



00577 6
2y
Universidad Nacional
Autónoma de México

FACULTAD DE QUIMICA

METODOS ANALITICOS MODERNOS
EN EL ESTUDIO DE ESTRUCTURAS
ORGANICAS

INFORME DE TRABAJO
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS QUIMICAS
(QUIMICA ANALITICA)

P R E S E N T A
Q. JOSE FEDERICO DEL RIO PORTILLA

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

MEXICO. D. F.

1991





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

CONTENIDO

Prólogo	1
Introducción	3
Resonancia magnética nuclear	5
Secuencias unidimensionales	7
Resonancia magnética nuclear en dos dimensiones	11
Captulo I.- Determinación de compuestos volátiles empleando el sistema analítico acoplado cromatografía de gases-espectrometría de masas.	19
Captulo II.	
a) La resonancia magnética nuclear como herramienta para el análisis químico.	26
b) Asignación de señales en RMN de ^1H y ^{13}C .	33
Captulo III.	
a) Separación y caracterización de los isómeros del <i>cis,trans</i> -2-carbetoxi-3-fenil-3-metil oxirano.	41
b) Conformaciones del 1,2-propanodiol y 1,3-propanodiol.	48
Conclusiones	60
Bibliografía y referencias	62
Espectros y Anexos	66

PRÓLOGO

Este informe de trabajo está dirigido a alumnos que ya terminaron la licenciatura o se encuentran estudiando alguna maestría en Química. No pretende ser un trabajo exhaustivo o una revisión bibliográfica completa sobre ninguno de los temas tratados en él.

Se espera que el lector esté familiarizado con conceptos fundamentales de espectroscopía como energía, frecuencia, momentos magnéticos, emisión de pulsos, transformadas de Fourier, etc.

En la introducción se abordan las técnicas de espectroscopía de manera general, describiendo su aplicación para el análisis químico. Se enfoca de manera particular a la espectrometría de masas acoplada a la cromatografía de gases y a la resonancia magnética nuclear; por ser estas técnicas espectroscópicas las que proporcionan mayor información estructural; se profundiza principalmente en resonancia magnética nuclear, haciendo hincapié en la resonancia magnética en dos dimensiones por ser una de las técnicas que más se emplea hoy en día.

El capítulo I trata de la aplicación de la espectroscopía de masas acoplada a la cromatografía de gases, en el estudio de los constituyentes del aceite esencial de "Chapote amarillo". Este trabajo se realizó en colaboración con la Dra. Martha Albores de la Facultad de Química y la M. en C. Leonora Sánchez de la E.N.E.P. Zaragoza.

El capítulo II aborda los trabajos realizados para la elucidación estructural de productos naturales empleando resonancia magnética nuclear y el papel primordial que cumple esta técnica. Se menciona en particular los trabajos realizados con el grupo

de la Dra. Rachel Mata de la Facultad de Química.

El capítulo III discurre sobre los trabajos que se han realizado con sustancias de interés científico. En una primera fase, la separación de los isómeros geométricos del *cis, trans* 2-carbetoxi-3-fenil-3-metil oxirano. En una segunda fase, los estudios efectuados para tratar de encontrar las posibles conformaciones del 1, 2-propanodiol y el 1, 3-propanodiol en disolución.

Agradecimientos:

Se quiere hacer patente el agradecimiento al Dr. Alain Quèrè Thorent por su paciencia durante estos cinco años, por sus consejos y dedicación. Al Dr. Raúl G. Enríquez Habib por su constante empeño, apoyo y asesoría, por todas las horas de discusión y por su amistad. A la Dra. Rachel Mata por su estímulo, comprensión, apoyo y por el reconocimiento al trabajo que realizo; también por los múltiples comentarios, sugerencias y ayuda para la realización de este manuscrito. Al Dr. Guillermo Delgado Lamas por sus valiosos comentarios al presente trabajo. Al Dr. Fernando Walls Armijo por su confianza al haberme encomendado la responsabilidad del manejo del equipo Varian VXR-300S. Al Dr. William F. Reynolds por su ayuda desinteresada, por todos los comentarios y sugerencias en la realización de este trabajo y por el apoyo brindado en la estancia de un mes en la Universidad de Toronto, Canadá. A la Q. Lucia del Carmen Márquez por sus enseñanzas en el manejo de los equipos de cromatografía. Al I. Q. Fernando Jauregui por la muestra del *cis, trans* 2-carbetoxi-3-fenil-3-metil oxirano. Por último, quisiera agradecer el apoyo de las siguientes instituciones: a la Universidad Nacional Autónoma de México por los siete meses de beca de maestría; al Conacyt por un año de beca; y al Chemical Soccer Club por la temporada 86-87.

MÉTODOS ANALÍTICOS MODERNOS EN EL ESTUDIO DE ESTRUCTURAS ORGÁNICAS

INTRODUCCIÓN

En nuestros días sería muy difícil concebir el trabajo del químico sin el uso de técnicas espectroscópicas y cromatográficas. La resonancia magnética nuclear, la espectrometría de masas, los rayos X, la cromatografía líquida de alta eficiencia, la cromatografía de gases, son las técnicas que más se emplean hoy en la separación y elucidación estructural de compuestos orgánicos e inorgánicos. Todos estos métodos en sus inicios se estudiaron esencialmente como fenómenos físicos y su aplicación al análisis químico fue limitada y quizá, insospechada.

La espectrometría de masas (EM) fue una de las técnicas espectroscópicas que tuvo su inicio a principios de siglo, pero no fue sino hasta después de la Segunda Guerra Mundial cuando comenzó a aplicarse al análisis químico. Esta técnica es hoy muy valiosa para la investigación química. El determinar la masa molecular y la interpretación de los fragmentos moleculares permite, en muchos casos, establecer la estructura química, permitiendo así, caracterizar una gran cantidad de compuestos¹.

La EM ha tenido mayor auge por la versatilidad que se puede lograr al acoplar estos equipos a cromatógrafos de gases ya que se resuelven dos problemas que en química se presentan normalmente asociados: la separación y la caracterización de compuestos en una mezcla.

Por otra parte la cromatografía de gases (CG) tiene la desventaja intrínseca de

que los picos cromatográficos *per se* no constituyen una prueba de identidad estructural química. El uso de estándares internos se extendió enormemente para lograr la identificación de los picos cromatográficos, pero con frecuencia, en las mezclas de sustancias complejas la probabilidad de encontrar picos que no pueden ser comparados con un estándar es alta y, en consecuencia, puede ser elevado el número de compuestos que no se identifiquen. Se requiere de gran experiencia, acumulada en muchos años, para poder asignar un número aceptable de estos picos.

Con el desarrollo de las columnas capilares, el problema de identificación se incrementó aún más. Los picos de sustancias de tiempo de retención similar, y que aparentan ser un sólo pico en condiciones de baja resolución, se resuelven mejor en las nuevas condiciones de separación de las columnas capilares y el resultado es obtener un número mayor de picos cromatográficos debido a la mejor separación.

Los sistemas acoplados de cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM) resolvieron la mayor parte del problema y abrieron nuevos campos de investigación.

Aunque la espectrometría de masas acoplada a la cromatografía de gases ha servido para la identificación de un gran número de compuestos, en muchos casos se tienen ambigüedades en la caracterización de los picos cromatográficos. Este es el caso de muchos isómeros que tienen prácticamente el mismo espectro de masas. En algunos, es posible diferenciarlos por las abundancias relativas de las señales, pero en muchos otros no es posible hacerlo.

La forma natural de caracterizar los picos cromatográficos es mediante la interpretación de los espectros de masas. Pero dada la variedad de sustancias desconocidas que es posible encontrar en muestras, como son: fluidos biológicos, contaminantes, aromas, etc. se han acoplado, computadoras a los sistemas de CG-EM

con el fin de facilitar la caracterización de los picos. Para su análisis se compara el o los espectros obtenidos con un banco de datos de espectros de masas de compuestos conocidos. La computadora compara y elige los espectros más parecidos al obtenido; en este momento el químico, conociendo la procedencia de la muestra y datos previos, hace el análisis caracterizando los compuestos; si aún quedan picos sin identificar se puede recurrir al uso de estándares. De otra manera es necesaria la separación preparativa de las sustancias y realizar su caracterización mediante la ayuda de todas las técnicas espectroscópicas disponibles.

Cuando se tienen componentes de mezclas en baja concentración y es factible obtener sus espectros de masas, el sistema CG-EM es de gran utilidad, ya que en ciertos casos es posible caracterizarlos sin ambigüedad².

RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

En la instrumentación analítica moderna se han incorporado las computadoras, dándoles versatilidad, confiabilidad, rapidez y la posibilidad de incluir experimentos que requieren de precisión elevada para la realización de los experimentos. Este es el caso de la resonancia magnética nuclear (RMN).

La RMN es la técnica espectroscópica que más se ha desarrollado en los últimos veinte años con el empleo de los equipos de transformada de Fourier y la adopción de imanes superconductores; estos equipos han aumentado la sensibilidad, la dispersión espectral y posibilitan el estudio de moléculas cada vez más complejas. En los inicios de esta técnica se observó que el incremento en el campo magnético lograba la resolución de muchas señales que se observaban superpuestas al emplear imanes de inducción pequeños. En sus inicios la RMN dispuso de instrumentos con

campos magnéticos de alrededor de 0.7 T. Con el uso de imanes superconductores se dispone actualmente de campos magnéticos de 14.1 T en los cuales la RMN del ^1H ocurre empleando radiofrecuencias (rf) de 600 Megahertz (MHz). Este no es el límite de los campos magnéticos que pueden ser generados; sin embargo para la RMN, sí constituye hoy un límite natural por dos razones: la orientación molecular que ocurre a campos magnéticos altos y el calentamiento de la muestra como resultado de la proximidad de la frecuencia a la región de las microondas.

Los logros alcanzados, las separaciones de las señales y los resultados obtenidos con los equipos con campos magnéticos mayores de 4.7 T en los espectros de ^1H son ilustrativos de la ganancia que en términos de información espectral han adquirido los químicos con la adopción de estos avances tecnológicos. En la RMN de ^{13}C , el uso de estos equipos no tienen la función principal de evitar la sobreposición de señales; esto es poco probable debido a que este núcleo posee una ventana espectral veinte veces mayor que la del hidrógeno. El mayor problema en el análisis del espectro de ^{13}C , es la asignación inequívoca de las señales. En la práctica normal siempre se analiza el espectro de ^{13}C y el de ^1H mediante correlaciones con estructuras semejantes. Para predecir el desplazamiento químico de estos núcleos se dispone de parámetros de aditividad utilizando como base de comparación los desplazamientos químicos de sustancias parecidas cuya asignación espectral es la más segura posible. La estimación del desplazamiento químico de un carbono se realiza considerando el efecto de los sustituyentes en las posiciones α , β y γ , principalmente. La magnitud de cada tipo de contribución es normalmente de carácter semi-empírico. A pesar de ello, la asignación de muchas señales en ciertas regiones donde coinciden muchas de ellas era muy ambigua y continuamente se asignaban erróneamente³.

Para disponer de una metodología experimental que permita obtener información espectral para la asignación inequívoca de las señales en RMN, se han

estudiado secuencias de pulsos donde la excitación y evolución de los sistemas de espines es procesada para obtener información espectral que debe cumplir con dos requerimientos esenciales: sensibilidad y selectividad. Estas metodologías comprenden actualmente el uso de secuencias de pulsos unidimensionales y bidimensionales. Estos experimentos sólo son posibles de realizar con el empleo de equipos que utilizan el modo de excitación de pulsos, convirtiendo la respuesta del sistema de espines nucleares del dominio del tiempo al dominio de frecuencias mediante una operación matemática conocida como transformada de Fourier.

Secuencias Unidimensionales^{4,5}

Las secuencias de pulsos unidimensionales son aquellas que emplean más de un pulso y tiempos de evolución constantes para obtener, en primera instancia una disminución libre de la inducción (*free induction decay*, *fid*) en función de la intensidad de la energía y el tiempo y posteriormente mediante una transformación de Fourier, obtener un espectro en función de absorción y frecuencia. Existe una gran variedad de secuencias unidimensionales, pero solamente se describirán dos. Se seleccionaron por su amplio uso en la caracterización de compuestos y asignación de señales en los espectros de ^{13}C : "Attached Proton Test" (APT) y "Distortionless Enhancement by Polarization Transfer" (DEPT).

Como modelo de uso general para la descripción de los cambios que ocurren en la magnetización de los momentos magnéticos nucleares se utiliza el modelo que se representa en la Figura 1, donde el sistema de coordenadas corresponde al modelo rotante.

APT⁷

Esta secuencia permite obtener un espectro de ^{13}C con las señales de los metilos y de los metinos invertidas, mientras que las señales de los metilenos y los carbonos cuaternarios se obtienen en posición normal.

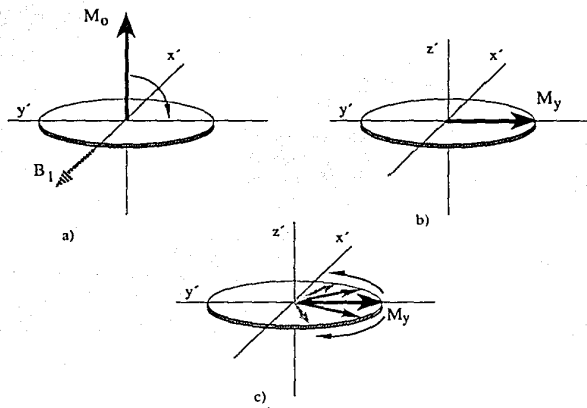
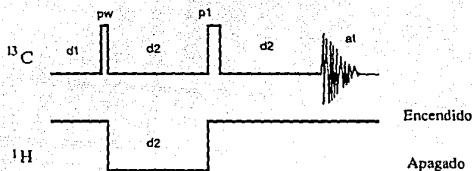


Figura 1. Representación esquemática de la magnetización de los espines nucleares en un sistema de coordenadas rotantes suponiendo que el pulso de excitación se aplica exactamente en la mitad de las frecuencias. a) La magnetización macroscópica resultante de los diferentes momentos magnéticos nucleares (M_0) en la posición de equilibrio, al momento de ser aplicado un pulso de radiofrecuencia (B_1); b) la modificación de M_0 (M_y) después de aplicar un pulso de 90° ; c) evolución de M_y en sus componentes de frecuencias distintas; en la figura se enfatizan las componentes del desplazamiento químico y del acoplamiento.

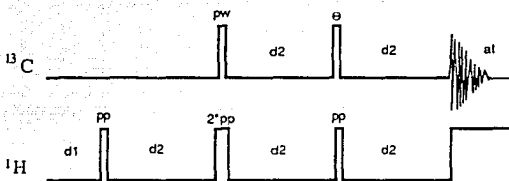
La secuencia de pulsos es la siguiente:



donde $d1$ ("delay" 1) es el tiempo requerido para que los momentos magnéticos de los carbonos se encuentren en estado de equilibrio; pw ("pulse width") es la duración del pulso que coloca en el plano xy (90° de la dirección z) a los momentos magnéticos de los diferentes carbonos agrupados en una magnetización global o macroscópica. En ese momento se apaga el desacoplador que actúa sobre la zona de resonancia del hidrógeno para permitir el acoplamiento 1H - ^{13}C . En esta forma se generan momentos magnéticos que precesonan con diferentes frecuencias. El tiempo $d2$ ("delay" 2) corresponde a la espera necesaria para que ocurra la inversión de la fase de las señales de los carbonos enlazados a un número non de hidrógenos; las señales de los carbonos unidos a un número par de hidrógenos permanecen en posición normal. El pulso $p1$ ("pulse" 1) es un pulso de 180° , que junto con el mismo tiempo de evolución $d2$, permite reenfoque aquellas señales que no tienen la misma frecuencia de oscilación que la referencia. De esta forma, la posible asincronía de las frecuencias no afecta el resultado del experimento. Inmediatamente después del tiempo $d2$, comienza la adquisición de datos con una duración at ("acquisition time"). La nomenclatura empleada ($d1$, pw , $d2$, $p1$, at) corresponde al nombre de los parámetros utilizados en los equipos Varian, que son los más utilizados en México.

DEPT³

Este experimento consta de tres secuencias que se representan con las siguientes secuencias de pulsos:



donde pw es el pulso de 90° para los carbonos, d2 es el tiempo correspondiente a $1/2 \cdot J_{\text{HC}}$ y pp ("proton pulse") es el pulso de 90° del desacoplador. Θ corresponde a la longitud del pulso necesaria para que ocurra la transferencia de la polarización apropiada a las características de la evolución de cada tipo de carbono, i. e. CH , CH_2 ó CH_3 . Los valores que puede tomar son:

a) $\Theta = 1/2 \cdot \text{pp}$ con lo cual en el espectro sólo aparecen las señales de los carbonos unidos a hidrógenos; los carbonos que no aparecen son, por omisión, carbonos cuaternarios. Esto se debe a que el incremento de la polarización de los carbonos se realiza a través de los hidrógenos. Así, los carbonos del CDCl_3 , que no poseen hidrógenos unidos, tampoco aparecen en este espectro.

b) $\Theta = \text{pp}$, donde sólo aparecen los carbonos unidos a un hidrógeno. Esta secuencia se repite dos veces para lograr la completa anulación de los metilos y metilenos.

c) $\Theta = 3/2 \cdot \text{pp}$ donde aparecen las señales de los CH y CH_3 en forma normal y las de los CH_2 aparecen invertidas.

