

00573 5
29

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO
FACULTAD DE QUÍMICA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

***ESTUDIO CONFORMACIONAL DEL SISTEMA ANULAR
DE L-PROLINA MEDIANTE EL USO DE EFECTOS DEL
DISOLVENTE Y DE SUSTITUYENTES AROMÁTICOS.***

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN
CIENCIAS QUÍMICAS (QUÍMICA ORGÁNICA)

PRESENTA:

Q.F.B. CARLOS ERNESTO LOBATO GARCÍA

DIRECTOR DE TESIS:

DR. RAÚL G. ENRÍQUEZ HABIB

ASESORES EXTERNOS:

DR. WILLIAM F. REYNOLDS

DR. DINO GNECCO MEDINA

REALIZADA EN:

LAB. 1-5 INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM

1999

270920

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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 esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA
COORDINACIÓN DEL PROGRAMA DE MAESTRÍA Y
DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

ING. LEOPOLDO SILVA GUTIÉRREZ
Director General de la Administración Escolar
Presente.

AT'N: Lic. Antonio Díaz García
Jefe de la Unidad de Administración del Posgrado.

Me es grato informarle que el alumno **Q.F.B. CARLOS ERNESTO LOBATO GARCÍA** presentará próximamente su examen para obtener el grado de Maestría en Ciencias Químicas (Química Orgánica) (Clave 473) ante el siguiente jurado:

Presidente:	Dr. Eduardo Díaz Torres (IQ)
Primer Vocal	Dr. Benjamín Ortiz Mendoza (IQ)
Secretario:	M. en C. José Manuel Méndez Stivalet
Primer Suplente:	Dr. Gabriel E. Cuevas González (IQ)
Segundo Suplente:	Dr. Federico del Río Portilla (IQ)

Sin otro particular de momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, D. F., 11 de enero de 1999.

La Coordinadora del Programa

Dra. Norah Barba Behrens

C.c.p. Integrantes del Jurado
C.c.p. Coordinador de Área
C.c.p. Departamento de Control Escolar
C.c.p. Interesado
CAPMDCQ*ggm.

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi agradecimiento a las siguientes personas e instituciones; sin su apoyo, este trabajo difícilmente se habría concretado.

Dr. Raúl G. Enríquez Habib (Instituto de Química, UNAM).

Dr. Benjamín Ortiz Mendoza (Instituto de Química, UNAM).

Dr. Rubén Armando Toscano (Instituto de Química, UNAM).

Personal Académico de la Maestría en Ciencias Química (Química Orgánica). Facultad e Instituto de Química. UNAM.

Personal Técnico del Instituto de Química.

Dirección General de Intercambio Académico de la UNAM.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.

Familia Lobato García.

Compañeros del Laboratorio 1-5:

Q. Julia Barajas Gómez.

Q. Virginia Jáuregui Villanueva.

I.Q. Raúl F. Conde Carrasco.

Dr. Ismael León Rivera.

M. en C. Elías Miranda González.

ÍNDICE

RESUMEN	iii
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	3
CAPÍTULO 1. GENERALIDADES	4
1.1 El aminoácido L-prolina.	4
1.1.1 Papel bioquímico de la L-prolina.	
1.1.2 Aplicación de la prolina y sus derivados en síntesis orgánica.	
1.1.3 Síntesis y caracterización estructural de derivados de prolina.	
1.2 Aspectos generales de anisotropía magnética.	18
CAPÍTULO 2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	22
2.1 Comportamiento del clorhidrato del éster metílico de L-prolina (I) en diferentes disolventes.	22
2.1.1 Asignación de los espectros de I en dimetilsulfóxido d_6.	22
a) Espectro de ^1H y correlaciones homonucleares en temperatura ambiente.	
b) Espectro de ^{13}C a 125 Mhz e interacciones heteronucleares en temperatura ambiente.	
c) Espectros en temperatura variable en dimetilsulfóxido d_6 .	
2.1.2 Asignación de los espectros de I en acetona d_6.	26
a) Espectro de ^1H y correlaciones homonucleares en acetona d_6 en temperatura ambiente.	
b) Espectro de ^{13}C a 125 Mhz e interacciones heteronucleares en temperatura ambiente.	
2.1.3 Asignación de los espectros de I en cloroformo deuteriado.	29
a) Espectros de ^1H en cloroformo deuteriado en temperatura ambiente.	
b) Espectro de ^{13}C a 125 Mhz e interacciones homo y heteronucleares.	
2.1.4 Asignación de los espectros de I en piridina d_5.	32
a) Espectros de ^1H y correlación homonuclear en piridina d_5 en temperatura ambiente.	
b) Espectro de ^{13}C a 125 Mhz e interacciones homo y heteronucleares.	
2.1.5 Resumen de desplazamientos químicos en diferentes disolventes.	35
2.2. Derivados del éster metílico de L-prolina con oblatos aromáticos.	39
2.2.1 Éster metílico de N-(1-naftoil)-L-prolina (II).	39
a) Caracterización fisicoquímica.	
b) Espectros de ^1H en cloroformo deuteriado.	
c) Espectro de ^{13}C a 125 Mhz y correlaciones heteronucleares (disolvente: cloroformo deuteriado).	

d) Espectros de ^1H en piridina deuteriada.	
e) Espectro de ^{13}C de II en piridina deuteriada y correlaciones heteronucleares.	
f) Comparación del efecto del disolvente y el sustituyente aromático sobre los desplazamientos químicos de ^1H y ^{13}C del sistema de prolina.	
2.2.2 Éster metílico de N-(2-naftoil)-L-prolina (III).	52
a) Caracterización fisicoquímica.	
b) Espectros de ^1H en cloroformo deuteriado.	
c) Espectro de ^{13}C y acoplamiento homo y heteronucleares.	
2.2.3 Éster metílico de (N-difenilacetil)-L-prolina (IV).	58
a) Caracterización fisicoquímica.	
b) Espectro de ^1H y correlaciones homonucleares, disolvente: cloroformo deuteriado.	
c) Espectro de ^{13}C y correlaciones heteronucleares, en cloroformo deuteriado.	
d) El caso del conformero minoritario.	
e) Espectros en piridina deuteriada: hidrógeno y correlaciones homonucleares.	
f) Espectro de ^{13}C y correlaciones heteronucleares en piridina deuteriada.	
2.2.4 Éster metílico de N-[(S)naproxenoil]-L-prolina (V).	71
a) Caracterización fisicoquímica.	
b) Espectro de ^1H y correlaciones homonucleares.	
c) Espectro de ^{13}C a 125 Mhz y correlaciones heteronucleares.	
2.2.5 Resumen del comportamiento de los cuatro derivados.	78
CAPÍTULO 3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	81
3.1 Análisis del clorhidrato del éster metílico de L-prolina (I).	81
3.2 Preparación de los derivados con oblatos aromáticos.	84
3.2.1 Preparación del éster metílico de N-(1-naftoil)-L-prolina (II).	
3.2.2 Preparación del éster metílico de N-(2-naftoil)-L-prolina (III).	
3.2.3 Preparación del éster metílico de N-(difenilacetil)-L-prolina (IV).	
3.2.4 Preparación del éster metílico de N[(S)-naproxenoil]-L-prolina (V).	
3.3 Caracterización fisicoquímica.	84
CONCLUSIONES	85
BIBLIOGRAFÍA	86

RESUMEN:

Los espectros de ^1H y ^{13}C del éster metílico de L-prolina manifiestan cambios importantes, particularmente en el primer caso, debido a efectos del disolvente. Dichas variaciones pueden ser interpretadas en términos de asociaciones soluto/disolvente tales como formación de puentes de hidrógeno por ejemplo en los casos en que el disolvente es acetona o dimetilsulfóxido, o bien por generación de efectos anisotrópicos, en el caso del disolvente piridina.

Para el estudio, se prepararon además, derivados amídicos de la prolina con sustituyentes aromáticos que se orientan de distinta forma respecto al sistema anular del aminoácido y provocan cambios interesantes en el patrón de los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) que pueden ser explicados en términos de efectos anisotrópicos de los sistemas aromáticos así como por efectos inductivos del grupo amida.

El espectro de RMN complejo, que se observa experimentalmente como resultado de acoplamiento múltiple en el sistema cíclico de prolina, permite obtener información dinámica acerca de este importante aminoácido, cuando se inducen modificaciones en los desplazamientos químicos mediante efectos anisotrópicos o de disolvente.

La correlación entre las estructuras estudiadas, tanto en disolución como en el estado sólido permitió hacer la comparación entre las conformaciones experimentales obtenidas por la cristalografía de Rayos X, con las de RMN y finalmente las generadas por la simulación en programas computacionales.

INTRODUCCIÓN

El aminoácido L-prolina es objeto de numerosos estudios que evidencian su importancia en diferentes campos del conocimiento de la química orgánica y la bioquímica.⁽¹⁻⁵⁾ Ello se comprende dadas las implicaciones fundamentales que sobre las propiedades moleculares tiene la presencia de este aminoácido.

Por ejemplo: se sabe que en la química de péptidos y proteínas, la prolina juega un papel determinante en la formación de estructuras secundarias de esas macromoléculas, dirigiendo las cadenas peptídicas a adoptar conformaciones que son determinantes en procesos biológicos,⁽¹⁾ su carácter cíclico imparte además características conformacionales *sui generis* importantes en la función biológica.⁽²⁾

Por otro lado, la prolina misma o los derivados de ella, se utilizan exitosamente en síntesis orgánica, tanto como material de partida en secuencias sintéticas⁽³⁾ o en el diseño de catalizadores quirales útiles en síntesis asimétrica.⁽⁴⁾

La elucidación estructural de la prolina y sus derivados ha significado retos importantes tanto en Cristalografía,⁽⁵⁾ como en Resonancia Magnética Nuclear (RMN)^(6,7) y Espectrometría de Masas.⁽⁸⁾

Por esta razón, el estudio del comportamiento conformacional de la prolina en diferentes condiciones está dado por la necesidad de profundizar en el conocimiento de una molécula aparentemente sencilla pero con implicaciones estructurales y actividad biológica sumamente interesantes.

La síntesis de derivados de la prolina molecularmente pequeños, es una estrategia interesante para probar el efecto sobre el sistema anular de la prolina de grupos funcionales con características estructurales específicas, *e.g.* generación de amidas con sustituyentes aromáticos, introducción de sustituyentes con grupos electroattractores, etc.

El complejo sistema de espines acoplados existente en la prolina, en condiciones especiales, constituye un sensor estructural que permite probar diferentes estrategias que lleven a un mejor discernimiento de estructuras derivadas de este aminoácido, mediante estudios de resonancia magnética nuclear.

De esta forma, surge el interés por ahondar y hacer una contribución en este campo, dadas las variaciones de la conducta química y de la reactividad, que se hacen evidentes en los experimentos para derivar a este importante aminoácido.

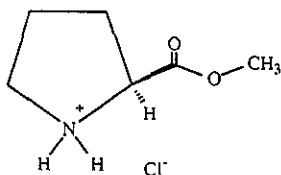
La versatilidad y complejidad de este comportamiento seguramente seguirán teniendo un número muy grande de estudios en el futuro cercano; aún así, los resultados modestos de esta investigación son una contribución concreta al conocimiento fundamental sobre la conducta química y estructural de la prolina.

Para el logro de los objetivos de este trabajo, fue necesario estudiar primero el espectro de RMN del clorhidrato del éster metílico de L-prolina, en diferentes medios y condiciones.

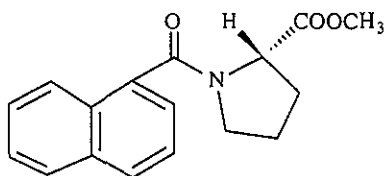
Posteriormente, se probó el uso de oblatos aromáticos para formar derivados amídicos con el éster metílico de L-prolina, con el objetivo de provocar efectos de anisotropía diamagnética, generando variaciones en los desplazamientos químicos y causando la modificación de las interacciones espaciales protón-protón. En algunos casos, ello

permitió la asignación completa de las señales del espectro de ^1H de la prolina, claro ejemplo de no equivalencia magnética, en un sistema sumamente complejo de influencias recíprocas.

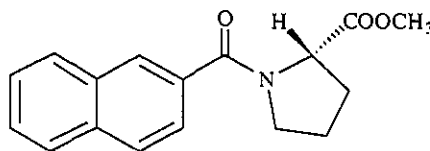
En este trabajo también se presenta el análisis espectroscópico de los efectos causados por el disolvente y la presencia de diferentes oblatos aromáticos en derivados del éster metílico de L-prolina. Los compuestos sintetizados y analizados en el presente estudio son:



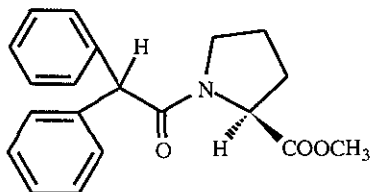
I) Clorhidrato del éster metílico de L-prolina



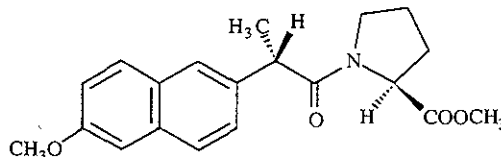
II) Éster metílico de [N-(1-naftoil)]-L-prolina.



III) Éster metílico de [N-(2-naftoil)]-L-prolina.



IV) Éster metílico de [N-(difenilacetil)]-L-prolina.



V) Éster metílico de [N-(S)-naproxenoyl]-L-prolina.

La constante estructural de los derivados sintetizados es la generación del grupo funcional amida con el nitrógeno de la prolina, empleando sustituyentes que incluyen anillos aromáticos.

En el caso de los compuestos II y III, el sistema aromática naftalénico está unido directamente a la función amida, respectivamente en las posiciones α y β ; en el compuesto III la parte aromática del derivado está dada por dos grupos fenilo, generando un sistema con dos anillos aromáticos no coplanares; el compuesto IV por su parte, involucra a un sistema naftalénico con la particularidad de incluir además a un centro quiral.

OBJETIVOS

Objetivo general.

Estudiar el sistema anular de la prolina en diferentes condiciones, evaluando los efectos del disolvente y de anisotropía magnética inducidos por sistemas aromáticos de diferentes tipos, en el espectro de Resonancia Magnética Nuclear de ^1H y ^{13}C .

Objetivos específicos.

- 1.- Preparar una serie de derivados amídicos del éster metílico de L-prolina con oblatos aromáticos para estudiar su comportamiento químico y espectroscópico.
- 2.- Evaluar los efectos de anisotropía magnética generados por estos oblatos, mediante el análisis de las variaciones en los desplazamientos químicos del sistema de la prolina.
- 3.- Estudiar las interacciones espaciales protón-protón, empleando los datos de RMN de alta resolución, para explicar los cambios espectrales generados por los cambios complejos en las equivalencias químicas y magnéticas del sistema cíclico de la prolina.
- 4.- Correlacionar los resultados obtenidos por RMN con los datos cristalográficos correspondientes.
- 5.- Caracterizar completamente los nuevos compuestos obtenidos con el fin de permitir un estudio ulterior *e.g.* simulación de sistemas de espines ó determinación de actividad biológica.

CAPÍTULO 1

GENERALIDADES

1.1 El aminoácido L-prolina.

En los últimos años se ha observado un inusitado interés por el estudio del aminoácido L-prolina y sus derivados.⁽¹⁻⁷⁾ Los trabajos de investigación que involucran a la prolina abarcan campos del conocimiento muy diversos que pueden englobarse en tres grandes conjuntos generales: papel bioquímico de la prolina; aplicación de la prolina y sus derivados en síntesis orgánica; síntesis y caracterización estructural de derivados de prolina.

1.1.1 Papel bioquímico de la L-prolina.

De los veinte aminoácidos que integran el código genético para la biosíntesis de proteínas, la prolina ocupa un papel especial: clasificado como un aminoácido con cadena lateral no polar, es el único en donde el grupo α -amino está unido a la cadena lateral, formando un ciclo de cinco miembros de pirrolidina en donde, por consecuencia, el grupo funcional amino es de tipo secundario, a diferencia de los diecinueve aminoácidos restantes en donde es una amina primaria (figura 1.1).

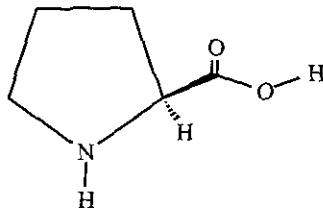


Figura 1.1. Estructura del aminoácido L-prolina.

Considerado como un aminoácido no esencial en la nutrición del ser humano, la prolina es biosintetizada en el organismo vía la ruta que se describe a continuación y que se resume en la figura 1.2.

A partir del ácido glutámico, se lleva a cabo una fosforilación en el carboxilo en posición γ por medio del trifosfato de adenosina (ATP), para después ser reducido al γ -semialdehído del ácido glutámico por acción de la glutamato deshidrogenasa y oxidación concomitante de una molécula de la forma reducida del fosfato de nicotinamida -adenin-dinucleótido (NADPH) que pasa a su forma oxidada (NADP⁺).

Mediante un proceso de ataque del grupo α -amino al aldehído en posición γ , con pérdida de una molécula de agua, se genera el iminoácido cíclico correspondiente (ácido Δ^1 -pirrolidin-5-carboxílico) el cual, es reducido posteriormente por la enzima pirrolidin-5-carboxílico reductasa (con intervención de NADPH), al aminoácido L-prolina, el cual autorregula su producción al ser inhibidor alostérico del primer paso de la secuencia biosintética.^(9,10,11)

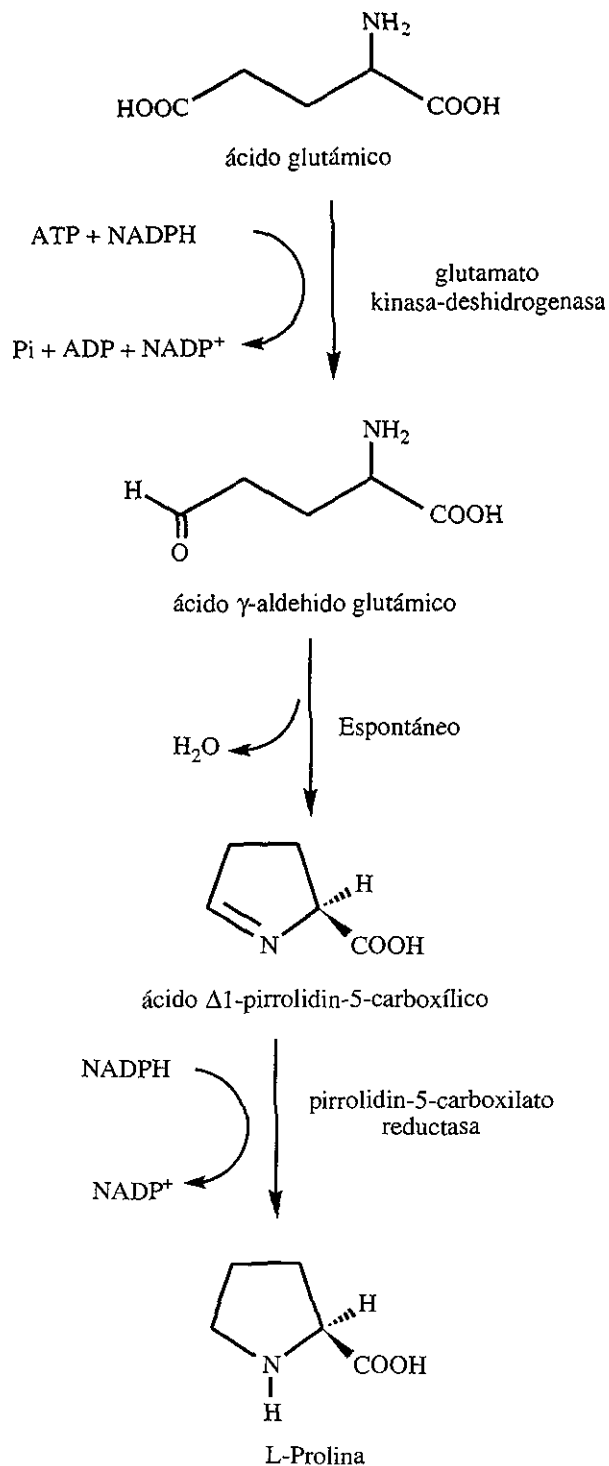


Figura 1.2. Biosíntesis de L-prolina.

La biodegradación de L-prolina, sigue un proceso inverso a la biosíntesis, como se muestra en la figura 1.3; a partir de la prolina se genera, por acción de la prolina oxidasa, el iminoácido Δ^1 -pirrolidin-5-carboxílico. Mediante un proceso espontáneo, se introduce una molécula de agua, para generar el ácido γ -semialdehido glutámico el cual, activado

por la Δ^1 -pirrolidin-deshidrogenasa y la reducción concomitante de NAD a NADH⁺, genera el ácido glutámico. Este último, es desaminado por acción de la L-glutamato deshidrogenasa para dar el ácido α -cetoglutarico que ingresa al ciclo de Krebs.^(9,10,11)

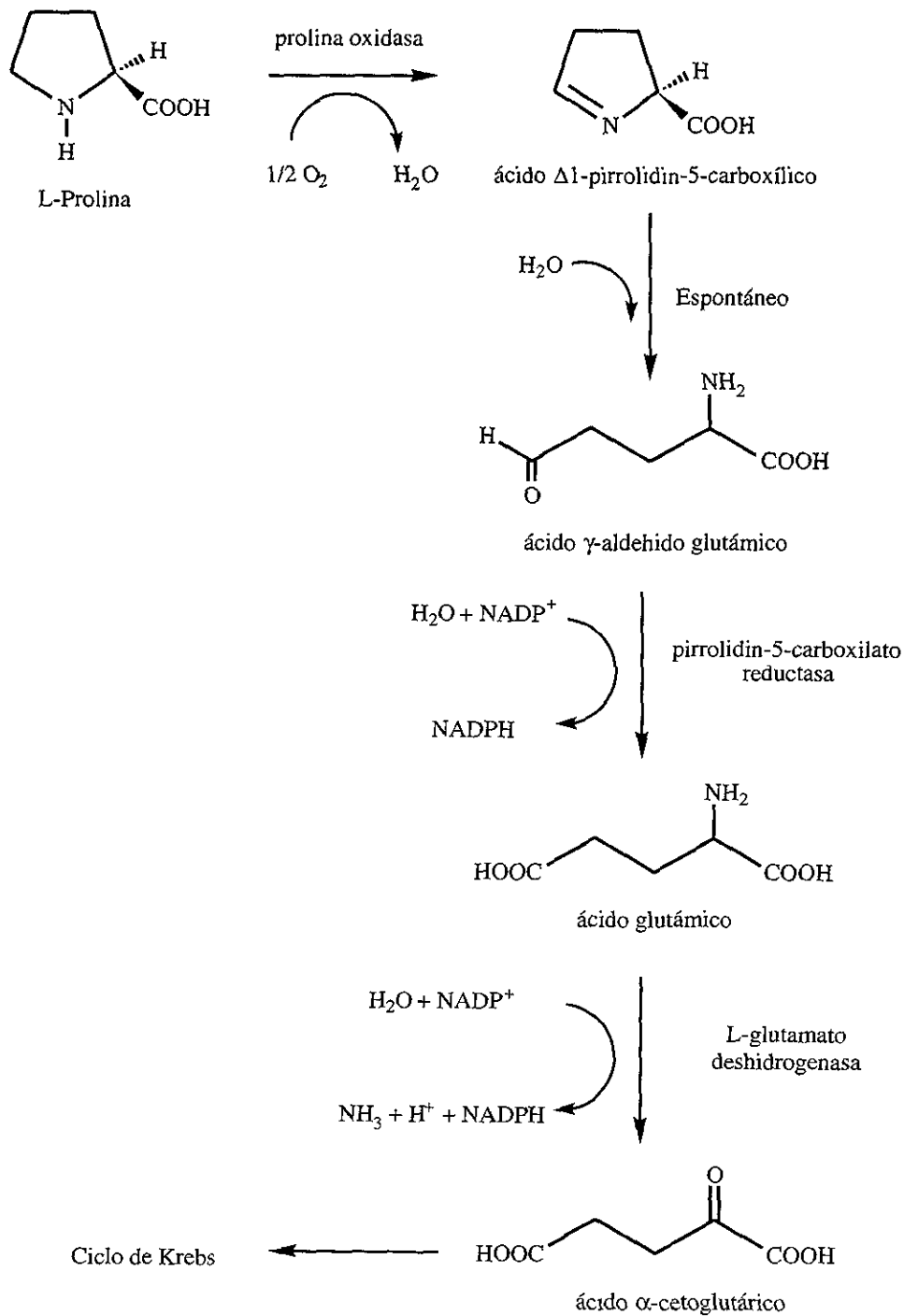


Figura 1.3. Biodegradación de L-Prolina.

El carácter cíclico de la prolina, le confiere propiedades especiales, que se ven reflejadas en su participación en la construcción de péptidos y estructuras proteicas. Debido a que

1.1.2 Aplicación de la prolina y sus derivados en síntesis orgánica.

Los aminoácidos en general, constituyen un conjunto de compuestos útiles en síntesis asimétrica.⁽²¹⁾ El hecho de que puedan ser obtenidos enantioméricamente puros a partir de fuentes naturales o por métodos de resolución relativamente accesibles,⁽²²⁾ ha permitido su aplicación en la resolución de compuestos racémicos a través de la formación de los complejos diastereómeros correspondientes. Tal es el caso del uso de la prolina en la resolución de mezclas racémicas, como por ejemplo la resolución óptica del ácido (\pm) fenilsuccínico (figura 1.5).⁽²³⁾

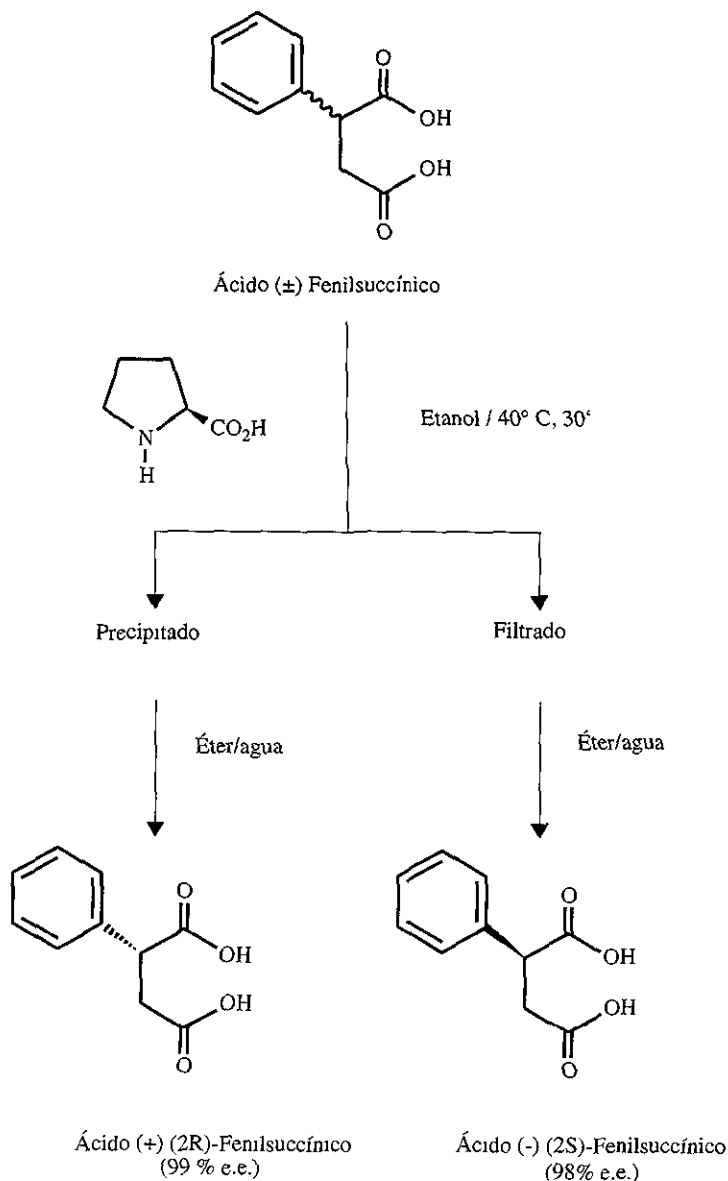


Figura 1.5. Esquema de resolución de la mezcla racémica del ácido (\pm) Fenilsuccínico, utilizando prolina.

La prolina también se ha usado como reactivo quiral para la resolución de compuestos con simetría C_2 ; ejemplo de ello es la resolución y enriquecimiento del exceso enantiomérico del 1,1'-Bi-2-naftol⁽²⁴⁾ (figura 1.6).

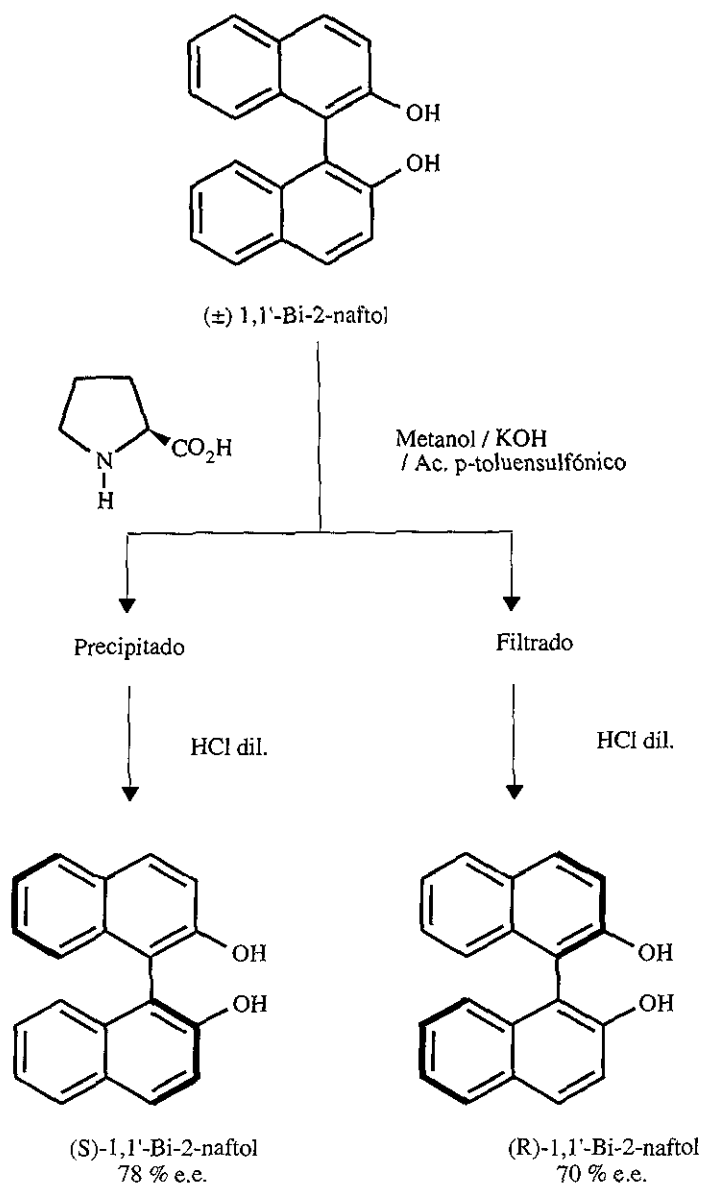


Figura 1.6. Resolución de la mezcla racémica del (±) 1,1'-Bi-2-naftol, utilizando prolina.

