



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

Aislamiento y elucidación estructural de los glicósidos triterpénicos de *Stenocereus Zopilotensis* Arreola-Nava & Terrazas

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
P R E S E N T A:
Erick Gabriel Lascarez Alcantara



DIRECTOR DE TESIS: Dr. Mariano Martínez Vázquez
ASESOR DE TESIS: M. en C. Francisco Oscar Guadarrama Morales

MÉXICO, D. F. NOVIEMBRE DE 2011



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.

AGRADECIMIENTOS

A mi director de tesis, DR. Mariano Martínez Vázquez por la oportunidad de ser parte de su grupo de trabajo y el apoyo incondicional para realizar este trabajo.

A los integrantes del laboratorio 1-4 del Instituto de Química por todas las enseñanzas, el apoyo y por todas las atenciones.

A mi Asesor de tesis M. en C. Francisco Oscar Guadarrama Morales, por su orientación en el presente trabajo.

A los miembros del jurado: M. en C. A. Lourdes Castillo Granada, Q.F.B. Martha Trinidad J. Oliveros García y M. en C. Rodolfo Carreón Sánchez. A todos, les agradezco por sus valiosos comentarios y sugerencias.

Al personal técnico del Instituto de Química.

DEDICATORIAS

A Dios, por ayudarme a terminar este proyecto, gracias por darme la fuerza y el coraje para hacer este proyecto realidad, por estar conmigo en cada momento de mi vida. Por darme tanto sin merecerlo.

A mi hermano Ismael (*In memoriam*), que sin duda me has cuidado y apoyado desde el cielo en cada momento de mi vida, sabes que vives en mi corazón y mente. Te extraño.

A mi madre Sofía, que en todo momento, buscó lo mejor para mí y me hizo una persona con valores, principios y sobre todo me enseñó a disfrutar y amar a la vida. Serás siempre mi inspiración para alcanzar mis metas, por enseñarme que todo se aprende y que todo esfuerzo es al final recompensado, Gracias por procurarme tanto.

A mi padre Gaudencio, por darme la estabilidad económica y el apoyo en todo momento, para poder llegar hasta este logro, Gracias por forjar mi carácter, por entender que nunca hay que darse por vencido.

A mis hermanos Jaqueline, Cristian y Susana, con mucho cariño, que definitivamente sin ustedes no hubiera podido efectuar la realización de mis sueños.

A mis sobrinas Valentina y Natalia que sin duda han venido a este mundo a llenar mi vida de alegría y cariño.

A mis amigos (as) y personas importantes en mi vida, por ser increíbles y con quienes he compartido muchos momentos que siempre llevaré en mi corazón. Ustedes han enriquecido mi vida con su cariño y alegría. Gracias por ser personas tan valiosas en este mundo y gracias por pertenecer al mío.

Al Dr. Mariano, por ser un amigo y apoyarme incondicionalmente, tanto en lo profesional como en lo persona; por creer en mí. Gracias.

A todos los integrantes de Control Químico en Sandoz, por su apoyo.

A tí, por tu apoyo incondicional.

A toda mi familia.

Contenido

	Página
Índice de figuras.....	v
Índice de tablas.....	viii
Resumen.....	ix
I. Marco teórico.....	1
1. Introducción.....	2
2. Plantas Medicinales.....	4
2.1 Definición.....	4
2.2 Historia.....	5
2.3 Importancia.....	6
3. Metabolitos secundarios.....	7
3.1 Definición.....	7
3.2 Función.....	11
3.3 Importancia.....	12
4. Fitoquímica.....	13
4.1 Objetivo de la fitoquímica.....	13
4.2 Principios activos de las plantas.....	13
4.3 Fitoquímica en Mexico.....	16
5. Técnicas de extracción y separación.....	17
5.1 Extracción.....	17
5.2 Separación.....	18

5.3	Identificación.....	19
6.	Obtención de derivados.....	19
6.1	Derivados de alcoholes.....	20
6.1.1	Formación de ésteres.....	20
6.1.2	Hidrólisis de ésteres.....	21
6.1.3	Hidrólisis de glicósidos del carbono anomérico.....	22
7.	Las Cactáceas.....	22
7.1	Generalidades de las Cactáceas.....	22
7.2	Distribución de las Cactáceas en México.....	23
7.3	Química de las Cactáceas.....	24
8.	Generalidades del género <i>Stenocereus</i>	26
8.1	Generalidades de <i>Stenocereus zopilotensis</i> y su relación fitogenética con otras especies de la misma familia.....	27
8.2	Triterpenos aislados del género <i>Stenocereus</i>	29
9.	Generalidades de los terpenos.....	31
9.1	Definición, biosíntesis y ejemplos.....	31
II.Justificación del estudio.....		35
III.Hipótesis y objetivos.....		37
IV.Parte experimental.....		39
V.Resultados y discusión.....		48
VI.Conclusiones.....		79
REFERENCIAS.....		81
Anexos.....		89

Índice de Figuras

- Figura 1. Diagrama de procedimiento general para la obtención de principios activos a partir de plantas medicinales.
- Figura 2. Organización Mundial de la Salud (OMS)⁵.
- Figura 3. Rutas metabólicas secundarias⁶.
- Figura 4. Diagrama que muestra la preparación de los extractos de plantas medicinales.
- Figura 5. Esquema de reacción de formación de ésteres.
- Figura 6. Esquema de reacción de Hidrólisis.
- Figura 7. Estados en México donde se encuentran distribuidas las Cactáceas¹⁸.
- Figura 8. Esquema de compuestos triterpénicos aislados de la familia *Cactaceae*^{22, 27-31}.
- Figura 9. Compuestos aislados del género *Stenocereus*²⁶⁻³¹.
- Figura 10. Esquema de triterpenos aislados de *M. geometrizzans*.
- Figura 11. Esquema biosíntesis de terpenos
- Figura 12. Esquema de algunos derivados del Ursano y Lupano
- Figura 15. Espectro IR de SZ3HF4 adquirido en KBr.
- Figura 16. Espectro de RMN¹ H de SZ3HF4 (500 MHz, DMSO).
- Figura 17. Espectro de ¹³C de SZ3HF4, 500 MHz, en DMSO.
- Figura 18. Espectro del experimento DEPT de SZ3HF4, (500 MHz en DMSO).
- Figura 19. Espectro de masas de SZ3HF4 (IE, 70 eV).
- Figura 20. Fragmentos principales de SZ3HF4 en el espectro de masas
- Figura 21. Esquema de la reacción de tipo retro Diels-Alder
- Figura 22. Esquema del mecanismo de fragmentación para el ácido oleanólico.
- Figura 23. Estructura del ácido oleanólico (SZ3HF4)²¹.
- Figura 24. Espectros del experimento HSQC de SZ3HF4, 500 MHz en DMSO.
- Figura 25. Espectro IR de SZ3HF12 en pastilla de KBr
- Figura 26. Espectro de RMN¹ H de SZ3HF12, 500 MHz, en DMSO.
- Figura 27. Espectro de RMN¹ H de SZ3HF12, 500 MHz, en DMSO + D₂O.
- Figura 28. Espectro de RMN ¹³C de SZ3HF12, 500 MHz, en DMSO + D₂O.
- Figura 29. Espectro del experimento DEPT de SZ3HF12

- Figura 30. Espectro de masas SZ3HF12 obtenido por IE (70 eV).
- Figura 31. Mecanismo de fragmentación del glicósido del Ác. Oleanólico.
- Figura 32. Espectros del experimento HSQC de SZ3HF12, 500 MHz en DMSO
- Figura 33. Espectro HMBC de SZ3HF12
- Figura 34. Correlaciones obtenidas en el espectro HMBC y estructura del glicósido del ácido oleanólico (SZ3HF12).
- Figura 35. Espectro de masas de SZPA215 (FABEM).
- Figura 36. Espectro de RMN¹³C de SZPA215 (75.4 MHz, C₅D₅N).
- Figura 37. Experimento DEPT (SZPA215).
- Figura 38. Estructura del ácido oleanólico y los residuos de azúcar identificados.
- Figura 39. Experimento HETCOR de SZPA215.
- Figura 40. Experimento HMBC de SZPA215.
- Figura 41. Algunas interacciones observadas en los espectros HMBC de SZPA215.
- Figura 42. Estructuras 1 y 2 de los glicósidos aislados de *S. Zopilotensis*.
- Figura 43. Cromatografía en capa fina (izquierda) y papel (derecha).
- Figura 44. Cromatografía en columna
- Figura 45. Esquema Cromatografía de gases².
- Figura 46. Esquema de un aparato de CLAR¹².
- Figura 47. Detectores más comúnmente usados en CLAR.
- Figura 48. Las polaridades de los solutos en fase reversa son A > B > C.
- Figura 49. Esquemas de reacciones en cromatografía con detector conductimétrico y supresión química.
- Figura 50. Esquemización del paso de una muestra por los principales componentes de un instrumento de espectroscopia de masas.
- Figura 51. Diagrama esquemático de un analizador de masas de sector magnético equivalente a los utilizados en espectrometría de masas.
- Figura 52. Diagrama de un espectrómetro de masa cuadrupolar, que es uno de los tipos de analizadores de masa más utilizados en espectrometría de masas dado su bajo precio y robustez.

Figura 53. Aspecto clásico de un espectrograma de masas, en el que se señalan su pico base

y su ión molecular más importante.

Figura 54. Espectro IR del estireno ^{36 y 37}.

Figura 55. Diagrama general de un espectrofotómetro IR.

Figura 56. Espectro ultra-violeta de la ferredoxina³⁹.

Figura 57. Esquema de un espectrómetro de RMN.

Figura 58. Espectro de RMN ¹H de la Apigenina⁴⁰.

Figura 59. Gráfica de contorno de un espectro COSY del ácido glutámico⁴⁰.

Figura 60. Espectro HSQC de la Apigenina (relación de señales en RMN entre ¹³C y ¹H)⁴⁰.

Figura 61. Espectro DEPT del Ipsenol

Figura 63. Estructura espacial y estereoquímica de isoargentatina A ⁴⁴.

Índice de tablas.

- Tabla 1. Estructuras de algunos alcaloides importantes¹³
- Tabla 2. Actividades fisiológicas de algunos alcaloides¹³.
- Tabla 3. Fotos de *S. zopilotensis*⁴⁵ y *S. pruinosus*
- Tabla 4. Proporción de disolventes y fracciones obtenidas de la Cromatografía en Columna
- Tabla 5. Peso de las fracciones obtenidas en la reacción de acetilación.
- Tabla 6. Proporción de disolventes y fracciones obtenidas de la Cromatografía en Columna de la reacción de hidrólisis de SZPA239 de la fracción disuelta en AcOEt
- Tabla 7. Características de las fracciones obtenidas en la reacción de acetilación.
- Tabla 8. Correlaciones obtenidas en el experimento HSQC de SZ3HF4
- Tabla 9. Comparación de los desplazamientos químicos de RMN ¹H y RMN ¹³C de SZ3HF4 y el ácido oleanólico⁵⁹ en DMSO a 500 MHz (*Datos obtenidos de la literatura).
- Tabla 10. Correlaciones obtenidas en el experimento HSQC de SZ3HF12
- Tabla 11. Desplazamientos químicos de RMN ¹H y RMN ¹³C asignados al compuesto SZ3HF12 comparados con SZ3HF4* en DMSO a 500 MHz.
- Tabla 12. Absorciones de algunos grupos funcionales en IR.

Resumen

En este trabajo se realizó el aislamiento del ácido oleanólico y un glicósido del mismo, donde el azúcar que forma el derivado es el éster metílico del ácido glucorónico de un conjunto de fracciones (239 a la 245) las cuales se obtuvieron de una columna eluída con metanol; así mismo, con los datos espectroscópicos de estos dos compuestos se facilitó la elucidación estructural del éster 3-O- β -glucoronil-28-(1,4-glucopiranosil) ramnosil oleanato. Otro glicósido del ácido oleanólico, el cual se obtuvo en la fracción 215 de la misma columna de las partes aéreas de *Stenocereus zopilotensis*. Esta especie fue reclasificada taxonómicamente en el año 2004, debido a esta situación no existen estudios fitoquímicos reportados en la literatura.

El procedimiento consistió en realizar reacciones de acetilación e hidrólisis ácida a microescala, ya que se tenían 2.3 g de sustancia de trabajo, sin embargo solo la reacción de hidrólisis permitió la separación por cromatografía en columna de los dos compuestos obtenidos.

La elucidación estructural se realizó una vez que se obtuvieron las sustancias puras, se procedió a determinar sus propiedades físicas —punto de fusión (p.f.), rotación óptica, factor de retención (R_f) por sus siglas en inglés, entre otras—, después se realizaron las diferentes pruebas para conocer las propiedades espectroscópicas, tales como, UV, IR, RMN ^1H y RMN ^{13}C con sus correspondientes experimentos bidimensionales —COSY, NOESY, NOE, HMBC, HMQC— además se determinó su peso por medio de espectrometría de masas (EM) con la técnica de impacto electrónico e ionización química de baja y alta resolución.

Por último se compararon los resultados que arrojaron los espectros y sus propiedades con la literatura llegando a la elucidación total de las estructuras del ácido oleanólico y dos glicósidos del mismo.

Capítulo I

Marco teórico

1. Introducción

La diversidad de climas que posee México ha propiciado el nacimiento y distribución de un gran número de especies vegetales. Así en el norte del país, el cual se caracteriza por climas desérticos y semidesérticos se ubican especies adaptadas a la falta de agua, como por ejemplo, las especies de la familia de las cactáceas. En el centro del país, con clima templado se localizan, entre otras, varias especies de la familia de las compuestas y en el sureste, con clima subtropical y tropical, se desarrollan especies como las anonas y las ipomeas entre otras.

La riqueza de la flora en México se ubica en aproximadamente 26,000 especies, lo cual lo hace un país rico en recursos vegetales. Esta abundancia de especies ha permitido el florecimiento de una medicina herbolaria muy importante, la cual se ha practicado desde tiempos prehispánicos. Sin embargo, el conocimiento sobre este recurso es muy deficiente y fragmentado, aun en sus aspectos básicos como serían la descripción botánica y su relativa abundancia, así como la falta de estudios sistemáticos acerca de la composición química, toxicidad y farmacología entre otros.

En general, las especies vegetales han sido utilizadas por siglos tanto como alimento así como para la procuración de la salud¹. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) aproximadamente el 80 % de la población mundial depende principalmente de la medicina tradicional². Tradicionalmente, los habitantes de los países llamados del tercer mundo o pobres eran los principales consumidores de las plantas medicinales, sin embargo, el uso de las plantas medicinales, por los llamados países desarrollados o ricos, se ha incrementado en los últimos años. Las más usadas son plantas con propiedades hipolipídicas, antiplaquetarias, antitumorales o que fortalezcan el sistema inmunológico. Propiedades que pueden ser útiles para prevenir enfermedades cardiovasculares y cáncer, típicos padecimientos de sociedades maduras o viejas³.

Es conocido que las propiedades terapéuticas de las plantas medicinales se deben a los componentes químicos que ellas mismas sintetizan. Dentro de la gran variedad de compuestos químicos que producen las especies vegetales destacan los llamados metabolitos secundarios, los cuales son responsables de las propiedades biológicas que se les atribuyen.

Bajo este contexto es clara la necesidad no solo de obtener principios activos puros, sino de conocer su estructura ya que ésta nos permitirá conocer su comportamiento químico. De aquí que los profesionales de la química juegan un papel central, ya que al ser esta ciencia la disciplina que estudia la estructura de la materia y sus transformaciones, resulta evidente que tales conocimientos son esenciales para el desarrollo de proyectos donde se involucre el estudio de metabolitos secundarios.

El estudio químico de especies endémicas de nuestro país, han proporcionado una serie de sustancias características del taxón bajo estudio, por ejemplo de algunas especies de la familia de las Cactáceas, se han aislado principalmente triterpenos. Estos metabolitos secundarios (MS) han mostrado poseer diversas actividades biológicas, entre las cuales se pueden mencionar su actividad antiviral contra el VIH, así como sus propiedades anticancerosas y antimaláricas entre otras. De ahí la importancia del estudio y la obtención de estos compuestos a partir de sus fuentes naturales.

Por lo anterior, se enmarca el estudio de *Stenocereus zopilotensis*, especie perteneciente a la familia de las Cactáceas. Esta especie es de reciente descripción botánica y que no se ha estudiado desde el punto de vista químico. Por todo lo anterior, se decidió realizar el estudio químico del extracto metanólico de las partes aéreas de ésta especie.

2. Plantas Medicinales

2.1 Definición

Cada zona geográfica del mundo tiene una vegetación local con la que se obtienen diferentes preparados con fines curativos. A principios del siglo pasado el desarrollo de la química y el descubrimiento de procesos de síntesis orgánica permitieron la obtención de varios medicamentos. Sin embargo, para la fabricación de muchos de ellos se utilizaron los principios activos de determinadas plantas medicinales⁴. La Organización Mundial de la Salud definió, en un congreso realizado en China en 1980, a la planta medicinal como “todo vegetal que contiene en uno o más de sus órganos, sustancias que pueden ser utilizadas con fines terapéuticos o preventivos o que son precursores de semisíntesis química”².

La misma organización definió a la medicina tradicional como “las prácticas, manejo, conocimientos y creencias de la salud que incorpora medicamentos basados en plantas, animales y minerales; es la terapia espiritual, técnicas manuales y ejercicios aplicados en combinación o solas para tratar, diagnosticar y prevenir una enfermedad”⁵.

Tradicionalmente, las plantas medicinales se usan en forma de infusión, de extracto, aceite esencial o resina, la mayoría de estas formas se administran como mezclas complejas de un gran número de constituyentes.

Es recomendable la obtención de los principios activos de estos preparados vegetales. Hoy en día se conocen diferentes métodos para la obtención de principios activos a partir de las plantas⁶ (Figura 1).

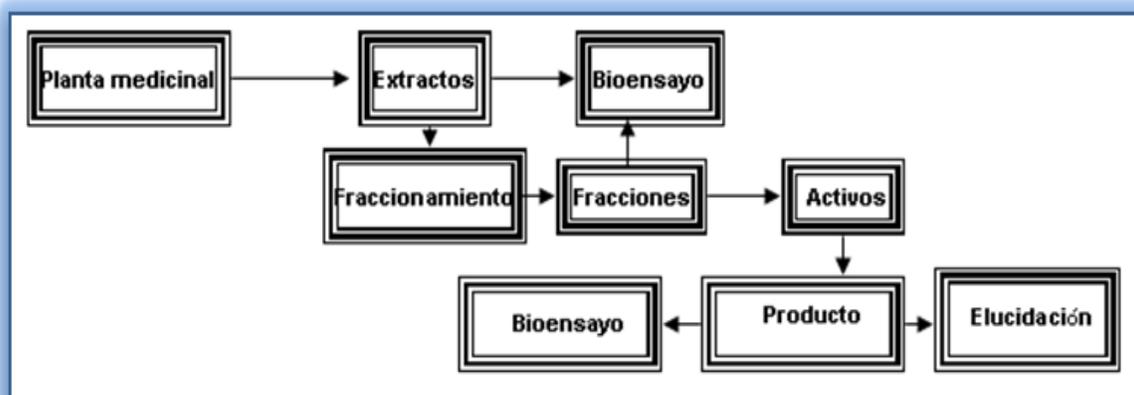


Figura 1. Diagrama de procedimiento general para la obtención de principios activos a partir de plantas medicinales.

El estudio de las plantas medicinales no sólo se limita al conocimiento de su actividad biológica, sino que también se enfoca en la purificación y la elucidación estructural de los principios responsables de la actividad biológica⁶.

2.1 Historia

A través del tiempo, las diferentes culturas ha creado todo un conocimiento de remedios vegetales que ha constituido la base de la medicina moderna⁴. Una de las referencias más antiguas que se conocen del uso de plantas medicinales se refiere a la civilización China, donde ya se utilizaba la herbolaria como remedio para diferentes enfermedades. Civilizaciones posteriores emplearon numerosas drogas animales y vegetales, bien para embalsamar a sus muertos o bien para curar enfermedades. Posteriormente, en Grecia, surgió el padre de la medicina, Hipócrates quien fue un gran conocedor de los remedios naturales de su tiempo. En la época romana se escribe la obra: “De Materia Médica”, la cual incluye el estudio de 600 plantas medicinales, de las cuales se describen sus aplicaciones y forma de administración⁶. Durante la Edad Media el estudio de las plantas medicinales estaba en manos de algunos monjes, que en sus monasterios, plantaban y experimentaban sobre las especies descritas en los textos clásicos. En el continente Americano, los conocimientos de las civilizaciones prehispánicas, acerca de la flora medicinal, estuvieron en peligro de perderse en la época de la

conquista por el rápido descenso en la civilización indígena, afortunadamente estos conocimientos quedaron plasmados en varios códigos⁷.

2.3 Importancia

Más de un tercio de la población de los países en vías de desarrollo carece de medicamentos esenciales para mantener la salud. Ante este panorama, la OMS ha declarado que “la provisión de terapias tradicionales que sean seguras y efectivas puede ser una herramienta exitosa para incrementar el acceso a medidas de salud para los que carecen de ellas”⁵.

Por ejemplo, en algunos países de África, Asia y América Latina se utiliza la medicina tradicional para cubrir las necesidades básicas de salud. Aún más, la medicina tradicional ha mantenido su popularidad en todos los sectores del mundo moderno y su uso se ha esparcido rápidamente a países industrializados. El uso creciente de la medicina tradicional es evidente en las diferentes estadísticas recolectadas por la Organización Mundial de la Salud en el año 2000⁵.

Adicionalmente, entre los años 1995 al 2000 el número de médicos que se han especializado en medicina a base de remedios naturales se ha duplicado hasta llegar a 10800⁵.

En Estados Unidos, de acuerdo a la Comisión para Medicina Alternativa y Complementaria de este país, 158 millones de personas adultas usan medicina complementaria con un gasto de 17 mil millones de dólares en remedios tradicionales en el año 2000⁵ Figura 2.



Figura 2 .Organización Mundial de la Salud (OMS)⁵.

3. Metabolitos secundarios

3.1 Definición

Las plantas sintetizan dos tipos de metabolitos: los básicos y los secundarios. En 1891 Kössel Stahls⁸ investigando sobre la bioquímica de las plantas, sugirió una distinción entre el metabolismo básico y secundario. Definió, el metabolismo básico a los procesos anabólicos y catabólicos requeridos para la respiración, la asimilación de nutrientes y el desarrollo o crecimiento. En contraste el metabolismo secundario se refiere a los componentes presentes en células especializadas que aparentemente no son necesarias para la supervivencia de la célula pero son requeridos para la supervivencia de las plantas en su ambiente⁸.

Las funciones más relevantes que puedan desempeñar los metabolitos secundarios son⁹:

1. Prevenir los ataques de insectos herbívoros así como también de patógenos.

2. Atracción de polinizadores por medio de las coloraciones de las flores o también por su aroma floral.

Actualmente se conocen cientos de miles de metabolitos secundarios, pero tal vez existan millones, y lo que es importante recalcar, es que se siguen biosintetizando nuevos esqueletos hidrocarbonados, los cuales originaran varios metabolitos novedosos. Esta dinámica se establece gracias a las interacciones bióticas dentro y entre especies a la continua evolución de los organismos⁹.

Los metabolitos secundarios se caracterizan a grandes rasgos, por⁹:

1. Una gran heterogeneidad de su estructura química.
2. Una distribución restringida.
3. El control estricto de su biosíntesis, por medio de la regulación de la cantidad de enzimas involucradas y de la actividad de estas.

Los principios activos de las plantas medicinales son generalmente metabolitos secundarios. Por lo tanto la síntesis de estos productos en las especies vegetales depende de la etapa vegetativa de la especie. La producción de los metabolitos secundarios en las plantas medicinales también depende de varios factores abióticos como; la temperatura, la humedad, la radiación solar en sus dos vertientes, luz y calor, así como el régimen de vientos y la química del suelo. La competencia por nutrientes con otros organismos es otro factor que influye en la producción de metabolitos secundarios al igual que la protección de insectos y otros animales⁴. El metabolismo secundario también produce polímeros especiales como los taninos condensados, taninos hidrolizables, ligninas, resinas, cutina, suberina y ceras.

La mayor parte de los compuestos de interés terapéutico se sintetizan por alguna de las siguientes tres grandes ramas biosintéticas:

- 1) Rutas del ácido shikímico y de los poliacetatos conducentes a la síntesis de sustancias aromáticas.
- 2) Ruta del ácido mevalónico que da lugar a terpenoides.
- 3) Rutas del metabolismo del nitrógeno, principalmente aminoácidos, que llevan a la síntesis de alcaloides⁶ (Figura 3).

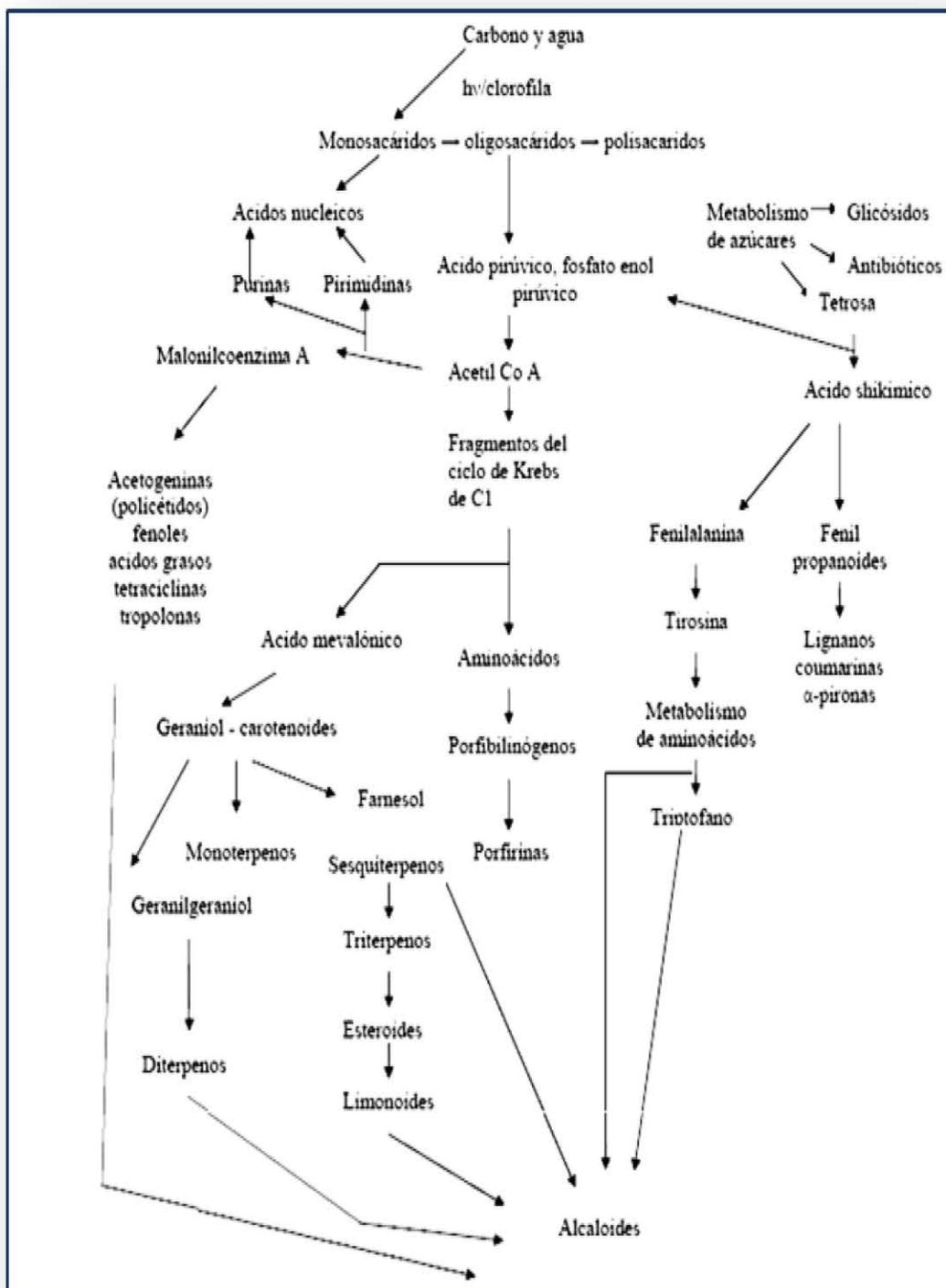


Figura 3. Rutas metabólicas secundarias⁶.

Varios de los metabolitos secundarios son tóxicos y son almacenados, en su mayoría, en vesículas específicas o en vacuolas. Varios estudios indican que esta función de almacenamiento tiene dos funciones; una es la desintoxicación de la planta y la otra es de reserva de energía, por ejemplo, de moléculas ricas en nitrógeno. Algunos metabolitos secundarios pueden ser reingresados al metabolismo primario¹⁰. Una de las características de los metabolitos secundarios es su distribución restringida. Algunos metabolitos son característicos de una sola especie y otros a grupos relacionados. La mayor parte de las veces se encuentran en una planta y un órgano específico de ésta, en un tipo de célula ó se genera en un periodo específico del desarrollo de la planta. Es importante especificar que la presencia de ciertos compuestos químicos en las plantas es una forma de adaptación a su medio, aunque esto no siempre es cierto como en el caso de los pigmentos de las flores¹⁰.

La estructura química de los metabolitos secundarios es mucho más compleja que los productos del metabolismo primario. Esto lo explica el hecho de que la mayoría son sintetizados a partir de aminoácidos o nucleótidos. La mayoría de los compuestos encontrados pertenecen a unas pocas familias de sustancias identificadas. Solo se pueden observar pequeñas modificaciones químicas como metilaciones, hidroxilaciones, intercalación con iones metálicos, etc. Esto conduce a un amplio espectro de sustancias biológicamente funcionales¹⁰.

3.2 Función

Muchos metabolitos secundarios tienen función de señalización, modulan la actividad de otras células, controlan la actividad metabólica y coordinan el desarrollo de toda la planta. Otras sustancias dan color a las flores para poder atraer polinizadores o proteger a la planta de ser consumida por animales.

Actualmente se conoce el papel desempeñado por algunos metabolitos secundarios por ejemplo se sabe que las antocianidinas participan en la coloración de las flores y los frutos mientras que algunos flavonoides están involucradas en la polinización para insectos y sirven como protectores frente a la radiación solar. Varios metabolitos secundarios tienen varias funciones dentro de la planta en los que podemos destacar a los taninos que tienen capacidad de precipitar proteínas, produciendo dificultades de digestión en los herbívoros.

En cuanto a los monoterpenoides, algunos son citotóxicos, inhiben la respiración y la germinación, propiedades que los hacen agentes alelopáticos. Adicionalmente, varios de ellos han sido descritos como agentes implicados en la defensa contra agentes fitopatógenos y finalmente, podemos citar a los fitosteroles, los cuales son elementos importantes en la estructura de las membranas, y a los cardenólidos que son protectores frente a la foto-oxidación⁶.

3.3 Importancia

Como se ha mencionado, existen varios ejemplos que ilustran la importancia de los metabolitos secundarios en la obtención de fármacos de primera línea. Entre estos podemos mencionar la aspirina, el glucósido del alcohol salicílico obtenido del sauce blanco (*Salix alba*) o el fármaco anticanceroso taxol, un diterpeno aislado del tejo del pacífico (*Taxus brevifolia*), entre otros. Por otro lado, durante los últimos 30 años el análisis de metabolitos secundarios ha progresado bastante. El uso de técnicas modernas como la cromatografía (en todas sus variantes), espectroscopías, espectrometrías, electroforesis, técnicas isotópicas y la enzimología, ha permitido elucidar tanto estructuras químicas exactas como las rutas biosintéticas más importantes¹¹.

4. Fitoquímica

4.1 Objetivo de la fitoquímica

La fitoquímica o la química de las plantas está enfocada a la biosíntesis, metabolismo, aislamiento, elucidación estructural, distribución y función biológica de los componentes químicos, sintetizados por medio del metabolismo secundario en las especies vegetales¹².

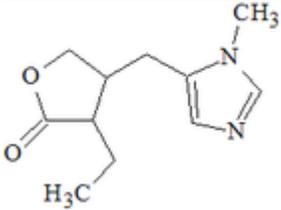
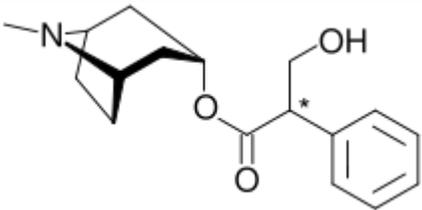
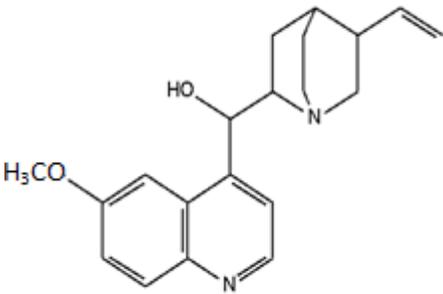
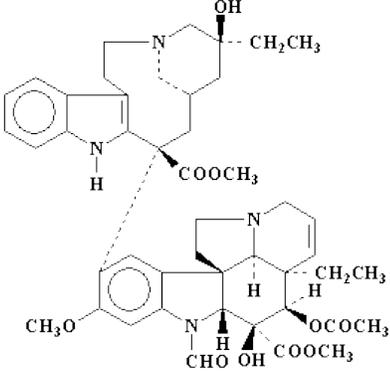
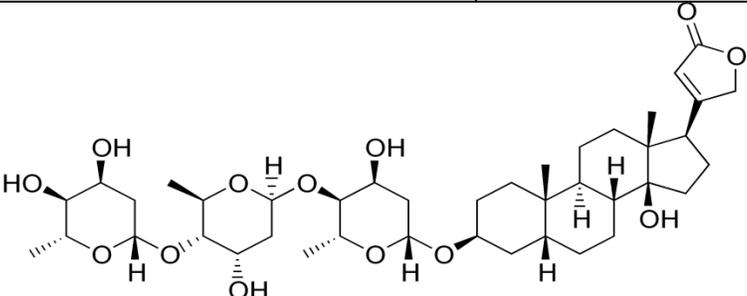
El interés por aislar y conocer las sustancias químicas de los vegetales ha sido uno de los quehaceres que han ocupado los químicos de todos los tiempos. La fitoquímica tiene múltiples aplicaciones en varias áreas del conocimiento, destacando entre ellas la obtención de principios activos de las plantas medicinales.

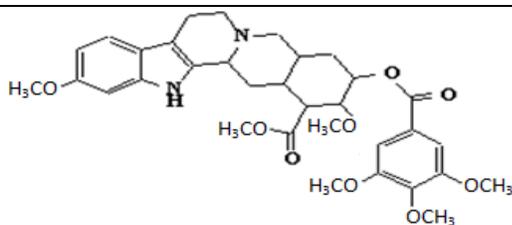
4.2 Principios activos de las plantas

El uso de plantas con fines medicinales, ha prevalecido durante miles de años y la medicina herbolaria ha sido la fuente de fármacos útiles.

Un gran número de productos terapéuticos han resultado del estudio científico de remedios tradicionalmente empleados por varias culturas. Ejemplo de ello son: pilocarpina [1], Atropina [2], Quinina [3], Vincristina [4], Digitoxina [5] y Reserpina [6]¹³ (Tabla 1).

Tabla 1. Estructuras de algunos alcaloides importantes¹³.

	
<p>Pilocarpina [1]</p>	<p>Atropina [2]</p>
	
<p>Quinina [3]</p>	<p>Vincristina [4]</p>
	
<p>Digitoxina [5]</p>	



Reserpina [6]

Tabla 2. Actividades fisiológicas de algunos alcaloides¹³.

ALCALOIDE	FUENTE NATURAL	ACCIÓN FISIOLÓGICA
Emetina	<i>Cephaelis ipecacuana</i>	Emético
Cocaína	<i>Erythroxylum coca</i>	Anestésico local
Atropina	<i>Atropa belladonna</i>	Antiespasmódico
Morfina	<i>Papaver somniferum</i>	Narístico
Yohimbina	<i>Pausnystalia yohimba</i>	Afrodisíaco
Reserpina	<i>Rauwolfia serpentina</i>	Tranquilizante
Quinina	<i>Cinchona officinalis</i>	Antimalárico
Vincristina	<i>Vinca rosea</i>	Anticanceroso

Por otro lado, la labor del etnobotánico coadyuva a el acercamiento del fitoquímico con los usuarios y practicantes de la medicina tradicional (yerberos, parteros, hueseros, médicos tradicionales, curanderos, etc.). Esto ha permitido abordar más atinadamente su investigación. Estudiar una planta usada en la

medicina tradicional ha conducido al aislamiento de sustancias con actividad biológica, tal es el caso del estudio de plantas con actividad antitumoral.

Los alcaloides son el principal tipo de metabolito secundario aislado de plantas medicinales, aunque también se ha obtenido una gama de estructuras entre las cuales se encuentran los terpenos, esteroides, flavonoides, cumarinas, quinonas, aminoácidos, naftalenos, lignanos, ácidos fenólicos, isocianatos, compuestos alifáticos, fenilpropanoides, cianoderivados, tiofenos y xantonas¹³.

4.3 Fitoquímica en México

La investigación fitoquímica en México se desarrolló a partir de la búsqueda de fuentes naturales ricas en esteroides o precursores de estos¹⁴, así mismo con el estudio de plantas tales como el *Helenium mexicanum* que es una planta amarga, estornutatoria y con propiedades insecticidas¹⁵ de la que se aislaron seis lactonas sesquiterpénicas a las que se les dio el nombre de mexicaninas¹⁶. A partir de este estudio y otros más, la investigación fitoquímica en México se caracterizó por su contribución en el estudio de las lactonas sesquiterpénicas, aislados principalmente de la familia de las compuestas¹⁷. Así mismo cabe señalar que a pesar de contar con la infraestructura instrumental y con investigadores de alta calidad, generalmente los estudios fitoquímicos se han realizado en forma independiente de los trabajos de actividad biológica¹⁷.

Sin embargo, la investigación de las plantas medicinales debe realizarse de manera interdisciplinaria, en donde deben concurrir la etnobotánica, la farmacología y la fitoquímica. Por lo que, una vez que se ha seleccionado la planta medicinal (según la etnobotánica), y se ha demostrado un efecto biológico positivo (según la farmacología), entonces se procederá a su aislamiento químico en base a el seguimiento de la actividad biológica, utilizando las técnicas de separación y los métodos de identificación¹⁶.

A continuación se describen algunos de los métodos más usuales para la extracción y separación de los metabolitos secundarios a partir de las especies vegetales.

5. Técnicas de extracción y separación

5.1 Extracción

Las técnicas de extracción más comunes, para el estudio de las plantas son: maceración, decocción, percolación, extracción ácido-base y la extracción sólido-líquido. Tales técnicas dependerán de la textura y del contenido de agua en el vegetal, por lo que primero es recomendable “inactivar” el tejido vegetal para prevenir oxidación enzimática o hidrólisis, en el caso de trabajar con material fresco (ej. hojas y flores), se realiza una extracción sólido-líquido utilizando alcohol en ebullición y se continua extrayendo con otros disolventes¹². Los disolventes empleados con mayor frecuencia son: hexano y/o éter de petróleo para separar los componentes de menor polaridad; cloroformo y/o benceno, para extraer componentes de polaridad intermedia; acetato de etilo y/o acetona, para los de polaridad mayor y etanol, metanol y/o agua para los más polares¹².

Para las plantas medicinales es recomendable preparar los extractos de la forma siguiente, sin embargo, otra metodología que se usa es la correspondiente a la Figura 4.

- 1.- Primero extraer con éter de petróleo o hexano.
- 2.- Extracción del residuo con metanol o etanol .
- 3.- Partición del extracto metanólico entre cloroformo y agua, y una extracción del extracto acuoso con 1-butanol¹³.

Por otro lado debe evitarse en lo posible el calentamiento al momento de preparar los extractos, para prevenir una posible descomposición de los principios activos.



Figura 4. Diagrama que muestra la preparación de los extractos de plantas medicinales.

5.2 Separación

Una vez que los extractos se han preparado, se someten a un proceso de identificación y separación utilizando una o la combinación de dos o más técnicas cromatográficas, de las cuales las más comunes son¹²:

1.- Para identificación:

- ❖ Cromatografía en papel (PC)
- ❖ Cromatografía en capa fina (CCF)
- ❖ Cromatografía gas-liquido (GLC)
- ❖ Cromatografía de líquidos de alta eficiencia ó resolución (CLAR)

2.- Para separación:

- ❖ Principalmente la cromatografía en columna.

Relacionando estas dos clasificaciones entre sí, sólo la cromatografía de líquidos es la que puede llevarse a cabo en columna o sobre superficies planas. Por otra parte, tanto la de gas como la de fluidos supercríticos están restringidas a los procedimientos en columna de tal manera que las paredes de la columna contienen la fase móvil.

5.3 Identificación

Después de los pasos mencionados anteriormente, se realiza la identificación de los compuestos obtenidos mediante la ayuda de diferentes técnicas: espectroscopía, espectrofotometría, cristalografía, etc.¹⁵ (Ver anexo II).

6. Obtención de derivados

Para la correcta elucidación estructural de los compuestos aislados, adicionalmente a los datos espectrales, es una práctica común la obtención de derivados. Generalmente se realizan transformaciones sencillas como la acetilación, hidrogenación e hidrólisis. A continuación se describen brevemente algunas de las reacciones utilizadas en este trabajo.

6.1 Derivados de alcoholes

6.1.1 Formación de ésteres

La reacción de acetilación es una reacción muy común y se realiza por adición de piridina hasta disolución de la muestra seguido por la adición de anhídrido acético.

En la figura 5 se puede observar la esterificación se realiza con un alcohol, en el primer paso del esquema de reacción se forma el acetato de piridonio que al hacerlo reaccionar con el alcohol se trans-esterifica con la parte del acetato, como subproductos se forman el ion acetato y el ion piridonio, lo cual por equilibrio finalmente obtenemos el producto esterificado, ácido acético y piridina.

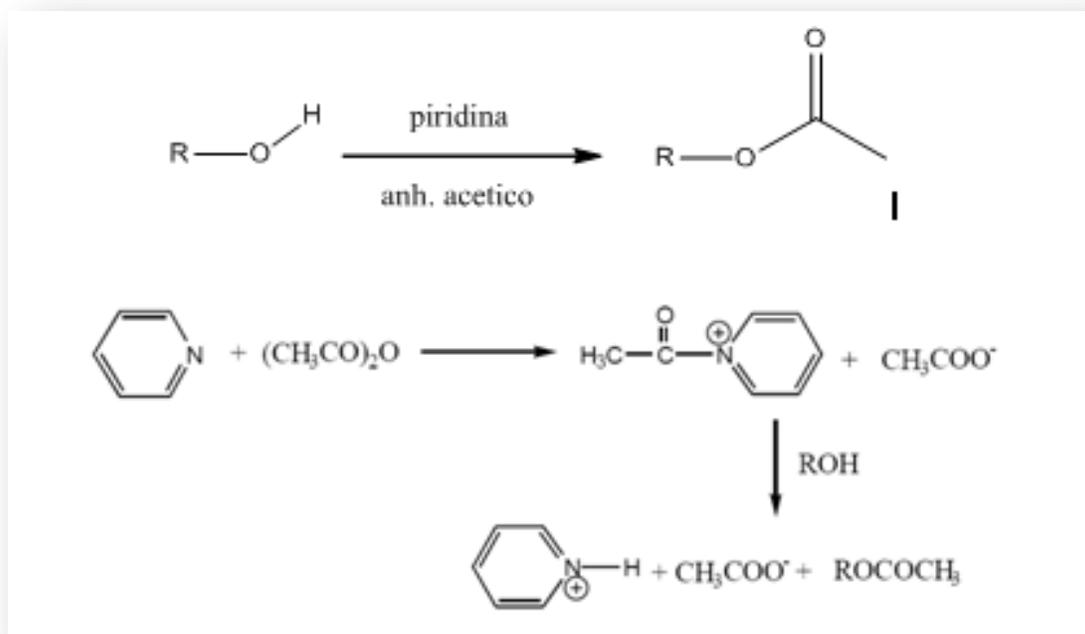


Figura 5. Esquema de reacción de formación de ésteres.

6.1.2 Hidrólisis de ésteres.

Una forma de simplificar la elucidación estructural de un nuevo metabolito secundario es someterlo a una reacción de hidrólisis. De esta forma los datos espectroscópicos de los productos obtenidos serán más fáciles de interpretar.

La hidrólisis se puede llevar a cabo en medio ácido o básico, para los ésteres hidrolizados en medio acuoso se obtienen ácidos carboxílicos y alcoholes (Figura 6). La hidrólisis básica recibe el nombre de saponificación y transforma ésteres en carboxilatos.

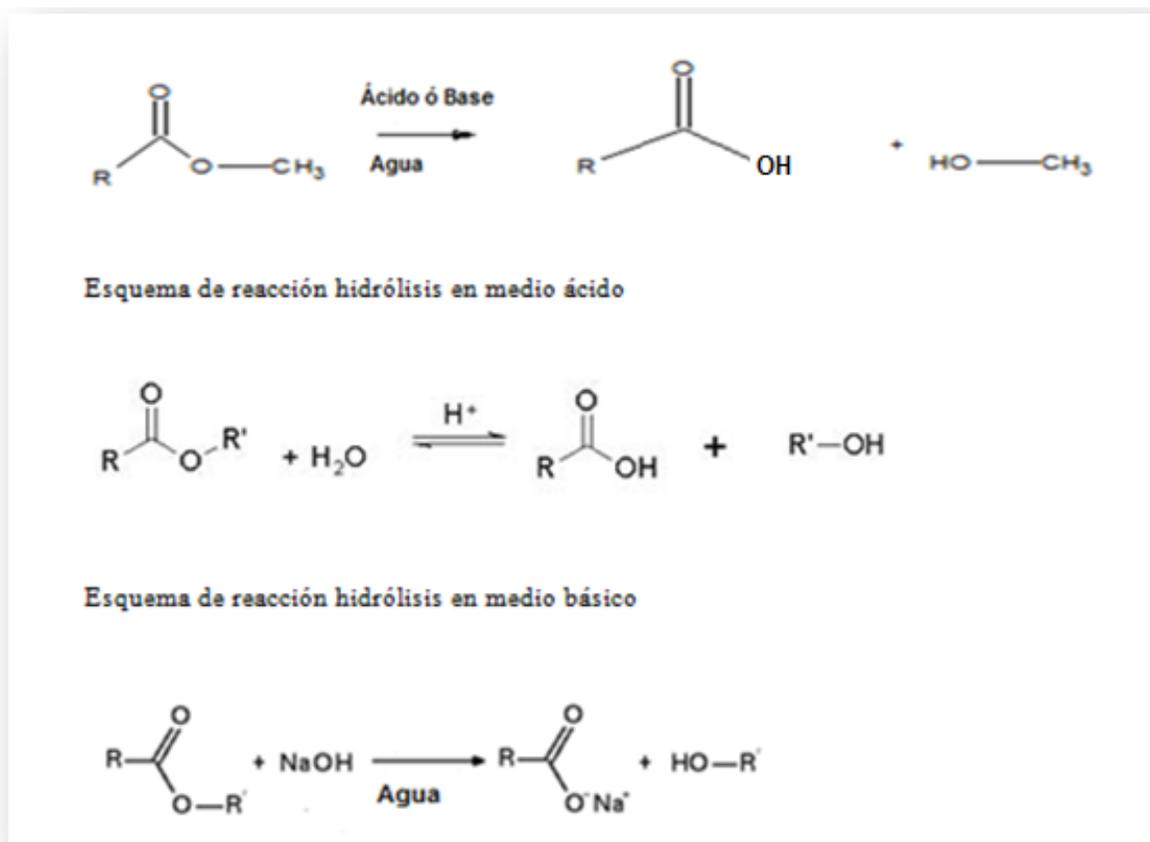
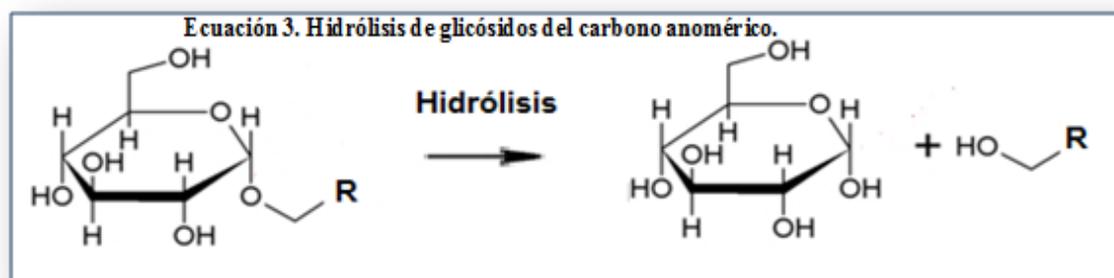


Figura 6. Esquema de reacción de Hidrólisis.

6.1.3 Hidrólisis de glicósidos del carbono anomérico.

El glicósido se disuelve en una solución ácida por ejemplo HCl acuoso 2N y se pone a reflujo por una hora. Las agliconas obtenidas se extraen con éter etílico, la parte acuosa se investiga para azúcares conocidos, el mecanismo de reacción es similar a los descritos anteriormente como en la ecuación 3.



7. Las Cactáceas

7.1 Generalidades de las Cactáceas.

La familia de las cactáceas está integrada por alrededor de 2000 especies distribuidas en lugares de clima desértico o muy seco¹⁸. Las condiciones geográficas de nuestro país debido a su relieve tan particular, han favorecido la diversificación de estas plantas, dando lugar a zonas con gran riqueza biológica¹⁹. México es el más importante centro de concentración de cactáceas, con un alto índice de endemismo a nivel genérico (73 %) y específico (78 %)²⁰. La mayor parte de las especies habitan en las regiones áridas y semi-áridas del país, particularmente en la porción sureste del desierto chihuahuense, incluyendo la zona árida queretano-hidalguense e incluso pueden mencionarse las regiones de tehuacán – Cuicatlán, y el valle de Mezquitlán en el centro del país²¹.

Entre los géneros representativos de esta familia en México podemos encontrar: *Echinocactus*, *Lophophora*, *Myrtillocactus*, *Opuntia* y *Stenocereus*)¹⁹.

En los últimos años se han realizado estudios acerca de la composición química de la familia *Cactaceae*, estos estudios revelan que especies de esta familia en su mayoría sintetizan glicósidos de triterpenos²².

7.1 Distribución de las Cactáceas en México

Uno de los grandes obstáculos para evaluar la distribución geográfica de las cactáceas a nivel mundial es la falta de información sobre su presencia en varios países, así como la gran inestabilidad taxonómica del grupo. Sin embargo, muy recientemente han sido publicados listados de géneros y especies cuyos conceptos taxonómicos reflejan los puntos de vista de la Organización Internacional para el Estudio de las Plantas Suculentas²³. Estos listados representan una excelente base para conocer la distribución geográfica de las cactáceas. En el caso de México, por otra parte, la obra monumental “Las cactáceas de México” representa el mejor y más completo tratado sobre la familia, aunque la sistemática de esta obra difiere de los conceptos taxonómicos más modernos²³, particularmente en lo que se refiere a la delimitación genérica²⁵.

Tomando como base los datos proporcionados por Hunt²³, México es sin duda el más importante centro de concentración de cactáceas, con un total de 48 géneros y 563 especies reconocidas. Del total de los géneros que existen en este país, 15 (31.3 %) están estrictamente restringidos a sus límites territoriales, y 20 más son casi endémicos. En este último caso, una o varias de las especies de un género determinado extienden su distribución en áreas adyacentes al territorio mexicano, especialmente en el suroeste de los Estados Unidos por ejemplo los géneros *Ariocarpus*, *Astrophytum*, *Bergerocactus*, *Carnegiea*, *Echinocactus*, entre otros^{23, 24 y 25}.

Los Estados con mayor número de especies de dicha familia son: Aguascalientes, Baja California, Chihuahua, Coahuila, Durango, Estado de México, Nuevo León, Sinaloa, San Luis Potosí, Sonora, Tamaulipas, entre otros¹⁸ (Figura 7).



Figura 7. Estados en México donde se encuentran distribuidas las Cactáceas¹⁸.

7.2 Química de las Cactáceas

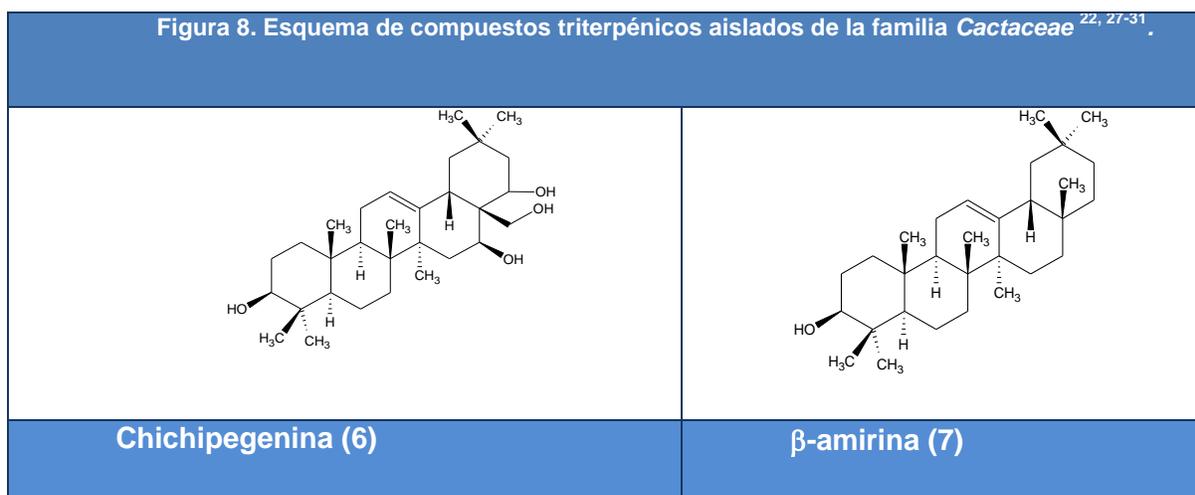
Hasta el momento la química de la familia *Cactacea* se distingue por sintetizar triterpenos pentacíclicos así como esteroides.

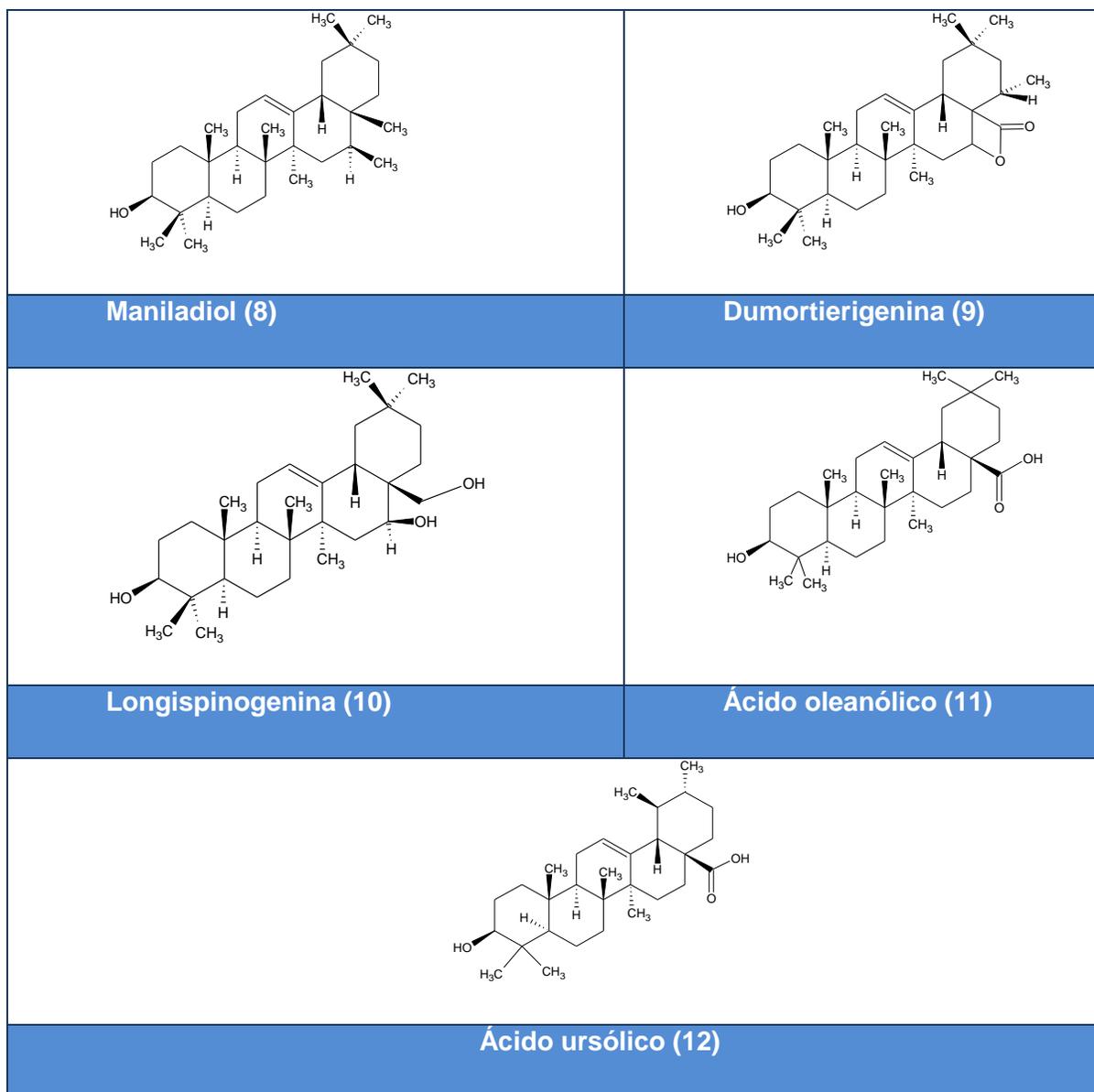
Por mencionar algunos metabolitos secundarios aislados de cactáceas tenemos al ácido oleanólico (6), chichipigenina (1), ácido ursólico (7), entre otros, cabe mencionar que se han aislado en forma libre o como glicósidos²² (Figura 8).