Al efectuar las sumas y restas de espectros en forma adecuada, se obtienen

cuatro espectros, donde en el primero aparecen todas las señales de los carbonos unidos a hidrógenos, en el segundo sólo los CH, en el tercero sólo los CH₂ y en el cuarto los CH₃ únicamente; finalmente todos estos espectros pueden trazarse con las intensidades de las señales positivas. Este procedimiento se conoce como "edición espectral" y en algunos casos se ha automatizado y forma parte de una rutina en las computadoras de los espectrómetros. Así, DEPT también ha generado un nuevo acrónimo, "ADEPT" al ser precedido por la palabra "Automatic".

Resonancia Magnética Nuclear en Dos Dimensiones

La resonancia magnética nuclear en dos dimensiones^{9,10} (RMN 2D) fue sugerida por primera vez por Jeener¹¹ en 1971, pero no fue sino hasta 1975 que se reportaron los primeros resultados experimentales¹². Este tipo de resonancia involucra cuatro períodos de tiempo:

1.- Preparación:

La etapa de preparación es el tiempo que transcurre para que todos los momentos magnéticos de los núcleos en estudio adquieran una posición de equilibrio o retornen a él después de haber sido excitados. La rapidez con la que esto ocurre esta gobernada por las características de relajación que posea la especie isotópica de que se trate. Esta característica de un sistema de espines se describe como T₁ y es específica para cada tipo de núcleos en una molécula. T₁ es también una medida de la rapidez con que un sistema de espines adquiere o retorna a su posición de equilibrio¹³. Este tiempo corresponde al tiempo d1.

2.- Evolución:

Este período comienza después de haber aplicado el primer pulso de rf; los

momentos magnéticos de los átomos cambian su orientación con respecto a la del campo magnético B. En este período se incluyen variaciones en los tiempos de espera, que permiten una evolución controlada de los espines nucleares. Este tiempo, llamado t_1 (que es diferente a T_1), va variando desde $t_1=0$ hasta un valor definido para obtener una colección de "fid's", cuya diferencia reside en una variación sistemática de la evolución de los sistemas de espines. Estos datos son una función de t_1 y es la responsable de la RMN 2D. Para la explicación de este tipo de RMN se ha realizado un cambio en la nomenclatura, ya que la mayoría de los libros y artículos que tratan sobre el tema se emplean frecuentemente los términos t_1 y t_2 , que corresponden respectivamente a los tiempos d_2 y a_1 utilizados en este trabajo.

3.- Mezclado:

Al final del tiempo de evolución, se puede optar por aplicar nuevos pulsos y/o esperar cierto tiempo, que será constante para toda la colección de "fid's". Se intenta que los diferentes espines interactúen entre ellos durante este período. No en todos los experimentos bidimensionales existe este período de mezclado.

4.- Detección:

Finalmente, la respuesta magnética del sistema como función del tiempo es recibida en la forma de "fid's" acumulados. Cada uno de estos espectros, como función del tiempo t_2 y de la energía, es idéntico a los espectros unidimensionales.

A medida que se varía el tiempo de evolución t_1 , se obtienen diferentes "fid's" de la forma:

$$S(t_2; t_1)$$

donde t_2 representa el período de detección normal en cada "fid" (constante) y t_1 , la duración específica del tiempo de evolución variable y el ";" indica que los símbolos a

la izquierda son variables y los de la derecha son parámetros.

El espectro S , en su acumulación original, depende de dos tiempos v. gr. t_2 y t_1 . La transformada de Fourier con respecto a t_2 proporciona una colección de espectros unidimensionales que definen una frecuencia (F_2) y que contienen modificaciones periódicas de las señales. Dichas modificaciones a su vez, son función de t_1 .

Para obtener los espectros de los fid's acumulados, se requiere efectuar la transformada de Fourier:

$$S(t_2; t_1) \rightarrow S(F_2; t_1).$$

En esta forma se tendría una serie de espectros con variaciones periódicas en las intensidades de las señales.

Estos espectros poseen información de las variaciones en t_1 , pero para que la información obtenida sea susceptible de interpretarse, se requiere aplicar una transposición de la forma:

$$S(F_2; t_1) \rightarrow S(t_1; F_2);$$

obteniéndose nuevamente funciones sinusoidales para cada frecuencia procesadas con la primera transformada de Fourier.

Así es posible volver aplicar una segunda transformada de Fourier:

$$S(t_1; F_2) \rightarrow S(F_1; F_2),$$

obteniendo el espectro en dos dimensiones como una función de frecuencias y no de tiempos, como se tenía en un principio. Esta representación en función de frecuencias en ambas dimensiones corresponde a la forma rápida de representación espectral. Las frecuencias de cada dimensión pueden corresponder a desplazamientos químicos i. e. δ vs. δ homo o heteronucleares, a desplazamientos químicos vs. acoplamientos i. e. δ

vs. J o a efectos especiales como desplazamientos químicos vs. efecto nuclear Overhauser⁹.

Existe actualmente del orden de 500 experimentos bidimensionales¹⁴, que corresponden esencialmente a variantes o combinaciones de estos tres casos.

Una representación esquemática de las funciones se representa en la Figura 2.

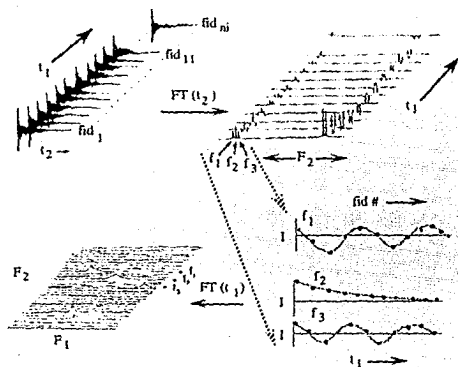


Figura 2. Representación de la RMN 2D. Se acumulan n_i fid's los cuales tienen una dependencia del tiempo de evolución (t_1) y la dependencia normal del tiempo t_2 . Al efectuarse la primera transformada de Fourier para todos estos fid's se obtienen diferentes espectros con oscilaciones periódicas que son función de t_1 . Se efectúa la transposición para todas las frecuencias del espectro para representar en funciones la dependencia de t_1 ; se deben obtener tantos fid's como número de puntos haya en los espectros obtenidos; se ejemplifica en particular tres frecuencias: f_1 , f_2 y f_3 . A estas funciones se les aplica nuevamente una transformada de Fourier, ahora empleando como parámetro t_1 ; obteniéndose así la representación interpretable del espectro en función de F_1 y F_2 .

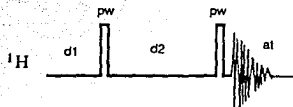
Los experimentos de RMN 2D más empleados para determinar estructuras orgánicas son:

COSY¹⁵

Estas siglas corresponde el acrónimo inglés de "CORrelated Spectroscopy". Con esta secuencia se obtienen espectros en dos dimensiones y permiten conocer el acoplamiento entre los diferentes hidrógenos en la molécula y por tanto las conectividades entre ellos. Esencialmente, el experimento COSY proporciona en un sólo experimento toda la información acerca de los acoplamientos entre todos los hidrógenos de la molécula. Esta información es la misma que se obtendría de un experimento unidimensional en el cual se realiza la irradiación de todas las frecuencias y se registra cada uno de los espectros resultantes. En la práctica esto involucra una gran cantidad de tiempo de instrumento y de ahí, la ventaja de emplear el experimento COSY.

La interpretación de este tipo de espectros se obtiene graficando tanto en las ordenadas como en las abscisas el desplazamiento químico de los protones. En él aparecen las interacciones que afectan el desplazamiento y acoplamiento de los hidrógenos. En este sentido, si un núcleo a 5 ppm está acoplado con otro a 4 ppm aparecerán señales en las coordenadas: (4,5) y (5,4) como resultado del acoplamiento de estos hidrógenos; también aparecen señales en las coordenadas (4,4) y (5,5) debido a la interacción de los ^1H con ellos mismos. Si además hubiera un acoplamiento del núcleo con desplazamiento químico en 5 con uno en 2 ppm, tendríamos señales en (5,2) y (2,5). Como consecuencia de ello los espectros obtenidos son simétricos por la diagonal. En esta forma se pueden determinar en un sólo experimento las conectividades de todos los protones de una molécula. Esta es una forma sencilla de encontrar las correlaciones entre los protones de una molécula, en vez de la forma tradicional de desacoplamiento selectivo, la cual no puede realizarse cuando las señales de los protones se superponen o se encuentran muy cercanas.

La secuencia de pulsos de este experimento es:



donde pw es el pulso de 90° de hidrógeno y $d2$ es el tiempo conocido como tiempo de evolución. Este tiempo es el causante de generar la información necesaria para producir una de las dos dimensiones.

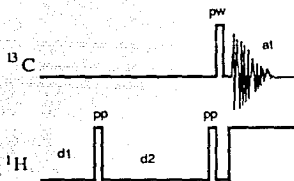
Una de las desventajas que tiene la secuencia ilustrada es que los acoplamientos pequeños no se observan claramente, por tal motivo se modificó esta secuencia. Esta variación consiste en disminuir el segundo pulso de 90° a un pulso de 45° , con lo que el tiempo de mezclado entre las transiciones no correlacionadas directamente se ve reducido, incrementando las señales con acoplamientos directos. Esta modificación en la secuencia de pulsos generó el nombre de COSY 90 cuando se emplea el pulso de 90° y COSY 45 cuando este pulso se reduce a 45° ¹⁵.

HETCOR¹⁶

HETCOR, "HETeronuclear CORrelation", genera un espectro no simétrico a diferencia del COSY, donde se obtiene la correlación entre los núcleos interactuantes v. gr. carbonos e hidrógenos a los que está unido. El espectro HETCOR de ^{13}C - ^1H se obtiene graficando en una de las coordenadas el espectro de ^{13}C y en otro el espectro de ^1H . La interacción entre ambos es observada por los contornos que correlacionan posiciones específicas de cada una de las escalas.

La interpretación de este espectro es similar a la del COSY; donde aparecen las señales, indica que el carbono con el desplazamiento químico definido por la señal esta unido al hidrógeno a un enlace de distancia, con el desplazamiento químico correspondiente.

Existen diferentes secuencias para obtener este tipo de espectros, siendo la más empleada:



En esta secuencia, d2 es el tiempo de evolución y está definido por el inverso de las constantes de acoplamiento promedio a un enlace de distancia entre carbono e hidrógeno. Esta secuencia de pulsos es muy útil cuando se tiene completamente asignado uno de los espectros, ya sea de ^1H o de ^{13}C , y automáticamente queda asignado el otro espectro como producto de la correlación entre ^1H y ^{13}C .

XCORFE¹⁷

En 1985 Reynolds y coautores¹⁷ describieron un nuevo experimento de correlación heteronuclear de largo alcance llamado XCORFE, "X-nucleus CORrelation with Fixed Evolution time", para establecer las conectividades por medio de modulaciones de transferencia de polarización indirecta a través de acoplamientos ^1H - ^1H . En este experimento se suprime la correlación ^{13}C - ^1H a un enlace de distancia y

permite observar la correlación $^{13}\text{C}-\text{C}-^1\text{H}$ y $^{13}\text{C}-\text{C}-\text{C}-^1\text{H}$ i. e. a dos y tres enlaces de distancia, logrando asignaciones totales de señales de ^{13}C en moléculas complejas. Con este tipo de correlaciones es más sencillo conocer la estructura de una molécula, ya que la información obtenida del COSY no considera carbonos cuaternarios; este experimento encuentra correlaciones con estos carbonos siempre y cuando existan hidrógenos hasta tres enlaces de distancia.

Este experimento de dos dimensiones permite la asignación no ambigua de carbonos cuaternarios. La asignación de estos carbonos se realizaba anteriormente con base en correlaciones empíricas comparando los desplazamientos químicos con los de sustancias muy parecidas; lo cual ha provocado numerosos errores de asignación o esta queda, frecuentemente, indeterminada. Con este experimento se logra observar, en algunos casos, la multiplicidad del acoplamiento $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ del carbono vecino. En esta forma se pueden diferenciar las señales a dos enlaces de distancia de las de tres enlaces.

Otra secuencia muy usada para determinar correlaciones a larga distancia entre hidrógenos y carbonos es la llamada COLOC¹³ (Correlation spectroscopy via LONG range Couplings). Esta secuencia determina las correlaciones a dos y tres enlaces de distancia entre hidrógenos y carbonos empleando la transferencia de polarización a través de las constantes de acoplamiento pequeñas con un desacoplador de banda ancha. La diferencia entre la secuencia XCORFE y COLOC se encuentra en que emplean diferentes secuencias, con la ventaja de que la XCORFE permite discernir por el tipo de señal entre las de dos, de las de tres enlaces de distancia, excepto para carbonos cuaternarios¹⁴.

Con estas técnicas, el químico posee todo un arsenal de recursos para realizar estudios estructurales y conformacionales. El empleo de estas técnicas, de manera conjunta, facilita el estudio y aumenta el conocimiento sobre la estructura y propiedades moleculares.

CAPÍTULO I

DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS VOLÁTILES EMPLEANDO EL SISTEMA ANALÍTICO ACOPLADO CROMATOGRAFÍA DE GASES-ESPECTROMETRÍA DE MASAS

Uno de los sistemas analíticos acoplados más populares y de mayor uso hoy en día es el sistema acoplado CG-EM. Este sistema permite tener una idea muy acertada o caracterizar con toda precisión los constituyentes de una mezcla, que puede ir desde lo muy sencillo hasta lo muy complejo. La identificación de los componentes se basa en la separación mediante CG y en la caracterización de los constituyentes por EM. Inmediatamente después de haberse separado los componentes, estos son incorporados al espectrómetro de masas. Para este propósito las columnas capilares han introducido la gran ventaja de que la cantidad de sustancia que se separa es comparable aproximadamente a la requerida para poder realizar los espectros de masas. La cantidad de sustancia total requerida para efectuar el análisis es mínima y corresponde a la necesaria para efectuar entre cinco y diez inyecciones en el cromatógrafo de gases-espectrómetro de masas. También con esta técnica es posible caracterizar sustancias que se encuentran en baja proporción en una mezcla determinada.

Una aplicación común de este sistema acoplado es el análisis de aceites esenciales; éstos tienen como principales componentes monoterpenos, sesquiterpenos y/o compuestos aromáticos simples.

Definición del problema:

Con el objeto de entender el efecto de atracción que posee el cítrico llamado "Chapote amarillo" (*Sargentia gregii*) sobre la mosca mexicana que plaga este fruto¹⁹ poniendo sus huevecillos sobre la semilla, se participó en este proyecto de investigación²⁰.

Se recolectó y trabajó la planta para extraer los aceites esenciales de hojas, frutos y semillas para analizar sus constituyentes y tratar de encontrar cuál o cuáles de ellos son los responsables de la atracción de este insecto hacia la fruta. El trabajo de extracción se llevó a cabo en el Departamento de Química Orgánica de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Química de la U.N.A.M.²⁰.

El problema analítico consistió en utilizar lo que se consideró como la técnica disponible más adecuada para separar y caracterizar los diferentes componentes del aceite esencial y de esta forma, conocer cuál de ellos era el responsable de la atracción del insecto. La técnica para realizar este análisis fue el sistema acoplado de cromatografía de gases-espectrometría de masas.

Experimentación y Resultados:

Para analizar el aceite esencial del "chapote amarillo" se usó un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard modelo 5840A acoplado a un espectrómetro de masas modelo 5985 utilizando dos columnas capilares: de trifluoro-propil-siloxano (RSL-400) de 30m X 0.32mm y de metil-silicón de 25m X 0.32mm con un sistema split ajustado 1/100, empleando un programa de temperaturas de 50° a 240° a 5°C/min, con una temperatura de inyector de 210°C y 240°C de temperatura en la interfase; la cámara de ionización se ajustó a 240°C, el voltaje de ionización del espectrómetro fue de 70eV y

se adquirieron los espectros de masas de 33 a 600 uma cada 0.3 s (ver Cromatograma 1).

La columna de RSL-400 se utilizó por ser una de dos columnas con que se cuenta y es utilizada para separar en forma adecuada monoterpenos²¹. El programa de temperaturas que se empleó son aquellas condiciones a las cuales se tiene la información para poder efectuar comparaciones con los tiempos de retención de compuestos ya estudiados. Este programa de temperaturas se estableció porque a temperaturas bajas es posible separar los monoterpenos poco retenidos; la velocidad en el incremento de la temperatura es lenta para permitir la separación de compuestos con tiempo de retención intermedio entre los monoterpenos y los sesquiterpenos. La temperatura de 240°C se estableció por ser la temperatura máxima recomendada por el fabricante.

Todos los espectros de masas obtenidos se cotejaron con el archivo de espectros de masas de compuestos orgánicos del National Bureau of Standards (NBS), provisto por el Software del sistema, para encontrar aquellos compuestos con espectros de masa lo más parecidos posibles con los obtenidos en la muestra. Estos resultados, junto con el análisis previo de los espectros y la búsqueda de información y confrontación con tablas, permitieron la caracterización de la mayoría de los picos cromatográficos.

