

Metodología para la protección selectiva del ácido *trans*-aconítico

Nicole Pinzón Hoyos

UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICAS
PROGRAMA DE QUÍMICA CON ÉNFASIS EN BIOQUÍMICA
Santiago de Cali
2017

Metodología para la protección selectiva del ácido *trans*-aconítico

Nicole Pinzón Hoyos

TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR AL TÍTULO DE PREGRADO EN QUÍMICA
CON ÉNFASIS EN BIOQUÍMICA

Tutor:

GIOVANNI ROJAS JIMÉNEZ, Ph.D

Santiago de Cali
2017



APROBADO POR:

Nora Elena Valderruten Posso Ph.D.
Evaluador

Giovanni Rojas Jiménez, Ph. D.
Tutor del proyecto

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por brindarme la fuerza necesaria para superar todos los obstáculos con paciencia y amor.

A mi mamá, por luchar por mí siempre y por enseñarme a hacer todo con la mayor motivación del mundo. Sin ella nada de esto sería posible y no valdría la pena. A mi familia por siempre creer en mí y apoyarme cada día.

A mi tutor, Giovanni Rojas, por estar siempre presente dándome los mejores consejos en diferentes ámbitos e impulsarme a salir adelante.

A Ferley Orozco y Juan David Giraldo por contenerme más de una vez en momentos difíciles y por su paciencia. A Valentina Gómez y Holly Castro por ayudarme y aconsejarme siempre que lo necesité.

A mis amigos que estuvieron presentes en diferentes momentos brindándome su ayuda y palabras de apoyo. A mi segunda familia, mi Icesi Crew, con quienes viví experiencias únicas que guardaré por siempre y con quienes compartí la pasión por el baile.

Al profesor Guillermo Montoya por ofrecerme su consejo, orientándome con paciencia y amabilidad.

A todos los colaboradores y profesores de la facultad que aportaron su ayuda y conocimiento para que este proyecto fuera posible.

A la Universidad Icesi por brindarme los recursos y espacios necesarios para poder desarrollarme en el ámbito personal, artístico y académico.

TABLA DE CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS.....	6
LISTA DE ANEXOS	7
RESUMEN	8
ABSTRACT	9
1. INTRODUCCIÓN	10
2. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO	12
2.1 Planteamiento del problema de investigación y justificación	12
2.2 Marco teórico y estado del arte.....	13
2.2.1 Ácido trans-aconítico	13
2.2.2 Esterificación	14
2.2.3 Cromatografía líquida de alta resolución (High pressure liquid chromatography HPLC) y detector de arreglos de fotodiodos (PDA).....	16
2.3 OBJETIVOS	18
2.3.1 OBJETIVO GENERAL.....	18
2.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
2.4 METODOLOGÍA PROPUESTA.....	19
2.4.1 Observaciones generales	19
2.4.2 Esterificación selectiva del ácido trans-aconítico.....	19
2.4.3 Extracción líquido-líquido.....	20
2.4.4 Procedimiento del método HPLC-PDA	20
2.4.5 Purificación	21
2.4.6 Procedimiento del método UPLC-masas	21
2.4.7 Caracterización estructural de los productos obtenidos	22
2.4.7.1 Resonancia magnética de ^1H y ^{13}C	22
2.4.7.2 Espectrometría de masas	22
2.4.8 MATRIZ DE MARCO LÓGICO	23
2.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	26
2.6 CONCLUSIONES.....	38
2.7 RECOMENDACIONES	39
2.8 REFERENCIAS.....	40
ANEXOS	42

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura del ácido trans-aconítico.....	13
Figura 2. Reacción general de la esterificación de ácidos carboxílicos.	14
Figura 3. Esterificación de un éster mediada por el catalizador $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	15
Figura 4. Esterificación selectiva esperada del ATA catalizada por $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	15
Figura 5. Esquema general instrumento de HPLC.....	17
Figura 6. Esquema general del montaje de la reacción de esterificación.	20
Figura 7. Cromatograma de la muestra de la esterificación con $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	27
Figura 8. Espectro de masas del pico de 0.98 min.	28
Figura 9. Fragmentaciones obtenidas por MS del pico de 0.98 min.	29
Figura 10. Espectro de masas del pico de 1.23 min.	30
Figura 11. Fragmentación obtenida por MS del pico de 1.23 min.	30
Figura 12. Espectro de masas del pico de 1.92 min	31
Figura 13. Propuesta de los derivados diesterificados del ácido trans-aconítico...32	
Figura 14. Espectro de RMN- ^1H del producto de esterificación.	32
Figura 15. Posible producto remanente después de la esterificación del ATA.	35
Figura 16. Espectro de RMN- ^{13}C del producto de esterificación.....	35
Figura 17. Reacción general de la metodología propuesta para la esterificación selectiva del ATA.	37

LISTA DE ANEXOS

Anexo A. Cromatograma de muestra de la reacción a 24 horas.....	42
Anexo B. Cromatograma de muestra de la reacción a 30 horas.....	42
Anexo C. Cromatograma de muestra de la reacción a 48 horas.	43

RESUMEN

El ácido *trans*-aconítico (ATA) es un compuesto de gran abundancia que se encuentra en los residuos del proceso industrial de la caña de azúcar, por lo que existe un especial interés en poder proveerle un valor agregado a este producto. El ATA es un ácido tricarboxílico, de los cuales dos grupos carboxilos se encuentran conjugados. Para poder generarle un valor agregado al ácido *trans*-aconítico, se planteó realizar una esterificación selectiva con un grupo metoxi, para su posible uso posterior como precursor para el desarrollo de polímeros lineales.

Para desarrollar dicha reacción se utilizó metanol como solvente y reactivo, en exceso, y cloruro de níquel hexahidratado ($\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) como catalizador. Para el monitoreo de la reacción se empleó como técnica cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), con una metodología validada para la identificación y cuantificación del ácido *trans*-aconítico. Una vez se identificaron los picos correspondientes al producto y al ATA que no reaccionó, se procedió a realizar una separación por medio de TLC preparativa para asegurar que no quedaran trazas de ATA en el producto final. Finalmente, se realizó la caracterización estructural del compuesto por medio de espectrometría de masas y resonancia magnética nuclear de ^1H y ^{13}C . De acuerdo con lo mencionado previamente, se concluyó que se obtuvo una mezcla de dos isómeros estructurales, siendo los dos derivados diesterificados del ATA.

Este proyecto contribuye a la síntesis de un precursor, a partir de ácido *trans*-aconítico, que presenta una estructura con un mayor potencial para realizar una polimerización lineal para poder a futuro estudiar sus propiedades mecánicas y la biocompatibilidad del polímero, ya que como el ATA queda con un grupo funcional diferente, es posible obtener un polímero con un menor grado de entrecruzamiento.

Palabras clave: ácido *trans*-aconítico, precursor, esterificación, caracterización.

ABSTRACT

Trans-aconitic acid (TAA) is a compound of great abundance that can be found in the wastes of the sugar cane industrial process. Therefore, there is a special interest in being able to provide an added value to this product. TAA is a tricarboxylic acid that has two conjugated carboxylic groups. To generate added value to the *trans*-aconitic acid, it was proposed to make a selective esterification with a methoxy group for its further use as a precursor for the development of linear polymers.

To develop the reaction, it was used methanol as solvent and excess reactant, and the catalyst was nickel(II) chloride hexahydrate ($\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$). To monitor the reaction, it was used the high-performance liquid chromatography technique (HPLC), with a validated method for the identification and quantification of the *trans*-aconitic acid. Once the peaks of the product and the unreacted TAA were identified, isolation was made using preparative TLC plates to make sure that no traces of TAA were left. Finally, a structural characterization was made using mass spectrometry, and ^1H and ^{13}C nuclear magnetic resonance. According to the mentioned above, it was concluded that it was synthesized two structural isomers from TAA that went through a di-esterification.

This project contributes to the synthesis of a polymer precursor derived from TAA that has a structure with a greater potential to accomplish a linear polymerization, giving the possibility of being able to study its mechanical properties and the biocompatibility of the polymer. Since the TAA is left with a different functional group, it is possible to obtain a polymer with a lower grade of cross-linking.

Keywords: *trans*-aconitic acid, precursor, esterification, characterization.

1. INTRODUCCIÓN

El ácido *trans*-aconítico (ATA) puede ser obtenido como un subproducto de la industria azucarera o por medio de la deshidratación del ácido cítrico. En la industria de la caña de azúcar, este ácido es parcialmente removido en la etapa de clarificación (Mane, Kumbhar, Barge, & Phadnis, 2002). Alrededor de la década de 1950, el ácido *trans*-aconítico se empezó a utilizar como plastificante, pero debido a su alto costo y la baja eficiencia de su recuperación a partir de las melazas no se continuó su uso. Como consecuencia, fue reemplazado por los ftalatos, que son plastificantes más económicos. Sin embargo, ha sido cuestionado el uso de estos compuestos ya que se han mostrado indicios de presentar efectos adversos en la salud (Javier & Zapata, 2007).

Debido a esta problemática se ha estado buscando una alternativa para poder utilizar el ATA y brindarle un valor agregado a este subproducto del proceso industrial de la caña de azúcar. Una de las posibles opciones es polimerizar este ácido con otros compuestos tales como diferentes dioles o polioles (Cao, Zheng, Zhou, Wang, & Pandit, 2011), lo cual ya se ha llevado a cabo con anterioridad. Por otro lado, no ha sido reportado en la literatura polimerizaciones lineales a partir del ácido *trans*-aconítico, sin embargo, diferentes estudios se están desarrollando en el grupo de investigación de síntesis orgánica de la Universidad Icesi. Para lograr dicho fin, una posible opción es realizar la protección selectiva de los ácidos carboxílicos del ATA para que quede con un grupo funcional diferente, y una polimerización pueda ser llevada a cabo por medio de dos grupos funcionales, de forma lineal.

El ATA tiene un ácido carboxílico que no está conjugado por lo que se puede aprovechar esta diferencia para cambiar estructuralmente ese grupo funcional. Para esto, se propuso inicialmente realizar una esterificación selectiva para ácidos carboxílicos no conjugados. A pesar de que los ésteres son grupos funcionales más reactivos que los ácidos carboxílicos (Bruice, 2008), esta reacción puede ser un buen principio para generar una diferenciación entre los tres grupos carboxílicos del ATA, y poder dejar un lado terminal protegido. Como resultado, se obtendría una molécula derivada del ATA pero sólo con dos grupos carboxílicos disponibles para reaccionar, lo que evitaría polímeros entrecruzados.

