



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

00550

ESTA TESIS NO
DE LA BIBLIOTECA

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

**GENERALIZACIÓN DEL MÉTODO MODIFICADO DE DUPLICACIÓN DE J EN EL DOMINIO
DE LAS FRECUENCIAS.**

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA
VICTOR URIEL CONSTANTINO CASTILLO



TUTOR: Dr. José Federico del Río Portilla. AÑO: 2005

0350082



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Victor Uriel
Constantino castillo

FECHA: 09/11/2005

FIRMA: p.a. [Signature]

A mi Familia.

Este trabajo se desarrollo, en los laboratorios de Bioquímica I y IV del Instituto de Química de la UNAM.

ÍNDICE	Página
RESUMEN	I
OBJETIVOS	III
CAPITULO 1. ESTRUCTURA DEL ESPECTRO DE RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR.	
1.1 MARCO TEORICO.	1
1.2 EL ESPIN NUCLEAR Y SU MOMENTO MAGNETICO ASOCIADO.	2
1.3 EL EFECTO ZEEMAN Y EL FENOMENO DE RESONANCIA.	3
1.4 ESPECTROS DE ALTA RESOLUCION EN MEDIOS ISOTROPICOS.	4
1.4.1 DESPLAZAMIENTO QUIMICO	5
1.4.1.1 RESONANCIAS DE DIFERENTES GRUPOS FUNCIONALES.	7
1.4.1.2 EL ORIGEN DE LAS CONSTANTES DE APANTALLAMIENTO.	8
1.4.1.2.1 LA CONTRIBUCION LOCAL.	9
1.4.1.2.2 LA CONTRIBUCION DE LOS GRUPOS VECINOS.	9
1.4.1.2.3 LA CONTRIBUCION DEL DISOLVENTE.	10
1.4.2 ACOPLAMIENTO INDIRECTO ESPIN-ESPIN O ACOPLAMIENTO ESCALAR.	11
1.4.2.1 LOS NIVELES DE ENERGIA DE SISTEMAS ACOPLADOS.	12
1.4.2.2 PATRONES DE ACOPLAMIENTO.	14
1.4.2.3 LA MAGNITUD DE LAS CONSTANTES DE ACOPLAMIENTO.	16
1.4.2.4 EL ORIGEN DEL ACOPLAMIENTO ESPIN-ESPIN.	18
1.4.2.5 NUCLEOS EQUIVALENTES.	21
CAPITULO 2. MEDICION DE CONSTANTES DE ACOPLAMIENTO.	
2.1 MARCO TEORICO.	22
2.2 CLASIFICACION DE LOS DIFERENTES METODOS PARA LA DETERMINACION PRECISA DE CONSTANTES DE ACOPLAMIENTO.	24
2.3 METODO DE DUPLICACION DE J.	26
2.3.1 DOMINIO DEL TIEMPO.	26
2.3.2 DOMINIO DE LAS FRECUENCIAS.	28

2.4 METODO MODIFICADO DE DUPLICACION DE J EN EL DOMINIO DE LAS FRECUENCIAS.	29
CAPITULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	
3.1 MARCO TEORICO.	33
3.2 DESARROLLO EXPERIMENTAL.	37
3.2.1 ESTUDIO DE SEÑALES SIMULADAS.	41
3.2.2 ESTUDIO DE SEÑALES EXPERIMENTALES.	45
CONCLUSIONES.	56
BIBLIOGRAFIA.	58
ANEXO I.	61

RESUMEN.

La dependencia de los valores de las constantes de acoplamiento espín-espín en la conformación molecular es una valiosa herramienta en el proceso de elucidación de la estructura molecular por medio de espectroscopia de resonancia magnética nuclear de alta resolución. A la fecha se han encontrado varias correlaciones empíricas entre los valores de estos acoplamientos y diversos parámetros conformacionales; tal vez la más conocida de estas correlaciones es la relación descubierta por Karplus, la cual relaciona los acoplamientos a tres enlaces de distancia con el ángulo diedro. Recientemente, el interés de tales correlaciones se ha incrementado debido al exitoso empleo de la RMN en la determinación estructural de complejas biomoléculas tales como las proteínas.

Desafortunadamente, conforme aumenta el tamaño de las moléculas, también aumenta el ancho de línea de sus espectros, lo que hace difícil la medición de sus constantes de acoplamiento. Por otra parte los programas computacionales desarrollados hasta la fecha para calcular estructuras de proteínas a partir de parámetros obtenidos de espectros RMN, requieren que estos sean medidos con gran precisión, para obtener estructuras de buena calidad. Por lo que es de crucial importancia el desarrollo de métodos confiables y precisos para medir los valores de las constantes de acoplamiento aún en situaciones desfavorables. Debido a lo anterior, actualmente se han hecho grandes esfuerzos en el desarrollo de tales métodos.

El mejor método general para medir constantes de acoplamiento espín-espín en situaciones desfavorables desarrollado hasta ahora es el método modificado de duplicación de J en el dominio de las frecuencias. Con este método ha sido posible medir constantes de acoplamiento hasta cinco veces más pequeñas que el ancho de la señal. Subsecuentes desarrollos han mejorado el desempeño del método en los casos en que se tienen muchas constantes de acoplamiento de igual magnitud.

En este trabajo se generaliza el método modificado de duplicación de J en el dominio de las frecuencias, para demostrar que es posible deconvolucionar todas las constantes de acoplamiento de una señal de RMN en un solo paso, sin importar su magnitud. La manera en que trabaja el método se muestra en el diagrama de flujo de la figura 1. Este nuevo método se aplicó a varias señales simuladas obteniendo buenos resultados aún en situaciones desfavorables. Su utilidad se ejemplifica al aplicarlo a complejas señales experimentales. Finalmente se propone una idea que podría reducir el tiempo de cómputo requerido por el método.

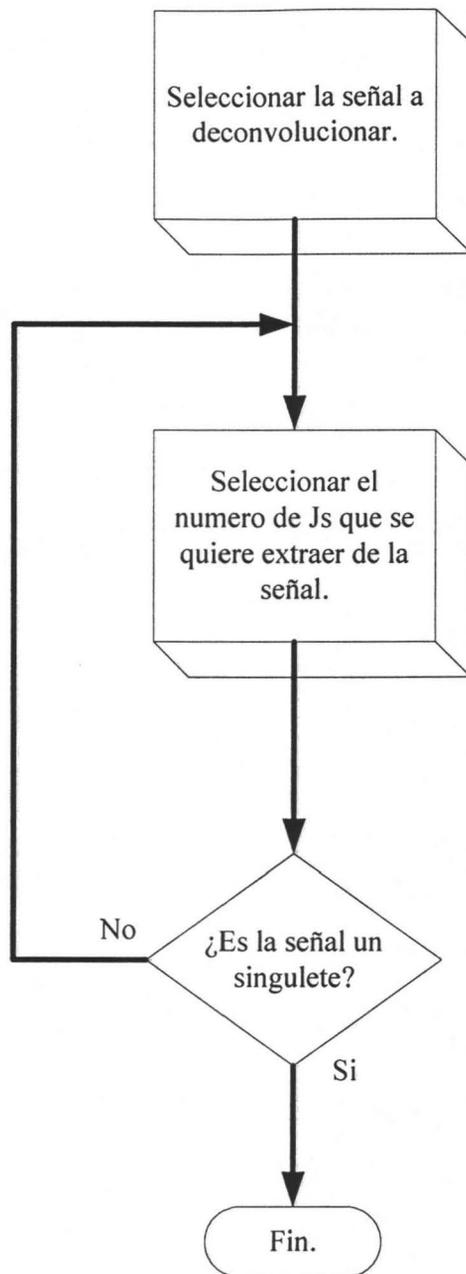


Figura1.

OBJETIVOS

General.

- Generalizar el método modificado de duplicación de J en el dominio de las frecuencias, de modo que sea posible medir y deconvolucionar todas las constantes de acoplamiento de un a señal de RMN en un solo paso.

Particulares.

- Desarrollar y programar un algoritmo que implemente este nuevo método generalizado de duplicación de J.
- Utilizar el nuevo método desarrollado para medir y deconvolucionar constantes de acoplamiento en un solo paso, en multipletes de RMN.

CAPITULO 1

ESTRUCTURA DEL ESPECTRO DE RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR.^[1-2]

1.1 MARCO TEORICO.

Durante las siguientes seis décadas después de su descubrimiento (en 1945), la resonancia magnética nuclear (RMN) ha llegado a ser una ciencia *per se*, cubriendo un gran número de aplicaciones que van desde la síntesis química a la medicina y la computación cuántica.

El experimento inicial, cuyas posibles aplicaciones parecían muy modestas, fue diseñado esencialmente para satisfacer la curiosidad de los científicos: ¿Era posible inducir transiciones entre los estados cuánticos de los espines inmersos en un campo magnético? Los físicos dieron una respuesta afirmativa a la pregunta; y posteriormente fisicoquímicos, químicos, bioquímicos, biólogos y médicos han sabido reconocer la gran cantidad de información que se puede obtener de un espectro de resonancia magnética nuclear, o más aún de los diferentes espectros que pueden ser obtenidos a partir de la gran variedad de técnicas desarrolladas hasta la fecha, las cuales permiten la determinación o correlación de un gran número de parámetros estructurales o propiedades dinámicas, de los diferentes sistemas estudiados.

La evolución de la RMN involucra importantes descubrimientos, cada uno representando innovaciones cruciales y muchas veces inesperadas, al momento cuando se creía que la técnica había alcanzado su estado estacionario y no eran posibles más desarrollos.

Poco tiempo después del descubrimiento de la RMN, se observó que núcleos de la misma naturaleza isotópica (por ejemplo protones), pertenecientes a la misma molécula no generaban una sola línea de absorción sino una serie de multipletes. Este fue el caso del espectro de protón del etanol, el cual incluía un triplete, un cuarteto y un singulete, respectivamente asignados a los grupos CH₃, CH₂ y OH de la molécula. Se infirió entonces que la técnica, inicialmente parte de la física nuclear, podría llegar a ser una poderosa herramienta de investigación estructural, tan pronto como la posición (o desplazamiento) de los multipletes y su estructura fina, pudieran ser correlacionados con la naturaleza química de los constituyentes de la molécula bajo estudio. Esta visión optimista, ha sido más que confirmada actualmente,

ya que ahora es posible determinar la estructura de moléculas extremadamente complicadas, como las proteínas.

1.1 EL ESPÍN NUCLEAR Y SU MOMENTO MAGNETICO ASOCIADO.

La apariencia del espectro de RMN se debe a la naturaleza discreta de los niveles de energía del sistema de espín nuclear. El concepto de espín nuclear es semejante al de espín electrónico que nos es más familiar debido a que por el principio de Pauli, está involucrado en la caracterización de los estados electrónicos de átomos y moléculas. Sin embargo, ya que los protones y los neutrones son también fermiones (partículas con espín fraccionario), el sistema de espín nuclear sigue las mismas reglas que el electrónico. Por lo que al aparearse los espines de neutrones y protones, estos se pueden llegar a cancelar entre sí, lo que explica por que ciertos isótopos, tales como el carbono-12, tengan espín 0. Cada isótopo está caracterizado por su número de espín I , el cual puede ser entero o fraccionario y define el número de diferentes estados en los que se puede encontrar su correspondiente espín, de acuerdo a la regla $2I + 1$ ¹. Algunos ejemplos pueden ilustrar mejor esta característica: el número de espín (o simplemente el espín) del electrón, del protón y del neutrón es igual a $\frac{1}{2}$ lo que corresponde a dos distintos estados ($2 \cdot (1/2) + 1 = 2$); el espín del deuterio es 1, lo que corresponde a tres distintos estados, etc. En general las siguientes propiedades se pueden verificar para todos los isótopos existentes:

- Si el número de masa A es impar, el espín nuclear es fraccionario;
- Si el número de masa A y el número atómico Z son pares, el espín nuclear es 0;
- Si el número de masa A es par y el número atómico Z es impar, el espín nuclear es entero.

Lo más importante, sin embargo, para entender el fenómeno de resonancia magnética no es entender el significado exacto del momento de espín I (el cual no es más que el momento angular intrínseco de las partículas) sino la existencia simultánea de un momento magnético μ colineal con I :

$$\mu = \gamma I \tag{1.1}$$

¹ Esta relación viene del hecho que el número cuántico m es igual a $-I, -I + 1, -I + 2 \dots + I$, lo que da como resultado $2I + 1$ estados para un espín.

donde η es la constante de Planck dividida por 2π ; γ es la constante giromagnética específica para cada núcleo. La ecuación 1.1 es la base de todo el fenómeno de resonancia magnética y a continuación veremos porque.

1.2 EL EFECTO ZEEMAN Y EL FENÓMENO DE RESONANCIA.

Debido a su momento magnético asociado, un núcleo con espín $I = 1/2$, se puede ver como una flecha microscópica magnetizada, cuya orientación es arbitraria hasta que es sometida a un campo magnético B_0 ; entonces se puede orientar tanto en forma paralela a B_0 (la configuración más estable) como antiparalela (la configuración menos estable). De esta manera se crean dos niveles de energía, cuya diferencia de energías (para sistemas con γ positiva²), es:

$$\Delta E = \gamma \hbar B_0 \quad (1.2)$$

la cual es calculada a partir de la energía de interacción,

$$E = -\mu \cdot B \quad (1.3)$$

entre un campo magnético y un momento magnético (Figura 1.1).

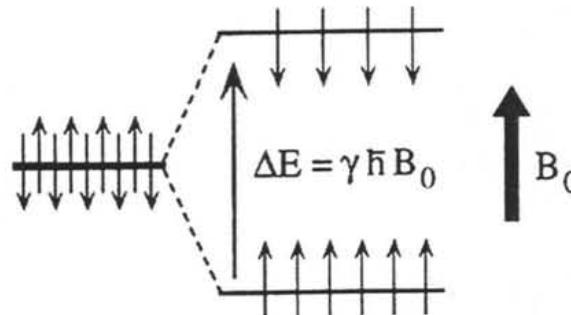


Figura 1.1. Desdoblamiento de los niveles de energía de un núcleo con espín $1/2$ debido a la aplicación de un campo magnético estático B_0 . La intensidad de una transición es proporcional al exceso de población del nivel más bajo con respecto al más alto.

Como para cualquier espectroscopia, se puede inducir una transición entre estos dos niveles de energía, si se aplica una onda electromagnética con la energía correcta, la cual se puede calcular con la ley de Bohr:

$$\Delta E = h\nu \quad (1.4)$$

La frecuencia a la cual ocurre la transición,

$$\nu_L = \frac{\gamma B_0}{2\pi} \quad (1.5)$$

² En los casos cuando γ es positiva (el momento magnético es paralelo al espín), como es el caso para la mayoría de los núcleos, los estados con valores negativos de I son de mayor energía que los estados con I positivo.

es proporcional al campo magnético y es llamada frecuencia de resonancia o frecuencia de Larmor. De una forma más fenomenológica, consideremos el exceso de espines orientados a favor del campo B_0 (con respecto a los que están alineados en la dirección opuesta o antiparalela), lo que da como resultado una magnetización nuclear microscópica M alineada con B_0 , la cual es llamada magnetización de equilibrio. Esta se puede desplazar de su posición de equilibrio aplicando una perturbación apropiada; de tal manera que M se somete a un movimiento de precesión alrededor de B_0 . Este movimiento, también llamado precesión de Larmor, se puede explicar con base en la mecánica clásica (teorema de momento angular) y ocurre a una frecuencia precisamente ν_L (Figura 1.2). Una perturbación que manda a M a un plano perpendicular a B_0 , permite la observación de la precesión de Larmor a través de una fuerza electromotriz (fem) inducida sobre una bobina, cuyo eje esta sobre el plano (Figura 1.3). La amplitud del voltaje inducido es proporcional a M mientras que su frecuencia es ν_0 . Este método de detección es equivalente, a un nivel microscópico, al papel que tiene una barra magnética dentro de un dínamo.

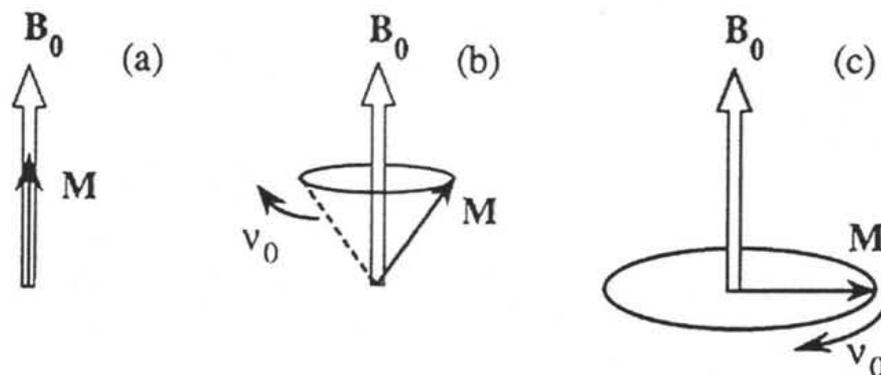


Figura 1.2. (a) Cuando está en equilibrio térmico, la magnetización nuclear M es colineal con B_0 . (b) Si una perturbación desplaza M de su posición de equilibrio, entonces comienza a precesar alrededor de B_0 a la frecuencia de Larmor ν_0 . (c) Cuando se manda a M a un plano perpendicular a B_0 el voltaje inducido en la bobina R (figura 1.3) alcanza su máxima amplitud.

1.3 ESPECTROS DE ALTA RESOLUCIÓN EN MEDIOS ISOTRÓPICOS.

Todas las consideraciones tomadas en cuenta hasta ahora no explican, por si solas, la existencia de diferentes señales para los diferentes grupos químicos en el espectro de una molécula, ni la multiplicidad de estas señales. Estas dos características se examinarán ahora.

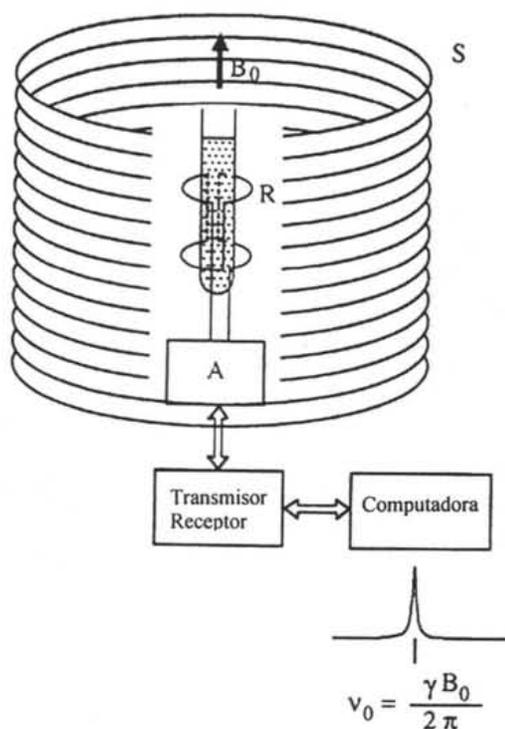


Figura 1.3. Un campo magnético estático B_0 —generalmente generado por una bobina superconductora S— genera un desdoblamiento de los niveles de energía (figura 1.1) de los núcleos dentro de la muestra en el centro del magneto). La bobina R, ajustada a la frecuencia de Larmor ν_0 (el circuito eléctrico es simbolizado por A), tiene un doble propósito:

- Crear un campo magnético alterno perpendicular a B_0 (función transmisora) el cual inducirá la transición entre los dos niveles de energía de la figura 1.1;
- Detectar la señal de resonancia (función receptora). Esta señal es procesada por una computadora la cual también controla al espectrómetro.

1.3.1 DESPLAZAMIENTO QUÍMICO.

El campo magnético que “experimentan” los núcleos, puede no ser el mismo que el campo aplicado B_0 , debido a que estos inducen un momento angular electrónico (provocado por la interacción de sus nubes electrónicas), que modifica B_0 , de manera que el campo magnético local se transforma en $B_0(1 - \sigma)$. Donde σ es la constante de apantallamiento, la cual generalmente es positiva (aunque puede ser negativa). De manera que la frecuencia de resonancia se transforma en:

$$\nu_0 = \frac{\gamma(1 - \sigma)B_0}{2\pi} \quad (1.6)$$

De la ecuación anterior nos podemos dar cuenta que la frecuencia de resonancia se vuelve una función del ambiente electrónico del núcleo, el cual depende del grupo químico al

que pertenece, por lo cual núcleos en diferentes grupos químicos tendrán diferente frecuencia de resonancia.

A este último efecto se le conoce como *desplazamiento químico* y tiene un profundo impacto en la interpretación de un espectro de RMN. Sin embargo para ser observado, se requiere un campo B_0 muy homogéneo que pase a través de la muestra. Lo que significa que es esencial corregir la inevitable inhomogeneidad de B_0 por medio de bobinas adicionales llamadas “*shims*”, las cuales generan pequeños campos correctivos para compensar las desviaciones de B_0 ; en términos matemáticos, esto se puede expresar como una expansión con respecto a las coordenadas espaciales X, Y, Z de la siguiente manera:

$$B_0(X, Y, Z) = B_0(0,0,0) + X\left(\frac{\partial B_0}{\partial X}\right) + Y\left(\frac{\partial B_0}{\partial Y}\right) + Z\left(\frac{\partial B_0}{\partial Z}\right) + X^2\left(\frac{\partial^2 B_0}{\partial X^2}\right) + Y^2\left(\frac{\partial^2 B_0}{\partial Y^2}\right) + Z^2\left(\frac{\partial^2 B_0}{\partial Z^2}\right) + XY\left(\frac{\partial^2 B_0}{\partial X\partial Y}\right) + \dots \quad (1.7)$$

donde $B_0(0,0,0)$ es el campo en el centro de la muestra. Los *shims* están diseñados para crear gradientes (por ejemplo $-\partial B_0 / \partial X$), los cuales compensan, tan exacto como sea posible, los gradientes que se muestran en la ecuación 1.7.

Una vez que se han corregido las inhomogeneidades, podemos proseguir a describir el desplazamiento químico. Debido a que la medición de B_0 con una precisión de 10^{-6} o mejor es imposible, ν_0 sólo se puede medir con respecto a una ν_{ref} de una sustancia de referencia. Sin embargo, para comparar espectros obtenidos con espectrómetros operando a diferentes valores de B_0 , generalmente se usa una variable reducida que se denota con δ y se define como:

$$\delta_{ppm} = \frac{\nu_0 - \nu_{ref}}{\nu_{ref}} \times 10^6 \quad (1.8)$$

esta cantidad se expresa en ppm por el 10^6 , el cual simplemente nos evita trabajar con números muy pequeños. Sustituyendo ν_0 y ν_{ref} en la ecuación anterior y despreciando σ_{ref} (que es del orden de 10^{-6}) con respecto a 1 obtenemos:

$$\delta_{ppm} = (\sigma_{ref} - \sigma_0) \times 10^6 \quad (1.9)$$

De esta manera podemos observar que la variable δ representa una medida de la constante de apantallamiento con respecto a la de referencia, independientemente del espectrómetro que se use. En la práctica, δ se calcula determinando experimentalmente la

diferencia de frecuencias ($\nu_0 - \nu_{ref}$) y aplicando la ecuación 1.8. Por razones históricas, (los espectrómetros de los 50s y 60s eran operados variando el campo magnético) los espectros se dibujan de tal manera que la frecuencia se incrementa de derecha a izquierda (Figura 1.4). Al igual que la escala δ pero de manera opuesta a la escala de σ ; el apantallamiento es más importante para resonancias localizadas en la parte derecha del espectro. Estas señales se dice que aparecen a campo alto en referencia al procedimiento de barrido de campo. La sustancia escogida como referencia, idealmente debería presentar las siguientes características: exhibir una sola línea de resonancia, ser fácilmente soluble, ser insensible a los efectos del disolvente y aparecer en uno de los extremos del espectro. Para experimentos de protón, silicio-29 y de carbono-13, generalmente se emplea TMS (tetrametilsilano, $\text{Si}(\text{CH}_3)_4$).