En la búsqueda de los espectros de masas más parecidos, la similitud de dos espectros se mide por la suma de las probabilidades de obtener los mismos picos en una muestra, ponderados por la masa y la ocurrencia de esos picos²². Por ejemplo, si un espectro de masas tiene el fragmento 43, la probabilidad de ocurrencia de este pico en otros compuestos es muy alta, por lo tanto el valor de k para este fragmento es pequeño, pero si existe el fragmento 446 la probabilidad de ocurrencia es baja por el hecho de tener una masa mayor, por tanto el valor de k es alto. La mayoría de los compuestos estudiados obtuvieron el máximo valor de k .

Los tiempos de retención y porcentajes se listan en la Tabla 1.

No.	Nombre	t _R	100%	Ión M ⁺	Proporción (%)
1	α-Pineno	2.0	93	136	21
2	Limoneno	3.2	68	136	3
3	p-Cimeno	4.1	119	134	2
4	2,4,6-Trimetilpiridina	5.0	121	121	4
5	2,3,5-Trimetilpiridina	5.2	121	121	3
6	cis-Oxido de linalool	7.2	59	154	8
7	trans-Oxido de linalool	8.0	59	154	3
8	Desconocido	11.5	81	204	18
9	β-Cariofileno	13.0	41	204	4
10	β-Cubebeno	14.8	161	204	16

Tabla 1. Constituyentes del aceite esencial de la fruta del Chapote amarillo y características de estos compuestos.

Para realizar la caracterización de los diferentes compuestos del aceite esencial los espectros de masas se analizaron de la siguiente forma: el del α-pineno se confrontó con el archivo de datos disponible (NBS) y se comparó con el espectro y el tiempo de retención obtenido del principal constituyente del aceite esencial de *Pinus moctezumae* procedente de Michoacán²³; el mismo procedimiento se siguió con el espectro del limoneno, utilizando ahora el aceite esencial de limón y naranja¹; para el cariofileno se empleó el aceite esencial de clavo¹; el p-cimeno se comparó con el aceite esencial de estafiate; los óxidos de linalool al igual que el γ-cubebeno se confrontaron con la base de datos y con tablas de espectros de masas²⁴ ya que no pudieron conseguirse estándares, pero en este caso la comparación del espectro de masas con el de la base de datos es idéntico (ver Espectro 1 y posibles estructuras de la fragmentación

del espectro de masas del γ -cubebeno en el Anexo 1); para la 2,4,6-trimetilpiridina y la 2,3,5-trimetilpiridina se compararon también con estándares.

Estos últimos compuestos fueron los que causaron mayor sorpresa como constituyentes de este aceite esencial; ya que en ningún cítrico se habían reportado anteriormente.

Además, un sesquiterpeno con tiempo de retención de 11.5 min en RSL-400 con masa molecular de 204, pico base de 81 y fragmentos importantes de 161 y 123 m/z quedó sin caracterizarse.

Discusión:

La asignación de la mayoría de los picos cromatográficos en este trabajo se realizó con la ayuda de la base de datos del sistema Hewlett-Packard GC-MS 5985 System. La caracterización relativamente rápida y confiable de los picos cromatográficos habría resultado prácticamente imposible si no se hubiera contado con esta base de datos. Sin embargo, aunque se tengan los espectros de masa de los compuestos a caracterizar y los espectros del banco de datos, es conveniente que se recuerde que existen isómeros que poseen el mismo espectro de masas; esto genera, en algunos casos, cierta desconfianza con los resultados, ya que si la base de datos se capturó con otro equipo, aún en condiciones similares, los resultados pueden ser distintos. Por tal motivo es conveniente que se comparen los espectros obtenidos con los de algún estandar, ya sea adquiridos como reactivos puros o utilizando aceites esenciales que estén bien caracterizados sus componentes; de esta forma se emplea el tiempo de retención (t_R) como parámetro cualitativo. Esto trae como consecuencia que a pesar de contar con un equipo de EM se requiera del uso de estándares para poder estudiar y caracterizar en forma inequívoca mezclas complejas, como es el caso de los

aceites esenciales. Existen compuestos que tienen el mismo t_R y muy similar espectro de masas. Con el parámetro t_R es muy frecuente que así ocurra, sin embargo existen varios monoterpenos que prácticamente tienen el mismo espectro de masas. Por este motivo existe la necesidad de utilizar espectros de referencia, aunando a ello los datos de t_R .

En el caso de los óxidos de linalool y del γ -cubebeno fue posible hacer la caracterización de estos compuestos, ya que los espectros del banco de datos y de las tablas disponibles son prácticamente idénticos. En la búsqueda de los espectros de masas parecidos no se encontraron ninguno semejante. Existen otros compuestos, como los ácidos anacárdicos, los anacardaldehidos y sus derivados epoxidados que es posible determinarlos exclusivamente por el sistema acoplado CG-EM².

Las metil-piridinas son compuestos que causaron asombro por ser los primeros compuestos nitrogenados que se determinan en el aceite esencial de un cítrico. A pesar de ello los espectros de masas del banco de datos y los espectros de la referencia son idénticos, al igual que el tiempo de retención. Para evitar dudas en cuanto a la presencia de estos compuestos en el aceite esencial convendría extraerlos por otros métodos e identificarlos para confirmar la presencia de este compuesto en el aceite esencial.

Una forma de evitar el uso de estándares es emplear un espectrómetro de masas de alta resolución. Este equipo permite analizar el compuesto mediante el estudio y la interpretación de cada espectro, al poder analizar cada fragmento; con este equipo se pueden caracterizar compuestos con el mismo tiempo de retención y espectros de masas muy parecidos. Se podría evitar también el uso de un banco de espectros, ya que con la información capturada se podrían identificar compuestos de mezclas complejas. Obviamente, el problema radica en la disponibilidad del equipo; además de requerir de mayor tiempo para la identificación cuando no se posee o no se

utiliza un banco de datos.

Otra forma de evitar el uso de estándares es emplear equipos acoplados en serie, como el de cromatografía de gases-espectroscopía de infrarrojo-espectrometría de masas (CG-IR-EM). En esta forma, además de contar con los parámetros de tiempo de retención, masa molecular y fragmentación se tendrían los espectros de infrarrojo de las sustancias por caracterizar, en esta forma la identificación sería más confiable.

En el banco de datos del sistema CG-EM no existió ningún espectro similar al del compuesto con tiempo de retención de 11.5 min, el espectro de masas tiene pocos fragmentos para poder ser interpretados exclusivamente por EM. La interpretación del espectro de masas de este compuesto revela una masa molecular de 204 uma y aunado al t_R , se puede decir que es un sesquiterpeno. Se requiere de otros estudios para poder realizar la completa caracterización de los constituyentes del aceite esencial de *Sargentia gregii*.

La técnica de CG-EM cumple dos funciones fundamentales: separación y caracterización. Sin embargo en ciertos casos no es posible caracterizar inequívocamente los compuestos de mezclas complejas en donde es posible encontrar compuestos con tiempo de retención y espectro de masas de gran parecido. Una de las desventajas de usar este tipo de sistemas esta en las limitaciones de las técnicas por separado; por ejemplo, muestras no volátiles no se pueden analizar.

CAPÍTULO II

A) LA RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR COMO HERRAMIENTA PARA EL ANÁLISIS QUÍMICO

La RMN desde su descubrimiento por Bloch y Purcell²⁵ tuvo una aplicación inmediata al análisis químico. El desarrollo de campos magnéticos más intensos trajo consigo un aumento de la resolución en los espectros de RMN, permitiendo un análisis más completo de las líneas espectrales. Desde entonces su uso se extendió enormemente, tratando de obtener el mismo tipo de información que se obtenía al observar el ^1H , pero ahora con otros núcleos. Así, se ha dado un rápido desarrollo hacia la RMN de otros núcleos menos abundantes y sensibles que el ^1H .

Con el desarrollo de equipos más sensibles y de imanes superconductores con campos magnéticos más intensos, así como la incorporación de avances en la computación, la RMN incrementó su uso al poderse observar rutinariamente el núcleo de ^{13}C . En esta forma se ha obtenido mayor información y mayor confiabilidad en la caracterización de las diferentes estructuras moleculares de compuestos orgánicos y organometálicos. El empleo de secuencias unidimensionales y bidimensionales han proporcionado tal tipo de información que facilita aún más la identificación estructural de todo tipo de compuestos.

La resonancia magnética nuclear ha sido la técnica espectroscópica que más perspectivas promete en cuanto al análisis estructural de productos naturales. Sin temor a equivocación, se puede decir que únicamente con el uso de esta técnica se

podría elucidar la estructura de la mayoría de los productos naturales encontrados y diversos compuestos obtenidos por síntesis²⁶.

Definición del problema:

La excelsina es una metilén-quinona triterpénica obtenida de la *Hipocratea excelsa* aislada por Mata y colaboradores²⁷ (ver Figura 2.1 y Tabla 2.1). El análisis conjunto de ultravioleta-visible, infrarrojo, espectrometría de masas y resonancia magnética nuclear protónica permitieron hacer una primera propuesta estructural, ya que el grupo metil alcohol puede estar localizado en C-20 o en C-17.

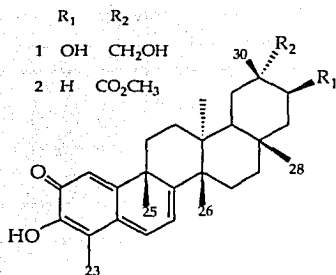


Figura 2.1 Estructura de la excelsina, 1²⁷ y de la pristimerina, 2²⁸.

Para la completa asignación estructural se requirió de efectuar el análisis por RMN de ¹³C. Un problema aunado a esto es la inestabilidad del producto aislado. Se requirió de determinar el espectro de RMN de ¹³C en las mejores condiciones y a la brevedad posible para poder confirmar con toda precisión la estructura propuesta.

Experimentación y resultados:

Para la caracterización de la excelsina se adquirió el espectro de ^{13}C en un equipo Varian VXR-300S empleando un pulso de 45° con un tiempo de adquisición de 1 s y un tiempo de retardo de 0.2 s. Para evitar la descomposición de la muestra se corrió el espectro inmediatamente después de ser obtenida y purificada. Se tomaron todas las medidas pertinentes para lograr una máxima sensibilidad en el equipo i. e. sintonización del *probe* y ajuste del campo magnético.

Por analogía Mata *et al.* asignaron las señales de este espectro. La asignación del espectro de ^{13}C se fundamentó principalmente en el estudio de la pristimerina y del celestranhidrido descrito por Gamlath²⁹ (ver Figura 2.3 y Tabla 2.1), basándose en la analogía existente con los compuestos 2 y 3.

Discusión:

La obtención del espectro de ^{13}C fue fundamental en la asignación de la posición del grupo hidroximetileno sobre C-20, ya que no estaba descrita su caracterización. La incertidumbre si el grupo CH_2OH se encontraba enlazado a C-20 o a C-17 quedó resuelta mediante el análisis del espectro de ^{13}C . Comparando con la molécula de la pristimerina y utilizando modelos semi-empíricos fue posible asignar la posición de este grupo; logrando de esta forma asignar al C-20 empleando únicamente los desplazamientos químicos. Sin el espectro de ^{13}C no hubiese sido posible resolverla.

Al emplear como modelo la β -amirina se pueden realizar cálculos que permiten modelar el grupo en estudio. El resultado de estos cálculos se muestran en la Figura 2.2. Con estos resultados se puede observar que los carbonos en posición β a los

OH son los mejor descritos. Con estos resultados se puede suponer que los incrementos debido al cambio de la β -amirina no son los adecuados para este tipo de estructuras.

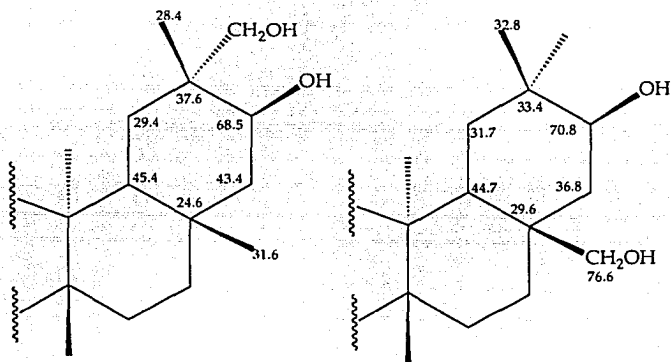


Figura 2.2. Cálculos de los desplazamiento químicos de RMN de ^{13}C tomando como estructura modelo la β -amirina.

Hay que mencionar que prácticamente todos los carbonos de la pristimerina y la excelsina tienen los mismos desplazamientos químicos, excepto aquellos donde se encuentra el grupo hidroximetileno, el OH y los carbonos vecinos a ellos; en todos los demás existe una buena correspondencia.

Una discusión de interés para el autor es la referente a la ambigüedad de las asignaciones de las señales de los carbonos no protonados y algunos de los metilos, donde el camino seguido para la asignación fue la comparación de los espectros de moléculas semejantes. En este trabajo se discutirán brevemente las asignaciones de las señales de estas moléculas.

En el artículo de Gamlath la asignación del espectro de ^{13}C se hizo con base en experimentos de RMN 2D, HETCOR, COSY y COSY a larga distancia; sin embargo, esto no fue posible hacerlo para aquellos carbonos aislados, donde no es posible encontrar correlaciones con hidrógenos vecinos, sino solamente correlaciones a largas distancias con algunos hidrógenos. Este es el caso de los carbonos cuaternarios y los metilos 25-29.

En este momento surge la interrogante de la ambigüedad en la asignación de las señales en ^{13}C para estos compuestos efectuada por Gamlath.

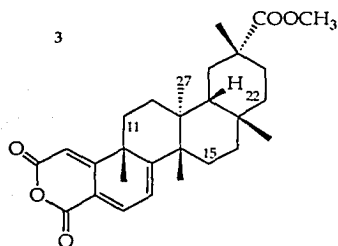


Figura 2.3 Estructura del celestranhídrido 3.

En el experimento HETCOR, Gamlath pudo encontrar las correlaciones entre todos los hidrógenos y carbonos de la molécula en estudio. Sin embargo, este experimento no resolvió todos los problemas de asignación. Se encuentra que los carbonos difíciles de asignar son los encontrados en parejas definidos por 11-12, 15-16 y 21-22. Al realizar el experimento COSY a larga distancia permitió encontrar las correlaciones de H-11 α con el metilo 25, de H-12 β con C-27, la de H-15 α con C-26 y la de H-22 α con C-28. La asignación de los grupos metilos se realizó empleando analogías con estructuras conocidas que permiten predecir el desplazamiento químico de carbonos³⁰. La asignación que hace este autor con los metilos no permite lugar a dudas,

salvo desde un punto muy rigorista en los metilos 26 y 27, ya que la diferencia entre sus desplazamientos químicos es de cuatro partes por millón (ppm) y por ende podría existir una inversión en la interpretación de las señales. Esta diferencia en el C-27 se puede explicar por el efecto diamagnético de protección debido a una interacción *syn* periplanar con el metileno C-19.

Compuesto No.				Compuesto No.			
Carbono	2	1	3	Carbono	2	1	3
1	120.2	120.2	109.5	16	36.4	36.3	36.3
2	178.2	178.2	174.5	17	30.6	32.3	30.6
3	145.9	146.0		18	44.2	47.9	44.4
4	117.8	117.8	168.0	19	30.9	36.3	30.9
5	127.4	127.4	115.4	20	39.9	38.5	40.5
6	135.2	135.2	141.3	21	29.7	79.0	29.8
7	118.2	118.2	117.4	22	34.9	43.5	34.7
8	169.8	169.7	161.3	23	10.4	10.4	
9	43.1	43.9	42.7	25	38.3	38.3	37.9
10	165.0	165.0	160.3	26	21.6	21.5	22.6
11	33.6	33.9	33.5	27	18.3	18.8	18.6
12	29.5	29.3	29.3	28	31.5	31.9	31.6
13	39.3	39.4	39.0	29	178.7	73.0	178.7
14	45.3	45.3	45.8	30	32.3	24.5	32.7
15	28.7	29.5	28.6	*	51.3		51.6

*COOCH₃ 1 y 3.

Tabla 2.1.- Desplazamientos químicos de ¹³C de la excelsina, pristimerina y del celestranhídrido en CDCl₃²⁷⁻²⁹ usando TMS como referencia interna.

Debido a que existen señales que no se pueden asignar en forma inequívoca se proponen los siguientes experimentos para poder lograrlo. Además se incluyen los

resultados que se esperarían en caso de realizarlos.

La asignación de los carbonos de la excelsina que quedan indeterminados, 8 y 10, puede lograrse mediante el empleo de secuencias de RMN 2D. Una de estas es la secuencia XCORFE. Esta permitiría observar el acoplamiento de C-10 con H-1, H-6 y H-25, para el C-8 se tendría el acoplamiento con H-6, H-7 y H-26 y en esta forma se pueden asignar en forma inequívoca estos carbonos.

Esta misma asignación se puede realizar con los metilos, para C-25, donde se vería el acoplamiento con H-11; C-26 se acoplaría con H-15; C-27 con H-12 y H-18; y C-28 con H-16 y H-22. Así, la asignación de todos los carbonos en la molécula se realiza en forma inequívoca.

