

00550
4



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORA EN
CIENCIAS QUIMICAS

"ANALISIS ESTRUCTURAL Y CONFORMACIONAL
DE DI PEPTIDOS-PEPTOIDES POR METODOS
ESPECTROSCOPICOS MODERNOS"

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS
P R E S E N T A :
VIRGINIA / JAUREGUI VILLANUEVA

299414

TUTOR: DR. RAUL G. ENRIQUEZ HABIB



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

A la Dirección General de Estudios de Posgrado (DGEP) por la beca otorgada que permitió que pudiera llevar a cabo mis estudios de maestría.

De manera especial al Instituto de Química por el apoyo recibido por su personal académico, técnico y administrativo en el desarrollo de esta tesis.

Al laboratorio de Inmunología en el Centro Médico Siglo XXI.

A la SEP por su apoyo en la beca para realizar el intercambio con la Universidad de Burgoña en Dijon, Francia.

Al Centro de Investigación en Polímeros (CIP) por su apoyo incondicional en la etapa final de esta tesis.

A mi Padre y a mi Madre

A mis hermanos y familiares

Al Dr. Raúl Enríquez

Al Dr. Dino Gnecco

A Tina Cervera

A mis compañeros de laboratorio

Indice

INTRODUCCIÓN	1
• Objetivo Principal	2
• Estrategias Propuestas	2
CAPÍTULO 1.	3
PROTEÍNAS, PÉPTIDOS Y AMINOÁCIDOS	3
1.1 Generalidades de proteínas.	3
1.2 Péptidos de bajo peso molecular.	5
1.3 Dipéptidos cíclicos.	7
1.4 Dos aminoácidos interesantes: prolina y ácido γ -aminobutírico (GABA).	8
1.4.1. Prolina	8
1.4.2. Ácido γ -aminobutírico (GABA)	12
CAPÍTULO 2.	15
SÍNTESIS Y ANÁLISIS DE PÉPTIDOS	15
2.1. Síntesis de péptidos	15
2.1.1. Grupos protectores	15
2.1.2. Formación de enlaces peptídicos	19
2.1.3. Síntesis en fase sólida	21
2.2. Análisis de péptidos	22
CAPÍTULO 3.	23
RMN DINÁMICA	23
3.1. Factores físicos que afectan el ancho de pico	23
3.1.1. Inhomogenidad de campo magnético	23
3.1.2. Efectos de relajación	24
3.1.3. Otros factores	27
3.2. Factor químico que afecta el ancho de pico (Intercambio Químico)	27
3.2.1. Equilibrio de la N,N-dimetilformamida	27
3.2.2. Equilibrio de la 2-metiloxepina	28
3.2.3. Equilibrio del metanol	29
3.3. Escala de tiempo en RMN ³⁶	29
3.4. Coalescencia ²⁹	30
3.5. Descripción Cuantitativa de RMN Dinámica ²⁹	30
3.5.1. Métodos y aproximaciones para la obtención de parámetros termodinámicos	32
3.5.2. Soluciones aproximadas	34
CAPÍTULO 4.	35
DESARROLLO EXPERIMENTAL	35
4.1 Síntesis	35
4.1.1 t-(butiloxicarbonil)-L-prolina (BOC-prolina) y éster metílico de prolina	35
4.1.2 Síntesis del éster metílico y bencílico del ácido γ -aminobutírico (GABAOMe / GABAOben).	35
4.1.3 Síntesis del éster metílico del BOC-prolina	35
4.1.4 Síntesis del t-butiloxicarbonil-GABA (BOC-GABA)	36
4.1.5 Acoplamiento de BOCprolina-éster metílico de GABA (BOC-pro-GABAOMe)	36
4.1.6 Acoplamiento de BOC-prolina- éster metílico de prolina (BOC-pro-proOMe)	36
4.2 Análisis	37
4.2.1 Infrarrojo (IR)	37
4.2.2 Polarografía	37
4.2.3 Espectrometría de masas (EM)	37
4.2.4 Cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE-HPLC)	37
4.2.5 Resonancia magnética nuclear (RMN)	37

CAPÍTULO 5.	38
RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS	38
5.1. Análisis de los espectros de BOC-prolina	38
5.1.1. Resultados de rotación óptica, análisis de IR y EM de BOC-prolina	38
5.1.2. Espectros de RMN en 500 MHz y temperatura ambiente (T.A.) en CDCl ₃	39
5.1.3. Espectros de RMN en 500 MHz en bajas temperaturas en acetona-d ₆	41
5.1.4. Espectros de RMN en 500 MHz en DMSO-d ₆ (alta temperatura)	50
5.2. Síntesis del éster metílico y bencílico del ácido γ -aminobutírico (GABAOMe / GABAOben)	55
5.3. Síntesis del éster metílico de BOC-prolina	56
5.3.1. Resultados de rotación óptica, IR y EM del éster metílico de BOC-prolina	56
5.3.2. Espectros de RMN en 500 MHz en T.A y baja temperatura	57
5.4. Síntesis del t-butyloxycarbonil-GABA (BOC-GABA)	59
5.5. Acoplamiento de BOCprolina- éster metílico de GABA (BOCpro-GABAOMe)	60
5.5.1. Análisis de los resultados de rotación óptica, IR y EM	62
5.5.2. Análisis de los espectros de RMN de BOC-prolina-GABAOMe	66
5.6. Acoplamiento de BOCprolina- éster metílico de prolina (BOCpro-proOMe).	76
5.6.1. Análisis de los espectros de IR, EM y rotación óptica	76
5.6.2. Análisis por HPLC	77
5.6.3. Análisis de los espectros de RMN de BOC-prolina-prolinaOMe	78
5.7. Efectos del disolvente.	84
CONCLUSIONES	85
ANEXOS	87
Anexo 1. Espectros de BOC-prolina en T.A.	87
Anexo 2. Espectros del éster metílico de BOC-prolina.	91
Anexo 3. Espectros del BOC-GABA	92
Anexo 4. Espectros del BOC-prolina-GABAOMe	92
Anexo 5. Espectros del BOC-prolina-prolinaOMe	96
BIBLIOGRAFIA	98

Introducción

Casimiroa edulis (zapote blanco) es una de las plantas utilizadas en la medicina tradicional mexicana y conocida por su efecto hipotensor^a que produce con la ingestión del fruto o con la preparación de un té a partir de su semilla. Desde principios del siglo XX diversos grupos de investigadores se dieron a la tarea de obtener el principio activo considerado entonces como “hipnótico”. Fue en 1958 cuando Major¹ aisló la dimetilhistamina que podía asociarse claramente al efecto farmacológico de hipotensión, sin embargo, la dimetilhistamina producía un efecto fugaz mientras que la infusión generaba un efecto constante.

Dentro del trabajo de tesis doctoral de Magos et al² se llevaron a cabo las identificaciones estructurales de 3 sustancias cuya presencia en la planta era desconocida hasta entonces: la prolina, N-metilprolina y el ácido γ -aminobutírico (GABA) encontrados dentro de los extractos metanólicos que presentaban gran potencial hipotensor tanto en ratas como en perros.

La idea de que estos aminoácidos en forma libre o formando pequeños péptidos participaran sinérgicamente en el efecto farmacológico llevó al planteamiento de un trabajo de investigación en donde se llevara a cabo la síntesis de dipéptidos así como un estudio estructural y conformacional de los mismos empleando las técnicas espectroscópicas más utilizadas: infrarrojo (IR), espectrometría de masas (EM) y resonancia magnética nuclear (RMN).

En esta tesis se presentan en primer término las generalidades que caracterizan a las proteínas, a los péptidos y a los aminoácidos y un resumen de las estrategias de síntesis más utilizadas en la actualidad para la obtención de péptidos y una breve descripción de generalidades de la RMN dinámica. Posteriormente se presentan los resultados de las reacciones de síntesis de varios dipéptidos y dipeptoides así como los resultados de estudios conformacionales por IR que adoptan algunos de los compuestos. Se describen también estudios de elucidación de la estructura química y la geometría adoptada por el enlace peptídico utilizando la evidencia de interacciones escalares y dipolares en RMN multidimensional. Finalmente con los estudios de dinámica molecular se determinó la energía involucrada en los procesos de intercambio químico presentes en enlace peptídico de los diferentes compuestos estudiados con la ayuda de la RMN de temperatura variable.

a. El efecto hipotensor se refiere a la caída en la presión arterial provocando una sensación de relajación.

¹Major, R.T., Dürsch, F., *J.Org.Chem.*, **23**,1564 (1958)

²Magos G.A., Tesis Doctoral en Ciencias Biomédicas (Farmacología), Facultad de Medicina, UNAM, 1999.

- ***Objetivo Principal***

Llevar a cabo la síntesis de dipéptidos y dipeptoides de prolina y realizar un estudio espectroscópico por Resonancia Magnética Nuclear (RMN), Infrarrojo (IR) y Espectrometría de Masas (EM) de las estructuras y propiedades de dichos compuestos.

- ***Estrategias Propuestas***

1. Síntesis de dipéptidos y dipeptoides empleando prolina y ácido γ -aminobutírico (GABA).
2. Analizar y evaluar por RMN los posibles equilibrios geométricos que generan las funciones amida de los péptidos.
3. Análisis completo de los espectros de los aminoácidos, los dipéptidos y los dipeptoides en diferentes disolventes.
4. Estudio de las conformaciones tridimensionales preferidas de cada compuesto estudiado.
5. Estudios de espectrometría de masas (EM) e infrarrojo (IR) de cada compuesto.

Capítulo 1.

Proteínas, péptidos y aminoácidos

1.1 Generalidades de proteínas.

En 1838 Mulden, al referirse a un tipo particular de sustancia presente tanto en vegetales como en animales, utilizó por primera vez el término proteína (del griego: *proteios* primero) y fue el primero en interesarse en la composición de las proteínas proponiendo que se trataba de compuestos de fósforo y azufre con un radical orgánico de fórmula $C_{40}H_{62}N_{10}O_{12}$. Posteriormente esta propuesta fue desechada y durante el siglo XIX las proteínas fueron descritas como agregados de tipo coloidal presentes en la naturaleza, lábiles y difíciles de purificar. En 1899 Emil Fischer inició sus investigaciones en esta área marcando una pauta en la química de las proteínas en toda la primera mitad del siglo XX. Su trabajo se centró en la síntesis y resolución de mezclas racémicas de aminoácidos y la combinación de 2 ó más de ellos formando "polipéptidos". Fue en 1907 cuando Fischer publicó la síntesis del dipéptido más simple: diglicil-glicina (figura 1-1) y en 1907, un polipéptido de 18 aminoácidos: leucil-triglicil-leucil-triglicil-leucil-octaglicil-glicina.

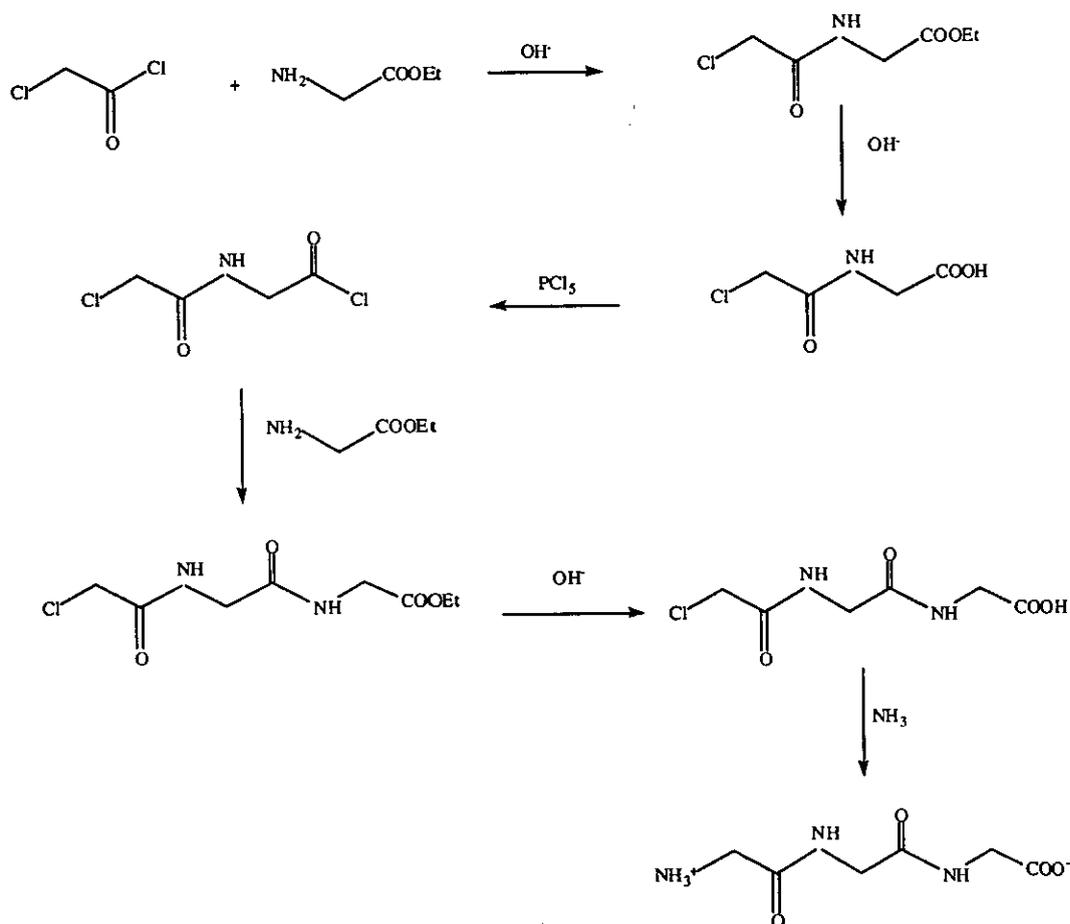


Figura 1-1. Esquema de síntesis de glicil-glicil-glicina llevada a cabo por Emil Fischer, 1901.

Con las similitudes fisicoquímicas entre los péptidos sintéticos y las proteínas naturales se pudo establecer tanto por Fischer como por Hofmeister (en 1908) la naturaleza polipeptídica de las proteínas como cadenas de α -aminoácidos unidos mediante enlaces amídicos (enlaces peptídicos) entre el grupo α -amino de uno de los aminoácidos y α -carboxilo del siguiente. En la figura 1-2 se muestra un polipéptido de alanina-glicina-fenilalanina-lisina-serina y valina en donde se marca en un recuadro uno de los enlaces peptídicos.

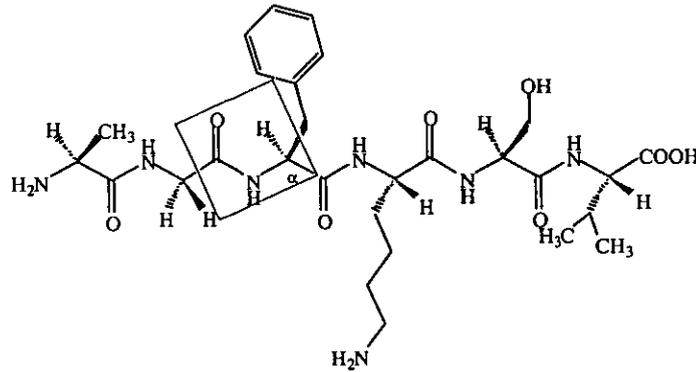


Figura 1-2. Enlace peptídico en un péptido con alanina-glicina-fenilalanina-lisina-serina-valina.

Con la elucidación de la estructura de la insulina (hormona de tipo proteico, compuesta de 51 aminoácidos) por Sanger en 1952 y posteriormente con el avance en la cromatografía, se han logrado obtener extractos homogéneos de proteínas de alta pureza. Asimismo con la utilización de Rayos X y la aplicación de la Resonancia Magnética Nuclear (RMN) multidimensional se han logrado conocer a profundidad las estructuras primaria, secundaria y terciaria de las proteínas así como su interacción con otras proteínas en una estructura cuaternaria.

La estructura primaria es aquella generada por la secuencia de los aminoácidos unidos químicamente mediante los enlaces peptídicos. Si se considera que existen 20 aminoácidos básicos utilizados en la síntesis de proteínas, el número de combinaciones posibles para un polipéptido de 300 aminoácidos es de ¡ 10^{300} !. Esta secuencia primaria determina en una gran parte las estructuras siguientes y el cambio de un sólo aminoácido puede generar variaciones fundamentales en las estructuras secundarias y terciarias. El ejemplo clásico es el caso de la hemoglobina en donde el cambio de ácido glutámico por valina lleva a cambios que originan la anemia.

En el enlace peptídico debido al parcial carácter de doble enlace entre los grupos NH y C=O, existe una restricción en la rotación. De manera general dicho enlace es E (trans) (estructura termodinámicamente más estable) por lo que la cadena asume las conformaciones resultantes de la rotación en los enlaces N-C α o C α -C=O. En la figura 1-3 se ilustran las rotaciones posibles en el enlace peptídico.

Existen contribuciones adicionales a la estabilidad molecular generadas por interacciones no covalentes como: puentes de hidrógeno, complejos de transferencia de carga, interacciones hidrofóbicas, puentes de disulfuro, etc. que permiten la generación y estabilización de la estructura secundaria que adopta forma de hélices (α) y hojas plegadas (β).

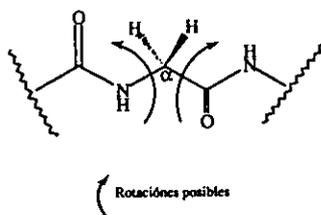


Figura 1-3. Rotaciones posibles alrededor del enlace peptídico.

La estructura terciaria constituye la forma total que adopta un polipéptido, en un ambiente determinado. El agua juega un papel importante ya que su interacción con el polipéptido le permite solvatar residuos de cadena hidrofílica y obligar a las porciones hidrofóbicas a que se concentren en el interior de la estructura adoptando la estructura terciaria. Finalmente la estructura cuaternaria es aquella que se logra cuando hay interacciones o asociaciones no covalentes entre subunidades proteicas para generar el complejo biológicamente activo.

1.2 Péptidos de bajo peso molecular.

De manera general se ha considerado que los péptidos tienen desde 2 hasta 50 aminoácidos y que sus estructuras están relacionadas con las proteínas. Uno de los primeros péptidos estudiados fue la oxitocina³ (OT; H-Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Leu-Gly-NH₂), el cual tiene un lugar muy especial en la química de los péptidos ya que fue el primer péptido aislado cuya estructura fue probada por síntesis total. Este trabajo le dio a Vincent du Vigneaud el premio Nobel de Química en 1955.

Algunos péptidos poseen características atípicas que van desde la presencia de (D)-aminoácidos, aminoácidos N-metilados, ciclos, β y γ -aminoácidos, etc. Algunos de estos péptidos han sido aislados de microorganismos o han sido sintetizados y muchos de ellos poseen actividad biológica como antibacterianos, antitumorales, antivirales, etc. Uno de los péptidos importantes es la hormona Tirotrópina (TRH) cuya biosíntesis es anómala al no ser inhibida por antibióticos que normalmente bloquean la síntesis de proteínas y que puede ser inhibida por yodoacetamida o por cloruro mercúrico. Su obtención se hace *in vitro* a partir de los aminoácidos libres y extractos hipotalámicos de animales. En la figura 1-4 se muestra la estructura de la Tirotrópina.

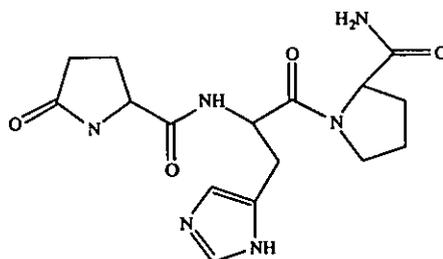


Figura 1-4. Estructura química de la hormona Tirotrópina (TRH).

En la figura 1-5 se muestra la estructura del glutatión que está presente en todos los organismos vivos y se encuentra intracelularmente en concentraciones relativamente altas. Su función es mantener los grupos tiol en las proteínas y otras moléculas, destruir peróxidos y radicales libres, ser coenzima de algunas enzimas, desintoxicar al

³ Urry D.W. & Walter R., *Proc. Natl. Acad. Sci, USA*, **68**, 956 (1971).

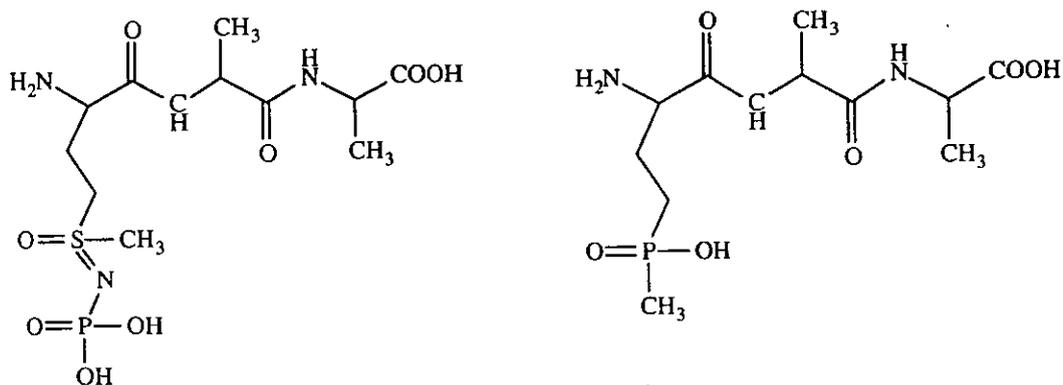


Figura 1-8. Inhibidores de la glutamina sintetasa que poseen fosfinas o sulfoximas .

1.3 Dipéptidos cíclicos.

En ocasiones cuando existen procesos de fermentación o de calentamiento, los péptidos pueden formar 2,5-dioxopiperazinas. Estos compuestos tienen un sabor amargo, y se pueden presentar en bebidas alcohólicas y en los granos tostados de la cocoa. En la tabla 1-1 se presentan algunos ejemplos de dipéptidos cíclicos encontrados en hongos y levaduras.

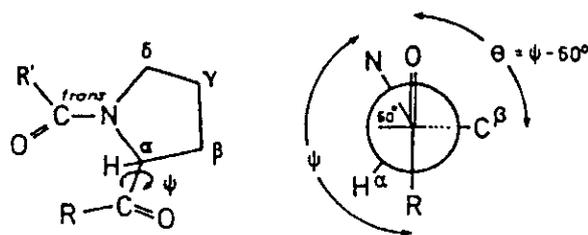
Tabla 1-1. Ejemplos de algunos dipéptidos cíclicos y su procedencia.

Compuesto	Procedencia
ciclo-L-Prolina-L-Leucina	<i>Aspergillus Fumigatus</i> (hongo)
ciclo-L-Prolina-L-Valina	<i>Aspergillus Ochraceus</i> (hongo)
ciclo-L-Prolina-L-Fenilalanina	<i>Roseilinia Necatrix</i> (hongo)
ciclo-L-Prolina-L-Glicina	Levadura
ciclo-L-Prolina-L-Tirosina	Levadura

El hecho de que la prolina esté presente en un número considerable de compuestos cíclicos se debe a que el aminoácido precursor debe adoptar una geometría Z (cis) alrededor del enlace peptídico para poder formar el ciclo. La energía de activación de la isomerización Z-E (cis-trans) de prolina es menor que en el caso de otros péptidos permitiéndole adoptar la geometría más conveniente. Es por esto que su presencia en los péptidos cíclicos no resulta extraña.

Siemion *et al.*⁴ han propuesto una manera muy conveniente de calcular los ángulos de enlace en un péptido cíclico que contiene prolina a partir de datos experimentales de RMN. El cálculo del valor absoluto del ángulo diedro (θ) (figura 1-9) del anillo pirrolidínico se puede determinar a partir de la diferencia de desplazamientos químicos entre el C β y C γ . Esta diferencia es muy susceptible a la geometría adoptada en el enlace peptídico y resulta de gran utilidad cuando el péptido es difícil de cristalizar para hacer un estudio por rayos X.

⁴ Siemion I.Z., Wieland T. & Pook K.H., *Angew. Chem. Internat. Edit.*, 14:10, 702 (1975).



Ángulos diedrales ψ y $\theta = (\psi - 60^\circ) = \text{O}=\text{C}-\text{C}^\alpha-\text{C}^\beta$

Figura 1-9. Representación de los ángulos diedros presentes en la prolina N-sustituida

1.4 Dos aminoácidos interesantes: prolina y ácido γ -aminobutírico (GABA).

1.4.1. Prolina

La prolina es el único de los aminoácidos naturales que es realmente un iminoácido y debido a la cadena lateral cíclica que presenta, su participación dentro de las proteínas es en la definición de la estructura secundaria dando lugar a ciertos arreglos espaciales como son los giros^{5,6,7} que pueden, a su vez, influenciar en la estructura terciaria (α -hélices⁸), generando la exposición de sitios de reconocimiento en interacciones proteicas.

La prolina dentro de los péptidos es un aminoácido poco esperado en una α -hélice y que dada su cadena lateral no polar, se esperaría que estuviera principalmente en ambientes hidrófobos. Sin embargo, existen referencias sobre la presencia de prolina en α -hélice de proteínas transmembranales dando lugar a unos pequeños "bultos" que se sospecha participan en el reconocimiento conformacional, así como a un carácter "extrañamente" hidrofílico de la prolina (comparado con residuos no cíclicos de similar longitud) generado por un factor entrópico que compensa el hecho de no poseer un NH^9 para la formación de puentes de hidrógeno.

1.4.1.1. Equilibrio conformacional de prolina

El anillo pirrolidínico se caracteriza por presentar una gran movilidad generando una serie de arreglos conformacionales que prácticamente resultan isoenergéticos. Ramachandran¹⁰ *et al.* encontraron que existen 2 mínimos locales en la conformación del anillo pirrolidínico en prolina donde $\text{C}\gamma$ se encuentra fuera del plano que forman los 4 átomos $\text{C}\alpha$, $\text{C}\beta$, N y $\text{C}\delta$ cuyo ángulo de torsión (θ) indica que son coplanares. En la figura 1-10 se muestran los 4 átomos que están en un plano y el ángulo diedro que se forma con ellos.

⁵ Boussard G. & Marraud, M., *J. Am. Chem. Soc.*, **107**, 1825 (1985).

⁶ Sak, K., Karelson, M & Järv, J., *Int. J. Quantum Chem* **66**, 391 (1998).

⁷ Rich, D.H. & Jasensky R.D., *J. Am. Chem. Soc.*, **102**:3, 1112 (1980).

⁸ Williams, K. & Deber, C., *Biochemistry*, **30**:37, 8919 (1991)

⁹ Gibbs P.R., Radzicka A & Wolfenden R., *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 4714 (1991).

¹⁰ Ramachandran, G.N., Lakshminarayanan, A., Balasubramanian, R & Tegoni, G., *Biochem. Biophys. Acta*, **221**, 165 (1970).

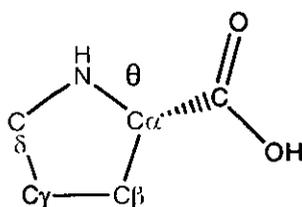


Figura 1-10. Ángulo diedro (θ) que forman $C\delta$, NH, $C\alpha$ y $C\beta$

La primera conformación a la que se refieren Ramachandrán¹⁰ y colaboradores es la llamada conformación A. En donde $C\gamma$ se encuentra del mismo lado que el grupo carboxilo y que es el de menor energía. (conformación endo, figura 1-11).

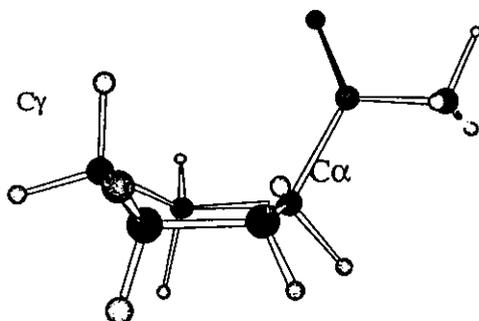


Figura 1-11. Imagen minimizada de prolina en la conformación A (endo)

La energía estérica es de 7.525 y el ángulo diedro (θ) entre $C\beta$, $C\alpha$, N y $C\delta$ es de 6.5° en esta minimización. La minimización se hizo utilizando el programa CHEM-3D basado en cálculos tipo MM2 (Allinger).

La segunda conformación llamada conformación B se presenta cuando $C\gamma$ se encuentra del lado opuesto del carbonilo del ácido y es también llamada conformación exo. Los valores negativos de θ están asociados a esta conformación. La energía estérica de 7.692 y el ángulo diedro (θ) entre $C\beta$, $C\alpha$, N y $C\delta$ es de -6.5° . En la figura 1-12 se muestra la estructura de la conformación exo.

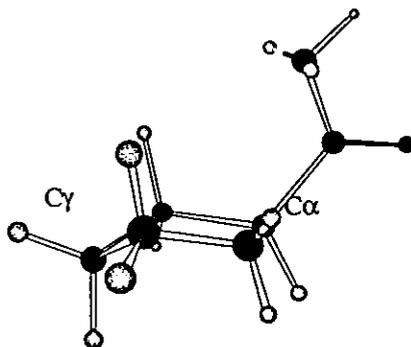


Figura 1-12. Imagen minimizada de la conformación B (exo)

Otros datos interesantes son los de la estructura cristalina del clorhidrato de DL-prolina que muestran al $C\alpha$ fuera del plano generado por los núcleos N, $C\beta$, $C\gamma$ y

Cδ. Es muy posible que este hecho se deba a la protonación que hay sobre el nitrógeno.

Otro caso más lo muestra el *t*-butiloxicarbonil-prolina (BOC-prolina). El grupo *t*-butiloxicarbonil (BOC) es uno de los grupos protectores más utilizados en la síntesis de péptidos y cuya estructura cristalina se conoce desde 1974¹¹. Sus cristales se crecen a partir de soluciones acuosas dando lugar a cristales ortorrómbicos pertenecientes al grupo espacial P2₁2₁2₁. Benedetti *et al*¹¹ evidenciaron un “pliegue” en C_β mostrando que este carbono está fuera del plano que forman los otros 4 átomos por 0.519Å como se muestra en la figura 1-13.

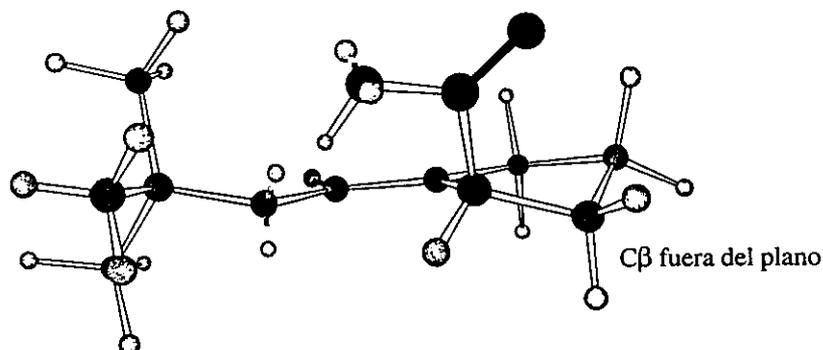
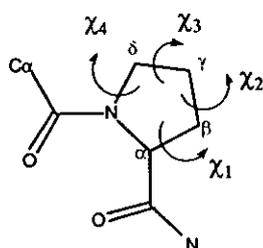


Figura 1-13. Estructura minimizada de BOC-prolina que muestra al C_β fuera del plano.

El grupo de colaboradores de Milner-White¹² llevaron a cabo un estudio de correlación entre la geometría de la prolina y sus ángulos de torsión al estudiar diferentes estructuras cristalinas de proteínas. Con esto se busca inferir la geometría que presentará una proteína al conocer la conformación adoptada por la prolina. En la figura 1.14 se observan los ángulos de torsión del anillo pirrolidínico y su relación con la conformación. En la tabla 1-2 se muestra el resumen de correlación de los ángulos de torsión con la geometría adoptada (cis o trans) de varias proteínas cristalizadas¹¹.



Conformación A: $(\chi_1 + \chi_3 - \chi_2 - \chi_4) > 40^\circ$

Conformación B: $(\chi_1 + \chi_3 - \chi_2 - \chi_4) < 40^\circ$

Figura 1-14. Resumen de los ángulos de torsión de la prolina y su correlación con la de la molécula.

Tabla 1-2. Correlación de Benedetti *et al*¹¹ entre los ángulos de torsión y la geometría preferencial.

Conformación en Proteínas	χ_1	χ_2	χ_3	χ_4
Z (cis) A	-21	363	-36	17
Z (cis) B	26	-38	18	-7
E (trans) A	-27	35	-34	20
E (trans) B	18	-29	17	-4

¹¹ Benedetti, E., Ciajolo, M.R. & Maisto, A., *Act. Cryst* **B30**,1783 (1974).

¹² Milner-White, E.J., Bell, L.H & Maccallum, P.H., *J.Mol.Biol*, **228**, 725 (

1.4.1.2. Equilibrio geométrico de la prolina

Aunado a los factores conformacionales que controlan el arreglo del anillo pirrolidínico, la prolina tiene la posibilidad de encontrarse formando parte de péptidos de geometría tanto Z (cis) como E (trans). Esta isomerización geométrica ha generado varios estudios en donde se aborda del efecto de la cadena lateral sobre la preferencia por alguna de las estructuras geométricas¹³, la influencia de la naturaleza del disolvente¹⁶, el tamaño del grupo acilo en N-acilprolinas¹⁴ o del aminoácido precedente a la prolina¹⁵, así como la determinación de su tasa de isomerización con la utilización de enzimas peptidil-prolil-Z (cis)-E (trans)-isomerasas (PPI) como la ciclopilina y la proteína de unión FK-506 (FKBP)¹⁶.

El origen de la isomerización es comunmente atribuido al carácter de doble enlace de la unión C-N de la amida. El grupo amida tiene una mayor separación de cargas cuando presenta una estructura plana que cuando está ortogonal y la isomerización a través de un estado de transición ortogonal es más rápida y se favorece en disolventes menos polares. Los disolventes próticos restringen la isomerización por la formación de puentes de hidrógeno ya que la carga parcial del oxígeno es mayor en el plano que en las amidas ortogonales⁸. En la figura 1-15 se muestra el equilibrio entre la forma ortogonal y la plana de la prolina.

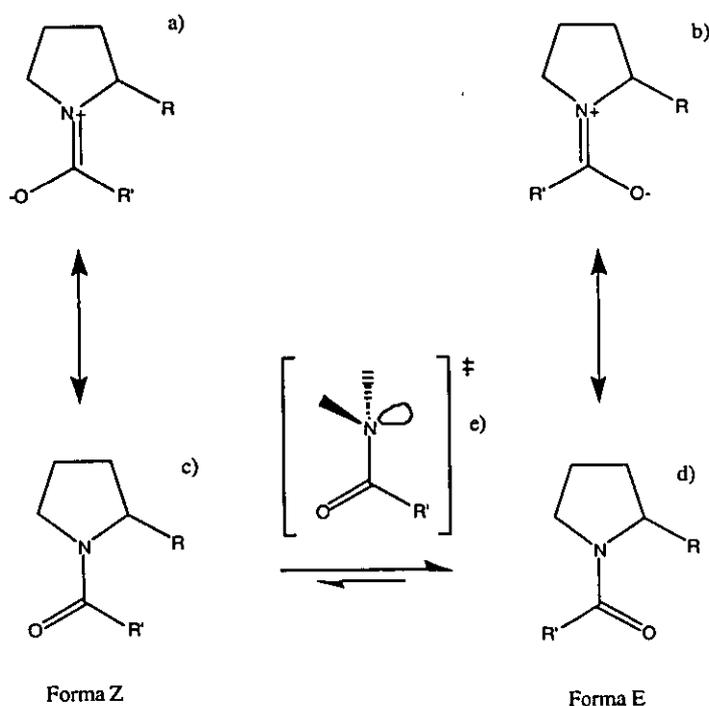


Figura 1-15. Isomerización de la prolina vía un intermediario tetraédrico.

¹³ Reimer, U., Scherer, G., Drewello, M., Kruber, S., Schutkowsky, M., Fischer, G., *J.Mol. Biol.*, **279**, 449 (1998).

¹⁴ Nishihara, H., Nishihara, K., Uefuji, T. & Sakota, N. *Bull.Chem.Soc.Jpn.*, **48**:2,553 (1975)

¹⁵ Grathwohl, C. & Wüthrich K., *Biopolymers* **15**, 2025 (1976).

¹⁶ Eberhardt, E., Loh, S.N., Hinck, A.P. & Raines R.T., *J.Am.Chem.Soc.*, **114**, 5437 (1992).

Esta isomerización Z(cis)-E(trans) ha sido correlacionada por Milner-While *et al*¹² y llegaron a la conclusión de que las Z (cis)-prolinas presentaban una preferencia hacia la conformación B (exo) mientras que E (trans)-prolina presentaba principalmente conformación A (endo).

1.4.2. Ácido γ -aminobutírico (GABA)

El ácido γ -aminobutírico (GABA) también llamado ácido pipérico es un aminoácido que al no ser un alfa aminoácido, no se encuentra en las proteínas y no forma parte de los aminoácidos esenciales. Sin embargo, GABA fue identificado como un constituyente del cerebro en la década de los 50's y desde entonces se ha estudiado su participación en rutas metabólicas cerebrales. A mediados de los años 60's se descubrió que GABA era una sustancia con actividad neurotransmisora. En la figura 1-16 se muestra la estructura tridimensional del GABA.

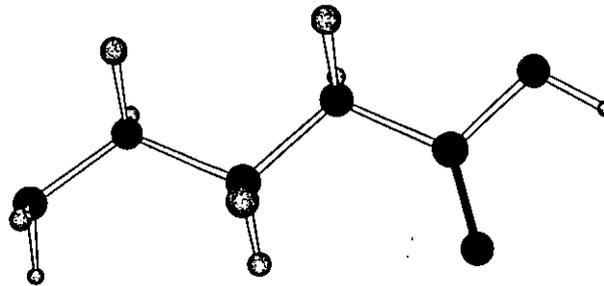


Figura 1-16. Estructura tridimensional de GABA.

Los neurotransmisores son sustancias que contienen las neuronas y que son secretadas para la transmisión de información hacia un objetivo específico de manera post-sináptica. Ellos se clasifican en 2 tipos:

1. Estimulantes. Este tipo de neurotransmisores genera canales iónicos que se abren para permitir un flujo de iones positivos ocasionando la despolarización y la reducción en la resistencia eléctrica membranal.
2. Inhibidores. En este tipo, a través de movimientos selectivos de iones se lleva a cabo una hiperpolarización que ocasiona una disminución en la resistencia membranal.

GABA es el principal neurotransmisor inhibitor del sistema nervioso central de los mamíferos y se produce a través de la acción de la ácido glutámico-descarboxilasa o bien de la hibridación *in situ* del mRNA que codifica para dicha enzima.

Cada neurotransmisor debe tener un sitio de acción y en el caso del GABA, existen (conocidos hasta el momento) dos receptores GABA_A y GABA_B. GABA_A es una proteína pentamérica cuyas subunidades se unen rodeando un "poro" iónico central. Este receptor es un canal de iones Cl⁻ que se abre al momento de detectar el GABA secretado por las neuronas presinápticas. GABA_B es un miembro de la familia de receptores acoplados a proteínas G que participa en diferentes rutas bioquímicas y en la regulación de canales iónicos.

Dentro de los aminoácidos cerebrales el GABA es uno de los que se pueden detectar *in vivo* y utilizando técnicas de marcaje isotópico se puede ir conociendo con exactitud su participación en las diferentes rutas metabólicas. En la figura 1-17 se muestra un ejemplo de la participación de GABA en el ciclo del ácido tricarboxílico así como su generación a partir de glutamato.