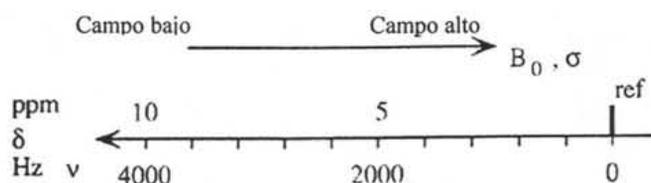


Figura 1.4. Escala de desplazamiento químico para $B_0 = 9.4$ T (frecuencia de resonancia de protón = 400 MHz), expresada en Hz y en ppm.

1.3.1.1 RESONANCIAS DE DIFERENTES GRUPOS FUNCIONALES.

La existencia del desplazamiento químico explica las características generales del espectro de etanol que se muestra en la figura 1.5. Los protones del metilo forman un grupo con $\delta \approx 1$. Los protones del metileno, se encuentran en una posición diferente dentro de la molécula, por lo tanto experimentan un campo magnético local diferente y aparecen en $\delta \approx 3$. Finalmente, el protón del grupo OH tiene otro ambiente químico, por lo que aparece en $\delta \approx 4$. El incremento en el valor de δ (esto es, la disminución del apantallamiento) es consistente con la electronegatividad del átomo de oxígeno, este reduce drásticamente la densidad electrónica del protón del grupo OH^3 y por lo tanto es el que sufre menos apantallamiento, mientras que los protones del grupo metilo, debido a su lejanía del átomo de oxígeno son los que tienen mayor densidad electrónica y por lo tanto mayor apantallamiento.

³ Aunque esto no siempre es cierto, ya que cuando se hacen experimentos a dilución infinita, el desplazamiento de este grupo OH se va hasta -1 ppm, debido a que como veremos más adelante la determinación precisa de la distribución electrónica sobre un átomo puede llegar a ser muy compleja.

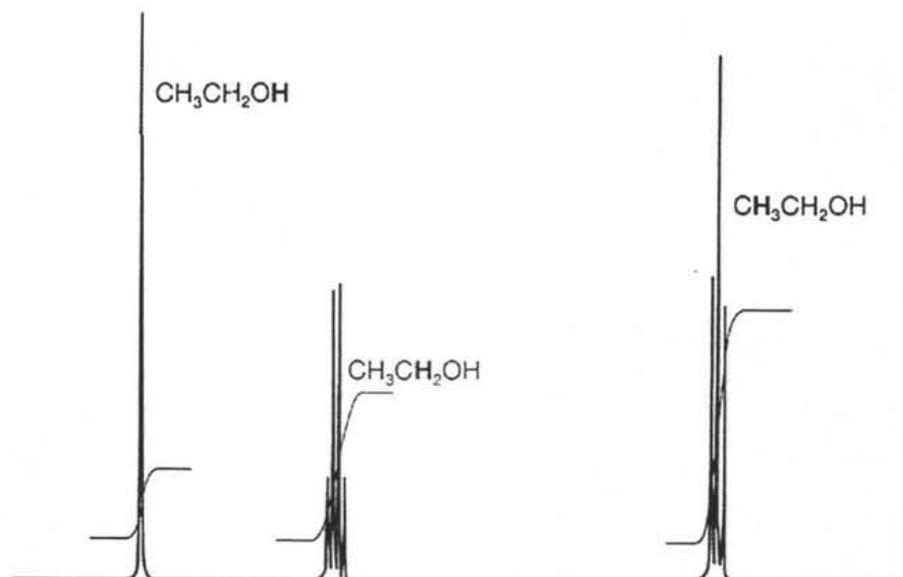


Figura 1.5. Espectro de RMN de ^1H de etanol. Las letras en negritas denotan al protón que provoca la señal de resonancia y la curva sobrepuesta es la señal de integral.

Las intensidades relativas de las señales (las áreas bajo las líneas de absorción) se pueden utilizar para distinguir que grupos de señales corresponden a que grupos químicos. En el etanol, las intensidades para cada señal, se encuentran en una relación 3:2:1, debido a que hay tres protones del metilo, dos protones del metileno y un protón del grupo OH en cada molécula. Las intensidades relativas y el desplazamiento químico de las señales en un espectro ayudan a identificar el compuesto presente en la muestra.

1.3.1.2 EL ORIGEN DE LAS CONSTANTES DE APANTALLAMIENTO.

La constante de apantallamiento σ , se puede evaluar por medio de cálculos de química cuántica. Sin embargo estos resultan muy complicados, aún para moléculas pequeñas, ya que requieren información detallada acerca de la distribución de densidad electrónica en el estado basal y excitado, además de las diferentes energías de ionización de la molécula. Por lo que nos limitaremos a la descripción empírica del fenómeno. Esta supone que la constante de apantallamiento es la suma de tres contribuciones:

$$\sigma = \sigma_{\text{local}} + \sigma_{\text{vecinos}} + \sigma_{\text{disolvente}} \quad (1.10)$$

La contribución local, σ_{local} , es esencialmente la contribución de los electrones del átomo que contiene el núcleo en cuestión. La contribución de los vecinos, σ_{vecinos} , es la

contribución de los grupos que forman el resto de la molécula. La contribución del disolvente, $\sigma_{\text{disolvente}}$, es la contribución de las moléculas del disolvente.

1.3.1.2.1 LA CONTRIBUCIÓN LOCAL.

Es conveniente considerar la contribución local de la constante de apantallamiento como la suma de dos contribuciones, una diamagnética, σ_d y otra paramagnética σ_p :

$$\sigma_{\text{local}} = \sigma_d + \sigma_p \quad (1.11)$$

La contribución diamagnética de σ_{local} se opone al campo aplicado y protege el núcleo en cuestión, mientras que la contribución paramagnética refuerza el campo aplicado y desprotege el núcleo. Por lo tanto, $\sigma_p < 0 < \sigma_d$. La contribución local total es positiva si la contribución diamagnética domina y es negativa si la contribución paramagnética domina.

La contribución diamagnética depende principalmente de la circulación de carga en el estado basal del átomo y es la única contribución en átomos libres y para sistemas con simetrías esféricas o cilíndricas.

La contribución paramagnética por otra parte surge debido a la circulación de carga en los orbitales de valencia, por lo que depende de los estados excitados electrónicos y de la simetría de los orbitales de valencia. Esta es cero para orbitales s (los cuales son de simetría esférica) y por lo tanto es de poca relevancia para las constantes de apantallamiento de protón. Sin embargo, se vuelve más importante que σ_d si los orbitales de valencia no son de simetría esférica. Este es el caso de carbono-13, flúor-19 y nitrógeno-15, por citar a algunos, cuyos orbitales de valencia son del tipo p.

1.3.1.2.2 LA CONTRIBUCIÓN DE LOS GRUPOS VECINOS.

La contribución de los grupos vecinos se debe a las corrientes inducidas por los grupos de átomos vecinos. Consideremos por ejemplo a un grupo vecino X sobre un protón H en una molécula H-X. El campo aplicado genera corrientes en la distribución electrónica de X y provoca un momento magnético inducido, proporcional al campo aplicado; la constante de proporcionalidad es la susceptibilidad magnética, χ , del grupo X. Este momento magnético inducido afecta al protón en dos formas. Primero, la fuerza de este campo magnético adicional que siente el protón es proporcional a la distancia (r) entre H y X. Segundo, el campo magnético en H depende de la anisotropía de la susceptibilidad magnética de X, esto significa

la variación de χ con el ángulo que hace X en la dirección del campo aplicado. Asumiendo que la susceptibilidad magnética de X tiene dos componentes, χ_{\parallel} y χ_{\perp} , las cuales son paralela y perpendicular al eje de simetría principal de X, respectivamente y que el eje de simetría de X hace un ángulo θ con el vector que conecta X y H (figura 1.6), podemos proponer una buena aproximación para la constante de apantallamiento de los vecinos:

$$\sigma_{\text{vecinos}} = (\chi_{\parallel} - \chi_{\perp}) \left(\frac{1 - 3 \cos^2 \theta}{r^3} \right) \quad (1.12)$$

La ecuación 1.12 muestra que la contribución de los grupos vecinos puede ser positiva o negativa de acuerdo a las magnitudes relativas de las dos susceptibilidades magnéticas y a la orientación relativa de los núcleos.

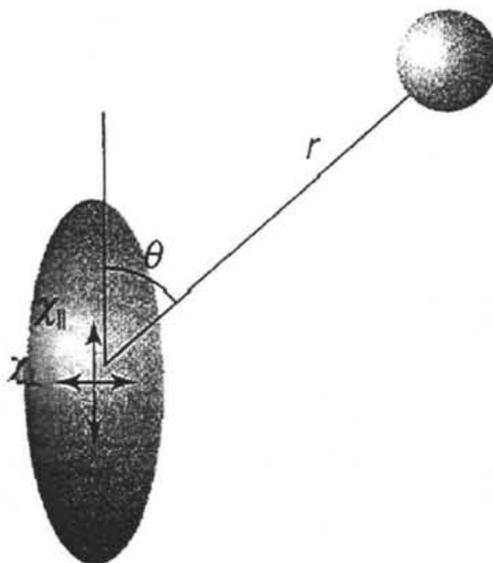


Figura 1.6. Anisotropía de la susceptibilidad magnética. X está representado por la elipse y H por el círculo.

1.3.1.2.3 LA CONTRIBUCIÓN DEL DISOLVENTE.

Un disolvente puede alterar el campo magnético local que siente un núcleo de muy diversas formas. Algunos de estos efectos se deben a interacciones específicas entre el soluto y el disolvente (tal como la formación de puentes de hidrógeno y otras formas de complejos ácido-base de Lewis). La susceptibilidad magnética de las moléculas del disolvente, especialmente si son aromáticas, también alteran el campo magnético local. Además, si existen interacciones estéricas que provoquen una pérdida de especificidad entre una molécula de soluto y una molécula de disolvente, entonces los protones en la molécula de soluto pueden modificar su apantallamiento de acuerdo a su posición relativa con respecto a las moléculas de disolvente

(figura 1.7). Por estas razones, se debe tener cierto cuidado a la hora de elegir el disolvente de nuestras muestras, ya que éste puede ayudar a simplificar la apariencia y la interpretación de un espectro.

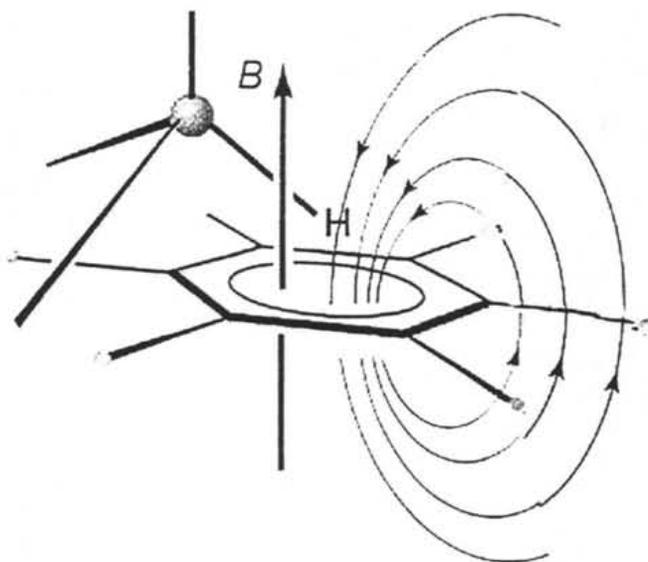


Figura 1.7. Un disolvente aromático (en este caso benceno) provoca corrientes locales, que pueden proteger o desproteger a un protón de una molécula de soluto. En esta orientación relativa del disolvente y el soluto, el protón de la molécula de soluto es protegido.

1.3.2 ACOPLAMIENTO INDIRECTO ESPÍN-ESPÍN O ACOPLAMIENTO ESCALAR.

El desdoblamiento de las líneas de resonancia en la figura 1.5 es llamado estructura fina del espectro y es producido por la interacción adicional entre los espines nucleares. Ésta, sin embargo, no se puede relacionar con una interacción directa entre los momentos magnéticos asociados con los espines ya que, en líquidos no viscosos, se puede demostrar que la característica anterior se anula debido a la reorientación molecular. De hecho, esta interacción ocurre vía los electrones de enlace (por lo que se le llama acoplamiento indirecto). La fuerza de la interacción es expresada en términos de la constante de acoplamiento escalar, J , y es dada en hertz (Hz). La constante de acoplamiento escalar es llamada así por que la energía de interacción que esta describe, es proporcional al producto escalar de la interacción de los dos espines: $E \approx I_1 \cdot I_2$. La constante de proporcionalidad de esta expresión es J , (más formalmente, hJ).

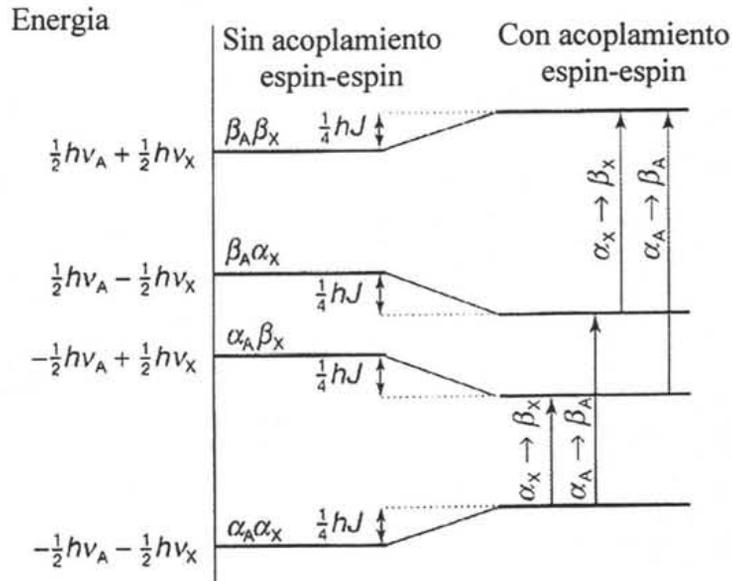


Figura 1.8. Niveles de energía de un sistema AX. Los cuatro niveles a la izquierda pertenecen a dos espines en la ausencia de acoplamiento espín-espín. Los cuatro niveles a la derecha muestran como una constante de acoplamiento espín-espín positiva modifica los niveles de energía.

1.3.2.1 LOS NIVELES DE ENERGIA DE SISTEMAS ACOPLADOS.

Algunas veces es útil considerar un espectro de RMN en términos de los niveles de energía de los núcleos y las transiciones entre ellos. Consideremos un sistema AX, esto es una molécula que tiene dos núcleos con espín $\frac{1}{2}$ A y X con desplazamientos químicos muy diferentes en el sentido que la diferencia en desplazamiento químico corresponde a una frecuencia que es grande comparada a su acoplamiento espín-espín (si esta condición no se cumple entonces, ya no es posible asignar las señales del espectro a un grupo funcional definido, a este tipo de espectros se les llama espectros fuertemente acoplados orden superior y son muy difíciles de analizar).

Para un sistema AX de espín $\frac{1}{2}$ hay cuatro estados.

$$\alpha_A \alpha_X \quad \alpha_A \beta_X \quad \beta_A \alpha_X \quad \beta_A \beta_X$$

La energía de cada nivel depende de la orientación de los espines en el campo magnético externo y si el acoplamiento espín-espín es despreciado, esta se puede expresar de la siguiente manera:

$$E = -\mathcal{M}(1 - \sigma_A)BI_A - \mathcal{M}(1 - \sigma_X)BI_X = -h\nu_A I_A - h\nu_X I_X \quad (1.13)$$

donde ν_A y ν_X son las frecuencias de Larmor y I_A y I_X son sus números cuánticos. Esta ecuación explica los cuatro estados de la izquierda en la figura 1.8. El acoplamiento espín-

espín depende de la orientación relativa de los dos espines nucleares, de modo que es proporcional al producto $I_A I_X$; la constante de proporcionalidad es hJ . Por lo tanto, la energía incluyendo el acoplamiento espín-espín es:

$$E = -h\nu_A I_A - h\nu_X I_X + hJ I_A I_X \quad (1.14)$$

Si $J > 0$, se obtiene un estado cuántico de menor energía cuando $I_A I_X < 0$, tal es el caso si un espín es α y el otro es β . Un estado de mayor energía se origina si ambos espines son α o β . Se tiene el caso opuesto si $J < 0$. El diagrama de niveles de energía resultante (para $J > 0$) se muestra a la derecha de la figura 1.8. En esta podemos observar que los estados $\alpha\alpha$ y $\beta\beta$ aumentaron una magnitud de $\frac{1}{4}hJ$ mientras que los estados $\alpha\beta$ y $\beta\alpha$ disminuyeron la misma magnitud.

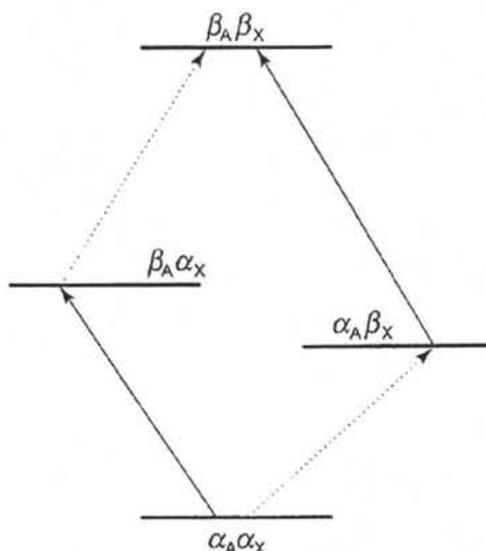


Figura 1.9. Descripción alternativa de las transiciones y los niveles de energía mostrados en la figura 1.8.

Cuando ocurre una transición en el núcleo A, el núcleo X permanece sin cambio. Por lo tanto, la resonancia de A es una transición para la cual $\Delta I_A = -1$ y $\Delta I_X = 0$. Existen dos transiciones $\alpha_A \rightarrow \beta_A$, una ocurre cuando el núcleo X se encuentra en el estado α_X y la otra cuando se encuentra en el estado β_X . Ambas se muestran en la figura 1.8 y en forma alternativa en la figura 1.9. Las energías de transición son:

$$\Delta E = h\nu_A \pm \frac{1}{2}hJ \quad (1.15)$$

De donde, podemos apreciar que la resonancia de A consiste de un doblete de separación J centrado en el desplazamiento químico de A (figura 1.10).

Esto mismo sucede con la resonancia de X, la cual consiste también de dos transiciones, dependiendo de si el núcleo A se encuentra en el estado α o β , como se muestra en la figura 1.9. A su vez las energías de transición son:

$$\Delta E = h\nu_X \pm \frac{1}{2}hJ \quad (1.16)$$

De donde apreciamos que la resonancia de X, también consiste de dos líneas de separación J, pero centradas en el desplazamiento químico de X (figura 1.10).

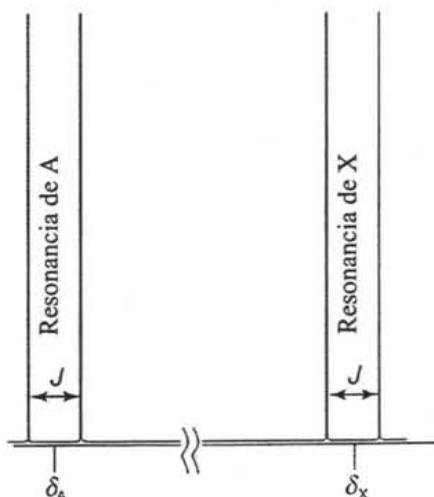


Figura 1.10. Efecto del acoplamiento espín-espín sobre un espectro AX. Cada línea de resonancia se desdobra en dos líneas separadas una distancia J. Los pares de resonancias están centrados en el desplazamiento químico original del protón en la ausencia de acoplamiento espín-espín.

1.3.2.2 PATRONES DE ACOPLAMIENTO.

Se ha visto que la resonancia de X en un sistema AX es un doblete centrado en el desplazamiento de X, sin embargo esto también es cierto en un sistema AX_n (tal como AX_2 o AX_3). Como veremos a continuación un grupo de núcleos equivalentes resuenan como un sólo núcleo. La única diferencia para la resonancia de X en un sistema AX_n es que su intensidad será n veces mayor que la señal en el sistema AX (figura 1.11). Por otra parte la resonancia de A en un sistema AX_n , es completamente diferente, de su resonancia en un sistema AX. Por ejemplo, consideremos el sistema AX_2 con dos núcleos X equivalentes. La resonancia de A se desdobra en un doblete de separación J debido a uno de los núcleos X, y cada línea de este doblete se desdoblara a su vez con la misma separación J, debido al otro núcleo X (figura 1.12). Estos desdoblamientos dan como resultado tres líneas, cuya relación de intensidades es 1:2:1 (debido a que las resonancias del centro se traslapan). La resonancia de A en un sistema

A_nX_2 también sería un triplete de intensidades 1:2:1, con la única diferencia que la resonancia de A sería n veces más intensa que en el sistema AX_2 .

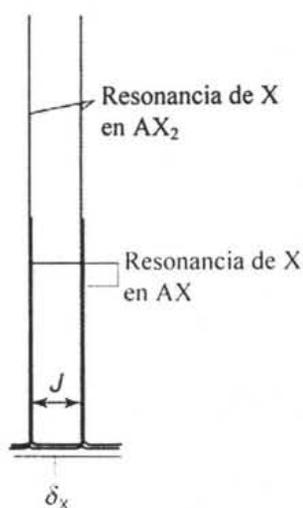


Figura 1.11. La resonancia de X en un sistema AX_2 es también un doblete, debido a que los dos núcleos X equivalentes se comportan como un sólo núcleo; sin embargo, la absorción global es dos veces más intensa que en el sistema AX.

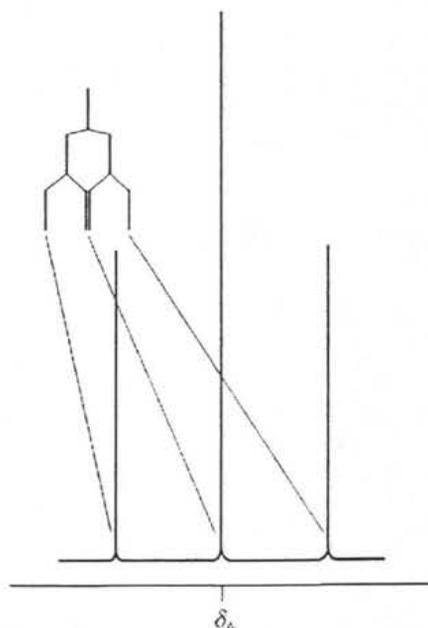


Figura 1.12. Origen del triplete 1:2:1 debido a la resonancia de A en el sistema AX_2 . La resonancia de A se desdobla en tres líneas de resonancia por el acoplamiento con un núcleo X, posteriormente cada una de las dos líneas se desdobla en otras dos líneas debido al acoplamiento con el segundo núcleo X. Debido a que cada núcleo X causa el mismo desdoblamiento, las dos transiciones centrales coinciden y provocan la aparición de una línea de absorción del doble de intensidad de las otras líneas.

Tres núcleos X equivalentes (sistema AX_3) desdoblan la resonancia de A en cuatro líneas, cuya relación de intensidades es 1:3:3:1 y separadas una distancia J una de otra. En general, n núcleos equivalentes de espín $\frac{1}{2}$ desdoblan la resonancia de un espín cercano o de un grupo de espines equivalentes en n + 1 líneas con una distribución de intensidades, dadas por los coeficientes de la expansión binomial (triángulo de Pascal). La manera más fácil de construir el patrón de desdoblamiento es dibujar un diagrama con desdoblamientos sucesivos de protones (figura 1.13). Este método se puede extender fácilmente a núcleos con $I > \frac{1}{2}$ como se muestra en la figura 1.14.

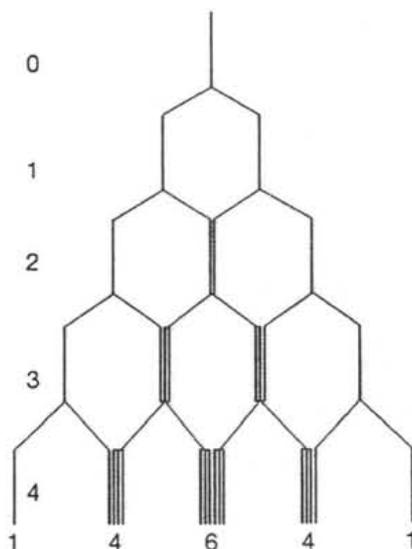


Figura 1.13. La distribución de intensidades de las resonancias de A en un sistema AX_n se puede construir considerando los desdoblamientos causados por 1, 2, ..., n protones como en la figura 1.12. La distribución de intensidades resultante tiene una forma binomial y están dadas por los renglones correspondientes del triángulo de Pascal.

