

UCH-FC
Doc.-Q
M 971
C.1

**PREPARACIÓN Y DETERMINACIÓN DE LA
CONFIGURACIÓN ABSOLUTA DE DERIVADOS
DEL (3R,6R)- Y (6S,6S)-3 α ,6 β -TROPANODIOL**

Facultad de Ciencias

Tesis entregada a la Universidad de Chile

en cumplimiento parcial de los requisitos

para optar al grado de

Doctor en Química

Por

Marcelo Andrés Muñoz Flores

Enero, 2008

Director de Tesis:

Dr. Orlando Muñoz M.

Co-Director de Tesis:

Dr. Pedro Joseph-Nathan

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE
INFORME DE APROBACION
TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato.

MARCELO A. MUÑOZ FLORES

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Química, en el examen de Defensa de Tesis rendido el día 28 de Noviembre de 2007.

Director de Tesis:

Dr. Orlando Muñoz

Co-Director de Tesis

Dr. Pedro Joseph-Nathan

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Bruce Cassels

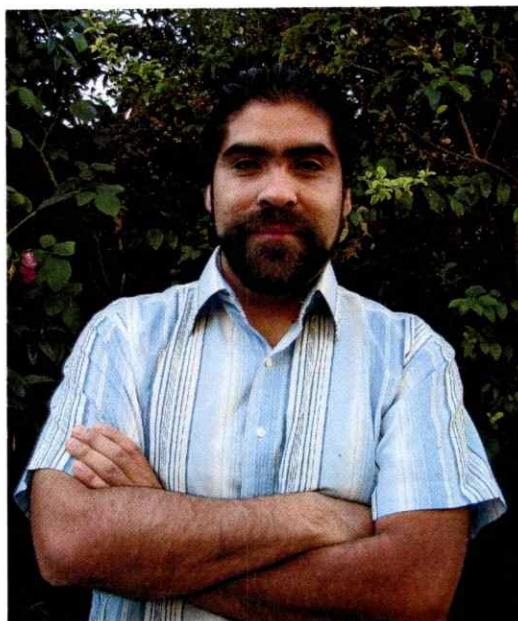
Dr. Boris Weiss

Dr. Fernando Castañeda

Dr. Glauco Morales

.....
.....
.....
.....
.....

*” a mis padres, a quienes he amado desde siempre y sin
cuyo esfuerzo y apoyo me habría sido imposible realizar
mis estudios”*



Marcelo Muñoz Flores nació en Santiago de Chile el 9 de Junio de 1980 donde recibió su enseñanza básica y media en el Colegio De La Salle de la Reina. A la edad de 17 años ingresó a la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile donde obtuvo el grado de Licenciado en Ciencias con mención en Química en 2002. En 2003 ingresó al programa de Doctorado en Química de la misma Universidad como becario CONICYT, donde bajo la tutela del Dr. Orlando Muñoz, y de la co-tutela del Dr. Pedro Joseph-Nathan del CINESTAV-IPN, desarrolló su tesis doctoral sobre estereoquímica de alcaloides del tropano. El licenciado Muñoz se ha desempeñado durante sus estudios de pregrado y postgrado como ayudante y profesor de laboratorio, así como también como ayudante de cátedra de diferentes cursos de Química Orgánica y Química General tanto en la Universidad de Chile como en la Universidad Nacional Andrés Bello.

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer a todos aquellos quienes me han auxiliado de alguna u otra forma a realizar este trabajo de tesis:

Le agradezco al Dr. Orlando Muñoz y al Dr. Pedro Joseph-Nathan por su incondicional apoyo, paciencia, comprensión y guía durante este trabajo, y por haber puesto a mi disposición todos sus conocimientos y experiencia en mi formación como científico.

A todos los miembros de la comisión evaluadora de esta tesis, los profesores Dr. Bruce Cassels, Dr. Boris Weiss, Dr. Fernando Castañeda y Dr. Glauco Morales, por su disposición y dedicación en su trabajo de evaluar y guiar este trabajo de tesis.

A CONICYT que mediante una beca de Doctorado 2003-2006 y una beca de financiamiento para estancias en el extranjero, hizo posible el realizar estos estudios de postgrado.

Al proyecto MECESUP 0-408 por otorgarme su beca de término de tesis, con la cual me fue posible finalizar este trabajo.

Al Departamento de Postgrado y Postítulo de la Vicerrectoría de Asuntos Académicos de la Universidad de Chile por su beca de apoyo a la realización de tesis doctoral.

Mis agradecimientos más sinceros al Decano de la Facultad de Ciencias Dr. Raúl Morales S. por su apoyo y estímulo en el desarrollo de este trabajo.

A todos aquellos que me apoyaron a realizar el trabajo experimental en Chile, particularmente a los profesores María Inés Toral, Dr. Bruce Cassels, Dr. Patricio Iturriaga, Dr. Aurelio San Martín, Dra. Juana Roviroso y Dr. Patricio Rivera, y al Licenciado Sebastián Figueroa por su trabajo de unidad de investigación el que se encuentra incluido en esta tesis. Una mención especial para María Inés Polanco, Patricio Romero, Marco Rebolledo, Sergio Alegría, Marisol Lagos e Inés Saavedra por su gran disposición y ayuda entregada cuando más lo necesitaba.

A quienes me apoyaron tanto científica como personalmente durante mis estadías en México en el laboratorio de Química de Productos Naturales Orgánicos del CINVESTAV-IPN, en especial a Dr. Carlos Cerda, MC María Alvina Bucio, QFB Angelina Hernández, Dr. Eleuterio Burgeño Tapia, MC Hugo García, MC Ángel Bañuelos, MC Perla López, MC José Alberto Mendoza, QFB, Elvia Celina Álvarez, QFB, Yolanda Mora, QFB Nadia Azucena Pérez y Mauro Gonzáles. Con especial cariño me gustaría agradecer la amistad y preocupación de Alvina, Eleuterio, Angelina, Edwin y Maru, a quienes tendré en mi corazón por siempre.

A todos mis amigos dentro y fuera de la Universidad de Chile, en particular a Luis Felipe Ortiz, por su invaluable ayuda en la manufactura de este escrito.

A mi compañera en la vida Sandra Orellana, por estar a mi lado en todo momento mostrándome su amor y comprensión, y dándome la fuerza e inspiración necesarias para completar estos estudios.

Finalmente me gustaría agradecer a mi familia, particularmente a mis padres Julio Muñoz y Rosario Flores y mis hermanos Paula Muñoz y Felipe Muñoz, por haberme apoyado incondicionalmente todos estos años.

TABLA DE CONTENIDOS

TABLA DE CONTENIDOS.....	vii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	x
LISTA DE TABLAS.....	xii
LISTA DE FIGURAS Y ESPECTROS	xiv
RESUMEN.....	xix
ABSTRACT.....	xxi
INTRODUCCION.....	1
1.1. Alcaloides del tropano y derivados del 3 α ,6 β -tropanodiol	1
1.2. Espectroscopía de dicroísmo circular vibracional y la determinación de la configuración absoluta de moléculas quirales	10
1.3. Predicción de corrimientos químicos de ¹ HRMN y ¹³ CRMN utilizando cálculos <i>ab initio</i>	16
HIPOTESIS.....	19
OBJETIVOS	20
Objetivos Generales	20
Objetivos Específicos.....	20
MATERIALES Y METODOS.....	21
2.1. Hidrogenólisis catalítica de (-)-escopolamina usando el catalizador de Ni-Raney	21
2.1.1. Preparación del catalizador de Ni-Raney W-2	21
2.1.2. Preparación del catalizador de Ni-Raney W-2 desactivado.....	22
2.1.3. Preparación del catalizador de Ni-Raney W-1	22
2.1.4. Hidrogenólisis catalítica de (-)-escopolamina.....	22

2.2. Separación de la mezcla de hidrogenólisis catalítica mediante cromatografía de pares iónicos	23
2.2.1. Procedimiento cromatográfico:	23
2.2.2. Procedimiento post-cromatográfico	24
2.3. Separación de la mezcla de hidrogenólisis catalítica mediante cristalizaciones fraccionadas.....	25
2.3.1. Hidrogenólisis catalítica de (-)-escopolamina.....	25
2.3.2. Precipitación y recristalización de bromhidratos en acetona.....	25
2.3.3. Precipitación y recristalización de O,O'-dibenzoil-L-tartratos en etanol.....	26
2.4. Preparación de (3S,6S)-3α,6β-tropanodiol y (3S,6S)-3α,6β-diacetoxitropano	27
2.4.1. Preparación de (3S,6S)-3 α ,6 β -tropanodiol	27
2.4.2. Preparación de (3S,6S)-3 α ,6 β -diacetoxitropano	27
2.5. Predicción de distribuciones conformacionales, espectros de DCV y de corrimientos químicos de ¹HRMN y ¹³CRMN.....	28
2.5.1. Búsqueda conformacional y predicción de las distribuciones conformacionales de (3R,6R)- y (3S,6S)-6 β -hidroxihiosciamina	28
2.5.2. Cálculo de intensidades vibracionales y obtención de espectros de IR y DCV teóricos para (3R,6R)- y (3S,6S)-6 β -hidroxihiosciamina...	29
2.5.3 Cálculo de apantallamientos magnéticos y obtención de corrimientos químicos teóricos para (3R,6R)- y (3S,6S)-6 β -hidroxihiosciamina	30.
2.6. Obtención de espectros de IR, DCV y RMN, y medición de rotaciones ópticas	30
2.6.1 Obtención de espectros de IR y DCV y medición de rotaciones ópticas	30
2.6.2. Obtención de espectros de RMN para (3R,6R)- y (3S,6S)-6 β -hidroxihiosciamina, (3S,6S)-3 α ,6 β -tropanodiol y (3S,6S)-3 α ,6 β -diacetoxitropano	31
DISCUSIONES Y RESULTADOS	32
3.1 Hidrogenólisis catalítica de (-)-escopolamina.....	32
3.1.1 Análisis de los espectros de RMN de la materia prima (-)-escopolamina y del producto secundario (-)-hiosciamina.....	32
3.1.1.1. (-)-Escopolamina	32
3.1.1.2. (-)-Hiosciamina	37
3.1.2. Optimización de la reacción de hidrogenólisis catalítica	40
3.2. Separación de la mezcla de hidrogenólisis catalítica utilizando cromatografía de pares iónicos	44

3.3. Separación de la mezcla de hidrogenólisis catalítica utilizando la metodología de cristalizaciones fraccionadas.....	48
3.4. Análisis de los espectros de RMN de (+)-6 β -hidroxihiosciamina y (-)-6 β -hidroxihiosciamina	53
3.4.1. (+)-(3 <i>R</i> ,6 <i>R</i>)-6 β -hidroxihiosciamina.....	53
3.4.2. (-)-(3 <i>S</i> ,6 <i>S</i>)-6 β -hidroxihiosciamina	56
3.5. Determinación de la configuración absoluta de ambos diastereoisómeros de 6 β -hidroxihiosciamina utilizando dicroísmo circular vibracional	58
3.6. Determinación de la configuración absoluta de ambos diastereoisómeros de 6 β -hidroxihiosciamina mediante el cálculo de corrimientos químicos.....	73
3.7. Exploración de la reactividad diferencial para la esterificación selectiva de los hidroxilos presentes en (3 <i>S</i> ,6 <i>S</i>)-(-)-6 β -hidroxihiosciamina.....	81
3.8. Preparación y análisis estructural mediante RMN del (3 <i>S</i> ,6 <i>S</i>)-3 α ,6 β -tropanodiol	83
3.8.1. Análisis de los espectros de RMN de (3 <i>S</i> ,6 <i>S</i>)-3 α ,6 β -tropanodiol.....	83
3.9. Preparación y análisis estructural mediante RMN del (3 <i>S</i> ,6 <i>S</i>)-3 α ,6 β -diacetoxitropano	85
3.9.1. Análisis de los espectros de RMN de (3 <i>S</i> ,6 <i>S</i>)-3 α ,6 β -diacetoxitropano	86
CONCLUSIONES	89
ESPECTROS	94
REFERENCIAS	135

LISTA DE ABREVIATURAS

1	8-metil-8-azabicyclo[3.2.1]octano (tropano)
2	(-)-escopolamina
3	(-)-hiosciamina
4	3 α ,6 β -di-(3,4,5-trimetoxicinamoiloxi)tropano (pervilefina C)
5	3 α ,6 β -tropanodiol
6	3 α -tropanol
7	(-)-valeroidina
8	6 β -tigloiloxi-3 α -tropanol
9	3 α ,6 β -di-(tigloiloxi)-tropano
10	3 α ,6 β -diacetiloxitropano
11	3 α ,6 β -dibenzoiloxitropano
12	3 α ,6 β -dicinamoiloxitropano
13	3 α ,6 β -di-(<i>N</i> -metilpirroiloxi)-tropano
14	6 β -hidroxihiosciamina
COSY ¹	Espectroscopia de Correlación
¹³CRMN	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13
DCV	Dicroísmo Circular Vibracional
DEPT ²	Transferencia de Polarización Amplificada sin Distorsión
DFT ³	Teoría de Funcionales de la Densidad
GIAO ⁴	Orbitales Atómicos Incluyendo Norma
HMBC ⁵	Correlación Heteronuclear de Múltiples Enlaces

HPLC ⁶	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución
¹H RMN	Resonancia Magnética Nuclear de Protones
HSQC ⁷	Correlación Mono-cuántica Heteronuclear
IR	Infrarrojo
NOESY ⁸	Espectroscopía de Efecto Nuclear Overhauser
RMS ⁹	Desviación Cuadrática Media
TMS	Tetrametilsilano

De las siglas en inglés:

- 1 "Correlation Spectroscopy"
- 2 "Distortionless Enhanced Polarization Transfer"
- 3 "Density Functional Theory"
- 4 "Gauge Included Atomic Orbitals"
- 5 "Heteronuclear Multiple Bond Correlation"
- 6 "High Performance Liquid Chromatography"
- 7 "Heteronuclear Single Quantum Correlation"
- 8 "Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy"
- 9 "Root Mean Square"

LISTA DE TABLAS

- Tabla 1.** Existencia natural (familia / género) y estereoquímica (signo del poder rotatorio / configuración absoluta) de las bases 3 α ,6 β -di-(3,4,5-trimetoxicinamoiloxi)tropano (**4**), 3 α ,6 β -ditigloiloxitropano (**9**), 3 α ,6 β -diacetiloxitropano (**10**), 3 α ,6 β -dibenzoiloxitropano (**11**), 3 α ,6 β -dicinamoiloxitropano (**12**) y 3 α ,6 β -di-(*N*-metilpirroiloxi)-tropano (**13**)..... 8
- Tabla 2.** Asignación de las señales en los espectros de ¹HRMN y ¹³CRMN de (-)-escopolamina (**2**)..... 37
- Tabla 3.** Asignación de las señales en los espectros de ¹HRMN y ¹³CRMN de (-)-hiosciamina (**3**)..... 40
- Tabla 4.** Rendimientos obtenidos en la reacción de hidrogenólisis catalítica de (-)-escopolamina (**2**) usando Ni-Raney con diferentes actividades. W-4 tomado de la literatura (Ishimaru y Shimomura, 1989). 43
- Tabla 5.** Masas y puntos de fusión (p. f.) de las fracciones obtenidas por recristalizaciones consecutivas de los productos de hidrogenólisis catalítica de 25 g de (-)-escopolamina (**2**) con ácido (-)-O,O'-dibenzoil-L-tartárico. 50
- Tabla 6.** Masas y composiciones de las fracciones obtenidas por recristalizaciones consecutivas de los productos de hidrogenólisis catalítica de 50 g de (-)-escopolamina (**2**) con ácido (-)-O,O'-dibenzoil-L-tartárico. 51
- Tabla 7.** Masas y composiciones de las fracciones obtenidas por recristalizaciones consecutivas de los productos de hidrogenólisis catalítica de 50 g de (-)-escopolamina (**2**), como bromhidratos en acetona. 52
- Tabla 8.** Asignación de las señales en los espectros de ¹HRMN y ¹³CRMN de (+)-(3*R*,6*R*)-6 β -hidroxihiosciamina ((+)-(3*R*,6*R*)-**14**). 55

Tabla 9.	Asignación de las señales en los espectros de $^1\text{HRMN}$ y $^{13}\text{CRMN}$ de (-)-(3 <i>S</i> ,6 <i>S</i>)-6 β -hidroxihiosciamina ((-)-(3 <i>S</i> ,6 <i>S</i>)- 14).....	58
Tabla 10.	Energías relativas calculadas (kcal/mol) y abundancias (%) de los ocho conformeros más estables de (3 <i>R</i> ,6 <i>R</i>)-6 β -hidroxihiosciamina ((3 <i>R</i> ,6 <i>R</i>)- 14 (a-h)) y (3 <i>S</i> ,6 <i>S</i>)-6 β -hidroxihiosciamina ((3 <i>S</i> ,6 <i>S</i>)- 14 (a-h)), usando búsqueda sistemática, cálculos de punto simple de energía y de optimización de la geometría con B3LYP/6-31G(d). Los conformeros de cada diastereoisómero están ordenados de acuerdo a las energías de los cálculos de optimización de la geometría.....	61
Tabla 11.	Valores de apantallamientos teóricos, corrimientos químicos teóricos (ppm), corrimientos químicos experimentales (ppm) y de desviaciones cuadráticas medias (rms) (ppm) para carbonos en la correlación entre (+)- 14 y (3 <i>R</i> ,6 <i>R</i>)- 14 , y entre (-)- 14 y (3 <i>S</i> ,6 <i>S</i>)- 14	76
Tabla 12.	Valores de coeficientes de correlación (r^2) y de desviaciones cuadráticas medias (rms) (ppm) obtenidos para las correlaciones entre los valores de corrimientos químicos teóricos de (3 <i>R</i> ,6 <i>R</i>)- 14 y (3 <i>S</i> ,6 <i>S</i>)- 14 con los valores experimentales de (+)- 14 y (-)- 14 para carbonos.	77
Tabla 13.	Valores de apantallamientos teóricos, corrimientos químicos teóricos (ppm), corrimientos químicos experimentales (ppm) y de desviaciones cuadráticas medias (rms) (ppm) para hidrógenos en la correlación entre (+)- 14 y (3 <i>R</i> ,6 <i>R</i>)- 14 , y entre (-)- 14 y (3 <i>S</i> ,6 <i>S</i>)- 14	79
Tabla 14.	Valores de coeficientes de correlación (r^2) y de desviaciones cuadráticas medias (rms) (ppm) obtenidos para las correlaciones entre los valores de corrimientos químicos teóricos de (3 <i>R</i> ,6 <i>R</i>)- 14 y (3 <i>S</i> ,6 <i>S</i>)- 14 con los valores experimentales de (+)- 14 y (-)- 14 para protones.	80
Tabla 15.	Asignación de las señales en los espectros de $^1\text{HRMN}$ y $^{13}\text{CRMN}$ de (3 <i>S</i> ,6 <i>S</i>)-3 α ,6 β -tropanodiol ((3 <i>S</i> ,6 <i>S</i>)- 5).....	85
Tabla 16.	Asignación de las señales en los espectros de $^1\text{HRMN}$ y $^{13}\text{CRMN}$ de (3 <i>S</i> ,6 <i>S</i>)-3 α ,6 β -diacetoxitropano ((3 <i>S</i> ,6 <i>S</i>)- 10).	88

LISTA DE FIGURAS Y ESPECTROS

Figura 1.	Dibujo de <i>Atropa belladonna</i>	2
Figura 2.	Esquema de funcionamiento de un espectrofotómetro de dicroísmo circular vibracional.....	11
Figura 3.	Reacción de hidrogenólisis catalítica de (-)-escopolamina (2).	33
Figura 4.	Espectros de ¹ HRMN entre 2.5 y 3.5 ppm de las mezclas producidas en la reacción de hidrogenólisis catalítica usando catalizadores de Ni-Raney con diferente actividad. a) Ni-Raney W-2; b) Ni-Raney W-2 desactivado y c) Ni-Raney W-1.	42
Figura 5.	Espectros de ¹ HRMN entre 2.5 y 3.5 ppm de dos muestras enriquecidas luego de utilizar cromatografía de pares iónicos (ver texto). a) 69.4% / 30.6%; b) 91.7% / 8.3%.	45
Figura 6.	Espectros de ¹ HRMN entre 2.5 y 3.5 ppm de dos muestras enriquecidas luego de utilizar cromatografía de pares iónicos (ver texto). a) 98% / 2% ((+)-14 / (-)-14); b) 95.2% / 4.8% ((-)-14 / (+)-14).	46
Figura 7.	Espectros de ¹ HRMN entre 2.5 y 3.5 ppm de ambos diastereómeros de la 6β-hidroxihiosciamina (14) totalmente separados utilizando cromatografía de pares iónicos (ver texto). a) primer isómero en eluir ((+)-14); b) segundo isómero en eluir ((-)-14).	47
Figura 8.	Estructuras optimizadas de los ocho conformeros más estables de (3R,6R)-6β-hidroxihiosciamina ((3R,6R)-14).....	62
Figura 9.	Estructuras optimizadas de los ocho conformeros más estables de (3S,6S)-6β-hidroxihiosciamina ((3S,6S)-14).	63

Figura 10. Correlación observada en el espectro de NOESY entre el grupo N-Me y los protones H-2ax y H-4ax para (3S,6S)-6β-hidroxihiosciamina ((3S,6S)-14).....	64
Figura 11. Espectros de IR (abajo) y DCV calculados (arriba) para los cuatro conformeros de menor energía de (3R,6R)-6β-hidroxihiosciamina ((3R,6R)-14) usando B3LYP/6-31G(d).....	66
Figura 12. Espectros de IR (abajo) y DCV calculados (arriba) para los cuatro conformeros de menor energía de (3S,6S)-6β-hidroxihiosciamina ((3S,6S)-14) usando B3LYP/6-31G(d).....	67
Figura 13. Amplitudes relativas de los modos vibracionales pertenecientes al biciclo para el conformero de menor energía de (3R,6R)-6β-hidroxihiosciamina ((3R,6R)-14) (arriba) y (3S,6S)-6β-hidroxihiosciamina ((3S,6S)-14) (abajo).....	70
Figura 14. Comparación de los espectros calculados y los observados de IR (abajo) y DCV (arriba) de (3R,6R)-6β-hidroxihiosciamina ((3R,6R)-14) ..	71
Figura 15. Comparación de los espectros calculados y los observados de IR (abajo) y DCV (arriba) de (3S,6S)-6β-hidroxihiosciamina ((3S,6S)-14)....	72
Espectro 1. Espectro de ¹ HRMN de (-)-escopolamina (2) en CDCl ₃	95
Espectro 2. Espectro de ¹³ CRMN de (-)-escopolamina (2) en CDCl ₃	96
Espectro 3. Espectro de DEPT de (-)-escopolamina (2) en CDCl ₃	97
Espectro 4. Espectro de COSY de (-)-escopolamina (2) en CDCl ₃	98
Espectro 5. Espectro de HSQC de (-)-escopolamina (2) en CDCl ₃	99
Espectro 6. Espectro de HMBC de (-)-escopolamina (2) en CDCl ₃	100
Espectro 7. Espectro de ¹ HRMN de (-)-hiosciamina (3) en CDCl ₃	101

Espectro 8.	Espectro de $^{13}\text{CRMN}$ de (-)-hiosciamina (3) en CDCl_3	102
Espectro 9.	Espectro de DEPT de (-)-hiosciamina (3) en CDCl_3	103
Espectro 10.	Espectro de COSY de (-)-hiosciamina (3) en CDCl_3	104
Espectro 11.	Espectro de HSQC de (-)-hiosciamina (3) en CDCl_3	105
Espectro 12.	Espectro de HMBC de (-)-hiosciamina (3) en CDCl_3	106
Espectro 13.	Espectro de $^1\text{HRMN}$ de (3 <i>R</i> ,6 <i>R</i>)-6 β -hidroxihiosciamina ((3 <i>R</i> ,6 <i>R</i>)- 14) en CDCl_3	107
Espectro 14.	Espectro de $^{13}\text{CRMN}$ de (3 <i>R</i> ,6 <i>R</i>)-6 β -hidroxihiosciamina ((3 <i>R</i> ,6 <i>R</i>)- 14) en CDCl_3	108
Espectro 15.	Espectro de COSY de (3 <i>R</i> ,6 <i>R</i>)-6 β -hidroxihiosciamina ((3 <i>R</i> ,6 <i>R</i>)- 14) en CDCl_3	109
Espectro 16.	Espectro de HSQC de (3 <i>R</i> ,6 <i>R</i>)-6 β -hidroxihiosciamina ((3 <i>R</i> ,6 <i>R</i>)- 14) en CDCl_3	110
Espectro 17.	Espectro de HMBC de (3 <i>R</i> ,6 <i>R</i>)-6 β -hidroxihiosciamina ((3 <i>R</i> ,6 <i>R</i>)- 14) en CDCl_3	111
Espectro 18.	Espectro de NOESY de (3 <i>R</i> ,6 <i>R</i>)-6 β -hidroxihiosciamina ((3 <i>R</i> ,6 <i>R</i>)- 14) en CDCl_3	112
Espectro 19.	Espectro de $^1\text{HRMN}$ de (3 <i>S</i> ,6 <i>S</i>)-6 β -hidroxihiosciamina ((3 <i>S</i> ,6 <i>S</i>)- 14) en CDCl_3	113
Espectro 20.	Espectro de $^{13}\text{CRMN}$ de (3 <i>S</i> ,6 <i>S</i>)-6 β -hidroxihiosciamina ((3 <i>S</i> ,6 <i>S</i>)- 14) en CDCl_3	114
Espectro 21.	Espectro de COSY de (3 <i>S</i> ,6 <i>S</i>)-6 β -hidroxihiosciamina ((3 <i>S</i> ,6 <i>S</i>)- 14) en CDCl_3	115

Espectro 22.	Espectro de HSQC de (3S,6S)-6β-hidroxihiosciamina ((3S,6S)-14) en CDCl ₃	116
Espectro 23.	Espectro de HMBC de (3S,6S)-6β-hidroxihiosciamina ((3S,6S)-14) en CDCl ₃	117
Espectro 24.	Espectro de NOESY de (3S,6S)-6β-hidroxihiosciamina ((3S,6S)-14) en CDCl ₃	118
Espectro 25.	Espectro de ¹ HRMN en CDCl ₃ de (3S,6S)-3α-acetiltropoiloxi-6β-acetoxitropano como producto de la acetilación de (3S,6S)-6β-hidroxihiosciamina ((3S,6S)-14) con anhídrido acético después de 14 h.	119
Espectro 26.	Espectro de ¹ HRMN en CDCl ₃ de la mezcla de la reacción de acetilación de (3S,6S)-6β-hidroxihiosciamina ((3S,6S)-14) con anhídrido acético después de 2 h.	120
Espectro 27.	Espectro de ¹ HRMN en CDCl ₃ de la mezcla de la reacción de acetilación de (3S,6S)-6β-hidroxihiosciamina ((3S,6S)-14) con anhídrido acético después de 5 h.	121
Espectro 28.	Espectro de ¹ HRMN en CDCl ₃ de la mezcla de la reacción de acetilación de (3S,6S)-6β-hidroxihiosciamina ((3S,6S)-14) con cloruro de acetilo después de 5 h.	122
Espectro 29.	Espectro de ¹ HRMN de ácido trópico en CDCl ₃	123
Espectro 30.	Espectro de ¹ HRMN de (3S,6S)-3α,6β-tropanodiol ((3S,6S)-5) en CD ₃ OH.	124
Espectro 31.	Espectro de ¹³ CRMN de (3S,6S)-3α,6β-tropanodiol ((3S,6S)-5) en CD ₃ OH.	125
Espectro 32.	Espectro de COSY de (3S,6S)-3α,6β-tropanodiol ((3S,6S)-5) en CD ₃ OH.	126

Espectro 33.	Espectro de HSQC de (3S,6S)-3 α ,6 β -tropanodiol ((3S,6S)-5) en CD ₃ OH.	127
Espectro 34.	Espectro de NOESY de (3S,6S)-3 α ,6 β -tropanodiol ((3S,6S)-5) en CD ₃ OH.	128
Espectro 35.	Espectro de ¹ H RMN de (3S,6S)-3 α ,6 β -diacetoxitropano ((3S,6S)-10) en CDCl ₃	129
Espectro 36.	Espectro de ¹³ C RMN de (3S,6S)-3 α ,6 β -diacetoxitropano ((3S,6S)-10) en CDCl ₃	130
Espectro 37.	Espectro de COSY de (3S,6S)-3 α ,6 β -diacetoxitropano ((3S,6S)-10) en CDCl ₃	131
Espectro 38.	Espectro de HSQC de (3S,6S)-3 α ,6 β -diacetoxitropano ((3S,6S)-10) en CDCl ₃	132
Espectro 39.	Espectro de HMBC de (3S,6S)-3 α ,6 β -diacetoxitropano ((3S,6S)-10) en CDCl ₃	133
Espectro 40.	Espectro de NOESY de (3S,6S)-3 α ,6 β -diacetoxitropano ((3S,6S)-10) en CDCl ₃	134

RESUMEN

Los alcaloides del tropano son un grupo definido de productos naturales que tienen en común el esqueleto base 8-metil-8-azabicyclo[3.2.1]octano. Hasta ahora se conocen más de 200 de estos alcaloides, la mayoría pertenecientes a las familias botánicas de las Solanáceas, Eritroxiláceas y Convolvuláceas.

Estas moléculas presentan variados usos farmacológicos, la mayoría de éstos relacionados a su capacidad de bloquear los sitios activos de los receptores colinérgicos muscarínicos. La (-)-escopolamina, la atropina y la (-)-cocaína se encuentran dentro de las más conocidas.

Entre los alcaloides del tropano, destacan los derivados del 3 α ,6 β -tropanodiol, que debido a su estructura molecular se pueden encontrar como dos especies estereoisoméricas. Esta estereoisomería se encuentra muy poco documentada y a varios de estos compuestos no se les conoce su configuración absoluta. En este aspecto, es necesario el uso de una metodología independiente y contemporánea para la determinación de la configuración absoluta de estos compuestos.

Por otra parte, la necesidad de contar con muestras ópticamente puras, así como con datos fisicoquímicos confiables, implica el desarrollo de rutas de síntesis que permitan su obtención. Aunque ya se han descrito un número considerable de rutas de síntesis para la obtención de tropanos enantioméricamente puros, éstas son de gran

dificultad experimental y hasta el momento no han conducido a la preparación de los derivados antes mencionados. Esto hace necesario, en consecuencia, desarrollar metodologías más factibles, usando como material de partida moléculas que ya contengan parte de la estructura y que sean posibles de obtener comercialmente.

En base al planteamiento anterior, se presenta aquí una metodología para la preparación de derivados naturales de (3*R*,6*R*)- y (3*S*,6*S*)-3 α ,6 β -tropanodiol a partir de (-)-escopolamina y el uso de dicroísmo circular vibracional (DCV) en la determinación de su configuración absoluta, permitiendo así la obtención de las propiedades fisicoquímicas necesarias en la investigación de estos alcaloides.

ABSTRACT

The tropane alkaloids are a well defined group of natural products that share the common 8-methyl-8-azabicyclo[3.2.1]octane skeleton. There are more than 200 known alkaloids of this type and most of them belong to the botanical families Solanaceae, Erythroxylaceae and Convolvulaceae.

These molecules present varied pharmacological uses, most of these related to their ability to block the active sites of muscarinic cholinergic receptors. Among the most well known are (-)-scopolamine, atropine and cocaine.

Within the tropane alkaloids family there are 3 α ,6 β -tropanediol derivatives, that because of their structure, can be found as two stereoisomeric species. This stereoisomerism is not well documented, and most of these molecules do not have a defined absolute configuration. This is why the use of an independent contemporary methodology has become necessary to establish the absolute configuration of these compounds.

On the other hand, the need to obtain optically active samples of these alkaloids as well as reliable spectroscopic data implies the development of synthetic routes that lead to these molecules stereospecifically. While a number of synthetic routes have been reported leading to enantiomeric tropane alkaloids, they are of great complexity and have not proved useful for the synthesis of these derivatives. For this reason, it is

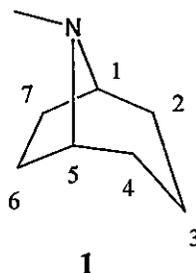
necessary to develop a much simpler synthetic pathway using commercially available compounds with the tropane skeleton in their structure.

Based on the above, here we present a methodology for the preparation of (3*R*,6*R*)- and (3*S*,6*S*)-3 α ,6 β -tropanediol derivatives from the commercially available tropane alkaloid (-)-scopolamine and the use of vibrational circular dichroism (VCD) to establish their absolute configuration, allowing important physicochemical data to be determined for the future investigation of these alkaloids.

INTRODUCCION

1.1. Alcaloides del tropano y derivados del 3 α ,6 β -tropanodiol

Los alcaloides del tropano son un grupo de productos naturales encontrados principalmente en las familias de las *Solanáceas*, *Eritroxiláceas* y *Convolvuláceas*. Su estructura molecular se caracteriza por presentar el esqueleto base 8-metil-8-azabicyclo[3.2.1]octano (tropano) (1) sustituido en diferentes posiciones y orientaciones del esqueleto, existiendo una gran diversidad entre los más de 200 representantes encontrados hasta la fecha (Lounasmaa y Tamminen, 1993; O'Hagan, 1997; O'Hagan, 2000).



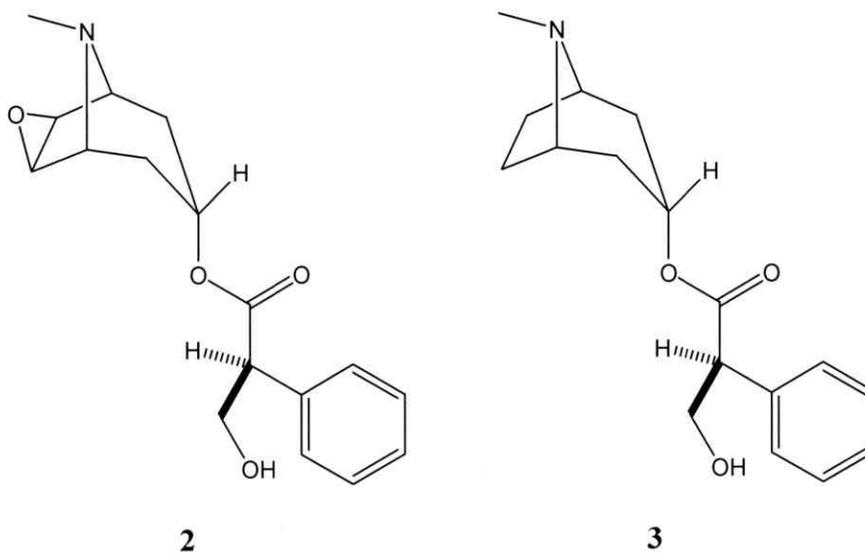
Es necesario mencionar que la numeración utilizada en el esqueleto del anillo puede cambiar al existir una sustitución. Es por esto que la diferenciación entre las posiciones C6/C7 se hará en términos de su configuración absoluta y no fijando un sistema numérico único.

Las especies pertenecientes a la familia de la papa (*Solanaceas*), y particularmente especies como la *Atropa belladonna* (Figura 1), *Hyoscyamus niger* y *Datura stramonium* han sido utilizadas por cientos de años debido a sus propiedades farmacológicas. Entre estas se encuentra su habilidad de provocar midriasis (dilatación de la pupila) cicloplegia (parálisis ciliar), reducir los espasmos de la musculatura lisa como la del intestino delgado, inhibir la secreción gástrica de HCl y minimizar los síntomas de la enfermedad de Parkinson y los de otras enfermedades que provocan temblores (Patrick, 1995).

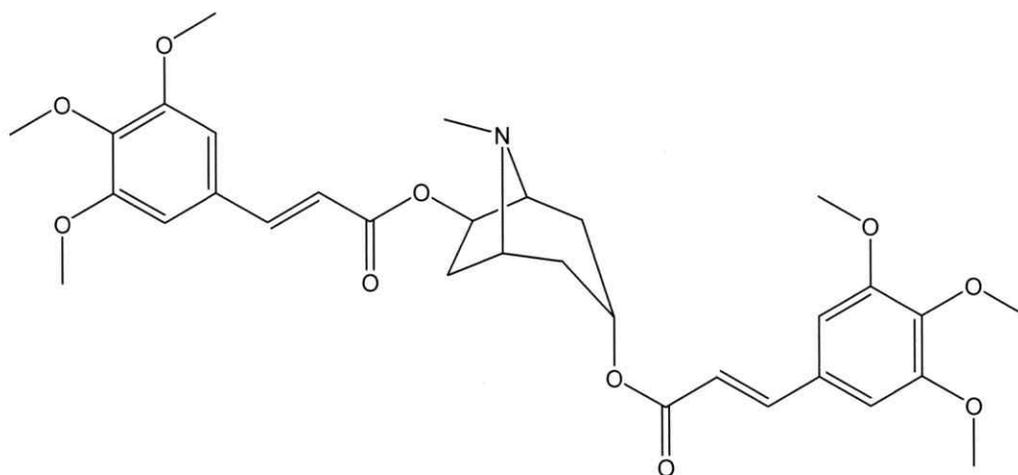


Figura 1. Dibujo de *Atropa belladonna*.

Hoy día se sabe que las propiedades farmacológicas y toxicológicas de estas plantas son provocadas por una serie de alcaloides del tropano, entre los que se encuentran la (-)-escopolamina (**2**) y (-)-hiosciamina (**3**). Aunque estos efectos antiespasmódicos, antisecretorios y midriáticos de este grupo de productos naturales ya era conocido en el siglo XIX, no fue hasta el siglo XX que se demostró que moléculas como la atropina (forma racémica de la (-)-hiosciamina) antagonizan todas las acciones muscarínicas de la acetilcolina (Ach). Esto se debe al bloqueo de los receptores colinérgico-muscarínicos de forma competitiva por esta sustancia, mediante interacciones de tipo no covalente (Patrick, 1995).



Por otra parte, la gran versatilidad estructural que presenta este grupo de productos naturales ha llevado a investigar sus posibles usos en diferentes áreas de la medicina. Entre éstos, destaca la capacidad de un grupo de alcaloides aislados desde las raíces de *Erythroxylum parvillei*, entre éstos el 3 α ,6 β -di-(3,4,5-trimetoxicinamoiloxi)tropano o pervileína C (**4**), de inhibir significativamente el

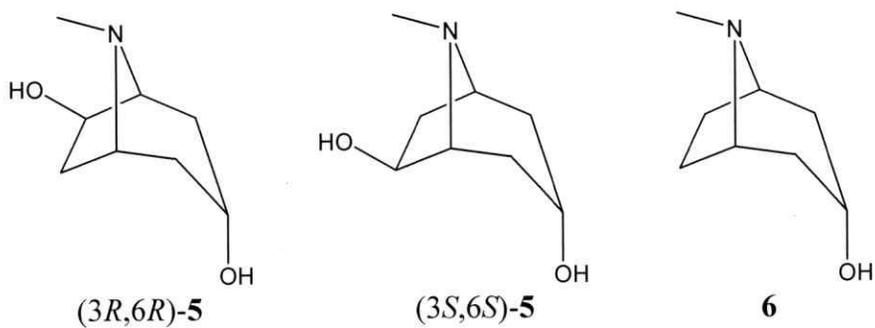


4

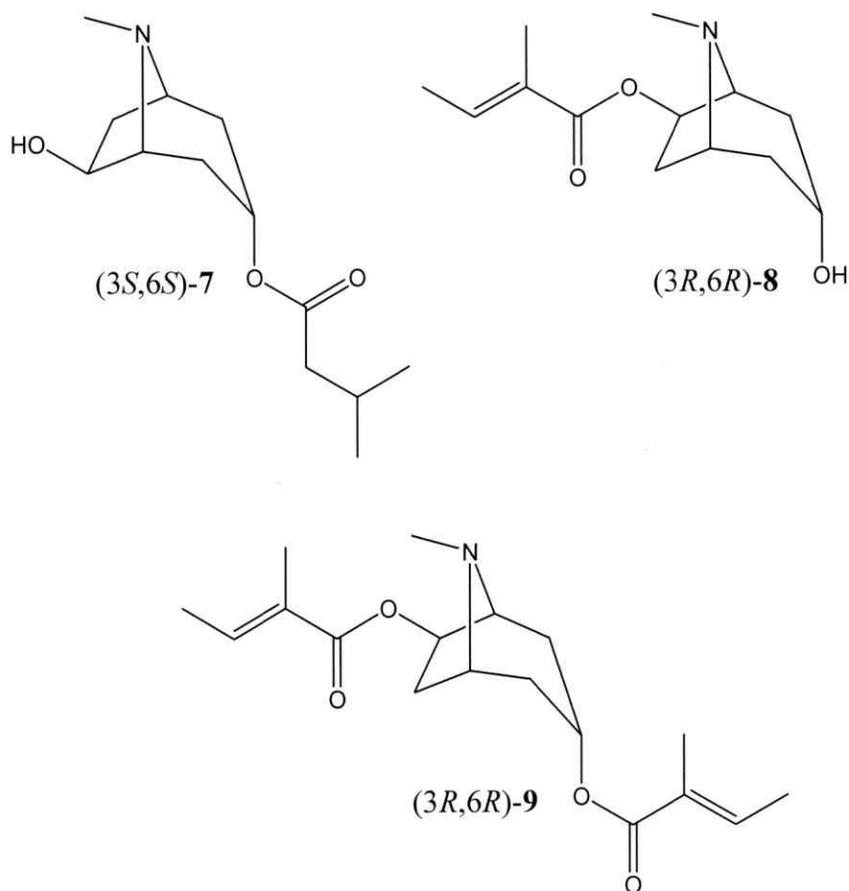
crecimiento de células cancerígenas resistentes a drogas (Silva y col., 2001).

Dentro de la amplia gama de posibilidades de sustitución del anillo del tropano, se destaca un subgrupo con sustituciones en C-3 y C-6, orientados en α y β respectivamente (*trans* y *cis* con respecto al puente nitrogenado). La estructura base de este subgrupo corresponde a la del 3 α ,6 β -tropanodiol (5), el que se puede presentar esterificado parcial o totalmente por una amplia variedad de ácidos carboxílicos. A este grupo pertenecen alrededor de 60 moléculas dispersas en gran parte de las familias antes mencionadas (Lounasmaa y Tamminen, 1993).

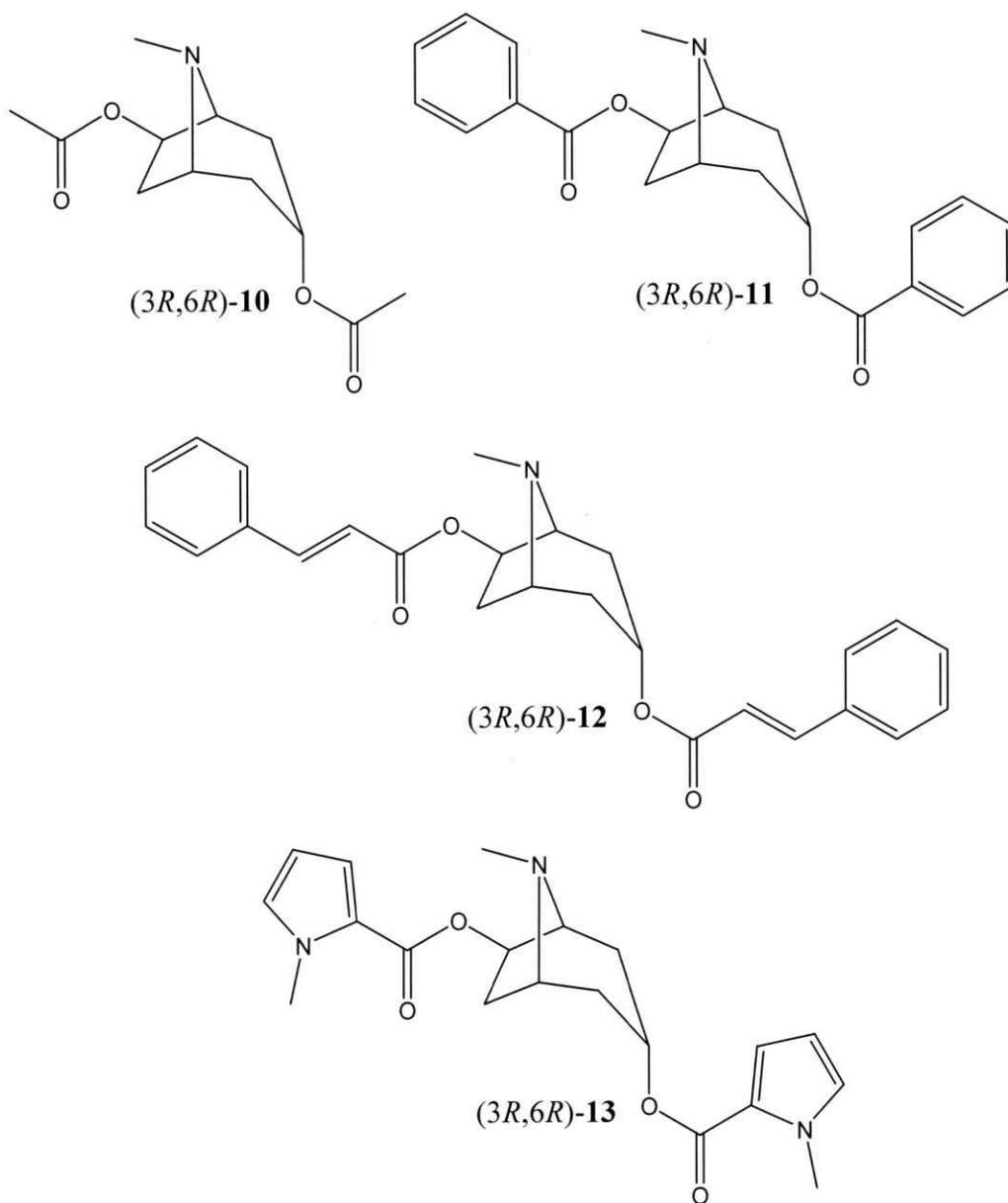
Aunque los alcaloides del tropano no necesariamente presentan actividad óptica, la presencia del sustituyente en la posición C-6 rompe el plano de simetría que pasa por C-3, y divide el enlace C-6/C-7, presente en el tropanol (6), por lo que este subgrupo sí presenta actividad óptica y ambas posiciones de sustitución se convierten en centros asimétricos. De lo anterior, es posible concluir que 5 y sus derivados tienen



dos posibles isómeros ópticos: (3*R*,6*R*)-5 y (3*S*,6*S*)-5.



Las estructuras enantioméricas (3*R*,6*R*)-5 y (3*S*,6*S*)-5, tienen existencia natural, y son diferenciadas por su poder rotatorio (+ o -). En primera instancia, la configuración



absoluta de **5** fue establecida como (3*R*,6*R*) para la base libre levorotatoria ($[\alpha]_D = -23.3$) y (3*S*,6*S*) para su enantiómero ($[\alpha]_D = +24.1$) (Fodor y Kovács, 1953; Fodor y col., 1961) adoptando la regla de la lactona de Hudson (Hudson, 1910). Sin embargo, los mismos autores corrigieron posteriormente las configuraciones absolutas de ambos enantiómeros de **5** mediante correlación química con el ácido metoxisuccínico, llegando a la conclusión opuesta (Fodor y Sóti, 1964; Fodor y Sóti, 1965).

