

18  
2 Gen



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE QUIMICA**

**ESTUDIO ESPECTROSCOPICO DE  
ESTEROIDES.**

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
**Q U I M I C O**  
P R E S E N T A :  
**ADOLFO GARCIA OSUNA**

México, D. F.

1985



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

I N D I C E

	página
- Introducción .....	1
- Parte Teórica .....	3
Espectroscopía U.V. ....	3
Espectroscopía I.R. ....	9
Espectroscopía R.M.N. ....	12
Espectrometría de Masas .....	18
Esteroides .....	23
- Parte Experimental .....	28
Espectroscopía U.V. ....	29
Espectroscopía I.R. ....	30
Espectrometría R.M.N. ....	30
Espectroscopía de Masas .....	30
- Resultados y Asignación de Señales .....	32
Espectroscopía U.V. ....	32
Espectroscopía I.R. ....	37
Espectroscopía R.M.N. ....	45
Espectrometría de Masas .....	57
- Conclusiones .....	74
- Apéndice I .....	76
Catálogo espectroscópico .....	76
- Apéndice II .....	163
Aplicación cuantitativa del catálogo espectroscópico .....	163
Espectroscopía U.V. ....	163
Espectroscopía I.R. ....	165
Espectroscopía R.M.N. ....	166
Espectrometría de Masas .....	168
Cromatografía de Gases .....	168
Conclusión del Apéndice II .....	169
- Anexo I .....	177
- Bibliografía .....	179

## INTRODUCCION

Los grandes avances logrados en el área de las ciencias químico-biológicas han permitido tanto la síntesis como la elucidación de las actividades biológicas de un número cada vez mayor de compuestos de importancia en la vida de los organismos superiores. Uno de estos casos lo constituye la familia de compuestos hormonales conocidos como esteroides.

Actualmente la función biológica así como la estructura de un gran número de estos esteroides es perfectamente conocida y no solo esto sino que al haber podido obtener sintéticamente muchos de estos, se les ha podido emplear como fármacos para el control del metabolismo humano. El ejemplo más conocido lo constituyen los anticonceptivos, los cuales cobran cada vez más importancia.

El conocimiento de la estructura química de los esteroides ha permitido diseñar metodologías analíticas para la determinación cuantitativa de éstos en fluidos biológicos, lo que permite el control de su utilización como fármacos en pacientes evitando provocar trastornos metabólicos graves. Sin embargo es conveniente mencionar el que las determinaciones espectroscópicas de estos compuestos fueron realizadas conforme se han aislado y sintetizado lo que significa que fueron realizadas hace muchos años (1950-1960) con instrumentación que actualmente resulta obsoleta y a la luz de teorías que actualmente no son del todo satisfactorias. Por otro lado la información espectroscópica para estos compuestos se encuentra dispersa en diferentes revistas científicas desde las muy generales hasta las demasiado especializadas, razón por la cual es difícil de obtener.

Por lo tanto el objetivo de la presente tesis es el de realizar un catálogo espectroscópico de esteroides ( se analizan 21 esteroides representativos de algunos subgrupos de esteroides) que incluye a las 4 técnicas espectroscópicas más relevantes para la elucidación estructural de compuestos orgánicos, estas son: - Ultravioleta, Infrarrojo, Resonancia Magnética Nuclear (protónica) y Espectrometría de Masas. Se pretende realizar también la interpretación de los espectros obtenidos con instrumental moderno, empleando las teorías mas actualizadas que soportan a estas metodologías.

La recopilación de información y la reinterpretación de los espectros para algunos esteroides nos deberá conducir a la determinación de parámetros que permitan la sistematización de los estudios espectroscópicos que se realicen para esta gran familia de compuestos químicos, cuya importancia es evidente. De esta

sistematización se podrá después lograr el diseño de metodologías analíticas rápidas y confiables que permitan su determinación tanto, flujidos biológicos a nivel de instituciones hospitalarias como para el control de calidad en la industria farmacéutica y como material de consulta y referencia para los investigadores en distintas áreas del conocimiento (biología, medicina y química).

La tesis cumple también con un objetivo fundamental que es el de poder ser empleada como material didáctico para los estudiantes y estudiosos de la espectroscopía de compuestos orgánicos.

## PARTE TEORICA

### Espectroscopia Ultravioleta (U.V).

Como se puede observar en la figura 1., la radiación ultravioleta en el espectro electromagnético comprende energías desde 2860 a 75.26 kcal/mol (10-380nm), ésta se divide en U.V. al vacío que se encuentra entre los 2860 a 143 kcal/mol (10-200nm) y la conocida como ultravioleta cercano o de cuarzo que se encuentra entre los 143 a 75.26 kcal/mol (200-380nm).

La energía de la radiación U.V. absorbida por la molécula produce cambios en la energía electrónica debida a las transiciones de los electrones de valencia en la molécula, transiciones en las que los electrones de valencia o de enlace son elevados a niveles de mayor energía, este comportamiento lo exhiben tanto sustancias orgánicas como inorgánicas.

La energía absorbida por la sustancia corresponde a la longitud de onda de la radiación U.V. cuya energía es igual a la requerida para la transición electrónica, es decir, la necesaria para pasar del estado basal al estado excitado. La energía absorbida depende de la diferencia de energía entre el estado basal y excitado, mientras menor sea esta diferencia mayor será la longitud de onda (debido a que la energía depende inversamente de la longitud de onda de la radiación). La absorción de energía a que dan lugar las sustancias puede determinarse cuantitativamente por medio de sistemas fotoeléctricos adecuados, y debido a ello se puede pensar que el espectro de absorción de una sustancia que se origina de una transición electrónica simple, debe consistir de una banda discreta, pero, la superposición de transiciones vibracionales (sobre las transiciones vibracionales) sobre las transiciones electrónicas conduce a espectros por una combinación compleja de series de bandas traslapadas dando por resultado una ancha banda de absorción continua. Esto es debido a que los equipos comerciales no logran discriminar en el registrador las bandas discretas que se traslapan.

Los electrones que contribuyen a las características de absorción de radiación U.V. de una molécula son las que participan directamente en la formación de enlaces entre átomos y los electrones exteriores no compartidos situados principalmente en heteroátomos.

Al formar un enlace covalente los electrones de unión se desplazan hacia dos centros atómicos de modo de reducir al mínimo las fuerzas coulombicas de repulsión que existen entre estos dos centros, los campos no localizados entre áto

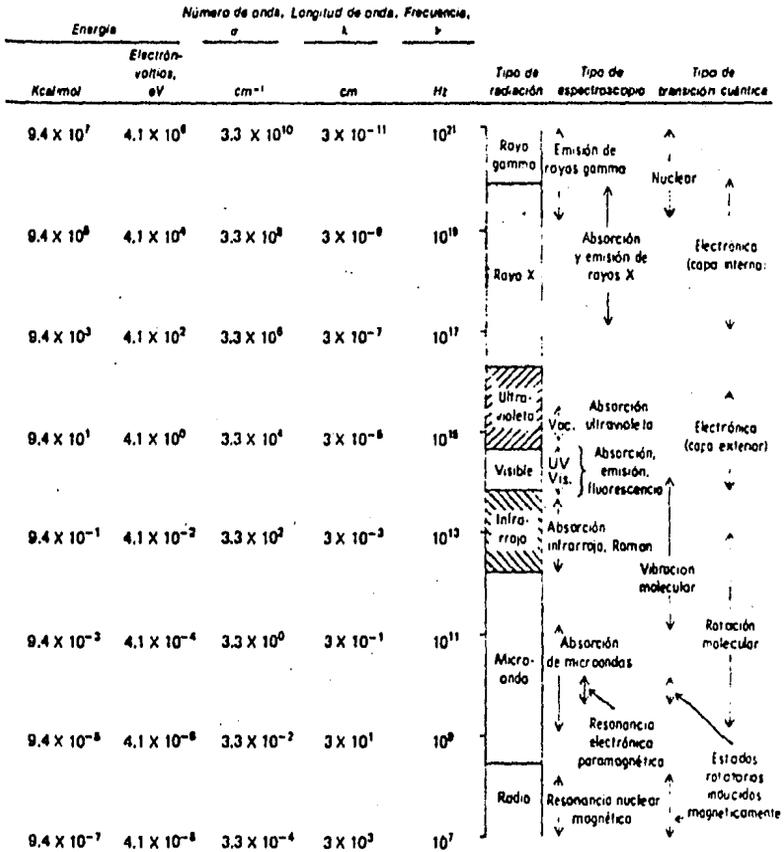


Fig. 1 Propiedades y aplicaciones de los espectros e interacciones de la radiación electromagnética.

mos ocupados por electrones de enlace se llaman orbitales moleculares y puede considerarse como el resultado del traslape de orbitales atómicos, si se combinan dos orbitales atómicos se obtiene un orbital molecular antienlace de alta energía. En el estado basal de la molécula los electrones ocupan los orbitales de enlace.

A los orbitales moleculares asociados con los enlaces sencillos de las moléculas y que involucran electrones "sigma" ( $\sigma$ ) se les designa como orbitales  $\sigma$ , al traslape paralelo de orbitales atómicos "p" y que involucran electrones "pi" ( $\pi$ ) se les designa como orbitales  $\pi$ , a los orbitales moleculares de antienlace se les denomina con los mismos símbolos solamente que se les pone un asterisco, a los electrones no compartidos se les designa el símbolo "n", la energía de estos electrones es intermedia entre las energías de orbitales enlace y de orbitales antienlace como se puede ver en la figura 2.

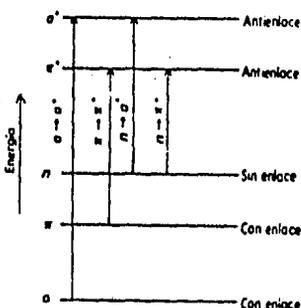


Fig. 2 Niveles electrónicos de energía molecular.

Las transiciones que pueden ocurrir en una molécula al absorber radiación U.V. son:



La absorptividad molar ( $\epsilon$ ) es la intensidad de la absorción y depende de la probabilidad de pasar de un estado basal a un estado excitado. Se considera que una absorción con  $\epsilon_{\text{máx.}} > 10^4$  es una absorción de alta intensidad, la absorción con  $\epsilon_{\text{máx.}} < 10^3$  es una de baja intensidad. Las de baja intensidad se consideran de baja probabilidad y por lo tanto son transiciones "prohibidas".

Las transiciones  $\sigma \rightarrow \sigma^*$  son las que requieren mayor energía para llevarse a cabo y éstas normalmente se logran en U.V. al vacío.

Las transiciones  $n \rightarrow \sigma^*$  requieren menos energía que las  $\sigma \rightarrow \sigma^*$  pero la mayoría de estas transiciones se llevan a cabo debajo de 200nm, las absorptividades molares asociadas varían generalmente de 100 a 3,000 ( $l \text{ cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ ) y los máximos de absorción se desplazan a longitudes de onda más cortas en presencia de disolventes polares como agua o etanol.

Las transiciones  $n \rightarrow \pi^*$  que se llevan a cabo en grupos cromóforos simples tales como grupos carbonilo o nitro, son "prohibidas" y las bandas que se obtienen se caracterizan por tener bajas absorptividades molares generalmente menores a 100, sus máximos se desplazan a longitudes de onda menores con el aumento de la polaridad del disolvente.

Las transiciones  $\pi \rightarrow \pi^*$  ocurren por la presencia de un grupo funcional cromóforo, se caracterizan por una alta absorptividad molar, éstas sufren también desplazamientos a mayores o menores longitudes de onda dependiendo del grupo cromóforo, y lo más importante es que las energías requeridas para estos procesos generan bandas de absorción en la región de 200-700nm igual que las  $n \rightarrow \pi^*$  lo que corresponde a la zona más simple para trabajar, por no necesitar aparatos tan complejos como los que se requieren para el U.V. al vacío.

La intensidad de la energía se puede expresar como transmitancia (T) y que se define por:

$$T = \frac{I}{I_0}$$

donde:

I = intensidad de la energía radiante que incide.

$I_0$  = intensidad de la energía radiante que sale de la muestra

Pero la expresión más utilizada es la intensidad de absorción dada a partir de la ley de Lambert-Beer, la cual se mide como absorbancia según:

$$A = \log(I_0/I) = kcb$$

donde:

k = constante característica del soluto

c= concentración del soluto  
b= longitud de la trayectoria  
A= absorbancia

Esta expresión es muy importante por la relación que muestra la absorbancia con respecto a la concentración y que permite el poder realizar análisis cuantitativos.

Cuando la concentración del soluto esta dada en moles por litro y la longitud de la celda en cm, a la constante característica se le da el término de absorptividad molar.

Es necesario definir algunos términos como:

Cromóforo.- Se le denomina a un grupo insaturado covalente como C=C, C=O y NO<sub>2</sub>, el cual es responsable de la absorción electrónica.

Auxocromo.- Se le denomina a un grupo saturado unido a un cromóforo y que altera tanto la longitud de onda como la intensidad del máximo de absorción, - ejemplos: halógenos, aminas, hidróxilos, etc..

Desplazamiento batocrómico.- Se le denomina al desplazamiento que sufre la absorción a una longitud de onda ( $\lambda$ ) mayor debido al disolvente o a un grupo sustituyente, también conocido como desplazamiento rojo.

Desplazamiento hipsocrómico.- Se le denomina al desplazamiento que sufre la absorción a una longitud de onda ( $\lambda$ ) menor debido al disolvente o a un grupo sustituyente, también conocido como desplazamiento azul.

Efecto hiperocrómico.- Se le denomina al aumento de la intensidad de absorción.

Efecto hipocrómico.- Se le denomina a la disminución de la intensidad de absorción.

La conjugación de dobles enlaces reduce la energía requerida para la transición, por lo que la absorción se desplaza hacia las longitudes de onda mayores, es decir la resonancia estabiliza más el estado excitado que al normal, por lo que reduce la diferencia entre el orbital  $\psi$  y el  $\psi^*$ , se dice entonces que el nivel de energía del orbital  $\psi^*$  presenta menos carácter de antienlace y los máximos de absorción se desplazan a longitudes de onda mayores.

De la teoría anterior se puede ver claramente las aplicaciones analíticas

que se le pueden dar a las mediciones de absorción de radiación ultravioleta.

- Análisis cualitativo.

La técnica de espectrometría U.V. se utiliza para establecer relación de grupos funcionales, principalmente conjugación: la conjugación entre 2 o más dobles enlaces (o triples) carbono-carbono; entre dobles enlaces carbono-carbono y carbono-oxígeno; entre dobles enlaces y anillos aromáticos, incluso la presencia de un anillo aromático; además, puede revelar el número y la ubicación de sustituyentes unidos a los carbonos del sistema conjugado.

En la literatura (1,2) se encuentran reportados métodos empíricos (como el de Woodward, Scoot, etc.) para predecir los efectos batocrómicos de diferentes auxócromos sobre la longitud de onda de máxima absorción de grupos cromóforos, así como tablas de diferentes grupos cromóforos con diferentes auxócromos reportando las longitudes de onda máxima absorción que presentan, junto con sus valores de absorptividad molar en diferentes disolventes.

- Análisis cuantitativo.

Esta técnica es de gran uso cuantitativo, debido a que una gran cantidad de compuestos orgánicos absorben radiación U.V., y algunos compuestos que no absorben radiación en la zona del U.V. pueden ser analizados en ésta, por formación de derivados químicos que sí absorban.

Para el análisis cuantitativo de estos compuestos se utiliza la ley de Lambert y Beer, debido a que ésta relaciona la absorbancia con la concentración del compuesto estudiado.

Siendo esta técnica muy utilizada en cuanto a métodos cuantitativos de control de calidad. Las cualidades que presenta esta técnica y que le permiten ser una fuerte herramienta cuantitativa son:

Son comunes absorptividades molares en la escala de 10,000 a 40,000; así, análisis de concentraciones en la escala de  $10^{-4}$  a  $10^{-5}$  M son ordinarios; por modificación del procedimiento la escala puede extenderse a menudo a menudo a  $10^{-7}$  M, lo que evidencia una alta sensibilidad.

En la técnica normal espectrofotométrica el error relativo en las mediciones de concentración se encuentra entre los límites de 1 a 3%; empleando técnicas especiales conocidas como métodos de precisión o diferenciales (alta absorbancia, -

baja absorbancia y de precisión final), los errores pueden a menudo reducirse hasta cerca del 0.1%, lo que permite una buena precisión.

Una adecuada elección de condiciones, puede permitir encontrar una región de longitud de onda en la que el único componente absorbente de una muestra sea la sustancia que se determina. Además, cuando hay traslape de bandas de absorción, a menudo son posibles las correcciones basadas en más mediciones a otras longitudes de onda, evitándose la necesidad de separar, esto indica que se tiene una selectividad que puede ser de moderada a alta. Esta última cualidad nos permite el poder realizar análisis de mezclas realizándose éste por medio de la ley de aditividades, que permite a través de sistema de ecuaciones conocer las concentraciones de compuestos en la mezcla. Para una mayor información sobre los métodos utilizados en esta técnica es conveniente revisar la literatura (3).

De todo lo anterior se puede concluir la gran importancia analítica que presenta la espectroscopía U.V. tanto en el análisis cualitativo como cuantitativo.

#### Espectroscopía Infrarroja (I.R).

La radiación infrarroja en el espectro electromagnético comprende energías de 40.86 a 0.57 kcal/mol ( $\bar{\nu}$  de 14290 a 200  $\text{cm}^{-1}$ ) siendo la de mayor aplicación la zona que se encuentra entre energías de 11.4 a 1.72 kcal/mol ( $\bar{\nu}$  de 4,000 a 600  $\text{cm}^{-1}$ ).

Esta técnica se utiliza fundamentalmente para la identificación de grupos funcionales. La radiación infrarroja contiene la energía suficiente para producir movimientos vibracionales y rotacionales en las moléculas.

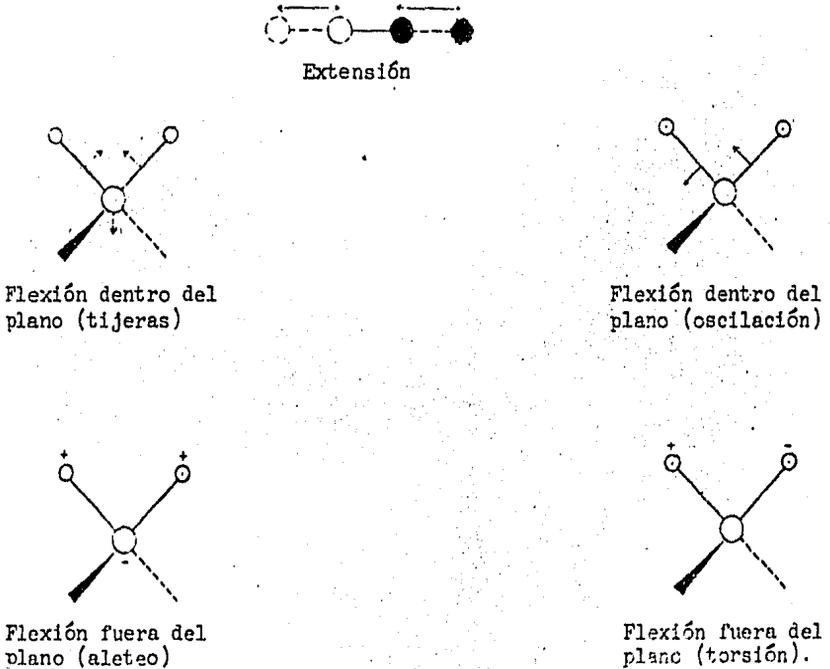
Para que una molécula absorba radiación infrarroja, la molécula debe experimentar un cambio neto en el momento dipolar debido al movimiento vibracional y rotacional. En una vibración se tiene una variación en la distancia interatómica, las vibraciones que se observan en el infrarrojo son solo las que dan por resultado un cambio rítmico del momento dipolar de la molécula. El campo eléctrico alternante, producido por la distribución de carga cambiante que acompaña a una vibración, acopla la vibración molecular con el campo eléctrico oscilante de la radiación electromagnética, por lo

que si la frecuencia de la radiación I.R. iguala a la frecuencia de una vibración natural de la molécula, produce un cambio en la amplitud de la vibración molecular. Análogamente la rotación produce una fluctuación dipolar periódica y por lo tanto interacción con la radiación. Las especies homonucleares como  $O_2$ ,  $N_2$  o  $Cl_2$  no absorben en el I.R. ya que no hay cambio en el momento dipolar durante la vibración o rotación de éstas.

En la zona de  $4,000$  a  $600\text{ cm}^{-1}$  se obtienen transiciones vibratorias y rotatorias y que son las registradas en un espectro de I.R. común.

Ya se ha mencionado que en el I.R. ocurren fenómenos de vibración molecular, pero, ¿cuáles son estos tipos de vibraciones? para empezar es necesario mencionar que las posiciones relativas de los átomos en una molécula se encuentran oscilando debido a una gran cantidad de distintos tipos de vibraciones. Estas vibraciones pueden clasificarse en dos tipos básicos las de extensión y de deformación y que pueden verse en la figura 3.

Fig. 3 Tipos de vibraciones moleculares.



Como se observa una vibración por extensión es un alargamiento periódico a lo largo del eje de enlace de modo que la distancia interatómica varia. Las vibraciones por deformación se caracterizan por un cambio en el ángulo entre dos enlaces con respecto a un eje de coordenadas obteniéndose vibraciones del tipo de tijera, oscilación o balanceo, aleteo y torsión.

En una molécula que tenga más de 2 átomos, todos los tipos de vibración son posibles además de todos aquellos que se formen por interacción o acompañamiento de vibraciones.

El número de vibraciones en una molécula poliatómica se puede calcular de la siguiente manera; se sabe que se necesitan 3 coordenadas para localizar un punto en el espacio, por lo tanto para fijar  $N$  puntos en el espacio se requieren  $3N$  coordenadas y si consideramos a una molécula con  $N$  átomos y que cada coordenada corresponde a un grado de libertad de movimiento de uno de los átomos, se dice entonces que la molécula tiene  $3N$  grados de libertad.

Para especificar el movimiento de traslación de una molécula se requieren 3 grados de libertad y otros 3 grados de libertad para describir su rotación, lo que indica que los  $\langle 3N-6 \rangle$  grados de libertad restantes dan los movimientos interatómicos y por tanto las posibles vibraciones dentro de la molécula. Un caso especial es una molécula lineal ya que bantan 2 grados de libertad para describir el movimiento rotatorio por lo que para una molécula lineal tenemos  $\langle 3N-5 \rangle$  vibraciones. Cada una de las  $\langle 3N-6 \rangle$  o  $\langle 3N-5 \rangle$  vibraciones se les llama modos normales de vibración. En la práctica, el número de modos normales no corresponde exactamente al número de bandas de absorción observadas, ya que en algunos casos el número de picos es menor ya sea debido a que la simetría de las moléculas es tal que no se producen cambios en el momento dipolo por la vibración, o las energías de dos o más vibraciones son idénticas o casi idénticas. Ocurre también que, el número de bandas aumenta debido a los multipletes de una frecuencia dada, conocidos como sobretonos. (Para mayor información, consultar literatura especializada (2,4)).

- Análisis cualitativo.

Está técnica, por las cualidades ya presentadas, es junto con otras técni-

cas espectroscópicas (U.V., Resonancia Magnética Nuclear y Espectrometría de Masas) una herramienta útil para elucidar la posible estructura del compuesto analizado. Para ésta técnica se ha acumulado una gran cantidad de información empírica relativa a las frecuencias en las que puede esperarse que los diferentes grupos funcionales absorban, siendo esta su mayor cualidad ya que a través de esta información se puede saber si se tiene un grupo saturado o insaturado, grupo carbonilo, etc.; existiendo una gran información en la literatura (2,4,5). Del espectro, la región conocida como de "huellas digitales" ( $1500$  a  $700\text{cm}^{-1}$ ) proporciona una mayor información específica sobre los grupos funcionales (sustitución en aromático, tipo de carbonilo, etc.), también permite realizar un análisis cualitativo por medio de comparación entre la muestra problema y una muestra pura del mismo compuesto, lo que hace posible su identificación dando además una idea sobre la pureza de la muestra problema, para ello se han obtenido los espectros infrarrojos de una gran cantidad de compuestos orgánicos puros, lo que ha generado varios catálogos (6,7) donde se incluyen y ya que un espectro de infrarrojo de un compuesto puro es único para éste y no hay otro compuesto que de un espectrograma igual, la identificación inequívoca es posible.

#### - Análisis cuantitativo.

Por ser ésta una técnica que aprovecha el fenómeno de la absorción como en la técnica de U.V. se podrá realizar un análisis cuantitativo aprovechando la ley de Lambert-Beer, el problema en este caso es encontrar la banda adecuada en todo el espectro obtenido, que permita realizar este análisis. En el caso de mezclas todavía es más importante el lograr definir una banda que pertenezca solamente a uno de los compuestos de la muestra para así poder cuantificarla.

#### Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (R.M.N.)

La región de radiación electromagnética a la que pertenece la R.M.N. se encuentra entre  $9.54 \times 10^{-9}$  a  $9.54 \times 10^{-6}$  kcal/mol ( $\nu$  entre 0.1 a 100 MHz) y se conoce como la zona de radiofrecuencia. Se considera que los átomos tienen núcleos con espín, siendo éste el nombre que se le da al movimiento rotacional de los núcleos, en un eje imaginario. El giro de estas partículas cargadas

(la circulación de carga) genera un momento magnético a lo largo del eje de giro, de modo que estos núcleos actúan como imanes de barra minúsculos. También hay que recordar que los núcleos orientados a una cierta dirección tenderían a orientarse paralelamente al campo magnético, pero esto no se efectúa debido a que los núcleos presentan una trayectoria circular o precesión. En este caso, la fuerza aplicada por el campo al eje de rotación hace que el movimiento no se produzca en el plano de la fuerza, sino perpendicularmente al plano; el eje de la partícula rotatoria se mueve en una trayectoria circular alrededor del campo magnético (como un trompo en movimiento). Ver figura 4.

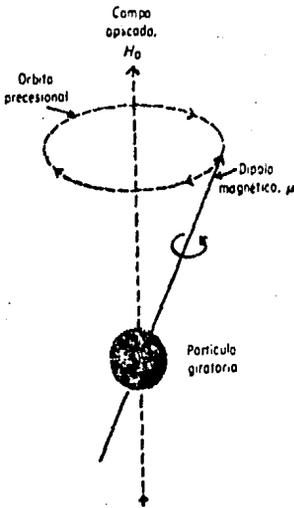


Fig. 4 Precesión de una partícula rotatoria en un campo magnético.

Ahora bien, si se coloca un núcleo en un campo magnético externo, de acuerdo con la mecánica cuántica, las energías de los núcleos de ciertos elementos se dividen en dos o más niveles cuánticos, como consecuencia de las propiedades magnéticas de estas partículas y su momento magnético puede alinearse en una de dos formas: con o contra el campo externo. Ver figura 5.

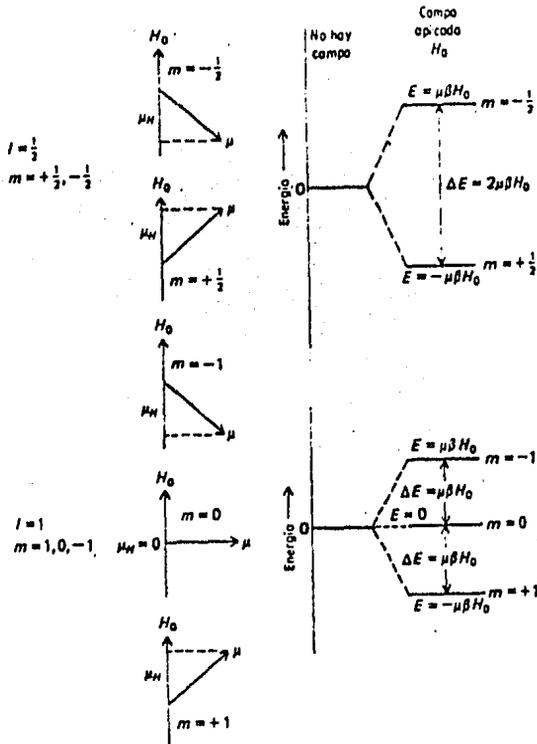


Fig. 5 Orientaciones de momentos magnéticos y niveles de energía de partículas situadas en un campo magnético  $H_0$ .

La alineación con el campo es la más estable, debiendo absorberse energía para invertir el minúsculo imán nuclear y así colocarlo alineado contra el campo, que es la situación menos estable.

La energía necesaria para invertir el campo asociado al protón, como es de suponer, depende de la intensidad del campo externo: cuanto más intenso es el campo, tanto mayor es la tendencia a permanecer alineado con él, y tanto más elevada la frecuencia de la radiación necesaria para conseguir la inversión, siendo la frecuencia electromagnética igual a:

$$\nu = \frac{\gamma H_0}{2\pi}$$

siendo:

$H_0$  = intensidad del campo magnético exterior aplicada.  $\gamma$  la relación giro-magnética y que es:

$$\gamma = \frac{2\pi\mu}{hI}$$

donde:

$h$  = constante de Plank

$I$  = número cuántico de espín

(La componente espín máxima de una partícula determinada es su  $I$ ).

Sí se analizan las propiedades de los núcleos se observa que:

El momento angular se debe al movimiento translacional que presentan los núcleos respecto a un punto dado; causado por el movimiento rotacional que presenta todo cuerpo.

Al movimiento rotacional de los núcleos, en un eje imaginario, se le conoce como espín nuclear. Los valores que toma este espín, están dados por las reglas.

- 1) Núcleos que tengan número de masa non, independientemente de su número de carga, tendrán espín nuclear cuyo valor es un número non dividido entre dos.
- 2) Núcleos con masa par y carga par, no presentan el fenómeno de resonancia, ya que a este tipo de núcleos no se les asigna ningún movimiento rotacional.
- 3) Núcleos con masa par y carga non, tendrán valores de espín, en números enteros.

De las propiedades eléctricas tenemos:

- 1) Carga eléctrica del núcleo.- Es conocido que a todo núcleo esta asociada una carga positiva.
- 2) Momento magnético.- Se conoce que todo movimiento de una carga origina un momento magnético ( $\mu$ ).

De lo anterior se observa que para que se tenga una señal de R.M.N. se necesita que el núcleo presente espín nuclear y por lo tanto un momento magnético.

Del número de espín ( $I$ ) se determinan el número de orientaciones adquiridas por el núcleo al ponerse en un campo magnético uniforme externo, este número de orientaciones esta dado por:

$$2I + 1$$

La fuerza aplicada a un núcleo giratorio de un campo magnético es el producto de la intensidad del campo ( $H_0$ ) y el momento magnético de la partícula ( $\mu$ )

y el magnetón nuclear ( $\beta$ ) y ya que el momento angular esta dado por:

$$I(h/2\pi)$$

y como la velocidad angular de precesión es directamente proporcional a la fuerza aplicada e inversamente proporcional al momento angular del cuerpo giratorio al que se aplica la fuerza, se tiene por lo tanto que la velocidad precesional es:

$$\omega_0 = \frac{2\pi \mu \beta}{Ih} \quad H_0 = \gamma H_0$$

y sí

$$\gamma H_0 = 2 \pi \nu$$

y se obtendrá

$$\omega_0 = 2 \pi \nu$$

Lo anterior indica que cuando un núcleo, con una velocidad precesional  $\omega_0$  es sometido a un campo magnético y se introduce la frecuencia adecuada de radiofrecuencia, la energía puede absorberse dando por resultado la excitación del núcleo en precesión, es decir este cambia rapidamente de estado de orientación rapidamente. Ver figura 6.

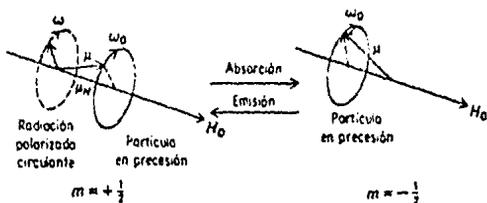


Fig. 6 Modelo de absorción de radiación por una partícula en precesión.

Como consecuencia la R.M.N. representa una técnica muy poderosa para el estudio de átomos que poseen propiedades magnéticas, y el hecho de que el protón aparezca en la mayoría de los compuestos orgánicos y muchos inorgánicos, ha dado por resultado que esta técnica tenga una gran aplicación cualitativa para realizar estudios estructurales, dando lugar a la R.M.N. protónica.

- Análisis cualitativo.

El uso de la R.M.N. protónica como método cualitativo se hace patente en el gran número de publicaciones sobre éste (2,8,9,10) con tablas que proporcionan un mecanismo adecuado para realizar cálculos de los desplazamientos químicos que sugren las señales en el espectro y conocimiento sobre la multiplicidad de señales.

El desplazamiento químico depende de los fenómenos de protección que están asociados con la densidad electrónica que rodea al núcleo tomado en consideración o con la corriente electrónica en la cual se encuentra el núcleo, y esto indica que se pueden tener protecciones debidas a los electrones que se encuentran cercanos al núcleo y a larga distancia.

La multiplicidad de señales observada en la resonancia de alta resolución (determinadas a partir de observaciones experimentales) llevaron a concluir que: A la relación de las interacciones magnéticas, entre núcleos de diferentes tipos (conocidas como interacción espín-espín) y la separación entre picos de una señal múltiple dada, se le conoce como constante de acoplamiento ( $J$ ), el cual toma diferentes valores según cada caso particular.

En el caso de la R.M.N. protónica como en el caso del I.R. se cuenta con - catálogos de espectros de R.M.N. (11,12) protónica que ayudan en la identificación cualitativa de un gran número de compuestos orgánicos. Estos catálogos tienen una extensa colección que proporciona una gran información.

- Análisis cuantitativo.

Con respecto al análisis cuantitativo la proporcionalidad directa entre las áreas de los picos y el número de núcleos que producen el pico, nos permite que en la determinación cuantitativa de un compuesto específico no se requiera de - muestras puras. Es decir, si un pico identificable de uno de los constituyentes de una muestra no se traslapa con los picos de los otros contituyentes, el área de este pico puede emplearse para establecer directamente la concentración de la especie, conociendo con anterioridad el área de la señal por protón por medio de una concentración conocida de un estándar interno.

De lo anterior se observa que se puede emplear esta técnica para determinar cuantitativamente mezclas de componentes múltiples, también para resolver mezclas



observados en la figura 7:

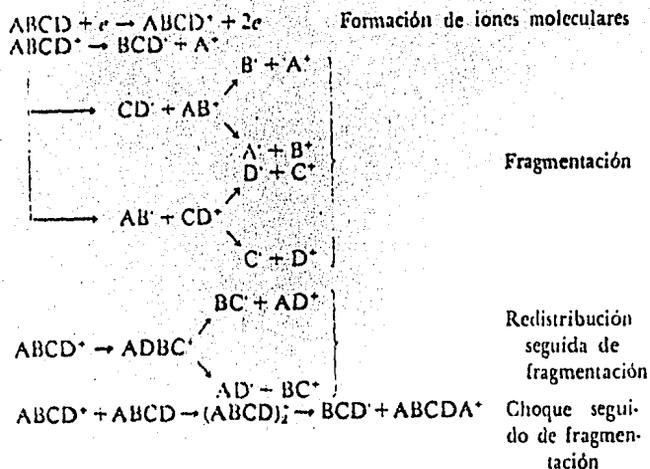


Fig. 7 Procesos que sufre una molécula en una fuente de impacto electrónico.

El hecho de que el 90% de los iones formados sean positivos, provoca que el sistema instrumental opere con iones positivos.

Para poder entender esto un poco mejor se debe recordar que Thomson demostró que un haz de iones era desviado de su trayectoria por la presencia de campos eléctricos y/o magnéticos y que además el grado de desviación era proporcional a la relación masa/carga ( $m/z$ ) para cada ion.

Los iones al viajar a través de un campo magnético experimentan una fuerza centrípeta magnética ( $F_m$ ) dada por:

$$F_m = \frac{H_o z v}{c}$$

donde:

- $H_o$  = fuerza del campo magnético.
- $z$  = carga del ion.
- $v$  = velocidad del ion.
- $c$  = velocidad de la luz en el vacío.

Ahora bien, los iones al salir de la fuente son acelerados al pasar por las rejillas de aceleración que se encuentran con una diferencia de potencial de varios miles de volts. En estas condiciones los iones adquieren una energía cinética que va a depender del voltaje de aceleración y de la carga de los iones, lo que se representa como:

$$E_{cin} = zV = 1/2 mv^2$$

Por otro lado una partícula que se mueve en una trayectoria circular experimenta una fuerza centrífuga, esta fuerza la podemos representar como:

$$F_{cen} = \frac{mv^2}{r}$$

donde:

r = radio de curvatura.

Un ión debe cumplir la condición de que  $F_m = F_{cen}$  para atravesar la trayectoria circular, así:

$$\frac{mv^2}{r} = \frac{H^2}{4\pi^2} \frac{z^2 v}{c}$$

y sustituyendo el valor de v en la ecuación de energía cinética y reorganizando los términos se obtiene:

$$m/z = \frac{H^2}{4\pi^2} \frac{r^2}{2Vz}$$

siendo esta última ecuación la ecuación fundamental de la espectrometría de masa.

Es importante en la interpretación de los espectros el poder asignar correctamente cada uno de los tipos de iones que aparecen en el espectro. El asignar correctamente el ion molecular es el primer paso y el más importante, el resto de los picos corresponderá a fragmentos. Los picos metaestables pueden indicar en muchos de los casos la secuencia de las fragmentaciones y por lo tanto, son útiles para unir todos los pedazos y reconstruir la estructura. - Ahora se verán cada uno de los tipos de iones que se forman en un espectro de masas:

- Ion molecular.- El término ion "molecular" simplemente describe el ion formado cuando una molécula neutra pierde un electrón y permite determinar del peso molecular.
- Iones isotópicos - El análisis adecuado de éstos permite determinar la fórmula mínima del compuesto.
- Iones fragmentarios.- La mayoría de los picos de un espectro corresponden a iones fragmentarios y son generados por rupturas de enlaces del ion molecular o de fragmentos de masa mayor.
- Iones metaestables.- Su utilidad en la interpretación de un espectro es valiosísima ya que es muy útil el poder saber si dos iones provienen de la misma parte de la molécula o fueron formados por procesos distintos.
- Iones negativos.- Este tipo de iones por el momento resultan poco importantes, debido a la proporción en que se encuentran. Sin embargo, es necesario tener presente que se puede obtener la misma información con los dos tipos de iones.
- Iones múltiple-cargados.- Estos iones aparecen a una fracción de su masa actual.

La resolución que se necesita en un espectrómetro de masa depende considerablemente de su aplicación. Partículas de bajo peso molecular que difieren en una unidad de masa o más pueden distinguirse con un instrumento que posea una resolución menor de 50. Es necesario un instrumento con una resolución de quizás cinco o diez veces esta cifra para mantener la separación unitaria de los picos cuando las masas sean mayores.

Aún para compuestos relativamente simples el espectro de masas generalmente contiene una gran cantidad de picos de diferentes intensidades, debido a la gran cantidad de iones que se forman de moléculas, por ejemplo de una molécula de 4 átomos se forman teóricamente 10 iones y de una de 20 átomos se forman 212 iones. La naturaleza detallada del espectro depende de las propiedades de la molécula (energía de los enlaces, estabilidad de los fragmentos, etc.). La interpretación completa de un espectro raras veces es posible. El estudio de compuestos de estructura conocida está comenzando a revelar los factores que determinan en que fragmentos tiende a descomponerse una estructura determinada. Pudiendo descubrir cosas que son familiares como la formación preferencial de iones carbono que re-

conocemos como relativamente estables; la eliminación de moléculas pequeñas, como agua, amoníaco y monóxido de carbono. Bajo las condiciones energéticas de trabajo, pueden producirse transposiciones extensas que complican la interpretación de los resultados, pero también aquí ciertos esquemas están siendo reconocidos. La dirección de las transposiciones es hacia los iones más estables, tal como se puede anticipar. A medida que se acumulan estos conocimientos, se invierte el proceso y se deduce la estructura de un compuesto desconocido, según el tipo de fragmentación que sufre. En la literatura se encuentran libros especializados sobre los diferentes tipos de fragmentación (2, 16, 17), para poder entender mejor este tipo de mecanismos.

- Análisis cualitativo.

El espectro de masas de un compuesto puro ofrece como ya se mencionó una valiosa información para fines de identificación cualitativa, ya sea por dar el peso molecular, fórmula molecular y el conocer el mecanismo de fragmentación lleva en algunas ocasiones a conocer la estructura del compuesto a estudiar utilizando junto con la E.M., las técnicas de U.V., I.R., y R.M.N..

- Análisis cuantitativo.

El espectrómetro de masa permite realizar análisis cuantitativo de mezclas que contienen componentes estrechamente relacionados, para realizar esto se requieren como en la técnica de R.M.N.:

- 1) Que cada componente de la mezcla exhiba por lo menos un pico que difiera marcadamente de los demás.
- 2) La contribución de cada componente de la mezcla en el pico debe ser linealmente aditiva.
- 3) Disponer de estándares apropiados para calibración.

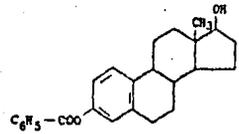
Sobre el tercer punto, en condiciones apropiadas, las alturas de los picos de masa son directamente proporcionales a las presiones parciales de los componentes. En muchas ocasiones en mezclas complejas raramente es posible hallar un pico único para cada componente; por lo que, se deben resolver una serie de ecuaciones simultáneas para resolver los datos de las mezclas. Esta técnica espectroscópica acoplada a la técnica cromatográfica permite realizar una gran variedad de trabajo analítico en mezclas.

Esteroides

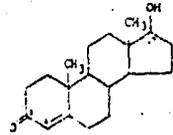
Para el ser humano, son los lípidos no energéticos más importantes. Existe una gran variedad de esteroides, y cada uno con una distinta función o actividad biológica, siendo aislados comunmente de fuentes naturales. - Presentan un papel importante en el sistema endocrino (hormonal) en el ser humano.

Observando sus propiedades los esteroides son clasificados comunmente como:

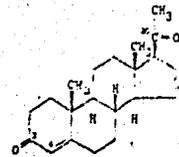
<u>Estructura</u>	<u>Funcionalidad</u>	<u>Ejemplo</u>
Estronas .....	Estrógenos .....	Benzoato de Estradiol



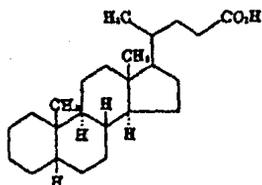
Androstonas .....	Andrógenos .....	Testosterona
-------------------	------------------	--------------



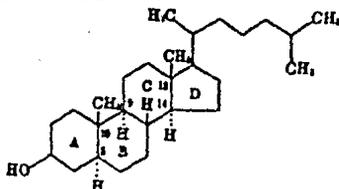
Pregnonas .....	Progestinas .....	
	Glucocorticoides .....	Progesterona
	Mineralocorticoides .....	



Colanos ..... Acidos biliares ..... Ac. Colánico



Colestanos ..... Esteroles ..... Colestanol



Los estrógenos presentan un anillo aromático en el anillo A y ausencia de un sustituyente angular en el carbono 10. Representan un papel importante en el ciclo menstrual femenino, por lo que se les conoce comúnmente como hormonas del sexo femenino.

Los andrógenos contienen un grupo metilo en el carbono 10 y ausencia de anillos aromáticos, tienen un gran número de centros asimétricos. Estos esteroides juegan un papel importante en la fisiología del aparato reproductor masculino, por lo que se les conoce comúnmente como hormonas del sexo masculino.

Las progestinas poseen en su estructura general 20 o 21 átomos de carbono, esto por la ausencia (en algunos) del metilo 19. Estos esteroides realizan una actividad biológica parecida a la realizada por la progesterona en la fisiología del aparato reproductor femenino.

Los glucocorticoides y los mineralocorticoides poseen una estructura parecida a las progestinas solamente que sus actividades biológicas son diferentes a las de éstas, ya que los glucocorticoides ejercen muy diversas acciones en el metabolismo intermedio, por ejemplo, éstos inhiben la síntesis de ácidos grasos de cadena larga y son necesarios para la movilización de ácidos grasos de almacenes adiposos por medio de hormonas lipolíticas, mientras que los mineralocorticoides son esenciales para conservar el equilibrio electrolítico y el volumen extracelular.

Los ácidos biliares poseen una estructura de colanos, esto es, un esqueleto

general entre 24 y 25 átomos de carbono, pero presentando grupos metilo en los carbonos 18 y 19, muy parecidos a los colestanos, sólo que con cadena más corta como sustituyente en el carbono 17, es decir que tiene gran parecido con el de los esteroides (o colestanos), pero ya que los ácidos biliares presentan el hidrógeno del carbono 5 en posición cis ( $\beta$ ) y los esteroides en trans ( $\alpha$ ) se tiene diferente actividad biológica entre ellos. Estos ácidos biliares se conocen como sales biliares y cumplen una función primordial en la digestión de las grasas (emulsionándolas a modo de detergente).

Los esteroides poseen una estructura general de 27 átomos de carbono, provienen generalmente del colesterol (por eso presentan estructuras parecidas a éste) y su hidrógeno del carbono 5 se encuentra en posición trans ( $\alpha$ ). Estos son fundamentales durante el crecimiento y desarrollo del organismo, siendo también los precursores (sobre todo el colesterol) de hormonas y parte esencial de muchos componentes celulares.

Los esteroides hormonales presentan una alta especialización en la función que realizan en el organismo y no producen generalmente efectos sistemáticos en el metabolismo de éste.

Los esteroides hormonales sexuales presentan una gran importancia durante el ciclo menstrual femenino y masculino, por lo que, del estudio de él ha permitido la preparación de anticonceptivos utilizando mezclas de esteroides, ya sean hormonales orales combinados o inyectables los cuales modifican el ciclo sexual y previenen el embarazo.

Las mezclas de esteroides comúnmente utilizados a nivel de fármacos en el mercado son las que se encuentran anotados en el cuadro I.

De este cuadro observamos que las combinaciones de estos esteroides consisten en mezclar estrógenos ya sea con andrógenos y/o progestinas, o andrógenos solos, encontrándose en mayor proporción siempre los andrógenos y progestinas que los estrógenos. De aquí la importancia de conocer la espectroscopía de estos esteroides para poder realizar un buen control de calidad, en primer lugar cualitativo y después por medio de una metodología adecuada hacer la determinación cuantitativa empleando alguna de las 4 técnicas espectroscópicas.

Para hacer un estudio adecuado de los esteroides es necesario conocer un

poco sobre su nomenclatura. Los esteroides son derivados del hidrocarburo tetracíclico saturado perhidrociclopentanofenantreno, en la figura 8 se puede ver la forma de enumerar los átomos de carbono y los anillos de la estructura esteroideal básica:

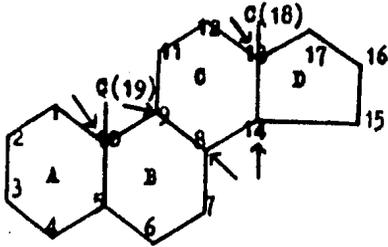


Fig. 8 Enumeración de C en un esteroide. C asimétricos. →

Los esteroides difieren en el número de posición de sus dobles ligaduras y en el tipo, localización y número de grupos funcionales sustituyentes que pueden tener, debido a esto para nombrarlos y conocer el grupo sustituyente se utiliza la siguiente regla:

<u>Grupo sustituyente</u>	<u>Prefijo</u>	<u>Subfijo</u>
doble ligadura (-C=C-)	$\Delta^+$	- eno
Triple ligadura (-C≡C-)	_____	- ino
hidroxil (-OH)	hidroxi-	- ol
acetato (-OCOCH <sub>3</sub> )	acetoxi-	- il acetato
carbonilo (>C=O)	oxo-	- ona
aldehído (-HC=O)	_____	- al
ác. carboxílico (-COOH)	carboxi-	- oico ácido

También se tiene variación en la configuración  $\alpha$  o  $\beta$  de los enlaces entre los grupos sustituyentes y los carbonos, y en la configuración de los sustituyentes en cada uno de los anillos. Presentan 6 carbonos asimétricos en la estructura general que son el 5,8,9,10,13 y 14 y los carbonos en los que normalmente se encuentra una sustitución son el carbono 3 del anillo A, el 11 del anillo C y el 17 del D.

CUADRO I

Mezclas de esteroides en medicamentos.

<u>Esteroides</u>	<u>Proporciones en</u>		<u>Ejemplo del fármaco.</u>
	<u>peso.</u>		
(E) Benzoato de estradiol	1		
(E) Valerianato de estradiol	1.6		
(P) Acetato de norestisterona	4		Ablactón
(A) Enantato de testosterona	36		
(E) Etinil estradiol	1		
(A) Metil testosterona	250		Gevrin
(P) Progesterona	10	16.67	Cumorit
(E) Benzoato de estradiol	1	1	Estroges
(A) Ciclopentil propionato de testosterona	4	3.75	Poseidón
(A) Propionato de testosterona	1	1.25	
(A) Dehidroisoandrosterona	1	1	Sten
(P) Caproato de hidroxiprogesterona	25		
(E) Benzoato de estradiol	1		Primosistén
(P) Progesterona	10		
(E) Estrona	1		Synergón 20
(P) Progesterona	1		
(A) Dipropionato de metil androstenediol	2.5		Trigenil
(P) Norgestrel	5		Nordiol
(E) Etinil estradiol	1		
(E) = Estrógeno	(A) = Andrógeno	(P) = Progestina	

PARTE EXPERIMENTAL

Los 21 esteroides que se estudian por las 4 técnicas espectroscópicas, fueron escogidos por su amplio uso farmacológico (como anticonceptivos):

	<u>P. fusión</u>
I ..... Testosterona .....	153-155°C
II ..... Dehidroisoandrosterona .....	140-141°C
III ..... Metil testosterona .....	161-166°C
IV ..... Propionato de testosterona .....	118-122°C
V ..... Propionato de promostanolona .....	126-130°C
VI ..... Dipropionato de metil androstenediol .....	86-87 °C
VII ..... Ciclopentil propionato de testosterona .....	101-102°C
VIII ..... Fenil propionato de testosterona .....	116-119°C
IX ..... Noretinodrel .....	169-170°C
X ..... Noretindrona .....	203-204°C
XI ..... Linestrenol .....	158-160°C
XII ..... Norgestrel .....	203-207°C
XIII..... Progesterona .....	127-131°C
XIV ..... Acetato de noretisterona .....	161-162°C
XV ..... Dipropionato de Bolandiol .....	169-172°C
XVI ..... Acetato de melengestrol .....	224-226°C
XVII ..... Caproato de hidroxiprogesterona .....	119-121°C
XVIII ..... Estrona .....	251-254°C
XIX ..... Etinil estradiol .....	180-186°C
XX ..... Mestranol .....	150-151°C
XXI ..... Benzoato de estradiol.....	191-196°C

De estos 21: los primeros 8 son andrógenos, los siguientes 9 son progestinas y los últimos 4 son estrógenos. En el apéndice I se presentan las estructuras de estos 21 esteroides junto con datos de peso molecular, punto de fusión, fórmula condensada, tipo terapéutico, así como los correspondientes espectros obtenidos.

Para la obtención de estos espectros se utilizaron muestras puras, comparando su pureza por su punto de fusión (confirmándose ésta en los espectros obtenidos).

Las muestras nos fueron donadas por el Laboratorio Central de la Secretaría de Hacienda y Crédito Público, ya que estos esteroides son de importación.

A continuación se dan la instrumentación y condiciones utilizadas para la realización de los espectros con las diferentes técnicas:

- Ultravioleta

Para la realización de los espectros de U.V. se utilizaron como instrumentos:

- Un espectrofotómetro U.V.- Visible Mod. 635 Varian Techtron.
- Un graficador Varian Techtron.
- Celdas de cuarzo de 1 cm. de longitud ( volumen de 5ml).

Se trabajó bajo las siguientes condiciones:

- Barrido de 350nm a 200nm.
- La velocidad de barrido fue de 50nm/min.
- La velocidad del papel en el graficador fue de  $3 \frac{1}{3}$  cm/min.
- Amplitud de la señal: la adecuada.
- Disolvente : Metanol.
- Blanco: Metanol.
- Se partió como primera aproximación de una concentración de  $1 \mu\text{g}/10\text{ml}$  (100ppm), y del análisis del espectro obtenido se procedió a aumentar la concentración - del esteroide o a diluir la solución original.
- Para los esteroides No. I, III, IV, VII, VIII, X, XII, XIII, XIV, XVI, XVII y XXI, con una dilución 1 a 10 de la concentración inicial, es decir que se - utilizaron disoluciones de una concentración de 10ppm.
- Para el esteroide No. XX se utilizó una disolución de 50mg/10ml, es decir, 5,000ppm (muy concentrada).
- Para los esteroides XVIII y XIX se utilizaron disoluciones de  $1 \mu\text{g}/10\text{ml}$ .
- Para los esteroides No. II, V, VI, IX, XI y XV se utilizaron disoluciones de 50mg/10ml sin que la señal pudiese ser registrada; aún a esa concentración tan alta.

- Infrarrojo

Para la realización de los espectros de I.R. se utilizó como instrumento:

- Un espectrofotómetro I.R. Perkin Elmer 599B.

Se trabajó bajo las siguientes condiciones:

- Barrido de  $4,000\text{cm}^{-1}$  a  $200\text{cm}^{-1}$ .
- Tiempo de barrido de 12 minutos.
- Lectura en absorción.
- Rendija normal, expansión de la carta 1, ruido 1 y multiplicador 1.
- Realizando la muestra en pastilla de KBr para su utilización.

- Resonancia Magnética Nuclear.

Para la realización de los espectros de R.M.N. se utilizó como instrumento:

- Espectrómetro de R.M.N. protónica de 90MHz, Varian EM-390.

