

## ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DEL $\alpha$ -CICLOPROPIL-(p-METOXIFENIL)-5-PIRIMIDINMETANOL (ANCIMIDOL) UTILIZANDO EL MÉTODO DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

O. Ospina<sup>1</sup>, F. Espejo<sup>2</sup>, C. Rojas<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Grupo de Biofísica Molecular, Departamento de Física,  
Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Cra. 7ª No. 40-62 Bogotá, Colombia

<sup>2</sup> Fundación Instituto de Inmunología de Colombia - FIDIC  
olucia@javeriana.edu.co

### RESUMEN

El Ancimidol,  $\alpha$ -ciclopropil-(p-metoxifenil)-5-pirimidinmetanol, ( $C_{15}H_{16}N_2O_2$ ) es un regulador de crecimiento vegetal sintético, que hace parte del grupo de compuestos heterocíclicos que contienen nitrógeno que inhiben la síntesis de las giberelinas. La estructura de esta molécula se determinó por resonancia magnética nuclear, partiendo de una solución en cloroformo deuterado ( $CDCl_3$ ), utilizando un espectrómetro de 500MHz (campo de 11.7 Teslas). Se tomaron espectros unidimensionales RMN  $^1H$ , RMN  $^{13}C$ , pruebas DEPT 45, 90 y 135 y espectros bidimensionales HMBC y HMQC. En la estructura obtenida para el Ancimidol, se observaron tres ciclos como son la pirimidina, el metoxifenilo y el ciclopropilo, identificados por la asignación de los átomos de hidrógeno y de carbono y por las relaciones de conectividad dadas por los espectros bidimensionales HMBC y HMQC.

**Palabras clave:** Ancimidol, giberelina, regulador de crecimiento, resonancia magnética nuclear.

### ABSTRACT

The ancymidol  $\alpha$ -cyclopropyl-(p-methoxyphenyl)-5-pyrimidinemetanol, ( $C_{15}H_{16}N_2O_2$ ) is a synthetic plant growth regulator, that is part of a group of heterocyclic compounds that contain nitrogen and that inhibit the synthesis of gibberellins. The structure of this molecule was determined by Nuclear Magnetic Resonance, from a deuterated chloroform solution ( $CDCl_3$ ), using a 500MHz Bruker spectrometer with a field of 11.7T.  $^1H$ -NMR,  $^{13}C$ -NMR unidimensional spectra were determined, experiments DEPT 45, 90 and 135, as well as HMBC and HMQC bidimensional spectra. In the structure obtained, three rings were observed: pyrimidine, methoxyphenyl and cyclopropyl, which were identified by the assignments of hydrogen and carbon atoms and by the connectivity relations given by the HMBC and HMQC bidimensional spectra.

**Key words:** Ancymidol, gibberellins, growth regulator, nuclear magnetic resonance.

### INTRODUCCIÓN

Las giberelinas son una familia de fitohormonas diterpénicas, que presentan estructuras tetracíclicas de 19 a 20 carbonos, que se encuentran en diversas plantas y en algunos hongos, en donde inicialmente fueron descubiertas y cuya función hormonal principal, radica en el crecimiento y desarrollo de

plantas superiores. Fisiológicamente, se han identificado y caracterizado funciones como la movilización de semillas de reservorios, estimulación de la germinación, promoción del crecimiento longitudinal, típicamente entre nodos, etc. Adicionalmente están presentes en la estimulación de la floración y el desarrollo de frutos de plantas superiores. (Swain S. *et al.*, 1997).

La biosíntesis de las giberelinas sigue una ruta secuencial que ha sido estudiada *in vitro* con sistemas enzimáticos en células libres para ciertas especies, con el objetivo de identificar el punto de interacción de inhibidores de esta ruta, que detengan total o disminuyan parcialmente la producción de estas giberelinas.