El mismo razonamiento es aplicable para la molécula de excelsina, donde la asignación de los C-12 y C-15 no está fundamentada en resultados que pueden no considerar todas las interacciones moleculares, ya que en una diferencia de 0.8 ppm no se podría asegurar que las señales de los carbonos no se inviertan.

El principal problema de la asignación por analogías consiste en que posibles inversiones de señales pasan inadvertidas por no tener pruebas contundentes, como los espectros de la secuencia XCORFE, que permiten comprobar las asignaciones hechas por comparación con otros espectros o, mejor aún, a determinar la estructura completa e inequívoca de la molécula en estudio.

Uno de los problemas actuales de la RMN es la asignación total de los espectros de diferentes núcleos. En la siguiente sección se hablará más de este tema.

B) ASIGNACIÓN DE SEÑALES EN RMN DE ^1H Y ^{13}C

El desarrollo de las secuencias unidimensionales y bidimensionales ha permitido el desarrollo del análisis químico, al poder asignar en forma inequívoca las señales en ^1H y ^{13}C . Para poder realizar experimentos con estas secuencias se requiere de equipos, personal capaz de operar los instrumentos en forma adecuada e interpretar los espectros obtenidos; si la interpretación de estos espectros es incorrecta, las conclusiones también lo son. La labor del espectroscopista cada día se vuelve más relevante³¹.

Para la asignación de los espectros de ^1H y ^{13}C se emplean experimentos unidimensionales como el APT y DEPT. El experimento bidimensional COSY se ha utilizado frecuentemente para la asignación de las señales de espectros de ^1H con rapidez y facilidad.

Definición del problema

Cuando uno de los espectros en RMN, ya sea de hidrógeno o de carbono, está totalmente asignado y el otro no, se puede recurrir al experimento HETCOR para lograr lo correspondiente con el espectro faltante al conocer las correlaciones heteronucleares entre estos núcleos.

Mata y coautores³² describieron dos nuevos compuestos obtenidos de *Dodonaea viscosa*, el primero un éster de 1L-*myo*-inositol del ácido *p*-cumárico (1-L-1-O-metil-2-acetil-3-*p*-cumaril-*myo*-inositol, 4)³³ (Figura 2.4) y un *ent* labdano (*ent*-15,16-epoxy-3 α ,8 β -dihidroxi,9 β H-labda-13(16),14-dieno, 6)³⁴ (Figura 2.5). El éster *p*-cumárico del 1 L-

myo-inositol fue caracterizado totalmente mediante los espectros de IR, RMN de ^1H y el experimento COSY³³; lográndose la asignación total de las señales de hidrógeno. Hasta donde se tiene información, no existe ninguna asignación reportada de las señales de ^{13}C para los inositolos; el problema fue asignar las señales de ^{13}C para poder tener un punto de comparación que permita resolver problemas similares con las señales ya asignadas.

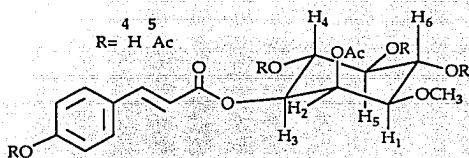


Figura 2.4 Estructura del 1-L-1-O-metil-2-acetil-3- β -cumaril-*myo*-inositol, 4^{32,33}.

Un problema análogo se trató con el nuevo labdano³⁴, donde se requiere asignar las señales de ^1H , ya que las de ^{13}C ya lo habían sido mediante la información espectroscópica del derivado acetilado, el producto de oxidación del producto natural y en la información reportada para compuestos similares de Fernández³⁶ y Tanaka³⁵.

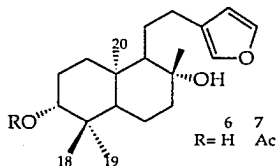


Figura 2.5 Estructura del *ent*-15,16-epoxy-3 α ,8 β -dihidroxi,9 β H-labda-13(16),14-dieno, 6, y del compuesto acetilado, 7.

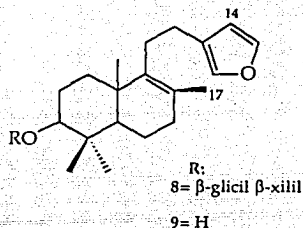


Figura 2.6 Estructura de los compuestos estudiados por Tanaka, 8 y 9.

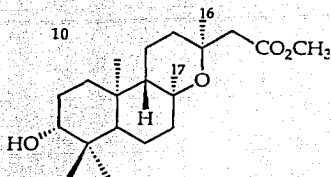


Figura 2.7 Estructura del compuesto estudiado por Fernández, 10.

Experimentación y resultados:

Todos los experimentos de RMN se realizaron en un equipo Varian VXR-300S.

Para el compuesto 4 y derivados se determinaron los espectros de ^1H , ^{13}C , COSY y APT. Con el experimento COSY, los desplazamientos químicos y las constantes de acoplamiento de este compuesto, y ayudados por la información obtenida del compuesto acetilado 5, Mata y coautores asignaron la totalidad de las señales del espectro de ^1H . El espectro de ^{13}C no era posible asignarlo por la proximidad de señales,

además de no existir un modelo en la literatura que permita predecir el desplazamiento químico (δ) de los carbonos base de oxígeno. La proximidad de las señales en ^{13}C no permiten realizar una asignación confiable; la diferencia en δ entre las dos señales más separadas del inositol en el compuesto 5 es de 11.05 ppm.

Para el compuesto acetilado, 5, se contó con aproximadamente 5 mg de muestra. Se requirió de 28 horas con 82,000 pulsos para poder obtener el espectro de ^{13}C con una relación señal ruido de 50 unidades. El experimento DEPT tardó 44 horas empleando 14,000 Hz de ventana espectral, pulsos de 90° para ^1H y ^{13}C , 2.0 s entre pulso y pulso y un valor promedio de 127 Hz de la constante de acoplamiento escalar entre ^1H y ^{13}C . El experimento HETCOR tardó 69 horas con 3072 pulsos y 100 incrementos, empleando 11,500 Hz en la ventana espectral de ^{13}C y 2,500 Hz en ^1H empleando 0.7 s de retardo entre pulsos (ver Espectros 2 y 3). Es conveniente resaltar que para obtener un experimento HETCOR se requieren de aproximadamente 60 mg de muestra y entre ocho y doce horas de acumulación de datos. Al tener 12 veces menos cantidad de muestra para obtener el experimento HETCOR de 5 se hubiera requerido entre 96 y 144 horas de acumulación empleando parámetros normales de adquisición. Las asignaciones para 5 se muestran en la Tabla 2.2

Para 6 se determinaron los espectros COSY, APT y DEPT. Para determinar algunas señales del espectro de ^1H se obtuvo el experimento HETCOR con lo cual se pudieron asignar las señales de los espectros de hidrógeno utilizando como base los de ^{13}C ; ya que para este tipo de compuestos existe información al respecto. Los resultados obtenidos se dan en la Tabla 2.3. Estos resultados se comparan con los resultados obtenidos por Tanaka³⁶ y Fernández³⁵, las estructuras que estudiaron se muestran en las Figuras 2.6 y 2.7.

Compuesto No.			Compuesto No.		
Carbono	4	5	Carbono	4	5
1	79.72	77.16	4'	159.56	152.35
2	66.65	66.11	7'	145.35	145.45
3	71.52*	69.27	8'	113.20	116.35
4	71.11*	69.50	9'	166.37	165.45
5	74.52	71.03	CH ₃ C=O	169.98	
6	70.32*	70.95		169.95	
7	57.32	58.24		169.87	
8	169.52	169.09		169.82	
9	20.32	20.53	C=CH ₃	21.13	
1'	125.09	131.53		20.82	
2',6'	129.56	129.45		20.74	
3',5'	115.62	122.13		20.61	

* Señales que pueden ser intercambiadas.

Tabla 2.2 Desplazamientos químicos de los compuestos 4, 5 en ppm con respecto a TMS.

Discusión:

En cuanto a las asignaciones de las señales de ¹H de 5 obtenidas por el experimento COSY permiten determinar la estructura y la estereoquímica relativa propuesta. Por falta de muestra del producto natural, 4, los carbonos 3, 4 y 6 no se asignaron; sin embargo, por analogía con el compuesto acetilado se pudieron asignar las señales de ¹³C que se encontraban más desplazadas³²; este es el caso de las señales de los carbonos 1, 2 y 5. La importancia de este trabajo radica en que es el primer estudio sobre inositoles que asigna en forma no ambigua las señales del espectro de ¹³C.

Siguiendo la tónica de este trabajo discutiremos como se realizaron las

asignaciones de ^{13}C para el compuesto 6.

Carbon	6	7	8	9	10
1	37.85	37.58	35.3	35.5	37.45
2	26.96	23.35	27.2	29.2	27.39
3	78.60	80.57	89.3	78.1	78.98
4	38.74	37.71	38.7*	39.1*	38.99
5	54.90	55.07	51.6	51.4	55.28
6	20.14	20.08	18.9	19.5	19.60
7	44.33	44.35	34.0	34.1	42.98
8	73.85	73.79	126.5+	126.6+	75.28
9	61.00	60.89	139.9	140.1	57.35
10	38.74	38.70	39.6*	39.5*	36.73
11	25.97	25.94	29.0	29.2	15.50
12	27.90	27.81	26.1	26.1	35.78
13	125.44	125.36	126.1+	126.1+	72.66
14	110.95	110.99	111.5	111.4	49.54
15	142.62	142.75	143.3	143.3	
16	138.57	138.81	139.0	139.1	28.31
17	23.73	23.75	19.0	19.2	24.66
18	28.04	28.03	28.0	28.7	28.11
19	15.30	16.44	16.4	16.5	15.34
20	15.48	15.62	20.2	20.3	15.89

+ Estas señales pueden intercambiarse entre sí.

* Estas señales pueden intercambiarse entre sí.

Tabla 2.3 Señales de ^{13}C de los compuestos reportados por Mata²⁸, Tanaka³² y Fernandez³¹.

Mata asignó las señales de 6 basándose en los resultados de los artículos antes mencionados. Sin embargo, Tanaka se basa en las asignaciones de las señales de ^{13}C de

los compuestos que estudiaron en 1969. En esta forma se genera desconfianza e incertidumbre acerca de los datos que obtuvo por no contar con resultados que permitan la asignación de los carbonos en forma contundente.

Se puede observar que las asignaciones en los compuestos reportados por Tanaka de los carbonos 17 y 20 pueden intercambiarse, ya que la diferencia es 1.2 ppm, además de no asignar las señales de los carbonos 4 y 10. Aunque también podría ponerse en duda las asignaciones de los metilenos, pero aquí los desplazamientos químicos son diferenciables.

Fernández y coautores no mencionan como realizaron las asignaciones en ^{13}C , sólo dan resultados y una referencia de Cambie³⁷ para la asignación de señales. Se podría discutir las conclusiones propuestas, ya que en los metilos los carbonos 16 y 18 pueden intercambiarse, al igual que el 19 con el 20, debido a que la diferencia en δ es de 0.21 y 0.54 ppm respectivamente. También la asignación de 4 y 10 es susceptible de críticas.

Sería conveniente asignar las señales de los metilo 17, 18, 19 y 20 de 8 mediante un experimento XCORFE, ya que los metilos 19 y 20 en el producto natural podrían invertirse, por la diferencia tan pequeña en el δ (0.12) y no se tienen referencias^{38,39} que permita asignar con toda certidumbre o dar datos para la asignación.

Los resultados del experimento XCORFE de los cuatro metilos de 6 sería: para el C-17 existiría el acoplamiento con los H-7 y H-9; el C-18 tendría acoplamientos con H-3, H-5 y H-19, éstos serían idénticos que con el C-19; y el C-20 se acoplaría con H-1, H-5 y H-9. Sin embargo la asignación de estos carbonos está bien diferenciada por el efecto γ -gauche sobre los metilos.

La asignación de los dos carbonos cuaternarios, 4 y 10 son un problema diferente, ya que, al parecer, las señales de ambos se sobreponen o cabe la posibilidad de

que se encuentren sobrepuestas con la del C-1. Este problema se solucionaría si se efectuara un experimento cuantitativo de ^{13}C ; para lo cual se requiere la supresión del efecto nuclear Overhauser (NOE)⁴⁰ y un tiempo de retardo largo, aproximadamente de cinco segundos, para poder integrar estas señales; conociendo la integral se puede conocer donde se encuentra la señal faltante, ya que integrará para dos carbonos.

La supresión del NOE se logra manteniendo el desacoplador de hidrógeno apagado durante los períodos de retardo y durante la aplicación del pulso de excitación y encendiéndolo durante el período de adquisición.

Una vez encontrada la señal del carbono restante, se podría intentar asignar la señal mediante el experimento XCORFE. Para lo cual se tendría que analizar 2 situaciones: 1) El carbono cuaternario restante se encuentra en el mismo δ que el C-1, con lo cual la asignación de las señales serían completa e inequívoca ya que, además de aparecer las correlaciones de C-1 con H-2, H-3, H-6, H-9 y H-20 existirían las correlaciones del carbono por determinar. 2) Los dos carbonos cuaternarios se encuentran en 38.74 como se reportó.

Con estos ejemplos se puede comprobar que con la RMN se tiene toda una gama de experimentos que se pueden efectuar para realizar asignaciones inequívocas de los diferentes carbonos de una molécula. En esta forma, la asignación de las diferentes señales de RMN pueden realizarse mediante el uso de los experimentos bidimensionales y unidimensionales.

Actualmente se está trabajando en la implementación de secuencias bidimensionales como el XCORFE, DQCOSY, NOESY y COLOC para poder realizar experimentación en este sentido.

CAPÍTULO III

A) SEPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS ISÓMEROS DEL *CIS,TRANS-2-CARBETOXI-3-FENIL-3-METIL OXIRANO*

En el capítulo anterior se mencionó un ejemplo de la utilidad que puede tener la RMN al emplear efectos como el NOE.

El NOE fue empleado por primera vez por Anet⁴¹ para determinar la conformación y estructura de compuestos orgánicos. Este efecto consiste en un incremento en la integral de las señales de aquellos núcleos que se encuentran cercanos espacialmente y cuya interacción conduce a una relajación mutua dominada por el acoplamiento dipolar magnético (a través del espacio) en lugar del mecanismo escalar (a través del acoplamiento J), por vía de enlaces químicos. En el momento que se irradia una señal de uno o varios hidrógenos, la señal de los vecinos más próximos espacialmente a éste incrementará su intensidad entre un 10 y 20%, lo cual se observa como un aumento de la integral correspondiente. Una forma de hacerlo con equipos que utilizan transformada de Fourier es restando el espectro normal al espectro irradiado; el núcleo en situación de interacción Overhauser verá incrementada su señal al restar el espectro normal al espectro "incrementado" selectivamente. La diferencia dejará solamente las señales incrementadas, mientras que las normales, serán anuladas.

Este experimento ha sido de gran utilidad para discernir entre isómeros geométricos, donde núcleos de hidrógeno quedan espacialmente muy cerca. Este

fenómeno también ha sido muy utilizado en la determinación de los cuatro tipos de estructuras de las proteínas, principalmente en la secundaria y terciaria, ya que protones que secuencialmente están separados pueden interactuar por diferentes pliegues de la molécula para dar la estructural global a la proteína.

Definición del problema

En la obtención del 2-carboxi-3-fenil-3-metil oxirano por oxidación del ácido 3-metil-3-fenil propenóico⁴² se obtienen dos isómeros geométricos v. gr.:



Figura 3.1 Estructuras del *cis*-2-carboxi-3-fenil-3-metil oxirano, 11, y del *trans*-2-carboxi-3-fenil-3-metil oxirano, 12.

Este compuesto ha sido trabajado como modelo para el estudio de reacciones de transposición que permiten evidenciar mecanismos concertados⁴³. Así mismo por su olor especial semejante al de la esencia de fresa es muy empleado como aromatizante y saborizante. Sin embargo, es interesante hacer notar que el olor de cada par diastereomérico es distinto.

Al obtener el espectro de RMN de la mezcla, se observa claramente la resolución de las señales de los isómeros *cis* y *trans* (ver Espectro 4). El problema a resolver es la separación de los isómeros *cis* y *trans* y la caracterización de los dos isómeros asignando todas las señales de los correspondientes espectros de ^1H y ^{13}C .

Experimentación y Resultados

La mezcla de los isómeros geométricos se separó mediante cromatografía de gases utilizando un cromatógrafo de gases HP-5890A con una columna capilar de 25m X 0.32mm X 1.05µm de 5% de fenil metil silicón, empleando un programa de temperaturas de 190° a 210° a 10°C/min, la temperatura del detector de ionización de flama a 270°C, con temperatura del inyector a 270°C y una presión de 10 psi. Se obtuvo un porcentaje del 52 y 48% de cada compuesto.

Se empleó este tipo de columna ya que el compuesto no presenta grupos muy polares, para emplear una columna polar como de Carbowax 20M, ni es una molécula no polar para emplear una columna de metil silicón. Se emplearon temperaturas altas ya que estos compuestos son líquidos muy viscosos.

Se intentó separarlos por CG con una columna preparativa de 2m X 1/4" de OV-17 al 5% cromosorb G como fase estacionaria en un equipo Varian 1400 con detector de conductividad térmica. Al momento de intentar recolectar las fracciones se observó que el compuesto se descompuso en la columna. Esto se confirmó al obtener más señales de las esperadas para los compuestos en los espectros de RMN de las fracciones recolectadas.