Por otra parte, la configuración absoluta de los derivados esterificados de **5** ha sido establecida comúnmente mediante correlación química. El procedimiento generalmente involucra la hidrólisis de los ésteres para la formación de **5** y posterior medición de su poder rotatorio (de la Fuente y col., 1988; Muñoz y col., 1991). Entre las bases aisladas cuya configuración absoluta fue determinada por este método, se encuentran la (-)-valeroidina (**7**), correlacionada con (3*S*,6*S*)-**5**, 6β-tigloiloxi-3α-tropanol (**8**) (*Datura cornigera*) y 3α,6β-ditigloiloxitropano (**9**) (*Datura ferox*, *D. innoxia* y *D. stramonium*), estos últimos correlacionados con (3*R*,6*R*)-**5** (Fodor y Sóti, 1965).

Sin embargo, la dificultad en realizar este tipo de transformaciones con los alcaloides minoritarios de las diferentes especies vegetales, debido a la pequeña cantidad en la que se encuentran, ha producido una gran ambigüedad en la estereoquímica de estos compuestos. Entre éstos se destacan aquellos derivados de **5** que poseen ambos hidroxilos esterificados con el mismo éster, tales como **4**, **9**, 3α,6β-diacetiloxitropano (**10**), 3α,6β-dibenzoiloxitropano (**11**), 3α,6β-dicinamoiloxitropano (**12**) y 3α,6β-di-(*N*-metilpirroiloxi)-tropano (**13**) en donde su configuración absoluta no se ha determinado en la mayoría de los casos (Tabla 1).

Por otra parte, existe también cierta controversia con respecto a la configuración absoluta de otros derivados de **5**, entre los que se encuentran ambos diastereoisómeros de la 6β-hidroxihiosciamina ((3*R*,6*R*) y (3*S*,6*S*)-**14**). En una primera instancia, la forma levorotatoria de **14** ($[\alpha]_D = -10.5$) fue correlacionada con el bromhidrato de (+)-**5** ($[\alpha]_D = +1.4$) y le fue asignada la configuración absoluta (3*R*,6*R*) (Fodor y col., 1962).

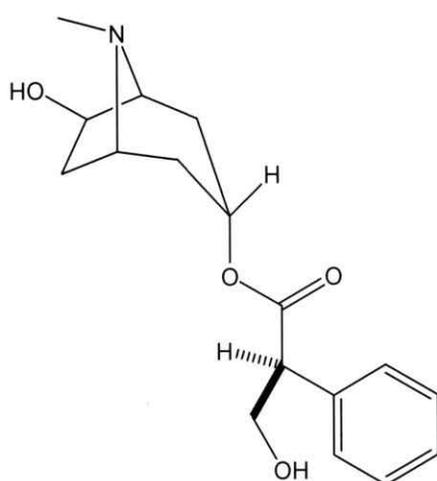
Tabla 1. Existencia natural (familia / género) y estereoquímica (signo del poder rotatorio / configuración absoluta) de las bases 3 α ,6 β -di-(3,4,5-trimetoxicinamoiloxi)tropano (**4**), 3 α ,6 β -ditigloiloxitropano (**9**), 3 α ,6 β -diacetiloxitropano (**10**), 3 α ,6 β -dibenzoiloxitropano (**11**), 3 α ,6 β -dicinamoiloxitropano (**12**) y 3 α ,6 β -di-(N-metilpirroiloxi)-tropano (**13**).

Compuesto	Existencia Natural	Estereoquímica
4	Erythroxyllaceae / <i>Erythroxyllum</i>	(+) / desconocida
9	Solanaceae / <i>Datura</i> , <i>Mandragora</i> , <i>Anthocercis</i> , <i>Symonanthus</i>	(-) / (3R,6R)
10	Solanaceae / <i>Datura</i>	desconocida
11	Erythroxyllaceae / <i>Erythroxyllum</i>	(\pm) / desconocida
12	Erythroxyllaceae / <i>Erythroxyllum</i>	desconocida
13	Erythroxyllaceae / <i>Erythroxyllum</i>	(-) / desconocida

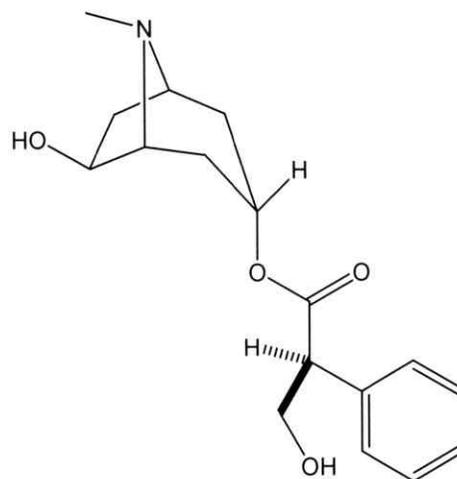
4 (Silva y col., 2001), **9** (Evans y Wellendorf, 1958; Evans y Wellemdorf, 1959; Evans y PeThan, 1962; Evans y Griffin, 1964; Evans y col., 1965; Evans y Wooley, 1965; Shah y Khanna, 1965 a y b; Griffin, 1966; Lubis, 1967; Evans y col., 1969; Anwar y Ghani, 1973; Evans y Treagust, 1973; Jackson y Berry, 1973; Evans y Somanabandhu, 1974; Evans y Ramsey, 1983; Witte y col., 1987; Petri, 1988; Aripova y Yunusov, 1989; Parr y col. 1990; Robins y col., 1990), **10** (Parr y col., 1990), **11** (El-Imam y col., 1988), **12** (Al-Said y col., 1989), **13** (Zandar y col., 2003).

Adicionalmente, se ha descrito en diferentes artículos el aislamiento de (-)-**14**, pero en la mayoría de estos no se informa la rotación específica. Sólo existen algunas excepciones en donde se describen valores negativos de rotación específica para el bromhidrato de **14**, cuando éste se encuentra disuelto en agua (Romeike, 1962; Griffin, 1975).

Posteriormente, ambos diastereoisómeros de **14** fueron encontrados en las raíces de *Hyoscyamus albus*, uno levorrotatorio ($[\alpha]_D = -13.0$) y otro dextrorrotatorio ($[\alpha]_D = +1.2$), ambos medidos como bases libres (Ishimaru y Shimomura, 1989). En esa oportunidad se realizaron las reacciones de hidrólisis de ambos compuestos, y las configuraciones absolutas de (+)-**14** y (-)-**14** fueron definidas como (3R,6R) y (3S,6S), respectivamente.



(3*R*,6*R*)-14



(3*S*,6*S*)-14

Sin embargo, aparece cierta confusión al analizar los valores de rotación específica obtenidos de los tropanodios resultantes ($[\alpha]_D = -1.8$ y $[\alpha]_D = -1.0$ para los clorhidratos de los dioles obtenidos por hidrólisis a partir de (-)-14 y (+)-14, respectivamente). Estos valores claramente no son lo suficientemente concluyentes para la determinación de la configuración absoluta de estos compuestos.

Aunque ya se ha descrito un número considerable de rutas de síntesis para la obtención de tropanos enantioméricamente puros, éstas son de gran dificultad experimental y hasta el momento no han llevado a la preparación de los derivados antes mencionados (Lounasmaa y Tamminen, 1993; O'Hagan, 1997; O'Hagan, 2000). Es por esto que es de gran significado explorar otras vías para la preparación de estos derivados para su estudio desde los puntos de vista fitoquímico, estereoquímico y farmacológico.

1.2. Espectroscopia de dicroísmo circular vibracional y la determinación de la configuración absoluta de moléculas quirales

La determinación de la configuración absoluta de moléculas quirales ha sido por mucho tiempo una problemática de gran importancia en el área de la estereoquímica. Dentro de los métodos más comúnmente utilizados se encuentra la cristalografía de rayos-X, la que debido a sus avances ha sido usada en forma rutinaria, mediante la metodología de dispersión anómala, como una forma directa y confiable para la determinación de la configuración absoluta. Lamentablemente la necesidad de contar con un monocristal de la muestra, que además contenga un átomo de masa atómica igual o mayor a la del S, puede complicar y hasta impedir su uso en muchos casos (Freedman y col., 2003). Sin embargo, un enfoque alternativo y potencialmente útil consiste en la determinación más simple de derivados en los que se ha introducido un centro estereogénico adicional de configuración absoluta conocida.

Otras metodologías que han sido utilizadas con este propósito son la rotación óptica y el dicroísmo circular electrónico. Estas técnicas se han basado principalmente en el establecimiento de reglas empíricas que correlacionan formas estructurales con su comportamiento espectral, pero en la mayoría de los casos estas reglas tienen excepciones que han llevado a asignaciones incorrectas.

Recientemente la espectroscopia de dicroísmo circular vibracional (DCV) ha mostrado ser de gran utilidad en la determinación de la configuración absoluta de

moléculas de mediana complejidad, mediante su medición y posterior comparación con espectros calculados utilizando métodos *ab initio* (Nadie y Freedman, 2000).

Este tipo de espectroscopia pertenece al área de la actividad óptica vibracional y es una extensión del dicroísmo circular electrónico hacia las regiones del infrarrojo e infrarrojo cercano. Esencialmente, el espectro de DCV corresponde a la diferencia entre los espectros vibracionales derivados de la exposición de la muestra a la radiación circularmente polarizada hacia la izquierda, con respecto a la radiación circularmente polarizada hacia la derecha. Esta medición (Figura 2) se realiza utilizando la radiación infrarroja de un espectrofotómetro infrarrojo de transformada de Fourier, la cual luego de ser linealmente polarizada, pasa a través de un modulador fotoelástico, el que modula la polarización para crear las ondas circularmente polarizadas hacia la derecha e izquierda.

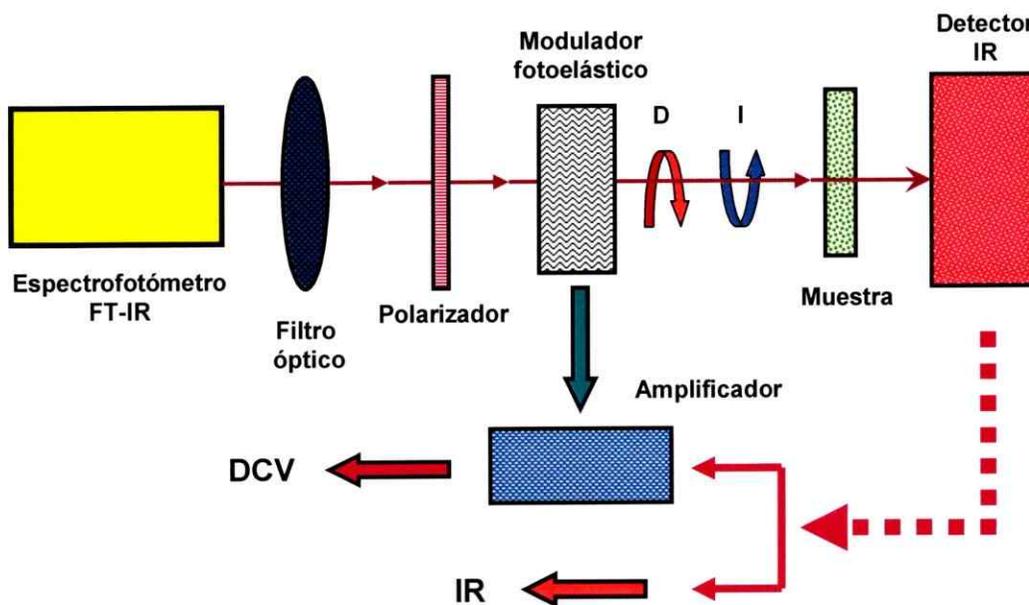


Figura 2. Esquema de funcionamiento de un espectrofotómetro de dicroísmo circular vibracional (adaptado de Nadie y Freedman, 2000).

El haz, luego de pasar a través de la muestra, es recogido por un detector de infrarrojo, el cual convierte su intensidad en impulsos eléctricos lo que a su vez son procesados electrónicamente.

A diferencia del dicroísmo circular electrónico, en donde las transiciones ocurren entre los estados electrónicos basal y excitado de la molécula (haciendo extremadamente difícil su cálculo teórico), el DCV involucra las transiciones vibracionales que ocurren únicamente en el estado electrónico basal de ésta. Como consecuencia, el cálculo del espectro sólo necesita considerar este estado electrónico, disminuyendo considerablemente el tiempo computacional necesario para estos cálculos (Freedman y col, 2003).

Sin embargo, y debido a la alta dependencia de las transiciones vibracionales con la conformación, es esencial conocer las preferencias conformacionales de la molécula mediante una distribución de Boltzmann, para así restringir el cálculo sólo a las conformaciones significativamente pobladas. Para esto, la primera etapa consiste en realizar una búsqueda conformacional para obtener todas aquellas conformaciones que puedan ser parte de la distribución dentro de un rango de energía. Dentro de este tipo de búsquedas se destacan la búsqueda sistemática y la de Monte Carlo.

En el caso de la búsqueda sistemática o de parrilla (Levine, 2001), se incrementan sistemáticamente todos los ángulos diedros que incluyen la rotación en torno a un enlace simple en una cantidad predeterminada, hasta que se hayan generado todas las combinaciones posibles para esta cantidad. Luego de generada una nueva serie de ángulos diedros, se comprueba que la nueva configuración no

contenga átomos que se encuentren demasiado cerca entre sí, lo que es determinado por el radio de van der Waals de estos. A este procedimiento se le llama "comprobación de sacudida" y tiene por objetivo determinar si dos o más átomos se encuentran ocupando las mismas posiciones en el espacio, lo que impediría la continuación del cálculo. De pasar esta comprobación, se usa un procedimiento de optimización de la geometría para encontrar el mínimo local más cercano en la superficie de energía potencial. Finalmente, este nuevo mínimo es comparado con los encontrados con anterioridad y, de ser único, es guardado en la lista final de confórmeros.

Por otra parte, en el método de búsqueda al azar, estocástico o de Monte Carlo (Levine, 2001) se comienza con un confórmero estable y se generan nuevas conformaciones iniciales, ya sea por cambios al azar en los valores de algunos ángulos diedros también elegidos al azar, o bien sumando pequeñas cantidades al azar a las coordenadas cartesianas de cada átomo. Luego de esto, la nueva conformación pasa a través de una comprobación de sacudida y luego por una optimización de geometría. Finalmente se determina si la conformación generada es nueva, y de serlo es grabada en la lista final.

Luego de realizada la búsqueda conformacional, los confórmeros obtenidos son sometidos a cálculos de punto simple de energía utilizando niveles de teoría del tipo *ab initio*. Estas energías, una vez utilizadas en una distribución de Boltzmann, permiten conocer las abundancias relativas de cada confórmero dentro de la distribución, y así elegir las conformaciones más representativas de esta. Finalmente, las conformaciones son sometidas a una optimización de la geometría antes de que los espectros de

infrarrojo (IR) y DCV sean calculados.

Con el objetivo de obtener los espectros teóricamente, es necesario realizar el cálculo de las intensidades y frecuencias vibracionales respectivas, las que determinan la forma final de éstos. Para el caso de las intensidades de IR éstas se realizan considerando que son proporcionales a la fuerza dipolar D , la que a su vez es proporcional al cuadrado de la derivada del momento dipolar eléctrico de la molécula con respecto al desplazamiento nuclear en el modo vibracional normal Q_a , según la siguiente relación:

$$D = \frac{\hbar}{2\omega_a} \left| \left(\frac{\partial \vec{\mu}}{\partial Q_a} \right) \right|^2$$

Por otra parte, las intensidades de DCV son proporcionales a la fuerza rotacional R , la que a su vez es proporcional al producto escalar entre la derivada del momento dipolar eléctrico de la molécula con respecto al modo de desplazamiento normal, y la derivada del momento dipolar magnético de la molécula con respecto a las velocidades nucleares del modo normal P , según la siguiente relación:

$$R = \frac{\hbar}{2} \left(\frac{\partial \vec{\mu}}{\partial Q_a} \right) \cdot \left(\frac{\partial \vec{m}}{\partial P_a} \right)$$

De estas dos ecuaciones, se desprende que una intensidad de absorción en el

infrarrojo diferente de cero requiere una oscilación lineal de la carga producida por el movimiento de los núcleos. Por otra parte, una intensidad de DCV diferente de cero requiere tanto una oscilación lineal (eléctrica) como angular (magnética) de la carga, producidas por el movimiento nuclear.

En la práctica, los programas de química cuántica realizan derivadas de la energía de la molécula con respecto al campo eléctrico (\mathbf{E}) o magnético (\mathbf{H}), y con respecto del desplazamiento nuclear en el modo vibracional normal, para así calcular las fuerzas dipolares y rotacionales respectivas (eq. 1 y eq 2, respectivamente).

$$\text{Eq. 1} \quad \left(\frac{\partial \vec{\mu}}{\partial Q_a} \right) = - \left(\frac{\partial^2 E_{el}}{\partial \mathbf{E} \partial Q_a} \right)$$

$$\text{Eq. 2} \quad \left(\frac{\partial \vec{m}}{\partial P_a} \right) = - \left(\frac{\partial^2 E_{el}}{\partial \mathbf{E} \partial P_a} \right)$$

Las intensidades calculadas son luego graficadas como bandas de forma Lorentziana para su posterior comparación con los espectros experimentales.

Finalmente, estos espectros individuales calculados son ponderados según una nueva distribución de Boltzmann, considerando las energías de las geometrías optimizadas, para entregar espectros de DCV e IR ponderados, los que a su vez son comparados con los espectros experimentales de la muestra.

1.3. Predicción de corrimientos químicos de $^1\text{HRMN}$ y $^{13}\text{CRMN}$ utilizando cálculos *ab initio*

La espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN) ha probado ser una poderosa herramienta de elucidación estructural en las últimas décadas. Aunque una gran parte de la información que esta técnica entrega puede ser usada sin la necesidad de cálculos computacionales, la predicción de corrimientos químicos tanto de ^1H como ^{13}C , ha incrementado la utilidad de la misma. Es por esto que se ha realizado un gran esfuerzo en lograr cálculos de corrimientos químicos lo suficientemente precisos como para ser utilizados en aplicaciones prácticas (Helgaker y col., 1999).

Experimentalmente, los corrimientos químicos producidos por los núcleos en una molécula son las diferencias entre las constantes de apantallamiento de éstos y los de un núcleo en una molécula de referencia, tal como el tetrametilsilano (TMS) usado en espectroscopia de $^1\text{HRMN}$ y $^{13}\text{CRMN}$.

Para calcular estas constantes de apantallamiento, el campo magnético es tratado como una perturbación, para luego resolver el sistema de ecuaciones llamadas ecuaciones perturbadas acopladas. Del mismo modo que el campo eléctrico es igual a menos el gradiente de potencial eléctrico, la inducción magnética B viene dada por $B = \nabla \times A$, donde A es el vector de potencial magnético. Muchas elecciones de A dan el mismo valor de B , por lo que una elección particular de este define la "norma" del vector potencial. Se han propuesto varios métodos para que los resultados sean independientes de la elección de la norma. De ellos el más ampliamente utilizado es el

método de orbitales atómicos incluyendo norma (conocido por sus iniciales en inglés como GIAO), en el que cada base de orbital atómico incluye un factor exponencial que contiene B (Levine, 2001).

Luego de calculadas las constantes de apantallamiento, los corrimientos químicos pueden ser obtenidos tomando diferencias entre éstas y la constante de apantallamiento calculada para una referencia. Sin embargo, se ha mostrado que cualquier error en la constante de apantallamiento calculada para la referencia se verá reflejado en los corrimientos químicos obtenidos de esta forma. Además, es posible que el orden relativo de los corrimientos químicos calculados sea predicho con precisión, pero que éstos necesiten ser escalados para mostrar una buena correlación con los corrimientos químicos experimentales. En este sentido, se ha mostrado que gran parte del error en el cálculo de constantes de apantallamiento de ^1H y ^{13}C es sistemático, y por lo tanto puede ser corregido utilizando un procedimiento de escalamiento lineal. Este tipo de procedimiento ha sido utilizado ampliamente en el cálculo de frecuencias vibracionales mediante teorías *ab initio*.

Para el caso de apantallamientos magnéticos de ^{13}C obtenidos usando la aproximación GIAO, se ha concluido que éstos exhiben una buena correlación con sus respectivos corrimientos químicos experimentales, incluso cuando se utilizan bases relativamente pequeñas para el cálculo, y siempre que los efectos de correlación electrónica sean incluidos mediante la teoría de funcionales de la densidad (conocida por sus iniciales en inglés como DFT).

Por otra parte, debido al menor rango en que encuentran los corrimientos

químicos de ^1H en comparación a ^{13}C , existe la creencia de que el cálculo de éstos no puede ser realizado con una precisión lo suficientemente útil. Sin embargo, esto ha probado ser incorrecto y los cálculos de apantallamientos magnéticos de ^1H pueden ser obtenidos con una precisión del orden de 0.1 ppm.

HIPOTESIS

Existe considerable interés en determinar la configuración absoluta de metabolitos secundarios, en particular los alcaloides del tropano, debido al aporte que estos datos entregan en áreas tales como la fitoquímica, la farmacología y la botánica. Por lo anterior proponemos que: "es posible la preparación de los diferentes estereoisómeros de un grupo de aciloxi derivados del 3 α ,6 β -tropanodiol a partir de (-)-escopolamina, permitiendo así la medición de las propiedades fisicoquímicas que luego permitan la determinación estructural y estereoquímica en muestras de origen natural."

OBJETIVOS

Objetivos Generales

El objetivo de este trabajo fue desarrollar una metodología de síntesis para la preparación de las formas enantioméricamente puras de un grupo de aciloxi derivados del 3 α ,6 β -tropanodiol, usando como material de partida el producto comercial (-)-escopolamina. La obtención de estos productos con estereoquímica conocida permitiría las mediciones fisicoquímicas necesarias para la determinación inequívoca de sus estructuras y estereoquímica, así como su posible determinación en muestras de origen natural.

Objetivos Específicos

- La preparación de ambos diastereoisómeros de la 6 β -hidroxihiosciamina y la determinación de su configuración mediante una metodología independiente.
- La preparación de ambos enantiómeros del 3 α ,6 β -tropanodiol y la evaluación de rutas de síntesis para la preparación de sus derivados.
- La medición de todas las propiedades fisicoquímicas necesarias para la determinación inequívoca de cada estructura preparada y su correspondiente configuración absoluta.

MATERIALES Y METODOS

2.1. Hidrogenólisis catalítica de (-)-escopolamina usando el catalizador de Ni-Raney

2.1.1. Preparación del catalizador de Ni-Raney W-2

El catalizador de níquel Raney W-2 fue preparado a partir de una aleación de níquel–aluminio al 50%. Esto se realizó colocando una solución de 126 g de NaOH en 500 mL de agua destilada en un vaso de precipitado de 2 L, equipado con un agitador mecánico de acero inoxidable. El sistema fue llevado a un baño de hielo, donde se adicionaron 100 g de aleación comercial de níquel–aluminio en pequeñas porciones durante 2 horas y se mantuvo la temperatura de la solución bajo los 25 °C en todo momento. Añadida toda la aleación, la solución se dejó a temperatura ambiente durante la noche. Luego, la mezcla fue entibiada en una placa calefactora hasta que la salida de H₂ disminuyó, para luego dejar decantar el líquido, restablecer el volumen original con agua y decantar el líquido nuevamente. El sólido se trasvasió a un matraz de Erlenmeyer de 1 L con una solución de 16 g de NaOH y 160 mL de agua. El sobrenadante fue decantado y el sólido fue lavado 20 veces con porciones de 200 mL de agua y agitando 10 minutos cada vez. El catalizador fue guardado en agua para su posterior utilización.

2.1.2. Preparación del catalizador de Ni-Raney W-2 desactivado

El catalizador de níquel Raney W-2 desactivado fue preparado a partir del catalizador W-2 ya preparado, mediante ebullición de éste en agua destilada por 60 min.

2.1.3. Preparación del catalizador de Ni-Raney W-1

El catalizador de níquel Raney W-1 fue preparado adicionando lentamente (2 a 3 h) 50 g de una aleación de níquel–aluminio al 50% a una solución de 50 g de NaOH en 200 mL de agua destilada, contenida en un vaso de precipitado de 500 mL en un baño de hielo. La mezcla fue luego calentada por un periodo de 4 h en una placa calefactora, con agitación ocasional, y manteniendo la temperatura de ésta entre 115 y 120° C. El nivel de líquido se mantuvo constante mediante adición de agua destilada. Luego de ser enfriada, a la mezcla se le agregó agua destilada hasta completar 1 L y el sólido fue lavado por decantación 6 veces con la misma cantidad de agua. Posteriormente el sólido fue lavado por suspensión en un embudo de Büchner con agua destilada hasta que el filtrado tuviese un pH neutro. Finalmente, el catalizador fue lavado 3 veces con etanol al 95 % y luego guardado en etanol absoluto para su uso posterior.

2.1.4. Hidrogenólisis catalítica de (-)-escopolamina

Las diferentes reacciones de hidrogenólisis catalítica de (-)-escopolamina (**2**) se realizaron agregando 5 g de bromhidrato de (-)-escopolamina a 100 mL de agua desionizada, junto con 10 mL del respectivo catalizador de Ni-Raney ya decantado. Las mezclas fueron llevadas a un hidrogenador Parr con un envase de vidrio de 500 mL, para luego ser desgasificadas bajo vacío y saturadas con H₂ a una presión de 50 psi

por 10 minutos. Luego de esto, las soluciones se mantuvieron bajo una presión de H_2 de 15 psi hasta la desaparición de la materia prima según cromatografía de capa fina ($CHCl_3$ -EtOH- NH_3 7:3:1). Las soluciones acuosas resultantes fueron separadas del catalizador mediante filtración al vacío sobre vidrio poroso, para luego ser llevadas a pH 10 con NH_3 (aq.) al 28 % y extraídas con 20 alícuotas de $CHCl_3$ de 20 mL. Los extractos clorofórmicos, luego de ser secados con Na_2SO_4 anhidro, se concentraron hasta sequedad, de donde se obtuvieron los productos de reacción como residuos aceitosos. Posteriormente, 10 mg de estos residuos fueron disueltos en 1 mL de $CDCl_3$ para luego ser analizados mediante espectroscopia de 1H RMN, utilizando un espectrómetro de RMN Bruker AVANCE de 400 MHz.

2.2. Separación de la mezcla de hidrogenólisis catalítica mediante cromatografía de pares iónicos

2.2.1. Procedimiento cromatográfico

La columna cromatográfica fue preparada agregando entre 50 y 100 g de sílice modificada C18 (Varian) en 200 mL de metanol e introduciendo la mezcla en una columna de vidrio de media presión de 30 cm de largo y 4 cm de diámetro interno. Luego de esto, la columna fue ambientada con 300 mL de solución de 1-heptanosulfonato de sodio 10 mM a pH 4 con ácido acético a través de una bomba de media presión. A continuación, 200 mg de mezcla de reacción se disolvieron en 10 mL de la solución anterior y fueron llevados sobre la columna mediante una pipeta de Pasteur. Posteriormente la columna fue eluída con una mezcla de metanol y una

solución de 1-heptanosulfonato de sodio 10 mM a pH 4. Durante la optimización del procedimiento se utilizaron diferentes proporciones entre los componentes de la fase móvil. Además, se utilizó tanto ácido acético como solución amortiguadora ácido acético – acetato de sodio para ajustar el pH de la solución acuosa. Finalmente se recibieron fracciones de 1 L las que fueron guardadas bajo refrigeración (3° C) en botellas de polipropileno. Para la obtención de las proporciones y cantidades específicas de cada procedimiento, ver Sección 3.2.

2.2.2. Procedimiento post-cromatográfico

Cada fracción obtenida durante el proceso cromatográfico fue llevada a pH 10 mediante una solución de NH_3 (aq.) al 28 % para luego ser extraída en un embudo de decantación de 2 L 20 veces con fracciones de 50 mL de CHCl_3 . Los respectivos extractos clorofórmicos, luego de ser secados con Na_2SO_4 anhidro, se evaporaron hasta sequedad, y los residuos aceitosos fueron traspasados a viales de masa conocida. Las muestras fueron luego disueltas en 1 mL de CDCl_3 para luego ser analizadas mediante espectroscopia de $^1\text{HRMN}$, utilizando un espectrómetro de RMN Bruker AVANCE de 400 MHz.

2.3. Separación de la mezcla de hidrogenólisis catalítica mediante cristalizaciones fraccionadas

2.3.1. Hidrogenólisis catalítica de (-)-escopolamina

Las diferentes reacciones de hidrogenólisis catalítica de **2** utilizadas para la separación por cristalizaciones fraccionadas se realizaron utilizando entre 25 y 50 g de bromhidrato de escopolamina con Ni-Raney W-1 y utilizando el procedimiento descrito anteriormente. Las soluciones acuosas resultantes fueron luego llevadas a sequedad en un evaporador rotatorio bajo vacío y calentamiento sin sobrepasar los 40° C. El residuo de bromhidratos fue luego lavado con 250 mL de etanol absoluto y este último eliminado por evaporación bajo vacío en dos oportunidades. El mismo procedimiento se realizó utilizando la misma cantidad de benceno, también en dos oportunidades. Para la obtención de las proporciones y cantidades específicas de cada procedimiento, ver Sección 3.3.

2.3.2. Precipitación y recristalización de bromhidratos en acetona

La mezcla seca de bromhidratos obtenida de la hidrogenólisis de **2** fue dejada bajo reflujo en 250 mL de acetona anhidra por 1 hora hasta la aparición de turbidez. Luego de esto, la mezcla se llevó a temperatura ambiente y fue refrigerada posteriormente (3° C) por 48 h. Los cristales obtenidos fueron recristalizados disolviéndolos en el menor volumen posible de etanol absoluto en ebullición, para luego dejar enfriar la solución a temperatura ambiente por 24 h. A los cristales obtenidos en cada paso se les midió su punto de fusión utilizando un equipo Fisher-Johns. Además, algunas muestras seleccionadas se analizaron mediante

espectroscopia de $^1\text{HRMN}$, utilizando un espectrómetro de RMN Bruker AVANCE de 400 MHz.

2.3.3. Precipitación y recristalización de O,O'-dibenzoil-L-tartratos en etanol

La solución acetónica obtenida luego de la precipitación de los bromhidratos fue llevada a sequedad por evaporación bajo calentamiento y vacío. La mezcla de bromhidratos resultante se disolvió en 60 mL de agua destilada y fue llevada a pH 10 mediante adición de carbonato de potasio y luego extraída en un embudo de decantación con 15 porciones de 50 mL de acetato de etilo. La solución orgánica fue secada con Na_2SO_4 , filtrada y llevada a sequedad por calentamiento y vacío. El aceite resultante fue disuelto en 100 mL de etanol absoluto tibio y luego se le agregó una solución de 8.6 g de ácido (-)-O,O'-dibenzoil-L-tartárico en 60 mL de etanol absoluto. La mezcla fue luego enfriada (3°C) por 12 h, después de las cuales un sólido fue separado por filtración al vacío en papel. Después de lavado con porciones de etanol absoluto frío y secado a temperatura ambiente, el sólido fue recristalizado disolviéndolo en el menor volumen posible de etanol absoluto en ebullición, para luego dejar enfriar la solución a temperatura ambiente por 24 h. Una muestra de 20 mg de los cristales obtenidos en cada paso fue disuelta en 20 mL de agua, su pH ajustado a 10 con NH_3 (aq.) al 28 % y la solución acuosa extraída 20 veces con CHCl_3 . La solución orgánica fue secada con Na_2SO_4 , filtrada y llevada a sequedad por calentamiento y vacío. Los residuos respectivos fueron disueltos en 1 mL de CDCl_3 para luego ser analizadas mediante espectroscopia de $^1\text{HRMN}$, utilizando un espectrómetro de RMN Bruker AVANCE de 400 MHz.

2.4. Preparación de (3S,6S)-3 α ,6 β -tropanodiol y (3S,6S)-3 α ,6 β -diacetoxitropano

2.4.1. Preparación de (3S,6S)-3 α ,6 β -tropanodiol

Se colocaron 205 mg de (-)-(3S,6S)-6 β -hidroxihiosciamina ((-)-(3S,6S)-**14**) y 500 mg de Ba(OH)₂ en 50 mL de agua desionizada. La mezcla fue calentada bajo reflujo y la evolución de la reacción monitoreada utilizando cromatografía de capa fina, con la cual se pudo determinar el término de la reacción a las 4 h de comenzada. Luego de esto se procedió a acidificar el medio usando H₂SO₄ 0.1 M hasta que la solución quedó levemente ácida, para luego ser filtrada hasta total claridad. Posteriormente la mezcla fue extraída 20 veces con éter dietílico (5 mL), el que se evaporó bajo vacío para dar ácido trópico. Por otra parte, la solución acuosa fue dejada bajo agitación con 500 mg de BaCO₃ por 12 h, para luego separar el sólido por centrifugación. El sobrenadante fue llevado a un evaporador rotatorio donde se eliminó el agua mediante calor y vacío. La parte soluble en EtOH del residuo obtenido fue nuevamente llevada a un evaporador rotatorio para eliminar el disolvente, obteniéndose 62 mg de (-)-(3S,6S)-3 α ,6 β -tropanodiol ((-)-(3S,6S)-**5**). Rf: 0.1 (CHCl₃/EtOH 17:3); positivo a los reactivos de Dragendorff y tiocianato de cobalto; $[\alpha]_{589} -9$, $[\alpha]_{578} -10$, $[\alpha]_{546} -11$, $[\alpha]_{436} -23$, $[\alpha]_{365} -43$ (c 0.81, EtOH).

2.4.2. Preparación de (3S,6S)-3 α ,6 β -diacetoxitropano

Se colocaron 10 mg de (3S,6S)-3 α ,6 β -tropanodiol con 10 mL de anhídrido acético a reflujo por 4 h. La mezcla de reacción se disolvió en 20 mL de H₂O acidificada con gotas de H₂SO₄ 1M y luego fue extraída con 3 porciones de CH₂Cl₂. Luego la

solución acuosa se basificó con NH_3 (aq.) 28% hasta pH 10 y se extrajo 20 veces con porciones de 20 mL de CH_2Cl_2 . La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 anh. y se concentró bajo vacío para obtener 16 mg de una sustancia aceitosa identificada como (-)-(3S,6S)-3 α ,6 β -diacetoxitropano ((-)-(3S,6S)-**10**) (Rf: 0.4 ($\text{CHCl}_3/\text{EtOH}$ 17:3), positivo a los reactivos de Dragendorff y tiocianato de cobalto). $[\alpha]_{589}^{20}$ -9 $[\alpha]_{578}^{20}$ -10 $[\alpha]_{546}^{20}$ -11 $[\alpha]_{436}^{20}$ -20 $[\alpha]_{365}^{20}$ -37 (c 0.85, EtOH); IR (CHCl_3) ν_{max} cm^{-1} : 1724 (C=O), 1252 (C-O).

2.5. Predicción de distribuciones conformacionales, espectros de DCV y de corrimientos químicos de $^1\text{HRMN}$ y $^{13}\text{CRMN}$

2.5.1. Búsqueda conformacional y predicción de las distribuciones conformacionales de (3R,6R) y (3S,6S)-6 β -hidroxihiosciamina

Las búsquedas conformacionales sistemáticas utilizadas fueron del tipo Dreiding y se realizaron mediante mecánica molecular (MMFF94). Estas consideraron un rango de energía de 10 kcal por sobre el mínimo global. Los conformeros de baja energía fueron generados por la variación de los ángulos endocíclicos del anillo del tropano en incrementos de 20° dentro del rango permitido por la geometría del sistema cíclico. A los ángulos restantes se les permitió su libre rotación en incrementos de 30° . Se realizaron búsquedas independientes utilizando las disposiciones del grupo N-Me *axial* y *ecuatorial*, para luego realizar cálculos de punto simple de energía al nivel de teoría DFT-B3LYP/6-31G(d) para cada conformero obtenido. Los conformeros derivados de ambas orientaciones del grupo N-Me fueron luego reunidos, y las energías obtenidas por los cálculos de punto simple de energía usados en una

distribución de Boltzmann. Las conformaciones de abundancia relativa más importante para cada diastereoisómero fueron geoméricamente optimizadas al nivel de teoría DFT-B3LYP/6-31G(d), y las energías obtenidas fueron usadas en una nueva distribución de Boltzmann considerando sólo estas conformaciones. Las búsquedas conformacionales y cálculos de punto simple de energía fueron realizados utilizando el paquete de software Spartan`04, mientras que los cálculos de optimización de la geometría se realizaron usando el paquete de software Gaussian 03W.

2.5.2. Cálculo de intensidades vibracionales y obtención de espectros de IR y DCV teóricos para (3R,6R)- y (3S,6S)-6β-hidroxihiosciamina

Los confórmeros ya optimizados geoméricamente fueron usados para el cálculo de intensidades y frecuencias vibracionales utilizando el nivel de teoría DFT-B3LYP/6-31G(d) y la malla de integración FineGrid, correspondiente a 75 capas radiales y 302 puntos angulares por capa. Las fuerzas dipolares (IR) y rotacionales (DCV) fueron convertidas en absortividades moleculares ($M^{-1} cm^{-1}$) utilizando las siguientes ecuaciones respectivamente:

$$D \approx 9.2 \times 10^{-39} \epsilon_0 \frac{\Delta}{\nu_0} \pi$$

$$R \approx 2.3 \times 10^{-39} \Delta \epsilon_0 \frac{\Delta}{\nu_0} \pi$$

Finalmente, estas fueron graficadas como bandas Lorentzianas con un ancho medio de $6 cm^{-1}$.

2.5.3 Cálculo de apantallamientos magnéticos y obtención de corrimientos químicos teóricos para (3*R*,6*R*)- y (3*S*,6*S*)-6β-hidroxihiosciamina

Los conformeros ya optimizados geoméricamente fueron usados para el cálculo de apantallamientos teóricos al nivel de teoría GIAO/DFT-B3LYP/6-31G(d) y 6-311G++(d,p). Para cada conformero, los valores obtenidos tanto para ^1H como para ^{13}C fueron ajustados linealmente con los corrimientos químicos experimentales de ambos diastereoisómeros. Luego, los corrimientos químicos teóricos obtenidos fueron comparados con los experimentales y la desviación cuadrática media (rms) calculada para cada comparación.

2.6. Obtención de espectros de IR, DCV y RMN, y medición de rotaciones ópticas

2.6.1 Obtención de espectros de IR y DCV y medición de rotaciones ópticas

La medición de espectros de IR y DCV de (3*R*,6*R*)- y (3*S*,6*S*)-6β-hidroxihiosciamina ((3*R*,6*R*)-**14** y (3*S*,6*S*)-**14**) fue llevada a cabo utilizando un espectrofotómetro FT-VCD dualPEM ChirIR en BioTools, Inc, Wauconda, IL. Las muestras de 10 mg se disolvieron en 200 μL de CDCl_3 y fueron colocadas en celdas de BaF_2 con un paso óptico de 100 μm. Los datos fueron tomados con una resolución de 4 cm^{-1} durante 9 h. Considerando que la absorción de CHCl_3 ocurre cerca de los 1200 cm^{-1} , se utilizó CDCl_3 , en donde la absorción cambia hasta aproximadamente 900 cm^{-1} . La medición del espectro de IR de (-)-(3*S*,6*S*)-3α,6β-diacetoxitropano ((3*S*,6*S*)-**10**) se llevó a cabo usando un espectrofotómetro Perkin Elmer 16F PC FT-IR. Las rotaciones

ópticas fueron medidas en un polarímetro Perkin Elmer 341.

2.6.2. Obtención de espectros de RMN para (3*R*,6*R*)- y (3*S*,6*S*)-6β-hidroxihiosciamina, (3*S*,6*S*)-3α,6β-tropanodiol y (3*S*,6*S*)-3α,6β-diacetoxitropano

La medición de espectros de RMN de (3*R*,6*R*)- y (3*S*,6*S*)-6β-hidroxihiosciamina ((3*R*,6*R*)-**14** y (3*S*,6*S*)-**14**), (-)-(3*S*,6*S*)-3α,6β-diacetoxitropano ((3*S*,6*S*)-**10**) y (-)-(3*S*,6*S*)-3α,6β-tropanodiol ((-)-(3*S*,6*S*)-**5**), se realizó utilizando un espectrómetro Varian Mercury de 300 MHz. Las muestras fueron preparadas diluyendo 10 mg de cada isómero en CDCl₃.

DISCUSIONES Y RESULTADOS

3.1 Hidrogenólisis catalítica de (-)-escopolamina

Con el objetivo de obtener (3*R*,6*R*)- y (3*S*,6*S*)-6 β -hidroxihiosciamina ((3*R*,6*R*)-**14** y (3*S*,6*S*)-**14**) por separado y realizar la determinación de su configuración absoluta, se realizó la reacción de hidrogenólisis catalítica de (-)-escopolamina (**2**) (Figura 3). En esta reacción, además de ambas formas diastereoisoméricas de **14**, se produce (-)-hiosciamina (**3**) como producto secundario.

3.1.1 Análisis de los espectros de RMN de la materia prima (-)-escopolamina y del producto secundario (-)-hiosciamina

Puesto que se utilizó espectroscopia de RMN para conocer la evolución de la reacción de hidrogenólisis catalítica de **2** y para determinar la composición de la mezcla final de ésta, se hizo necesario realizar un análisis de los espectros de ¹HRMN y ¹³CRMN de la materia prima **2** y del producto secundario **3**. Los espectros de ¹HRMN, ¹³CRMN, DEPT, COSY, HSQC y HMBC de **2** se muestran con los números 1, 2, 3, 4, 5 y 6, y para **3** con los números 7, 8, 9, 10, 11 y 12.

3.1.1.1. (-)-Escopolamina

El espectro de ¹HRMN de **2** presenta quince señales diferentes, de las cuales trece corresponden a protones unidos a carbonos alifáticos, y dos corresponden en su

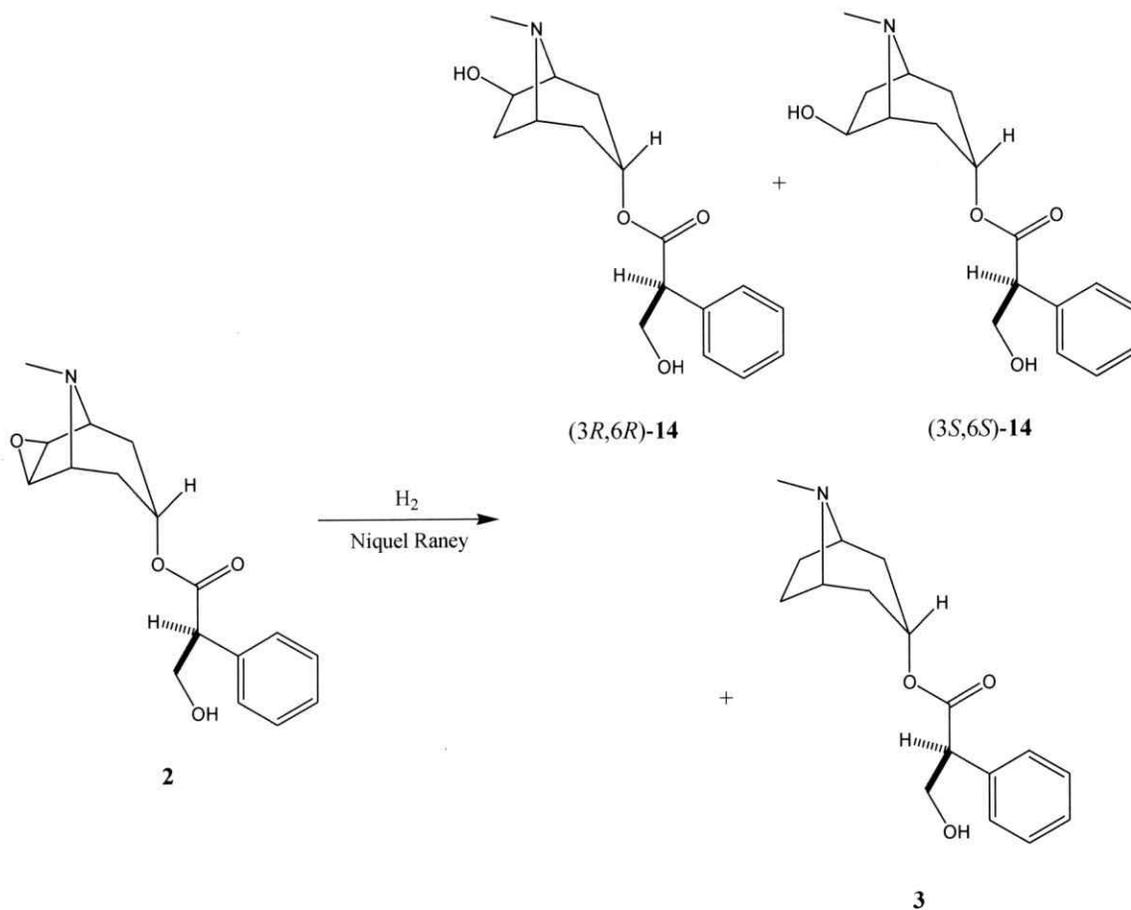
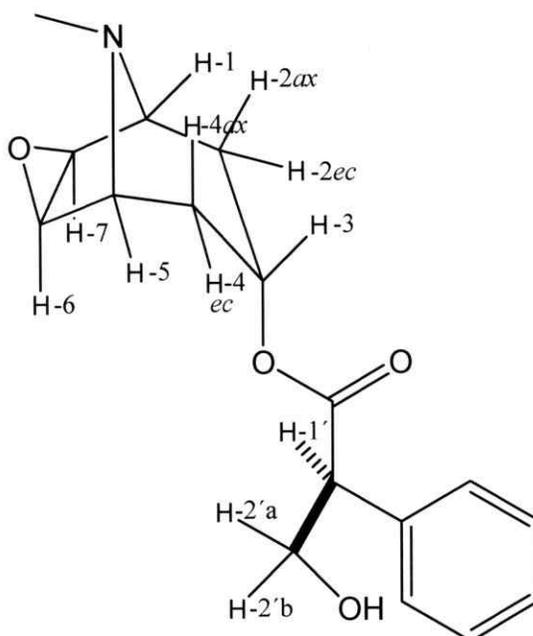


Figura 3. Reacción de hidrogenólisis catalítica de (-)-escopolamina (**2**).

conjunto a cinco protones unidos a carbonos aromáticos. La señal simple en 2.44 ppm, correspondiente a tres protones, es asignable al grupo N-Me. Esto es confirmado usando el espectro de HSQC que muestra la correlación de esta señal con la señal en el espectro de ¹³CRMN en 42.2 ppm, la que a su vez muestra una intensidad positiva en el espectro de DEPT, reafirmando su calidad de carbono metílico.

El espectro de COSY muestra que las señales múltiples en 4.15, 3.80 y 3.74 ppm, cada una correspondiente a un protón, se correlacionan sólo entre sí. Las



primeras dos muestran una correlación en el espectro de HSQC con la señal de $^{13}\text{CRMN}$ en 63.9 ppm, mientras que la tercera lo hace con la señal en 54.4 ppm. De esto se deduce que la señal en 3.74 ppm corresponde a H-1' y las señales en 4.15 y 3.80 ppm corresponden a H-2'a y H-2'b (señales intercambiables).