Además se ha reportado la resolución del ácido 9,10-dihidro-9,10-etanoantraceno-11,12-dicarboxílico (figura 1.7) y el enriquecimiento enantiomérico del ácido 2,3-difenil-succínico (figura 1.8); en ambos casos, se utiliza prolina para la formación de complejos con estequiometría 1:1, lo que permite separar aceptablemente a los isómeros involucrados.⁽²⁵⁾

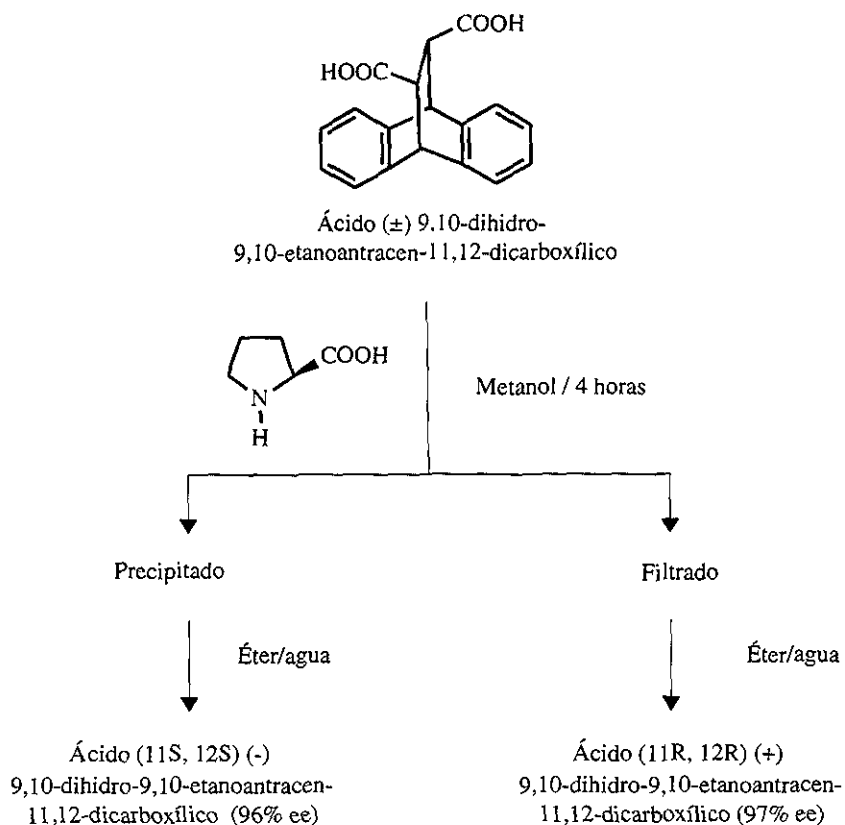


Figura 1.7. Esquema del procedimiento de desimetrización del ácido 9,10-dihidro-9,10-etano-antracén-11,12-dicarboxílico, por formación de un complejo con prolina.

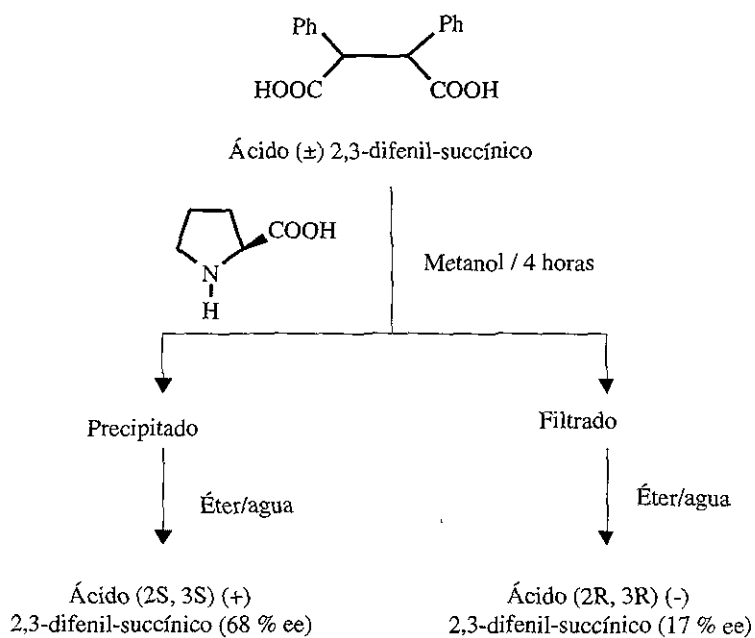


Figura 1.8. Esquema del procedimiento de desimetrización del ácido 2,3-difenil-succínico, por formación de un complejo con prolina.

La desimetrización de anhídridos utilizando al éster metílico de L-prolina, lleva a la obtención de aminoácidos que pueden utilizarse como bloques de construcción en la síntesis de análogos de péptidos con una conformación restringida.⁽²⁶⁾ De esta forma, para el caso de *meso*-anhídridos derivados del norborneno, la reacción con prolina se lleva a cabo con una inducción asimétrica atribuible a las diferencias estéricas entre las dos caras del anhídrido⁽²⁷⁾ (figura 1.9).

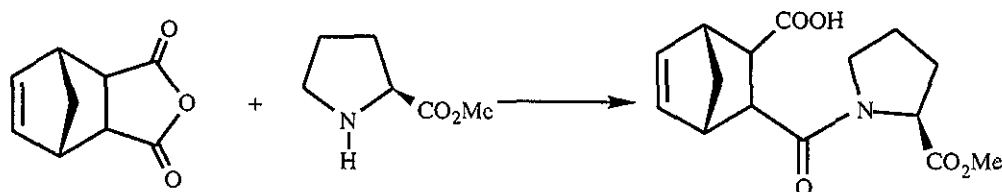


Figura 1.9. Desimetrización del *meso*-anhídrido carbónico, por reacción con el éster metílico de L-prolina.

Los ésteres metílico y bencílico de L-prolina, se han utilizado exitosamente como material de partida en la síntesis diastereoselectiva de epilupinina (figura 1.10), compuesto que pertenece a la familia de alcaloides de la lupina. Mediante la generación de un iluro de amonio derivado de prolina y vía un reordenamiento de Stevens [1,2] diastereoselectivo del intermediario, se genera el anillo de quinolizidina, con excesos diastereoméricos por arriba del 70% dependiendo del catalizador utilizado.⁽²⁸⁾

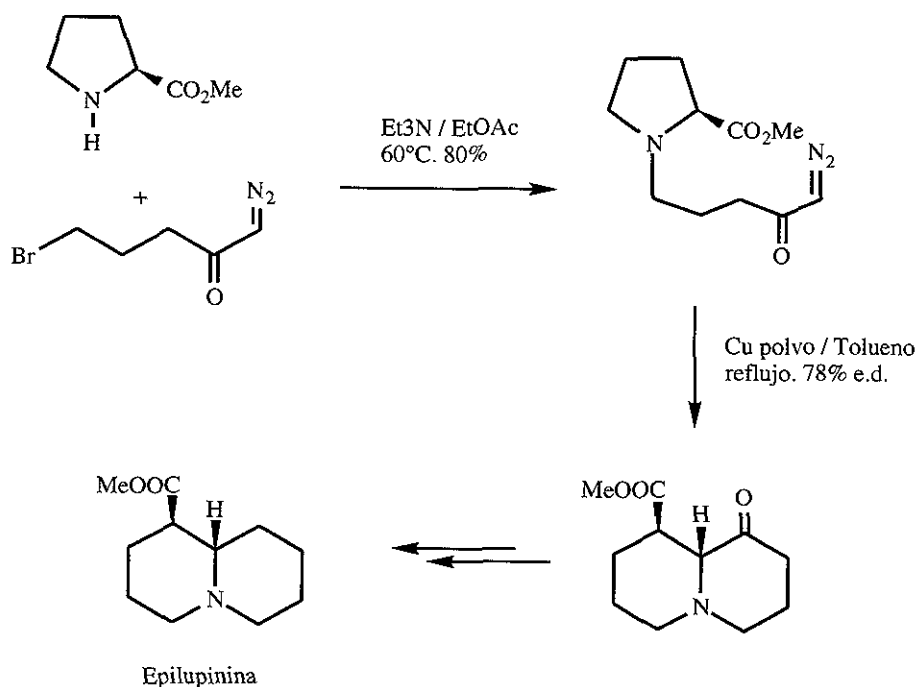


Figura 1.10. Síntesis de epilupinina a partir de L-prolina.

Una aplicación interesante de la prolina, es el diseño y síntesis de catalizadores quirales, ejemplos de ello son: las fosoramidas derivadas de prolina,⁽⁴⁾ utilizadas en la alilación asimétrica de aldehídos aromáticos (figura 1.11); así como las sales de rubidio de prolina que se emplean en la catálisis de reacciones de adición tipo Michael de

nitroalcanos a enonas proquirales⁽²⁹⁾ (figura 1.12). En ambos casos, la dirección de las adiciones está gobernada por la estereoquímica del catalizador.

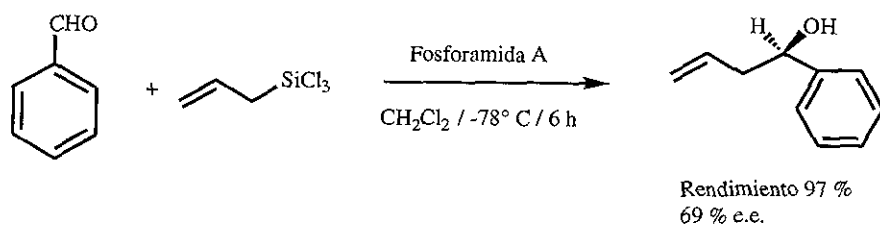
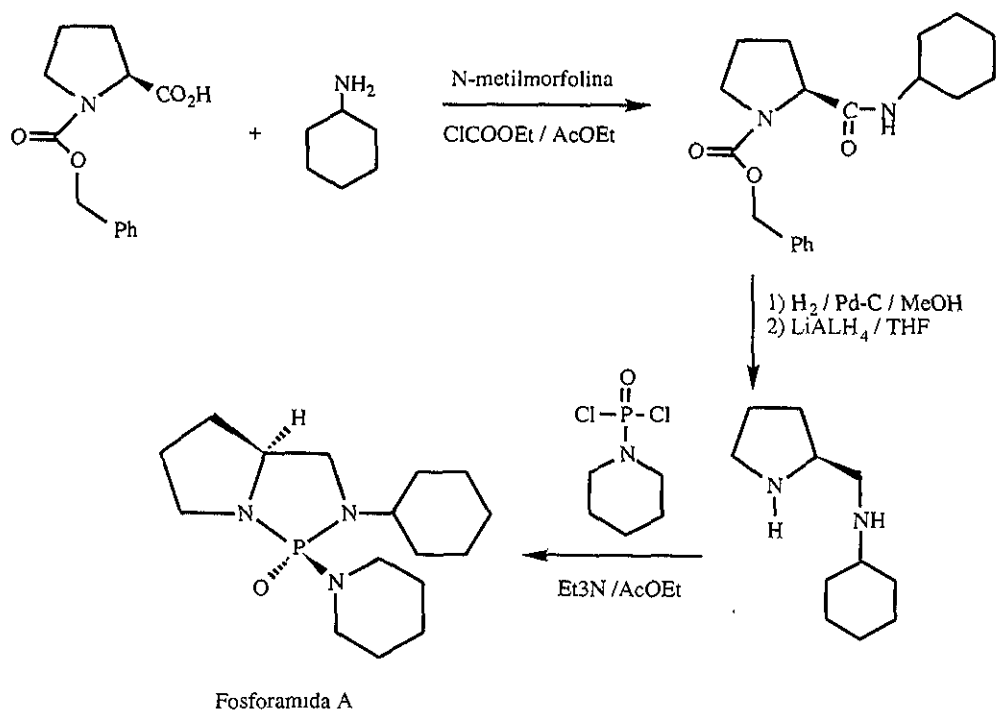


Figura 1.11. Síntesis del derivado A de fosforamida a partir de prolina y uso del mismo en la alilación asimétrica de benzaldehído.

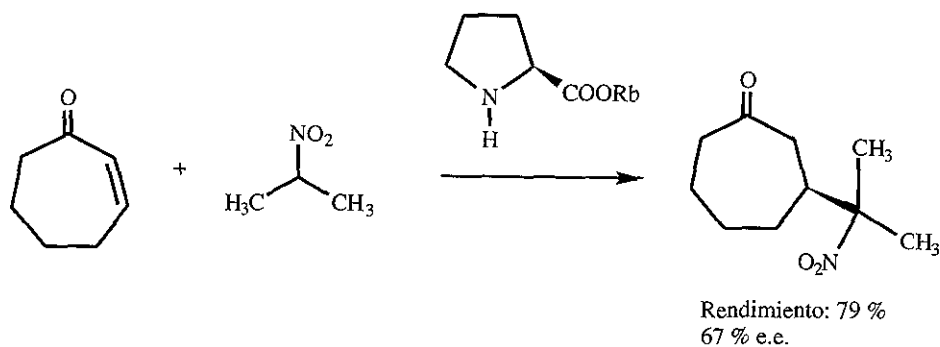


Figura 1.12. Adición asimétrica tipo Michael de nitroalcanos a enonas, catalizada por la sal de rubidio de L-prolina.

Mención especial merece el derivado *trans*-(2S,4R)-4-hidroxi-L-prolina (*trans*-4-hidroxi-prolina), el cual se encuentra en la naturaleza formando parte de la estructura del colágeno y que ha recibido gran atención en el campo de la síntesis orgánica por su utilidad y versatilidad como precursor sintético quiral.⁽³⁾

Así, la *trans*-4-hidroxi-prolina se ha utilizado, en la síntesis de 4-fluoroprolinas⁽³⁰⁾ (figura 1.13) y en la síntesis asimétrica de los cuatro isómeros de la 4-amino-4-carboxiprolina. Estos últimos considerados como análogos conformacionalmente restringidos del ácido glutámico⁽³¹⁾ (figura 1.14).

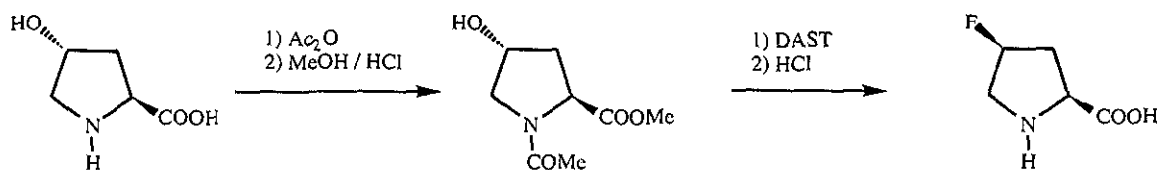


Figura 1.13. Síntesis de *cis*-4-fluoro-L-prolina a partir de *trans*-4-hidroxi-prolina

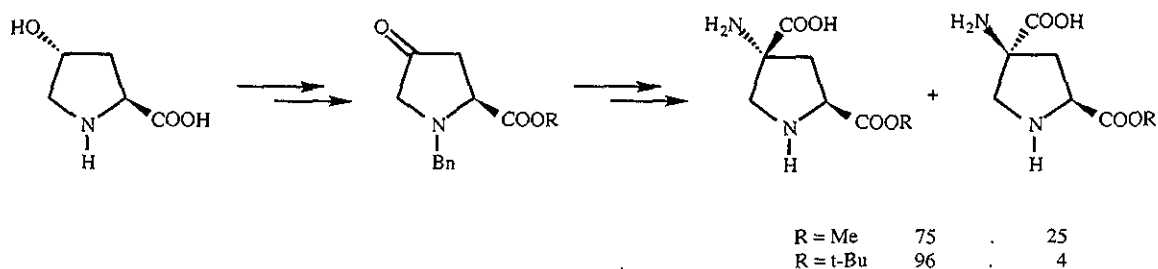


Figura 1.14. Esquema general de síntesis de (2S,4R) y (2S,4S) 4-amino-4-carboxiprolinas a partir de *trans*-4-hidroxi-prolina. Los enantiómeros correspondientes se obtienen por inversión en el carbono 2.

Además, también se ha utilizado a la *trans*-4-hidroxi-prolina en la síntesis de piperazinas bicíclicas,^(32, 33) las cuales se utilizan como intermediarios en la obtención de compuestos antibacterianos de la familia de las quinolonas (figura 1.15).

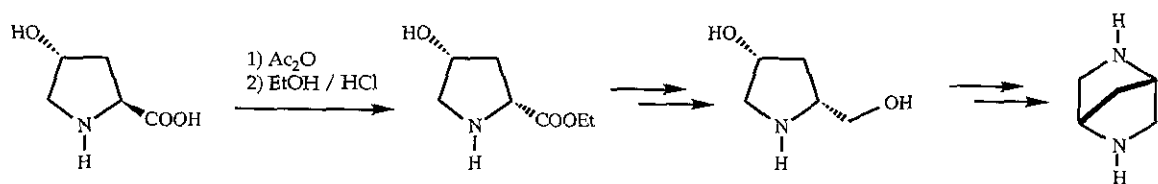


Figura 1.15. Esquema general de síntesis de (1R, 4R)-2,5-diaza-biciclo [2,2,1] heptano a partir de *trans*-4-hidroxi-prolina

Un proceso interesante por la utilización de enzimas en algunos de los pasos de la secuencia sintética, es la síntesis a partir de 4-hidroxi-prolina de derivados de benzodiazepina de los que se ha reportado actividad antitumoral⁽³⁴⁾ (figura 1.16).

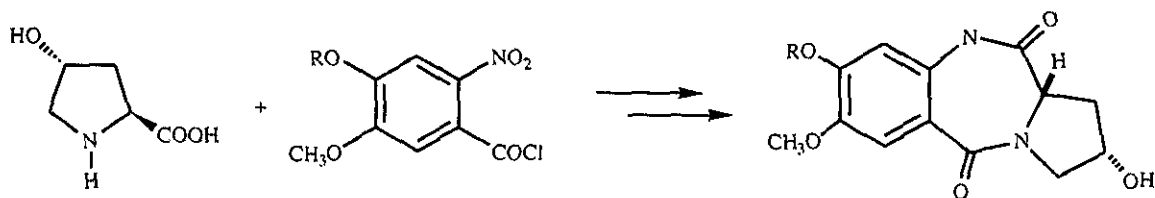


Figura 1.16. Esquema general de obtención de benzodiazepinas con actividad antitumoral, a partir de *trans*-4-hidroxirolina.

1.1.3 Síntesis y caracterización estructural de derivados de prolina.

La elucidación estructural de la prolina y sus derivados, ha significado retos importantes para áreas analíticas tales como: la Resonancia Magnética Nuclear, la Cristalografía por Rayos X y la Espectrometría de Masas.

Desde el establecimiento de la RMN como herramienta analítica fundamental en la elucidación estructural, el estudio de la no equivalencia magnética de los siete protones presentes en el ciclo de prolina, ha generado reportes interesantes que han llevado a afinar la percepción de los parámetros conformacionales y rotacionales presentes en la estructura de este aminoácido.⁽⁶⁾

El caso de los anillos de cinco miembros, como lo es la prolina, requiere una atención especial en cuanto a las características del sistema anular. En general, puede observarse que un anillo de cinco miembros, se encuentra en condiciones de libertad conformacional, sin un mínimo de energía bien definido.⁽³⁵⁾

De esta forma se logró establecer que, para el anillo de pirrolidina presente en la prolina, la asimetría natural de los protones geminales, dado su carácter diastereotópico, se hace aún más evidente debido a los efectos anisotrópicos generados por el plano del grupo carboxilo,⁽³⁶⁾ este fenómeno de no equivalencia se encuentra en competencia con una interconversión *endo-exo* del ciclo de cinco miembros, que tiende a disminuir la no equivalencia y lleva a una situación aparente de simetría molecular^(8,37) (figura 1.17).

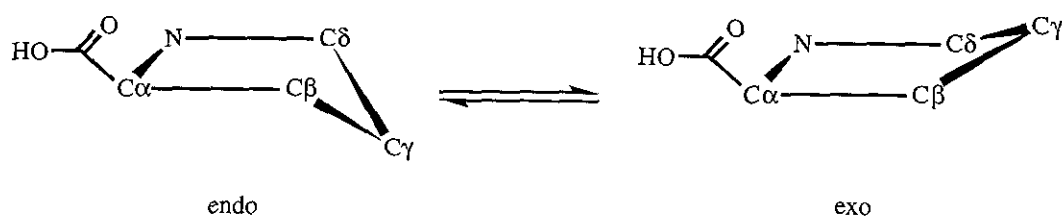


Figura 1.17. Equilibrio conformacional *endo-exo* en prolina

En conjunto, con los resultados obtenidos por RMN y el análisis de los datos proporcionados por la Cristalografía de Rayos X de diversos derivados de prolina, mostraron dificultad para generalizar una definición de la geometría del anillo, sobre todo por la movilidad de los carbonos en posición β y γ , y en menor medida por la movilidad del carbono en posición δ .

Aunado al fenómeno conformacional *endo-exo* ya mencionado, se encontró que en la prolina existe otro modelo dinámico de deformación anular el cual implica una interconversión entre dos formas antisimétricas C_2 ⁽³⁸⁾ (figura 1.18).



Figura 1.18. Equilibrio de interconversión entre dos formas C_2 antisimétricas en prolina.

Lo anterior lleva a que en muchas ocasiones el sistema de la prolina no pueda ser asignado para una sola conformación; por el contrario los datos obtenidos por RMN, deben ser analizados como el promedio de dos o más conformaciones posibles.^(16,38)

El fenómeno de isomería *cis-trans* del enlace amida de la prolina mencionado anteriormente, es un factor adicional de complejidad, que dificulta la caracterización de estructuras que contienen prolina, tanto por difracción de Rayos X como por RMN. Es por ello que se han dirigido estudios que llevan a una mejor comprensión de las características de este fenómeno.

Así, se ha logrado establecer el efecto del disolvente sobre este equilibrio *cis-trans*.⁽³⁹⁾ El origen de la barrera energética para la isomerización del enlace amida se atribuye generalmente al carácter de doble enlace alrededor del sistema C-N.^(40,41) Como se observa en la figura 1.19, el grupo amida muestra una separación de cargas mayor cuando presenta una estructura plana (presente en las estructuras A y B) que la que ocurre cuando es ortogonal (formas C y D). Por lo tanto, la interconversión de isómeros considerada a través de un estado ortogonal de transición (E) debe ser más rápida en disolventes menos polares.⁽³⁹⁾

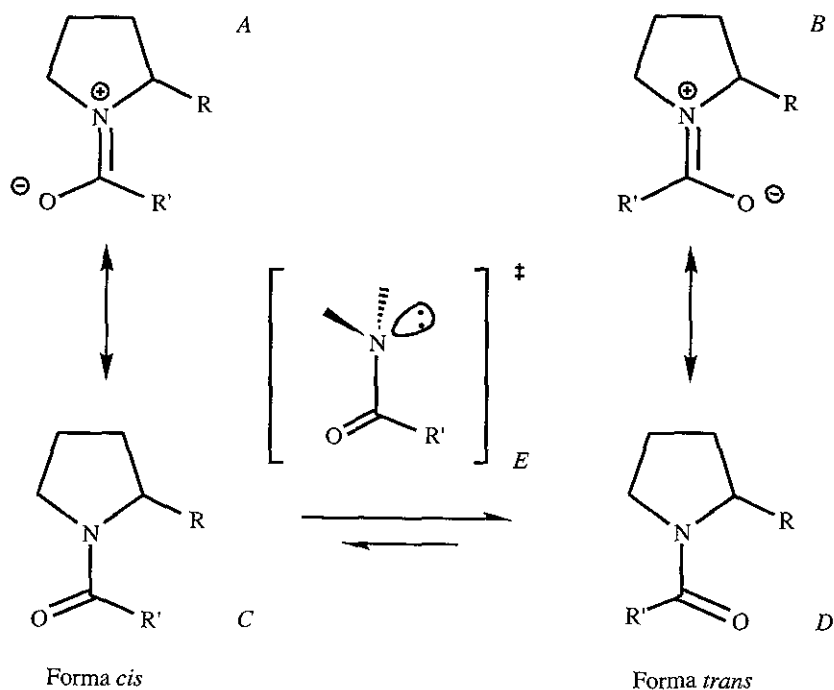


Figura 1.19. Estructuras resonantes presentes en la isomería *cis-trans* del enlace amida de la prolina.

Además, puesto que la carga parcial del oxígeno es mayor en el estado plano que en el ortogonal, entonces los disolventes próticos tienden a restringir la isomerización por la formación de puentes de hidrógeno entre el disolvente y el oxígeno de la amida.⁽⁴¹⁾

Por otro lado, reportes recientes hacen énfasis en los efectos de la cadena lateral sobre la isomerización *cis-trans* de la prolina.⁽⁴²⁾ Estudios de RMN efectuados sobre series de pentapéptidos del tipo Ac-Ala-Xaa-Pro-Ala-Lys-NH₂, donde Xaa representa a cualquiera de los veinte aminoácidos proteínogénicos, se encontró que el porcentaje de isómero *cis* presente para el sistema Xaa-Pro del pentapéptido, era muy similar al porcentaje del conformero *cis* presente para esa misma combinación Xaa-Pro en proteínas complejas; esto es indicativo de que la conformación de estructuras macromoleculares tiene una componente como resultado de ordenamientos en el nivel local.

De manera interesante, para el sistema Xaa-Pro con Xaa=Pro, se encontró una reducción considerable de interconversión a la forma *cis*, atribuida a los efectos estéricos entre ambos anillos.^(42,43) Por otro lado, si Xaa es tirosina (Tyr) o histidina (His), y el péptido se encuentra en medio básico, se observa también una disminución en la proporción de la forma *cis*. Puesto que en medio básico las cadenas laterales de Tyr e His están desprotonadas, se sugiere una relación entre la carga formal de la cadena lateral sobre el equilibrio *cis-trans* de la prolina.⁽⁴²⁾

Este carácter director estructural de la prolina, ha sido reconocido de igual forma utilizando espectrometría de masas, al analizar el patrón de fragmentación que siguen péptidos pequeños que incluyen a la prolina en su estructura.^(44,45)

Utilizando espectrometría de masas de iones negativos en tetrapéptidos conteniendo combinaciones que van de 1 a 4 residuos de prolina, se observan patrones de fragmentación que dependen del número y posición que ocupan los residuos de este aminoácido. Se concluyó por tanto, que las diferencias conformacionales generadas por la prolina, son determinantes en la generación de los iones negativos en fase gaseosa vía FAB.⁽⁴⁶⁾

Puesto que la presencia de prolina en fármacos y metabolitos^(47,48) puede influenciar la estabilidad, estructura o reconocimiento antigénico de estas sustancias^(20,49) y debido a que es necesario el conocimiento detallado de los aspectos conformacionales en la evaluación de la actividad biológica, se han considerado diversas estrategias para tratar de resolver esta problemática.

Así se ha propuesto la síntesis de análogos a la prolina en donde su geometría se encuentre restringida; de esta forma la síntesis de (2S,5R)-terbutilprolina⁽⁴⁹⁾ (figura 1.20) permite obtener un análogo de la prolina adecuado para introducirlo en secuencias sintéticas de péptidos, en donde el grupo terbutilo en la posición 5 impone restricciones estéricas que favorecen al isómero *cis*-amida.⁽⁵⁰⁾

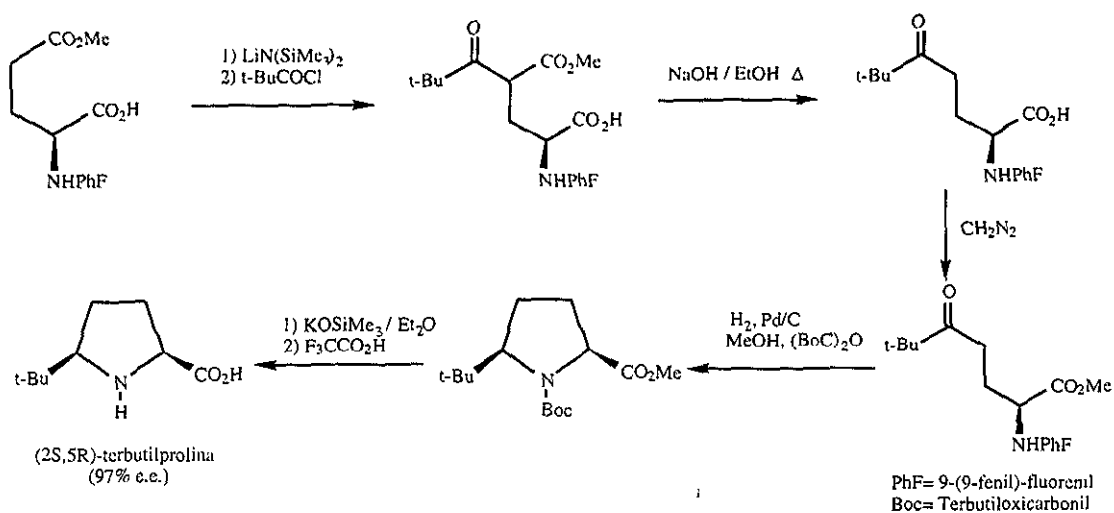


Figura 1.20. Secuencia sintética de obtención del (2S,5R)-terbutilprolina.

En el mismo orden de ideas, se ha propuesto la síntesis de L-prolina marcada con deuterio en posiciones específicas.⁽⁵¹⁾ En un proceso sintético que se resume en la figura 1.21, se presenta la trideuteriación estereoespecífica de L-prolina.

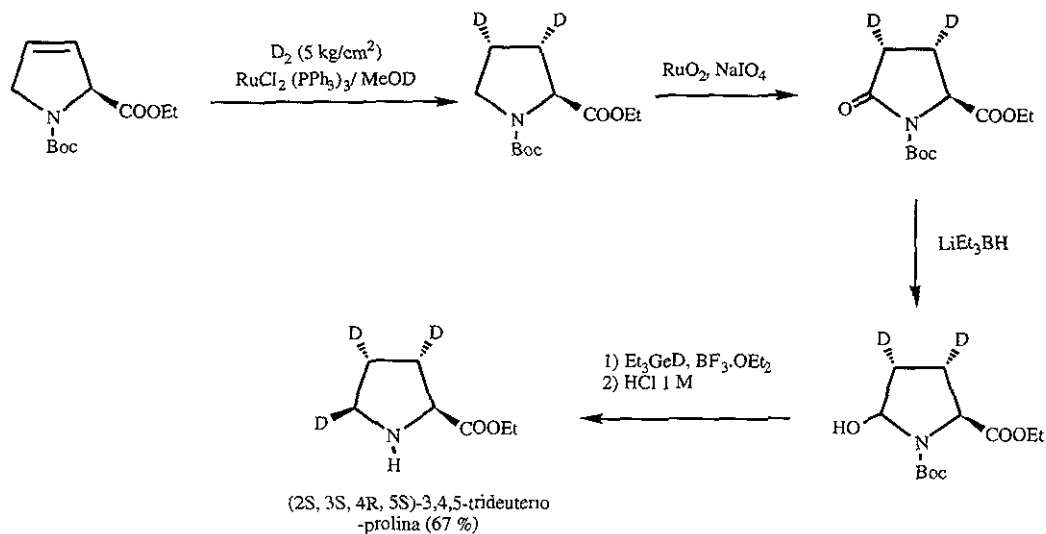


Figura 1.21. Secuencia sintética para la obtención del (2S, 3S, 4R, 5S)-3,4,5-trideuterio-L-prolina.

Se propone que este aminoácido marcado, puede ser utilizado en análisis conformacionales del residuo de prolina en cadenas peptídicas así como en estudios estereoquímicos de reacciones enzimáticas.⁽⁵¹⁾

Al considerar la prolina como un elemento estructural importante en péptidos y proteínas y al explorar sus aplicaciones en procesos de síntesis orgánica o al analizar las dificultades que presenta la caracterización y elucidación estructural de sus derivados, se plantea como un punto interesante el poder profundizar en el estudio de esta molécula.

1.2 Aspectos generales de anisotropía magnética.

En documentos anteriores generados por nuestro equipo de trabajo ^(52, 53) se hace una revisión amplia del fenómeno de la resonancia magnética nuclear y los experimentos bidimensionales modernos. A ellos y a las referencias ahí citadas se remite el presente trabajo. A continuación se presenta brevemente una descripción del fenómeno de anisotropía magnética, por ser este tema fundamental en la interpretación de los resultados presentados.

Para el caso del átomo de hidrógeno, el efecto de protección diamagnética que genera su electrón es pequeño comparado con el efecto que pueden tener átomos vecinos más pesados. Así la presencia de átomos o grupos funcionales vecinos al hidrógeno, puede generar dipolos magnéticos que alteran el campo magnético local y con ello la frecuencia de resonancia. Lo anterior se hace evidente en las variaciones en el desplazamiento químico protónico.

El aprovechamiento de este fenómeno ha beneficiado grandemente el conocimiento sobre las propiedades y estructura molecular orgánica e inorgánica y su estudio es un tema de actualidad en diversos campos de la química.

Tomando el caso más simple de una molécula diatómica AB , al colocarla en un campo magnético externo B_0 , se induce un momento magnético μ_A considerado como un dipolo puntual que se localiza en el centro geométrico del átomo A . Este momento magnético μ_A es proporcional a la susceptibilidad magnética de A (χ_A) y puede resolverse en un sistema cartesiano en sus tres componentes: $\mu_A(x)$, $\mu_A(y)$ y $\mu_A(z)$.⁽⁵⁴⁾

La contribución que este dipolo magnético ejercerá sobre la frecuencia de resonancia del núcleo B , está dada por:

$$\Delta\sigma = \frac{1}{4\pi} \sum_{i=x,y,z} \chi_A^i (1 - 3\cos^2 \theta_i) / R^3 \quad \text{ec. 1.1}$$

Donde θ es el ángulo entre la dirección de $\mu_A(x,y,z)$ y el eje del enlace entre A y B ; R es la distancia entre el centro de A y el núcleo B . Esta expresión es también conocida como ecuación de McConnell⁽⁵⁴⁾.

La figura 1.22 representa esquemáticamente las tres disposiciones geométricas principales del campo magnético secundario con respecto al campo magnético B_0 .

