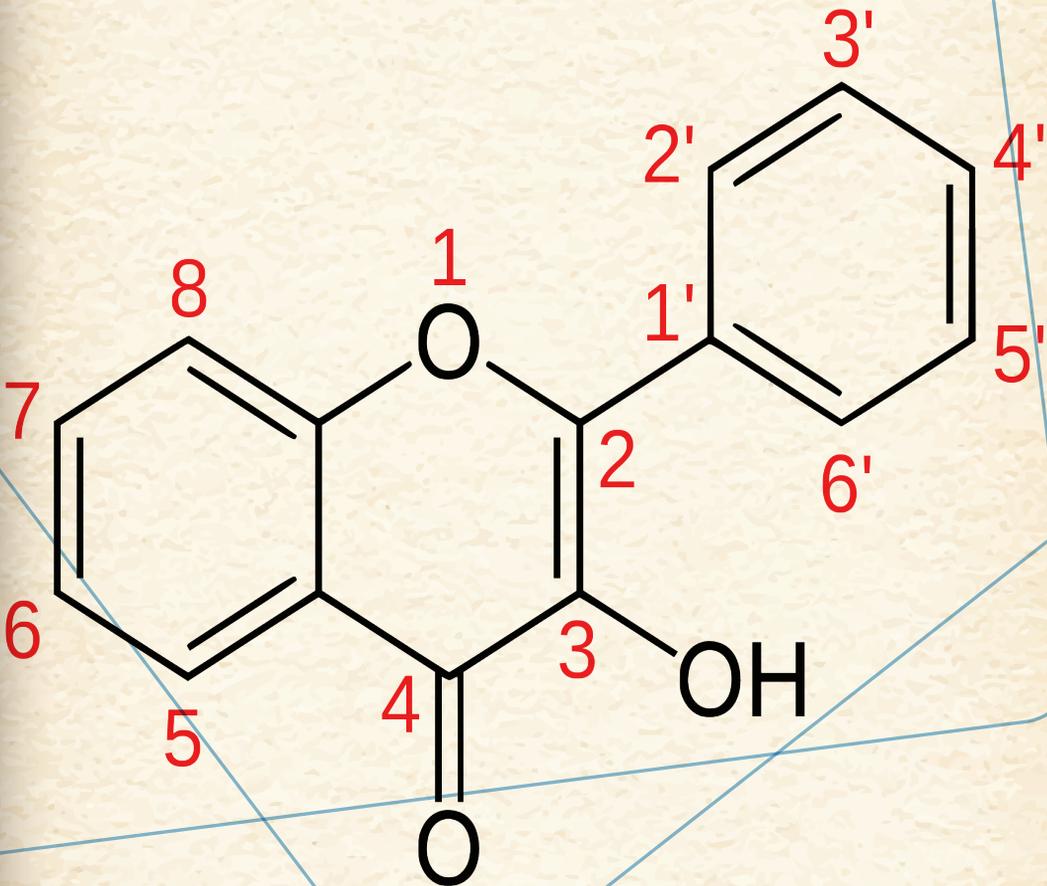


# Introducción a la Caracterización Estructural de Flavonoides

Osmany Cuesta R, Ingrid Márquez H, Mercedes Campo F





# Introducción a la Caracterización Estructural de Flavonoides



Ing. César Quezada Abad, MBA  
**RECTOR**

Ing. Amarilis Borja Herrera, Mg. Sc.  
**VICERRECTORA ACADÉMICA**

Soc. Ramiro Ordóñez Morejón, Mg. Sc.  
**VICERRECTOR ADMINISTRATIVO**

COORDINACIÓN EDITORIAL  
VICERRECTORADO ACADÉMICO

Tomás Fontaines-Ruiz, PhD.  
**INVESTIGADOR BECARIO PROMETEO-UTMACH**  
**ASESOR DEL PROGRAMA DE REINGENIERÍA**

Ing. Karina Lozano Zambrano  
**COORDINADORA EDITORIAL**

Ing. Jorge Maza Córdova, Ms.  
Ing. Cyndi Aguilar  
**EQUIPO DE PUBLICACIONES**

# Introducción a la Caracterización Estructural de Flavonoides

Osmany Cuesta Rubio

Ingrid Márquez Hernández

Mercedes Campo Fernández

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE MACHALA  
2015

Primera edición 2015

ISBN: 978-9978-316-61-0

D.R. © 2015, UNIVERSIDAD TÉCNICA DE MACHALA  
Ediciones UTMACH  
Km. 5 1/2 Vía Machala Pasaje  
www.utmachala.edu.ec

ESTE TEXTO HA SIDO SOMETIDO A UN PROCESO DE EVALUACIÓN POR PARES EXTERNOS  
CON BASE EN LA NORMATIVA EDITORIAL DE LA UTMACH.

Portada:  
Concepto editorial  
Samanta Cabezas (EST. COMUNICACIÓN SOCIAL)

Diseño, montaje y producción editorial: UTMACH

Impreso y hecho en Ecuador  
*Printed and made in Ecuador*

Advertencia: “Se prohíbe la reproducción, el registro o la transmisión parcial o total de esta obra por cualquier sistema de recuperación de información, sea mecánico, fotoquímico, electrónico, magnético, electroóptico, por fotocopia o cualquier otro, existente o por existir, sin el permiso previo por escrito del titular de los derechos correspondientes”.

# Índice

Generalidades.....	11
Tamizaje fitoquímico para la identificación de flavonoides ...	15
Caracterización estructural de flavonoides .....	21
Introducción.....	21
