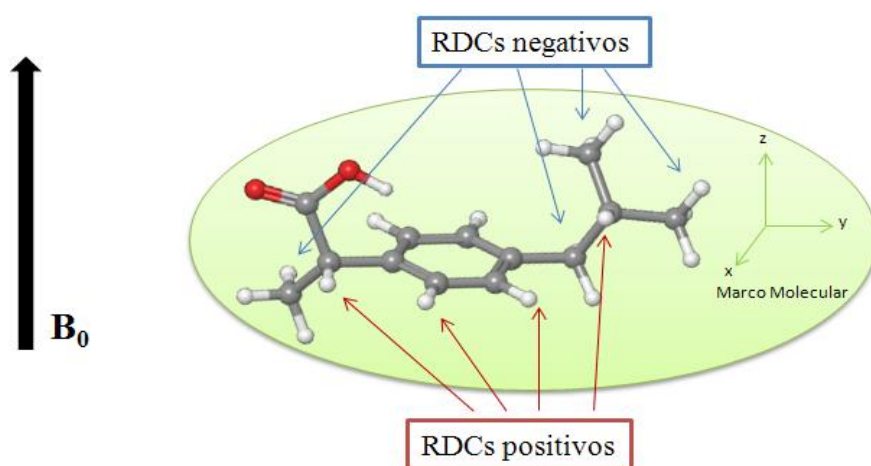


Medida de Acoplamientos Dipolares Residuales en Moléculas Orgánicas



Màster Universitari en Ciència i Tecnologia Químiques
Mòdul d'Iniciació a la Recerca. Treball Fi de Màster

Laura Castañar Acedo

Memòria presentada per superar el mòdul d'Iniciació a la Recerca corresponent
al Màster Universitari en Ciència y Tecnologia Químiques

Laura Castañar Acedo

Vist i plau:

Dr. Albert Virgili Moya

Dr. Teodor Parella Coll

Bellaterra, a _____ de _____ de 2012.

AGRADECIMIENTOS

El trabajo de investigación realizado durante este año y recogido en el presente Trabajo Fin de Máster ha sido posible gracias a la financiación de las siguientes instituciones y entidades:

- Beca de Personal Investigador en Formació (PIF) del Departament de Química de la Universitat Autònoma de Barcelona.
- Proyecto del MICINN: “Nuevas metodologías en Resonancia Magnética Nuclear”. Ref: CTQ2009-08328.
- *Departament de Química i Servei de Ressonància Magnètica Nuclear de la Universitat Autònoma de Barcelona.*

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

He de sintetizar en estas breves líneas mi sentida y sincera gratitud hacia todas las personas que durante este año me han ayudado, tanto a nivel profesional como personal. Sin ellas, nada hubiese sido lo mismo.

En primer lugar quiero dar las gracias a mis directores el Dr. Albert Virgili y el Dr. Teodor Parella, pues sin ellos esto no hubiera sido posible. Muchas gracias por vuestra ayuda, consejos, dedicación, entrega y confianza.

Quiero hacer una mención especial a Miquel Cabañas, siempre dispuesto a echarme una mano, bien para fabricar un tapón, para hacer que el imán vuelva a medir o para evitar que enloquezca con el caprichoso ordenador. Sin tu ayuda y sin tus innumerables consejos todo hubiese sido más difícil.

A todos mis compañeros del Máster por los buenos momentos vividos y por haberme ayudado siempre que lo he necesitado, sobre todo en las primeras semanas cuando, literalmente, no entendía nada.

A mis compañeros del SeRMN y del laboratorio Silvia Lope, Eva Monteagudo, Miriam Pérez, Albert Gargallo, Josep Sauri, Marta Sangüesa, Josep Recasens y en especial a Pau Nolis por tu indispensable ayuda que no puedo agradecer con palabras. Gracias a todos por haberme recibido con los brazos abiertos, por hacer que el día a día sea más ameno y por vuestra ayuda durante todo este año.

Y por supuesto a los que han hecho que poco a poco me sienta en Barcelona como en casa. Gracias por vuestra compañía, por las tardes de risas compartidas, por hacerme disfrutar de la vida fuera y dentro de la universidad, por las continuas clases de catalán y por hacer que este año lejos de mi casa y de mi gente haya sido toda una experiencia inolvidable. Mil gracias Albert, Pau, Josep, Joseju, Marta y Alba.

A Diego, mi inseparable compañero de aventuras, por tu apoyo incondicional, por estar a mi lado en todo momento, por tu paciencia y comprensión. Sin ti nada de esto habría sido posible, sin ti no estaría aquí. Mil gracias.

A mi familia, porque a pesar de la distancia siempre están a mi lado y me han apoyado en todos mis proyectos e ilusiones.

Tabla de contenidos

ACRÓNIMOS	i
ABSTRACT	ii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Aspectos generales.....	1
1.2. Información estructural de los acoplamientos dipolares residuales (RDCs).....	2
1.2.1. Cálculo de RDCs en moléculas rígidas/fragmento rígido.....	4
1.2.2. Interpretación estructural de RDCs en moléculas rígidas/fragmento rígido.....	5
1.3. Medios de alineamiento parcial para moléculas orgánicas.....	6
1.4. Experimentos de Resonancia Magnética Nuclear (RMN).....	7
1.4.1. Comprobación experimental del alineamiento.....	7
1.4.2. Medida experimental de los RDCs.....	8
1.4.3. Medida de RDCs a un enlace protón-heteronúcleo, $^1D_{XH}$	9
1.4.3.1. Experimentos 2D HSQC acoplado en la dimensión directa.....	10
1.4.3.2. Experimentos 2D HSQC acoplado en la dimensión indirecta.....	11
2. OBJETIVOS	12
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	13
3.1. Variación del grado de orden del medio con la compresión.....	13
3.1.1. Variación del acoplamiento cuadrupolar con el grado de orden del medio.....	13
3.1.2. Variación de $^1T_{CH}$ con el grado de orden del medio.....	15
3.2. Medidas del tiempo de relajación transversal, T_2	16
3.2.1. Tiempo de relajación transversal.	16
3.2.2. Estudio de la secuencia 1H -CPMG.	18
3.2.3. Medidas de T_2 del (S)-ibuprofeno.....	18
3.2.4. Cálculo de T_2	19
3.2.4.1. Cálculo de T_2 del ibuprofeno en medio isotrópico.....	20

3.2.4.2. Cálculo de T_2 del ibuprofeno en medio anisotrópico.....	20
3.3. Experimentos 2D ^1H - ^{13}C -HSQC acoplados en la dimensión directa.....	21
3.4. Experimentos 2D ^1H - ^{13}C -HSQC acoplados en la dimensión indirecta.....	23
3.5. Obtención de la estructura molecular a partir de los RDCs.....	24
4. PARTE EXPERIMENTAL.....	26
4.1. Preparación de las muestras.....	26
4.1.1. Preparación y caracterización del (S)-Ibuprofeno en medio isotrópico.....	26
4.1.2. Síntesis de polimetilmetacrilato (PMMA).....	26
4.1.3. Descripción del material utilizado: Tubo Shigemi.....	26
4.1.4. Preparación del medio anisotrópico.....	27
4.1.5. Preparación del (S)-Ibuprofeno en medio anisotrópico.....	28
4.2. Experimentos de Resonancia Magnética Nuclear (RMN).....	28
4.2.1. Medidas del tiempo de relajación transversal, T_2	28
4.2.2. Medidas de $^1J_{\text{CH}} / ^1D_{\text{CH}}$ en medio isotrópico/anisotrópico.....	29
4.2.2.1. Experimentos 2D ^1H - ^{13}C -HSQC acoplados en la dimensión directa.....	29
4.2.2.2. Experimentos 2D ^1H - ^{13}C -HSQC acoplados en la dimensión indirecta.....	30
5. CONCLUSIONES.....	31
6. BIBLIOGRAFÍA.....	32
ANEXO I. Resultados y discusión.....	34
ANEXO II. Parte experimental.....	37

Acrónimos

1D	Experimento monodimensional
2D	Experimento bidimensional
BIRD	B ilinear R otation D ecoupling
CLIP	C lean I n- P hase
CPMG	C arr- P urcell- M eiboom- G ill
DEPT	D istortionless E nhancement by P olarization T ransfer
F1	Dimensión indirecta
F2	Dimensión directa
FID	F ree I nduction D ecay
GARP	G lobally O ptimized A lternating P hase R ectangular P ulses
HSQC	H eteronuclear S ingle- Q uantum C oherence
INEPT	I nsensitive N uclei E nhanced by P olarization
MMA	M etilm M etacrilato
NOE	N uclear O verhauser E ffect
PEP	P reservation of e quivalent p athways.
PMMA	P olim M etilm M etacrilato
RDCs	R esidual D ipolar C ouplings
RINEPT	R efocused I nsensitive N uclei E nhanced by P olarization
RMN	R esonancia M agnética N uclear
SVD	S ingular V alue D ecomposition

Abstract

En los últimos años el uso de las constantes dipolares residuales (RDCs) ha despertado un gran interés en la determinación estructural de macromoléculas biológicas por espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear. Su utilidad para determinar la estructura de compuestos orgánicos de pequeño y mediano tamaño es cada vez más reconocida.

En este trabajo se describe la forma de preparar el medio de alineamiento necesario para llevar a cabo la medida de los RDCs utilizando como medio anisotrópico un gel comprimido de polimetilmetacrilato (PMMA). Mediante la utilización de este tipo de gel se ha podido realizar un estudio de la variación del grado de orden del medio con la compresión axial del mismo.

A la hora de utilizar los RDCs para determinar la estructura molecular de moléculas orgánicas es muy importante que la medida de la constante de acoplamiento escalar y de la constante dipolar residual sea exacta y precisa. Estas constantes de acoplamiento pueden ser extraídas de la dimensión directa o indirecta de los espectros ^1H - ^{13}C HSQC acoplados. Por ello en el presente trabajo se han realizado diferentes experimentos HSQC con la intención de estudiar cuál o cuáles de ellos son los más apropiados para llevar a cabo la medida de los RDCs.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Aspectos generales

La espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) es una de las técnicas más importante para la determinación estructural de moléculas orgánicas. Las cuatro interacciones espectroscópicas más importantes que tienen lugar en la RMN son el desplazamiento químico (δ), el acoplamiento escalar (J), el acoplamiento dipolar (D) y el acoplamiento cuadrupolar. Cuando se trabaja en un medio isotrópico (disolución), donde las moléculas presentan una elevada movilidad (rotacional y traslacional), sólo se observan directamente el desplazamiento químico y el acoplamiento escalar. Esto es debido a que los acoplamientos dipolares y cuadrupolares son dependientes de la orientación de la molécula con respecto al campo magnético aplicado (B_0) y se anulan al promediar los movimientos erráticos en el volumen total de la muestra. Por el contrario, en un medio totalmente anisotrópico (sólidos) la movilidad molecular está restringida por lo que las moléculas presentan una orientación relativa fija respecto a B_0 y esto permite observar todas las interacciones espectroscópicas obteniendo así una mayor información estructural. Mientras en medio isotrópico los espectros obtenidos presentan señales muy estrechas y bien resueltas, en medio anisotrópico las señales son muy anchas (del orden de kHz) lo que suele impedir la obtención de la información estructural de manera sencilla y rápida.

Los investigadores A. Saupe y G. Englert¹ descubrieron la existencia de los acoplamientos residuales dipolares (RDCs) en el año 1963 cuando trabajaban con moléculas orgánicas que se alineaban en presencia de un campo magnético. Los mayores avances en el estudio de los RDCs tuvieron lugar a finales de los años 90 con la aparición de medios de alineamiento que son capaces de orientarse en presencia de un campo magnético e inducir a su vez, a través de efectos estéricos y/o electrostáticos entre el soluto y el medio orientador, un alineamiento en la molécula de soluto que se quiere estudiar. El movimiento de volteo molecular del soluto se vuelve parcialmente anisotrópico en este medio y las interacciones espectroscópicas que normalmente no son observables en disolución (acoplamiento dipolar y cuadrupolar) pueden ser medidas. Si el medio genera un elevado grado de orden en el soluto los valores de las constantes de acoplamiento dipolares son del orden de kHz, mucho mayores que las constantes de acoplamiento escalares, lo cual hace casi imposible la interpretación y extracción de información de los espectros resultantes. Por el contrario, si el grado de orden del soluto es pequeño las constantes de acoplamiento dipolar presentan un valor menor que las constantes de acoplamiento escalar haciendo posible extraer del espectro la información estructural adicional contenida en los llamados *acoplamientos dipolares residuales* (RDCs)¹. La utilización de estos medios de alineamiento permite trabajar en una situación intermedia entre estado sólido y disolución, ideal para la medida de los RDCs.

Los RDCs se observan experimentalmente como una contribución adicional al desdoblamiento de las señales producido por el acoplamiento escalar. Por lo tanto, para poder realizar las medidas de RDCs es necesario llevar a cabo dos medidas: una en medio isotrópico (J) y otra en medio anisotrópico (J+D).

Los parámetros de RMN que clásicamente proporcionan información sobre la estructura local son δ , J y el NOE. Los RDCs suponen un complemento más y en algunos casos pueden resultar cruciales para la elucidación estructural de biomoléculas² y compuestos orgánicos³. El estudio de los RDCs permite obtener información de la geometría molecular a largo alcance pudiendo conocer la orientación relativa entre diferentes parejas de núcleos de una molécula. Otro aspecto interesante de los RDCs es que se pueden utilizar para determinar distancias inter-atómicas entre núcleos relativamente próximos en el espacio. El límite máximo de distancia que puede medirse está en torno a los 7.5Å, un valor que dobla el que se puede alcanzar con el NOE debido a que la dependencia de los RDCs y del NOE con la distancia es $1/r^3$ y $1/r^6$, respectivamente. Los RDCs también pueden ser utilizados para determinar la amplitud y velocidad de las fluctuaciones de ángulos de torsión de estructuras moleculares^{4,5}. En este trabajo nos centraremos en las aplicaciones de los RDCs en moléculas orgánicas de tamaño pequeño con abundancia isotópica natural. El interés de los RDCs en este tipo de moléculas no sólo se basa en poder determinar con mayor grado de precisión la conformación mayoritaria de la molécula, sino además en la determinación de la configuración relativa de sus centros diastereotópicos, y en la distinción de enantiómeros^{6,7}.

1.2. Información estructural de los acoplamientos dipolares residuales (RDCs)

Los RDCs se originan por un tipo de interacción espectroscópica, observable en medio anisotrópico, denominada acoplamiento dipolar que se produce entre dos espines nucleares. Esta interacción, al igual que el acoplamiento escalar, puede causar desdoblamientos en las señales espectrales. Para una pareja de núcleos I y S de espín $\frac{1}{2}$ y bajo condiciones acoplamiento dipolar débil, la expresión que describe el desdoblamiento de cada una de las señales debido al acoplamiento dipolar viene dado por la siguiente ecuación⁸:

$$D_{IS} = \frac{\mu_0 \gamma_I \gamma_S \hbar}{8\pi^2} \frac{1}{r_{IS}^3} \left\langle \frac{3\cos^2 \theta_{IS} - 1}{2} \right\rangle \quad \text{Ec. 1}$$

donde D_{IS} es el acoplamiento dipolar en Hz, γ_I y γ_S son las constantes giromagnéticas de los núcleos I y S respectivamente, μ_0 es la permeabilidad magnética del vacío y \hbar la constante de Plank. El operador promedio de la ecuación indica un promediado temporal sobre los movimientos moleculares. Los parámetros estructurales que aparecen en la ecuación son la distancia entre los

núcleos (r_{IS}) y el ángulo θ_{IS} que es el ángulo formado entre el vector que conecta ambos núcleos y el vector dirección del campo magnético B_0 (Fig. 1).

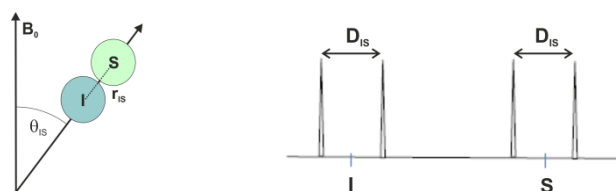


Figura 1. Esquema de los parámetros estructurales que intervienen en el acoplamiento dipolar de dos espines (I, S).

En muestras sólidas en “estado polvo”, en general, no existe una única orientación θ del vector internuclear I-S, sino una distribución aleatoria de orientaciones fijas de θ debido al ordenamiento aleatorio de los microcristales de la muestra. Esto hace que al aplicar la Ec.1, cada una de las orientaciones de θ tenga un desdoblamiento dipolar diferente y en el espectro se obtenga una señal correspondiente a la suma de todos ellos. Por el contrario, para muestras en disolución el movimiento browniano de volteo molecular provoca que en cada molécula el vector internuclear I-S cambie rápidamente con el tiempo. Esto hace que la distribución de ángulos sea aleatoria e isotrópica y por lo tanto el promedio temporal del término $\langle \cos^2 \theta_{IS} \rangle$ de la Ec.1 sea cero. Al anularse este término no hay contribución del acoplamiento dipolar y no se observa ningún desdoblamiento adicional en las señales espectrales.

Se puede conseguir una situación intermedia entre sólidos y líquidos trabajando con un medio capaz de ser orientado por el campo magnético del espectrómetro, denominado medio de alineamiento. Este medio al orientarse adquiere un movimiento ligeramente anisotrópico y esto hace que cuando la molécula del soluto que se quiere estudiar interacciona con él adquiera también cierto grado de anisotropía rotacional (Fig. 2).

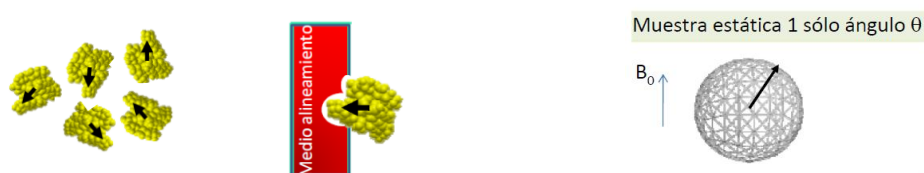


Figura 2: Ordenamiento del soluto en el medio de alineamiento.

En esta situación una pareja de núcleos que interacciona dipolarmente presentará ciertas orientaciones θ respecto al campo magnético más probables que otras. Esto hace que el término $\langle \cos^2 \theta_{IS} \rangle$ de la Ec.1 no promedie exactamente a cero recuperándose parcialmente o “residualmente” el efecto del desdoblamiento de la señal debido a la interacción dipolar. La ventaja fundamental de las medidas de RDCs es que permite obtener información estructural y/o dinámica de la interacción dipolar mientras que el espectro del soluto en el medio orientado conserva gran parte de la simplicidad habitual observada en condiciones de disolución.

1.2.1. Cálculo de RDCs en moléculas rígidas/fragmento rígido

La teoría y los conceptos matemáticos de los RDCs se describen exhaustivamente en el artículo de Kramer⁹. En este apartado se describen únicamente los conceptos y ecuaciones necesarias para entender el uso de los RDCs en la determinación de estructuras orgánicas.

Como se ha visto anteriormente, las moléculas de soluto que interaccionan con el medio alineador presentan un movimiento browniano de rotación anisotrópico. El cálculo de la interacción dipolar mediante la Ec.1 requiere hacer el promediado temporal de las distintas orientaciones que puede presentar la pareja de núcleos sobre los cuales se quiere medir su RDC. Una forma de incluir este promediado es utilizando el concepto del tensor de alineamiento **A**.