En los años cincuentas los cactus del genero *Lemaireocereus* habían demostrado ser una rica fuente de triterpenos libres y en forma de glicósidos. Se aisló de *L. dumortieri* una lactona dihidroxi-triterpenica denominada dumortierigenina (4), cuya fórmula molecular corresponde a $C_{30}H_{46}O_4$, este compuesto mostró en IR bandas a 3570 cm^{-1} y 1745 cm^{-1} características de grupo hidroxilo, por otro lado, en *L. chichipe* se aislaron en grandes cantidades los triterpenos de chichipegenina (6), ácido oleanólico (11), y longispinogenina (10)²² (Figura 8).

El género *Myrtillocactus* posee 5 especies todas ellas endémicas de México y Guatemala, el estudio de la totalidad de las especies permitió conocer el perfil fotoquímico particularmente de triterpenos de este género. *Myrtillocactus cochal* proveniente de Baja California proporcionó una gran cantidad de triterpenos derivados de la chichipigenina entre otros^{22 y 26} (Figura 8).

Continuando con los estudios dirigidos a la búsqueda de triterpenos de plantas mexicanas, en 1956 se publicó el estudio de siete especies correspondientes a los géneros *Lemaireoceus*, *Tichocereus* y *Escontria* (*Cactaceae*). El estudio fitoquímico de *B. crassifolia* y *B. ipicata*, empleadas en la medicina tradicional durante el parto, permitió obtener en grandes cantidades de β -amirina (7), maniladiol (8)²² (Figura 8).





8. Generalidades del género *Stenocereus*

El género *Stenocereus* comprende aproximadamente 25 especies que se distribuyen en los Estados Unidos de Norteamérica, México, Centroamérica, las Antillas y Venezuela²³. La mayoría de estas especies tienen frutos comestibles que son objeto de recolección desde hace cientos de años²⁴. Como parte del estudio monográfico sobre el género *Stenocereus* se realizaron recolecciones de

material en el campo y se revisaron diferentes herbarios. Recientemente se encontró una población de *Stenocereus* en el estado de Guerrero que no pudo ser identificada con las claves disponibles para el género. De manera simultánea se encontró un ejemplar de esta especie en el herbario MEXU, con una observación de Sánchez-Mejorada, en la que se considera como especie nueva para la ciencia. Por lo anterior, se describe con el nombre de *Stenocereus zopilotensis*. De 1998 a 2002, se recolectaron ejemplares con estructuras reproductoras para completar su estudio²¹.

8.1 Generalidades de *Stenocereus zopilotensis* y su relación fitogenética con otras especies de la misma familia.

Stenocereus zopilotensis Arreola-Nava y Terrazas⁴⁵, es una nueva especie reclasificada en México, la descripción botánica fue realizada por Arreola-Nava y Terrazas. Dicha especie fue recolectada en la Cañada del Zopilote en el municipio de Zumpango del Río en el centro del estado de Guerrero. Botánicamente a *S. zopilotensis* se le encontraba morfológicamente parecida a *Stenocereus quevedonis* (J. G. Ortega), *S. fricii* (Sánchez-Mej.) y *S. pruinosus* (Otto Buxb.). Cabe señalar que a *S. zopilotensis* se le asocia con *S. pruinosus*. Sin embargo se distinguen perfectamente por el número de costillas donde *S. pruinosus* presenta cinco costillas, mientras *S. zopilotensis* presenta seis costillas de mayor tamaño, además esta última alcanza alturas mayores que *S. pruinosus*³² (Ver fotos en Tabla 3).

Tabla 3. Fotos de *S. zopilotensis*⁴⁵ y *S. pruinosus*



S. zopilotensis



S. pruinosus

Clasificación taxonómica

Reino: *Plantae*

División: *Magnoliophyta*

Clase: *Magnoliopsida*

Orden: *Caryophyllales*

Familia: *Cactaceae*

Subfamilia: *Cactoideae*

Tribu: *Pachycereeae*

Género: *Stenocereus*

Especie: *S. zopilotensis* Arreola-Nava & Terrazas.

La descripción botánica de Arreola-Nava y Terrazas, se refiere a un cactus columnar arborescente de 4 a 5m de altura, tronco definido de 40 a 45 cm de altura, de 19 a 20 cm de diámetro, numerosos talos verde claro, rectos, paralelos y juntos de 6 a 10 cm de diámetro, tiene 7, 8 ó 9 costillas redondeadas y obtusas de aproximadamente 1 cm, areola de 5 a 6 mm y de 10 a 14 espinas de 0.3 a 4.5 cm blancas que se torna grises con la edad según la posición, presentan floración en junio-agosto con flores blancas de 5, 6 ó 7 cm de longitud y 4 a 5 cm de diámetro, frutos esféricos de 5 a 6 cm de diámetro^{32 y 45}.

8.2 Triterpenos aislados del género *Stenocereus*.

Es importante mencionar que aparentemente la química del género *Stenocereus* esta caracterizada por la presencia de algunos triterpenos como la estelatogenina (9), ácido betulínico (10) y ácido queratóico (11) entre otros²⁶⁻³¹(Figura 9).

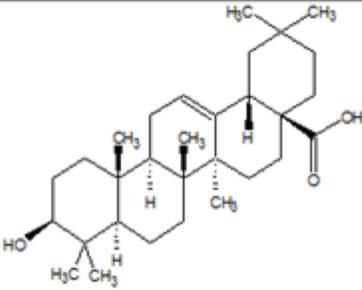
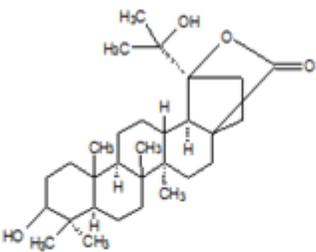
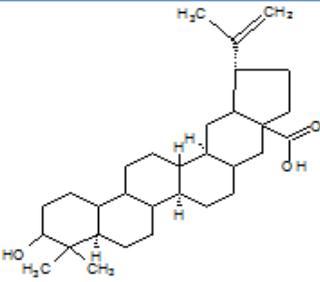
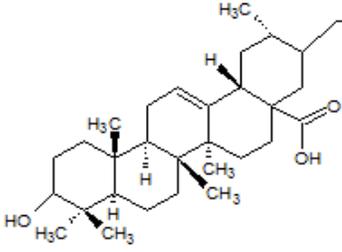
Compuesto	Estructura	Género y especie
Ácido oleanólico		<i>S. eruca</i> , <i>S. stellatus</i> <i>S. hystrix</i> <i>S. thurberi</i> <i>S. longispinus</i> <i>S. trelesi</i>
Estelatogenina		<i>S. eruca</i> , <i>S. stellatus</i> <i>S. trelesi</i>

Figura 9. Compuestos aislados del género *Stenocereus*²⁶⁻³¹.

...Continuación Figura 9

Compuesto	Estructura	Género y especie
Ácido betulínico		<i>S. eruca</i>
		<i>S. stellatus</i>
		<i>S. hystrix</i>
		<i>S. griceus</i>
Ácido queratoico		<i>S. queretaroensi</i>
		<i>S. benckey</i>
		<i>S. quevedonis</i>

Recientemente se dio a conocer las propiedades antiinflamatorias y citotóxicas de glicósidos de triterpenos aislados de *M. geometrizans* (Figura 10) lo que indica la posibilidad de obtener posibles fármacos citotóxicos y/o antiinflamatorios a partir de este tipo de metabolitos secundarios de *M. geometrizans*²¹.

Cabe mencionar que estudios de relación filogenética realizados por la Dra. Teresa Terrazas sobre la familia *Cactaceae* señalan una relación próxima entre los géneros *Myrtillocactus* y *Stenocereus*. Por lo que se decidió realizar el estudio fitoquímico de *S. zopilotensis* especie de reciente clasificación que no ha sido estudiada en sus aspectos químicos y farmacológicos²¹.

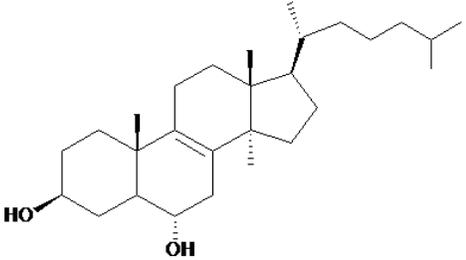
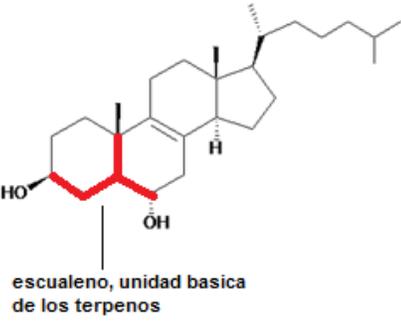
Nombre	Estructura
<p>Macdougallina (14α-methyl-3β, 6α-diol- colest-8-eno)</p>	
Nombre	Estructura
<p>Peniocerol (3β, 6α-diol-colest-8-eno)</p>	 <p>escualeno, unidad basica de los terpenos</p>

Figura 10. Esquema de triterpenos aislados de *M. geometrizans*.

9. Generalidades de los terpenos.

9.1 Definición, biosíntesis y ejemplos.

Los triterpenos son una familia de terpenos que contienen 30 átomos de carbono procedentes de la incorporación biosintética de seis unidades de isoprenilo. Se han descrito provenientes de fuentes naturales, más de 40 triterpenos cíclicos con formula $C_{30}H_{50}$, alrededor de 150 con formula $C_{30}H_{50}O$ y además numerosos compuestos relacionados. Se ha propuesto que la mayoría tienen como origen biosintético a partir del escualeno $C_{30}H_{50}$ o del óxido del escualeno $C_{30}H_{50}O$ (Figura 11). La presencia de estos triterpenos es habitual en plantas superiores, pero aparecen también en animales superiores, hongos y bacterias³³.

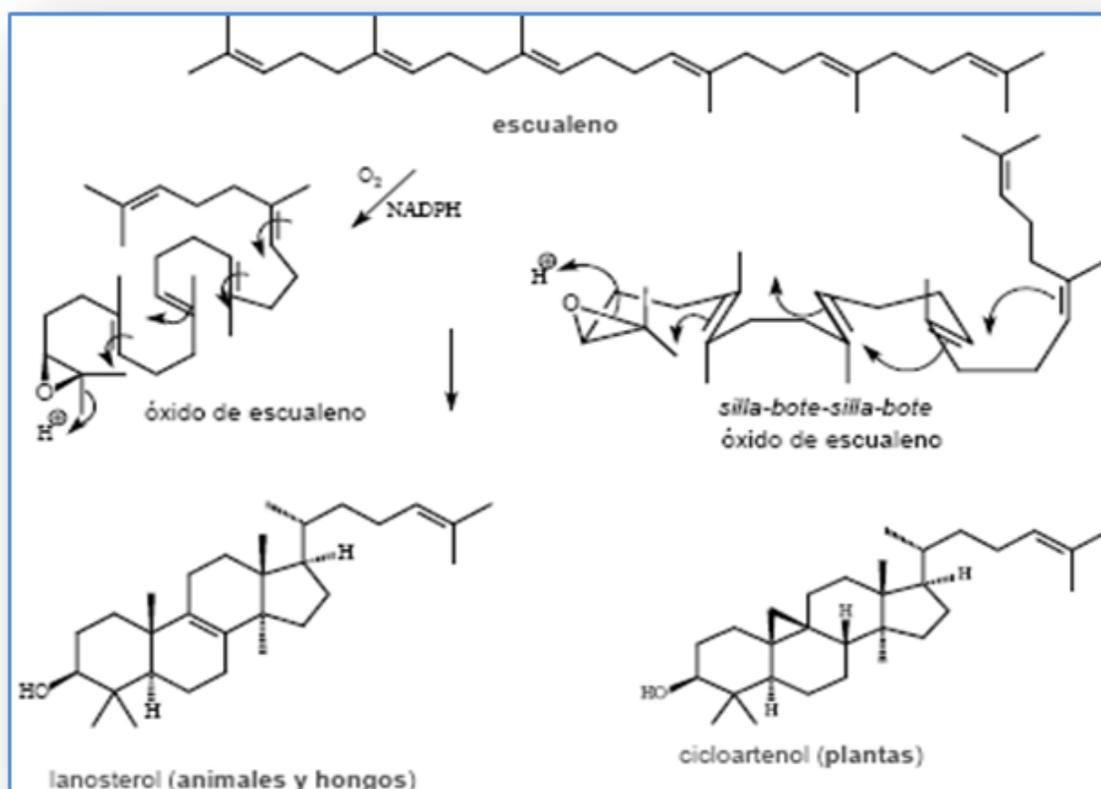


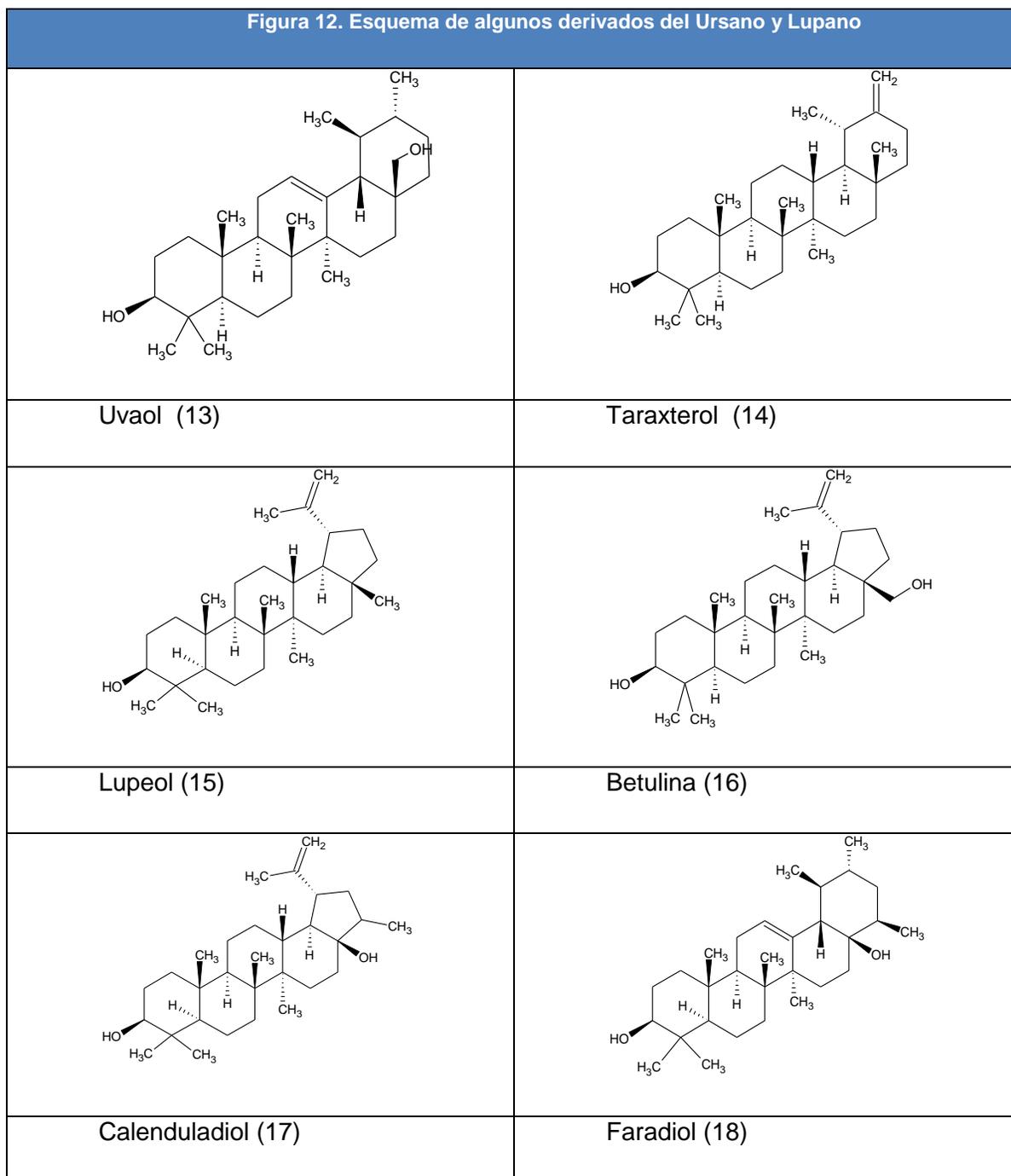
Figura 11. Esquema biosíntesis de terpenos

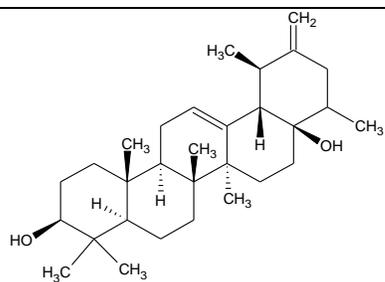
No solo por su relativa ubicuidad y su fácil extracción, sino principalmente por sus propiedades biológicas, los triterpenos constituyen un interesante grupo de metabolitos secundarios²⁶.

Aún cuando es generalmente aceptado el origen biogénico de los triterpenos, se ha suscitado especial interés en algunos aspectos específicos a su biogénesis, y numerosos grupos de investigación han propuesto varias hipótesis biogénicas que tratan de explicar cómo pasar de los sistemas acíclicos de los precursores a los complejos policíclicos presentes en la mayor parte de los triterpenos³³.

Actualmente parece aceptado que la ciclación enzimática transcurre con una precisa estereoespecificidad para construir numerosos enlaces C-C que se

ciclan para originar sistemas policíclicos con nuevos centros quirales. Por ejemplo, los derivados del ursano, el uvaol (13), taraxterol (14), faradiol (18), amidiol (19) entre otros, mientras que dentro de los lupanos están el lupeol (15), betulina (16) y calenduladiol (17)³³ (Figura 12).





Amidiol (19)

Capítulo II

Justificación del estudio

México es un país donde convergen una gran variedad de climas y diferentes tipos de suelo que dan lugar a un mosaico muy diverso de ecosistemas. Parte de estos ecosistemas son las zonas áridas de nuestro país, las cuales se caracterizan por albergar diferentes especies de la familia de las Cactáceas²⁰.

A pesar de la abundancia en nuestro país de especies de esta familia, éstas han sido poco estudiadas ya sea en los aspectos químicos, biológicos o farmacológicos¹⁸.

Adicionalmente a la abundancia de estas especies, México es el centro de distribución de especies de la familia *Cactaceae*, donde se puede apreciar un buen número de especies endémicas, una de ellas es *Stenocereus zopilotensis*, la cual ha sido recientemente incluida en el género³².

Existen pocos informes sobre la composición química de especies del género *Stenocereus*. Sin embargo, de las pocas especies estudiadas, se han aislado principalmente glicósidos de triterpenos²¹.

Debido a su reciente descripción botánica, no existe estudio químico de *Stenocereus zopilotensis* por lo que consideramos importante realizar un estudio fitoquímico de esta especie. Los resultados que arroje este estudio, indudablemente, aportaran datos para un mejor conocimiento químico del género y en general de la familia *Cactaceae*.

Capítulo III

Hipótesis y objetivos

Hipótesis

Se conoce que la química de algunas especies del género *Stenocereu* se caracteriza por la presencia de glicósidos de triterpenos pentacíclicos y esteroides. Entonces es factible suponer que la especie *Stenocereus zopilotensis*, especie de reciente descripción botánica, genere este tipo de metabolitos secundarios.

Objetivo

Realizar el aislamiento y purificación por métodos fisicoquímicos de los metabolitos secundarios e identificar sus estructuras por métodos espectroscópicos de los metabolitos secundarios presentes en el extracto metanólico de las partes aéreas de *S. zopilotensis*.

Objetivos particulares

1. Aislamiento de los metabolitos secundarios de un extracto metanólico de las partes aéreas por medio de métodos cromatográficos
2. Caracterización de los metabolitos secundarios aislados.

Capítulo IV

Parte experimental

1. Material, reactivos y equipo.

1.1 Material.

Columnas cromatográficas de vidrio (6.5 cm de diámetro x 6 cm de largo, 2 cm de diámetro x 25 cm de largo).

Vasos de precipitado.

Matraz kitasato

Embudo.

Matraz Erlen Meyer.

Matraz bola.

Pipetas Pasteur.

Pipetas graduadas.

Probeta.

Viales.

Soporte universal

Pinzas de tres dedos.

Magneto

Pipeta graduada

1.1 Reactivos

Hexano

Acetato de etilo

Metanol

Dicloro metano

Éter isopropílico

Acetona

Agua destilada

Silica gel (MN-Kiesegel)

Placas de cromatografía (60/UV250, Alugram)

1.3 Equipo

Balanza granatária

Balanza analítica

Rotavapor

Baño maría

Parrilla de agitación

Canastilla

Lámpara UV

Canastilla de calentamiento

Reostato

La evaporación de los disolventes a presión reducida se realizó en un rotavapor Büchi 110.

Para las cromatografías en columna (CC) se utilizó gel de sílice 60 Alugram Sil G, kiesel, malla 70-230, (Merck), con indicador de fluorescencia UV 254. Las cromatografías en capa fina (CCF) se realizaron en cromatofólios de aluminio cubiertos de sílice DC Fertigplatten Sil G-200, UV (Merck), de 0.2 mm de espesor. Como reveladores se emplearon una disolución de sulfato cérico (Ce_2SO_4) al 1 % en ácido sulfúrico (H_2SO_4 , baker) 2 N; y una lámpara de luz UV de 254 y 365 nm (Cole Parmer 9815 series Lamps).

Los puntos de fusión se determinaron en un equipo Fisher Johns, y se informaron sin corrección.

Para la adquisición de espectros de ultravioleta visible (UV) se realizó en un espectrofotómetro Shimadzu modelo U160. Los resultados se dieron en la longitud de onda máxima ($\lambda_{\text{máx}}$) y coeficiente de extinción molar, los cuales se expresaron en nanómetros (nm) y logaritmo base 10 ($\log \lambda$), respectivamente.

Los espectros de infrarrojo (IR) se obtuvieron en los espectrofotómetros Nicolet modelo Magna 750 y Nicolet FT-IR5-SX, con las técnicas de pastilla en KBr ó de disolución en CHCl_3 . Las absorbancias se presentaron en cm^{-1} , para estas se indicaron las siguientes abreviaturas: d (débil), m (mediana), f (fuerte).

Los experimentos de espectrometría de masas (EM) se realizaron en un espectrómetro JEOL JMS AX 505 HA mediante la técnica de impacto electrónico a 70 eV. Los resultados se presentaron como relación de masa respecto de la carga (m/z), junto con los porcentajes de abundancia relativa (% a.r.).

Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) protónica (^1H) y de carbono trece (^{13}C) se efectuaron en espectrómetros Varian Gemini 200, Varian VXR 300 y Bruker AS X 300; se utilizaron los siguientes disolventes deuterados (Aldrich): cloroformo deuterado, sulfóxido de dimetilo deuterado y piridina deuterada. Se empleó tetrametilsilano (TMS) como referencia interna. Los desplazamientos químicos se expresaron en partes por millón (ppm); las señales protónicas se indicaron con las siguientes abreviaturas: s (simple), d (doble), t (triple), q (cuádruple), dd (doble de doble), dt (doble triple), td (triple doble), qd (cuádruple doble), m (múltiple).

Las constantes de acoplamiento (J) se indicaron en Hertz (Hz). Los experimentos adicionales de RMN incluyeron COSY-2D, DEPT, HETCOR, HMBC, HSQC y HMBC.

El análisis de cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) se realizó en un cromatógrafo Waters modelo Delta Prep 4000 acoplado con un detector de absorción UV Waters modelo 486. El equipo contenía una columna de sílice C-18 modelo Pegasil ODS (Senshu Scientific Co.) con dimensiones de 15 cm x 4.6 mm.

La mayoría de los disolventes empleados se destilaron previamente, y se almacenaron en recipientes de color ámbar. De esta manera se manipularon el cloruro de metileno (CH_2Cl_2); el acetato de etilo (AcOEt) y el hexano se destilaron

en presencia de CaCl_2 ; en tanto, el etanol (EtOH) y metanol (MeOH) se trató con hojuelas de magnesio a reflujo durante 18 h y se destilaron.

2. Métodos

El objetivo del presente estudio fue la separación y elucidación estructural de los metabolitos secundarios presente en las fracciones 239-245 (SZPA239) obtenidas de una cromatografía en columna abierta del extracto metanólico de la parte aérea de *Stenocereus zopilotensis*. El peso total fue de 2.4 g y se le asignó la clave SZPA239. La secuencia de extracción fue la siguiente

1.- Se hicieron los extractos orgánicos de las partes aéreas de la planta (Hexánico, acetato de etilo y metanólico) y acuso del material secado previamente.

2.- Se concentraron los extractos en un rotavapor.

3.- Se procedió a la separación de los compuestos de cada extracto por cromatografía en columna y la elución se realizó con disolventes en polaridad creciente.

4.- Cada fracción se precipito y evaluó su pureza por CCF y revelando con sulfato cérico amoniacal.

5.- Algunas fracciones obtenidas de los mismos extractos se trataron de esta misma forma para purificar mejor los compuestos obtenidos.

A continuación se describe como se trabajó la fracción SZPA239

Una alícuota de SZPA239 fue analizada por cromatografía en placa fina (CCF). La placa utilizada fue eluída tres veces en una mezcla de acetato de etilo:metanol (3:2). La visualización con una solución ácida de sulfato de cérico mostró una mezcla compleja de compuestos con coloración rojiza intensa, la cual indica la presencia de triterpenos en la muestra.

Inicialmente, la separación de los diferentes compuestos presentes en SZPA239 se intentó por cromatografía en placa preparativa, así como por cromatografía en columna empacada con sílice y eluída con mezcla de disolventes de polaridad ascendente, sin embargo, en ningún método se logró una buena separación. Tomando en cuenta estos resultados se decidió obtener, mediante reacciones químicas, algunos derivados, los cuales, eventualmente fueran fácilmente de obtener puros.

En el espectro de IR de la muestra SZ239 se observó una banda intensa a 3400 cm^{-1} , lo que indicó la presencia de grupos hidroxilos.

Tomando en cuenta, que la química del género *Stenocereus* está caracterizada por la presencia de glicósidos de triterpenos, así como la absorción en IR de SZ239 y su coloración mostrada en CCF se supuso que la mezcla en SZ239 correspondía a una mezcla de glicósidos triterpénicos.

Tomando en cuenta lo anterior se decidió que las reacciones llevadas para obtener algunos de los derivados de SZ239 fueran la acetilación e hidrólisis.

2.1 Reacción de acetilación de SZPA239

Esta reacción se efectuó con 500 mg de SZPA239, disueltos en 5 mL de piridina a esta solución se le agregaron 5 mL de anhídrido acético y la mezcla de reacción se mantuvo a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 4 h. Posteriormente, la mezcla de reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente durante 10 minutos, pasado este tiempo se le adicionaron aproximadamente 5 g de hielo y 5 mL de agua destilada. La solución resultante fue extraída con acetato de etilo (3X 15 mL). Con el fin de eliminar la piridina de la fase orgánica, ésta se lavó con una solución acuosa de HCl al 10% (3 x 10 mL), el exceso de HCl la fase orgánica se lavó con una solución de NaHCO_3 al 10 %. Posteriormente se eliminó de la fase orgánica, el agua residual con sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4), se filtró y se eliminó el disolvente mediante una destilación a presión reducida. El producto de la reacción se disolvió con acetato de etilo y se transfirió a un vial.

Un análisis por CCF de la mezcla de reacción mostró la presencia de tres productos con coloración rojiza característica de compuestos triterpenoides.

La separación de los productos de la reacción se realizó mediante una columna cromatográfica empacada con sílice y eluida con mezclas de disolventes de polaridad ascendente. De esta columna se obtuvieron 36 fracciones (tabla 8), de las cuales las fracciones 17 (200 mg), 19 (14 mg) y 20 (11 mg) obtenidas en una polaridad de AcOEt al 100% y la fracción 25 (90 mg) obtenida en AcOEt:MeOH, en la proporción 90:10, fueron las más abundantes.

Tabla 4. Proporción de disolventes y fracciones obtenidas de la Cromatografía en Columna

Proporción (%)			
Hexano	AcOEt	MeOH	Fracciones
100			1-5
90	10		6-10
80	20		11-15
	100		16-23
	90	10	24-30
	80	20	31-36

No obstante, que los valores de los puntos de fusión fueron diferentes (tabla 6), un análisis por CCF mostró que estos sólidos eran en realidad mezclas muy similares. Observación apoyada por los espectros de IR, los cuales no mostraron diferencias entre ellos. Tomando en cuenta lo anterior se decidió reunir estos compuestos.

Tabla 5. Peso de las fracciones obtenidas en la reacción de acetilación.

Fracción	Clave	Peso mg
17	SZPA17	220
19	SZPA19	14
20	SZPA20	11
25	SZPA25	90

La reunión de las muestras SZPA17, SZPA19, SZPA20 y SZPA25 (330 mg), obtenidas de la fracción 239, se trataron de purificar en una columna empacada con sílice y eluida como el caso anterior. Durante el proceso de

cromatografía los productos de la reacción de acetilación se descompusieron, lo cual fue evidente por análisis de CCF de las diversas fracciones que se obtuvieron de esta columna.

2.2 Reacción de hidrólisis de SZPA239

Una muestra (500 mg) de la fracción SZPA239 se disolvió en 25 mL de metanol y se agregaron 12.5 mL de HCl 2N. La mezcla de reacción se dejó a reflujo con agitación por 3h. Después de este tiempo se agregaron aproximadamente 3 g de hielo, lo cual permitió la formación de un precipitado amarillo. La mayor parte del precipitado formado se disolvió con AcOEt y la otra porción del residuo se disolvió en metanol. De esta manera se obtuvieron dos fracciones, la mayoritaria soluble en AcOEt y la minoritaria soluble en MeOH.

La cromatografía de la fracción soluble en AcOEt se llevó a cabo en una columna abierta, empacada con gel de sílice y eluída con mezclas de disolventes de polaridad creciente, iniciando con hexano y terminando con MeOH. Es importante destacar que los compuestos observados al revelar con sulfato cérico ácido mostraron el característico color rojizo de los triterpenos. Se obtuvieron 33 fracciones de 5 mL cada una (Tabla 6).

Tabla 6. Proporción de disolventes y fracciones obtenidas de la Cromatografía en Columna de la reacción de hidrólisis de SZPA239 de la fracción disuelta en AcOEt

Proporción (%)			Fracciones
Hexano	AcOEt	MeOH	
100			1 y 2
50	50		3-7
	100		8-11
	90	10	12-15
	80	20	16-20
	70	30	21-25
	50	50	26-30
		100	31-33

La fracción 4 eluída con Hex:AcOEt (50:50), las fracciones 12-15 (AcOEt:MeOH, 90:10), 17 y 18 (AcOEt:MeOH, 80:20) y la fracción 22 (AcOEt:MeOH,70:30) precipitaron al evaporar el disolvente y agregar hexano. De la fracción 4 a la cual se le dio la clave SZPAH2F4 se obtuvieron 15 mg de ácido oleanólico. La identidad de este compuesto se logró mediante el análisis y la comparación de sus datos físicos y espectroscópicos con aquellos informados en la literatura. De la fracción 12 (SZPAH2F12) se lograron aislar 28 mg del ácido 3-O- β -(6-metil)-glucoronil oleanólico. La elucidación estructural de este compuesto se trata en detalle en la parte de la discusión.

Capítulo V

Resultados y discusión

Resultados y discusión.

1. Reacción de acetilación.

El producto de la reacción de acetilación de la mezcla SZPA239 se sometió a un proceso cromatográfico en una columna abierta y empacada con gel de sílice, obteniéndose varios precipitados. No obstante que estos compuestos presentaron diferentes puntos de fusión, el análisis de la cromatografía de placa fina indicaba que eran mezclas similares.

Tabla 7. Características de las fracciones obtenidas en la reacción de acetilación.

Fracción	Clave	Peso mg	p.f.
17	SZPA17	220	122-130°C
19	SZPA19	14	162-165°C
20	SZPA20	11	156-160°C
25	SZPA25	90	186-191°C

Inclusive las señales observadas en los espectros de infrarrojo de las fracciones sometidas a la reacción de acetilación SZPA17, 19, 20 y 25 fueron semejantes por lo que solo se muestra el espectro de SZPA17 (Figura 14). En todos se observó una banda alrededor de 3485cm^{-1} característica de grupos hidroxilos, esta misma señal observada en el espectro IR de SZPA239 (Figura 13) indica que estos hidroxilos se acetilaron. También se observó, una banda intensa a 1755 cm^{-1} para un grupo carbonilo y una absorción débil a 1436 cm^{-1} posiblemente referente a la presencia de un doble enlace (Figura 14). Estos datos, claramente indicaron que los productos obtenidos eran derivados acetilados. Sin embargo, no se logró obtener compuestos puros ya que durante los procesos de purificación, estos derivados se hidrolizaron.

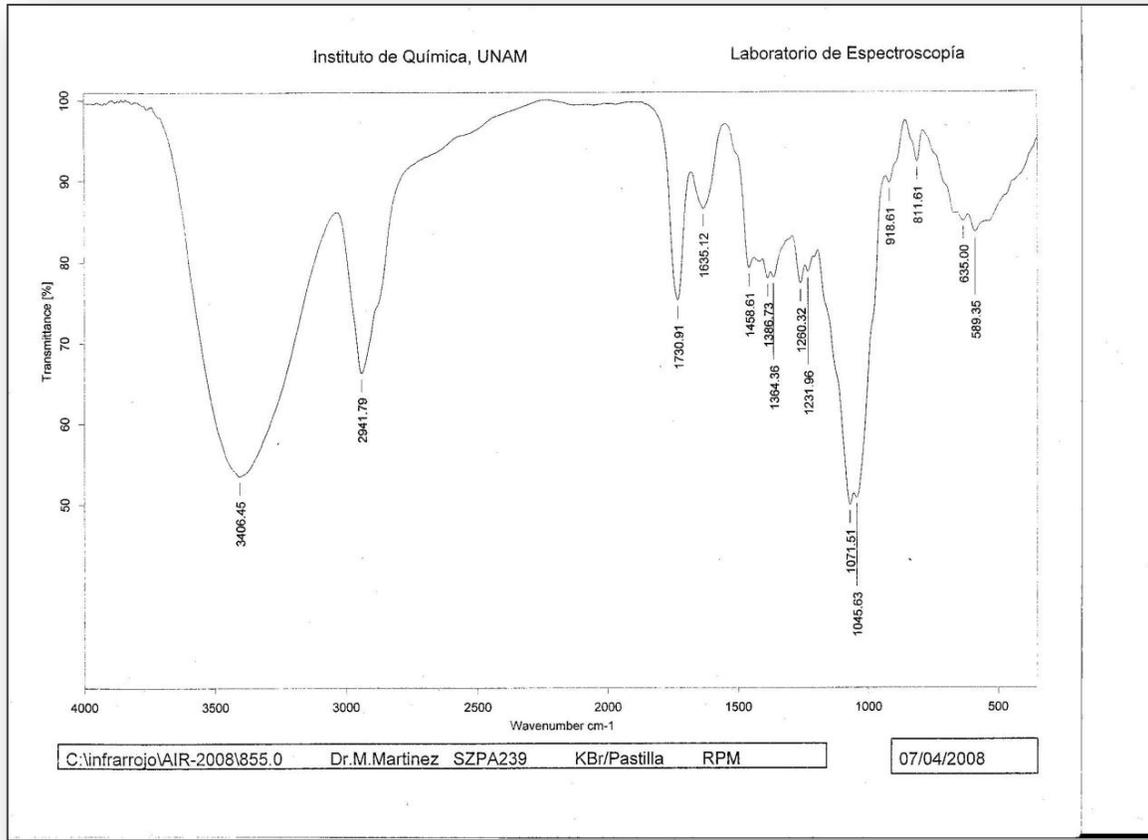


Figura 13. Espectro IR de la fracción SZPA239.

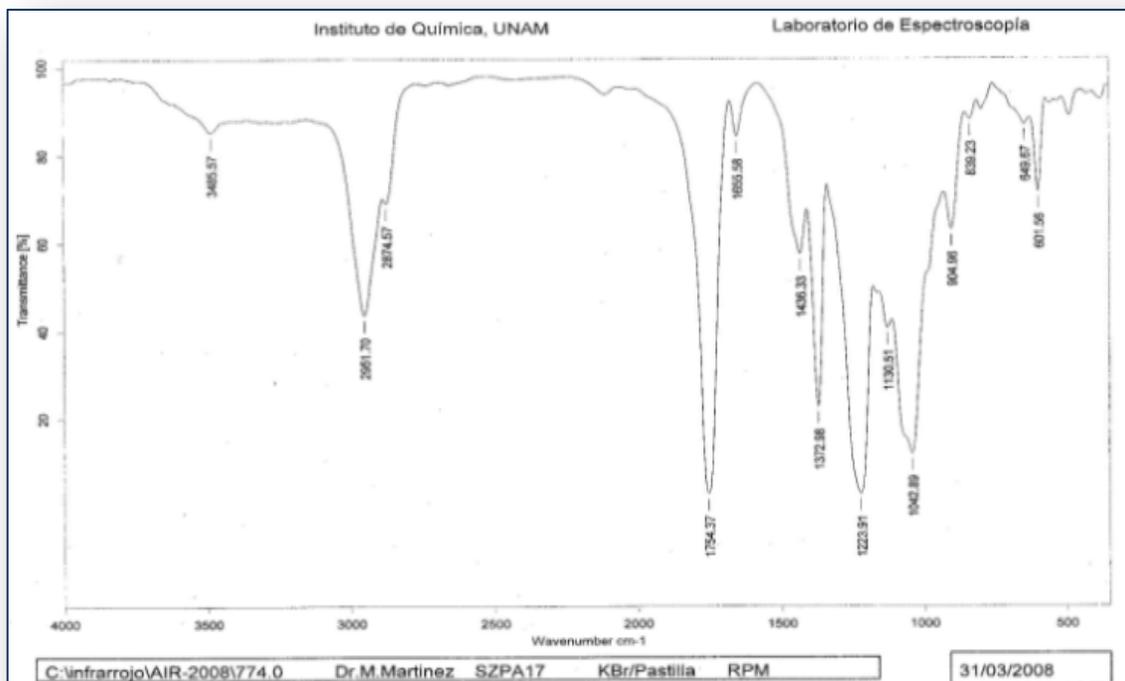


Figura 14. Espectro IR de SZPA17.

2. Reacción de hidrólisis de la fracción SZPA239.

Una muestra de SZPA239 se sometió a una reacción de hidrólisis con HCl en metanol, después el producto de la reacción se sometió a una cromatografía obteniéndose varias fracciones.

En la fracción 4 (SZ3HF4) se obtuvo un sólido blanco amorfo con punto de fusión de 287-292°C, y una rotación óptica en MeOH $\alpha = +0.072^\circ$ (1.25 mg/mL). El espectro IR, muestra una banda a 3437 cm⁻¹ característica de grupos hidroxilo así como una banda intensa a 1694.66 cm⁻¹ para un grupo carbonilo y una absorción débil a 1462 cm⁻¹ lo cual nos indica un doble enlace (Figura 15).

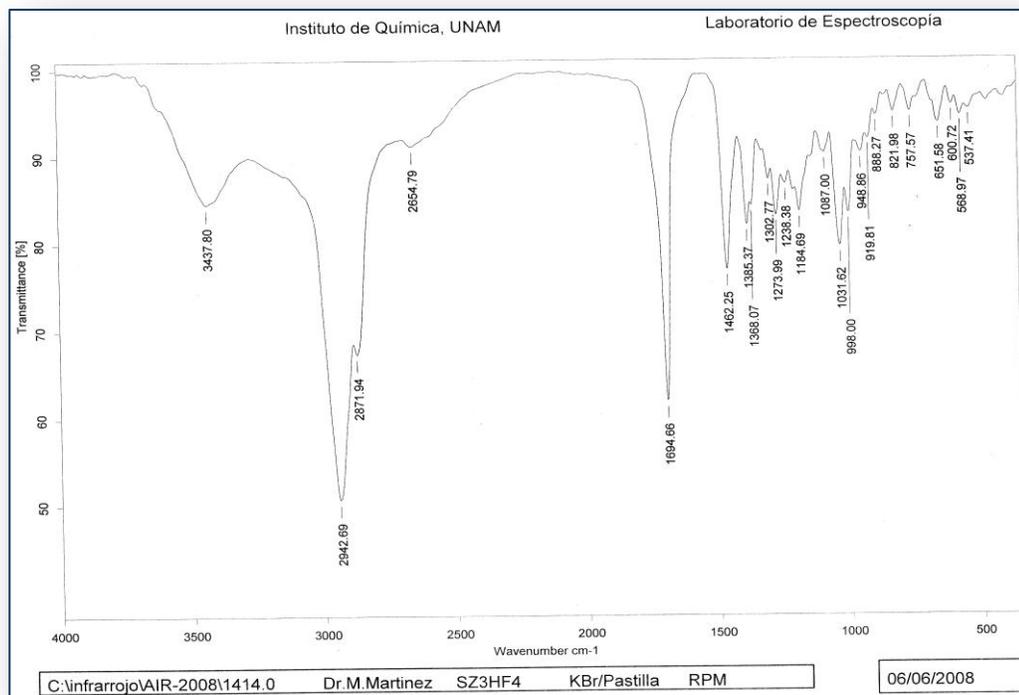


Figura 15. Espectro IR de SZ3HF4 adquirido en KBr.

Por otro lado, en el espectro de masas se observó un ión molecular a 456 m/z que corresponde a una fórmula molecular $C_{30}H_{50}O_3$ (Figura 19).

En el espectro de RMN 1H (500 MHz, DMSO) se observó la presencia de una señal desplazada a 11.99 ppm la cual intercambia con D_2O lo que indica que es un protón de un ácido carboxílico. Así mismo, se observó una señal triple a 5.14 ppm ($J=3.5$ Hz) asignado a un protón vinílico, así como una señal doble a 4.26 ppm ($J=5.0$ Hz) la cual se asignó a un protón de un hidroxilo y un multiplete a 2.98 ppm ($J=5$ Hz) asignado a un protón unido a un átomo de carbono ligado a un grupo electronegativo tal como un hidroxilo. En la región a campo alto en el espectro de RMN 1H , se observaron siete singuletes que integran para 7 grupos metilos (Figura 16). Estos hallazgos indicaron que posiblemente el compuesto SZ3HF4 sea de naturaleza triterpénica, esta teoría se complementó al mismo tiempo con los siguientes experimentos.

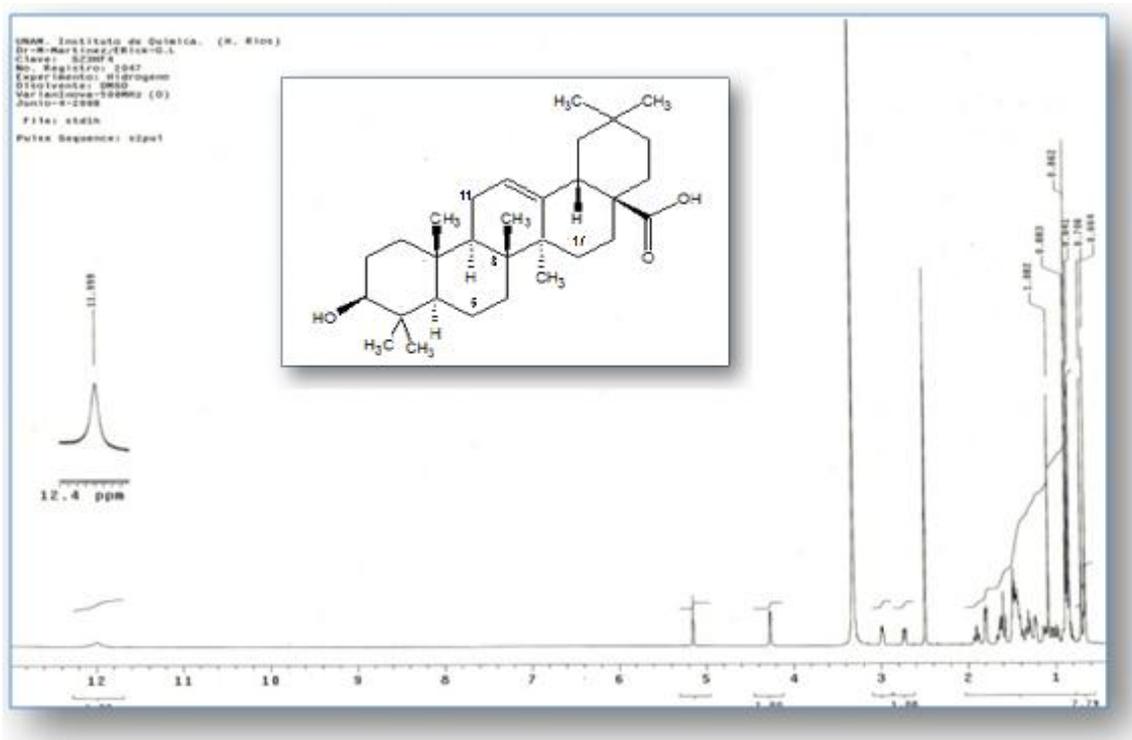


Figura 16. Espectro de RMN¹ H de SZ3HF4 (500 MHz, DMSO).

Propuesta que fue demostrada en el espectro de RMN ¹³C (Figura 17) donde se observan las 30 señales de los átomos de carbono indicados para la fórmula molecular del compuesto. Adicionalmente, en el experimento DEPT se observan 22 señales (Figura 18) de las cuales 7 señales corresponden a CH₃, 5 señales para CH y 10 grupos CH₂. Por lo tanto, si restamos los 22 carbonos observados en el experimento DEPT al total de los observados en el espectro de ¹³C, podemos obtener por diferencia un total de 8 átomos de carbono cuaternarios determinados indirectamente.

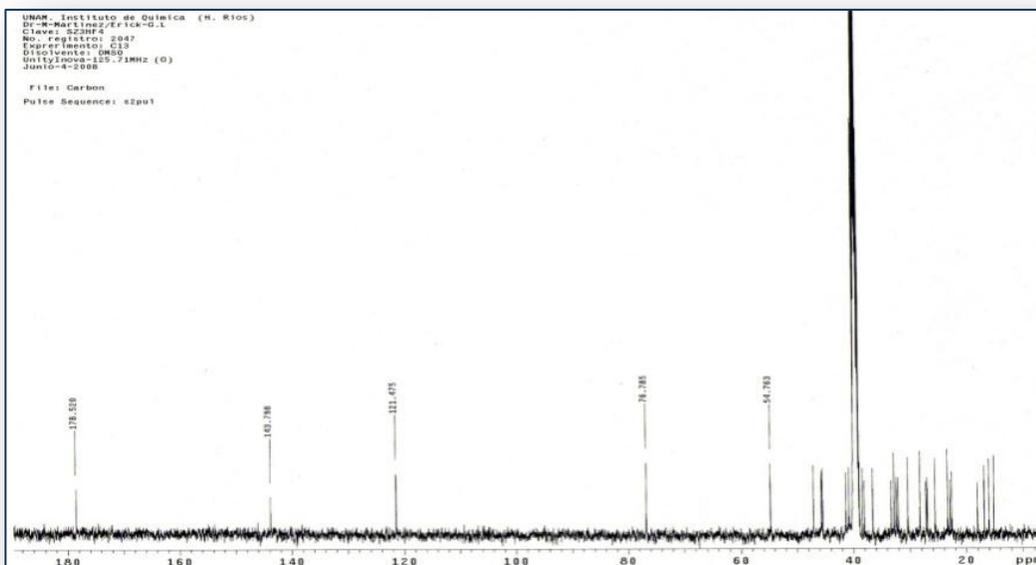


Figura 17. Espectro de ^{13}C de SZ3HF4, 500 MHz, en DMSO.

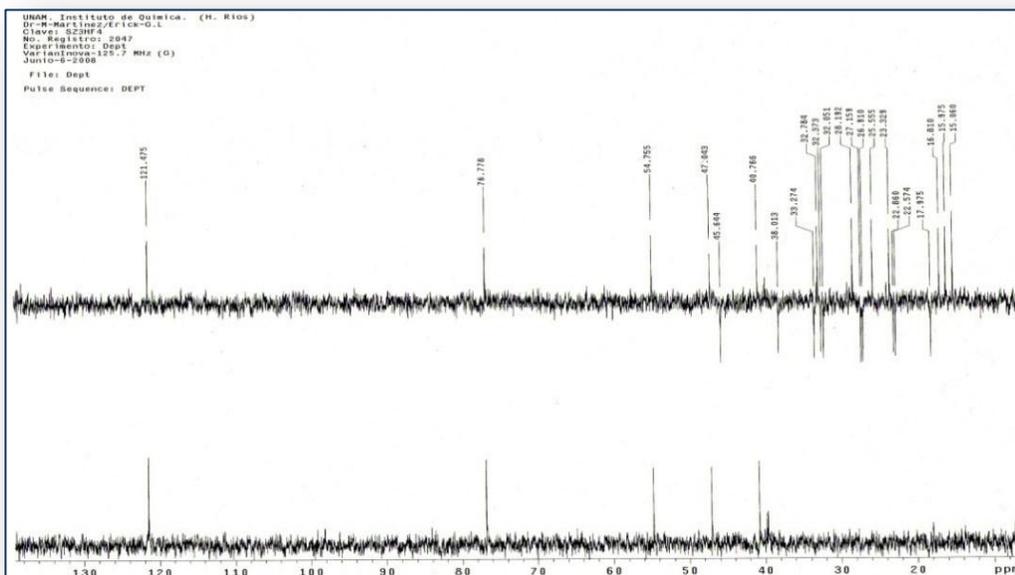


Figura 18. Espectro del experimento DEPT de SZ3HF4, (500 MHz en DMSO).

El total de átomos de carbono e hidrógenos señalados en los espectros de RMN están de acuerdo con el peso molecular indicado por la espectrometría de masas.

Adicionalmente (Figura), se observan en este espectro fragmentos a 411 m/z, 248 m/z y 203 m/z característicos de triterpenos con esqueleto del tipo del oleanano.

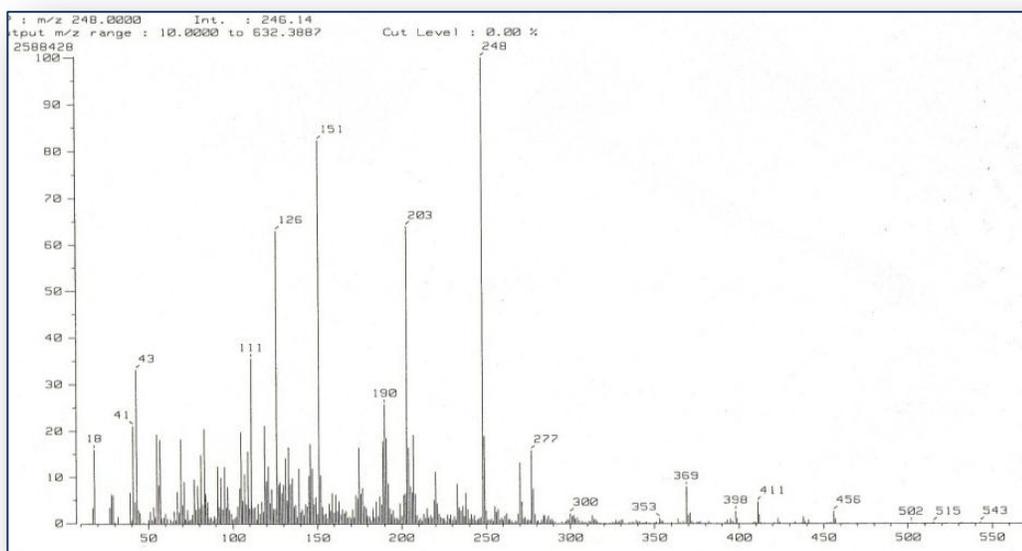


Figura 19. Espectro de masas de SZ3HF4 (IE, 70 eV).

En la figura 20 se muestran las principales fragmentos en el espectro de masas, los cuales están de acuerdo para la estructura del ácido oleanólico.^{61 y 62}

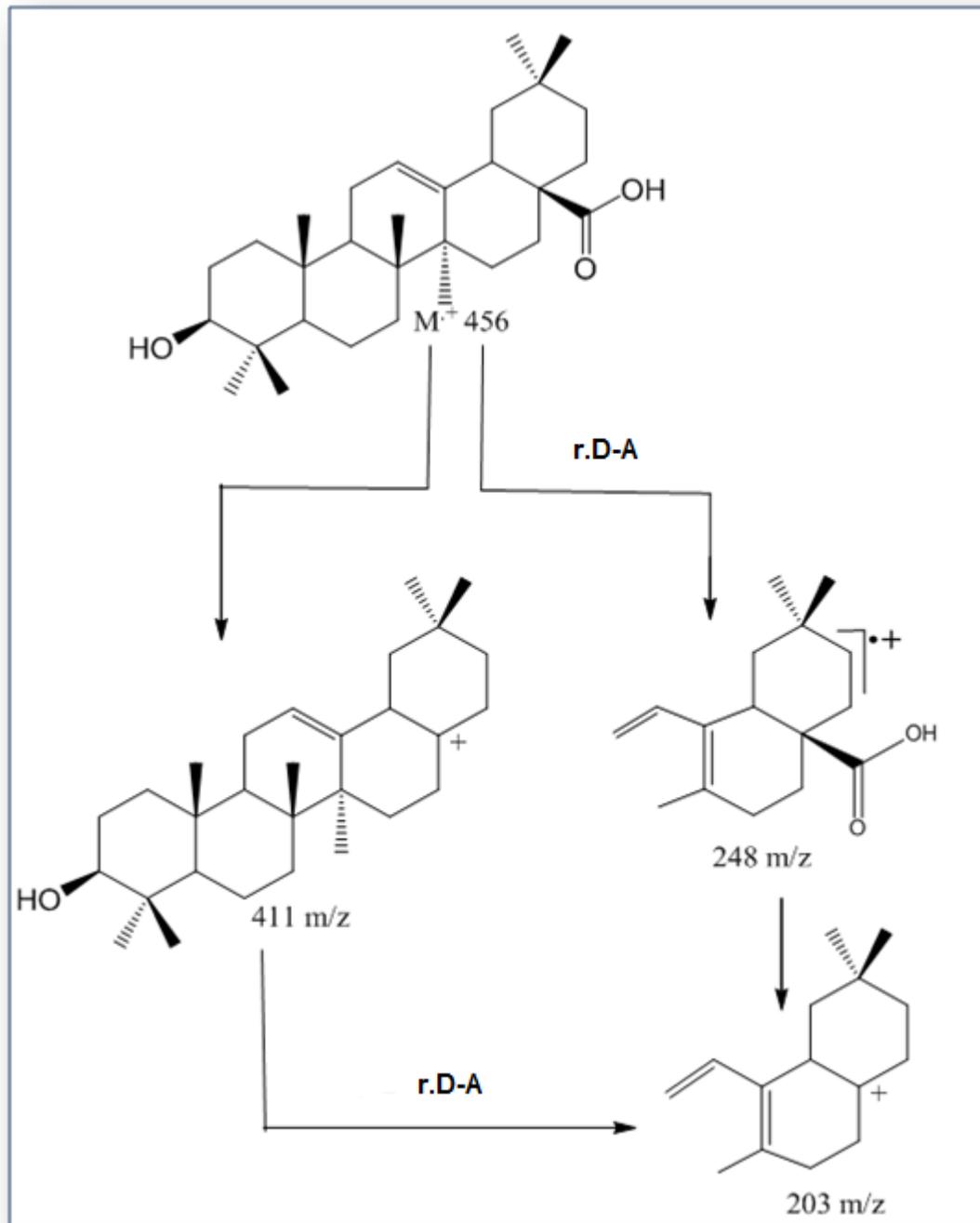


Figura 20. Fragmentos principales de SZ3HF4 en el espectro de masas

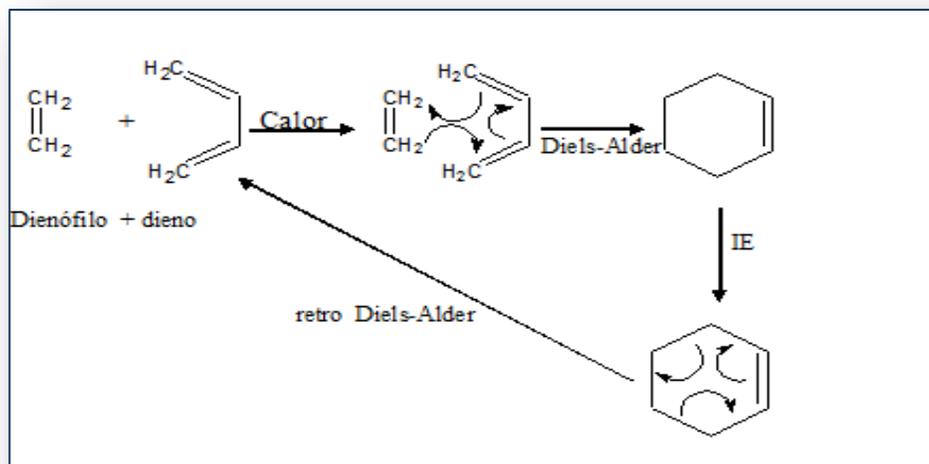


Figura 21. Esquema de la reacción de tipo retro Diels-Alder

El ión observado en el EM a 248, se forma por una reacción de tipo retro Diels-Alder (r. D-A.) (Figura 21) donde el mecanismo de ruptura es el inverso de una reacción de cicloadición entre un dienófilo y un dieno.