1.3.2.3 LA MAGNITUD DE LAS CONSTANTES DE ACOPLAMIENTO.

La constante de acoplamiento de dos núcleos separados por N enlaces se denota $^N J$, con subíndice para los núcleos involucrados. Por ejemplo, $^1 J_{CH}$ es la constante de acoplamiento entre un protón unido directamente a un átomo de carbono ^{13}C y $^2 J_{CH}$ es la constante de acoplamiento cuando los mismos dos núcleos están separados por dos enlaces. Un valor típico de $^1 J_{CH}$ está en el rango de 120 a 250 Hz; $^2 J_{CH}$ está entre 10 y 20 Hz. Tanto $^3 J$ y $^4 J$ dan efectos apreciables en el espectro, pero acoplamientos a mayor número de enlaces generalmente son difíciles de ver. Uno de los acoplamientos a mayor número de enlaces que se han detectado es $^9 J_{HH} = 0.4$ Hz entre los protones del CH_3 y el CH_2 en la molécula $CH_3C \equiv CC \equiv CC \equiv CCH_2OH$.

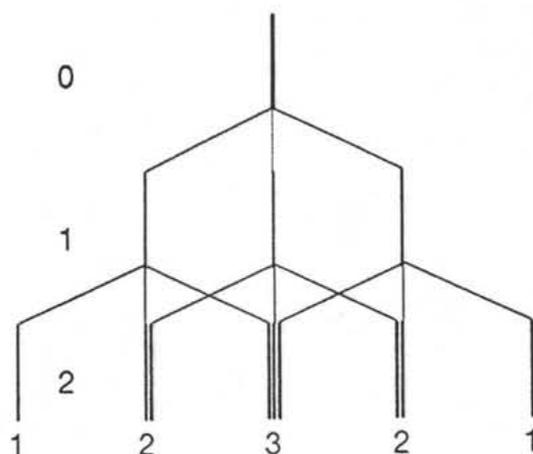


Figura 1.14. La distribución de intensidades generadas por el acoplamiento espín-espín entre núcleos con $I = 1$ se puede construir de manera similar, pero cada núcleo sucesivo desdobra las líneas en tres componentes de igual intensidad. Dos núcleos equivalentes de espín 1 generan un quinteto de intensidades 1:2:3:2:1.

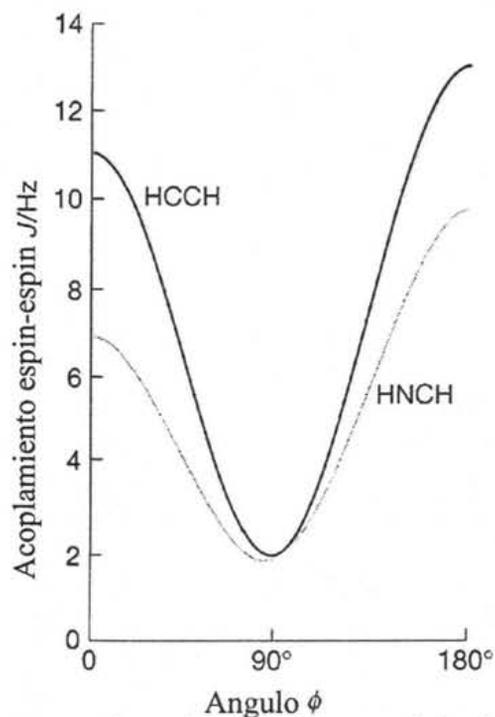


Figura 1.15. Variación de la constante de acoplamiento $^3J_{HH}$ con el ángulo diedro, tal como lo predice la ecuación de Karplus para el grupo HCCH y para el grupo HNCH.

El signo de J_{XY} indica si la energía de un par de espines es menor cuando son paralelos ($J < 0$) o cuando son antiparalelos ($J > 0$). En general se ha visto que frecuentemente $^1J_{HH}$ es positiva, $^2J_{HH}$ es negativa, $^3J_{HH}$ es positiva, etc. Otra característica de J es que varía con el

ángulo entre los enlaces (figura 1.15). De modo que una constante de acoplamiento ${}^3J_{\text{HH}}$ depende del ángulo diedro ϕ de acuerdo a la ecuación de Karplus:

$$J = A + B \cos \phi + C \cos 2\phi \quad (1.17)$$

donde A, B y C son constantes empíricas con valores cercanos a 7 Hz, -1 Hz y 5 Hz respectivamente. Por lo que la magnitud de ${}^3J_{\text{HH}}$ puede ayudar a determinar la conformación de varios compuestos. El valor de la constante de acoplamiento ${}^1J_{\text{CH}}$ también depende de la hibridación del átomo de carbono, como lo indican los siguientes valores:

	sp	sp ²	sp ³
${}^1J_{\text{CH}}/\text{Hz}$	250	160	125

1.3.2.4 EL ORIGEN DEL ACOPLAMIENTO ESPÍN-ESPÍN.

El acoplamiento espín-espín es un fenómeno muy complicado y es mejor tratar J como un parámetro empírico en lugar de usar valores calculados. Sin embargo, podemos llegar a tener cierta idea sobre su origen, considerando las interacciones magnéticas dentro de las moléculas.

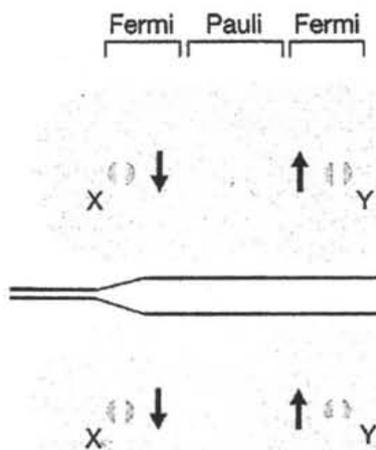


Figura 1.16. Mecanismo de polarización para el acoplamiento espín-espín (${}^1J_{\text{HH}}$). Los dos arreglos tienen energías ligeramente diferentes. En este caso, J es positiva, por lo que el estado de menor energía se genera cuando los espines nucleares son antiparalelos.

El acoplamiento espín-espín en moléculas en disolución se puede explicar en términos del mecanismo de polarización, en el cual la interacción se transmite a través de los enlaces. El caso más simple a considerar es ${}^1J_{\text{XY}}$ donde X y Y son núcleos de espín $\frac{1}{2}$ unidos por un par de electrones (figura 1.16). El mecanismo de acoplamiento depende del hecho que en algunos átomos es favorable para los espines de los núcleos y electrones cercanos, estar paralelos

(ambos α o ambos β), mientras que para otros es favorable estar antiparalelos (uno α y el otro β). El acoplamiento núcleo-electrón es de origen magnético y puede ser tanto una interacción dipolar entre los momentos magnéticos de los espines nucleares y electrónicos o una interacción de contacto de Fermi. Una descripción muy simplificada del contacto de Fermi es la siguiente: primero, consideremos el momento magnético del núcleo como consecuencia de la circulación de una corriente en un pequeño círculo con un radio similar al del núcleo (figura 1.17). Lejos del núcleo el campo generado por esta corriente es indistinguible del campo generado por un dipolo magnético puntual. Cercano al núcleo, sin embargo, el campo difiere del de un dipolo puntual. La interacción magnética entre este campo no dipolar y el momento magnético del electrón es el contacto de Fermi. Las líneas de fuerza descritas en la figura 1.17 corresponden a las de un protón con espín α . El estado de menor energía para el espín de un electrón en tal campo es el estado β . En conclusión, el contacto de Fermi depende de la aproximación de un electrón a un núcleo y por lo tanto solo puede ocurrir si el electrón ocupa un orbital s. Suponiendo que es energéticamente favorable para el espín de un electrón y para el espín de un núcleo estar antiparalelos (como es el caso para un protón y un electrón en el átomo de hidrógeno).

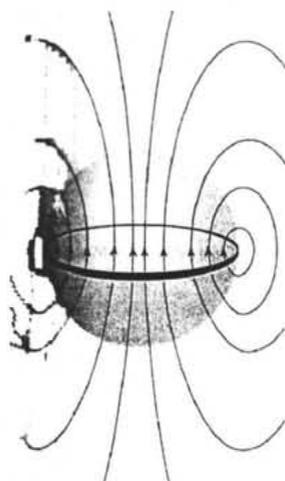


Figura 1.17. Origen de la interacción de contacto de Fermi. Desde lejos, el patrón del campo magnético generado por la circulación de corriente alrededor del núcleo (esfera gris), se parece a la de un dipolo puntual. Sin embargo, si un electrón se acerca lo suficiente a la región indicada por la esfera, la distribución del campo difiere significativamente de la de un dipolo puntual.

Si el núcleo X es α , entonces uno de los electrones de enlace con espín β tenderá a estar cerca (debido a que es energéticamente favorable para este). El segundo electrón en el enlace, el cual necesariamente deberá tener espín α , se encontrará principalmente al final del

enlace (debido a que los electrones tienden a alejarse entre si, para reducir su repulsión mutua). Debido a que es energéticamente favorable para el espín de Y estar antiparalelo al espín de un electrón, un núcleo Y con espín β tiene una menor energía y por lo tanto una menor frecuencia de Larmor que la de un núcleo Y con espín α . Lo contrario es cierto cuando X es β , por lo que ahora el espín α de Y es de menor energía. En otras palabras, el arreglo antiparalelo de los espines nucleares es de menor energía que el arreglo paralelo, como resultado de su acoplamiento magnético con los electrones de enlace. Por lo que $^1J_{HH}$ es positiva.

Para explicar el valor de $^2J_{XY}$, como en el caso H-C-H, necesitamos un mecanismo que pueda transmitir la información de los espines a través del átomo central de carbono (el cual puede ser ^{12}C , que no posee espín nuclear). En este caso (figura 1.18), un núcleo X con espín β polariza los electrones de su enlace, por lo que los electrones β se encontrarán más cercanos al núcleo C. El arreglo más favorable de dos electrones en el mismo átomo, es con sus espines paralelos (regla de Hund), de modo que el arreglo más favorable para el electrón β del enlace vecino, es estar cerca del núcleo de carbono. En consecuencia, el electrón α del mismo enlace, se encontrará mas cerca del núcleo Y y por lo tanto el núcleo tendrá menor energía si su espín es β . Por lo que, de acuerdo a este mecanismo, Y tendrá una menor frecuencia de Larmor si su espín es paralelo al de X. De modo que, $^2J_{HH}$ será negativo.

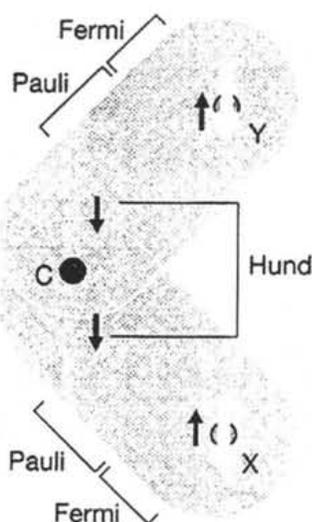


Figura 1.18. Mecanismo de polarización para la constante de acoplamiento espín-espín $^2J_{HH}$. La información de los espines se transmite de un enlace a otro, por medio de un mecanismo que explica que dos electrones se encontrarán en su estado de menor energía si se encuentran en el mismo átomo pero en diferentes orbitales atómicos. (Regla de Hund de máxima multiplicidad).

El acoplamiento del espín nuclear al espín electrónico por medio del contacto de Fermi, es la interacción más importante para los espines de hidrógeno, sin embargo no necesariamente es el mecanismo más importante para otros núcleos. Estos núcleos también pueden interactuar mediante un mecanismo dipolar con los momentos magnéticos de los electrones y con su movimiento orbital, por lo que no existe una manera simple de saber si J será positiva o negativa.

1.3.2.5 NUCLEOS EQUIVALENTES.

Un grupo de núcleos es químicamente equivalente si todos sus miembros están relacionados por una operación de simetría de la molécula y además tienen el mismo desplazamiento químico. Por otra parte se dice que un conjunto de núcleos A_i es magnéticamente equivalente si cumple las siguientes dos condiciones:

- Las frecuencias de resonancia de todos los núcleos A_i son idénticas;
- Cada núcleo A_i está acoplado de manera idéntica a cualquier núcleo $X, Y \dots$, fuera del conjunto A_i .

Los dos ejemplos dados en la figura 1.19 nos ayudarán a entender el concepto de equivalencia magnética. Para el 1,2,3-triclorobenceno, el único núcleo fuera del conjunto A_i es X , y por razones de simetría $J_{AX} = J_{A'X}$, además $\nu_A = \nu_{A'}$. Por lo que las dos condiciones de arriba se satisfacen y por consiguiente A y A' son magnéticamente equivalentes. Por el contrario en el orto-diclorobenceno, aunque se cumple la condición $\nu_A = \nu_{A'}$ y además $J_{AX} = J_{A'X}$, es claro que $J_{AX} \neq J_{A'X}$ y que $J_{AX'} \neq J_{A'X}$. De modo que para esta molécula A y A' no son magnéticamente equivalentes. Una consecuencia importante, de la propiedad de equivalencia magnética, es la ausencia, en el espectro de RMN, del desdoblamiento debido al acoplamiento J , dentro del conjunto de núcleos A_i . Por ejemplo, mientras que $J_{AA'}$ se puede medir del espectro del orto-diclorobenceno, esta no se puede medir en el espectro del 1,2,3-triclorobenceno.

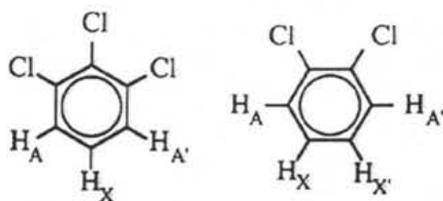


Figura 1.19. Izquierda: 1,2,3-triclorobenceno; derecha *orto*-diclorobenceno.

CAPITULO 2.

MEDICIÓN DE CONSTANTES DE ACOPLAMIENTO.

2.1 INTRODUCCIÓN.

Desde su descubrimiento a principios de los cincuentas (3-6), las constantes de acoplamiento escalares han sido de gran interés para los químicos debido a que proporcionan valiosa información estructural, su impacto en la determinación de estructuras moleculares por RMN radica en el hecho que la magnitud de la constante de acoplamiento se relaciona directamente con la conformación estructural. Como el acoplamiento se transmite a través de los electrones de enlace, este proporciona información acerca de los constituyentes de la molécula en términos de la conectividad de los núcleos acoplados. El tamaño de la constante de acoplamiento no sólo depende del número de enlaces que separan los núcleos acoplados, sino que también de la configuración de los electrones y su arreglo especial. Este último efecto es especialmente útil en la determinación de la estereoquímica de las moléculas.

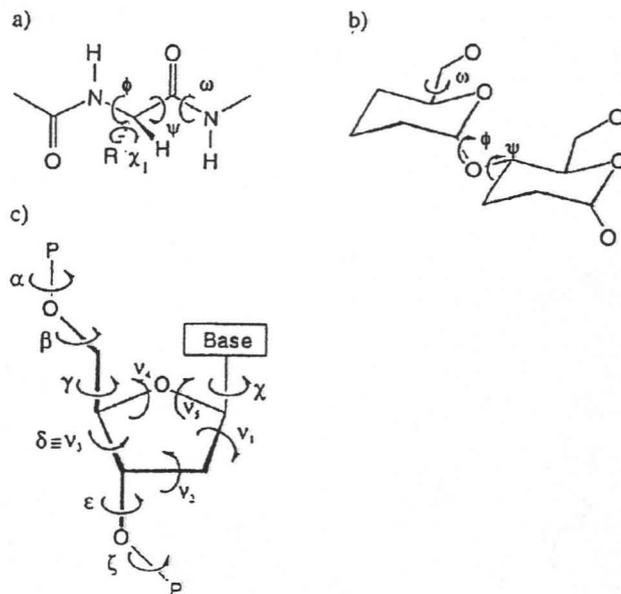


Figura 2.1. Definición de los ángulos diedros en péptidos, glucósidos y ácidos nucleicos. a) Fragmento de un péptido (L-aminoácido) con sus correspondientes ángulos diedros que forman el enlace peptídico y el grupo R utilizando la nomenclatura de la IUPAC-IUB. b) Los ángulos diedros Φ , ψ y ω en oligosacáridos: Φ = H1-C1-O1-C_X, ψ = C1-O1-C_X-H_X, ω = C1-O1-C6-C5. c) ángulos de torsión del esqueleto de una molécula de azúcar-fosfato y el ángulo glucosídico χ usado para definir la conformación de ácidos nucleicos.

Como ya mencionamos muchas constantes de acoplamiento muestran una clara dependencia con el ángulo diedro y por lo tanto son una fuente importante de información conformacional. Esta relación se expresa por medio de la ecuación de Karplus, la cual por ejemplo correlaciona el acoplamiento $^3J_{\text{HN}, \text{H}\alpha}$ en amino ácidos con el ángulo diedro ϕ (Figura 2.1). Tales acoplamientos J fueron utilizados al principio intensivamente en el estudio conformacional de las moléculas. Sin embargo, con el tiempo llegaron a ser menos importantes debido al desarrollo de restricciones estructurales obtenidas a partir de NOE (Efecto Nuclear Overhauser por sus siglas en ingles), los cuales han tomado un papel dominante (7-9). Solo recientemente ha habido un renacimiento en el interés de las constantes de acoplamiento J como parámetros de restricción estructural. Esto ha venido acompañado por el desarrollo de nuevos métodos que permiten determinar de manera precisa el valor de las constantes de acoplamiento (10). Simultáneamente, se han desarrollado métodos que utilizan el valor de los acoplamientos J en cálculos estructurales de biomoléculas. De esta manera no sólo ha sido posible incrementar el número de estructuras obtenidas por RMN, sino que también se ha obtenido información acerca de la dinámica interna de las moléculas.

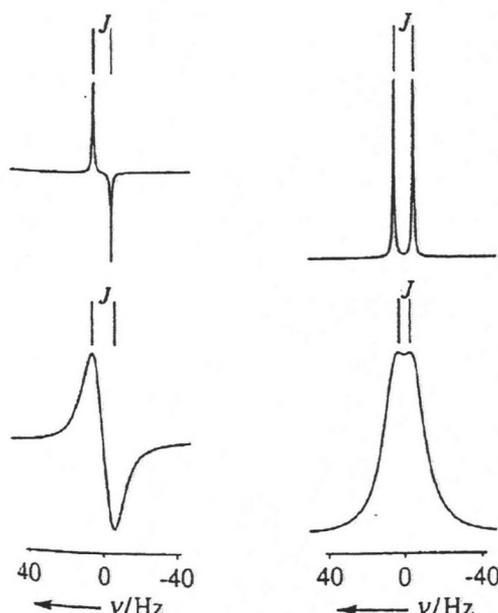


Figura 2.2. Comparación de dobletes en fase (derecha) y en antifase (izquierda) con una constante de acoplamiento J de 10.0 Hz y diferentes anchos de línea: ancho a la mitad del pico de 1 Hz (arriba) y 15 Hz (abajo). En el primer caso, en ambos espectros es posible medir la constante de acoplamiento correcta. En contraste, para anchos de línea mayores (abajo), la constante de acoplamiento aparente es más grande para la señal en antifase y más pequeña para la señal en fase.

En el siguiente capítulo describiremos algunos de los métodos, desarrollados para la determinación precisa de constantes de acoplamiento, enfocándonos principalmente en el método modificado de duplicación de J en el dominio de las frecuencias.

2.2 CLASIFICACION DE LOS DIFERENTES METODOS PARA LA DETERMINACION PRECISA DE CONSTANTES DE ACOPLAMIENTO.

Es de crucial importancia para obtener información estructural a partir de los datos provenientes de constantes de acoplamiento el desarrollo de métodos confiables, convenientes y precisos para medir los valores de las constantes de acoplamiento. Por esta razón, se ha puesto un gran esfuerzo en el desarrollo de tales técnicas. Si el ancho de línea en el espectro es mucho menor que las constantes de acoplamiento de interés, se determina el valor de los acoplamientos simplemente midiendo la separación entre las líneas de los multipletes. Sin embargo, en espectros en donde el ancho de línea es comparable o mayor que la constante de acoplamiento, es bien conocido que la separación aparente entre las diferentes líneas de un multiplete (Figura 2.2) ya no es igual a los valores de las constantes de acoplamiento (11).

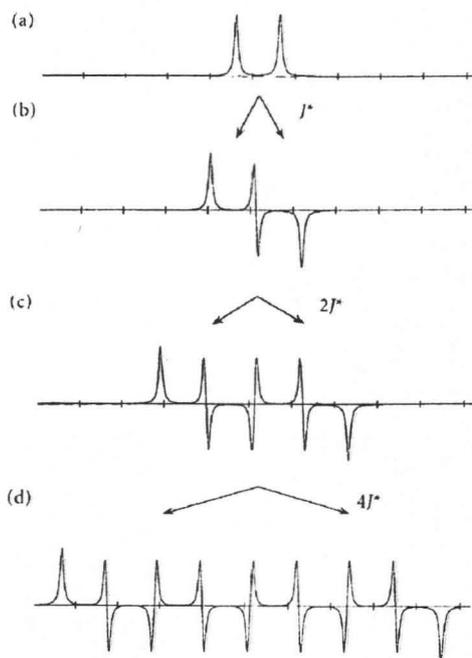


Figure 2.3. Simulación de duplicación de J , representado en el dominio de las frecuencias. a) El acoplamiento original en fase J_{1S} . b) Primera fase de duplicación de J con un acoplamiento en antifase J^* . c) Segunda fase de duplicación de J con un acoplamiento adicional en fase $2J^*$. d) Tercera fase de duplicación de J con un acoplamiento adicional en fase de $4J^*$. Cuando $J^* = J_{1S}$, todas las líneas interiores de la señal desaparecen, debido a la mutua cancelación.

Existen esencialmente tres enfoques generales para extraer los valores de las constantes de acoplamiento de multipletes pobremente resueltos. El primero de los cuales es manipular la estructura del multiplete de tal manera que, cuando se disperse en dos dimensiones, el traslape entre los diferentes componentes del multiplete se reduce o elimina. El ejemplo mas simple de tales experimentos es el E. COSY (12-14), aunque el mismo principio subyacente se puede utilizar en un gran rango de diferentes experimentos de RMN bi y tridimensionales, particularmente cuando se aplica a proteínas marcadas con carbono 13 y nitrógeno 15. En este último caso, un acoplamiento grande, tal como nitrógeno-protón, carbono-protón o carbono-carbono, es utilizado para dispersar los componentes del multiplete en una dimensión y posteriormente separarlos en una segunda dimensión por un acoplamiento más pequeño. El segundo enfoque consiste en idear un experimento en el cual los picos de correlación dependan, de alguna forma conocida, del valor de la constante de acoplamiento de interés (15-19). De esta manera, todos los problemas asociados con la medición de las separaciones entre líneas son eliminados. Desgraciadamente una de las desventajas de estos métodos es su pobre sensibilidad, por lo que generalmente requieren marcaje isotópico para núcleos poco abundantes. El tercer enfoque utiliza un procedimiento de ajuste en el cual los valores de las constantes de acoplamiento se utilizan como parámetros; otra vez, muchos tipos de tales procedimientos se han desarrollado (20-26).

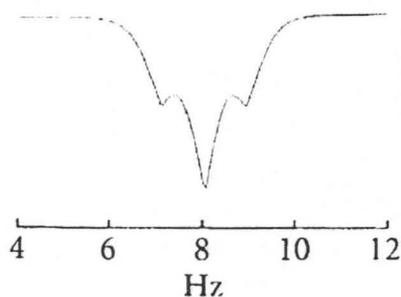


Figure 2.4. Grafica de Σ contra J^* , obtenida con el procedimiento de duplicación de J .

