



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

“Extracción, purificación y caracterización de compuestos
fenólicos presentes en *Vitis vinifera* (uva) y sus derivados”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Q U Í M I C O

P R E S E N T A :

ABEL SÁNCHEZ BEJARANO



MÉXICO, D.F.

2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: M. en C. José Manuel Méndez Stivalet

VOCAL: Dr. José Federico del Río Portilla

SECRETARIO: Dr. Raúl Guillermo Enríquez Habib

1er. SUPLENTE: M. en C. Blas Flores Pérez

2° SUPLENTE: M. en C. Margarita Romero Ávila

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

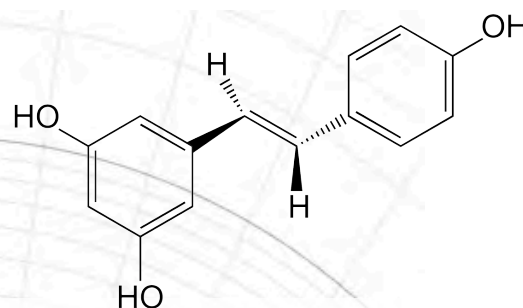
Laboratorio 1-5 del Instituto de Química, UNAM.

Asesor

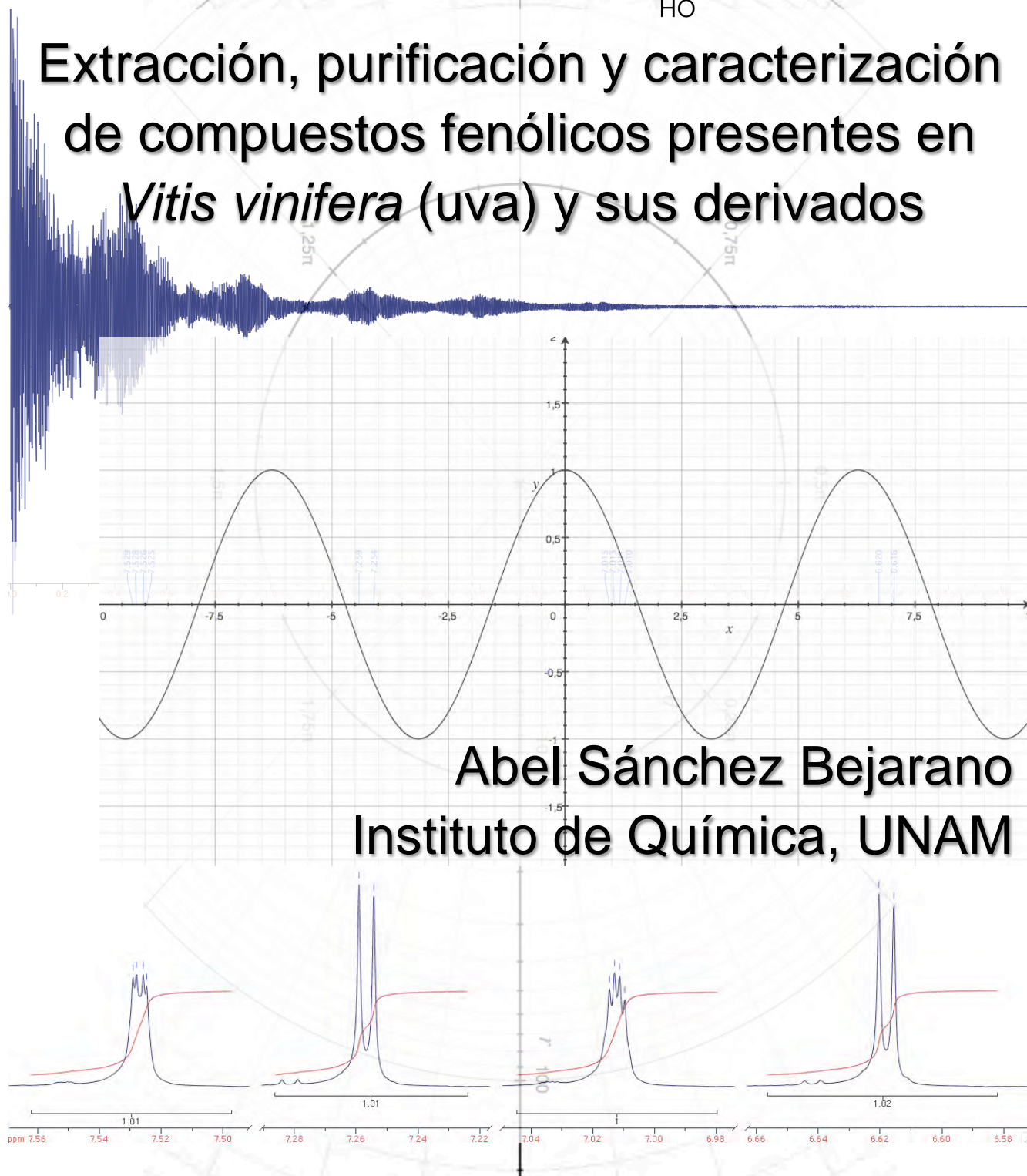
Dr. Raúl G. Enríquez Habib

Sustentante

Abel Sánchez Bejarano



Extracción, purificación y caracterización de compuestos fenólicos presentes en *Vitis vinifera* (uva) y sus derivados



Abel Sánchez Bejarano
Instituto de Química, UNAM

Y todas estas cosas se llaman sustancias porque no se predicán de un sujeto,

sino que las demás cosas se predicán de éstas

Aristóteles

Contenido

	<i>Página</i>
Capitulo I. Resumen	1
Capitulo II. Introducción	4
2.1 Generalidades	5
2.2 Antecedentes	7
2.3 Aplicaciones	10
Capitulo III. Marco teórico	15
3.1 Productos naturales	16
3.2 Polaridad	16
3.3 Técnicas analíticas de separación	19
3.3.1 Interacciones no covalentes	21
3.4 Técnicas analíticas instrumentales	22
3.4.1 Espectroscopia de ultravioleta-visible	23
3.4.2 Espectroscopia de infrarrojo	25
3.4.3 Espectrometría de masas	28
3.4.4 Espectroscopia de resonancia magnética nuclear	31
3.5 Reacción de sustitución nucleofílica en el grupo acilo	35
3.6 Reacción de oxidación de alquenos	37
Capitulo IV. Objetivos	38
4.1 Generales	39
4.2 Particulares	40

Capitulo V. Hipótesis	41
Capitulo VI. Metodología	43
6.1 Materia prima	44
6.2 Materiales	44
6.3 Reactivos	44
6.4 Equipos	45
6.5 Software	45
6.6 Extracción por maceración con disolventes orgánicos	45
6.6.1 Preparación del revelador	46
6.7 Aislamiento por cromatografía en columna	47
6.8 Purificación por cristalización	48
6.9 Reacción de acetilación de resveratrol	49
6.10 Reacción de epoxidación de resveratrol acetilado	49
6.11 Caracterización de physcion, emodina, resveratrol y sus derivados	50
6.12 Valoración de la actividad antioxidante de physcion, emodina, resveratrol y sus derivados	52
Capitulo VII. Resultados	53
7.1 Del extracto al compuesto puro	54
7.2 El acetilado	60
7.3 La epoxidación del acetilado	63
7.4 Del compuesto puro a la estructura química	66
7.4.1 Compuesto I. Physcion	67
7.4.2 Compuesto II. Emodina	75
7.4.3 Compuesto III. Resveratrol	83
7.4.4 Compuesto IV. Acetilado	92
7.4.5 Compuesto V. Epóxido	100
7.5 Actividad antioxidante	110
Capitulo VIII. Conclusiones	114
Capitulo IX. Bibliografía	118

Capitulo X. Espectros	123
10.1 Phycion	124
10.2 Emodina	133
10.3 Resveratrol	142
10.4 Resveratrol acetilado	151
10.5 Epóxido de resveratrol acetilado	160

La naturaleza hace que los hombres nos parezcamos unos a otros y nos juntemos;

la educación hace que seamos diferentes y que nos alejemos

Confucio

Abreviaturas y símbolos

A	absorbancia
AcOEt	acetato de etilo
BHA	hidroxianisol butilado
BHT	hidroxitolueno butilado
<i>d</i>	doblete
DMSO	dimetilsulfóxido
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidracil
EAcOEtVv	extracto de acetato de etilo de Vitis vinifera
EHVv	extracto de hexano de Vitis vinifera
EM	espectrometría de masas
EMeOHVv	extracto de metanol de Vitis vinifera
EtOH	etanol
HPLC	cromatografía de líquidos de alta resolución
IR	infrarrojo
<i>m</i>	multiplete
MeOH	metanol
MPCBA	ácido meta-cloroperoxibenzoico
RMN	resonancia magnética nuclear
<i>s</i>	singulete
<i>t</i>	tripleto
TBA	ácido tiobarbitúrico
TMS	tetrametilsilano
UV-visible	ultravioleta-visible
δ	desplazamiento químico
ϵ	constante de absortividad molar
λ	longitud de onda
ν	frecuencia
ν	número de onda
ϕ	benceno

Resumen

*La inteligencia consiste no sólo en el conocimiento,
sino también en la destreza de aplicar los conocimientos en la práctica*

Aristóteles

Mediante procedimientos de maceración con disolventes orgánicos se extrajeron tres importantes compuestos químicos presentes en el bagazo finamente molido de la uva (*Vitis vinifera*), v.gr: *physcion*, *emodina* y *resveratrol*. Estos metabolitos poseen actividad biológica y además, uno de ellos es un fuerte antioxidante muy conocido y utilizado en todo el mundo, el *trans-resveratrol*.

Los tres compuestos mencionados fueron aislados y purificados por medio de cromatografía en columna y cristalización. La caracterización de cada uno de estos compuestos se realizó principalmente a través de resonancia magnética nuclear de una y dos dimensiones, apoyada con otras espectroscopias, como infrarrojo, ultravioleta-visible y espectrometría de masas.

Se realizaron modificaciones estructurales a través de reacciones químicas a uno de estos compuestos, el resveratrol. Se espera que algún derivado del resveratrol pueda presentar, al menos como una de sus actividades biológicas, un mayor potencial antioxidante. Los derivados sintéticos del resveratrol obtenidos son: resveratrol acetilado y epóxido de resveratrol acetilado. Estos derivados se caracterizaron de igual forma por los métodos espectroscópicos antes mencionados.

Los compuestos obtenidos son analizados mediante dos pruebas biológicas para determinar la actividad antioxidante de cada uno de ellos, las dos pruebas utilizan como referencia a un antioxidante sintético, como el BHT y uno de origen natural, como el α -tocoferol. La primer prueba consiste en hacer reaccionar uno de los compuestos obtenidos con un radical libre (DPPH) y cuantificar la disminución de la concentración del radical libre.



La segunda prueba (TBARS) consta de inhibir la peroxidación de lípidos, donde también se hace reaccionar uno de los compuestos obtenidos con un radical libre, en este caso el radical libre se obtiene a partir de un lípido y de igual forma se cuantifica la disminución de la concentración del radical libre a través de reacciones químicas sucesivas. Ambas pruebas utilizan a la espectroscopia de ultravioleta-visible como técnica de identificación y cuantificación.

El sabio no dice nunca todo lo que piensa, pero siempre piensa todo lo que dice

Aristóteles



Introducción

La naturaleza no hace nada en vano

Aristóteles

2.1

Generalidades

El aislamiento de sustancias químicas que provienen de fuentes naturales, conocidas comúnmente como productos naturales, es tan antiguo como la humanidad misma y la identificación de la estructura química de estos compuestos está intrínsecamente relacionada con el nacimiento de la ciencia moderna de la química. La importancia de estudiar a los productos naturales es que son el resultado de miles de millones de años de evolución de la vida en nuestro planeta.

Los productos naturales poseen estructuras privilegiadas en relación a su actividad biológica frente a compuestos sintéticos similares. Mediante ensayos biológicos se ofrece una fuerte evidencia para el conocimiento adicional de la actividad de estos compuestos y en comparación con un grupo de compuestos sintéticos, la utilización de los productos naturales ya ha sido evaluada por su actividad durante la evolución.^[1]

Un producto natural se define como un compuesto químico característico de una especie, sea una planta o cualquier ser vivo, que en la mayoría de los casos, no tiene utilidad definida en el organismo que lo sintetiza, de aquí que también se le conozca como metabolito secundario. Comparado con el metabolito primario que sí es fundamental en los procesos bioquímicos del organismo.^[2]

Uno de los principales productos naturales que se comercializa en la actualidad es el resveratrol, debido a que presenta actividad antioxidante en los seres vivos.



La uva es la fuente principal de donde se obtiene este compuesto químico y se consume en todo el mundo. Otra fuerte aplicación de la uva, es en la elaboración de vino, de aquí que tenga una elevada demanda y sea de importancia económica.

Las distintas clases de uvas que se consiguen hoy en día pertenecen todas al genero *Vitis vinifera*, todas son provenientes del genero *Vitis silvestris* y han sido modificadas de manera espontánea y por el hombre en un proceso de selección, generando mas de cinco mil especies distintas. Los frutos que se obtienen del genero *Vitis silvestris* son siempre tintos, por lo tanto, los frutos que actualmente carecen de pigmentación son el resultado de mutaciones de albinismo.

La presencia del genero *Vitis* en todo el mundo se debe a la migración del ser humano durante la formación de los continentes, la expansión fue limitada por zonas montañosas con climas fríos lo que provoco la existencia del genero *Vitis viniferae* en la cuenca del Mediterráneo.

La prueba más antigua del genero *Vitis* se da con el descubrimiento de una hoja fosilizada de hace 63 millones de años en la localidad de Sézanne en el Marne, Francia. Aparece en Europa hace unos 26 millones de años en regiones moderadamente cálidas en el Macizo Central. Y hace 2 millones de años aparece el genero *Vitis viniferae silvestris* en la cuenca del mar Mediterráneo y sur del mar Caspio.

El genero *Vitis vinifera* es posible cultivarlo en casi cualquier terreno, restringido solamente por zonas climáticas frías, abarcando entre los 50° latitud norte y los 40° latitud sur a una altitud de 800 a 900 metros sobre el nivel del mar. Aunque también se ha logrado cultivar en los 1300 metros sobre el nivel del mar en un viñedo de Saint Leocadie de los Pirineos orientales.^[3]



2.2

Antecedentes

Se reporta la obtención de una antraquinona de color amarillo llamada physcion, considerada como un pigmento, aislada a partir del extracto de éter de *Aspergillus ruber*. También se reporta la capacidad de physcion para formar quelatos con átomos de hierro y se demuestra la formación de complejos entre hierro y 1,8-dihidroxiantraquinonas.

El complejo formado con hierro y physcion es soluble en cloroformo y por lo tanto podría presentar una función en el entorno lipídico de la pared celular. Además, el complejo de physcion puede tener un uso como transportador de hierro o en el metabolismo de células fúngicas.^[4]

Se reporta el aislamiento de una antraquinona nueva llamada alatinona a partir de *Cassia alata*.^[5] En ese entonces se le asigna una estructura incorrecta a tal compuesto y posteriormente fue revisada la estructura de alatinona y se llega a la conclusión de que el compuesto obtenido es realmente emodina.^[6] En 1971 se confirma la presencia de emodina en la naturaleza.^[7]

Mediante un método de cromatografía centrífuga de partición, con un sistema de disolventes hexano-acetato de etilo-etanol-agua (4:5:3:3; v/v) se aísla trans-resveratrol con rendimiento del 0,7 % y pureza del 90 %.^[8]

Las antraquinonas son un grupo de compuestos fenólicos presentes en plantas, generalmente producidas por plantas con usos medicinales, provenientes principalmente de dos importantes géneros, el *Rheum* en la familia Polygalaceae y *Rubia* en la familia Rubiaceae.^[7]



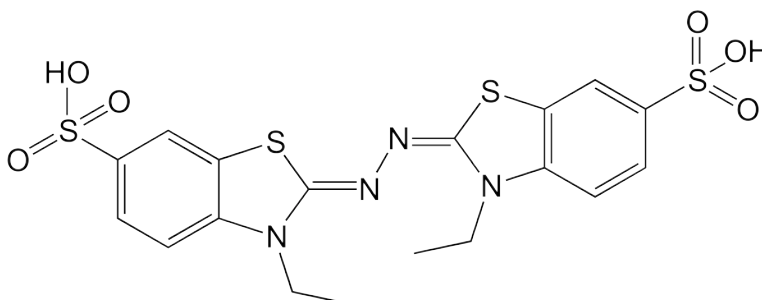
Se reporta la extracción, separación, purificación e identificación de emodina y physcion a partir de raíces de *Rheum officinale* mediante cromatografía de líquidos de alto rendimiento con arreglo de fotodiodos (HPLC-PDA), cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas (LC-MS) y por comparación con patrones de referencia auténticos.

Se obtiene un tiempo de retención y una masa, respectivamente de: 66,04 min y 270 g·mol⁻¹ para emodina y 72,23 min y 284 g·mol⁻¹ para physcion. Además, se encuentra que el contenido de emodina y physcion en la raíz de *Rheum officinale* es de 2,6 % y 0,8 %, respectivamente.

En el mismo estudio realizado a las raíces de *Rheum officinale*, se determina la actividad de eliminación de radicales libres y por ende la actividad antioxidante, de las antraquinonas obtenidas mediante el método ABTS^{·+}. En términos generales, este método consiste en hacer reaccionar una muestra con el radical libre ABTS^{·+} y cuantificar la disminución en la concentración del radical mediante espectroscopia de UV-visible.

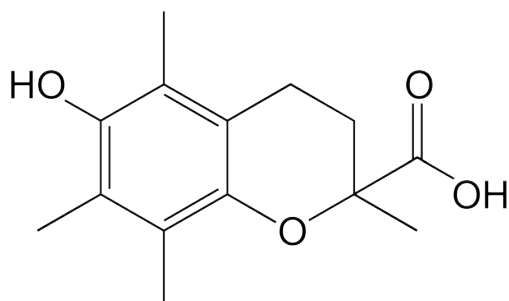
El método ABTS^{·+} usa el ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) llamado comúnmente ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)) en forma de sal de diamonio. La estructura química de ABTS se muestra en la figura 1. La sal de ABTS absorbe radiación electromagnética a una longitud de onda de 734 nm.

Figura 1. ABTS



Los resultados obtenidos por el método $ABTS^{\cdot+}$ se expresan en términos de TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity), que consiste en medir la actividad antioxidante de una sustancia dada y compararla con la de un estándar de Trolox. Trolox es el nombre común para el ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico, es un antioxidante derivado de la vitamina E y su estructura química se muestra en la figura 2.

Figura 2. Trolox



El resultado obtenido para emodina y physcion es que tienen valores bajos de TEAC: 0,172 mM y 0,171 mM, respectivamente. Por lo tanto, resulta que no tengan buena actividad de eliminación de radicales y por lo tanto una mala actividad antioxidante. Con el análisis hecho a la raíz de *Rheum officinale* se demuestra que para tener actividad de eliminación de radicales libres es necesaria la presencia de grupos hidróxido en uno solo de los anillos de benceno de la estructura de la antraquinona, la presencia de dos grupos hidróxido en posiciones *orto* en la molécula de la hidroxiantraquinona puede mejorar el efecto de eliminación de radicales y la glicosilación de las hidroxiantraquinonas reduce la actividad.^[9]

Se reporta que emodina muestra pobre actividad en el ensayo de $ABTS^{\cdot+}$ y también en el ensayo de DPPH, lo cual es relacionado directamente a su estructura química, es decir, a la presencia de grupos hidróxido en ambos anillos aromáticos y un sustituyente metilo, todos en posiciones *meta*.^[10, 11]

Se reporta la extracción y aislamiento de emodina y physcion a partir del extracto de cloroformo de semillas de *Cassia tora* usando técnicas de cromatografía en columna, con un rendimiento menor al 0,1 % para cada compuesto.



En el mismo estudio se reporta la determinación estructural fue hecha por comparación con patrones de referencia auténticos y aplicando métodos espectroscópicos como resonancia magnética nuclear (RMN) y espectroscopia de masas (EM). En el mismo estudio, se realizan pruebas de microbiología para determinar la actividad fungicida *in vivo*, resultando ser emodina y physcion potentes agentes fungicidas contra *Botrytis cinerea*, *Erysiphe graminis*, *Phytophthora infestans* y *Rhizoctonia solani*. Los compuestos muestran de fuerte a moderada actividad en concentraciones de $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, $0,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ y $0,25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$.

El valor de concentración letal que se espera produzca la muerte del 50 % de los organismos (LC_{50}) también se calcula para los compuestos obtenidos de las semillas de *Cassia tora*. Para emodina son: $0,102 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, $0,163 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, $0,385 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ y $0,046 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ contra *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea*, *Phytophthora infestans* y *Erysiphe graminis*, respectivamente. Y para physcion son: $0,248 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, $0,263 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, $0,518 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ y $0,073 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ contra *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea*, *Phytophthora infestans* y *Erysiphe graminis*, respectivamente.^[12]

Se reporta la extracción de physcion a partir de *Rheum emodi* y además se demuestra que exhibe actividad fungicida contra *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Trichophyton mentagrophytes* y *Aspergillus fumigatus*.^[13]

2.3

Aplicaciones

Los polifenoles ejercen un efecto benéfico para la salud humana y particularmente contra las enfermedades del corazón. Varios estudios realizados *in vitro* con extractos crudos de polifenoles mostraron importantes propiedades biológicas tales como: actividades de vasodilatación dependientes del endotelio, inhibición de la oxidación de lipoproteínas de baja densidad, actividades anticancerígenas y antiagregación plaquetaria.^[14, 15, 16, 17, 18]



El resveratrol posee importantes propiedades biológicas, recientes estudios han demostrado efectos protectores al corazón y propiedades preventivas de quimioterapia para el tratamiento contra el cáncer.^[19, 20, 21]

Las raíces de *Rheum officinale* han sido usadas como una importante medicina tradicional China durante varios siglos y también son usadas en la elaboración de medicamentos a base de hierbas en Japón y Corea.^[10, 22]

Los componentes activos mayoritarios en la raíz de *Rheum officinale* son hidroxiantraquinonas y sus derivados. Poseen efectos bactericidas, antiinflamatorios, antivirales y contra el cáncer. Tradicionalmente se usa la raíz para remedios contra enfermedades del sistema digestivo, como estreñimiento, disentería, gastritis, enteritis, úlcera gástrica y hepatitis. También es usada para el tratamiento de varios tipos de hemorragias y traumas, además ha sido empleada en el tratamiento y prevención de algunas enfermedades crónicas como aterosclerosis y diabetes.^[23, 24]

La dificultad para definir la significancia ecológica de fungicidas sintéticos ha sido una buena razón para suponer que los metabolitos secundarios de plantas han evolucionado para proteger a las plantas contra los ataques por patógenos microbianos.^[25]

El extracto de semillas de *Cassia tora* exhibe potente actividad fungicida contra *Pyricularia grisea*, *Botrytis cinerea*, *Phytophthora infestans* y *Erysiphe graminis*. *Cassia tora* no es la única especie importante como fuente de fungicidas naturales pero también es considerada importante por sus propiedades medicinales como antiséptico, antidiarreico, antioxidante, antimicrobiano y antimutágeno.^[26, 27, 28, 29] Las semillas de *Cassia tora* han sido usadas extensamente para el tratamiento de ojos rojos y lagrimeo, dolor de cabeza y mareos.^[30]

Los antioxidantes sintéticos como el hidroxianisol butilado (BHA) y el hidroxitolueno butilado (BHT), han sido usados ampliamente como antioxidantes para alimentos y se han reportado como cancerígenos, por lo que se han usado con menor frecuencia a pesar de tener elevada actividad antioxidante.



El antioxidante BHA es una mezcla de dos isómeros, el 2-(*ter*-butil)-4-metoxifenol y el 3-(*ter*-butil)-4-metoxifenol (figura 3), ha sido probado en ratas y se ha demostrado que produce células cancerígenas en el estomago del animal, además el aumento del cáncer depende del incremento en la concentración del antioxidante. Concentraciones grandes de BHA y BHT causan significativamente el crecimiento del hígado y además, el BHT incrementa la actividad de la enzima hepática microsomal. La estructura química del BHT (2,6-di-*ter*-butil-4-metilfenol) se muestra en la figura 4.^[31, 32, 33]

Figura 3. BHA

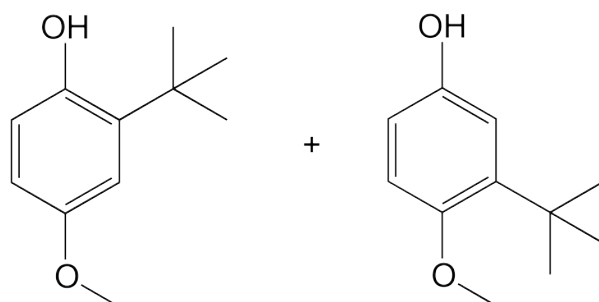
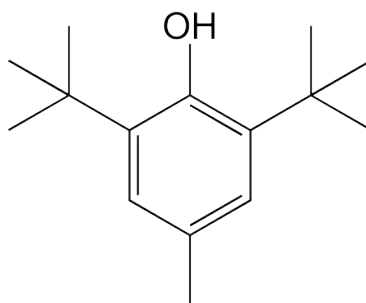


Figura 4. BHT

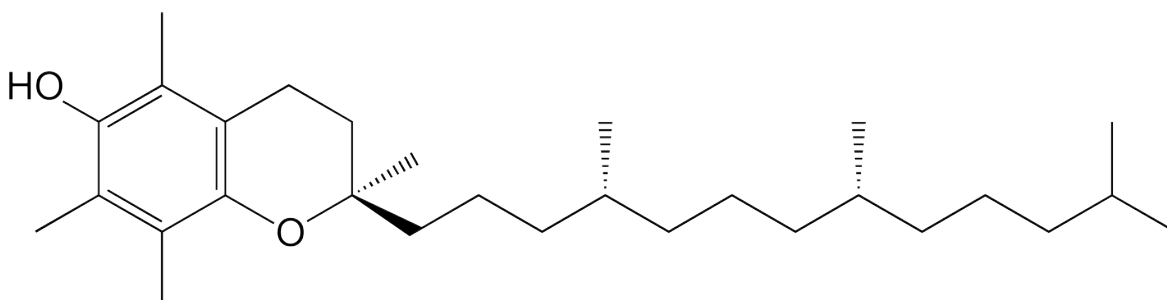


Antioxidantes naturales como el tocoferol son alternativas usadas frecuentemente consideradas como seguras y que presentan menos reacciones adversas. En general el tocoferol presenta menor actividad antioxidante que antioxidantes sintéticos como el BHA y el BHT.^[34]



El α -tocoferol, un antioxidante natural, es un antioxidante efectivo para alimentos que contienen lípidos pero su uso es limitado. Además, se conoce bien su efecto contra radicales provenientes del oxígeno causantes de la peroxidación de lípidos.^[35, 36] El α -tocoferol (figura 5) se ha reportado que presenta menor actividad antioxidante que el BHA.

Figura 5. α -tocoferol



La adición de antioxidantes a alimentos es uno de los métodos mas efectivos para retardar la oxidación de lípidos. Esto se ha vuelto popular para aumentar la vida de anaquel de productos alimenticios logrando mejorar la estabilidad de lípidos y de los alimentos que los contienen. Así se previene la perdida de la calidad sensorial y nutricional.^[37]

La peroxidación de lípidos en grasas y alimentos grasos no solo provoca el deterioro químico, también produce radicales libres u oxígenos activos que están asociados supuestamente con efectos de cáncer, mutaciones y envejecimiento.^[38]

La aplicación mas conocida para una reacción de acetilación o acilación se da en la aspirina, o ácido acetilsalicílico, cuyo uso se remonta a finales de 1800. Desde antes del tiempo de Hipócrates en el año 400 dC se sabia que la fiebre puede disminuirse masticando la corteza de los árboles de sauce. El agente activo en la corteza del sauce descubierto en 1827, es un compuesto aromático llamado salicina, la cual puede convertirse por la reacción con agua en alcohol salicílico y oxidarse para dar ácido salicílico.



El ácido salicílico resulta ser aún mas efectivo que la salicina para reducir la fiebre y tiene acción analgésica y antiinflamatoria. Desafortunadamente, también resulta ser mas nocivo para las paredes del estomago si se toma diariamente. Sin embargo, la conversión del grupo fenólico a un éster acético produce ácido acetilsalicílico, el cual es tan potente como el ácido salicílico, pero es menos agresivo con el estomago.

La aplicación mas conocida para un epóxido es en resinas y adhesivos epóxicos. Las resinas y los adhesivos epóxicos consisten por lo general en dos componentes que se mezclan antes de usarlo. Un componente es un prepolímero líquido y el otro es un agente de endurecimiento que reacciona con el prepolímero y hace que se solidifique. Las resinas y los adhesivos epóxicos mas ampliamente utilizados se basan en un prepolímero preparado a partir del bisfenol A y de la epiclorohidrina (un epóxido). En el momento en que se va a usar el epóxido, se añade un agente de endurecimiento básico como una amina terciaria, para ocasionar que las cadenas individuales del prepolímero se unan entre sí, involucrando la apertura del anillo del epóxido catalizada por base. El resultado de la polimerización y de la reacción de apertura del epóxido es un polímero inmenso que posee una enorme fuerza y resistencia química.^[39]

Nuestro carácter es el resultado de nuestra conducta

Aristóteles



Marco teórico

Estudia el pasado si quieres pronosticar el futuro

Confucio

3.1

Productos naturales

Los productos naturales siempre han sido uno de los objetos más fascinantes de la química práctica. De hecho, en muchas definiciones de la química, el aislamiento, purificación y elucidación estructural de productos naturales juega un papel central. La historia de este arte se desarrolló gradualmente desde el comienzo de la química, pasando por las mediciones físicas y finalmente a las técnicas espectroscópicas recientes. Otra fuerza impulsora de la química de productos naturales era y es hacer uso de sus propiedades, por ejemplo, en la medicina. Los productos naturales tienen "estructuras privilegiadas" con respecto a su actividad biológica. En ensayos biológicos ellos a menudo ofrecen una ventaja estructural para el desarrollo adicional o futuro de nuevos compuestos, en comparación con un grupo de compuestos puramente sintéticos. Y a todo esto se suma un hecho muy importante, el cual es que ya han sido evaluados por su actividad en la naturaleza durante la evolución.^[1]

3.2

Polaridad

La polaridad de un enlace se considera como la distribución de los electrones en los enlaces covalentes y algunas de las consecuencias que surgen cuando en un enlace los electrones no están compartidos equitativamente.



El continuo en el enlace a partir de covalente a iónico es el resultado de una distribución inequitativa de los electrones de enlace entre átomos. La carga parcial positiva (δ^+) representa al átomo pobre en electrones y negativa (δ^-) al átomo rico en electrones.

El enlace en el cloruro de sodio es iónico, porque el sodio transfiere un electrón al cloro para formar iones Na^+ y Cl^- , los cuales se mantienen juntos en el sólido a través de atracciones electrostáticas. El enlace C-C en el etano es covalente, los dos átomos de carbono comparten por igual los dos electrones del enlace, lo que resulta de una distribución electrónica simétrica en el enlace; sin embargo, la mayor parte de los enlaces, ni son totalmente iónicos ni totalmente covalentes, sino que están entre los dos extremos; a los electrones compartidos se les conoce como enlaces covalentes polares, lo que significa que los electrones de enlace son más fuertemente atraídos por un átomo que por el otro, lo que lleva a que la distribución electrónica entre los átomos sea asimétrica.

La polaridad del enlace es debida a las diferencias en la electronegatividad (EN), la habilidad intrínseca de un átomo para atraer a los electrones compartidos en un enlace covalente.

Los enlaces entre el carbono y los elementos más electronegativos, tales como el oxígeno y el nitrógeno están polarizados, por lo que los electrones del enlace se apartan del carbono y van hacia el átomo electronegativo. Esto deja al carbono con una carga parcial positiva, representada por δ^+ , y al átomo electronegativo con una carga parcial negativa, δ^- . Los enlaces entre el carbono y los elementos menos electronegativos están polarizados, por lo que el carbono porta una carga parcial negativa y el otro átomo porta una carga parcial positiva.

Como regla general, los enlaces entre átomos cuyas electronegatividades difieren por menos de 0.5 son covalentes no polares, los enlaces entre átomos cuyas electronegatividades difieren entre 0.5 a 2 son covalentes polares y los enlaces entre átomos cuyas electronegatividades difieren en más de 2 son iónicos en gran medida.



Cuando hablamos de la capacidad de un átomo para polarizar un enlace, por lo regular utilizamos el término efecto inductivo y un efecto inductivo simplemente es el desplazamiento de electrones en un enlace σ como respuesta a la electronegatividad de los átomos cercanos. Los metales, como el litio y el magnesio donan electrones inductivamente, mientras que los no metales reactivos, como el oxígeno y el nitrógeno, retiran electrones inductivamente.

Como los enlaces individuales con frecuencia son polares, también lo son las moléculas en su conjunto. La polaridad molecular resulta a partir de la suma vectorial de todas las polaridades de los enlaces individuales y el aporte de pares de electrones no enlazados en la molécula.

La polaridad molecular neta se mide por una cantidad denominada momento dipolar y puede concebirse como sigue: un centro de masa de todas las cargas positivas (núcleos), en una molécula y un centro de masa de todas las cargas negativas (electrones), si estos dos centros no coinciden, entonces la molécula tiene una polaridad neta.

El momento dipolar, μ , se define como la magnitud de la carga Q en cualquier extremo del dipolo molecular, multiplicada por la distancia r entre las cargas.

Ecuación 1

$$\mu = Qr$$

Los pares de electrones no enlazados en el átomo de oxígeno y en el átomo de nitrógeno sobresalen en el espacio alejándose de los núcleos con carga positiva, llevando a una separación considerable de cargas y haciendo una gran contribución dipolar. Un compuesto con momento dipolar elevado se considera como polar y uno con momento dipolar bajo se considera no polar.^[39]



3.3

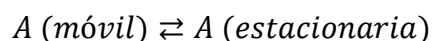
Técnicas analíticas de separación

La mayoría de los análisis en química se relaciona con especies extrañas que pueden atenuar la señal del analito o producir una que no se distinga de la que produce el analito. Una sustancia que afecta una señal analítica se dice que es una interferencia o un interferente.

La cromatografía es un método muy empleado para la separación, identificación y determinación de los componentes químicos de mezclas complejas. Es difícil definir con rigor el término "cromatografía" porque el concepto se aplica a una gran variedad de sistemas y técnicas. Sin embargo, todos estos métodos tienen en común el empleo de una fase estacionaria y una fase móvil. Los componentes de una mezcla se pasan a través de una fase estacionaria mediante el flujo de una fase móvil y las separaciones están basadas en las diferencias en la velocidad de migración entre los componentes de la fase móvil.

Los métodos cromatográficos son de dos tipos fundamentales. En la cromatografía en columna la fase estacionaria se mantiene dentro de un tubo angosto y la fase móvil se hace pasar por el tubo, con presión o por gravedad. En la cromatografía en capa fina la fase estacionaria está sujeta por una placa plana o en los poros de un papel. En este caso la fase móvil se mueve a través de la fase estacionaria por acción capilar o por la influencia de la gravedad.

Todas las separaciones cromatográficas se basan en las diferencias de la cantidad de la distribución del soluto entre la fase móvil y la fase estacionaria. Para la especie A de un soluto, el equilibrio implicado es el siguiente:



La constante de equilibrio K_c , para este equilibrio, se denomina constante de distribución, que se define como:

Ecuación 2

$$K_c = \frac{[A]_E}{[A]_M} = \frac{C_E}{C_M}$$

En donde los términos entre corchetes son las actividades del soluto A en las dos fases. A dilución infinita se puede sustituir por C_E , la concentración molar del soluto en la fase estacionaria y C_M , su concentración analítica molar en la fase móvil. De manera ideal, la constante de distribución es constante en un intervalo amplio de concentraciones de soluto, es decir, C_E es directamente proporcional a C_M .

A la relación de la distancia que recorre una sustancia en una placa de cromatografía en capa fina y la distancia que recorre el eluyente a partir del punto de aplicación se le conoce como frente de referencia, R_f , y se expresa como una fracción decimal. El valor del frente de referencia es de gran utilidad cuando se desea seleccionar el eluyente adecuado en una separación de compuestos, por lo que podemos decir que para los siguientes valores de R_f la información que obtendremos es:

- ✓ $R_f < 0.5$ el eluyente es de baja polaridad para la separación.
- ✓ $R_f = 0.5$ el eluyente es el ideal para la separación.
- ✓ $R_f > 0.5$ es de alta polaridad para la separación.

Existen diferentes clases de interacciones intermoleculares que originan que los compuestos orgánicos se unan a la superficie del adsorbente con mayor o menor fuerza, dependiendo de la naturaleza polar o no polar de los compuestos. Los compuestos no polares interactúan con debilidad con el adsorbente por medio de fuerzas de van der Waals, mientras que las interacciones más fuertes se manifiestan en compuestos polares que van desde fuerzas del tipo dipolo-dipolo hasta interacciones más directas como formación de sales, enlace de coordinación o puentes de hidrógeno.^[40, 41]



3.3.1

Interacciones no covalentes

La reactividad química enfoca principalmente la atención en los enlaces, interacciones covalentes entre los átomos dentro de moléculas individuales; sin embargo, también son importantes una variedad de interacciones entre moléculas que afectan en forma intensa las propiedades moleculares. En forma colectiva se llaman fuerzas intermoleculares, fuerzas de van der Waals o interacciones no covalentes, también son de varios tipos diferentes: fuerzas dipolo-dipolo, fuerzas de dispersión y enlaces por puente de hidrógeno.

Las fuerzas dipolo-dipolo ocurren entre moléculas polares como resultado de interacciones electrostáticas entre dipolos. Las fuerzas pueden ser atractivas o repulsivas, dependiendo de la orientación de las moléculas: atractivas cuando están juntas cargas distintas y repulsivas cuando están juntas cargas iguales. La geometría atractiva es de menor energía y por tanto predominante.

Las fuerzas de dispersión ocurren entre todas las moléculas vecinas y surgen porque la distribución electrónica dentro de las moléculas está cambiando constantemente, y aunque uniforme en una base de tiempo promedio, la distribución electrónica aun en las moléculas no polares tiende a ser no uniforme en cualquier instante. Un lado de la molécula puede tener, por casualidad, un ligero exceso de electrones en relación con el lado opuesto, dando a la molécula un dipolo temporal; este dipolo temporal en una molécula ocasiona que una molécula cercana adopte un dipolo temporal opuesto, con el resultado de que se induce una pequeña atracción entre las dos. Los dipolos temporales moleculares tienen sólo una existencia fugaz y están en constante cambio, pero sus efectos acumulativos son con frecuencia lo suficientemente fuertes como para causar que una sustancia sea líquida o sólida en lugar de gaseosa.



El enlace por puente de hidrógeno, es una interacción atractiva entre un átomo de hidrógeno enlazado a un átomo de oxígeno o de nitrógeno electronegativo y un par de electrones sin compartir en otro átomo de oxígeno o de nitrógeno. En esencia, un enlace por puente de hidrógeno es una interacción dipolo-dipolo fuerte que involucra enlaces polarizados O-H y N-H.^[39]

3.4

Técnicas analíticas instrumentales

La espectroscopia es la ciencia que estudia las interacciones que suceden entre la radiación y la materia. Los métodos de análisis en química que emplean a la luz y otras formas de radiación electromagnética son los que más se utilizan en la química analítica.

Los métodos espectroscópicos de análisis miden la cantidad de radiación producida o absorbida por las especies atómicas o moleculares que se analizan. Estos métodos también se clasifican de acuerdo con la región del espectro electromagnético que se utiliza para hacer la medición. Estas regiones incluyen los rayos γ , X, ultravioleta (UV), visible, infrarrojo (IR), las microondas y radiofrecuencias (RF). Además de la radiación electromagnética, la espectroscopia también incluye técnicas de espectroscopia acústica, de masa y electrónica.

La espectroscopia ha jugado un papel fundamental en el desarrollo de la teoría atómica moderna. Los métodos espectroscópicos también han aportado las herramientas que, posiblemente, son las que más se utilizan para elucidar estructuras moleculares, así como para identificar y obtener la composición cuantitativa y cualitativa de sustancias orgánicas e inorgánicas.^[40]



3.4.1

Espectroscopia de ultravioleta-visible

Los métodos espectroscópicos de absorción hacen uso de la absorción de radiación electromagnética que exhibe una molécula o material a una frecuencia característica correspondiente a la energía de transición existente entre diferentes niveles de energía vibracional o electrónica. La intensidad está relacionada con la probabilidad de que la transición ocurra.

La espectroscopia de ultravioleta-visible (espectroscopia UV-visible) consiste en la observación de la absorción de radiación electromagnética en las regiones del visible y el ultravioleta (UV) del espectro. En ocasiones se le conoce como espectroscopia electrónica porque la energía se utiliza para excitar especies a niveles de energía electrónica más altos.

La muestra suele encontrarse en disolución, pero también puede tratarse de un gas; en cualquier caso, está contenida en una celda construida con un material ópticamente inactivo como el vidrio o, para examinar espectros UV a longitudes de onda por debajo de 320 nm, cuarzo (SiO_2). La celda se coloca frente al haz de una fuente luminosa y la transmisión óptica se mide con un detector. Por lo general, el haz de luz incidente se divide en dos: una parte del haz pasa a través de la muestra y la otra a través de otra celda que es idéntica, excepto que la muestra se encuentra ausente (blanco). Los haces de la muestra y el de referencia se comparan en el detector (un fotodiodo).

Los espectrómetros convencionales barren la longitud de onda del haz incidente cambiando el ángulo de una rejilla de difracción, si bien ahora es más común registrar el espectro completo de una sola vez mediante el uso de un detector de arreglo de diodos. La absorbancia, A , de una muestra se define como:



Ecuación 3

$$A = \log\left(\frac{I_0}{I}\right)$$

Donde I_0 es la intensidad incidente e I la intensidad medida después de pasar a través de la muestra. El detector es el factor delimitante para especies que absorben fuertemente porque la medición de un flujo de fotones bajo no es confiable. La ley de Lambert-Beer empírica se usa para relacionar la absorbancia con la concentración molar C_i de la especie absorbente i y la longitud de la trayectoria óptica b (longitud o espesor de la celda).

Ecuación 4

$$A = \varepsilon C_i b$$

En ésta ecuación, ε es la constante de absortividad molar (aún conocido como coeficiente de extinción). Los valores de ε comprenden desde por arriba de los $10^5 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ para transiciones totalmente permitidas hasta menos de $1 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ para transiciones prohibidas; en este último caso, las especies absorbentes pueden ser difíciles de observar, a menos de que la concentración o la longitud de la trayectoria se incrementen.

El hecho de que átomos y moléculas posean una serie discreta de niveles de energía es una característica esencial de todas las espectroscopias. Si todas las moléculas tuvieran un espectro continuo de energía, sería imposible distinguir las sobre la base de sus espectros de absorción. Sin embargo, no todas las transiciones entre estados elegidos arbitrariamente tienen lugar. Las reglas de selección nos dicen qué transiciones se observarán experimentalmente.^[42, 43]



3.4.2

Espectroscopia de infrarrojo

La espectroscopia vibracional se usa tanto para caracterizar compuestos en términos de la fuerza y la cantidad de enlaces que se encuentran presentes, como para detectar la presencia de compuestos conocidos (huella digital), para monitorear cambios en la concentración de especies durante una reacción, para determinar los componentes de un compuesto desconocido, para establecer la probable estructura de un compuesto y para medir propiedades de enlaces (constantes de fuerza).

Un enlace en una molécula se comporta como un resorte: al extenderlo a lo largo de la distancia x produce una fuerza de restauración F . Para pequeños desplazamientos, la fuerza de restauración es proporcional al desplazamiento:

Ecuación 5

$$F = -kx$$

Donde k es la constante de fuerza del enlace: cuanto más rígido es el enlace, mayor es la constante de fuerza. Un sistema así se conoce como oscilador armónico y la solución de la ecuación de Schrödinger proporciona las energías para cada estado vibracional:

Ecuación 6

$$E_n = \left(n + \frac{1}{2}\right) \hbar\omega \quad n = 0, 1, 2, \dots$$

Donde:

Ecuación 7

$$\hbar = \frac{h}{2\pi}$$



Ecuación 8

$$\omega = \left(\frac{k}{M}\right)^{1/2}$$

Donde n es el número cuántico vibracional, ω es la frecuencia angular, h es la constante de Planck ($0.66262 \cdot 10^{-33}$ J·s) y M es la masa efectiva o reducida del oscilador. Para una molécula diatómica compuesta de átomos de masas m_A y m_B :

Ecuación 9

$$M = \frac{m_A \cdot m_B}{m_A + m_B}$$

Si $m_A \gg m_B$, entonces $M = m_B$ y sólo el átomo B se mueve de manera apreciable durante la vibración: en este caso, los niveles de energía vibracional son determinados en gran medida por m_B , la masa del átomo más ligero. Por ende, la frecuencia angular ω será alta cuando la constante de fuerza sea grande (un enlace rígido) y la masa del oscilador será baja (sólo los átomos ligeros se mueven durante la vibración). Las energías vibracionales por lo general se expresan en términos del número de onda ν , que es igual al inverso de la longitud de onda λ :

Ecuación 10

$$\nu = \frac{\omega}{2\pi c}$$

Donde c es la velocidad de la luz ($2.997925 \cdot 10^8$ m·s⁻¹). La relación entre la frecuencia angular ω y la frecuencia vibracional ν es:

Ecuación 11

$$\nu = \frac{1}{2\pi} \omega$$

Recordando que la relación entre la longitud de onda λ y la frecuencia vibracional ν es una constante.



$$c = \lambda\nu$$

Los valores típicos de ν se ubican en el intervalo de los 300 cm^{-1} a los 3800 cm^{-1} . Una molécula que consta de N átomos puede vibrar de $3N-6$ formas distintas si es no lineal, y de $3N-5$ formas diferentes si es lineal. Estas diversas vibraciones se llaman modos normales. Los modos de flexión suelen presentarse a frecuencias mas bajas que los modos de alargamiento y dependen de las masas de los átomos en una forma compleja que refleja hasta dónde se pueden mover los diferentes átomos en cada modo. Los modos se indican como n_1, n_2, \dots , y en ocasiones reciben nombres evocadores, como estiramiento simétrico y asimétrico. Sólo los modos normales que corresponden a un momento dipolar eléctrico cambiante pueden interactuar con la radiación infrarroja, de manera que únicamente esos modos son activos en la producción de un espectro de infrarrojo (IR).

El campo eléctrico actúa sobre un momento dipolar de la molécula que puede ser de dos tipos: permanente y dinámico. Las moléculas polares tienen un momento dipolar permanente. Conforme las moléculas vibran, se puede generar un momento dipolar dinámico adicional inducido. La magnitud del momento dipolar depende de la longitud de enlace y del grado en el que la carga se transfiere de un átomo a otro.

A su vez, la transferencia de carga depende del solapamiento de las densidades electrónicas de los dos átomos y por lo tanto, sensible a la distancia internuclear. Conforme la molécula vibra, su momento dipolar cambia, generándose un momento dipolar dinámico. Debido a que la amplitud vibracional es una pequeña fracción de la distancia de enlace, el momento dipolar dinámico es generalmente pequeño comparado con el momento dipolar permanente.

El momento dipolar dinámico más que el permanente es el que determina si una molécula absorbe energía en la parte infrarroja del espectro.



En la espectroscopia de infrarrojo (espectroscopia IR), el espectro vibracional de un compuesto se obtiene al exponer la muestra a la radiación infrarroja registrando la variación de la transmisión con la frecuencia. En los primeros espectrómetros se medía la transmisión a medida que la frecuencia se barría entre dos límites. Ahora el espectro se obtiene de un interferograma por medio de una transformada de Fourier, que convierte la información de dominio del tiempo (con base en la interferencia de ondas que viajan a lo largo de las trayectorias de distintas longitudes) al dominio de la frecuencia. La muestra debe estar contenida en un material que no absorba radiación infrarroja, lo cual significa que no puede utilizarse vidrio, y las disoluciones acuosas son inadecuadas, a menos que las bandas espectrales de interés se presenten a frecuencias no absorbidas por el agua. Las ventanas ópticas suelen construirse de CsI; por su parte, los procedimientos tradicionales de preparación de muestras en pastillas de KBr o en suspensión de parafina han sido reemplazados en gran medida por dispositivos de reflectancia en los cuales la muestra simplemente se coloca en posición.^[42, 43]

3.4.3

Espectrometría de masas

Las técnicas de ionización miden las energías de productos, electrones o fragmentos moleculares generados cuando una muestra es ionizada mediante el bombardeo con radiación o partículas de alta energía.