Debido a su alto corrimiento químico, la señal triplete en 5.00 ppm es característica de los alcaloides del tropano 3- α sustituidos, y corresponde a H-3. Esta señal muestra correlaciones en el espectro de COSY con dos señales de igual multiplicidad en 2.01 y 2.10 ppm, las que a su vez muestran una intensa correlación con otras dos señales en 1.33 y 1.57 ppm, respectivamente. Por otra parte, las señales de menor corrimiento químico de cada par muestran correlación en el espectro de HSQC con la señal de $^{13}\text{CRMN}$ en 30.8 ppm, mientras que las señales de mayor corrimiento químico de cada par se correlacionan con la señal en 31.0 ppm. De lo anterior se deduce que cada par de señales corresponde respectivamente a los

protones *ecuatoriales* y *axiales* en cada metileno contiguo a C-3 (C-2 y C4). Por otra parte, el espectro de $^1\text{HRMN}$ muestra que H-3 y las señales de 2.01 y 2.10 ppm están acopladas con una constante de acoplamiento 3J de 5.4 Hz, mientras que no existe un acoplamiento detectable con las señales de 1.33 y 1.57 ppm. Cuando se analizan las posiciones relativas de los protones *axiales* (H-2 ax y H-4 ax) y *ecuatoriales* (H-2 ec y H-4 ec) en relación al protón H-3, es posible apreciar que el ángulo diedro entre éstos es de aproximadamente 33° para los primeros y de 83° para los segundos, según cálculos conformacionales usando mecánica molecular. La ecuación general de Karplus, que relaciona el valor de la constante de acoplamiento entre dos protones con el ángulo diedro entre éstos, predice que un ángulo de 83° producirá una constante de acoplamiento de 1.38 Hz, mientras que un ángulo de 33° producirá una constante de acoplamiento de 5.94 Hz. De esto se deduce que H-3 tendrá una correlación de mayor intensidad con los protones *axiales* que con los protones *ecuatoriales*, por lo que las señales en 2.01 y 2.10 ppm corresponden a los protones *axiales* H-2 ax y H-4 ax , respectivamente. De igual forma, las señales de 1.33 y 1.57 ppm son asignables a los protones *ecuatoriales* H-2 ec y H-4 ec , respectivamente.

Por otra parte, las señales de los protones H-2 ax y H-4 ax tienen una correlación en el espectro de COSY con las señales en 2.96 y 3.09 ppm respectivamente, lo que lleva a concluir que estas señales corresponden a H-1 y H-5, respectivamente.

Finalmente, las señales en 2.71 y 3.39 ppm correspondientes a los protones unidos al grupo oxirano en el tropano, sólo se correlacionan entre sí en el espectro de COSY. Sin embargo, es posible relacionarlas con los protones de cabeza de puente mediante el espectro de HMBC. Esto es considerando que ambas señales muestran en

este espectro una correlación con las señales de $^{13}\text{CRMN}$ en 56.0 y 56.4 ppm, las que a su vez pueden ser asignadas como C-1 y C-5 respectivamente, mediante el espectro de HSQC. Por lo anterior las señales en 2.71 y 3.39 ppm corresponden a H-7 y H-6 respectivamente.

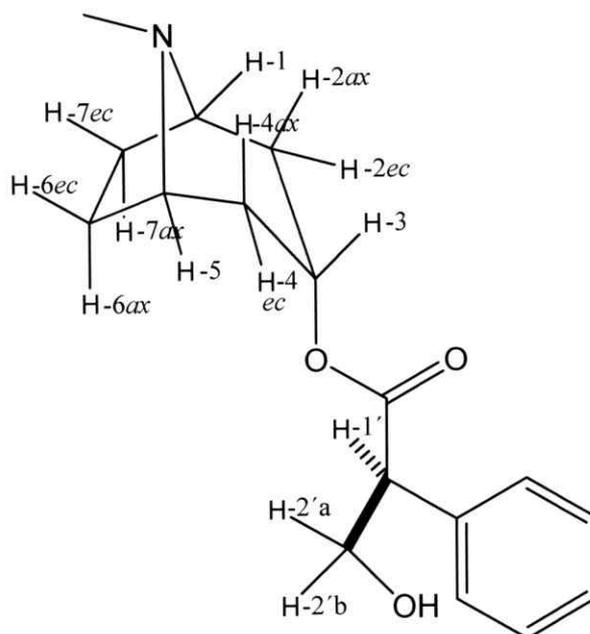
La molécula **2** es una estructura quiral con un centro asimétrico en el carbono α al carbonilo. De esto se deduce que pares de hidrógenos contiguos a este centro se conviertan en pares diastereotópicos, por lo que a pesar de la igualdad en el ambiente químico que les rodea, presenten corrimientos químicos diferentes debido a la desigualdad magnética producida por este centro. Aunque se espera que este tipo de fenómeno provoque un efecto importante entre los hidrógenos del metileno unido al centro asimétrico, la gran distancia entre éste y los demás pares diastereotópicos en el anillo del tropano (cuatro enlaces o más) hace pensar que esta influencia será muy pequeña o nula para estos núcleos. Sin embargo, se desprende del espectro de $^1\text{HRMN}$ que cada hidrógeno dentro del anillo del tropano tiene una señal diferente y que las diferencias entre pares diastereotópicos son bastante mayores que las esperadas. Como se verá mas adelante, este fenómeno puede ser atribuido a una preferencia conformacional del éster trópico en este tipo de moléculas, en donde el anillo aromático se posiciona en la parte inferior del biciclo, produciendo así un efecto anisotrópico sobre los núcleos en esta parte de la molécula. La asignación completa de las señales de $^1\text{HRMN}$ y $^{13}\text{CRMN}$ de **2** se encuentra en la tabla 2. Estas asignaciones están de acuerdo con las descritas en la literatura (Zarazin y col., 1991).

Tabla 2. Asignación de las señales en los espectros de $^1\text{HRMN}$ y $^{13}\text{CRMN}$ de (-)-escopolamina (**2**).

H	δ (ppm)	C	δ (ppm)
H-1	2.96	C-1	57.9
H-2ax	2.01	C-2	31.0
H-2ec	1.33	C-3	66.9
H-3	5.00	C-4	30.8
H-4ax	2.10	C-5	57.8
H-4ec	1.57	C-6	56.0
H-5	3.09	C-7	56.4
H-6	3.39	C-1'	54.4
H-7	2.71	C-2'	63.9
H-1'	3.74	Ccarb	171.8
H-2'a	4.15	Cipso	135.8
H-2'b	3.80	Fenilo	129.0, 128.1 y 127.9
Fenilo	7.19 - 7.37	N-Me	42.2
N-Me	2.44		

3.1.1.2. (-)-Hiosciamina

Al igual que para **2**, el espectro de $^1\text{HRMN}$ de **3** presenta una serie de señales entre 1 y 5 ppm, correspondientes a los diecisiete átomos de hidrógeno unidos a carbonos alifáticos presentes en esta molécula. Así también, se observa una señal múltiple alrededor de 7.3 ppm correspondiente a los cinco protones unidos a carbonos del grupo fenilo. Como es típico para este tipo de alcaloides, el espectro presenta una señal simple en 2.18 ppm atribuible al grupo N-Me. De la misma forma, se observan las señales características del éster trópico en 3.8 (H-1' y H-2'a) y 4.17 ppm (H-2'b). Por otra parte, la señal triplete en 5.00 ppm, también típica en este tipo de moléculas, corresponde al protón H-3.



Siguiendo también la tendencia de **2**, la señal de H-3 muestra correlación en el espectro de COSY solamente con dos señales, en 2.01 y 2.08 ppm. Igual que en el caso anterior, estas señales pueden ser asignadas considerando sus ángulos diedros de aproximadamente 30° para protones *axiales* y 80° para los *ecuatoriales*. Por consiguiente, estas señales corresponden a H-2ax y H-4ax respectivamente. Por otra parte, la primera de estas señales muestra una intensa correlación en este espectro con la señal en 1.47 ppm, mientras que la segunda lo hace con la señal en 1.67 ppm, ambas con la misma multiplicidad. De esto se deduce que corresponden a H-2ec y H-4ec, respectivamente. Consecuentemente, estos protones se correlacionan también con dos señales; en 2.90 ppm en el primer caso y 3.01 ppm en el segundo, por lo que estas señales corresponden a H-1 y H-5 respectivamente.

Como ya fue analizado para **2**, debido al ángulo diedro cercano a 90° entre los protones de cabeza de puente y los protones *axiales* en los carbonos C-6 y C-7, la

correlación entre éstos será muy baja o inexistente. Por el contrario, este ángulo cambia a aproximadamente 30° con los protones *ecuatoriales* en estos carbonos. Consecuentemente, las señales de H-1 y H-5 muestran correlación con dos señales en 1.67 (solapada con la señal de H-4_{ec}) y 1.84 ppm, las que por lo anterior corresponden a H-7_{ec} y H-6_{ec} respectivamente.

Aunque sólo restan dos señales por asignar, correspondientes a los protones *axiales* de las posiciones 6 y 7 en el biciclo (en 1.23 y 1.75 ppm), las correlaciones en el espectro de COSY no permiten la asignación de la posición relativa de cada átomo. Esto se debe a que estas señales se correlacionan de igual forma con ambos hidrógenos *ecuatoriales* en las mismas posiciones. Adicionalmente, las señales de los protones de cabeza de puente no muestran correlación con estos protones por las razones ya señaladas, y al analizar los espectros de HSQC y HMBC de esta molécula, tampoco se observan correlaciones claras que diferencien las posiciones relativas de estos protones. Sin embargo, tanto **2** como **3** han mostrado la tendencia a diferenciar ambos pares diastereotópicos en el biciclo de forma que las señales de menor o mayor corrimiento químico se correlacionen entre sí, lo que lleva a la conclusión de que cada grupo pertenece a uno u otro lado del anillo. Esto sugiere que la señal de menor corrimiento químico corresponde al protón H-7_{ax} y la de mayor corrimiento químico a H-6_{ax}. La asignación completa de las señales de ¹HRMN y ¹³CRMN de **3** se encuentra en la tabla 3. Estas asignaciones se encuentran parcialmente de acuerdo con las descritas en la literatura, difiriendo para las señales en 1.67 y 1.23 ppm, las que se encuentran asignadas a la inversa (Duran-Patron y col., 2000).

Tabla 3. Asignación de las señales en los espectros de $^1\text{HRMN}$ y $^{13}\text{CRMN}$ de (-)-hiosciamina (**3**).

H	δ (ppm)	C	δ (ppm)
H-1	2.90	C-1	59.6
H-2 _{ax}	2.01	C-2	36.3
H-2 _{ec}	1.47	C-3	68.1
H-3	5.00	C-4	36.1
H-4 _{ax}	2.08	C-5	59.5
H-4 _{ec}	1.67	C-6	25.0
H-5	3.01	C-7	25.4
H-6 _{ec}	1.84	C-1'	54.6
H-6 _{ax}	1.75	C-2'	64.1
H-7 _{ec}	1.67	Ccarb	172.2
H-7 _{ax}	1.23	Cipso	135.9
H-1'	3.80	Fenilo	128.8, 128.2 y 127.6
H-2'a	3.80	N-Me	40.2
H-2'b	4.17		
Fenilo	7.23 - 7.30		
N-Me	2.18		

3.1.2. Optimización de la reacción de hidrogenólisis catalítica

El procedimiento de hidrogenólisis catalítica de **2** utilizando Ni-Raney W-4 descrito en la literatura, logra tan solo un 49 % de rendimiento para la mezcla de diastereómeros de **14**, junto con un alto porcentaje del producto secundario **3** (51%) (Ishimaru y Shimomura, 1989). Estos rendimientos pudieron ser aumentados considerablemente utilizando catalizadores de Ni-Raney de menor actividad.

Este tipo de catalizadores de Ni fueron clasificados (Adkins y Pavlic, 1947) utilizando la letra W y un número dado, dependiendo del procedimiento utilizado para prepararlos. Estos procedimientos consisten en hacer reaccionar una aleación de Ni y

Al con NaOH acuoso, y difieren entre sí en el tiempo y temperatura de digestión de la aleación, así como también en la forma, cantidad y disolvente utilizados durante la etapa de limpieza del catalizador producido. Tiempos más prolongados, así como también temperaturas más elevadas durante el proceso de digestión, dejan una menor cantidad de hidrógeno adsorbido sobre la superficie del metal, y en consecuencia generan catalizadores de menor actividad. Así también, lavados bajo presión de hidrógeno evitan la pérdida de este gas de la superficie del catalizador en comparación a cuando éstos son realizados al aire libre, produciendo catalizadores de mayor actividad en el primer caso. Aunque no se utilizó un criterio de actividad en su clasificación, sino más bien uno histórico, la numeración utilizada tiende a ser correlativa con la actividad del catalizador, siendo los clasificados como W-1 y W-2 menos activos que sus pares W-3 y W-4.

Para el caso de la hidrogenólisis de **2**, se utilizaron los catalizadores de Ni-Raney W-2, W-2 desactivado y W-1, todos éstos con metodologías de preparación con temperaturas más altas y tiempos más prolongados de digestión que los utilizados en la preparación del catalizador W-4.

Como ya fue analizado en la sección anterior, existen algunas señales características en el espectro de $^1\text{HRMN}$, tanto en la materia prima **2** como en el producto secundario de reacción **3**. Entre éstas se encuentran las señales pertenecientes a los hidrógenos geminales al epóxido en **2** (en 2.71 y 3.39 ppm) y los hidrógenos de cabeza de puente en **3** (en 2.90 y 3.01 ppm). Cuando se observan estas zonas en los espectros de $^1\text{HRMN}$ de las mezclas resultantes de cada reacción de hidrogenólisis (Fig. 4), se puede observar la desaparición prácticamente total de las

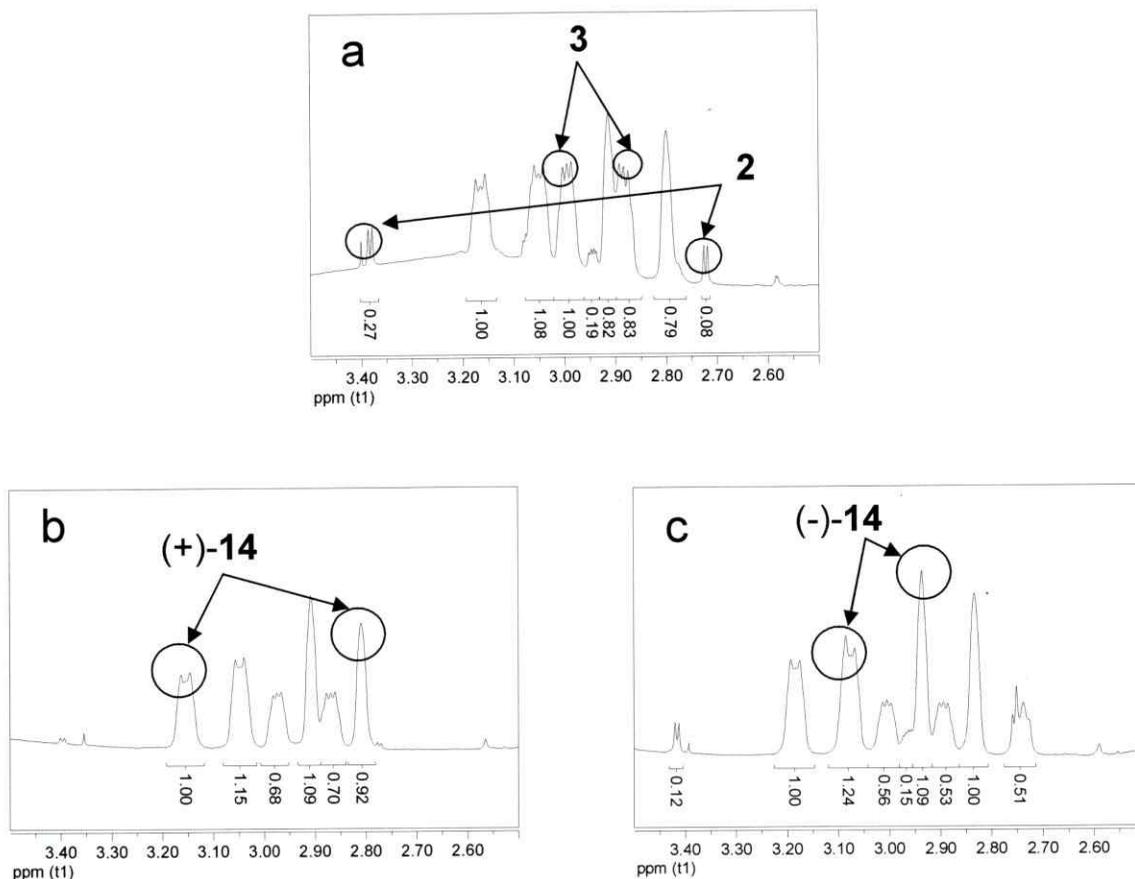


Figura 4. Espectros de ¹HRMN entre 2.50 y 3.50 ppm de las mezclas producidas en la reacción de hidrogenólisis catalítica usando catalizadores de Ni-Raney con diferente actividad. a) Ni-Raney W-2; b) Ni-Raney W-2 desactivado y c) Ni-Raney W-1.

señales características de **2** y la aparición de las señales pertenecientes a **3**. Además, en los tres casos se observan cuatro señales, correspondientes a los hidrógenos de cabeza de puente de cada diastereoisómero de **14** (para asignaciones de ((3*R*,6*R*)-**14** y (3*S*,6*S*)-**14** ver secciones 3.4.1. y 3.4.2., respectivamente).

Utilizando las integrales relativas de cada una de las señales en los respectivos espectros de ¹HRMN, fue posible conocer los porcentajes de cada compuesto en la

mezcla y saber el rendimiento total para la formación de los diastereómeros de **14**.

Como se puede apreciar en la tabla 4, los rendimientos para la formación de los diastereómeros de **14** aumentan considerablemente con la utilización de catalizadores de Ni-Raney de menor actividad. Es importante hacer notar que en todas estas reacciones se ha observado una ligera diastereoselectividad en la formación del isómero (-)-**14** por sobre (+)-**14**. Esta selectividad aumenta al disminuir la actividad del catalizador, mostrando un claro acuerdo con el principio de reactividad – selectividad. Este fenómeno puede deberse a una diferencia en el impedimento estérico entre ambas posiciones del oxirano, debido al residuo de ácido trópico.

Finalmente, el catalizador que mostró el mayor rendimiento para la formación de los diastereómeros de **14** fue el Ni-Raney W-1 con un 76%. Este resultado corresponde a un aumento de 51 % en el rendimiento previamente descrito (Ishimaru y Shimomura, 1989). Este catalizador se continuó utilizando para la acumulación de la mezcla de diastereómeros para su posterior separación.

Tabla 4. Rendimientos obtenidos en la reacción de hidrogenólisis catalítica de (-)-escopolamina (**2**) usando Ni-Raney con diferentes actividades. W-4 tomado de la literatura (Ishimaru y Shimomura, 1989).

Catalizador	Presión H ₂ (psi)	Rendimiento (%)				
		(+)- 14	(-)- 14	(+)- 14 + (-)- 14	2	3
W-4	14	24.5	24.5	49.0	0.0	51.0
W-2	14	31.2	34.4	65.6	3.1	31.3
W-2 desc.	14	33.9	40.3	74.2	1.4	24.4
W-1	14	33.9	41.7	75.6	4.7	19.7

3.2. Separación de la mezcla de hidrogenólisis catalítica utilizando cromatografía de pares iónicos

La separación cromatográfica de los componentes de la mezcla producida en la reacción anterior se encuentra resumidamente descrita en la literatura (Ishimaru y Shimomura, 1989). En ella se describe el uso de cromatografía de fase reversa para la separación de **3** de la mezcla de diastereoisómeros de **14**, y luego cromatografía de pares iónicos en fase reversa para finalmente separar estos últimos. La cromatografía de pares iónicos es una forma de cromatografía de fase reversa usada para la separación de analitos muy polares para interactuar con una columna apolar, y consiste en agregar un surfactante de carga opuesta al analito para formar un par iónico entre ambas especies, el que puede interactuar de mejor forma con la columna. Esta variante es utilizada generalmente en HPLC, existiendo información casi nula sobre su uso en columnas de media presión preparativas. Entre las desventajas de esta cromatografía se pueden mencionar su alto costo, dificultad experimental y los bajos porcentajes de recuperación de las muestras. Esto último se debe a que los analitos, luego de ser separados, quedan disueltos en grandes volúmenes de solución acuosa, haciendo muy difícil su recuperación. En general, la elección de variables como pH, temperatura, surfactante y su concentración, entre otras, son de vital importancia para el éxito de la separación, considerándose como una de las cromatografías más complejas de realizar (Dolan, 2005). Para este caso en particular, se decidió usar las condiciones ya descritas para la segunda fase de la metodología como condiciones iniciales, con el objetivo de separar la mezcla inicial en tan solo un paso, disminuyendo la pérdida de muestra, el costo operacional y el tiempo de

separación.

En una primera instancia se utilizó la fase móvil de menor contenido alcohólico descrita, es decir: MeOH - 1-heptanosulfonato de sodio 10 mM a pH 4 con AcOH (3:17). El flujo se mantuvo a 10 mL/min, el diámetro interno de la columna fue de 4 cm y su largo de 7 cm (50 g). La columna se mantuvo a temperatura ambiente. Bajo estas condiciones, la separación demoró aproximadamente dos días mostrando volúmenes de retención de entre 3 y 13 L, observándose un enriquecimiento parcial de las fracciones iniciales y finales por uno u otro de los diastereómeros (Figura 5). El cambio en la composición de la fase móvil a una de mayor contenido en MeOH produjo una disminución considerable en los volúmenes de retención, pero tuvo un impacto negativo en la calidad de la separación. Es preciso mencionar aquí, que el largo de la columna fue elegido considerando la cantidad de material disponible y los altos volúmenes de retención esperados.

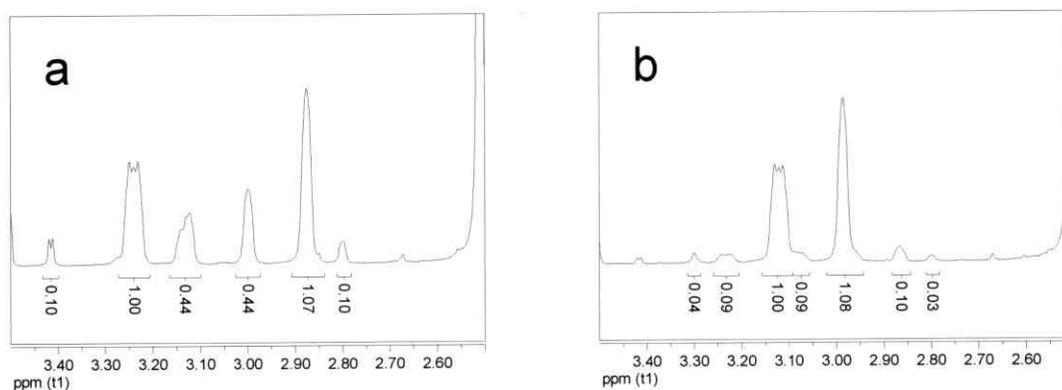


Figura 5. Espectros de ^1H RMN entre 2.50 y 3.50 ppm de dos muestras enriquecidas luego de utilizar cromatografía de pares iónicos (ver texto). a) 69.4% / 30.6% ((+)-**14** / (-)-**14**); b) 91.7% / 8.3% ((-)-**14** / (+)-**14**).

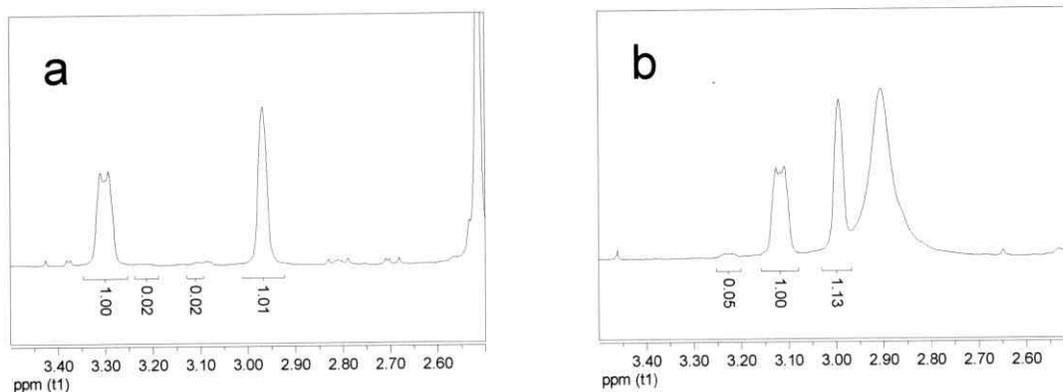


Figura 6. Espectros de ^1H RMN entre 2.50 y 3.50 ppm de dos muestras enriquecidas luego de utilizar cromatografía de pares iónicos (ver texto). a) 98.0% / 2.0% ((+)-**14** / (-)-**14**); b) 95.2% / 4.8%((-)-**14** / (+)-**14**).

Posteriormente, se procedió a aumentar el largo de la columna a 14 cm (100 g), con el objetivo de mejorar la resolución, manteniendo el resto de las variables constantes. En este punto, se debe enfatizar que el largo de la columna no puede ser aumentado de forma indiscriminada, ya que al utilizar fases estacionarias de muy pequeño tamaño de partícula la presión en la columna también aumenta considerablemente, con el riesgo de dañar la bomba o la columna de vidrio. Adicionalmente, el aumento de largo de la columna también trae aparejado un ensanchamiento de las bandas cromatográficas debido al fenómeno de difusión bidireccional. Con estas condiciones se obtuvieron mejores resultados ya que las fracciones mostraron un enriquecimiento de hasta un 98.0% para el isómero (+)-**14** (Figura 6).

Sin embargo, la reproducibilidad de la separación se mostró bastante pobre, siendo esto evidenciado por volúmenes de retención y porcentajes de enriquecimiento dispares entre una y otra separación bajo las mismas condiciones. Luego de evaluar

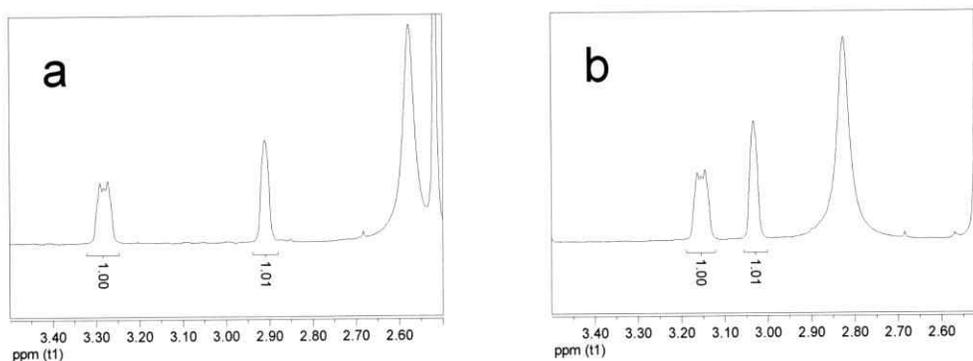


Figura 7. Espectros de ^1H RMN entre 2.5 y 3.5 ppm de ambos diastereómeros de 6 β -hidroxihiosciamina (**14**) totalmente separados utilizando cromatografía de pares iónicos (ver texto). a) primer isómero en eluir ((+)-**14**); b) segundo isómero en eluir ((-)-**14**).

las variables que podrían ser la causa de la no reproducibilidad, se concluyó que el pH de la solución podría no estar totalmente controlado durante todo el proceso cromatográfico. En respuesta a este problema, se utilizó una solución tampón de ácido acético / acetato de sodio 50 mM a pH 4, con el objetivo de mantener el pH de la fase móvil constante en todo momento durante el procedimiento.

La aplicación de esta nueva estrategia permitió obtener volúmenes de retención estables y la separación total de cada diastereoisómero (Figura 7). Es de hacer notar que, en todos los casos, **3** fue obtenido durante la etapa de limpieza de la columna, que consiste en eluir 4 L de agua destilada y 2 L de MeOH antes de equilibrar y utilizar nuevamente la columna.

Aunque la metodología desarrollada cumplió el objetivo de separar la mezcla producida por la hidrogenólisis de **2**, esta no fue capaz de lograr un rendimiento mayor al 10%. Esto, junto al largo tiempo necesario para completar el procedimiento y su alto

costo, hizo imposible su uso en la obtención de cantidades suficientes de estas sustancias como para que estas fuesen usadas como materia prima en la síntesis de otros derivados de **5**.

Por lo anterior, las muestras diastereoméricamente puras de (+)-**14** y (-)-**14** obtenidas por cromatografía de pares iónicos sólo se utilizaron en su elucidación estructural y estereoquímica mediante RMN y dicroísmo circular vibracional (DCV), respectivamente.

3.3. Separación de la mezcla de hidrogenólisis catalítica utilizando la metodología de cristalizaciones fraccionadas

Con el objetivo de contar con una metodología alternativa a la cromatografía de pares iónicos, que permitiese la obtención de ambos diastereoisómeros de **14** en una mayor escala, se procedió a realizar la separación de la mezcla de hidrogenólisis catalítica utilizando el método de cristalizaciones fraccionadas.

Este procedimiento consiste principalmente en la utilización de ácido (-)-O,O'-dibenzoil-L-tartárico como fuente de contraión en la formación de sales de la mezcla de alcaloides (Fodor y col., 1962). Esta es una metodología comúnmente utilizada para la separación de mezclas racémicas de aminas (Keese y col., 1990)

Inicialmente, el procedimiento utilizado consistió en realizar la hidrogenólisis

catalítica de 25 g de bromhidrato de (-)-escopolamina, usando Ni Raney W-1 bajo las condiciones experimentales de reacción ya optimizadas previamente. Luego de eliminar el agua de la mezcla de reacción, los bromhidratos fueron dejados bajo reflujo con 125 mL de acetona anhidra por una hora, y la mezcla resultante se enfrió por 30 min. a temperatura ambiente. Aunque la metodología ya descrita informa sobre la obtención de un sólido después de esta disminución de temperatura, en este caso sólo se observó una turbidez en la solución, la que desapareció después de unos minutos.

De la solución acetónica se liberaron las bases disueltas como bromhidratos y el residuo obtenido fue disuelto en 50 mL de etanol absoluto y tibio, para luego agregar una solución de ácido (-)-O,O'-dibenzoil-L-tartárico en etanol absoluto. La solución etanólica fue dejada a 5° C por 3 días, luego de los cuales se obtuvieron 11.92 g de un sólido blanco.

Luego de esto, el sólido fue recristalizado repetidas veces usando etanol absoluto. Finalmente, los cristales obtenidos después de 24 h a temperatura ambiente fueron separados mediante filtración, y el punto de fusión de cada fracción (F1 a F6) fue medido y comparado con los previamente descritos. Estos valores se muestran en la tabla 5.

La composición de la última fracción fue analizada mediante la liberación de la base y posterior análisis de su espectro de ¹HRMN. De esto se concluyó que la composición de la mezcla fue de un 90% para (-)-**14** y de 6% para (+)-**14**, junto con un 4% de **3**.

Tabla 5. Masas y puntos de fusión (p. f.) de las fracciones obtenidas por recristalizaciones consecutivas de los productos de hidrogenólisis catalítica de 25 g de (-)-escopolamina (**2**) con ácido (-)-O,O'-dibenzoil-L-tartárico.

Fracción	Masa (g)	p. f. (°C)
F1	11.19	152-154
F2	6.66	157-158
F3	4.33	160-162
F4	2.31	163-164
F5	1.46	164-165
F6	0.52	165-166

La clara diferencia entre los resultados obtenidos y los ya descritos (Fodor y col., 1962) hace necesario un análisis de los mismos. En efecto, la baja pureza de la última fracción obtenida, y la diferencia entre el número de recristalizaciones necesarias para obtenerla, es un claro indicio de que la composición de la mezcla a recristalizar no fue la misma en los dos casos. Por otra parte, se obtuvieron fracciones con un punto de fusión mayor que el de la muestra descrita como pura (p. f. 163 °C), poniendo en duda la composición de esta última. Una explicación para estas observaciones podría ser la probable diferencia en la composición de la mezcla resultante de la reacción de hidrogenólisis catalítica utilizada en el trabajo descrito, con la utilizada en este caso. Esto, debido a las optimizaciones realizadas a esta reacción con el objetivo de disminuir la cantidad de **3** producida, y aumentar así la proporción de los diastereoisómeros. Esta menor cantidad de **3** pudo haber provocado la imposibilidad de que esta sustancia cristalizara después del calentamiento en acetona, impidiendo así su separación de la mezcla, y provocar así una mayor dificultad en la separación de sus componentes durante las cristalizaciones. Además, al reescalar el procedimiento para utilizar solamente la mitad de **2**, se pudo haber provocado también un cambio en las condiciones experimentales, originando los resultados obtenidos.

Tabla 6. Masas y composiciones de las fracciones obtenidas por recristalizaciones consecutivas de los productos de hidrogenólisis catalítica de 50 g de (-)-escopolamina (**2**) con ácido (-)-O,O'-dibenzoil-L-tartárico.

Fracción	Masa (g)	Composición ((-)- 14 /(+)- 14 / 3) (%)
F1	18.38	65/20/15
F2	11.35	76/14/10
F3	5.83	83/7/10
F4	2.22	89/4/4
F5	1.75	95/3/2
F6	1.39	95/4/1
F7	0.97	96/4/-
F8	0.61	98/2/-
F9	0.43	98/2/-

Como respuesta a lo anterior, se procedió a repetir la metodología, esta vez utilizando el doble de **2** como se encontraba descrito (Fodor y col., 1962), siendo el procedimiento idéntico al anterior, pero duplicando la cantidad de todos los reactivos en cada paso. Sin embargo, luego del reflujo de la mezcla seca de bromhidratos, y después de enfriar la solución a temperatura ambiente por 30 min. como está descrito, nuevamente no se separó ningún tipo de sólido, por lo que la solución se dejó enfriar por 48 h bajo refrigeración (2 a 3° C). Como resultado, un sólido se separó de la solución, el que fue filtrado al vacío y luego lavado con porciones de acetona fría. De la solución acetónica se obtuvieron las bases libres de la mezcla de aminas, las que luego de ser tratadas con ácido (-)-O,O'-dibenzoil-L-tartárico en etanol entregaron un sólido blanco. El sólido obtenido fue luego recristalizado en repetidas oportunidades de etanol absoluto. En la tabla 6 se muestra la evolución en la composición de las mezclas a través de las diferentes cristalizaciones, determinada por análisis de sus espectros de ¹HRMN. Como se puede observar, las diferentes cristalizaciones llevaron a la

Tabla 7. Masas y composiciones de las fracciones obtenidas por recristalizaciones consecutivas de los productos de hidrogenólisis catalítica de 50 g de (-)-escopolamina (**2**), como bromhidratos en acetona.

Fracción	Masa (g)	Composición ((-)- 14 /(+)- 14 / 3) (%)
F1	20.96	21/53/26
F2	14.98	10/60/30
F3	5.25	3/60/37
F4	3.61	2/60/38
F5	2.94	1/60/39
F6	2.49	-/60/40

purificación de (-)-**14** de una forma mucho más rápida y con una pureza superior a la obtenida en la primera experiencia.

Por otra parte, el sólido obtenido del enfriamiento de los bromhidratos en acetona fue recristalizado en varias oportunidades, y su composición determinada por ¹HRMN. La tabla 7 muestra la composición de los cristales en cada paso.

Como se puede observar, y contrariamente a lo descrito en la literatura, se encontró una alta concentración de (+)-**14** junto con pequeñas cantidades de (-)-**14** y **3**. La recristalización de este sólido llevó a la formación de una mezcla entre (+)-**14** y **3**, provocando la desaparición del isómero (-)-**14**. Así también, se observó que la proporción entre (+)-**14** y **3** disminuye con las recristalizaciones, por lo que la purificación final de (+)-**14** no pudo ser realizada utilizando el mismo contraión.

Finalmente, el procedimiento anterior permitió la producción de 0.43 g de O,O'-dibenzoil-L-tartrato de (+)-**14**, junto con 2.49 g de una mezcla 3:2 de los bromhidratos de (-)-**14** y **3**.

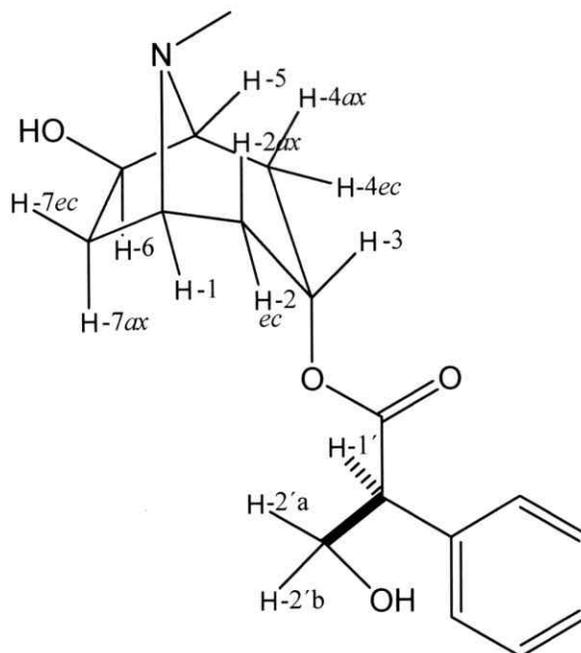
3.4. Análisis de los espectros de RMN de (+)-6 β -hidroxihiosciamina y (-)-6 β -hidroxihiosciamina

Con el objetivo de corroborar las estructuras de los dos diastereoisómeros, y de comparar con los datos espectroscópicos existentes en la literatura (Ishimaru y Shimomura, 1989), se procedió a realizar un análisis completo de los espectros de RMN de estas dos especies. Los espectros de $^1\text{HRMN}$, $^{13}\text{CRMN}$, COSY, HSQC, HMBC y NOESY de (+)-(3*R*,6*R*)-6 β -hidroxihiosciamina ((+)-(3*R*,6*R*)-**14**) se muestran con los números 13, 14, 15, 16, 17 y 18, y los de (-)-(3*S*,6*S*)-6 β -hidroxihiosciamina ((-)-(3*S*,6*S*)-**14**) con los números 19, 20, 21, 22, 23 y 24.

3.4.1. (+)-(3*R*,6*R*)-6 β -hidroxihiosciamina

El espectro de $^1\text{HRMN}$ de (+)-(3*R*,6*R*)-**14** muestra catorce señales, las que en su conjunto corresponden a dieciocho protones unidos a carbonos sp^3 , junto con dos señales correspondientes a cinco protones unidos a carbonos sp^2 . La señal simple correspondiente a tres protones en 2.46 ppm puede ser asignada a los protones del grupo N-Me debido a su corrimiento químico, multiplicidad e integral típicos de este grupo en este tipo de compuestos. Por otra parte, también es posible distinguir las señales características de los protones H-1', H-2'a y H-2'b en el éster trópico; la primera y la segunda solapadas en 3.80 ppm, y la tercera en 4.17 ppm. Asimismo, la señal en 5.01 ppm típica en estos compuestos corresponde al protón H-3.

Cuando se observa el espectro de COSY se puede apreciar que la señal de H-3 muestra correlación con dos grupos de señales, el primero en 1.37 y 1.44 ppm, y el



segundo en 2.06 y 2.13 ppm, todas estas asignables a los protones H-2 y H-4, *axiales* y *ecuatoriales*. Sin embargo, el primer grupo de señales no muestra una constante de acoplamiento apreciable con H-3, a diferencia del segundo grupo que muestra una 3J de 5.4 Hz. Esta diferencia puede ser explicada, al igual que con **2** y **3**, mediante los ángulos diedros entre estos protones en el bicyclo. En el caso de los protones *ecuatoriales*, un ángulo diedro con H-3 cercano a 80° produce una constante de acoplamiento muy pequeña en comparación a los protones *axiales*, que con un ángulo cercano a los 30° producen una 3J de aproximadamente 5 Hz. De lo anterior, es posible asignar las señales de 1.37 y 1.44 ppm como H-4_{ec} y H-2_{ec}, y las señales de 2.06 y 2.13 ppm como H-4_{ax} y H-2_{ax}. Por otra parte, las señales de H-4_{ax} y H-4_{ec} muestran correlación en el espectro de COSY con la señal en 2.84 ppm, así como también las señales de H-2_{ax} y H-2_{ec} muestran correlación con la señal en 3.21 ppm. Consecuentemente, estas señales son asignables a los protones de cabeza de puente

Tabla 8. Asignación de las señales en los espectros de $^1\text{HRMN}$ y $^{13}\text{CRMN}$ de (+)-(3*R*,6*R*)-6 β -hidroxihiosciamina ((+)-(3*R*,6*R*)-**14**).

H	δ (ppm)	C	δ (ppm)
H-1	3.21	C-1	58.2
H-2 _{ec}	1.44	C-2	30.3
H-2 _{ax}	2.13	C-3	75.4
H-3	5.01	C-4	28.7
H-4 _{ec}	1.37	C-5	66.7
H-4 _{ax}	2.06	C-6	67.8
H-5	2.84	C-7	40.2
H-6	3.72	C-1'	54.5
H-7 _{ec}	1.77	C-2'	64.1
H-7 _{ax}	2.33	Ccarb	171.7
H-1'	3.80	Cipso	135.3
H-2'a	3.80	Fenilo	128.8, 127.9 y 127.7
H-2'b	4.17	N-Me	36.6
Fenilo	7.22 - 7.39		
N-Me	2.46		

H-5 y H-1, respectivamente.

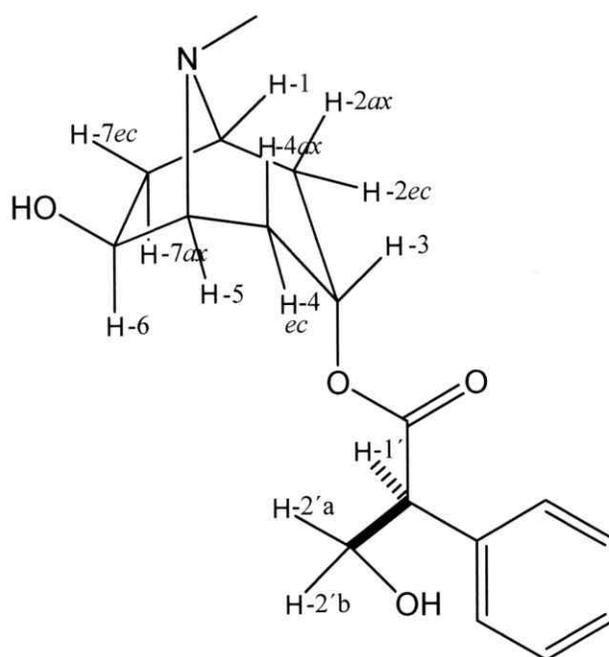
En el caso de la señal de H-5, ésta no muestra otras correlaciones con otros núcleos más que las ya descritas. Por el contrario, la señal de H-1 muestra una correlación con la señal en 1.77 ppm. Esta diferencia puede ser explicada nuevamente por los diferentes ángulos diedros de estos protones con los respectivos adyacentes en los carbonos C-6 y C-7. Esta vez, el ángulo diedro entre los protones de cabeza de puente y los protones *axiales* en C-6 y C-7 es de aproximadamente 89° , mientras que este ángulo cambia a aproximadamente 31° entre H-1 y H-7_{ec}. De esto se deduce que tanto H-5 como H-1 no mostrarán una correlación apreciable con sus respectivos protones H-6_{ax} y H-7_{ax}. Por el contrario, H-1 si se correlacionará con H-7_{ec}, que

origina la señal en 1.77 ppm. A su vez H-7_{ec} muestra correlaciones con las señales en 3.72 ppm y 2.33 ppm. La clara diferencia de corrimiento químico establece que la señal en 3.72 ppm corresponde a H-6 y la señal en 2.33 ppm a H-7_{ax}. La asignación completa de las señales de ¹H RMN y ¹³C RMN de (+)-(3*R*-6*R*)-**14** se encuentra en la tabla 8. Estas asignaciones se encuentran de acuerdo con las descritas en la literatura (Ishimaru y Shimomura, 1989).

3.4.2. (-)-(3*S*,6*S*)-6β-hidroxihiosciamina

Como en el caso de (+)-(3*R*,6*R*)-**14**, el espectro de ¹H RMN de (-)-(3*S*,6*S*)-**14** muestra una serie de señales entre 1 y 5 ppm, que en su totalidad corresponden a dieciocho protones unidos a carbonos alifáticos, como también una señal múltiple en la zona de 7.20 a 7.40 ppm correspondiente a cinco protones unidos a carbonos aromáticos. Como ya ha sido establecido anteriormente, las señales características en 5.01 y 2.48 ppm corresponden a H-3 y el grupo N-Me respectivamente. Así también, las señales en 3.78 y 4.15 ppm corresponden a los protones en el éster trópico H-1' y H-2'a en el primer caso, y H-2'b en el segundo.

Como ya había sido observado en los casos anteriores, el protón H-3 tiende a correlacionarse más intensamente en el espectro de COSY con las señales de H-2_{ax} y H-4_{ax}, por sobre las de H-2_{ec} y H-4_{ec}, con las cuales no presenta una ³J apreciable. De esto se deduce que las señales en 2.06 y 2.16 ppm corresponden a H-2_{ax} y H-4_{ax}, mientras que las señales en 1.26 y 1.62 ppm corresponden a los protones H-2_{ec} y H-4_{ec}. Asimismo, las señales de H-2_{ax} y H-4_{ax} muestran correlación con las señales en 3.11 y 2.99 ppm, permitiendo su asignación a H-1 y H-5 respectivamente.



Como en el caso de (+)-(3*R*,6*R*)-**14**, la señal de H-5 no muestra correlaciones con las señales restantes por asignar. Por otra parte la señal de H-1, además de mostrar una correlación con las señales de otros protones en el mismo lado del biciclo, muestra una correlación con la señal en 1.62 ppm, la que se encuentra solapada con la señal de H-4*ec*. Como ya ha sido definido anteriormente en base a sus ángulos diedros, esta señal corresponde a H-7*ec*. Consecuentemente, esta señal muestra correlación con las señales 1.83 y 4.36 ppm, las que por su evidente diferencia de corrimiento químico pueden ser asignadas a H-7*ax* y H-6 respectivamente. La asignación completa de las señales de ¹HRMN y ¹³CRMN de (-)-(3*S*,6*S*)-**14** se encuentra en la tabla 9. Estas asignaciones están de acuerdo con las descritas en la literatura (Ishimaru y Shimomura, 1989).

Tabla 9. Asignación de las señales en los espectros de $^1\text{HRMN}$ y $^{13}\text{CRMN}$ de (-)-(3*S*,6*S*)-6 β -hidroxihiosciamina ((-)-(3*S*,6*S*)-**14**).

H	δ (ppm)	C	δ (ppm)
H-1	3.11	C-1	58.2
H-2 _{ax}	2.06	C-2	30.1
H-2 _{ec}	1.26	C-3	67.6
H-3	5.01	C-4	28.9
H-4 _{ax}	2.16	C-5	66.9
H-4 _{ec}	1.62	C-6	75.5
H-5	2.99	C-7	39.7
H-6	4.36	C-1'	54.5
H-7 _{ec}	1.83	C-2'	64.2
H-7 _{ax}	1.62	Ccarb	171.7
H-1'	3.78	Cipso	135.2
H-2'a	3.78	Fenilo	128.8, 127.9 y 127.7
H-2'b	4.15	N-Me	36.5
Fenilo	7.22 - 7.36		
N-Me	2.48		

3.5. Determinación de la configuración absoluta de ambos diastereoisómeros de 6 β -hidroxihiosciamina utilizando dicroísmo circular vibracional

Como ya se estableció, los datos disponibles sobre la estereoquímica de (+)-**14** y (-)-**14** no son lo suficientemente concluyentes para la determinación de la configuración absoluta de estos compuestos. Por consiguiente, fue necesario establecer la configuración absoluta de (+)-**14** y (-)-**14** utilizando una metodología independiente. Para ello se decidió utilizar la espectroscopia de dicroísmo circular

vibracional (DCV).

Para esto fue necesario conocer las preferencias conformacionales de cada diastereoisómero de **14**, comenzando por determinar sus conformaciones de mínima energía dentro de las primeras 10 kcal/mol. Para cumplir este objetivo se realizaron búsquedas del tipo sistemático según Dreiding y del tipo al azar o de Monte Carlo.