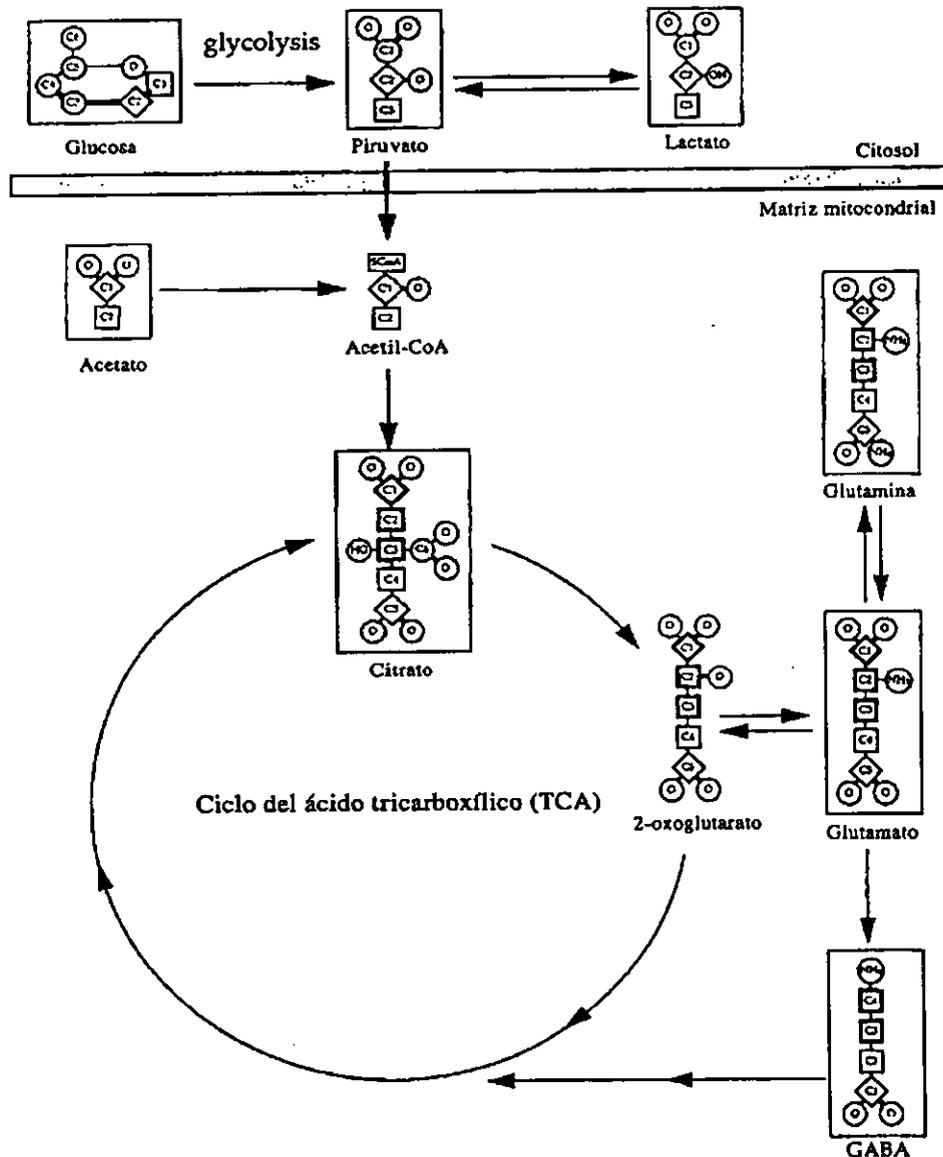


Figura 1-17. Principales metabolitos involucrados en la glicólisis, en el ciclo del ácido tricarboxílico y la formación de aminoácidos en células eucariotas¹⁷.

Además de la alanina, aspartato, glicina, entre otros, el GABA puede ser observado con resonancia protónica en 500 MHz al llevar a cabo variaciones en los tiempos de relajación así como la supresión de disolvente en muestras de corteza de los cerebros

¹⁷ Graaf R.A. de, *In vivo NMR Spectroscopy Principles & Techniques*, John Wiley & Sons, 1990.

humanos. En la figura 1-18 se muestra el espectro de un extracto perclórico de la corteza del cerebro humano. GABA muestra sus 3 señales características.

Corteza Humana

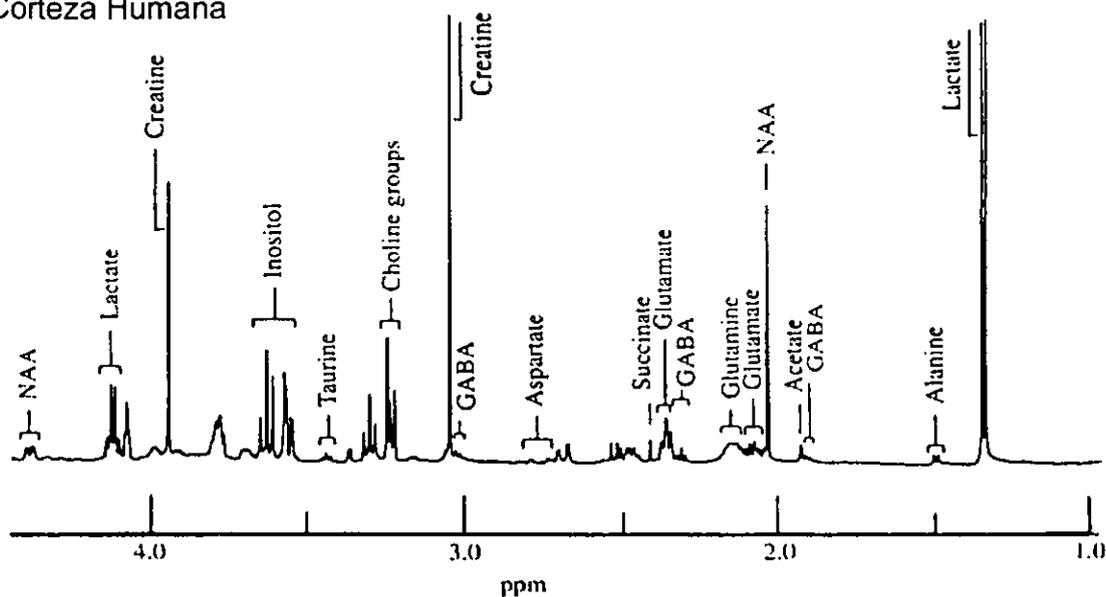


Figura 1-18. Espectro protónico en 500 MHz. Extracto perclórico de tejido de corteza de cerebro humano sin patología alguna¹⁸

Capítulo 2.

Síntesis y análisis de péptidos

2.1. Síntesis de péptidos

La síntesis de péptidos ha sido un reto al que se han enfrentado los químicos desde el inicio del siglo XX. Los métodos clásicos de la síntesis de péptidos en solución ofrecieron una deficiencia con respecto a la demanda requerida ya que incluso en manos expertas, los rendimientos resultaban ser insatisfactorios.

Existen algunos aspectos a considerar en la síntesis de péptidos:

- Grupos protectores de los grupos funcionales.
- Formación de enlaces peptídicos.

2.1.1. Grupos protectores

Para llevar a cabo la formación de un enlace peptídico, es necesario el uso de grupos que protejan los grupos funcionales presentes en los diferentes aminoácidos. Estos grupos protectores también permiten romper el dipolo o carácter de ion doble (zwitterion) de los aminoácidos y péptidos, evitar la formación de puentes de hidrógeno, etc. En la figura 2-1 se muestra un esquema simplificado de una síntesis utilizando grupos protectores (x ó y).

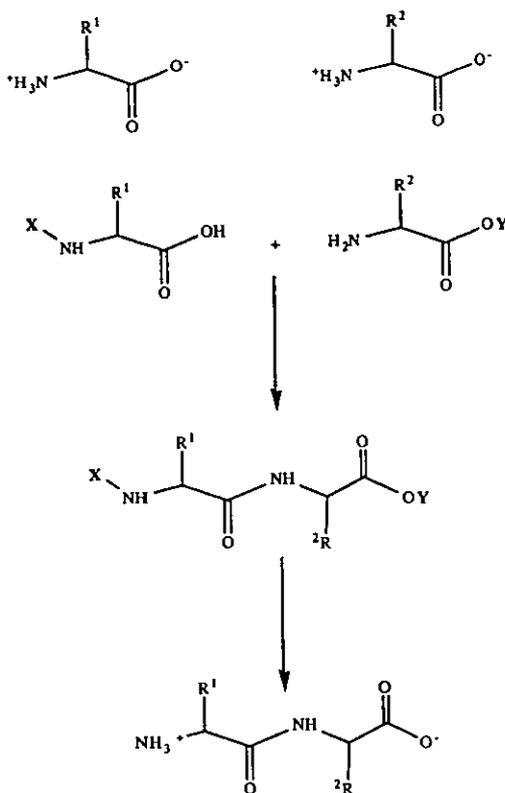


Figura 2-1. Esquema general de la síntesis de péptidos usando grupos protectores.

Los grupos protectores deben poseer las siguientes características:

- Facilidad de incorporación
- Estabilidad química
- Reducción de la actividad de los grupos funcionales presentes.
- Prevención de la racemización
- Facilidad de remoción.

Sobre la base del tiempo de permanencia del grupo protector se pueden clasificar en:

- Permanentes: Son removidos hasta que el péptido está completamente formado.
- Temporales: Son removidos en pasos intermedios

Para escoger el grupo protector apropiado se debe tomar en consideración la estrategia a seguir dado que hay ciertos grupos que se adecuan más a ciertas condiciones de reacción. Una de las estrategias es utilizando un grupo protector permanente en el grupo amino y una serie de grupos protectores temporales para el carboxilo. Esta estrategia permite que se puedan hacer reacciones a través del carboxilo. En la figura 2-2 se muestra un esquema de una síntesis de péptidos con un grupo protector temporal en el carboxilo.

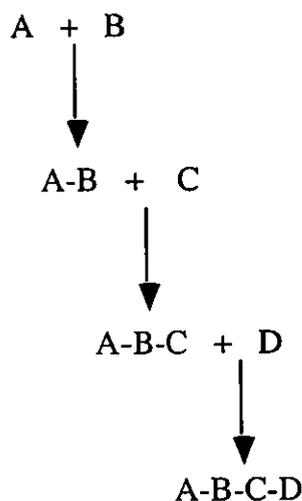


Figura 2-2. Esquema de síntesis de péptidos con un grupo protector permanente en el grupo amino y protectores temporales para el ácido.

Otra alternativa de la elongación de la cadena es utilizando un grupo permanente en el grupo carboxilo y una serie de grupos temporales en el grupo amino. Esta estrategia tiene la ventaja de que las condiciones de hidrólisis de los grupos temporales del amino no son tan drásticas y se evita la formación de subproductos. Esta estrategia es la más usada en la síntesis en fase sólida. Esta es muy utilizada actualmente para la síntesis de péptidos y su principio será descrito un poco más adelante en el texto. En la figura 2-3 se muestra un esquema de síntesis utilizado esta estrategia.

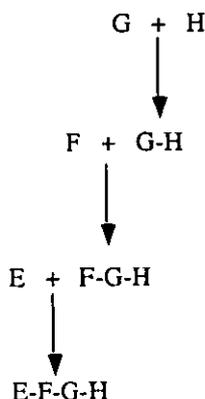


Figura 2-3. Estrategia de elongación a partir del carboxilo.

2.1.1.1. Grupos protectores del grupo amino^{18,19}

Dentro de los primeros grupos protectores que se utilizaron se encuentra el benciloxycarbonilo. Este grupo se elimina fácilmente con hidrogenólisis lo que lo hace un muy buen grupo protector temporal y es en general muy estable a la racemización. En la figura 2-4 se muestra la estructura del ácido benciloxycarbonilo.

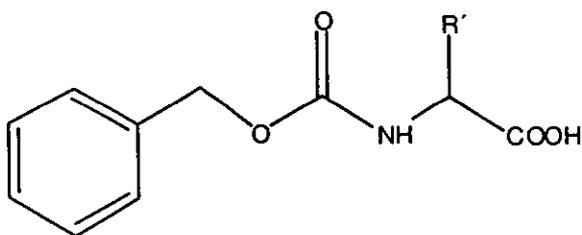


Figura 2-4. Aminoácido con el grupo protector benciloxycarbonilo.

Existen otros grupos protectores complementarios al benciloxycarbonilo, como el *t*-butiloxycarbonil²⁰ (t-BOC ó BOC). El BOC no es afectado por la hidrogenólisis catalítica sino que su hidrólisis se da bajo condiciones relativamente suaves como el ácido trifluoroacético en temperatura ambiente. Así, las propiedades hidrolíticas de ambos resultan complementarias facilitando una hidrólisis selectiva. Existen otros grupos protectores que se han utilizado en situaciones muy específicas y que se muestran a continuación en la figura 2-5.²¹

¹⁸ Bodanszky, M. and Bodanszky, A., *The Practice of Peptide Synthesis*, 2nd. Ed, Springer-Verlag, Berlin, 1994.

¹⁹ Jones J., *Amino Acid and Peptide Synthesis*, Oxford University Press, Oxford, 1992.

²⁰ Itoh M., Hagiwara D. & Kamiya T., *Tetrahedron Letters*, (1975), 49, 4393.

²¹ TROC: Windholz T.B & Johnston D.B.R., *Tetrahedron Letters*, 27, 2555 (1967) y Carson J.F., *Synthesis*, 268 (1981).

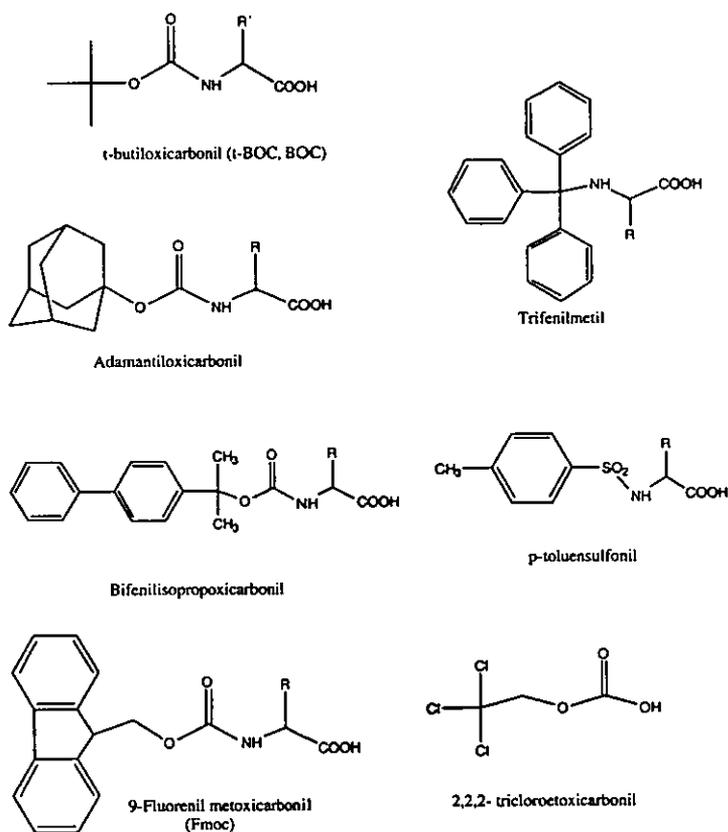


Figura 2-5. Grupos protectores para el grupo amino²².

2.1.1.2. Grupos protectores del grupo carboxilo¹⁹

Los grupos más utilizados son los ésteres metílico y etílico, pero la hidrólisis en medios acuosos básicos suelen presentar algunas complicaciones. De ahí que otros grupos utilizados sean los ésteres bencílico y *t*-butílico cuya hidrólisis es a través de hidrogenólisis. En la figura 2-6 se muestra la estructura de estos compuestos.

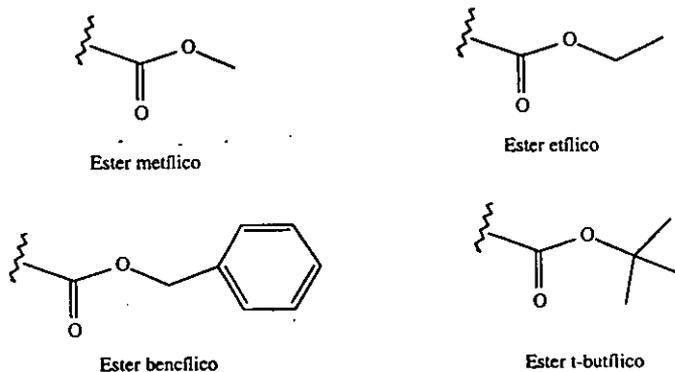


Figura 2-6. Grupos protectores del carboxilo.

²² FMOC: Carpino L.A. & Han G.Y., *J. Org. Chem.*, 37:22, 3404 (1972).

2.1.2. Formación de enlaces peptídicos

Son varias las estrategias utilizadas para llevar a cabo la unión peptídica. En la literatura se reportan una gran cantidad de reactivos de acoplamiento que se han utilizado con exitosos resultados²³.

2.1.2.1. Activación del carboxilo a través de haluros de acilo¹⁹

Una de las formas más simples de aproximación a la formación del péptido es llevando a cabo la activación del grupo carboxilo a través de la formación del cloruro del ácido seguido por la reacción con el éster del aminoácido bajo condiciones Shotten-Baumann. Sin embargo la reacción es muy vigorosa para ser compatible con los sustratos y se lleva a cabo la ciclización espontánea dando lugar a la generación de oxazolonas y péptidos racémicos.

2.1.2.2. Activación del carboxilo a través de anhídridos

Como alternativas a la formación del cloruro de ácido se encuentra el uso del monoetil carbonato como grupo protector del carboxilo en combinación con el BOC. En la figura 2-7 se muestra la estructura del monoetil carbonato.

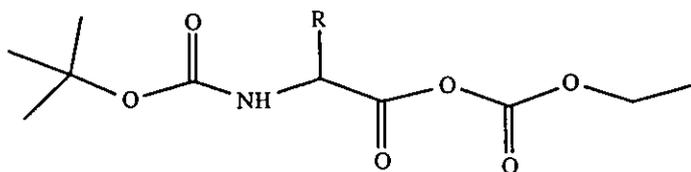


Figura 2-7. Aminoácido protegido con BOC en el amino y con monoetil carbonato en el carboxilo.

Para la síntesis en fase sólida se utilizan anhídridos simétricos como el que se muestra a continuación en la figura 2-8.

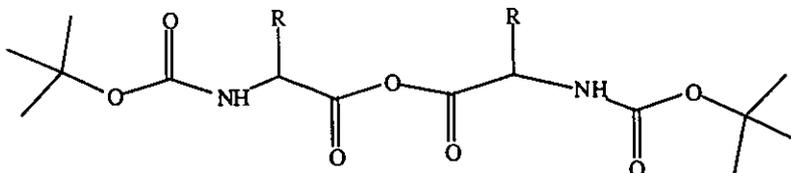


Figura 2-8. Anhídrido simétrico usado en síntesis en fase sólida.

La utilización de anhídridos simétricos da la ventaja de una aminólisis sin ambigüedades. Sin embargo solamente la mitad del componente carboxílico usado se incorpora al producto. En estos casos se puede recurrir al uso de anhídridos asimétricos¹⁹.

2.1.2.3. Activación por medio de agentes acoplantes

Existe una gama de reactivos utilizados como agentes acoplantes²⁴ y dentro de los agentes acoplantes más utilizados y que se conocen desde los años 50's es la dicitohexilcarbodiimida (DCC). La DCC reacciona con el grupo ácido de los

²³ Klausner Y.S. and Bodansky M., *Synthesis*, 453 (1972).

aminoácidos para formar un aducto inicial, (O-acilisourea). En la figura 2-9 se muestra la estructura de la DCC y del complejo activado la O-acilisourea.

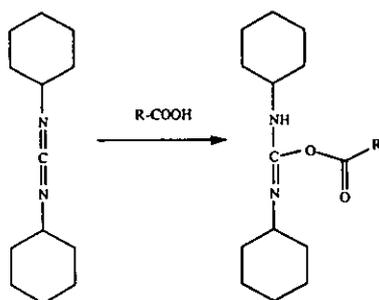


Figura 2-9. Formación del aducto inicial producto de la activación del carboxilo con DCC.

Esta O-acilisourea no ha sido aislada²⁴ pero dependiendo de las condiciones puede reaccionar posteriormente dando lugar a una serie de productos:

- En ausencia de un nucleófilo (el grupo amino o exceso de carboxilato) puede reasegurarse a la N-acilurea, la cual es muy estable.
- En presencia de un exceso de carboxilato, es decir un equivalente de DCC y 2 equivalentes del aminoácido, el aducto es atacado por el carboxilo formando el anhídrido y la respectiva dicitclohexilurea.
- En presencia del grupo amino el aducto reacciona con ésta para formar el derivado peptídico y la correspondiente dicitclohexilurea. Esta reacción se genera en un solo paso por la adición del amino, del ácido y de la carbodiimida.

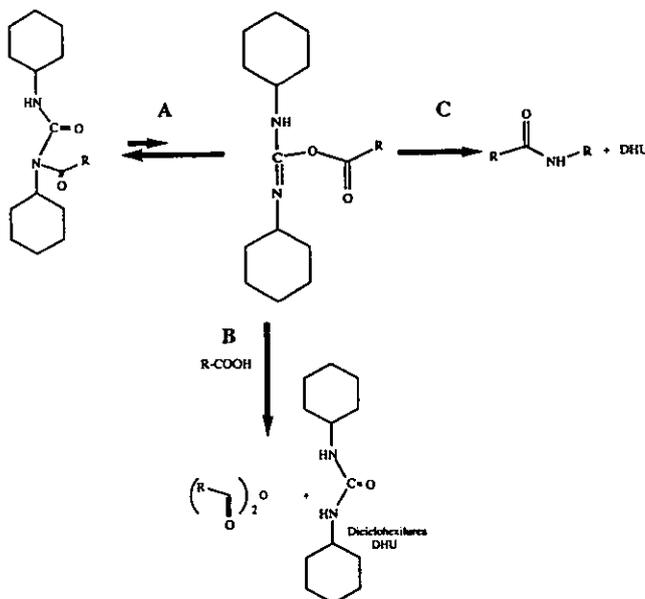


Figura 2-10. Reacciones posibles del aducto en diferentes condiciones de reacción: A) rearrreglo a la N-acilurea; B) con un exceso de carboxilo; C) en presencia de un grupo amino y formación del péptido.

²⁴ Atherton E., Sheppard R.C., *Solid Phase Peptide Synthesis. A practical approach.*, IRL press at Oxford University Press, England, 1989.

2.1.2.4. Desventajas de la síntesis en solución

Uno de los problemas a los que se enfrentó la síntesis clásica en solución es la serie de inconvenientes que se presentan cuando los péptidos empiezan a crecer en tamaño. Dentro de los principales problemas están la solubilidad y la purificación de dichos péptidos así como los rendimientos de reacción, que aún en manos expertas, resultaban considerablemente bajos. De ahí la necesidad de desarrollar una estrategia tal que permitiera poder sintetizar grandes péptidos y proteínas de manera fácil, rápida, limpia y con rendimientos altos; y ello se logró con la síntesis en fase sólida.

2.1.3. Síntesis en fase sólida

La síntesis en fase sólida fue desarrollada por R.B. Merrifield en 1962 cuando describió la preparación del tetrapéptido leucil-alanil-glicil-valina por adición sucesiva de aminoácidos benciloxicarbonilados a una resina de poliestireno-divinilbenceno (2%)²⁵. En la figura 2-11 se describe esquemáticamente el funcionamiento de la síntesis en fase sólida.

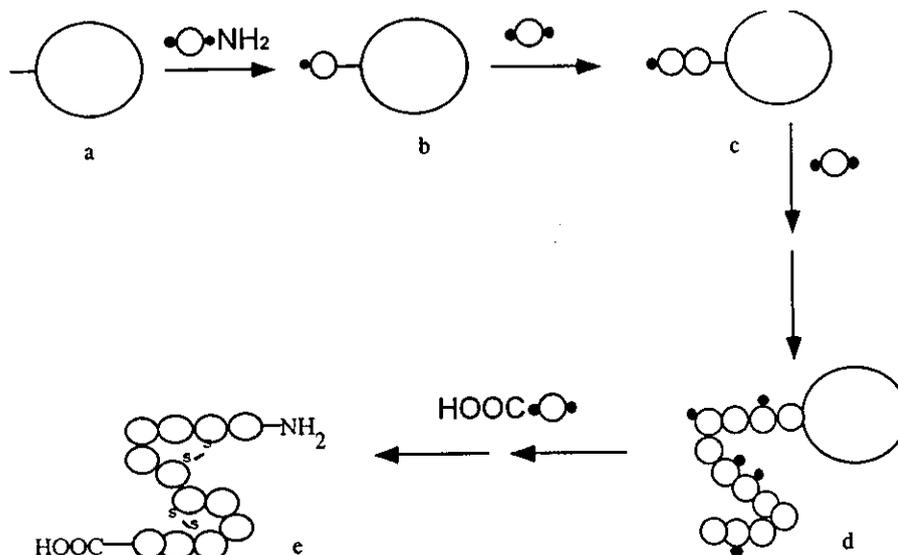


Figura 2-11. Esquema general de la síntesis en fase sólida. a) funcionalización de la resina, b) adición de un BOC-aminoácido con sus grupos funcionales laterales protegidos, c) adición de otro BOC-aminoácido, d) obtención final del péptido con grupos protegidos, e) péptido libre ya con los grupos desprotegidos.

En este método se pueden considerar 3 pasos importantes.

- El primer aminoácido queda unido químicamente a la resina.
- Los aminoácidos subsecuentes se unen al primer aminoácido para generar el péptido correspondiente.
- Finalmente el péptido deseado se separa de la resina y así la purificación y la caracterización se hace en solución.

²⁵ Merrifield, B., *J. Am. Chem. Soc.*, 85, 2149, (1963).

Dentro de los problemas que se presentan en la síntesis en fase sólida²⁶ se encuentran las reacciones no cuantitativas, ortogonalidad incompleta entre los grupos protectores temporales y los permanentes y reacciones laterales principalmente. Sin embargo, son más las ventajas que las desventajas ya que se ha logrado llevar a cabo la síntesis en fase sólida automatizada minimizando los tiempos de reacción y optimizando los rendimientos²⁰.

2.2. Análisis de péptidos

Durante este proceso de síntesis en fase sólida resulta difícil el uso de técnicas espectroscópicas convencionales para ir evaluando el avance de la reacción. Una manera fácil de hacerlo, sin necesidad de la separación de la resina, es el uso de técnicas cualitativas coloridas como la técnica de Kaiser que puedan evidenciar el fin de la reacción. Dentro de estas técnicas está el uso de ninhidrina y ácido trinitrobencensulfónico para mostrar los residuos de los aminoácidos unidos a la resina. Para el caso de prolina, el uso de ninhidrina dará una coloración azul o bien ligeramente café, aunque se prefiere para este aminoácido utilizar la prueba de la Isatina.

Otras técnicas se basan en el uso de isótopos radioactivos o en la medición de la conductividad eléctrica para ir siguiendo las protecciones, desprotecciones de los grupos funcionales y la unión final del aminoácido al péptido dando claras muestras del avance de reacción.²⁷ La conductimetría es la técnica más utilizada en la síntesis automatizada de péptidos.

La síntesis en fase sólida ha llegado a tal desarrollo que se pueden utilizar resinas fotosensibles facilitándose la química combinatoria. El desarrollo de la RMN de sólidos ha marcado un hito al permitir dar seguimiento de reacción cuando todavía se encuentra el péptido directamente unido a la resina²⁸.

Una vez que se separa el péptido de la resina se pueden emplear las técnicas comunes de elucidación y caracterización espectral: resonancia magnética nuclear y espectrometría de masas. En el caso de las proteínas se prefiere sintetizarlos con un enriquecimiento isotópico con ¹⁵N, ¹³C y en ocasiones ²H.

²⁶ Jones John, **The Chemical Synthesis of Peptides**, Clarendon Press, Oxford, 1994.

²⁷ Jones J.H. Senior Reporter, **Amino Acids and Peptides. A Review of the Literature Published during 1984**, Vol. 17, The Royal Society of Chemistry, Burlington House, London, 1984.

²⁸ *Tetrahedron*, **40**,4141(1984).

Capítulo 3.

RMN Dinámica

En ocasiones los espectros de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) presentan señales anchas junto a señales que se ven finas. Estas señales anchas empiezan a hacerse más finas al elevar la temperatura, y empiezan a presentar multiplicidad a medida que se baja la temperatura. Este hecho está relacionado con procesos dinámicos de intercambio, ya que el ancho del pico (anchura de la señal: "lineshape") es sensible al proceso de intercambio químico. Esto permite que la RMN se pueda utilizar en el estudio de las reacciones reversibles rápidas bajo el nombre de Resonancia Magnética Nuclear Dinámica (RMND).

3.1. Factores físicos que afectan el ancho de pico

Dentro de la teoría de probabilidad de transición se predice una señal de absorción infinitamente delgada cuando la frecuencia de la radiofrecuencia aplicada iguala exactamente la frecuencia asociada a la diferencia energética entre los dos niveles permitidos para una transición cualquiera. (considerando núcleos con $I=1/2$).

En la práctica, sin embargo, las líneas de absorción se ven ensanchadas por diversos factores provocando que la absorción se dé a lo largo de un rango de frecuencias. Experimentalmente las líneas de absorción tienen una forma Lorentziana descrita en la ecuación 3-1.

$$g(\nu) = \frac{a}{b^2 + (\nu - \nu_0)^2} \quad \text{ecuación 3-1.}$$

a,b= constantes

ν_0 = frecuencia de absorción

ν = frecuencia de Larmor

Dentro de los factores que afectan el ancho de pico se encuentran:

3.1.1. Inhomogenidad de campo magnético

El campo magnético externo, B_0 , no es completamente homogéneo, lo que provoca que las moléculas experimenten ligeras diferencias en el campo magnético efectivo. (ecuación 3-2)

$$B = B_0(1 - \sigma) \quad \text{ecuación 3-2.}$$

Esto provoca que la absorción de la energía se dé en un rango de frecuencias cuya superposición da lugar al ancho de pico observado. Actualmente las inhomogenidades magnéticas del imán principal no sobrepasan modificaciones en las señales mayores a 0.1 Hz.

3.1.2. Efectos de relajación

3.1.2.1. Relajación Longitudinal (espín-red), T_1

Cuando una molécula absorbe energía, el equilibrio de sus estados de espín se ve alterado. Si la magnetización M_0 cambia de orientación 90° , las poblaciones en ambos niveles de energía (cuando $I=1/2$) se igualan, mientras que un cambio de magnetización de 180° provoca que las poblaciones se inviertan por completo.

Con el paso del tiempo la magnetización original en el eje z (M_z) alterada por un cambio de 90° ó de 180° se recupera paulatinamente como se muestra en la figura 3-1.

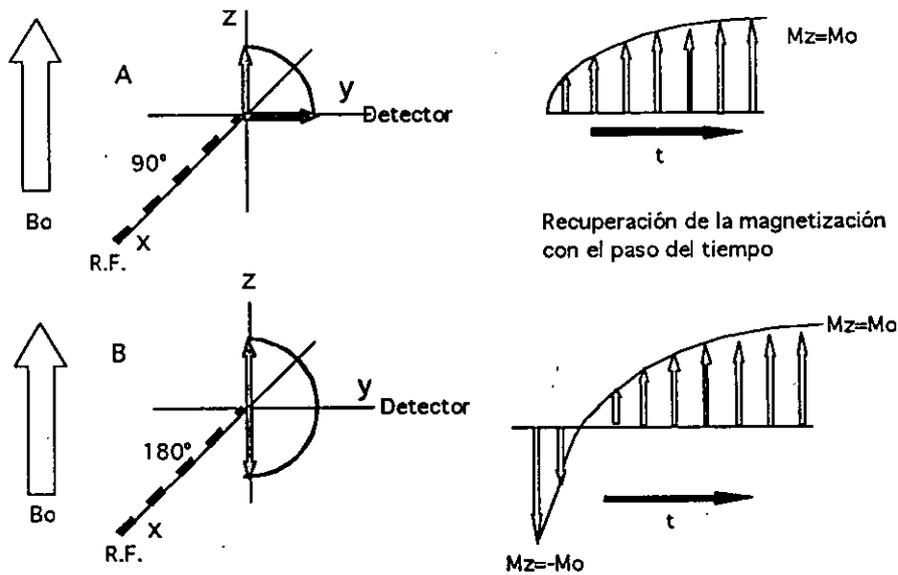


Figura 3-1. A). Tras la aplicación del pulso de 90° la magnetización cambia del eje z al eje y donde está el detector. Con el paso del tiempo, la magnetización en el eje z se va recuperando poco a poco. B). El pulso de 180° tiene a la magnetización en z completamente invertida y se va recuperando poco a poco.

La rapidez de esta variación en la magnetización a lo largo del eje z está descrita por las ecuaciones diferenciales propuestas por Bloch y se muestra en la ecuación 3-3.

$$\frac{dM_z}{dt} = \frac{M_z - M_0}{T_1} \quad \text{ecuación 3-3.}$$

M_z = Componente en el eje z de la magnetización.

M_0 = Magnetización original

T_1 = Constante de tiempo de recuperación de la magnetización original $M_z = M_0$.

La disipación de la energía absorbida se propaga hacia el medio provocando un aumento en la energía térmica de los alrededores (proceso que se asocia a la entalpia del proceso). Una de las formas principales de esta relajación espín-red es vía

interacción dipolar y su descripción teórica obedece a una relación de proporcionalidad.

$$\frac{1}{T_1} \propto \tau_c \approx \nu_{1/2} \quad \text{ecuación 3-4.}$$

El tiempo de correlación, τ_c , está definido como el tiempo que tarda una molécula en dar un giro de 1 radian y de acuerdo a la ecuación 3-4, este tiempo está relacionado con el tiempo de relajación T_1 , y el ancho de pico a media altura $\nu_{1/2}$. De manera general se puede pensar que *entre más rápido se mueva una molécula, mayor será su T_1 , y más delgado será el pico*. Esto se muestra esquemáticamente en la figura 3-2.

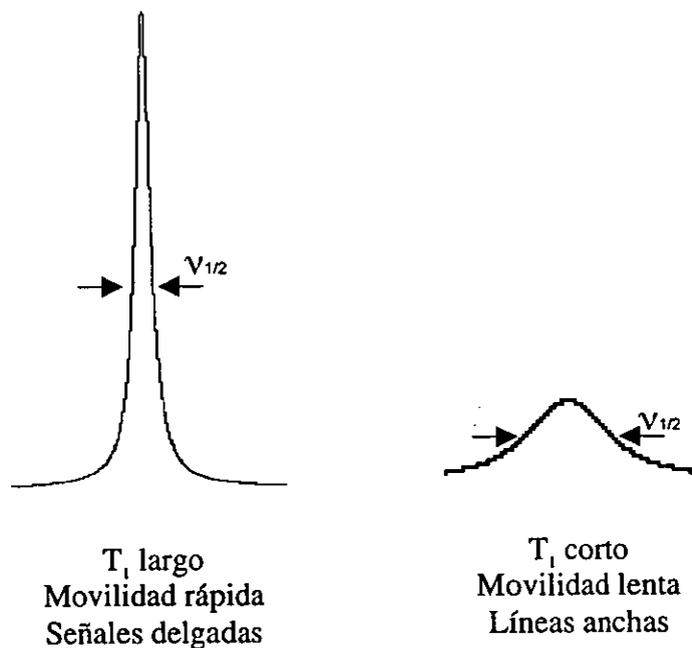


Figura 3-2. Relación ancho de banda con rapidez de movilidad

Este ensanchamiento provocado por T_1 se explica utilizando el principio de incertidumbre de Heisenberg:

$$\Delta E \Delta t \cdot h$$

como $\Delta E = h \Delta \nu$

$$\Delta \nu \cdot 1/\Delta t$$

El tiempo de relajación de los protones está en el orden de segundos, en cambio los núcleos de ^{13}C pueden variar desde milisegundos en macromoléculas hasta cientos de segundos en moléculas pequeñas. En líquidos viscosos o en sólidos las interacciones entre los momentos magnéticos de los núcleos adyacentes dan lugar a un mayor ensanchamiento que el predicho por la relajación espín-red.

3.1.2.2. Relajación transversal (espín-espín), T_2

Este tipo de relajación se manifiesta cuando un núcleo (A), experimenta un campo magnético ligeramente más intenso que otro núcleo (B). Cuando la magnetización de estos núcleos se encuentran en el plano x-y (después de un pulso de 90°) el núcleo A experimenta una frecuencia de resonancia mayor que la del núcleo B haciendo que A gire en el plano más rápido que un sistema de referencia mientras que B girará más lento que el mismo sistema. Esto con el paso del tiempo hace que las magnetizaciones en el plano x-y del núcleo A y del B se empiecen a separar. En la figura 3-2 se muestra de manera esquemática la magnetización de A y B en el plano. En ella se ve como el núcleo A va más rápido que la referencia mientras que B va más lento que la misma. Esto provoca que haya una pérdida de fase entre las señales de los núcleos A y B.

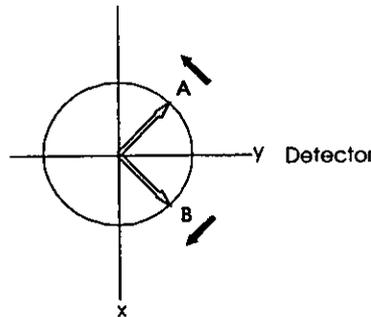


Figura 3-3. Magnetización de dos núcleos A y B en el plano precesando con frecuencias diferentes. Con respecto a una frecuencia de referencia pareciera que se fueran separando.

En el detector se puede ver que con el paso del tiempo la señal de M_y va disminuyendo. Sin embargo si se le aplica un pulso de 180° en el eje de las x, se provocará un torque de la proyección de A y B en el eje de las y, cambiando su orientación.(figura 3-4)

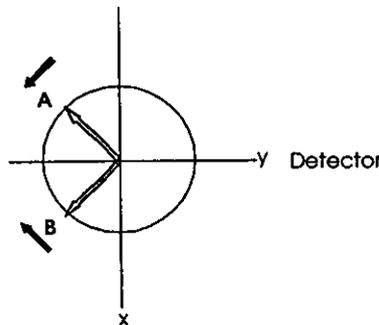


Figura 3-4. Magnetización de los núcleos A y B tras un pulso de 180° (espín-eco).

Los núcleos A y B tras un tiempo determinado vuelven a entrar en fase y llegan a tener la magnitud máxima, pero con signo contrario: $-M_y$. La rapidez de variación de la magnetización M_y está relacionada con un segundo tiempo de relajación T_2 descrita por la ecuación 3-5.

$$\frac{dM_y}{dt} = \frac{-M_y}{T_2} \quad \text{ecuación 3-5}$$

La energía total del sistema de espín no cambia y la relación de T_2 con el ancho de banda está descrito por la ecuación 3-6.

$$v_{1/2} = \frac{1}{\pi T_2} \quad \text{ecuación 3-6}$$

La contribución de T_2 al ancho de pico puede ser minimizada ya que T_2 en RMN de líquidos siempre será menor o igual a T_1 .

3.1.3. Otros factores

El ensanchamiento provocado por núcleos con $I > 1/2$ que presentan propiedades cuadrupolares es producto de una relajación más eficiente provocando tiempos de vida media del estado de espín menores y con ello un ensanchamiento de la señal. Asimismo los compuestos que poseen electrones desapareados (paramagnéticos) presentarán un ensanchamiento en las señales.

3.2. Factor químico que afecta el ancho de pico (Intercambio Químico)

Los efectos de ensanchamiento de pico provocados por el intercambio químico se ilustran con el estudio de algunos equilibrios en temperatura variable.