El caso más simple es cuando una molécula adopta una estructura rígida, o presenta una conformación muy mayoritaria. Si no se puede asumir esta situación *a priori* lo que se puede hacer es considerar que simplemente un fragmento de la molécula es rígido. Un fragmento molecular rígido es aquel en el que los átomos tienen el mismo comportamiento dinámico en la disolución. Se pueden encontrar fragmentos rígidos por ejemplo en los átomos en torno a enlaces con rotación torsional restringida tales como dobles enlaces, en estructuras cíclicas o en heterociclos aromáticos.

Para definir el vector de alineamiento es útil situarse en un sistema de referencia centrado en la molécula de modo que es necesario definir dos sistemas de referencia. Un sistema de coordenadas denominado marco de laboratorio ($X_{lab}, Y_{lab}, Z_{lab}$) en el que la dirección del campo magnético B_0 es fija (por convenio B_0 paralelo a Z_{lab}) y un sistema de coordenadas arbitrario centrado en la molécula ($X_{mol}, Y_{mol}, Z_{mol}$) que rota conjuntamente con ésta (Fig. 3).

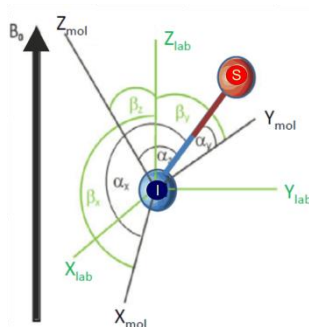


Figura 3. Relación entre dos sistemas de ejes de coordenadas. El sistema de ejes del laboratorio $X_{lab}, Y_{lab}, Z_{lab}$, donde el eje Z_{lab} apunta en la dirección de B_0 . Los ejes $X_{mol}, Y_{mol}, Z_{mol}$ definen otro sistema de ejes arbitrario centrado en la molécula. Los ángulos $\alpha_x, \alpha_y, \alpha_z$ definen la orientación del vector internuclear I-S respecto al sistema de ejes de la molécula y no dependen del tiempo porque se mueven con la molécula. Los ángulos $\beta_x, \beta_y, \beta_z$ definen la orientación del sistema de ejes de la molécula respecto al eje Z_{lab} y varían con el ⁸.

Bajo este punto de vista, la molécula queda estática y es el campo magnético y sus ejes de referencia los que rotan. El conjunto de orientaciones que puede adoptar el campo magnético

debe tenerse en cuenta en el promediado del término $\langle \cos^2 \theta_{IS} \rangle$ de la Ec.1 y se expresa matemáticamente por un tensor de probabilidad conocido como tensor de alineamiento \mathbf{A} .

$$\mathbf{A} = \begin{pmatrix} A_{xx} & A_{xy} & A_{xz} \\ A_{yx} & A_{yy} & A_{yz} \\ A_{zx} & A_{zy} & A_{zz} \end{pmatrix} \quad \text{Ec. 2}$$

El tensor de alineamiento \mathbf{A} es una matriz real de dimensión de (3x3), simétrica y con traza nula ($A_{xx} + A_{yy} + A_{zz} = 0$). Sus términos definen el promedio temporal de la orientación del campo magnético en todas las direcciones, definidas todas ellas respecto al sistema de ejes de la molécula. Para determinar los ejes principales del alineamiento hay que diagonalizar la matriz \mathbf{A} , los autovectores proporcionan tres ejes denominados principales, que corresponden a la orientación del marco de referencia del laboratorio (ejes X_{lab} , Y_{lab} , Z_{lab}). Los tres autovalores determinan otras dos magnitudes más del alineamiento: *la componente axial* \mathbf{A}_a ($A_a = 3/2 A_{zz}$) y *la componente rómbica* \mathbf{A}_r ($A_r = A_{xx} - A_{yy}$) por lo que la Ec.1 se puede reescribir del siguiente modo²:

$$D_{IS}(\theta, \varphi) = \frac{-\mu_0 \gamma_I \gamma_S \hbar}{16\pi^2 \cdot r_{IS}^3} \cdot \left[A_a (3 \cos^2 \theta_{IS} - 1) + \frac{3}{2} A_r \cdot \sin^2 \theta_{IS} \cdot \cos^2 2 \varphi_{IS} \right] \quad \text{Ec. 3}$$

donde \mathbf{A}_a y \mathbf{A}_r son la magnitud axial y rómbica del tensor de alineamiento, θ_{IS} y φ_{IS} son los ángulos polares que forma el vector internuclear I-S con el sistema de referencia de la molécula. θ_{IS} es el ángulo formado entre el vector I-S y el eje Z_{mol} ($\theta = \alpha_z$ en Fig.3) y φ_{IS} es el ángulo acimutal que describe la posición de la proyección del vector I-S sobre el plano X_{mol} - Y_{mol} relativo al eje X_{mol} . Esta ecuación proporciona directamente los RDCs teóricos de un vector dipolar I-S cualquiera de la molécula. La ecuación anterior suele expresarse de forma simplificada como:

$$D_{IS}(\theta, \varphi) = D_a (3 \cos^2 \theta_{IS} - 1) + \frac{3}{2} D_r \cdot \sin^2 \theta_{IS} \cdot \cos^2 2 \varphi_{IS} \quad \text{Ec. 4}$$

donde \mathbf{D}_a y \mathbf{D}_r tienen unidades de Hz e incluyen la componente axial (\mathbf{A}_a) y rómbica (\mathbf{A}_r) del tensor de alineamiento, la distancia internuclear ($\langle r_{IS}^3 \rangle$) y el resto de los términos constantes de la Ec. 3.

1.2.2. Interpretación estructural de RDCs en moléculas rígidas/fragmento rígido¹⁰

El caso más sencillo es un fragmento rígido en el que se ha medido sólo un RDC, por ejemplo $^1D_{CH}$ para una pareja de núcleos C-H unida directamente donde la r_{CH} es conocida y constante. Al determinar qué orientación del vector concuerda con el RDC experimental mediante la Ec. 4, se obtienen no una, sino múltiples orientaciones posibles del vector debido a los términos \cos^2 y \sin^2 . Dentro de la esfera unidad las soluciones obtenidas caen dentro de dos líneas con forma de sección cónica algo distorsionadas debido al parámetro A_r (Fig. 4A).

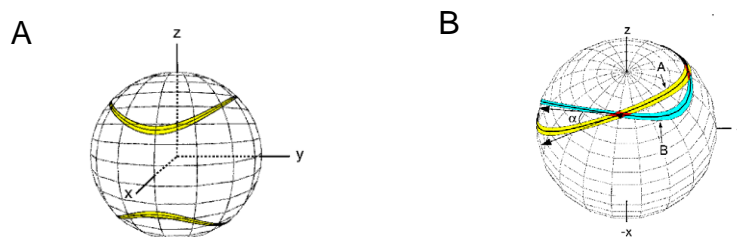


Figura 4. (A) Dos conos de degeneración en la orientación de un solo RDC. (B) Conos de degeneración obtenidos para dos RDC de A y B que apuntan en direcciones diferentes.

En el caso de medir dos RDCs para un mismo fragmento rígido, de nuevo utilizando Ec. 4, las posibles soluciones para cada RDC entrarían dentro de su respectivo cono de degeneración. Cuando los dos vectores RDC apuntan en direcciones diferentes (no paralelas), los dos conos de degeneración son diferentes y las posibles soluciones se restringen a los puntos de intersección entre ambos conos (Fig. 4B) eliminando así cierta parte de la ambigüedad debida a la degeneración orientacional de los RDCs.

Cuando en un fragmento molecular rígido se miden cinco o más RDCs con direcciones no paralelas es posible interpretar la dirección de estos vectores en términos de una sola orientación del fragmento sin que exista degeneración orientacional. Mediante la construcción y posterior diagonalización del tensor de alineamiento **A** se determinan los cinco parámetros que determinan el único tensor de alineamiento posible que son: A_a , A_r y los tres ejes principales del alineamiento. Esta operación se realiza para un modelo conformacional de la molécula utilizando algunos de los *softwares* diseñados para ello (MSPIN y PALES). La diagonalización de la matriz se realiza frecuentemente mediante el algoritmo de Descomposición de Valores Singulares (SVD)¹¹.

1.3. Medios de alineamiento parcial para moléculas orgánicas¹²

El medio de alineamiento juega un papel fundamental en la metodología de los RDCs ya que de sus características depende el grado de alineamiento conseguido para el soluto y la orientación de sus ejes respecto al campo magnético. La elección del medio adecuado y de las condiciones experimentales óptimas (disolvente, concentración, temperatura, etc.) se ha de hacer para cada caso de forma particular. Dada la gran variedad de tipos de moléculas orgánicas, no siempre es posible encontrar casos similares descritos. En estos casos, se ha de elegir el medio orientador en función de las posibles interacciones polares y/o apolares con el soluto. Cuando el soluto tiene demasiada afinidad por el medio orientador el grado de alineamiento inducido es elevado, esto provoca un ensanchamiento de las señales y una pérdida de sensibilidad, debido al aumento de su relajación transversal (T_2) y a la excesiva magnitud de los acoplamientos dipolares. Existen tres tipos de medios de alineamiento para moléculas orgánicas:

1. Los **cristales líquidos** tienen un rango de temperatura y concentración muy definido en el que se forman. Estas fases cristalinas funcionan bien para disolventes acuosos y apolares ya que se puede conseguir un grado de alineamiento débil, adecuado para medir RDCs.
2. Los medios orientadores basados en **geles comprimidos** fueron propuestos por Deloche y Samulski¹³ y actualmente son muy utilizados para disolventes orgánicos polares y apolares. En este medio el grado de alineamiento del soluto sólo está determinado por la fuerza con la que se comprime mecánicamente el gel, lo que permite re-escalar a voluntad los RDCs.
3. Los medios que consiguen la orientación mediante la utilización de **iones paramagnéticos** requieren modificar químicamente la molécula de interés acoplándole este tipo de iones. Su uso en moléculas orgánicas es muy limitado ya que el ión paramagnético unido covalentemente produce un ensanchamiento demasiado grande en los núcleos cercanos, lo que normalmente dificulta su detección.

En la Tabla 1 se da una selección de medios de alineamiento de tipo cristal líquido y gel comprimido para distintos tipos de disolventes.

Tabla 1. Medios de alineamiento más utilizados para orientar moléculas orgánicas en distintos tipos de disolventes¹⁴.

<u>Cristales líquidos</u>	<u>Disolventes compatibles</u>	<u>Observaciones</u>
Bicelas ²	D ₂ O	
Fases de Otting ¹⁵	D ₂ O	
Poli- γ -benzil-L-glutamato (PBLG) ¹⁶	CDCl ₃ , CD ₂ Cl ₂ , DMF, THF, Dioxano	Quiral
Poli- γ -etil-L-glutamato (PELG) ¹⁷	CDCl ₃ , CD ₂ Cl ₂	Quiral
<u>Geles comprimidos</u>		
Gelatina ¹⁸	D ₂ O	Quiral
Poliacrilamida ¹⁹	D ₂ O	
Polimetilmetacrilato (PMMA) ²⁰	Acetona, CD ₃ CN, C ₆ D ₆ , CDCl ₃ , CD ₂ Cl ₂ , EtOAc	
Poliestireno ²¹	CDCl ₃ , CD ₂ Cl ₂ , C ₆ D ₆ , THF, Dioxano	

Muchos de los medios de alineamiento tienen algún centro estereogénico, sin embargo se denomina medio de alineamiento quiral a aquel que tienen una estructura promedio altamente quiral y que por ello es capaz de inducir un alineamiento diferente entre enantiómeros del soluto.

1.4. Experimentos de Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

1.4.1. Comprobación experimental del alineamiento

Una vez que el soluto se encuentra disuelto en el medio es conveniente comprobar directamente en el espectrómetro que se ha generado un medio anisotrópico. Si se trabaja con muestras preparadas en un disolvente deuterado la forma más rápida de comprobar si hay orden en el medio es hacer un experimento 1D de RMN de deuterio (²H-RMN). Como ya se ha

mencionado en el *apartado 1.1* el acoplamiento cuadrupolar es una de las interacciones espectroscópicas que sólo es posible observar en un medio anisotrópico. Este tipo de acoplamiento se produce entre núcleos cuadrupolares ($I \geq 1$) los cuales poseen un momento cuadrupolar eléctrico (expresa la desviación de la distribución de carga eléctrica sobre su superficie de la simetría esférica) que interacciona con el gradiente de campo eléctrico del campo electromagnético presente en el espectrómetro de RMN. Esta interacción depende de la orientación de la molécula respecto al campo magnético aplicado B_0 . Cuanto mayor es el ordenamiento del medio, mayor es el valor de la constante de acoplamiento cuadrupolar (Fig. 5). La separación en Hz que se mide para el acoplamiento cuadrupolar de la señal de deuterio es proporcional al grado de alineamiento conseguido en el medio orientador.

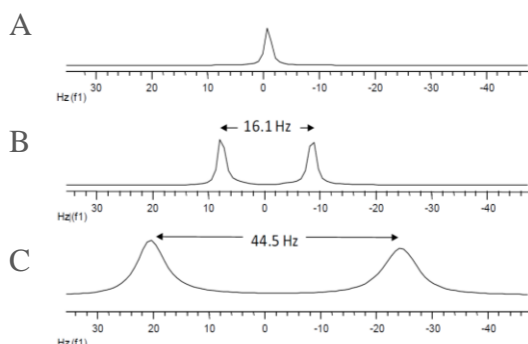


Figura 5. Espectro ^2H -RMN que muestra el desdoblamiento cuadrupolar de la señal de D_2O del disolvente en el medio orientado CPCL/hexano. (A) Disolución isotrópica, (B) concentración del medio de alineamiento del 5% y (C) concentración del medio de alineamiento del 10%.

1.4.2. Medida experimental de los RDCs.

Los RDCs se observan experimentalmente como una contribución adicional al desdoblamiento de las señales producido por el acoplamiento escalar. Cuando se trabaja en un medio anisotrópico el desdoblamiento observado de las señales es debido a la contribución del acoplamiento escalar (J) y del acoplamiento dipolar residual (D), por ello se suele denominar *constante de acoplamiento total* (T):

$$T = J + D \quad \text{Ec.5}$$

Es necesario realizar el experimento en medio isotrópico para obtener la constante de acoplamiento escalar y así poder extraer el valor de los RDCs por diferencia en las medidas realizadas en medio anisotrópico. Cuando el acoplamiento dipolar residual es menor, en valor absoluto, que el acoplamiento escalar es posible determinar su signo. Esta situación suele darse cuando el grado de alineamiento del soluto es débil.

En principio la mayoría de los experimentos de RMN diseñados para medir los distintos tipos de acoplamientos escalares ($^1J_{\text{CH}}$, $^nJ_{\text{CH}}$, $^nJ_{\text{HH}}$) pueden usarse también para determinar los

correspondientes RDCs. Sin embargo, en la práctica, la precisión que se requiere para medir los RDCs es mayor que la necesaria en los acoplamientos escalares. Para realizar estas medidas es necesario evaluar, modificar y mejorar los métodos clásicos de RMN existentes para las medidas de acoplamientos escalares. A continuación se exponen algunos de los métodos experimentales de medida de RDCs que son aplicables a moléculas orgánicas en abundancia natural.

1.4.3. Medida de RDCs a un enlace protón- heteronúcleo, ${}^1D_{XH}$.

Los RDCs más sencillos de medir son los protón-heteronúcleo a un enlace (${}^1D_{XH}$) donde X se refiere a cualquier heteronúcleo, por ejemplo ${}^{13}C$ o ${}^{15}N$. Para este tipo de RDCs la distancia internuclear es conocida y constante de modo que la información estructural que proporcionan es el valor del ángulo θ que define la orientación relativa del vector internuclear respecto a B_0 .

Para realizar la medida experimental de ${}^1T_{XH}$ es posible hacerlo mediante experimentos 1D y/o 2D. Los experimentos 1D utilizados se basan en la detección directa del heteronúcleo. El ${}^{13}C$ es cuatro veces menos sensible que el 1H por lo tanto sólo pueden utilizarse cuando se dispone de muestras muy concentradas. Por el contrario, los experimentos 2D aportan una mayor dispersión de señales y sensibilidad. La secuencia HSQC es uno de los experimentos más utilizados (Fig. 6A) basado en métodos de detección inversa donde la señal se detecta en el canal del 1H . La transferencia de magnetización de la secuencia HSQC se basa en un proceso *out-and-back* para etiquetar la magnetización del 1H con las frecuencias del ${}^{13}C$ (Fig. 6B).

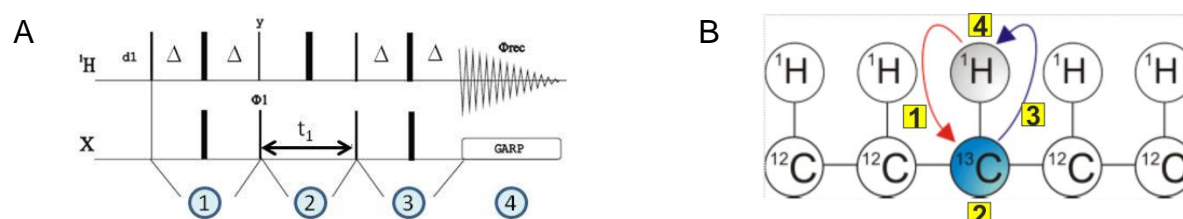


Figura 6. A) Secuencia básica del experimento HSQC. Los pulsos estrechos y anchos corresponden a pulsos de 90° y 180° respectivamente. La secuencia consta de 4 bloques: 1º) Bloque INEPT donde se produce la transferencia de polarización del 1H al ${}^{13}C$ por medio del acoplamiento directo ${}^1J_{CH}$; 2º) la magnetización heteronuclear en antifase evoluciona durante el período t_1 bajo el efecto del desplazamiento químico del ${}^{13}C$. La evolución del acoplamiento heteronuclear se reenfoca mediante la aplicación de un pulso de 180° en 1H en la mitad del período t_1 . Como resultado, en la dimensión F1 (dimensión del ${}^{13}C$), sólo aparece el desplazamiento químico heteronuclear evitando el desdoblamiento de las señales debido al acoplamiento directo ${}^1J_{CH}$. El período de espera Δ está optimizado para un valor de $1/(4 \cdot {}^1J_{XH})$; 3º) Un bloque RINEPT transfiere la magnetización de ${}^{13}C$ al 1H en fase. 4º) Adquisición en el canal del 1H con el ${}^{13}C$ desacoplado. B) Esquema de la transferencia de magnetización *out-and-back* del experimento HSQC.

Desde la publicación de la secuencia básica de HSQC²² se han introducido varias mejoras como, por ejemplo, la incorporación de gradientes para la selección de transferencia de coherencia cuántica²³ y la utilización de la metodología PEP²⁴ para aumentar la sensibilidad. Con

el fin de obtener distintos patrones de correlación se han propuesto diferentes versiones de la secuencia básica HSQC para facilitar la extracción de los acoplamientos escalares²⁵ (Fig. 7).

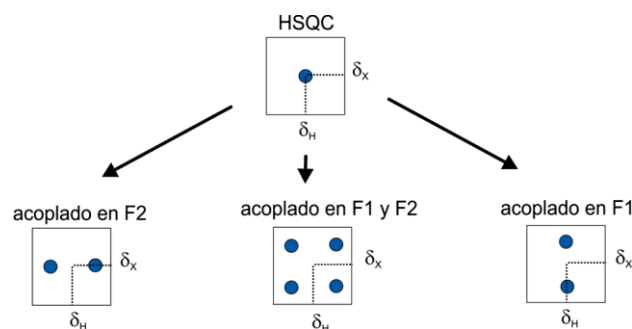


Figura 7. Esquema de los distintos patrones de acoplamientos obtenidos a partir de un espectro HSQC desacoplado.