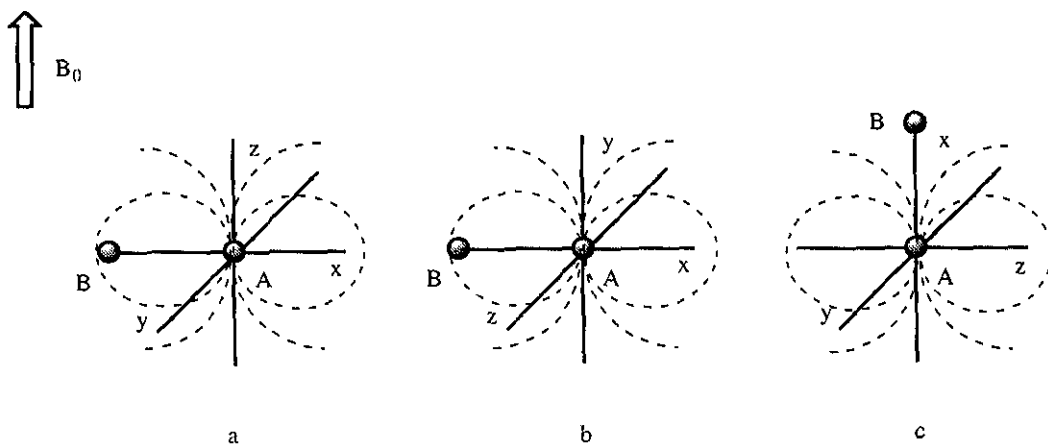


Figura 1.22. Disposiciones espaciales del campo magnético secundario generado en una molécula diatómica AB con respecto al campo magnético principal B_0 .

Las disposiciones señaladas como *a* y *b*, muestran condiciones en donde el campo secundario es paralelo al campo magnético principal. En ambos casos el campo inducido se suma al campo principal y la resonancia del núcleo B ocurre en campos más bajos (se dice que el núcleo B está desprotegido).

Por el contrario, la disposición marcada como *c*, muestra que el campo inducido sobre el núcleo B, se opone al campo principal. La resonancia de B ocurre en campos más altos y se dice entonces que este núcleo está protegido.

En el caso de moléculas en disolución no viscosa, la rotación molecular es lo suficientemente rápida en todas direcciones como para que se presente un promedio de las tres disposiciones espaciales mencionadas.

De acuerdo con la ecuación 1.1, el factor $1 - 3 \cos^2 \theta$ lleva a un resultado neto igual a cero, siempre y cuando los componentes de la susceptibilidad magnética $\chi_A(x)$, $\chi_A(y)$ y $\chi_A(z)$ tengan el mismo valor. Esta condición permite considerar al núcleo A como magnéticamente isotrópico. Típicamente, la topología de una distribución electrónica que se adhiere idealmente a esta condición es la de tipo esférico.

En el caso de existir diferencias entre las componentes cartesianas de la susceptibilidad magnética de A, se considera que A posee anisotropía magnética (denominada como $\Delta\chi$), la cual de acuerdo con su orientación puede efectuar variaciones en el desplazamiento del núcleo B que pueden ser tanto paramagnéticas como diamagnéticas.

La evaluación de la anisotropía magnética está dada por la relación:

$$\Delta\chi = \chi_{\parallel} - \chi_{\perp} \quad \text{ec. 1.2}$$

Esto es la diferencia de susceptibilidades entre dos disposiciones ortogonales. Como puede observarse de la ecuación 1.2, la anisotropía de un grupo con un eje de simetría está definida como la diferencia entre las susceptibilidades paralela y perpendicular a dicho eje.

La contribución magnética generada por el fenómeno de anisotropía, para un protón, está descrita por la ecuación de McConnell, de la siguiente forma:

$$\Delta\sigma = \frac{1}{3} \Delta\chi(1 - 3\cos^2 \theta) / 4\pi R^3 \quad \text{ec. 1.3}$$

La ecuación 1.3 puede representarse gráficamente como conos de protección cuyo plano nodal (donde $\Delta\sigma = 0$) se fija en un ángulo de 54.7° (figura 1.23) ^(54,55). Ello ocurre porque el término $3\cos^2(54.7^\circ) = 1$ y el término angular se iguala a cero.

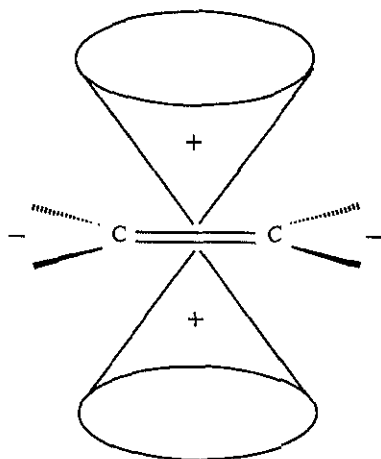


Figura 1.23. Representación gráfica de la ecuación de McConnell para el sistema de doble enlace carbono-carbono. La zona de protección está marcada con signo (+) y la zona de desprotección se encuentra marcada con el signo (-).

Un caso especial de anisotropía magnética es el que se presenta en sistemas cíclicos π conjugados. En términos de un modelo simplificado, una molécula aromática puede ser concebida como un esqueleto cíclico formado por los enlaces σ y en este esqueleto se genera una corriente de electrones π . Cuando una molécula aromática se coloca en un campo magnético externo B_0 , se induce un campo magnético secundario generado por la corriente cíclica diamagnética de los electrones π (figura 1.24).

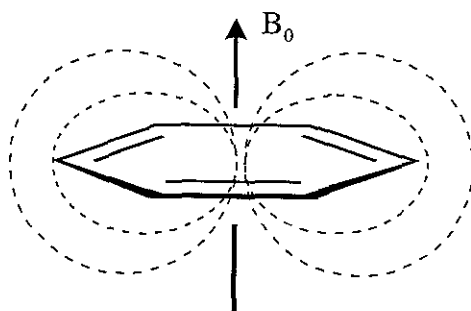


Figura 1.24. Corrientes magnéticas presentes en el anillo de benceno.

El campo magnético secundario está dado por el dipolo opuesto a B_0 y se localiza en el centro geométrico del anillo. Como resultado de lo anterior, los núcleos situados en el plano molecular y por fuera del anillo se encuentran desprotegidos. A la inversa, aquellos núcleos situados por encima o por debajo del plano del anillo, se encontrarán fuertemente protegidos.

La primera aproximación cuantitativa de este fenómeno, fue dada por Pople para la resonancia magnética del protón: considerando el plano del anillo de benceno como perpendicular al campo magnético B_0 , que revela la orientación en donde la susceptibilidad diamagnética es dominante *i.e.* χ_{\perp} , el movimiento circular de los electrones está dado por la frecuencia de Larmor:

$$\omega = \frac{\mu_0 e B_0}{4\pi 2m_e} \quad \text{ec. 1.4}$$

Donde e y m_e son la carga y la masa del electrón respectivamente y μ_0 es la permeabilidad en el vacío. Para un sistema de seis electrones π , como es el caso del benceno, la intensidad de la corriente está dada por:

$$i = \frac{3e\omega}{\pi} = \frac{\mu_0 3e^2 B_0}{4\pi^2 2m_e} \quad \text{ec. 1.5}$$

Las propiedades magnéticas de la corriente electrónica se aproximan, como ya se mencionó, a un dipolo magnético situado en el centro del anillo. La magnitud de dicho dipolo está dada por:

$$\mu = i \pi r^2 \quad \text{ec. 1.6}$$

Combinando las ecuaciones 1.5 y 1.6:

$$\mu = \frac{\mu_0 3e^2 B_0 r^2}{4\pi 2m_e} \quad \text{ec. 1.7}$$

En donde r es el radio del anillo. Para un protón situado a una distancia R del centro del anillo aromático, el campo magnético secundario al que se ve expuesto es:

$$B' = \frac{\mu_0 3e^2 B_0 r^2}{4\pi 2m_e R^3} \quad \text{ec. 1.8}$$

A partir de la ecuación 1.8, se puede encontrar que la contribución magnética generada por la anisotropía del benceno está dada por:

$$\Delta\sigma = -\frac{\mu_0 e^2 r^2}{4\pi 2m_e R^3} \quad \text{ec. 1.9}$$

Debido a que existe una relación de proporcionalidad inversa entre $\Delta\sigma$ y R^3 , el modelo presentado permite una interpretación cualitativa de sistemas aromáticos polinucleares. En este caso, los desplazamientos observados en cada región espacial, se consideran el resultado de la suma de las contribuciones anisotrópicas individuales de cada anillo. Así, para un sistema bencénico se ha postulado un diagrama que permite estimar aceptablemente el efecto de protección o desprotección de un núcleo en función de su ubicación geométrica respecto del plano del anillo.^(56,57)

CAPÍTULO 2

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A manera de aclaración inicial, debe hacerse notar que la numeración en todos los compuestos analizados es arbitraria (no sigue las reglas de la UIQPA), haciéndose esto deliberadamente y de tal forma que en todos los compuestos, los carbonos del sistema del éster metílico de L-prolina coincidieran en su número asignado y así facilitar la discusión de los resultados obtenidos.

Los experimentos de resonancia magnética nuclear se realizaron en 500 MHz para el caso de hidrógeno y en 125 MHz para el caso de carbono. Las condiciones generales de los experimentos de resonancia magnética nuclear, así como el tratamiento dado a los datos cristalográficos para la obtención de las estructuras tridimensionales y el cálculo de las energías estérica y minimizada, se presentan en el capítulo 3.

2.1 Comportamiento del clorhidrato del éster metílico de L-prolina en diferentes disolventes.

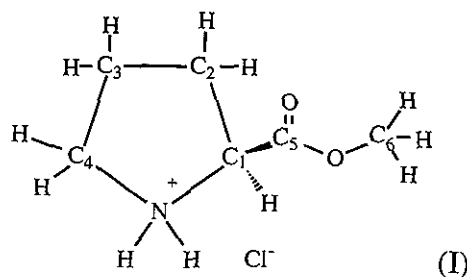


Figura 2.1 Estructura numerada del clorhidrato del éster metílico de L-prolina (I).

2.1.1 Asignación de los espectros de RMN de I en dimetilsulfóxido-d₆.

a) Espectro de ¹H en 500 MHz y correlaciones homonucleares en temperatura ambiente.

El espectro de hidrógeno de I en dimetilsulfóxido deuteriado, muestra sobreposición de los protones del C₃ así como la sobreposición de los protones correspondientes al C₄. Aunque en el experimento HMQC (que se muestra en el siguiente apartado) es posible asignar su posición, no es posible discernir cuál de cada par de protones es *cis* al protón de la posición 1.

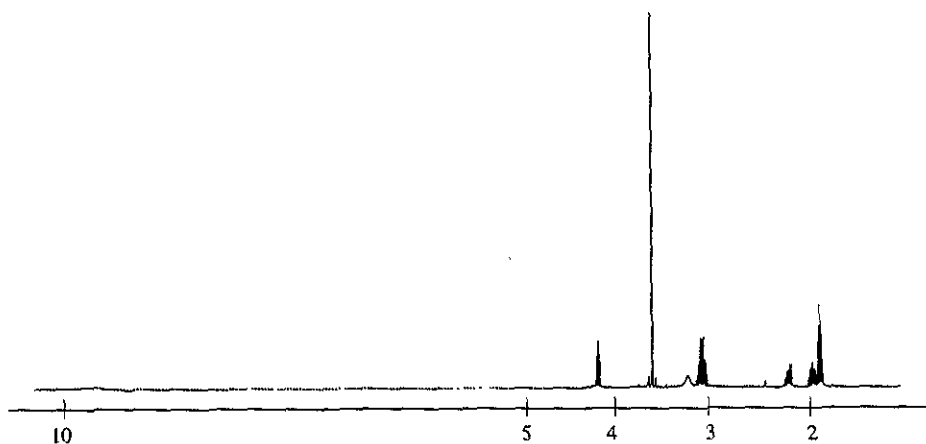


Figura 2.2 Espectro unidimensional de ^1H de I en $\text{DMSO } d_6$ en temperatura ambiente.

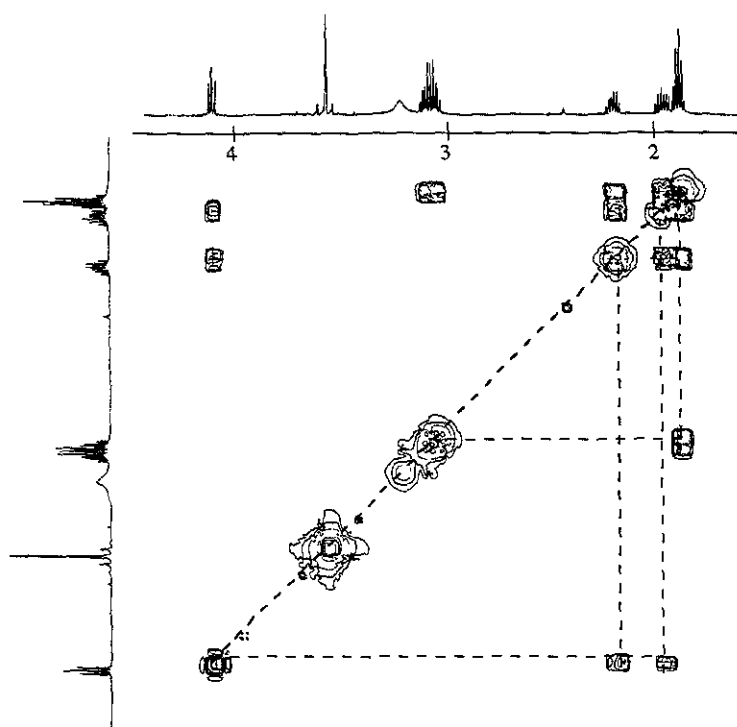


Figura 2.3 Espectro COSY de I en $\text{DMSO } d_6$ en temperatura ambiente.

Tabla 2.1 Señales en el espectro de ^1H (500 MHz) del éster metílico de L-prolina (clorhidrato). Disolvente: dimetilsulfóxido- d_6 . Temperatura ambiente.

Hidrógeno	δ (ppm)	J (Hz)*	COSY
H_1	4.33	$J_1 = 8.5, J_2 = 7.5$	H_2, H_2'
H_2	2.23		$\text{H}_3, \text{H}_3', \text{H}_1$
H_2'	1.99		$\text{H}_3, \text{H}_3', \text{H}_1$

H ₃ , H ₃ '	1.91		H ₂ , H ₂ ', H ₄ , H ₄ '
H ₄ , H ₄ '	3.19		H ₃ , H ₃ '
H ₆ , H ₆ ', H ₆ ''	3.73		
NH ₂ ⁺	9.80		

*J= constante de acoplamiento.

b) Espectro de ¹³C en 125 MHz e interacciones heteronucleares en temperatura ambiente.

La asignación de los protones correspondientes a cada carbono, se efectuó mediante el experimento HMQC.

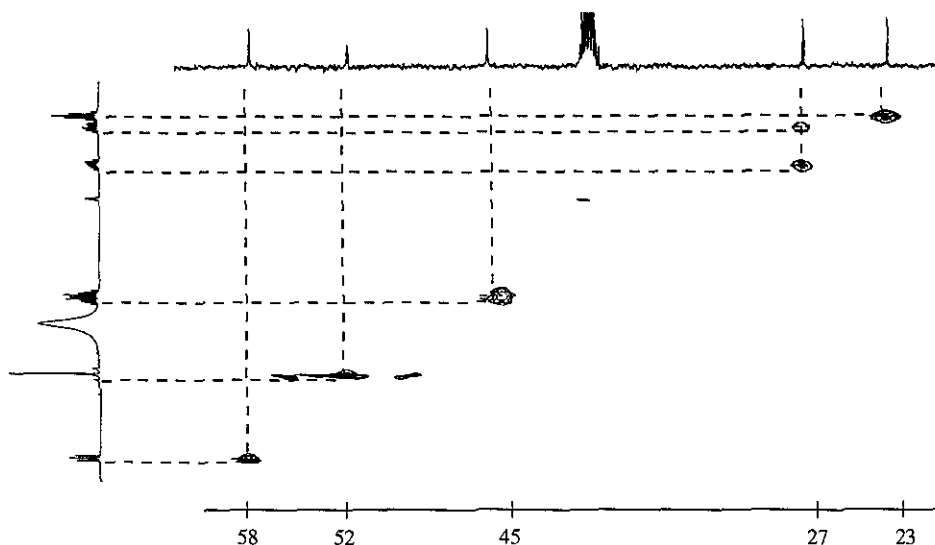


Figura 2.4 Espectro HMQC de I en DMSO deuteriado en temperatura ambiente.

Tabla 2.2. Resumen de la elucidación de los espectros de ¹H y ¹³C del clorhidrato del éster metílico de L-prolina en dimetilsulfóxido-d₆ en temperatura ambiente.

Carbono	δ_C	δ_H (n_H , m, J_{HH}^*)	δ_H (n_H^* , m, J_{HH}^*)
1	58.4	4.33 (1, dd, 8.5, 7.5)	
2	27.6	2.23 (1, m)	1.99 (1, m)
3	23.0	1.91 (2, m)	
4	45.2	3.19 (2, m)	
5	169.2		
6	53.0	3.73 (3, s)	
NH ₂ ⁺		9.80 (2, ancha)	

* n_H = número de hidrógenos, m= multiplicidad, J= constante de acoplamiento.

c) Espectros en temperatura variable en dimetilsulfóxido-d₆.

Se determinaron espectros unidimensionales de hidrógeno a 50, 70 y 90°C. Aunque no existen variaciones importantes en el valor del desplazamiento químico para cada señal; los espectros de I en dimetilsulfóxido, realizados en temperaturas altas, muestran un comportamiento general característico, en donde a medida que se aumenta la temperatura, los acoplamientos débiles observados en el espectro en temperatura ambiente, se hacen menos definidos; esto lleva a una simplificación de las señales múltiples, que permite observar más claramente las multiplicidades debidas a acoplamientos fuertes.

La pérdida de multiplicidad puede también atribuirse al efecto de promediación de las constantes de acoplamiento por incremento de la movilidad molecular.

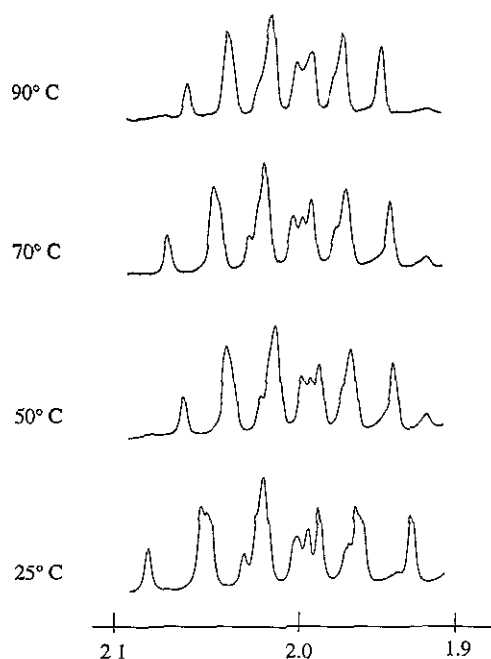


Figura 2.5 Comportamiento del espectro de ¹H de I en temperatura variable en DMSO. Se presentan las ampliaciones correspondientes a la señal del protón 2'.

Tabla 2.3 Desplazamientos químicos de I en DMSO en diferentes temperaturas.

Protón	δ^* (t. a.)	δ^* (50° C)	$\Delta\delta^{**}$	δ^* (70° C)	$\Delta\delta^{**}$	δ^* (90° C)	$\Delta\delta^{**}$
H ₁	4.33	4.32	-0.01	4.32	-0.01	4.32	-0.01
H ₂	2.23	2.24	0.01	2.25	0.02	2.26	-0.03
H ₂ '	1.99	1.99		2.00	0.01	2.02	0.03
H ₃	1.91	1.91		1.92	0.01	1.93	0.02
H ₃ '	1.91	1.91		1.92	0.01	1.93	0.02
H ₄	3.19	3.20	0.01	3.22	0.03	3.22	0.03
H ₄ '	3.19	3.20	0.01	3.22	0.03	3.22	0.03
H ₆ , H ₆ ', H ₆ ''	3.73	3.74	0.01	3.75	0.02	3.75	0.02
NH ₂ ⁺	9.80	9.90	0.10	9.90	0.10	9.90	0.10

* δ en ppm. **en ppm y con respecto a temperatura ambiente.

2.1.2 Asignación de los espectros de I en acetona-d₆.

a) Espectro de ¹H y correlaciones homonucleares en acetona-d₆ en temperatura ambiente.

Se llevaron a cabo espectros uni y bidimensionales de ¹H. En temperatura ambiente se observa la presencia de señales minoritarias, en proporción aproximada 85:15, tomando como base para la cuantificación la proporción existente entre las áreas bajo la curva de las señales a 3.83 y 3.84 ppm.

A diferencia de los espectros en dimetilsulfóxido, en acetona se observan señales separadas para los dos protones del carbono 4. Sin embargo, no se observan señales para los protones del clorhidrato.

Debido a la sobreposición de señales, los protones de los metilenos en posiciones 2,3 y 4 no fueron asignadas como *cis* o *trans* con respecto al protón en el carbono 1.

Para la asignación del espectro, sólo se consideraron las señales correspondientes al compuesto mayoritario. La presencia de señales minoritarias, llevó inicialmente a pensar que se trataba de un confórmero, sin embargo los experimentos en baja temperatura, no proporcionaron mayor información acerca de este compuesto minoritario, por lo que no se tabulan los datos respectivos.

El hecho de que las señales del compuesto minoritario se deban a un confórmero del compuesto principal queda descartado ya que, de manera interesante, en el experimento EXSY realizado sobre la señal del metino a 5.72 ppm (minoritaria) por irradiación de la señal del metino a 4.48 ppm (mayoritaria) se genera un efecto muy pequeño (disminución cercana a 2.5 %). Esto estaría implicando un intercambio muy lento entre ambos confórmeros.

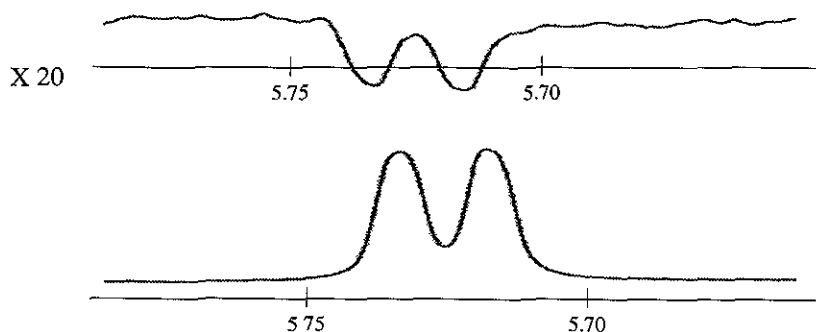


Figura 2.6 Espectro EXSY: Incremento de la señal a 5.72 ppm, irradiando la señal a 4.48 ppm.

Una hipótesis que justifique la presencia de un compuesto minoritario, es la formación reversible de un aducto por reacción entre el carbonilo de la acetona y la amina secundaria del aminoácido, generando de esta forma una enamina (figura 2.7); puesto que la amina se encuentra protonada, tal reacción sería muy lenta y debido a que la acetona se encuentra deuteriada, no es posible detectarla en el espectro de ¹H.

Para confirmar lo anterior es necesario llevar a cabo estudios más específicos con mayor tiempo de acumulación en los experimentos de carbono 13, que van más allá de los alcances de este trabajo.

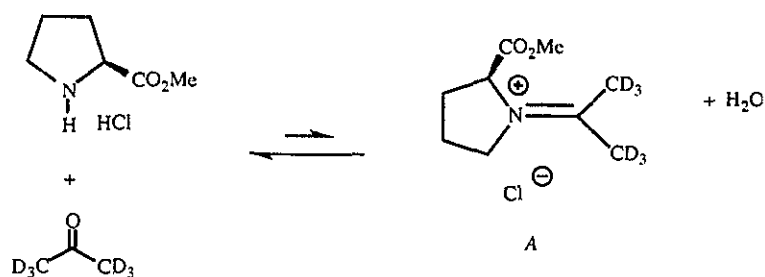


Figura 2.7 Propuesta de formación de un aducto de reacción entre I y el disolvente acetona-d₆, la estructura A sería la responsable de las señales minoritarias detectadas.

Otra explicación plausible y acorde con lo que se conoce, es el hecho de que se esté presentando la formación de puentes de hidrógeno entre el soluto y el disolvente, en este caso la acetona, tal y como se muestra en la figura 2.8.

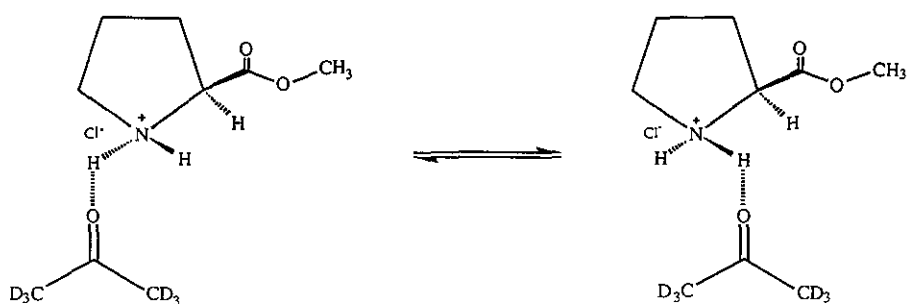


Figura 2.8 Propuesta de formación de puentes de hidrógeno entre el clorhidrato del éster metílico de L-prolina y la acetona deuteriada, provocando las señales minoritarias encontradas.

Tabla 2.4 Señales en el espectro de ¹H (500 MHz) del éster metílico de L-prolina (clorhidrato). Disolvente: acetona-d₆. Temperatura ambiente.

Hidrógeno	δ (ppm), (J) (Hz)*	COSY	NOESY
H ₁	4.48 (J ₁ = 8.5, J ₂ = 7.5)	H ₂ , H ₂ '	H ₄ '
H ₂	2.42	H ₃ , H ₃ ', H ₁	
H ₂ '	2.21	H ₃ , H ₃ ', H ₁	
H ₃ , H ₃ '	2.08	H ₂ , H ₂ ', H ₄ , H ₄ '	
H ₄	3.52 (J ₁ = 7.5, J ₂ = 4)	H ₃ , H ₃ '	
H ₄ '	3.41 (J ₁ = 7.5, J ₂ = 4.5)	H ₃ , H ₃ '	H ₁
H ₆ , H ₆ ', H ₆ ''	3.39		H ₁ , H ₄
NH ₂ ⁺			

*J= constante de acoplamiento.

b) Espectro de ^{13}C en 125 MHz e interacciones heteronucleares en temperatura ambiente.

El espectro HMQC permitió la asignación de los protones de cada carbono.

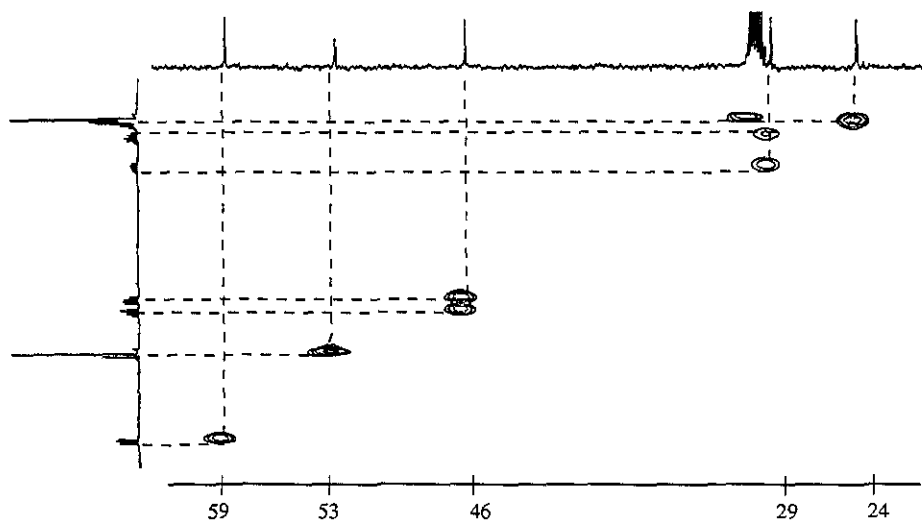


Figura 2.9 Espectro HMQC de I en acetona- d_6 en temperatura ambiente

Tabla 2.5 Resumen de la elucidación de los espectros de ^1H y ^{13}C del clorhidrato del éster metílico de L-prolina en acetona- d_6 en temperatura ambiente.

Carbono	δ_{C}	δ_{H} (n_{H} , m, J_{HH}^*)	δ_{H} (n_{H} , m, J_{HH}^*)
1	59.6	4.48 (1, dd, 8.5, 7.5)	
2	29.0	2.42 (1, m)	2.21 (1,m)
3	24.2	2.08 (2, m)	
4	46.2	3.52 (1, m, 7.5, 4)	3.41 (1, m, 7.5, 4.5)
5	170.2		
6	53.4	3.39 (3, s)	
NH_2^+			

* n_{H} = número de hidrógenos, m= multiplicidad, J= constante de acoplamiento.

2.1.3 Asignación de los espectros de I en cloroformo deuteriado.

Se determinaron tanto espectros unidimensionales de ^1H y ^{13}C , como bidimensionales de correlación homonuclear (COSY) y heteronuclear (HMQC y HMBC).

a) Espectros de ^1H en cloroformo deuteriado en temperatura ambiente.

El espectro unidimensional de ^1H , muestra sobreposición de señales para los protones del carbono 3. Por ello no se efectuó el discernimiento de la posición *cis* o *trans* de cada protón de los tres metilenos con respecto al hidrógeno en posición 1.



Figura 2.10 Espectro de ^1H de I en cloroformo deuteriado en temperatura ambiente.

Tabla 2.6 Señales en el espectro de ^1H (500 MHz) del éster metílico de L-prolina (clorhidrato). Disolvente: cloroformo deuteriado. Temperatura ambiente.

Hidrógeno	δ (ppm), (J)(Hz)*	COSY
H ₁	4.50 (J ₁ = 7.0, J ₂ = 8.5)	H ₂ , H ₂ '
H ₂	2.44	H ₁ , H ₂ ', H ₃ , H ₃ '
H ₂ '	2.19	H ₁ , H ₂ , H ₃ , H ₃ '
H ₃ , H ₃ '	2.09	H ₂ , H ₂ ', H ₄ , H ₄ '
H ₄	3.62 (J ₁ = 7.5, J ₂ = 7)	H ₃ , H ₃ '
H ₄ '	3.51 (J ₁ = 7.5, J ₂ = 7)	H ₃ , H ₃ '
H ₆ , H ₆ ', H ₆ ''	3.84	
NH	10.60	
NH'	9.20	

*J= constante de acoplamiento.

Un aspecto interesante del espectro protónico de I en cloroformo deuteriado es el hecho de que a diferencia del dimetilsulfóxido, aquí se presentan dos señales separadas para los protones del clorhidrato. esto puede atribuirse al hecho de que siendo el cloroformo un disolvente no polar e incapaz de formar puentes de hidrógeno, los protones unidos al nitrógeno de la prolina se encuentran fijos en su posición y pueden diferenciarse.

b) Espectro de ^{13}C en 125 MHz e interacciones homo y heteronucleares.

La asignación de los protones para cada carbono, se efectuó mediante el experimento HMQC. Por otro lado, el experimento HMBC evidenció las interacciones entre los protones del metilo del éster y el carbono carboxílico.