Se trabajó bajo las siguientes condiciones:

- Barrido de 0-10ppm (no se tiene ninguna señal fuera de campo).
- Disolvente utilizado  $\text{CDCl}_3$  (en los esteroides No. XII y XVIII se utilizan 2 gotas de DMSO).
- Utilizándose como compuesto de referencia TMS (0ppm).
- Filtro de 0.05 segundos.
- Radiofrecuencia de 0.1 mG.
- Tiempo de barrido: 5 minutos.
- Amplitud del espectro: La adecuada (del orden de 1000).
- Amplitud de la integración: La adecuada (En el espectro se marca el número de protones a los que integra).
- Se utilizó  $\text{D}_2\text{O}$  para eliminar el protón del hidroxilo.
- Se utilizaron algunos casos sales de Europio ( $\text{Eu}(\text{Fod})_3$ ).

- Espectrometría de masas

Para la realización de los espectros de masas se utilizaron los instrumentos:

- Un espectrómetro de masas DuPont 21-490B de baja resolución.
- Un espectrómetro de masas Hitachi Perkin Elmer RMU-7H de alta resolución.

Se trabajó bajo las siguientes condiciones.

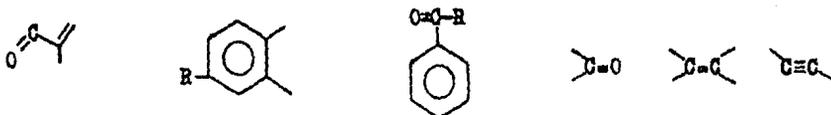
- Velocidad de barrido: 10 y 5 seg/de cade.
- Temperatura de la fuente :  $275^\circ\text{C}$ .

- Temperatura del probe: 250°C.
- Vacío:  $1 \times 10^{-6}$  torr.
- Potencial de ionización: 70eV.
- Corriente al filamento: 100 $\mu$ A.

RESULTADOS Y ASIGNACION DE SEÑALES.

Ultravioleta.

Los esteroides estudiados contienen fundamentalmente 4 diferentes grupos cromóforos responsables de las bandas de absorción en el U.V., estos grupos son:



- 1)  Este sistema es conocido como enona, y consiste en la conjugación de un grupo carbonilo con una doble ligadura (o más), este sistema contiene 2 grupos cromóforos, por lo tanto ocurren 2 transiciones, una  $n \rightarrow \pi$  y otra  $\pi \rightarrow \pi^*$ , y de las cuales solo es observable la transición  $\pi \rightarrow \pi^*$ , desplazada a  $\lambda$  mayor a la que se obtendría de una doble ligadura aislada, esto debido a la conjugación con el grupo carbonilo. En la Tabla # 1 se colocan las  $\lambda_{\text{máx.}}$  y  $\log \epsilon$  obtenidos experimentalmente para estos esteroides, más la  $\lambda_{\text{máx.}}$  teórica que se obtiene a partir de las reglas de Woodward modificadas para enonas (1).

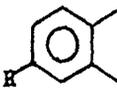
Tabla # 1

<u>Esteroides No.</u>	<u><math>\lambda_{\text{máx. exp.}}</math> (nm)</u>	<u><math>\log \epsilon</math> (1 mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>)</u>	<u><math>\lambda_{\text{máx. calculada}}</math> (nm)</u>
I	246	4.21	239
III	247	4.22	239
IV	246	4.22	239
VII	246	4.25	239
VIII	237	4.26	239
X	244	4.24	239
XII	246	4.36	239
XIII	246	4.22	239
XIV	243	4.27	239
XVI	291	4.35	298
XVII	243	4.24	239

Como se mencionó en la parte teórica las transiciones  $\pi \rightarrow \pi^*$  son desplazadas a longitudes de onda altas por efecto de la conjugación, ya que se reduce el ni-

vel de energía del orbital  $\pi^*$  al tener éste menor carácter de antienlace, esto es claramente observable en el esteroide XVI donde un aumento en la conjugación desplaza la señal de absorción a longitudes de onda mayores que las esperadas - por una enona sin conjugación.

El valor de  $\log \epsilon$  que se encuentra publicado en la literatura (13) para algunos esteroides de este tipo confirma que la transición es  $\pi \rightarrow \pi^*$

2)  Grupo aromático de anillo A.- Los hidrocarburos aromáticos se caracterizan por presentar 3 bandas de absorción que se originan de transiciones  $\pi \rightarrow \pi^*$  y que son:

$$\lambda = 184\text{nm} \quad \log \epsilon = 4.8, \quad \lambda = 204\text{nm} \quad \log \epsilon = 3.9 \quad \text{y} \quad \lambda = 256\text{nm} \quad \log \epsilon = 2.3$$

Las transiciones  $\pi \rightarrow \pi^*$  sufren un efecto batocrómico en disolventes polares, así como por ciertos tipos de sustituyentes, es decir un auxocromo que como ya se mencionó es un grupo funcional que no absorbe en la región U.V., pero produce el efecto batocrómico e hiperocrómico, que en el caso de los esteroides XVIII XIX y XX se presenta. En la tabla # 2 se presentan los resultados experimentales obtenidos, solamente que en este caso no se presentan longitudes de onda teóricas, debido a que no existe una forma de cálculo precisa o aceptada para el sustituyente aromático de estos esteroides.

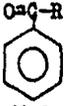
Tabla # 2

<u>Esteroides No.</u>	<u><math>\lambda</math> máx. exp. (nm)</u>	<u><math>\log \epsilon</math> (l mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>)</u>
XVIII	285	3.64
XIX	284	3.30
XX	290	3.15
	283	3.20

De las 3 bandas que presenta un grupo aromático la que se puede observar en la zona de U.V. que se trabaja es la que se encuentra a  $\lambda$  mayor siendo ésta desplazada aun más por efectos batocrómicos generados por los sustituyentes que presente. Para los esteroides XVIII y XIX se observa un desplazamiento batocrómico e hiperocrómico generado por el sustituyente hidroxilo (-OH) en el anillo aromático. Para comprobar que dicha variación era debida al grupo hidroxilo se corrió el espectro del fenol, obteniéndose como resultado una  $\lambda$  máx.=274nm y un  $\log \epsilon=3.16$  del mismo rango que los esteroides estudiados. Las variaciones que se observan en los resultados obtenidos para el fenol y los esteroides son debidas a los efectos batocrómico e hiperocrómico provocados por la unión entre el anillo A (aromático) y el anillo B.

En el caso del esteroide XX se registran dos señales y los  $\log \epsilon$  obtenidos indican que se trata de grupo aromático (en la literatura (1,13) se reportan  $\log \epsilon$  del orden de 3 para sustituyentes aromáticos), estas dos bandas que se obtienen son debidas a que el pico a  $\lambda = 283\text{nm}$  pertenece al sistema normal que se observó tanto en el esteroide XVIII como en el XIX, y el de  $\lambda = 290\text{nm}$  se debe al efecto parecido al que ocurre cuando se tiene la forma aniónica (fenolato), es decir en el caso del anión (fenolato) se tiene un par de electrones libres, que provocan un efecto batocrómico e hipercrómico; en el caso del esteroide XX el grupo metoxilo presenta una estructura semejante a la del fenol y no a la del fenolato ya que no se tiene un par de electrones libres, pero la tendencia del grupo metilo a meter electrones al sistema provoca el efecto batocrómico e hipercrómico. Los 2 fenómenos ocurren en la molécula por lo que ambos se observan en el espectro de U.V. obtenido (ver el espectro U.V. XX en el apéndice I). Para comprobar lo anterior se corrió el espectro de U.V. del anisol, obteniéndose también 2 bandas, una a  $\lambda = 278\text{nm}$  y  $\log \epsilon = 3.4$  y otra a  $\lambda = 269\text{nm}$  y  $\log \epsilon = 3.2$ . Estos resultados permiten comprobar los resultados obtenidos por el esteroide XX, las diferencias entre las longitudes de onda de max. absorción y  $\log \epsilon$  respectivos que presenta el anisol con respecto a las del esteroide XX son las debidas a la unión del anillo B con el A.

En los 3 esteroides el valor del  $\log \epsilon$  permite comprobar que el tipo de transición es  $\pi \rightarrow \pi^*$ , que es la reportada en la literatura (3,13) para compuestos aromáticos sustituidos.

3)  Este carbonilo aromático lo contiene el esteroide XXI. En este la transición  $\pi \rightarrow \pi^*$  de este sistema generada por el benzoato unido al estradiol predomina sobre la transición  $\pi \rightarrow \pi^*$  generada por el anillo aromático del estradiol, esto debido a que el  $\log \epsilon$  del primero es del orden de 4.27 en cambio el del segundo es del orden de 3.4, por lo que la absorción del primero no permite observar la transición del segundo sistema, es decir, la absorción del primer sistema es 10 veces mayor que la del segundo, lo que no indica que no se presente la segunda transición. Esto es comprobable en el espectro obtenido para el esteroide XXI (ver espectro U.V. XXI en el apéndice I), ya que en el se puede observar una inflexión pequeña a 277nm aprox. la cual no se le puede asignar como máximo ya que comienza a aparecer la banda del sistema carbonílico aromático.

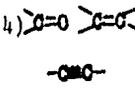
Este sistema como en el caso de las enonas presenta 2 grupos cromóforos, uno que genera transiciones  $n \rightarrow \pi^*$  y otro que genera transiciones  $\pi \rightarrow \pi^*$ . Al ser éste un sistema conjugado de dobles ligaduras, la transición  $\pi \rightarrow \pi^*$  que es la que se observa en la zona del barrido realizado, sufre un efecto batocrómico e hipercrómico,

en cambio la transición  $n \rightarrow \pi^*$  no se observa debido a que su  $\log \epsilon$  es del orden de 1.4.

En la tabla # 3 se observan los valores experimentales de  $\lambda$  y  $\log \epsilon$  obtenidos para el esteroide XXI, así como la  $\lambda$  teórica obtenida a partir de las reglas de Scott (1).

Tabla # 3

<u>Esteroides No.</u>	<u><math>\lambda</math> máx. exp. (nm)</u>	<u><math>\log \epsilon</math> (l mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>)</u>	<u><math>\lambda</math> máx. calc. (nm)</u>
XXI	237	4.27	230

4)  Este tipo de grupos funcionales se encuentran presentes en los esteroides estudiados, pero estas transiciones del tipo  $\pi \rightarrow \pi^*$  y  $n \rightarrow \pi^*$  no son observables en la zona del barrido realizado; ya sea debido a que los grupos alqueno y alquino no se encuentran conjugados y por lo tanto presentan  $\lambda$  máx. de absorción en la zona de U.V. al vacío aún a pesar del efecto batocrómico provocado por el disolvente polar; para el alquino la literatura (2) menciona una  $\lambda$  a 225nm pero con un  $\log \epsilon = 2.2$ , siendo este valor demasiado pequeño para poder ser observado, o bien los esteroides estudiados generan una transición que no permite detectarlo o la concentración que se debe utilizar para poder observar su transición es mayor a la saturación de la solución. Los esteroides que presentan grupos alqueno no conjugados son el II, VI, XI, XV y XVI; los que presentan grupo alquino son el IX, X, XI, XII, XIV, XIX y XX.

El grupo carbonilo genera la transición  $n \rightarrow \sigma^*$  en la zona del U.V. al vacío, por lo que no es observable; y las transiciones  $n \rightarrow \pi^*$  que se observan en  $\lambda$  máx. de 285nm aprox. ocurren con valores de  $\log \epsilon$  pequeños (del orden de 1), por lo que no son observables. Los esteroides que presentan grupos carbonilo no conjugados son el II, IV, V, VI, VII, VIII, IX, XIII, XIV, XV, XVI, XVII y XVIII.

El esteroide VIII presenta aparte del sistema de enona, un grupo aromático no conjugado y solamente monosustituído por un radical alcano, por lo tanto, como ya se mencionó en el punto 2 una de las bandas (la más intensa) se encuentra en la zona del U.V. al vacío por lo que no se observa, la segunda banda se encuentra en la zona en la que comienza a absorber el disolvente (metanol) y la tercera que se encuentra en la zona del barrido realizado no se observa por presentar un  $\log \epsilon$  pequeño.

Los resultados mencionados en los puntos anteriores se encuentran agrupados en la tabla # 4.

Tabla # 4

<u>Esteroides No.</u>	<u><math>\lambda_{\text{máx. exp.}}</math> (nm)</u>	<u><math>\log \epsilon</math> (<math>1 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}</math>)</u>	<u><math>\lambda_{\text{máx. calc.}}</math> (nm)</u>
I	246	4.21	239
II	---	----	---
III	247	4.22	239
IV	246	4.22	239
V	---	----	---
VI	---	----	---
VII	246	4.25	239
VIII	237	4.26	239
IX	---	----	---
X	244	4.24	239
XI	---	----	---
XII	246	4.36	239
XIII	246	4.22	239
XIV	243	4.27	239
XV	---	----	---
XVI	291	4.35	298
XVII	243	4.24	239
XVIII	285	3.64	---
XIX	284	3.30	---
XX	290	3.15	---
	283	3.20	---
XXI	237	4.27	230

## Infrarrojo

Los espectros de I.R. obtenidos de los esteroides estudiados se encuentran en el apéndice I.

El explicar un espectro de I.R. de esteroides es bastante complejo debido a la gran cantidad de bandas presentes, pero se puede emplear una metodología secuencial de obtención de bandas características de grupos funcionales con lo que se facilita el estudio, partiendo del esqueleto básico esteroidal (fig. 8), sólo se observa en el espectro de I.R. absorciones de las uniones C-H, tanto de metilos como de metilenos, teniendo de  $2980\text{cm}^{-1}$  a  $2850\text{cm}^{-1}$  las vibraciones longitudinales ( $\nu$ ) simétricas y asimétricas y en  $1450\text{cm}^{-1}$  y  $1380\text{cm}^{-1}$  las vibraciones de flexión ( $\delta$ ).

Es de hacer notar que la gran cantidad de grupos metileno intensifica la absorción de las bandas  $2925\text{cm}^{-1}$ ,  $2850\text{cm}^{-1}$  y  $1470\text{cm}^{-1}$  comparativamente con las bandas de absorción presentadas por los metilos en  $2960\text{cm}^{-1}$ ,  $2870\text{cm}^{-1}$  y  $1380\text{cm}^{-1}$ .

La facilidad de poder observar las bandas de  $1470\text{cm}^{-1}$  y  $1380\text{cm}^{-1}$  depende de la presencia en el esqueleto esteroidal de grupos funcionales que sobrepongan sus bandas de absorción a éstas o a grupos que debido a la intensidad de su banda de absorción disminuyen la intensidad de las bandas mencionadas.

Cuando en el esqueleto esteroidal se tiene la presencia de insaturaciones se observa la banda del enlace =C-H de  $2970\text{cm}^{-1}$  a  $3000\text{cm}^{-1}$  debida a las vibraciones longitudinales de este grupo. Las vibraciones longitudinales -C=C- se encuentran entre  $1675\text{cm}^{-1}$  -  $1645\text{cm}^{-1}$ .

Las vibraciones de flexión =C-H son observables en la zona entre  $1000$ - $600\text{cm}^{-1}$  dependiendo de la sustitución que presenten, siendo esta zona difícil de trabajar debido a la presencia de un amplio número de bandas.

Las vibraciones longitudinales -C=C- se desplazan a números de onda más bajos ( $1650$ - $1580\text{cm}^{-1}$ ) debido a la conjugación que generan con otras insaturaciones. En el caso de las enonas que presentan algunos esteroides estudiados, la banda se desplaza a  $1610\text{cm}^{-1}$  aprox.. Pero este desplazamiento dependerá también del grupo o grupos insaturados con los que exista conjugación.

En el caso de que la insaturación sea de tipo aromático las bandas de vibraciones longitudinales -C-H aparecen cerca de  $3000\text{cm}^{-1}$  y las de flexión entre  $1000$ - $600\text{cm}^{-1}$  siendo en las bandas de esta zona en donde se puede tener idea del tipo de sustitución que presenta el anillo aromático.

Las bandas de absorción presentadas por el esqueleto aromático aparecen entre  $1600$ - $1450\text{cm}^{-1}$  siendo estos picos muy característicos.

Los grupos funcionales que se encuentran presentes en los esteroides estudiados son ésteres, éteres, cetonas, alcoholes y triples ligaduras, para las cuales se mencionarán sus bandas características.

Las triples ligaduras, presentan vibraciones longitudinales  $\text{-C}\equiv\text{C-}$  entre los  $2260\text{cm}^{-1}$  y  $2140\text{cm}^{-1}$  y las vibraciones longitudinales  $\equiv\text{C-H}$  aparecen cerca de  $3300\text{cm}^{-1}$ . El problema es que las vibraciones longitudinales  $\text{-C}\equiv\text{C-}$  no pueden detectarse en los espectros obtenidos, debido a la pequeña intensidad que pueden dar en comparación con las dadas por toda la estructura esteroidal.

El grupo alcohol (considerando también a los fenoles) presenta una banda ancha en la zona de  $3600\text{cm}^{-1}$  a  $3200\text{cm}^{-1}$  muy característica de vibración longitudinal  $\text{-O-H}$  y la vibración longitudinal  $\text{C-O}$  entre  $1200\text{cm}^{-1}$ - $1050\text{cm}^{-1}$ , siendo ésta la zona que permite tener idea de que tipo de alcohol es (primario, secundario, terciario o fenol).

El grupo éter presenta bandas del enlace  $\text{C-O-C}$  en la zona de  $1275$ - $1000\text{cm}^{-1}$  y en caso de presentarse como metoxilo presenta banda entre  $2850$ - $2800\text{cm}^{-1}$  dando una idea de si es aromático o alifático.

El grupo carbonilo presenta la vibración longitudinal  $\text{=C=O}$  en la zona de  $1900$ - $1650\text{cm}^{-1}$ , presentándose el de las cetonas por  $1715\text{cm}^{-1}$  y el de los ésteres por  $1735\text{cm}^{-1}$ , además de que estos últimos presentan 2 bandas intensas entre  $1300$ - $1050\text{cm}^{-1}$ . El grupo carbonilo también se desplaza a números de onda menores si éste se encuentra conjugado como en el caso de las enonas presentes en algunos de los esteroides estudiados y que su banda se desplaza alrededor de  $1660\text{cm}^{-1}$  aprox..

Solamente se han mencionado los datos más importantes que presentan los grupos funcionales presentes en los 21 esteroides estudiados, para una mayor información es conveniente la revisión de las tablas del libro de Nakanishi (5) u otra publicación especializada.

Los resultados obtenidos por medio de los espectros de I.R. realizados a los 21 esteroides, concuerdan con los resultados esperados por la teoría, ya que se conoce previamente la estructura del compuesto que se estudia.

Los resultados de los espectros de infrarrojo obtenidos se encuentran en la tabla # 5.

Tabla # 5

Esteroides No. I

3520-3380cm <sup>-1</sup> v O-H	1100cm <sup>-1</sup> v C-O (Alcohol secundario)
3000-2700cm <sup>-1</sup> v C-H	1460 y 1380cm <sup>-1</sup> δ C-H no están bien definidos saturados e insaturados)
1650cm <sup>-1</sup> v C=O	1080cm <sup>-1</sup> v y δ -C-(C=O)-C- (Cetona alifática conjugada)
1620cm <sup>-1</sup> v C=C	860cm <sup>-1</sup> δ C-H (Doble ligadura trisustituída conjugada)

Esteroides No. II

3500-3100cm <sup>-1</sup> v O-H	1060cm <sup>-1</sup> v C-O (Alcohol secundario)
3000-2800cm <sup>-1</sup> v C-H	1460 y 1380cm <sup>-1</sup> δ C-H de metilos y metilenos (C saturados e insaturados)
1730cm <sup>-1</sup> v C=O	1040cm <sup>-1</sup> v y δ -C-(C=O)-C- (Cetona alifática)

La banda v C=C trisustituída no se observa y no se puede asegurar la de δ C-H fuera del plano.

Esteroides No. III

3600-3200cm <sup>-1</sup> v O-H	1150cm <sup>-1</sup> v C-O (Alcohol terciario)
3000-2800cm <sup>-1</sup> v C-H	1460 y 1380cm <sup>-1</sup> δ C-H no están bien definidos (C saturados e insaturados)
1660cm <sup>-1</sup> v C=O	1080cm <sup>-1</sup> v y δ -C-(C=O)-C- (Cetona alifática conjugada)
1610cm <sup>-1</sup> v C=C	La δ C-H fuera del plano no se observa (Doble ligadura trisustituída conjugada)

Esteroides No. IV

3000-2800cm <sup>-1</sup> v C-H	1460 y 1380cm <sup>-1</sup> δ C-H no están bien definidos (C saturados e insaturados)
1660cm <sup>-1</sup> v C=O	1070cm <sup>-1</sup> v y δ -C-(C=O)-C- no está bien definida (Cetona alifática conj.)
1610cm <sup>-1</sup> v C=C	860cm <sup>-1</sup> δ C-H (Doble ligadura trisustituída conjugada)
1720cm <sup>-1</sup> v C=O	1260 y 1230cm <sup>-1</sup> v C-O-C (Grupo éster)

Esteroide No. V

3000-2800cm <sup>-1</sup> v C-H	1460 y 1380cm <sup>-1</sup>	no se observan (C saturados e insaturados)
1710cm <sup>-1</sup> v C=O	1080cm <sup>-1</sup> v y δ	-C-(C=O)-C- (Cetona alifática)
1735cm <sup>-1</sup> v C=O	1210 y 1190cm <sup>-1</sup>	v C-O-C (Grupo éster)

Esteroido No. VI

3000-2800cm <sup>-1</sup> v C-H	1460 y 1380cm <sup>-1</sup>	δ C-H no están bien definidos (C saturados e insaturados)
1740cm <sup>-1</sup> v C=O	1200 y 1150cm <sup>-1</sup>	v C-O-C (Grupo éster)

La banda v C=C trisustituída no se observa y no se puede asegurar la de δ C-H fuera del plano.

Esteroido No. VII

3000-2800cm <sup>-1</sup> v C-H	1460 y 1380cm <sup>-1</sup>	δ C-H de metilos y metilenos (C saturados e insaturados)
1680cm <sup>-1</sup> v C=O	1040cm <sup>-1</sup> v y δ	-C-(C=O)-C- (Cetona alifática (Conjugada))
1610cm <sup>-1</sup> v C=C	870cm <sup>-1</sup>	δ C-H no está bien definido (Doble ligadura trisustituída conj.)
1735cm <sup>-1</sup> v C=O	1240 y 1200	v C-O-C (Grupo éster)

Esteroido No. VIII

3000-2800cm <sup>-1</sup> v C-H	1460 y 1380cm <sup>-1</sup>	δ C-H no están bien definidos (C saturados e insaturados)
1680cm <sup>-1</sup> v C=O	1060cm <sup>-1</sup> v y δ	-C-(C=O)-C- no está bien definida (Cetona alifática conj.)
1610cm <sup>-1</sup> v C=C	860cm <sup>-1</sup>	δ C-H (Doble ligadura trisustituída conjugada)
1740cm <sup>-1</sup> v C=O	1300 y 1170cm <sup>-1</sup>	v C-O-C (Grupo éster)
3040-3030cm <sup>-1</sup> v C-H	1600 y 1500cm <sup>-1</sup>	Anillo aromático
	760 y 700cm <sup>-1</sup>	Aromático monosustituído δ C-H

Esteroido No. IX

3500-3200cm <sup>-1</sup> v O-H	1120cm <sup>-1</sup>	v C-O (Alcohol terciario)
3000-2700cm <sup>-1</sup> v C-H	1460 y 1380cm <sup>-1</sup>	δ C-H no están bien definidos (C saturados e insaturados)
1740cm <sup>-1</sup> v C=O	1050cm <sup>-1</sup> v y δ	-C-(C=O)-C- (Cetona alifática)

1610cm <sup>-1</sup> v C=C	880cm <sup>-1</sup> δ C-H (Doble ligadura trisustituída conjugada)
1710cm <sup>-1</sup> v C=O	1360cm <sup>-1</sup> δ C-H (Metil cetona alifática)

Esteroido No. XIV

3050-2800cm <sup>-1</sup> v C-H	1460 y 1380cm <sup>-1</sup> δ C-H de metilos y metilenos (C saturados e insaturados)
1670cm <sup>-1</sup> v C=O	1030cm <sup>-1</sup> v y δ -C-(C=O)-C- (Cetona alifática conjugada)
1610cm <sup>-1</sup> v C=C	900cm <sup>-1</sup> δ C-H (Doble ligadura trisustituída conjugada)
1760cm <sup>-1</sup> v C=O	1250 y 1220cm <sup>-1</sup> v C-O-C (Grupo éster)
3240cm <sup>-1</sup> v ≡C-H	No se observa la v C≡C de la posición terminal (Triple ligadura terminal)

Esteroido No. XV

3000-2800cm <sup>-1</sup> v C-H	1460 y 1380cm <sup>-1</sup> no se observan (C saturados e insaturados)
1720cm <sup>-1</sup> v C=O	1260 y 1190cm <sup>-1</sup> v C-O-C (Grupo éster)

La banda v C=C trisustituída no se observa y no se puede asegurar la δ C-H fuera del plano.

Esteroido No. XVI

3000-2700cm <sup>-1</sup> v C-H	1460 y 1380cm <sup>-1</sup> no se observan (C saturados e insaturados)
1660cm <sup>-1</sup> v C=O	1030cm <sup>-1</sup> v y δ -C-(C=O)-C- (Cetona alifática conjugada)
1620cm <sup>-1</sup> v C=C	1430cm <sup>-1</sup> δ C-H dentro del plano 870cm <sup>-1</sup> δ C-H fuera del plano (Doble ligadura terminal)
1580cm <sup>-1</sup> v C=C-C=O	860cm <sup>-1</sup> δ C-H (Dieno conjugado con cetona)
1720cm <sup>-1</sup> v C=O	1350cm <sup>-1</sup> δ C-H (Metil cetona alifática)
1740cm <sup>-1</sup> v C=O	1240 y 1250cm <sup>-1</sup> v C-O-C 1360cm <sup>-1</sup> δ C-H (Metil éster)

Esteroido No. XVII

3000-2700cm <sup>-1</sup> v C-H	1460 y 1380cm <sup>-1</sup> no se observan (C saturados e insaturados)
1680cm <sup>-1</sup> v C=O	-C-(C=O)-C- no ésta bien definida (Cetona alifática conjugada)

1610cm <sup>-1</sup> v C=C	860cm <sup>-1</sup> δ C-H (Doble ligadura trisustituída conjugada)
1720cm <sup>-1</sup> v C=O	1350cm <sup>-1</sup> δ C-H (Metil cetona alifática)
1740cm <sup>-1</sup> v C=O	1220 y 1180cm <sup>-1</sup> v C-O-C (Grupo éster)

Esteroides No. XVIII

3480cm <sup>-1</sup> v O-H	1250cm <sup>-1</sup> v C-O (Grupo fenol)
3050-2700cm <sup>-1</sup> v C-H	1460 y 1360cm <sup>-1</sup> δ C-H no están bien definidos (C saturados e insaturados)
1730cm <sup>-1</sup> v C=O	1080cm <sup>-1</sup> v y δ -C-(C=O)-C- no está bien definido (Cetona alifática)
1600 y 1500cm <sup>-1</sup> Anillo aromático	860 y 810cm <sup>-1</sup> Aromático trisustituído δ C-H

Esteroides No. XIX

3500-3300cm <sup>-1</sup> v O-H	1050cm <sup>-1</sup> v C-O (Alcohol terciario)
	1250cm <sup>-1</sup> v C-O (Grupo fenol)
3000-2800cm <sup>-1</sup> v C-H	1440 y 1380cm <sup>-1</sup> δ C-H no están bien definidos (C saturados e insaturados)
3300cm <sup>-1</sup> v ≡C-H	No se observa la v ≡C de la posición terminal (Triple ligadura terminal)
1610 y 1500cm <sup>-1</sup> Anillo aromático	830 y 810cm <sup>-1</sup> Aromático trisustituído δ C-H

Esteroides No. XX

3500cm <sup>-1</sup> v O-H	1050cm <sup>-1</sup> v C-O no está bien definido (Alcohol terciario)
3000-2700cm <sup>-1</sup> v C-H	1440 y 1380cm <sup>-1</sup> δ C-H no están bien definidos (C saturados e insaturados)
1240cm <sup>-1</sup> v =C-O-C	2860cm <sup>-1</sup> v -OCH <sub>3</sub> (Metoxilo aromático)
3250cm <sup>-1</sup> v ≡C-H	No se observa la v ≡C de la posición terminal (Triple ligadura terminal)
1600 y 1480cm <sup>-1</sup> Anillo aromático	No se encuentran bien definidas las δ C-H del aromático trisustituído.

Esteroides No. XXI

3440cm <sup>-1</sup> v O-H	1050cm <sup>-1</sup> v C-O (Alcohol secundario)
3000-2800cm <sup>-1</sup> v C-H	1450 y 1380cm <sup>-1</sup> δ C-H de metilos y metilenos

1730cm<sup>-1</sup> v C=O (C saturados e insaturados)  
1260 y 1220cm<sup>-1</sup> v C-O-C (Grupo éster aromáti-  
co)  
1600 y 1490cm<sup>-1</sup> Anillo aromático No se encuentran bien definidas  
las δ C-H del aromático trisustituído y el monosusti-  
tuído.

Resonancia Magnética Nuclear (protónica).

Con el objeto de simplificar el estudio de los espectros de R.M.N. para esteroides se consideró conveniente el agrupar los espectros que generasen señales comunes, sin tomar en cuenta la clasificación de actividad biológica a la que pertenecen.

Así se discutiran los espectros en los siguientes grupos:

- ① -Esqueleto esteroideal.
- ①② -Asignación de los metilos en C-18 y C-19.
- ①③ -Asignación del protón base de C-17 y C-3.
- ①④ -Asignación del protón de la doble ligadura en el anillo A o B y protones del anillo aromático.
- ② -Sustituyente en la posición C-3.
- ③ -Sustituyente en la posición C-17.

① -Esqueleto esteroideal.

La mayoría de los metilenos y metinos del esqueleto esteroideal presentan sus señales correspondientes en la zona de 0.5-3.0ppm. Como se puede observar en los espectros, esta zona resulta sumamente compleja. La asignación de protones de metinos y metilenos resulta muy difícil, no se encontraron en la literatura trabajos para la asignación de estas señales en R.M.N. protónica. Únicamente el Satdler (11) marca para el esteroide No. II (ver espectro No. II) la zona de 2.2-2.7ppm aprox. para los protones del C-7 y C-16 y para el esteroide No. IV (ver espectro No. IV) esta misma zona para el C-2, pero no da mayor información.

Como ya se mencionó esta zona es difícil de analizar y el poder asegurar que estas señales sean generadas por esos protones no se puede tomar tan a la ligera, ya que esos protones no son magneticamente equivalentes debido a su posición (axial y ecuatorial) y presentan una diferencia de 0.5ppm (8,9) donde -- los ecuatoriales se presentan a campos más bajos. Además los metilenos y metinos que se encuentran al lado de un grupo carbonilo se desplazan a campos más bajos, y también aquellos protones que se encuentren vecinos a dobles ligaduras sufren los mismos desplazamientos. Los grupos hidroxilo y éster producen este tipo de desplazamiento aunque no tan marcado como en los dos primeros casos.

Todo lo anterior nos indica que no se puede, al ver esta zona, indicar que tipo de esteroide se tiene. Para tratar de aclarar la interpretación de esta -- zona de los espectros se utilizaron reactivos de desplazamiento químico (sales

de Europio) en el esteroide No. II y XVI (ver espectros XXII, XXIII y XXIV), observando en el caso del XXII y XXIII (en los cuales se agregaron diferentes cantidades de reactivo, siendo mayor cantidad en el XXIII que en el XXII) que el espectro sigue presentando bastante complejidad y no se logra separar las señales de los protones adyacentes a los grupos ya mencionados arriba. En el caso del espectro XXIV, al agregar este reactivo, se observa un desplazamiento de los protones que se encuentran en el C-2, lo que indica que los protones que se encuentran adyacentes al carbonilo se desplazan a campo más bajo. Sin embargo el uso de estos reactivos no llega a aclarar el análisis completo del espectro.

Cabe señalar que en esta zona se observan las señales de ciertos grupos funcionales, que no se comentan en este punto por ser tratados en incisos posteriores.

①a - Asignación de metilos en C-18 y C-19.

R.F. Zürcher (18) así como Bhaacca y Williams (19) realizaron un trabajo exhaustivo para asignar las señales de los metilos 18 y 19 en los espectros de esteroides, demuestran que la posición de estas señales permite una secuencia metodológica, ya que estas posiciones se encuentran muy influenciadas por los distintos sustituyentes de la estructura, fig. 9.

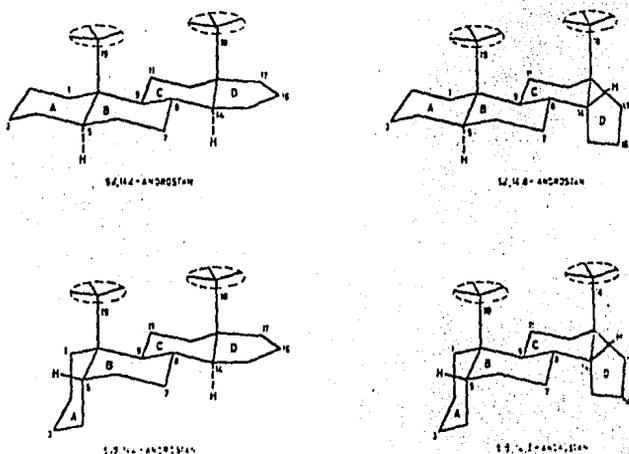


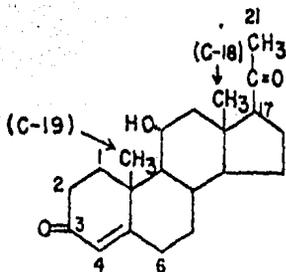
Fig. 9 Posiciones en el espacio de la estructura esteroidal con los C-18 y C-19.

De esto deriva una regla para la asignación a-priori de los desplazamientos químicos para C-18 y C-19, fig. 10.

En los espectros estudiados los  $\delta$  para C-18 y C-19 son los que se repor -

tan en la tabla # 6.

Cabe señalar, que las señales intensas que sobre salen en la zona de 0.5-3.0ppm son las generadas por estos metilos.



	C-19	C-18
5 $\alpha$ , 14 $\alpha$ -androstane (used as reference)	47.5	41.5
3-oxo- $\Delta^4$ system	25.0	4.5
11 $\alpha$ -hydroxyl	7.0	1.5
17 $\beta$ -COCH <sub>3</sub>	-0.5	-5.0
Calculated	79.0 cps	42.5 cps
Found	79.8	42.5

Fig. 10 Ejemplo del uso de las constantes aditivas de Zürcher para el cálculo de los protones de los metilos de C-18 y C-19 de esteroides.

No. Esteroide y espectro	$\delta$ C-18 (ppm)	$\delta$ C-19 (ppm)
I	0.80	1.20
II	0.90	1.10
III	0.95	1.25
IV	0.90	1.26
V	0.85	1.20
VI	0.90	1.30
VII	0.80	1.20

VIII	0.80	1.20
IX	0.90	----
X	0.90	----
XI	0.90	----
XII	1.10	----
XIII	0.70	1.25
XIV	0.90	----
XV	0.83	----
XVI	0.80	1.20
XVII	0.70	1.20
XVIII	0.95	----
XIX	0.95	----
XX	0.92	----
XXI	0.80	----

①④ -Asignación del protón base de C-17 y C-3.

En algunos de los esteroides estudiados se tiene presente el protón base de C-17 (ver los espectros R.M.N. I, IV, V, VII, VIII, XIII, XV y XXI), este protón genera una señal triple entre 4.62-3.75ppm que integra para un protón, solamente en el espectro No. XIII no se observa esta triple señal, debido a que su desplazamiento químico se encuentra en 2.5ppm.

En los casos de los esteroides IV, V, VII, VIII y XV la señal sufre un desplazamiento químico de 4.62<sup>±</sup> 0.02ppm. Esto se debe a que en el C-17 existe además del protón la sustitución de un grupo éster.

En los esteroides I y XXI la señal presenta un desplazamiento químico de 3.75<sup>±</sup> 1.00ppm. Esto es debido a la sustitución de un grupo hidroxilo en el C-17.

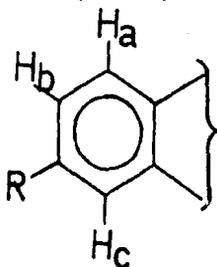
En algunos de los esteroides estudiados se tiene presente el protón base de C-3 (ver los espectros de los esteroides II, VI y XV), este protón genera para los esteroides II, VI y XV una señal múltiple, en el esteroide No. XV esta señal se sobrepone con la señal del protón del C-4. Sus desplazamientos químicos presentan valores diferentes debido a sus diferentes vecindades; para el esteroide No. II el C-3 presenta una sustitución de un radical hidroxilo ( $\delta=3.5$ ), el esteroide No. VI la sustitución de un grupo éster ( $\delta=4.7$ ) y por último el esteroide No. XV que tiene una sustitución de un grupo éster y una doble ligadura alílica, la señal se desplaza a campos más bajos ( $\delta=5.3$ ).

①① -Asignación del protón de la doble ligadura en el anillo A o B y protones del anillo aromático.

La mayoría de los esteroides estudiados presentan ya sea una doble ligadura o un anillo aromático, en este inciso tocaremos los resultados que obtenemos para los protones de estos grupos. Hablaremos primero de las dobles ligaduras; en la mayoría de los esteroides (ver espectros I, III, IV, VII, VIII, X, XII, XIII, XIV y XVII) tenemos presente una doble ligadura entre los C-4 y C-5 conjugada con el grupo carbonilo que se tiene en el C-3, siendo el protón del C-4 el que genera una señal simple con un valor de desplazamiento químico de  $5.81^{+0.09}$ ppm. El protón de la doble ligadura en el anillo A de los esteroides XI y XV presenta una señal sencilla a un desplazamiento químico de 5.40ppm y 5.35ppm respectivamente.

Los esteroides No. II y VI presentan doble ligadura en el anillo B, el protón de la doble ligadura da una señal donde se observa el acoplamiento de éste con los protones del C-7 a un desplazamiento químico de  $5.45^{+0.05}$ ppm.

Los esteroides estrógenos presentan un anillo aromático en el anillo A de la estructura esteroidal (ver los espectros de los esteroides No. XVIII, XIX, XX y XXI). Para estos 4 esteroides el sistema presentado por los protones es un sistema ABC lo que da una zona común de señales entre 6-8ppm, con valores de desplazamiento químico y acoplamiento de espín del orden de:



Protón	$\delta$ (ppm)	J (Hz)
Ha	$7.31^{+0.22}$	$J_{a-b}=8\text{Hz}$ $J_{a-c}=0\text{Hz}$
Hb } Hc }	En este caso la señal generada por el Hc - se sobrepone con una de las dobles señales dadas por el Hb por lo que daremos un solo valor de desplazamiento químico para ambos protones $6.85^{+0.25}$ ppm. Siendo las J para -	

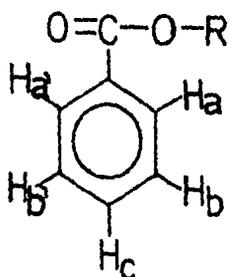
Hb:  $J_{b-a}=8\text{Hz}$  y  $J_{b-c}=3\text{Hz}$ , y para Hc:  $J_{c-a}=0\text{Hz}$  y  $J_{c-b}=3\text{Hz}$ .

Las variaciones que se observan en  $\delta$  dependerán del tipo de sustituyente que se tenga en el C-3, estos valores de  $\delta$  se comprueban utilizando las tablas para cálculo de  $\delta$  para anillo aromático (9) y del que se dan los valores calculados para esteroide No. XVIII para comprobarlos con los obtenidos experimentalmente:

Utilizando la misma nomenclatura que en el punto de arriba se tiene:

Protón	$\delta$ calc. (ppm)	$\delta$ exp. (ppm)
Ha	7.13	7.15
Hb	6.77	6.75
Hc	6.77	6.75

En el caso del esteroide No. XXI (ver espectro de R.M.N. No. XXI) se tiene además del anillo aromático de la estructura esteroideal un grupo benzoato, cuyos protones también presentan señales en la zona de 6-8ppm y un sistema AA'BB'C - obteniendo los siguientes valores de  $\delta$  calculados así como los experimentales:



Protón	$\delta$ calc. (ppm)	$\delta$ exp. (ppm)
Ha,Ha'	8.01	8.30
Hb,Hb'	7.34	7.65
Hc	7.97	

En el caso de los protones Hb, Hb' y Hc se puso como valor experimental un solo valor debido a que esta zona presenta un sistema complejo que no permite el asegurar que pico pertenece a que protón, así como tampoco se pueden observar las J exp..

De los esteroides ya mencionados que presentan protones de doble ligadura o de anillo aromático existen dos casos que resulta conveniente el tratarlos por separado, siendo estos los esteroides No. VIII y XVI.

El esteroide No. VIII presenta un grupo fenilo que se encuentra en el sustituyente del C-17, este fenilo, es responsable de una señal a un  $\delta = 7.3$ .

El esteroide No. XVI presenta tres dobles ligaduras, una entre los C-4,5 y otra entre C-6,7 y una (terminal) en el C-16, estas dobles ligaduras generan en la zona de 5.4-6.2ppm 4 señales, 2 de ellas se encuentran sobrepuestas. Para saber que señal pertenece a que protón, se procedió a agregar reactivo de desplazamiento químico a la solución. Los protones más afectados por el reactivo son el protón del C-4 que se desplaza de 5.9ppm a 7.35ppm, luego el protón del C-7 que se desplaza de 5.5ppm a 5.7ppm y los protones del metileno en el C-16 que varían las 2 señales dadas por éstos de 5.6ppm a 6.0ppm uno y de 5.95ppm a 6.3ppm para el otro.

### ② -Sustituyente en la posición C-3.

Aquí resulta conveniente analizar cada caso por separado:

-Esteroides No. II.- Este esteroide presenta un grupo hidroxilo como sustituyente, su desplazamiento ocurre a 1.68ppm dando una señal intensa que sobresale en la zona de acumulamiento de señales (0.5-3.0 ppm), y que desaparece al agregar  $D_2O$ .

-Esteroides No. VI.- Este esteroide presenta un grupo éster (propílico) que genera un mayor acumulamiento de señales en la zona de 0.5--3.0ppm, aunque en este caso se puede evidenciar que el metileno aparecerá en la zona de 2.3-2.6ppm debido a su vecindad con el grupo carbonilo. Y la señal del metilo debe encontrarse en 1.2-1.5ppm en donde se observan unas señales acumuladas que deben ser de 2 tripletes.

-Esteroides No. XV.- Este esteroide presenta un grupo éster (propílico) igual que en el esteroide anterior, por lo que el mismo razonamiento es válido.

-Esteroides No. XVIII y XIX.- Estos esteroides presentan un grupo hidroxilo fenólico como sustituyente entre 7.0-7.8ppm (señal ancha y difusa) que se sobrepone con las señales generadas por los protones del anillo aromático, al agregar D<sub>2</sub>O la integración disminuye en un protón.

-Esteroides No. XX.- Este esteroide presenta un grupo metoxilo como sustituyente y genera una señal sencilla a 3.8ppm.

-Esteroides No. XXI.- Este esteroide contiene un grupo benzoato ya analizado en el punto ①c.

Todos los demás esteroides presentan un grupo carbonilo en el C-3 con excepción del No. XI que no contiene sustituyente alguno.

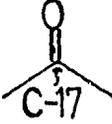
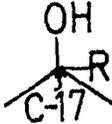
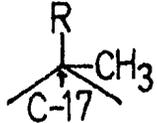
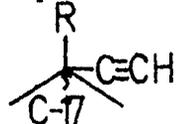
### ③ -Sustituyente en la posición C-17.

Los sustituyentes en C-17 son más variados y ocurre en todos los esteroides estudiados; estos sustituyentes generan una gran variedad de señales. Con el objeto de simplificar su análisis, las señales de los sustituyentes en C-17 se presentan en forma de tabla (tabla # 7). En aquellos casos en que varios esteroides presentan el mismo sustituyente se indicará el valor promedio de su desplazamiento químico, sin olvidar que las variaciones se deben a la estructura esteroideal.

Tabla # 7

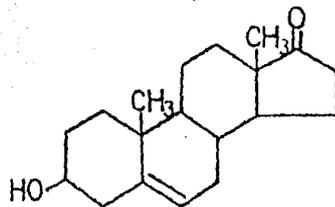
Esteroido No.	Tipo de sustituyente	Señal y desplazamiento químico
IV, V, VI, y XV	Grupo éster (éster propílico) $\begin{array}{c} \text{O}=\text{C}-\text{CH}_2\text{CH}_3 \\   \\ \text{O} \\   \\ \text{C}-17 \end{array}$	En este caso las señales presentes se deben a los protones del metileno y el metilo y esto ya fue tratado en el punto ② en el caso del esteroide No. VI.
XIII, XVI y XVII	Grupo metil cetona $\begin{array}{c} \text{O} \\    \\ \text{C}-\text{CH}_3 \\   \\ \text{C}-17 \end{array}$	Señal sencilla $\delta = 2.14 \pm 0.25 \text{ppm}$ . Intensa.
XIV y XVI	Grupo metil éster $\begin{array}{c} \text{O}=\text{C}-\text{CH}_3 \\   \\ \text{O} \\   \\ \text{C}-17 \end{array}$	Señal sencilla $\delta = 2.1 \text{ppm}$ . Intensa.
VII, VIII y XVII	Grupo éster (VII Ciolepentil y VIII Fenil propionato) (XVII hexanoato) $\begin{array}{c} \text{O}=\text{C}-\text{CH}_2\text{R} \\   \\ \text{O} \\   \\ \text{C}-17 \end{array}$	El VII sus metilenos entran en la zona de acumulación igual que el del esteroide No. XVII. Solamente los metilenos pegados al grupo carbonilo se desplazan a la zona más baja de 0.5-3.0ppm. Del grupo fenil ya se trate en el punto ①②

Tabla # 7 (cont.)

<u>Estercoide No.</u>	<u>Tipo de sustituyente</u>	<u>Señal y desplazamiento químico</u>
II y XVIII	Grupo carbonilo 	No hay señal ya que no hay proton.
I, III, IX, X, XI, XII, XIX, XX y XXI	Grupo hidroxilo 	Señal sencilla $\delta = 1.82 \pm 0.13$ ppm. Intensa.
III y VI	Grupo metilo 	Señal sencilla $\delta = 1.3 \pm 0.15$ ppm en el III se junta con el metilo del C-19. Intensa.
IX, X, XI, XII, XIV, XIX y XX	Grupo acetileno 	Señal sencilla $\delta = 2.64 \pm 0.06$ ppm Intensa.

R=puede ser un H o alguno de los grupos funcionales mencionados arriba.

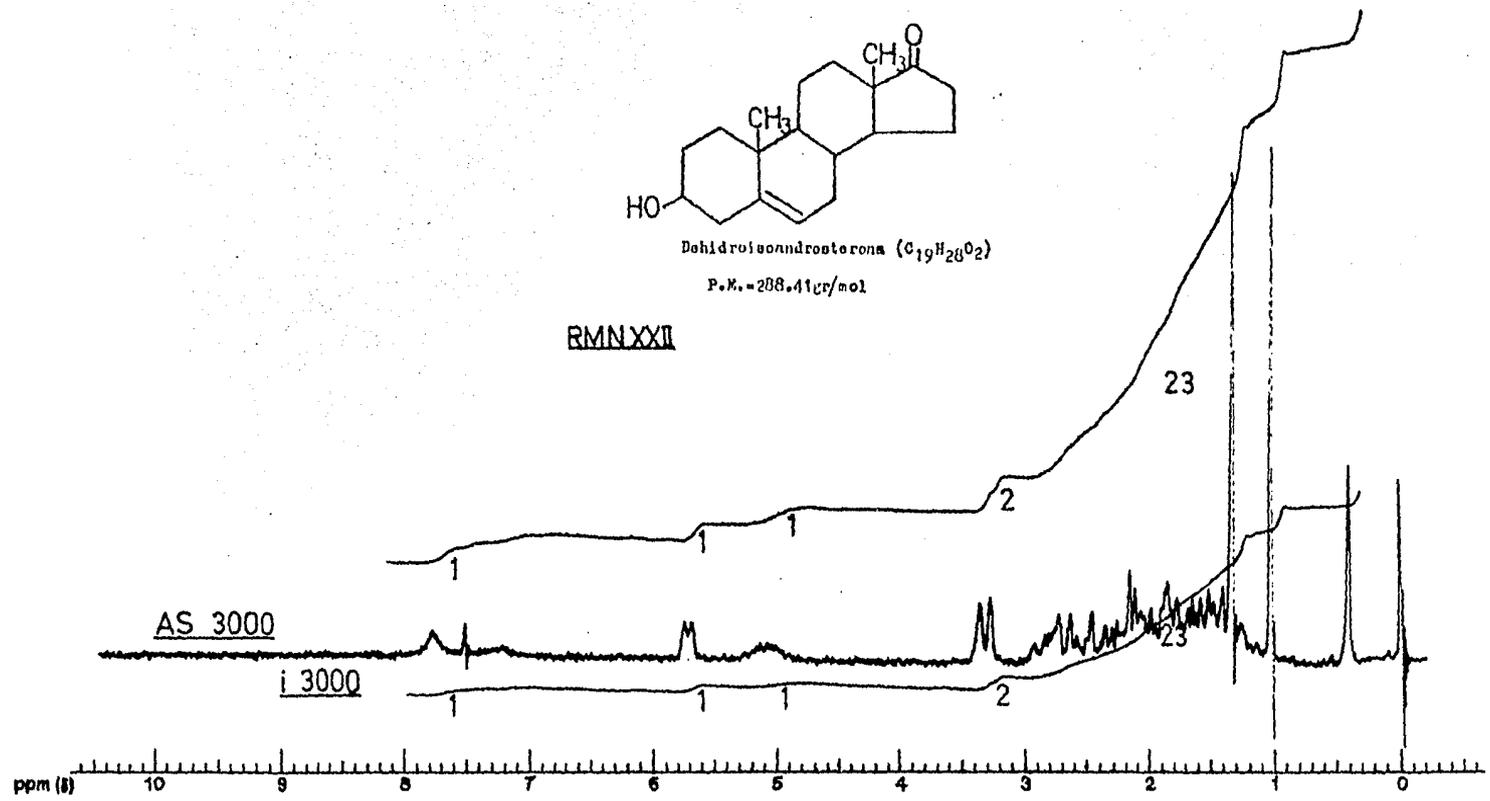
El nivel de significancia utilizado en los límites es del 95%.

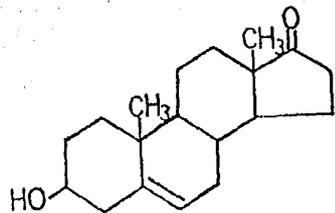


Dehidroisandrosterona (C<sub>19</sub>H<sub>28</sub>O<sub>2</sub>)

P.M. = 288.41 gr/mol

RMNXXII

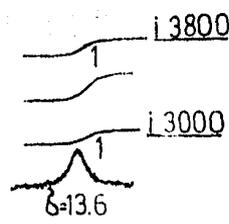




Dehidroandrosterona ( $C_{19}H_{28}O_2$ )

P.M. = 300.41 r/mol

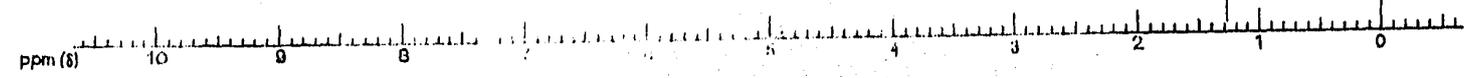
RMN XXIII

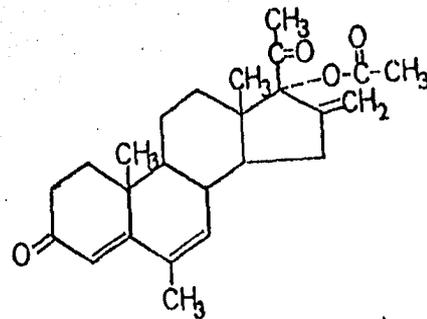


AS 3000

L 3800

25

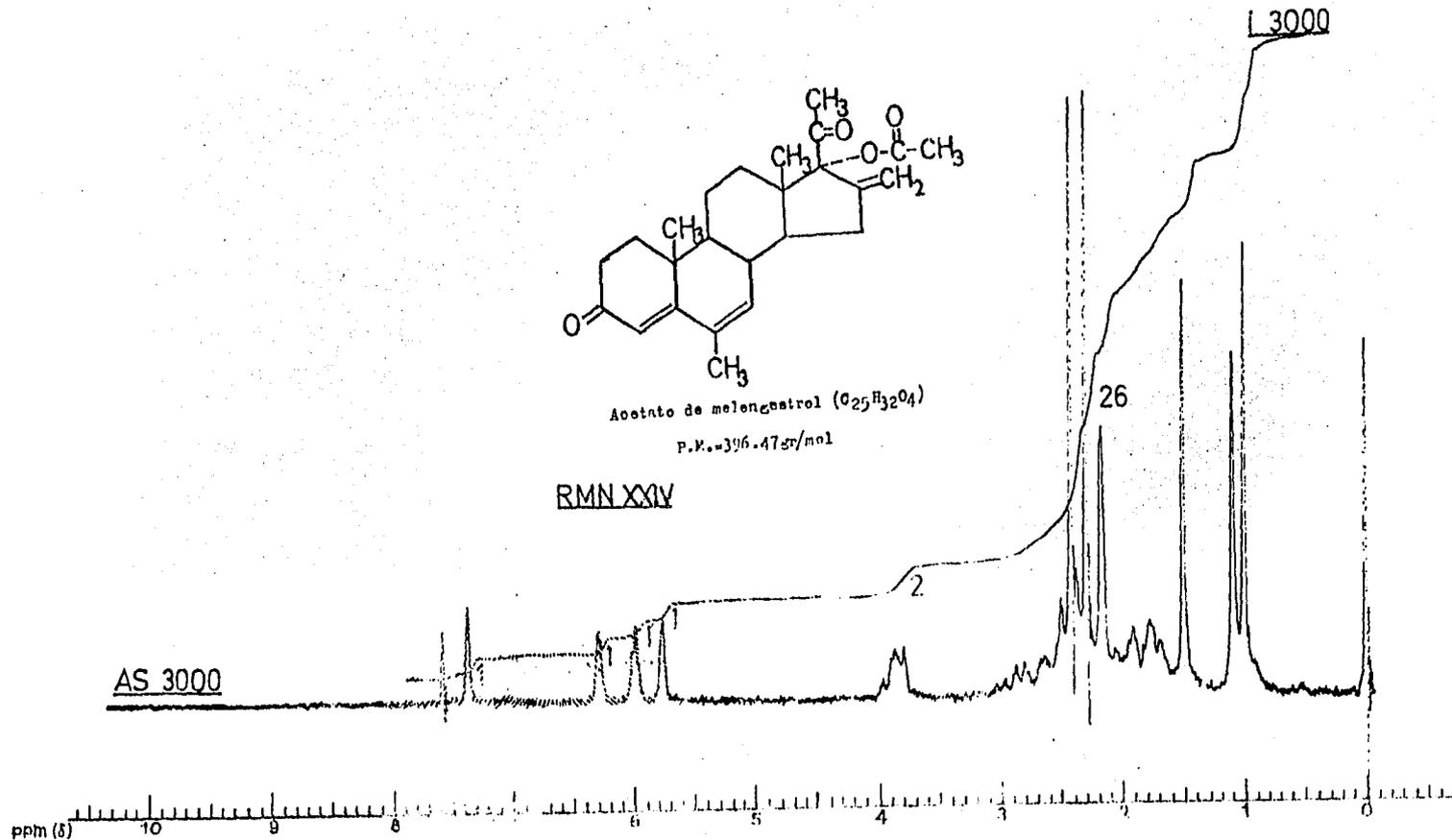




Acetato de melengestrol ( $C_{25}H_{32}O_4$ )

P.M.=396.47 gr/mol

RMN XXIV



## Espectrometría de Masas.

La familia de compuestos químicos quizás más estudiada por espectrometría de masas es la de los esteroides. Para el estudio de los esteroides y la correcta elucidación de su estructura se han preparado un sinúmero de derivados (deuterados en distintas posiciones, metilados, acetilados, etc.) lo que ha permitido un análisis bastante detallado. Es importante hacer notar que un grupo, el de C. Djerasi, ha sido responsable en más del 80%, de todo el trabajo de síntesis y elucidación estructural por espectrometría de masas de esta familia de compuestos.