1.4.3.1. Experimentos 2D HSQC acoplados en la dimensión directa

El experimento HSQC acoplado en la dimensión directa (HSQC-F2) permite extraer del espectro de forma directa el valor absoluto de la constante de acoplamiento heteronuclear a un enlace en la dimensión del ¹H (Fig. 8A). Esto se consigue modificando la secuencia HSQC original eliminando el desacoplador durante la adquisición (ver *Parte Experimental*).

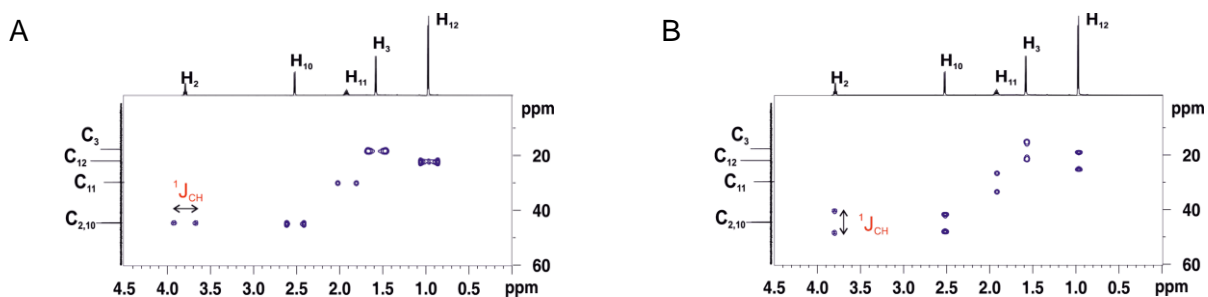


Figura 8. Extracción de la constante de acoplamiento de los espectros (A) Espectro HSQC-F2. (B) Espectro HSQC-F1.

El experimento CLIP-HSQC-F2²⁶ es una versión mejorada donde se introduce un pulso de 90° en el canal del ¹³C justo antes de la adquisición para eliminar las distorsiones de fase de las señales (ver *Parte Experimental*). Esta distorsión provoca errores en la medida de las constantes de acoplamiento y se debe a coherencias en antifase generadas durante el experimento cuando la duración de los periodos Δ del INEPT no coincide exactamente con la magnitud del acoplamiento ¹J_{CH}. Los acoplamientos protón-heteronúcleo (J o J+D) de una molécula varían significativamente entre ellos lo que impide que la duración del período INEPT se pueda optimizar simultáneamente para todos ellos.

Si se dispone de muestras poco concentradas el experimento que aporta mayor sensibilidad es el HSQC con sensibilidad aumentada o PEP²⁴ (PEP-HSQC-F2). Este experimento es una modificación de la secuencia HSQC donde se añade un segundo bloque RINEPT al final de la secuencia (ver *Parte Experimental*). En este experimento se lleva a cabo la detección simultánea de las dos componentes de la magnetización (I_x , I_y) obteniéndose un aumento significativo de la sensibilidad.

Las señales de los experimentos HSQC-F2 pueden presentar formas complejas y bastante anchas que dificultan la extracción precisa de los RDCs. Este problema se origina por acoplamiento dipolares adicionales, principalmente homonucleares ($^nJ_{HH}$) pero también heteronucleares a larga distancia, con el resto de protones próximos en la molécula. Para minimizar este problema se utilizan experimentos HSQC acoplado en la dimensión indirecta.

1.4.3.2. Experimentos 2D HSQC acoplados en la dimensión indirecta

En el experimento bidimensional HSQC acoplado en la dimensión indirecta (HSQC-F1), las señales aparecen desdobladas por $^1J_{XH}/^1T_{XH}$ en la dimensión del ^{13}C (Fig. 8B). Esto se consigue mediante la eliminación del pulso de 180° del canal del 1H que hay en el centro del período de la evolución (t_1)²⁷ (ver *Parte Experimental*). De este modo se consigue eliminar el problema del acoplamiento 1H - 1H y por lo tanto no interfiere en la medida de $^1J_{XH}/^1T_{XH}$ en la dimensión indirecta. Sin embargo, el problema que presenta este experimento es que durante el t_1 no solo evoluciona la constante de acoplamiento $^1J_{XH}$, también lo hacen los acoplamientos 1H - ^{13}C a larga distancia. Esto conlleva un ensanchamiento adicional o incluso un desdoblamiento de las señales en F1 debido a $^nD_{CH}$ lo que puede suponer una fuente potencial de error en la extracción de los RDCs. Estos acoplamientos no deseados pueden ser eliminados eficientemente con la incorporación del bloque BIRD²⁸ en la secuencia HSQC-F1 (ver *Parte Experimental*).

El máximo inconveniente de este tipo de experimentos es que es necesario adquirir un número de puntos más elevado de lo habitual en la dimensión indirecta para alcanzar suficiente resolución digital para realizar la medida de las constantes $^1J_{XH}/^1T_{XH}$ lo que implica un aumento muy importante en el tiempo necesario para realizar el experimento. Para ahorrar tiempo, se puede realizar el experimento BIRD-HSQC- $J_{escalado}$ utilizando un escalado de la constante de acoplamiento $^1J_{XH}/^1T_{XH}$ mediante el uso de una constante de escalado (K) que permite reducir significativamente el número de puntos que es necesario adquirir en la dimensión indirecta²⁹.

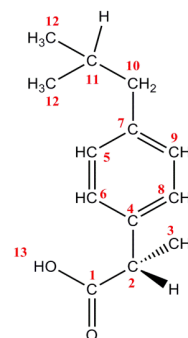
2. OBJETIVOS

Los principales objetivos del presente trabajo de investigación son:

- Llevar a cabo la preparación de un medio ordenado para poder realizar el estudio de los RDCs de moléculas orgánicas. Para ello nos propusimos trabajar con un medio anisotrópicos de tipo gel comprimido de polimetilmetacrilato (PMMA).
- Realizar distintos experimentos de Resonancia Magnética Nuclear para medir los tiempos de relajación transversal (T_2) y las constantes de acoplamiento heteronucleares a un enlace tanto en medio isotrópico como anisotrópico.
- Evaluar la importancia del tiempo de relajación transversal a la hora de diseñar y aplicar diferentes secuencias de pulsos.
- Estudiar qué experimentos de RMN son los más apropiados, en términos de sensibilidad, resolución y precisión, para medir los RDCs.
- Conocer la metodología de los distintos experimentos de RMN utilizados y poder realizar las modificaciones técnicas necesarias con el fin de obtener experimentos mejorados.
- Utilizar los valores experimentales de los RDCs para determinar la estructura tridimensional de la molécula estudiada mediante la utilización de programas de modelización molecular.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El estudio de los acoplamientos residuales dipolares se realizó en un medio orientador de tipo gel comprimido. El polímero utilizado fue el polimetilmetacrilato (PMMA) y cloroformo deuterado (CDCl_3) como disolvente. La molécula objeto de estudio ha sido el (S)-Ibuprofeno.



3.1. Variación del grado de orden del medio con la compresión.

El PMMA/ CDCl_3 es un medio de alineamiento de tipo gel comprimido. En este tipo de geles el grado de alineamiento del soluto viene determinado únicamente por la fuerza con la que se comprime mecánicamente el gel. La utilización del émbolo del Shigemi permite variar la compresión del gel y de ese modo el grado de alineamiento de las moléculas del soluto. Cuanto mayor es el grado de compresión del gel mayor es el grado de orientación de las moléculas del soluto (Fig. 9). El proceso de compresión/relajación del gel es totalmente reversible por lo que se puede variar el grado de orden en función del valor de los RDCs.

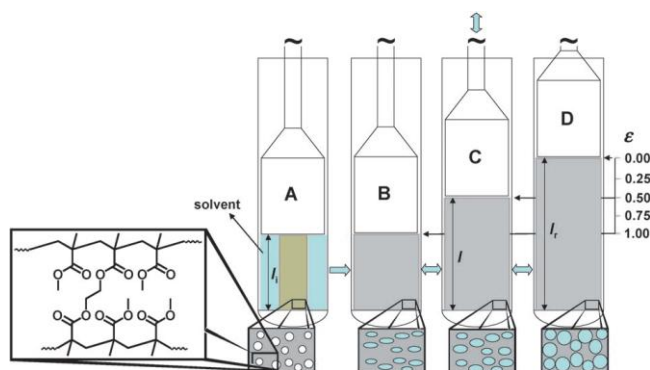


Figura 9. Representación del soluto en el gel PMMA para distintas compresiones. A) Barra de PMMA seco con el soluto y el CDCl_3 necesario para su hinchado bajo la restricción de un émbolo Shigemi. B) PMMA hinchado y con el émbolo en su posición de máxima compresión axial lo que provoca el mayor grado de orientación molecular. C) Grado de compresión y orientación intermedio. D) Gel totalmente relajado, no hay compresión axial, donde el grado de alineamiento es prácticamente nulo.

3.1.1. Variación del acoplamiento cuadrupolar con el grado de orden del medio

Como ya se ha mencionado en la introducción, el deuterio es un núcleo cuadrupolar y cuando se encuentra en un medio anisotrópico es posible observar su constante de acoplamiento cuadrupolar. Así, la forma más rápida de comprobar la variación del orden con la compresión es adquiriendo un espectro ^2H -RMN. Se realizaron experimentos ^2H -RMN a distintas compresiones para verificar que el orden del medio variaba con la compresión.

En la Fig. 10 se puede observar como el desdoblamiento cuadrupolar ($\Delta\nu_Q$) disminuye al relajar el gel hasta llegar a colapsar en una única señal. Esto es debido a que el $\Delta\nu_Q$ depende de la orientación

del núcleo (parcialmente restringida en medio anisotrópico) y por lo tanto, cuanto mayor es el grado de orden del medio, más fija estará su orientación y mayor será la magnitud del acoplamiento.

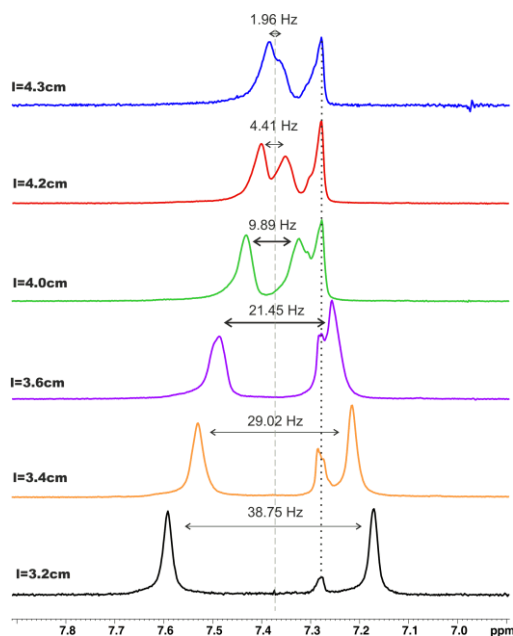


Figura 10. Espectro ²H-RMN para distintas elongaciones del gel PMMA/CDCl₃.

La utilización del émbolo del Shigemi implica que la compresión mecánica del gel es axial. El grado de compresión, ϵ , se define como:

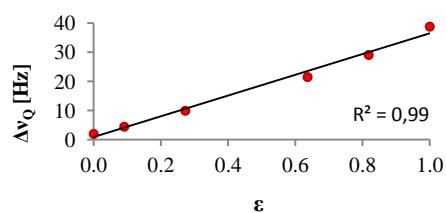
$$\epsilon = \frac{l_r - l}{l_r - l_i} \tag{Ec.6}$$

donde l_r , l y l_i son la longitud del gel totalmente relajado, la longitud del gel en cualquier posición al presionar el émbolo y la longitud inicial del gel (máxima compresión) respectivamente (Fig. 9). Los valores de ϵ varían de cero (gel relajado) a uno (totalmente comprimido).

En la Tabla 2 se muestran los valores de ϵ calculados para cada una de las elongaciones y el acoplamiento cuadrupolar provocado en la señal de deuterio del CDCl₃ ($\Delta v_Q(\text{CDCl}_3)$) embebido en el gel. Al representar el $\Delta v_Q(\text{CDCl}_3)$ frente al grado de compresión se observó una dependencia lineal entre ellos.

Tabla 2. Elongación, grado de compresión y el desdoblamiento cuadrupolar a distintas compresiones del gel.

l (cm)*	ϵ	Δv_Q (Hz)
3,2	1,00	38,74
3,4	0,82	29,02
3,6	0,64	21,45
4	0,27	9,89
4,2	0,09	4,41
4,3	0,00	1,96



*La medida de la elongación del gel se realizó directamente sobre el tubo de RMN utilizando una regla con un error de 1 mm.

3.1.2. Variación de ${}^1T_{CH}$ con el grado de orden del medio

Una vez comprobado que el orden varía con la compresión del gel se realizaron experimentos HSQC para analizar la variación de las constantes de acoplamiento dipolares en función del grado de orden del medio. Para ello se hicieron 5 experimentos CLIP-HSQC-F2 a cinco compresiones del gel diferentes (ver Tabla 3).

Tabla 3. a) Resultados obtenidos de las ${}^1T_{CH}$ en (S)-ibuprofeno a partir de los experimentos CLIP-HSQC-F2 a distintas compresiones del gel. b) Valores de la pendiente y la ordenada en el origen de las regresiones lineales de cada una de las señales. c) Valores de ${}^1J_{CH}$ obtenidos en medio isotrópico. d) Valores de RDCs (${}^1D_{CH}$) calculados como la diferencia entre el ${}^1T_{CH}$ a máxima compresión ($\Delta\nu_Q=33.5\text{Hz}$) y la correspondiente ${}^1J_{CH}$ en medio isotrópico.

Enlace		${}^1T_{CH} = {}^1J_{CH} + {}^1D_{CH}$ (Hz) ^a					Pendiente ^b (R^2)	Y_0 (Hz) ^b	${}^1J_{CH}$ (Hz) ^c	${}^1D_{CH}$ (Hz) ^d
C	H									
2	2	154,8	147,8	142,8	139,7	138,2	0,661 (0,99)	132,8	130,4	24,4
3	3	123,1	124,6	125,8	127,1	128,0	-0,189 (0,97)	129,1	128,9	-5,8
5;9	5;9	171,3	167,1	165,4	162,8	161,3	0,374 (0,99)	158,8	158,9	12,4
6;8	6;8	174,9	170,0	165,9	163,2	162,4	0,506 (0,98)	158,3	158,8	16,1
10	10	124,4	125,0	125,3	125,4	125,6	-0,044 (0,99)	125,9	125,9	-1,5
11	11	134,6	132,5	131,2	130,3	129,6	0,194 (0,99)	128,2	127,2	7,4
12	12	122,2	122,7	123,2	123,6	124,0	-0,072 (0,97)	124,4	124,5	-2,4
$\Delta\nu_Q(\text{CDCl}_3)$ (Hz)		33,5	21,4	15,9	11,1	7,5				

En la Fig. 11 se observa claramente una relación lineal entre las constantes de acoplamiento totales (${}^1T_{CH}$) y el $\Delta\nu_Q(\text{CDCl}_3)$ obtenido para cada una de las compresiones. Esta dependencia lineal ya había sido previamente observada por Luy y colaboradores en estudios realizados sobre RDC³⁰. A medida que aumenta $\Delta\nu_Q$ (mayor ordenamiento del medio) la constante de acoplamiento total varía. En algunos casos la ${}^1T_{CH}$ aumenta al aumentar el grado de orden, presentando una pendiente positiva (H₂, H_{5,9}, H_{6,8} y H₁₁) y en otros disminuye, rectas con pendiente negativa (H₃, H₁₀ y H₁₂).

De la representación lineal es posible extraer el valor teórico de la constante de acoplamiento para un grado de orden nulo, medio isotrópico, ya que coincide con el valor de la ordenada en el origen (Y_0). Esto puede suponer una ventaja en aquellos casos donde no se disponga de mucha cantidad de muestra ya que evitaría tener que preparar una disolución en medio isotrópico.

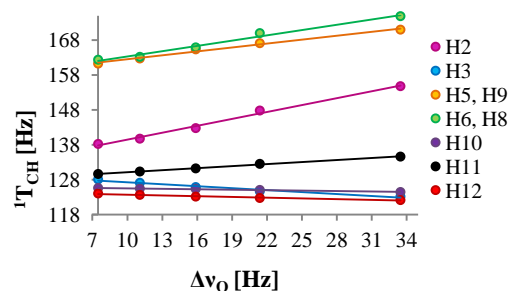


Figura 11. Representación gráfica de la variación de ${}^1T_{CH}$ con el desdoblamiento cuadrupolar.

En la Fig. 12 se puede observar como las señales se van deformando a medida que aumenta el grado de compresión. Esto se puede ver tanto en el espectro 2D como en el corte 1D extraído de cada uno de ellos. Esta distorsión es debida a la influencia de los acoplamientos residuales dipolares, que aumenta al aumentar la anisotropía del medio.

A la vista de los resultados obtenidos se puede afirmar que es posible llevar a cabo la medida de varios RDCs para una misma señal de forma independiente solo variando la compresión axial. Esto ofrece la ventaja de obtener los datos necesarios para realizar los cálculos de modelización molecular sin mayores complicaciones experimentales incluso cuando se trabaja con moléculas pequeñas.

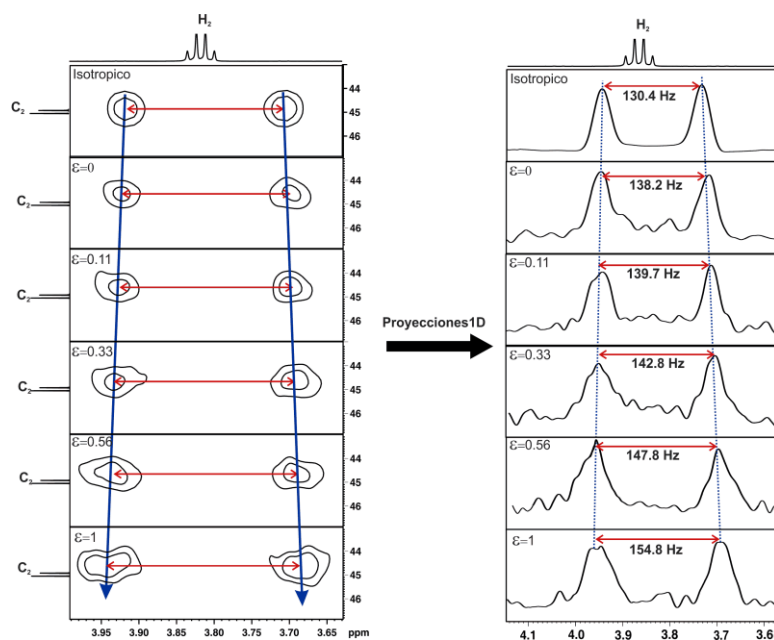


Figura 12. Variación de la constante de acoplamiento $^1J_{CH}$ y $^1T_{CH}$ en el protón H_2 del (S)-Ibuprofeno observada en los experimentos HSQC-F2 en medio isotrópico y anisotrópico a distintas compresiones del gel.

3.2. Medidas del tiempo de relajación transversal, T_2

3.2.1. Tiempo de relajación transversal³¹

En un experimento de RMN se perturba el equilibrio térmico del sistema de espín al irradiar los núcleos a la frecuencia de resonancia. Cuando la perturbación cesa el sistema retorna a la situación de equilibrio mediante toda una serie de procesos disipativos en lo que se conoce comúnmente como relajación. Uno de estos procesos de relajación es el denominado relajación espín-espín o relajación transversal. En este proceso la relajación tiene lugar en el plano perpendicular a la dirección del campo magnético (plano xy) y se caracteriza por el tiempo de relajación transversal (T_2).