Experimentalmente se han identificado cuatro tipos diferentes de inhibidores de crecimiento, de los cuales, los compuestos con heterociclos que contienen nitrógeno son el grupo en el cual se clasifica el Ancimidol. (Rademacher W., 2000).

Los reguladores o inhibidores de crecimiento vegetal, son compuestos sintéticos, los cuales son utilizados para reducir la longitud de crecimiento de una manera controlada, sin cambiar los patrones de desarrollo y sin utilizar compuestos fitotóxicos.

El Ancimidol ( $\alpha$ -ciclopropil-(*p*-metoxifenil)-5-pirimidinmetanol), cuya estructura química se presenta en la figura 1, es un regulador de crecimiento que hace parte del grupo de compuestos heterocíclicos que contienen nitrógeno y posee gran impor-

tancia comercial en arroz, árboles frutales y ornamentales. (SWAIN S. *et al.*, 1997).

Este grupo de reguladores actúa en ciertas especies bajo condiciones específicas, como inhibidores de enzimas monooxigenasas que catalizan un paso oxidativo en la biosíntesis de las giberelinas. La estructura característica de estos inhibidores consiste en un par de electrones en el nitrógeno con hibridación  $sp^2$  del anillo heterocíclico, localizados en la periferia de la molécula. El blanco de la enzima monooxigenasa contiene citocromo P450, el cual aparea ese par de electrones desenlazando el oxígeno de su sitio de unión con el hierro. Este proceso es el que detiene o disminuye la producción de giberelinas, interrumpiendo un paso metabólico por medio del cambio estructural de una enzima.

Estudios experimentales han demostrado que este grupo de reguladores de crecimiento, genera una disminución en los niveles óptimos de giberelinas, en ciertas especies y por consiguiente, la reducción de crecimiento de la planta, afectando los niveles de otras fitohormonas y en general, rutas metabólicas de vital importancia para la producción de giberelinas.

El objetivo de este trabajo fue determinar la estructura tridimensional de este regulador de crecimiento vegetal sintético, el Ancimidol, por medio de la resonancia magnética nuclear, que permite determinar estructuras tridimensionales de compuestos de interés biológico.

## MATERIALES Y MÉTODOS

La técnica de resonancia magnética nuclear llevada a cabo, se inició realizando las pruebas de solubilidad para el compuesto problema; el Ancimidol. Este proceso se realizó colocando diferentes concentraciones de la muestra (mg por ml de solvente) para averiguar la concentración a la cual es

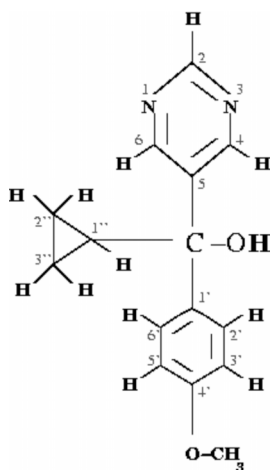


FIGURA 1: Estructura química del Ancimidol.

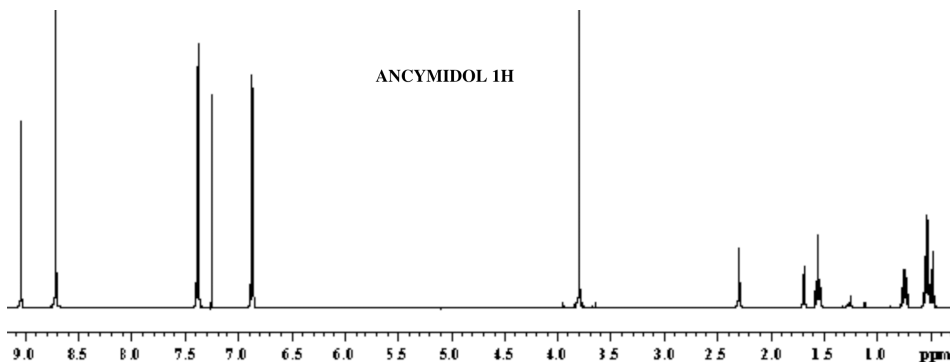


FIGURA 2: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 500MHz), del compuesto Ancimidol.

soluble. Se utilizaron solventes orgánicos como acetona, metanol, acetato de etilo y cloroformo. Para la toma de los espectros se utilizó una solución de 4 mg de Ancimidol en 500 ml de cloroformo deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ).