En la siguiente figura 22 se muestra el mecanismo de fragmentación r. D-A. para el ácido oleanólico (Figura 43).

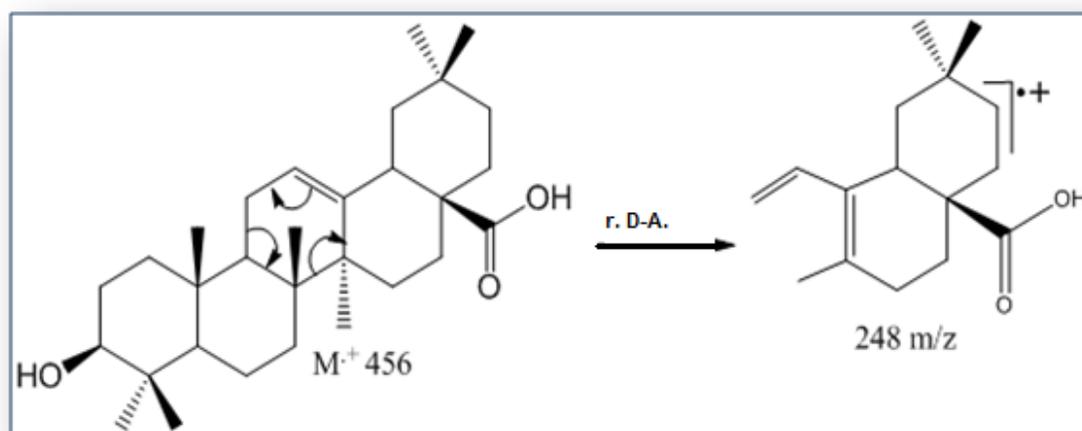


Figura 22. Esquema del mecanismo de fragmentación para el ácido oleanólico.

En la tabla 8 se observan las correlaciones C/H obtenidas en un experimento HSQC de la muestra SZ3HF4 (Figura 24).

Tabla 8 . Correlaciones obtenidas en el experimento HSQC de SZ3HF4

No.Carbono	RMN ¹³ C	RMN ¹ H
3	76.8	3.0(m, J=5 Hz)
12	121.5	5.1, (t, J=3,5 Hz)
23	28.2	0.9(s)
24	16.0	0.7(s)
25	15.1	0.8(s)
26	16.8	0.7(s)
27	25.6	1.1 (s)
29	32.8	0.9(s)
30	23.4	0.9(s)

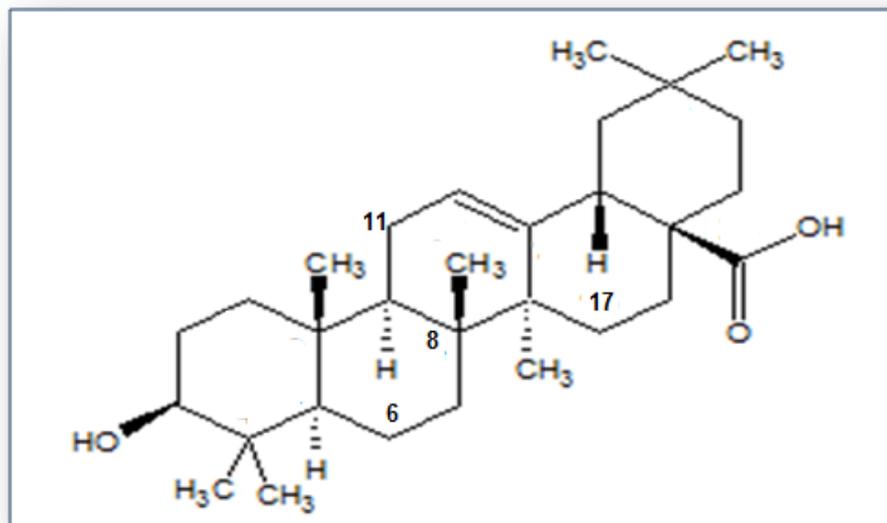


Figura 23. Estructura del ácido oleanólico (SZ3HF4)²¹.

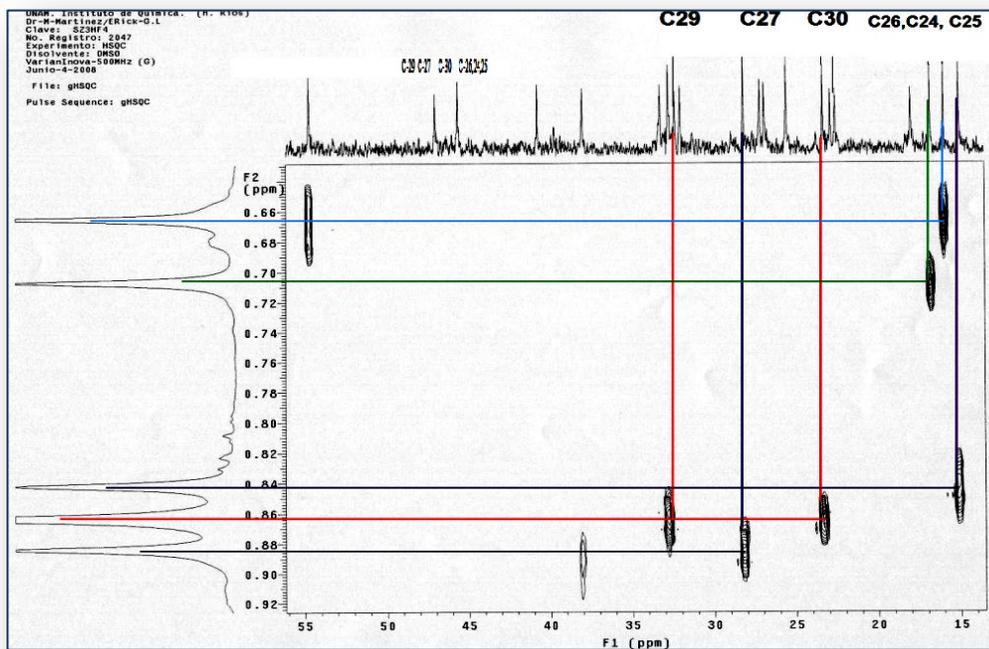
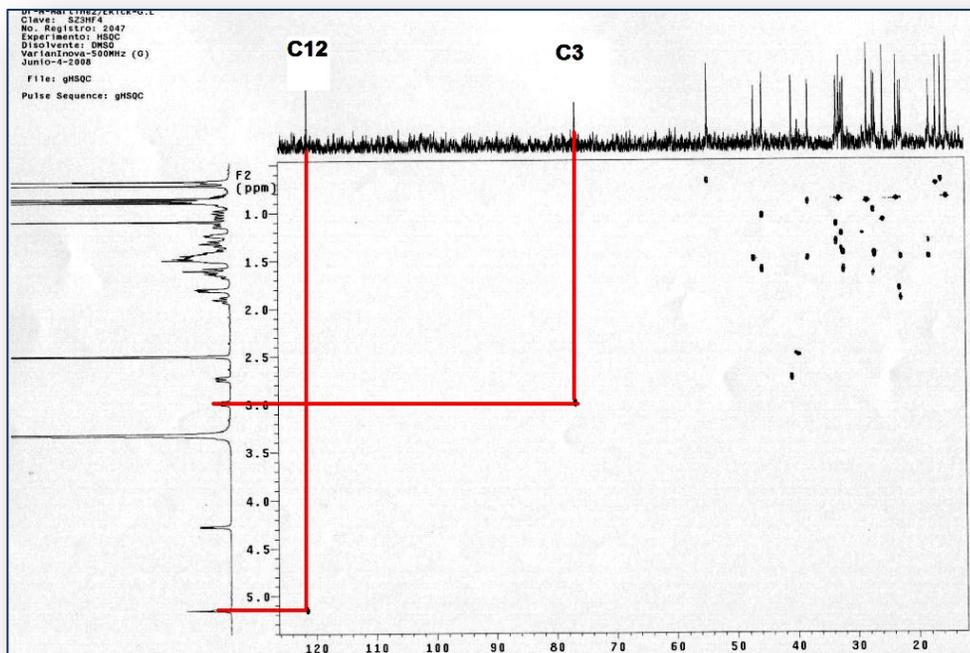


Figura 24. Espectros del experimento HSQC de SZ3HF4, 500 MHz en DMSO.

Tabla 9. Comparación de los desplazamientos químicos de RMN ¹H y RMN ¹³C de SZ3HF4 y el ácido oleanólico⁵⁹ en DMSO a 500 MHz (*Datos obtenidos de la literatura).

No. Carbono	RMN ¹³ C	RMN ¹ H	RMN ¹³ C*	RMN ¹ H*
1	38.0		39.0	
2	26.9		28.1	
3	76.8	3.0 (m, J=5 Hz)	78.2	3.0
4	38.3		39.4	
5	54.8		55.9	
6	18.0		18.8	
7	32.4		33.4	
8	38.8		39.8	
9	47.0		48.2	
10	36.6		37.4	
11	22.6		23.8	
12	121.475	5.1 (t, J=3,5 Hz)	122.6	5.2
13	143.8		144.8	
14	41.3		42.2	
15	27.2		28.4	
16	22.9		23.8	
17	45.7		46.7	
18	40.8		42.1	
19	45.4		46.6	
20	30.4		31.0	
21	33.3		34.3	
22	32.1		33.2	
23	28.2	0.9 (s)	28.8	1.0
24	16.0	0.7 (s)	16.5	0.8
25	15.1	0.8 (s)	15.6	0.9
26	16.8	0.7 (s)	17.5	0.7
27	25.6	1.1 (s)	26.2	1.1
28	178.5		180.0	
29	32.8	0.9 (s)	33.4	0.9
30	23.3	0.9 (s)	23.8	0.9

Todos los datos obtenidos hasta el momento, indican que el compuesto SZ3HF4 es en realidad el ácido oleanólico, propuesta que fue confirmada al comparar los datos espectroscópicos y espectrométricos de SZ3HF4 con aquellos publicados en la literatura (Djerassi, 1954)(Tabla 9).

En la fracción 12 (SZ3HF12) se obtuvo un producto sólido blanco con un punto de fusión de 185-189°C. El espectro IR, muestra una banda a 3430.0 cm^{-1} característica de grupo hidroxilo, dos bandas en 1742 y 1696 cm^{-1} para grupos carbonilo y una absorción débil a 1461 cm^{-1} que indica la presencia de un doble enlace (Figura 25).

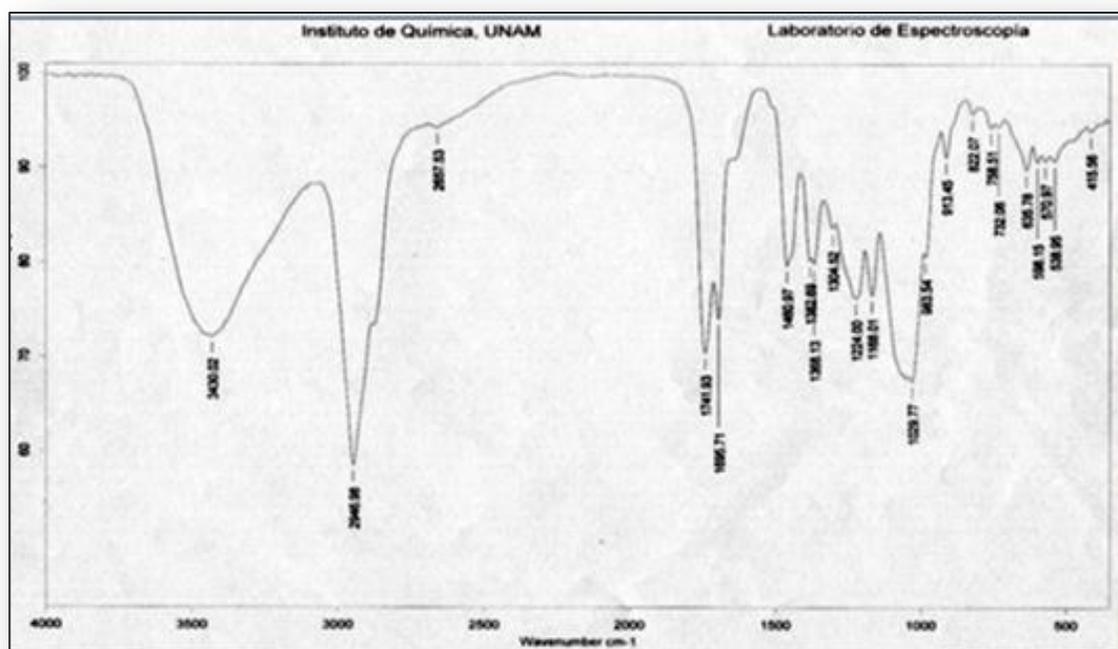


Figura 25. Espectro IR de SZ3HF12 en pastilla de KBr

En el espectro de RMN ^1H (Figuras 26 y 27) se observan las señales típicas del ácido oleanólico; a 11.9 ppm para el protón del hidroxilo del grupo ácido carboxílico, que se intercambia con D_2O , a 5.2 ppm ($J=3.5$ Hz) un doblete asignado al protón unido al C-12 y a 3.17 ppm un doblete ($J=5$ Hz) asignado al protón del carbono en C-3. La presencia de un residuo de ácido oleanólico en SZ3FH12 se ve confirmada en el espectro de RMN ^{13}C en donde se observan

todas las señales asignadas a este metabolito secundario. Adicionalmente, se observó un triplete a 5.14 ($J=3.5$ Hz) perteneciente a un protón vinílico, cuatro dobletes a 5.22 ($J=5.5$ Hz), 5.04 ($J= 5$ Hz), 5.70 y 5.95 atribuidos a protones de grupos hidroxilos, así mismo se observa en 4.27 una señal para un protón terciario que soporta un grupo éster, también se observa un singulete a 3.62 ppm que integra para tres protones, por último de observó un multiplete a 3.17 asignado a un protón unido a un átomo de carbono ligado a un grupo electronegativo tal como un hidroxilo. Estos datos indican que posiblemente SZ3HF12 es de naturaleza glicosídica.

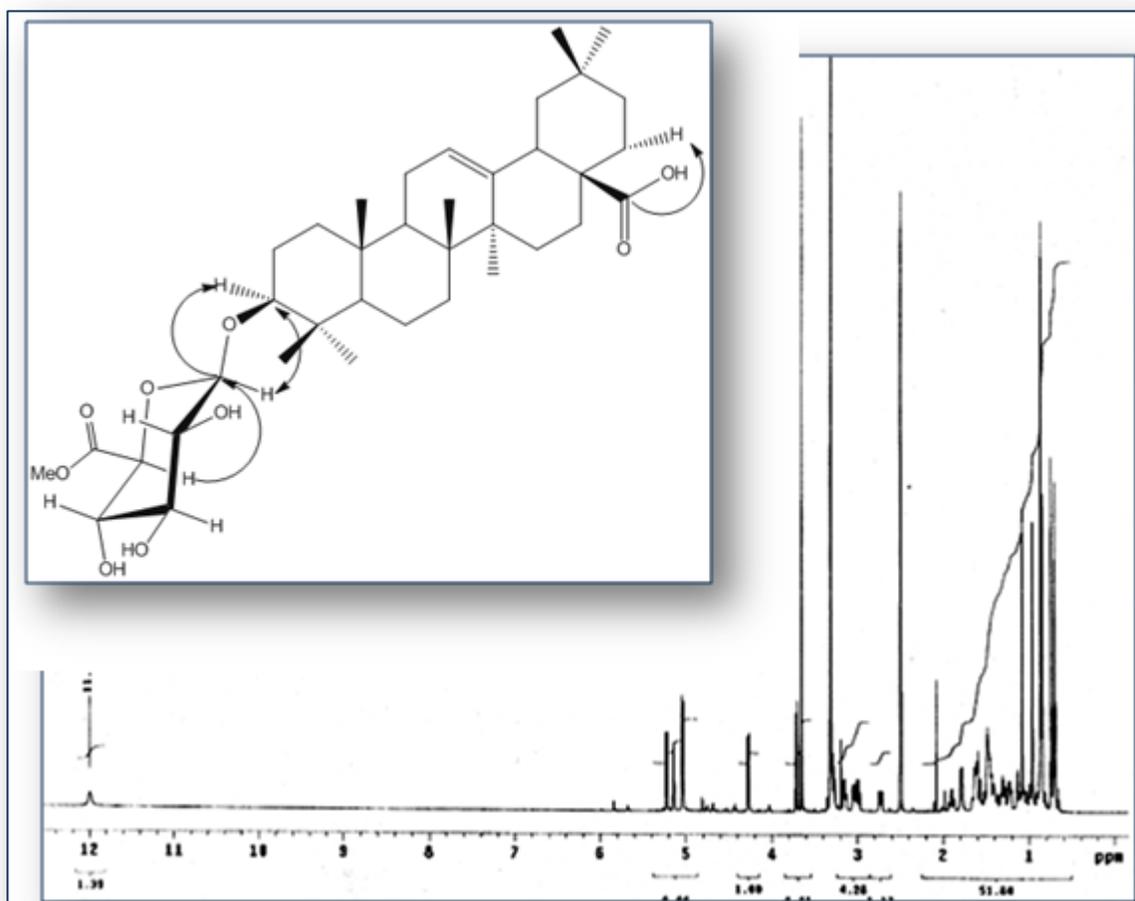


Figura 26. Espectro de RMN¹ H de SZ3HF12, 500 MHz, en DMSO.



Figura 27. Espectro de RMN¹ H de SZ3HF12, 500 MHz, en DMSO + D₂O.

Esta propuesta estructural es apoyada por las señales mostradas por SZ3HF12 en el espectro de RMN ¹³C donde se observan 37 señales de átomos de carbono (Figura 28). Por otro lado, en el experimento DEPT (Figura 29) se observan 8 señales que corresponden a CH₃, 10 señales para CH y 10 grupos CH₂, dando un total de 28 señales de átomos de carbono. Por lo tanto si restamos las 28 señales observadas en el experimento DEPT al total de observadas en el espectro de RMN ¹³C dan un total de 9 carbonos cuaternarios es decir carbonos sin hidrógenos lo cual dá un total de 37 átomos de carbono para SZ3HF12. Si se resta los 30 átomos de carbono de ácido oleanólico, ya identificado, entonces queda un residuo constituido de 7 átomos de carbono, que nos indican la presencia de un azúcar.

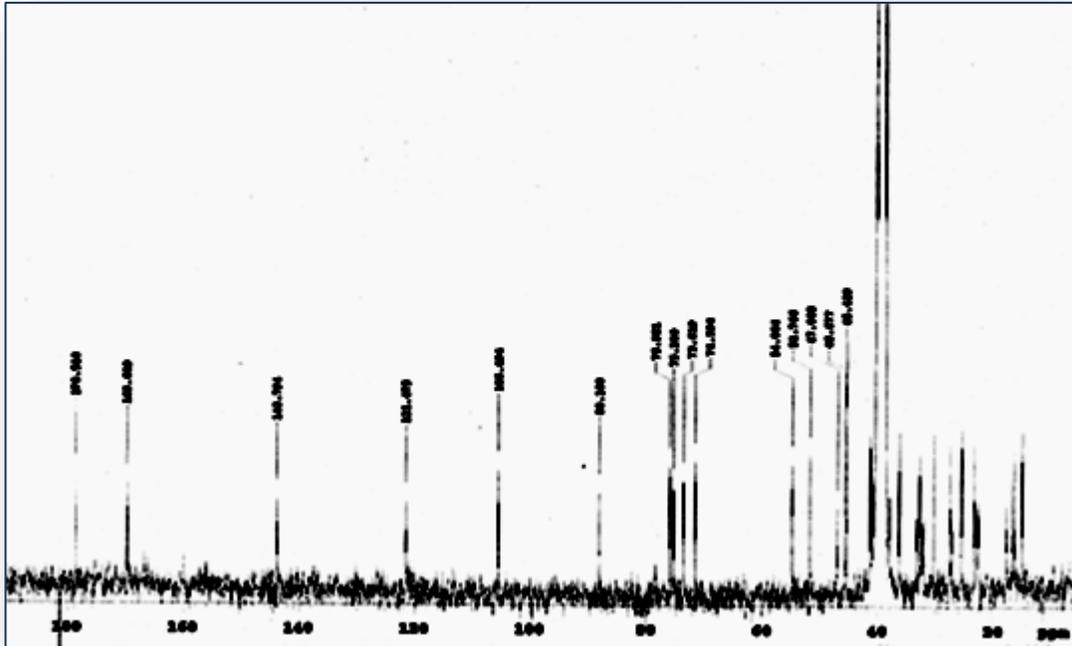


Figura 28. Espectro de RMN ^{13}C de SZ3HF12, 500 MHz, en DMSO + D₂O.

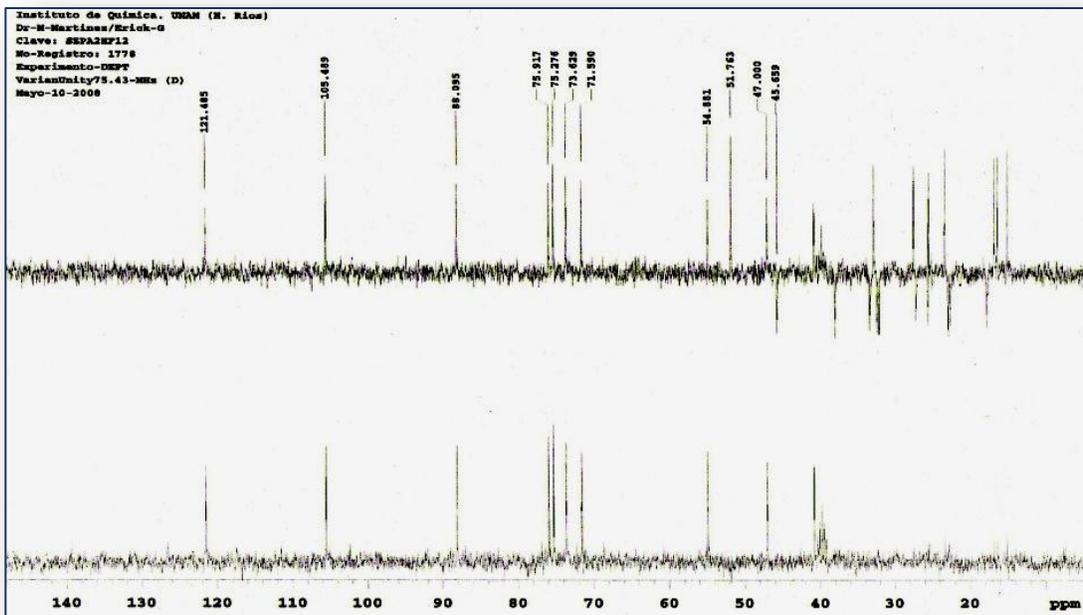


Figura 29. Espectro del experimento DEPT de SZ3HF12

Otro dato que evidencia la presencia de un residuo de ácido oleanólico en SZ3HF12, en su patrón de fragmentación en el espectro de masas, en donde se observan los fragmentos a 248 m/z y 203 m/z característicos de triterpenos con esqueleto de tipo del oleanano (Figura 30).

El fragmento en 207 m/z ($C_7H_{11}O_7$) aunado a la presencia de un grupo metoxilo, identificado en RMN 1H (s, 3.62) y ^{13}C (51.76, DEPT), podría indicar la presencia de un residuo de éster metílico del ácido glucónico en SZ3HF12. Suposición que es apoyada por el residuo de 7 átomos de carbono, adicionales al ácido oleanólico, indicado por los experimentos de RMN ^{13}C .

De acuerdo con los datos hasta el momento analizados, se podría sugerir que el compuesto SZ3HF12 es un glicósido donde la aglicona es el ácido oleanólico y la parte del azúcar es el glucoronato de metilo. Sin embargo, en el espectro de masas no muestra el ion molecular esperado a 646 m/z, no obstante se observa un fragmento a 438 m/z que corresponde a la pérdida de una molécula del éster metílico de la estructura principal (Figura 31).

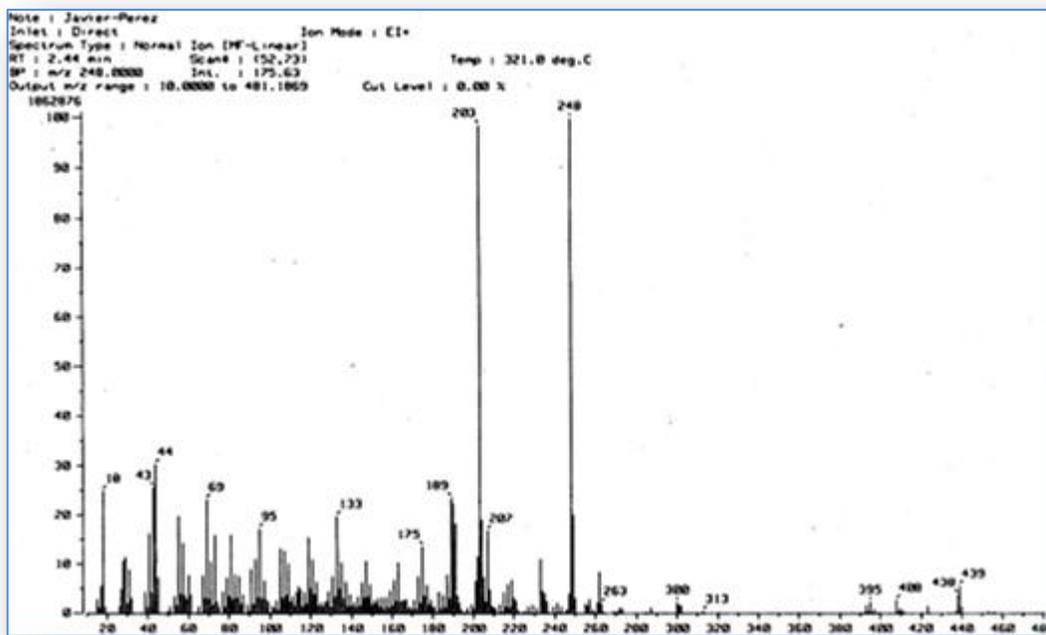


Figura 30. Espectro de masas SZ3HF12 obtenido por IE (70 eV).

Así mismo, la fragmentación de la molécula sucede de forma similar que para el ácido oleanólico, de igual forma para el ion observado en el EM a 248 m/z, se forma por una reacción de tipo retro Diels-Alder (r.D-A.) donde el mecanismo de ruptura es el inverso de una reacción de adición entre un dienófilo y un dieno como en el mismo caso de SZ3HF4.

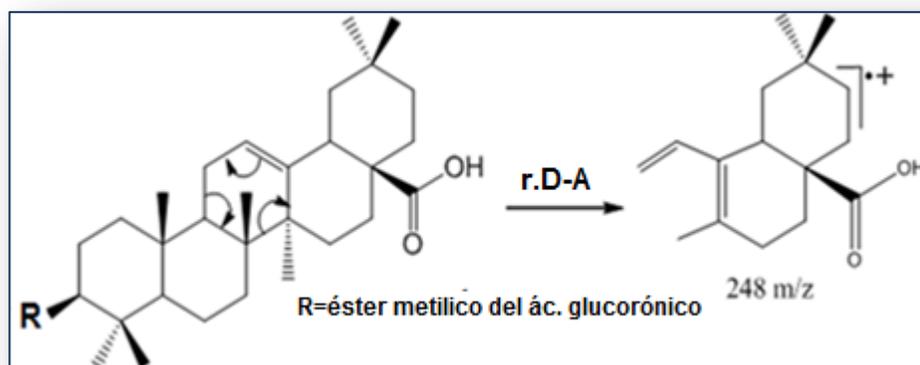


Figura 31. Mecanismo de fragmentación del glicósido del Ác. Oleanólico.

De lo anterior, para el glicósido del ácido oleanólico se muestra el mecanismo de fragmentación r. D-A. formando el ión respectivo (Figura 31).

En la tabla 10. Se observan las correlaciones C-H obtenidas en un experimento HSQC de la muestra SZ3HF12 (Figura 32).

Tabla 10. Correlaciones obtenidas en el experimento HSQC de SZ3HF12

No. Carbono	RMN ¹³ C	RMN ¹ H
3	88.0	3.0 (d, <i>J</i> =5 Hz)
12	121.5	5.1 (t, <i>J</i> = 3.5 Hz)
23	30.4	1.0
24	16.4	0.7
25	15.1	0.8
26	16.8	0.7
27	25.5	1.1
29	33.3	0.9 (s)
30	22.6	0.9 (s)
Asignaciones para el éster metílico del ác. glucorónico		
No. Carbono	RMN ¹³ C	RMN ¹ H
1'	105.5	4.3 (d, <i>J</i>=6Hz)
2'	75.3	3.1
3'	73.6	3.0
4'	71.6	3.3
5'	75.3	3.2
6'	169.6	-
OMe	51.8	3.6

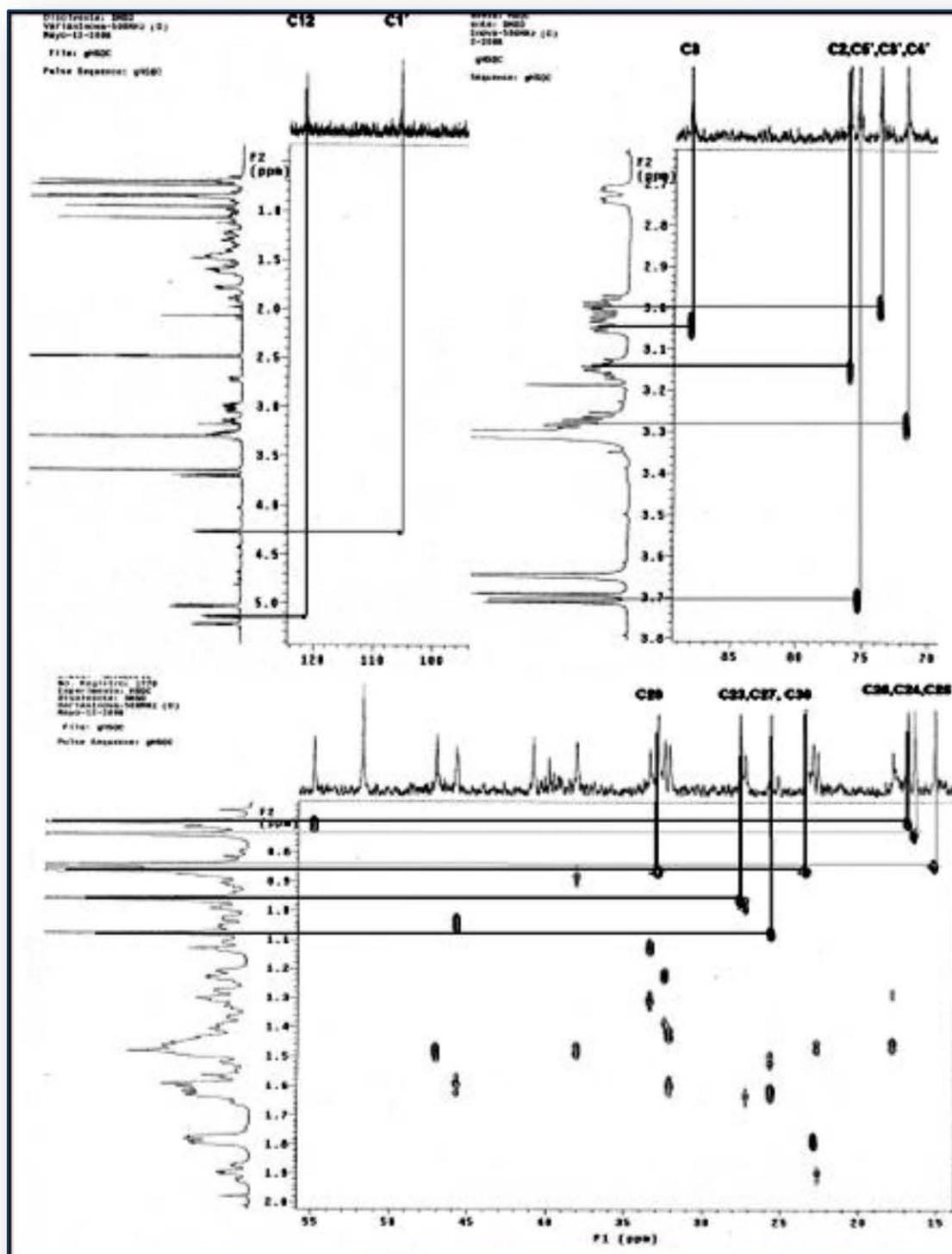


Figura 32. Espectros del experimento HSQC de SZ3HF12, 500 MHz en DMSO

Los datos, hasta el momento obtenidos, indican que SZ3HF12 es un glicosido del éster metílico del ácido oleanólico, propuesta que fue confirmada al comparar los datos espectroscópicos y espectrométricos de SZ3HF12 con los de SZ3HF4 y aquellos publicados en la literatura (tabla 11).

Tabla 11. Desplazamientos químicos de RMN ¹H y RMN ¹³C asignados al compuesto SZ3HF12 comparados con SZ3HF4* en DMSO a 500 MHz.

No.Carbono	RMN ¹³ C	RMN ¹ H	RMN ¹³ C*	RMN ¹ H*
1	38.7		39.0	
2	27.2		28.1	
3	88.0	3.0 (d, J=5.0 Hz)	78.2	3.1
4	39.0		39.4	
5	54.9		55.9	
6	17.8		18.8	
7	32.8		33.4	
8	40.8		39.8	
9	51.8		48.2	
10	38.0		37.4	
11	23.3		23.8	
12	121.5	5.1 (t, J= 3.5 Hz)	122.6	5.2
13	143.8		144.8	
14	45.4		42.2	
15	27.5		28.4	
16	22.9		23.8	
17	47.0		46.7	
18	41.3		42.1	
19	45.7		46.6	
20	32.1		31	
21	36.3		34.3	
22	32.3		33.2	
23	30.4	1.0	28.8	1.0
24	16.4	0.7	16.5	0.8
25	15.1	0.9	15.6	0.9
26	16.8	0.7	17.5	0.7
27	25.5	1.1	26.2	1.1
28	178.5		180	
29	33.3	0.9 (s)	33.4	0.9
30	22.6	0.9 (s)	23.8	0.9

Continuación de la tabla 11. Asignaciones para el éster metílico del ácido glucorónico.

No.Carbono	RMN ¹³ C	RMN ¹ H	RMN ¹³ C*	RMN ¹ H*
1'	105.5	4.3 (d, J=6Hz)	105.3	5.23(d, J=7.8 Hz)
2'	75.3	3.1	73.7	3.4
3'	73.6	3.0	77.6	3.4
4'	71.6	3.3	72.2	3.3
5'	75.3	3.2	76.5	3.2
6'	169.6	-	172.9	-
OMe	51.8	3.6	52.1	3.8 (3H, s)

*Desplazamientos químicos según la literatura, los cuales están en piridina. ²⁷⁻³¹.

De acuerdo con los resultados, es evidente que SZ3HF12 es un glicósido del ácido oleanólico; a saber el glucoronato de metilo. En el espectro de HMBC se observaron las interacciones entre el átomo de carbono anomérico C-1' con la señal doblete asignada al protón en C-3 y aquella entre el átomo C-3 y el protón anomérico (Figura 33). Los datos espectroscópicos señalan inequívocamente que SZ3HF12 corresponde al ácido 3-O-β-(6'-metil)-glucoronil oleanólico (Figura 34).

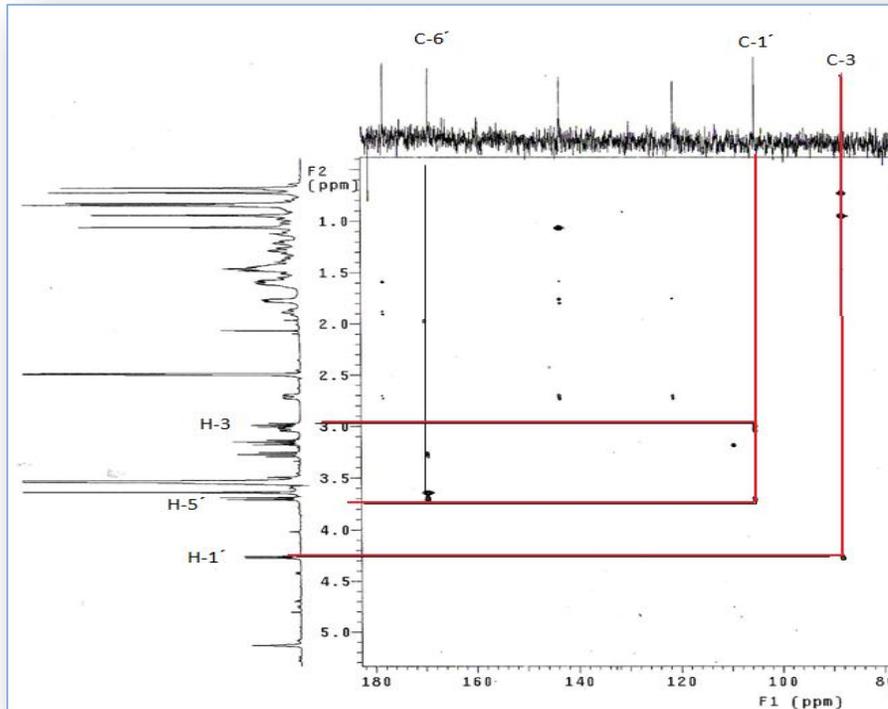


Figura 33. Espectro HMBC de SZ3HF12

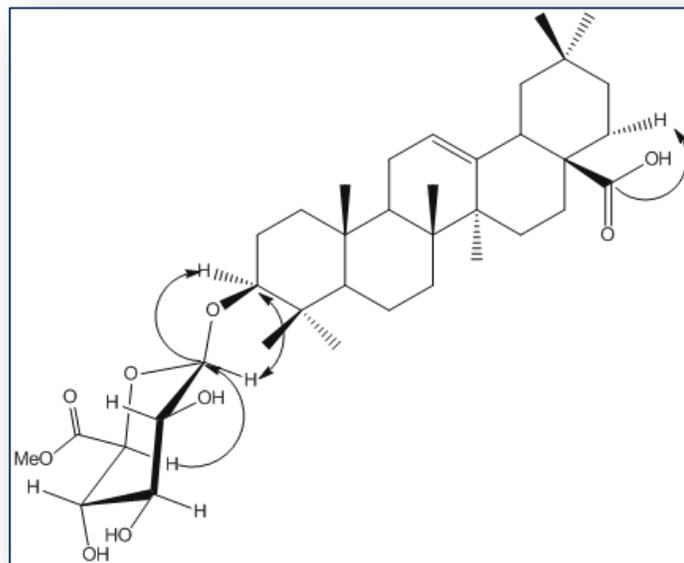


Figura 34 . Correlaciones obtenidas en el espectro HMBC y estructura del glicósido del ácido oleanólico (SZ3HF12).

Por otro lado, del mismo extracto metanólico de las partes aéreas se logró aislar un sólido (SZPA215) de la misma columna que se obtuvo SZPA239 con un punto de fusión de 238- 240°C, PM 940 (FABEM) que corresponde a la fórmula $C_{48}H_{76}O_{18}$, lo anterior se corroboró con los datos espectroscópicos de RMN ^{13}C (Figura 35) en el cual se observaron 48 átomos de carbono señalados en la fórmula determinada en FABEM (Figura 36).

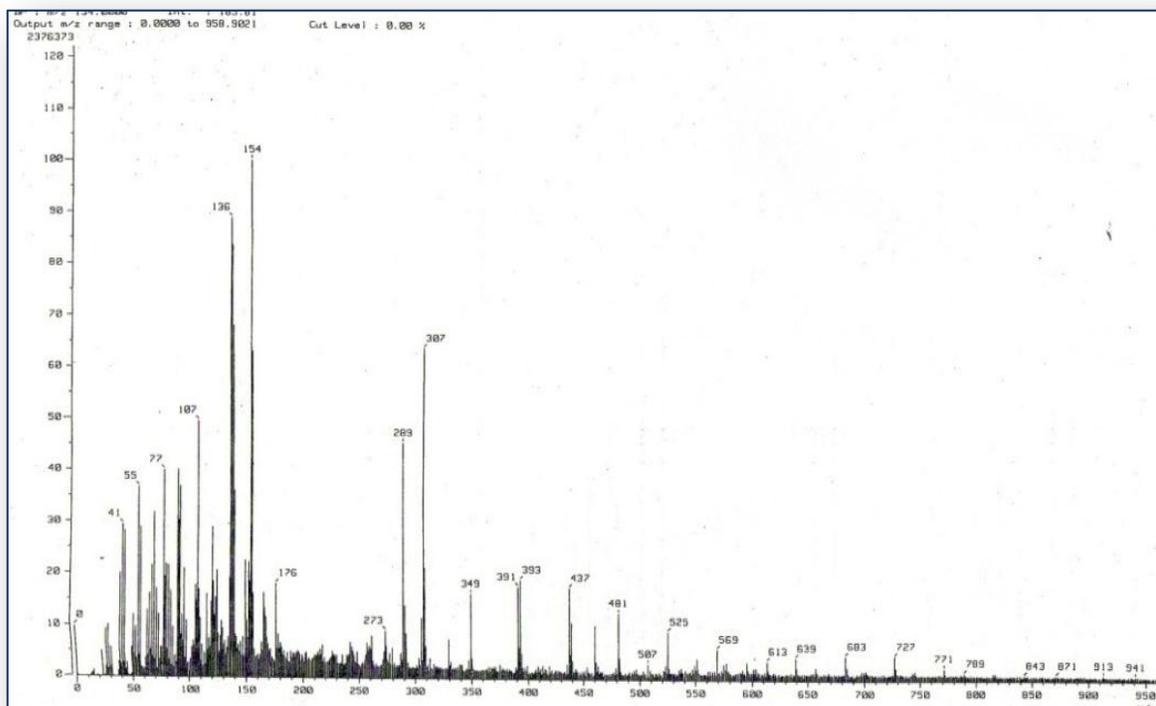


Figura 35. Espectro de masas de SZPA215 (FABEM).

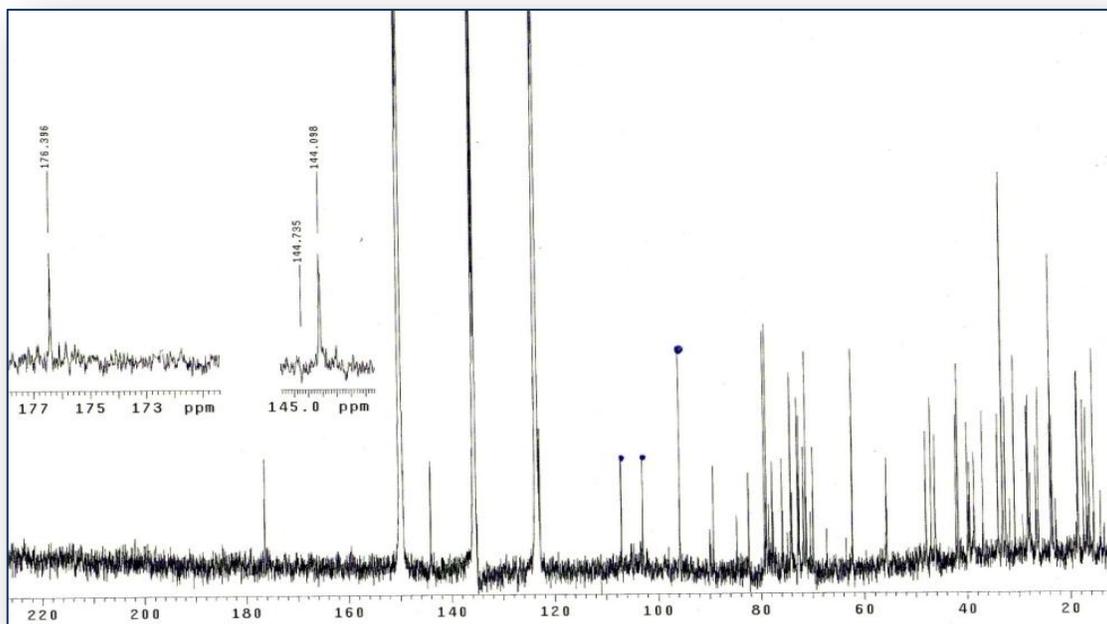


Figura 36. Espectro de RMN^{13}C de SZPA215 (75.4 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$).

En el experimento DEPT se observaron 8 CH_3 , 11 CH_2 , 18 CH y 11 átomos de carbono sin hidrógenos (Figura 37).

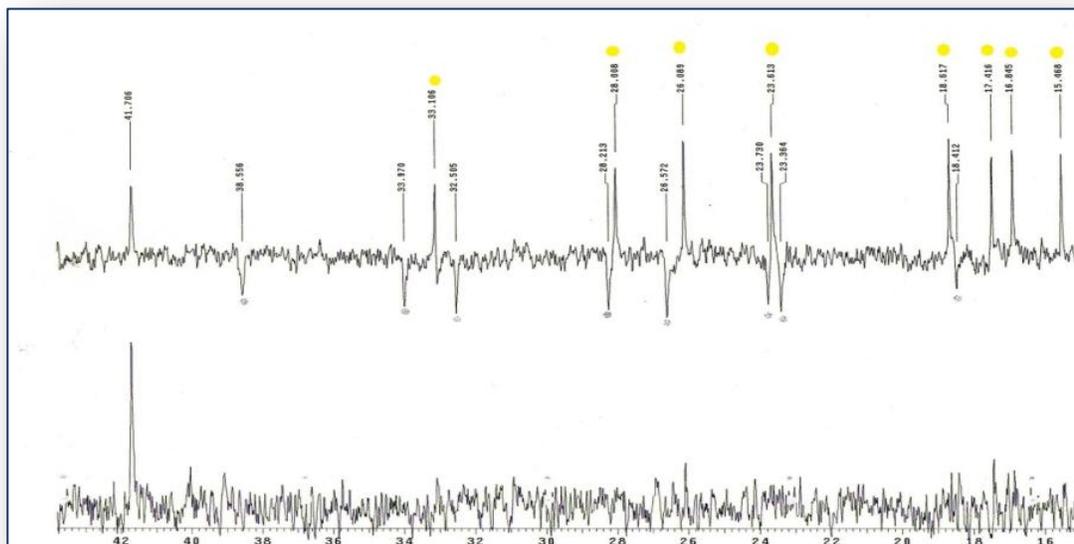


Figura 37. Experimento DEPT (SZPA215).

El análisis del espectro de RMN ^{13}C mostró que la aglicona de este glicósido es el ácido oleanólico. Sin embargo en el espectro se observan tres residuos de azúcares (ramnosa, glucosa y ac. glucorónico). La presencia de estos residuos junto con el ácido oleanólico está de acuerdo con la fórmula $\text{C}_{48}\text{H}_{76}\text{O}_{18}$ establecida por FABEM (Figura 38).

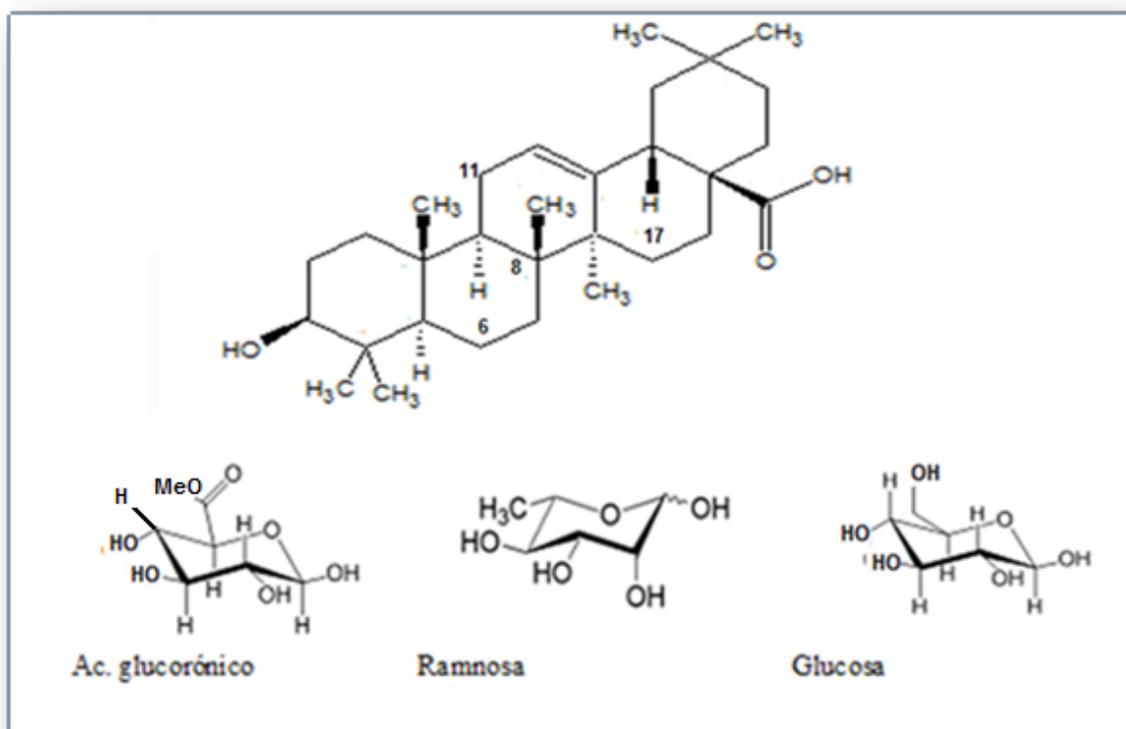


Figura 38. Estructura del ácido oleanólico y los residuos de azúcar identificados.

Las señales en 107.0 (C'1), 75.3 (C'2), 78.9 (C'3), 72.5 (C'4), 77.8 (C'5), 172.6 (C'6) fueron asignadas a un residuo del ácido glucorónico, las señales en 102.9 (C''1), 78.4 (C''2), 77.8 (C''3), 71.6 (C''4), 78.9 (C''5), 62.6 (C''6), fueron asignadas a un residuo de glucosa y las señales en 95.5 (C'''1), 72.7 (C'''2), 71.0 (C'''3), 82.3 (C'''4), 69.8 (C'''5), 18.6 (C'''6), fueron asignadas a un residuo de ramnosa (Figura 39).

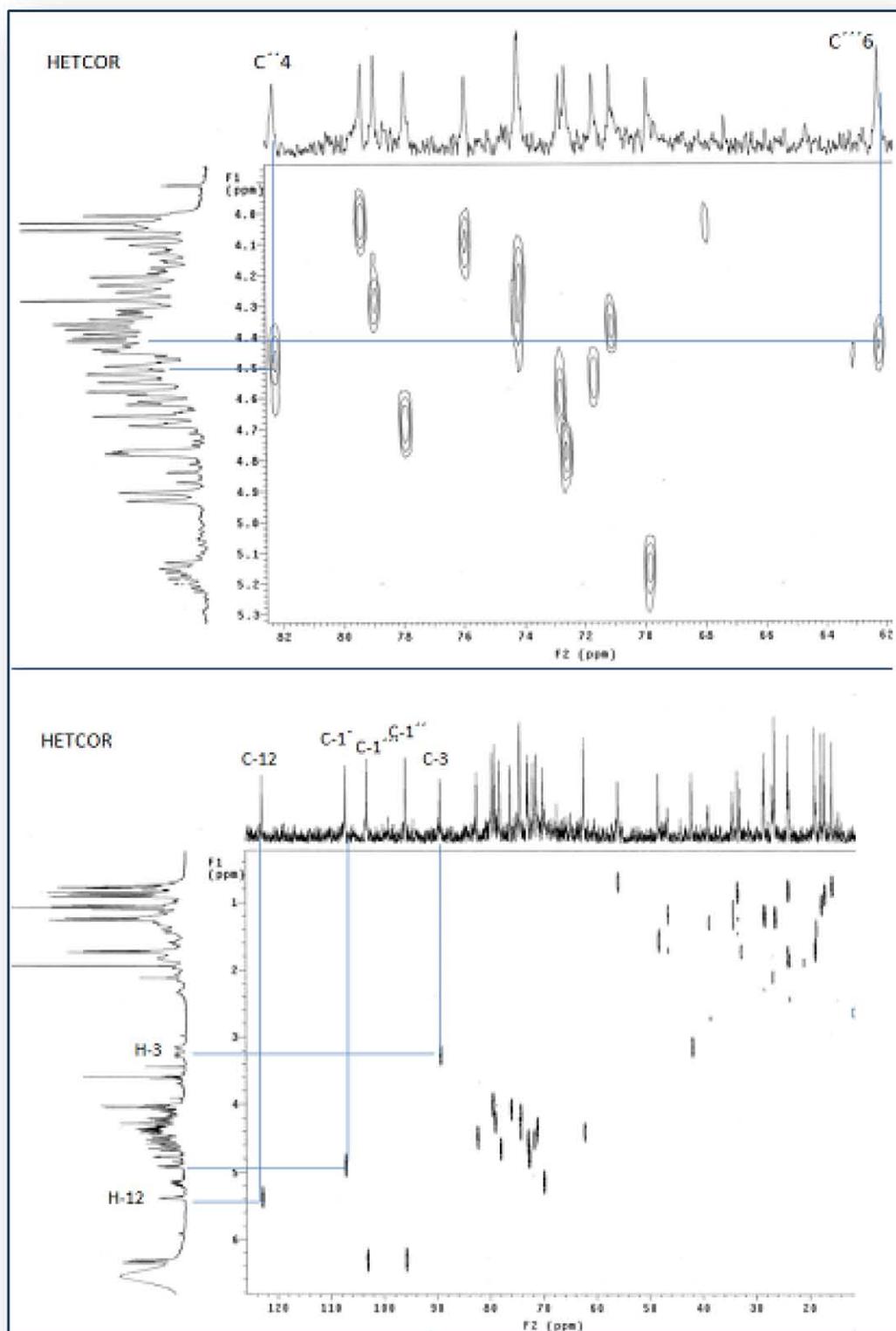


Figura 39. Experimento HETCOR de SZPA215.

La posición de estos azúcares, por un lado el glucoronato de metilo unido al carbono 3 del esqueleto principal y por otra la glucosa y ramnosa unidos en cadena al carbono 28 de la estructura del ácido oleanólico, se logró comparando los datos espectroscópicos obtenidos de los productos de hidrólisis a la cual se sometió este glicósido.

Los resultados obtenidos indican que la estructura de SZPA215 está conformado por la subestructura de SZHF12, y por dos residuos de carbohidratos uno de ramnosa y otro de glucosa. La posición de la ramnosa y glucosa en SZPA215 se logró mediante el análisis y correlación de los datos de los experimentos HETCOR y HMBC de SZHF12 y SZPA215.

Las interacciones de RMN $^{13}\text{C}/^1\text{H}$: 95.7/ 6.32 C'' ramnosa 102.9/ 6.36 C''' glucosa 106.9/ 4.89 C' ác. glucorónico y 88.2/ 3.28 C-3 se observan en el espectro HMBC (Figura 40).

Es interesante mencionar la importancia de estas interacciones:

La primera interacción de la ramnosa $^{13}\text{C}/^1\text{H}$, correlaciona la parte del azúcar que se une al esqueleto base del ácido oleanólico por la parte del ácido carboxílico presente en la estructura.

La interacción de la ramnosa y la glucosa nos dice en que carbono de la ramnosa se une a la glucosa.

La tercera interacción nos dice la posición del azúcar restante que es el glucoronato de metilo unido al esqueleto base del ácido oleanólico en el carbono 3.

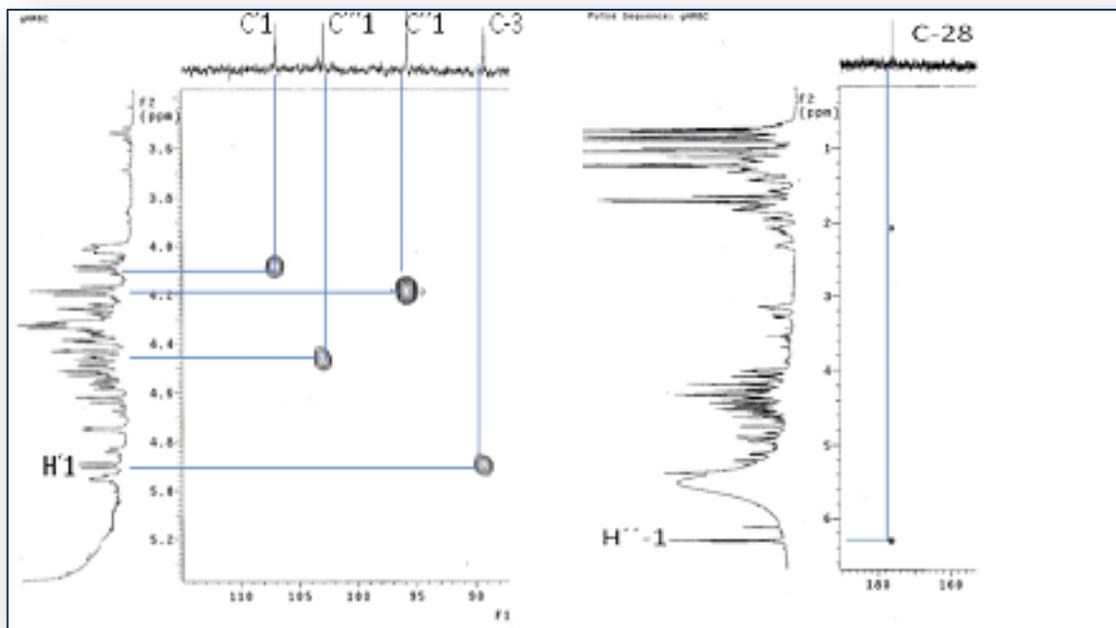


Figura 40. Experimento HMBC de SZPA215.