3.2.1. Equilibrio de la N,N-dimetilformamida

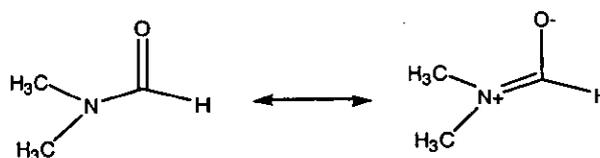


Figura 3-5. Estructuras en equilibrio de la N,N-dimetilformamida

Dado el carácter de doble enlace parcial que se presenta en el enlace N-CO de la amida representado en la figura 3-5, los 2 metilos se encuentran en ambientes magnéticos diferentes dando lugar a una frecuencia de resonancia diferente para cada uno, es decir los núcleos son **anisocrónicos**.

La rotación interna alrededor del enlace N-CO da lugar a un intercambio intramolecular de los grupos metilo: (A) \rightleftharpoons (A'). En la figura 3-6 se muestra el equilibrio de interconversión en donde el metilo (A) a través de una rotación se vuelve (A').



Figura 3-6. Ilustración del equilibrio presente en la N,N-dimetilformamida.

Debido a la barrera energética de rotación (88 KJ/mol ó 21 kcal/mol) este intercambio es lento en temperatura ambiente y el tiempo de residencia de los 2

metilos en las posiciones Z (cis) o E (trans) al carbonilo es largo, con lo que se observan 2 señales diferentes de resonancia para cada metilo. Al ir aumentando la temperatura se logra vencer el impedimento energético aumentando la tasa de intercambio y dando lugar a una coalescencia que hace indistinguibles al metilo Z (cis) del E (trans).

3.2.2. Equilibrio de la 2-metiloxepina

Una situación similar se presenta con la 2 α -metiloxepina que tiene un equilibrio químico con el óxido de 2-metil benceno como se presenta en la figura 3-7.



Figura 3-7. Equilibrio del óxido de 2-metil benceno y la 2 α -metiloxepina.

En temperatura ambiente la barrera energética de este equilibrio es de 30 kJ/mol (7 kcal/mol). Este valor indica que la tasa de intercambio es alta por lo que se presenta un intercambio rápido y una sola señal para el metilo.

Si se desea ver la señal para cada isómero, es necesario disminuir la temperatura con el fin de reducir la tasa de intercambio. En este caso, al bajar la temperatura hasta -123°C se pueden apreciar ambos isómeros. En la figura 3-8 se puede ver la aparición de una señal pequeña en -123°C correspondiente al metilo de la 2 α -metiloxepina

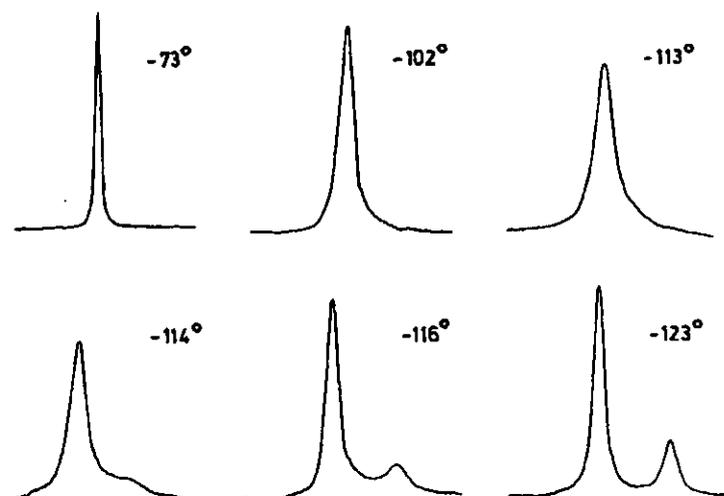


Figura 3-8. Espectro ^1H del metilo de la 2 α -metiloxepina en función de la temperatura. El isómero mayoritario es la 2-metiloxepina y el minoritario es el óxido de 2-metil benceno²⁹.

²⁹ Günther Harald, NMR Spectroscopy Basic Principles, concepts, and Applications in Chemistry, 2nd Ed, John Wiley & Sons, 1995.

3.2.3. Equilibrio del metanol

Un tercer equilibrio involucra un acoplamiento espín-espín que solo es distinguible en bajas temperaturas como en el caso del metanol (CH_3OH). En la figura 3-9, cuando la temperatura es de -65°C se aprecia el acoplamiento entre los protones del metilo y del OH. El desplazamiento químico de la señal del alcohol (OH) se mueve hacia bajas frecuencias ya que los enlaces de puentes de hidrógeno se disocian al ir aumentando la temperatura.

Los tres casos antes mencionados tienen un momento de coalescencia de las señales en donde el equilibrio empieza a ser más rápido provocando un ensanchamiento de la señal. Lo importante de estos experimentos es el hecho de obtener información termodinámica y cinética del proceso de equilibrio.

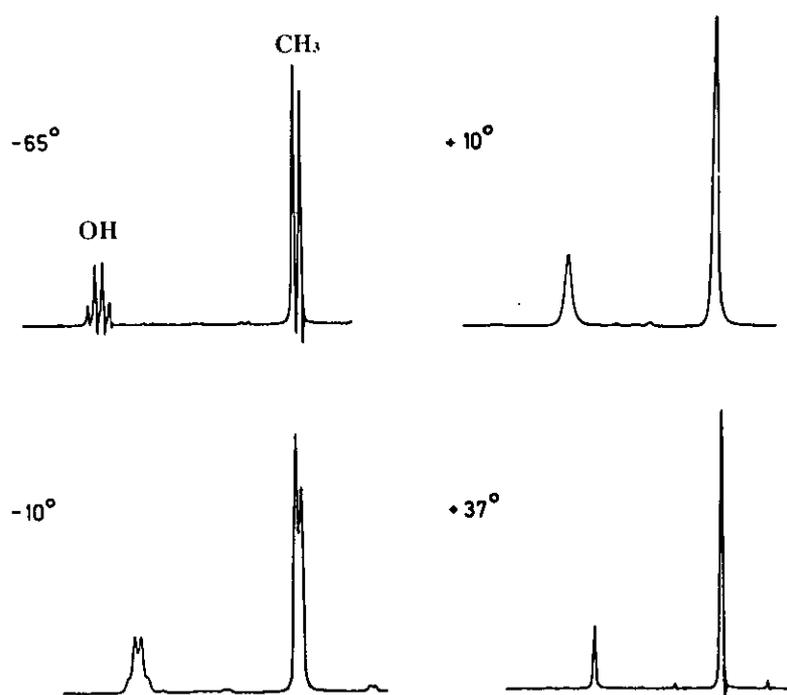


Figura 3-9. Espectros de MeOH a -65°C a 37°C . Figura tomada del libro Günther³⁹. La coalescencia se presenta a los 10°C .

3.3. La escala de tiempo en RMN³⁶

Para que un intercambio químico se pueda apreciar utilizando la RMN, es necesario que el tiempo de vida de un núcleo (τ) en una posición sea lo suficientemente largo que permita que la frecuencia de detección sea la adecuada. De acuerdo al principio de incertidumbre de Heisenberg expresado en la ecuación 3-7, el límite de τ está dado por

$$\tau\Delta\nu \approx 1/2\pi \quad \text{ecuación 3-7}$$

Donde $\Delta\nu = \Delta E/h = \nu_A - \nu_B$ ecuación 3-8

y ν_A y ν_B son las frecuencias de resonancia de 2 núcleos diferentes.

Como se mencionó anteriormente (Capítulo 3 sección 3.1) cuando τ es muy pequeña $\Delta\nu$ debe ser grande, lo que implica que cuando el tiempo de vida de un núcleo en una posición es corto la diferencia de frecuencias debe ser grande para que puedan ver 2 señales diferentes, de lo contrario se tendrá un espectro promedio y una sola señal.

El tiempo de vida de un núcleo es también una función del campo magnético externo. Hasta el momento la tasa de intercambio lenta en el orden de 10^5 s^{-1} en temperatura ambiente pueden ser observados por RMN con facilidad.

3.4. Coalescencia²⁹

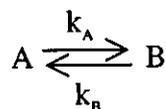
La *coalescencia* es el fenómeno que se presenta cuando dos señales se van uniendo al ir aumentando la temperatura y deja de existir el valle entre ellas. Se le llama temperatura de coalescencia (T_c) a la temperatura en la que dicho fenómeno se presenta. Por el contrario la *des coalescencia* es el fenómeno en el cual una señal se separa en 2 ó más señales al bajar la temperatura. A partir de la temperatura de coalescencia se pueden determinar propiedades fisicoquímicas importantes como lo son:

- Energía libre de activación
- Constante de equilibrio de intercambio.
- Parámetros termodinámicos ΔG , ΔH y ΔS

3.5. Descripción Cuantitativa de RMN Dinámica²⁹

Para lograr una descripción cuantitativa que involucre parámetros de RMN, de cinética química y de termodinámica química es necesario relacionar el ancho de pico (lineshape) con el tiempo de vida de los protones en diferentes ambientes magnéticos. Si se considera que las ecuaciones de Bloch describen el ancho de pico como una función de la frecuencia (ν) y la relajación transversal (T_2) y por otro lado los procesos de intercambio químico representan un proceso efectivo de relajación transversal (T_2), la variación en el ancho de pico se puede expresar como una función de T_2 (Capítulo 3 sección 3.2.2).

Definiendo el equilibrio de intercambio químico entre dos especies A y B como:



La magnetización en el plano x,y de A (M_A) se verá incrementada con la llegada de núcleos de B en una proporción de $k_B M_B$. Por otro lado la magnetización de A se verá disminuida por aquellos núcleos de A que parten hacia B en una proporción $k_A M_A$. Así con una serie de consideraciones se llega a la ecuación que describe el ancho de pico (lineshape $g(\nu)$)²⁹ que se presenta en la ecuación 3-9.

$$g(\nu) \equiv \frac{[(1+\tau\pi\Delta\nu_{1/2})P+QR]}{4\pi^2P^2+R}$$

ecuación 3-9

$$P = [(0.25\Delta\nu_{1/2}^2 - \nu^2 + 0.25 \Delta\nu^2)\tau] + \Delta\nu_{1/2}/4\pi$$

$$Q = [-\nu - 0.5(p_A - p_B) \Delta\nu]\tau$$

$$R = 0.5(p_A - p_B) \Delta\nu - \nu(1 + 2\pi\tau\Delta\nu_{1/2})$$

$$\tau = \frac{\tau_A \tau_B}{(\tau_A + \tau_B)}$$

$$\tau_A = \tau/p_B = 1/k_A$$

$$\tau_B = \tau/p_A = 1/k_B$$

Donde:

ν = Frecuencia variable (Hz)

τ_A, τ_B Tiempo de vida promedio

p_A, p_B fracción molar

$\Delta\nu = \nu_A - \nu_B$

$\Delta\nu_{1/2}$ = Ancho de pico a la altura media cuando no hay intercambio

Con esta ecuación de ancho de pico se pueden determinar las constantes de equilibrio reversibles de una reacción química cuando ésta involucra cambios en la frecuencia de resonancia de 1 o más núcleos. Una vez conocida la constante de equilibrio, es posible obtener los parámetros termodinámicos más utilizados para la descripción de intercambios químicos como: ΔG , ΔH y ΔS .

Para cualquier reacción química, el paso en el que el intermediario tiene la más alta energía determina la velocidad de la reacción. Este paso donde el intermediario tiene la más alta energía se conoce como el **estado de transición**. Este estado resulta ser el menos poblado y es esencialmente hipotético, pues no se observa directamente. En la teoría del estado de transición se postula que el intermediario de más alta energía sufre de la ruptura de enlaces para generar los productos con una frecuencia vibracional equivalente a la frecuencia de vibración de los enlaces covalentes (ν) como se muestra en la ecuación 3-10.

$$\nu = \frac{k_B T}{h}$$

ecuación 3-10

donde k_B es la constante de Boltzmann, h es la constante de Planck y T es la temperatura en Kelvin. Esta frecuencia se asume como igual para todos los estados de transición y las diferencias entre unas reacciones y otras radica en la población de dicho estado y en la energía necesaria para vencer la barrera energética, esto es la energía libre relativa del estado inicial hacia el estado de transición (ΔG^\ddagger). En la figura 3-10 se muestra un diagrama energético de una reacción cualquiera.

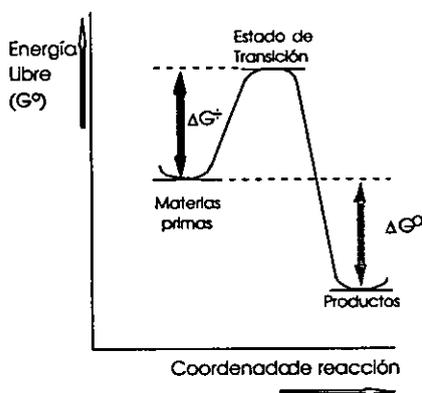


Figura 3-10. Diagrama energético en la teoría del estado de transición.

Bajo este mismo criterio, la rapidez de reacción (ecuación 3-11) se puede considerar como la frecuencia expresada anteriormente por la concentración del intermediario o complejo activado.

$$\text{rapidez} = \frac{k_B T}{h} [Q]^* \quad \text{ecuación 3-11}$$

Y a través de la constante de equilibrio (ecuación 3-12) hacia el estado de transición es posible relacionar la concentración del estado de transición y la concentración de los sustratos.

$$k^* = \frac{[Q]^*}{[Sustratos]} \quad \text{ecuación 3-12}$$

Esto significa que la constante de rapidez en una temperatura específica es proporcional a k^* cuyo valor está determinado por la diferencia en energía libre entre los sustratos (materia prima) y el complejo activado como se representa en la ecuación 3-13.

$$\Delta G^* = -RT \ln k^* \quad \text{ecuación 3-13}$$

3.5.1. Métodos y aproximaciones para la obtención de parámetros termodinámicos

3.5.1.1. Comparación de espectros teóricos y experimentales

La constante de equilibrio se puede obtener por comparación de los espectros teóricos (utilizando la ecuación del ancho de pico) y los experimentales en diferentes temperaturas y los datos se substituyen en la ecuación de Arrhenius con lo que se obtienen la Energía de Activación (E_a) y el factor de frecuencia A . (ecuación 3-14).

$$\ln k = (-E_a/RT) + \ln A \quad \text{ecuación 3-14}$$

Este método asume que tanto la energía de activación (E_a) como el factor de frecuencia son independientes de la temperatura. Una vez que se conoce la E_a se pueden determinar la entalpia y la entropía de activación con las siguientes relaciones.

$$\begin{aligned} \Delta H^\ddagger &= E_a - RT \\ \Delta S^\ddagger &= R[\ln(hA/k_B T)] \\ \Delta G^\ddagger &= \Delta H^\ddagger - T\Delta S^\ddagger \end{aligned}$$

Donde :

$$h = 6.625(10)^{-34} \text{ Js}$$

T = Temperatura absoluta

$$R = 8.31 \text{ J/K}$$

$$k_b = 1.3805(10)^{-23} \text{ J/K}$$

κ = Coeficiente de transmisión (para una reacción completa $\kappa = 1$)

3.5.1.2. Ecuación de Eyring

Otra manera de evaluar la energía libre de activación es utilizando la ecuación de Eyring (ecuación 3-15) donde:

$$K = \kappa (k_b T / h) (-\Delta G^\ddagger / RT) \quad \text{ecuación 3-15}$$

y reorganizando

$$\Delta G^\ddagger = RT(23.76 - \ln(k/T)) \quad \text{o bien}$$

$$\ln(k/T) = 23.76 - (\Delta H^\ddagger / RT) + (\Delta S^\ddagger / R)$$

Y al correlacionar gráficamente $\ln(k/T)$ vs $(1/T)$ se pueden calcular la pendiente (ΔH^\ddagger) y la abscisa (ΔS^\ddagger) que son independientes de la temperatura.

3.5.1.3. Equilibrios con diferente energía (Ecuación de Van't Hoff)

En este caso la constante de equilibrio se determina por integración de las señales cuando la tasa de intercambio es lenta y su entalpía se calcula con la ecuación de Van't Hoff. En la ecuación 3-16 se representa la ecuación de Van't Hoff.

$$\ln k = -\Delta G / RT = -\Delta H / RT + \Delta S / R \quad \text{ecuación 3-16}$$

En los cálculos, se debe considerar la fracción molar de los componentes en el equilibrio. Si son muy diferentes, esto es, si la diferencia de energía libre es grande entre los dos sistemas, la coalescencia de los 2 sistemas no se define bien. El proceso de intercambio en este caso resulta aparente y solamente se observa un ligero ensanchamiento de la señal más abundante.

3.5.1.4. Experimentos de espín-eco

Los experimentos de espín-eco también se han utilizado para estudiar procesos dinámicos con base en la amplitud del eco afectado principalmente por la relajación transversal, T_2 .

La disminución en T_2 a través de un proceso de intercambio químico no es significativa en este contexto si el tiempo de residencia de un núcleo en posiciones con diferente frecuencia de Larmor es largo comparado con el tiempo de recuperación (delay) entre pulsos. Sin embargo, cuando las reacciones son rápidas o el tiempo de recuperación entre pulsos es largo, el eco disminuye más rápido cuando hay intercambio que en el caso de sistemas sin perturbaciones en la relajación transversal. Si se determina este decremento adicional como función del tiempo de recuperación (delay), se puede calcular la constante de reacción en la temperatura que se obtuvo el experimento.

Este método resulta ventajoso ya que se aplica a lo largo de un rango considerable de temperaturas y no se ve afectado por interacciones espín-espín.

3.5.2. Soluciones aproximadas

3.5.2.1. Determinación de la constante de coalescencia ($K_{\text{coalescencia}}$)²⁹

Dada la complejidad de la ecuación 3-9 del análisis completo de la forma de la señal (lineshape), se han desarrollado algunas soluciones aproximadas. Una de las más comunes es utilizando la expresión de la ecuación 3-17 en donde se obtiene la constante de equilibrio en la temperatura de coalescencia para un sistema con poblaciones equivalentes.

$$k_{\text{coal}} = \pi \Delta \nu / (2)^{1/2} \quad \text{ecuación 3-17}$$

Una vez calculada la k_{coal} , se puede sustituir en la ecuación de Eyring calculándose la barrera energética involucrada en el proceso.

$$\Delta G^\ddagger = RTc [22.96 + \ln(Tc/\Delta \nu)] \text{ J/mol}$$

Este valor de ΔG^\ddagger depende de la temperatura dado que

$$\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T \Delta S^\ddagger$$

En general, la temperatura de coalescencia es diferente para cada proceso dinámico, y la comparación de ΔG^\ddagger es factible siempre y cuando la entropía de activación sea cero.

3.5.2.2. Ensanchamiento de intercambio Δe ²⁹

Otro de los análisis considera el ensanchamiento de intercambio (Δe) que se calcula considerando el ancho observado Δ_{obs} y restándole el ancho de línea natural (Δ_0) y el ensanchamiento por inhomogenidad de campo (Δ_1) representado en la ecuación 3-18.

$$\Delta e = \Delta_{\text{obs}} - \Delta_0 - \Delta_1 \quad \text{ecuación 3-18}$$

Haciendo las consideraciones y aproximaciones necesarias, las ecuaciones para cuando existe un intercambio lento y un intercambio rápido se muestran a continuación:

$$1/\tau_A = k_A = \pi \Delta e \quad \text{y} \quad 1/\tau_A = k_A = (4\pi p_A p_B^2 \Delta \nu^2) / \Delta e$$

Las aplicaciones de este sistema son limitadas pero son útiles para cálculos aproximados.

Capítulo 4.

Desarrollo experimental

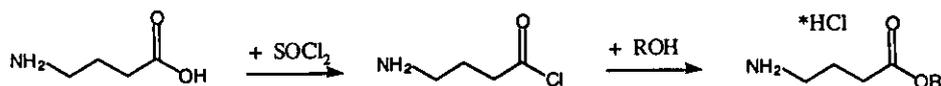
4.1 Síntesis

4.1.1 *t*-(butiloxicarbonil)-*L*-prolina (BOC-prolina) y éster metílico de prolina

La BOC-prolina y el éster metílico de prolina se compraron a Aldrich y se utilizaron sin previa purificación. La pureza reportada por el vendedor es del 98.5 y 99.3 % respectivamente.

4.1.2 Síntesis del éster metílico y bencílico del ácido γ -aminobutírico (GABAOMe / GABAOben).

La síntesis se llevó a cabo vía la formación del cloruro de ácido utilizando el cloruro de tionilo (SOCl_2). En un matraz se suspendió el GABA en diclorometano con agitación magnética constante. Se agregó gota a gota SOCl_2 con un exceso de 10%. La reacción se dejó en agitación por 45 min a temperatura ambiente. La adición del alcohol correspondiente se hizo en baño de hielo en cantidades equimoleculares para el éster bencílico y en exceso para el éster metílico. La recristalización se hizo de etanol-éter y el rendimiento fue del 90% y 85% respectivamente. La reacción 4-1 muestra esquemáticamente la secuencia que se utilizó.



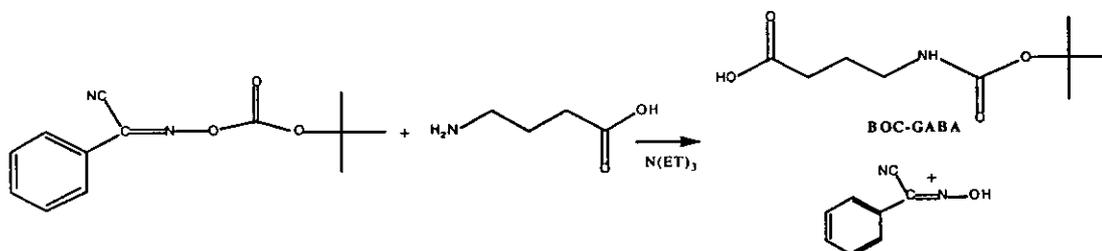
Reacción 4-1. Síntesis del éster metílico de GABA.

4.1.3 Síntesis del éster metílico del BOC-prolina

La esterificación se llevó a cabo con el empleo de diazometano generado *in situ*. En un matraz se agrega nitrosometilurea y una solución al 35% (aprox.) de NaOH. Se deja reaccionar unos minutos y se añade éter etílico. El éter empieza a tomar una coloración amarilla que hace evidente la presencia del diazometano. Cuidadosamente se agrega la solución etérea de diazometano a una solución de BOC-prolina en éter con la generación inmediata de nitrógeno. Se deja reaccionar sin agitación a temperatura ambiente y se sigue la reacción por cromatografía en capa fina de sílice utilizando AcOEt-Hexano (20%) como fase móvil. Se agrega MeOH/EtOH para destruir del diazometano residual. Posteriormente se lleva a cabo la evaporación a sequedad y una percolación en sílice 70/230 con el sistema AcOEt-Hexano (20:80) dando lugar a un aceite amarilloso puro con un rendimiento del 90%.

4.1.4 Síntesis del *t*-butiloxicarbonil-GABA (BOC-GABA)

Se siguió un protocolo reportado en la literatura³⁰ en donde se agrega el 2-*t*-butiloxicarboniloximino-2-fenilacetnitrilo (BOCON) en exceso del 10% a una mezcla de GABA con trietilamina (10% exceso) disuelta en suficiente mezcla dioxano-agua (1:1) por 2h a temperatura ambiente. Se agregó acetato de etilo 3 veces para lavar la fase acuosa y se acidificó hasta obtener reacción positiva de rojo Congo (pH=5). El producto fue un aceite y el rendimiento obtenido tras una percolación en columna de sílice 70/230 con el sistema AcOEt-Hexano (20:80) fue del 40%. En la reacción 4-2 se ilustra el proceso llevado a cabo.



Reacción 4-2. Reacción de síntesis de BOC-GABA

4.1.5 Acoplamiento de BOCprolina-éster metílico de GABA (BOC-pro-GABAOMe)

Modificando el método propuesto por Bodansky¹⁵ para el acoplamiento de aminoácidos en donde se utiliza la diciclohexilcarbodiimida (DCC) como el agente acoplante se decidió utilizar además la *N*-hidroxisuccinimida (NHS) como un auxiliar en la formación de un éster activo *in situ* evitando que el intermediario sufriera un rearrreglo. La explicación completa de la razón de esta modificación se da dentro del análisis de resultados. La DCC y la NHS fueron reactivos Aldrich y se utilizaron sin purificación previa.

Se liberó previamente el éster metílico de GABA con cantidades equimoleculares de trietilamina en presencia de un exceso del 10% de BOC-prolina en suficiente diclorometano. Se filtró el clorhidrato de trietilamina y se agregó la NHS y la DCC. Se dejó reaccionar toda una noche y al día siguiente se filtró la diciclohexilurea (DHU) formada. Se lavó la fase orgánica con HCl (diluido), NaHCO₃ y agua destilada. Se secó sobre Na₂SO₄ y se llevó a sequedad. El producto fue un sólido de punto de fusión de 69-71°C con un rendimiento 60% después de la purificación por columna de sílice 70/230 y acetato de etilo como fase móvil.

4.1.6 Acoplamiento de BOC-prolina-éster metílico de prolina (BOC-pro-proMe)

Nuevamente siguiendo el protocolo propuesto por Bodansky¹⁵ y con la modificación de la adición equimolecular de NHS, primero se liberó el clorhidrato del éster metílico de prolina en diclorometano con un 10% de exceso de trietilamina. Una vez que el clorhidrato de trietilamina precipitó, se filtró, se lavó el sólido con un poco más de

³⁰ Bodanszky, M. and Bodanszky, A., *The Practice of Peptide Synthesis*, 2nd. Ed, Springer-Verlag, Berlin, 1994.

diclorometano y se le agregó BOC-prolina, NHS y DCC. Se dejó la reacción toda la noche en temperatura ambiente y en agitación magnética constante.

El precipitado formado se filtró y la fase orgánica se lavó con HCl (diluido), NaHCO₃ y agua destilada. Se secó sobre Na₂SO₄ y se llevó a sequedad. El producto fue un aceite y el rendimiento de reacción fue de 56% después de la purificación por columna de sílice 70/230 y acetato de etilo como fase móvil.

4.2 Análisis

4.2.1 Infrarrojo (IR)

Para el análisis de infrarrojo se utilizó un espectrómetro FTIR Nicolet® Magna 750. Para el caso de pastillas se utilizó KBr grado espectroscópico y en el caso de película la muestra disuelta en CHCl₃.

4.2.2 Polarografía

Polarímetro JASCO® modelo DIP-360. Las muestras se prepararon en CHCl₃, salvo en caso específico que se mencione. Las celdas fueron de 1cm de largo y la concentración se especifica en cada caso.

4.2.3 Espectrometría de masas (EM)

En el caso de impacto electrónico se utilizó un JEOL® JMS-AX 505 HA utilizando 70eV. La resolución es de 1,500. Para el caso de alta resolución se utilizó el mismo equipo pero con una resolución de 8500. En el caso de FAB se consideró la modalidad de iones positivos con una matriz de alcohol bencílico y una resolución de 3000.

4.2.4 Cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE-HPLC)

Se utilizó un equipo Varian® 9050 con un detector de UV Varian® 4400 a una longitud de onda de 215 nm. Una columna fase invertida (reversa) RP 18 esférica/5 Brownlee l = 20cm i.d 2.1 mm con un sistema de disolventes MeOH-H₂O (95-5%).

4.2.5 Resonancia magnética nuclear (RMN)

El equipo que se utilizó fue un Varian® Unity 500 MHz con probe de 5 mm de detección inversa. Los experimentos que se llevaron a cabo fueron ¹H, ¹³C, DEPT, HSQC, HMBC y NOESY. Los disolventes utilizados fueron CDCl₃, DMSO-d₆ y acetona-d₆ para temperatura ambiente, alta temperatura y baja temperatura respectivamente.

Capítulo 5.

Resultados y análisis de resultados

La materia prima N-(*t*-butiloxicarbonil)-prolina i.e. BOC-prolina empleada fue Aldrich y se utilizó directamente sin ulterior purificación. Este compuesto resultó adecuado como punto de partida para analizar la influencia de disolventes y de la temperatura en la medición de equilibrios conformacionales. Se obtuvieron espectros de RMN en DMSO, acetona- d_6 y $CDCl_3$, cuyos resultados se muestran más adelante.

El grupo *t*-butiloxicarbonil es uno de los grupos protectores del grupo amino en la síntesis de péptidos. Este grupo al unirse al amino permite que se lleve a cabo un equilibrio de isomería geométrica en torno al enlace “peptídico” que se forma.

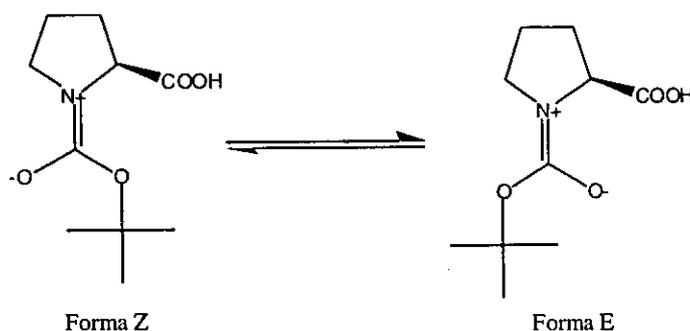


Figura 5-1. Equilibrio geométrico de BOC-prolina.

De una manera particular, la prolina es el único residuo que se encuentra en los mamíferos en el cual el enlace Z (cis) es energéticamente accesible gracias a la desestabilización de la conformación E (trans)⁵. El equilibrio se ha documentado en la literatura y se conoce tanto para péptidos que involucran a la prolina, como en proteínas³¹ y se ha propuesto como la razón de la apertura de canales intramembranales⁵.

5.1. Análisis de los espectros de BOC-prolina

5.1.1. Resultados de rotación óptica, análisis de IR y EM de BOC-prolina

El valor obtenido para BOC-prolina en cloroformo fue de $[\alpha]^{20} = -89.3^\circ$ ($c=1$). En IR en pastilla de bromuro de potasio se observan las siguientes señales. El espectro completo se encuentra en el Anexo 1 (E-1-1).

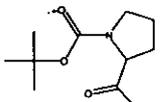
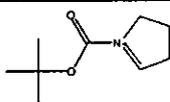
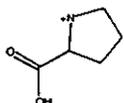
Tabla 5-1. Asignación de las bandas de IR de acuerdo a los grupos funcionales que las generan.

Frecuencia	Descripción	Frecuencia	Descripción
3300 cm^{-1}	ν COOH banda ancha	1740 cm^{-1}	C=O Carbamato
2973-2932 cm^{-1}	ν_{as} CH_3 y CH_2	1638 cm^{-1}	C=O Acido
2895 cm^{-1}	ν_s CH_3 y CH_2		

³¹ Milner-White, E.J., Bell, L.H. & Maccallum, P.H., *J.Mol. Biol*, 228, 725 (1992).

El método de ionización utilizado en espectrometría de masas fue impacto electrónico. El espectro completo se presenta en el anexo 1 (E-1-2) y los datos más representativos se presentan en la tabla 5-2

Tabla 5-2. Fragmentos más importantes en EM de impacto electrónico y la estructura de los fragmentos de BOC-prolina.

Identificación	m/z	Descripción
M+ (ion molecular)	215	
M-45	170	
M-101 (pico base)	114	
M-145	70	
M-158	57	

Tanto el espectro de IR como el de EM dan evidencia contundente de la estructura general, sin embargo en este caso debido a que las isomerías no son detectables en EM y la evidencia de IR no resulta concluyente.

5.1.2. Espectros de RMN en 500 MHz y temperatura ambiente (T.A.) en CDCl₃

Para la elucidación estructural final fue necesario recurrir a la RMN protónica y de ¹³C tanto uni como bidimensionales. A pesar de contar con un equipo de 500 MHz, la asignación inequívoca sobre el isómero Z y el E en torno al carbamato (uretano) no se hizo evidente en temperatura ambiente de ahí que solo se pueda hablar del isómero más y del isómero menos abundante. En la figura 5-2 se muestra un resumen de las asignaciones para cada protón y carbono de los isómeros más y menos abundantes. Los espectros completos se encuentran en el anexo 1 (E-1-3 al E-1-8).

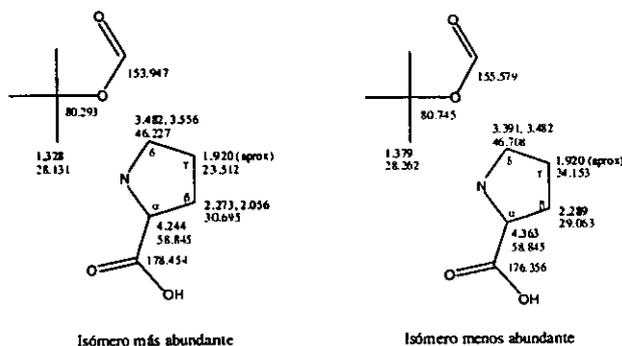


Figura 5-2. Asignación parcial de los isómeros Z (cis) y E (trans) de BOC-prolina en CDCl₃ en temperatura ambiente.

Los espectros completos de RMN protónica, de ^{13}C y bidimensionales están en el anexo 1 (E-3-E-8).

Uno de los espectros que permite conocer las interacciones a través del espacio es el experimento NOESY (figura 5-3) y dicho experimento nos puede dar evidencia de las señales que provienen de cada uno de los isómeros. La similitud de las señales NOESY para cada uno de los isómeros dificultó probar de forma inequívoca las señales del isómero Z y del E. Es claro que la presencia de señales de intercambio entre los 2 isómeros jugó un papel importante. Considerando esto, se llevaron a cabo estudios en donde se disminuyera la tasa de intercambio para poder saber las señales que corresponden a cada isómero.

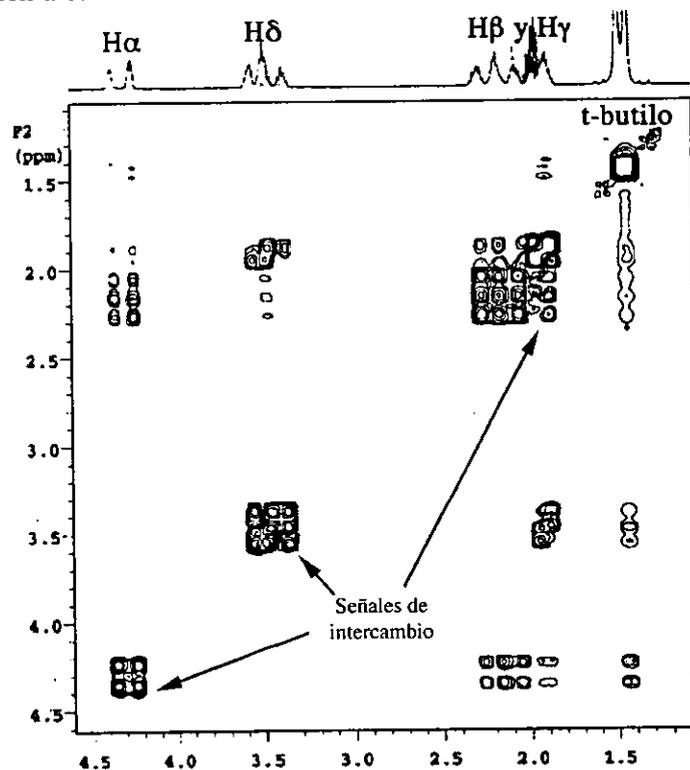


Figura 5-3. NOESY en temperatura ambiente para BOC-prolina en CDCl_3 .

Existen en la literatura, algunas referencias que hacen alusión a la determinación de la geometría Z (cis)-E (trans) de las amidas. Nishihara *et al.*³² analizan el impedimento estérico que generaría la presencia del isómero Z (cis) en pivaloil-L-prolina dando lugar solamente al isómero E (trans) mismo que, en el caso de derivados donde se presentaban ambos isómeros, tendría un desplazamiento químico en campo más alto.

Por otro lado Wüthrich *et al.*¹⁵ plantean que la isomerización E-Z de X-Pro se afecta en forma importante por la cadena lateral de X dando lugar a una mayor proporción del isómero Z (cis) cuando se tienen L-L dipéptidos y proponen que sean los carbonos β y γ los que sean utilizados como la base para el cálculo de abundancias relativas. Más aún, dentro de sus observaciones vieron que la diferencia del desplazamiento químico entre los C_β y C_γ del isómero Z (cis), es mayor que la del isómero E (trans).

³² Nishihara, H., Nishihara, K., Uefuji, T. & Sakota N., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 48:2, 553 (1975).

Otro grupo de investigadores, Bovey *et al.*³³, proponen que a través de la inducción anisotrópica del carbonilo del carbamato (una posición *syn* o *anti* con respecto al carbonilo), se puede distinguir a los carbonos α y δ de cada uno de los isómeros geométricos dando lugar a un carbono α en campo más alto para el isómero E mientras que el desplazamiento químico del carbono δ del isómero Z se espera que esté en campo más alto.

El hecho más relevante es que los resultados de Bovey *et al.*, y de Wüthrich *et al.*, son consistentes a pesar de haber tomado 2 puntos de referencia diferentes. Sin embargo, los resultados de estos dos grupos contraponen lo que propone Nishihara *et al.* La literatura actual se basa mucho en la propuesta de Wüthrich y su grupo de colaboradores, y considerando que dichos experimentos fueron realizados en la época de los 70's, se decidió llevar a cabo el estudio de la isomería utilizando las técnicas en donde la elucidación resulte inequívoca, de ahí que se haya decidido llevar a cabo un estudio sistemático en baja temperatura para poder asignar completamente a cada isómero.

5.1.3. Espectros de RMN en 500 MHz en bajas temperaturas en acetona-d₆

Los espectros tanto de protón como de ¹³C muestran las señales correspondientes para cada uno de los isómeros, y se puede notar que nuevamente uno de los isómeros se encuentra en una proporción mayor con respecto del otro. También, como era de esperarse, en el espectro de ¹³C existen señales que parecen estar "invertidas" como es el caso de la zona de los carbonilos en donde el isómero más abundante tiene al carbonilo del carbamato en campo más alto y el carbonilo del éster en campo más bajo. Este mismo hecho se presenta con los C α y C δ así como para los C β y C γ .

El cambio de disolvente de CDCl₃ a acetona no significó un cambio en los resultados del experimento NOESY y no se observaron evidencias contundentes para poder asignar las señales del isómero Z (*cis*) y del isómero E (*trans*) a temperatura ambiente.

Los espectros de ¹H y ¹³C en acetona a T.A. se muestran en las figuras 5-4 y 5-5. En el espectro protónico en la zona de 4 ppm se ven claramente 2 dobles de dobles correspondientes a los protones alfa del anillo pirrolidínico. Se ve que uno de ellos es más abundante que el otro y que las constantes de acoplamiento son ligeramente diferentes (δ 4.166 (³J_{H-H} 4.0 y 8.5 Hz) y δ 4.216 (³J_{H-H} 3.5 y 9.0Hz)).

Por otro lado el espectro de ¹³C muestra claramente 4 señales de carbonilos: 2 del ácido y 2 del carbamato (uretano). La abundancia relativa puede ser directamente asociada a la abundancia de cada uno de los isómeros. Es importante hacer notar que a pesar de tener presente el efecto nuclear Overhauser, es decir, no haber hecho una secuencia de pulsos cuantitativa en ¹³C, los carbonos cuaternarios se ven muy poco afectados por el NOE por lo que se puede asegurar que su intensidad es proporcional a la abundancia relativa que presentan.

Finalmente en la figura 5-6 se muestra el espectro NOESY de BOC-prolina en acetona y en temperatura ambiente. En este caso el espectro es un poco más limpio pero se siguen viendo señales de intercambio.

³³ Dorman D.E. & Bovey F.A., *J.Org. Chem*, 38:13, 2379 (1973).