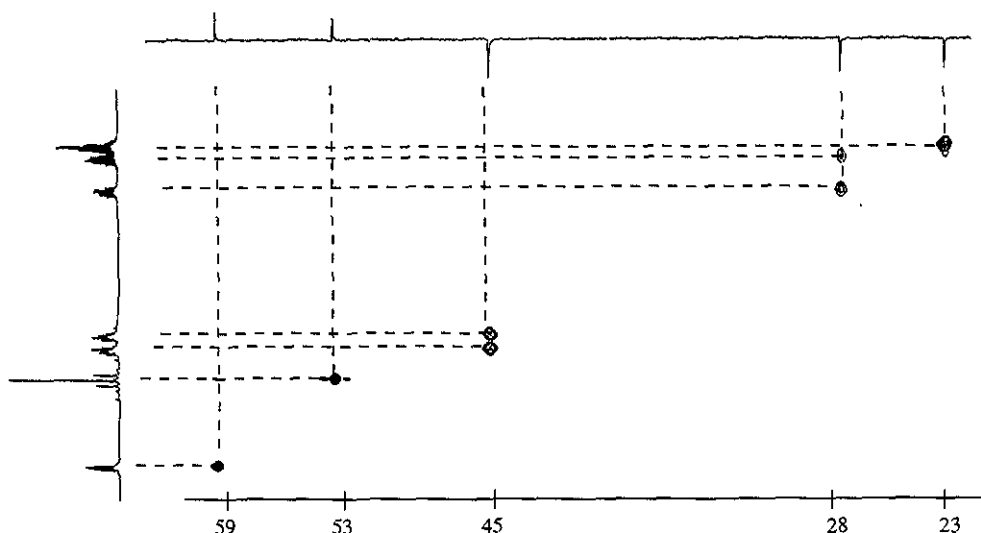


Figura 2.11 Espectro HMQC de I en cloroformo deuteriado en temperatura ambiente

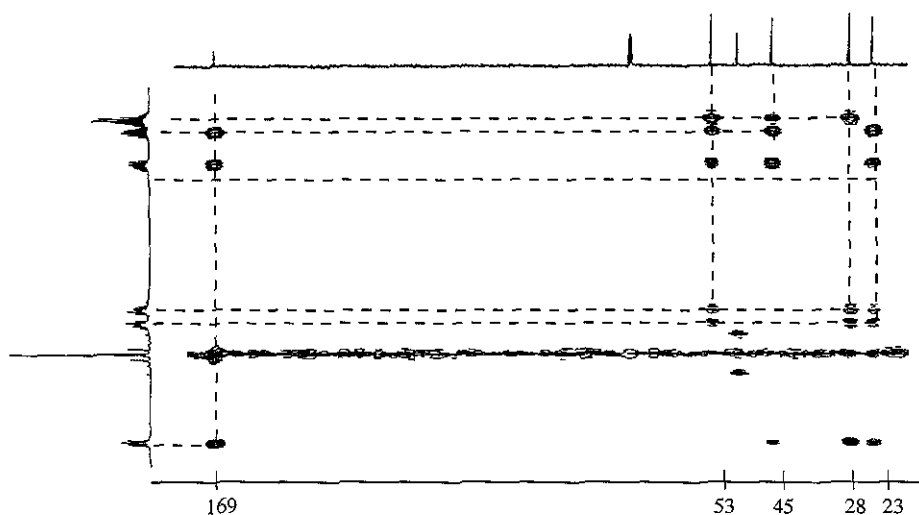


Figura 2.12 Espectro HMBC de I en cloroformo deuteriado en temperatura ambiente.

Tabla 2.7 Resumen de la asignación de los espectros de ^1H y ^{13}C del clorhidrato del éster metílico de L-prolina en cloroformo deuteriado en temperatura ambiente.

Carbono	δ_{C}	δ_{H} (n_{H} , m, J_{HH}^*)	δ_{H} (n_{H} , m, J_{HH}^*)
1	59.1	4.50 (1, dd, 8.5, 7.0)	
2	28.5	2.44(1, m)	2.19 (1, m)
3	23.5	2.09 (2, m)	
4	45.7	3.62 (1, m, 7.5, 7.0)	3.3.15 (1, m, 7.5, 7.0)

5	169.3		
6	53.3	3.84 (3, s)	
NH ₂ ⁺		10.60 (1, ancha)	9.20 (1, ancha)

*n_H= número de hidrógenos, m = multiplicidad, J= constante de acoplamiento.

Tabla 2.8 Acoplamientos homo y heteronucleares para el clorhidrato del éster metílico de L-prolina en cloroformo en temperatura ambiente.

Carbono (δ)	Hidrógeno (δ)	COSY	HMQC	HMBC
C ₁ (59.1)	H ₁ (4.50)	H ₂ , H ₂ '	H ₁	H ₃ , H ₃ ' H ₂ , H ₂ ' H ₄ , H ₄ '
C ₂ (28.5)	H ₂ (2.44)	H ₁ , H ₂ ' H ₃ , H ₃ '	H ₂ , H ₂ '	H ₃ , H ₃ ' H ₄ , H ₄ ' H ₁
	H ₂ ' (2.19)	H ₁ , H ₂ H ₃ , H ₃ '		
C ₃ (23.5)	H ₃ (2.09)	H ₂ , H ₂ ' H ₄ , H ₄ '	H ₃ , H ₃ '	H ₁ H ₂ , H ₂ ' H ₆ , H ₆ ', H ₆ ''
	H ₃ ' (2.09)			
C ₄ (45.7)	H ₄ (3.62),	H ₃ , H ₃ '	H ₄ , H ₄ '	H ₃ , H ₃ ' H ₂ , H ₂ ' H ₁
	H ₄ '(3.51)	H ₃ , H ₃ '		
C ₅ (169.3)				H ₁ H ₂ , H ₂ ' H ₆ , H ₆ ', H ₆ ''
C ₆ (53.3)	H ₆ (3.84), H ₆ ' (3.84), H ₆ ''(3.84)		H ₆ , H ₆ ', H ₆ ''	
NH ₂ ⁺	NH ₁ (10.60), NH ₁ '(9.20)			

2.1.4 Elucidación de los espectros de I en piridina-d₅.

Se obtuvieron tanto espectros unidimensionales de ¹H y de ¹³C, como espectros bidimensionales de correlación homonuclear (COSY, NOESY) y de correlación heteronuclear (HMQC y HMBC).

a) Espectros de ¹H en piridina-d₅.

Para el caso de piridina como disolvente, se observa en el espectro de ¹H unidimensional, que los seis protones diasterotópicos de los tres metilenos del anillo de prolina, se encuentran bien definidos, habiendo sobreposición de señales únicamente entre un protón de la posición 4 y el singulete del metoxilo de la posición 6. Sin embargo, esto no fue un inconveniente para poder asignar mediante las interacciones observadas en el espectro NOESY, cuál de cada par de protones de los metilenos se encuentra en relación *cis* con respecto al protón de la posición 1.

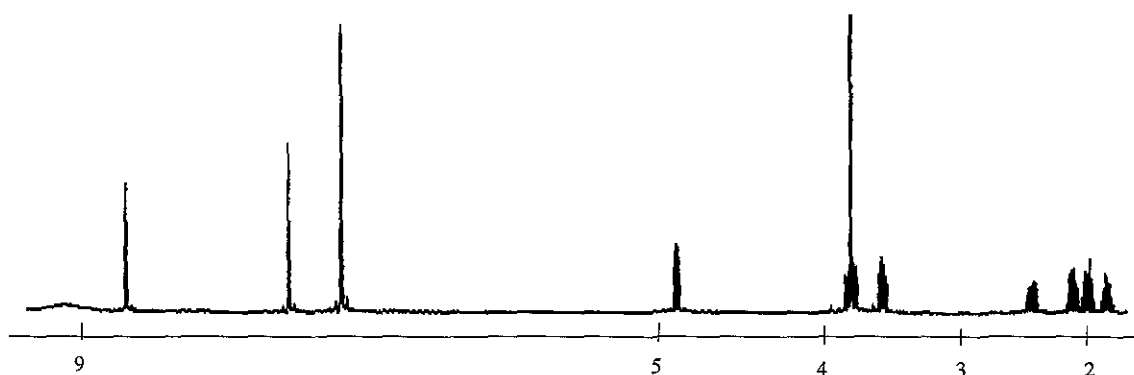


Figura 2.13 Espectro de ¹H de I en piridina -d₅ en temperatura ambiente.

En el espectro NOESY, que se muestra en la figura 2.14, se observan interacciones del protón 1 con sólo uno de los protones de la posición 4 y con sólo uno de los protones de la posición 3, estas señales fueron asignadas como *cis* al protón 1. Aunque se observan interacciones con los dos protones de la posición 2, una de ellas es más fuerte que la otra, asignándose a la primera la posición relativa *cis*. Las interacciones entre los 6 protones diasterotópicos, confirman la asignación, tal y como se muestra en la tabla 2.9.

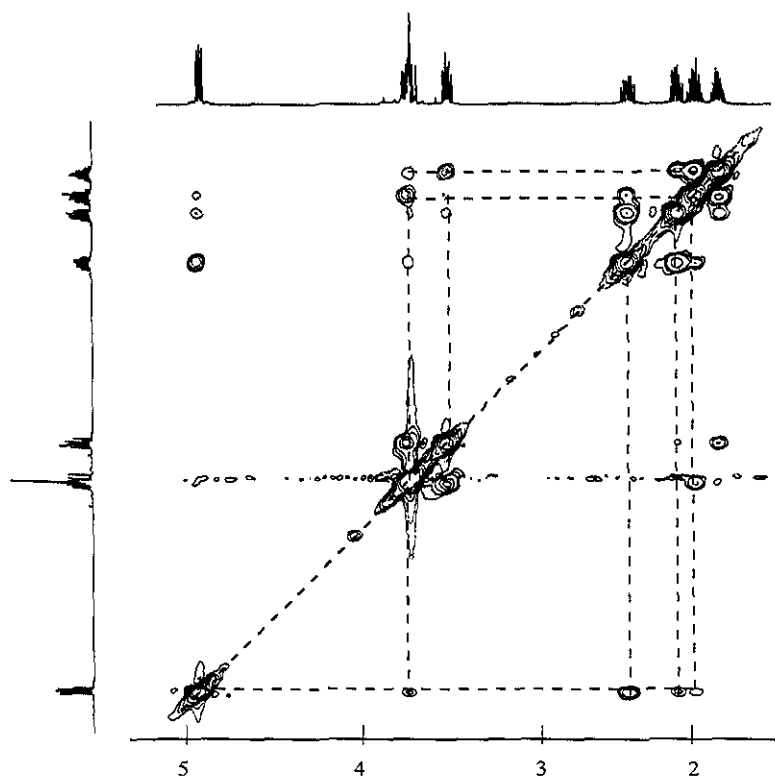


Figura 2.14 Espectro NOESY de I en piridina -d₅ en temperatura ambiente.

Tabla 2.9 Señales en el espectro de ¹H (500 MHz) del éster metílico de L-prolina (clorhidrato). Disolvente: piridina-d₅. Temperatura ambiente.

Hidrógeno	δ (ppm), (J) (Hz)	COSY	NOESY
H ₁	4.88, (J ₁ = 9, J ₂ = 6.5)	H ₂ , H ₂ '	H ₂ *, H ₄ *, H ₃ *
H ₂ *	2.39, (J ₁ = 7)	H ₁ , H ₃ , H ₃ '	H ₁
H ₂ '	2.10, (J ₁ = 7)	H ₁ , H ₃ , H ₃ '	H ₃ ', H ₄ '
H ₃ *	2.00, (J ₁ = 7)	H ₂ , H ₂ ', H ₄ , H ₄ '	H ₁
H ₃ '	1.86, (J ₁ = 7)	H ₂ , H ₂ ', H ₄ , H ₄ '	H ₂ ', H ₄ '
H ₄ *	3.66	H ₃ , H ₃ '	H ₁
H ₄ '	3.43	H ₃ , H ₃ '	H ₂ ', H ₃ '
H ₆ , H ₆ ', H ₆ ''	3.66		
NH ₂ ⁺	9.16		

**cis* al protón 1.

Para un par de protones de un metileno, la señal en campo bajo es *cis* al protón 1 y la señal en campo alto corresponde al protón en posición *trans* con respecto al mismo.

b) Espectro de ¹³C en 125 MHz e interacciones homo y heteronucleares.

El espectro HMQC permitió asignar los protones a cada carbono de la estructura estudiada.

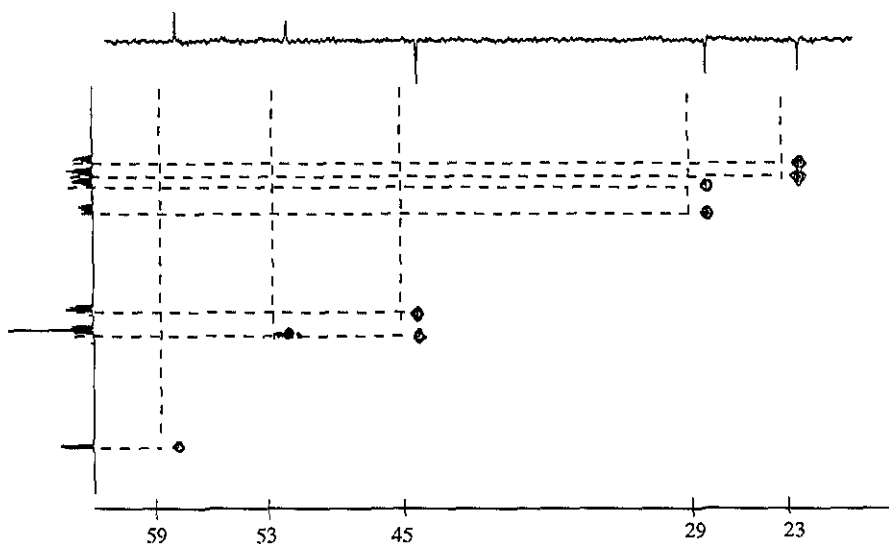


Figura 2.15 Espectro HMQC de I en piridina- d₅.

Tabla 2.10 Resumen de la asignación de los espectros de ¹H y ¹³C del clorhidrato del éster metílico de L-prolina en piridina-d₅ en temperatura ambiente.

Carbono	δ_C	δ_H (n_H , m, J_{HH} *)	δ_H (n_H , m, J_{HH} *)
C ₁	59.2	H ₁ 4.88 (1,d,9, 6.5)	
C ₂	29.2	H ₂ 2.39 (1, m, 7)	H ₂ ' 2.10 (1, m, 7)
C ₃	24.0	H ₃ 2.00 (1, m 7)	H ₃ ' 1.86 (1, m 7)
C ₄	45.5	H ₄ 3.66 (1, m)	H ₄ ' 3.43 (1, m)
C ₅	170.5		
C ₆	52.9	H ₆ 3.66 (3, s)	
NH ₂ ⁺		NH ₂ ⁺ 9.16 (2, ancha)	

* n_H = número de hidrógenos, m= multiplicidad, J= constante de acoplamiento.

Tabla 2.11 Acoplamientos homo y heteronucleares para el clorhidrato del éster metílico de L-prolina en piridina-d₅ en temperatura ambiente.

Carbono (δ)	Hidrógeno (δ)	COSY	NOESY	HMQC
C ₁ (59.2)	H ₁ (4.88)	H ₂ , H ₂ '	H ₂ , H ₃ , H ₄	H ₁
C ₂ (29.2)	H ₂ (2.39,) H ₂ ' (2.10)	H ₁ , H ₃ , H ₃ ' H ₁ , H ₃ , H ₃ '	H ₁ H ₃ ', H ₄ '	H ₂ H ₂ '
C ₃ (24.0)	H ₃ (2.00) H ₃ ' (1.86)	H ₂ , H ₂ ', H ₄ , H ₄ ' H ₂ , H ₂ ', H ₄ , H ₄ '	H ₁ H ₂ ', H ₄ '	H ₃ H ₃ '
C ₄ (45.5)	H ₄ (3.66) H ₄ ' (3.43)	H ₃ , H ₃ ' H ₃ , H ₃ '	H ₁ H ₂ ', H ₃ '	H ₄ H ₄ '
C ₅ (170.5)				
C ₆ (52.9)	H ₆ (3.66)			H ₆

2.1.5 Resumen de desplazamientos químicos en diferentes disolventes:

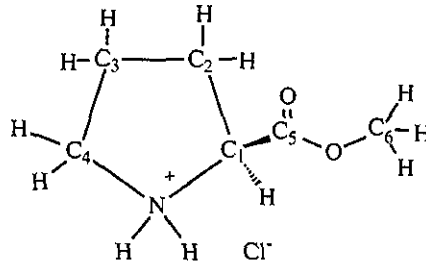


Figura 2.16 Estructura numerada de I.

Tomando como referencia al cloroformo deuteriado, por ser el disolvente de uso más común en RMN, se observa que existen variaciones importantes en los desplazamientos químicos de los protones del clorhidrato del éster metílico de L-prolina, principalmente en DMSO y en piridina, donde los desplazamientos químicos se ubican en lo general en campos más altos.

Debe recalcar que sólo en piridina se observan las seis señales de los protones de los metilenos bien separadas lo que permite su asignación completa con respecto al protón de la posición 1. De esta forma para un metileno del sistema de prolina, el protón situado en el valor de campo más bajo es *cis* al protón de la posición 1, mientras que el protón situado en campo más alto es *trans*. En los demás disolventes, existe sobreposición de señales y aunque es posible la asignación de protones para cada carbono del sistema, no puede asignarse su posición relativa al protón 1.

La tabla 2.12 resume la comparación de desplazamientos químicos de los diferentes disolventes, con respecto a cloroformo. Como puede observarse, la polaridad de los disolventes afecta ligeramente el valor del desplazamiento químico de los protones del sistema de prolina, enviándolos en campos más altos, como puede observarse en el caso de dimetilsulfóxido, en donde las variaciones del desplazamiento químico son de hasta 0.4 ppm. En el caso de piridina, existe un efecto anisotrópico de protección del disolvente que explica este hecho.⁽⁵⁸⁾

Los espectros de resonancia magnética nuclear de hidrógeno dependen de la temperatura y disolvente usado de tal forma que las conformaciones pueden ser estabilizadas por puentes de hidrógeno.

La conformación con puente de hidrógeno no es favorecida en disolventes no polares (caso del cloroformo deuteriado) porque tales disolventes no pueden formar puentes de hidrógeno en interacciones soluto/disolvente.

Sin embargo, en disolventes capaces de formar puentes de hidrógeno como el dimetilsulfóxido y en menor forma la acetona, existe un equilibrio entre la forma libre del soluto y aquella que se encuentra formando puente de hidrógeno con el disolvente.⁽⁵⁸⁾

Tabla 2.12 Comparación de los desplazamientos químicos de ^1H del clorhidrato del éster metílico de L-prolina en diferentes disolventes. Temperatura ambiente.

Protón	CDCl_3 δ (ppm)	DMSO		Acetona		Piridina	
		δ (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)*	δ (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)*	δ (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)*
NH	10.60	9.80	-0.8			9.16	-1.441
NH'	9.20	9.80	0.6			9.16	-0.041
H ₁	4.51	4.33	-0.18	4.48	-0.03	4.88	0.370
H ₂	2.44	2.23	-0.21	2.42	-0.02	2.39	-0.047
H ₂ '	2.19	1.99	-0.20	2.21	0.02	2.10	-0.084
H ₃	2.09	1.91	-0.18	2.08	-0.01	2.09	-0.095
H ₃ '	2.09	1.91	-0.18	2.08	-0.01	1.86	-0.232
H ₄	3.62	3.19	-0.43	3.52	-0.10	3.66	0.032
H ₄ '	3.51	3.19	-0.32	3.41	-0.10	3.43	-0.079
H ₆ , H ₆ ', H ₆ ''	3.84	3.73	-0.11	3.84		3.66	-0.189

*con respecto al desplazamiento químico en cloroformo deuteriado.

Para explicar las variaciones en el desplazamiento químico encontradas cuando el disolvente es piridina, se propone, la asociación de una molécula de piridina a través de puente de hidrógeno con la prolina, tal y como se muestra en la figura 2.17, esta asociación es una fuente posible de interacciones para diferenciar el efecto anisotrópico preferencial sobre una de las caras del sistema de prolina.

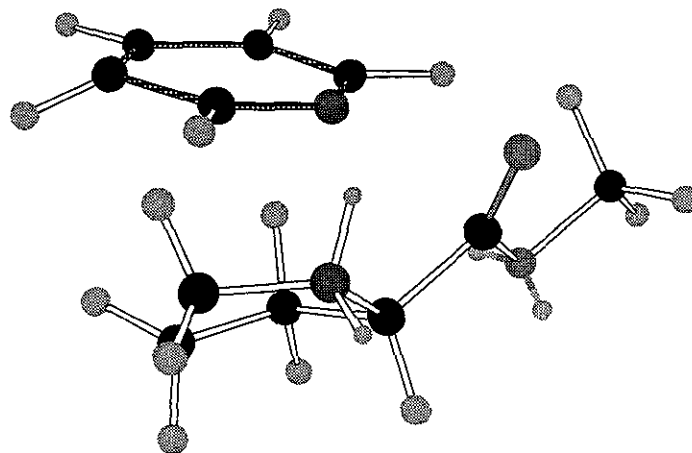


Figura 2.17 Propuesta de interacción entre la piridina y I que explica las variaciones observadas en el desplazamiento químico del aminoácido.

En el caso de la espectroscopía de ^{13}C , se observan también efectos de variación en el desplazamiento químico de los diferentes carbonos, en DMSO, este efecto es hacia campos más altos, mientras que en piridina y en acetona el efecto es hacia campos más bajos.

Tabla 2.13 Comparación de los desplazamientos químicos de ^{13}C del clorhidrato del éster metílico de L-prolina en diferentes disolventes. Temperatura ambiente

Carbono	CDCl ₃	DMSO		Acetona		Piridina	
	δ (ppm)	δ (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)*	δ (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)*	δ (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)*
1	59.1	58.4	-0.7	59.6	-0.5	59.2	0.1
2	28.5	27.6	-0.9	29.0	0.5	29.2	0.7
3	23.5	23.0	-0.5	24.2	0.7	24.0	0.5
4	45.7	45.2	-0.5	46.2	0.5	45.5	-0.2
5	169.3	169.2	-0.1	170.2	0.9	170.5	1.2
6	53.3	53.0	-0.3	53.4	0.1	52.9	-0.4

*con respecto al desplazamiento químico en cloroformo deuteriado.

Un aspecto interesante es la variación encontrada en las constantes de acoplamiento de la señal doble de dobles del protón de la posición 1, cuyos valores se resumen en la tabla 2.14 y que se presentan gráficamente en la figura 2.18. Para el caso del sistema anular de prolina, el acoplamiento más fuerte se presenta con el protón *cis*, mientras que el menos intenso se realiza con el protón *trans*.^(16,36) Lo anterior puede explicarse en virtud de que el ángulo diedro entre los protones *cis* es pequeño, mientras que con el protón *trans* se acerca a un valor de 90° que implica un mínimo en el valor de la constante de acoplamiento de acuerdo con la ecuación de Karplus.^(58,59,60)

Tabla 2.14 Variación de la constante de acoplamiento del protón de la posición 1 con los protones diastereotópicos de la posición 2 del clorhidrato del éster metílico de L-prolina, en diferentes disolventes, en temperatura ambiente.

Disolvente	$^3\text{JH}_{12cis}$	$^3\text{JH}_{12trans}$
Cloroformo d	8.5	7.0
DMSO d ₆	8.5	7.5
Acetona-d ₆	8.5	7.5
Piridina-d ₅	9.0	6.5

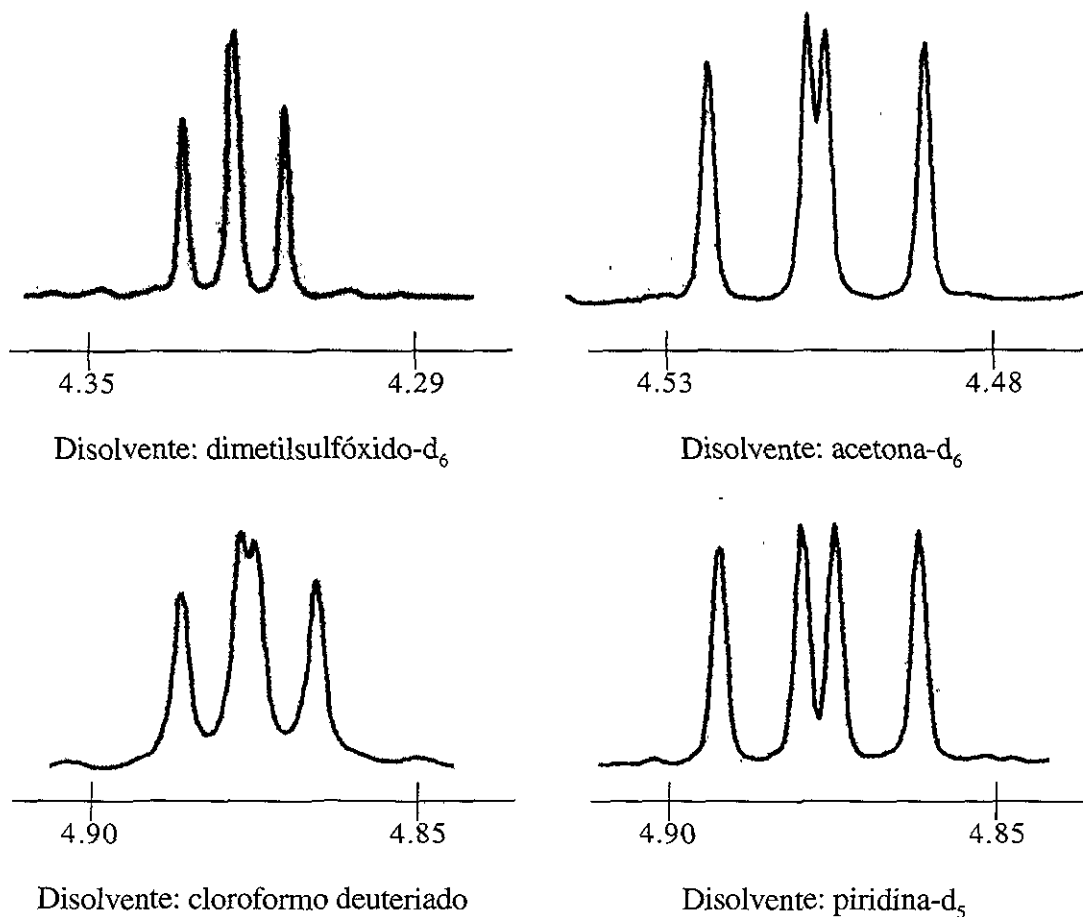


Figura 2.18 Señal doble de dobles del protón 1 en los diferentes disolventes empleados.

Con lo anterior, puede verse qué cambios en el disolvente provocan efectos importantes en la conformación del sistema anular de la prolina, de tal suerte que en piridina los carbonos 1 y 2 se encuentran más cercanos a la planaridad (dentro del promedio de conformaciones posibles), puesto que en dicho disolvente se observan los valores máximo y mínimo de las constantes de acoplamiento del protón 1 con los protones diastereotópicos de la posición 2.

2.2. Derivados del éster metílico de L-prolina con oblatos aromáticos.

2.2.1 Éster metílico de N-(1-naftoil)-L-prolina (II).

a) Caracterización fisicoquímica.

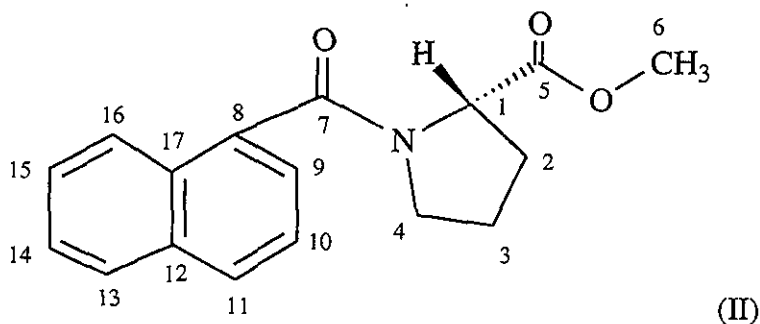


Figura 2.19 Estructura numerada del compuesto II: Éster metílico de N-(1-naftoil)-L-prolina

Fórmula molecular: $C_{17}H_{17}NO_3$.

Peso molecular: 283 gr/mol.

Punto de fusión: 108 - 110 °C.

Rotación específica (en cloroformo): $[\alpha]_D^{30} = -100.67$ ($c = 0.15$).

Bandas en el espectro de infrarrojo (cm^{-1}): 3015, 2954, 1743, 1631.

Fragmentos principales en el espectro de masas:

m/z	% de Abundancia relativa
155	100
127	60
224	40
283 (M^+)	35
128	10
126	8
77	5

Datos cristalográficos:

Sistema cristalino:	monoclínico	
Grupo espacial:	$P2_1$	
Dimensiones de la celda unitaria:	$a = 7.41 \text{ \AA}$	$\alpha = 90^\circ$
	$b = 7.73 \text{ \AA}$	$\beta = 105.35^\circ$
	$c = 13.55 \text{ \AA}$	$\gamma = 90^\circ$

Las coordenadas cartesianas obtenidas por difracción de Rayos X, fueron procesadas mediante el programa *Chem 3D* de *Cambridgesoft Co.* para reconstruir la estructura tridimensional obtenida por difracción de Rayos X, que se muestra en la figura 2.20.

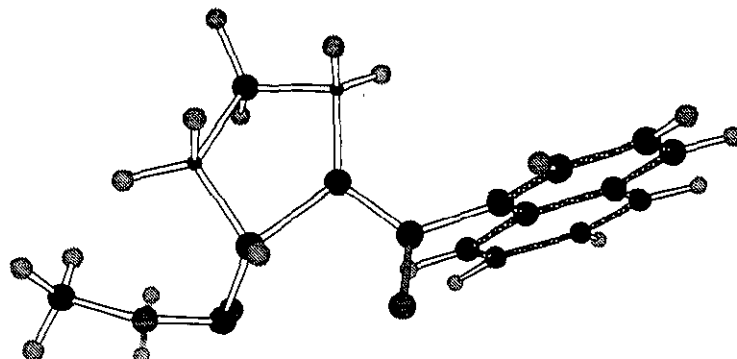


Figura 2.20 Estructura tridimensional del Éster metílico de N-(1-naftoil)-L-prolina.

Mediante el mismo programa, esta estructura fue sometida a iteraciones sucesivas para minimizar la energía estérica, obteniéndose la estructura tridimensional mostrada en la figura 2.21.

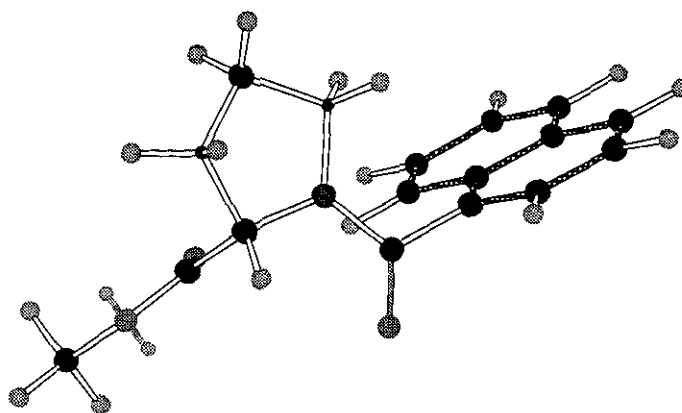


Figura 2.21 Estructura minimizada en su energía estérica del compuesto II.

Los parámetros de la energía estérica son 314.89 y 56.48 kcal/mol respectivamente para la estructura obtenida de las coordenadas cartesianas y la estructura minimizada.

Empleando el mismo programa se obtuvieron los valores de los ángulos diedro entre las diferentes series de átomos. La tabla 2.15 muestra ángulos diedro representativos calculados para ambas estructuras.

Tabla 2.15. Ángulos diedro calculados para el compuesto II.

Ángulo	Serie de átomos	Ángulo diedro estructura original	Ángulo diedro estructura minimizada
a	C ₁ -N-C ₄ -C ₃	-16.8°	-9.4°
b	C ₂ -C ₁ -N-C ₄	-7.0°	-14.0°
c	C ₁ -C ₂ -C ₃ -C ₄	-38.9°	-36.9°
d	C ₁ -N-C ₇ -C ₈	177.2°	177.7°
e	C ₄ -N-C ₈ -C ₇	6.8°	-0.5°
f	C ₁ -N-C ₇ -O ₇	-1.9°	0.6°
g	C ₄ -N-C ₇ -O ₇	-172.3°	-177.5°
h	C ₂ -C ₁ -N-C ₇	-179.2°	167.5°
i	C ₃ -C ₄ -N-C ₇	154°	169°
j	N-C ₁ -C ₂ -C ₃	28.4°	31.6°
k	C ₂ -C ₃ -C ₄ -N	34.0°	28.9°

Los resultados obtenidos para los ángulos diedro, muestran que en la minimización de la energía estérica, se varía sensiblemente la conformación del anillo de prolina (ángulos *a*, *b*), lo que es de esperarse pues de una estructura rígida en el sistema cristalino a una estructura minimizada en su energía estérica, se permite mayor posibilidad de flexibilidad en el anillo de prolina acerca del cual se sabe que presenta múltiples conformaciones posibles.

De manera interesante los ángulos *f* y *g* muestran que el carbonilo del grupo amida se encuentra en posición coplanar con respecto al carbono 1 y antiperiplanar con respecto al carbono de la posición 4. Por lo tanto se encuentra presente el conformero Z, lo que puede atribuirse a un impedimento estérico por parte del sistema aromático, el cual se coloca más alejado del grupo carboxilo del aminoácido.

b) Experimentos de resonancia magnética nuclear: Espectros de ¹H en 500 MHz en cloroformo deuteriado.

En el espectro unidimensional de hidrógeno, puede observarse que los seis protones diastereotópicos de los metilenos del anillo de prolina, se encuentran bien diferenciados, lo que permitió la signación espacial de cada uno de ellos con respecto al protón del carbono 1 por medio del experimento NOESY.