De acuerdo con los datos espectrométricos y espectroscópicos de SZPA215 corresponde a la estructura del éster 3-O- β -glucoronil-28-(1,4-glucopiranosil) ramnosil oleanato (Figura 41).

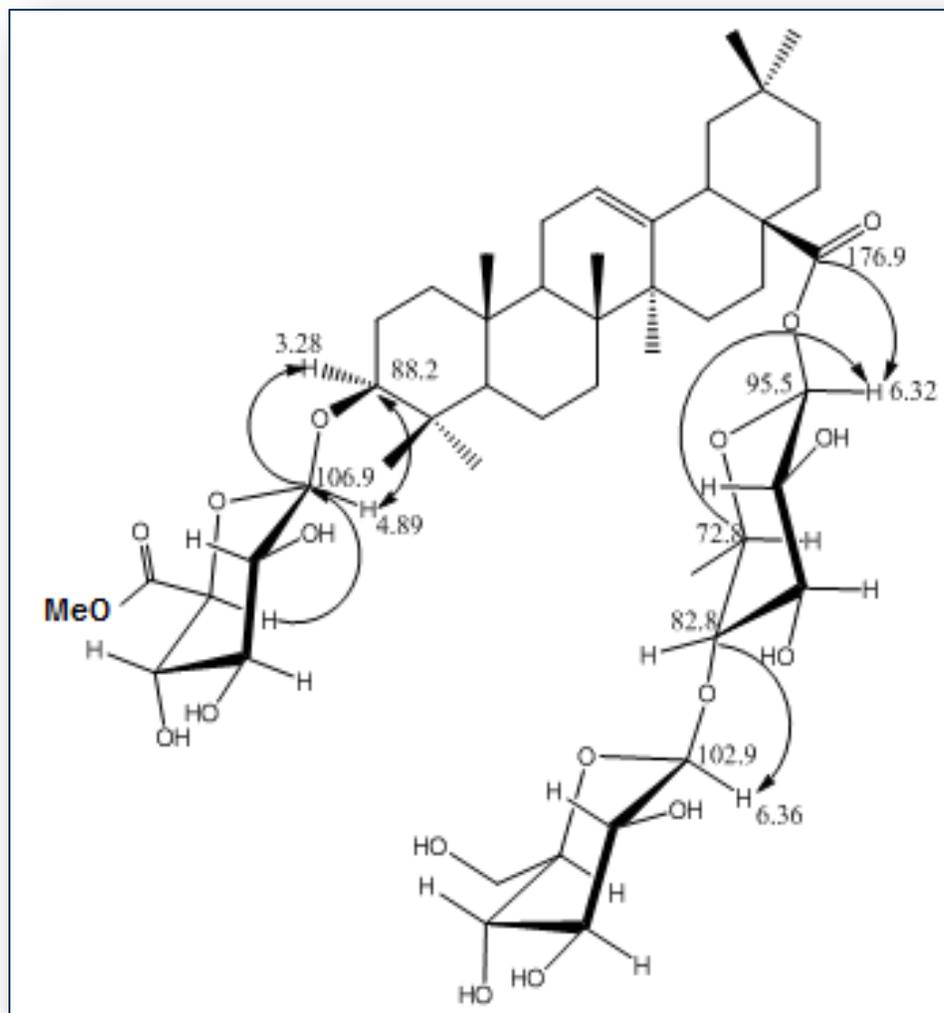


Figura 41. Algunas interacciones observadas en los espectros HMBC de SZPA215 .

Capítulo VI

Conclusiones

El estudio fitoquímico de las partes aéreas de *Stenocereus zopilotensis* permitió el aislamiento del ácido 3-O-β-(6-metil)-glucoronil oleanólico (estructura **1**) y del éster 3-O-β-glucoronil-28-(1,4-glucopiranosil) ramnosil oleanato (estructura **2**), constituyen nuevos compuestos en la literatura.

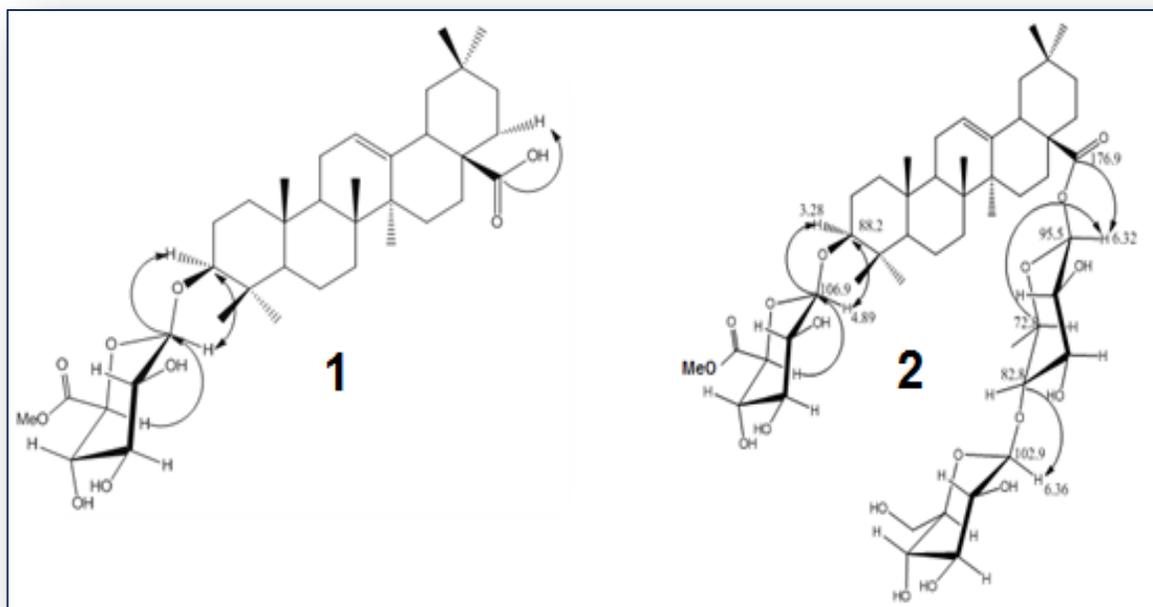


Figura 42. Estructuras 1 y 2 de los glicósidos aislados de *S. Zopilotensis*.

Estos hallazgos están en total acuerdo con estudios previos de especies del género *Stenocereus*, en donde la característica química del género es la presencia de triterpenos del tipo oleanano.

Referencias

1. Adedapo A, Koduru S, Jimoh F, Masika P, Afolayan A. An Ethnoveterinary survey and the antibacterial activity of some plants in the Eastern Cape Providence of South Africa, en “ Recent Progress in Medicinal Plants. Ed. Stadium Press, LLC, USA, florida; **2008**. pp 1-7.
2. Organización Mundial de la Salud (OMS). Summary of WHO guidelines for the assessment of herbal medicines, Herbal Groom; **1993**. 28, 13-14
3. Izevbigie E. Discovery of water-soluble anticancer agents (Edotides) from a vegetable found in Benin City, Nigeria; **2003**. 228, 293-298.
4. Domínguez X., Métodos de investigación fitoquímica. Centro Regional de Ayuda Técnica. Ed. Gráfica Panamericana, México D.F; **1973**.
5. Organización Mundial de la Salud. Tradicional Medicine; **2008**. disponible: www.who.int/mediacentre/factsheets/fs134/enl.
6. Villar del Fresno A. Farmacognosia general. Ed. Síntesis, S.A., España, Madrid; **1999**
7. Martínez M. Las plantas medicinales de México. Ed. Botas, S.A., México, D.F.; **1990**. pp. 104-129.
8. Kliebenstein D. Secondary Metabolites and Plant/Environment Interactions: A View Through Arabidopsis thaliana Tinged Glasses. J. Plant, Cell and Environment; **2004**. 27: 675–684.
9. Kliebenstein D, Anaya L. Ecología química. Editorial Plaza y Valdes. México.D.F; **2004**.
10. Evans W. “Pharmacognosy”. Ed. W.B. Saunders, Reino Unido; **2002**.
11. Sengbusch, P. The Secondary Metabolism of Plants: Secondary defense Compounds; **2008**. Disponible en : www.biologie.uniamburg.de/bonline/e20/20.htm.

12. Harborne, H. B. **1984**. *Phytochemical Methods (A Guide to modern techniques of plant analysis)*. Second edition, Chapman and Hall, New York 1-36.
13. Farnsworth N, Bingel A. Problems and prospects of discovering new drugs from higher plants by pharmacological screening. En: H. Wagner y P. Wolff (Eds.) *New Natural Products and Plants Drugs. with pharmacological, Biological or therapeutic Activity*. Springer, Berlin; **1977**. 1-22.
14. Marker R, Wagner R, Vishafer R, Wittbesker E, Goldsmith P, Rouf G. Steroidal sapogenins. *J. Am. Chem. Soc.*; **1947**. 69, 2167.
15. Martínez M. *Las Plantas Medicinales de México*, 4ta. Edición, Editorial Botas, México, DF; **1959**. pág. 107.
16. Romo de Vivar A, Romo J. Constituents of *Helenium mexicanum* H.B.K. *Chemistry and Industry*; **1959**. Pp. 882.
17. Romo de Vivar A. La Química de los Productos Naturales en México: Lactonas Sesquiterpénicas. *Ciencia Méx.*; **1981**. 32, 163-189.
18. Hernández H, Godínez A. Contribución al conocimiento de las cactáceas mexicanas amenazadas. *Acta Botánica Mexicana*; **1994**. 26, 33-52.
19. Bravo H, Scheinvar L. El interesante mundo de las cactáceas. CONACYT-FCE, México, DF; **1995**. pp. 233.
20. Rzedowski J. *Vegetación de México*. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Instituto Politécnico Nacional. México, DF; **1978**. pp. 432-433.
21. Terrazas T, Loza-Cornejo, Arreola-Nava J. Anatomía caulinar de las especies del género *Stenocereus* (Cactaceae). *Acta Botánica Venezolana*; **2005**. 28, 321-336.
22. Fontana-Urbe B. Una mirada retrospectiva al estudio de los triterpenos en el Instituto de Química. En *Química de la Flora Mexicana*. Romo de Vívar, A. (Editor). Instituto de Química- Sociedad química de Mexico. UNAM; **2005**. pp. 89-139.
23. Hunt D. *Cites Cactaceae Checklist*. 2da edición; **1999**. 315 p.

24. Barrios P. El pitayo en Jalisco y especies afines en México . Edit. Universidad de Guadalajara. México, Guadalajara; **1999**. 234 pp.
25. Gibson C, Horak E. Systematic anatomy and phylogeny of Mexican columnar cacti. *Ann. Missouri Bot. Gard*; **1978**.65, 999-1057.
26. Céspedes C. Insect growth regulatory effects of some extracts and sterols from *Myrtillocactus geometrizans* (Cactaceae) against *Spodoptera frugiperda* and *Tenebrio molitor*. *Phytochemistry*; **2005**. 66, 2481-2493.
27. Djerassi C, Geller L, Lemin A. Terpenoids. I. The triterpenes of the cactus *Lemaireocereus Thurberi*. *Jour. Am. Chem. Soc.*; **1953**.75, 2254.
28. Djerassi C. Terpenoids. XIII. The Structures of the Cactus Triterpenes Machaeric Acid and Machaerinic Acid. *J. Am. Chem. Soc.*; **1955**.77, 1825-1828.
29. Djerassi C. Terpenoids. VIII. The Structures of the Cactus Triterpenes Gummosogenin and Longispinogenin. *J. Am. Chem. Soc.*; **1964**.76, 4089-4091.
30. Djerassi C. Terpenoids. XXIV. The Structure of the Cactus Triterpene Queretaroic Acid. *J. Am. Chem. Soc.*; **1956**. 78, 3783-3787.
31. Djerassi C. Terpenoids. XI. Investigation of Nine Cactus Species. Isolation of Two New Triterpenes, Stelatogenin and Machaeric Acid. *J. Am. Chem. Soc.*; **1954**. 77, 1200-1203.
32. Nava & Terrazas T. *Stenocereus zopilotensis* Arreola-Nava & Terrazas *Brittonia*; **2004**. 56,1 97-98.
33. Rosellón A. Nuevas estrategias sintéticas hacia triterpenos irregulares y cromano derivados. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias. Universidad de Granada; **2005**.
34. Salemink C. Problems involved in structure determination of active principles of plants used in traditional medicines: Extraction, separation and determination of characteristics of active principles. *J. of Ethno pharmacology*; **1980**. 2,135-143.

35. Silverstein R, Bassler G, Morrill T. Identificación espectrométrica de compuestos orgánicos. Editorial Diana, México, DF; **1980**. 17-84.
36. Creswell C, Runquist O, Campbell M. Análisis Espectral de Compuestos Orgánicos, Editorial Diana. México, DF; **1979**. P-31.
37. Domínguez X. Métodos de Investigación Fitoquímica. Editorial Limaza, México, DF; **1979**. p.p. 202-218.
38. Scott A. Interpretation of the Ultraviolet Spectra of Natural Products. Pergamon Press, Oxford.; **1964**. Pp. 202
39. Williams D, Fleming I. Spectroscopic methods in organic chemistry. Third Edition, McGraw-Hill, Inglaterra; **1980**. P-18.
40. Jelinski L. Modern NMR Spectroscopy: New Techniques instruments help to elucidate structures and Dynamics in Polymer Studies and Biochemistry. *Chem. Eng. News.*; **1984**. 26-42.
41. Bates R. Schaefer J. Técnicas de Investigación en Química Orgánica. Prentice Hall Internacional. España, Madrid, **1977**. pp. 124-125.
42. Walls F. Las ciencias en el siglo XX, 3. La Química Contemporánea. Resonancia magnética. Nuclear; Cárdenas, J. Universidad Nacional Autónoma de México, DF; **1984**. p-177.
43. Romo de Vivar A, Reyes B, Delgado G, Schlemper E. Constituents of *Pluchea sericea* Structure and Stereochemistry of (11S) 11,13-Dihydrotessaric Acid. *Chem. Let.*; **1982**. 957-960.
44. Salgado O, Magana M, Ramírez A, Salazar J, Martínez V. Citotoxic activity of, 3 β ,6 α -diol-cholest-8-ene, 14 α -methyl-3 β ,6 α -diol-cholest-8-ene and 3 β ,16 β ,22 α ,28-tetrol-olean-12-ene. 53rd Annual Congress of the Medicinal Plant Research; **2005**.
45. Nava & Terrazas T. *Stenocereus zopilotensis* Arreola-Nava & Terrazas. *Brittonia*; **2004**. 56,1 97-98.

46. Barberán F, Tomás F. An allose containing 8-hydroxycitrisoeriol diglycoside from *Siderites leucantha*. *Rev. Latinoamer. Quím.*; **1985**. 16, 47-50.
47. Farnsworth N. The Development of Pharmacological and Chemical Research for Application to Traditional Medicine in Development Countries. *J. of Ethnopharmacology.*; **1980**. 2, 173-181.
48. Jiménez H. Estudio Químico de Plantas Medicinales Mexicanas: Constituyentes de *Cecropia obtusifolia* (Guarumbo) y *Zanthoxylum liebmaniarum* (Colopahtle). Tesis de Licenciatura. UNAM, ENEP-ZARAGOZA (México); **1989**. 108 p.
49. Mata R, Navarrete A, Álvarez L, Pereda-Miranda R, Delgado G, Romo de Vivar A. Flavonoids and terpenoids of *Chenopodium graveolens*. *Phytochemistry*; **1987**. 26, 191-192.
50. Navarrete A, Mata R, Delgado G. Alkyl anacardic acids from *Amphipterygium Adstringes*. *Planta Medica* (en prensa); **1989**.
51. Pesce E. Productos farmacéuticos de las Plantas Medicinales. *Medicina Tradicional*; **1977**. 4, 5-21.
52. Romo de Vivar A, Romo J. *Ciencia Méx.*; **1961**. 21, 33.
53. Sadler I. The use of N.M.R. Spectroscopy in the structure Determination of Natural Products: One Dimensional Methods. *Natural Products Reports*; **1988**. 43, 101-127.
54. Shoolery J. Recent Developments in ¹³C and Proton-NMR. *J. Nat. Prod.*; **1984**. 47, 226-259
55. Silverstein R, Bassler G, Morrill T. Identificación espectrométrica de compuestos orgánicos. Editorial Diana, México, DF.; **1980**. 17-84.
56. Soriano M, Toscano R, Ortiz B, Navarrete A, Sánchez R, Barrios H, et. Al. Structure and Stereochemistry of the methyl ester of (5,13, 14, 17,20S, 24Z) -3- oxolanosta -7, 24-dien-26-oic acid (Masticadienonin Acid). *Acta Cryst. C.*; **1987**. 43, 990-992.

57. Swaving J. Separation of diantrona glycosides in senna and rhubarb on columns of sephadex LH-20. *J. Chromatography*; **1968**. 35, 562.
58. Walls F. Las Ciencias en el siglo XX, 3; La Química Contemporánea (Cristalografía de Rayos X; Soriano-García, M y Toscano, R. A.) Universidad Nacional Autónoma de México, México, DF.; **1984** p-221.
59. Williams D, Fleming I Spectroscopic methods in organic chemistry. Third Edition, McGraw-Hill, Inglaterra; **1980**. P-18.
60. Harborne J, Mabry T, Mabry H. The Flavonoids, Chapman and Hall, London; **1975**. pp. 202-204.
61. Harborne J, Mabry T. The Flavonoids: Advances in Research. Chapman and Hall; London. **1982**.
62. Manitto P. Biosynthesis of Natural Products. John Wiley & Sons. Capitulo II; **1981**.
63. Scott A. Interpretation of the Ultraviolet Spectra of Natural Products. Pergamon Press, Oxford; **1964**. Pp. 202
64. Yamamoto K, Kobayashi N. Isolation and Purification of Tyrosine Hydroxylase from Callus Cultures of *Portulaca grandiflora*. *Plant and Cell Physiology*; **2001**. 42, 969-975.
65. Yang Y. New Triterpenes from *Machaerocereus eruca*.. *J. Nat. Prod.*; **1998**. 61, 456-460.
66. Oyamat K, Mak O. New triterpenes from cactaceous plants. *J. Nat. Prod.*; **1993**. 56, 2201-2203.
67. Ahmed A, Galal T, Masatake N, Takaya Y. A new triterpene from *Chenopodium ficifolium*. *Z. Naturforsch*; **2002**. 57c, 597-602.

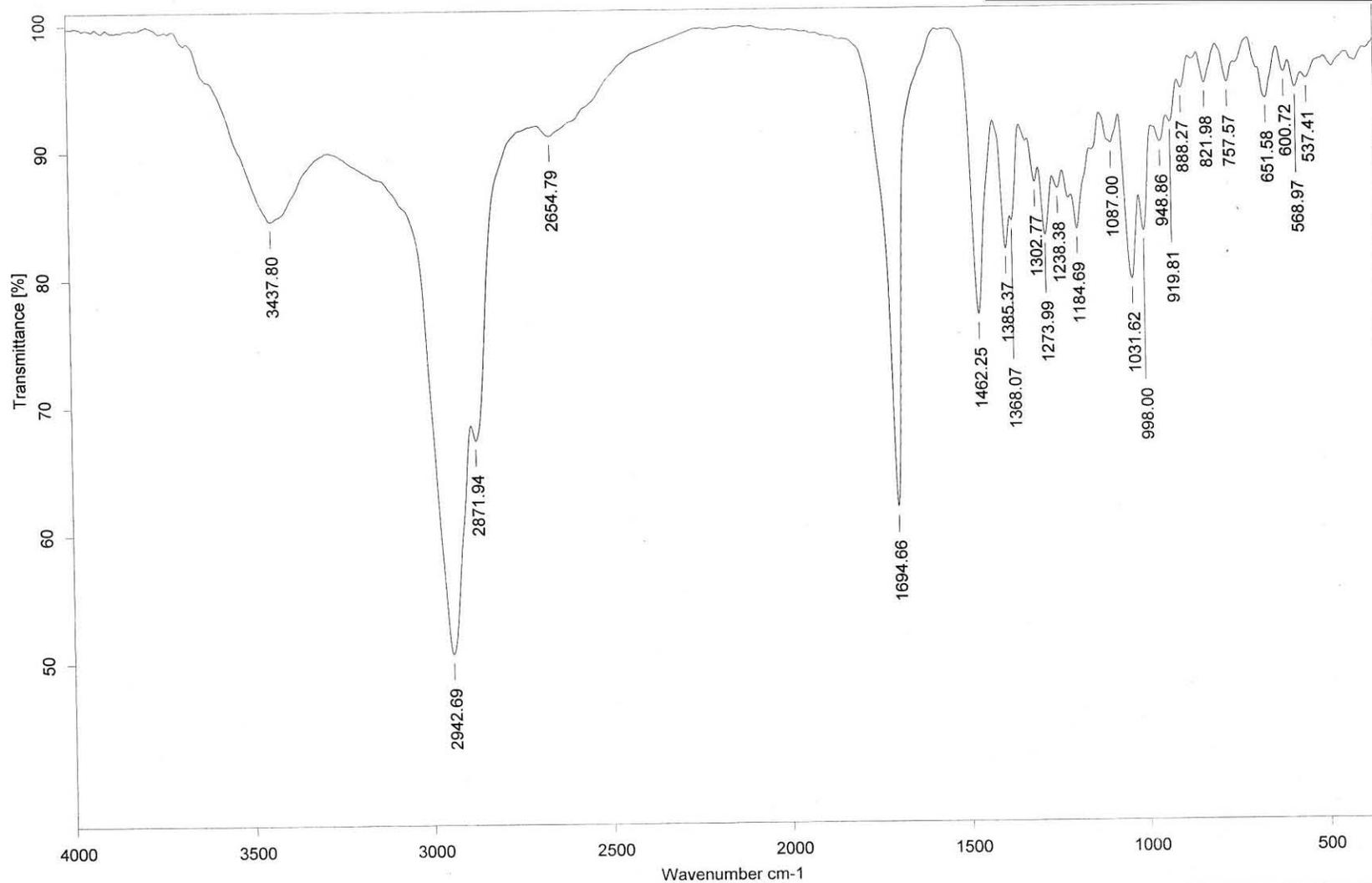
68. Mitaine-Offer A, Marouf A, Hanquet B, Bilirakis N, Lacalle-Bubois M. Two triterpene saponins from *Achyranthes bidentata*. *Chem. Pharm. Bull*; **2001**. 49, 1492-1494.
69. Madhusunadan K, Singh C, Singh R. Chemical ionization mass spectrometry using ammonia as reagent gas: Mass spectra of pentacyclic triterpenes, *Indian Journal of Chemistry*; **1983**. 22B 370-373.
70. Aplin R, Cox I. Application of mass spectrometry to the structural investigation of triterpenes. II. 3,4-A-seco-triterpenoids, *Organic Mass Spectrometry*; **1975**. 10, 981.
71. Okazaki S, Kinoshita K, Koyama K. New triterpene saponins from *Stenocereus eruca* (Cactaceae). *J. Nat. Med.*; **2007**. pp. 61:24–29.

Anexos

Espectros de SZHF4

Instituto de Química, UNAM

Lat **Espectro 1**



C:\infrarrojo\AIR-2008\1414.0

Dr.M.Martinez

SZ3HF4

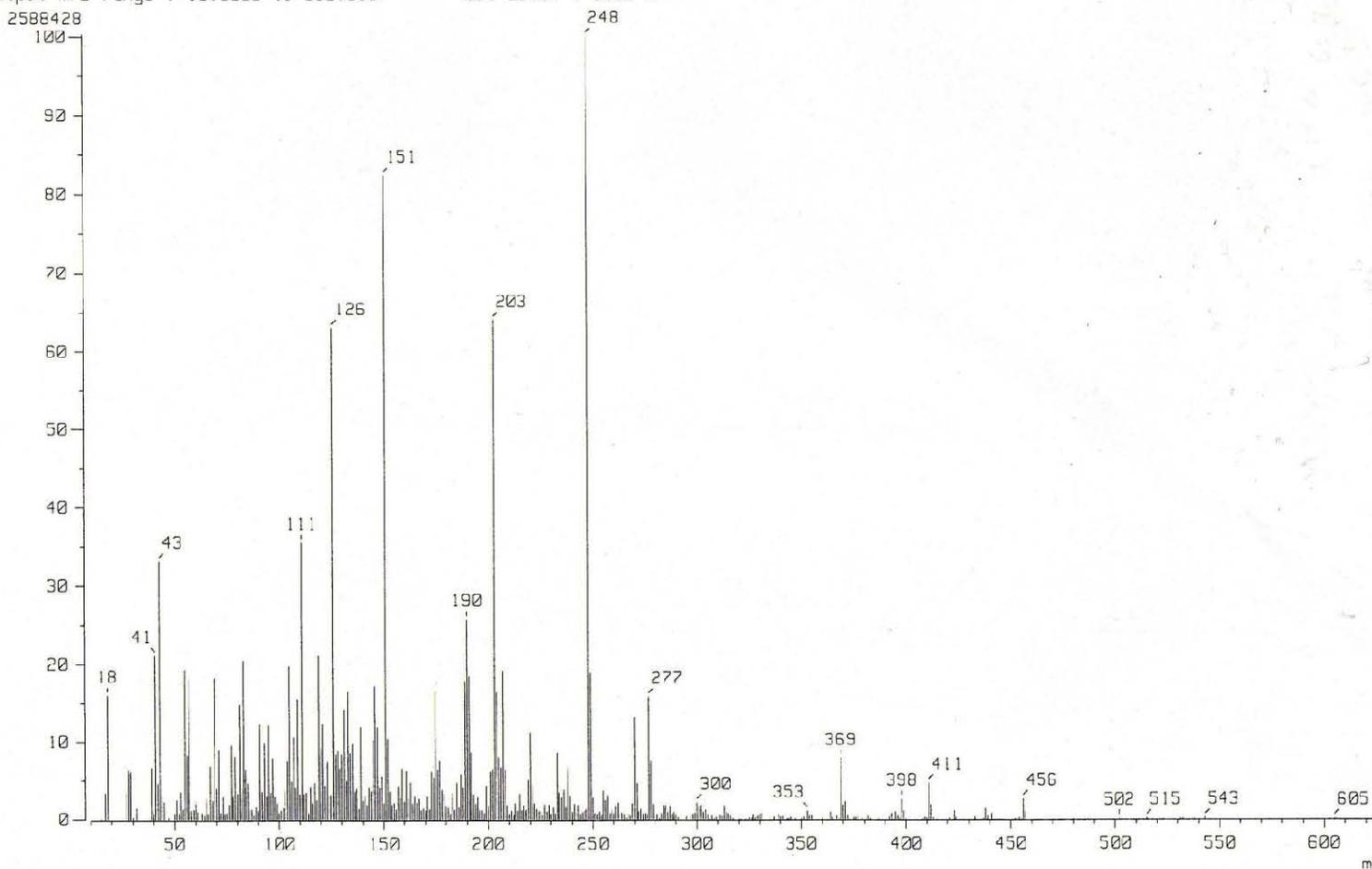
KBr/Pastilla

RPM

06/06/2008

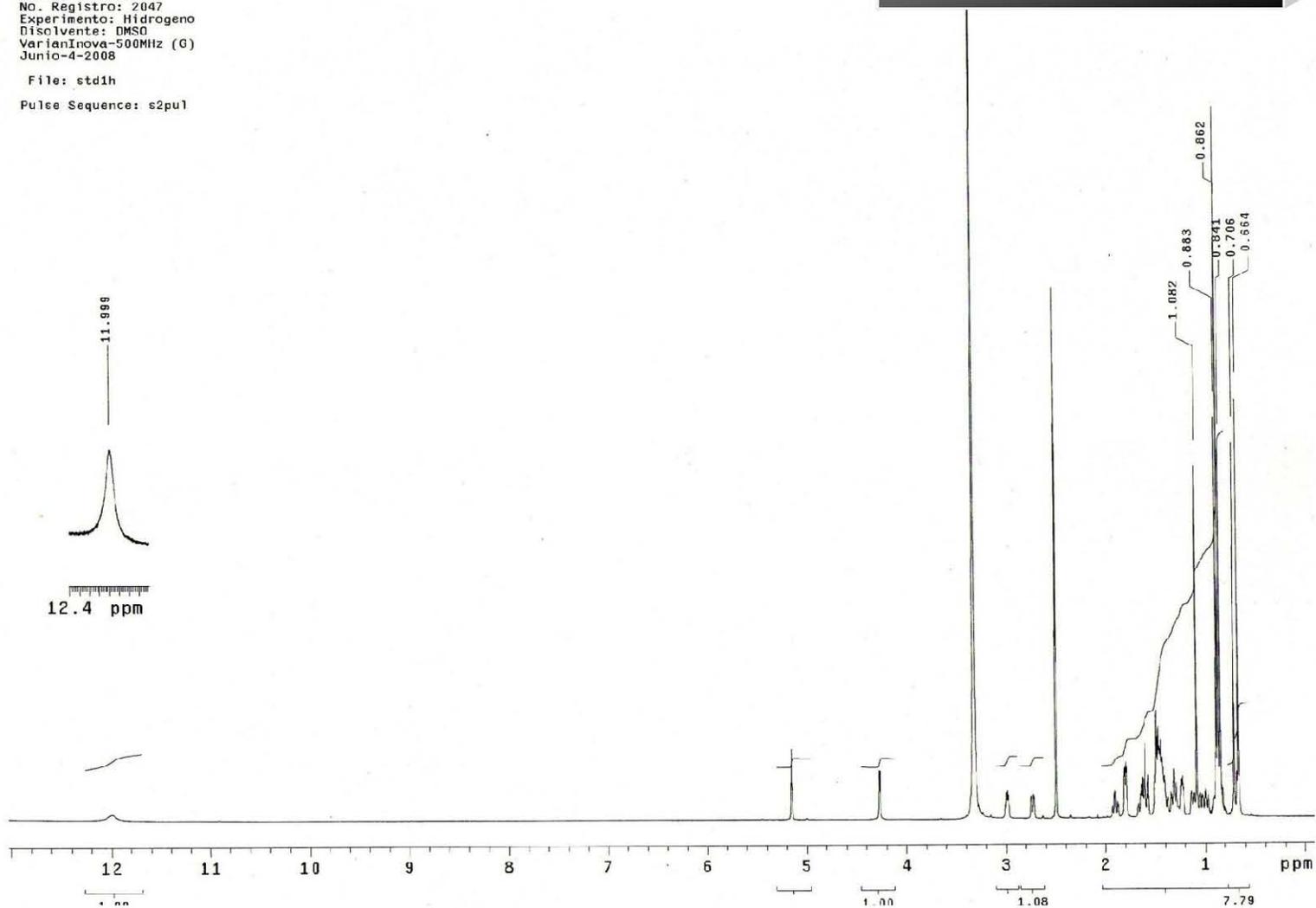
Espectro 2

[Mass Spectrum] Dr. Mariano MTE
Data : ~~MC Fendras-Jorge-070~~ Date : 04-Jun-12 09:55
Sample: 1403 M232 SZ3HF4 Jeo1AX505HA
Note : Javier-Perez
Inlet : Direct Ion Mode : EI+
Spectrum Type : Normal Ion [MF-Linear]
RT : 1.36 min Scan# : (16,55) Temp : 152.9 deg.C
BP : m/z 248.0000 Int. : 246.14
Output m/z range : 10.0000 to 632.3687 Cut Level : 0.00 %



UNAM. Instituto de Química. (H. Ríos)
Dr.-M-Martínez/ERick-G.L
Clave: S23HF4
No. Registro: 2047
Experimento: Hidrogeno
Disolvente: DMSO
VarianInova-500MHz (G)
Junio-4-2008
File: std1h
Pulse Sequence: s2pu1

Espectro 3

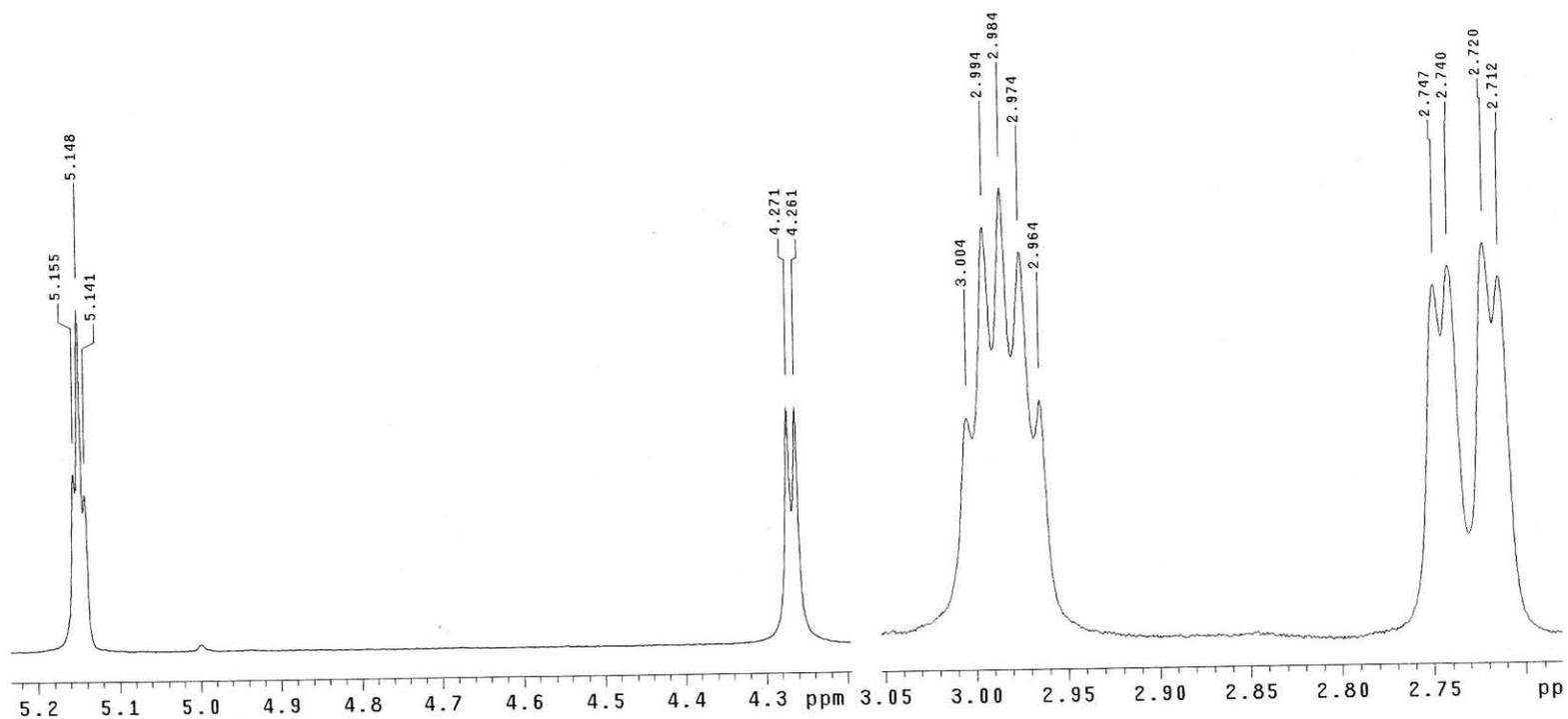


UNAM. Instituto de Química. (H. Ríos)
Dr-M-Martinez/ERick-G.L
Clave: SZ3HF4
No. Registro: 2947
Experimento: Hidrogeno
Disolvente: DMSO
VarianInova-500MHz (G)
Junio-4-2008

File: std1h

Pulse Sequence: s2pu1

Espectro 4

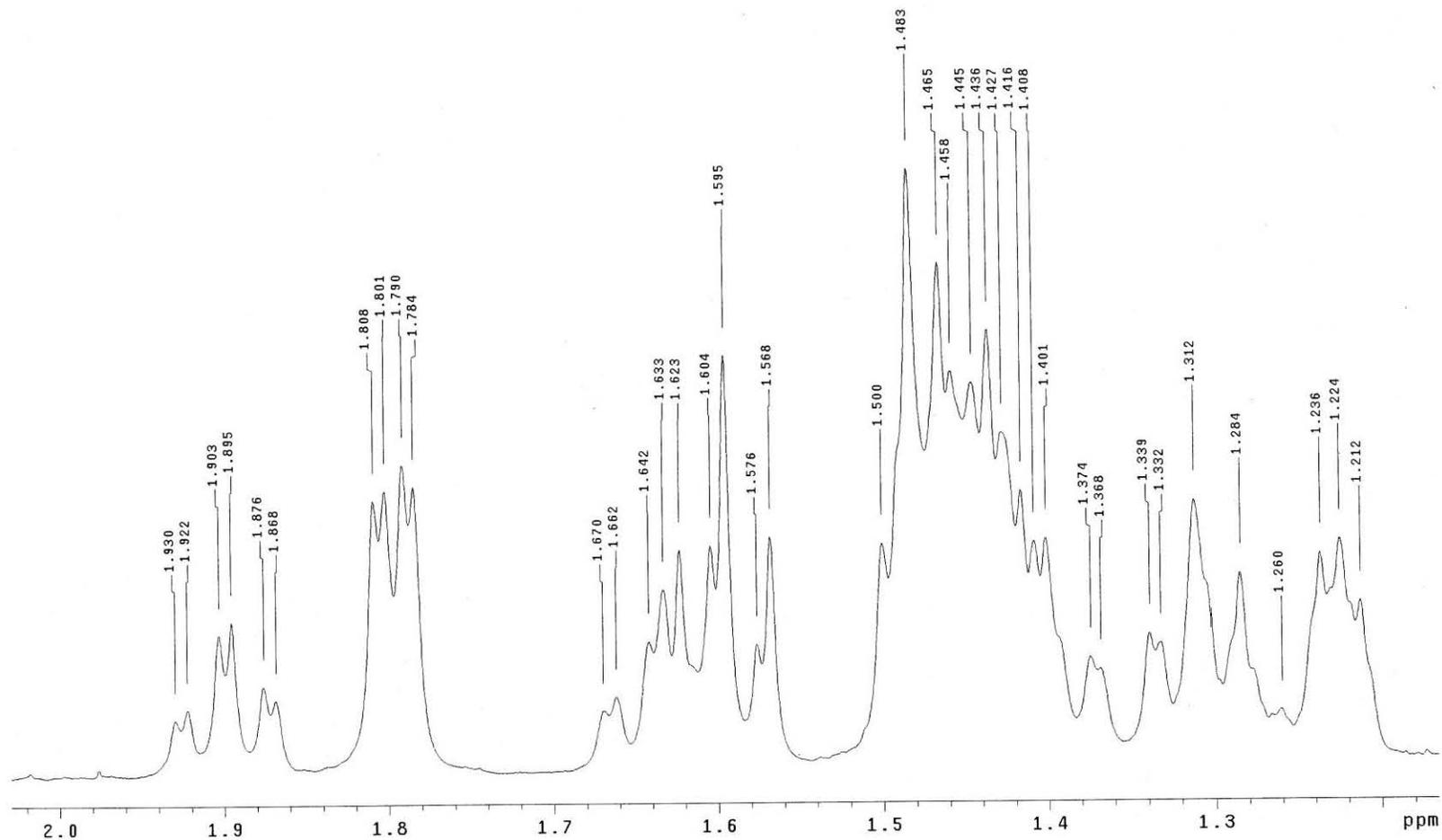


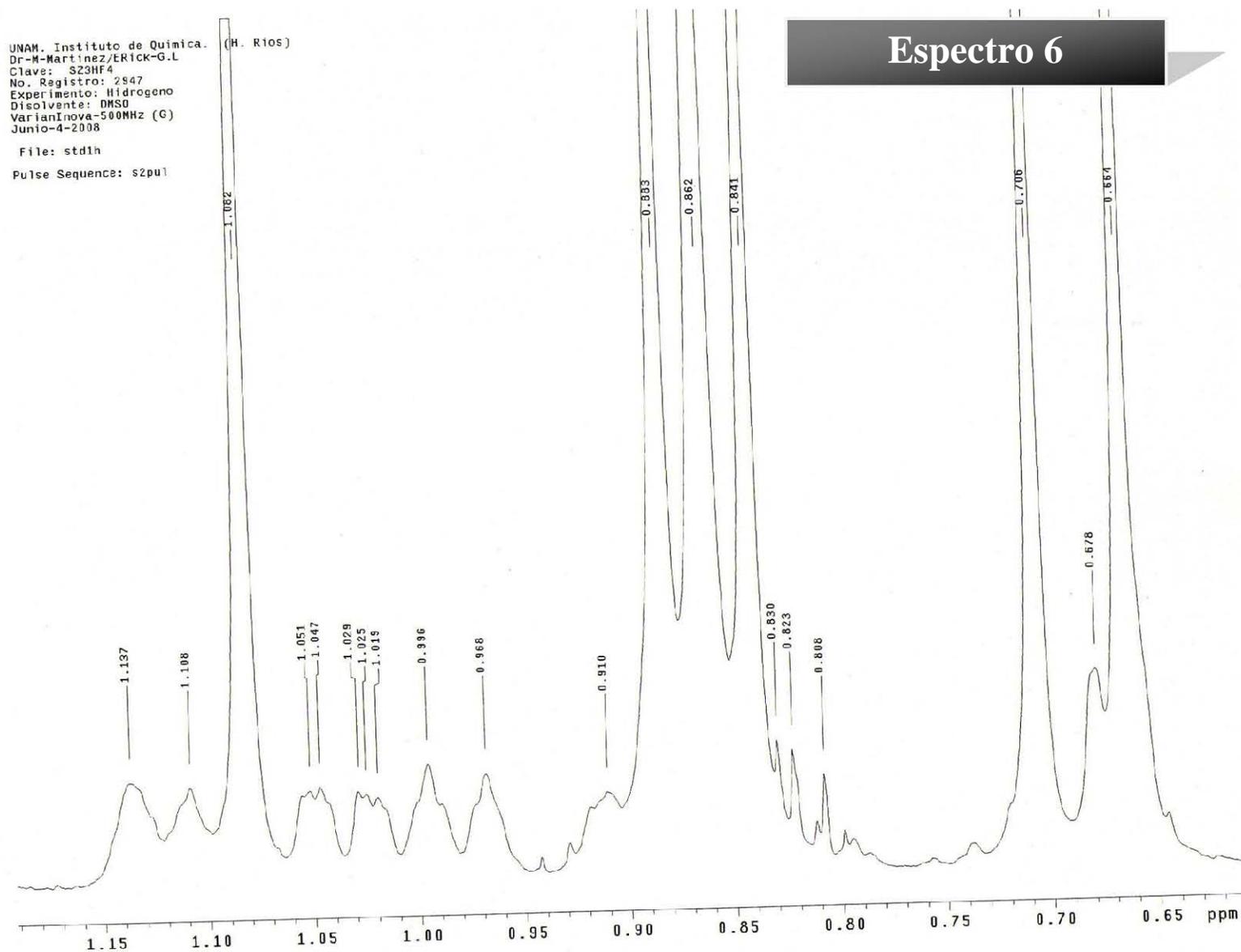
UNAM. Instituto de Química. (H. Rios)
Dr-M-Martínez/ERICK-G.L
Clave: SZ3HF4
No. Registro: 2947
Experimento: Hidrogeno
Disolvente: DMSO
VarianInova-500MHz (G)
Junio-4-2008

File: std1h

Pulse Sequence: s2pu1

Espectro 5

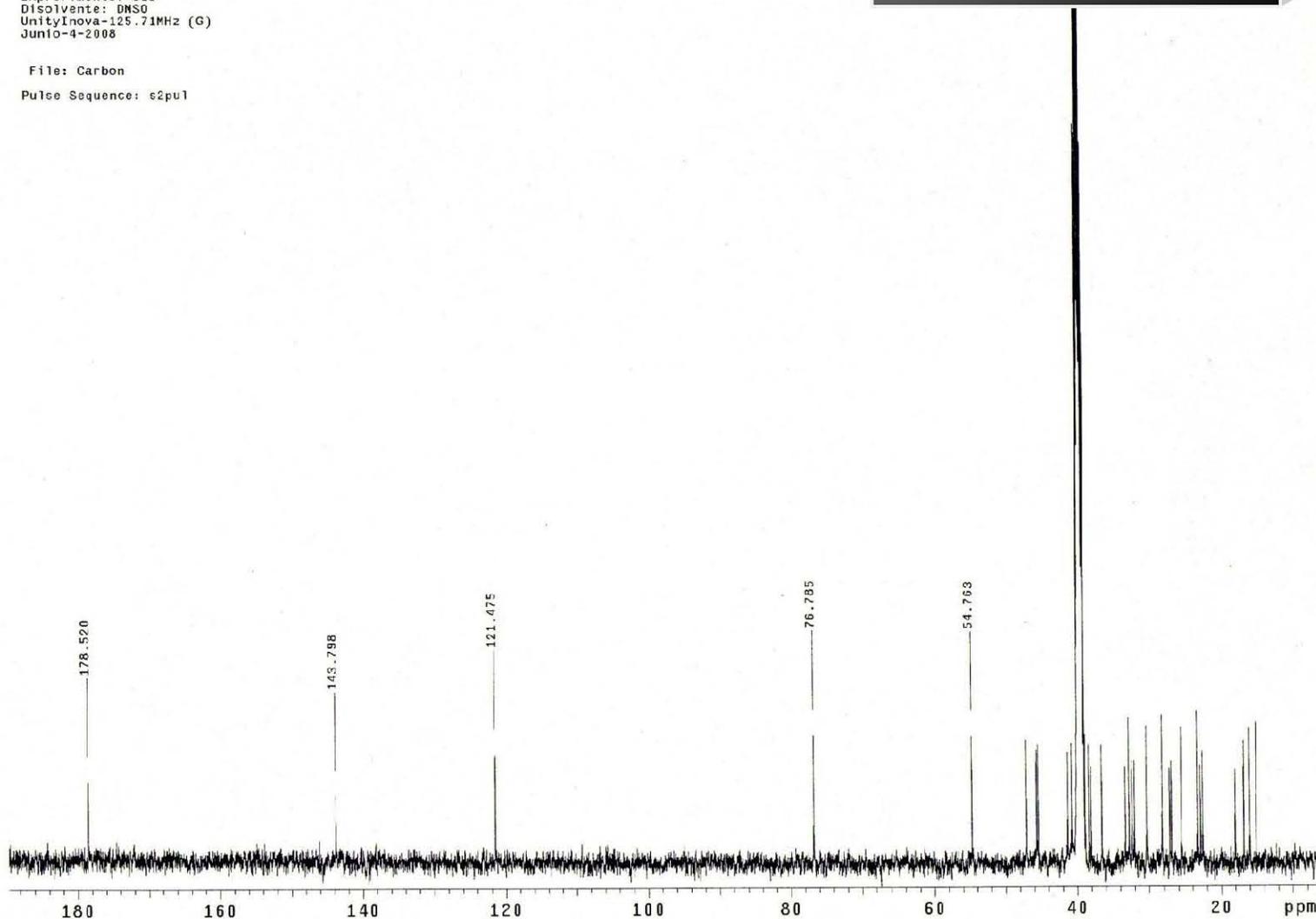




UNAM, Instituto de Química (H. Ríos)
Dr.-M-Martínez/Erick-G.L.
Clave: SZ3HF4
No. registro: 2047
Experimento: C13
Disolvente: DMSO
UnityInova-125.71MHz (G)
Junio-4-2008

File: Carbon
Pulse Sequence: s2pu1

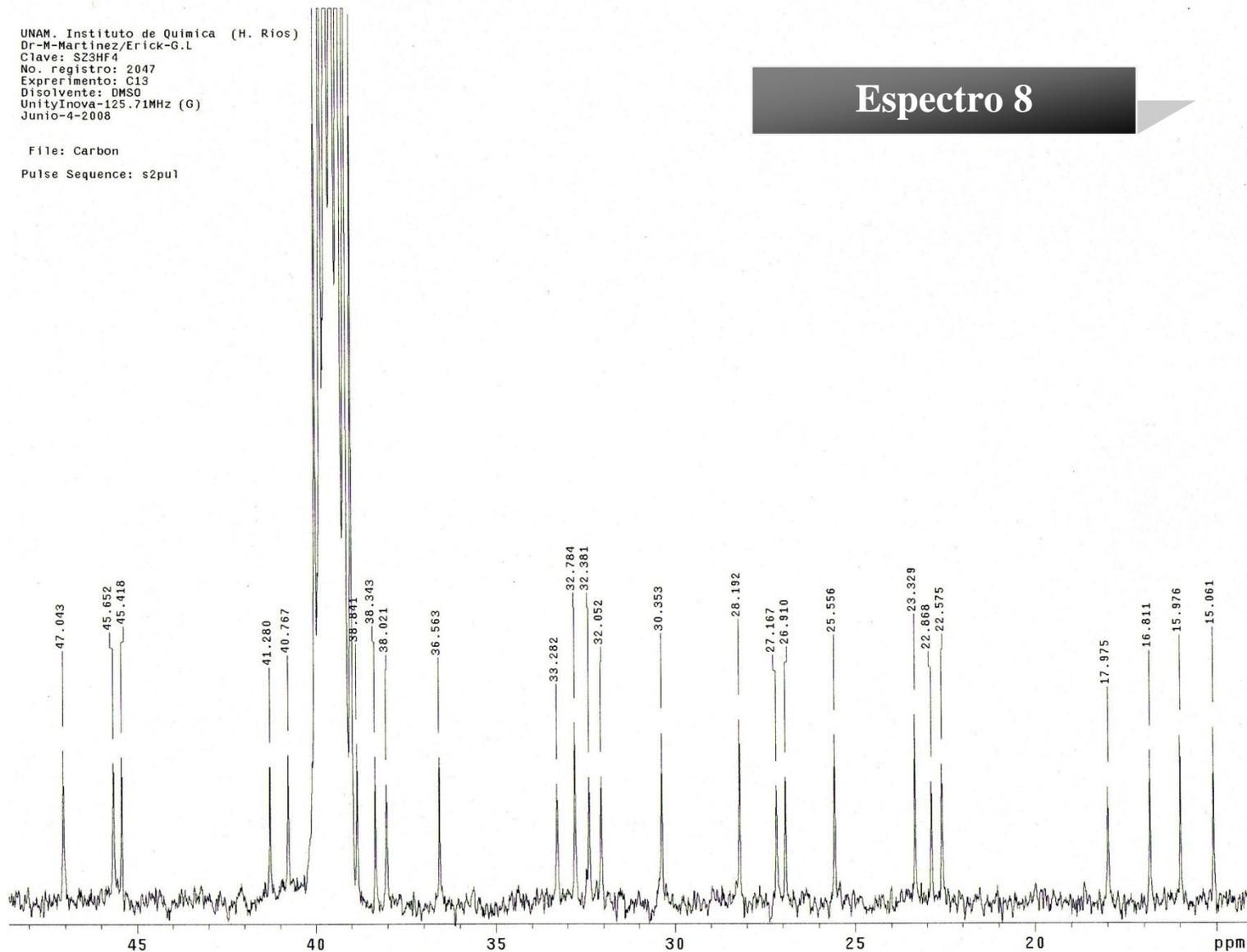
Espectro 7



UNAM. Instituto de Química (H. Ríos)
Dr-M-Martínez/Erick-G.L
Clave: S23HF4
No. registro: 2047
Experimento: C13
Disolvente: DMSO
UnityInova-125.71MHz (G)
Junio-4-2008

File: Carbon
Pulse Sequence: s2pu1

Espectro 8

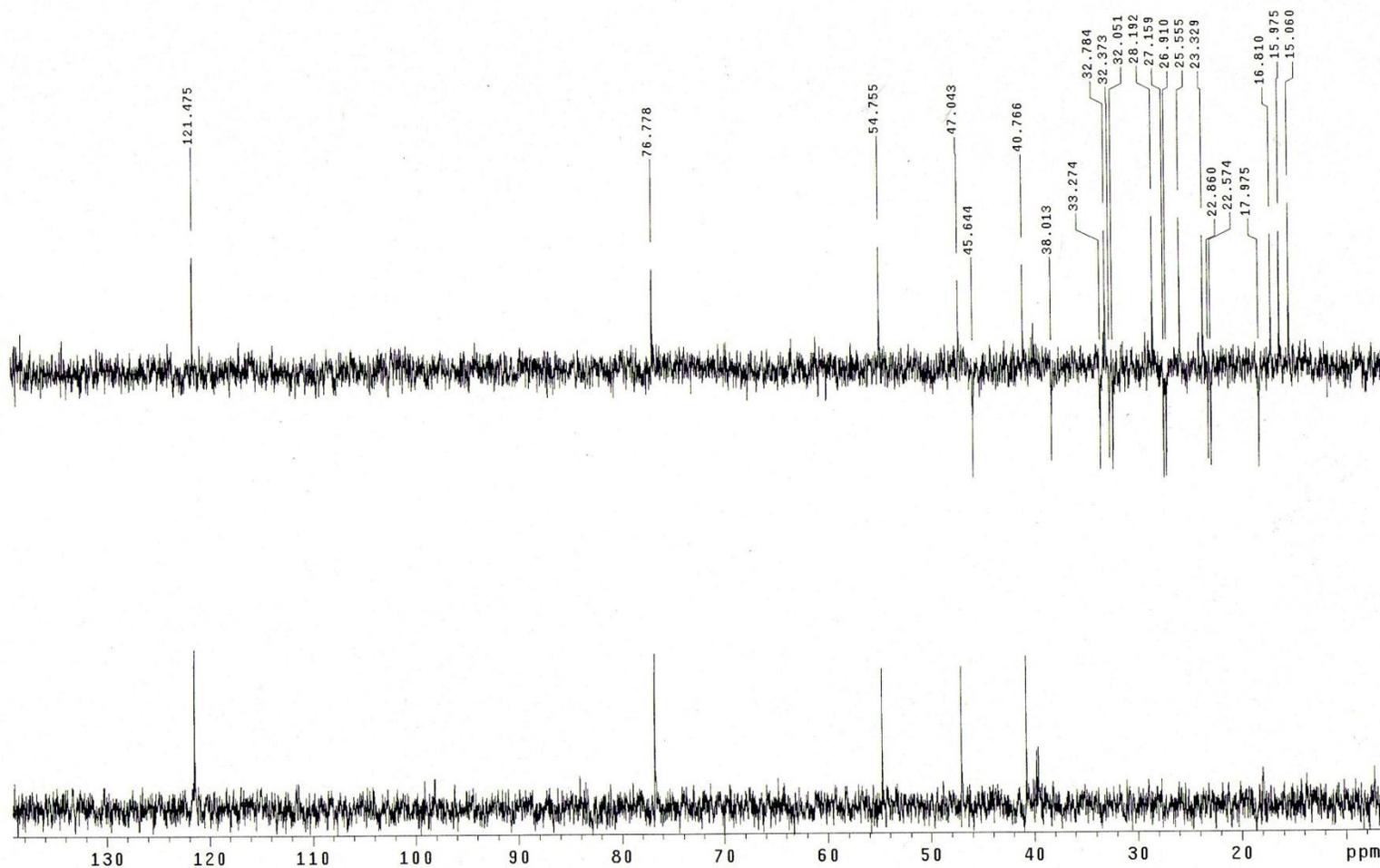


UNAM. Instituto de Química. (H. Rios)
Dr-M-Martinez/Erick-G.L
Clave: SZ3HF4
No. Registro: 2047
Experimento: Dept
VarianInova-125.7 MHz (G)
Junio-6-2008

File: Dept

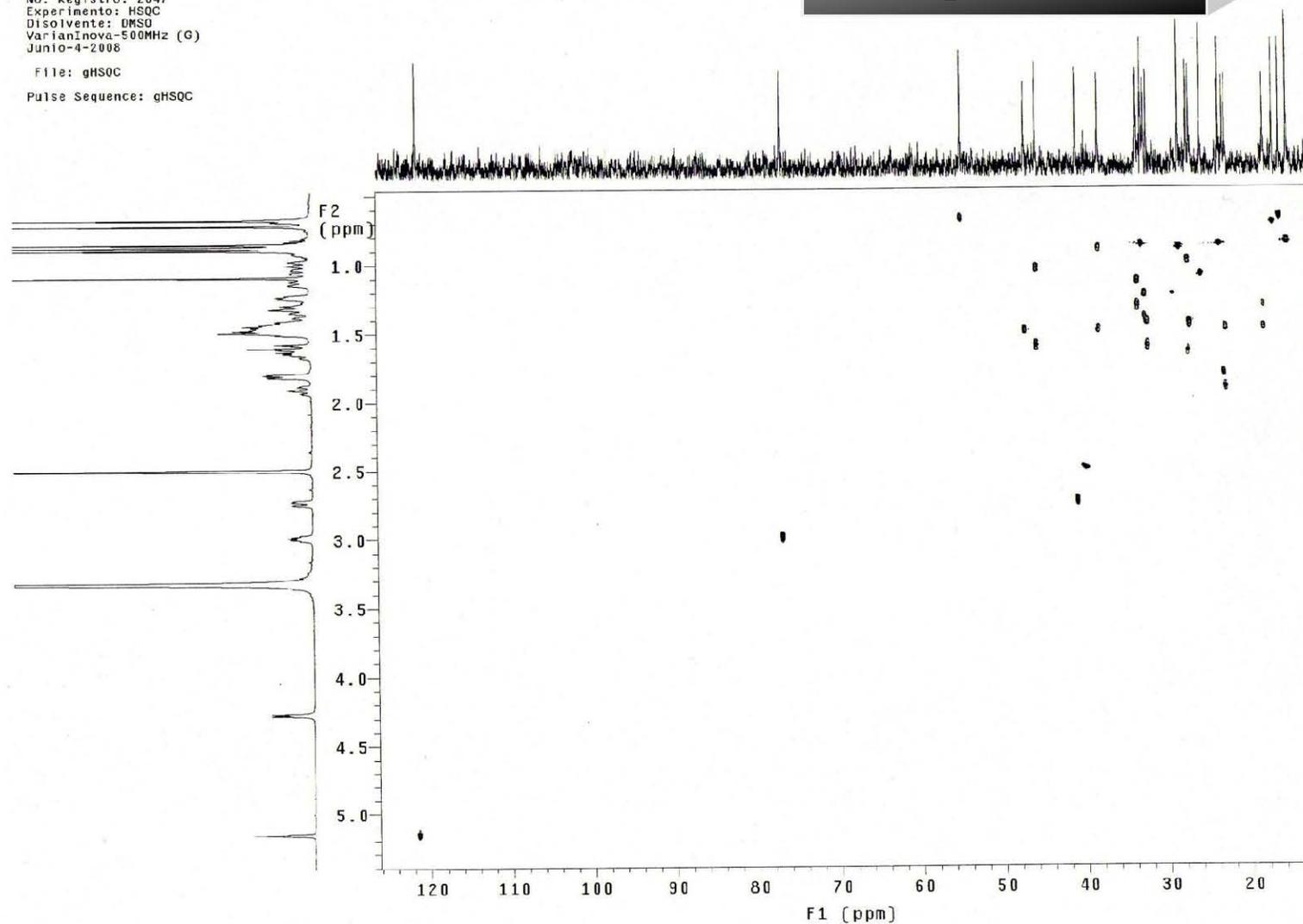
Pulse Sequence: DEPT

Espectro 9



UNAM. Instituto de Química. (H. Ríos)
Dr-M-Martínez/ERICK-G.L
Clave: SZ3HF4
No. Registro: 2047
Experimento: HSQC
Disolvente: DMSO
VarianInova-500MHz (G)
Junio-4-2008
File: gHSQC
Pulse Sequence: gHSQC