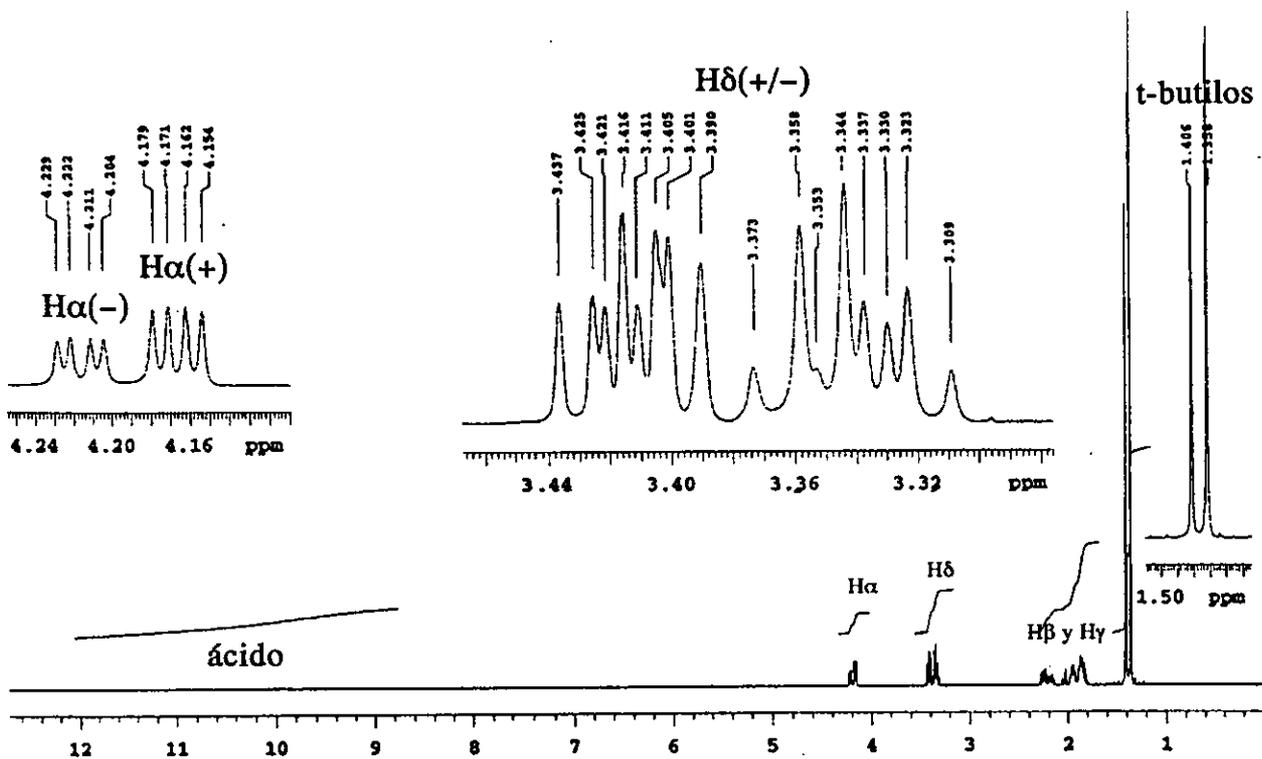


Figura 5-4. Espectro protónico de BOC-prolina en Acetona a T.A.

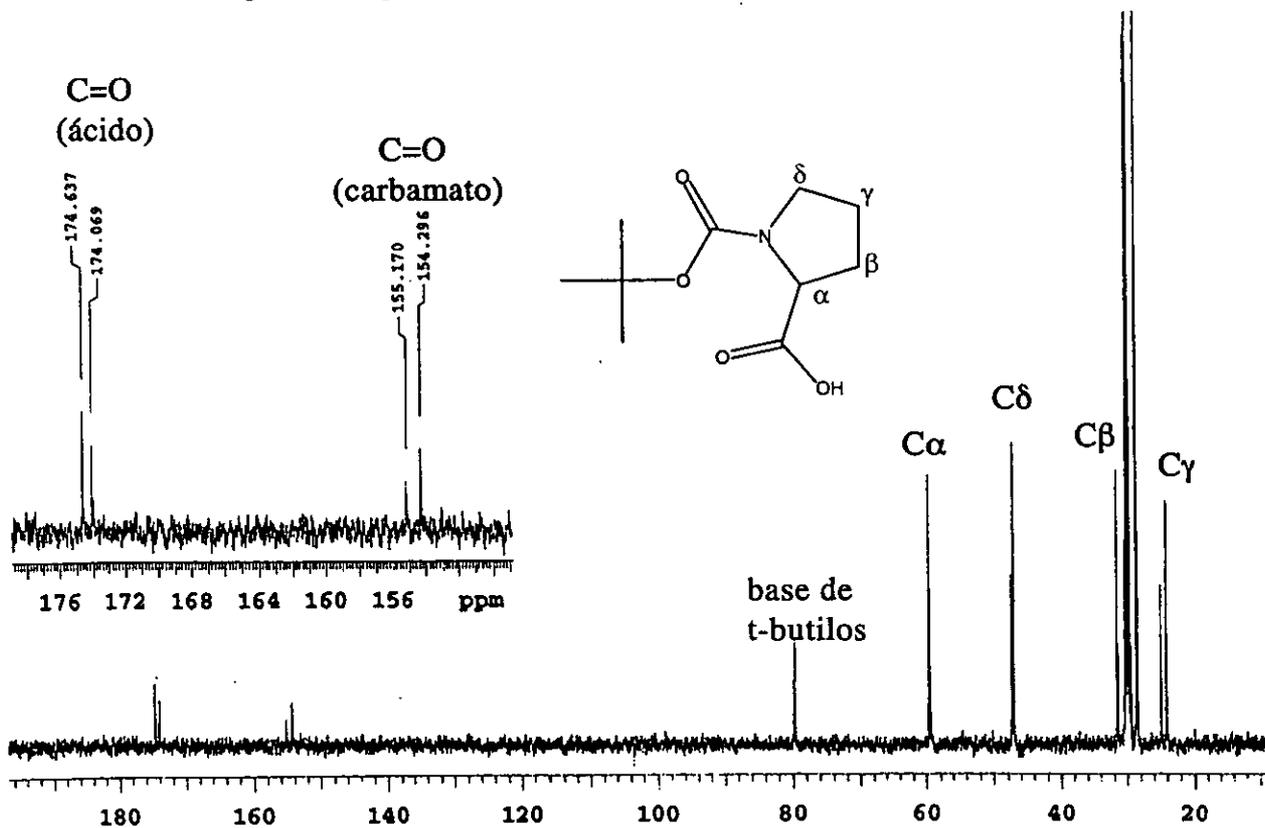


Figura 5-5. Espectro de ^{13}C de BOC-prolina a T. A. en acetona-d6

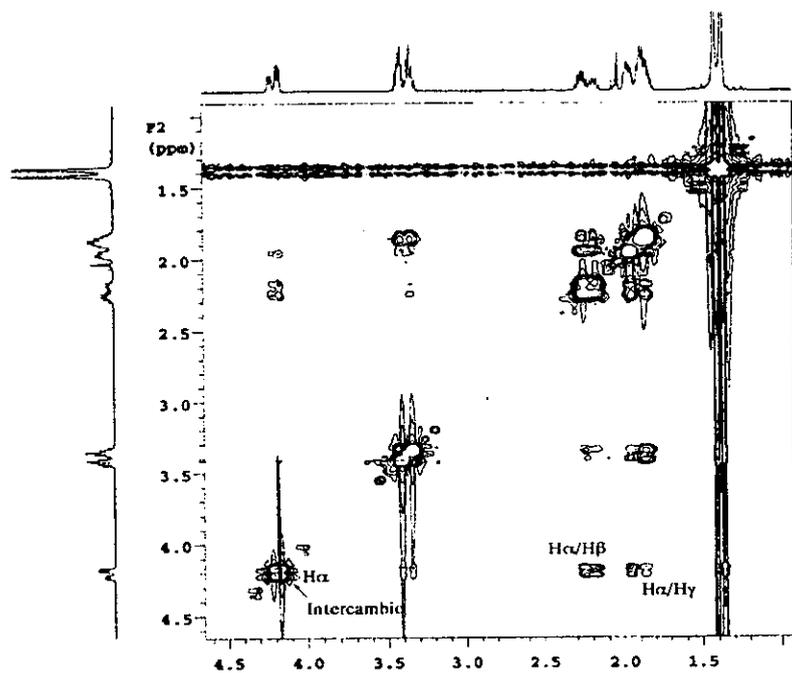


Figura 5-6. Espectro NOESY en acetona-d₆ de BOC-prolina en T.A.

El cambio de disolvente se propuso para poder disminuir la temperatura hasta -90°C y con ello llevar a cabo un estudio sistemático de variación de temperatura que se presenta en la siguiente tabla.

5.1.3.1. Análisis de los protones α y δ del anillo pirrolidínico de BOC-prolina en acetona en diferentes temperaturas (baja temperatura)

Tabla 5-3. Primera parte del estudio sistemático de temperatura variable en acetona para BOC-prolina.

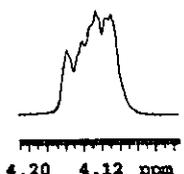
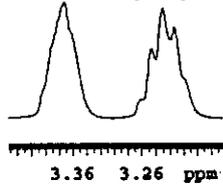
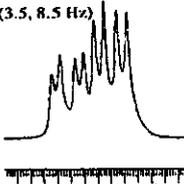
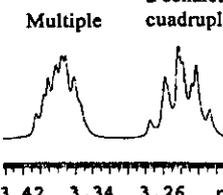
	T($^{\circ}\text{C}$)	$\delta^1\text{H}$ protón α	Espectro ampliado Protón α	$\delta^1\text{H}$ protones δ	Espectro ampliado de protones δ
	-90	4.126	Multiple 	3.371	Multiple Pseudo quintuple 
				3.228	
Menor frecuencia	-80	4.11	dd (3.5, 8.5 Hz) dd (4.0, 9.0 Hz) 	3.241	Multiple 2 señales cuádruples 
Mayor frecuencia		4.149	3.381		

Tabla 5-3. Continuación del estudio de temperatura variable en acetona para BOC-prolina.

	T° C	$\delta^1\text{H}$ protón α	Espectro ampliado Protón α	$\delta^1\text{H}$ protones δ	Espectro ampliado de protones δ
Menor Frecuencia	-70	4.123	dd (4.0, 8.5 Hz) dd (3.0, 8.5 Hz) 	3.253	2 señales Multiple cuádruples
Mayor frecuencia		4.156		3.383	
Menor Frecuencia	-60	4.127	dd (4.0, 8.5 Hz) dd (3.5, 9.0 Hz) 	3.257	2 señales Multiple cuádruples
Mayor frecuencia		4.161		3.391	
Menor Frecuencia	-30	4.141	dd (4.0, 9.0 Hz) dd (3.5, 9.0 Hz) 	3.284	Triple (6 Hz) Triple (6 Hz) Señal cuádruple (8 Hz) Señal cuádruple (7 Hz)
Mayor frecuencia		4.18		3.306 3.388 3.409	
Menor Frecuencia	-20	4.146	dd (4.0, 8.5 Hz) dd (3.5, 9.0 Hz) 	3.299	Triple (6 Hz) Cuádruple (7.5 Hz) Cuádruple (7.5 Hz) Pseudo triple (6 Hz)
Mayor frecuencia		4.180		3.317 3.391 3.411	
Menor Frecuencia	-10	4.15	dd (4.5, 9 Hz) dd (3.5, 9 Hz) 	3.307	dd (5.5, 6.5 Hz) Cuádruple (7.5 Hz) Cuádruple (7.5 Hz) dd (6.0, 6.5 Hz)
Mayor frecuencia		4.19		3.324 3.393 3.413	

Tabla 5-3. Continuación del estudio de temperatura variable en acetona para BOC-prolina.

	T° C	$\delta^1\text{H}$ protón α	Espectro ampliado Protón α	$\delta^1\text{H}$ protones δ	Espectro ampliado de protones δ
Menor Frecuencia	10	4.16		3.321	
				3.342	
Mayor frecuencia		4.208		3.399	
				3.420	
Menor Frecuencia	25	4.156		3.332	
				3.355	
Mayor frecuencia		4.196		3.421	
				3.425	

A medida que se reduce la temperatura, disminuye la tasa de intercambio químico entre los isómeros Z (cis) y E (trans), el desplazamiento químico de ambos isómeros se empieza a hacer más semejante. Este hecho es fortuito y resulta de la coincidencia de que ambos desplazamientos químicos coinciden en tales condiciones.

Al modificar la temperatura de la muestra, los desplazamientos químicos de los $\text{H}\alpha$ del isómero más y menos abundante varían ca. 0.056 y 0.067 ppm respectivamente. En ocasiones es mejor definir la variación de desplazamiento químico en ppm ya que esta medida está normalizada. En cambio el uso de Hz variará dependiendo de la intensidad del campo magnético utilizado.

Como se muestra en la tabla 5-3. el isómero más abundante es el que menos variación de desplazamiento químico sufre. Esta variación en δ se estima utilizando al TMS como referencia en 0 ppm a lo largo del estudio.

Tabla 5-4. Diferencia de desplazamientos químicos en RMN protónica para los protones α .

	$\Delta\delta \text{H}\alpha$ (ppm)	Hz
Más abundante	0.056	28
Menos abundante	0.067	33.5

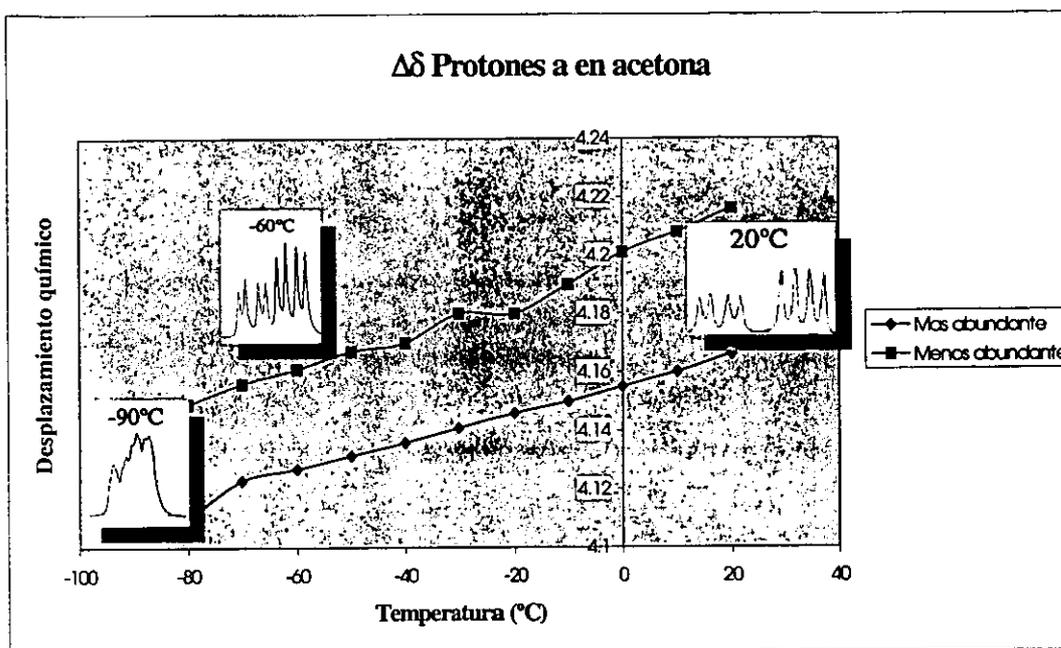


Figura 5-7. Variación del desplazamiento químico de los protones alfa en acetona al variar la temperatura.

Dada la variación de desplazamientos químicos y sobre todo, de la disminución en la separación para las señales de $H\alpha$, se decidió obtener del espectro NOESY en -60°C donde las señales estaban lo suficientemente resueltas y la temperatura era considerablemente baja como para apreciar una disminución en la tasa de intercambio.

5.1.3.2. Análisis de los espectros NOESY de BOC-prolina en acetona a -60°C .

El experimento NOESY con una tasa de intercambio químico disminuida logró hacer evidente una serie de interacciones determinantes. Como se ve en la figura 5-8, al ver la sección cruzada correspondiente al protón alfa del isómero más abundante, se ve un aumento en la intensidad de las señales de los protones beta, gama y t-butilo.

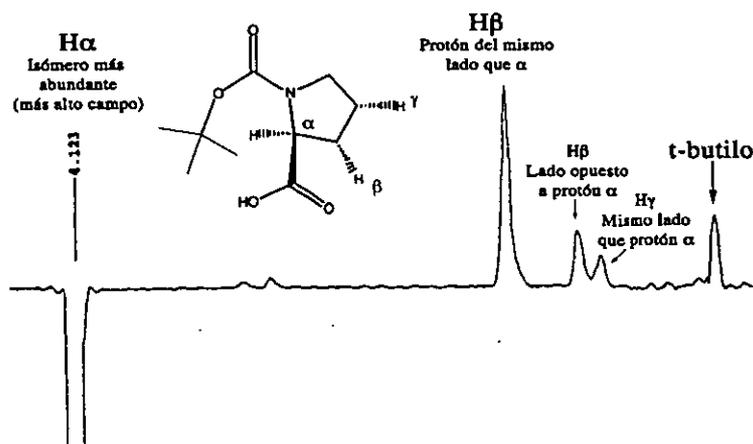


Figura 5-8. Sección cruzada del espectro NOESY del $H\alpha$ en menor frecuencia. La interacción del protón α con el t-butilo confirma el hecho de que se trata del isómero E (trans) y de la conformación endo.

Esto lleva a pensar en una conformación preferente que correspondería a la conformación B (o endo) descrita en la literatura para algunas conformaciones del anillo pirrolidínico. Estas observaciones confirman lo propuesto por Milner-White *et al*³⁴, en donde se plantea que tanto en péptidos como en proteínas, los residuos de prolina con geometría Z(cis) prefieren tener una conformación tipo B o endo, mientras que los E (trans) prefieren una conformación A o exo. En la figura 5-9 se muestran las interacciones que pueden existir entre los diferentes grupos.

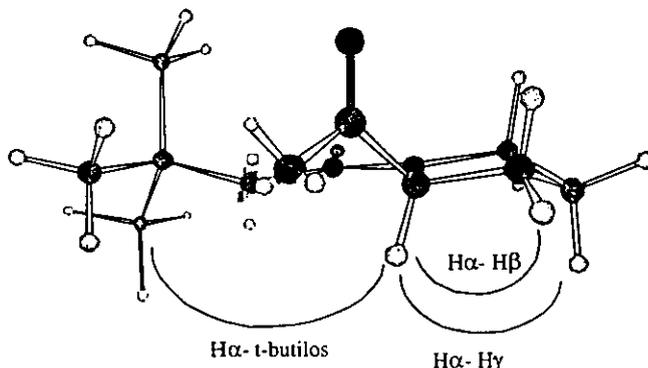


Figura 5-9. Conformación B (o endo) para BOC-prolina Z (cis) basándose en los efectos NOE observados.

La figura 5-10 muestra que existe una interacción entre los protones α y una interacción grande con el protón β del mismo lado del anillo y un poco menos intenso la interacción con el protón β del lado opuesto. Pero particularmente en este caso se tiene el isómero trans, dado que no existe interacción entre el protón alfa y el t-butilo.

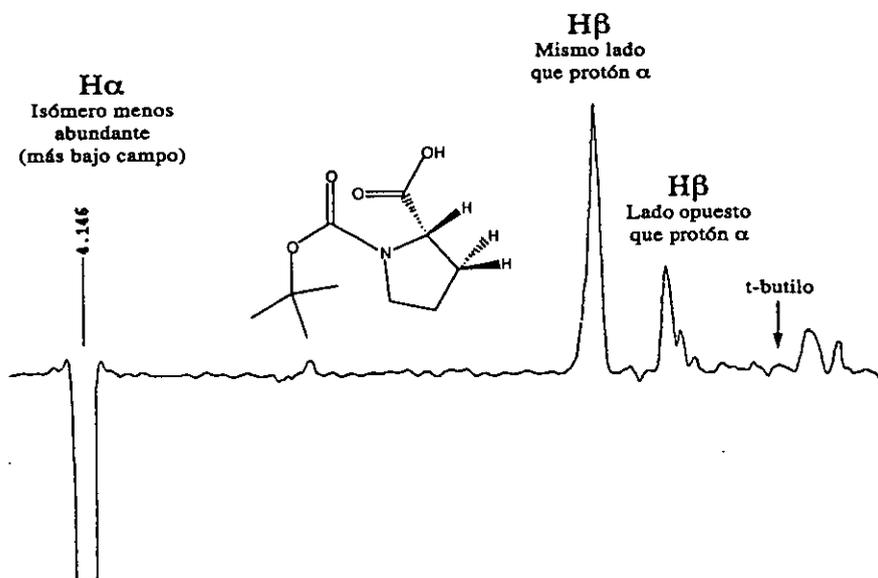


Figura 5-10. Sección cruzada del espectro NOESY del H α en una frecuencia menor. La interacción del protón α con los t-butilos confirma el hecho de que se trata del isómero E (trans) y de la conformación exo.

³⁴ Milner-White, J.E., Bell, L.H. & Maccallum, P.H., *J.Mol.Biol.*, 228, 725 (1992).

De la evidencia experimental se puede concluir que el isómero más abundante corresponde al isómero Z (cis), mientras que el isómero menos abundante es del isómero E (trans). En la tabla 5-4 se muestran los desplazamientos químicos para cada uno de los isómeros.

Tabla 5-4. Resumen de los desplazamientos químicos

Isómero	H α	C α	C δ	C β	C γ	$\Delta\delta$ C β -C γ	NOESY	Conclusión
Más abundante	4.1315	59.03	46.615	30.426	23.243	7.183	H α con T-butilos	Z (cis)
Menos abundante	4.1675	58.782	46.848	29.494	24.001	5.493	No se observó	E (trans)

Estas observaciones resultan muy importantes al dar una evidencia contundente de interacciones dipolares reales. En la literatura, los estudios sobre la geometría del enlace que se llevaron a cabo fueron principalmente con los desplazamientos químicos de ^{13}C .

5.1.3.3. Análisis de una zona de los espectros de ^{13}C de los C α y C δ en acetona- d_6 a 3 temperaturas diferentes

De la controversia que se tiene en la literatura, se pensó en analizar los espectros de ^{13}C desde la perspectiva de los diferentes grupos. Contrario a lo que sucede en RMN protónica, en ^{13}C las señales de los carbonos α y δ se fueron separando a medida que se disminuía la temperatura. (tabla 5-5)

Tabla 5-5. Espectro ampliado de los carbonos alfa y delta de Boc-prolina.

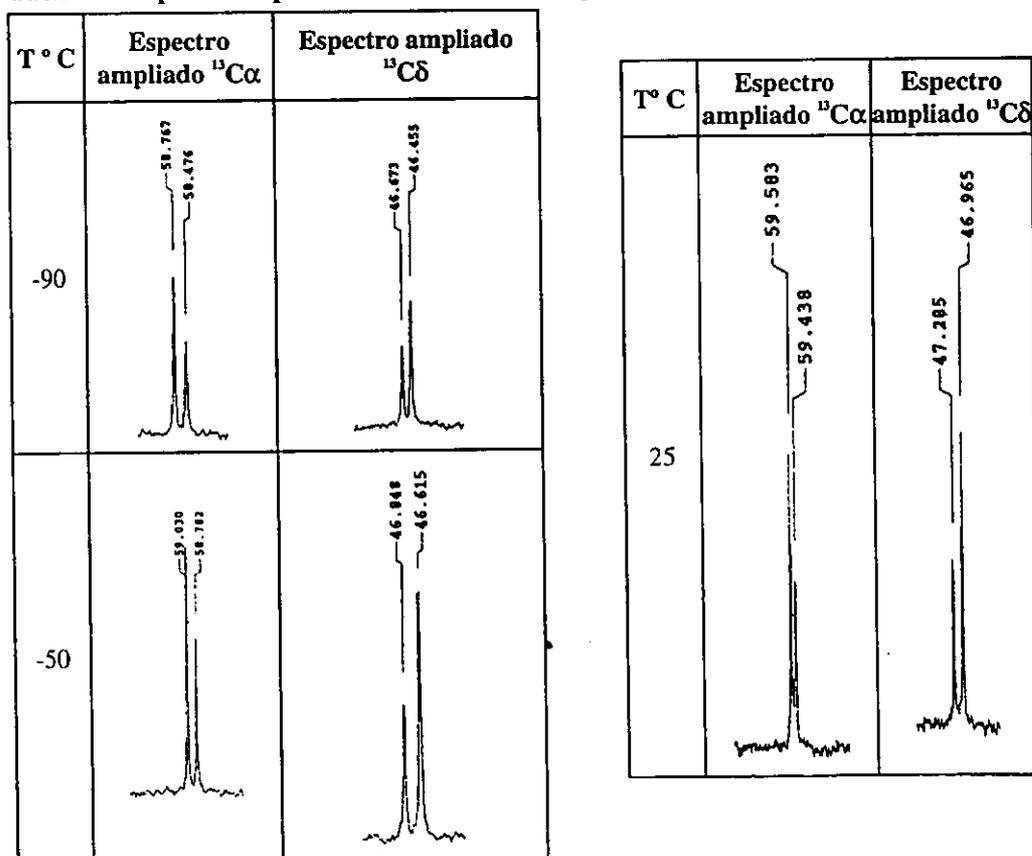


Tabla 5-6. Diferencia de desplazamientos químicos en Hz y en ppm de los isómeros cis y trans de BOC-prolina.

Isómero	$\Delta\delta$ C α	Hz	$\Delta\delta$ C δ	Hz
Z	0.816	102	0.51	63.7
E (trans)	0.962	120	0.612	76.5

En la tabla 5-6 se ven las diferencias de desplazamiento químico tanto en Hz como en ppm. Sin embargo, el valor en Hz queda sujeto al valor de campo magnético externo que se utilice. Como era de esperarse, la variación del desplazamiento químico con la temperatura en el caso de los carbonos fue más significativa que en el caso de los protones.

Si consideramos las conclusiones de los 3 diferentes grupos de investigación, se verá que efectivamente las observaciones experimentales concuerdan con las reportadas en la literatura. Los resultados publicados en la literatura se muestran en la tabla 5-7.

Tabla 5-7. Desplazamientos químicos promedio para isómeros Z(cis) y E(trans) de acil-prolina reportados por Wüthrich, Bovey y Siemion.

Isómero	C α W ¹⁵	C δ W ¹⁵	C β W ¹⁵	C γ W ¹⁵	$\Delta\delta$ C β - C γ	Wüthrich ¹⁵	Bovey ³³	Siemion ³⁹
Z (cis)	61.7	46.2	31.2	22.2	9	C β en mayor frecuencia (Z (CIS))	C δ en menor frecuencia Z (CIS)	Z (CIS) (mayor $\Delta\delta$ C β -C γ)
E (trans)	61.2		29.1	24.0	5.1	C γ en mayor frecuencia (E (trans))	C α en menor frecuencia (E (trans))	E (trans) (menor $\Delta\delta$ C β -C γ)

Los desplazamientos químicos experimentales y las conclusiones derivadas del análisis de los espectros NOESY de BOC-prolina se muestran en la tabla 5-8.

Tabla 5-8. Desplazamientos químicos experimentales y la conclusión de la geometría para cada una de las señales de los isómeros de BOC-prolina.

Isómero	H α	C α	C δ	C β	C γ	$\Delta\delta$ C β -C γ	NOESY	Conclusión
Más abundante	4.1315	59.03	46.615	30.426	23.243	7.183	H α con T-butilos	Z (CIS)
Menos abundante	4.1675	58.782	46.848	29.494	24.001	5.493	No se ve señal	E (TRANS)

Estos resultados contradicen lo propuesto por Nishihara *et al*⁴⁴ y dan una evidencia inequívoca total ya que para cada señal de carbono se pudo asignar su protón unido. El resumen de los datos obtenidos experimentalmente tanto para RMN protónica como para ¹³C se presenta a continuación en la figura 5-11. En dicha figura se representan en la parte superior el desplazamiento químico protónico y en la parte inferior los desplazamientos de ¹³C de ambos isómeros geométricos.

Para concluir el estudio sistemático en temperatura variable, se pensó en llevar a cabo el cálculo de la energía involucrada en la isomerización, con los estudios en alta temperatura utilizando DMSO como disolvente.

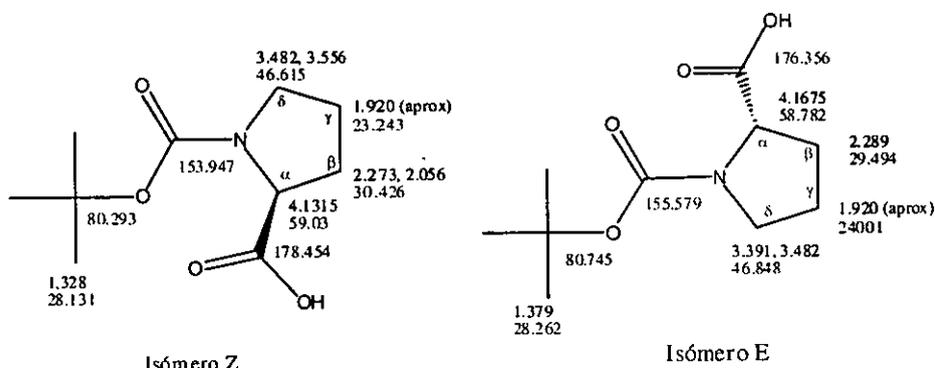


Figura 5-11. Asignación completa de los desplazamientos químicos de protón y ^{13}C para cada isómero de BOCprolina.

5.1.4. Espectros de RMN en 500 MHz en DMSO-d₆ (alta temperatura)

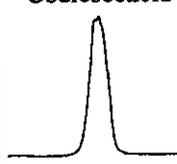
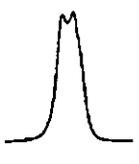
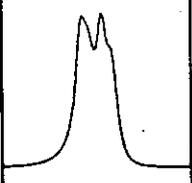
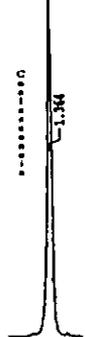
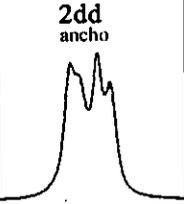
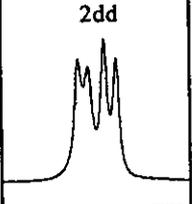
5.1.4.1. Análisis de los espectros de los protones alfa del anillo pirrolidínico de BOC-prolina y del grupo t-butilo

La variación de los desplazamientos químicos de los protones alfa y la señal del t-butilo se resumen en la tabla 5-9.

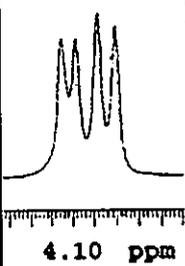
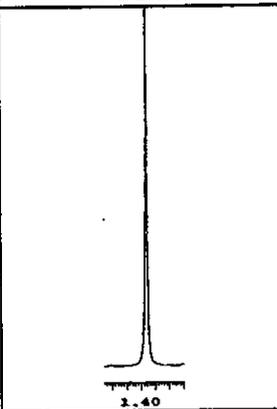
Tabla 5-9. Variación de desplazamientos químicos al cambiar la temperatura en DMSO de BOC-prolina

	T° C	$\delta^1\text{H}$	Espectro ampliado Protón α	$\delta^1\text{H}$	Espectro ampliado de la señal de t-butilo
Más abundante	27	4.038		1.328	
Menos abundante		4.061		1.379	
Más abundante	40	4.047		1.335	
Menos abundante		4.068		1.385	
Más abundante	50	4.062		1.341	
Menos abundante		4.062		1.389	

Tabla 5-9. Continuación de la tabla de variación de desplazamientos químicos con el cambio de temperatura en DMSO de BOC-prolina

	T° C	δ' H	Espectro ampliado Protón α	δ' H	Espectro ampliado de la señal de t-butilo
Más abundante	55	4.069	Coalescencia  4.20 4.08 ppm	1.347	
Menos abundante				1.389	
Más abundante	60	4.072	Ψ doble  4.10 ppm	1.352	
Más abundante	65	4.077	ψ doble  4.12 4.06 ppm	1.364	
Menor frecuencia	70	4.069	2dd ancho  4.11 4.07 ppm	1.369	
Mayor frecuencia		4.084			
Menor frecuencia	80	4.077	2dd  4.13 4.08 ppm	1.375	
Mayor frecuencia		4.094			

- Tabla 5-9. Continuación de la tabla de variación de desplazamientos químicos con el cambio de temperatura en DMSO de BOC-prolina

	T° C	δ'H	Espectro ampliado Protón α	δ 'H	Espectro ampliado de la señal de t-butilo
Más alto campo	90	4.084		1.381	
Más bajo campo		4.101			

La energía involucrada en la isomería tanto geométrica como conformacional se calcula a partir de las temperaturas de coalescencia. En este caso la temperatura de coalescencia del protón α es de 55°C mientras que la del grupo *t*-butilo está entre 60 y 65°C.

5.1.4.2. Análisis de los espectros de RMN protónica del *t*-butilo de BOC-prolina y Hα del anillo pirrolidínico en altas temperaturas en DMSO

Considerando la temperatura de coalescencia del grupo *t*-butilo como la media entre 60 y 65°C y la del Hα como de 55°C, se pueden calcular las energías asociadas al intercambio geométrico entre las especies Z (cis) y E (trans).

Una de las maneras formales más utilizadas es el análisis completo de la forma de la señal llamada "complete lineshape analysis"; sin embargo, existen una serie de aproximaciones, que si bien no darán lugar al valor exacto de la energía de activación involucrada en el proceso, si podrán dar una aproximación válida al valor real. Para el cálculo de ΔG^\ddagger existen una serie de expresiones que toman en cuenta diferentes aproximaciones.

- $\Delta G_c^\ddagger = 2.303 RT_c \log \left\{ \left(\frac{2}{k_c} \right)^{1/2} \frac{\kappa T_c}{\pi \Delta \nu h} \right\}$. Siendo κ el coeficiente de transmisión y considerado como la unidad¹⁴
- Otra aproximación³⁵ utiliza la expresión $\Delta G_c^\ddagger = 2.303 RT_c (10.32 + \log T_c/k_c)$ considerando que $k_c = 2.22 \Delta \nu$.
- $\Delta G_c^\ddagger = 4.57 T_c \{9.97 + \log (T_c/\Delta \nu)\}$ ³⁶. Esta ecuación se utiliza principalmente a sistemas donde los sitios A y B en equilibrio tengan la misma población. Sin embargo, se puede utilizar como una aproximación a los valores reales. La constante de equilibrio en la coalescencia obedece a

³⁵ Juaristy E. Físicoquímica Orgánica, CINVESTAV-IPN, México, 1994.

³⁶ Oki M., Applications of Dynamic NMR Spectroscopy to Organic Chemistry, Series Methods in Stereochemical Analysis Vol. 4, VCH, USA, 1985.

$$k_c = \pi(\Delta\nu)/(2)^{1/2} \text{ y } k_c = 1/(2\tau)$$

Esta relación es válida cuando $5 \geq \Delta\nu 2\tau$ no excede del 10%³⁷

iv. La expresión que más se adecua al caso que se está estudiando es la propuesta por Bar-Eli³⁸ *et al.*, en donde se tienen las siguientes expresiones:

$$\Delta G_A^\ddagger = 4.57 T_c \{ 10.62 + \log (X/(2\pi(1+\Delta P))) + \log (T_c/\Delta\nu) \}$$

$$\Delta G_B^\ddagger = 4.57 T_c \{ 10.62 + \log (X/(2\pi(1-\Delta P))) + \log (T_c/\Delta\nu) \}$$

$$X = 2\pi\Delta\nu\tau \text{ y } \Delta P = P_A - P_B = ((X^2 - 2)/3)^{3/2} * X^{-1}.$$

Los valores de las constantes de equilibrio son:

$$k_A = (1-\Delta P)/2\tau \text{ y } k_B = (1+\Delta P)/2\tau$$

Los resultados se presentan en la tabla 5-10.

Tabla 5-10. Resultados del cálculo de energía involucrado en el intercambio.

Expresión	ΔG^\ddagger para el grupo t-butilo considerando $\Delta\nu = 25.5$ Hz y $T_c = 335.5$ K		ΔG^\ddagger para el H α considerando $\Delta\nu = 11$ Hz y $T_c = 328$ K	
i	71.216 kJ/mol (17.03 kcal/mol)		71.88 kJ/mol (17.198 kcal/mol)	
ii	71.25 kJ/mol (17.04 kcal/mol)		71.89 kJ/mol (17.2 kcal/mol)	
iii	71.06 kJ/mol (17.0 kcal/mol)		71.707 kJ/mol (17.154 kcal/mol)	
iv	71.39 kJ/mol (17.081 kcal/mol)	72.70 kJ/mol (17.393 kcal/mol)	72.02 kJ/mol (17.231 kcal/mol)	72.89 kJ/mol (17.44 kcal/mol)

Los resultados de ΔG^\ddagger muestran que existe una diferencia menor de 1 kJ/mol (0.6 kJ/mol) para el t-butilo. Es importante resaltar que para este sistema no se consideró al H α como un caso de señales acopladas ya que el equilibrio que se establece es entre el H α del isómero Z (cis) y el H α del isómero E (trans) que no están acoplados entre sí.

Al calcular la energía involucrada cuando el sistema no tiene poblaciones iguales como lo propone Bar-Eli *et al.*³⁸ se tiene que considerar la energía para cada una de las señales. Es por ello que en este caso, se tienen 2 energías diferentes.

Resulta evidente que debido a la coalescencia desaparece el acoplamiento de H α con H β característico, lo que sugiere que la energía conformacional del anillo puede provocar que el H α no distinga la posición "pseudo-axial" o "pseudo-ecuatorial" de

³⁷ Allerhand, A., Gutowsky, H.S., Jonas J. & Meinzer R.A., *J. Am. Chem. Soc.*, **88**:14, 3185, (1966).

³⁸ Shanani-Atidi H., & Bar-Eli, K.H., *J. Phys. Chem.*, **74**:4, 961, (1970).

los protones H β causando una señal promedio de las constantes de acoplamiento y la observación de una sola señal (un múltiple ancho) en coalescencia en esta temperatura en particular.

Una vez que se ha pasado la temperatura de coalescencia de los H α , al ir subiendo más la temperatura se van definiendo unas señales que parecieran 1dd (J= 3.5, 8Hz). La diferencia en la abundancia relativa de las señales ha desaparecido lo que muestra que una vez vencida la barrera de la isomería geométrica, será la isomería conformacional la que empiece a definir el nuevo patrón de acoplamiento.

5.1.4.3. Ampliación de los espectros de ^{13}C de BOC-prolina en DMSO en alta temperatura.

Tabla 5-11. Ampliación de los espectros de ^{13}C para BOC-prolina a T.A y a 65°C.

T° C	Espectro ampliado $^{13}\text{C}\alpha$	Espectro ampliado $^{13}\text{C}\delta$	Espectro ampliado $^{13}\text{C}\beta$, $^{13}\text{C}\gamma$, y ^{13}C de t-butilo
25			
55			
65			

Al analizar los espectros de ^{13}C en estas temperaturas de la tabla 5-11, resulta claro que las señales de $\text{C}\alpha$, $\text{C}\delta$ y t-butilos han presentado la coalescencia a los 65°C mientras que $\text{C}\beta$ y $\text{C}\gamma$ muestran solamente un ensanchamiento de señales que sugiere que a una temperatura más elevada se podría llevar a cabo la coalescencia de dichos núcleos. También llama la atención que a 55°C el espectro protónico de los $\text{C}\alpha$ ha tenido coalescencia, mientras que en ^{13}C este fenómeno no se ha producido.

El hecho de tener una diferenciación entre los $\text{C}\beta$ y $\text{C}\gamma$ tanto Z (cis) como E (trans) aún a pesar de estar alejados del sitio de la isomería geométrica y a pesar de la temperatura de 65°C , apoya lo dicho por Wüthrich *et al.*¹⁵, y Siemion *et al.*³⁹, al considerar a estos carbonos como los carbonos "reflejo" (probes) para la determinación de la isomería geométrica de macromoléculas al verse menos afectados por variaciones de temperatura.