En teoría el método adecuado para medir constantes de acoplamiento, debería de ser general, fácil de usar, confiable, poseer buena sensibilidad y no necesitar información adicional para determinar el acoplamiento en cuestión. Sin embargo, casi ninguno cumple con estas características. Por ejemplo, casi todos los experimentos del primero y segundo enfoques

son altamente específicos para un determinado tipo de acoplamiento en un sistema dado; lo que significa que están diseñados para medir un acoplamiento en particular en una proteína marcada isotópicamente. Por otra parte los métodos del tercer enfoque por lo regular son más generales y pueden ser utilizados para analizar multipletes de una gran variedad de espectros. No obstante, casi todos estos métodos presuponen que el ancho de línea no es significativamente más grande que la constante de acoplamiento, de modo que se pueda obtener suficiente información para la corrección a partir de la señal experimental.

Uno de los métodos que mejores resultados a dado, dentro del tercer enfoque por su generalidad y precisión es el método modificado de duplicación de J, el cual tiene sus orígenes en el método de duplicación de J del cual hablaremos a continuación.

2.3 METODO DE DUPLICACION DE J.

El método de duplicación de J resuelve el problema del traslape en multipletes pobremente resueltos, duplicando la separación de las señales tantas veces como sea necesario para que este llegue a ser más grande que el ancho de la señal. Este método tiene dos variantes, en el dominio del tiempo (27) y en el dominio de las frecuencias (28).

2.3.1 DOMINIO DEL TIEMPO.

Este método hace uso de las características generales de la función trigonométrica $\text{sen}(2\theta)$. Consideremos el caso de un doblete (J_{IS}), representado en el dominio del tiempo por:

$$S = S_0 \cos(2\pi\delta_s t) \cos(\pi J_{IS} t) \exp(-t/T_2^*) \quad (2.1)$$

Si al doblete anterior lo multiplicamos por un término que involucre una constante de acoplamiento de prueba J^* , obtenemos:

$$S' = S_0 \cos(2\pi\delta_s t) \exp(-t/T_2^*) \text{sen}(\pi J^* t) \cos(\pi J_{IS} t) \quad (2.2)$$

Después de la transformada de Fourier obtenemos un espectro de prueba que es un patrón de cuatro líneas como se ilustra en la figura 2.3b. Claramente se puede observar que si $J^* = J_{IS}$, las dos líneas centrales se cancelan mutuamente mientras que la separación de las líneas de los extremos (en antifase) llega a ser $2J_{IS}$.

Una segunda fase de duplicación se puede llevar a cabo multiplicando la señal en el dominio del tiempo por $\cos(2\pi J^* t)$, obteniendo:

$$S' = S_0 \cos(2\pi\delta_s t) \exp(-t/T_2^*) \text{sen}(\pi J^* t) \cos(2\pi J^* t) \cos(\pi J_{IS} t) \quad (2.3)$$

En el dominio de las frecuencias, el espectro tiene ahora ocho líneas (Figura 2.3c). Una tercera fase de duplicación involucra multiplicar por $\cos(4\pi J^* t)$ dando un espectro de 16 líneas (Figura 2.3d). Cuando $J^* = J_{IS}$ todas las líneas excepto los extremos desaparecen.

En todos estos casos la suma de los módulos de todas la funciones en el espectro de prueba Σ pasa por un mínimo bien definido cuando $J^* = J_{IS}$, en donde hay autocancelaciones de todas las líneas internas. Múltiples duplicaciones aseguran que las dos líneas restantes, queden lo suficientemente separadas de modo que no haya peligro que se traslapen. Aunque cada fase de duplicación reduce a la mitad la relación señal-ruido (27) en el espectro de prueba, lo que en realidad importa es la relación señal-ruido en la grafica de Σ contra J^* (Figura 2.4), y esta es mucho mejor para múltiple duplicación, debido a la gran cantidad de líneas que se cancelan en la condición $J^* = J_{IS}$.

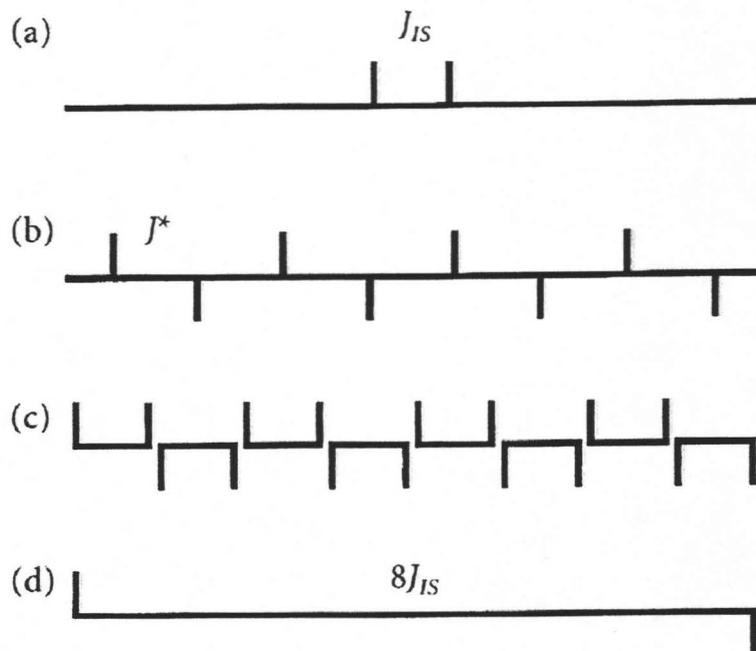


Figura 2.5. Representación esquemática de duplicación de J en el dominio de las frecuencias. El doblete experimental (a) se deconvoluciona con un arreglo regular de funciones delta con signo alternado y separadas una distancia igual a J^* (b). El resultado (c) es un espectro de 16 líneas que degenera (d) en un espectro de dos líneas con separación $8J_{IS}$ cuando $J^* = J_{IS}$, debido a que todas las líneas excepto las mas externas se cancelan mutuamente en esta condición.

Cuando un doblete en fase se duplica dos veces, aparece otro mínimo en la gráfica de Σ contra J^* en la condición $J^* = J_{IS}/3$. Este subarmónico es menos pronunciado que el mínimo

principal, ya que este se debe a la cancelación mutua de las líneas en antifase 2 y 7 de la figura 2.3c. Si son empleadas más operaciones de duplicación, aparecen progresivamente mínimos locales, en los subarmónicos impares $J_{IS}/5$, $J_{IS}/7$, etc.

El método de duplicación de J en el dominio del tiempo está sujeto a las limitaciones impuestas por la resolución del espectrómetro y la relación señal-ruido, además del tiempo que requiere para realizar las múltiples transformadas de Fourier. Si el ancho de línea es muy grande en comparación con J_{IS} , el mínimo en la curva de Σ contra J^* se ensancha y no es posible determinar su valor; si el nivel de ruido es muy alto, es difícil localizar el verdadero mínimo. Sin embargo, con una razonable relación señal-ruido, se pueden medir acoplamientos varias veces más pequeños que el ancho de línea.

2.3.2 DOMINIO DE LAS FRECUENCIAS.

Existen varias ventajas prácticas en aplicar el método de duplicación en el dominio de las frecuencias. Mientras que duplicación de J en el dominio del tiempo requiere una transformada de Fourier cada vez que se incrementa J^* , el método en el dominio de las frecuencias elimina este requerimiento y, por lo tanto, es mucho más rápida la implementación. Además, es posible implementar esquemas generales de duplicación.

Duplicación de J en el dominio de las frecuencias se basa en la convolución. La convolución de dos funciones f y g se define como:

$$h(v') = \int_{-\infty}^{\infty} f(v)g(v'-v)dv \quad (2.4)$$

donde $f(v)$ corresponde al multiplete original, $g(v - v')$ a un conjunto de funciones delta (δ 's) igualmente espaciadas y $h(v')$ al multiplete convolucionado. Además como la operación nos permite utilizar cualquier arreglo de δ 's, la implementación es muy flexible.

El procedimiento es el siguiente, un doblete en fase con acoplamiento J_{IS} es convolucionado con un número par de funciones delta de signo alternado, espaciadas por una J de prueba, J^* (Figura 2.5), la cual se varía dentro del intervalo donde se espera que se encuentre la J real. De manera similar al método en el dominio del tiempo, duplicación de J en el dominio de las frecuencias obtiene la integral absoluta de cada señal obtenida con cada J^* . La gráfica de la integral absoluta contra J^* se llama función de integral. El mínimo de esta función es la constante de acoplamiento real. Sin embargo de manera similar al dominio del tiempo, cuando

se utiliza mas de un par de δ 's, aparecen mínimos locales debido a coincidencias subarmónicas, el número de estos depende del tipo y número de acoplamientos presentes. Todos estos mínimos son menos intensos que J_R y tienden a desaparecer cuando se incrementa el ancho de línea.

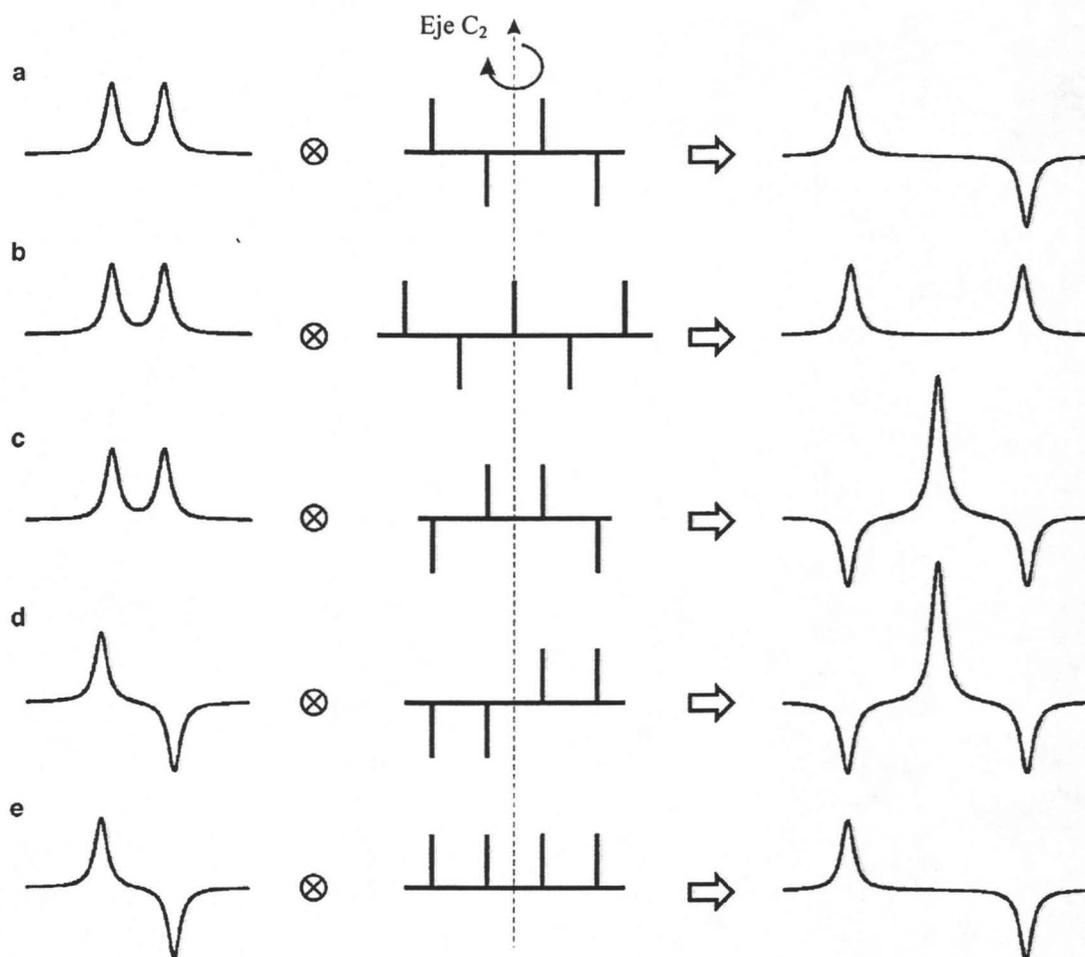


Figura 2.6. Convolución de multipletes en fase y en antifase con diferentes conjuntos de funciones delta (δ 's) separadas una distancia igual a la constante de acoplamiento real J_R . a) Convolución de un multiplete en fase con un numero par de δ 's con signos alternados produce dos submultipletes en antifase. b) Convolución de un multiplete en fase con un conjunto de simetría C_2 de un numero impar de δ 's con signos alternados genera dos submultipletes en fase. c) Un conjunto de simetría C_2 de un numero par de δ 's con signos alternados genera dos submultipletes en los extremos y un multiplete efectivamente deconvolucionado en el centro del multiplete original. d) Un conjunto de simetría S_2 de δ 's crea dos submultipletes en los extremos y un multiplete efectivamente deconvolucionado en el centro del multiplete original. e) Convolución de un multiplete en antifase con δ 's positivas genera dos submultipletes en antifase. La distancia entre los submultipletes en los extremos es siempre nJ_R .

2.4 MÉTODO MODIFICADO DE DUPLICACIÓN DE J EN EL DOMINIO DE LAS FRECUENCIAS.

Aunque el método de duplicación de J clásico, tanto en el dominio del tiempo como en el dominio de las frecuencias demostró ser robusto y efectivo, también posee ciertas limitaciones como son disminución de la relación señal-ruido en el espectro de salida, dificultad para encontrar las Js correctas en la gráfica de integral en señales muy complicadas y finalmente la imposibilidad de encontrar Js inmersas en el ancho de la señal cuando no hay ningún indicio de estas en el multiplete. Ahora bien, como ya hemos visto duplicación de J en el dominio de las frecuencias, presenta las mismas características que su contraparte en el dominio del tiempo, pero con las ventajas que es más rápido y fácil de implementar, por lo que es lógico pensar en tratar de mejorar duplicación de J en el dominio de frecuencias. Esto fue lo que hicieron precisamente Garza-García *et al.* (29). Introduciendo un nuevo conjunto de funciones delta (Figura 2.6c y 2.6d) se dieron cuenta que no solo era posible medir las constantes de acoplamiento, sino que también obtenían la señal efectivamente deconvolucionada en el centro del multiplete original, conservando la relación señal-ruido y la integral del espectro original. Adicionalmente este proceso de deconvolución resultó ser lineal, lo que permite múltiples deconvoluciones del multiplete problema hasta extraer todos los acoplamientos. Esta nueva aproximación a permitido medir Js tan pequeñas como 0.11 Hz con una precisión de ± 0.03 Hz.

La implementación de este método modificado de duplicación de J es la siguiente:

Primero se selecciona el multiplete problema, al cual también se le hace una corrección de línea base. Posteriormente se introduce este multiplete en el algoritmo de duplicación y se busca dentro de la gráfica de integral el mínimo más profundo a la derecha (Figura 2.7b), el cual corresponde al valor de la constante de acoplamiento más grande presente en el multiplete. Una vez que se lleva a cabo lo anterior se introduce el valor de J encontrado, para deconvolucionar nuestro multiplete y volver a empezar el proceso, hasta que ya no sea posible extraer más Js. Otra de las ventajas del método radica en que, por si solo nos indica cuando parar el procedimiento de deconvolución, por ejemplo en la figura 2.7h podemos observar la apariencia de un mínimo no muy bien definido en 0.08 Hz sin embargo, cuando se introduce este valor en el algoritmo, obtenemos una señal con artefactos en los bordes (figura 2.7i). Ambos factores, el mínimo poco definido y la aparición de artefactos son un indicador que el proceso de deconvolución se debió de haber detenido en el paso anterior.

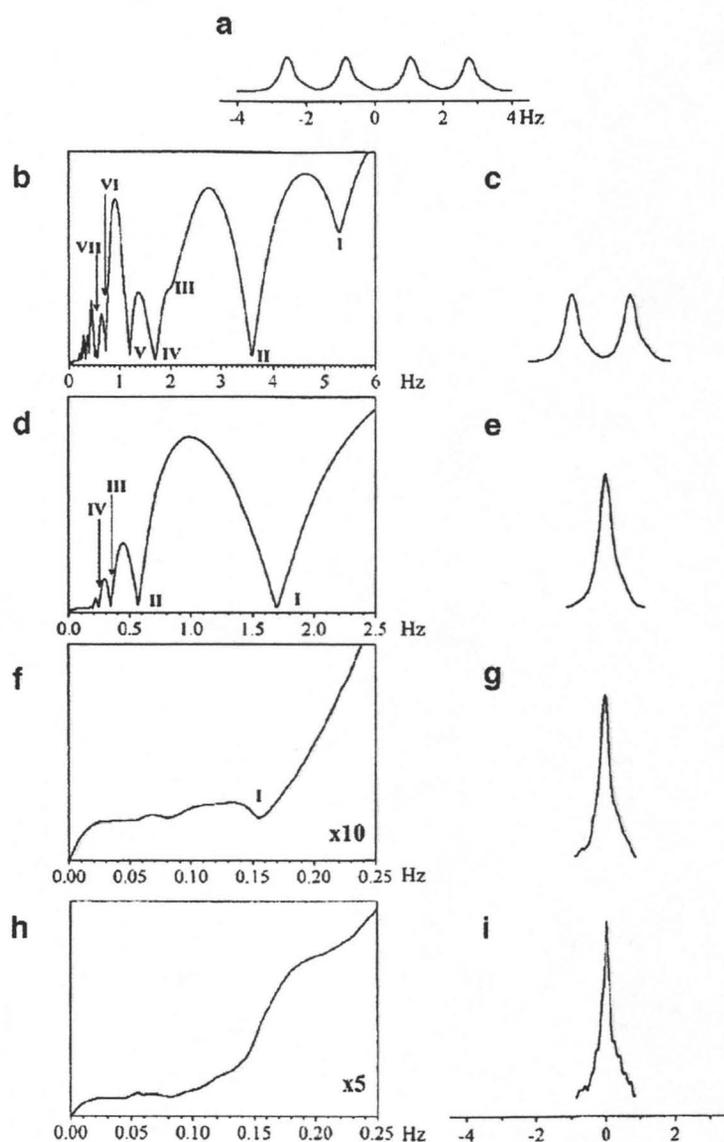


Figura 2.7. Proceso de deconvolución en varias etapas para uno de los protones del 2-formil-furano en $[^2\text{H}_6]\text{DMSO}$ obtenido en un equipo de 300 MHz. Se encontraron tres constantes de acoplamiento: $J_{\text{BC}} = 3.60$ Hz, $J_{\text{AC}} = 1.70$ Hz, $J_{\text{CX}} = 0.16$. a) el multiplete original. b) Función de integral del multiplete original, en la que se pueden apreciar la aparición de varios subarmónicos (I, III, V, VI y VII) y los valores de dos constantes de acoplamiento (II y IV). c) Multiplete deconvolucionado, después de remover el acoplamiento J_{BC} y reducir el ancho espectral en 3.60 Hz. d) Función de integral del multiplete en c), donde se puede apreciar el valor de la constante de acoplamiento (I) y algunos subarmónicos (II, III, IV). e) Multiplete deconvolucionado después de remover el acoplamiento J_{AC} y reducir el ancho espectral; ningún otro acoplamiento se puede observar. f) La función de integral del multiplete en (e) muestra solo un mínimo en J_{CX} . g) Multiplete deconvolucionado después de extraer el acoplamiento J_{CX} y reducir el ancho espectral. h) Función de integral del multiplete en (g), donde difícilmente se puede distinguir un pseudo mínimo en 0.08 Hz. i) Gráfica deconvolucionada de la señal (g) con 0.08 Hz.

El método modificado de duplicación de J ha demostrado ser uno de los mejores métodos de medición de Js que se haya diseñado hasta ahora. Sin embargo, presenta algunos problemas cuando se tienen que medir varias constantes de acoplamiento iguales en algún multiplete. Por esta razón, se ha tratado de implementar mejoras en el método, con dos aproximaciones distintas. Una de las cuales consiste en combinar el método modificado de duplicación de J, con el método publicado recientemente por Hoye *et al.* (30) de manera que se pueda resolver el problema anterior y al mismo tiempo tener un método automático y fácil de manejar que permita medir acoplamientos, dentro de un paquete de RMN comercial (31). La segunda de tales aproximaciones consiste en tratar de extraer todos los acoplamientos de la misma magnitud en un solo paso (32), para que de esta manera se evite el problema del ensanchamiento del mínimo en la gráfica de integral y al mismo tiempo se gane generalidad en el proceso de demostrar que el método modificado de duplicación de J es el método formal para deconvolucionar multipletes de RMN.

CAPITULO 3.

RESULTADOS Y DISCUSION.

3.1 MARCO TEÓRICO.

Para demostrar la generalización del método modificado de duplicación de J comencemos con profundizar un poco más en el concepto de convolución.

El concepto de convolución se puede utilizar no sólo para describir estructuras de multipletes en espectros de RMN (33-35), sino que también para describir diversos efectos en el campo de la instrumentación. De hecho, la convolución se utiliza en muy diversas áreas de la química y la física (36-38).

La convolución de dos funciones $f(v)$ y $g(v)$ en el dominio de las frecuencias se define de la siguiente manera:

$$h(v') = \int_{-\infty}^{\infty} f(v)g(v'-v)dv \quad (3.1)$$

Si las funciones son discretas, la integral se puede reemplazar por una suma. Así, la convolución de dos arreglos $a = \{a_0, a_1, \dots, a_n\}$ y $b = \{b_0, b_2, \dots, b_m\}$ da un arreglo $c = \{c_0, c_1, \dots, c_{n+m}\}$ que contiene $n + m + 1$ elementos y se puede expresar de la siguiente forma:

$$c_i = \sum_{k=0}^i a_k b_{i-k} \quad (3.2)$$

La ecuación anterior es llamada convolución discreta o producto serial. Los valores de a y b , sin embargo, pueden ser muestras de funciones continuas.

La integral de convolución la podemos expresar con el símbolo \otimes , de manera que podemos reescribir la ecuación 3.1 de la siguiente forma:

$$h = f \otimes g \quad (3.3)$$

La presencia del signo menos en el argumento de g en la ecuación 3.1, le da a la convolución la muy útil propiedad de conmutatividad (36), esto es,

$$f \otimes g = g \otimes f \quad (3.4)$$

La convolución también obedece la ley asociativa,

$$(d \otimes g) \otimes f = d \otimes (g \otimes f) \quad (3.5)$$

y es distributiva con respecto a la adición,

$$d \otimes (g + f) = (d \otimes g) + (d \otimes f) \quad (3.6)$$

Estas propiedades también se aplican a la formulación discreta de la convolución. Por lo que usaremos tanto la formulación discreta como la continua en lo sucesivo, cambiando de una a otra como se requiera.

Por ser de gran importancia para el trabajo que desarrollamos en esta tesis, procederemos a demostrar las primeras dos propiedades. Comencemos con la propiedad conmutativa. Combinando las ecuaciones 3.1 y 3.3 se obtiene:

$$f \otimes g = \int_{-\infty}^{\infty} f(v)g(v'-v)dv \quad (3.7)$$

haciendo el cambio de variable $v' - v = y$, esto es $v = v' - y$, se obtiene,

$$\begin{aligned} f \otimes g &= \int_{-\infty}^{\infty} f(v'-y)g(y)dy \\ &= \int_{-\infty}^{\infty} g(y)f(v'-y)dy \end{aligned}$$

Por lo tanto,

$$f \otimes g = g \otimes f$$

Respecto a la propiedad asociativa, primero permítasenos hacer el siguiente cambio de variable $d \otimes g = a$ y $g \otimes f = b$, entonces (3.5) se puede expresar como:

$$a \otimes f = d \otimes b \quad (3.8)$$

Puesto que

$$a(v) = \int_{-\infty}^{\infty} d(y)g(v-y)dy, \quad (3.9)$$

se tiene

$$\begin{aligned} a \otimes f &= \int_{-\infty}^{\infty} a(x)f(v-x)dx \\ &= \int_{-\infty}^{\infty} \left[\int_{-\infty}^{\infty} d(y)g(x-y)dy \right] f(v-x)dx \end{aligned} \quad (3.10)$$

Sustituyendo $z = x - y$ e intercambiando el orden de integración, se obtiene

$$a \otimes f = \int_{-\infty}^{\infty} d(y) \left[\int_{-\infty}^{\infty} g(z)f(v-y-z)dz \right] dy \quad (3.11)$$

y dado que

$$b(v) = \int_{-\infty}^{\infty} g(z)f(v-z)dz \quad (3.12)$$

se tiene

$$b(v-y) = \int_{-\infty}^{\infty} g(z)f(v-y-z)dz \quad (3.13)$$

Por consiguiente, la integral se identifica dentro del paréntesis en el segundo miembro de (3.11) como $b(v-y)$.