Cuando se aplica un pulso de excitación de 90°_x el vector magnetización inicial (M_0) pasa al plano transversal. El vector magnetización es la resultante de muchos vectores correspondientes a cada uno de los núcleos individuales, los cuales presentan una coherencia de fase tras la aplicación del pulso de 90° . Inmediatamente después de la aplicación del pulso se pierde la coherencia de fase debido a que el campo magnético experimentado por cada núcleo no es exactamente el mismo debido principalmente a dos motivos:

- La falta de homogeneidad del campo magnético a lo largo del volumen de muestra.

- La presencia de núcleos vecinos. Un núcleo concreto no se encuentra aislado, sino rodeado de otros núcleos magnéticos. Estos núcleos pueden modificar ligeramente el valor del campo (B_{loc}) que el núcleo experimenta a lo largo de la dirección de B_0 . Esta magnitud variable B_{loc} depende del entorno. En fase líquida (medio isotrópico) los movimientos moleculares tienden a reducir el B_{loc} a cero cosa que no ocurre en medios anisotrópicos (geles, cristales líquidos y sólidos).

Estas diferencias en el campo magnético que sufre cada núcleo provoca que algunos espines experimenten un campo ligeramente mayor, aumentando su frecuencia y desplazándose más rápido, mientras que otros experimentarán un campo ligeramente menor y comienza a quedarse atrás. Esto genera una dispersión de la magnetización en el plano xy (Fig. 13) que hace que la componente de la magnetización en el plano transversal (M_y) disminuya hasta llegar a anularse.

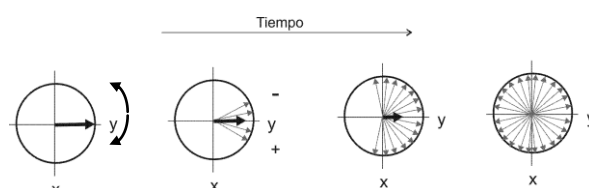


Figura 13. Relajación transversal debido a la pérdida de coherencia de fase.

La pérdida de magnetización en el plano transversal se puede expresar como:

$$\frac{dM_y}{dt} = -\frac{M_y}{T_2} \quad \text{Ec. 7}$$

La integración de esta ecuación diferencial lleva a la siguiente expresión:

$$M_y = M_0 \cdot e^{-t/T_2} \quad \text{Ec. 8}$$

Esta caída exponencial de la magnetización transversal con el tiempo se manifiesta experimentalmente en la FID. Como puede observarse en la Fig. 14, para tiempos de relajación transversal cortos la caída de la FID es más acusada. Además hay una relación de inversa proporcionalidad entre la anchura de la señal espectral (medida como anchura a altura media) y el tiempo de relajación transversal T_2 . De modo que los núcleos con tiempos de relajación transversal corto presentaran unas señales anchas mientras que en los que tienen un T_2 largo serán más estrechas.

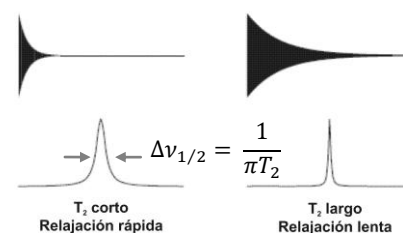


Figura 14. Diferencias en la FID y en la señal en función del tiempo de relajación transversal.

Como se ha mencionado anteriormente en medios anisotrópicos los campos magnéticos producidos por los dipolos magnéticos de núcleos vecinos no se anulan por promediado de los movimientos moleculares. Además cuanto mayor es la viscosidad del medio, más próximos se encuentran los distintos núcleos magnéticos y por lo tanto más fácilmente pueden relajar vía espín-espín. Todo esto provoca una importante disminución del T_2 , con el consecuente ensanchamiento de las señales, lo que

conlleva una pérdida más rápida de la magnetización transversal. Esta pérdida de magnetización puede suponer un problema a la hora de realizar experimentos largos como es el caso de los experimento para medir las constantes de acoplamiento C-H a larga distancia.

3.2.2. Estudio de la secuencia ^1H -CPMG.

Se realizaron estudios de dos secuencias ^1H -CPMG diferentes (*cpmg1d* y *cpmg1d modificada*) para la muestra en medio isotrópico y anisotrópico. Los detalles diferenciales de ambas secuencias de pulsos así como los parámetros de adquisición utilizados en cada caso se detallan en la Parte Experimental. En la Figura 15 se muestra el ejemplo de dos experimentos de ^1H -CPMG del (S)-ibuprofeno en medio isotrópico comparando los resultados obtenidos con las dos secuencias descritas anteriormente.

Los espectros obtenidos al realizar los experimentos con la secuencia estándar *cpmg1d* presentaban problemas de fase en algunas señales debido a la evolución de J_{HH} durante la aplicación del eco, lo cual conlleva una distorsión de las señales y por lo tanto un error importante en la medida de los tiempo de relajación transversal (Fig. 15A y 15C).

Recientemente Morris y colaboradores³² han realizado una modificación de la secuencia CPMG para eliminar el efecto del acoplamiento escalar. Se implementó dicha técnica y se registraron los experimentos con la secuencia *cpmg1d modificada* observándose que se habían eliminado por completo las distorsiones de fase (Fig. 15B y 15D).

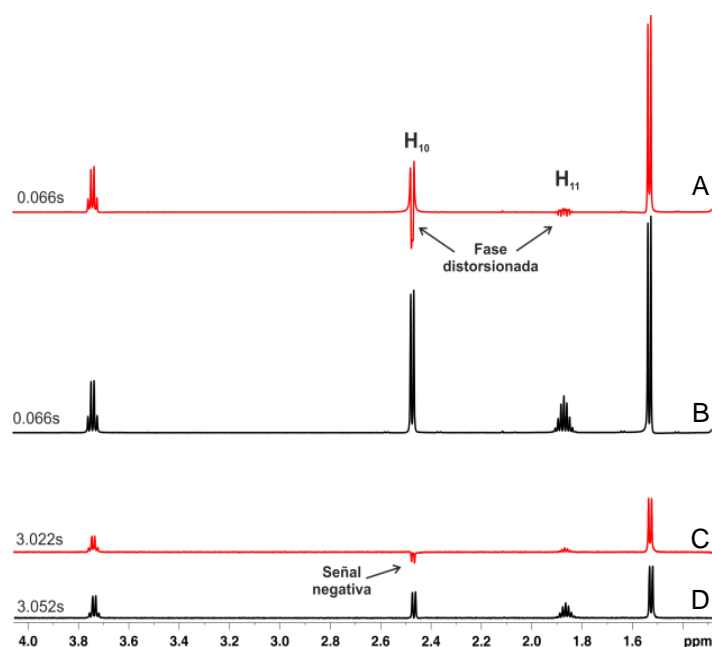


Figura 15. Espectros ^1H -CPMG del (S)-ibuprofeno/ CDCl_3 . (A y C) Espectros registrados con la secuencia *cpmg1d*. (B y D) Espectro registrados con la secuencia *cpmg1d modificada*.

3.2.3. Medidas de T_2 del (S)-ibuprofeno

Viendo los resultados obtenidos en el estudio de las secuencias ^1H -CPMG se decidió utilizar la secuencia *cpmg1d modificada* para llevar a cabo la determinación experimental de los tiempos de relajación tanto en medio isotrópico (Fig.16A) como anisotrópico (Fig.16B). Al eliminarse los problemas de fase la extracción de los tiempos de relajación se pudo realizar de forma más precisa y fiable. Para

poder comparar los resultados obtenidos en ambos medios todos los experimentos se realizaron con los mismos parámetros de adquisición (*Parte Experimental*).

Lo primero que cabe mencionar es que cada una de las señales tarda un tiempo diferente en desaparecer lo cual es lógico teniendo en cuenta que el T_2 es característico de cada núcleo. En la Figura 16 se observa que las señales presentan un tiempo de relajación transversal diferente en medio isotrópico y anisotrópico ya que la caída de la intensidad de las señales con el tiempo no es igual. Todas las señales presentan una caída de intensidad más acusada en el medio anisotrópico lo cual indica que tendrán un tiempo de relajación transversal más corto.

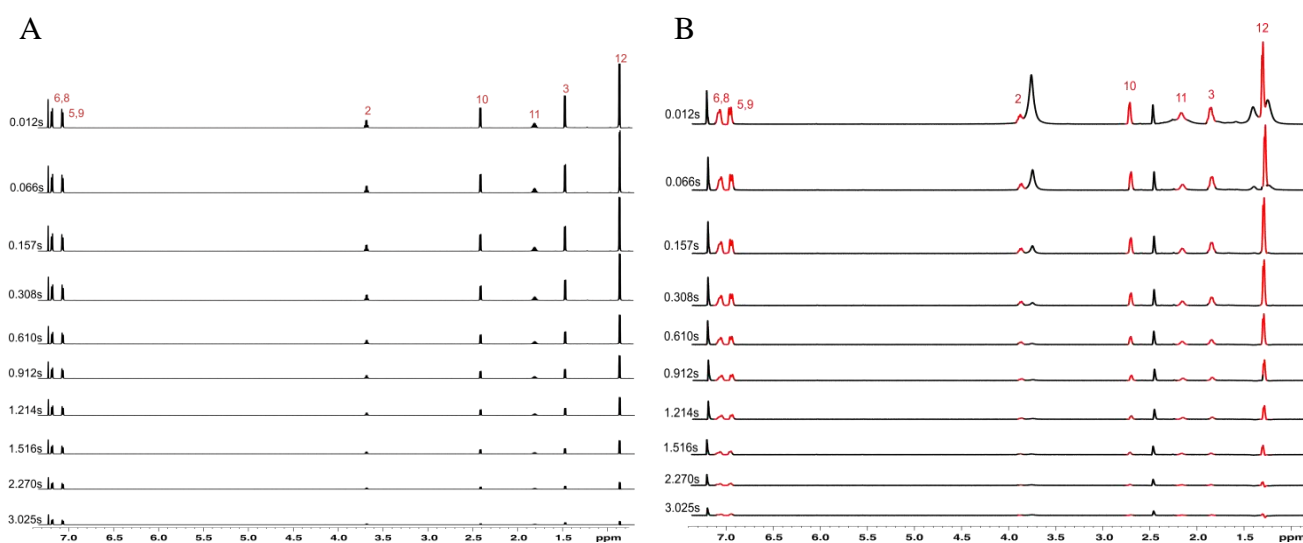


Figura 16. (A) Espectros ^1H -CPMG del (S)-ibuprofeno en CDCl_3 . (B) Espectros ^1H -CPMG del (S)-ibuprofeno en $\text{PMMA}/\text{CDCl}_3$. (S)-ibuprofeno (señales rojas). PMMA (señales negras).

3.2.4. Cálculo de T_2

La diferencia de intensidad de los picos observada en los experimentos a distinto número de ecos de espín se debe exclusivamente a la pérdida de M_y con el tiempo. La intensidad del pico varía de acuerdo con una ecuación del tipo:

$$I = I_0 \cdot e^{-t/T_2} \longrightarrow \ln(I) = \ln(I_0) - \frac{1}{T_2} t \quad \text{Ec. 9}$$

siendo t el tiempo comprendido entre el primer pulso de 90° y el comienzo de la adquisición (tiempo durante el cual la magnetización está en el plano transversal). Es equivalente hablar de intensidad (I) que de integración del pico (A_I) por lo tanto se utilizaron los valores de las integrales de cada señal para determinar el T_2 . Para facilitar la extracción de los valores de la relajación transversal se trabajó con la ecuación lineal anterior donde T_2 se obtiene de la inversa de la pendiente.

3.2.4.1. Cálculo de T_2 del ibuprofeno en medio isotrópico

Los valores de las integrales extraídas de los espectros ^1H -CPMG para cada uno de los experimentos realizados se muestran en el Anexo I. La representación gráfica de estos valores frente al tiempo presenta una dependencia exponencial como puede observarse en la Fig. 17.

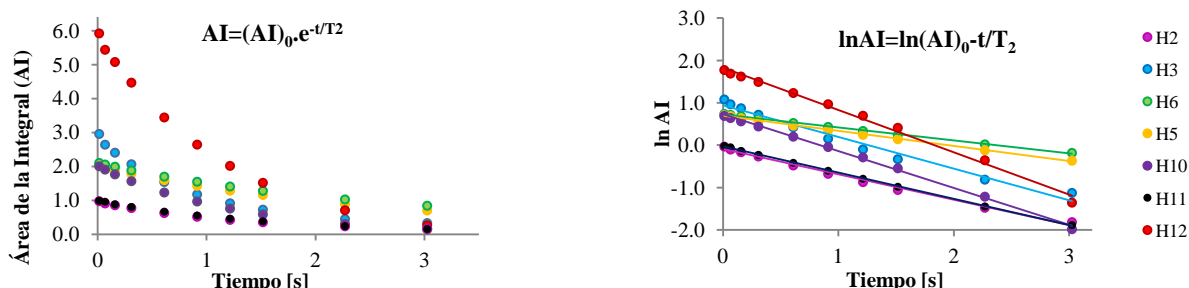


Figura 17. Representación de la dependencia exponencial y lineal de la integral de cada señal con el tiempo.

En la Tabla 4 se muestran los valores del coeficiente de correlación (R^2) y de la pendiente de cada una de las rectas ajustadas a los valores experimentales obtenidos para cada uno de los núcleos. El T_2 se calculó como la inversa de la pendiente de la recta. El ajuste lineal es bastante bueno ya que en la mayoría de los casos el coeficiente de correlación es superior a 0.99.

Tabla 4. Valores del ajuste lineal y de T_2 de las señales del ibuprofeno en CDCl_3 .

	H_2	H_3	$\text{H}_{5,9}$	$\text{H}_{6,8}$	H_{10}	H_{11}	H_{12}
R^2	0,990	0,977	0,996	0,995	0,998	0,997	0,994
pendiente	0,611	0,763	0,364	0,313	0,888	0,632	1,020
T_2 (s)	1,64	1,31	2,75	3,19	1,13	1,58	0,98

3.2.4.2. Cálculo de T_2 del ibuprofeno en medio anisotrópico

Los valores de las integrales extraídas de los espectros ^1H -CPMG para cada uno de los experimentos realizados se muestran en el Anexo I. La representación gráfica de estos valores frente al tiempo presenta una dependencia exponencial como puede observarse en la Fig. 18. No se pudo integrar la señal del H_{11} ya que estaba solapada con una señal muy intensa del PMMA y su integración podía conducir a errores en la determinación de su T_2 .

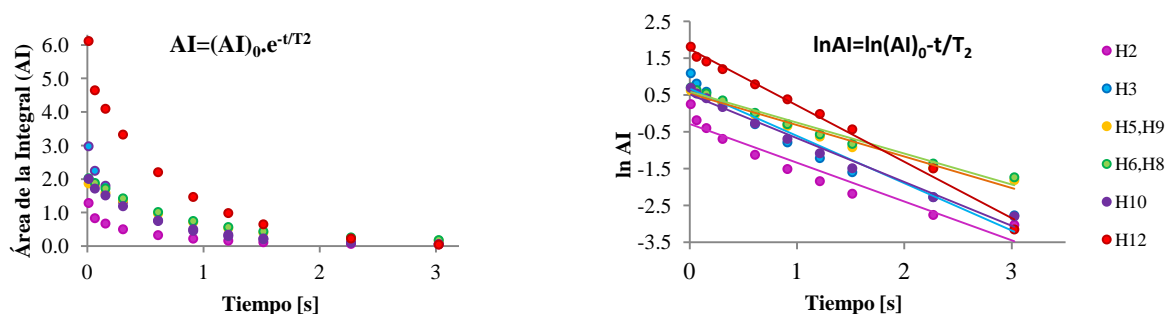


Figura 18. Representación de la dependencia exponencial y lineal de la integral de cada señal con el tiempo.

Los valores del coeficiente de correlación (R^2) y de la pendiente de cada una de las rectas así como el valor de T_2 calculado para cada uno de los núcleos se muestran en la Tabla 5. En este caso el ajuste lineal valores de los coeficientes de correlación menores lo cual puede ser debido a errores en la integración causados por el solapamiento de las señales del PMMA. Estos errores en la medida de las integrales son mayores en los primeros experimentos ya que es en estos donde las señales del gel tienen una mayor intensidad.

Tabla 5. Valores del ajuste lineal y de T_2 de las señales del ibuprofeno en PMMA/ $CDCl_3$.

	H_2	H_3	$H_{5,9}$	$H_{6,8}$	H_{10}	H_{12}
R^2	0,926	0,952	0,979	0,979	0,983	0,991
Pendiente	1,054	1,286	0,854	0,839	1,192	1,531
T_2 (s)	0,95	0,78	1,17	1,19	0,84	0,65

Al comparar los valores de T_2 para cada uno de los núcleos en medio isotrópico y anisotrópico se observó que en todos los casos el tiempo de relajación transversal es menor en el gel PMMA/ $CDCl_3$.

Es muy importante tener en cuenta estos tiempos de relajación a la hora de diseñar y aplicar las secuencias ya que si el tiempo total de la secuencia es superior al T_2 de un determinado núcleo toda su información se perderá por relajación antes de la adquisición.

3.3. Experimentos 2D 1H - ^{13}C -HSQC acoplados en la dimensión directa

Se realizaron tres experimentos distintos HSQC acoplados en la dimensión directa con la intención de ver cuál de ellos era más apropiado para realizar las medidas de las constantes de acoplamiento en medio isotrópico ($^1J_{CH}$) y anisotrópico ($^1T_{CH}$). Los experimentos realizados fueron: HSQC-F2, CLIP-HSQC-F2 y PEP-HSQC-F2. Las secuencias de pulsos y los parámetros de adquisición utilizados en cada uno de los experimentos se describen en la *Parte Experimental*.

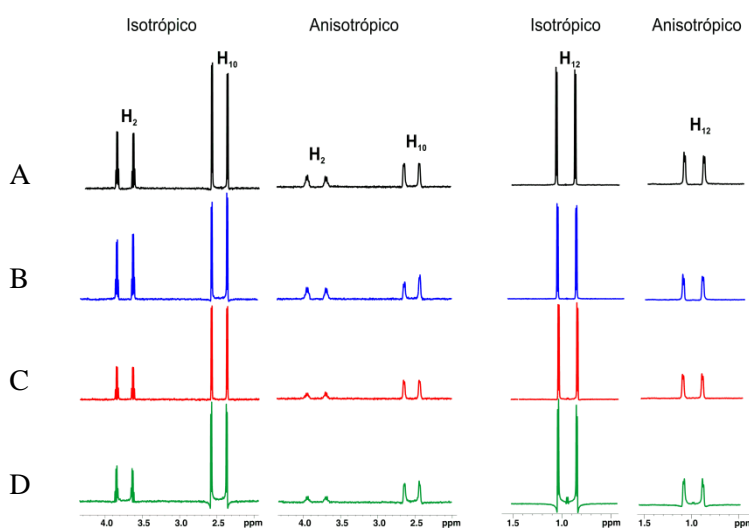


Figura 19. Cortes 1D extraídos de los espectros HSQC del (S)-ibuprofeno en medio isotrópico y anisotrópico. (A) PEP-HSQC-F2 ($\Delta_r=1/8 \ ^1J_{CH}$). (B) PEP-HSQC-F2 ($\Delta_r=1/4 \ ^1J_{CH}$). (C) CLIP-HSQC-F2. (D) HSQC-F2.

Al comparar los espectros obtenidos se observó que, igualdad de condiciones experimentales, las señales en medio anisotrópico eran mucho menos intensas que en medio isotrópico (Fig. 19). Esta menor intensidad se atribuye a la pérdida de señal debida a la relajación transversal.

Los experimentos realizados con secuencia básica HSQC-F2 presentaban problemas de fase en todas las señales, especialmente en los protones H₁₀ y H₁₂ tanto en medio isotrópico como anisotrópico (Fig. 19D). Estos problemas de fase son debidos a coherencias en antifase generadas durante el experimento cuando la duración de los periodos Δ del INEPT no coincide exactamente con la magnitud del acoplamiento $^1J_{CH}/T_{CH}$. Para eliminar estas distorsiones se hizo el experimento CLIP-HSQC-F2. En este caso se obtuvieron todas las señales perfectamente en fase mejorando la precisión de la medida de las constantes de acoplamiento (Fig. 19C).