Los espectros unidimensionales RMN  $^1\text{H}$ , RMN  $^{13}\text{C}$ , los experimentos DEPT 45, 90 y 135, y los espectros bidimensionales HMBC (Direct) y HMQC, se tomaron en un espectrómetro de 500MHz de la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los espectros de resonancia magnética nuclear o RMN correspondientes al Ancimidol (figura 1), de fórmula química  $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2$ ; permitieron asignar los núcleos de hidrógeno y de carbono-13 y encontrar sus correlaciones en la estructura. La asignación de las señales en los espectros se realizó con base en los datos de las tablas para elucidación de estructuras de compuestos orgánicos. (Pretsch E. *et al.*, 1980)

Datos del espectro de RMN  $^1\text{H}$

El análisis del espectro de RMN  $^1\text{H}$ , (figura 2), se inició observando cada señal, identificando los desplazamientos químicos, el

área bajo la curva y la intensidad. En el espectro se identificaron 13 señales para los 16 hidrógenos del compuesto. De campo alto a campo bajo, se encuentran las señales a  $\delta(0.48 - 0.52 \text{ ppm, m, CH}_2)$ , a  $\delta(0.53 - 1.56 \text{ ppm, m, CH}_2)$ , a  $\delta(1.71 \text{ ppm, m, CH})$ , a  $\delta(2.41 \text{ ppm, s, OH})$ , a  $\delta(3.80 \text{ ppm, s, CH}_3)$ , a  $\delta(6.86 - 6.88 \text{ ppm, } \delta, 2 \text{ CH})$ , a  $\delta(7.36 - 7.37 \text{ ppm, } \delta, 2 \text{ CH})$ , a  $\delta(8.70 \text{ ppm, s, 2 CH})$ , y a  $\delta(9.03 \text{ ppm, s, CH})$ . Las señales a campos altos a  $\delta$  comprendidos entre 0.48 y 1.71 ppm, corresponden a los hidrógenos del anillo ciclopropilo, a  $\delta$  comprendidos entre 6.86 y 7.37 ppm, a los hidrógenos aromáticos del anillo fenilo, y entre  $\delta$  comprendidos entre 8.7 y 9.03 ppm a los hidrógenos del anillo pirimidínico.

## Datos del espectro de RMN $^{13}\text{C}$ y experimentos DEPT 45, 90 y 135

En el espectro RMN  $^{13}\text{C}$  completamente desacoplado (figura 3), se presentaron 12 señales correspondientes de campo alto a campo bajo a desplazamientos químicos  $\delta(\text{ppm})$ : 1.02, 2.51, 21.51, 55.30, 74.48, 113.84, 128.27, 137.28, 140.62, 155.13, 157.02 y 159.29. La identificación de los tipos de carbonos  $\text{CH}$ ,  $\text{CH}_2$ ,  $\text{CH}_3$  y  $\text{C}$ , se realizó con los experimentos DEPT 45, 90 y 135 (figura 3).