Para lograr este objetivo, se propuso realizar una esterificación selectiva utilizando como catalizador cloruro de níquel hexahidratado ($\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), el cual se coordina con el oxígeno del ácido carboxílico no conjugado, facilitando la posterior remoción del -OH (Ram & Charles, 1997). Adicionalmente, por medio de HPLC se realizó un monitoreo del consumo del ATA y la consecuente generación de productos, hallando que a las 24 horas de reacción ya había una cantidad considerable de productos. Debido a que los productos son compuestos que no se encuentran reportados en la literatura, para las condiciones del HPLC (en fase reversa) se utilizó

un método ya validado para la identificación de ATA (Orozco, 2016). Posteriormente, por medio de cromatografía de capa delgada fue posible observar la presencia de dos bandas, de las cuales una presentó un factor de retención (Rf) muy cercano al del ATA, por lo que probablemente dicho compuesto haya sido ATA sin reaccionar. Luego, por medio de cromatografía preparativa se prosiguió con la correspondiente separación de la segunda banda que presentó un Rf mayor, para poder realizar los análisis de caracterización estructural, tales como espectrometría de masas y espectroscopia de RMN de ^1H y ^{13}C .

2. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO

2.1 Planteamiento del problema de investigación y justificación

La producción de azúcar y otros productos como etanol a partir de la caña de azúcar es un sector industrial que se encuentra en constante crecimiento en Colombia, pero principalmente en el Valle del Cauca. En los últimos años se ha invertido mayormente en la búsqueda de productos con valor agregado que se deriven de la caña de azúcar, debido al surgimiento de nuevas leyes medio ambientales que promueven evitar la quema de la caña de azúcar (Javier & Zapata, 2007). Como consecuencia, se ha explorado la extracción del ácido *trans*-aconítico, el cual es el principal ácido orgánico encontrado a partir de este proceso industrial. Inicialmente, este ácido se extrajo de la melaza que se obtiene de la caña y fue utilizado como plastificante en la producción de cloruro de polivinilo (Robert & Martin, 1954).

Este proyecto busca brindarle un valor agregado al ácido *trans*-aconítico por medio de su conversión en un mejor precursor para sintetizar polímeros. Para dicho fin, se pretende sintetizar un derivado del ATA que presente una diferencia estructural en alguno de sus grupos carboxílicos. Para poder llegar a un precursor protegido a partir de esta molécula, se realizó una esterificación selectiva de dos de sus ácidos carboxílicos. El desarrollo de este precursor permitirá que a partir del ATA se realicen más investigaciones para poder generar polímeros con un menor grado de entrecruzamiento.

El posterior desarrollo de polímeros a partir de derivados diesterificados del ATA, significaría un mayor avance no sólo a nivel nacional sino también a nivel mundial, ya que existe un gran interés en producir polímeros biodegradables, termoestables, etc. Por lo que esta investigación podría significar un primer paso para llevar a cabo la síntesis de productos industriales con utilidades que abarquen un número mayor de áreas de interés.

2.2 Marco teórico y estado del arte

2.2.1 Ácido *trans*-aconítico

El ácido *trans*-aconítico es un ácido tricarboxílico que tiene una masa molecular de 174,11 g/mol. En su estructura dos ácidos carboxílicos están conjugados entre sí debido a la presencia del doble enlace en su cadena principal, mientras que el ácido restante, no lo está (Figura 1). Esta diferencia entre los ácidos carboxílicos que posee es la que se pretende aprovechar para lograr su modificación. Además, se sabe que este compuesto es soluble en agua y alcohol debido a la presencia de los tres ácidos carboxílicos, lo que le brinda un carácter polar. También es importante tener en cuenta que los ácidos carboxílicos son grupos funcionales que pueden sufrir diversas reacciones nucleofílicas debido a que bajo ciertas condiciones de reacción, existe la posibilidad de que el hidroxilo (OH) sea desplazado, lo cual es una propiedad que será de vital importancia para la producción del precursor deseado. Por otro lado, este compuesto se produce comercialmente a partir de la deshidratación del ácido cítrico (Wyrzykowski, Hebanowska, Nowak-Wiczak, Makowski, & Chmurzyński, 2011).

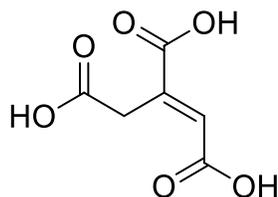


Figura 1. Estructura del ácido *trans*-aconítico

El ácido *trans*-aconítico (ATA) es el ácido más abundante que se extrae a partir de los residuos de la caña de azúcar, fue purificado e identificado por Arno Behr en 1877 a partir de la melaza, la cual es el residuo de la cristalización final de la producción de azúcar (Honig, 1953). La concentración del ácido *cis*-aconítico en la caña es demasiado baja debido a que es este isómero es el que utiliza la célula en el ciclo de Krebs, por lo que no es almacenado en la planta. Adicionalmente, se conoce que la concentración de ATA es de tres a seis veces mayor en las hojas de la caña de azúcar que en los tallos (Briceno, Cock, & Torres, 2001). Además, debido a que las nuevas leyes medio ambientales prohíben la quema de caña de azúcar, se ha generado en este sector industrial un interés por evaluar posibles usos para la parte superior y las hojas de esta planta (Hassuani, 2001). Estas partes de la caña de azúcar tienen un alto contenido de fibra y ácido *trans*-aconítico, el cual fue utilizado inicialmente como plastificante para el cloruro de polivinilo (PVC). Pero presentaba el problema de que a comparación de otros plastificantes obtenidos a partir de ácido ftálico, el TAA no era competitivo debido a su alto costo. Sin embargo,

se ha encontrado que plastificantes obtenidos a partir del ácido ftálico son tóxicos, por lo que el interés en el uso de ATA como plastificante ha ido en aumento (Tullo, 2005).

2.2.2 Esterificación

Para generar un buen diseño de una esterificación, es importante tener en cuenta la eficiencia y optimización de variables como: consumo de materias primas, tiempo de reacción, tipos de requerimientos en los sistemas de purificación de productos, obtención de productos indeseados, rendimiento del producto de interés, entre otros.

La esterificación entre un ácido carboxílico y un alcohol es reversible en medio ácido y termodinámicamente factible (Figura 2). Generalmente, el metanol o etanol son los alcoholes más comúnmente utilizados y, debido a la reversibilidad de la reacción, se requiere un gran exceso de alcohol para desplazar el equilibrio hacia los productos. Además, también puede separarse el agua generada por la reacción por medio de una destilación azeotrópica con un disolvente adecuado, lo que conlleva a que la reacción se complete (Allinger et al., 1984).

La reactividad disminuye en el siguiente orden para los alcoholes: primarios > secundarios > terciarios. También, el tipo de sustituyente en el carbono próximo al grupo hidroxilo hace que el alcohol sea más o menos reactivo. En lo que respecta al ácido carboxílico, la estructura, tipos de sustituyentes, entre otros factores, afectan el carácter ácido del grupo carboxilo, lo cual es determinante para la velocidad y rendimiento obtenido en este tipo de reacciones (Sánchez C. & Rodríguez N., 1995).

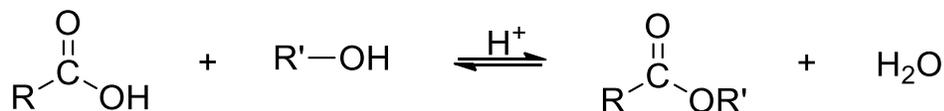


Figura 2. Reacción general de la esterificación de ácidos carboxílicos.

Es importante tener en cuenta que normalmente la esterificación ocurre tanto para ácidos carboxílicos conjugados como no conjugados bajo, las condiciones ya mencionadas. Debido a que no se pretende modificar todos los ácidos carboxílicos del ATA, se requiere trabajar condiciones diferentes para obtener cierto grado de selectividad en la reacción, ya que un medio ácido puede afectar a los tres ácidos

carboxílicos por igual y no existiría selectividad alguna. Se puede lograr una esterificación selectiva de ácidos no conjugados en la presencia de ácidos carboxílicos conjugados o aromáticos si se utiliza cloruro de níquel hexahidratado ($\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) como catalizador (Ram & Charles, 1997). La forma hidratada de este catalizador facilita la remoción del hidroxilo (Figura 3) ya que se da una coordinación entre el níquel y el oxígeno del ácido carboxílico de interés (el no conjugado), lo cual se puede detectar por medio de un cambio en la absorción del níquel, usando un espectrofotómetro ultravioleta-visible. En esta metodología se utiliza como alcohol el metanol y se demuestra que cuando se hacen reaccionar ácidos aromáticos, como el ácido mandélico, se obtiene un mayor porcentaje de ácido sin reaccionar que el éster formado, con 71% y 17% de rendimiento, respectivamente. Adicionalmente, reportan la reacción del ácido crotonico, el cual es un ácido carboxílico conjugado, con metanol y obtienen como resultado un 96% del reactivo inicial, en donde no se detectó la formación del éster correspondiente (Ram & Charles, 1997).

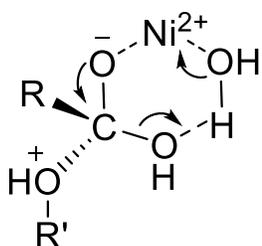


Figura 3. Esterificación de un éster mediada por el catalizador $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

Finalmente, en el caso del ácido *trans*-aconítico, como sólo se daría la esterificación en el ácido carboxílico no conjugado, teóricamente se esperaría obtener como producto ácido 2-(2-metoxi-2-oxoetil)fumárico (Figura 4).

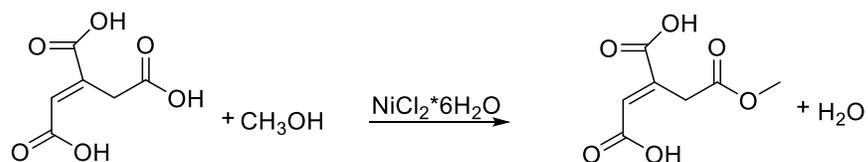


Figura 4. Esterificación selectiva esperada del ATA catalizada por $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

Debido a que no hay información reportada en la literatura acerca de esta reacción para el ácido *trans*-aconítico, es necesario llevar a cabo un monitoreo del proceso para poder seleccionar las mejores condiciones de reacción, tales como relación

estequiométrica entre los reactivos y tiempo de reacción, principalmente. Para lograr dicho fin, se requiere el uso del equipo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

2.2.3 Cromatografía líquida de alta resolución (*High pressure liquid chromatography* HPLC) y detector de arreglos de fotodiodos (PDA)

La cromatografía líquida de alta resolución es un tipo de cromatografía de columna en la que la muestra es bombeada a altas presiones con la fase móvil a través de la columna que contiene la fase estacionaria. El tiempo de retención de los diferentes componentes de la muestra depende de las interacciones que estos tengan con la fase estacionaria y la fase móvil, lo cual varía según la naturaleza del componente. En la figura 5 (V. Meyer, 2004) se muestra el esquema general de un equipo de HPLC, en el cual la bomba impulsa la fase móvil a través de la columna hasta llegar al detector, teniendo en cuenta que antes de esto, la muestra es inyectada automáticamente a una alta presión (Snyder, Kirkland, & Dolan, 2010).