Espectro 10

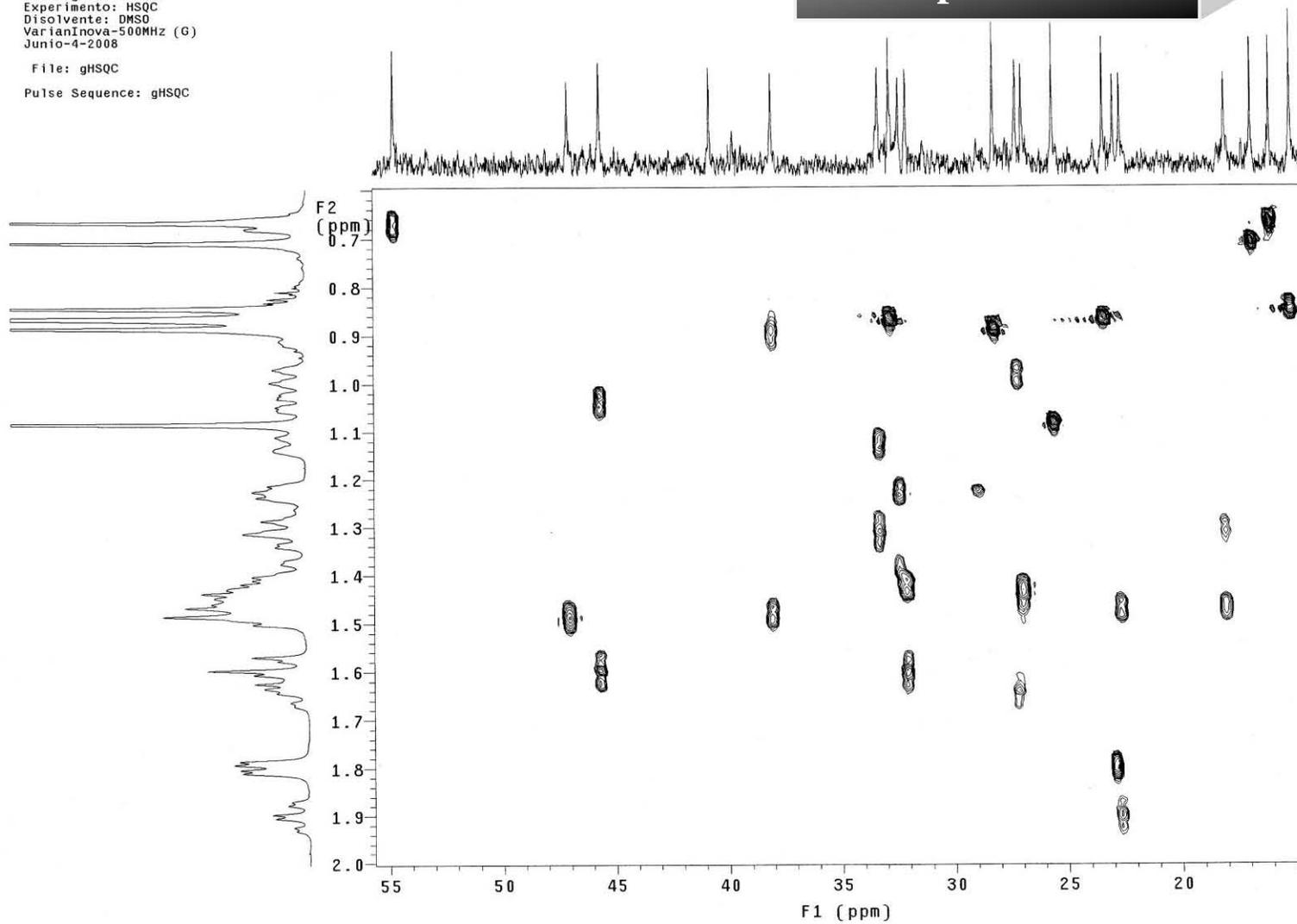


UNAM. Instituto de Química. (H. Rios)
Dr-M-Martinez/ERick-G.L
Clave: SZ3HF4
No. Registro: 2047
Experimento: HSQC
Disolvente: DMSO
VarianInova-500MHz (G)
Junio-4-2008

File: gHSQC

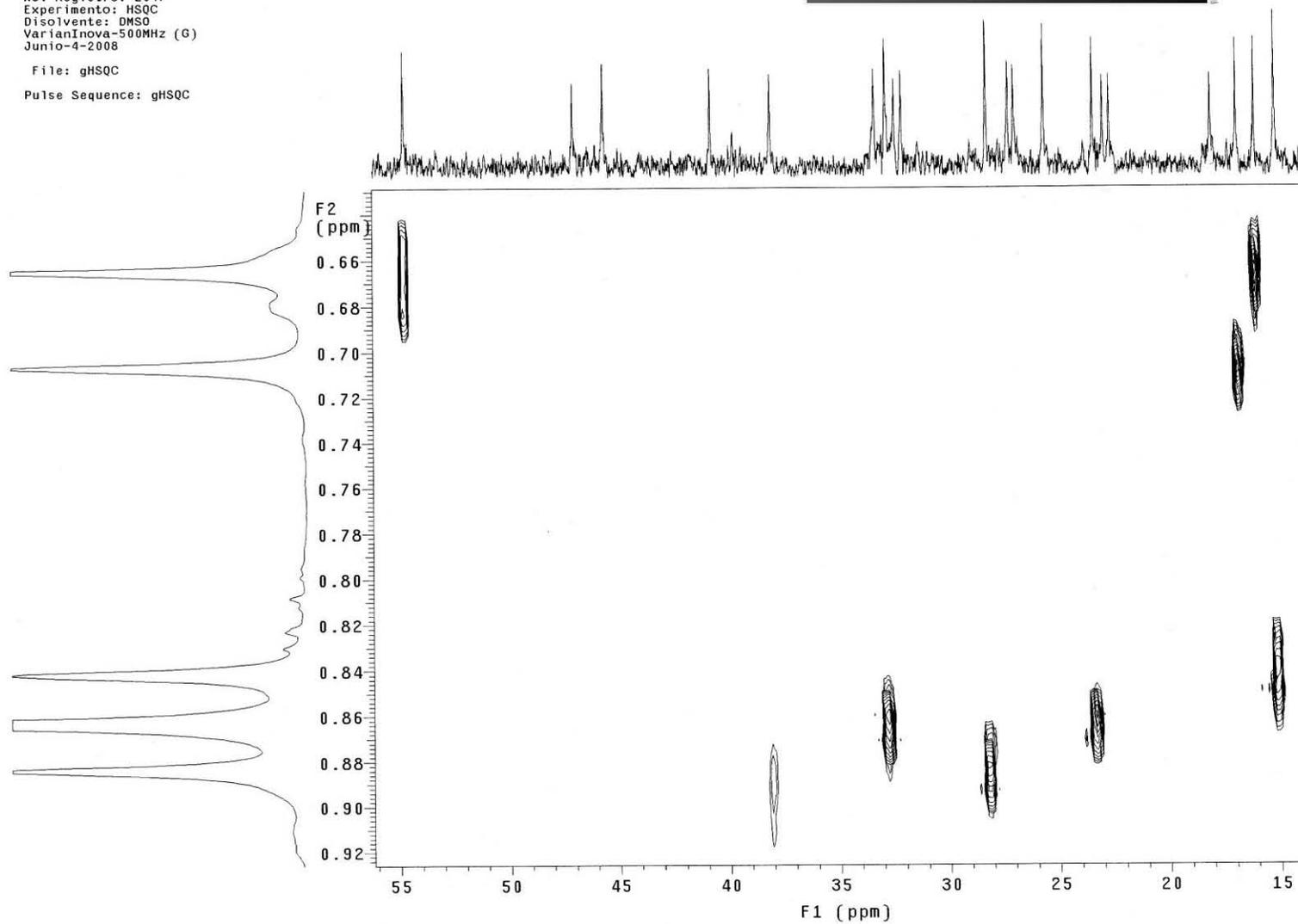
Pulse Sequence: gHSQC

Espectro 11



UNAM. Instituto de Química. (H. Rios)
Dr-M-Martinez/ERick-G.L
Clave: SZ3HF4
No. Registro: 2047
Experimento: HSQC
Disolvente: DMSO
VarianInova-500MHz (G)
Junio-4-2008
File: gHSQC
Pulse Sequence: gHSQC

Espectro 12



Espectros de SZHF12

[Mass Spectrum]

Data : Dr-Martinez-Mariano-029 Date : 09-May-12 09:38

Sample: 1190 M231 SZPAZHF18 JeolAX505HA

Note : Javier-Perez

Inlet : Direct

Ion Mode : EI+

Spectrum Type : Normal Ion [MF-Linear]

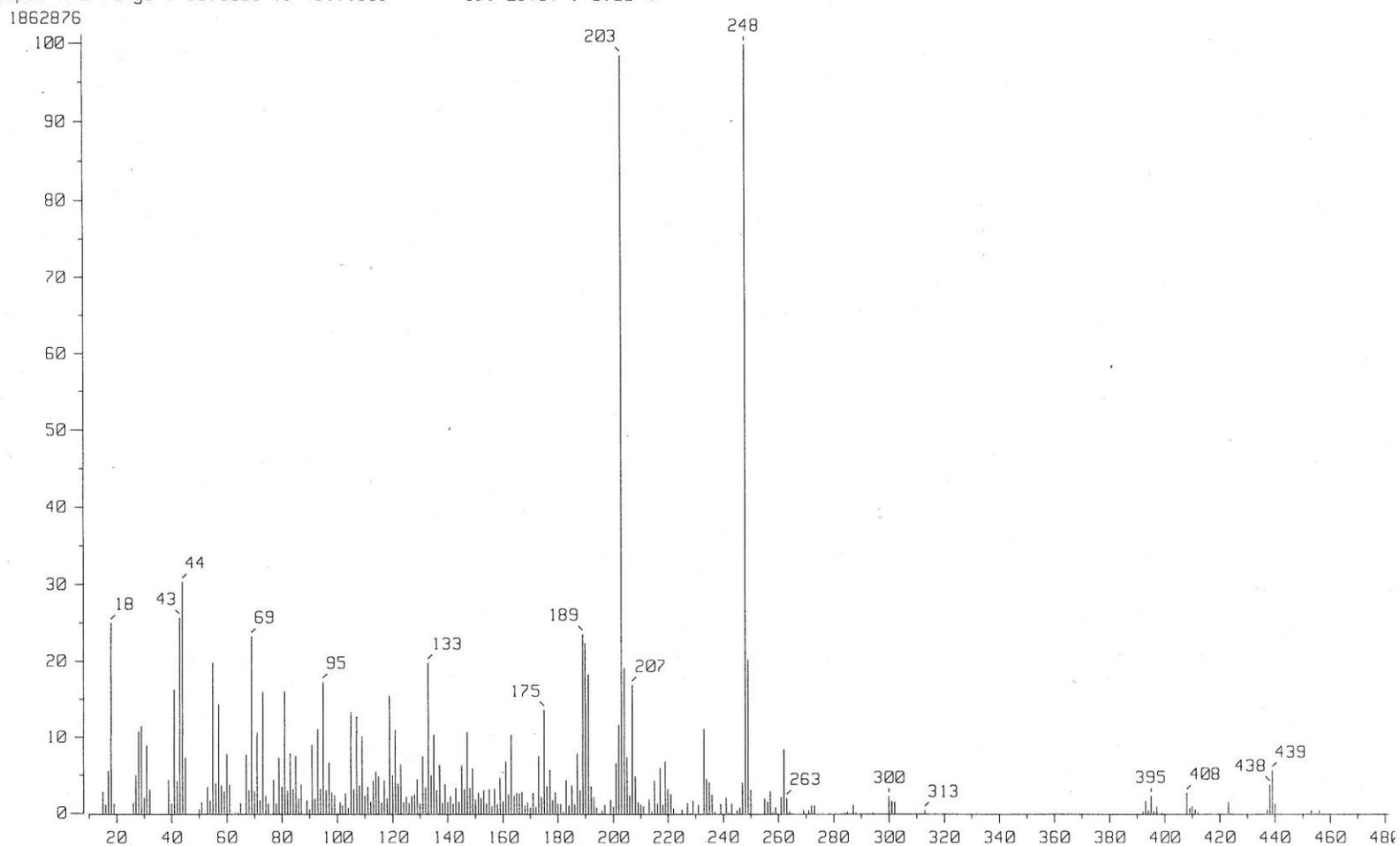
RT : 2.44 min Scan# : (52,73)

Temp : 321.0 deg.C

BP : m/z 248.0000 Int. : 175.63

Output m/z range : 10.0000 to 481.1869

Cut Level : 0.00 %



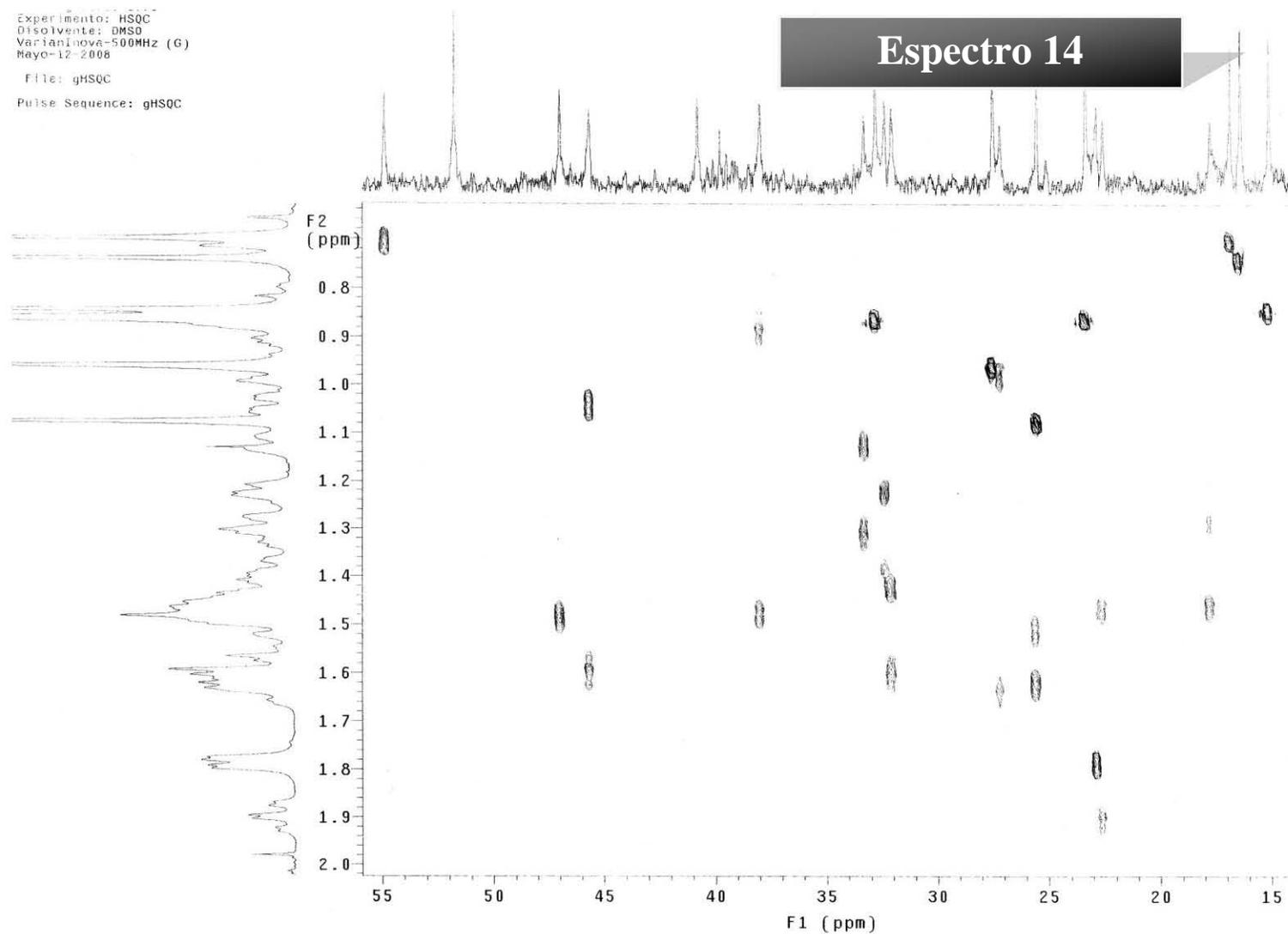
Espectro 13

Experimento: HSQC
Disolvente: DMSO
VarianInova-500MHz (G)
Mayo-12-2008

File: gHSQC

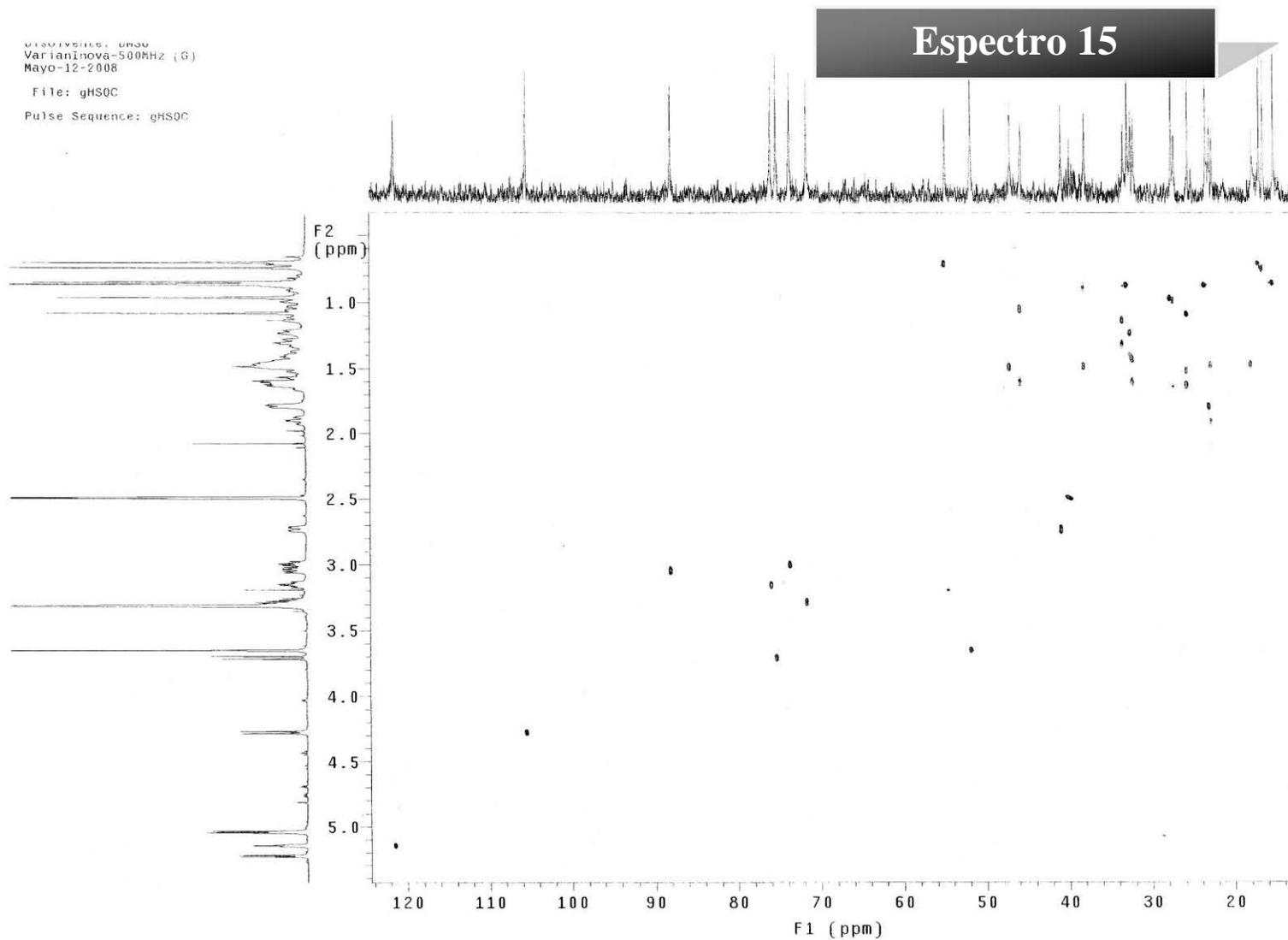
Pulse Sequence: gHSQC

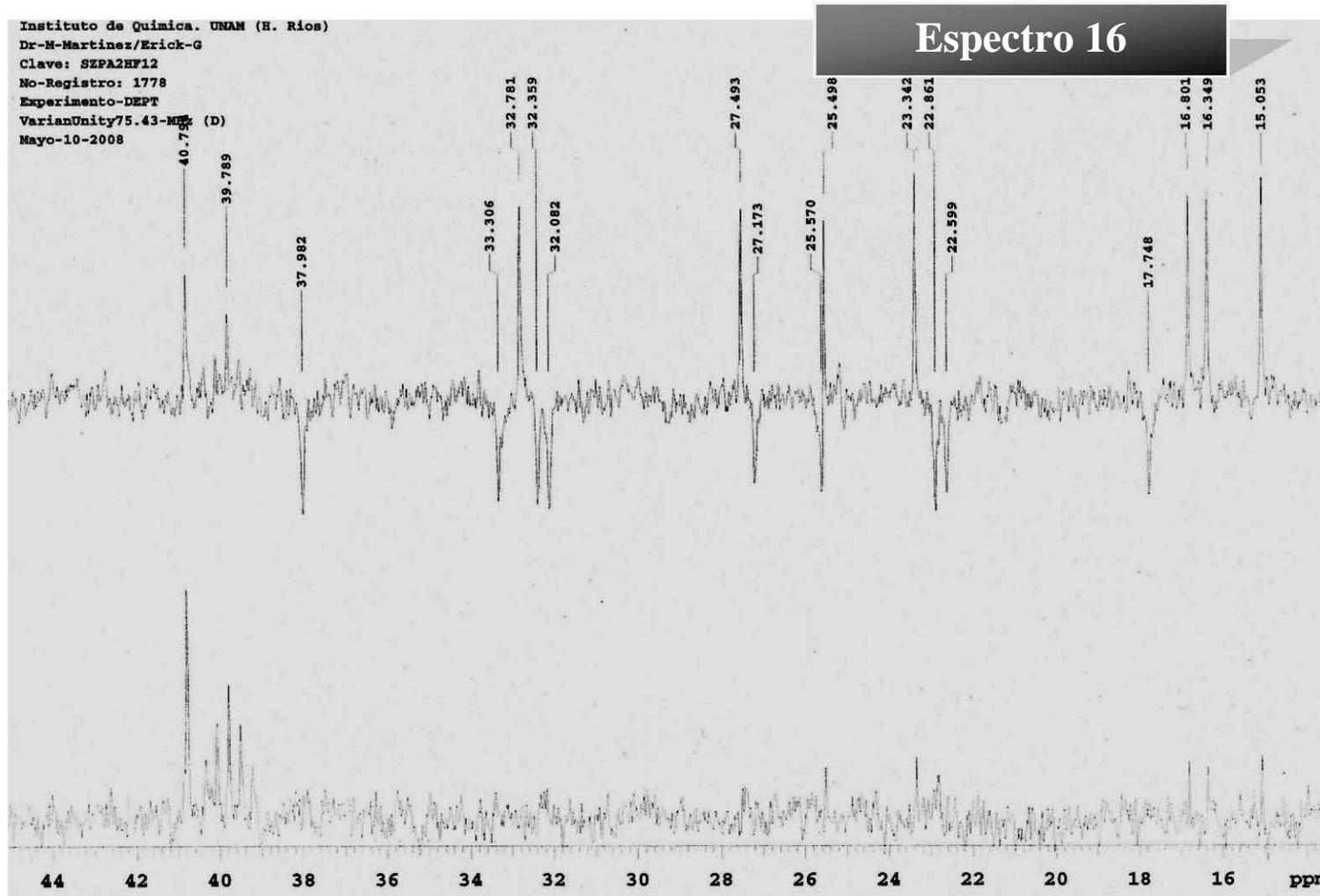
Espectro 14

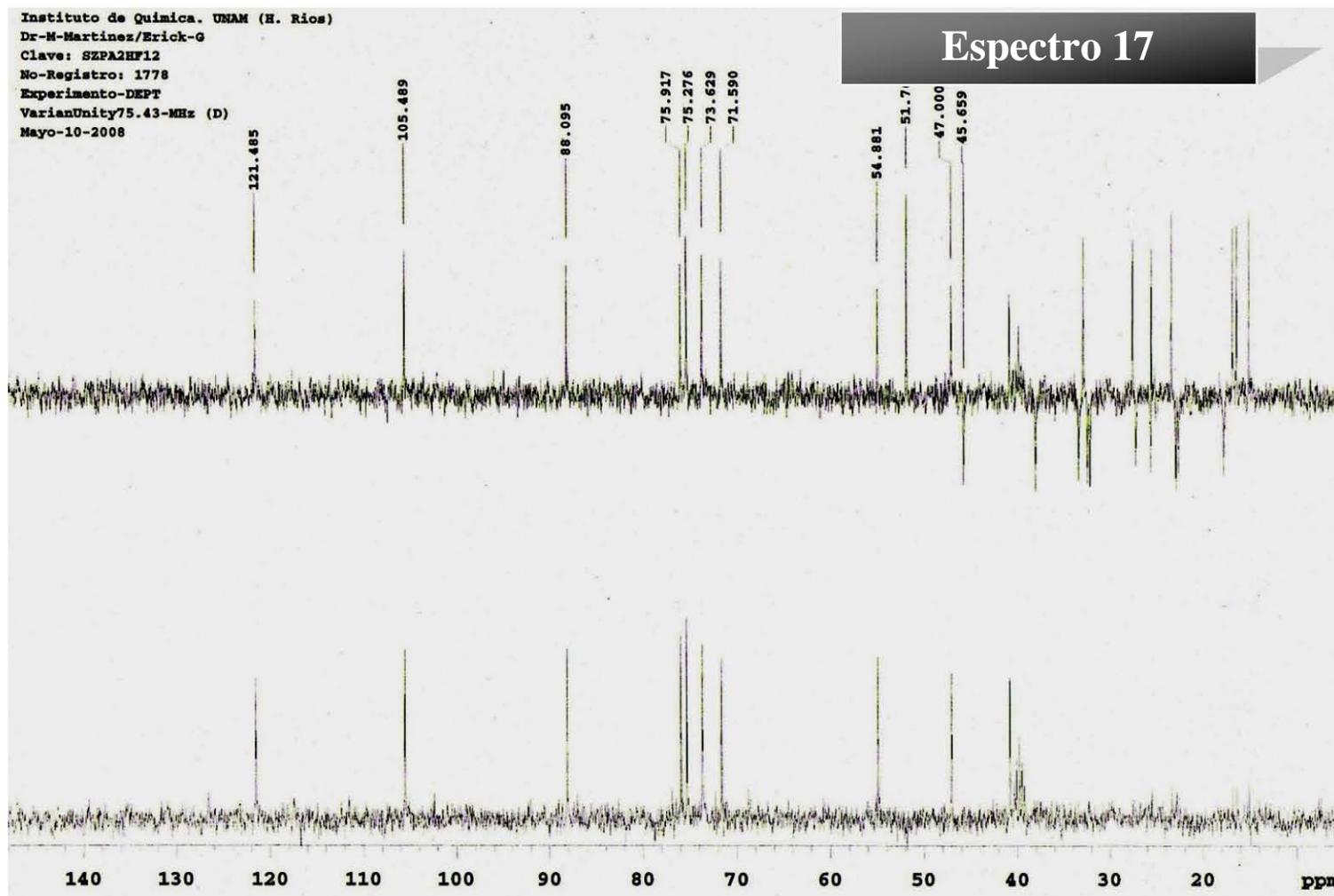


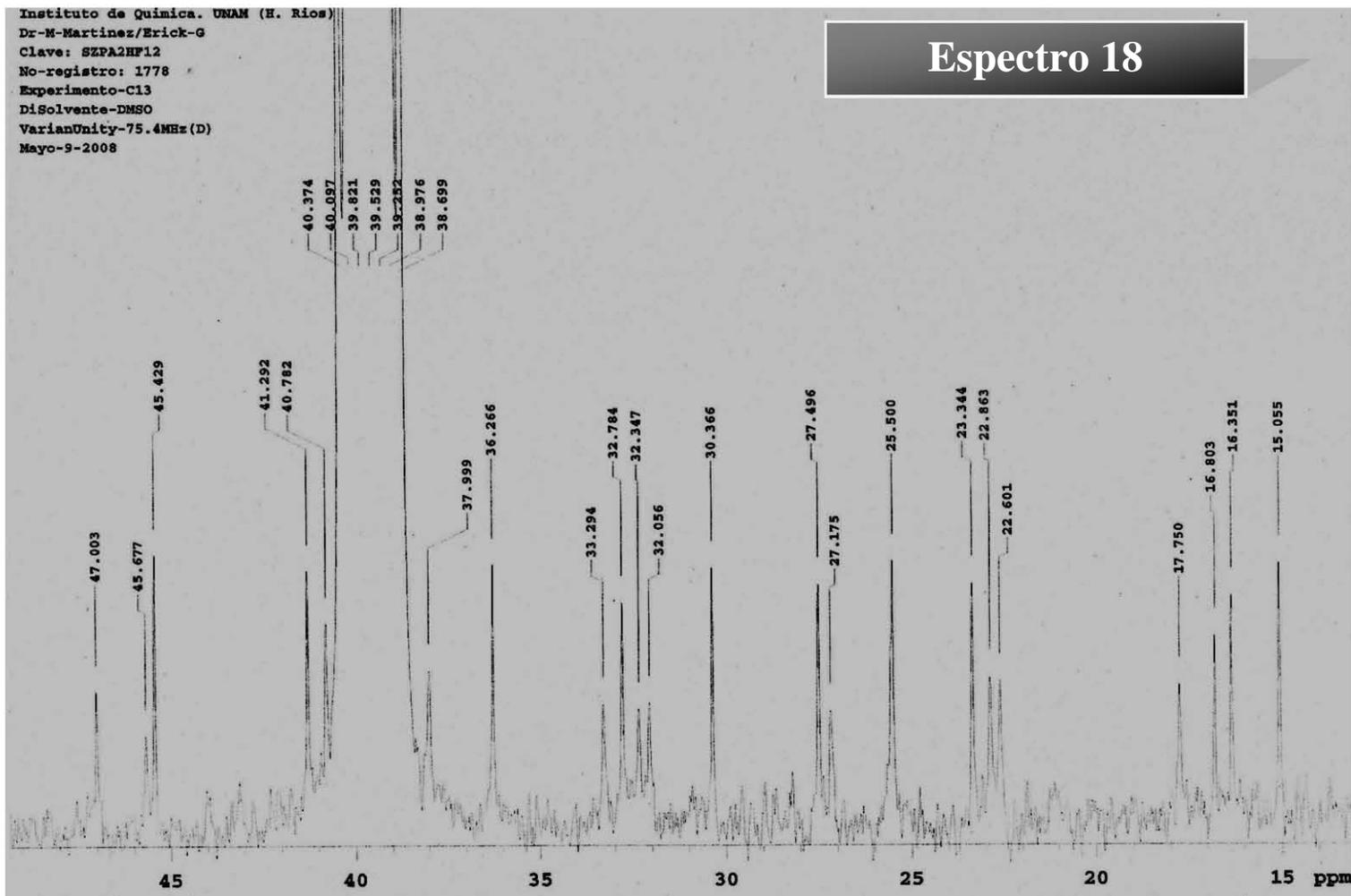
0130151616.DMSO
VarianInova-500MHz (G)
Mayo-12-2008
File: gHSQC
Pulse Sequence: gHSQC

Espectro 15



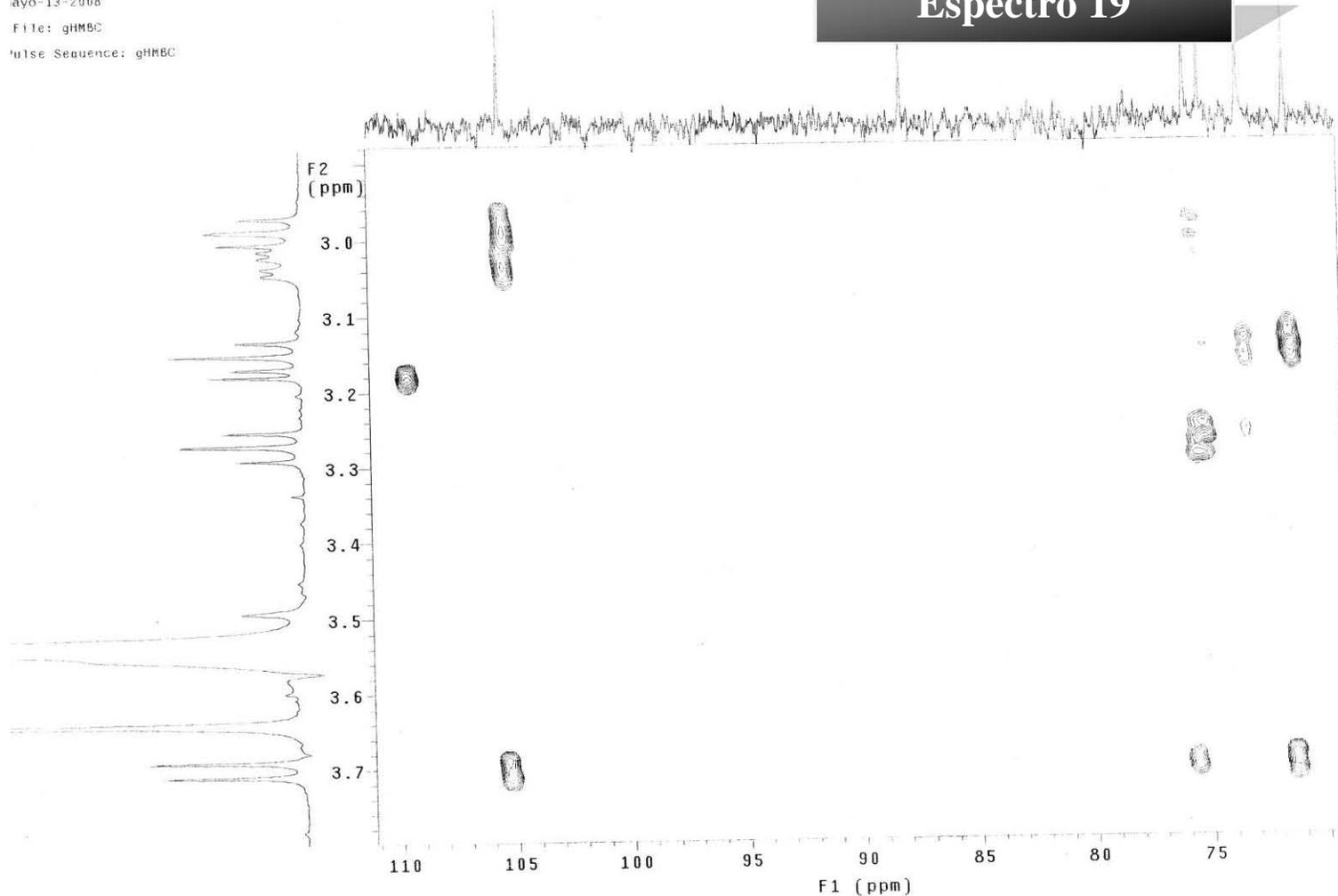






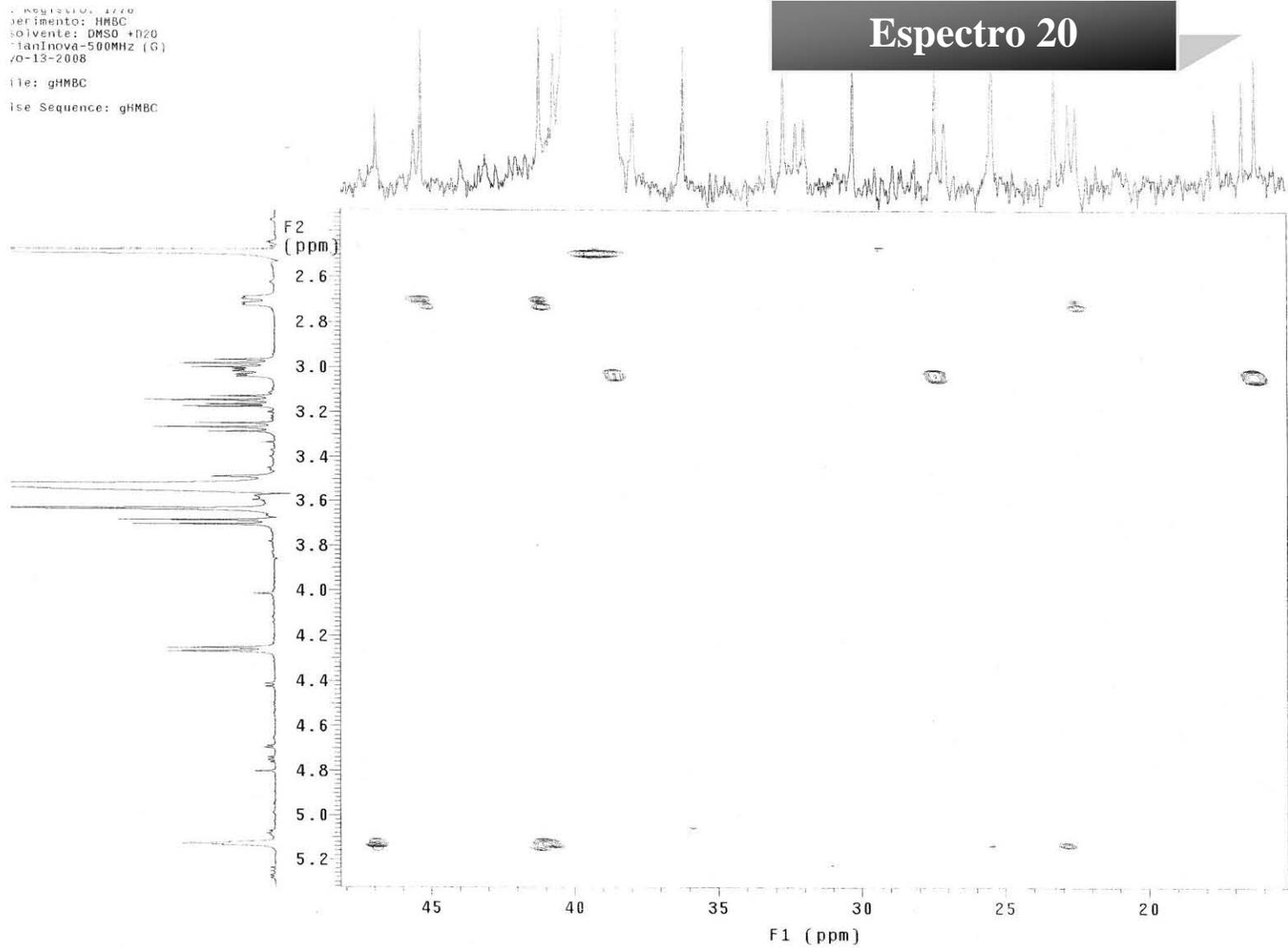
Experimento: HRBC
Disolvente: DMSO -d6
Marianova-500MHz (G)
Mayo-13-2008
File: gHMBC
Pulse Sequence: gHMBC

Espectro 19



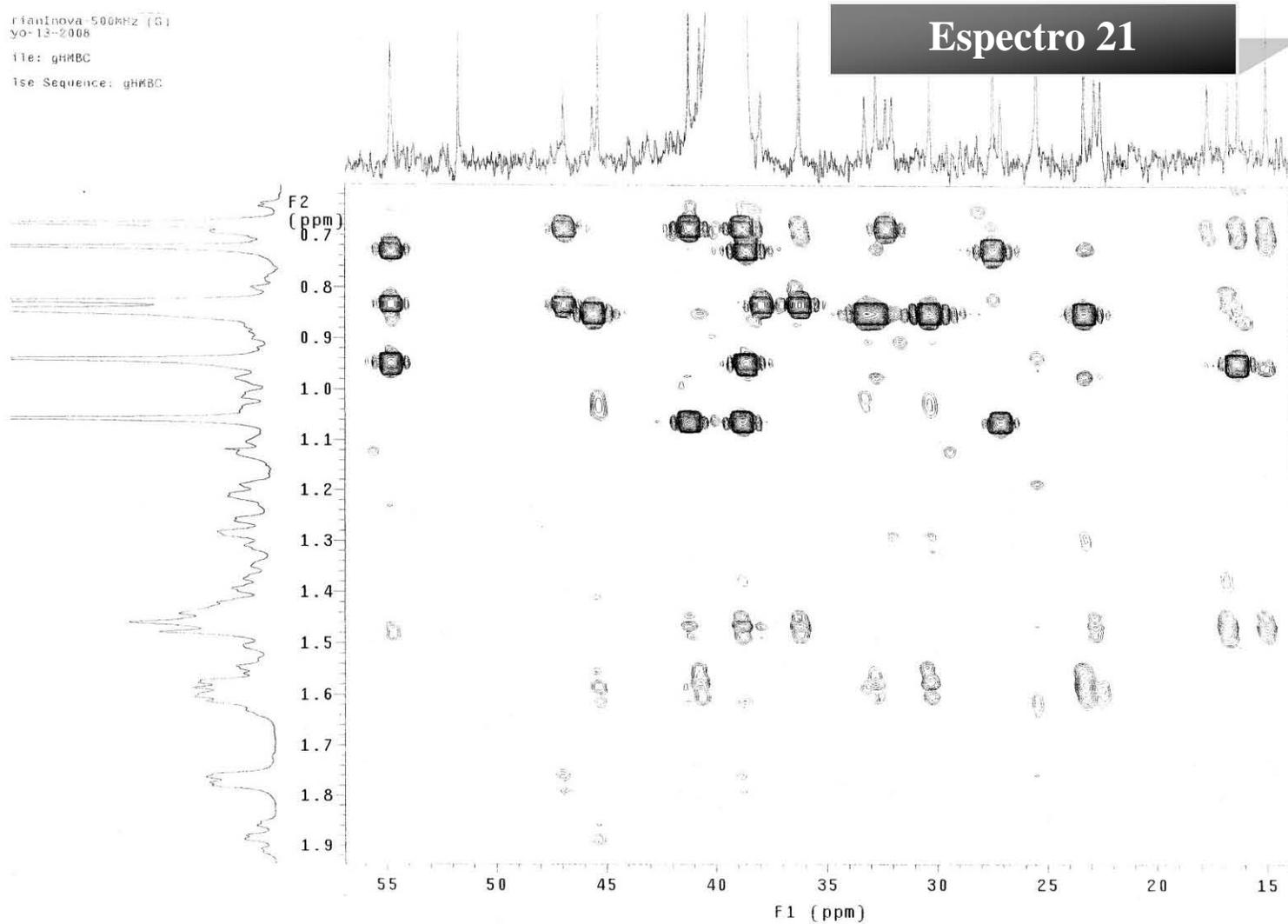
Experimento: 1770
Experimento: gHMBC
Solvente: DMSO +D2O
Pulsador: Bruker-500MHz (G)
0-13-2008
File: gHMBC
Pulse Sequence: gHMBC

Espectro 20



FinInova-500MHz (G)
yo-13-2008
file: gHRBC
1se Sequence: gHRBC

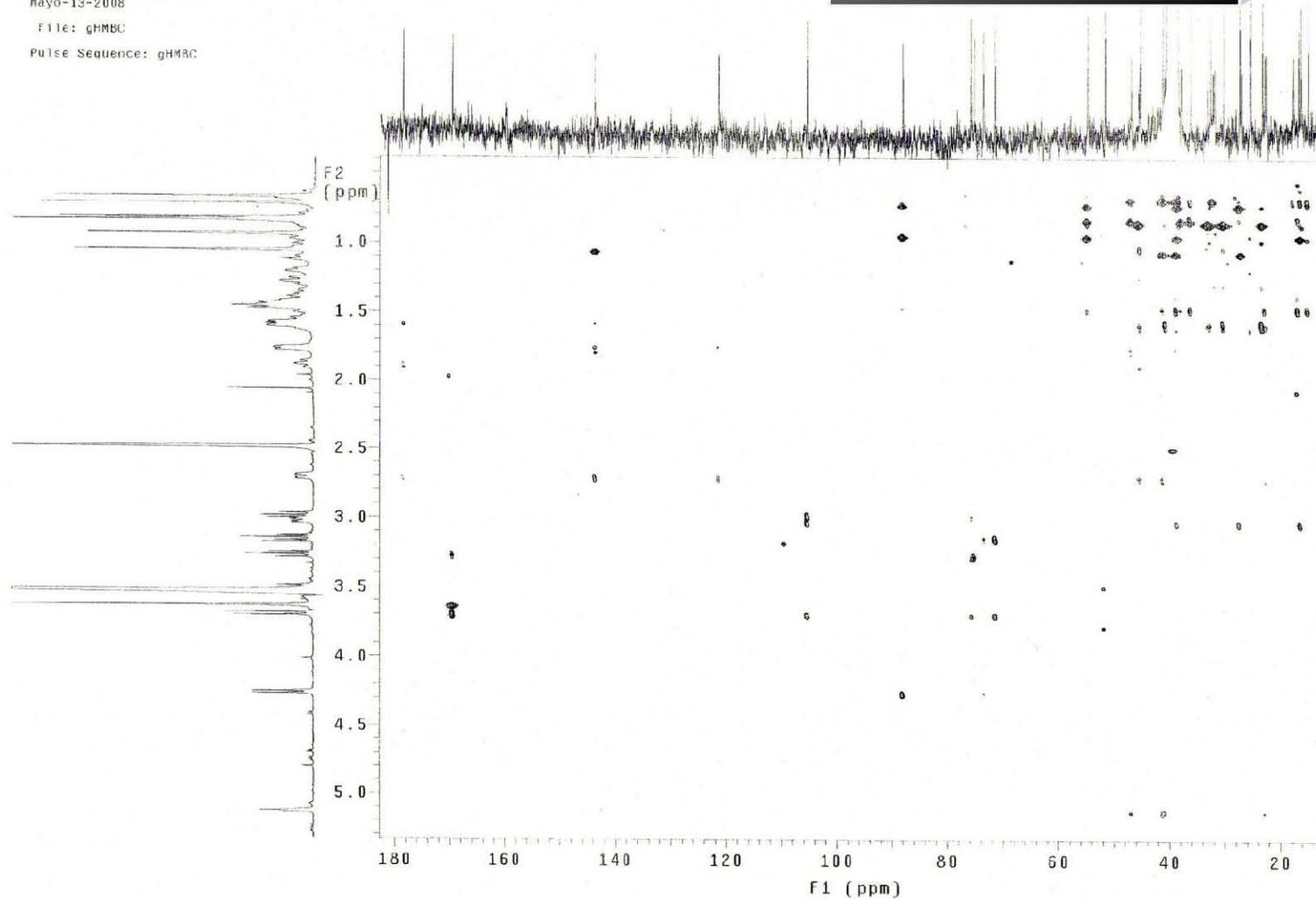
Espectro 21



Espectro 22

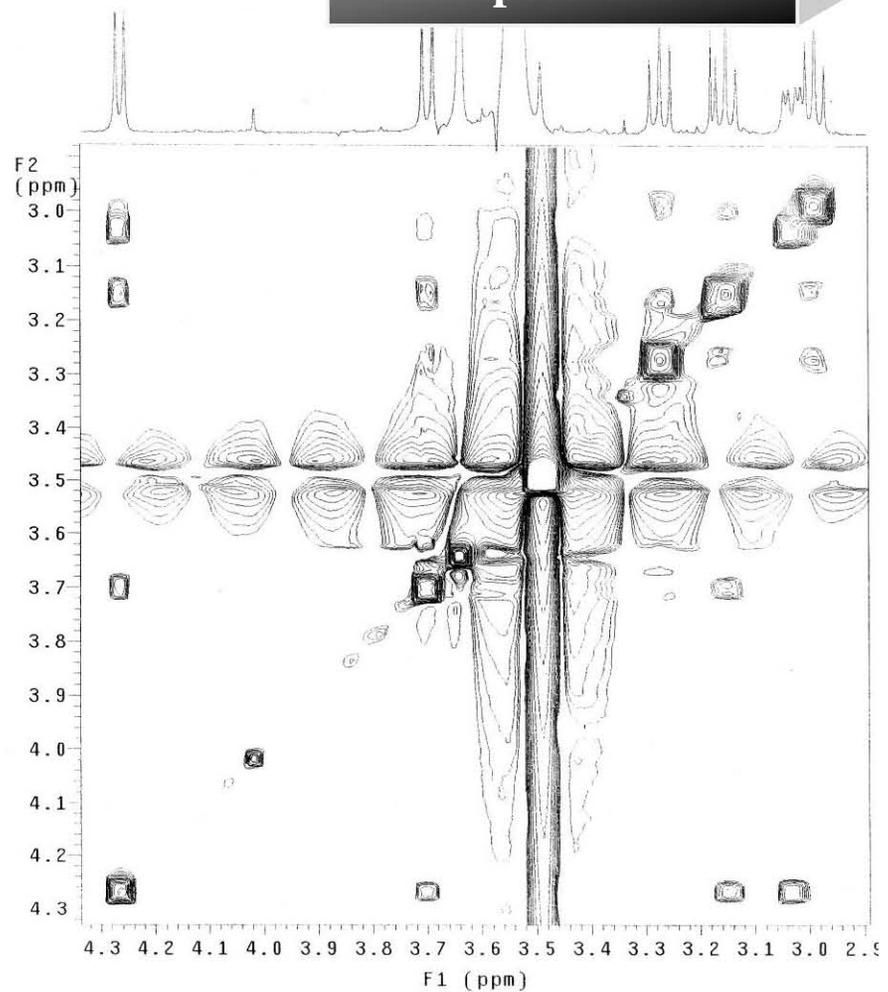
Disolvente: DMSO d_6
VarianInova-500MHz (G)
Mayo-13-2008

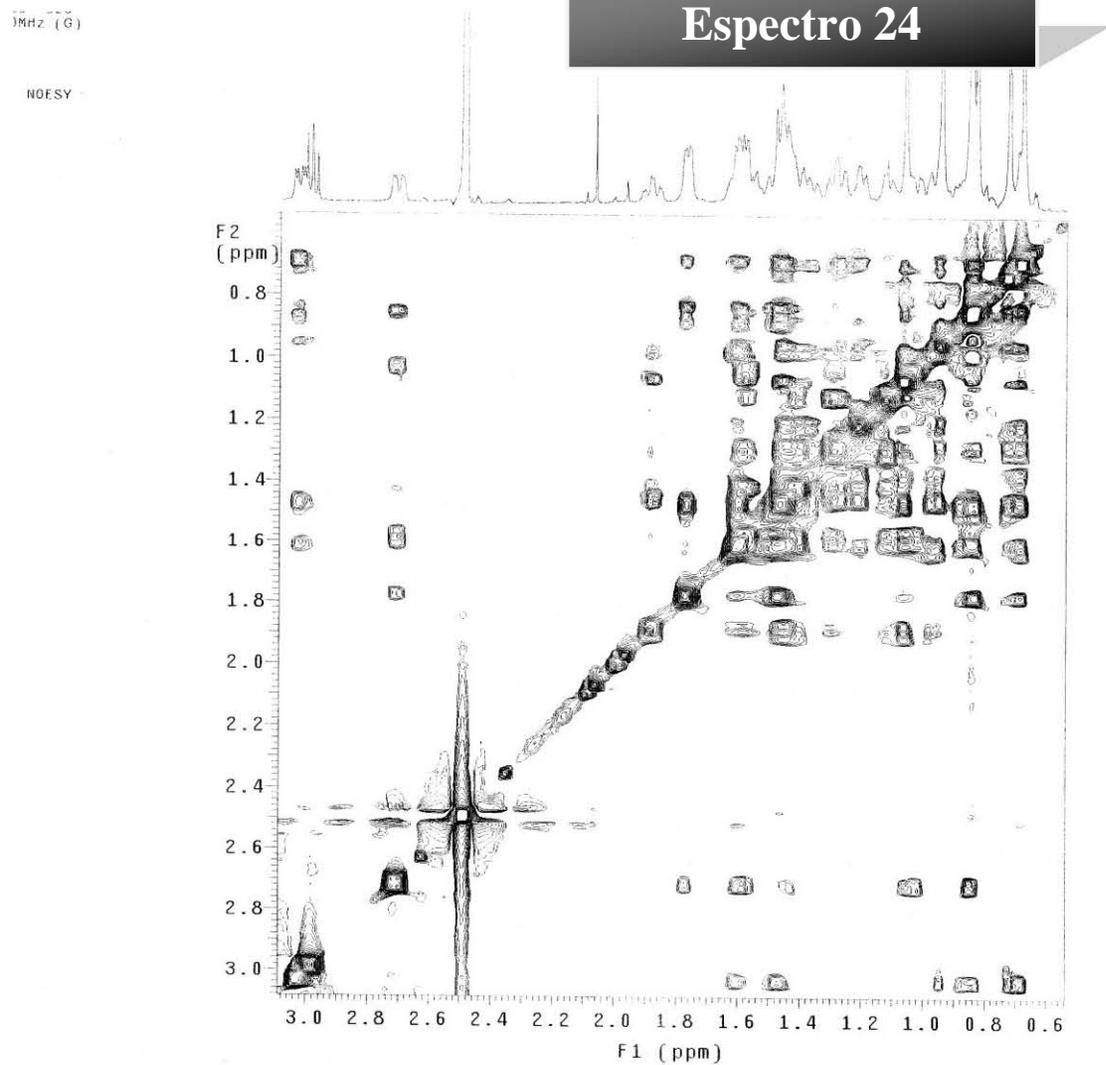
File: gHMBC
Pulse Sequence: gHMBC



solvente: DMSO-d6
PulsInova-500MHz (G)
70-13-2008
file: NQESY
Use Sequence: NQESY

