



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

Asignación de configuración absoluta de productos naturales por RMN¹³C, síntesis total de la sandostatina por acoplamiento entre ésteres de benzotriazol y aminoácidos libres.

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

M. en C. Eréndira Torales Gómez

Dr. Ricardo Jorge Cárdenas Pérez

Ciudad de México, septiembre 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN
CIENCIAS QUÍMICAS**

**ASIGNACIÓN DE CONFIGURACIÓN ABSOLUTA DE PRODUCTOS
NATURALES POR RMN¹³C, SÍNTESIS TOTAL DE LA
SANDOSTATINA POR ACOPLAMIENTO ENTRE ÉSTERES DE
BENZOTRIAZOL Y AMINOÁCIDOS LIBRES.**

**T E S I S
PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS**

P R E S E N T A

M. en C. ERÉNDIRA TORALES GÓMEZ

Dr. RICARDO JORGE CÁRDENAS PÉREZ



Ciudad de México, septiembre 2023.

Jurado

Presidente Dr. Eduardo Guillermo Delgado Lamas, Instituto de Química, UNAM

Vocal Dr. José Federico del Río Portilla, Instituto de Química, UNAM

Vocal Dr. José Alfredo Vázquez Martínez, Facultad de Química, UNAM

Vocal Dr. José Antonio Morales Serna, King's College London

Secretario Dr. Marcos Hernández Rodríguez, Instituto de Química, UNAM

El presente trabajo se realizó en el laboratorio 2-6 del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Ricardo Jorge Cárdenas Pérez, con una beca de Doctorado (No. de registro 335820, No CVU 579660) del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONAHCYT) y con el financiamiento del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT-UNAM, Project No. IN209818).

Producto del trabajo doctoral

Eréndira Torales, Serguei Fomine; Jorge Cárdenas; *Assignment of the absolute configuration of secondary alcohols by ¹³C NMR and its correlation with methyl-1-(chloromethyl)-oxopyrrolidine-2-carboxylate and quantum-mechanical GIAO calculations; New Journal of Chemistry, 2023,47, 9222-9228*

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a CONAHCYT por el apoyo económico recibido a través de una beca de doctorado (No. de registro 335820, No de CVU. 579660) y al programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas de la UNAM.

También agradezco al Dr. Ricardo Jorge Cárdenas Pérez por permitirme colaborar en su equipo de trabajo, por la confianza, consejos que me dio y por la preparación y formación a la que me encaminó.

Agradezco a su vez al doctor Serguei Fomine por su aportación en la elaboración de los cálculos computacionales y su asesoría.

Agradezco al comité tutor y a los miembros del jurado por sus consejos y aportaciones en el desarrollo de este trabajo.

También agradezco el apoyo del Dr. Rubén Luis Gaviño Ramírez por su apoyo en la enseñanza del equipo y de la determinación de muestras de resonancia magnética nuclear. A los técnicos académicos del Instituto de Química, del laboratorio de Cromatografía de Gases y Líquidos por su asesoría en el análisis por Cromatografía a la M. en C. Lucía del Carmen Márquez Alonso, a la Q. Eréndira García Ríos, y a la M. en C. Lucero Mayra Ríos Ruiz.

Agradezco todo el apoyo que me ha dado Balú Cruz para continuar con mis estudios, soportarme y acompañarme en las horas más difíciles de este trabajo.

Índice

Abreviaturas	6
Parte I. Formación de enlace peptídico en fase líquida usando aminoácidos no protegidos, con la estrategia HOBt/DCC. Síntesis total de la Sandostatina.....	7
Resumen:	7
Abstract:	7
1. Introducción.....	8
2. Antecedentes	9
2.1. Sandostatina	9
2.2 Síntesis de péptidos.....	10
2.3. Uso de grupos protectores en síntesis peptídica.....	12
2.4. Síntesis peptídica con estrategia HOBt/DCC y aminoácidos libres	13
3. Objetivos	17
3.1. Objetivo general	17
3.2. Objetivos particulares.....	17
4. Discusión de resultados.....	17
4.1 Análisis retrosintético de la sandostatina.....	17
4.2 Optimización de la metodología de acoplamiento	19
4.3 Síntesis total de la Sandostatina	22
5. Conclusiones	27
6. Parte experimental	28
6.1 Protección de aminoácidos	28
6.2. Metodología general de acoplamiento peptídico.	31
6.3 Sandostatina 1. Formación del puente disulfuro.....	36
7. Referencias.	36
Parte II. Determinación de la configuración absoluta de alcoholes, aminas y ácidos carboxílicos por RMN.....	39

Resumen:	39
Abstract:.....	40
1. Introducción.	41
2. Antecedentes	43
2.1. Asignación de la configuración absoluta de productos naturales por RMN	43
2.2. Uso del ácido piroglutámico y sus derivados cómo agentes de derivación quiral.....	48
3. Discusión de resultados	51
3.1 Metodología para asignación de la configuración absoluta de productos naturales que contengan alcoholes usando 1-clorometil-piroglutamato de metilo1.	51
3.2. <i>Estudio del</i> ácido piroglutámico como agente de derivación quiral de aminas α -quirales RMN.....	72
3.3. Estudio del piroglutamato de metilo como agente de derivación quiral de ácidos carboxílicos para asignación de configuración absoluta por RMN.	75
4. Conclusiones	79
5. Sección experimental.	80
6.1 Procedimiento general de formación de éteres entre alcoholes y 19-(S) ó 19-(R) utilizando hidruro de sodio.	80
6.2 Metodología de una sola derivación.....	91
6. Referencias.	99
Anexo.....	102

Abreviaturas

HOBt	1-hidroxibenzotriazol
DCC	Diciclohexilcarbodiimida
THF	Tetrahidrofurano
Boc	ter-butoxicarbonilo
Bn	Bencilo
tBu.	Terbutil
Fmoc	9-Fluorenilmetoxicarbonil
Z	Benciloxicarbonil
Trt	Tritilo
Alloc	Aliloxicarbonil
Phe	Fenilalanina
Cys	Cisteina
Trp	Triptófano
Lys	Lisina
Thr	Treonina
Thr-ol	Treoninol, treonina reducida
RMN-¹H	Resonancia Magnética Nuclear de protón
RMN ¹³C	Resonancia Magnética Nuclear de carbono
MALDI-TOF	desorción/ionización láser asistida por matriz
HPLC	cromatografía líquida de alta eficiencia
EDCI	(1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)) -carbodiimida clorhidrato
HT	Hidrotalcita
DCM	Diclorometano

Parte I. Formación de enlace peptídico en fase líquida usando aminoácidos no protegidos, con la estrategia HOBt/DCC. Síntesis total de la Sandostatina.

Resumen:

Se desarrolló una metodología de síntesis para la Sandostatina también conocida como Octreotida, por acoplamiento de aminoácidos en fase líquida mediante una síntesis total convergente. El acoplamiento se llevó a cabo mediante la activación de Boc-*N*-Aminoácidos a los ésteres de benzotriazol, utilizando DCC-HOBt; seguido de su acoplamiento controlado con aminoácidos no protegidos en solución parcialmente acuosa. Esta metodología es fácilmente escalable y se obtuvo el péptido en un 17% de rendimiento. Los productos se purificaron por recristalización y se identificaron por RMN-¹H y ¹³C y MALDI.

Abstract:

A new procedure was developed for the synthesis of octreotide by liquid phase peptide synthesis through an orthogonal coupling method, mediated by DCC-HOBt couplings, by activation of Boc-*N*-Amino acids to HOBt esters and controlled coupling with unprotected amino acid in a partially aqueous solution. The methodology is easily scalable and produces peptide with a yield of 17%. The products are purified by recrystallisation and identified by ¹H and ¹³C-RMN spectroscopy, and by MALDI.

1. Introducción.

En este trabajo de investigación se ha desarrollado una nueva metodología de síntesis peptídica en fase líquida, en la cual se reduce el uso de grupos protectores en los aminoácidos para la formación del enlace peptídico. La síntesis se desarrolla al formar los enlaces peptídicos de la secuencia del extremo amino al extremo del carboxilo (estrategia $N \rightarrow C$) para crecer la secuencia entre ésteres activos de benzotriazol de un aminoácido protegido en su grupo amino y un aminoácido en su forma ión zwitter. Los ésteres de benzotriazol se forman por activación de Boc-*N*-aminoácidos con 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) y dicitlohexilcarbodiimida (DCC) en diclorometano, estos ésteres activos se concentran y se utilizan directamente en el acoplamiento con un segundo aminoácido no protegido utilizando un equivalente de NaOH para activar el grupo amino, en solución acuosa con THF/H₂O. De esta manera se obtiene un péptido libre en su extremo ácido, sin formación de subproductos de reacción y con control de oligomerización, listo para un siguiente acoplamiento.

Esta estrategia de acoplamiento peptídico presenta las siguientes ventajas: No requiere del uso de disolventes anhidros, ni de grupos protectores en el grupo ácido carboxílico, pasos que son obligatorios en la síntesis peptídica en fase líquida y sólida. Por lo tanto, se eliminan los pasos de protección y desprotección de estos grupos para el siguiente acoplamiento. Por las condiciones de reacción neutras, no es necesario proteger otros grupos funcionales de residuos de aminoácidos como los grupos oxhidrilo de treonina y serina o el grupo indol del triptófano, ya que las condiciones de reacción favorecen el acoplamiento entre el aminoácido activado como éster de hidroxibenzotriazol con el grupo amino de otro aminoácido.

La estrategia mencionada se utilizó en la síntesis total convergente de la Sandostatina, un octapéptido cíclico utilizado en terapia clínica. Este péptido comercial se vende a altos costos en el mercado; por lo que la síntesis con esta estrategia disminuye el costo de producción y se obtiene el péptido de manera fácil y económica ya que se reduce considerablemente el uso de grupos protectores evitando los consecuentes pasos de protección y desprotección.

2. Antecedentes

2.1. Sandostatina

Los péptidos son compuestos muy importantes en la industria farmacéutica debido a que participan en muchas funciones fisiológicas; tienen alta actividad, presentan área superficial grande lo que les confiere alta afinidad y selectividad, y por lo tanto tienen baja toxicidad; lo que los hace atractivos para el desarrollo de diversos agentes terapéuticos teniendo gran éxito.¹ En la actualidad se desarrollan nuevos péptidos cíclicos con fines terapéuticos. En su mayoría derivan de productos naturales de origen peptídico como antimicrobianos u hormonas.^{1,2}

Un ejemplo importante de los péptidos mencionados arriba, es la hormona natural tetradecapeptídica Somatostatina que está involucrada en neurotransmisión y neuromodulación; tiene importante actividad en la regulación de la liberación de otras hormonas como la hormona de crecimiento, insulina y glucagón.³ Sin embargo, esta hormona no se puede utilizar *in vivo* ya que su tiempo de vida media en plasma es menor a tres minutos;⁴ por lo que se han desarrollado gran variedad de análogos sintéticos de los cuales el más importante es el octapéptido cíclico con puente disulfuro Octreotida o Sandostatina (D-Phe-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-ol Figura 1).^{3,4}

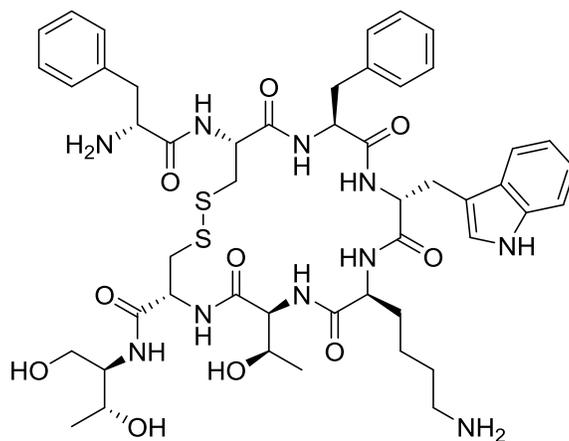


Figura 1. Sandostatina.

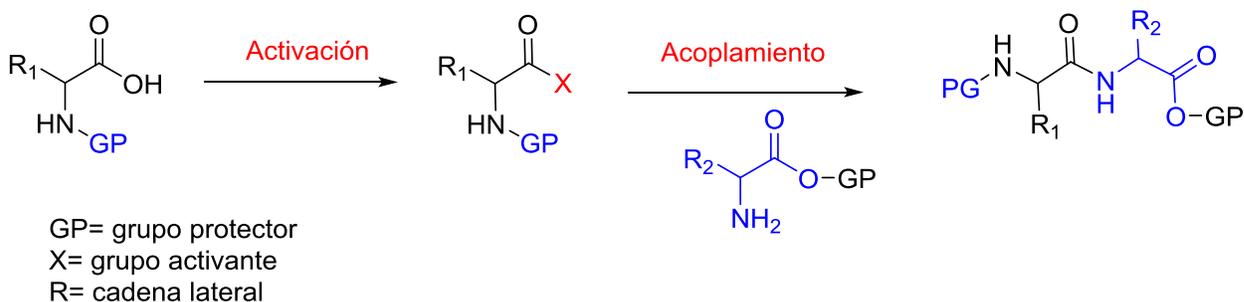
La Sandostatina tiene un mayor tiempo de vida media en plasma que la Somatostatina, además presenta una potente actividad en la inhibición de la secreción de hormona de crecimiento y glucagón; por lo que se utiliza en el tratamiento de acromegalia, problemas asociados a tumores endócrinos y gastroentero-pancreáticos.⁴⁻⁶

Este péptido se ha sintetizado en fase sólida⁷⁻¹¹ y en fase líquida,^{7,12-13} y se vende con altos costos en el mercado.¹⁴ En términos generales, los fármacos a base de péptidos presentan altos costos, lo que nos motiva al interés de desarrollar una nueva síntesis en fase líquida de la Sandostatina, que sea simple, eficiente y que permita de reducir los costos de producción.

2.2 Síntesis de péptidos

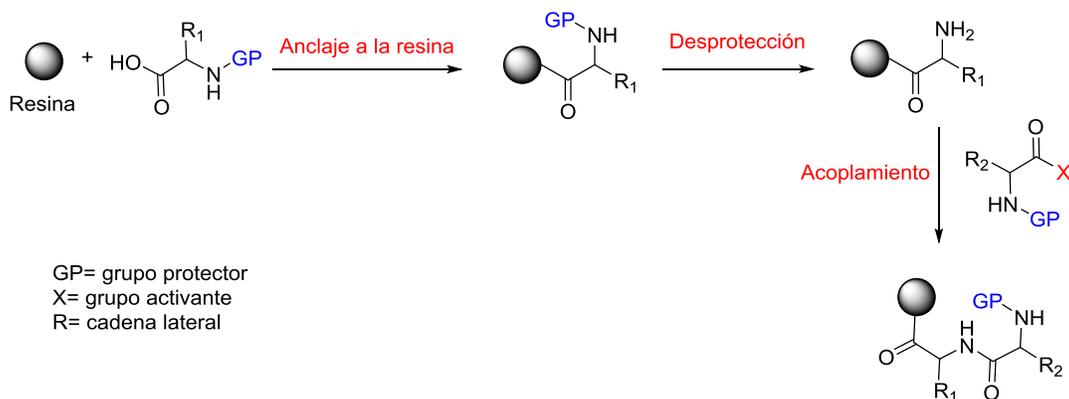
La síntesis de péptidos ha sido muy estudiada y se han desarrollado diferentes métodos para el acoplamiento peptídico, o enlace amida; los cuales se basan en la combinación de dos aminoácidos por diferentes métodos de acoplamiento que se dan en dos pasos. El primer paso en síntesis en fase líquida es la activación del ácido carboxílico de un residuo, por introducción de un grupo electroattractor; seguido de su acoplamiento por ataque nucleofílico del grupo amino de un segundo aminoácido.¹⁵ Para obtener un acoplamiento selectivo entre ambos aminoácidos, se requiere que uno de ellos se proteja en el grupo amino y el residuo del ácido carboxílico se mantenga libre, el cual será activado, mientras que el otro aminoácido debe estar protegido en el extremo del ácido carboxílico y con el grupo amino libre. Una vez obtenido el acoplamiento de los aminoácidos, se retira el grupo protector del ácido carboxílico para realizar la siguiente activación y acoplamiento; proceso que se realiza hasta terminar la secuencia peptídica. Este proceso de síntesis de elongación de la cadena peptídica que se lleva del extremo amino al extremo del carboxilo se conoce como estrategia $N \rightarrow C$, Esquema 1.¹⁵⁻

16.



Esquema 1. Esquema general de acoplamiento peptídico en fase líquida.

Otra metodología utilizada para formación de péptidos es la síntesis peptídica en fase sólida, que se lleva a cabo en la superficie sólida de una resina polimérica, donde un aminoácido protegido en el grupo amino se une por el ácido carboxílico al material sólido o resina, formando un enlace covalente. Después de ser anclado el primer aminoácido, se remueve el grupo protector del grupo amino para hacerlo reaccionar con el ácido carboxílico activado de un siguiente residuo protegido en el grupo amino. De esta manera, se lleva a cabo la elongación de la cadena peptídica, a través de sucesivas desprotecciones de los grupos amino seguido del acoplamiento con los ácidos carboxílicos activados de aminoácidos *N*-protegidos. Este proceso de síntesis de elongación de la cadena peptídica que se lleva del extremo ácido carboxílico al extremo de la amina se conoce como estrategia *C*→*N*. Obtenido el oligopéptido con la secuencia de aminoácidos deseada, al final este péptido debe desanclarse de la resina, Esquema 2.¹⁷⁻¹⁸



Esquema 2. Síntesis peptídica en fase sólida

2.3. Uso de grupos protectores en síntesis peptídica

El uso de grupos protectores surge de la necesidad de formar los enlaces de manera controlada, prevenir reacciones secundarias y por lo tanto subproductos de reacción. Su uso está muy ligado a la síntesis peptídica, ya que se desarrollaron primeramente en este campo y se adaptaron rápidamente a la síntesis orgánica. Para síntesis peptídica existen diversos grupos protectores, para proteger aminoácidos, donde la elección de un grupo es crucial, ya que depende del grupo funcional a proteger, del tipo de aminoácido y de las condiciones de reacción, por lo cual la lista de grupos protectores utilizados es extensa. Para cada caso, existe un método de introducción del grupo protector, así como la remoción. Los grupos protectores más utilizados para proteger aminas y ácidos carboxílicos son la estrategia Boc/Bn y Fmoc/tBu. Así mismo, existen los grupos protectores para el residuo de los diferentes aminoácidos de los cuales Boc, Fmoc, Z, Trt, y Alloc son los más utilizados. En la Figura 2 se muestran los grupos protectores más utilizados en síntesis de péptidos.¹⁹

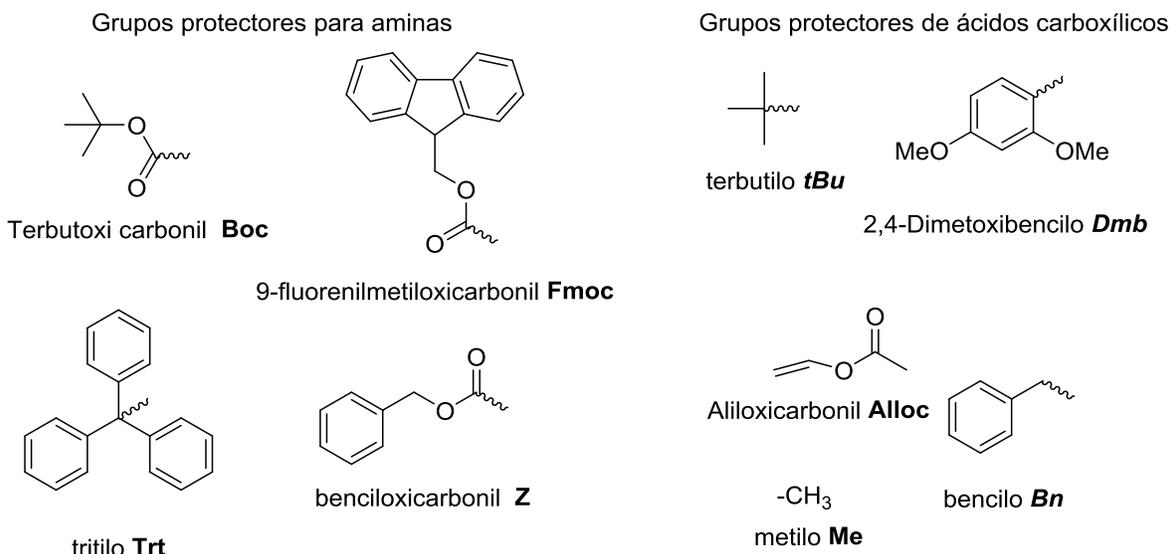


Figura 3. Grupos protectores usados en síntesis peptídica.

Conjuntamente, la protección de los grupos funcionales confiere a los aminoácidos solubilidad en los disolventes más comunes y previene o minimiza la epimerización durante el acoplamiento. Otra característica importante es que la mayoría son sólidos cristalinos, lo que facilita su manipulación y le dan suficiente estabilidad.^{16,18}

Los grupos protectores son indispensables, pero también conllevan a un proceso químico costoso, ya que el proceso protección/desprotección conlleva dos pasos de reacción en la secuencia de síntesis, incrementando los costos en reactivos, proceso y residuos químicos. Por tal razón, trabajar en reducir su uso puede resultar en gran ventaja, no solo económica sino en tiempo del proceso de producción y en aspectos ecológicos. Para resolver este problema, se buscan metodologías quimiosselectivas, es decir, donde exista un reactivo que genere una preferencia del ácido carboxílico activado para reaccionar en particular con la amina de un segundo aminoácido sin interferencia de otros grupos funcionales diferentes como el ácido carboxílico; para disminuir el uso de grupos protectores.¹⁹

2.4. Síntesis peptídica con estrategia HOBt/DCC y aminoácidos libres

Para poder reducir el uso de grupos protectores en síntesis de péptidos en fase líquida, utilizamos dos estudios preliminares como referencia sobre la formación de enlace amida que se basan en la activación del grupo ácido carboxílico de aminoácidos *N*-protegidos, seguido de su acoplamiento con aminas en condiciones básicas y suaves. El primer reporte se basa en la activación de aminoácidos *N*-protegidos a los ésteres de *para*-nitrofenol, seguido de su acoplamiento con aminoácidos no protegidos usando como base trietilamina y dimetilaminopiridina en una solución parcialmente acuosa, el acoplamiento se da sin epimerización; este reporte solo se estudió en la formación de dipéptidos.²⁰ El segundo reporte es similar, pero la activación de aminoácidos *N*-protegidos se realiza con etil cloroformiato para formar anhídridos de ácido seguido del acoplamiento con aminoácidos no protegidos usando trietilamina como base,

igualmente esta metodología se estudió para la formación de dipéptidos.²¹ Este tipo de metodologías representan una gran ventaja para reducir el uso de grupos protectores y por ende los costos en síntesis de péptidos. La reducción de grupos protectores se debe a que estos ácidos activados son estables y suficientemente reactivos para favorecer el acoplamiento con aminas y que al reaccionar en condiciones suaves impiden que reaccionen con otros nucleófilos.

Además de reducir el uso de grupos protectores, otro problema a considerar en el acoplamiento peptídico es el control de la epimerización, que se da principalmente en el paso de activación del ácido carboxílico, que es requerido antes del acoplamiento; por lo que la elección correcta del grupo activante es crucial en síntesis peptídica, ya que, si la activación del ácido carboxílico es lenta, los reactivos activantes se degradan y no serán capaces de activar al ácido carboxílico.²³⁻²⁴

Para un acoplamiento peptídico se puede activar el grupo ácido carboxílico a haluros de acilo, azida de acilo, acilimidazoles, anhídridos o ésteres, estos intermediarios se pueden aislar o usar directamente para el paso de acoplamiento peptídico.^{18,20} En este contexto, el uso de carbodiimidas es frecuentemente usado para este propósito, ya que presentan mayores rendimientos y son reactivos económicos. Las carbodiimidas más utilizadas son la DCC (diciclohexilcarbodiimida) o la EDCI (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida clorhidrato, Figura 4, para acoplamiento peptídico.²⁵

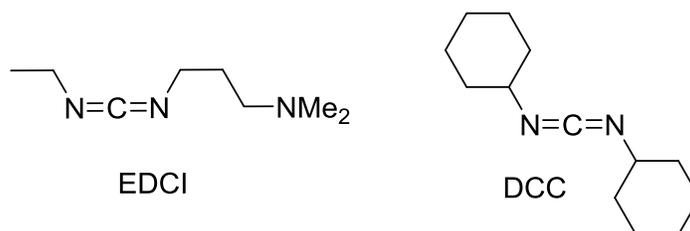
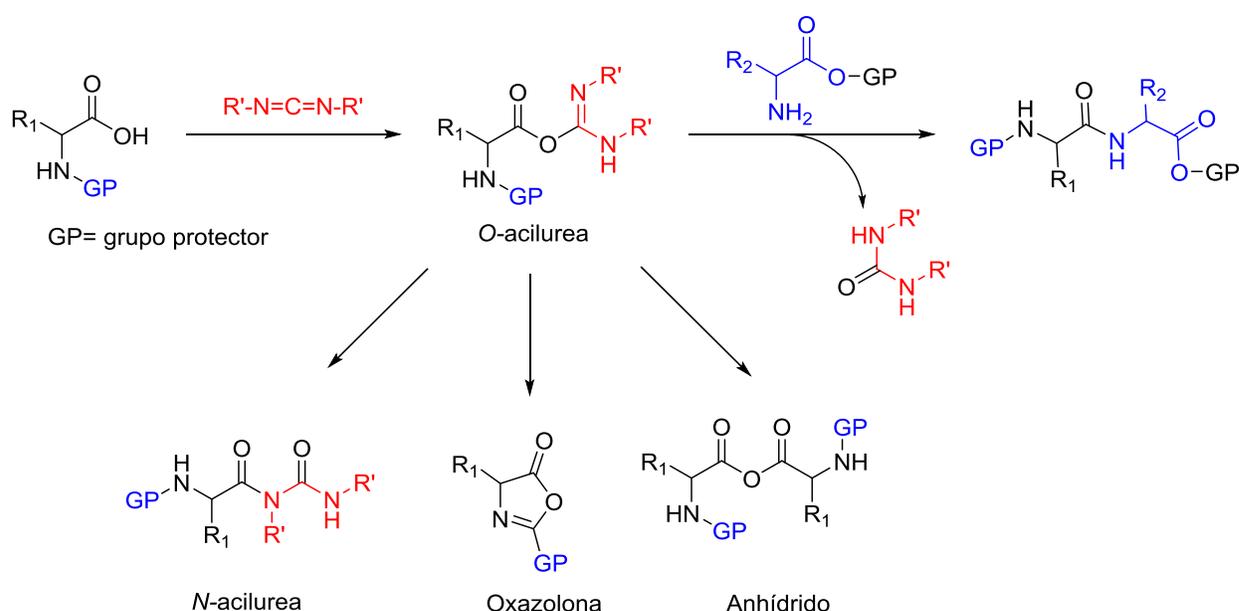


Figura 4. Carbodiimidas típicas para el acoplamiento peptídico.

La carbodiimida activa por deshidratación al ácido carboxílico, que reacciona con éste para formar la O-acilurea por transferencia de protón del ácido carboxílico al

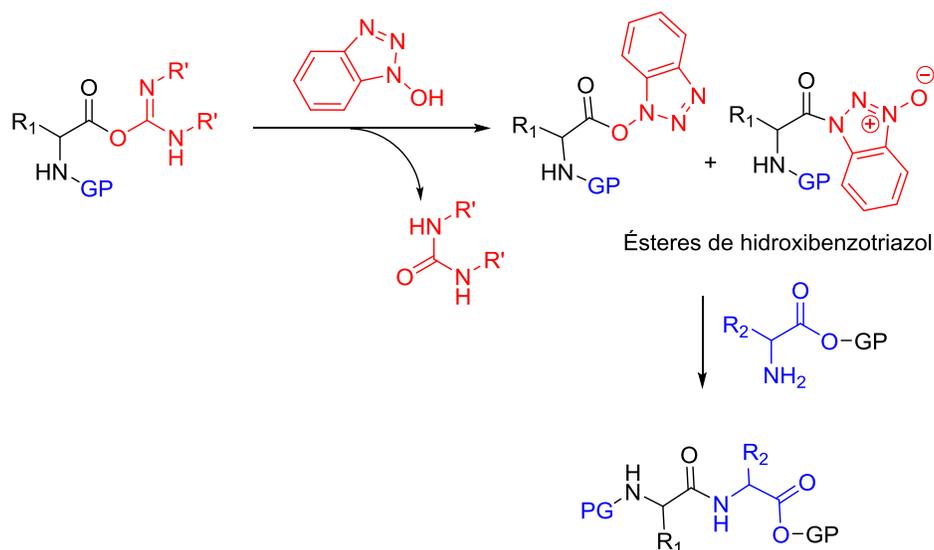
nitrógeno de la carbodiimida, el anión carboxilato forma la O-acilurea, que es un agente acilante altamente reactivo, por lo que se acopla rápidamente con la amina de un segundo aminoácido para formar el enlace amida y urea como subproducto. Las desventajas de esta metodología es que pueden llevarse a cabo reacciones secundarias. Si se utiliza un exceso de ácido carboxílico, se puede dar la formación del anhídrido, también se ha observado la formación de oxazolonas después de la formación de O-acilurea dando la epimerización, aunque en una menor proporción que con otros agentes de activación, y finalmente puede ocurrir una transposición de O-acilurea a N-acilurea que es estable e inerte, Esquema 3.²⁴



Esquema 3. Acoplamiento peptídico usando carbodiimidas y formación de subproductos.

Estas reacciones secundarias se pueden reducir considerablemente con el uso de aditivos, que son auxiliares nucleofílicos como *N*-hidroxi derivados, que al mismo tiempo incrementan la eficiencia en el acoplamiento, reducen la formación de *N*-acilurea y la epimerización del carbono estereogénico alfa al ácido carboxílico.²⁶ Uno de los aditivos más utilizados es el 1-hidroxibenzotriazol (HOBt), el cual reacciona con la O-acilurea para dar los ésteres activados de benzotriazol, que mejoran la reactividad; reducen la epimerización, favorecen y estabilizan la reacción con la amina para dar el enlace peptídico correspondiente, reaccionando

de manera limpia y en condiciones suaves de reacción, Esquema 4.²⁶⁻²⁷ Esta metodología es muy usada por lo que se han reportado diferentes agentes basados en el HOBt y las diferencias reportadas en cuestión de reactividad son pocas, por lo que el método tradicional DCC/HOBt o EDCI/HOBt aun representa muchas ventajas.²⁶



Esquema 4. Acoplamiento peptídico utilizando carbodiimidas y HOBt como aditivo.

Los ésteres de benzotriazol son altamente reactivos a nucleófilos como aminas de aminoácidos, ya que requieren de condiciones suaves de reacción; por lo que la amina de un aminoácido en su forma de ion zwitter, libre de grupos protectores, puede utilizarse sin necesidad de proteger al grupo ácido carboxílico. De esta manera, se considera la posibilidad de desarrollar una nueva metodología para acoplamiento peptídico entre los ésteres activados de benzotriazol de un aminoácido *N*-protegido y un aminoácido no protegido en un medio orgánico/acuoso.

Para esta estrategia, primero se preparan los ésteres de benzotriazol de un aminoácido *N*-protegido. Los ésteres reactivos se pueden usar directamente en el siguiente paso de acoplamiento, que se da con un aminoácido en su forma ion zwitter disuelto en un medio parcialmente acuoso, que en presencia de un equivalente de una base como NaOH activa el grupo amino para su acoplamiento. Como resultado, se obtiene un péptido libre en su extremo carboxilo, listo para un

siguiente acoplamiento.

Esta metodología es una alternativa atractiva para la síntesis peptídica, ya que se reduce el uso de los pasos de protección y desprotección en los ácidos carboxílicos; y por lo tanto se reducen los costos de producción y de residuos. Además, se reduce el costo del proceso por el uso de condiciones acuosas y temperatura ambiente. Así, se puede utilizar esta estrategia en la síntesis de la Sandostatina, para lograr una síntesis económica que haga más accesible el costo del medicamento.

3. Objetivos

3.1. Objetivo general

Desarrollar la síntesis total de la Sandostatina económica y sencilla empleando la activación de Boc-aminoácidos con HOBt y DCC, seguido de su acoplamiento con un segundo aminoácido sin grupos protectores para reducir el uso de grupos protectores y por ende los pasos de protección y desprotección.

3.2. Objetivos particulares

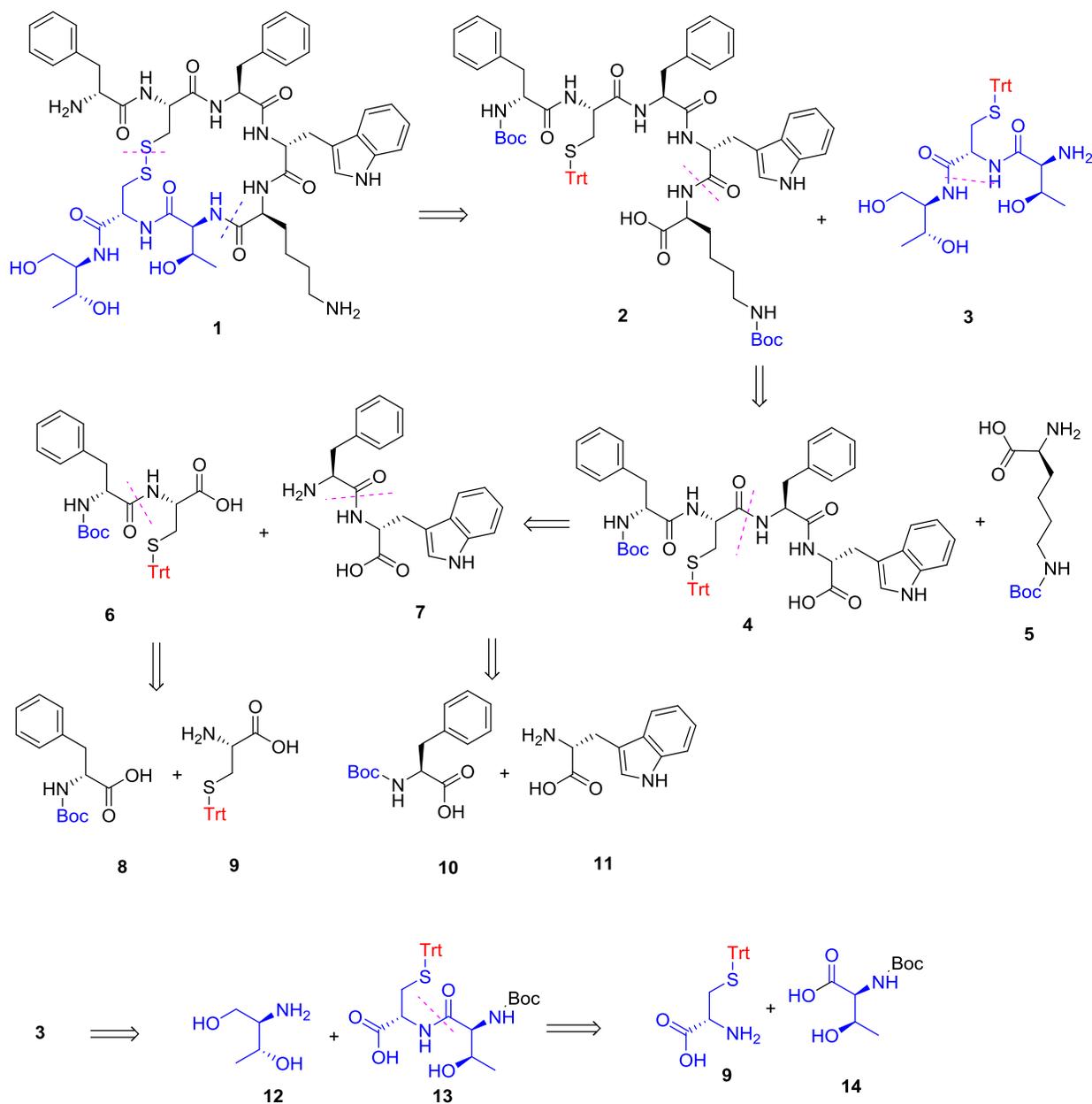
- Optimizar una metodología de acoplamiento entre aminoácidos usando la estrategia HOBt/DCC.
- Con la metodología optimizada realizar la síntesis total de la Sandostatina.

4. Discusión de resultados

4.1 Análisis retrosintético de la sandostatina

De acuerdo con la estructura de la sandostatina 1, que es un octapéptido cíclico con puente disulfuro, se propuso el análisis retrosintético planteado en el Esquema

5, siguiendo la estrategia DCC-HOBt en fase líquida para el acoplamiento entre aminoácidos. Se escoge el grupo *ter*-butiloxicarbonilo (Boc), para la protección de las aminas de los residuos que serán activados, que es estable en el medio básico de la reacción, lo que es necesario en el paso de acoplamiento. De la misma manera, se protegerán los grupos amino de los residuos que serán activados en la estrategia sintética.¹⁸ Por la naturaleza del puente disulfuro que contiene la sandostatina, el cual se forma entre dos cisteínas, se planteó proteger el grupo tiol con el grupo protector tritilo (Trt), con el objetivo para realizar la desprotección oxidativa y formar el macrociclo a través del enlace disulfuro y para evitar que el azufre participe en reacciones de acoplamiento con los ésteres de benzotriazol. Se dispuso una síntesis total convergente, por formación de un pentapéptido **2** y un tripéptido **3** que serán acoplados. La formación de **2** se realiza por unión de dos residuos **4** y lisina **5**, la cual debe ser protegida en su amina épsilon. El péptido **4** se formará por unión de dos dipéptidos **6** y **7**, cada uno de estos será formado de manera lineal, **7** por su acoplamiento entre Boc-*N*-D-fenilalanina **8** y cisteína **9** y **6** por su acoplamiento entre Boc-*N*-fenilalanina **10** y D-triptófano **11**; y. Por otro lado, el péptido **3** será obtenido de manera lineal, primero para la formación del dipéptido **13** por acoplamiento con treoninol **12**, el dipéptido **13** se formará por acoplamiento entre Boc-*N*-treonina **14** y cisteína **9**.