Con toda la evidencia mostrada anteriormente tanto en baja como en alta temperatura se patentiza el hecho de que existen 2 barreras energéticas bien diferenciadas:

- La barrera que interconvierte los isómeros geométricos en torno al enlace peptídico dada por el grupo t-butilo.
- La barrera que interconvierte las dos conformaciones extremas del anillo pirrolidínico que promedia las constantes de acoplamiento del $\text{H}\alpha$ con las de $\text{H}\beta$ principalmente en altas temperaturas.

5.2. Síntesis del éster metílico y bencílico del ácido γ -aminobutírico (GABAOMe / GABAOBen)

Ambos compuestos fueron sintetizados como materia prima para la posterior obtención de los dímeros y la confirmación de las estructuras químicas de ambos compuestos fue hecha solamente utilizando la RMN protónica y de ^{13}C unidimensional en 300MHz. Los espectros se muestran en las figuras 5-12 y 5-13.

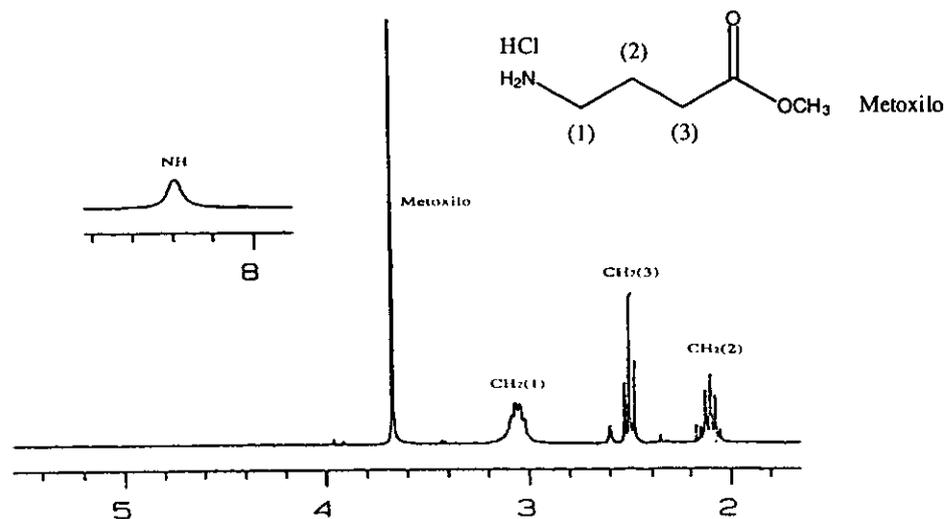


Figura 5-12. Espectro protónico del éster metílico del ácido γ -aminobutírico.

³⁹ Siemion I.Z., Wieland T. & Pook K.H., *Angew.Chem.internat.Edit.*, 14:10, 702 (1975).

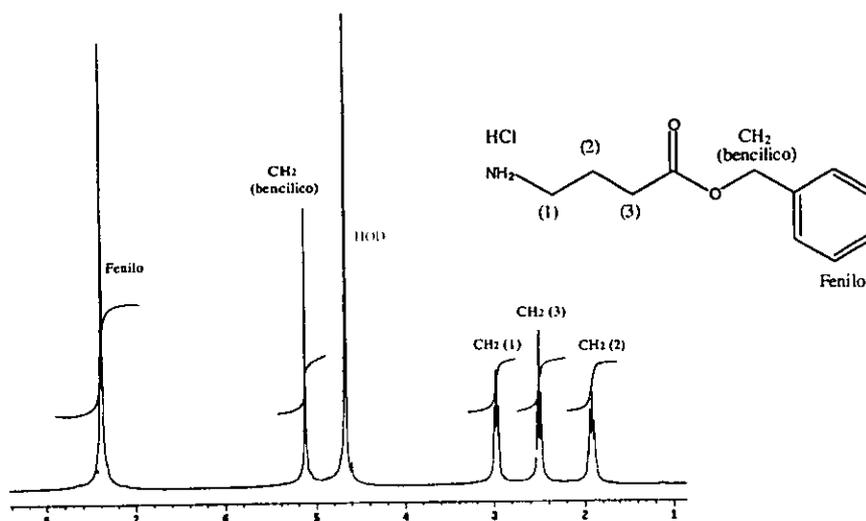


Figura 5-13. Espectro protónico del éster bencilico del ácido γ -aminobutírico corrido en D_2O .

Una vez confirmada la estructura utilizando RMN y al ver una sola señal en cromatografía en capa fina se decidió utilizar ambos compuestos para las siguientes reacciones de acoplamiento. En RMN no se detectaron señales de impurezas mayores al 5%.

5.3. Síntesis del éster metílico de BOC-prolina

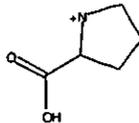
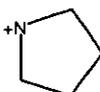
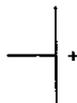
5.3.1. Resultados de rotación óptica, IR y EM del éster metílico de BOC-prolina

La síntesis del éster metílico de BOC-prolina se hizo con el fin de obtener un espectro NOESY en donde fuera más notoria la interacción del éster metílico con el butilo. La rotación óptica $[\alpha]^{20}(c=0.01 \text{ en } CHCl_3)$ fue de -48.5° . Los resultados de la espectrometría de masas se presentan en la tabla 5-12 y confirmaban la obtención del éster con los siguientes fragmentos.

Tabla 5-13. Fragmentos que dan lugar a cada uno de los picos en EM del éster metílico de BOC-prolina

Identificación	m/z	Descripción
M+ (ion molecular muy pequeño)	229	
M-59	170	
M-101	128	

Tabla 5-13. Continuación de la tabla de fragmentos que dan lugar a cada uno de los picos en EM del éster metílico de BOC-prolina.

Identificación	m/z	Descripción
M-115	114	
M-159 (pico base)	70	
M-172	57	

5.3.2. Espectros de RMN en 500 MHz en T.A y baja temperatura

Los espectros de ^1H y ^{13}C a temperatura ambiente se muestran a continuación en las figuras 5-13 y 5-14.

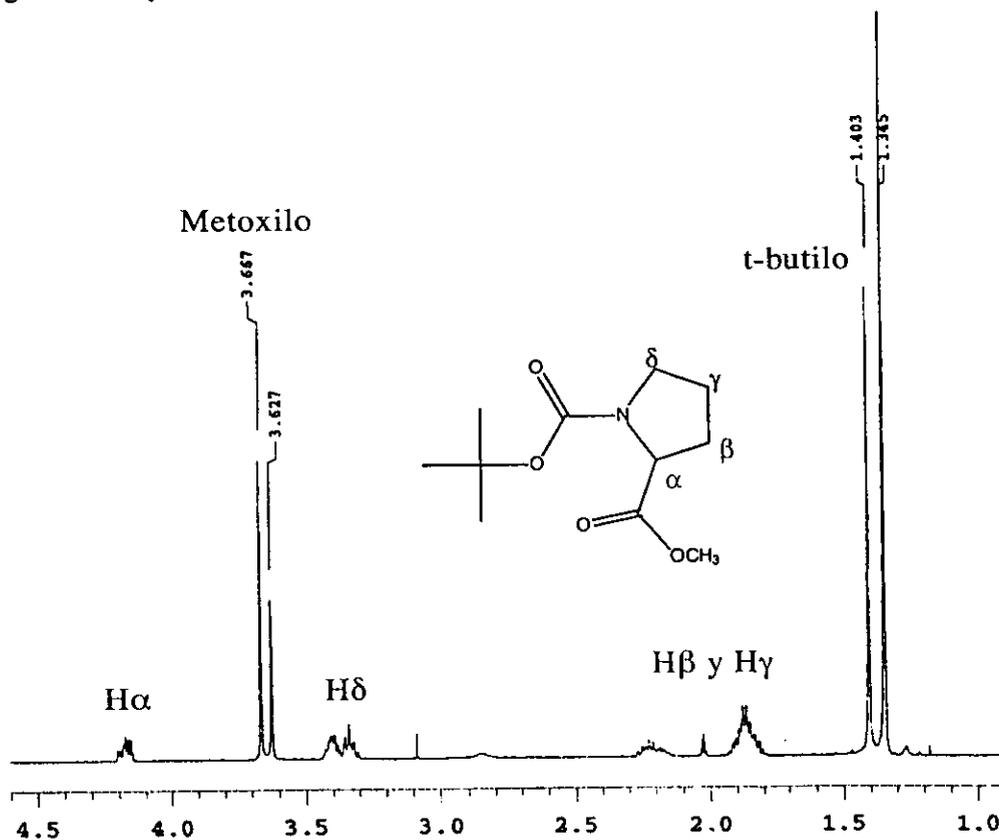


Figura 5-13. Espectro protónico a T.A en acetona- d_6 del éster metílico de BOC-prolina.

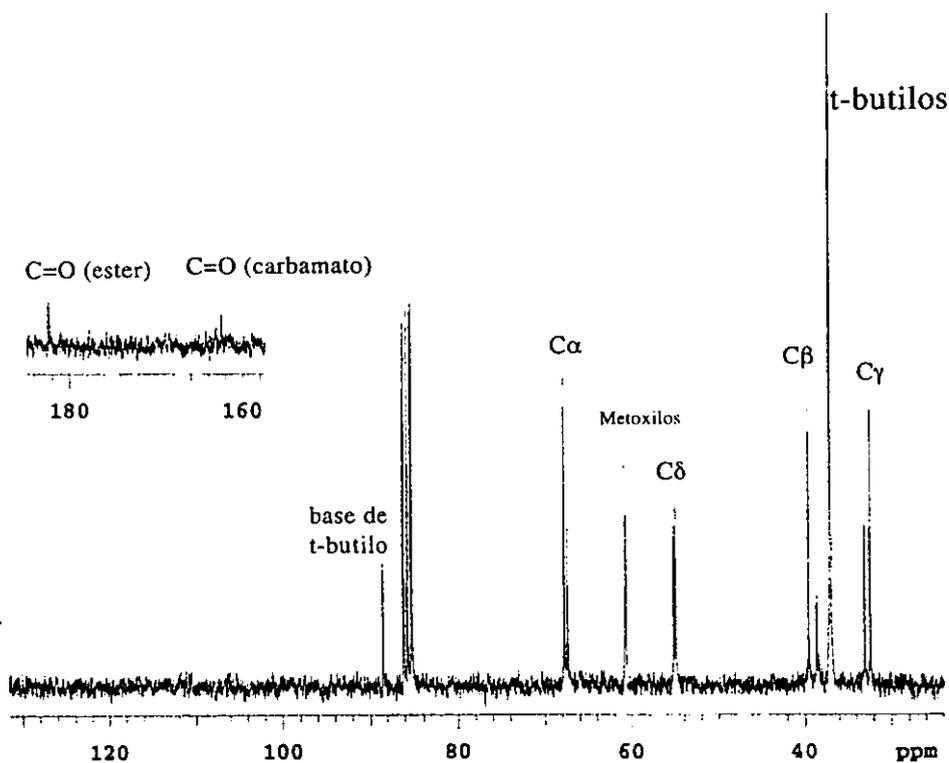


Figura 5-14. Espectro de ^{13}C del éster metílico de BOCprolina.

Las señales de los metoxilos en 3.66 y 3.627 ppm en protónica muestran la evidencia del resultado exitoso de la formación del éster. Nuevamente se llevaron a cabo los estudios en baja temperatura para minimizar el intercambio y poder tener evidencia más contundente de asignación. El espectro NOESY mostró mucho ruido evitando una buena interpretación (anexo 2: E-2-1 y E-2-2) y una evidencia contundente de la isomería presente. Considerando análogos los resultados de este compuesto a los del BOC-prolina libre, así como los datos de Würthich *et al*¹⁵ . y Bovey *et al*³³ la elucidación final se muestra en la siguiente figura.

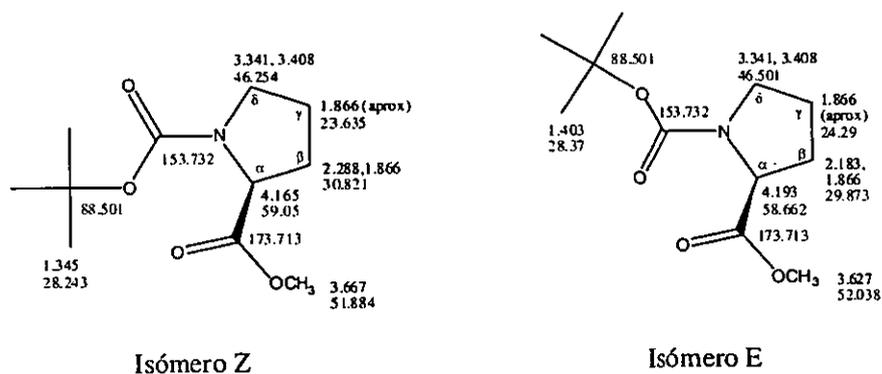


Figura 5-15. Resumen de los desplazamientos químicos para el isómero Z (cis) y el E (trans) del éster metílico de BOC-prolina.

5.4. Síntesis del *t*-butyloxycarbonil-GABA (BOC-GABA)

En la figura 5-16 se presenta la estructura de BOC-GABA.

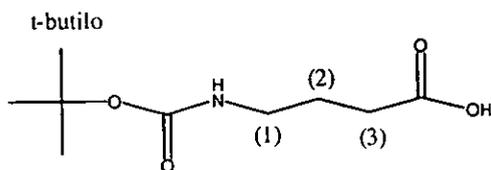


Figura 5-16. Estructura química de BOC-GABA.

Para la confirmación estructural, se obtuvieron los espectros de EM en baja resolución y se presentan en el anexo 3 (E-3-1). Las fragmentaciones más importantes se presentan en la tabla 5-14.

Tabla 5-14. Tabla de asignaciones del espectro de masas.

EM	m/Z	Asignación
M+1	204	M+H
M-57	147	M-(t-Bu)
M-73	130	M-(O-t-Bu)
M-116	86	M-(C ₅ H ₁₀ NO ₂)
M-146	57	t-Butilo

El espectro de RMN protónica de BOC-gaba se presenta en la figura 5-17. En el se ven claramente las señales de cada uno de los diferentes protones en la molécula.

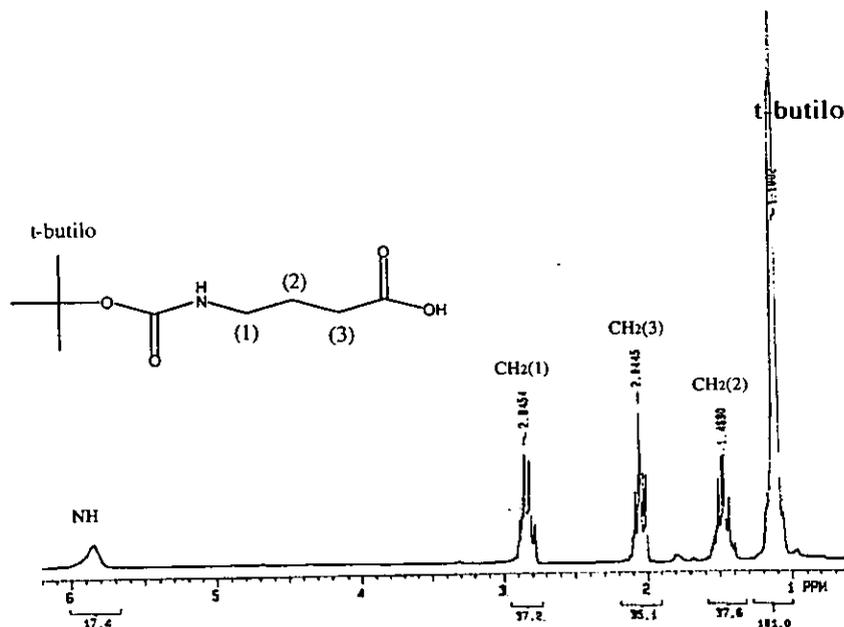


Figura 5-17. Espectro protónico de BOC-GABA en 300 MHz en CDCl₃.

5.5. Acoplamiento de BOCprolina- éster metílico de GABA (BOCpro-GABAOMe)

Siguiendo la técnica descrita por Bodanszky¹⁸ se obtuvieron compuestos que no correspondían a los esperados. Los espectros de RMN mostraron que el compuesto obtenido no tenía señales de GABA, pero si había señales de BOC prolina y de DCC. Esto nos llevó a pensar que la O-acilisourea se había reorganizado dando lugar a la N-acilurea. El mecanismo normal de reacción de síntesis de dipéptidos utilizando la diciclohexilcarbodiimida (DCC) con la formación de DHU se muestra en la figura 5-18.

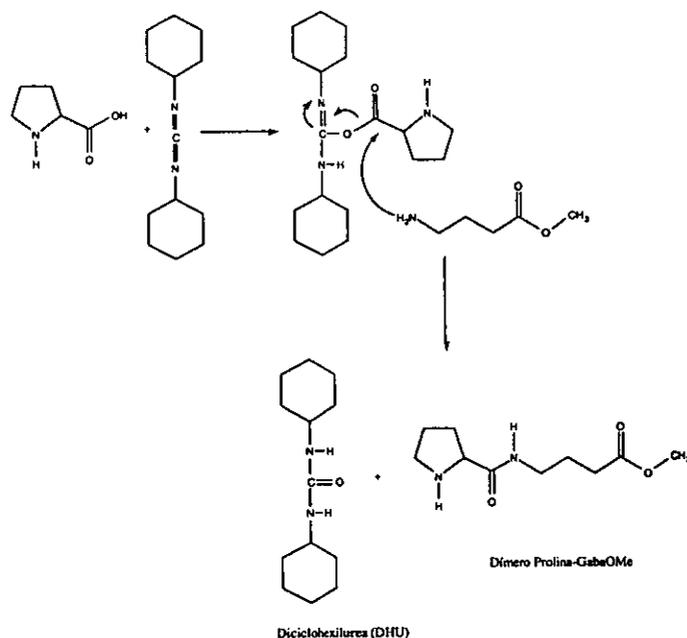


Figura 5-18. Mecanismo de reacción propuesto para la formación del dipeptide utilizando DCC como agente acoplante.

Una de las reacciones laterales es el reorganizado del intermediario O-acilisourea dando lugar a la N-acilurea como se muestra en la figura 5-19. El espectro de RMN protónica que se muestra en la figura 5-20, muestra una señal doble del NH producto de su acoplamiento con el CH del ciclohexilo así como las señales características de prolina y de los metilenos del ciclohexilo.

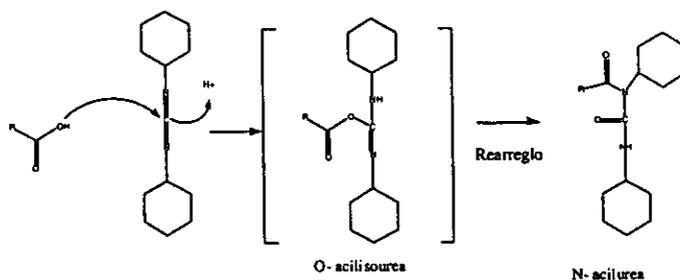


Figura 5-19. Rearreglo del intermediario O-acilisourea a N-acilurea.

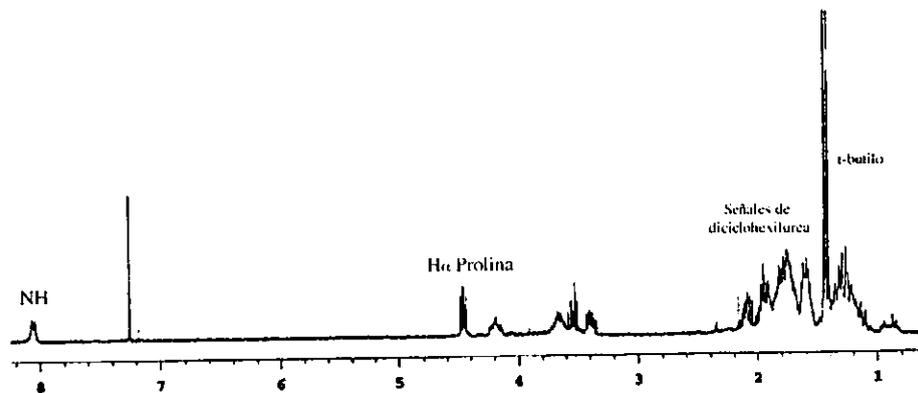


Figura 5-20. Espectro de RMN protónica en CDCl_3 del BOCprolina-DCC sin agente auxiliar.

Considerando este hecho, el rendimiento de la formación del dipeptido fue muy bajo y se decidió ya no continuar con su purificación sino optimizar la síntesis utilizando un auxiliar. De manera general la utilización de auxiliares en la síntesis de péptidos es con el propósito de evitar la racemización. Tal es el caso de la N-hidroxisuccinimida y del N-hidroxibenzotriazol (figura 5-21) que forman un éster *in situ* impidiendo el rearreglo del intermediario y facilitando la entrada del segundo aminoácido.

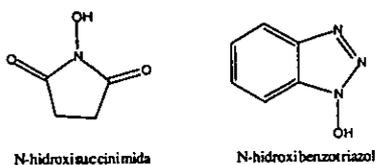


Figura 5-21. Estructuras de algunos auxiliares utilizados en la síntesis de péptidos.

El mecanismo de acción del auxiliar se muestra en la figura 5-22.

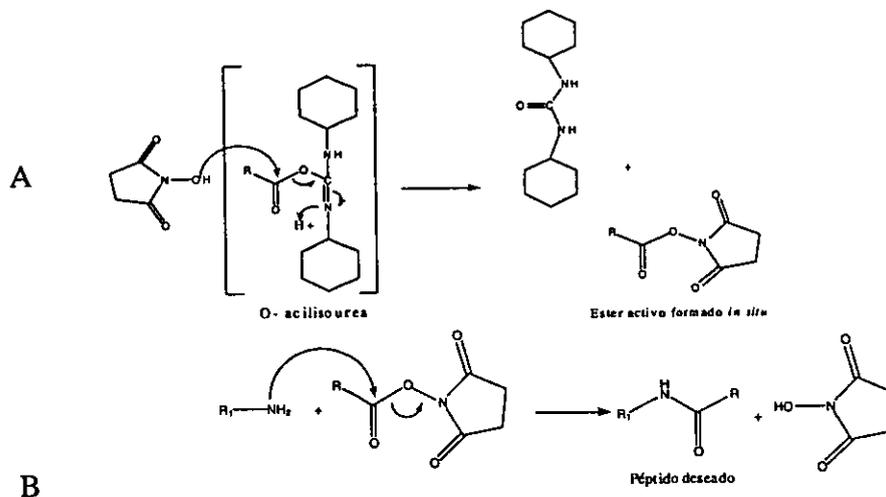


Figura 5-22. A) Ataque de la N-hidroxisuccinimida (NHS) sobre el intermediario O-acilisourea para la formación del éster activo *in situ*. B) Ataque del segundo aminoácido al éster activo para la formación del péptido deseado y la recuperación de la NHS.

⁴⁰ Jones J. Amino Acid and Peptide Synthesis, Oxford University Press-Zeneca, Great Britain, 1999.

5.5.1. Análisis de los resultados de rotación óptica, IR y EM

El hecho de utilizar un auxiliar como la N-hidroxisuccinimida permitió que la reacción de acoplamiento se llevara a cabo exitosamente. El rendimiento de la reacción fue del 60% tras haber purificado en una columna de sílice 70/230 con acetato de etilo como fase móvil. El producto fue un sólido amorfo de punto de fusión de 69-71°C (sin corregir) cuya estructura se muestra en la figura 5-23. La rotación óptica determinada en cloroformo fue de $[\alpha]^{20} = -90^\circ$ ($c=0.1$).

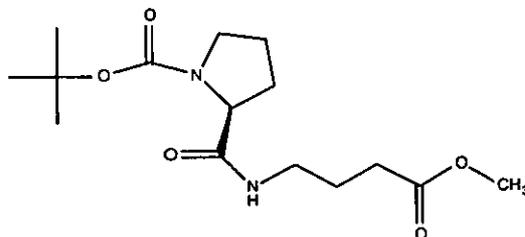


Figura 5-23. Estructura del BOCprolina- éster metílico de GABA (BOCpro-GABAOMe).

El espectro de infrarrojo obtenido en pastilla de bromuro de potasio se presenta en la figura 5-24.

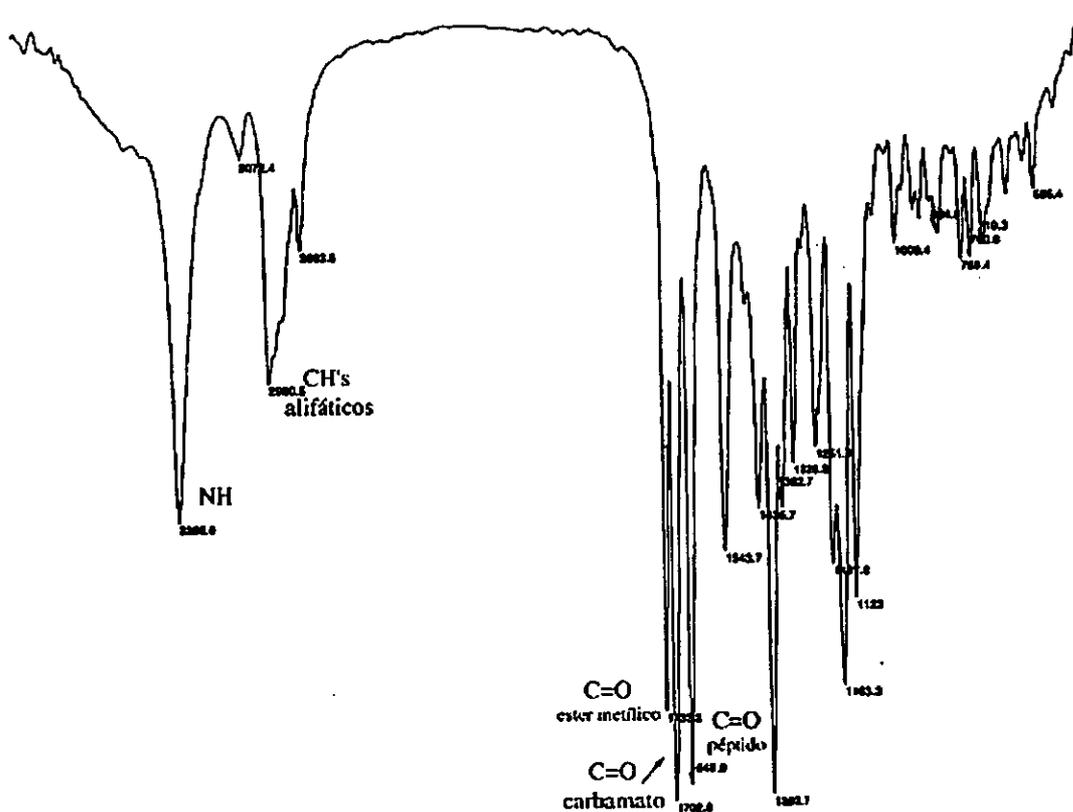


Figura 5-24. Espectro de Infrarrojo en pastilla de KBr del dipeptide BOCprolina-GABAOMe.

Se pueden ver las bandas características del grupo NH así como las 3 bandas diferentes para los 3 carbonilos presentes. En la tabla 5-14 se presenta un resumen de las bandas más representativas en IR.

Tabla 5-15. Resumen de las bandas características de IR para el dipeptido BOC-prolina-GABAOMe en pastilla de KBr.

Frecuencia	Descripción	Frecuencia	Descripción
3266 cm^{-1}	ν N-H asociada	1702 cm^{-1}	C=O Carbamato
3072 cm^{-1}	ν N-H	1649 cm^{-1}	C=O Banda Amida (I)
2980 cm^{-1}	ν sCH	1543 cm^{-1}	δ N-H, ν C-N Amida (II)
2883 cm^{-1}	ν _a CH	1393 cm^{-1}	δ N-H, ν C-N Amida (III)
1733 cm^{-1}	C=O Éster metílico	1163 cm^{-1}	ν C-O Éster metílico

Se puede ver en el espectro de IR en pastilla la banda de ν N-H asociada en 3266 cm^{-1} . Al obtener el espectro en disolución de CHCl_3 , se eliminó la asociación y se logró observar una banda de absorción del N-H libre y otra banda de N-H asociado por vía de puente de hidrógeno intramolecular así como un ensanchamiento de la señal de los carbonilos del carbamato y el enlace peptídico generando que a simple vista parecieran solamente 2 carbonilos. En la figura 5-25 se muestra el espectro en solución de CHCl_3 del dipeptido.

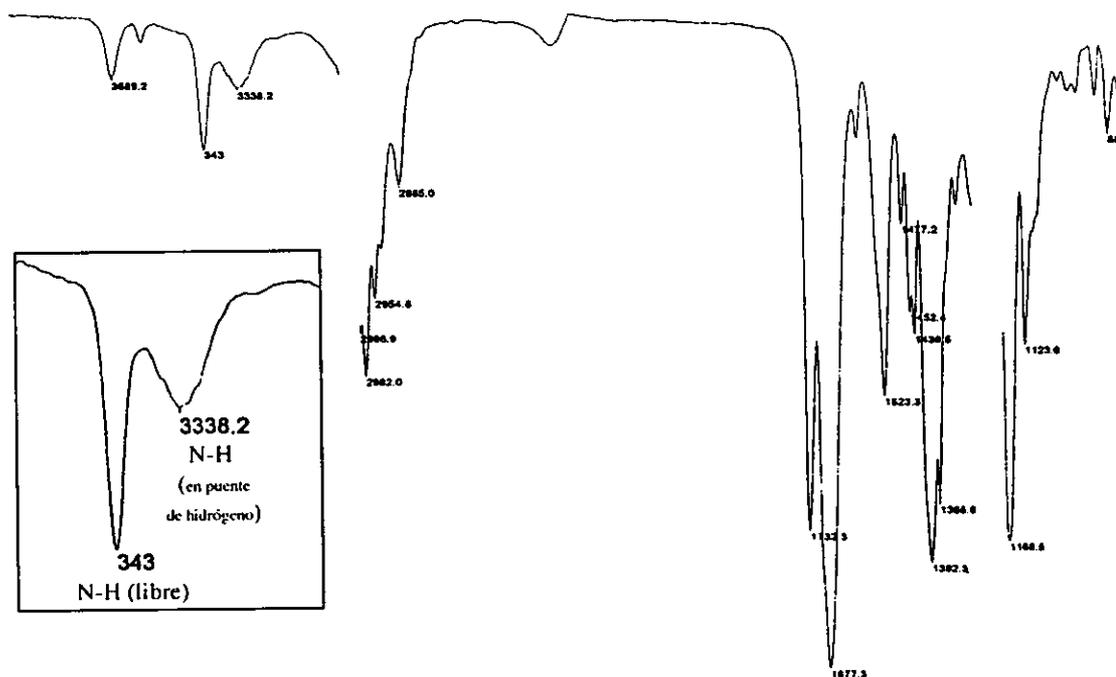


Figura 5-25. Espectro en CHCl_3 de BOC-prolina-GABAOMe. Se aprecia una diferencia en la zona de NH en donde se puede apreciar la banda de absorción del NH libre y del NH asociado.

A través de un ciclo de 7 miembros, la existencia de un puente de hidrógeno entre el NH de GABA y el carbonilo del carbamato puede dar lugar a un corrimiento en la frecuencia de absorción del carbonilo del carbamato y dando lugar a una señal ancha

en 1677.3 cm^{-1} . La posibilidad de un puente de hidrógeno intramolecular de GABA no se ve favorecida de acuerdo a lo propuesto por Gellman *et al*⁴¹ y concuerda con la evidencia de IR corrido en CHCl_3 . En la figura 5-26 se esquematizan los puentes de hidrógeno favorecido y el desfavorecido de acuerdo a los datos de la literatura.

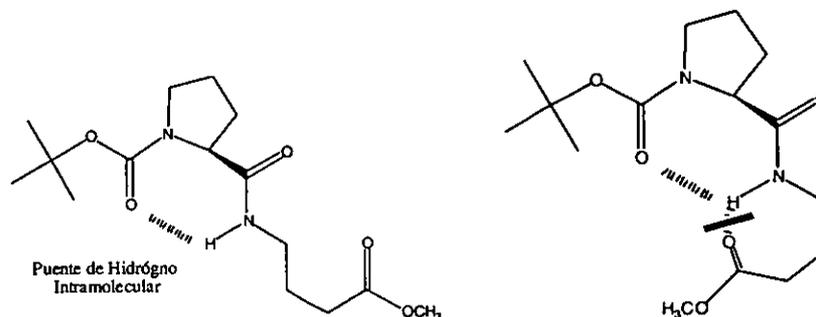


Figura 5-26. Un puente de hidrógeno intramolecular generando un giro y es factible entre el carbonilo del carbamato (posición i) y el protón amídico (i+2). El puente de hidrógeno intramolecular de GABA no es muy favorecido de acuerdo con Gellman *et al*.

En IR se ve claramente que existen absorciones de NH libre y de NH asociado en puente de hidrógeno. La intensidad es mayor para el NH libre que del asociado. A través de RMN se corroborará la existencia de algunos puentes de hidrógeno intramoleculares. Más adelante se presentan los resultados.

En EM se pudo ver la señal del ion molecular lo que indicaba que el producto tenía el mismo peso molecular del producto esperado y al considerar las posibles fragmentaciones, se pudo comprobar que se trataba del dipeptido esperado. En la figura 5-27 se muestra el espectro completo de EM en baja resolución.

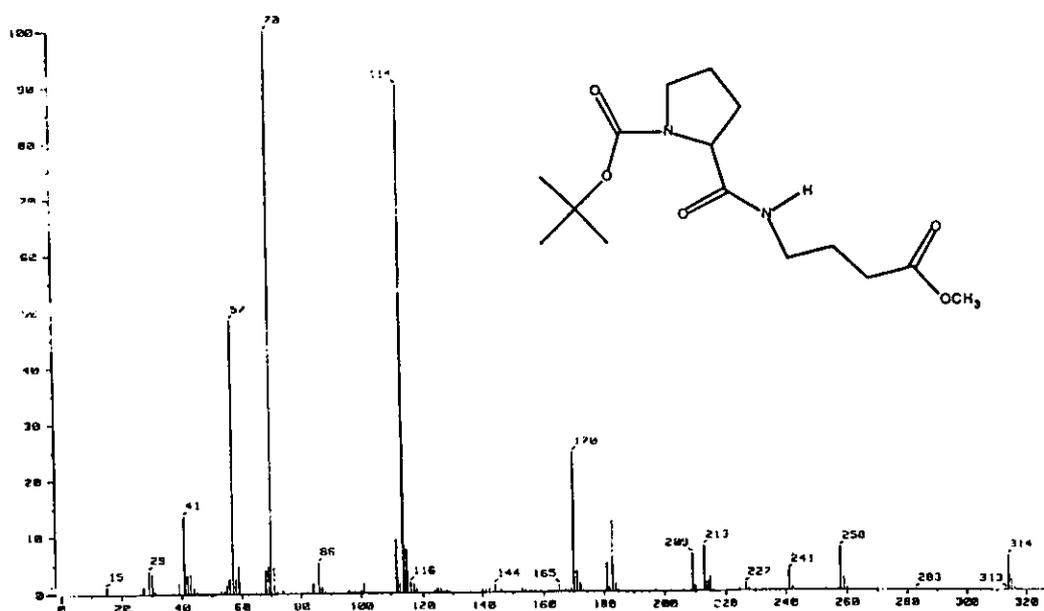


Figura 5-27. Espectro de Masas de baja resolución de BOCpro-GABAOMe

⁴¹ Gellman S.H., Dado G.P., Liang G-B. & Adams B.R., *J. Am. Chem.Soc.*, 113, 1164 (1991).

El mecanismo propuesto para el origen de algunos fragmentos se muestra en las figuras 5-28 y 5-29.

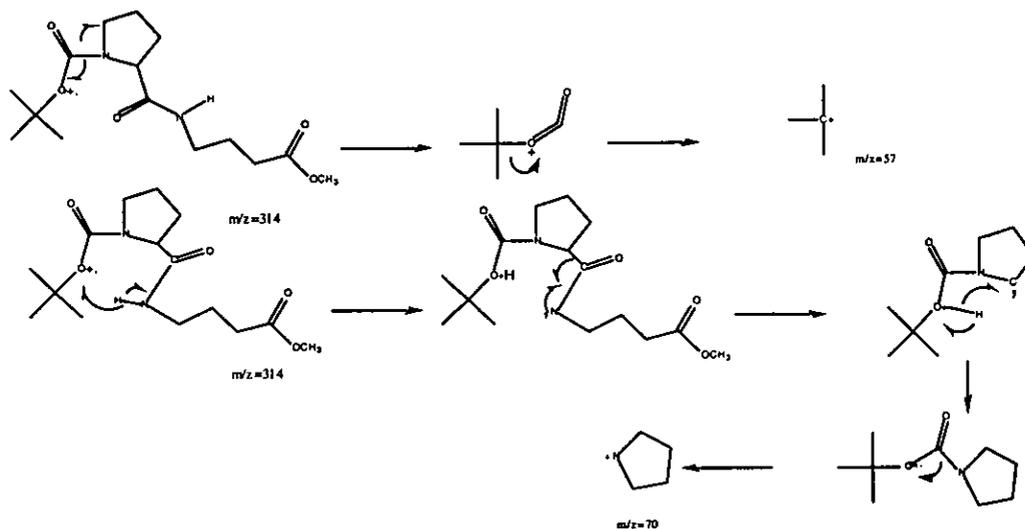


Figura 5-28. Mecanismo propuesto para la fragmentación de BOCpro-GABAOMe en espectrometría de masas.

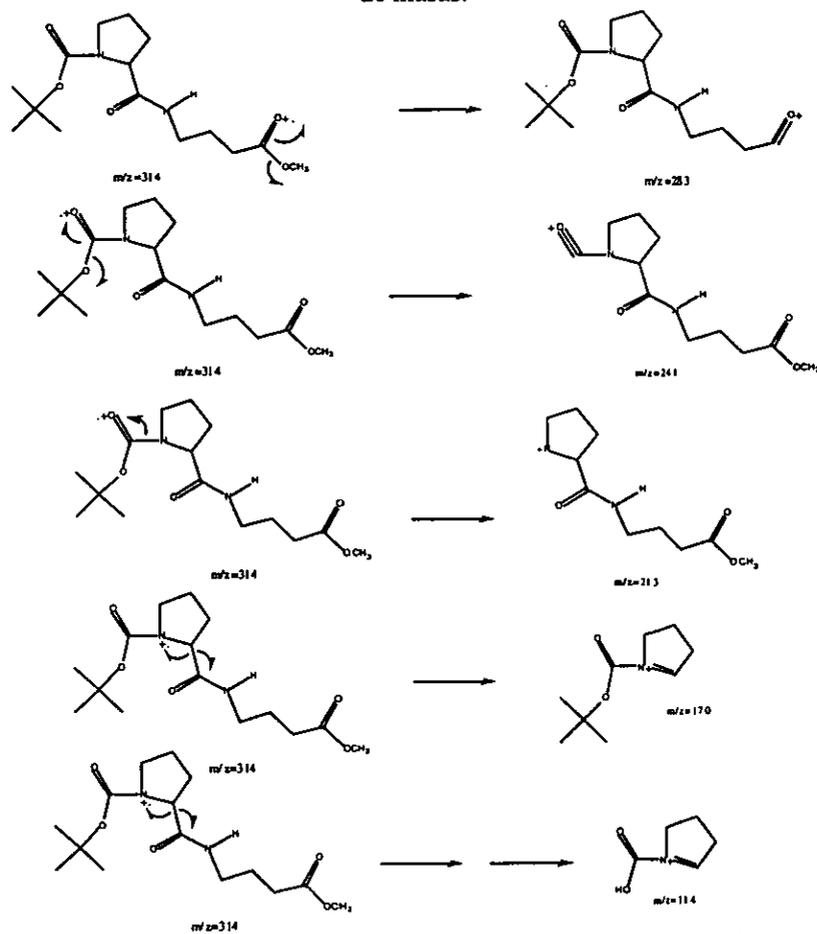


Figura 5-29. Mecanismo propuesto para la fragmentación de BOCpro-GABAOMe en espectrometría de masas.