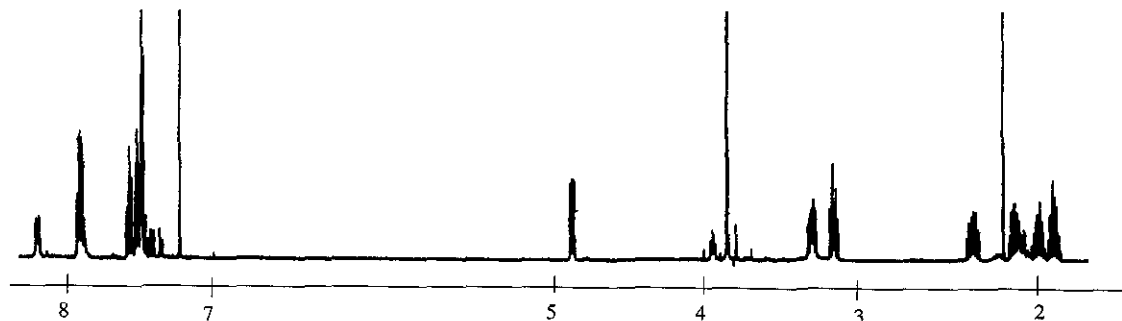


Figura 2.22 Espectro de ¹H de II en cloroformo deuteriado.

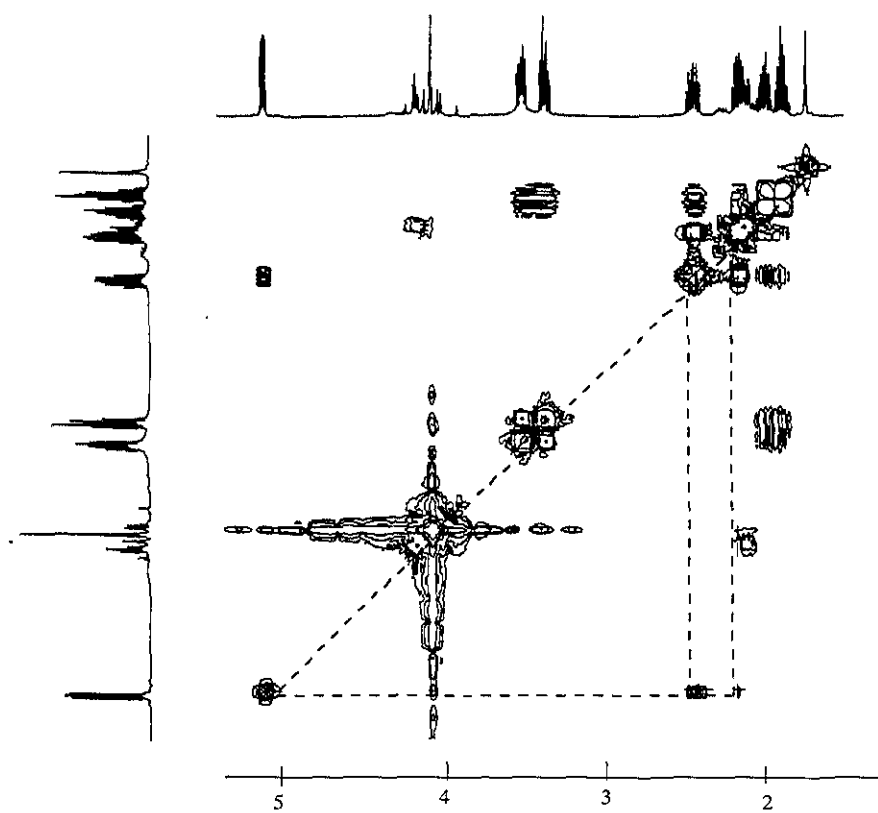


Figura 2.23 Espectro COSY de II en cloroformo deuteriado.

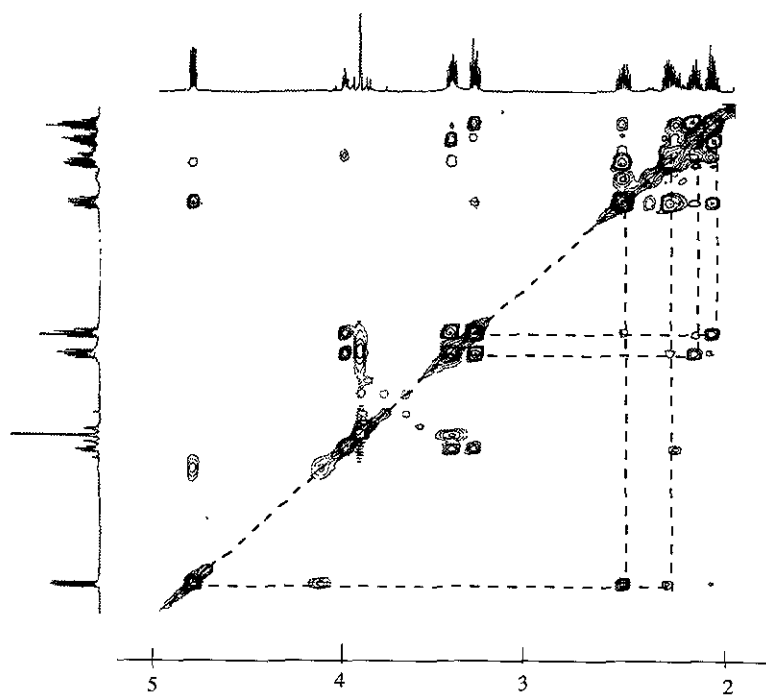


Figura 2.24 Espectro NOESY de II en cloroformo deuteriado.

Tabla 2.16 Señales en el espectro unidimensional de ^1H para el éster metílico de N-(1-naftoil)-L-prolina. Disolvente cloroformo deuteriado.

Hidrógeno	δ (ppm)	J (Hz)	COSY	NOESY
H ₁	4.82	8.5, 4	H ₂ , H ₂ '	H ₂
H ₂ *	2.35		H ₁	H ₁
H ₂ '	2.08		H ₁	H ₃
H ₃	1.95		H ₂ , H ₂ ', H ₄ , H ₄ '	H ₄ , H ₂ '
H ₃ '*	1.85		H ₂ , H ₂ ', H ₄ , H ₄ '	H ₄ '
H ₄	3.34		H ₃ , H ₃ '	H ₃
H ₄ '*	3.21		H ₃ , H ₃ '	H ₃ '
H ₆	3.87			
H ₉	8.18	8	H ₁₀	
H ₁₀	7.56	8, 7.5	H ₉	
H ₁₁	7.87	8.25		
H ₁₃	7.86	7.5, 4	H ₁₄ , H ₁₅	
H ₁₄	7.48	8, 7.5	H ₁₃	
H ₁₅	7.53	8, 7	H ₁₄	
H ₁₆	7.54	6.75		

* *cis* al protón 1.

Como puede observarse los protones de las posiciones 3 y 4, siguen el mismo patrón que en el espectro de I en piridina, esto es: para cada metileno del anillo de prolina, el protón en campo más bajo es *cis* al protón 1 y por consiguiente aquél de campo alto es *trans*. Sin embargo, ocurre lo contrario en los protones del carbono 2. Esto puede atribuirse al hecho de que el oxígeno del carboxilo del éster de prolina, se encuentre generando un efecto de desprotección sobre el protón 2 *trans*, enviándolo a un campo más bajo. Lo anterior está implicando una conformación más rígida del anillo de prolina de tal forma que permita una mayor interacción anisotrópica del grupo carboxilo sobre dicho protón.

c) Espectro de ^{13}C en 125 MHz y correlaciones heteronucleares (disolvente: cloroformo deuteriado).

La asignación de los protones de la región aromática se vió dificultada por la sobreposición de señales. El experimento de correlación heteronuclear HSQC acoplado, permitió la asignación de los mismos.

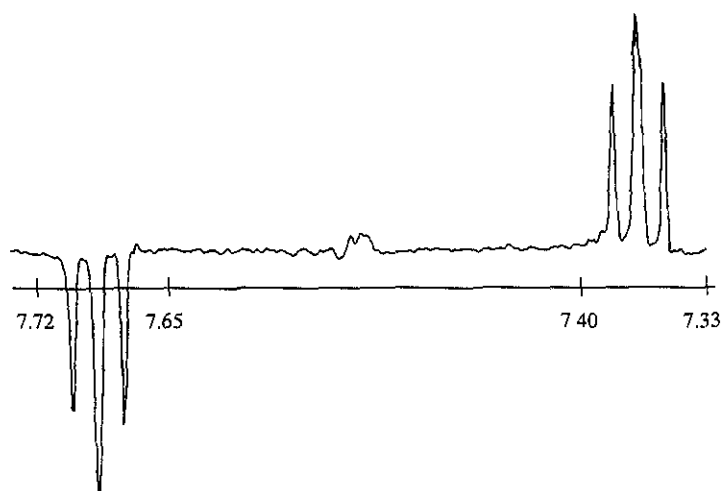


Figura 2.25 Experimento HSQC acoplado de II en cloroformo deuteriado. Acoplamiento de la señal centrada a 7.53 ppm en el espectro de hidrógeno con la señal a 125.07 ppm del espectro de ^{13}C .

Tabla 2.17 Asignación de los protones de la región aromática y constantes de acoplamiento por experimento cHSQC del éster metílico de N-(1-naftoil)-L-prolina. Disolvente cloroformo deuteriado.

Señal de ^{13}C (δ)	Señal de ^1H (m) (δ) (J_{CH} , J_{HH})*
C ₉ (125.2)	H ₉ (d) (8.18) (161.5, 8)
C ₁₀ (126.4)	H ₁₀ (dd) (7.56) (160.5, 7.5, 8)
C ₁₁ (128.2)	H ₁₁ (d) (7.87) (159.25, 8.25)
C ₁₃ (129.4)	H ₁₃ (dd) (7.86) (157.5, 7.5, 4)
C ₁₄ (124.9)	H ₁₄ (dd) (7.48) (164.5, 8, 7.5)
C ₁₅ (125.1)	H ₁₅ (dd) (7.53) (161.5, 7, 8)
C ₁₆ (123.8)	H ₁₆ (d) (7.54) (160.75, 6.75)

* m= multiplicidad, δ = desplazamiento químico (ppm),
 J_{CH} = constante de acoplamiento carbono-hidrógeno (Hz),
 J_{HH} = constante de acoplamiento hidrógeno-hidrógeno (Hz).

Para conocer la correspondencia de protones a cada carbono de la estructura se utilizó el experimento HSQC. La asignación del carbonilo de amida y del carbonilo del éster se efectuó mediante el experimento HMBC.

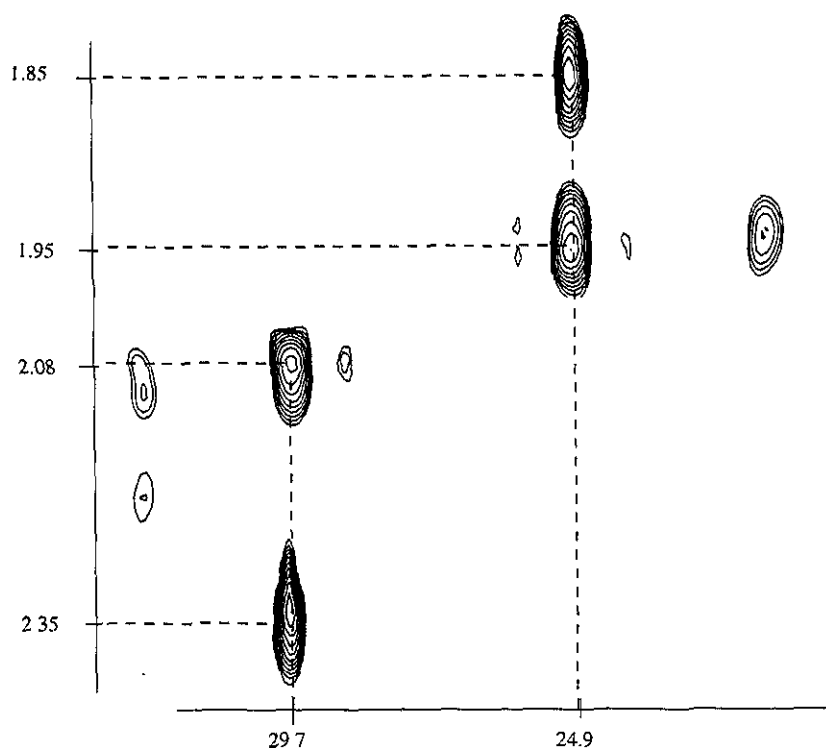


Figura 2.26 Ampliación del espectro HSQC de II. Se muestran las interacciones de los carbonos 2 y 3 del anillo de prolina con sus hidrógenos correspondientes. Disolvente cloroformo deuteriado.

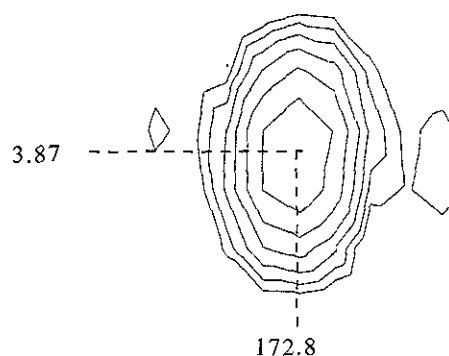


Figura 2.27 Ampliación del espectro HMBC de II. Se observa la interacción entre los protones de la posición 6 a 3.87 ppm y la señal de carbonilo del éster a 172.8 ppm. Disolvente cloroformo deuteriado.

Tabla 2.18 Acoplamientos heteronucleares observados en los espectros HSQC y HMBC del éster metílico de N-(1-naftoil)-L-prolina. Disolvente cloroformo deuteriado.

$\delta^{13}\text{C}$	HSQC	HMBC
C_1 (58.6)	H_1 (4.82)	$\text{H}_4, \text{H}_4', \text{H}_2, \text{H}_2'$ H_3, H_3'
C_2 (29.7)	H_2 (2.35), H_2' (2.08)	$\text{H}_4, \text{H}_4', \text{H}_3$
C_3 (24.9)	H_3 (1.95),	$\text{H}_4, \text{H}_4', \text{H}_2, \text{H}_2'$

	H ₃ ' (1.85)	
C ₄ (48.8)	H ₄ (3.34), H ₄ ' (3.21)	H ₂ , H ₂ ', H ₃ , H ₃ '
C ₅ (172.8)		H ₁ , H ₆
C ₆ (52.4)	H ₆ (3.87)	
C ₇ (169.5)		
C ₈ (127.2)		H ₁₁
C ₉ (125.2)	H ₉ (8.18)	H ₃
C ₁₀ (126.4)	H ₁₀ (7.56)	H ₉
C ₁₁ (128.2)	H ₁₁ (7.87)	H ₁₃
C ₁₂ (134.9)		H ₁₄
C ₁₃ (129.4)	H ₁₃ (7.86)	H ₁₁
C ₁₄ (124.9)	H ₁₄ (7.48)	
C ₁₅ (125.1)	H ₁₅ (7.53)	H ₁₃
C ₁₆ (123.8)	H ₁₆ (7.54)	H ₁₅
C ₁₇ (133.4)		H ₉ , H ₁₅ , H ₁₆

d) Espectros de ¹H en piridina deuteriada.

Los resultados obtenidos en piridina deuteriada para el clorhidrato del éster metílico de L-prolina en donde se observó una separación de todos los protones diastereotópicos, aunado al hecho de que el compuesto II presentaba esa separación en cloroformo deuteriado, llevó a efectuar una serie de espectros de RMN de II en piridina deuteriada, para observar el comportamiento de dichos protones por combinación de efectos anisotrópicos del oblató sustituyente con los efectos anisotrópicos del disolvente.

Sin embargo, la sobreposición de señales de la región aromática dificultó la asignación de los protones en esta región. Por lo que no es posible evaluar satisfactoriamente la región aromática, con los experimentos efectuados.

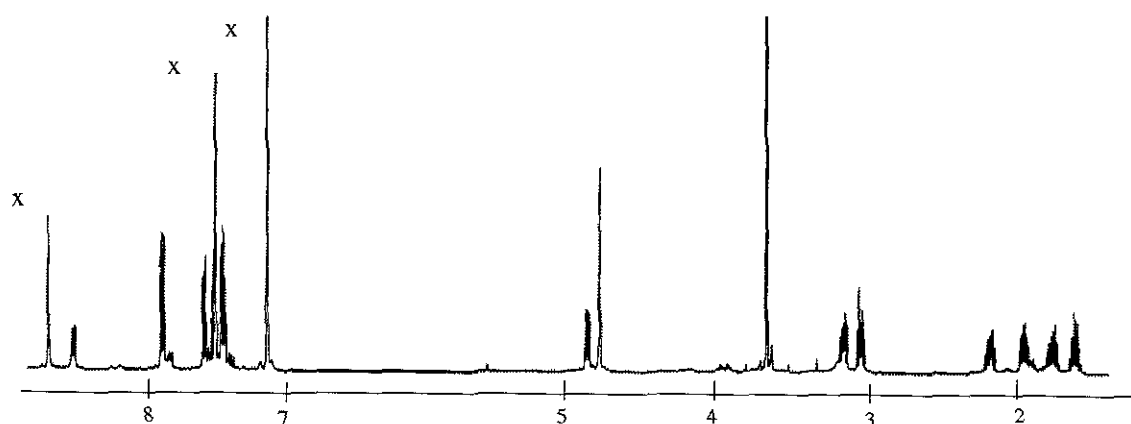


Figura 2.28 Espectro de ¹H de II en piridina-d₅. x = señales del disolvente.

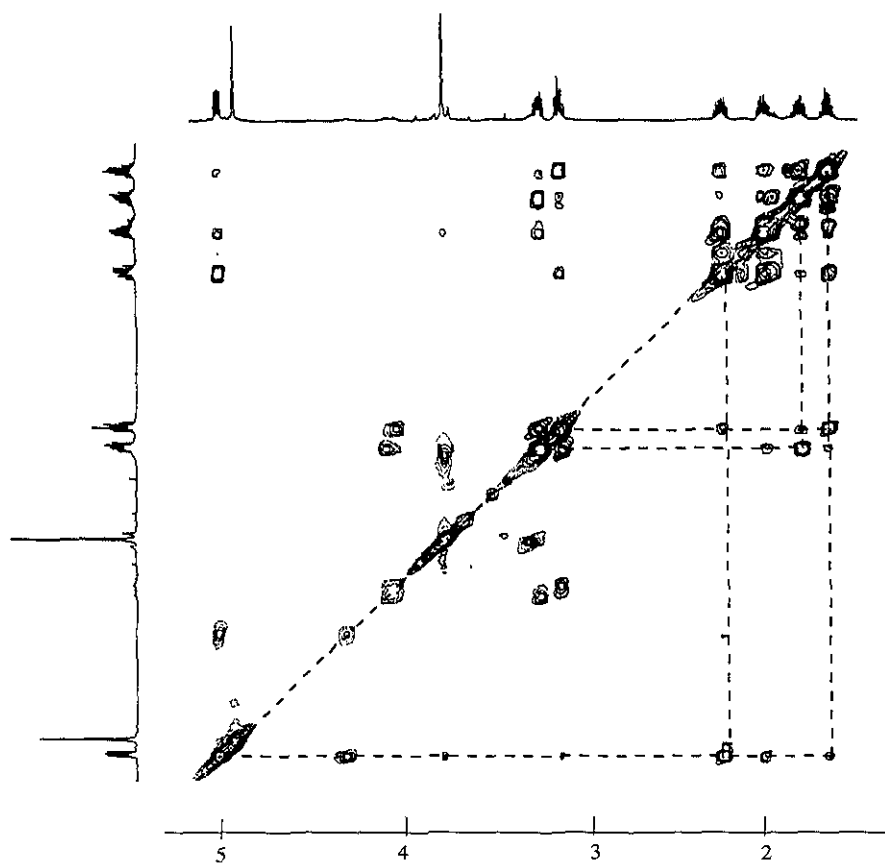


Figura 2.29 Espectro NOESY de II en piridina- d_5 .

Tabla 2.19 Señales en el espectro unidimensional de ^1H y correlaciones homonucleares para el éster metílico de N-(1-naftoil)-L-prolina. Disolvente piridina- d_5 .

Hidrógeno	δ (ppm)	J (Hz)	COSY	NOESY
H_1	4.99	8.75, 4.75	H_2, H_2'	$\text{H}_4', \text{H}_2, \text{H}_3'$
H_2^*	2.21		$\text{H}_1, \text{H}_3, \text{H}_3'$	H_4', H_3'
H_2'	1.96		$\text{H}_1, \text{H}_3, \text{H}_3'$	H_4, H_3
H_3	1.78		$\text{H}_2, \text{H}_2', \text{H}_4, \text{H}_4'$	H_4, H_2'
$\text{H}_3'^*$	1.63		$\text{H}_2, \text{H}_2', \text{H}_4, \text{H}_4'$	H_4', H_2
H_4	3.22		H_3, H_3'	H_2', H_3
$\text{H}_4'^*$	3.10		H_3, H_3'	H_2, H_3'
H_6	3.75			
1 H_{Ar}	8.56	8.5		
2 H_{Ar}	7.94	7.5		
1 H_{Ar}	7.66	7, 1		
2 H_{Ar}	7.59			
1 H_{ar}	7.52			

* *cis* al protón 1.

La diferenciación total de los seis protones diastereotópicos del anillo de prolina en el espectro de RMN de ^1H , cuando se utiliza como disolvente piridina- d_5 , permite postular la asociación de este disolvente tipo oblató con el soluto formando un complejo π soluto/disolvente.⁽⁵⁸⁾ Las interacciones débiles de señales minoritarias encontradas en el espectro NOESY, apoyan lo anterior.

Sin embargo para una mejor elucidación de lo anterior serían necesarios experimentos con mayor número de acumulaciones y una serie de mejoras para incrementar la relación señal/ruido, mismas que no se consideraron en este trabajo.

e) Espectro de ^{13}C de II en piridina deuteriada y correlaciones heteronucleares.

La asignación de los protones para cada carbono, se efectuó mediante el espectro HMQC, debido a la sobreposición de señales en la región aromática, no fue posible la asignación correspondiente a esta parte de la molécula con este experimento.

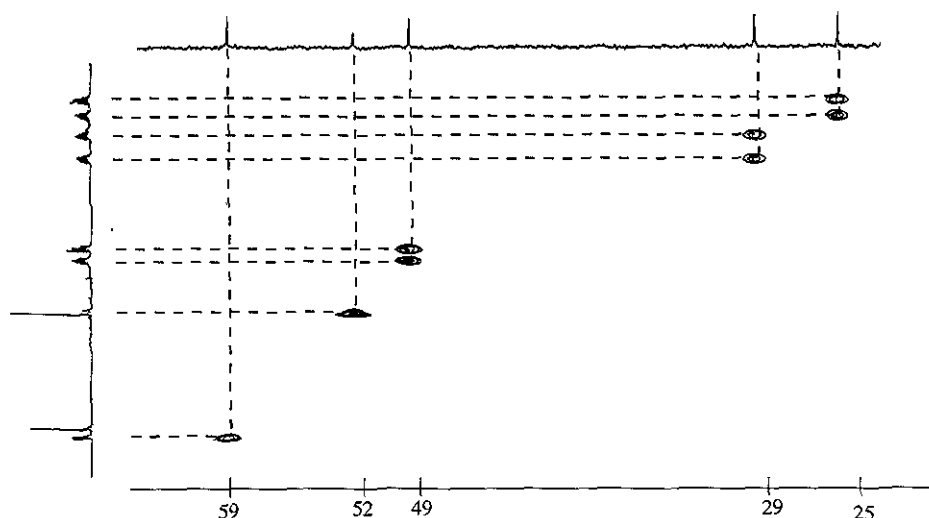


Figura 2.30 Espectro HMQC de II en piridina- d_5 .

Tabla 2.20 Señales en el espectro de ^{13}C y asignación de los protones por experimento HMQC del éster metílico de N-(1-naftoil)-L-prolina. Disolvente piridina- d_5 .

Señal de ^{13}C (δ)	Señal de ^1H (δ)
C_1 (59.1)	H_1 (4.99)
C_2 (29.7)	H_2 (2.21) H_2' (1.96)
C_3 (25.1)	H_3 (1.78) H_3' (1.63)
C_4 (49.0)	H_4 (3.22) H_4' (3.10)
C_5 (173.2)	
C_6 (52.1)	H_6 (3.75)

C ₇ (169.2)	
C _{Ar} (136.1)	
C _{Ar} (134.0)	
C _{Ar} (130.1)	
C _{Ar} (129.6)	
C _{Ar} (128.8)	
C _{Ar} (127.4)	
C _{Ar} (126.9)	
C _{Ar} (125.9)	
C _{Ar} (125.7)	
C _{Ar} (124.3)	

f) Comparación del efecto del disolvente y el sustituyente aromático sobre los desplazamientos químicos de ¹H y ¹³C del sistema de prolina.

Se compararon los desplazamientos químicos de ¹H del compuesto II en piridina y cloroformo, con el fin de evaluar tanto los efectos del sistema aromático como los del disolvente. En el caso del espectro protónico, existe una tendencia a desplazar los protones en campos más altos cuando el disolvente es piridina.

Esto permite observar un efecto anisotrópico del disolvente, en este caso la piridina que lleva a los protones en campos más altos. Se puede proponer que el oblató aromático de piridina se coloca paralelo al sistema de prolina, ocasionando un efecto de protección sobre los protones del sistema pirrolidínico, aunque lo hace preferencialmente por una de las caras del anillo de prolina.

Tabla 2.21 Comparación de los desplazamientos químicos de ¹H del residuo de prolina del compuesto II en cloroformo y piridina deuteriados.

Hidrógeno	δ en Π* (ppm)	δ en Π** (ppm)	Δδ (ppm)
H ₁	4.82	4.99	0.17
H ₂ <i>cis</i>	2.35	2.21	-0.14
H ₂ <i>trans</i>	2.08	1.96	-0.12
H ₃ ' <i>cis</i>	1.85	1.63	-0.22
H ₃ <i>trans</i>	1.95	1.78	-0.17
H ₄ <i>cis</i>	3.21	3.10	-0.11
H ₄ <i>trans</i>	3.34	3.22	-0.12
H ₆	3.87	3.75	-0.12

* disolvente cloroformo deuteriado.

** disolvente piridina-d₅.

Por otro lado, el cambio en el disolvente provoca también variaciones en el desplazamiento químico observado en el espectro de ^{13}C ; así, los carbonos de II presentan desplazamientos en campos más bajos cuando el disolvente es piridina que en cloroformo.

Tabla 2.22 Comparación de los desplazamientos químicos de ^{13}C del residuo de prolina del compuesto II en cloroformo y piridina deuteriados

Carbono	δ en II* (ppm)	δ en II** (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)
C ₁	58.6	59.1	0.5
C ₂	29.7	29.7	0.0
C ₃	24.9	25.1	0.2
C ₄	48.8	49.0	0.2
C ₅	172.8	173.2	0.4
C ₆	52.4	52.1	-0.3

* disolvente cloroformo deuteriado.

** disolvente piridina-d₅.

Al comparar los desplazamientos químicos de los núcleos de ^1H y de ^{13}C del clorhidrato del éster metílico de L-prolina en piridina deuteriada, contra los desplazamientos químicos del residuo de prolina en el compuesto II en el mismo disolvente. Los protones de II están en campo más alto que en I, con excepción de los protones 1 y 6.

De esta forma se observa un efecto de protección del oblato aromático unido a prolina. Este efecto puede ser inductivo o por acomodamiento espacial en donde el sistema de prolina se encuentra ubicado preferentemente por encima del anillo aromático. Como se observa en la estructura de Rayos X.

El hecho de que el hidrógeno de la posición 1 tenga un desplazamiento químico hacia campo más bajo en el compuesto II, se puede atribuir a que el nitrógeno es parte de un grupo funcional amida, lo que le confiere un carácter más electropositivo que en el caso del aminoácido, por lo que por efectos inductivos ocasiona una desprotección sobre dicho protón.

Tabla 2.23 Comparación de los desplazamientos químicos de ^1H entre el clorhidrato del éster metílico de L-prolina y el residuo de prolina de II en piridina-d₅.

Hidrógeno	δ en I* (ppm)	δ en II* (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)
H ₁	4.88	4.99	0.11
H ₂ <i>cis</i>	2.39	2.21	-0.18
H ₂ <i>trans</i>	2.10	1.96	-0.14
H ₃ ' <i>cis</i>	2.00	1.63	-0.37
H ₃ <i>trans</i>	1.86	1.78	-0.08
H ₄ <i>cis</i>	3.66	3.10	-0.56
H ₄ <i>trans</i>	3.43	3.22	-0.21
H ₆	3.66	3.75	0.09

* disolvente piridina-d₅.

Al analizar los desplazamientos de ^{13}C , se observa que los carbonos del compuesto amídico (II) se encuentran en campos más altos que los del aminoácido (compuesto I), con excepción de C_1 y C_6 . Dichas variaciones pueden explicarse en función de la existencia de un efecto de inducción a la posición β .

Tabla 2.24 Comparación de los desplazamientos químicos de ^{13}C entre el clorhidrato del éster metílico de L-prolina y el residuo de prolina de II en piridina deuteriada.

Carbono	δ en I* (ppm)	δ en II* (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)
C_1	59.2	59.1	-0.1
C_2	29.2	29.7	0.5
C_3	24.0	25.1	1.1
C_4	45.5	49.0	3.5
C_5	170.5	173.2	2.7
C_6	52.9	52.1	-0.8

* disolvente piridina- d_5 .

2.2.2 Éster metílico de N-(2-naftoil)-L-prolina (III)

a) Caracterización fisicoquímica.

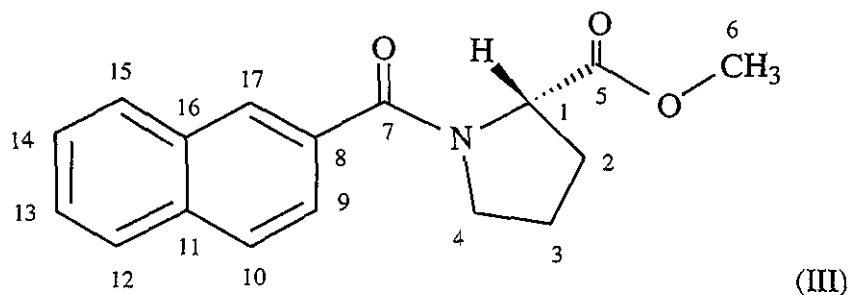


Figura 2.31 Estructura numerada del compuesto III: Éster metílico de N-(2-naftoil)-L-prolina.

Fórmula molecular: $C_{17}H_{17}NO_3$.

Peso molecular: 283 gr/mol.

Punto de fusión: 114 - 116 °C.

Rotación específica (en cloroformo): $[\alpha]_D^{30} = -72$ ($c = 0.15$).

Bandas en el espectro de infrarrojo (cm^{-1}): 3005, 2954, 1743, 1624.

Fragmentos principales en el espectro de masas:

m/z	% de Abundancia relativa
155	100
127	70
224	60
283 (M^+)	37
77	7
112	5
101	5

Datos cristalográficos:

Sistema cristalino:	monoclínico	
Grupo espacial:	$P2_1$	
Dimensiones de la celda unitaria:	$a = 6.77 \text{ \AA}$	$\alpha = 90^\circ$
	$b = 7.70 \text{ \AA}$	$\beta = 93.22^\circ$
	$c = 13.96 \text{ \AA}$	$\gamma = 90^\circ$

De la misma forma que para el compuesto II, las coordenadas cartesianas del compuesto III, permitieron la obtención de la estructura tridimensional mostrada en la figura 2.32.

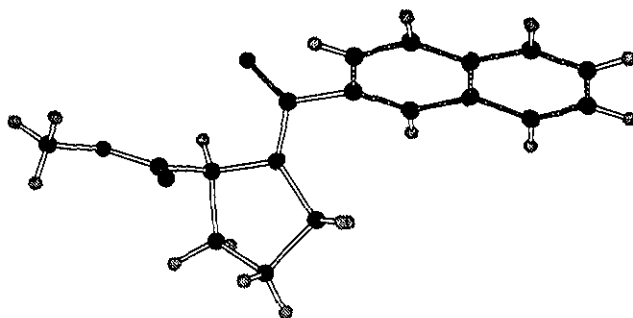


Figura 2.32 Estructura tridimensional del Éster metílico de N-(2-naftoil)-L-prolina.

Siguiendo el procedimiento aplicado para II, se llevó a cabo la minimización de la energía estérica que produce la estructura tridimensional mostrada en la figura 2.33.