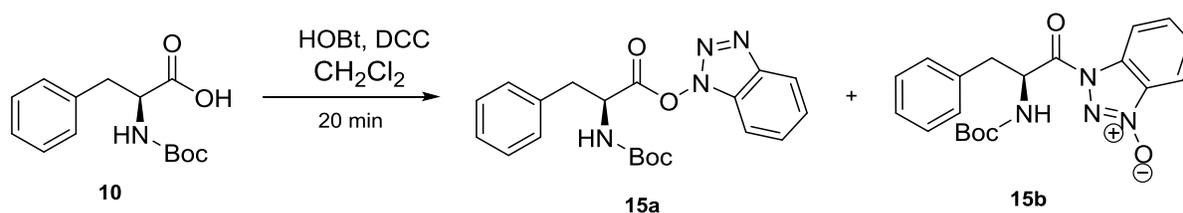


Esquema 5. Análisis retrosintético convergente de la sandostatina 5+3

4.2 Optimización de la metodología de acoplamiento

Con el análisis retrosintético de la sandostatina definido y la estrategia de síntesis propuesta mediante una secuencia de elongación de la cadena peptídica N→C, que inicia con un aminoácido protegido en el grupo amino con Boc y que se activa a los correspondientes ésteres de benzotriazol, para acoplarse con un aminoácido no protegido en su forma de sal de sodio que con el uso de una base equimolar

activa el grupo amino; se procedió a optimizar la metodología propuesta de enlace peptídico. Como modelo de acoplamiento se estudió la reacción entre Boc-*N*-Fenilalanina (Boc-*N*-Phe), y D-Triptófano (D-Trp). Como primer paso se activó la Boc-*N*-Phe **10**, con DCC y HOBt, donde reportes previos determinan que 1.2 equivalentes de DCC y HOBt en diclorometano a temperatura ambiente, dan una mejor y rápida activación.²⁷ La activación de **10** a los ésteres de benzotriazol, **15a** y **15b**, es rápida y cuantitativa, se forman en 20 min (Esquema 6).



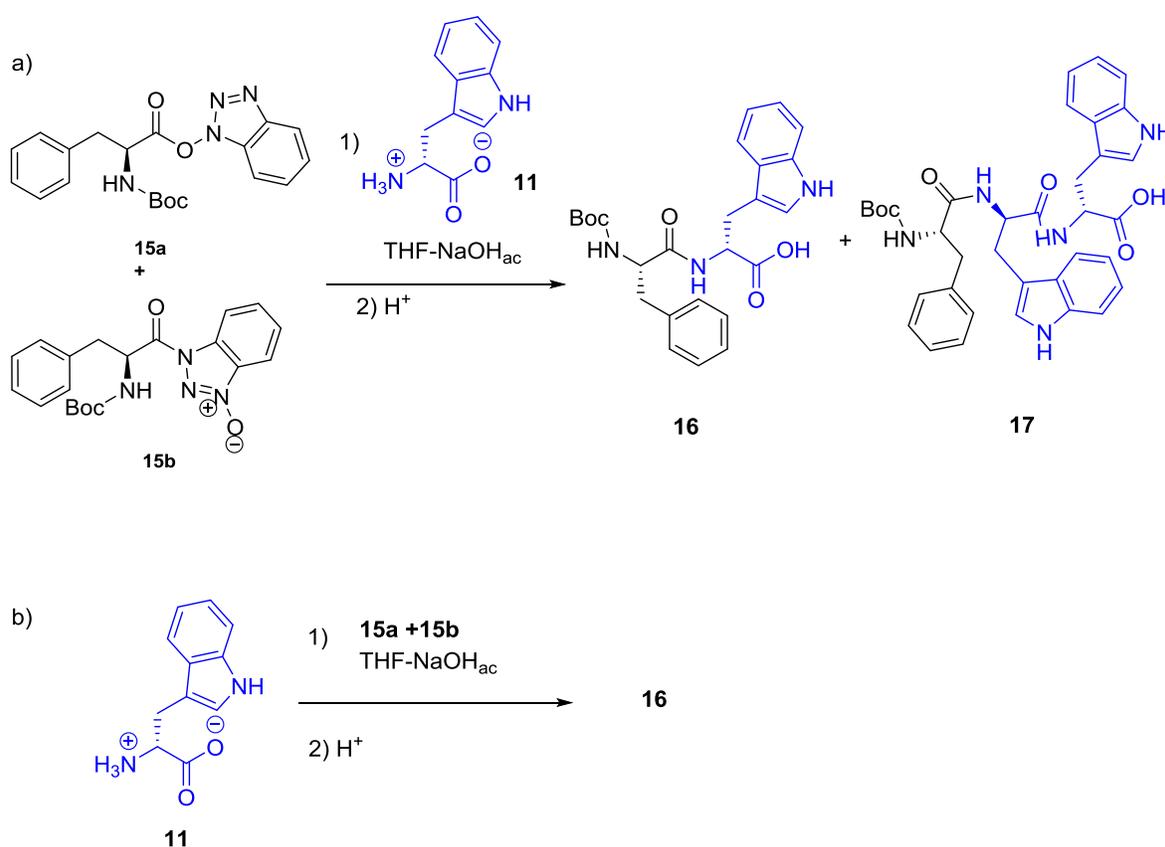
*Esquema 6. Activación de Boc-*N*-fenilalanina a los ésteres de benzotriazol utilizando HOBt/DCC*

La solución que contiene los ésteres de benzotriazol de la Boc-*N*-fenilalanina se concentra, sin remover la DCU, se disuelven en THF y se usa directamente en el siguiente paso de acoplamiento; con el D-Trp **11**; que está en solución con NaOH 1M y una mezcla de THF/agua. La solución 1M de NaOH se utiliza para activar el grupo amino del aminoácido; para lo cual se usa un equivalente molar respecto al D-Trp. En la reacción de acoplamiento se determinó por HPLC-Masas-UV que cuando se adiciona la solución de D-Trp a los ésteres de benzotriazol preparados, se obtienen el dipéptido **7** deseado en un 97% y un subproducto de oligomerización **16** en un 3%. Esquema 7. La oligomerización se da ya que al agregar el nucleófilo a los ésteres activos el nucleófilo libera el grupo saliente HOBt, y forma el dipéptido que como tiene desprotegido el ácido carboxílico se activa con el HOBt liberado y se acopla con D-Trp.

Por otro lado, si se realiza la adición de los ésteres de benzotriazol de Boc-*N*-Phe a la solución de D-Trp, lentamente, se reduce la oligomerización, obteniendo solamente el producto **7**, ya que de esta forma el nucleófilo está en mayor proporción al agregar los ésteres y así evitamos la activación del ácido carboxílico

del triptófano. En este acoplamiento, al terminar la adición de los ésteres de benzotriazol al nucleófilo, la reacción es completada.

El uso de la base debe ser un equivalente molar, ya que al agregar menor proporción el rendimiento de la reacción disminuye. Otro factor importante es utilizar un exceso del triptófano de 1.5 equivalentes para obtener mejores resultados, ya que si se utiliza menor proporción se obtiene un menor rendimiento. Este exceso aumenta la posibilidad de colisión con los ésteres de benzotriazol y acelera la reacción.



Esquema 7 Acoplamiento péptido entre ésteres de benzotriazol de Boc-Phe y D-trp a) adición del D-Trp a los ésteres de benzotriazol. b) adición de ésteres de benzotriazol al D-Trp.

Para aislar el dipéptido **16**, se evaporó el THF al vacío, se adicionó agua fría para disolver el producto, se filtró sobre tierra de diatomeas para eliminar la DCU, se aciduló el filtrado con ácido cítrico a un pH 2-3 y se extrajo con acetato de etilo. La

fase orgánica se lavó con K_2CO_3 al 5% para eliminar el HOBt y la Boc-N-Phe; se lavó con salmuera, se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y se concentró a sequedad. El producto se purificó por recristalización en acetona/hexano. Los productos se analizaron por HPLC-UV-Masas y espectrometría de masas, (Q)-TOF/MS Figura 4. Este último método nos permite detectar moléculas en un amplio rango de masas, por lo que podríamos identificar la oligomerización fácilmente. En el Figura 4 se observan las masas correspondientes para el producto **16** sin oligomerización.

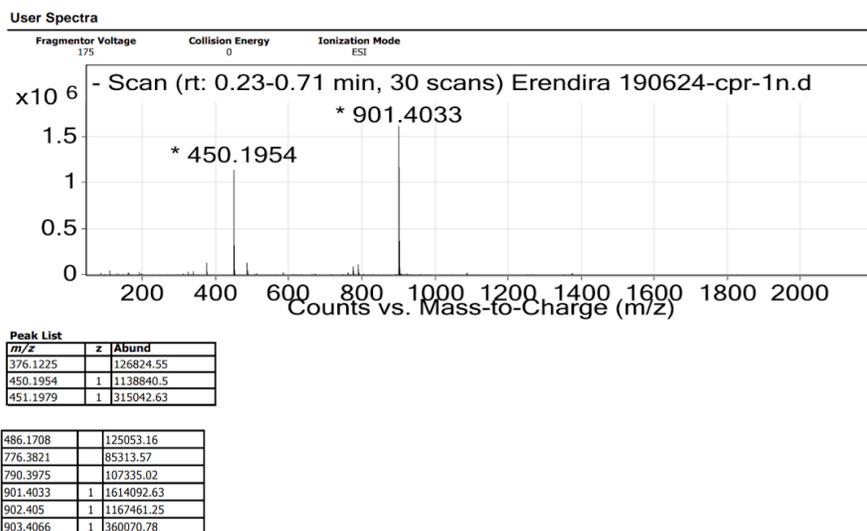


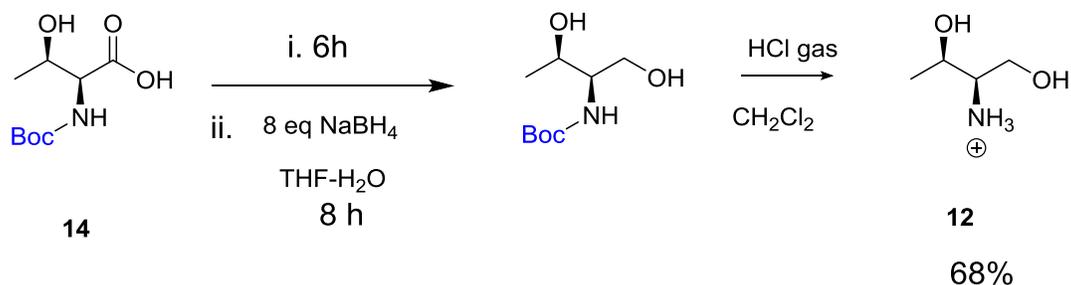
Figura 4. (Q)-TOF/MS del producto **16** sin oligomerización masa 450.1954 [M-1H]⁺, 901.4033 [2M-1H]⁺.

4.3 Síntesis total de la Sandostatina

Con la metodología de acoplamiento optimizada, se realizó la síntesis total de la sandostatina, siguiendo el análisis retrosintético. Como primer paso, se realizó la protección de las aminas con el grupo *ter*-butoxicarbonil (Boc) de los aminoácidos: D-Phe, L-Phe, y L-treonina (L-Thr) usando metodologías descritas, los rendimientos son de 92%, 95% y 96% respectivamente.¹⁸ La amina épsilon de la L-Lisina (L-Lys) se preparó formando un quelato con $CuSO_4$ entre el grupo α -amino y el ácido carboxílico del aminoácido, para después proteger selectivamente con el grupo Boc la amina en la posición épsilon, con un rendimiento de 69%. También se protegieron los grupos tiol de las cisteínas (L-

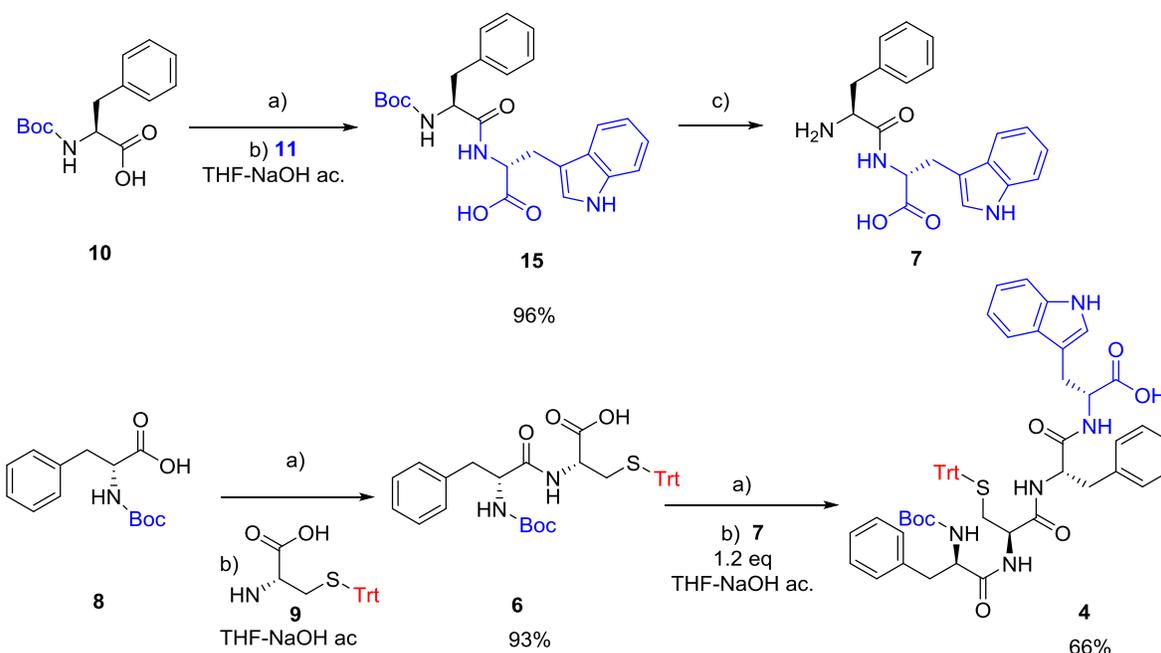
Cys) con Trt, con un rendimiento de 82%.¹⁸

En la sandostatina existe el grupo treoninol (Thr-ol) **12** que se obtiene de la reducción del ácido carboxílico de la treonina. Para esto se activó la Boc-*N*-Thr **14** a los ésteres de benzotriazol y estos se reducen con NaBH₄, seguido de la desprotección con HCl del grupo Boc (Esquema 8).²⁶



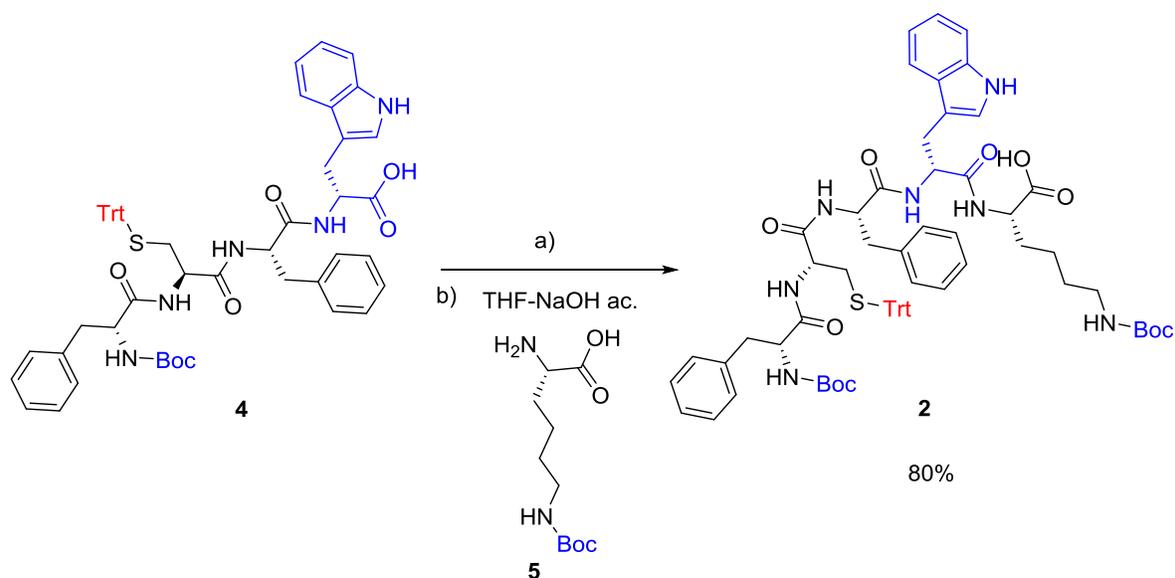
Esquema 8. Reducción de la L-Treonina al treoninol. i. 1.2 eq HOBt, 1.2 eq DCC, CH₂Cl₂

La síntesis de **1** comienza con la preparación de los dipéptidos **6** y **7**, que se acoplarán para formar el tetrapéptido **4**, seguido de su acoplamiento con lisina **5**, Esquema 9. El dipéptido **7** se obtiene del acoplamiento de Boc-*N*-Phe **10** con D-Trp **11**, que se obtiene con la metodología de optimización, seguido de la desprotección de la amina con HCl_{gas}, el producto se obtuvo con un 96% de rendimiento, en este caso la activación y acoplamiento son rápidos. Por otro lado, se formó el dipéptido **6** por acoplamiento entre Boc-*D*-*N*-Phe **8** y S-Trt-Cys **9**, con un rendimiento de 92%. Una vez obtenido el dipéptido **6**, fue activado a los ésteres de benzotriazol y acoplado con **7**, para obtener el tetrapéptido **4**, con un 66% de rendimiento.



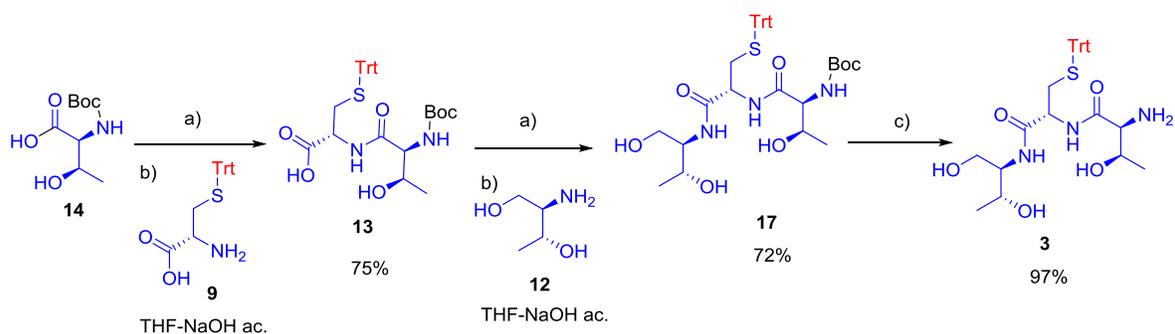
Esquema 9 Síntesis del péptido 4, de la secuencia lineal de la Sandostatina. a) HOBt, DCC, CH₂Cl₂. b) acoplamiento peptídico, c) HCl Boc desprotección.

Una vez obtenido **4**, se activa el ácido carboxílico a los ésteres de benzotriazol y se acopla con Boc- ϵ -N-lisina **5** para obtener **2**, con un rendimiento de 80%. Esquema 10. En la preparación del pentapéptido **5** el grupo indol del D-Trp no fue afectado, por lo que no fue necesaria su protección. La formación de los dipéptidos es rápida, tanto la activación como el acoplamiento, la activación del ácido carboxílico se realizó en 20 min y, el acoplamiento terminó cuando concluyó la adición. La activación de los péptidos **6** y **4** a los ésteres de benzotriazol fue más lenta, igual que su acoplamiento. Se puede considerar que, al aumentar el peso molecular de los péptidos, aumenta el tiempo de reacción. No se observó oligomerización de los péptidos en ninguno de los casos, lo cual se observó por espectrometría de masas.



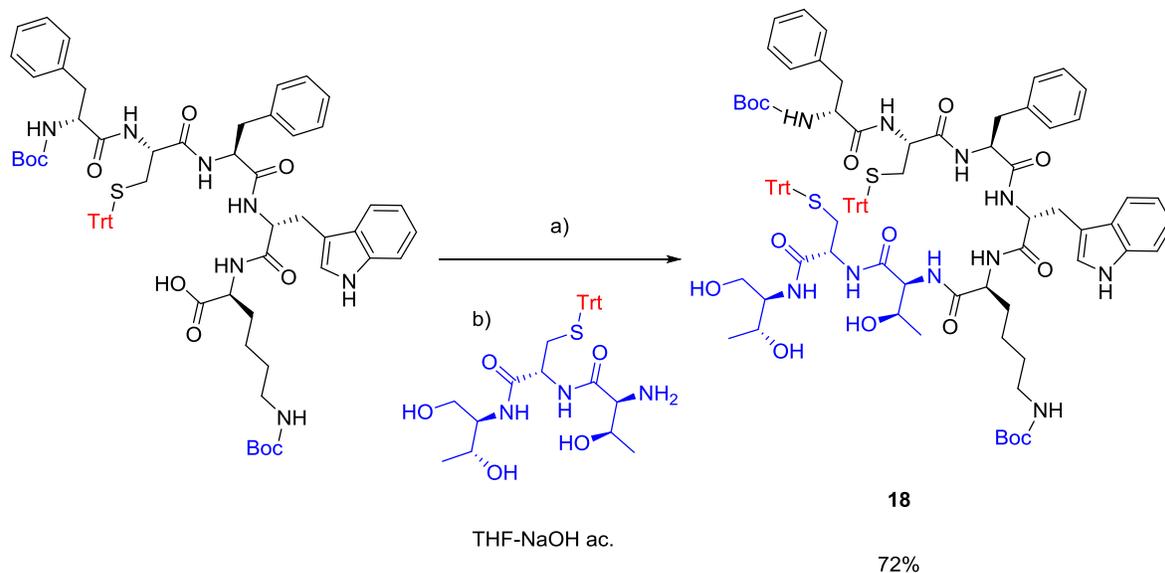
Esquema 10 Síntesis del péptido 2, de la secuencia lineal de la Sandostatina. a) HOBt, DCC, CH₂Cl₂. b) acoplamiento peptídico, c) HCl Boc desprotección.

Por otro lado, el tripéptido **3** se formó de manera lineal, comenzando por activación de Boc-Thr **14** y su acoplamiento con Trt-Cys **9** para obtener **13** con un rendimiento de 75%. Esta activación es muy lenta en comparación con la activación de la fenilalanina, la cual se lleva a cabo en 6h, su acoplamiento se llevó a cabo en 12h. El péptido **13** se activa a los ésteres de benzotriazol y se acopla con Thr-ol **12** para dar **17** con un rendimiento de 72%, seguido de la desprotección del grupo amino para obtener el péptido **3** (Esquema 11). la activación de **13** se llevó a cabo en 12 h. De manera análoga, el acoplamiento es más lento, pero no produce oligomerización. En este caso podríamos decir que la activación es lenta más por un aumento de polaridad que de masa, como en la formación del pentapéptido **2**. Los grupos hidroxilos de la treonina y del treoninol no reaccionan con los ésteres de benzotriazol a los ésteres correspondientes ya que en estas condiciones de reacción la basicidad no activa al grupo hidroxilo, por lo que su protección no es necesaria ahorrando también la protección y desprotección de estos grupos.



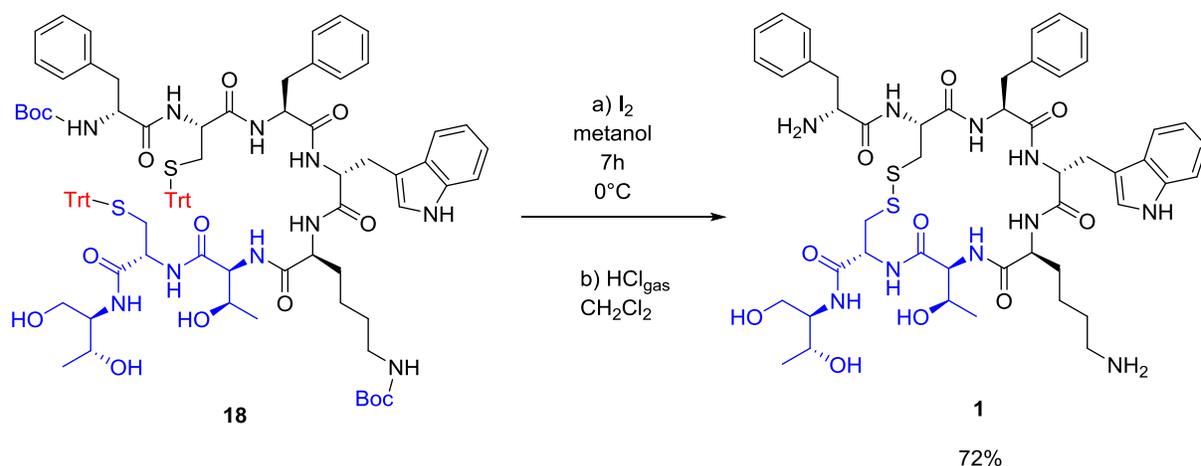
Esquema 11. Síntesis del tripéptido **3** de la secuencia lineal de la sandostatina. a) HOBt, DCC, CH_2Cl_2 . b) acoplamiento peptídico, c) HCl Boc desprotección.

Una vez obtenidos los péptidos **2** y **3**, convenientes para la formación de la secuencia lineal de la sandostatina, se realizó el acoplamiento entre ellos (Esquema 12), que se realiza por activación del ácido carboxílico de **2**, a los ésteres de benzotriazol, seguido con el acoplamiento de la amina de la treonina de **3**, para obtener el octapéptido cíclico **15**. En este caso la activación y el acoplamiento se llevan en un mayor tiempo de reacción 12h cada uno.



Esquema 12. Formación del octapéptido cíclico de la secuencia lineal de la sandostatina.

Finalmente, este péptido se cicla por reducción oxidativa con en yodo en condiciones de alta dilución y a 0°C, seguido de la desprotección de los grupos Boc de las aminas, obtenido con un rendimiento de 72 % Esquema 13. El octapéptido también fue ciclado sin los grupos Boc, pero fue más difícil su purificación. El rendimiento total de la síntesis es de 28%, el producto se pudo verificar por MALDI, no se logró obtener un espectro de RMN definido ya que fue difícil su disolución del producto.



Esquema 13. Ciclación por formación del enlace disulfuro para la obtención de la sandostatina.

5. Conclusiones

Este método de activación y acoplamiento con aminoácidos desprotegidos, utilizando HOBt y DCC fue eficiente en la síntesis peptídica. Su importancia radica en la reducción del uso de grupos protectores en el grupo ácido carboxílico, donde solamente se utilizaron grupos protectores para los aminoácidos que fueron activados, igualmente se ahorraron grupos protectores para alcoholes e indoles, ya que los ésteres de benzotriazol no reaccionan con estos grupos en las condiciones de reacción y son altamente reactivos a las aminas. Esto redujo aún más los pasos de protección y desprotección requeridos en síntesis peptídica. Otra ventaja son las condiciones neutras y no anhidras de la metodología. En conclusión, este método ofrece una síntesis peptídica eficiente, económica y

sencilla que permite obtener la sandostatina con un rendimiento total del 28%.

6. Parte experimental

Los aminoácidos, el HOBt y la DCC fueron adquiridos en Sigma-Aldrich México, los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fisher Johns. La espectroscopia de RMN de protón y carbono se obtuvo en un espectrómetro Bruker Avance III y un Bruker Fourier que operan a 300 MHz para la determinación del protón y 75 MHz para detectar el isótopo de C-13. Los desplazamientos químicos se expresan en ppm. Las reacciones de acoplamiento se siguieron por Ccf en placas de aluminio Macherey-Nagel recubiertas de sílica gel 60 con detector de fluorescencia, el sistema de elución es una mezcla de Hexano, diclorometano y metanol en porciones de 50:40:10 o 70:20:10; y se revelaron en una lamara de UV de 254nm y con ninhidrina. Los productos se analizaron por HPLC con un amortiguador A: de acetonitrilo/ácido fórmico (0.1%) 70/30; y un amortiguador B: acetonitrilo.

6.1 Protección de aminoácidos

(ter-butoxicarbonil)-fenilalanina 8.

Una solución de fenilalanina (1.924 g, 11.64 mmol) en dioxano (10 mL), agua (11.6 mL) y NaOH 1M (11.6 mL) se agitó en un baño de hielo-agua. Se adicionó una solución de pirocarbonato de di-terbutilo (2.789 g, 11.78 mmol) en dioxano (11.5 mL); la mezcla se agitó por 1 h a temperatura ambiente. La solución se concentró al vacío a un volumen de 15 mL. Posteriormente se adicionó agua (45 mL), se aciduló con ácido cítrico a pH 2-3 (papel pH). La fase acuosa se extrajo con acetato de etilo tres veces. Los extractos de acetato de etilo se juntaron, se lavaron con salmuera, se secaron sobre sulfato de sodio anhidro y se evaporaron al vacío. El residuo se cristalizó con hexano/acetato de etilo, se obtuvieron 2.94 g (95%). pf 68-70° C (disolvente: dioxano). RMN ¹H (400 MHz, Cloroformo-*d*):

(mezcla de rotámeros 1:2) δ 9.03 (s, 0H), 7.55 – 6.84 (m, 5H), 6.48 (d, J = 7.9 Hz, NH), 5.09 (d, J = 7.39 Hz, 1H), 4.64 (q, J = 6.6 Hz, 1H), 4.42 (dd, J = 9.5, 5.9 Hz, 1H), 3.21 (q, J = 6.3, 4.5 Hz, 1H), 3.10 (dd, J = 14.0, 6.5 Hz, 1H), 2.93 (dd, J = 13.7, 8.9 Hz, 1H), 1.44 (s, 6H), 1.33(s, 3H)).

(ter-butoxicarbonil)-D-fenilalanina 10.

Una solución de D-Fenilalanina (1.156 g, 6.99 mmol) en dioxano (8.2 mL), agua (6.9 mL) y NaOH 1M (6.9 mL) se agitó en un baño de agua-hielo. Se adicionó una solución de di-ter-butil pirocarbonato (1.677 g, 7.68 mmol) en dioxano (6.9 mL); la mezcla se agitó a temperatura ambiente por 1 h. La solución se concentró al vacío a un volumen de 9 mL, se adiciona agua (25 mL), se acidifica con ácido cítrico a pH 2-3 (papel pH). La fase acuosa se extrae repetidamente con acetato de etilo. Los extractos de acetato de etilo se juntaron, se lavaron con salmuera, se secaron sobre sulfato de sodio anhidro y se evaporaron al vacío. El residuo se cristalizó con hexano/acetato de etilo, se obtuvieron 1.726 g (92 %).p.f 85-88 °C (solvente: dioxano). RMN ^1H (300 MHz, Cloroformo- d): (mezcla de rotámeros 1:2) δ 9.03 (s, 1H), 7.50 – 6.8 (m, 5H), 6.52 (d, J =8.03 Hz, NH), 5.03 (d, J = 7.8 Hz, NH), 4.72 – 4.57 (m, 1H), 3.2 – 2.81 (m, 2H), 1.4 (s, 6h), 1.3 (s, 6H).

(ter-butoxicarbonil)-treonina 14.

Una solución de treonina (655 mg, 5.5 mmol) en dioxano (7 mL), agua (5 mL) y NaOH 1M (5 mL) se agitó en un baño de agua-hielo. Se adicionó una solución de di-ter-butil pirocarbonato (1.316 g, 6 mmol) en dioxano (7 mL); la mezcla se agitó a temperatura ambiente por 2 h. La solución se concentró al vacío, se acidificó con ácido cítrico a pH 2-3 (papel pH). La fase acuosa se extrajo repetidamente con acetato de etilo. Los extractos de acetato de etilo se juntaron, se lavaron con agua, se secaron sobre sulfato de sodio anhidro y se evaporaron al vacío. El residuo se cristalizó con hexano/diclorometano, se obtuvieron 1.160 g (96%). RMN ^1H (300 MHz, Cloroformo- d): δ 7.54 (s, 0H), 6.11 (s, 1H), 5.68 (s, 1H), 4.97 (s, 0H), 4.40 – 4.18 (m, 1H), 4.05 (dd, J = 11.0, 5.8 Hz, 1H), 1.39 (s, 9H), 1.19 (t, J = 7.1 Hz, 3H).

Citrato de (ter-butoxicarbonil)- ϵ -N-L-lisina 5.

Una solución de lisina (1.826g, 10 mmol) en NaHCO₃ 2M (15 mL) se agitó a temperatura ambiente. A esta mezcla se adicionó una solución de CuSO₄ H₂O (1.2 g, 5 mmol) en agua (15 mL). Después se adicionó NaHCO₃ (10 mmol) y finalmente una solución de di-ter-butil pirocarbonato (1.316 g, 13 mmol) en acetona (12 mL), la reacción se agitó a temperatura ambiente por 24 h. Se adicionó metanol (3 mL) y se agitó por 2 h. Se adicionó acetato de etilo (12 mL) y agua (12 mL). La mezcla se filtró, el precipitado se suspendió en agua (25 mL) y se filtró, este paso se repitió 2 veces y se secó el precipitado al aire.

El precipitado se disolvió en agua caliente (5 mL) y se burbujeó H₂S por 30 minutos. La reacción se calentó a reflujo para eliminar el H₂S. Se adicionó ácido cítrico al 10% a un pH 3, y se filtró. El filtrado se basificó a pH 6 con NaOH 4M y se concentró al vacío, se obtuvieron 3.059 g (69%). RMN ¹H (300 MHz, D₂O, supresión de agua) δ 5.56 (s, 1H), 3.54 (t, $J = 6.1$ Hz, 1H), 2.89 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H), 2.69-2.17 (dd, $J=14.5, 17$ Hz, 4H), 1.42–1.14 (m, 4H), 1.25 (s, 3H), 1.50 – 1.25 (m, 2H), 1.25 (s, 9H).

S-tritil-cisteína 9.

En un matraz Erlenmeyer se mezcló cisteína (1.580 g, 10 mmol) en ácido acético glacial (10 mL); la mezcla se calentó en un baño de agua a 60 °C con agitación ocasional. A la mezcla se le adicionó trifenilmetanol (2.600 g, 10 mmol), seguido de eterato de dietilo de trifluoruro de boro (1.4 mL). La solución se calentó en baño de agua a 80 °C por 30 minutos. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se transfirió a una solución de etanol (15 ml) y agua (5 mL). Se adicionó acetato de sodio anhidro (3 g, 36 mmol) seguido de agua (400 mL). Se forma una goma solidifica en agua fría. El sólido se disgregó, se lavó con agua, luego con acetona y finalmente con éter. El sólido se seca sobre NaOH y P₂O₅ por 3 días y se recristaliza en repetidas ocasiones de dimetilformamida/agua hasta

alcanzar un punto de fusión de 183-185°C sin descomposición. Se obtuvieron 2.998 g (82.5%). RMN ¹H (300 MHz, Metanol-*d*) δ 7.43 (d, *J*=7.7 Hz, 6H), 7.30 (t, *J* = 7.3 Hz, 6H), 7.26 – 7.21 (m, 3H), 3.05 (dd, *J* = 9.1, 4.2 Hz, 1H), 2.81 (dd, *J* = 13.4, 4.2 Hz, 1H), 2.68 (dd, *J* = 13.4, 9.1 Hz, 1H).

(ter-butoxicarbonil)-treoninol 12.

Una mezcla de Boc-treonina (1 g, 4.56 mmol), HOBt (856 mg, 5.46 mmol), EDC (1.126g, 5.46 mmol) en diclorometano (20 mL) se agitó por 6 h. La mezcla se concentró y se adicionó THF (20 mL), agua (5mL) y se enfrió en un baño de agua-hielo. Se adicionó NaBH₄ (3.79 g, 36.5 mmol) y se mantuvo en agitación por 8h. A la reacción se le agregó ácido acético (0.2 mL), se concentró al vacío y extrajo con acetato de etilo, la fase de acetato de etilo se lavó con K₂CO₃ al 5% y con salmuera. Se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y se concentró. Se obtuvo un sólido con pf. 64-66 °C. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 5.65 (t, *J* = 5.9 Hz, 1H), 5.43 (d, *J* = 5.8 Hz, 1H), 3.24 – 3.02 (m, 1H), 2.81 – 2.65 (m, 1H), 2.50 (s, 9H), 1.87 – 1.67 (m, 2H), 1.05 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H). RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 5.65 (t, *J* = 5.9 Hz, 1H), 5.44 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 3.85 (s, 1H), 3.18 – 3.06 (m, 4H), 2.77 – 2.68 (m, 2H), 2.50 (s, 6H), 2.40 (s, 0H), 1.92 – 1.80 (m, 2H), 1.05 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H).