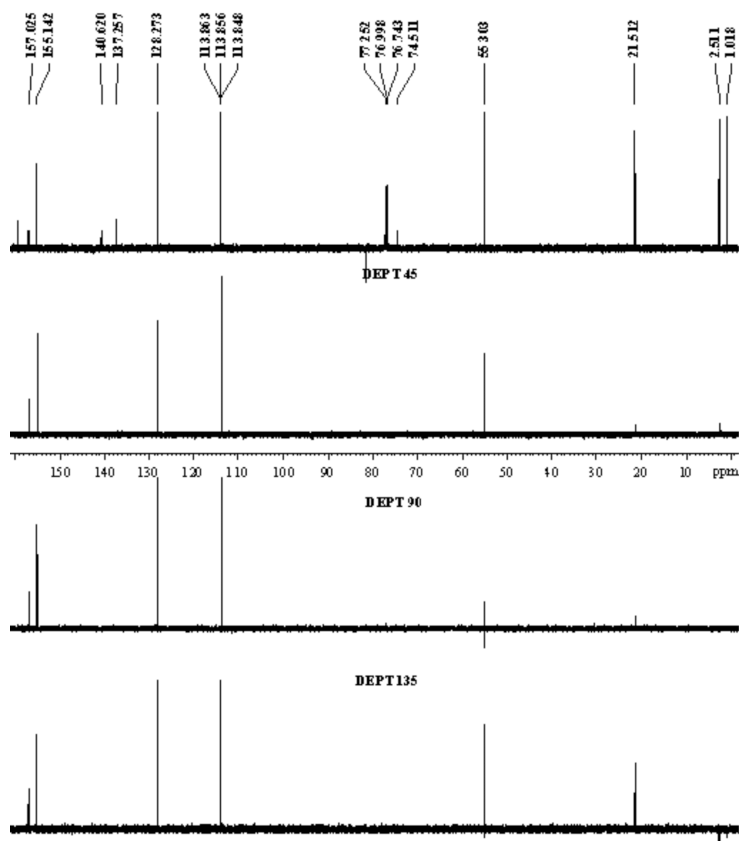


FIGURA 3: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  y experimentos DEPT 45 - DEPT 90 y DEPT 135, ( $\text{CDCl}_3$ ; 500MHz), del compuesto Ancimidol.

En el experimento DEPT 45, se identificaron las señales de carbonos que tienen protones adyacentes, CH,  $\text{CH}_2$  y  $\text{CH}_3$ , en el cual se observan 8 señales. Con el experimento DEPT 90, se determinaron 5 señales que corresponden a los 8 carbonos que tienen un enlace con un hidrógeno CH, tres de las señales representan dos carbonos equivalentes cada uno: dos del grupo fenilo (C2'-C6' y C3'-C5') y uno de la pirimidina (C4-C6). Corresponden a los desplazamientos químicos  $\delta(\text{ppm})$ : 21.51, 113.84(2), 128.27(2), 155.13(2) y 157.02. Con el experimento DEPT 135, se identificaron señales para los grupos CH y  $\text{CH}_3$ , que aparecen en fase positiva y los grupos  $\text{CH}_2$  que aparecen en fase negativa; mostrando

6 señales en fase positiva, de ellas 5 corresponden a los 5 CH determinados por el DEPT 90 y uno más que correspondería al grupo  $\text{CH}_3$  a  $\delta(\text{ppm})$ : 55.03. y 2 señales en fase negativa que corresponden a los grupos  $\text{CH}_2$  del ciclopropilo a  $\delta(\text{ppm})$ : 1.02 y 2.51 ppm. Los carbonos cuaternarios no aparecen en los (sub)espectros DEPT 45, 90 y 135. Éstos se identificaron por comparación con el espectro RMN  $^{13}\text{C}$  completamente desacoplado. Se determinó la presencia de 4 señales correspondientes a estos carbonos ubicados en los desplazamientos químicos  $\delta(\text{ppm})$ : 74.48, 137.28, 140.67 y 159.29. De acuerdo a la información obtenida de los espectros de RMN  $^1\text{H}$  y RMN  $^{13}\text{C}$  y los datos obtenidos en las