La espectrometría de masas (EM) es una técnica que permite determinar la masa de una molécula y de sus fragmentos. La EM mide la relación masa/carga (m/z) de los iones gaseosos. Los iones pueden tener carga positiva o negativa, y resulta normalmente trivial inferir la carga real en un ion y por lo tanto, la masa de una especie.



La exactitud en la medición de la masa de los iones varía de acuerdo con el uso que se haga del espectrómetro. Si todo lo que se requiere es una medición poco refinada de la masa para una molécula (por ejemplo dentro de $m/z \pm 1$), la resolución del espectrómetro de masas sólo necesita ser del orden de una parte en 10^4 .

En contraste, para determinar la masa de los átomos individuales de modo que pueda determinarse el defecto de masa, la exactitud debe aproximarse a una parte en 10^{10} . Con un espectrómetro de masas de esta resolución, las moléculas con la misma masa nominal como $^{12}\text{C}^{16}\text{O}$ ($m/z = 27.9949$) pueden distinguirse de las de $^{14}\text{N}_2$ ($m/z = 28.0061$) y la composición elemental e isotópica de los iones de masa nominal menor a $m/z = 1000$ puede determinarse sin ambigüedades.

La principal dificultad técnica con la espectrometría de masas es convertir una muestra (a menudo líquida o sólida y normalmente sin carga) en iones gaseosos. Por lo general, se utiliza menos de un miligramo del compuesto. Se han desarrollado muchos sistemas experimentales diferentes para producir iones en fase gaseosa, todos ellos tendientes a fragmentar al compuesto de interés. La ionización por impacto electrónico (IE) se lleva a cabo a partir del bombardeo de una muestra con electrones de alta energía, lo que origina tanto su vaporización como su ionización; la desventaja radica en que IE tiende a inducir una considerable descomposición de las moléculas más grandes.

El bombardeo por átomos rápidos (FAB) es similar a IE, pero el bombardeo de la muestra con átomos neutros rápidos es ahora lo que se usa para volatilizar y conseguir la ionización de la muestra; induce menos fragmentación que IE. La desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI) es similar a IE, pero se usa un pulso de láser corto con el mismo efecto; esta técnica es en particular efectiva para muestras de polímeros. En la ionización por electroespray (ESI) se rocían en una cámara de vacío gotitas cargadas de disolución donde la evaporación de disolventes da como resultado la generación de iones individualmente cargados; la espectrometría de masas ESI a menudo es el método de elección para compuestos iónicos en disolución.



El método tradicional para la separación de los iones se basa en la aceleración de éstos con un campo eléctrico para deflecciónlos posteriormente con un campo magnético mientras se encuentran en movimiento; los iones con una relación de masa/carga más baja se deflecan más que los iones más pesados; por consiguiente, el barrido a través de un campo magnético permite detectar iones de diferente relación masa/carga.

En el espectrómetro de masas de tiempo de vuelo (TOF), los iones de una muestra son acelerados por un campo eléctrico durante un tiempo fijo y luego se les permite volar con libertad. Como la fuerza en todos los iones de la misma carga es igual, los iones más ligeros se acelerarán a velocidades más altas que los iones más pesados y harán contacto más rápidamente con el detector.

En un espectrómetro de masas de resonancia ciclotrónica de iones (ICR), a menudo denotado como FTICR, debido a la transformada de Fourier, los iones se recolectan en una pequeña celda ciclotrónica dentro de un campo magnético fuerte, circulan alrededor del campo magnético y se comportan como una corriente eléctrica. Como una corriente acelerada genera radiación electromagnética, la señal producida por los iones puede detectarse y ser utilizada para establecer la relación masa/carga de los iones en movimiento.

Además de indicar la masa de la molécula (y en consecuencia su masa molar) o de un ion bajo estudio, el espectro de masas también proporciona información acerca de las rutas o patrones de fragmentación de las moléculas, esta información puede utilizarse para confirmar asignaciones estructurales.^[42, 43]



3.4.4

Espectroscopia de resonancia magnética nuclear

La resonancia magnética nuclear (RMN) es el método espectroscópico más eficiente y utilizado para determinar estructuras moleculares en disolución y en líquidos puros. En muchos casos proporciona información acerca de la forma y simetría con mayor certidumbre de la que es posible con otras técnicas espectroscópicas, como la espectroscopia IR. Asimismo, puede utilizarse para seguir reacciones, en muchos casos proporcionando detalles mecanísticos. Sin embargo, a diferencia de la difracción de rayos X, la mayoría de los estudios de RMN de moléculas en disolución no pueden proporcionar una distancia de enlace detallada ni información acerca de los ángulos, con excepción del experimento NOE que sí determina tales parámetros.

La sensibilidad de la RMN depende de varios parámetros, incluidos la abundancia del isótopo y el tamaño de su momento magnético nuclear. Por ejemplo el ^1H , con un 99.98 % de abundancia natural y un gran momento magnético, resulta más fácil de observar que el ^{13}C , cuyo momento magnético nuclear es más pequeño y cuenta con sólo un 1.1 % de abundancia natural. Con técnicas modernas de RMN multinucleares es particularmente fácil correr espectros de ^1H , ^{19}F y ^{31}P , pudiéndose obtener también espectros útiles para muchos otros elementos. Una limitante común de los núcleos exóticos es la presencia de un momento nuclear cuadrupolar, una distribución no uniforme de carga eléctrica (que está presente para todos los núcleos con $I > \frac{1}{2}$), que ensancha señales y degrada los espectros. Los núcleos con números atómicos pares y números de masa pares (como ^{12}C y ^{16}O) tienen un espín de cero y son invisibles en RMN.



Un núcleo con espín I puede tener hasta $2I + 1$ orientaciones relativas a la dirección de un campo magnético aplicado. Cada orientación tiene una energía diferente, siendo el más bajo el nivel más poblado de acuerdo a la distribución de Boltzmann (ecuación 14). La separación de energía entre los dos niveles de un núcleo con un espín de $\frac{1}{2}$ (como ^1H o ^{13}C) es:

Ecuación 13

$$\Delta E = \hbar\gamma B_0$$

Donde B_0 es la magnitud del campo magnético aplicado y γ la relación giromagnética del núcleo o razón giromagnética, es decir, la relación del momento magnético con respecto a su momento angular de giro, γ también es conocida como constante giromagnética y es diferente para cada núcleo.

Ecuación 14

$$p_n = \frac{e^{-\beta E_n}}{q}$$

Con:

Ecuación 15

$$\beta = \frac{1}{kT}$$

Donde p_n es la probabilidad de ocupación de un nivel de energía dado, E_n es la energía del nivel n , q se denomina función de partición, T es la temperatura absoluta y k es la constante de Boltzmann ($1.3806 \cdot 10^{-23} \text{ J} \cdot \text{K}^{-1}$).

Ecuación 16

$$q = \sum_n e^{-\beta E_n}$$



La función de partición representa la suma de todos los términos que describe la probabilidad asociada a la variable de interés, en este caso E_n .

Como la diferencia entre los niveles de energía es relativamente pequeña, la población del nivel más bajo es sólo marginalmente mayor que la de los niveles más altos, y así la sensibilidad del experimento RMN será baja, pero podrá incrementarse si se usa un campo magnético más potente, lo cual aumenta la diferencia de población y la intensidad de la absorción.

En un principio, los espectros se obtenían en un modo de onda continua (OC) en la cual la muestra se sometía a un barrido de radiofrecuencia y las resonancias se iban registrando en el espectro. Ahora las separaciones de energía se identifican al excitar los núcleos en la muestra con una secuencia de pulsos de radiofrecuencia para posteriormente observar el retorno de la magnetización nuclear al equilibrio. La transformada de Fourier convierte posteriormente los datos del dominio en función del tiempo a dominio en función de la frecuencia, con máximos en las frecuencias correspondientes a transiciones entre los distintos niveles de energía nuclear.

La frecuencia de una transición en RMN depende del campo magnético local experimentado por el núcleo y se expresa en términos del desplazamiento químico, δ (expresado en ppm), es la diferencia entre la frecuencia de resonancia ν_R de los núcleos en la muestra y la de un compuesto de referencia ν_R^0 :

Ecuación 17

$$\delta = \frac{\nu_R - \nu_R^0}{\nu_R^0} \cdot 10^6$$

Un estándar común para los espectros de ^1H es el tetrametilsilano $\text{Si}(\text{CH}_3)_4$, abreviado como TMS. Los desplazamientos químicos del ^1H y de otros núcleos en diversos ambientes químicos se encuentran tabulados, de modo que a menudo pueden usarse correlaciones para identificar compuestos o al elemento al cual está enlazado el núcleo resonante.



Los desplazamientos químicos son diferentes para el mismo elemento en posiciones no equivalentes dentro de una molécula.

La asignación estructural está apoyada a menudo por la observación del acoplamiento espín-espín de los núcleos, lo cual da lugar a multipletes en el espectro. La fortaleza del acoplamiento espín-espín, que se describe en términos de la constante de acoplamiento espín-espín, J (expresada en Hz), se reduce rápidamente con la distancia a través de los enlaces químicos y en muchos casos es mayor cuando los dos átomos se enlazan de manera directa entre sí. Todas las transiciones permitidas ocurren en la misma frecuencia cuando los núcleos están relacionados por simetría y cualquier acoplamiento espín-espín resulta invisible. De este modo, para la molécula de CH_3I se observa una sola señal de ^1H aun cuando haya acoplamiento entre los núcleos de H debido a que los tres núcleos están relacionados entre sí mediante un eje de orden 3.

Cuando un núcleo de espín $\pm \frac{1}{2}$ (o un conjunto de núcleos de medio espín simétricamente relacionados) se acopla(n) a un núcleo de espín I se obtiene un multiplete de $2I + 1$ señales. El acoplamiento entre los espines nucleares de diferentes elementos se denomina acoplamiento heteronuclear. El acoplamiento homonuclear entre núcleos del mismo elemento es detectable cuando los núcleos no están relacionados por las operaciones de simetría de la molécula.

Las dimensiones de las constantes de acoplamiento homonuclear ^1H - ^1H en moléculas orgánicas suelen ser de 18 Hz o menos. La magnitud de las constantes de acoplamiento a menudo se relacionan con la geometría de la molécula haciendo referencia a las tendencias empíricas.

La intensidad integrada de una señal que surge de un conjunto de núcleos relacionados por simetría es proporcional al número de núcleos contenidos en ese conjunto. Siempre que haya suficiente tiempo durante la adquisición del espectro para la relajación total del núcleo observado, las intensidades integradas (las "integrales") podrán utilizarse con certidumbre para ayudar a la asignación de señales del espectro.



Las intensidades relativas de las $2N + 1$ señales en un multiplete que surge del acoplamiento con N núcleos equivalentes de espín $\frac{1}{2}$ están dadas por el triángulo de Pascal (figura 6); de esta manera, el acoplamiento con tres protones equivalentes inducen un cuarteto 1:3:3:1. Por su parte, los grupos de núcleos con números cuánticos de espín más alto generan diferentes patrones. Por ejemplo, el espectro ^1H RMN del HD consiste en tres señales de igual intensidad como resultado del acoplamiento con el núcleo de ^2H ($I = 1$, con $2I + 1 = 3$ orientaciones).^[42, 43]

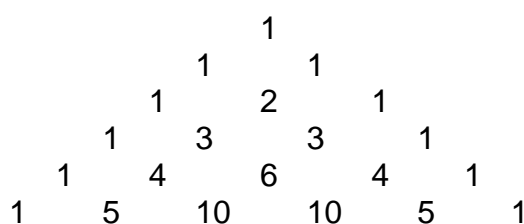


Figura 6. Triángulo de Pascal.

3.5

Reacción de sustitución nucleofílica en el grupo acilo

Este tipo de reacción solo ocurre con derivados de ácidos carboxílicos, los derivados de ácidos carboxílicos son compuestos en los cuales un grupo acilo (R-C=O) está unido a un átomo o a un sustituyente electronegativo que puede actuar como un grupo saliente en una reacción de sustitución.

Cuando el grupo carbonilo de un derivado de ácido carboxílico reacciona con un nucleófilo, la adición ocurre de la manera usual, pero el alcóxido tetraédrico intermediario formado inicialmente no se puede aislar. Debido a que todos los derivados de ácidos carboxílicos tienen un grupo saliente unido al carbono del carbonilo, el intermediario tetraédrico puede reaccionar posteriormente, expulsando el grupo saliente y formando un nuevo compuesto carbonílico. La adición de un nucleófilo a un enlace polar C=O es el paso clave para esta reacción.



El comportamiento de los derivados de ácidos carboxílicos se debe a que tienen un carbono de un grupo acilo unido a un grupo saliente que puede salir como un anión estable. Tan pronto como se forma el intermediario tetraédrico, se expulsa el grupo saliente para generar un nuevo compuesto carbonílico.

La sustitución nucleofílica directa en el grupo acilo de un ácido carboxílico es difícil debido a que el -OH es un mal grupo saliente y por lo general es necesario incrementar la reactividad del ácido, ya sea utilizando un ácido fuerte como catalizador para protonar el grupo carboxilo y hacerlo un mejor electrófilo, o convertir el grupo -OH en un mejor grupo saliente.

La reacción de un derivado de ácido con un alcohol se conoce comúnmente como alcoholísis, el producto de esta reacción es un éster. Por lo general este tipo de reacción se realiza en presencia de piridina o de NaOH para que reaccionen con el ácido formado. La reacción de alcoholísis utilizando un cloruro de ácido es probablemente la reacción más utilizada para la preparación de ésteres en el laboratorio.

El impedimento estérico afecta de manera considerable la reacción de un alcohol con un derivado de ácido. Los grupos voluminosos, en cualquiera de los dos reactivos, retardan considerablemente la reacción, debido al orden de reactividad entre los alcoholes: primario > secundario > terciario. Como resultado de este orden, con frecuencia es posible esterificar selectivamente un alcohol no impedido en presencia de uno más impedido.

Con frecuencia se utiliza el anhídrido acético para preparar ésteres acetato a partir de alcoholes. Por ejemplo, la aspirina (ácido acetilsalicílico) se prepara de forma comercial por la acetilación del ácido salicílico con anhídrido acético en NaOH acuoso.^[39]



3.6

Reacción de oxidación de alquenos

Los alquenos se oxidan para dar epóxidos en el tratamiento con un peroxiácido (RCO_3H), como el ácido *meta*-cloroperoxibenzoico. Un epóxido, también llamado oxirano, es un éter cíclico con un átomo de oxígeno en un anillo de tres miembros. La química de los epóxidos es de interés debido a que los epóxidos son mucho más reactivos que otros éteres, esta propiedad se le atribuye a la tensión angular en el anillo de tres miembros, brindando a los epóxidos de una reactividad química única.

Los peroxiácidos transfieren un átomo de oxígeno al alqueno con estereoquímica *sin*, es decir, los dos enlaces C-O se forman por el mismo lado del doble enlace a través de un mecanismo de una etapa sin intermediarios, en donde el átomo de oxígeno que se transfiere es el que se encuentra más alejado del grupo carbonilo.

Otro método para la síntesis de epóxidos es a través del uso de halohidrinás, preparadas por adiciones electrofílicas de HO-X a alquenos (donde X representa un halógeno). Posteriormente, el tratamiento de una halohidrina con una base, provoca la eliminación de HX formando un epóxido por medio de una síntesis de éter tipo Williamson intramolecular, es decir, el ion alcóxido nucleofílico y el haluro de alquilo electrofílico están en la misma molécula.^[39]

Aprender sin pensar es inútil. Pensar sin aprender es peligroso

Confucio



Objetivos

El hombre tiene mil planes para sí mismo. El azar, solo uno para cada uno

Aristóteles

4.1

Generales

1. Poseer una visión introductoria de la importancia de los productos naturales en la química contemporánea desde el punto de vista extractivo, analítico y espectroscópico.
2. Obtener experiencia en procedimientos de laboratorio empleados en el estudio de materia vegetal de importancia química, farmacológica y económica en la actualidad.
3. Desarrollar experiencia general sobre la aplicación de técnicas analíticas instrumentales en el estudio de metabolitos secundarios de origen vegetal incluyendo técnicas cromatográficas y espectroscópicas como infrarrojo, ultravioleta-visible, resonancia magnética nuclear y espectrometría de masas.
4. Adquirir la habilidad de síntesis orgánica a partir de reacciones químicas simples a compuestos aislados presentes en la naturaleza y obtener derivados con estructura química diferente.



4.2

Particulares

1. Extraer mediante maceración con disolventes orgánicos de distinta polaridad a tres de los principales compuestos presentes en *Vitis vinifera* (uva): physcion, emodina y resveratrol.
2. Estudiar mediante cromatografía en capa fina cada paso de la extracción para determinar en que extracto se encuentra physcion, emodina y resveratrol y así analizar la posibilidad para separar a cada uno de ellos.
3. Aislar mediante cromatografía en columna y purificar mediante cristalización a physcion, emodina y resveratrol. Determinar el rendimiento de extracción para cada compuesto.
4. Realizar modificaciones estructurales al resveratrol mediante reacciones químicas simples como acetilación y epoxidación.
5. Caracterizar principalmente por resonancia magnética nuclear a physcion, emodina, resveratrol y a los derivados sintéticos del resveratrol con el apoyo de la espectroscopia de infrarrojo, ultravioleta-visible y espectrometría de masas.
6. Usar como criterio de reacción a la cromatografía en capa fina y a la resonancia magnética nuclear para las reacciones hechas al resveratrol.
7. Reunir la espectroscopia completa (UV-visible, IR, EM y RMN) de los compuestos obtenidos.
8. Valorar la actividad antioxidante de physcion, emodina, resveratrol y de los derivados sintéticos del resveratrol.

Hay una fuerza motriz más poderosa que el vapor, la electricidad y la energía atómica: la voluntad

Albert Einstein



Hipótesis

La formulación de un problema, es más importante que su solución

Albert Einstein

De manera simple, mediante maceración con disolventes orgánicos, se obtendrá a tres importantes compuestos polifenólicos presentes en *Vitis vinifera* (uva), los cuales son metabolitos secundarios que se espera tengan actividad antioxidante.

Es posible obtener derivados sintéticos a partir de productos naturales mediante reacciones químicas simples. El partir de una estructura aislada, tendrá como ventaja que el producto de las reacciones no necesite de algún método sofisticado de purificación.

También se espera que los derivados sintéticos de resveratrol presenten igual o mayor actividad antioxidante comparados con los antioxidantes sintéticos que se manejan con frecuencia y que tienen gran importancia en el mercado.

Hay dos cosas infinitas: el Universo y la estupidez humana; y yo no estoy seguro sobre el universo

Albert Einstein



Metodología

Lo que tenemos que aprender a hacer, lo aprendemos haciéndolo

Aristóteles

6.1

Materia prima

Bagazo de uva (*Vitis vinifera*) finamente molido. Adquirido de AHD International.

6.2

Materiales

Sílice gel, 60 F₂₅₄ (cromatografía en capa fina, grosor de capa: 250 μm), Merck. **Sílice gel**, grado 10180 (malla 70-230, 40 Angstrom), Sigma-Aldrich. **Tiras de prueba de pH**, P-4786 (0-14.0), Sigma. **Papel filtro (estándar)**, grado cualitativo 1 (círculos de 55 mm de diámetro), Whatman. **Papel filtro (estándar)**, grado cualitativo 1 (círculos de 25 mm de diámetro), Whatman.

6.3

Reactivos

Sulfato de cerio (IV), Ce(SO₄)₂ (332.24 g·mol⁻¹, 3.010 g·cm⁻³), Aldrich. **Ácido sulfúrico**, H₂SO₄ 97.8 % (98.08 g·mol⁻¹, 1.84 g·mL⁻¹), J. T. Baker. **Anhídrido acético**, (CH₃CO)₂O ≥ 97 % (102.09 g·mol⁻¹, 1.08 g·mL⁻¹), Merck. **Piridina**, C₅H₅N ≥ 99 % (79.10 g·mol⁻¹, 0.978 g·mL⁻¹), Aldrich. **Bicarbonato de sodio**, NaHCO₃ 99.5-100.5 % (84.01 g·mol⁻¹, 2.160 g·cm⁻³), Aldrich. **Sulfato de sodio anhidro**, Na₂SO₄ ≥ 99.0 % (142.04 g·mol⁻¹), Aldrich. **Ácido meta-cloroperoxibenzoico (MPCBA)**, ClC₆H₄CO₃H ≤ 77 % (172.57 g·mol⁻¹), Aldrich.



6.4

Equipos

Balanza analítica, V-1mg (capacidad: 120 g, sensibilidad: 0.001 g), ACCULAB®. **Parrilla de calentamiento**, Cimarec® 2, Thermolyne. **Rotavapor**, R-205, BÜCHI. **Equipo de punto de fusión**, IA9100x1, ThermoFisher Scientific-Electrothermal. **Lámpara de UV**, UVGL-25 (lámpara multibanda UV-254/365 nm, 115 V, 60 MHz y 0.16 A), Mineralight®. **Manta de calentamiento con agitación de 100 mL**, MCA 302-3, SEV®. **Recirculador**, ECO-30 (127 V, 6 A, 60 Hz y 762 W), SEV®. **Bomba de vacío**, DOA-P104-AA (115 V, 4.2 A y 60 Hz), GAST®.

6.5

Software

iNMR, versión 4.0.3, Febrero 2011, Mestrelab Research©.

6.6

Extracción por maceración con disolventes orgánicos

10.000 g de materia prima finamente molida, se coloca en un matraz Erlenmeyer de 250 mL, se adiciona 200 mL de hexano y se deja en agitación a temperatura ambiente durante 24 horas. Transcurrido este tiempo se filtra a vacío el residuo vegetal y el líquido filtrado se denomina extracto de hexano de *Vitis vinifera* (EHVV).



El sólido obtenido se coloca nuevamente en el matraz Erlenmeyer, se adiciona 200 mL de AcOEt y se deja en agitación a temperatura ambiente durante 24 horas más. Transcurridas las 24 horas se filtra a vacío el residuo vegetal y el líquido filtrado se denomina extracto de acetato de etilo de *Vitis vinifera* (EAcOEtVV).

El sólido obtenido se coloca una vez mas en el matraz Erlenmeyer, se adiciona 200 mL de MeOH y se deja en agitación a temperatura ambiente durante 24 horas más. Transcurridas las 24 horas se filtra a vacío el residuo vegetal y el líquido filtrado se denomina extracto de metanol de *Vitis vinifera* (EMeOHVV).

Cada extracto orgánico se concentra por separado, ocupando un matraz redondo de 500 mL y el Rotavapor para evaporar por completo el disolvente hasta sequedad total. Una vez secos, cada extracto se transfiere a un vial debidamente etiquetado y se seca a alto vacío durante 1 hora.

Se toma de cada extracto alrededor de 1 mg y se disuelve cada uno por separado ocupando la mínima cantidad de disolvente (acetona). Cada extracto se aplica sobre la superficie de una placa para cromatografía (sílice gel en vidrio) y se coloca dentro de una cámara de elución para realizar la separación. Para el EHVV y el EAcOEtVV se utiliza como eluyente una mezcla de hexano-AcOEt (7:3) y para el EMeOHVV se ocupa hexano-AcOEt (1:1). Para las 3 placas hechas se emplea como revelador $Ce(SO_4)_2$ y calentamiento.

6.6.1

Preparación del revelador

Se preparan 100 mL de disolución diluida de H_2SO_4 (0.018 M) ocupando 0.1 mL de H_2SO_4 concentrado en agua destilada. Se adiciona a la disolución 1.661 g de $Ce(SO_4)_2$ y se agita hasta disolver completamente.



6.7

Aislamiento por cromatografía en columna

El EAcOEtVV sólido se mezcla con sílice gel en un mortero de porcelana y se pulveriza hasta conseguir un sólido fluido finamente molido. La muestra se coloca sobre la superficie del sílice gel, encima se coloca la cama de sal y se inyecta la muestra poco a poco con eluyente. Una vez inyectada la muestra se ajusta un flujo de 2 mL por minuto (aproximadamente).

Los compuestos presentes en el EAcOEtVV se aíslan mediante cromatografía en columna (monitoreo de la separación por cromatografía en capa fina). Utilizando una columna de vidrio de 10 cm de diámetro interno por 43 cm de longitud, ocupando aproximadamente 500 g de sílice gel y como eluyente una mezcla de hexano-AcOEt (7:3).

Cada compuesto obtenido se concentra por separado, ocupando un matraz pera de 1 L y el Rotavapor para evaporar por completo el disolvente hasta sequedad total. Una vez secos, cada compuesto se transfiere a un vial debidamente etiquetado y se seca a alto vacío durante 1 hora.

Se toma de cada compuesto alrededor de 1 mg y se disuelve cada uno por separado ocupando la mínima cantidad de disolvente (acetona). Cada compuesto se aplica sobre la superficie de una placa para cromatografía (sílice gel en vidrio) y se coloca dentro de una cámara de elución para realizar la separación. Para todos los compuestos obtenidos se utiliza como eluyente una mezcla de hexano-AcOEt (1:1). Para las placas hechas se emplea como revelador $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ y calentamiento.



6.8

Purificación por cristalización

Primer compuesto: se disuelve en la mínima cantidad de acetona caliente, se adiciona aproximadamente 2 mL de hexano y 1 mL de EtOH. Se evapora el exceso de disolvente, se deja enfriar la disolución y se induce la cristalización en baño de hielo.

Segundo compuesto: se disuelve en la mínima cantidad de acetona caliente y se adiciona hexano hasta que la disolución se ponga turbia. Se disuelve nuevamente con mas acetona caliente hasta eliminar la turbidez y se evapora todo exceso de disolvente. Se deja enfriar la disolución y se induce la cristalización en baño de hielo.

Tercer compuesto: se disuelve en la mínima cantidad de acetona caliente y se adiciona hexano hasta que la disolución se ponga turbia. Se disuelve nuevamente con mas acetona caliente hasta eliminar la turbidez y se evapora todo exceso de disolvente. Se deja enfriar la disolución y se induce la cristalización en baño de hielo. Se deja reposar la disolución en baño de hielo durante 1 hora.

Los cristales obtenidos de cada compuesto se filtran a vacío por separado. Una vez secos, cada compuesto se transfiere a un vial debidamente etiquetado (pesado previamente) y se seca a alto vacío durante 1 hora. Se pesa cada compuesto y se calcula el rendimiento de extracción obtenido.

Se toma de cada compuesto puro alrededor de 1 mg y se disuelve cada uno por separado ocupando la mínima cantidad de disolvente (acetona). Cada compuesto se aplica sobre la superficie de una placa para cromatografía (sílice gel en vidrio) y se coloca dentro de una cámara de elución para realizar la separación. Para todos los compuestos obtenidos se utiliza como eluyente una mezcla de hexano-AcOEt (1:1). Para las placas hechas se emplea como revelador $Ce(SO_4)_2$ y calentamiento.



6.9

Reacción de acetilación de resveratrol

En un vial de reacción de 5 mL se coloca 0.800 g de resveratrol y se adiciona 1.5 mL de anhídrido acético (en exceso) y 1 mL de piridina, se tapa el vial y se deja en agitación durante 4 horas a temperatura ambiente. Transcurridas las 4 horas se extrae con 25 mL de AcOEt y se lava 7 veces cada una con 25 mL de agua destilada neutralizando en cada ocasión con NaHCO_3 . Se seca la fase orgánica con Na_2SO_4 anhidro.

Se concentra el producto ocupando un matraz redondo de 100 mL y el Rotavapor para evaporar por completo el disolvente hasta sequedad total. Una vez seco, se transfiere a un vial debidamente etiquetado (pesado previamente) y se seca a alto vacío durante 1 hora. Se pesa y se calcula el rendimiento de reacción obtenido.

Se toma del producto obtenido alrededor de 1 mg y se disuelve ocupando la mínima cantidad de disolvente (acetona). Se aplica sobre la superficie de una placa para cromatografía (sílice gel en vidrio) y se coloca dentro de una cámara de elución para realizar la separación. Se utiliza como eluyente una mezcla de hexano-AcOEt (1:1). Para la placa hecha se emplea como revelador $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ y calentamiento.

6.10

Reacción de epoxidación de resveratrol acetilado

En un matraz redondo de 50 mL se coloca 0.100 g de resveratrol acetilado y se adiciona 0.070 g de ácido meta-cloroperoxibenzoico (en exceso), se pone en agitación y en reflujo con 5 mL de AcOEt durante 4 horas. Transcurridas las 4 horas se extrae con 25 mL de AcOEt y se lava 5 veces cada una con 25 mL de agua destilada neutralizando en cada ocasión con NaHCO_3 . Se seca la fase orgánica con Na_2SO_4 anhidro.



Se concentra ocupando un matraz redondo de 100 mL y el Rotavapor para evaporar por completo el disolvente hasta sequedad total. Una vez seco, se transfiere a un vial debidamente etiquetado (pesado previamente) y se seca a alto vacío durante 1 hora. Se pesa y se calcula el rendimiento de reacción obtenido.

Se toma del producto obtenido alrededor de 1 mg y se disuelve ocupando la mínima cantidad de disolvente (acetona). Se aplica sobre la superficie de una placa para cromatografía (sílice gel en vidrio) y se coloca dentro de una cámara de elución para realizar la separación. Se utiliza como eluyente una mezcla de hexano-AcOEt (1:1). Para la placa hecha se emplea como revelador $Ce(SO_4)_2$ y calentamiento.

6.11

Caracterización de physcion, emodina, resveratrol y sus derivados

La caracterización se realiza principalmente mediante espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN) apoyada de técnicas espectroscópicas como infrarrojo (IR), ultravioleta-visible (UV-visible) y espectrometría de masas (EM). Los espectros son obtenidos por el técnico académico encargado del área correspondiente y son entregados para su análisis. En el caso de RMN, se entregan los archivos "FID" y los espectros se procesan mediante el software *iNMR*.

Para la obtención de los espectros de RMN de physcion se emplea 0.005 g para el experimento de 1H y 0.010 g para el experimento de ^{13}C , HSQC y HMBC. Se utiliza $CDCl_3$ como disolvente y como referencia se usa TMS (para el experimento de 1H) y $CDCl_3$ (para los experimentos de ^{13}C , HSQC y HMBC). Para los experimentos solicitados se emplea el equipo de RMN de 400 MHz.



Para la obtención de los espectros de RMN de emodina se emplea 0.005 g para el experimento de ^1H y 0.010 g para el experimento de ^{13}C , HSQC y HMBC. Se utiliza CDCl_3 y tres gotas de DMSO como disolvente y como referencia se usa TMS (para el experimento de ^1H) y CDCl_3 (para los experimentos de ^{13}C , HSQC y HMBC). Para los experimentos solicitados se emplea el equipo de RMN de 500 MHz.

Para la obtención de los espectros de RMN de resveratrol se emplea 0.005 g para el experimento de ^1H y 0.010 g para el experimento de ^{13}C , HSQC y HMBC. Para el experimento de ^1H se utiliza $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ como disolvente y se usa el disolvente como referencia. Para los experimentos de ^{13}C , HSQC y HMBC se utiliza CDCl_3 y tres gotas de DMSO como disolvente y se usa CDCl_3 como referencia. Para los experimentos solicitados se emplea el equipo de RMN de 400 MHz.

Para la obtención de los espectros de RMN de resveratrol acetilado se emplea 0.005 g para el experimento de ^1H y 0.010 g para el experimento de ^{13}C , HSQC y HMBC. Se utiliza CDCl_3 como disolvente y como referencia se usa TMS (para el experimento de ^1H) y CDCl_3 (para los experimentos de ^{13}C , HSQC y HMBC). Para los experimentos solicitados se emplea el equipo de RMN de 500 MHz.

Para la obtención de los espectros de RMN de epóxido de resveratrol acetilado se emplea 0.005 g para el experimento de ^1H y 0.010 g para el experimento de ^{13}C , HSQC y HMBC. Se utiliza CDCl_3 como disolvente y como referencia se usa TMS (para el experimento de ^1H) y CDCl_3 (para los experimentos de ^{13}C , HSQC y HMBC). Para los experimentos solicitados se emplea el equipo de RMN de 500 MHz.

Para la obtención de los espectros de UV-visible, se emplean 0.005 g de cada compuesto y se utiliza MeOH como disolvente. Se realiza un análisis cualitativo para todos los compuestos.



Para la obtención de los espectros de IR, se emplean 0.002 g de cada compuesto y se prepara la muestra mediante el método de pastilla con KBr, a excepción del epóxido de resveratrol acetilado que se prepara mediante el método de película con nujol.

Para la obtención de los espectros de EM, se emplean 0.001 g de cada compuesto. El método de ionización es por impacto electrónico para todos los compuestos.

6.12

Valoración de la actividad antioxidante de physcion, emodina, resveratrol y sus derivados

Todos los compuestos obtenidos se analizan mediante dos pruebas biológicas para determinar su actividad antioxidante: inhibición de la peroxidación de lípidos (TBARS) y reducción del radical DPPH. Tales pruebas son realizadas por el técnico académico encargado del área correspondiente y los resultados son entregados para su análisis. Se envían 0.005 g de cada compuesto para realizar ambas pruebas solicitadas.

No son las malas hierbas las que ahogan la buena semilla, sino la negligencia del campesino

Confucio



Resultados

Me lo contaron y lo olvidé; lo vi y lo entendí; lo hice y lo aprendí

Confucio

7.1

Del extracto al compuesto puro

De la maceración con disolventes orgánicos de la materia prima, se obtienen tres extractos que muestran el contenido de varios compuestos de polaridad distinta. En estos tres extractos, se obtienen a todos los compuestos que son solubles en el disolvente empleado correspondiente en cada caso, extrayendo compuestos desde baja polaridad hasta alta polaridad.

El primer extracto obtenido, denominado EHVV, es un sólido de color café oscuro (casi negro), que al ser analizado mediante cromatografía en capa fina (imagen 1), muestra la presencia de varios compuestos con polaridad de baja a media, en concentraciones altas y dos compuestos en concentraciones bajas, uno con polaridad media y el otro con polaridad alta.

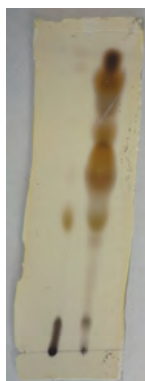


Imagen 1. Extracto de hexano de *Vitis vinifera* (EHVV). La aplicación del lado izquierdo corresponde a la materia prima disuelta en MeOH y es usada como referencia. La aplicación del lado derecho corresponde al EHVV. El medio de elución es hexano-AcOEt (7:3) y se utiliza como revelador sulfato de cerio (IV) y calentamiento.



Los compuestos que están en mayor concentración, son probablemente ácidos grasos de cadena larga, compuestos aromáticos, glúcidos, disacáridos, etcétera. Estos son solubles o parcialmente solubles en hexano (disolvente orgánico no polar utilizado para extraerlos), los compuestos con polaridad ligeramente mayor que la del hexano, pueden ser extraídos debido a que los ácidos grasos, por ejemplo, cambian las propiedades del hexano, aumentando un poco su polaridad y facilitando la solubilidad de ellos. Todos estos compuestos no son de interés en este estudio por lo cual no son analizados ampliamente.

Los dos compuestos que están en menor concentración, pueden ser los de interés en este estudio, dado que emodina y resveratrol son compuestos de polaridad media y alta, respectivamente. Sin embargo, estos dos compuestos presentes en el EHVV podrían llegar a perderse en el momento en que quisieran ser separados, debido a que se encuentran menos concentrados con respecto a los demás compuestos. Por lo tanto, no se decide aislar a estos compuestos a partir de este extracto.

El segundo extracto obtenido, denominado EAcOEtVV, es un sólido de color entre naranja y café oscuro, que al ser analizado mediante cromatografía en capa fina (imagen 2), muestra la presencia de tres compuestos de polaridad distinta. El compuesto I es de polaridad baja, el compuesto II es de polaridad media y el compuesto III es de polaridad alta.

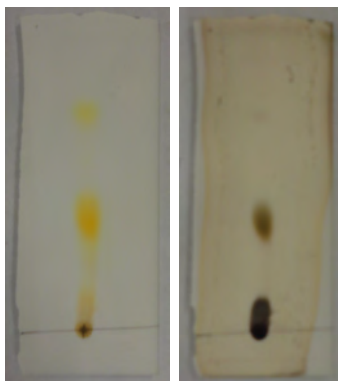


Imagen 2. Extracto de AcOEt de *Vitis vinifera* (EAcOEtVV). La aplicación en ambas ilustraciones corresponde al EAcOEtVV. La imagen de la izquierda ilustra a la imagen de la derecha antes de aplicar el revelador. El medio de elución es hexano-AcOEt (7:3) y se utiliza como revelador sulfato de cerio (IV) y calentamiento.



La diferencia de polaridad entre los compuestos presentes en el EAcOEtVV, hace posible el pensar en separarlos fácilmente por cromatografía en columna, además de que están en concentraciones altas y parcialmente puros. Y dado que physcion, emodina y resveratrol presentan distintas polaridades que concuerdan a las mostradas anteriormente, los compuestos extraídos presentes en el EAcOEtVV pueden ser los que se busca separar y por ende se decide aislar a los compuestos presentes en este extracto.

El tercer extracto obtenido, denominado EMeOHVV, es un sólido de color negro, que al ser analizado mediante cromatografía en capa fina (imagen 3), no muestra la presencia de algún compuesto de polaridad distinta al de el o los compuestos muy polares que conforman el punto de aplicación. Lo cual explica que con hexano y AcOEt se ha logrado extraer a todos los compuestos de polaridad baja, media y alta presentes en la materia prima.

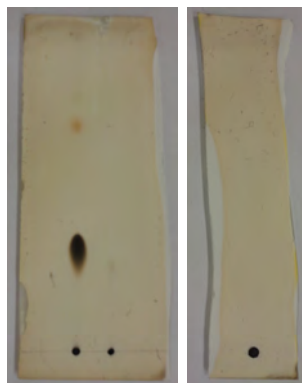


Imagen 3. Extracto de MeOH de *Vitis vinifera* (EMeOHVV). En la imagen de la izquierda: la aplicación del lado izquierdo corresponde a la materia prima disuelta en MeOH y es usada como referencia; la aplicación del lado derecho corresponde al EMeOHVV. En la imagen de la derecha: la aplicación corresponde al EMeOHVV. El medio de elución es hexano-AcOEt (1:1) y se utiliza como revelador sulfato de cerio (IV) y calentamiento.

Los tres compuestos presentes en el EAcOEtVV se aíslan mediante cromatografía en columna (imagen 4), el monitoreo de la separación se realiza mediante cromatografía en capa fina y se logra separar a cada compuesto en un número mínimo de fracciones. Las fracciones iguales se juntan y se analiza la pureza de los tres compuestos separados. Los tres compuestos obtenidos se purifican mediante cristalización y nuevamente, se analizan mediante cromatografía en capa fina.





Imagen 4. Columna empacada. Se observa como se van separando los distintos compuestos presentes en el EAcOEtVV. El medio de elución es hexano-AcOEt (7:3).

El primer compuesto aislado y purificado a partir del EAcOEtVV (compuesto I), es un sólido de color amarillo que funde a 202-203 °C (imagen 5). De este compuesto se obtiene 0.143 g, alcanzando un rendimiento de extracción de 1.43 %. Este compuesto aislado es probablemente physcion, coincide en polaridad y en el punto de fusión reportado por la literatura (207-209 °C), referencia [12].



Imagen 5. Compuesto I (Physcion). Polvo que no se ve afectado electrostáticamente y aparentemente sin propiedades cristalinas.



El compuesto I se analiza mediante cromatografía en capa fina (imagen 6), se observa que el compuesto se ha separado totalmente y que posee elevada pureza. El compuesto conserva la polaridad baja con un valor de $R_f = 0.872$.

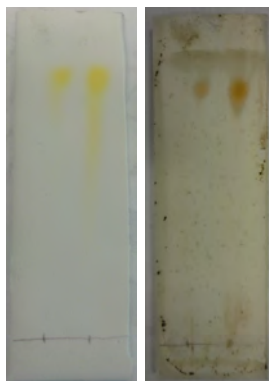


Imagen 6. Compuesto I ($R_f = 0.872$). La aplicación se ha colocado por duplicado en la misma placa y en ambas imágenes corresponde al primer compuesto separado. La imagen de la izquierda ilustra a la imagen de la derecha antes de aplicar el revelador. El medio de elución es hexano-AcOEt (1:1) y se utiliza como revelador sulfato de cerio (IV) y calentamiento. En las imágenes se muestra la aplicación del compuesto después de haber sido purificado.

El segundo compuesto aislado y purificado a partir del EAcOEtVV (compuesto II), es un sólido de color naranja que funde a 261-262 °C (imagen 7). De este compuesto se obtiene 0.367 g, alcanzando un rendimiento de extracción de 3.67 %. Este compuesto aislado es probablemente emodina, coincide en polaridad y en el punto de fusión reportado por la literatura (260-263 °C), referencia [12].



Imagen 7. Compuesto II (Emodina). Polvo que se ve afectado electrostáticamente y aparentemente sin propiedades cristalinas.



El compuesto II se analiza mediante cromatografía en capa fina (imagen 8) se observa que el compuesto se ha separado totalmente y que posee elevada pureza. El compuesto conserva la polaridad media con un valor de $R_f = 0.718$.

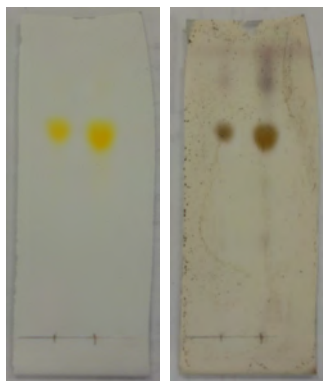


Imagen 8. Compuesto II ($R_f = 0.718$). La aplicación se ha colocado por duplicado en la misma placa y en ambas imágenes corresponde al segundo compuesto separado. La imagen de la izquierda ilustra a la imagen de la derecha antes de aplicar el revelador. El medio de elución es hexano-AcOEt (1:1) y se utiliza como revelador sulfato de cerio (IV) y calentamiento. En las imágenes se muestra la aplicación del compuesto después de haber sido purificado.

El tercer compuesto aislado y purificado a partir del EAcOEtVV (compuesto III), es un sólido de color café claro que funde a 244-245 °C. De este compuesto se obtiene 3.291 g, alcanzando un rendimiento de extracción de 32.91 % (imagen 9). Este compuesto aislado es probablemente resveratrol.



Imagen 9. Compuesto III (Resveratrol). Polvo que no se ve afectado electrostáticamente y aparentemente sin propiedades cristalinas.



El compuesto III se analiza mediante cromatografía en capa fina (imagen 10) se observa que el compuesto se ha separado totalmente y que posee elevada pureza. El compuesto conserva la polaridad alta con un valor de $R_f = 0.325$.

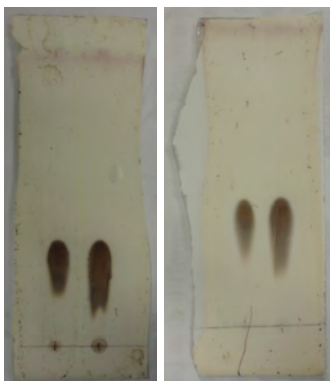


Imagen 10. Compuesto III ($R_f = 0.325$). La aplicación se ha colocado por duplicado en cada placa y se muestra en ambas imágenes la aplicación del tercer compuesto separado. El medio de elución es hexano-AcOEt (1:1) y se utiliza como revelador sulfato de cerio (IV) y calentamiento. En las imágenes se muestra la aplicación del compuesto después de haber sido purificado. En ambas imágenes, las dos aplicaciones del tercer compuesto se encuentran concentradas.

7.2

El acetilado

El producto de la reacción de acetilación de resveratrol (compuesto IV), es un sólido de color café claro, mas claro que el color original del resveratrol y funde a 117-118 °C. Se obtiene 1.183 g de producto, alcanzando un rendimiento de reacción de 95.25 %.

El compuesto IV se analiza mediante cromatografía en capa fina (imagen 11), se observa un cambio en la polaridad del compuesto obtenido con respecto al resveratrol, el producto sintetizado se observa completamente puro y es de polaridad media con un $R_f = 0.667$ (para el resveratrol el $R_f = 0.325$). Además se observa que los reactivos han reaccionado totalmente.



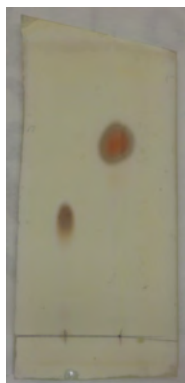
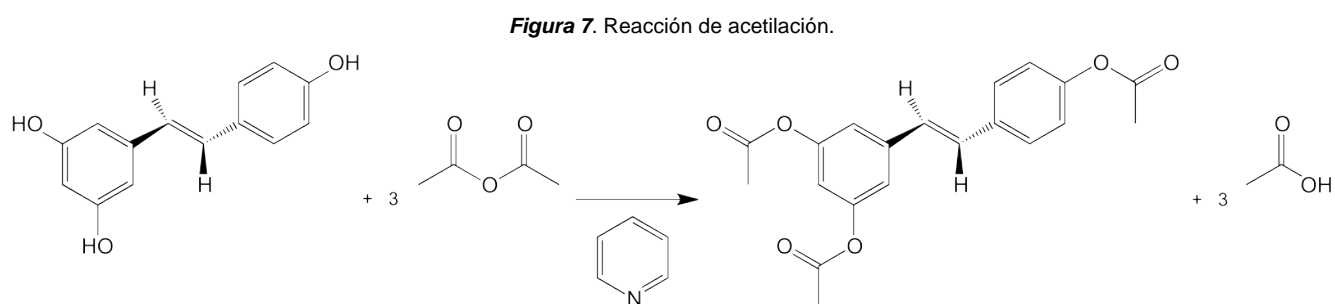


Imagen 11. Acetilación de resveratrol. La aplicación del lado izquierdo corresponde al resveratrol y es usada como referencia. La aplicación del lado derecho corresponde al producto de la reacción. El medio de elución es hexano-AcOEt (1:1) y se utiliza como revelador sulfato de cerio (IV) y calentamiento.

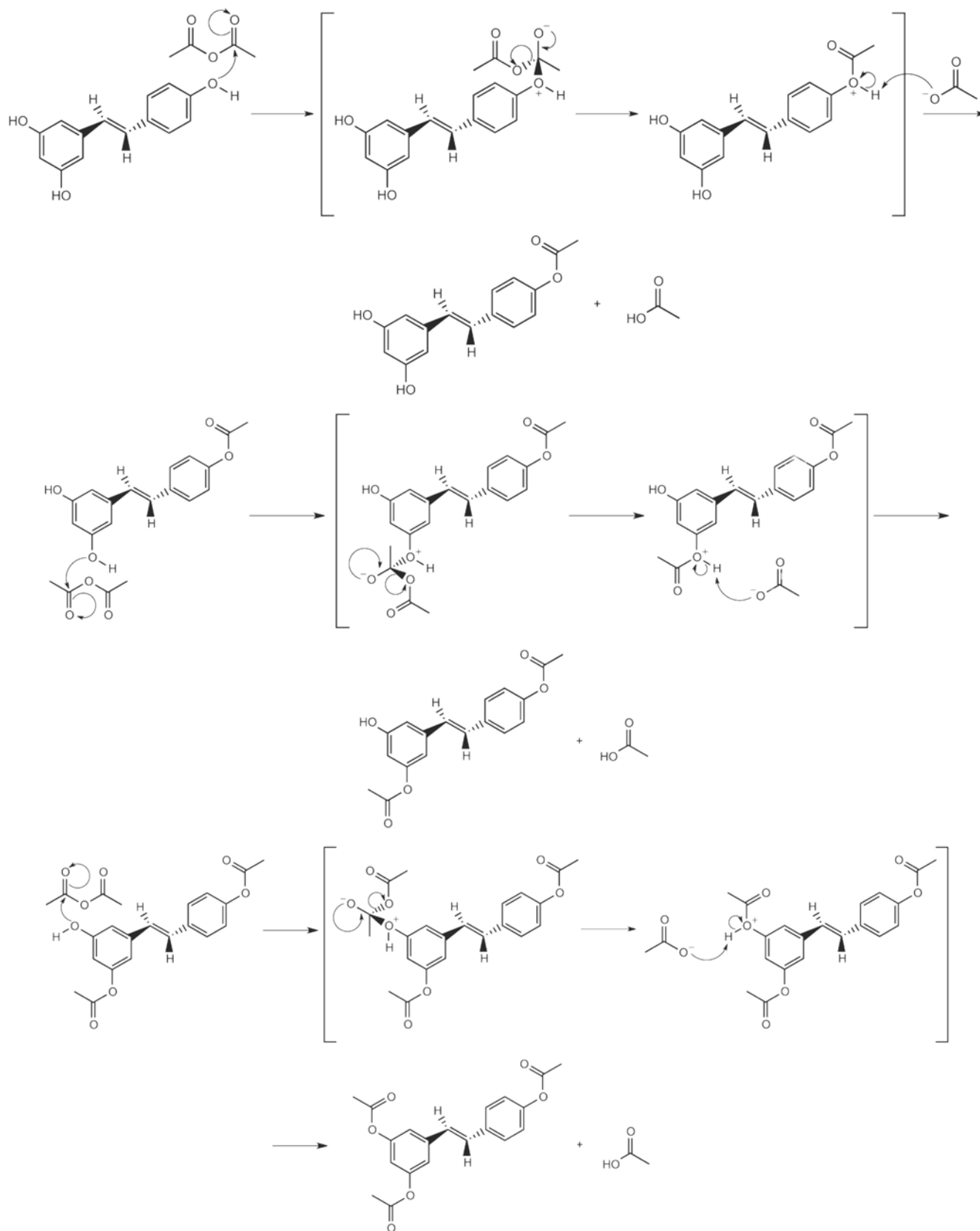
El resveratrol es un compuesto polifenólico que posee en su estructura tres hidrógenos ácidos ($pK_{a,1} = 8.8$, $pK_{a,2} = 9.8$ y $pK_{a,3} = 11.4$, referencia [44]), sin embargo, no reacciona con la piridina ($pK_a = 5.25$, referencia [39]) en una reacción ácido-base para sustraer el protón del fenol, el átomo de oxígeno del fenol se comporta como un nucleófilo. La formación del producto se rige por la reacción de sustitución nucleofílica en el grupo acilo del anhídrido acético. La reacción se muestra en la figura 7.