6.2. Metodología general de acoplamiento peptídico.

En un matraz se mezclan Boc-aminoácido (1 equivalente), 1-HOBt monohidratado (1.2 equivalentes), DCC (1.2 equivalentes) en diclorometano (1 mmol de aminoácido por 5 mL de diclorometano), la mezcla se agita a temperatura ambiente de 20 min a 16 horas, se monitorea por cromatografía en capa fina el avance de formación de los ésteres de benzotriazol. Terminada la formación de los ésteres de benzotriazol se evapora el diclorometano a presión reducida y el residuo se disuelve en THF y se adiciona lentamente a una mezcla de un segundo aminoácido (1.5 a 4 equivalentes), THF-agua (1:2) y NaOH 1M (equimolar al aminoácido). Una vez terminada la adición se agita a temperatura ambiente de 20

min a 16 h, la reacción se monitorea por cromatografía en capa fina. Se concentra la mezcla de reacción a presión reducida, se filtra sobre celita para remover la urea, después se acidula a pH 3 con ácido cítrico y se extrae con acetato de etilo. Los extractos de acetato de etilo se juntan y se lavan 3 veces con K₂CO₃ 5%, después 3 veces con salmuera y finalmente se seca sobre sulfato de sodio anhidro, se filtra y se concentra a sequedad. El péptido obtenido se recrystaliza.

(ter-butoxicarbonil)-L-fenilalanil-D-triptófano 7.

Una solución de Boc-fenilalanina (530 mg, 1.99 mmol), 1-HOBt hidratado (367 mg, 2.4 mmol) y DCC (465 mg, 2.4 mmol) y diclorometano (20 mL); se agitó a temperatura ambiente por 30 minutos. La mezcla de reacción se evaporó al vacío y se disolvió en THF (24 mL). La mezcla se adicionó lentamente a otra mezcla de D-Triptófano (626 mg, 2.98 mmol), agua (8 mL), NaOH 1M (3 mL) y THF (4 mL). La mezcla se agitó por 20 minutos a temperatura ambiente y se trató como lo describe el método general. El péptido se cristalizó en acetona/hexano, se obtuvieron 863 mg (96%). p.f. 113-118 °C. RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆, 60 °C) δ 10.61 (s, 1H), 8.21 (t, 1H), 7.82 (s, 1H), 7.54 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H), 7.29 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.17 – 7.05 (m, 5H), 7.02 (t, *J* = 7.05 Hz, 2H), 6.94 (t, *J* = 7.25 Hz, 1H), 6.45 (s, 1H), 4.47 (s, 1H), 4.21 (s, 1H), 3.23 (d, *J* = 11.9 Hz, 1H), 3.05 (s, 1H), 2.88 (d, *J* = 12.9 Hz, 1H), 2.63 (s, 1H), 1.27 (s, 9H). RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ 175.9, 171.7, 155.6, 136.5, 135.9, 129.1, 128.1, 127.4, 126.4, 123.1, 121.5, 118.9, 118.2, 111.1, 109.6, 79.8, 55.4, 53.9, 38.3, 27.9, 27.2. RMN DEPT 135 (75 MHz, CDCl₃) δ 129.1, 128.1, 126.4, 123.0, 121.4, 118.9, 118.2, 111.1, 55.4, 53.9, negativo 38.2, 27.9, negativo 27.22. (Q)-TOF/MS: 450.1954 [M-1H]⁻, 901.4033 [2M-1H]⁻. $[\alpha]_D^{20} = +2.7$ (c 1.46).

N-((ter-butoxicarbonil)-D-fenilalanil)-S-tritil-cisteína 6.

Una solución de Boc-D-fenilalanina (584 mg, 2.2 mmol), HOBt hidratado (404 mg, 2.4 mmol), DCC (495 mg, 2.4 mmol) en diclorometano (20 mL); se agitó a temperatura ambiente por 30 minutos. La mezcla de reacción se evaporó al vacío

y se disolvió en THF (24 mL). La mezcla se adicionó lentamente a otra mezcla que contiene tritil-cisteína (1.090 g, 2.99 mmol), agua (8 mL), NaOH 1M (3 mL) y THF (4mL). La mezcla se agitó por 20 minutos a temperatura ambiente, se adicionó agua (10 mL) y se trató como lo describe el método general. El péptido se cristalizó en acetato de etilo/hexano, se obtuvieron 1.179 g (92.9%). p.f. 105-108 °C, RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.24 (s, 1H), 7.39 – 7.10 (m, 20H), 6.86 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 4.18 (m, 2H), 3.00 ppm (dd, *J*=3.7, 13.4 Hz, 2H), 2.71 (dd, *J* = 13.5, 10.6 Hz, 1H), 2.47 – 2.42 (m, 1H), 2.38 (dd, *J*= 4.9, 11.3 Hz, 1H), 1.26 (s, 9H). RMN ¹³C (75 MHz, DMSO) δ 170.6, 154.3, 143.8, 137.3, 128.5, 127.7, 127.2, 126.7, 126.0, 125.4, 65.8, 55.2, 51.0, 37.3, 33.0, 30.2, 27.5. $[\alpha]_D^{20} = +8.66$ (c 0.003, MeOH). (Q)-TOF/MS: 609.2451 [M+1], 1021.4418 [M-2Boc].

***N*-((*ter*-butoxicarbonil)-*D*-fenilalanil)-*S*-tritil-*L*-cisteína-*L*-phenilalanil-*D*-triptófano, 4.**

Una solución de **3** (686 mg, 1.123 mmol), HOBt hidratado (206 mg, 1.35 mmol), DCC (278 mg, 1.35 mmol) y diclorometano (15 mL); se agitó a temperatura ambiente por 16 h. La mezcla de reacción se evaporó al vacío y se disolvió en THF (24 mL). Por otro lado, una solución de **2** (626 mg, 1.91 mmol) en diclorometano seco (15 mL), en un baño de agua hielo se desprotegió con burbujeo de HCl gas por 7 minutos, después la mezcla se concentró al vacío y se disolvió en agua (3 mL), NaOH 1M (2 mL) y THF (5 mL). La mezcla se agitó a temperatura ambiente y se adicionaron lentamente los ésteres de benzotriazol de **3**., Se mantuvo en agitación por 16 h a temperatura ambiente y se trató como lo describe el método general. El péptido se cristalizó en acetona/hexano, se obtuvieron 697 mg (65.74%). p.f. 114-116 °C. RMN ¹³C (126 MHz, DMSO) of **4**. δ 173.2, 173.2, 173.1, 144.2, 137.4, 137.1, 136.1, 130.6, 130.1, 129.1, 129.0, 128.3, 128.2, 127.9, 127.7, 127.5, 126.7, 126.6, 126.4, 126.3, 125.5, 123.8, 120.9, 118.4, 118.1, 111.4, 109.6, 71.7, 54.8, 54.5, 54.3, 53.9, 53.5, 53.0, 30.9, 30.3, 28.9, 27.2. NALDI-TOF/MS: 966 [M+Na].

N-((ter-butoxicarbonil)-D-fenilalanil)-S-tritil-L-cisteína-L-fenilalanil-D-triptófano-N-ter-butoxicarbonil-lisina, 2.

Una solución de **4** (643 mg, 0.68 mmol), HOBt hidratado (125 mg, 0.816 mmol), DCC (168 mg, 0.816 mmol) y diclorometano (15 mL); se agitó a temperatura ambiente por 16 h. La mezcla de reacción se evaporó al vacío y se disolvió en THF (15 mL). La mezcla se adicionó lentamente a otra mezcla de citrato de Boc-^εN-L-Lisina (599 mg, 1.36 mmol), agua (7mL), NaOH 1M (1.4 mL) y THF (6 mL). La mezcla se agitó por 16 h a temperatura ambiente y se trató como lo describe el método general. El péptido se cristalizó en acetato de etilo/hexano, se obtuvieron 637 mg (79. 9%).RMN ¹³C (101 MHz, DMSO) δ 208.89, 207.00, 175.44, 173.99, 171.75, 157.11, 156.03, 155.58, 144.68, 136.57, 129.71, 129.59, 129.51, 128.49, 128.24, 128.00, 127.70, 127.18, 126.56, 121.28, 119.26, 118.59, 111.67, 110.35, 79.64, 78.55, 77.81, 72.68, 68.96, 66.24, 56.29, 52.12, 51.87, 43.44, 33.81, 31.16, 30.06, 29.49, 28.73, 28.55, 28.15, 27.89, 25.79, 24.93. (Q)-TOF/MS: 584.0676 [(M/2)-2]⁻. (Q)-TOF/MS: 609.1909 [(M/2)+Na]⁺, 994.87 [M-Boc+2K]²⁺ p.f. 119 °C. [α]_D²⁰=+3.75 (c 2.4, MeOH).

N-((ter-butoxicarbonil)-L-treonina)-S-tritil-L-cisteína, 13.

Una solución de Boc-treonina (484 mg, 2.2 mmol), HOBt hidratado (404 mg, 2.64 mmol), DCC (544 mg, 2.64 mmol) y diclorometano (15 mL); se agitó a temperatura ambiente por 6 h. La mezcla de reacción se evaporó al vacío y se disolvió en THF (20 mL). La mezcla se adicionó lentamente a otra mezcla que contenía S-Tritil-L-cisteína (1.198 g, 3.29 mmol), agua (8 mL), NaOH 1M (3.3 mL) y THF (6 mL). La mezcla se agitó por 16 h a temperatura ambiente, se adicionó agua (15 mL) y se trató como lo describe el método general. El péptido se cristalizó en acetato de etilo/hexano, se obtuvieron 936 mg (75.34%). RMN ¹H (400 MHz, Methanol-*d*₄) δ 7.52 – 7.03 (m, 15H), 4.45 – 3.94 (m, 2H), 2.63 (dt, *J* = 21.6, 6.3 Hz, 1H), 1.41 (s, 9H), 1.33 – 1.04 (m, 5H). RMN ¹³C (101 MHz, Methanol-CDCl₃) δ 197.3, 182.8, 173.6, 171.9, 156.3, 155.7, 152.5, 144.2, 129.5, 128.7, 127.9, 127.7, 126.8, 83.3, 80.3, 67.1, 66.9, 58.3, 51.4, 51.3, 33.2, 31.5, 28.2, 25.2, 24.6, 22.6, 17.7, 14.0. RMN DEPT-135 (101 MHz, CDCl₃) δ 129.5, 128.7, 127.9, 127.7, 126.8, 77.3,

76.5, 67.2, 58.3, 51.4, 33.2, 31.5, 28.2, 22.6, 14.0. (Q)-TOF/MS: 563.2249 [M-1H]⁺, 863.2496 [2M-Boc-Cl-1H]⁺. $[\alpha]_D^{20} = +9.16$ (c 1.2, MeOH).

N-((ter-butoxicarbonil-L-treonina-S-tritil-cisteína)-L-treoninol, 17.

Una solución de **6** (781 mg, 1.38 mmol), HOBt hidratado (253 mg, 1.656 mmol), DCC (342 mg, 1.656 mmol) y diclorometano (15 mL); se agitó a temperatura ambiente por 16 h. La mezcla de reacción se evaporó al vacío y se disolvió en THF (20 mL).

Por otro lado, una solución de Boc-*N*-treoninol (1.126 g, 5.52 mmol) en diclorometano seco (20 mL), en un baño de agua hielo se desprotegió con burbujeo de HCl gas por 10 minutos, después la mezcla se concentró al vacío y se disolvió en agua (6 mL) y THF (4 mL). La mezcla se agitó a temperatura ambiente y se adicionaron lentamente los ésteres de benzotriazol de **6**, se mantuvo en agitación por 16 h a temperatura ambiente y se trató como lo describe el método general. El péptido se cristalizó en acetato de etilo/hexano, se obtuvieron 576 mg (72%). RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.71 – 6.74 (m, 16H), 6.44 (s, 1H), 5.59 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 4.83 (d, *J* = 5.8 Hz, 1H), 4.56 (s, 1H), 3.86 (s, 1H), 2.87 – 2.54 (m, 2H), 2.09 (s, 9H), 1.84 – 1.54 (m, 6H), 1.51 – 0.70 (m, 2H). RMN ¹³C (101 MHz, DMSO) δ 208.8, 206.9, 171.7, 157.1, 144.7, 128.3, 128.2, 127.9, 81.0, 72.7, 68.9, 64.1, 60.62, 56.3, 56.1, 47.9, 43.4, 33.8, 31.1, 30.1, 28.6, 25.7. (Q)-TOF 686.2687 [M+Cl].

N-((ter-butoxicarbonil)-D-fenilalanil)-S-tritil-cisteína-fenilalanil-D-triptófano-treonina-S-tritil-cisteína-treoninol, 18.

Una solución de **5** (541 mg, 0.46 mmol), HOBt hidratado (84 mg, 0.552 mmol), DCC (113 mg, 0.552 mmol) y diclorometano (15 mL); se agitó a temperatura ambiente por 16 h. La mezcla de reacción se evaporó al vacío y se disolvió en THF (20 mL). En otro matraz se preparó una solución de **7** (435 mg, 0.667 mmol) en diclorometano seco (15 mL), en un baño de agua hielo se desprotegió con burbujeo de HCl gas por 10 minutos, la mezcla se concentró al vacío y se disolvió

en agua (3 mL), NaOH 1M (0.7 mL) y THF (5 mL). La mezcla se agitó a temperatura ambiente y se adicionaron lentamente los ésteres de benzotriazol de **5**, se dejó en agitación por 16 h a temperatura ambiente y se trató como lo describe el método general. El péptido se cristalizó en acetato de etilo/hexano, se obtuvieron 566 mg (72.11%). m.p. 119-124 °C. MALDI-TOFMS: 1707.205 [M+1H]⁺.

6.3 Sandostatina 1. Formación del puente disulfuro.

Una solución de **8** (500 mg, 0.29 mmol) en diclorometano seco (15 mL) en un baño de hielo agua se desprotegió con una fuente HCl gas por 10 minutos, la mezcla se concentró al vacío y se disolvió en metanol (24 mL), esta solución se transfirió por adición a una solución en agitación de yodo (411 mg, 1.62 mmol) en metanol (12 mL) por 7h a 0-5 °C, la solución se agitó por 2 h a 0-5°C. El exceso de yodo se eliminó por adición de bisulfito de sodio 0.5 M (12.5 mL), después se adicionó NaOH 4M (8.3 mL) y 3.5 mL de ácido acético. El metanol se evaporó al vacío. Al residuo se le agregó ácido acético al 0.8% (13 mL) y se agitó a temperatura ambiente por 2 h. La solución se enfrió por 2 h y se filtró, el filtrado se analizó por HPLC-MASAs UV y MALDI-TOFMS: 1011.244 [M-8H]⁻, 1013.234 [M-5H]⁻, 1014.247 [M-5H]⁻.

7. Referencias.

1. J. L. Lau, M. K. Dunn, *Bioorg. & Med. Chem.*, **2018**, *26*, 2700-2707. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.06.052>
2. M.H. Baig, K. Ahmad, M. Saeed, A. M. Alharbi, G. E. Barreto, G. Md. Ashraf, I. Choi; *Biomedical & Pharmacotherapy*; **2018**, *Vol 113*, 574-581. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.04.025>
3. Bloom, S. R.; Polak, J. M.; *British Medical Journal*, **1987**, *Vol. 295*: 288. Doi: <https://doi.org/10.1136/bmj.295.6593.288>
4. W. Bauer, U. Briner, W. Doepfner, R. Haller, R. Huguenin, P. Marbach, T. J. Petcher, J. Pless; *Life Sci.*, **1982**, *31*, 1133-1140. Doi: [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(82\)90087-X](https://doi.org/10.1016/0024-3205(82)90087-X).

5. M. Chalabi, C. Duluc, P. Caron, D. Vezzosi, J. Guillerment-Guibert, S. Pyeonnet, C. Bousquet; *Trends in Endocrinology and Metabolism*, **2014**, Vol 25, No 3, 115-127. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.tem.2013.11.003>.
6. S.W.J. Lamberts, L.J. Hofland; *Eur. J. Endocrinology*; **2019**, 181, R173-R183. Doi: <https://doi.org/10.1093/ejendo/lvad066>
7. S. Sabatino, I. Guryanov, A. Rombecchi, J. Zanon, A. Ricci, W. Cabri, A. M. Papini, P. Rovero, *Expert. Opin. Ther. Pat.*, **2016**, 26 (4), 485-495. Doi: <https://doi.org/10.1517/13543776.2016.1158810>
8. H. P. Hsieh, Y. T. Wu, S-T. Chen, K-T. Wang, *Bioorg. & Med. Chem.*, **1999**, 7, 1797-1803. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0968-0896\(99\)00125-X](https://doi.org/10.1016/S0968-0896(99)00125-X)
9. N. Bubey R. Varshney, J. Shukla, A. Ganeshpurkar, P. P. Hazari, G. P. Bandopadhyaya, A. K. M. Mishra, P. Trivedi, *Drug Delivery*, **2012**; 19(3): 132–142. Doi: <https://doi.org/10.3109/10717544.2012.657718>
10. A. Tovi, C. Eidelman, S. Shushan, Kariel; S. Elster, A. Hagi, Y. Kibbutz; U. S. Patent, 0249121 A1, **2004**.
11. J. K. Rueter, R. H. Mattern, L. Zhang, J. Taylor, B. Morgan, D. Hoyer, M. Goodman, *Biopolymers*, **2000**, 53, 497-505. Doi: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0282\(200005\)53:6<497::AID-BIP6>3.0.CO;2-Y](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0282(200005)53:6<497::AID-BIP6>3.0.CO;2-Y)
12. A. N. Balaev, V. N. Osipov, K. A. Okhmanovich, E. V. Reshetnikov, V. E. Fedorov; *Pharm. Chem. J.* **2013** 47, 378–381. Doi: <https://doi.org/10.1007/s11094-013-0963-9>
13. N. C. Chaturvedi, S. Beri, R. D. Yeole, N.J. De Souza; *U.S. Patent*, 6987167, **2006**.(24)
14. R. Ayyagari, M. Neary, S. Li, A. Rokito, H. Yang, J. Xie, A. B. Benson, *Health Drug Benefits*. **2017**, 10(8):408-415. John Jones; The chemical synthesis of peptides; Clarendon Press, Oxford, pag 82-86; 1994.
15. A. Isidro-Llobet, M. Álvarez, F. Albericio; *Chem. Rev.* **2009**, 109, 2455–2504. Doi: <https://doi.org/10.1021/cr800323s>
16. D.M.M. Jaradat; *Amino Acids*, **2018**, 50, 39–68. Doi: <https://doi.org/10.1007/s00726-017-2516-0>

17. M. Amblard, J. A. Fehrentz, J. Martinez, G. Subra; *J Mol Biotechnol*, **2006**, 33, 239–254. Doi: <https://doi.org/10.1385/MB:33:3:239>
18. P.G.M. Wuts; *Protection for the Amino Group, Capítulo 7, Greene's Protective Groups in Organic Synthesis*, **2014**, Volumen 2103, 895-1193.
19. I. S. Young, P. S. Baran, *Nature Chem*, **2009**, 1, 193–205. Doi: <https://doi.org/10.1038/nchem.216>
20. P. Gagnon, X. Huang, E. Therrien, J.W. Keillor; *Tetrahedron Lett.*; **2002**, Volumen 43, 43, 7717-7719. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(02\)01840-3](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(02)01840-3)
21. T. Ezawa, S. Jung, Y. Kawashima, T. Noguchi, N. Imai, *Tetrahedron: Asymmetry*; **2017**, Volumen 28; 1, 75-83. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.tetasy.2016.11.009>
22. J. A. Morales-Serna, E. Sánchez, R. Velázquez, J. Bernal, E. García-Ríos, R. Gaviño, G. Negrón-Silva, J. Cárdenas; *Org. Biomol. Chem.* **2010**, 8, 4940–4948. Doi: <https://doi.org/10.1039/C0OB00161A>.
23. M. Bodanszky, A. Bodanszky, (1967). *Che. Commun. (London)*, **1967**, 12, 591-593. Doi: <https://doi.org/10.1039/C19670000591>
24. T.I. Al-Warhi H. M.A. Al-Hazimi, A. El-Faham; *J. Saudi Chem. So.*; **2012**, 16, 97–116. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2010.12.006>
25. A. El-Faham, F. Albericio, *Chem. Rev.*, **2011**, 111, 6557–6602. <https://doi.org/10.1021/cr100048w>
26. E. Valeur, M. Bradley; *Chem. Soc. Rev.*, **2009**, 38, 606–631. Doi: <https://doi.org/10.1039/B701677H>
27. J. A. Morales-Serna, E. García-Ríos, J. Bernal, E. Paleo, R. Gaviño, J. Cárdenas, *Synthesis*, **2011**, 1375-1382. Doi: 10.1055/s-0030-1259988

Parte II. Determinación de la configuración absoluta de alcoholes, aminas y ácidos carboxílicos por RMN

Resumen:

En este trabajo se estudió el uso del ácido piroglutámico y sus derivados como agentes de derivación quiral, para la asignación de la configuración absoluta por RMN de compuestos que contengan alcoholes, aminas o ácidos carboxílicos. Usando los efectos estéricos de este compuesto, se logró afectar los desplazamientos químicos en RMN ^{13}C entre los diastereoisómeros formados con un alcohol secundario y los enantiómeros del carboxilato 1-(clorometil)-5-pirrolidona de metilo. Los cambios en los desplazamientos químicos entre isómeros generan una estrategia para asignar la configuración absoluta de alcoholes secundarios, los cuales exhiben diferencias hasta de 3 ppm en el carbono estereogénico del alcohol, sus α -carbonos y en el metileno del *N*-alcoximetileno. Estos cambios se correlacionaron con los tensores de desplazamiento calculados por el método GIAO usando B3LYP/6-311+(2d, p). Este efecto de compresión también afecta la constante de acoplamiento geminal en RMN- ^1H del *N*-alcoximetileno, influenciado por la estereoquímica del alcohol.

Por otro lado, se propuso el uso del ácido piroglutámico como agente de derivación quiral para asignar la configuración absoluta de aminas, por formación de amidas diastereoisoméricas. A pesar de que se generan diferencias en los desplazamientos químicos en RMN ^{13}C , los datos no son reproducibles, por lo que no se puede generar una metodología de asignación de configuración absoluta. A su vez, el uso del piroglutamato de metilo se propuso para la asignación como agente de derivación quiral para la asignación de configuración absoluta de ácidos carboxílicos quirales, al formar las imidas correspondientes generando diferencias en los desplazamientos químicos entre diastereoisómeros, pero la metodología de

formación de imidas aunque es reproducible, no muestra una tendencia para asignar la configuración absoluta.

Abstract:

The use of piroglutamic acid as a derivatizing chemical agent for assignment of absolute configuration is studied in this work. The analysis of the effect of steric compression on the chemical shifts of carbons (^{13}C NMR) in diastereoisomers is an accessible strategy for assigning the absolute configuration of secondary alcohols. Here we take advantage of such chemical shift differences and establish a validation protocol to assign the absolute configuration. The two enantiomers of methyl-1-(chloromethyl)-5-oxopyrrolidine-2-carboxylate are used as derivatizing agents to treat separately a secondary alcohol yielding two diastereoisomeric derivatives. Interestingly, these diastereoisomers exhibit clear ^{13}C NMR differences in their chemical shifts up to 3 ppm only where the stereogenic centre of the alcohol and its α -carbons are located. These changes in chemical shifts correlate well with the results obtained by the GIAO method applying the B3LYP/6-311+(2d, p) theoretical model to calculate the NMR shielding tensor of alcohols. The steric compression effect was noticed as well in the derivatizing agent moiety, since the measurement of the geminal coupling constant of its methylene is influenced by the stereochemistry of the secondary alcohol.

On other hand, the use of pyroglutamic acid to assign the absolute configuration of secondary amines generate differences in chemical shifts, but the data are not reproducible. In the same way, the use of methyl pyroglutamate for assigning the absolute configuration of carboxylic acids generate differences in NMR chemical shifts, but in this case the methodology of formation of diastereoisomers is not reproducible.

1. Introducción.

En este trabajo se estudió un derivado del ácido piroglutámico como agente quiral de derivación para asignar la configuración absoluta de productos naturales por RMN, el cual es un excelente reactivo ya que además de tener un centro estereogénico se puede funcionalizar fácilmente y unir con aminas, ácidos carboxílicos o alcoholes, presentes en productos naturales. Ambos enantiómeros del agente quiral se hacen reaccionan con compuestos quirales de configuración absoluta conocida. La comparación de los desplazamientos químicos en RMN entre los diastereoisómeros formados lo cual puede ayudar a generar una metodología de asignación de configuración absoluta.

El estudio para aminas se realizó con el agente quiral ácido piroglutámico, por formación de amidas diastereoisoméricas, que analizadas por RMN se observan diferencias en los desplazamientos químicos, pero no generan un patrón claro para la asignación de la configuración absoluta. También se estudió el piroglutamato de metilo para asignación de configuración absoluta de ácidos carboxílicos por formación de imidas diastereoisoméricas que prometen generar diferencias en los desplazamientos químicos pero la metodología de formación de diastereoisómeros es difícil si se utilizan productos naturales.

La metodología para la asignación de la configuración absoluta por RMN-¹³C de productos naturales que contengan alcoholes se realizó utilizando como agente quiral de derivación el **1-(clorometil)-2-pirrolidona-5-carboxilato de metilo**, formando diastereoisómeros *N*-alcoxi metileno (N-CH₂-O-CH), los pares de isómeros presentan diferencias en sus desplazamientos químicos que ayudan a asignar la configuración absoluta. Estas diferencias son de 0.5 hasta 3 ppm, y se dan principalmente en el carbono estereogénico unido al alcohol, en los carbonos- α , y en el carbono metileno del grupo *N*-alcoxi metileno. Cuando un alcohol cíclico tiene una configuración (*S*) y el agente quiral 1 también, sus desplazamientos químicos serán de campo más alto que el isómero formado con el agente quiral

(*R*); si el alcohol es de configuración (*R*) el isómero más desplazado será el formado con el agente quiral (*R*). Lo contrario sucede para los alcoholes lineales, si un alcohol con configuración (*S*) y el agente quiral 1 también, sus desplazamientos químicos serán de campo más bajo que el isómeros formado con el agente quiral (*R*); si el alcohol es de configuración (*R*) el isómero más desplazado será el formado con el agente quiral (*S*).

En RMN-¹H los diastereoisómeros presentan diferencia de 1 Hz en la constante de acoplamiento geminal (²*J*) del *N*-alcoxi metileno, los isómeros (*S*)-(*S*) o (*R*)-(*R*) tienen una menor constante de acoplamiento comparada con los isómeros (*S*)-(*R*) o (*R*)-(*S*).

Estos cambios se compararon con cálculos computacionales de los desplazamientos químicos, los cuales se encuentran en correlación directa con los datos experimentales.

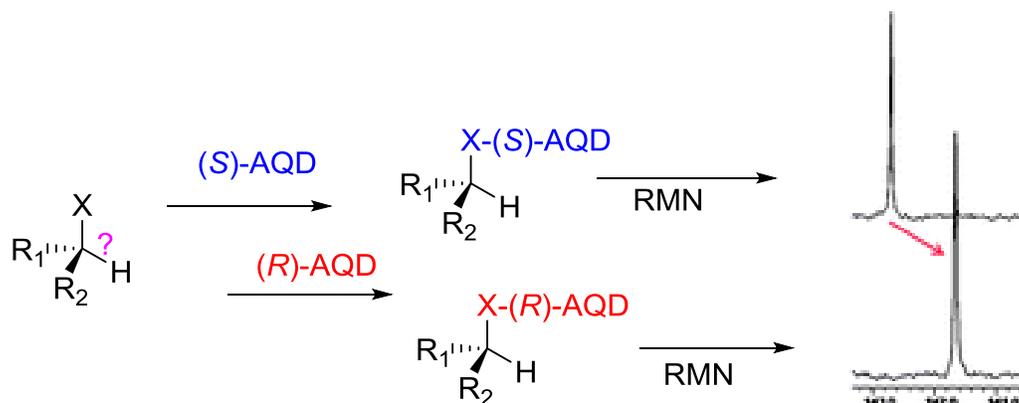
2. Antecedentes

2.1. Asignación de la configuración absoluta de productos naturales por RMN

La elucidación estructural de productos naturales es de suma importancia, ya que un gran número de los fármacos comerciales provienen de estos compuestos; y en esta área, la asignación de la configuración absoluta es sin duda esencial,¹ Esta labor ha resultado ser difícil a pesar de que se han desarrollado diversas técnicas analíticas para obtenerla, ya que cada una tiene sus ventajas y limitaciones que dependen de las propiedades físicas y químicas del sustrato a analizar. Una técnica predominante es la difracción de rayos X, que se puede utilizar por dispersión anómala para moléculas cristalinas de alta calidad que presenten este efecto. Los métodos quirópticos están basados en diferentes interacciones con las moléculas quirales y se acompañan de cálculos *ab initio*, estas se utilizan de acuerdo con la naturaleza del compuesto; la rotación óptica y el dicroísmo circular vibracional son útiles para muestras que no tengan cromóforos en el UV-visible; por otro lado, el dicroísmo circular electrónico se utiliza cuando la muestra tiene cromóforos en el UV-visible. Finalmente, la resonancia magnética nuclear (RMN) es una técnica que se utiliza para compuestos mono-funcionales que contengan aminas, alcoholes o ácidos carboxílicos.²

Debido a las limitaciones que presenta cada una de estas técnicas, la selección cuidadosa y apropiada de uno o más métodos para la asignación de la configuración absoluta es crucial; por lo que la demanda de un método accesible en procedimientos y tiempo real de trabajo es evidente. Con este interés, se ha puesto mayor atención en la determinación de la configuración absoluta utilizando RMN, que se ha desarrollado en las últimas décadas debido a la disponibilidad de la instrumentación, ya que se encuentra presente en la mayoría de los laboratorios de investigación, es una herramienta de uso cotidiano y brinda la oportunidad de trabajar con muestras líquidas o sólidas, además se necesita poca cantidad de muestra y no es una técnica destructiva.

El uso de esta herramienta para asignación de configuración absoluta se basa en comparar diferencias en los desplazamientos químicos entre dos diastereoisómeros, los cuales se preparan haciendo reaccionar la muestra quiral separadamente con dos enantiómeros de un agente quiral de derivación; los isómeros preparados se analizan por RMN, generalmente de protón, y las diferencias entre desplazamientos químicos ayudan a asignar la configuración absoluta (Esquema 14). La clave de estas metodologías es el agente quiral de derivación, que debe tener un grupo polar o voluminoso que mantenga una conformación, un grupo funcional para unirse al sustrato y un grupo aromático que produzca una orientación espacial para generar anisotropía que afecte selectivamente al sustrato.²



Esquema 14. Metodología general para la asignación de la configuración absoluta por RMN usando un AQD (agente quiral de derivación).

Este principio fue originalmente propuesto por Mosher en 1973 con el ácido α -metoxi- α -(trifluorometil)fenilacético³, y subsecuentemente se han desarrollado diferentes agentes quirales⁴ de los cuales los agentes análogos del reactivo de Mosher han sido muy utilizados y estudiados para determinar la configuración absoluta de alcoholes secundarios, aminas y ácidos carboxílicos, Figura 5.⁵ Estos agentes de derivación tienen un grupo aromático esencial para producir los efectos de anisotropía en RMN de protón, lo que causa diferencias en los desplazamientos químicos entre diastereoisómeros, esta correlación ayuda a asignar la configuración absoluta. Su uso se ha extendido, pero en muchas

ocasiones las señales en RMN-¹H se traslapan debido a los diversos acoplamientos, requiriendo técnicas de desacoplamiento, cambios de temperatura, uso de RMN-¹⁹F, agentes solvatantes, adición de sales de bario o quelatos lantánidos y así causar diferencias en los desplazamientos químicos.^{6,7}

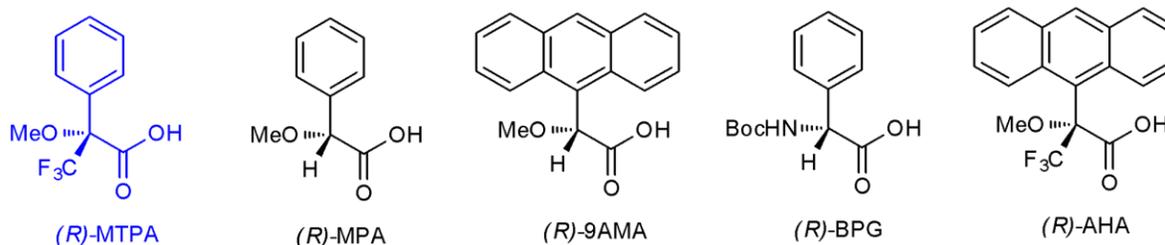
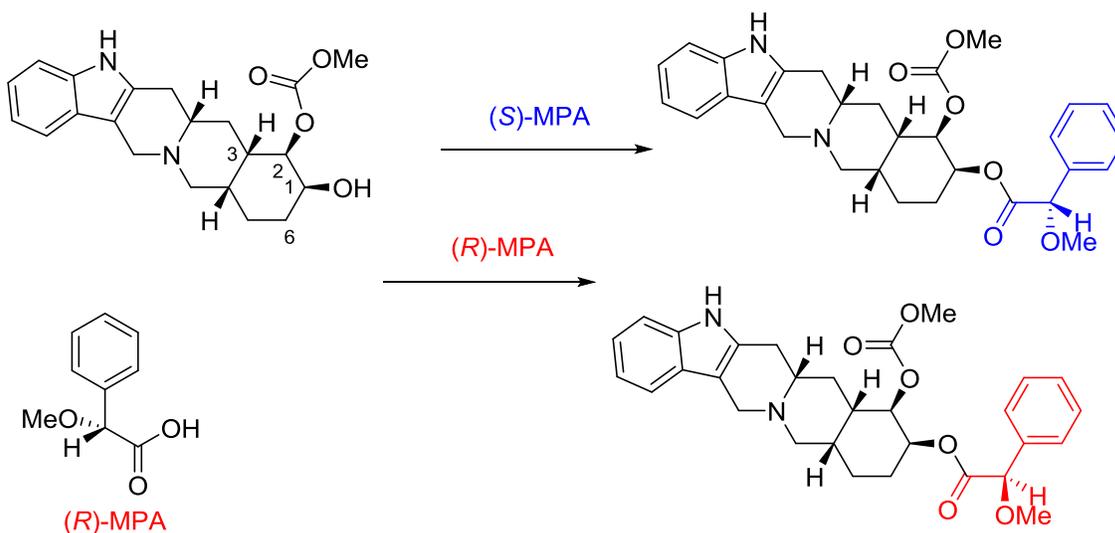


Figura 5. Reactivo de Mosher (MTPA) y sus análogos.

Cabe mencionar que la mayor parte de estos métodos han sido desarrollados para ser probados por RMN-¹H y no existen muchas propuestas para la asignación de configuración absoluta por RMN-¹³C, ya que las diferencias en desplazamientos químicos observadas en diastereoisómeros analizados por RMN-¹H, se atribuyen a efectos de anisotropía causados por los grupos aromáticos provenientes del agente quiral. Estos efectos anisotrópicos son insignificantes en el experimento de RMN-¹³C, como se observa cuando se utilizan los ácidos de Mosher y análogos derivados del ácido mandélico en RMN-¹³C,⁸ al considerar que los efectos de anisotropía que se observan por el uso de estos derivados en el espectro de RMN ¹H, operan de la misma manera que en RMN ¹³C.

Un análisis cuidadoso de los resultados del uso de estos derivados por RMN-¹³C, permite comprobar que los pequeños cambios en desplazamiento químico, no se deben a los efectos anisotrópicos de los grupos aromáticos de los ácidos α -metoxi arilacético estudiados. Se conoce que la derivatización de un alcohol secundario, genera en RMN-¹³C un desplazamiento a campo bajo para el carbono unido al oxígeno y un desplazamiento a campo alto para los carbonos alfa. El modelo estudiado por el grupo del profesor Riguera⁸ fue la Corinantina, un alcaloide aislado de especies de *Rauwolfia* y *Pausinystalia*. En la Esquema 15 se muestran las diferencias de desplazamiento químico de los diastereoisómeros formados,

utilizando los dos enantiómeros de los cuatro asistentes quirales de derivación ($\Delta\delta^{RS}$), se observa un desplazamiento a campo bajo de 0.2 a 0.6 ppm para el carbono unido al oxígeno del éster formado. Para ejemplificar la no existencia de los efectos de anisotropía en RMN ^{13}C , se pueden analizar los desplazamientos químicos de los metilos unidos a ciclopentano, fenilo y ciclohexano que se observan en 20.8, 21.4 y 22.9 ppm, respectivamente, y en RMN ^1H en 0.97, 2.35 y 0.87 ppm, respectivamente. El análisis de los desplazamientos químicos de los metilos permite proponer que los efectos de anisotropía solo operan en el espectro de RMN ^1H . Las diferencias para uno de los carbonos alfa se observan de -0.17 a -0.41 ppm y para el otro carbono alfa van de +0.74 a +1.35. Este estudio fue complementado con el tratamiento de los datos de acuerdo con el método de Mosher de RMN- ^1H . Los pequeños cambios en desplazamiento químico no permiten proponer la estereoquímica absoluta del carbono quiral unido al oxhidrilo. Se puede concluir que el efecto que gobierna el desplazamiento a campo alto de uno de los carbonos se debe a compresión estérica y no a efectos de anisotropía.