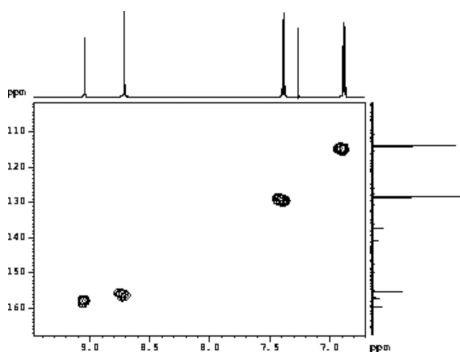


FIGURA 4: Espectro bidimensional HMQC( $\text{CDCl}_3$ ; 500MHz), del compuesto Ancimidol.

tablas para elucidación de estructuras de compuestos orgánicos, (PRETSCH E. *et al.*, 1980) se realizó la asignación para cada uno de los núcleos de carbono e hidrógeno de la estructura.

#### Espectro bidimensional HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Correlation)

La asignación de los núcleos de hidrógeno y de carbono realizada con los espectros RMN  $^1\text{H}$ , RMN  $^{13}\text{C}$  y los experimentos

DEPT 45, 90 y 135, se corroboró por medio de los espectros bidimensionales HMQC y HMBC. En el espectro HMQC (figura 4) se determinaron los hidrógenos de la molécula que están unidos directamente a un núcleo de carbono, por medio de señales de correlación entre una señal del espectro de RMN  $^1\text{H}$  con la señal correspondiente del espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ . En este espectro se observan 4 señales de correlación así: las señales a  $\delta(\text{ppm})$ : 6.86(d) y 6.88(d), correlacionan con el carbono en d 113.84 ppm y corresponden a los CH C3' y C5' del anillo fenilo. Las señales a  $\delta(\text{ppm})$ : 7.37(d) y 7.36(d), correlacionan con el carbono en  $\delta$  128.27 ppm y corresponden a los CH equivalentes C2' y C6' del anillo fenilo. La señal en d(ppm): 8.70 correlaciona con el carbono en  $\delta$  155.13 ppm, que corresponden a los CH equivalentes C4 y C6 del anillo pirimidínico. La señal 4 en  $\delta$  9.03 ppm correlaciona con el carbono C2 a d157.02 ppm del anillo pirimidínico. Tabla 1.

#### Espectro bidimensional HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation)

En el espectro bidimensional HMBC se obtuvieron señales que representan las conectividades entre  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  en un rango

**Tabla 1**  
Datos de RMN bidimensional HMQC, tomados de los espectros del Ancimidol

Señal	$^1\text{H}(\text{ppm})$	$^{13}\text{C}(\text{ppm})$	Enlace
1	6.86 - 6.88	113.84	
2	7.37 - 7.36	128.27	
3	8.70	155.13	
4	9.03	157.02	

más amplio, hasta de tres enlaces. El espectro obtenido se representa en la figura 5. En este espectro se identificaron 12 señales que proporcionan información sobre la conectividad entre hidrógenos y carbonos unidos por uno, dos y tres enlaces. Tabla 2.

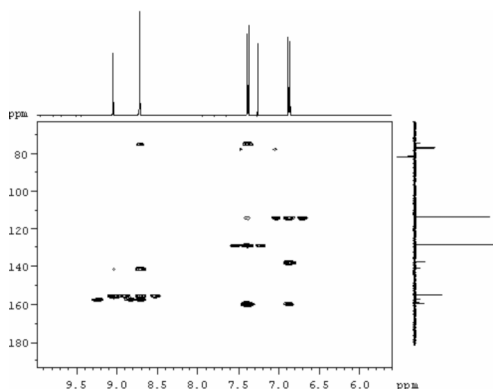


FIGURA 5: Espectro bidimensional HMBC (CDCl<sub>3</sub>; 500MHz), del compuesto Ancimidol.