Dependiendo de la polaridad del solvente y la fase estacionaria, existe cromatografía de fase normal y de fase reversa (o inversa). En HPLC fase normal, la fase estacionaria es polar y la fase móvil es apolar. En este caso, entre más polar sea el compuesto de interés, va a ser retenido en mayor medida por la fase estacionaria, aumentando el tiempo de retención. Por otro lado, en HPLC fase reversa, la fase estacionaria es apolar y la fase móvil tiene una polaridad moderada. Para esta técnica en particular, una de las fases estacionarias más comunes es la sílica modificada en su superficie con RMe_2SiCl , donde R puede ser $\text{C}_{18}\text{H}_{37}$ o C_8H_{17} . Para este caso, se presenta una fuerte atracción entre el solvente, que es polar, y las moléculas polares de la mezcla que pasen a través de la columna. Por lo que los componentes más polares aparecen primero (Snyder et al., 2010). En fase reversa el principio de separación depende de la interacción hidrofóbica entre el analito y el ligando hidrofóbico que hay en la fase estacionaria. Como consecuencia, la adsorción del analito con la fase estacionaria se relaciona proporcionalmente con la superficie de contacto de la parte apolar de la muestra que interacciona con la fase móvil, ya que entre mayor sea la tensión superficial, el analito tenderá a ser desplazado en mayor proporción hacia la fase estacionaria. (V. R. Meyer, 2010).

En una cromatografía de fase inversa la elución se lleva a cabo con una fase móvil de elevada polaridad. Normalmente es una solución acuosa que puede contener diferentes concentraciones de solventes como metanol, acetonitrilo o tetrahidrofurano. En este caso se debe ser cuidadoso con los valores de pH, ya que con los valores mayores de 7.5 la sílica tiene la capacidad de formar especies de silicato solubles (Skoog, Holler, & Crouch, 2008).

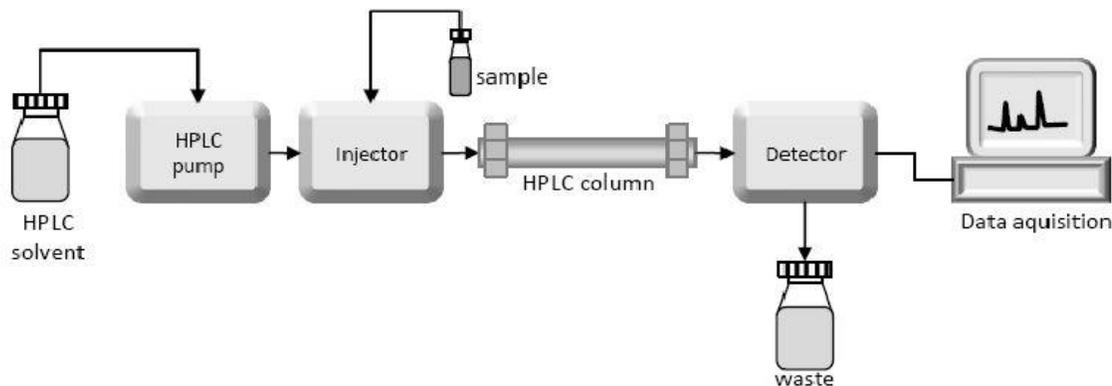


Figura 5. Esquema general instrumento de HPLC.

En este caso, se utilizó un método que ya se encontraba validado para la identificación y cuantificación del ácido *trans*-aconítico, en el cual las condiciones cromatográficas son las siguientes (Orozco, 2016):

- Equipo HPLC con detector PDA.(Chrom Elite Merck)
- Columna: Kinetex C18 2.6 μm 100mm x 4.60 mm
- Flujo: 0.8 mL/min
- Temperatura: 25°C
- Fase móvil: Agua pH 2.5 (Con HCl) : Acetonitrilo (95:5)
- Longitud de onda: 240 nm.
- Volumen de inyección: 10 μL .

La señal de los compuestos de interés se obtiene utilizando un detector de arreglo de fotodiodos, en donde el haz de radiación que ha atravesado la columna se dispersa por medio de una red de difracción fija, lo que permite que recoja simultáneamente todas las longitudes de onda dispersadas mediante una matriz de fotodiodos (Snyder et al., 2010).

2.3 OBJETIVOS

2.3.1 OBJETIVO GENERAL

Obtener un precursor protegido a partir del ácido *trans*-aconítico para la producción de polímeros lineales, durante el primer semestre del año 2017.

2.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Sintetizar el precursor protegido a partir del ácido *trans*-aconítico, por medio de una esterificación selectiva.
2. Purificar el producto de la reacción por medio de su identificación con HPLC-PDA, UPLC-masas y separación con cromatografía preparativa.
3. Caracterizar estructuralmente el producto obtenido, por medio de técnicas espectroscópicas y espectrométricas tales como RMN de ^1H y ^{13}C , y espectrometría de masas.

2.4 METODOLOGÍA PROPUESTA

2.4.1 Observaciones generales

Los reactivos usados, tales como ácido *trans*-aconítico (pureza de 98%) y cloruro de níquel hexahidratado fueron adquiridos en Sigma Aldrich. Por otro lado, el metanol que se utilizó como reactivo y solvente, fue grado HPLC.

Debido a que la reacción previamente mostrada (Figura 4) no se encuentra reportada en la literatura, en un inicio se requirió realizar diferentes pruebas de cromatografía en capa fina, para poder identificar la fase móvil adecuada para poder diferenciar y separar el ácido *trans*-aconítico (ATA) de los posibles productos y llevar a cabo el monitorio de la reacción. Como conclusión, se halló que la mejor fase móvil fue 70:30 metanol:cloroformo. Adicionalmente, no se tenía conocimiento previo del tiempo de reacción adecuado, de tal forma que se obtuviera el mayor rendimiento posible. Para dicho fin, utilizando la metodología ya validada para la identificación y cuantificación del ácido *trans*-aconítico en HPLC, se aseguró que sí hubiera presencia de algún producto diferente al ATA, para poder tener un indicio inicial de si estaba ocurriendo una esterificación. También, por medio de HPLC se evaluó qué tiempo de reacción era el más adecuado, teniendo en cuenta a qué tiempo se obtenía un mayor rendimiento y menos subproductos. Finalmente, se realizó su respectiva purificación y caracterización.

2.4.2 Esterificación selectiva del ácido *trans*-aconítico

En un balón de fondo redondo se adicionó ácido *trans*-aconítico con un grado de pureza del 98%, y este fue disuelto en metanol grado HPLC, el cual actuó como solvente y reactivo en exceso. Adicionalmente, una vez se disolvió totalmente el ATA en metanol, se prosiguió con la adición del cloruro de níquel hexahidratado ($\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), que actuó como catalizador. La relación entre el ATA y el catalizador fue de 10:1, teniendo en cuenta que el ATA no se encuentra totalmente puro, y por cada gramo de ATA se agregó 15 mL de metanol. Una vez se adicionó el cloruro de níquel, se aumentó la temperatura hasta que el baño de aceite en el que el balón estaba sumergido tuvo una temperatura constante de aproximadamente 65°C, y para evitar la pérdida del metanol, la reacción se adaptó a un condensador de reflujo (Figura 6). La reacción se llevó a cabo durante un periodo de 24 horas.

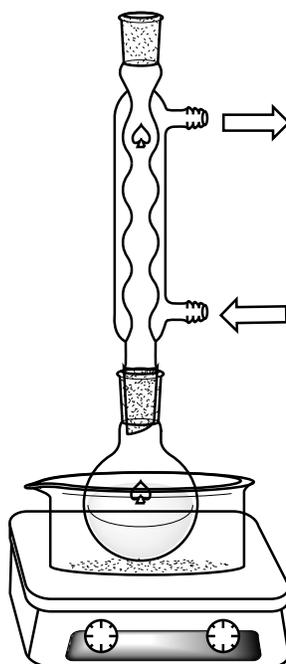


Figura 6. Esquema general del montaje de la reacción de esterificación.

2.4.3 Extracción líquido-líquido

Una vez que completaron las 24 horas de la esterificación, el metanol sobrante se rotaevaporó inmediatamente para asegurarse de que la reacción no siguiera ocurriendo. Posteriormente, para poder separar el catalizador ($\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) del producto, se realizó una extracción líquido-líquido. Para dicho fin, inicialmente se disolvió el crudo de la reacción en éter dietílico, el cual disuelve principalmente los compuestos orgánicos (el ácido *trans*-aconítico que no reaccionó y el producto). Por cada gramo de ATA, se adicionó aproximadamente 14 mL de éter. Luego, se lavó la fase orgánica (solución con éter) con agua (3x10 mL) y se recolectaron las fases acuosas, en las cuales quedó disuelto el cloruro de níquel hexahidratado. Para asegurarse de no perder producto en la fase acuosa, éstas se recolectaron y se lavaron con éter (2x25 mL), obteniendo al final los compuestos orgánicos disueltos en aproximadamente 64 mL de éter.

2.4.4 Procedimiento del método HPLC-PDA

Una vez se realizó la extracción para eliminar el catalizador de la muestra, se prosiguió a preparar las muestras que se inyectaron en el equipo con las

condiciones cromatográficas ya mencionadas con anterioridad (Orozco, 2016), para la detección del ATA y compuestos derivados a partir de éste.

- Equipo HPLC con detector PDA.(Chrom Elite Merck)
- Columna: Kinetex C18 2.6 μm 100mm x 4.60 mm (Utilizar pre-columna)
- Flujo: 0.8 mL/min
- Temperatura: 25°C
- Fase móvil: Agua pH 2.5 (Con HCl) : Acetonitrilo (95:5)
- Longitud de onda: 240 nm.
- Volumen de inyección: 10 μL

Debido a que no se conocía la concentración del producto, para poder saber qué cantidad de muestra tomar, se tuvo que realizar diferentes experimentos de ensayo y error, de tal forma que en los cromatogramas no se observara que la muestra estaba muy concentrada. Se llegó a la conclusión de que los cromatogramas con mejor resolución se obtenían cuando se tomaba 10 μL de la muestra problema, se llevaba a 300 μL en el microinserto para los viales de HPLC, usando metanol como solvente y este procedimiento se realizaba otra vez. Es decir que, de esta solución, se tomaron otros 10 μL y se llevaron a 300 μL con metanol. También es importante tener en cuenta que debido a que el producto es menos polar que el ATA, su tiempo de retención es mayor, por lo que el tiempo de corrida del método fue aumentado a 10 minutos para que fuera visible el pico del producto, ya que si esto no se hacía, no se observaba el pico del producto en el cromatograma correspondiente.

2.4.5 Purificación

Se detectó presencia de ATA sin reaccionar por medio de cromatografía de placa delgada y HPLC, por lo que por medio de TLC preparativa se purificó la banda de la placa correspondiente a los productos diferentes al ATA.