A pesar de que actualmente se han obtenido los espectros de masas para casi todos los esteroides y sus estructuras son perfectamente conocidas, los mecanismos de fragmentación que se han propuesto aún suscitan dudas y discusión.

En el presente trabajo para la interpretación de los espectros de masas, se partió del concepto de localización de carga, fundamentándose en el trabajo de D. Williams (20). Suponiendo aquí que todo proceso de fragmentación es producto de reacciones unimoleculares, consecutivas y competitivas, y que debido a esto el espectro de masas que se obtiene para un compuesto es la sumatoria de todos los procesos posibles.

Con el objeto de simplificar el análisis de los espectros de los esteroides estudiados, se agruparon distintas rutas de fragmentación comunes a todos ellos, discutiendo por separado los procesos particulares a cada uno de ellos.

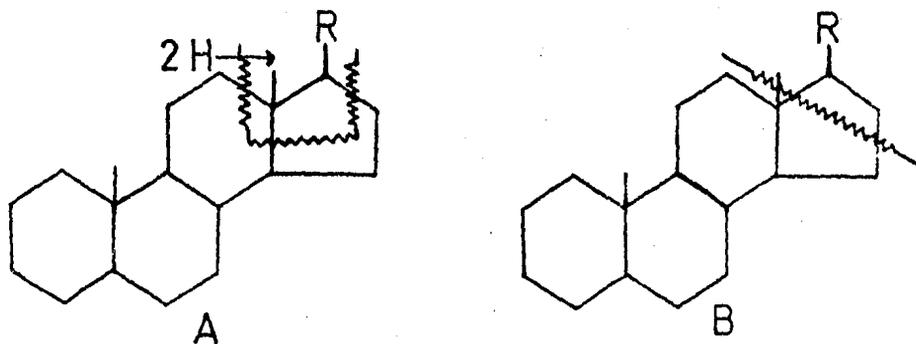
### I) Fragmentación del anillo D.

La fragmentación del anillo D es quizás una de las fragmentaciones mejor documentadas en espectrometría de masas, ésta genera un ion que ha perdido  $(42+R)$  unidades de masa (R es el sustituyente sobre C-17). Esta fragmentación ha sido motivo de estudio desde que Mayo y Reed (21) emplearon por primera vez la espectrometría de masas para la elucidación estructural de compuestos esteroidales.

Esta fragmentación resulta la más común entre esteroides y esteroides C-17 sustituidos, y resulta interesante el observar que las distintas interpretaciones que han sido propuestas para esta fragmentación en particular, involucran, no solo cronológicamente sino también conceptualmente, toda la historia de la espectrometría de masas en química orgánica.

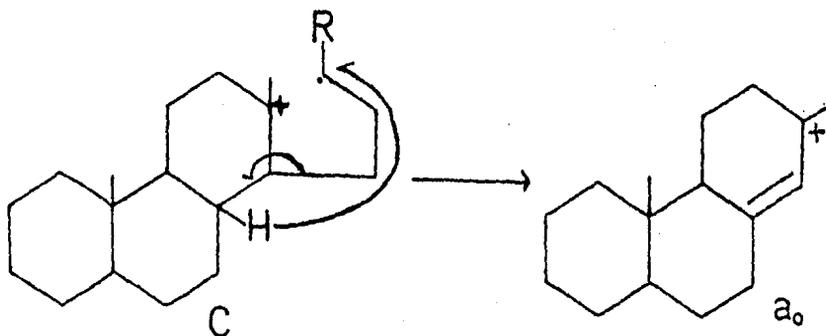
Reed y Mayo propusieron la fragmentación del anillo D en términos de la estructura A sin proponer una estructura para el ion fragmento resultante o preocuparse por dar una explicación a la migración de protones que debería tener lugar, dada su proposición. Friedland (22) propuso la fragmentación en términos de la es-

estructura B, también sin preocuparse por proponer alguna estructura para el fragmento iónico resultante; su proposición, que se mantuvo durante algún tiempo, fue preferida sobre la de Mayo y Read ya que ésta no involucraba la migración de hidrógenos.



Es importante hacer notar que tanto A como B involucran la ruptura de dos enlaces comunes a un átomo de carbono, éste es un proceso rara vez observado en espectrometría de masas y que generalmente procede a través de un extensivo rearrreglo de los iones moleculares.

La tercera proposición la constituye la de Ryhage y Stenhagen (23) quienes propusieron la fragmentación en términos de C, pero fueron los primeros en proponer la estructura  $a_0$  para el fragmento iónico resultante. Esta estructura implica la migración de un protón del C-8 durante la fragmentación (proceso  $C \rightarrow a_0$ ).



La importancia de esta proposición radica en la asignación del ion fragmento como un ion carbonio alílico. Sin embargo tiempo después C. Djerassi y cols. (24) demostraron que la migración del protón de C-12 o C-18 eran igualmente probables para generar dicho ion carbonio alílico.

Finalmente es C. Djerassi (25) quien propone el mecanismo de fragmentación más aceptable y que posteriormente es confirmada por F.W. Mc Lafferty (26).

1) Ruta A<sub>1</sub>

Esta fragmentación presupone como sitio de ionización el enlace formado entre los C-13 y C-17, según se muestra en la siguiente página como ruta A<sub>1</sub>.

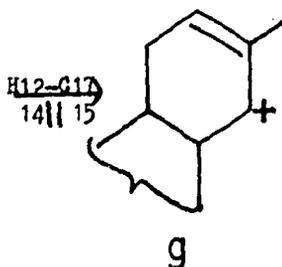
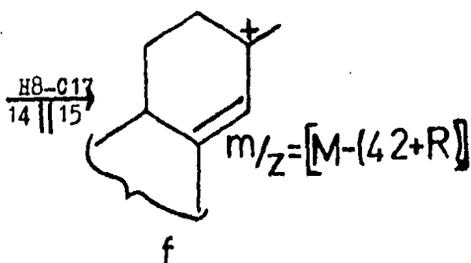
Como se puede observar del mecanismo propuesto, estas estructuras sufren importantes cambios estructurales previos a la fragmentación, ese tipo de cambios ha sido motivo de estudio por varios grupos de investigadores, que sustentan que muchos compuestos orgánicos, en el proceso de ionización fragmentación, pasan por dos estados energéticos (conformacionales) distintos: una configuración de umbral y una configuración reactiva y que ambas no necesariamente son equivalentes. Se presupone que es a partir de la configuración reactiva que ocurren las fragmentaciones.

En el caso de la ruptura del anillo D éste debe liberar una gran cantidad de energía ya que se involucran en el proceso la ruptura o reacomodo de 4 enlaces. En una primera etapa la ionización ocurre sobre el enlace entre el C-17 y C-13 (estructura a) lo que promueve la migración de un protón del metilo C-18 sobre C-17, y la posterior transferencia de un protón del metileno C-16 a C-18 (estructura b) con lo cual la ruptura del enlace C-14-C-15 (estructura c) resulta evidente dejando un radical iónico más estable (estructura e), también se puede realizar la ruptura del enlace C-14-C-15 de la estructura b y realizándose un rearreglo, obtener la estructura d.

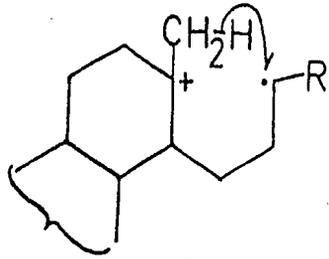
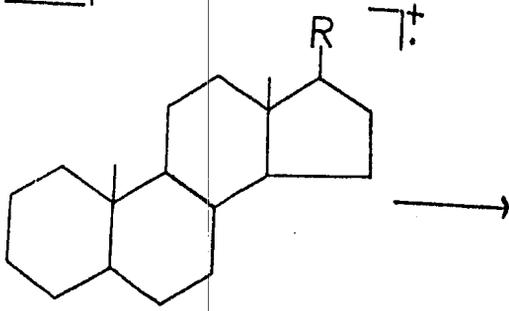
La evidencia de estos procesos de fragmentación fué proporcionada por Djerrasi a través de la preparación de distintos derivados deuterados sobre el anillo D, el metilo C-18 y los sustituyentes en C-17. Requiriéndose de un sustituyente (que no sea hidrógeno) para que esta fragmentación proceda.

Esta fragmentación genera los iones [M-(42+R)] y [M-(41+R)] en los espectros de masas de los esteroides estudiados (ver tabla # 8 bajo ruta A<sub>1</sub>).

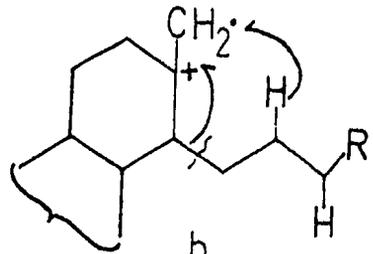
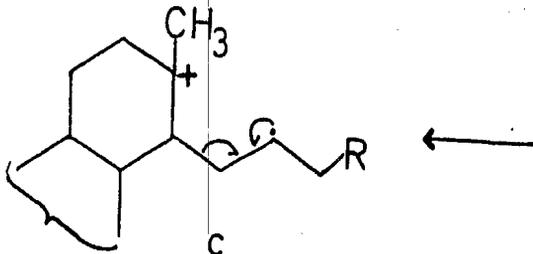
Cabe mencionar que la estructura d puede tomar otro tipo de arreglo dependiendo del rearreglo que se realice y que pueden dar las estructuras f y g que se muestran a continuación:



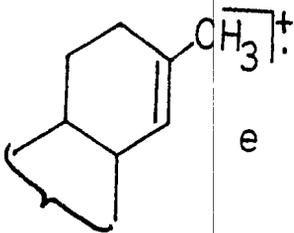
RUTA A1



a



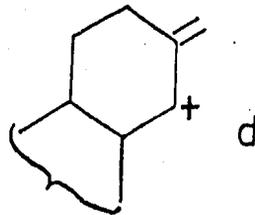
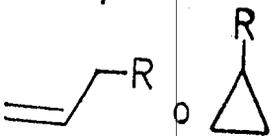
b



e

$$m/z = [M - (41 + R)]$$

+



d

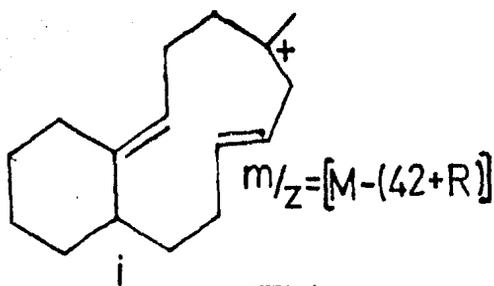
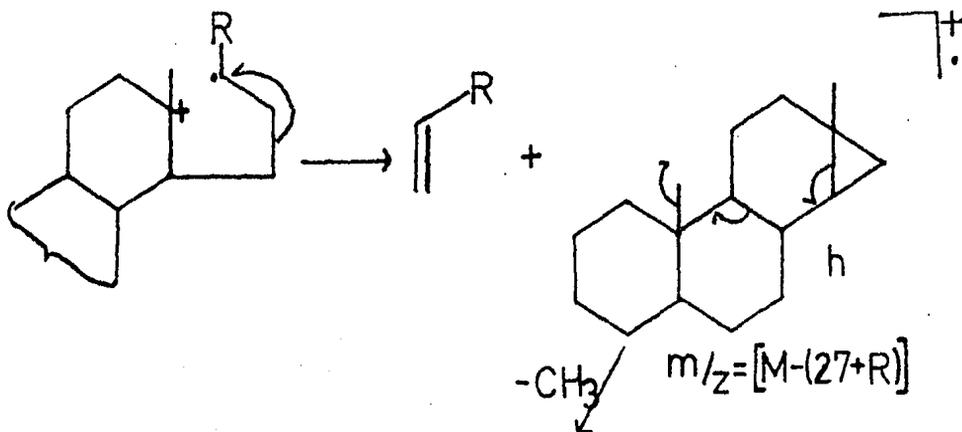
$$m/z = [M - (42 + R)]$$

+



2) Ruta A<sub>2</sub>

Otro proceso de fragmentación propuesto (25) para la ruptura del anillo D pero que involucra la pérdida del metilo angular C-19 es la siguiente:

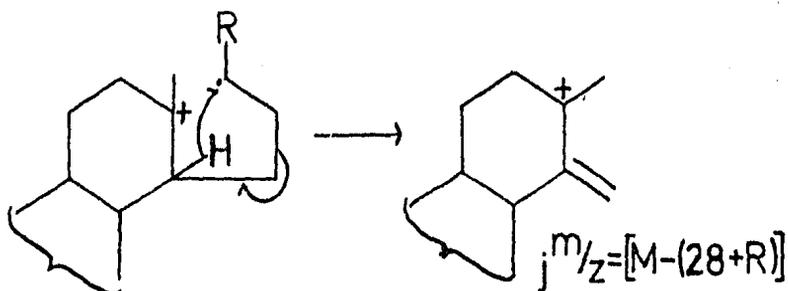


RUTA A<sub>2</sub>

En este proceso de fragmentación estudiado por Djerassi y que se trata de un proceso competitivo con la ruta A<sub>1</sub>, se presenta un complejo sistema de donación de electrones entre los componentes de los anillos B, C y D para generar la estructura i que es altamente estable, además de la presencia de la estructura h, siendo ésta última la evidencia de que esta ruta de fragmentación se lleva a cabo, debido a que la estructura i y d son indistinguibles. Esta ruta de fragmentación en los esteroides estudiados genera los iones reportados en la tabla # 8 bajo ruta A<sub>2</sub>.

3) Ruta A<sub>3</sub>

Otro proceso de fragmentación propuesto para la ruptura del anillo D y que involucra un rearrreglo en el anillo D intercambiando el protón del C-14 en el proceso, es la siguiente:

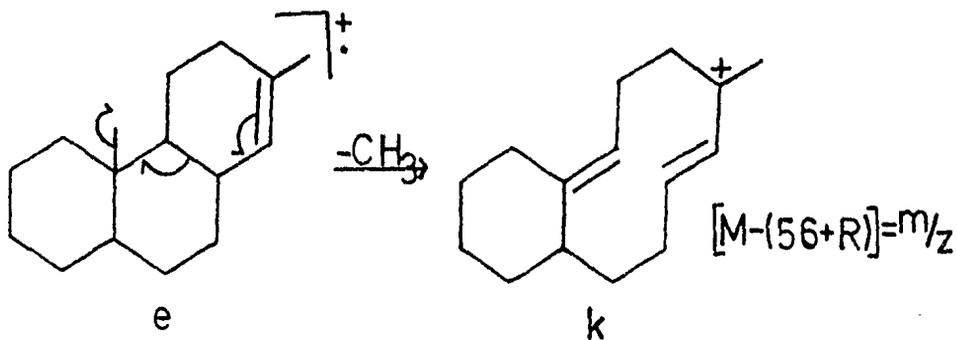


RUETA A<sub>3</sub>

Esta ruta de fragmentación en los esteroides estudiados genera los iones reportados en la tabla # 8 bajo ruta A<sub>3</sub>.

4) Ruta A<sub>4</sub>

La formación de otro ion a partir del reagrupamiento electrónico entre los anillos B, C y D para generar la estructura k a partir de la estructura e obtenida en la ruta A<sub>1</sub>, así como la pérdida del metilo C-19, se presenta a continuación:

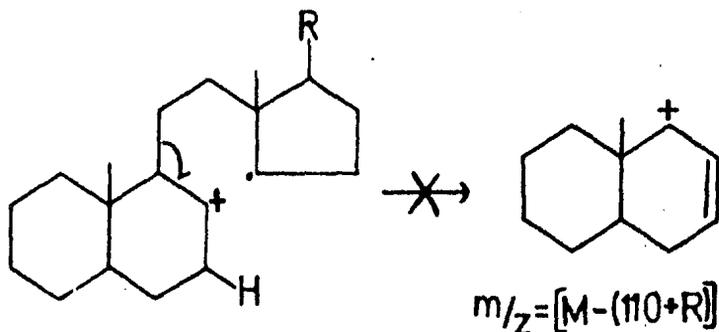


RUETA A<sub>4</sub>

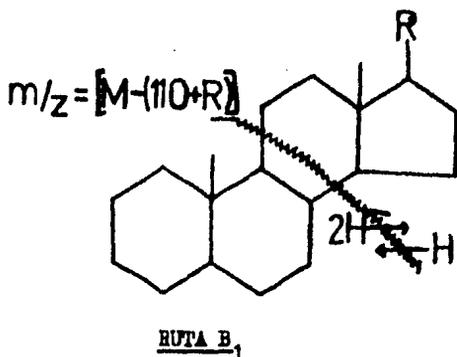
Esta ruta de fragmentación en los esteroides estudiados genera los iones reportados en la tabla # 8 bajo ruta A<sub>4</sub>.

II) Fragmentación del anillo C.

En la literatura se reporta la fragmentación del anillo C, teniéndose la pérdida tanto del anillo C y D junto con un átomo de hidrógeno extra. Biemann (27) sugirió que el protón del C-7 es el átomo de hidrógeno que se transfiere, dando como mecanismo (no siendo éste correcto):



Pero en el trabajo de L. Tőkés y Djerassi (25) comprueba que los anillos A y B forman el ion  $[M - (110 + R)]$  en la fragmentación del anillo C, en este trabajo los investigadores, al deuterar diferentes posiciones comprobaron que el protón del C-7 no era intercambiado, por lo que el mecanismo y estructura propuestos por Biemann no era del todo correcto, siendo propuesto entonces que la fragmentación de este anillo se lleva a cabo a partir de un mecanismo muy complejo que opera en conjugación de una transferencia triple de hidrógenos como se señala a continuación:

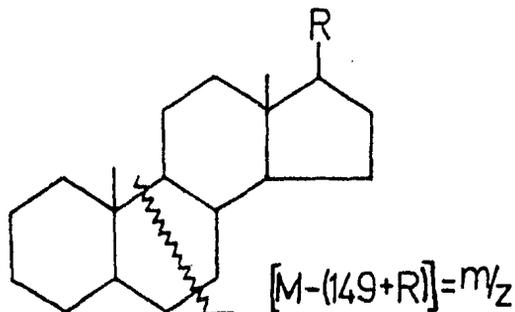


Esta ruta de fragmentación en los esteroides estudiados genera los iones reportados en la tabla # 8 bajo ruta B<sub>1</sub>.

### III) Fragmentación del anillo B.

No se encuentran mecanismos reportados en la literatura para los esteroides estudiados, sobre la fragmentación del anillo B, pero si se menciona en el trabajo de Djerassi (25) sobre la formación de un ion como resultado de la fragmentación del anillo B y que es:

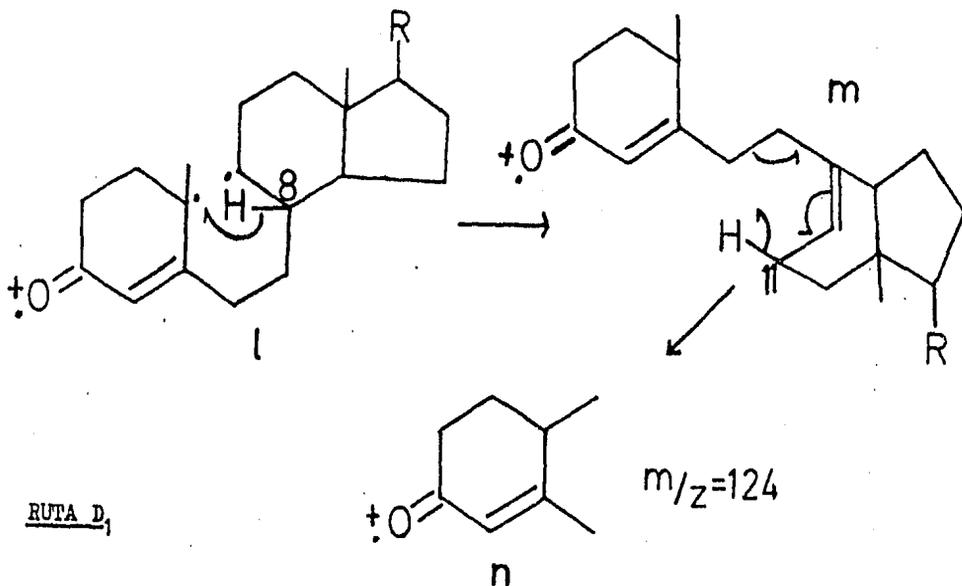
RUTA C<sub>1</sub>



Esta ruta de fragmentación en los esteroides estudiados genera los iones reportados en la tabla # 8 bajo ruta C<sub>1</sub>.

IV) Fragmentación dirigida por el carbonilo, en  $\Delta^4$ -3 cetonas.

Budzikiewicz y Djerassi reportan (26) en la literatura el siguiente mecanismo:

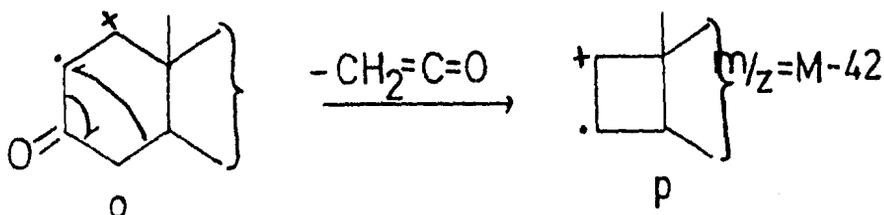


Marcando por medio de deuterio Budzikiewicz y Djerassi comprueban que los hidrógenos específicos transferidos en este tipo de esteroides son los pertenecientes a los C-8 (estructura 1) y C-11 (estructura m) que por medio de un rearrreglo interno nos generan la estructura n que presenta una  $m/z=124$ . En caso de no tener el C-19 (metilo) la  $m/z=110$ .

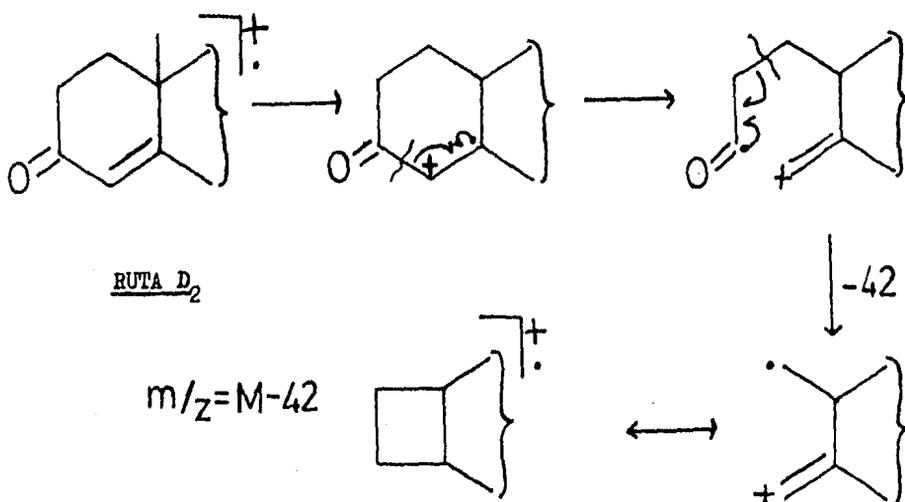
Esta fragmentación se encuentra en la tabla # 8 para los esteroides estudiados bajo ruta D<sub>1</sub>.

V) Fragmentación del anillo A.

Para las Δ<sup>1</sup>-3 cetonas que se trabajan, Budzikiewicz y Djerassi reportan (28) la evidencia de un pico M-42 que proviene de la ruptura del anillo A asociada con la pérdida de una cetena y proponiendo el siguiente mecanismo:



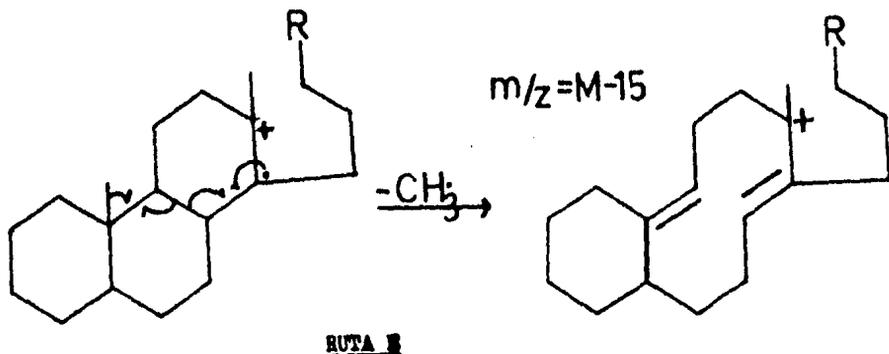
Como se observa se reporta como la ionización de la doble ligadura cercana al grupo carbonilo (estructura o) pudiéndose eliminar la cetena en un proceso homolítico quedando el fragmento cargado en forma de un ciclobutano (estructura p), por lo que para las Δ<sup>4</sup>-3 cetonas se debe presentar la siguiente ruta:



Esta fragmentación se encuentra en la tabla # 5 para los esteroides estudiados bajo ruta D<sub>2</sub>.

VI) Perdida de grupo metilo.

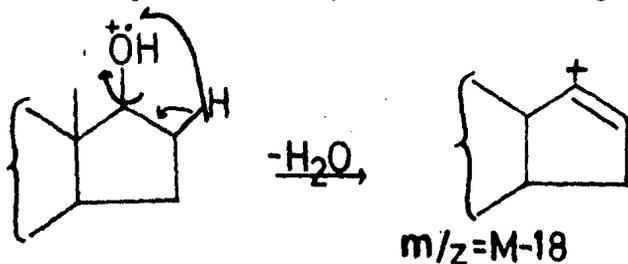
Djerassi y Tőkés (25) al deuteroar diferentes posiciones comprueban que en la pérdida de 15 unidades de masa que es debida a la pérdida de un grupo metilo se tiene que el 80% de la señal es dada al perder el metilo C-19 y el otro 20% del metilo C-18, teniéndose como mecanismo para la pérdida del metilo C-19 el siguiente:



Esta fragmentación se encuentra en la tabla # 8 para los esteroides estudiados bajo ruta E.

VII) Perdida de H<sub>2</sub>O a partir de hidroxilo en C<sub>17</sub>.

Biemann (17) reporta la pérdida de agua con formación de una doble ligadura entre el carbono que tiene al hidroxilo como sustituyente y el carbono adyacente a él con protones disponibles de ceder, el mecanismo es el siguiente:



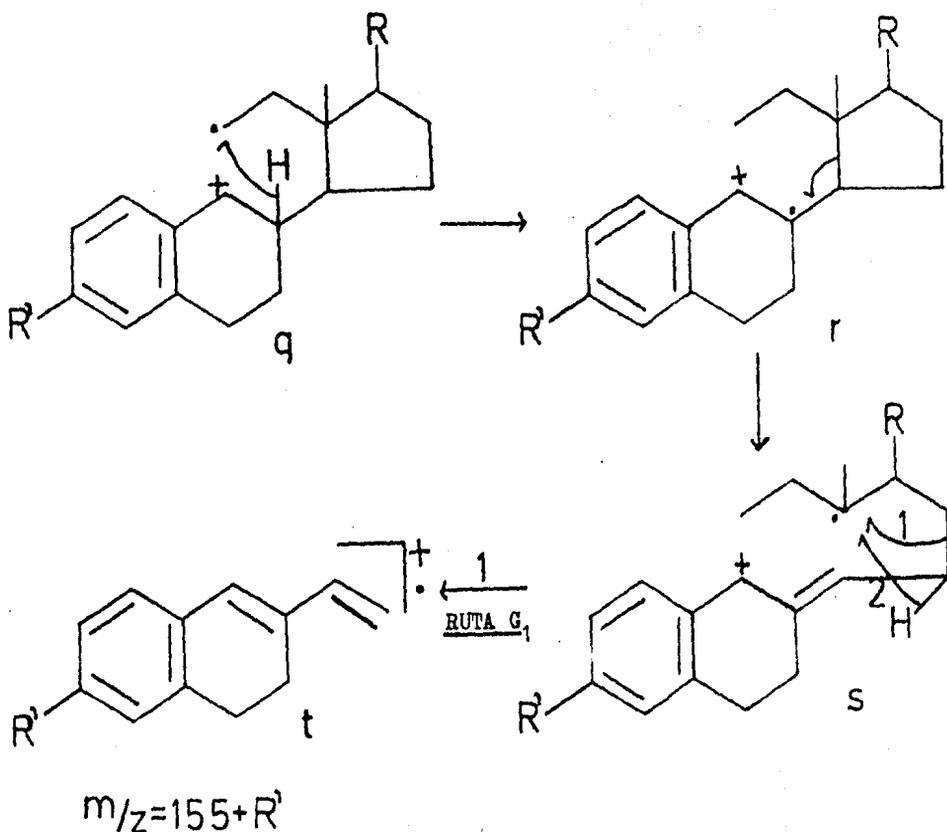
Aquí cabe mencionar que algunas de las señales presentes en los espectros de masas sufren las rutas de fragmentación mencionadas en esta sección después de haber perdido agua, y que se marcaran en la tabla # 8 con la letra F antes de anotar la masa correspondiente, además de que en ésta se encuentra reportada la pérdida de H<sub>2</sub>O bajo ruta F.

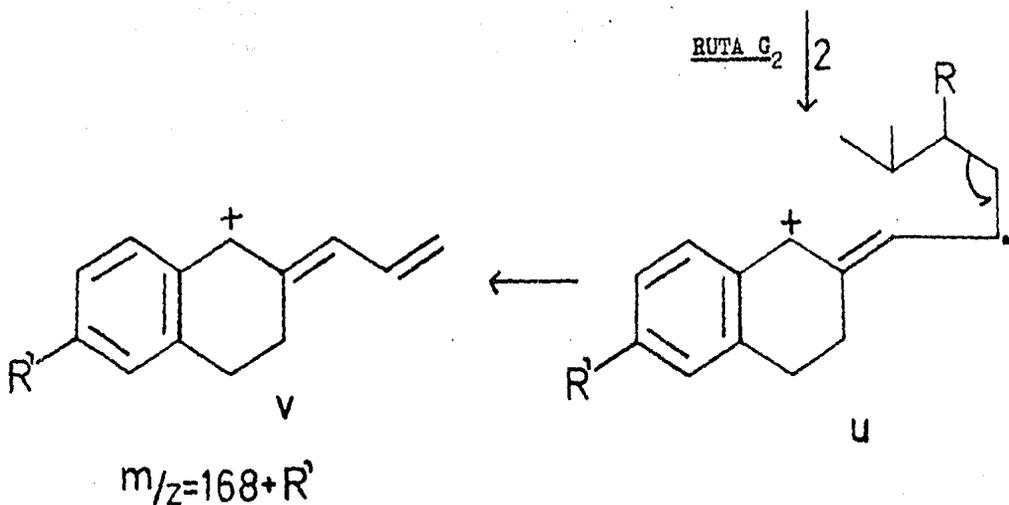
A continuación se escribieran tres rutas de fragmentación que se encuentran presentes en los espectros de masas de los estrógenos.

VIII) Fragmentación del anillo C en estrógenos.

Budzikiewicz y Djerassi (28) reportan para los estrógenos dos rutas de fragmentación en el anillo C además de la que se vió como ruta B<sub>1</sub> y que a diferencia de ésta se realiza un arreglo interno y se modifica el resultado de la fragmentación obtenida.

Ambas rutas presentan unas estructuras en común (estructura q, r y s) y por medio de 2 rearrreglos diferentes se obtienen en una de las rutas un ion estable de estructura t, y en la segunda con el intercambio de un protón se obtiene la estructura u que posteriormente por una ruptura homolítica da lugar a la estructura v, siendo estos mecanismos los siguientes:

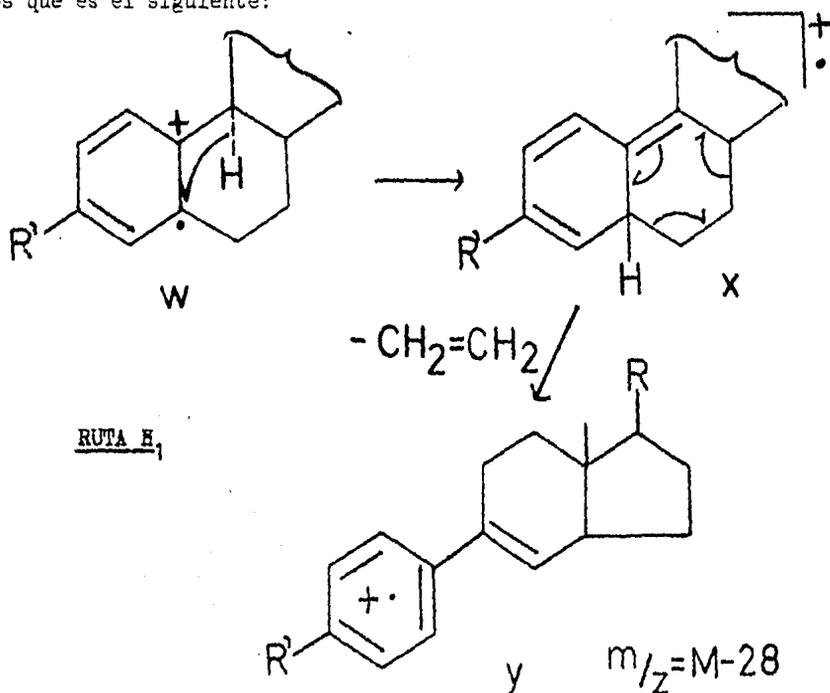




Estas rutas de fragmentación en los esteroides estudiados genera los iones reportados en la tabla # 8 bajo rutas  $G_1$  y  $G_2$ .

IX) Fragmentación del anillo B en estrógenos.

Budzikiewicz y Djerassi (28) reportan un rearrreglo en el anillo B de los estrógenos que es el siguiente:



Como se puede observar si ocurre la migración del protón del C-9 al C-5 del anillo aromático activado (estructura w), la expulsión de etileno por medio de una retro Diels-Alder (estructura x) nos permitirá la obtención de la estructura y.

Esta ruta de fragmentación en los esteroides estudiados genera los iones reportados en la tabla # 8 bajo ruta H<sub>1</sub>.

Es importante hacer notar que las rutas antes mencionadas no son las únicas que se llevan a cabo sino que también todas las rupturas de los diferentes grupos funcionales que se indican en la literatura (2,16) que se presentan en los esteroides estudiados.

TABLA DE RESULTADOS DE m/z Y DE %I DE LOS ESTEROIDES ESTUDIADOS POR LAS DIFERENTES RUTAS.

Tabla # 8

No. de- Esteroides	RUTA A <sub>1</sub>	←→		RUTA A <sub>2</sub>	RUTA A <sub>3</sub>	RUTA A <sub>4</sub>	RUTA B <sub>1</sub>	RUTA C <sub>1</sub>	RUTA D <sub>1</sub>
	M-(41+R)	M-(42+R)		M-(27+R)	M-(28+R)	M-(56+R)	M-(110+R)	M-(149+R)	m/z=124
I	F248 (4.5)	F247 (13.9) 229 (10.4)		270 (6.9)	-----	-----	-----	122 (14.2)	(100)
II	232 (19.5)	231 (19.5)		246 (15.6)	-----	-----	-----	-----	-----
III	-----	229 (14.6)		244 (7.5)	-----	F232 (7.5)	161 (14.8)	122 (19.8)	(41.8)
IV	230 (11.1)	229 (43.9)		-----	-----	-----	161 (7.3)	122 (9.1)	(89.8)
V	246 (9.1)	245 (36.4)		260 (4.5)	259 (22.7)	231 (16.7)	177 (12.1)	138 (95.5)	-----
VI	-----	-----		-----	-----	-----	-----	-----	-----
VII	230 (6.5)	229 (20.7)		-----	-----	215 (6.5)	-----	122 (23.9)	(85.9)
VIII	230 (5.6)	229 (7.4)		-----	-----	-----	161 (11.1)	122 (5.6)	(22.2)
IX	216 (15)	215 (100)		-----	229 (7.4)	201 (7.2)	147 (11.5)	108 (9.8)	(25.9)
X	-----	215 (82.2)		230 (16.5)	-----	201 (14.8)	147 (31.1)	108 (28.2)	m/z=110 (59.3)
XI	202 (16)	201 (16.7)		216 (62.5)	-----	-----	133 (41.7)	94 (37.5)	-----
XII	230 (20.0)	229 (44.0)		244 (28.0)	-----	215 (16.0)	161 (32.0)	122 (32.0)	m/z=110 (81.0)
XIII	230 (5.1)	229 (6.7)		-----	-----	-----	-----	122 (15.6)	(100)
XIV	-----	-----		-----	229 (26.6)	-----	-----	108 (28.1)	-----

Tabla # 8 (cont.)

<u>No. de</u>	<u>RUTA D<sub>2</sub></u>	<u>RUTA E</u>	<u>RUTA F</u>	<u>RUTA G<sub>1</sub></u>	<u>RUTA G<sub>2</sub></u>	<u>RUTA H<sub>1</sub></u>	<u>OBSERVACIONES</u>
<u>Esteroides</u>	M-42	M-15	M-18	(155+R)	(168+R)	M-28	
I	246 (54.5)	273 (7.6)	270(6.9)	-----	-----	-----	
II	246 (15.6)	273 (7.7)	270(11.7)	-----	-----	-----	
III	-----	287(7.9)	284(14.4)	-----	-----	-----	
IV	302(32.5)	-----	-----	-----	-----	-----	Sust. en C <sub>17</sub> : m/z=57 (100)
V	-----	-----	-----	-----	-----	-----	Sust. en C <sub>17</sub> : m/z=57 (57.6)
VI	-----	-----	-----	-----	-----	-----	m/z=268 (100)
VII	370(12.0)	-----	-----	-----	-----	-----	m/z=147 (100)
VIII	-----	-----	-----	-----	-----	-----	m/z=105 (74.1), m/z=91 (59.3)
IX	-----	283(6.1)	280(9.8)	-----	-----	-----	
X	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
XI	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
XII	-----	-----	294 (8)	-----	-----	-----	m/z=91 (100)
XIII	272(74.1)	299(15.6)	-----	-----	-----	-----	Sust. en C <sub>17</sub> : m/z=43 (83)
XIV	298(9.4)	325(27.5)	-----	-----	-----	-----	Sust. en C <sub>17</sub> : m/z=43 (100)

Tabla # 8 (cont.)

No. de Esteroides	RUTA A <sub>1</sub>	↳	RUTA A <sub>2</sub>	RUTA A <sub>3</sub>	RUTA A <sub>4</sub>	RUTA B <sub>1</sub>	RUTA C <sub>1</sub>	RUTA D <sub>1</sub>
	M-(41+R)	M-(42+R)	M-(27+R)	M-(28+R)	M-(56+R)	M-(110+R)	M-(149+R)	m/z=124
XV	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
XVI	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
XVII	-----	-----	-----	-----	-----	-----	124 (16.7)	(16.7)
XVIII	214(14.6)	213(26.1)	228(4.9)	227(6.1)	199(12.1)	145(25.8)	106(10.9)	-----
XIX	214(17.9)	213(100)	-----	-----	199(7.0)	145(17.5)	-----	(12.0)
XX	228(17.1)	227(100)	242(21.2)	-----	213(5.5)	159(14.5)	-----	-----
XXI	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Los valores anetades entre parentesis son los valores de porcentaje de intensidad relativa de la señal con respecto a la altura del pico base.

Es importante señalar que las intensidades relativas son dependientes del tipo y forma de operación del instrumento empleado.

Tabla # 8 (cont.)

<u>No. de</u>	<u>RUTA D<sub>2</sub></u>	<u>RUTA E</u>	<u>RUTA F</u>	<u>RUTA G<sub>1</sub></u>	<u>RUTA G<sub>2</sub></u>	<u>RUTA H<sub>1</sub></u>	<u>OBSERVACIONES</u>
<u>Esteroide</u>	M-42	M-15	M-18	(155+R)	(168+R)	M-28	
XV	-----	-----	-----	-----	-----	-----	Sust. en C <sub>17</sub> : m/z=57 (100)
XVI	354(18.8)	-----	-----	-----	-----	-----	Sust. en C <sub>17</sub> : M-43, M-59
XVII	-----	-----	-----	-----	-----	-----	m/z=99 (100)
XVIII	-----	255(3.6)	-----	172 (40)	185(44.9)	242(7.3)	m/z=270 M* (100)
XIX	-----	-----	-----	172(15.9)	185(8.0)	-----	
XX	-----	-----	-----	186(12.6)	199(6.7)	-----	
XXI	-----	-----	-----	-----	-----	-----	Sust. en C <sub>3</sub> : m/z=105 (100)

CONCLUSIONES DE LA ESPECTROSCOPIA DE ESTEROIDES.

Se ha presentado hasta el momento la asignación de las señales obtenidas en cada una de las técnicas espectroscópicas estudiadas, realizando esta asignación por analogía con la teoría que se reporta en la literatura y que se ha marcado en su momento. Ahora se expondrán las conclusiones a que dan lugar las anteriores asignaciones.

- 1) Los espectros de U.V. permitieron la asignación de grupos cromóforos y su utilidad se reduce al análisis cuantitativo, ya que la elucidación estructural por esta metodología resulta imposible.
- 2) En I.R. fue posible asignar las principales bandas de absorción que se presentaron a los grupos funcionales que constituyen la molécula. Se pone en evidencia que a través de esta metodología y con los espectros presentados en esta tesis se puede realizar una identificación tentativa de estos esteroides, ya que los espectros presentan señales características. Por otro lado con la mecánica establecida y la información aquí contenida debe ser posible la asignación de bandas para otros esteroides y que esto conduzca a su posible elucidación.
- 3) Los espectros obtenidos de R.M.N. como ya se esperaba proporcionaron poca información estructural, sin embargo también fue posible asignar las señales o grupos de señales a los principales grupos funcionales de estas moléculas. Ya que las diferencias en los espectros de esteroides son muy sutiles, la identificación tan solo por R.M.N. podría conducir a errores. La aplicación de esta técnica al análisis cuantitativo de esteroides se encuentra planteada en el apéndice II.
- 4) Los espectros de E.M. nos permitieron la inmediata asignación para cada una de las moléculas, dado que en todos los casos el ion molecular, constituía una señal fácilmente identificable y como se observa en las tablas los pesos moleculares son muy distintos. El problema que presentan estos espectros es que la asignación mecanística de las señales generadas aún no están lo suficientemente clara lo que podría conducir a asignaciones erróneas para los iones fragmentos pero no para la estructura de la molécula.

Como se puede deducir para la correcta elucidación de la estructura molecular de un compuesto desconocido se requiere de la información que proporciona cada una de estas técnicas, y es a través de la interpretación conjunta de toda ella, que se pueden alcanzar resultados coherentes y satisfactorios.

La información contenida en esta tesis puede resultar de interés a distintos

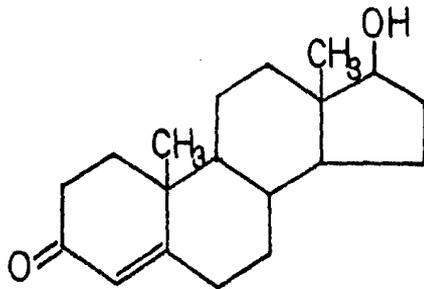
niveles:

- Al químico que pretenda llevar a cabo la síntesis de estos compuestos, ya que los espectros aquí contenidos le pueden servir de referencia y control de sus reacciones.
- A la industria los espectros de referencia aquí contenidos le pueden servir para el establecimiento de adecuados controles de calidad.
- En el área de las ciencias de la salud para la investigación de estos compuestos al ser suministradas a pacientes o en la investigación de sus metabolitos.

APENDICE I

CATALOGO ESPECTROSCOPICO DE ESTEROIDES.

-I-

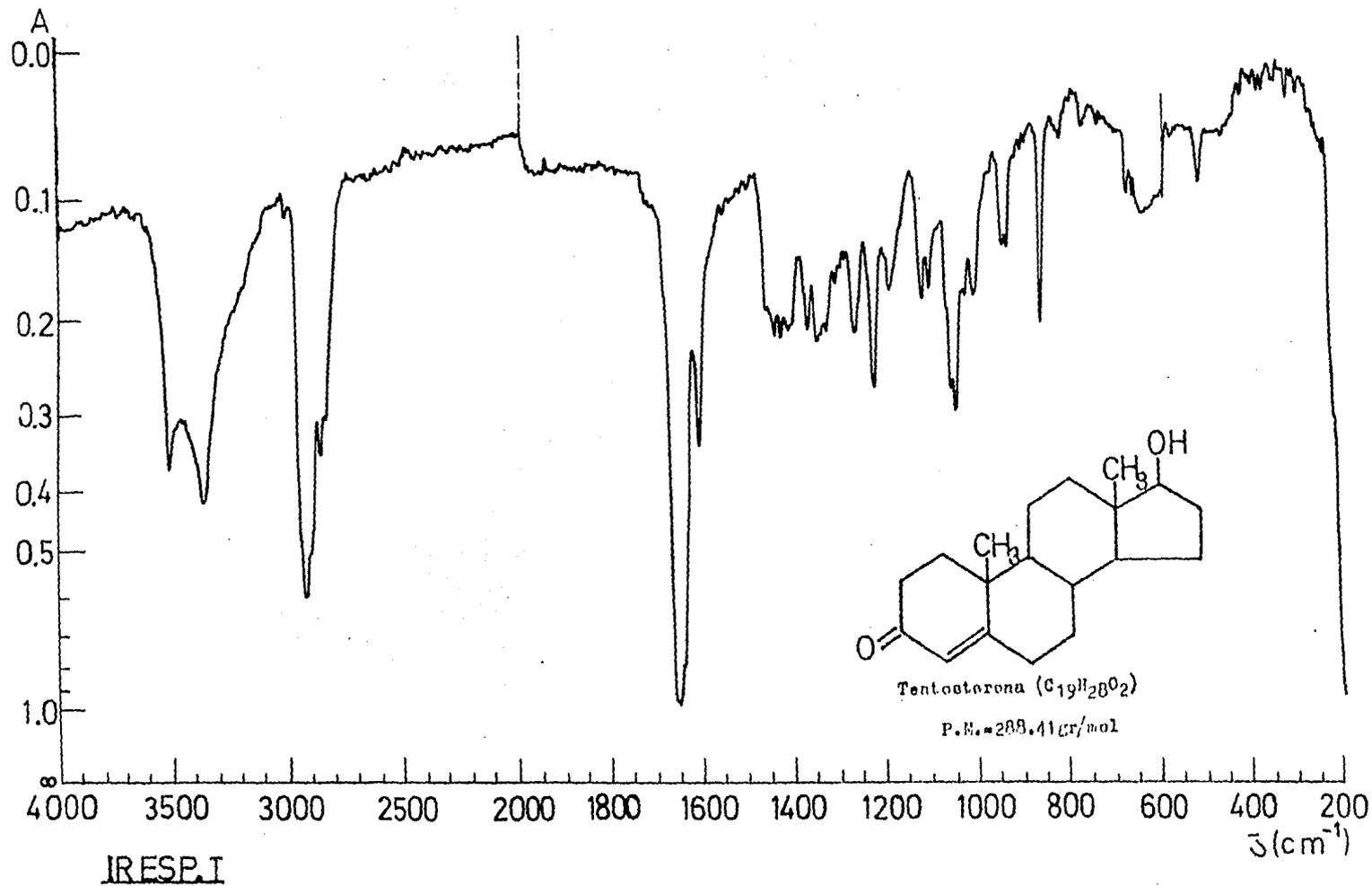


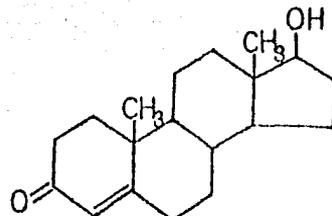
-77-

Testosterona ( $C_{19}H_{28}O_2$ ) P.M.=288.41gr/mol

P. de fusión=153-155°C T.F.=Andrógeno

U.V.: 246nm  $\lambda_{\text{máx.}}$  de absorción.