De donde,

$$a \otimes f = \int_{-\infty}^{\infty} d(y)b(v-y)dy = d \otimes b \quad (3.14)$$

esto es,

$$(d \otimes g) \otimes f = d \otimes (g \otimes f)$$

Aunque parece haber acuerdo universal en la definición de la ecuación 3.1, el concepto de deconvolución no parece ser muy claro, ya que varios autores lo utilizan de diferentes maneras. Biraud (38) propone la siguiente definición: si se conocen las funciones $h(v')$ y $f(v)$, la deconvolución consiste en resolver la ecuación 3.1 para determinar $g(v' - v)$. Los procedimientos que se pueden utilizar para este propósito varían de caso a caso.

Por otra parte la deconvolución en la presencia de ruido se puede definir como la tarea de determinar g resolviendo la siguiente ecuación:

$$h' = h + N = f \otimes g + N \quad (3.15)$$

donde h' representa un espectro con ruido experimental y donde el ruido N es una función estocástica.⁴ Obviamente la ecuación 3.15 se puede resolver solo aproximadamente para g , por lo que es necesario algún criterio para seleccionar la mejor solución de múltiples posibilidades.

Para extraer g de la ecuación 3.15 es suficiente que f posea un recíproco con respecto a la convolución, el cual, siguiendo a Biraud (38), denotamos $f^{\otimes -1}$, de modo que

$$f^{\otimes -1} \otimes f = f \otimes f^{\otimes -1} = \delta \quad (3.16)$$

⁴ Una función aleatoria.

La función δ es el elemento neutro con respecto a la convolución, de manera que, $f \otimes \delta = \delta \otimes f = f$ para toda f . Si $f^{\otimes -1}$ existe, entonces se puede resolver la ecuación 3.15 para g :

$$\begin{aligned} f^{\otimes -1} \otimes h &= f^{\otimes -1} \otimes f \otimes g \\ &= \delta \otimes g \\ &= g \end{aligned} \quad (3.17)$$

Desafortunadamente, el recíproco $f^{\otimes -1}$ puede no existir o puede no ser único (33) y aún si este existe puede ser difícil de determinar.

Sin embargo, como ya mencionamos existen varios métodos para obtener g y el más eficiente hasta el momento ha sido el propuesto por Garza-García *et al* (29). En este método, llegamos a la función g , sin necesidad de realizar una deconvolución *per se*, sino que por medio de una convolución con un conjunto especial de δ 's obtenemos una señal efectivamente deconvolucionada. En el capítulo anterior, ya hablamos de este método modificado de duplicación de J , el cual lo podemos expresar con la ecuación 3.3,

$$c = a \otimes b \quad (3.18)$$

donde a es un doblete, b es un conjunto de funciones delta (δ 's) espaciadas una distancia igual a la constante de acoplamiento J y que tiene la forma [... - + - + + - + - ...] para dobletes en fase y [... + + + - - - ...] para dobletes en antifase y c es la señal convolucionada, que al cortar todos los puntos fuera del rango $\pm sw/2$, da la señal efectivamente deconvolucionada, la cual podríamos representar como c' .

Dado lo anterior, se generaliza nuestro razonamiento de la siguiente manera, si tenemos una señal con n acoplamientos esta la podríamos representar como una serie de $n - 1$ convoluciones de n dobletes cada uno con una J característica,

$$a_1 \otimes a_2 \otimes a_3 \dots \otimes a_n \quad (3.19)$$

ahora para deconvolucionar una señal con estas características por nuestro método necesitaríamos n conjuntos de funciones delta, espaciadas una distancia igual a las diferentes J 's,

$$b_1 \otimes b_2 \otimes b_3 \dots \otimes b_n \quad (3.20)$$

si convolucionamos 3.19 con 3.20 obtenemos,

$$c_1 \otimes c_2 \otimes c_3 \dots \otimes c_n = a_1 \otimes a_2 \otimes a_3 \dots \otimes a_n \otimes b_1 \otimes b_2 \otimes b_3 \dots \otimes b_n \quad (3.21)$$

aplicando la propiedad conmutativa del lado derecho de 3.21,

$$c_1 \otimes c_2 \otimes c_3 \dots \otimes c_n = a_1 \otimes b_1 \otimes a_2 \otimes b_2 \otimes a_3 \otimes b_3 \dots \otimes a_n \otimes b_n \quad (3.22)$$

aplicando ahora la propiedad asociativa en 3.22,

$$c_1 \otimes [c_2 \otimes (c_3 \dots \otimes c_n)] = (a_1 \otimes b_1) \otimes [(a_2 \otimes b_2) \otimes (a_3 \otimes b_3) \dots \otimes (a_n \otimes b_n)] \quad (3.23)$$

haciendo el cambio de variable $[c_2 \otimes (c_3 \dots \otimes c_n)] = x$ y $[(a_2 \otimes b_2) \otimes (a_3 \otimes b_3) \dots \otimes (a_n \otimes b_n)] = v$ 3.23 se puede expresar como:

$$c_1 \otimes x = (a_1 \otimes b_1) \otimes v \quad (3.24)$$

finalmente aplicando el cambio de variable $c_1 \otimes x = z$ y $a_1 \otimes b_1 = w$, llegamos a una ecuación idéntica a 3.18

$$z = w \otimes v \quad (3.25)$$

por lo tanto de manera idéntica a 3.18 podríamos extraer de 3.25 un singulete z' que representa la señal efectivamente deconvolucionada después de haber extraído todas las constantes de acoplamiento.

3.2 DESARROLLO EXPERIMENTAL.

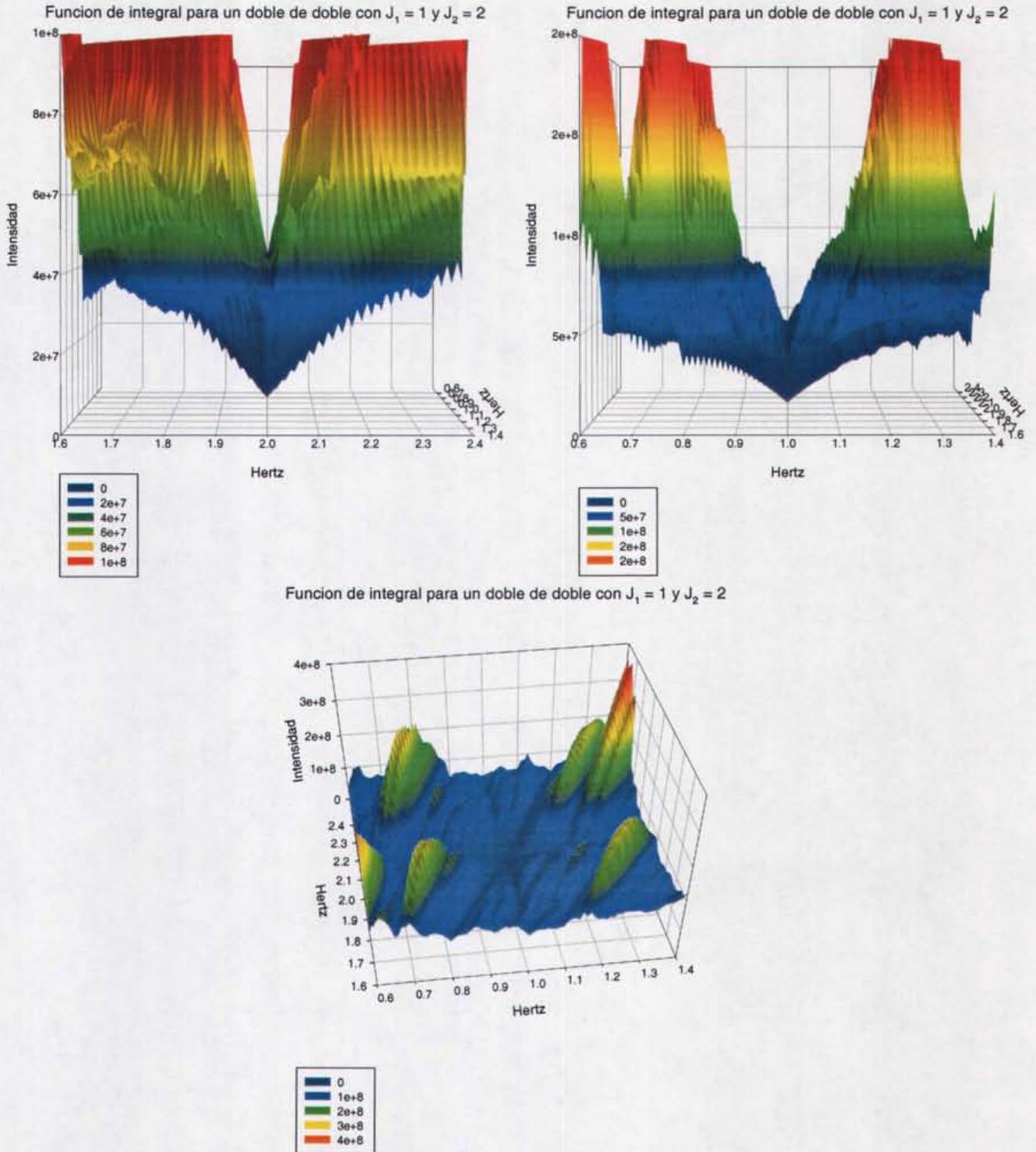
La implementación práctica de la generalización del método modificado de duplicación de J en el dominio de las frecuencias es muy sencilla. Para empezar se extrae la señal digitalizada del espectro total. Esta señal debe de tener una buena digitalización y no debe de estar trasladada con otra. Si la señal cumple con los requisitos anteriores entonces se comienza con el proceso de medición y deconvolución. Lo cual se lleva a cabo con el programa *autoj*, este tiene tres archivos de configuración, *par1*, *par2* y *parauto*, en los cuales se especifica los diferentes parámetros que utilizara el programa para realizar la medición de las J's y la deconvolución de la señal. Una vez que tenemos nuestra señal aislada, por inspección visual tratamos de bosquejar el número de J's que posee. Por ejemplo, para un doble de doble como el que se muestra en la figura 3.3b es claro que posee 2 J's, con esta información se puede configurar el programa *autoj* para que busque solamente dos J's y el intervalo en el cual realizará la búsqueda de estas dos J's, los cuales de acuerdo a nuestra experiencia recomendamos que sean de ± 0.6 Hz para cada J. Hecho lo anterior el programa generará dos archivos, *senals* el cual contiene la señal original en formato ascii y *sums* el cual contiene los datos necesarios para generar la gráfica de la función de integral, con la cual se puede identificar las J's que contiene nuestra señal, identificando el mínimo de nuestra gráfica. Desafortunadamente, el proceso de identificar el mínimo en la gráfica se complica cuando

tenemos más de dos constantes de acoplamiento, debido a que no podemos visualizar más de tres dimensiones, por lo que en estos casos y aún en el caso en el que tenemos sólo dos J 's utilizamos diferentes curvas de nivel de nuestra gráfica de integral para encontrar el mínimo y por lo tanto las J 's presentes en nuestra señal. En la figura 3.1 se observan diferentes vistas de la gráfica de integral para nuestro doble de doble, en esta se observa que desde diferentes ángulos se aprecia un mínimo en la intersección de 2 y 1, que son precisamente los valores de las constantes de acoplamiento del doble de doble. Sin embargo, es difícil tratar de localizar el mínimo con este tipo de gráfica, por lo que al hacer cortes de esta gráfica a diferentes niveles, obtenemos las curvas de nivel de la figura 3.2. Vemos claramente como al ir haciendo cortes cada vez más abajo en la gráfica 3.1, se profundiza el mínimo, hasta que se hace completamente evidente que tenemos un mínimo en 2 y 1. Una vez localizado el mínimo, el programa nos pedirá los valores de las J 's inmersas en la señal para realizar el proceso de deconvolución. Finalmente, se generaran 3 archivos mas, *doblad*os que contiene la señal producto de la convolución, *desdos* que contiene la señal efectivamente deconvolucionada y *sendes* que también contiene la señal efectivamente deconvolucionada, pero con un formato apropiado para utilizarlo otra vez como archivo de entrada del programa, si se desea realizar otra deconvolución.

En la figura 3.3 se observa una representación gráfica de la ecuación 3.25. En esta se muestra un par de funciones delta espaciadas $J_1 = 1$ y $J_2 = 2$ Hz (figura 3.3a). El proceso de convolución genera una nueva función delta que se muestra en la figura 3.3b (1, -1, -2, 2, 0, 0, 2, -2, -1, 1), a la cual llamamos función delta maestra para una señal con valores de J de 1 y 2 Hz. Cuando un doble de dobles con las características anteriores se convolucionan con esta función delta maestra, se obtiene el multiplete que se muestra en la figura 3.3c. Esta última señal contiene en el centro un singulete, el cual es la señal efectivamente deconvolucionada. La señal anterior tiene un ancho espectral igual al ancho espectral original menos las magnitudes de todas las J 's extraídas.

En este trabajo hemos estudiado varias señales simuladas para probar el método, ya que como demostramos arriba, este procedimiento se puede aplicar a cualquier tipo de multipletes de primer orden. Por ejemplo como caso particular podemos citar un triplete dobleteado con $J_1 = J_2 = 3J_3$, cuya función delta maestra sería (-1, 1, 1, 1, -2, -2, 3, -1, -1, -3, 4,

4, -3, -1, -1, 3, -2, -2, 1, 1, 1, -1) ver figura 3.4b. En la figura 3.4c observamos el centro de la señal convolucionada, la cual claramente se aprecia que se trata de un singulete.



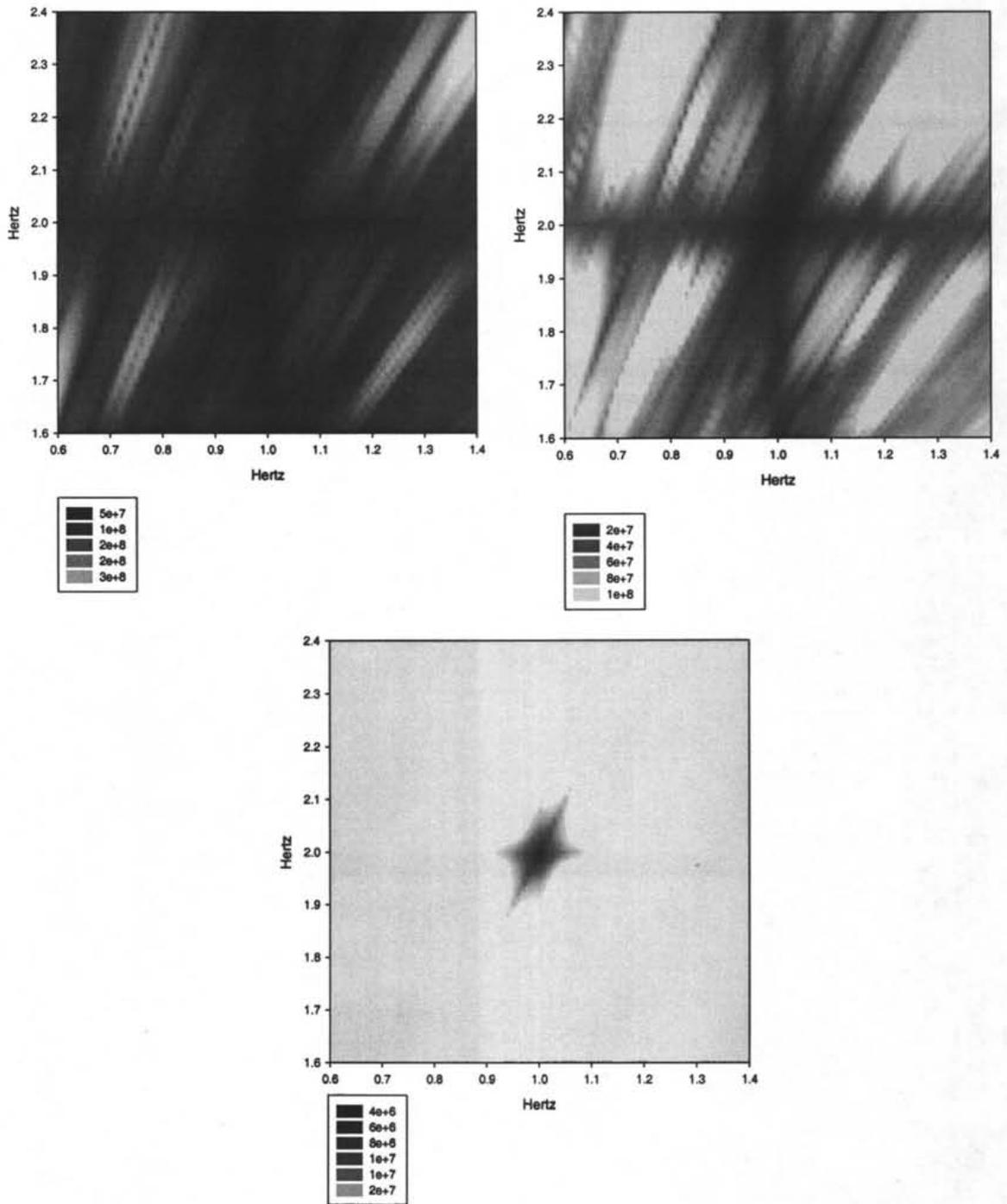


Figura 3.2 Curvas de nivel de la función de integral.

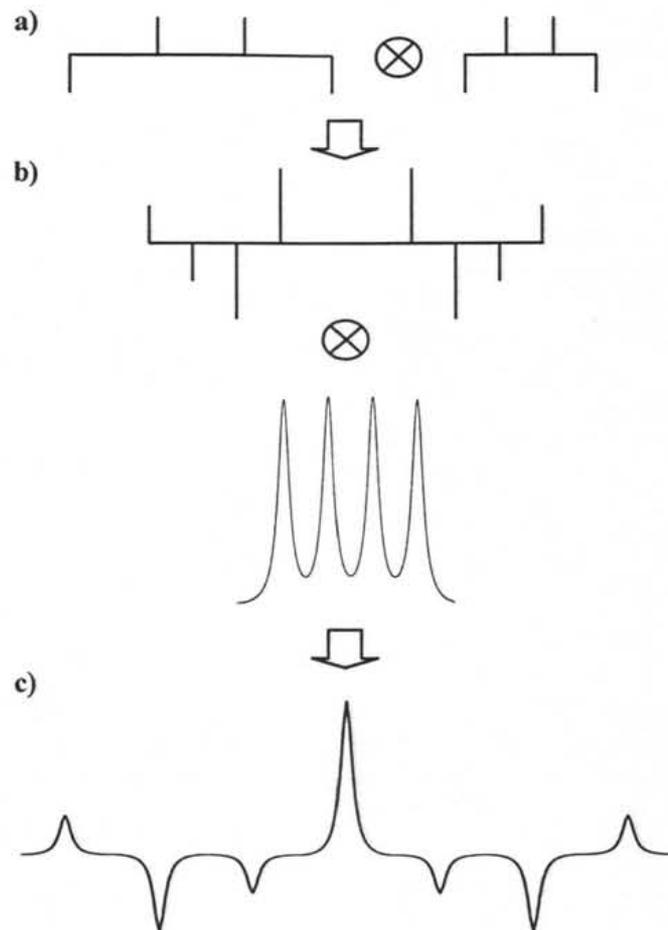


Figura 3.3. Sinopsis del método de deconvolución en un solo paso.

3.2.1 ESTUDIO DE SEÑALES SIMULADAS.

Una vez que se resolvió el problema de encontrar el mínimo en la gráfica de integral, se procedió a probar el desempeño del método en señales simuladas con diversos patrones de acoplamiento. En este punto nos encontramos con una limitante del método. El tiempo requerido para identificar y medir las constantes de acoplamiento era excesivo, a pesar que el programa se corrió en una computadora con dos procesadores Athlon AMD a 2.2 GHz (Tabla 3.1). Por esta razón nos limitamos a estudiar el comportamiento del método con un número pequeño de funciones delta y con un arreglo de solo 3 constantes de acoplamiento, aunque como veremos más adelante el número de funciones delta utilizado resultó ser más que suficiente para nuestros propósitos.

J's (Hz)	8 deltas	12 deltas	16 deltas	32 deltas
1, 1,5, 2	3min 50 seg	9 min	14 min	47 min
1, 2, 3	5 min	14 min	26 min	----
1, 2, 4	9 min	29 min	56 min	----
1, 3, 5	9 min	29 min	56 min	----

Tabla 3.1 Tiempos de cálculo para diversos patrones de acoplamiento con diferente número de funciones delta.

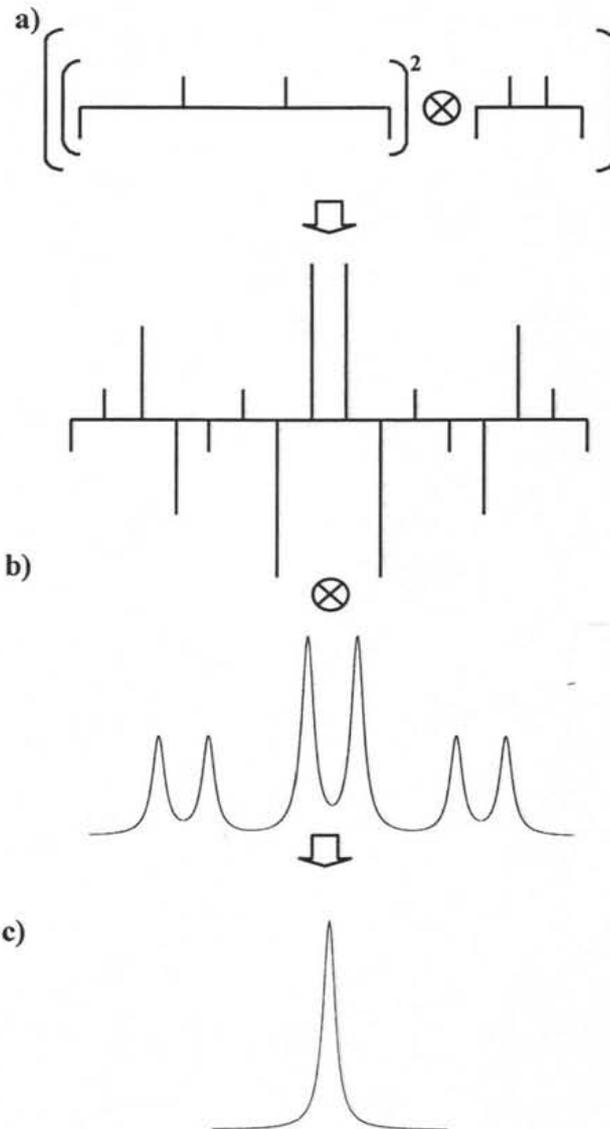


Figura 3.4. Deconvolución de un triplete dobleteado libre de ruido.

Nuestro estudio de señales simuladas comenzó con una señal con constantes de acoplamiento $J_1 = 1$, $J_2 = 1.5$ y $J_3 = 2$ Hz. Esta fue la única señal con la que se realizó el estudio con 32

funciones delta debido a que era la que menos tiempo de cálculo requería y nos servía para darnos una idea de que tanto mejoraban los resultados con este número de funciones delta. De la figura 3.5 podemos observar que con 32 funciones delta podemos medir sin problemas las 3 J 's hasta un ancho de señal de 1.4 Hz, después del cual empiezan a aparecer otros mínimos que dificultan la medición hasta que la hacen imposible. En esta misma figura están los resultados para 16, 12 y 8 funciones delta, en los cuales notamos cómo al disminuir el número de funciones delta, también disminuye el rango de mediciones que podemos hacer. Finalmente, en la figura 3.6 observamos como para un ancho de 0.2 Hz se puede encontrar fácilmente el mínimo en la gráfica de la función de integral. Sin embargo cuando tenemos un ancho de señal de 1 Hz, esta tarea se hace imposible para cuando sólo utilizamos 8 y 12 funciones delta, pero aún podemos realizar la medición con 16 funciones delta.