2.4.6 Procedimiento del método UPLC-masas

Una vez se purificó el producto de interés por medio de cromatografía de placa delgada, se inyectó la muestra en el equipo de UPLC acoplado a masas para poder identificar qué compuestos con diferente relación masa/carga y tiempo de retención se habían generado. A continuación se muestran las condiciones cromatográficas:

- Sistema ACQUITY UPLC H-Class.
- Columna: Kinetex C18 2.6 μm 150mm x 2.10 mm.
- Flujo: 0.3 mL/min
- Temperatura: 25°C
- Fase móvil: Agua desionizada: Acetonitrilo (95:5)

2.4.7 Caracterización estructural de los productos obtenidos

2.4.7.1 Resonancia magnética de ^1H y ^{13}C

Para poder realizar la elucidación estructural de los productos obtenidos y así, asegurarse que derivados del ATA se obtuvo, se utilizó el equipo de resonancia magnética nuclear de la Universidad del Valle, el cual es de 400 MHz.

2.4.7.2 Espectrometría de masas

Para llevar a cabo este análisis se utilizó un espectrómetro de masas Waters SQD2 de la Universidad Icesi, el cual es un detector de masas de cuadrupolo simple y con una gama de masas de 3000 Da, y se programó el capilar a 2.21 kV y el cono a 20 V, modo negativo. Se preparó una solución de la muestra de 1 ppm y se inyectó por medio de infusión directa.

2.4.8 MATRIZ DE MARCO LÓGICO

OBJETIVO GENERAL			
Obtener un precursor protegido a partir del ácido <i>trans</i> -aconítico para la producción de polímeros lineales, durante el primer semestre del año 2017.			
	ACTIVIDADES	SUPUESTOS	INDICADOR
<p>OBJETIVO ESPECÍFICO 1:</p> <p>Sintetizar el precursor protegido a partir del ácido <i>trans</i>-aconítico, por medio de una esterificación selectiva.</p>	<p>Consultar artículos científicos sobre condiciones de reacción para la esterificación de ácidos carboxílicos no conjugados.</p> <p>Obtención de los reactivos y solventes.</p> <p>Bajo condiciones de reacción controladas y con los reactivos necesarios realizar la esterificación.</p>	<p>Disponibilidad a tiempo de los reactivos requeridos.</p> <p>Disponer del espacio adecuado en el laboratorio de Química Orgánica con los respectivos materiales adecuados.</p> <p>Disponibilidad de las referencias para determinar las condiciones de reacción.</p> <p>No obtención de los productos deseados en alguna de las reacciones.</p>	<p>Obtención del precursor protegido a partir del ácido <i>trans</i>-aconítico.</p>
<p>OBJETIVO ESPECÍFICO 2:</p>	<p>Utilizar el método validado de HPLC para la</p>	<p>Realizar técnicas de separación no</p>	<p>Identificación y del</p>

<p>Purificar el producto de la reacción por medio de su identificación con HPLC-PDA, UPLC-masas y separación con cromatografía preparativa.</p>	<p>identificación de ácido <i>trans</i>-aconítico que no reaccionó durante la esterificación.</p> <p>Utilizar técnicas de purificación tal como cromatografía de placa delgada preparativa, dependiendo de la naturaleza del producto obtenido.</p>	<p>adecuadas para cada compuesto determinado.</p> <p>No obtener el compuesto puro.</p> <p>Disponibilidad de los equipos y materiales necesarios.</p>	<p>precursor protegido puro.</p>
<p>OBJETIVO ESPECÍFICO 3:</p> <p>Caracterizar estructuralmente los productos obtenidos en cada reacción realizada para el desarrollo de la metodología, por medio de técnicas espectroscópicas y espectrométricas como RMN de ^1H y ^{13}C, y espectrometría de masas.</p>	<p>Realizar análisis de RMN de ^1H y ^{13}C, para determinar si se obtienen las estructuras esperadas del producto.</p> <p>Realizar análisis de espectrometría de masas para distinguir los cambios estructurales que ocurren al obtener el precursor.</p> <p>Por medio de los softwares adecuados, se llevará a cabo el análisis de los espectros</p>	<p>No disponer de los equipos requeridos para cada análisis en la Universidad Icesi, por lo que probablemente se lleguen a utilizar equipos de la Universidad del Valle.</p> <p>Fallas en los diferentes equipos a utilizar.</p>	<p>Obtención de los espectros con los picos característicos del precursor.</p>

	obtenidos en cada equipo.		
--	------------------------------	--	--

2.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Inicialmente, se montó una reacción con 0.5012 g de ATA y la cantidad estequiométrica respectiva del $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y se realizó un seguimiento por cromatografía en capa delgada por un periodo de 24 horas. Como resultado, se notó que a partir de aproximadamente 20 horas, se empezó a detectar un compuesto diferente al ATA, menos polar, ya que tenía un factor de retención mayor en una fase estacionaria de sílice, por lo que este fue el primer indicio de que sí se estaba llevando a cabo la reacción.

Una vez se comprobó que sí se estaba generando producto, por medio del equipo de HPLC, y utilizando el método ya validado para la identificación del ácido *trans*-aconítico (Orozco, 2016), se analizaron muestras después de que la reacción transcurrió durante diferentes horas para realizar una monitorización. Se detectó que se empezaba a ver un cambio relevante en los picos del ATA y del producto después de aproximadamente 24 horas. Por lo que, se montaron tres reacciones paralelamente con las mismas cantidades estequiométricas de reactivos y catalizador, a diferentes tiempos: 24, 30 y 48 horas. Se llevaron a cabo estas tres reacciones simultáneamente, con el fin de poder realizar la extracción líquido-líquido, ya explicada en la sección de metodología, a cada reacción y así poder analizar, por medio de HPLC, los productos generados sin la presencia del catalizador.

Posteriormente, cuando se detallaron los tres cromatogramas correspondientes a cada tiempo de reacción (ver anexos), se observó que el correspondiente a las 24 horas era el que presentaba un pico de producto con la mayor área (92.67%). Es posible observar que a las 48 horas también se obtiene un área considerable (88.47%), pero a diferencia del cromatograma de 24 horas, en este cromatograma se detalla que hay presencia de otros compuestos, que posiblemente sean productos de descomposición, entre otros. Por otro lado, en el cromatograma que corresponde a la reacción de 30 horas, se puede visualizar que no aparecieron solamente los picos correspondientes al ácido *trans*-aconítico restante y el producto, aparentemente también hay presencia de otros compuestos de origen desconocido por lo que se decidió que 30 horas tampoco era el tiempo indicado de reacción.

Una vez se halló el tiempo de reacción más adecuado y se llevó a cabo la reacción durante 24 horas, se prosiguió a realizar la extracción líquido-líquido. Posteriormente, cuando se tomó placa delgada se detectó la presencia de dos bandas diferentes. El R_f hallado para el ATA fue de 0.6, y los R_f de las dos bandas de productos fueron 0.7 y 0.8. La banda que se encontraba más cerca al R_f del ATA, se cree que probablemente pertenecía al ATA que no reaccionó y probablemente estaba siendo levemente arrastrado en la placa, por la presencia de los otros productos de carácter menos polar. Cuando se identificaron estas dos bandas, se intentaron separar los dos compuestos a partir de lo obtenido en la placa delgada

de sílice. Sin embargo, durante este proceso no fue posible recuperar una cantidad significativa de producto debido a que no se contaba con las placas preparativas adecuadas, y para que en las placas de sílice pudiera haber la separación entre las dos bandas se tuvo que diluir repetidamente la muestra de la reacción. Adicionalmente, el producto que presentó un Rf menor (0.7), presentó una concentración muy baja por lo que no se pudo realizar una correcta separación y recuperación de este compuesto. De igual forma, según lo obtenido en los cromatogramas por medio de HPLC, y lo observado en las TLC de sílice, probablemente esta banda correspondía al ATA restante de la reacción. A continuación, se muestran los resultados de la caracterización y correspondientes análisis de la muestra purificada a partir de la banda con un Rf de 0.8.

Por medio del equipo de UPLC acoplado a masas de la Universidad Icesi se analizó la muestra de la reacción, obteniendo el cromatograma mostrado en la figura 7. Esto se realizó con el fin de identificar los diferentes tipos de compuestos existentes en la muestra según los tiempos de retención que se fueron elucidando en el cromatograma.

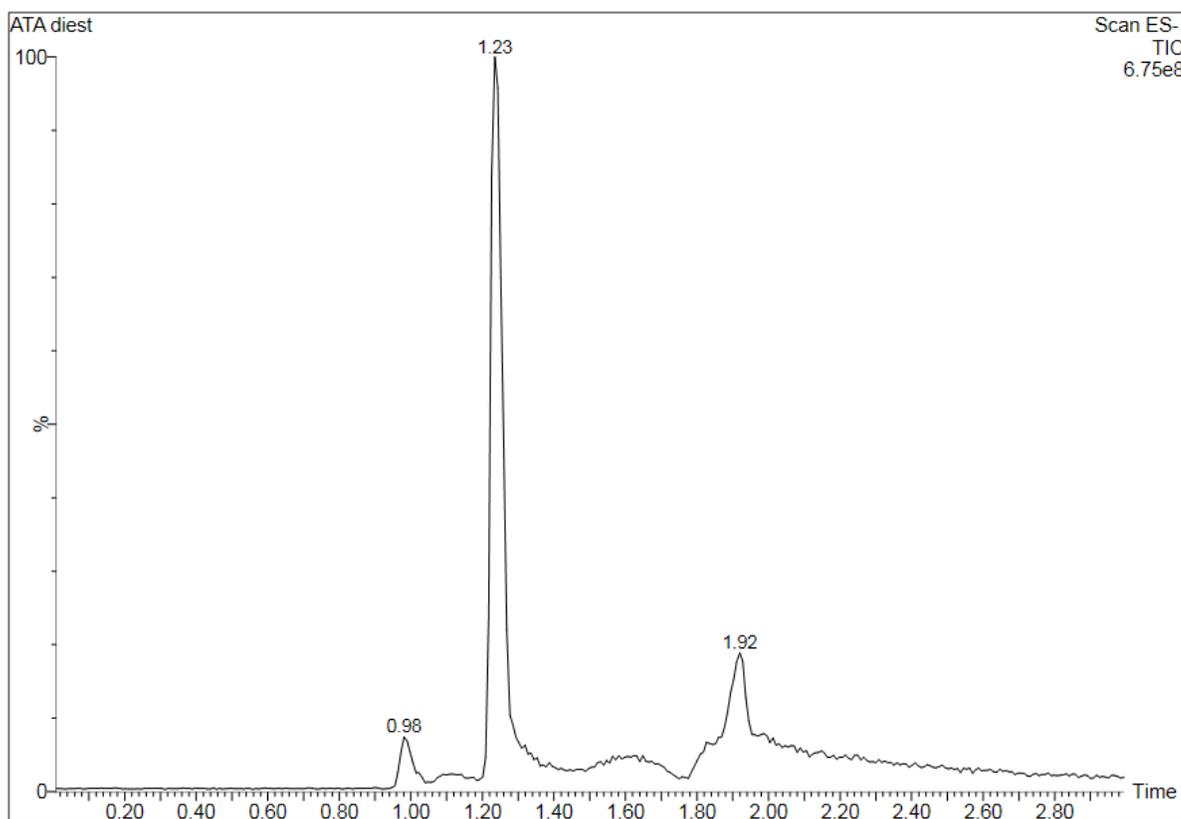


Figura 7. Cromatograma de la muestra de la esterificación con $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

Se observa que se obtuvieron tres picos principales con tiempos de retención de 0.98 min, 1.23 min y 1.92 min. Teniendo en cuenta que se trabajó con una columna apolar, los compuestos con menor tiempo de retención son los que tienen un carácter más polar. En este caso, es posible notar que el pico con mayor intensidad es el de 1.23 min, y el de menor intensidad es el de 0.98 min. Al analizar por medio de espectrometría de masas los compuestos presentes en cada pico encontrado, se obtuvo los espectros mostrados en las figuras 8, 10 y 12.