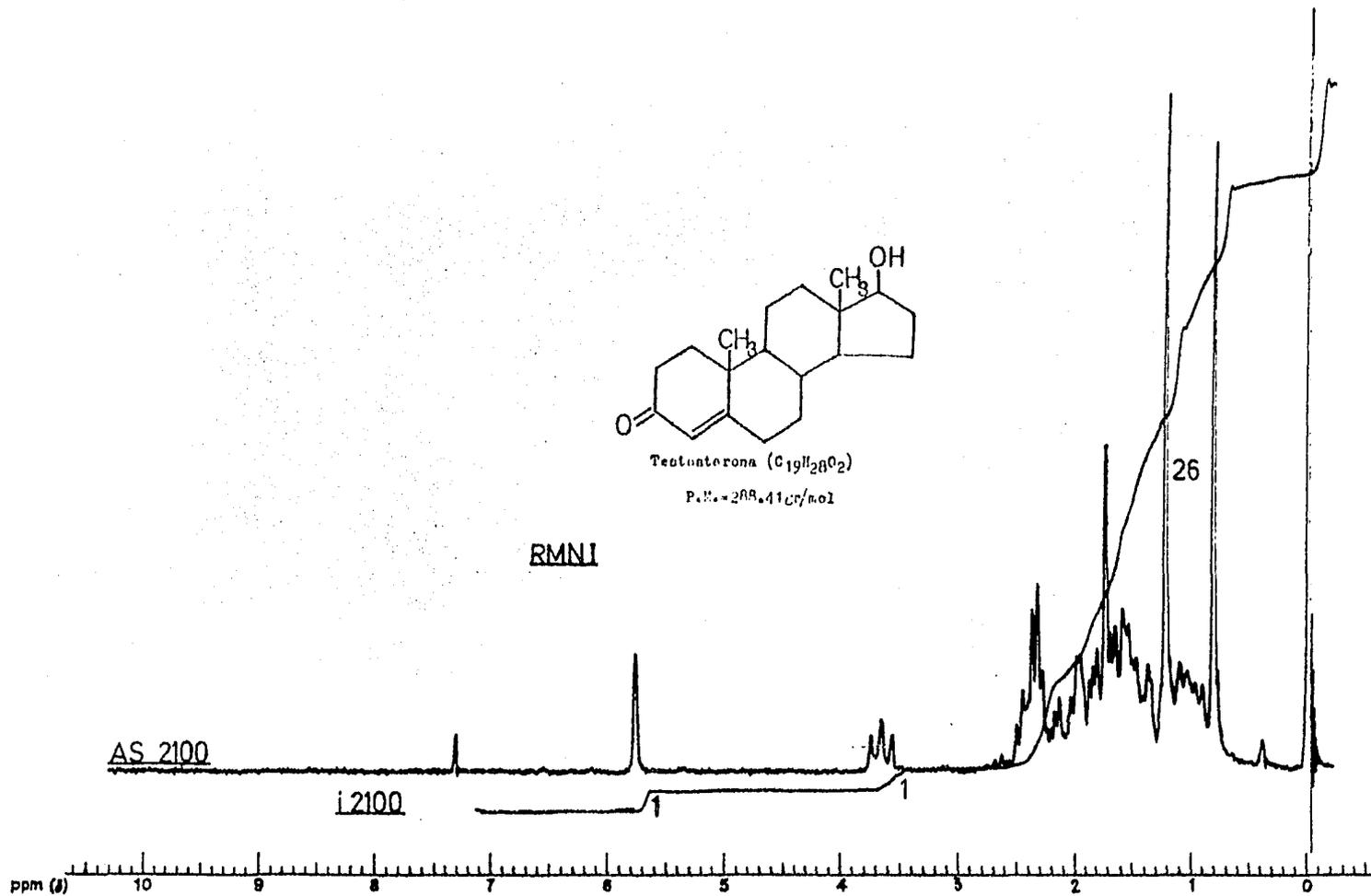


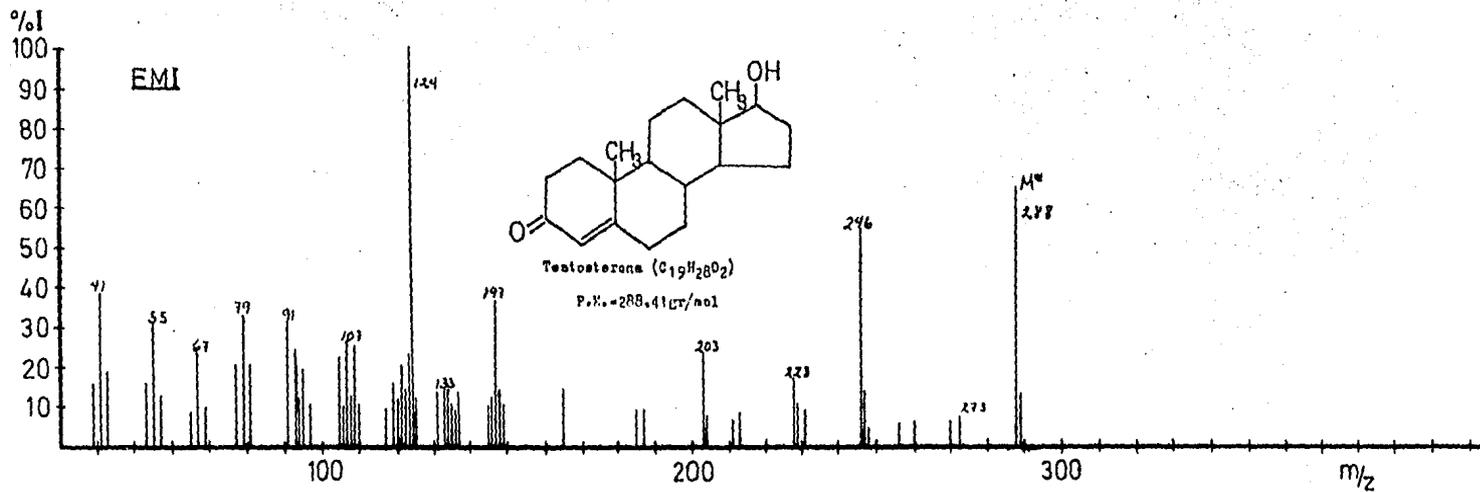


Testosterona (C<sub>19</sub>H<sub>28</sub>O<sub>2</sub>)

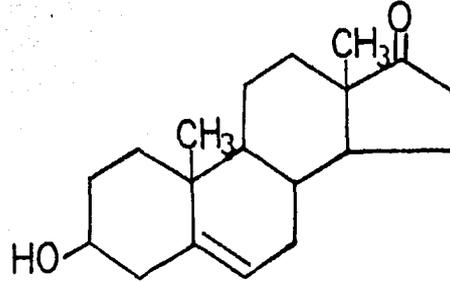
P.M. = 288.4107/mol

RMNI





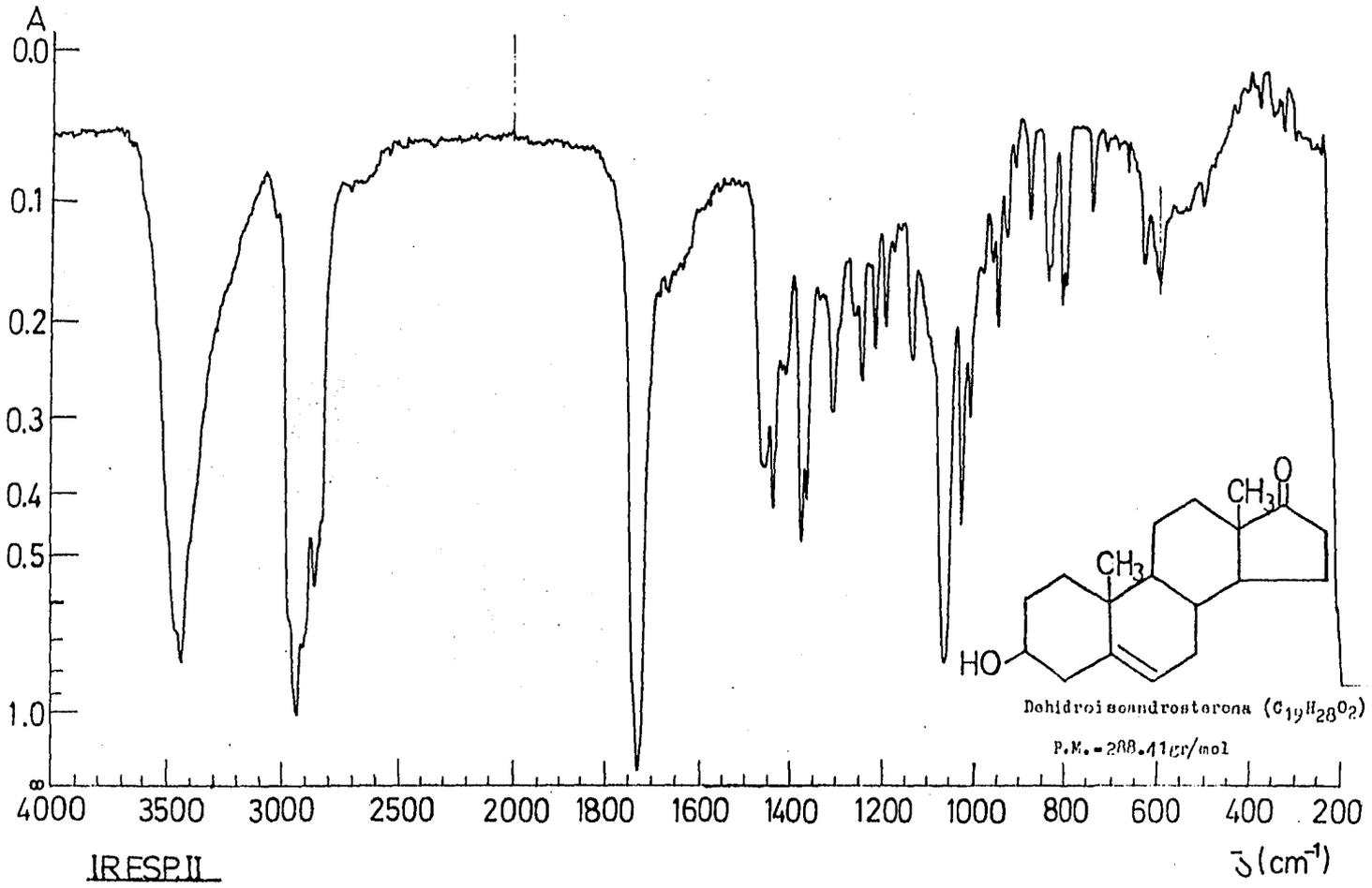
-II-

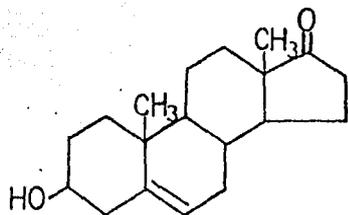


Dehidroisandrosterona ( $C_{19}H_{28}O_2$ ) P.M.=288.41gr/mol

P. de fusión=140-141°C T.F.:Andrógeno

U.V.: —

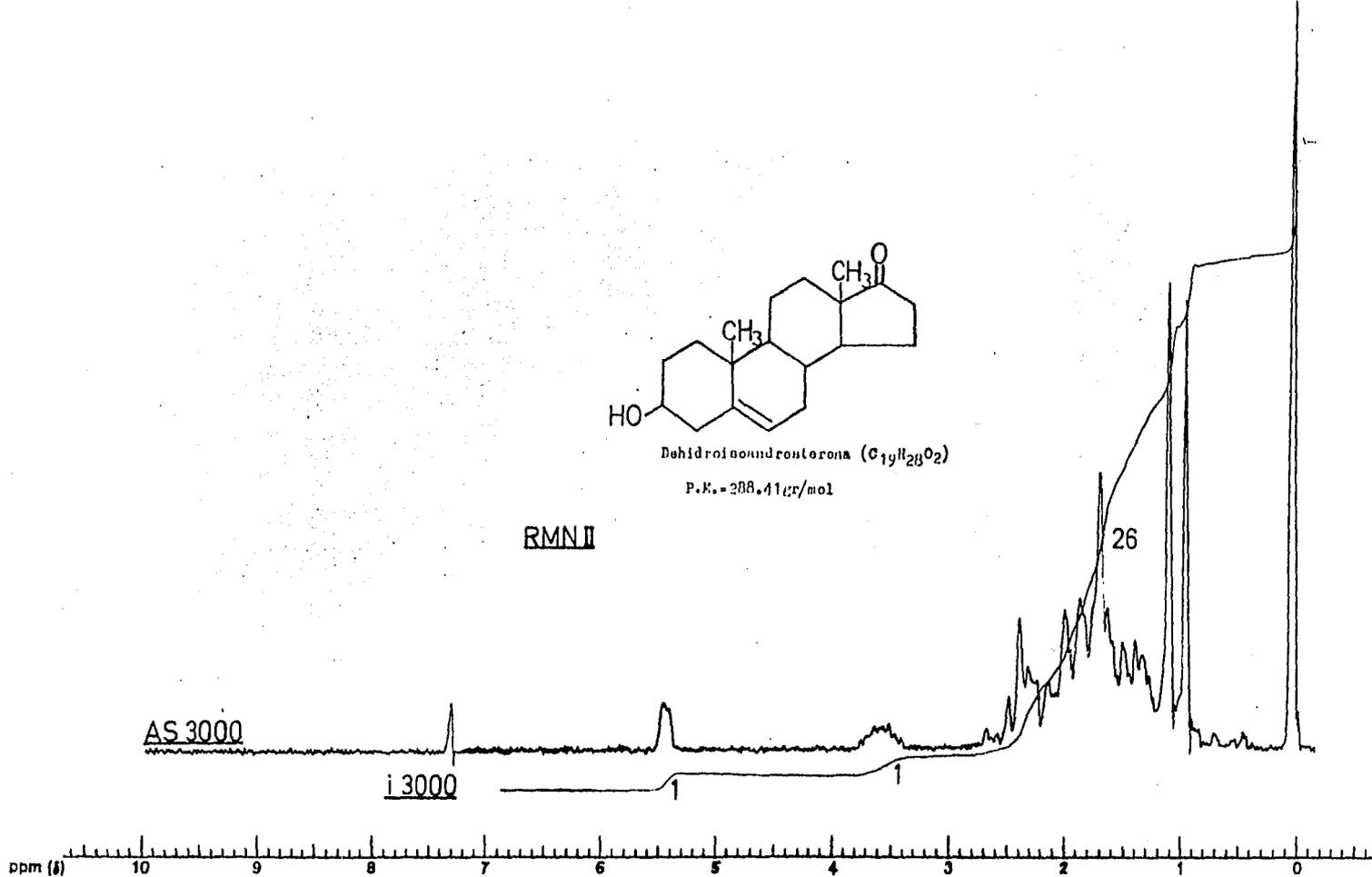


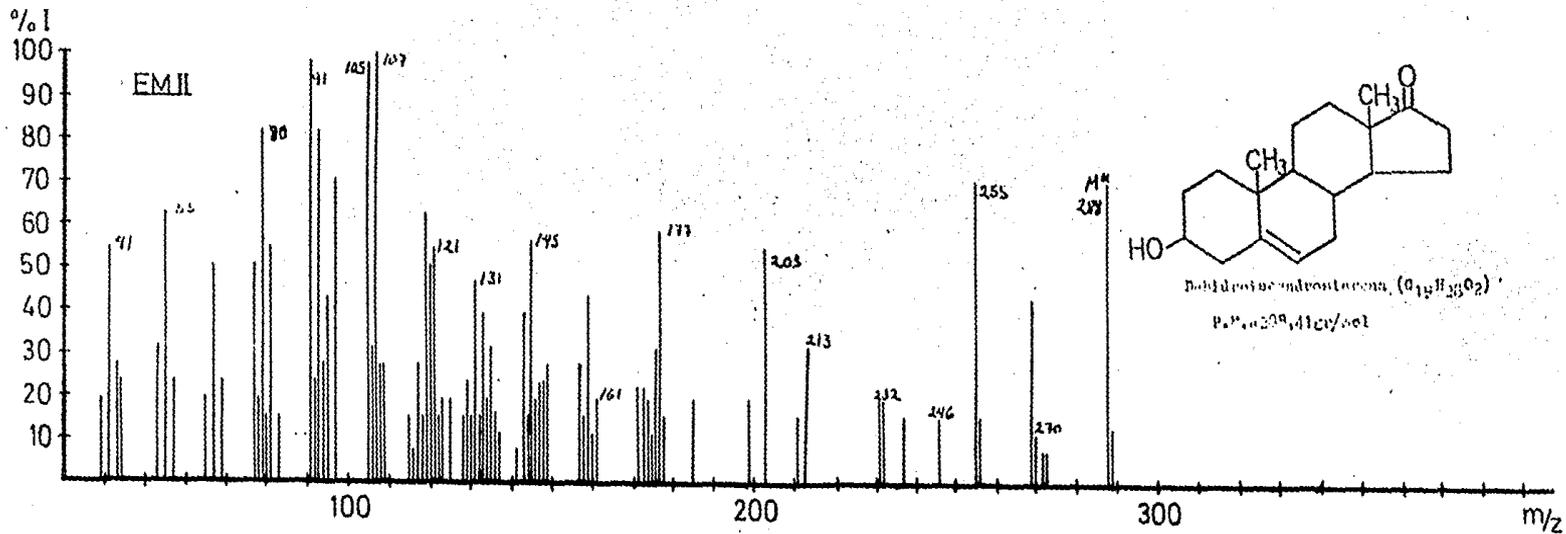


Dehidroandrosterona (C<sub>19</sub>H<sub>28</sub>O<sub>2</sub>)

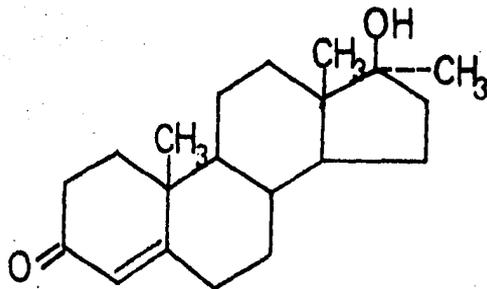
P.K.<sub>a</sub> = 388.41 g/mol

RMN I





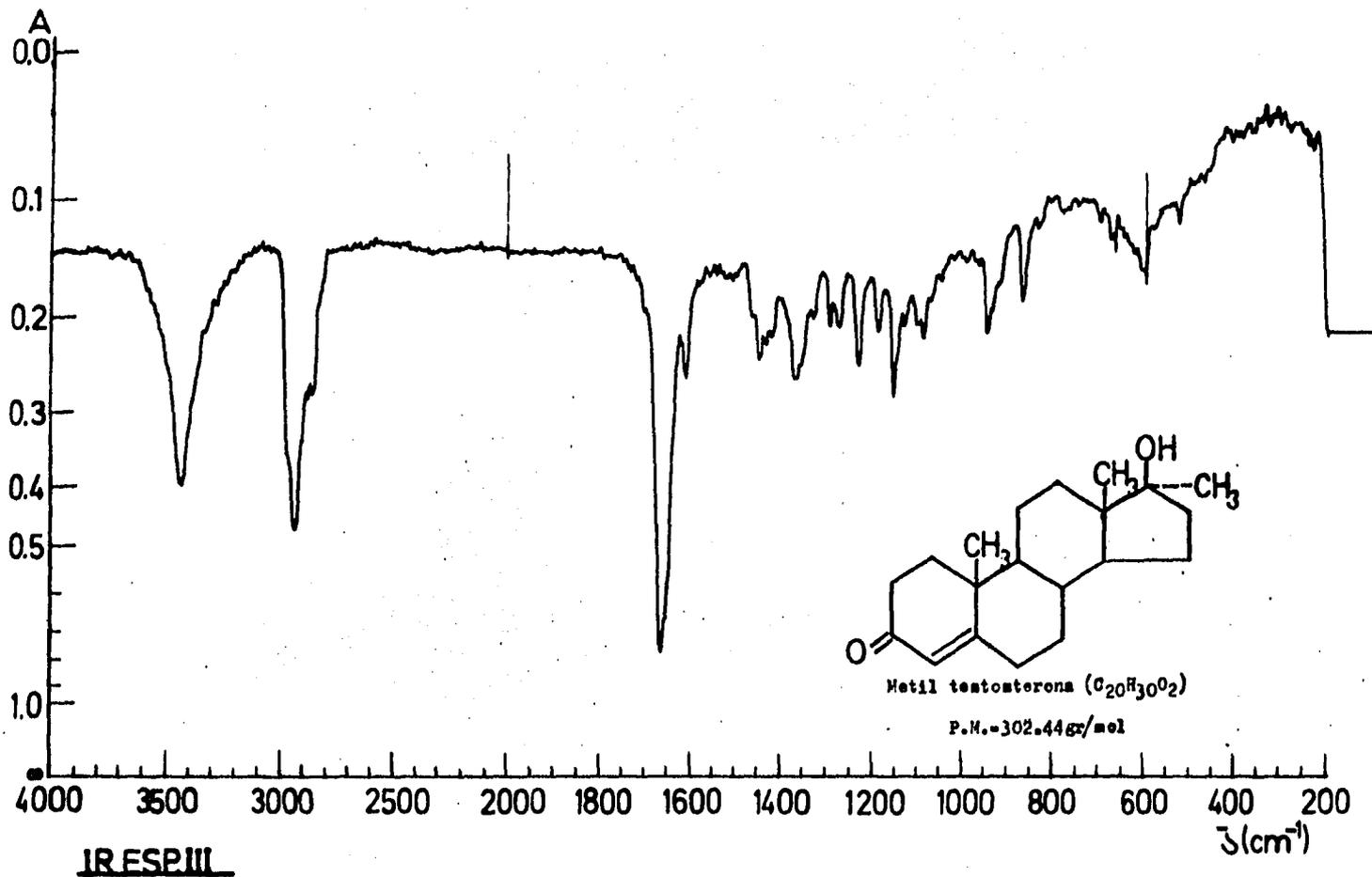
-III-

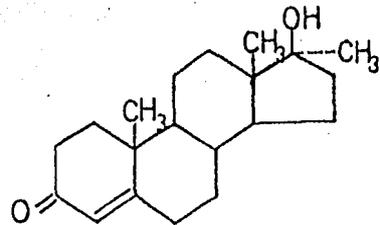


Metil testosterona ( $C_{20}H_{30}O_2$ ) P.M.=302.44gr/mol

P. de fusión=161-166°C T.F.:Andrógeno

U.V.: 247mμ λ máx. de absorción

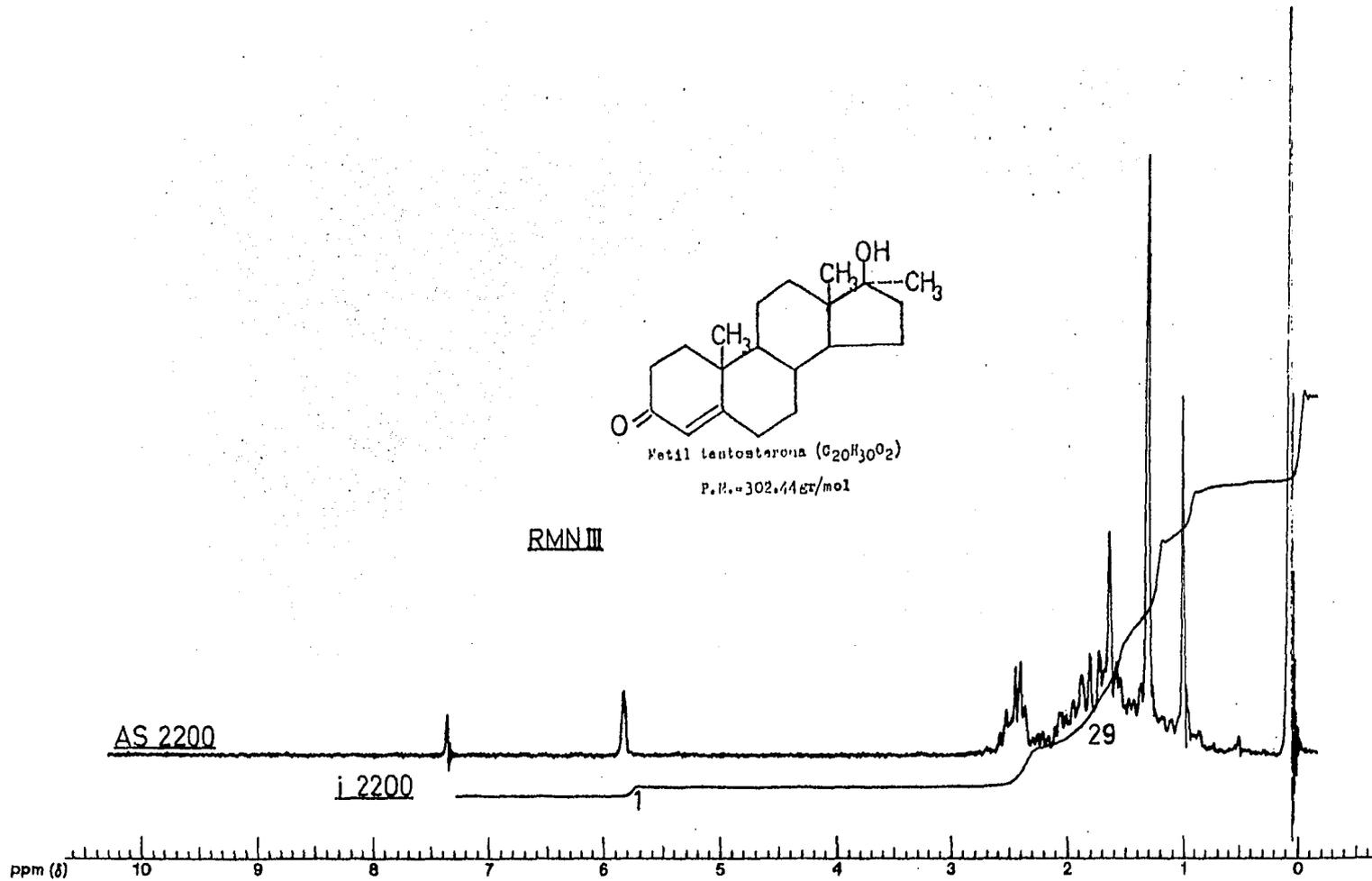


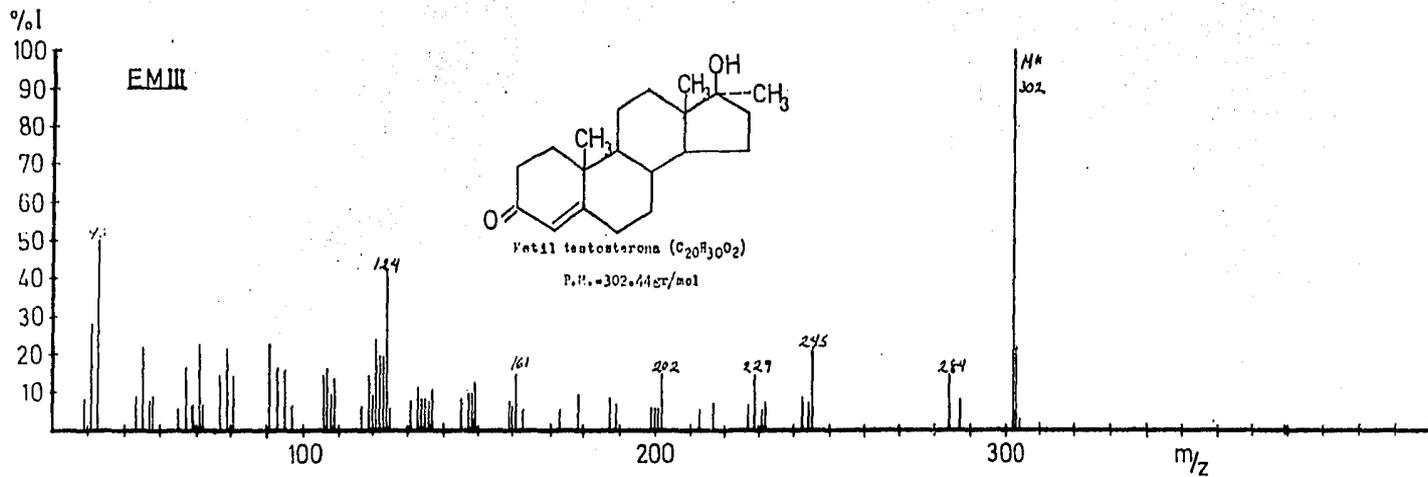


Metil lanosterona ( $C_{28}H_{48}O_2$ )

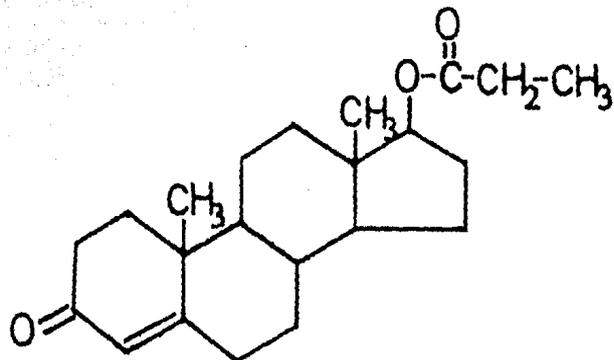
P.M. = 302.44 g/mol

RMN III





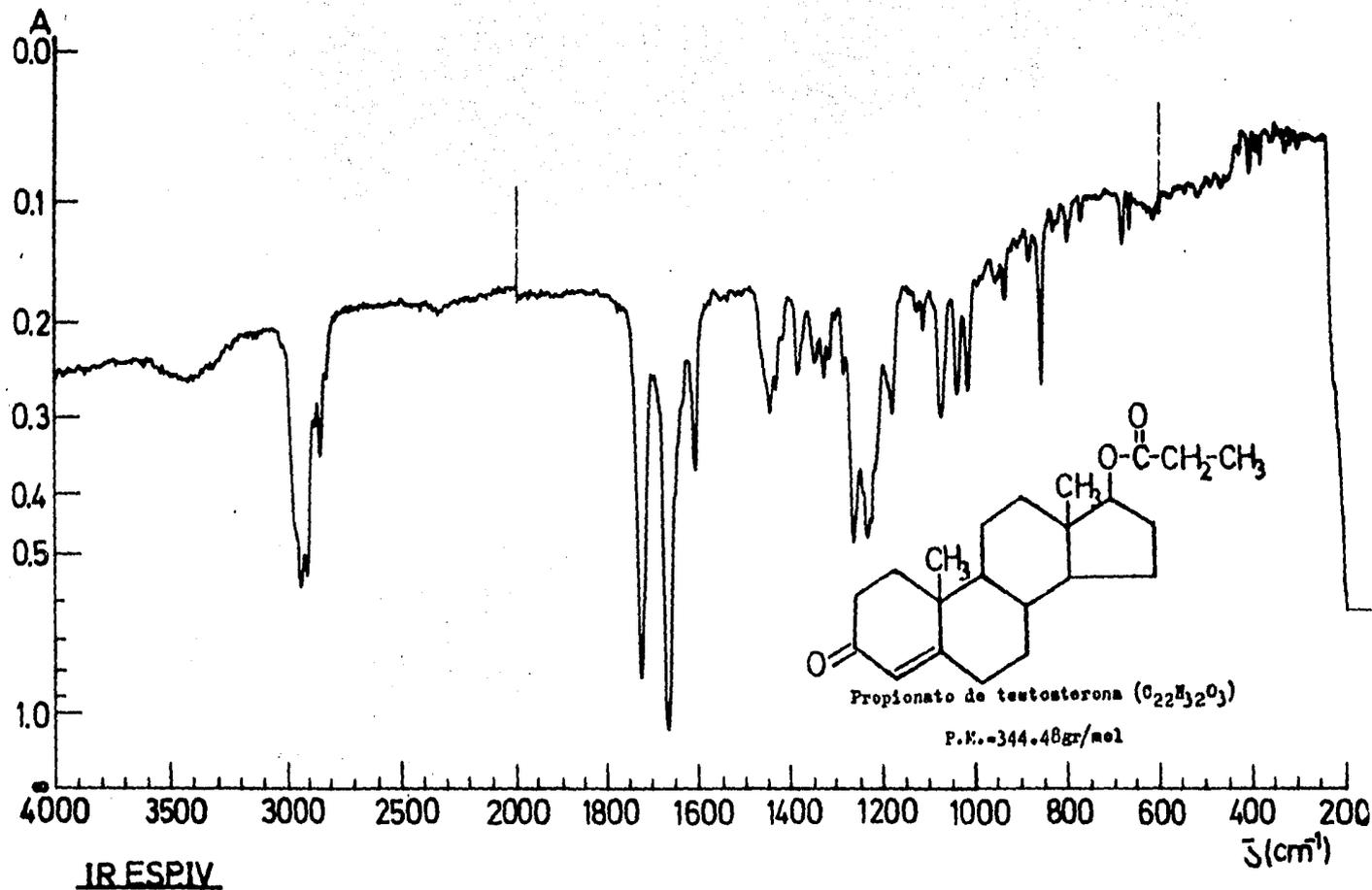
-IV-

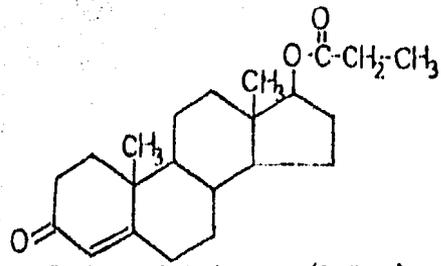


Propionato de testosterona ( $C_{22}H_{32}O_3$ ) P.M.=344.48gr/mol

P. de fusión=118-122°C T.F.:Andrógeno

U.V.: 246nm  $\lambda_{\text{máx.}}$  de absorción

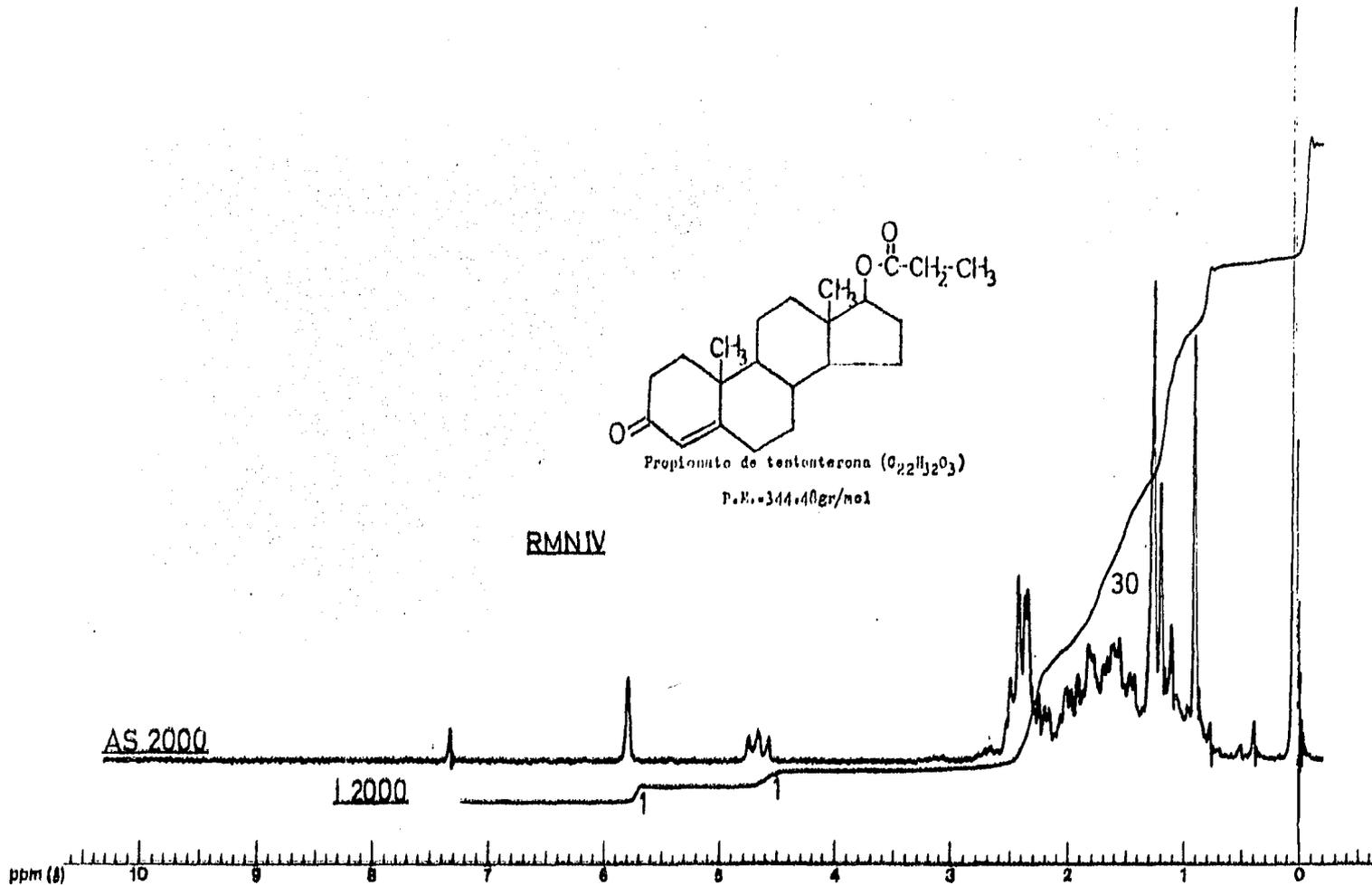


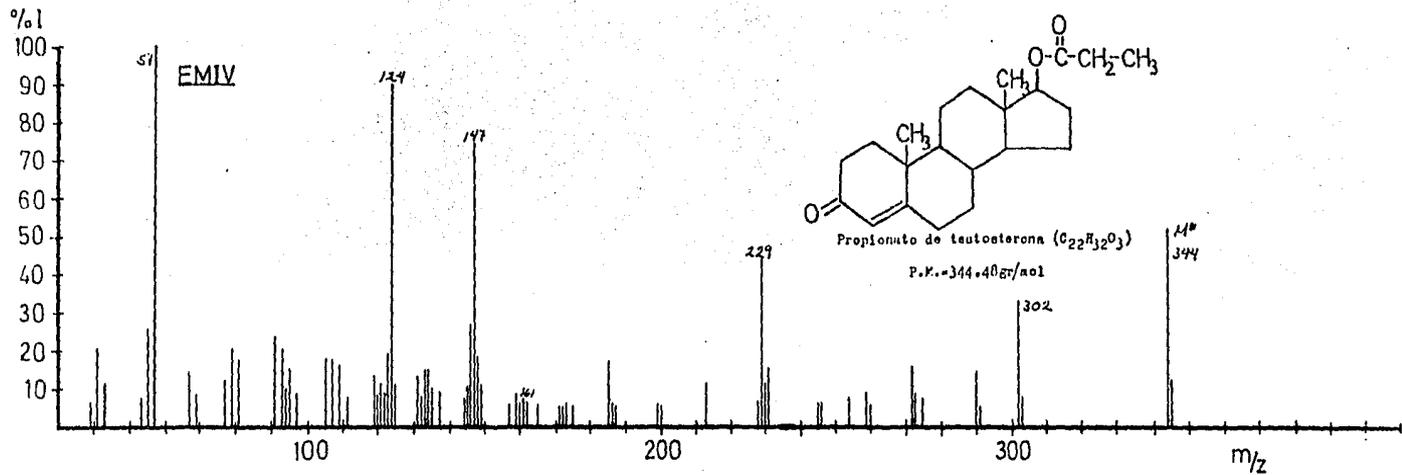


Propionato de tentoterona (C<sub>22</sub>H<sub>32</sub>O<sub>3</sub>)

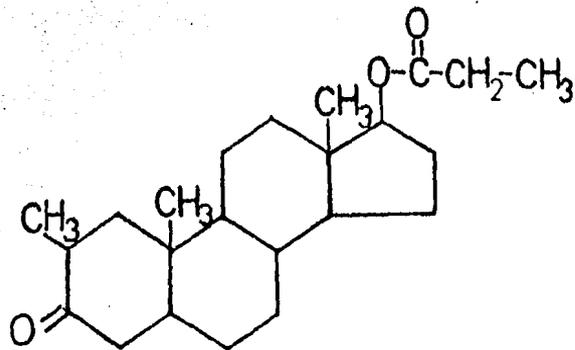
P.N. = 344.40gr/mol

RMNIV





-V-

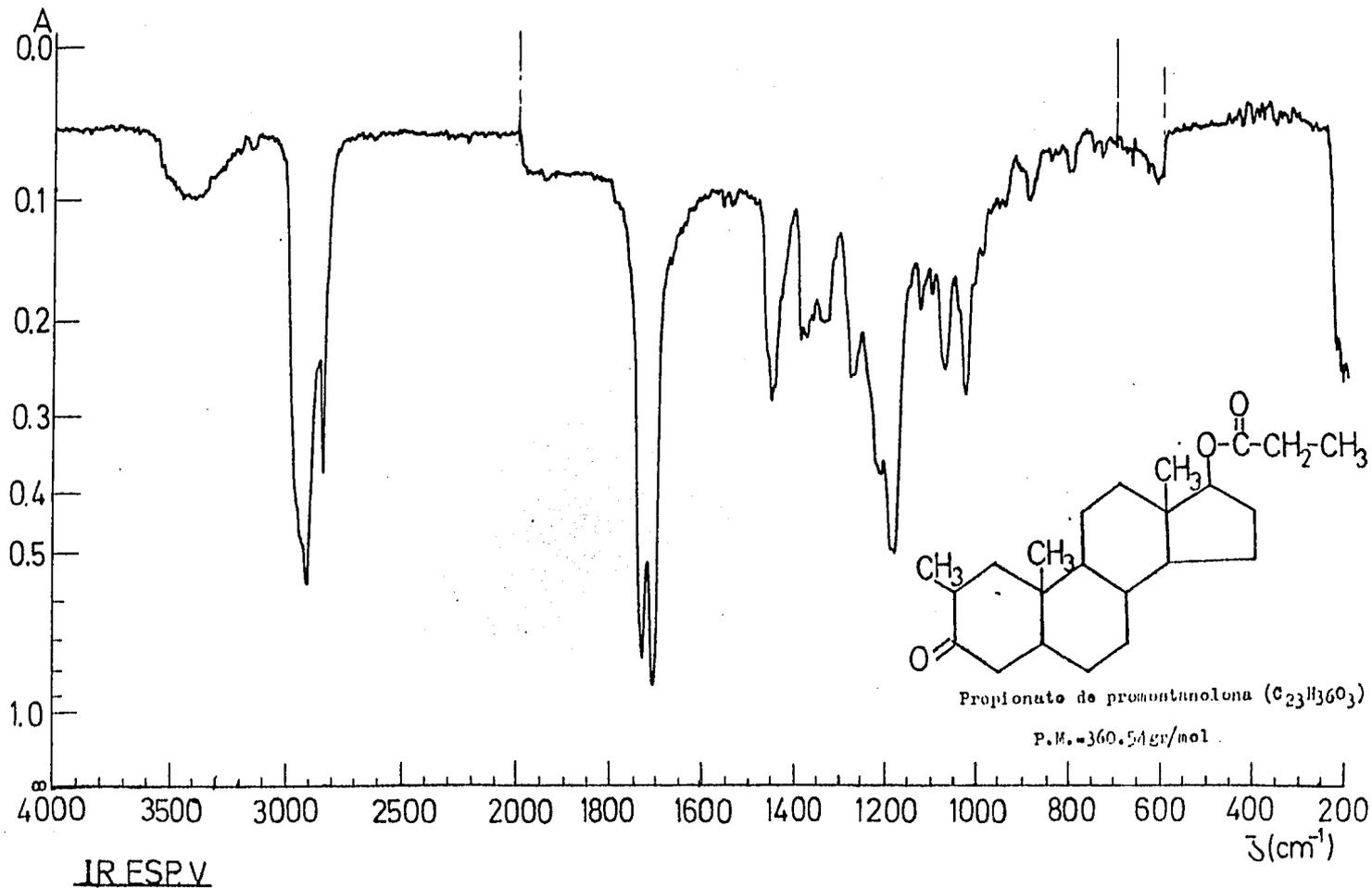


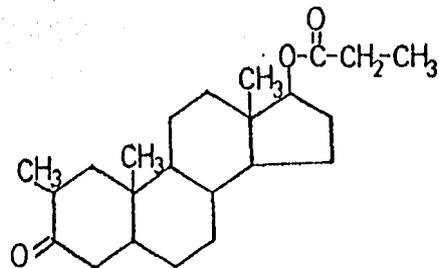
-55-

Propionate de premetanona ( $C_{23}H_{36}O_3$ ) P.M.=360.54gr/mol

P. de fusión=126-130°C T.F.:Andrógeno

U.V.: ---

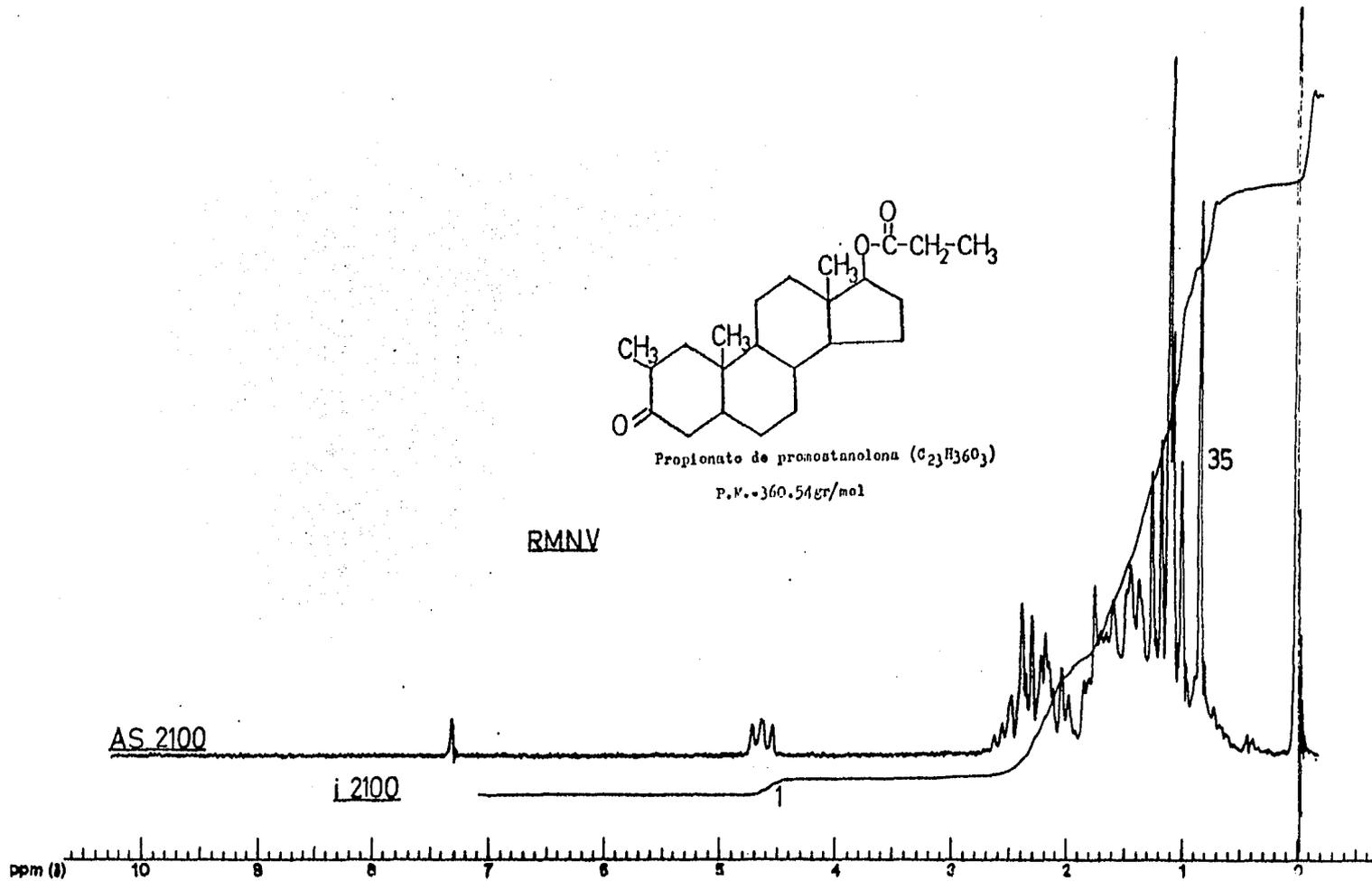


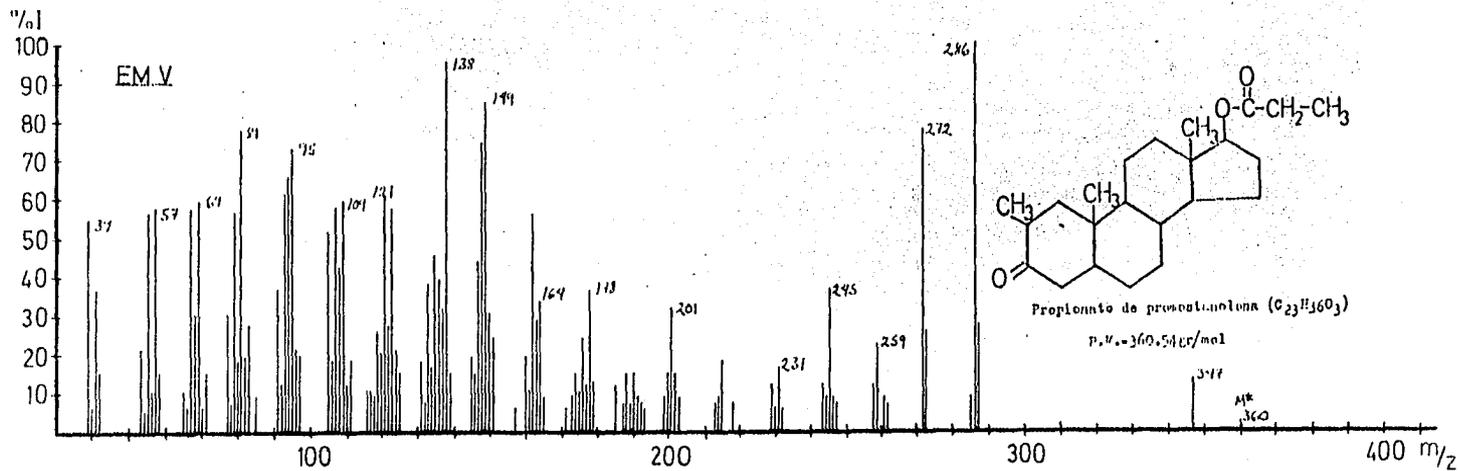


Propionato de pronostanolona ( $C_{23}H_{36}O_3$ )

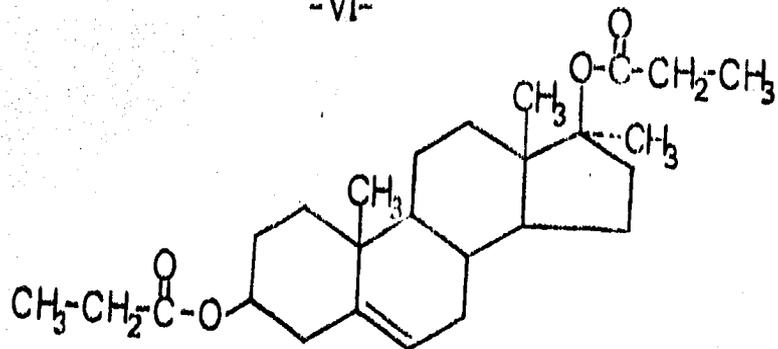
P.V. = 360.54 gr/mol

RMNV





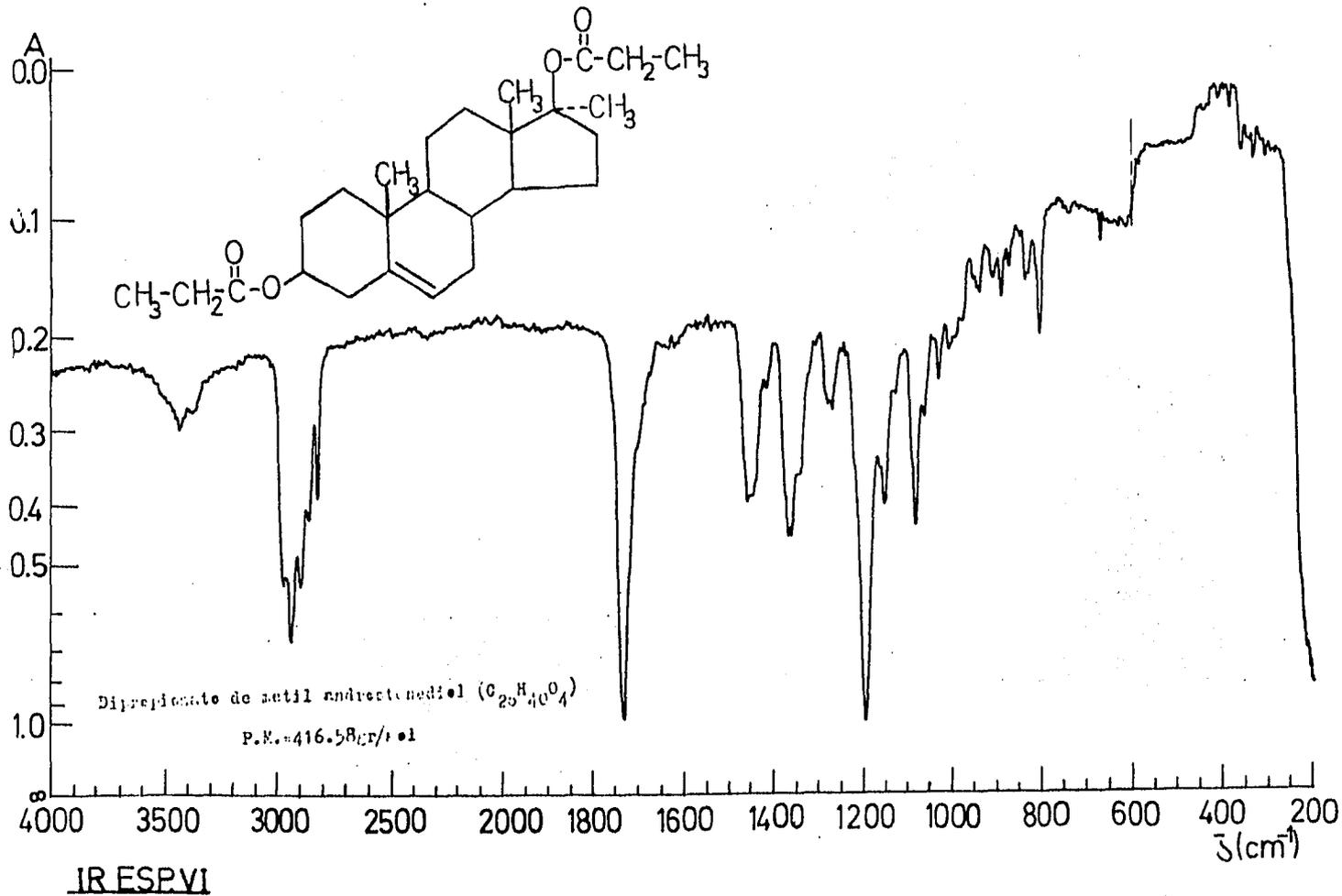
-VI-

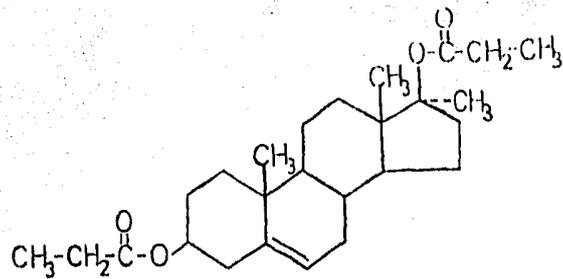


Dipropionate de metil androstenadiol ( $C_{26}H_{40}O_4$ )  $P.M_0=416.58\text{gr/mol}$

P. de fusión=86-87° T. P.: Andrógono

U. V.: ---

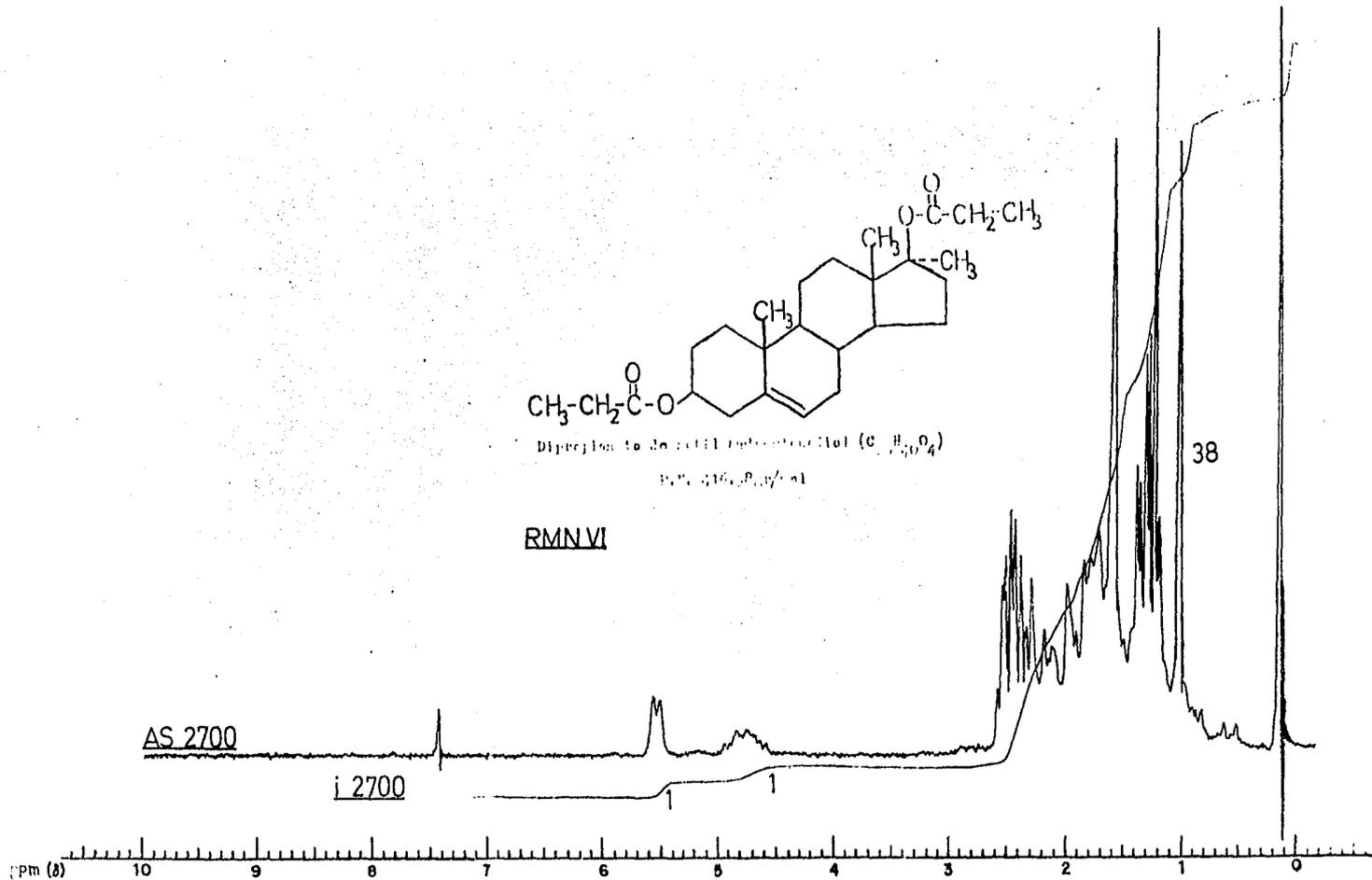


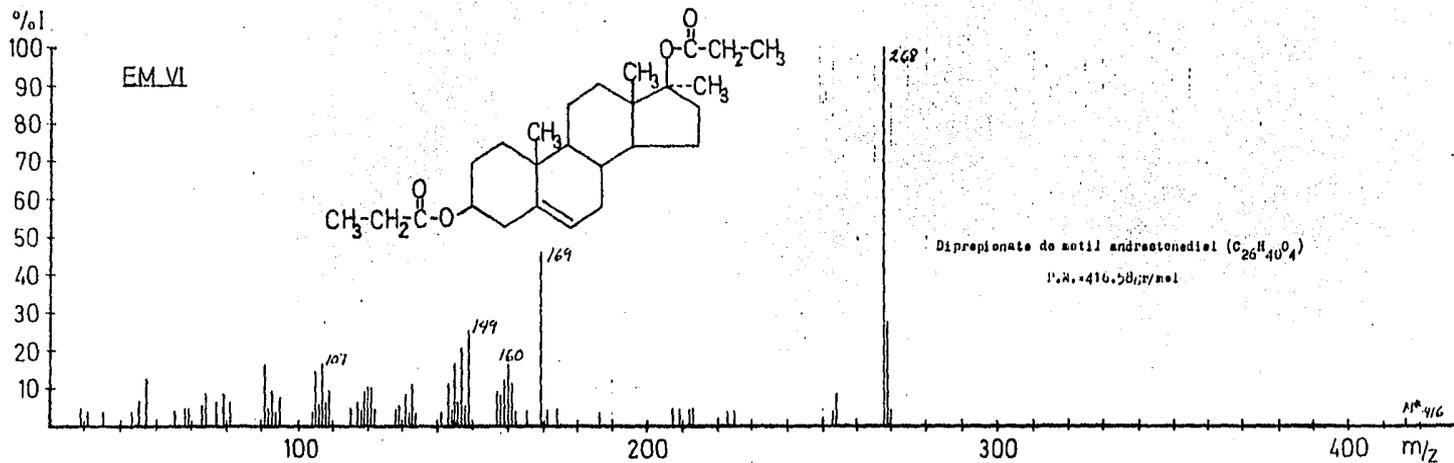


Dipropionate de 3-oxo-14-esteroide (C<sub>28</sub>H<sub>46</sub>O<sub>4</sub>)

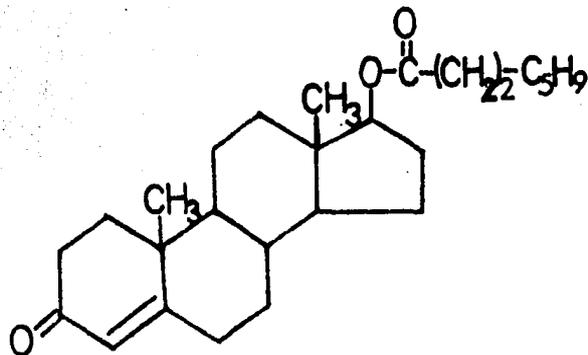
N.º. 416, P.º.º.º.º.