Rangos en las diferencias en desplazamiento químico en ppm

	^1H	^{13}C
CH(2)	-0.12 a -0.13	-0.17 a -0.41
CH ₂ (6)	+0.25	+0.74 a +1.35

Esquema 15. Análisis en la derivación para asignación de la configuración absoluta de la Corinantina usando los agentes de Mosher (MPA) y sus análogos.

Por otro lado, se conoce que los desplazamientos químicos en RMN-¹³C son afectados por la geometría molecular y compresión estérica, que se origina por grupos cercanos en el espacio que influyen fuertemente entre ellos; por lo que un carbono separado por varios enlaces puede afectar en el desplazamiento químico de otro carbono;⁹ lo que puede ayudar a explorar la asignación de la configuración absoluta por RMN-¹³C, ya que la naturaleza de los sustituyentes influye en la compresión estérica de diastereoisómeros. Tal es el caso del estudio previo para asignar configuración absoluta de alcoholes utilizando como agentes quirales los enantiómeros del tetraacetato de fucufuranosa y formar con estos los diastereoisómeros β-D y β-L-fucufuranosidos, los cuales desplazan a campo bajo el carbón oxigenado y a campo alto los carbonos alfa, debido a la cercanía 1,3-syn periplanar. En la Figura 6 se muestra el ejemplo para la derivación del colestanol-5α, donde se pueden observar las diferencias en desplazamientos químicos en RMN ¹³C para los carbonos cercanos al agente de derivación quiral. Lo que favorece los cambios de desplazamientos químicos por RMN-¹³C y permite asignar la configuración absoluta.¹⁰

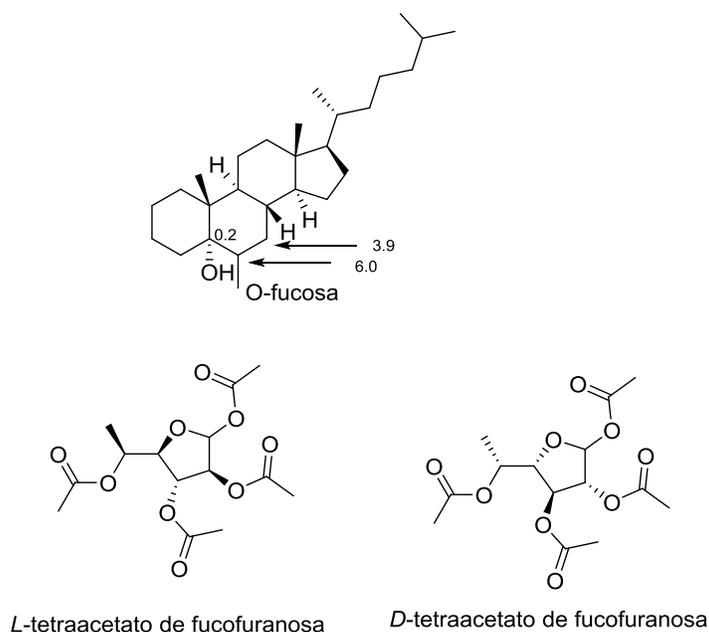


Figura 6. Método fucoranosa para asignación de la configuración absoluta de alcoholes. Diferencias entre desplazamientos químicos en RMN-¹³C de diastereoisómeros generados con el Colestanol-5α y los enantiómeros de tetraacetato de fucufuranosa.

Además, el uso de esta técnica presenta varias ventajas, aunque se requiere un mayor tiempo para adquirir el espectro de RMN ^{13}C , es una técnica que va acompañada de los experimentos de protón y tiene una mayor ventana espectral, de 200 ppm, lo que hace menos probable la superposición de señales, además de que cada carbono tiene una señal independiente.

2.2. Uso del ácido piroglutámico y sus derivados como agentes de derivación quiral.

Para resolver este reto, se propone el uso de piroglutamato de metilo como agente quiral, ya que éste se ha utilizado como auxiliar quiral,¹⁰ como sintón quiral para diversos productos naturales bioactivos,¹¹ como restrictivo conformacional de péptidos,¹² además, tiene una gran variedad de aplicaciones sintéticas,¹¹ lo que permite su unión a diferentes sustratos como aminas, alcoholes y ácidos carboxílicos que son grupos funcionales presentes en los productos naturales; a su vez, el piroglutamato es un compuesto quiral; tiene dos grupos carbonilo, uno de ellos forma una lactama que le permite adoptar una conformación preferente que puede causar efectos de compresión estérica.

Las dos antípodas del ácido piroglutámico como agente quiral, pueden ser modificadas al 1-clorometil-piroglutamato de metilo **19** (Figura 7), para su uso como agente quiral de derivación para la asignación de configuración absoluta de productos naturales que contengan alcoholes, el cual ya fue anteriormente estudiado en la asignación de configuración absoluta utilizando el efecto nuclear de Overhauser, a través del experimento NOESY,¹³ pero puede ofrecer mejores ventajas en su estudio por RMN- ^{13}C .

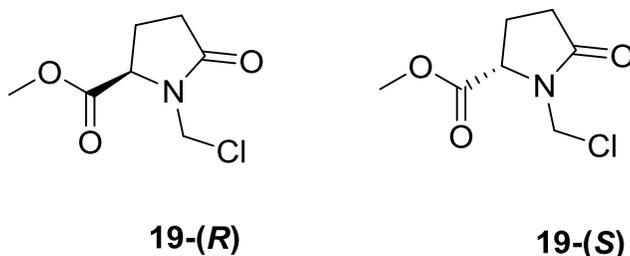
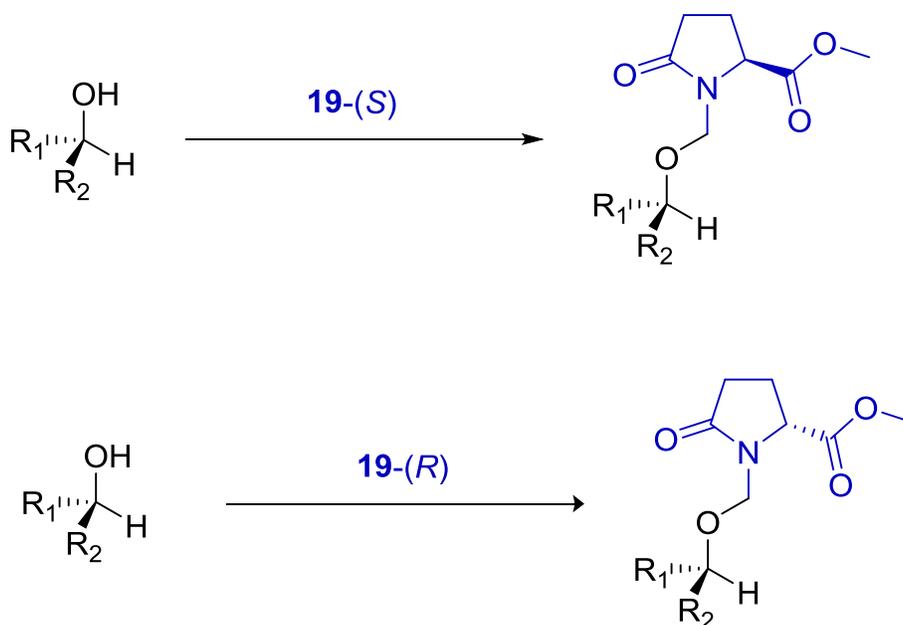


Figura 7. 1-clorometil-pirolglutamato de metilo 19.

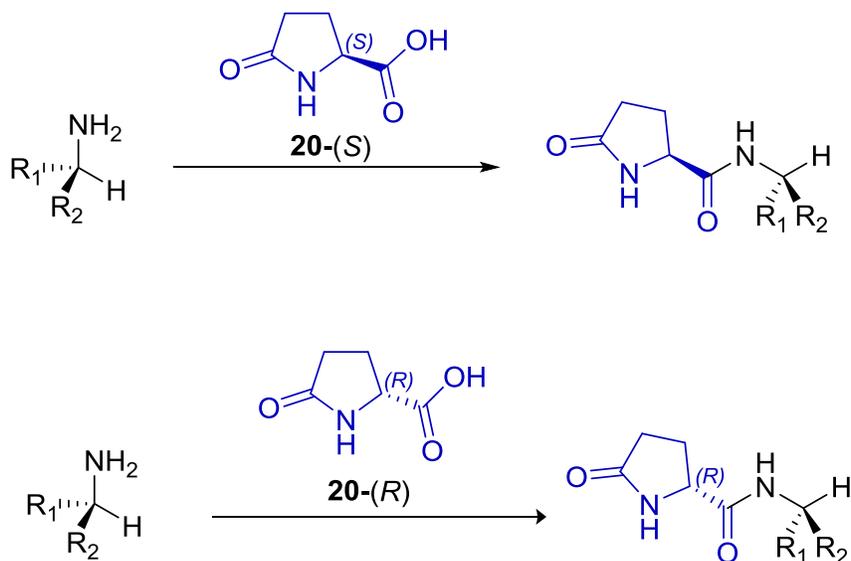
La metodología para asignación de configuración absoluta se realizó por medio de derivación doble, formando pares diastereoisoméricos, que se obtienen haciendo reaccionar ambos enantiómeros del agente de derivación quiral con un enantiómero de un alcohol de configuración absoluta conocida, formando isómeros *N*-alcoxi metilenos; posteriormente el par de diastereoisómeros se analizó por RMN-¹³C para estudiar sus desplazamientos químicos, analizando las diferencias entre estos y las correlaciones empíricas del carbono oxigenado al anclar el agente quiral, Esquema 16.



Esquema 16. Uso de 1 como agente de derivación quiral para alcoholes secundarios a quirales.

Los resultados experimentales se compararon con cálculos computacionales de modelado molecular, lo que permite predecir la conformación de los isómeros y los parámetros de RMN. Los cálculos de desplazamientos químicos están basados en la geometría de las moléculas de los estereoisómeros, por lo que es posible comparar los resultados experimentales con los cálculos computacionales, para confirmar la estereoquímica relativa.

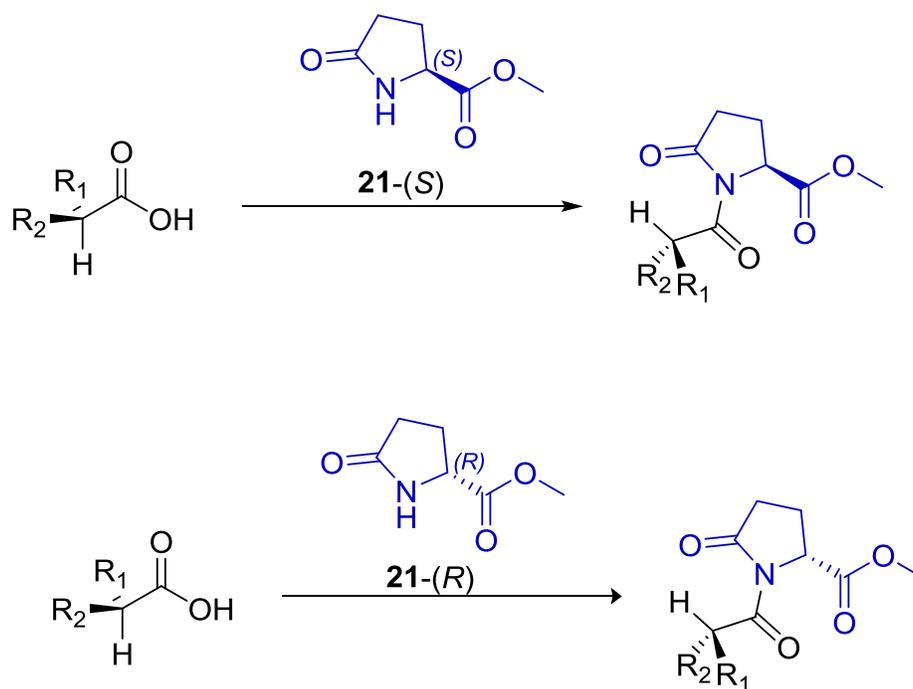
También se propone el uso del ácido piroglutámico **20** como agente quiral de derivación para asignar la configuración absoluta de aminas cercanas a un centro quiral, formando amidas diastereoisómericas o enlace peptídico, las amidas se analizaron por RMN en cuanto a sus desplazamientos y correlaciones empíricas y de la misma manera se realizará un estudio computacional de los parámetros de RMN y así realizar una metodología de asignación de configuración absoluta, Esquema 17.



Esquema 17. Uso del ácido piroglutámico como agente quiral de derivación para aminas.

Conjuntamente se propone el uso del piroglutamato de metilo como agente quiral de derivación, para crear una metodología de asignación de configuración absoluta de compuestos que contengan ácidos carboxílicos. En este caso se funcionaliza el nitrógeno del piroglutamato con un ácido carboxílico para formar

una imida, una vez obtenidos los diastereoisómeros correspondientes realizar el análisis por RMN y su estudio por cálculos teóricos (Esquema 18).



Esquema 18. Uso de piroglutamato de metilo como agente de derivación quiral para ácidos carboxílicos.

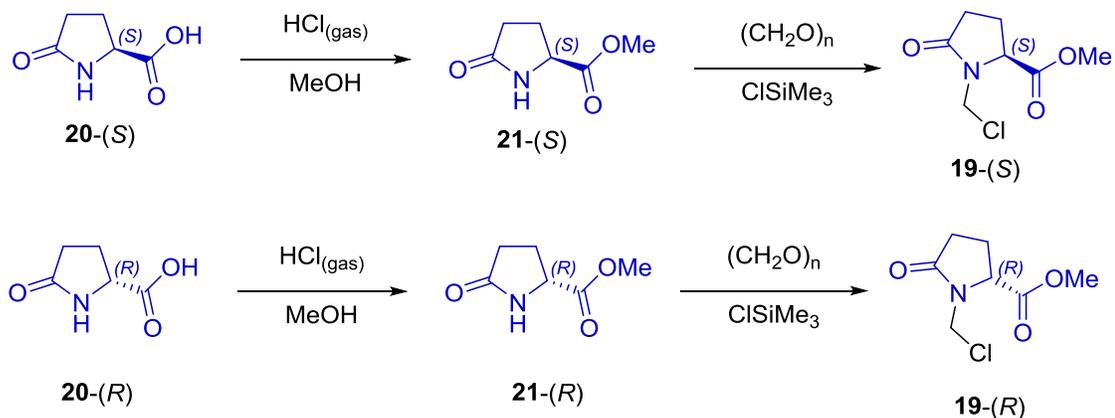
3. Discusión de resultados

3.1 Metodología para asignación de la configuración absoluta de productos naturales que contengan alcoholes usando 1-clorometil-piroglutamato de metilo1.

3.1.1. Metodología de formación de N-alcoximetilenos

Los agentes quirales **19**-(S) y **19**-(R) se prepararon a partir de los enantiómeros del ácido piroglutámico **20**, por esterificación con HCl gas en metanol seco para formar piroglutamato de metilo **21**, seguido de una reacción con paraformaldehído y clorotrimetilsilano (ClSiMe₃),¹⁵ como se observa en el

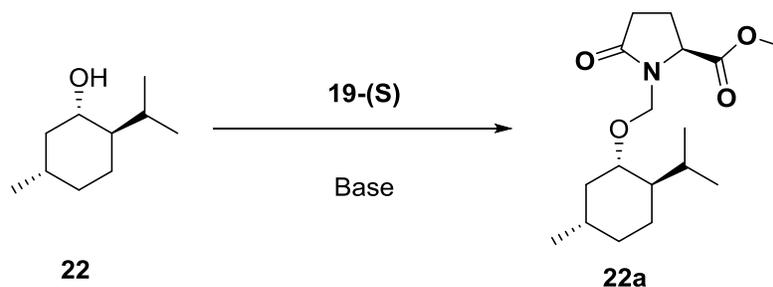
Esquema 19. Este agente quiral se purifica en un aparato de destilación al vacío Kugelrohr y se puede almacenar en refrigeración en un ambiente seco.



Esquema 19. Síntesis del agente quiral 1-Clorometil-piroglutamato de metilo metilo 19-(S) y 19-(R).

La formación de los derivados *N*-alcoximetilenos se estudió utilizando el (-)-mentol **22** como alcohol ejemplo, el cual se hizo reaccionar con el agente quiral **19**-(S), para formar el derivado **22a**. Se estudiaron dos metodologías: una por reacción de Williamson usando hidruro de sodio (NaH) como base, esta reacción se da eficientemente en tetrahidrofurano seco (THF) por 12h a reflujo. En la segunda metodología se utilizó triflato de plata (AgOTf) en diclorometano seco; esta reacción requiere el uso de una base para atrapar el HCl que se genera y evitar la deshidratación del alcohol, además de que la base que se utilice no sea nucleofílica para evitar el desplazamiento del cloruro del derivado **19**, en este caso se usó la hidrotalcita (HT) como base sólida, asimismo, la reacción se debe llevar a cabo en ausencia de luz; en estas condiciones la reacción es mucho más rápida, 3 h, aunque el rendimiento es menor. Ambas metodologías son eficientes para la formación de diastereoisómeros *N*-alcoxi derivados, pero su uso va a depender del alcohol en estudio.

Tabla 1. Estudio de formación de diastereoisómeros *N*-alcoximetilenos usando 19-(*S*) y 19-(*R*).



Base	Disolvente	Tiempo (h)	Rendimiento %
NaH 1.2 eq	THF	14	65
NaH 4 eq	DCM	24	trazas
AgOTf 1.2 eq	DCM	2	Deshidratación
AgOTf 1.2 eq/HT	DCM	3	41
AgOTf 1.2 eq/HT	THF	3	40

Para preparar los derivados diastereoisoméricos y realizar el estudio de RMN se utilizaron diferentes alcoholes provenientes de productos naturales, lo cuales se muestran en Figura 8, algunos son comerciales y otros provienen de fuentes naturales como el éster metílico del ácido ursólico **23**; el alcohol **24** se obtuvo a partir de la estrona, de la cual se formó el éter metílico del fenol con yoduro de metilo y se redujo la cetona de C-17 al alcohol con borohidruro de sodio. El alcohol **25** se obtuvo de la hidrólisis con hidróxido de litio de 3-O-[2,3-epoxi-2-metilbutiroil]cuaughtemona.

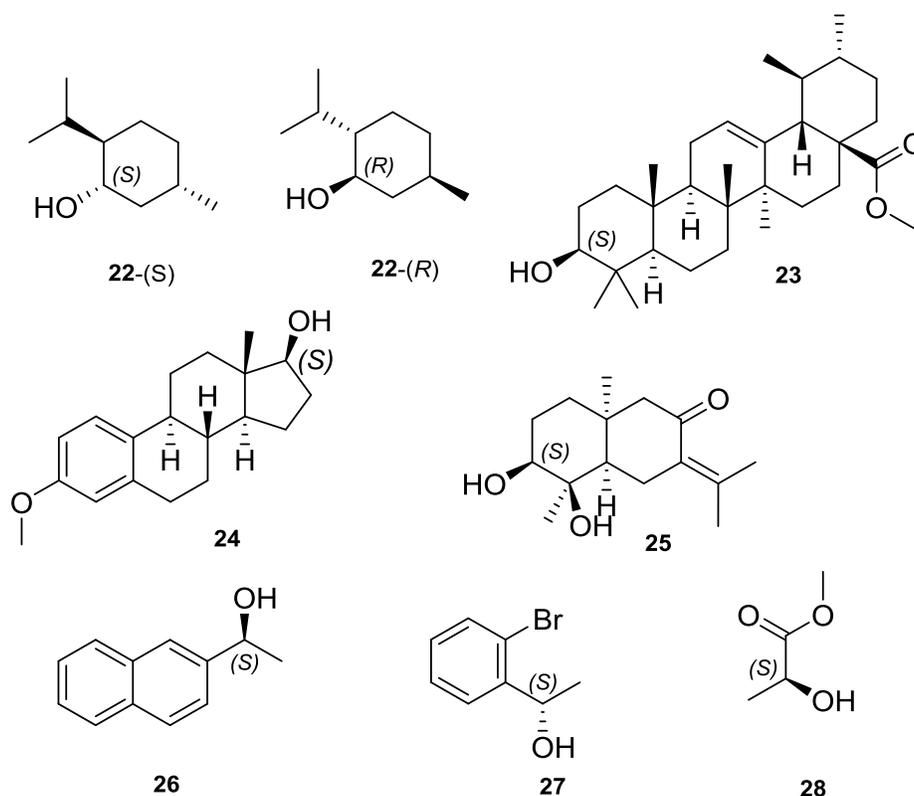
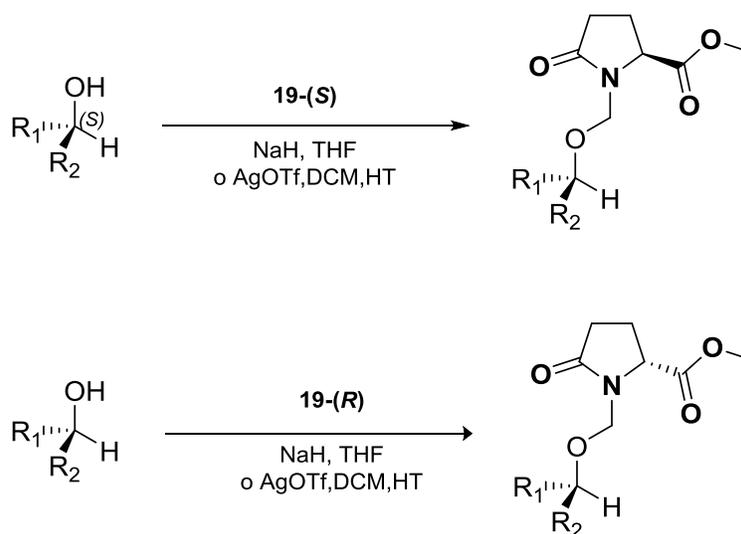


Figura 8. Alcoholes estudiados con centro estereogénico cercano.

La formación de derivados se realizó haciendo reaccionar cada alcohol separadamente con ambos enantiómeros del agente quiral **19**, excepto con el mentol **22**, en este caso los isómeros se prepararon con ambos enantiómeros del mentol y el agente quiral **19**-(S). La preparación se realizó con las metodologías descritas para la formación de *N*-alcoximetilenos, con NaH/THF (método A) o con AgOTf/HT (método B). En la Tabla 2 se muestra la metodología utilizada para cada alcohol y sus rendimientos. En términos generales, en la derivación de alcoholes cíclicos se utilizó el método A ya que todos excepto el mentol, no reaccionan con AgOTf. El alcohol **25** tiene un alcohol terciario, el cual no fue protegido, en este caso la reacción fue selectiva al alcohol secundario. Por otro lado, los alcoholes lineales **26**, **27** y **28** se derivaron con el método B. Todos los derivados obtenidos se purificaron por cromatografía en columna, los rendimientos son mayores para los derivados formados con **19**-(S) que con **19**-(R).

Tabla 2. Síntesis de diastereoisómeros 1-(alcoximetil)-metil-2-carboxilato de metilo. Método A (NaH 1.2 eq, THF, reflujo) método B (AgOTf 1.2 eq, HT, DCM)



R₁ de mayor prioridad que R₂

Alcohol	Agente quiral	Metodología	Rendimiento (%)
2-(S)	19-(S)		65
2-(R)	19-(S)		52
3	19-(S)		28
	19-(R)		16
4	19-(S)	A	57
	19-(R)		53
5	19-(S)		53
	19-(R)		45
6	19-(S)		31
	19-(R)		17
7	19-(S)	B	34
	19-(R)		71
8	19-(S)		46
	19-(R)		20

3.1.2 Análisis de RMN de los derivados *N*-alcoximetilenos

En este punto cabe mencionar los aspectos básicos que influyen en el desplazamiento químico de los espectros de RMN-¹³C, con los que se justifica la asignación de los espectros para esclarecer la configuración absoluta del carbinol de diversos alcoholes estudiados.

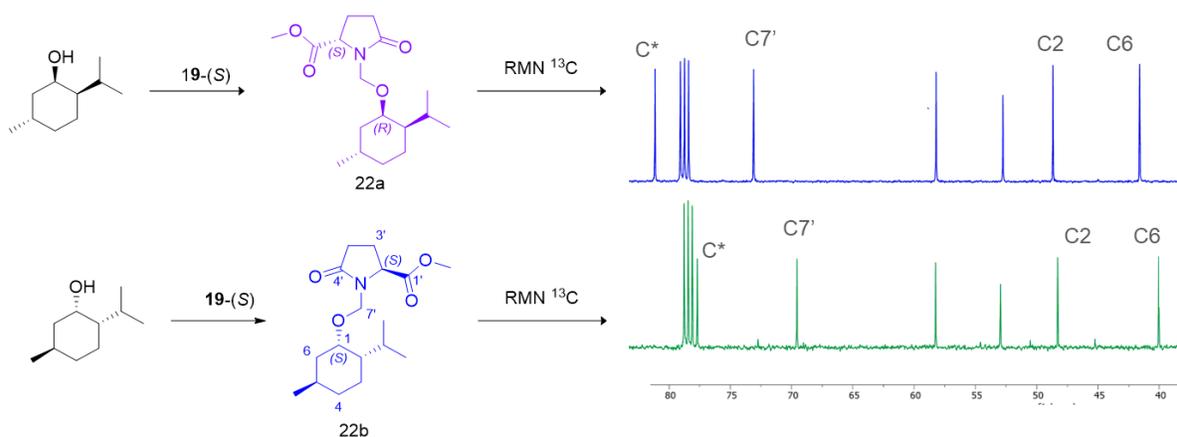
Los efectos que influyen en el desplazamiento químico de cada carbono en RMN-¹³C en orden de importancia son: hibridación del carbono y electronegatividad de los grupos unidos a éste. Otros de menor magnitud, pero de gran importancia, son aquellos debidos a la presencia de los sustituyentes α y β unidos a un carbono que ejercen efectos de desprotección, produciendo un desplazamiento a campo bajo de aproximadamente 9 ppm. Otro efecto muy importante que se relaciona con las cuestiones estereoquímicas y conformacionales, es el que ejercen los sustituyentes γ , que causan un desplazamiento a campo alto de 2 a 5 ppm, debido al efecto de compresión estérica. Para ejemplificar lo anterior; la derivación de un oxidrilo para la formación de ésteres o éteres genera un desplazamiento a campo bajo del carbono unido al oxígeno al tener un nuevo sustituyente β . Los carbonos vecinos al carbono unido al oxígeno son desplazados a campo alto por tener un nuevo sustituyente γ . Otro efecto de protección se observa en los carbonos unidos a un carbono con hibridación *sp*, como los carbonos unidos a un acetileno.

Debe tenerse en cuenta que esta propuesta de metodología considera que la estereoquímica relativa del producto a analizar debe ser definida con anterioridad, así como la asignación del espectro de RMN-¹³C, ya que solo se determinará la estereoquímica absoluta del grupo carbinol a través de la derivación del grupo oxhidrilo, la comparación y análisis de los desplazamientos químicos del carbinol y sus carbonos α en los espectros de RMN-¹³C de ambos compuestos.

Con este fin cada par de diastereoisómeros fue analizado por RMN-¹³C y ¹H, se compararon todos los desplazamientos químicos calculando las diferencias entre el isómero preparado con 19-(*S*) menos el isómero preparado con 19-(*R*) ($\Delta d_{S-R} = d_S - d_R$). Para el caso del mentol, se utilizaron los enantiómeros del alcohol y el

agente quiral 1-(*S*) las diferencias se calcularon entre el isómero preparado con alcohol unido al carbinol de configuración absoluta (*S*) ((+)-mentol) menos el preparado con el alcohol con el carbinol de configuración (*R*) ((-)-mentol).

Los desplazamientos químicos en RMN-¹H entre ambos isómeros son prácticamente los mismos. Por el contrario, en RMN-¹³C existen diferencias significativas en los desplazamientos químicos entre los diastereoisómeros, como se observa en el Esquema 20, para el caso del mentol, donde se compararon los desplazamientos químicos entre los isómeros **22a** y **22b**, cómo se puede observar, los desplazamiento químicos son diferentes en cada isómero, el carbono estereogénico C(1) para **22a** tiene un desplazamiento químico de 79.5 ppm a diferencia del isómero **22b** donde este carbono tiene un desplazamiento químico de 76.4 ppm es decir, si se calcula la diferencia de los desplazamientos químicos $\Delta\delta_{S-R}$ tenemos que la diferencia es de 3.1 ppm. Existe un comportamiento similar para el metileno C(7') del asistente quiral donde observamos que su $\Delta\delta_{S-R}$ es de 3.3 ppm. También observamos un cambio en los desplazamientos químicos de los α -carbonos C(2) y C(6) los cuales presentan una $\Delta\delta_{S-R}$ de 1.8 y 0.3 ppm respectivamente



*Esquema 20. Análisis de los desplazamientos químicos en RMN ¹³C de 400 MHz de los diastereoisómeros **22a** y **22b** formados con ambos enantiómeros del mentol y 19-(*S*).*

Así como en el análisis del mentol, en todos los derivados formados se observaron diferencias similares, las cuales se resumen en la Figura 10, a las diferencias más

importantes se observan en los carbonos unidos o cercanos al oxígeno del oxhidrilo; en el metileno del *N*-alcoximetileno, en el carbono estereogénico del alcohol y los carbonos- α a este. Para el *N*-alcoximetileno las diferencias pueden ser de hasta 3.7ppm, para el carbono estereogénico de hasta 3 ppm y para los carbonos alfa estas diferencias suelen ser menores, pero igualmente significativas.

Al analizar los desplazamientos químicos de los estereoisómeros, las diferencias ($\Delta\delta_{S-R}$) obtenidas presentan signos, lo que muestra una tendencia; que depende de la configuración del carbinol, del agente quiral y de la naturaleza del alcohol (si este es lineal o cíclico). Para los alcoholes cíclicos los isómeros (*S*)-(*S*) o (*R*)-(*R*) (configuración del carbinol- configuración del agente quiral) se encuentran a campo más bajo que los desplazamientos de los isómeros (*S*)-(*R*) o (*R*)-(*S*). Por esta razón, cuando el derivado de un alcohol cíclico con carbono estereogénico (*S*), se obtendrá una $\Delta\delta_{S-R}$ positiva; por otro lado, será negativa para un centro estereogénico (*R*). El caso contrario es para los alcoholes lineales, los isómeros (*S*)-(*R*) y (*R*)-(*S*) se encuentran a campo más bajo que los desplazamientos de los isómeros (*S*)-(*S*) o (*R*)-(*R*). Por esto, un alcohol lineal derivado con carbono estereogénico (*S*), la $\Delta\delta_{S-R}$ será negativa; y será positiva para un centro estereogénico de configuración (*R*).

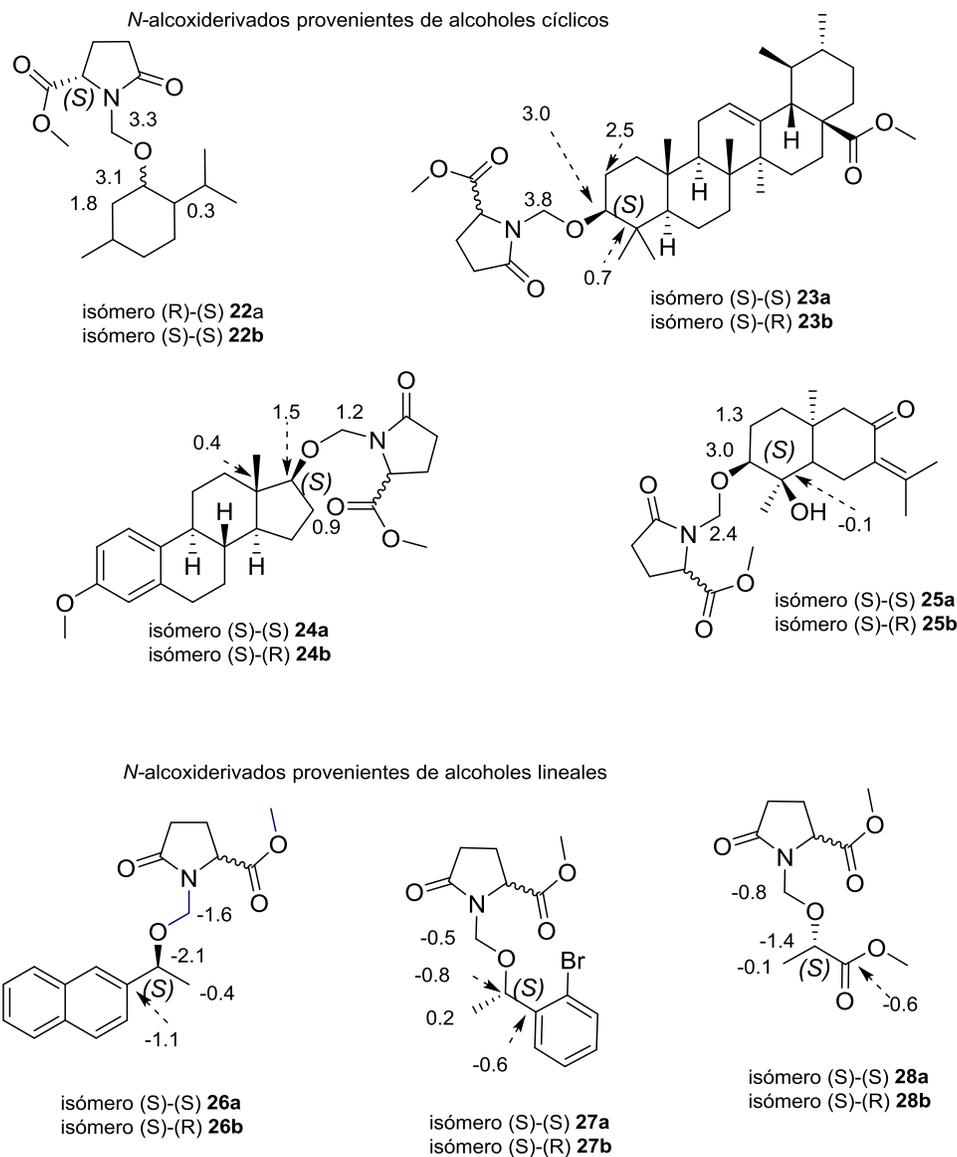


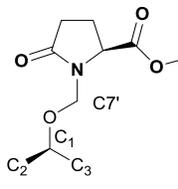
Figura 10. $\Delta\delta_{S-R}$ de RMN- ^{13}C entre diastereoisómeros *N*-alcoxi derivados. Isómero (S)-(S) o (R)-(R) (Centro estereogénico del carbinol)-(Centro estereogénico del agente quiral).

Las diferencias generadas en los desplazamientos químicos se compararon con cálculos computacionales; para esto, se realizó una búsqueda conformacional para cada molécula empleando mecánica molecular MMFF94. Las diferencias generadas en los desplazamientos químicos se compararon con cálculos computacionales; para esto, se realizó una búsqueda

conformacional para cada molécula empleando mecánica molecular MMFF94 para asegurar la conformación de menor energía. Después se realizó la optimización en fase gas empleando la base B3LYP/6-311+(2d, p), usando el método GIAO (Gauge Including Atomic Orbital) para calcular los parámetros de RMN.¹⁵ De esta forma se obtuvieron los tensores de desplazamientos para cada núcleo de carbono en cada derivado formado.

Con los tensores de desplazamientos químicos se calcularon las deltas restando al isómero con 1-(R) el isómero preparado con 1-(S) ($\Delta\delta_{S-R} = \delta_S - \delta_R$), los resultados se muestran en la Tabla 3. Como podemos observar, la correlación con los datos experimentales en signos, lo que nos da una buena reproducibilidad para la asignación de la configuración absoluta por cálculos teóricos.

Tabla 3. $\Delta\delta_{S-R}$ de desplazamientos químicos entre diastereoisómeros N-alcoxi derivados en RMN¹³. Comparación entre datos experimentales y datos calculados en GIAO/B3LYP (fase gas) /6-31+G(d) considerando los conformeros de menor energía. C2 es carbono de mayor prioridad entre este y el C(3).

Derivados	$\Delta\delta_{S-R}$ Experimentales				$\Delta\delta_{S-R}$ Calculadas			
	C(1)	C(2)	C(3)	C(7)'	C(1)	C(2)	C(3)	C(7)'
								
2a-2b	3.1	0.3	1.8	3.3	3.3	0.2	0.5	1.5
3a-3b	3.0	0.7	2.5	3.8	-0.3	-0.2	-0.2	-0.1
4a-4b	1.5	0.4	0.9	1.2	0.5	0.1	0.04	0.8
5a-5b	3.0	-0.1	1.3	2.4	7.1	2.6	-0.3	2.3
6a-6b	-2.7	-1.5	-0.4	-1.5	-1.3	-0.9	-1.1	-2.8
7a-7b	-0.8	-0.6	0.2	-0.5	3	-0.6	5	0.9
8a-8b	-1.4	-0.6	-0.1	-0.8	-3.8	-0.7	-5	-0.6

Los estudios de mecánica molecular son útiles para estudiar la conformación que adquiere cada uno de los derivados preparados, basado en optimización de la geometría, Figura 11. Se observa que la conformación adoptada por el anillo de la lactama permite al grupo éster metílico que está anclado al anillo, afectar al grupo *N*-alcoximetileno por cercanía, generando los cambios en los desplazamientos químicos del carbono metileno, esto también afecta el carbono estereogénico del alcohol y sus carbonos alfa, modificando los desplazamientos químicos entre ellos.