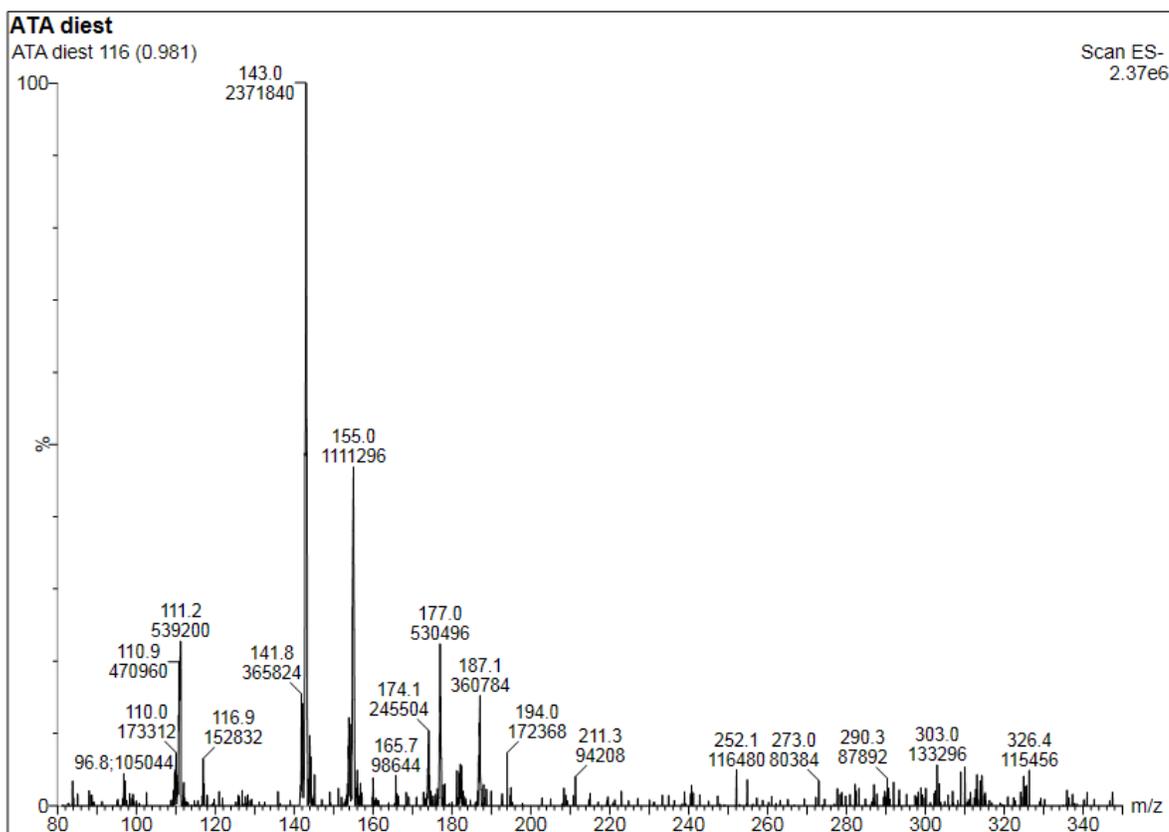


Figura 8. Espectro de masas del pico de 0.98 min.

En la figura 8, se observa que hay picos principales que tienen una relación masa/carga aproximadamente de 187.14, 177.05, 155.01 y 143.02. La señal de 187.14 coincide con el peso molecular del derivado del ATA monoesterificado, teniendo en cuenta que el ATA tiene una masa de 174.11 g/mol. Por ende, es posible que sí haya presencia de este compuesto, pero en una cantidad mínima. Cabe tener en cuenta que debido a que el análisis en el espectrómetro de masas se hizo en modo negativo, se ve favorecida la pérdida de hidrógenos y, por ende, la

presencia de una carga negativa en los oxígenos de la molécula. Por otro lado, el pico de m/z de 155.01 puede corresponder a la fragmentación del grupo metoxi, y el pico de m/z de 143.02, que es el pico base, coincide con una descarboxilación por parte del derivado monoesterificado del ATA (Figura 9). Los demás picos que aparecen con una relación m/z mayor a 187.14 se cree que pueden ser productos de reacciones de entrecruzamiento entre el mismo ATA y sus derivados, o incluso con trazas de solventes que se usaron previamente, ya que esos pesos moleculares no coinciden con ninguno de los compuestos esterificados. Por otro lado, se desconoce el origen del pico que tiene una relación m/z de 177.05.

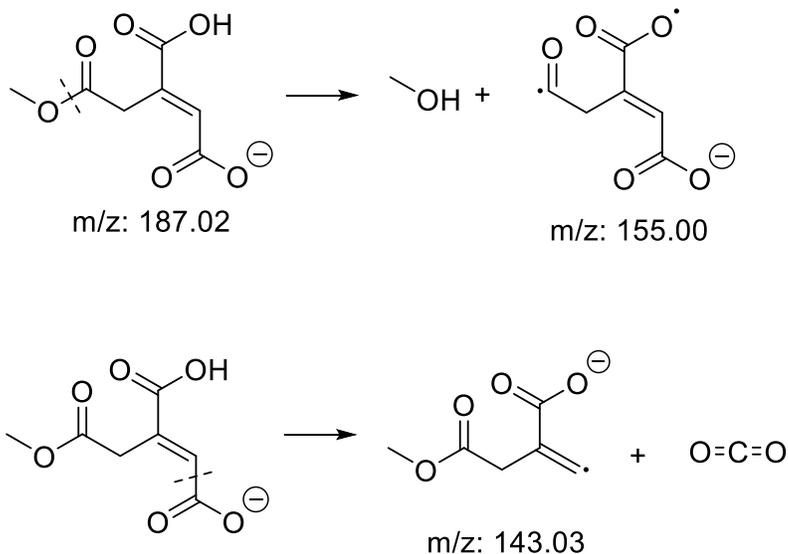


Figura 9. Fragmentaciones obtenidas por MS del pico de 0.98 min.

En la figura 10 se observa el espectro de masas correspondiente al pico detectado que aparece a los 1.23 minutos en el cromatograma de la figura 7, que es el que aparece con una intensidad considerablemente mayor a comparación de las otras dos señales restantes, y posee un carácter menos polar que la señal correspondiente a los 0.98 min.

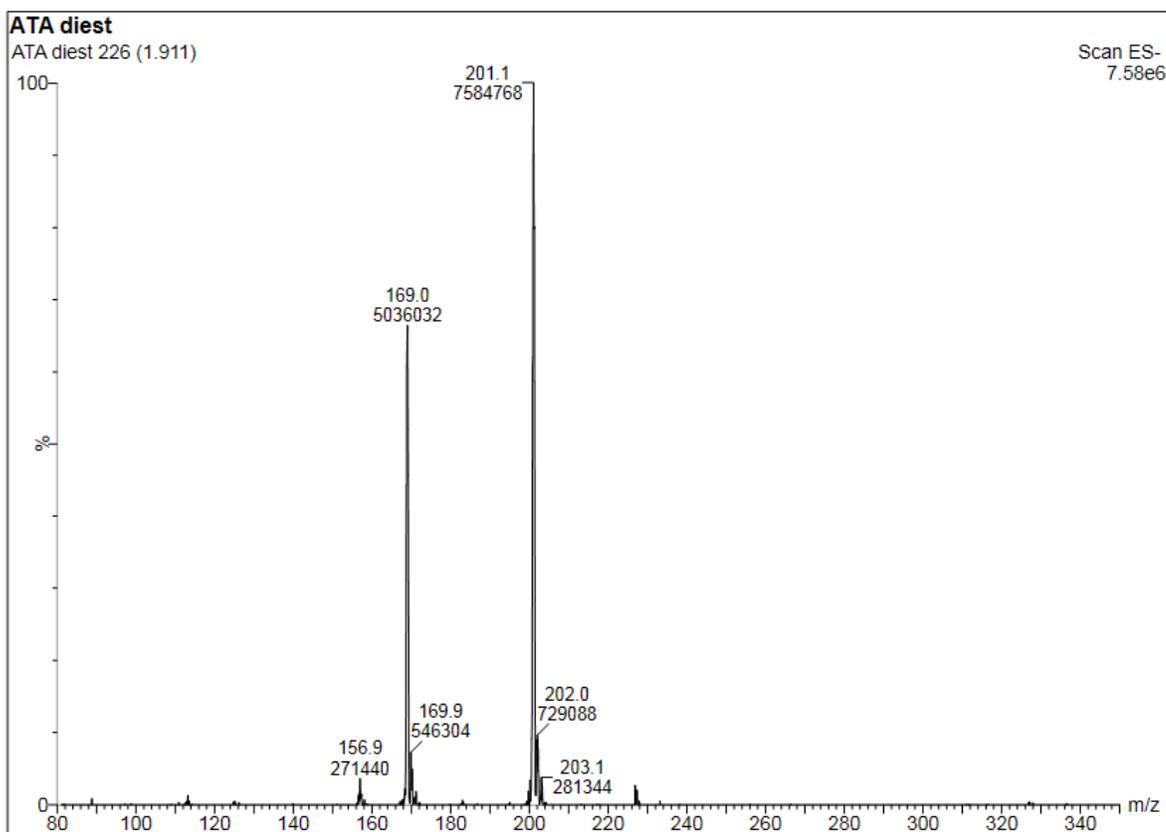
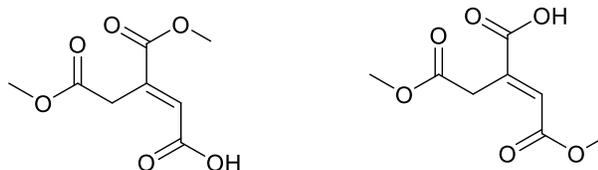


Figura 12. Espectro de masas del pico de 1.92 min

En este espectro es posible notar que se sigue el mismo comportamiento que el espectro del pico de 1.23 min (figura 10). Como consecuencia, es posible afirmar que en este caso también se trata de un derivado diesterificado del ATA, pero a diferencia de la molécula propuesta en la figura 11, uno de los grupos metoxilos puede encontrarse en el otro carbonilo que está conjugado. Sin embargo, siguen el mismo mecanismo de fragmentación. En la figura 13 se plantean los dos posibles isómeros diesterificados. Adicionalmente, en los dos espectros de las figuras 10 y 12, aparece una señal con una relación m/z de aproximadamente 227.02, de muy baja intensidad, y que tiene un peso superior al derivado diesterificado del ATA. Probablemente se trate de un subproducto que se generó como consecuencia de entrecruzamientos que ocurrieron mientras se realizaba el análisis, o reacciones que se generaron con contaminantes en la muestra.