**RMNVI**





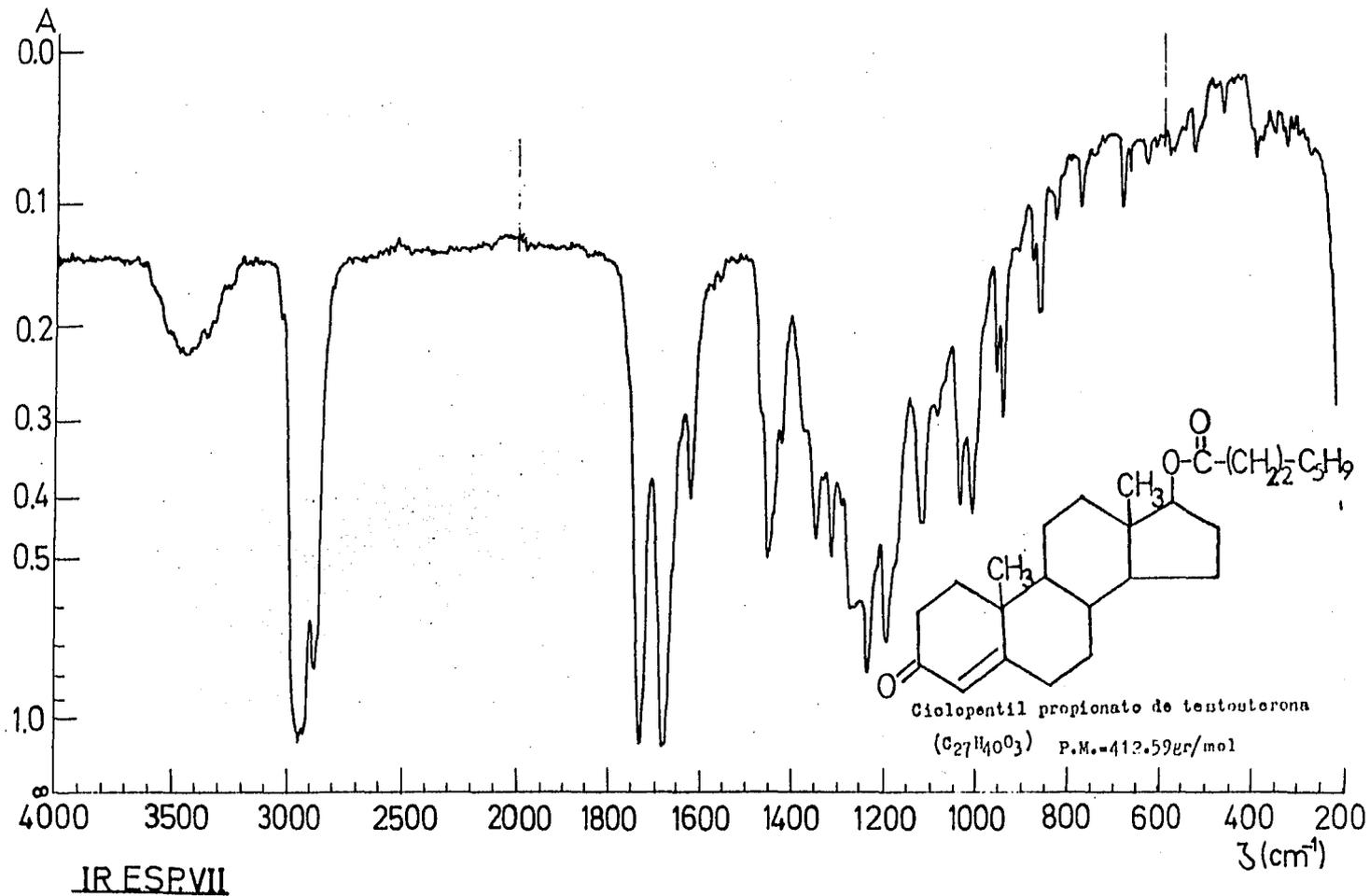
-VII-

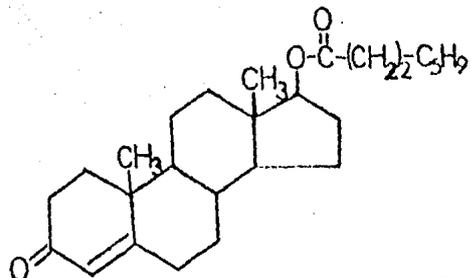


Ciolepentil propionate de testosterona ( $\text{C}_{27}\text{H}_{40}\text{O}_3$ ) P.M.=412.59gr/mol

P. de fusión=101-102°C T.F.:Andrógeno

U.V.: 246nm  $\lambda_{\text{máx.}}$  de absorción

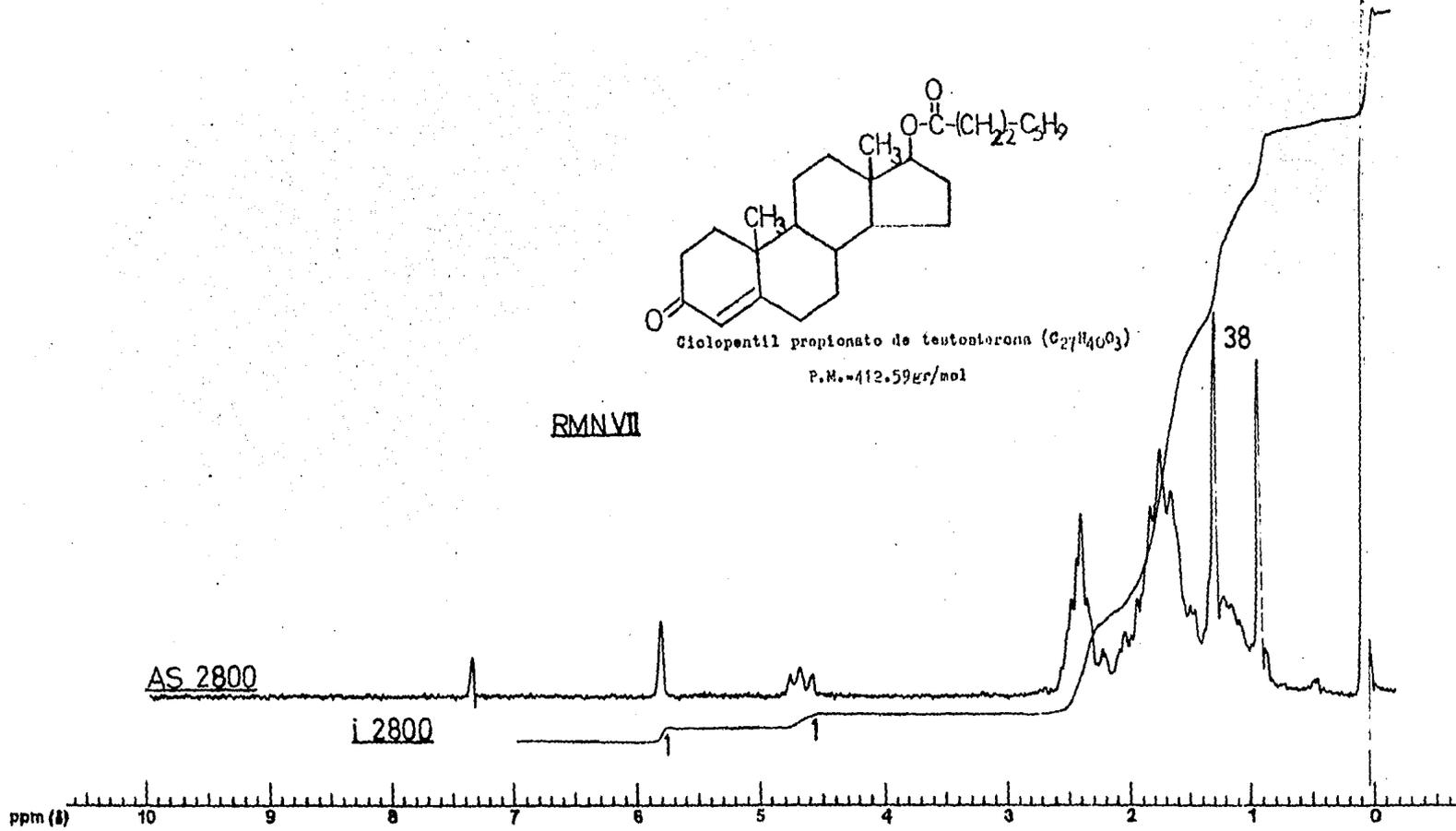


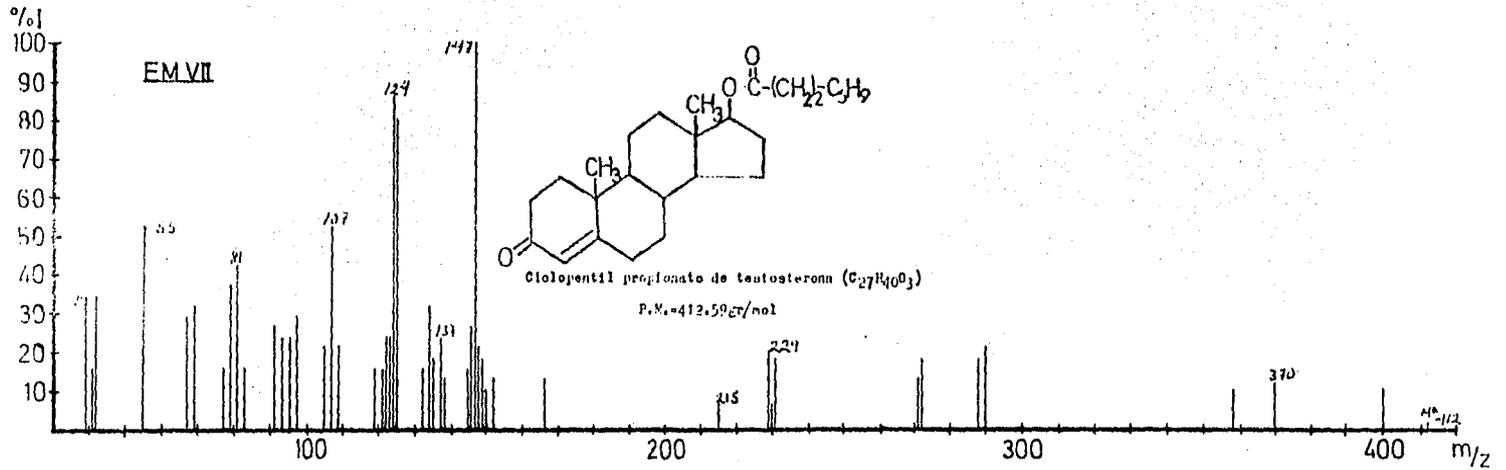


Ciclopentil propionato de testosterona (C<sub>27</sub>H<sub>40</sub>O<sub>3</sub>)

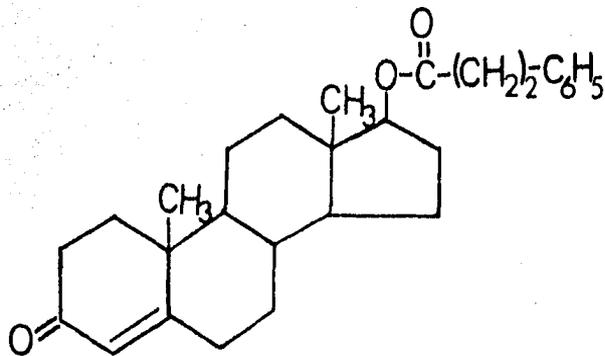
P.M.=412.59gr/mol

RMN VII





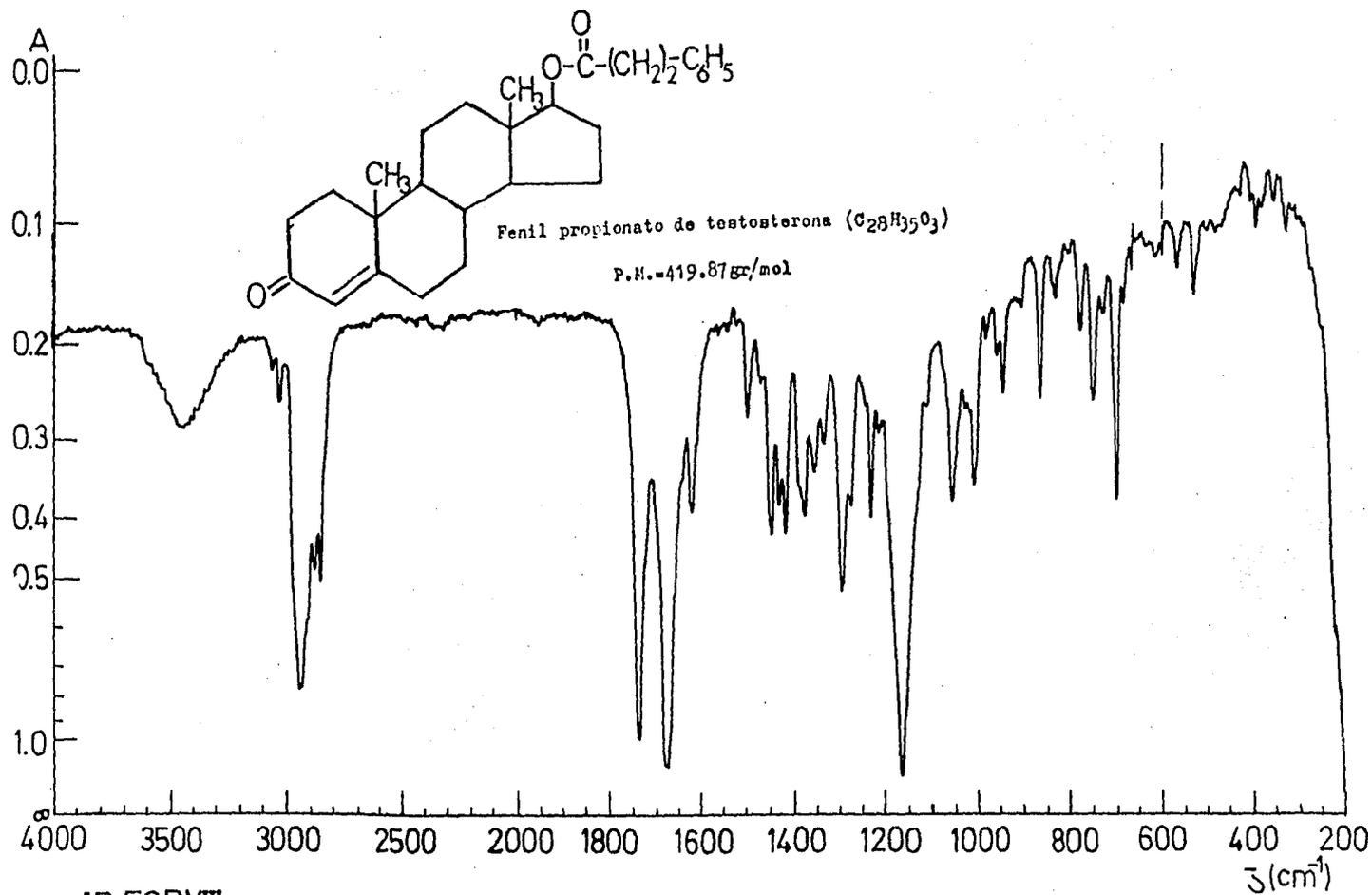
-VIII-



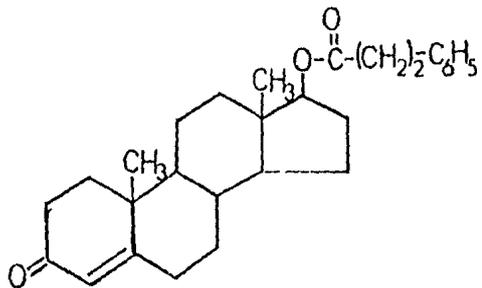
Fenil propionato de testosterona ( $C_{28}H_{35}O_3$ ) P.M.-419.87gr/mol

P. de fusión-116-119°C T.F.:Andrógeno

U.V.: 237nm  $\lambda_{m\acute{a}x.}$  de absorción



IR ESP.VIII



Fenil propionato de teutonterona (C<sub>28</sub>H<sub>35</sub>O<sub>3</sub>)

P.M. = 419.67 gr/mol

RMN VIII

AS 5500

AS 3000

i 3000

28

ppm (δ)

10

9

8

7

6

5

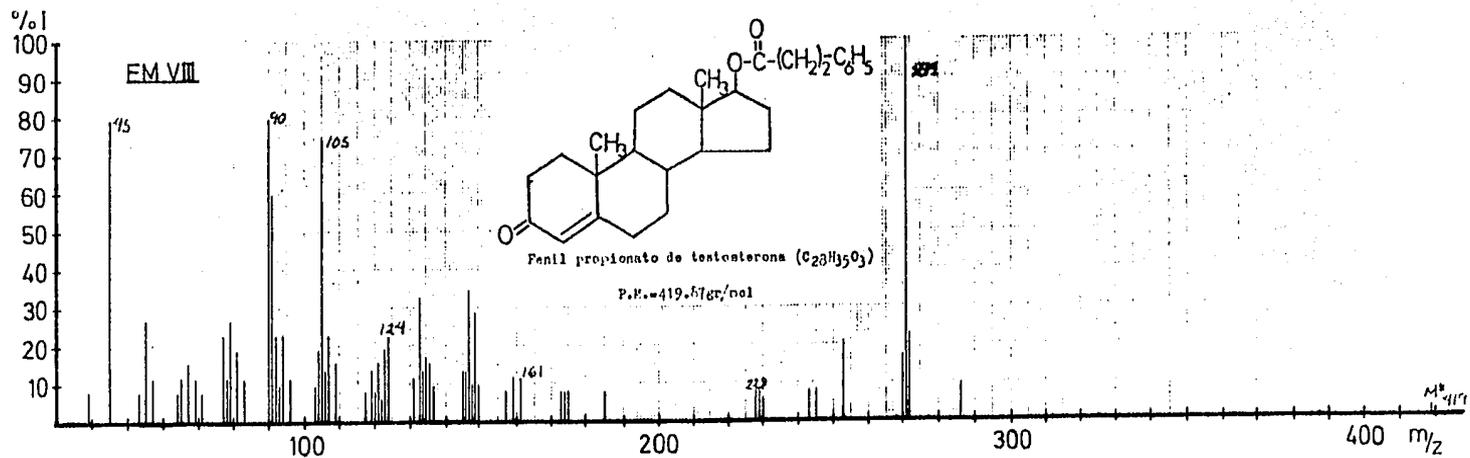
4

3

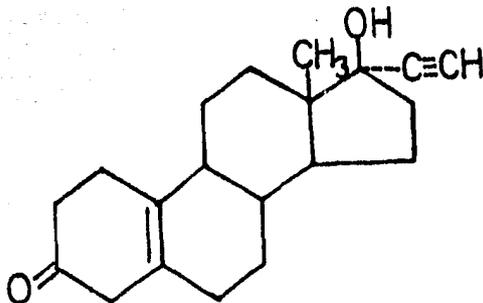
2

1

0



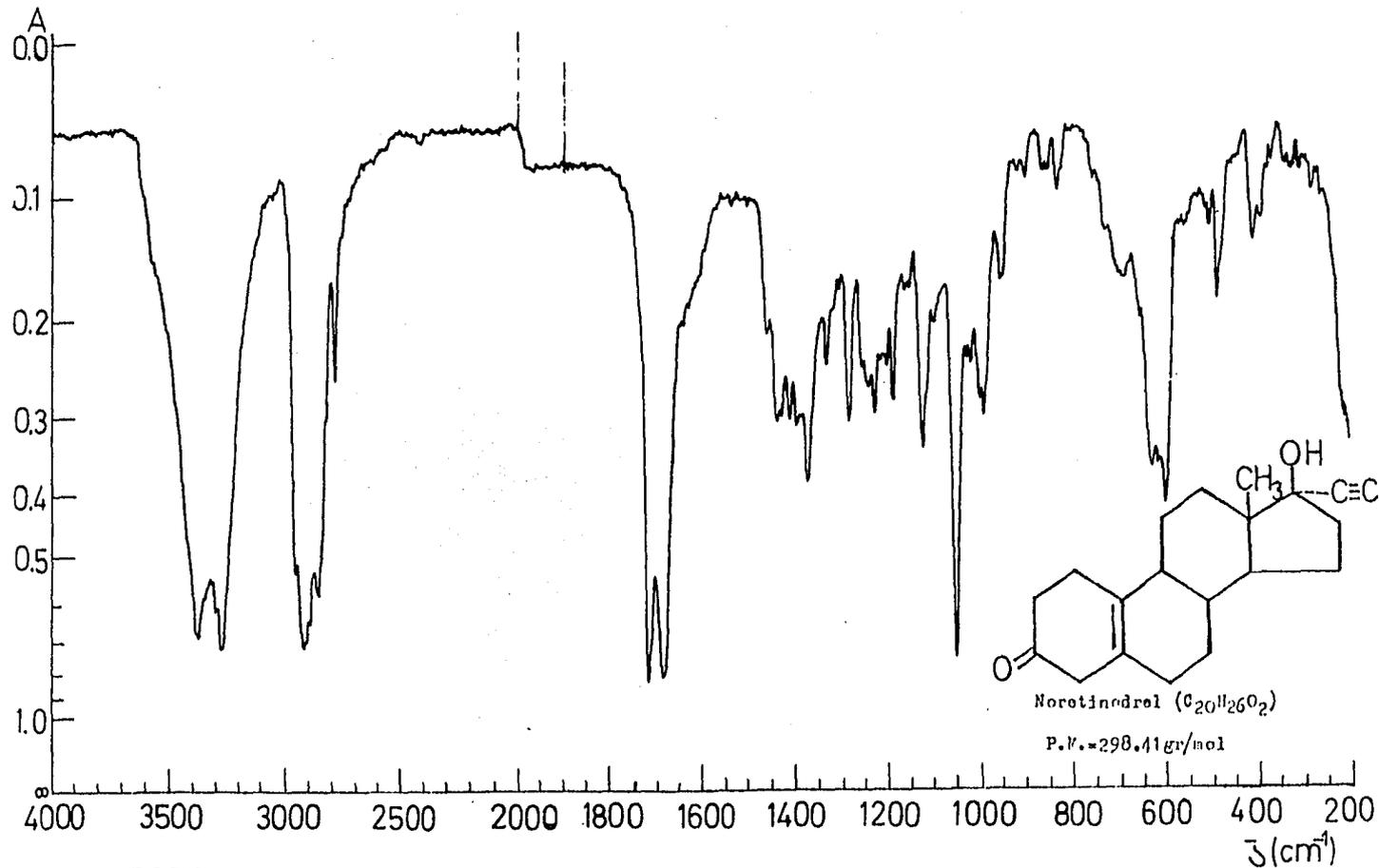
-IX-

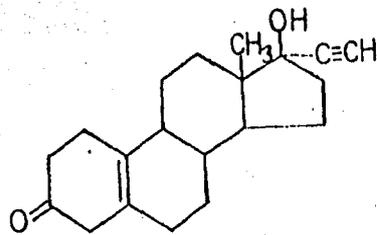


Noretindrel ( $C_{20}H_{26}O_2$ ) P.M.=298.41gr/mol

P. de fusión=169-170°0 T.F.: Progestina

U.V.: —

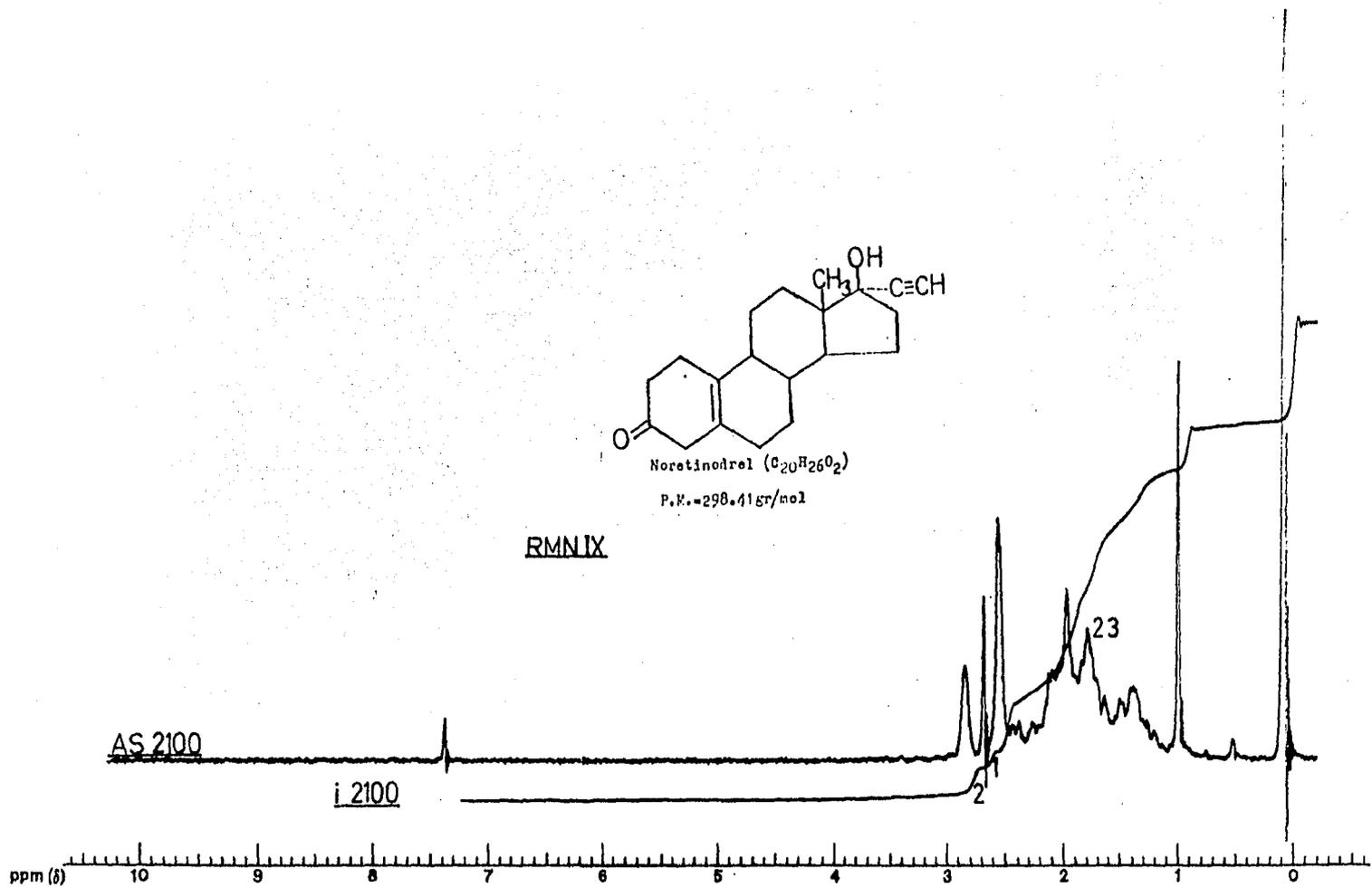


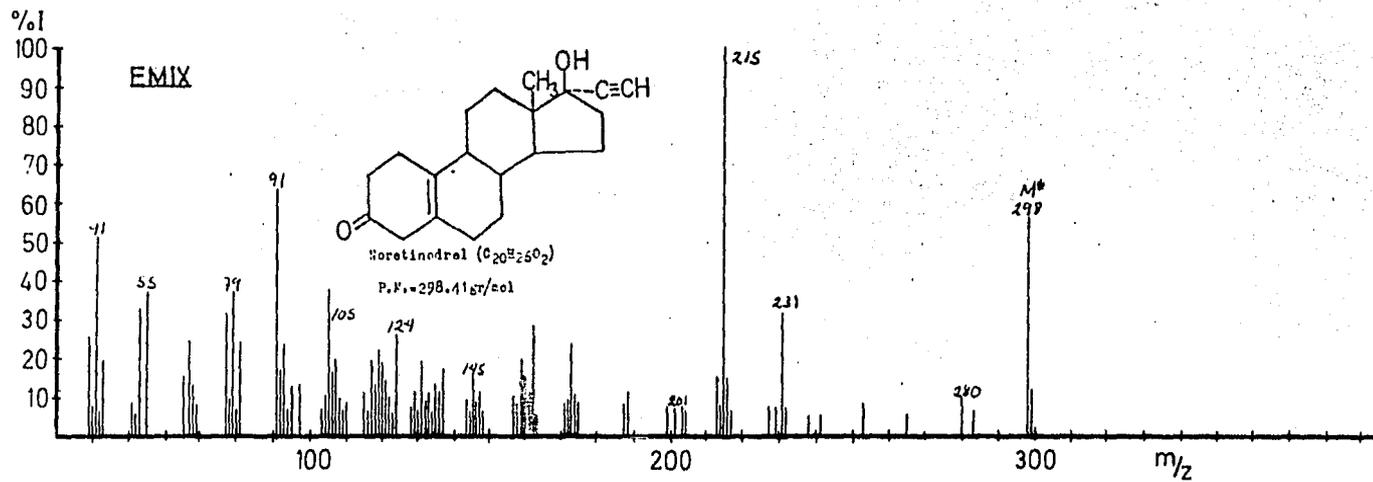


Noretinodrel (C<sub>20</sub>H<sub>26</sub>O<sub>2</sub>)

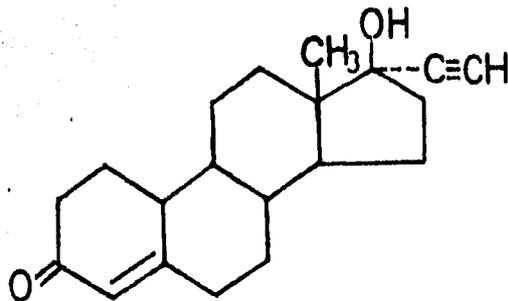
P.M. = 298.41 gr/mol

RMNIX





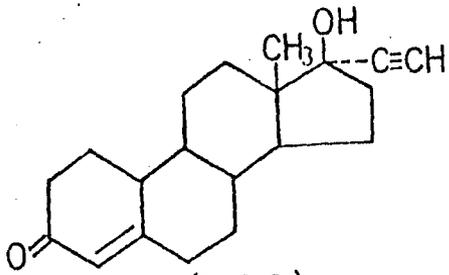
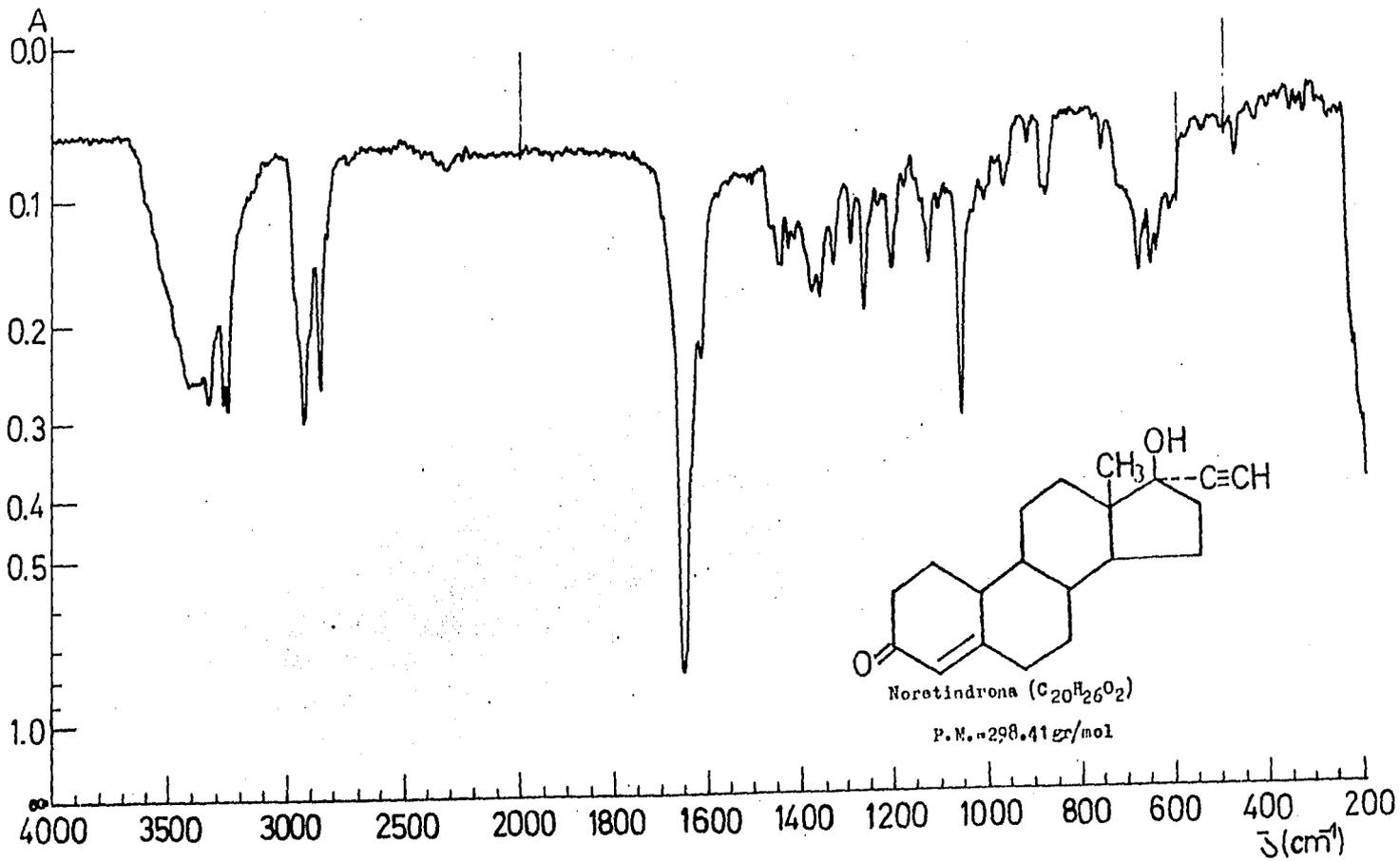
-X-



Noretindrona ( $C_{20}H_{26}O_2$ ) P.M.=298.41gr/mol.

P. de fusión=203-204°C T.F.: Progestina

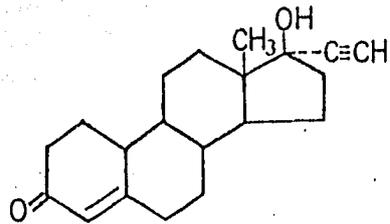
U.V.: 244nm  $\lambda$ máx. de absorción



Noretindrona (C<sub>20</sub>H<sub>26</sub>O<sub>2</sub>)

P.M. = 298.41 gr/mol

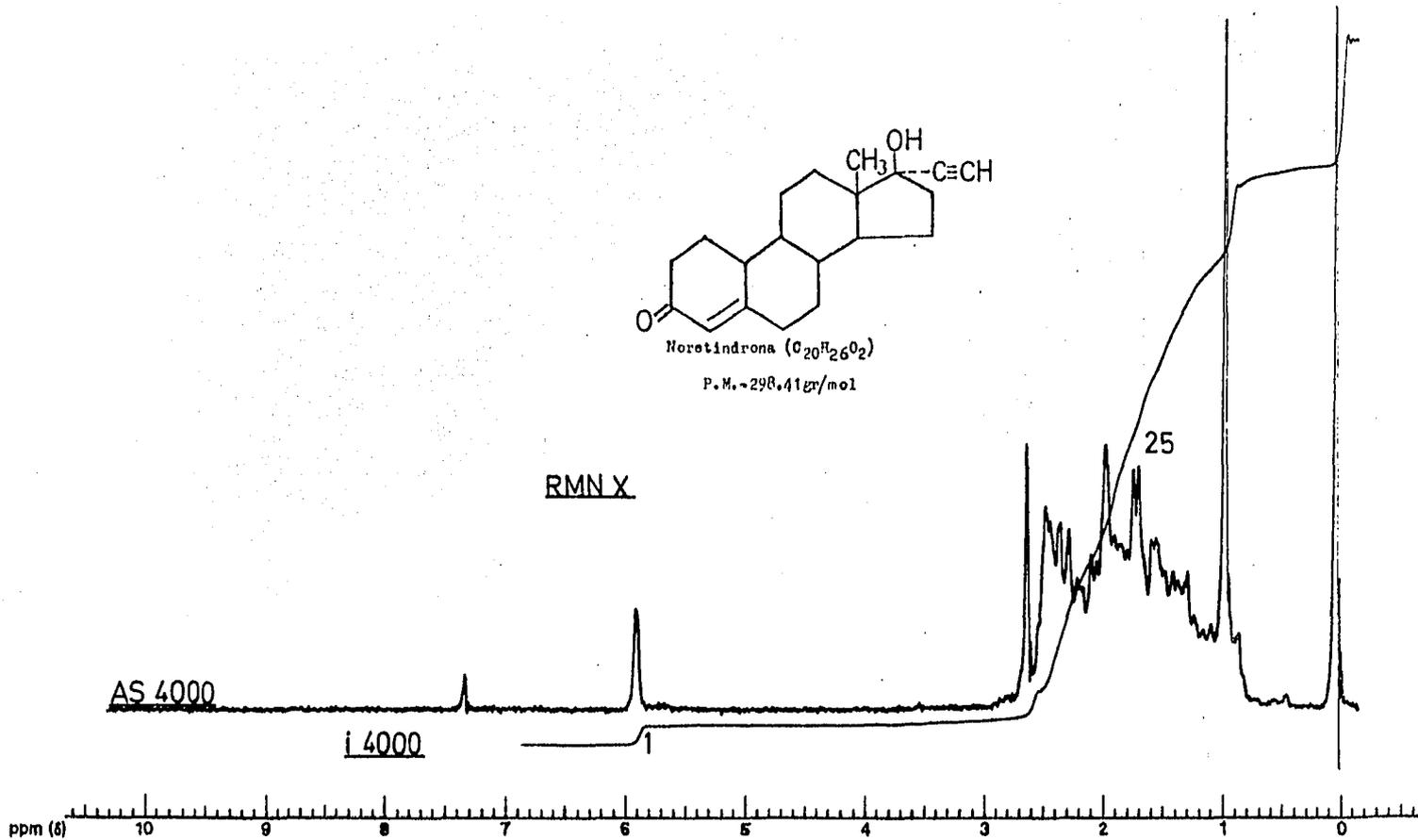
IRESPX

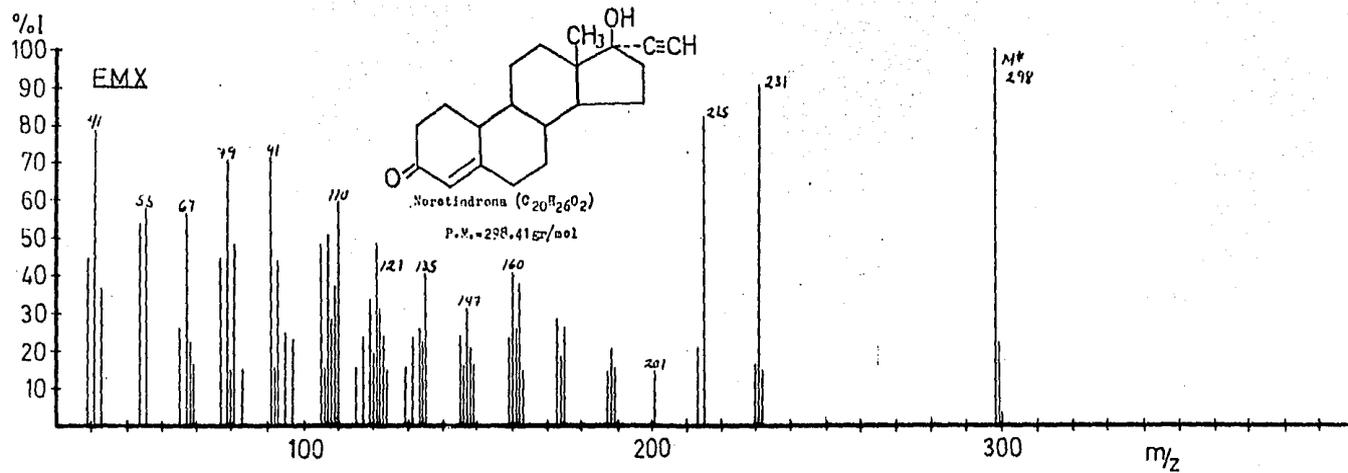


Noretindrona (C<sub>20</sub>H<sub>26</sub>O<sub>2</sub>)

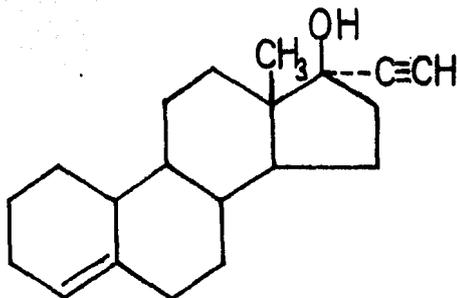
P.M. ~ 298.41 g/mol

RMN X





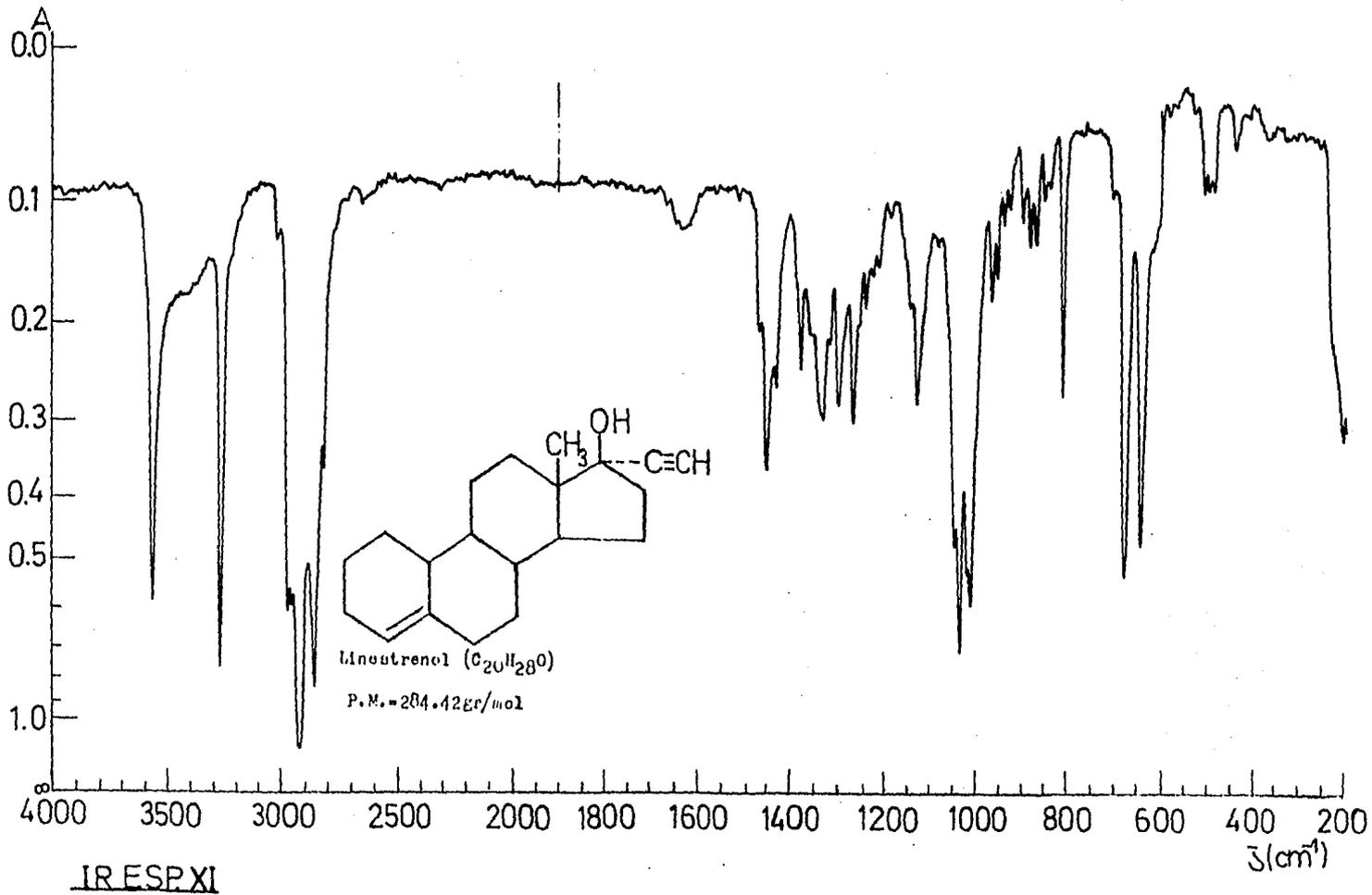
-XI-

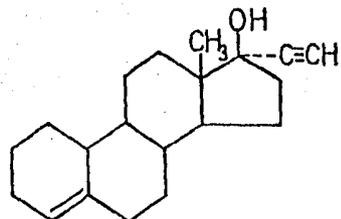


Linestrenol (C<sub>20</sub>H<sub>28</sub>O) P.M.-284.42gr/mol

P. de fusión-158-160°C T.F.:Pregestina

U.V.: —

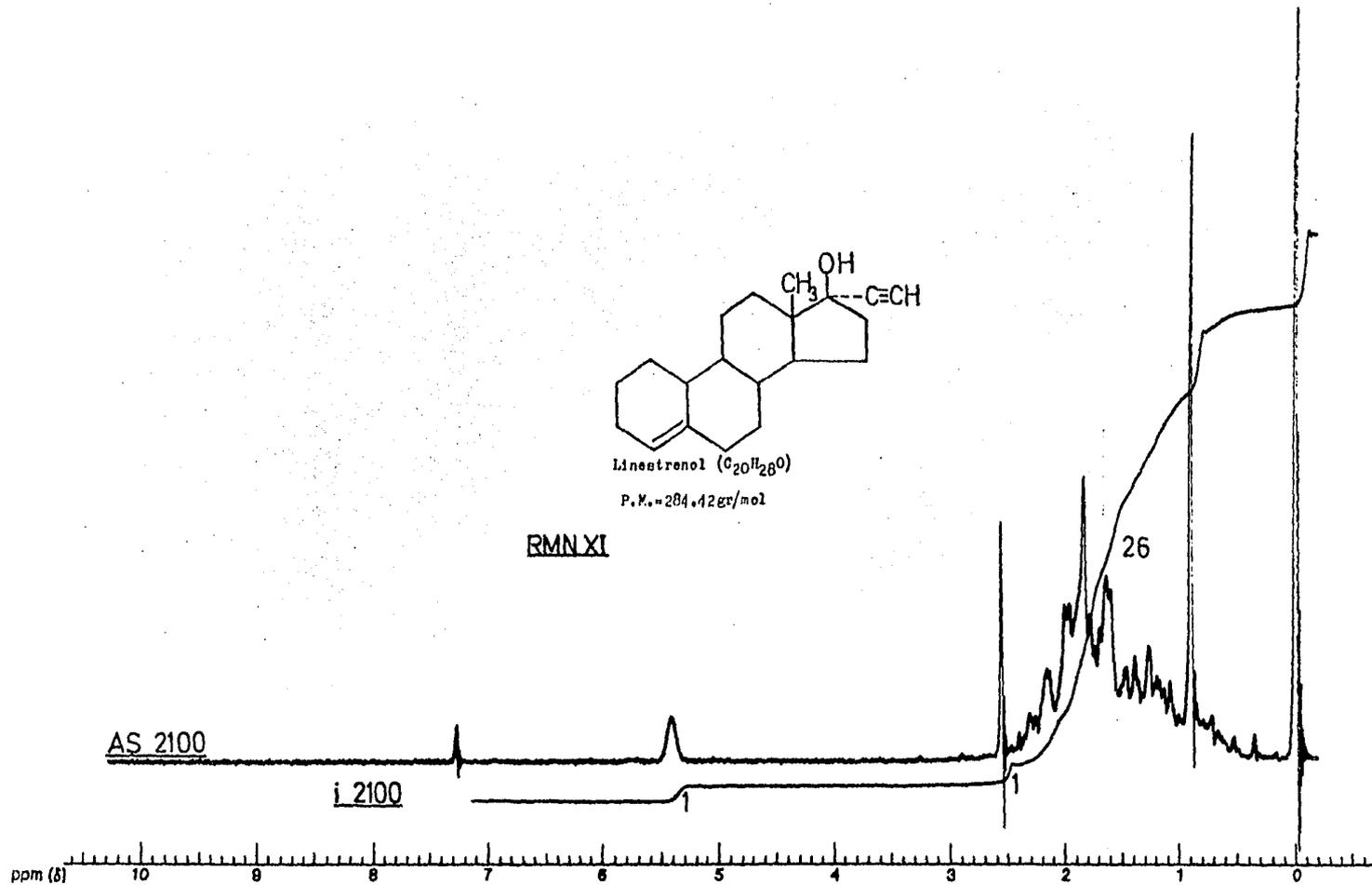


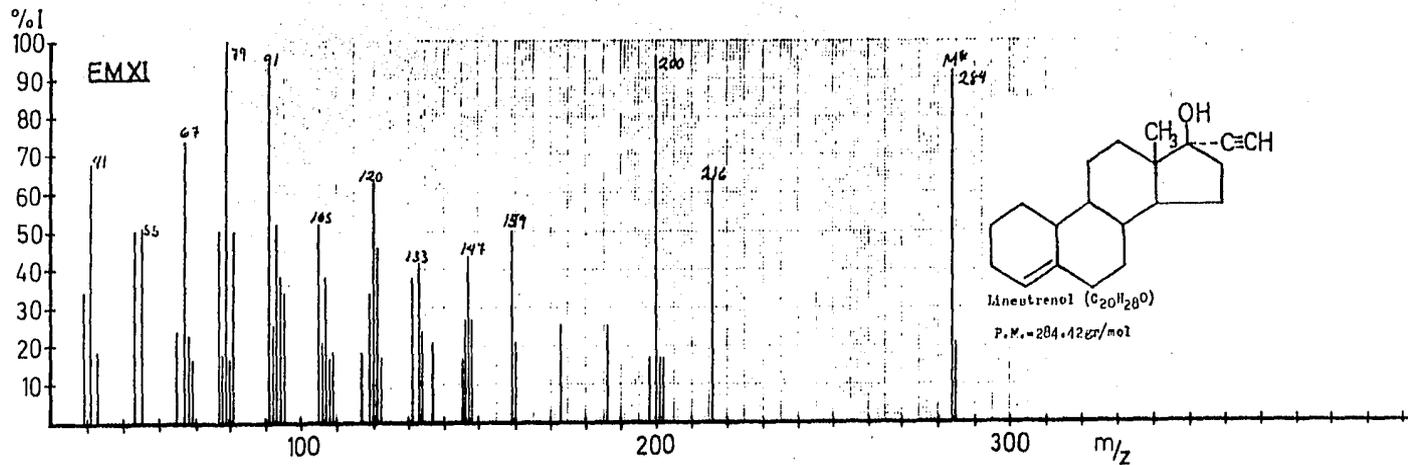


Linestrenol (C<sub>20</sub>H<sub>28</sub>O)