Espectro 23



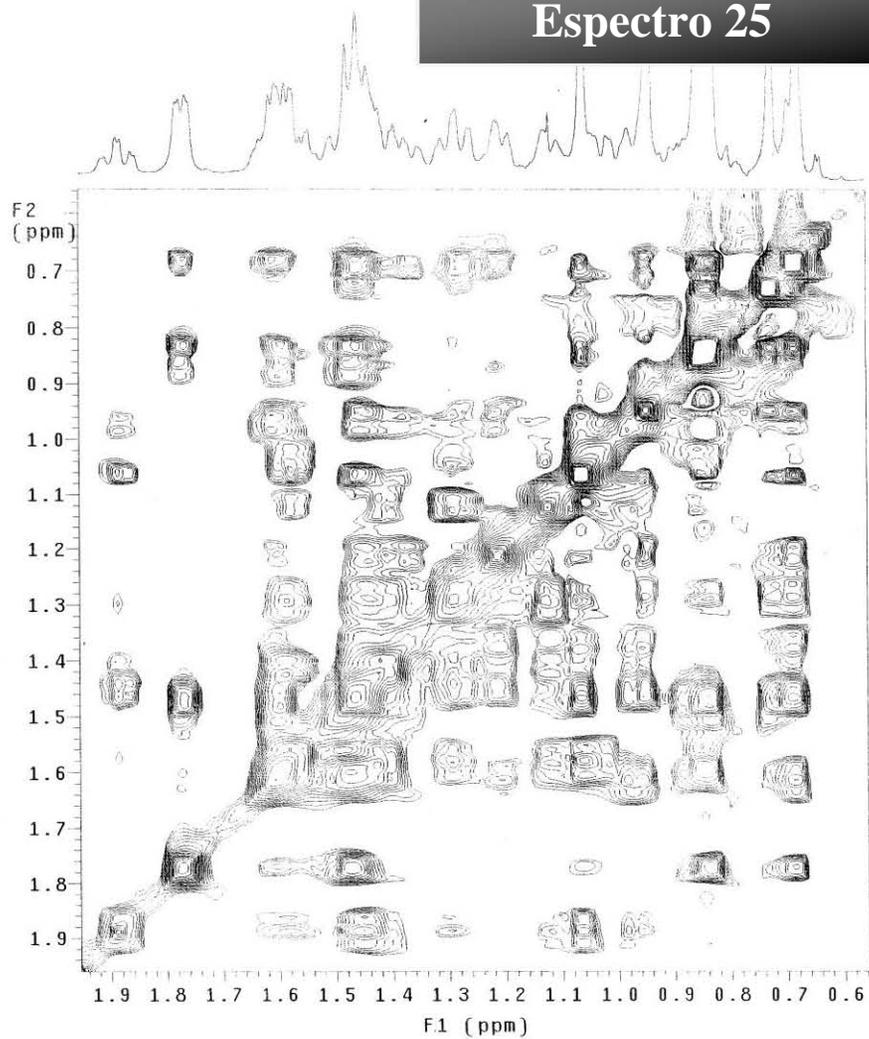


Experiment: 000007
Disolvente: DMSO-d6
VarianInova-500MHz (G)
Mayo-13-2008

File: NOESY

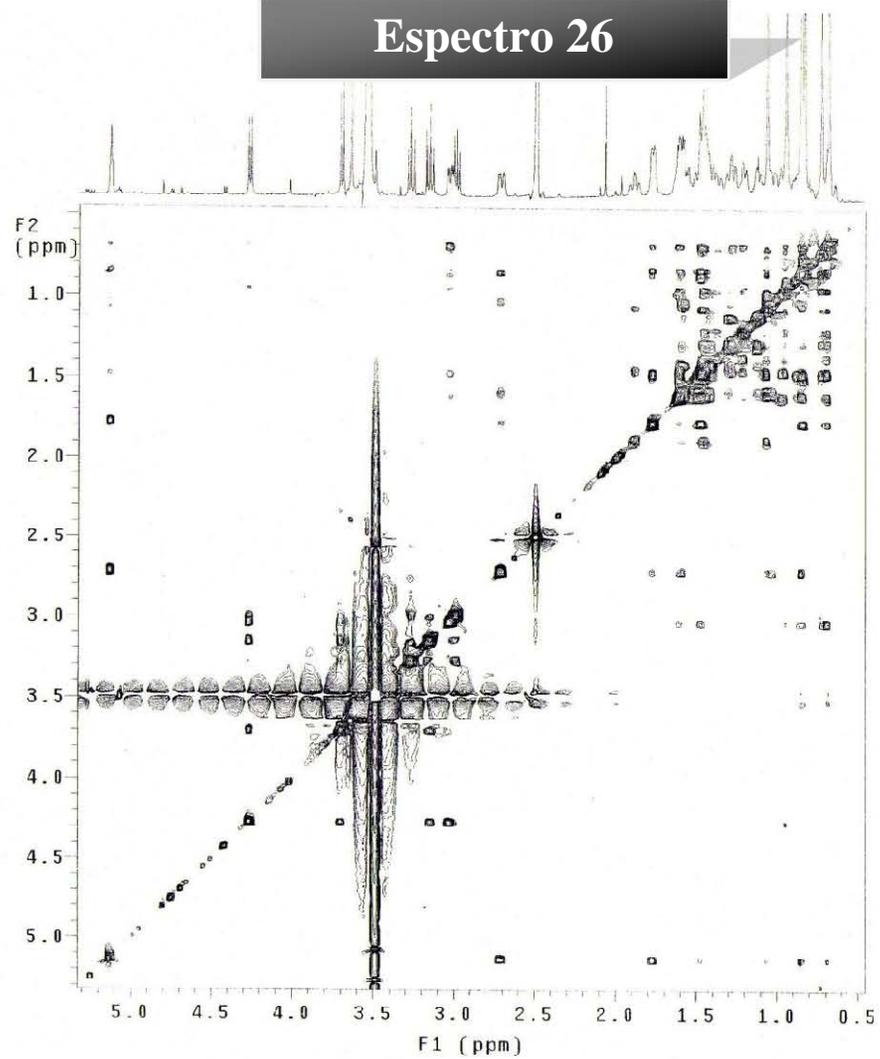
Pulse Sequence: NOESY

Espectro 25



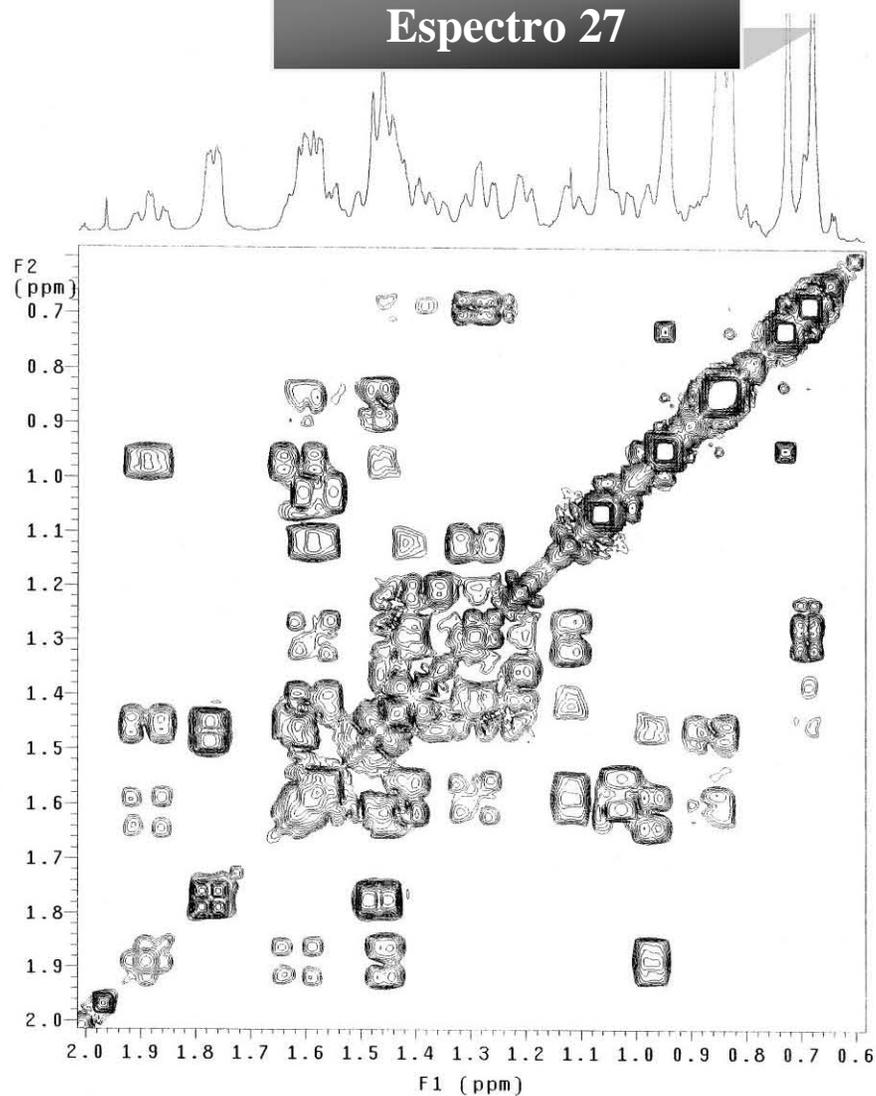
01_101100VA-000007 (0)
ayo-13-2005
File: NOESY
ulse Sequence: NOESY

Espectro 26

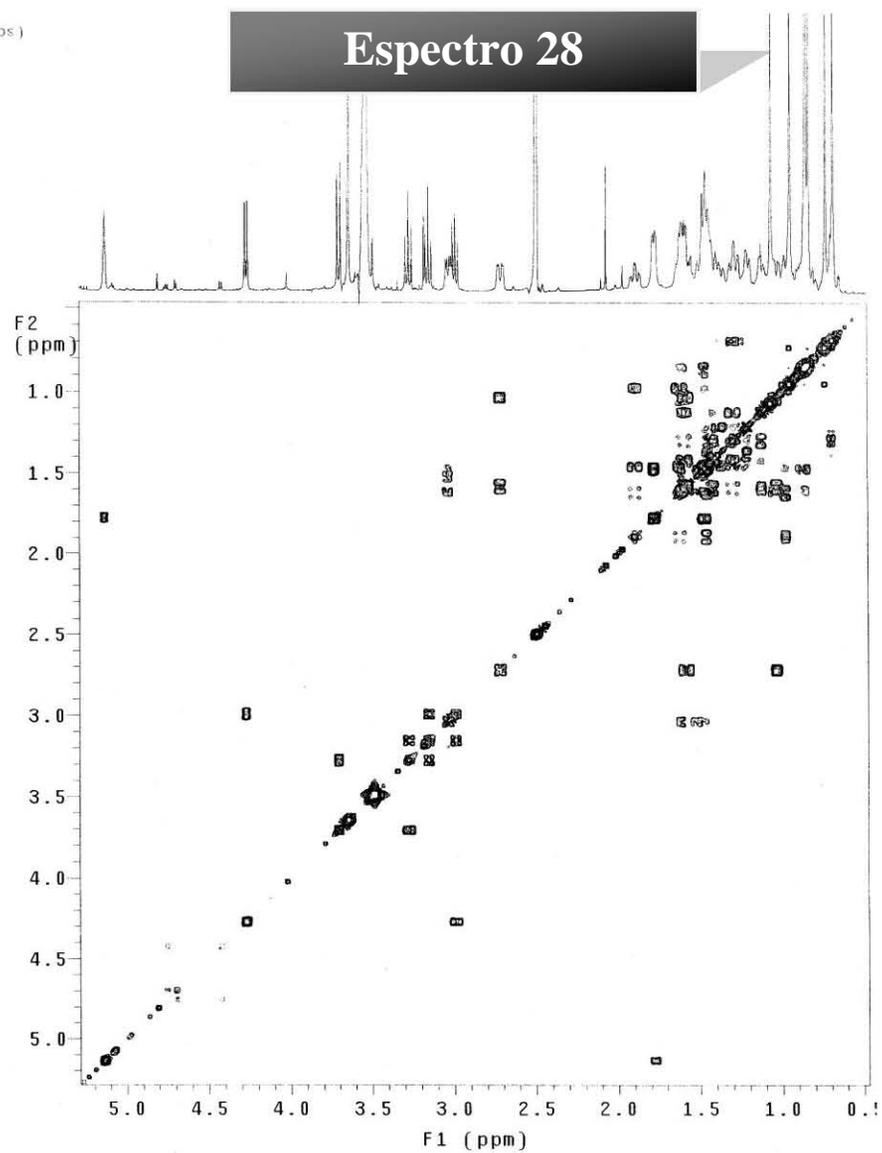


U: REGISTRO: 1770
Experimento: Cosy
solvente: DMSO +D2O
arianova-500MHZ (G)
ayo-12-2008
File: gCOSY
pulse Sequence: gCOSY

Espectro 27

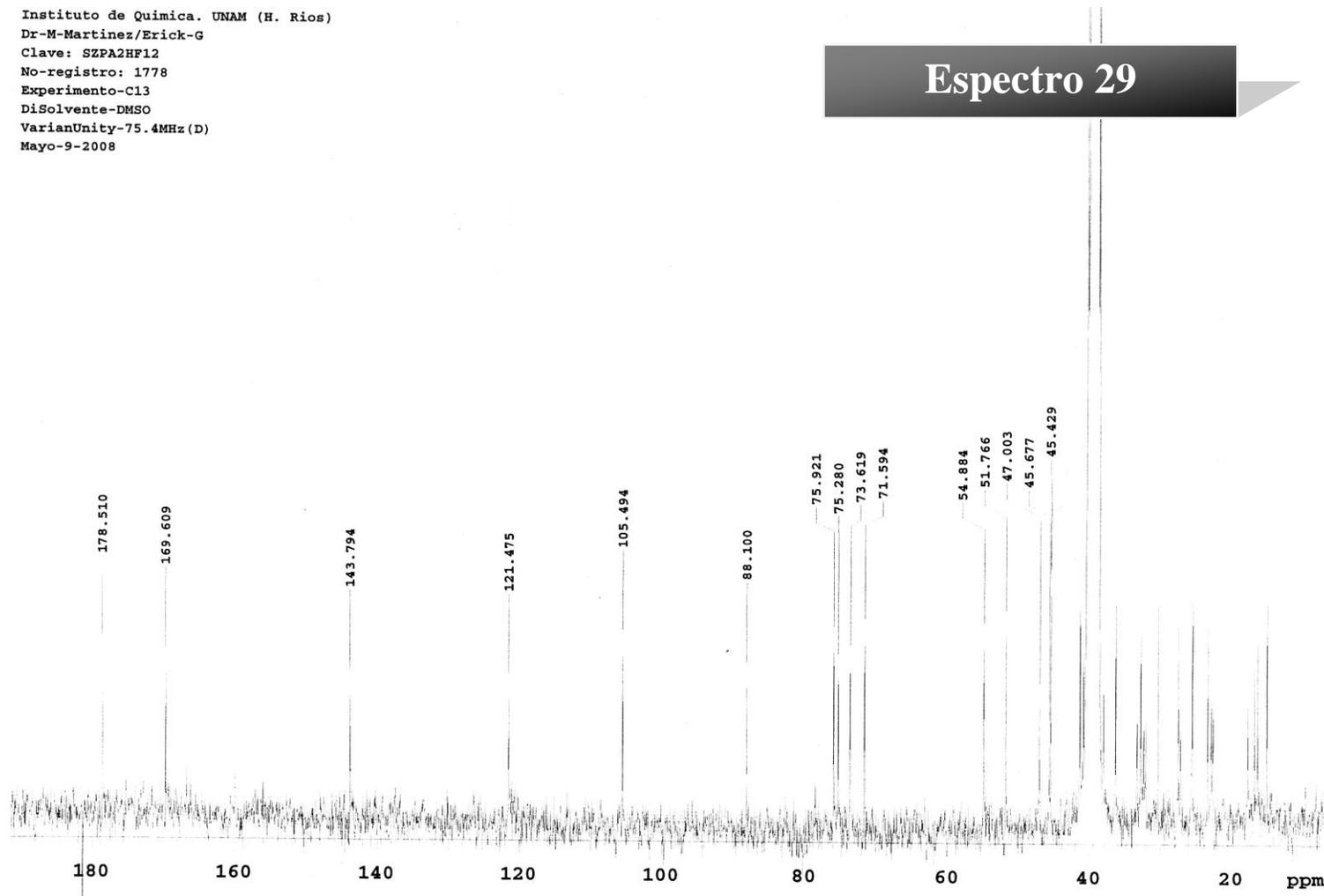


UNAM, Instituto de Química. (H. Ríos)
Dr. R. Martínez/Erick-G
Clave: S2PA2HF12
No. Registro: 1778
Experimento: Cosy
Disolvente: DMSO +D2O
VarianInova-500MHz (G)
Mayo-12-2008
File: gCOSY
Pulse Sequence: gCOSY



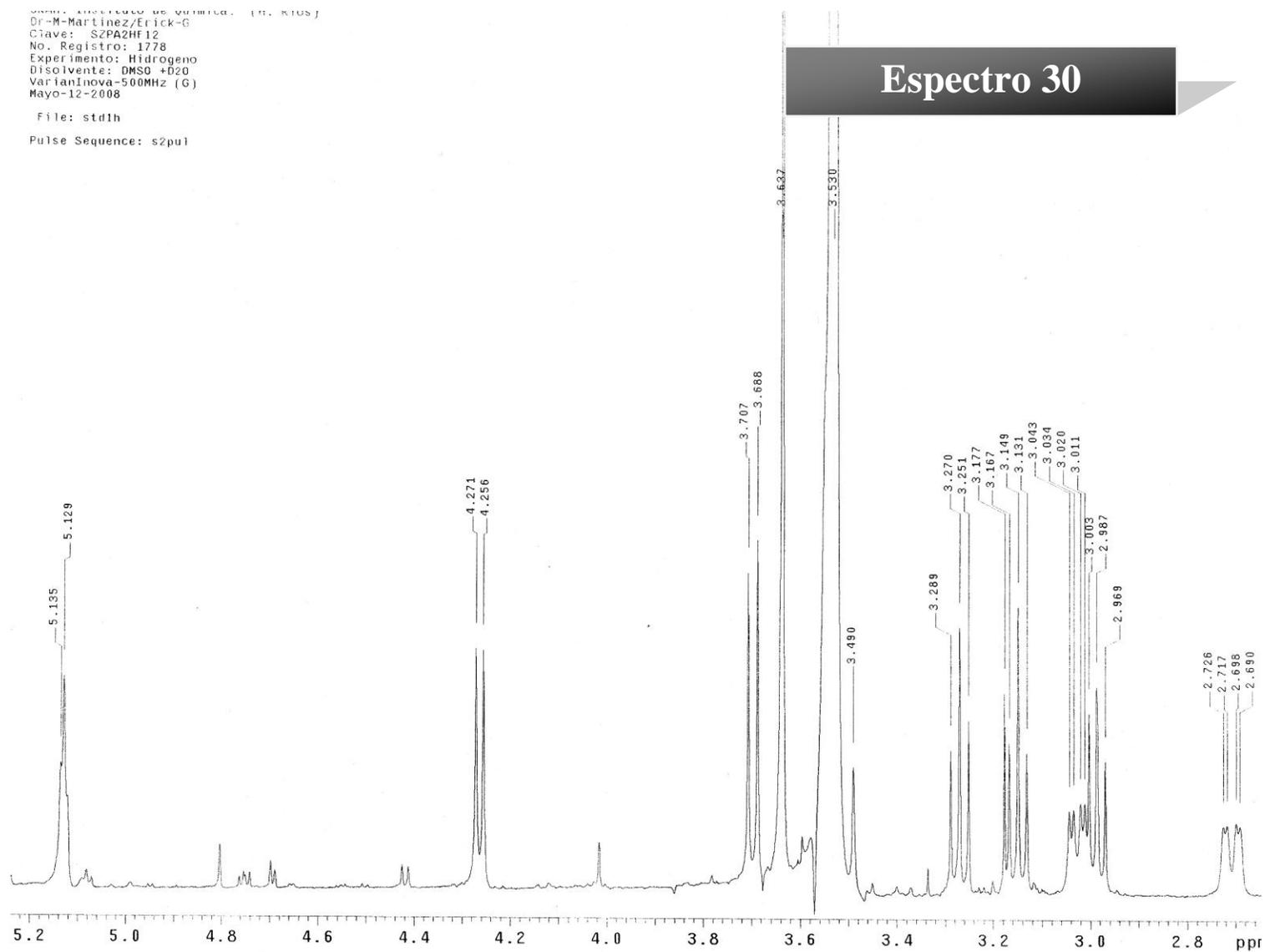
Instituto de Química. UNAM (H. Ríos)
Dr-M-Martinez/Erick-G
Clave: SZPA2HF12
No-registro: 1778
Experimento-C13
DiSolvente-DMSO
VarianUnity-75.4MHz(D)
Mayo-9-2008

Espectro 29

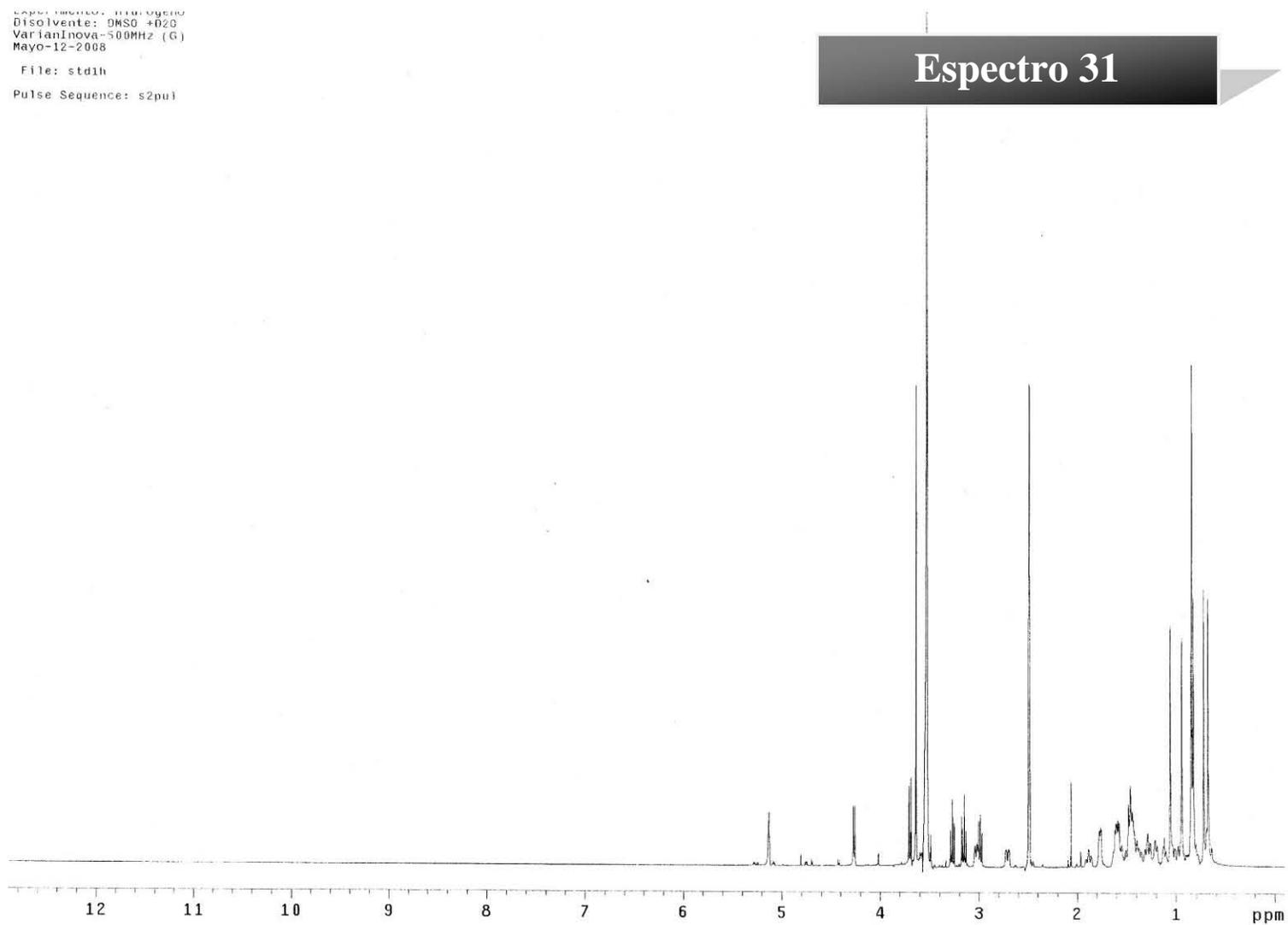


Nombre: ANTES PAGO DE MUESTRA (1H, K105)
Dr: M-Martinez/Erick-G
Clave: SZPA2HF12
No. Registro: 1778
Experimento: Hidrogeno
Disolvente: DMSO +D2O
VarianInova-500MHZ (G)
Mayo-12-2008
File: std1h
Pulse Sequence: s2pu1

Espectro 30

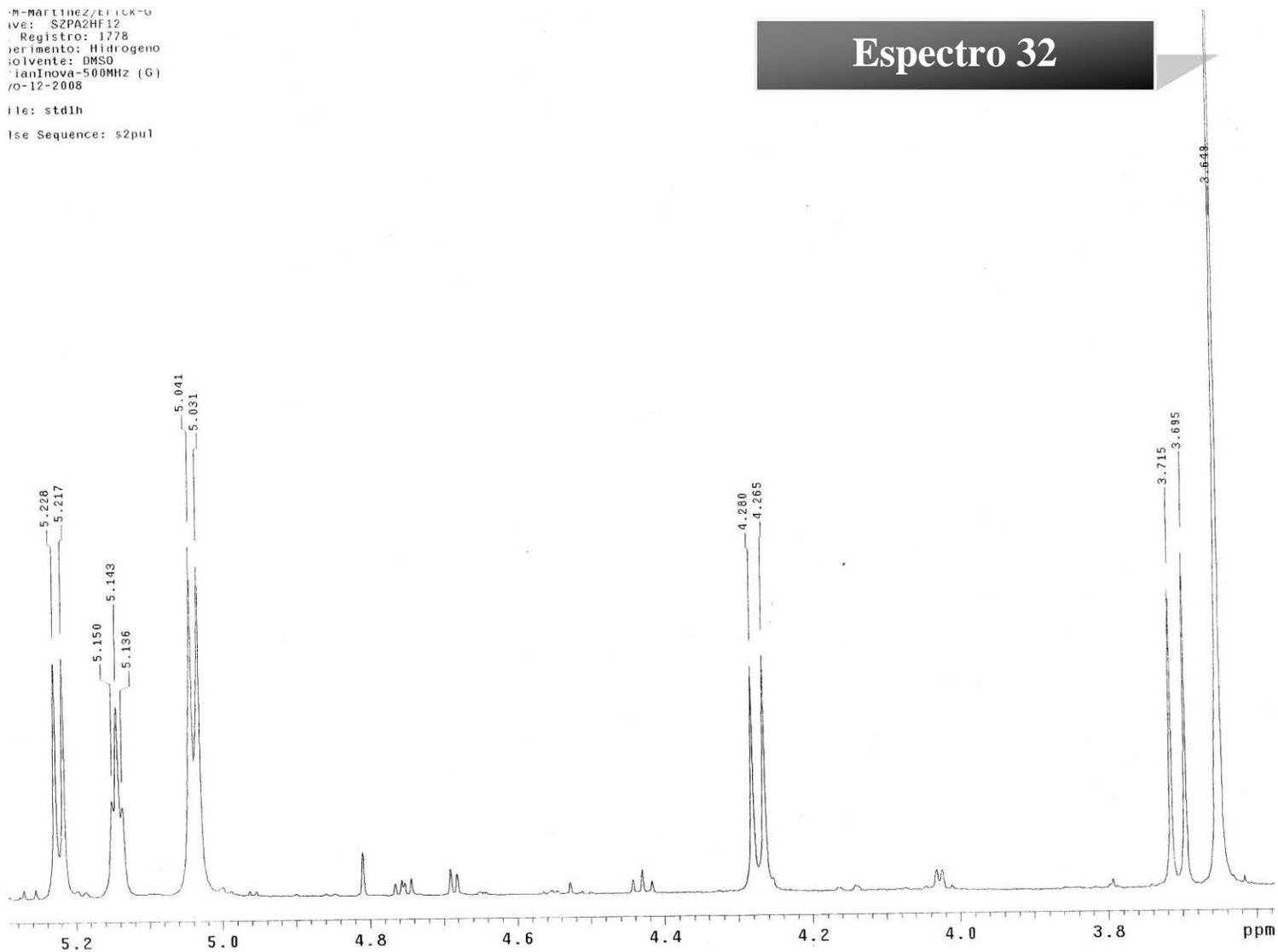


Experimento: 11110000
Disolvente: DMSO +D2O
VarianInova-500MHz (G)
Mayo-12-2008
File: std1h
Pulse Sequence: s2pul



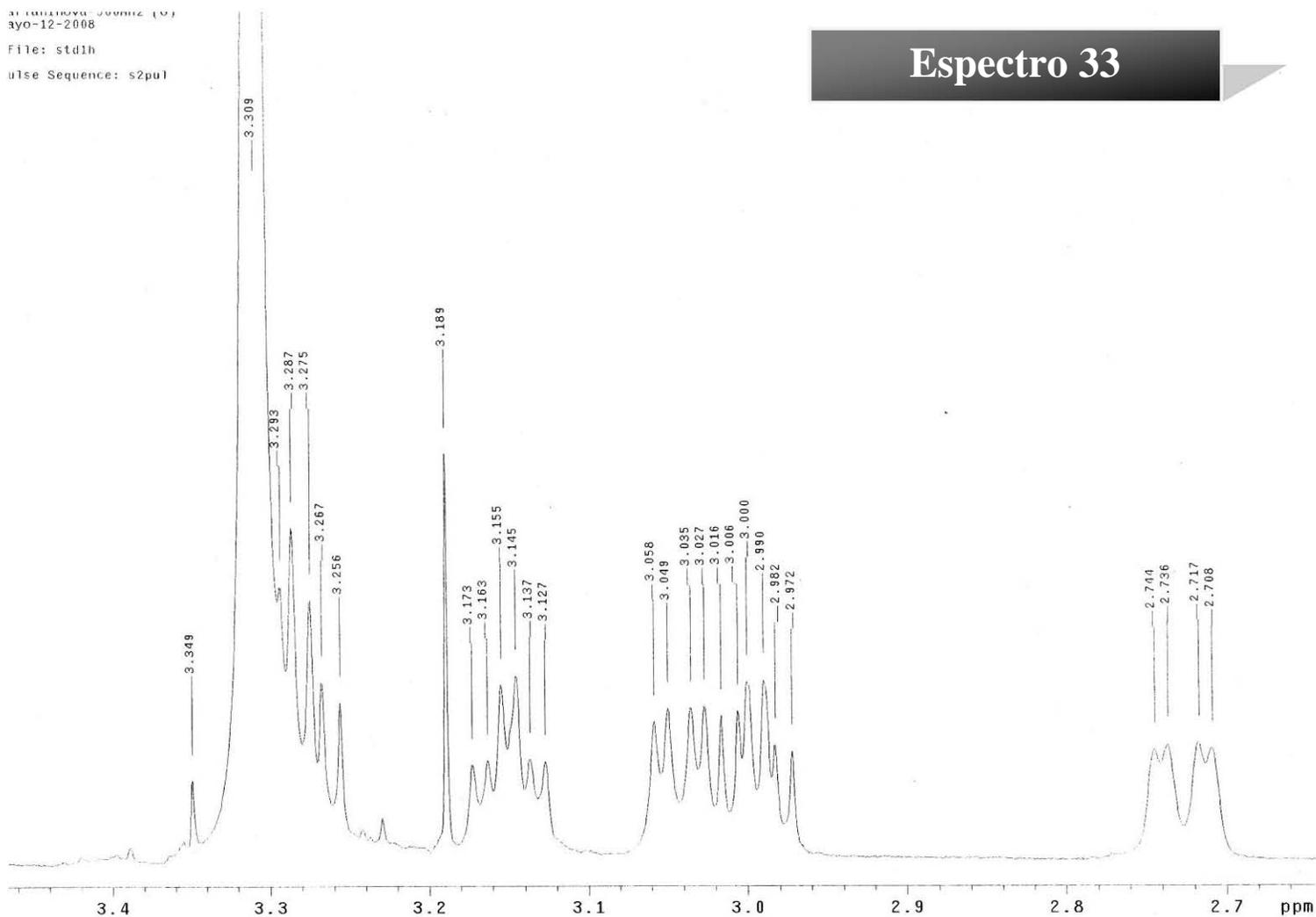
Martínez/Elck-G
ive: S2PA2HF12
Registro: 1778
Experimento: Hidrogeno
Solvente: DMSO
Bruker Inova-500MHz (G)
0-12-2008
file: std1h
Use Sequence: s2pu1

Espectro 32



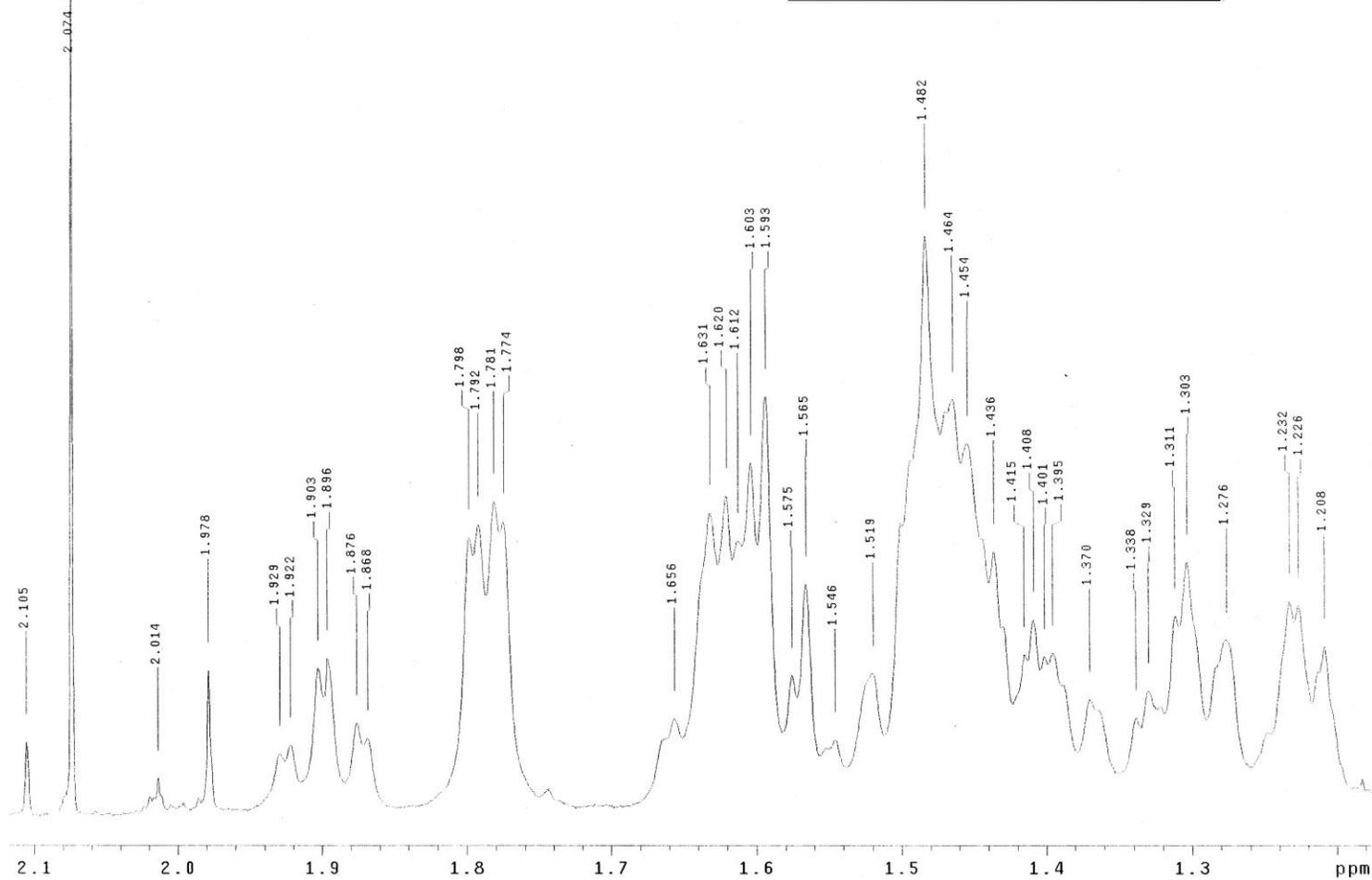
31 MAR 2008 09:00:02 (P)
ayo-12-2008
File: std1h
ulse Sequence: s2pu1

Espectro 33

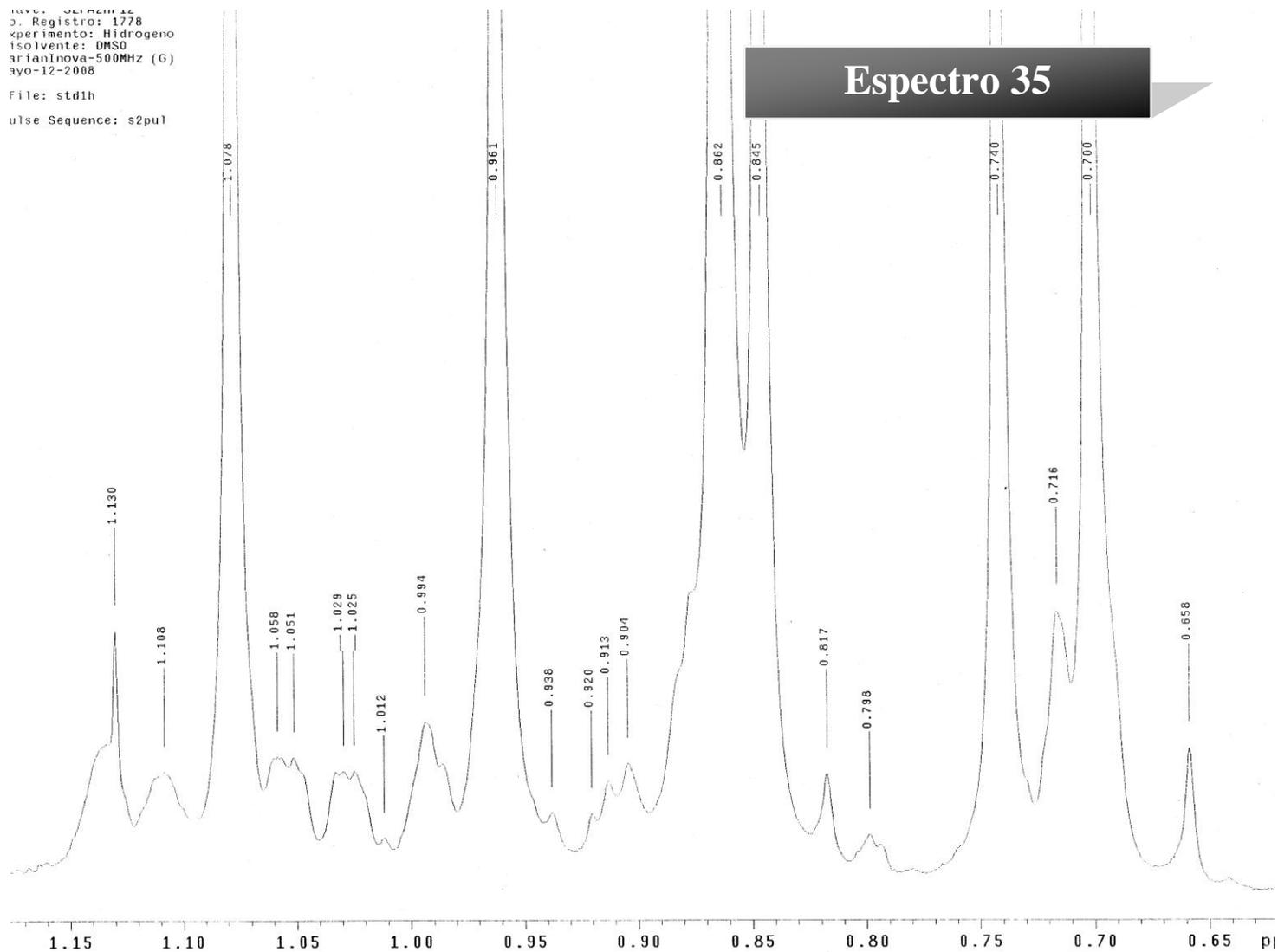


Experimento: nitroogero
Solvente: DMSO
Pulsador: 500MHz (G)
70-12-2008
file: std1h
Use Sequence: s2pu1

Espectro 34

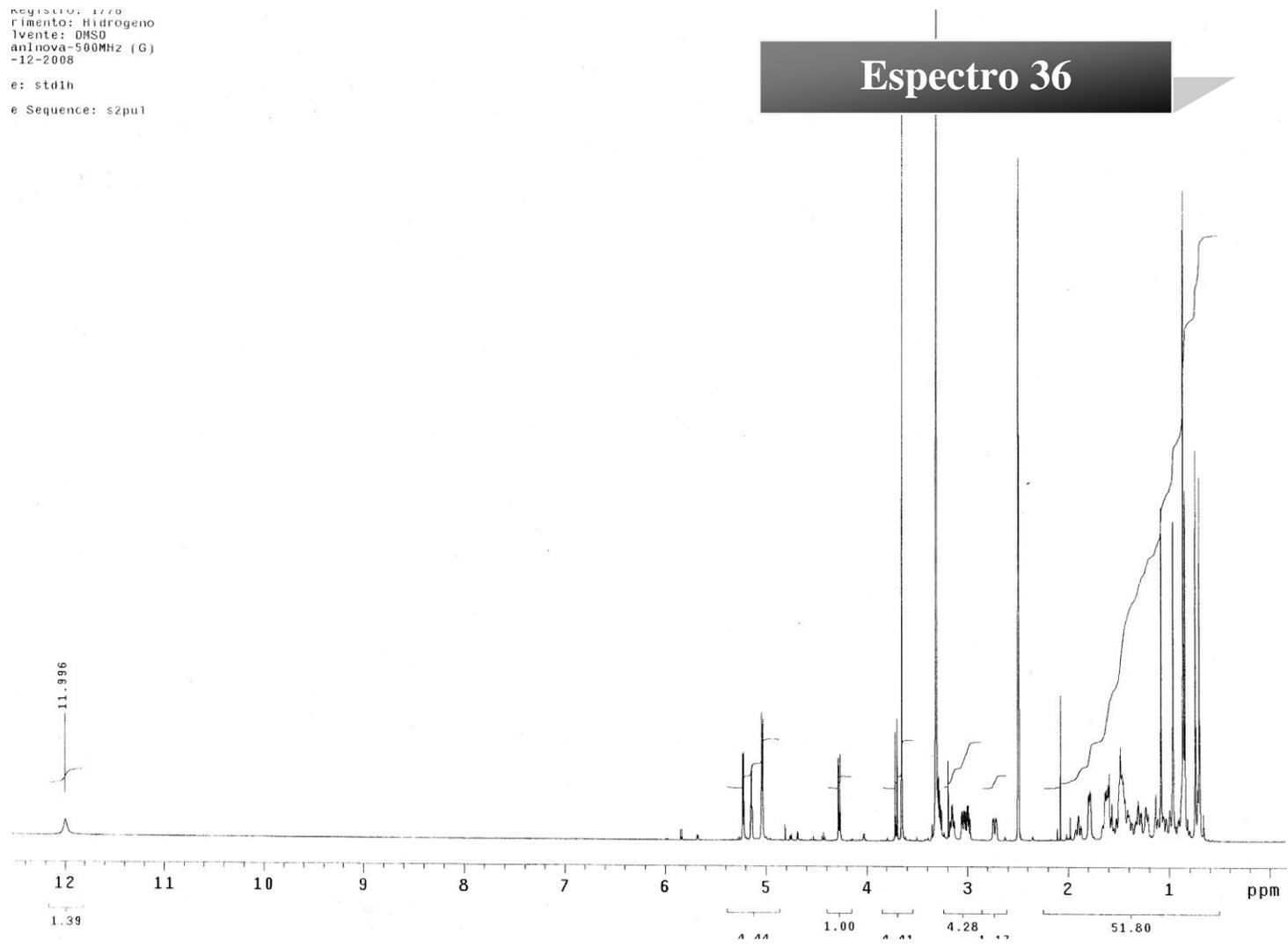


ave: 3074116
o: Registro: 1778
xperimento: Hidrogeno
solvente: DMSO
arianInova-500MHz (G)
ayo-12-2008
File: std1h
ulse Sequence: s2pul



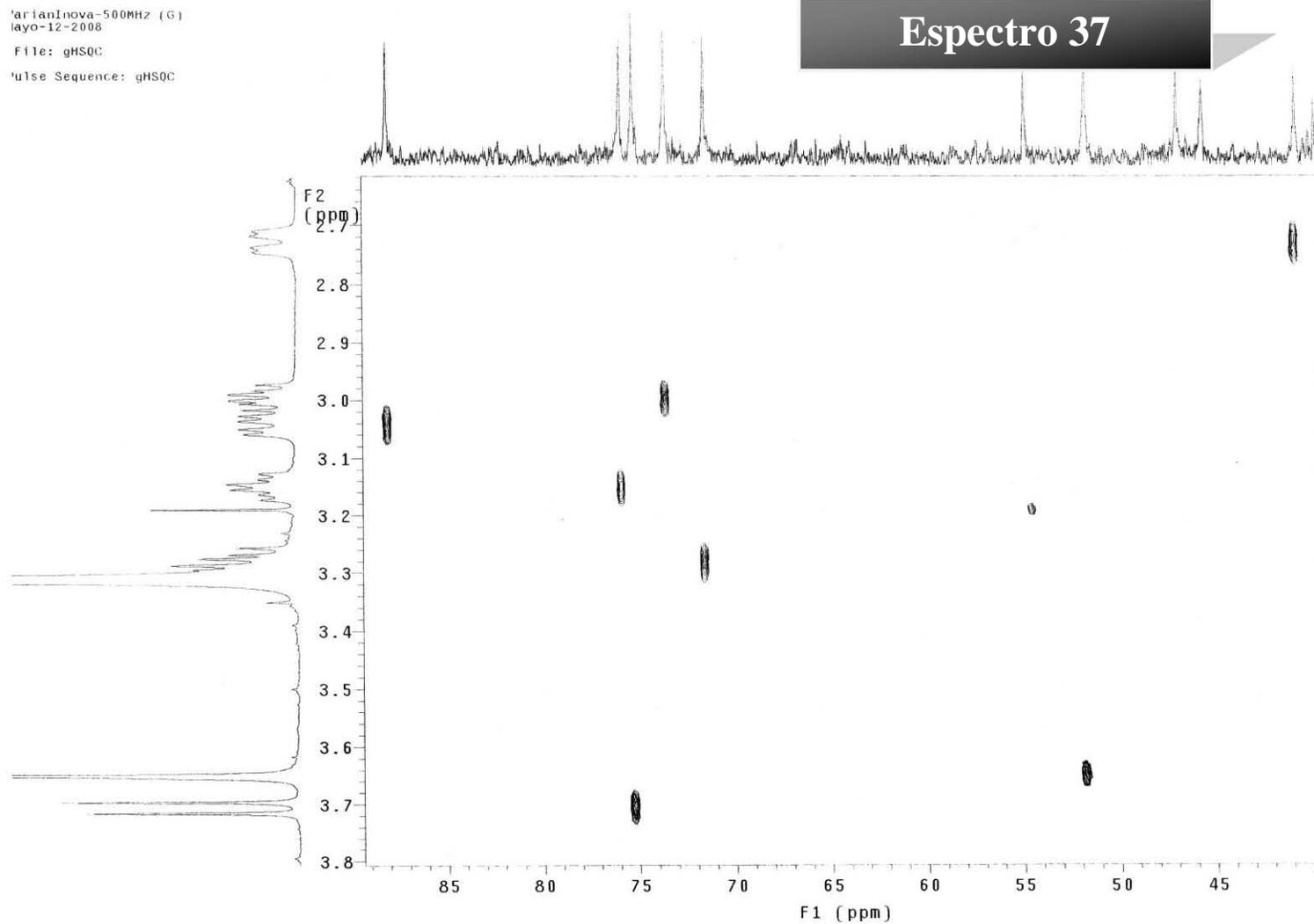
Registro: 1770
Experimento: Hidrogeno
Solvente: DMSO
anInova-500MHz (G)
-12-2008
e: std1h
e Sequence: s2pu1

Espectro 36



VarianInova-500MHz (G)
Mayo-12-2008
File: gHSQC
Pulse Sequence: gHSQC

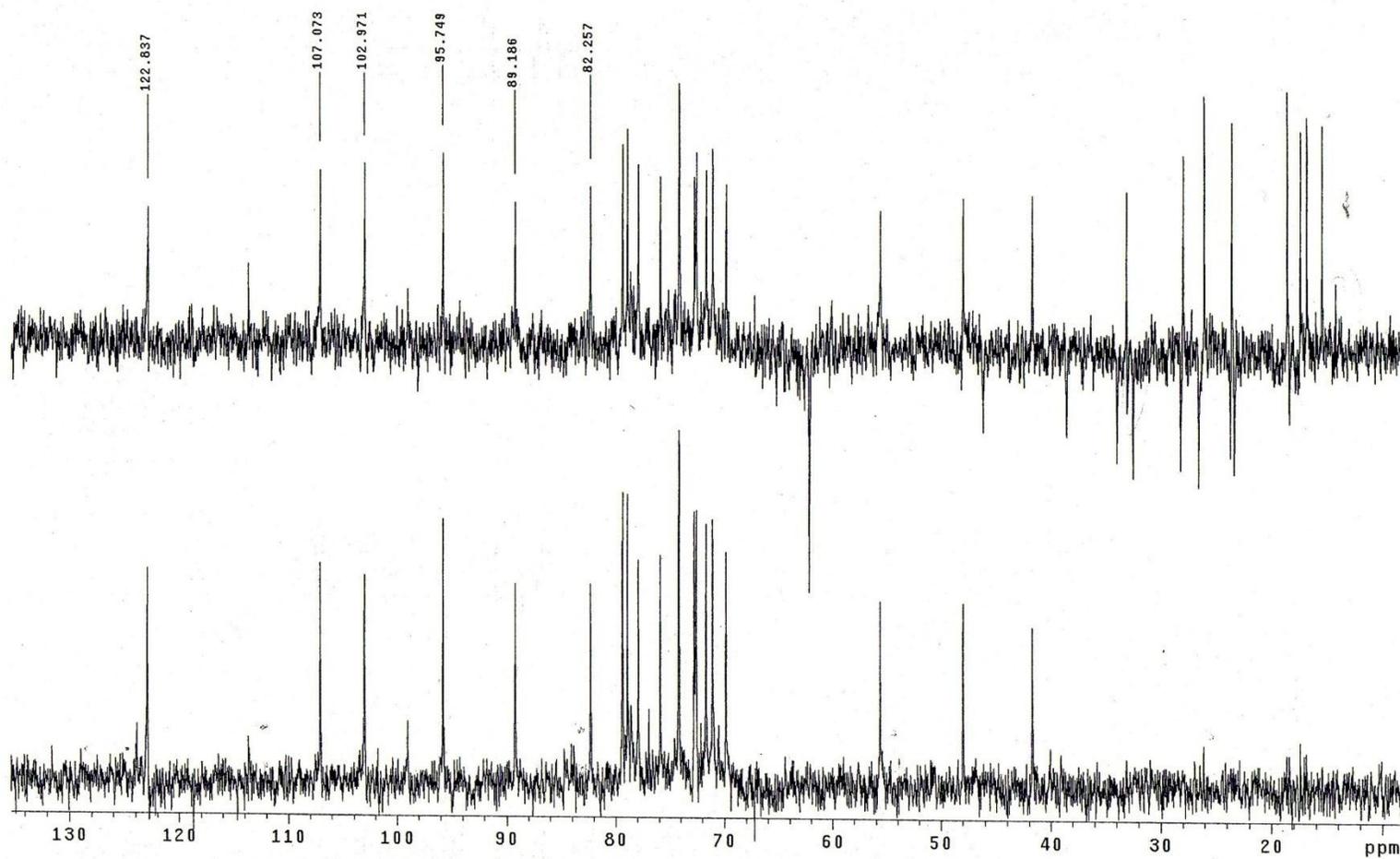
Espectro 37



Espectros de SZPA215

Instituto de Química, UNAM (H. Ríos)
Dr-M-Martínez/Luis-E-Guadarrama
Clave: 52PA215
No-Registro: 1771
Experimento-Dept
Disolvente-Piridina-d5
VarianUnity-75.4MHz(C)
Junio-21-2007
Pulse Sequence: DEPT

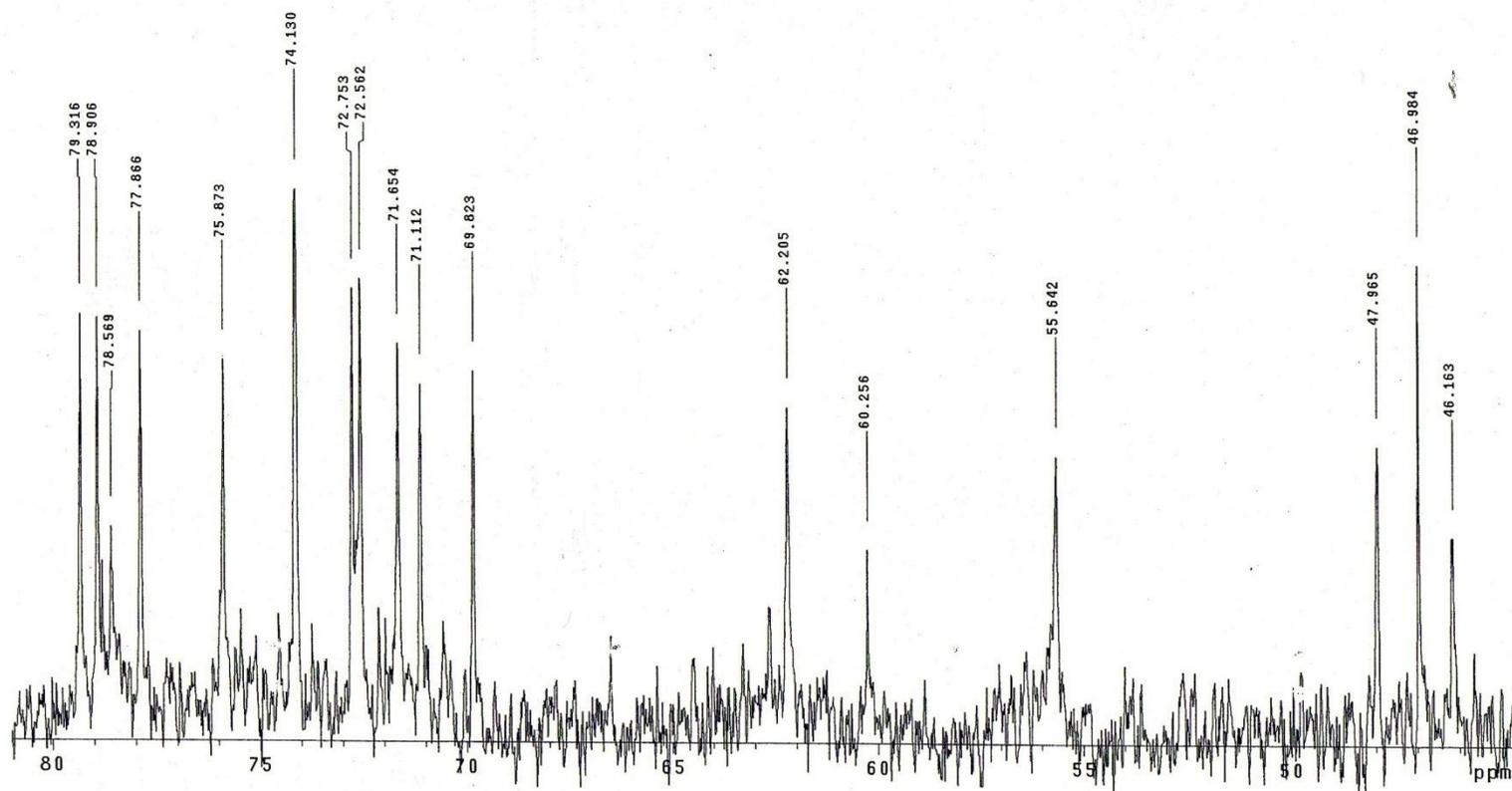
Espectro 38



Instituto de Química, UNAM (H. Ríos)
Dr. M. Martínez/Luis-E. Guadarrama
Clave: SZPA215
No-Registro: 1771
Experimento-C13
Disolvente- Piridina-d5
VarianUnity-75.4MHz(C)
Junio-21-2007