Continuando con el estudio de señales simuladas, estudiamos un multiplete con constantes de acoplamiento $J_1 = 1$, $J_2 = 2$ y $J_3 = 3$ Hz. Esta señal presenta características muy interesantes, ya que fue la única en la que se pudieron realizar mediciones hasta un ancho de señal de 1.8 Hz con 16 funciones delta (figura 3.7), lo que sugiere que el patrón $2J_1 = J_2$ y $3J_1 = J_3$ de alguna manera facilita la medición de las constantes de acoplamiento inmersas en la señal. Por otra parte en la figura 3.8 podemos observar que para un ancho de señal de 0.2 Hz es fácil localizar el mínimo en la gráfica de la función de integral para cualquier caso. Sin embargo, para un ancho de 1.6 Hz, solo con 16 funciones delta podemos resolver inequívocamente la medición de las constantes de acoplamiento.

Para una señal con constantes de acoplamiento $J_1 = 1$, $J_2 = 2$ y $J_3 = 4$ Hz, a diferencia del caso anterior parece no haber ningún efecto en la medición de J 's la combinación $2J_1 = J_2$ y $2J_2 = J_3$ ya que como observamos en la figura 3.9 sólo medimos con precisión las tres constantes de acoplamiento hasta un ancho de 1 Hz con 16 funciones delta. En cuanto a las curvas de nivel para esta señal (figura 3.10) podemos observar nuevamente que para un ancho de 0.2 Hz es fácil identificar las constantes de acoplamiento en todos los casos sin embargo para un ancho de 1 Hz sólo con 16 funciones delta podemos identificar inequívocamente las constantes de acoplamiento.

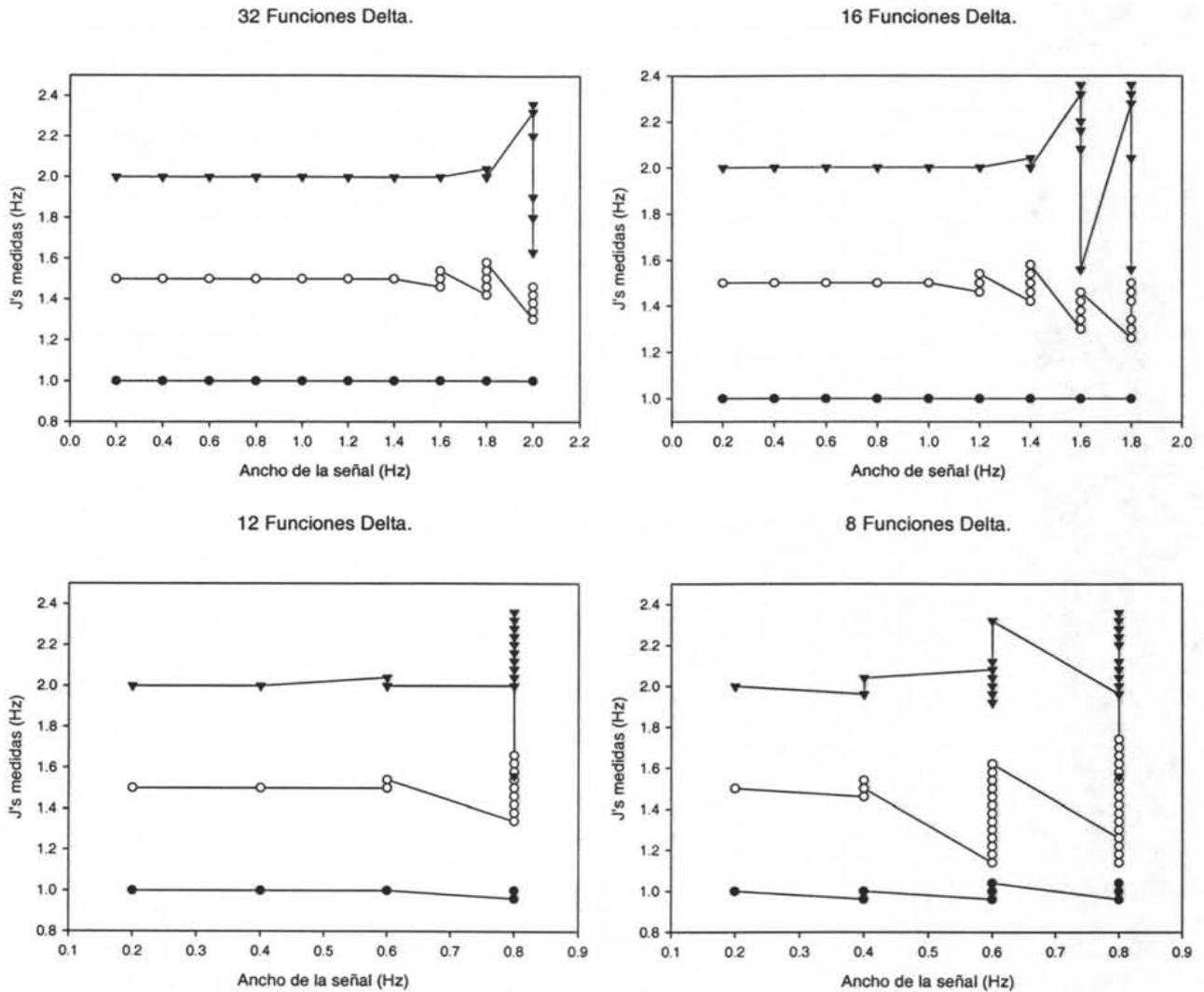


Figura 3.5. Gráficas de la medición simultánea de tres constantes de acoplamiento a diferentes anchos de señal.

Finalmente para una señal con constantes de acoplamiento $J_1 = 1$, $J_2 = 3$ y $J_3 = 5$ Hz se obtuvieron los resultados que se muestran en la figura 3.11. En este caso fue posible medir las tres constantes de acoplamiento de manera precisa hasta un ancho de 1.2 Hz con 16 funciones delta, después del cual comienzan a aparecer otros mínimos que hacen difícil la determinación. En cuanto a la gráfica de la función de integral observamos que para un ancho de 0.2 Hz no hay problema en la medición de las J 's en ningún caso. Sin embargo para un ancho de 0.8 Hz sólo es posible realizar la medición correcta con 16 funciones delta (figura 3.12).

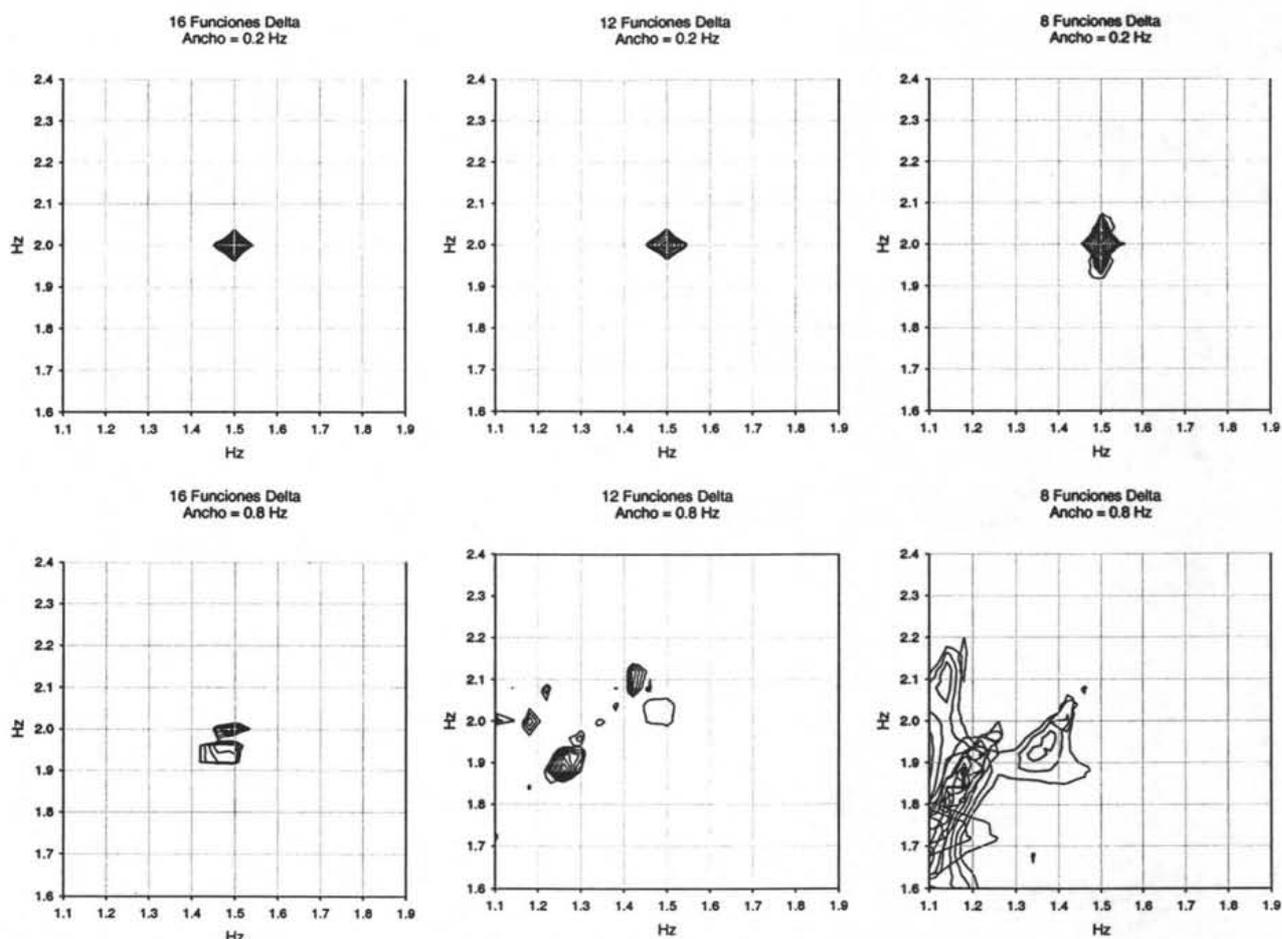


Figura 3.6. Curvas de nivel de la gráfica de la función de integral de una señal simulada con $J_1 = 1$, $J_2 = 1.5$ y $J_3 = 2$ Hz, manteniendo J_1 constante.

3.2.2 ESTUDIO DE SEÑALES EXPERIMENTALES.

Continuando con nuestro estudio, pasamos a estudiar señales experimentales con nuestro método. Comenzamos midiendo las constantes de acoplamiento para el protón H_{21} de la estricnina. Éste da una señal que a primera vista parece un triplete dobleteado (figura 3.14b). Sin embargo, como observamos en la figura 3.13, con nuestro método medimos 4 constantes de acoplamiento $J_1 = 10.48$, $J_2 = 3.48$, $J_3 = 3.08$ y $J_4 = 0.66$ Hz, lo que significa que en realidad se trata de un doble de doble de doble de doble.

Con los valores anteriores de J deconvolucionamos la señal del protón H_{21} y obtenemos el singulete de la figura 3.14c. Como podemos darnos cuenta, con nuestro método es muy fácil encontrar todas las constantes de acoplamiento inmersas en una señal, con solo dos inconvenientes: 1) el tiempo requerido para medir muchas constantes de acoplamiento puede llegar a ser excesivo y 2) las señales estudiadas tienen que ser de primer orden. Aunque

el primero de estos se podría resolver en gran parte poniendo en práctica una idea que se nos ocurrió al final. Se trata de lo siguiente: De nuestro estudio de las propiedades de la convolución, hemos observado que cuando se convoluciona un par de funciones delta con una función cualquiera, lo que sucede es que esta última función se duplica. Siguiendo este razonamiento, nos percatamos que ya no sería necesario convolucionar n veces nuestra función par con simetría C_2 , sino que sólo con una función sería más que suficiente, convolucionada n veces con pares de funciones delta que contengan la información de los acoplamientos. De esta manera el tiempo de cómputo necesario para medir todas las constantes de acoplamiento se reduciría drásticamente.

Finalmente en la figura 3.15 observamos la deconvolución de las 5 constantes de acoplamiento del protón H_4 del α -pineno en un solo paso, éstas fueron medidas previamente con el método modificado de duplicación de J clásico ($J_1 = 5.94$, $J_2 = 5.81$, $J_3 = 3.04$, $J_4 = 2.68$ y $J_5 = 1.37$ Hz). Este ejemplo es solo una muestra del gran potencial que tiene nuestro método, para deconvolucionar todas las constantes de acoplamiento en un solo paso lo que a su vez facilitará la interpretación de señales complejas.

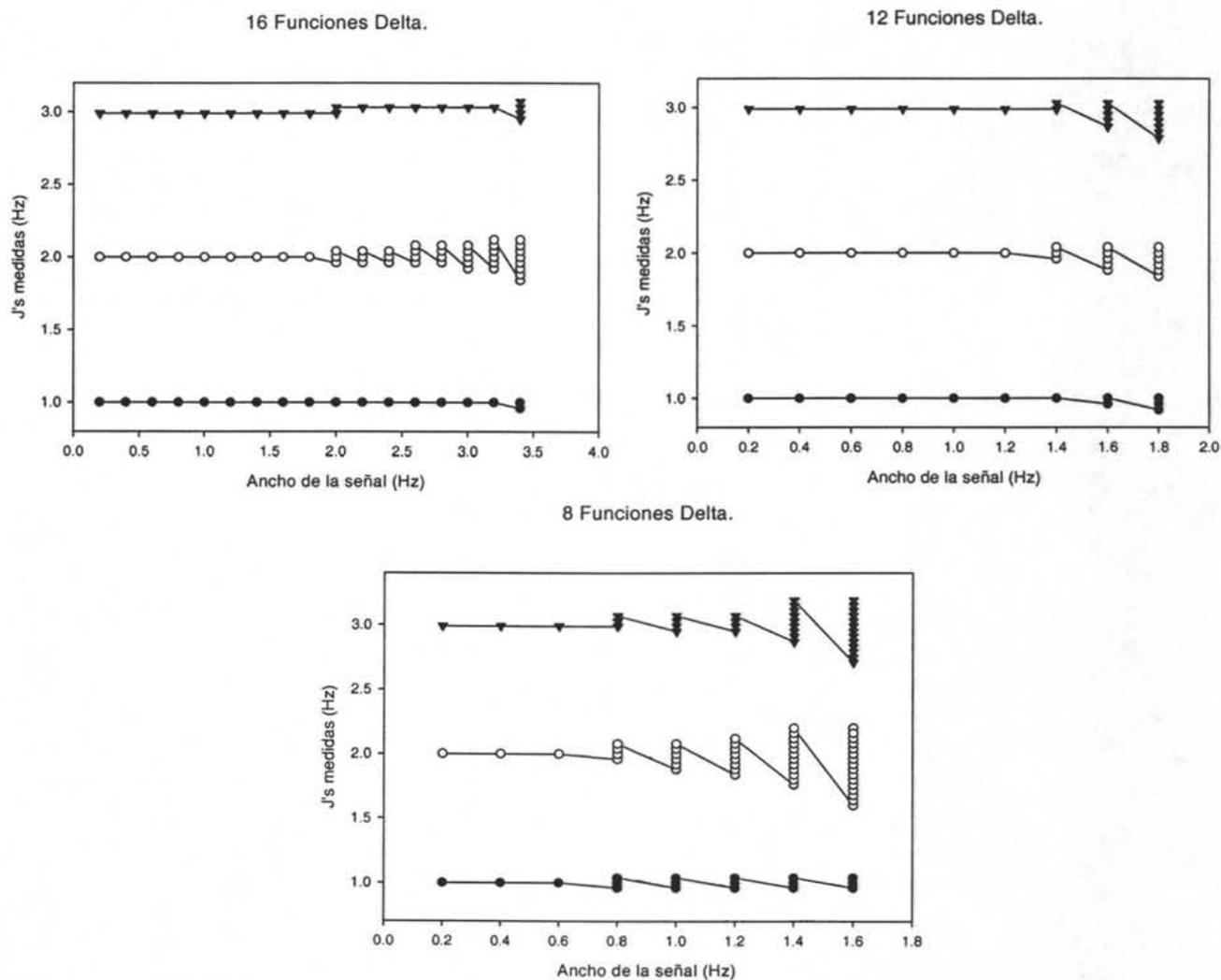


Figura 3.7. Gráficas de la medición simultánea de tres constantes de acoplamiento a diferentes anchos de señal.

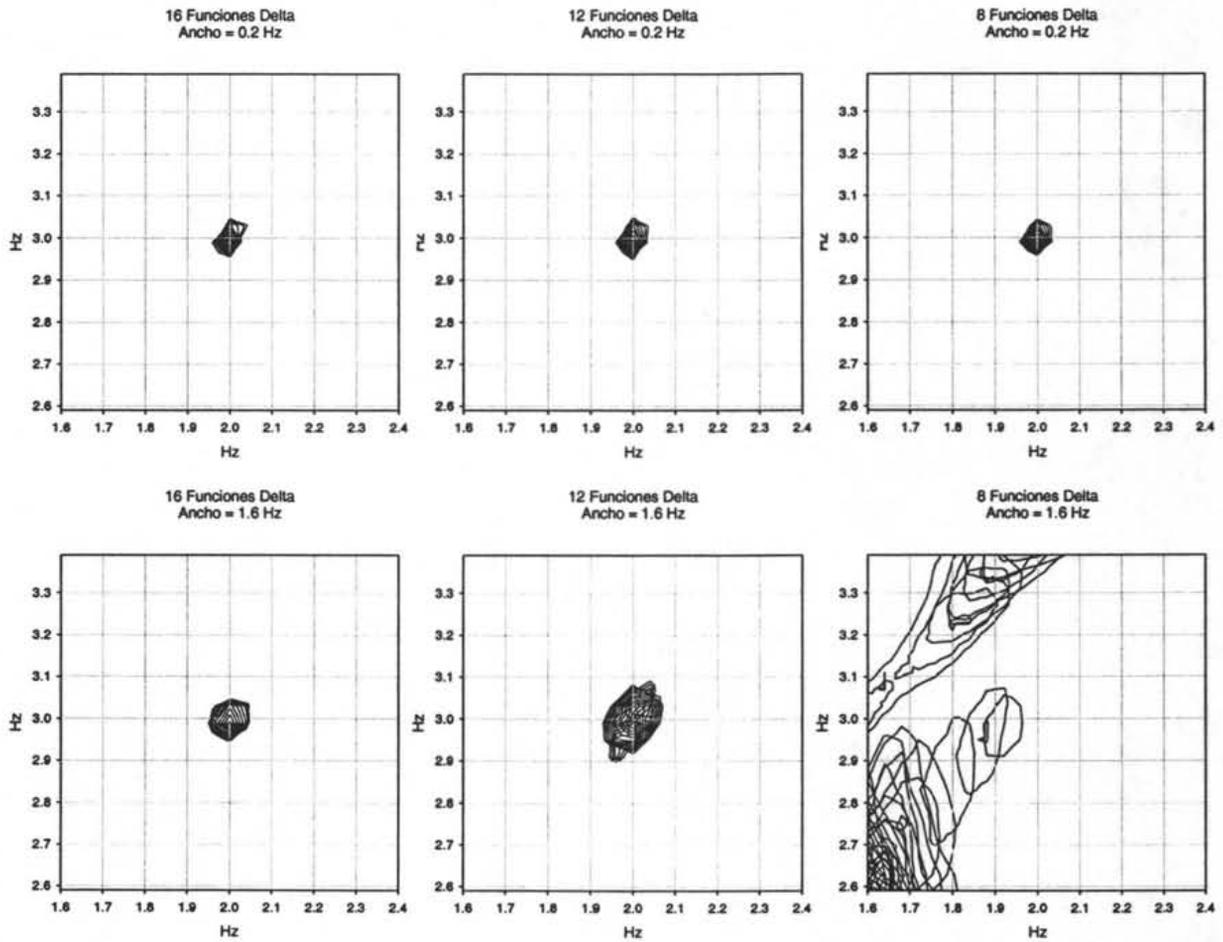


Figura 3.8. Curvas de nivel de la gráfica de la función de integral de una señal simulada con $J_1 = 1$, $J_2 = 2$ y $J_3 = 3$ Hz, manteniendo J_1 constante.

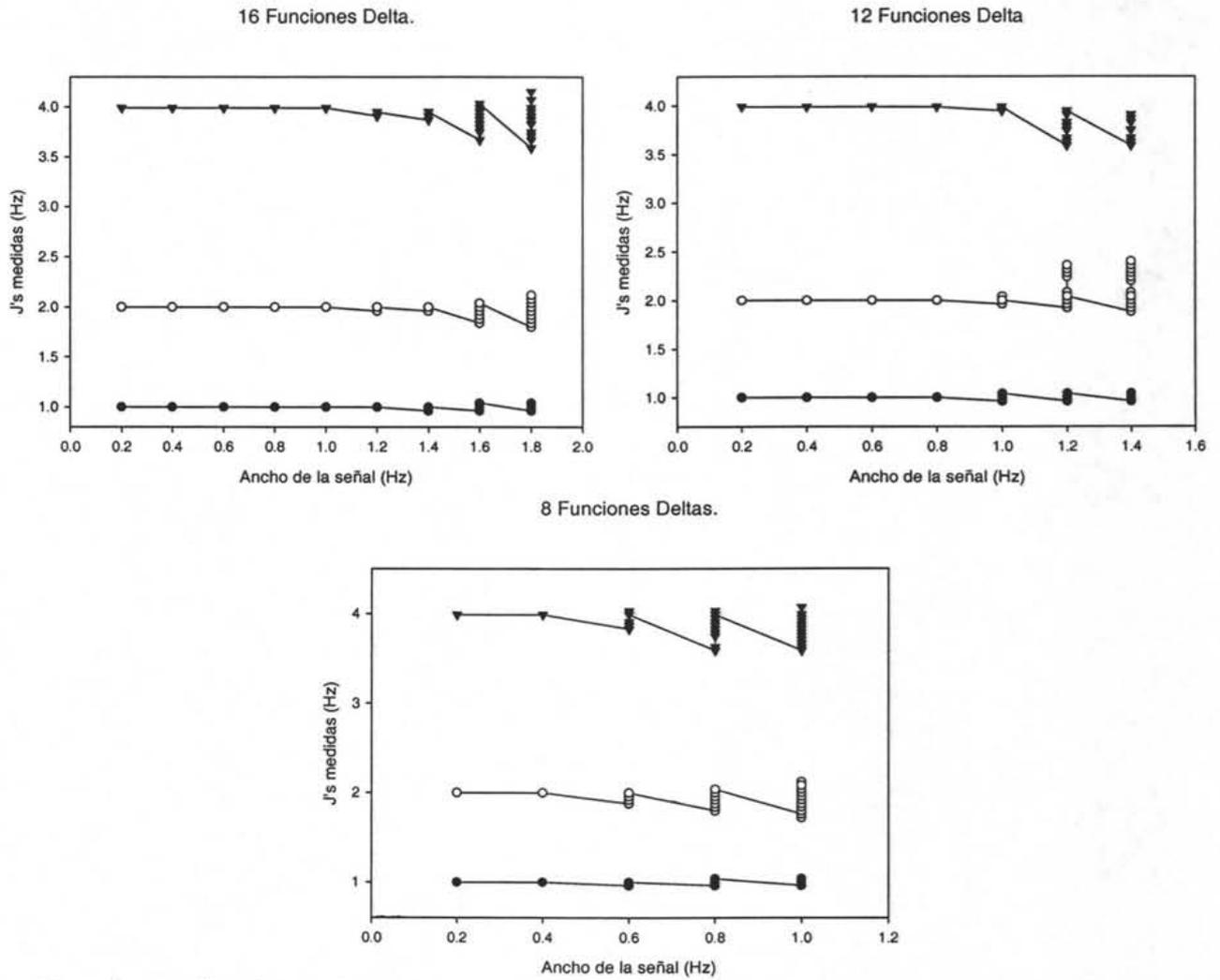


Figura 3.9. Gráficas de la medición simultánea de tres constantes de acoplamiento a diferentes anchos de señal.