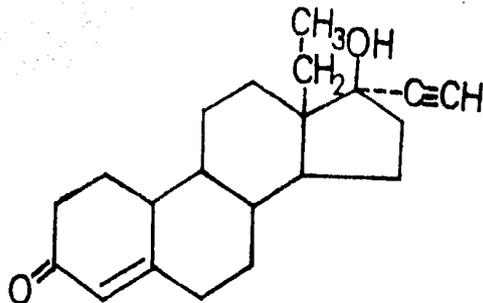
P.M. = 284.42 g/mol

RMN XI





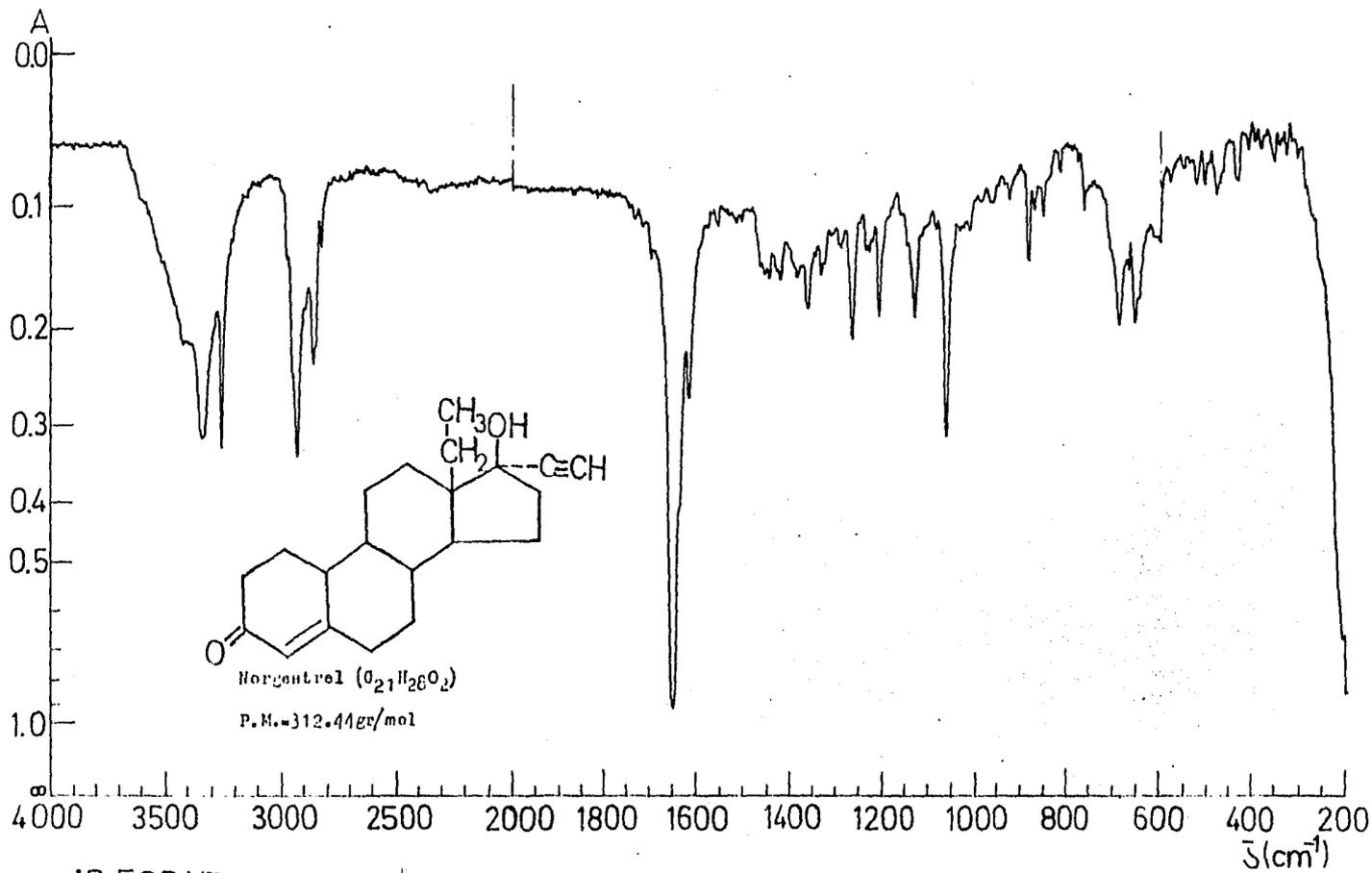
-XII-

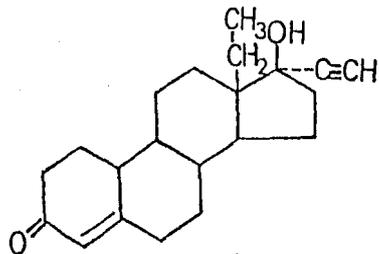


Norgestrel ( $C_{21}H_{28}O_2$ ) P.M. = 312.44 gr/mol

P. de fusión = 203-207°C T.F.: Progestina

U.V.: 246nm  $\lambda_{\text{máx.}}$  de absorción

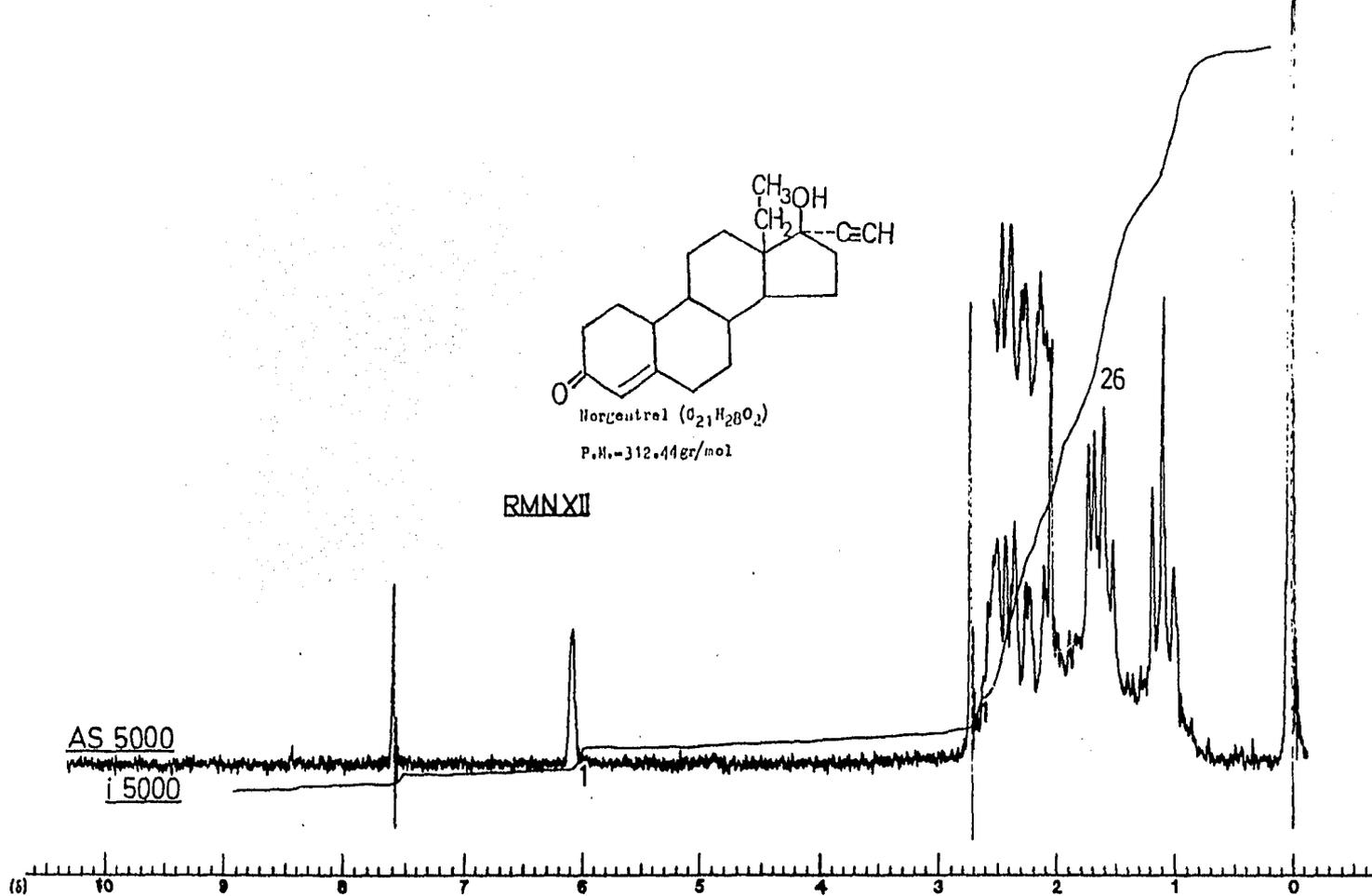


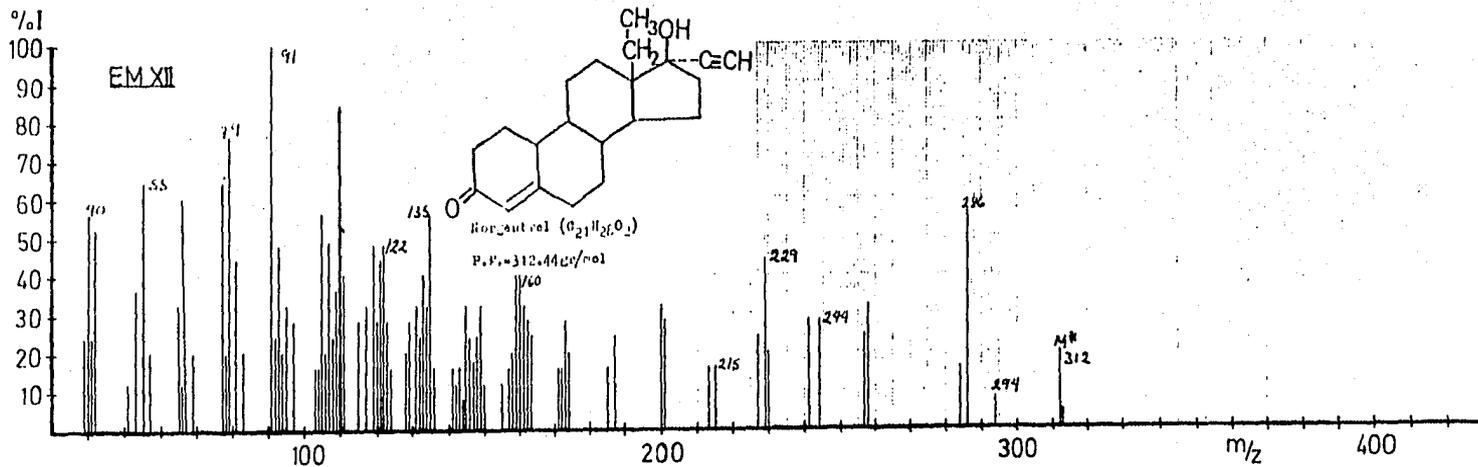


Norgestrel (C<sub>21</sub>H<sub>28</sub>O<sub>2</sub>)

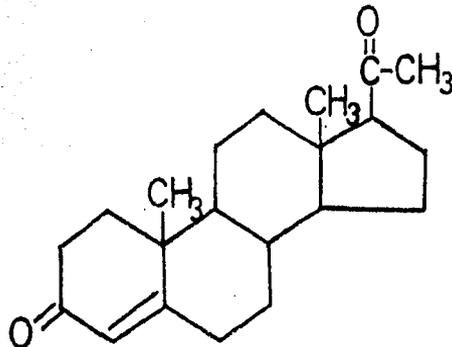
P.M. = 312.44 g/mol

RMN XI





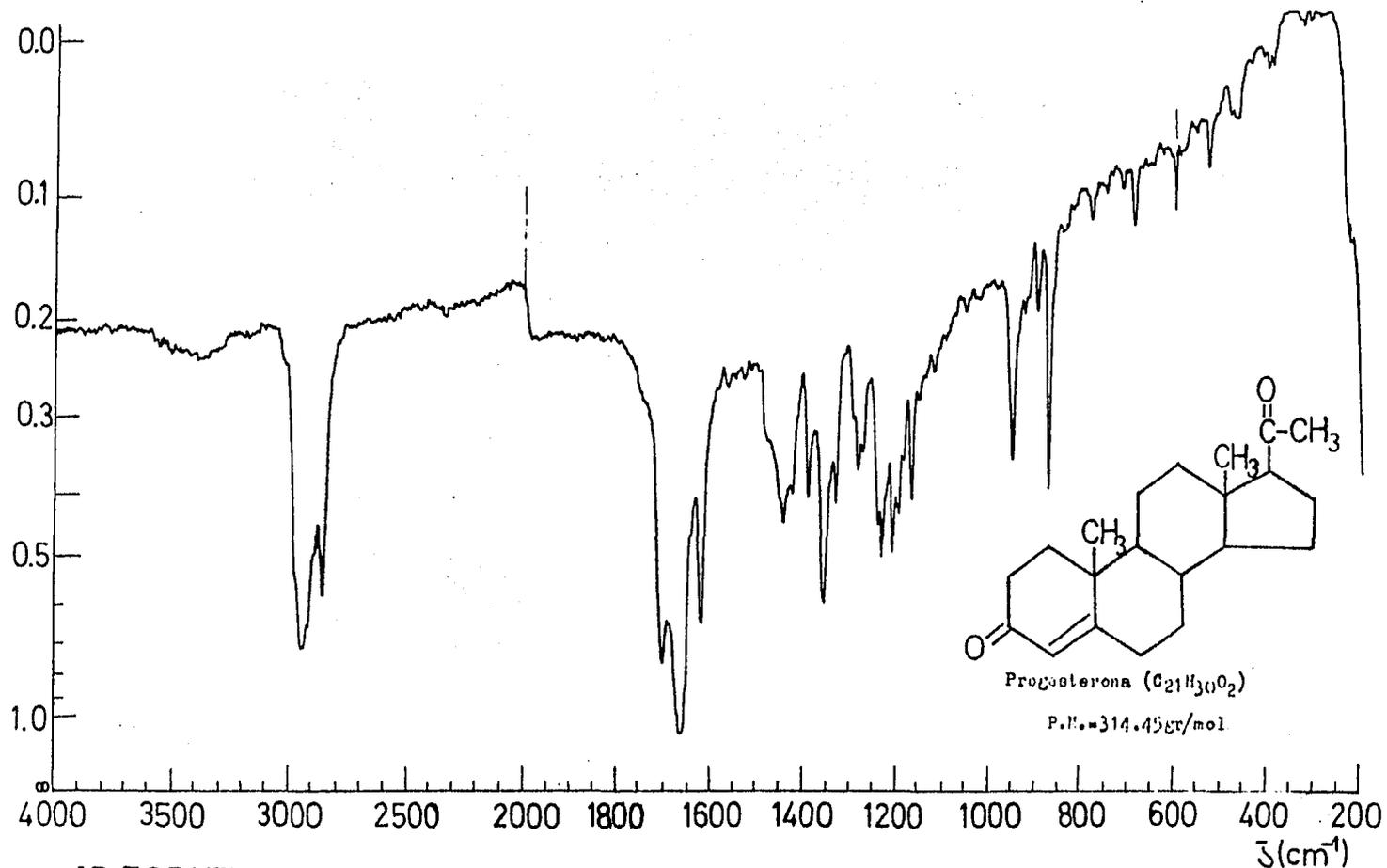
-XIII-



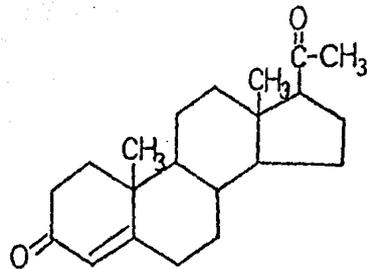
Progesterona ( $C_{21}H_{30}O_2$ ) P.M.=314.45 gr/mol

P. de fusión=127-131°C T.F.: Progestina

U.V.: 246nm  $\lambda$  máx. de absorción



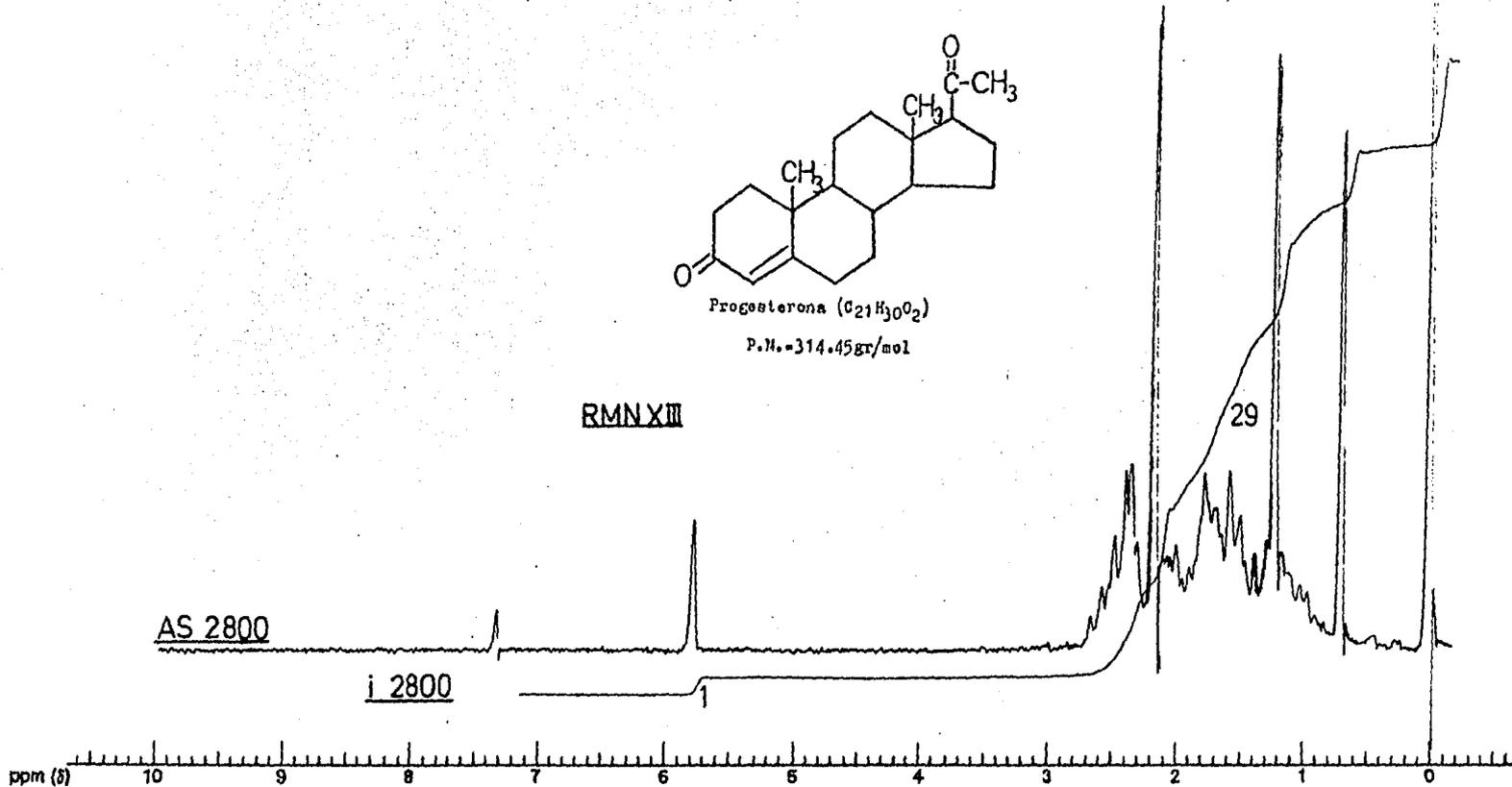
IR ESP. XIII

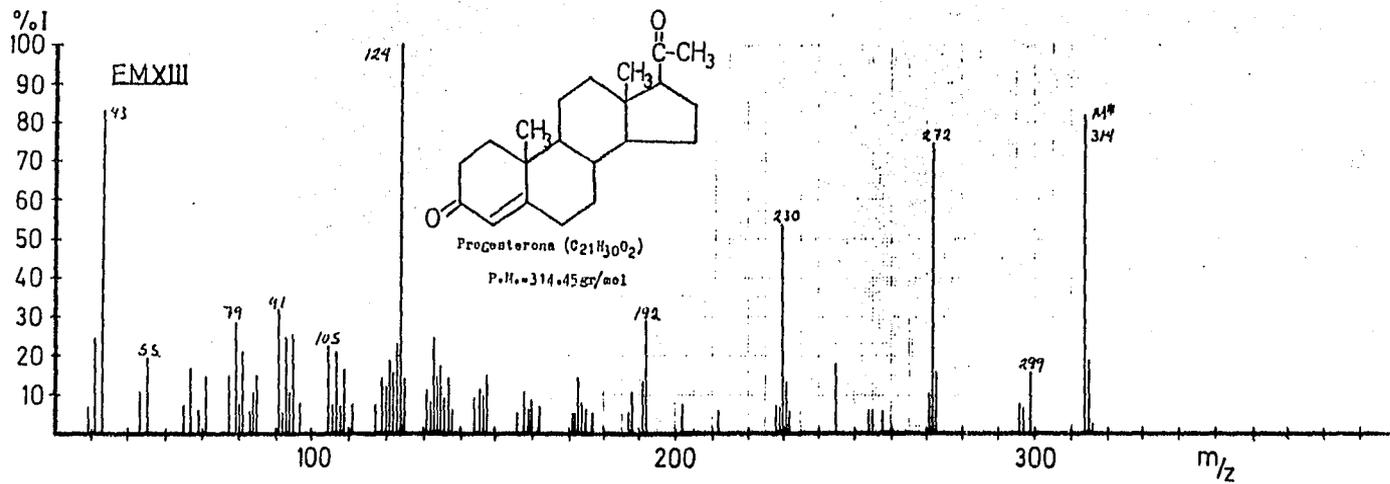


Progesterona (C<sub>21</sub>H<sub>30</sub>O<sub>2</sub>)

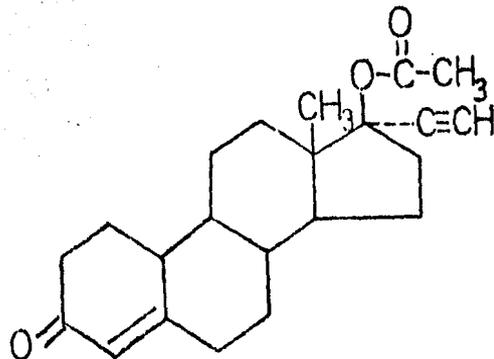
P.M. = 314.45 gr/mol

RMN XIII





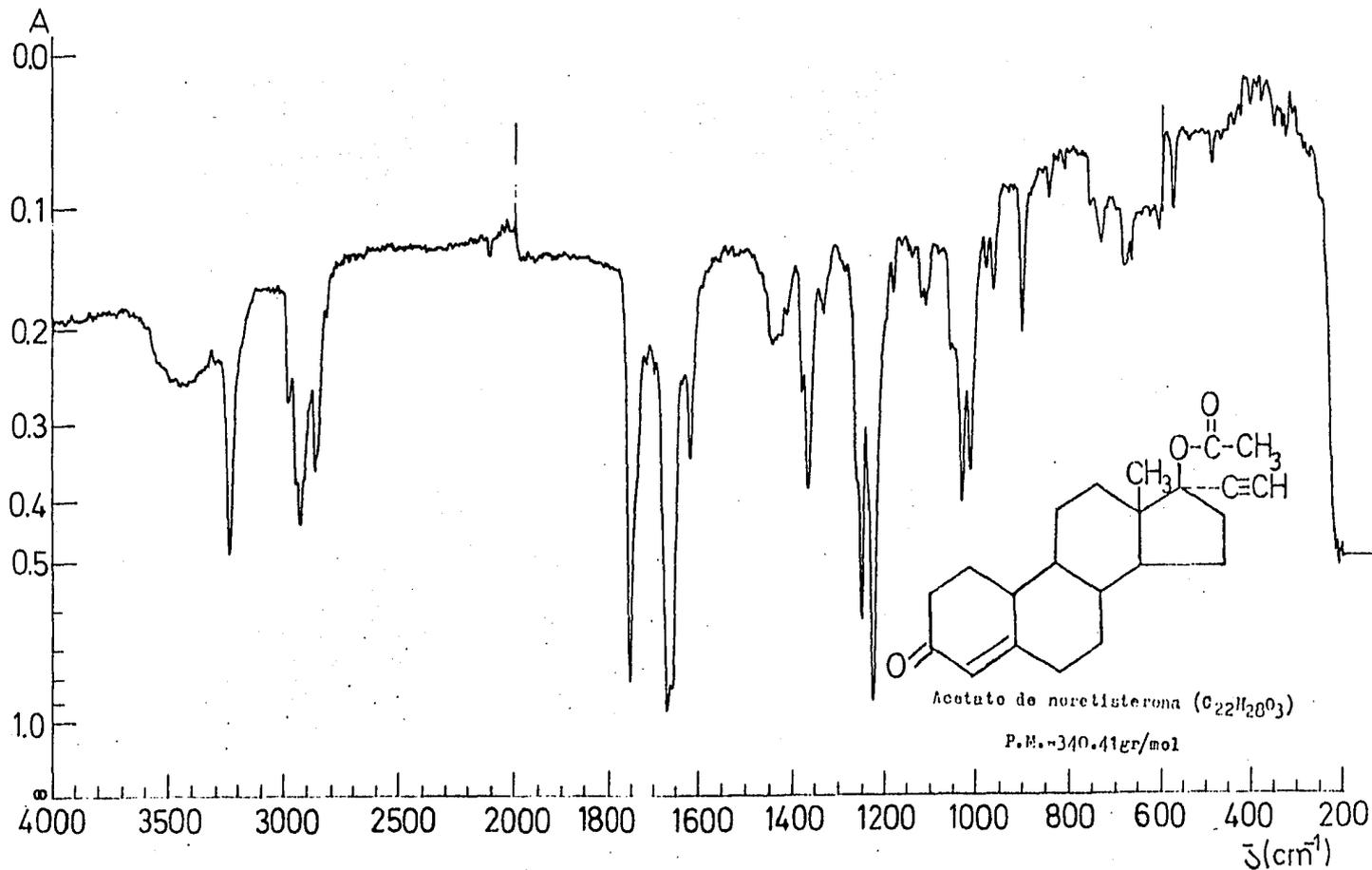
-XIV-



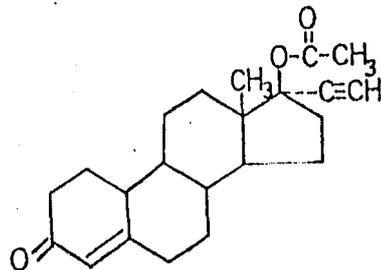
Acetate de noretisterona ( $C_{22}H_{28}O_3$ ) P.M.=340.41gr/mol

P. de fusión-161-162°C T.F.:Pregestina

U.V.: 243nm  $\lambda_{máx.}$  de absorción



IR ESPXIV



Acetato de noretisterona ( $C_{22}H_{28}O_3$ )

P.M.=340,41gr/mol

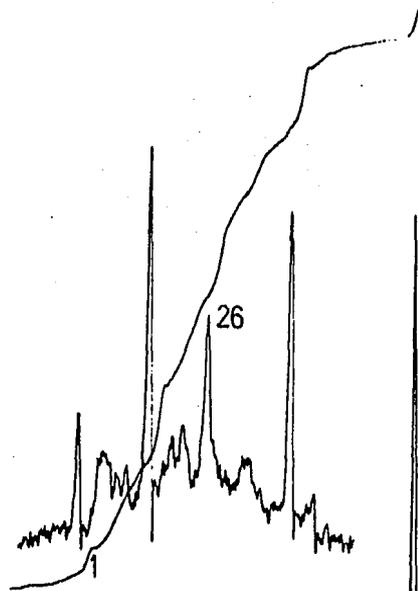
RMN XIV



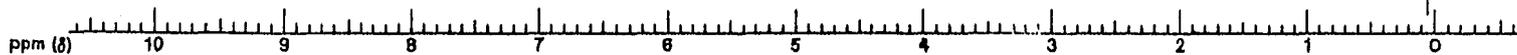
AS 7000

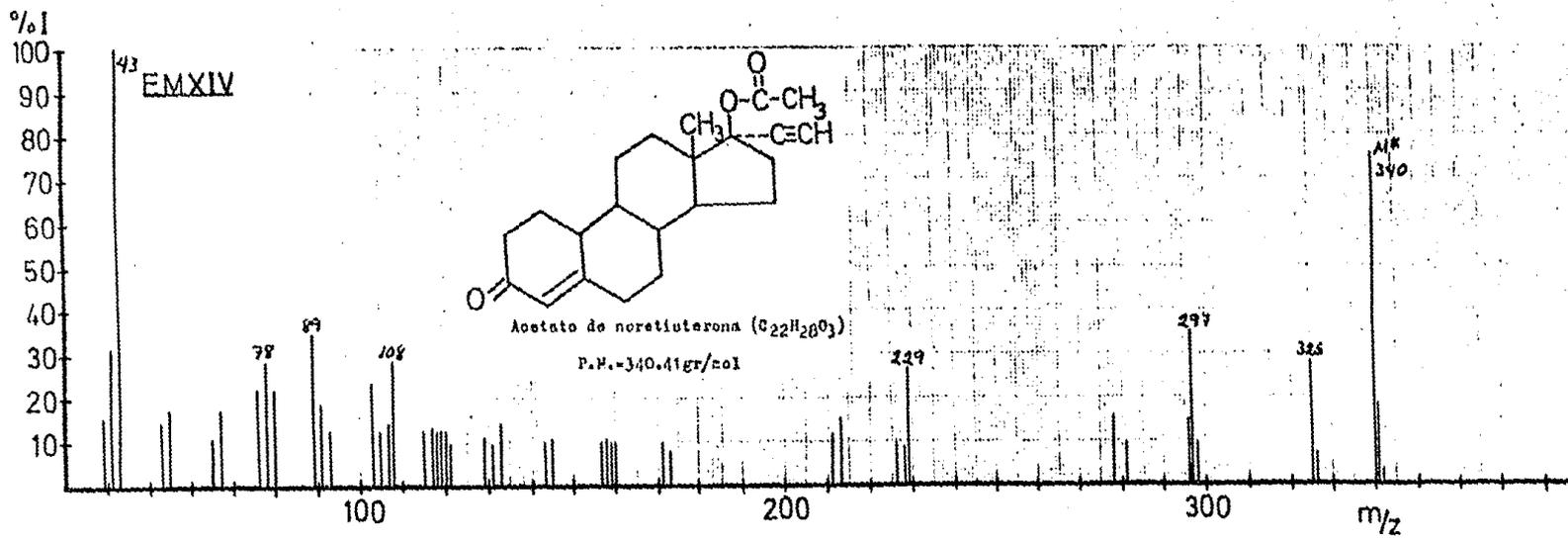


17000

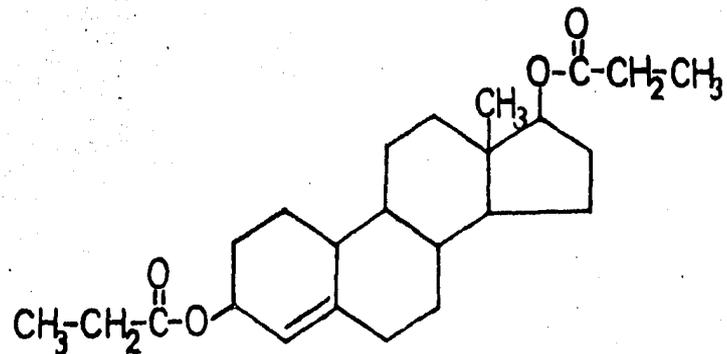


AS 2000





-XV-

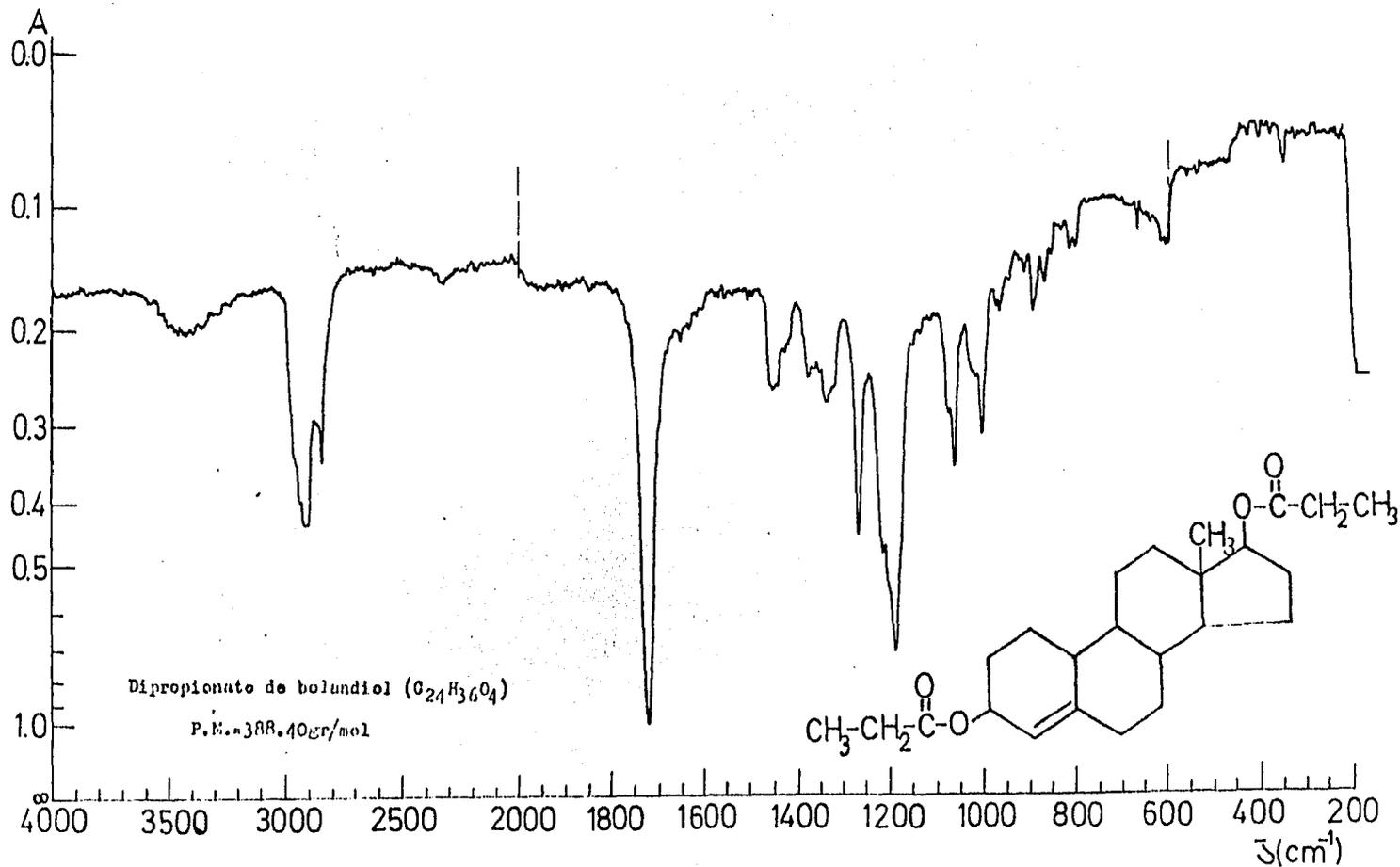


-133-

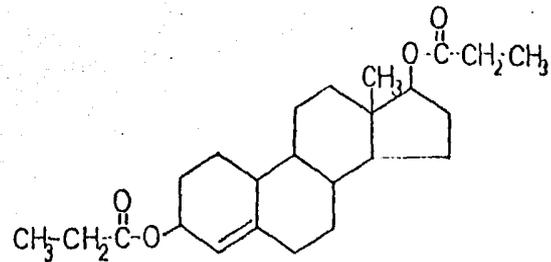
Dipropionate de belandiol ( $C_{24}H_{36}O_4$ ) P.M.=388.40gr/mol

P. de fusión=169-172°0 T.F.: Progestina

U.V.: ---



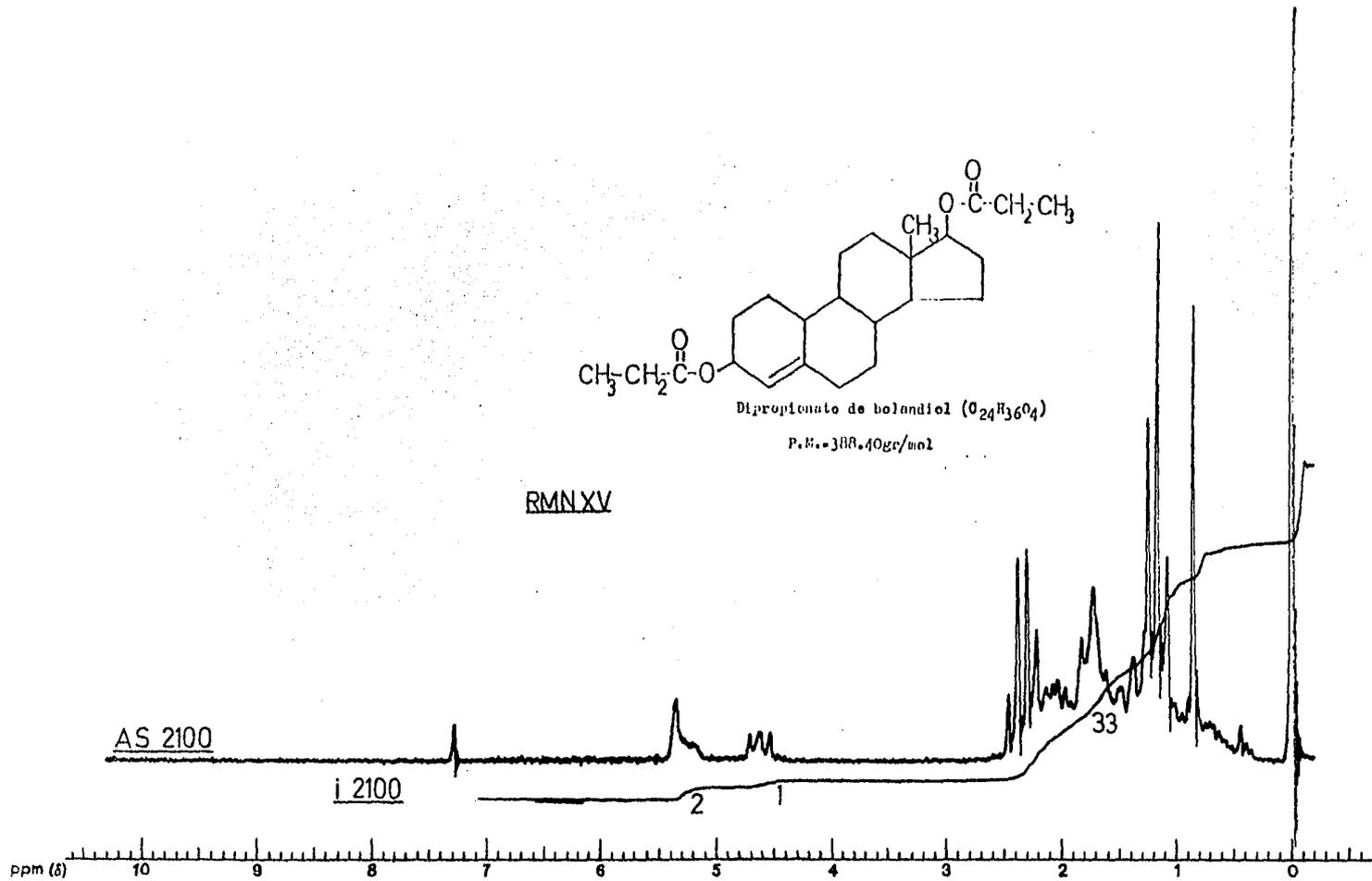
IR ESP XV

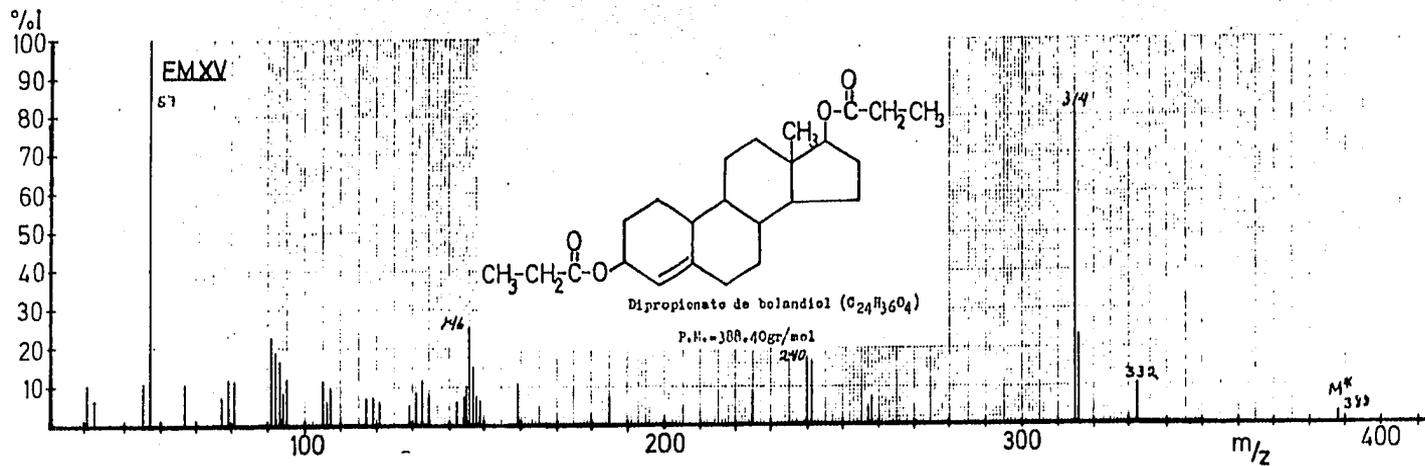


Dipropionate de bolandiol (C<sub>24</sub>H<sub>36</sub>O<sub>4</sub>)

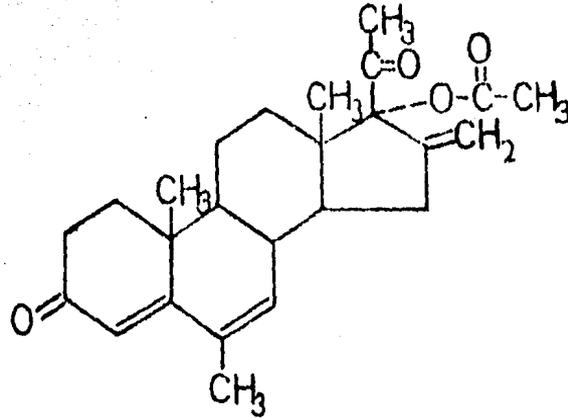
P.M. = 388.40 gr/mol

RMN XV





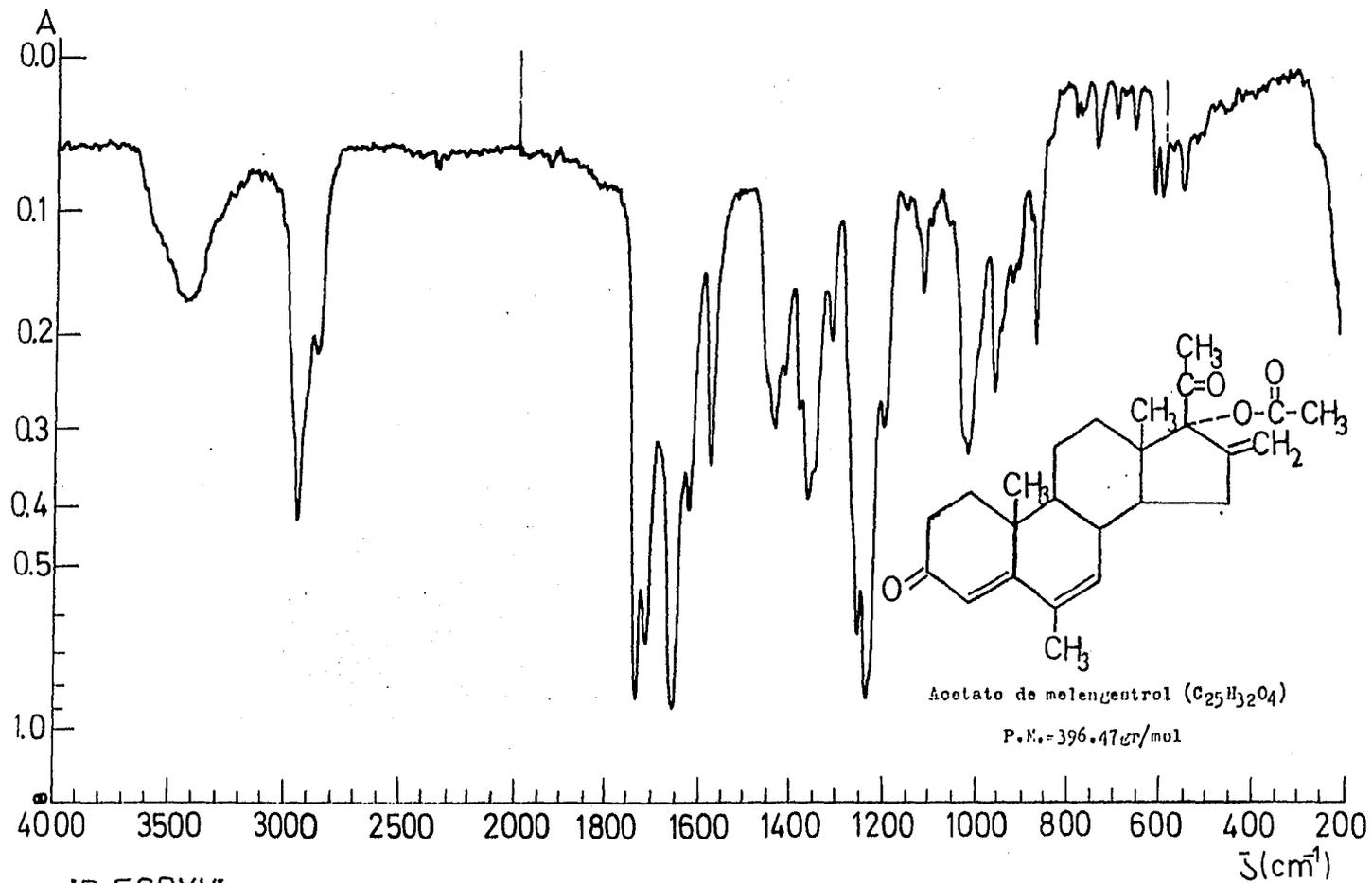
-XVI-



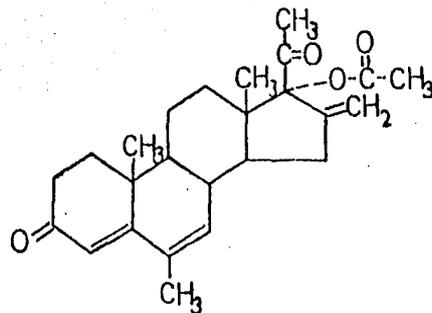
Acetato de melengestrol ( $C_{25}H_{32}O_4$ ) P.M.: 396.47 gr/mol

P. de fusión=224-226°0 T.P.: Progestina

U.V.: 291m  $\lambda$ máx. de absorción



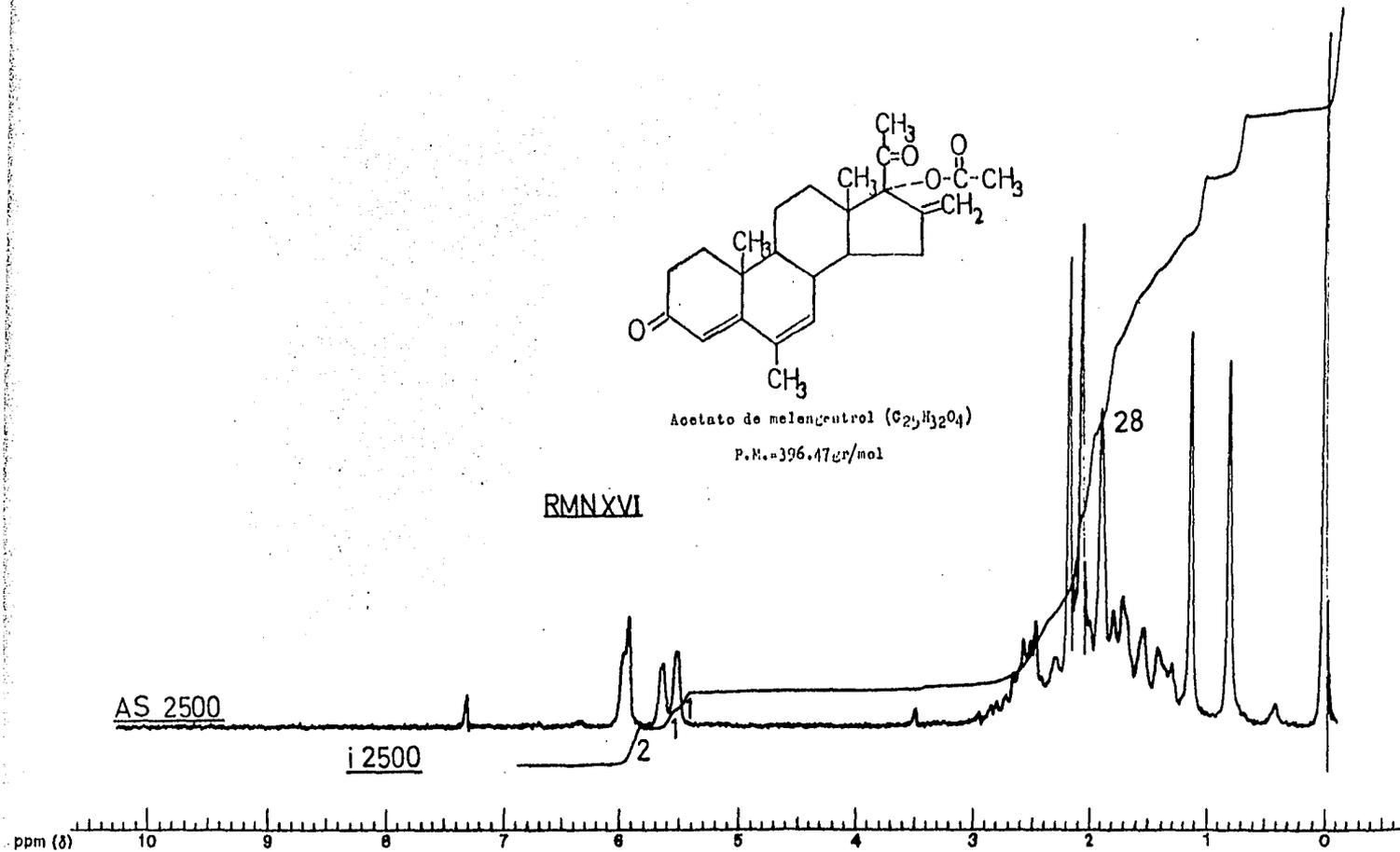
IR ESP.XVI

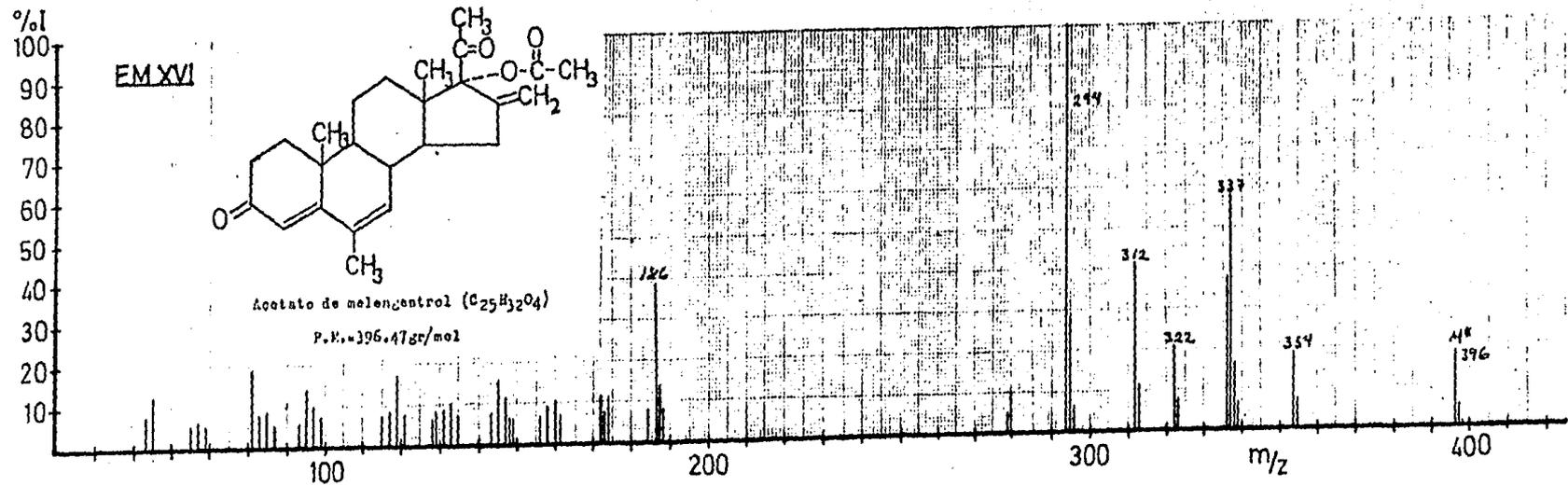


Acetato de melengestrol (C<sub>25</sub>H<sub>32</sub>O<sub>4</sub>)