El efecto neto de la sustitución nucleofílica en el grupo acilo es el reemplazo del grupo saliente por el nucleófilo entrante, en este caso el grupo saliente es el ion acetato. El mecanismo de la reacción sucede a través de un intermediario tetraédrico, seguido de una reacción ácido-base donde el ion acetato recién formado o el proveniente de alguna otra molécula, sustrae el hidrógeno del fenol. El uso de piridina en la reacción, es para controlar la generación del ácido acético formado ($pK_a = 4.8$, referencia [39]), por medio una reacción ácido-base. El mecanismo de la reacción se muestra en la figura 8.



Figura 8. Mecanismo de la reacción de acetilación.



No se tiene la certeza de que hidroxilo reacciona primero y es poco probable que reaccionen los tres al mismo tiempo, debido a que las moléculas deben encontrarse en la posición adecuada y tener la energía cinética necesaria para que reaccionen. Sin embargo, es más probable que reaccione primero el hidroxilo que tiene menor impedimento estérico. Una vez que ha reaccionado el primer hidroxilo, los otros dos son equivalentes y de igual forma es poco probable que reaccionen los dos al mismo tiempo, por lo tanto, reacciona uno y después el otro.

La reacción con el último hidroxilo de la molécula tiene sin duda una cinética menor que el primer hidroxilo que reacciona, es decir, se efectúa más lento que las otras dos reacciones, debido al impedimento estérico formado en la molécula. Además se suma el hecho de que los anhídridos reaccionan más lentamente que los cloruros de ácido, debido a que un cloruro de ácido es más reactivo que un anhídrido, sin embargo, la cinética de la reacción no es un objetivo en este estudio, por lo cual no se abunda en el tema.

La reacción de acetilación de resveratrol realizada en este trabajo no se ha reportado en la literatura consultada, con este estudio se obtiene el método de síntesis para formar el compuesto triacetilado del resveratrol mediante la reacción con anhídrido acético y piridina.

7.3

La epoxidación del acetilado

El producto de la reacción de epoxidación de resveratrol acetilado (compuesto V), es un líquido espeso de color amarillo. Se obtiene 0.067 g de producto, alcanzando un rendimiento de reacción de 64.11 %. El compuesto V se analiza mediante cromatografía en capa fina (imagen 12), no se observa un cambio en la polaridad del compuesto obtenido con respecto al resveratrol acetilado, el producto sintetizado se observa completamente puro y es de polaridad media con un $R_f = 0.667$, igual al del resveratrol acetilado. Además se observa que los reactivos han reaccionado totalmente.



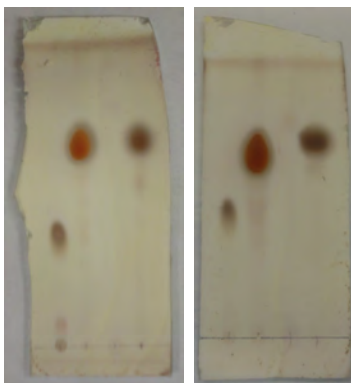
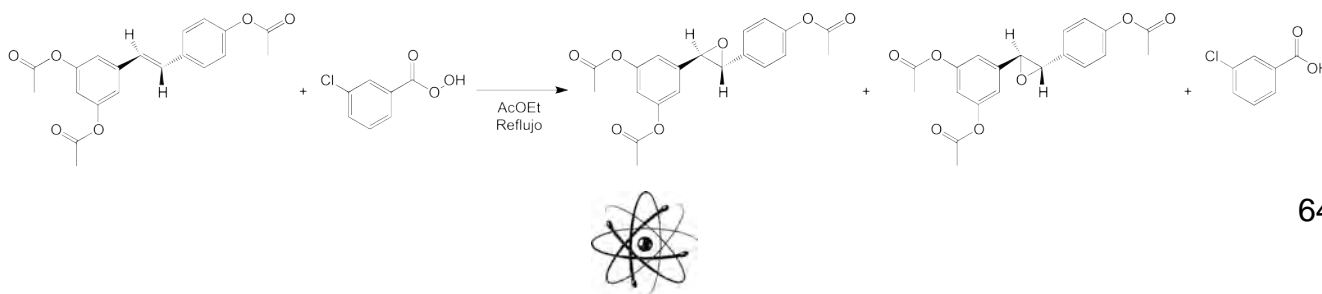


Imagen 12. Epoxidación de resveratrol acetilado. La aplicación del lado izquierdo corresponde al resveratrol y es usada como referencia. La aplicación del centro lado izquierdo corresponde al resveratrol acetilado y es usada como referencia. La aplicación del centro lado derecho corresponde al MPCBA y es usada como referencia, este compuesto se observa con luz ultravioleta debido a que no reacciona con el revelador usado y es por eso que no se ve alguna mancha en las imágenes mostradas. La aplicación del lado derecho corresponde al producto de la reacción. El medio de elución es hexano-AcOEt (1:1) y se utiliza como revelador sulfato de cerio (IV) y calentamiento. Se hace por duplicado el análisis.

Aunque no existe un cambio notorio en la polaridad del producto obtenido, se pueden observar diferencias en la forma de las manchas que aparecen en la placa al momento de ser revelada con sulfato de cerio (IV) y calentamiento. Es decir, los compuestos presentes en la placa reaccionan de manera distinta con el revelador de sulfato de cerio (IV), en las placas de la imagen 12 la mancha del centro lado izquierdo que corresponde al resveratrol acetilado es distinta en color y forma a la mancha de la derecha que corresponde al producto sintetizado. Por lo tanto, indica que se ha formado un nuevo producto.

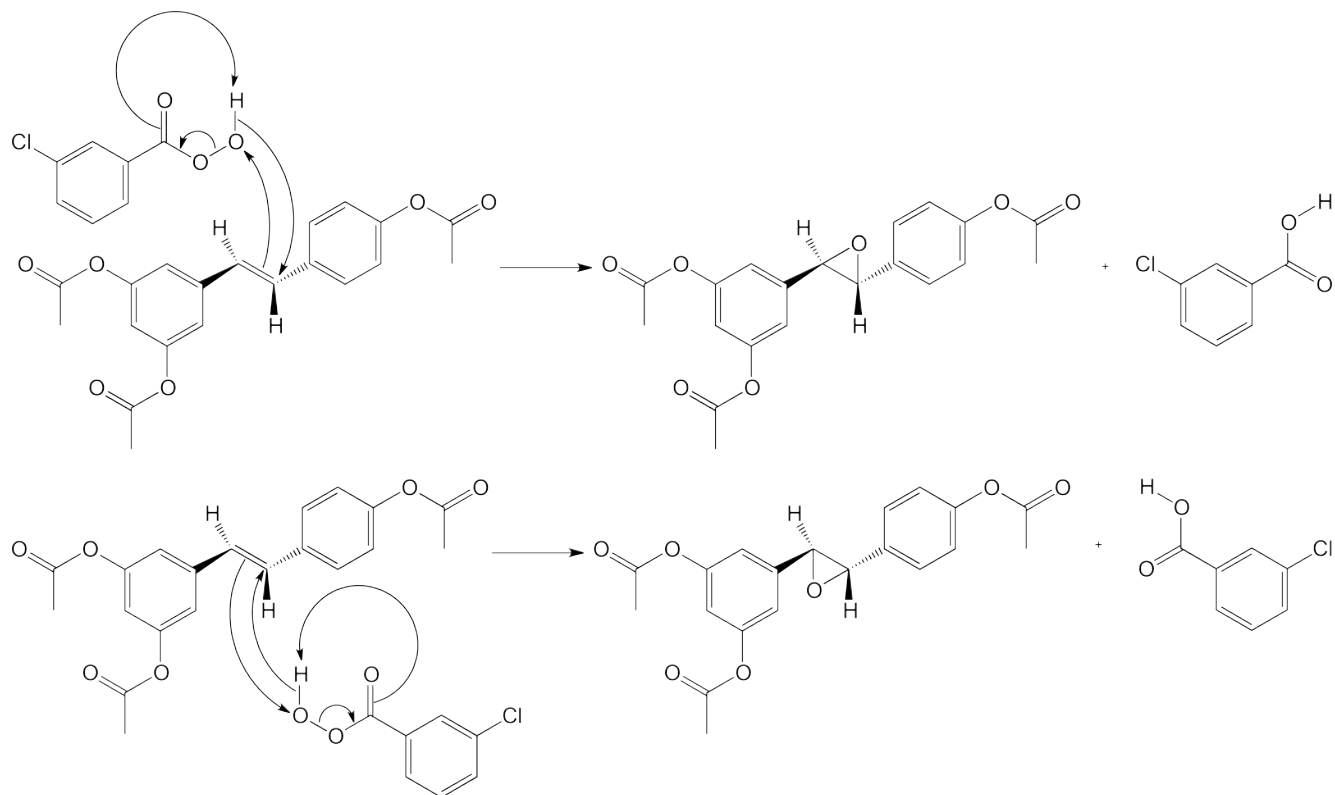
El resveratrol acetilado posee en su estructura un doble enlace *trans*, el cual se oxida en presencia del MPCBA, el peroxiácido transfiere un átomo de oxígeno al alqueno formando un epóxido. La formación del producto se rige con estereoquímica *sin*, es decir, los dos enlaces C-O se forman por el mismo lado del doble enlace sin modificar la estereoquímica *trans*. La reacción se muestra en la figura 9.

Figura 9. Reacción de epoxidación.



El mecanismo de la reacción sucede en una sola etapa sin intermediarios, el átomo de oxígeno que se transfiere es el más alejado del grupo carbonilo. Sin embargo, el epóxido puede formarse por “arriba” o por “debajo” del doble enlace, lo cual genera dos isómeros: el 2R,3R y el 2S,3S, respectivamente. El mecanismo de la reacción se muestra en la figura 10.

Figura 10. Mecanismo de la reacción de epoxidación.



La reacción de epoxidación de resveratrol acetilado, se probó en varias ocasiones sin aplicar calor a la reacción, en todos estos casos, la reacción no procedía y el epóxido esperado no se formaba. La aplicación de energía en forma de calor al medio de reacción, provocó que la reacción sucediera y se produjera el epóxido. Lo cual nos dice que la formación del epóxido requiere de energía y que la reacción es endotérmica. Es muy probable que el efecto estérico sea el causante de que la reacción necesite energía para que suceda, debido a que el doble enlace se encuentra en medio de dos anillos de benceno y además el peroxiacido utilizado es muy voluminoso, por lo que sí hay un impedimento estérico en la reacción.



Siempre que se forma un producto quiral por la reacción entre dos reactivos aquirales, el producto se obtiene en una mezcla racémica, es decir, los enantiómeros del producto se forman en cantidades iguales. Por lo tanto, el producto de la reacción de epoxidación de resveratrol acetilado se espera sea una mezcla racémica de epóxidos (2R,3R) y (2S,3S). En este trabajo no se separan los dos isómeros formados, dejando abierta la investigación acerca de métodos de aislamiento para enantiómeros del epóxido de resveratrol acetilado.

En la actualidad se desarrollan métodos de síntesis *enantioselectivos*, los cuales producen en mayor cantidad solo uno de los dos enantiómeros posibles. Un ejemplo de reacción enantioselectiva es la epoxidación de Sharpless, en la cual un alcohol alílico se trata con hidroperóxido de *ter*-butilo (CH₃)₃C-OOH, en presencia de tetraisopropóxido de titanio y de tartrato de dietilo (DET) como un reactivo quiral auxiliar, sea el tartrato (R,R) o el (S,S).

La reacción de epoxidación de resveratrol acetilado realizada en este trabajo no se ha reportado en la literatura consultada, con este estudio se obtiene el método de síntesis para formar el epóxido del resveratrol acetilado mediante la reacción con MPCBA.

7.4

Del compuesto puro a la estructura química

De los tres compuestos aislados se obtienen los espectros de RMN, EM, IR y UV-visible. Todos los espectros se muestran en el *Capítulo X* (página 123). Estos resultados se analizan para determinar la estructura química y saber de que compuesto se habla en cada caso. Para la interpretación de los espectros de todas las técnicas espectroscópicas se utiliza el apoyo de tablas provenientes de: *Structure Determination of Organic Compounds*, referencia [45]. También se usan los valores de desplazamiento químico para disolventes comunes y trazas de impurezas, reportados en: *NMR Chemical Shifts of Common Laboratory Solvents as Trace Impurities*, referencia [46].



Los espectros han sido agrupados conforme al compuesto que corresponden, ordenados de acuerdo a la importancia para establecer la estructura química y numerados consecutivamente. Es decir, se agrupan los espectros de todas las técnicas espectroscópicas para cada uno de los compuestos obtenidos en orden de aparición: physcion, emodina, resveratrol, resveratrol acetilado y epóxido de resveratrol acetilado. Se ordenan dentro del grupo de acuerdo a la información proporcionada para elucidar la estructura química de mayor a menor prioridad: RMN, EM, IR y UV-visible. Y una vez acomodados, solo son numerados consecutivamente. Sin embargo, el uso de los resultados se ocupa de manera diferente al orden establecido anteriormente. Se empieza utilizando la información que proporcionan los resultados de menor prioridad y se termina con los resultados de mayor prioridad, solo para establecer al final mejores conclusiones. Se conserva la agrupación y la numeración dada a los espectros.

Compuesto I. Physcion

7.4.1

El espectro de UV-visible del compuesto I (espectro 8), muestra señales con máximos de absorción a distintas longitudes de onda, las cuales corresponden a transiciones energéticas permitidas del grupo funcional: doble enlace a 224.0 nm (0.731 A); cetona a 266.0 nm (0.387 A) y 287.0 nm (0.386 A); y aromático policíclico (bencenos fusionados como naftaleno, antraceno, etcétera) a 434.0 nm (0.245 A).

El orden de magnitud de las constantes de absorptividad molar teóricas son: para un doble enlace es entre 10^3 - 10^4 L·mol⁻¹·cm⁻¹; para una cetona es entre 10 - 10^2 L·mol⁻¹·cm⁻¹; y para un aromático policíclico es entre $10^{2.4}$ - $10^{4.1}$ L·mol⁻¹·cm⁻¹ (referencia [45]). Esto indica que la absorbancia de un doble enlace es mayor que la absorbancia de una cetona, mientras que la absorbancia de un aromático policíclico puede ser mayor o menor que la absorbancia de un doble enlace pero siempre mayor a la absorbancia de una cetona. Esta relación resulta debido a que la absorbancia y la constante de absorptividad molar (ϵ) son directamente proporcionales (ecuación 4).



El espectro de UV-visible del compuesto I se realiza mediante un análisis cualitativo, por lo que no es posible calcular el valor de ϵ , pero se puede considerar a la absorbancia como un criterio para corroborar la asignación de señales debido a la proporcionalidad entre ambos parámetros.

En el espectro de UV-visible del compuesto I se observa que la absorbancia para la señal que corresponde a un doble enlace es mayor que la absorbancia de las dos señales de cetonas y que la absorbancia de la señal del aromático policíclico, tal como se espera teóricamente. Sin embargo, la absorbancia de la señal que corresponde al aromático policíclico no es mayor que la absorbancia de las dos señales de las cetonas, lo cual indica que la absorción del aromático policíclico no corresponde exactamente a anillos de benceno fusionados. Las señales y las asignaciones se muestran de manera resumida en la tabla 1.

Tabla 1. Resumen de señales obtenidas por UV-visible del compuesto I.

Señal	λ/nm	Absorbancia/A	$\epsilon/L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$ (teórico)	Grupo Funcional
1	224.0	0.731	10^3-10^4	-C=C-
2	266.0	0.387	$10-10^2$	>C=O
3	287.0	0.386	$10-10^2$	>C=O
4	434.0	0.245	$10^{2.4}-10^{4.1}$	ϕ (policíclicos)*

*No son exactamente anillos de benceno fusionados.

El espectro de IR del compuesto I (espectro 7), muestra señales de absorción que corresponden a diferentes grupos funcionales: metilo en 2980.25 cm^{-1} , 2917.80 cm^{-1} y 1365.73 cm^{-1} ; metoxilo en 2847.53 cm^{-1} ; carbonilo en 1620.35 cm^{-1} ; fenol en 1224.37 cm^{-1} ; benceno en 1563.39 cm^{-1} , 1476.85 cm^{-1} , 757.96 cm^{-1} y 712.52 cm^{-1} ; y éter en 1157.66 cm^{-1} y 1033.87 cm^{-1} .

En el espectro de IR del compuesto I no se observa la presencia de señales que correspondan a grupos funcionales hidroxilo. La intensidad de las señales que se encuentran por debajo de los 3000 cm^{-1} indican que son pocos los sustituyentes metilo en el compuesto.



Las señales a 757.96 cm^{-1} y 712.52 cm^{-1} corresponden a un benceno trisustituido en posiciones 1,2,3 (*orto* y *meta*). Las señales a 872.18 cm^{-1} y 849.62 cm^{-1} pueden corresponder a un benceno tetrasustituido en posiciones 1,2,3,5 (*orto* y *meta*), pero son poco confiables debido a que son señales débiles. Las señales y las asignaciones se muestran de manera resumida en la tabla 2.

Tabla 2. Resumen de señales obtenidas por IR del compuesto I.

Señal	ν/cm^{-1}	Intensidad	Tipo de Vibración	Vibración	Grupo Funcional
1	2980.25	Débil	Estiramiento	C-H	-CH ₃
2	2917.80	Débil	Estiramiento	C-H	-CH ₃
3	2847.53	Débil	Estiramiento	C-H	-O-CH ₃
4	1620.35	Media	Estiramiento	C=O	>C=O
5	1563.39	Débil	Estiramiento	C=C	ϕ
6	1476.85	Media	Estiramiento	C=C	ϕ
7	1365.73	Media	Flexión	C-H	-CH ₃
8	1224.37	Media	Estiramiento	C-O	ϕ -OH
9	1157.66	Media	Estiramiento	C-O	-C-O-C-
10	1033.87	Media	Estiramiento	C-O	-C-O-C-
11	757.96	Media	Flexión	C-H	ϕ (1,2,3)
12	712.52	Media	Flexión	C-H	ϕ (1,2,3)

Nota: se consideran señales de intensidad media entre 80 % y 40 % de Transmitancia.

El espectro de EM del compuesto I (espectro 6), muestra a 284 m/z el valor que corresponde al ión molecular (M^+), este valor también corresponde al pico base del espectro. No se observan pérdidas de masa lógicas debidas a la fragmentación de la molécula.

De acuerdo a la isotopía no se observa la presencia de algún átomo de halógeno en la estructura de la molécula. La masa del compuesto es par por lo que no hay un número impar de átomos de nitrógeno en el compuesto. Por lo tanto, la fórmula molecular para el compuesto I es $C_{16}H_{12}O_5$ con una masa molar de $284.263\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$.



El espectro de RMN ^1H del compuesto I (espectro 1 y 2), muestra señales a diferentes desplazamientos químicos: hidrógenos del grupo funcional metilo unido a un benceno a 2.438 ppm; hidrógenos del grupo funcional metilo unido a un fenóxido a 3.929 ppm; hidrógenos del grupo funcional benceno a 6.659 ppm, 7.056 ppm, 7.331 ppm y 7.593 ppm; e hidrógenos del grupo funcional hidroxilo unido a un benceno a 12.077 ppm y 12.274 ppm.

En el espectro de RMN ^1H del compuesto I, la señal a 6.659 ppm se muestra como un doblete y corresponde a un acoplamiento *meta* entre dos núcleos de hidrógeno involucrados que están a cuatro enlaces de distancia, su constante de acoplamiento es 2.8 Hz. De igual forma, la señal a 7.331 ppm se muestra como un doblete y corresponde a un acoplamiento *meta* entre dos núcleos de hidrógeno involucrados que están a cuatro enlaces de distancia, su constante de acoplamiento es 2.4 Hz. Las señales a 2.438 ppm, 3.929 ppm, 12.077 ppm y 12.274 ppm se muestran como señales simples, comúnmente llamadas singuletes.

Las señales a 7.056 ppm y 7.593 ppm se muestran con otro tipo de multiplicidad (la cual no se describe), debido a que los núcleos de hidrógeno involucrados presentan constantes de acoplamiento diferentes, lo que ocasiona que el desdoblamiento de las señales no siga las proporciones de intensidad establecidas en la figura 6, además de que poseen mas tipos de acoplamientos (los cuales no se describen). Las señales y las asignaciones se muestran de manera resumida en la tabla 3.

La correlación de un átomo de hidrógeno con un átomo de carbono se muestra en la columna “*Localización*” de la tabla 3, en la cual se indica en que átomo de carbono se encuentra enlazado el o los átomos de hidrógeno correspondientes a la señal que aparece a determinado desplazamiento químico. Para asignar la posición de los átomos de hidrógeno en la estructura química de la molécula, se utiliza el apoyo de los espectros de RMN de los experimentos HSQC y HMBC (como se verá mas adelante).

En el caso de los hidrógenos del grupo funcional hidroxilo que no se encuentran directamente enlazados a un átomo de carbono, la correlación se hace con el átomo de carbono que está enlazado al oxígeno del hidroxilo correspondiente.



Tabla 3. Resumen de señales obtenidas por RMN ^1H del compuesto I. *Ver figura 11.

Señal	δ/ppm	Multiplicidad	f/H	J/Hz	Grupo Funcional	Localización*
1	2.438	Singulete	3	–	$\phi\text{-CH}_3$	C16
2	3.929	Singulete	3	–	$\phi\text{-O-CH}_3$	C15
3	6.659	Doblete	1	2.8	ϕ	C2
4	7.056	–	1	–	ϕ	C7
5	7.331	Doblete	1	2.4	ϕ	C4
6	7.593	–	1	–	ϕ	C5
7	12.077	Singulete	1	–	$\phi\text{-OH}$	C8**
8	12.274	Singulete	1	–	$\phi\text{-OH}$	C1**

**Los hidrógenos se correlacionan al carbono enlazado al oxígeno del hidroxilo.

El espectro de RMN ^{13}C del compuesto I (espectro 3), muestra señales a diferentes desplazamientos químicos: carbono alifático a 22.292 ppm; carbono alifático base de oxígeno a 56.210 ppm; carbono aromático a 106.890 ppm, 108.319 ppm, 110.375 ppm, 113.787 ppm, 121.398 ppm, 124.620 ppm, 133.324 ppm, 135.353 ppm y 148.562 ppm; carbono aromático base de oxígeno a 162.619 ppm, 165.301 ppm y 166.662 ppm; y carbono de cetona a 182.070 ppm y 190.877 ppm.

En el espectro de RMN ^{13}C del compuesto I, las señales a 110.375 ppm, 113.787 ppm, 133.324 ppm, 135.353 ppm, 148.562 ppm, 162.619 ppm, 165.301 ppm, 166.662 ppm, 182.070 ppm y 190.877 ppm corresponden a carbonos cuaternarios. Las señales y las asignaciones se muestran de manera resumida en la tabla 4.

La numeración de los átomos de carbono en la estructura de la molécula se muestra en la columna “Localización” de la tabla 4, en la cual se indica que número se le asigna al átomo de carbono correspondiente a la señal que aparece a determinado desplazamiento químico. Para asignar la posición de los átomos de carbono en la estructura química de la molécula, se utiliza el apoyo de los espectros de RMN de los experimentos HSQC y HMBC (como se verá más adelante).



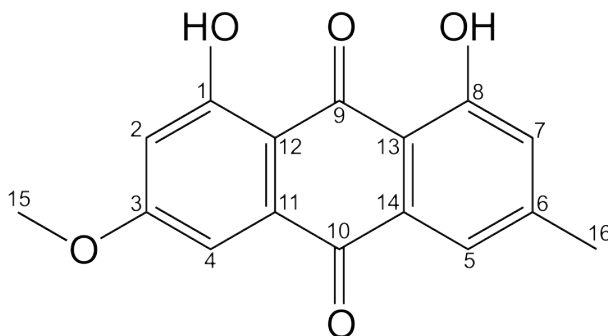
Tabla 4. Resumen de señales obtenidas por RMN ^{13}C del compuesto I. *Ver figura 11.

Señal	δ/ppm	Grupo Funcional	Localización*
1	22.292	$\phi\text{-CH}_3$	C16
2	56.210	$\phi\text{-O-CH}_3$	C15
3	106.890	ϕ	C2
4	108.319	ϕ	C4
5	110.375	ϕ	C12
6	113.787	ϕ	C13
7	121.398	ϕ	C5
8	124.620	ϕ	C7
9	133.324	ϕ	C14
10	135.353	ϕ	C11
11	148.562	ϕ	C6
12	162.619	$\phi\text{-OH}$	C8
13	165.301	$\phi\text{-OH}$	C1
14	166.662	$\phi\text{-O-CH}_3$	C3
15	182.070	$>\text{C=O}$	C10
16	190.877	$>\text{C=O}$	C9

Con la información obtenida de los espectros de UV-visible, IR, EM, RMN ^1H y RMN ^{13}C obtenidos para el compuesto I, se logra elucidar la estructura química de este compuesto, la cual se muestra en la figura 11. El nombre que recibe de acuerdo a las recomendaciones de la IUPAC es 1,8-dihidroxi-3-metoxi-6-metilanttraquinona, sin embargo, el compuesto I se conoce comúnmente como physcion y se ha reportado ampliamente en la literatura. La estructura de physcion ha sido bien planteada por medio de estas técnicas espectroscópicas en este estudio, pero estas no proporcionan suficiente información para asignar y correlacionar los átomos de hidrógeno y de carbono en la estructura de la molécula, por lo que es necesario utilizar más técnicas de espectroscopia para caracterizar por completo la estructura química.



Figura 11. 1,8-dihidroxi-3-metoxi-6-metilantraquinona.



*Numeración basada en las recomendaciones de la IUPAC.

El espectro de RMN HSQC del compuesto I (espectro 4), muestra señales para los acoplamientos químicos a un enlace de distancia entre núcleos de hidrógeno y núcleos de carbono, con estas señales es posible correlacionar a átomos de hidrógeno enlazados directamente a átomos de carbono. Las señales que se observan se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Resumen de señales obtenidas por RMN HSQC del compuesto I. *Ver figura 11.

Señal	$\delta/\text{ppm de } ^1\text{H}$	$\delta/\text{ppm de } ^{13}\text{C}$	Acoplamiento	Distancia	Correlación H-C*
1	2.438	22.292	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	1 enlace	C16
2	3.929	56.210	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	1 enlace	C15
3	6.659	106.890	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	1 enlace	C2
4	7.056	124.620	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	1 enlace	C7
5	7.331	108.319	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	1 enlace	C4
6	7.593	121.398	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	1 enlace	C5

En la columna de “Correlación H-C” en la tabla 5, se indica a que número de átomo de carbono se correlaciona el átomo de hidrógeno correspondiente al acoplamiento mostrado en la señal que aparece a determinado desplazamiento químico.

El espectro de RMN HMBC del compuesto I (espectro 5), muestra señales para los acoplamientos químicos a dos y tres enlaces de distancia entre núcleos de hidrógeno y núcleos de carbono, con estas señales es posible correlacionar a átomos de hidrógeno cercanos a átomos de carbono. Las señales que se observan se muestran en la tabla 6.



Tabla 6. Resumen de señales obtenidas por RMN HMBC del compuesto I. *Ver figura 11.

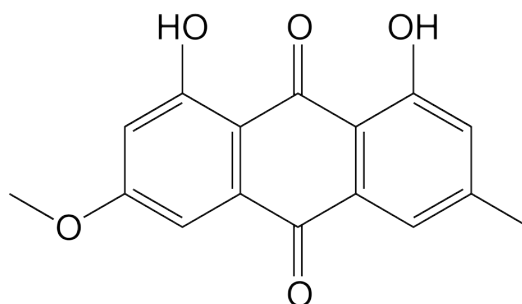
Señal	$\delta/\text{ppm de } ^1\text{H}$	$\delta/\text{ppm de } ^{13}\text{C}$	Acoplamiento	Distancia	Correlación H-C*
1	2.438	121.398	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	3 enlaces	C5
2		124.620	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	3 enlaces	C7
3		148.562	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	2 enlaces	C6
4	3.929	166.662	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	3 enlaces	C3
5	6.659	108.319	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	3 enlaces	C4
6		110.375	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	3 enlaces	C12
7		165.301	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	2 enlaces	C1
8		166.662	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	2 enlaces	C3
9	7.056	22.292	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	3 enlaces	C16
10		113.787	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	3 enlaces	C13
11		121.398	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	3 enlaces	C5
12		162.619	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	2 enlaces	C8
13	7.331	106.890	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	3 enlaces	C2
14		110.375	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	3 enlaces	C12
15		135.353	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	2 enlaces	C11
16		166.662	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	2 enlaces	C3
17		182.070	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	3 enlaces	C10
18	7.593	22.292	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	3 enlaces	C16
19		113.787	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	3 enlaces	C13
20		124.620	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	3 enlaces	C7
21		148.562	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	2 enlaces	C6
22		182.070	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	3 enlaces	C10
23	12.077	113.787	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	3 enlaces	C13
24		124.620	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	3 enlaces	C7
25		162.619	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	2 enlaces	C8
26	12.274	106.890	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	3 enlaces	C2
27		110.375	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	3 enlaces	C12
28		165.301	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	2 enlaces	C1



En la columna de “*Correlación H-C*” en la tabla 6, se indica a que número de átomo de carbono se correlaciona el átomo de hidrógeno correspondiente al o a los acoplamientos mostrados en la o las señales que aparecen a determinado desplazamiento químico.

Una vez que se tiene la estructura química de physcion es posible visualizar los probables acoplamientos químicos a dos y tres enlaces, la mayoría de ellos se observan en el espectro de RMN HMBC, sin embargo, hay unos pocos que no se observan como es el caso: del acoplamiento a dos enlaces de distancia entre el hidrógeno a 7.056 ppm y el carbono a 148.562 ppm; y del acoplamiento a dos enlaces de distancia entre el hidrógeno a 7.593 ppm y el carbono a 133.324 ppm.

Figura 12. Physcion.



Compuesto II. Emodina

7.4.2

El espectro de UV-visible del compuesto II (espectro 16), muestra señales con máximos de absorción a distintas longitudes de onda, las cuales corresponden a transiciones energéticas permitidas del grupo funcional: doble enlace a 222.5 nm (0.246 A); cetona a 252.0 nm (0.119 A), 266.0 nm (0.120 A) y 288.5 nm (0.141 A); y aromático policíclico (bencenos fusionados como naftaleno, antraceno, etcétera) a 436.0 nm (0.075 A).

El orden de magnitud de las constantes de absortividad molar teóricas son: para un doble enlace es entre 10^3 - 10^4 L·mol⁻¹·cm⁻¹; para una cetona es entre 10 - 10^2 L·mol⁻¹·cm⁻¹; y para un aromático policíclico es entre $10^{2.4}$ - $10^{4.1}$ L·mol⁻¹·cm⁻¹ (referencia [45]).



Lo anterior indica que la absorbancia de un doble enlace es mayor que la absorbancia de una cetona, mientras que la absorbancia de un aromático policíclico puede ser mayor o menor que la absorbancia de un doble enlace pero siempre mayor a la absorbancia de una cetona. Esta relación resulta debido a que la absorbancia y la constante de absorptividad molar (ϵ) son directamente proporcionales (ecuación 4). El espectro de UV-visible del compuesto II se realiza mediante un análisis cualitativo, por lo que no es posible calcular el valor de ϵ , pero se puede considerar a la absorbancia como un criterio para corroborar la asignación de señales debido a la proporcionalidad entre ambos parámetros.

En el espectro de UV-visible del compuesto II se observa que la absorbancia para la señal que corresponde a un doble enlace es mayor que la absorbancia de las tres señales de cetonas y que la absorbancia de la señal del aromático policíclico, tal como se espera teóricamente. Sin embargo, la absorbancia de la señal que corresponde al aromático policíclico no es mayor que la absorbancia de las tres señales de las cetonas, lo cual indica que la absorción del aromático policíclico no corresponde exactamente a anillos de benceno fusionados. Las señales y las asignaciones se muestran de manera resumida en la tabla 7.

Tabla 7. Resumen de señales obtenidas por UV-visible del compuesto II.

Señal	λ/nm	Absorbancia/A	$\epsilon/L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$ (teórico)	Grupo Funcional
1	222.5	0.246	10^3-10^4	-C=C-
2	252.0	0.119	$10-10^2$	>C=O
3	266.0	0.120	$10-10^2$	>C=O
4	288.5	0.141	$10-10^2$	>C=O
5	436.0	0.075	$10^{2.4}-10^{4.1}$	ϕ (policíclicos)*

*No son exactamente anillos de benceno fusionados.

El espectro de IR del compuesto II (espectro 15), muestra señales de absorción que corresponden a diferentes grupos funcionales: hidroxilo en 3356.98 cm^{-1} ; carbonilo en 1626.63 cm^{-1} ; benceno en 1559.69 cm^{-1} , 1481.46 cm^{-1} , 758.42 cm^{-1} y 724.79 cm^{-1} ; y fenol en 1209.68 cm^{-1} y 1161.98 cm^{-1} .



En el espectro de IR del compuesto II no se observa la presencia de señales por debajo de 3000 cm^{-1} que correspondan a grupos funcionales metilo y metileno. Sin embargo, la señal a 1373.00 cm^{-1} podría ser la absorción de un grupo metilo, pero es baja la posibilidad, o en todo caso, son pocos los sustituyentes metilo en el compuesto.

Las señales a 758.42 cm^{-1} y 724.79 cm^{-1} corresponden a un benceno trisustituido en posiciones 1,2,3 (*orto* y *meta*). Las señales a 1209.68 cm^{-1} y 1161.98 cm^{-1} indican la probabilidad de presentar dos tipos distintos de fenoles en la estructura de la molécula. Las señales y las asignaciones se muestran de manera resumida en la tabla 8.

Tabla 8. Resumen de señales obtenidas por IR del compuesto II.

Señal	ν/cm^{-1}	Intensidad	Tipo de Vibración	Vibración	Grupo Funcional
1	3356.98	Débil	Estiramiento	O-H	-OH
2	1626.63	Media	Estiramiento	C=O	>C=O
3	1559.69	Media	Estiramiento	C=C	ϕ
4	1481.46	Media	Estiramiento	C=C	ϕ
5	1209.68	Media	Estiramiento	C-O	ϕ -OH
6	1161.98	Media	Estiramiento	C-O	ϕ -OH
7	758.42	Media	Flexión	C-H	ϕ (1,2,3)
8	724.79	Media	Flexión	C-H	ϕ (1,2,3)

Nota: se consideran señales de intensidad media entre 80 % y 40 % de Transmitancia.

El espectro de EM del compuesto II (espectro 14), muestra a 270 m/z el valor que corresponde al ión molecular (M^+), este valor también corresponde al pico base del espectro. No se observan pérdidas de masa lógicas debidas a la fragmentación de la molécula.

De acuerdo a la isotopía no se observa la presencia de algún átomo de halógeno en la estructura de la molécula. La masa del compuesto es par por lo que no hay un número impar de átomos de nitrógeno en el compuesto. Por lo tanto, la fórmula molecular para el compuesto II es $C_{15}H_{10}O_5$ con una masa molar de $270.237\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$.



El espectro de RMN ^1H del compuesto II (espectro 9 y 10), muestra señales a diferentes desplazamientos químicos: hidrógenos del grupo funcional metilo unido a un benceno a 2.418 ppm; hidrógenos del grupo funcional benceno a 6.618 ppm, 7.012 ppm, 7.256 ppm y 7.527 ppm; e hidrógenos del grupo funcional hidroxilo unido a un benceno a 10.580 ppm, 12.132 ppm y 12.202 ppm.

En el espectro de RMN ^1H del compuesto II, la señal a 6.618 ppm se muestra como un doblete y corresponde a un acoplamiento *meta* entre dos núcleos de hidrógeno involucrados que están a cuatro enlaces de distancia, su constante de acoplamiento es 2.0 Hz. De igual forma, la señal a 7.256 ppm se muestra como un doblete y corresponde a un acoplamiento *meta* entre dos núcleos de hidrógeno involucrados que están a cuatro enlaces de distancia, su constante de acoplamiento es 2.5 Hz. Las señales a 2.418 ppm, 10.580 ppm, 12.132 ppm y 12.202 ppm se muestran como señales simples, comúnmente llamadas singuletes.

Las señales a 7.012 ppm y 7.527 ppm se muestran con otro tipo de multiplicidad (la cual no se describe), debido a que los núcleos de hidrógeno involucrados presentan constantes de acoplamiento diferentes, lo que ocasiona que el desdoblamiento de las señales no siga las proporciones de intensidad establecidas en la figura 6, además de que poseen mas tipos de acoplamientos (los cuales no se describen). Las señales y las asignaciones se muestran de manera resumida en la tabla 9.

La correlación de un átomo de hidrógeno con un átomo de carbono se muestra en la columna “*Localización*” de la tabla 9, en la cual se indica en que átomo de carbono se encuentra enlazado el o los átomos de hidrógeno correspondientes a la señal que aparece a determinado desplazamiento químico. Para asignar la posición de los átomos de hidrógeno en la estructura química de la molécula, se utiliza el apoyo de los espectros de RMN de los experimentos HSQC y HMBC (como se verá mas adelante).

En el caso de los hidrógenos del grupo funcional hidroxilo que no se encuentran directamente enlazados a un átomo de carbono, la correlación se hace con el átomo de carbono que está enlazado al oxígeno del hidroxilo correspondiente.



Tabla 9. Resumen de señales obtenidas por RMN ¹H del compuesto II. *Ver figura 13.

Señal	δ/ppm	Multiplicidad	f/H	J/Hz	Grupo Funcional	Localización*
1	2.418	Singulete	3	–	ϕ -CH ₃	C15
2	6.618	Doblete	1	2.0	ϕ	C2
3	7.012	–	1	–	ϕ	C7
4	7.256	Doblete	1	2.5	ϕ	C4
5	7.527	–	1	–	ϕ	C5
6	10.580	Singulete	1	–	ϕ -OH	C3**
7	12.132	Singulete	1	–	ϕ -OH	C8**
8	12.202	Singulete	1	–	ϕ -OH	C1**

**Los hidrógenos se correlacionan al carbono enlazado al oxígeno del hidroxilo.

El espectro de RMN ¹³C del compuesto II (espectro 11), muestra señales a diferentes desplazamientos químicos: carbono alifático a 20.900 ppm; carbono aromático a 107.368 ppm, 108.130 ppm, 108.601 ppm, 112.482 ppm, 119.710 ppm, 123.059 ppm, 132.023 ppm, 134.085 ppm y 146.776 ppm; carbono aromático base de oxígeno a 161.079 ppm, 164.111 ppm y 164.636 ppm; y carbono de cetona a 180.900 ppm y 189.190 ppm.

En el espectro de RMN ¹³C del compuesto II, las señales a 108.130 ppm, 112.482 ppm, 132.023 ppm, 134.085 ppm, 146.776 ppm, 161.079 ppm, 164.111 ppm, 164.636 ppm, 180.900 ppm y 189.190 ppm corresponden a carbonos cuaternarios. Las señales y las asignaciones se muestran de manera resumida en la tabla 10.

La numeración de los átomos de carbono en la estructura de la molécula se muestra en la columna “Localización” de la tabla 10, en la cual se indica que número se le asigna al átomo de carbono correspondiente a la señal que aparece a determinado desplazamiento químico. Para asignar la posición de los átomos de carbono en la estructura química de la molécula, se utiliza el apoyo de los espectros de RMN de los experimentos HSQC y HMBC (como se verá más adelante).



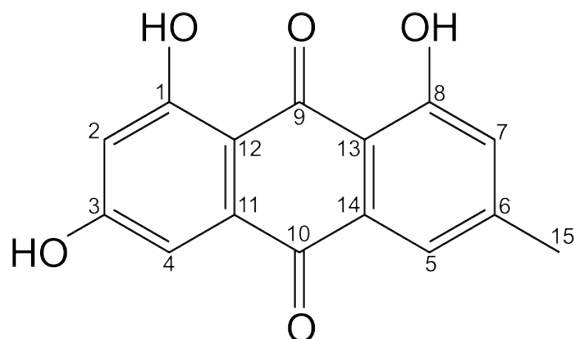
Tabla 10. Resumen de señales obtenidas por RMN ^{13}C del compuesto II. *Ver figura 13.

Señal	δ/ppm	Grupo Funcional	Localización*
1	20.900	$\phi\text{-CH}_3$	C15
2	107.368	ϕ	C2
3	108.130	ϕ	C12
4	108.601	ϕ	C4
5	112.482	ϕ	C13
6	119.710	ϕ	C5
7	123.059	ϕ	C7
8	132.023	ϕ	C14
9	134.085	ϕ	C11
10	146.776	ϕ	C6
11	161.079	$\phi\text{-OH}$	C8
12	164.111	$\phi\text{-OH}$	C3
13	164.636	$\phi\text{-OH}$	C1
14	180.900	$>\text{C}=\text{O}$	C10
15	189.190	$>\text{C}=\text{O}$	C9

Con la información obtenida de los espectros de UV-visible, IR, EM, RMN ^1H y RMN ^{13}C obtenidos para el compuesto II, se logra elucidar la estructura química de este compuesto, la cual se muestra en la figura 13. El nombre que recibe de acuerdo a las recomendaciones de la IUPAC es 1,3,8-trihidroxi-6-metilantraquinona, sin embargo, el compuesto II se conoce comúnmente como emodina y se ha reportado ampliamente en la literatura. La estructura de emodina ha sido bien planteada por medio de estas técnicas espectroscópicas en este estudio, pero estas no proporcionan suficiente información para asignar y correlacionar los átomos de hidrógeno y de carbono en la estructura de la molécula, por lo que es necesario utilizar más técnicas de espectroscopia para caracterizar por completo la estructura química.



Figura 13. 1,3,8-trihidroxi-6-metilntraquinona.



*Numeración basada en las recomendaciones de la IUPAC.

El espectro de RMN HSQC del compuesto II (espectro 12), muestra señales para los acoplamientos químicos a un enlace de distancia entre núcleos de hidrógeno y núcleos de carbono, con estas señales es posible correlacionar a átomos de hidrógeno enlazados directamente a átomos de carbono. Las señales que se observan se muestran en la tabla 11.

Tabla 11. Resumen de señales obtenidas por RMN HSQC del compuesto II. *Ver figura 13.

Señal	$\delta/\text{ppm de } ^1\text{H}$	$\delta/\text{ppm de } ^{13}\text{C}$	Acoplamiento	Distancia	Correlación H-C*
1	2.418	20.900	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	1 enlace	C15
2	6.618	107.368	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	1 enlace	C2
3	7.012	123.059	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	1 enlace	C7
4	7.256	108.601	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	1 enlace	C4
5	7.527	119.710	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	1 enlace	C5

En la columna de “Correlación H-C” en la tabla 11, se indica a que número de átomo de carbono se correlaciona el átomo de hidrógeno correspondiente al acoplamiento mostrado en la señal que aparece a determinado desplazamiento químico.

El espectro de RMN HMBC del compuesto II (espectro 13), muestra señales para los acoplamientos químicos a dos y tres enlaces de distancia entre núcleos de hidrógeno y núcleos de carbono, con estas señales es posible correlacionar a átomos de hidrógeno cercanos a átomos de carbono. Las señales que se observan se muestran en la tabla 12.



Tabla 12. Resumen de señales obtenidas por RMN HMBC del compuesto II. *Ver figura 13.

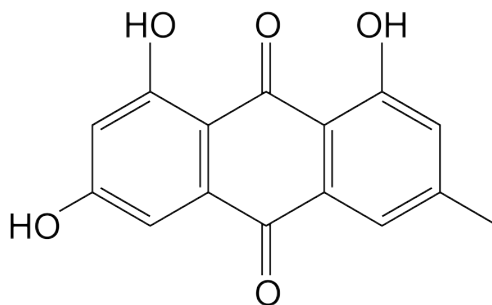
Señal	$\delta/\text{ppm de } ^1\text{H}$	$\delta/\text{ppm de } ^{13}\text{C}$	Acoplamiento	Distancia	Correlación H-C*
1	2.418	119.710	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	3 enlaces	C5
2		123.059	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	3 enlaces	C7
3		146.776	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	2 enlaces	C6
4	6.618	108.130	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	3 enlaces	C12
5		108.601	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	3 enlaces	C4
6		164.111	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	2 enlaces	C3
7		164.636	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	2 enlaces	C1
8	7.012	20.900	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	3 enlaces	C15
9		112.482	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	3 enlaces	C13
10		119.710	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	3 enlaces	C5
11		161.079	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	2 enlaces	C8
12	7.256	107.368	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	3 enlaces	C2
13		108.130	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	3 enlaces	C12
14		134.085	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	2 enlaces	C11
15		164.111	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	2 enlaces	C3
16		180.900	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	3 enlaces	C10
17	7.527	20.900	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	3 enlaces	C15
18		112.482	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	3 enlaces	C13
19		123.059	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	3 enlaces	C7
20		146.776	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	2 enlaces	C6
21		180.900	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	3 enlaces	C10
22	12.132	112.482	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	3 enlaces	C13
23		123.059	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	3 enlaces	C7
24		161.079	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	2 enlaces	C8
25	12.202	107.368	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	3 enlaces	C2
26		108.130	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	3 enlaces	C12
27		164.636	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	2 enlaces	C1



En la columna de “*Correlación H-C*” en la tabla 12, se indica a que número de átomo de carbono se correlaciona el átomo de hidrógeno correspondiente al o a los acoplamientos mostrados en la o las señales que aparecen a determinado desplazamiento químico.

Una vez que se tiene la estructura química de emodina es posible visualizar los probables acoplamientos químicos a dos y tres enlaces, la mayoría de ellos se observan en el espectro de RMN HMBC, sin embargo, hay unos pocos que no se observan como es el caso: del acoplamiento a dos enlaces de distancia entre el hidrógeno a 7.012 ppm y el carbono a 146.776 ppm; del acoplamiento a dos enlaces de distancia entre el hidrógeno a 7.527 ppm y el carbono a 132.023 ppm; y del acoplamiento a dos y tres enlaces de distancia entre el hidrógeno a 10.580 ppm y los carbonos a 164.111 ppm, 107.368 ppm y 108.601 ppm.

Figura 14. Emodina.



Compuesto III. Resveratrol

7.4.3

El espectro de UV-visible del compuesto III (espectro 24), muestra señales con máximos de absorción a distintas longitudes de onda, las cuales corresponden a transiciones energéticas permitidas de grupo funcional: doble enlace a 218.0 nm (0.979 Å); y benceno a 306.0 nm (1.302 Å).