Posteriormente se separó por cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE) fase normal en un equipo Varian modelo Vista S con detector de índice de refracción modelo Varian RI-4 empleando una columna preparativa de Spherisorb S5W 5 micrones de 25cm X 10mm de diámetro interno utilizando hexano-acetato de etilo 95-5% v/v con un flujo de 3 ml/min, obteniéndose la separación de las dos mezclas de enantiómeros. Para fijar el porcentaje de cada uno de los disolventes de la fase móvil, primero se empleó un gradiente, al observar el tiempo de salida de los dos compuestos se fue modificando el porcentaje de cada uno hasta obtener una diferencia de tiempos

de retención de dos minutos, necesaria para poder separarlos en forma preparativa.

Se utilizó CLAE en fase normal debido a que es más sencillo la recuperación de los compuestos en forma pura mediante una simple evaporación de los disolventes, en vez de fase inversa donde es preciso hacer una extracción y posteriormente una evaporación.

Una vez separados los compuestos se obtuvieron los espectros de ^1H a 300 MHz (ver Espectro 5) y los espectros de ^{13}C a 75 MHz en un equipo Varian modelo VXR-300S. Se realizó el experimento NOE^{44,45} diferencial en C_6D_6 para poder caracterizar a los dos isómeros geométricos (ver Espectros 6 y 7).

El experimento NOE se realizó mediante la irradiación del metilo observando la diferencia de los espectros irradiados y sin irradiar. Se observa en la mezcla de enantiómeros *trans* un incremento en la señal del metino en un 19% con respecto a la señal no irradiada, mientras que en la mezcla del compuesto *cis* no se observa tal efecto.

El espectro de RMN de ^1H se puede asignar mediante la simple observación y análisis de las señales: el triple corresponde a la señal de los CH_3 unidos al CH_2 , la señal sencilla a campos más altos es la del metilo del oxirano, la otra señal sencilla a campos más bajos corresponde a la del CH del oxirano, las señales múltiples bases de oxígeno corresponden a las señales de los CH_2 y las señales múltiples a campos magnéticos más bajos corresponde a los hidrógenos del anillo aromático. Las señales de los CH_2 son un sistema ABX_3 , lo cual hacen pensar en cierta rigidez de esa parte de la molécula.

Para la asignación de las señales de ^{13}C se efectuó un experimento HETCOR, con el cual todas las señales de los carbonos unidos a hidrógeno quedo asignada, exceptuando a las señales de los carbonos aromáticos, ya que el desplazamiento

químico de este tipo de hidrógenos es muy similar. Al conocer que los carbonos en meta están a campos magnéticos más bajos se pueden inferir las asignaciones dadas en la Tabla 3.1.

De esta forma se pudo confirmar la estereoquímica de cada par enantiomérico y la asignación total de las diferentes señales de los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C de los compuestos (ver Tabla 3.1).

Grupo	H comp 12	H comp 11	C comp 12	C comp 11
CH_3CH_2	1.33	0.88	14.26	13.52
CH_2	4.30	3.89	61.52	60.67
CH_3	1.78	1.74	17.02	24.39
CH	3.45	3.65	61.52	60.43
CH^2	7.40-7.28	7.30-7.22	128.44+	127.85*
CH^3	7.40-7.28	7.30-7.22	125.18+	124.96*
CH^4	7.40-7.28	7.30-7.22	128.04	127.99
$\text{C}(\text{Ph})$	-	-	140.14	136.98
$\text{C}-\text{O}-\text{CH}$	-	-	61.88	63.36
$\text{C}=\text{O}$	-	-	167.55	166.83

+,* Señales que pueden intercambiarse entre ellas.

Tabla 3.1 Señales de ^1H y ^{13}C de los isómeros *cis* y *trans* del 2-carbetoxi-3-fenil-3-metil oxirano.

Discusión

Las separaciones de los isómeros geométricos hechas por CLAE fueron las más apropiadas, ya que se logró el objetivo de separar cada par diastereomérico.

La CG preparativa no fue la indicada para separar los isómeros geométricos

debido a que los compuestos se descomponen cuando se trabaja con columnas diferentes a las capilares.

La caracterización de los isómeros geométricos se realizó con el empleo de la RMN, logrando la asignación de la mayoría de las señales de estos espectros. Cabe mencionar que no es posible asignar la estructura de estos compuestos con el empleo de otras técnicas, como espectrometría de masas, espectroscopía de ultravioleta-visible o infrarrojo exclusivamente. En cambio, mediante la técnica de rayos X sería posible, siempre y cuando se pudieran obtener cristales del ácido correspondiente, ya que el 2-carbetoxi-3-fenil-3-metil oxirano es líquido.

El espectro de RMN ^1H de la mezcla nos presenta la alternativa de continuar este estudio mediante la separación de los enantiómeros del compuesto mediante un reactivo de desplazamiento ópticamente activo⁴⁶. En esta forma se podría confirmar la suposición de que los reactivos de desplazamiento ópticamente activos reaccionan preferencialmente con el compuesto que presenta la misma configuración óptica.

La RMN de los años setentas se caracterizó por el empleo de reactivos que permitieran separar las señales de ^1H que se obtenían en una región muy pequeña del espectro. Debido a la formación de complejos entre estos reactivos y diferentes compuestos orgánicos, las señales se resolvían y se tenía mejor posibilidad de asignarlas. Estos reactivos, llamados de desplazamiento, emplean principalmente compuestos de coordinación de plata y de lantánidos como europio y praseodimio entre otros.

Los reactivos de desplazamiento más comunes son complejos de coordinación donde los ligantes son β -dicetonas coordinados al átomo central y cuyo número de coordinación es seis. Se postula que el mecanismo de interacción consiste en la recepción de pares electrónicos libres por el átomo central aumentando el número de

coordinación.

Se han ensayado muchos tipos de ligantes, entre los cuales las β -dicetonas polifluoradas han llegado a ser comunes. No tardó mucho tiempo antes de experimentarse con ligantes quirales. Se observó que ciertos reactivos de desplazamiento ópticamente activos reaccionaban preferentemente con uno de los enantiómeros del compuesto orgánico. Esto desarrolló e incrementó el uso de estos productos. Desde entonces se supone que el reactivo de desplazamiento reaccionará preferencialmente con un isómero del compuesto orgánico. Sin embargo esto no ha sido comprobado en la mayoría de los casos. Una forma de comprobar esta hipótesis es separar los enantiómeros y realizar el estudio correspondiente empleando reactivos de desplazamiento quirales.

El estudio realizado se puede continuar separando los enantiómeros. Una vez logrado esta separación efectuar un estudio de reactivos de desplazamientos. Esta separación se puede lograr con el empleo de la CLAE utilizando columnas ópticamente activas, preferentemente ciclodextrinas⁴⁷. También podrían separarse mediante la formación de derivados y posteriormente separarlos por técnicas cromatográficas convencionales.

La RMN además de poder establecer estructuras de isómeros geométricos con el empleo del NOE es posible asignar conformaciones. En la siguiente sección se mencionarán los trabajos que se han realizado para proponer o confirmar conformaciones moleculares que se han descrito por otras técnicas.

B) CONFORMACIONES DEL 1,2-PROPANODIOL Y 1,3-PROPANODIOL

El estudio de interacciones moderadamente débiles como la que involucra la formación de puentes de hidrógeno puede ser estudiada con ventajas sobre otras técnicas mediante la RMN.

En comparación con la técnica de infrarrojo, la RMN aporta información de tipo cualitativo y cuantitativo. El infrarrojo es conocido por su sensibilidad para detectar la formación de puentes de hidrógeno intramolecular. Con la RMN, se utilizan los parámetros de desplazamiento químico, multiplicidad y aún forma de la señal para realizar conjeturas sobre las características del puente de hidrógeno inter e intramolecular. Como resultado de ello, la conformación molecular puede afectarse.

Es un hecho que las señales de los grupos oxhidrilo puedan verse modificadas al realizar la determinación analítica en diferentes frecuencias de RMN. Esto ocurre porque las señales hidroxílicas están sometidas reiteradamente a fenómenos de intercambio químico y sus características espectrales dependen de la frecuencia de observación del fenómeno.

Al estudiar este tipo de compuestos de bajo peso molecular por RMN en campos magnéticos altos ($>7T$) la mayoría de las señales que uno encuentra empleando equipos con imanes superconductores son sencillas de identificar y explicar.

Sin embargo, existen espectros de moléculas pequeñas que carecen de esa sencillez, v. gr. 1, 2 y 1, 3-propanodiol. Buc⁴⁸ estudió por espectroscopía de infrarrojo varios tipos de dioles y al analizar las frecuencias de los OH ligados y enlazados infirió

la existencia de los puentes de hidrógeno intramoleculares en solución de tetracloruro de carbono. A partir de entonces se ha continuado estudiando este tipo de fenómenos.

Vázquez *et al.*⁴⁹ estudiaron las posibles conformaciones del 1,2-propanodiol empleando un cálculo *ab-initio* concluyendo que las configuraciones más estables son las que forman puentes de hidrógeno intramolecular; van Duin⁵⁰, empleando cálculos de mecánica molecular obtuvo resultados similares. Caminati⁵¹ realizó un estudio de las posibles conformaciones que puede adquirir este compuesto, concluyendo que el puente intramolecular existe, siendo el factor más importante para su conformación en fase gaseosa y no existen evidencias de la formación de dímeros.

Grenier y coautores⁵² estudiaron por RMN los desplazamiento químicos de ¹³C de los metilos en términos de las interacciones H/H, H/CH₃ y CH₃/CH₃, concluyeron que para el 1,2-propanodiol existe un equilibrio de 50% de la conformación anti y 50% de la conformación *gauche*, empleando CDCl₃ como disolvente; en el caso de D₂O el equilibrio se desplaza hacia la forma anti. Spoormaker⁵³ mediante el estudio por RMN con reactivos de desplazamiento de praseodimio concluyó que la estructura más estable del diol es aquella donde se forman puentes de hidrógeno. Schwartz⁵⁴ estudió soluciones acuosas en diferentes temperaturas y encontró que el desplazamiento químico de los grupos alquílicos depende de la concentración y de la temperatura, confirmando la existencia de un puente de hidrógeno involucrado en el sistema. Busfield⁵⁵ y Morantz⁵⁶ estudiaron por espectroscopía infrarroja los puentes intramoleculares del 1,2 y del 1,3-propanodiol.

Para el 1,3-propanodiol Kinningg⁵⁷ estudió la formación de puentes de hidrógeno en fase gaseosa mediante difracción electrónica. Vázquez⁵⁸ realizó cálculos *ab-initio* concluyendo que las estructuras más estables son las que forman puentes de hidrógenos intramoleculares; resultados similares obtuvo van Duin⁵⁰.

Existen otros estudios también acerca del puente de hidrógeno en el 1,4-butanodiol⁵⁹⁻⁶¹, el 1,2,3-propanotriol^{59, 62-65}, 1,2 y 1,3 propan-diamina⁶⁶⁻⁶⁸ y el existente entre alcoholes y aminas⁶⁹.

Definición del problema

Con el empleo de la RMN se puede suponer la existencia del puente de hidrógeno intramolecular, sin embargo no se tiene un estudio con esta técnica que en forma directa se realice la asignación de la conformación del 1,2 y 1,3-propanodiol en solución. La hipótesis de partida fue mantener rígida una de las posibles conformaciones en bajas temperaturas y determinar las constantes de acoplamiento y los desplazamientos químicos en un disolvente dado para postular la conformación más favorable. Si se considera que esta es una molécula sencilla se espera poder predecir y corroborar la existencia del puente de hidrógeno intramolecular con base en los espectros obtenidos por RMN de ¹H. El objetivo de este trabajo es proponer una conformación preferida para este tipo de dioles, los cuales es sabido que en soluciones diluidas forman puentes de hidrógeno intramolecular.

Para facilitar el problema antes planteado, se restringe la discusión únicamente a tres conformaciones posibles (ver Figura 3.2). Estas son dos con puentes de hidrógeno intramolecular, a) y b), y una que carece de él, c). El espectro de RMN es la observación del promedio de un sin número de conformaciones posible que tiene una molécula en disolución.

Experimentación y resultados:

El primer compuesto que se estudió fue el 1,2-propanodiol. A este compuesto

se le determinó su espectro de RMN ^1H en sulfóxido de dimetilo D_6 (DMSO), acetona D_6 y en cloroformo D (CDCl_3).

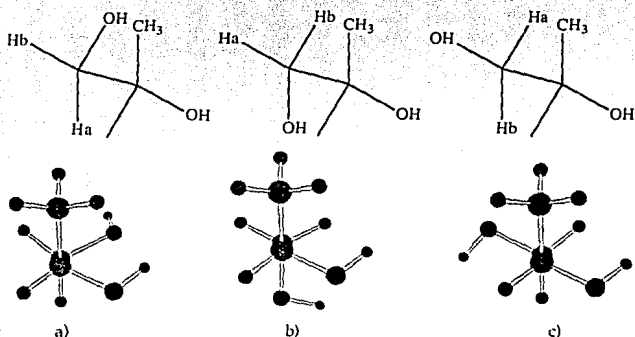


Figura 3.2. Conformaciones extremas del 1,2-propanodiol. a) Conformación donde se forma un puente de hidrógeno intramolecular y el ángulo formado entre los hidrógenos del metino y los hidrógenos de los metilos es el mismo. b) Conformación con puente de hidrógeno intramolecular donde existe una diferencia entre los ángulos formados entre los dos hidrógenos del metileno y el del metino. c) Conformación sin puente de hidrógeno intramolecular, el ángulo entre los hidrógenos del metileno es diferente con el del metino.

En DMSO se obtuvieron los espectros a 20, 40, 60 y 80°C (ver Tabla 3.2). A 20°C se logran diferenciar todos los desplazamientos químicos de los hidrógenos y observándose un porcentaje alto de humedad en la muestra, dos veces más concentrado que el soluto a estudiar. Todos los protones se pueden diferenciar, los dos tipos de OH's, el CH-OH y se distinguen los dos hidrógenos del metileno. Cuando la muestra se va calentando, las señales de los hidrógenos del CH_2 van sobreponiéndose. Es importante hacer notar la existencia de una señal intercambiable junto a la señal del agua, ya que es posible que se trate de moléculas de agua con un posible puente de

hidrógeno en condiciones de baja interacción (ver Espectro 8 y Tabla 3.2).

Señal	20°	40°	60°	80°
CH ₃	1.00	1.00	1.00	1.01
CH ₂	3.15,3.25	3.16,3.25	3.18,3.25	3.25,3.22
CH	3.57	3.57	3.58	3.60
<u>H</u> OCH ₂	4.48	4.35	4.23	4.22
<u>H</u> OCH	4.41	4.29	4.17	4.05

Tabla 3.2 Desplazamientos químicos en ppm con respecto a TMS para el 1,2-propanodiol en DMSO.

Para este mismo compuesto y disolvente a temperatura ambiente se determinaron las constantes de acoplamiento (ver Tabla 3.3).

J	DMSO	CDCl ₃
J _{ab}	10.7	11.0
J _{ac}	5.8	7.8
J _{bc}	5.5	3.1
J _{cCH₃}	6.2	6.4
J _{aOH}	5.8	-
J _{bOH}	5.8	-
J _{cOH}	4.6	-

Tabla 3.3. Constantes de acoplamiento para el 1,2-propanodiol en DMSO y CDCl₃.

De las tres conformaciones extremas (ver Figura 3.2) se espera que la a) y la b) sean las más favorecidas debido a la formación de puentes de hidrógeno intramolecular, con los resultados obtenidos esto es factible de explicar. Se podría

descartar la conformación c) por no estar estabilizada por este tipo de unión, pero otra prueba que ayuda a descartarla es la ausencia de una constante de acoplamiento entre H_c y H_a o H_b mayor de 8 Hz, que denotaría un ángulo diedro mayor de 120° .

El mismo inconveniente se presenta en la conformación b) donde los protones H_b y el del metino forman un ángulo diedro de 180° por lo cual la conformación que en un principio sería la más favorable es la a). Esta podría considerarse como una primera conclusión de este trabajo.

En $CDCl_3$ se determinaron los espectros a $20, 10, 0, -10, -20$ y $-30^\circ C$ (ver Tabla 3.4). En estos espectros las señales de los OH aparecen junto a las señales de la humedad del disolvente y no se observa multiplicidad aparente. Los espectros son más sencillos que en DMSO y se siguen diferenciando los hidrógenos del metileno. A medida que va disminuyendo la temperatura el espectro tiende a simplificarse, y la señal de los OH's presentan mayor multiplicidad. Esto podría considerarse como una prueba de la rigidez que va adquiriendo la molécula al ir bajando la temperatura.

Para este mismo disolvente se determinaron las constantes de acoplamiento (ver Tabla 3.2).

Señal	20°	10°	0°	-10°	-20°	-30°
CH_3	1.18	1.17	1.16	1.15	1.15	1.15
CH_2	3.41 3.65	3.40 3.64	3.39 3.64	3.38 3.63	3.38 3.62	3.38 3.62
CH	3.92	3.92	3.91	3.91	3.90	3.90
HO	2.16	2.43	2.70	3.13	3.6	4.11

Tabla 3.4 Desplazamientos químicos en ppm con respecto a TMS para el 1,2-propanodiol en $CDCl_3$.