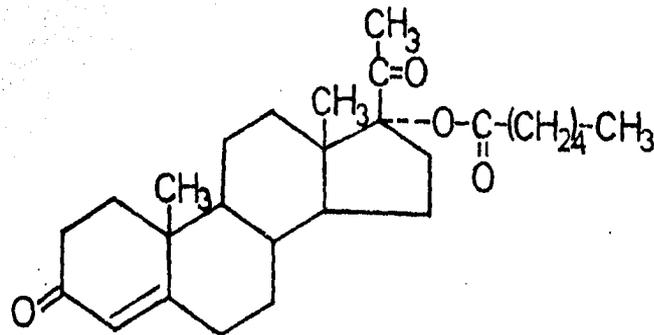
P.M.=396.47 gr/mol

RMN XVI





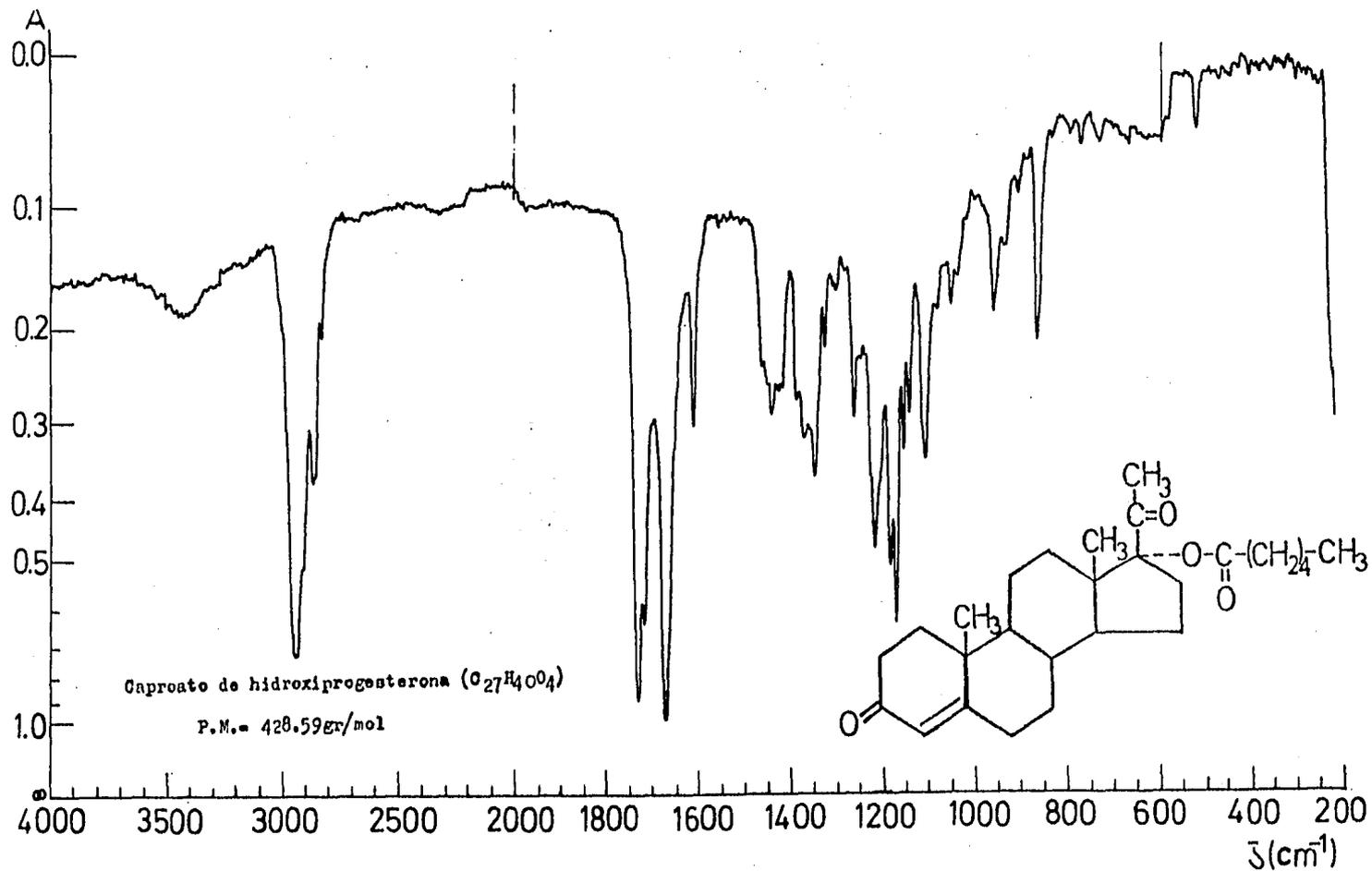
-XVII-



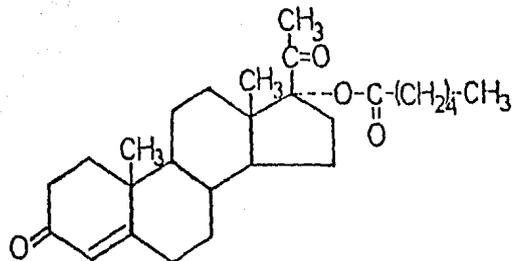
Caproate de hidroxipregesterona (C<sub>27</sub> H<sub>40</sub> O<sub>4</sub>) P.M.=428.59gr/mol

P. de fusión=119-121°C T.F.: Progesterina

U.V.: 243nm λ<sub>máx.</sub> de absorción



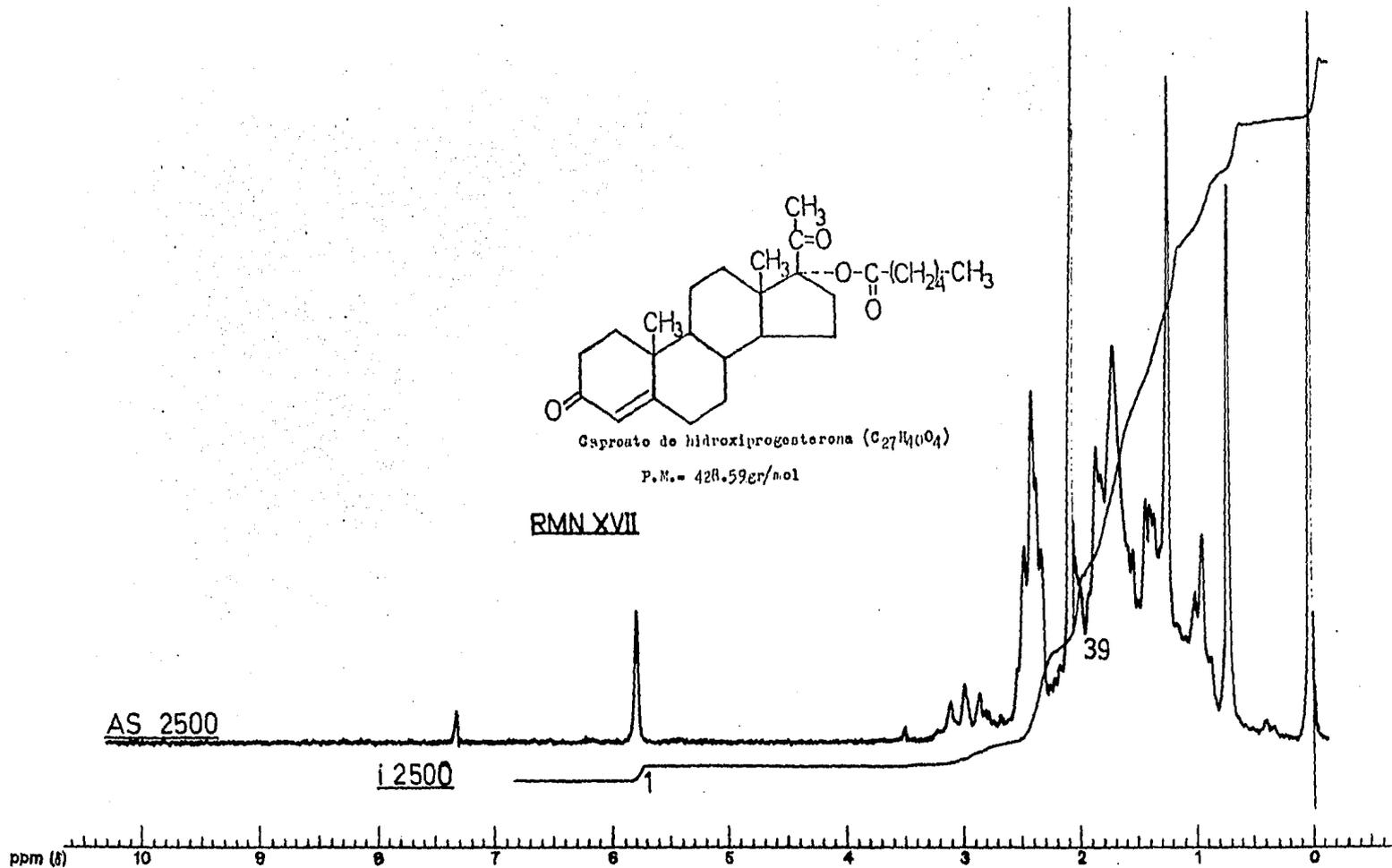
IR ESPXVII

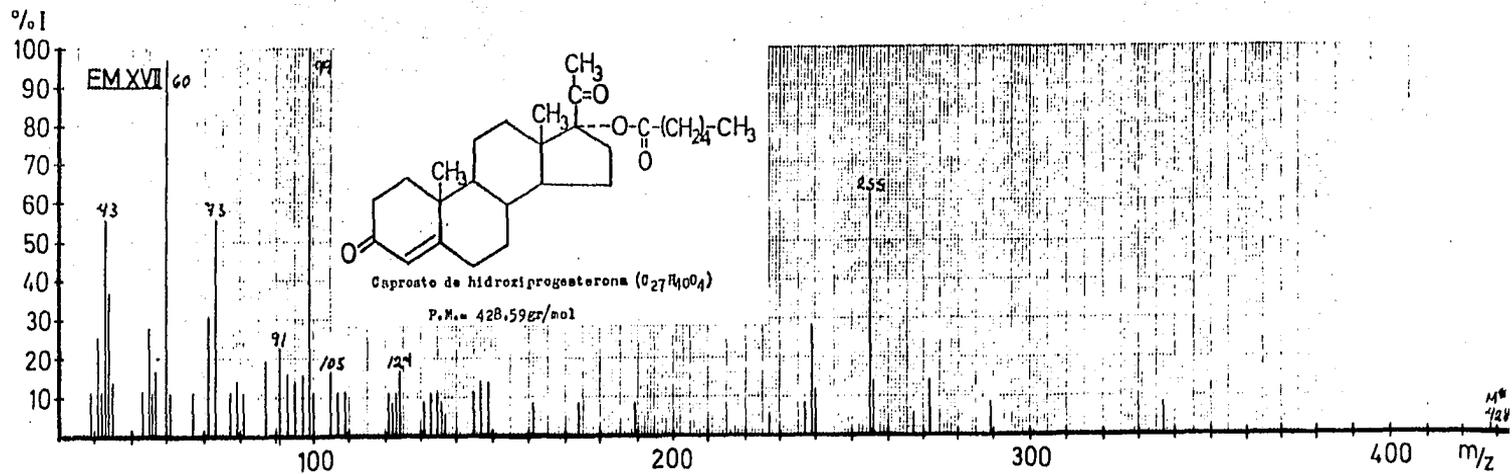


Caproate de hidroxiprogesterona (C<sub>27</sub>H<sub>44</sub>O<sub>4</sub>)

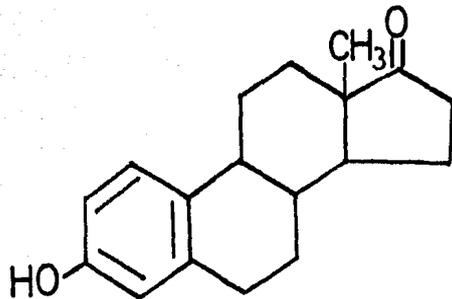
P.M. = 428.59 gr/mol

**RMN XVII**





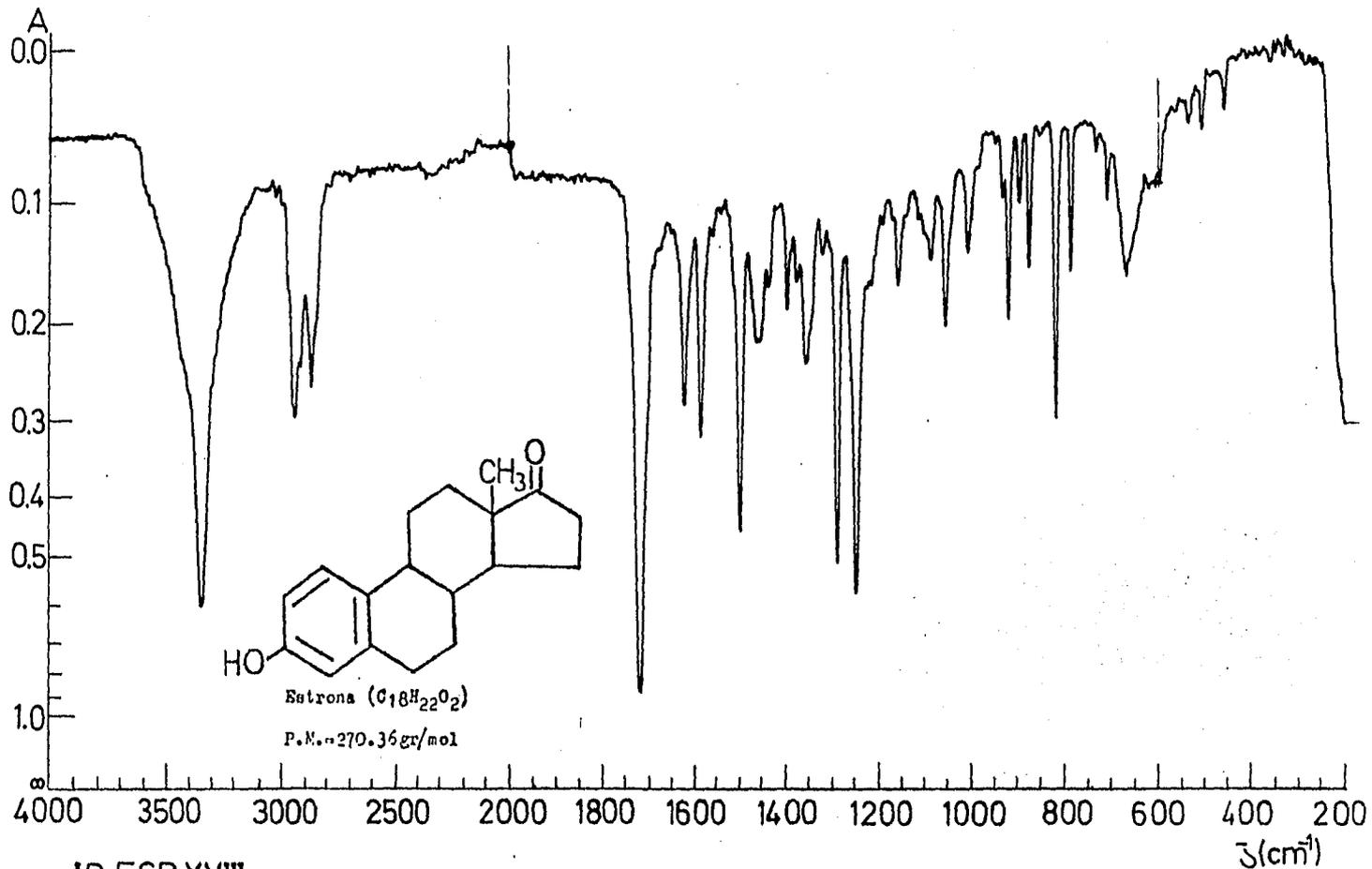
-XVIII-



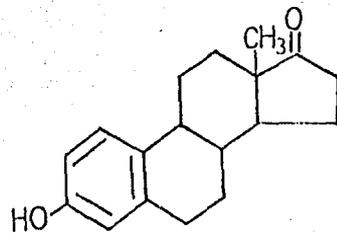
Estrona (C<sub>18</sub>H<sub>22</sub>O<sub>2</sub>) P.M.<sub>r</sub>=270.36gr/mol

P. de fusión=251-254°C T.F.:Estrógeno

U.V.: 285nm  $\lambda$  máx. de absorción



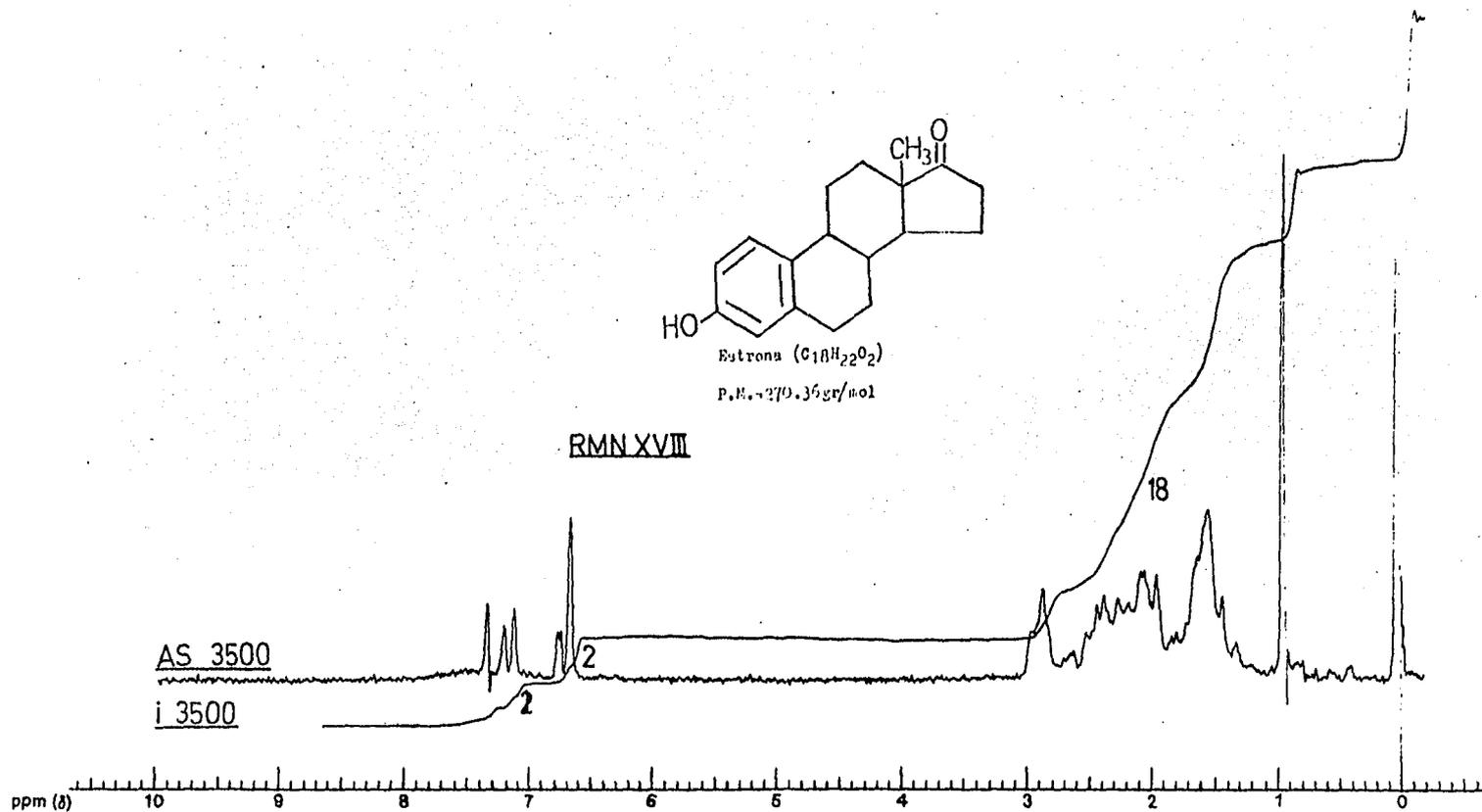
IR ESP XVIII

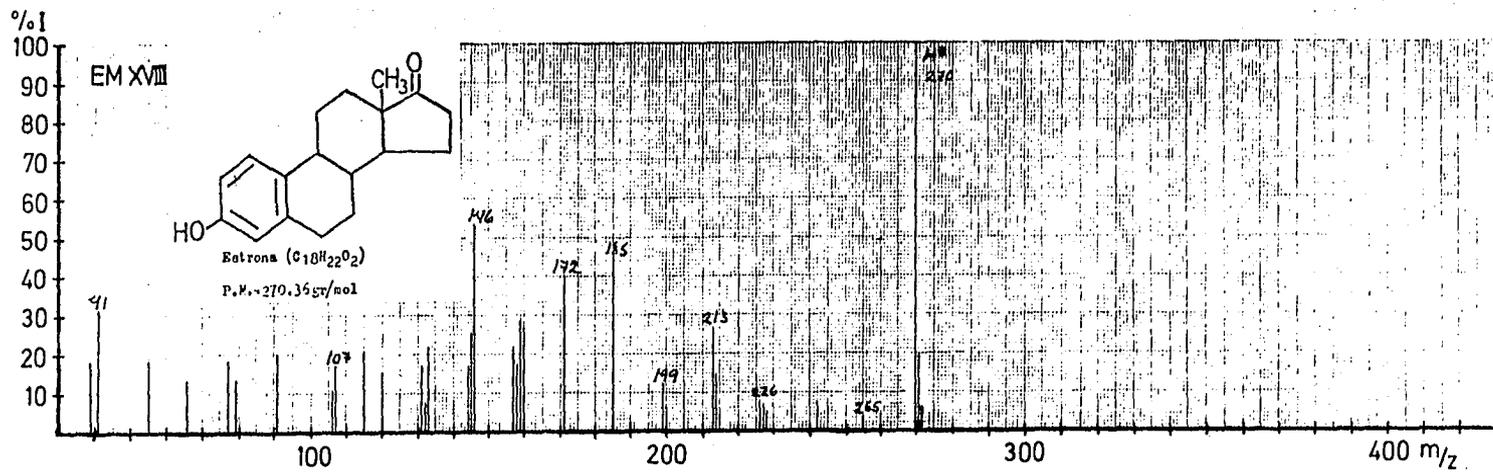


Estroona (C<sub>18</sub>H<sub>22</sub>O<sub>2</sub>)

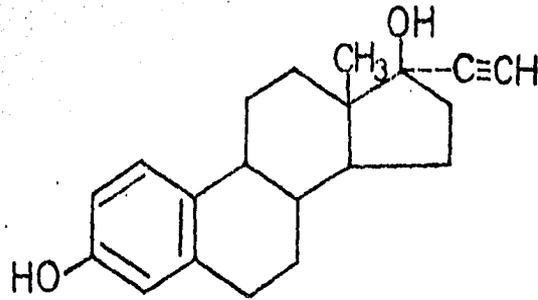
P.M. = 270.36 gr/mol

RMN XVIII





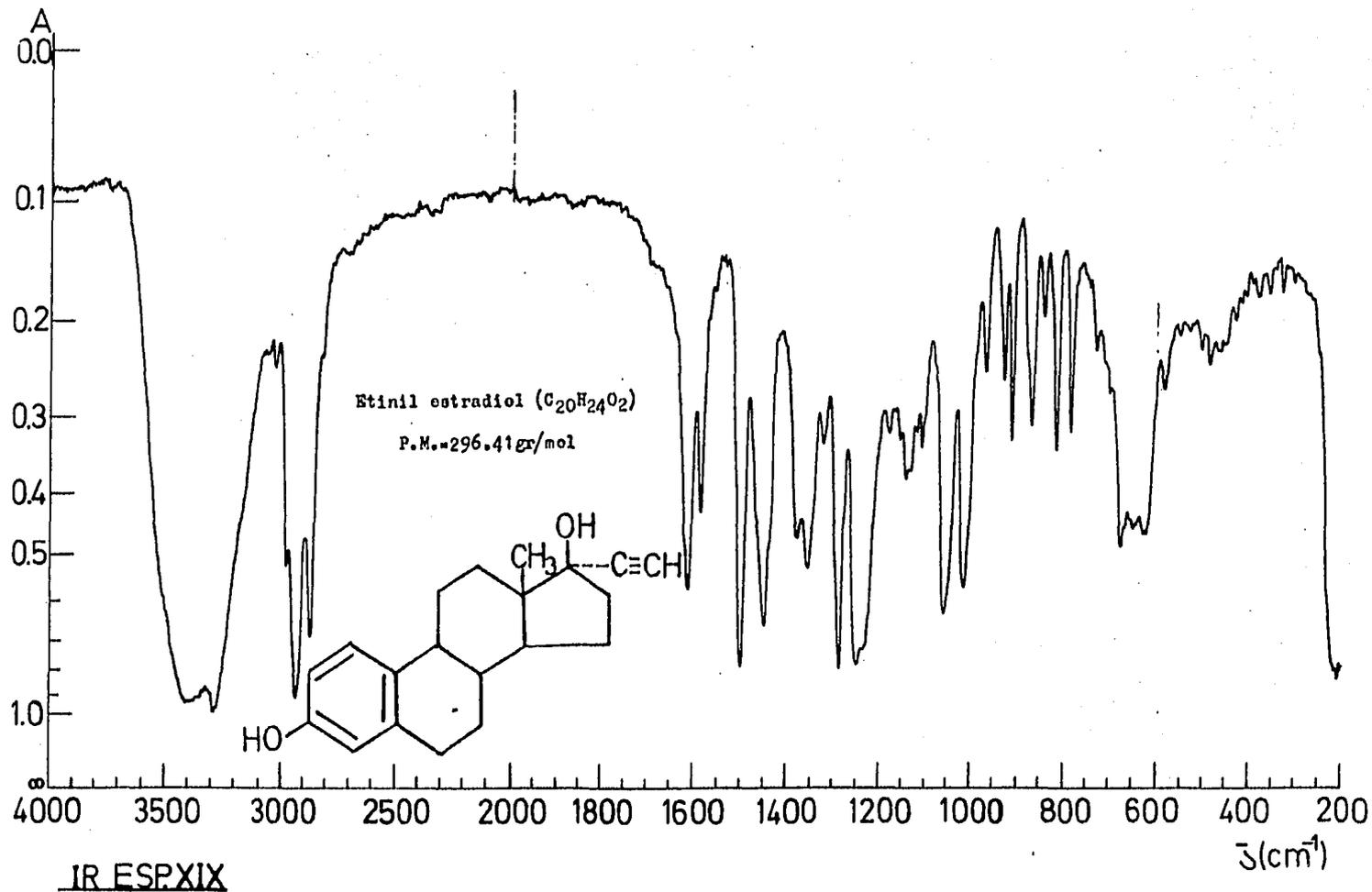
-XIX-

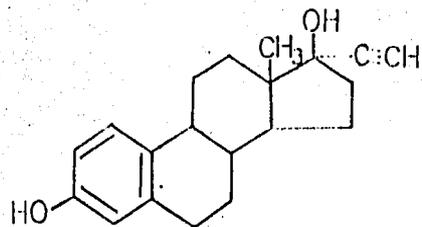


Ethinil estradiol ( $C_{20}H_{24}O_2$ ) P.M.-296.41gr/mol

P. de fusión-180-186°C P.F. Estrogéno

U.V.: 274m  $\lambda_{max}$  de absorción

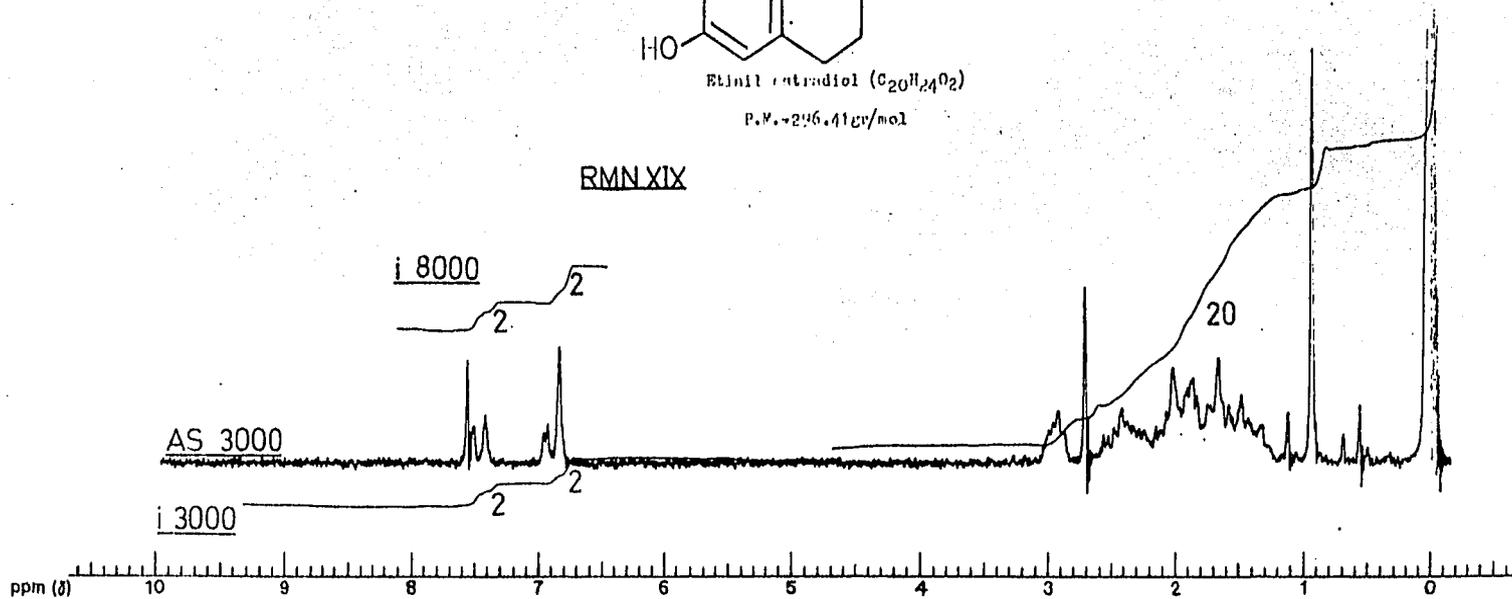


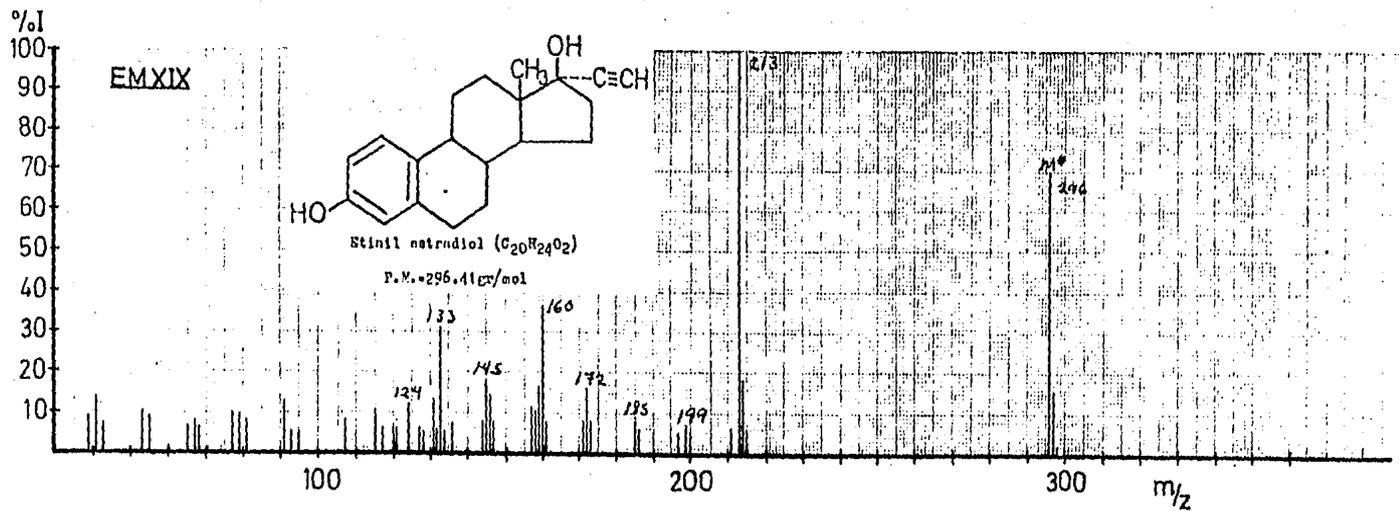


Ethinil estradiol ( $C_{20}H_{24}O_2$ )

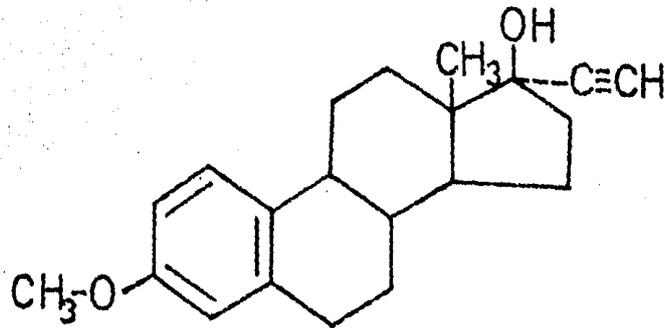
P.V. +216.41 g/mol

RMN XIX





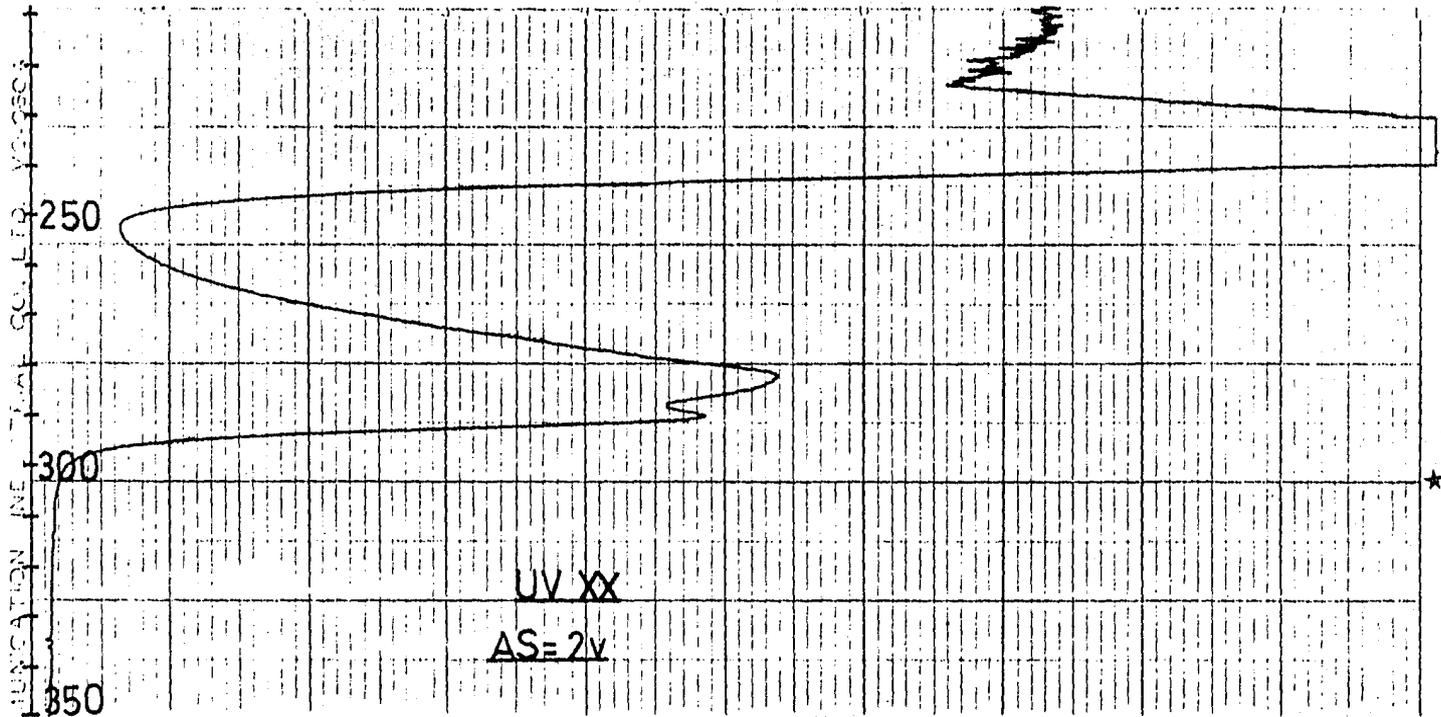
-XX-

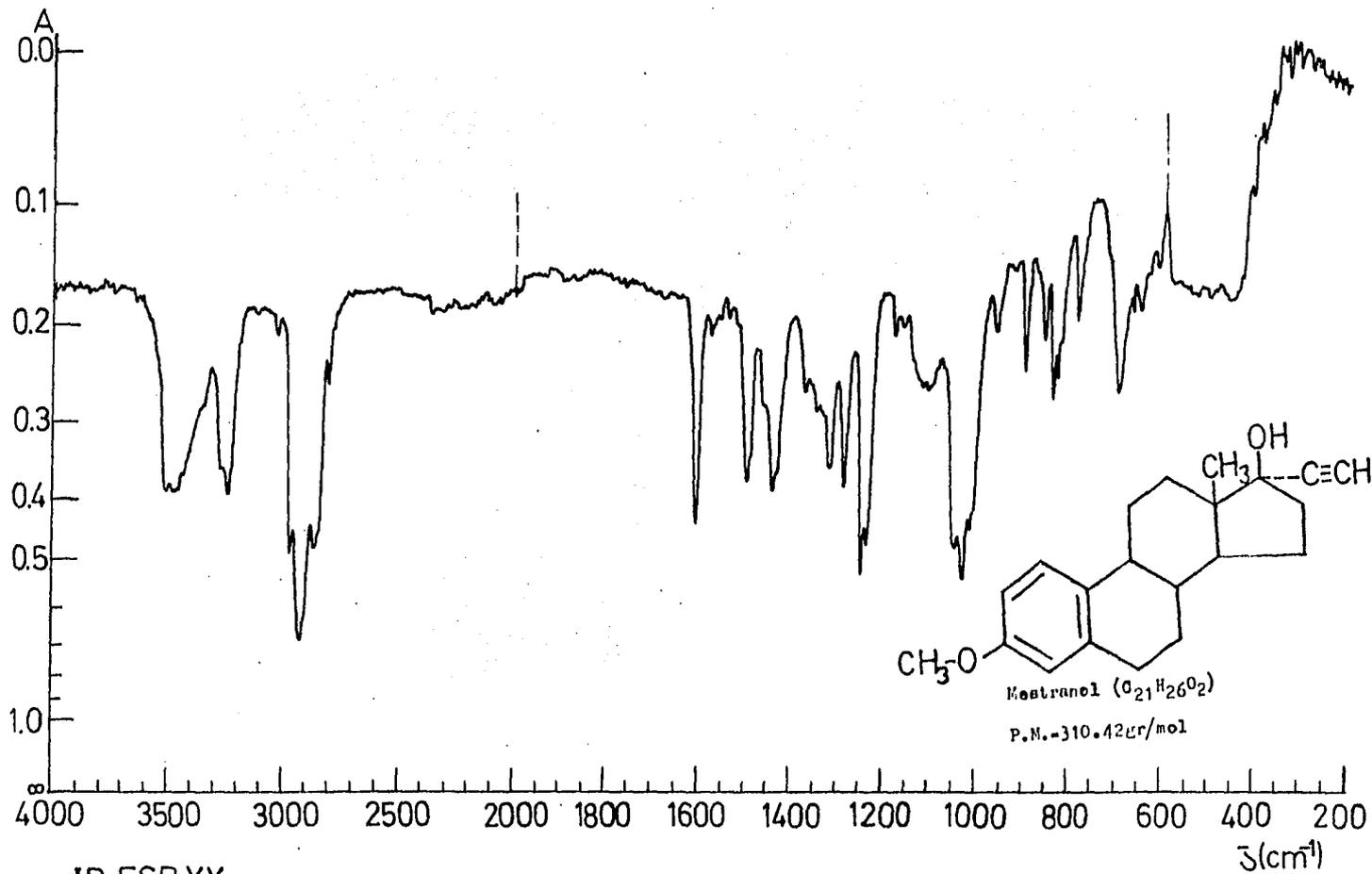


Mestranol ( $C_{21}H_{26}O_2$ )  $P.M.=310.42\text{gr/mol}$

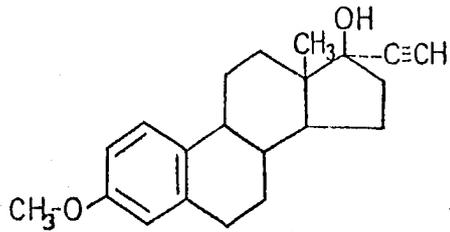
P. de fusión = 150-151°  $T.F.: \text{Estrógeno}$

U.V.: 290nm y 283nm  $\lambda_{\text{máx. de absorción}}$





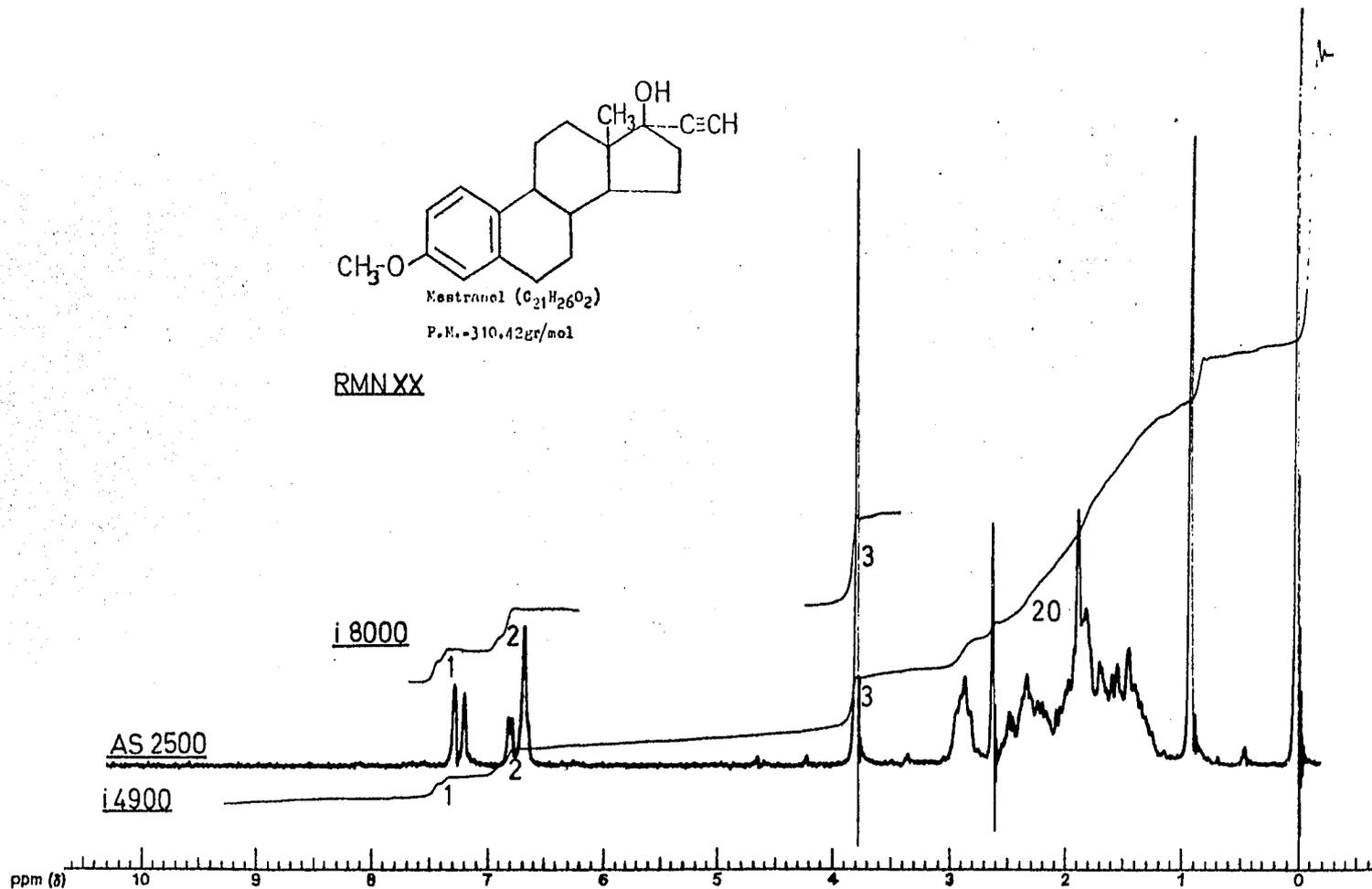
IR ESP XX

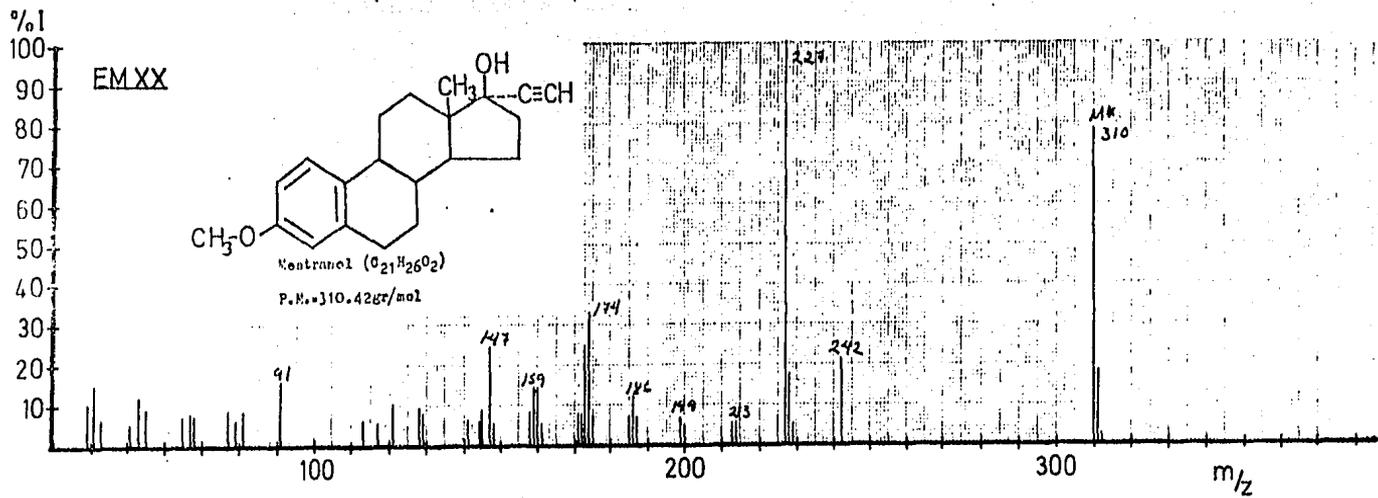


Mentranol (C<sub>21</sub>H<sub>26</sub>O<sub>2</sub>)

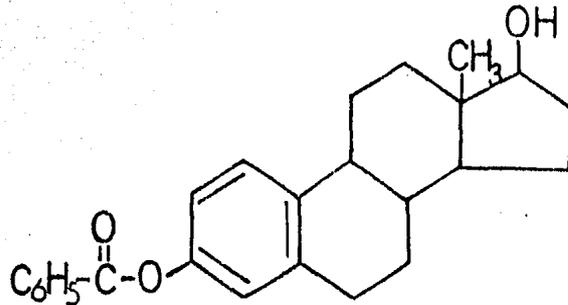
P.M. = 310.42 gr/mol

RMN XX





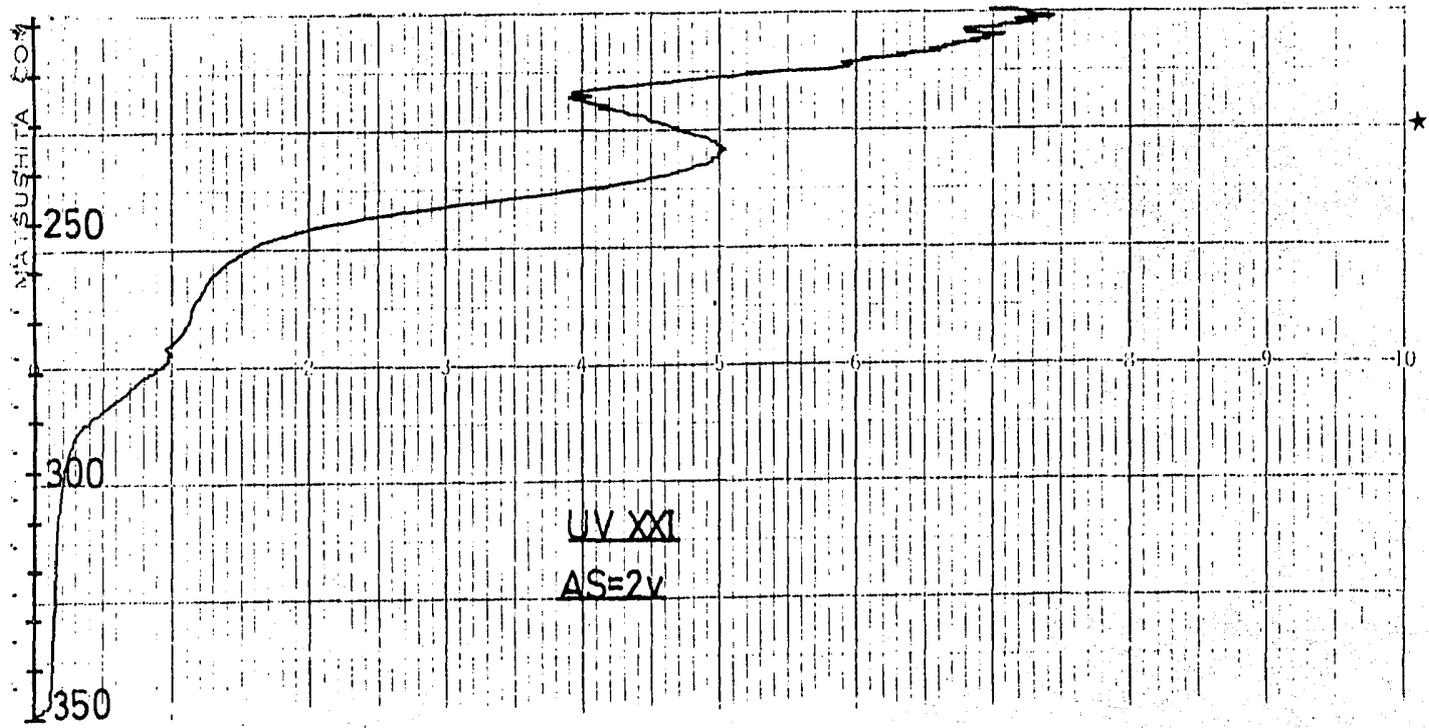
-XXI-

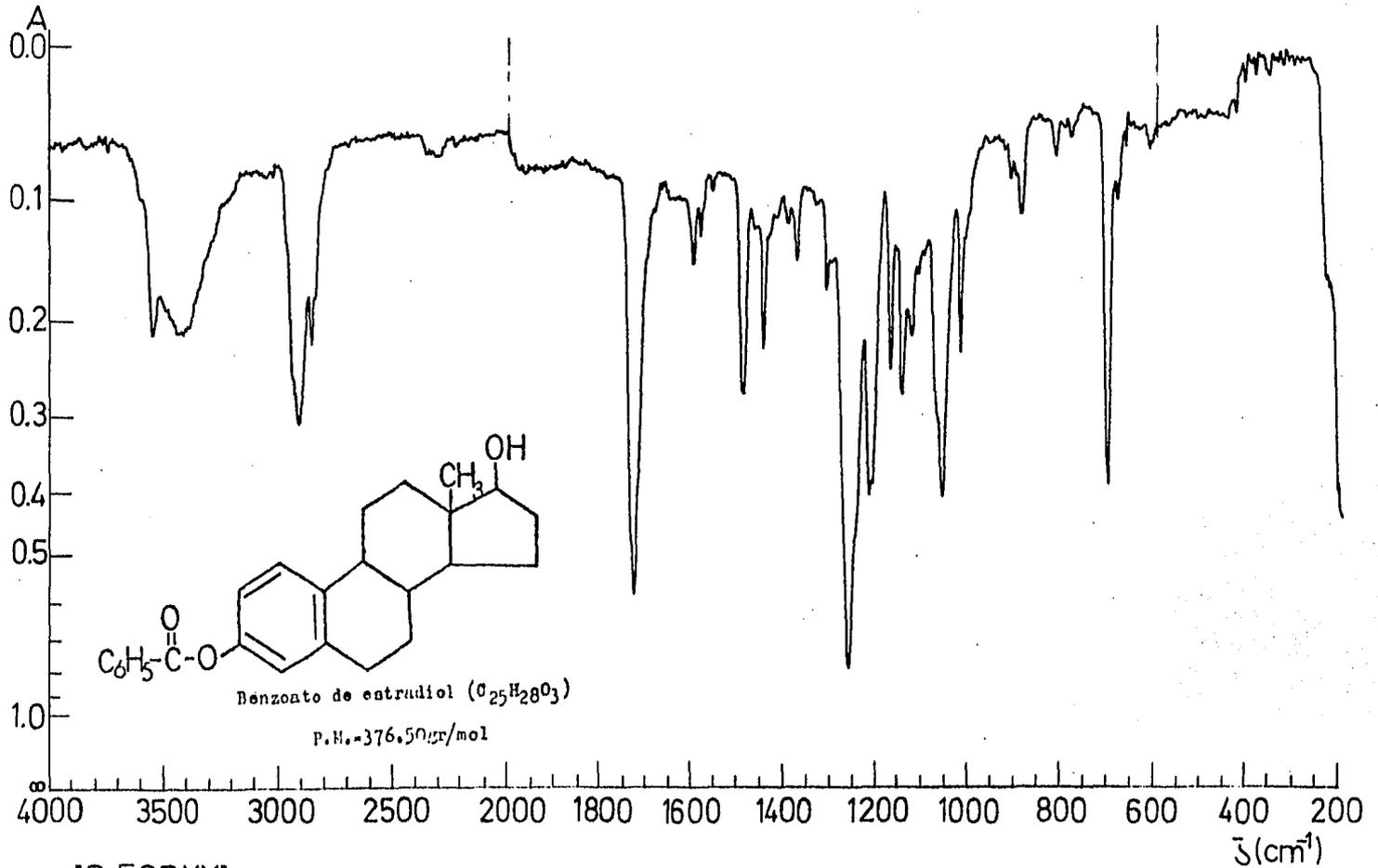


Benzoate de estradiol (C<sub>25</sub>H<sub>28</sub>O<sub>3</sub>) P.M.=376.50gr/mol