El orden de magnitud de las constantes de absortividad molar teóricas son: para un doble enlace es entre 10^3 - 10^4 L·mol⁻¹·cm⁻¹; y para un benceno es entre 10^4 - 10^5 L·mol⁻¹·cm⁻¹ (referencia [45]).



Lo anterior indica que la absorbancia de un benceno es mayor que la absorbancia de un doble enlace. Esta relación resulta debido a que la absorbancia y la constante de absorptividad molar (ϵ) son directamente proporcionales (ecuación 4). El espectro de UV-visible del compuesto III se realiza mediante un análisis cualitativo, por lo que no es posible calcular el valor de ϵ , pero se puede considerar a la absorbancia como un criterio para corroborar la asignación de señales debido a la proporcionalidad entre ambos parámetros.

En el espectro de UV-visible del compuesto III se observa que la absorbancia para la señal que corresponde a un benceno es mayor que la absorbancia de la señal de un doble enlace, tal como se espera teóricamente. Las señales y las asignaciones se muestran de manera resumida en la tabla 13.

Tabla 13. Resumen de señales obtenidas por UV-visible del compuesto III.

Señal	λ/nm	Absorbancia/A	$\epsilon/L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$ (teórico)	Grupo Funcional
1	218.0	0.979	10^3-10^4	-C=C-
2	306.0	1.302	10^4-10^5	ϕ

El espectro de IR obtenido para el compuesto III (espectro 23), muestra señales de absorción que corresponden a diferentes grupos funcionales: hidroxilo en 3206.83 cm^{-1} ; doble enlace en 3019.47 cm^{-1} y 964.17 cm^{-1} ; benceno en 1606.79 cm^{-1} , 1585.17 cm^{-1} , 1510.41 cm^{-1} , 1461.31 cm^{-1} , 1443.30 cm^{-1} y 830.83 cm^{-1} ; y fenol en 1147.17 cm^{-1} .

En el espectro de IR del compuesto III las señales a 3019.47 cm^{-1} y 964.17 cm^{-1} corresponden a un doble enlace, cuya estereoquímica es atribuida al isómero *trans*. La señal a 830.83 cm^{-1} corresponde a un benceno disustituido en posiciones 1,4 (*para*).

Las señales a 1606.79 cm^{-1} y 1461.31 cm^{-1} corresponden a un tipo de benceno y las señales a 1585.17 cm^{-1} y 1443.30 cm^{-1} corresponden a otro tipo distinto de benceno, esta conclusión se obtiene de analizar la forma y posición de las señales.



La señal a 1382.41 cm^{-1} podría ser la absorción de un grupo metilo, pero debido a que no aparecen señales por debajo de 3000 cm^{-1} se descarta la posibilidad de presentar metilos y metilenos en la estructura de la molécula. Las señales y las asignaciones se muestran de manera resumida en la tabla 14.

Tabla 14. Resumen de señales obtenidas por IR del compuesto III.

Señal	ν/cm^{-1}	Intensidad	Tipo de Vibración	Vibración	Grupo Funcional
1	3206.83	Media	Estiramiento	O-H	OH
2	3019.47	Débil	Estiramiento	C-H	C=C (trans)
3	1606.79	Media	Estiramiento	C=C	ϕ
4	1585.17	Media	Estiramiento	C=C	ϕ
5	1510.41	Media	Estiramiento	C=C	ϕ
6	1461.31	Media	Estiramiento	C=C	ϕ
7	1443.30	Media	Estiramiento	C=C	ϕ
8	1147.17	Intensa	Estiramiento	C-O	ϕ -OH
9	964.17	Media	Flexión	C-H	C=C (trans)
10	830.83	Media	Flexión	C-H	ϕ (1,4)

Nota: se consideran señales de intensidad media entre 80 % y 40 % de Transmitancia.

El espectro de EM del compuesto III (espectro 22), muestra a 228 m/z el valor que corresponde al ión molecular (M^+), este valor también corresponde al pico base del espectro. No se observan pérdidas de masa lógicas debidas a la fragmentación de la molécula.

De acuerdo a la isotopía no se observa la presencia de algún átomo de halógeno en la estructura de la molécula. La masa del compuesto es par por lo que no hay un número impar de átomos de nitrógeno en el compuesto. Por lo tanto, la fórmula molecular para el compuesto III es $C_{14}H_{12}O_3$ con una masa molar de $228.243\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$.



El espectro de RMN ^1H del compuesto III (espectro 17 y 18), muestra señales a diferentes desplazamientos químicos: hidrógenos del grupo funcional benceno a 6.271 ppm, 6.542 ppm, 6.837 ppm y 7.417 ppm; hidrógenos del grupo funcional doble enlace a 6.881 ppm y 7.017 ppm; e hidrógenos del grupo funcional hidroxilo unido a un benceno a 8.176 ppm, y 8.442 ppm.

En el espectro de RMN ^1H del compuesto III, la señal a 6.271 ppm se muestra como un triplete y corresponde a dos acoplamientos *meta* entre tres núcleos de hidrógeno involucrados que están a cuatro enlaces de distancia cada uno, su constante de acoplamiento es 2.4 Hz. Las señales a 6.881 ppm y 7.017 ppm se muestran como un doblete cada una (aunque podría ser un doble de dobles debido a las interacciones de ambos hidrógenos), aun así corresponden a un acoplamiento entre dos núcleos de hidrógeno involucrados que están a tres enlaces de distancia y que es característico de un doble enlace *trans*, la constante de acoplamiento para cada doblete es 16.4 Hz. Las señales a 8.176 ppm y 8.442 ppm se muestran como señales simples, comúnmente llamadas singuletes.

Las señales a 6.542 ppm, 6.837 ppm y 7.417 ppm se muestran con otro tipo de multiplicidad (la cual no se describe), debido a que los núcleos de hidrógeno involucrados presentan constantes de acoplamiento diferentes, lo que ocasiona que el desdoblamiento de las señales no siga las proporciones de intensidad establecidas en la figura 6, además de que poseen mas tipos de acoplamientos (los cuales no se describen). Las señales y las asignaciones se muestran de manera resumida en la tabla 15.

La correlación de un átomo de hidrógeno con un átomo de carbono se muestra en la columna “*Localización*” de la tabla 15, en la cual se indica en que átomo de carbono se encuentra enlazado el o los átomos de hidrógeno correspondientes a la señal que aparece a determinado desplazamiento químico. Para asignar la posición de los átomos de hidrógeno en la estructura química de la molécula, se utiliza el apoyo de los espectros de RMN de los experimentos HSQC y HMBC (como se verá mas adelante).



En el caso de los hidrógenos del grupo funcional hidroxilo que no se encuentran directamente enlazados a un átomo de carbono, la correlación se hace con el átomo de carbono que está enlazado al oxígeno del hidroxilo correspondiente.

Tabla 15. Resumen de señales obtenidas por RMN ¹H del compuesto III. *Ver figura 15.

Señal	δ/ppm	Multiplicidad	f/H	J/Hz	Grupo Funcional	Localización*
1	6.271	Triplete	1	2.4	φ	C2
2	6.542	–	2	–	φ	C4 y C6
3	6.837	–	2	–	φ	C3'' y C5''
4	6.881	Doblete	1	16.4	-CH=CH-	C1'
5	7.017	Doblete	1	16.4	-CH=CH-	C2'
6	7.417	–	2	–	φ	C2'' y C6''
7	8.176	Singulete	2	–	-OH	C1 y C3**
8	8.442	Singulete	1	–	-OH	C4''**

**Los hidrógenos se correlacionan al carbono enlazado al oxígeno del hidroxilo.

El espectro de RMN ¹³C del compuesto III (espectro 19), muestra señales a diferentes desplazamientos químicos: carbono aromático a 101.029 ppm, 103.522 ppm, 114.605 ppm, 126.562 ppm, 126.907 ppm y 138.271 ppm; carbono de doble enlace a 124.710 ppm y 127.248 ppm; y carbono aromático base de oxígeno a 156.176 ppm y 157.459 ppm. Las señales a 126.907 ppm, 138.271 ppm, 156.176 ppm y 157.459 ppm corresponden a carbonos cuaternarios. Las señales y las asignaciones se muestran de manera resumida en la tabla 16.

La numeración de los átomos de carbono en la estructura de la molécula se muestra en la columna “Localización” de la tabla 16, en la cual se indica que número se le asigna al átomo de carbono correspondiente a la señal que aparece a determinado desplazamiento químico. Para asignar la posición de los átomos de carbono en la estructura química de la molécula, se utiliza el apoyo de los espectros de RMN de los experimentos HSQC y HMBC (como se verá mas adelante).



Tabla 16. Resumen de señales obtenidas por RMN ^{13}C del compuesto III. *Ver figura 15.

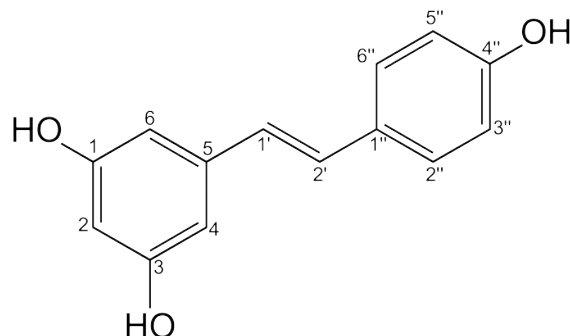
Señal	δ/ppm	Grupo Funcional	Localización*
1	101.029	ϕ	C2
2	103.522	ϕ	C4 y C6
3	114.605	ϕ	C3'' y C5''
4	124.710	-CH=CH-	C1'
5	126.562	ϕ	C2'' y C6''
6	126.907	ϕ	C1''
7	127.248	-CH=CH-	C2'
8	138.271	ϕ	C5
9	156.176	$\phi\text{-O-}$	C4''
10	157.459	$\phi\text{-O-}$	C1 y C3

No se observan todas las señales de carbono e hidrógeno que se esperarían, debido a que los carbonos e hidrógenos tienen un entorno electrónico similar, lo que los hace ser equivalentes químicamente.

Con la información obtenida de los espectros de UV-visible, IR, EM, RMN ^1H y RMN ^{13}C obtenidos para el compuesto III, se logra elucidar la estructura química de este compuesto, la cual se muestra en la figura 15. El nombre que recibe de acuerdo a las recomendaciones de la IUPAC es (*E*)-5-(4-hidroxiestiril)-1,3-dihidroxibenceno, sin embargo, el compuesto III se conoce comúnmente como resveratrol y se ha reportado ampliamente en la literatura. La estructura de resveratrol ha sido bien planteada por medio de estas técnicas espectroscópicas en este estudio, pero estas no proporcionan suficiente información para asignar y correlacionar los átomos de hidrógeno y de carbono en la estructura de la molécula, por lo que es necesario utilizar más técnicas de espectroscopia para caracterizar por completo la estructura química.



Figura 15. (E)-5-(4-hidroxiestiril)-1,3-dihidroxibenceno.



*Numeración basada en las recomendaciones de la IUPAC.

El espectro de RMN HSQC del compuesto III (espectro 20), muestra señales para los acoplamientos químicos a un enlace de distancia entre núcleos de hidrógeno y núcleos de carbono, con estas señales es posible correlacionar a átomos de hidrógeno enlazados directamente a átomos de carbono. Las señales que se observan se muestran en la tabla 17.

Tabla 17. Resumen de señales obtenidas por RMN HSQC del compuesto III. *Ver figura 15.

Señal	$\delta/\text{ppm de } ^1\text{H}$	$\delta/\text{ppm de } ^{13}\text{C}$	Acoplamiento	Distancia	Correlación H-C*
1	6.271	101.029	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	1 enlace	C2
2	6.542	103.522	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	1 enlace	C4 y C6
3	6.837	114.605	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	1 enlace	C3'' y C5''
4	6.881	124.710	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	1 enlace	C1'
5	7.017	127.248	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	1 enlace	C2'
6	7.417	126.562	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	1 enlace	C2'' y C6''

En la columna de "Correlación H-C" en la tabla 17, se indica a que número de átomo de carbono se correlaciona el átomo de hidrógeno correspondiente al acoplamiento mostrado en la señal que aparece a determinado desplazamiento químico.

El espectro de RMN HMBC del compuesto III (espectro 21), muestra señales para los acoplamientos químicos a dos y tres enlaces de distancia entre núcleos de hidrógeno y núcleos de carbono, con estas señales es posible correlacionar a átomos de hidrógeno cercanos a átomos de carbono. Las señales que se observan se muestran en la tabla 18.



Tabla 18. Resumen de señales obtenidas por RMN HMBC del compuesto III. *Ver figura 15.

Señal	$\delta/\text{ppm de } ^1\text{H}$	$\delta/\text{ppm de } ^{13}\text{C}$	Acoplamiento	Distancia	Correlación H-C*
1	6.271	103.522	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	3 enlaces	C4 y C6
2		157.459	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	2 enlaces	C1 y C3
3	6.542	101.029	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	3 enlaces	C2
4		103.522	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	3 enlaces	C4 y C6
5		124.710	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	3 enlaces	C1'
6		157.459	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	2 enlaces	C1 y C3
7	6.837	114.605	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	3 enlaces	C3'' y C5''
8		126.562	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	2 enlaces	C2'' y C6''
9		126.907	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	3 enlaces	C1''
10		156.176	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	2 enlaces	C4''
11	6.881	103.522	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	3 enlaces	C4 y C6
12		126.907	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	3 enlaces	C1''
13		127.248	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	2 enlaces	C2'
14		138.271	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	2 enlaces	C5
15	7.017	124.710	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	2 enlaces	C1'
16		126.562	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	3 enlaces	C2'' y C6''
17		126.907	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	2 enlaces	C1''
18		138.271	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	3 enlaces	C5
19	7.417	114.605	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	2 enlaces	C3'' y C5''
20		126.562	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	3 enlaces	C2'' y C6''
21		126.907	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	2 enlaces	C1''
22		127.248	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	3 enlaces	C2'
23		156.176	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	3 enlaces	C4''
24	8.176	101.029	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	3 enlaces	C2
25		103.522	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	3 enlaces	C4 y C6
26		157.459	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	2 enlaces	C1 y C3
27	8.442	114.605	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	3 enlaces	C3'' y C5''

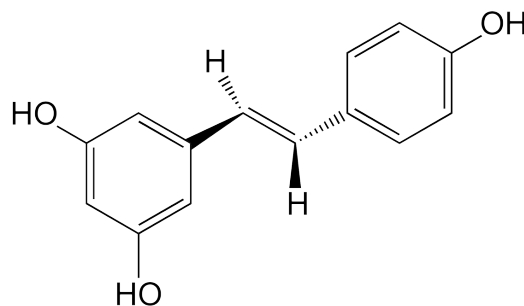


En la columna de “*Correlación H-C*” en la tabla 18, se indica a que número de átomo de carbono se correlaciona el átomo de hidrógeno correspondiente al o a los acoplamientos mostrados en la o las señales que aparecen a determinado desplazamiento químico.

Una vez que se tiene la estructura química de resveratrol es posible visualizar los probables acoplamientos químicos a dos y tres enlaces, la mayoría de ellos se observan en el espectro de RMN HMBC, sin embargo, hay unos pocos que no se observan como es el caso: del acoplamiento a dos enlaces de distancia entre el hidrógeno a 6.542 ppm y el carbono a 138.271 ppm; y del acoplamiento a dos enlaces de distancia entre el hidrógeno a 8.442 ppm y el carbono a 156.176 ppm.

En la figura 15 no se muestra la estereoquímica correcta del resveratrol, debido a que el objetivo en esa estructura es mostrar la numeración de los átomos de carbono para poder entender las correlaciones hidrógeno-carbono. En la figura 16 se muestra la distribución espacial de los sustituyentes en la molécula de resveratrol, mostrando el doble enlace *trans*.

Figura 16. Resveratrol.



En la literatura consultada son pocos los artículos que reportan la caracterización de la estructura de la molécula de resveratrol mediante RMN, el método que ha sido mayormente reportado es mediante HPLC y el uso de estándares auténticos de resveratrol. Con este estudio se establecen las asignaciones, correlaciones y acoplamientos hidrógeno-carbono para la estructura del resveratrol mediante RMN utilizando los experimentos de ^1H , ^{13}C , HSQC y HMBC.



Compuesto IV. Acetilado

7.4.4

El espectro de UV-visible del compuesto IV (espectro 32), muestra señales con máximos de absorción a distintas longitudes de onda, las cuales corresponden a transiciones energéticas permitidas de grupo funcional: doble enlace a 207.0 nm (1.133 A); éster 228.0 nm (0.995 A); y benceno a 299.0 nm (1.701 A). El orden de magnitud de las constantes de absorptividad molar teóricas son: para un doble enlace es entre 10^3 - 10^4 $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$; para un éster es de $10^{1.7}$ $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$; y para un benceno es entre 10^4 - 10^5 $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$ (referencia [45]).

Lo anterior indica que la absorbancia de un benceno es mayor que la absorbancia de un doble enlace y que la absorbancia de un doble enlace es mayor que la absorbancia de un éster. Esta relación resulta debido a que la absorbancia y la constante de absorptividad molar (ϵ) son directamente proporcionales (ecuación 4). El espectro de UV-visible del compuesto IV se realiza mediante un análisis cualitativo, por lo que no es posible calcular el valor de ϵ , pero se puede considerar a la absorbancia como un criterio para corroborar la asignación de señales debido a la proporcionalidad entre ambos parámetros.

En el espectro de UV-visible del compuesto IV se observa que la absorbancia para la señal que corresponde a un benceno es mayor que la absorbancia de la señal de un doble enlace y que la absorbancia de un doble enlace es mayor que la absorbancia de un éster, tal como se espera teóricamente. Las señales y las asignaciones se muestran de manera resumida en la tabla 19.

Tabla 19. Resumen de señales obtenidas por UV-visible del compuesto IV.

Señal	λ/nm	Absorbancia/A	$\epsilon/L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$ (teórico)	Grupo Funcional
1	207.0	1.133	10^3 - 10^4	-C=C-
2	228.0	0.995	$10^{1.7}$	-O-CO-
3	299.0	1.701	10^4 - 10^5	ϕ



El espectro de IR obtenido para el compuesto IV (espectro 31), muestra señales de absorción que corresponden a diferentes grupos funcionales: éster en 1751.89 cm^{-1} , 1189.06 cm^{-1} y 1124.32 cm^{-1} ; benceno en 1610.67 cm^{-1} , 1579.82 cm^{-1} , 1505.17 cm^{-1} , 1017.37 cm^{-1} y 902.03 cm^{-1} ; metilo en 1369.09 cm^{-1} ; y doble enlace en 971.91 cm^{-1} .

En el espectro de IR del compuesto IV la señal a 971.91 cm^{-1} corresponde a un doble enlace, cuya estereoquímica es atribuida al isómero *trans*. La señal a 1751.89 cm^{-1} corresponde al carbonilo de un éster, esta asignación se confirma con las señales que aparecen a 1189.06 cm^{-1} y 1124.32 cm^{-1} . No se observan las señales correspondientes al grupo funcional hidroxilo por arriba de 3000 cm^{-1} .

La señal a 1369.09 cm^{-1} corresponde a la absorción de un grupo metilo de un solo tipo, debido a que la intensidad de la señal es buena y no aparecen mas señales por debajo de 3000 cm^{-1} correspondientes a metilos. Las señales y las asignaciones se muestran de manera resumida en la tabla 20.

Tabla 20. Resumen de señales obtenidas por IR del compuesto IV.

Señal	ν/cm^{-1}	Intensidad	Tipo de Vibración	Vibración	Grupo Funcional
1	1751.89	Media	Estiramiento	C=O	-O-C=O
2	1610.67	Débil	Estiramiento	C=C	ϕ
3	1579.82	Débil	Estiramiento	C=C	ϕ
4	1505.17	Débil	Estiramiento	C=C	ϕ
5	1369.09	Media	Flexión	C-H	-CH ₃
6	1189.06	Media	Estiramiento	C-O	-O-C=O
7	1124.32	Media	Estiramiento	C-O	-O-C=O
8	1017.37	Media	Flexión	C-H	ϕ
9	971.91	Media	Flexión	C-H	-CH=CH- (<i>trans</i>)
10	902.03	Media	Flexión	C-H	ϕ

Nota: se consideran señales de intensidad media entre 80 % y 40 % de Transmitancia.



El espectro de EM del compuesto IV (espectro 30), muestra a 354 m/z el valor que corresponde al ión molecular (M^+) y a 228 m/z muestra el valor que corresponde al pico base del espectro (resveratrol).

Se observan 3 pérdidas de masa lógicas debidas a la fragmentación de la molécula: a 312 m/z se observa la pérdida de un acetilo ($M-42$), excepto un protón ($M-\text{COCH}_2$); a 270 m/z se observa la pérdida de dos acetilos ($M-84$), excepto dos protones ($M-(\text{COCH}_2)_2$); y a 228 m/z se observa la pérdida de tres acetilos ($M-126$), excepto tres protones ($M-(\text{COCH}_2)_3$). En los casos en donde se hace excepción a la pérdida de protones, se debe a que hay un rearrreglo en la molécula para protonarse.

De acuerdo a la isotopía no se observa la presencia de algún átomo de halógeno en la estructura de la molécula. La masa del compuesto es par por lo que no hay un número impar de átomos de nitrógeno en el compuesto. Por lo tanto, la fórmula molecular para el compuesto IV es $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{O}_6$ con una masa molar de $354.353 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

El espectro de RMN ^1H del compuesto IV (espectro 25 y 26), muestra señales a diferentes desplazamientos químicos: hidrógenos del grupo funcional metilo a 2.299 ppm; hidrógenos del grupo funcional benceno a 6.823 ppm, 7.086 ppm, 7.113 ppm y 7.479 ppm; e hidrógenos del grupo funcional doble enlace a 6.961 ppm y 7.054 ppm.

En el espectro de RMN ^1H del compuesto IV, la señal a 6.823 ppm se muestra como un triplete y corresponde a dos acoplamientos *meta* entre tres núcleos de hidrógeno involucrados que están a cuatro enlaces de distancia cada uno, su constante de acoplamiento es de 2.0 Hz. Las señales a 6.961 ppm y 7.054 ppm se muestran como un doblete cada una (aunque podría ser un doble de dobles debido a las interacciones de ambos hidrógenos), aun así corresponden a un acoplamiento entre dos núcleos de hidrógeno involucrados que están a tres enlaces de distancia y que es característico de un doble enlace *trans*, la constante de acoplamiento para cada doblete es 16.5 Hz y 16.0 Hz, respectivamente. La señal a 2.299 ppm se muestra como señal simple, comúnmente llamada singulete.



Las señales a 7.086 ppm, 7.113 ppm y 7.479 ppm se muestran con otro tipo de multiplicidad (la cual no se describe), debido a que los núcleos de hidrógeno involucrados presentan constantes de acoplamiento diferentes, lo que ocasiona que el desdoblamiento de las señales no siga las proporciones de intensidad establecidas en la figura 6, además de que poseen mas tipos de acoplamientos (los cuales no se describen). Las señales y las asignaciones se muestran de manera resumida en la tabla 21.

La correlación de un átomo de hidrógeno con un átomo de carbono se muestra en la columna “Localización” de la tabla 21, en la cual se indica en que átomo de carbono se encuentra enlazado el o los átomos de hidrógeno correspondientes a la señal que aparece a determinado desplazamiento químico. Para asignar la posición de los átomos de hidrógeno en la estructura química de la molécula, se utiliza el apoyo de los espectros de RMN de los experimentos HSQC y HMBC (como se verá mas adelante).

Tabla 21. Resumen de señales obtenidas por RMN ^1H del compuesto IV. *Ver figura 17.

Señal	δ/ppm	Multiplicidad	f/H	J/Hz	Grupo Funcional	Localización*
1	2.299	Singulete	9	–	-CH ₃	CII y CII'
2	6.823	Triplete	1	2.0	ϕ	C2
3	6.961	Doblete	1	16.5	-CH=CH-	C1'
4	7.054	Doblete	1	16	-CH=CH-	C2'
5	7.086	–	2	–	ϕ	C3'' y C5''
6	7.113	Doblete	2	2.5	ϕ	C4 y C6
7	7.479	–	2	–	ϕ	C2'' y C6''

El espectro de RMN ^{13}C del compuesto IV (espectro 27), muestra señales a diferentes desplazamientos químicos: carbono alifático a 21.246 ppm; carbono aromático a 114.527 ppm, 117.024 ppm, 122.016 ppm, 127.773 ppm, 134.583 ppm y 139.657 ppm; carbono de doble enlace a 127.327 ppm y 129.780 ppm; carbono aromático base de oxígeno a 150.561 ppm y 151.442 ppm; y carbono del carbonilo de un éster a 169.076 ppm y 169.473 ppm.



En el espectro de RMN ^{13}C del compuesto IV, las señales a 134.583 ppm, 139.657 ppm, 150.561 ppm, 151.442 ppm, 169.076 ppm y 169.473 ppm corresponden a carbonos cuaternarios. Las señales y las asignaciones se muestran de manera resumida en la tabla 22.

La numeración de los átomos de carbono en la estructura de la molécula se muestra en la columna “Localización” de la tabla 22, en la cual se indica que número se le asigna al átomo de carbono correspondiente a la señal que aparece a determinado desplazamiento químico. Para asignar la posición de los átomos de carbono en la estructura química de la molécula, se utiliza el apoyo de los espectros de RMN de los experimentos HSQC y HMBC (como se verá mas adelante).

Tabla 22. Resumen de señales obtenidas por RMN ^{13}C del compuesto IV. *Ver figura 17.

Señal	δ/ppm	Grupo Funcional	Localización*
1	21.246	-CH ₃	CII y CII'
2	114.527	ϕ	C2
3	117.024	ϕ	C4 y C6
4	122.016	ϕ	C3'' y C5''
5	127.327	-CH=CH-	C1'
6	127.773	ϕ	C2'' y C6''
7	129.780	-CH=CH-	C2'
8	134.583	ϕ	C1''
9	139.657	ϕ	C5
10	150.561	ϕ -O-	C4''
11	151.442	ϕ -O-	C1 y C3
12	169.076	-COO-	CI
13	169.473	-COO-	CI'

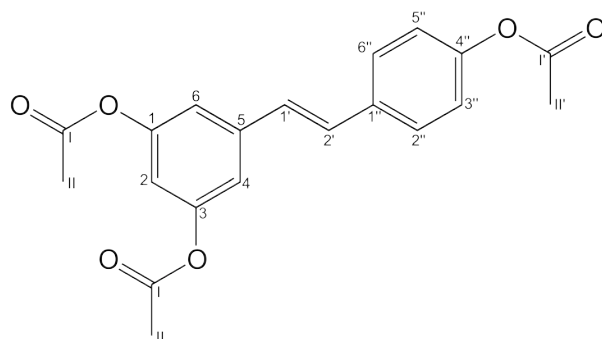


No se observan todas las señales de carbono e hidrógeno que se esperarían, debido a que los carbonos e hidrógenos tienen un entorno electrónico similar, lo que los hace ser equivalentes químicamente.

Con la información obtenida de los espectros de UV-visible, IR, EM, RMN ^1H y RMN ^{13}C obtenidos para el compuesto IV, se logra elucidar la estructura química de este compuesto, la cual se muestra en la figura 17. El nombre que recibe de acuerdo a las recomendaciones de la IUPAC es (*E*)-5-(4-acetoxiestiril)-1,3-diacetoxibenceno, sin embargo, el compuesto IV lo podemos llamar resveratrol acetilado y para fines prácticos en este estudio, solo como “acetilado”.

La estructura del acetilado ha sido bien planteada por medio de estas técnicas espectroscópicas en este estudio, pero estas no proporcionan suficiente información para asignar y correlacionar los átomos de hidrógeno y de carbono en la estructura de la molécula, por lo que es necesario utilizar más técnicas de espectroscopia para caracterizar por completo la estructura química.

Figura 17. (*E*)-5-(4-acetoxiestiril)-1,3-diacetoxibenceno.



*Numeración basada en las recomendaciones de la IUPAC.

El espectro de RMN HSQC del compuesto IV (espectro 28), muestra señales para los acoplamientos químicos a un enlace de distancia entre núcleos de hidrógeno y núcleos de carbono, con estas señales es posible correlacionar a átomos de hidrógeno enlazados directamente a átomos de carbono. Las señales que se observan se muestran en la tabla 23.



Tabla 23. Resumen de señales obtenidas por RMN HSQC del compuesto IV. *Ver figura 17.

Señal	$\delta/\text{ppm de } ^1\text{H}$	$\delta/\text{ppm de } ^{13}\text{C}$	Acoplamiento	Distancia	Correlación H-C*
1	2.299	21.246	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	1 enlace	CII y CII'
2	6.823	114.527	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	1 enlace	C2
3	6.961	127.327	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	1 enlace	C1'
4	7.054	129.780	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	1 enlace	C2'
5	7.086	122.016	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	1 enlace	C3'' y C5''
6	7.113	117.024	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	1 enlace	C4 y C6
7	7.479	127.773	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	1 enlace	C2'' y C6''

En la columna de “Correlación H-C” en la tabla 23, se indica a que número de átomo de carbono se correlaciona el átomo de hidrógeno correspondiente al acoplamiento mostrado en la señal que aparece a determinado desplazamiento químico.

El espectro de RMN HMBC del compuesto IV (espectro 29), muestra señales para los acoplamientos químicos a dos y tres enlaces de distancia entre núcleos de hidrógeno y núcleos de carbono, con estas señales es posible correlacionar a átomos de hidrógeno cercanos a átomos de carbono. Las señales que se observan se muestran en la tabla 24.

En la columna de “Correlación H-C” en la tabla 24, se indica a que número de átomo de carbono se correlaciona el átomo de hidrógeno correspondiente al o a los acoplamientos mostrados en la o las señales que aparecen a determinado desplazamiento químico.

Una vez que se tiene la estructura química del acetilado es posible visualizar los probables acoplamientos químicos a dos y tres enlaces, la mayoría de ellos se observan en el espectro de RMN HMBC, sin embargo, hay unos pocos que no se observan como es el caso: del acoplamiento a dos enlaces de distancia entre el hidrógeno a 7.113 ppm y el carbono a 139.657 ppm; y del acoplamiento a dos enlaces de distancia entre el hidrógeno a 7.479 ppm y el carbono a 134.583 ppm.



Tabla 24. Resumen de señales obtenidas por RMN HMBC del compuesto IV. *Ver figura 17.

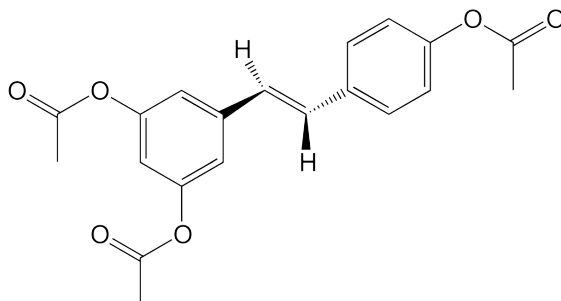
Señal	$\delta/\text{ppm de } ^1\text{H}$	$\delta/\text{ppm de } ^{13}\text{C}$	Acoplamiento	Distancia	Correlación H-C*
1**	2.299	169.076**	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	2 enlaces	C1
		169.473**	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	2 enlaces	C1'
2	6.823	117.024	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	3 enlaces	C4 y C6
3		151.442	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	2 enlaces	C1 y C3
4	6.961	117.024	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	3 enlaces	C4 y C6
5		129.780	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	2 enlaces	C2'
6		134.583	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	3 enlaces	C1''
7		139.657	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	2 enlaces	C5
8**	7.054	127.327**	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	2 enlaces	C1'
		127.773**	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	3 enlaces	C2'' y C6''
9	7.086	134.583	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	2 enlaces	C1''
10		139.657	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	3 enlaces	C5
11		122.016	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	3 enlaces	C3'' y C5''
12		127.773	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	2 enlaces	C2'' y C6''
13	7.113	134.583	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	3 enlaces	C1''
14		150.561	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	2 enlaces	C4''
15	7.479	114.527	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	3 enlaces	C2
16		117.024	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	3 enlaces	C4 y C6
17		127.327	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	3 enlaces	C1'
18		151.442	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	2 enlaces	C1 y C3
19	7.479	122.016	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	2 enlaces	C3'' y C5''
20		127.773	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	3 enlaces	C2'' y C6''
21		129.780	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	3 enlaces	C2'
22		150.561	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	3 enlaces	C4''

**Se observa solo una señal para correlacionar el átomo de hidrógeno con los dos átomos de carbono distintos.



En la figura 17 no se muestra la estereoquímica correcta del acetilado, debido a que el objetivo en esa estructura es mostrar la numeración de los átomos de carbono para poder entender las correlaciones hidrógeno-carbono. En la figura 18 se muestra la distribución espacial de los sustituyentes en la molécula del acetilado, mostrando el doble enlace *trans*.

Figura 18. Acetilado.



En la literatura consultada no se reporta la caracterización de la estructura de la molécula del acetilado mediante RMN. Con este estudio se establecen las asignaciones, correlaciones y acoplamientos hidrógeno-carbono para la estructura del acetilado mediante RMN utilizando los experimentos de ^1H , ^{13}C , HSQC y HMBC.

Compuesto V. Epóxido

7.4.5

El espectro de UV-visible del compuesto V (espectro 40), muestra señales con máximos de absorción a distintas longitudes de onda, las cuales corresponden a transiciones energéticas permitidas de grupo funcional: epóxido a 204.5 nm (0.838 A); éster 230.5 nm (0.511 A); y benceno a 297.0 nm (0.061 A).

El orden de magnitud de las constantes de absortividad molar teóricas son: para un epóxido es de $10^{3.6} \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$; para un éster es de $10^{1.7} \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$; y para un benceno es entre 10^4 - $10^5 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ (referencia [45]).



Lo anterior indica que la absorbancia de un benceno es mayor que la absorbancia de un epóxido y que la absorbancia de un epóxido es mayor que la absorbancia de un éster. Esta relación resulta debido a que la absorbancia y la constante de absorción molar (ϵ) son directamente proporcionales (ecuación 4). El espectro de UV-visible del compuesto V se realiza mediante un análisis cualitativo, por lo que no es posible calcular el valor de ϵ , pero se puede considerar a la absorbancia como un criterio para corroborar la asignación de señales debido a la proporcionalidad entre ambos parámetros.

En el espectro de UV-visible del compuesto V se observa que la absorbancia para la señal que corresponde a un epóxido es mayor que la absorbancia de un éster, tal como se espera teóricamente. Sin embargo, la señal que corresponde a un benceno es mucho menor que la absorbancia del éster y del epóxido, lo cual indica que la conjugación ha cambiado entre los dos anillo aromáticos. Las señales y las asignaciones se muestran de manera resumida en la tabla 25.

Tabla 25. Resumen de señales obtenidas por UV-visible del compuesto V.

Señal	λ/nm	Absorbancia/A	$\epsilon/L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$ (teórico)	Grupo Funcional
1	204.5	0.838	$10^{3.6}$	-C-O-C-
2	230.5	0.511	$10^{1.7}$	-O-C=O
3	297.0	0.061	10^4-10^5	ϕ

El espectro de IR obtenido para el compuesto V (espectro 39), muestra señales de absorción que corresponden a diferentes grupos funcionales: éster en 1768.82 cm^{-1} ; éster y epóxido a 1196.23 cm^{-1} y 1125.07 cm^{-1} ; benceno en 1616.26 cm^{-1} , 1594.55 cm^{-1} , 1510.17 cm^{-1} , 1021.89 cm^{-1} y 910.10 cm^{-1} ; y metilo en 1369.84 cm^{-1} .

En el espectro de IR del compuesto V no se observa la señal del doble enlace. La señal a 1768.82 cm^{-1} corresponde al carbonilo de un éster, esta asignación se confirma con las señales que aparecen a 1196.23 cm^{-1} y 1125.07 cm^{-1} , aunque estas dos últimas señales también corresponden a un epóxido.



La señal a 1369.84 cm^{-1} corresponde a la absorción de un grupo metilo de un solo tipo, debido a que la intensidad de la señal es buena y no aparecen mas señales por debajo de 3000 cm^{-1} correspondientes a metilos. No se observan las señales correspondientes al grupo funcional hidroxilo por arriba de 3000 cm^{-1} . Las señales y las asignaciones se muestran de manera resumida en la tabla 26.

Tabla 26. Resumen de señales obtenidas por IR del compuesto V.

Señal	ν/cm^{-1}	Intensidad	Tipo de Vibración	Vibración	Grupo Funcional
1	1768.82	Intensa	Estiramiento	C=O	-O-C=O
2	1616.26	Media	Estiramiento	C=C	ϕ
3	1594.55	Media	Estiramiento	C=C	ϕ
4	1510.17	Media	Estiramiento	C=C	ϕ
5	1369.84	Media	Flexión	C-H	-CH ₃
6	1196.23	Intensa	Estiramiento	C-O	-O-C=O -C-O-C-
7	1125.07	Media	Estiramiento	C-O	-O-C=O -C-O-C-
8	1021.89	Media	Flexión	C-H	ϕ
9	910.10	Media	Flexión	C-H	ϕ

Nota: se consideran señales de intensidad media entre 80 % y 40 % de Transmitancia.

El espectro de EM del compuesto V (espectro 38), muestra a 370 m/z el valor que corresponde al ión molecular (M^+) y a 328 m/z muestra el valor que corresponde al pico base del espectro.

De acuerdo a la isotopía no se observa la presencia de algún átomo de halógeno en la estructura de la molécula. La masa del compuesto es par por lo que no hay un número impar de átomos de nitrógeno en el compuesto. Por lo tanto, la formula molecular para el compuesto V es $C_{20}H_{18}O_7$ con una masa molar de $370.353\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$.



Se observan 7 pérdidas de masa lógicas debidas a la fragmentación de la molécula: a 354 m/z se observa la pérdida de un oxígeno (M-16, M-O); a 328 m/z se observa la pérdida de un acetilo (M-42), excepto un protón (M-COCH₂); a 312 m/z se observa la pérdida de un acetilo y un oxígeno (M-58), excepto un protón (M-O(COCH₂)); a 286 m/z se observa la pérdida de dos acetilos (M-84), excepto dos protones (M-(COCH₂)₂); a 268 m/z se observa la pérdida de dos acetilos y un oxígeno (M-102, M-O(COCH₃)₂); a 244 m/z se observa la pérdida de tres acetilos (M-126), excepto tres protones (M-(COCH₂)₃); y a 226 m/z se observa la pérdida de tres acetilos y un oxígeno (M-144), excepto un protón (M-O(COCH₃)₂(COCH₂)). En los casos en donde se hace excepción a la pérdida de protones, se debe a que hay un rearrreglo en la molécula para protonarse. En los casos en donde se pierde un átomo de oxígeno, la pérdida proviene del enlace -C-O-C- del epóxido.

Aunque es poco probable que salga un átomo de oxígeno en forma de radical, la primer fragmentación de la molécula es debida a la pérdida de un oxígeno proveniente del epóxido. Sin contemplar la primer pérdida, la segunda fragmentación de la molécula se debe a la pérdida de un acetilo como única posibilidad, esto indica que en la segunda fragmentación se rearregla la molécula formando nuevamente el enlace -C-O-C- del epóxido, perdiendo un ion acetilo. En la tercer fragmentación de la molécula se vuelve a observar la pérdida de un oxígeno, para esta pérdida existen dos posibilidades: (1) que se pierda el oxígeno del epóxido; o (2) que se pierda el oxígeno del fenol (ya se ha perdido un acetilo, por lo que se ha formado un fenol). Para saber que opción de las planteadas anteriormente es la correcta, se utiliza la cuarta fragmentación de la molécula sin contemplar las tres pérdidas anteriores, en esta fragmentación solo es posible la pérdida de dos acetilos, lo cual indica que el epóxido se ha vuelto a formar y que el enlace C-O del fenol permanece. El elegir la opción (2) como la mas probable implica el romper y formar el enlace C-O del fenol lo cual no se puede comprobar, mientras que el elegir a la opción (1) como la mas probable implica el romper y formar los enlaces C-O del epóxido, lo cual ya se observo en las primeras dos fragmentaciones de la molécula. Por lo tanto, en la tercer fragmentación de la molécula la pérdida del átomo de oxígeno proviene del epóxido. Para la quinta, sexta y séptima fragmentación, se pueden hacer las mismas conjeturas hechas para las primeras cuatro fragmentaciones, debido a que se observa cierta periodicidad en las señales del espectro.



El espectro de RMN ^1H del compuesto V (espectro 33 y 34), muestra señales a diferentes desplazamientos químicos: hidrógenos del grupo funcional metilo a 2.287 ppm y 2.302 ppm; hidrógenos del grupo funcional epóxido a 3.818 ppm; e hidrógenos del grupo funcional benceno a 6.892 ppm, 6.967 ppm, 7.099 ppm y 7.334 ppm.

En el espectro de RMN ^1H del compuesto V, la señal a 3.818 ppm se muestra como un cuarteto y corresponde a un acoplamiento entre dos núcleos de hidrógeno involucrados que están a tres enlaces de distancia cada uno, su constante de acoplamiento es de 2.0 Hz. La señal a 6.892 ppm se muestra como un triplete y corresponde a dos acoplamientos *meta* entre tres núcleos de hidrógeno involucrados que están a cuatro enlaces de distancia cada uno, su constante de acoplamiento es de 2.5 Hz. La señal a 6.967 ppm se muestra como un doblete y corresponde a dos acoplamientos *meta* entre tres núcleos de hidrógeno involucrados que están a cuatro enlaces de distancia cada uno, su constante de acoplamiento es 2.5 Hz. Las señales a 2.287 ppm y 2.302 se muestran como señales simples, comúnmente llamadas singuletes.

Las señales a 7.099 ppm y 7.334 ppm se muestran con otro tipo de multiplicidad (la cual no se describe), debido a que los núcleos de hidrógeno involucrados presentan constantes de acoplamiento diferentes, lo que ocasiona que el desdoblamiento de las señales no siga las proporciones de intensidad establecidas en la figura 6, además de que poseen mas tipos de acoplamientos (los cuales no se describen). Las señales y las asignaciones se muestran de manera resumida en la tabla 27.

La correlación de un átomo de hidrógeno con un átomo de carbono se muestra en la columna “*Localización*” de la tabla 27, en la cual se indica en que átomo de carbono se encuentra enlazado el o los átomos de hidrógeno correspondientes a la señal que aparece a determinado desplazamiento químico. Para asignar la posición de los átomos de hidrógeno en la estructura química de la molécula, se utiliza el apoyo de los espectros de RMN de los experimentos HSQC y HMBC (como se verá mas adelante).



Tabla 27. Resumen de señales obtenidas por RMN ^1H del compuesto V. *Ver figura 19.

Señal	δ/ppm	Multiplicidad	f/H	J/Hz	Grupo Funcional	Localización*
1	2.287	Singulete	6	–	-CH ₃	CII
2	2.302	Singulete	3	–	-CH ₃	CII'
3	3.818	Cuarteto	2	2.0	-CH-O-CH-	C2' y C3'
4	6.892	Triplete	1	2.5	ϕ	C2
5	6.967	Doblete	2	2.5	ϕ	C4 y C6
6	7.099	–	2	–	ϕ	C3'' y C5''
7	7.334	–	2	–	ϕ	C2'' y C6''

El espectro de RMN ^{13}C del compuesto V (espectro 35), muestra señales a diferentes desplazamientos químicos: carbono alifático a 21.188 ppm y 21.227 ppm; carbono base de oxígeno a 62.029 ppm y 62.533 ppm; carbono aromático a 115.554 ppm, 116.217 ppm, 121.997 ppm, 126.744 ppm, 134.258 ppm y 139.852 ppm; carbono aromático base de oxígeno a 150.937 ppm y 151.507 ppm; y carbono del carbonilo de un éster a 169.020 ppm y 169.512 ppm.

En el espectro de RMN ^{13}C del compuesto V, las señales a 134.258 ppm, 139.852 ppm, 150.937 ppm, 151.507 ppm, 169.020 ppm y 169.512 ppm corresponden a carbonos cuaternarios. Las señales y las asignaciones se muestran de manera resumida en la tabla 28.

La numeración de los átomos de carbono en la estructura de la molécula se muestra en la columna “Localización” de la tabla 28, en la cual se indica que número se le asigna al átomo de carbono correspondiente a la señal que aparece a determinado desplazamiento químico. Para asignar la posición de los átomos de carbono en la estructura química de la molécula, se utiliza el apoyo de los espectros de RMN de los experimentos HSQC y HMBC (como se verá más adelante).



Tabla 28. Resumen de señales obtenidas por RMN ¹³C del compuesto V. *Ver figura 19.

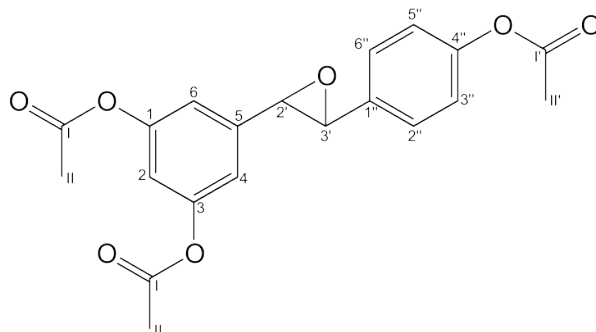
Señal	δ/ppm	Grupo Funcional	Localización*
1	21.188	-CH ₃	CII
2	21.227	-CH ₃	CII'
3	62.029	-CH-O-CH-	C2'
4	62.533	-CH-O-CH-	C3'
5	115.554	φ	C2
6	116.217	φ	C4 y C6
7	121.997	φ	C3'' y C5''
8	126.744	φ	C2'' y C6''
9	134.258	φ	C1''
10	139.852	φ	C5
11	150.937	φ-O-	C4''
12	151.507	φ-O-	C1 y C3
13	169.020	-COO-	CI'
14	169.512	-COO-	CI

Con la información obtenida de los espectros de UV-visible, IR, EM, RMN ¹H y RMN ¹³C obtenidos para el compuesto V, se logra elucidar la estructura química de este compuesto, la cual se muestra en la figura 19. El nombre que recibe de acuerdo a las recomendaciones de la IUPAC es 5-((2'R,3'R)-3'-(4''-acetoxifenil)oxiran-2'-il)-1,3-diacetoxibenceno para uno de los isómeros y 5-((2'S,3'S)-3'-(4''-acetoxifenil)oxiran-2'-il)-1,3-diacetoxibenceno para el otro, sin embargo, el compuesto V lo podemos llamar epóxido de resveratrol acetilado y para fines prácticos en este estudio, solo como "epóxido". La estructura del epóxido ha sido bien planteada por medio de estas técnicas espectroscópicas en este estudio, pero estas no proporcionan suficiente información para asignar y correlacionar los átomos de hidrógeno y de carbono en la estructura de la molécula, por lo que es necesario utilizar más técnicas de espectroscopia para caracterizar por completo la estructura química.



No se observan todas las señales de carbono e hidrógeno que se esperarían, debido a que los carbonos e hidrógenos tienen un entorno electrónico similar, lo que los hace ser equivalentes químicamente.

Figura 19. 5-((2'R,3'R)-3'-(4''-acetoxifenil)oxiran-2'-il)-1,3-diacetoxibenceno.
5-((2'S,3'S)-3'-(4''-acetoxifenil)oxiran-2'-il)-1,3-diacetoxibenceno.



*Numeración basada en las recomendaciones de la IUPAC.

El espectro de RMN HSQC del compuesto V (espectro 36), muestra señales para los acoplamientos químicos a un enlace de distancia entre núcleos de hidrógeno y núcleos de carbono, con estas señales es posible correlacionar a átomos de hidrógeno enlazados directamente a átomos de carbono. Las señales que se observan se muestran en la tabla 29.

Tabla 29. Resumen de señales obtenidas por RMN HSQC del compuesto V. *Ver figura 19.

Señal	$\delta/\text{ppm de } ^1\text{H}$	$\delta/\text{ppm de } ^{13}\text{C}$	Acoplamiento	Distancia	Correlación H-C*
1**	2.287**	21.188**	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	1 enlace	CII
	2.302**	21.227**	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	1 enlace	CII'
2	3.818***	62.029	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	1 enlace	C2'
3		62.533	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	1 enlace	C3'
4	6.892	115.554	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	1 enlace	C2
5	6.967	116.217	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	1 enlace	C4 y C6
6	7.099	121.997	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	1 enlace	C3'' y C5''
7	7.334	126.744	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	1 enlace	C2'' y C6''

Se observa solo una señal para correlacionar a los dos átomos de hidrógeno con los dos átomos de carbono distintos presentes en la molécula para el grupo funcional $-\text{CH}_3$, por lo que la correlación se hace a partir del espectro de RMN HMBC. *Los dos hidrógenos son equivalentes químicamente.