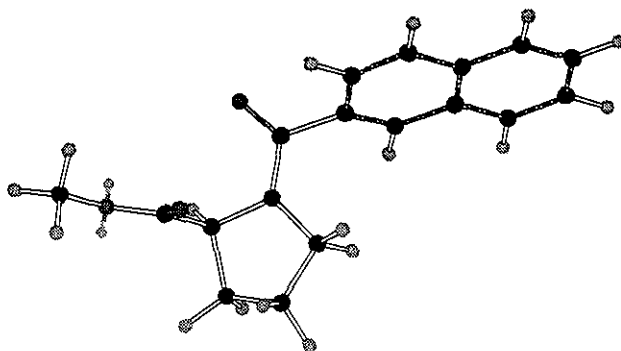


Figura 2.33 Estructura minimizada en su energía estérica del compuesto III.

Los parámetros de la energía estérica son 206.34 y 9.17 kcal/mol respectivamente para la estructura obtenida de las coordenadas cartesianas y la estructura minimizada.

El mismo programa permitió obtener los valores de los ángulos diedro entre diferentes series de átomos. La tabla 2.25 muestra ángulos diedro representativos calculados para ambas estructuras.

Tabla 2.25. Ángulos diedro calculados para el compuesto III.

Ángulo	Serie de átomos	Ángulo diedro estructura original	Ángulo diedro estructura minimizada
a	C ₁ -N-C ₄ -C ₃	-7.4°	-8.7°
b	C ₂ -C ₁ -N-C ₄	-15.4°	-15.0°
c	C ₁ -C ₂ -C ₃ -C ₄	-36.5°	-37.2°
d	C ₁ -N-C ₇ -C ₈	-174.5°	177.2°
e	C ₄ -N-C ₈ -C ₇	8.6°	-2.5°
f	C ₁ -N-C ₇ -O ₇	5.0°	-0.5°
g	C ₄ -N-C ₇ -O ₇	-171.9°	177.2°

h	C ₂ -C ₁ -N-C ₇	167.2	163.0°
i	C ₃ -C ₄ -N-C ₇	169.7°	173.3°
j	N-C ₁ -C ₂ -C ₃	31.8°	32.4°
k	C ₂ -C ₃ -C ₄ -N	27.0°	28.7°

Los ángulos diedro marcados como *f* y *g*, muestran que el grupo carbonilo de la amida y el carbono de la posición 1 se encuentran en el mismo plano. Por lo que el compuesto analizado tiene la conformación Z.

Experimentos de resonancia magnética nuclear.

Se determinaron espectros tanto unidimensionales de ¹H y ¹³C como de correlación homo y heteronuclear : COSY, NOESY, cHSQC, HSQC y HMBC. En todos ellos se utilizó cloroformo deuteriado como disolvente en temperatura ambiente.

La sobreposición de señales en el espectro de ¹H, no permitió asignar como *cis* o *trans* a los protones de prolina.

Sin embargo la aplicación del experimento de HSQC acoplado, permitió asignar a la región aromática.

b) Espectros de ¹H en cloroformo deuteriado.

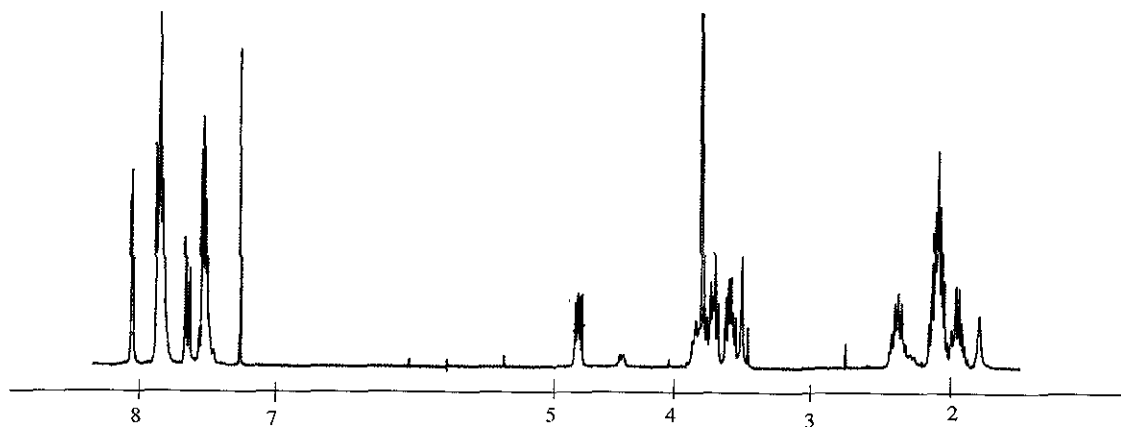


Figura 2.34 Espectro de ¹H de III en cloroformo deuteriado.

Tabla 2.26 Señales en el espectro unidimensional de ^1H y correlaciones homonucleares para el éster metílico de N-(2-naftoil)-L-prolina. Disolvente cloroformo deuteriado.

Hidrógeno	δ (ppm)	J (Hz)	COSY	NOESY
H ₁	4.74	$J_1 = 8.35, J_2 = 5.55$	H ₂ , H ₂ '	
H ₂	2.35		H ₁ , H ₃ , H ₃ '	
H ₂ '	2.05		H ₁ , H ₃ , H ₃ '	
H ₃	2.05		H ₃ ', H ₂ , H ₂ '	H ₄
H ₃ '	1.90		H ₃ , H ₄ , H ₄ ', H ₂ , H ₂ '	H ₄ '
H ₄	3.73		H ₄ ', H ₃ '	H ₃
H ₄ '	3.59		H ₄ , H ₃ , H ₃ '	H ₂ ', H ₃ '
H ₆	3.81			
H ₉	7.66	$J_1 = 7.15, J_2 = 2.4$	H ₁₀	
H ₁₀	7.88		H ₉	
H ₁₂	7.87			
H ₁₃	7.54			
H ₁₄	7.52		H ₁₅	
H ₁₅	7.86		H ₁₄	
H ₁₇	8.07			

c) Espectro de ^{13}C y acoplamientos homo y heteronucleares.

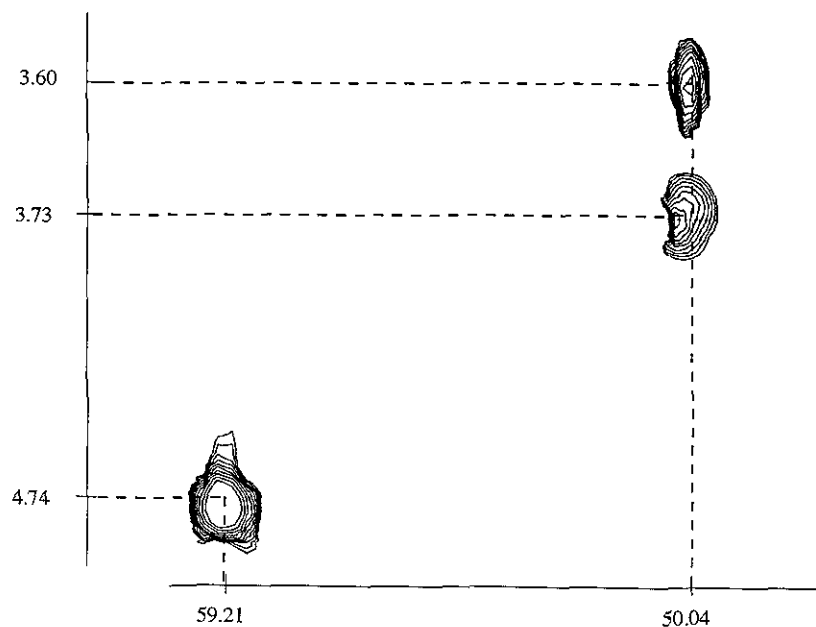


Figura 2.35 Ampliación del espectro HSQC de III, donde se muestran las interacciones de los carbonos 1 y 4 con sus hidrógenos correspondientes. Disolvente cloroformo deuteriado.

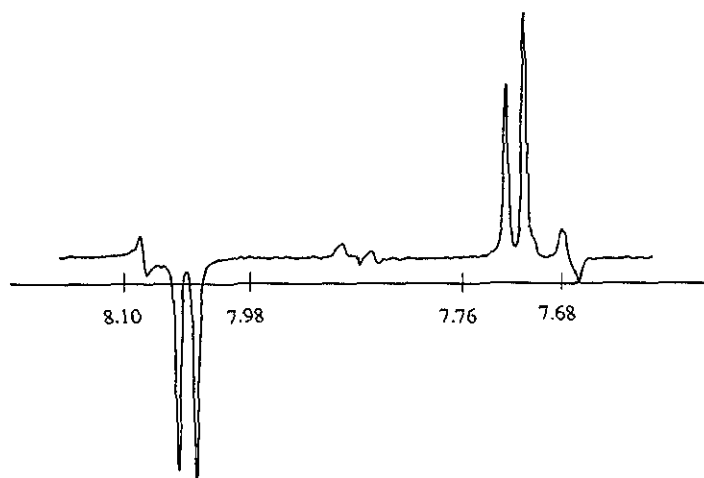


Figura 2.36 Espectro HSQC acoplado de III. Acoplamiento de la señal centrada a 7.87 ppm en el espectro de hidrógeno con la señal a 128.10 ppm del espectro de ^{13}C . Disolvente cloroformo deuteriado.

Tabla 2.27 Asignación de los protones y cálculo de las constantes de acoplamientos por experimentos HSQC y cHSQC del éster metílico de N-(2-naftoil)-L-prolina. Disolvente cloroformo deuteriado.

Señal de ^{13}C (δ)	Señal de ^1H (δ) (m) (J_{CH} , J_{HH})*
C_1 (59.2)	H_1 (4.74) (dd) (8.35, 5.55)
C_2 (29.4)	H_2 (2.35) (m) H_2' (2.05) (m)
C_3 (25.4)	H_3 (2.05) (m) H_3' (2.05) (m)
C_4 (50.0)	H_4 (3.73) (m) H_4' (3.60) (m)
C_6 (52.3)	H_6 (3.81) (s)
C_9 (124.4)	H_9 (7.66) (d) (161.2, 9)
C_{10} (128.6)	H_{10} (7.88) (d) (160.25, 8)
C_{12} (128.1)	H_{12} (7.87) (d) 159.75, 8.5)
C_{13} (127.2)	H_{13} (7.54) (dd) (160, 7, 8)
C_{14} (126.6)	H_{14} (7.53) (dd) (160.5, 7, 8)
C_{15} (127.8)	H_{15} (7.83) (dd) (160, 8, 2.5)
C_{17} (127.3)	H_{17} (8.07) (s) (160)

*m= multiplicidad. δ = desplazamiento químico (ppm).

J_{HH} = acoplamiento hidrógeno-hidrógeno (Hz).

J_{CH} = acoplamiento carbono-hidrógeno (Hz).

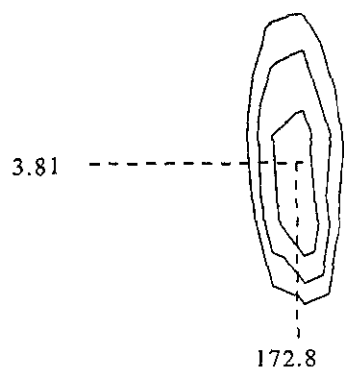


Figura 2.37 Ampliación del espectro HMBC de III, en donde se muestra la correlación de los protones de la posición 6 con el carbonilo del éster. Disolvente cloroformo deuteriado.

Tabla 2.28 Correlaciones homo y heteronucleares del éster metílico de N-(2-naftoil)-L-prolina. Disolvente cloroformo deuteriado.

Carbono (δ)	Hidrógeno (δ)	COSY	NOESY	HMBC
C ₁ (59.2)	H ₁ (4.74)	H ₂ , H ₂ '		H ₂ , H ₂ ' H ₃ , H ₃ '
C ₂ (29.4)	H ₂ (2.35)	H ₁ , H ₃ , H ₃ '		H ₁ , H ₃ , H ₃ ' H ₄ , H ₄ '
	H ₂ ' (2.05)	H ₁ , H ₃ , H ₃ '		
C ₃ (25.4)	H ₃ (2.05)	H ₃ ', H ₂ , H ₂ '	H ₄	H ₁ , H ₂ , H ₂ ' H ₄ , H ₄ '
	H ₃ ' (2.05)	H ₃ , H ₄ , H ₄ ' H ₂ , H ₂ '	H ₄ '	
C ₄ (50.0)	H ₄ (3.73)	H ₄ ' H ₃ '	H ₃	H ₂ , H ₃ '
	H ₄ ' (3.60)	H ₄ , H ₃ , H ₃ '	H ₂ ', H ₃ '	
C ₅ (172.8)				H ₁ , H ₂ , H ₂ ' H ₃ , H ₆
C ₆ (52.3)	H ₆ (3.81)			
C ₇ (169.7)				H ₁₇ , H ₉
C ₈ (132.5)				H ₁₀ , H ₁₃
C ₉ (124.4)	H ₉ (7.66)	H ₁₀		H ₁₄
C ₁₀ (128.6)	H ₁₀ (7.88)	H ₉		H ₁₇
C ₁₁ (134.0)				H ₁₇ , H ₉
C ₁₂ (128.1)	H ₁₂ (7.87)			
C ₁₃ (127.2)	H ₁₃ (7.54)			
C ₁₄ (126.6)	H ₁₄ (7.53)	H ₁₅		H ₁₀
C ₁₅ (127.8)	H ₁₅ (7.83)	H ₁₄		H ₁₃ , H ₁₄
C ₁₆ (133.4)				H ₁₀
C ₁₇ (127.3)	H ₁₇ (8.07)			H ₉

2.2.3 Éster metílico de N-(difenilacetil)-L-prolina (IV).

a) Caracterización fisicoquímica.

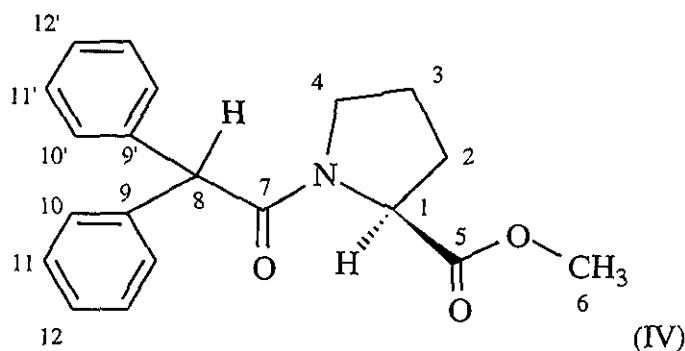


Figura 2.38 Estructura numerada del Éster metílico de N-(difenilacetil)-L-prolina (Compuesto IV).

Fórmula molecular: $C_{20}H_{21}NO_3$.

Peso molecular: 323.28 gr/mol.

Punto de fusión: 122 - 123 °C.

Rotación específica (en metanol): $[\alpha]_D^{30} = -21.4$ (c= 0.20).

Bandas en el espectro de infrarrojo (cm^{-1}): 3002, 2954, 1743, 1649.

Fragmentos principales en el espectro de masas:

m/z	% de Abundancia relativa
128	100
167	33
156	30
323 (M^+)	25
70	20
84	5

Datos cristalográficos:

Sistema cristalino:	monoclínico	
Grupo espacial:	P2 ₁	
Dimensiones de la celda unitaria:	a= 8.71 Å	$\alpha = 90^\circ$
	b= 25.121 Å	$\beta = 118.5^\circ$
	c= 9.09 Å	$\gamma = 90^\circ$

La figura 2.39 muestra la estructura tridimensional del compuesto IV, obtenida mediante el procesamiento de las coordenadas cartesianas del experimento de difracción de Rayos X, utilizando el programa *Chem 3D* de *Cambridgesoft Co.*

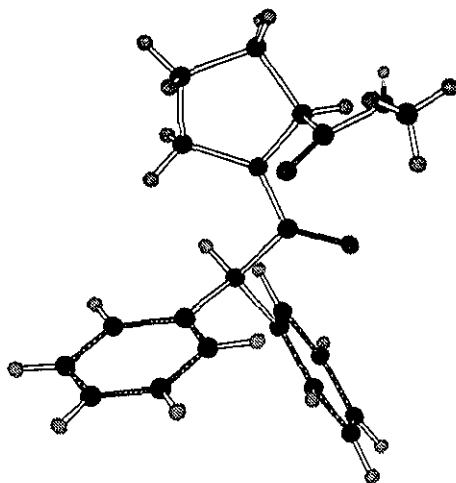


Figura 2.39 Estructura tridimensional del Éster metílico de N-(difenilacetil)-L-prolina.

La minimización de la energía estérica, proporcionó la estructura mostrada en la figura 2.40.

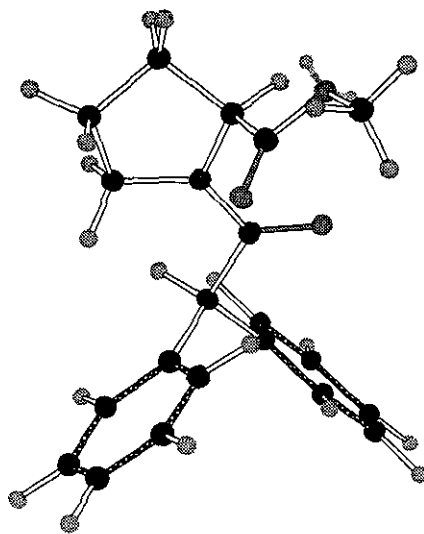


Figura 2.40 Estructura minimizada en la energía estérica de IV.

El cálculo del valor de la energía estérica para la estructura obtenida a partir de las coordenadas cartesianas arrojó un valor de 234.58 kcal/mol. Mientras que la estructura minimizada tiene un valor de 12.92 kcal/mol para su energía estérica.

El mismo programa permitió obtener los ángulos diedro entre diferentes series de átomos. La tabla 2.29 muestra ángulos diedro representativos calculados para ambas estructuras.

Tabla 2.29. Ángulos diedro calculados para el compuesto IV.

Ángulo	Serie de átomos	Ángulo diedro estructura original	Ángulo diedro estructura minimizada
a	C ₁ -N-C ₄ -C ₃	-7.4°	-8.7°
b	C ₂ -C ₁ -N-C ₄	-15.4°	-15.0°
c	C ₁ -C ₂ -C ₃ -C ₄	-36.6°	23.5°
d	C ₁ -N-C ₇ -C ₈	-174.5°	179.7°
e	C ₄ -N-C ₈ -C ₇	8.6°	-2.5°
f	C ₁ -N-C ₇ -O ₇	5.0°	-0.5°
g	C ₄ -N-C ₇ -O ₇	-171.9°	177.2°
h	C ₂ -C ₁ -N-C ₇	-32.2°	-21.9°
i	C ₃ -C ₄ -N-C ₇	163.2°	-15.3°
j	N-C ₁ -C ₂ -C ₃	31.8°	32.4°
k	C ₂ -C ₃ -C ₄ -N	-27.0°	-17.5°

El análisis de los ángulos diedro, permite observar que el compuesto presenta una conformación Z alrededor del enlace amida, considerando los valores encontrados para los ángulos diedro marcados como *f* y *g*.

Experimentos de Resonancia Magnética Nuclear.

Se determinaron espectros de ¹H y ¹³C unidimensionales. Además espectros de correlación bidimensional: homonuclear (COSY, NOESY) y heteronuclear (HSQC). En cloroformo deuteriado y en temperatura ambiente.

Además se utilizó piridina deuteriada como disolvente, para efectuar los siguientes experimentos: ¹H, ¹³C, COSY, NOESY, HMQC y HMBC.

b) Espectro de ¹H y correlaciones homonucleares, disolvente: cloroformo deuteriado.

Se obtuvo el espectro unidimensional de hidrógeno en 500 MHz. En este caso se observa la presencia de los dos isómeros geométricos en torno a la función amida, en proporción 87.5:12.5, tomando como base para la cuantificación las áreas bajo la curva de las señales a 3.73 y 3.62 ppm.

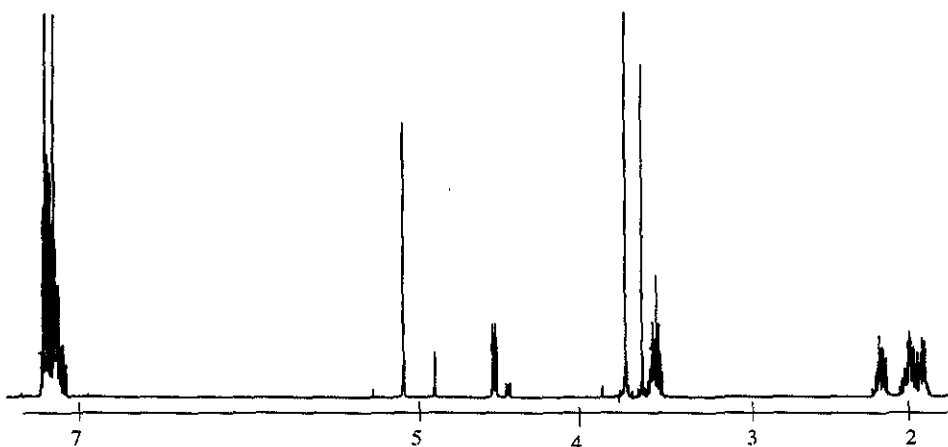


Figura 2.41 Espectro de ^1H de IV en cloroformo deuteriado.

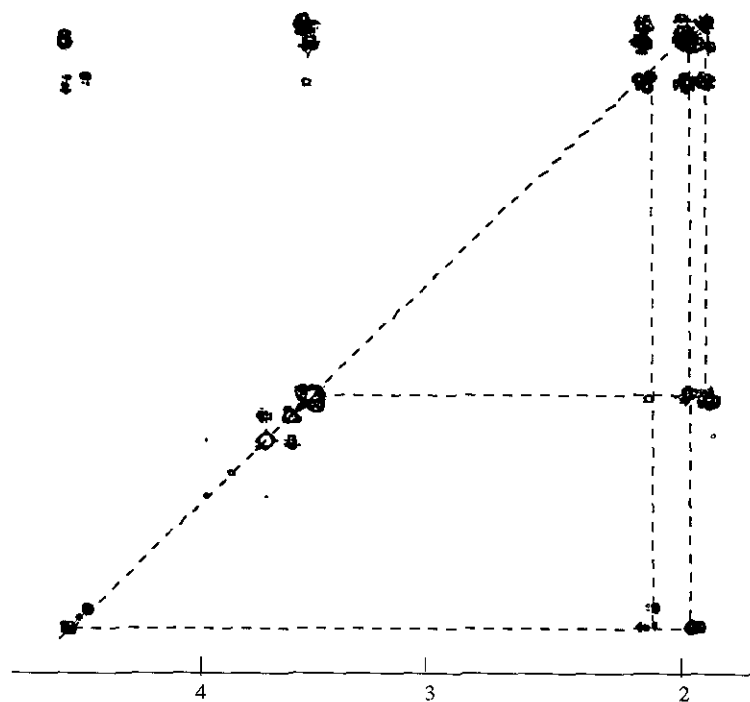


Figura 2.42 Espectro COSY de IV. Disolvente cloroformo deuteriado.

A continuación se muestran los datos que permiten postular la estructura del isómero mayoritario, el cual de acuerdo con los datos obtenidos a partir de los resultados cristalográficos presenta una conformación Z.

Tabla 2.30 Señales en el espectro unidimensional de ^1H para el éster metílico de N-(difenilacetil)-L-prolina. Disolvente cloroformo deuteriado.

Hidrógeno	δ (ppm)	J (Hz)	COSY	NOESY
H ₁	4.54	J ₁ = 8.5, J ₂ = 4	H ₂ , H ₂ '	
H ₂	2.16		H ₁ , H ₃ , H ₃ '	
H ₂ '	1.98		H ₁ , H ₃ , H ₃ '	
H ₃	1.98		H ₂ , H ₂ ', H ₄ , H ₄ '	H ₄ , H ₄ '
H ₃ '	1.90		H ₂ , H ₂ ', H ₄ , H ₄ '	H ₄ , H ₄ '
H ₄ , H ₄ '	3.54		H ₃ , H ₃ '	H ₈
H ₆	3.73			
H ₈	5.11		H _{ar}	H _{ar} , H ₄ , H ₄ '
H ₉ - H ₁₂	7.2 - 7.4		H ₈	H ₈

c) Espectro de ^{13}C y correlaciones heteronucleares, en cloroformo deuteriado.

La asignación de los hidrógenos se realizó por medio del espectro HSQC.

Para el caso de los carbonos aromáticos, en el espectro HSQC se encuentran cuatro interacciones principales de hidrógenos con carbonos en la región aromática.

Los desplazamientos de ^{13}C que corresponden a estas interacciones son de acuerdo con la escala del espectro HSQC las siguientes:

- 1) 129.3 ppm que en el espectro unidimensional corresponde a la señal a 129.2 ppm.
- 2) 129.0 que corresponde a la señal a 128.9 ppm del espectro unidimensional.
- 3) 128.5 que corresponde a las señales en el espectro unidimensional situadas a 128.5 y 128.4 ppm.
- 4) 127.0 que es equivalente a las señales a 127.0 y 126.9 ppm del espectro unidimensional.

La tabla de desplazamientos químicos en el espectro unidimensional de ^{13}C muestra también dos señales a 139.2 y 138.9, que no presentan correlación con las señales de hidrógeno en el espectro HSQC. Esto es son carbonos no protonados.

Las predicciones de desplazamientos químicos de ^{13}C para un sistema de benceno monosustituido⁽⁶⁰⁾ dan los siguientes valores:

$$\begin{aligned}\delta_i &= 128.5 + 9.3 = 137.8 \\ \delta_o &= 128.5 + 0.7 = 129.2 \\ \delta_m &= 128.5 - 0.1 = 128.4 \\ \delta_p &= 128.5 - 2.9 = 125.6\end{aligned}$$

Es pertinente señalar que en el espectro de ^{13}C se distinguen a ambos anillos aromáticos con desplazamientos químicos diferentes para cada tipo de carbono (*i*, *o*, *m*, *p*) en cada anillo.

Asimismo, el espectro HSQC permite ubicar la posición de los diferentes protones aromáticos dentro del multiplete localizado entre 7.2 y 7.4 ppm. Considerando que los protones orto y meta de un anillo son homotópicos entre sí y diastereotópicos con respecto a los protones del otro anillo. Es necesario mencionar, que para una misma posición, los carbonos de campo alto están relacionados por el espectro HSQC con los protones de campo bajo y a la inversa.

En el análisis de los carbonos en la región del carbonilo, se encuentran dos señales en la región de carboxilo, de acuerdo con tablas de desplazamientos químicos,⁽⁶⁰⁾ el carbono de un grupo éster se encuentra desplazado hacia campos más bajos que el carbono de un grupo amida, por ello es que la asignación de estas dos señales es la siguiente:

A) 172.7 carbonilo de éster (reportado 165 - 175 ppm).⁽⁶⁰⁾

B) 170.5 carbonilo de amida (reportado 160 - 170 ppm).⁽⁶⁰⁾

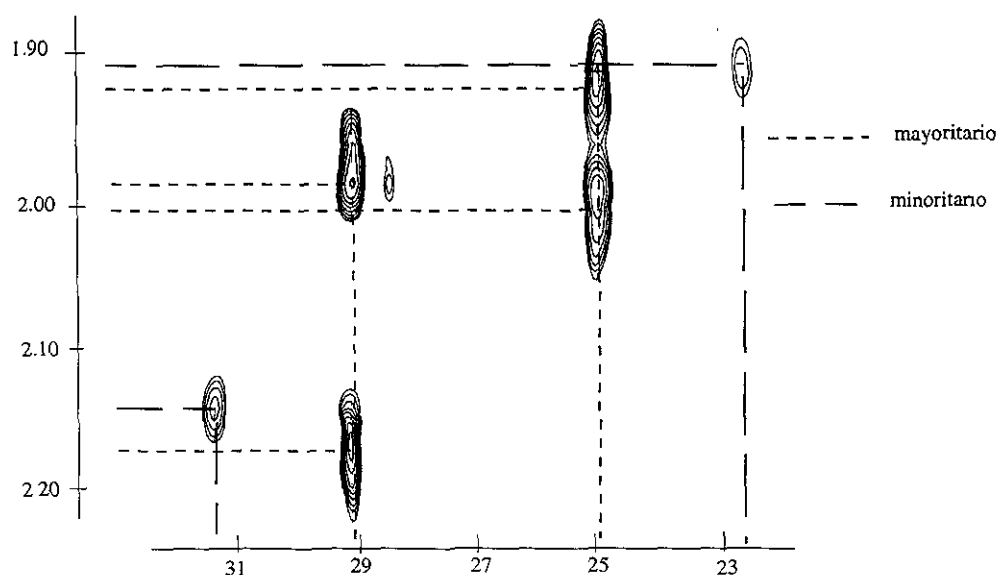


Figura 2.43 Espectro HSQC de IV en cloroformo deuteriado. Asignación de señales para las posiciones 2 y 3 tanto del conformero mayoritario como del minoritario.

Tabla 2.31 Resumen de los espectros de ^1H y ^{13}C del éster metílico de N-(difenilacetil)-L-prolina. Disolvente cloroformo deuteriado.

Carbono	δ_{C}	δ_{H} (n_{H} , m, J_{HH})*	δ_{H} (n_{H} , m, J_{HH})*
C ₁	59.2	4.54 (1, dd, 8.5, 4)	
C ₂	29.1	2.15 (1, m)	1.98 (1, m)
C ₃	24.9	1.98 (1, m)	1.91 (1, m)
C ₄	47.2	3.54 (2, m)	
C ₅	172.7		
C ₆	52.2	3.73 (3, s)	
C ₇	170.5		
C ₈	56.2	5.11 (1, s)	

C ₉ ó C ₉ '	139.2		
C ₉ ó C ₉ '	138.9		
C ₁₀ ó C ₁₀ '	129.2	7.27 (1, m)	
C ₁₀ ó C ₁₀ '	128.9	7.32 (1, m)	
C ₁₁ ó C ₁₁ '	128.5	7.28 (1, m)	
C ₁₁ ó C ₁₁ '	128.4	7.32 (1, m)	
C ₁₂ ó C ₁₂ '	127.0	7.23 (1,m)	
C ₁₂ ó C ₁₂ '	126.9	7.26 (1,m)	

*n_H= número de hidrógenos, m= multiplicidad, J= constante de acoplamiento.

Tabla 2.32 Acoplamientos homo y heteronucleares para el éster metílico de N-(difenilacetil)-L-prolina. Disolvente cloroformo deuteriado.

Carbono (δ)	Hidrógeno (δ)	COSY	NOESY
C ₁ (59.2)	H ₁ (4.54)	H ₂ , H ₂ '	H ₂
C ₂ (29.1)	H ₂ (2.15) H ₂ ' (1.98)	H ₁ , H ₃ , H ₃ ' H ₁ , H ₃ , H ₃ '	H ₁
C ₃ (24.9)	H ₃ (1.98) H ₃ ' (1.91)	H ₂ , H ₂ ', H ₄ , H ₄ ' H ₂ , H ₂ ', H ₄ , H ₄ '	H ₄ , H ₄ ' H ₄ , H ₄ '
C ₄ (47.2)	H ₄ , H ₄ ' (3.54)	H ₃ , H ₃ '	H ₈
C ₅ (172.7)			
C ₆ (52.2)	H ₆ (3.73)		
C ₇ (170.5)			
C ₈ (56.2)	H ₈ (5.11)	H _{ar}	H ₄ , H ₄ '
C ₉ (139.2)			
C ₉ ' (138.9)			
C ₁₀ (129.2)	H ₁₀ ' (7.27)		
C ₁₀ ' (128.9)	H ₁₀ (7.32)		
C ₁₁ (128.5)	H ₁₁ ' (7.28)		
C ₁₁ ' (128.4)	H ₁₁ (7.32)		
C ₁₂ (127.0)	H ₁₂ ' (7.23)		
C ₁₂ ' (126.9)	H ₁₂ (7.26)		

d) El caso del conformero minoritario:

El conjunto de experimentos realizados en este compuesto, permitió una mejor evaluación del conformero minoritario, asignado como *E*. A continuación se presenta un resumen de las señales que se observan claramente para dicho conformero, tanto en el espectro de ¹H como de ¹³C.

Tabla 2.33 Señales que se observan claramente en el espectro de ^1H para el conformero minoritario de IV. Disolvente cloroformo deuteriado.

Señal	δ	multiplicidad	J
H ₃ min	4.91	singulete	
H ₁ min	4.46	doble de dobles	J ₁ = 7.5, J ₂ = 3.5
H ₆ min	3.62	singulete	

El espectro HSQC, permitió la asignación de los protones correspondientes a la señal minoritaria, aunque algunas señales de protón están enmascaradas dentro de las señales correspondientes al conformero mayoritario.

Tabla 2.34 Señales que se observan en el espectro de ^{13}C para el conformero minoritario de IV y correlación heteronuclear. Disolvente cloroformo deuteriado.