Tabla 6. Aumento de señal observado en los experimentos PEP-HSQC-F2 respecto del CLIP-HSQC-F2.

	PEP-HSQC-F2 (medio isotrópico)		PEP-HSQC-F2 (medio anisotrópico)	
	$\Delta_r = 1/4 \ ^1J_{CH}$	$\Delta_r = 1/8 \ ^1J_{CH}$	$\Delta_r = 1/4 \ ^1J_{CH}$	$\Delta_r = 1/8 \ ^1J_{CH}$
CH	94%	73%	93%	80%
CH₂	7%	34%	9%	29%
CH₃	---	22%	---	19%

Finalmente se hicieron dos experimentos PEP-HSQC-F2 optimizados para diferentes sistemas de espines variando el *delay* del bloque RINEPT (Δ_r). En ambos casos se observó una menor distorsión de fase en las señales que en el caso del experimento HSQC-F2 pero sin llegar a eliminarse por completo como en el experimento CLIP-HSQC-F2. En los experimentos optimizados para un *delay* de $1/(4 \cdot ^1J_{CH})$ se observó un aumento de señal de aproximadamente el doble para los CH y prácticamente nulo para los CH₂ y CH₃. (Fig. 20B). Al utilizar un *delay* de $1/(8 \cdot ^1J_{CH})$ se observó un aumento de sensibilidad para todos los sistemas de espines (Fig. 20A). Los valores de aumento de sensibilidad en comparación con el experimento CLIP-HSQC-F2 obtenidos en cada uno de los casos se muestran en la Tabla 6.

Se realizaron las medidas de las constantes de acoplamiento heteronucleares a un enlace en cada uno de los experimentos (Tabla 7). Se observó que los valores de $^1J_{CH}/T_{CH}$ obtenidos de los experimentos CLIP-HSQC-F2 y PEP-HSQC-F2 eran más precisos que las del HSQC-F2 debido a los problemas de fases que presentaba este último experimento.

Tabla 7. Comparación de las constantes de acoplamiento $^1J_{CH}$ y $^1T_{CH}$ extraídas de los experimentos HSQC-F2, CLIP-HSQC-F2 y PEP-HSQC-F2 para la muestra de (S)-ibuprofeno en medio isotrópico y anisotrópico.

Enlace	Medio isotrópico			Medio anisotrópico		
	HSQC-F2 $^1J_{CH}$ (Hz)	CLIP-HSQC-F2 $^1J_{CH}$ (Hz)	PEP-HSQC-F2 $^1J_{CH}$ (Hz)	HSQC-F2 $^1T_{CH}$ (Hz)	CLIP-HSQC-F2 $^1T_{CH}$ (Hz)	PEP-HSQC-F2 $^1T_{CH}$ (Hz)
C2 H2	129,5	130,4	130,2	153,2	154,8	154,7
C3 H3	128,4	128,9	128,6	118,5	120,3	119,2
C5, C9 H5, H9	159,3	158,9	158,9	172,6	171,0	171,8
C6, C8 H6, H8	158,7	158,8	158,8	173,1	174,9	174,4
C10 H10	124,8	125,9	125,8	123,5	124,4	124
C11 H11	126,4	127,2	127,1	133,5	134,6	134,1
C12 H12	123,8	124,5	124,4	119,9	122,1	121,4

3.4. Experimentos 2D ^1H - ^{13}C -HSQC acoplados en la dimensión indirecta

Al trabajar en un medio anisotrópico los espectros HSQC-F2 presentan problemas de ensanchamiento de señales debido a la existencia de acoplamiento dipolares homonucleares y heteronucleares a larga distancia que dificultan la extracción precisa de los RDCs. Para minimizar este problema se han realizado los experimentos bidimensionales acoplados en la dimensión indirecta HSQC-F1 y BIRD-HSQC-F1, el cual también elimina los acoplamiento $^n\text{J}_{\text{CH}}$. Las secuencias de pulsos y los parámetros de adquisición utilizados se describen en la *Parte Experimental*. En estos experimentos las señales aparecen desdobladas por $^1\text{J}_{\text{XH}} (+^1\text{D}_{\text{XH}})$ en la dimensión del ^{13}C .

Se compararon los espectros obtenidos en medio isotrópico y anisotrópico observándose que, igualdad de condiciones experimentales, la intensidad de las señales era menor en medio anisotrópico (Fig. 20A). Al igual que en los experimentos HSQC-F2 esta pérdida de señal se atribuye a la disminución del tiempo de relajación transversal.

Las señales observadas en los experimentos HSQC-F1 y BIRD-HSQC-F1 son dupletes bien definidos, no presentan multiplicidad adicional como en los experimentos HSQC-F2, debido a que en este tipo de experimentos los acoplamiento homonucleares (escalares y dipolares) no evolucionan. En el experimento HSQC-F1 se observó que las señales espectrales eran más anchas que el experimento BIRD-HSQC-F1 (Fig. 20B). Esta disminución de la anchura espectral es debida a la eliminación de los acoplamiento $^n\text{J}_{\text{CH}}$.

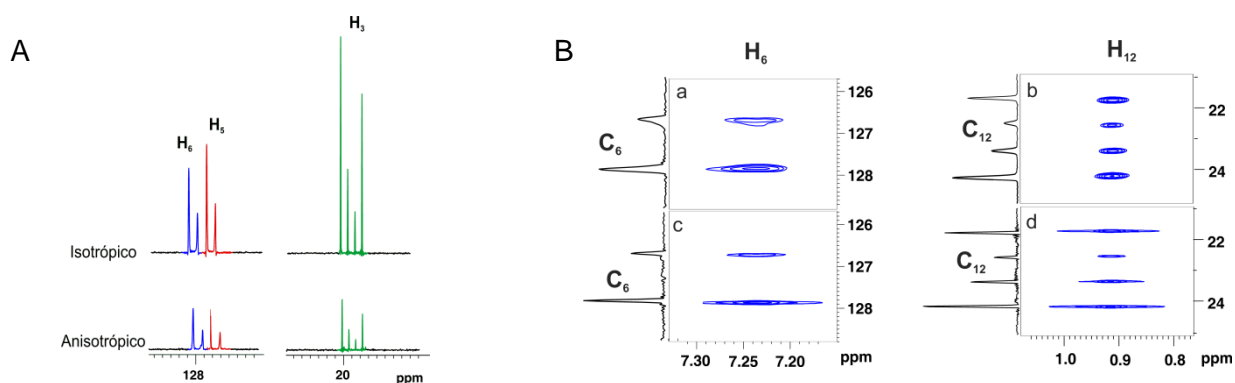


Figura 20. (A) Secciones 1D extraídas de los experimentos HSQC-F1 del (S)-ibuprofeno en medio isotrópico y anisotrópico. (B) Ampliación de las señales del H_6 y H_{12} del (S)-ibuprofeno en PMMA/ CDCl_3 del experimento HSQC-F1 (a,b) y BIRD-HSQC-F1 (c,d).

El inconveniente de los dos experimentos anteriores radica en la necesidad de adquirir un elevado número de puntos en la dimensión indirecta (F1) para alcanzar suficiente resolución digital en la medida de las constantes $^1\text{J}_{\text{XH}}/^1\text{T}_{\text{XH}}$ lo que implica un aumento muy importante en el tiempo necesario para realizar el experimento ($\approx 3\text{h } 50\text{min}$). El experimento BIRD-HSQC-F1- $\text{J}_{\text{escalado}}$ permite reducir el tiempo experimental al introducir una constante de escalado (K) que aumenta la magnitud del desdoblamiento ($\text{K} \cdot ^1\text{J}_{\text{XH}}$; $\text{K} \cdot ^1\text{T}_{\text{XH}}$) y esto hace que el número de puntos necesario para adquirir en la dimensión indirecta

disminuya significativamente. Se realizaron tres experimentos BIRD-HSQC-F1- J_{escalado} donde se modificaron sólo dos parámetros experimentales: la resolución en la dimensión indirecta (td_1) y la constante de escalado (K).

- a) $td = 1k$; $td_1 = 4k$; $K = 8$; $t = 4h\ 36min$. (Igual condiciones que HSQC-F1 y BIRD-HSQC-F1)
- b) $td = 1k$; $td_1 = 1k$; $K = 4$; $t = 57min$
- c) $td = 1k$; $td_1 = 1k$; $K = 8$; $t = 1h$

En el experimento **a** se observó una disminución de la intensidad de las señales respecto a los obtenidos en los experimentos HSQC-F1 y BIRD-HSQC-F1. Al introducir la constante de escalado la duración de la secuencia aumenta y esto hace que en el espectro obtenido las señales sean menos intensas debido al T_2 . Esta disminución de señal es mucho más importante cuando se trabaja en medio anisotrópico. En los experimentos **b** y **c** las señales eran más intensas y la resolución obtenida seguía siendo óptima debido al escalado. El valor de la constante de acoplamiento obtenida para cada señal es idéntica en los tres experimentos.

Las medidas realizadas de las constantes de acoplamiento heteronucleares a un enlace en cada uno de los diferentes experimentos HSQC-F1 se muestran en la siguiente Tabla 8:

Tabla 8. Comparación de las constantes $^1J_{CH}$ y $^1T_{CH}$ extraídas de los experimentos HSQC-F1, BIRD-HSQC-F1 y BIRD-HSQC-F1- J_{escalado} para la muestra de (S)-ibuprofeno en medio isotrópico y anisotrópico.

Enlace	Medio isotrópico			Medio anisotrópico		
	HSQC-F1 $^1J_{CH}$ (Hz)	BRID-HSQC-F1 $^1J_{CH}$ (Hz)	BRID-HSQC-F1- J_{esc} $^1J_{CH}$ (Hz)	HSQC-F1 $^1T_{CH}$ (Hz)	BRID-HSQC-F1 $^1T_{CH}$ (Hz)	BRID-HSQC-F1- J_{esc} $^1T_{CH}$ (Hz)
C2 H2	130,7	130,7	129,9	154,0	154,3	153,8
C3 H3	128,7	128,8	128,8	121,5	122,1	122,5
C5, C9 H5, H9	157,9	157,9	158,2	173,3	170,6	171,3
C6, C8 H6, H8	158,3	158,0	158,9	174,9	173,9	173,6
C10 H10	126,3	125,4	125,3	125,1	124,5	125,2
C11 H11	128,1	127,2	126,9	136,3	134,3	133,9
C12 H12	124,9	124,6	124,5	122,7	123,1	123,7

3.5. Obtención de la estructura molecular a partir de los RDCs

Para obtener la estructura molecular que mejor se ajusta a los RDCs obtenidos experimentalmente en primer lugar es necesario generar el modelo 3D. Para ello se utilizó el programa de modelización molecular MacroModel (<http://www.schrodinger.com/>) con el cual se hizo un estudio conformacional del

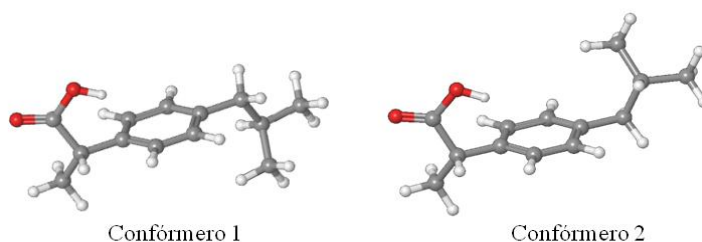


Figura 21. Estructura 3D de los conformeros más estables del (S)-ibuprofeno obtenidos en el MacroModel.

(S)-Ibuprofeno donde se obtuvieron de forma mayoritaria dos conformaciones de baja energía (Fig. 21). La principal diferencia entre ambas conformaciones es la disposición relativa del grupo carboxilo e isopropilo, siendo *transoide* en el **1** y *cisoide* en el **2**.

Los valores de $^1D_{CH}$ de la Tabla 3 correspondientes a los enlaces CH de los carbonos 2, 3, 5, 6, 10, 11 y 12 fueron ajustados por SVD a las estructuras **1** y **2** en MSpin (<http://www.mestrelabs.com>) usando la opción de promediar los grupos metilos y fenilos como rotores libres. Los valores obtenidos para las componentes del vector de alineamiento (A_{xx}, A_{yy}, A_{zz}) y de la componente axial (A_a) y rómbica (A_r) en cada uno de los confórmeros se muestran en el Anexo I. El factor Q informa sobre la calidad del ajuste de los datos experimentales introducidos y los datos teóricos calculados por el programa para una estructura dada, cuanto menor sea este valor mejor es el ajuste de los RDCs experimentales y teóricos. Los factores de calidad (Q) obtenidos para las estructuras **1** y **2** fueron de 0,222 y 0,116, respectivamente. La estructura **2** se adapta mejor a los datos experimentales ya que el factor Q de **1** es casi dos veces mayor que el factor Q de **2**. El mismo resultado se obtiene al hacer un ajuste lineal de los datos experimentales y calculados. Los valores de $^1D_{CH}$ obtenidos experimentalmente y calculados con el Mspin se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9. Valores de $^1D_{CH}$ del (S)-ibuprofeno en PMMA/ $CDCl_3$ calculados y experimentales para las dos conformaciones más estables obtenidas en el MacroModel.

Enlace		Confórmero 1		Confórmero 2	
		$^1D_{CH}$ exp. (Hz)	$^1D_{CH}$ cal. (Hz)	$^1D_{CH}$ exp. (Hz)	$^1D_{CH}$ cal. (Hz)
C2	H2	24,4	23,0	24,4	25,2
C3	H3	-5,8	-8,1	-5,8	-5,6
C5, C9	H5, H9	12,4	13,9	12,4	13,1
C6, C8	H6, H8	16,1	16,5	16,1	14,7
C10	H10	-1,5	3,1	-1,5	-0,4
C11	H11	7,4	2,5	7,4	5,5
C12	H12	-2,4	-2,6	-2,4	-0,4

En un primer análisis de los resultados se observa que los RDCs de los enlaces C-H de los carbonos 3, 11 y 12 tienen un valor negativo mientras que los enlaces 2, 5, 6, 8, 9 y 11 tienen un valor positivo. El signo de los RDCs está relacionado con la orientación del enlace C-H respecto al campo magnético aplicado. A primera vista se observó que los enlaces C-H que presentaban valores positivos de $^1D_{CH}$ estaban orientados perpendicularmente a B_0 (Fig. 22).

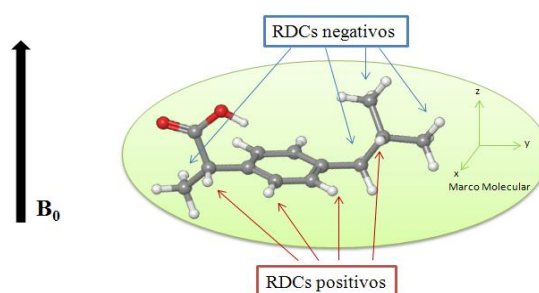


Figura 22. Representación de la orientación mayoritaria de las moléculas de (S)-ibuprofeno en las "cavidades" del gel comprimido.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1. Preparación de las muestras

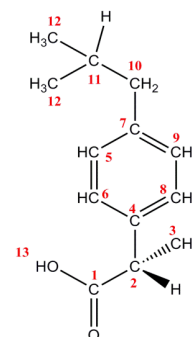
4.1.1. Preparación y caracterización del (S)-ibuprofeno en medio isotrópico

Para llevar a cabo los experimentos de RMN en medio isotrópico se preparó una muestra de 2.8mg de (S)-ibuprofeno en 1ml de CDCl_3 .

Caracterización por RMN:

^1H -RMN (600 MHz, CDCl_3): δ 7.27 (d, $J=8.1$, 2H, $\text{H}_{6,8}$), 7.13 (d, $J=8.1$, 2H, $\text{H}_{5,9}$), 3.74 (q, $J=7.1$, 1H, H_2), 2.48 (d, $J=7.1$, 2H, H_{10}), 1.87 (n, $J=6.8$, 1H, H_{11}), 1.53 (d, $J=7.1$, 3H, H_3), 0.93 (d, $J=6.8$, 3H, H_{12}).

^{13}C -RMN (600 MHz, CDCl_3): δ 181.1 (C_1), 141.3 (C_7), 137.4 (C_4), 129.8 ($\text{C}_{5,9}$), 127.7 ($\text{C}_{6,8}$), 45.5 (C_{10}), 45.3 (C_2), 30.6 (C_{11}), 22.8 (C_{12}), 18.52 (C_3).



(S)-Ibuprofeno

4.1.2. Síntesis de polimetilmetacrilato (PMMA)

El gel utilizado en este trabajo como medio orientador para llevar a cabo la medida de los RDCs fué polimetilmetacrilato (PMMA). La utilización de este gel es idónea para moléculas orgánicas pequeñas ya que es posible trabajar en disolventes orgánicos, sus propiedades de alineamiento son buenas y presenta poca señal de fondo en los experimentos HSQC y derivados. La síntesis del PMMA fue realizada por el grupo de investigación del Dr. Roberto Gil³³ (ver Anexo II).

4.1.3. Descripción del material utilizado: Tubo Shigemi

El hinchado y lavado del PMMA, así como la posterior introducción de la muestra de interés, se realizó directamente dentro del tubo que posteriormente se utilizó para hacer los experimentos de RMN. Se trata de un tubo especial, Shigemi (Fig. 23A), cuya susceptibilidad magnética está adaptada a un disolvente concreto, en este caso se trabaja con un Shigemi de CDCl_3 . El set completo de Shigemi

consta de dos piezas independientes: un tubo exterior de 5mm de diámetro y un embolo interior de 4.17mm de diámetro (Fig. 23B). La utilización de este sistema permite coger el lock de muestras con escaso volumen de disolvente, como es el caso de las muestras utilizadas para las medidas de RDCs. En la Fig. 23B se muestran los materiales necesarios para llevar

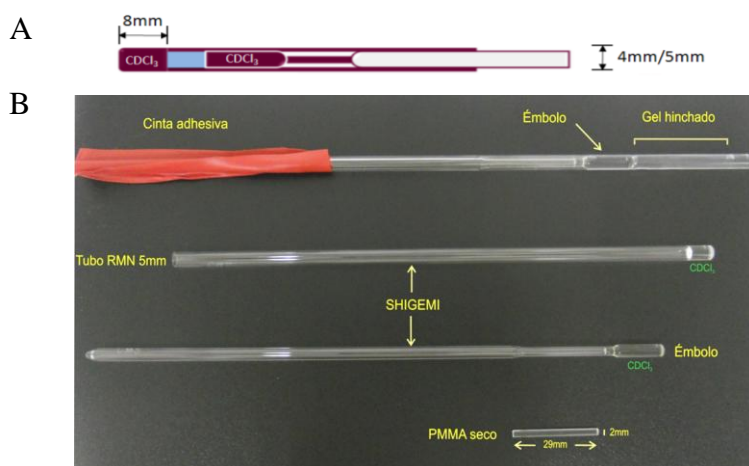


Figura 23. (A) Esquema del Shigemi. (B) Materiales utilizados en la experimentación.

a cabo los experimentos de medida de los RDCs: el cilindro seco de PMMA y el set de émbolo y tubo Shigemi. También se puede observar el montaje completo con el gel ya hinchado en el interior del tubo donde el émbolo es sujetado con cinta americana.