En la columna de “*Correlación H-C*” en la tabla 29, se indica a que número de átomo de carbono se correlaciona el átomo de hidrógeno correspondiente al acoplamiento mostrado en la señal que aparece a determinado desplazamiento químico.

El espectro de RMN HMBC del compuesto V (espectro 37), muestra señales para los acoplamientos químicos a dos y tres enlaces de distancia entre núcleos de hidrógeno y núcleos de carbono, con estas señales es posible correlacionar a átomos de hidrógeno cercanos a átomos de carbono. Las señales que se observan se muestran en la tabla 30.

En la columna de “*Correlación H-C*” en la tabla 30, se indica a que número de átomo de carbono se correlaciona el átomo de hidrógeno correspondiente al o a los acoplamientos mostrados en la o las señales que aparecen a determinado desplazamiento químico.

Una vez que se tiene la estructura química del epóxido es posible visualizar los probables acoplamientos químicos a dos y tres enlaces, la mayoría de ellos se observan en el espectro de RMN HMBC, sin embargo, hay unos pocos que no se observan como es el caso: del acoplamiento a dos enlaces de distancia entre el hidrógeno a 6.967 ppm y el carbono a 139.852 ppm; y del acoplamiento a dos enlaces de distancia entre el hidrógeno a 7.334 ppm y el carbono a 134.258 ppm.

En la figura 19 no se muestra la estereoquímica correcta del epóxido, debido a que el objetivo en esa estructura es mostrar la numeración de los átomos de carbono para poder entender las correlaciones hidrógeno-carbono. En la figura 20 se muestra la distribución espacial de los sustituyentes en la molécula del epóxido, mostrando los dos centros quirales y los dos isómeros formados.

En el epóxido se observa dos señales diferentes para los átomos de carbono alifático, así también se observan dos tipos de hidrógeno correspondientes al grupo metilo. Mientras que en el acetilado solo se observa una señal para carbono alifático y una para hidrógeno del grupo metilo. Esto indica que la formación del epóxido elimina la similitud electrónica ente los carbonos e hidrógenos que en el acetilo son equivalentes químicamente.



Tabla 30. Resumen de señales obtenidas por RMN HMBC del compuesto V. *Ver figura 19.

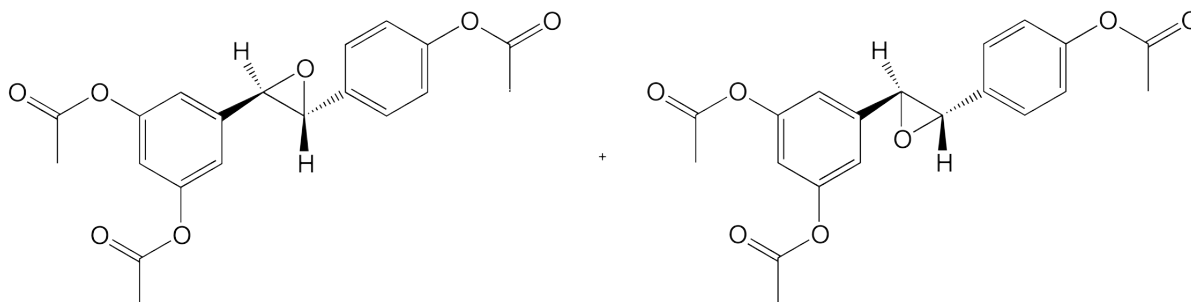
Señal	$\delta/\text{ppm de } ^1\text{H}$	$\delta/\text{ppm de } ^{13}\text{C}$	Acoplamiento	Distancia	Correlación H-C*
1	2.287	169.512	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	2 enlaces	C1
2	2.302	169.020	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	2 enlaces	C1'
3***	3.818**	62.029***	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	2 enlaces	C2'
		62.533***	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	2 enlaces	C3'
116.217		$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	3 enlaces	C4 y C6	
126.744		$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	3 enlaces	C2'' y C6''	
134.258		$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	2 y 3 enlaces	C1''	
139.852		$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	2 y 3 enlaces	C5	
8		6.892	116.217	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	3 enlaces
9	151.507		$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	2 enlaces	C1 y C3
10	6.967	62.029	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	3 enlaces	C2'
11***		115.554***	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	3 enlaces	C2
		116.217***	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	3 enlaces	C4 y C6
12		151.507	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	2 enlaces	C1 y C3
13	7.099	121.997	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	3 enlaces	C3'' y C5''
14		126.744	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	2 enlaces	C2'' y C6''
15		134.258	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	3 enlaces	C1''
16		150.937	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	2 enlaces	C4''
17	7.334	62.533	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	3 enlaces	C3'
18		121.997	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	2 enlaces	C3'' y C5''
19		126.744	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	3 enlaces	C2'' y C6''
20		150.937	$^1\text{H}-^{13}\text{C}$	3 enlaces	C4''

*Los dos hidrógenos son equivalentes químicamente. ***Se observa solo una señal para correlacionar el átomo de hidrógeno con los dos átomos de carbono distintos.

El epóxido de resveratrol acetilado no se ha reportado en la literatura y por ende, la caracterización de la estructura de la molécula del epóxido mediante RMN o alguna otra espectroscopia no se conoce.



Figura 20. Isómeros del epóxido: 2R,3R y 2S,3S, respectivamente.



Con este estudio se establecen las asignaciones, correlaciones y acoplamiento hidrógeno-carbono para la estructura del epóxido principalmente mediante RMN utilizando los experimentos de ^1H , ^{13}C , HSQC y HMBC. Así también mediante UV-visible, IR y EM.

7.5

Actividad antioxidante

Los resultados de la prueba biológica TBARS, obtenidos para los cinco compuestos caracterizados, se procesan y con ellos se analiza la actividad antioxidante que genera cada una de las moléculas probadas. En el ensayo de la inhibición de la peroxidación de lípidos se utiliza BHT y α -tocoferol como patrones de referencia, su actividad antioxidante es alta a una concentración de 100 ppm, con un máximo de 100 % y 72.25 % de inhibición para la peroxidación de lípidos, respectivamente. Los resultados se resumen en la grafica 1.

El ensayo TBARS (ThioBarbituric Acid Reactive Substances) consiste a grandes rasgos en evitar la formación del malondialdehído, el dialdehído se produce de la peroxidación de ácidos grasos en una secuencia de reacciones con FeSO_4 . El método de detección es a través de un detector UV-visible, debido a que el malondialdehído al reaccionar con el ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) forma un compuesto colorido que absorbe luz a una longitud de onda de 532 nm, por lo tanto, se puede medir el cambio en la concentración del malondialdehído al agregar un compuesto que inhiba su formación. Un compuesto que inhibe la peroxidación de lípidos y por lo tanto la formación del dialdehído se considera con actividad antioxidante.

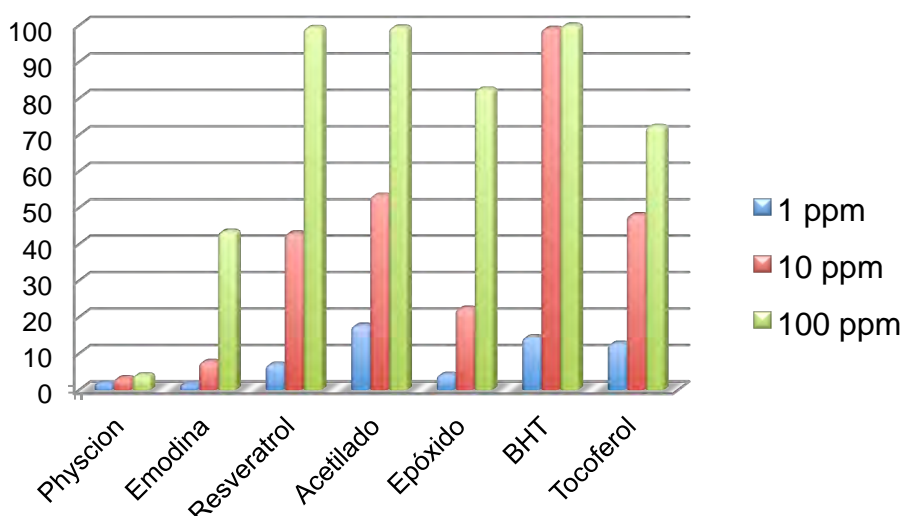


Se observa que physcion no presenta actividad antioxidante en el ensayo TBARS, por lo que su estructura química no genera la inhibición de la peroxidación de lípidos. A la concentración de 100 ppm resulta casi nula la actividad antioxidante del compuesto, con un máximo de 4.13 % de inhibición para la peroxidación de lípidos.

Mientras que emodina presenta moderada actividad antioxidante en el ensayo TBARS, por lo que su estructura química genera la inhibición de la peroxidación de lípidos. A la concentración de 100 ppm resulta mediana la actividad antioxidante del compuesto, con un máximo de 43.50 % de inhibición para la peroxidación de lípidos.

Por otro lado, se observa que el resveratrol, el acetilado y el epóxido presentan alta actividad antioxidante en el ensayo TBARS, por lo que su estructura química genera la inhibición de la peroxidación de lípidos. A la concentración de 100 ppm resulta elevada la actividad antioxidante de estos compuestos, con un máximo de 99.38 %, 99.50 % y 82.50 % de inhibición para la peroxidación de lípidos.

Grafica 1. Ensayo TBARS.



En la grafica 1 se observa que el resveratrol tiene la misma actividad antioxidante que el antioxidante sintético BHT y mas actividad que el antioxidante natural α -tocoferol. Por lo tanto, el resveratrol extraído posee tanta actividad antioxidante como uno sintético y mas que el antioxidante natural comúnmente usado.

En la prueba de TBARS el resveratrol triacetilado presenta igual actividad antioxidante que el resveratrol aunque el epóxido de resveratrol triacetilado pierde eficacia frente a la inhibición de la peroxidación de lípidos. Por otro lado, la emodina resulta ser otro antioxidante natural presente en la uva (*Vitis vinifera*) con baja inhibición de la peroxidación lipídica.

Los resultados de la prueba biológica DPPH, obtenidos para los cinco compuestos caracterizados, se procesan y con ellos se analiza la actividad antioxidante que genera cada una de las moléculas probadas. En el ensayo de la reducción del radical DPPH se utiliza BHT y α -tocoferol como patrones de referencia, su actividad antioxidante es alta a una concentración de 100 ppm, con un máximo de 21.01 % y 94.28 % de inhibición para la peroxidación de lípidos, respectivamente. Los resultados se resumen en la grafica 2.

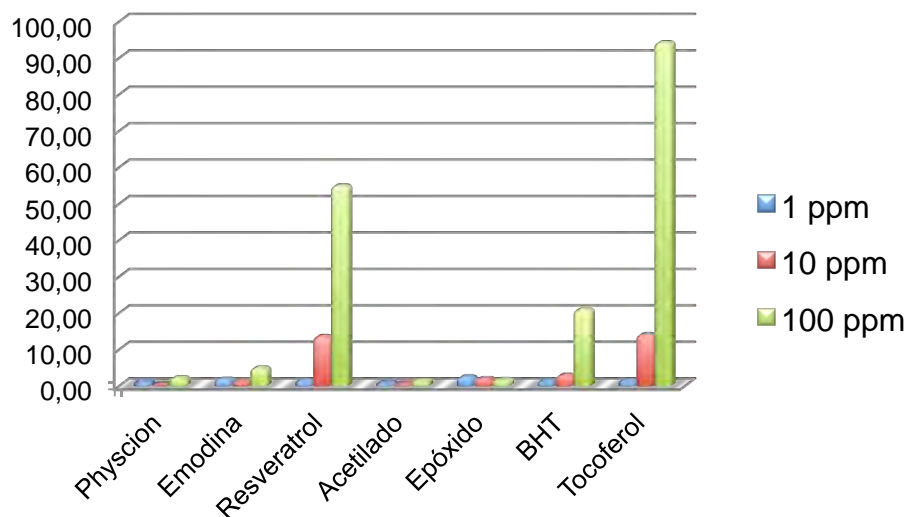
El ensayo DPPH consiste en reducir al radical 1,1-difenil-2-picrilhidracil (DPPH), el radical extrae un protón de un compuesto polifenólico formando el 1,1-difenil-2-picrilhidracina. El método de detección es a través de un detector UV-visible, debido a que la hidracina formada es un compuesto colorido que absorbe luz a una longitud de onda de 515 nm, por lo tanto, se puede determinar el cambio en la concentración del radical al agregar un compuesto que lo reduzca. Un compuesto que reduce el radical a la hidracina se considera con actividad antioxidante.

Se observa que physcion, emodina, el acetilado y el epóxido no presentan actividad antioxidante en el ensayo DPPH, por lo que su estructura química no genera la reducción del radical DPPH. A la concentración de 100 ppm resulta casi nula la actividad antioxidante de los compuestos, con un máximo de 2.27 %, 5.02 %, 1.62 % y 1.79 % para la reducción del radical, respectivamente.



El resveratrol es el único compuesto que presenta actividad antioxidante mediante el ensayo DPPH, por lo que su estructura química sí interacciona en con el radical DPPH. A la concentración de 100 ppm presenta un máximo de 55.00 % en la reducción del radical.

Grafica 2. Porcentaje de reducción del radical DPPH.



La grafica 2 muestra que el resveratrol posee una actividad antioxidante poco mas del doble que el BHT y poco mas de la mitad del α -tocoferol, por lo que en la reducción del radical DPPH no es tan eficiente comparado con el antioxidante natural comúnmente usado, aunque si mas eficiente que el sintético.

Si buscas resultados distintos, no hagas siempre lo mismo

Albert Einstein



Conclusiones

Yo no enseño a quien no se esfuerza en comprender

Confucio

Mediante la maceración con acetato de etilo y cromatografía en columna se aíslan tres compuestos presentes en el bagazo de la uva (*Vitis vinifera*): physcion, emodina y resveratrol. Del resveratrol se obtienen dos derivados mediante reacciones químicas frecuentemente usadas en síntesis orgánica: resveratrol acetilado y epóxido de resveratrol acetilado. Los cinco compuestos obtenidos se caracterizan utilizando en conjunto cuatro técnicas de espectroscopia: UV-visible, IR, EM y principalmente por RMN con los experimentos de ^1H , ^{13}C , HSQC y HMBC. Además, los cinco compuestos obtenidos se analizan para valorar su actividad antioxidante mediante las pruebas: inhibición de la peroxidación de lípidos (TBARS) y reducción del radical DPPH.

Physcion, el primer compuesto aislado, es un polifenol que posee la estructura base de una antraquinona con una masa molar de $284.263 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, es un sólido de color amarillo con un punto de fusión de $202\text{-}203 \text{ }^\circ\text{C}$, tiene un $R_f = 0.872$ en hexano-AcOEt (1:1) y del cual se obtiene 0.143 g , alcanzando un rendimiento de extracción de 1.43% . Physcion resulta no tener actividad significativa en ninguna de las dos pruebas para determinar su actividad antioxidante.

Emodina, el segundo compuesto aislado, es un polifenol que posee la estructura base de una antraquinona con una masa molar de $270.237 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, es un sólido de color naranja con un punto de fusión de $261\text{-}262 \text{ }^\circ\text{C}$, tiene un $R_f = 0.718$ en hexano-AcOEt (1:1) y del cual se obtiene 0.367 g , alcanzando un rendimiento de extracción de 3.67% . Emodina resulta ser activa en la prueba de TBARS, pero su actividad es casi nula en la inhibición del radical DPPH.



Resveratrol, el tercer compuesto aislado, es un polifenol que posee la estructura base de un estilbeno con una masa molar de $228.243 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, es uno de los antioxidantes de mayor importancia económica y es usado frecuentemente en todo el mundo. Es un sólido de color café claro con un punto de fusión de $244\text{-}245 \text{ }^\circ\text{C}$, tiene un $R_f = 0.325$ en hexano-AcOEt (1:1) y del cual se obtiene 3.291 g , alcanzando un rendimiento de extracción de 32.91% . El resveratrol es un antioxidante muy activo en la inhibición de la peroxidación de lípidos, pero de mediana eficacia en la reducción de radicales libres DPPH.

El primer derivado es el resveratrol acetilado con una masa molar de $354.353 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, es un sólido de color café claro con un punto de fusión de $117\text{-}118 \text{ }^\circ\text{C}$, tiene un $R_f = 0.667$ en hexano-AcOEt (1:1) y del cual se obtiene 1.183 g de producto, alcanzando un rendimiento de reacción de 95.25% . El resveratrol acetilado muestra gran actividad en la inhibición de la peroxidación de lípidos, pero su actividad es prácticamente nula en la reducción del radical DPPH.

El segundo derivado es el epóxido de resveratrol acetilado con una masa molar de $370.353 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, es un líquido espeso de color amarillo, tiene un $R_f = 0.667$ (1:1) y del cual se obtiene 0.067 g de producto, alcanzando un rendimiento de reacción de 64.11% . El epóxido de resveratrol acetilado es eficaz en la prueba de TBARS pero su actividad es nula en la reducción del radical DPPH.

La espectroscopia de UV-visible es poco confiable en la determinación de grupos funcionales y resulta menos útil en la caracterización de la molécula, mientras que la espectroscopia de IR asigna inequívocamente los grupos funcionales presentes en el compuesto y es de gran ayuda en la caracterización de la molécula, sin embargo, no resuelve el problema de elucidar la estructura química. La espectrometría de masas (EM) proporciona sin ningún problema el valor de la masa molar del compuesto y elimina una cantidad innumerable de posibilidades.



La espectroscopia de RMN resuelve todos estos problemas en conjunto por medio de varios experimentos, solo por mencionar los utilizados en este estudio, como ^1H , ^{13}C , HSQC y HMBC, aunque existen en la actualidad un gran número de experimentos que podrían ser utilizados para elucidar la estructura química por completo, sin embargo, puede ser que no resuelva el problema de asignar la masa molar. Por lo tanto, el utilizar al menos estas cuatro espectroscopias en conjunto proporciona de una manera fácil, rápida y sencilla el caracterizar la estructura química de un compuesto puro.

La cromatografía en capa fina es una técnica muy útil para analizar cualitativamente la presencia de compuestos en una mezcla homogénea, también muestra la pureza de cada uno de ellos y puede ser usada como criterio en una reacción química. Al igual, la espectroscopia de RMN también puede usarse como una técnica para analizar la pureza de un compuesto y como un criterio adicional en una reacción química.

La espectroscopia de RMN por medio de los experimentos utilizados en este estudio, no es capaz de distinguir entre los dos isómeros obtenidos del epóxido de resveratrol acetilado, debido a que las señales de los espectros para los cuatro experimentos analizados, no proporcionan información acerca de la estereoquímica de los dos centros quirales que contiene el compuesto. Por lo tanto, queda abierta la investigación acerca de: técnicas espectroscópicas de RMN para diferenciar y métodos de aislamiento para separar, a los isómeros 2R,3R y 2S,3S obtenidos en este trabajo.

Rebasar los límites no es un defecto menor que no alcanzarlos

Confucio



Bibliografía

La naturaleza esconde su secreto porque es sublime, no por astucia

Albert Einstein

1. Stefan Berger; Dieter Sicker. *Classics in Spectroscopy. Isolation and Structure Elucidation of Natural Products*; WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Alemania, 2009.
2. Deanna Marcano; Masahisa Hasegawa. *Fitoquímica Orgánica*, 2ª Edición; Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico: Venezuela, 2002.
3. José Hidalgo Togores. *Tratado de Enología*; Ediciones Mundi-Prensa: España, 2002.
4. Engstrom, G. W.; McDorman, D. J.; Maroney, M. J. *J. Agric. Food Chem.* **1980**, *28*, 1139.
5. Hemlata; Kalidhar, S. B. *Phytochemistry.* **1993**, *32*, 1616.
6. T. Ross Kelly; Zhenkun Ma; Wei Xu. Revision of the Structure of Alatinone to Emodin. *Phytochemistry.* **1994**, *36*, 253-254.
7. Thomson, R. H. *Naturally Occurring Quinones, 2nd ed.*; Academic Press: New York, 1971.
8. Jean-Claude Delaunay; Chantal Castagnino; Catherine Chèze; Joseph Vercauteren. Preparative isolation of polyphenolic compounds from *Vitis vinifera* by centrifugal partition chromatography. *J. Chromatogr. A.* **2002**, *964*, 123-128.
9. Yizhong Cai; Mei Sun; Jie Xing; Harold Corke. Antioxidant Phenolic Constituents in Roots of *Rheum officinale* and *Rubia cordifolia*: Structure-Radical Scavenging Activity Relationships. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 7884-7890.
10. Matsuda, H.; Morikawa, T.; Toguchida, I.; Park, J. Y.; Harima, S.; Yoshikawa, M. Antioxidant constituents from rhubarb: Structural requirements of stilbenes for the activity and structures of two new anthraquinone glucosides. *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 41-50.
11. Ömür Demirezer, L.; Kuruüzüm-Uz, A.; Bergere, I.; Schiewe H.-J.; Zeeck, A. The structures of antioxidant and cytotoxic agents from natural source: Anthraquinones and tannins from roots of *Rumex patientia*. *Phytochemistry.* **2001**, *58*, 1213-1217.
12. Young-Mi Kim; Chi-Hoon Lee; Hyo-Gyung Kim; Hoi-Seon Lee. Anthraquinones Isolated from *Cassia tora* (Leguminosae) Seed Show an Antifungal Property against Phytopathogenic Fungi. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 6096-6100.



13. Agarwal, S. K.; Singh, S.; Verma, S.; Kumar, S. Antifungal activity of anthraquinone derivatives from *Rheum emodi*. *J. Ethnopharmacol.* **2000**, *72*, 43-46.
14. S. Renaud; M. De Lorgeril. *Lancet.* **1992**, *39*, 1523.
15. A.A.E. Bertelli; L. Giovannini; D. Giannessi; M. Migliori; W. Bernini; M. Fregoni; A. Bertelli. *Int. J. Tissue React.* **1995**, *17*, 1.
16. U. Jager; H. Nguyen-Duong. *Arzneimittelforschung.* **1999**, *49*, 207.
17. L. Fremont; L. Belguendouz; S. Delpal. *Life Sci.* **1999**, *64*, 2511.
18. K. Subbaramaiah; W.J. Chung; P. Michaluart; N. Telang; T. Tanabe; H. Inoue; M. Jang; J.M. Pezzuto; A.J. Dannenberg. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 21875.
19. C.R. Pace-Asciak; O. Rounova; S.E. Hahn; E.P. Diamandis; D.M. Goldberg. *Clin. Chim. Acta.* **1996**, *246*, 163.
20. E.N. Frankel; J. Kanner; J. German; E. Parks; J. Kinsella. *Lancet.* **1993**, *341*, 454.
21. M. Jang; L. Cai; G.O. Udeani; K.V. Slowing; C.F. Thomas; C.W.W. Beecher; H.H.S. Fong; N.R. Farnsworth; A.D. Kinghorn; R.G. Mehta; R.C. Moon; J.M. Pezzuto. *Science.* **1997**, *275*, 218.
22. Gao, X. M.; Xu, Z. M.; Li, Z. W. *Traditional Chinese Medicines*; People's Health Publishing House: Beijing, 2000.
23. Shen, Y. J.; Li, Y. K. *Pharmacology of Traditional Chinese Medicines*; Shanghai Science and Technology Publishing House: Shanghai, 1997.
24. Ji, Y. B.; He, S. W.; Ma, Y. L.; Li, J.; Yang, C.; Liu, L. L. *Pharmacological Action and Application of Anticancer Traditional Chinese Medicines*; Heilongjiang Science and Technology Publishing House: China, 1999.
25. Benner, J. P. Pesticidal compounds from higher plants. *Pestic. Sci.* **1993**, *39*, 95-102.
26. Lee, H. S.; Kim, H. T.; Cho, K. Y.; Ahn, Y. J. Fungicidal activities of leguminous seed extracts toward phytopathogenic fungi. *J. Pestic. Sci.* **1998**, *2*, 21-27.
27. Choi, J. S.; Lee, H. J.; Park, K. Y.; Ha, J. O.; Kang, S. S. *In vitro* antimutagenic effects of anthraquinone aglycones and naphthopyrone glycosides from *Cassia tora*. *Planta Med.* **1997**, *63*, 11-14.
28. Yen, G. C.; Chen, H. W.; Duh, P. D. Extraction and identification of an antioxidative component from Jue Ming Zi (*Cassia tora* L.). *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 820-824.



29. Yen, G. C.; Chung, D. Y. Antioxidant effects of extracts from *Cassia tora* L. prepared under different degrees of roasting on the oxidative damage to biomolecules. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 1326-1332.
30. Guo, H.; Chang, Z.; Yang, R.; Guo, D.; Zheng, J. Anthraquinones from hairy root cultures of *Cassia obtusifolia*. *Phytochemistry.* **1998**, *49*, 1623-1625.
31. Ito, N.; Fukushima, S.; Tamano, S.; Hirose, M.; Hagiwara, A. Dose response in butylated hydroxyanisole induction of forestomach carcinogenesis in F344 rats. *J. Natl. Cancer Inst.* **1986**, *77*, 1261-1265.
32. Matsui, T.; Hirose, M.; Imaida, K.; Fukushima, S.; Tamano, S.; Ito, N. *Jpn. J. Cancer Res. (Gann).* **1986**, *77*, 1983.
33. Waldrop, M. *Chem. Eng. News.* **1980**, *22*.
34. Atsuyoshi Nishina; Kohji Kubota; Hiromu Kameoka; Toshihiko Osawa. Antioxidizing Component, Musizin, in *Rumex japonicus* Houtt. *JAOCS.* **1991**, *68*, 735-739.
35. Osawa, T.; Namiki, M. A novel type of antioxidant isolated from leaf wax of eucalyptus leaves. *Agric. Biol. Chem.* **1981**, *45*, 735-739.
36. Foote, C. S.; Denny, R. W. Chemistry of singlet oxygen. VII. Quenching by β -carotene. *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90*, 6233-6235.
37. Pin-Der Duh; Dong-Bor Yeh; Gow-Chin Yen. Extraction and Identification of an Antioxidative Component from Peanut Hulls. *JAOCS.* **1992**, *69*, 818-814.
38. Tagi, K. Lipid peroxides and human disease. *Chem. Phys. Lipids.* **1987**, *45*, 337-341.
39. John McMurry. *Química Orgánica*, 7ª edición; CENGAGE Learning: México, 2008
40. Douglas A. Skoog; Donald M. West; F. James Holler; Stanley R. Crouch. *Química Analítica*, 7ª edición; McGraw-Hill: México, 2001.
41. José G. Ávila; Consuelo García; et al. *Química Orgánica. Experimentos con un enfoque ecológico*, 2ª edición; UNAM: México, 2009.
42. Peter Atkins; Tina Overton; et al. *Química inorgánica*, 4ª edición; McGraw-Hill: México, 2008.
43. Thomas Engel; Philip Reid. *Química Física*; Pearson Educación: Madrid, 2006.
44. José Manuel López-Nicolás; Francisco García-Carmona. Aggregation State and pK_a Values of (E)-Resveratrol As Determinated by Fluorescence Spectroscopy and UV-Visible Absorption. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 7600-7605.



45. Ernö Pretsch; Philippe Bühlmann; Martin Badertscher. *Structure Determination of Organic Compounds*, 4^a edición; Springer: Alemania, 2009.
46. Hugo E. Gottlieb; Vadim Kotlyar; Abraham Nudelman. NMR Chemical Shifts of Common Laboratory Solvents as Trace Impurities. *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 7512-7515.

Bibliografía complementaria

- I. Tian Tang, Longwu Yin, Jing Yang, Guang Shan. Emodin, an anthraquinone derivative from *Rheum officinale* Baill, enhances cutaneous wound healing in rats. *European Journal of Pharmacology.* **2007**, 567, 177-185.
- II. Gow-Chin Yen, She-Ching Wu, and Pin-Der Duh. Extraction and Identification of Antioxidant Components from the Leaves of Mulberry (*Morus alba* L.). *J. Agric. Food Chem.* **1996**, 44, 1687-1690.
- III. Gow-Chin Yen; Horn-Wen Chen; Pin-Der Duh. Extraction and Identification of an Antioxidative Component from Jue Ming Zi (*Cassia tora* L.). *J. Agric. Food Chem.* **1998**, 46, 820-824.
- IV. V. Bondet, W. Brand-Williams and C. Berset. Kinetics and Mechanisms of Antioxidant Activity using the DPPH· Free Radical Method. *Lebensm Wiss Technol.* **1997**, 30, 609-615.
- V. Y. Dotan, D. Lichtenberg, I. Pinchuk. Lipid peroxidation cannot be used as a universal criterion of oxidative stress. *Progress in Lipid Research.* **2004**, 43, 200-227.

El hombre solitario es una bestia o un dios

Aristóteles

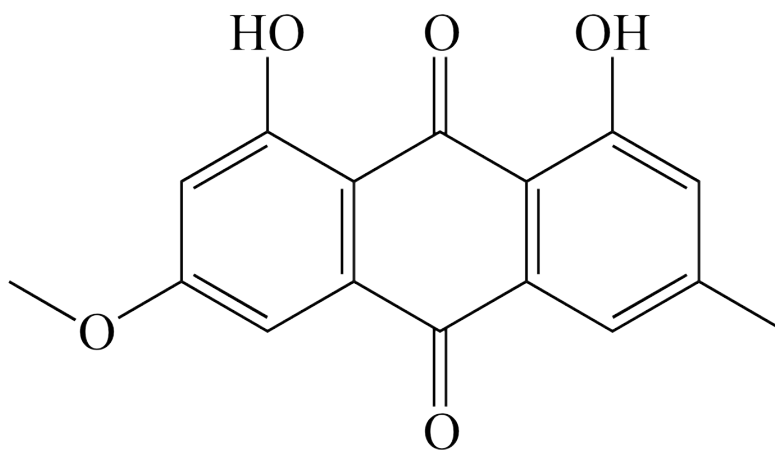


Espectros

Dios no juega a los dados

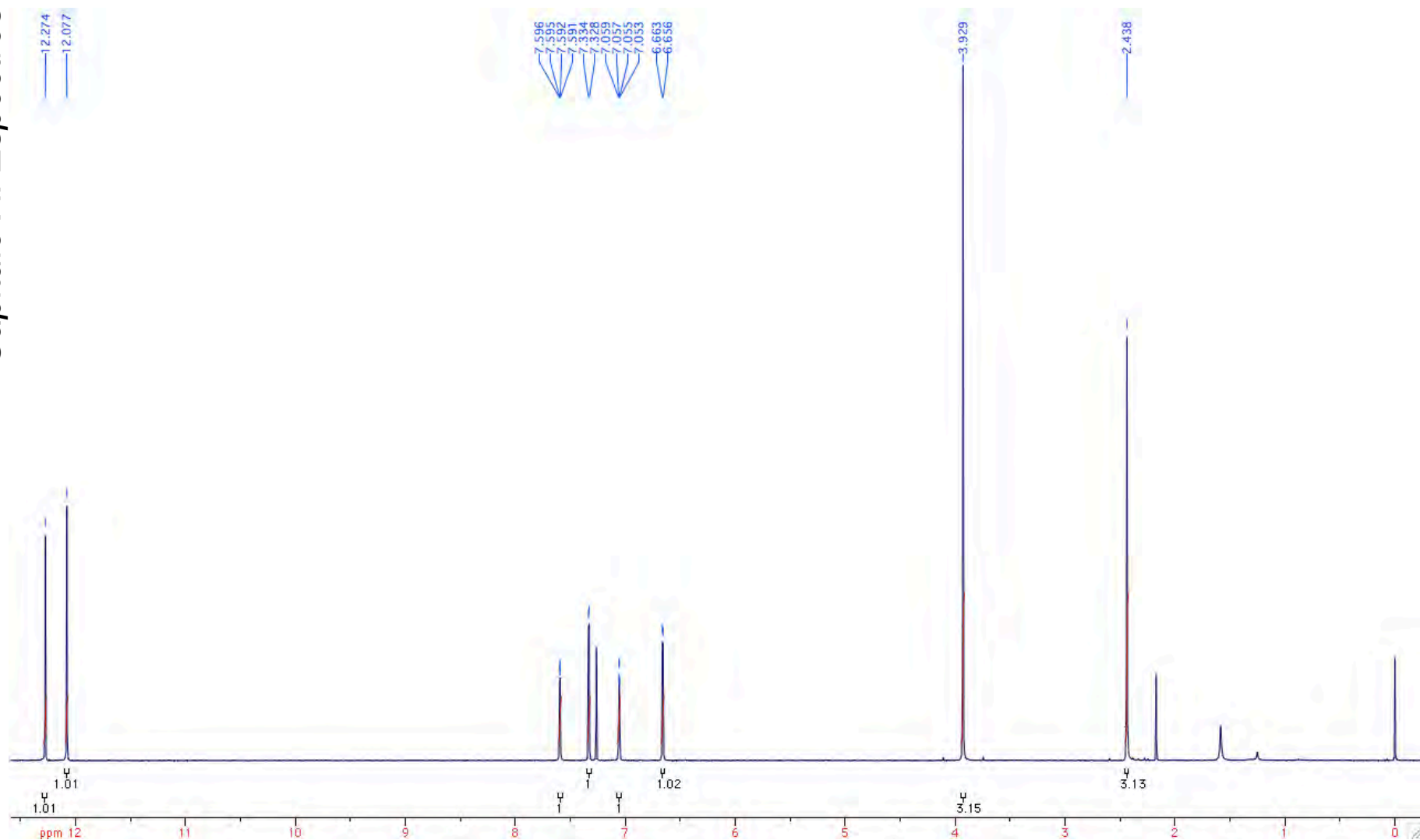
Albert Einstein

Phycion



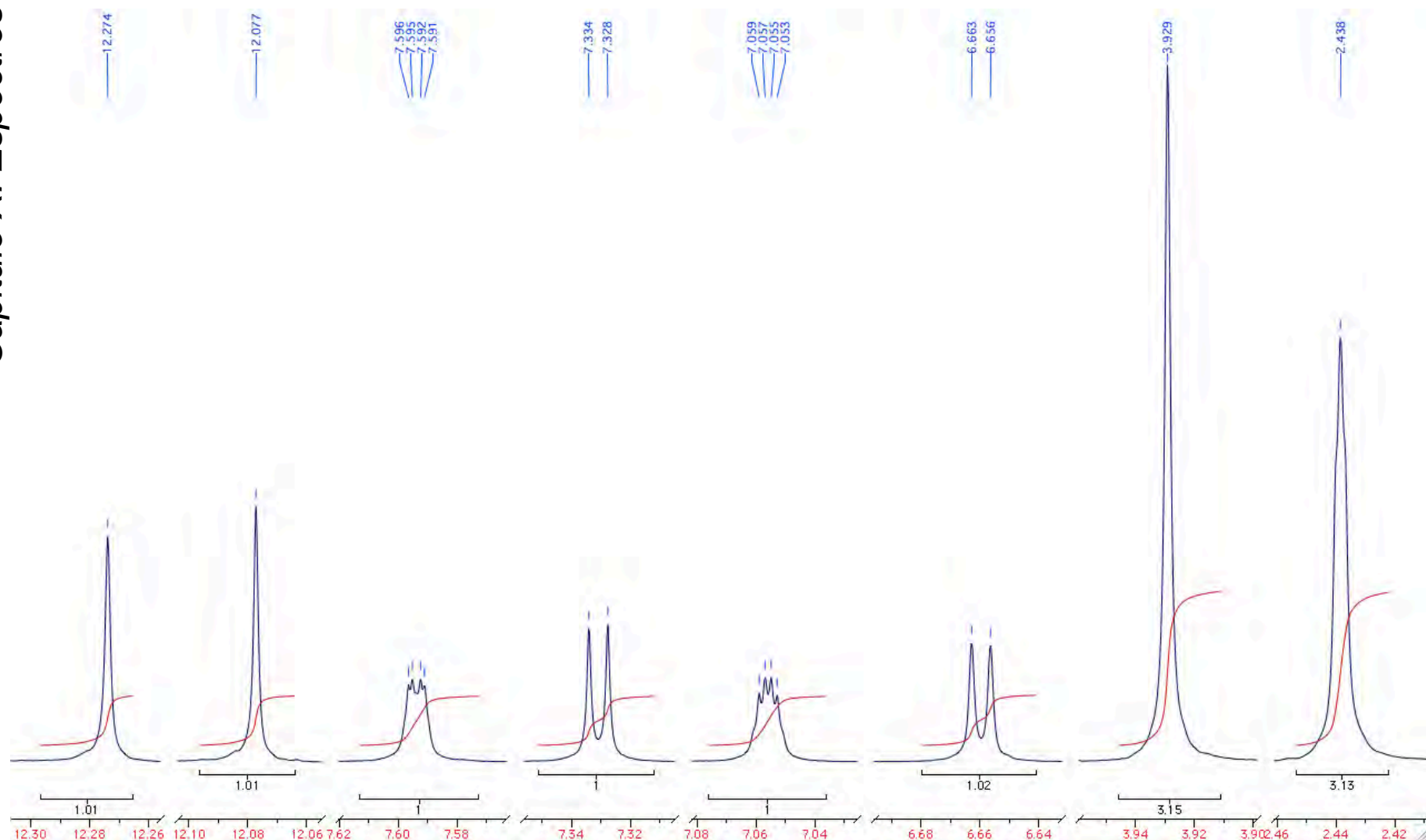
1,8-dihidroxi-3-metoxi-6-metilantraquinona





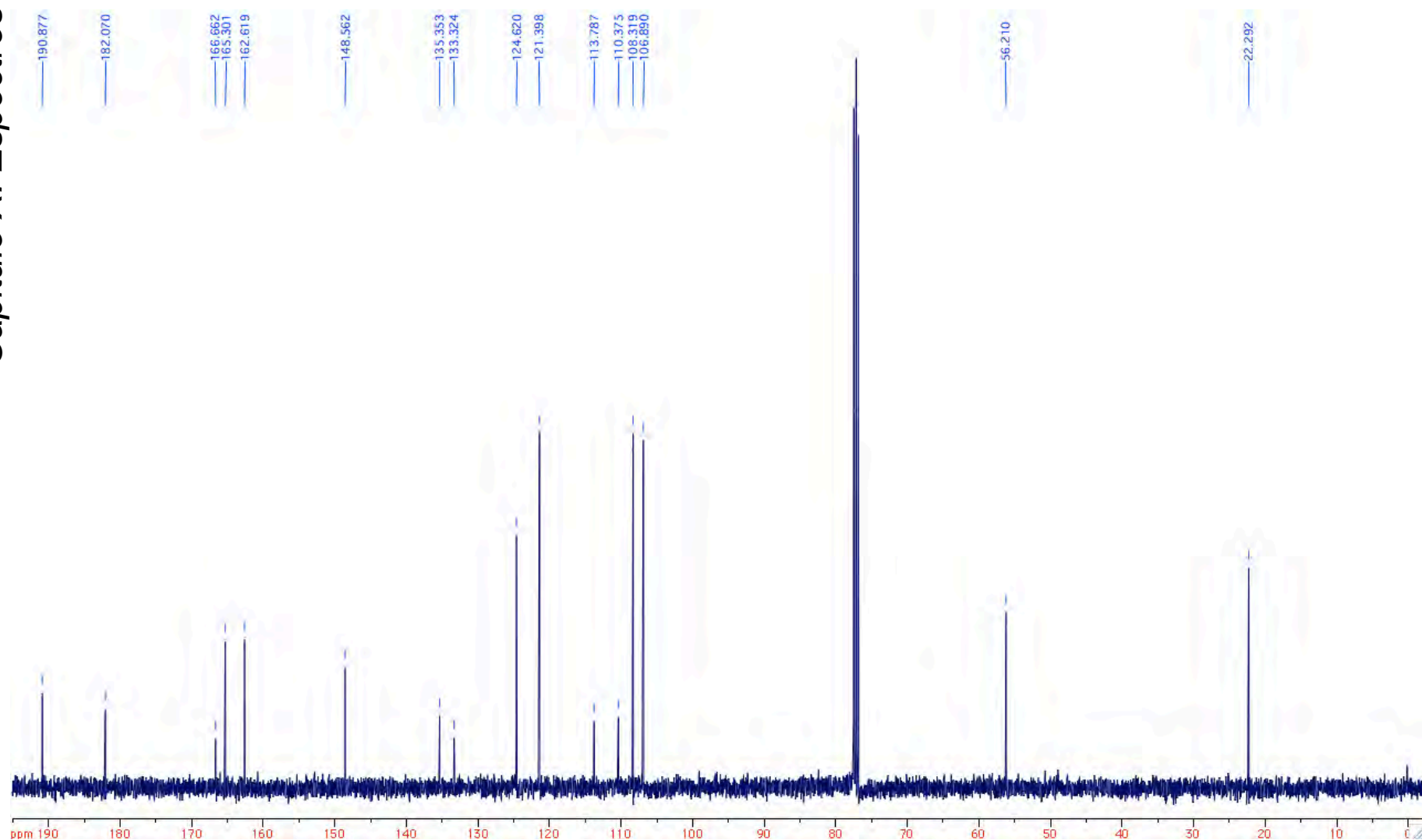
Espectro 1. Espectro de RMN ^1H de physcion. El espectro se obtiene a partir de un espectrofotómetro de RMN de 400 MHz. El desplazamiento químico se muestra en partes por millón (ppm). Se utiliza CDCl_3 como disolvente (7.263 ppm). Las señales son referenciadas con respecto a la señal de TMS (0.000 ppm). La señal a 2.171 ppm corresponde a residuos de $(\text{CH}_3)_2\text{CO}$. La señal a 1.585 ppm corresponde a impurezas (grasa).





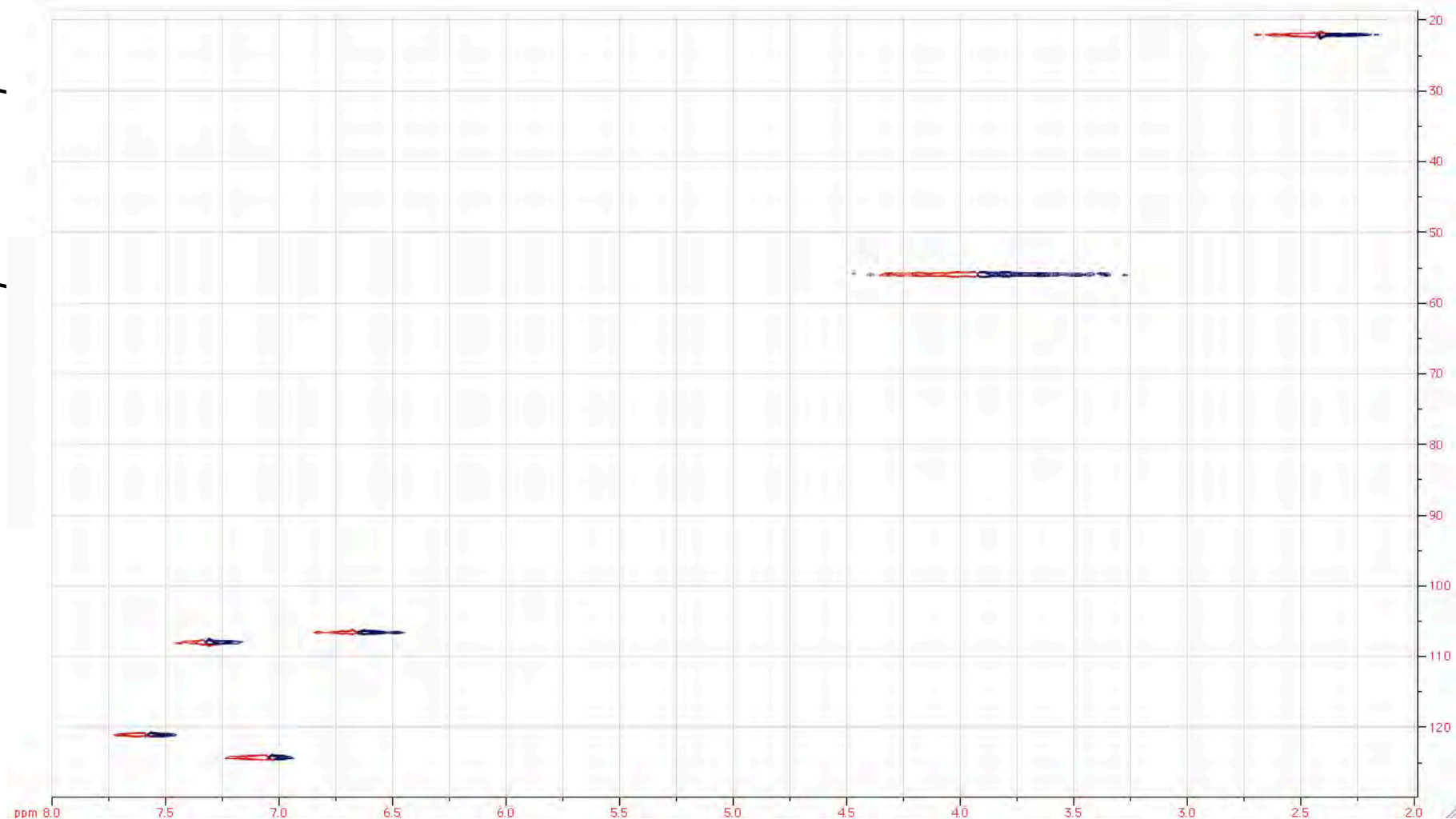
Espectro 2. Espectro de RMN ¹H de physcion (expansiones). El espectro se obtiene a partir de un espectrofotómetro de RMN de 400 MHz. El desplazamiento químico se muestra en partes por millón (ppm). Se utiliza CDCl₃ como disolvente (7.263 ppm). Las señales son referenciadas con respecto a la señal de TMS (0.000 ppm).





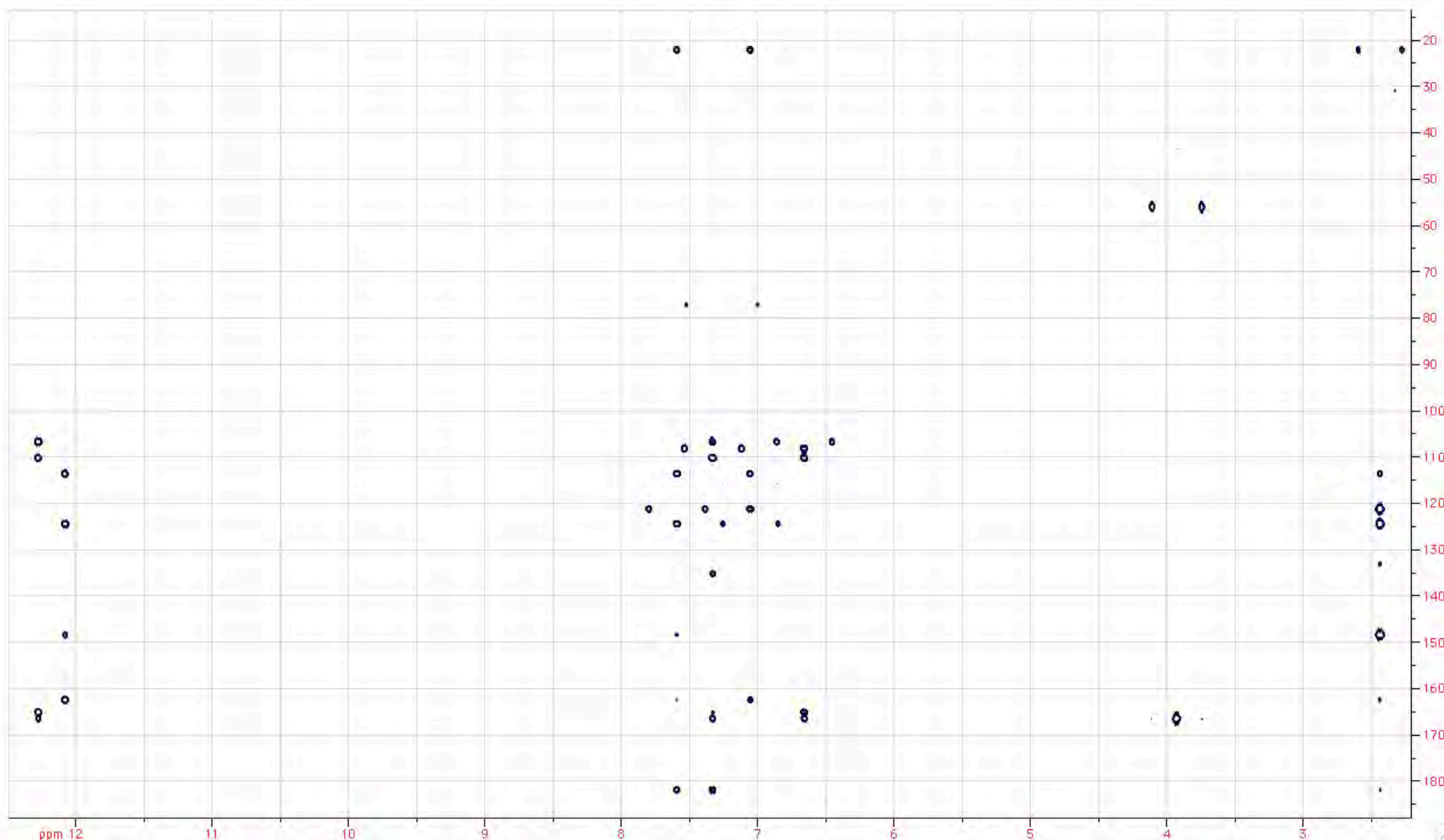
Espectro 3. Espectro de RMN ^{13}C de physcion. El espectro se obtiene a partir de un espectrofotómetro de RMN de 400 MHz. El desplazamiento químico se muestra en partes por millón (ppm). Las señales son referenciadas con respecto a la señal de CDCl_3 (t , 77.160 ppm). Se utiliza CDCl_3 como disolvente.