Con los valores que se obtuvieron se observa nuevamente que la conformación preferida es la a), descartando las anteriores por falta de una constante de acoplamiento mayor. Sin embargo existe una diferencia mayor entre las constantes J_{ac} y por lo cual se supone que existe una ligera modificación entre la conformación en cloroformo y sulfóxido de dimetilo.

Señal	CH ₃	CH ₂	CH	H ₂ CHO ₂	HOCH	H ₂ O
30°	1.07	3.37	3.74	3.52	3.49	2.82
20°	1.07	3.38,3.36	3.74	3.61	3.57	2.82
10°	1.07	3.38,3.36	3.74	3.68	3.64	2.95
0°	1.07	3.38,3.36	3.7	3.7	3.7	3.07
-10°	1.07	3.37	3.73	3.86	3.82	3.16
-20°	1.07	3.37	3.74	3.95	3.86	3.25
-30°	1.07	3.37	3.74	4.02	3.97	3.37
-40°	1.07	3.37	3.74	4.12	4.09	3.42
-50°	1.07	3.37	3.74	4.22	4.19	3.53
-60°	1.07	3.37	3.74	4.31	4.29	3.62
-70°	1.07	3.37	3.74	4.40	4.39	3.74
-80°	1.07	3.37	3.74	4.51	4.51	3.82
-85°	1.07	3.37	3.74	4.58	4.58	3.89
-90°	1.07	3.37	3.74	4.65	4.65	3.95

Tabla 3.5 Desplazamientos químicos en ppm con respecto a TMS para el 1,2-propanodiol en acetona D₆.

En acetona los espectros tienen cierta similitud con los espectros en DMSO, ya que se observa una señal satélite a la del agua y los hidrógenos de los OH's son diferenciables (ver Espectro 9). Al disminuir la temperatura las señales de los OH's tienden a desplazarse a campo bajo, junto con la del agua y las señales de los ¹H del

CH₂ se vuelven menos complejas, tendiendo a un sistema AX₂ (ver Tabla 3.5).

Dado que el puente de hidrógeno intramolecular forma un anillo de cinco miembros en el 1,2-propanodiol, se espera que el 1,3-propanodiol al formar un anillo de seis miembros sea más estable, por tal motivo se decidió estudiar este compuesto a la par del 1,2.

Para el 1,3-propanodiol en CDCl₃ los espectros resultaron sin complicación aparente (ver Espectro 10). Con este disolvente se hicieron varios ensayos bajando la concentración; sólo se observó un desplazamiento en las señales de los OH's y se concluyó que la señal del agua interfería demasiado. Se secó el cloroformo D por seis horas a reflujo con pentóxido de fósforo; aunque no se logró secar completamente al disolvente. Al disminuir la temperatura a -10°C comienzan a aparecer señales muy anchas en el espectro. Con la disminución posterior hasta -50°C se observa una notable disminución de las señales de los espectros y la generación de señales muy anchas (ver Espectro 11). Estas señales pueden deberse a la formación de agregados moleculares del soluto o probablemente a la formación de micelas (ver Tabla 3.6).

Señal	CH ₂	CH ₂ OH	HOCH	H ₂ O
20°	1.83	3.87	2.02	1.6
10°	1.83	3.88	2.11	1.65
0°	1.83	3.88	2.21	1.70
-10°	1.83	3.88	2.27	1.72
-20°	1.83	3.88	2.32	1.75
-30°	1.83	3.88	2.38	1.78
-40°	1.83	3.88	2.43	1.80
-50°	1.83	3.88	2.49	1.82

Tabla 3.6 Señales de 1,3-propanodiol en CDCl₃. La temperatura sombreada indica a la cual comienzan a aparecer señales anchas en el espectro.

Para bajar la temperatura más allá de -50°C se utilizó una mezcla de CDCl_3 y CS_2 2:3 v/v, sin embargo desde el principio se observó la aparición de señales muy anchas parecidas a las de CDCl_3 a -30°C a pesar de tener una concentración 1 mg/ 1 ml (ver Espectro 12). Cuando se bajo la temperatura se observó la aparición de las mismas señales que en el espectro de RMN de ^1H en CDCl_3 ; al llegar a los -60°C se observó una disminución abrupta de las señales en todo el espectro (ver Tabla 3.7). Esto confirma la formación de una segunda fase, ya que no se puede observar nada en el espectro.

Señal	CH_2	CH_2OH	OH
20°	1.82	3.84	2.07
0°	1.82	3.84	2.15
-20°	1.82	3.84	2.24
-40°	1.82	3.84	2.37
-60°	1.82	3.84	2.5

Tabla 3.7. Desplazamientos químicos del 1,3-propanodiol en $\text{CDCl}_3/\text{CS}_2$ 2:3 v/v. La temperatura sombreada indica a la cual comienzan a aparecer señales anchas en el espectro.

Para confirmar esta hipótesis se bajó la temperatura a una disolución aproximadamente 0.01 M de este soluto en cloroformo con baños de hielo seco y disolventes como benceno, tetracloruro de carbono, clorobenceno y cloroformo para obtener temperaturas aproximadamente de 0 , -20 , -40 y -60°C respectivamente. Las temperaturas se fueron confirmando con un termómetro de alcohol. Se observó que desde -20°C se comienza a observar cierta turbiedad en la disolución y arriba de ella comienza a aparecer un precipitado sobrenadante. Esto nos confirma un cambio de fase en el sistema debido a la poca solubilidad del propanodiol en el cloroformo y explica las señales obtenidas al bajar la temperatura más allá de -10°C .

Para el 1,3-propanodiol en acetona (ver Tabla 3.8) se observaron dos tipos de hidrógenos alifáticos con las multiplicidades esperadas para cada una de estas señales, el problema se encuentra al tratar de asignar la señales de los protones de los OH, ya que la acetona tenía humedad, además la integral de estos protones no corresponde con la esperada. Este resultado puede permitirnos pensar en posibles puentes de hidrógeno en la molécula.

Señal	CH ₂	CH ₂ OH	OH	H ₂ O
20°	1.64	3.61	3.48	2.62
0°	1.62	3.61	3.60	2.98
-20°	1.62	3.59	3.74	3.10
-40°	1.60	3.56	3.88	3.28
-60°	1.58	3.55	4.03	3.96
-80°	1.57	3.54	4.17	3.62
-90°	1.55	3.52	4.27	3.73

Tabla 3.8 Desplazamiento de las señales de 1,3-propanodiol en acetona D₆.

Se estudió el espectro de ¹H del 1, 3-propanodiol en acetona, en un espectrómetro de RMN XL-400 observándose que variaban las señales dependiendo del tiempo entre la preparación de la solución y la adquisición de los espectros, muy probablemente debido a la formación de un aducto cetónico con el diol. Además, en el espectro de ¹³C aparecieron dos señales en cada uno de los carbonos. Estas señales no pudieron ser caracterizadas (ver Espectro 13).

En este mismo equipo se trató de irradiar las diferentes señales en el espectro para observar si existía alguna interacción extra entre las diferentes señales con la de los OH's sin llegar a ninguna conclusión satisfactoria.

Discusión

Cuando se tienen moléculas que poseen libre rotación como los sistemas del propanodiol, no es común hablar de una conformación a temperatura ambiente, sin embargo con los resultados obtenidos se puede proponer que la conformación preferida promedio de la infinidad de posibilidades es aquella donde existe el puente de hidrógeno intramolecular, como la representada en la Figura 3.2; para ello se toma como base los valores de constantes de acoplamiento que se obtuvieron.

Esta conclusión debe considerarse como una primera aproximación para establecer la conformación del 1,2 y del 1,3-propanodiol mediante el uso de la RMN. Los puntos a discusión son: a temperatura ambiente se tiene un sistema dinámico con lo cual hablar de una rigidez a 20°C es muy arriesgado; sin embargo los valores de J son valores comúnmente aceptados como promedios de las diferentes conformaciones que puede poseer las moléculas no rígidas, lo cual representa una estructura promedio.

Para poder confirmar la existencia de este tipo de conformaciones en forma indiscutible, sería necesario la obtención de espectros de RMN que nos indicaran que todos los protones de las moléculas son no equivalentes, ya que nos hablaría de una rigidez intramolecular.

Existe una gran dependencia del espectro obtenido con el disolvente empleado, ya que con disolventes diferentes los espectros cambian. Esto se puede interpretar como la interacción de soluto-disolvente, el cual obliga al soluto a adquirir cierta conformación. Esto es posible observarlo al comparar los espectros del 1,2-propanodiol en DMSO y en CDCl_3 donde los valores de J son diferentes, lo cual sugiere conformaciones promedio diferentes. Los protones más susceptibles a este tipo de interacciones son la de los OH's; los cuales cambian su multiplicidad y desplazamiento conforme el disolvente. Otro factor importante es el agua del disolvente; esta

impureza está en proporción semejante a la del soluto (1 mg / 1 ml) y se observa una interacción fuerte con los dioles.

Una posible solución a este problema radica en el estudio de moléculas que tengan una conformación estable como los derivados de estos dioles con grupos terbutilos sustituidos formando el éter u otros sustituyentes con volumen molecular grande para formar compuestos cuya rigidez impida la libre rotación. De esta forma se podrá caracterizar la conformación y extrapolar las posibles estructuras a los dioles.

Los dioles son poco solubles en disolventes como el cloroformo, disulfuro de carbono y en otros disolventes no polares. Con la formación de derivados de estos compuestos se espera incrementar la solubilidad en disolventes no polares y evitar el problema de insolubilidad a bajas temperaturas y en esta forma establecer, si existe, una conformación de los compuestos a estudiar.

Para poder realizar el estudio de moléculas complejas, como las estudiadas en productos naturales, es necesario conocer las posibles interacciones que se tienen con moléculas sencillas y posteriormente establecer conformaciones de ellas para poderlas extrapolar a moléculas más complejas.

Al lograr establecer la conformación de moléculas pequeñas, sería muy conveniente poder predecir conformación, desplazamiento químico y multiplicidad de las diferentes señales con programas computacionales de mecánica molecular.

CONCLUSIONES

La espectrometría de masas ha sido de gran utilidad para realizar determinaciones y caracterizaciones de mezclas complejas separadas por cromatografía de gases. El análisis empleando sistemas acoplados representa una gran ventaja sobre los sistemas convencionales, ya que se obtiene información acumulada de dos técnicas. Con la técnica de espectrometría de masas aunada a la cromatografía de gases es posible determinar los constituyentes de los aceites esenciales; es necesario contar con un buen número de estándares para efectuar estos análisis en forma precisa. Sin embargo, en ciertos casos, como en los oxidos de linalool y del γ -cubebeno, fue posible caracterizarlos únicamente con los datos de sus espectros de masas y los espectros referencia del banco de datos. Este hecho ilustra la necesidad de emplear dentro de una técnica todos los datos que sirven al propósito de aumentar la certidumbre sobre la naturaleza de las sustancias

El uso de la cromatografía líquida de alta eficiencia permitió la separación de los isómeros geométricos del 2-carbetoxi-3-fenil-3-metil oxirano, mientras que la cromatografía de gases preparativa no lo permitió hacer.

En lo referente a la RMN unidimensional es una herramienta que permite determinar estructuras de sustancias complejas. Sin embargo, la asignación de señales de RMN utilizando experimentos unidimensionales es un problema no trivial y requiere del uso de técnicas más sofisticadas para asignar, sin ambigüedades, las diferentes señales en estos espectros.

La caracterización de la excelsina no se hubiera podido realizar si no se cuenta con el espectro de RMN de ^{13}C . Gracias a esta técnica fue posible asignar la posición del grupo hidroximetileno con este experimento.

Se confirma la necesidad de emplear experimentos de RMN de dos dimensiones adicionalmente a los unidimensionales. Una vez asignadas las señales del espectro de RMN ^1H de del 1-L-1-O-metil-2-acetil-3-*p*-cumaril-*myo*-inositol fue posible asignar las del espectro de ^{13}C con el experimento HETCOR. Para el *cut*-15,16-epoxy-3 α ,8 β -dihidroxi,9 β H-labda-13(16),14-dieno se siguió la ruta inversa, una vez asignado el espectro de ^{13}C con el experimento HETCOR se asignó el espectro de ^1H .

El efecto nuclear Overhauser sirvió para poder caracterizar al *cis*-2-carboxi-3-fenil-3-metil oxirano y al *trans*-2-carboxi-3-fenil-3-metil oxirano, sin el cual no hubieran podido diferenciarse. Con el experimento HETCOR se lograron asignar las diferentes señales de los espectros de RMN de ^{13}C y de ^1H .

Mediante el empleo de RMN es posible asignar una conformación preferida para el 1,2-propanodiol mediante el análisis tradicional de los espectros de ^1H . En esta forma la conformación propuesta es aquella favorecida por un puente de hidrógeno, donde los hidrógenos del metileno y el del metino forman un ángulo diedro menor de 90° .

Para el 1,3-propanodiol se determinaron señales no reportadas para una especie en transición de fase en cloroformo donde es poco soluble a bajas temperaturas.

Con las técnicas espectroscópicas se tiene toda una gama de experimentos que se pueden efectuar para realizar determinaciones y asignaciones inequívocas de las diferentes señales de RMN que corroboran la estructura de diferentes sustancias. Las asignaciones por RMN se pueden realizarse mediante el empleo de experimentos unidimensionales y bidimensionales.

BIBLIOGRAFIA Y REFERENCIAS

- 1.- Masada, Y. "Analysis of Essential Oils by Gas Chromatography and Mass Spectrometry" New York, John Wiley & Sons Inc., 1976.
- 2.- Calzada, F.; Navarrete, A.; del Rfo, F.; Delgado, G. and Mata, R.; "Long Chain Phenols from *Amphipterygium adstringens*"; J. of Ethnopharmacology, aceptado, 1991.
- 3.- Enríquez Habib, R. G. Tesis Doctoral, Facultad de Química, U.N.A.M., 1986.
- 4.- Derome, A. E. "Modern NMR Techniques for Chemistry Research" 1st Ed. Pergamon Press, England, 1988.
- 5.- Sanders, J. K. M. and Hunter, B. K. "Modern NMR Spectroscopy: A Guide for Chemists" Oxford University Press, England, 1988.
- 6.- Shoolery, J.N. "Recent Developments in ¹³C and Proton-NMR" J. Nat. Prod., 47 (1984) 226-256.
- 7.- Patt, S. L. and Shoolery, J. N.; J. Mag. Res., 46 (1982) 535.
- 8.- Doddrell, D.M.; Pegg, D.T. and Bendall, M.R. "Distortionless Enhancement of NMR Signals by Polarization Transfer" J. Mag. Res., 48 (1982) 323-327.
- 9.- Martin, G. E. and Zektzer, A. S. "Two-Dimensional NMR Methods for Establishing Molecular Connectivity: A Chemist's Guide to Experiment Selection, Performance, and Interpretation" New York, VCH Publishers Inc., 1988.
- 10.- Croasmun, W. R. and Carlson, R. M. K. Ed "Two-Dimensional NMR Spectroscopy: Applications for Chemists and Biochemists" Methods in Stereochemical Analysis V. 9, New York, VCH Publishers Inc., 1987.
- 11.- Jeener, J. Ampere Summer School, Basko Polje, Yugoslavia, 1971.
- 12.- Aue, W.P.; Bartholdi, E. and Ernst, R.R. J. Chem. Phys., 64 (1976) 2229-2246.
- 13.- Drago, R.S. "Physical Methods in Chemistry", W.B. Saunders Co. 1977, pp. 194.
- 14.- Kessler, H.; Gehrke, M and Griesinger, C. "Two-Dimensional NMR Spectroscopy: Background and Overview of the Experiments" Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 27 (1988) 490-536.
- 15.- Bax, A. and Freeman, R. "Investigation of Complex Networks of Spin-Spin Coupling by Two-Dimensional NMR" J. Mag. Res., 44 (1981) 542-561.
- 16.- Bax, A. and Morris, G. A. J. Mag. Res., 42 (1981) 501.
- 17.- Reynolds, W.F.; Hughes, D.W.; Perpich-Dumont, M. and Enríquez, R.G. "A Pulse Sequence for Establishing Carbon-Carbon Connectivities via Indirect ¹³C-1H Polarization Transfer Modulated by Vicinal ¹H-¹H Coupling" J. Mag. Res., 63 (1985)

413-417.

18.- Kessler, H.; Griesinger, C.; Zarboch, J. and Loosli, H. R. J. Magn. Reson. 57 (1984) 331-5.

19.- Domínguez, X.; Phytochemistry, 11 (1972) 2648.

20.- Sánchez, L.; Albores-Velasco, M. and del Rfo, F. "Volatile Compounds of", Phytochemistry, en prensa 1991.

21.- Alltech Associates Inc. Catalog No.70; 1985, pp.86.

22.- Hewlett-Packard, GC/MS Data System 5985 Software 1978.

23.- Garcia, Federico Alfredo, comunicación personal.

24.- Cornu, A. and Massot, R. M. "Compilation of Mass Spectral Data" 2nd Ed. V. 1 and 2, London, Hyden, 1975.

25.- a) Purcell, E. M.; Torrey, H. C. and Pound, R. V. Phys. Rev. 69 (1946) 37. b) Bloch, F.; Hansen, W. W. and Packard, M. Phys. Rev. 69 (1946) 127.