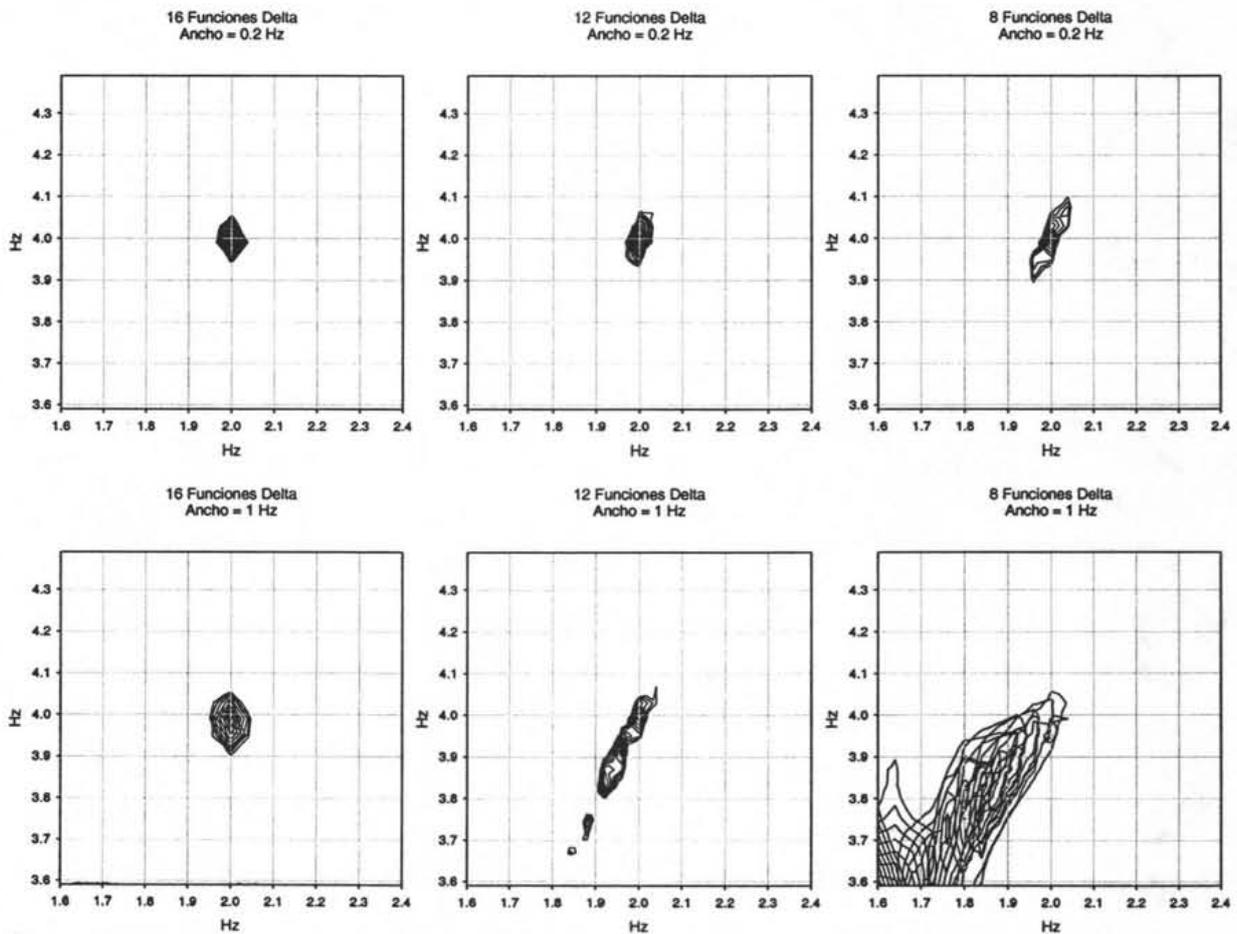


Figura 3.10. Curvas de nivel de la gráfica de la función de integral de una señal simulada con $J_1 = 1$, $J_2 = 2$ y $J_3 = 4$ Hz, manteniendo J_1 constante.

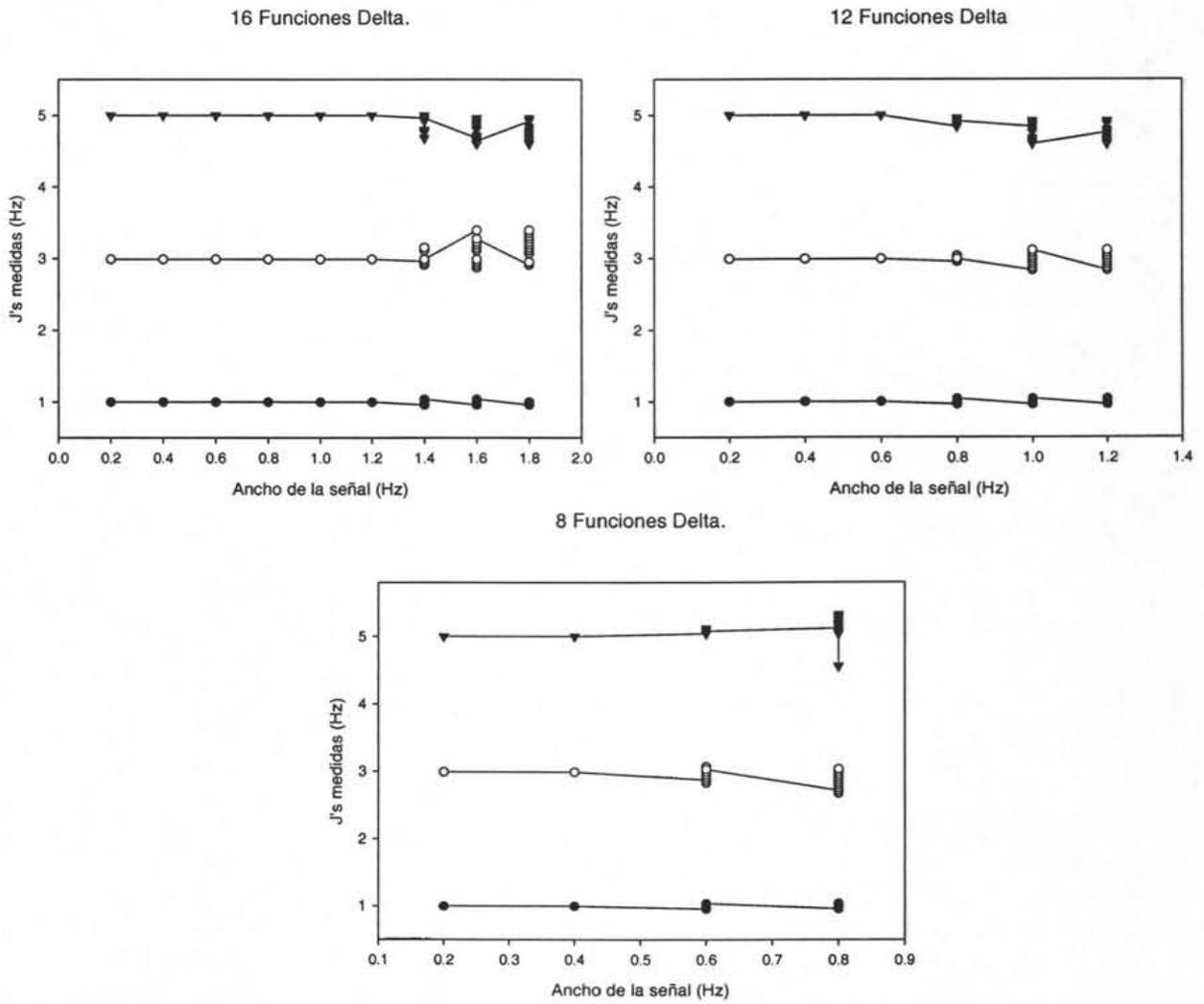


Figura 3.11. Gráficas de la medición simultánea de tres constantes de acoplamiento a diferentes anchos de señal.

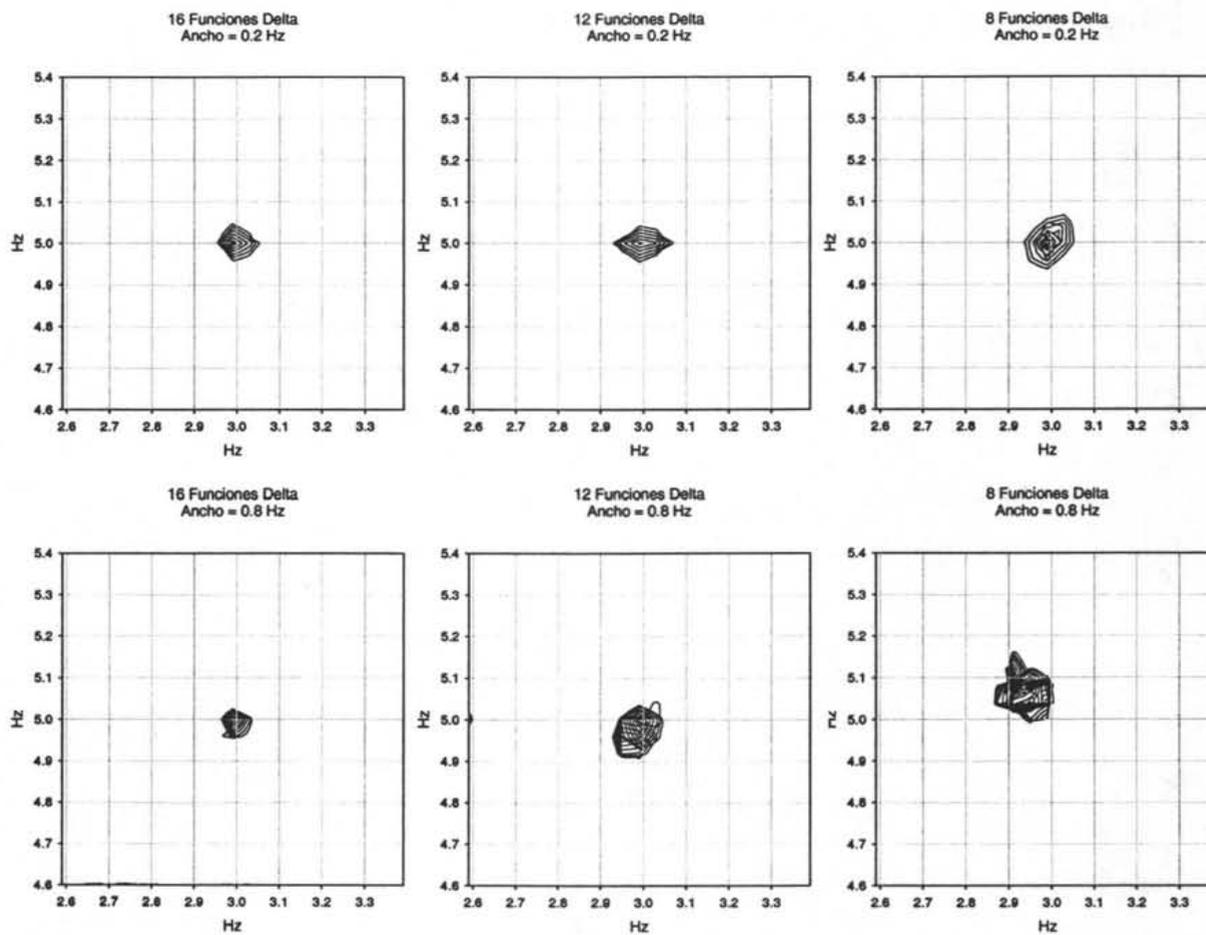


Figura 3.12. Curvas de nivel de la gráfica de la función de integral de una señal simulada con $J_1 = 1$, $J_2 = 3$ y $J_3 = 5$ Hz, manteniendo J_1 constante.

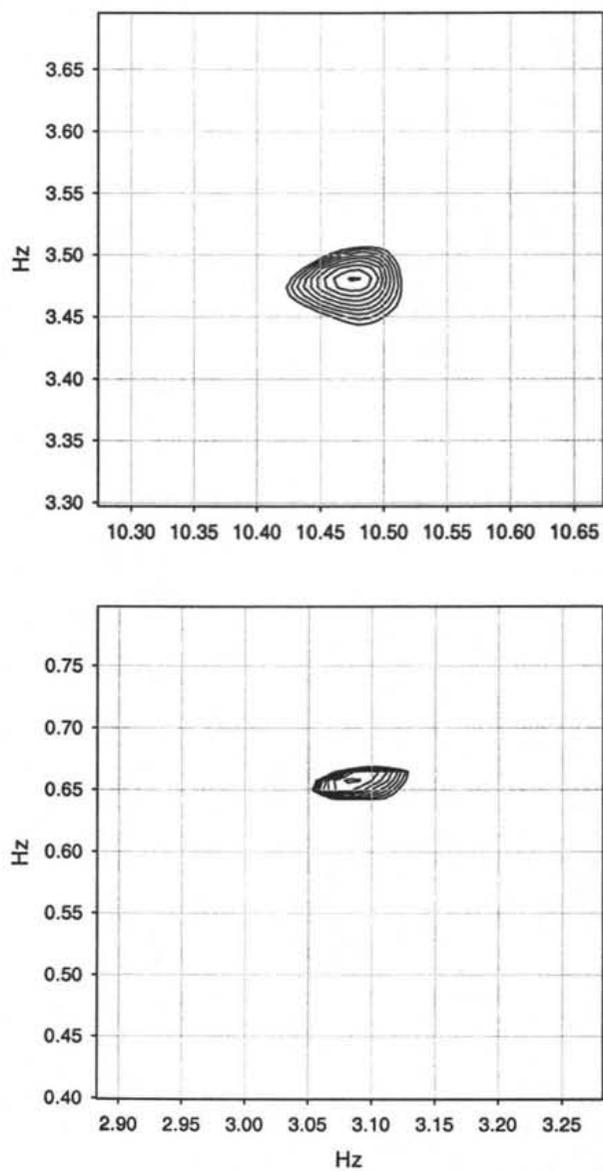


Figura3.13. Curvas de nivel de la gráfica de la función de integral, para la señal del protón H_{21} de la estriquina.

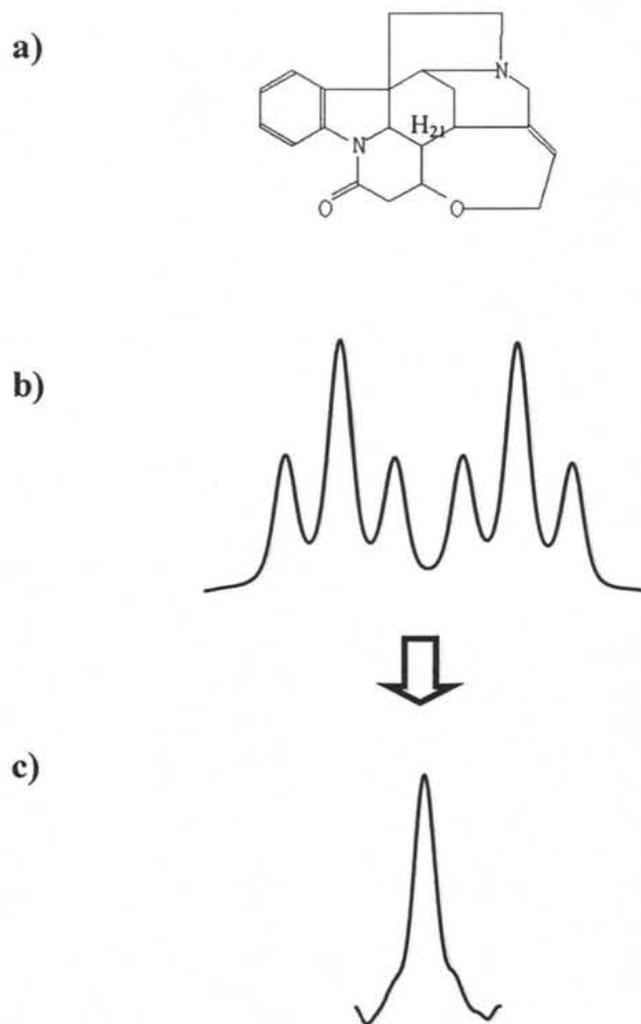


Figura 3.14. Proceso de deconvolución en un sólo paso para el protón H₂₁ de la estrocinina.

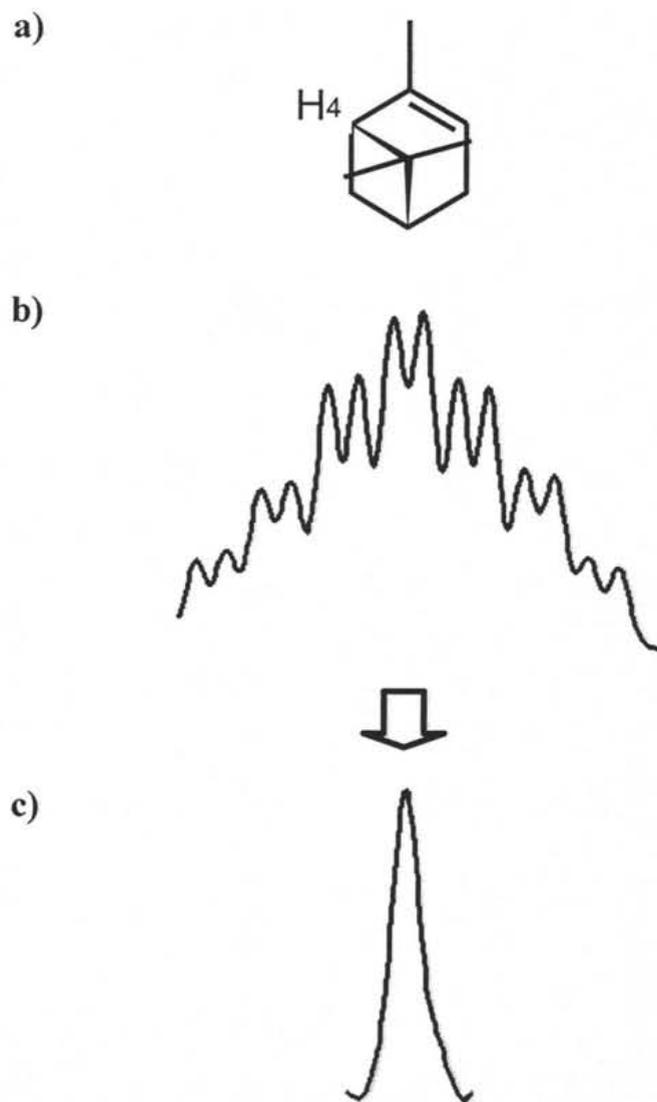


Figura 3.15. Proceso de deconvolución en un sólo para el protón H₄ del α-pineno.

CONCLUSIONES.

- Se generalizó el método modificado de duplicación de J en el dominio de las frecuencias. Con ello se demuestra que es posible medir y deconvolucionar todas las constantes de acoplamiento de una señal de RMN en un sólo paso.
- Se identificaron las constantes de acoplamiento presentes en una señal haciendo cortes en forma de curvas de nivel de la gráfica de la función de integral.
- Se observó que el método es capaz de determinar constantes de acoplamiento inmersas en la señal usando multipletes teóricos.
- Conforme aumenta el ancho de la señal es más difícil medir y deconvolucionar las constantes de acoplamiento de un multiplete, debido a que comienzan a aparecer mínimos que ya no permiten la determinación precisa de las constantes de acoplamiento a menos que se aumente el número de funciones delta.
- Para medir constantes de acoplamiento comparables con anchos de señal trae como consecuencia un incremento sustancial en el tiempo de cómputo.
- A mayor ancho de señal, se requiere de un mayor número de funciones delta para medir y deconvolucionar sus constantes de acoplamiento.
- En señales experimentales es posible medir y deconvolucionar multipletes siempre y cuando estos tengan una buena relación señal/ruido y las constantes de acoplamiento sean al menos parecidas al ancho de la señal.
- La medición y deconvolución de varias constantes de acoplamiento en un sólo paso en señales de RMN es una contribución única de entre todos los métodos diseñados para medir constantes de acoplamiento, lo que nos permite afirmar una vez más que el método modificado de duplicación de J en el dominio de las frecuencias es el mejor método diseñado hasta ahora para la medición de J's.

- Se propuso una nueva idea, que debería de reducir drásticamente el tiempo de cómputo necesario para medir y deconvolucionar todas las constantes de acoplamiento en un sólo paso.

BIBLIOGRAFIA.

1. P. W. Atkins and J. De Paula Physical Chemistry 7th Ed. Oxford University Press. USA. 2002.
2. R. S. Drago Physical Methods in Chemistry. Saunders Company. USA. 1977.
3. H. S. Gutowsky, D. W. McCall. "Nuclear Magnetic Resonance Fine Structure in Liquids". *Phys. Rev.* **82**, 748-749. (1951).
4. H. S. Gutowsky, D. W. McCall. "Coupling among Nuclear Magnetic Dipoles in Molecules". *Phys. Rev.* **84**, 589-590. (1951).
5. E. L. Hahn, D. E. Maxwell. "Chemical Shift and Field Independent Frequency Modulation of the Spin Echo Envelope". *Phys. Rev.* **84**, 1246-1247. (1951).
6. E. L. Hahn, D. E. Maxwell. "Spin Echo Measurements of Nuclear Spin Coupling in Molecules". *Phys. Rev.* **88**, 1070-1084. (1952).
7. K. Wüthrich NMR of Proteins and Nucleic Acids. Wiley. USA. 1986.
8. R. Kaptein, R. Boelens, R. M. Scheek, W. F. van Gasteren. "Protein Structures from NMR". *Biochemistry.* **27**, 5389-5395. (1988).
9. G. Wagner. "NMR Investigations of Protein Structure". *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **22**, 101-139. (1990).
10. M. Eberstadt, G. Gemmecker, D. F. Mierke, H. Kessler. "Scalar Couplings Constants. Their Analysis and Their Application for the Elucidation of Structures". *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **34**, 1671-1695. (1995).
11. D. Neuhaus, G. Wagner, M. Vasak, J. H. R. Kägi, K. Wüthrich. "Systematic Application of High-Resolution, Phase-Sensitive Two-Dimensional ¹H-NMR Techniques for the Identification of the Amino-Acid Proton Spin Systems in Proteins. Rabbit Metallothionein-2". *Eur. J. Biochem.* **151**, 257-273. (1985).
12. C. Griesinger, O. W. Sørensen, R. R. Ernst. "Correlation of Connected Transitions by Two-Dimensional NMR Spectroscopy". *J. Chem. Phys.* **85**, 6837-6852. (1986).
13. C. Griesinger, O. W. Sørensen, R. R. Ernst. "Practical Aspects of the E. COSY Technique. Measurement of Scalar Spin-Spin Coupling Constants in Peptides". *J. Magn. Reson.* **75**, 474-492. (1987).
14. C. Griesinger, O. W. Sørensen, R. R. Ernst. "Two-Dimensional Correlation of Connected NMR Transitions". *J. Am. Chem. Soc.* **107**, 6394-6396. (1985).
15. D. Neri, G. Otting, K. Wüthrich. "New Nuclear Magnetic Resonance Experiment for Measurements of the Vicinal Coupling Constants ³J_{HN.alpha.} in proteins". *J. Am. Chem. Soc.* **112**, 3663-3665. (1990).