Cuando ambos procedimientos fueron utilizados, se observó que la metodología de Monte Carlo entregó resultados poco repetibles en el tiempo, encontrando diferentes series de conformaciones durante cada repetición del procedimiento. Además, se encontró una alta dependencia entre la conformación de entrada y las obtenidas posteriormente. Por el contrario, la metodología de búsqueda sistemática entregó los mismos resultados bajo diferentes condiciones y no mostró ninguna dependencia entre la conformación de entrada y las obtenidas posteriormente. Esta diferencia entre los resultados de ambas metodologías de búsqueda conformacional puede deberse a que en el primer caso, al ser una búsqueda basada en el azar, la cantidad de configuraciones nuevas generadas no fue suficiente para explorar el espacio conformacional adecuadamente. Esto necesariamente provoca resultados poco repetibles, aunque la búsqueda se realice bajo las mismas condiciones. Además, en el caso de búsqueda sistemática, se observó un gran parecido entre las conformaciones generadas para ambos isómeros. Por lo anterior, se decidió utilizar las conformaciones derivadas de la búsqueda conformacional sistemática.

Adicionalmente, y debido a la imposibilidad de esta metodología de pasar desde una orientación dada del N-Me en el biciclo hacia la otra, fue necesario utilizar

conformaciones de entrada con ambas orientaciones por separado, para luego unir ambas series de resultados.

Al finalizar lo anterior, se realizó un cálculo de punto simple de energía, utilizando DFT con una base 6-31G(d), para cada una de las conformaciones encontradas anteriormente. Esto se hizo con el objetivo de contar con energías más confiables, que permitiesen conocer la distribución conformacional de cada diastereoisómero. Posteriormente, estas energías fueron usadas en una distribución de Boltzmann que permitió conocer los porcentajes de abundancia relativa de cada conformero dentro de la distribución.

Usando estos resultados, se pudo deducir que las primeras ocho conformaciones de cada diastereoisómero ((3*R*,6*R*)-**14a-h** y (3*S*,6*S*)-**14a-h** en las figuras 8 y 9 respectivamente) dentro de la distribución, dan cuenta de sobre el 96% de abundancia relativa (96.8 % y 96.5 % para (3*R*,6*R*)-**14** y (3*S*,6*S*)-**14**, respectivamente). Por lo anterior, estas ocho conformaciones por cada isómero fueron luego geoméricamente optimizadas y usadas en el cálculo de los espectros vibracionales. Esta aproximación se realiza considerando que conformeros con energías relativas mayores tendrán una presencia muy poco significativa, y por lo tanto no alterarían el espectro ponderado final de forma importante.

En la tabla 10 es posible apreciar las energías y abundancias relativas correspondientes para los ocho conformeros más significativos de cada diastereoisómero en cada etapa de cálculo.

Tabla 10. Energías relativas calculadas (kcal/mol) y abundancias (%) de los ocho conformeros más estables de (3*R*,6*R*)-6β-hidroxihiosciamina ((3*R*,6*R*)-**14** (a-h)) y (3*S*,6*S*)-6β-hidroxihiosciamina ((3*S*,6*S*)-**14** (a-h)), usando búsqueda sistemática, cálculos de punto simple de energía y de optimización de la geometría con B3LYP/6-31G(d). Los conformeros de cada diastereoisómero están ordenados de acuerdo a las energías de los cálculos de optimización de la geometría.

Conf.	E _{sist}	E _{PS}	% _{PS}	E _{OPT}	% _{OPT}
(3 <i>R</i> ,6 <i>R</i>)- 14a	2.02	0.00	25.54	0.00	25.66
(3 <i>R</i> ,6 <i>R</i>)- 14b	1.14	0.20	18.28	0.08	22.42
(3 <i>R</i> ,6 <i>R</i>)- 14c	2.29	0.01	25.02	0.24	17.11
(3 <i>R</i> ,6 <i>R</i>)- 14d	1.41	0.51	10.85	0.25	16.83
(3 <i>R</i> ,6 <i>R</i>)- 14e	1.54	0.92	5.39	0.87	5.91
(3 <i>R</i> ,6 <i>R</i>)- 14f	1.90	0.74	7.30	0.93	5.34
(3 <i>R</i> ,6 <i>R</i>)- 14g	0.84	1.66	1.54	1.12	3.88
(3 <i>R</i> ,6 <i>R</i>)- 14h	1.46	1.30	2.85	1.30	2.86
(3 <i>S</i> ,6 <i>S</i>)- 14a	1.97	0.00	34.88	0.00	30.45
(3 <i>S</i> ,6 <i>S</i>)- 14b	1.39	0.46	16.13	0.23	20.66
(3 <i>S</i> ,6 <i>S</i>)- 14c	2.81	0.23	23.54	0.25	19.97
(3 <i>S</i> ,6 <i>S</i>)- 14d	2.00	0.71	10.43	0.43	14.74
(3 <i>S</i> ,6 <i>S</i>)- 14e	1.47	1.25	4.20	1.19	4.09
(3 <i>S</i> ,6 <i>S</i>)- 14f	0.87	1.94	1.32	1.24	3.76
(3 <i>S</i> ,6 <i>S</i>)- 14g	2.30	1.23	4.40	1.27	3.57
(3 <i>S</i> ,6 <i>S</i>)- 14h	1.53	1.82	1.61	1.42	2.77

Como muestran las figuras 8 y 9, existe una clara dependencia de la preferencia conformacional de cada diastereoisómero en relación a la formación de puentes de hidrógeno intramoleculares. Las ocho conformaciones más pobladas de cada diastereoisómero muestran este tipo de asociación entre los grupos hidroxilo y carbonilo presentes en el éster trópico, formando un anillo de seis miembros. Por otro lado, la capacidad del hidroxilo en el biciclo de formar un puente de hidrógeno con el nitrógeno de la amina terciaria, depende fuertemente de la orientación del grupo N-Me. Mientras una disposición *axial* de éste deja el par electrónico del nitrógeno orientado hacia el grupo hidroxilo, permitiendo la formación de un puente de hidrógeno entre estos, una orientación *ecuatorial* lo evita completamente.

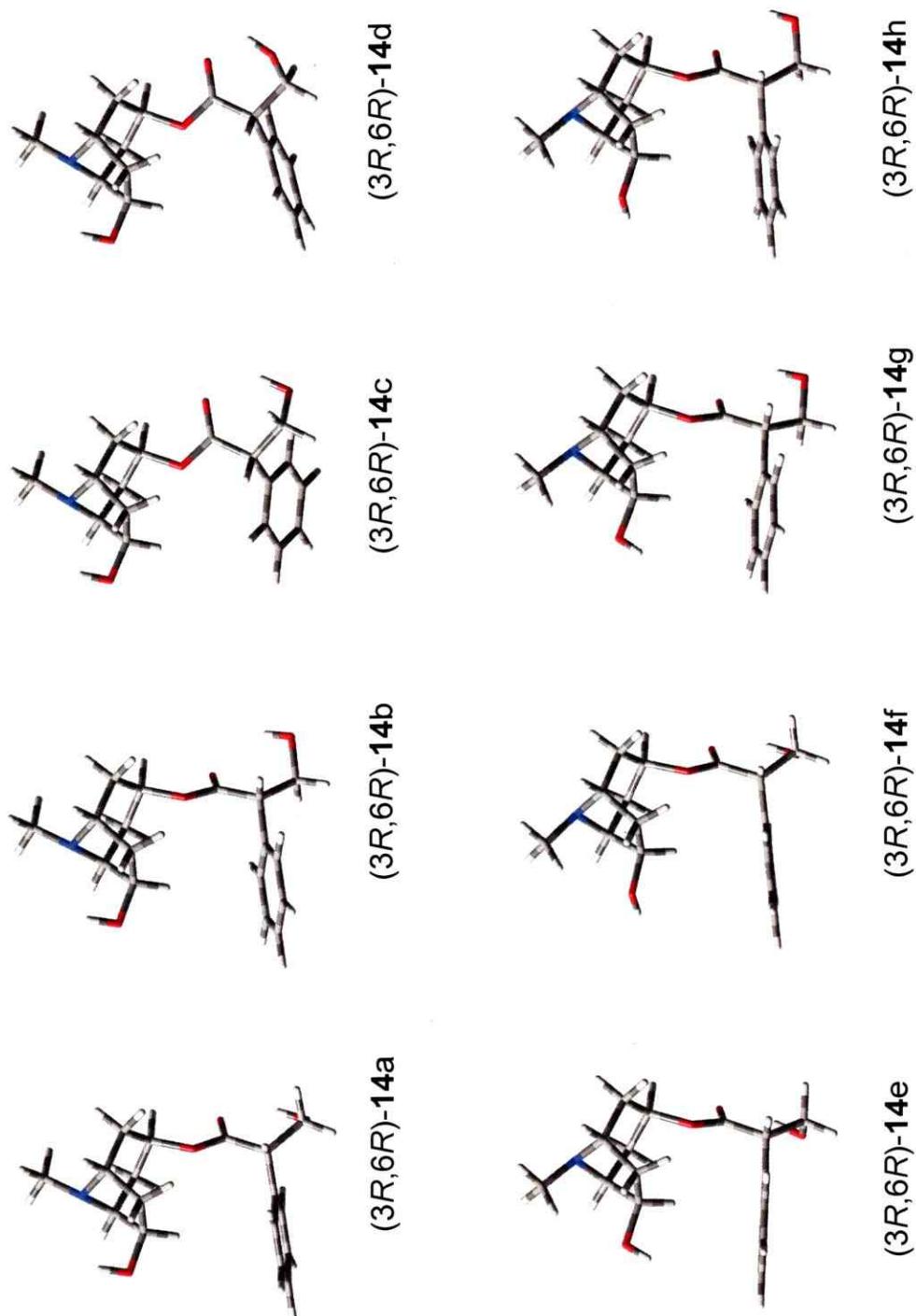


Figura 8. Estructuras optimizadas de los ocho conformeros más estables de (3R,6R)-6β-hidroxiosciamina ((3R,6R)-14).

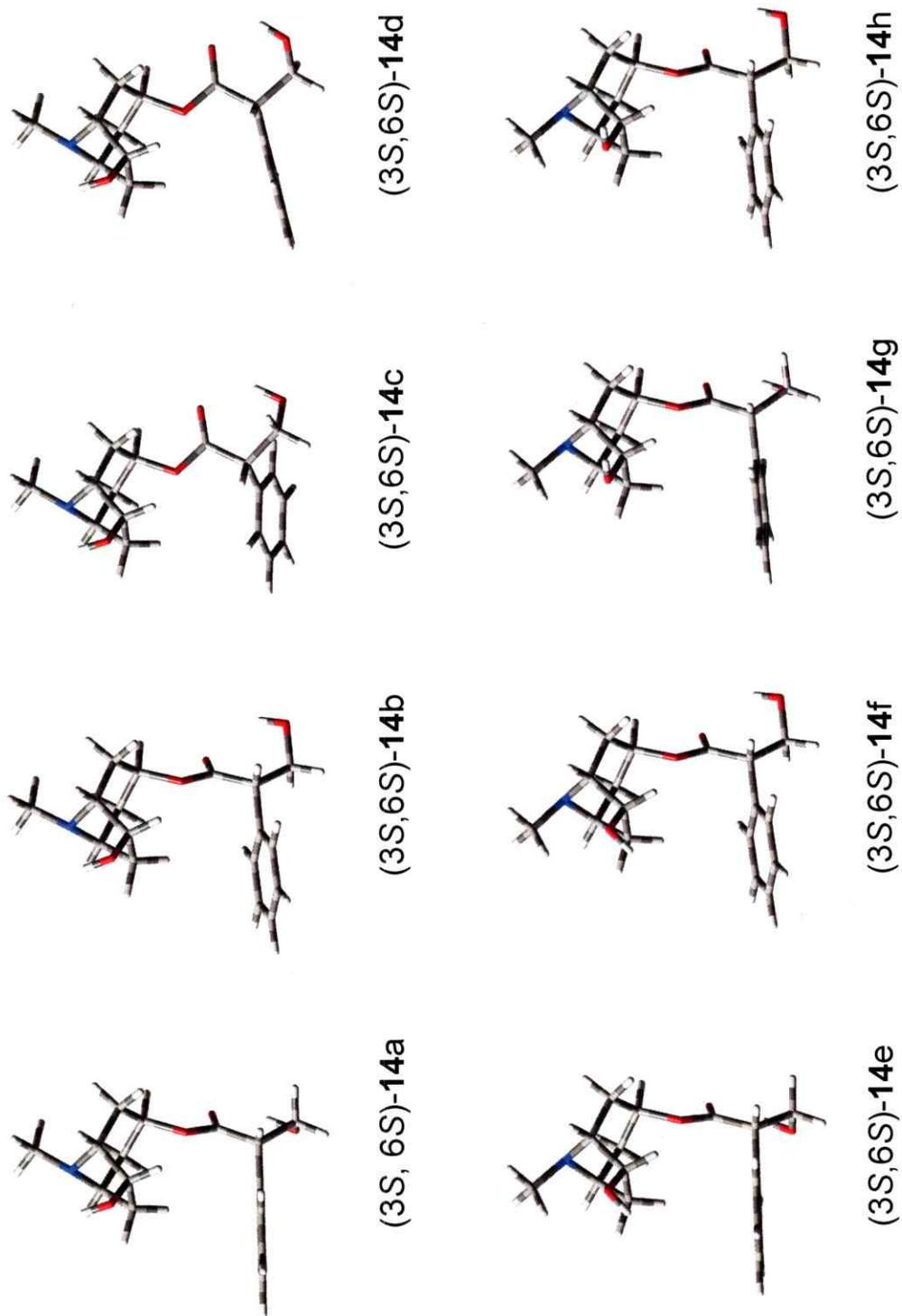


Figura 9. Estructuras optimizadas de los ocho conformeros más estables de (3S,6S)-6β-hidroxihiosiamina ((3S,6S)-14).

En ambos isómeros, los cuatro conformeros más estables muestran una orientación del N-Me *axial*, y por lo tanto presentan ambos puentes de hidrógeno. Por el contrario, los siguientes cuatro conformeros muestran una orientación *ecuatorial* del N-Me, y en consecuencia presentan sólo el puente de hidrógeno del éster trópico. Esta preferencia por una orientación *axial* del N-Me podría ser confirmada por estudios más profundos de RMN e IR, y ya ha sido sugerida anteriormente en base al corrimiento químico de $^{13}\text{CRMN}$ del grupo metilo unido al nitrógeno (Yagudaev y Aripova, 1986). Adicionalmente, el espectro de NOESY de (+)-**14** mostró correlación entre las señales del grupo N-Me con las señales de H-2 $_{ax}$, H-4 $_{ax}$ y H-7 $_{ec}$. Sin embargo para (-)-**14**, el mismo espectro mostró sólo la correlación entre las señales del grupo N-Me con H-2 $_{ax}$ y H-4 $_{ax}$ (Fig. 10). Esto indica nuevamente una tendencia del grupo N-Me por una orientación *axial*, la que podría estar acentuada en el isómero (-)-**14**.

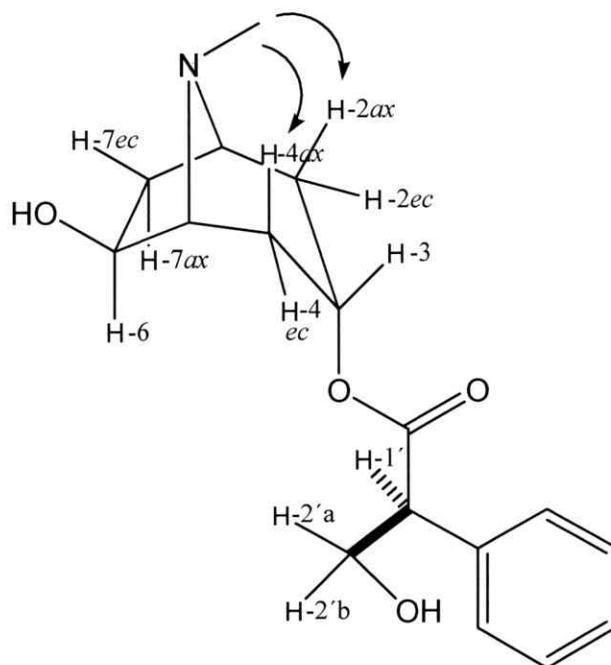


Figura 10. Correlación observada en el espectro de NOESY entre el grupo N-Me y los protones H-2 $_{ax}$ y H-4 $_{ax}$ para (3S,6S)-6β-hidroxihiosciamina ((3S,6S)-**14**).

Al analizar en detalle las preferencias conformacionales de ambos grupos es posible apreciar que las conformaciones se encuentran exactamente en el mismo orden en la escala de energías de punto simple, y varían ligeramente en la escala de energías de las geometrías optimizadas. Esto da cuenta de un patrón de comportamiento conformacional que depende mayormente del éster trópico y es independiente de la posición relativa del hidroxilo en el biciclo.

Sin embargo, las energías calculadas de estabilización debidas a la presencia del puente de hidrógeno entre el hidroxilo y la amina en el biciclo, tienen un valor de no más de 1.5 kcal/mol. Esta cantidad es bastante pequeña considerando que este tipo de interacciones normalmente muestran energías de estabilización de entre 3 y 5 kcal/mol. Esta divergencia puede ser explicada por la geometría de la interacción, que debido a la alta rigidez del anillo de cinco miembros formado, podría no permitir una óptima formación de ésta. Por otro lado, el nivel relativamente bajo de la base usada para calcular tanto las energías como las geometrías, también podría estar involucrado en esta diferencia.

Una vez determinados los confórmeros más relevantes de cada isómero, se procedió a realizar una optimización de la geometría de cada uno, utilizando la funcional B3LYP con la base 6-31G(d). Posteriormente, se realizó el cálculo de frecuencias vibracionales para cada geometría optimizada utilizando la misma funcional y base, y tanto las fuerzas dipolares como rotacionales obtenidas fueron convertidas a unidades de absorptividad molar ($M^{-1}cm^{-1}$). Finalmente, estas intensidades fueron graficadas como bandas de forma Lorentziana, para dar paso a los espectros calculados de IR y DCV de cada confórmero por separado (figuras 11 y 12).

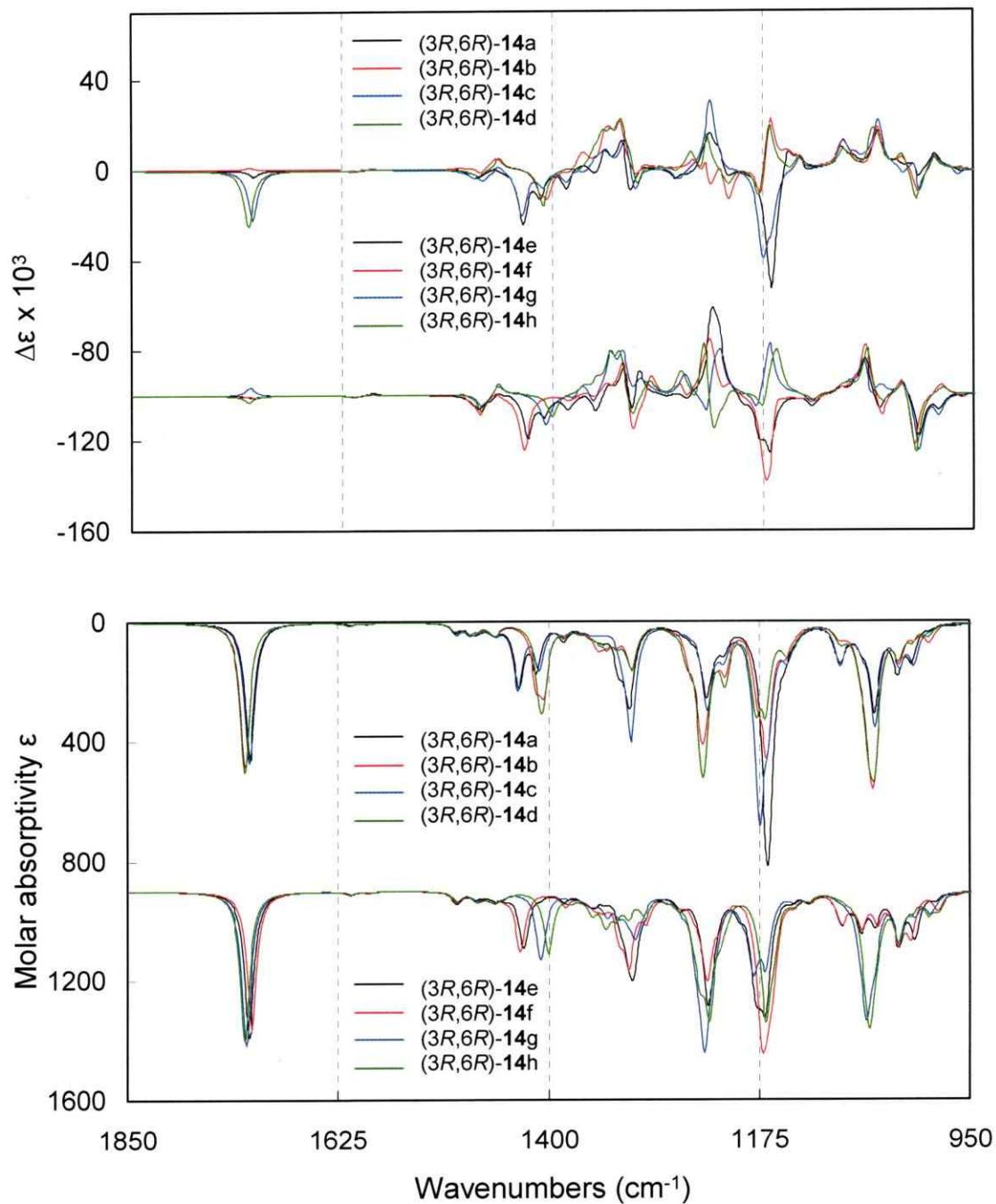


Figura 11. Espectros de IR (abajo) y DCV calculados (arriba) para los ocho conformeros de menor energía de (3R,6R)-6 β -hidroxihiosciamina ((3R,6R)-14) usando B3LYP/6-31G(d).

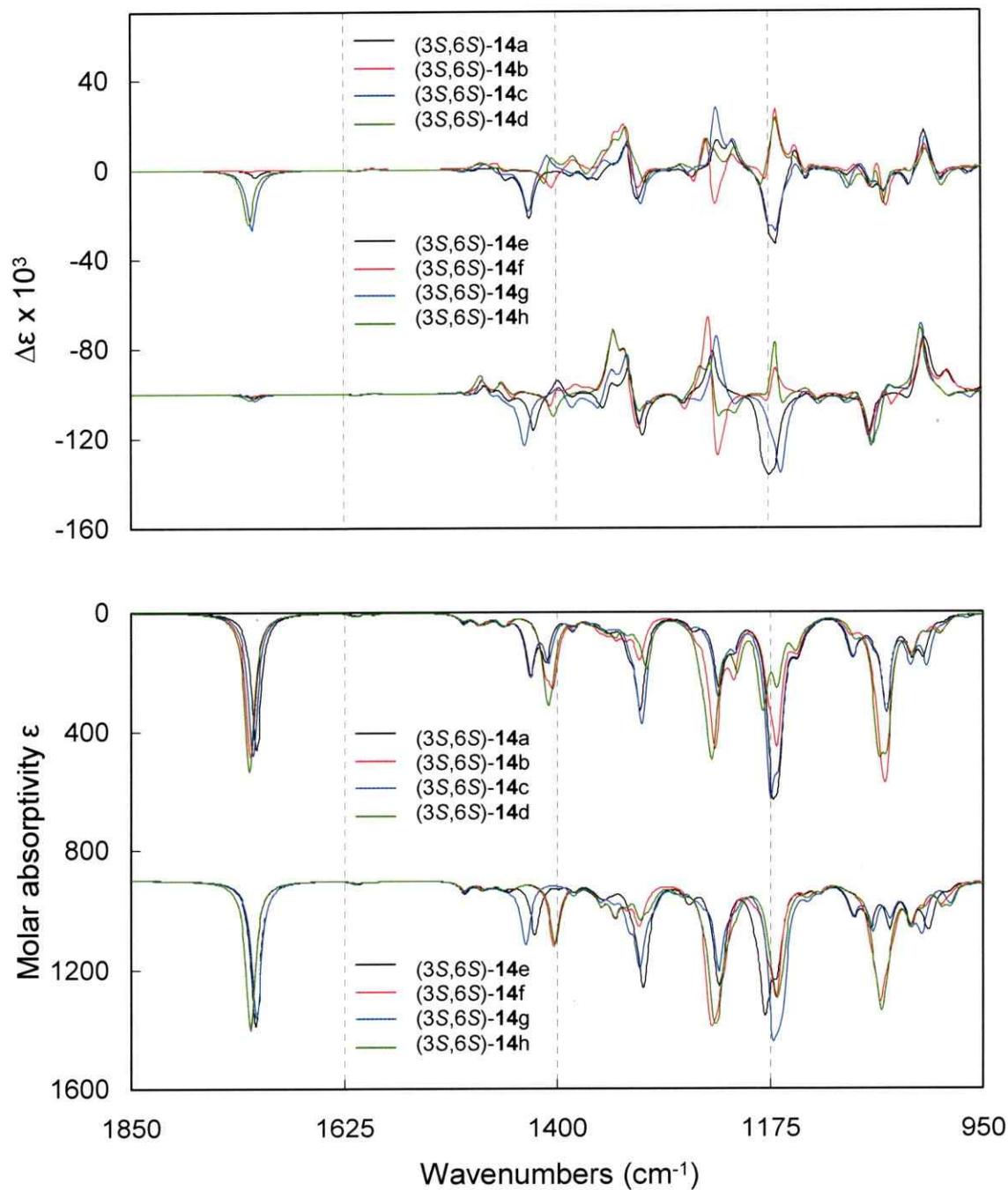


Figura 12. Espectros de IR (abajo) y DCV calculados (arriba) para los ocho conformeros de menor energía de (3S,6S)-6 β -hidroxihiosciamina ((3S,6S)-14) usando B3LYP/6-31G(d).

Como se aprecia, los espectros calculados de IR no muestran cambios significativos entre los diferentes conformeros. Por el contrario, los espectros de DCV de los conformeros considerados muestran una serie de bandas que dependen de las preferencias conformacionales, particularmente del éster trópico. Ya que estas vibraciones están relacionadas con una parte más flexible de la molécula, se espera que la correlación entre las bandas calculadas teóricamente y las experimentales sea de menor calidad que la surgida de partes más restringidas conformacionalmente. Esto es especialmente cierto cuando se han utilizado bases de bajo nivel para calcular tanto las propiedades geométricas como espectrales de la molécula.

Por otra parte, la dificultad de distinguir dos especies diastereoisoméricas mediante DCV, reside principalmente en que no todas las bandas en este espectro son imágenes especulares, como es el caso de un par de enantiómeros. Esto implica la necesidad de identificar las bandas vibracionales que se encuentran relacionadas con los centros asimétricos que difieren entre los dos diastereoisómeros. También es necesario que tanto el cálculo de búsqueda conformacional, como el de espectros vibracionales, se realicen para ambos isómeros, ya que esta información no puede ser inferida desde una molécula a la otra, como en el caso de enantiómeros.

Por consiguiente, y debido a que el centro asimétrico del éster trópico tiene una configuración absoluta igual para ambos isómeros, las bandas relacionadas a este centro no pueden ser usadas para la determinación de la configuración absoluta de éstos.

Sin embargo, es posible apreciar que en el intervalo de entre 950 y 1100 cm^{-1} se encuentran a lo menos tres bandas que se mantienen sin cambios importantes en todos los conformeros de baja energía. Además, como se muestra en la figura 13, estas bandas pueden ser asignadas principalmente a vibraciones en el biciclo.

De éstas, la más intensa (1040 y 1041 cm^{-1} para (3*R*,6*R*)-**14** y (3*S*,6*S*)-**14**, respectivamente) se debe a la interacción entre cuatro vibraciones de estiramiento asimétrico entre C1-N-C5, N-C1-C2, N-C5-C4 y O-C6-C7.

En ambas moléculas, la banda en 1084 cm^{-1} es producida por el estiramiento asimétrico de O-C6-C7 y N-C1-C2, mientras que la banda en 1125 cm^{-1} se debe a los estiramientos asimétricos de C2-C3-C4, C1-C2-C3 y C3-C4-C5, junto con el estiramiento simétrico de O-C6-C7. Entre cada isómero, estos movimientos son imágenes especulares, y por lo tanto sus respectivas bandas muestran intensidades opuestas cuando se comparan en sus espectros de DCV. Consecuentemente, estas bandas pueden ser usadas para determinar la configuración absoluta de ambos isómeros.

Luego utilizando las energías de las geometrías optimizadas de cada diastereoisómero de baja energía, se generó una distribución de Boltzmann con el objetivo de conocer las abundancias relativas en cada equilibrio. A su vez, estas abundancias se utilizaron en la generación de espectros ponderados de IR y DCV que pudiesen ser comparados con los respectivos espectros experimentales.

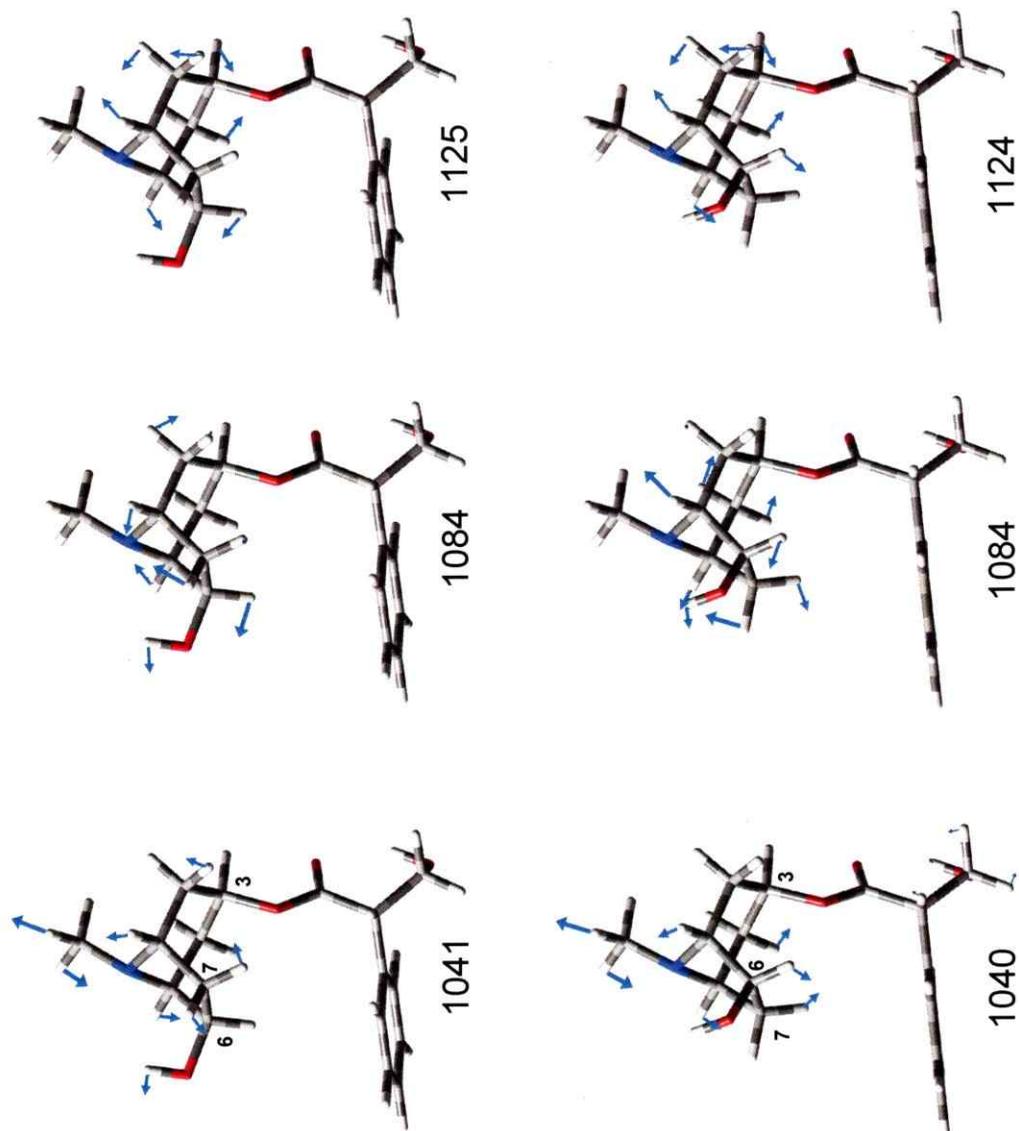


Figura 13. Amplitudes relativas de los modos vibracionales pertenecientes al biciclo para el conformero de menor energía de (3*R*,6*R*)-6 β -hidroxiosciamina ((3*R*,6*R*)-**14**) (arriba) y (3*S*,6*S*)-6 β -hidroxiosciamina ((3*S*,6*S*)-**14**) (abajo).

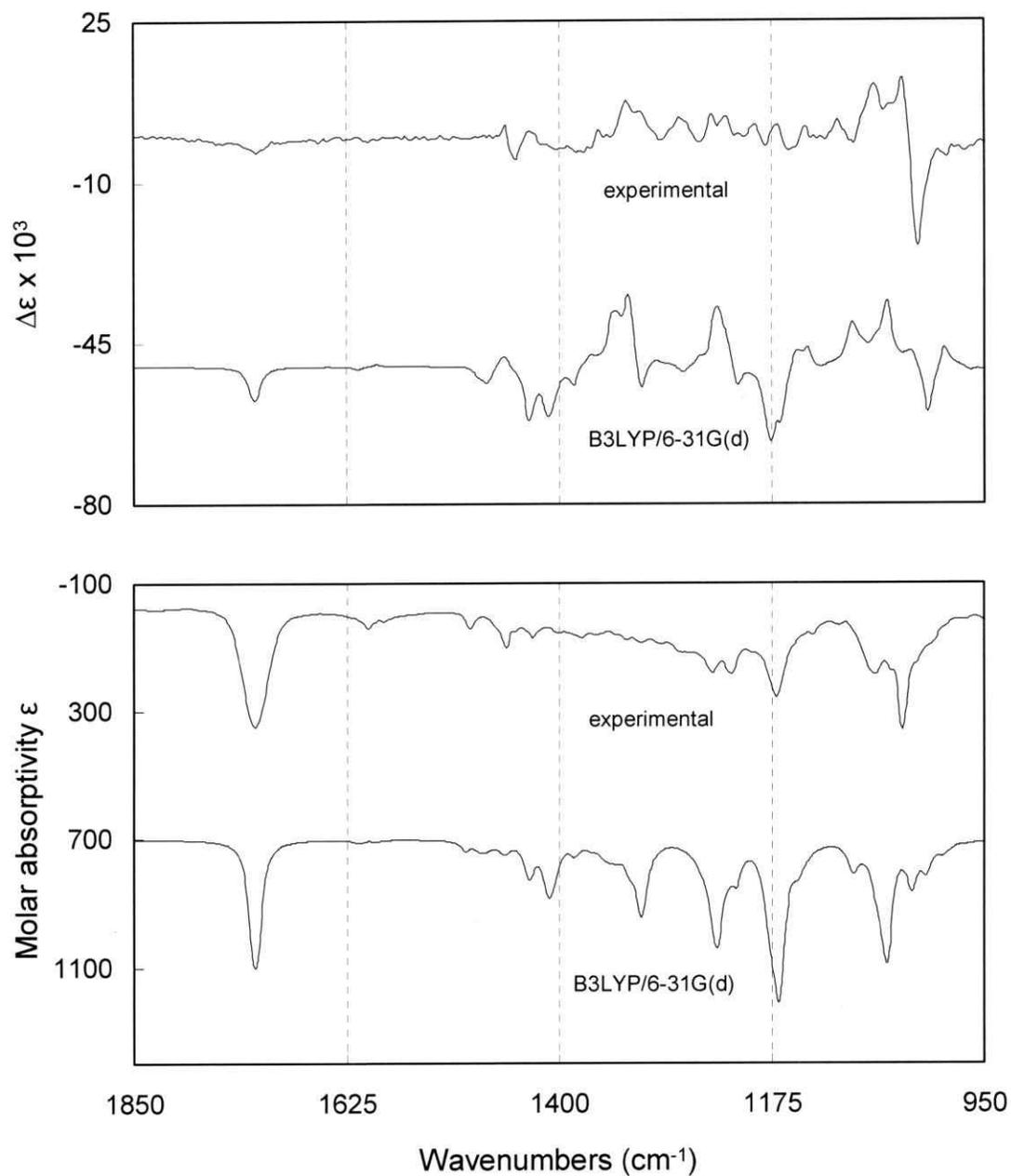


Figura 14. Comparación de los espectros calculados y los observados de IR (abajo) y DCV (arriba) de (3R,6R)-6 β -hidroxihiosciamina ((3R,6R)-**14**).

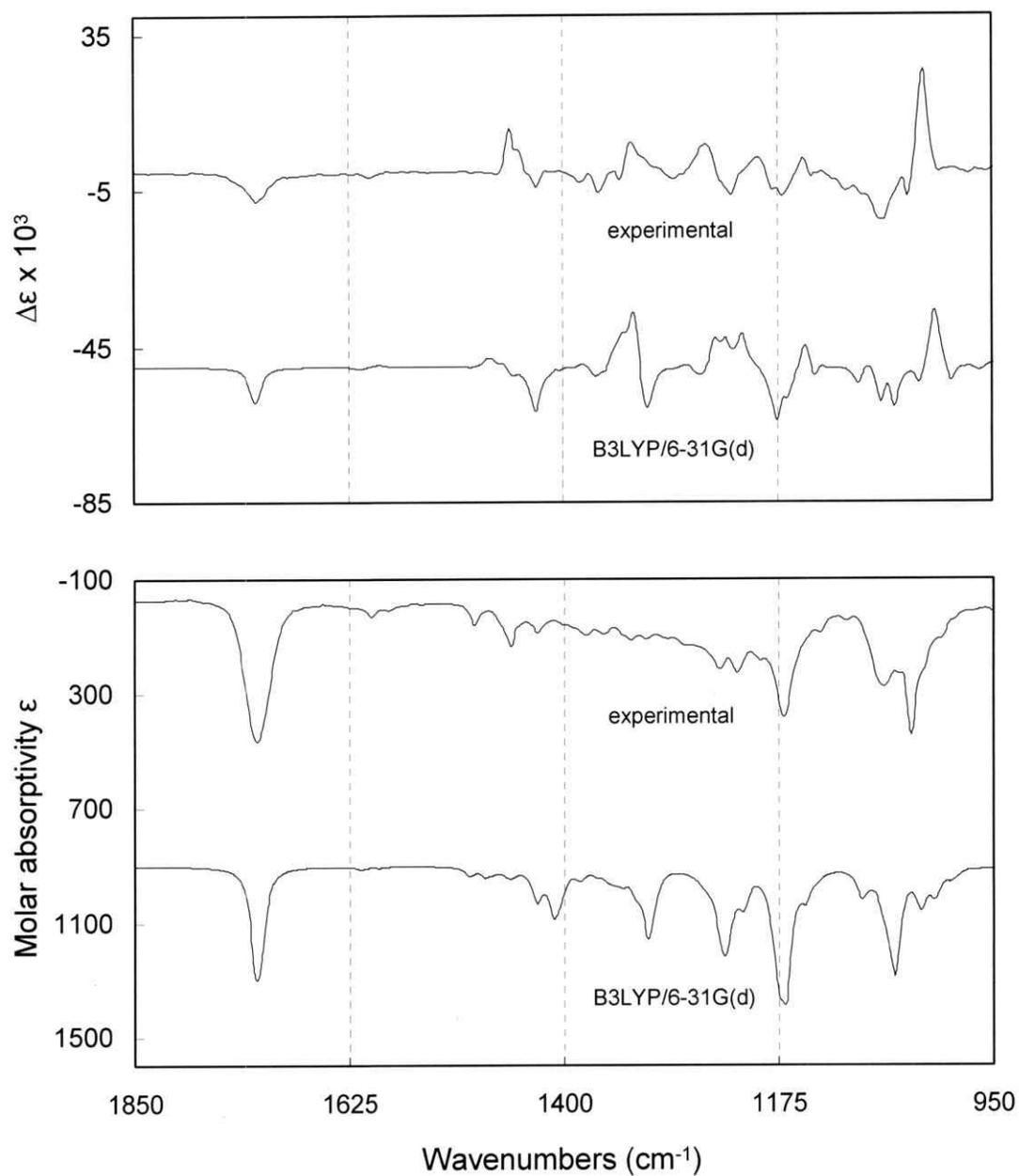


Figura 15. Comparación de los espectros calculados y los observados de IR (abajo) y DCV (arriba) de (3S,6S)-6 β -hidroxihiosciamina ((3S,6S)-**14**).

Finalmente, al realizar esta comparación (figuras 14 y 15), fue posible diferenciar ambos diastereoisómeros de forma clara. Las bandas en cada espectro calculado, previamente asignadas a vibraciones dentro del biciclo, muestran una clara correlación con uno u otro espectro experimental, mostrando que la configuración absoluta de (+)-**14** es (3*R*,6*R*,2'*S*) y (-)-**14** es (3*S*,6*S*,2'*S*).

3.6. Determinación de la configuración absoluta de ambos diastereoisómeros de 6β-hidroxihiosciamina mediante el cálculo de corrimientos químicos

Durante la asignación de los espectros de ¹HRMN y ¹³CRMN de **2** y **3**, fue posible apreciar diferencias importantes de corrimientos químicos entre pares de núcleos equivalentes en el biciclo (i.e. H-1 / H-5). Por otra parte, ambos diastereoisómeros de **14** también presentan notables diferencias entre núcleos equivalentes entre ellos (i.e H-5 / H-5). Ejemplos representativos de este fenómeno son las diferencias de corrimiento químico entre las señales de H-6 y H-7 en **2** (0.7 ppm) y **3** (0.5 ppm). De la misma manera, los corrimientos químicos de las señales de H-6_{ax} en (3*R*,6*R*)-**14** y (3*S*,6*S*)-**14** se diferencian en 0.6 ppm.

Al analizar las preferencias conformacionales de (3*R*,6*R*)-**14** y (3*S*,6*S*)-**14** se puede observar (Sec. 3.5.) que la porción de éster trópico de estas moléculas tiene una marcada tendencia a dejar el grupo fenilo en la zona inferior del biciclo. Considerando el conocido efecto de protección magnética producido por grupos aromáticos tales

como éste, es posible inferir que este efecto es el responsable de las diferencias de corrimiento químico observadas.

Tales diferencias pueden ser usadas para discriminar entre ambos diastereoisómeros de **14**, en la medida que éstas puedan ser predichas con la precisión necesaria. En este sentido, los cálculos de corrimientos químicos utilizando técnicas *ab initio* (GIAO, IGLO, etc.) han tenido un gran avance en los últimos 20 años (Helgaker y col., 1999), llegando a ser utilizados en una gran variedad de aplicaciones (Czinki y col., 2007; Bassarello y col., 2007 y Vailikhit y col., 2006).

Es por esto que con el objetivo de explicar este fenómeno desde un punto de vista conformacional, y para evaluar la capacidad de estos cálculos de diferenciar ambos diastereoisómeros, se procedió a realizar cálculos de predicción de corrimientos químicos mediante DFT-GIAO para (+)-**14** y (-)-**14**, considerando dos bases diferentes (6-31G(d) y 6-311G++(d,p)). Para esto se utilizaron las distribuciones conformacionales ya conocidas de estos isómeros, usando cada conformero como geometría de entrada. Como resultado se obtuvieron los apantallamientos magnéticos de cada hidrógeno y carbono presente en la molécula, los que fueron ponderados según las abundancias relativas de cada conformero ya conocidas de la sección anterior. Estos apantallamientos nucleares magnéticos son una medida del campo magnético producido por los electrones en la molécula y son inversamente proporcionales a los corrimientos químicos experimentales. Por consiguiente, una excelente forma de convertir estos apantallamientos teóricos en corrimientos químicos teóricos, es realizar un procedimiento de escalaje lineal entre estos valores teóricos y los correspondientes experimentales. Para este efecto se utilizaron corrimientos químicos descritos

previamente en la literatura (Ishimaru y Shimomura, 1989).

El procedimiento matemático utilizado consistió en obtener una correlación lineal entre los apantallamientos teóricos ya ponderados para ambos diastereoisómeros y los corrimientos químicos experimentales de (+)-**14** y (-)-**14**. Cuando esta correlación se realizó para ^{13}C entre los apantallamientos teóricos de (3*R*,6*R*)-**14** y los corrimientos químicos experimentales de (+)-**14**, esta entregó una pendiente de -0.9701, un intercepto de 188.34 y un coeficiente de correlación (r^2) de 0.9990 para la base 6-31G(d), y una pendiente de -1.0671, un intercepto de 182.13 y un coeficiente de correlación (r^2) de 0.9995 para la base 6-311G++(d,p). Por otra parte, la correlación entre los apantallamiento teóricos de (3*S*,6*S*)-**14** y los corrimientos químicos experimentales de (-)-**14** entregó una pendiente de -0.9701, un intercepto de 188.34 y un coeficiente de correlación (r^2) de 0.9990 para la base 6-31G(d), y una pendiente de -1.0671, un intercepto de 182.13 y un coeficiente de correlación (r^2) de 0.9995 para la base 6-311G++(d,p). Luego de esto, los apantallamientos teóricos fueron convertidos en corrimientos químicos teóricos utilizando las ecuaciones lineales derivadas de cada correlación.

Finalmente, se procedió a realizar el cálculo de la desviación cuadrática media (rms) de cada grupo de valores teóricos con sus respectivos experimentales. Estos valores, junto con los apantallamientos teóricos, los corrimientos químicos teóricos y los corrimientos químicos experimentales se muestran en la tabla 11.

De los valores de los coeficientes de correlación (r^2) y la desviación cuadrática media (rms), obtenidos para ^{13}C se concluye que para ambos diastereoisómeros

Tabla 11. Valores de apantallamientos teóricos, corrimientos químicos teóricos (ppm), corrimientos químicos experimentales (ppm) y desviaciones cuadráticas medias (rms) (ppm) para carbonos en la correlación entre (+)-**14** y (3*R*,6*R*)-**14**, y entre (-)-**14** y (3*S*,6*S*)-**14**.

(+)- 14 v/s (3 <i>R</i> ,6 <i>R</i>)- 14							
Base		B3LYP/6-31G(d)			B3LYP/6-311G++(d,p)		
Carbono	Exp	AT	CQT	rms	AT	CQT	rms
1	58.0	131.8976	58.18		120.3147	57.93	
2	30.1	160.7625	28.43		150.9254	29.24	
3	67.9	121.2506	69.16		108.7119	68.80	
4	28.4	162.7444	26.38		153.4995	26.83	
5	66.6	123.1079	67.24	1.4304	111.1800	66.49	0.8018
6	75.5	115.4041	75.18		102.2602	74.85	
7	40.2	147.9407	41.64		137.3788	41.94	
1'	172.0	22.2509	171.21		-1.1655	171.77	
2'	54.4	135.6982	54.26		123.6234	54.83	
3'	64.0	124.7453	65.55		113.2991	64.50	

(-)- 14 v/s (3 <i>S</i> ,6 <i>S</i>)- 14							
Base		B3LYP/6-31G(d)			B3LYP/6-311G++(d,p)		
Carbono	Exp	AT	CQT	rms	AT	CQT	rms
1	57.9	132.2597	57.89		120.6846	57.53	
2	29.8	161.6946	27.58		151.9684	28.19	
3	67.9	121.1116	69.37		108.3447	69.11	
4	28.5	162.6034	26.64		153.0022	27.22	
5	66.7	122.9017	67.53	1.7276	110.5990	66.99	1.1212
6	75.8	115.0045	75.66		101.7785	75.27	
7	39.9	148.1536	41.52		137.1865	42.05	
1'	172.1	22.3664	171.06		-1.0005	171.67	
2'	54.4	135.8340	54.21		123.6538	54.75	
3'	64.1	124.7681	65.60		113.4051	64.36	

AT: Apantallamientos Teóricos; CQT: Corrimientos Químicos Teóricos

existe una buena correlación entre los valores de corrimientos químicos experimentales y los apantallamientos calculados teóricamente, observándose una desviación

Tabla 12. Valores de coeficientes de correlación (r^2) y de desviaciones cuadráticas medias (rms) (ppm) obtenidos para las correlaciones entre los valores de corrimientos químicos teóricos de (3R,6R)-**14** y (3S,6S)-**14** con los valores experimentales de (+)-**14** y (-)-**14** para carbonos.