Peso molecular: 202,16 g/mol Peso molecular: 202,16 g/mol

Figura 13. Propuesta de los derivados diesterificados del ácido *trans*-aconítico.

En este caso, no es posible saber cuál de los dos isómeros es el que se produjo en mayor cantidad, por lo que no se especifica cuál de las dos moléculas propuestas corresponde a cada pico (1.23 min y 1.91 min), ya que cualquiera de las dos puede tener el mismo tipo de fragmentaciones y generan un espectro de masas casi idéntico. Por ende, es importante tener en cuenta que en el documento se está planteando una de las dos estructuras como el derivado del ATA que se encuentra en mayor proporción, pero esto no se puede saber con total certeza, ya que no es posible diferenciar entre estos dos isómeros por medio de las caracterizaciones realizadas.

A continuación, se muestra el espectro de RMN-¹H de la muestra obtenida.

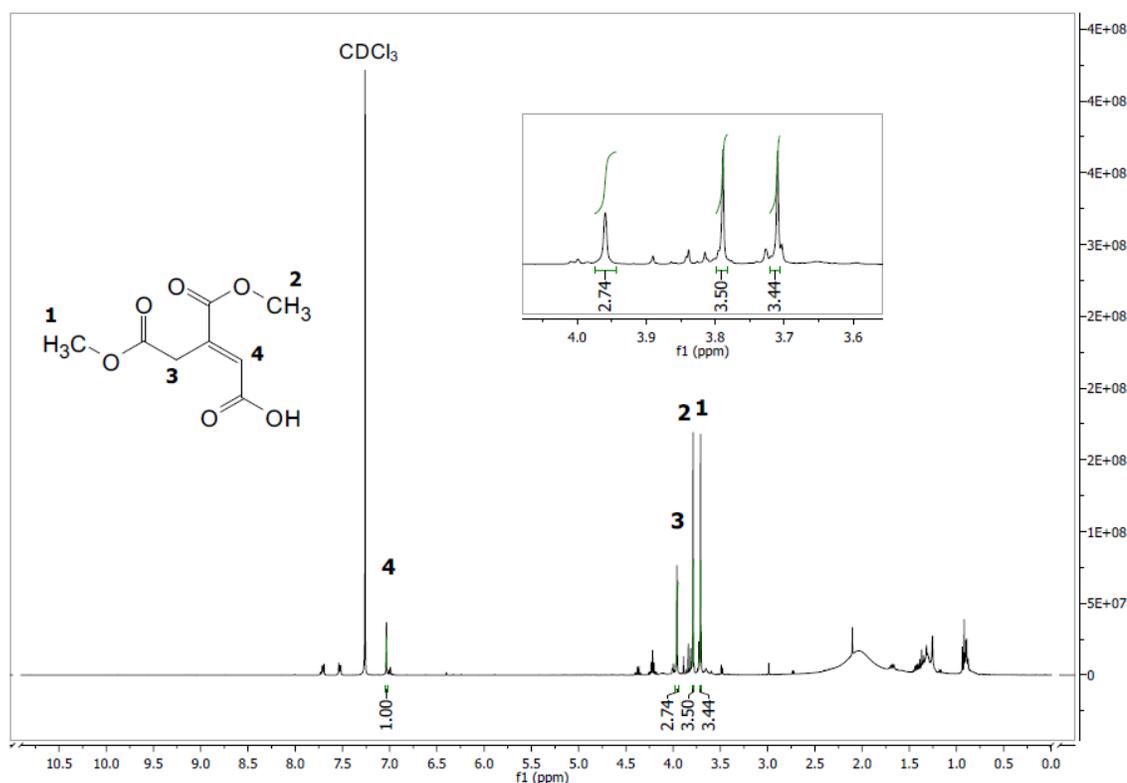


Figura 14. Espectro de RMN-¹H del producto de esterificación.

Como observaciones generales, es notable que el espectro presenta muchas señales correspondientes posiblemente a presencia de solventes, agua y productos secundarios de la reacción, ya que a pesar de que se identifican cuatro picos de mayor intensidad, se observa que a una menor intensidad hay diversas señales. Además, es importante resaltar que en este caso los cuatro picos numerados son singuletes ya que todos los carbonos adyacentes de los carbonos que tienen hidrógenos no poseen protones, por lo cual no hay un desdoblamiento de las señales. Por otro lado, el pico que aparece con la mayor intensidad, alrededor de 7.25 ppm es el del cloroformo deuterado (CDCl_3) que fue el solvente que se utilizó para realizar el análisis de la muestra.

En el espectro de RMN- ^1H se puede observar que a campo alto se presentan señales que posiblemente corresponden a trazas de solventes que quedaron remanentes en la muestra analizada. Como se mencionó anteriormente, se utilizó metanol y éter para llevar a cabo las etapas de extracción y purificación del compuesto producido. El éter fue usado para realizar la extracción líquido-líquido que permitió remover el catalizador ($\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), y el metanol se utilizó para la extracción del producto de la sílica de las placas que se rasparon en el proceso de separación. Se observa que a campo alto aparecen señales características (entre 3.5 ppm y 0.8 ppm) de hidrógenos pertenecientes a estos solventes. Por ejemplo, las señales correspondientes a los dos tipos de hidrógeno que tiene el dietil éter aparecen alrededor de 1.2 ppm y 3.5 ppm, respectivamente, y en el espectro es posible observar la presencia de señales a estas frecuencias. Por otro lado, el metanol también presenta dos señales características aproximadamente a frecuencias de 0.8 ppm y 3.4 ppm. Además, también es posible que alguna de estas señales se deba a la presencia de agua.

Los picos 1 y 2 corresponden a los tres hidrógenos, del grupo metoxi ($-\text{OCH}_3$) correspondiente a un éster, apareciendo a una frecuencia de aproximadamente 3.7 ppm y 3.8 ppm, respectivamente. Estos picos, 1 y 2, integran para 3.44 y 3.50, lo que por aproximación sería una integración para tres protones, concordando con la cantidad de hidrógenos que hay en el metoxilo. Cabe tener en cuenta que estas integraciones dan mayor que tres porque probablemente hay una mezcla de los dos isómeros diesterificados derivados del ATA ya propuestos, por lo que en ese pico se encuentran solapadas otras señales.

El pico 3, que también es un singulete, tiene una integración de 2.74, que numéricamente se aproxima más a 3, pero al comparar este pico con las señales 1 y 2 se nota que tiene un área menor. Por consiguiente, se afirma que este pico integra para dos protones ya que, como se mencionó con anterioridad, es muy probable que haya solapamiento de la señal correspondiente al isómero de la molécula propuesta, por lo que las integraciones dan mayores. Por lo que se propone que este pico corresponde al único metileno presente en el derivado del ATA, que se encuentra más hacia campo bajo de lo usual, debido a su cercanía con un grupo carbonilo y al sistema de conjugación de la molécula.

El pico 4 aparece con un desplazamiento de aproximadamente 7.04 ppm, el cual corresponde al único hidrógeno vinílico que posee este derivado del ATA, y este se encuentra más desplazado de lo normal hacia campo bajo, debido a la conjugación que presenta la molécula, lo que genera una mayor densidad de electrones a su alrededor y, por ende, una mayor desprotección.

Se propone que la esterificación de los ácidos carboxílicos haya ocurrido en el lado no conjugado de la molécula y en uno de los ácidos que presenta la conjugación de electrones porque según lo reportado en la literatura (Ram & Charles, 1997), la esterificación con el catalizador cloruro de níquel hexahidratado ($\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) favorece la reacción en los ácidos carboxílicos no conjugados. La diferencia radica es que en la literatura reportan la selectividad comparando los resultados de la esterificación de mezclas físicas de los dos tipos de ácidos: conjugados y no conjugados. No obstante, en este caso en específico se intentó realizar dicha reacción selectiva en una misma molécula, el ácido *trans*-aconítico, que contiene tanto un ácido no conjugado, como ácidos conjugados. Como consecuencia, puede que la selectividad generada por el $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ se haya visto afectada por la cercanía entre los grupos carboxílicos. A pesar de esto, sí hubo una selectividad parcial debido a que no se esterificaron los tres ácidos del ATA sino que hubo una diesterificación. Sin embargo, no es posible afirmar cuál de los dos ácidos carboxílicos que se encuentran conjugados se vio más favorecido que el otro para ser esterificado con el grupo metoxi. De igual forma, sí es posible afirmar que uno de los dos grupos metoxi presentes está en el lado del grupo carbonilo no conjugado, porque según el mecanismo del catalizador (Figura 3), la reacción se ve favorecida principalmente en ese grupo de la molécula.

En el espectro de RMN- ^1H es posible ver alrededor de los picos ya explicados, señales de menor intensidad que aparecen a desplazamientos cercanos a los picos 1, 2, 3 y 4. Es probable que estos picos correspondan a los protones del isómero del derivado diesterificado, por lo que siguen la misma tendencia en cuanto a la integración de protones y desplazamiento químico que el derivado de ATA propuesto. Adicionalmente, aproximadamente a 7.70 y 7.50 ppm se observan dos señales que se encuentran más hacia campo bajo que el pico 4, y parece ser los picos característicos de una olefina terminal. Por lo que, es posible que haya ocurrido una descarboxilación del grupo carboxilo conjugado generando así una olefina terminal, lo cual pudo haber sido consecuencia del calentamiento de la reacción por largos periodos de tiempo o por una contaminación previa del ATA, generando el compuesto mostrado en la figura 15 que sería un derivado del ácido itacónico (dimetil 2-metilen succinato). Por último, es importante recordar que a pesar de que haya en la molécula propuesta un ácido libre, los protones de los hidroxilos de los ácidos carboxílicos (^-OH) no siempre se muestran en los RMN- ^1H , por lo que la ausencia de esta señal no significa que no se trate de un diéster, ya que todas las señales explicadas concuerdan con un derivado diesterificado del ATA.