4.1.4. Preparación del medio anisotrópico

En primer lugar se introdujo el cilindro de polímero entre-cruzado seco en el fondo del tubo de RMN y se adicionó el disolvente (CDCl_3) hasta sobrepasar el cilindro unos 2mm. Seguidamente se insertó el émbolo del Shigemi y se colocó a ras del cilindro evitando así que el gel se hinchase verticalmente y solo lo hiciese de forma radial hasta cubrir todo el volumen del tubo. Es importante que un pequeño volumen de disolvente quede por encima del cuello del émbolo para evitar que el gel pueda llegar a secarse. Cuando el gel se hincha ejerce una presión sobre el émbolo, para evitar que éste se moviera hacia arriba se fijó su posición con ayuda de teflón y cinta americana, como se observa en la Fig. 23B.

El proceso de hinchado del PMMA duró unas 48h. Transcurrido este tiempo el gel se había hinchado completamente solo de forma radial generándose de este modo el medio anisotrópico necesario para llevar a cabo la medida de los acoplamientos dipolares residuales.

Una vez hinchado el polímero se realizó un experimento ^2H -RMN, estando el gel en el máximo estado de compresión, para verificar que se había generado un medio anisotrópico (ver Anexo II). Se observó un duplete ($\delta=7.4\text{ppm}$) correspondiente al acoplamiento cuadrupolar del ^2H del CDCl_3 presente en el gel ($\Delta\nu_Q=29.65\text{ Hz}$) y un singlete menos intensa ($\delta=7.3\text{ppm}$) corresponde al ^2H del CDCl_3 no ordenado ($\Delta\nu_Q=0\text{ Hz}$). Esto indica que la mayor parte del disolvente está ordenado debido a la existencia de un medio anisotrópico.

Una vez comprobado el ordenamiento del medio se procedió a realizar un experimento 1D de RMN de protón (^1H -RMN) para conocer el estado de pureza del PMMA (ver Anexo II). En él se observa la presencia de restos del MMA de partida utilizado en el proceso de polimerización. Para eliminar el monómero fue necesario realizar varios lavados del gel. El proceso de lavado consistió en comprimir y descomprimir el émbolo suavemente sucesivas veces. Esto hace que el disolvente entre y salga del gel arrastrando así los restos de monómero hacia el exterior del gel. Finalmente se comprimió el émbolo al máximo y se decantó el excedente de disolvente. Una vez eliminado el disolvente se sacó el émbolo y se adicionaron 200 μL de CDCl_3 nuevo. Una vez en este punto se volvió a repetir el proceso de compresión-descompresión y decantado. El paso de extracción e introducción del émbolo se hizo lo más rápido posible para evitar una excesiva exposición del gel al aire ya que podría secarse y quedaría inservible. Este proceso de lavado se realizó cinco veces hasta eliminar por completo los restos de MMA. Tras cada lavado se registró un espectro de ^1H -RMN para verificar que la cantidad de monómero presente en el gel cada vez era menor hasta su desaparición (ver Anexo II).

4.1.5. Preparación del (S)-ibuprofeno en medio anisotrópico

Una vez lavado el polímero se procedió a la introducción del (S)-Ibuprofeno en el medio de alineamiento. Se pesaron 2.8 mg de (S)-Ibuprofeno y se disolvieron en 200 μ L de CDCl₃. La disolución resultante se añadió al tubo de RMN que contiene el gel previamente lavado, se insertó el émbolo y se comprimió y descomprimió suavemente el polímero facilitando la difusión de las moléculas de soluto por las cavidades del gel donde serán parcialmente orientadas por la matriz del mismo.

Para comprobar que el ibuprofeno se había introducido en el gel se registró un espectro ¹H-RMN de la muestra (ver Anexo II).

4.2. Experimentos de Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

Todos los experimentos de RMN han sido registrados en el espectrómetro BRUKER 600 Avance II del Servei de Ressonància Magnètica Nuclear de la Universitat Autònoma de Barcelona. El equipo dispone de tres canales de radiofrecuencia (¹H, ¹³C, BB), una sonda triple inversa TXI de 5 mm y gradientes. Todos los datos han sido adquiridos y procesados con el paquete de software TOPSPIN v3.1.

4.2.1. Medidas del tiempo de relajación transversal, T₂.

Para medir el tiempo de relajación transversal debido sólo a las interacciones *spin-spin* es necesario eliminar la contribución de la inhomogeneidad del campo magnético aplicado. Esto se consigue con la secuencia *spin-eco* (Fig. 24A) donde tras la aplicación del pulso de 90°_x el vector magnetización evoluciona libremente en el plano transversal (xy) durante un tiempo conocido τ . Seguidamente se aplica un pulso de 180°_x y se deja evolucionar un periodo τ lo que hace que los vectores converjan en el eje $-y$ reorientando la dispersión de la magnetización en el plano xy provocada por las inhomogeneidades del campo magnético (Fig. 24B). La intensidad de la magnetización reenfocada es menor que la M_y inicial y dado que el efecto de la inhomogeneidad del campo ha sido eliminado, ésta pérdida de magnetización se debe únicamente a la relajación *spin-spin* caracterizada por T₂.

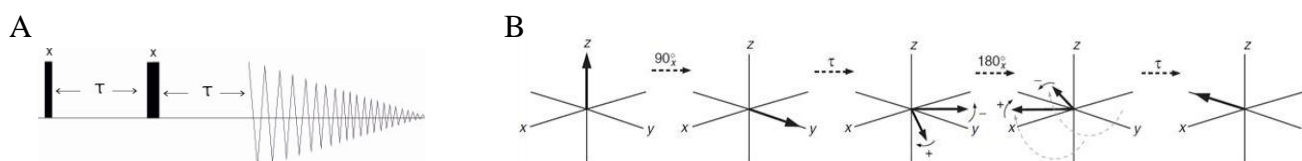


Figura 24. (A) Secuencia *spin-eco*. (B) Evolución de la magnetización a lo largo de la secuencia *spin-eco*.

Sobre esta secuencia original se han realizado distintas modificaciones para minimizar efectos secundarios que afectaban a la determinación de T_2 . La secuencia utilizada actualmente conlleva la

aplicación de múltiples *spin-eco* dentro de un mismo experimento donde el decaimiento de la intensidad con el tiempo es constante, es T_2 . Esta secuencia se denomina secuencia de Carr-Purcell-Meiboom-Gill y es conocida como bloque CPMG^{34,35} (Fig. 25).

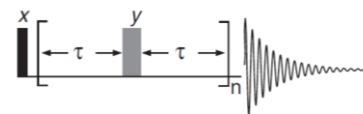


Figura 25. Secuencia CPMG.

Para extraer el valor de T_2 es necesario realizar una serie de experimentos donde se incremente el tiempo de evolución entre los pulsos, $2\tau n$. Cuanto mayor es el valor de n , mayores son los tiempos de evolución y por lo tanto más señal se pierde, hasta llegar a anularse. El tiempo de relajación transversal es un tiempo característico de cada núcleo y la magnitud de T_2 se ha de extraer de manera individual de cada una de las señales en el espectro.

Se han realizado los experimentos ^1H -CPMG de la muestra en medio isotrópico y anisotrópico utilizando dos secuencias: *cpmg1d* y *cpmg1d modificada* (ver Anexo II).

La secuencia *cpmg1d* presenta una ligera modificación respecto a la secuencia original donde se introduce un eco antes y otro después a los ecos del *loop* para corregir el tiempo $\Delta 2$ entre el último pulso de 180° y la adquisición, consiguiendo así que la secuencia sea totalmente simétrica. Se realizaron 10 experimentos incrementando en cada uno de ellos el número de ecos de espín n (*loop l4*). Los valores de n (*l4*) utilizados fueron: 2, 20, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 750 y 1000; y el tiempo entre el primer pulso de 90° y el comienzo de la adquisición en cada uno de los casos fue de 0.012, 0.066, 0.157, 0.308, 0.609, 0.911, 1.212, 1.514, 2.268 y 3.022 s.

La secuencia *cpmg1d modificada* ha sido propuesta recientemente Morris y colaboradores³³ para eliminar el efecto del acoplamiento escalar introduciendo un pulso de 90°_y en el medio de un doble eco. Se realizaron 10 experimentos incrementando en cada uno de ellos el número de ecos de espín (*loop l4*). Para reproducir el experimento en las mismas condiciones (igual tiempo de evolución de las magnetizaciones en el plano xy) se utilizaron la mitad de *loops* ya que en este cada *loop* implica hacer dos ecos de espín. Los valores de n (*l4/2*) utilizados fueron: 1, 10, 25, 50, 100, 150, 200, 250, 375 y 500; y el tiempo entre el primer pulso de 90° y el comienzo de la adquisición en cada uno de los casos fue de 0.012, 0.066, 0.157, 0.308, 0.610, 0.912, 1.214, 1.516, 2.270 y 3.025 s.

4.2.2. Medidas de $^1J_{\text{CH}} / ^1T_{\text{CH}}$ en medio isotrópico/anisotrópico

4.2.2.1. Experimentos HSQC acoplado en la dimensión directa

Se realizaron tres experimentos 2D HSQC acoplados en F2 diferentes para medir las constantes de acoplamiento en medio isotrópico y anisotrópico: HSQC-F2, CLIP-HSQC-F2 y PEP-HSQC-F2. Las

secuencias de pulsos de estos experimentos así como los parámetros experimentales utilizados más importantes de las mismas se muestran en el Anexo II.

Al trabajar en un espectrómetro de 600MHz todos los pulsos de 180° de ^{13}C utilizados (p14 y p24) son pulsos adiabáticos. Los parámetros de adquisición utilizados en todos los casos fueron: ns=4; sw (F2, F1)= 8, 200 ppm; td= 4k; td1=128.

El experimento HSQC-PEP-F2 se puede optimizar variando el *delay* del bloque PEP (d24) para obtener un aumento de intensidad sólo de los CH ($d24 = 1/(4 \cdot J_{\text{CH}})$) o para obtener un aumento de intensidad en todos los sistemas de espines CH, CH_2 y CH_3 ($d24 = 1/(8 \cdot J_{\text{CH}})$). Se realizaron los dos experimentos HSQC-PEP-F2 descritos anteriormente para ver cuál de ellos era más conveniente para la medida de los RDCs.

4.2.2.2. Experimentos HSQC acoplado en la dimensión indirecta

Se realizaron tres experimentos 2D HSQC acoplados en F1 diferentes para medir las constantes de acoplamiento en medio isotrópico y anisotrópico: HSQC-F1, BIRD-HSQC-F1 y BIRD-HSQC-F1- J_{escalado} . Las secuencias de pulsos de estos experimentos así como los parámetros experimentales utilizados más importantes de las mismas se muestran en el Anexo II.

Al trabajar en un espectrómetro de 600MHz todos los pulsos de 180° de ^{13}C utilizados (p14, p24 y p39) son pulsos adiabáticos. Los parámetros de adquisición utilizados en los experimentos HSQC-F1 y BIRD-HSQC-F1 fueron: ns=2; sw (F2, F1)= 8, 150 ppm; td= 1k; td1=4k. La duración de estos experimentos fue de 3h 50 min de modo que se realizaron tres experimentos BIRD-HSQC-F1- J_{escalado} adicionales para estudiar el ahorro de tiempo experimental y la influencia del escalado en la pérdida de señal. Los parámetros de adquisición utilizados fueron:

- ns=2; sw (F2, F1)= 8, 150 ppm; td= 1k; td1=4k; K=8, t=4h 36min
- ns=2; sw (F2, F1)= 8, 150 ppm; td= 1k; td1=1k; K=4; t= 57min
- ns=2; sw (F2, F1)= 8, 150 ppm; td= 1k; td1=1k; K=8; t= 1h

5. CONCLUSIONES

Las conclusiones más importantes obtenidas a lo largo de la realización del presente trabajo de investigación son:

- Es posible preparar un medio anisotrópico de tipo gel comprimido de PMMA/ CDCl_3 para estudiar los RDCs de moléculas orgánicas. La metodología utilizada para la preparación del medio orientador e introducción de la muestra es limpia, rápida y sencilla. El gel puede ser reutilizado tras un proceso de lavado para eliminar la molécula estudiada.
- Cuando se trabaja en medio anisotrópico los tiempos de relajación transversal (T_2) son mayores que en medio isotrópico, de modo que la intensidad de las señales disminuye más rápidamente con el tiempo. Es muy importante tener esto en cuenta a la hora de diseñar y aplicar las secuencias de pulsos ya que si el tiempo total de la secuencia es superior al T_2 de un determinado núcleo toda su información se puede perder por relajación antes de la adquisición.
- Se pueden medir las constantes de acoplamiento heteronucleares a un enlace $^1J_{\text{CH}}/^1T_{\text{CH}}$ en medio isotrópico y anisotrópico mediante la utilización de distintos experimentos bidimensionales de RMN todos ellos derivados del experimento HSQC.
- A la hora obtener las constantes de acoplamiento en medio anisotrópico ($^1T_{\text{CH}}$) los experimentos HSQC acoplados en F2 presentan una mayor sensibilidad ya que las secuencias de pulsos son más cortas y hay menos pérdida de señal por T_2 . Sin embargo, en términos de precisión es mejor utilizar los experimentos HSQC acoplados en F1 ya que presentan líneas más simples y estrechan que reducen el error en la medida de $^1T_{\text{CH}}$.
- Se han modificado distintas secuencias de pulsos de RMN para obtener tanto los tiempos de relajación como las constantes de acoplamiento utilizando las últimas secuencias publicadas que mejoran dichas medidas.
- Se han utilizado los valores experimentales de los RDCs del (S)-Ibuprofeno para determinar cuál de los dos conformeros de menor energía obtenidos por modelización molecular se ajusta mejor a los resultados experimentales.
- Se han descrito las bases para poder aplicar este método a cualquier compuesto orgánico soluble en cloroformo.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. A. Saupe, G. Englert. "High-Resolution Nuclear Magnetic Resonance Spectra of Orientated Molecules", *Phys. Rev. Lett.* **1963**, 11, 462-464.
2. N. Tjandra, A. Bax. "Direct measurement of distances and angles in biomolecules by NMR in a dilute liquid crystalline medium", *Science*. **1997**, 278, 1111–1114.
3. C.M. Thiele, S. Berger. "Probing the diastereotopicity of methylene protons in strychnine using residual dipolar couplings", *Org. Lett.* **2003**, 5, 705–708.
4. J.R. Tolman, M. Al-Hashimi, L.E. Kay, J.H. Prestegard. "Structural and Dynamic Analysis of Residual Dipolar Coupling Data for Proteins", *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 1416-1424.
5. J.R. Tolman, K. Ruan. "NMR Residual Dipolar Couplings as Probes of Biomolecular Dynamics", *Chem. Rev.* **2006**, 106, 1720-1736.
6. M. Sarfarti, P. Lesot, D. Merlet, J. Courtieu. "Theoretical and experimental aspects of enantiomeric discrimination using natural abundance multinuclear spectroscopy in chiral polypeptide liquid crystals", *Chem. Commun.* **2000**, 2069–2081.
7. V. M. Marathias, G. J. Tawa, I. Goljer, A. C. Bach. "Stereochemical identification of (*R*)- and (*S*)-ibuprofen using residual dipolar couplings, NMR, and modeling", *Chirality*. **2007**, 19, 741–750.
8. C. M. Thiele. "Residual Dipolar Couplings (RDCs) in Organic Structure Determination", *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 5673–5685.
9. F. Kramer, M.V. Deshmukh, H. Kessler, S.J. Glaser. "Residual Dipolar Coupling Constants: An Elementary Derivation of Key Equations", *Concepts in Nucl. Magn. Reson.* **2004**, 21A, 10-21.
10. V.A. Higman, J. Boyd, L.J. Smith, C. Redfield. "Residual dipolar couplings: are multiple independent alignments always possible?", *J. Biomol. NMR.* **2011**, 49, 53-60.
11. J.A. Losonczi, M. Andrec, M.W.F. Fischer, J.H. Prestegard. "Order Matrix Analysis of Residual Dipolar Couplings Using Singular Value Decomposition", *J. Magn. Reson.* **1999**, 138, 334-342.
12. C.M. Thiele. "Use of RDCs in Rigid Organic Compounds and Some Practical Considerations Concerning Alignment Media", *Concepts in Magn. Reson part A.* **2007**, 30A, 65–80.
13. B. Deloche, E.T. Samulski. "Short-range nematic-like orientational order in strained elastomers: a deuterium magnetic resonance study", *Macromolecules.* **1981**, 14, 575-581.
14. G. Kummerlöwe, B. Luy. "Residual dipolar couplings as a tool in determining the structure of organic molecules", *Trends in Analytical Chem.* **2009**, 28, 483-493.
15. M. Rückert, G. Otting. "Alignment of Biological Macromolecules in Novel Nonionic Liquid Crystalline Media for NMR Experiments", *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 7793-7797.
16. A. Meddour, I. Canet, A. Loewenstein, J.M. Pechine, J. Courtieu. "Observation of Enantiomers, Chiral by Virtue of Isotopic Substitution, through Deuterium NMR in a Polypeptide Liquid Crystal", *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 9652-9656.
17. C.M. Thiele. "Simultaneous Assignment of All Diastereotopic Protons in Strychnine Using RDCs: PELG as Alignment Medium for Organic Molecules", *J. Org. Chem.* **2004**, 69, 7403-7413.
18. K. Kobzar, H. Kessler, B. Luy. "Stretched Gelatin Gels as Chiral Alignment Media for the Discrimination of Enantiomers by NMR Spectroscopy", *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2005**, 44, 3145-3147.

19. R. Tycko, F.J. Blanco, Y. Ishii. "Alignment of Biopolymers in Strained Gels: A New Way To Create Detectable Dipole–Dipole Couplings in High-Resolution Biomolecular NMR", *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 9340-9341.
20. R. Gil, C. Gayathri, N. Tsarevsky, K. Matyjaszewski. "Stretched Poly(methylmethacrylate) Gel Aligns Small Organic Molecules in Chloroform. Stereochemical Analysis and Diastereotopic Proton NMR Assignment in Ludartin Using Residual Dipolar Couplings and 3J Coupling Constant Analysis", *J. Org. Chem.* **2008**, 73, 840-848.
21. B. Luy, K. Kobzar, S. Knör, J. Furrer, D. Heckmann, H. Kessler. "Orientational properties of stretched poly(styrene) gels in various organic solvents and the suppression of its residual 1H -NMR signals", *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 6459-6465.
22. G. Bodenhauser, D.J. Ruben. "Natural abundance nitrogen-15 NMR by enhanced heteronuclear spectroscopy", *Chem. Phys. Lett.* **1980**, 69, 185-189.
23. W. Wilker, D. Leibfritz, R. Kerssebaum, W. Bermel, "Gradient selection in inverse heteronuclear correlation spectroscopy", *Magn. Reson. Chem.* **1993**, 31, 287-292.
24. A. G. Palmer III, J.Cavanagh, P.E. Wright, M. Rance. "Sensitivity improvement in proton-detected two-dimensional heteronuclear correlation NMR spectroscopy", *J. Magn. Reson.* **1969**, 93, 151-170.
25. T. Parella, M. Gairí. "Simultaneous Recording of Spin-State-Selective NMR Spectra for Different I_nS Spin Systems", *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 9821-9826.
26. A. Enthart, J. C. Freudenberger, J. Furrer, H. Kessler, B. Luy. "The CLIP/CLAP-HSQC: Pure absorptive spectra for the measurement of one-bond couplings", *J. Magn. Reson.* **2008**, 192, 314–322.
27. N. Tjandra, S. Grzesiek, A. Bax. "Magnetic field dependence of nitrogen-proton J splittings in N-15-enriched human ubiquitin resulting from relaxation interference and residual dipolar coupling", *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 6264–6272.
28. K. Feher, S. Berger, K.E. Kover. "Accurate determination of small one-bond heteronuclear residual dipolar couplings by F1 coupled HSQC modified with a G-BIRD(r) module", *J. Magn. Reson.* **2003**, 163, 340–346.
29. J.R. Tolman, J.H. Prestegard. "A Quantitative J -Correlation Experiment for the Accurate. Measurement of amide ^{15}N – 1H one-bond couplings in proteins using accordion heteronuclear-shift-correlation experiments", *J. Magn. Reson.* **1996**, B112, 269–274.
30. Kummerlowe, F. Halbach, B. Laufer, B. Luy. "Precise Measurement of RDCs in Water and DMSO Based Gels Using a Silicone Rubber Tube for Tunable Stretching", *The Open Spectroscopy Journal*, **2008**, 2, 29–33.
31. T. Claridge. "High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry", Elsevier Science Ltd. England, **1999**.
32. J. A. Aguilar, M. Nilsson, G. Bodenhausen, G. A. Morris. "Spin echo NMR spectra without J modulation", *Chem. Commun.* **2012**, 48, 811–81.
33. C. Gayathri, N. V. Tsarevsky, R. Gil. "Residual Dipolar Couplings (RDCs) Analysis of Small Molecules Made Easy: Fast and Tuneable Alignment by Reversible Compression/Relaxation of Reusable PMMA Gels", *Chem. Eur. J.* **2010**, 16, 3622–3626.
34. H. Y. Carr, E. M. Purcell. "Effects of diffusion on free precession in nuclear magnetic resonance experiments" *Phys. Rev.* **1954**, 94, 630–638.
35. S. Meiboom, D. Gill. "Modified spin-echo method for measuring nuclear relaxation times", *Rev. Sci. Instrum.*, **1958**, 29, 688–691.