Los datos de alta resolución corroboraron la fórmula mínima del ion molecular. Cabe mencionar que en alta resolución, debido a que se determina vía FAB+ que utiliza alcohol bencílico como matriz soporte lo que realmente se observó el M+1.

Tabla 5-16. Datos de alta resolución de EM en donde se comprueba la composición mínima.

[Elemental Composition]					
Data :	Dr-Enriquez060	Date :	30-Apr-98 03:26		
Sample:	VJ27 (21)				
Note :	=Virginia				
Inlet :	Direct	Ion Mode :	FAB+		
RT :	0.49 min	Scan#:	(1,4)		
Elements :	C 50/0, H 65/0, O 7/1, N 3/0				
Mass Tolerance	: 10ppm, 10mmu if m/z > 1000				
Unsaturation (U.S.)	: 0.0 - 6.0				
Observed m/z	Int%				
315.1921	100.0				
Estimated m/z	Error [ppm]	U.S.	C	H	O
315.1920	+0.4	3.5	15	27	5
					N
					2

5.5.2. Análisis de los espectros de RMN de BOC-prolina-GABAOMe

Si lugar a dudas, los resultados más interesantes se presentaron al llevar a cabo el análisis de los espectros de resonancia magnética nuclear en donde se muestra el equilibrio tautomérico que tiene este compuesto además de la isomería Z(cis)-E(trans) que se ha analizado para BOC-prolina anteriormente. En la figura 5-30 se muestra la estructura de las formas tautoméricas posibles en este compuesto.

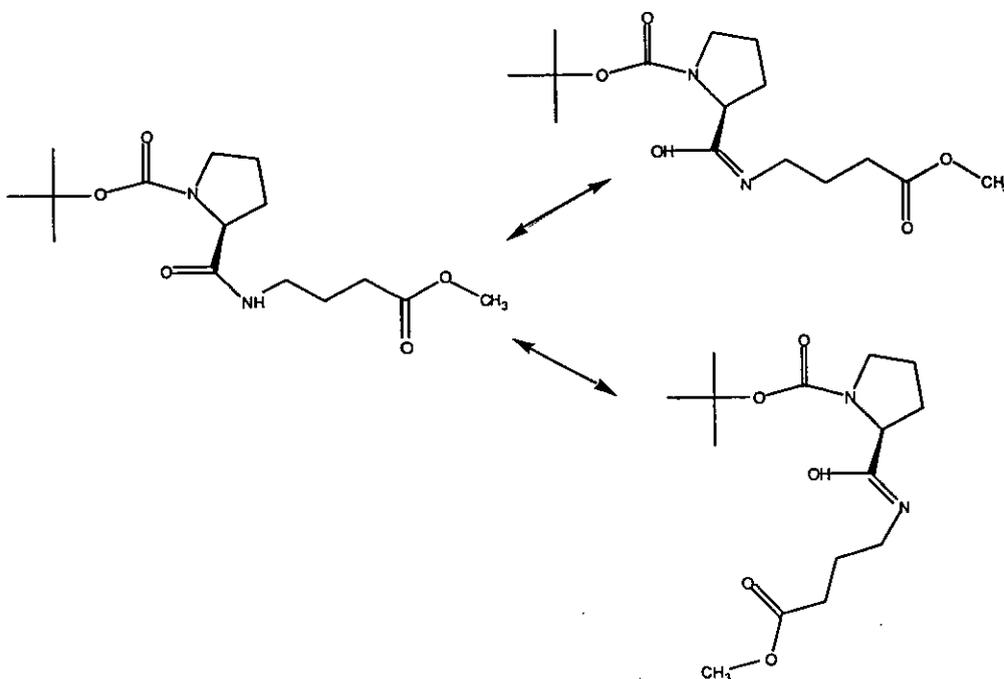


Figura 5-30. Equilibrio tautomérico de BOC-prolina-GABAOMe.

5.5.2.1. Espectros de RMN en CDCl_3 , 300 MHz en T.A

El espectro unidimensional de protón muestra a las señales de 3.4 y 4.23 como señales anchas y son las señales de metilenos y del metino de prolina. En la figura 5-31 se muestra el espectro protónico en 300 MHz.

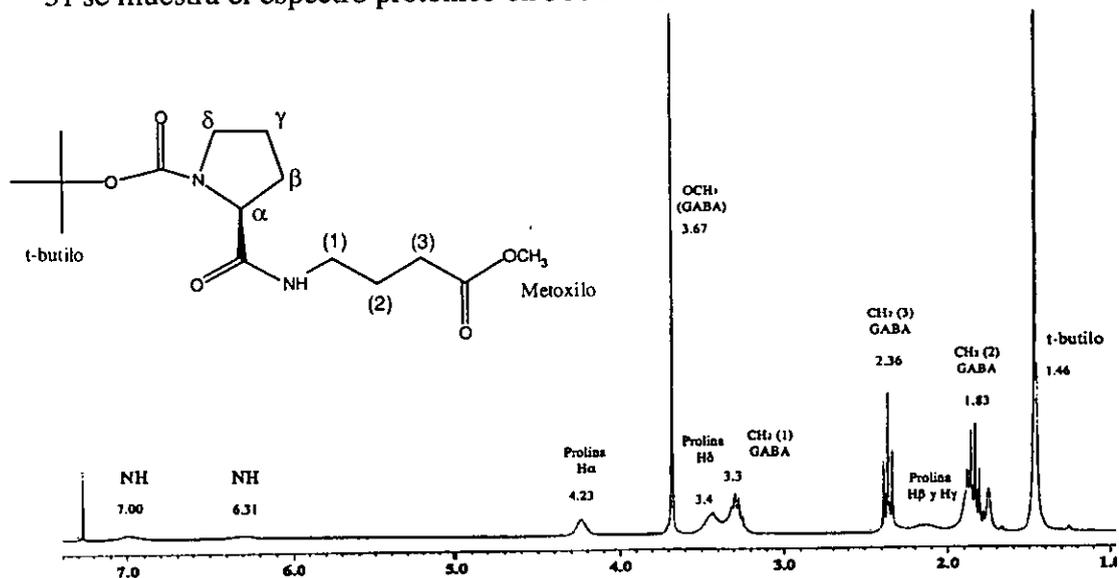


Figura 5-31. Espectro ^1H unidimensional en CDCl_3 del BOCprolina-GABAOMe en 300 MHz en temperatura ambiente.

En carbono solamente se ve una señal para carbonilos, cuando en realidad se esperarían 3 de acuerdo a la estructura propuesta. En la figura 5-32 se muestra el espectro.

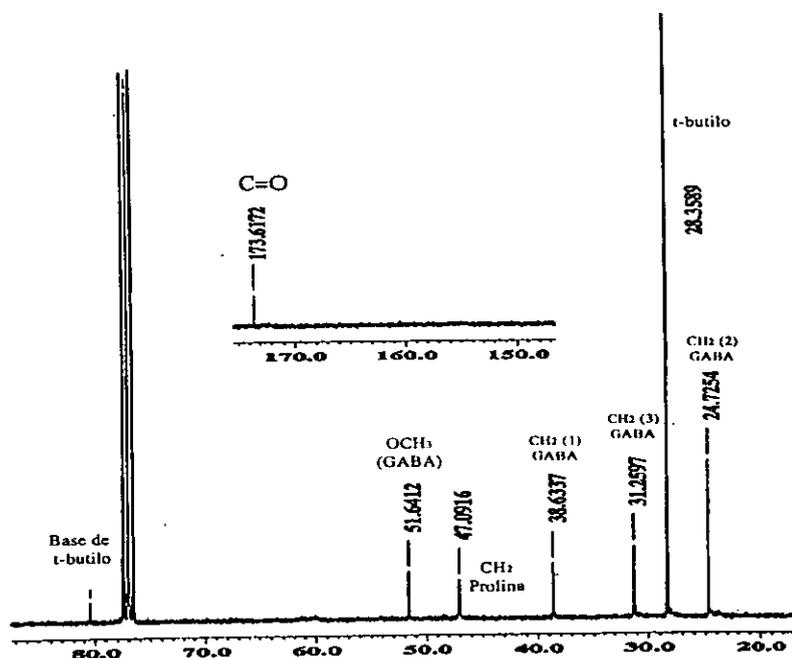


Figura 5-32. Espectro de ^{13}C en CDCl_3 de BOCprolina-GABAOMe.

A pesar de que solo aparece una señal de carbonilo, la evidencia contundente de IR y de EM permitió que se pensara en un ensanchamiento de señales producto de una rápida relajación de la prolina. La elucidación total de la estructura no se pudo llevar a cabo en 300 MHz.

5.5.2.2. Espectros de RMN en CDCl_3 , 500 MHz en altas temperaturas

Como alternativa se pensó en impedir la rápida relajación llevando a cabo la evaluación espectral en alta temperatura en DMSO y utilizando un equipo de 500 MHz. Las señales de desplazamiento químico para los NH se encuentran en 7.71 y 7.79 ppm (menos abundante y más abundante respectivamente) mientras que las señales de los OH muestran un desplazamiento químico de 3.21 y 3.23 ppm (isómeros más y menos abundante respectivamente) que evidencian el equilibrio tautomérico presente en la estructura.

La elucidación estructural completa se hizo utilizando los experimentos de ^1H , ^{13}C , COSY, HSQC, HMBC y NOESY que llevaron a la asignación total de la estructura. En la figura 5-33 se muestra el espectro protónico en 500 MHz. En el anexo 4 se encuentran los demás espectros (E-4-1 al E-4-8).

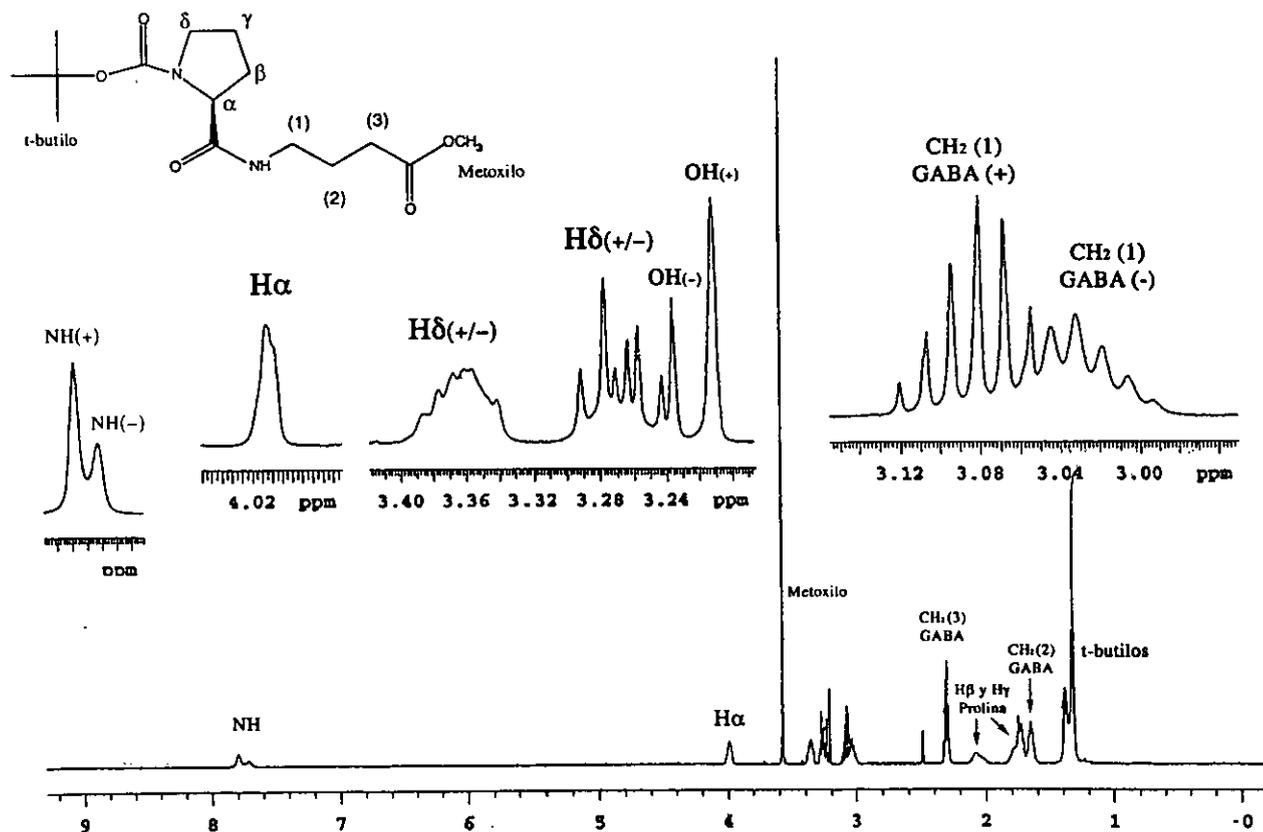


Figura 5-33. Espectro unidimensional protónico en 500 MHz y 40°C de BOC-prolina-GABAOMe en donde se observan claramente las señales de prolina que se enmascaraban en 300 MHz. También se observan 2 señales para el t-butilo. La nomenclatura (+) y (-) se refieren a los isómeros más y menos abundantes respectivamente.

En la figura 5-34 se muestra la expansión del espectro de ^{13}C de BOC-prolina-GABAOMe.

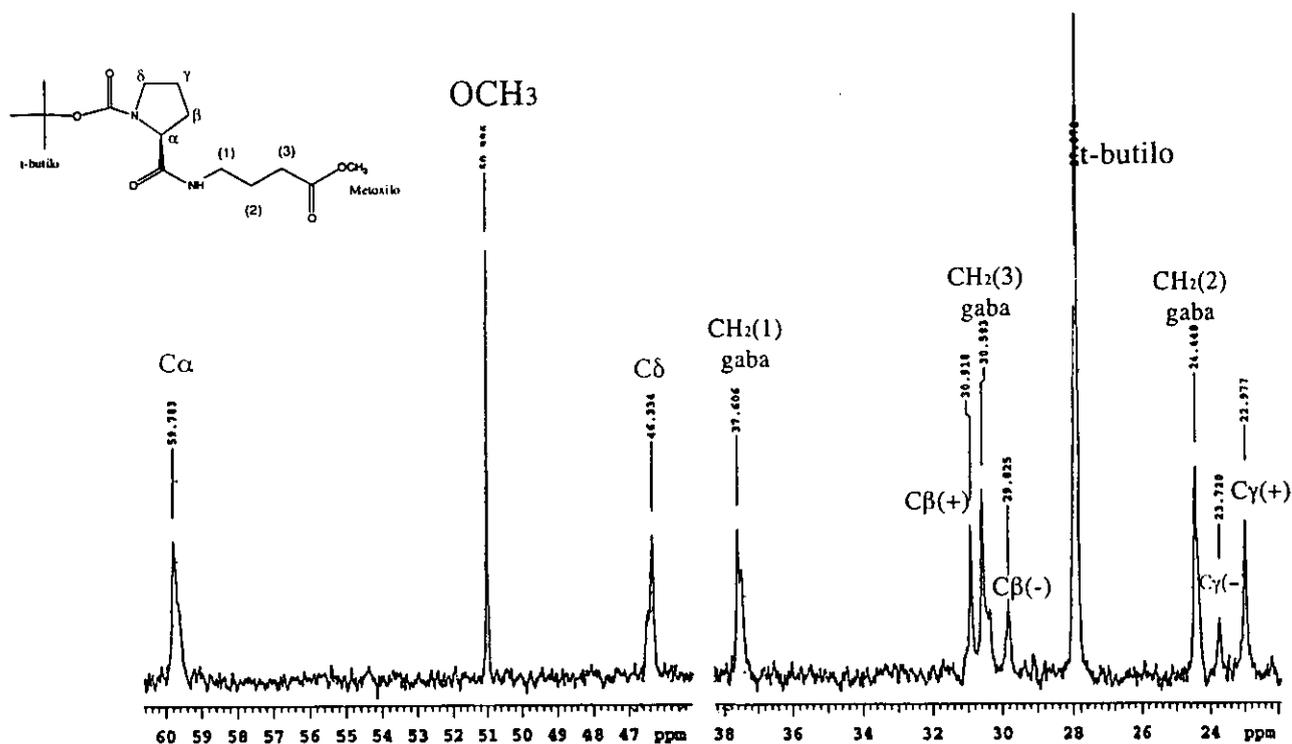


Figura 5-34. Ampliación del espectro de ^{13}C BOCprolina-GABAOMe en 40°C .

Sobre la base de la diferencia de desplazamiento químico de los carbonos γ y β , se pueden asignar las señales que corresponden al isómero Z (cis) del E (trans) y por ende poder reconocer cada una de las formas tautoméricas. Las señales de los $\text{C}\alpha$ y $\text{C}\delta$ muestran idénticos desplazamientos químicos para sus isómeros Z (cis) y E (trans).

Tabla 5-17. Asignaciones de los isómeros Z y E con base en la diferencia de desplazamientos químicos.

	$\delta^{13}\text{C}$	$\Delta\nu^{13}\text{C}_{\beta-\gamma}$ (Hz)	Isómero
$\text{C}\gamma$	22,977	992,6	Z (CIS)
$\text{C}\beta$	30,918		
$\text{C}\gamma$	23,720	763,1	E (TRANS)
$\text{C}\beta$	29,825		

Las estructuras propuestas para cada uno de los isómeros se muestran en la figura 5-35 en donde se identifica como Z(cis) o E(trans) la isomería en el enlace uretánico y ceto o enol la tautomería preferencial de cada uno de los isómeros. Es importante hacer notar que la isomería en torno al enlace peptídico no resultó evidente con la información con la que se cuenta.

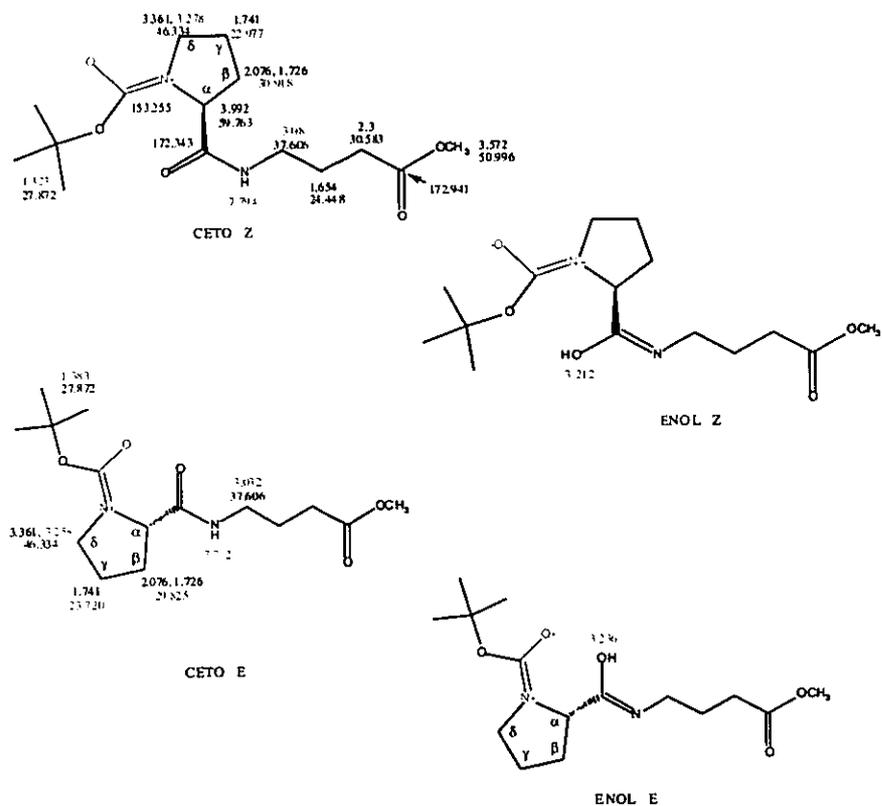


Figura 5-35. Resumen de los desplazamientos químicos de ¹H y ¹³C de BOCprolina-GABAOMe. Se muestran las señales que cambian con respecto al isómero CETO Z (CIS).

Dentro del proceso de elucidación total se observaron unas interacciones homonucleares no comunes de larga distancia entre el protón del OH con el metileno CH₂(1) del GABA en el espectro COSY. En la figura 5-36 se muestran los núcleos involucrados en dicha interacción.

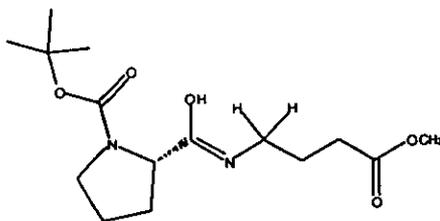


Figura 5-36. Interacción homonuclear a 5 enlaces de distancia en el isómero enólico de BOC-prolina-GABAOMe.

El espectro homonuclear COSY en 40°C que se presenta en la figura 5-37 muestra claramente la interacción del OH y del metileno (1) de GABA.

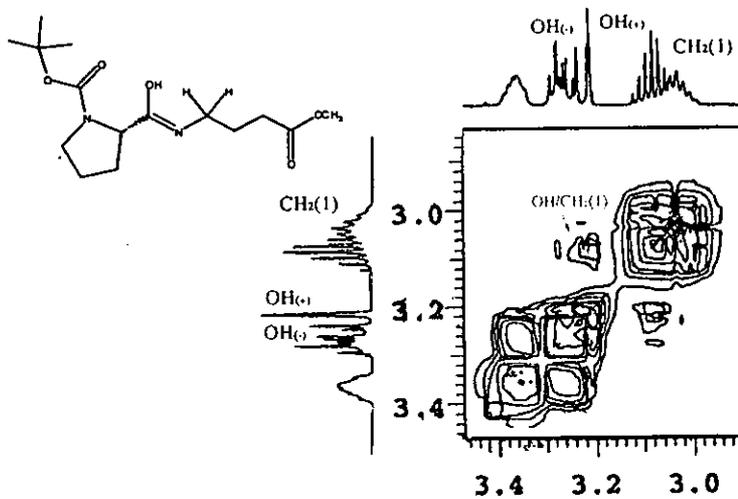


Figura 5-37. Ampliación del espectro COSY de BOCprolina-GABAOMe en 40°C.

En el espectro de correlación heteronuclear de la figura 5-38 se puede ver una interacción a 4 enlaces de distancia entre el OH y el CH₂(1) de GABA. Confirmando lo que se había visto anteriormente.

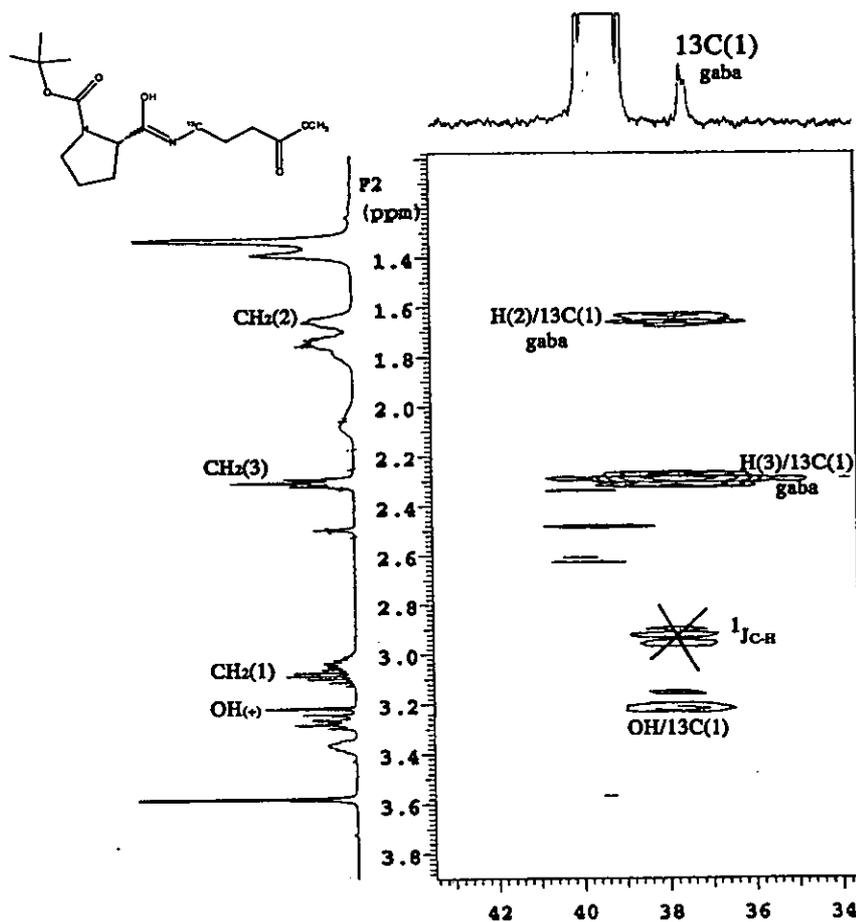


Figura 5-38. Espectro HMBC en donde se ve la interacción heteronuclear del OH con el ¹³C (1) de GABA

5.5.2.3. Estudio sistemático de los espectros protónicos de BOCpro-GABAOMe en altas temperaturas

Nuevamente al llevar con el estudio en alta temperatura se llevaron a cabo los cálculos de parámetros termodinámicos haciendo hincapié en que a medida que se elevaba la temperatura, se presentaron dos fenómenos muy diferentes. En primer lugar la relajación del anillo pirrolidínico fue haciéndose más lenta, lo que permitió la definición final de las señales y el cálculo de las constantes de acoplamiento. Por otro lado, como era de esperarse, se tuvo la coalescencia de las señales del t-butilo, permitiendo calcular la energía involucrada en la barrera de isomerización Z (cis)-E (trans) del uretano.

Tabla 5-18. Análisis del espectro protónico del metino (protón α) de la prolina en el compuesto BOCpro-GABAOMe a diferentes temperaturas: a) 40°C, b) 50°C, c) 60°C, d) 70°C y e) 80°C.

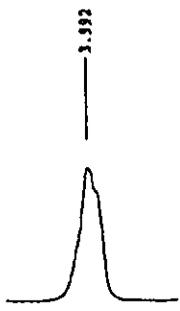
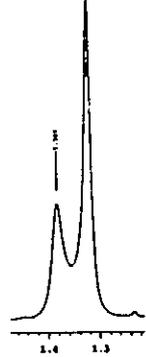
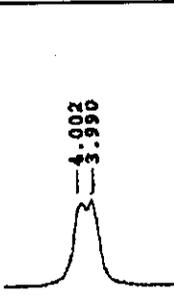
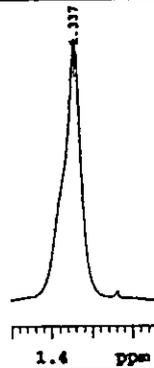
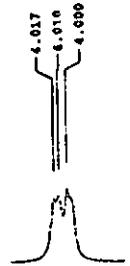
T° C	$\delta \cdot 'H$	Espectro ampliado Protón α	$\delta 'H$	Espectro ampliado de t-butilo
40	3.992		1.323	
			1.383	
50	3.996		1.337	
60	4.005		1.354	

Tabla 5-18. Continuación del análisis del espectro protónico del metino (protón α) de la prolina en el compuesto BOCpro-GABAOMe a diferentes temperaturas: a) 40°C, b) 50°C, c) 60°C, d) 70°C y e) 80°C.

T° C	$\delta^1\text{H}$	Espectro ampliado Protón α	$\delta^1\text{H}$	Espectro ampliado de t-butilo
70	4.014		1.361	
80	4.023		1.37	

Considerando la temperatura de coalescencia del grupo t-butilo como 60°C (333K) y $\Delta\nu=30$ Hz, se puede calcular la energía asociada al intercambio geométrico entre las especies Z (cis) y E (trans). Utilizando las mismas expresiones que para el caso de BOC-prolina, se tienen los siguientes resultados.

Tabla 5-19. Cálculos de ΔG^\ddagger para BOC-prolina-GABAOMe.

Expresión	ΔG^\ddagger para el grupo t-butilo considerando $\Delta\nu = 30$ Hz y $T_c = 333$ K	
i	70.253 kJ/mol (16.806 kcal/mol)	
ii	70.223 kJ/mol (16.799 kcal/mol)	
iii	70.07 kJ/mol (16.763 kcal/mol);	
iv	69.54 kJ/mol (16.637 kcal/mol) $\tau=7.5(10)^{-3}$ seg	70.66 kJ/mol (16.905 kcal/mol) $\tau=7.5(10)^{-3}$ seg

El cálculo de la constante de equilibrio Z (cis)-E (trans) del sistema se puede determinar simplemente considerando el área bajo la curva de cada señal.

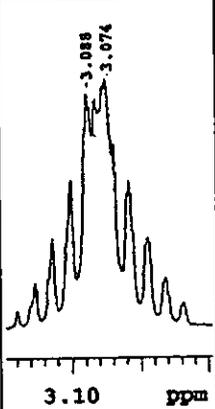
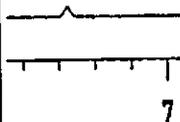
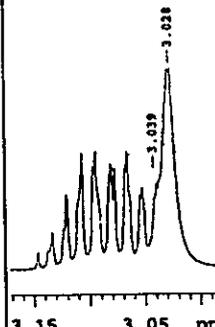
$$\text{Para el equilibrio Z (cis)-E (trans): } K = \frac{[\text{trans}]}{[\text{cis}]} = 0.66$$

Una vez conocida la constante de equilibrio se puede calcular la energía libre para este sistema en temperatura ambiente: $\Delta G^\circ = -RT \ln K = 267.9 \text{ cal/mol}$. Asimismo, se produjo la coalescencia de las señales y cambios de desplazamiento químico del NH y del OH a medida que se iba incrementando la temperatura como se muestra en la tabla 5-20.

Tabla 5-20. Análisis de los espectros ampliados de NH y OH.

T° C		δ^{H}	Espectro ampliado NH	δ^{H}	Espectro ampliado de OH
40	Más abundante	7.734		3.212	
	Menos abundante	7.712		3.236	
50	Menor frecuencia	7.75		3.168	
	Mayor frecuencia			3.187	
60	Más alto campo	7.65 Coalescencia		3.120	
	Más bajo campo			3.133	

Tabla 5-20. Continuación del análisis de los espectros ampliados de NH y OH.

T° C		δ 'H	Espectro ampliado NH	δ 'H	Espectro ampliado de OH
70	Más alto campo	7.60		3.074	
	Más bajo campo		8	3.088	
80		7.55		3.028 pseudo coalescencia	

La variación del desplazamiento químico fue hacia campo alto como resultado de los rompimientos de puentes de hidrógeno al ir aumentando la temperatura. En la tabla 5-21 se muestra la variación en ppm del desplazamiento químico tanto de NH como del OH.

Tabla 5-21. Diferencia de desplazamiento químico del NH y OH con variación de la temperatura.

ΔT	$\Delta\delta$ NH	$\Delta\delta$ OH
40	-92 Hz	-87 Hz

La temperatura de coalescencia del grupo NH es de aproximadamente 60°C. Cuando se trata de señales muy anchas, existe un error al considerar visualmente la temperatura de coalescencia. Es por ello que solamente se plantea un estimado de temperatura de coalescencia para el grupo NH. Por otro lado, la temperatura de coalescencia del grupo OH es superior a 80°C. El estimado de la energía involucrada en este intercambio químico se puede observar en la tabla 5-22.

Tabla 5-22. Temperatura de coalescencia y valores de $\Delta G'$ del NH y del OH de BOC-prolina-GABAOMe.

Grupo	Temperatura de Coalescencia (K)	$\Delta\nu$ (Hz)	$\Delta G'$	$\Delta\delta/\Delta T$
NH	333	11	17.426 kcal/mol	-4.6 ppb/K
OH	353	12	18.452 kcal/mol	

La temperatura estimada de coalescencia para los cálculos de OH fue de 80°C. Esto nos permite solamente tener un estimado. Este valor que se utilizó para $\Delta\nu$ fue el de la temperatura de 40°C, cuando el equilibrio no se ha minimizado completamente.

Uno de los parámetros utilizados para saber si los protones del enlace amídico se encuentran formando puentes de hidrógeno internos en un giro, o externos, es el parámetro de $-\Delta\delta/\Delta T$. El valor para los protones de amida internos es de 1 a 1.5 ppb/K, mientras que los externos tienen valores cercanos a 5.8 ppb/K. En nuestro caso, el valor de 4.6ppb/K muestra que se encuentra en una posición externa, es decir, que existe una gran interacción del NH con el disolvente dando lugar a un NH libre. Esto confirma lo observado en las bandas de absorción de IR.

5.6. Acoplamiento de BOCprolina- éster metílico de prolina (BOCproproMe).

5.6.1. Análisis de los espectros de IR, EM y rotación óptica

El resultado de esta reacción fue un aceite cuyo rendimiento fue del 56% después de su purificación en columna de sílice con acetato de etilo como fase móvil. La rotación óptica fue de $[\alpha]^{20} = -100^\circ$ en cloroformo ($c=1$).

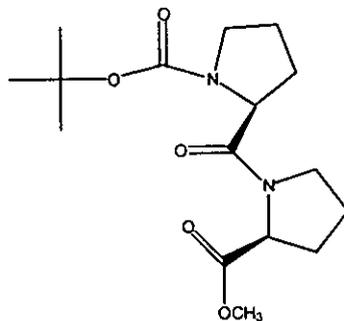


Figura 5-39. Estructura del dipéptido BOC-prolina-prolinaOMe.

En IR se observan las 3 bandas que corresponden a los 3 carbonilos presentes en la molécula y en la tabla 5-23 se muestran las frecuencias de absorción de IR de los diferentes grupos funcionales presentes en el dipéptido BOC-prolina-prolinaOMe. El espectro completo se muestra en el anexo 5 (E-5-1).

Tabla 5-23. Frecuencias de absorción de IR de cada grupo funcional presente en BOC-prolina-prolinaOMe.

Frecuencia	Descripción	Frecuencia	Descripción
2975 cm ⁻¹	$\nu_{as}CH$	1660 cm ⁻¹	C=O Banda Amida (I)
2878 cm ⁻¹	ν_sCH	1435 cm ⁻¹	$\delta_{as} (CH_3)$ Ester metílico.
1746 cm ⁻¹	C=O Ester metílico	1365 cm ⁻¹	$\delta_s (CH_3)$ Ester metílico.
1699 cm ⁻¹	C=O Carbamato	1167 cm ⁻¹	ν C-O Ester metílico

El espectro de masas de la figura 5-40 muestra que el ion molecular corresponde al peso molecular esperado para el dipéptido y las diferentes fragmentaciones, considerando las rupturas beta al sitio radical como los motores de la fragmentación, dan evidencia de que se trata del compuesto esperado.

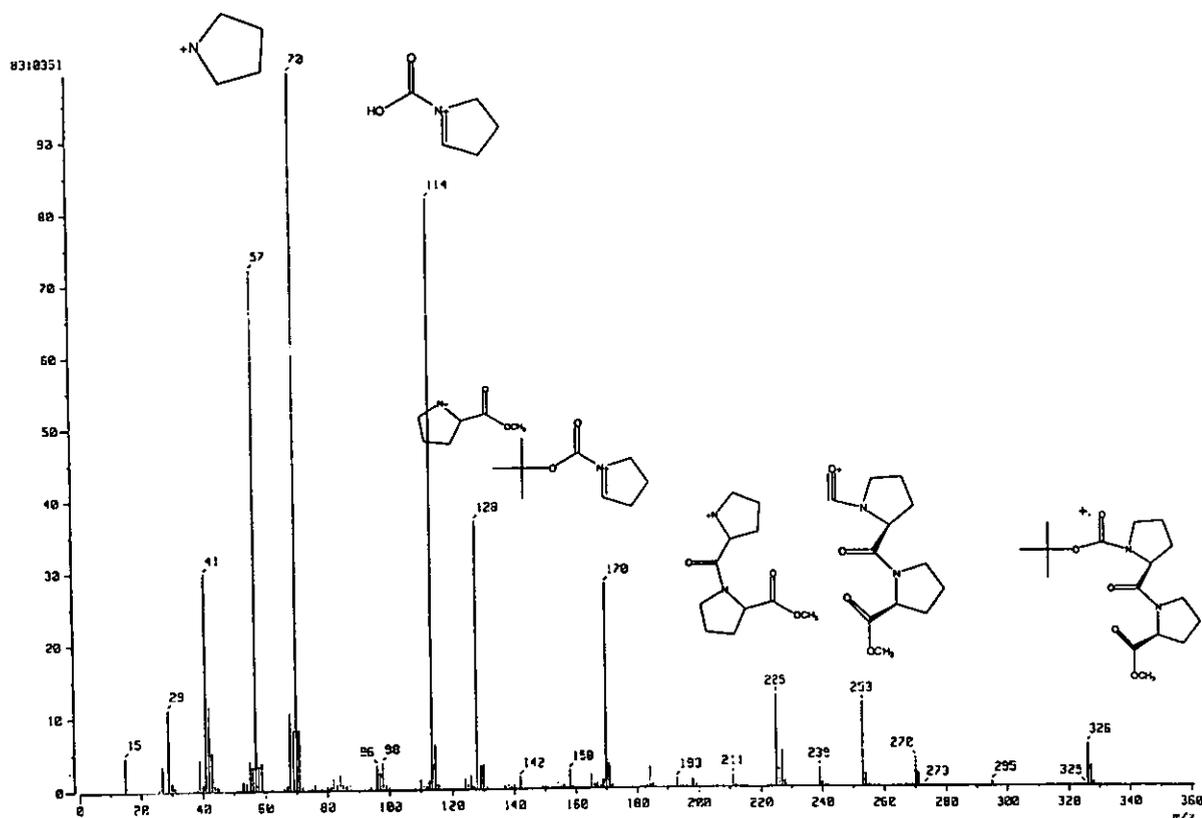


Figura 5-40. Espectro de EM de BOCprolina-prolinaOMe de baja resolución.

5.6.2. Análisis por HPLC

Esta muestra en particular, se pensó en llevar a cabo un ensayo de separación utilizando HPLC en fase reversa y en temperatura ambiente. El resultado confirmó que la barrera energética de interconversión isomérica es tan baja, que la separación física no se puede llevar a cabo a menos que la separación se haga en temperaturas muy bajas como lo realizan Kalmán *et al*⁴².

⁴² Kálmán, A., Thuncke F., Schmidt R., Schiller, P.W. & Horváth C., *J. Chromatogr. A* **729**, 155 (1996).

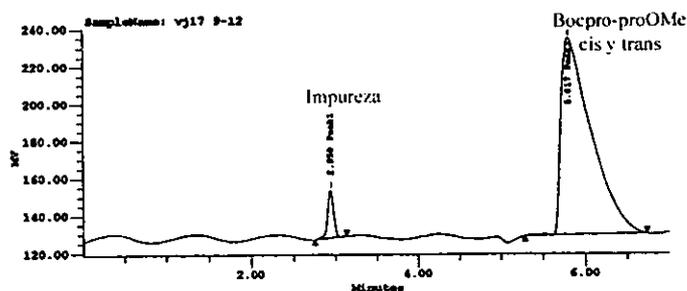


Figura 5-41. HPLC de BOC-prolina-prolina OMe

5.6.3. Análisis de los espectros de RMN de BOC-prolina-prolinaOMe

5.6.3.2. Espectros en CDCl₃ en baja temperatura

El espectro de RMN protónico en temperatura ambiente en CDCl₃ mostró 4 diferentes señales correspondientes al protón α del anillo pirrolidínico, así como 2 señales para el grupo t-butilo y 2 señales para los metoxilos. En la figura 5-42 se ve el espectro protónico de BOC-prolina-prolinaOMe y las expansiones se encuentran en el anexo 5 E-5-2.