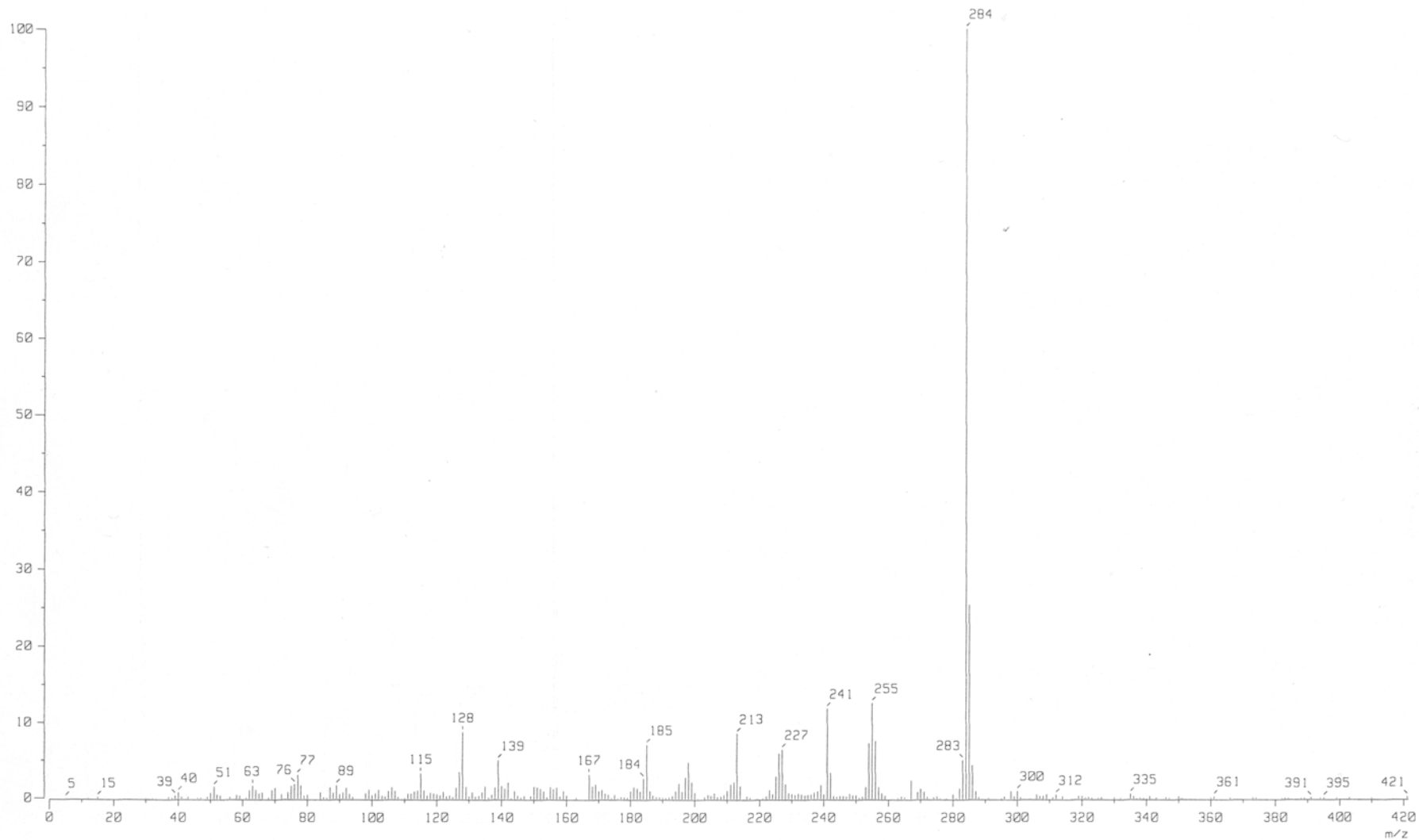
Espectro 4. Espectro de RMN HSQC de physcion. El espectro se obtiene a partir de un espectrofotómetro de RMN de 400 MHz. El desplazamiento químico se muestra en partes por millón (ppm). Se utiliza CDCl_3 como disolvente.





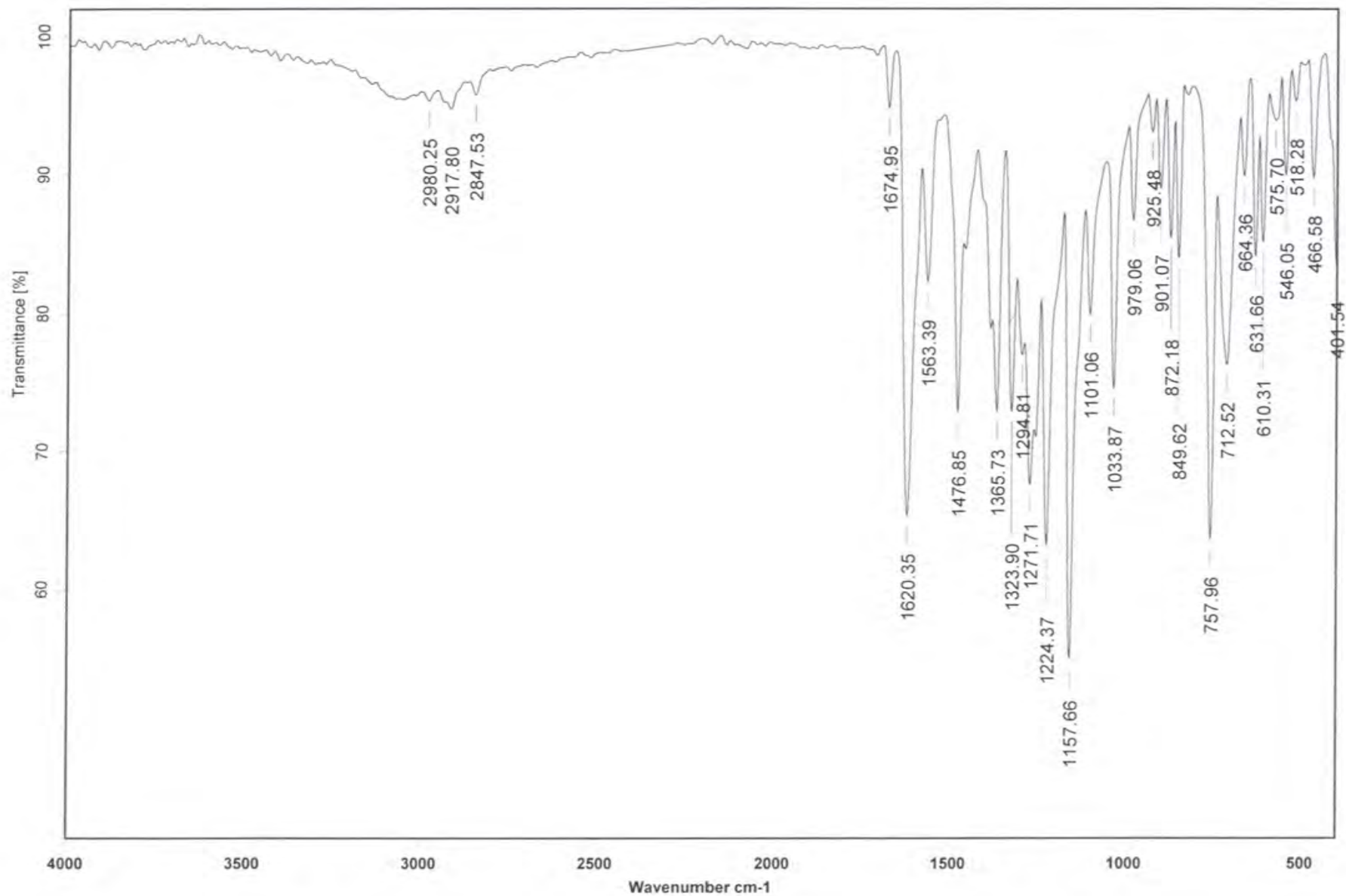
Espectro 5. Espectro de RMN HMBC de physcion. El espectro se obtiene a partir de un espectrofotómetro de RMN de 400 MHz. El desplazamiento químico se muestra en partes por millón (ppm). Se utiliza CDCl_3 como disolvente.





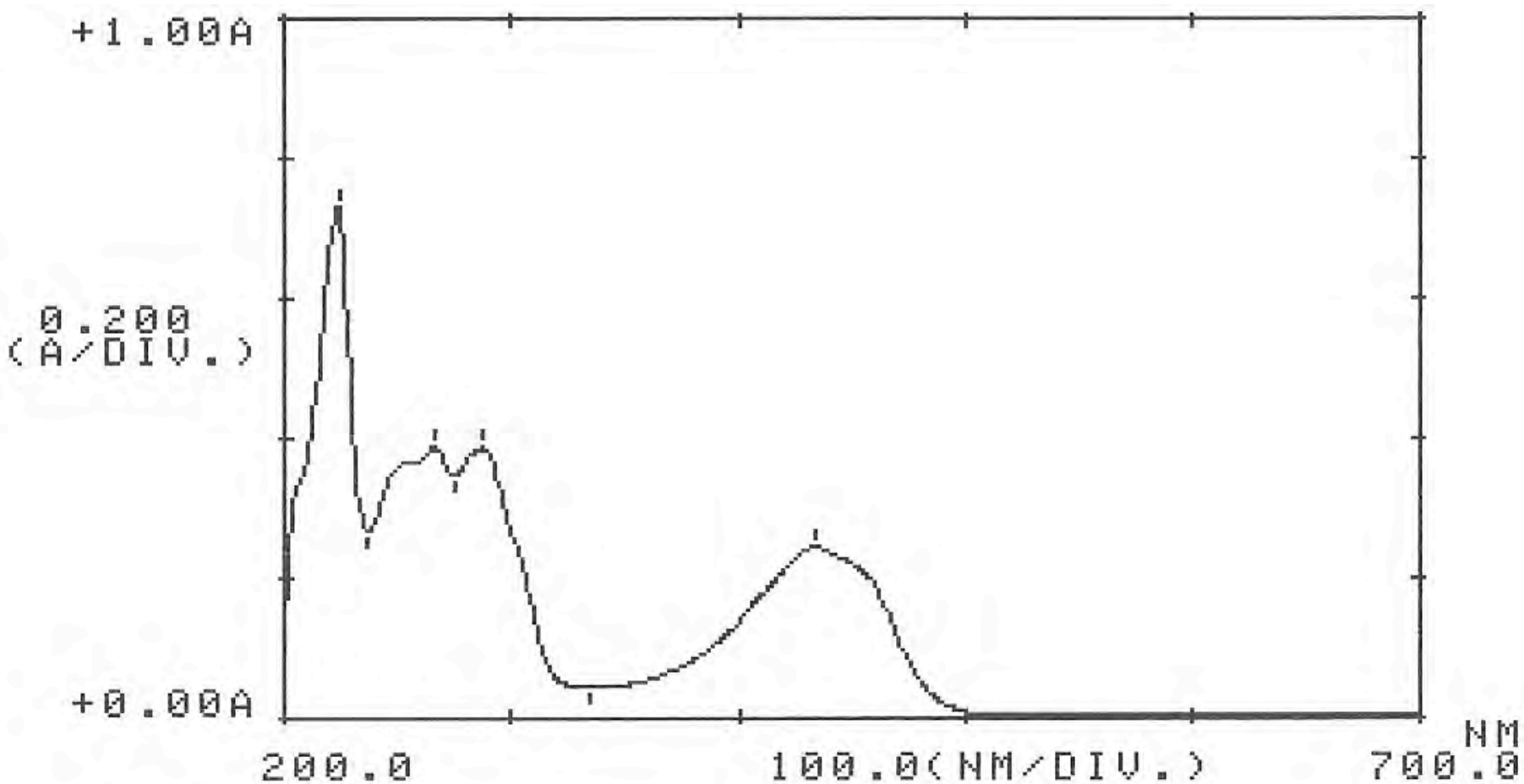
Espectro 6. Espectro de EM de phycion. El espectro se obtiene a partir de un espectrómetro de masas. El método de ionización es por impacto electrónico. Las unidades de masa se obtienen de la relación masa-carga (m/z).





Espectro 7. Espectro de IR de phycion. El espectro se obtiene a partir de un espectrofotómetro de IR. El número de onda se muestra en cm⁻¹ y la transmitancia en %. La muestra se prepara por el método de pastilla con KBr para su análisis.

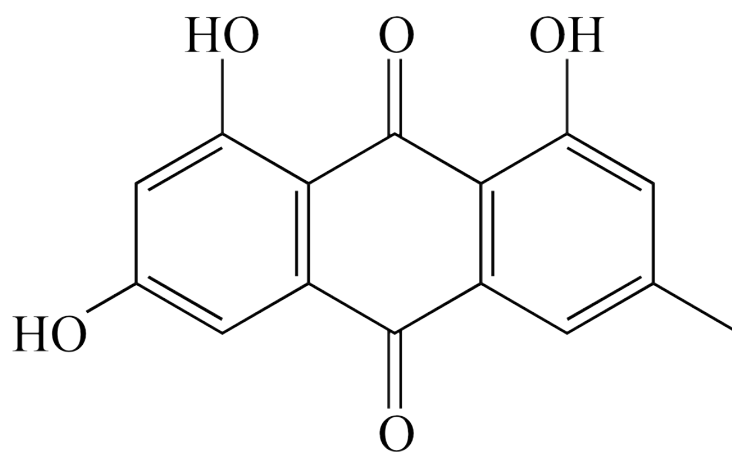




Espectro 8. Espectro de UV-visible de physcion. El espectro se obtiene a partir de un espectrofotómetro de UV-visible. Se realiza un análisis cualitativo. La longitud de onda se muestra en nm y la absorbancia en A. La división mínima es de 100.0 nm y 0.200 A. Se utiliza MeOH como disolvente.

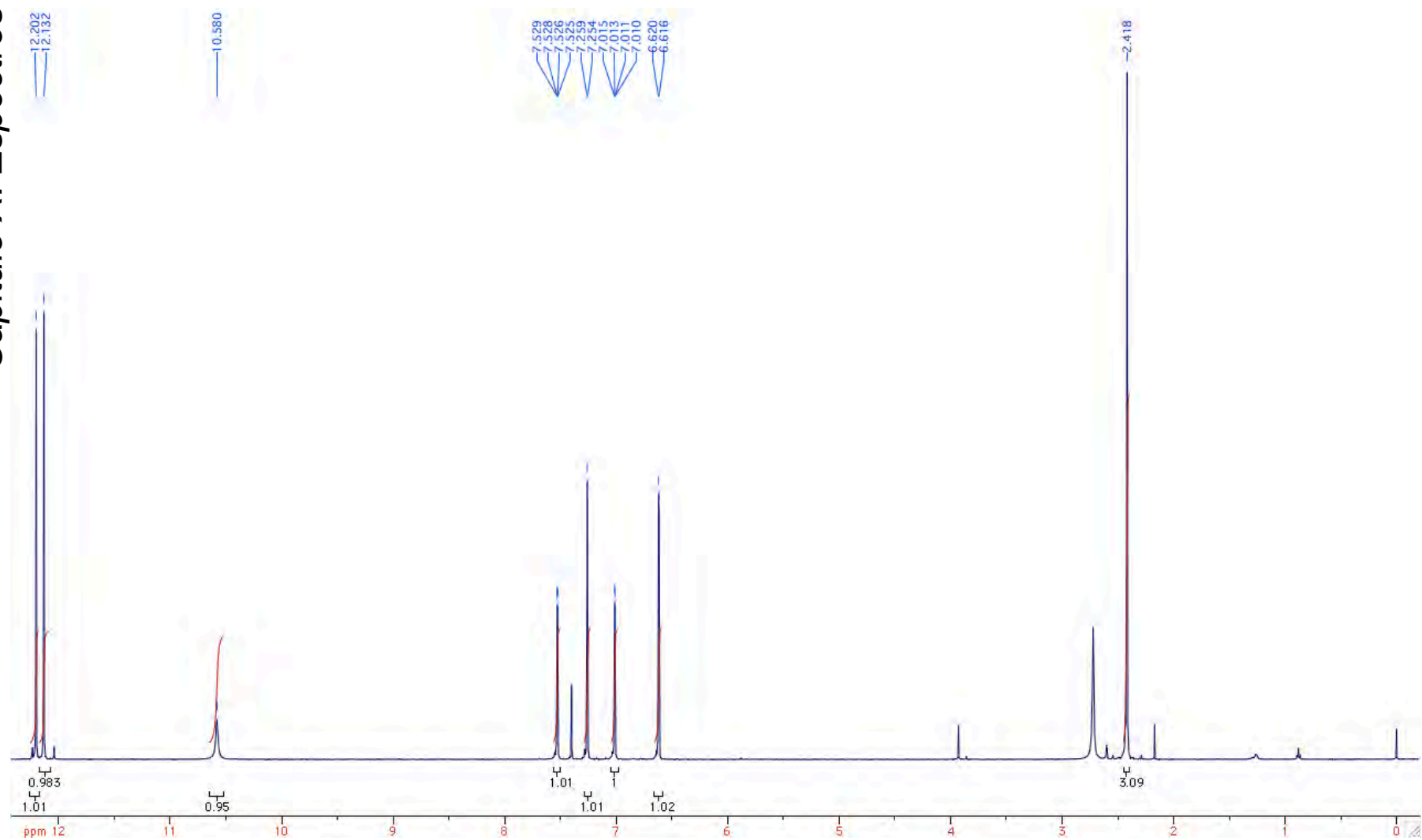


Emodina



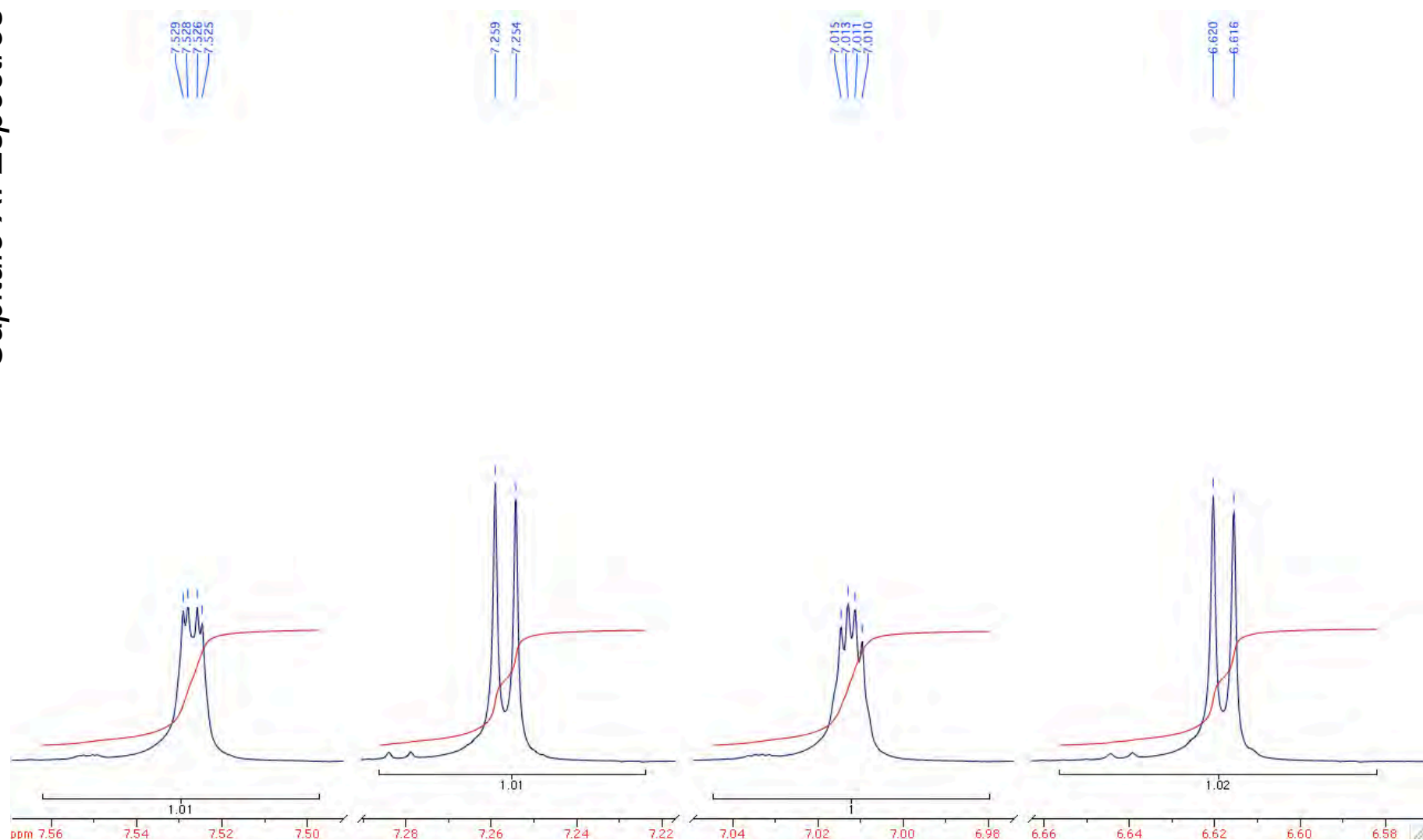
1,3,8-trihidroxi-6-metilantraquinona





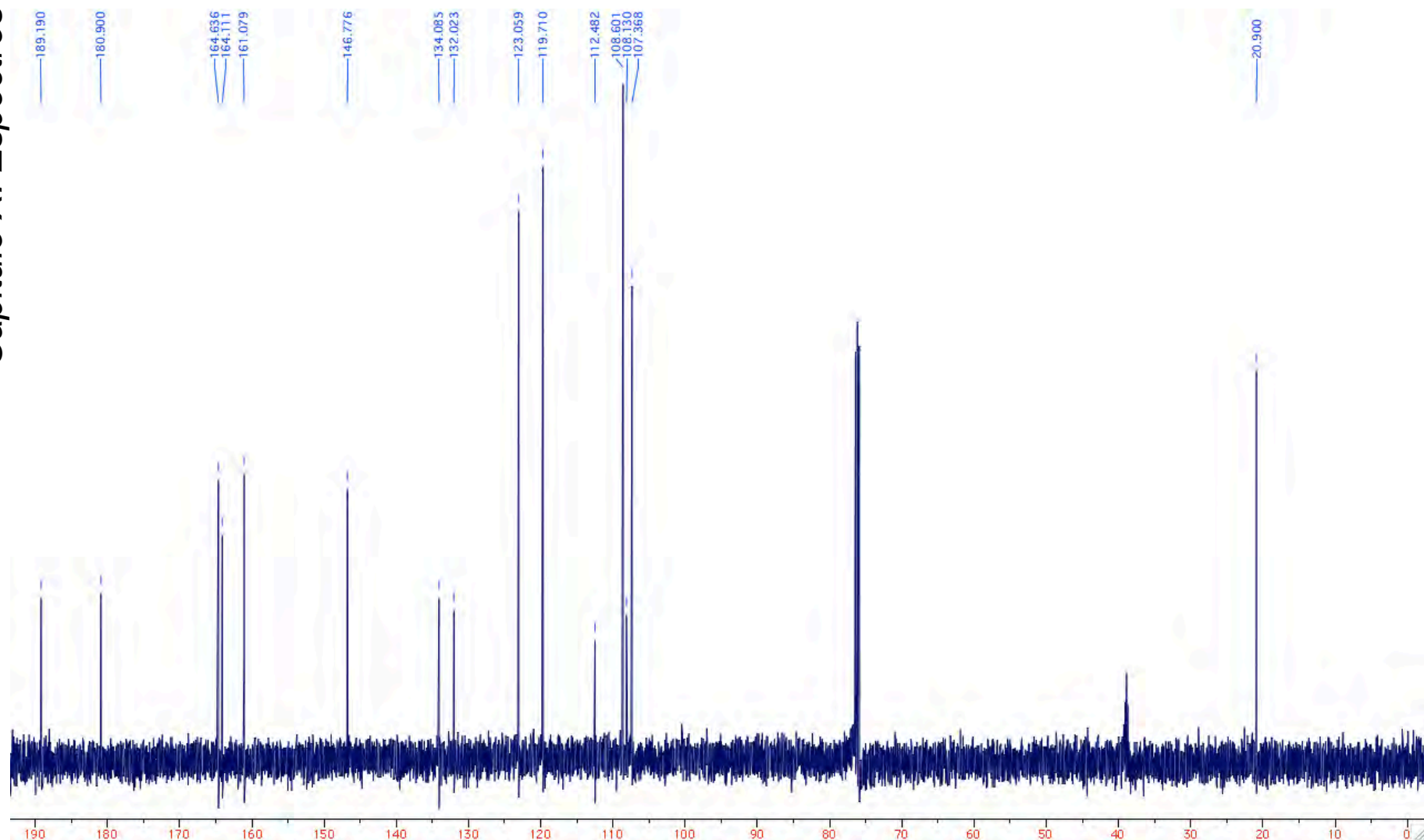
Espectro 9. Espectro de RMN ^1H de emodina. El espectro se obtiene a partir de un espectrofotómetro de RMN de 500 MHz. El desplazamiento químico se muestra en partes por millón (ppm). Se utiliza CDCl_3 (7.399 ppm) y tres gotas de DMSO (2.722 ppm) como disolvente. Las señales son referenciadas con respecto a la señal de TMS (0.000 ppm). La señal a 2.171 ppm corresponde a residuos de $(\text{CH}_3)_2\text{CO}$. La señal a 3.929 ppm corresponde a residuos de H_2O presente en el DMSO usado.





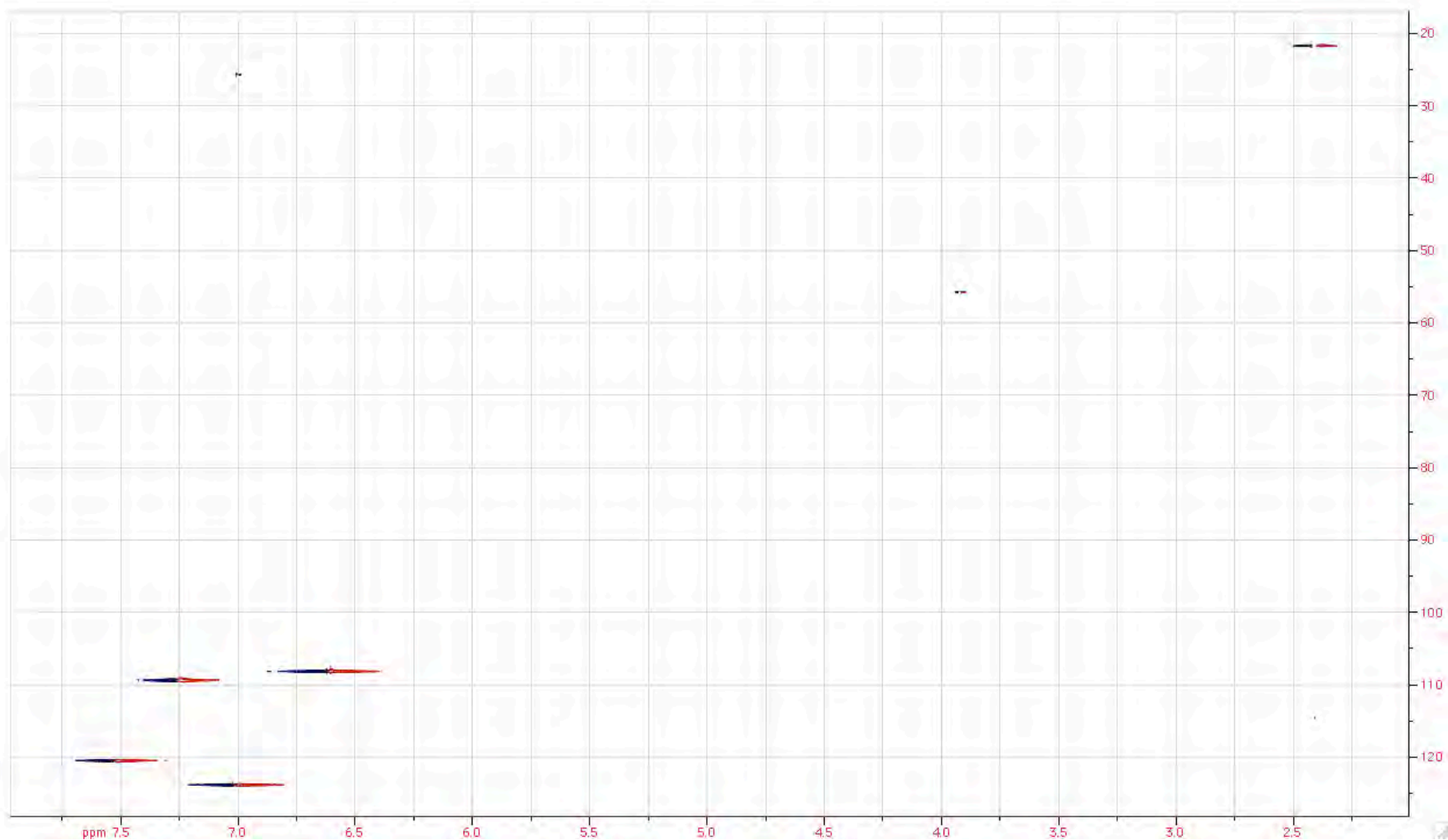
Espectro 10. Espectro de RMN ^1H de emodina (expansiones). El espectro se obtiene a partir de un espectrofotómetro de RMN de 500 MHz. El desplazamiento químico se muestra en partes por millón (ppm). Se utiliza CDCl_3 (7.399 ppm) y tres gotas de DMSO (2.722 ppm) como disolvente. Las señales son referenciadas con respecto a la señal de TMS (0.000 ppm).





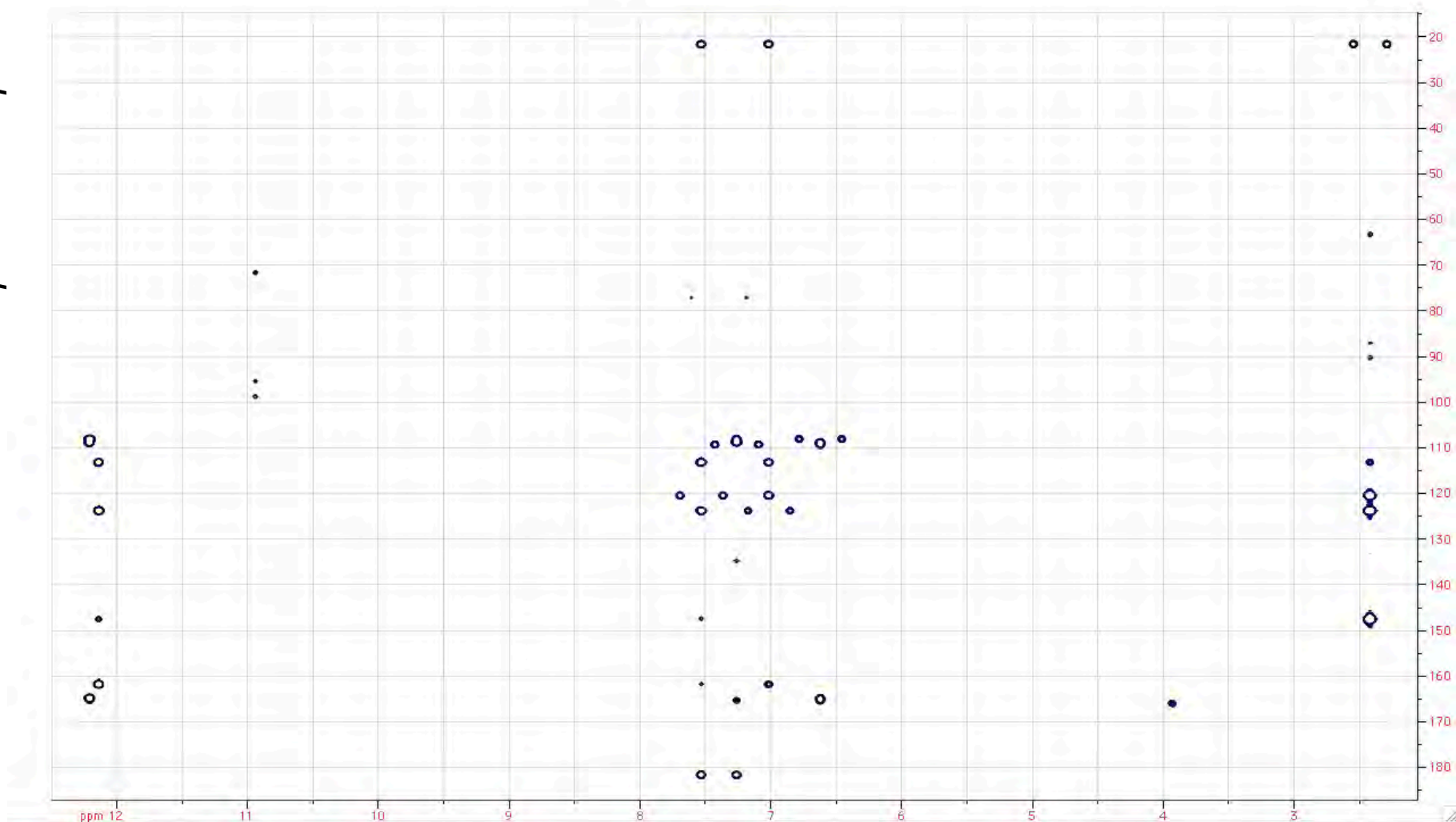
Espectro 11. Espectro de RMN ¹³C de emodina. El espectro se obtiene a partir de un espectrofotómetro de RMN de 500 MHz. El desplazamiento químico se muestra en partes por millón (ppm). Las señales son referenciadas con respecto a la señal de CDCl₃ (*t*, 77.160 ppm). Se utiliza CDCl₃ y tres gotas de DMSO (*m*, 38.873) como disolvente.





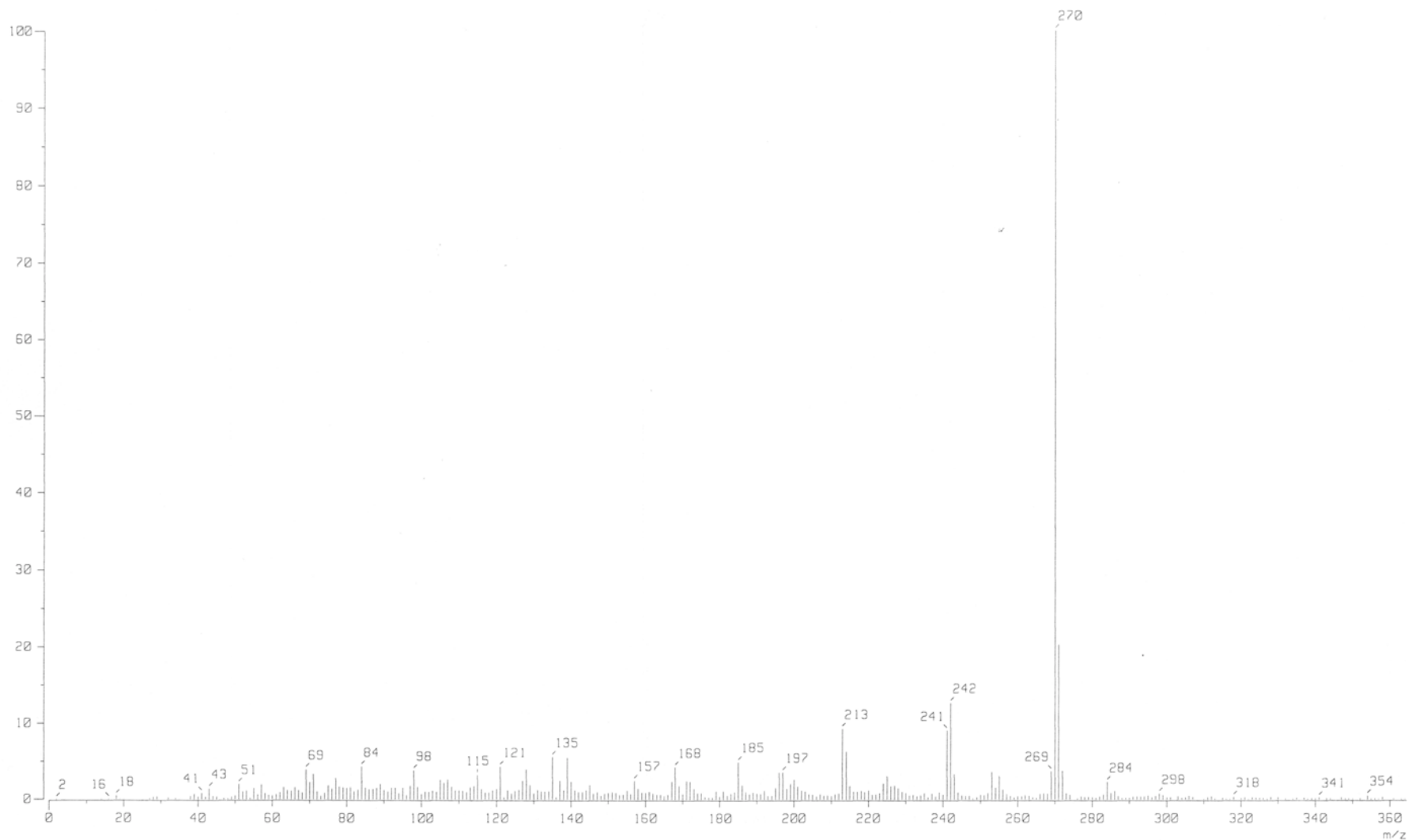
Espectro 12. Espectro de RMN HSQC de emodina. El espectro se obtiene a partir de un espectrofotómetro de RMN de 500 MHz. El desplazamiento químico se muestra en partes por millón (ppm). Se utiliza CDCl_3 y tres gotas de DMSO como disolvente.





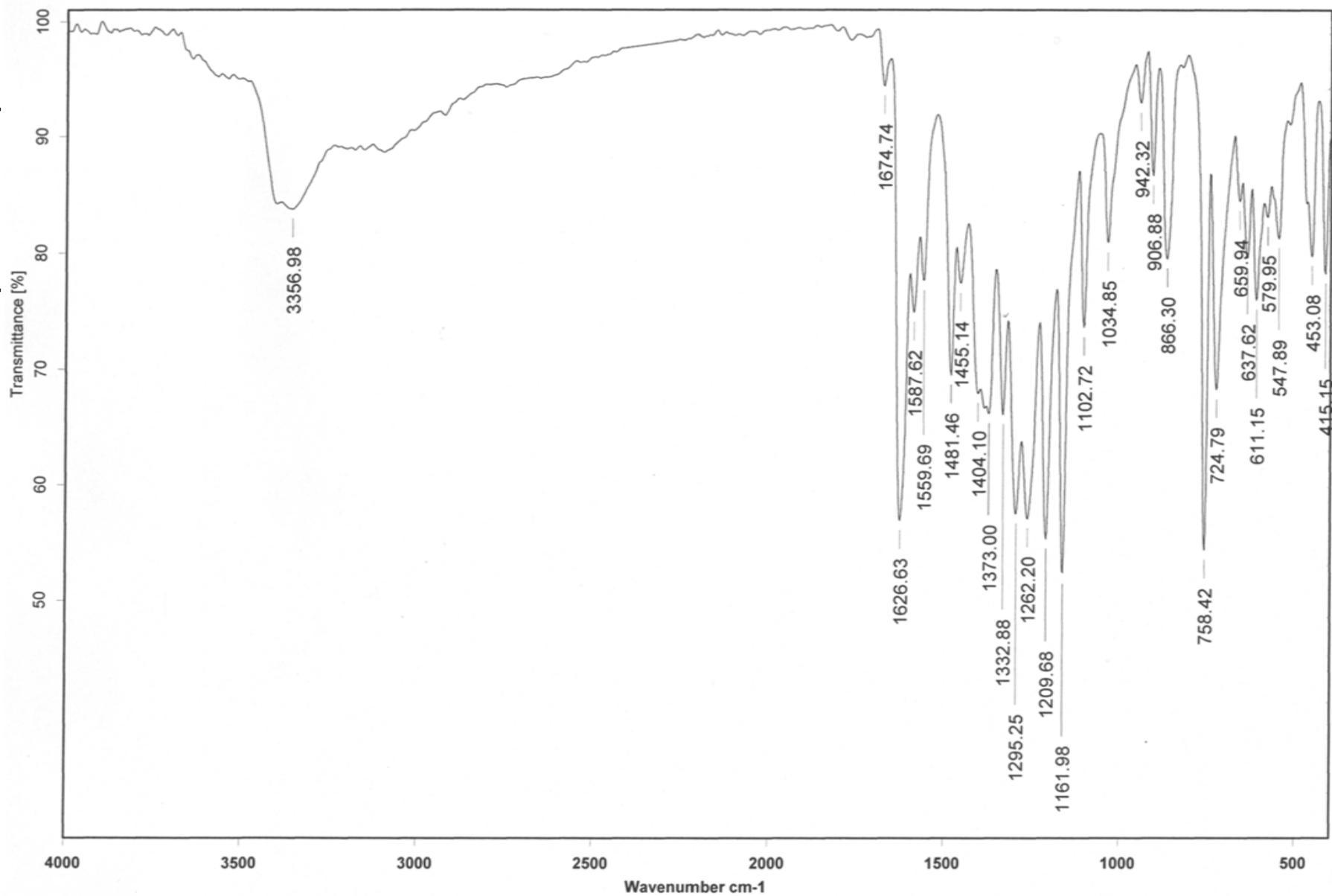
Espectro 13. Espectro de RMN HMBC de emodina. El espectro se obtiene a partir de un espectrofotómetro de RMN de 500 MHz. El desplazamiento químico se muestra en partes por millón (ppm). Se utiliza CDCl_3 y tres gotas de DMSO como disolvente.





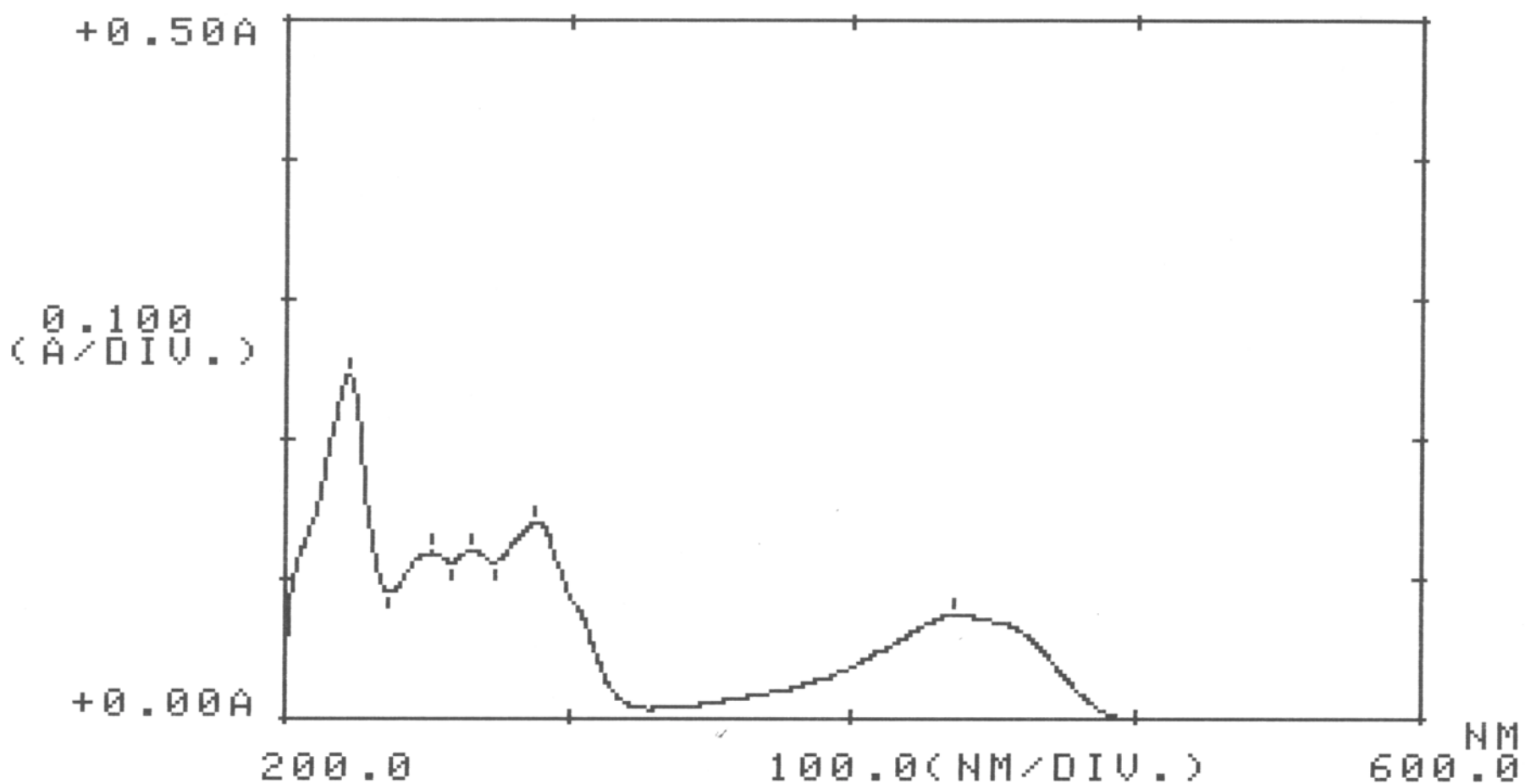
Espectro 14. Espectro de EM de emodina. El espectro se obtiene a partir de un espectrómetro de masas. El método de ionización es por impacto electrónico. Las unidades de masa se obtienen de la relación masa-carga (m/z).





Espectro 15. Espectro de IR de emodina. El espectro se obtiene a partir de un espectrofotómetro de IR. El número de onda se muestra en cm⁻¹ y la transmitancia en %. La muestra se prepara por el método de pastilla con KBr para su análisis.

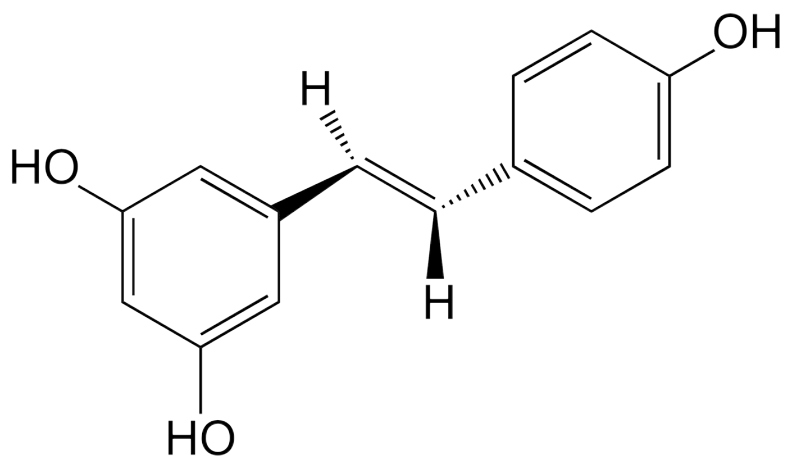




Espectro 16. Espectro de UV-visible de emodina. El espectro se obtiene a partir de un espectrofotómetro de UV-visible. Se realiza un análisis cualitativo. La longitud de onda se muestra en nm y la absorbancia en A. La división mínima es de 100.0 nm y 0.100 A. Se utiliza MeOH como disolvente.