BASE	(3R,6R)- 14				(3S,6S)- 14			
	6-31G(d)		6-311G++(d,p)		6-31G(d)		6-311G++(d,p)	
	(+)- 14	(-)- 14	(+)- 14	(-)- 14	(+)- 14	(-)- 14	(+)- 14	(-)- 14
r^2	0.9990	0.9990	0.9995	0.9994	0.9988	0.9988	0.9993	0.9993
rms	1.4304	1.4680	0.8018	0.9469	1.7897	1.7276	1.0751	1.1212

cuadrática media (rms) del orden de 1 ppm. Para conocer la capacidad de la técnica de diferenciar cada uno de los isómeros, y así poder realizar una asignación de su configuración absoluta, se decidió realizar el mismo procedimiento anterior pero comparando los valores teóricos obtenidos para (3R,6R)-**14** y los experimentales de (-)-**14**, y de la misma forma para los obtenidos para (3S,6S)-**14** y los experimentales de (+)-**14**.

Como resultado de estas correlaciones, se observó que en el primer caso se obtuvo una pendiente de -0.9689, un intercepto de 188.25 y un coeficiente de correlación (r^2) de 0.9990 para la base 6-31G(d), y una pendiente de -1.0657, un intercepto de 182.03 y un coeficiente de correlación (r^2) de 0.9994 para la base 6-311G++(d,p). Por otra parte, el segundo caso arrojó una pendiente de -0.9721, un intercepto de 188.56 y un coeficiente de correlación (r^2) de 0.9988 para la base 6-31G(d), y una pendiente de -1.0675, un intercepto de 182.12 y un coeficiente de correlación (r^2) de 0.9993 para la base 6-311G++(d,p). Finalmente se calcularon los valores de desviación cuadrática media (rms), los que se muestran en la tabla 12 junto con los valores de r^2 de todas las correlaciones anteriores.

Al analizar los resultados obtenidos, se observa que en general los valores de r^2 se mantienen invariables en todas las correlaciones, por lo que éstos no son un buen indicador del nivel de parecido entre los valores experimentales y los teóricos. Por otra parte, el valor de desviación cuadrática media (rms) aumenta en 2% y 18%, para las bases 6-31G(d) y 6-311G++(d,p), respectivamente, cuando los valores de los corrimientos químicos teóricos del isómero (3*R*,6*R*) son correlacionados con los experimentales de (-)-**14**, en comparación a cuando son correlacionados con (+)-**14**. Sin embargo, aunque también existe un aumento del 3% en la desviación cuadrática media (rms) para la base 6-31G(d), cuando los corrimientos químicos teóricos del isómero (3*S*,6*S*) son correlacionados con los experimentales de (+)-**14**, en comparación a cuando son correlacionados con (-)-**14**, este valor disminuye en un 4% para la base 6-311G++(d,p). Adicionalmente, los valores de desviación cuadrática media (rms) en todos los casos son mayores que las diferencias de corrimiento químico entre carbonos equivalentes en cada isómero.

Por lo anterior, se deduce que la metodología, cuando es aplicada a corrimientos químicos de ^{13}C , no arroja resultados concluyentes en la tarea de distinguir ambos isómeros, debido a que las diferencias entre carbonos equivalentes son demasiado pequeñas.

Por otra parte, cuando el mismo análisis planteado para los corrimientos químicos de ^{13}C es realizado para protones, éste arroja los resultados resumidos en las tablas 13 y 14. Los valores de r^2 , a diferencia de aquellos para ^{13}C , muestran una clara disminución cuando los corrimientos químicos para ^1H teóricos son comparados con

Tabla 13. Valores de apantallamientos teóricos, corrimientos químicos teóricos (ppm), corrimientos químicos experimentales (ppm) y desviaciones cuadráticas medias (rms) (ppm) para hidrógenos en la correlación entre (+)-**14** y (3*R*,6*R*)-**14**, y entre (-)-**14** y (3*S*,6*S*)-**14**.

(+)- 14 v/s (3 <i>R</i> ,6 <i>R</i>)- 14							
Base		B3LYP/6-31G(d)			B3LYP/6-311G++(d,p)		
Hidrógeno	Exp	AT	CQT	rms	AT	CQT	rms
1	3.17	29.2172	3.12		28.8923	3.14	
2ax	2.11	30.2156	2.11		29.8301	2.22	
2ec	1.40	30.9846	1.34		30.6978	1.38	
3	5.00	27.2504	5.11		26.8780	5.10	
4ax	2.03	30.3571	1.97	0.0261	30.0284	2.03	0.0236
4ec	1.33	31.0576	1.26		30.8591	1.22	
5	2.80	29.5867	2.75		29.4215	2.62	
6	3.70	28.5852	3.76		28.4999	3.52	
7ax	1.73	30.5114	1.81		30.2897	1.77	
7ec	2.31	29.7432	2.59		29.4803	2.56	
2'	3.79	28.9460	3.39		28.4477	3.57	
3'a	3.79	28.3164	4.03		27.9203	4.09	
3'b	4.19	28.2433	4.10		27.8722	4.13	

(-)- 14 v/s (3 <i>S</i> ,6 <i>S</i>)- 14							
Base		B3LYP/6-31G(d)			B3LYP/6-311G++(d,p)		
Hidrógeno	Exp	AT	CQT	rms	AT	CQT	rms
1	3.05	29.4032	2.96		29.0712	2.96	
2ax	2.01	30.3695	1.99		29.9627	2.09	
2ec	1.20	31.2118	1.15		30.9351	1.15	
3	5.01	27.2441	5.11		26.8580	5.11	
4ax	2.11	30.1893	2.17	0.0183	29.7751	2.27	0.0140
4ec	1.53	30.8375	1.53		30.5323	1.54	
5	2.92	29.4406	2.92		29.1931	2.84	
6	4.31	28.0163	4.34		27.8125	4.18	
7ax	1.55	30.8225	1.54		30.5976	1.47	
7ec	1.76	30.4590	1.90		30.2696	1.79	
2'	3.78	28.9573	3.40		28.4512	3.56	
3'a	3.78	28.3588	4.00		28.0014	4.00	
3'b	4.14	28.2008	4.15		27.8154	4.18	

AT: Apantallamientos Teóricos; CQT: Corrimientos Químicos Teóricos

Tabla 14. Valores de coeficientes de correlación (r^2) y desviaciones cuadráticas medias (rms) (ppm) obtenidos para las correlaciones entre los valores de corrimientos químicos teóricos de (3*R*,6*R*)-**14** y (3*S*,6*S*)-**14** con los valores experimentales de (+)-**14** y (-)-**14** para protones.

BASE	(3 <i>R</i> ,6 <i>R</i>)- 14				(3 <i>S</i> ,6 <i>S</i>)- 14			
	6-31G(d)		6-311G++(d,p)		6-31G(d)		6-311G++(d,p)	
	(+)- 14	(-)- 14	(+)- 14	(-)- 14	(+)- 14	(-)- 14	(+)- 14	(-)- 14
r^2	0.9795	0.9244	0.9814	0.9079	0.9501	0.9875	0.9567	0.9904
rms	0.0261	0.1185	0.0236	0.1469	0.0653	0.0183	0.0564	0.0140

los corrimientos químicos experimentales incorrectos, es decir el isómero (6*R*,6*R*) con (-)-**14** y el isómero (3*S*,6*S*) con (+)-**14**. Consecuentemente, los valores de desviación cuadrática media (rms) muestran a su vez un aumento considerable, de entre 6 y 10 veces para el isómero (3*R*,6*R*), y entre 2 y 3 veces para el isómero (3*S*,6*S*), cuando se hace la misma comparación anterior. También, y en contraste con el caso de ^{13}C , estos errores tienen una magnitud de entre 0.01 y 0.02 ppm, los que son notablemente menores que las diferencias experimentales observadas entre hidrógenos equivalentes de ambos diastereoisómeros (0.6 ppm aprox.).

Es interesante también reconocer que los corrimientos químicos teóricos predicen de muy buena forma las diferencias experimentales en los corrimientos químicos de hidrógenos equivalentes. Por ejemplo, se encuentra que los hidrógenos geminales a OH en el biciclo (H-6) muestran experimentalmente una diferencia de 0.61 ppm, mientras que los cálculos predicen una diferencia de 0.58 ppm, cuando se utiliza el nivel de teoría GIAO/DFT-B3LYP/6-311G++(d,p). En todos los casos, estas diferencias están de acuerdo con una conformación en donde los hidrógenos y carbonos en las posiciones C-6, C-5 y C4 para (3*R*,6*R*)-**14** y C-7, C-1 y C-2 para

(3S,6S)-**14** del anillo del tropano se ven afectados por el efecto anisotrópico del grupo fenilo, como se observa en todos los conformeros de baja energía de ambos isómeros (figuras 8 y 9).

3.7. Exploración de la reactividad diferencial para la esterificación selectiva de los hidroxilos presentes en (3S,6S)-(-)-6 β -hidroxihiosciamina

Con el objetivo de conocer la reactividad diferencial de los dos hidroxilos presentes en **14** para la esterificación, se realizaron reacciones de acetilación bajo diferentes condiciones de reacción. Como materia prima se utilizó (-)-**14** debido a sus características espectrales. En primer lugar, se realizó la reacción de acetilación utilizando piridina como disolvente y anhídrido acético en exceso como agente acetilante. La reacción se realizó durante 14 h bajo refrigeración (2 – 3 °C). El espectro de ¹HRMN de la mezcla de reacción, una vez terminada añadiendo agua destilada, ajustando el pH a 10, extrayendo los productos 10 veces con CHCl₃ y eliminando los disolventes con un flujo de N₂, se muestra en el espectro 25.

Como se puede apreciar, existen diversos cambios entre el espectro de la mezcla de reacción y el de la materia prima. En primer lugar, se puede observar un aumento en el corrimiento químico de la señal de H-6 desde 4.36 hacia 5.30 ppm. Asimismo, se produjo un aumento en el corrimiento químico de las señales de los hidrógenos H-2'a y H-2'b desde 3.78 a 4.35 ppm y 4.15 a 4.62 ppm, respectivamente.

Adicionalmente, se puede apreciar la aparición de dos señales simples prácticamente juntas en 2.03 y 2.04 ppm, asignables a los grupos metilo de cada acetilo. Estas evidencias espectroscópicas muestran de manera clara la acetilación de ambos hidroxilos presentes en (-)-**14**, llevando a la formación de (3S,6S)-3 α -acetiltropoiloxi-6 β -acetoxitropano.

Por otra parte, se realizó una nueva reacción de acetilación bajo las mismas condiciones de disolvente y temperatura, pero disminuyendo la cantidad de anhídrido acético hasta una proporción de 1.5 mol de agente acetilante por mol de materia prima. Además, la reacción fue monitoreada a las 2 y 5 h de comenzada, tomando alícuotas y procesándolas como se describió anteriormente. Los espectros de $^1\text{HRMN}$ de las mezclas de reacción a 2 y 5 h de comenzada, se muestran en los espectros 26 y 27.

Como se puede apreciar en el primer caso, la reacción tiene sólo una pequeña evolución evidenciada por una ligera aparición de la señal en 4.62 ppm correspondiente a H-2'b, sugiriendo una acetilación mas rápida del hidroxilo del éster trópico por sobre el perteneciente al biciclo. Esto es confirmado cuando se analiza el espectro de $^1\text{HRMN}$ de la mezcla de reacción una vez pasadas 5 h de comenzada. En este caso, se puede ver una evidente diferencia de intensidad entre la señal de H-2'b en 4.62 ppm y la señal de H-6 en 5.30 ppm, ambas testigos de la acetilación en sus respectivos hidroxilos. Esta diferencia de intensidad es reflejada en las integrales de cada señal, donde se puede deducir que la proporción entre la acetilación del hidroxilo en C-2' y el hidroxilo en C-6 es de aproximadamente 3 veces.

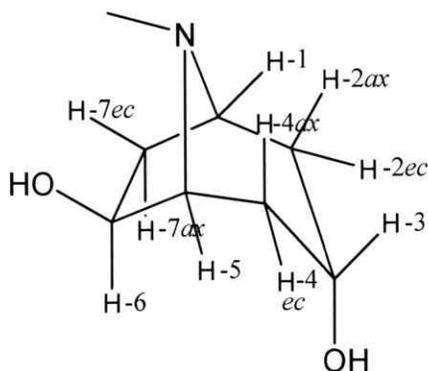
Se descubrió también que usando tanto cloruro de acetilo ($^1\text{HRMN}$, espectro 28) como anhídrido acético, con tiempos de reacción prolongados y proporciones grandes de los agentes acetilantes, se produce la esterificación en ambas posiciones, siendo la reacción con anhídrido acético en piridina la más limpia y de mayor rendimiento.

3.8. Preparación y análisis estructural mediante RMN del (3S,6S)-3 α ,6 β -tropanodiol

Con el objetivo de preparar (3S,6S)-3 α ,6 β -tropanodiol ((3S,6S)-5) a partir de (-)-14, se realizó la hidrólisis básica del segundo utilizando $\text{Ba}(\text{OH})_2$, obteniéndose además ácido trópico ($^1\text{HRMN}$, espectro 29). Posteriormente, se analizaron sus espectros de RMN ($^1\text{HRMN}$, espectro 30; $^{13}\text{CRMN}$, espectro 31; COSY, espectro 32; HSQC, espectro 33; NOESY, espectro 34) y se obtuvieron datos de rotación óptica e IR.

3.8.1. Análisis de los espectros de RMN de (3S,6S)-3 α ,6 β -tropanodiol

El espectro de $^1\text{HRMN}$ (3S,6S)-5 muestra once señales, las que en su conjunto corresponden a trece hidrógenos unidos a carbonos alifáticos. La multiplicidad y corrimiento químico característicos de las señales en 2.63, 3.92 y 4.80 ppm indican que éstas corresponden al grupo N-Me y a H-3 y H-6, respectivamente. Por otra parte, la señal en 3.92 ppm muestra en el espectro de COSY correlación con dos señales en 2.12 y 2.03 ppm. Como ha sido señalado anteriormente, la señal de H-3 tiende a mostrar correlación sólo con las señales de los hidrógenos con orientación *axial* en las



posiciones 2 y 4. Por lo anterior, las señales en 2.12 y 2.03 ppm pueden ser asignadas a H-4ax y H-2ax, respectivamente. Adicionalmente, la señal de H-4ax correlaciona con las señales en 1.80 y 3.17 ppm, las que por su evidente diferencia de corrimiento químico pueden ser asignadas como H-4ec y H-5, respectivamente. Asimismo, la señal de H-2ax se correlaciona con dos señales en 1.66 y 3.44 ppm, las que por las mismas razones pueden ser asignadas a H-6 y H-1, respectivamente. Por otra parte, la señal de H-1 muestra una correlación adicional con la señal en 2.00 ppm. Como ya se ha establecido, H-1 y H-5 sólo se correlacionan con los hidrógenos con orientación *ecuatorial* en las posiciones 6 y 7. Por lo tanto la señal en 2.00 ppm puede ser asignada a H-7ec. Como era de esperarse, la señal en 2.71 ppm se correlaciona con las señales debidas a H-6 y H-7ec, indicando que corresponde a H-7ax.

Finalmente, los espectros de HSQC y NOESY confirman todas las asignaciones anteriores y permiten la asignación del espectro de $^{13}\text{CRMN}$. Estas asignaciones se encuentran resumidas en la tabla 15.

Tabla 15. Asignación de las señales en los espectros de $^1\text{HRMN}$ y $^{13}\text{CRMN}$ de (3S,6S)-3 α ,6 β -tropanodiol ((3S,6S)-5).

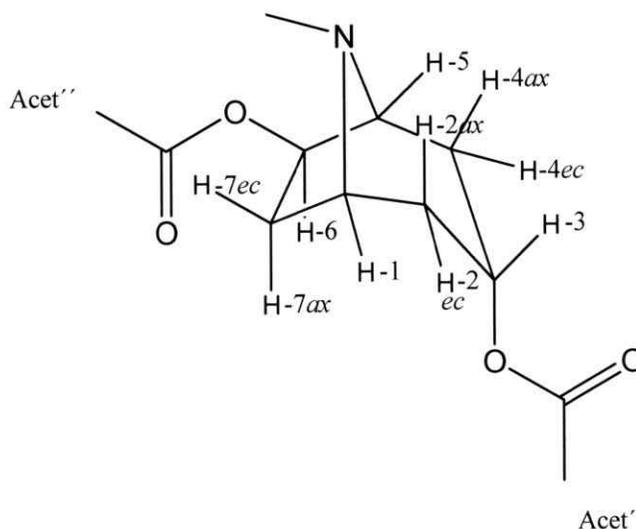
H	δ (ppm)	C	δ (ppm)
H-1	3.44	C-1	63.5
H-2ax	2.03	C-2	38.1
H-2ec	1.66	C-3	64.8
H-3	3.92	C-4	37.0
H-4ax	2.12	C-5	71.2
H-4ec	1.80	C-6	76.8
H-5	3.17	C-7	39.8
H-6	4.80	N-Me	41.1
H-7ec	2.00		
H-7ax	2.71		
N-Me	2.63		

3.9. Preparación y análisis estructural mediante RMN del (3S,6S)-3 α ,6 β -diacetoxitropano

Con el objetivo de obtener una muestra de un derivado diesterificado del (3S,6S)-3 α ,6 β -tropanodiol ((3S,6S)-5), se realizó la esterificación de este compuesto mediante su reacción con anhídrido acético. Posteriormente, se analizaron sus espectros de RMN ($^1\text{HRMN}$, espectro 35; $^{13}\text{CRMN}$, espectro 36; COSY, espectro 37; HSQC, espectro 38; HMBC, espectro 39; NOESY, espectro 40) y se obtuvieron datos de rotación óptica e IR.

3.9.1. Análisis de los espectros de RMN de (3S,6S)-3 α ,6 β -diacetoxitropano

El espectro de $^1\text{HRMN}$ (3S,6S)-3 α ,6 β -diacetoxitropano ((3S,6S)-**10**) muestra trece señales, las que en su conjunto corresponden a diecinueve hidrógenos unidos a carbonos alifáticos. Como ya ha sido señalado, la señal en 5.01 ppm, cuya integral corresponde a un hidrógeno, es característica de este tipo de compuestos, y corresponde a H-3. Esta señal muestra correlación en el espectro de COSY con las señales múltiples en 2.17 y 2.12 ppm, correspondientes a un hidrógeno cada una. Tomando en cuenta que este átomo tiende a correlacionarse principalmente con los hidrógenos *axiales*, por sobre las señales de hidrógenos con orientación *ecuatorial*, debido a sus ángulos diedros, es posible asignar las señales en 2.12 y 2.17 ppm como H-2 ax y H-4 ax , respectivamente. Por otra parte, las señales correspondientes a H-2 ax y H-4 ax muestran correlación con las señales en 3.30 y 3.14 ppm respectivamente, por lo que pueden ser asignadas como H-1 y H-5 respectivamente. Además, ambas señales asignadas a H-1 y H-2 ax se correlacionan con la señal en 1.56 ppm, así como también ambas señales asignadas a H-5 y H-2 ax se correlacionan con la señal en 1.77 ppm. Esto indica que las señales en 1.56 y 1.77 ppm corresponden a H-2 ec y H-4 ec respectivamente. Adicionalmente, la señal de H-1 se correlaciona con la señal en 2.08 ppm, la que se encuentra solapada con las señales simples en 2.07 y 2.05 ppm. Esto indica que esta señal corresponde a H-7 ec , ya que la señal de H-1 tiende a correlacionarse preferentemente con esta posición, que con H-7 ax . Consecuentemente, la señal en 5.42 ppm, asignable a H-6 debido a su corrimiento químico característico, muestra correlaciones con las señales en 2.08 ppm (solapada con la señal simple en 2.49 ppm) y 2.51 ppm, indicando que esta última corresponde a H-7 ax .



Finalmente, los espectros de HSQC, HMBC y NOESY confirman todas las asignaciones anteriores, permitiendo la asignación del espectro de $^{13}\text{CRMN}$. Adicionalmente, la señal simple en 2.49 ppm se correlaciona intensamente en el espectro HMBC con las señales en 64.9 y 58.8 ppm del espectro de $^{13}\text{CRMN}$, ambas asignables a C-5 y C-1 respectivamente en el espectro de HSQC. Esto indica que esta señal simple corresponde a los hidrógenos del grupo N-Me. Por otra parte, la señal de H-3 en 5.01 ppm muestra correlación en el espectro de HMBC con la señal en 170.1 ppm del espectro de $^{13}\text{CRMN}$, indicando que esta última corresponde a la señal de Ccarb'. En consecuencia, la segunda señal de carbonilo en 171.0 ppm corresponde a Ccarb''. Además, las señales simples en 2.07 y 2.05 ppm muestran correlación en el espectro de HSQC con las señales de Ccarb' y Ccarb'' respectivamente, lo que permite asignar estas señales a los hidrógenos en los metilos Acet' y Acet'' respectivamente. Estas asignaciones se encuentran resumidas en la tabla 16.

Tabla 16. Asignación de las señales en los espectros de ^1H RMN y ^{13}C RMN de (3*S*,6*S*)-3 α ,6 β -diacetoxitropano ((3*S*,6*S*)-**10**).

H	δ (ppm)	C	δ (ppm)
H-1	3.30	C-1	58.9
H-2ax	2.12	C-2	32.4
H-2ec	1.56	C-3	67.0
H-3	5.01	C-4	30.8
H-4ax	2.17	C-5	64.9
H-4ec	1.77	C-6	79.0
H-5	3.14	C-7	36.3
H-6	5.42	N-Me	38.2
H-7ec	2.08	Acet'	21.6
H-7ax	2.51	Acet''	21.4
N-Me	2.49	Ccarb'	170.1
Acet'	2.07	Ccarb''	171.0
Acet''	2.05		

CONCLUSIONES

La estereoquímica de un importante grupo de alcaloides del tropano ha permanecido en controversia o indefinida por casi 60 años. Durante el desarrollo de este trabajo, se intentó aportar a esta área de la fitoquímica mediante la preparación y determinación estructural y estereoquímica de algunos de estos alcaloides derivados del 3 α ,6 β -tropanodiol (**5**). Con este propósito se realizó la hidrogenólisis del alcaloide comercialmente disponible (-)-escopolamina (**2**), lo que llevó a la obtención de una mezcla de ambos diastereoisómeros de la 6 β -hidroxihiosciamina ((3*R*,6*R*)-**14** y (3*S*,6*S*)-**14**) junto con (-)-hiosciamina (**3**). Esta reacción fue optimizada variando el tipo de catalizador utilizado encontrándose que con el catalizador Ni-Raney W-1, el rendimiento de la reacción fue de 75.6%, lo que corresponde a un aumento del 51% con respecto al rendimiento informado en la literatura usando el catalizador de Ni-Raney W-4. Posteriormente, se evaluó la separación de esta mezcla mediante cromatografía de pares iónicos sobre una fase estacionaria de gel de sílice C18, observándose que la fase móvil óptima fue una solución 85:15 de ácido 1-heptanosulfónico 10 mM en tampón ácido acético / acetato de sodio 0.1 M a pH 4. Aunque estas condiciones permitieron la separación de los tres componentes de la mezcla de alcaloides, esta sólo mostró un rendimiento del 10% debido a las dificultades en la recuperación de las muestras una vez terminada la cromatografía. Esto impidió que esta metodología fuese usada con el objetivo de obtener materia prima para reacciones que eventualmente llevasen a la preparación de otros derivados de **5**. Sin embargo las muestras obtenidas mostraron una alta pureza, por lo que fueron

usadas en su determinación estructural mediante espectroscopia de RMN y en la determinación de su configuración absoluta. Para esto, era necesario utilizar una metodología moderna e independiente que permitiese llegar a la configuración absoluta de (+)-**14** y (-)-**14** de forma definitiva y así disipar las dudas provocadas por trabajos anteriores.

Para este propósito la metodología elegida fue la espectroscopia de dicroísmo circular vibracional, debido a la gran utilidad que ésta ha mostrado en la determinación de la configuración de moléculas quirales. Esta técnica, en conjunto con cálculos mediante DFT, permitió conocer las preferencias conformacionales de ambos diastereoisómeros de **14**, observándose una marcada tendencia de ambas moléculas a la formación de puentes de hidrógeno intramoleculares. Estas interacciones se formaron entre el átomo de nitrógeno del grupo N-Me y el grupo hidroxilo en el anillo del tropano, y entre el grupo carbonilo y el grupo hidroxilo presentes en el éster trópico. La primera de éstas lleva a la preferencia del grupo N-Me para tener una orientación *axial*, en desmedro de la orientación *ecuatorial* que evita la formación de la interacción.

La comparación de los espectros de IR y DCV calculados de esta forma con los obtenidos experimentalmente, permitió finalmente la determinación de la configuración absoluta de estos diastereoisómeros, llegándose a la conclusión que al isómero (+) le corresponde la configuración (3*R*,6*R*) y al isómero (-) la configuración (3*S*,6*S*).

Por otra parte, al inicio de esta investigación se observó que los espectros de ¹HRMN y ¹³CRMN de (3*R*,6*R*)-**14** y (3*S*,6*S*)-**14** muestran importantes diferencias que no pueden ser explicadas de forma simple por sus diferencias estructurales. Esto junto

a la información obtenida anteriormente sobre sus preferencias conformacionales, llevó a la conclusión que tales diferencias debían ser generadas por el efecto anisotrópico del grupo fenilo posicionado en la parte inferior del biciclo del tropano. Adicionalmente, también se concluyó que estas diferencias podrían ser de utilidad para discriminar entre ambos diastereoisómeros, y por tanto determinar su configuración absoluta. Por esto, se decidió utilizar la predicción de corrimientos químicos mediante la técnica GIAO. El uso de esta metodología mostró que los corrimientos químicos calculados para ^{13}C presentan una buena correlación con sus pares experimentales, pero los valores de desviación cuadrática media (rms) entre éstos mostraron ser mayores que las diferencias observadas entre los espectros experimentales de cada diastereoisómero. Estos resultados indican que esta técnica no es lo suficientemente precisa para distinguir los corrimientos de ^{13}C cuyas diferencias son muy pequeñas. Sin embargo, los resultados obtenidos para ^1H mostraron valores de desviación cuadrática media (rms) de entre 0.014 y 0.026 ppm. Esta desviación sufrió un aumento de 622 % cuando los corrimientos químicos teóricos del isómero (3*R*,6*R*) fueron comparados con los experimentales del isómero (-). Consecuentemente, cuando los corrimientos químicos teóricos del isómero (3*S*,6*S*) fueron comparados con los experimentales del isómero (+) el valor de desviación cuadrática media experimentó un aumento del 402 %. De estos resultados se pudo concluir que la técnica es capaz de diferenciar ambos diastereoisómeros, corroborando la asignación previamente determinada por DCV y por tanto confirmando las bases conformacionales detrás de las diferencias observadas.

Como fue explicado anteriormente, la metodología cromatográfica de pares iónicos no permitió la separación de cantidades suficientes como para ser utilizadas en

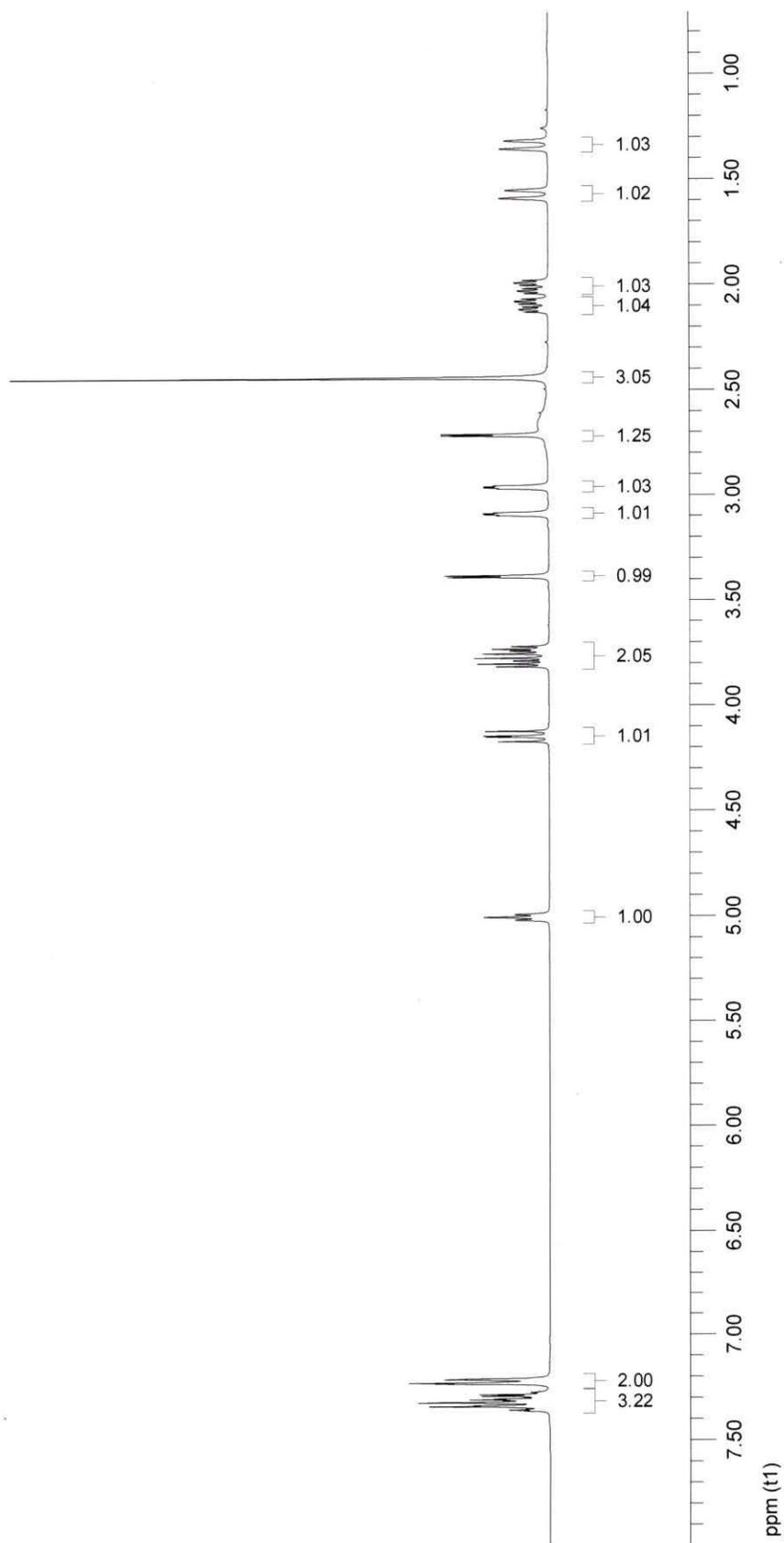
reacciones posteriores. Por esto se decidió realizar la separación de la mezcla de hidrogenólisis utilizando la técnica de cristalizaciones fraccionadas. Para esto se recurrió a condiciones previamente descritas en donde se utilizaba el ácido (-)-O,O'-dibenzoil-L-tartárico como fuente de contraión en la formación de las sales.

Una vez realizadas estas cristalizaciones se pudo observar que los resultados publicados no se reprodujeron bajo las condiciones descritas. Entre estas discrepancias, particularmente importante fue la ausencia de un precipitado durante la ebullición en acetona de la mezcla de bromhidratos producidos por la hidrogenólisis catalítica de **2**. Este fenómeno puede deberse a la menor proporción de (-)-hiosciamina (**3**) presente en la mezcla de bromhidratos, impidiendo su cristalización bajo las condiciones descritas. Sin embargo, la misma cristalización a una menor temperatura llevó a la separación de una mezcla de bromhidratos de (3*R*,3*R*)-**14** y **3**. Por otra parte, de la mezcla obtenida de las aguas madres acetónicas fue posible separar O,O'-dibenzoil-L-tartrato de (3*S*,6*S*)-**14**.

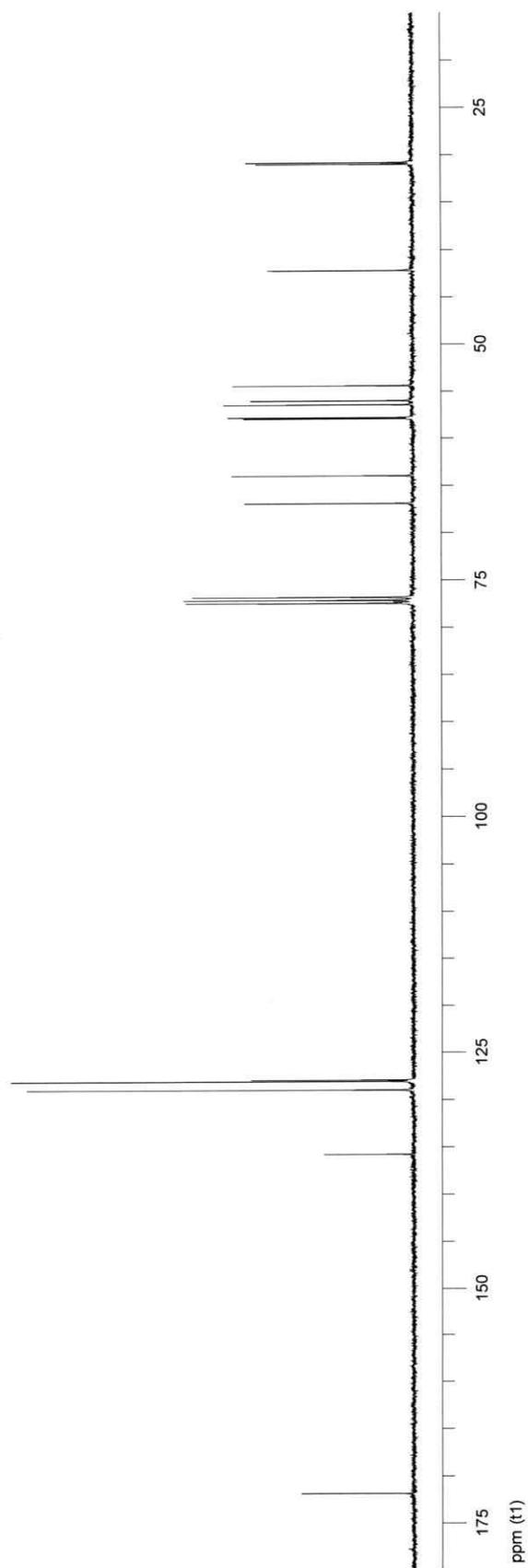
Como etapa final de esta investigación, se realizó la evaluación de diferentes vías de síntesis para la preparación de derivados de 3 α ,6 β -tropanodiol (**5**) enantioméricamente puros, utilizando ambos diastereoisómeros de **14** como materia prima. En una primera etapa se evaluó la posibilidad de realizar una esterificación regioselectiva del hidroxilo en C-6 evitando la esterificación del hidroxilo en C-3'. De las experiencias realizadas se pudo determinar que la posición en C-3' es alrededor de tres veces más susceptible a la esterificación que la posición en C-6, descartando esta vía de síntesis. Sin embargo, fue posible obtener (3*R*,6*R*)-3 α -acetiltropoiloxi-6 β -acetoxitropano.

Por otra parte, se realizó también la hidrólisis en medio básico de (3*R*,6*R*)-**14**, con la consecuente producción de (3*R*,6*R*)-**5** y ácido trópico, el primero obtenido como sulfato. Además, cuando el mismo proceso se utilizó con (3*S*,6*S*)-**14**, y el sulfato resultante fue liberado, se obtuvo (3*S*,6*S*)-**5**, que mostró rotación óptica levorotatoria. Este resultado confirma la configuración absoluta establecida para estos diastereoisómeros como (-)-(3*S*,6*S*)-**14** y (+)-(3*R*,6*R*)-**14**. Finalmente, se realizó la esterificación de (3*S*,6*S*)-**5** utilizando anhídrido acético en reflujo, produciendo (-)-(3*S*,6*S*)-3 α ,6 β -diacetiloxitropano (-)-(3*S*,6*S*)-**10**.

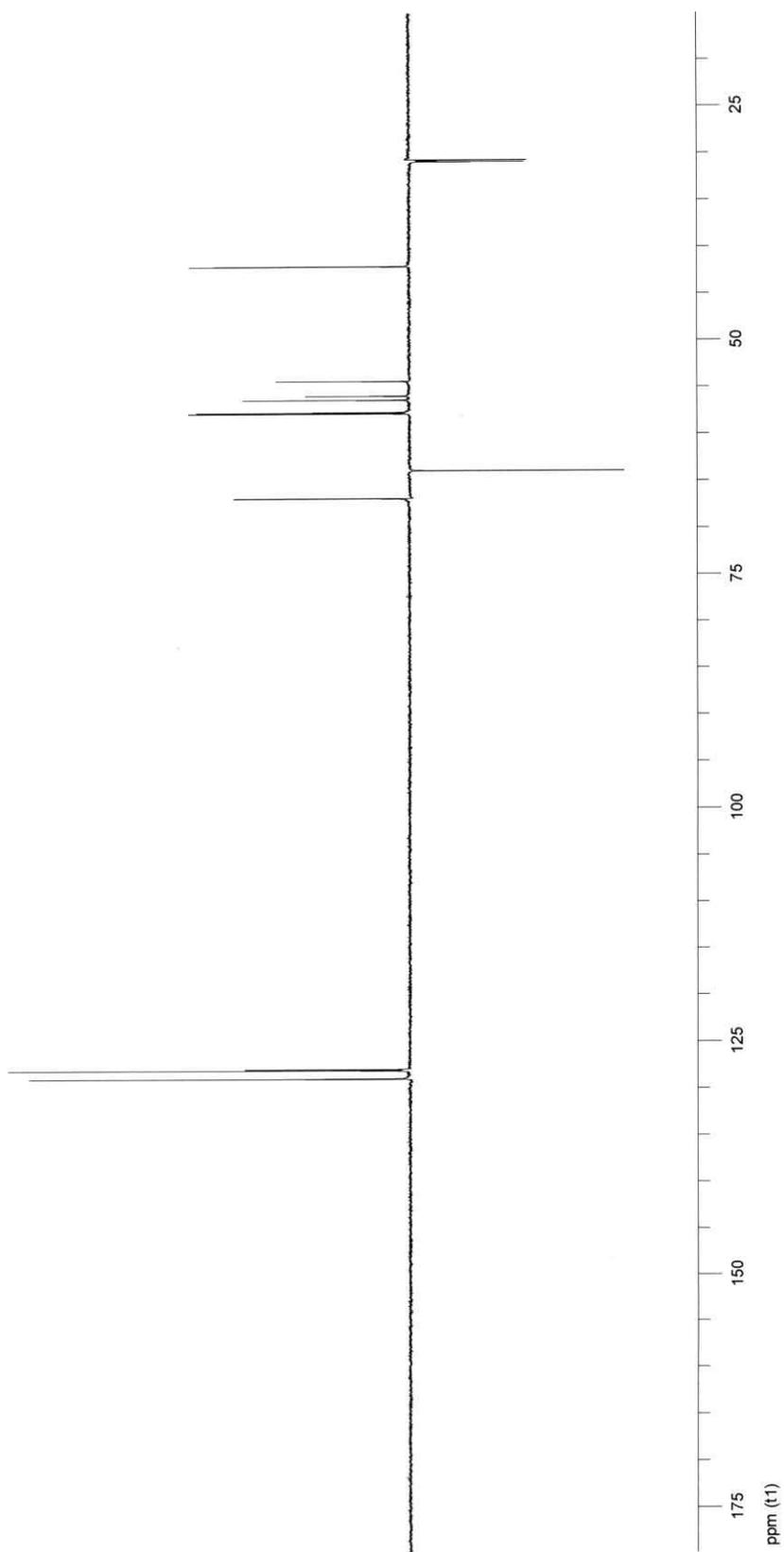
ESPECTROS



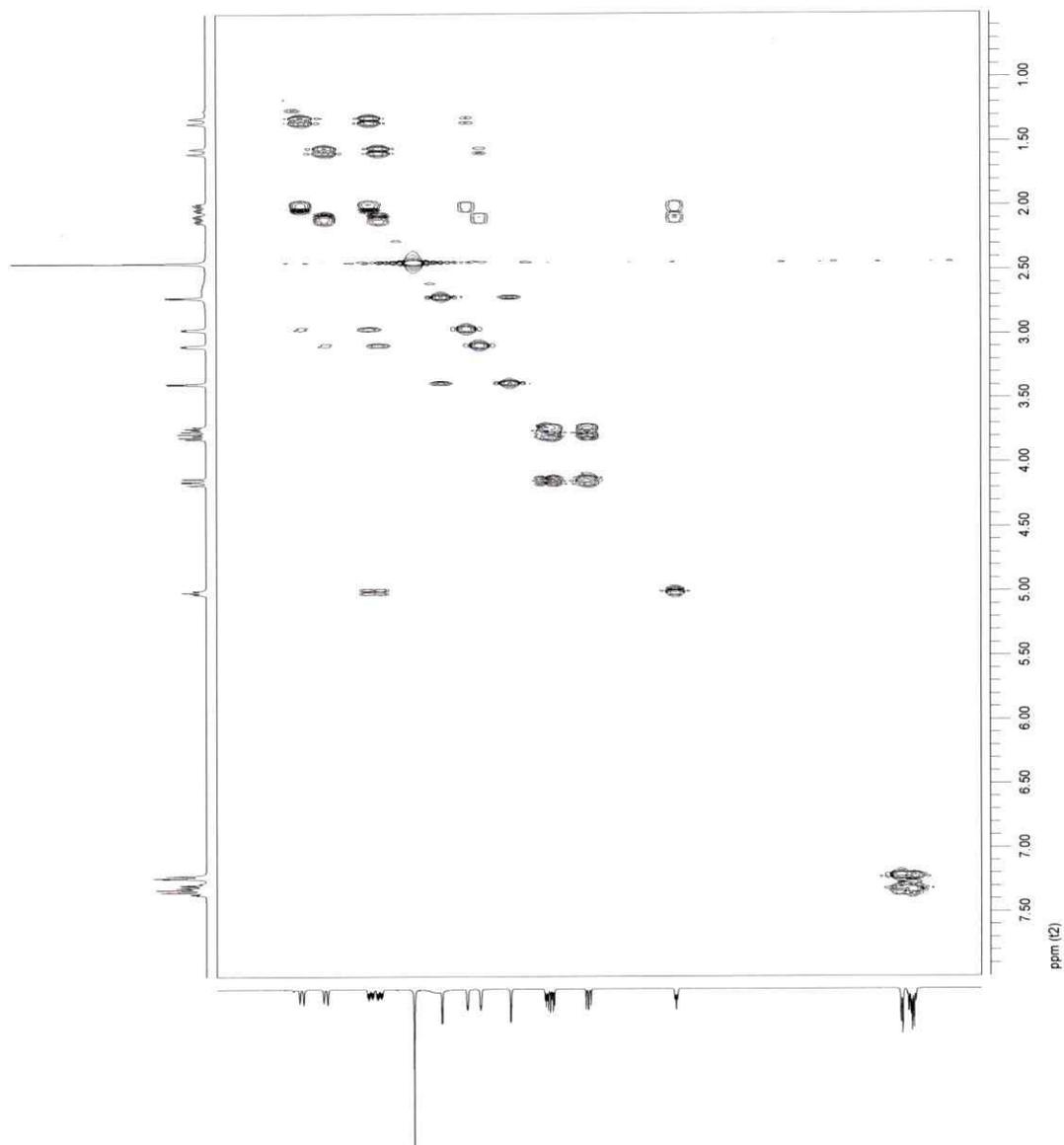
Espectro 1. Espectro de $^1\text{HRMN}$ de (-)-escopolamina (**2**) en CDCl_3 .



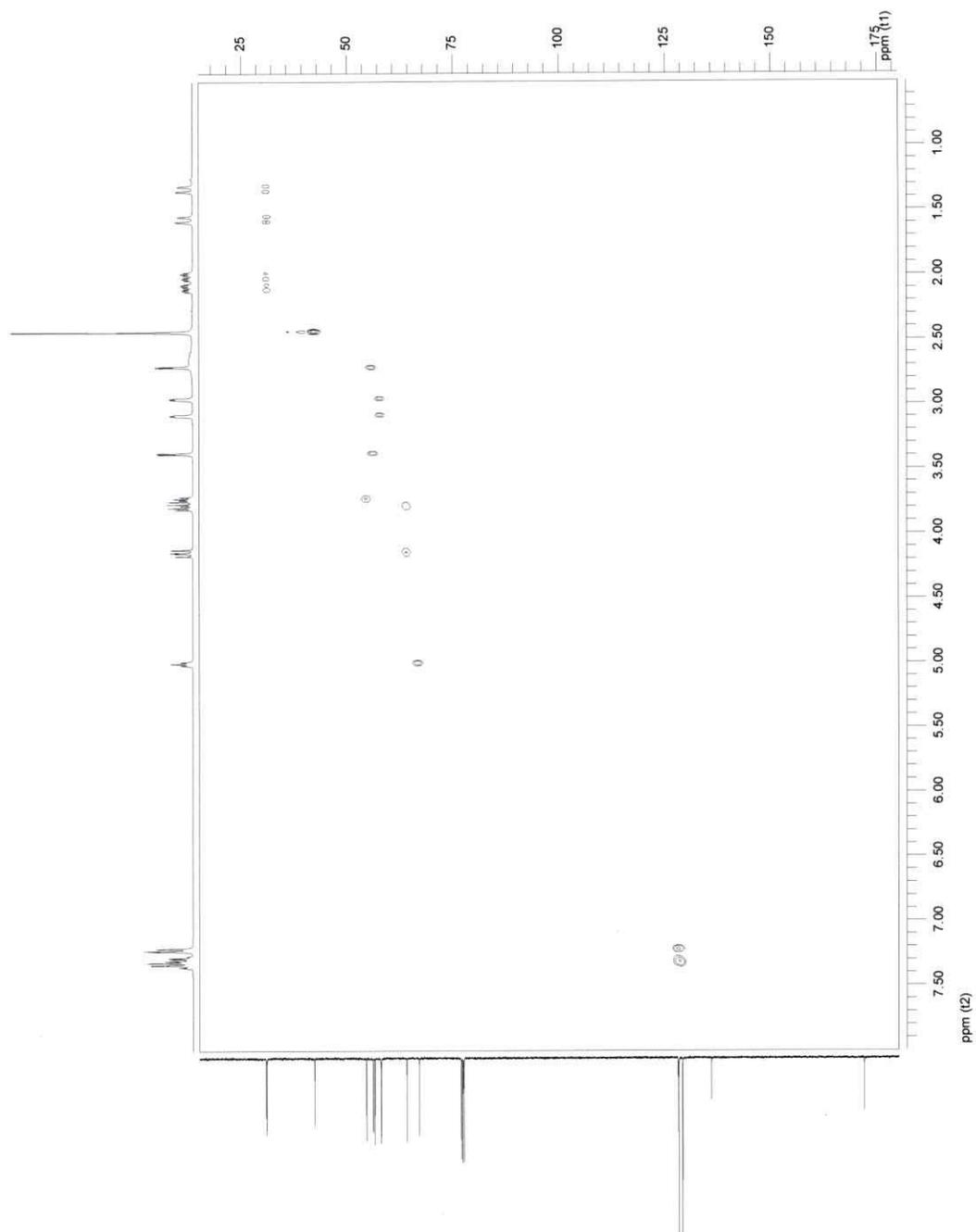
Espectro 2. Espectro de ^{13}C RMN de (-)-escopolamina (2) en CDCl_3 .