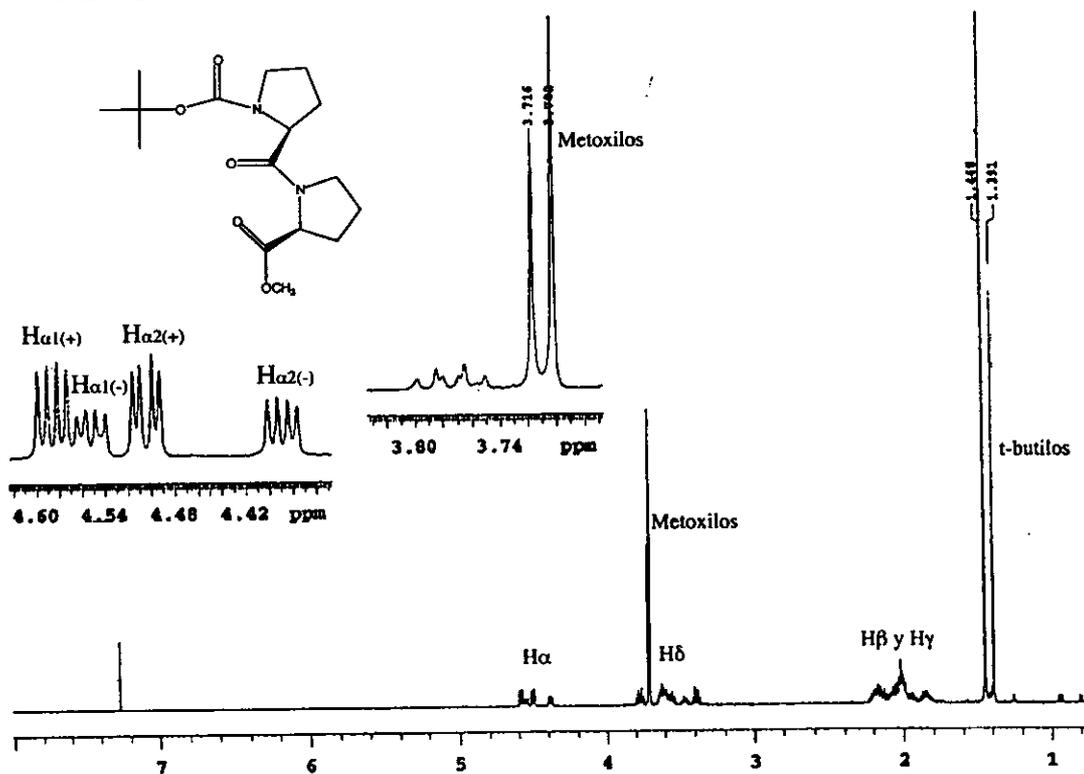


Figura 5-42. Espectro de RMN protónico de BOC-prolina-prolinaOMe en CDCl₃ en T.A.

El espectro de ¹³C presentó 22 señales diferentes y en proporciones diferentes, lo que nuevamente evidencia la isomería geométrica y el reto está en la asignación inequívoca de cada anillo pirrolidínico y de cada isómero geométrico. En el anexo 5

(E-5-3) se muestra el espectro de ^{13}C . Tabulando las señales para el isómero más abundante y para las del menos abundante, se tienen los siguientes resultados.

Tabla 5-24. Desplazamientos químicos en protón y ^{13}C de los diferentes núcleos en BOC-prolina-prolinaOMe

Isómero más abundante			Isómero menos abundante	
	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$
t-butilo	1.448ppm	28.499ppm	1.391	28.376
C α	4.504	57.686	4.38	57.686
	4.586	58.670	4.54	58.670
C β	Zona de 2.214-2.03	zona(29.9-28.714)	Multiple zona (2.2 -1.95)	Multiple zona(29.9-28.714)
C γ	Múltiple zona (2,0-1.83)	Múltiple zona (24.96-23.51)	Múltiple zona (2,0-1.83)	Múltiple zona (24.96-23.51)
C δ	3.61	46.460	3.78, 3.59	46.460
	3.40, 3.57	46.860	3.46	46.675
metoxilo	3.702	52.027	3.716	52.119
carbono base de t-butilo		79.430		79.430
C=O (uretano)		154.596		153.735
C=O (peptídico)		171.173		171.604
C=O (éster)		172.927		172.619

Para la elucidación estructural completa es necesario llevar a cabo diferentes experimentos bidimensionales, pero particularmente la resolución de los experimentos HSQC y HMBC en la zona de los protones y carbonos alfa en esta temperatura particular, no logró aportar evidencia contundente para la asignación inequívoca.

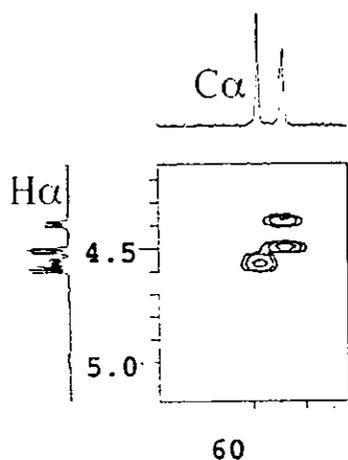


Figura 5-43. Ampliación del espectro HSQC.

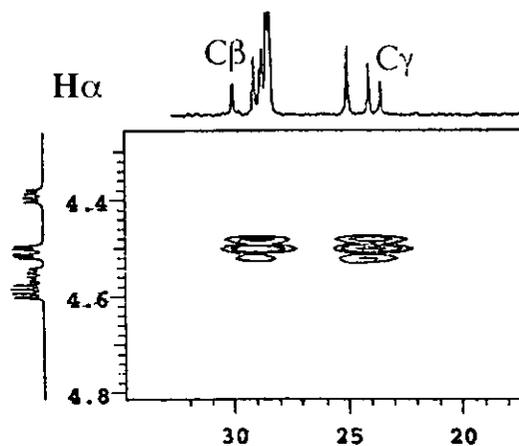


Figura 5-44. Ampliación del espectro HMBC de BOCprolina-prolinaOMe

Una causa de baja resolución se debe a que al tratarse de experimentos de detección inversa, la ventana espectral de ^{13}C queda sujeta al número de incrementos del experimento y la resolución digital la tiene la ventana de hidrógeno. En la ampliación del experimento HSQC (espectro 5-24) se puede ver la presencia de solamente dos tipos de carbonos alfa, mientras que en protón se logran distinguir 3 tipos diferentes. Algo similar llega a pasar en el HMBC donde, sin duda, a 2 y 3 enlaces de distancia se debieran ver las interacciones de $\text{H}\alpha$ con $\text{C}\beta$ y $\text{C}\gamma$.

5.6.3.2. Espectros en acetona- d_6 en baja temperatura

Nuevamente para minimizar la tasa de intercambio químico se decidió utilizar acetona y bajar la temperatura hasta -90°C . El simple cambio de disolvente empezó a complicar la asignación ya que las señales se empezaron a traslapar.

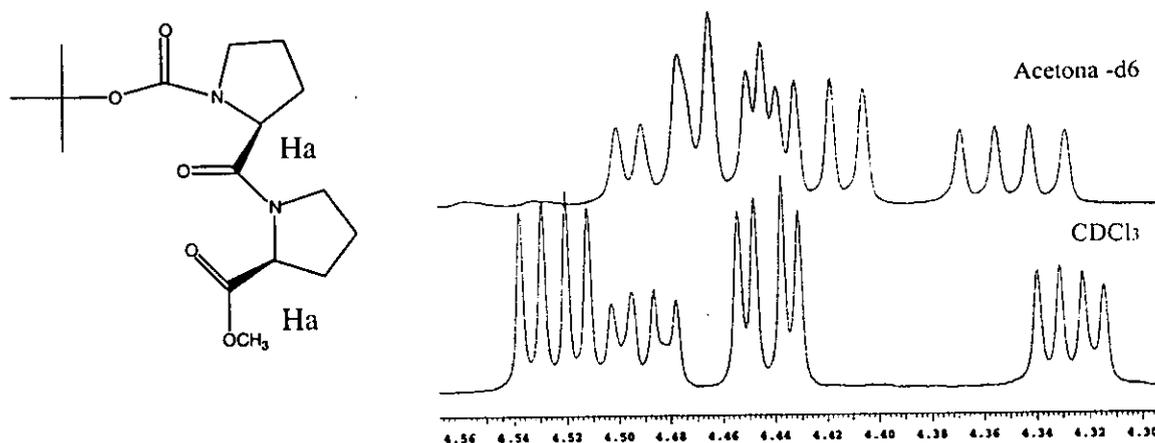


Figura 5-45. Comparación de las señales de los protones alfa del dímero BOC-prolina-prolinaOMe en una misma dispersión de campo.

A medida que se bajó la temperatura, se vieron variaciones en los desplazamientos químicos de ambos isómeros. El estudio en baja temperatura se encuentra en la tabla 5-25.

Tabla 5-25. Espectro ampliado de la zona de los protones alfa de BOC-prolina-prolinaOMe en diferentes temperaturas.

T° C		$\delta^1\text{H}$	Multiplicidad	Espectro ampliado de $\text{H}\alpha$
25	Menor frecuencia	4.371	dd (8.5, 4.5 Hz)	
	Mayor frecuencia	4.420	dd (8.5, 4.0 Hz)	
		4.442	dd (8.5, 3.5 Hz)	
		4.459	dd (8.0, 3.0Hz)	

Tabla 5-25. Continuación del análisis del espectro ampliado de la zona de los protones alfa de BOC-prolina-prolinaOMe en diferentes temperaturas.

T° C		δ ¹ H	Multiplicidad	Espectro ampliado de H α
-50	Menor frecuencia	4.313	dd (8.5, 4.0 Hz)	
	Mayor frecuencia	4.39	dd (8.5, 4.0 Hz)	
		4.418	dd (8.0, 4.5 Hz)	
	Mayor frecuencia	4.431	Difícil de determinar	
-60	Menor frecuencia	4.308	dd (9.0, 4.0 Hz)	
	Mayor frecuencia	4.402	Señal múltiple	
-70	Menor frecuencia	4.301	dd (9.0, 4.0 Hz)	
	Mayor frecuencia	4.401	Señal múltiple	
-80	Menor frecuencia	4.296	dd (8.5, 4.0 Hz)	
	Mayor frecuencia	4.407	Señal múltiple	

Al hacer el estudio comparativo del desplazamiento químico de las señales de los protones alfa en ambos disolventes, se vio que las señales entre 4.40 y 4.50 ppm empezaron a tener valores de desplazamiento cada vez más parecidos hacia el valor de 4.41ppm. A pesar de esto, se obtuvo el espectro NOESY en -60°C , con la tasa de intercambio minimizada.

Es importante considerar dos hechos en la elucidación total de BOCpro-proOMe:

1. La geometría de BOC-prolina en torno al enlace uretano.
2. La geometría en torno al enlace peptídico.

Los 4 isómeros posibles para los dos diferentes centros de isomería geométrica, BOC-prolina y el enlace peptídico, son:

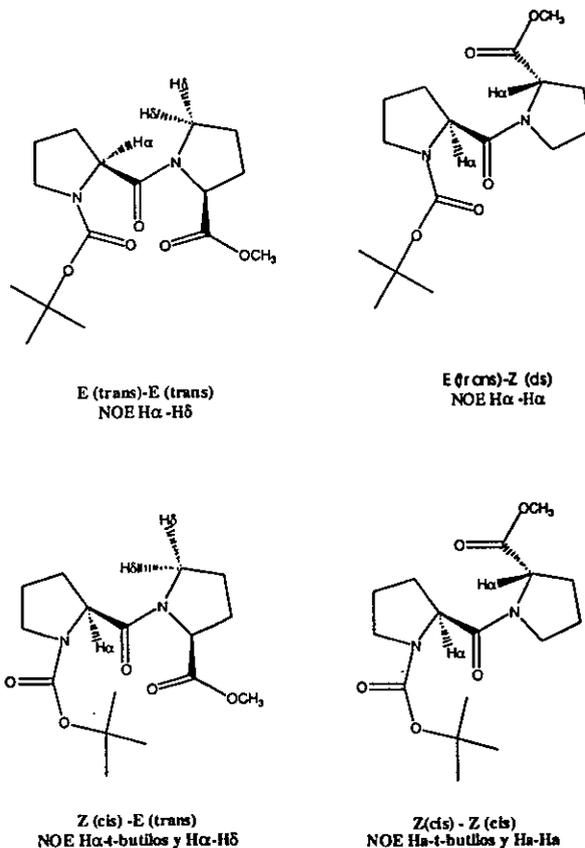


Figura 5-46. Posibles isómeros del dipéptido BOCprolina-prolinaOMe

En el espectro protónico solamente se tienen evidencia de dos isómeros: uno más abundante que otro. Al analizar las señales de NOESY en -60°C de la región de los protones alfa y los t-butilos vemos que el H α en más alto campo no tiene interacción con el t-butilo. Esto puede significar 3 cosas:

1. H α (4.308 ppm) forma parte de BOC prolina E (trans)
2. O bien, forma parte de la segunda prolina.
3. No se observa.

La presencia de una señal NOESY entre el mismo H α (4.308ppm) y uno de los metilos, sugiere que esta señal pertenece al éster metílico de prolina. Asimismo existe una interacción entre H α y H β pero esto sería producto de la interacción intraanular y no resulta contundente para la geometría en el enlace peptídico.

Por otro lado dentro de los protones alfa en más bajo campo (4.412ppm) se presenta una interacción con los protones delta lo que sugiere que existe una geometría E (trans) en el enlace peptídico.

Esta correlación entre el protón alfa y los protones delta no fue observada en los espectros de BOC-prolina o de prolinaOMe, (figura 5-47) por lo que se puede atribuir a la interacción E (trans) entre las dos prolinas sobre el enlace peptídico.

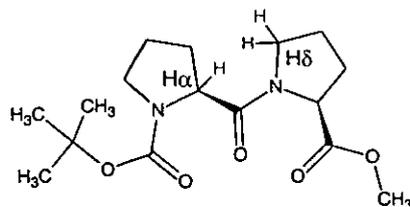


Figura 5-47. Estructura de BOC-prolina-prolinaOMe con el protón alfa y los deltas indicados.

Si consideramos la siguiente expansión se ve que las dos señales del isómero más abundante se encuentran centradas en 4.44 ppm, mientras que las del isómero menos abundante están en 4.34 y 4.47 ppm. Resulta desafortunado el no contar con una mejor resolución aunque se puede ver que existe una interacción dipolar de uno de los protones con el t-butilo (1.283 ppm en NOESY), así como con H γ , H β y H δ evidenciando que se trata del protón alfa de BOC-prolina Z (cis) y de una interacción E (trans) en el enlace peptídico (figura 5-48).

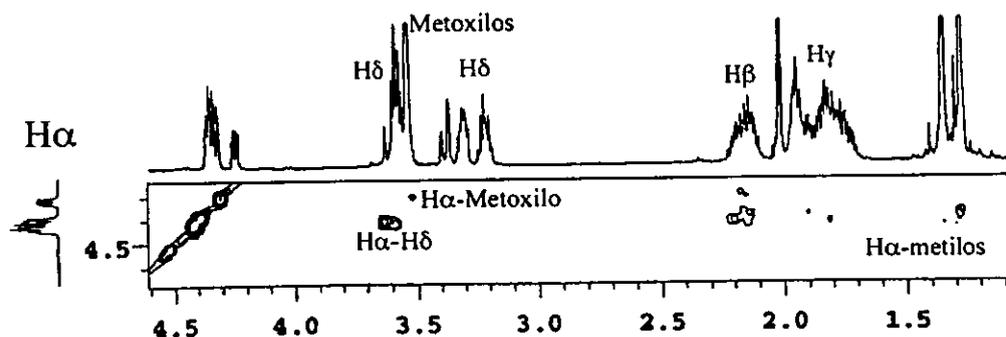


Figura 5-48. Ampliación del espectro NOESY de BOCprolina-prolina OMe.

Considerando el espectro comparativo de la zona de los protones alfa tanto en acetona como en cloroformo, resulta evidente la mayor dispersión y resolución que tienen las señales en cloroformo en temperatura ambiente. Si además se considera que a medida que se ha ido bajando la temperatura los desplazamientos químicos de los protones alfa tienden a converger en un mismo desplazamiento, resulta claro que el llevar a cabo un experimento NOESY en -60°C en CDCl_3 permitiría una completa resolución de las señales en una tasa minimizada de intercambio. Dicho experimento desgraciadamente no se pudo llevar a cabo, pero la posibilidad de la resolución inequívoca se podría tener con los resultados de dicho experimento.

5.7. Efectos del disolvente.

Con el fin de llevar a cabo un estudio dinámico, se consideró el utilizar CDCl_3 , cuando se llevaron a cabo los experimentos en temperatura ambiente, DMSO-d_6 como el disolvente en altas temperaturas y acetona en bajas temperaturas. Al ir cambiando los disolventes, la apariencia del espectro cambiaba considerablemente. Este hecho es conocido como efecto del disolvente y afecta principalmente a través de variaciones en las constantes de apantallamiento. Una de las teorías más aceptadas⁴³ es la que se refiere al **campo reactivo** (reaction field theory) en donde una molécula polar induce una polarización en el medio generando un campo eléctrico. Existe una relación que desarrollaron Marshall y Pople⁴⁴ en donde se correlaciona el cambio de desplazamiento químico debido al disolvente y la constante dieléctrica del mismo.

$$\sigma_e = \chi \cdot 10^{-12} \cdot \frac{2(\epsilon - 1)(n^2 - 1)}{3(2\epsilon + n^2)} \cdot \frac{\mu \cos \theta}{\alpha}$$

En donde χ es una constante, ϵ es la constante dieléctrica, μ es el momento del dipolo, n es el índice de refracción y α es la polarizabilidad de una esfera.

De tal manera que los disolventes pueden generar dipolos o cuadrupolos al ir interactuando con el sustrato. Si la densidad de carga negativa de un disolvente se encuentra cerca de un núcleo del sustrato, este sufrirá un desplazamiento hacia bajas frecuencias debido a la protección que generará la densidad de carga provocando una protección magnética y dando lugar a un cambio en el desplazamiento químico. Esta teoría explica satisfactoriamente los cambios en desplazamientos químicos que se presentan en los disolventes polares pero no explica adecuadamente en casos generales cuando las moléculas no se aproximan a una geometría esférica o cuando las interacciones soluto-disolvente son particularmente fuertes.

Asimismo, el efecto de disolvente influye principalmente en las constantes de acoplamiento geminal en donde llegan a existir variaciones hasta de un 100%⁴³. Una generalización aceptada considera que los disolventes que generan puentes de hidrógeno producen un cambio negativo en las constantes de acoplamiento geminales (gemelas). Los disolventes como el cloroformo solvatan los sustratos vía electrones no compartidos (e.g. hacia el oxígeno) disminuyendo la retro donación. De ahí que una constante más negativa se espera cuando se genera un campo reactivo.

Dentro del trabajo sistemático realizado, no se hizo particular hincapié en la evaluación del efecto de disolvente; particularmente porque las constantes de acoplamiento de los protones alfa evaluados no se vieron afectados por el cambio de disolvente. De manera contraria, la variación en el desplazamiento químico se presentó tanto en el cambio de disolvente como en la variación de la temperatura. Un estudio en mayor profundidad de este fenómeno no formaba parte de los objetivos del trabajo, por lo que se dejó para estudios posteriores.

⁴³ Mooney E.F (editor), Annual Review of NMR Spectroscopy, Vol 2, Academic Press, 1969.

⁴⁴ Marshall, T.W. and Pople J.A., *Mol.Phys.*, 1, 199 (1958)

Conclusiones

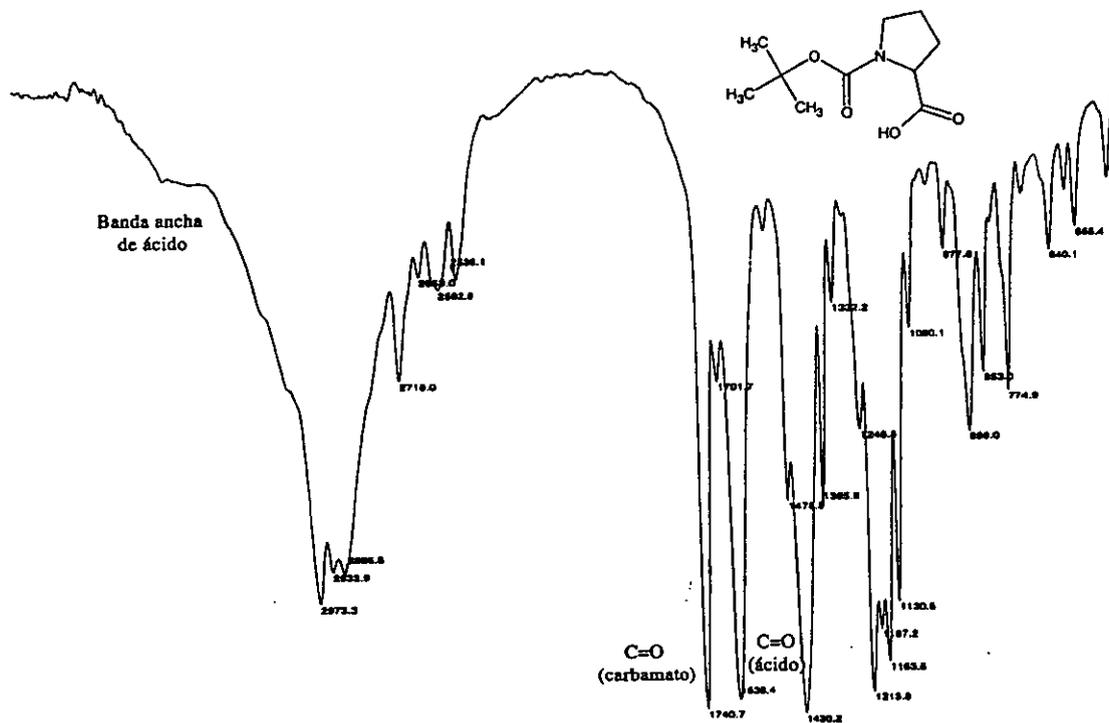
- Los diferentes sistemas estudiados correspondieron a la mimetización de los posibles componentes peptídicos de bajo peso molecular que fueron hallados en una fracción de gran potencia hipotensora en extractos acuoso-metanólicos de *Casimiroa edulis* en donde se reconocieron tres aminoácidos principales: GABA, Prolina y N-metilprolina²
- BOC-prolina demostró ser un modelo satisfactorio para evidenciar la dependencia de los desplazamientos químicos en ¹³C de los carbonos beta y gama con respecto a la geometría del enlace del grupo uretano. A dichos efectos se puede agregar en este trabajo que el grupo t-butilo del carbamato tiene un efecto NOE con el protón alfa del sistema anular marcando inequívocamente la isomería Z (cis) en el carbamato.
- La observación de efectos NOE en BOC-prolina entre H α y H γ es congruente con la conformación endo del sistema anular para la geometría Z (cis) propuesta sobre la base de diferentes estudios por rayos X de sistemas conteniendo el mismo fragmento prolínico.
- La observación de dos temperaturas de coalescencia en el análisis en alta temperatura evidenció la existencia de dos barreras energéticas bien definidas: una barrera de isomería geométrica Z (cis)-E (trans) dada por la coalescencia del t-butilo, y la barrera de isomerización conformacional endo-exo dada por la coalescencia del protón alfa del anillo pirrolidínico.
- El espectro de Infrarrojo del dipeptoide BOC-prolina-GABAOMe demostró su utilidad para explicar el cambio de conformación por asociación intramolecular de puentes de hidrógeno en 2 diferentes medios: KBr y CHCl₃.
- Se pudieron evidenciar dos situaciones extremas en el derivado BOC-prolina-GABAOMe en los espectros de RMN protónica en 300 y 500 MHz y entre temperatura ambiente y 80°C. En el primer caso se puede proponer que el sistema anular tiene una movilidad restringida y es menor al movimiento segmental que posee el fragmento molecular lineal de GABA. Al aumentar la temperatura y la frecuencia de observación es posible distinguir la E (trans)ición a la coalescencia del grupo t-butilo y el aumento de la movilidad molecular segmental del anillo pirrolidínico.
- Las señales para el hidrógeno sobre el nitrógeno en el BOC-prolina-GABAOMe muestra un equilibrio tautomérico ceto-enol, permitiendo que coexistan 4 estructuras isoméricas correspondientes a 2 involucrando el hidrógeno sobre el nitrógeno y 2 correspondientes al protón sobre oxígeno en la forma enólica. La proporción asociada a ambos ca. 7 y 3.2 ppm para NH y OH respectivamente, demuestran la abundancia mayoritaria para el confórmero con el carbamato de geometría Z (cis). Asimismo el ¹³C que en temperatura ambiente muestra señales dobles con muy poca diferencia de desplazamiento químico para casi todas las señales, las correspondientes a C β y C γ muestran la

mayor $\Delta\delta$ que confirma su utilidad como sensores de la geometría del grupo carbamato.

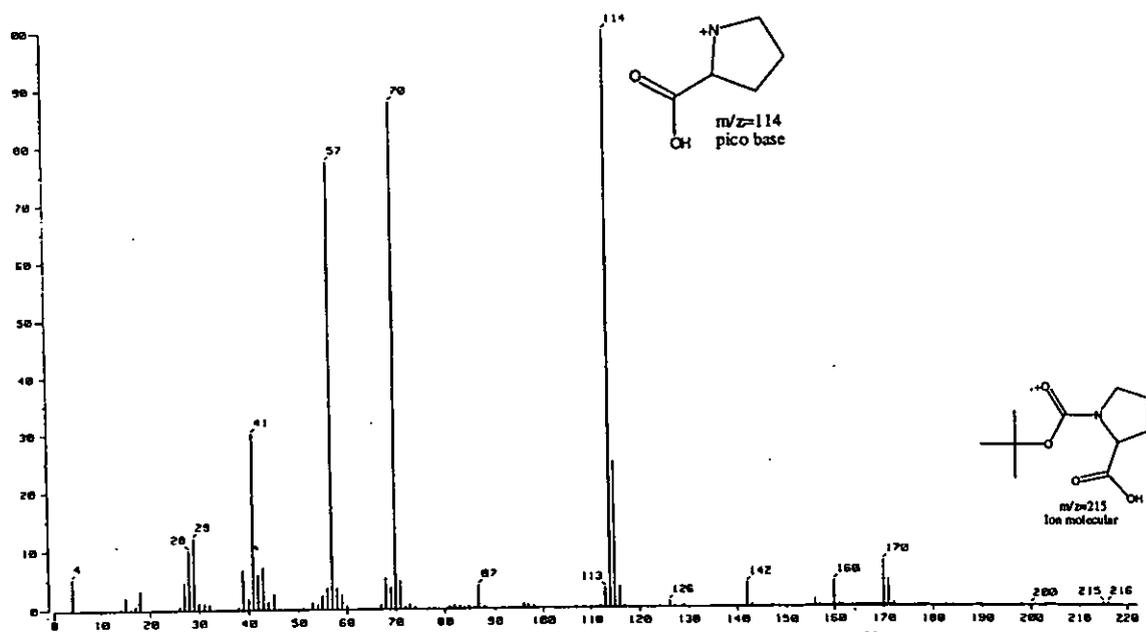
- La correlación en COSY del compuesto BOC-prolina-GABAOMe entre el OH y el CH₂(1) de GABA no pudo ser discernida en su origen aunque la correlación de HMBC con el protón del enol apoya la posibilidad de un acoplamiento escalar inusualmente intenso. Esta interacción fue observada en 2 temperaturas distintas en donde se eliminó la posibilidad de ambigüedades con otras señales con desplazamientos semejantes.
- En el caso de BOC-prolina-prolinaOMe, se distinguen con claridad dos especies resultantes del equilibrio Z (cis)-E (trans) en torno a los grupos amida considerados en términos de los dobles enlaces posibles.
- El sistema de péptidos pequeños es sensible a los efectos del disolvente y en el estudio conformacional estos efectos pueden ser aprovechados para la asignación inequívoca estructural y conformacional.
- La evaluación farmacológica de tripéptidos que contienen dichos aminoácidos indica que estos compuestos pueden ser responsables de la actividad hipotensora del zapote blanco.
- Dado que en los resultados experimentales se observaron equilibrios químicos, el estudio por espectrometría de masas no contribuyó a una elucidación de gran profundidad, salvo para la identificación y caracterización de los compuestos.

Anexos

Anexo 1. Espectros de BOC-prolina en T.A.

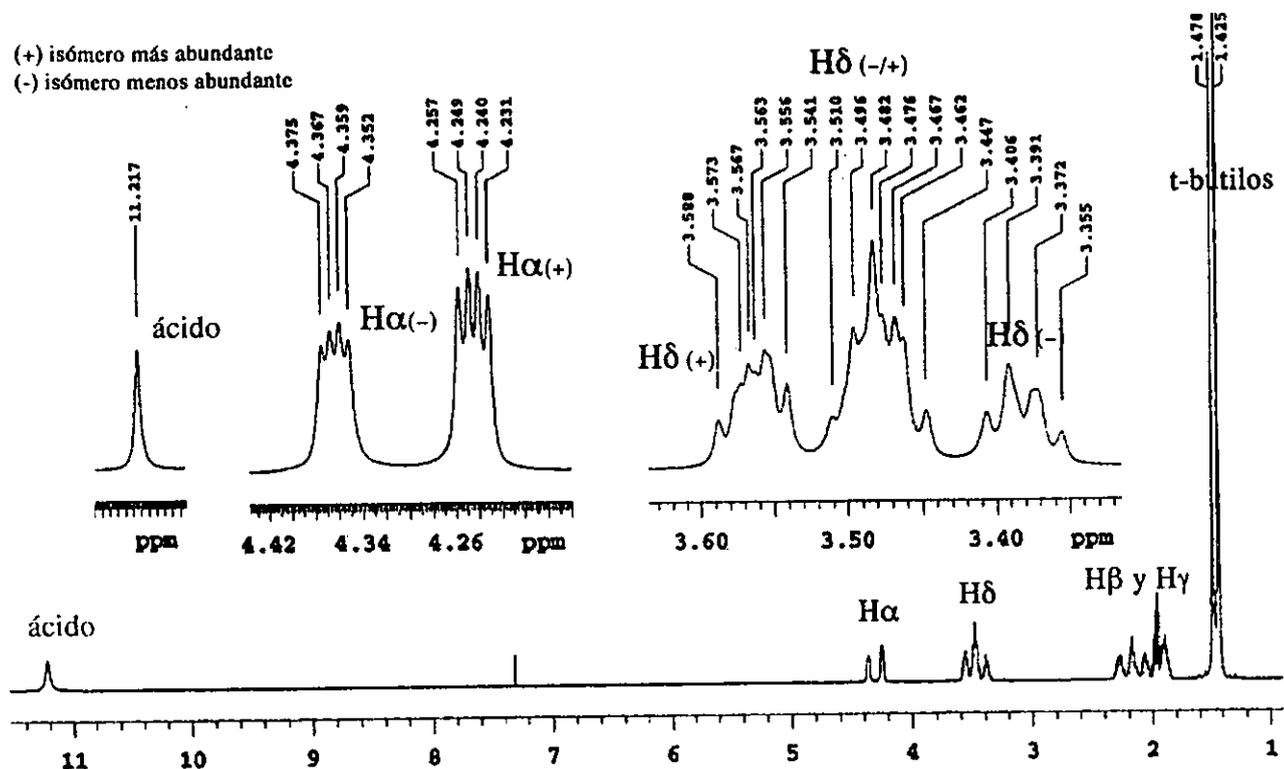


E-1-1. Espectro de IR de BOCprolina en pastilla de KBr

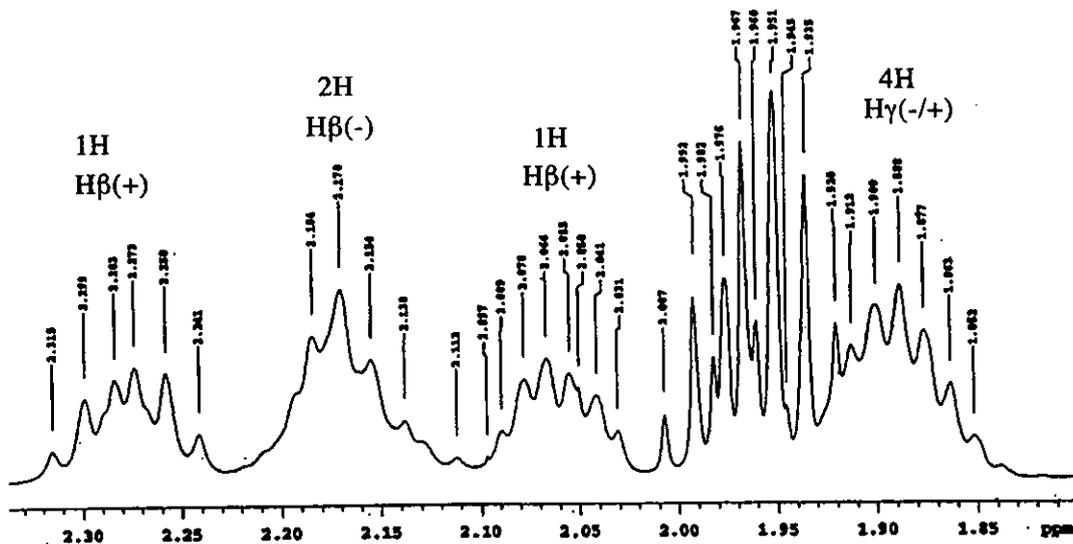
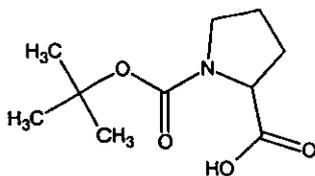


E-1-2. Espectro de masas baja resolución de BOC-prolina

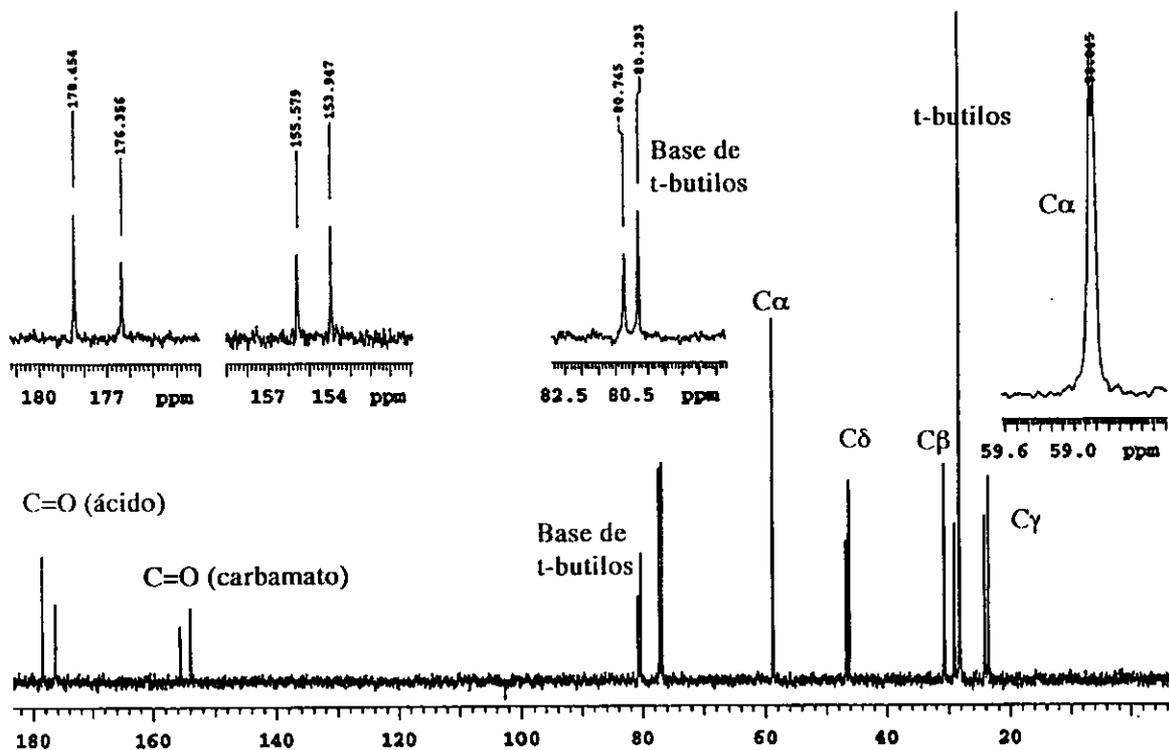
(+) isómero más abundante
 (-) isómero menos abundante



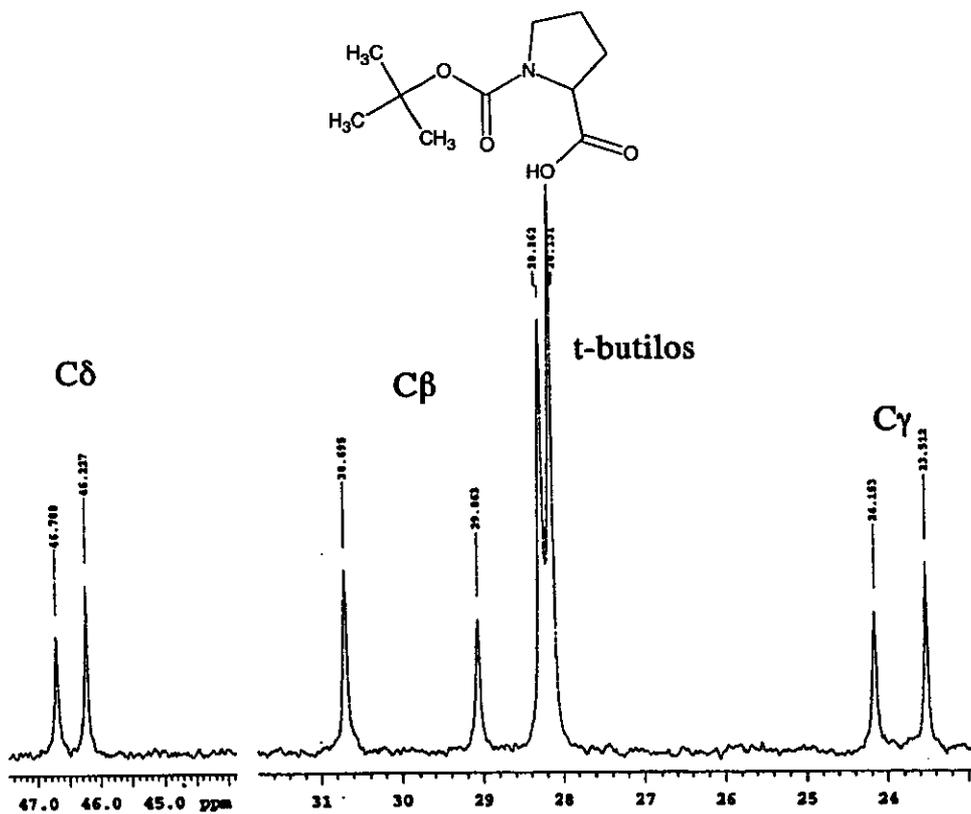
E-1-3. Espectro de RMN protónica en CDCl₃, 500 MHz y temperatura ambiente de BOCprolina.