ANEXO I. Resultados y Discusión

Medidas del tiempo de relajación transversal, T_2

En la Tabla 10 se muestran los valores de las integrales extraídas de los experimentos ^1H -CPMG para el (S)-ibuprofeno en medio isotrópico.

Tabla 10. Integral de las señales del (S)-ibuprofeno en CDCl_3 para cada uno de los experimentos ^1H -CPMG.

n° loops	Tiempo [s]	H_2	H_3	$\text{H}_{5,9}$	$\text{H}_{6,8}$	H_{10}	H_{11}	H_{12}
2	0,012	0,970	2,952	2,032	2,098	2,000	0,983	5,917
20	0,066	0,905	2,636	1,992	2,051	1,901	0,954	5,434
50	0,157	0,850	2,400	1,897	1,987	1,760	0,876	5,073
100	0,308	0,768	2,060	1,779	1,877	1,560	0,799	4,465
200	0,610	0,621	1,535	1,591	1,694	1,226	0,662	3,438
300	0,912	0,510	1,169	1,423	1,544	0,961	0,548	2,639
400	1,214	0,419	0,909	1,280	1,403	0,752	0,454	2,012
500	1,516	0,349	0,721	1,154	1,275	0,581	0,376	1,512
750	2,270	0,229	0,445	0,887	1,022	0,298	0,236	0,703
1000	3,025	0,163	0,325	0,695	0,837	0,138	0,152	0,259

En la Tabla 11 se muestran los valores de las integrales extraídas de los experimentos ^1H -CPMG para el (S)-ibuprofeno en medio anisotrópico. No se pudo integrar la señal del H_{11} ya que estaba solapada con una señal muy intensa del PMMA y su integración podía conducir a errores en la determinación de su T_2 .

Tabla 11. Integral de las señales del (S)-ibuprofeno en PMMA/ CDCl_3 para cada uno de los experimentos ^1H -CPMG.

N° loops	Tiempo [s]	H_2	H_3	$\text{H}_{5,9}$	$\text{H}_{6,8}$	H_{10}	H_{12}
2	0,012	1,282	2,973	1,866	2,018	2,000	6,111
20	0,066	0,829	2,242	1,812	1,879	1,713	4,642
50	0,157	0,669	1,797	1,583	1,716	1,508	4,091
100	0,308	0,499	1,313	1,360	1,421	1,186	3,322
200	0,610	0,324	0,745	0,966	1,013	0,761	2,200
300	0,912	0,220	0,454	0,712	0,746	0,499	1,463
400	1,214	0,158	0,296	0,531	0,565	0,338	0,982
500	1,516	0,113	0,202	0,398	0,436	0,225	0,647
750	2,270	0,063	0,103	0,226	0,255	0,102	0,224
1000	3,025	0,048	0,062	0,163	0,176	0,061	0,043

En la Figura 26 se muestran las representaciones gráficas de los valores de las integrales frente al tiempo extraídas de los experimentos ^1H -CPMG para cada una de las señales del (S)-ibuprofeno en medio isotrópico y anisotrópico. Se observa que en todas las señales la caída exponencial es mayor en medio anisotrópico.

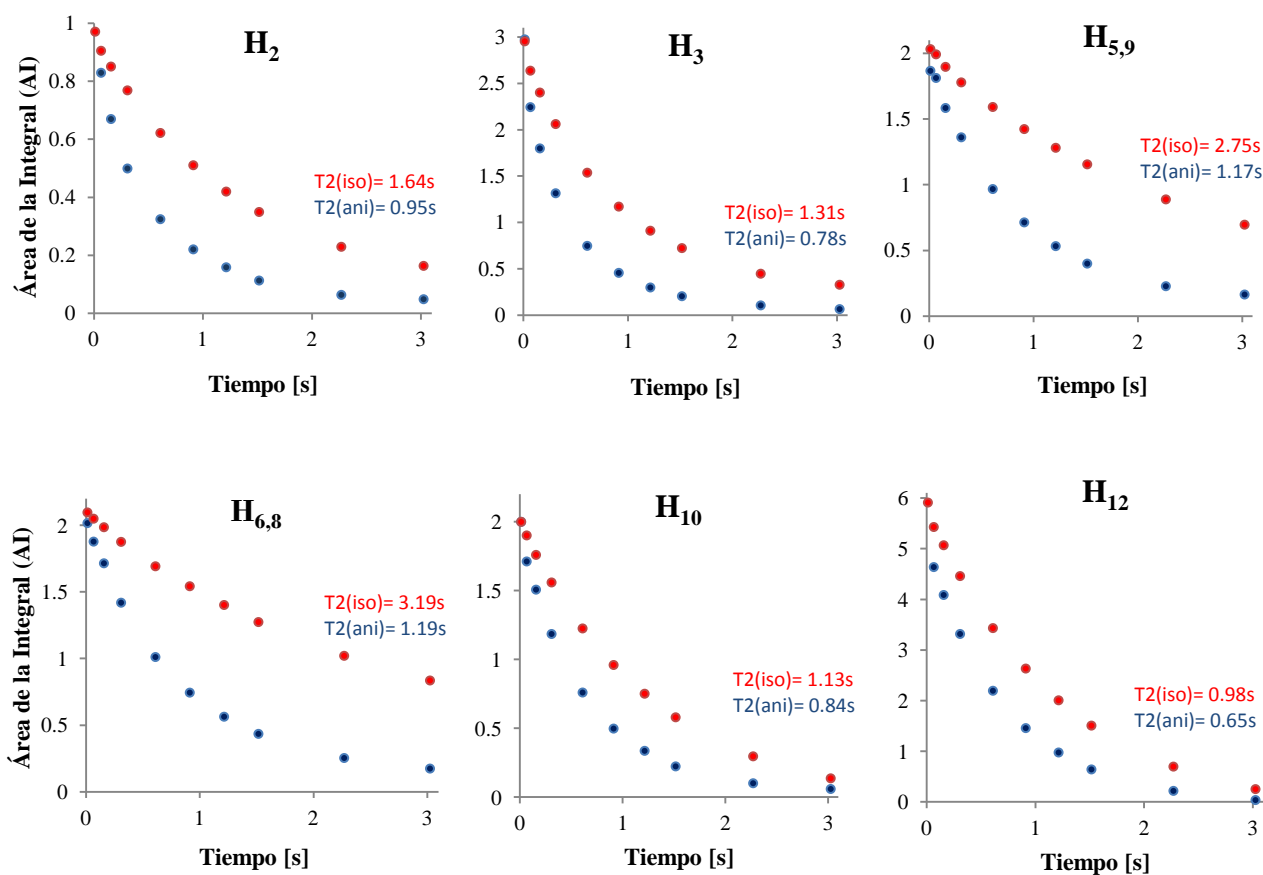


Figura 26. Representación del decaimiento exponencial de la señal con el tiempo para cada uno de los núcleos.

Obtención de la estructura molecular a partir de los RDCs

Los valores obtenidos para las componentes del vector de alineamiento (A_{xx}, A_{yy}, A_{zz}) y de la componente axial (A_a) y rómbica (A_r) para cada uno de los confórmers se obtuvieron con el programa MSpin (<http://www.mestrelabs.com>).

Confórmero 1 (*transoide*)

Q=0.222

Alignment vector

Axx=-2.48594e-05

Ayy=-0.00283011

Azz=0.00285497

(0.375875,-0.817148,0.43702,)

(0.916984,0.395996,-0.0482444,)

(-0.133636,0.418875,0.898157,)

SVD condition number is 95.4233

Axial component $A_a=0.00428246$

rhombic component $A_r=0.00280525$

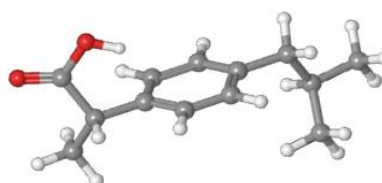
rhombicity $R=0.655057$

Asimmetry parameter $\text{etha}=0.982585$

GDO=0.00602136

Euler Angles

Set 1

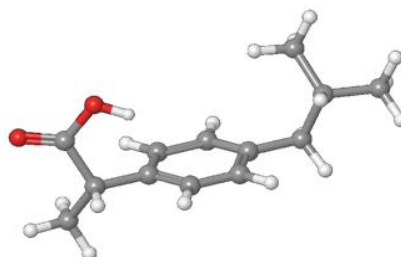


Confórmero 1

(25.003,7.67973,67.7111)
 Set 2
 (-154.997,172.32,-112.289)

Confórmero 2 (cisoide)

Q=0.116
 Alignment vector
 Axx=-0.000247891
 Ayy=-0.00169517
 Azz=0.00194306
 (-0.0109105,0.964418,-0.264157,)
 (-0.236088,0.25422,0.937889,)
 (0.971671,0.0725971,0.224914,)
 SVD condition number is 44.5122
 Axial component Aa=0.00291459
 rhombic component Ar=0.00144728
 rhombicity R=0.496563
 Asimmetry parameter etha=0.744845
 GDO=0.00380373
 Euler Angles
 Set 1
 (17.8889,-76.3294,-92.646)
 Set 2
 (-162.111,256.329,87.354)



Confórmero 2

Tabla 12. Valores de $^1D_{CH}$ del (S)-ibuprofeno en PMMA/CDCI₃ calculados y experimentales para las dos conformaciones más estables obtenidas en el MacroModel.

Enlace	Confórmero 1		Confórmero 2	
	$^1D_{CH}$ exp. (Hz)	$^1D_{CH}$ cal. (Hz)	$^1D_{CH}$ exp. (Hz)	$^1D_{CH}$ cal. (Hz)
C2 H2	24,4	23,0	24,4	25,2
C3 H3	-5,8	-8,1	-5,8	-5,6
C5, C9 H5, H9	12,4	13,9	12,4	13,1
C6, C8 H6, H8	16,1	16,5	16,1	14,7
C10 H10	-1,5	3,1	-1,5	-0,4
C11 H11	7,4	2,5	7,4	5,5
C12 H12	-2,4	-2,6	-2,4	-0,4

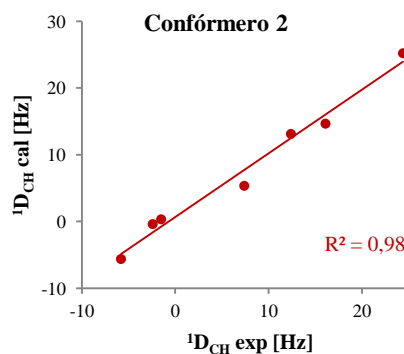
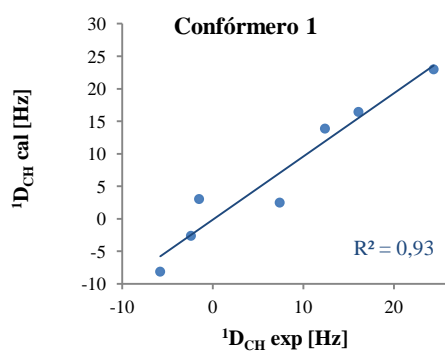
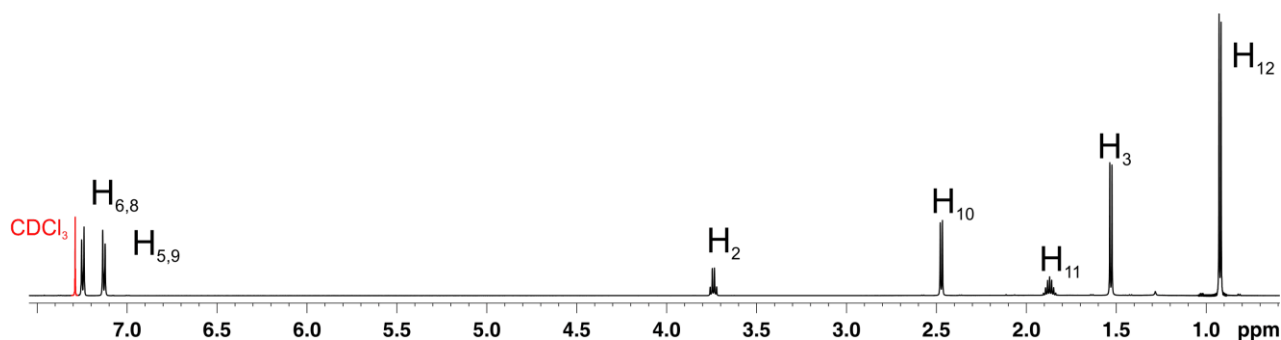


Figura 27. Representación y ajuste lineal de los datos mostrados en la tabla.

ANEXO II. Resultados y discusión

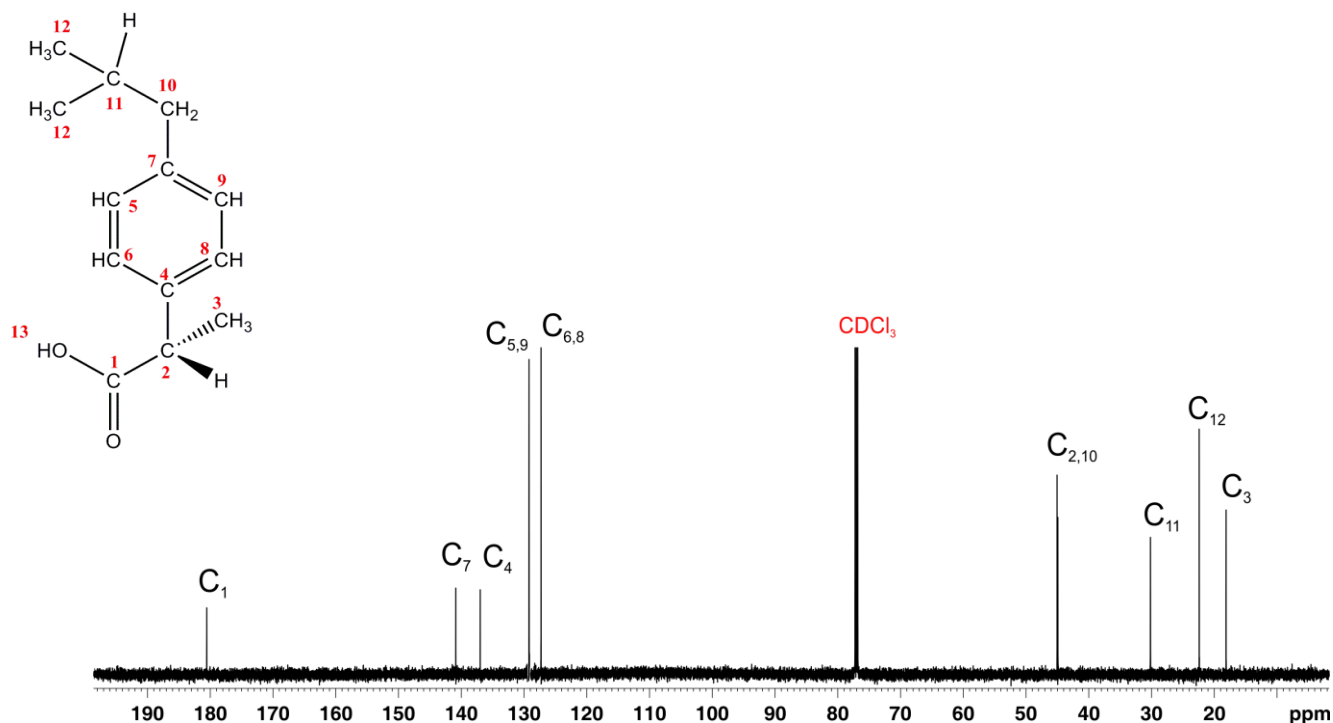
Preparación de las muestras

- Caracterización por RMN del (S)-Ibuprofeno**



$^1\text{H-RMN}$ (600 MHz, CDCl_3): δ 7.27 (d, $J=8.1$, 2H, $\text{H}_{6,8}$), 7.13 (d, $J=8.1$, 2H, $\text{H}_{5,9}$), 3.74 (q, $J=7.1$, 1H, H_2), 2.48 (d, $J=7.1$, 2H, H_{10}), 1.87 (n, $J=6.8$, 1H, H_{11}), 1.53 (d, $J=7.1$, 3H, H_3), 0.93 (d, $J=6.8$, 3H, H_{12}).

Espectro 1. Espectro $^1\text{H-RMN}$ del (S)-ibuprofeno en CDCl_3 a 298 K y a 600 MHz.

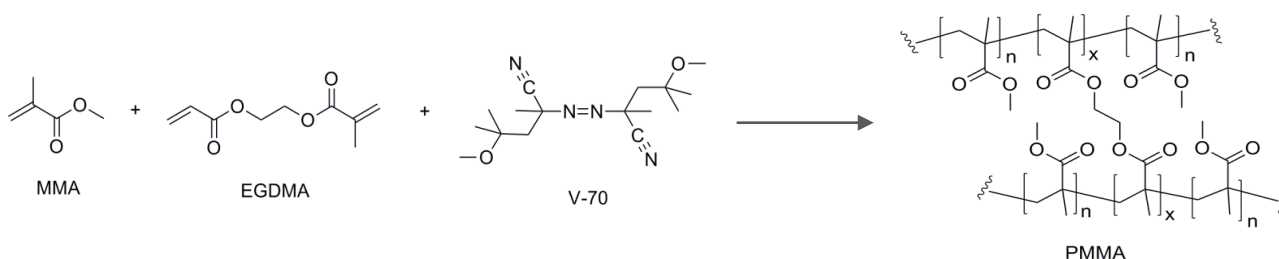


$^{13}\text{C-RMN}$ (600 MHz, CDCl_3): δ 181.1 (C_1), 141.3 (C_7), 137.4 (C_4), 129.8 ($\text{C}_{5,9}$), 127.7 ($\text{C}_{6,8}$), 45.5 (C_{10}), 45.3 (C_2), 30.6 (C_{11}), 22.8 (C_{12}), 18.52 (C_3).

Espectro 2. Espectro $^{13}\text{C-RMN}$ del (S)-ibuprofeno en CDCl_3 a 298 K y a 600 MHz.