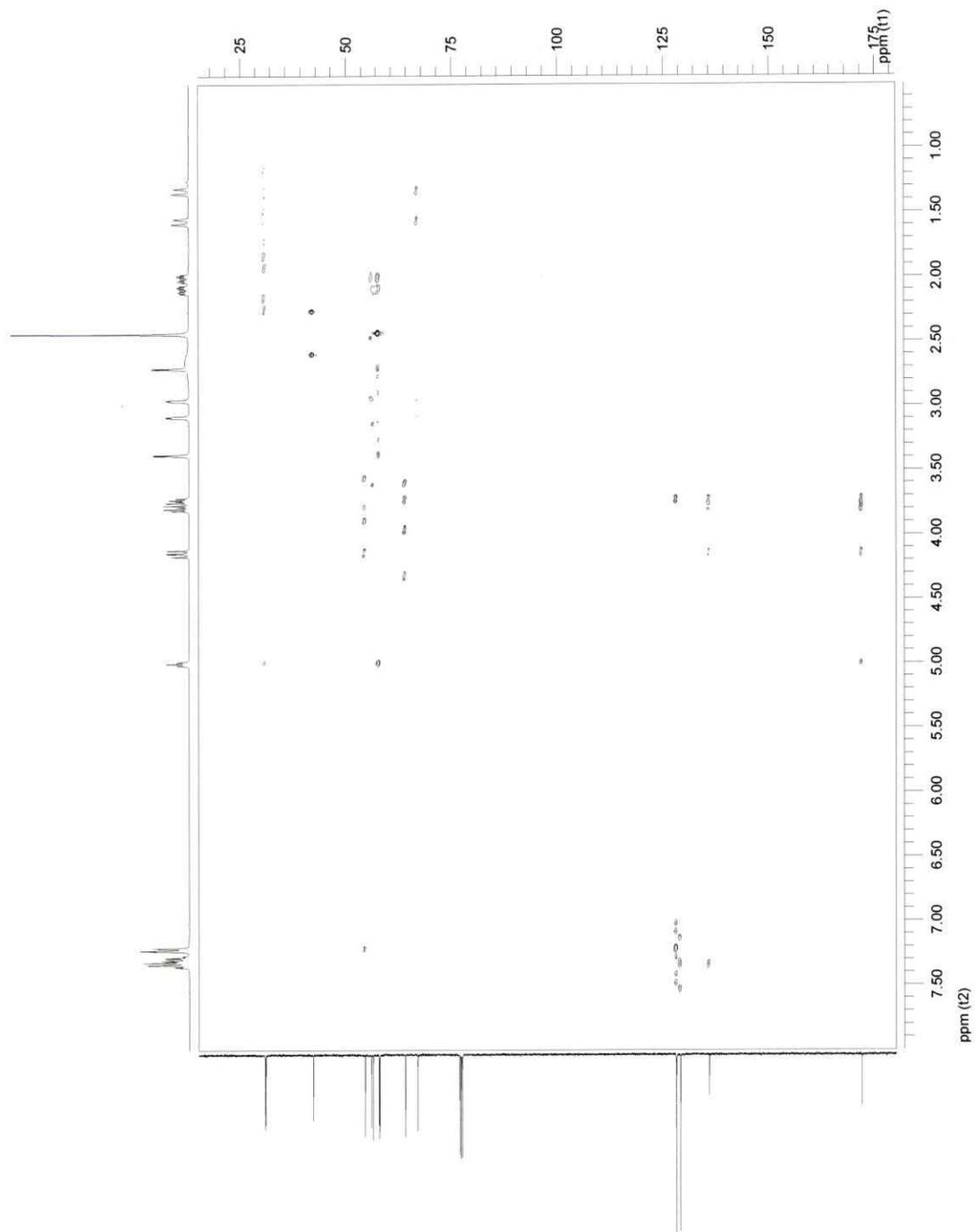
Espectro 3. Espectro de DEPT de (-)-escopolamina (2) en CDCl₃.



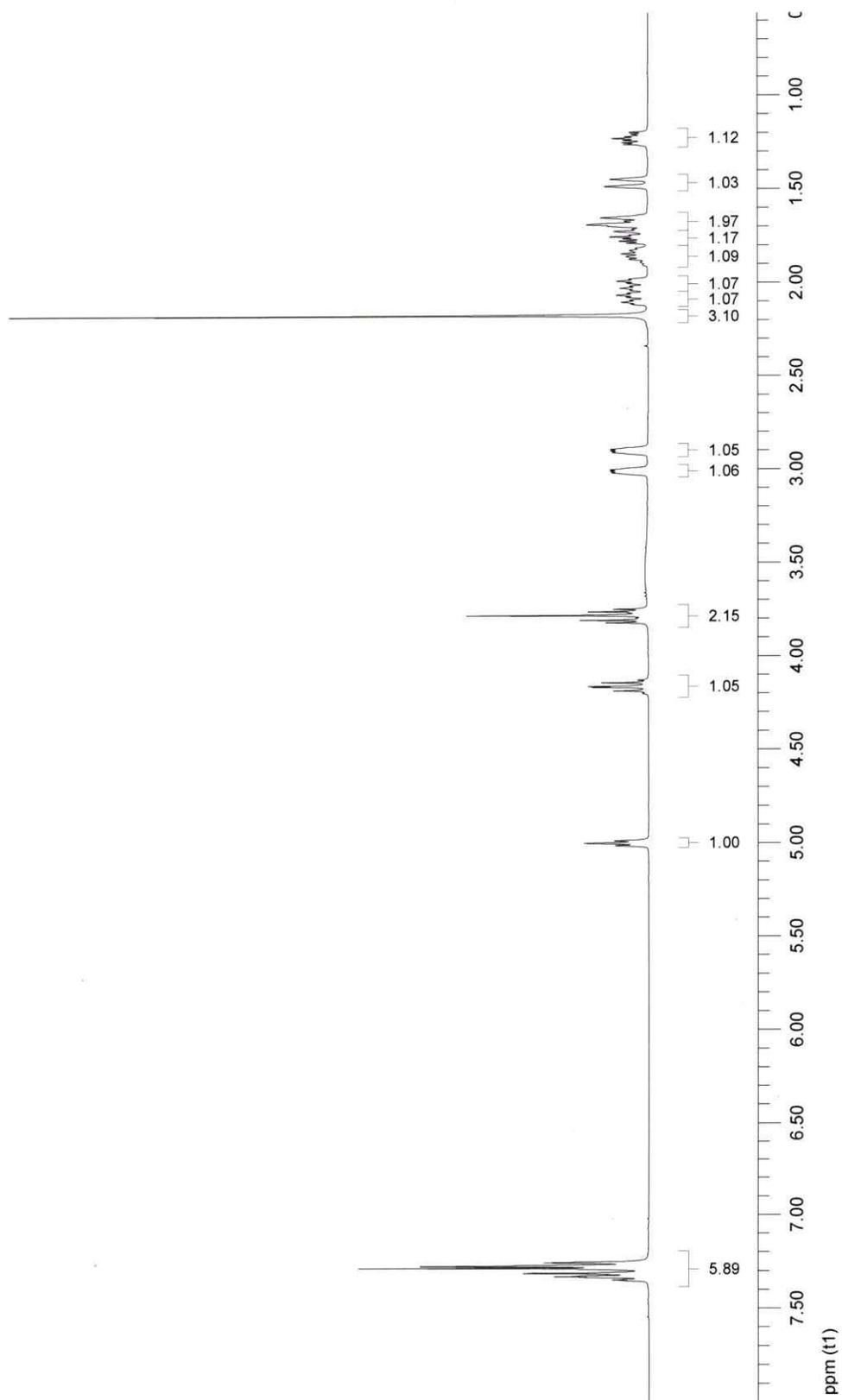
Espectro 4. Espectro de COSY de (-)-escopolamina (2) en CDCl₃.



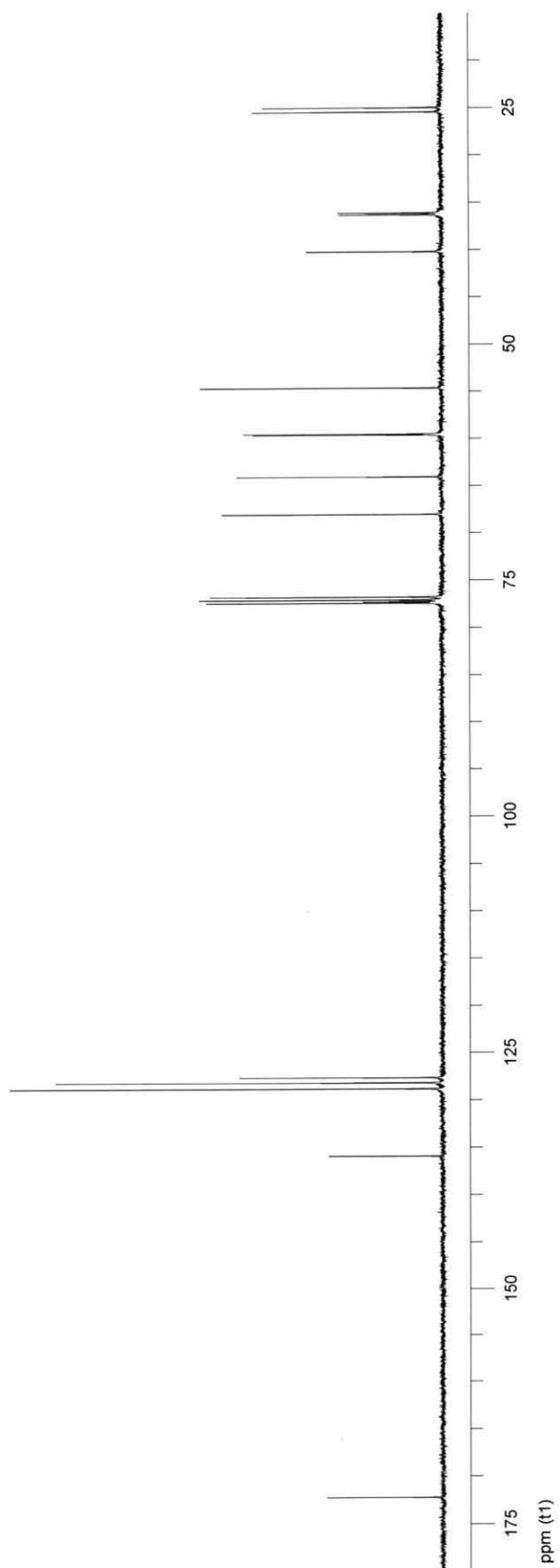
Espectro 5. Espectro de HSQC de (-)-escopolamina (**2**) en CDCl_3 .



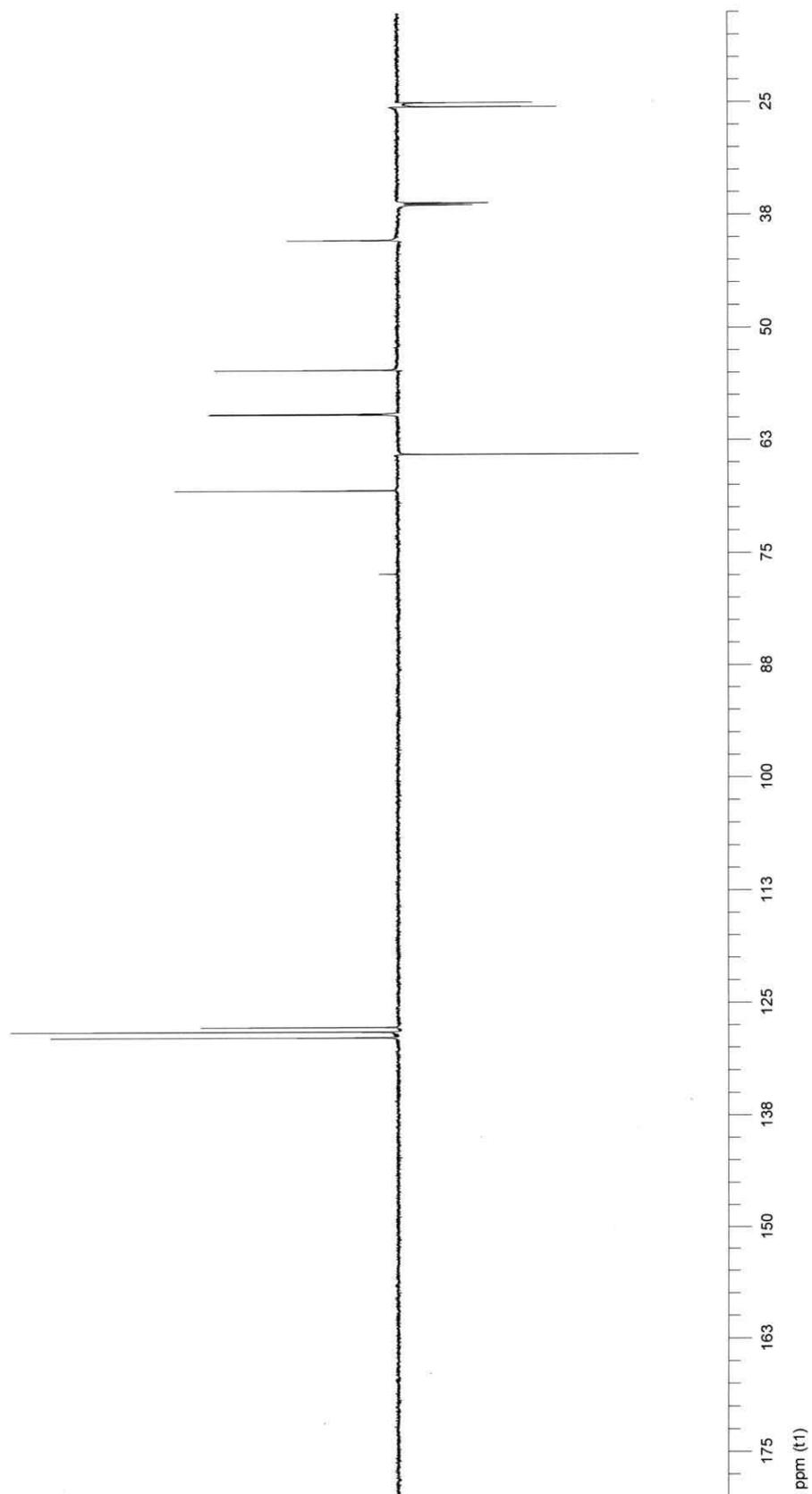
Espectro 6. Espectro de HMBC de (-)-escopolamina (2) en CDCl₃.



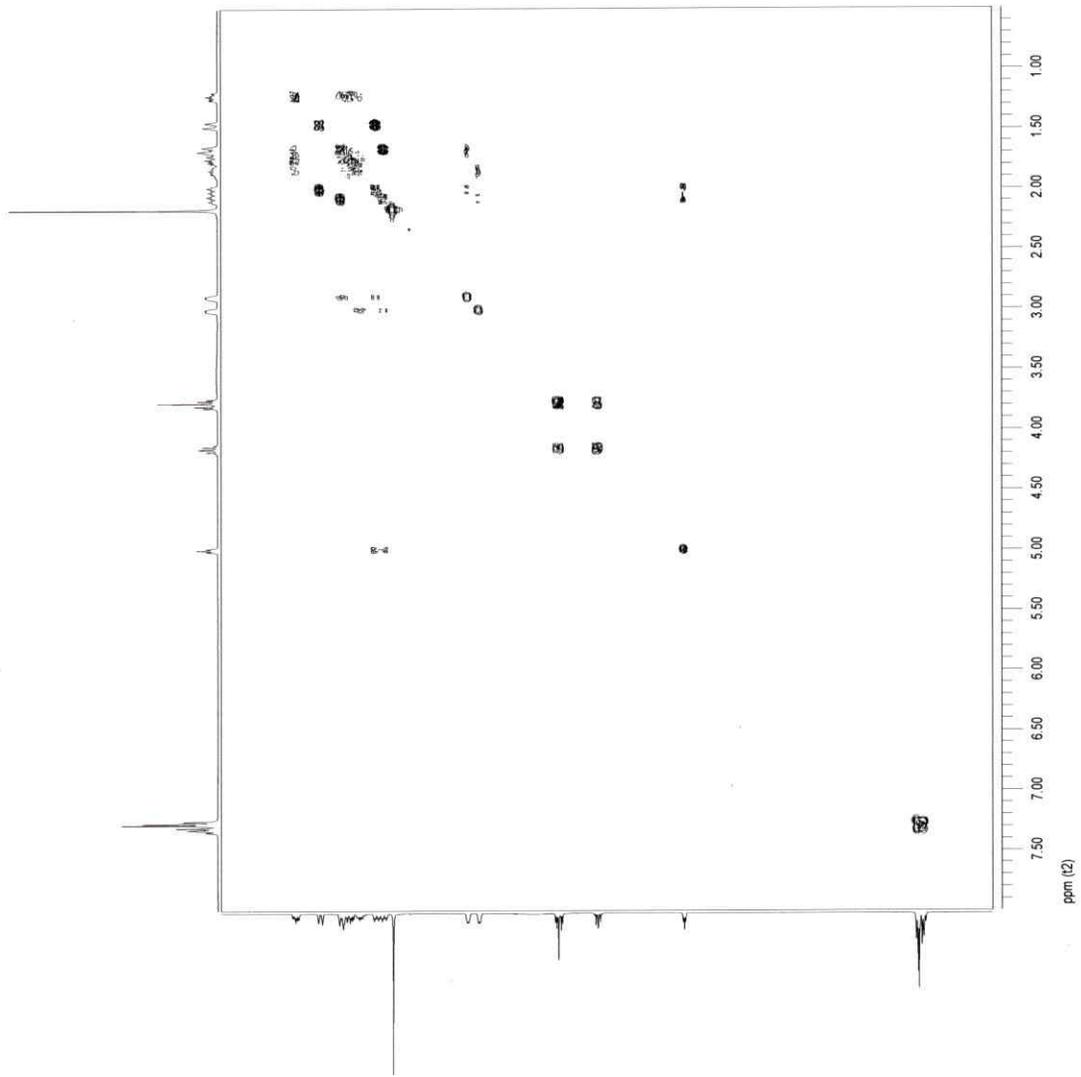
Espectro 7. Espectro de $^1\text{HRMN}$ de (-)-hiosciamina (3) en CDCl_3 .



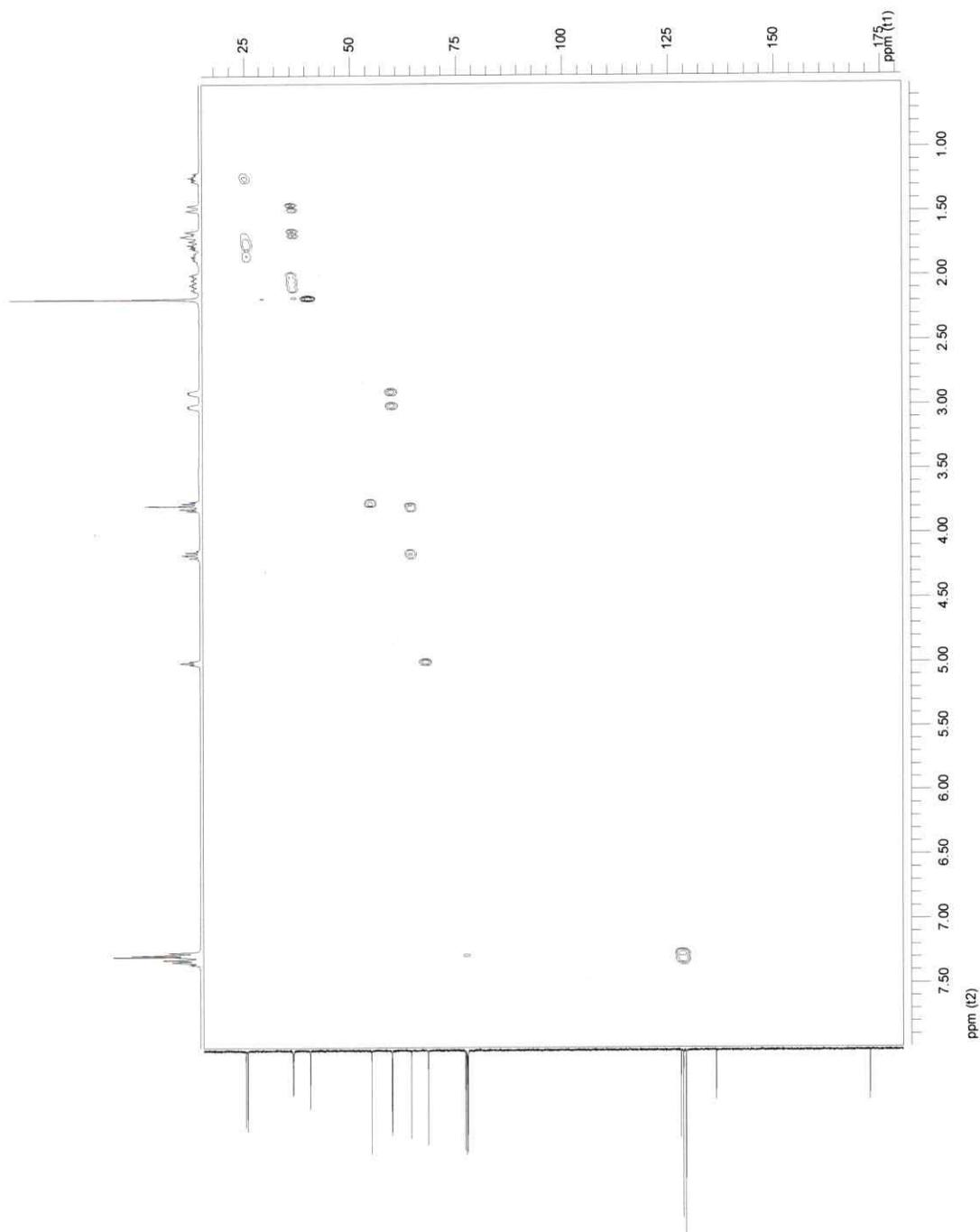
Espectro 8. Espectro de ^{13}C RMN de (-)-hiosciamina (3) en CDCl_3 .



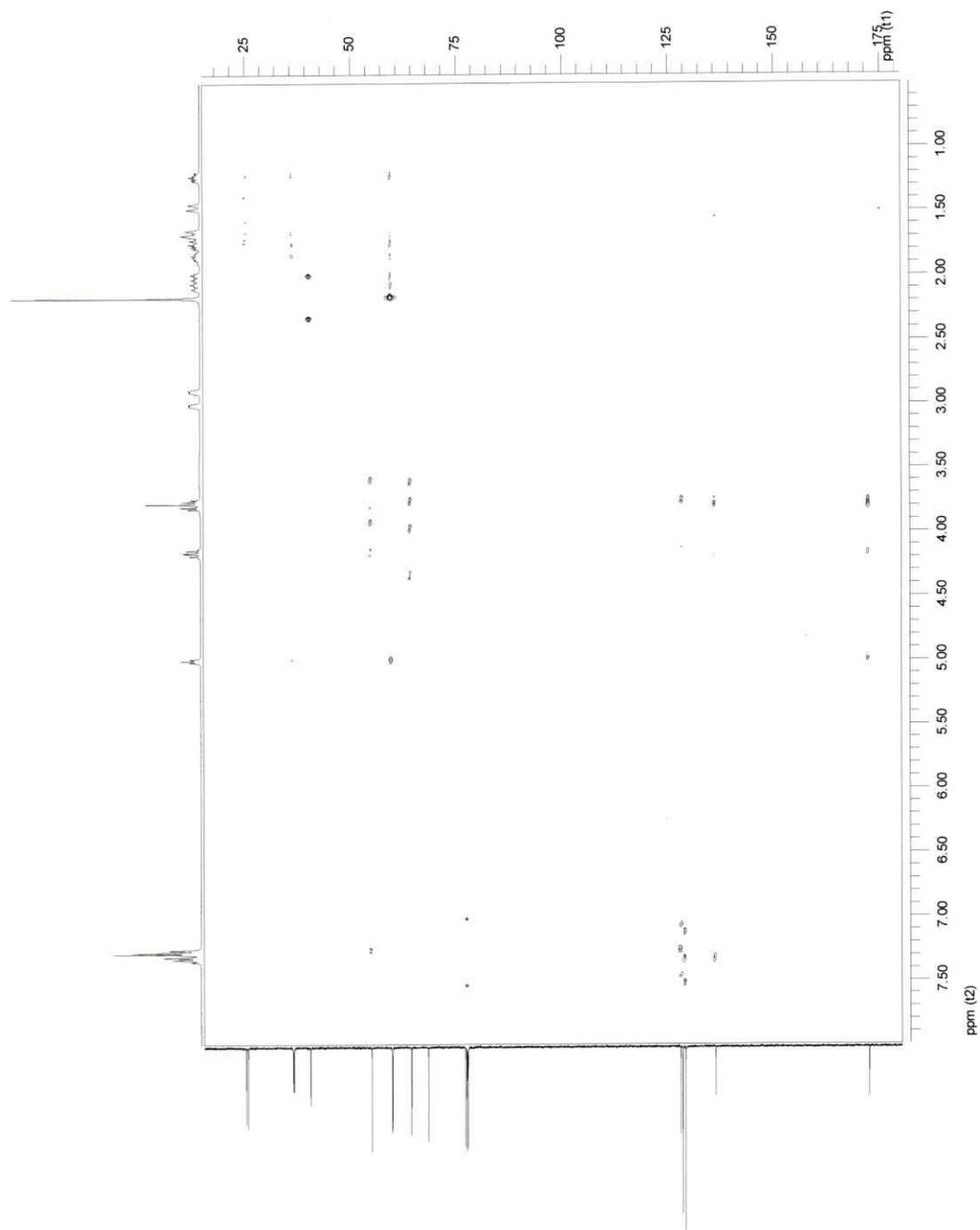
Espectro 9. Espectro de DEPT de (-)-hiosciamina (3) en CDCl₃.



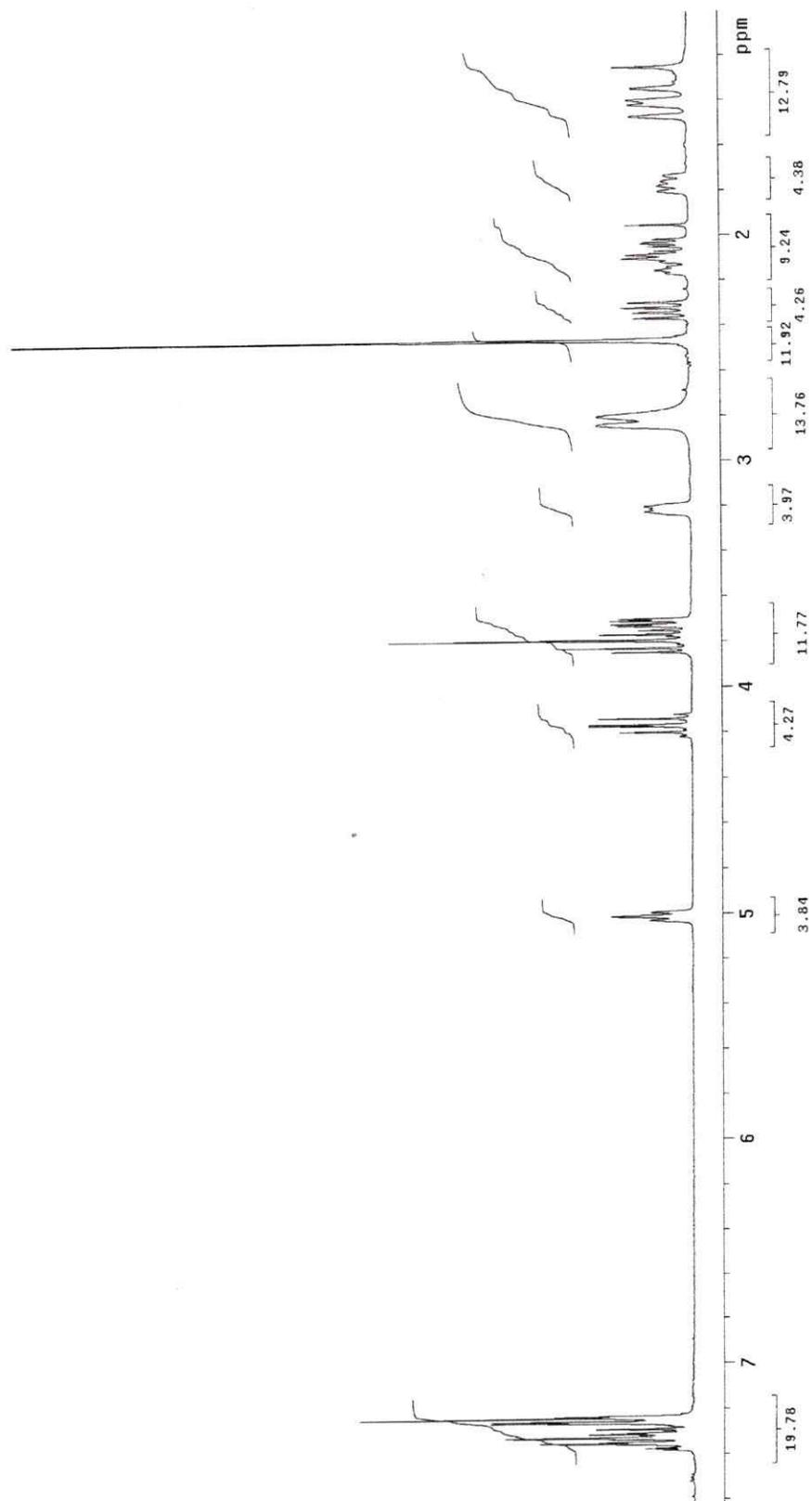
Espectro 10. Espectro de COSY de (-)-hiosciamina (3) en $CDCl_3$.



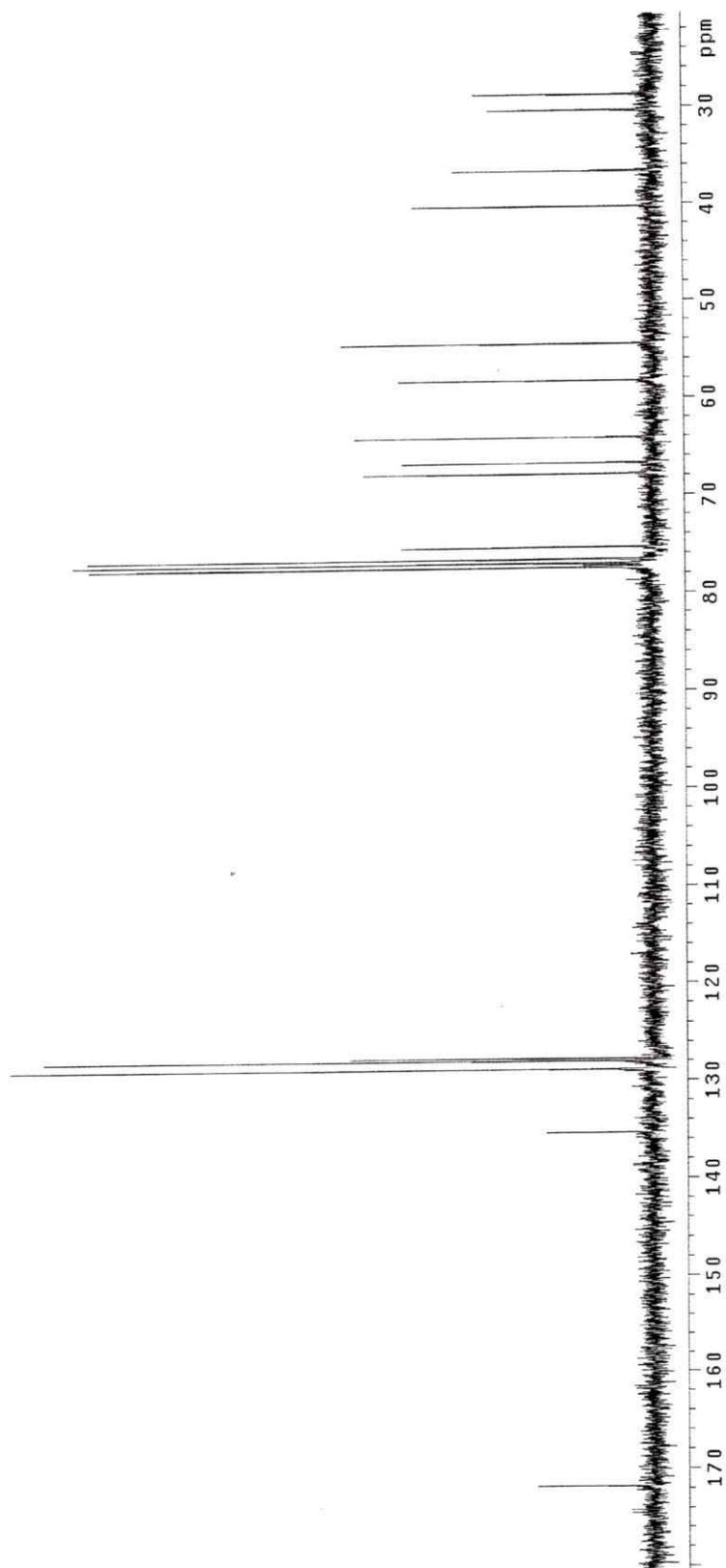
Espectro 11. Espectro de HSQC de (-)-hiosciamina (3) en CDCl_3 .



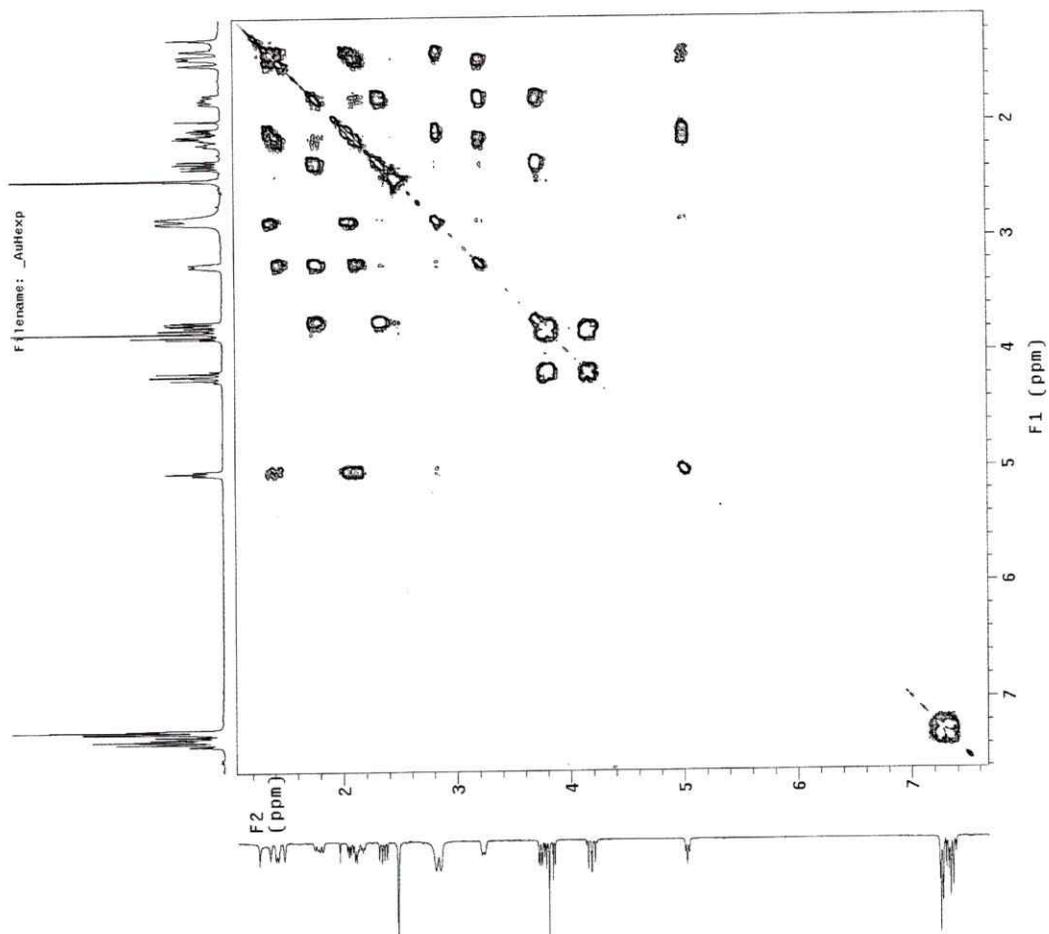
Espectro 12. Espectro de HMBC de (-)-hiosciamina (**3**) en CDCl_3 .



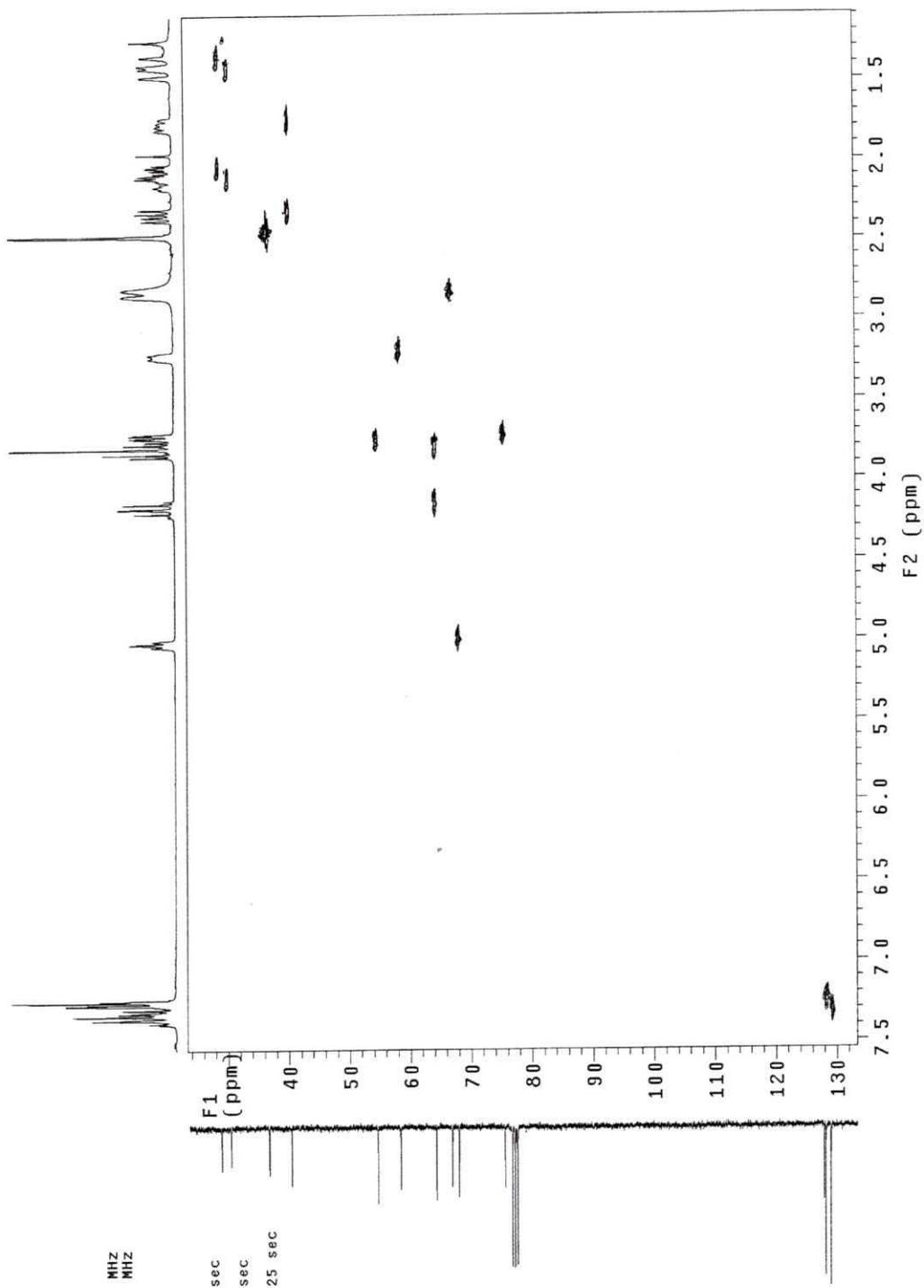
Espectro 13. Espectro de ¹HRMN de (3R,6R)-6β-hidroxihiosciamina ((3R,6R)-**14**) en CDCl₃.



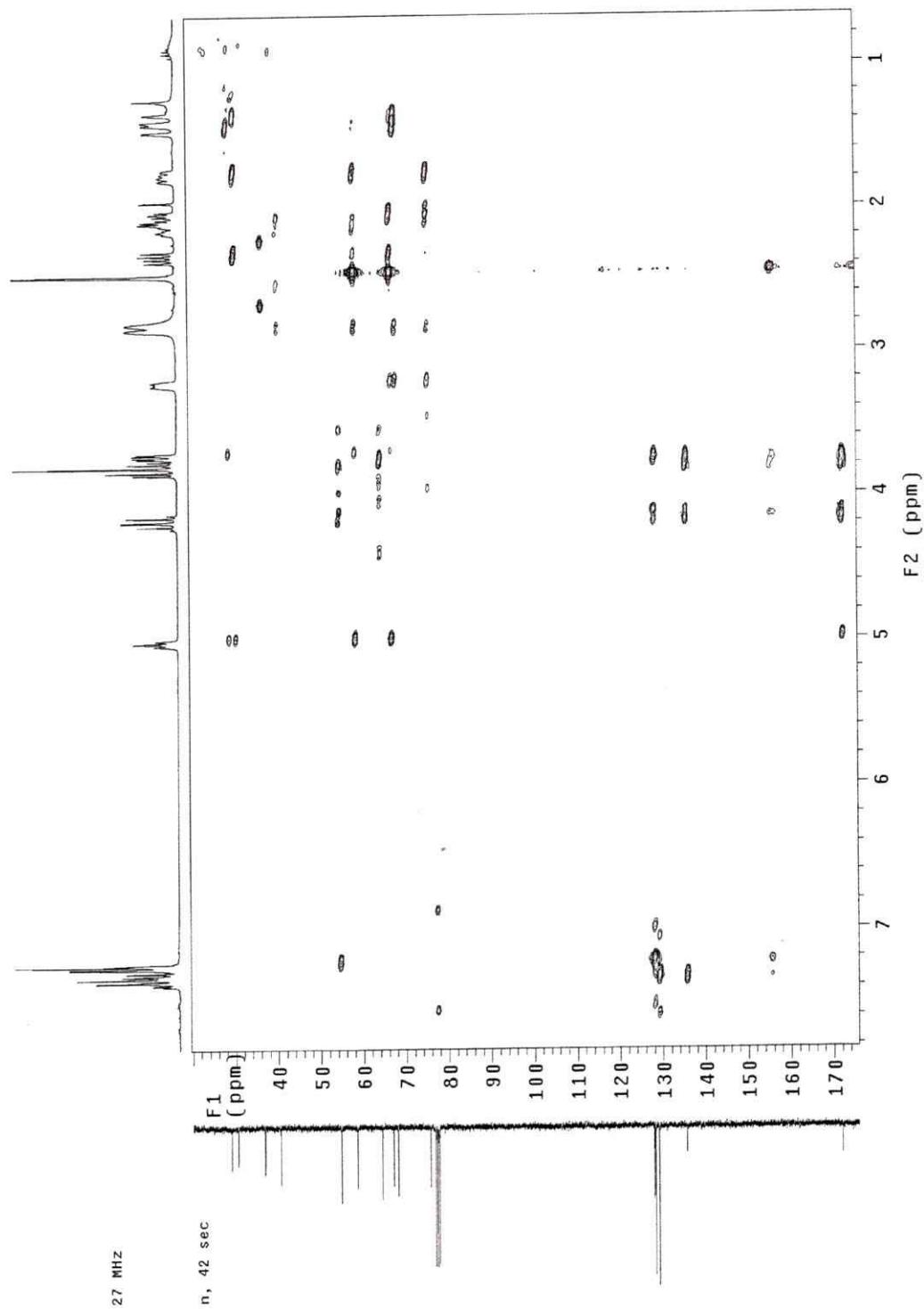
Espectro 14. Espectro de ^{13}C RMN de (3R,6R)-6 β -hidroxihiosciamina ((3R,6R)-14) en CDCl_3 .



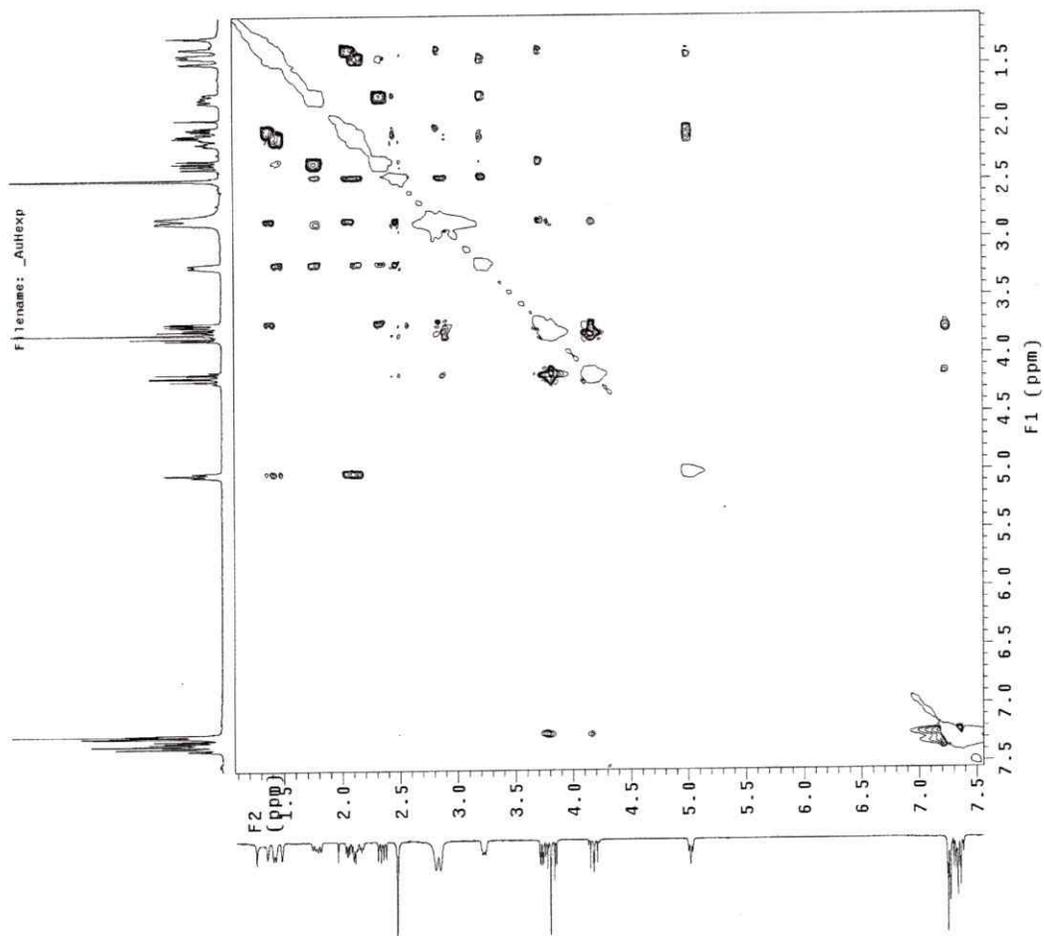
Espectro 15. Espectro de COSY de (3R,6R)-6 β -hidroxiosiamina ((3R,6R)-14) en CDCl₃.