26.- Díaz, E. et al "Reaction of Dibenzalcylohexanone with Hydroxylamine Hydrochloride. 2D NMR Elucidation of the Structure of the Products" Mag. Res. Chem., 27 (1988) 719-724.

27.- Calzada, F.; Mata, R.; López, R.; Linares, E.; Bye, R.; Barreto, V. M. and del Rfo, F. "Friedelanes and Triterpenoid Quinone Methide from *Hippocratea excelsa*" Planta Medica, en prensa 1991.

28.- Betancor, C.; Freire, R.; González, A. G.; Salazar, J. A.; Pascard, C. and Prange, T. "Three Triterpenes and other Terpenoids from *Catha cassinoides*"; Phytochemistry, 19 (1980) 1989-93.

29.- Gamlath, C. B. and Gunatilaka, A. A. L. "The Structure of Celastranhydride: a Novel Triterpene anhydride of Celastraceae" Tetrahedron Letters, 29 (1988) 109-112.

30.- Hammann, P. E.; Habermehl, G. G. and Kluge, H. " γ gauche Effects in the ¹H and ¹³C NMR Spectra of Steroids" Mag. Res. Chem., 26 (1988) 85-88.

31.- Reynolds, W. F. Conferencia impartida durante la celebración del 50 aniversario del Instituto de Química.

32.- Mata, R.; Contreras, J. L.; Crisanto, D.; Pereda-Miranda, R.; Castañeda, P. and del Rfo, F. "Chemical Studies on Mexican Plants Used in Traditional Medicine XVIII. New Secondary Metabolites from *Dodonaea viscosa*", J. Nat. Prod. en prensa 1991.

33.- Contreras Muciño, J. L. Tesis de Licenciatura, Universidad Motolinía, 1990.

34.- Castañeda, P. Tesis de Maestría, en prensa, 1991.

35.- Fernández, C.; Fraga, B. M. and Hernández, M. G. "Diterpenes from *Sideritis Nutans*" Phytochemistry, 25 (1986) 2825-2827.

36.- Tanaka, T.; Tanaka, O.; Lin, Z. W.; Zhou, J. and Ageta, H. "Sweet and Bitter Glycosides of the Chinese Plant Drug, Bai-Yun-Shen" Chem. Pharm. Bull. 31 (1983)

780-783.

- 37.- Cambie, R. C., Joblin, K. N. and Preston, A. F. *Aust. J. Chem.* 24 (1971) 583.
- 38.- Dreyer, D.L. "Kaempferol Methyl Ethers from Flowers of *Dodonaea viscosa*" *Revista Latinoamericana de Química*, 9 (1978) 97.
- 39.- Wagner, H.; Ludwig, C.; Grotjahn, L. and Khan, "Biologically Active Saponins from *Dodonaea viscosa*", *Phytochemistry*, 26 (1987) 697.
- 40.- Noggle, J. H. and Schirmer, R. E. "The Nuclear Overhauser Effect: Chemical Applications", New York, Academic Press, 1971.
- 41.- Anet, F. A. L. and Bourn, A. J. R.; *J. Amer. Chem. Soc.* 87 (1965) 5250-1.
- 42.- Katritzky, A. R. Ed. "Comprehensive Heterocyclic Chemistry" V. 7 Oxford, Pergamon Press, 1984, pp. 33, 390-4.
- 43.- Nakano, M.; Takayama, K.; Shimizu, Y.; Tsuji, Y.; Inaba, H. and Migita, T. *J. Am. Chem. Soc.*, 98 (1976) 1975-7.
- 44.- van Antwerp, C. L. "Experimental Determination of the Nuclear Overhauser Effect" *J. Chem. Ed.*, 50 (1973) 638-9.
- 45.- Kennewell, P. D. "Applications of the Nuclear Overhauser Effect in Organic Chemistry" *J. Chem. Ed.*, 47 (1970) 278-80.
- 46.- Krstulovic, A. M. Ed. "Chiral Separations by HPLC", New York, John Wiley & Sons, 1989.
- 47.- Mc Nair, H. comunicación personal.
- 48.- Buc, H. "Liason Hydrogène Intramoléculeire et Isomérisation de Rotation dans les β -Diols en Solution dans le Tétrachlorure de Carbone" *Ann. Chim.* 8 (1963) 409-30.
- 49.- Vázquez, S.; Mosquera, R. A.; Rios, M. A. and van Alsenoy, C. "AB-Initio Gradient Optimized Molecular Geometry and Conformational Analysis of 1,2-Propanediol at the 4-21G Level" *J. Mol. Structure (Theochem)*, 184 (1989) 323-42.
- 50.- van Duin, M.; Baas, J. M. and van de Graff "Empirical Force Field Calculations. 27. A Study on the Conformations of the Simple Vicinal Diols" *Journal of Organic Chemistry*, 51 (1986) 1298-302.
- 51.- Caminati, W. "Conformation and Hydrogen Bond in 1,2-Propanediol" *Journal of Molecular Spectroscopy*, 86 (1981) 193-201.
- 52.- Grenier-Loustalot, M. F.; Bonastre, J. et Grenier, P. "Les Déplacements Chimiques Carbone 13 des Groupements Méthyles Traités en Termes D'interactions H/H, H/Me, Me/Me" *J. Mol. Structure*, 65 (1980) 249-58.
- 53.- Spoomaker, T. and de Bie, J. A. *Recueil, Journal of the Royal Netherlands Chemical Society*, 99 (1980) 154-60.
- 54.- Schwartz, M. and Colville, M. J. "Proton Magnetic Resonance Investigation of Hydrogen Bonding in Aqueous Polyalcohols" *J. Mag. Res.*, 32 (1978) 377-82.

55.- Busfield, W. K.; Ennis, M. P. and McEwen, I. J. "An Infrared Study of Intramolecular Hydrogen Bonding in α, ω diols" *Spectrochimica Acta*, 29A (1972) 1259-64.

56.- Morantz, D. J. and Waite, M. S. "Anharmonic Effects and Intra-Molecular Hydrogen Bonding in Alkane-Diols" (1970) 1133-1137.

57.- Kinneging, A. J.; Mom, V.; Mijlhoff, F. C. and Renes, G. H. "The Molecular Structure of 1,3-Propanediol in the Gas Phase, an Electron Diffraction Study" *J. Mol. Structure*, 82 (1982) 271-5.

58.- Vázquez, S.; Mosquera, R. A.; Rios, M. A. and van Alsenoy, C "AB-Initio Gradient Optimized Molecular Geometry and Conformational Analysis of 1,3-Propanediol at the 4-21G Level" *J. Mol. Structure (Theochem)*, 181 (1988) 149-67.

59.- Reuben, J. "Isotopic Multiplets in the Carbon-13 NMR Spectra of Polyols with Partially Deuterated Hydroxyls. 5. β -Diols" *J. Am. Chem. Soc.* 107 (1985) 1756-9.

60.- Kleeberg, H. "Cooperative Effects in H-Bond Formation: Influence on the Acidity of Proton Donors"; *J. Mol. Structure* 177 (1988) 157-71.

61.- Kleeberg, H.; Klein, D. and Luck, W. A. P. "Quantitative Infrared Spectroscopic Investigations of Hydrogen-Bond Cooperativity" *J. Phys. Chem.* 91 (1987) 3200-3.

62.- van den Eden, L.; van Alsenoy, C.; Scarsdale, J. N. and Schäfer, L. "AB-Initio Studies of Structural Features Not Easily Amenable to Experiment" *J. Mol. Structure (Theochem)*, 104 (1983) 471-87.

63.- Burnett, L. J. and Roeder, S. B. W. "Carbon-13 NMR Study of Molecular Reorientation in Glycerol" *J. Chem. Phys.*, 60 (1974) 2420-3.

64.- Müller, L. "Excitation of Deuterium Double-Quantum Transitions in Liquids" *Chem. Phys. Letters*, 91 (1982) 303-6.

65.- Kono, R. "The Relation Between the Limiting Shear Modulus and Degree of Hydrogen Bonding in Alcohols" *J. Chem. Phys.*, 75 (1981) 3025-6.

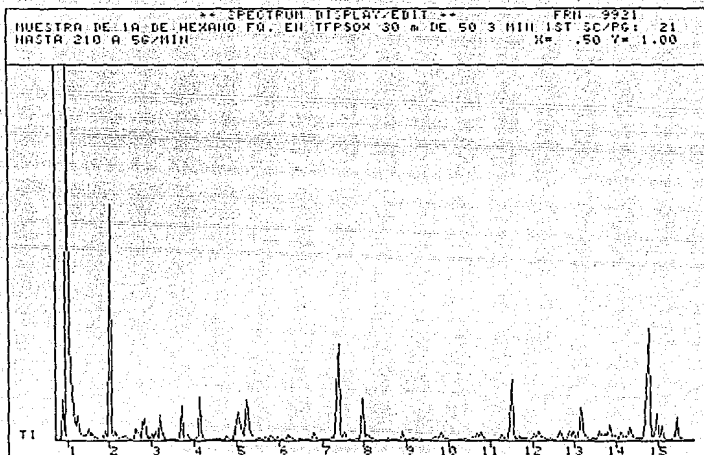
66.- Chauvel, J. P.; Folkendt, M. M. and True, N. S. " ^1H NMR Chemical Shifts of Gaseous Amines" *Mag. Res. Chem.*, 25 (1987) 101-4.

67.- Carballeira, L.; "Conformational Analysis of Polifunctional Amino Compounds by Molecular Mechanics" *J. Mol. Structure*, 193 (1989) 263-77.

68.- Rasmussen, K. and Tosi, C. "Conformational Analysis of 1,2-Ethanediamine and 1,3-Propanediamine by CFF, PCILO, and ab initio Methods" *Acta Chem. Scand. A* 37 (1983) 79-91.

69.- Ellingsen, B.H.; Marstokk, K.M. and Mollendal, H.; *J. Mol. Structure* 48 (1978) 9-23.

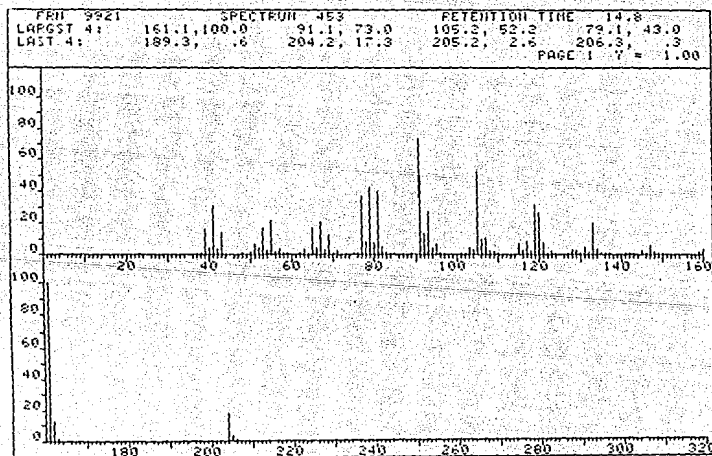
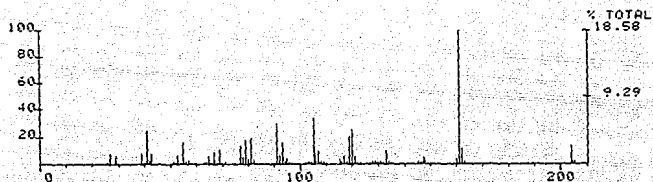
ESPECTROS Y ANEXOS



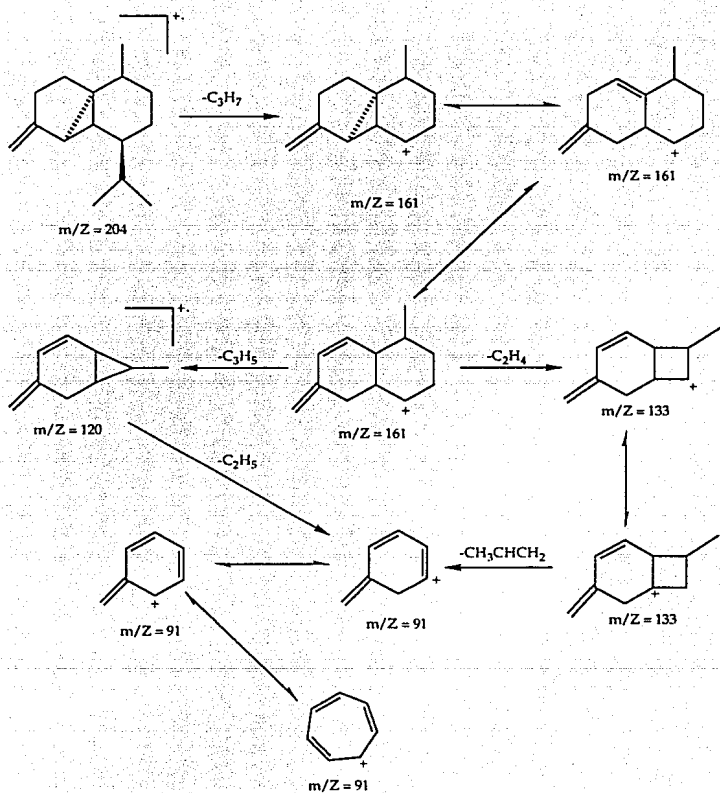
Cromatograma 1. Aceite esencial de la fruta del chapote amarillo en RSL-400.

1H-Cyclopenta[1,3]cyclopropa[1,2]benzene, octahydro-7-methyl-3-methylene-4-(1-methylethyl)-, (3a.alpha.,3b.alpha.,4.alpha.,7.beta.,7a.beta.)- (9CI)
 FRII: 3006 LSN: 2601 (NBS 13475.) MW 204 C15H24

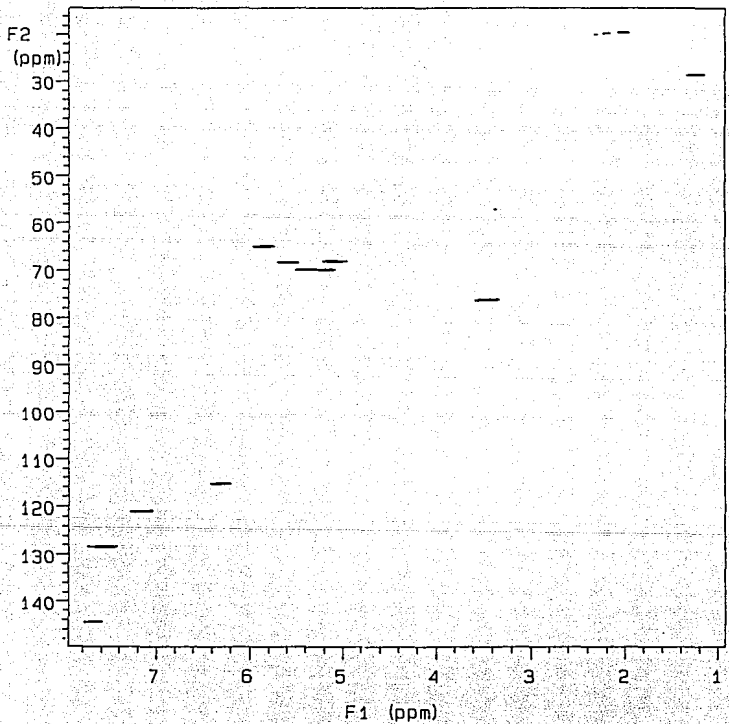
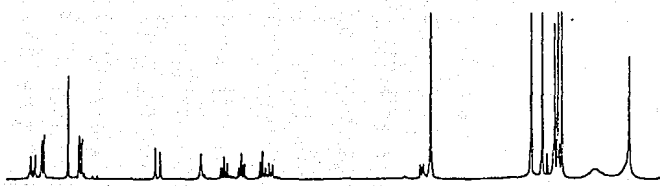
CAS: 0013744155 EPA: 0000009256 QUAL INDX: 728



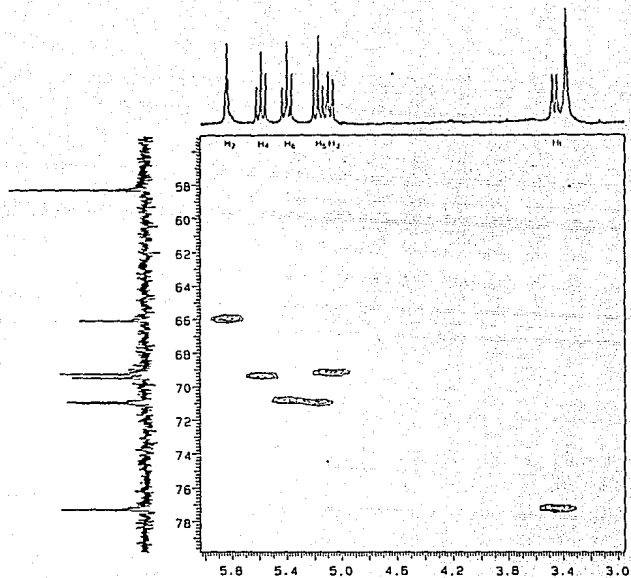
Espectro 1. En la parte superior se muestra el espectro de masas del banco de datos del sistema HP-5885; en la inferior el espectro de masas caracterizado como *N*-cubebeno.