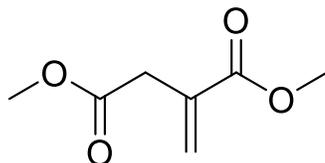


Figura 15. Posible producto remanente después de la esterificación del ATA.

En la figura 16, se muestra el espectro de RMN-¹³C de los derivados diesterificados del ATA. Concordando con lo que se ha mostrado en los espectros anteriores, en el RMN de ¹³C también fue posible notar que en la muestra existe una mezcla de dos compuestos que probablemente sean isómeros debido a la similitud de los ambientes químicos de cada carbono, ya que muchas de las señales características de los carbonos están por duplicado. También es importante tener en cuenta que a 77.16 ppm aparece la señal característica para cloroformo, que fue el solvente empleado, al igual que en el RMN de ¹H.

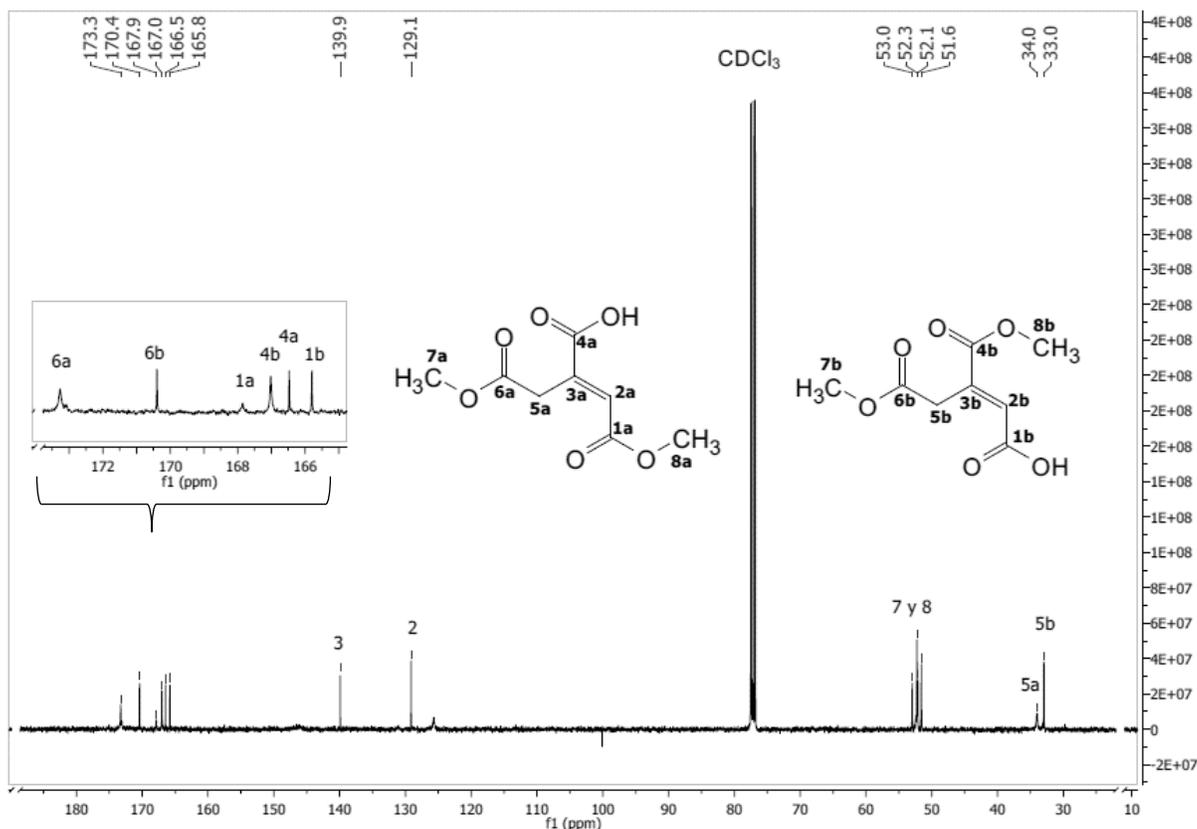


Figura 16. Espectro de RMN-¹³C del producto de esterificación.

En la figura 16 se muestra la propuesta de los dos isómeros diesterificados derivados del ATA, de los cuales se sabe que hay uno en mayor proporción que el otro, pero como se ha mencionado previamente, no fue posible diferenciar cuál. Por lo que en este caso se están asignando los carbonos respectivos de las dos moléculas, pero teniendo en cuenta dicha premisa cabe resaltar que existe la posibilidad de que el que se encuentre en mayor proporción sea el otro compuesto (la molécula *a* en vez de la *b*).

Los primeros picos que se observan, hacia campo alto, corresponden a los carbonos del metileno (carbonos N°5) que son los menos desprotegidos. En este caso, sí se notan las dos señales por separadas de cada isómero, *a* y *b*, a 34.0 y 33.0 ppm, respectivamente. Posteriormente, aparecen 4 picos (a 51.6 ppm, 52.1 ppm, 52.3 ppm y 53.0 ppm) que corresponden a los carbonos de los cuatro grupos metoxilos que hay en total entre los dos isómeros, es decir los carbonos 7a, 8a, 7b y 8b. Sin embargo, no es posible diferenciar con exactitud qué pico corresponde a cada metoxi, debido a su similitud de ambientes químicos. Hacia campo bajo, a 129.1 ppm, aparece sólo un pico que corresponde a los carbonos 2a y 2b. En este caso hay un solapamiento de las señales y el mismo pico aparece para el carbono N°2 de los dos isómeros, al igual que sucede con los carbonos 3a y 3b, ya que también se observa sólo una señal (pico 3). Esto puede ocurrir ya que en ambos compuestos todos los carbonos se encuentran en el mismo ambiente químico, y en los casos en los que se observan dos picos para el mismo tipo de carbonos, las dos señales se encuentran a frecuencias muy cercanas entre sí, con una diferencia mínima. Por lo cual, concordando con lo mencionado con anterioridad, es difícil deducir qué pico corresponde a cada derivado del ATA y cuál se encuentra en mayor proporción.

Por último, hacia campo bajo se detectaron 6 señales que concuerdan con la cantidad de carbonilos que hay en total entre los dos derivados del ATA, teniendo en cuenta que cada isómero presenta tres enlaces C=O. Al igual que en los casos anteriores, no es posible diferenciar qué pico corresponde a qué carbono con exactitud. De igual forma, se propone que los carbonos 6a y 6b son los que se encuentran más desprotegidos, a comparación de los otros carbonilos (1a, 4a, 1b y 4b), ya que estos no hacen parte del sistema conjugado y se encuentran en un ambiente menos denso en electrones.

En la figura 17 se muestra la reacción general de la metodología planteada, donde los compuestos 1 y 2 son los productos propuestos. Tanto los espectros de masas como los de resonancia magnética concuerdan con el hecho de que se obtuvo una mezcla de dos compuestos diesterificados a partir del ácido *trans*-aconítico. A pesar de que no sea posible diferenciar cuál fue el producto de mayor cantidad y haya una mezcla de estas dos moléculas, sigue siendo posible trabajar con dicha mezcla de productos ya que se trata de isómeros estructurales, y en ambos casos se logró una protección del ATA para lograr la futura síntesis de polímeros lineales, por medio de posibles diferentes reacciones, como puede ser una transesterificación con dioles. Por otro lado, con el uso de NiCl₂*6H₂O se esperaba poder realizar una

esterificación únicamente del carbonilo que no se encuentra conjugado, lo cual probablemente sí sucedió según el espectro de masas mostrado en la figura 8, pero en una cantidad muy mínima. Sin embargo, lo que se obtuvo en cantidades mayores fueron los derivados diesterificados del ATA, que de igual forma se lograron sintetizar por medio de una esterificación selectiva, ya que en ambos isómeros quedó un ácido carboxílico sin reaccionar, generando así una diferenciación en los lados terminales de los compuestos.

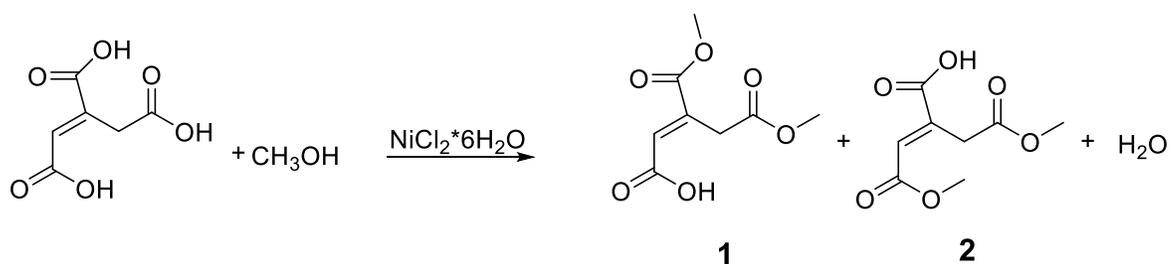


Figura 17. Reacción general de la metodología propuesta para la esterificación selectiva del ATA.

2.6 CONCLUSIONES

La mezcla de los productos obtenidos presentó características físicas similares al ATA, ya que también fue un sólido de una tonalidad blanca-amarilla, poco denso y fácilmente soluble en solventes como metanol, acetonitrilo y éter. Sin embargo, en repetidas ocasiones, después de realizar el proceso de extracción líquido-líquido, y proseguir con la evaporación del solvente (éter), se obtuvo un compuesto con una viscosidad muy alta, de color amarillo pálido, lo cual se debió a que el éter, a pesar de ser muy volátil, llegaba un punto en que su evaporación y separación del producto requería de secar la muestra con nitrógeno y posteriormente dejarla al vacío.

Basándose en los resultados obtenidos a partir de los diferentes análisis realizados, tales como HPLC, UPLC, espectrometría de masas y espectroscopia de RMN- ^1H y ^{13}C , de la muestra obtenida a partir de la esterificación con el catalizador $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ del ácido *trans*-aconítico, se halló que se obtuvo dos derivados diesterificados del ATA. Como consecuencia, es posible afirmar que se encontró una forma de realizar una protección selectiva, por medio de una esterificación, del ATA.

Según lo reportado en la literatura, el catalizador debería ser selectivo solamente para ácidos carboxílicos no conjugados. Sin embargo, es importante tener en cuenta la proximidad existente entre los diferentes ácidos en la molécula afecta dicha selectividad y que los experimentos previos que se habían realizado con $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, se llevaron a cabo con mezclas físicas de los dos tipos de ácidos: aquellos con un sistema de conjugación y los que carecían totalmente de una región con deslocalización electrónica. Sin embargo, se logró evitar la completa esterificación de todos los ácidos carboxílicos presentes del ATA, cumpliendo así con el objetivo del trabajo.