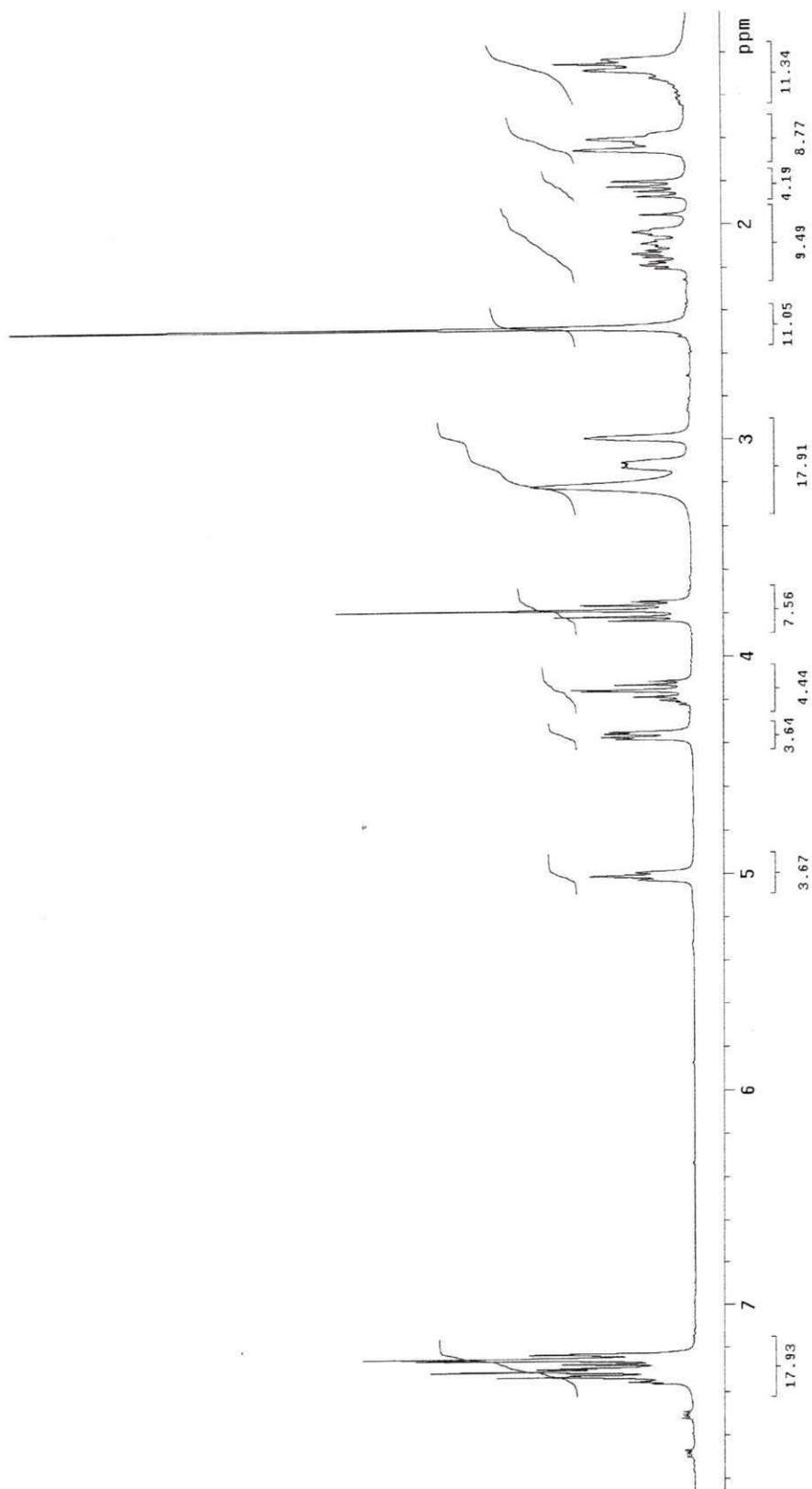
Espectro 16. Espectro de HSQC de (3R,6R)-6β-hidroxiiosiamina ((3R,6R)-14) en CDCl₃.



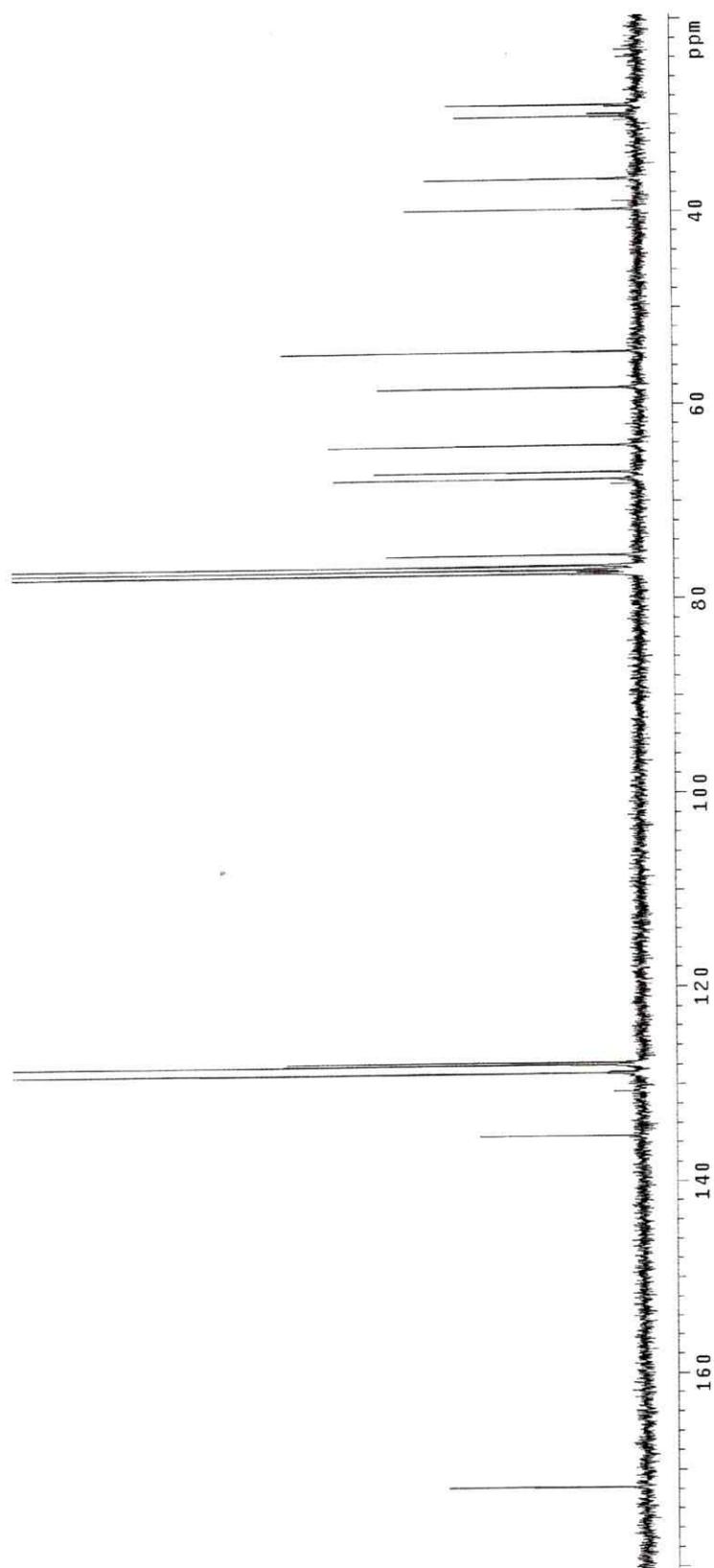
Espectro 17. Espectro de HMBC de (3R,6R)-6β-hidroxiiosciamina ((3R,6R)-14) en CDCl_3 .



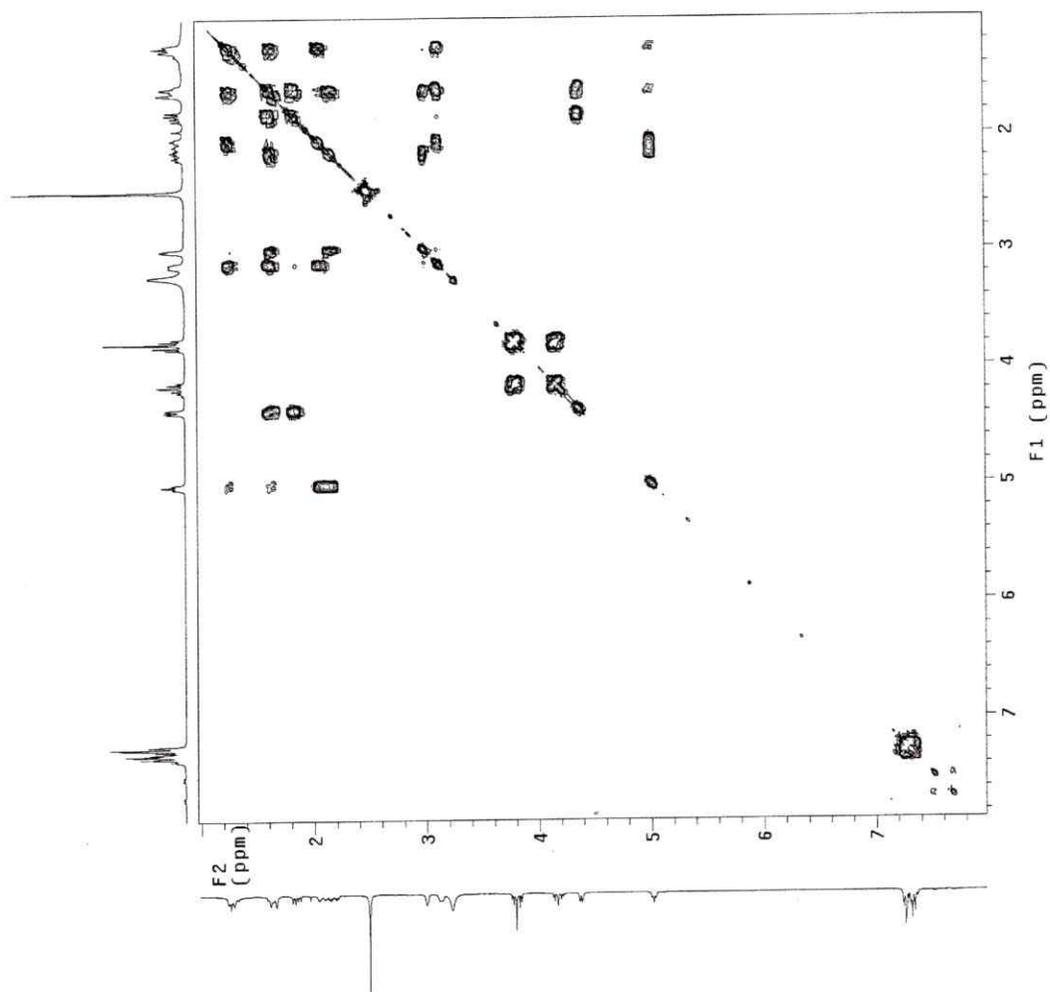
Espectro 18. Espectro de NOESY de (3R,6R)-6 β -hidroxihiosiamina ((3R,6R)-**14**) en CDCl₃.



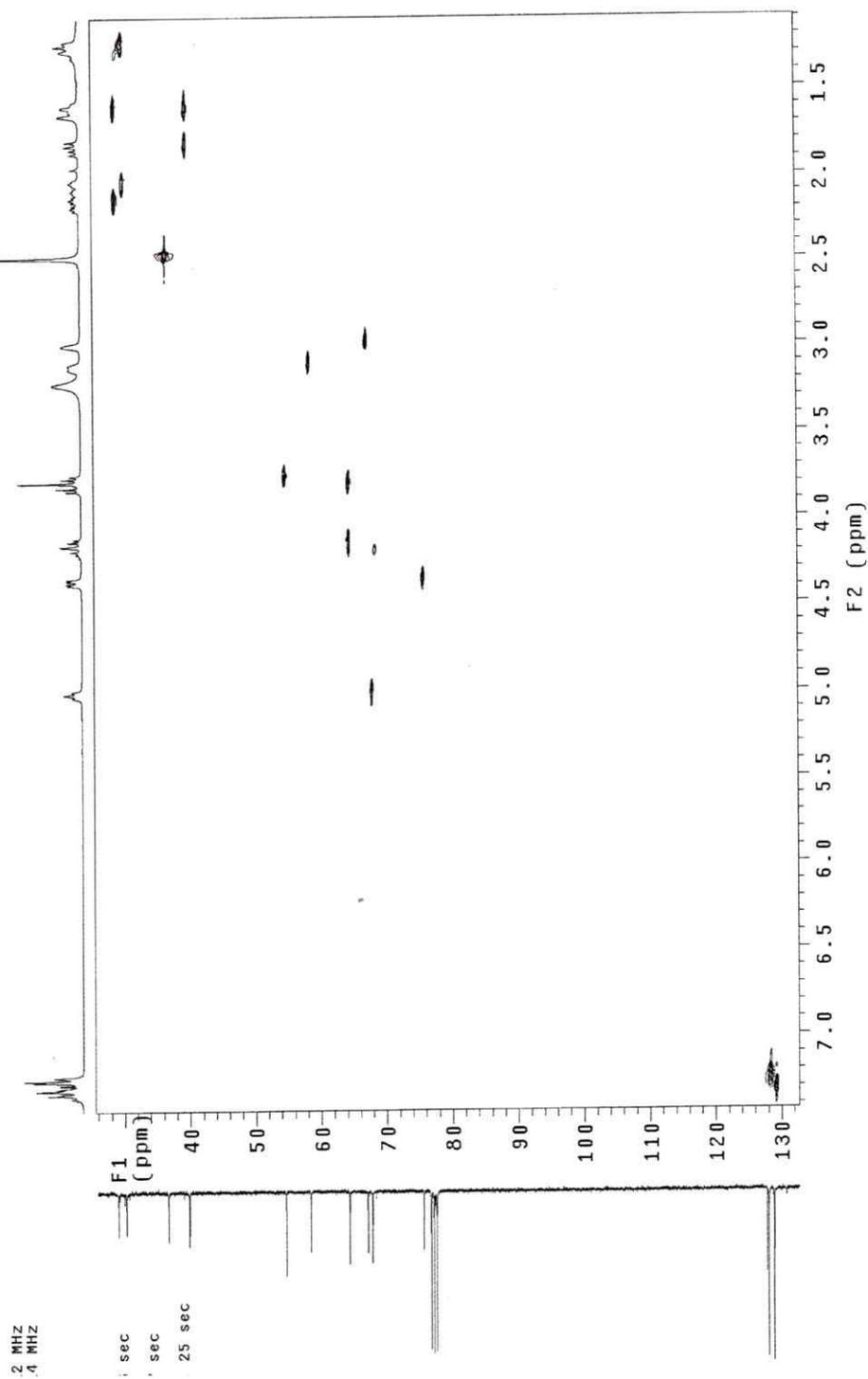
Espectro 19. Espectro de ¹HRMN de (3S,6S)-6β-hidroxiociamina ((3S,6S)-**14**) en CDCl₃.



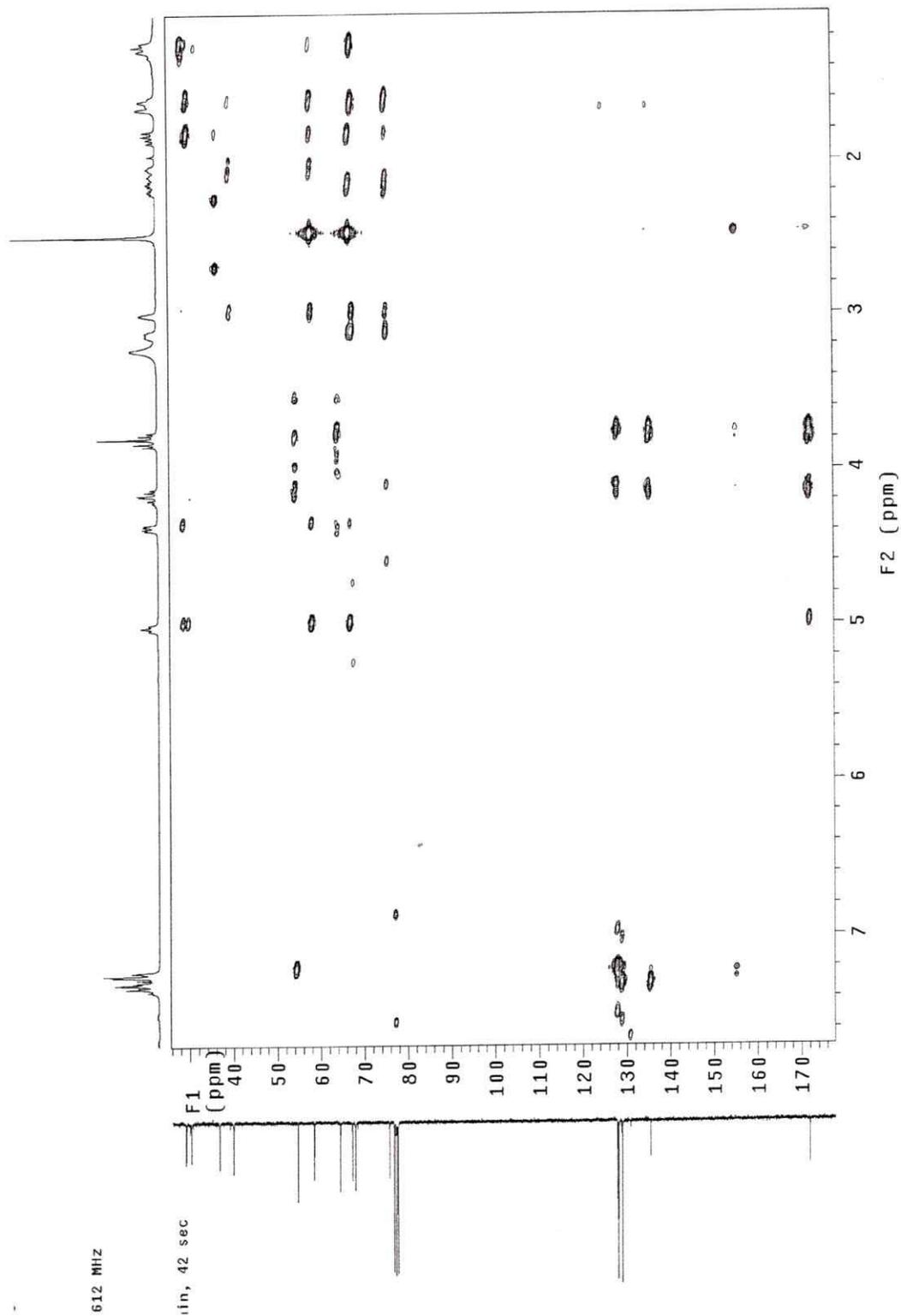
Espectro 20. Espectro de ^{13}C CRMN de (3S,6S)-6 β -hidroxihiosciamina ((3S,6S)-**14**) en CDCl_3 .



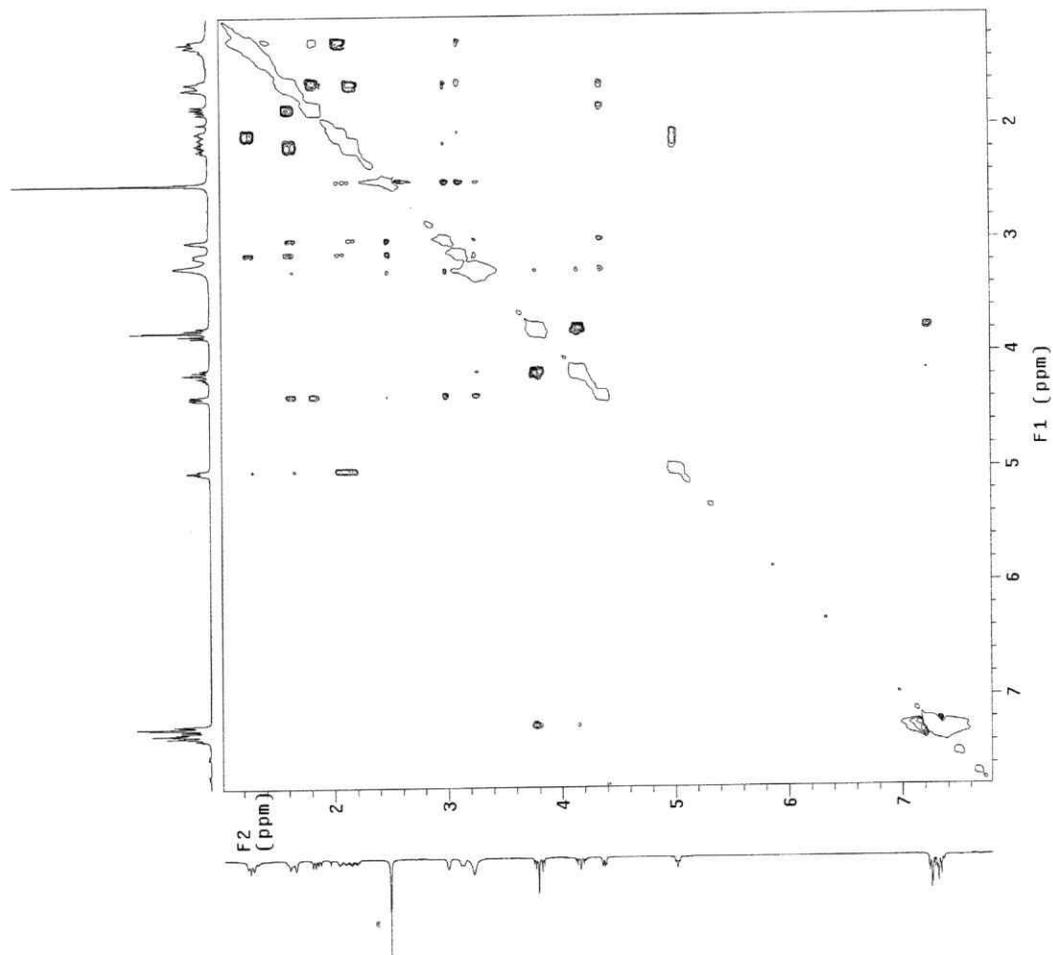
Espectro 21. Espectro de COSY de (3S,6S)-6 β -hidroxiosiamina ((3S,6S)-14) en CDCl_3 .



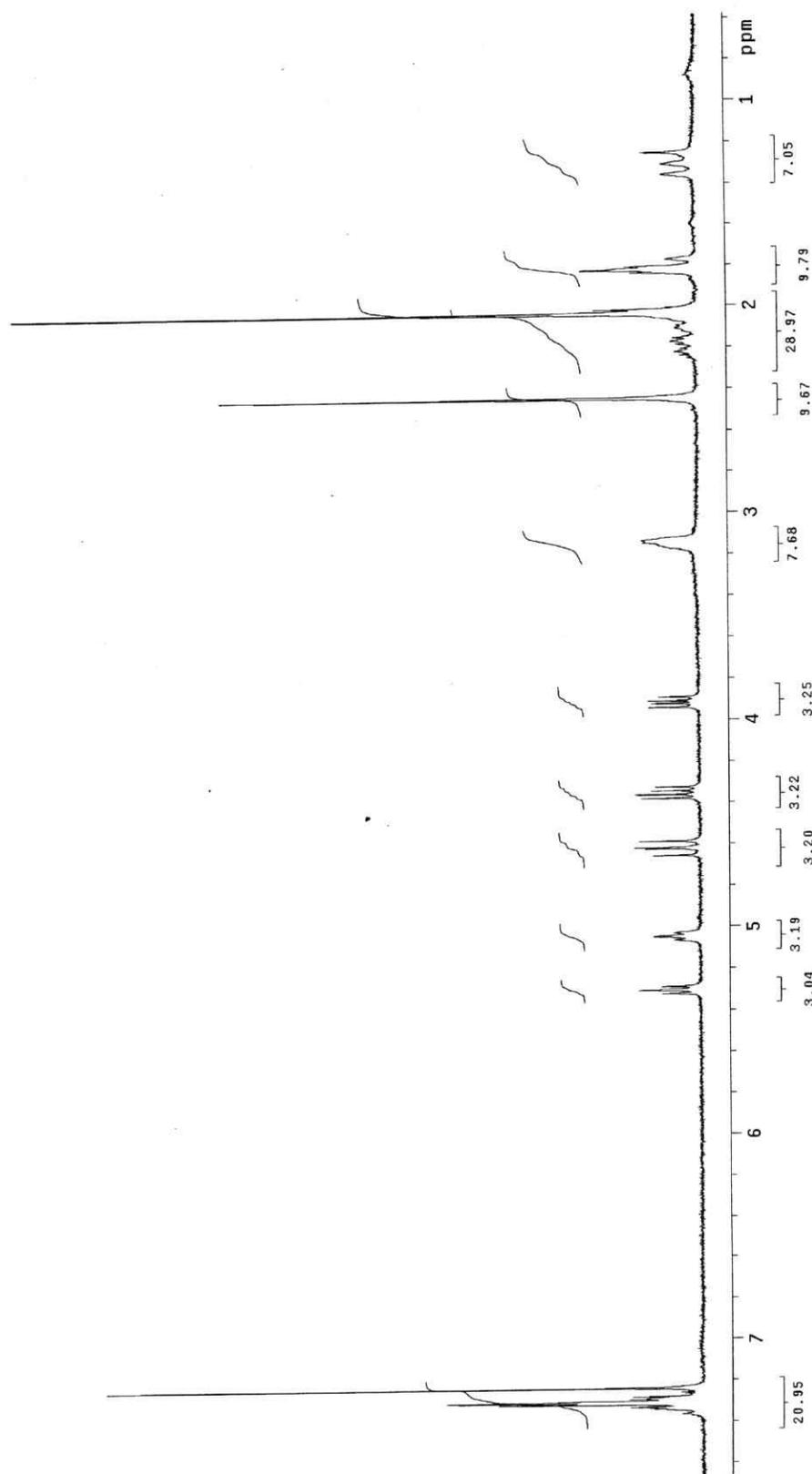
Espectro 22. Espectro de HSQC de (3S,6S)-6β-hidroxihiosciamina ((3S,6S)-14) en CDCl₃.



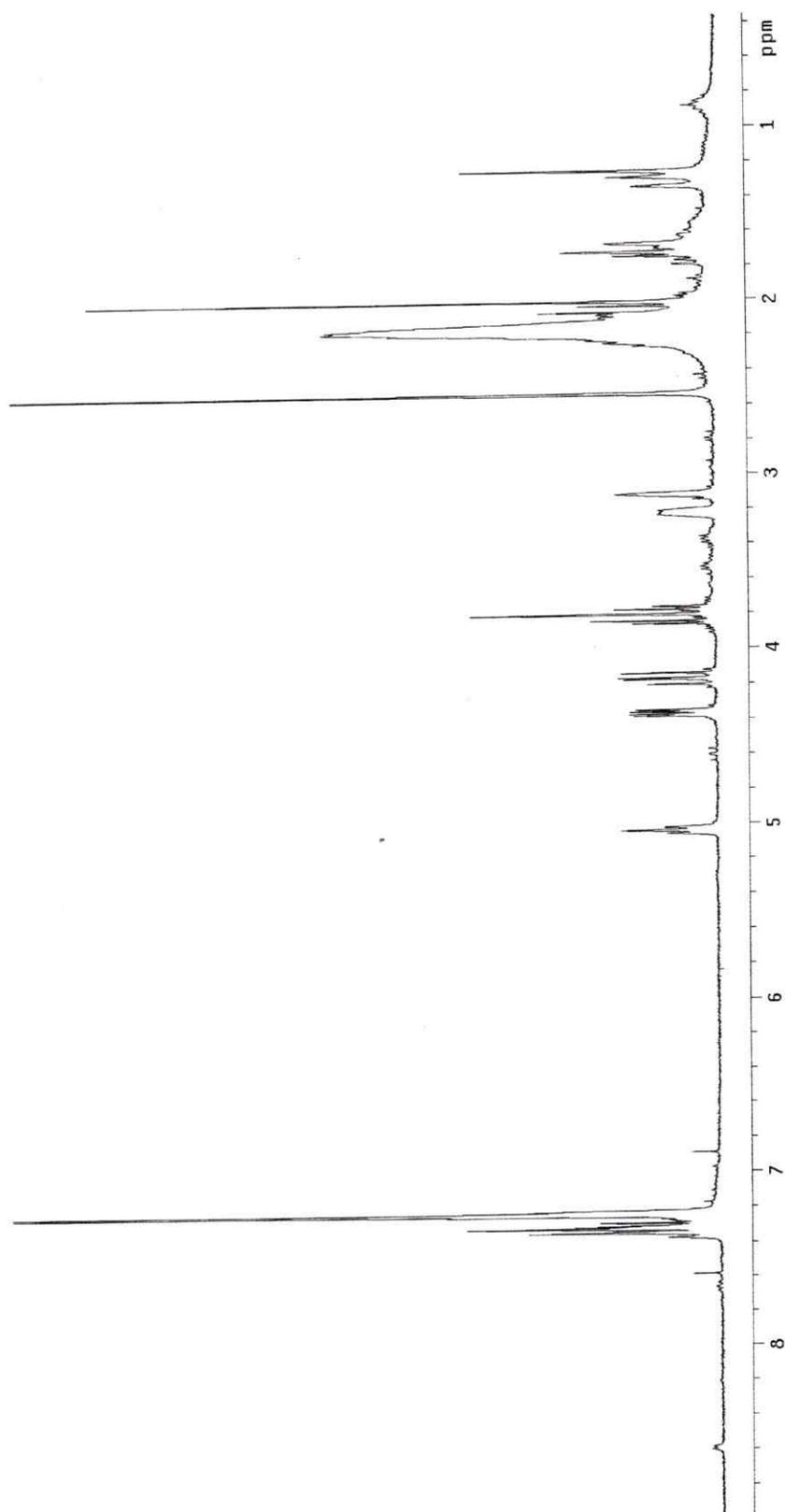
Espectro 23. Espectro de HMBC de (3S,6S)-6β-hidroxiiosciamina ((3S,6S)-14) en $CDCl_3$.



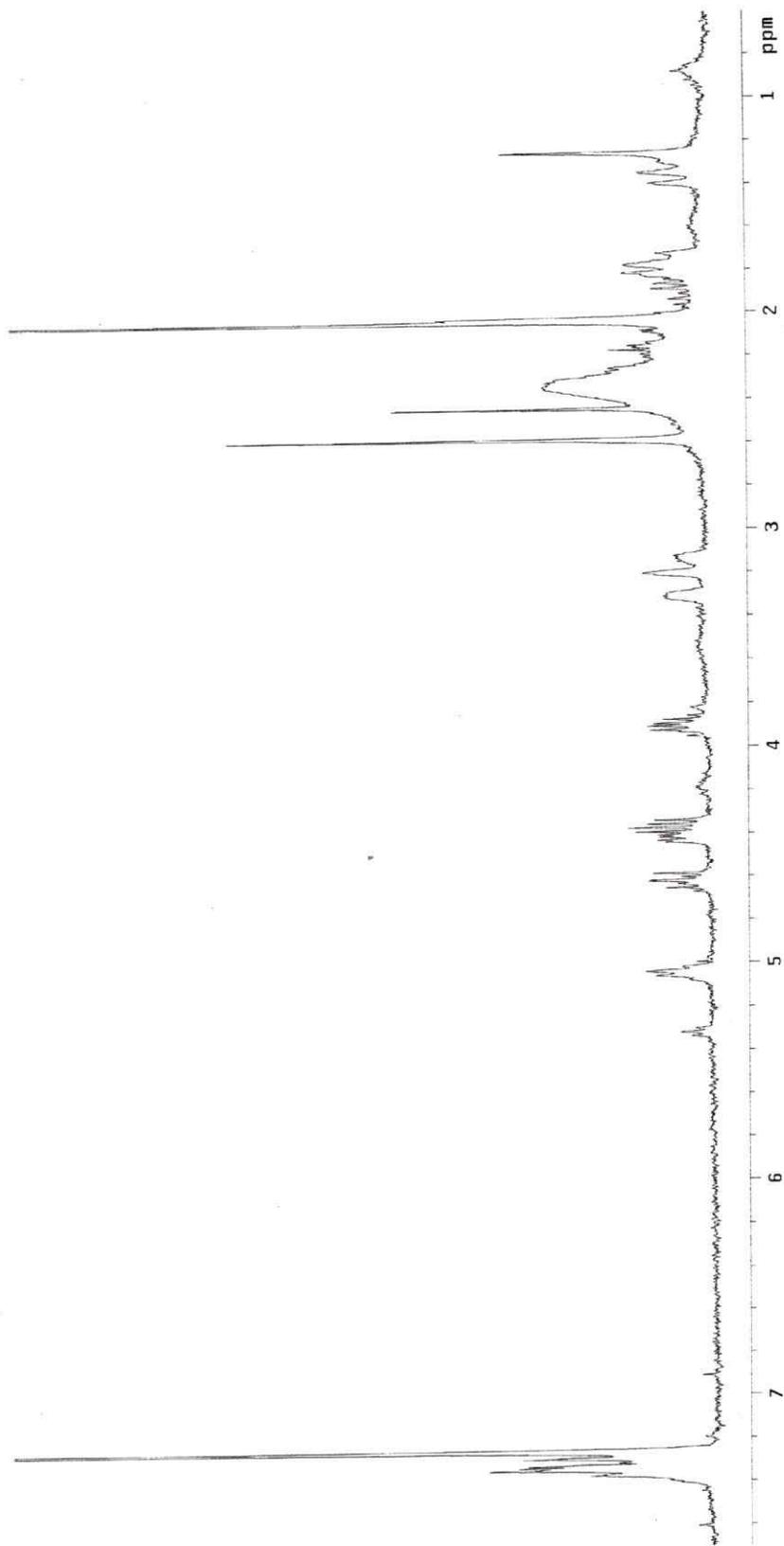
Espectro 24. Espectro de NOESY de (3S,6S)-6β-hidroxiociamina ((3S,6S)-**14**) en CDCl_3 .



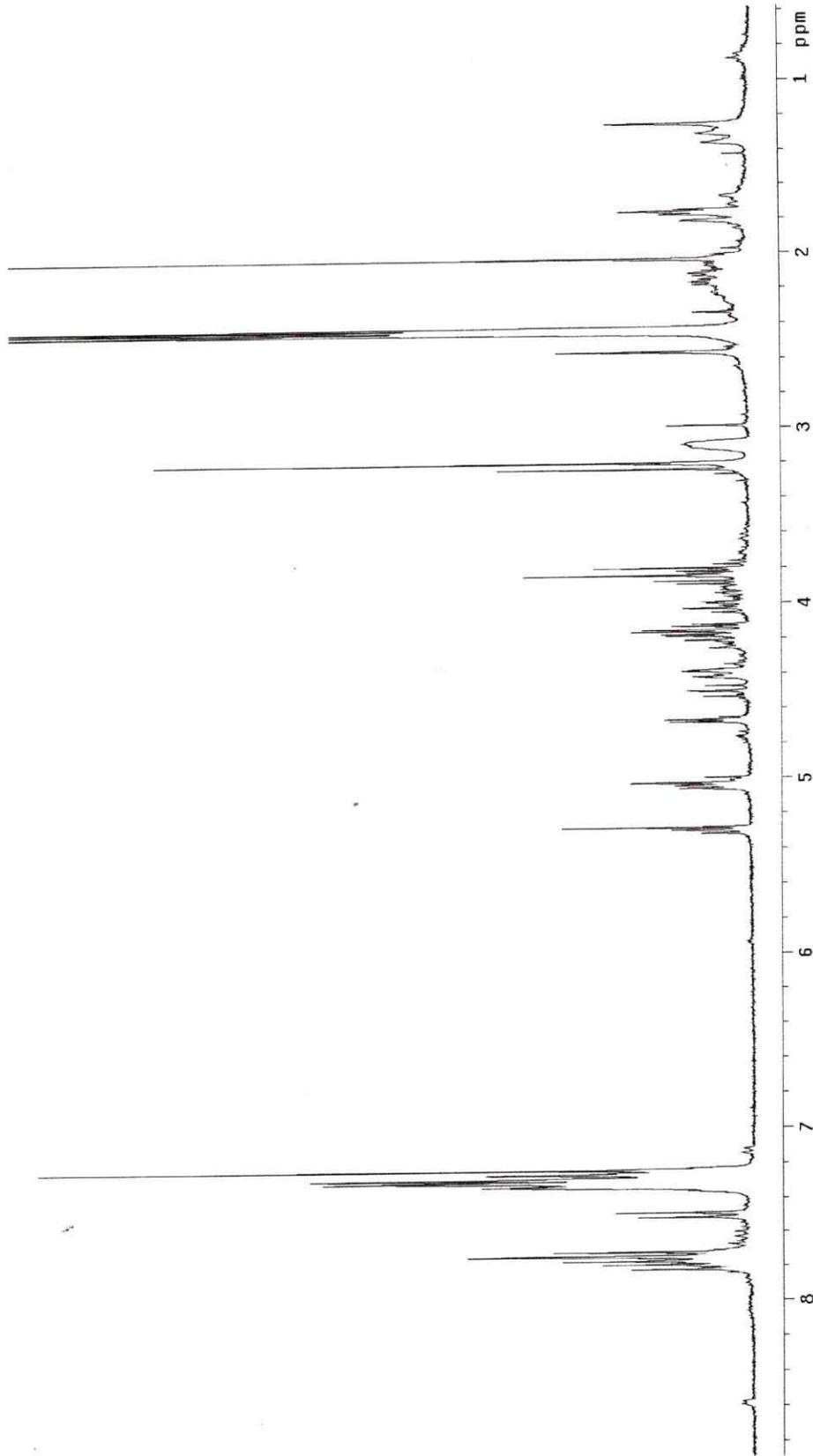
Espectro 25. Espectro de $^1\text{HRMN}$ en CDCl_3 de (3S,6S)-3 α -acetiltropoiloxi-6 β -acetoxitropano como producto de la acetilación de (3S,6S)-6 β -hidroxihiosciamina ((3S,6S)-**14**) con anhídrido acético después de 14 h.



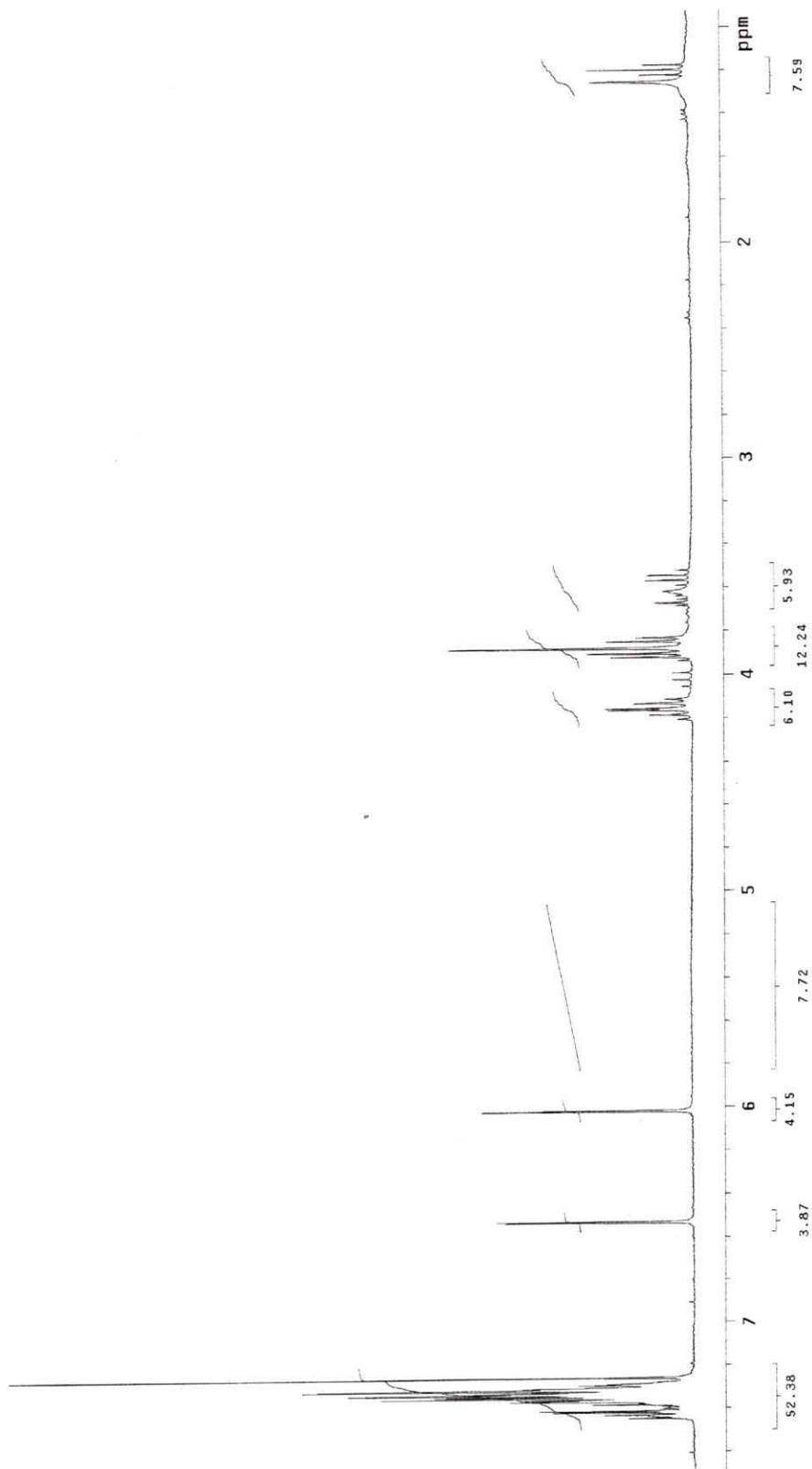
Espectro 26. Espectro de $^1\text{HRMN}$ en CDCl_3 de la mezcla de la reacción de acetilación de (3S,6S)-6 β -hidroxiosciamina ((3S,6S)-14) con anhídrido acético después de 2 h.



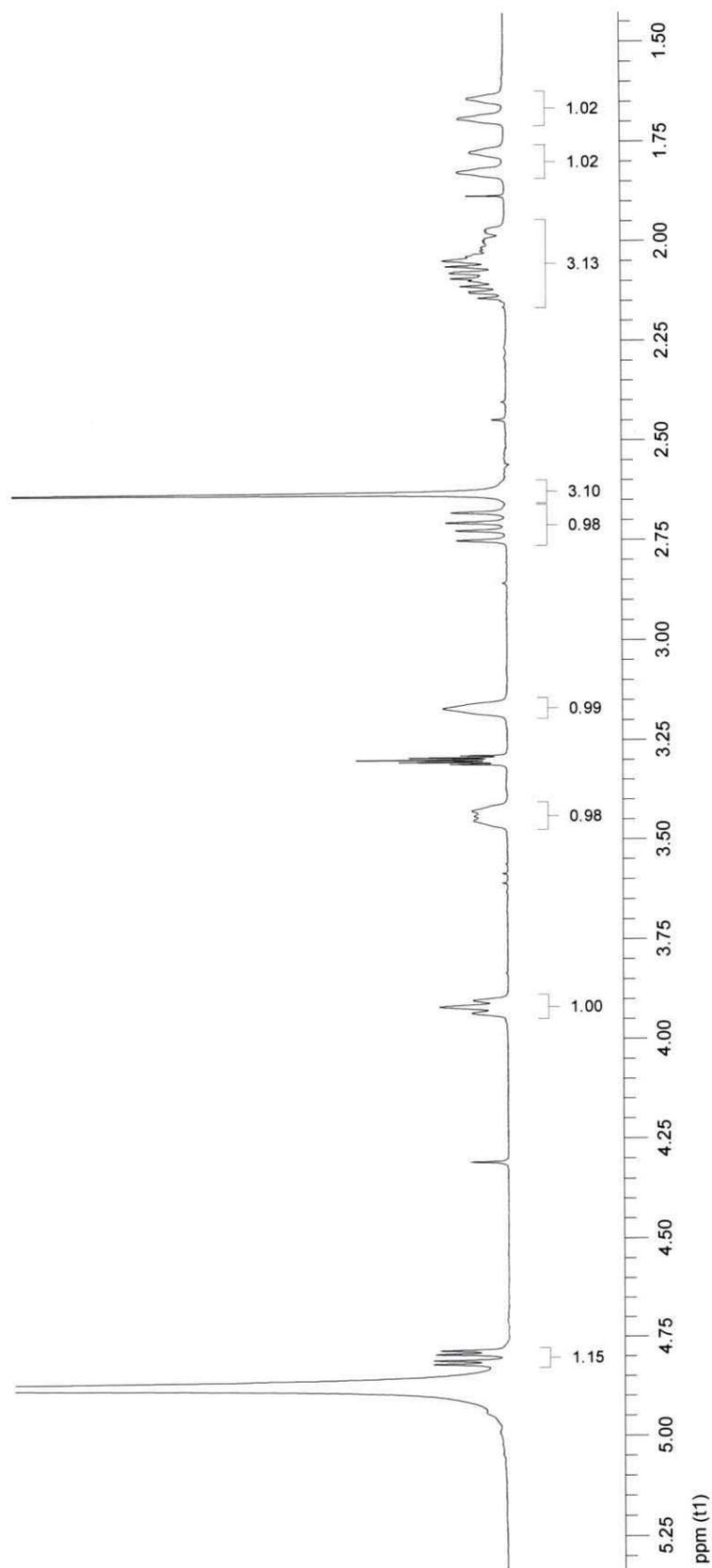
Espectro 27. Espectro de ¹HRMN en CDCl₃ de la mezcla de la reacción de acetilación de la mezcla de la reacción de acetilación de (3S,6S)-6β-hidroxiiosciamina ((3S,6S)-14) con anhídrido acético después de 5 h.



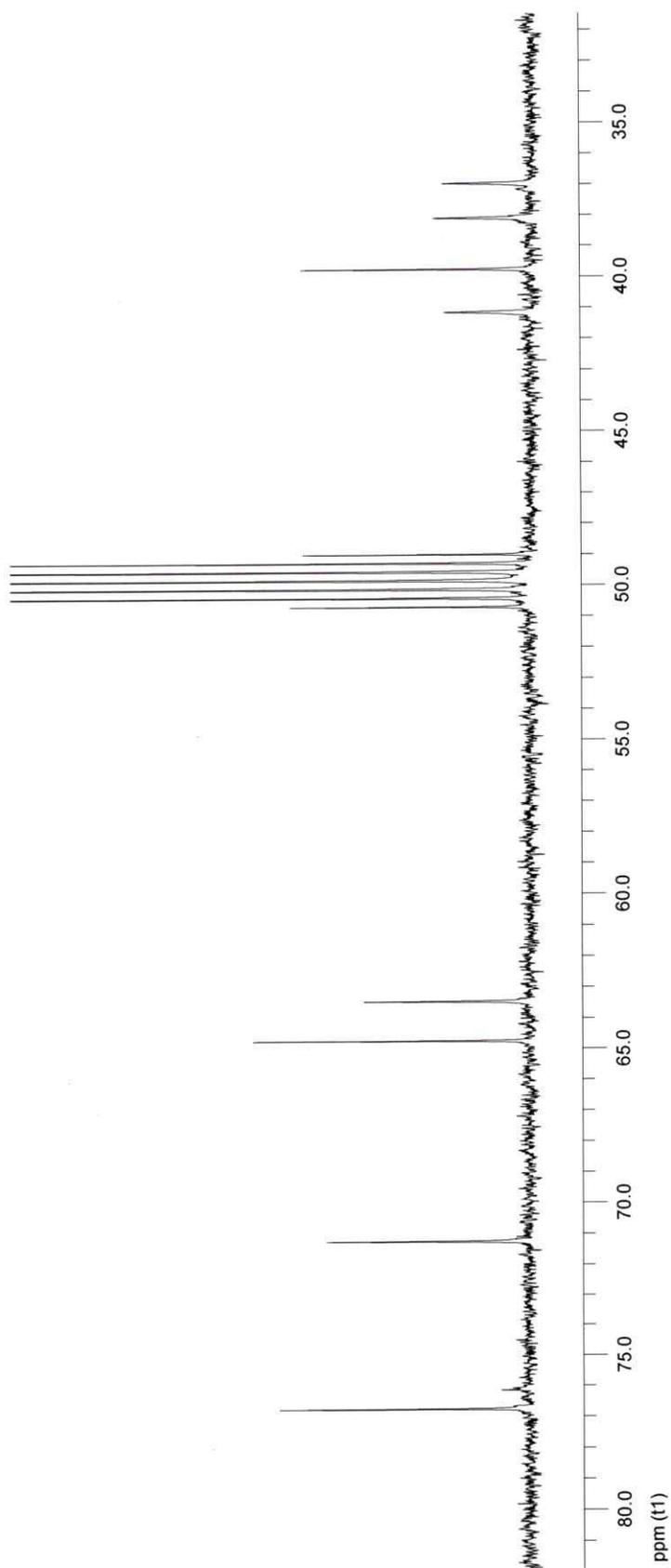
Espectro 28. Espectro de ¹HRMN en CDCl₃ de la mezcla de la reacción de acetilación de (3S,6S)-6β-hidroxiociamina ((3S,6S)-**14**) con cloruro de acetilo después de 5 h.