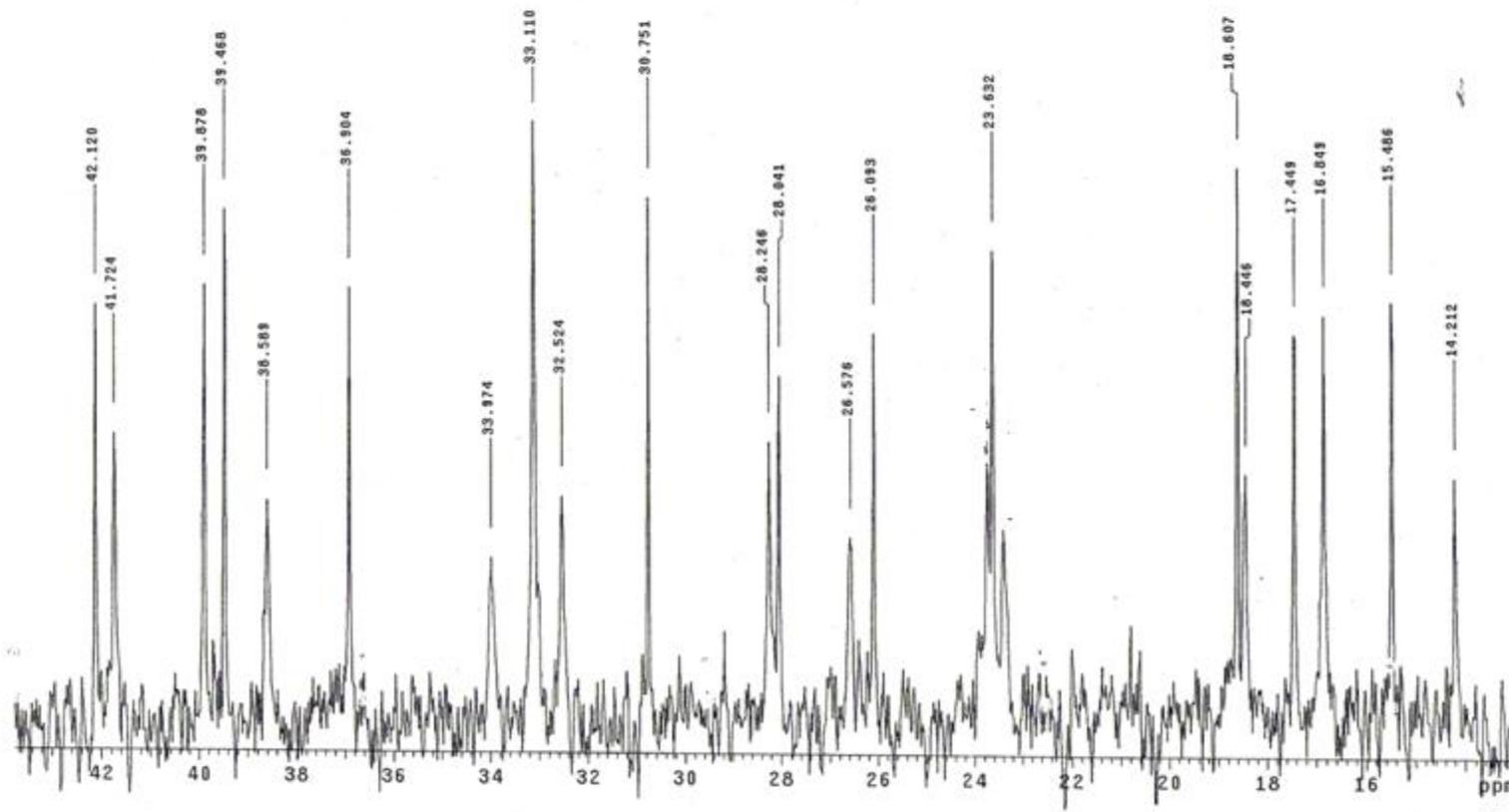
Pulse Sequence: s2pu1

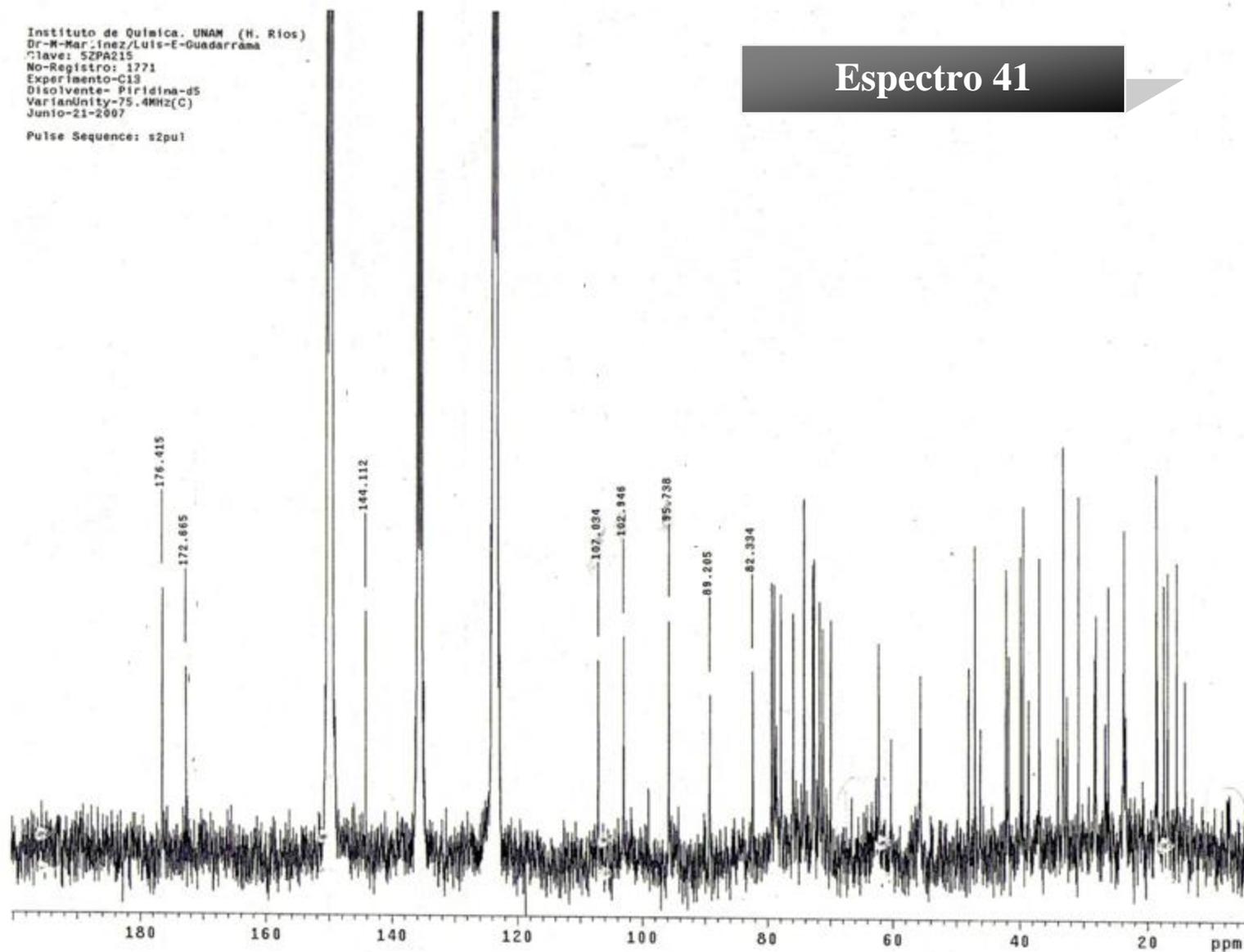
Espectro 39



Instituto de Química, UNAM (H. Ríos)
Dr-M-Martínez/Luis-E-Guadarrama
Clave: 52PA215
No-Registro: 1771
Experimento-C13
Disolvente- Piridina-d5
VarianUnity-75.4MHz(C)
Junio-21-2007
Pulse Sequence: s2pu1

Espectro 40

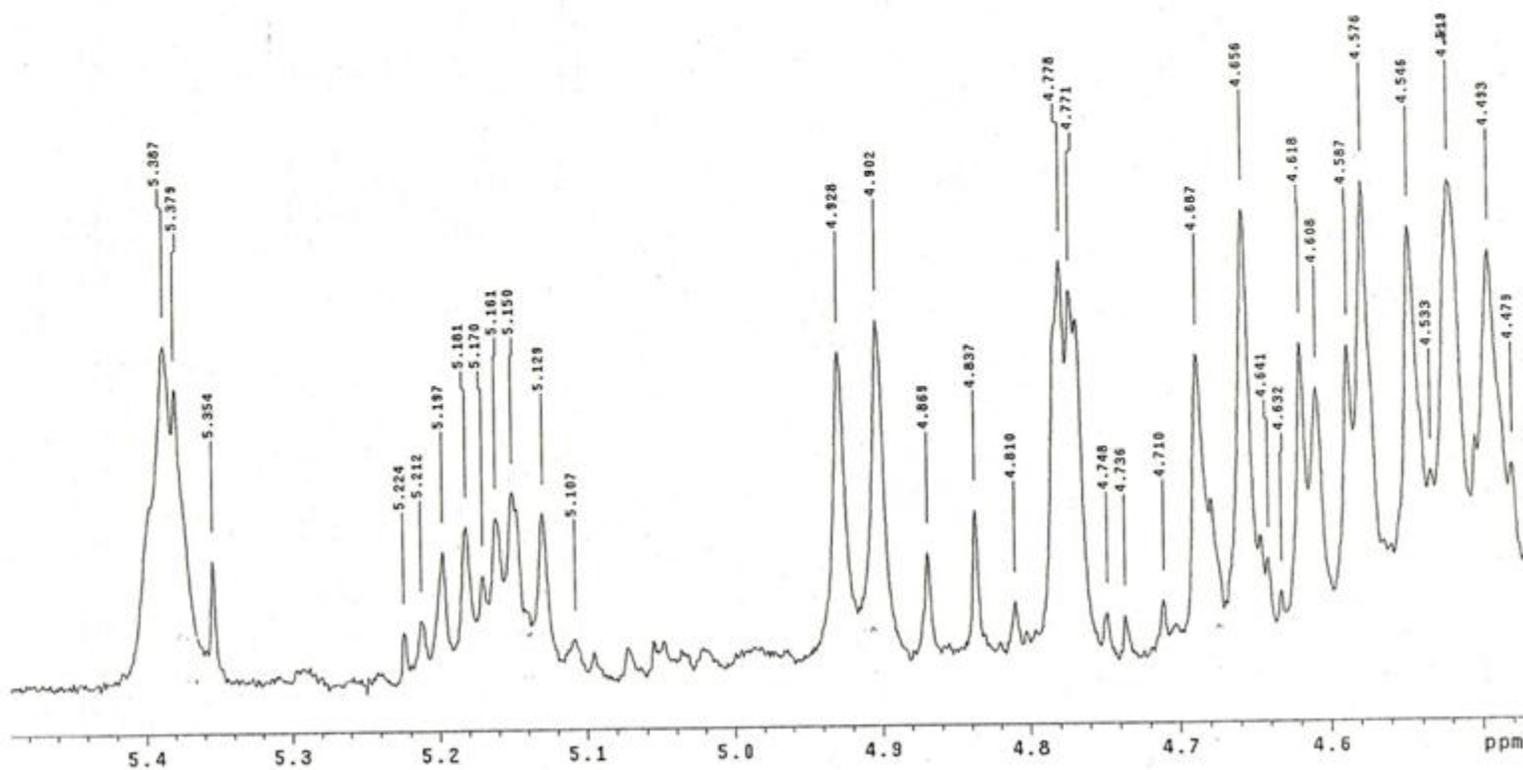




Instituto de Química, UNAM (H. Ríos)
Dr-M-Martínez/Luis-E-Guzarrama
Clave: SZPA215
No.Registro: 1771
Experimento-Hidrogeno
Disolvente- Piridina-d5
VarianUnity-300Mhz(C)
Junio-21-2007

Pulse Sequence: s2pu1

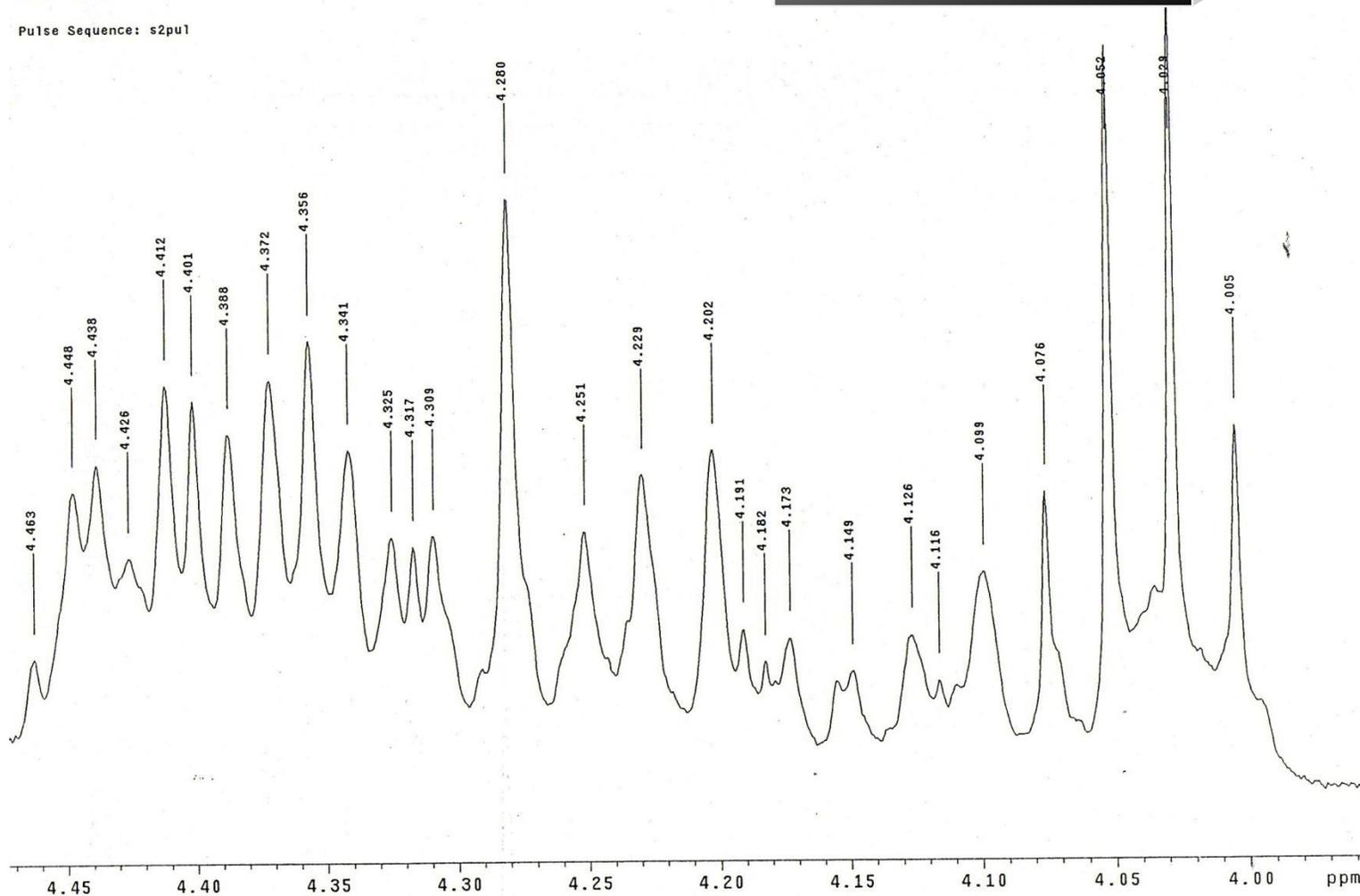
Espectro 42



Instituto de Química, UNAM (H. Ríos)
Dr.-M-Martínez/Luis-E-Guadarrama
Clave: 5ZPA215
No.Registro: 1771
Experimento-Hidrogeno
Disolvente- Piridina-d5
VarianUnity-300Mhz(C)
Junio-21-2007

Espectro 43

Pulse Sequence: s2pu1



ANEXOS 2

MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN

MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS.

La cromatografía es una técnica que permite separar los compuestos químicos en mezclas complejas.

Cabe destacar desde un principio que en todas las técnicas cromatográficas hay:

- ❖ Una fase estacionaria y una fase móvil.
- ❖ En cromatografía líquida, la fase móvil es un líquido que se hace pasar a través de una fase estacionaria.

Una de las características fundamentales en las cromatografías es que los componentes de la mezcla que queremos separar y/o identificar y/o cuantificar, se separan cuando sus velocidades de migración son distintas.

Para elegir una técnica de separación además de tener en cuenta los criterios económicos y de accesibilidad, hay que atender a dos tipos de consideraciones: unas tienen que ver con las propiedades físicas estructurales de las moléculas que se pretende separar, o de las características de la matriz en que se encuentran; otras se derivan de los objetivos del análisis (sensibilidad, *resolución*, tiempo de análisis, necesidad de una detección específica).

El método de selección incluye los pasos necesarios para la obtención, preparación y posible fraccionamiento de la muestra, la aplicación de la técnica analítica adecuada y el tratamiento de los datos obtenidos.

Las técnicas espectroscópicas proporcionan, para cada compuesto analizado, una información compleja, relacionada con sus características estructurales específicas, por otro lado las técnicas de separación se utilizan para resolver los componentes de una mezcla y la señal obtenida puede utilizarse con fines analíticos cuantitativos o cualitativos.

La cromatografía comprende un conjunto importante y diverso de métodos que permite a los científicos separar componentes estrechamente relacionados en mezclas complejas, lo que en muchas ocasiones resulta imposible por otros medios. Se pueden separar moléculas en función de sus cargas, tamaños y masas moleculares. También a través de la polaridad de sus enlaces, sus potenciales redox, etc...

La cromatografía no solo permite la separación de los componentes de una mezcla, sino también su identificación y cuantificación.

El análisis cualitativo está basado en la medida de parámetros cromatográficos (tiempos y volúmenes de retención) mientras que el análisis cuantitativo está basado en la medida de alturas o áreas de picos cromatográficos que se relacionan con la concentración. La columna cromatográfica y la forma con la que se diseña, constituye el corazón de la separación. El detector, situado al final de la columna es el que garantiza la respuesta de los componentes que se separan.

En todas las separaciones cromatográficas la muestra se desplaza con una fase móvil, que puede ser un gas, un líquido o un fluido supercrítico. La fase móvil pasa a través de una fase estacionaria, con la que es inmisible y que se fija

a una columna o a una superficie sólida. Las dos fases se eligen de forma, que los componentes de la muestra se distribuyen de modo distinto entre la fase móvil y la fase estacionaria.

Aquellos componentes que son fuertemente retenidos, por la fase estacionaria se mueven lentamente con el flujo de la fase móvil; por el contrario los componentes que se unen débilmente a la fase estacionaria, se mueven con rapidez. Como consecuencia de la distinta movilidad, los componentes de la muestra se separan en bandas o zonas discretas que pueden analizarse cualitativa y/o cuantitativamente. Estos resultados se recogen en forma de gráficos llamados *cromatogramas*¹².

La técnica más usada es la cromatografía líquida de alta resolución, Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR) por su sensibilidad, fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, su idoneidad para la separación de especies no volátiles o termolábiles y su aplicación a sustancias de primordial interés en la industria, como son los aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, hidrocarburos, carbohidratos, entre otros.

Cromatografía en capa fina.

Por este método se pueden analizar diversos tipos de mezclas de manera cualitativa principalmente. La muestra para análisis se aplica por medio de un tubo capilar en la superficie de una capa fina adsorbente en forma de banda, punto o mancha y es adsorbida en la superficie por la acción de fuerzas electrostáticas (Fuerzas de Van der Waals, puentes de hidrogeno, efectos inductivos, etc). Los adsorbentes más utilizados son gel de sílice, alúmina, tierra silícea,

celulosa y poliamidas. Como soportes del adsorbente se utilizan laminas o placas de vidrio, plásticas o metálicas, algunas placas tienen indicador de fluorescencia (f254 ó f366).

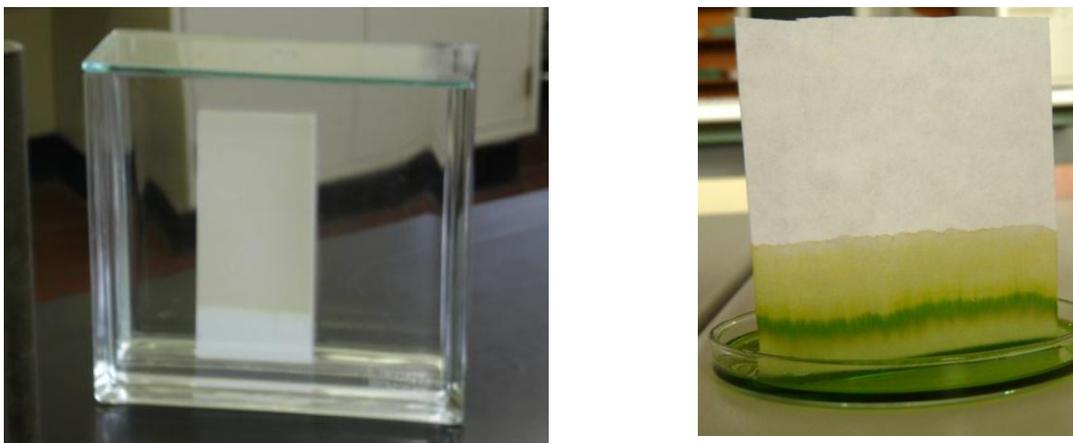


Figura 43. Cromatografía en capa fina (izquierda) y papel (derecha).

La placa seca se coloca en el tanque cromatográfico o cámara, en el cual debe encontrarse saturado el eluyente (Fase Móvil Líquida). El eluyente ascenderá o desplazará por capilaridad en la placa y “arrastrará” los componentes a lo largo de ésta, produciendo “manchas” que representan a los componentes, la separación se da por migración diferencial, es decir que la fase móvil “arrastrará” primero a las sustancias apolares y aquellas más polares son retenidas por la fase estacionaria dando lugar a la separación. Posteriormente se evapora el eluyente y la placa se analiza por métodos químicos. Existe una diversidad de reactivos reveladores entre los más comunes se encuentran los siguientes, Ninhidrina para aminas, Ácido sulfúrico para carbonizar compuestos orgánicos, etc., en estos últimos la placa se impregna con una

solución del reactivo revelador y se calienta para acelerar el proceso, también se pueden revelar las placas por medio de métodos físicos ópticos utilizando radiación UV o luz visible.

El análisis puede ser de tipo cualitativo, semicuantitativo o cuantitativo. En el primero se hacen comparaciones visuales de color e intensidad y propiedades UV entre otras. En el semicuantitativo se observa diámetro y comparación visual e intensidad del color de la mancha contra manchas patrones de concentración conocida. Y en la forma cuantitativa se pueden realizar medidas de transmisión a través de la sustancia y medidas de emisión o medida de luz reflejada desde la sustancia, y espectrofotometría por fluorescencia¹².

Cromatografía en papel.

El proceso es básicamente el mismo, solo que se usan tiras de papel cromatográfico en el tanque cromatográfico.

Cromatografía en Columna.

Se utilizan columnas de vidrio rellenas con la fase estacionaria por ejemplo de alúmina, gel de sílice u óxido de magnesio. La fase móvil se encuentra formada por la solución que lentamente va atravesando la fase estacionaria por gravedad. La solución que sale al final de la columna se reemplaza constantemente por nueva solución que se suministra desde un contenedor por la parte superior de la columna.



Figura 44. Cromatografía en columna

La migración de las sustancias de la mezcla a través de la columna se encuentra retardada en diferente grado por las interacciones diferenciales que cada una de ellas pueda ejercer con la fase estacionaria. Las sustancias se separan gradualmente dentro de la banda total, la separación, y por tanto la resolución, aumenta con la longitud y diámetro de la columna.

CROMATOGRAFÍA DE GASES.

En esta técnica cromatográfica, la muestra se inyecta y volatiliza en la cabeza de una columna cromatográfica.

La *elución* se produce por el flujo de una fase móvil de un gas inerte y a diferencia de la mayoría de las técnicas cromatográficas la fase móvil no interacciona con las moléculas del analito; su única misión es transportar el analito a través de la columna.

Cromatografía Gas – Sólido: La fase estacionaria es un sólido de gran área superficial sobre el que se adsorbe el analito. Actualmente sólo se aplica a la separación de especies de bajo peso molecular (CO_2 , O_2 , N_2 e hidrocarburos). Los compuestos más polares son retenidos en la fase estacionaria de manera semipermanente.

En la cromatografía de gases: Cromatografía Gas – Líquido, se usa como fase estacionaria un compuesto orgánico polimérico de baja volatilidad, estable térmicamente y con adecuadas características de disolvente. Es preciso señalar que deben usarse fases estacionarias, similares funcionalmente al compuesto a analizar.

Componentes básicos de un Cromatógrafo Gases

De forma muy esquemática podemos resumirlos en:

Gas portador, Sistema de Inyección de la Muestra, Columna, Detector, Registrador como indica esta imagen (Figura 45):

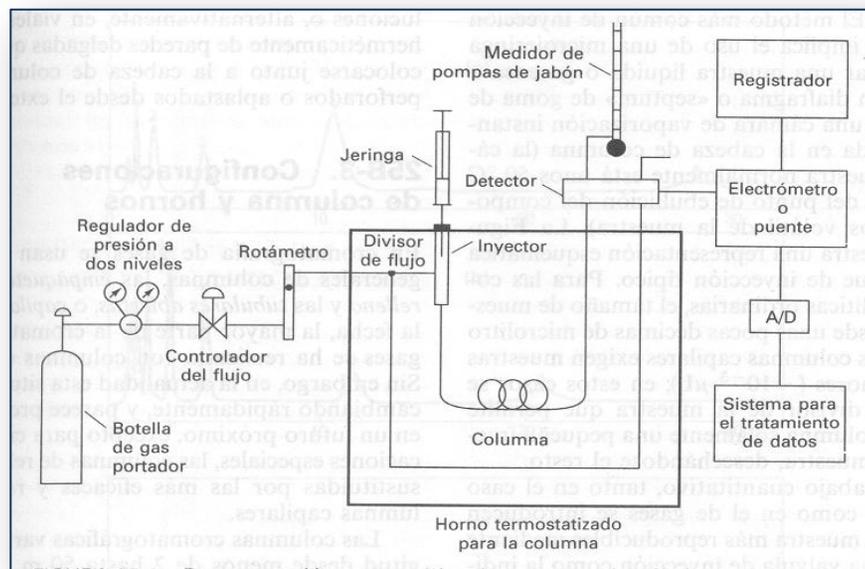


Figura 45. Esquema Cromatografía de gases².

La función de cada componente es:

GAS PORTADOR: El gas portador debe ser inerte y de alta pureza (He, Ar, N₂, CO₂, H₂). Su elección vendrá determinada por el tipo de detector que se use. Este gas estará en la botella de gas portador que son botellas con manureductores para poder controlar el caudal.

SISTEMA DE INYECCIÓN DE MUESTRAS: El método más común de inyección de muestra implica el uso de una microjeringa que inyecta la muestra líquida o gaseosa a través de una septa de goma de silicona en una cámara de vaporización instantánea situada en la cabeza de la columna. Esta cámara normalmente está a unos 50 °C por encima del punto de ebullición del componente menos volátil de la muestra, el cual normalmente es el disolvente¹².

Al inyectar con microjeringas el sistema debe asegurar:

- Que la muestra se vaporice en la cabeza de la columna sin distorsión del gas portador.
- Que la muestra ocupe la mínima longitud posible de la columna.

También se encuentra el inyector en columnas empaquetadas en una cámara de vidrio o cuarzo denominada *glass insert*, colocada en un bloque termostatzado a 200–300°C. El gas portador circula a través del bloque, penetra caliente en el inyector por una parte lateral y arrastra la muestra vaporizada al interior de la columna.

Otro tipo de inyector es el usado en columnas capilares donde la muestra vaporizada debe ser mucho más pequeña. Se inyectan volúmenes similares a los de las columnas empaquetadas, o bien dejan pasar sólo una pequeña fracción de la muestra inyectada a la cabeza de la columna (inyección Split), o bien reconcentra el analito gas en la cabeza de la columna (inyección Splitness), o bien vaporizan los analitos una vez que lo ha hecho el disolvente (inyección en-columna).

COLUMNAS

Las columnas cromatográficas varían en longitud desde menos de 2 hasta 60 metros. Se construyen de acero inoxidable, vidrio, sílice fundida, o teflón. A fin de poder ser colocadas en el interior del horno termostatzado, normalmente son configuradas como helicoides con diámetros de 10 a 30 cm.

La temperatura de trabajo es una variable importante para realizar un trabajo preciso, por ello son introducidas dentro de un horno termostatzado. La temperatura óptima de la columna depende del punto de ebullición de la muestra y del grado de separación requerido. Normalmente con una temperatura igual o ligeramente superior al punto de ebullición promedio de la muestra, se obtienen tiempos de elución razonables (2 a 30 minutos).

En cromatografía de gases se usan dos tipos generales de columnas, las empaquetadas y las capilares. En las columnas empaquetadas la fase estacionaria se impregna en un soporte sólido poroso. Este soporte sólido debe mantener inmóvil la fase líquida proporcionándole la máxima superficie. Estos soportes sólidos suelen ser tierra de Diatomeas que son fuertemente adsortivas.

Las columnas capilares son de sílice fundida con una capa protectora exterior de poliamida. Su longitud varía entre los 10 y 60 metros. Su diámetro interior oscila entre 0,1–0,32 mm. Su fase estacionaria recubre las paredes internas de la sílice y permiten conseguir mejores eficiencias que las empaquetadas aunque su uso es más complicado. Este tipo de columna requiere sistemas especiales de inyección de muestra y detectores más sensibles. En ambas columnas, su fase

estacionaria está unida químicamente al soporte sólido, lo que las lleva a ser más estables frente a la temperatura y pérdida de fase estacionaria que aquellas en las que la fase estacionaria está inmovilizada por adsorción física.

DETECTORES

La función básica de un detector es la de producir respuestas muy rápidas a pequeñas concentraciones de soluto.

Las características ideales de un detector en cromatografía de gases son:

1. Adecuada sensibilidad. En general, las sensibilidades de los detectores actuales se encuentran en el intervalo de 8 a 15 g de analito/s.
2. Una respuesta lineal para los analitos que se extienda a varios órdenes de magnitud.
3. Buena estabilidad y reproducibilidad.
4. Un intervalo de temperaturas de trabajo comprendido desde la temperatura ambiente hasta al menos 400 °C.
5. Un tiempo de respuesta corto que lo haga independiente del caudal.
6. Alta fiabilidad y fácil manejo. Hasta el punto de estar a prueba de la impericia de operadores inexpertos.
7. Respuesta semejante para todos los analitos, o por el contrario, una respuesta selectiva y altamente predecible para una o más clases de analitos.
8. No sea destructivo de la muestra.

Actualmente no existe el detector que reúna todas esas características.

Los detectores más generalizados son:

Detector de conductividad térmica (TCD): Es totalmente universal y muy sencillo, aunque no es muy sensible. Se emplea básicamente en el análisis de gases. Su baja sensibilidad impide usarlo con columnas capilares. Los gases que salen de la columna entran en un compartimiento en el que se encuentra un filamento caliente, cuya temperatura depende de la capacidad del gas que le rodea en disipar calor, esto es, su conductividad térmica. En el momento en que se eluye de la columna un compuesto con diferente conductividad térmica que el gas portador, la temperatura del filamento varía, y por tanto su resistencia eléctrica, lo que es registrado en forma de aumento o disminución de la corriente.

Detector de ionización a la llama (FID): Es el más usado. Esto se debe porque es prácticamente universal para los compuestos orgánicos, donde es bastante sensible y tiene un comportamiento excelente. Los gases que eluyen de la columna son introducidos en una llama formada por H₂ y aire cuya conductividad eléctrica está permanentemente registrada. En el momento en que un compuesto de carbono se eluye de la columna, se quema y durante la reacción de combustión se generan electrones y otras especies cargadas que alteran la conductividad eléctrica de la llama.

Detector de captura de electrones (ECD): Este detector es selectivo para las moléculas que contienen átomos electronegativos, como peróxidos o halógenos e insensible a compuestos como aminas, alcoholes, o hidrocarburos. Por lo que se emplea en el análisis de pesticidas halogenados. Se trata de un detector tremendamente sensible y en algunos casos hasta inestable. El eluyente de la columna se hace circular entre un pequeño núcleo de un metal radiactivo que

emite electrones (partículas), y un electrodo cargado positivamente que los recibe. En el momento en que la columna eluye una especie de átomos electronegativos, capaces de capturar a dichos electrones, se detecta una disminución de la corriente del electrodo.

Detector Termoiónico (TID): Se trata de un detector selectivo de los compuestos orgánicos que contienen fósforo y nitrógeno. En comparación con un FID, el TID es 500 veces más selectivo para los compuestos que contienen fósforo y 50 veces más con los compuestos continentales de nitrógeno. Un detector termoiónico tiene una configuración similar al detector de llama. El eluyente de la columna se mezcla con hidrógeno, pasa a través de la llama y se quema. El gas caliente fluye alrededor de una bola de silicato de rubidio calentada eléctricamente. La bola caliente forma un plasma que alcanza una temperatura de 600 a 800 °C. Esto provoca que se produzcan una gran cantidad de iones a partir de las moléculas que contienen fósforo o nitrógeno, lo que resulta en una gran corriente de iones, la cual se utiliza para la determinación de compuestos que contienen esos dos elementos.

Detector de Emisión Atómica (AED): Es el detector más reciente y se encuentra a la venta. En este detector el *eluyente* se introduce en un plasma de helio obtenido por microondas que se acopla a un espectrofotómetro de emisión con series de diodos. El plasma es suficientemente energético como para atomizar todos los elementos de una muestra, excitarlos, y así obtener los espectros de emisión¹².

CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCION (CLAR)

En cromatografía líquida, la fase móvil es un líquido que circula a través de una columna en la que está contenida la fase estacionaria. La fase móvil no sólo arrastra al analito, sino que existen interacciones intensas entre el analito y la fase móvil.

La retención en cromatografía depende de:

- ✓ La fase móvil.
- ✓ La fase estacionaria.
- ✓ El analito.

Todas las especies que pueden disolverse pueden separarse eligiendo la combinación adecuada de fase móvil y fase estacionaria.

La cromatografía líquida se clasifica según el lecho cromatográfico:

- Cromatografía Líquida: La columna es de vidrio y se usa para mezclas complejas, la cual se abordó anteriormente.
- Cromatografía de alta resolución o CLAR: La columna es de acero inoxidable.

El método de **CLAR** consta de una columna de acero inoxidable de 10-30 cm de longitud, y un diámetro interno de 4–10 mm. Las partículas de la fase estacionara son de un tamaño aproximado a las 5–10 μm . Cabe destacar que separa con gran *eficacia*, identifica los compuestos separados por la columna y además lo cuantifica por su altura o área de picos en el cromatograma¹².

Componentes básicos en un equipo de cromatógrafo de líquidos:

De forma esquemática los componentes básicos son:

Sistema de suministro, Inyector, Columna, Detector, Registrador, Bombeo y conducciones de la fase móvil. En la Figura 46 pueden observarse con más detalle:

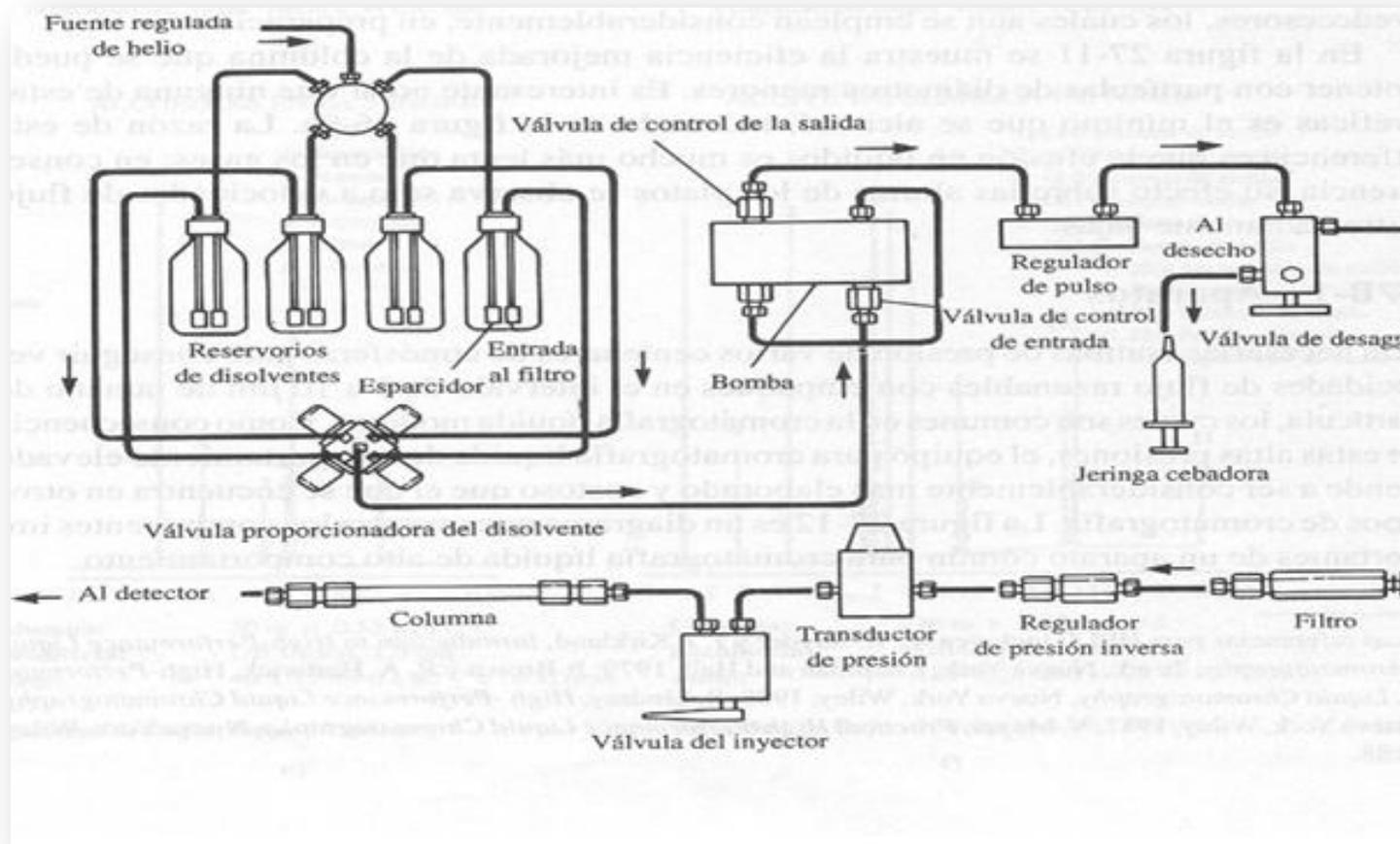


Figura 46. Esquema de un aparato de CLAR¹².

SISTEMA SUMINISTRO DE LA FASE MÓVIL:

Se trata de uno o varios reservorios para los disolventes. Sirve para desgasificar y eliminar partículas en suspensión de los disolventes que interfieren formando burbujas en los sistemas de detección.

SISTEMA DE BOMBEO DE LA FASE MÓVIL:

Se usan bombas para impulsar a la fase móvil y deben cumplir los siguientes requisitos:

- ✓ Deben vencer altas presiones.
- ✓ Proporcionar caudales estables entre 0,1 y 10mL/min.
- ✓ Deben estar libres de pulsaciones y tener volúmenes muertos pequeños.
- ✓ Deben estar construidas de materiales resistentes a la presión y a las agresiones químicas.
- ✓ Fácil manejo y mantenimiento.

Se utilizan tres tipos de bombas:

- ✓ Bombas recíprocas
- ✓ Bombas de desplazamiento
- ✓ Bombas neumáticas.

INYECTORES:

Son los encargados de introducir la muestra en la cabeza de la columna de forma reproducible y adecuada.

- ✓ Septa: Inyecta la muestra mediante una jeringa. Se usa poco y no permite mucha presión.
- ✓ Bucle de muestreo: Este dispositivo normalmente se encuentra integrado en el equipo cromatográfico y existen bucles intercambiables que permiten la elección de tamaños de muestra.

PRECOLUMNAS:

Se colocan delante de la columna para eliminar la materia en suspensión y los contaminantes de los disolventes. La composición del relleno de la precolumna debe ser semejante al de la columna. Aunque el tamaño de partícula es mayor para minimizar la caída de presión. En muchas ocasiones se usan para aumentar la vida de la columna.

COLUMNA:

Normalmente son de acero inoxidable de diámetro interno uniforme aunque en ocasiones se encuentran tubos de vidrio de paredes resistentes.

La mayoría de las columnas de cromatografía de líquidos tienen una longitud entre 10 y 30 cm. Generalmente son rectas y se pueden alargar, si es necesario, acoplando dos o más columnas. El diámetro interno de las columnas es a menudo de 4 a 10 mm y los tamaños de las partículas de los rellenos más comunes son 3, 5 y 10 μm .

Las fases estacionarias más comunes son las de partículas de sílice pero también se usa la alúmina, polímeros porosos y resinas de intercambio iónico.

La columna más utilizada es la de 25 cm de longitud y 4,6 mm de diámetro interno, empaquetada con partículas de 5 μm . Estas columnas tienen de 40 000 a 60 000 platos teóricos/metro.

Desde hace poco, se han empezado a fabricar columnas de alta resolución más rápidas, las cuales tienen menores dimensiones que las anteriormente descritas. Estas columnas pueden tener diámetros internos que oscilan entre 1 y 4,6 mm y se rellenan con partículas de 3 o 5 μm . A menudo su longitud es de 3 a 7,5 cm.

Pueden tener hasta 100 000 platos teóricos/metro y presentan la ventaja de la rapidez y del mínimo consumo de disolvente característica muy importante ya que los disolventes de alta pureza que se requieren en cromatografía de líquidos son muy caros.

DETECTORES:

A diferencia de la cromatografía de gases, en CLAR no existen detectores tan universalmente aplicables, ni tan fiables. En lo que sí coinciden cromatografía de gases y CLAR, son las cualidades enumeradas en los detectores de cromatografía de gases (Figura 47).

En CLAR existen dos tipos básicos de detectores:

- 1) Los basados en una propiedad de la disolución: Que corresponden a una propiedad de la fase móvil, como el índice de refracción, la constante dieléctrica, la densidad, etc.
- 2) Los basados en una propiedad del soluto: Es decir, responden a alguna de las propiedades del soluto, como la absorbancia UV, fluorescencia, intensidad de difusión, que no son propias de la fase móvil.

Detector LC	Disponible comercialmente	LOD de masa (detectores comerciales) ^a	LOD de masa (situación actual) ^b
Absorbancia	Sí ^c	100 pg-1 ng	1 pg
Fluorescencia	Sí ^c	1-10 pg	10 fg
Electroquímico	Sí ^c	10 pg-1 ng	100 fg
Índice de refracción	Si	100 ng-1 μ g	10 ng
Conductividad	Si	500 pg-1 ng	500 pg
Espectrometría de masas	Sí ^d	100 pg-1 ng	1 pg
FT-IR	Sí ^d	1 μ g	100 ng
Dispersión de luz ^e	Si	10 μ g	500 ng
Actividad óptica	No	—	1 ng
Selectivo de elemento	No	—	10 ng
Fotoionización	No	—	1 pg-1 ng

^a El LOD de masa se calcula para una masa inyectada que proporciona una señal igual a cinco veces el ruido σ , empleando un compuesto de masa molecular 200 g/mol e inyectando 10 μ L en LC convencional o 1 μ L en LC con columnas microcapilares.

^b La misma definición que en *a*, pero el volumen inyectado por lo general es menor.

^c Disponible comercialmente sólo para LC con columnas microcapilares.

^d Disponible comercialmente, todavía muy caro.

^e Incluyendo la dispersión de luz de bajo ángulo y la nefelometría.

(Tomado con autorización de E. S. Yeung y R. E. Synovec, *Anal. Chem.*, 1986, 58, 1238.)

Figura 47. Detectores más comúnmente usados en CLAR.

A continuación se hace una breve descripción de algunos de ellos:

Detectores de Absorbancia: Miden la absorbancia de los eluyentes de una columna cromatográfica. Muchos detectores de absorbancia son dispositivos de doble haz, uno de los haces pasa por la cubeta de flujo y el otro a través de un filtro que reduce su intensidad. Para comparar las intensidades de los dos haces se usan detectores fotoeléctricos contrastados. En cualquier caso, el cromatograma consiste en una representación en función del tiempo del logaritmo del cociente de las dos señales transducidas. También se utilizan instrumentos de un solo haz, en cuyo caso, las medidas de intensidad del disolvente se almacenan en la memoria de un ordenador y al final se recuperan para el cálculo de la absorbancia.

Detectores de Fluorescencia: La fluorescencia es detecta por medio de un detector fotoeléctrico colocado perpendicularmente respecto al haz de excitación. Los detectores más sencillos utilizan una fuente de excitación de mercurio, y uno o más filtros para aislar la radiación fluorescente.

Detectores de Índice de refracción: Tienen la ventaja de que responden a casi todos los solutos. Es decir, son detectores universales análogos a los detectores de llama en cromatografía de gases. Además de ser confiables, no dependen del caudal, son muy sensibles a los cambios de temperatura, y se matienen a una temperatura constante. Por otra parte, no son tan sensibles como la mayoría de los demás detectores, y por lo general no se pueden utilizar en la elución con gradiente.

Detector de dispersión de luz: El eluyente de la columna pasa a un nebulizador donde se convierte en una fina niebla gracias a un flujo de nitrógeno o aire. Estas finas gotitas pasan por un tubo de conducción a una determinada temperatura de forma que se evapora la fase móvil y se originan partículas de analito. Estas partículas pasan a través de

un láser y por un fotodiodo de silicio se detecta la radiación dispersada perpendicularmente al flujo. Su principal ventaja es que resulta ser más sensible que el detector de índice de refracción.

Detectores Electroquímicos: Actualmente hay varios tipos de detectores electroquímicos, que se basan en cuatro métodos: amperometría, voltamperometría, coulombimetría y conductimetría.

Analizador de espectrometría de masas: Consiste en el acoplamiento de la cromatografía de líquidos con la espectrometría de masas. De forma general se pueden obtener tanto cromatogramas a tiempo real como reconstruidos por ordenador hasta los espectros de los picos eluidos¹².

MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS EN CLAR:

Hay cinco métodos cromatográficos:

- ✓ Cromatografía de reparto:
- ✓ Cromatografía en fase normal.
- ✓ Cromatografía en fase reversa.
- ✓ Cromatografía iónica.
- ✓ Cromatografía de exclusión.
- ✓ Cromatografía de adsorción.

La cromatografía de reparto es hoy en día el método más utilizado. La cromatografía de reparto se divide en fase normal, y fase reversa, cuyas principales diferencias radican en las distintas polaridades de sus fases estacionarias y móviles.

En la cromatografía de fase reversa su fase estacionaria es apolar, y la fase móvil polar. Las fases estacionarias han sido obtenidas haciendo reaccionar químicamente los centros silanoles activos de la sílice con un trialkilclorosilano. La retención se produce en esta especie de capa líquida depositada químicamente como consecuencia de la distinta solubilidad relativa entre la fase estacionaria (apolar) y la fase móvil (polar)(Figura 48).

Los compuestos más retenidos son los más apolares. La retención y *selectividad* se controlan fundamentalmente con la composición de la fase móvil. Para obtener una fase móvil de fuerza de elución óptima, se ensayan mezclas de metanol, acetonitrilo o tetrahidrofurano en agua.

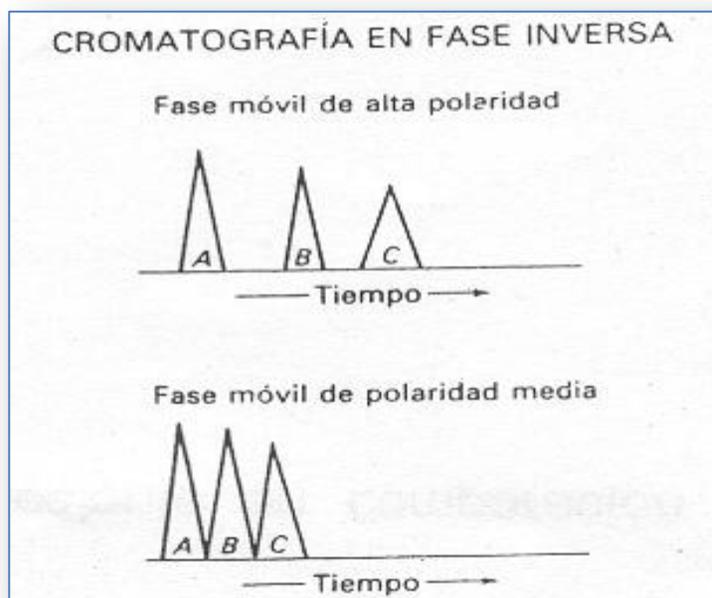


Figura 48. Las polaridades de los solutos en fase reversa son $A > B > C$.

Actualmente, el 75% de los análisis con CLAR se realizan en fase reversa. Permite un análisis directo de muestras acuosas y de compuestos solubles en agua o en disolventes relativamente polares (metanol). Si se compara con la de adsorción, su comportamiento cromatográfico es excelente.

La cromatografía iónica se usa para separar y determinar especies iónicas. La fase móvil es un líquido acuoso y salino que contiene un disolvente orgánico como metanol o acetonitrilo y un compuesto iónico que aporta un *contra-ion* de carga opuesta al analito. La elución de los pares iónicos se consigue mediante una disolución acuosa de metanol u otro disolvente orgánico miscible en agua. La fase estacionaria es una resina de intercambio iónico. Se trata de un material polimérico (Ej: poliestireno), que contiene muchos grupos funcionales por molécula y prácticamente insoluble en agua.

Hay dos tipos de cromatografía iónica, que se clasifican según el método empleado, para evitar que la alta conductividad de la fase móvil interfiera en la medida de conductividad del analito.

Una con detector conductimétrico y supresión química: Se coloca una columna supresora del eluyente inmediatamente después de la columna analítica (de baja capacidad). Esta columna supresora es un intercambiador iónico de alta capacidad y de signo opuesto a la columna analítica, que convierte los iones del eluyente en especies moleculares poco ionizadas y no retiene los iones del analito. La columna supresora se debe regenerar periódicamente. Veamos las reacciones entre el eluyente y el supresor: La primera reacción de la Figura 49 corresponde a la columna analítica cuando es catiónica¹².

La ecuación 2 de la Figura 49 corresponde a la columna analítica cuando es aniónica:

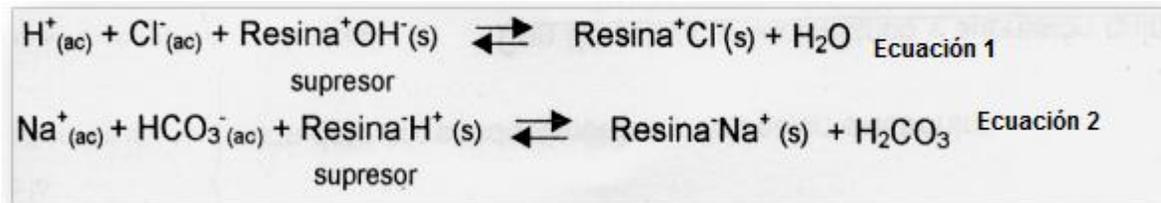


Figura 49. Esquemas de reacciones en cromatografía con detector conductimétrico y supresión química.

Y otra con detector conductimétrico y supresión electrónica: Se utilizan fases móviles de conductividades muy bajas y diluidas. Su conductividad se corrige de forma electrónica. Comparada con la supresión química, requiere un equipo más sencillo y menos sensible.

También conocida como cromatografía en geles permeables o de filtración en geles. Es una técnica que se aplica particularmente a especies de alto peso molecular. La fase estacionaria está compuesta de partículas de sílice o polímeros en forma de gel, que contienen una red de poros uniformes. La retención está basada en el tamaño de las moléculas. Si las moléculas son más grandes que los poros, no pueden penetrar en ellos (sólo pasan las partículas), y son las primeras que se eluyen. Si las moléculas son más pequeñas que los poros, penetran en ellos recorriendo caminos mucho más largos, y serán las últimas en eluir. Si las moléculas tienen un tamaño intermedio, podrán penetrar en los poros más grandes (camino recorrido intermedio). Por tanto, el tiempo de retención medio en los poros, depende del tamaño afectivo de las moléculas de los analitos.

La retención no se controla regularmente con la fase móvil, se controla eligiendo la fase estacionaria, cuya elección vendrá determinada por:

- ✓ Si la separación se realiza en fase acuosa (filtración en gel), o en fase orgánica.
- ✓ El rango de pesos moleculares (tamaños) que contiene la muestra que queremos analizar.

Cabe observar, que este tipo de separación difiere de los demás que han sido considerados, en que no implica una interacción química o física entre los analitos y la fase estacionaria. De hecho, se procura evitar este tipo de interacciones, dado que originan una mala separación³⁴.

Métodos de identificación y caracterización

Para la identificación y caracterización de los compuestos se utilizan fundamentalmente la espectrometría de masas, la espectroscopia infrarroja, ultravioleta, resonancia magnética nuclear (^1H y ^{13}C) y cristalografía, que en conjunto dan información de las características estructurales de un compuesto³⁴.

Espectrometría de masas (EM)

La Espectrometría de Masas es una poderosa técnica microanalítica usada para identificar compuestos y para elucidar la estructura y propiedades químicas de moléculas. La detección de compuestos puede ser llevada a cabo con

cantidades realmente pequeñas de muestra y obtener información característica como el peso y la estructura del analito. En la técnica clásica de impacto electrónico (electron ionization EI), se bombardea a la molécula con electrones y algunas de las moléculas ionizadas del analito “explotan” en una variedad de fragmentos ionizados, el patrón de fragmentación resultante, así, como los iones residuales constituyen el espectro de masas. En principio, el espectro de masas de cada compuesto es único y puede ser usado como una “huella química” para caracterizar el analito.

La espectrometría de masas atómicas es una herramienta muy versátil y útil para identificar los elementos presentes en una muestra y determinar las concentraciones de cada una de las materias que la componen. Esta técnica nos permite determinar prácticamente todos los elementos del sistema periódico y ofrece numerosas ventajas frente a las técnicas espectrofotométricas ya que:

- Los límites de detección que son más sensibles.
- Espectros notablemente más sencillos, generalmente únicos y con frecuencia fácilmente interpretables.
- Capacidad para medir relaciones isotópicas atómicas.

En cambio, también tienen una serie de desventajas que no podemos obviar como:

- El costo del instrumento es de dos a tres veces el de los instrumentos ópticos atómicos.
- Contiene unas determinadas interferencias.

La espectrometría de masas es capaz de proporcionar información acerca de:

- La composición elemental de las muestras: de esta se encarga la espectrometría de masas atómica.
- De la composición de las moléculas inorgánicas, orgánicas y biológicas.

- De la composición cualitativa y cuantitativa de moléculas.
- De las relaciones isotópicas de átomos en las muestras.

Hoy en día, esta técnica continúa teniendo los mismos fundamentos que en su origen, aunque el espectrómetro de hoy en día poco tenga que ver con su predecesor. La espectrometría de masas se fundamenta en la separación de partículas moleculares o atómicas por su diferente masa¹².

El proceso de la espectrometría de masas comprende básicamente cuatro etapas:

- Ionización de la muestra.
- Aceleración de los iones por un campo eléctrico.
- Dispersión de los iones según su masa/carga.
- Detección de los iones y producción de la correspondiente señal eléctrica.

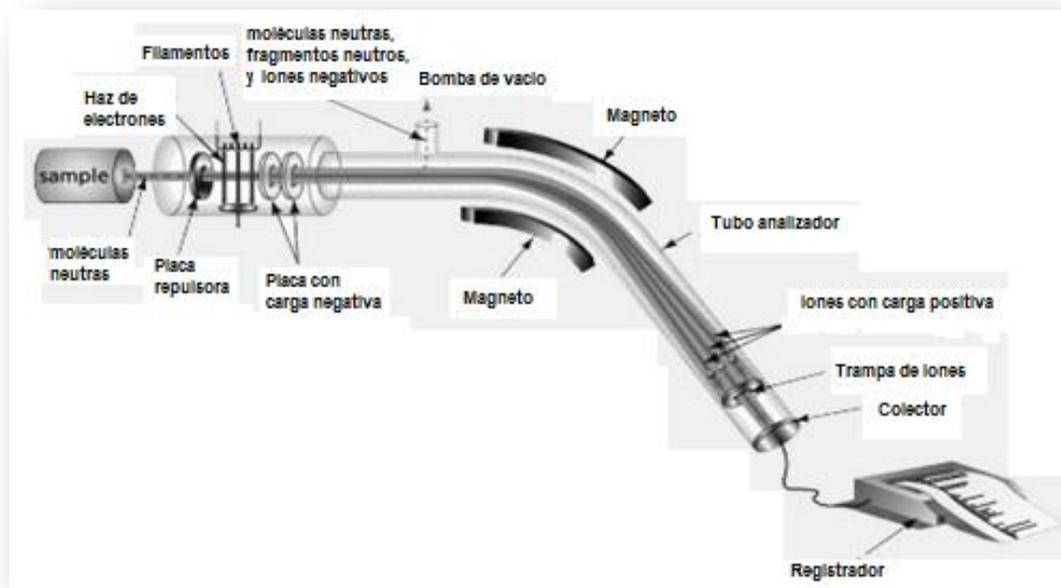


Figura 50. Esquemización del paso de una muestra por los principales componentes de un instrumento de espectroscopia de masas.

A. Ionización de la muestra .

La ionización de la muestra se consigue por bombardeo mediante electrones (e⁻).

B. Aceleración de los iones por un campo eléctrico.

Convertimos una fracción significativa de los átomos formados en la etapa 1 en un flujo de iones, generalmente positivos y de carga única. La velocidad que adquieren viene regida por la fórmula:

$$V = [2eV/m]^{1/2}$$

Donde V es el potencial aplicado, “e” la carga del electrón y “m” la masa. Cuando las partículas aceleradas se someten a la acción de un campo magnético (H) describen una trayectoria circular de radio (r) alrededor de este campo, desarrollando una fuerza centrífuga mv^2/r , la cual es igual a la fuerza de atracción del campo.

De esto deducimos que el radio es igual a:

$$r = (2Vm/H^2e)^{1/2}$$

C. Dispersión de los iones según su relación masa/carga .

Basándonos en la ecuación anterior podemos calcular la relación m/e que es:

$$m/e = H^2r^2/2V$$

Dado que la mayoría de los iones formados en la segunda etapa tienen una sola carga y que el resto de parámetros se mantienen constantes, la relación m/e suele ser la masa del ión. La utilidad analítica de un espectrómetro

de masas depende de la resolución del instrumento, o capacidad del mismo para separar dos partículas de diferente masa.

D. Detección de los iones y producción de la correspondiente señal eléctrica.

El ordenador al que está conectado el analizador recoge las distintas señales y las reproduce en forma de espectrograma, formato de fácil interpretación.

Básicamente un espectrómetro de masas consta esencialmente de las siguientes partes:

- Sistema de entrada de muestras.
- Cámara de ionización.
- Acelerador.
- Analizadores.
- Detector.

Sistema de entrada de muestras.

En el sistema de entrada de muestras, un micromol o menos de la muestra se convierte al estado gaseoso por calentamiento a unos 400°C y se introduce lentamente en la cámara de ionización. La finalidad del sistema de entrada es permitir la introducción de una muestra representativa en la fuente de iones con la mínima pérdida de vacío. En los espectrómetros de masas más modernos encontramos diferentes tipos de sistemas de entrada:

- **Sistemas indirectos de entrada:** es el sistema más clásico y el más simple, en el cual la muestra se volatiliza externamente y se introduce en la región de ionización que esta a baja presión. El sistema de entrada es normalmente de vidrio para evitar posibles pérdidas por adsorción.

- **Entrada por sonda indirecta:** los líquidos y los sólidos no volátiles se pueden introducir en la región de ionización mediante un soporte para muestra o sonda, el cual se inserta a través de un cierre de vacío. El sistema de cierre se utiliza para controlar la cantidad de aire que entra después de la inserción de la sonda en la región de ionización. Las sondas también se usan cuando la cantidad de muestra es limitada ya que se pierde mucha menos cantidad.