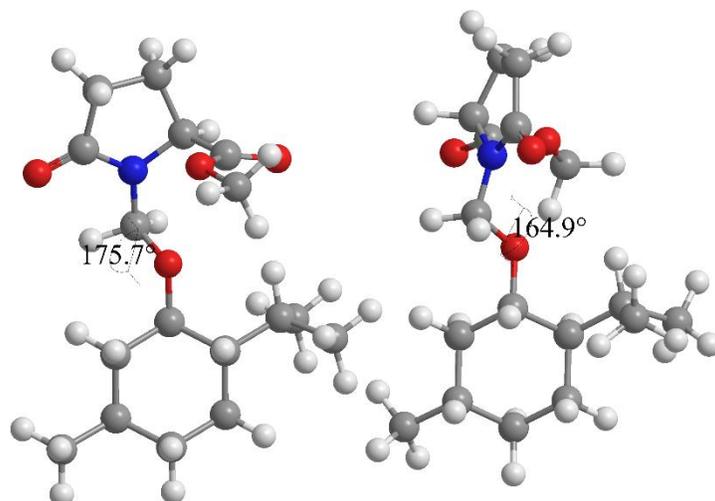


Figura 11. Conformación observada para los derivados del mentol.

Además, se observa un cambio en el ángulo diedro del fragmento formado entre cuatro átomos, el nitrógeno de la lactama, el metileno del alcoximetileno, el oxígeno y el carbono estereogénico del carbinol $N-CH_2-O-CH$, del *N*-alcoximetileno entre derivados, en la Tabla 4 se resumen estos ángulos. Como podemos observar, los isómeros (*S*)-(*S*) muestran un ángulo diedro más grande que los isómeros (*S*)-(*R*).

Tabla 4. Ángulo diedro del fragmento *N*-alcoxi-metileno *N*-CH₂-O-CH

Alcohol	19 -configuración	Ángulo diedro
2.1(S)	(S)	175.69
2.2(R)	(S)	164.94
3(S)	(S)	179.2
	(R)	175.24
4(S)	(S)	175.25
	(R)	104.189
5(S)	(S)	173.919
	(S)	136.74
6(S)	(S)	162.571
	(R)	162.571
7(S)	(S)	92.903
	(R)	89.798
8(S)	(S)	89.75
	(R)	84..93

Como es de esperar, al derivar el alcohol con los enantiómeros del agente quiral **19**, los desplazamientos químicos son distintos, porque se realiza un análisis comparativo de como este agente quiral modificó los desplazamientos químicos del alcohol, por correlación de desplazamientos químicos. Lo que también puede ayudar a la predicción de configuración absoluta. En la Tabla 5, se detalla, como se modificaron los desplazamientos químicos en RMN-¹³C, del carbono estereogénico C (1) y sus carbonos alfa C(2) y C(3); siendo C(2) el de mayor prioridad. En general observamos, que se produce una desprotección de C(1) una

protección de los α -carbonos, pero este efecto va a depender de la naturaleza del alcohol, si es cíclico o lineal.

Cuando el alcohol es cíclico de configuración (S), la adición de **19-(S)** desprotege C(1) 6 a 9 ppm, mientras que la adición de **19-(R)** da una menor desprotección de 4 a 6.6 ppm; por el contrario, los α -carbonos son protegidos de 0.3 a 3ppm por **19-(S)** y 0.7-3.4 ppm por **19-(R)**, los efectos α son claramente menos significantes cuando el carbono es cuaternario como en los alcoholes, **23, 24 y 25**.

La adición del AQD 19-(S) a alcoholes lineales de configuración (S) desprotege C(1) 5ppm, y 19-(R) desprotege de 6 a 7 ppm, los α -carbonos son más protegidos que los alcoholes cíclicos, 0.9-3.12 ppm por **19-(S)** y 1.2-24 por **19-(R)**.

A su vez, estos datos se compararon con cálculos teóricos, determinando las correlaciones en RMN-¹³C del alcohol al adicionar el ADQ **19**, por lo que se realizaron también los cálculos de los tensores de desplazamientos químicos de los alcoholes sin derivar para comparar con los derivados, los resultados se muestran también en la Tabla 5. Los alcoholes cíclicos de configuración (S) con la adición de **19-(S)** desprotege a C(1) de 6-10 ppm, excepto los alcoholes ursólico y estradiol en este caso se protege 14 ppm; la adición de **19-(R)** desprotege 3 ppm, lo cual no tiene correlación con los datos experimentales. Pero para el caso de los α -carbonos a C(1) son desprotegidos por la adición de **19-(S)** y **19-(R)** aunque no en correlación con los datos experimentales.

Tabla 5. Efecto en los desplazamientos químicos en alcoholes por efecto de **19**, en negro los datos experimentales y el azul los datos calculados.

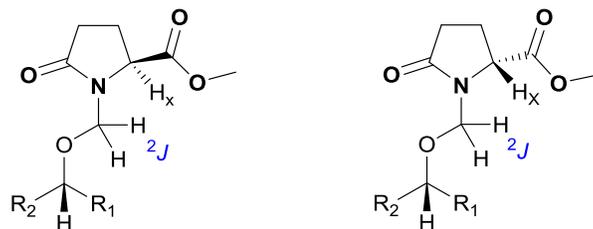
Alcohol	Efecto de 19-(S)			Efecto de 19-(R)		
	C1	C2	C3	C1	C2	C3
Alcoholes cíclicos						
2.1(S)	+8	-1.5	-3.1			
	+9.8	+2.4	-6.7			
2.2(R)	+4.9	-2.1	-4.9			
	+6.5	+2.2	-7.2			
3(S)	+9.0	-0.3	-3.3	+6.0	-1.0	-2.4
	-14.2	-15	-21	-13.5	-17.8	-17.8
4(S)	+6.3	-2.5	-0.4	+4.8	-3.4	-0.7
	-14.2	-16.1	-18.5	-14.7	-16	-18.6
5(S)	+7.5	-0.8	-2.8	+4.6	-0.7	-4.2
	+10	+2.3	-2.5	+3.1	-0.02	-2.5
Alcoholes lineales						
6(S)	+5.3	-2.9	-1.8	+6.7	-2.4	-1.8
	+5.4	-4.7	-14.5	+6.7	-3.6	-13.6
7(S)	+5.1	-3.1	-1.6	+7.2	-2	-4.1
	+7.2	+0.9	-5.3	+4.1	-3.3	-10.3
8(S)	+5.4	-2.3	-0.9	+6.2	-1.8	-1.2
	+11.3	-5.5	-2	+7.5	-6.2	-1.8

3.1.3 Constates de acoplamiento en RMN-¹H

En el experimento de RMN-¹H, ya se mencionó que los desplazamientos químicos entre diastereoisómeros son muy similares entre ellos, ya que los efectos de anisotropía no son muy fuertes, pero observamos que las constantes de acoplamiento (J) son diferentes entre cada par. Las constantes acoplamiento que presentan cambio son las del dd del centro estereogénico C-2 (H_x) del piroglutámico y la constante de acoplamiento geminal 2J del sistema AB correspondiente a los hidrógenos del *N*-alcoxi metileno, Tabla 6. La primera J en general es cercana a 9 y entre diastereoisómeros se da una diferencia de 0.2 a 0.5 Hz; siendo de menor valor para isómeros (*R*)-(*S*) o (*S*)-(*R*), que la de los isómeros (*S*)-(*S*) y (*R*)-(*R*). Para el caso de la 2J la diferencia entre diastereoisómeros puede ser de hasta 1Hz, para los isómeros (*R*)-(*S*) o (*S*)-(*R*) la 2J es mayor, aproximadamente 11 Hz, que la 2J de los isómeros (*S*)-(*S*) y (*R*)-(*R*).

Este análisis es importante porque ayuda a complementar la información conformacional de los derivados; en este caso la constante geminal del *N*-alcoximetileno es afectada por los sustituyentes α y β , los sustituyentes α son dos grupos electronegativos, el nitrógeno de la lactama y oxígeno; pero es igual para cada para de diastereoisómeros. En cambio, los sustituyentes β son los carbonos estereogénicos, uno el de la pirrolidona y el otro pertenece al carbono estereogénico anclado al alcohol, que cambian en cada par de isómeros, los que influye fuertemente en el cambio de la constante de acoplamiento geminal, y a su vez afecta el ángulo diedro de los isómeros, lo cual ya observamos en el estudio conformacional, Figura 11, Tabla 4.

Tabla 6. Constantes de acoplamiento del Sistema AB y el H_x de la pirrolidona en RMN- 1H de los derivados diastereoisoméricos



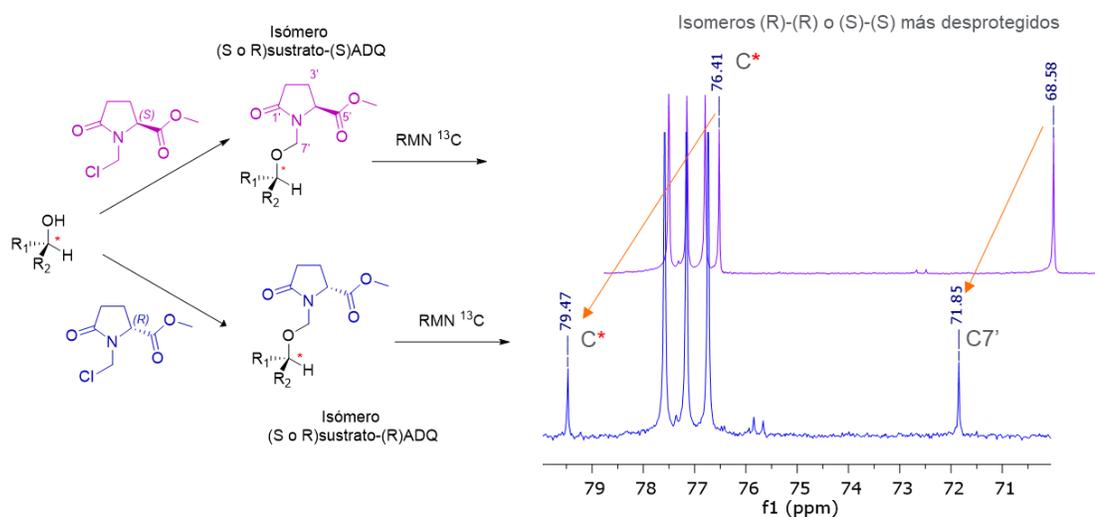
Alcohol	$^2J(\text{Hz})$		$J(\text{Hz}) \times$	
	ab	Isómero	dd	Isómero
	Isómero (S)(S)	Isómero o (R)(S)	Isómero (S)(S)	Isómero o (R)(S)
2	9.9	11.2	8.9, 3.7	9.2, 3
4	10.3	11.1	8.6, 3.2	9, 2.9
3	10.5	10.6	8.9, 3.2	8.9, 3.2
5	10.7	10.6	8.8, 3.7	8.3, 3.6
6	10.6	11.1	8.7, 3.3	8.9, 3.2
7	10.4	10.8	8.9, 3.4	9.5, 2.7
8	10.8	11.4	9, 3.4	8.9, 3.2

3.1.4 Asignación de la configuración absoluta por doble derivación

Todo lo anterior nos ayuda a poder asignar la configuración absoluta de productos naturales que contengan alcoholes por doble derivación para esto debemos seguir la siguiente regla, que también se ilustra en el Esquema 21:

1. Derivar el alcohol utilizando **19-(R)** y **19-(S)** separadamente para obtener el par de diastereoisómeros *N*-alcoximetilenos.
2. Obtener la espectroscopia RMN- ^{13}C y asignar las señales para los carbonos metileno del *N*-alcoxi metileno, para el carbono estereogénico del alcohol y sus α -carbonos.

3. Calcular las diferencias entre los desplazamientos químicos ($\Delta\delta_{S-R}$) para cada carbono entre el isómero preparado con **19-(S)** menos el isómero preparado con **19-(R)** ($\Delta\delta_{S-R} = \delta_S - \delta_R$).
4. Si el alcohol es cíclico; y se obtienen $\Delta\delta_{S-R}$ con signo **positivo**, el carbono estereogénico tiene una configuración (*S*), si resulta negativa la configuración es (*R*). Ya que el isómero formado con **19-(S)** estará más desprotegido.
5. Si el alcohol es lineal; y se obtienen $\Delta\delta_{S-R}$ con signo **negativo**, el carbono estereogénico tiene una configuración (*R*), si resulta positiva la configuración es (*S*). Ya que el isómero formado con **19-(R)** estará más desprotegido.
6. También podemos apoyarnos de los cálculos teóricos calculando las deltas de desplazamiento.



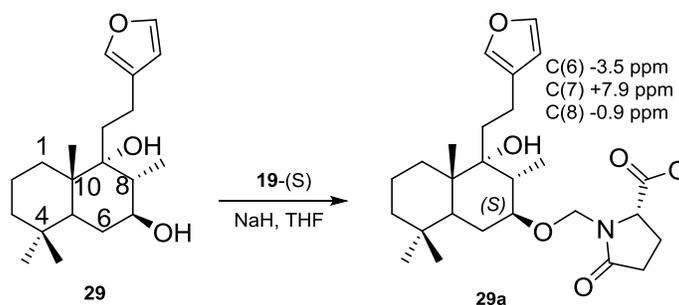
Esquema 21. Metodología general de asignación de configuración absoluta de alcoholes secundarios usando 19 con ADQ y RMN ^{13}C .

3.1.5 Asignación de la configuración absoluta por una sola derivación

Todos estos resultados son clave para la asignación de la configuración absoluta, lo que también puede ayudar a realizar la asignación de configuración absoluta de alcoholes por una sola derivación, es decir, preparando solo un derivado con el alcohol y un enantiómero del agente quiral, basándonos en la Tabla 5, y comparando el efecto de cambio de desplazamientos químicos al adicionar al alcohol el agente quiral.

Para comprobar su eficacia se utilizó la hispanolona (un labdano diterpenoide), la cual fue reducida con NaBH_4 , al alcohol- β **29**,¹⁷ y el epóxido del diterpenoide aislado de *Viguiera insignis* **30**¹⁸ que tiene dos alcoholes secundarios. Ambos compuestos se derivaron utilizando el agente quirál **19**-(S) y se evaluó su configuración absoluta por correlaciones empíricas en RMN-¹³C, Tabla 5, y por constante de acoplamiento en RMN-¹H, Tabla 6.

Para el caso de la hispanolona reducida **29**, la derivación se llevó a cabo selectivamente en el alcohol secundario, manteniendo el alcohol terciario sin derivar, Esquema 22. En el análisis de los desplazamientos químicos para los carbonos C-6, C-7 y C-8 en el derivado que contiene el ADQ **19**-(S), comparado con el espectro que tiene el grupo oxhidrilo libre. El carbono unido al oxígeno se desplaza 7.9 ppm a campo bajo, los carbonos- α se protegen; el carbono metileno C-6 y el metino C-8 se desplazan a campo alto 3.5 y 0.9 ppm, respectivamente. La magnitud del desplazamiento químico del carbinol y los carbonos- α al derivarlo con **19**-(S), confirman que el carbono del alcohol secundario tiene configuración **S**. Además, al analizar la magnitud de la constante de acoplamiento geminal del metileno del grupo $N\text{-CH}_2\text{-O}$ es de 10 Hz, por lo que el carbono estereogénico se confirma que es de configuración (S), ya que una mayor constante cercana a 11 Hz correspondería a la configuración opuesta.

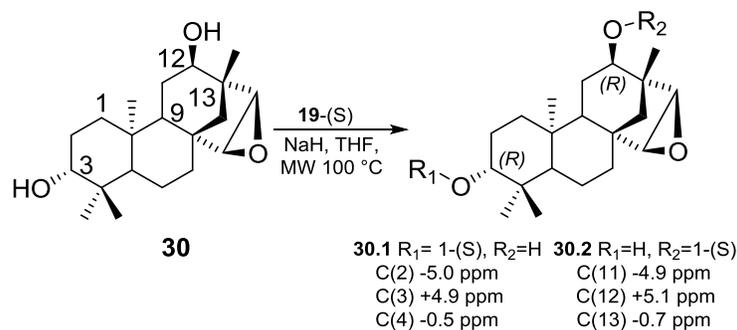


*Esquema 22. Derivación de **29** con **19**-(S), para asignación de configuración absoluta por una sola derivación.*

Por otro lado, el diterpenoide **30** tiene dos alcoholes secundarios. En este caso la adición de **19**-(S) no fue selectiva, ya que se derivó separadamente en ambos

alcoholes, obteniendo los isómeros **30.1** y **30.2** en mezcla, Esquema 23. Afortunadamente la mezcla de ambos alcoholes es claramente diferenciable en RMN-¹³C, sin traslape de señales, lo que permite realizar la correlación para ambos carbonos estereogénicos y obtener su configuración absoluta. El isómero **30.1**, que fue derivado en el alcohol del carbono estereogénico 3, fue desprotegido 5 ppm con respecto al alcohol, de la misma manera que un carbono (*R*) cíclico al adicionar 19-(*S*). Los carbonos (*R*) son menos desprotegidos que los (*S*) como en el caso del alcohol ursólico 3. Los carbonos- α a C3 el carbono cuaternario y el metileno fueron protegidos 5 y 0.5 ppm como los carbonos (*R*). La constante geminal es 10.7 Hz cercana a 11 Hz, lo que confirma la configuración (*R*) de este carbono.

Para el isómero **30.2** que fue derivado en el alcohol del carbono C(12), fue desprotegido 5.1 ppm como un carbono (*R*) y los carbonos- α el carbono cuaternario y el metileno fueron protegidos 0.7 y 4.9 ppm, además la constante de acoplamiento es 10.7 Hz confirmando la configuración (*R*) del carbono C(12).



Esquema 23. Derivación de 30 con 19-(S), para asignación de configuración absoluta por correlaciones empíricas.

Con estos datos podemos aplicar la siguiente regla para asignación de configuración absoluta usando una sola derivación.

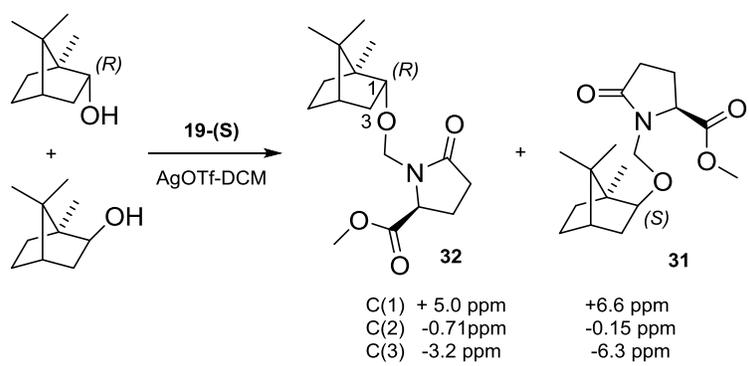
1. Derivar el alcohol utilizando **19-(R)** o **19-(S)** para obtener un estereoisómero.
2. Obtener la espectroscopia RMN-¹³C para el alcohol y el diastereoisómero obtenido y asignar las señales para el carbono estereogénico C(1) del alcohol y sus α -carbonos.

3. Si el alcohol es cíclico y se derivó con **19**-(*S*) y C(1) es desprotegido de 6-9 ppm y sus α -carbonos son protegidos. El centro estereogénico es (*S*). Un menor valor nos dará una configuración (*R*).
4. Si el alcohol es lineal, se derivó con **19**-(*S*) y C1 es desprotegido de 5 ppm y sus carbonos alfa son protegidos. El centro estereogénico es (*S*). Un mayor valor de 6-7 ppm nos dará una configuración (*R*).

3.1.6 Doble derivación en mezcla

Se sabe que los estereoisómeros tienen propiedades físicas diferentes, por lo que, una mezcla de estereoisómeros es distinguible tanto en su estructura como en su concentración por los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C . Para conocer el alcance de esta metodología, se obtuvo por reducción del (-)-alcanfor, con NaBH_4 , la mezcla de estereoisómeros (+)-isoborneol **31** y (-)-borneol **32** en una relación 8:2.

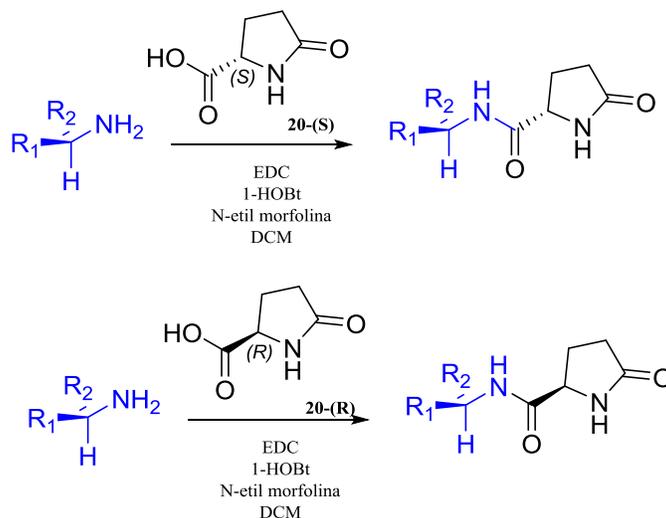
Como la mezcla de alcoholes proviene del (-)-alcanfor que tiene definidos sus centros asimétricos, la reducción del carbonilo genera los alcoholes epiméricos con los hidroxilos *endo* y *exo*, por lo que solo se tiene que asignar la estereoquímica de cada uno de los carbonos oxigenados. La mezcla de alcoholes se derivó con el ADQ **19**-(*S*). La comparación de los espectros de RMN ^{13}C de la mezcla de alcoholes con los derivados con **19**-(*S*), permiten analizar las diferencias en desplazamiento químico y correlacionar con los resultados previos. Se encuentra que el carbono oxigenado del derivado del isoborneol se desplazó 6.6 ppm a campo bajo, mientras que en el borneol se desprotegió 5 ppm. El N-alcoximetileno del isoborneol se protegió 6.3 ppm y el del borneol 3.2 ppm (Esquema 24). Debido a que la derivación de la mezcla de alcoholes fue con **19**-(*S*) y el carbono oxigenado de isoborneol se encuentra más desprotegido que el carbono del borneol, el isoborneol tiene la configuración (*S*) en el carbono oxigenado. Las correlaciones empíricas determinadas por RMN ^{13}C están en buena correspondencia con todos los datos analizados.



Esquema 24. Derivación doble de la mezcla de (-)-borneol y (+)-isoborneol con **19-(S)**.

3.2. Estudio del ácido piroglutámico como agente de derivación quiral de aminas α -quirales RMN

Para desarrollar una metodología de la asignación de la configuración absoluta de aminas, se estudió al ácido piroglutámico como agente quiral de derivación. Se analizaron aminas quirales provenientes de aminoácidos, las cuales se hicieron reaccionar separadamente con ambos enantiómeros del agente de derivación quiral **20**, para formar dos amidas diastereoisoméricas. La reacción de formación de amidas se realizó con HOBt (1-hidroxibenzotriazol), EDC (*N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida), utilizando como base la *N*-etil morfolina en diclorometano, Esquema 25. Las amidas diastereoisoméricas se formaron con las aminas: fenilalanina éster metílico, triptófano éster metílico, leucina éster metílico, valina éster bencílico, prolina éster bencílico, serina éster bencílico y (*S*)-(-)-1-naftil-etil-amina, todas de configuración absoluta (*S*).



Esquema 25. Formación de amidas diastereoisoméricas.

Cada par de diastereoisómeros se analizó por RMN-¹³C y ¹H, con el fin de observar si se generan diferencias en sus desplazamientos químicos, mediante el cálculo de delta $\Delta\delta_{S-R}$; (donde δ_S es el desplazamiento químico para el diastereoisómero formado con (*S*)-ácido piroglutámico y δ_R del diastereoisómero formado a partir del agente quiral de configuración (*R*). Para el caso de-RMN-¹³C,

los resultados de las deltas entre cada par diastereoisomérico se muestran en la Figura 12.

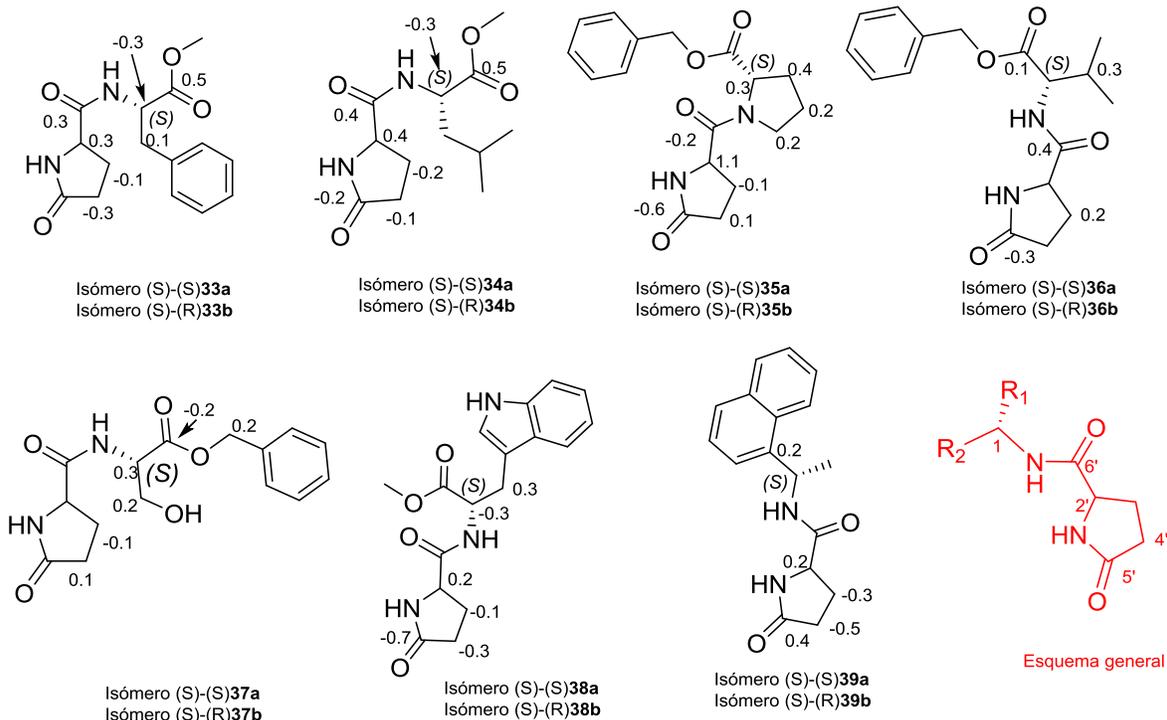


Figura 12. $RMN-^{13}C$ $\Delta\delta_{S-R}$ obtenidos de la derivación de aminas quirales con el agente quiral, ácido piroglutámico, **20**.

En el análisis de $\Delta\delta_{S-R}$, por $RMN-^{13}C$, observamos cambios, que se generan principalmente en los carbonos del agente quiral, ya que en los carbonos del aminoácido no observamos un patrón claro en las $\Delta\delta_{S-R}$. Los cambios en el carbono estereogénico del agente quiral C2' son positivos de 0.2 a 0.4, ppm, los carbonos metileno C3' y C4' al contrario dan diferencias negativas de 0.1 a 0.5 ppm. Estos cambios generados en el ácido piroglutámico podrían ayudar a asignar la configuración absoluta, aunque este patrón solo se observa en pocos carbonos, por lo que podría presentar algunas fallas, además de que los valores son menores a 0.5 ppm. La técnica puede ser aplicada tanto para aminas provenientes de aminoácidos como otro tipo de aminas quirales.

También se analizaron los desplazamientos químicos en $RMN-^1H$ entre los diastereoisómeros, aunque los espectros entre ambos isómeros se empalman, observamos un cambio importante en el protón de la amida formada, que puede

cambiar hasta 0.5 ppm entre isómeros, la delta es positiva para aminas cercanas a un centro estereogénico de configuración (S); lo que quiere decir que el isómero derivado con el (S)-ácido piroglutámico es el más desprotegido que con el de configuración (R), Figura 13.

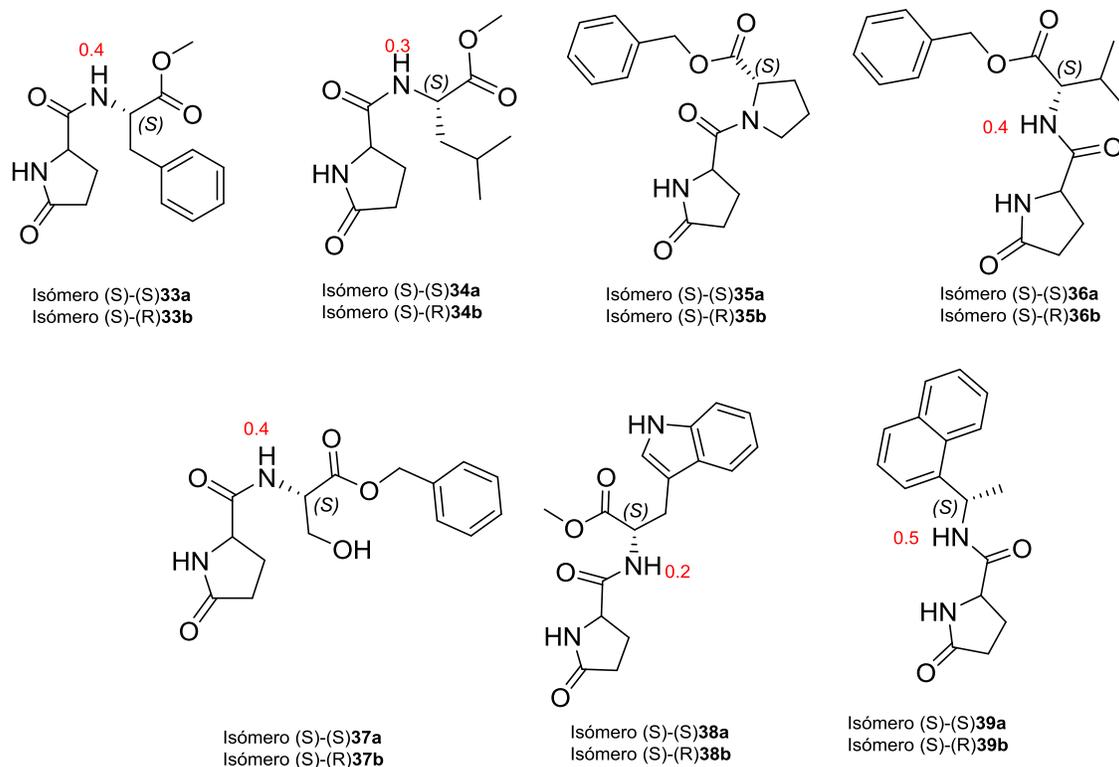


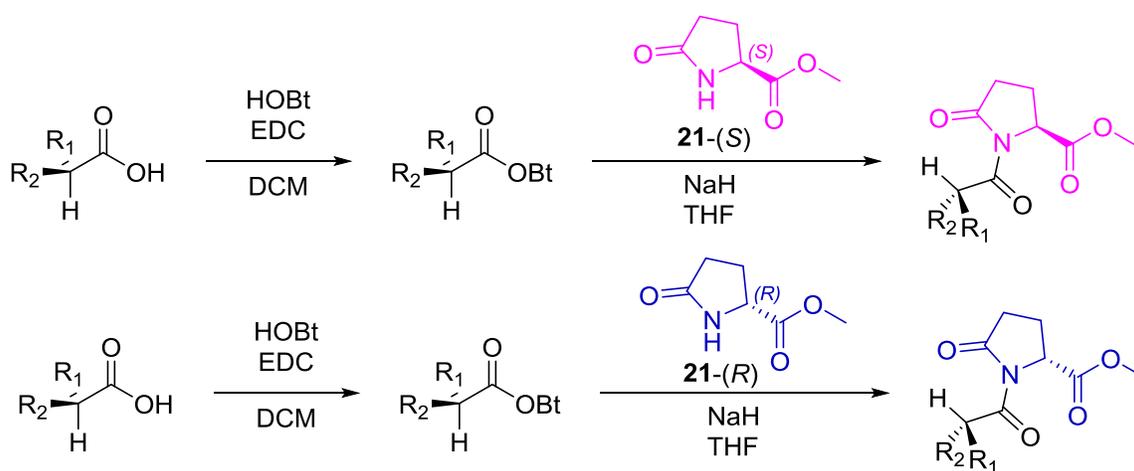
Figura 13. RMN-¹H $\Delta\delta_{S-R}$ obtenidos de la derivación de aminas quirales con el agente quiral, ácido piroglutámico **20**.

Los cambios generados en RMN protón son considerablemente buenos por lo que esta metodología podría utilizarse en conjunto con RMN de carbono para asignar la configuración absoluta.

La metodología para los cálculos computacionales fue la siguiente: se realizó una búsqueda conformacional en Spartan 16 para cada diastereoisómero y se calcularon en Gaussian 09 los espectros de RMN-¹³C con el método RLC-TPSSTPSS y la base CC-pVTZ. Se realizó también el cálculo de $\Delta\delta_{(S-R)}$ para los espectros calculados, pero hasta el momento la correlación de los estudios no se ha podido empatar con los datos experimentales.

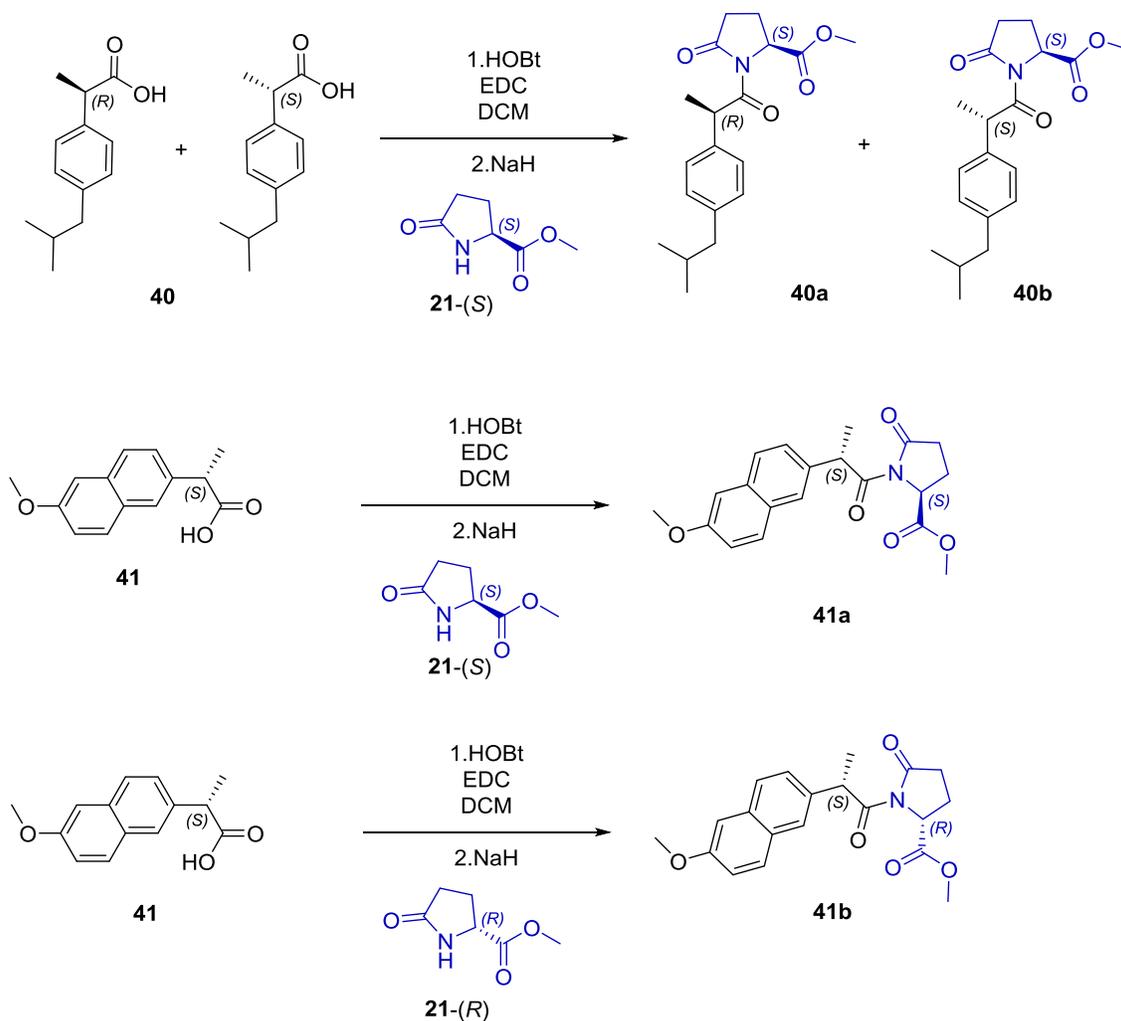
3.3. Estudio del piroglutamato de metilo como agente de derivación quiral de ácidos carboxílicos para asignación de configuración absoluta por RMN.

El estudio de diferenciación enantiomérica para ácidos carboxílicos por RMN, se realizó utilizando como agente quiral de derivación los dos enantiómeros del piroglutamato de metilo, para formar un enlace imida con el grupo del ácido carboxílico del sustrato a analizar. El acoplamiento se inicia de la misma manera que la formación del enlace amida o enlace peptídico, formando los ésteres de hidroxibenzotriazol del ácido carboxílico, en este caso, los ésteres de benzotriazol se aíslan y reaccionan con el piroglutamato de metilo en NaH/THF, Esquema 26.



Esquema 26. Derivación de ácidos carboxílicos usando piroglutamato de metilo como agente de derivación quiral.