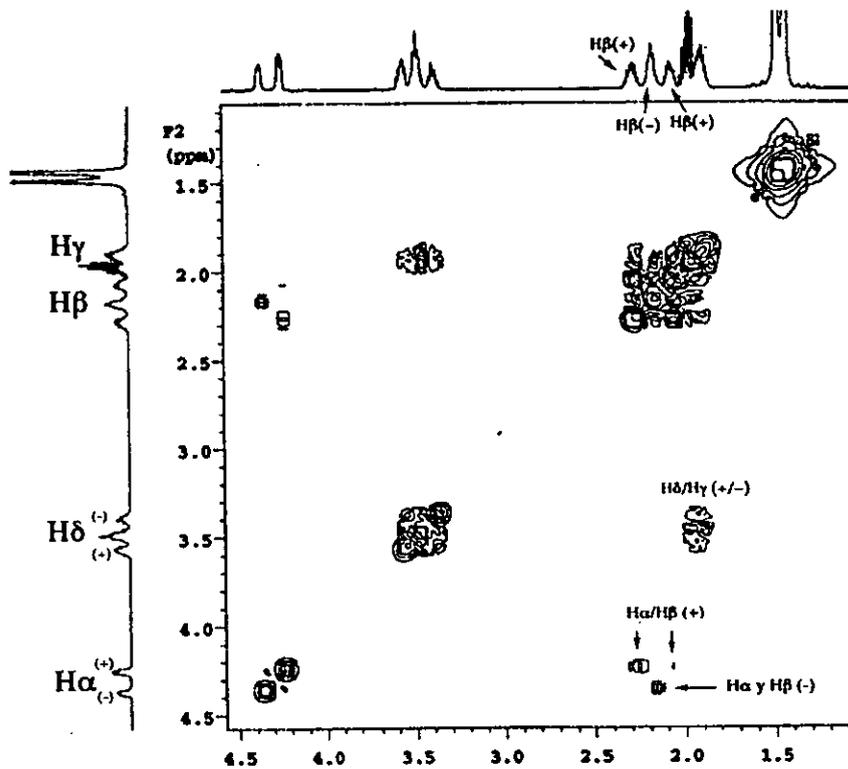
E-1-4. Espectro ampliado de la zona de protones β y γ de BOCprolina en CDCl₃, a T.A.



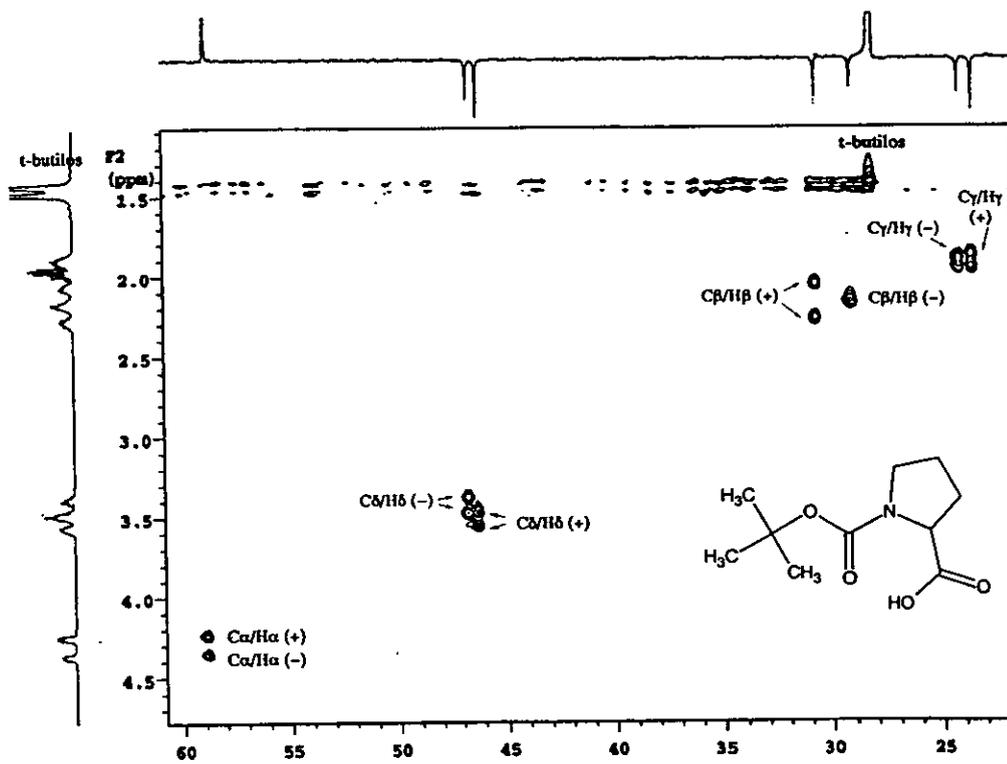
E-1-5. Espectro de ^{13}C de BOCprolina $\cdot \text{CDCl}_3$ en T.A.



E-1-6. Ampliación del espectro de ^{13}C BOCprolina en CDCl_3 en T.A.

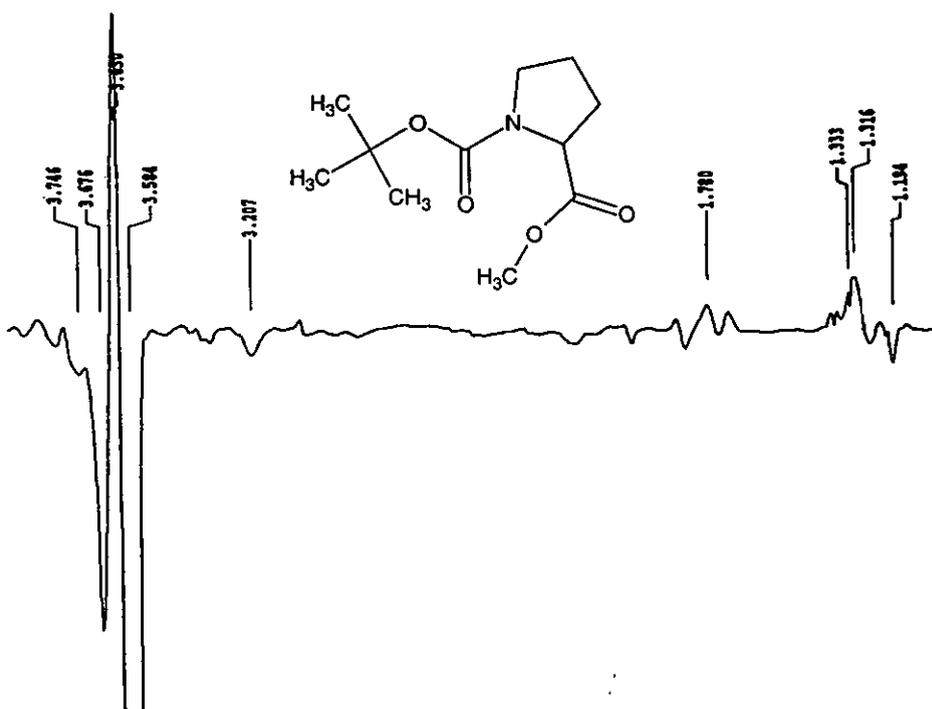


E-1-7. COSY de BOCprolina en CDCl_3 en T.A.

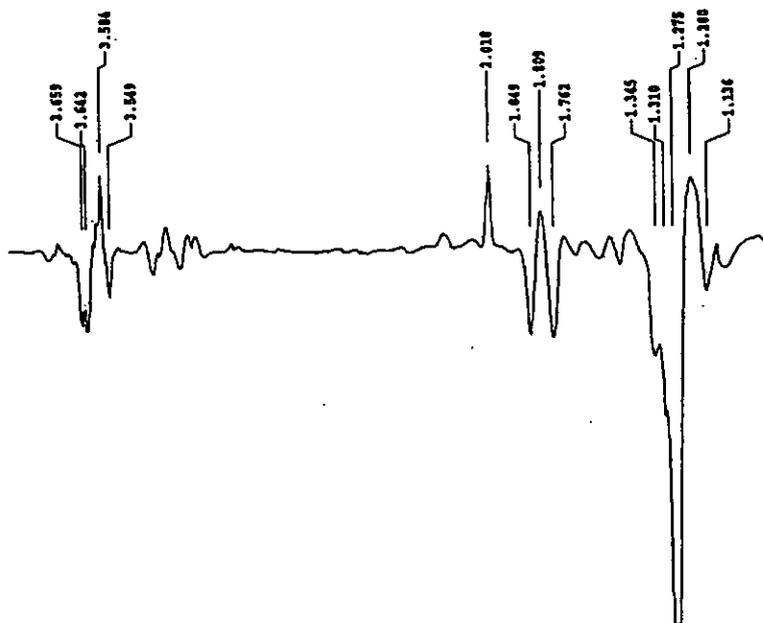


E-1-8. HSQC de BOCprolina en CDCl_3 en T.A.

Anexo 2. Espectros del éster metílico de BOC-prolina.

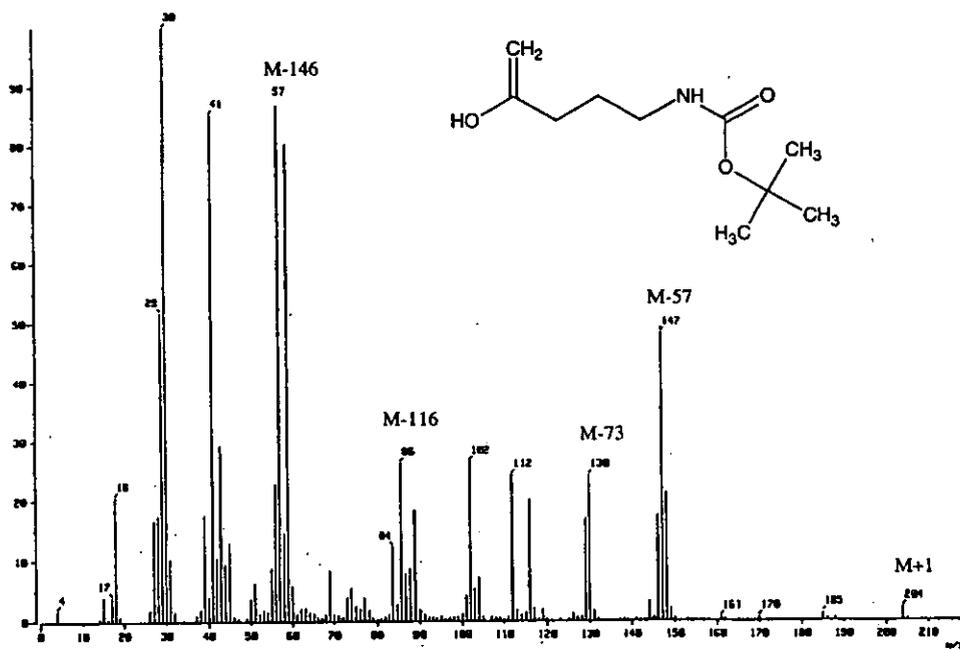


E-2-1. Sección cruzada del espectro NOESY en -90°C del éster metílico de BOC-prolina en acetona



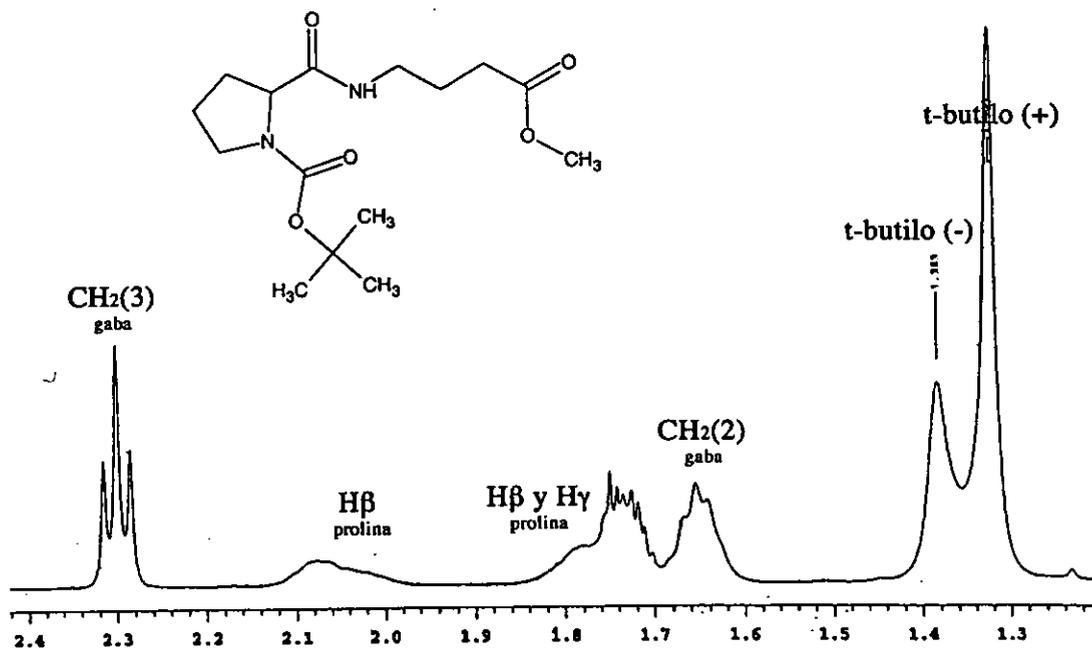
E-2-2 Sección cruzada del espectro NOESY en -90°C del éster metílico de BOC-prolina en acetona-d₆.

Anexo 3. Espectros del BOC-GABA

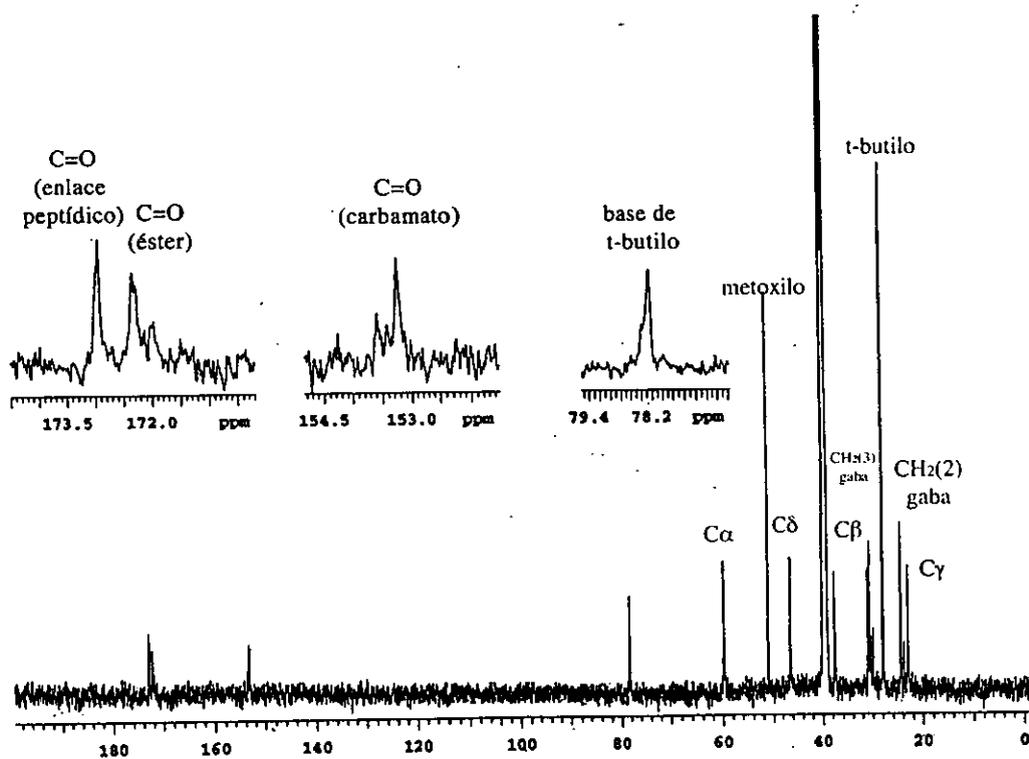


E-3-1. Espectro de masas de baja resolución de BOC-GABA.

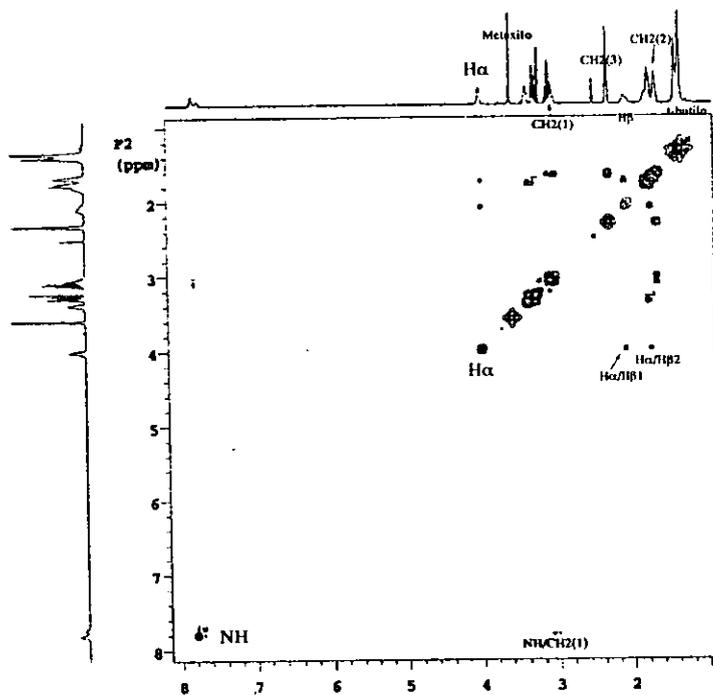
Anexo 4. Espectros del BOC-prolina-GABAOMe



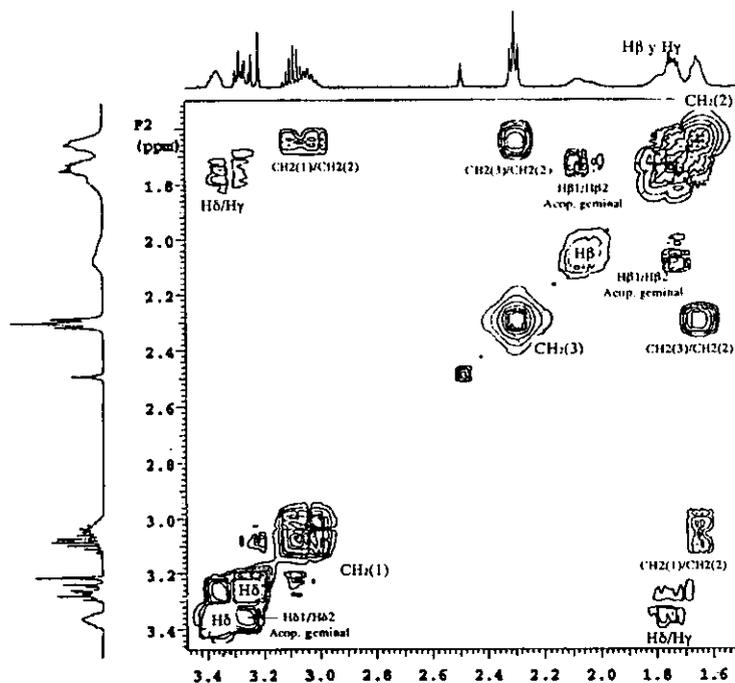
E-4-1. Espectro protónico ampliado de Boprolina-GABAOME a 40°C.



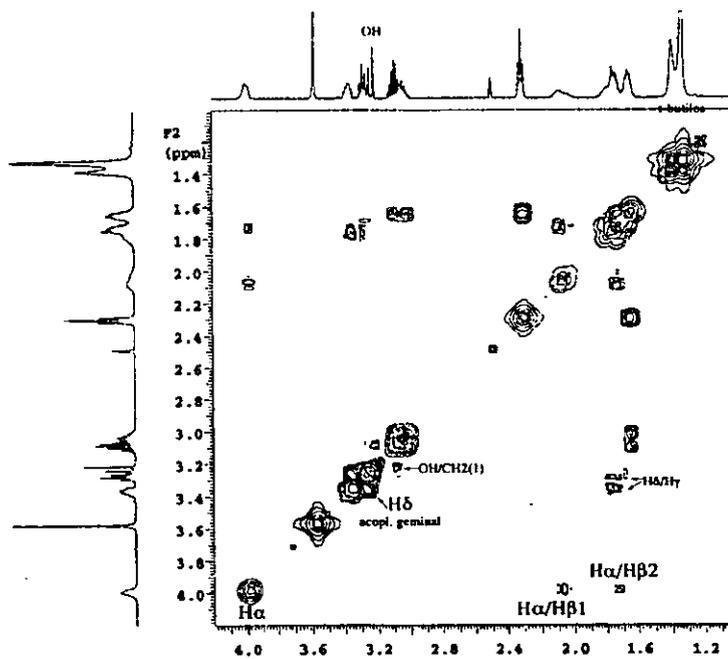
E-4-2. Espectro de ^{13}C total de BOCprolina-GABAOMe a 40°C .



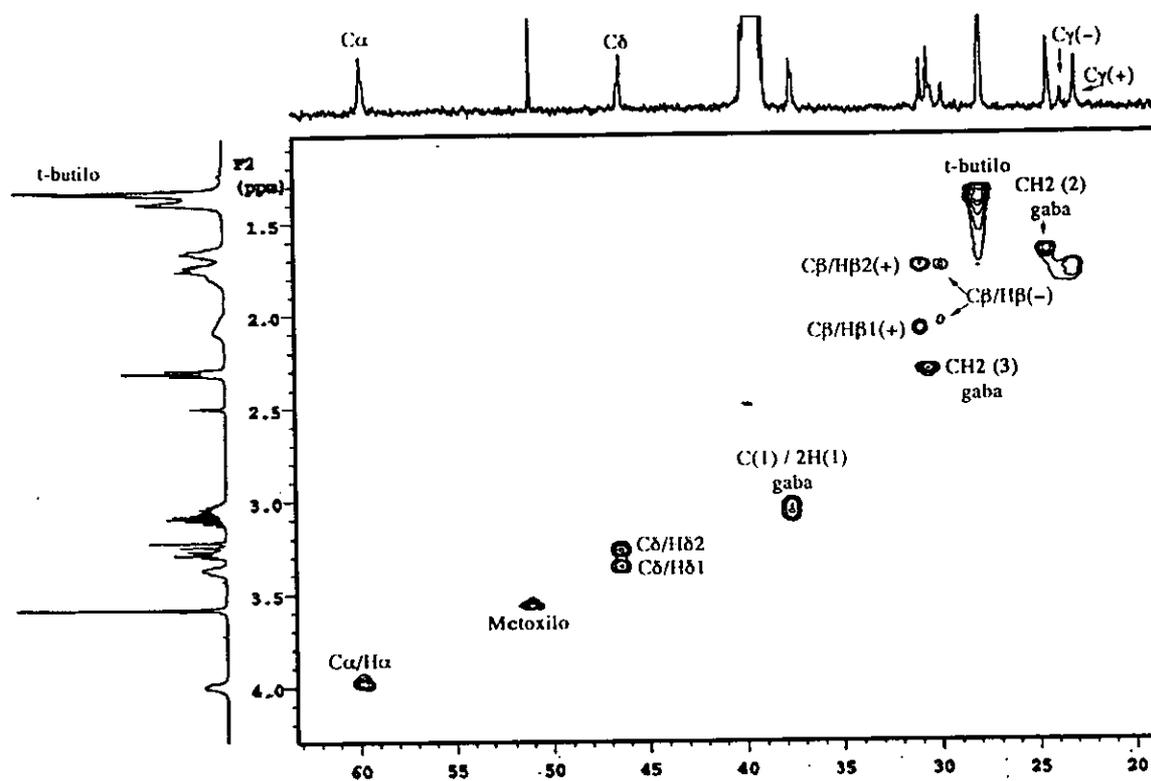
E-4-3. Espectro COSY de BOCprolina-GABAOMe a 40°C .



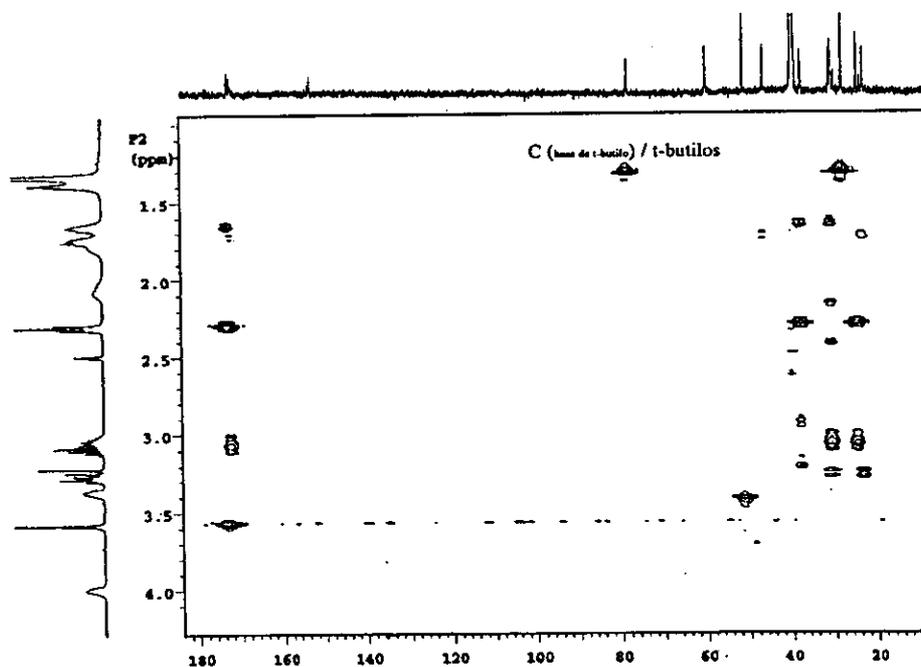
E-4-4. Espectro COSY ampliado de BOCprolina-GABAOMe a 40°C.



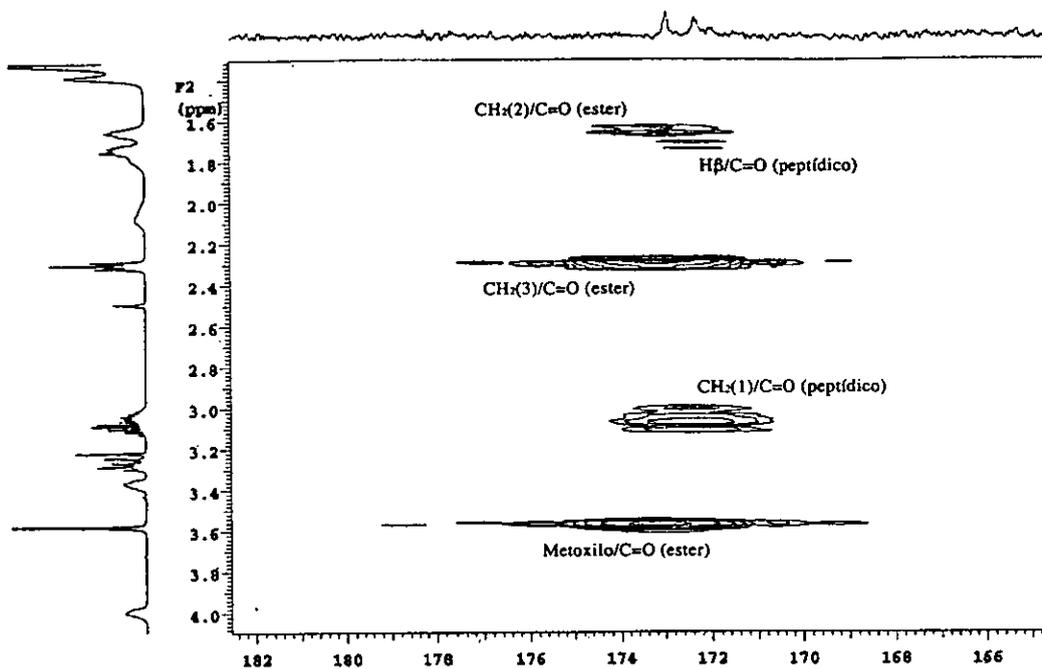
E-4-5. Espectro ampliado COSY de BOCprolina-GABAOMe en 40°C.



E-4-6. Espectro HSQC de BOCprolina-GABAOMe a 40°C.

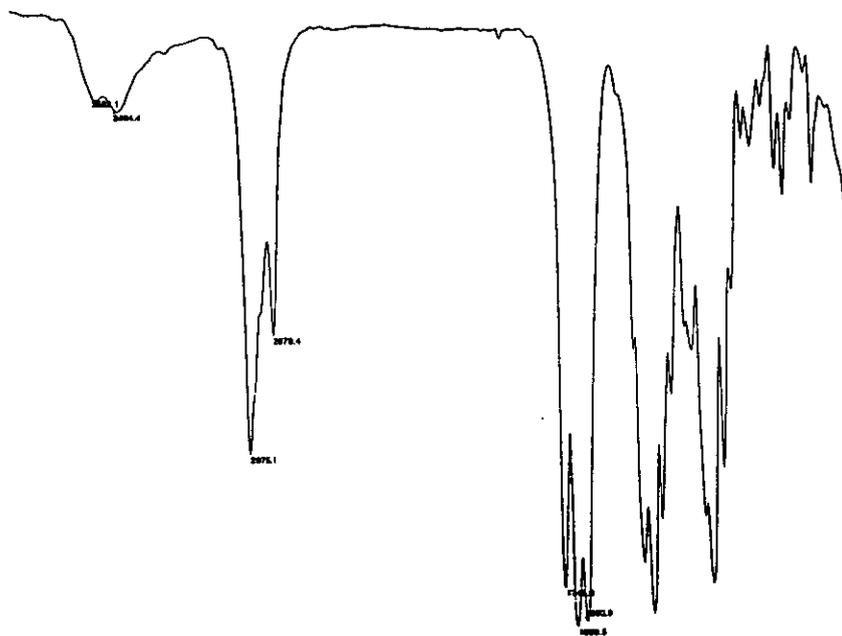


E-4-7. Espectro HMBC de BOCprolina-GABAOMe en donde se ve que los carbonilos a más bajo campo corresponden a los carbonilos del ester y del enlace peptídico.

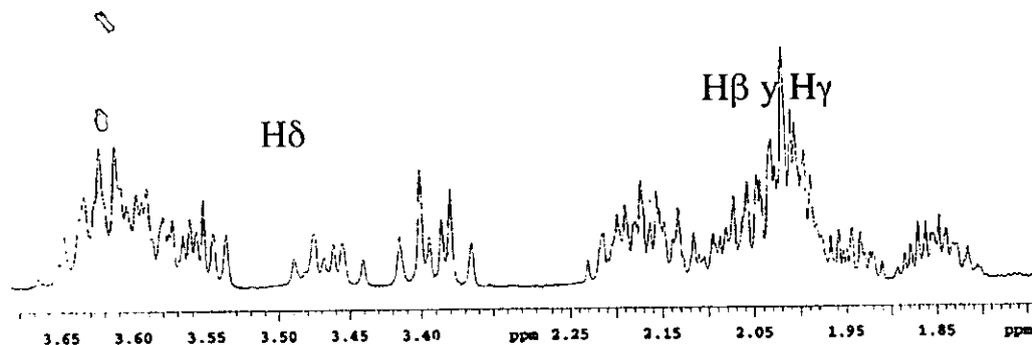


E-4-8. Ampliación del espectro HMBC en la zona de los carbonilos a más bajo campo. Se ve claramente que el carbonilo a más bajo campo corresponde al carbonilo del ester, mientras que el de más alto campo corresponde al carbonilo del enlace peptídico.

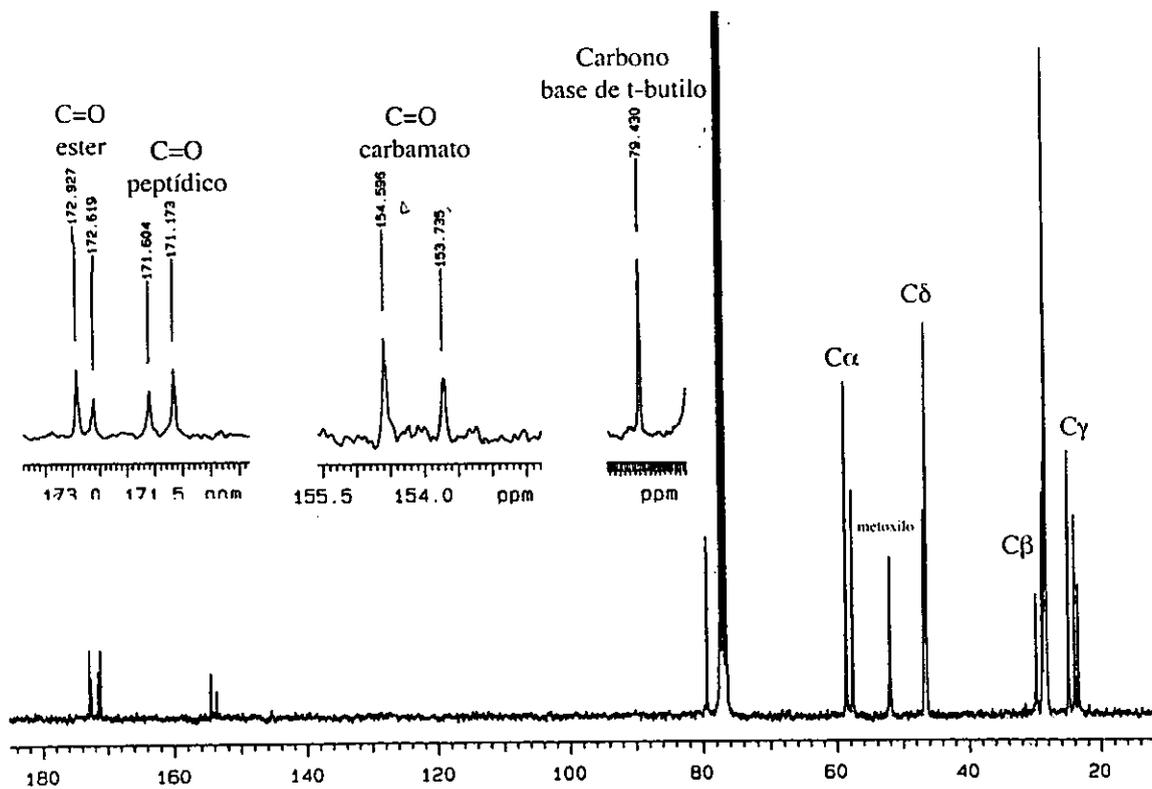
Anexo 5. Espectros del BOC-prolina-prolinaOMe



E-5-1. Espectro de IR de BOCprolina-prolinaOMe en película.



E-5-2. Expansión del espectro protónico de BOCprolina-prolinaOMe en temperatura ambiente en CDCl₃.



E-5-3. Espectro de ¹³C del dipéptido BOC-prolina-prolinaOMe en CDCl₃ en T.A.

Bibliografía

1. Major, R.T., Dürsch, F., *J.Org.Chem*, **23**,1564 (1958)
2. Magos G.A., Tesis Doctoral en Ciencias Biomédicas (Farmacología), Facultad de Medicina, UNAM, 1999.
3. Urry D.W. & Walter R., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **68**, 956 (1971).
4. Siemion I.Z., Wieland T. & Pook K.H., *Angew. Chem. Internat. Edit.*, **14**:10, 702 (1975).
5. Boussard G. & Marraud,M., *J.Am .Chem.Soc.*, **107**, 1825 (1985).
6. Sak, K., Karelson, M & Järv, J., *Int. J. Quantum Chem* **66**, 391 (1998).
7. Rich, D.H. & Jasensky R.D., *J. Am. Chem. Soc.*, **102**:3 ,1112 (1980).
8. Williams, K. & Deber, C., *Biochemistry*, **30**:37, 8919 (1991)
9. Gibbs P.R., Radzicka A & Wolfenden R., *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 4714 (1991).
10. Ramachandran,G.N., Lakshminarayanan,A., Balasubramanian, R & Tegoni, G., *Biochem.Biophys. Acta*, **221**, 165 (1970).
11. Benedetti, E., Ciajolo, M.R. & Maisto, A., *Act. Cryst B***30**,1783 (1974).
12. Milner-White,E.J., Bell,L.H &Maccallum,P.H., *J.Mol.Biol*, **228**, 725 (
13. Reimer, U., Scherer,G., Drewello, M., Kruber, S., Schutkowsky, M., Fischer, G., *J.Mol. Biol.*, **279**, 449 (1998).
14. Nishihara,H., Nishihara,K., Uefuji,T. & Sakota,N. *Bull.Chem.Soc.Jpn.*, **48**:2,553 (1975)
15. Grathwohl, C. & Wüthrich K., *Biopolymers* **15**, 2025 (1976).
16. Eberhardt, E., Loh, S.N., Hinck, A.P. & Raines R.T., *J.Am.Chem.Soc*, **114**, 5437 (1992).
17. Graaf R.A. de, *In vivo NMR Spectroscopy Principles & Techniques*, John Wiley & Sons, 1990.
18. Bodanszky, M. and Bodanszky, A., *The Practice of Peptide Synthesis*, 2nd. Ed, Springer-Verlag, Berlin, 1994.
19. Jones J., *Amino Acid and Peptide Synthesis*, Oxford University Press, Oxford, 1992.
20. Itoh M., Hagiwara D. & Kamiya T., *Tetrahedron Letters* , **49**, 4393, (1975).
21. TROC: Windholz T.B & Johnston D.B.R., *Tetrahedron Letters*, **27**, 2555 (1967) y Carson J.F., *Synthesis*, 268 (1981).
22. FMOC: Carpino L.A. & Han G.Y., *J.Org. Chem.*, **37**:22, 3404 (1972).
23. Klausner Y.S. and Bodansky M., *Synthesis*, 453 (1972).
24. Atherton E., Sheppard R.C., *Solid Phase Peptide Synthesis. A practical approach.*, IRL press at Oxford University Press, England, 1989.
25. Merrifield,B., *J.Am.Chem.Soc.*, **85**, 2149,(1963).
26. Jones John, *The Chemical Synthesis of Peptides*, Clarendon Press, Oxford, 1994.
27. Jones J.H. Senior Reporter, *Amino Acids and Peptides. A Review of the Literature Published during 1984*, Vol. 17, The Royal Society of Chemistry, Burlington House, London, 1984.
28. *Tetrahedron*, **40**, 4141(1984).
29. Günther Harald, *NMR Spectroscopy Basic Principles, concepts, and Applications in Chemistry*, 2nd Ed, John Wiley &Sons, 1995.
30. Bodanszky, M. and Bodanszky, A., *The Practice of Peptide Synthesis*, 2nd. Ed, Springer-Verlag, Berlin, 1994.
31. Milner-White, E.J., Bell, L.H. & Maccallum, P.H., *J.Mol. Biol*, **228**, 725 (1992).
32. Nishihara, H., Nishihara, K., Uefuji, T. & Sakota N., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **48**:2, 553 (1975).
33. Dorman D.E. & Bovey F.A., *J.Org. Chem*, **38**:13, 2379 (1973).
34. Milner-White, J.E., Bell, L.H. & Maccallum, P.H., *J.Mol.Biol*, **228**, 725 (1992).
35. Juaristy E. *Fisicoquímica Orgánica*, CINVESTAV-IPN, México, 1994. .
36. Oki M., *Applications of Dynamic NMR Spectroscopy to Organic Chemistry*, Series Methods in Stereochemical Analysis Vol. 4, VCH, USA, 1985.
37. Allerhand, A., Gutowsky, H.S., Jonas J. & Meinzer R.A., *J. Am. Chem. Soc.*, **88**:14, 3185, (1966).
38. Shanan-Atidi H., & Bar-Eli, K.H., *J. Phys. Chem.*, **74**:4, 961, (1970).
39. Siemion I.Z., Wieland T. & Pook K.H., *Angew.Chem.internat.Edit.*, **14**:10, 702 (1975).
40. Jones J. *Amino Acid and Peptide Synthesis*, Oxford University Press-Zeneca, Great Britain, 1999.
41. Gellman S.H., Dado G.P., Liang G-B. & Adams B.R., *J. Am. Chem.Soc.*, **113**, 1164 (1991).
42. Kálmán, A., Thuncke F., Schmidt R., Schiller, P.W. & Horváth C., *J. Chromatogr. A* **729**, 155 (1996).
43. Mooney E.F (editor), *Annual Review of NMR Spectroscopy*, Vol 2, Academic Press, 1969.
44. Marshall, T.W. and Pople J.A., *Mol.Phys*, **1**, 199 (1958)