Señal	δ (ppm)	HSQC
C ₁ min	59.5	H ₁ min
C ₂ min	31.5	Señal centrada a 2.14 (parcialmente enmascarada)
C ₃ min	22.4	Señal centrada a 1.90 (enmascarada)
C ₄ min	46.8	Señal centrada a 3.62 (enmascarada)
C ₅ min	172.8	
C ₆ min	52.5	Señal centrada a 3.62
C ₇ min	170.6	
C ₈ min	56.1	Señal centrada a 4.91
C ₉ min	139.3	
C ₉ ' min	138.4	
C ₁₀ min	129.0	Enmascarada por protones orto
C ₁₀ ' min	128.8	Enmascarada por protones orto
C ₁₁ min	128.7	Enmascarada por protones meta
C ₁₁ ' min	128.2	Enmascarada por protones meta
C ₁₂ min	127.2	Enmascarada por protones para
C ₁₂ ' min	126.9	Enmascarada por protones para

Se intentó la separación por HPLC de ambos conformeros separándose el pico principal y el hombro posterior.

El espectro de protón de la fracción 1 separada en HPLC, es similar al espectro original, conservándose la proporción aproximada 85:15 entre ambos conformeros. A partir de estos datos, podemos establecer que entre ambos conformeros existe una interconversión que ocurre en temperatura ambiente y no permite el aislamiento de ninguno de ellos en las condiciones empleadas.

e) Espectros en piridina deuteriada: hidrógeno y correlaciones homonucleares.

Para probar el efecto anisotrópico del disolvente piridina sobre un sistema en donde existe sobreposición de señales en la región de protones de prolina, se probaron experimentos de RMN de ^1H en este disolvente deuteriado. Sin embargo, los resultados no son del todo satisfactorios, ya que sigue habiendo sobreposición de señales. En el espectro unidimensional de hidrógeno en 500 MHz. se observa la presencia de los dos conformeros aunque no es posible cuantificar las proporciones.

Un aspecto interesante es el hecho de que en este disolvente la señal doble de dobles del conformero minoritario (*E*) está en campos más altos ($\delta = 4.72$ ppm) que la señal a 4.69 ppm correspondiente del conformero mayoritario (*Z*). Esto puede atribuirse al hecho de que el protón 1 del conformero *trans* se encuentre protegido por el disolvente, por la formación de complejos tipo π entre el soluto y el disolvente.⁽⁵⁸⁾

A continuación se presenta la elucidación correspondiente al isómero mayoritario.

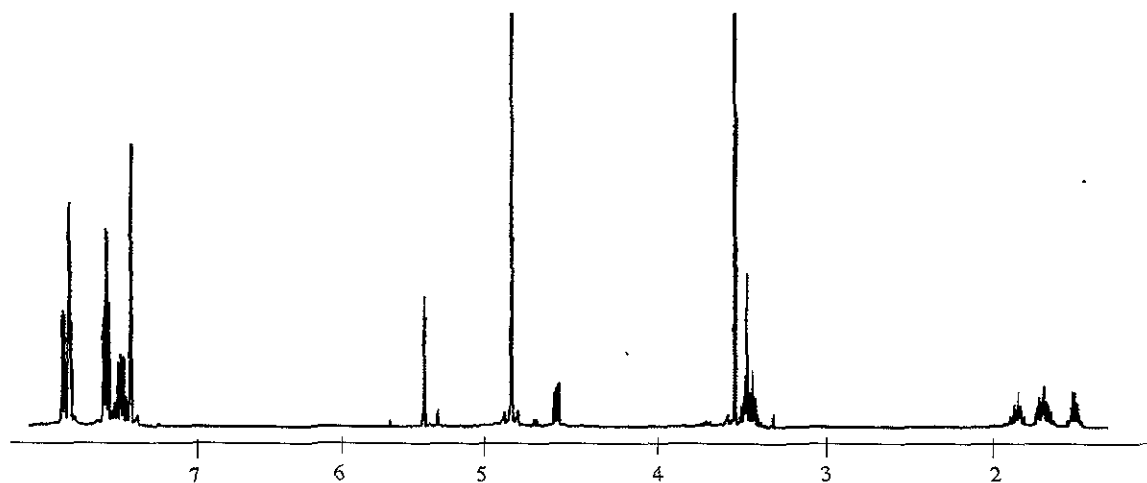


Figura 2.44 Espectro de ^1H de IV en piridina- d_5 .

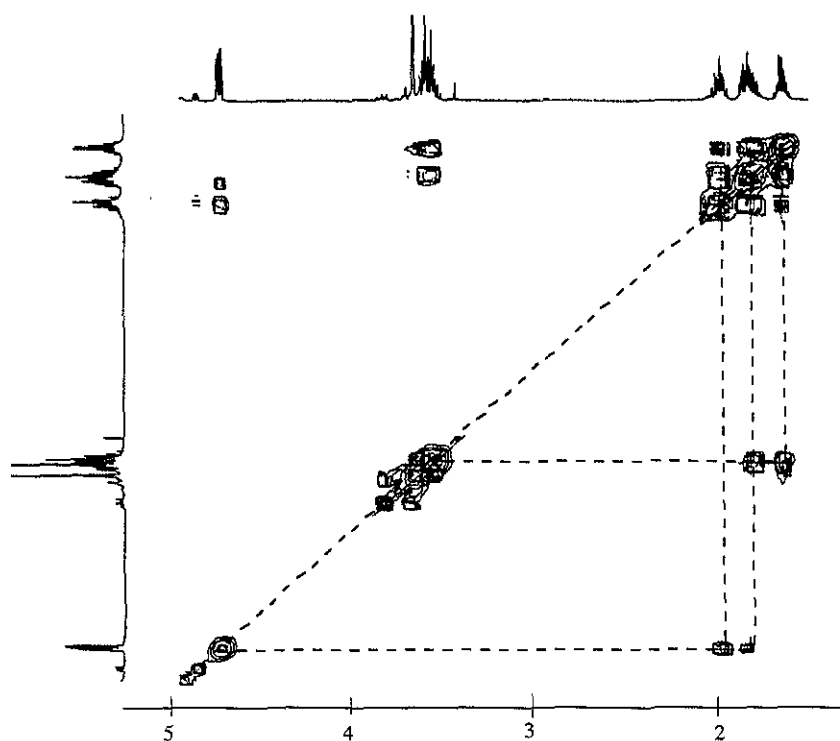


Figura 2.45 Espectro COSY de IV en piridina-d₅.

Tabla 2.35 Señales en el espectro unidimensional de ¹H para el éster metílico de N-(difenilacetil)-L-prolina. Disolvente piridina-d₅.

Hidrógeno	δ (ppm)	J (Hz)	COSY	NOESY
H ₁	4.69	J ₁ = 8.5, J ₂ = 4	H ₂ , H ₂ '	
H ₂	1.97		H ₁ , H ₃ , H ₃ '	
H ₂ '	1.81		H ₁ , H ₃ , H ₃ '	
H ₃	1.81		H ₂ , H ₂ ', H ₄ , H ₄ '	H ₄ , H ₄ '
H ₃ '	1.63		H ₂ , H ₂ ', H ₄ , H ₄ '	H ₄ , H ₄ '
H ₄ , H ₄ '	3.55		H ₃ , H ₃ '	H ₈
H ₆	3.64			
H ₈	5.48		H _{ar}	H _{ar} , H ₄ , H ₄ '
H ₉ - H ₁₂	7.28 - 7.62		H ₈	H ₈

f) Espectro de ¹³C y correlaciones heteronucleares en piridina deuteriada.

La asignación de protones se llevó a cabo mediante el experimento HMQC.

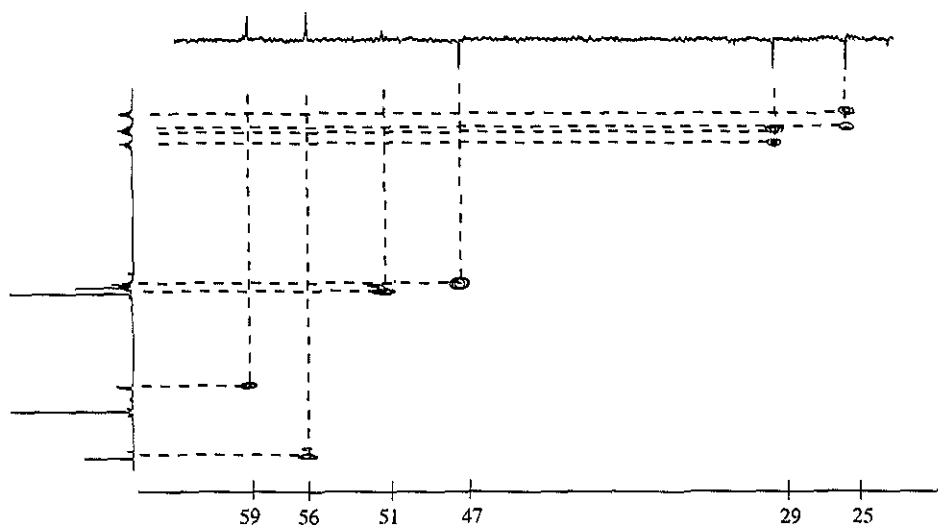


Figura 2.46 Espectro HMQC de IV en piridina- d_5 . Asignación de las posiciones 1, 2, 3, 4 y 8.

Tabla 2.36 Resumen de los espectros de ^1H y ^{13}C del éster metílico de N-(difenilacetil)-L-prolina. Disolvente piridina- d_5 .

Carbono	δ_{C}	δ_{H} (n_{H} , m, J_{HH}^*)	δ_{H} (n_{H} , m, J_{HH}^*)
C_1	59.6	4.69 (1, dd, 8.5, 4)	
C_2	29.2	1.97 (1, m)	1.81 (1, m)
C_3	25.0	1.81 (1, m)	1.63 (1, m)
C_4	47.4	3.55 (2, m)	
C_5	173.1		
C_6	51.8	3.64 (3, s)	
C_7	170.3		
C_8	56.2	5.48 (1, s)	
C_9 ó C_9'	140.5		
C_9 ó C_9'	140.4		
C_{10} ó C_{10}'	130.0	H_{ar}	
C_{10} ó C_{10}'	129.6	H_{ar}	
C_{11} ó C_{11}'	128.8	H_{ar}	
C_{11} ó C_{11}'	128.7	H_{ar}	
C_{12} ó C_{12}'	127.3	H_{ar}	
C_{12} ó C_{12}'	126.2	H_{ar}	

* n_{H} = número de hidrógenos, m= multiplicidad, J= constante de acoplamiento.

El experimento HMBC permitió la asignación de las dos señales de carbono presentes en la región de carboxilo, por correlación de los protones del éster metílico a 3.64 ppm con

la señal de carboxilo del éster a 173.1 ppm y la correlación del protón de la posición 8 a 5.48 ppm con la señal de carboxilo de la amida a 170.3 ppm.

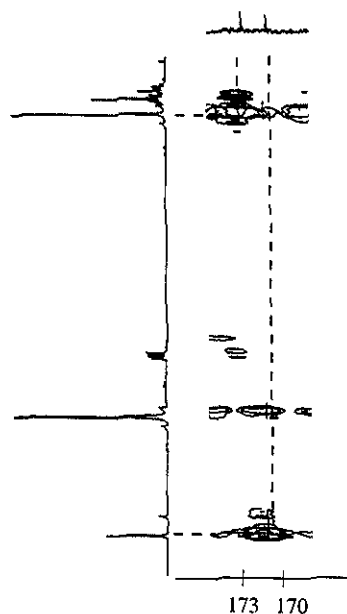


Figura 2.47 Espectro HMBC de IV en piridina-d₅. Asignación de las posiciones 5 y 7.

Tabla 2.37 Acoplamientos homo y heteronucleares para el éster metílico de N-(difenilacetil)-L-prolina. Disolvente piridina-d₅.

Carbono (δ)	Hidrógeno (δ)	COSY	NOESY	HMBC
C ₁ (59.6)	H ₁ (4.69)	H ₂ , H ₂ '	H ₂	
C ₂ (29.2)	H ₂ (1.97) H ₂ ' (1.81)	H ₁ , H ₃ , H ₃ ' H ₁ , H ₃ , H ₃ '	H ₁	
C ₃ (25.0)	H ₃ (1.81) H ₃ ' (1.63)	H ₂ , H ₂ ', H ₄ , H ₄ ' H ₂ , H ₂ ', H ₄ , H ₄ '	H ₄ , H ₄ ' H ₄ , H ₄ '	
C ₄ (47.4)	H ₄ , H ₄ ' (3.55)	H ₃ , H ₃ '	H ₈	
C ₅ (173.1)				H ₆
C ₆ (51.8)	H ₆ (3.64)			
C ₇ (170.3)				H ₈
C ₈ (56.2)	H ₈ (5.48)	H _{ar}	H _{ar} , H ₄ , H ₄ '	
C ₉ ó C ₉ ' (140.5)	H ₉ - H ₁₂ (7.28 - 7.62)	H ₈	H ₈	
C ₉ ó C ₉ ' (140.4)				
C ₁₀ ó C ₁₀ ' (130.0)				

$C_{10} \text{ ó } C_{10}'$ (129.6)				
$C_{11} \text{ ó } C_{11}'$ (128.8)				
$C_{11} \text{ ó } C_{11}'$ (128.7)				
$C_{12} \text{ ó } C_{12}'$ (127.3)				
$C_{12} \text{ ó } C_{12}'$ (126.2)				

2.2.4 Éster metílico de N-[(S)-naproxenoil]-L-prolina (V).

a) Caracterización fisicoquímica.

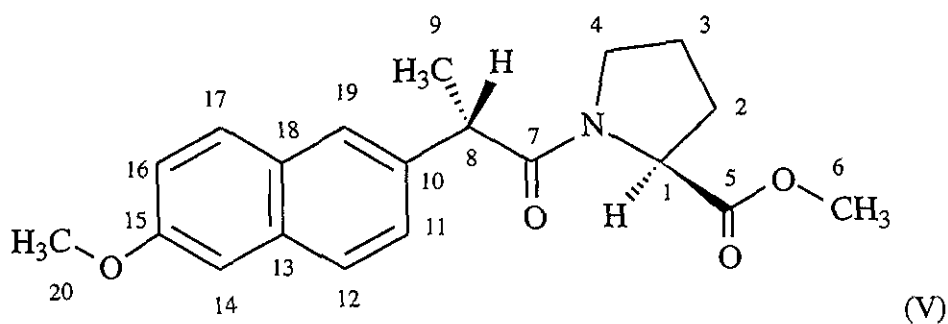


Figura 2.48 Estructura numerada del compuesto V: éster metílico de N-[(S)-naproxenoil]-L-prolina.

Fórmula molecular: $C_{20}H_{23}NO_4$.

Peso molecular: 341.39 gr/mol.

Punto de fusión: 115 - 117 °C.

Rotación específica (en cloroformo): $[\alpha]_D^{30} = + 60$ ($c = 0.15$).

Bandas en el espectro de infrarrojo (cm^{-1}): 3015, 2960, 1748, 1633.

Fragmentos principales en el espectro de masas:

m/z	% de Abundancia relativa
185	100
341 (M^+)	55
128	35
212	5

Datos cristalográficos:

Sistema cristalino:	ortorrómbico	
Grupo espacial:	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	
Dimensiones de la celda unitaria:	a= 7.99 Å	$\alpha = 90^\circ$
	b= 13.67 Å	$\beta = 90^\circ$
	c= 16.64 Å	$\gamma = 90^\circ$

Las coordenadas cartesianas obtenidas mediante difracción de Rayos X se procesaron mediante el programa Chem 3D de *Cambridgesoft* Co para obtener el modelo molecular tridimensional del compuesto V, que se muestra en la figura 2.49.

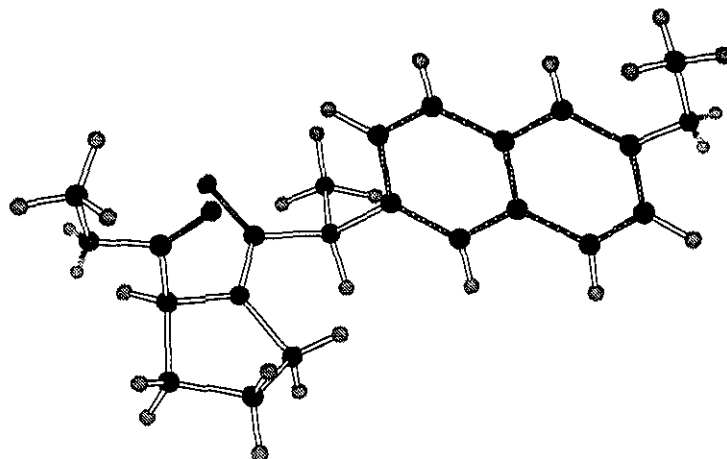


Figura 2.49 Estructura tridimensional del Éster metílico N-[(S)-naproxenoil]-L-prolina.

La minimización de la energía estérica, mediante iteraciones sucesivas efectuadas en el mismo programa, llevó a la obtención de la estructura minimizada mostrada en la figura 2.50. Las energías estéricas respectivas son: 172.17 kcal/mol (para la estructura inicial) y 13.16 kcal/mol (para la estructura minimizada).

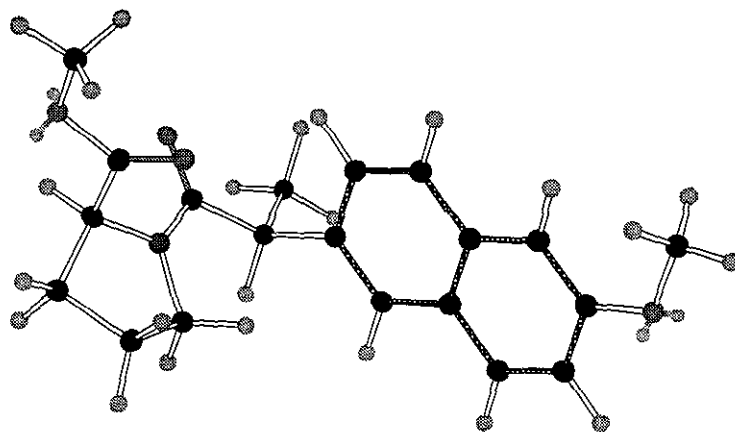


Figura 2.50 Estructura minimizada en energía estérica para el compuesto V.

El mismo programa permitió obtener las coordenadas de los ángulos diedro entre diferentes series de átomos. La tabla 2.29 muestra ángulos diedro representativos calculados para ambas estructuras.

Tabla 2.38. Ángulos diedro calculados para el compuesto V.

Ángulo	Serie de átomos	Ángulo diedro estructura original	Ángulo diedro estructura minimizada
a	C ₁ -N-C ₄ -C ₃	-9.8°	-6.6°
b	C ₂ -C ₁ -N-C ₃ -C ₄	-12.7°	-17.0°

c	C ₁ -C ₂ -C ₃ -C ₄	-36.6°	-37.0°
d	C ₁ -N-C ₇ -C ₈	-178.7°	178.6°
e	C ₄ -N-C ₈ -C ₇	5.4°	-3.5°
f	C ₁ -N-C ₇ -O ₇	1.2°	-1.2°
g	C ₄ -N-C ₇ -O ₇	-174.7°	176.7°
h	C ₂ -C ₁ -N-C ₇	170.9°	161.2°
i	C ₃ -C ₄ -N-C ₇	166.3°	175.3°
j	N-C ₁ -C ₂ -C ₃	30.0°	33.4°
k	C ₂ -C ₃ -C ₄ -N	28.5°	27.4°

De la misma forma que en los compuestos anteriormente analizados, los ángulos diedro entre el oxígeno del carbonilo de la amida y los carbonos de las posiciones 1 y 4 (ángulos *f* y *g*), muestran que la conformación favorecida para este compuesto es la *Z*.

El hecho de que en todos los derivados amídicos analizados en este trabajo, presenten una conformación *Z* alrededor del enlace amida, puede atribuirse al impedimento estérico que los sustituyentes aromáticos generan, de esta forma se colocan espacialmente alejados del grupo éster unido a la posición 1 de la prolina.

Experimentos de resonancia magnética nuclear.

Se determinaron espectros de ¹H y ¹³C uni y bidimensionales (COSY, NOESY, cHSQC y HSQC). El disolvente utilizado fue cloroformo deuteriado. Todos los experimentos se realizaron en temperatura ambiente.

b) Espectro de ¹H y correlaciones homonucleares.

Se observa la presencia de dos conformeros en proporción 86:14, tomando como referencia la relación de áreas entre la señal doble de dobles a 4.6 ppm (mayoritario) y la señal doble de dobles minoritaria a 4.3 ppm. De acuerdo con los datos obtenidos a partir de los resultados cristalográficos, se atribuye al conformero mayoritario la conformación *Z*.

La sobreposición de señales no permite asignar satisfactoriamente la posición relativa de los seis protones de metilenos de prolina con respecto al protón de la posición 1.

La asignación correspondiente se refiere al conformero mayoritario. Aunque en el espectro COSY se observan algunos acoplamientos para la señal a 4.3 ppm del conformero minoritario *E*, no es posible la evaluación satisfactoria de dicho conformero, con el conjunto de experimentos realizados.

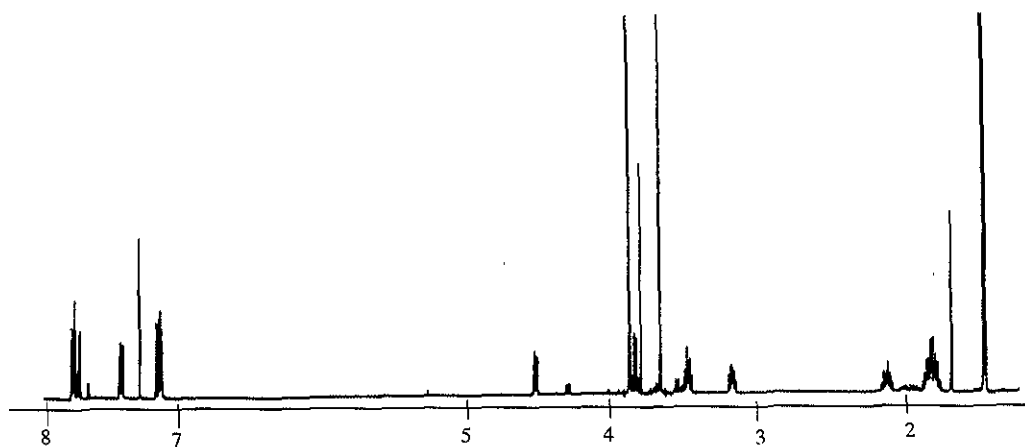


Figura 2.51 Espectro de ^1H de V en cloroformo deuteriado.

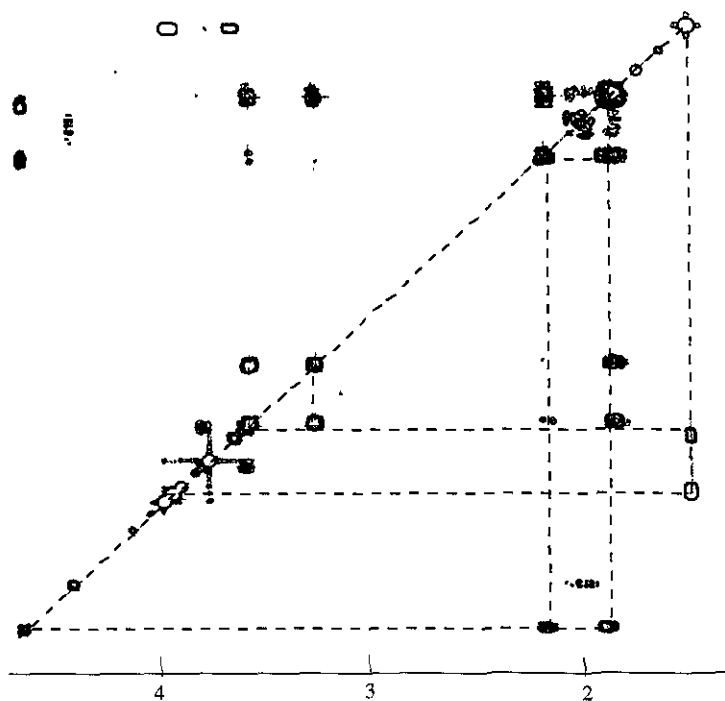


Figura 2.52 Espectro COSY de V en cloroformo deuteriado.

Tabla 2.39 Señales en el espectro unidimensional de ^1H para el éster metílico de N-[(S)-naproxenoil]-L-prolina. Disolvente cloroformo deuteriado.

Hidrógeno	δ (ppm)	J (Hz)	COSY	NOESY
H_1	4.55	$J_1 = 7.8, J_2 = 3.9$	H_2, H_2'	
H_2	2.14		H_1, H_2'	
H_2'	1.84		H_1, H_2	$\text{H}_4', \text{H}_{14}$
H_3, H_3'	1.82		H_4, H_4'	
H_4	3.51		$\text{H}_4', \text{H}_3, \text{H}_3'$	$\text{H}_2', \text{H}_6, \text{H}_8$
H_4'	3.21		H_3, H_3'	H_3', H_8

H ₆	3.69			H ₄
H ₈	3.87	J ₁ = 7	H ₉	H ₁₉ , H ₁₀ , H ₄ , H ₄ '
H ₉	1.49	J ₁ = 6.75	H ₈	
H ₁₁	7.38	J ₁ = 8.55, J ₂ = 1.9	H ₁₂	H ₈
H ₁₂	7.71	J ₁ = 8.7	H ₁₁	
H ₁₄	7.11	J ₁ = 2.5		H ₂ '
H ₁₆	7.14	J ₁ = 8.8, J ₂ = 2.4	H ₁₇	
H ₁₇	7.72	J ₁ = 8.6	H ₁₆	
H ₁₉	7.68	J ₁ = 1.9		H ₈
H ₂₀	3.91			

c) Espectro de ¹³C en 125 MHz y correlaciones heteronucleares.

El espectro HSQC permitió la asignación de los protones a los carbonos correspondientes, de manera especial para la región aromática se utilizó el experimento HSQC acoplado.

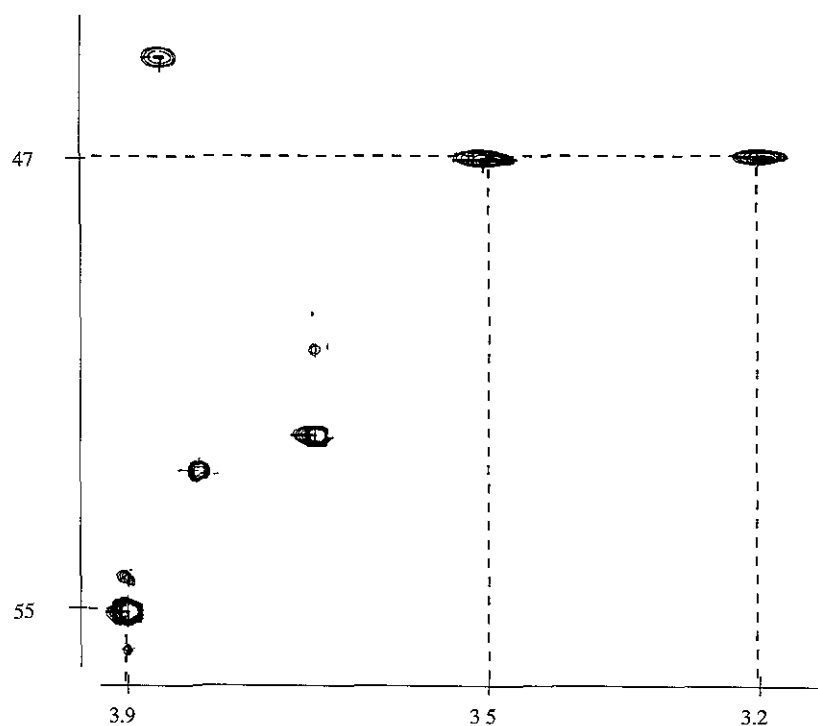


Figura 2.53 Espectro HSQC de V en cloroformo deuteriado. Asignación de las posiciones 1 y 4.

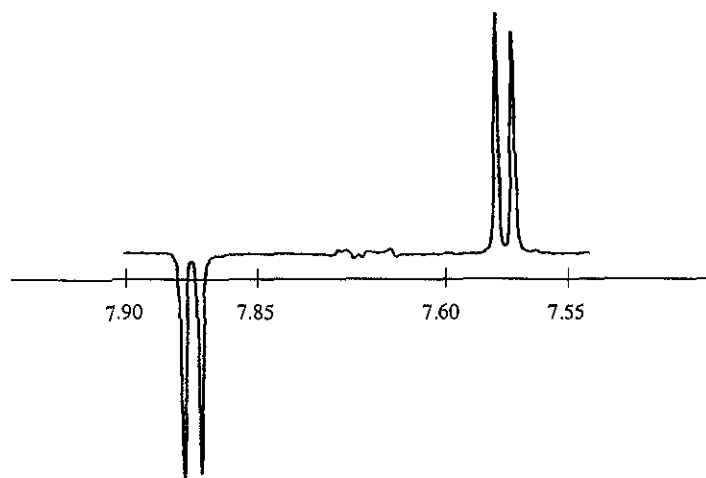


Figura 2.54 Espectro HSQC acoplado de V en cloroformo deuteriado. Acoplamiento de la señal de protón centrada a 7.72 ppm con la señal de carbono a 127.3 ppm.

Tabla 2.40 Asignación de los protones y cálculo de las constantes de acoplamientos por experimentos HSQC y cHSQC del éster metílico de N-[(S)-naproxenoil]-L-prolina. Disolvente cloroformo deuteriado.

Señal de ^{13}C (δ)	Señal de ^1H (δ) (m) (J_{CH} , J_{HH})*
C ₁ (59.1)	H ₁ (4.55) (dd) (7.8, 3.9)
C ₂ (29.0)	H ₂ (2.14) (m) H ₂ ' (1.84) (m)
C ₃ (24.9)	H ₃ , H ₃ ' (1.82) (m)
C ₄ (46.8)	H ₄ (3.51) (m) H ₄ ' (3.21) (m)
C ₆ (52.0)	H ₆ (3.69) (m)
C ₈ (44.9)	H ₈ (3.87) (d) (7)
C ₉ (20.2)	H ₉ (1.49) (d) (7)
C ₁₁ (126.5)	H ₁₁ (7.38) (dd) (157.5, 8.5, 1.5)
C ₁₂ (129.2)	H ₁₂ (7.71) (d) (158.5, 9)
C ₁₄ (105.6)	H ₁₄ (7.11) (d) (157.5, 2.5)
C ₁₆ (118.9)	H ₁₆ (7.14) (dd) (160.75, 9, 2.5)
C ₁₇ (127.2)	H ₁₇ (7.72) (d) (159.75, 8.65)
C ₁₉ (126.1)	H ₁₉ (d) (7.68) (1.9)
C ₂₀ (55.3)	H ₂₀ (3.91) (m)

* m= multiplicidad, δ = desplazamiento químico (ppm),
 J_{CH} = constante de acoplamiento carbono-hidrógeno (Hz),
 J_{HH} = constante de acoplamiento hidrógeno-hidrógeno (Hz).

Tabla 2.41 Correlaciones homo y heteronucleares del éster metílico de N-[(S)-naproxenoil]-L-prolina. Disolvente cloroformo deuteriado.

Carbono (δ)	Hidrógeno (δ)	COSY	NOESY	HMBC
C ₁ (59.1)	H ₁ (4.55)	H ₂ , H ₂ '		
C ₂ (29.0)	H ₂ (2.14)	H ₁ , H ₂ '	H ₄ ', H ₁₄	
	H ₂ ' (1.84)	H ₁ , H ₂		
C ₃ (24.9)	H ₃ , H ₃ ' (1.82)	H ₄ , H ₄ '		
C ₄ (46.8)	H ₄ (3.51)	H ₄ ', H ₃ , H ₃ '	H ₂ ', H ₆ , H ₈	
	H ₄ ' (3.21)	H ₃ , H ₃ '	H ₃ ', H ₈	
C ₅ (172.6)				H ₆
C ₆ (52.0)	H ₆ (3.69)		H ₄	
C ₇ (172.4)				H ₉
C ₈ (44.9)	H ₈ (3.87)	H ₉	H ₁₉ , H ₁₀ , H ₄ , H ₄ '	
C ₉ (20.2)	H ₉ (1.49)	H ₈		
C ₁₀ (136.3)		H ₁₂	H ₈	H ₉ , H ₁₂
C ₁₁ (126.5)	H ₁₁ (7.38)	H ₁₁		
C ₁₂ (129.2)	H ₁₂ (7.71)		H ₂ '	
C ₁₃ (133.4)		H ₁₇		H ₁₉ , H ₁₁
C ₁₄ (105.6)	H ₁₄ (7.11)	H ₁₆		H ₁₂
C ₁₅ (157.5)				H ₂₀
C ₁₆ (118.9)	H ₁₆ (7.14)			H ₁₄
C ₁₇ (127.2)	H ₁₇ (7.72)			
C ₁₈ (129.1)				H ₁₆ , H ₁₄ , H ₁₉ , H ₁₂
C ₁₉ (126.1)	H ₁₉ (7.68)		H ₈	H ₁₁
C ₂₀ (55.3)	H ₂₀ (3.91)			

2.2.5 Resumen del comportamiento de los cuatro derivados.

Como puede observarse en la tabla 2.42, al comparar los desplazamientos químicos del éster metílico de L-prolina con los desplazamientos respectivos en los derivados amídicos, se observa que en todos los derivados con oblatos aromáticos existe una variación en el desplazamiento químico en campos más altos, esto puede atribuirse a una orientación espacial del residuo de prolina sobre los anillos aromáticos, colocándose preferentemente en la zona de protección anisotrópica del plano de los sistemas aromáticos.