Para probar la eficacia del agente quiral se estudió el ibuprofeno **40** y naproxeno **41**, como ácidos carboxílicos cercanos a un centro estereogénico; el primero es la mezcla racémica por lo que fue derivado en mezcla con el piroglutamato de metilo de configuración (S), 21-(S) y el naproxeno es de configuración (R), este ácido se derivó separadamente con ambos enantiómeros del piroglutamato de metilo. Las reacciones de derivación se llevaron a cabo en dos pasos primero la activación del ácido a los ésteres de benzotriazol en diclorometano, los cuales se adicionan al piroglutamato de metilo en NaH, Esquema 27.



Esquema 27. Derivación de ibuprofeno y naproxeno con piroglutamato de metilo

Los derivados se analizaron por RMN-¹H y ¹³C, calculando las diferencias en sus desplazamientos químicos como en los estudios anteriores, estas diferencias se muestran en la Figura 14. Las diferencias en rojo corresponden al experimento de protón. Para el caso del ibuprofeno donde los diastereoisómeros están en mezcla se calculan las diferencias entre los desplazamientos restando el desplazamiento químico de la señal de campo bajo menos la de campo alto en cada núcleo. Para el naproxeno las diferencias se obtienen restando los desplazamientos químicos del isómero preparado con el agente quiral de configuración (S) menos el formado con el (R). Las diferencias en RMN-¹³C se observan en los carbonos del piroglutamato, en ambos metilenos la delta es de 0.1ppm, en el metino 0.2 ppm, en el carbonilo de lactama de 0.3-0.4 ppm, y en el metoxi de 0.2-0.3 ppm, la diferencia más grande es el carbonilo imida de 0.8 ppm. Para el ibuprofeno no se

puede discriminar un isómero del otro, pero en el naproxeno las diferencias van acompañadas de signos, en los carbonilos y los carbonos del sustrato son negativos, ya que el isómero (S)-(R) se encuentra a campo más alto, caso contrario para los carbonos metileno y metino del agente quiral que se obtiene un signo positivo. Por otro lado, el análisis por RMN-¹H genera sólo diferencias en los protones del éster, en el metino del piroglutámico y en el centro estereogénico del sustrato.

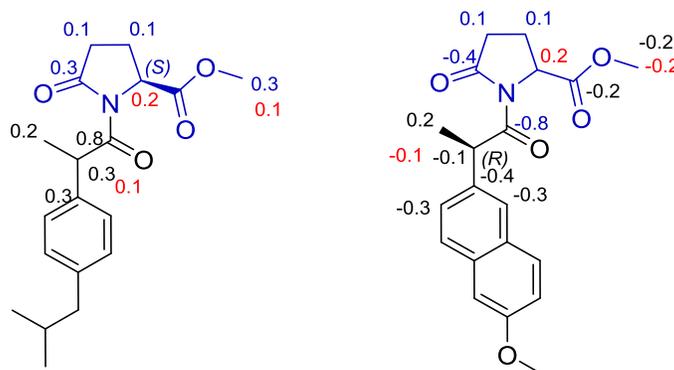


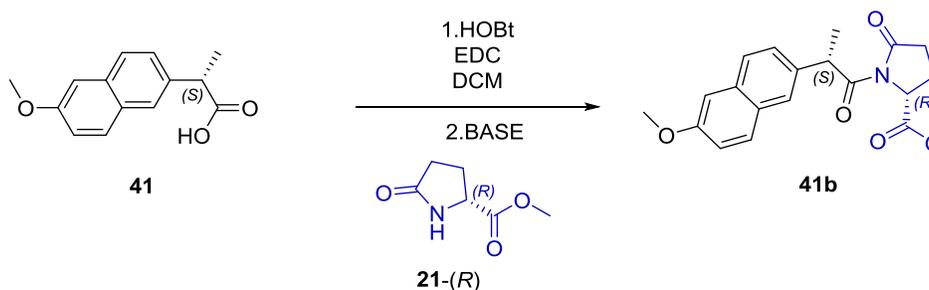
Figura 14. Diferencias en desplazamientos químicos entre diastereoisómeros $\Delta\delta_{S-R}$ RMN-¹³C (negro) y RMN-¹H (rojo)

Los resultados obtenidos para la derivación del naproxeno e ibuprofeno son importantes, por lo que se realizó el análisis de los isómeros mediante cálculos computacionales para conocer los parámetros de RMN, y poder comparar los resultados de RMN-¹³C calculados con los datos experimentales, así como obtener un estudio más detallado. Se realizó una búsqueda conformacional en Spartan 16, con una orientación *syn* y *anti* con respecto al carbonilo de la lactama y el carbonilo de la imida para cada diastereoisómero. Después se realizaron los cálculos computacionales en Gaussian 09, utilizando diferentes métodos para la optimización de la geometría y el cálculo de espectros de RMN-¹³C, se compararon dos diferentes métodos: método GIAO, con una base 6-311G, en cloroformo; el método CSGT con una base cc-pVTZ en cloroformo. Los espectros de RMN-¹³C obtenidos para cada diastereoisómero se compararon con los datos experimentales, pero en este caso ningún dato de $\Delta\delta$ está en correlación con los

datos experimentales, esto puede deberse a que las diferencias experimentales son pequeñas comparadas con el margen de error de cálculo.

Observando el gran potencial que tiene el piroglutamato de metilo como agente quiral, se intentó ampliar la metodología de ácidos carboxílicos usando ácidos provenientes de aminoácidos, pero la metodología de síntesis no es aplicable, ya que no se formó en enlace imida con la metodología descrita. Se trabajó en variaciones experimentales en el paso de la formación de la imida, utilizando diferentes bases, usando como ejemplo la derivación del naproxeno, los resultados se muestran en la Tabla 7, el uso de NaH es eficiente al igual que la 4-*N,N*-Dimetil amino piridina (4-DMAP) pero con epimerización. Aún falta profundizar en esta metodología para llevarla a cabo la formación de imidas en todo tipo de ácidos carboxílicos, ya que los provenientes de aminoácido no reaccionan bajo las condiciones de reacción descritas y con el uso de bases fuertes, pierden su integridad estereoquímica.

Tabla 7. Uso de la base en la reacción de formación de imidas, con el naproxeno y agente quiral 21-(R).



Base	Tiempo h	Rendimiento %
NaH	1	60
DMAP catalítico	3	50
		Epimerizado
DMAP equivalente	3	0
Di-isopropil etil amina	3	0
Trietilamina	6	0

4. Conclusiones

El 1-(clorometil)-5-oxopirrolidona-2-carboxilato de metilo **19** es un excelente agente quiral de derivación para la asignación de configuración absoluta por RMN- ^{13}C de productos naturales que contengan alcoholes secundarios. La asignación se obtiene por derivación doble del sustrato con ambos enantiómeros de **19**, para obtener dos diastereoisómeros que presentan diferencias en los desplazamientos químicos en RMN- ^{13}C , estos cambios nos dan la configuración absoluta.

También se puede asignar la configuración absoluta formando un solo diastereoisómero y comparando el cambio generado en los desplazamientos químicos entre el sustrato y el producto derivado, realizando una correlación empírica.

Otra ventaja importante de este agente quiral es poder realizar una discriminación enantiomérica de sustratos.

Por otro lado, el estudio del ácido piroglutámico como agente quiral de derivación para asignar la configuración absoluta de productos con aminas al generar amidas diastereoisoméricas puede lograrse si se analizan los cambios generados en RMN- ^{13}C , este estudio se puede apoyar con el experimento de protón y observar el cambio en el protón de la amida, lo que ayuda a confirmar la configuración absoluta.

Por último, el piroglutamato de metilo para la asignación de la configuración absoluta de ácidos carboxílicos al formar las imidas correspondientes tiene gran potencial en generar cambios en los desplazamientos químicos de ^{13}C , pero la formación de los diastereoisómeros es difícil para muchos ácidos, lo que impide su uso.

5. Sección experimental.

Los reactivos fueron adquiridos en Sigma Aldrich México, y se utilizaron sin previa purificación. El éster metílico del ursólico se obtuvo de la extracción de *Salvia Candicans* [1] y la cuauhtemona de la extracción de especies de *Epaltes mexicana* [2]. Los espectros de RMN se obtuvieron en un equipo Bruker Avance 300 MHz.

1-(Clorometil)-2-pirrolidona-5-carboxilato de metilo 19-(S) y 19-(R). En un matraz se mezcló piroglutamato de metilo (500 mg, 3.49 mmol), paraformaldehído (170 mg, 5.6 mmol) y clorotrimetilsilano (7.4 mL, 17.9 mmol). Se mantuvo en agitación por 3 horas. Se eliminó el exceso de clorotrimetilsilano al alto vacío y el crudo de reacción se purificó en un Kugelrohr a 100 °C. RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃), 5.72 ppm (d, *J*=10.2 Hz, 1H), 4.9 ppm (d, *J*=10.2 Hz, 1H), 4.45 ppm (dd, *J*= 8, 4 Hz, 1H), 3.79 ppm (s, 3H), 2.3 ppm (m, 4H).

6.1 Procedimiento general de formación de éteres entre alcoholes y 19-(S) ó 19-(R) utilizando hidruro de sodio.

En un matraz bajo atmósfera de nitrógeno se agrega el alcohol (1 equivalente) en THF seco a 0°C, NaH (2.5 equivalente, 60% en aceite mineral), después de 10 minutos se adiciona por cánula **19-(S)** o **19-(R)** (3 equivalentes) disuelto en THF. La mezcla de reacción se mantiene a reflujo y se monitorea por cromatografía en capa fina. Al final de la reacción se adiciona agua y se concentra, se extrae con acetato de etilo, se seca sobre sulfato de sodio anhidro, se filtra, se concentra al vacío y se purifica por cromatografía en columna flash.

(S)-1-((((1R,2S,5R)-2-isopropil-5-metilciclohexil)oxi)metil)-5-oxopirrolidona-2-carboxilato de metilo, 22a.

En un matraz se agrega (-)-Mentol (78 mg, 0.5 mmol) en THF seco a 0°C, 24 mg NaH (0.6 mmol), después de 10 minutos se adiciona por cánula **19-(S)** (114 mg, 0.6 mmol) en THF, la mezcla de reacción se agitó a reflujo por 12 horas. Al final de

la reacción se adiciona agua y se concentra al alto vacío, se extrae con acetato de etilo, se seca sobre sulfato de sodio anhidro, se filtra y se purifica por cromatografía en columna flash con hexano/Acetato de etilo 80:20. obteniendo 83 mg de **2a**, 52% de rendimiento. RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 5.29 (d, *J* = 11.2 Hz, 1H), 4.40 (dd, *J* = 9.2, 3.0 Hz, 1H), 4.32 (d, *J* = 11.2, 1H), 3.76 (s, 3H), 3.15 (td, *J* = 10.4, 4.2 Hz, 1H), 2.55 – 2.26 (m, 3H), 2.22-2.17(m,1H), 2.14-2.06(m, 2H), 1.65 – 1.57 (m, 2H), 1.42-1.31 (m, 1H), 1.20-1.12 (m, 1H), 0.92-0.71 (m,3H), 0.92 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H), 0.88 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H), 0.69 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H). RMN-¹³C (101 MHz, CDCl₃) δ 175.8, 172.4, **76.5**, **68.6**, 57.7, 52.6, **48.1**, **40.2**, 34.5, 31.4, 29.8, 25.6, 23.0, 22.4, 21.2, 15.9. EM IE *m/z* (intensidad rel., %): M+ 311(0.5), 268 (1), 252(13), 224(2), 222(1), 182(1), 172(8), 156(100), 128(75), 84(62), 68(19), 41(15), 29(4), 27(3), 15(2). ESI+ *m/z*: C₁₇H₃₀N₁O₄ [M+1] calculada 312.21748 observada. 312.21717. [α]_D20= -105.2° (c 0.25, CHCl₃)

(S)-1-((((1S, 2R, 5S)-2-isopropil-5-metilciclohexil)oxi)metil)-5-oxopirrolidona-2-carboxilato de metilo 22b.

En un matraz se agrega al (+)-Mentol (78 mg, 0.5 mmol) en THF seco y 0°C, 24 mg de NaH (0.6 mmol), después de 10 minutos se adiciona por cánula **19-(S)** (114 mg, 0.6 mmol) disuelto en THF, la mezcla de reacción se agitó a reflujo por 12 horas. Al final de la reacción se adiciona agua y se concentra al alto vacío, se extrae con acetato de etilo, se seca sobre sulfato de sodio anhidro, se filtra y evapora a sequedad. Se purifica por cromatografía en columna flash con hexano/Acetato de etilo 80:20. obteniendo 104 mg de **2b**, 65% de rendimiento. RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 5.20 (d, *J* = 9.9 Hz, 1H), 4.38 (dd, *J* = 8.9, 3.7 Hz, 1H), 4.32 (d, *J* = 10.0 Hz, 1H), 3.69 (s, 3H), 3.14 (td, *J* = 10.6, 4.4 Hz, 1H), 2.53 – 2.20 (m, 3H), 2.12 – 1.94 (m, 2H), 1.92-1.87 (m, 1H), 1.63-1.55(m, 2H), 1.38 – 1.28 (m, 1H), 1.2-1.1 (m-1H), 0.99-0.80(m-3H), 0.83 (d, *J* = 1.72 Hz, 3H), 0.81 (d, *J* = 1.15 Hz, 3H), 0.71 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H). RMN-¹³C (101 MHz, CDCl₃) δ 175.4, 172.4, **79.4**, **71.8**, 57.7, 52.5, **48.7**, **41.9**, 34.4, 31.6, 29.9, 25.7, 23.2, 22.9, 22.4, 21.2, 16.2., DART+ *m/z* (rel intensidad, %): [2M+2] 624 (14), [2M+1] 623 (32), 467 (28), 329 (14), [M+2] 313 (13), [M+1] 312 (100), 299 (14), 174(17), 156 (98), 128

(23). ESI+ m/z : $C_{17}H_{30}N_1O_4$ [M+1] calculada 312.21748, observada 312.21750. $[\alpha]_D^{20} = +11.29$ (c 1, $CHCl_3$).

(S)-1-((((3S,4aR,6aR,6bS,8aS,11R,12S,12aS,14aR,14bR)-8a-(metoxicarbonil)-4,4,6a,6b,11,12,14b-heptametill-1,2,3,4,4a,5,6,6a,6b,7,8,8a,9,10,11,12,12a,14,14a,14b-icosahidropicen-3-il)oxi)metill)-5-oxopirrolidin-2-carboxilato de metilo, 23a.

En un matraz se agrega al éster metílico del ácido Ursólico (42 mg, 0.089 mmol) en THF seco a 0°C, NaH (8 mg, 0.2 mmol), después de 10 minutos se adiciona por cánula **19-(S)** (37 mg, 0.19 mmol) disuelto en THF, la mezcla de reacción se mantiene a reflujo con agitación por 16 horas. Al final de la reacción se adiciona agua y se concentra al alto vacío, se extrae con acetato de etilo, se seca sobre sulfato de sodio anhidro, se filtra y evapora a sequedad y se purifica por cromatografía en columna flash con hexano/Acetato de etilo 90:10. obteniendo 16 mg de **23a**, 28.6 % de rendimiento. RMN- 1H (300 MHz, $CDCl_3$), δ . 5.22 (t, J = 3.9 Hz, 1H), 5.18 (d, J = 10.3 Hz, 1H), 4.47 (d, J = 10.2 Hz, 1H), 4.11 (dd, J = 8.6, 3.24 Hz, 1H), 3.75 (s, 3H), 3.59 (s, 3H), 3.00 (dd, J = 9.9, 5.2 Hz, 1H), 2.58-2.10 (m, 7H), 1.97 (dd, J = 12.3, 4.47 Hz, 1H), 1.88 (dd, J = 8.64, 3.57 Hz, 1H), 1.79-1.29 (m, 18H), 1.05 (s, 3H), 0.94 (s, 6H), 0.89 (s, 3H), 0.84 (d, J = 6.4 Hz, 3H), 0.73 (d, J = 5.7 Hz, 6H). RMN- ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) δ 178.2, 175.5, 172.5, 138.3, 125.6, **87.2**, **72.9**, 57.9, 55.5, 53.0, 52.6, 51.6, 48.2, 47.6, 42.1, 39.6, 39.2, **39.0**, 39.0, 38.7, 36.9, 36.8, 33.1, 30.8, 29.9, 28.1, 28.1, **24.8**, 24.4, 23.7, 23.4, 23.1, 21.3, 18.3, 17.2, 17.0, 16.5, 15.6. DART $^+$ m/z (rel intensidad, %): [M+2] 627 (31), [M+1] 626 (75) 608 (45), 454 (35), 453 (100), 329 (12), 299 (13), 156 (56), 144 (16), 117 (29).

(R)-1-((((3S,4aR,6aR,6bS,8aS,11R,12S,12aS,14aR,14bR)-8a-(metoxicarbonil)-4,4,6a,6b,11,12,14b-heptametill-1,2,3,4,4a,5,6,6a,6b,7,8,8a,9,10,11,12,12a,14,14a,14b-icosahidropicen-3-il)oxi)metill)-5-oxopirrolidin-2-carboxilato de metilo, 23b.

En un matraz se agrega al éster metílico del ácido Ursólico (42 mg, 0.089 mmol) en THF seco y 0°C, NaH (8 mg, 0.2 mmol), después de 10 minutos se adiciona por

cánula **19**-(R) (37 mg, 0.19 mmol) disuelto en THF, la mezcla de reacción se mantiene a reflujo con agitación por 16 horas. Al final de la reacción se adiciona agua y se concentra al alto vacío, se extrae con acetato de etilo, se seca sobre sulfato de sodio anhidro, se filtra y se purifica por cromatografía en columna flash con hexano/Acetato de etilo 90:10. obteniendo 14 mg de **3b**, 16 % de rendimiento. RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃), δ. 5.30 – 5.18 (m, 2H), 4.44 (dd, J = 9.0, 2.9 Hz, 1H), 4.37 (d, J = 11.1 Hz, 1H), 3.77 (s, 3H), 3.59 (s, 3H), 2.91 (dd, J = 11.6, 4.3 Hz, 1H), 2.57 – 2.02 (m, 7H), 1.97 (dd, J = 12.9, 4.8 Hz, 1H), 1.89 (dd, J = 8.8, 3.3 Hz, 1H), 1.78 – 1.22 (m, 18H), 1.06 (s, 3H), 0.94 (s, 3H), 0.91 (s, 3H), 0.88 (s, 3H), 0.84 (d, J = 6.4 Hz, 3H), 0.73 (d, J = 6.2 Hz, 6 H). RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ 178.3, 176.1, 172.5, 138.2, 125.7, **84.3**, **69.2**, 57.8, 55.6, 53.0, 52.6, 51.6, 48.2, 47.5, 42.2, 39.6, 39.2, 39.0, **38.5**, 38.4, 37.03, 36.7, 33.1, 30.8, 29.9, 28.2, 28.2, 24.4, 23.7, 23.4, 23.1, **22.4**, 21.3, 18.4, 17.1, 17.1, 16.5, 15.6. MS IE m/z (rel intensidad %): M+ 625(1), 610 (1), 566 (3), 565(3), 482 (5), 409 (6), 393 (5), 364 (9), 317 (3), 262 (68), 261(10), 203 (66), 156 (100), 128 (69), 69 (33), 57 (45), 41 (29), 27 (25). ESI+ m/z: C₃₈H₆₀N₁O₆ [M+1] calculada 626.44206 observada. 626.44211, [α]_D20= +55.7°m(c 0.14, CHCl₃).

Éter metílico del Estradiol, 24.

En un matraz bola de 250 mL, se agregan a la Estrona (1g, 3.69 mmol), Acetona (100 mL), KOH molido y seco (160 mg, 2.8 mmol) y en baño de hielo agua se adiciona MeI (0.3 mL, 4.8 mmol) disuelto en Acetona (16 mL), se deja en agitación por 2.5 h y se adiciona nuevamente MeI (0.04 mL, 0.64 mmol) disuelto en acetona (5 mL) y se deja en agitación 4 h. Al final de la reacción se evapora la acetona, se agregan 10 mL de agua y extrae con Acetato de Etilo, se lava con salmuera, se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtra y se concentra. El producto obtenido se cristaliza en metanol, obteniendo 992 mg, un rendimiento de 94% de éster metílico de la estrona **24i**. RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃), δ 7.23 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 6.75 (dd, J = 8.6, 2.8 Hz, 1H), 6.68 (d, J = 2.57 Hz, 1H), 3.81 (s, 3H), 3.00 – 2.84 (m, 2H), 2.63 – 1.88 (m, 7H), 1.75 – 1.36 (m, 6H), 0.94 (s, 3H). En un matraz bola de 50 mL se agregan el éter metílico de la estrona (148 mg, 0.5 mmol), 15 mL de

metanol a 0°C y con agitación vigorosa se adiciona NaBH₄ (125 mg, 3.12 mmol), la reacción se deja en agitación 4 h, después de este tiempo se adiciona ácido acético (0.2 mL), se evapora el metanol, y se cristalizó en metanol. Se obtienen 103 mg, 69% de rendimiento de **24**. RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃), δ. 7.22 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 6.73 (dd, *J* = 8.52, 2.88 Hz, 1H), 6.64 (d, *J* = 2.64 Hz, 1H), 3.79 (s, 4H), 2.90-2.84 (m, 2H), 2.45 – 1.09 (m, 13H), 0.79 (s, 3H).

(S)-1-((((8R,9S,13S,14S,17S)-3-metoxi-13-metil-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-decahidro-6H-ciclopenta[a]fenantren-17-il)oxi)metil)-5-oxopirrolidin-2-carboxilato de metilo, 24a.

En un matraz de bola de 25 mL se agrega al β-Estradiol éter metílico (40 mg, 0.13 mmol) en THF seco y 0°C, NaH (7 mg, 0.16 mmol), después de 10 minutos se adiciona por cánula **19-(S)** (52 mg, 0.27 mmol) disuelto en THF, la mezcla de reacción se deja en agitación a temperatura ambiente por 16 horas. Al final de la reacción se adiciona agua y se concentra al alto vacío, se extrae con acetato de etilo, se seca sobre sulfato de sodio anhidro y se purifica por cromatografía en columna flash con Hexano/Acetato de etilo 80:20. obteniendo 36 mg de **24a**, 57% de rendimiento. RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃), δ. 7.20 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 6.70 (dd, *J* = 8.6, 2.7 Hz, 1H), 6.62 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 5.11 (d, *J* = 10.5 Hz, 1H), 4.57 (d, *J* = 10.4 Hz, 1H), 4.38 (dd, *J* = 8.9, 3.2 Hz, 1H), 3.7705 (s, 3H), .3.7703 (s, 3H), 3.49 (t, *J* = 8.19 Hz, 1H), 2.86-2.81 (m, 2H), 2.63 – 1.13 (m, 17H), 0.76 (s, 3H). RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ 175.5, 172.1, 157.5, 138.1, 132.7, 126.5, 113.9, 111.6, 88.01, 72.21, 57.82, 55.35, 52.62, 49.8, 44.0, 43.5, 38.8, 37.5, 30.0, 29.9, 28.5, 27.34, 26.4, 23.3, 23.1, 11.8. MS IE *m/z* (rel intensidad %): 441(28), 413 (1), 382 (3), 352 (0.5), 314 (0.5), 285 (25), 267 (23), 227 (9), 201 (20), 173 (42), 157 (91), 128 (100), 91 (21), 57 (30), 41 (33), 28 (18), 18 (4). ESI+ *m/z*: C₂₆H₃₆N₁O₅ [M+1] calculada 442.25935 observada. 442.25883, [α]_D²⁰ = +1.81 (c 0.55, CHCl₃).

(R)-1-((((8R,9S,13S,14S,17S)-3-metoxi-13-metil-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-decahidro-6H-ciclopenta[a]fenantren-17-il)oxi)metil)-5-oxopirrolidin-2-carboxilato de metilo, 24b.

En un matraz de bola de 25 mL se agrega al β -Estradiol éter metílico (68 mg, 0.238 mmol) en THF seco y 0°C, NaH (12 mg, 0.28 mmol), después de 10 minutos se adiciona por cánula **19-(R)** (67 mg, 0.35 mmol) disuelto en THF, la mezcla de reacción se deja en agitación a temperatura ambiente por 16 horas. Al final de la reacción se adiciona agua y se concentra al alto vacío, se extrae con acetato de etilo, se seca sobre sulfato de sodio anhidro y se purifica por cromatografía en columna flash con hexano/Acetato de etilo 80:20. obteniendo 56 mg de **4b**, 53% de rendimiento. RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃), δ 7.18 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 6.70 (dd, J = 8.6, 2.7 Hz, 1H), 6.62 (d, J = 2.6 Hz, 1H), 5.11 (d, J = 10.6 Hz, 1H), 4.53 (d, J = 10.6 Hz, 1H), 4.37 (dd, J = 8.9, 3.2 Hz, 1H), 3.78 (s, 3H), 3.77 (s, 3H), 3.42 (t, J = 8.2 Hz, 1H), 2.92 – 2.76 (m, 2H), 2.66 – 1.07 (m, 17H), 0.77 (s, 3H). RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ 175.8, 172.5, 157.6, 138.1, 132.7, 126.4, 113.9, 111.6, 86.5, 70.9, 57.6, 55.4, 52.6, 50.1, 44.0, 43.1, 38.7, 37.5, 30.0, 29.9, 27.6, 27.3, 26.5, 23.2, 23.2, 11.8. MS IE m/z (rel intensidad %): 441(93), 413 (2), 382 (7), 352 (1), 316 (1), 285(58), 267 (33), 241 (10.3), 201 (16), 173 (45), 156 (100), 128 (87), 84 (20), 59 (20), 43(34), 41 (15), 29 (4), 15 (3). ESI+ m/z : C₂₆H₃₆N₁O₅ [M+1] calculada 442.25935 observada. 442.25806, $[\alpha]_D^{20}$ = +45.2° (c 0.46, CHCl₃).

(5R,6S,8aS)-5,6-dihidroxi-5,8a-dimetil-3-(propan-2-iliden)octahidronaftalen-2(1H)-ona, 25.

En un matraz bola se agrega a la cuauhtemona (100 mg, 0.29 mmol), THF (10 mL) y LiOH 2.5 N (2mL), se deja en agitación a temperatura ambiente por 1.5 h. Al final de la reacción se extrae el THF al alto vacío, se acidula con HCl 1M a y se extrae con Acetato de etilo, se lava con salmuera, se seca sobre sulfato de sodio anhidro, se filtra y se concentra, se obtienen 67 mg de producto puro, un 91 % de rendimiento. RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃), δ 3.68 (d, J = 2.9 Hz, 1H), 2.96 (dd, J = 14.7, 3.5 Hz, 1H), 2.24 (d, J = 4.7 Hz, 2H), 2.11 – 2.05 (m, 3H), 2.03 (s, 3H), 1.85 (s, 1H), 1.81-1.70 (m, 4H), 1.23 (s, 6H), 0.95 (s, 3H).

(2S)-1-((((1R,2S,4aS)-1-hidroxi-1,4a-dimetil-6-oxo-7-(propan-2-iliden)decahidronaftalen-2-il)oxi)metil)-5-oxopirrolidin-2-carboxilato de metilo, 25a.

En un matraz de bola se agrega **25** (40 mg, 0.15 mmol) en THF seco a 0°C, y NaH (7 mg, 1.8 mmol), después de 10 minutos se adicionó por cánula **19-(S)** (35mg, 0.18 mmol) disuelto en THF, la mezcla de reacción se deja en agitación a reflujo por 12 h. Al final de la reacción se adicionó agua y se concentró al alto vacío, se extrajo con acetato de etilo, se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se purificó por cromatografía en columna flash con Hexano/Acetato de etilo 80:20. obteniendo 34 mg de **25a**, 53% de rendimiento. RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃), δ 4.95 (d, *J* = 10.7 Hz, 1H), 4.79 (d, *J* = 10.7 Hz, 1H), 4.34 (dd, *J* = 8.87, 3.72 Hz, 1H), 3.79 (s, 3H), 3.53 (dd, *J* = 3.7, 1.8 Hz, 1H), 2.98 (dd, *J* = 15.3, 4.2 Hz, 1H), 2.70 – 2.25 (m, 6H), 2.18 (d, *J* = 2.9 Hz, 3H), 2.17 – 2.07 (m, 3H), 2.01 (s, 3H), 1.92-1.85 (m, 3H), 1.83 (s, 1H), 1.17 (s, 6H), 0.93 (s, 3H). RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃) 202.9, 176.1, 172.5, 144.4, 131.5, 81.9, 71.9, 60.2, 59.5, 52.9, 47.2, 36.3, 33.3, 29.8, 29.6, 25.6, 23.5, 23.3, 23.0, 22.8, 20.9, 18.9. DART⁺ *m/z* (rel intensidad): ESI+ *m/z*: C₁₉H₂₂N₁O₄ [M+1] calculada, observada [α]_D20= +26.3 (*c* 0.285, CHCl₃).

(2R)-1-((((1R,2S,4aS)-1-hidroxi-1,4a-dimetil-6-oxo-7-(propan-2-iliden)decahidronaftalen-2-il)oxi)metil)-5-oxopirrolidin-2-carboxilato de metilo, 25b.

En un matraz de bola se agrega **5** (40 mg, 0.15 mmol) en THF seco a 0°C, y NaH (7 mg, 1.8 mmol), después de 10 minutos se agregó por cánula **19-(S)** (35mg, 0.18 mmol) disuelto en THF, la mezcla de reacción se deja en agitación a reflujo por 12 h. Al final de la reacción se agregó agua y se concentró al alto vacío, se extrajo con acetato de etilo, se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se purificó por cromatografía en columna flash con Hexano/Acetato de etilo 80:20. obteniendo 28 mg de **25b**, 45% de rendimiento RMN 1H (300 MHz, CDCl₃), δ 5.02 (d, *J* = 11.4 Hz, 3H), 4.72 (d, *J* = 11.4 Hz, 3H), 4.45 (dd, *J* = 8.9, 3.2 Hz, 5H), 4.14 (q, *J* = 6.9 Hz, 4H), 3.75 (s, 3H), 3.70 (s, 3H), 2.28-2.03 (m, 4H), 1.35 (d, *J* = 6.9 Hz, 9H).

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ 176.3, 173.7, 172.6, 77.6, 73.5, 71.8, 58.3, 52.6, 52.1, 29.6, 23.0, 18.6.

Procedimiento general de formación de éteres entre alcoholes y 19-(S) y 19-(R) utilizando triflato de plata.

En un matraz se agrega al alcohol (1 equivalente), **19-(S)** o **19-(R)** (3 equivalentes), se disuelve en diclorometano seco y se agrega hidrotalcita (100 mg por mmol de alcohol) y finalmente triflato de plata (1.2 equivalentes), la reacción se agita a temperatura ambiente y sin luz. Se monitorea por cromatografía en capa fina. Al final de la reacción se filtra la hidrotalcita, se lava la mezcla de reacción con salmuera, se seca con cloruro de calcio, se filtra y se concentra. El producto se purifica por cromatografía en columna flash.

(S)-1-(((S)-1-(naftalen-2-il)etoxi)metil)-5-oxopirrolidin-2-carboxilato de metilo, 26a.

En un matraz se agrega al (S)-1-(naftalen-2-il)-etan-1-ol (69 mg, 0.40 mmol), **19-(S)** (86 mg, 0.45 mmol), se disuelve en diclorometano seco y se agrega hidrotalcita (40 mg) y finalmente triflato de plata (103 mg, 0.4 mmol), la reacción se agita a temperatura ambiente y sin luz por 6 horas. Al final de la reacción se filtra la hidrotalcita, se lava la mezcla de reacción con salmuera, se seca con cloruro de calcio, y se concentra. El producto se purifica por cromatografía en columna flash con un eluyente 80:20 Hexano/Acetato de etilo se obtienen 61 mg de producto aceitoso, 46%. RMN- ^1H (300 MHz, CDCl_3), δ 7.84-7.76 (m, 4H), 7.51 – 7.41 (m, 3H), 5.06 (d, $J = 10.6$ Hz, 1H), 4.66 (q, $J = 6.5$ Hz, 1H), 4.41 (d, $J = 10.84$ Hz, 1H), 4.38 (dd, $J = 8.99, 3.45$ Hz, 1H), 3.54 (s, 3H), 2.58-2.27 (m, 3H), 2.09-2.01 (m, 1H), 1.50 (d, $J = 6.5$ Hz, 2H). RMN- ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ 175.8, 172.3, 140.3, 133.28, 133.2, 128.4, 128.0, 127.7, 126.2, 125.9, 125.5, 124.2, 75.9, 70.0, 57.9, 52.4, 29.7, 23.6, 22.9. DART $^+$ m/z (rel intensidad, %): [2M+2] 656 (12), [2M+1] 655 (28), 552 (12), 484 (15), 483 (40), 330 (20), 329 (100), 328 (16), 174 (14), 156 (32). ESI+

m/z : $C_{19}H_{22}N_1O_4$ [M+1] calculada 328.15488, observada 328.15588. $[\alpha]_D^{20} = -5.45$ (c 0.22, $CHCl_3$),

(R)-1-(((S)-1-(naftalen-2-il)etoxi)metil)-5-oxopirrolidin-2-carboxilato de metilo, 26b.

En un matraz se agrega al (S)-1-(naftalen-2-il)-etan-1-ol (35 mg, 0.20 mmol), **19-(R)** (46 mg, 0.24 mmol), se disuelve en diclorometano seco y se agrega hidrotalcita (20 mg) y finalmente triflato de plata (50 mg, 0.2 mmol), la reacción se agita a temperatura ambiente y sin luz por 6 horas. Al final de la reacción se filtra la hidrotalcita, se lava la mezcla de reacción con salmuera, se seca con cloruro de calcio, y se concentra. El producto se purifica por cromatografía en columna flash con un eluyente 80:20 Hexano/Acetato de etilo se obtienen 13 mg de producto aceitoso, 20%. RMN- 1H (300 MHz, $CDCl_3$), δ 7.94 – 7.68 (m, 4H), 7.59 – 7.38 (m, 3H), 5.16 (d, $J = 11.1$ Hz, 1H), 4.70 (q, $J = 6.6$ Hz, 1H), 4.62 (d, $J = 11.2$ Hz, 1H), 4.03 (dd, $J = 9.5, 2.7$ Hz, 1H), 3.74 (s, 3H), 2.49 – 2.16 (m, 3H), 1.94 – 1.58 (m, 1H), 1.49 (d, $J = 6.5$ Hz, 4H). RMN- ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) δ 175.77, 172.71, 141.30, 133.31, 133.05, 128.43, 128.03, 127.77, 126.42, 126.05, 124.87, 124.03, 77.94, 71.56, 57.94, 52.58, 29.51, 24.09, 22.33. DART $^+$ m/z (rel intensidad): [2M+2] 656 (13), [2M+1] 655 (30), 483 (30), [M+3] 330 (17), [M+2] 329 (100), 310 (24), 174 (25), 156 (94), 128 (32). ESI $^+$ m/z : $C_{19}H_{22}N_1O_4$ [M+1] calculada 328.15488, observada 328.15532. $[\alpha]_D^{20} = -20^\circ$ (c 0.12, $CHCl_3$).

(S)-1-(((S)-1-(2-bromofenil)etoxi)metil)-5-oxopirrolidin-2-carboxilato de metilo, 27a.

En un matraz se agrega al (S)-(-)-2-Bromo- alfa-metil alcohol bencílico (50 mg, 0.25 mmol), **19-(S)** (60 mg, 0.33 mmol), se disuelve en diclorometano seco y se agrega hidrotalcita (30 mg) y finalmente triflato de plata (77 mg, 0.33 mmol), la reacción se agita a temperatura ambiente y sin luz por 8 h. La mezcla de reacción se filtra, para recuperar la hidrotalcita, se lava la mezcla de reacción con salmuera, se seca con cloruro de calcio, y se concentra. El producto se purifica por

cromatografía en columna flash con un eluyente 90:10 Hexano/Acetato de etilo se obtienen 31 mg de producto puro, 34% de rendimiento. RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃), δ 7.51 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.46 (dd, *J* = 7.9, 1.5 Hz, 1H), 7.31 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.12 (td, *J* = 7.6, 1.62 Hz, 1H), 5.00 (d, *J* = 10.4 Hz, 1H), 4.89 (q, *J* = 6.4 Hz, 1H), 4.44 (d, *J* = 10.4 Hz, 1H), 4.36 (dd, *J* = 9.0, 3.4 Hz, 1H), 3.66 (s, 3H), 2.57 – 2.7 (m, 3H), 2.15 – 2.03 (m, 1H), 1.4 (d, *J* = 6.39 Hz, 3H). RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ 175.6, 172.5, 142.9, 132.8, 128.8, 127.8, 127.2, 122.0, 75.3, 71.0, 58.08, 52.5, 29.5, 22.7, 22.3. DART⁺ *m/z* (rel intensidad, %): [2M+1] 713 (18), 514 (9), 513 (43), [M] 356 (13), 329 (67), 299 (3), 174 (18), 156 (100), 128 (32). ESI⁺ *m/z*: C₁₅H₁₉Br₁N₁O₄ [M+1] calculada 356.04975, observada 356.05105. [α]_D²⁰ = -44.7272 (c 0.275, CHCl₃).