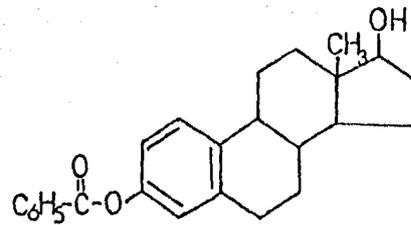
P. de fusión=191-196°C T.F.:Estrógeno

U.V.: 237nm λm&x. de absorción





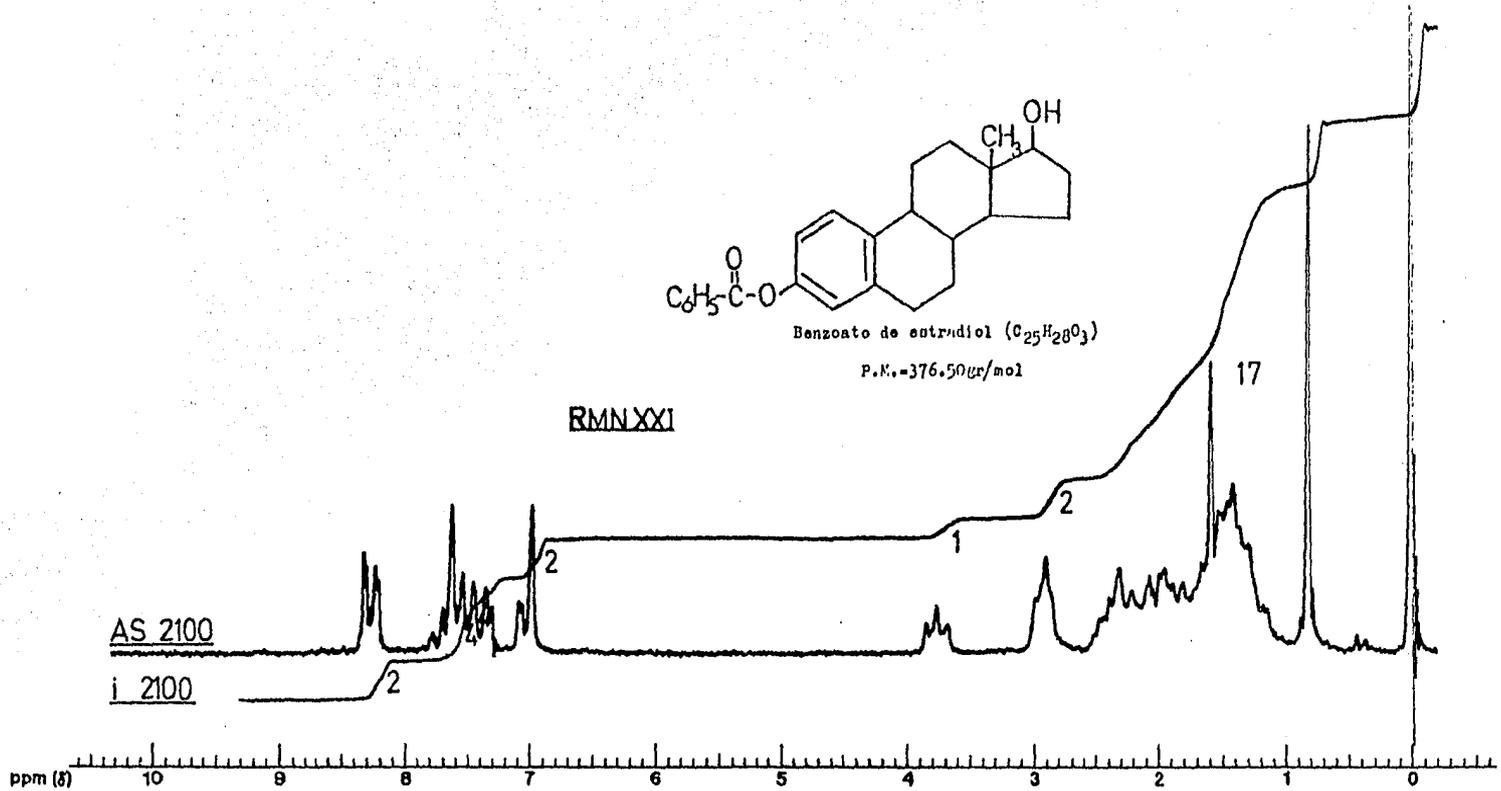
IR ESPXXI

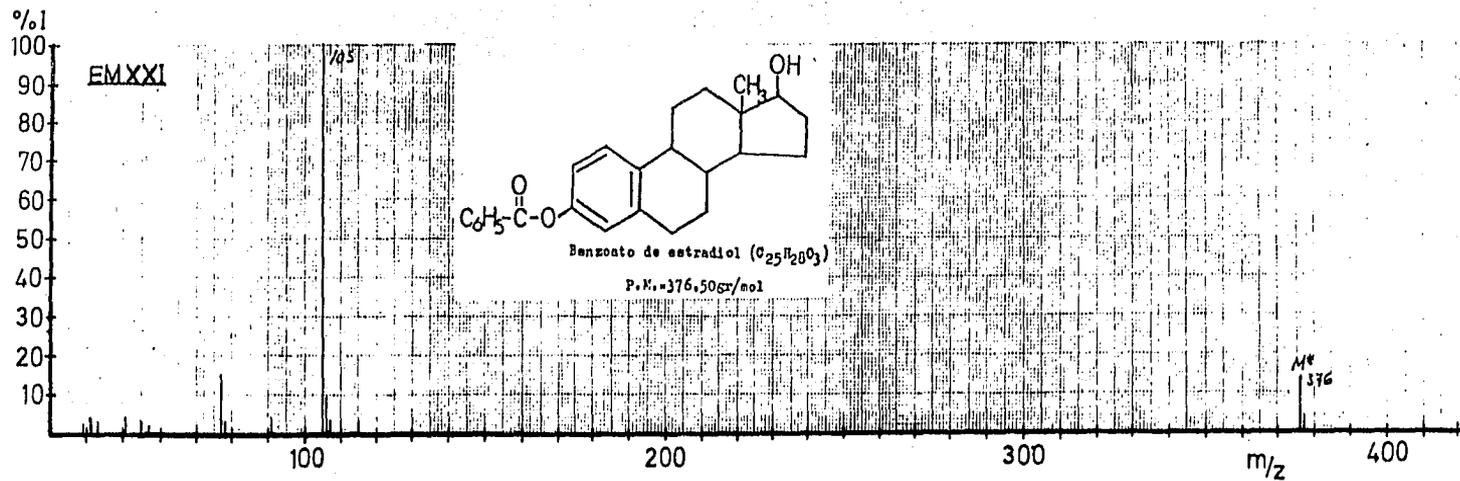


Benzoato de estradiol (C<sub>25</sub>H<sub>28</sub>O<sub>3</sub>)

P.M.=376.50gr/mol

RMN XXI





APENDICE II

Aplicación cuantitativa del catálogo espectroscópico de esteroides en mezclas farmacológicas.

En este trabajo se presenta la posibilidad de aplicar las técnicas espectroscópicas a medicamentos anovulatorios formados por mezclas de esteroides del tipo androgénico, progestínico y estrogénico como ya se ha mencionado en la parte teórica de los esteroides. Las mezclas de esteroides que se utilizan comunmente en el mercado como anticonceptivos orales son los presentados en el cuadro I (pág. 26), de los ahí mencionados no se dispuso de los esteroides Valerianato de estradiol ni enantato de testosterona, todos los demás esteroides se analizaron por las 4 técnicas espectroscópicas. Otra observación es que las mezclas comunes utilizadas son de andrógenos y estrógenos, progestinas y estrógenos y solamente de andrógenos.

En este apéndice se expondrán las aplicaciones analíticas que se pueden llevar a cabo contando con el catálogo espectroscópico, empleandolo para el análisis de las mezclas anteriores, determinando en cuál de estas técnicas es factible realizar un análisis cuantitativo.

Se tomó una mezcla representativa para realizar el trabajo cuantitativo por las técnicas espectroscópicas que lo permitan, así como por la técnica de cromatografía de gases que es la técnica más común para la determinación cuantitativa de compuestos orgánicos, y que será el método de referencia.

Ultravioleta.

En la literatura (14,15) se aprecia la importancia que representa el conocer los valores de  $\lambda$  máx. y  $\log \epsilon$  para estos esteroides, ya que la técnica más empleada para la determinación cuantitativa en mezclas es la espectroscopía U.V. (como en el caso de mezclas entre Norgestrel y Etilnil estradiol, Noretindrona y Etilnil estradiol Acetato de noretindrona y Etilnil estradiol, etc.).

De los resultados obtenidos por U.V. para los esteroides estudiados (tabla # 4 pág. 35) y aplicando la ley de aditividades para la realización del análisis cuantitativo, se observa que las mezclas que se pueden estudiar por esta técnica son todas las presentes en el cuadro I con excepción de las mezclas 1 y 4. Para ejemplificar lo anterior se analizó una mezcla de Norgestrel y Etilnil estradiol que presenta una relación de 5:1 en peso respectivamente. Se preparan estándares de Norgestrel y Etilnil estradiol para calcular los valores de  $\epsilon$  a las longitudes de onda en que cada uno de los componentes absorbe, obteniéndose los siguientes resultados:

	$\lambda=285\text{nm}$	$\lambda=246\text{nm}$	F.M. (g/mol)
Norgestrel	$\epsilon=45.70 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$	$\epsilon'=22,908.65 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$	312.45
Etinil estradiol	$\epsilon=4365.16 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$	$\epsilon'=408.60 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$	296.41

Conociendo ya estos valores se prepara una mezcla de estos esteroides, de los datos obtenidos se obtienen los siguientes resultados:

	<u>Peso de muestra</u>	<u>Concentración (en 25ml)</u>
Norgestrel	4.973mg	$6.4 \times 10^{-4} \text{ M}$
Etinil estradiol	1.081mg	$1.5 \times 10^{-4} \text{ M}$
	$\lambda=285\text{nm}$	$\lambda=246\text{nm}$
Mezcla	A=0.684	A=8.771

Con estos valores se realizan los siguientes cálculos:

Norgestrel (N) y Etinil estradiol (EE)

$$\begin{aligned}
 0.684 &= 45.70 C_N + 4365.16 C_{EE} && \times 22908.65 \\
 8.771 &= 22908.65 C_N + 408.60 C_{EE} && \times 45.7 \\
 \hline
 15669.52 &= 1046925.30 C_N + 999999230 C_{EE} \\
 - 400.84 &= 1046925.30 C_N + 15673.020 C_{EE} \\
 \hline
 15268.68 &= 99981250 C_{EE}
 \end{aligned}$$

$$C_{EE} = \frac{15268.68}{99981250 \text{ mol}^{-1} \text{ l}} = 1.5 \times 10^{-4} \text{ M}$$

$$C_N = \frac{0.684 - (4365.16 \text{ mol}^{-1} \text{ l})(1.5 \times 10^{-4} \text{ mol/l})}{45.7 \text{ mol}^{-1} \text{ l}} = 6.4 \times 10^{-4} \text{ M}$$

Como se puede observar los valores obtenidos experimentalmente concuerdan con las cantidades utilizadas al preparar la mezcla.

El proceso se confirmó analizando un anticonceptivo comercial en forma de comprimidos, sin película de color y el Nordiol que es el mismo tipo de anticonceptivo, pero con película de color, el contenido indicado por los laboratorios productores para estos medicamentos es:

	<u>Peso en la tableta</u>
Norgestrel	0.25mg
Etinil estradiol	0.05mg

La técnica de extracción utilizada es la misma que se utiliza en la técnica - cromatográfica:

Se pulverizaron y homogeneizaron aprox. 70 tabletas. Se pesa con exactitud el peso promedio correspondiente a 10 tabletas. (Anteriormente se calcula el peso promedio de 10 tabletas).

Se transfirió el polvo a un embudo de separación con ayuda de 20ml de agua - destilada, se agita y deja reposar 5 minutos, enseguida se extrae con 3 porciones de 20ml de cloroformo. Los extractos se reúnen y se evaporan en un rotavapor, el - residuo que se obtiene se disuelve en metanol y se pasa a un matraz aforado de 50ml y se lee al U.V. a  $\lambda=285\text{nm}$  y  $\lambda=246\text{nm}$ .

Por 10 tabletas se tiene:

	<u>Peso en la tableta</u>	<u>Concentración</u>
Norgestrel	2.50mg	$1.6 \times 10^{-4} \text{M}$
Etinil estradiol	0.50mg	$3.4 \times 10^{-5} \text{M}$

Realizando esto para 3 diferentes extracciones se obtuvieron de resultados:

Etinil estradiol  $0.049 \pm 0.0014 \text{mg}$  por tableta.

Norgestrel  $0.232 \pm 0.0132 \text{mg}$  por tableta.

tomando relaciones en peso de la mezcla:

$4.767 \pm 0.260$  de N por 1 de EE

### Infrarrojo.

Esta técnica ofrece la posibilidad de determinar un número grande de sustancias el problema es que para determinar cuantitativamente los componentes de mezclas se puede trabajar de 2 maneras:

- 1) Obteniendo una banda que corresponda a uno solo de los componentes y otra banda para el otro componente.
- 2) Trabajando la ley de aditividad como en U.V..

El problema en el caso de las mezclas estudiadas es que no se puede encontrar el primero de los casos (ver los espectros de I.R. de los diferentes esteroides que se tienen en las mezclas).

Y en caso de utilizar la segunda, se presenta el problema de que los espectros se obtuvieron en pastilla de KBr y para realizar la determinación cuantitativa de los componentes aplicando la ley de Beer se requiere de obtenerlos en solución, lo que genera problemas en el sentido de:

-Escoger el disolvente adecuado.

-Que no presenten desviaciones a la ley de Beer en la zona de trabajo.

-Calibración del aparato en 0 y 100% de transmitancia.

-Disminuir en lo más posible la estrechez de las bandas obtenidas en los espectros.

Por los problemas anteriores, no se realizó la determinación cuantitativa de las mezclas por esta técnica, debido a que no es el objetivo principal de la tesis, y en este apéndice se desean técnicas rápidas para el análisis de mezclas anticonceptivas.

### Resonancia Magnética Nuclear.

En la R.M.N. se tiene una cualidad técnica que es la proporcionalidad directa entre las áreas de los picos y el número de núcleos que producen el pico (como consecuencia, la determinación cuantitativa de un compuesto específico no requiere - muestras puras del compuesto para su calibración). Así, si un pico identificable de uno de los constituyentes de una muestra no traslapa los picos de los otros constituyentes, puede emplearse el área de este pico para establecer directamente la concentración de la especie, siempre que se conozca el área de la señal por protón, y se realice una calibración con un estándar, es decir tener un patrón de concentración conocida.

De los espectros de R.M.N. obtenidos para los esteroides presentes en las mezclas, se observa que la zona de 0.5-3.0ppm no permite la determinación cuantitativamente de los componentes de las mezclas, pero las señales fuera de esta zona de  $\delta$  - permite el analizar cuantitativamente las mezclas. De las mezclas presentes en el cuadro I (pag. 26) se estudiaron todas por esta técnica excepto la primera, segunda y cuarta, esto debido a que para la primera no se tienen señales diferentes de los componentes que lo constituyen, la segunda que sí se puede realizar, presenta una relación en peso grande y en la cuarta se traslapan 2 de las señales. De los espectros obtenidos las señales de cada uno de los esteroides que cumplen estos requisitos son:

I.....Testosterona .... 5.75ppm del H del C-4.

VI....Dipropionato de metil androstenediol .... 5.40ppm del H del C-6.

XII....Norgestrel .... 6.1ppm del H del C-4.

XIII...Progesterona .... 5.8ppm del H del C-4.

XVII...Caproato de hidroxiprogesterona .... 5.8ppm del metoxilo.

XVIII..Estrona .... 6.5-7.2ppm del H del C-1,2,4.

XIX....Etinil estradiol .... 6.5-7.2ppm del H del C-1,2,4.

XXI....Benzoato de estradiol .... 6.5-7.2ppm del H del C-1,2,4 y 7.3-8.3ppm del H

del grupo benzoato.

Utilizando esteroides patrón se corren los espectros de las siguientes mezclas:

- |  |  |
|--|--|
| 1.... Progesterona (P)<br>Benzoato de estradiol (BE) | 2.... Caproato de hidroxiprogesterona (CH)<br>Benzoato de estradiol (BE) |
| 3.... Progesterona (P)<br>Estrona (E)                | 4.... Progesterona (P)<br>Dipropionato de matil androstenediol<br>(DMA)  |
| 5.... Norgestrel (N)<br>Etinil estradiol (EE)        |  |

Aprovechando la relación que hay entre las integraciones de los diferentes picos se puede calcular la relación en que se encuentran estos esteroides utilizando los siguientes cálculos:

Tomando como ejemplo la mezcla 1 y la integración a 2000.

$$0.8\text{cm}--8\text{H BE} == 0.1\text{cm}--1\text{H BE y } 1.0\text{cm}--1\text{H P}$$

esto da una relación molar igual a: 10

pero ya que buscamos relación en peso:

multiplicamos el P.M. del BE por la relación molar y ésta dividida por el P.M. de la P nos da una relación de: 12 de P por 1 de BE

y el valor teórico de acuerdo a las cantidades de los principios activos usados para su preparación fueron:

P	191.80mg	
BE	15.98mg	12 a 1

Realizando lo mismo para cada una de las mezclas se obtienen los siguientes resultados:

<u>Mezcla No.</u>	<u>Relación teórica</u>	<u>Relación experimental</u>
1 (Esp. No. XXV)	1 BE por 12 P	1 BE por 12.19 <sup>+</sup> -0.61 P
2 (Esp. No. XXVI)	1 BE por 7.3 CH	1 BE por 7.23 <sup>+</sup> -0.65 CH
3 (Esp. No. XXVII)	1 E por 9 P	1 E por 9.09 <sup>+</sup> -1.46 P
4 (Esp. No. XXVIII)	1 P por 2.5 DMA	1 P por 2.5 DMA
5 (Esp. No. XXIX)	1 EE por 5.2 N	1 EE por 5.31 <sup>+</sup> -0.61 N

La mezcla No. 5 se analizo extrayendo practicamente los esteroides del fármaco Nordiol que ya habia sido valorado por U.V., empleando la misma técnica de extrac-

ción, solamente que en lugar de disolver el residuo en metanol se disuelve en 3ml de  $\text{CDCl}_3$ , obteniéndose el siguiente resultado (ver espectro No. XXX):

5.08<sup>+</sup>-0.60 de N por 1 de EE

#### Espectrometría de masas.

Para realizar un análisis cuantitativo por medio de esta técnica se necesitan cumplir los siguientes requerimientos básicos:

- 1) Cada componente debe exhibir por lo menos un pico que difiera marcadamente de los demás.
- 2) La contribución de cada componente a un pico debe ser linealmente aditiva.
- 3) Presentar una buena sensibilidad.
- 4) Disponer de estándares apropiados para calibración.

Cumpliendo los requisitos anteriores se necesita realizar una calibración con los estándares de tal manera que las alturas de picos sean directamente proporcionales a las presiones parciales de los componentes. En caso de no encontrar un pico único para cada componente, se tiene que resolver una serie de ecuaciones simultáneas, utilizándose normalmente para esto computadoras. En caso de contar con un sistema acoplado de C.G.-E.M. se pueden resolver de una manera más sencilla estas mezclas, en el caso de este trabajo no se contaba con un aparato que permitiera el realizar el análisis cuantitativo y por lo tanto sólo es mencionado, además de los motivos ya mencionados en la parte técnica de I.R..

#### Cromatografía de gases.

La técnica de cromatografía de gases es una de las técnicas cuantitativas más utilizadas para el análisis de mezclas orgánicas. Para comprobar y comparar las técnicas anteriores se realiza también un análisis cuantitativo por medio de la C.G., aplicando una metodología para determinar cuantitativamente la mezcla de EE y N en el medicamento, ya realizada con anterioridad en la sección de C.G. en el Depto. de Química Analítica de la D.E.Pg., y que se describe a continuación:

#### "Método propuesto para la determinación de Norgestrel y Etilnil estradiol en tabletas"

-Preparación de la disolución estandar.

Disol. A: Colesterol de referencia en  $\text{CHCl}_3$  a una conc. de 500 $\mu\text{g/ml}$ .

Disol. B: Norgestrel de referencia en  $\text{CHCl}_3$  a una conc. de 2,500 $\mu\text{g/ml}$ .

Disol. C: Etilnil estradiol de referencia en  $\text{CHCl}_3$  a una conc. de 500 $\mu\text{g/ml}$ .

-Preparación de mezcla estándar.

1ml de disol. A + 1ml de disol. B + 1ml de disol. C === aforar a 10ml con  $\text{CHCl}_3$

-Extracción de los principios activos en las tabletas.

Se pulverizaran y homogenizan aprox. 70 tabletas. Se pesa con exactitud el peso promedio correspondiente a 10 tabletas.

Se transfiere el polvo a un embudo de separación con ayuda de 20ml de agua - destilada, se agita y deja reposar 5 minutos, enseguida se extrae con 3 porciones de 20ml de cloroformo. Los extractos se reúnen y evaporan en un rotavapor hasta un volumen aprox. de 3ml, se transfieren a un matraz aforado de 10ml con ayuda de más  $\text{CHCl}_3$ , agregar 1ml de la disol. A de Colesterol y se afora.

-Condiciones cromatográficas.

Cromatógrafo: Varian Aerograph Serie 2100 con detector de ionización de flama.

Integrador: Spectra Physics SP4100 Computing Integrator.

Columna: 10% QF-1 Chromosorb WHP 100/120 de 6ft1/8" de vidrio.

Temperaturas: Columna 245°C; Detector 250°C e Inyector 250°C.

Flujo de nitrógeno: 25ml por minuto.

Se empleó el método de estándar interno, programando al integrador con el programa I (ver anexo I), obteniéndose para el medicamento estudiado los siguientes - resultados:

Etinil estradiol  $0.050^+ - 0.0064\text{mg}$  por tableta.

Norgestrel  $0.247^+ - 0.0153\text{mg}$  por tableta.

tomando relaciones en peso de la mezcla:

$4.9559^+ - 0.4187$  de N por 1 de EE

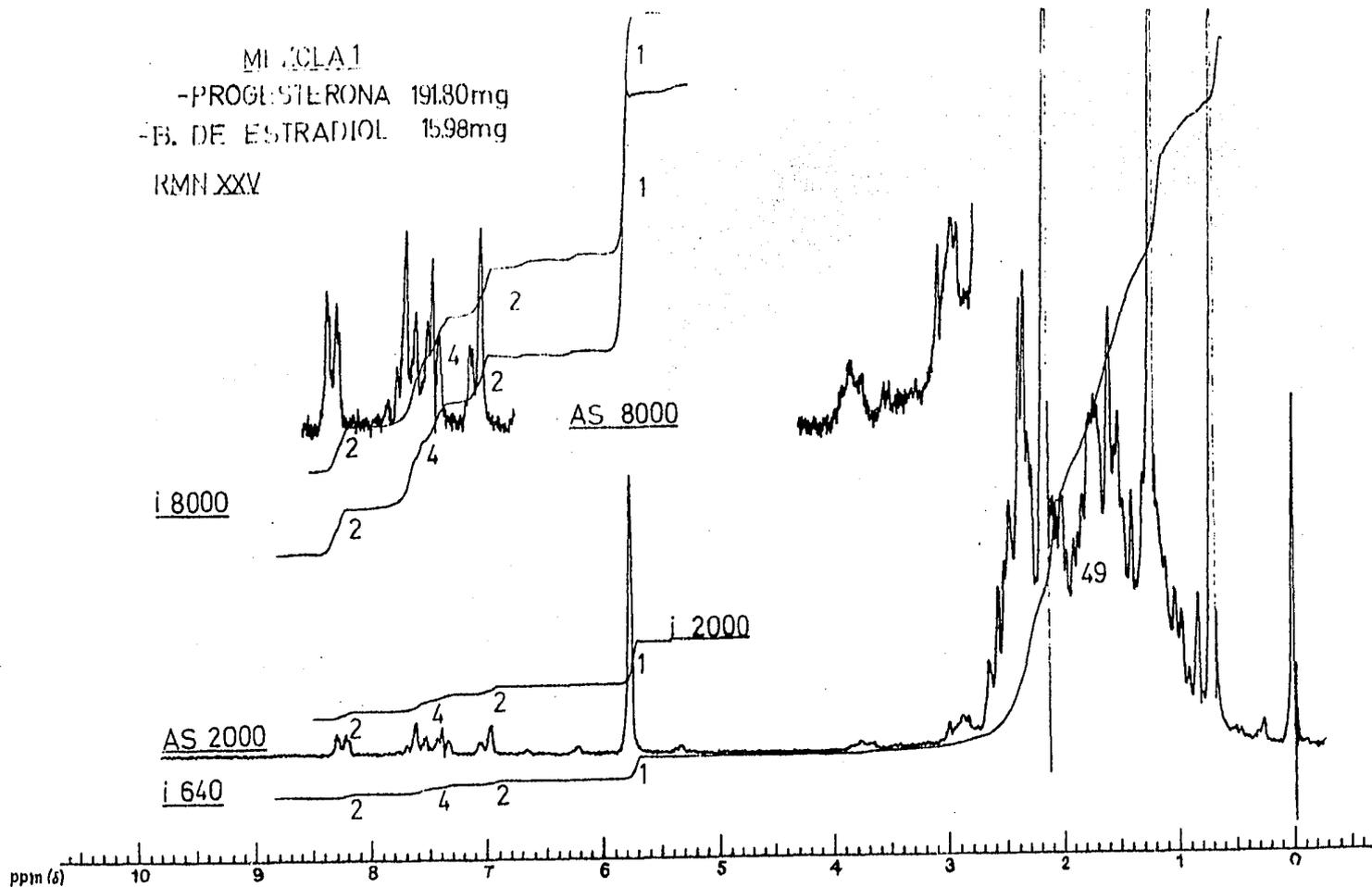
Algo que es importante hacer notar es que el intervalo de confianza es grande debido a que la columna utilizada ya tenía cierto tiempo de haber sido empacada y por lo tanto su capacidad de separación se ve disminuida, cuando la columna se encuentra en estado óptimo se esperaría un intervalo de confianza del orden de: 0.250

### Conclusión

Como se mencionó al principio de este apéndice, lo que se desea es que se observen las aplicaciones analíticas de este catálogo en la cuantificación de mezclas con acción farmacológica, por lo que toca a las ventajas y desventajas que presentan se dejan al criterio de la persona que consulte esta tesis ya que dependerá de dife-

rentes factores, la selección de la técnica más adecuada. Queda este trabajo como base a investigaciones posteriores tendientes a implantar nuevas técnicas analíticas para esteroides.

MI JCLA1  
-PROGESTERONA 191.80mg  
-B. DE ESTRADIOL 15.98mg  
RMN XXV



MEZCLA 2

-CAP. DE HI. 248.56mg

-B. DE ESTR. 34.05mg

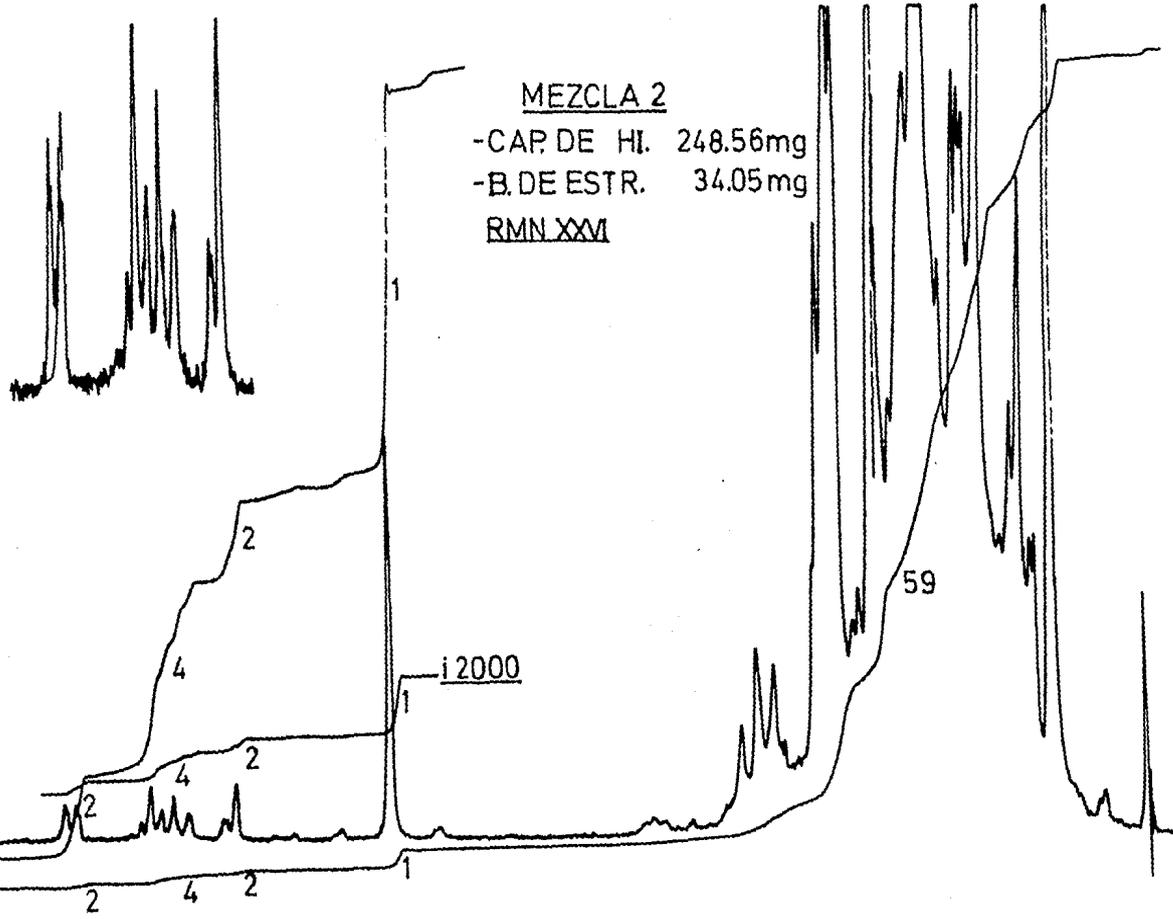
RMN XXVI

AS 8000

AS 2000

i 400  
i 8000

ppm (δ)

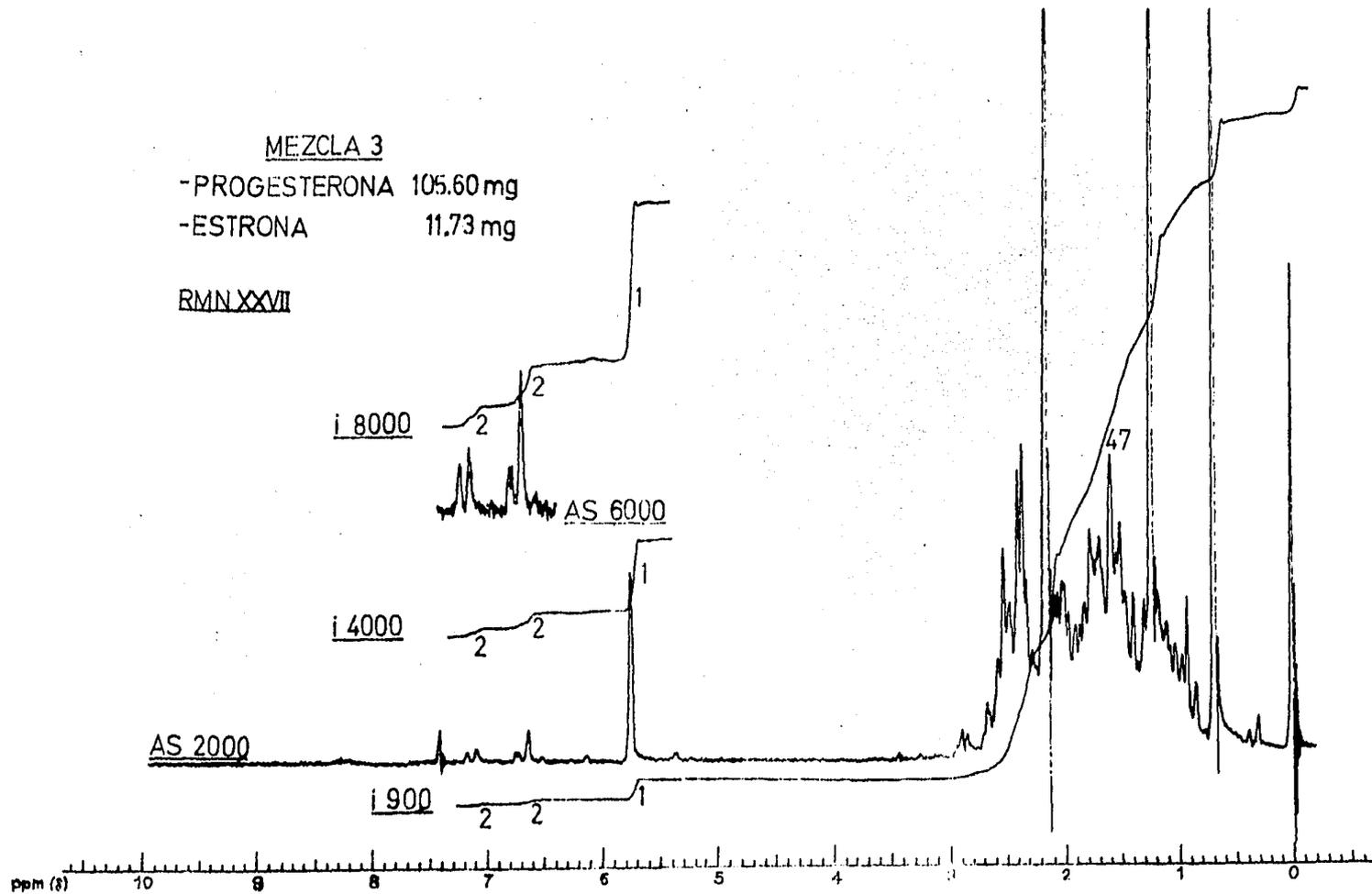


MEZCLA 3

-PROGESTERONA 105.60 mg

-ESTRONA 11.73 mg

RMN XXVII

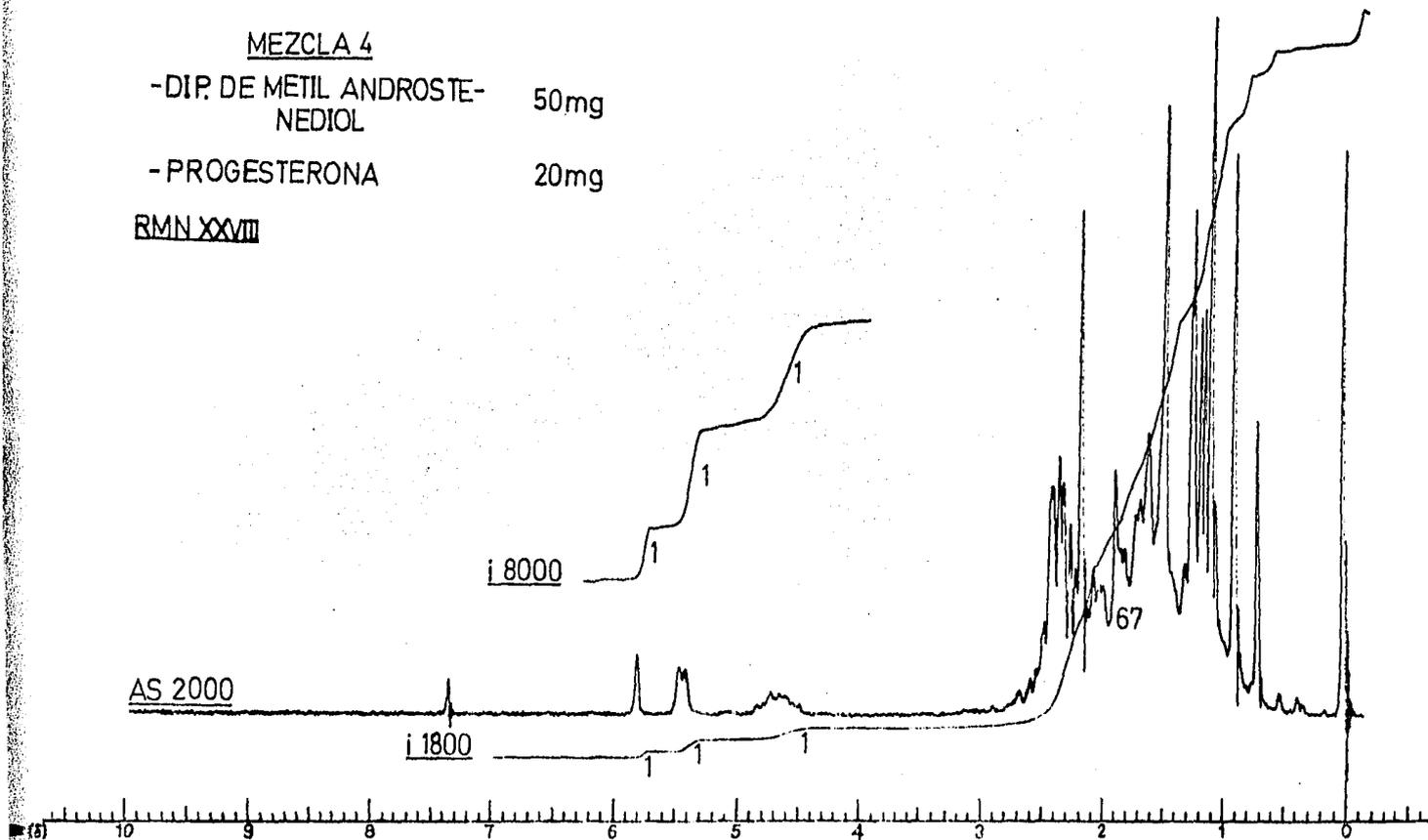


MEZCLA 4

-DIP. DE METIL ANDROSTE-  
NEDIOL 50mg

-PROGESTERONA 20mg

RMN XXVII

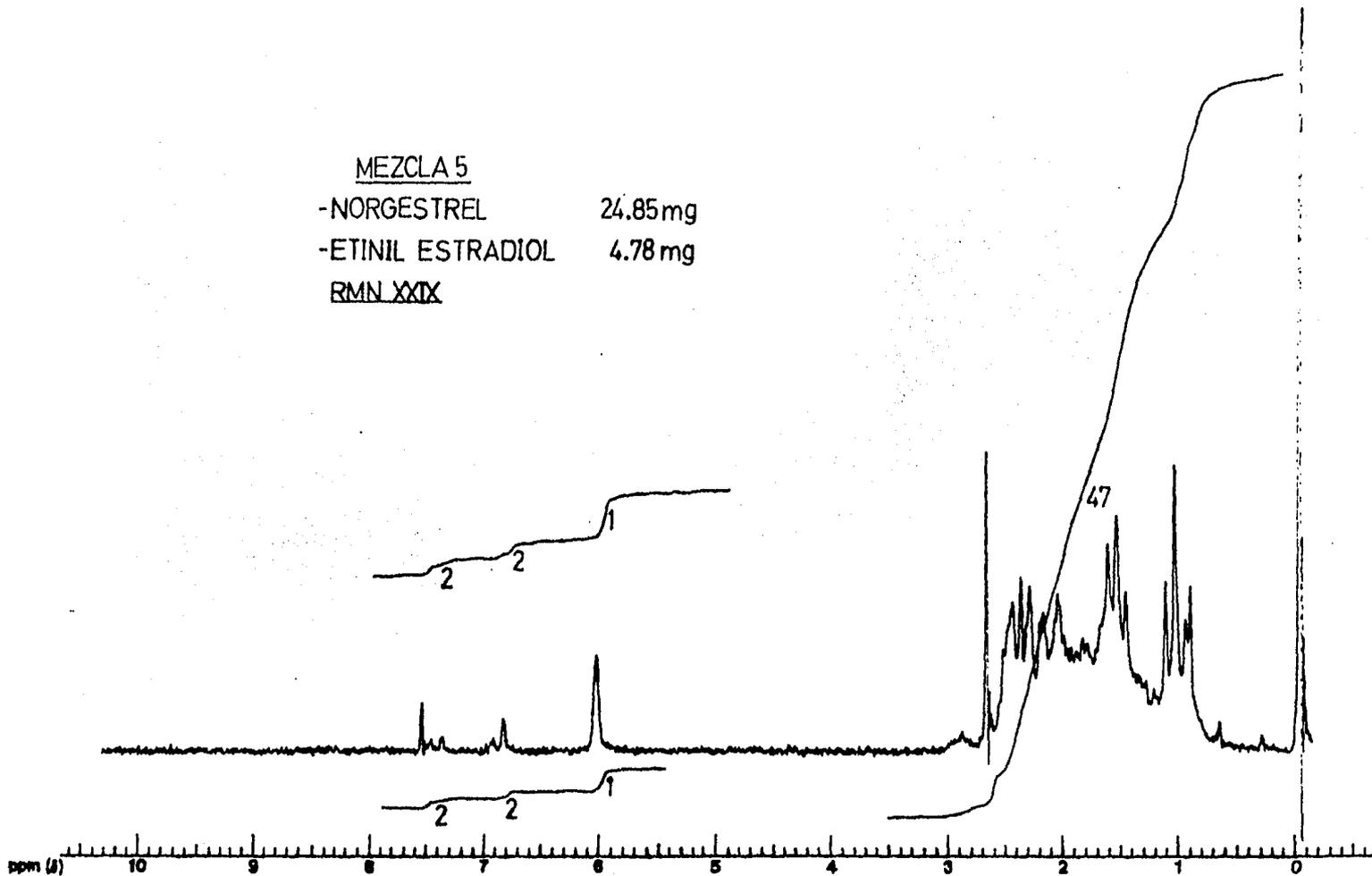


MEZCLA 5

-NORGESTREL 24.85 mg

-ETINIL ESTRADIOL 4.78 mg

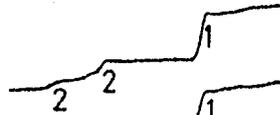
RMN XXIX



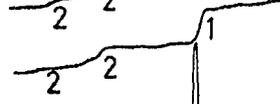
FARMACO NORDIOL

RMN XXX

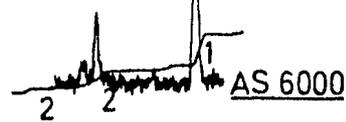
i 4000



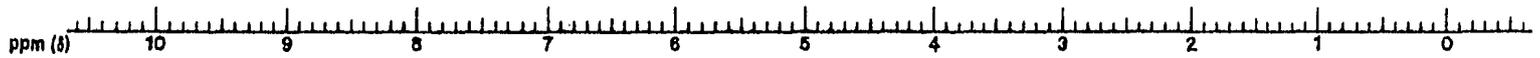
i 3100



i 3000



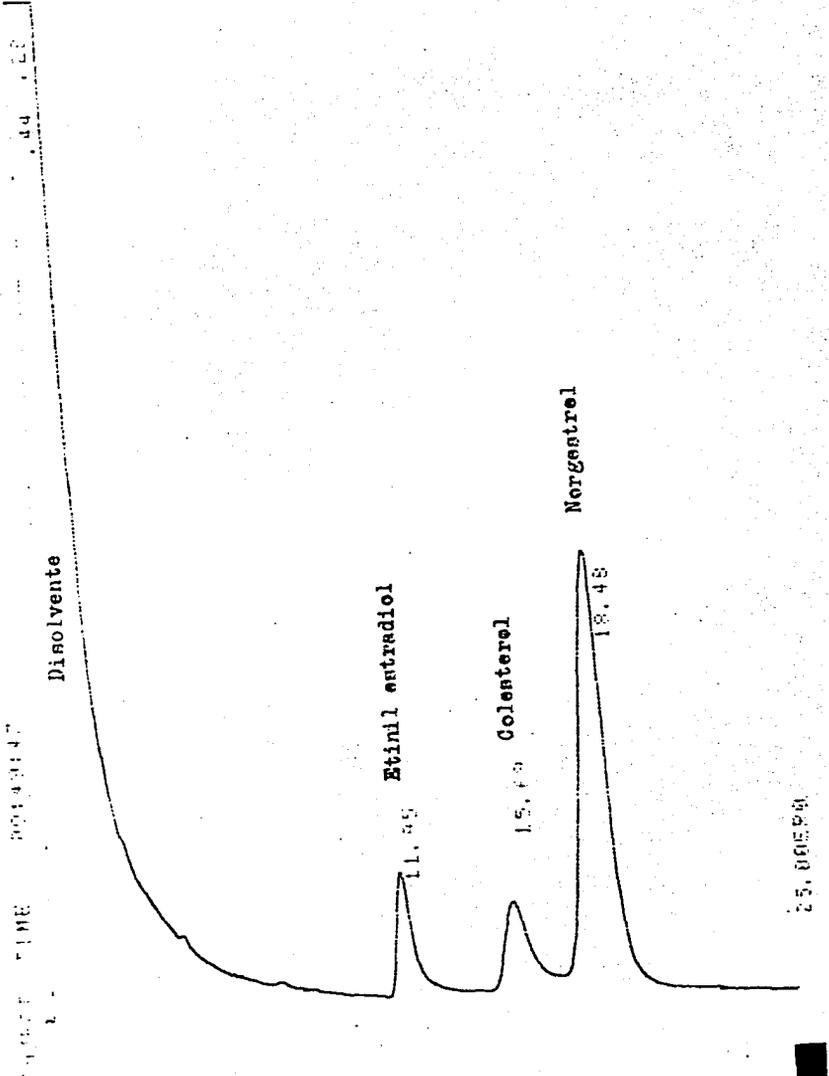
AS 3000



Anexo I  
PROGRAMA I

FILE 1. METHOD 8.  
PRESS 'ENTER' TO SKIP ENTRY  
FILE NAME? ANTICONCEPTIVOS  
TIME FUNCTIONS...  
RUN TIME:TTQ 25  
FUNCTIONATED? EP  
RUN TIME:TTQ  
METHODS:MS 1  
INJECTIONS/CALIBRATION:RCQ 1  
NONLINEAR CALIBRATION:LSC  
COMPONENT TABLE...  
RETENTION TIME:RTQ 12.15  
CONCENTRATION:CCQ 50  
NAME:MSQ ETINIL ESTRADIOL  
EXPECTED CONC:ECQ  
RETENTION TIME:RTQ 15  
CONCENTRATION:CCQ 50  
NAME:MSQ COLESTEROL  
RETENTION TIME:RTQ 18.8  
CONCENTRATION:CCQ 250  
NAME:MSQ NORGESTREL  
RETENTION TIME:RTQ  
REFERENCE PEAK:RP(1)? 15  
REFERENCE PEAK:RP(1)?  
INT STD 15  
SAMPLE TABLE...  
SAMPLES BETWEEN CALIB:CIQ 1  
INJECTIONS/SAMPLE:RAQ 1  
ANALYST:ADOLFQ  
SAMPLE INDEX:SIQ 2  
NAME:MSQ 009  
SAMPLE AMOUNT:SAQ 47.52  
INT STD AMOUNT:IS 50  
SCALE FACTOR:KFAQ  
SAMPLE INDEX:SIQ 2  
NAME:MSQ TRES  
SAMPLE AMOUNT:SAQ 49.9  
INT STD AMOUNT:IS 50  
SCALE FACTOR:KFAQ  
SAMPLE INDEX:SIQ  
END OF DIRLOG

CHROMATOGRAMA



BIBLIOGRAFIA

- (1) Rao, C.N., "Ultra-violet and Visible Spectroscopy", 3a. Edición, Ed. Butterworths, London (1975).
- (2) Silverstein R.M. y Bassler G.C., "Spectrometric Identification of Organic Compounds", 2a. Edición, Ed. John Wiley & Sons, Inc., New York (1967).
- (3) Skoog D.A. y West D.M., "Análisis Instrumental", 1a. Edición, Ed. Nueva editorial Interamericana, México (1975).
- (4) Colthup N.B., Daly L.N. y Wiberley S.E., "Introduction to Infrared and Raman Spectroscopy", Ed. Academic Press, Inc., New York (1964).
- (5) Nakanishi K., "Infrared absorption Spectroscopy", Ed. Holden-Day, San Francisco (1962).
- (6) Sadtler Standar Spectra, Ed. Samuel P. Sadtler and Sons, Inc., "Sección de I.R." Philadelphia, Pa. (1968).
- (7) Pouchert C.J., "The Aldrich library of I.R. Spectra", 3a. Edición, Ed. Aldrich Chemical Company, Inc., U.S.A. (1981).
- (8) Lambert J.B. "Organical Structural Analysis", Ed. McMillan, New York (1976).
- (9) Jackman L.M. y Sternhall S., "Applications of N.M.R. Spectroscopy in Organic Chemistry", 2a. Edición, Vol. 5, Ed. Pergamon Press, Inc., New York (1969).
- (10) Nathan J. y Diaz E., "Introducción a la R.M.N.", 1a. Edición, Ed. Limusa-Wiley, México (1970).
- (11) Sadtler Standar Spectra, Ed. Samuel P. Sadtler and Sons, Inc., "Sección de R.M.N.", Philadelphia, Pa. (1968).
- (12) Pouchert C.J., "The Aldrich library of N.M.R. Spectra", 2a. Edición, Ed. Aldrich Chemical Company, Inc., U.S.A. (1981).
- (13) The Merck Index, 10a. Edición, Ed. Merck & Co., Inc., U.S.A. (1983).
- (14) The United States Pharmacopeia, 15a. Edición, Ed. United States Pharmacopeial Convention, Inc., U.S.A. (1980).
- (15) British Pharmacopeia, Ed. London Her Majesty's Stationery Office, London (1980).
- (16) Mead W.L., "Advances in Mass Spectrometry", Vol. 3, Ed. The Institute of petroleum, London (1966).
- (17) Biemann K., "Mass Spectrometry Organic Chemical Applications", Ed. McGraw-Hill Book Company, Inc., New York (1962).
- (18) Zürcher Von R.F., Helvetica Chimica Acta, Vol. 46, No. 6, 2054-2088, (1963).
- (19) Bhacca N.S. y Williams D.H., "Applications of N.M.R. Spectroscopy in Organic Chemistry", Ed. Holden-Day, San Francisco (1964).
- (20) Williams D.H., "The Organic Mass Spectrometry", Vol. 11, 103-116, (1976).

- (21) Mayo P.de y Reed R.I., Chem. Ind., 1481, (1956).
- (22) Friedland S.S. y cols. Anal. Chem., Vol. 31, 169, (1959).
- (23) Ryhage R. y Stenhagen E., J. Lipid Res., Vol. 1, 361, (1960).
- (24) Djerassi y cols., J. Am. Chem. Soc., Vol. 84, 4544, (1962).
- (25) Tökés L., Jones G. y Djerassi C., J. Am. Chem. Soc., Vol. 90:20, 5465 (1968).
- (26) Mc Lafferty F.W., "Interpretation of Mass Spectra", 3a. Edición, Ed. University Science Books, Calif., (1980).
- (27) Biemann K., Mass Spectrometry-Organic Chemical Applications, Ed. Mc Graw-Hill Book Co., Inc., New York (1962).
- (28) Budzikiewicz H., Djerassi C. y Williams D.H., "Structural Elucidation of Natural Products by Mass Spectrometry", Vol. 2, Ed. Holden-Day, San Francisco California, (1964).