Tabla 2.42 Tabla comparativa de desplazamientos químicos de los protones de prolina en los diferentes derivados con oblatos aromáticos. Disolvente cloroformo deuteriado.

Protón	I			II		III		IV		V	
	δ (ppm)	δ (ppm)	$\Delta\delta^*$ (ppm)	δ (ppm)	$\Delta\delta^*$ (ppm)	δ (ppm)	$\Delta\delta^*$ (ppm)	δ (ppm)	$\Delta\delta^*$ (ppm)	δ (ppm)	$\Delta\delta^*$ (ppm)
H ₁	4.50	4.82	0.32	4.74	0.24	4.54	0.04	4.55	0.05		
H ₂	2.44	2.35†	-0.09	2.35	-0.09	2.16	-0.28	2.14	-0.30		
H ₂ '	2.19	2.08	-0.11	2.05	-0.14	1.98	-0.21	1.84	-0.35		
H ₃	2.09	1.95	-0.14	2.05	-0.04	1.98	-0.11	1.82	-0.27		
H ₃ '	2.09	1.85†	-0.24	1.90	-0.19	1.90	-0.19	1.82	-0.27		
H ₄	3.62	3.34	-0.28	3.73	0.11	3.54	-0.08	3.51	-0.11		
H ₄ '	3.51	3.21†	-0.30	3.59	0.08	3.54	0.03	3.21	-0.30		
H ₆	3.84	3.87	0.03	3.81	-0.03	3.73	-0.11	3.69	-0.15		

* con respecto al desplazamiento químico en cloroformo deuteriado. † *cis* al protón 1.

La excepción a este comportamiento se presenta en el hidrógeno de la posición 1, que en los derivados amídicos se desplaza en campos más bajos. Esto puede atribuirse a la funcionalidad del nitrógeno, puesto que en el aminoácido puede generar efectos inductivos sobre el protón de la posición 1, que no es tan evidente cuando el nitrógeno forma un enlace amida.

Para el caso de los desplazamientos químicos de ¹³C, que se presentan en la tabla 2.43, se observa en los derivados amídicos un efecto inductivo β de la función amídica, con un comportamiento general de variación en el desplazamiento químico hacia campos más bajos.

Tabla 2.43 Tabla comparativa de los desplazamientos químicos de ¹³C de L-prolina en los diferentes derivados con oblatos aromáticos. Disolvente cloroformo deuteriado

Carbono	I			II		III		IV		V	
	δ (ppm)	δ (ppm)	$\Delta\delta^*$ (ppm)	δ (ppm)	$\Delta\delta^*$ (ppm)	δ (ppm)	$\Delta\delta^*$ (ppm)	δ (ppm)	$\Delta\delta^*$ (ppm)	δ (ppm)	$\Delta\delta^*$ (ppm)
1	59.1	58.6	-0.5	59.2	0.1	59.2	0.1	59.1	0.0		
2	28.5	29.7	1.2	29.4	0.9	29.1	0.6	29.0	0.5		
3	23.5	24.9	1.4	25.4	1.9	24.9	1.4	24.9	1.4		
4	45.7	48.8	3.1	50.0	4.3	47.2	1.5	46.8	1.1		
5	169.3	172.8	3.5	172.8	3.5	172.7	3.4	172.6	3.3		
6	53.3	52.4	-0.9	52.3	-1.0	52.2	-1.1	52.0	-1.3		

* con respecto al desplazamiento químico en cloroformo deuteriado.

En reportes previos se ha establecido una correlación entre los desplazamientos químicos de ^{13}C con la conformación alrededor del enlace amida en derivados de la L-prolina,⁽⁴⁹⁾ de acuerdo con ello, en la conformación *trans* (que es equivalente a la asignación Z otorgada a nuestros derivados), el valor del desplazamiento químico del carbono de la posición 2 debe ser mayor a 25 ppm. De esta forma los datos obtenidos por RMN para nuestros derivados, coinciden con la conformación asignada a partir de los datos cristalográficos, que muestran una conformación Z alrededor del enlace amida.

Lo anterior implica que la conformación Z de los derivados amídicos analizados en su estructura cristalina, se mantiene en disolución.

Un aspecto interesante, es el cambio en las constantes de acoplamiento que el protón en posición 1 presenta con los dos protones diastereotópicos del carbono en posición 2. Estos cambios pueden apreciarse gráficamente en los trazos espectrales que se muestran en la figura 2.55 y que se resumen en la tabla 2.44.

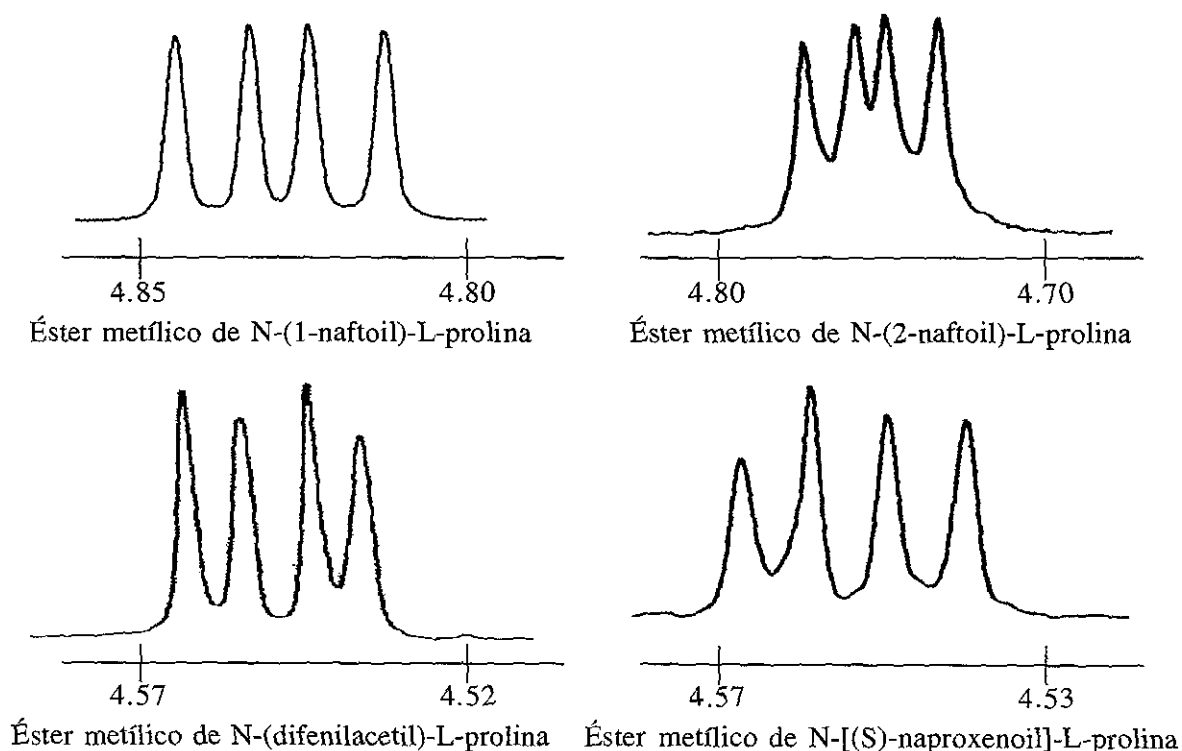


Figura 2.55 Trazos espectrales del protón 1 en los derivados amídicos sintetizados. Disolvente cloroformo deuteriado

Considerando las múltiples posibilidades conformacionales del anillo de prolina,^(36,37) que llevan a la obtención de un promedio conformacional en los parámetros obtenidos por RMN y tomando en cuenta que el valor de las constantes de acoplamiento está íntimamente ligado con el ángulo diedro de un sistema de espines,⁽⁵⁹⁾ las variaciones observadas en la constante de acoplamiento están implicando un cambio en la conformación promedio del sistema heterocíclico de la prolina con respecto al aminoácido no derivado.

De manera general, el valor de la constante *trans* en los derivados amídicos es menor que en la prolina, esto implica que el ángulo diedro entre el protón de la posición 1 y el protón *trans* de la posición 2 se acerca aún más a el valor de 90° en los derivados obtenidos con respecto a la prolina misma.

Tabla 2.44 Variación de la constante de acoplamiento y ángulos diedros del protón 1 del clorhidrato del éster metílico de L-prolina y los derivados de oblatos. Temperatura ambiente.

	$^3J_{H_{12cis}}$	$^3J_{H_{12trans}}$
Disolvente: Cloroformo deuteriado		
I	8.50	7.00
II	8.50	4.00
III	8.35	5.55
IV	8.50	4.00
V	7.80	3.90
Disolvente: Piridina-d ₅		
I	9.0	6.5
II	8.75	4.75
IV	8.50	4.00

A partir de las estructuras tridimensionales obtenidas por el procesamiento de las coordenadas cartesianas, se calcularon los ángulos diedro entre el protón de la posición 1 y los protones diasterotópicos de la posición 2.

Estos valores de ángulo diedro, fueron interpolados empleando la ecuación de Karplus^(54,59) para obtener el intervalo de constantes de acoplamiento esperadas para un valor determinado de ángulo diedro.

Tabla 2.45 Ángulos diedro del protón de la posición 1 con los protones de la posición 2, obtenidos a partir de las estructuras cristalinas.

Compuesto	θ_{trans}	Constante de acoplamiento esperada	θ_{cis}	Constante de acoplamiento esperada
II	-97°	0 - 5	23.4°	6 - 10
III	-90.4°	0 - 5	29.2°	6 - 10
IV	-90.4°	0 - 5	31°	6 - 10
V	-91°	0 - 5	30.8°	6 - 10

Como puede observarse en la tabla 2.45, dichos valores apoyan la asignación del acoplamiento *cis* como aquél correspondiente al acoplamiento más grande, puesto que el ángulo diedro es pequeño. Por el contrario, el acoplamiento *trans* es el más débil por corresponder a un ángulo diedro cercano a los 90°.

CAPÍTULO 3

METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

3.1 Análisis del clorhidrato del éster metílico de L-prolina (I).

El clorhidrato del éster metílico de L-prolina (Aldrich) se sometió experimentos de resonancia magnética nuclear unidimensionales y de correlación homo y heteronuclear, en diferentes disolventes y condiciones. Utilizando un espectrómetro Varian de 500 Mhz modelo Unity II con sonda de detección inversa, acoplado a una estación de trabajo Sun. Los experimentos efectuados, se resumen en la tabla 3.1.

Tabla 3.1 Resumen de experimentos de RMN efectuados al clorhidrato del éster metílico de L-prolina.

DISOLVENTE	EXPERIMENTOS
Dimetilsulfóxido-d ₆	¹ H, COSY, ¹³ C, HMQC, ¹ H a temperatura variable (50, 70 y 90° C)
Acetona-d ₆	¹ H, COSY, ¹³ C, HMQC, ¹ H a baja temperatura (-60, -70 y -90° C)
Cloroformo deuteriado	¹ H, COSY, ¹³ C, HMQC, HMBC
Piridina-d ₅	¹ H, COSY, NOESY, ¹³ C, HMQC, HMBC

3.2 Preparación de los derivados con oblatos aromáticos.

3.2.1 Preparación del éster metílico de N-(1-naftoil)-L-prolina (II):

El ácido 1-naftoico (1 eq) (Aldrich), se disolvió en diclorometano seco. Se adicionaron lentamente 1.2 eq de cloruro de tionilo (Aldrich) y se dejó reaccionar en temperatura ambiente por espacio de una hora. Se evaporó el disolvente a presión reducida y el residuo se dejó al alto vacío por una hora, para eliminar el dióxido de azufre generado en la reacción así como el exceso de cloruro de tionilo.

El cloruro de ácido así generado, se redisolvió en diclorometano seco y a esta solución se agregaron 1.1 equivalentes del clorhidrato del éster metílico de L-prolina (Aldrich), añadiendo unas gotas de trietilamina (Aldrich) como base para neutralizar el clorhidrato *in situ*. La reacción transcurrió en temperatura ambiente durante un tiempo de dos horas, durante el cual se siguió el curso de la misma mediante cromatografía en placa fina de sílice (Merck 60 F254), utilizando como eluyente una mezcla de diclorometano/metanol en proporción 95:5. Cuando la reacción llegó a término, se evaporó el disolvente a presión reducida.

El producto de reacción se sometió a una purificación por cromatografía en columna de sílice (tamaño de malla 70/230), utilizando como eluyente una mezcla diclorometano-metanol en proporción inicial 95:5. El producto II se obtuvo con un 80% de rendimiento. El esquema general de reacción se presenta en la figura 3.1.

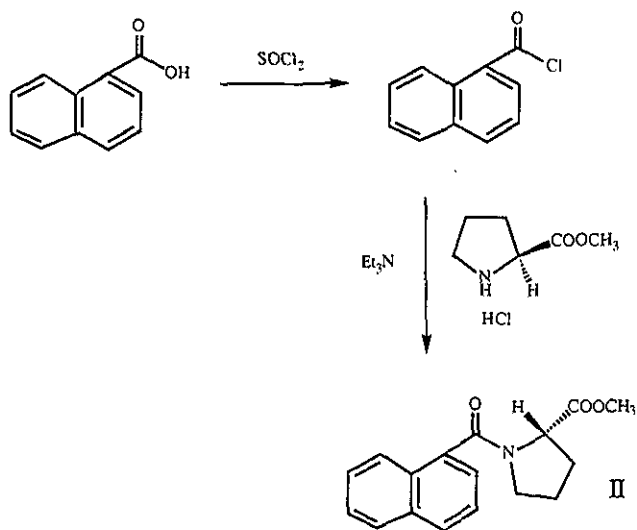


Figura 3.1 Esquema de reacción para la síntesis del éster metílico de N-(1-naftoil)-L-prolina.

3.2.2 Preparación del éster metílico de N-(2-naftoil)-L-prolina (III).

Se siguió el mismo procedimiento que para el compuesto II, utilizando al ácido 2-naftoico (Aldrich) en la generación del cloruro de ácido que se acopló posteriormente al éster metílico de L-prolina. El producto III, se obtuvo con un rendimiento del 83%. La figura 3.2 resume la secuencia empleada.

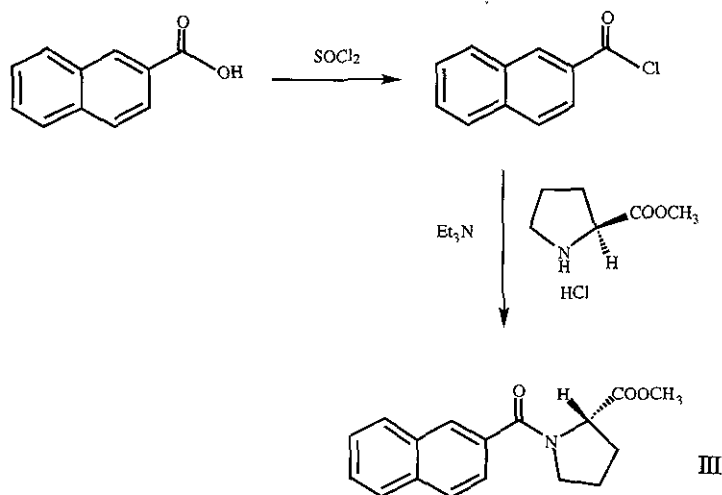


Figura 3.2 Esquema general de reacción para la obtención del éster metílico de N-(2-naftoil)-L-prolina.

3.2.3 Preparación del éster metílico de N-(difenilacetil)-L-prolina (IV).

En un procedimiento similar a la síntesis del compuesto II, se generó inicialmente el cloruro de ácido a partir del ácido difenilacético (Aldrich) para después generar la amida con el éster metílico de L-prolina. El rendimiento total de la reacción fue del 85% y en la figura 3.3 se presenta el esquema de secuencia de síntesis.

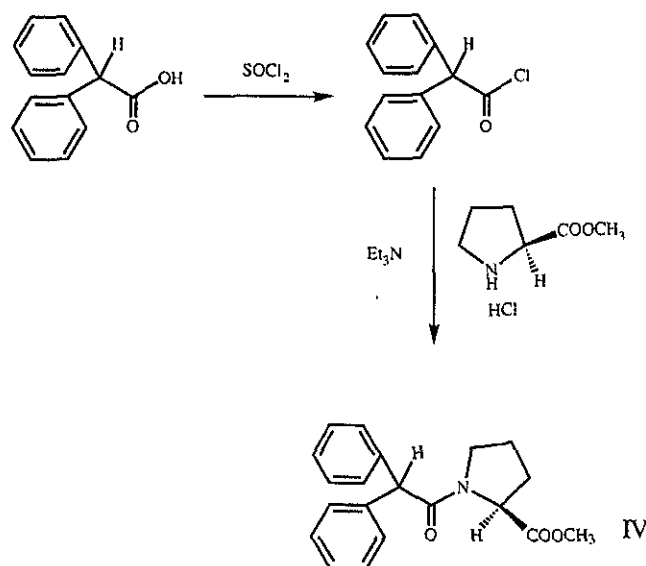


Figura 3.3 Esquema de obtención del éster metílico de N-(difenilacetil)-L-prolina.

3.2.4 Preparación del éster metílico de N-[(S)-naproxenoil]-L-prolina (V).

La preparación siguió el procedimiento ya mencionado; utilizando (S)-naproxén (Fluka) para generar el cloruro de ácido correspondiente que se acopló al éster metílico de L-prolina, tal y como se muestra en la figura 3.4. El rendimiento total de la reacción fue del 92%.

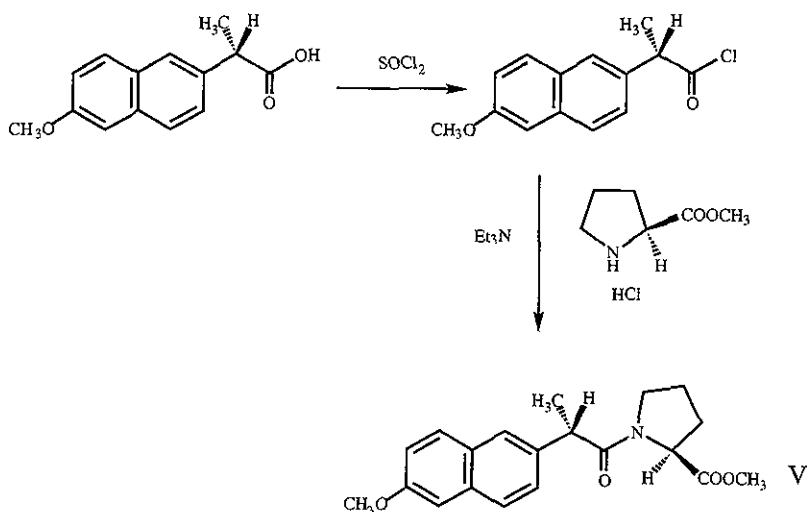


Figura 3.4 Secuencia utilizada en la obtención del éster metílico de N-[(S)-naproxenoil]-L-prolina.

3.3 Caracterización fisicoquímica.

Los compuestos II, III, IV y V fueron sometidos para su caracterización a las siguientes pruebas: punto de fusión mediante un aparato Fisher-Johns. La actividad óptica se determinó en un polarímetro marca Jasco modelo DIP-360, utilizando lámpara de sodio. La espectroscopía de infrarrojo se efectuó en pastilla de KBr empleando un espectrofotómetro de FT-IR marca Nicolet, modelo 55X. Los espectros de masas por impacto electrónico fueron obtenidos mediante un espectrómetro de masas Hewlett Packard modelo 5985B. Las estructuras cristalinas se determinaron mediante un espectrómetro de difracción de rayos X Siemens P4PC, con irradiación a una longitud de onda de 0.71073 Å.

Las coordenadas cartesianas obtenidas del experimento de difracción de rayos X, fueron procesadas mediante el programa *CS Chem3d* de *Cambridgesoft Co.* para obtener la estructura tridimensional, que posteriormente fue minimizada en su energía estérica en el mismo programa utilizando MM2.

Asimismo se efectuaron experimentos uni y bidimensionales de resonancia magnética nuclear en un espectrómetro Varian de 500 MHz modelo Unity II con sonda de detección inversa, acoplado a una estación de trabajo Sun. Los diferentes experimentos realizados para cada compuesto, se resumen en la tabla 3.2.

Tabla 3.2 Resumen de experimentos de RMN efectuados sobre los derivados del éster metílico de L-prolina con oblatos aromáticos.

Experimentos de RMN (temperatura ambiente)	
Compuesto	Disolvente cloroformo deuteriado
II	¹ H, ¹³ C, COSY, NOESY, cHSQC, HMBC
III	¹ H, ¹³ C, COSY, DQCOSY, NOESY, HSQC, cHSQC, HMBC
IV	¹ H, ¹³ C, COSY, NOESY, HSQC, TOCSY
V	¹ H, ¹³ C, COSY, NOESY, HSQC, cHSQC
Compuesto	Disolvente piridina-d ₅
II	¹ H, ¹³ C, COSY, NOESY, HMQC
IV	¹ H, ¹³ C, COSY, NOESY, HMQC, HMBC

CONCLUSIONES

Para el caso del éster metílico de L-prolina, se observan variaciones interesantes en el espectro de RMN de ^1H , por efecto del disolvente. De esta forma, la piridina resultó ser el mejor medio para poder asignar las posiciones relativas de los seis protones diasterotópicos de los metilenos del anillo, con respecto al protón de la posición 1. Al mismo tiempo este disolvente provoca efectos de protección anisotrópica sobre los protones de prolina, lo que lleva a observar en general un cambio en los desplazamientos químicos de protón hacia campos más altos.

Se sintetizaron cuatro nuevos productos derivados de L-prolina. Siendo la constante estructural el ser derivado amídicos con presencia de sistemas aromáticos.

El análisis de las estructuras cristalinas, específicamente los ángulos diedro entre el oxígeno del carbonilo de la amida y los carbonos de las posiciones 1 y 4, muestran que la conformación favorecida para los compuestos obtenidos es la Z.

El hecho de que en todos los derivados amídicos analizados en este trabajo, presenten una conformación Z alrededor del enlace amida, puede atribuirse al impedimento estérico que los sustituyentes aromáticos generan, de esta forma se colocan espacialmente alejados del grupo éster unido a la posición 1 de la prolina.

En los derivados obtenidos, se observaron cambios en los desplazamientos químicos del aminoácido, como resultado de efectos anisotrópicos de los oblatos aromáticos integrados en los derivados.

Una vez más se corrobora la gran utilidad de las técnicas modernas de RMN bidimensional, pues en aquellos derivados en donde se aplicaron las secuencias HSQC y HSQC acoplado, se logró una mejor asignación de las estructuras, sobre todo en aquellas regiones espectrales en donde existe gran sobreposición de señales.

Los cambios en las constantes de acoplamiento del protón en alfa con los protones en posición beta, sugieren variaciones en la conformación del anillo de prolina en los derivados obtenidos.

Se lograron condiciones que permiten la exploración de la conformación del sistema cíclico de prolina, resolviendo los problemas de sobreposición espectral que normalmente dificultan la interpretación.

Una perspectiva que se presenta con los resultados del presente trabajo es que los datos obtenidos permitirán la exploración del cálculo de sistemas de espines, mediante la simulación teórica de los espectros de resonancia. Con lo anterior se podrá hacer una contribución a la comprensión del complejo sistema de espines de la prolina.

Igualmente los datos obtenidos se suman a los descritos en la literatura y que son importantes para explicar las variaciones en la estructura tridimensional de péptidos donde interviene este aminoácido.

BIBLIOGRAFÍA

- 1) Williams, K.; Deber, Ch. *Biochemistry* **1991**, *30*: 8919 - 8923.
- 2) Williamson, M. *Biochem. J.* **1994**, *297*: 249 - 260.
- 3) Remuzon, P. *Tetrahedron* **1996**, *52(44)*: 13803-13835.
- 4) Iseki, K.; Kuroki, Y.; Takahashi, M.; Kishimoto, S.; Kobayashi, Y. *Tetrahedron* **1997**, *53(10)*: 3513 - 3526.
- 5) Milne, P.; Oliver, D.; VanRooyen, P.; Roos, H. *J. Chem. Crystall.* **1997**, *27(3)*: 167-175.
- 6) Pogliani, L.; Ellenberger, M. *Org. Mag. Res.* **1975**, *7*: 61 -71.
- 7) Hübner, D.; Hartrodt, B.; Kleinpeter, E.; Ströhl, D.; Brandt, W.; Schinke, H.; Wahab, M.; Fischer, G. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1991**, *177(1)*: 271 - 278.
- 8) Schwartz, B.; Erickson, B. *Org. Mass. Spectrom.* **1993**, *29*: 113 - 122.
- 9) Stryer, L. *Biochemistry*. 3rd. Ed. W.H. Freeman & Co. New York. **1988**, p. 18, 579.
- 10) Voet, D.; Voet, J. *Biochemistry*. John Wiley & Sons. New York. **1990**, p. 19.
- 11) Lehninger, A.; Nelson, D.; Cox, M. *Principles of Biochemistry*. 2nd. Ed. Worth Publishers. New York. **1993**, p. 175.
- 12) Branden, C.; Tooze, J. *Introduction to Protein Structure*. Garland Publishers Co. New York. **1991**, p. 13, 14, 259.
- 13) London, R.; Stewart, J.; Cann, R. *Biochem. Pharmacol.* **1990**, *40(1)*: 41 - 48.
- 14) Hayashi, T.; Asai, T.; Ogoshi, H. *Tet. Lett.* **1997**, *38(17)* : 3039 - 3042.
- 15) MacArthur, M.; Thornston, J. *J. Mol. Biol.* **1991**, *218*: 397 - 412.
- 16) De Tar, D.; Luthra, N. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99(4)*: 1232-1244.
- 17) Maia, H.; Orrell, K.; Rydon, H. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II* **1976**, 761-763.
- 18) Magaard, V.; Sanchez, R.; Bean, J.; Moore, M. *Tet. Lett.* **1993**, *34(3)*: 381 - 384.
- 19) Curran, T.; McEnaney, P. *Tet. Lett.* **1995**, *36(2)*: 191 - 194.
- 20) Richards, N.; Hinds, M.; Brennand, D.; Glennie, M.; Welsh, J.; Robinson, J. *Biochem. Pharmacol.* **1990**, *40(1)*: 119 - 123.
- 21) Eliel, E.; Wilen, S.; Mander, L. *Stereochemistry of Organic Compounds*. John Wiley & Sons. New York **1994**, p. 336-337.
- 22) Yoshioka, R.; Tohyama, M.; Ohtsuki, O.; Yamada, S.; Chibata, I. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1987**, *60*: 649-652.

- 23) Shiraiwa, T.; Sado, Y.; Fujii, S.; Nakamura, M.; Kurokawa, H. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1987**, *60*: 824-826.
- 24) Periasamy, M.; Venkataram, L.; Thomas, K. *J. Org. Chem.* **1997**, *62(13)*: 4302-4306.
- 25) Ramanathan, C.; Periasamy, M. *Tet. Asymm.* **1998**, *9*: 2651 - 2656.
- 26) Albers, T.; Biagini, S.; Hibbs, D. Hursthouse, M.; Malik, K.; North, M.; Uriarte, E.; Zagotto, G. *Synthesis.* **1996**, 393-398.
- 27) Jones, I.; Jones, W.; North, M.; Teijeira, M.; Uriarte, E. *Tet. Lett.* **1997**, *38 (5)* : 889 - 892.
- 28) Naidu, B.; West, F. *Tetrahedron.* **1997**, *53 (48)*: 16565 - 16574.
- 29) Yamaguchi, M.; Igarashi, Y.; Reddy, R.; Shiraishi T.; Hiramama, M. *Tetrahedron.* **1997**, *53 (32)*: 11223-11236.
- 30) Avent, A.; Bowler, A.; Doyle, P.; Marchand, C.; Young, D. *Tet. Lett.* **1992**, *33 (11)*: 1509 - 1512.
- 31) Tanaka, K.; Sawanishi, H. *Tet. Asymm.* **1995**, *6(7)*: 1641 - 1656.
- 32) Braish, T. Fox, D. *J. Org. Chem.* **1990**, *55(5)*: 1684 - 1687.
- 33) Jordis, U.; Sauter, F.; Siddiqi, S.; Küenburg, B.; Bhattacharya, K.; *Synthesis.* **1990**, :925 - 930.
- 34) Kamal, A. *J. Org. Chem.* **1991**, *56(6)*: 2237 - 2240.
- 35) Thomasson, K.; Applequist, J. *Biopolymers.* **1990**, *30*: 437 - 450.
- 36) Pogliani, L.; Ellenberger, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, *96(5)*: 1621 - 1622.
- 37) Ellenberger, M.; Pogliani, L.; Häuser, K.; Valat, J. *Chem. Phys. Lett.* **1974**, *27(3)*: 419 -424.
- 38) London, R. *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100(9)*: 2678 - 2685.
- 39) Eberhardt, E.; Loh, S.; Hinck, A.; Raines, R. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114(13)*: 5437 - 5439.
- 40) Wiberg, K.; Breneman, C. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114(1)*: 831 - 840.
- 41) Mirkin, N.; Krimm, S. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*: 9742 - 9747.
- 42) Reimer, U.; Scherer, G.; Drewello, M.; Kruber, S.; Schutkowski, M.; Fischer, G. *J. Mol. Biol.* **1998**, *279*: 449 - 460.
- 43) Poznański, J.; Ejchart, A.; Wierzchowski, K.; Ciurak, M.; *Biopolymers.* **1993**, *33*: 781 - 795.

- 44) Tsunematsu, H.; Horie, H.; Fukuda, K.; Yamamoto, M. *Org. Mass. Spectrom.* **1994**, 29: 197 - 200.
- 45) Schwartz, B.; Erickson, B. *Org. Mass. Spectrom.* **1993**, 29: 1053 - 1058.
- 46) Tsunematsu, H.; Isobe, R.; Futatsuka, Y.; Yamamoto, M. *Chem. Pharm. Bull.* **1996**, 44(10): 1962 - 1965.
- 47) Morita, H.; Gonda, A.; Takeya, K.; Itokawa, H.; Iitaka, Y. *Tetrahedron* **1997**, 53 (5) : 1617 - 1626.
- 48) Langlois, N. *Tet. Asymm.* **1998**, 9: 1333 - 1336.
- 49) Beausoleil, E.; Lubell, W. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118: 12902 - 12908.
- 50) Beausoleil, E.; L'Archevêque, B.; Bélec, L.; Atfani, M.; Lubell, W. *J. Org. Chem.* **1996**, 61: 9447 - 9454.
- 51) Oba, M.; Terauchi, T.; Hashimoto, J.; Tanaka, T.; Nishiyama, K. *Tet. Lett.* **1997**, 38(31): 5515 -5518.
- 52) Alducín E. *Tesis de Maestría en Ciencias Químicas (Química Analítica)*. División de Estudios de Posgrado. Facultad de Química. UNAM. México, **1997**.
- 53) Jáuregui V. *Tesis de Licenciatura*. Facultad de Química. UNAM. México, **1998**.
- 54) Günther, H. *NMR Spectroscopy: Basic Principles, Concepts and Applications in Chemistry*. 2nd. Ed. John Wiley & Sons. New York **1995**, p. 78-89.
- 55) Akitt, J. *NMR and Chemistry: An Introduction to Modern NMR Spectroscopy*. 3rd. Ed. Chapman & Hall. London **1992**, p. 17-24.
- 56) Haigh, C.; Mallion, R. *Prog. NMR Spectroscopy*. **1980**, 13:303.
- 57) Bovey, F. *Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*. 2nd. Ed. Academic Press. California. **1988**, p.110.
- 58) Ronayne J., Eilliams D. *Solvent Effects in Proton Magnetic Resonance Spectroscopy*. Annual Review of NMR Spectroscopy Vol. 2. Ed. E.F. Mooney. Academic Press. London **1969**, p. 83-124.
- 59) Karplus, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85: 2870-2871.
- 60) Macomber, R. *A Complete Introduction to Modern NMR Spectroscopy*. Wiley Interscience. New York **1998**, p. 47.