La construcción del modelo estructural para el Ancimidol, también se puede llevar a cabo por medio de un procedimiento teórico basado en programas computacionales en donde se elabora manualmente la molécula y se realiza un proceso de minimización de energía, en el cual el programa por datos experimentales ya establecidos, le proporciona la forma tri-

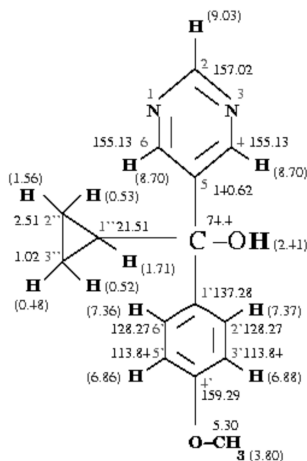


Figura 7: Asignación de los núcleos de hidrógeno y carbono del compuesto Ancimidol.

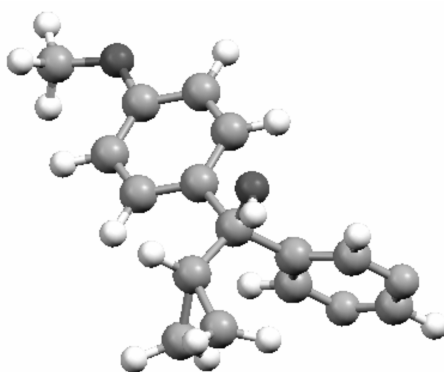


Figura 8: Modelo final de la estructura tridimensional del compuesto Ancimidol.

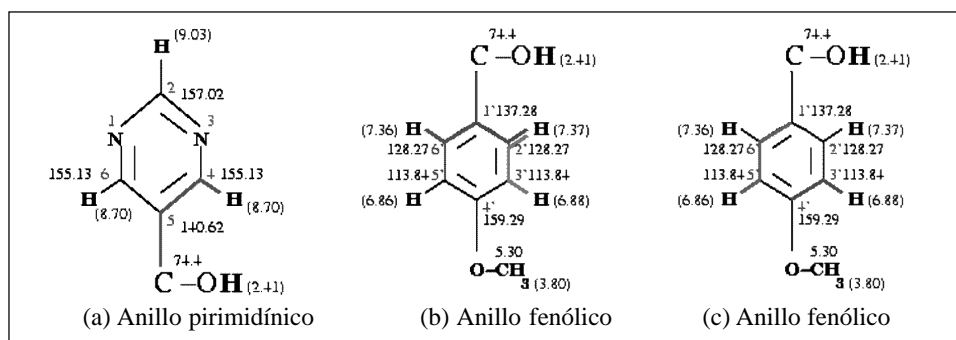


Figura 6: Representación de los datos de conectividad del espectro HMQC.

**Tabla 2**  
**Datos de RMN bidimensional H-C directo y HMQC, tomados de los espectros del Ancimidol**

$^1\text{H}$ (ppm)	H-C direct (ppm)	HMBC $^{13}\text{C}$ (ppm)
9.03 8.70	— 155.13	155.13 74.48 (2 enlaces) 140.62 (2 enlaces) 157.02 (3 enlaces)
7.36 y 7.37	128.27	74.48 (3 enlaces) 113.84 (2 enlaces) 159.29 (2 enlaces)
6.88 y 6.86	113.84	137.28 159.29 (2 enlaces)

**Tabla 3**  
**Asignación de los núcleos de hidrógeno y de carbono del Ancimidol, obtenida por RMN de  $^1\text{H}$  y de  $^{13}\text{C}$**