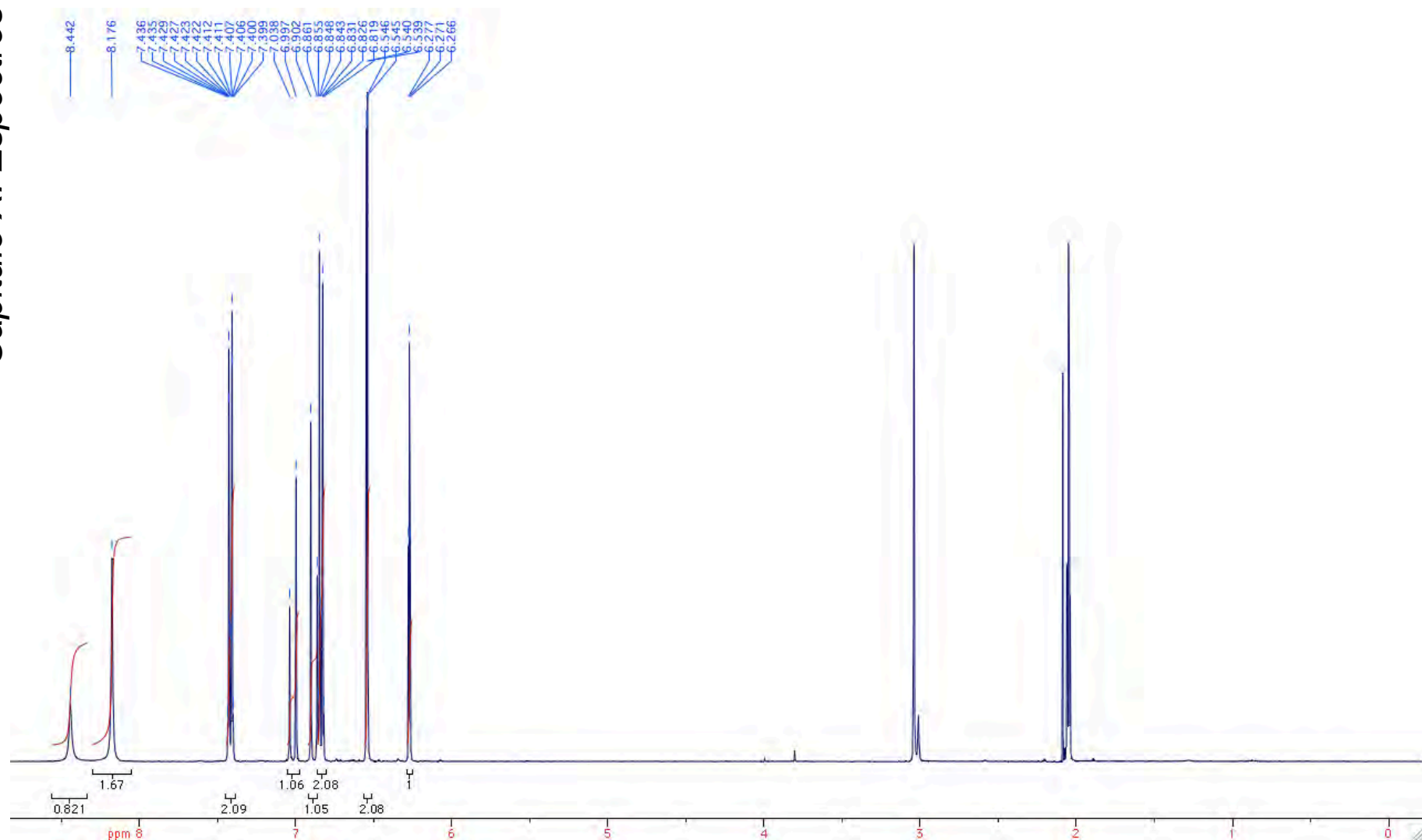


Resveratrol



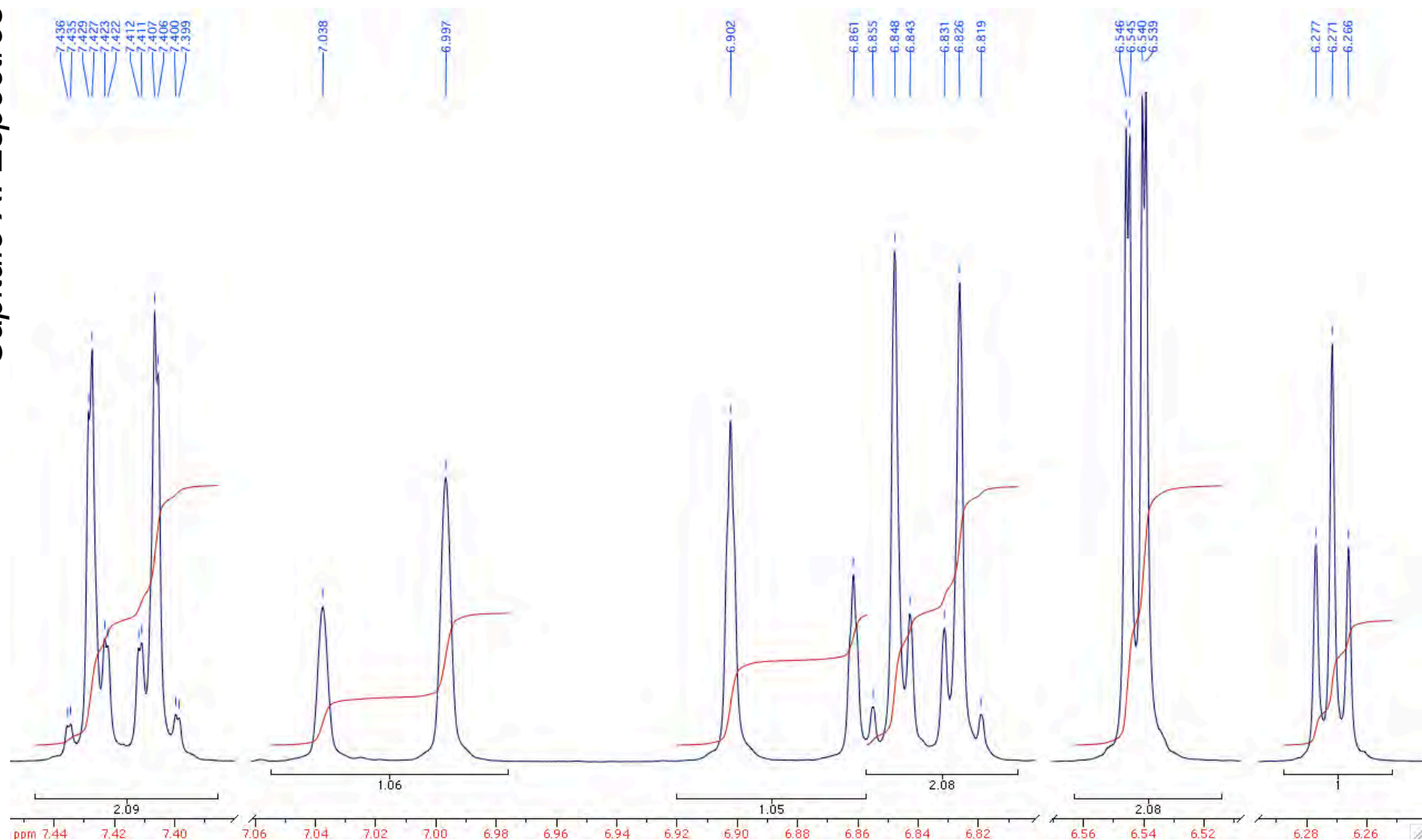
(*E*)-5-(4-hidroxiestiril)-1,3-dihidroxi-benceno





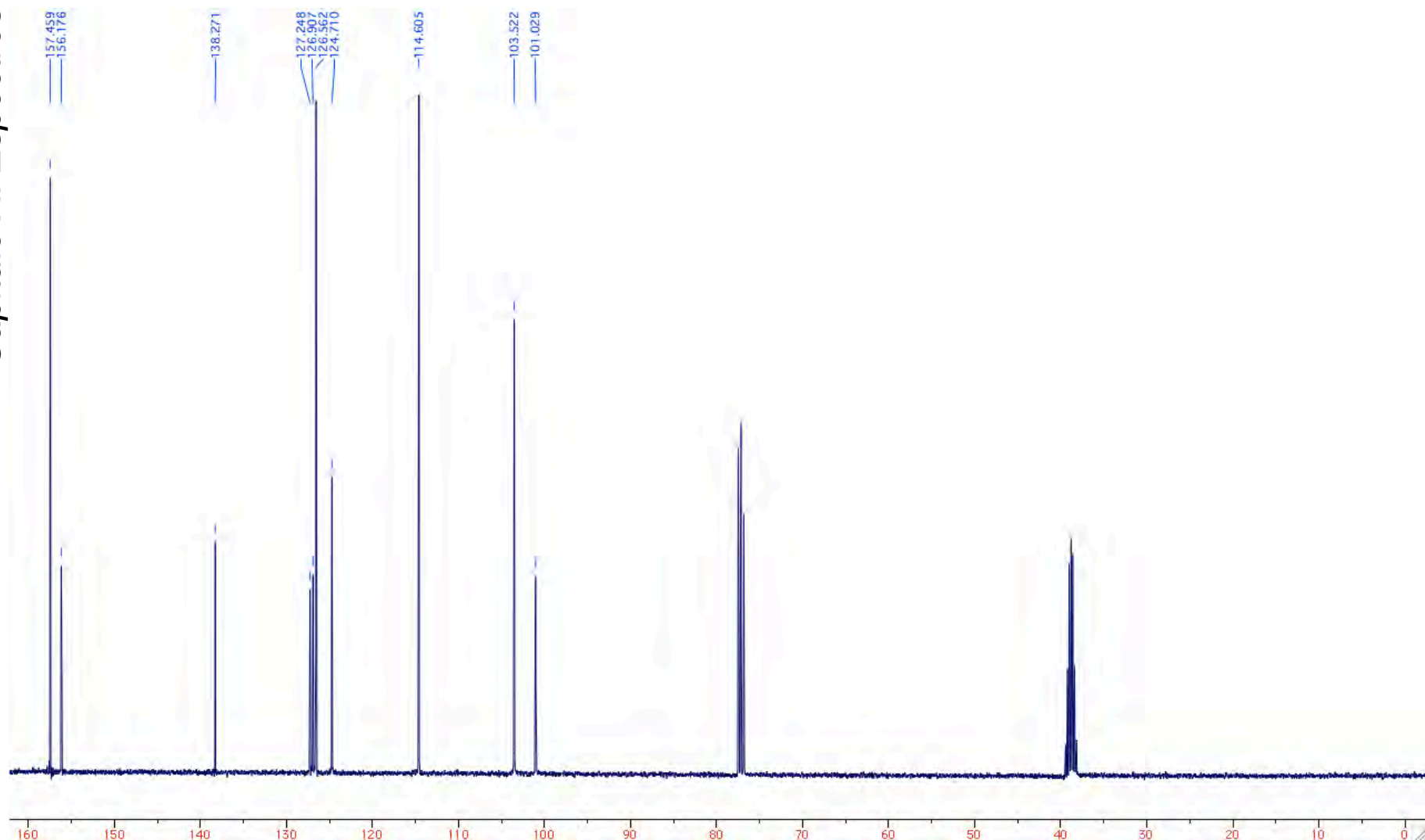
Espectro 17. Espectro de RMN ^1H de resveratrol. El espectro se obtiene a partir de un espectrofotómetro de RMN de 400 MHz. El desplazamiento químico se muestra en partes por millón (ppm). Las señales son referenciadas con respecto a la señal de $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ (2.050 ppm). Se utiliza $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ como disolvente. La señal a 2.086 ppm corresponde a residuos de $(\text{CH}_3)_2\text{CO}$. La señal a 3.040 ppm corresponde a H_2O presente en el disolvente usado.





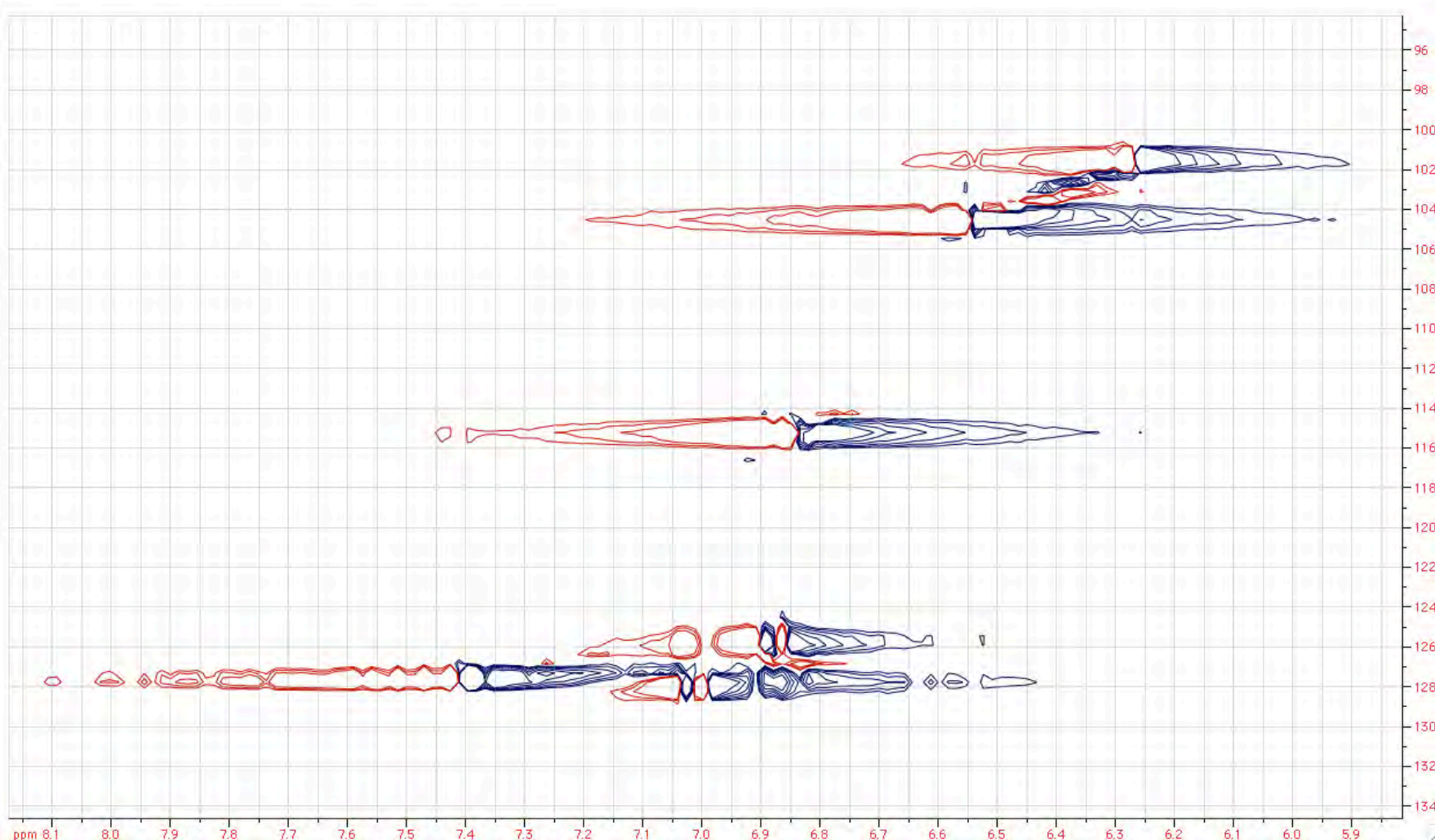
Espectro 18. Espectro de RMN ¹H de resveratrol (expansiones). El espectro se obtiene a partir de un espectrofotómetro de RMN de 400 MHz. El desplazamiento químico se muestra en partes por millón (ppm). Las señales son referenciadas con respecto a la señal de (CD₃)₂CO (2.050 ppm). Se utiliza (CD₃)₂CO como disolvente.





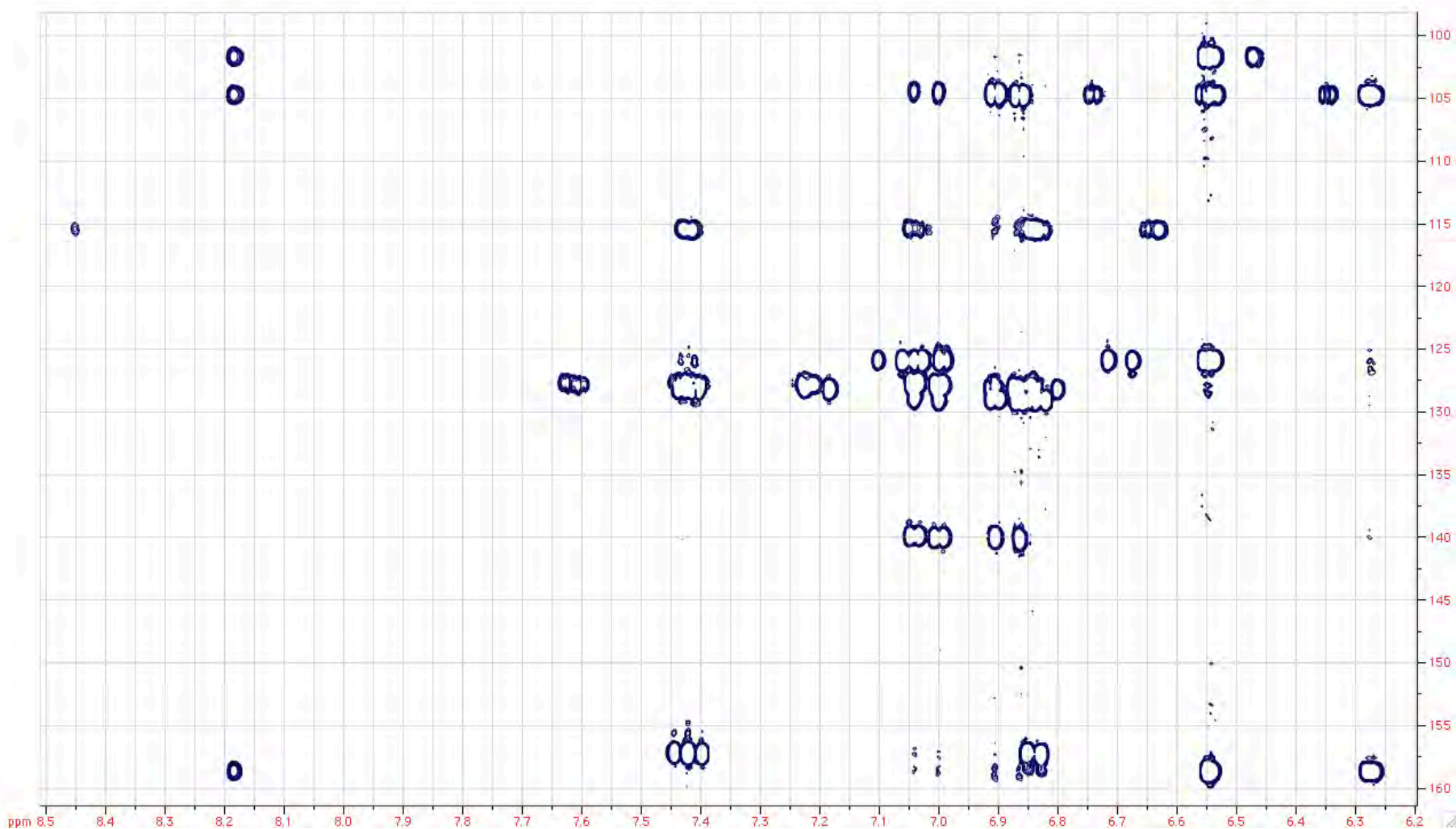
Espectro 19. Espectro de RMN ^{13}C de resveratrol. El espectro se obtiene a partir de un espectrofotómetro de RMN de 400 MHz. El desplazamiento químico se muestra en partes por millón (ppm). Se utiliza CDCl_3 y tres gotas de DMSO (*m*, 38.803 ppm) como disolvente. Las señales son referenciadas con respecto a la señal de CDCl_3 (*t*, 77.160 ppm).





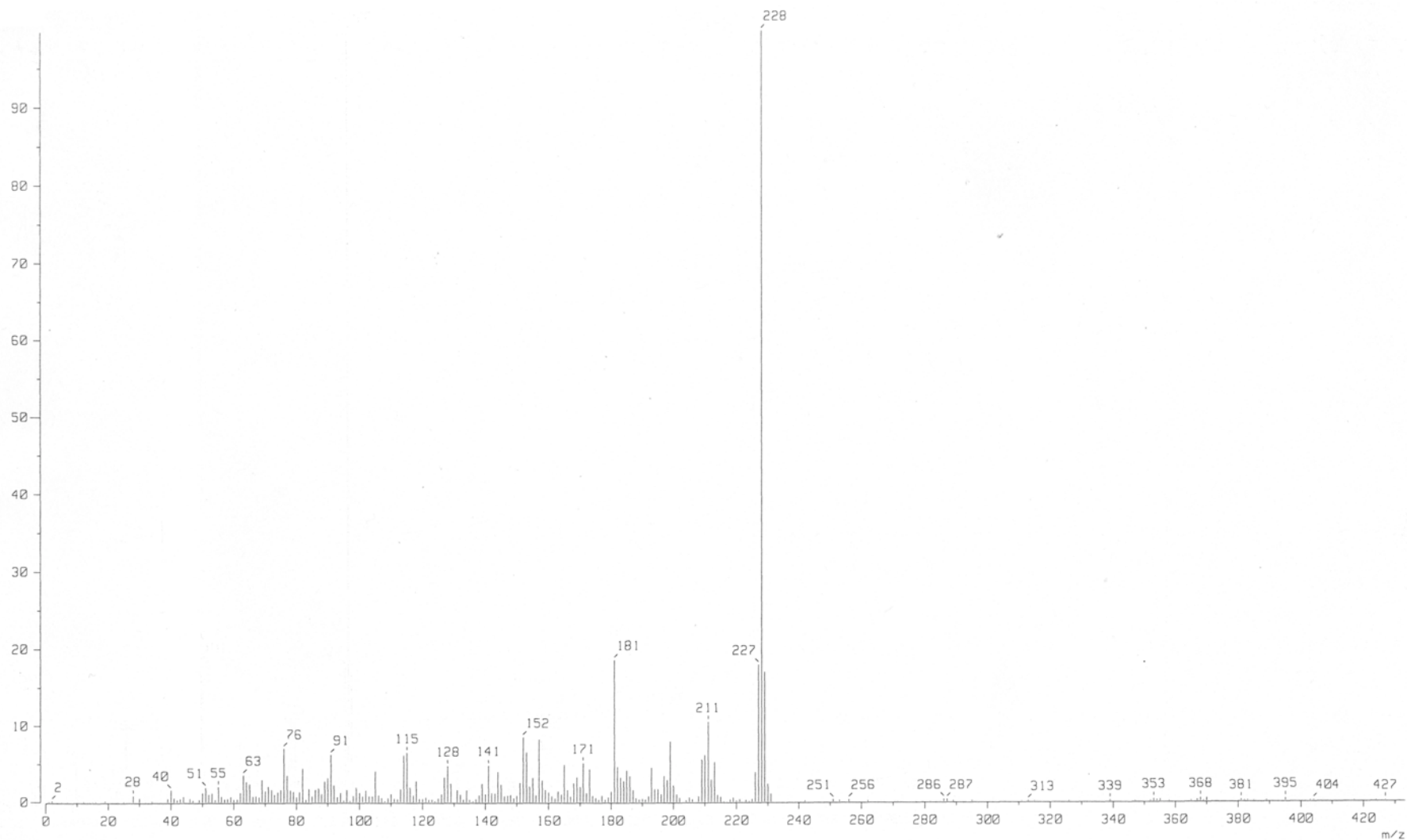
Espectro 20. Espectro de RMN HSQC de resveratrol. El espectro se obtiene a partir de un espectrofotómetro de RMN de 400 MHz. El desplazamiento químico se muestra en partes por millón (ppm). Se utiliza CDCl_3 y tres gotas de DMSO como disolvente.





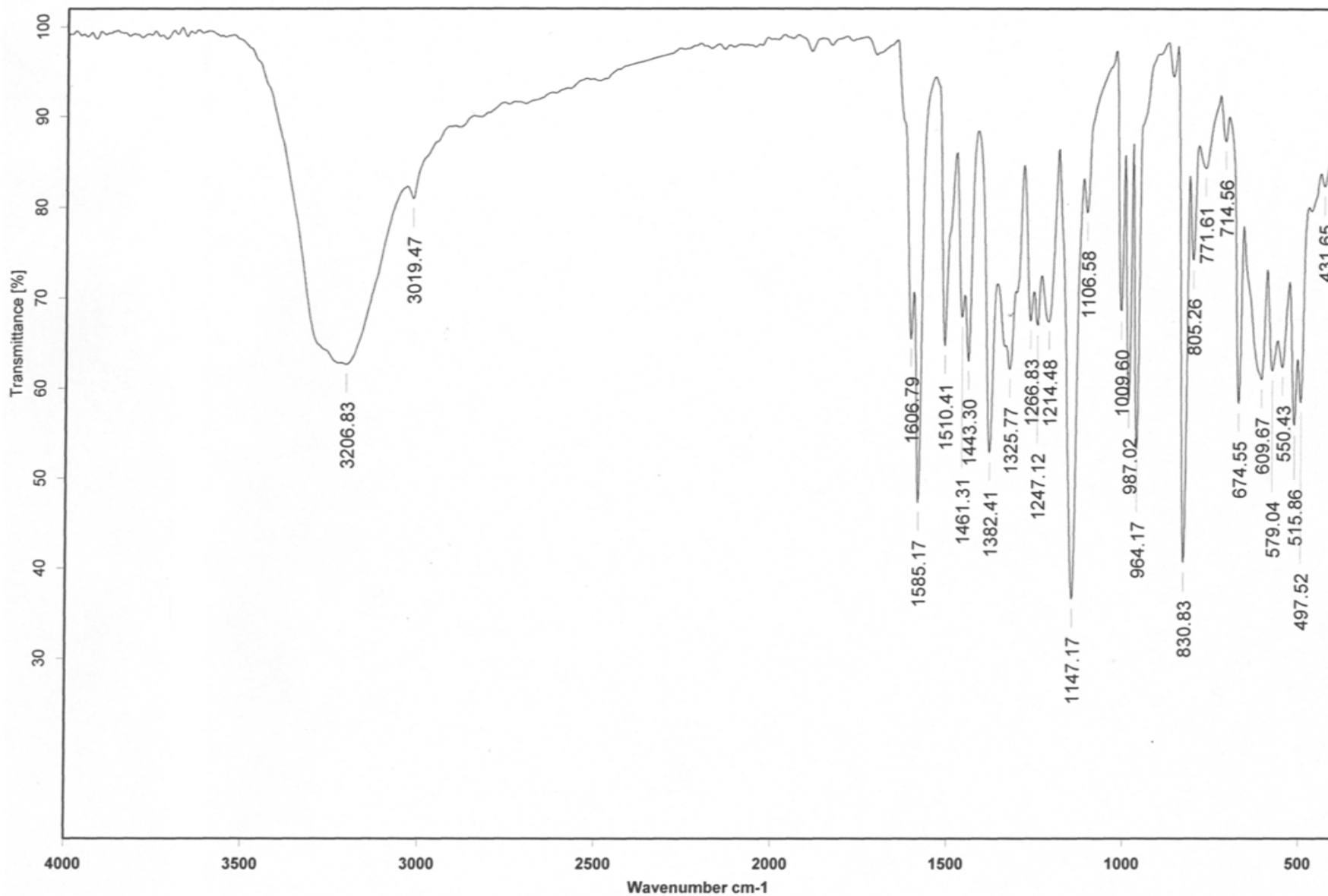
Espectro 21. Espectro de RMN HMBC de resveratrol. El espectro se obtiene a partir de un espectrofotómetro de RMN de 400 MHz. El desplazamiento químico se muestra en partes por millón (ppm). Se utiliza CDCl_3 y tres gotas de DMSO como disolvente.





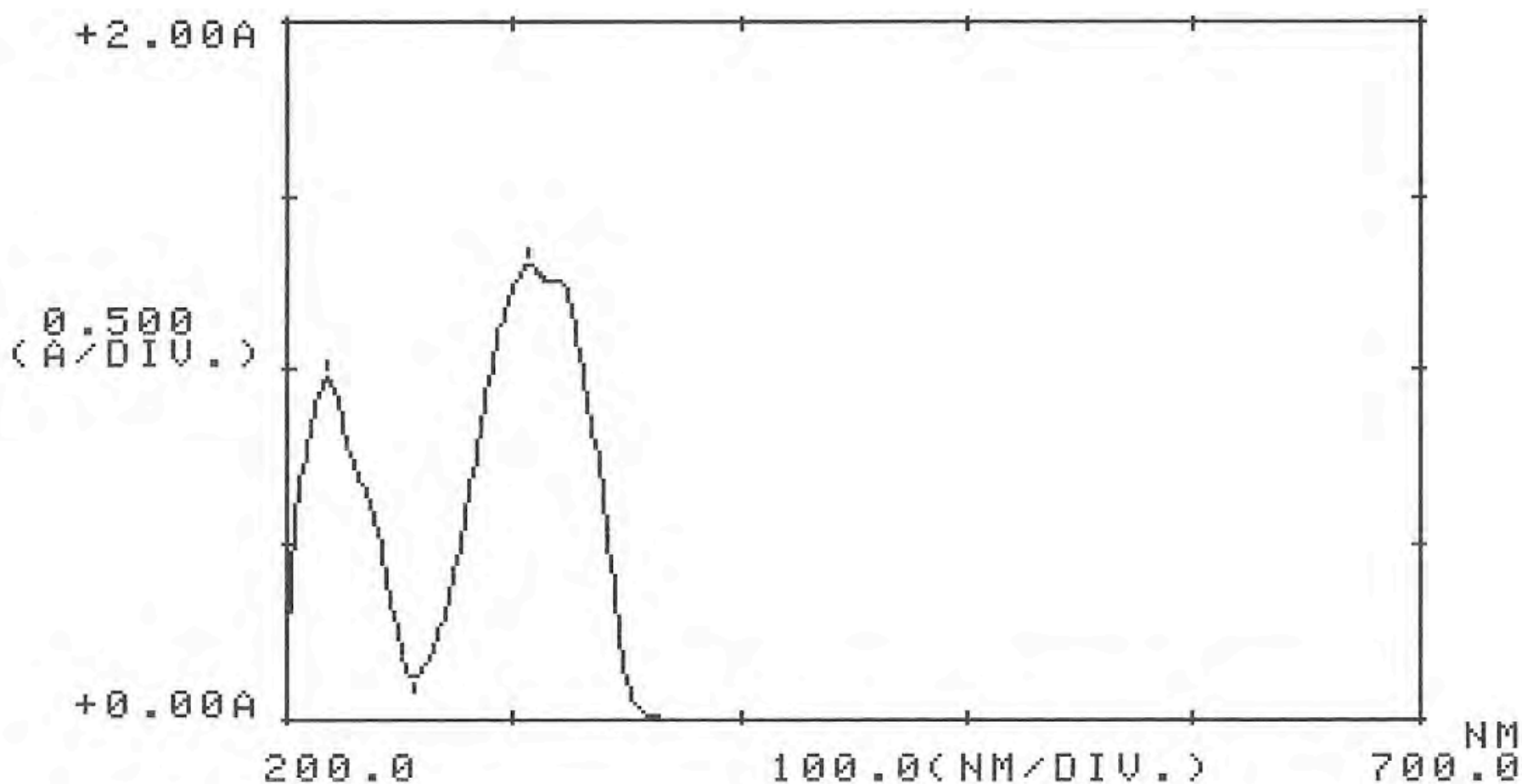
Espectro 22. Espectro de EM de resveratrol. El espectro se obtiene a partir de un espectrómetro de masas. El método de ionización es por impacto electrónico. Las unidades de masa se obtienen de la relación masa-carga (m/z).





Espectro 23. Espectro de IR de resveratrol. El espectro se obtiene a partir de un espectrofotómetro de IR. El número de onda se muestra en cm^{-1} y la transmitancia en %. La muestra se prepara por el método de pastilla con KBr para su análisis.

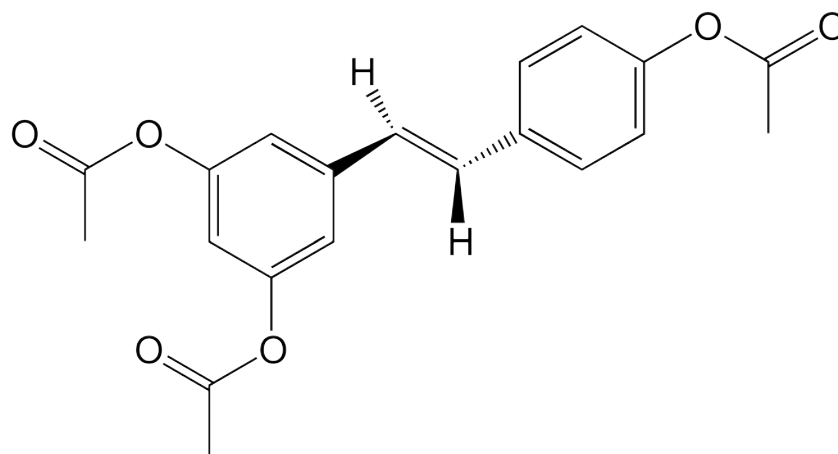




Espectro 24. Espectro de UV-visible de resveratrol. El espectro se obtiene a partir de un espectrofotómetro de UV-visible. Se realiza un análisis cualitativo. La longitud de onda se muestra en nm y la absorbancia en A. La división mínima es de 100.0 nm y 0.500 A. Se utiliza MeOH como disolvente.

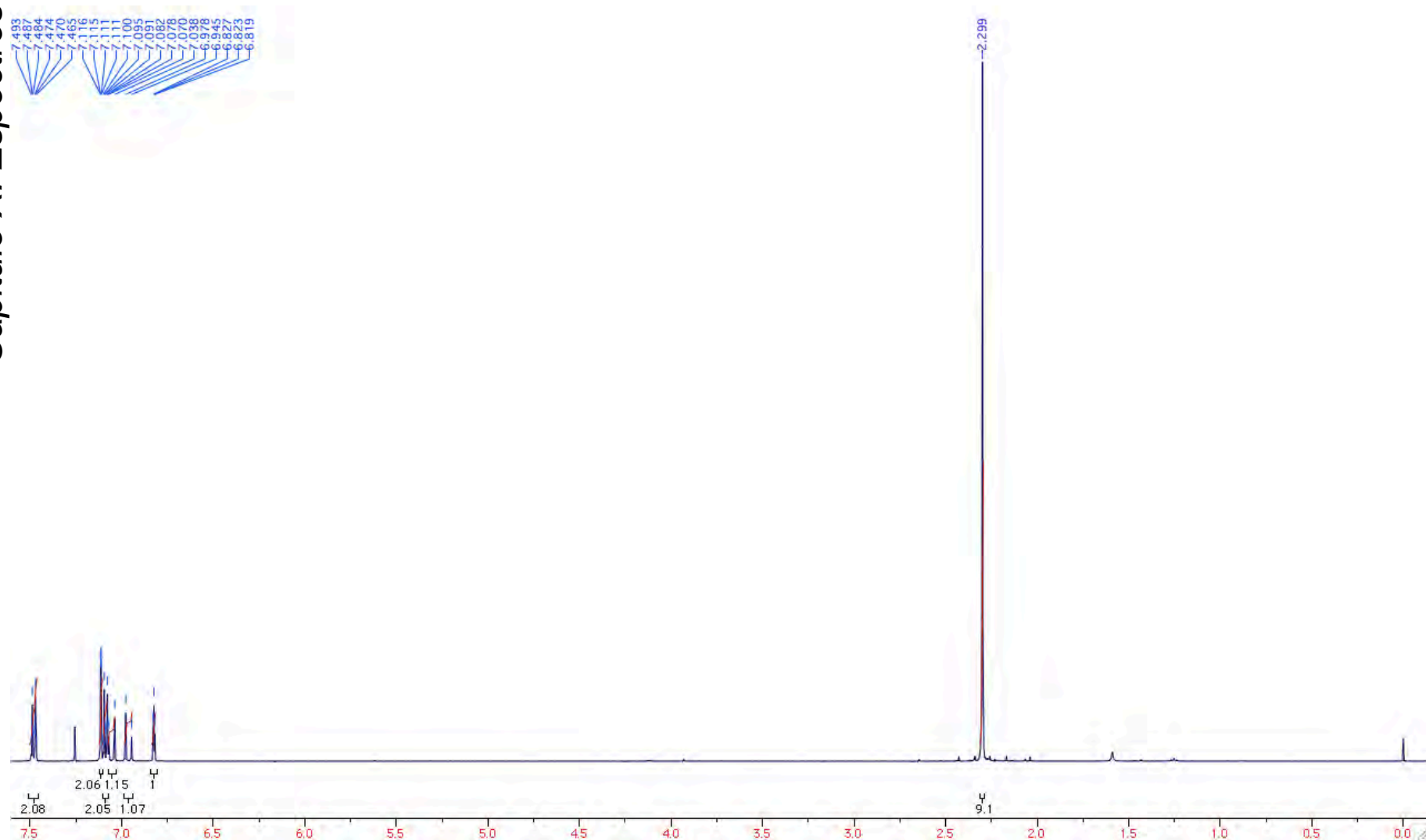


Resveratrol acetilado



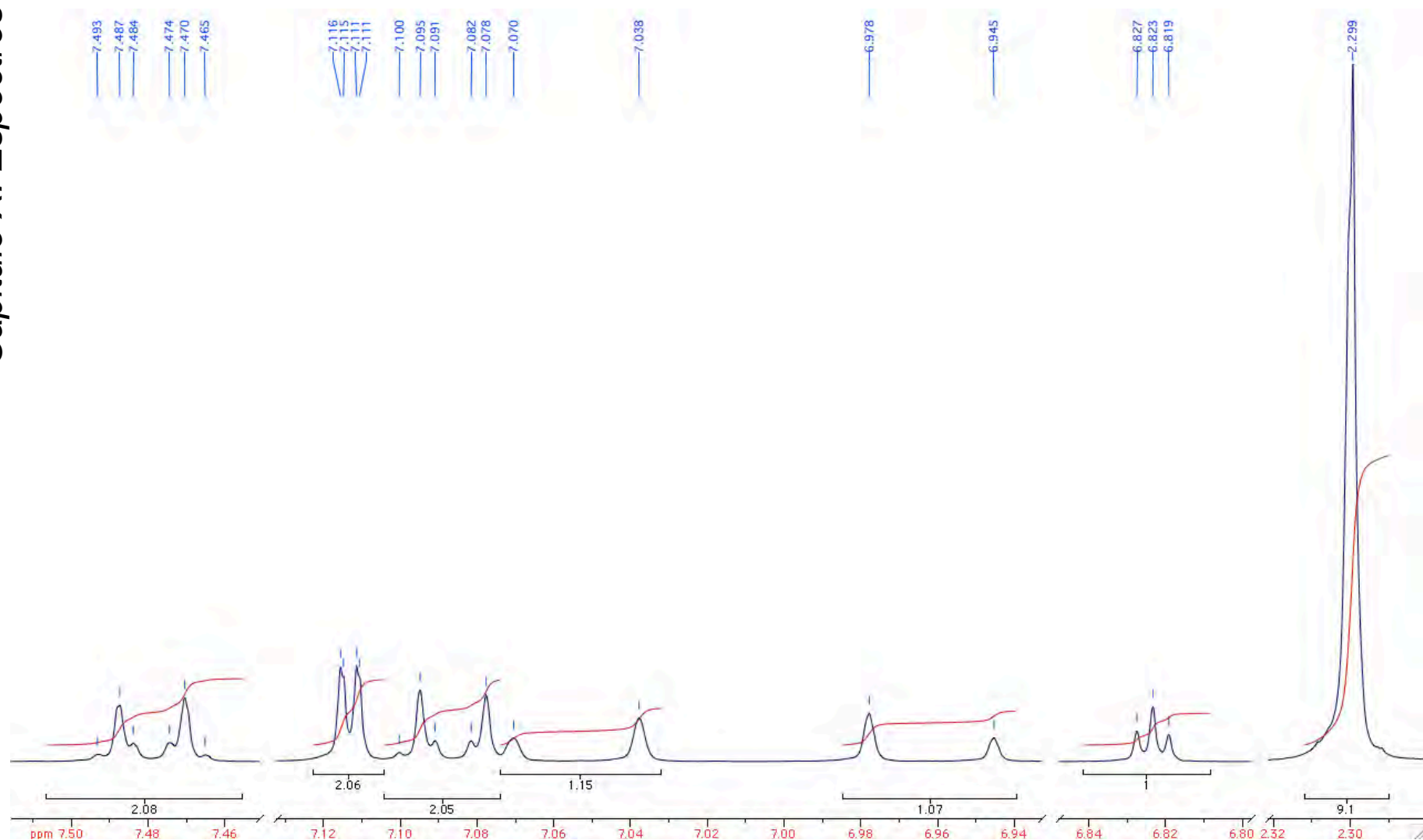
(*E*)-5-(4-acetoxiestiril)-1,3-diacetoxibenceno





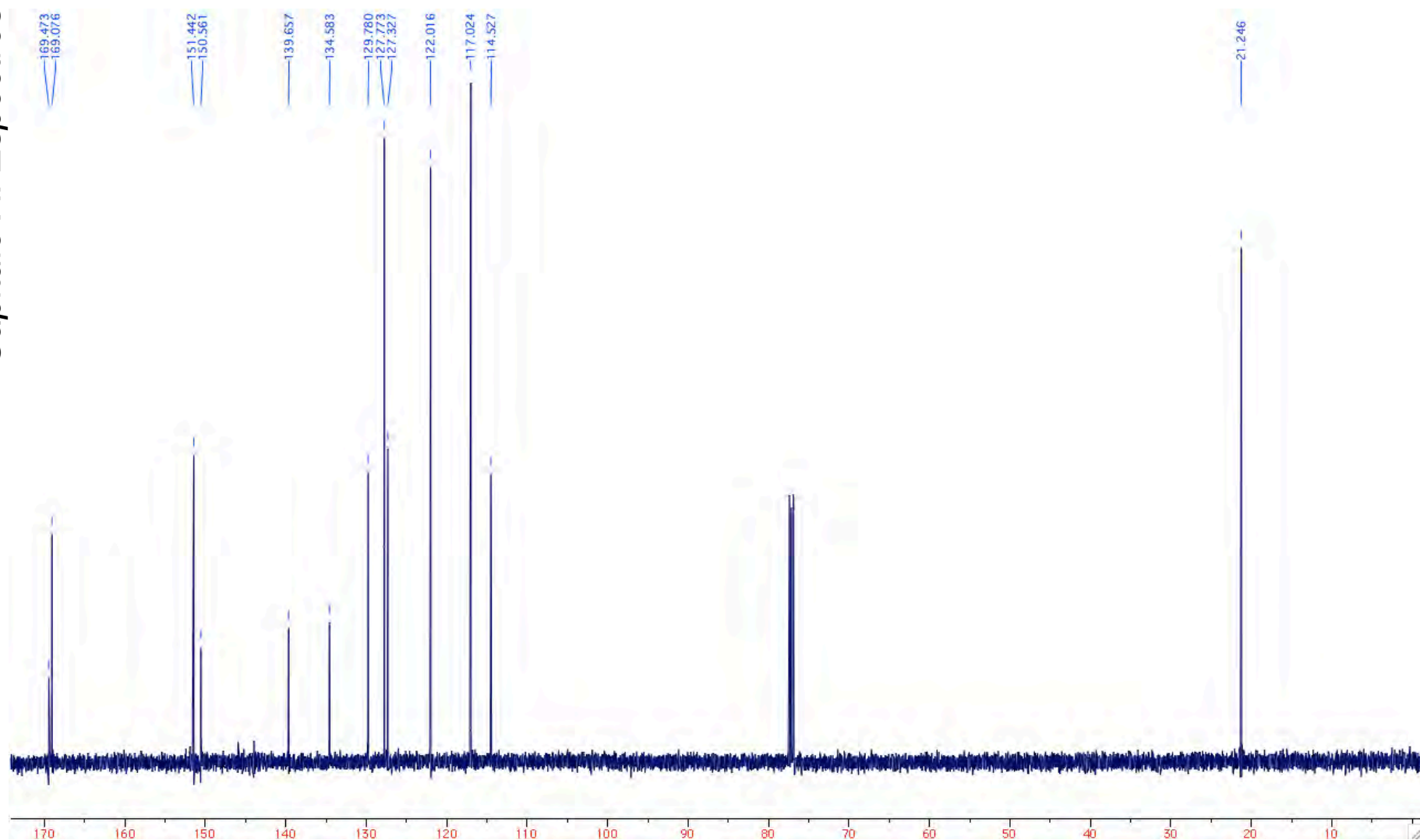
Espectro 25. Espectro de RMN ^1H de resveratrol acetilado. El espectro se obtiene a partir de un espectrofotómetro de RMN de 500 MHz. El desplazamiento químico se muestra en partes por millón (ppm). Se utiliza CDCl_3 como disolvente (7.256 ppm). Las señales son referenciadas con respecto a la señal de TMS (0.000 ppm).





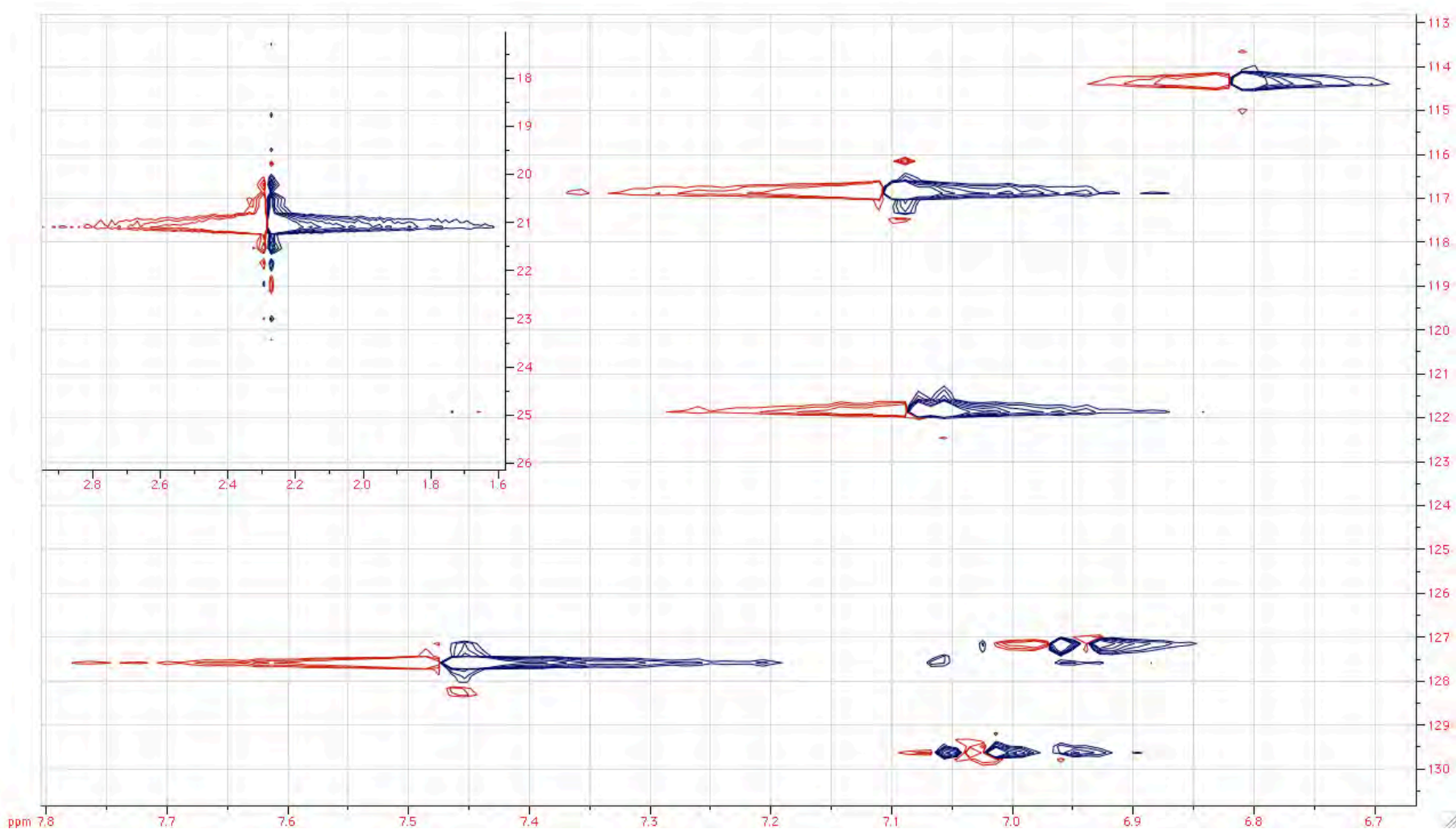
Espectro 26. Espectro de RMN ^1H de resveratrol acetilado (expansiones). El espectro se obtiene a partir de un espectrofotómetro de RMN de 500 MHz. El desplazamiento químico se muestra en partes por millón (ppm). Se utiliza CDCl_3 como disolvente (7.256 ppm). Las señales son referenciadas con respecto a la señal de TMS (0.000 ppm).