La presencia de estos dos isómeros diesterificados no interferirá con el propósito del trabajo, ya que sin importar que los dos compuestos reaccionen, igual se podría sintetizar un polímero con un menor grado de entrecruzamiento con estos derivados del ATA. Además, es importante tener en cuenta que uno de los dos isómeros se encuentra en una proporción considerablemente mayor, por lo que en la síntesis del polímero, habría un precursor principal, permitiendo así, el desarrollo de futuros proyectos para la producción de nuevos materiales.

2.7 RECOMENDACIONES

Para el montaje de la reacción se recomienda pesar y adicionar con la mayor rapidez posible el $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, ya que es un compuesto muy higroscópico. Además, antes de adicionarlo es importante asegurarse de que ya se ha disuelto completamente el ácido *trans*-aconítico en el metanol. Por otro lado, durante el proceso de la extracción líquido-líquido se recomienda realizar los lavados de las fases acuosas que se recolectan en la primera parte, con éter, ya que este paso asegura la total recolección de los productos y el ATA que no reacciona.

En el momento de realizar la purificación por medio de cromatografía de placa delgada, se recomienda utilizar placas preparativas ya que esto puede asegurar un mayor rendimiento. Adicionalmente, es importante que la muestra esté diluida en éter para que haya una buena separación de las bandas (la del ATA sin reaccionar y los productos).

La preparación de las muestras para inyectar en el HPLC debe ser realizada justo antes de llevar a cabo el proceso debido a que el solvente que se utiliza es metanol, y en este caso, el metanol puede reaccionar con la muestra, por lo que para evitar esta posibilidad, no se recomienda almacenar las muestras por tiempos prolongados.

Por otro lado, en lo que respecta a las cantidades de reactivos utilizados, también se sugiere intentar llevar a cabo la reacción con diferentes cantidades de $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y metanol. El cloruro de níquel hexahidratado debido a que se regenera como ocurre con los catalizadores, se puede intentar adicionar en cantidades menores, y no en cantidades estequiométricas como se sugiere en la literatura reportada. Además, se recomienda intentar montar la reacción usando cuantitativamente el metanol, es decir, sin tener un exceso de este, por lo que sería necesario utilizar otras alternativas para desplazar el equilibrio de la reacción hacia los productos.

2.8 REFERENCIAS

- Allinger, N., Cava, M., De Jongh, D., Johnson, C., Lebel, N., & Stevens, C. (1984). *Química Orgánica* (Second). Barcelona: Editorial Reverté.
- Briceno, C. O., Cock, J. H., & Torres, J. S. (2001). Electric power from green harvesting residues of sugar cane in Colombia. *Int. Sugar J.*, *103*, 107–111.
- Bruice, P.-. (2008). *Química Orgánica* (5th ed.). México D.F.: Pearson Educación.
- Cao, H., Zheng, Y., Zhou, J., Wang, W., & Pandit, A. (2011). A novel hyperbranched polyester made from aconitic acid (B3) and di(ethylene glycol) (A2). *Polymer International*, *60*(4), 630–634. <https://doi.org/10.1002/pi.2993>
- Hassuani, S. J. (2001). "Sugarcane trash recovery for use in power generation". *International Society of Sugar Cane Technologists Congres*, *24.*, 192–196.
- Honig, P. (1953). *Principles of Sugar Technology*. New York: Elsevier Publishing Company.
- Javier, N., & Zapata, G. (2007). *Aconitic Acid From Sugarcane : Production and Industrial Application*. Louisiana State University and Agriculture and Mechanical College. Retrieved from http://etd.lsu.edu/docs/available/etd-11132007-235550/unrestricted/Gil_Zapata_dis.pdf
- Mane, J., Kumbhar, D. L., Barge, S. C., & Phadnis, S. . (2002). Relationship between aconitic acid content in cane cultivars and molasses from various recovery zone of Maharashtra. *Int. Sugar J.*, *104*, 177–179.
- Meyer, V. (2004). *Practical High-performance Liquid Chromatography* (4th ed.). New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.
- Meyer, V. R. (2010). *Practical High-Performance Liquid Chromatography* (5th editio). United Kingdom: John Wiley & Sons, Inc.
- Orozco, S. P. (2016). *Validación del método cromatográfico HPLC-PDA para la cuantificación de Ácido trans-Aconítico presente en la melaza proveniente de la caña de azúcar*.
- Ram, R. N., & Charles, I. (1997). Selective esterification of aliphatic nonconjugated carboxylic acids in the presence of aromatic or conjugated carboxylic acids catalysed by NiCl₂·6H₂O. *Tetrahedron*, *53*(21), 7335–7340. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(97\)00416-X](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(97)00416-X)
- Sánchez C., F. J., & Rodríguez N., G. (1995). Esterificación. *Ingeniería E*

Investigación, 87–94.

Skoog, D. A., Holler, J., & Crouch, S. R. (2008). Cromatografía de líquidos. In *Principios de Análisis Instrumental* (6 ed., p. 829). México D.F.: Cengage Learning.

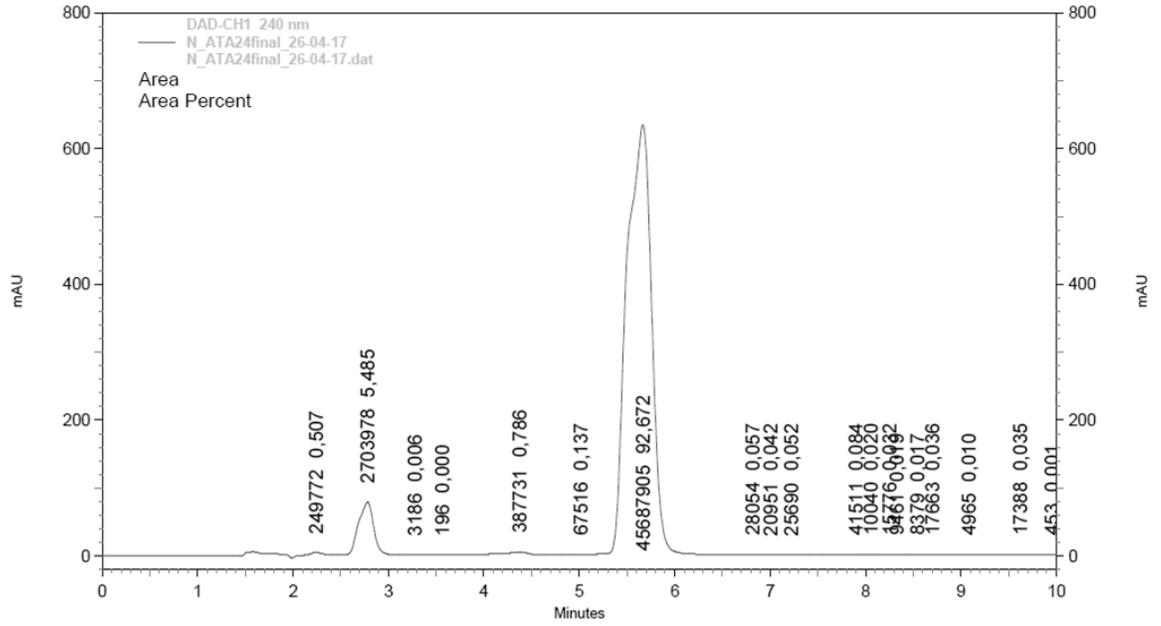
Snyder, L. R., Kirkland, J. J., & Dolan, J. W. (2010). *Introduction to Modern Liquid Chromatography* (3rd ed.). New Jersey: John Wiley & Sons, Inc. Retrieved from [https://books.google.com.co/books?hl=en&lr=&id=taurNJU0u2AC&oi=fnd&pg=PT11&dq=introduction+to+modern+liquid+chromatography&ots=yaJIVI-2AA&sig=YwAiEwH_BroblWVsF51W1J66NVc#v=onepage&q=introduction to modern liquid chromatography&f=false](https://books.google.com.co/books?hl=en&lr=&id=taurNJU0u2AC&oi=fnd&pg=PT11&dq=introduction+to+modern+liquid+chromatography&ots=yaJIVI-2AA&sig=YwAiEwH_BroblWVsF51W1J66NVc#v=onepage&q=introduction%20to%20modern%20liquid%20chromatography&f=false)

Tullo, A. H. (2005). Cutting out phthalates. *Chemical & Eng. News*, 83(46), 29–31.

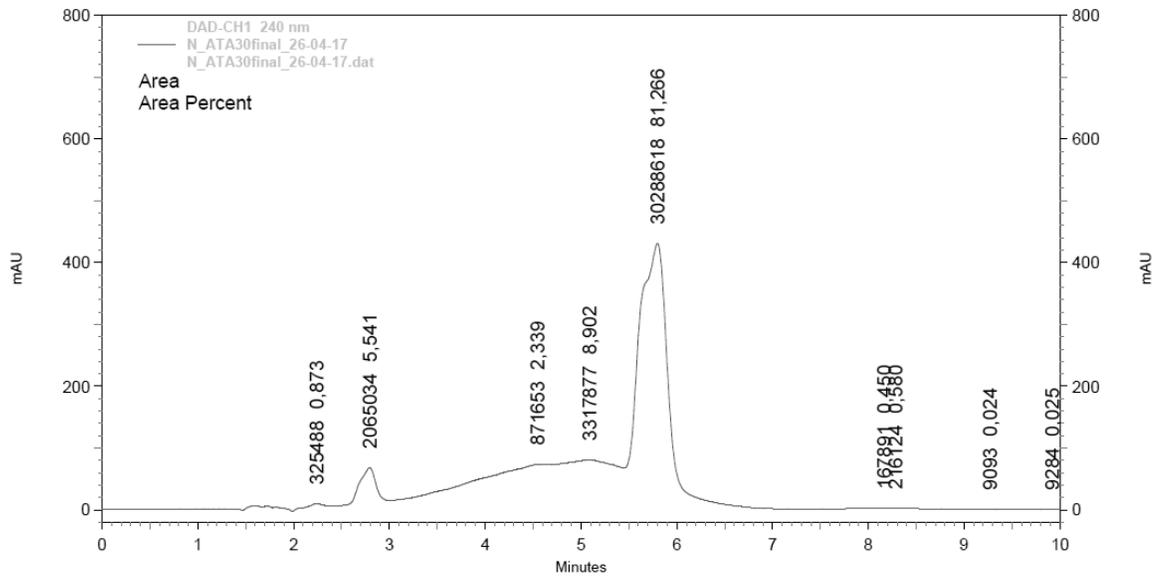
Wyrzykowski, D., Hebanowska, E., Nowak-Wicz, G., Makowski, M., & Chmurzyński, L. (2011). Thermal behaviour of citric acid and isomeric aconitic acids. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 104(2), 731–735. <https://doi.org/10.1007/s10973-010-1015-2>

ANEXOS

Anexo A. Cromatograma de muestra de la reacción a 24 horas



Anexo B. Cromatograma de muestra de la reacción a 30 horas.



Anexo C. Cromatograma de muestra de la reacción a 48 horas.