<b>Pirimidin-Metanol</b>				
$^{13}\text{C}$	d(ppm)	Tipo de enlace	$^1\text{H}$	d(ppm)
C2	157.02	CH	H-2	9.03
C4	155.13	CH	H-4	8.70
C5	140.62	Cuaternario	—	—
C6	155.13	CH	H6	8.70
C-OH	74.4	Cuaternario	—	—
<b>p-metoxifenilo</b>				
$^{13}\text{C}$	d(ppm)	Tipo de enlace	$^1\text{H}$	d(ppm)
C1'	137.28	Cuaternario	—	—
C2'	128.27	CH	H-2'	7.37
C3'	113.84	CH	H-3'	6.88
C4'	159.29	Cuaternario	—	—
C5'	113.84	CH	H-5'	6.86
C6'	128.27	CH	H-6'	7.36
CH <sub>3</sub>	5.30	CH <sub>3</sub>	H <sub>3</sub>	3.80
<b>Ciclopropilo</b>				
$^{13}\text{C}$	d(ppm)	Tipo de enlace	$^1\text{H}$	d(ppm)
C1''	21.51	CH	H-1''	1.71
C2''	2.51	CH <sub>2</sub>	H2-2''	0.53 - 1.56
C3''	1.02	CH <sub>2</sub>	H2-2''	0.52 - 0.48

dimensional al compuesto. El modelo obtenido por medio de este procedimiento se observa en las figuras 6-8.

## CONCLUSIONES

En la estructura obtenida para el Ancimidol, se observaron tres ciclos como son la pirimidina, el metoxifenilo y el ciclopropilo, identificados por la asignación de los átomos de hidrógeno y de carbono y por las relaciones de conectividad dadas por los espectros bidimensionales HMBC y HMQC. En la figura 6 se presentan los ciclos identificados con la numeración pertinente para cada uno de ellos y se señalan los desplazamientos químicos tanto para los núcleos de hidrógeno como de carbono. En la tabla 2 se presentan los datos para cada carbono e hidrógeno, siguiendo la numeración indicada. Al comparar la estructura obtenida por RMN con la obtenida por cristalografía, (Soriano y Rojas, 2004) se encuentran estructuras claramente similares que concuerdan con la planaridad de los anillos y la distribución de éstos. El anillo ciclopropilo está orientado de tal forma que se ve la repulsión entre los otros dos grupos, el metoxifenilo y la pirimidina. Los tres anillos presentan alta planaridad, dada por la rigidez de cada uno de éstos y su ubicación en la molécula. Adicionalmente el grupo metoxifenilo está ubicado perpendicularmente a la pirimidina, siendo ésta la que le confiere a la molécula su capacidad de inhibir la producción de giberelinas, efecto dado por un par de electrones libres localizados en la periferia de la molécula. El grupo principal OH completa la valencia del carbono principal o carbono  $\alpha$ .

El modelo final del Ancimidol se presenta en la figura 7, y los datos de esta estructura se relacionan en la tabla 3.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan su agradecimiento a la Pontificia Universidad Javeriana, quien por medio de la Vicerrectoría Académica proporciona los medios económicos para llevar a cabo los proyectos de investigación. También agradecen a la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia FIDIC por facilitar los equipos para la toma de los espectros, de forma muy especial a las integrantes del Grupo Funcional de Estructura Tridimensional, por su valiosa colaboración. A la doctora Nohemí Téllez por sus pertinentes comentarios en el desarrollo del trabajo.

## LITERATURA CITADA

- SWAIN, S. *et al.*, 1997. Gibberellins are required for embryo growth and seed development in pea. *The Plant Journal*. 12 (6): 1329-1338.
- RADEMACHER, W. 2000. Growth Retardants: Effects on Gibberellin Biosynthesis and Other Metabolic Pathways. *Annu Rev Plant Physiol. Plant Mol Biol*, 51: 501-531.
- Pretsch E., *et al.* 1980. Tablas para la elucidación estructural de compuestos orgánicos por métodos espectroscópicos. Alhambra. España.
- SORIANO, M. ROJAS, C. and ALVARADO, J. 2004. Crystal Structure of  $\alpha$ -Cyclopropyl-4-methoxy- $\alpha$ -(pyrimidin-5-yl)benzyl alcohol (Ancymidol). *Analytical Sciences*, vol. 20.

Recibido: 6.02.2005

Aceptado: 11.09.2005