- **Sistemas de entrada cromatográficos y de electroforesis capilar:** es un tipo de sistema de entrada especial, está indicado su uso cuando al espectrómetro de masa va acoplado un sistema de cromatografía de gases o de líquidos de alta eficacia o a columnas de electroforesis capilar que permiten la separación y determinación de los componentes de mezclas complejas.

- **Cámara de ionización**

Las fuentes de iones de los espectrómetros de masas, todas tienen unas características comunes, pese a la variabilidad de tipos existente y es que todas transforman los componentes de una muestra en iones. En muchos casos el sistema de entrada y la fuente de iones están combinadas en un único componente. En todos los casos, se obtiene un

haz de iones positivos o negativos (normalmente positivos) que posteriormente se aceleran hacia el interior del analizador de masas o sistema separador a través del acelerador.

La formación de iones del analito es el punto de arranque de un análisis por espectrometría de masas. El aspecto de los espectros de masas para distintas especies moleculares, depende en gran medida del método utilizado para la formación de los iones. Estos métodos los podemos dividir en dos categorías:

- Fuentes de fase gaseosa: en estas primero se volatiliza la muestra y luego se ioniza.

Están generalmente restringidas a compuestos térmicamente estables que tengan puntos de ebullición menores de unos 500°C. En la mayoría de los casos, estos requerimientos limitan la utilización de las fuentes de fase gaseosa a compuestos con pesos moleculares menores de unos 103 Daltons.

Son aplicables a muestras no volátiles y térmicamente inestables. Normalmente los espectrómetros de masas están equipados con accesorios que permiten intercambiar ambos tipos de fuentes. Son aplicables a compuestos que tienen pesos moleculares superiores de 1000 Daltons.

- Fuentes de desorción: en estas la muestra en estado sólido o líquido, se transforman directamente en iones gaseosos.

Las fuentes de iones se pueden clasificar también en fuentes duras y fuentes blandas.

- Fuentes duras: comunican suficiente energía a las moléculas para que estén en un estado de energía altamente excitado. La relajación posterior, implica la rotura de las uniones produciendo iones fragmentados. Su espectro da lugar a muchos picos y nos da información acerca de la naturaleza de los grupos funcionales e información estructural de los analitos.
- Fuentes blandas: dan lugar a poca fragmentación y el resultado es un espectro con muy pocos picos dándonos información útil ya que nos permite la determinación exacta del peso molecular de la molécula o moléculas

TIPOS DE CAMARAS DE IONIZACIÓN.

FUENTES DE FASE GASEOSA

- **Impacto de electrones (EI).**

Se somete a la muestra a una temperatura suficientemente elevada (normalmente mediante un filamento caliente de wolframio o de renio) como para producir un vapor molecular, el cual posteriormente se ioniza bombardeando las moléculas originadas con un haz de electrones de elevada energía. Pese a sus desventajas, esta técnica es la que se ha usado para determinar la mayoría de los espectros que componen las colecciones de espectros.

- **Fuentes de ionización química.**

En la ionización química los átomos gaseosos de la muestra (tanto de un sistema de entrada indirecto como de una sonda caliente) se ionizan al colisionar con los iones producidos al bombardear con electrones un exceso de gas reactivo (normalmente metano). Normalmente se utilizan iones negativos, aunque la ionización química de iones negativos se utiliza ocasionalmente en aquellos analitos que contienen átomos muy electronegativos.

- **Fuentes de ionización por campo.**

En las fuentes de ionización por campo, los iones se forman bajo la influencia de un campo eléctrico elevado (108 V/cm). Estos campos se producen al aplicar elevados potenciales (10 a 20 kV) a emisores especialmente contruidos. Que están formados por numerosas puntas finas cuyos diámetros son menores a 1 μm . A menudo estos emisores adquieren la forma de un fino hilo de wolframio en el cual se han formado dendritas o filamentos microscópicos de carbono por pirólisis de benzonitrilo en un campo eléctrico elevado. El resultado de este tratamiento es la aparición de centenares de microagujas de carbón que emergen desde la superficie del hilo. En este caso el analito adquiere poca energía vibracional y rotacional por lo que tiene poca fragmentación.

- **FUENTES DE DESORCIÓN .**

En las dos últimas décadas se han desarrollado numerosos métodos de ionización por desorción para tratar muestras no volátiles o termodinámicamente inestables. Estas técnicas prescinden de la volatilización y de la posterior

ionización y en su lugar se suministra energía a la muestra sólida o líquida de diversas maneras, de modo que se provoca la formación directa de iones gaseosos. Como consecuencia se obtienen espectros muy simplificados.

Fuentes de desorción por campo (FD).

Esta fuente de ionización usa un emisor con múltiples puntas, similar al usado en las fuentes de ionización por campo. En este caso el electrodo se coloca sobre una sonda que puede retirarse y recubrirse con una disolución de la muestra, después de reinsertarla la ionización se produce tras proporcionar un potencial elevado a este electrodo. En ocasiones es necesario calentarlo haciéndole pasar una corriente pero puede ocurrir una degradación térmica antes de completarse la degradación.

Desorción/ionización por láser asistida por una matriz.

Esta técnica de reciente descubrimiento nos permite calcular pesos moleculares exactos de extractos de biopolímeros polares en un intervalo de masas moleculares de varios cientos de miles de Daltons.

En esta técnica se mezcla una disolución acuoso/alcohólica de la muestra con un exceso de una sustancia matriz que absorbe la radiación. La disolución resultante se evapora en la superficie de una sonda metálica que se utiliza para la introducción de la muestra. La mezcla sólida se expone a la acción de un haz de láser pulsante, provocando la sublimación del analito a iones que son introducidos en un espectrómetro de tiempo de vuelo para el análisis de masas.

Ionización por electronebulización.

Esta técnica se ha convertido en una de las más importantes para el análisis de biomoléculas de pesos superiores a 100 000 Daltons.

Se realiza en condiciones atmosféricas de presión y temperatura. La disolución de la muestra se bombardea a través de una aguja capilar de acero inoxidable a un flujo de algunos microlitros por minuto. Las agujas se mantienen a un potencial de varios kV con respecto al electrodo cilíndrico que rodea a dicha aguja. La niebla de finas gotitas cargadas resultantes pasa a través de un capilar de desolvatación donde se produce la evaporación del disolvente y de las moléculas del analito y donde estas adquieren la carga. Debido a que las gotitas se vuelven más pequeñas por la evaporación del disolvente, su densidad aumenta produciéndose la desorción de los iones en la atmósfera gaseosa.

Fuentes de bombardeo con átomos rápidos (FAB).

Con este tipo de fuentes, las muestras en un estado condensado, a menudo en una matriz de una disolución de glicerol, se ionizan por bombardeo con átomos de xenón o argón de elevada energía. Tanto los iones positivos como negativos del analito son expulsados de la superficie de la muestra por un proceso de desorción. El haz de átomos rápido se obtiene pasar iones acelerados de argón o xenón de una fuente o cañón de iones a través de una cámara que contiene átomos de argón o xenón a una presión de unos 10^{-5} torr. Setos experimentan una reacción de intercambio de electrones en resonancia con los átomos obteniéndose un haz de átomos de alta energía.

Desorción por plasma (PD).

El deterioro del ^{252}Cf produce dos fragmentos de fisión que viajan en direcciones opuestas. Un fragmento golpea la muestra anulando entre 1-10 iones analíticos. El otro fragmento golpea un detector y desencadena la puesta en marcha de la adquisición de datos. Este método es especialmente interesante para moléculas largas de origen biológico.

Espectrometría de masas de iones secundarios (EMIS).

Un haz de luz ionizado primitivo como $^3\text{He}^+$, $^{16}\text{O}^+$, o $^{40}\text{Ar}^+$ es acelerado y enfocado hacia la superficie de la muestra y se dispersa entrando dentro de la fase gas. Aproximadamente el 1% del material dispersado entra en forma ionizada, el cual ya puede ser analizado. SIMS tiene la ventaja que puede ser continuamente chisporroteado desde la superficie y determinar las concentraciones analíticas en función de la distancia desde la superficie original (perfil de profundidad).

Ionización por termonebulización (TS).

La ionización por termonebulización se usa para elementos reflectantes. Una muestra es depositada encima de una cinta metálica, que puede ser de Pt o Re y una corriente eléctrica calienta el metal a altas temperaturas. La cinta es revestida de grafito que reduce la desfragmentación.

- **Sistema acelerador.**

En el sistema acelerador las partículas ionizadas producidas por el impacto de los electrones son obligados a atravesar una primera ranura aceleradora por una pequeña diferencia de potencial. Entre esta primera y una segunda ranura existe una diferencia de potencial muy elevada que imprime a las partículas su velocidad final. Una tercera ranura actúa como colimador del haz de partículas.

- **Analizadores de masa.**

Para la separación de iones con diferente relación m/e se dispone de varios dispositivos. Lo ideal es que el analizador fuera capaz de distinguir entre diferencias muy pequeñas de masa. Además, los analizadores deberían de permitir el paso del número suficiente para producir corrientes iónicas fáciles de medir. Al igual que sucede con los monocromadores ópticos, a los que los analizadores son análogos, estas dos propiedades no son compatibles y se debe de llegar a un equilibrio que está regido por la resolución del espectrómetro de masas.

Existen diferentes tipos de analizadores de masas:

- **Analizadores de sector magnético:** los analizadores de sector magnético utilizan un imán permanente o un electroimán para hacer que el haz procedente de la fuente de iones se desplace con una trayectoria circular de 180, 90 o 60°. Estos analizadores también son llamados de enfoque simple (Figura 51).

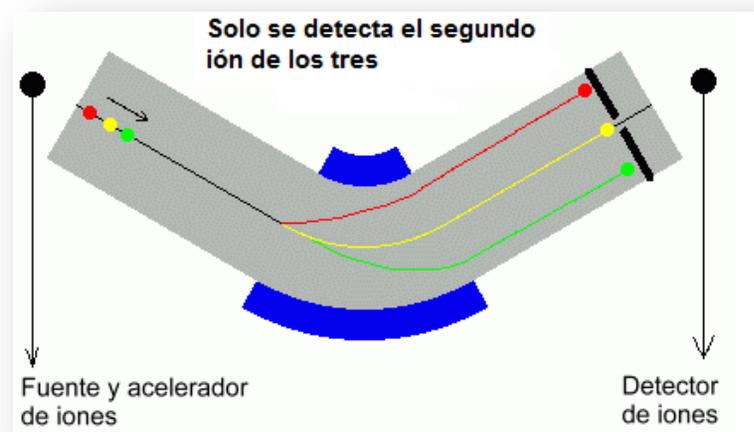


Figura 51. Diagrama esquemático de un analizador de masas de sector magnético equivalente a los utilizados en espectrometría de masas.

Espectrómetros de doble enfoque: este término se usa en los espectrómetros en los cuales las aberraciones direccionales y las aberraciones de energía de una población de iones se minimizan simultáneamente. El doble enfoque se consigue utilizando combinaciones de campos magnéticos y electrostáticos cuidadosamente seleccionados.

- **Espectrómetro de masa cuadrupolar:** son normalmente menos caros y más robustos que los de sector magnético, además también ofrecen la ventaja de emplear tiempos de barrido pequeños (<100 ms), lo cual es particularmente útil para realizar barridos de picos cromatográficos en tiempo real. Son, con diferencia los más utilizados hoy en día.

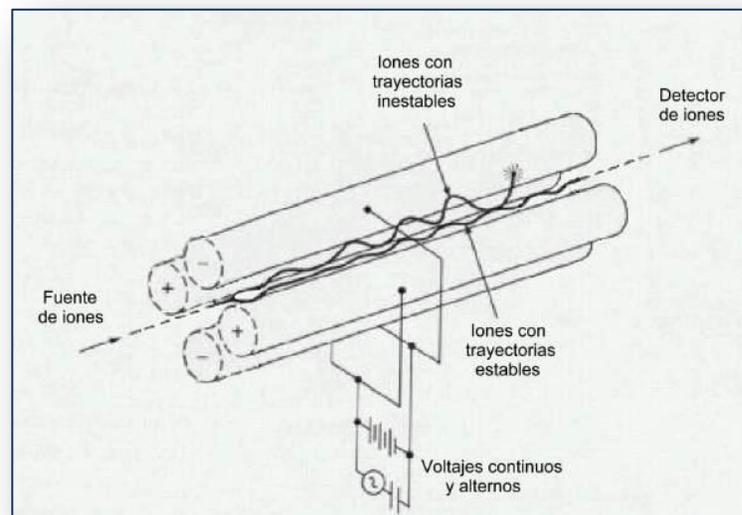


Figura 52. Diagrama de un espectrómetro de masa cuadrupolar, que es uno de los tipos de analizadores de masa más utilizados en espectrometría de masas dado su bajo precio y robustez.

- **Analizadores de masas de tiempo de vuelo (TOF):** en estos aparatos se producen los iones positivos periódicamente por bombardeo de la muestra con impulsos de electrones, de iones secundarios o de fotones generados por láser. Los iones producidos de esta forma son acelerados en un tubo analizador libre de campo mediante un campo eléctrico pulsante de 10^3 a 10^4 V. La separación de los iones en función de la masa se produce durante su recorrido hacia el detector, situado al final del tubo. Estos aparatos presentan ventajas como la robustez, simplicidad, fácil acceso a las fuentes de iones y el virtualmente ilimitado intervalo de masas, pero tienen no obstante una sensibilidad y una resolución limitadas.

- **Analizadores de trampa de iones:** es un dispositivo en el que los cationes o aniones gaseosos pueden formarse y quedar confinados durante largos periodos de tiempo por la acción de campos eléctricos y/o magnéticos. Los espectrómetros de trampa de iones son más robustos, compactos y más económicos que los anteriores.
- **Transformada de Fourier (FT):** Como sucede con los instrumentos de infrarrojo y de resonancia magnética nuclear, los espectrómetros de masas de transformada de Fourier proporcionan mejores relaciones señal/ruido, velocidades mayores y sensibilidad y resolución más elevadas.

La parte fundamental de un instrumento de transformada de Fourier es una trampa de iones en la cual los iones circulan en órbitas bien definidas durante largos periodos. Tales cavidades se construyen aprovechando el fenómeno de resonancia iónica ciclotrónica. La resolución en espectrometría de masas de transformada de Fourier está limitada por la precisión en la medida de la frecuencia más que por las rendijas o las medidas de campo.

Es posible alcanzar una resolución extremadamente elevada (superior a 10⁶) dado que las medidas de frecuencia se pueden realizar con elevada precisión³⁵.

Detectores.

Los iones procedentes del sistema acelerador llegan al detector el cual generalmente está constituido por un cátodo emisor que al recibir el impacto producido por las partículas cargadas emite electrones. Estos electrones son

acelerados hacia un dínodo el cual emite varios electrones más al recibir el impacto de cada electrón. Este proceso se repite varias veces hasta obtenerse una cascada de electrones que llega al colector lográndose una corriente fuertemente amplificada, por un procedimiento muy similar al que se utiliza en los tubos fotomultiplicadores. La corriente obtenida puede amplificarse de nuevo por procedimientos electrónicos y se lleva a un sistema registrador.

OBTENCIÓN Y ANÁLISIS DE UN ESPECTROGRAMA DE MASAS.

Como consecuencia del bombardeo electrónico en la cámara de ionización, las moléculas se rompen en una serie de fragmentos, siempre que una misma molécula se rompa en las mismas condiciones nos dará el mismo tipo y número de fragmentos y constituyen la fragmentación patrón.

Gracias a esto se pueden determinar que es la muestra por comparación y por otra parte, la intensidad relativa de los distintos picos, permite deducir la proporción en que cada componente se encuentra en la muestra.

El pico del espectrograma que aparece con valor más elevado de m/e corresponde a la molécula ionizada sin fragmentar y recibe el nombre de masa patrón. Esta masa patrón nos permite determinar con rapidez y precisión la masa molecular, siempre que se opere con una tensión de ionización no excesivamente elevada, la cual produciría la fragmentación total de la molécula.

El pico de mayor abundancia relativa del espectrograma de masa se llama **pico base**. Las intensidades de los demás picos se expresan en porcentajes de la intensidad del pico base³⁵ (Figura 53).

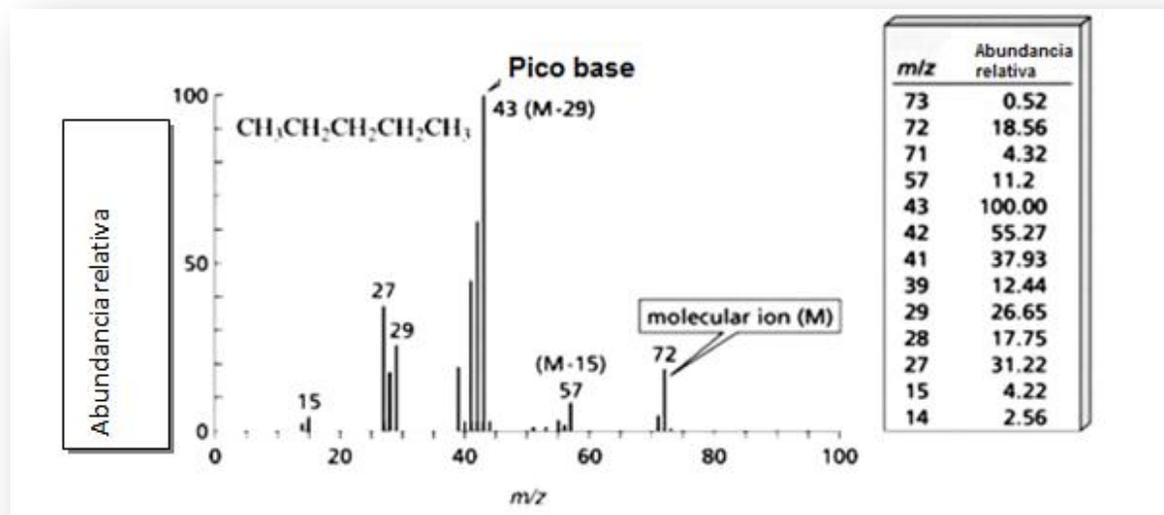


Figura 53. Aspecto clásico de un espectrograma de masas, en el que se señalan su pico base y su ión molecular más importante.

La Figura 53 nos indica la abundancia relativa y la relación m/z de cada uno de los elementos presentes en el analito.

APLICACIONES DE E.M.

Las aplicaciones son tan numerosas y abarcan tantos campos que resulta complicado citarlas todas, a continuación veremos las más características:

- Elucidación de la estructura de moléculas orgánicas y biológicas.
- Determinación del peso molecular de péptidos, proteínas y oligonucleicos.
- Identificación de los compuestos de cromatogramas en capa fina y papel.
- Determinación de secuencias de aminoácidos en muestras de polipéptidos y proteínas.
- Detección e identificación de especies separadas por cromatografía y electroforesis capilar.
- Identificación de drogas de abuso y sus metabolitos en sangre, orina y saliva.
- Control de gases en enfermos respiratorios durante los procesos quirúrgicos.
- Pruebas para confirmar la presencia de drogas en sangre de caballos de carreras y en atletas olímpicos.
- Datación de ejemplares en arqueología.
- Análisis de partículas en aerosoles.
- Determinación de residuos de pesticidas en alimentos.
- Control de compuestos orgánicos volátiles en el agua de suministro.

Vamos a ver ahora de un modo más extenso las principales aplicaciones de esta técnica.

- **Aplicaciones cualitativas.**
- **Determinación del peso molecular** de todas las sustancias que pueden volatilizarse por la posición del pico correspondiente a la masa patrón.
- **Determinación de la fórmula molecular.** Si el instrumento es de gran resolución bastará la determinación precisa de su masa molecular para poder atribuirle una fórmula empírica. Otras veces puede determinarse por la relación entre las alturas del pico correspondiente a la masa patrón y la de los picos de los fragmentos. Existe una tercera forma que sería con la regla del nitrógeno, según la cual todas las sustancias orgánicas con peso molecular par deben de contener un número par o ningún átomo de N y los de número impar deben de contener un número impar de Nitrógenos. Por el contrario los fragmentos moleculares por ruptura de enlace, tienen una masa impar si contienen cero o número par de átomos de N y masa par si el número de átomos de N es impar.
- **Identificación de compuestos por su fragmentación patrón:** la fragmentación de la mayor parte de las moléculas produce un gran número de picos que permiten la identificación de numerosos compuestos y el reconocimiento de ciertos grupos funcionales de ellos. Se han descrito una serie de reglas generales que rigen los procesos de fragmentación, los cuales son de gran utilidad para la determinación de los espectros.
- **Identificación de productos de reacción o de productos metabólicos:** se usa en cinética química y en farmacología pudiéndose llegar a identificar impurezas y metabolitos a concentraciones de pocas partes por millón.

- **Caracterización y análisis de polímeros:** el polímero se piroliza en condiciones controladas y los productos volátiles se hacen pasar a un espectrómetro para su análisis.
- **Análisis de sangre:** gracias a la rapidez del método, se puede emplear incluso como control durante un proceso quirúrgico. Así se puede determinar a gran velocidad las concentraciones hemáticas de monóxido y dióxido de carbono, oxígeno, nitrógeno, gases anestésicos (como el NO).
- **Estudiar la abundancia de isótopos:** Esta fue la finalidad con la que fue creada la técnica y en la actualidad se usa para análisis por dilución de isótopos, estudios con trazadores isotrópicos, estudiar la edad de las muestra por su proporción de isótopos con la ventaja frente a los radiactivos que se pueden medir los isótopos no radiactivos.
- **Aplicaciones cuantitativas.**

Para la determinación cuantitativa de los componentes de una mezcla es conveniente que cada uno de ellos presente por lo menos un pico que difiera claramente de los demás. La calibración se realiza por comparación de los picos con patrones adecuados. Las alturas de los picos son directamente proporcionales a las presiones parciales de los componentes volatilizados en la muestra³⁵.

Espectroscopía infrarroja (IR)

La espectroscopia infrarroja es una técnica general para identificar grupos funcionales presentes en una molécula. La muestra se puede analizar, ya sea en disolución con cloroformo o tetracloruro de carbono, en película con nujol o directo en los prismas en pastilla de KBr. Un espectro típico de infrarrojo es el del estireno como el que se muestra en la Figura 54^{36,37}.

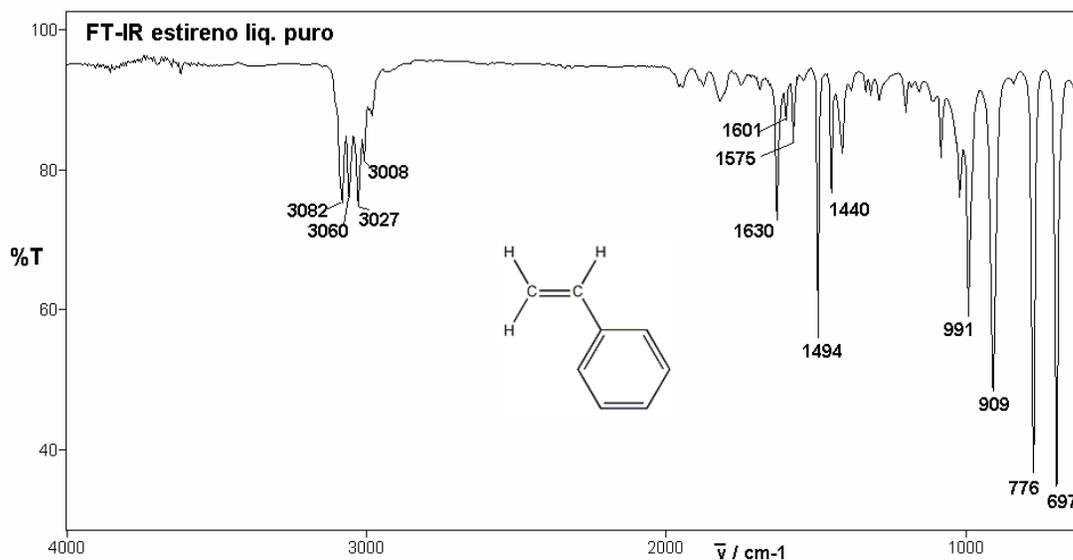


Figura 54. Espectro IR del estireno^{36 y 37}.

Tomando en cuenta que lo que se registra en un espectro de infrarrojo son los cambios producidos por la energía (vibracional, rotacional, trasnacional) y de las flexiones y deformaciones de los enlaces y ángulos de una molécula, se ha definido que la región arriba de 1200 cm^{-1} como aquella que muestra las vibraciones de la mayoría de enlaces individuales o grupos funcionales en la molécula que se examina, mientras que la región abajo de 1200 cm^{-1} muestra bandas debidas a las vibraciones de la molécula completa y por su complejidad, es conocida como la región de “huellas digitales”^{36 y 37}.

La Figura 55 muestra esquemáticamente los principales componentes de un espectrofotómetro infrarrojo, el cual está equipado con una fuente de emisión de radiación infrarroja, que normalmente es una barra de un material cerámico. La radiación emitida por esta fuente se divide en dos haces al atravesar una serie de espejos. De los dos haces uno de ellos pasa por una celda que contiene una disolución del compuesto orgánico (haz de la muestra) que se desea estudiar, mientras que el otro haz atraviesa una celda que sólo contiene el disolvente empleado (haz de referencia). Los dos haces se dirigen luego hacia un dispositivo que permite el pase alternativamente de un haz y luego del otro (interruptor rotatorio). El haz se dirige a la rejilla de difracción donde se separa en las longitudes de onda que lo componen (espectro de IR). Estas radiaciones, separadas por su valor de longitud de onda, pasan a través de una ranura y llegan al detector. El detector es una bobina de alambre cuya resistencia aumenta debido al calentamiento que produce la radiación incidente. Así pues, la resistencia del detector depende de la intensidad de la radiación. La acción del interruptor rotatorio permite alternar la llegada al detector del haz de la muestra con la llegada del haz de referencia, pudiéndose comparar estas señales mediante una serie de circuitos eléctricos. Como la absorción por el disolvente es la misma en ambas celdas el efecto de éste se puede restar y el registrador recibe sólo las señales debidas a la absorción de la muestra.

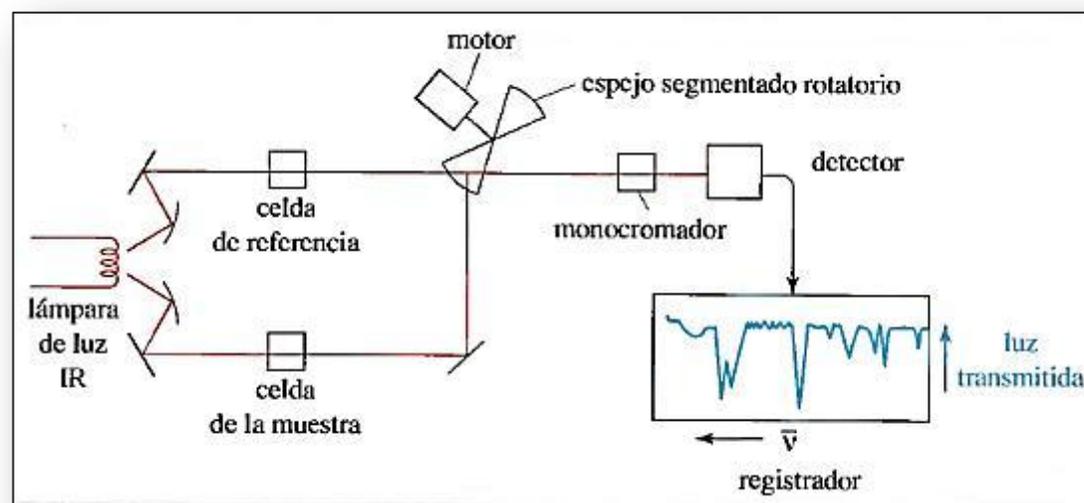


Figura 55 .Diagrama general de un espectrofotómetro IR.

La espectroscopía infrarroja se emplea fundamentalmente en química orgánica como método para la asignación funcional. La tabla 12 muestra una lista de las bandas de absorción características para los grupos funcionales más comunes³⁶.

Tabla 12. Absorciones de algunos grupos funcionales en IR.

Grupo funcional	Banda (cm ⁻¹)	intensidad
C-H	2960-2850	Media
C=C-H	3100-3020	Media
C=C	1680-1620	Media
C≡C-H	3350-3300	Fuerte
R-C≡C-R'	2260-2100	Media
Ar-H	3030-3000	Media
	1600, 1500	Fuerte
OR-H	3650-3400	Fuerte, ancha
-C-O-	1150-1050	Fuerte
C=O	1780-1640	Fuerte
R ₂ N-H	3500-3300	Media, ancha
-C-N-	1230-1030	Media
-C≡N	2260-2210	Media
RNO ₂	1540	Fuerte

Espectroscopía ultravioleta y visible (U.V.)

Este tipo de espectroscopía es de utilidad para la determinación de las estructuras de moléculas orgánicas y en el análisis cuantitativo. El fundamento de ésta técnica instrumental se basa en la teoría de las transiciones electrónicas las cuales le permiten a la molécula absorber energía a una longitud de onda determinada, como resultado de dichas transiciones electrónicas se obtiene el espectro electrónico de cada sustancia. En consecuencia, la intensidad de la absorción ó la posición de la absorción máxima de cada banda que aparece en el espectro electrónico, corresponde a la longitud de onda necesaria de la luz para las transiciones electrónicas mencionadas^{36 y 38}.

En la Figura 56, se muestra un espectro típico de ultravioleta, en este caso el de la ferredoxina. El espectro de absorción de una sustancia puede ser determinado en una solución muy diluida (0.4 mg/ml) en disolventes tales como etanol, agua, metanol ó hexano. Se puede dar un valor estimado a la absorción (máximo de absorción) por medio de las reglas de Woodward y modificadas por Fieser y Scott³⁹. Este tipo de espectroscopía sirve de apoyo en la elucidación estructural de compuestos aromáticos y sistemas conjugados de enlaces dobles.

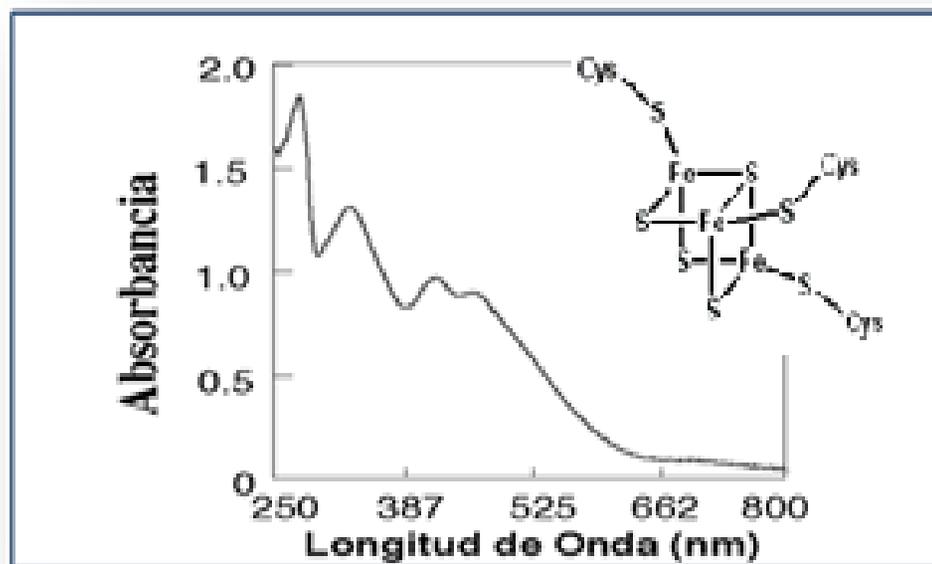


Figura 56. Espectro ultra-violeta de la ferredoxina³⁹.

Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN)

La RMN sólo puede identificar átomos con número atómico non; por ejemplo, ^1H , ^{13}C , ^{15}N , etc.

La resonancia magnética nuclear ha tenido un desarrollo significativo en los últimos años y cada vez da mayor información estructural con menor cantidad de muestra. Los espectrómetros de RMN de rutina son de 200 MHz, 300 MHz

y 500 MHz, dónde la concentración de la muestra para estos equipos debe ser aproximadamente 50 miligramos de sustancia en 0.50 mL, de disolvente.

La resonancia magnética nuclear (RMN) es una técnica que estudia los átomos en resonancia cuando se aplica un campo magnético, no desde el punto de vista físico, sino en términos de la estructura molecular, con la que el químico, apoyado en otras espectroscopías, puede lograr la inequívoca elucidación estructural de los compuestos bajo estudio.

Indiscutiblemente que el advenimiento de mejoras tecnológicas, principalmente en el área de la electrónica, permitió la creación de programas para la adquisición de espectros de resonancia magnética nuclear. Hoy en día es rutinaria la adquisición de espectros de ^{13}C , ^1H , así como de varios experimentos que correlacionan la interacción de diferentes núcleos analizando algunos parámetros como apantallamiento o protección magnética por los electrones, desplazamientos químicos, curva de integración, desacoplamiento espín-espín, constantes de acoplamiento, etc.

El espectrómetro de resonancia magnética nuclear.

A continuación, se muestra de forma esquemática en la Figura 57 los principales componentes de un equipo para medidas de resonancia magnética nuclear.

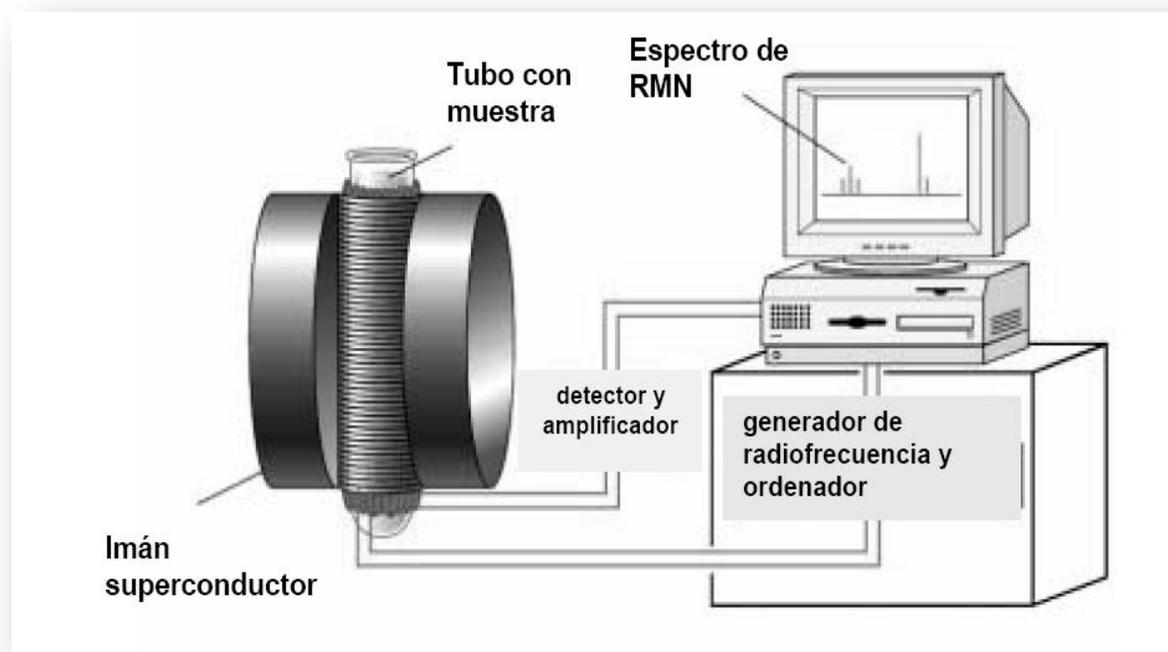


Figura 57. Esquema de un espectrómetro de RMN.

Como se observa, el espectrómetro de RMN consta de cuatro partes:

1. Un imán estable, con un controlador que produce un campo magnético preciso.
2. Un transmisor de radiofrecuencias, capaz de emitir frecuencias precisas.
3. Un detector para medir la absorción de energía de radiofrecuencia de la muestra.

4. Un ordenador y un registrador para realizar las gráficas que constituyen el espectro de RMN.

Para obtener un espectro de RMN, se coloca una pequeña cantidad del compuesto orgánico disuelto en medio mililitro de disolvente deuterado y Tetrametilsilano como referencia cero en un tubo de vidrio largo que se sitúa dentro del campo magnético del aparato. El tubo con la muestra se hace girar alrededor de su eje vertical⁴⁰.

En los aparatos modernos el campo magnético se mantiene constante mientras un breve pulso de radiación excita a todos los núcleos simultáneamente. Como el pulso corto de radiofrecuencia cubre un amplio rango de frecuencias los protones individualmente absorben la radiación de frecuencia necesaria para entrar en resonancia (cambiar de estado de espín). A medida que dichos núcleos vuelven a su posición inicial emiten una radiación de frecuencia igual a la diferencia de energía entre estados de espín. La intensidad de esta frecuencia disminuye con el tiempo a medida que todos los núcleos vuelven a su estado inicial.

Un ordenador recoge la intensidad respecto al tiempo y convierte dichos datos en intensidad respecto a frecuencia, esto es lo que se conoce con el nombre de transformada de Fourier (FT-RMN). Un espectro FT-RMN puede registrarse en 2 segundos utilizando menos de 5 mg de muestra⁴⁰.

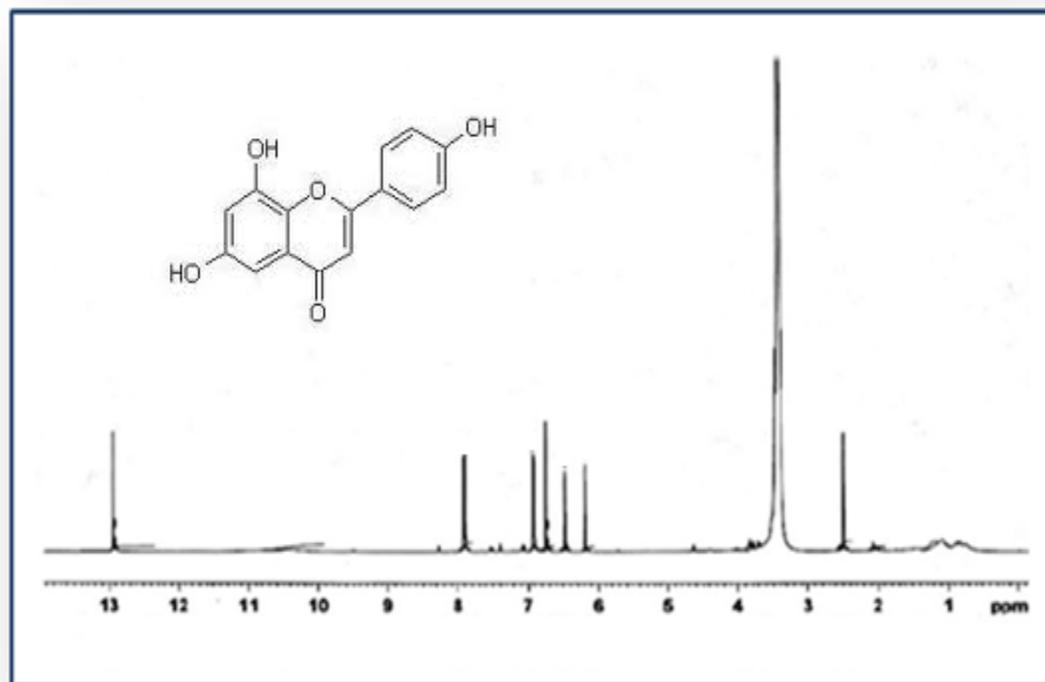


Figura 58. Espectro de RMN ¹H de la Apigenina⁴⁰.

Resonancia magnética nuclear de ^1H

Hasta ahora se ha descrito el concepto de resonancia de un núcleo aislado dentro de un campo magnético, pero en realidad los núcleos, como pueden ser los protones o los carbonos que forman las moléculas orgánicas, no se encuentran aislados sino que están rodeados de electrones que los protegen parcialmente del campo magnético externo al que se ven sometidos. Los electrones se mueven generando un pequeño campo magnético inducido que se opone al campo magnético externo.

En cualquier molécula la nube electrónica que existe alrededor de cada núcleo actúa como una corriente eléctrica en movimiento que, como respuesta al campo magnético externo, genera una pequeña corriente inducida que se opone a dicho campo. El resultado de este hecho es que el campo magnético que realmente llega al núcleo es más débil que el campo externo, por tanto, se dice que el núcleo está protegido o apantallado. Este **apantallamiento** es muy importante desde el punto de vista experimental ya que el campo magnético efectivo (H_{ef}) que siente un protón dentro de una molécula es siempre menor que el campo externo, y por lo tanto, para que el núcleo entre en resonancia dicho campo externo debe ser mayor.

Si todos los protones (^1H) de una molécula orgánica estuvieran apantallados de igual forma, todos entrarían en resonancia con la misma combinación de frecuencia y campo magnético. Sin embargo, los protones se hallan dentro de entornos electrónicos diferentes y, por tanto, se encuentran diferentemente protegidos o apantallados.

Por lo general, los efectos de protección, o apantallamiento, de las nubes electrónicas que rodean a cada protón son diferentes, lo que provoca diferentes frecuencias de emisión. El resultado es un espectro de diversas frecuencias donde cada conjunto de núcleos específicos da origen a una señal única de RMN. Así pues, un espectro de RMN es una

gráfica de la intensidad de señal en función de la frecuencia de la energía electromagnética que liberan los diversos núcleos de una muestra.

Las variaciones en las frecuencias de absorción de resonancia magnética nuclear, que tienen lugar debido al distinto apantallamiento de los núcleos, reciben el nombre de **desplazamientos químicos** (ppm).

El compuesto de referencia más común en resonancia magnética nuclear es el tetrametilsilano (TMS, $(\text{CH}_3)_4\text{Si}$). Como el silicio es menos electronegativo que el carbono, los grupos metilo del TMS son relativamente ricos en electrones, es decir, sus protones están fuertemente apantallados. Como consecuencia de este apantallamiento, estos protones absorben a una intensidad de campo mayor que el resto de protones enlazados al carbono o a otros elementos, de manera que casi todas las señales de resonancia magnética nuclear aparecen a campos más bajos (hacia la izquierda de la señal del TMS). Además todos los protones del TMS absorben con el mismo desplazamiento químico dando una única absorción intensa.

La mayor parte de los protones absorben a campos menores que el TMS, de modo que la escala aumenta hacia los campos menores. La mayoría de las señales de protones (^1H) varían entre 0 y 12 ppm⁴⁰.

Espectroscopia de resonancia magnética nuclear de ^{13}C .

La resonancia magnética nuclear de ^{13}C es complementaria a la de ^1H . Esta última técnica se utiliza para deducir la estructura del esqueleto carbonado observando los entornos magnéticos de los átomos de hidrógeno, mientras que la espectroscopia de RMN de ^{13}C determina el entorno magnético de los átomos de carbono.

Aproximadamente el 99% de los átomos de carbono en una muestra natural son del isótopo ^{12}C . Este isótopo posee un número par de protones y un número par de neutrones, por tanto, no tiene espín magnético y no puede dar lugar a señales de resonancia magnética nuclear. El isótopo de ^{13}C menos abundante tiene un número impar de neutrones, lo que le confiere un espín magnético de 1/2, igual al del protón.

La espectroscopia de resonancia magnética nuclear de ^{13}C es menos sensible que la de ^1H debido a que sólo el 1% de los átomos de carbono poseen espín y a que, además, la frecuencia de resonancia del ^{13}C , para un campo magnético dado, es la cuarta parte de la que se da en la RMN de ^1H . Los desplazamientos químicos del carbono son de 15 a 20 veces mayores que los del hidrógeno debido a que el carbono está directamente unido a los átomos que resultan ser bien apantallantes o desapantallantes. Por ejemplo, el protón de un aldehído absorbe a 9.4 ppm en el espectro de ^1H mientras que el carbono de carbonilo absorbe a 180 ppm en el espectro de ^{13}C .

Además, las señales en el espectro de ^{13}C son líneas verticales, es decir, no hay desdoblamientos de espín-espín. Esto se debe a que sólo el 1% de los átomos de carbono entran en resonancia, y por tanto, existe una probabilidad muy pequeña de que un núcleo de ^{13}C esté adyacente a otro núcleo de ^{13}C .

Así, en resumen, las estructuras químicas de los metabolitos que presentan el fenómeno de resonancia pueden ser identificados por medio de la RMN ^1H y ^{13}C .

Como previamente se menciono se han desarrollado los métodos bidimensionales de correlación homonuclear es decir atomos del mismo tipo (COSY, H-H) y heteronuclear (HETCOR, H-C y C-H)⁴⁰.

Con este tipo de métodos es posible asignar la vecindad de grupos o fragmentos de moléculas, como se describen brevemente a continuación:

Para interpretar los resultados del experimento COSY:

Se hace un trazo de líneas verticales u horizontales a partir de cada una de las señales de los protones localizados en el espectro, lo cual conduce a puntos de intersección que por medio de un giro de 90° para cada punto nos conducirá a la señal del protón con el cual esta interaccionando cada protón a distancia de 3 enlaces sigma, de esta manera es posible elucidar la estructura de cualquier compuesto mediante su espectro COSY⁴⁰(Figura 59).

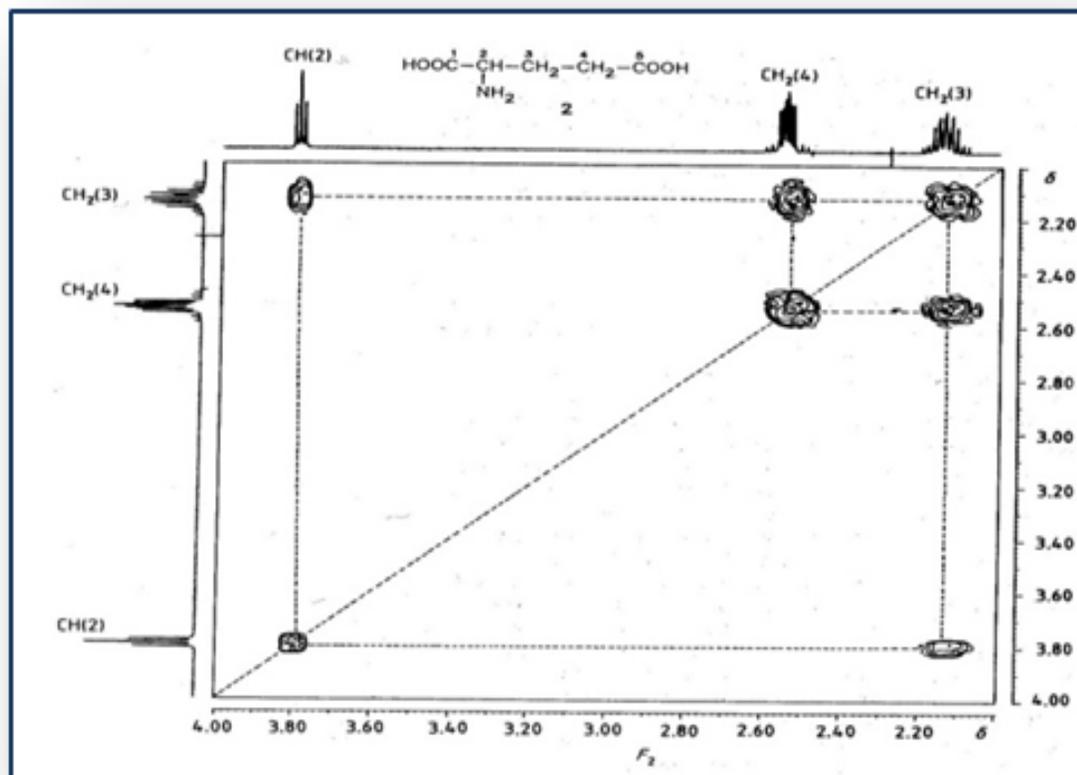


Figura 59. Gráfica de contorno de un espectro COSY del ácido glutámico⁴⁰.

Por otro lado, una vez que se han asignado las señales de RMN para el núcleo de hidrógeno, el desplazamiento químico (la posición) de los carbonos en el espectro de RMN ^{13}C , se puede ubicar por medio de su correlación heteronuclear (HETCOR)⁴⁰, bajo este procedimiento se determina la ubicación de cada carbono en la estructura así como la relación con cada hidrogeno relacionado con su espectro protónico ya sea HMBC y/o HSQC(Figura 60)⁴⁰.

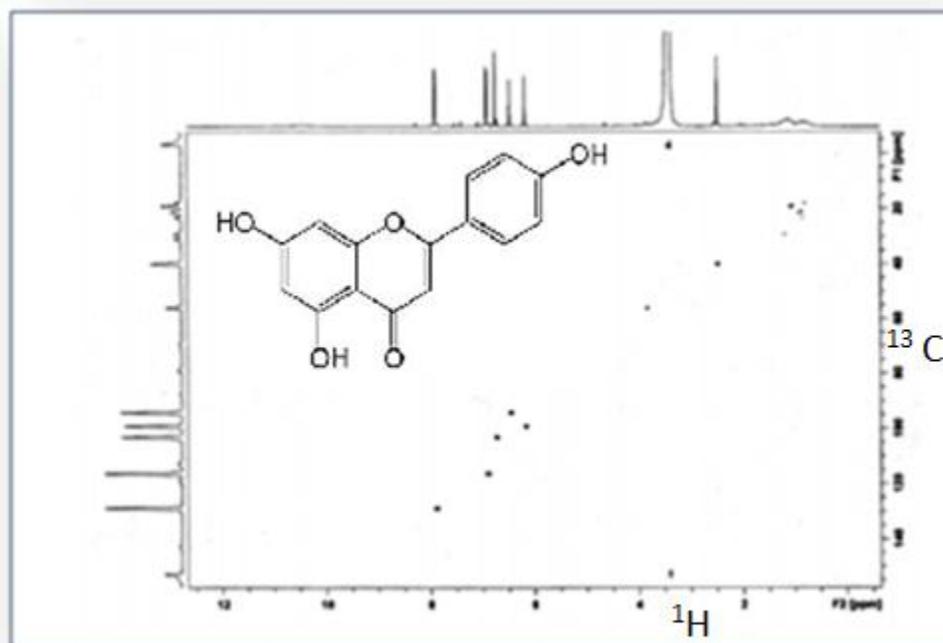


Figura 60. Espectro HSQC de la Apigenina (relación de señales en RMN entre ^{13}C y ^1H)⁴⁰.

Por otro lado se han desarrollado algunos métodos para distinguir a los grupos metilo, metileno y metino así como carbonos cuaternarios en resonancia de ^{13}C , tales como APT, INEPT, DEPT (Figura 61), entre otras. Análogamente, por utilización del método APT en el cual los metilos (CH_3 -) y metinos (CH) aparecen invertidos en el espectro.

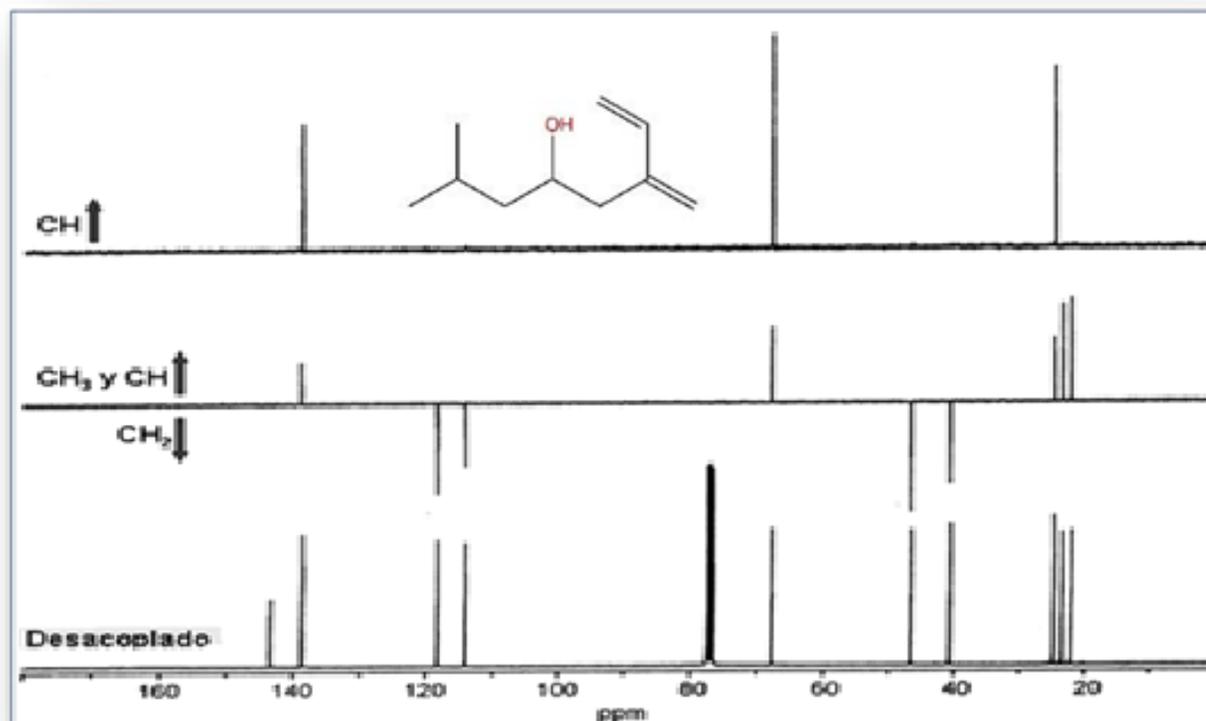


Figura 61. Espectro DEPT del Ipsenol

Difracción de los rayos –X

Otra técnica muy importante para la determinación estructural de compuestos es la difracción de rayos X, la cual se aplica a cristales y da no solo los detalles estereoquímicos, sino la conformación en la que cristaliza la sustancia, el empaquetamiento en el cristal, las distancias y ángulos intra e intermoleculares y los movimientos vibracionales del cristal⁴¹.

La cristalografía de rayos X estudia la estructura atómica de la materia, su objetivo principal es entender como las propiedades de la materia se encuentran bajo la influencia de arreglos atómicos espaciales específicos y de las interacciones de los átomos que la forman⁴².

Cuando en la molécula se encuentran centros quirales, que por métodos químicos y espectroscópicos no pueden ser determinados, la difracción de rayos X puede solucionarlo, como en el caso del ácido (11-s)-11,13-dihidrotesárico aislado de la cachanilla (*Pluchea Sericea*) donde la configuración del carbono C-11 fue asignada por rayos X⁴³. Para moléculas grandes y con varios anillos es posible establecer por rayos X su conformación, configuración y la disposición espacial de todos sus átomos como en la isoargentatina A⁴⁴(Figura 63).

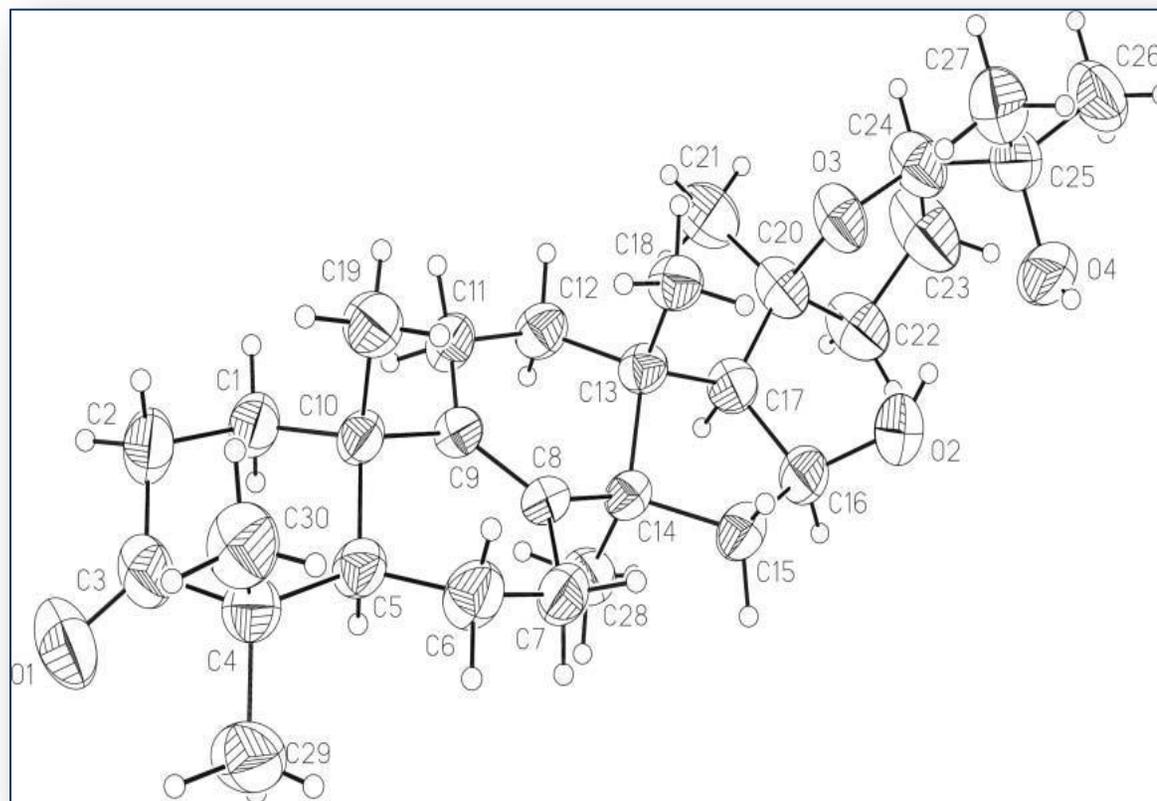


Figura 63. Estructura espacial y estereoquímica de isoargentatina A⁴⁴.