***(R)*-1-(((*S*)-1-(2-bromofenil)etoxi)metil)-5-oxopirrolidin-2-carboxilato de metilo, 27b.**

En un matraz se agrega al (*S*)-(-)-2-Bromo- alfa-metil bencil alcohol (50 mg, 0.25 mmol), **19-*R*** (60 mg, 0.33 mmol), se disuelve en diclorometano seco y se agrega hidrotalcita (30 mg) y finalmente triflato de plata (77 mg, 0.33 mmol), la reacción se agita a temperatura ambiente y sin luz por 8 h. La mezcla de reacción se filtra, para recuperar la hidrotalcita, se lava la mezcla de reacción con salmuera, se seca con cloruro de calcio, y se concentra. El producto se purifica por cromatografía en columna flash con un eluyente 90:10 Hexano/Acetato de etilo se obtienen 64 mg de producto puro, 71 % de rendimiento. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃), δ 7.50-7.45 (m, 2H), 7.32 (td, *J* = 7.5, 1.3 Hz, 1H), 7.10 (td, *J* = 7.79, 1.84 Hz, 1H), 5.11 (d, *J* = 10.8 Hz, 1H), 4.92 (q, *J* = 6.4 Hz, 1H), 4.49 (d, *J* = 10.8 Hz, 1H), 4.21 – 4.13 (m, 1H), 3.73 (s, 3H), 2.48- 2.37 (m, 1H), 2.24– 2.11 (m, 1H), 2.03 – 1.88 (m, 2H), 1.38 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H). RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ 175.5, 172.5, 142.9, 132.8, 128.8, 127.8, 127.3, 122.0, 75.3, 71.0, 58.1, 52.5, 29.5, 22.7, 22.3. DART⁺ *m/z* (rel intensity): [2M+1] 713 (9), 511 (34), [M] 356 (15), 329 (66), 299 (19), 174 (16), 156 (100), 128 (35). ESI-HRMS *m/z*: C₁₅H₁₉Br₁N₁O₄ [M+1] calculada 356.04975, observada 356.04896. [α]_D²⁰ = -10.9635 (c 0.602, CHCl₃)

***(S)*-1-((((*S*)-1-metoxi-1-oxopropan-2-il)oxi)metil)-5-oxopirrolidin-2-carboxilato de metilo 28a.**

En un matraz se agrega al (*S*)-Lactato de metilo (56 mg, 0.54 mmol), **19-(*S*)** (124 mg, 0.65 mmol), se disuelve en diclorometano seco y se agrega hidrotalcita (50 mg) y finalmente triflato de plata (166 mg, 0.65 mmol), la reacción se agita a temperatura ambiente y sin luz por 6 horas. La mezcla de reacción se filtra, para recuperar la hidrotalcita, se lava la mezcla de reacción con salmuera, se seca con cloruro de calcio, y se concentra. El producto se purifica por cromatografía en columna flash con un eluyente 50:50 Hexano/Acetato de etilo se obtienen 44 mg de producto puro **28a**, 31%. RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃), δ 5.10 (d, *J* = 10.8 Hz, 1H), 4.58 (d, *J* = 10.8 Hz, 1H), 4.42 (dd, *J* = 8.7, 3.3 Hz, 2H), 4.11 (q, *J* = 6.9 Hz, 1H), 3.75 (s, 3H), 3.73 (s, 3H), 2.60-2.29 (m, 4H), 1.38 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H). RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ 176.1, 173.2, 172.4, 72.1, 71.0, 57.9, 52.7, 52.2, 29.6, 23.1, 18.5. DART+ *m/z* (rel intensity, %): [2M+2] 656 (12), [2M+1] 655 (28), 552 (12), 484 (15), 483 (40), 330 (20), 329 (100), 328 (16), 174 (14), 156 (32). ESI-HRMS *m/z*: C₁₉H₂₂N₁O₄ [M+1] calculado 328.15488, observado 328.15588. [α]_D20 = -5.45° (c 0.22, CHCl₃),

***(R)*-1-((((*S*)-1-metoxi-1-oxopropan-2-il)oxi)metil)-5-oxopirrolidin-2-carboxilato de metilo 28b.**

En un matraz se agrega al (*S*)-Lactato de metilo (57 mg, 0.54 mmol), **19-(*R*)**(124 mg, 0.65 mmol), se disuelve en diclorometano seco y se agrega hidrotalcita (50 mg) y finalmente triflato de plata (166 mg, 0.65 mmol), la reacción se agita a temperatura ambiente y sin luz por 6 horas. . La mezcla de reacción se filtra, para recuperar la hidrotalcita, se lava la mezcla de reacción con salmuera, se seca con cloruro de calcio, y se concentra. El producto se purifica por cromatografía en columna flash con un eluyente 50:50 Hexano/Acetato de etilo se obtienen 24 mg de producto puro **28b**, 17%. RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃), δ 5.02 (d, *J* = 11.4 Hz, 3H), 4.72 (d, *J* = 11.4 Hz, 3H), 4.45 (dd, *J* = 8.9, 3.2 Hz, 5H), 4.14 (q, *J* = 6.9 Hz, 4H), 3.75 (s, 3H), 3.70 (s, 3H), 2.28-2.03 (m, 4H) , 1.35 (d, *J* = 6.9 Hz, 9H). RMN-

^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ 176.3, 173.8, 172.6, 77.6, 73., 71.82, 58.3, 52.6, 52.1, 29.6, 23.0, 18.6. DART⁺ m/z (rel intensidad, %): $[2M+1]$ 518 (4), 415 (14), $[M+2]$ 261 (12), $[M+1]$ 260 (100), 156 (41). ESI⁺ m/z : $\text{C}_{11}\text{H}_{18}\text{N}_1\text{O}_5$ $[M+1]$ calculada 260.11341 observada. 260.113003. $[\alpha]_{\text{D}20} = -9.92^\circ$ (c 0.252, CHCl_3).

6.2 Metodología de una sola derivación

Reducción de la Hispanolona al alcohol- β

(1R,2R,3R,8aS)-1-(2-(furan-3-il)etil)-2,5,5,8a-tetrametidecahidronaftalen-1,3-diol. alcohol- β de la hispanolona.

Se mezcló en un matraz de bola Hispanolona (300 mg, 0.94 mmol) en metanol seco (10 mL), a 0 °C, la mezcla de reacción se agitó y se adicionó NaBH_4 (300 mg, 0.94 mmol), se mantuvo la agitación por 16 h. Se adiciono ácido sulfúrico (0.5 mL), y se concentró al vacío, la mezcla se disolvió en acetato de etilo, se lavó con agua destilada, se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró, y se concentró al vacío. El producto se purificó por Cromatografía flash con n-hexano/Acetato de etilo 90/10 como eluyente, obteniendo 60 mg del α -alcohol (20 %) p.f. 129 °C, 134 mg del derivado borato (35%) p.f. 205°C, y 45 mg (15%) de alcohol- β p.f., 105°C RMN ^1H (300MHz, CDCl_3) δ 7.33 (t, J = 1.6 Hz, 1H), 7.23 – 7.17 (m, 1H), 6.26 (dd, J = 1.8, 0.9 Hz, 1H), 3.49 (td, J = 10.7, 5.2 Hz, 1H), 2.59 – 2.36 (m, 3H), 1.95 – 1.24 (m, 23H), 1.10 (d, J = 6.6 Hz, 2H), 0.96 (s, 2H), 0.87 (d, J = 10.7 Hz, 5H). RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ 143.0, 138.6, 125.4, 110.9, 78.7, 73.2, 44.4, 44.0, 43.1, 41.7, 35.4, 33.7, 33.3, 32.3, 31.7, 22.1, 21.7, 18.6, 16.5, 11.5.

Methyl (2S)-1-((((2R,3R,4R,4aS)-4-(2-(furan-3-yl)ethyl)-4-hydroxy-3,4a,8,8-tetramethyldecahydronaphthalen-2-yl)oxy)methyl)-5-oxopyrrolidina-2-carboxylate, 29.

En un matraz de bola se agregó alcohol- β de hispanolona (32 mg, 0.1 mmol), THF seco, NaH (7 mg, 1.8 mmol) a 0°C, después de 10 minutos se agregó por cánula

19-(S) (57 mg, 0.3mmol) disuelto en THF, la mezcla de reacción se llevó a cabo en microondas por 3h a 100°C. Al final de la reacción se adiciona agua y se concentró al alto vacío, se extrajo con acetato de etilo, se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se purificó por cromatografía en columna flash con Hexano/Acetato de etilo obteniendo 20 mg of **29** (40%). RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 7.35 (t, J = 1.7 Hz, 1H), 7.22 (dd, J = 1.6, 0.9 Hz, 1H), 6.28 – 6.26 (m, 2H), 5.28 (d, J = 10.0 Hz, 1H), 4.48 (dd, J = 8.6, 3.5 Hz, 1H), 4.43 (d, J = 9.9 Hz, 1H), 3.78 (s, 3H), 3.29 (td, J = 10.7, 5.1 Hz, 1H), 2.65 – 2.28 (m, 3H), 2.21 – 2.04 (m, 1H), 1.95 – 1.79 (m, 2H), 1.80 – 1.65 (m, 2H), 1.57 (s, 9H), 1.54 – 1.13 (m, 7H), 1.06 (d, J = 6.5 Hz, 3H), 0.95 (s, 3H), 0.87 (d, J = 10.2 Hz, 6H). RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ 175.1, 172.2, 142.9, 138.5, 125.2, 110.8, 80.9, 78.4, 77.2, 72.0, 57.7, 52.5, 43.5, 42.8, 42.8, 41.5, 35.2, 33.5, 33.2, 32.0, 29.7, 28.5, 22.9, 21.9, 21.5, 18.5, 16.3, 11.3.

Mezcla de 2-Carboxilato (2S)-1-(((2R,3R,3aR,4aS,4bS,8R,10aR)-2-hidroxi-3,7,7,10a-tetrametiltetradecahidro-3,4b-metanonafto[2',1':3,4]ciclohepta[1,2-b]oxiren-8-il)oxi)metil)-5-oxopirrolidin-2-carboxilato de metilo (2S)-1-(((2R,3R,3aR,4aS,4bS,8R,10aR)-8-hidroxi-3,7,7,10a-tetrametiltetradecahidro-3,4b-metanonafto[2',1':3,4]ciclohepta[1,2-b]oxiren-2-il)oxi)metil)-5-oxopirrolidona de metilo, 30.1 y 2-Carboxilato (2S)-1-(((2R,3R,3aR,4aS,4bS,8R,10aR)-8-hidroxi-3,7,7,10a-tetrametiltetradecahidro-3,4b-metanonafto[2',1':3,4]ciclohepta[1,2-b]oxiren-2-l)oxi)metil)-5-oxo pyrrolidina de metilo, 30.2.

En un matraz de bola se agregó el derivado epóxido beyereno **30** obtenido de la especie vegetal *Viguiera insignis* (40 mg, 0.12 mmol), THF seco, NaH (11 mg, 0.8 mmol) a 0°C, después de 10 min se agregó por cánula **19-(S)** (77 mg, 0.4 mmol) disuelto en THF, la mezcla de reacción se llevó a cabo en microondas por 3h a 110°C. Al final de la reacción se adiciona agua y se concentró al alto vacío, se extrajo con acetato de etilo, se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se purificó por cromatografía en columna flash con /Hexano/Acetato de etilo, 70/30,

obteniendo 34 mg de una mezcla de **30.1** y **30.2** (30%).RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 5.22 (t, J = 10.7 Hz, 1H), 4.41 (ddt, J = 11.2, 6.2, 3.6 Hz, 4H), 3.78 (d, J = 1.0 Hz, 3H), 3.50 – 3.42 (m, 1H), 3.37 (d, J = 2.9 Hz, 1H), 3.22 (dd, J = 11.5, 4.5 Hz, 1H), 3.00 (dd, J = 10.9, 2.8 Hz, 1H), 2.91 (dd, J = 11.6, 4.2 Hz, 1H), 2.60 – 2.24 (m, 4H), 1.98 – 1.83 (m, 1H), 1.62 (d, J = 19.1 Hz, 2H), 1.26 (s, 1H), 1.11 (s, 2H), 1.03(s, 2H), 0.91 (d, J = 2.1 Hz, 7H), 0.80 (d, J = 8.3 Hz, 3H). RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ 175.9, 175.8, 172.3, 172.2, 83.7, 78.8, 77.2, 77.2, 72.1, 69.3, 69.1, 59.6, 59.2, 57.7, 57.6, 55.7, 55.5, 55.4, 55.1, 52.6, 52.5, 52.0, 51.6, 44.6, 44.3, 44.0, 43.9, 39.0, 38.8, 38.7, 38.3, 37.4, 37.1, 36.9, 36.8, 32.7, 29.7, 29.3, 28.8, 28.2, 28.2, 27.2, 23.9, 22.9, 22.1, 19.5, 18.1, 17.7, 16.2, 15.9, 15.6.

Isoborneol/Borneol

A una mezcla de metanol seco (10 mL) y (-)-alcanfor (100 mg, 0.65 mmol) en agitación se adicionó borohidruro de sodio (59 mg, 1.58 mmol); la mezcla de reacción se agitó por 1 h; después se agregó sobre 15 mL de hielo, el sólido formado se filtró al vacío obteniendo 63 mg (66.8%) de (+)-Isoborneol/(-)-borneol.

Mezcla de 5-oxo-1-(((1S,2R,4S)-1,7,7-trimetilbicyclo[2.2.1]heptan-2-il)oxi)metil)pirrolidin-2-carboxilato de metilo y 5-oxo-1-(((1S,2S,4S)-1,7,7-trimetilbicyclo[2.2.1]heptan-2-il)oxi)metil)pirrolidin-2-carboxilato de metilo **31+32.**

Una mezcla 80/20 de (+)-isoborneo/(-)-borneol (50 mg, 0.25 mmol), **19**-(S) (60 mg, 0.33 mmol), HT (20mg) y AgOTf (77 mg, 0.33 mmol) en diclorometano seco, se agitó a temperatura ambiente por 8h; el crudo de reacción se aisló como la metodología general y se purificó por cromatografía en columna con hexano/acetato de etilo 90/10 como eluyente para obtener 31 mg de **31 +32**. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 5.05 (d, J = 10.5 Hz, 0.2H), 4.99 (d, J= 10.5 Hz, 1H), 4.46 (d, J = 10.5 Hz, 1H), 4.44 (d, J = 10.5 Hz, 0.2H), 4.30 (dd, J = 8.7, 3.3 Hz, 1H), 3.73 (s, 1H), 3.72 (s, 3H), 3.35 – 3.24 (m, 1H), 2.60 – 1.98 (m, 5H), 1.77 – 1.35 (m,

5H), 0.95 (td, J = 7.3, 6.4, 2.9 Hz, 1H), 0.89 (s, 3H), 0.83 (s, 3H), 0.79 (s, 1H), 0.77 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 0.75 (s, 3H). RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ 175.6, 175.5, 172.4, 86.5, 82.4, 72.2, 70.8, 57.8, 57.5, 52.4, 49.2, 48.9, 47.8, 46.6, 45.1,

Procedimiento general de formación de amidas diastereoisoméricas entre aminas alfa quirales y (S o R)-Ácido piroglutámico.

En un matraz de bola se mezclan ácido piroglutámico (*R* o *S*) (1 equivalente), HOBt (1.2 equivalentes), EDC (1.2 equivalentes), ánima alfa quiral (1.5 equivalentes), Morfolina (1.5 equivalentes) y Diclorometano seco. La mezcla de reacción se mantuvo en agitación hasta que en cromatografía en capa fina se observa la formación del nuevo producto y el consumo del ácido piroglutámico. Al finalizar, el crudo de reacción se lava con carbonato de potasio al 5%, seguido del lavado con ácido cítrico al 10 % para eliminar la amina libre, y finalmente un lavado con salmuera hasta pH neutro, obteniendo la amida correspondiente, la cual se purifica por cristalización.

(S)-(5-oxopirrolidona-2-carbonil)-L-fenilalaninato de metilo 33a.

En un matraz de bola se mezclaron (S)-ácido piroglutámico (0.5 mmol, 65 mg), HOBt (0.6 mmol,92 mg), EDC , L-éster metílico de fenilalanina clorhidrato (0.75 mmol, 161.75 mg) y Morfolina (0.75 mmol, 65.34 mg) en Diclorometano seco (8 mL). La mezcla de reacción se mantuvo en agitación por 30 minutos El crudo de reacción se trató como siguiendo el procedimiento general y la amida se cristalizó en acetato de etilo/hexano, obteniendo 110 mg (81%) de 12a. RMN ^{13}C 75 MHz, CDCl_3) δ 179.50 172.5, 172.4, 136.2, 129.1, 128.4, 126.9, 57.1, 52.9, 52.4, 37.5, 29.0, 24.5.

(R)-(5-oxopirrolidona-2-carbonil)-L-fenilalaninato de metilo 33b.

En un matraz de bola se mezclaron (R)-ácido piroglutámico (0.5 mmol, 65 mg), HOBt (0.6 mmol,92 mg), EDC (0.6 mmol, 115 mg) , L-éster metílico de fenilalanina clorhidrato (0.75 mmol, 161.75 mg) y Morfolina (0.75 mmol, 65 mg) en

Diclorometano seco (8 mL). La mezcla de reacción se mantuvo en agitación por 30 minutos. El crudo de reacción se trató siguiendo el procedimiento general y la amida se cristalizó en acetato de etilo/hexano, obteniendo 105 mg (77%) de **33b**. RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 179.5, 172.1, 172.1, 136.0, 129.0, 128.4, 126.9, 56.7, 53.2, 52.3, 37.4, 29.3, 25.6.

(S)- (5-oxopirrolidona-2-carbonil)-L-Leucinato de metilo 34a.

En un matraz de bola se mezclaron (S)-ácido piroglutámico (0.25 mmol, 33 mg), HOBt (0.33 mmol, 41 mg), EDC (0.33 mmol, 57mg) , L-éster metílico de leucina clorhidrato (0.38 mmol, 68 mg), Morfolina (0.38 mmol, 33 mg) en Diclorometano seco (6 mL). La mezcla de reacción se mantuvo en agitación por 6 horas. El crudo de reacción se trató siguiendo el procedimiento general y la amida se cristalizó en acetato de etilo/hexano, obteniendo 53 mg (70%) de **34a**. RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 7.47 (s, NH), 7.60 (d, J=7.9Hz, NH), 4.62 (dd, J=6.65, 8.35, 1H), 4.41 (dd, J=, 1H), 3.63 (s, 3H), 2.46 (m, 4H), 1.6 (m, 1H), 0.89 (d, 3H), 0.87 (d, 3H). RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ 179.5, 173.9, 172.7, 57.4, 52.3, 50.4, 40.6, 29.3, 25.5, 24.8, **22.7, 21.4**.

(R)- (5-oxopirrolidona-2-carbonil)-L-Leucinato de metilo 34b.

En un matraz de bola se mezclaron (R)-ácido piroglutámico (0.25 mmol, 33 mg), HOBt (0.33 mmol, 41 mg), EDC (0.33 mmol, 57mg) , L-éster metílico de leucina clorhidrato (0.38 mmol, 68 mg), Morfolina (0.38 mmol, 33 mg) en Diclorometano seco (8mL). La mezcla de reacción se mantuvo en agitación por 6 horas. El crudo de reacción se trató siguiendo el procedimiento general y la amida se cristalizó en acetato de etilo/hexano, obteniendo 50 mg (66%) de **34b**. RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 7.5 (s, NH), 7.17(d, J=7.9Hz, NH), 4.6 (dd, J=6.65, 8.35, 1H), 4.22 (dd, J=, 1H), 3.68 (s, 3H), 2.45 (m, 4H), 1.62 (m, 1H), 0.91 (d, 3H), 0.89 (d, 3H). RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ 179., 173.9, 172.90 57.00, 52.3, 50.7, 40.6, 29.4, 25.7, 24.7, 22.8, 21.5.

(S)- (5-oxopirrolidona-2-carbonil)-L-prolinato de bencilo 35a.

En un matraz de bola se mezclaron (S)-ácido piroglutámico (0.25 mmol, 33 mg), HOBt (0.33 mmol, 41 mg), EDC (0.33 mmol, 57mg) , L-éster bencílico de prolina clorhidrato (0.38 mmol, 92 mg), Morfolina (0.38 mmol, 33 mg) en Diclorometano seco (6 mL). La mezcla de reacción se mantuvo en agitación por 8 horas. El crudo de reacción se trató siguiendo el procedimiento general y la amida se cristalizó en acetato de etilo/hexano, obteniendo 49 mg (64%) de **35a**. RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ 178.5, 171.6, 170.3, 135, 128.5, 128., 128.30, 66., 59.45, 55.2, 46.5, 29.2, 28.7, 24.8, 24.7.

(R)-(5-oxopirrolidona-2-carbonil)-L-prolinato de bencilo 35b.

En un matraz de bola se mezclaron (R)-ácido piroglutámico (0.25 mmol, 33 mg), HOBt (0.33 mmol, 41 mg), EDC (0.33 mmol, 57mg), L-éster bencílico de prolina clorhidrato (0.38 mmol, 92 mg), Morfolina (0.38 mmol, 33 mg) en Diclorometano seco (7 mL). La mezcla de reacción se mantuvo en agitación por 8 horas. El crudo de reacción se trató siguiendo el procedimiento general y la amida se cristalizó en acetato de etilo/hexano, obteniendo 53 mg (58%) de **35b**. RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ 179.1, 171.6, 170.5, 135.5, 128.5, 128.3, 128.1, 66.9, 59.2, 54.1, 46.2, 29.1, 28.6, 24.9, 24.3.

(S)- (5-oxopirrolidona-2-carbonil)-L-valinato de bencilo 36a.

En un matraz de bola se mezclaron (S)-ácido piroglutámico (0.25 mmol, 33 mg), HOBt (0.33 mmol, 41 mg), EDC (0.33 mmol, 57mg) , L-valina bencil éster clorhidrato (0.38 mmol, 93 mg), Morfolina (0.38 mmol, 33 mg) en Diclorometano seco (7 mL). La mezcla de reacción se mantuvo en agitación por 12 horas. El crudo de reacción se trató siguiendo el procedimiento general y la amida se cristalizó en acetato de etilo/hexano, obteniendo 42 mg (45%) de **36a**. RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ 179.9, 172.2, 171.9, 135.1, 128.64, 128.6, 128.4, 67.3, 57.2, 57.0, 31.2, 29.3, 26.1, 19.1, 17.8.

(R)-(5-oxopirrolidona-2-carbonil)-L-valinato de bencilo 36b.

En un matraz de bola se mezclaron (R)-ácido piroglutámico (0.25 mmol, 33 mg), HOBt (0.33 mmol, 41 mg), EDC (0.33 mmol, 57mg) , L-valina bencil éster clorhidrato (0.38 mmol, 92 mg), Morfolina (0.38 mmol, 33 mg) en Diclorometano seco (7 mL). La mezcla de reacción se mantuvo en agitación por 8 horas. El crudo de reacción se trató siguiendo el procedimiento general y la amida se cristalizó en acetato de etilo/hexano, obteniendo 44 mg (48%) de **36b**. RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ 179.2, 172.0, 171.5, 135.1, 128.6, 128.5, 128.4, 67.3, 57.1, 56.9, 30.9, 29.3, 25.9, 25.9, 19.0, 17.7.

(S)- (5-oxopirrolidona-2-carbonil)-L-serinato de bencilo 37a.

En un matraz de bola se mezclaron (S)-ácido piroglutámico (0.25 mmol, 33 mg), HOBt (0.33 mmol, 41 mg), EDC (0.33 mmol, 57mg) , L-serina bencil éster clorhidrato (0.38 mmol, 88 mg), Morfolina (0.38 mmol, 33 mg) en Diclorometano seco (7 mL). La mezcla de reacción se mantuvo en agitación por 10 horas. El crudo de reacción se trató siguiendo el procedimiento general y la amida se cristalizó en acetato de etilo/hexano, obteniendo 31 mg (35%) de **37a**. RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ 180.0, 172.8, 170.3, 134.9, 128.4, 128.3, 128.0, 67.4, 61.7, 56.7, 54.7, 29.2, 25.1.

(R)-(5-oxopirrolidona-2-carbonil)-L-serinato de bencilo 37b.

En un matraz de bola se mezclaron (R)-ácido piroglutámico (0.25 mmol, 33 mg), HOBt (0.33 mmol, 41 mg), EDC (0.33 mmol, 57mg, L-serina bencil éster clorhidrato (0.38 mmol, 88 mg), Morfolina (0.38 mmol, 33 mg) en Diclorometano seco (7 mL). La mezcla de reacción se mantuvo en agitación por 10 horas. El crudo de reacción se trató siguiendo el procedimiento general y la amida se cristalizó en acetato de etilo/hexano, obteniendo 30 mg (34%) de **37b**. RMN ¹³C

(75 MHz, CDCl₃) δ 179.9, 173.00, 170.3, 135.1, 128.3, 128.2, 127.9, 67.2, 61.5, 56.7, 54.4, 29., 25.21.

(S)- (5-oxopirrolidona-2-carbonil)-L-triptofanato de metilo 38a.

En un matraz de bola se mezclaron (S)-ácido piroglutámico (0.25 mmol, 33 mg), HOBt (0.33 mmol, 41 mg), EDC (0.33 mmol, 57mg) , L-triptófano metil éster clorhidrato (0.38 mmol, 97 mg), Morfolina (0.38 mmol, 33 mg) en Diclorometano seco (7 mL). La mezcla de reacción se mantuvo en agitación por 1 hora. El crudo de reacción se trató siguiendo el procedimiento general y la amida se cristalizó en acetato de etilo/hexano, obteniendo 138 mg (96%) de **38a**. RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ 179.3, 172., 171.9, 136.2, 127., 123.3, 123., 122.3, 119., 118.3, 111.4, 109.4, 56., 52.6, 52.6, 29.0,27.4, 25.5.

(R)-(5-oxopirrolidona-2-carbonil)-L--triptofanato de metilo 38b.

En un matraz de bola se mezclaron (R)-ácido piroglutámico (0.25 mmol, 33 mg), HOBt (0.33 mmol, 41 mg), EDC (0.33 mmol, 57mg), L-triptófano metil éster clorhidrato (0.38 mmol, 97 mg), Morfolina (0.38 mmol, 33 mg) en Diclorometano seco (7 mL). La mezcla de reacción se mantuvo en agitación por 1 hora. El crudo de reacción se trató siguiendo el procedimiento general y la amida se cristalizó en acetato de etilo/hexano, obteniendo 136 mg (95%) de **38b**. RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ 180.0, 172.4, 171.9, 136.3, 127.3, 122.7, 122.3, 119.6, 118.1, 111.6, 109.3, 57.2, 52.6, 52.3, 29.3, 27.1, 25.7.

(S)-N-((S)1-Naftalen-1-il)etil)-5-oxopirrolidona-2-carboxamida) 39a.

En un matraz de bola se mezclaron (S)-ácido piroglutámico (0.25 mmol, 33 mg), HOBt (0.33 mmol, 41 mg), EDC (0.33 mmol, 57mg), (S)-1-naftiletilamina (0.38 mmol, 65 mg), Morfolina (0.38 mmol, 33 mg) en Diclorometano seco (6 mL). La mezcla de reacción se mantuvo en agitación por 1 hora. El crudo de reacción se trató siguiendo el procedimiento general y la amida se cristalizó en acetato de

etilo/hexano, obteniendo 69 mg (95%) de **39a**. RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ 179.3, 170.7, 137.8, 133.9, 133.9, 130.9, 128.8, 128.4, 126.5, 125.2, 122.9, 122.6, 57.1, 44.7, 29.2, 25.8, 20.6.

(R)-N-((S)-1-Naftalen-1-il)etil)-5-oxopirrolidona-2-carboxamida 39b.

En un matraz de bola se mezclaron (*R*)-ácido piroglutámico (0.25 mmol, 33 mg), HOBt (0.33 mmol, 41 mg), EDC (0.33 mmol, 57 mg), (*S*)-1-naftiletilamina (0.38 mmol, 65 mg), Morfolina (0.38 mmol, 33 mg) en diclorometano seco (7 mL). La mezcla de reacción se mantuvo en agitación por 1 hora. El crudo de reacción se trató siguiendo el procedimiento general y la amida se cristalizó en acetato de etilo/hexano, obteniendo 66 mg (90%) de **39b**. RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ 178.8, 170.7, 137.7, 134.0, 131.0, 128.9, 128.6, 126.6, 125.9, 122.2, 123.1, 122.8, 56.95, 44.7, 29.7, 26.1, 20.6.

6. Referencias.

- 1) K. C. Nicolaou, S. A. Snyder; *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2005**, 44, 1012–1044. Doi: <https://doi.org/10.1002/anie.20046086>.
- 2) a. L.Y. Kong, Wang Peng; *Chin. J. Nat. Med*; **2013**, 11(3): 0193 –0198. Doi: [https://doi.org/10.1016/s1875-5364\(13\)60016-3](https://doi.org/10.1016/s1875-5364(13)60016-3). b. T. J. Wenzel, *Differentiation of Chiral Compounds Using NMR Spectroscopy*, 2nd edn, 2018, John Wiley and Sons. ISBN: 978-1-119-32391-4
- 3) J. A. Dale y H.S. Mosher; *J. Am. Chem. Soc.*; **1973**, 95, 2, 512-519. Doi: <https://doi.org/10.1021/ja00783a034>.
- 4) T. J. Wenzel, C. D. Chisholm; *Chirality*, **2011**, 23:190-214. Doi: <https://doi.org/10.1002/chir.20889>
- 5) J. M. Seco, E. Quiñoá, R. Riguera; *Tetrahedron: Asymmetry.*; **2001**, 12: 2915-2925. Doi: [https://doi.org/10.1016/s0957-4166\(01\)00508-0](https://doi.org/10.1016/s0957-4166(01)00508-0).
- 6) J. M. Seco, E. Quiñoá, R. Riguera; *Chem. Rev.*, **2004**, 104, 17, 117. Doi: <https://doi.org/10.1021/cr000665j>.

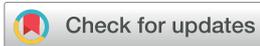
- 7) I. Louzao, J. M. Seco, E. Quiñoá, R. Riguera; *Chem. Com.*; **2010**, 46, 7903-7905. Doi: <https://doi.org/10.1002/anie.200905222>
- 8) M. Prashad, M. Seth, A. P. Bhaduri, A. Banerji, *Org. Mag. Reason.*, **1980**, 14, 74-75. Doi: <https://doi.org/10.1002/mrc.1270140118>
- 9) L. A. M.M. Barbosa, P. Sautet; *J.Catal.*, **2003**, 217, 1, 23-29. [https://doi.org/10.1016/s0021-9517\(03\)00039-3](https://doi.org/10.1016/s0021-9517(03)00039-3).
- 10) M. Kobayashi; *Tetrahedron*, **2000**, 56, 1661–1665. Doi: [https://doi.org/10.1016/s0040-4020\(00\)00070-3](https://doi.org/10.1016/s0040-4020(00)00070-3).
- 11) A. Stefanucci, E. Novellino, R. Constante, A. Mollica; *Heterocycles*, **2014**, vol. 89, No. 8, 1801-1825.
- 12) E. L. Bentz, R. Goswami, M. G. Moloney, S. M. Westaway; *Org. Biomol. Chem.*, **2005**, 3, 2872-2882. Doi: <https://doi.org/10.1039/b503994k>.
- 13) B. E. Domínguez, P. E. García, J. Cárdenas; *Tetrahedron: Asymmetry* , **2005**, 16, 3976-3985. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.tetasy.2005.11.003>.
- 14) G. D. Williams, C. E. Wade, G. J. Clarkson, M. Wills; *Tetrahedron: Asym.*, **2007**, 18, 664-670. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.tetasy.2007.02.014>.
- 15) Ref Gaussian 16, Revision A.03, M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, X. Li, M. Caricato, A. V. Marenich, J. Bloino, B. G. Janesko, R. Gomperts, B. Mennucci, H. P. Hratchian, J. V. Ortiz, A. F. Izmaylov, J. L. Sonnenberg, D. Williams-Young, F. Ding, F. Lipparini, F. Egidi, J. Goings, B. Peng, A. Petrone, T. Henderson, D. Ranasinghe, V. G. Zakrzewski, J. Gao, N. Rega, G. Zheng, W. Liang, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, K. Throssell, J. A. Montgomery, Jr., J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. J. Bearpark, J. J. Heyd, E. N. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, T. A. Keith, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. P. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, J. M. Millam, M. Klene, C. Adamo, R. Cammi, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, O. Farkas, J. B. Foresman, and D. J. Fox, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2016. Doi: <https://gaussian.com/citation/> (accessed 2023-08-14).

- 16) A. G. Savona, F. Piozzi, B. Rodríguez, *Heterocycles*, 9, **1978**, 9, pp. 257-261. b). L. Rodríguez-Hahn, J. Cárdenas, B. Esquivel, R.A. Toscano; B. Rodríguez; *Tetrahedron Lett.*; **1995**, 36(36), 6391–6394. Doi: [https://doi.org/10.1016/0040-4039\(95\)01321-8](https://doi.org/10.1016/0040-4039(95)01321-8).
- 17) G. Delgado, A. Romo de Vivar, A. Ortega, J. Cárdenas, E. O. Schlemper, *Phytochemistry*. **1983**, 22, 5, 1227-1230. Doi: [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(83\)80227-1](https://doi.org/10.1016/0031-9422(83)80227-1).

Anexo

Publicación

PAPER



Cite this: *New J. Chem.*, 2023, 47, 9222

Assignment of the absolute configuration of secondary alcohols by ^{13}C NMR and its correlation with methyl-1-(chloromethyl)-oxopyrrolidine-2-carboxylate and quantum-mechanical GIAO calculations†

Eréndira Torales,^a Serguei Fomine^{ib} and Jorge Cárdenas^{ib} *^a

Analysis of the effect of steric compression on the chemical shifts of carbons (^{13}C NMR) in diastereoisomers is an accessible strategy for assigning the absolute configuration of secondary alcohols. Here we take advantage of such chemical shift differences and establish a validation protocol to assign the absolute configuration of secondary alcohols in natural products. The two enantiomers of methyl-1-(chloromethyl)-5-oxopyrrolidine-2-carboxylate are used as derivatizing agents to treat separately a secondary alcohol producing two diastereoisomeric derivatives. These derivatives exhibit clear ^{13}C NMR differences only at four carbons: first at the stereogenic oxygenated carbon and methylene of the chiral assistant with a deshielding effect up to 3 ppm, and a shielding effect for the α carbons to the stereogenic centre. With the results obtained from a 1D NMR ^{13}C spectrum, we were able to establish the absolute stereochemistry of the asymmetric centre beyond the concept of anisotropy. The observed changes in chemical shifts correlate well with the results obtained by the GIAO method applying the B3LYP/6-311+(2d,p) theoretical model to calculate the NMR shielding tensors of the diastereoisomeric derivatives. Furthermore, the steric compression effect was observed as well by ^1H NMR at the methylene of the pyroglutamic moiety, since the magnitude of its geminal coupling constant is directly influenced by the stereochemistry of the secondary alcohol, thus, confirming the stereochemistry assignment of the asymmetric carbon.

Received 30th November 2022,
Accepted 18th April 2023

DOI: 10.1039/d2nj05887a

rsc.li/njc

1. Introduction

Natural products structural elucidation is decisive, and the absolute configuration assignment is imperative, where various strategies have been described.¹ However, each strategy has its own scope and limitation, and its use depends on the chemical and physical properties of the substrate to be analysed. Nuclear Magnetic Resonance (NMR) is preferred when the natural product exhibits different chemical functionalities.^{2,3} In addition, NMR techniques are the most used for the determination of absolute configuration since chemical shifts are sensitive to the electronic surroundings of a nucleus caused by conformational changes.

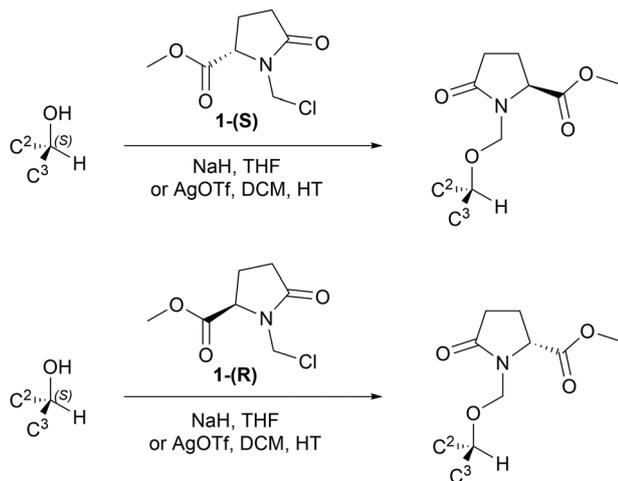
The widely known ^1H NMR method for determining the absolute configuration was proposed by Mosher in 1973.⁴ This method is based on the derivatization of a chiral alcohol through the formation of diastereoisomeric esters. Since then, several methodologies have been developed,⁵⁻⁷ and they are based on differences in chemical shifts between two diastereoisomeric ester derivatives. The diastereoisomers exhibit different chemical shifts due to anisotropic effects caused by the aromatic substituent of the ester, when chiral Mosher type agents are used in ^1H NMR. Nonetheless, these anisotropic effects are imperceptible or nonexistent when ^{13}C is the observed nucleus because nuclear shielding is affected by molecular conformation.⁸ In ^{13}C NMR, alkyl groups closer in space have a strong effect on those carbons separated by three bonds. This kind of shielding effect is known as steric compression shifts. For instance, fucufuranose tetraacetate has been used as a chiral derivatizing agent with chiral alcohols to produce the diastereoisomers β -D- and β -L-fucufuranosides.⁹ The downfield induced chemical shift for the oxygenated carbon and the upfield shift for the α -C-H bonds when approaching the

^a Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, Ciudad de México, 04510, Mexico.