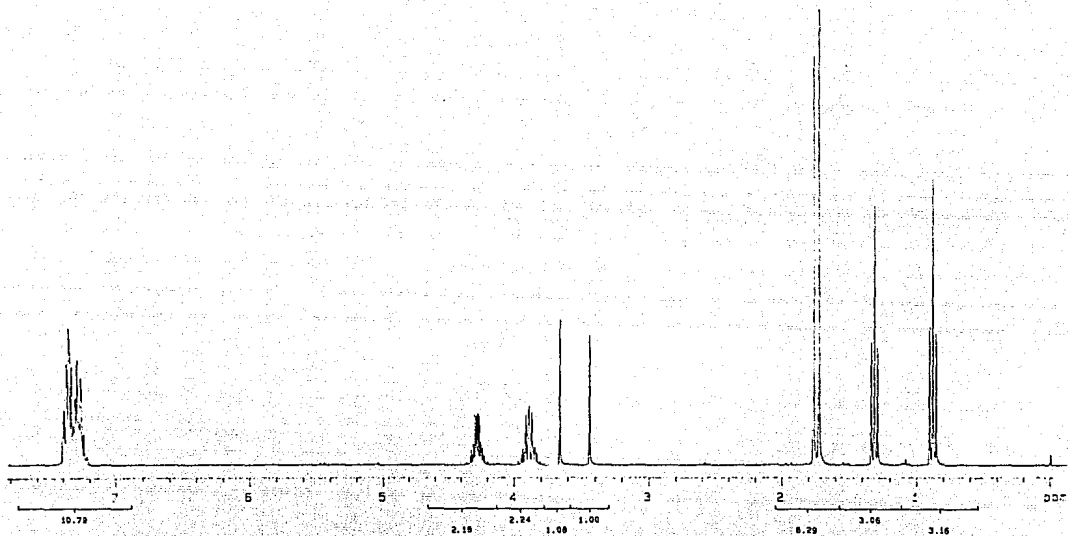
Anexo 1.- Propuesta de la ruta de fragmentación del γ -cubebeno. Los fragmentos inferiores siguen la ruta de los aromáticos mono y di sustituidos.



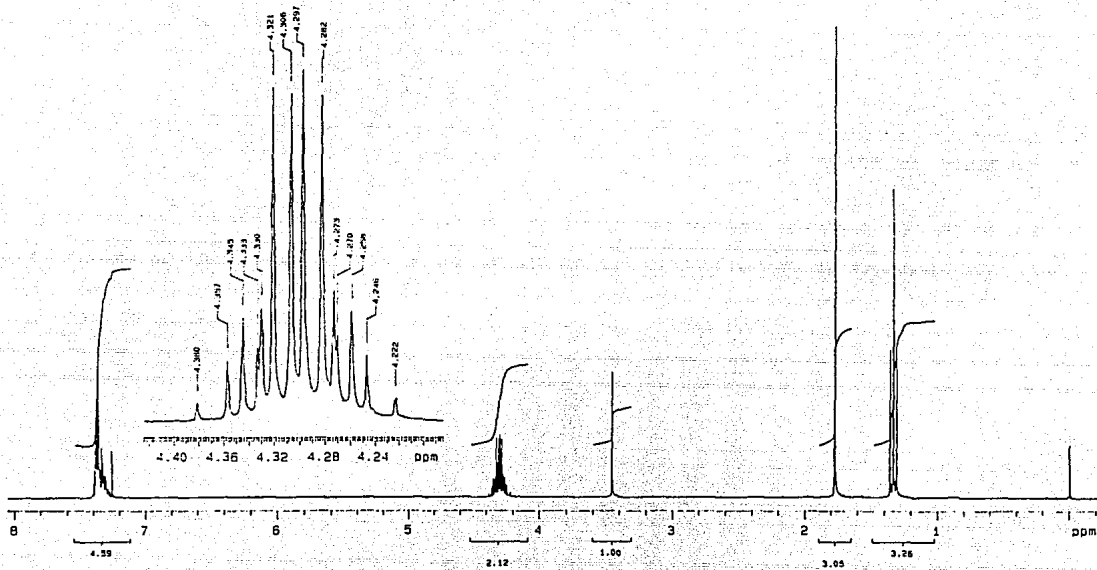
Espectro 2. Hctcor del 1-L-1-O-metil-2-acetil-3-p-cumaril-myo-inositol.



Espectro 3. Amplificación del Espectro 2 que comprende la región de los hidrógenos y carbonos base de oxígeno.

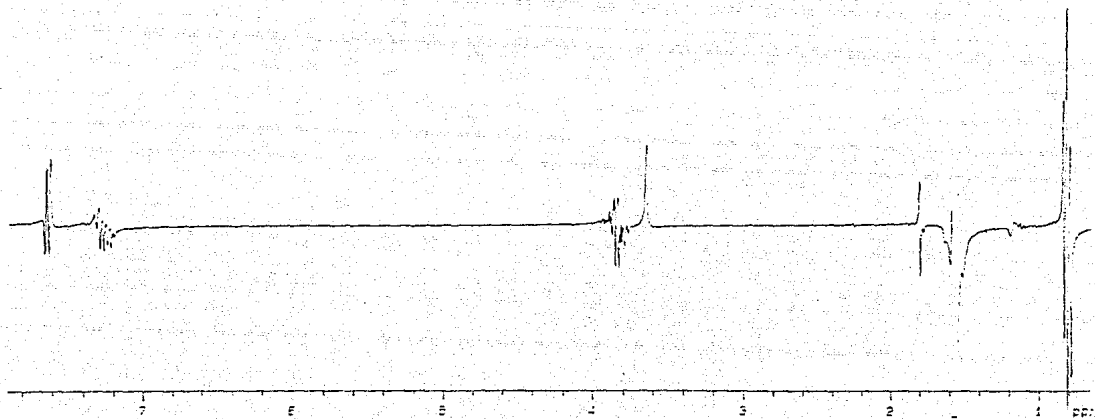


Espectro 4. RMN de ^1H de la mezcla del 2-carboxi-3-fenil-3-metil oxirano en CDCl_3 usando TMS como referencia.

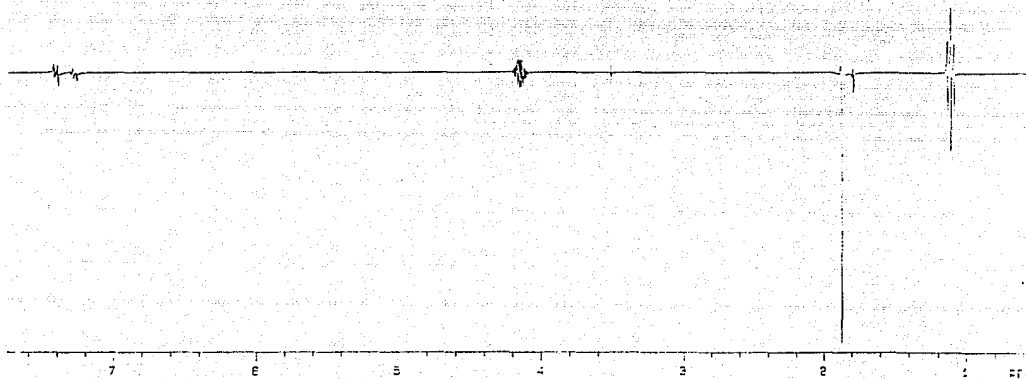


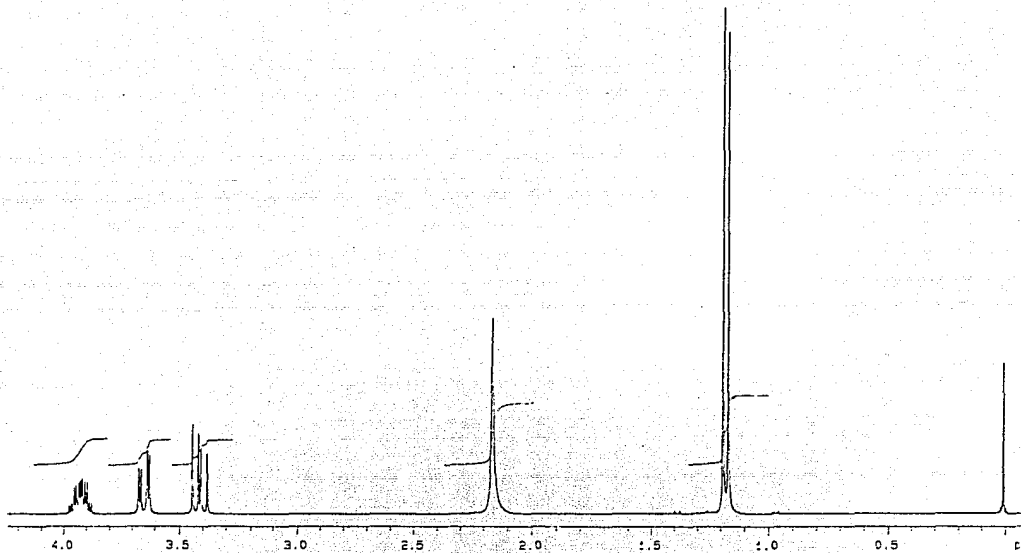
Espectro 5. RMN de ^1H del trans-2-carboxi-3-fenil-3-metil oxirano.

Espectro 6. NOE diferencial del cis-2-carboxi-3-fenil-3-metil oxirano.

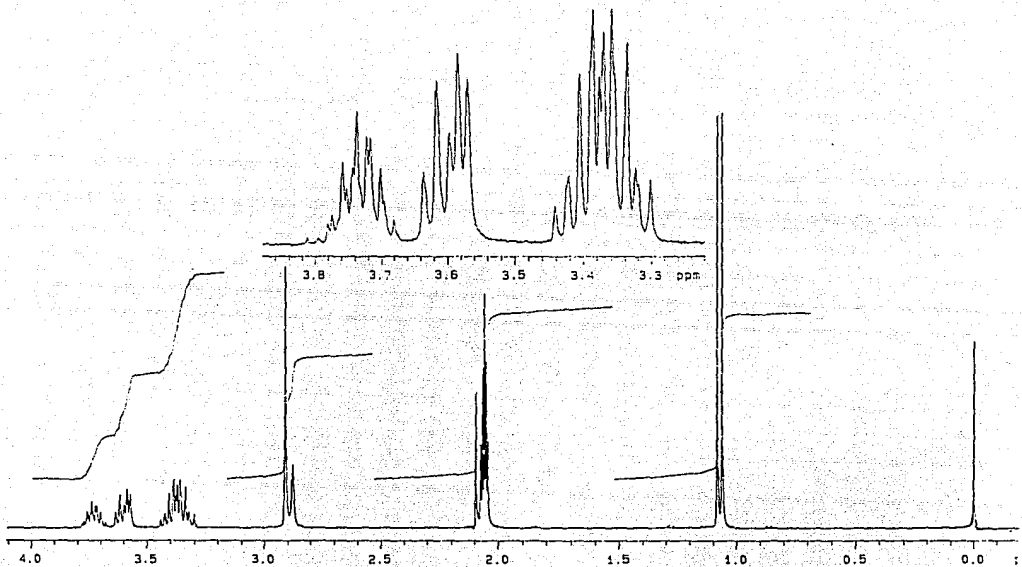


Espectro 7. NOE diferencial del trans-2-carbetoxi-3-fenil-3-metil oxirano.

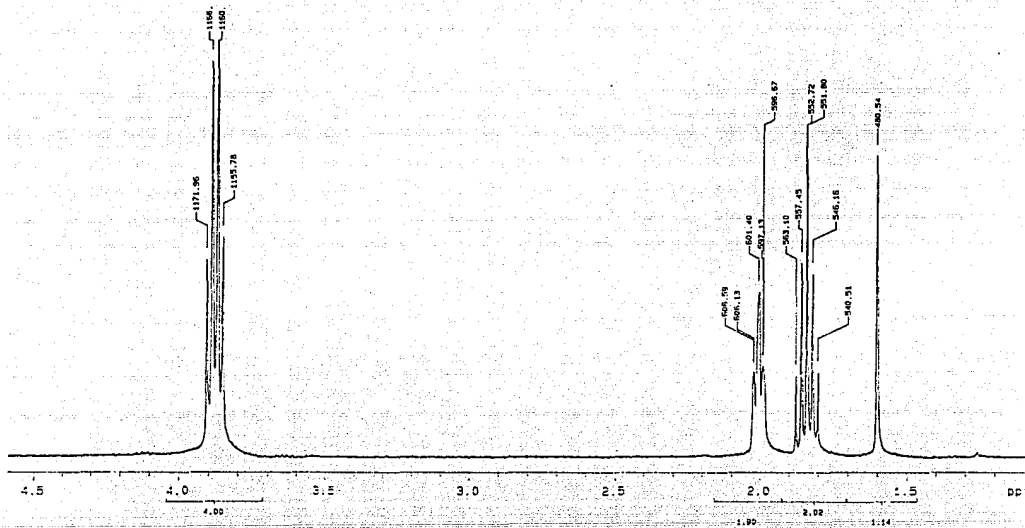




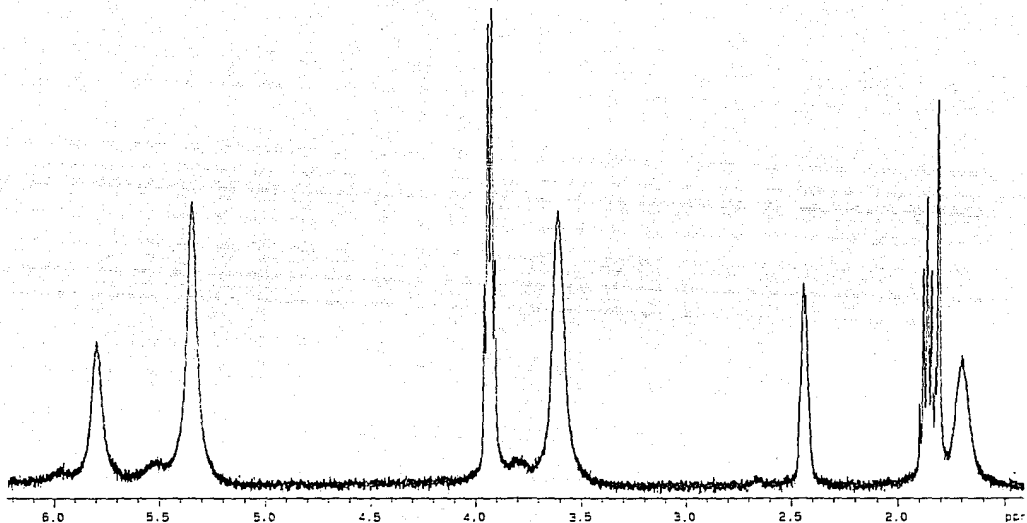
Espectro 8. RMN de ^1H del 1,3-propanodiol en CDCl_3 a 20°C .



Espectro 9. RMN de ^1H del 1,2-propanodiol en acetona a 30°C .

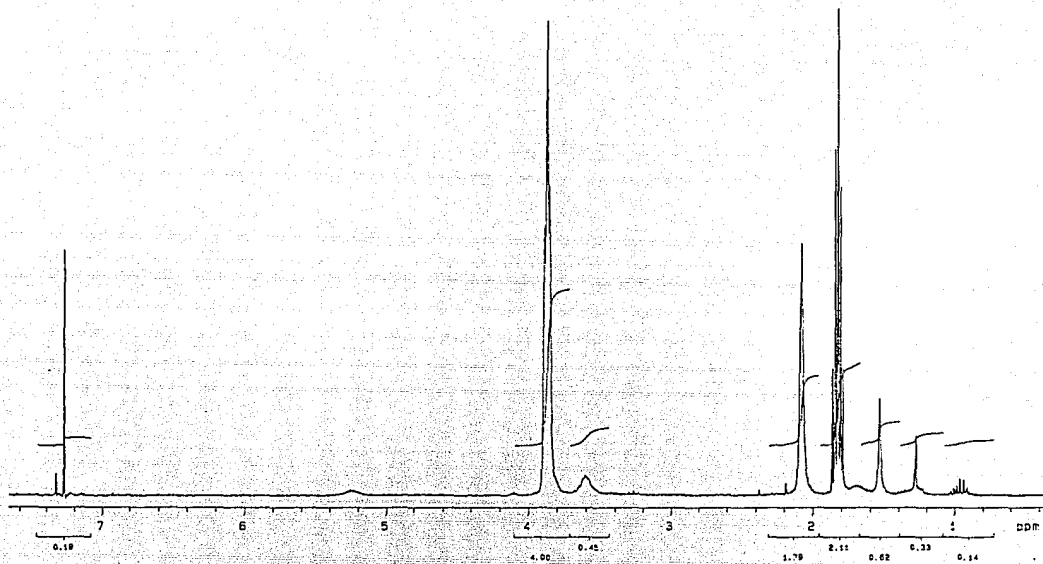


Espectro 10. RMN de ^1H del 1,3-propanodiol en CDCl_3 a 20°C .



Espectro 11. RMN de ^1H del 1,3-propanodiol en CDCl_3 a -40°C .

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA



Espectro 12. RMN de ^1H del 1,3-propandiol en mezcla de CDCl_3 y CS_2 a 20°C .

Espectro 13. RMN de ^{13}C a 100 MHz del 1,3-propanodiol en acetona a 23°C.