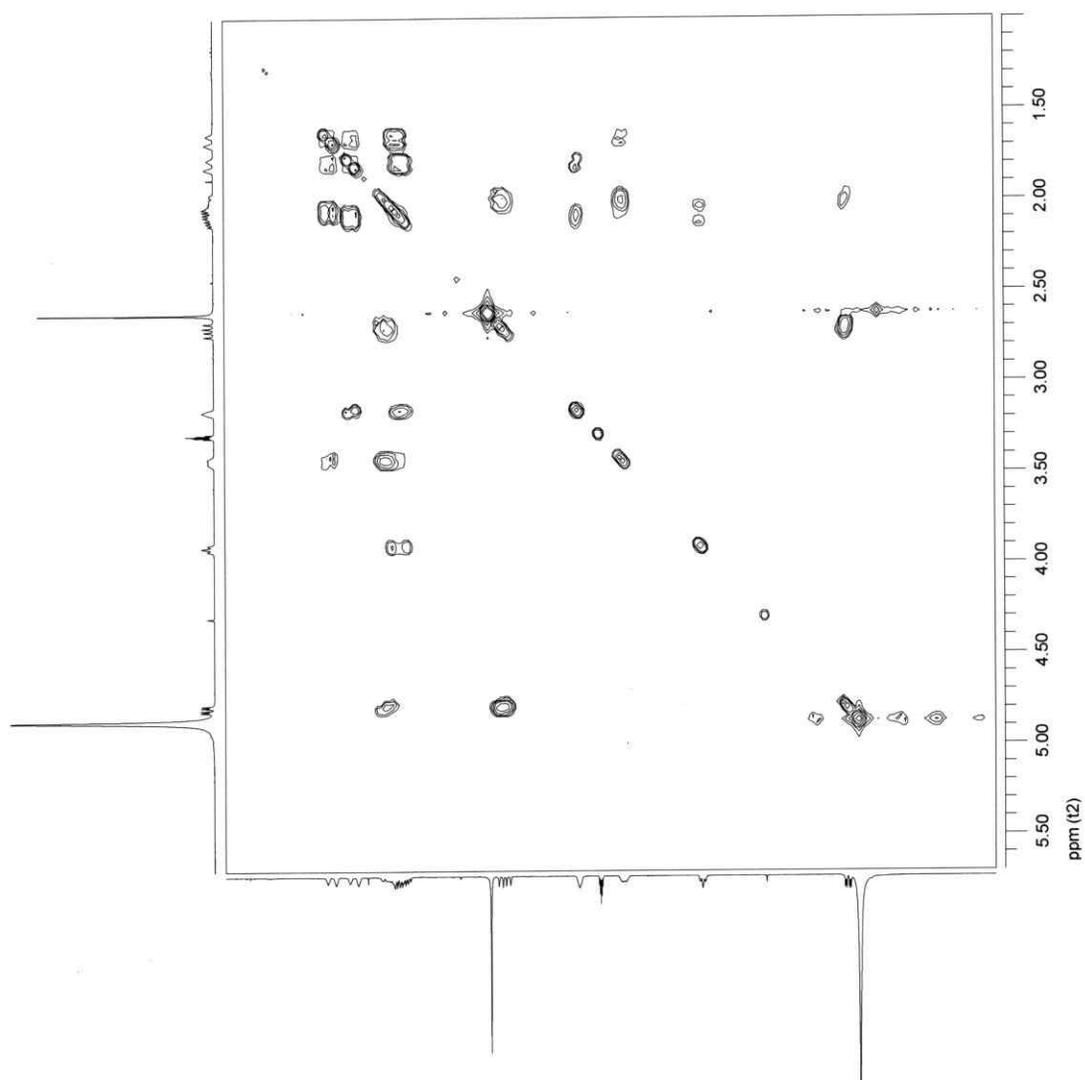
Espectro 29. Espectro de ^1H RMN de ácido trópico en CDCl_3 .



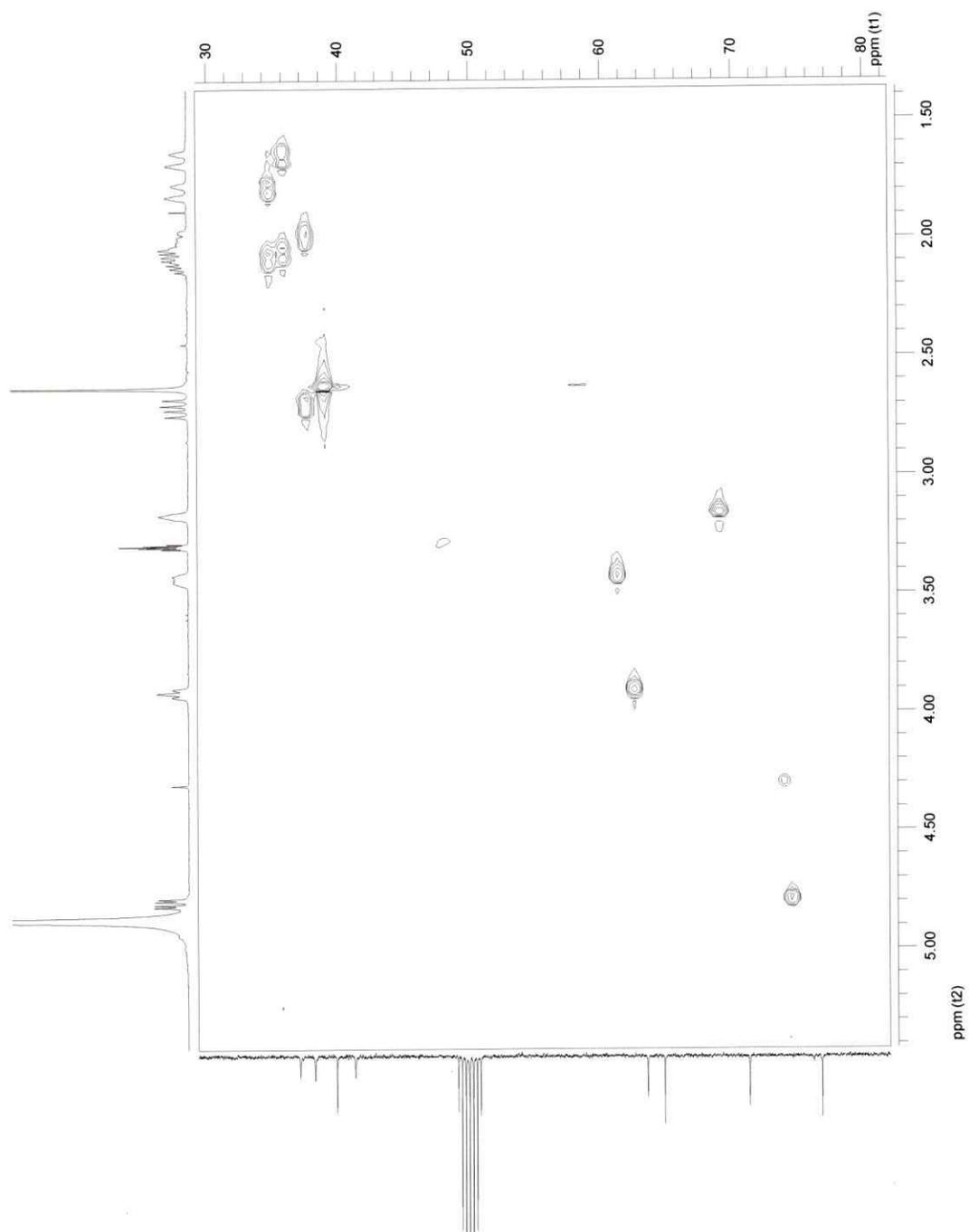
Espectro 30. Espectro de $^1\text{HRMN}$ de (3S,6S)-3 α ,6 β -tropanodiol ((3S,6S)-5) en CD_3OH .



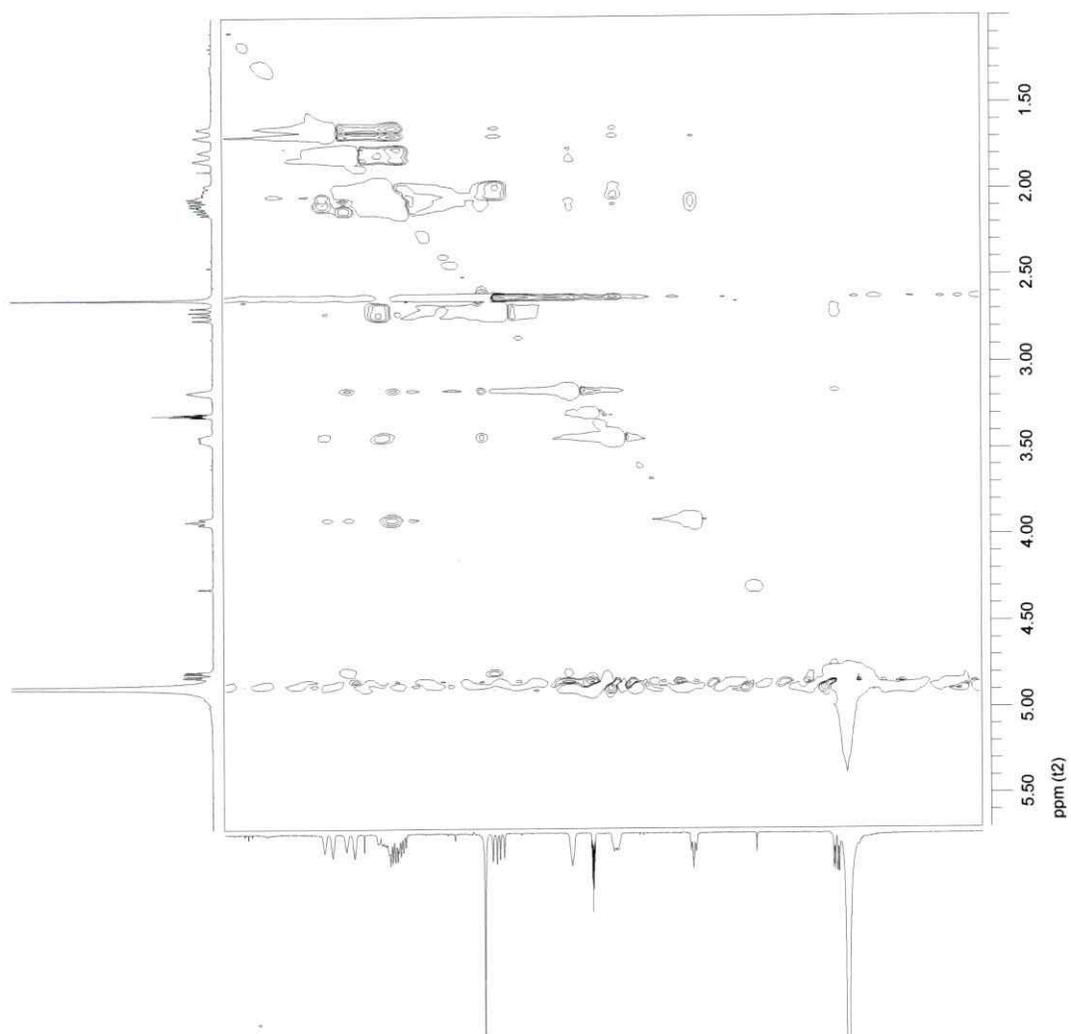
Espectro 31. Espectro de ^{13}C RMN de (3S,6S)-3 α ,6 β -tropanodiol ((3S,6S)-5) en CD_3OH .



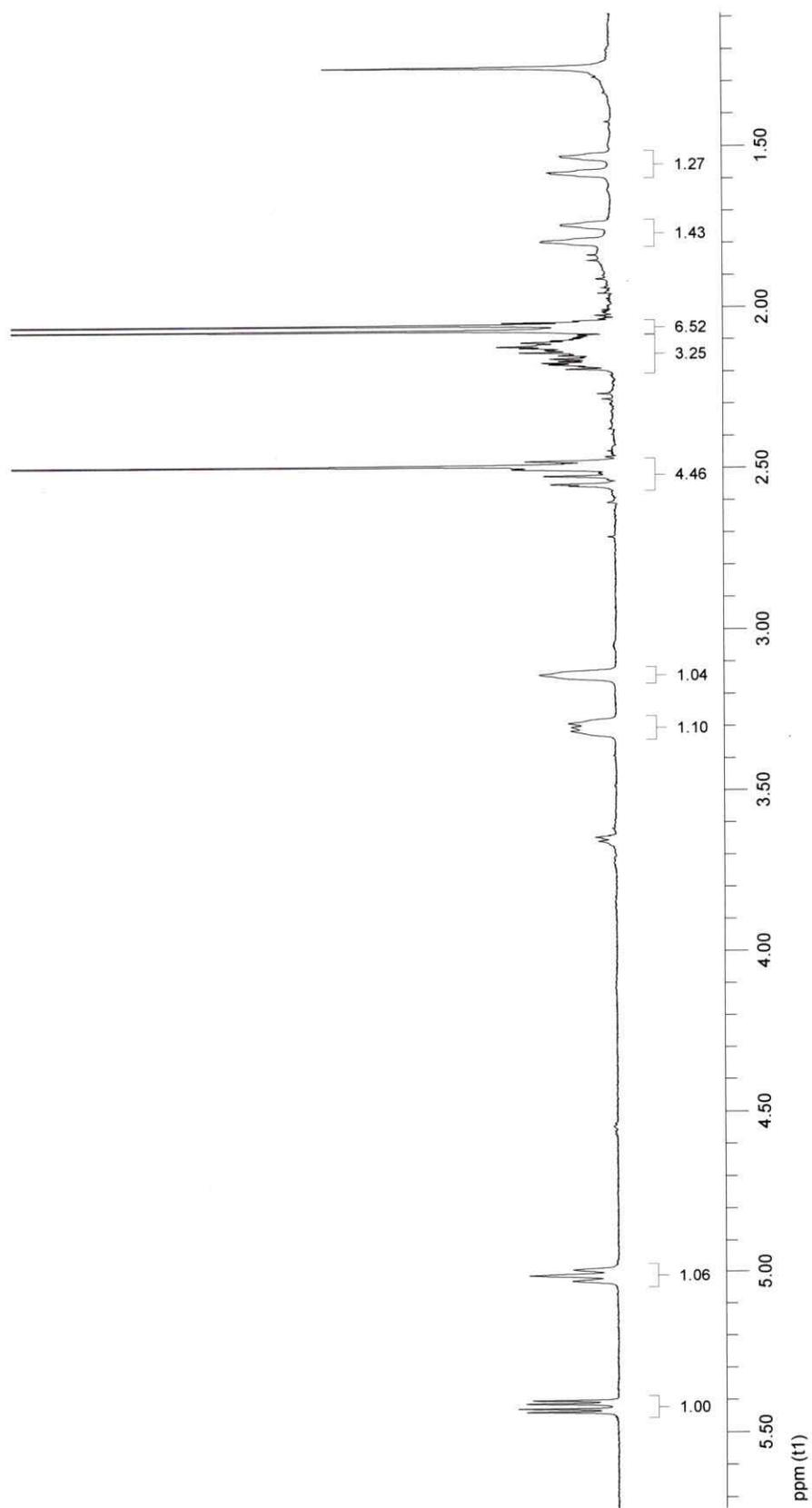
Espectro 32. Espectro de COSY de (3S,6S)-3α,6β-tropanodiol ((3S,6S)-5) en CD₃OH.



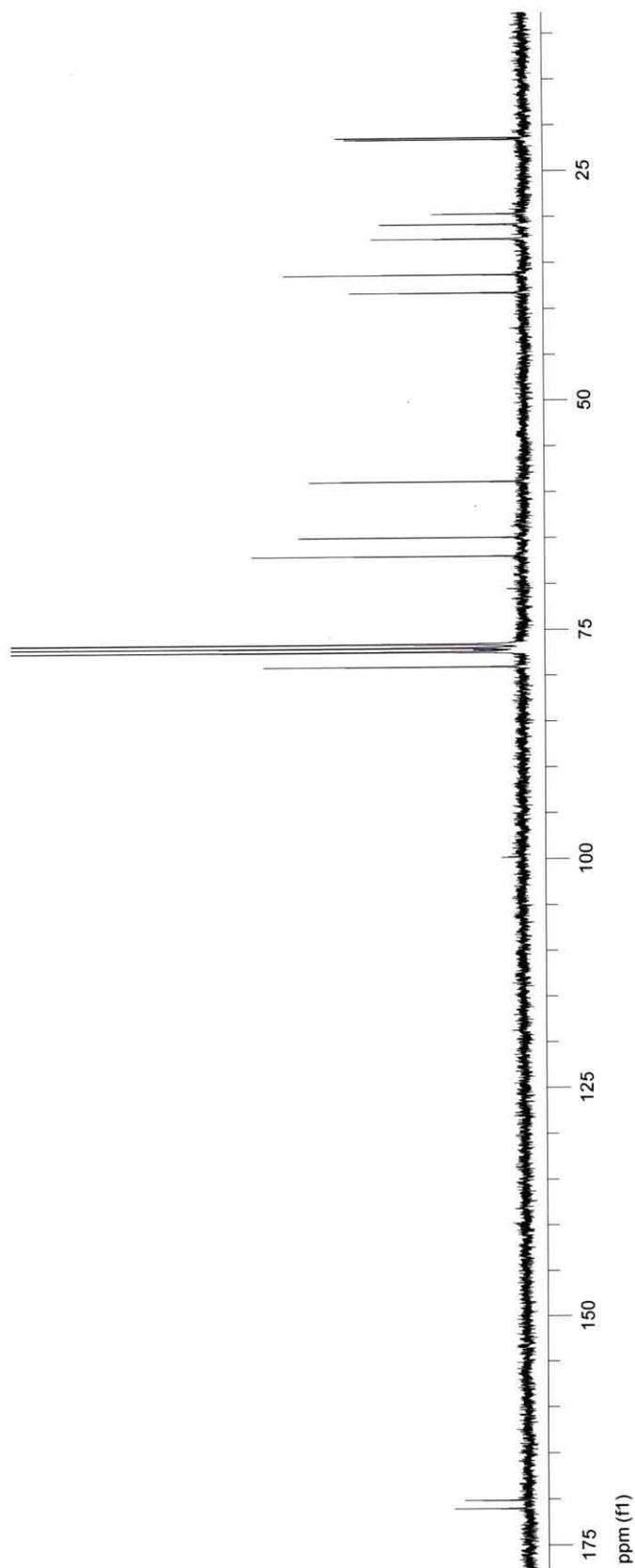
Espectro 33. Espectro de HSQC de (3S,6S)-3 α ,6 β -tropanodiol ((3S,6S)-5) en CD_3OH .



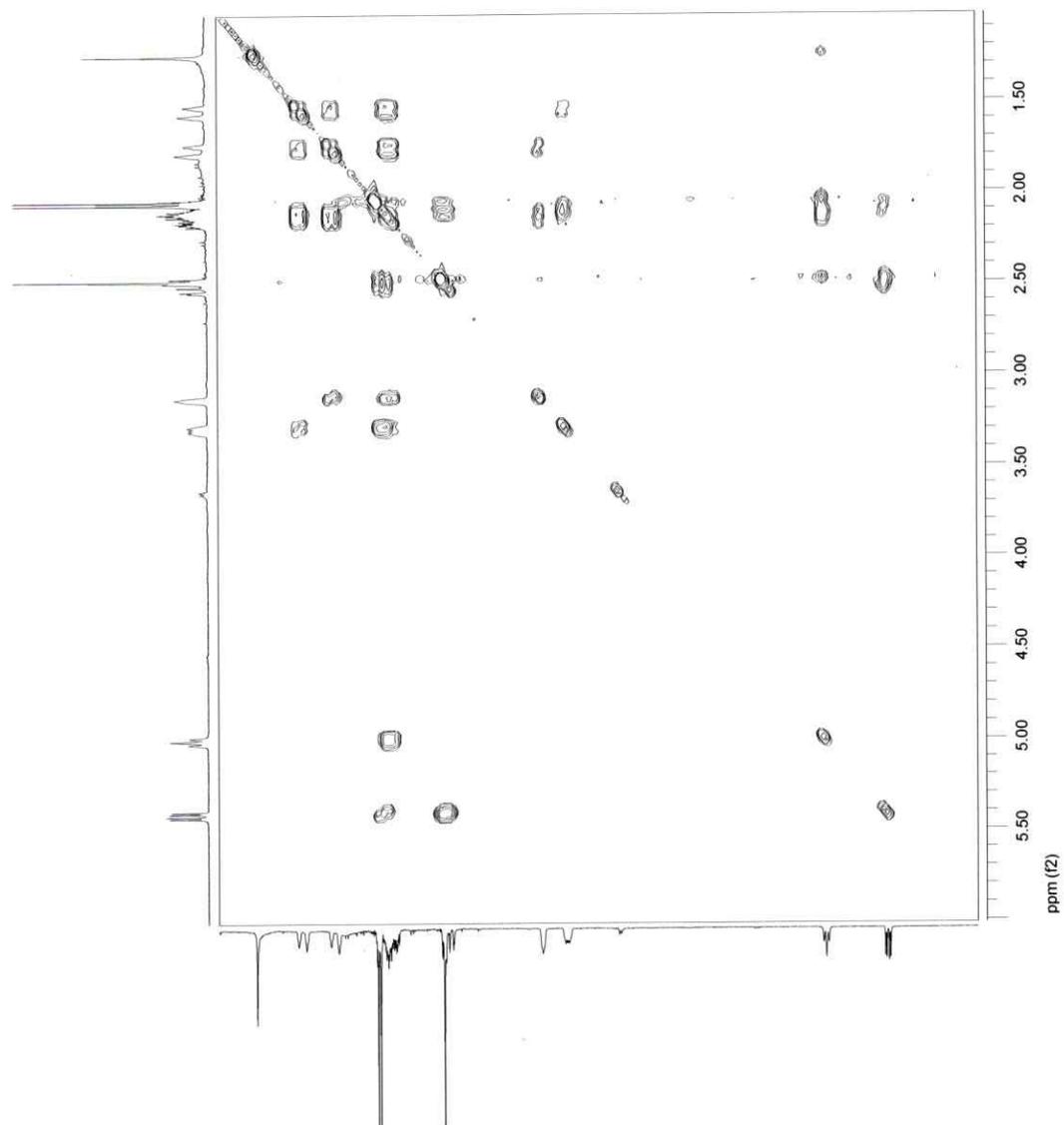
Espectro 34. Espectro de NOESY de (3S,6S)-3 α ,6 β -tropanodiol ((3S,6S)-5) en CD₃OH.



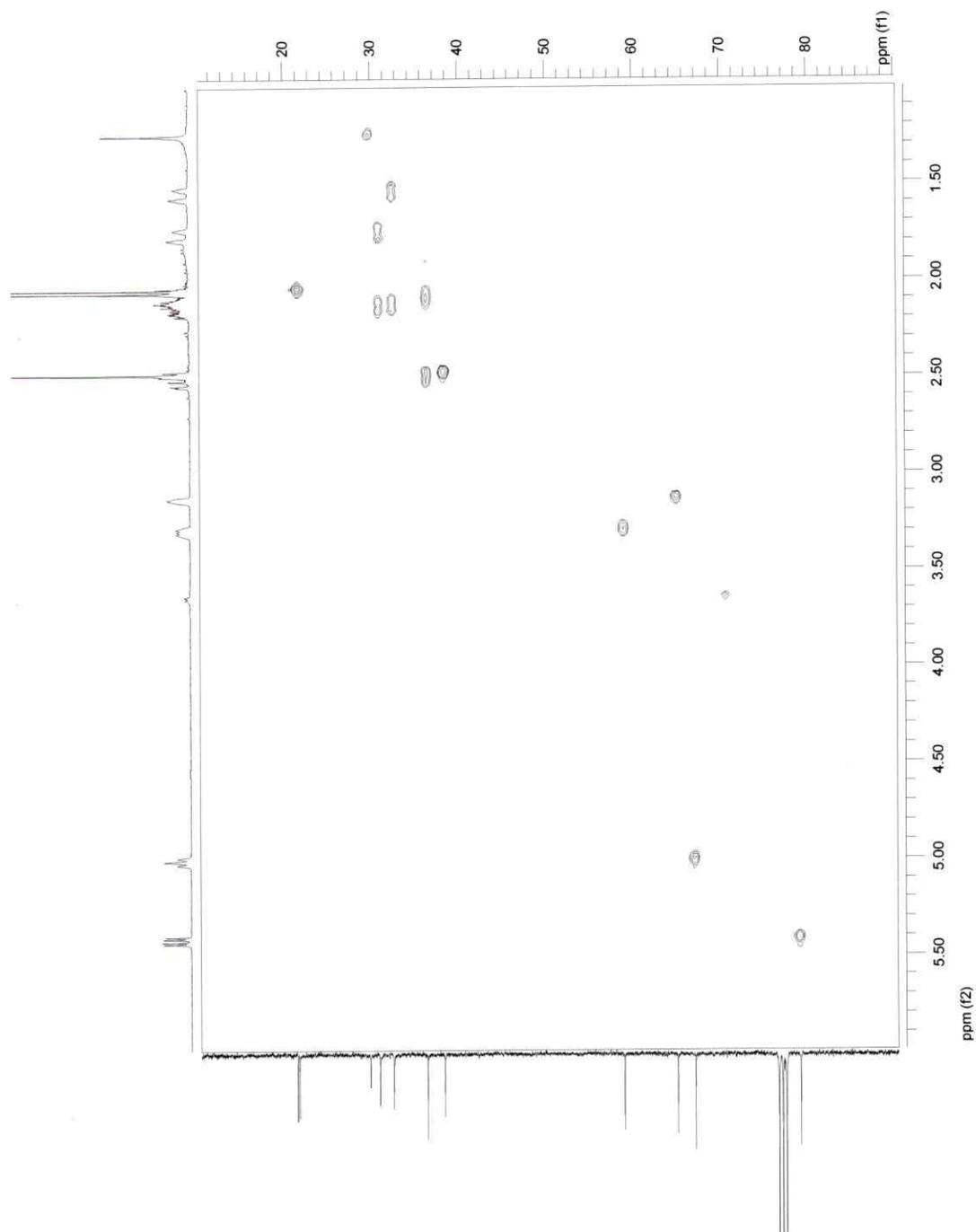
Espectro 35 Espectro de $^1\text{HRMN}$ de (3S,6S)-3 α ,6 β -diacetoxitropano ((3S,6S)-**10**) en CDCl_3 .



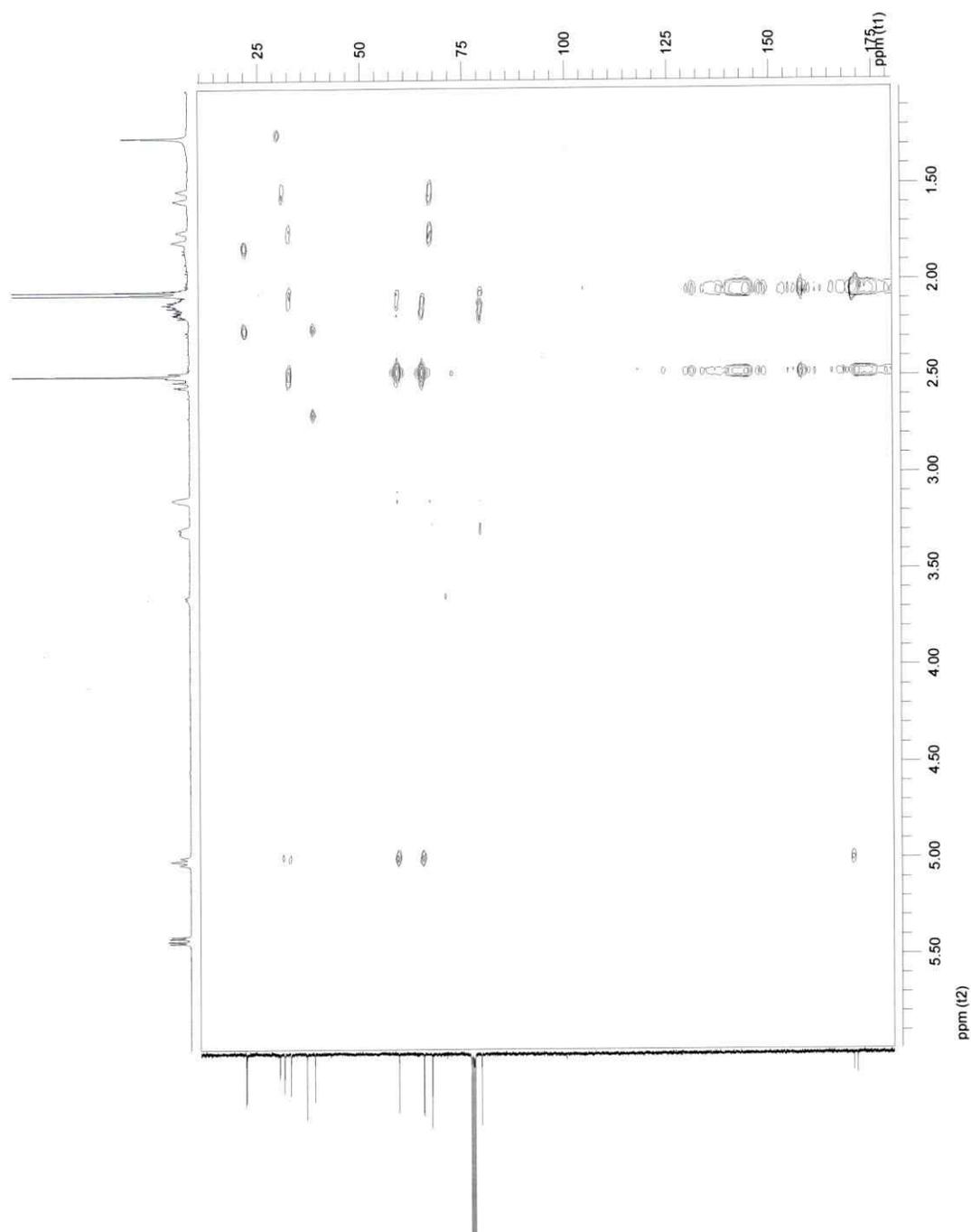
Espectro 36. Espectro de ^{13}C RMN de (3S,6S)-3 α ,6 β -diacetoxitropano ((3S,6S)-10) en CDCl_3 .



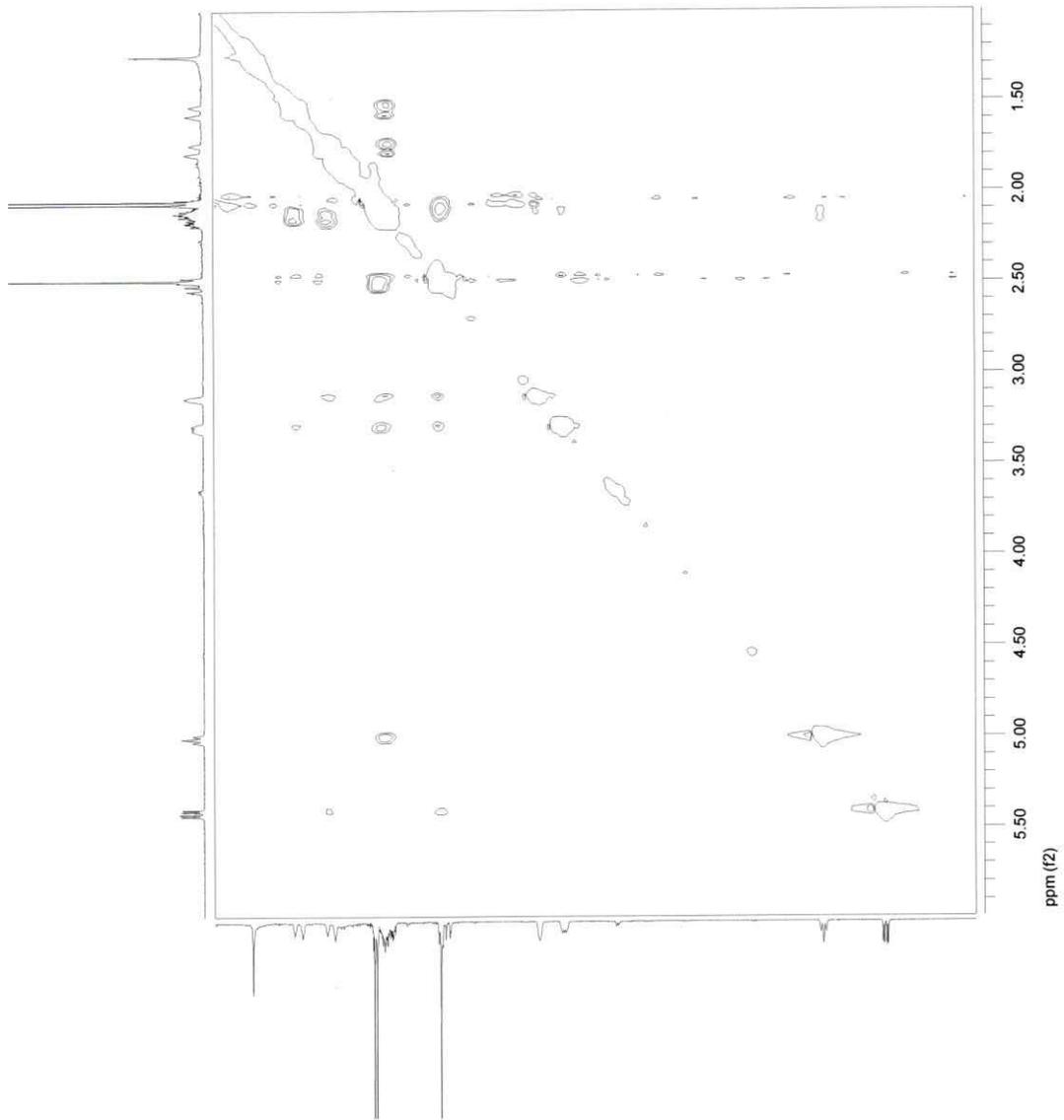
Espectro 37. Espectro de COSY de (3S,6S)-3 α ,6 β -diacetoxitropano ((3S,6S)-**10**) en CDCl₃.



Espectro 38. Espectro de HSQC de (3S,6S)-3 α ,6 β -diacetoxitropano ((3S,6S)-**10**) en CDCl_3 .



Espectro 39. Espectro de HMBC de (3S,6S)-3 α ,6 β -diacetoxitropano ((3S,6S)-10) en CDCl_3 .



Espectro 40. Espectro de NOESY de (3S,6S)-3 α ,6 β -diacetoxitropano ((3S,6S)-**10**) en CDCl₃.

REFERENCIAS

- 1.- Adkins H. y Pavlic A. A. 1947. Hydrogenation of Esters to Alcohols over Raney Nickel. I. J. Am. Chem. Soc. 69: 3039-3041.
- 2.- Al-Said M. S., Evans W. C. y Grout R. J. 1989. Alkaloids of *Erythroxylum hypericifolium* Leaves. Phytochemistry 28: 3211-3215.
- 3.- Anwar K. y Ghani A. 1973. Alkaloids of the Roots of *Datura metel* var. *fastuosa* Grown in Bangladesh. Bangladesh Pharm. J. 2: 25-27; Chem. Abstr. 80: 57429c (1974).
- 4.- Aripova S. F. y Yunusov S. N. 1989. Phytochemistry of *Datura innoxia*. Khim. Prir. Soedin: 36-38; Chem. Abstr. 111: 112282k (1989).
- 5.- Bassarello C., Bifulco G., Montoso P., Skhirthdze A., Kemertelidze E., Pizza C. y Piacente S. 2007. Gloriosols A and B, two novel phenolics from *Yucca gloriosa*: structural characterization and configurational assignment by a combined NMR-quantum mechanical strategy. Tetrahedron 63: 148-154.
- 6.- Czinki E., Csaszar A. G., Magyarfalvi G., Schreiner P. R. y Allen W. D. 2007. Secondary Structures of Peptides and Proteins via NMR Chemical Shieldings Anisotropy (CSA) Parameters. J. Am. Chem. Soc. 129: 1568-1577.
- 7.- de la Fuente G., Reina M., Muñoz O., San Martín A. y Girault J.-P. 1988. Tropane Alkaloids from *Schizanthus pinnatus*. Heterocycles 27: 1887-1897.
- 8.- Dolan J. W. 2005. What Mobile Phase Conditions Will Give Good Results?. LC-GC Europe – Reader Questions (<http://www.lcgceurope.com/lcgceurope/article/articleDetail.jsp?id=177449>).

- 9.- Duran-Patron R., O'Hagan D., Hamilton J. T. G. y Wong C. W. 2000. Biosynthetic studies on the tropane ring system of the tropane alkaloids from *Datura stramonium*. *Phytochemistry* 53: 777-784.
- 10.- El-Imam Y. M. A., Evans W. C. y Grout R. J. 1988. Alkaloids of *Erythroxylum cuneatum*, *E. ecarinatum* and *E. australe*. *Phytochemistry* 27: 2181-284.
- 11.- Evans W. C. y Ramsey K. P. A. 1983. Alkaloids of the *Solanaceae* Tribe *Anthocercideae*. *Phytochemistry* 22: 2219-2225.
- 12.- Evans W. C. y Somanabandhu A-O. 1974. Alkaloids of *Datura discolor*. *Phytochemistry* 13: 304-305.
- 13.- Evans W. C. y Treagust P. G. 1973. Alkaloids of *Datura pruinosa*. *Phytochemistry* 12: 2077-2078.
- 14.- Evans W. C., Stevenson N. A. y Timoney R. F. 1969. *Datura leichhardtii* V. Alkaloidal Constituents of the Cross *D. leichhardtii* x *D. innoxia*. *Planta Med.* 17: 120-126; *Chem. Abstr.* 71: 19584f (1969).
- 15.- Evans W. C., Major V. A. y PeThan M. 1965. The alkaloids of the genus *Datura*, section *Brugmansia*. 3. *Datura sanguinea* R. et P. *Planta Med.* 13: 353-358; *Chem. Abstr.* 63: 14637g (1965)
- 16.- Evans W. C. y Wooley J. G. 1965. The Alkaloids of *Datura meteloides* D.C. J. *Chem. Soc.* 4936-4939.
- 17.- Evans W. C. y Griffin W. J. 1964. Translocation of Alkaloids in *Datura* Species. *J. Pharm. Pharmacol.* 16: 337-341.
- 18.- Evans W. C. y PeThan M. 1962. The Alkaloids of the Genus *Datura*, Section *Brugmansia*: Part I. *D. cornigera* Hook. *J. Pharm. Pharmacol.* 14: 147-156.

- 19.- Evans W. C. y Wellendorf M. 1959. The Alkaloids of the Roots of *Datura*. J. Chem Soc. 1406-1409.
- 20.- Evans W. C. y Wellendorf M. J. 1958. (-)-3 α : 6 β -Ditigloyloxytropane, a New Alkaloid From the Roots of *Datura*. J. Chem. Soc.: 1991-1993.
- 21.- Fodor G. y Solti F. 1965. The Stereochemistry of the Tropane Alkaloids. Part XVII. Correlation of Valeroidine with S(-)-Methoxysuccinic Acid and of Mono- and Di-tigloyltropane-3,6-diol with its R(+)-Antimer. J. Chem. Soc. 6830-6833.
- 22.- Fodor G. y Solti F. 1964. Correlation of Valeroidine with S(-)-Methoxysuccinic Acid and of Mono- and Ditigloyl-tropane-3.6-diol with its R(+)Antimer. Tetrahedron Lett.: 29, 1917-1921.
- 23.- Fodor G., Janzso G. y Koczor I. 1962. Die Halbsynthese des 6-Hydroxyhyoscyamins. Arch. Pharm. 195: 91-95.
- 24.- Fodor G., Vincze I. W. y Toth J. 1961. The Stereochemistry of the Tropane Alkaloids. Part XIII. The Absolute Configuration and a Simplified Syntheses of Valeroidine. J. Chem. Soc.: 3219-3221.
- 25.- Fodor G., y Kovacs O. 1953. The Stereochemistry of the Tropane Alkaloids. Part III. The Configuration of Scopolamine and of Valeroidine. J. Chem. Soc.: 2341-2344.
- 26.- Freedman T. B., Cao X., Dukor R. K. y Nafie L. A. 2003. Absolute Configuration Determination of Chiral Molecules in the Solution State Using Vibrational Circular Dichroism. Chirality 15: 743-758.
- 27.- Griffin W. J. 1975. The Isolation of 6-Hydroxyhyoscyamine from a *Duboisia* Hybrid. Naturwissenschaften 62: 97.

- 28.- Griffin W. J. 1966. Alkaloids in *Datura*, Section *Brugmansia*: The Peach Flowered Form of *Datura candida sens. lat.* *Planta Med.* 2, 14: 468-474.
- 29.- Helgaker T., Jaszunski M. y Ruud K. 1999. *Ab Initio* Methods for the Calculation of NMR Shielding and Indirect Spin-Spin Coupling Constants. *Chem. Rev.* 99: 293-342.
- 30.- Hudson C. S. 1910. A Relation between the Chemical Constitution and the Optical Rotatory Power of the Sugar Lactones. *J. Am. Chem. Soc.* 32: 338-346.
- 31.- Ionkova I., Witte L. y Alfermann A. W. 1994. Spectrum of Tropane Alkaloids in Transformed Roots of *Datura innoxia* and *Hyoscyamus x györfgyi* cultivated *in Vitro* *Planta Med.* 60: 382-384.
- 32.- Ishimaru K. y Shimomura K. 1989. 7 β -Hydroxyhyoscyamine From *Duboisia myoporoides-D. leichhardtii* Hybrid and *Hyoscyamus albus*. *Phytochemistry* 28: 3507-3509.
- 33.- Jackson B. P. y Berry M. I. 1973. Hydroxytropane Tiglates in the Roots of *Mandragora* species. *Phytochemistry* 12: 1165-1166.
- 34.- Keese R., Müller R. K. y Toube T. P. 1990. "Métodos de Laboratorio de Química Orgánica" 29. Limusa, México.
- 35.- Levine I. 2001. "Química Cuántica", 522. Prentice Hall, Madrid.
- 36.- Lounasmaa M. y Tamminen T. 1993. *The Alkaloids* 44, 1, Academic Press, New York.
- 37.- Lubis I. 1967. Alkaloids Production in *Datura* Hybrids. *Ann. Bogor.* 4: 163-190. ; *Chem. Abstr.* 69: 84182w (1968).

- 38.- Muñoz O., Hartmann R. y Breitmaier E. J. 1991. Schizanthine X, a new alkaloid from *Schizanthus grahamii*. J. Nat. Prod. 54: 1094-1096.
- 39.- Nafie L. A. y Freedman T. B. 2000. "Circular Dichroism – Principles and Applications" 2da Edición, 97. Wiley-VCH, New York.
- 40.- O'Hagan D. 2000. Pyrrole, Pyrrolidine, Pyridine, Piperidine and Tropane Alkaloids. Nat. Prod. Rep. 17: 435-446.
- 41.- O'Hagan D. 1997. Pyrrole, Pyrrolidine, Pyridine, Piperidine, Azepine and Tropane Alkaloids. Nat. Prod. Rep. 14: 637
- 42.- Parr A. J., Payne J., Eagle J., Chapman B. T., Robins R. J. y Rhodes M. J. C. 1990. Variation in Tropane Alkaloid Accumulation within the *Solanaceae* and Strategies for its Exploitation. Phytochemistry 29: 2545-2550.
- 43.- Patrick G.L. 1995. An Introduction to Medicinal Chemistry. 224. Oxford University Press.
- 44.- Petri G. 1988. Tropanes. [Phytochemicals in Plant Cell Cultures]. Cell Cult. Somatic Cell Genet. Plants 5: 263-275; Chem. Abstr. 109: 226799y (1988).
- 45.- Robins R. J., Parr A. J., Payne J., Walton N. J. y Rhodes M. J. C. 1990. Factors Regulating Tropane-Alkaloid Production in a Transformed Root Culture of a *Datura candida* x *D. aurea* Hybrid. Planta 181: 414-422; Chem. Abstr. 114: 118565p (1991).
- 46.- Romeike A. Über Vorkommen von 6-Hydroxyhyoscyamine in *Datura*. 1962. Naturwissenschaften 49: 281.
- 47.- Shan C. S. y Khanna P. N. 1965. Alkaloid Estimation of Roots of *Datura metel* and *Datura metel* var. *fastuosa*. Lloydia 28: 71-72.

- 48.- Shah C. S. y Khanna P. N. 1965. A Note on the Alkaloidal Content of *Datura innoxia* Miller. J. Pharm. Pharmacol. 17: 115-117.
- 49.- Silva G. L., Cui B. L., Chavez D., You M., Chai H. B., Rasoanaivo P., Lynn S. M., O'Neill M. J., Lewis J. A., Besterman J. M., Monks A., Farnsworth N. R., Cordell G. A., Pezzuto J. M. y Kinghorn A. D. 2001. Modulation of the Multidrug-Resistance Phenotype by new Tropane Alkaloid Aromatic Esters from *Erythroxylum pervillei*. J. Nat. Prod. 64: 1514-1520.
- 50.- Vailikhit V., Bunsawansong P., Techakul S. y Hannongbua S. 2006. Conformational Analysis of Nevirapine in Solutions, Based on NMR Spectroscopy and Quantum Chemical Calculations. J. Theo. Comp. Chem. 5: 913-924.
- 51.- Witte L., Müller K. y Arfmann H-A. 1987. Investigation of the Alkaloid Pattern of *Datura innoxia* Plants by Capillary Gas-Liquid-Chromatography-Mass Spectrometry. Planta Med. 53: 192-197.
- 52.- Yagudaev M. R. y Aripova S. F. 1986. The NMR Investigation of Alkaloids. IX. ¹³C NMR Spectra and Stereochemistry of Convolvine, Convolamine, Convoline, Convolodine, Subhirsine, and 6-Hydroxyhyoscyamine. Khim. Prir. Soedin.: 80-84. ; Chem. Nat. Compd. 22: 74-78. (1986).
- 53.- Zanolari B., Guilet D., Marston A., Queiroz E. F., Paulo M. de Q. y Hostettmann K. 2003. Tropane Alkaloids From the Bark of *Erythroxylum vacciniifolium*. J. Nat. Prod. 66: 497-502.
- 54.- Zarazin C., Goethals G., Seguin J.-P. y Barbotin J.-N. 1991. Spectral Reassignment and Structure Elucidation of Scopolamine Free Base Through Two-Dimensional NMR Techniques. Magn. Reson. Chem. 29: 291-300.