Espectro 27. Espectro de RMN ^{13}C de resveratrol acetilado. El espectro se obtiene a partir de un espectrofotómetro de RMN de 500 MHz. El desplazamiento químico se muestra en partes por millón (ppm). Las señales son referenciadas con respecto a la señal de CDCl_3 (t , 77.160 ppm). Se utiliza CDCl_3 como disolvente.



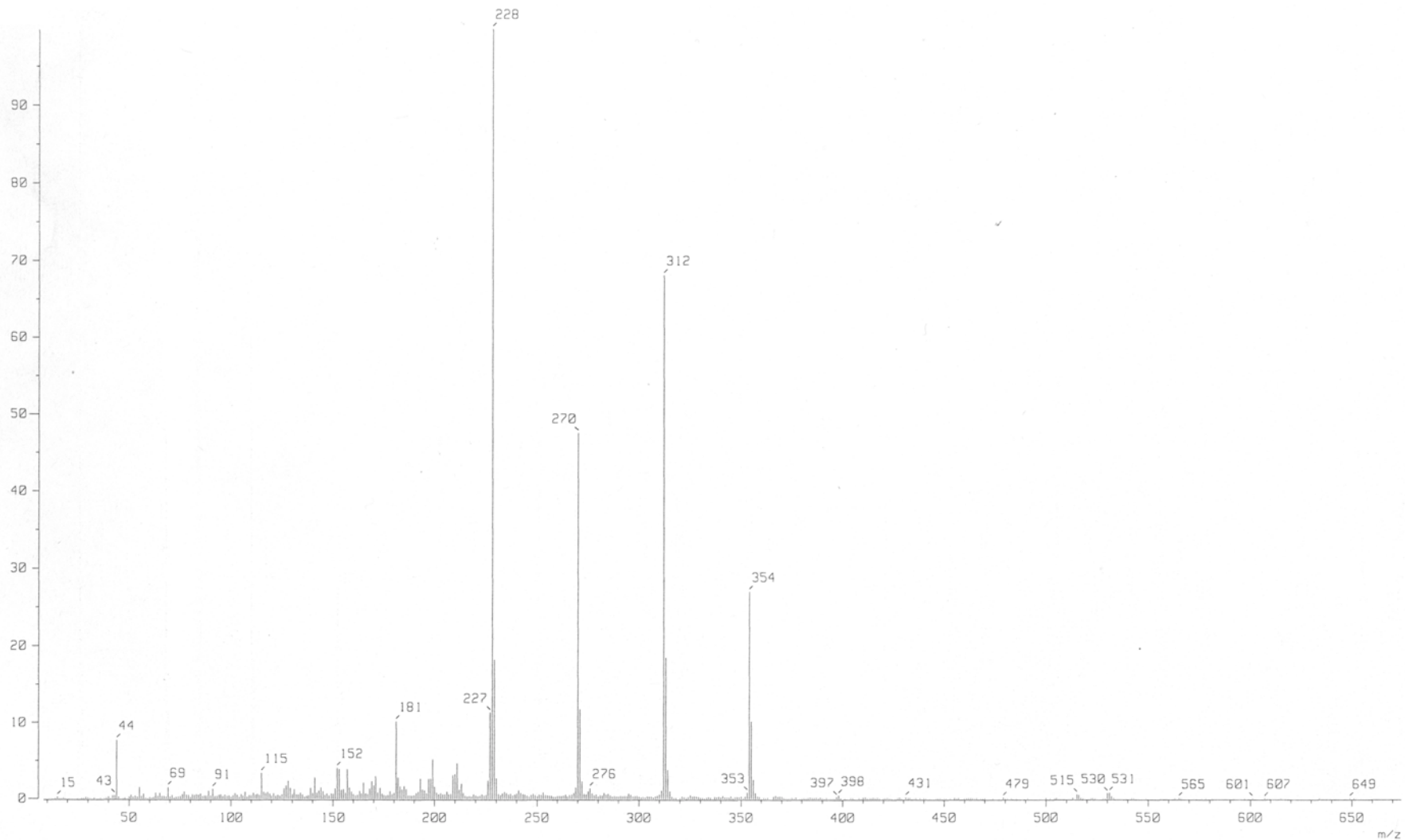


Espectro 28. Espectro de RMN HSQC de resveratrol acetilado. El espectro se obtiene a partir de un espectrofotómetro de RMN de 500 MHz. El desplazamiento químico se muestra en partes por millón (ppm). Se utiliza CDCl_3 como disolvente.



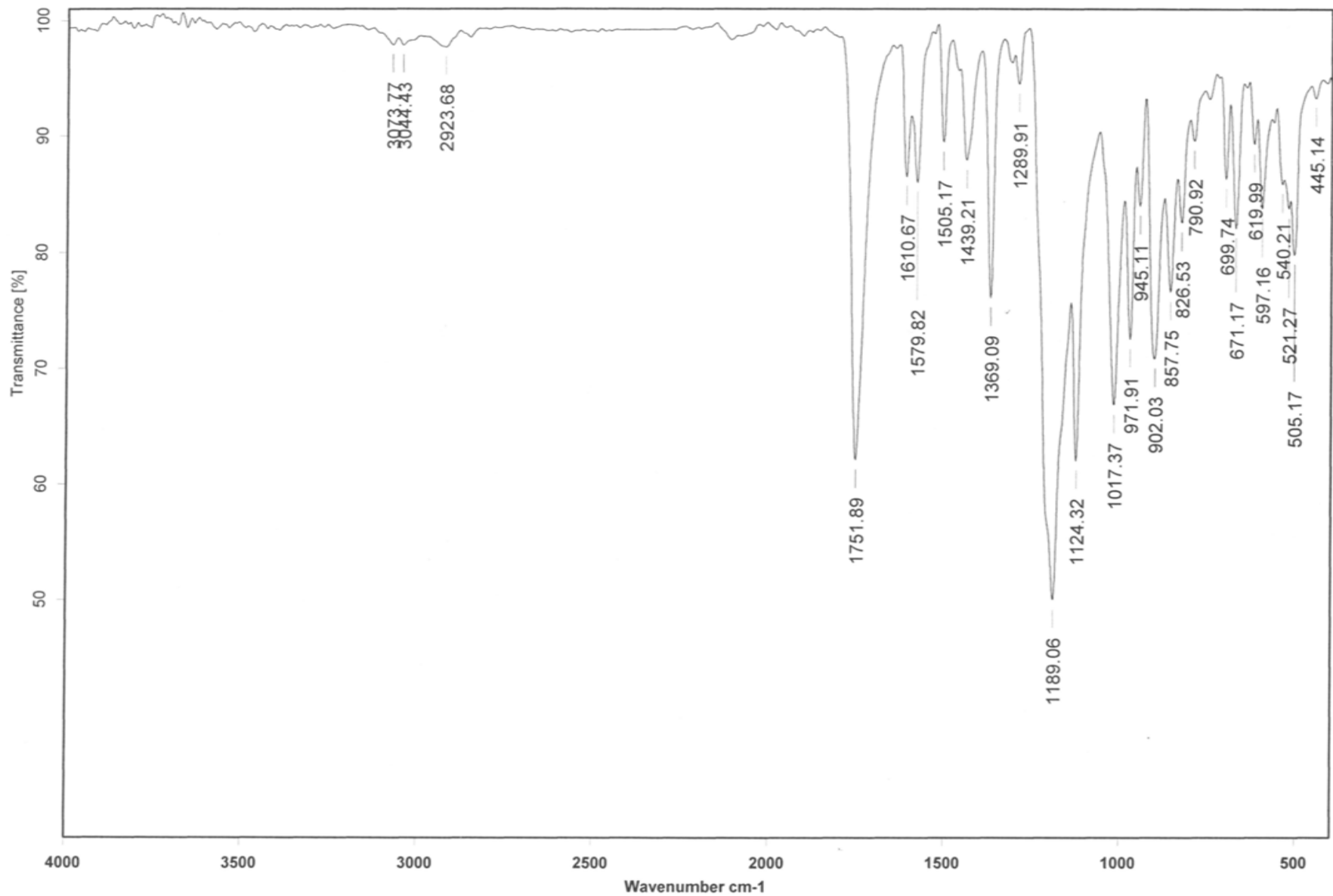


Espectro 29. Espectro de RMN HMBC de resveratrol acetilado. El espectro se obtiene a partir de un espectrofotómetro de RMN de 500 MHz. El desplazamiento químico se muestra en partes por millón (ppm). Se utiliza CDCl_3 como disolvente.



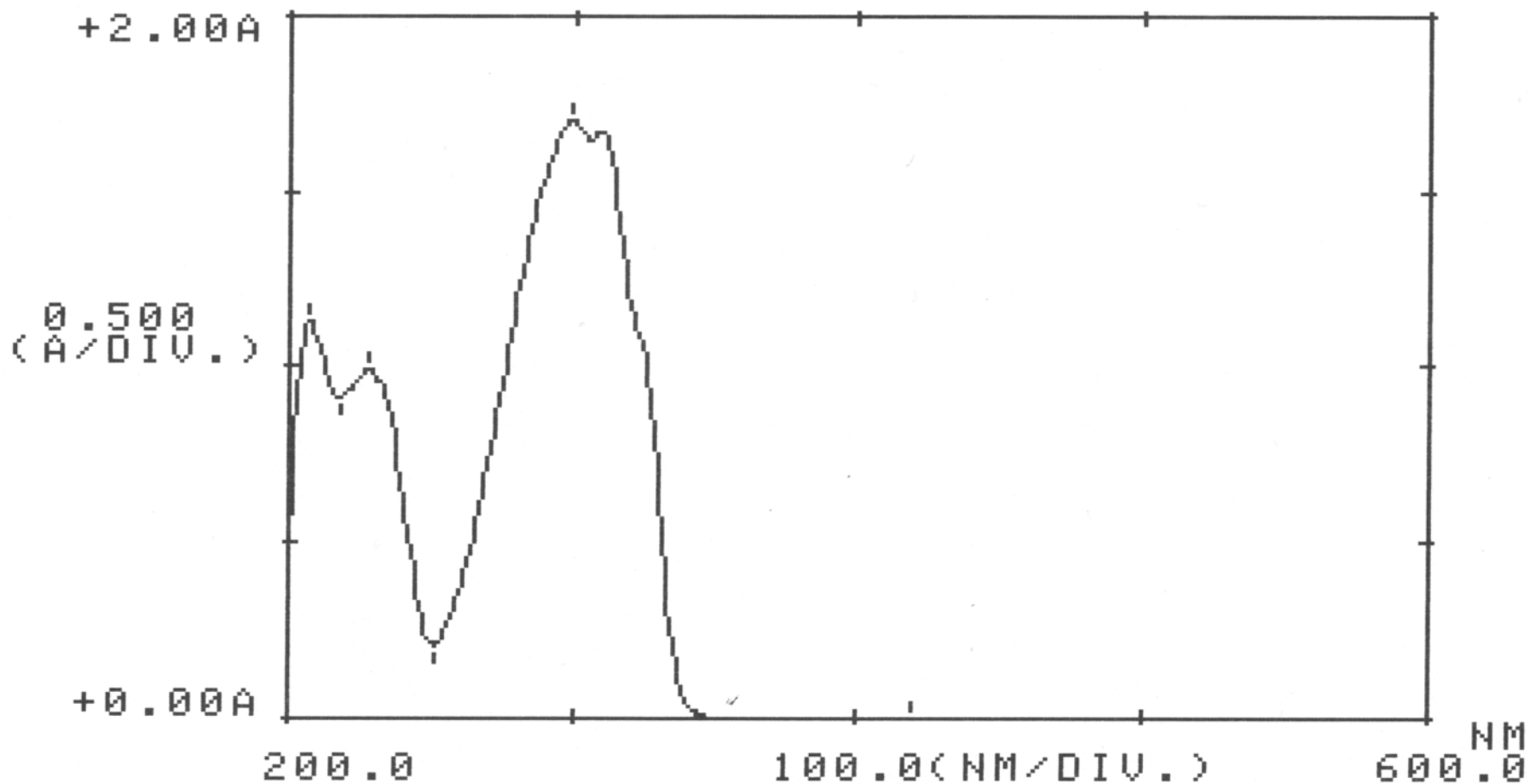
Espectro 30. Espectro de EM de resveratrol acetilado. El espectro se obtiene a partir de un espectrómetro de masas. El método de ionización es por impacto electrónico. Las unidades de masa se obtienen de la relación masa-carga (m/z).





Espectro 31. Espectro de IR de resveratrol acetilado. El espectro se obtiene a partir de un espectrofotómetro de IR. El número de onda se muestra en cm^{-1} y la transmitancia en %. La muestra se prepara por el método de pastilla con KBr para su análisis.

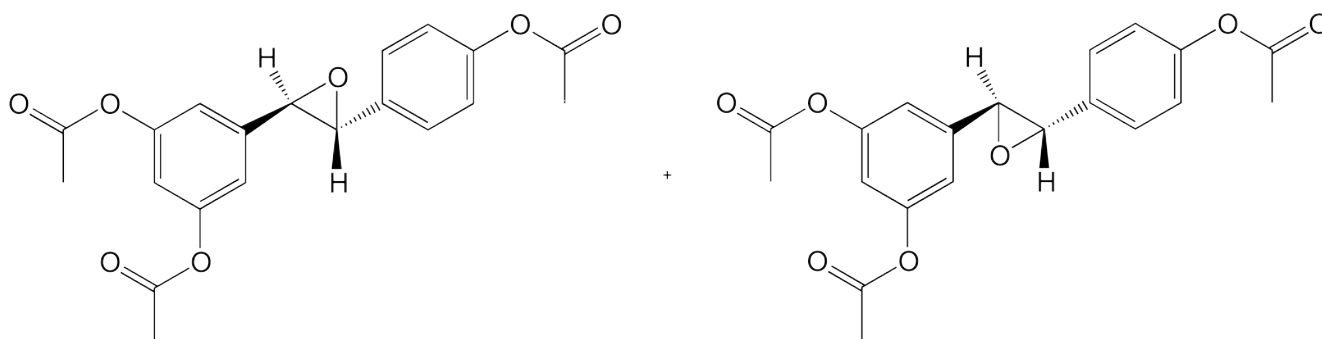




Espectro 32. Espectro de UV-visible de resveratrol acetilado. El espectro se obtiene a partir de un espectrofotómetro de UV-visible. Se realiza un análisis cualitativo. La longitud de onda se muestra en nm y la absorbancia en A. La división mínima es de 100.0 nm y 0.500 A. Se utiliza MeOH como disolvente.



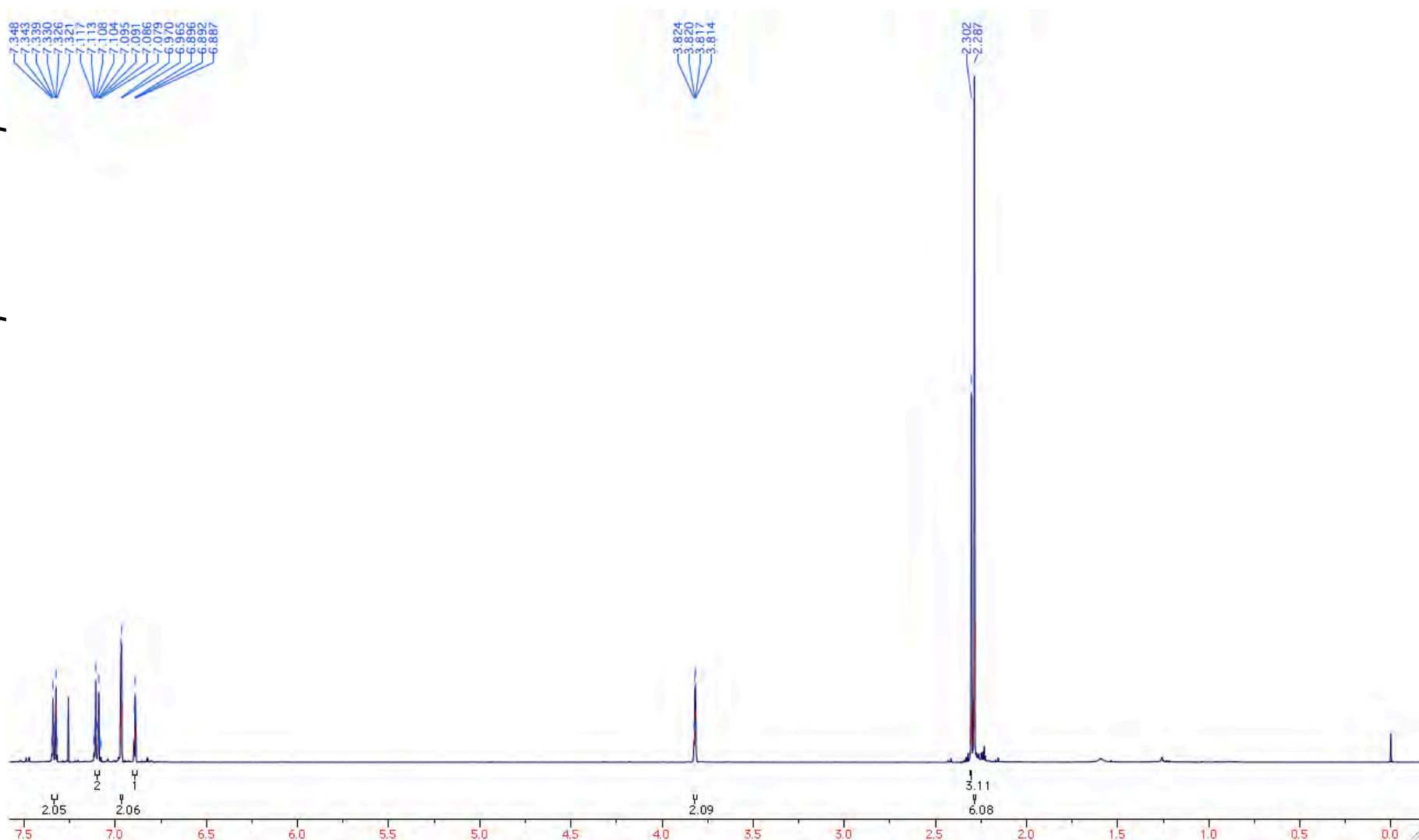
Epóxido de resveratrol acetilado



5-((2'R,3'R)-3'-(4''-acetoxifenil)oxiran-2'-il)-1,3-diacetoxibenceno

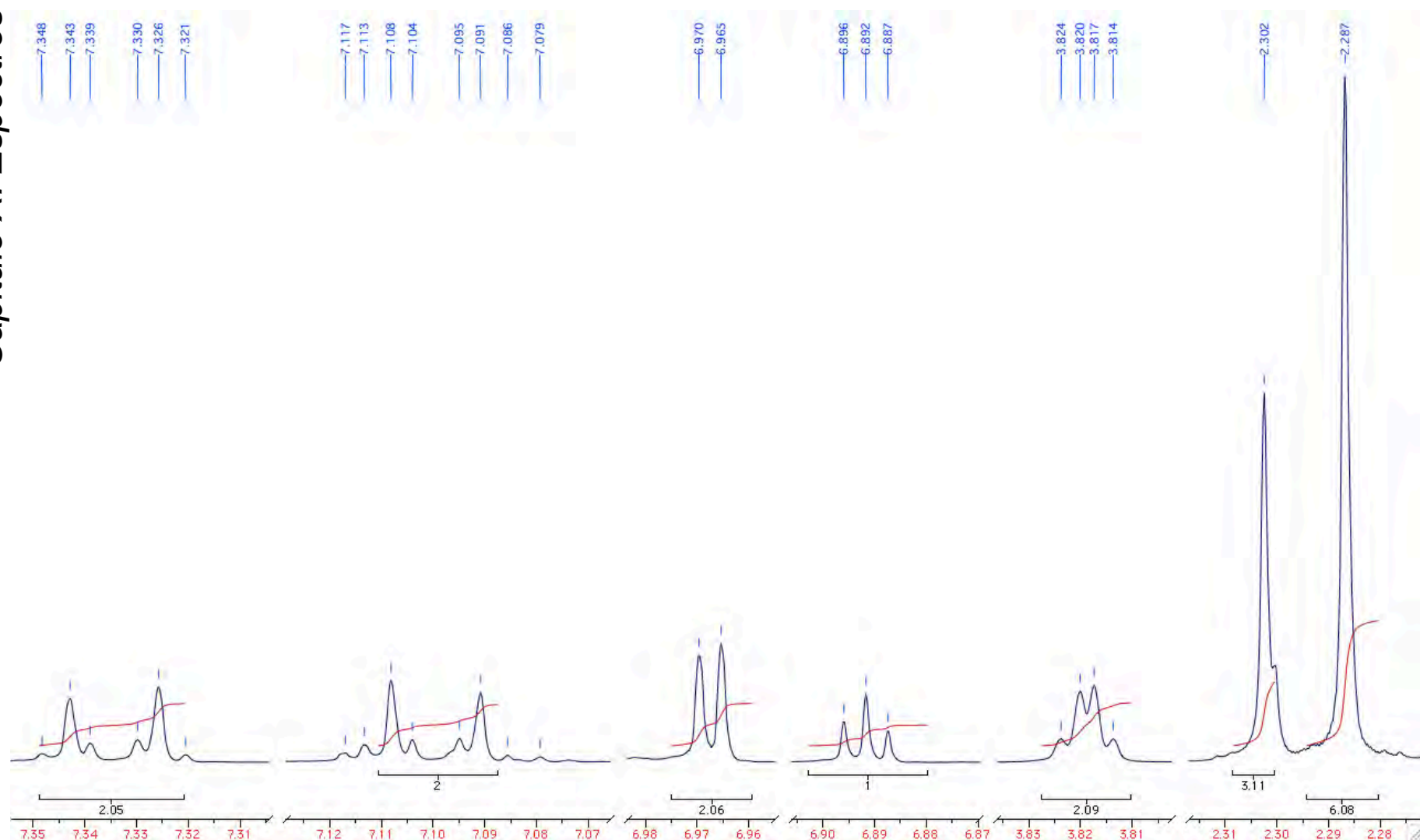
5-((2'S,3'S)-3'-(4''-acetoxifenil)oxiran-2'-il)-1,3-diacetoxibenceno





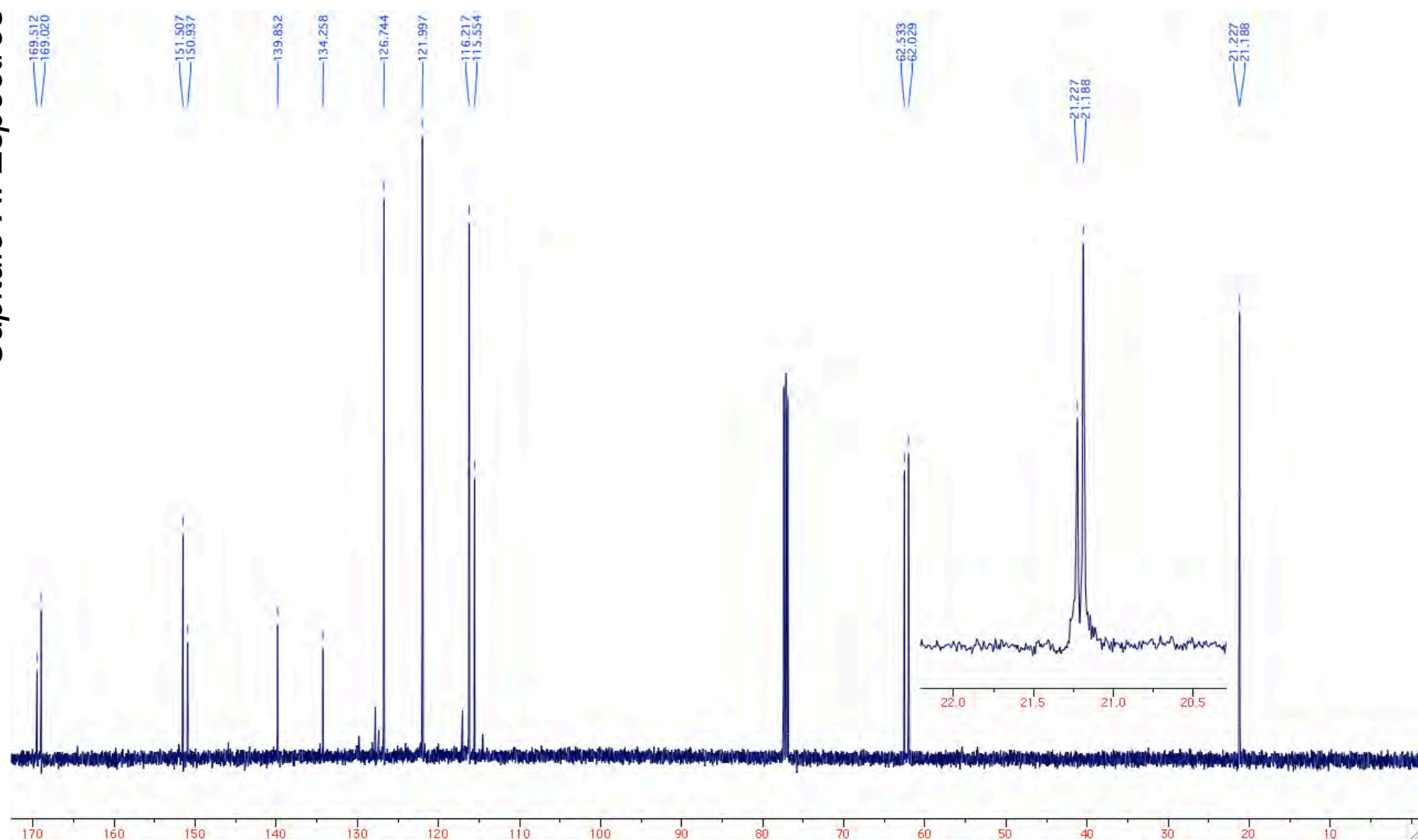
Espectro 33. Espectro de RMN ^1H de epóxido de resveratrol acetilado. El espectro se obtiene a partir de un espectrofotómetro de RMN de 500 MHz. El desplazamiento químico se muestra en partes por millón (ppm). Se utiliza CDCl_3 (7.258 ppm) como disolvente. Las señales son referenciadas con respecto a la señal de TMS (0.000 ppm).





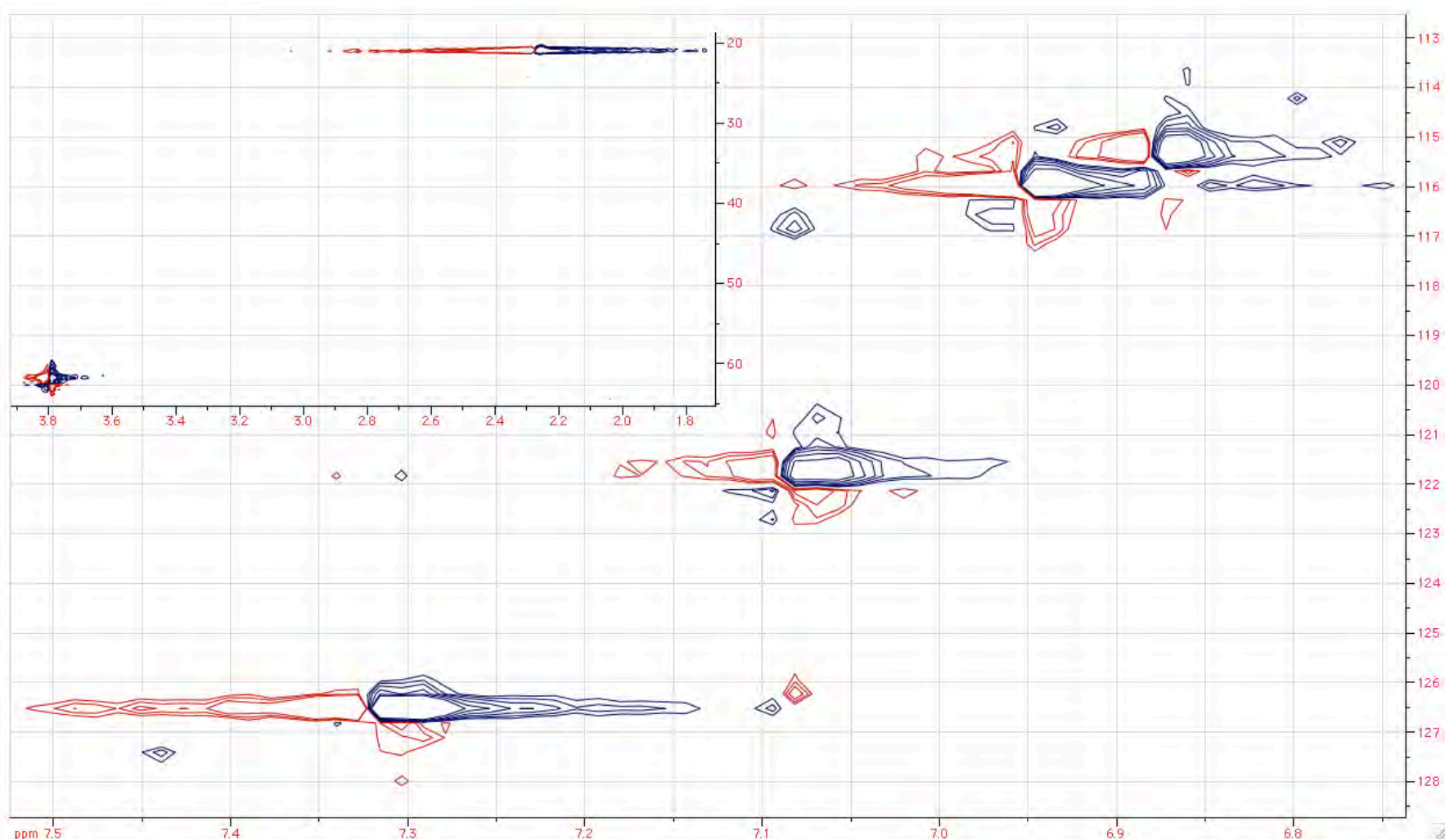
Espectro 34. Espectro de RMN ^1H de epóxido de resveratrol acetilado (expansiones). El espectro se obtiene a partir de un espectrofotómetro de RMN de 500 MHz. El desplazamiento químico se muestra en partes por millón (ppm). Se utiliza CDCl_3 (7.258 ppm) como disolvente. Las señales son referenciadas con respecto a la señal de TMS (0.000 ppm).





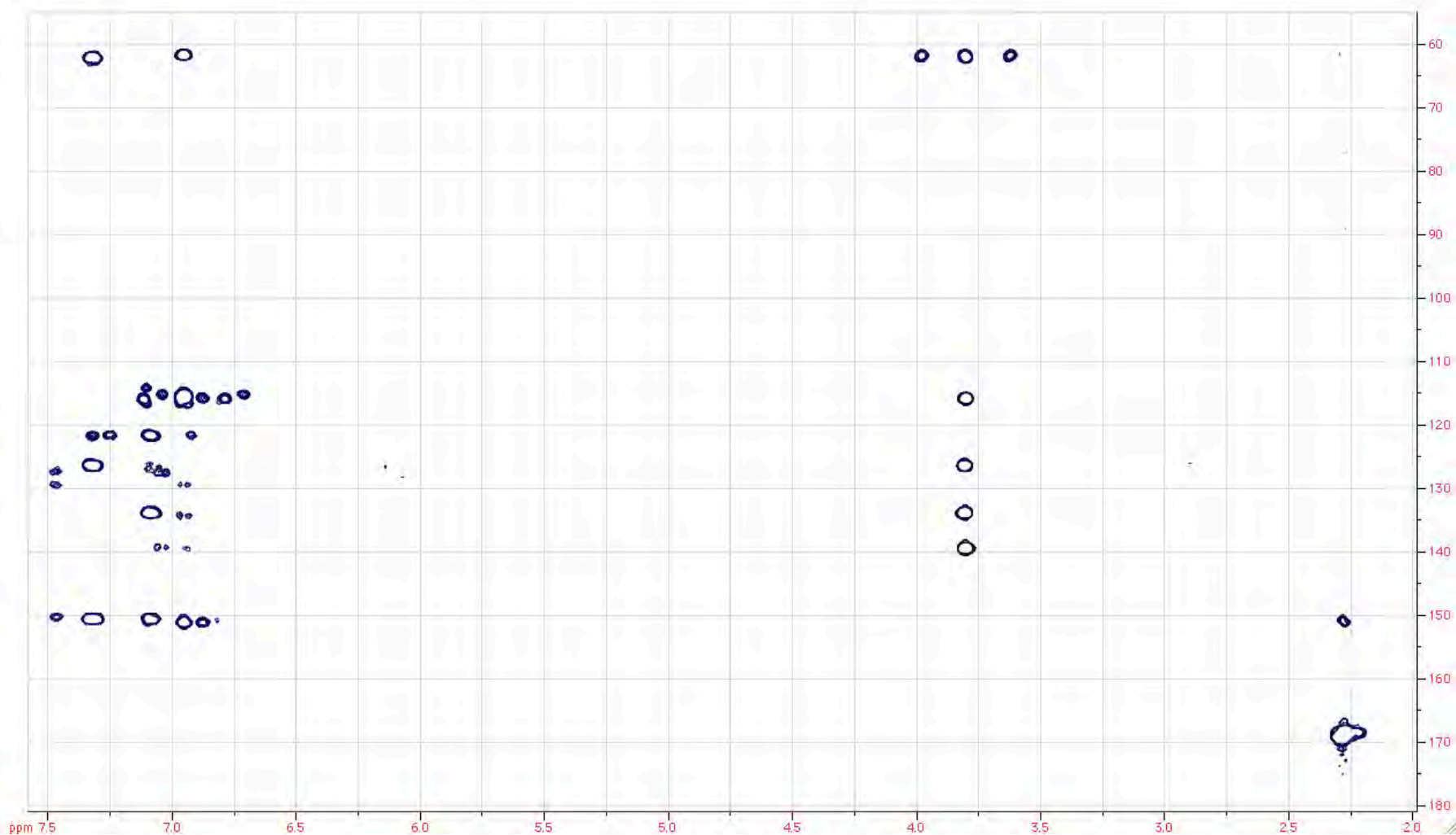
Espectro 35. Espectro de RMN ^{13}C de epóxido de resveratrol acetilado. El espectro se obtiene a partir de un espectrofotómetro de RMN de 500 MHz. El desplazamiento químico se muestra en partes por millón (ppm). Las señales son referenciadas con respecto a la señal de CDCl_3 (t , 77.160 ppm). Se utiliza CDCl_3 como disolvente.





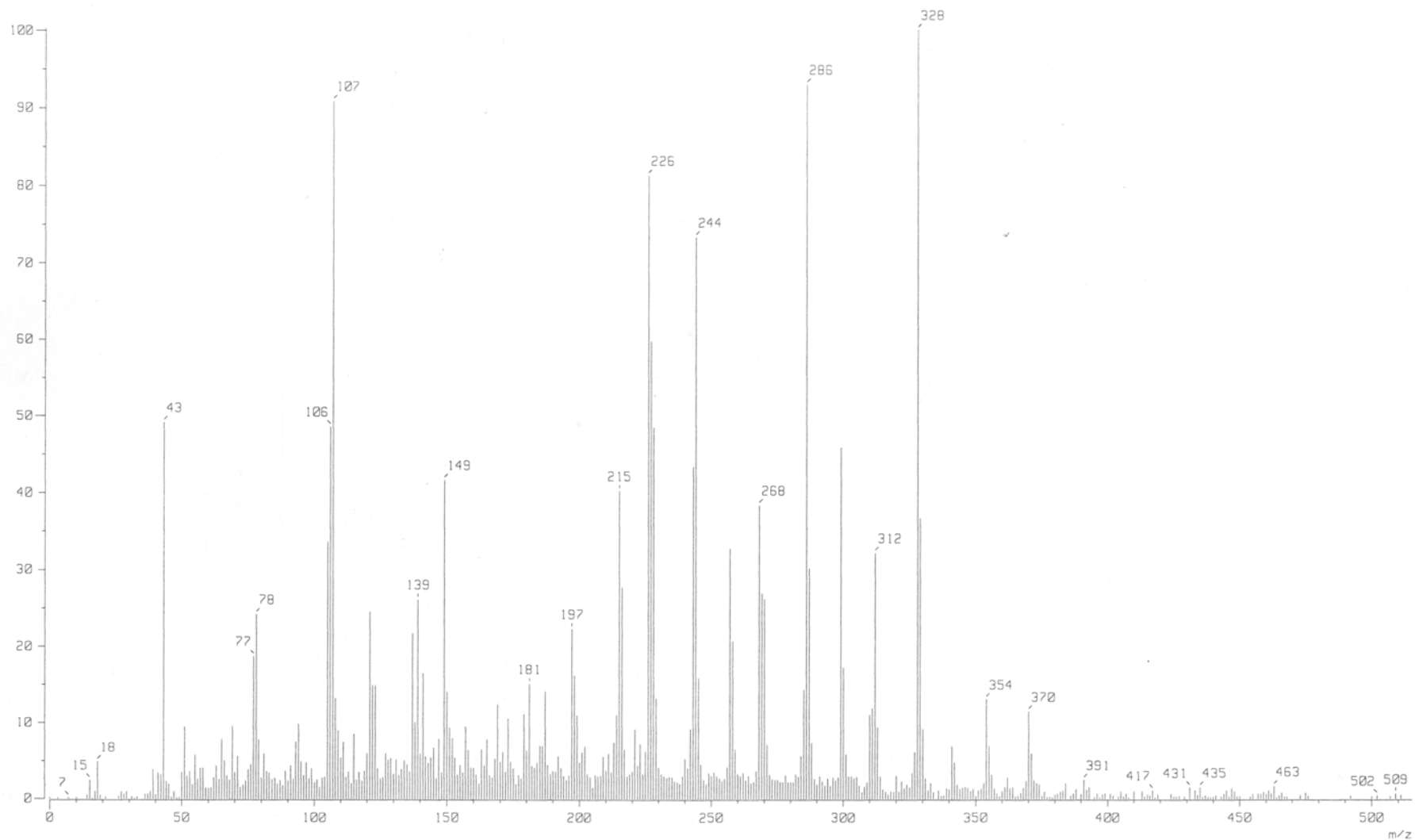
Espectro 36. Espectro de RMN HSQC de epóxido de resveratrol acetilado. El espectro se obtiene a partir de un espectrofotómetro de RMN de 500 MHz. El desplazamiento químico se muestra en partes por millón (ppm). Se utiliza CDCl_3 como disolvente.





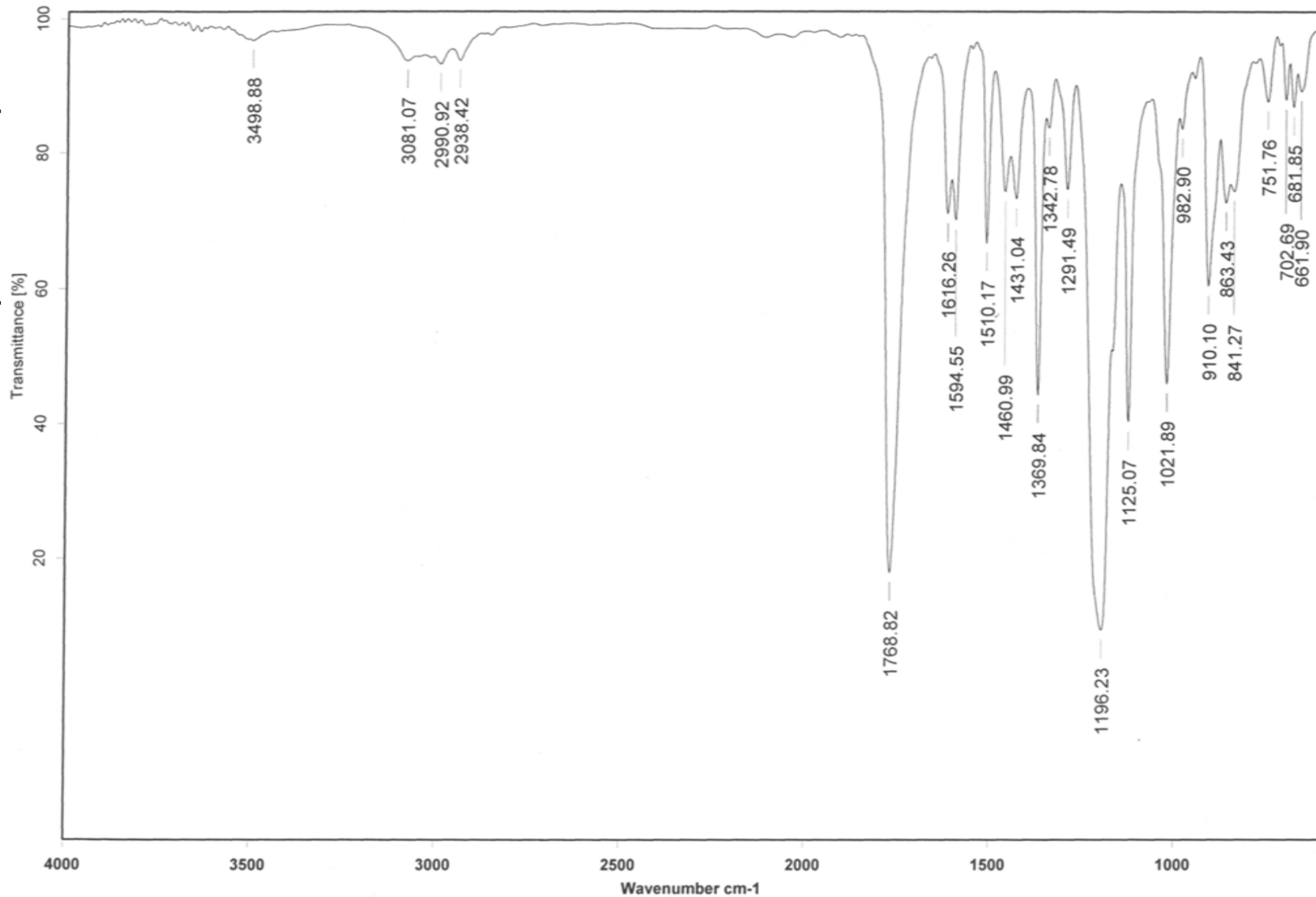
Espectro 37. Espectro de RMN HMBC de epóxido de resveratrol acetilado. El espectro se obtiene a partir de un espectrofotómetro de RMN de 500 MHz. El desplazamiento químico se muestra en partes por millón (ppm). Se utiliza CDCl_3 como disolvente.





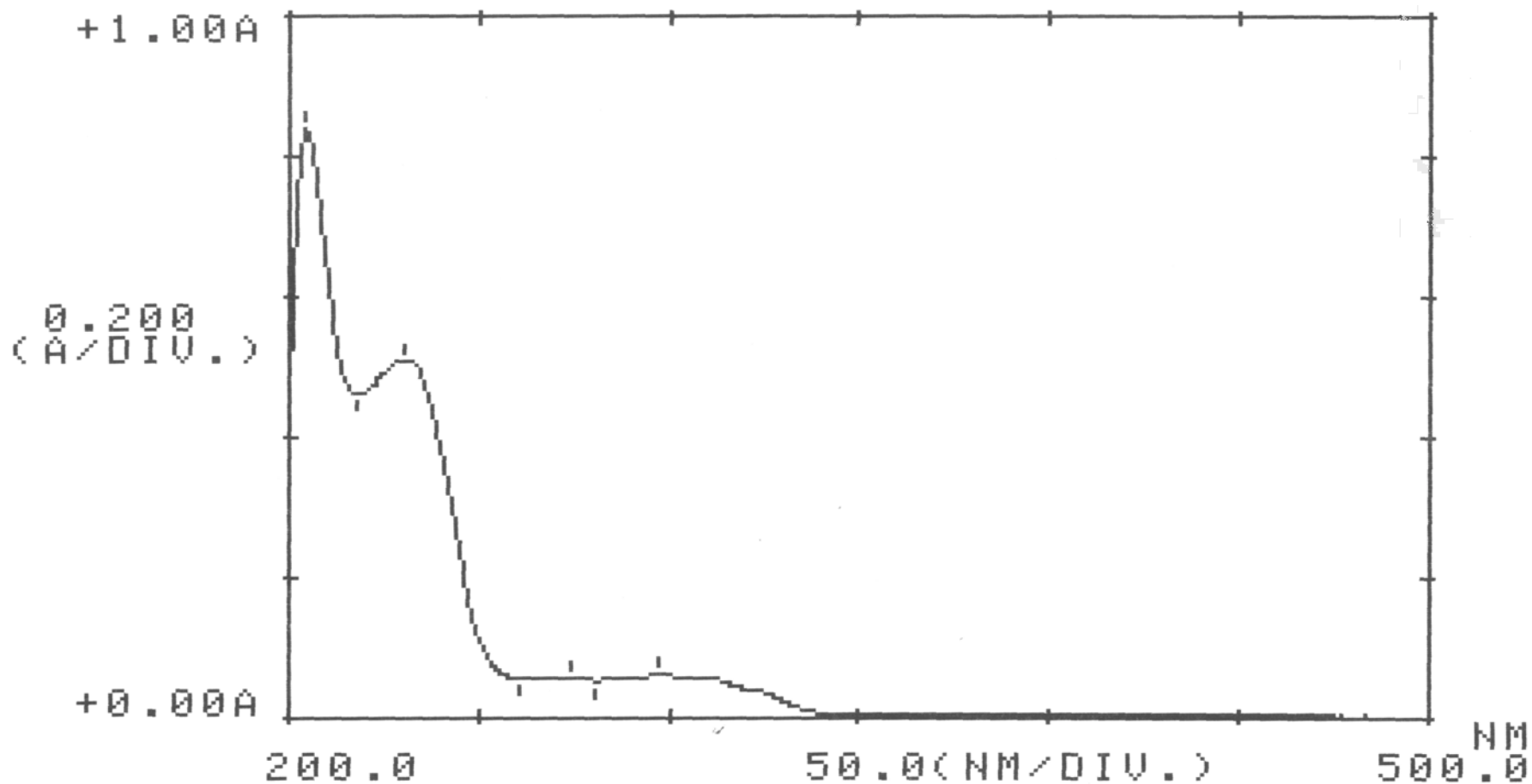
Espectro 38. Espectro de EM de epóxido de resveratrol acetilado. El espectro se obtiene a partir de un espectrómetro de masas. El método de ionización es por impacto electrónico. Las unidades de masa se obtienen de la relación masa-carga (m/z).





Espectro 39. Espectro de IR de epóxido de resveratrol acetilado. El espectro se obtiene a partir de un espectrofotómetro de IR. El número de onda se muestra en cm⁻¹ y la transmitancia en %. La muestra se prepara por el método de película con nujol para su análisis.





Espectro 40. Espectro de UV-visible de epóxido de resveratrol acetilado. El espectro se obtiene a partir de un espectrofotómetro de UV-visible. Se realiza un análisis cualitativo. La longitud de onda se muestra en nm y la absorbancia en A. La división mínima es de 50.0 nm y 0.200 A. Se utiliza MeOH como disolvente.



El problema del hombre no está en la bomba atómica, sino en su corazón

Albert Einstein