• **Síntesis de polimetilmetacrilato (PMMA)** ³⁴

La síntesis del PMMA fue realizada por el grupo de investigación del Dr. Roberto Gil (Pittsburg, USA). El PMMA es un gel reticulado químicamente cuya síntesis consiste en la polimerización del metilmetacrilato (MMA) iniciada por radicales libres (iniciador V-70) y utilizando etilenglicoldimetilacrilato (EGDMA, $x=0.01-0.5\text{mol}\%$) como agente entrecruzante. El proceso de polimerización se llevó a cabo dentro de un tubo de resonancia de 3mm de diámetro permitiendo así la obtención de cilindros de polímero de 2 mm de diámetro. El gel se dejó secar a temperatura ambiente. Uno de los inconvenientes del método de polimerización utilizado es que en el polímero final (PMMA) quedan restos del monómero de partida (MMA). Antes de comenzar a trabajar con el gel es necesario hincharlo con el disolvente deseado y eliminar los restos de monómero.



• **Preparación del medio anisotrópico**

Espectro ²H-RMN del PMMA/CDCl₃ estando el gel en el máximo estado de compresión. Realizado para verificar que se había generado un medio anisotrópico. Las dos señales más intensas corresponden al acoplamiento cuadrupolar del ²H del CDCl₃ presente en el gel ($\Delta\nu_Q=29.65\text{ Hz}$). La señal singlete menos intensa corresponde al ²H del CDCl₃ no ordenado ($\Delta\nu_Q=0\text{ Hz}$).

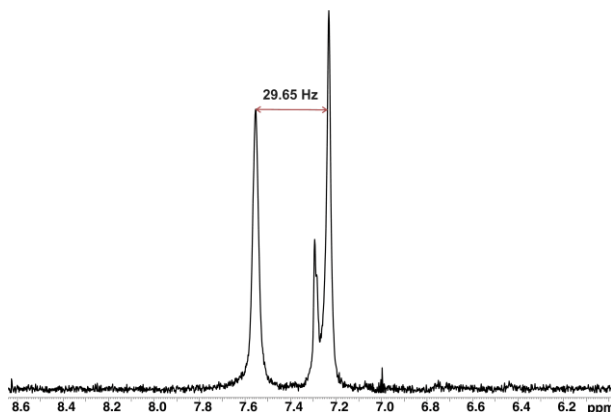


Figura 28. Espectro ²H-RMN que muestra el desdoblamiento cuadrupolar del disolvente, CDCl₃, en el medio de alineamiento PMMA/CDCl₃.

Espectro ^1H -RMN realizado para conocer el estado de pureza del gel de PMMA/ CDCl_3 . Se observa la presencia de restos del MMA de partida (marcados con asterisco).

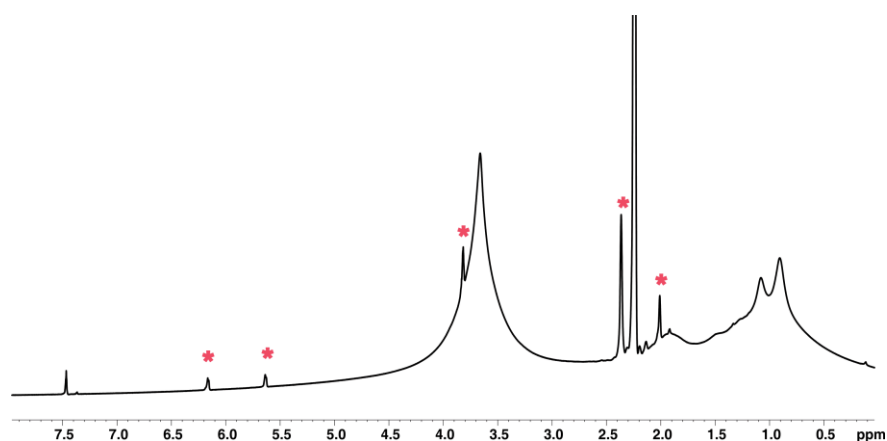


Figura 29. Espectro ^1H -RMN del PMMA/ CDCl_3 . Restos de MMA*

Para eliminar los restos de MMA del gel de PMMA/ CDCl_3 se llevó a cabo un proceso de lavado. Fue necesario realizar cinco lavados para eliminar por completo los restos de MMA. Tras cada lavado se registró un espectro de ^1H -RMN para verificar que la cantidad de monómero presente en el gel cada vez era menor hasta su desaparición (Fig. 30).

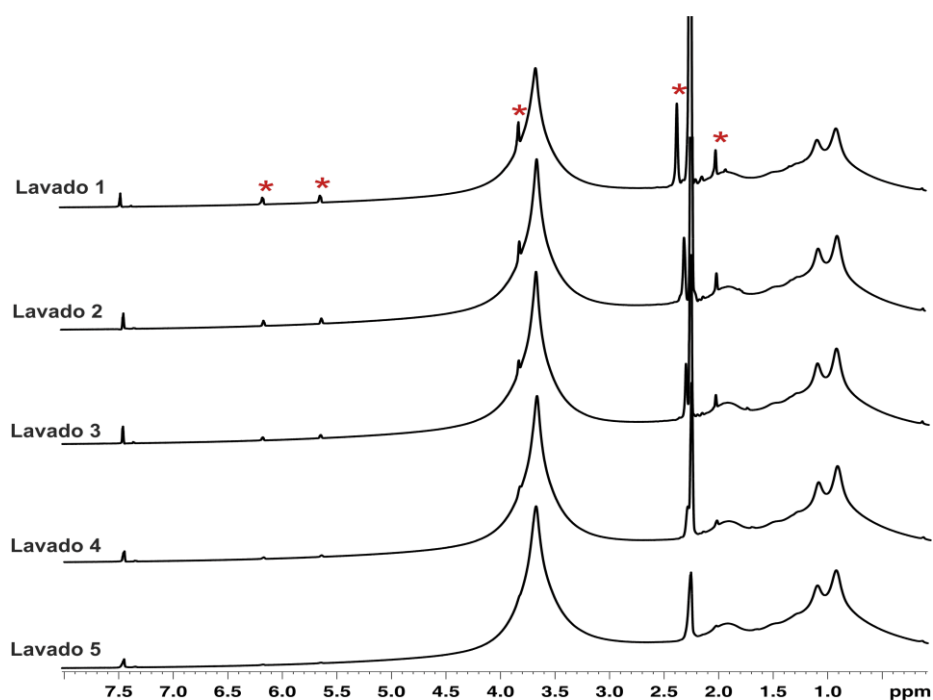


Figura 30. Espectro ^1H -RMN de cada lavado del gel de PMMA/ CDCl_3 . Restos de MMA*

• **Preparación del (S)-ibuprofeno en medio anisotrópico**

Para comprobar que el ibuprofeno se había introducido en el gel se registró un espectro ^1H -RMN (Fig. 31B). En él se observa que el ibuprofeno se ha introducido en el gel y que algunas de las señales del mismo (H_2 y H_{11}) aparecen bajo las del PMMA (Fig. 31A). Las señales del (S)-ibuprofeno en medio anisotrópico presentan un mayor ensanchamiento que en medio isotrópico (Fig. 30C). Esto es debido a que en el medio anisotrópico las interacciones espectroscópicas dependientes de la orientación, como los acoplamiento dipolares, no se anulan. La existencia de estos acoplamiento dipolares, tanto homonucleares como heteronucleares, aparecen como una contribución adicional en el desdoblamiento de las señales. Esto hace que la multiplicidad de las mismas sea más compleja y difícil de resolver, lo que lleva a un ensanchamiento de las señales. Este aumento en la anchura de las líneas espectrales también es debido a la disminución del tiempo de relajación transversal (T_2) de la molécula en el gel. También se observa una ligera variación en el desplazamiento químico de las señales registradas en medio isotrópico y anisotrópico, tanto del CDCl_3 como del (S)-ibuprofeno.

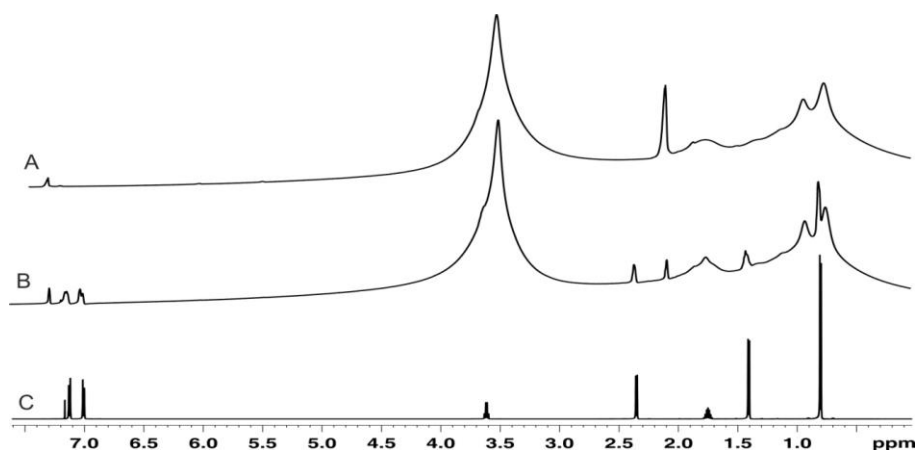


Figura 31. (A) Espectro ^1H -RMN del PMMA/ CDCl_3 . (B) Espectro ^1H -RMN de (S)-ibuprofeno en PMMA/ CDCl_3 . (C) Espectro ^1H -RMN de (S)-ibuprofeno en CDCl_3 .

Experimentos de Resonancia Magnética Nuclear

• **Medidas del tiempo de relajación transversal, T_2 .**

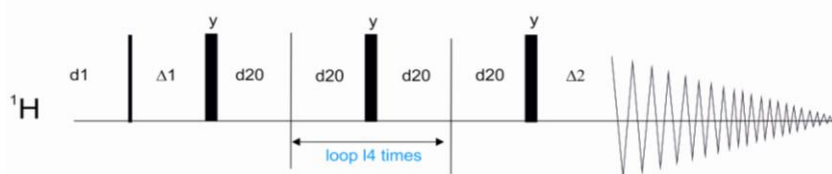


Figura 32. Secuencia de pulsos cpmg1d. $d1=150\text{s}$; $d20=1.5\text{ms}$; $\Delta1=1.5\text{ms}$; $\Delta2=1.49\text{ms}$; $ns=1$.

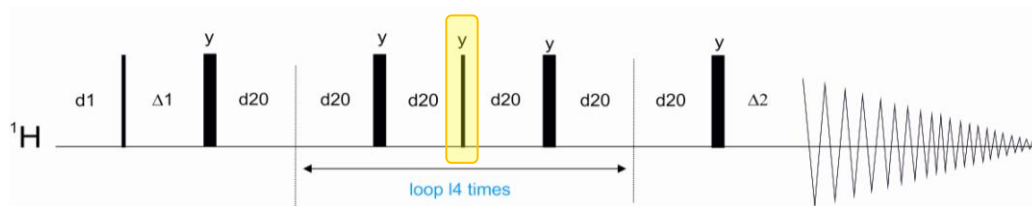


Figura 33. Secuencia de pulsos cpmg1d modificada³⁷. d1=150s; d20=1.5ms; Δ1=1.5ms; Δ2=1.49ms; ns=1.

• **Medidas de $^1J_{CH}/^1D_{CH}$ en medio isotrópico/anisotrópico**

Experimentos HSQC acoplado en la dimensión directa

Secuencias de pulsos de los experimentos HSQC-F2 (A), CLIP-HSQC-F2 (B) Y PEP-HSQC-F2 (C).

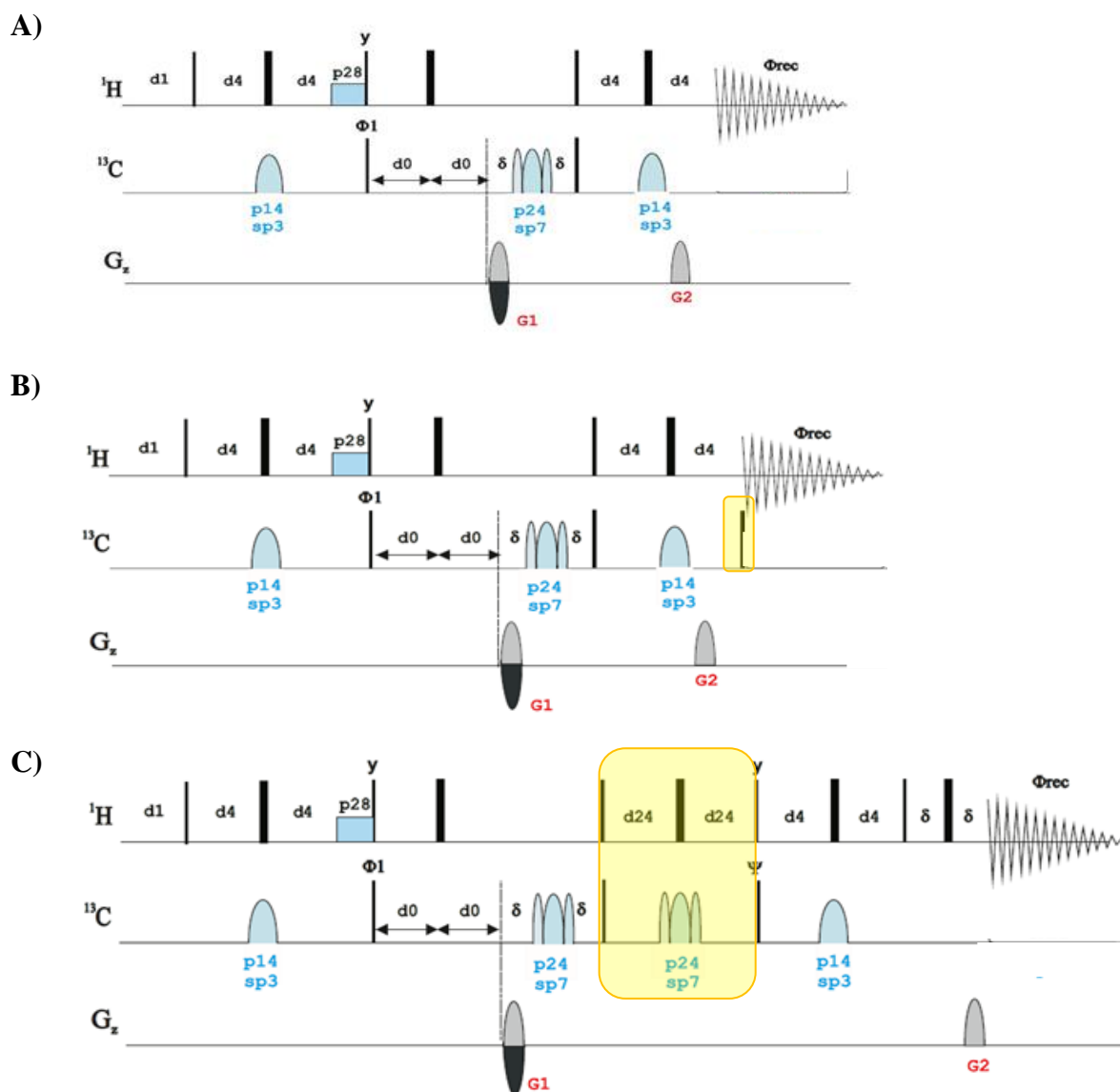


Figura 34. Secuencia de pulsos de los experimentos HSQC-F2 (A); CLIP-HSQC-F2 (B); PEP-HSQC-F2(C). d1=1.5s; $^1J_{CH}$ =145 Hz; d4=1/(4* $^1J_{CH}$); G1:G2=80:20.1%.

Experimentos HSQC acoplado en F1

Secuencia de pulsos de los experimentos HSQC-F1(A), BIRD-HSQC-F1 (B) y BIRD-HSQC-F1-J_{esc} (C).

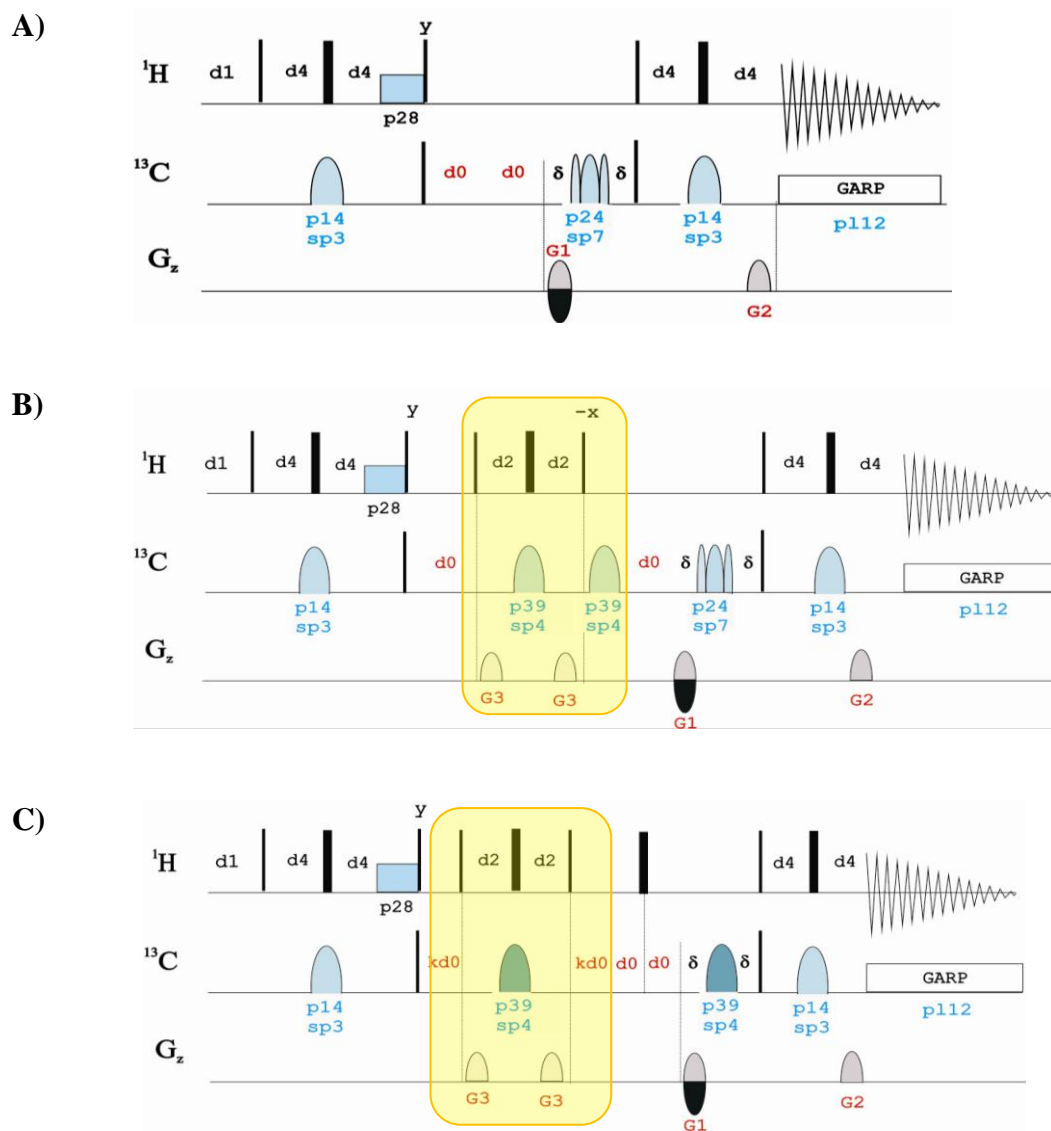


Figura 35. Secuencia de pulsos de los experimentos HSQC-F1 (A); BIRD-HSQC-F1 (B); BIRD-HSQC-F1-J_{esc} (C). $d1=1.5s$; $^1J_{CH}=145$ Hz; $d4=1/(4 \cdot ^1J_{CH})$; $d2=1/(2 \cdot ^1J_{CH})$; $G1:G2:G3 = 80:20.1:11\%$.