16. M. Billeter, D. Neri, G. Otting, Y. Q. Quian, K. Wüthrich. *J. Biomol. NMR.* **2**, 257. (1992).
17. A. Bax, D. Max, D. Zax. "Measurement of Long-Range ^{13}C - ^{13}C J Couplings in a 20-KDa Protein-Peptide Complex". *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 6923-6925. (1992).
18. S. J. Archer, A. Bax, A. B. Roberts, M. B. Sporn, Y. Ogawa, K. A. Piez, J. A. Weatherbee, M. L.-S. Tsang, R. Lucas, B-L. Zheng, J. Wenker, D. A. Torchia. "Transforming Growth Factor .beta.1: Secondary Structure as Determined by Heteronuclear Magnetic Resonance Spectroscopy". *Biochemistry.* **32**, 1164-1171. (1993).
19. F. Fogolari, G. Esposito, S. Cauci, P. Viglino. "Evaluation of J Coupling Constants from Peak Amplitudes of Total Correlation Spectra". *J. Magn. Reson.* **102**, 49-57. (1993).
20. Y. Kim, J. H. Prestegard. "Measurement of Vicinal Couplings from Cross Peaks in COSY". *J. Magn. Reson.* **84**, 9-13. (1989).
21. J-M. Le Parco, L. McIntyre, R. Freeman. "Accurate Coupling Constants from Two-Dimensional Correlation Spectra by J Deconvolution". *J. Magn. Reson.* **97**, 553-567. (1992).
22. T. Szyperski, P. Güntert, G. Otting, K. Wüthrich. "Determination of Scalar Coupling Constants by Inverse Fourier Transformation of In-Phase Multiplets". *J. Magn. Reson.* **99**, 552-560. (1992).
23. J. J. Titman, J. Keeler. "Measurement of Homonuclear Coupling Constants from NMR Correlation Spectra". *J. Magn. Reson.* **89**, 640-646. (1990).
24. J. J. Titman, D. Neuhaus, J. Keeler. "Measurement of Long-Range Heteronuclear Coupling Constants". *J. Magn. Reson.* **85**, 111-131. (1989).
25. J. Stonehouse, J. Keeler. "A Convenient and Accurate Method for the Measurement of the Values of Spin-Spin Coupling Constants". *J. Magn. Reson. Series A* **112**, 43-57. (1995).
26. L. J. Smith, M. J. Sutcliffe, C. Redfield, C. M. Dobson. "Analysis of ν_{phi} and χ_1 Torsion Angles for Hen Lysozyme in Solution from Proton NMR Spin-Spin Coupling Constants". *Biochemistry.* **30**, 986-996. (1991).
27. L. McIntyre, R. Freeman. "Acurate Measurement of Coupling Constants by J Doubling". *J. Magn. Reson.* **96**, 425-431. (1992).
28. F. Del Rio-Portilla, V. Blechta, R. Freeman. "Measurement of Poorly Resolved Splitting by J Doubling in the Frequency Domain". *J. Magn. Reson. Series A* **111**, 132-135. (1994).

29. A. Garza-García, G. Ponzanelli-Velázquez, F. Del Río-Portilla. "Deconvolution and Measurement of Spin-Spin Splittings by Modified J Doubling in the Frequency Domain". *J. Magn. Reson.* **148**, 214-219. (2001).
30. T. R. Hoye, H. Zhao. "A Method for Easily Determining Coupling Constant Values: An Addendum to A Practical Guide to First-Order Multiplet Analysis in ^1H NMR Spectroscopy". *J. Org. Chem.* **67**, 4014-4016. (2002).
31. J. C. Cobas, V. Constantino-Castillo, M. Martín-Pastor, F. Del Río-Portilla. "A Two-Stage Approach to Automatic Determination of ^1H NMR Coupling Constants". *Magn. Reson. Chem.* (Aceptado). (2005).
32. F. Del Río-Portilla, E. Sánchez-Mendoza, V. U. Constantino-Castillo, J. A. Del Río. "New Guide for First Order Multiplets Analysis by Modified J Doubling in the Frequency Domain". *Arkivoc.* **XI**, 213-226 Part II. (2003).
33. P. Huber, G. Bodenhausen. "Simplification of Multiplets by Deconvolution in One and Two Dimensional NMR Spectra". *J. Magn. Reson. Series A* **102**, 81-89. (1993).
34. P. Huber, G. Bodenhausen. "Bidirectional Deconvolution, an Improvement for the Stepwise Simplification of Multiplets". *J. Magn. Reson. Series A* **104**, 96-102. (1993).
35. D. Jeannerat, G. Bodenhausen. "Determination of Coupling Constants by Deconvolution of Multiplets in NMR". *J. Magn. Reson.* **141**, 133-140. (1999).
36. R. N. Bracewell. The Fourier Transform and its Applications. 2nd Ed. McGraw-Hill. USA. 1978.
37. D. C. Champeney. A Handbook of Fourier Theorems. Cambridge University Press. England. 1987.
38. Y. G. Biraud. "Les Methodes de Deconvolution et leurs Limitations, Fondamentales". *Rev. Phys. Appl.* **11**, 203-214. (1976).

ANEXO I.

Programa que deconvoluciona y mide todas las constantes de acoplamiento en una señal de RMN.

/*autoj.c es el programa principal que mide y deconvoluciona todas las constantes de acoplamiento de una señal de RMN.

Para compilar los programas solo se tiene que teclear el siguiente comando:

```
make -f autoj.mkf
```

y asegurarse que todas las subrutinas se encuentren en el mismo directorio en donde se esta compilando.

autoj.c es el programa principal.*/

```
#include <stdio.h>
#include <math.h>
#include <string.h>
#include <stdlib.h>

#define MAXSTR 140

float  Jmin, Jmax, Jmin1, Jmin2, Jmin3, Jmin4, Jmax1, Jmax2, Jmax3,
Jmax4, lf, rf, sw, swt, sfrq;
int    imprime, elf, erf1, *conv, step;
long   ebytes, delta, jsteps, np, npt, nptt;
double *indata, *max1, *max2, rff, lff, rpp, lpp;
char   ndoblado[MAXSTR], nsuma[MAXSTR];

main(int argc, char *argv[])
{
    FILE      *infile, *parfile, *sumfile, *senal, *doblado, *desdo,
*sendes, *fpp, *olvido, *pardelta, *Js;
    char      c[50], par[1];
    extern double *indata, *max1, *max2, rff, lff, rpp, lpp;
    double    *outdata, mitad;
    extern long np, npt, nptt, ebytes, delta, jsteps;
    extern float  Jmin, Jmax, Jmin1, Jmin2, Jmin3, Jmin4, Jmax1,
Jmax2, Jmax3, Jmax4, lf, rf, sw, swt, sfrq;
    extern int    imprime, elf, erf1, *conv, step;
    extern char   ndoblado[MAXSTR], nsuma[MAXSTR];
    int          i, j, z, v, jp, k, ax, in, r, count, *steps, *delta1,
*delta2, *delta3, *delta4, *delta5;
    float        swd, swn, *minimo, *Jminima, *frecuencia;
    float        min, slope, x0, max, mini, x, mit, *xd;
    char         infilename[MAXSTR], sumfilename[MAXSTR],
jdoublefilename[MAXSTR], sendesc[MAXSTR];
    char         home[MAXSTR], ndatos[MAXSTR], ntrazos[MAXSTR],
nescritura[MAXSTR],
nsenal[MAXSTR], ndesdo[MAXSTR], *countchar, respuesta,
nolvido[MAXSTR], nJmin[MAXSTR];
    float        Jin, Jmini1, Jmini2, Jmini3, Jmini4, Jmini5, leído, A,
at, frq, J[8], I[2], ppm[2];
    double       sum, suma, sump, *iindata;
    int          Jreal, Jreal1, Jreal2, Jreal3, Jreal4, inicio, final,
rango, axi1, axi2, nciclos, nde;
    int          w, Np, q, ima[20000];
    float        hertz[5000];
```

```

/* reading of input parameters */
system("clear");

printf("\t\tJDSIM.C\nDetermination of passive coupling constants by
J doubling in the frequency domain.\n");
strcpy( home, "./");
strcpy( ndatos, home);
strcat( ndatos, "par2");
strcpy( nescritura, home);
strcat( nescritura, "");
strcpy( sendesc, home);
strcat( sendesc, "sendes");
strcpy( ndoblado, nescritura);
strcpy( ndesdo, nescritura);
strcat( ndesdo, "desdos");
strcpy( nsuma, nescritura);
parfile = fopen( ndatos, "r");
fscanf(parfile, "%f Jmin1\n%f Jmax1\n%f Jmin2\n%f Jmax2\n%f
Jmin3\n%f Jmax3\n%f Jmin4\n%f Jmax4\n%d Jsteps\n%d Imprime\n", &Jmin1,
&Jmax1, &Jmin2, &Jmax2, &Jmin3, &Jmax3, &Jmin4, &Jmax4, &jsteps,
&imprime);
/*****
*****/
Jmin = Jmin1;
Jmax = Jmax1;
printf("I will use the following parameters (par2 file):Jmin= %.2f
Jmax= %.2f Jsteps= %3d\n",Jmin, Jmax, jsteps);
fclose(parfile);
count = 1;
Jminil = 1;
pardelta = fopen("par1", "r");
fscanf(pardelta,"%d %s %d %s %s", &nde, c, &nciclos, c, par);
fclose(pardelta);
printf("delta %d nciclos %d c %s\n", nde, nciclos, par);
delta = nde;
A = 0;
while (A < 10)
{
    if (argc == 2)
    {
        q = strcmp(argv[1], "sendes");
        if ((infile = fopen( argv[1], "r")) == 0)
        {
            printf("\t%s: can't open %s\n", argv[0],
argv[1]);
            exit(1);
        }
        if (q != 0)
            JDSIMVAR(parfile, infile, argv); /*Read phasefile
from VARIAN*/
        else
            JDSIMARG(infile); /*Read xeasy's format file*/
        fclose(infile);
    }
    else
    {
        fpp = fopen("parauto", "r");
        fscanf(fpp,
"%f%s%d%s%f%s%f%s%f%s%f%s%f%s%f%s%f%s", &at, c, &w,
c, &A, c, &frq, c, &sw, c, &Np, c, &J[0], c, &J[1], c, &J[2], c, &J[3],
c, &J[4], c, &J[5], c, &J[6], c, &J[7], c);

```

```

fscanf(fpp, "%f%f%s%f%f%s", &I[0], &ppm[0], c, &I[1],
&ppm[1], c);
fclose(fpp);
SIMULAUTO(A, at, w, frq, sw, Np, J, I, ppm);/*J2, J3,
J4, J5, J6, J7);*/
JDSIM();
}
/*Baseline correction*/

iindata = indata;
LINEABASE(indata, np);
/*Determination of the maximum and minimum intensity
values*/

MAXIMO(indata, np, &max, &ax);
MINIMO(indata, np, &mini, &in);
if(imprime == 1)
printf("Maximum %.2f at row %d\nMinimum %.2f at row
%d\n",
max, ax, mini, in);

/*Writing of "senals", e.i. the same multiplet that was
introduced,
* but with the baseline correction and in a x-y
format*/

inicio = 0;
final = np;
rango = np / 2;
countchar = (char *) calloc(1, sizeof(char));
*countchar = count + 48;
strcpy(nsenal, "senal");
strncat(nsenal, countchar, 1);
senal = fopen(nsenal, "w");
ESCRIBEFREC(indata, senal, np, sw, inicio, final, rango);
fclose(senal);

/* Determination of couplig constants by the direct
method */

if(imprime == 2)
PICOAPICO(indata, np, sw, hertz, i, r, elf, erfl, ima);

/*****/
/* Determinacion del ancho a la mitad del multiplete
antes de realizar la operacion de convolucion*/
senal = fopen(nsenal, "r");
mitad = indata[ax] / 2.0;
MITADPICO(senal, np, mitad, &mit);
printf("Ancho a la mitad del pico anterior= %f\n",mit);
fclose(senal);

/* Starts J doubling*/

printf("***** J DOUBLING *****\n");
step = (int) ceil((Jmax - Jmin) * np / (sw * jsteps));
printf("step %d \n", jsteps);
printf("I will look for coupling constants every %.3f Hz.\n",
step * sw / np);
if (sw * step / np > sw / np)

```

```

        printf("To obtain the same resolution, jsteps = %.1f
times\n",
                (Jmax - Jmin) * np / (sw * jsteps));
k = jsteps - (Jmax - Jmin) * np / sw;
if ( k > 5) {
    printf("There are %d steps left in the value of Jmax.
", k);
    printf("I will do only %d steps\n", jsteps - k);
    jsteps -= k;
}
if(imprime == 1)
    printf("It seems that the maximum value in the domain
is %d\n",
            (int) (Jmax * delta * np / sw + np));
Jminima = (float *) calloc(jsteps * jsteps * jsteps,
sizeof(float));
minimo = (float *) calloc(jsteps * jsteps * jsteps,
sizeof(float));
steps = (int *) calloc(jsteps * jsteps * jsteps,
sizeof(int));
printf("\nStep1\t Step2\t Step3\t Step4\t J1*\t J2*\t J3*\t
J4*\t minimum\n");
k = 0;
suma = 0;
sump = 0;
strcpy(nsuma, "sum");
strncat(nsuma, countchar, 1);
sumfile = fopen(nsuma, "w");
strcpy(ndoblado, "doblados");
strncat(ndoblado, countchar, 1);
doblado = fopen(ndoblado, "w");
sendes = fopen(sendesc, "w");
strcpy(ndesdo, "desdos");
strncat(ndesdo, countchar, 1);
desdo = fopen( ndesdo, "w");
/*Starts the calculus of the integral function graph
and displays the minima found*/
strcpy( nJmin, "Jminima");
strncat(nJmin, countchar, 1);
Js = fopen( nJmin, "w");
for (v = 0; v < jsteps; v++)
{
    Jreal = Jmin1 * np / sw + v * step;
    if ((Jreal * sw / np) > Jmax1)
        break;
    delta1 = (int *) calloc((int)(nde * Jreal),
sizeof(int));
    DELTAS(nde, 0, par, delta1, Jreal);
    for (z = 0; z < jsteps; z++)
    {
        Jreal1 = Jmin2 * np / sw + z * step;
        if ((Jreal1 * sw / np) > Jmax2)
            break;
        delta2 = (int *) calloc((int)(nde * Jreal1),
sizeof(int));
        DELTAS(nde, 0, par, delta2, Jreal1);
        /*delta2 = (int *) calloc((int)(2 * Jreal1),
sizeof(int));
        DELTAS(2, 0, par, delta2, Jreal1);*/
        for (j = 0; j < jsteps; j++)
        {

```

```

Jreal2 = Jmin3 * np / sw + j * step;
if ((Jreal2 * sw / np) > Jmax3)
    break;
delta3 = (int *) calloc((int)(nde *
Jreal2), sizeof(int));
DELTAS(nde, 0, par, delta3, Jreal2);
/*delta3 = (int *) calloc((int)(2 *
Jreal2), sizeof(int));
DELTAS(2, 0, par, delta3, Jreal2);*/
/*if (j > 1)
    fprintf(sumfile, "\n");*/
for (i = 0; i < jsteps; i++)
{
    Jreal3 = Jmin4 * np / sw + i * step;
    if ((Jreal3 * sw / np) > Jmax4)
        break;
    delta4 = (int *) calloc((int)(nde *
Jreal3), sizeof(int));
    DELTAS(nde, 0, par, delta4, Jreal3);
    /*delta4 = (int *) calloc((int)(2 *
Jreal3), sizeof(int));
    DELTAS(2, 0, par, delta4, Jreal3);*/
    conv = (int *) calloc((delta *
(Jreal + Jreal1 + Jreal2 + Jreal3)) - (Jreal + Jreal1 + Jreal2 + Jreal3)
+ 1), sizeof(int));
    NEWCONVOL3(Jreal, Jreal1, Jreal2,
Jreal3, delta1, delta2, delta3, delta4, 0, conv);
    /*if (j == 50 && i == 51)
        exit(0);*/
    /*if (i > j)
        break;*/
    /*if (count == 1)
        if(imprime == 1)
            printf("sw = %f elf %d erf1 =
%d Jreal = %d np = %d delta= %d\n", sw, elf, erf1, Jreal, np, delta);*/
    outdata = (double *) calloc(np +
((delta * (Jreal + Jreal1 + Jreal2 + Jreal3)) - (Jreal1 + Jreal2 +
Jreal3)), sizeof(double));
    NEWCONVOL(Jreal, Jreal1, Jreal2,
Jreal3, &sum, 2, outdata);
    fprintf(sumfile,
"%%.3f\t%.3f\t%.3f\t%.3f\t%.4e\n", Jreal * sw / np, Jreal1 * sw / np,
Jreal2 * sw / np, Jreal3 * sw / np, sum);
    if (sump < suma && sump < sum)
    {
        Jminima[k] = (Jreal1 - step) *
sw / np;
        minimo[k] = sump;
        steps[k] = j;
        ++k;

        printf("%d\t%d\t%d\t%d\t%.2f\t%.2f\t%.2f\t%.2f\t%.2f\n", v, z, j,
i, (Jreal) * sw / np, (Jreal1) * sw / np, (Jreal2) * sw / np, (Jreal3/* -
step*/) * sw / np, sump);

        fprintf(Js, "%d\t%d\t%d\t%d\t%.2f\t%.2f\t%.2f\t%.2f\t%.2f\n", v,
z, j, i, (Jreal) * sw / np, (Jreal1) * sw / np, (Jreal2) * sw / np,
(Jreal3/* - step*/) * sw / np, sump);
    }
    suma = sump;
    sump = sum;

```

```

        free(delta4);
        free(conv);
        free(outdata);
    }
    free(delta3);
    //free(outdata);
}
free(delta2);
}
free(delta1);
}
fclose(Js);
fclose(sumfile);

/*Calculates the global minimum*/
/*****/
min = minimo[0];
Jminil = Jminima[0];
for (i = 1; i < k; i++) {
    if (minimo[i] < min) {
        min = minimo[i];
        Jminil = Jminima[i];
    }
}

/*Reads the value of J that will be used in the deconvolution
process*/
printf("\nThe global minimum is J*= %.2f\n", Jminil);
printf("*** Enter the value of J1* and J2* you want to work
with:\n");
scanf("%f %f %f %f", &Jminil, &Jmini2, &Jmini3, &Jmini4/*,
&Jmini5*/);

/*Starts the deconvolution process*/

Jreal = Jminil * np / sw;
Jreal1 = Jmini2 * np / sw;
Jreal2 = Jmini3 * np / sw;
Jreal3 = Jmini4 * np / sw;
/*Jreal4 = Jmini5 * np / sw;*/
printf("With J = %.2f Hz = to %d points,I will double the
signal %d times.\n", Jminil, Jreal, delta);
//printf("Jreal = %d\n", Jreal);
delta1 = (int *) calloc((int)(delta * Jreal), sizeof(int));
delta2 = (int *) calloc((int)(delta * Jreal1), sizeof(int));
delta3 = (int *) calloc((int)(delta * Jreal2), sizeof(int));
delta4 = (int *) calloc((int)(delta * Jreal3), sizeof(int));
/*delta5 = (int *) calloc((int)(delta * Jreal4),
sizeof(int));*/
DELTAS(delta, 0, par, delta1, Jreal);
DELTAS(delta, 0, par, delta2, Jreal1);
DELTAS(delta, 0, par, delta3, Jreal2);
DELTAS(delta, 0, par, delta4, Jreal3);
/*DELTAS(delta, 0, par, delta5, Jreal4);*/
conv = (int *) calloc(((delta * (Jreal + Jreal1 + Jreal2 +
Jreal3 /*+ Jreal4*/)) - (Jreal + Jreal1 + Jreal2 + Jreal3 /*+ Jreal4*/) +
1), sizeof(int));
//conv = (int *) calloc(((10 * delta ) * jsteps * step),
sizeof(int));

```

```

        NEWCONVOL3(Jreal, Jreal1, Jreal2, Jreal3, /* Jreal4, */ delta1,
delta2, delta3, delta4, /* delta5, */ 2, conv);
        outdata = (double *) calloc(/*2*2*/np + ((delta * (Jreal +
Jreal1 + Jreal2 + Jreal3 /*+ Jreal4*/)) - (Jreal + Jreal1 + Jreal2 +
Jreal3 /*+ Jreal4*/))/* - Jreal1/*(nciclos + 1) - nciclos - 1) * jsteps
* step) * jsteps*step*/, sizeof(double));
        //outdata = (double *) calloc(2*2*(np + (delta* (nciclos + 1)
- nciclos - 1) * jsteps) * jsteps, sizeof(double));
        NEWCONVOL(Jreal, Jreal1, Jreal2, Jreal3, /* Jreal4, */ &sum, 2,
outdata);

        free(delta1);
        free(delta2);
        free(delta3);
        free(delta4);
        /*free(delta5);*/
        free(conv);
        inicio = 0;
        final = np + ((delta /*(nciclos + 1) - nciclos - 1)*/ *
(Jreal + Jreal1 + Jreal2 + Jreal3 /*+ Jreal4*/)) - (Jreal + Jreal1 +
Jreal2 + Jreal3 /*+ Jreal4*/ - 1 );
        rango = final / 2;
        swd = sw + ((delta * ((Jreal + Jreal1 + Jreal2 + Jreal3 /*+
Jreal4*/)) * sw / np)) - ((Jreal + Jreal1 + Jreal2 + Jreal3 /*+ Jreal4*/
* sw / np));
        printf("%f\n", swd);
        /*Writes "doblados", which is the whole deconvoluted
multiplet*/

        ESCRIBEFREC(outdata, doblado, final, swd, inicio, final,
rango);

        //printf("banderal");
        /*Writes "desdos" which is only the efectively
deconvoluted signal at centre the signals at the extremes are removed*/

        lff -= ((Jreal + Jreal1 + Jreal2 + Jreal3 /*+ Jreal4*/))/*(
nciclos + 1)*/ * swd / final / 2;
        rff += ((Jreal + Jreal1 + Jreal2 + Jreal3 /*+ Jreal4*/))/*(
nciclos + 1)*/ * swd / final / 2;
        swn = rff - lff;
        inicio = (final / 2) - (np / 2) + ((Jreal + Jreal1 + Jreal2 +
Jreal3 /*+ Jreal4*/ / 2);
        final = (final / 2) + (np / 2) - ((Jreal + Jreal1 + Jreal2 +
Jreal3 /*+ Jreal4*/ / 2);
        rango = (final - inicio) / 2;
        /*lff -= ((Jreal + Jreal1 + Jreal2 + Jreal3 + Jreal4)/
(nciclos + 1)) * swd / final / 2;
        rff += ((Jreal + Jreal1 + Jreal2 + Jreal3 + Jreal4)/ (nciclos
+ 1)) * swd / final / 2;
        swn = rff - lff;*/
        ESCRIBEFREC(outdata, desdo, final - inicio /*- ((Jreal +
Jreal1 + Jreal2)/*(nciclos + 1)/*)*/, /* ((sw - ((Jreal + Jreal1 +
Jreal2) * sw)) / np)*/ swn, inicio, final, rango);

        /*Writes sendes, which is the same signal as "desdos"
but with an xeasy's * *.slc format ("senal" format)*/

        if (count > 1)
        {
                lpp = lff * sfrq;
                rpp = rff * sfrq;
        }

```

```

else
{
    rff = (-1) * sw / 2;
    lff = sw / 2;
    lpp = lff / 300;
    rpp = rff / 300;
}
    ESCRIBEDATOS(outdata, sendes, final - inicio, inicio, final,
lpp, rpp, lff, rff);
    printf("\nFiles senals, sums, desdos, doblados and sendes
have been created.\nI have successfully finished.\n");

    fclose(sendes);
    fclose(doblado);
    /*****
    *****/
    /*Determinacion del ancho a la mitad del multiplete
despues de realizar la operacion de convolucion*/

    /*xd = (float *) calloc(np, sizeof(float));
np = final - inicio;
for (i = 1; i < np; i++)
    fscanf(desdo, "%f\t%lf\n", &xd[i], &indata[i] );
MAXIMO(indata, np, &max, &ax);
mitad = indata[ax] / 2.0;
MITADPICO(desdo, np, mitad, &mit);
fclose(desdo);
printf("\nAncho a la mitad del pico actual= %f\n",mit);

    free(steps);
    free(xd);
    free(countchar);

    */
    free(Jminima);
    free(minimo);
    free(outdata);
    free(indata);
    printf("contador %d numero de puntos %d sw = %f y ancho de
%f\n", count, Np, sw, A);
    strcpy(nolvido, "datos");
    strncat(nolvido, countchar, 1);
    olvido = fopen(nolvido, "w");
    fprintf(olvido, "Ancho de senal %5.2f\nNumero de puntos
%d\nVentana espectral %5.2f\nMultiplete de Ji = %f %f %f %f %f %f %f
%f\n", A, np, sw, J[0], J[1], J[2], J[3], J[4], J[5], J[6], J[7]);
    fprintf(olvido, "Deltas = %d, ciclos = %d, funcion simetrica
%c\n", nde, nciclos, c);
    fclose(olvido);
    while ((respuesta != 121) && (respuesta != 110))
    {
        printf("Deseas realizar el proceso de deconvolucion
nuevamente (y/n)\n");
        scanf("%s", &respuesta);
        if (respuesta == 110)
            exit(0);
    }
    respuesta = 0;
    A += 0.2;
    count++;
}

```