E-mail: rjcp@unam.mx

^b Instituto de Investigación en Materiales, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, Ciudad de México, 04510, Mexico

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: <https://doi.org/10.1039/d2nj05887a>



C^2 larger than C^3

Fig. 1 Synthesis of diastereomeric *N*-alkoxy methylene derivatives by Williamson's etherification reaction with derivatization agent **1**. The alcohols used as starting materials are asymmetric, and its substituents C^2 and C^3 follow the Cahn–Ingold–Prelog sequence rules.¹⁶

1,3-syn-periplanar alignment allow the absolute stereochemistry to be assigned. In summary, this steric compression is an effect which favours the use of ^{13}C NMR for stereochemical assignments.¹⁰

We looked for those steric compression shifts in ^{13}C NMR to facilitate the determination of the absolute configuration by using methyl-1-(chloromethyl)-5-oxopyrrolidine-2-carboxylate **1**¹¹ as a chiral derivatizing agent (Fig. 1). Although it has been used previously for absolute configuration assignment based on ^1H NMR NOESY experiments,¹² the steric effects are not distinguishable. Therefore, we took advantage of the steric effects caused by the pyroglutamic group in the chemical shift of the secondary alcohol once it is a derivative (Fig. 2).

We compared the NMR experimental chemical shift values with the theoretical values from the gauge including atomic orbitals (GIAO) calculation model,¹³ and looked at the value of the geminal coupling constant of the O-based methylene in the pyroglutamic moiety. Finally, after establishing a set of steps to assign the absolute configuration of the alcohol based on 1D ^{13}C NMR, we applied them to solve the absolute configuration of three natural products.

2. Results and discussion

N-Alkoxy methylene derivatives were prepared by either the Williamson's reaction using NaH in anhydrous THF,¹⁴ or silver triflate (AgOTf)¹⁵ in the presence of hydrotalcite (HT) to avoid alcohol dehydration (Fig. 1).

Initially, diastereomeric derivatives were prepared from natural products bearing a secondary alcohol of known absolute configuration as shown in Fig. 3. Aside from menthol (**2**), where both enantiomers are accessible and reacted with only one enantiomer of **1**; when only one enantiomer of the alcohol is available (Fig. 4), it reacted separately with the (*R*) and (*S*)

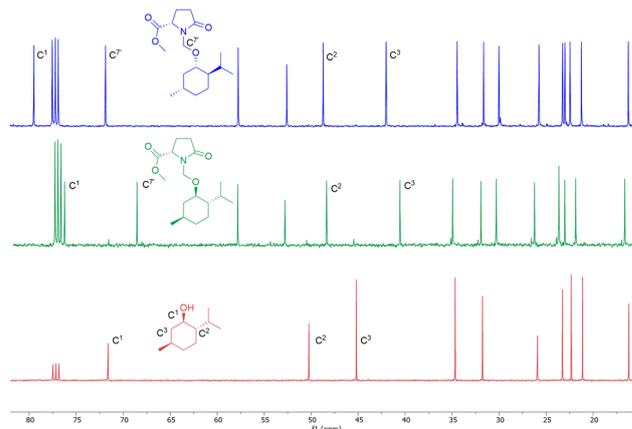


Fig. 2 ^{13}C NMR spectra of menthol **2** and its derivatives after reaction with **1**-(*S*). In red, the ^{13}C NMR spectrum of **2** (*R*)-menthol specifying C^1 , C^2 and C^3 substituents. In green and blue, the ^{13}C NMR spectra of **2a** (*R*)-(*S*) and **2b** (*S*)-(*S*); respectively. The chemical shifts for groups C^1 , C^2 and C^3 are distinguishable in both diastereoisomers, as well as the chemical shift of $C^{7'}$ which belongs to the pyroglutamate group of the derivatizing agent **1**-(*S*).

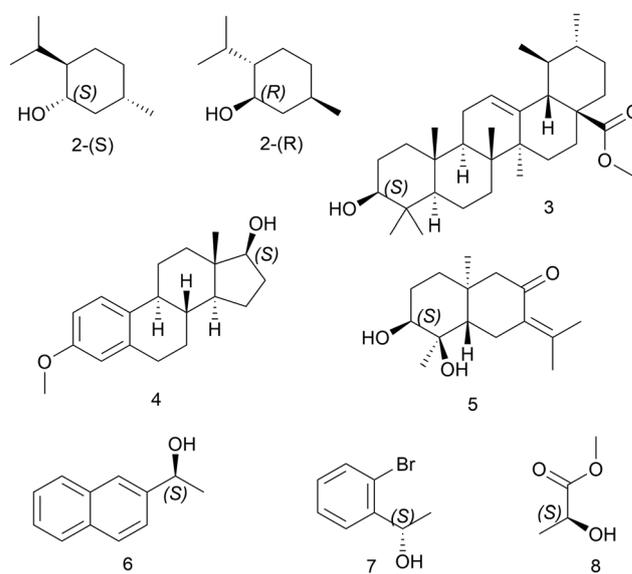


Fig. 3 Structures of the secondary alcohols used in this study. The known absolute configuration of the stereogenic centres is indicated in parentheses. Their IUPAC names can be found in the ESI.†

enantiomers of **1** to generate two diastereomeric *N*-alkoxy methylene derivatives. The reaction yields ranged from 30–80% yields without racemization.

Then, each pair of diastereoisomers was routinely analysed by ^1H and ^{13}C NMR spectroscopy. We noticed, as expected, the similarity between ^1H NMR spectra exhibiting the absence of anisotropy. But, the largest differences were found in the ^{13}C NMR spectra for four carbons: C^1 , C^2 , C^3 and $C^{7'}$ (See Fig. 2 and ESI†). The chemical shift differences ($\Delta\delta_{S-R} = \delta_S - \delta_R$) of these carbons are expressed as $\Delta\delta_{S-R}$; where δ_S is the chemical shift of

the diastereoisomer derivative with **1**-(*S*) and δ_R is the chemical shift of the diastereoisomer derivative prepared with **1**-(*R*). As previously stated, both menthol enantiomers are available thus this $\Delta\delta_{S-R}$ corresponds to the difference between diastereoisomer derivatives **2b** and **2a** prepared with **1**-(*S*).

Our data show that the most important $\Delta\delta_{S-R}$ values corresponded to the stereogenic carbon of the alcohol C^1 and the methylene attached to oxygen $C^{7'}$ (see Fig. 2 for reference). Moreover, the most downfield shifted ^{13}C NMR signal is exclusively C^1 . The largest $\Delta\delta_{S-R}$ values (3 ppm) were for those six-membered ring derivatives, while the non-cyclic derivatives rendered $\Delta\delta_{S-R}$ negatives from 0.5 to 2 ppm. Following the sequence rules by Cahn-Ingold-Prelog,¹⁶ the α -carbons with higher-priority (C^2) and α -carbons with secondary priority (C^3) to the stereogenic centre were affected as well. In case of the cyclic alcohols, $\Delta\delta_{S-R}$ values were lower for C^2 than C^3 ; whilst for non-cyclic alcohols $\Delta\delta_{S-R}$ values were lower at C^3 . These $\Delta\delta_{S-R}$ are depicted in Fig. 4, for easy association of the value with the structure.

The nature of the alcohol seems to dictate where in the ^{13}C NMR spectra one can find the signal for C^1 , C^2 , C^3 and $C^{7'}$, and therefore, determine the absolute configuration of the asymmetric carbon. If a cyclic alcohol is derivatized, (*S*)-(*S*) derivatives are observed at lower field than (*S*)-(*R*) derivatives with positive $\Delta\delta_{S-R}$ values. In contrast, non-cyclic alcohols show that (*S*)-(*R*) derivatives are more deshielded than (*S*)-(*S*) derivatives with negative $\Delta\delta_{S-R}$ values.

In terms of values, those derivatives from cyclic alcohols with (*S*) configuration derived with **1**-(*S*) led to deshielding of 6–9 ppm for C^1 , while the addition of **1**-(*R*) led to minor deshielding of 4.6–6 ppm. In contrast, the α -carbons, C^2 and C^3 experienced shielding of 0.3–3 ppm by **1**-(*S*), and 0.7–3.4 ppm by **1**-(*R*).

On the other hand, for non-cyclic alcohols, the derivatization with **1**-(*S*) led to approximate deshielding of 5 ppm for the C^1 with (*S*) configuration, while **1**-(*R*) led to greater deshielding of 6–7 ppm. The shielding effect on the α -carbons was more pronounced than the shielding effect on cyclic alcohols, with values of 0.9–3.1 ppm for **1**-(*S*) and 1.2–2.4 ppm for **1**-(*R*).

The experimental data in all cases show the differences in chemical shifts between two diastereoisomeric derivatives is caused by the chirality of **1** once it is attached as an ether to the secondary alcohol. In addition, these results were correlated with geometry optimization chemical shift calculations for *N*-alkoxy methylene derivatives using Gaussian 16 code.¹⁷ B3LYP/6-311+(2d,p) model was used for ^1H and ^{13}C NMR modelling. First, systematic conformational search was performed using MMFF94 force field to ensure that all conformations have been tested and the global minimum conformation was selected. Second, the geometries of lowest energy conformers were optimized at B3LYP/6-311+(2d,p) level, and GIAO Magnetic shielding tensors were calculated at this level for both alcohols and derivatives, as shown in blue in Table 1. Third, the same calculations were repeated for TMS standard. Finally, the difference between the corresponding isotropic shielding tensors gave the calculated chemical shifts.

The calculated $\Delta\delta_{S-R}$ values for each carbon between two diastereoisomers formed was noteworthy. The $\Delta\delta$ sign agreed

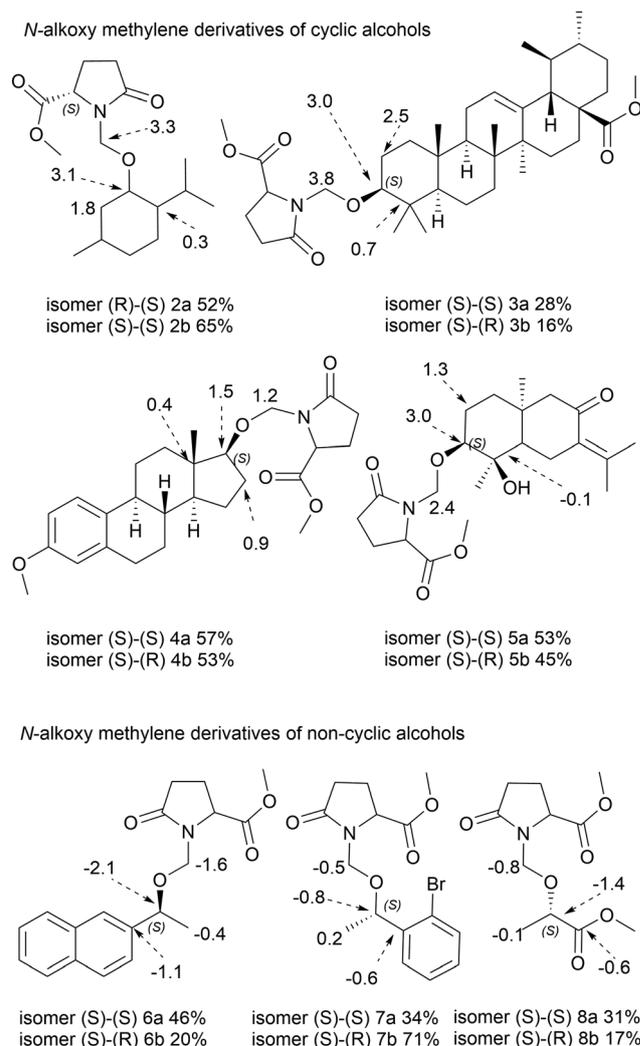


Fig. 4 Experimental chemical shift differences ($\Delta\delta_{S-R}$) between diastereoisomeric *N*-alkoxy methylene derivatives. Top panel: *N*-alkoxy methylene derivatives of cyclic alcohols; bottom panel: *N*-alkoxy methylene derivatives of non-cyclic alcohols. Yields from Williamson's etherification reaction are shown in percentages according to the type of diastereoisomer. The numbers with positive or negative sign are the $\Delta\delta_{S-R}$ values used to predict the absolute configuration of these secondary alcohols.

with the experimental $\Delta\delta_{S-R}$ data when a good correlation existed. Furthermore, the data supported that ^{13}C NMR chemical shifts can be used for the assignment of absolute configuration (See ESI†).

In addition, the conformation of each pair of diastereoisomeric derivatives was evaluated based on geometry optimization. Here it is noticeable the conformation adopted by the pyroglutamic acid ring because the methyl ester of the chiral agent is twisted; and the movement of the oxygen from the carbonyl moiety was closer to the methoxy group in one diastereoisomer; and closer to the hydrogen of the stereogenic centre in the other diastereoisomer (Fig. 5). These conformations also altered the chemical shift of the stereogenic centre of the alcohol and its α -neighbours, resulting in an upfield shift of the α -carbons signals by the effect of steric compression. Furthermore, the

Table 1 Induced chemical shifts from ^{13}C NMR spectra. Each alcohol was first derivatized with **1-(S)** and **1-(R)**. In blue are shown the estimated induced chemical shifts by GIAO model

Alcohol	Effect of 1-(S)			Effect of 1-(R)		
	C ¹	C ²	C ³	C ¹	C ²	C ³
2-(S)	+8	-1.5	-3.1			
	+ 9.8	+ 2.4	-6.7			
2-(R)	+4.9	-2.1	-4.9			
	+ 6.5	+ 2.2	-7.2			
3-(S)	+9.0	-0.3	-3.3	+6.0	-1.0	-2.4
	-14.2	-15.0	-21	-13.5	-17.8	-17.8
4-(S)	+6.3	-2.5	-0.4	+4.8	-3.4	-0.7
	-14.2	-16.1	-18.5	-14.7	-16	-18.6
5-(S)	+7.5	-0.8	-2.8	+4.6	-0.7	-4.2
	+10	+2.3	-2.5	+3.1	-0.02	-2.5
6-(S)	+5.3	-2.9	-1.8	+6.7	-2.4	-1.8
	+5.4	-4.7	-14.5	+ 6.7	-3.6	-13.6
7-(S)	+5.1	-3.1	-1.6	+7.2	-2	-4.1
	+7.2	+0.9	-5.3	+ 4.1	-3.3	-10.3
8-(S)	+5.4	-2.3	-0.9	+6.2	-1.8	-1.2
	+11.3	-5.5	-2	+7.5	-6.2	-1.8

dihedral angles changed in each derivative at the N-C-O-C* fragment of *N*-alkoxy methylene (ESI†).

Thus, a rule of thumb for the assignment of the absolute stereochemistry of a chiral compound bearing a secondary alcohol and known relative stereochemistry, like a natural product, is: Step 1: Derivatization of the alcohol with **1-(S)** and **1-(R)**. Step 2: Assignment of the ^{13}C NMR signals of the stereogenic carbon (C¹), its α -carbons (C², C³) and the *N*-alkoxy methylene (C^{7'}) in both derivatives. Step 3: Compute the corresponding $\Delta\delta_{S-R}$ values. If the alcohol is cyclic, the $\Delta\delta_{S-R}$ are positive; then C¹ has (*S*) configuration, likewise if the $\Delta\delta_{S-R}$ are negative, then C¹ has (*R*) configuration. If the alcohols are non-cyclic and $\Delta\delta_{S-R}$ are positive, then C¹ has (*R*) configuration, and if $\Delta\delta_{S-R}$ are negative then C¹ has (*S*) configuration. The use of a single enantiomer of the derivatizing agent will be explained later.

Nonetheless, a next layer of complexity can exist when after derivatizing these chiral alcohols a profound coupling constants

(*J*) profile analysis is done. Although ^1H NMR spectra of these *N*-alkoxy methylene diastereoisomers are almost identical, one can estimate the *J* values in the pyroglutamic moiety. Induced polarization of C-H bonds is considered the steric effect; while this effect is not observed in a quaternary carbon, it is present when two proton-bearing carbons are spatially close in a γ -gauche relative orientation, resulting in a high field shift in ^{13}C NMR. Since *J* based configuration analysis provides a complement to geometric information for conformational assignment;¹⁸ it can be rationalized that the polarization induced on hydrogen-bonded carbons at this γ -gauche relative orientation are having a higher steric compression, thus polarizing the C-H bond with a larger geminal coupling constant (2J) as observed in the ^1H NMR spectra. We focused our attention at the methylene group C^{7'} (*N*-CH₂-O-C*) 2J values, as an AB system, on the *N*-alkoxy derivatives (Table 2). We noticed an interesting difference between diastereoisomers. The Δ^2J between diastereoisomers remained up to 1 Hz because when the diastereoisomer was either (*R*)-(*S*) or (*S*)-(*R*) 2J was approximately 11 Hz, while for either (*S*)-(*S*) or (*R*)-(*R*) diastereoisomers 2J was approximately 10 Hz. Additionally, the 2J value of the methylene was affected by the presence of those substituents at β and γ positions. The β position corresponds to the stereogenic carbon of the alcohol (*N*-CH₂-O-C*) and the coupling constant increases as different configurations are present. Nevertheless, the groups who are influencing the most are the

Table 2 Chemical shifts (^1H , ^{13}C ; ppm) and geminal coupling constant (2J ; Hz) of the AB system (C^{7'}H₂)

Derivative	$^2J(\text{Hz})$ (<i>S</i>)-(<i>S</i>)	$\delta_{^1\text{H}}\delta_{^{13}\text{C}}$ (<i>S</i>)-(<i>S</i>)	$^2J(\text{Hz})$ (<i>S</i>)-(<i>R</i>)	$\delta_{^1\text{H}}\delta_{^{13}\text{C}}$ (<i>S</i>)-(<i>R</i>)
2b ^a	9.9	5.3, 4.3 71.8		
2a			11.2	5.2, 4.3 68.6
3	10.3	5.2, 4.5 72.9	11.1	5.2, 4.4 69.1
4	10.5	5.1, 4.6 72.2	10.6	5.1, 4.5 70.9
5	10.7	4.9, 4.8 71.9	10.6	5.0, 4.7 69.5
6	10.6	5, 4.4 70.0	11.1	5.2, 4.6 71.5
7	10.4	5, 4.4 70.5	10.8	5.1, 4.5 71.0
8	10.8	5.1, 4.6 71.0	11.4	5.0, 4.7 71.8

^a Menthol is special case because the (*S*)-(*R*) diastereoisomer is the enantiomer of the (*R*)-(*S*) diastereoisomer, thus the values are the same. All other diastereoisomeric derivatives have an (*S*) stereogenic centre and reacted with either **1-(S)** or **1-(R)**. The values of the first two columns correspond to derivative a, and the values of the last two columns for derivative b, in accordance with Fig. 4.

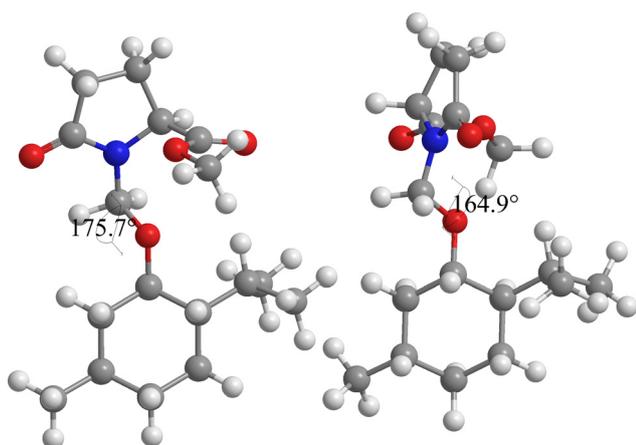


Fig. 5 Ball and stick geometry optimization model of *N*-alkoxy methylene diastereoisomers derivatives of **2**. Left model is **2a** and right model is **2b**. Also, the different dihedral angles from the derivatizing agent **1-(S)** are shown.

substituents of the alcohol (seen at γ position) because depending on their conformation will cause a difference in how the steric effect takes place. We, therefore, found how this induced polarization rationale explains the 2J data of the methylene groups from the *N*-alkoxy derivative, as well as establishing a direct correlation with their corresponding signals observed at higher field in ^{13}C NMR spectra.

Since our research is focused on natural products, the development of this methodology helped us to simplify what kind of derivatizing agent to use and solve other absolute configurations from our natural products library. We used **1-(S)** and tested the β -alcohol from hispanolone (**9**), the beyerene (**10**) and the mixture of borneols (**11** and **12**) from (–)-camphor. These alcohols were chosen based on their complexity. To derive the alcohols, hispanolone (a labdane diterpenoid) was reduced with NaBH_4 ,¹⁹ and derivatized to **9.1**; the epoxy beyerene (from *Viguiera insignis*) **10**²⁰ was derivatized at both secondary alcohols though derivatization was not simultaneous at both stereogenic centers; finally, (–)-camphor was reduced with NaBH_4 to obtain a mixture of (+)-isoborneol and (–)-borneol (8 : 2).

Following the previous rule of thumb, the assignment of the absolute stereochemistry of a compound with known relative stereochemistry using only one derivatization agent was as follows: Each natural product was derivatized with **1-(S)**, then ^{13}C NMR signals of C^1 , C^2 , C^3 and C^7 were identified and assigned. Finally, the natural products derivatives were compared with their corresponding alcohol and if C^1 was deshielded by 6–9 ppm, and C^2 , C^3 were shielded, then the stereogenic centre C^1 had the absolute (*S*) configuration.

Certainly, after the derivatization of hispanolone and beyerene diterpenoids with **1-(S)**, they were evaluated in terms of their induced chemical shifts as well as the geminal coupling constant. Hispanolone β -alcohol (**9**) after derivatization experienced deshielding of 7.9 ppm, the α -carbon (C8) experienced shielding of 0.9 ppm, and the α -carbon (C6) experienced shielding of 3.5 ppm (C6) as shown in Fig. 6A. Its corresponding C^7 (pyrrolglutamic moiety) has a 2J value of 10 Hz. With these results, the absolute configuration of the carbon bonded to the oxygen was solved as the corresponding (*S*)-(*S*) diastereoisomer.^{19a} Derivatization of beyerene diterpenoid **10** was not regioselective as both secondary alcohols reacted. The addition of **1-(S)** rendered a mixture of **10.1** and **10.2** (Fig. 6B). Interestingly, this derivatization reaction was distinguishable in ^{13}C NMR, providing not only an excellent differentiation of the chiral centres but also their respective α -carbons (See ESI,† S 64). The induced chemical shift of **10.1** experienced deshielding of 4.9 ppm, and the α -quaternary carbon (C4) and methylene (C2) experienced shielding of 0.5 and 5.0 ppm, respectively. In addition, 2J was 11.2 Hz. This means that its absolute configuration is the (*R*)-(*S*) diastereoisomer. Likewise, diastereoisomer **10.2** experienced deshielding of 5.1 ppm, the α -quaternary carbon (C13) experienced shielding of 0.7 ppm, and methylene (C11) experienced shielding of 4.9 ppm, and its C^7 methylene has a $^2J = 11.2$ Hz solving this stereogenic centre with an (*R*) absolute configuration. No differences in chemical shifts of the derivatives were observed when the relative orientation of the

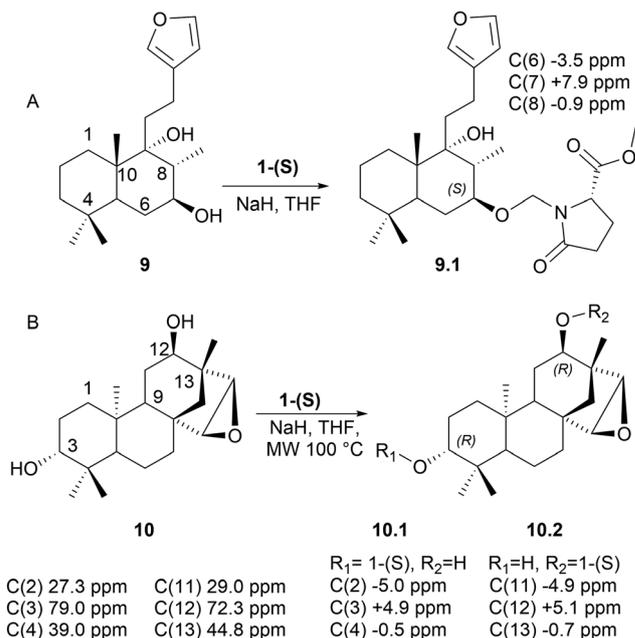


Fig. 6 Derivatization of two natural products with **1-(S)**. Panel A: Derivatization of reduced hispanolone **9**, the induced chemical shifts for C6, C7, C8 are shown. Panel B: Derivatization of epoxybeyerene **10**, the ^{13}C chemical shifts for starting material are shown, as well as the induced chemical shifts for both alcohols. Since this beyerene does not present steric hindrance at its secondary alcohols, both centres react with the derivatizing agent in a 1 : 1 ratio.

hydroxyl group is equatorial or axial in a six-membered ring. Thus, this beyerene diterpenoid isolated from *Viguiera sp* belongs to the *ent*-beyerene series.

Finally, we analysed the case of (–)-camphor. After reduction a ratio 8 : 2 of (+)-isoborneol **11** and (–)-borneol **12** was derivatized with **1-(S)**. The ^{13}C NMR spectrum of this mixture was analysed for differences in chemical shifts and induced chemical shifts (Fig. 7). It was found that (+)-isoborneol with **1-(S)** (**11.1**) was deshielded at C^1 by 6.6 ppm while (–)-borneol with **1-(S)** (**12.1**) was deshielded at C^1 by 5 ppm, so the absolute stereochemistry of the (+)-isoborneol stereogenic centre has the (*S*) configuration, and (–)-borneol stereogenic centre has the (*R*) configuration.

3. Experimental details

3.1. Materials and methods

^1H and ^{13}C NMR were recorded on a Bruker Avance 300 MHz and Bruker Avance III 400 MHz instruments using CDCl_3 (99.9% D) as solvent, with chemical shifts (δ) referenced to internal standards residual CHCl_3 and CDCl_3 , (7.26 ppm ^1H , 77.0 ppm ^{13}C). Mass spectra were recorded on MStation JMS-700 high-resolution mass spectrometer. THF was distilled from potassium and benzophenone, dichloromethane (DCM) was distilled from calcium hydride. All reagents and solvents were purchased from Sigma Aldrich Mexico and were used without further purification. Glassware for anhydrous reactions was

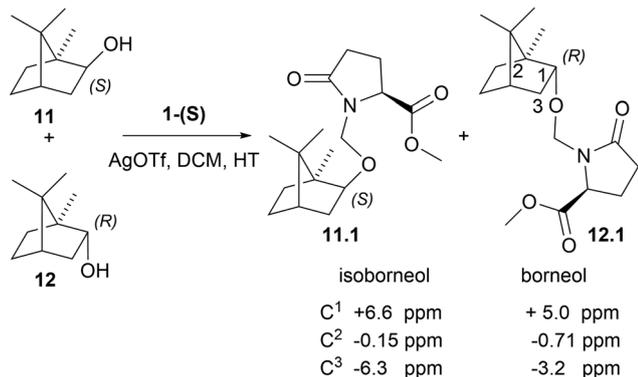


Fig. 7 Derivatization of a mixture of (+)-isborneol (**11**) and (–)-borneol (**12**) with **1-(S)**. The mixture of borneols come from the reduction of (–)-camphor. After derivatization, the largest induced chemical shift is for isborneol diastereoisomer (S)–(S). The induced chemical shifts are listed for each C¹, C², and C³.

dried in an oven at 100 °C overnight and cooled under molecular sieves as a moisture trap.

3.2. Synthetic procedures

General procedure for preparation of derivatization chiral agent, methyl-1-(chloromethyl)-2-pyrrolidone-5-carboxylate 1-(S) and 1-(R). A mixture of methyl pyroglutamate (500 mg, 3.5 mmol), paraformaldehyde (170 mg, 5.6 mmol) and chlorotrimethylsilane (2.3 mL, 17.9 mmol) was stirred at room temperature for 3 h. Excess of chlorotrimethylsilane was removed under vacuum and paraformaldehyde was removed by distillation in Kugelrohr at 100 °C. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃), 5.72 ppm (d, *J* = 10.2 Hz, 1H), 4.90 ppm (d, *J* = 10.2 Hz, 1H), 4.45 ppm (dd, *J* = 8, 4 Hz, 1H), 3.79 ppm (s, 3H), 2.30 ppm (m, 4H).

3.3. General procedure for preparation 1-(alkoxy-methyl)-methyl-2-pyrrolidine-5-carboxylate derivatives with 1-(S) or 1-(R) and NaH

Sodium hydride, NaH (2.5 equiv., 60% in mineral oil) was added to a solution of alcohol (1.0 equiv.) in dried THF at 0 °C, under nitrogen atmosphere. The mixture was stirred for 10 minutes, then **1-(S)** or **1-(R)** (3.0 equiv.) in THF was added. The mixture was stirred under reflux for 6–12 h. A saturated solution of NH₄Cl was added and THF was removed, and the reaction mixture was extracted with ethyl acetate. Organic extracts were dried over anhydrous sodium sulfate, filtered, and concentrated. The mixture was purified by flash chromatography.

3.4. General procedure for preparation 1-(alkoxy-methyl)-methyl-2-pyrrolidine-5-carboxylate derivatives with 1-(S) or 1-(R) with silver triflate

Silver trifluoromethanesulfonate (AgOTf) (1.2 equiv.) was added in absence of light to a mixture of alcohol (1.0 equiv.), **1-(S)** or **1-(R)** (3.0 equiv.) and Hydrotalcite (HT) (50 mg per mmol of alcohol) in dried DCM. The mixture was stirred for 3–12 h. The mixture was filtered over Celite and washed with brine.

The organic extract was dried over calcium chloride and concentrated. The mixture was purified by flash chromatography.

4. Conclusions

Methyl-1-(chloromethyl)-5-oxopyrrolidine-2-carboxylate **1**, as a chiral derivatizing agent, was used in combination with ¹³C NMR spectroscopy to determine the absolute stereochemistry of secondary alcohols of natural products. Both enantiomers of **1** were used to easily derivatize a chiral alcohol to produce the respective diastereoisomers for analysis by 1D ¹³C NMR. The characterization by ¹³C NMR spectroscopy allowed us to take advantage of the very sensitive change in chemical shifts to establish not only a direct correlation between the steric compression effects and the absolute stereochemistry, but also to settle rules for the configuration assignment based on the difference between the alcohol and the diastereomeric derivative. This difference was defined by us as induced chemical shifts and was used intuitively to determine the absolute configuration of the alcohol stereogenic centre in the natural products. The changes in chemical shifts were observed mainly at three key positions in the diastereoisomeric derivative. The first one was the stereogenic centre (C¹), the second one at the α-carbons to the stereogenic centre (C² and C³), and lastly but not less important at the methylene carbon and protons of the pyroglutamic moiety C⁷.

Since the chemical shift changes were pivotal for establishing intuitive rules to the configuration assignment, we were able to compare experimental data with GIAO calculations to ensure the absolute configuration and conformation based on geometry optimizations.

Another advantage of the present methodology was to assign the absolute configuration by using only one single enantiomer of the derivatizing agent, or a mixture of alcohols for enantiomeric discrimination, as in the case of derivatives **9**, **10.1**, **10.2**, and the derivatives of isborneol and borneol.

Finally, we wanted to know if ¹H NMR spectra could show without more elaborate experiments such as NOESY any indication of the steric compression effects. Thus, we looked closely at the geminal coupling constant values of the diastereoisomeric derivatives and found that C⁷ (which is the methylene at the pyroglutamic moiety) agreed and ratified what we already noticed by ¹³C NMR.

This methodology is important because it requires simple organic chemistry reactions and takes advantage of 1D NMR spectroscopy. In addition, it provides another approach for the absolute configuration determination, and it is not based on anisotropic effects.

Author contributions

E. Torales: conception, data curation, formal analysis, research, visualisation, validation, writing. S. Fomine: analysis, software, validation, writing, reviewing, and editing. J. Cárdenas: funding, project administration, supervision, conception, investigation, supervision, validation, writing, reviewing & editing.

Conflicts of interest

Authors declare having no conflicts of interest.

Acknowledgements

This research was supported by the Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT-UNAM, Project No. IN209818), and the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT-355820) for the ET PhD fellowship. We express our deepest gratitude to Dr Rubén Gaviño for the NMR experiment acquisition, and Dr Karina Herrera-Guzman for her help reviewing and editing this manuscript.

Notes and references

- 1 K. C. Nicolaou and S. A. Snyder, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2005, **44**, 1012–1044.
- 2 (a) K. Ling-Yi and W. Peng, *Chin. J. Nat. Med.*, 2013, **11**, 193–198; (b) T. J. Wenzel, *Differentiation of Chiral Compounds Using NMR Spectroscopy*, 2nd edn, 2018, John Wiley and Sons.
- 3 M. Menna, C. Imperatore, A. Magoni, G. Della Sala and O. Tagliallatela-Scafati, *Nat. Prod. Rep.*, 2019, **36**, 476.
- 4 J. A. Dale and H. S. Mosher, *J. Am. Chem. Soc.*, 1973, **9**, 512–519.
- 5 T. J. Wenzel and C. D. Chisholm, *Chirality*, 2011, **23**, 190–214.
- 6 J. M. Seco, E. Quiñoa and R. Riguera, *Chem. Rev.*, 2004, **104**, 17–117.
- 7 J. M. Seco, E. Quiñoa and R. Riguera, *Chem. Rev.*, 2012, **112**(8), 4603–4641.
- 8 (a) I. Louzao, J. M. Seco, E. Quiñoa and R. Riguera, *Chem. Commun.*, 2010, **46**, 7903–7905; (b) G. S. Sankaran, R. Vasanthan, D. V. Lenin and S. Balasubramaniam, *J. Postdoctoral Res.*, 2018, **6**, 46–58; (c) A. Arnone, R. Bernardi, F. Blasco, R. Cardillo, G. Resnati, I. I. Gerus and V. P. Kukhar, *Tetrahedron*, 1998, **54**, 2809–2818.
- 9 M. Kobayashi, *Tetrahedron*, 2000, **56**, 1661–1665.
- 10 P. R. Seidl, K. Z. Leal, V. E. Uberdi Costa and M. M. E. Stapelbroek, *Magn. Reson. Chem.*, 1998, **36**, 261–266.
- 11 G. D. Williams, C. E. Wade, G. J. Clarkson and M. Wills, *Tetrahedron: Asymmetry*, 2007, **18**, 664–670.
- 12 B. E. Domínguez, P. E. García and J. Cárdenas, *Tetrahedron: Asymmetry*, 2005, **16**, 3976–3985.
- 13 (a) G. Barone, L. Gomez-Paloma, D. Duca, A. Silvestri, R. Riccio and G. Bifulco, *Chem. – Eur. J.*, 2002, **8**, 3233–3239; (b) K. K. Onchoke, *Results Chem.*, 2021, **3**, 100099; (c) M. Beytur and I. Avinca, *Heterocycl. Commun.*, 2021, **27**, 1–16; (d) J. Li, J. K. Liu and W. X. Wang, *J. Org. Chem.*, 2020, **85**, 11350–11358.
- 14 J. Robert, J. Ouellette and D. Rawn, *Organic Chemistry, Structure, Mechanism, Synthesis*, 2nd edn, 2018, 507–536.
- 15 J. T. Lundquist, A. D. Satterfield and J. C. Pelletier, *Org. Lett.*, 2006, **18**, 3915–3918.
- 16 R. S. Cahn and C. K. Ingold, *J. Chem. Soc.*, 1951, 612–622.
- 17 M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, X. Li, M. Caricato, A. V. Marenich, J. Bloino, B. G. Janesko, R. Gomperts, B. Mennucci, H. P. Hratchian, J. V. Ortiz, A. F. Izmaylov, J. L. Sonnenberg, D. Williams-Young, F. Ding, F. Lipparini, F. Egidi, J. Goings, B. Peng, A. Petrone, T. Henderson, D. Ranasinghe, V. G. Zakrzewski, J. Gao, N. Rega, G. Zheng, W. Liang, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, K. Throssell, J. A. Montgomery Jr, J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. J. Bearpark, J. J. Heyd, E. N. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, T. A. Keith, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. P. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, J. M. Millam, M. Klene, C. Adamo, R. Cammi, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, O. Farkas, J. B. Foresman and D. J. Fox, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2016.
- 18 (a) F. W. Wehrli, A. P. Marchand and S. Wehrli, *Interpretation of carbon-13 NMR spectra*, 2nd edn, John Wiley & Sons, 1988, ch. 2; (b) M. Balci, *Basic 1H- and 13C-NMR Spectroscopy*, 1st edn, Elsevier Science, 2005, pp. 87–133; (c) Z. Q. Huo, F. Zhu, X. W. Zhang, X. Zhang, H. B. Liang, J. C. Yao, Z. Liu, G. M. Zhang, Q. Q. Yao and G. F. Qin, *Mar. Drugs*, 2002, **20**, 333.
- 19 (a) G. Savona, F. Piozzi and B. Rodríguez, *Heterocycles*, 1978, **9**, 257–261; (b) L. Rodríguez-Hahn, J. Cárdenas, B. Esquivel, R. A. Toscano and B. Rodríguez, *Tetrahedron Lett.*, 1995, **36**, 6391–6394.
- 20 G. Delgado, A. Romo de Vivar, A. Ortega, J. Cárdenas and E. O. Schlemper, *Phytochemistry*, 1983, **22**, 1227–1230.