Espectroscopia UV-Visible .....	23
Fundamentos básicos generales.....	23
Aplicaciones.....	27
Flavonas y flavonoles.....	28
Efecto de los sustituyentes en el espectro de flavonas y flavonoles.....	30
Efecto de la metilación y glicosilación.....	31
Efecto de la acetilación.....	31
Obtención de espectros UV-Vis con reactivos de desplazamiento batocrómico.....	31
Espectro MeOH/HCl.....	32
Espectro en MeONa.....	32
Espectro $AlCl_3$ y $AlCl_3/HCl$ .....	33

Espectro en AcONa.....	35
Espectro AcONa/H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> .....	35
Espectroscopia infrarroja (IR).....	37
Espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN).....	39
Resonancia magnética nuclear protónica (RMN <sup>1</sup> H).....	41
4'-oxiflavonoides.....	42
3', 4'-dioxiflavonoides.....	42
3',4', 5'-trioxisustituciones.....	43
Glicósidos.....	44
Resonancia magnética nuclear de carbono 13 (RMN <sup>13</sup> C).....	45
Flavanonas.....	48
Flavanonoles.....	49
Flavonas.....	50
Flavonoles.....	50
Chalconas (1,3-diarilprop-2-en-1-ona).....	52
Auronas.....	53
Isoflavanos.....	54
Isoflavanonas (3-fenil cromanonas).....	55
Isoflavonas (3-fenil cromonas).....	56
Pterocarpanos.....	56
Rotenoides.....	57
Biflavonoides.....	58
Flavonoides glicosídicos.....	59
Diglicósidos.....	60
Espectrometría de masas.....	65
Bibliografía.....	71

## Prefacio

La caracterización estructural de metabolitos secundarios es un proceso fascinante que exige dominar diferentes conocimientos y habilidades. Durante dos décadas, nos hemos percatado de las dificultades que enfrentan los estudiantes universitarios, de diferentes carreras, para acopiar y comprender la información relacionada con la caracterización estructural de compuestos orgánicos aislados de plantas y otras fuentes naturales.

Los flavonoides se encuentran entre los productos naturales que con mayor frecuencia detectan los estudiantes que dedican sus esfuerzos al estudio de extractos de plantas. Por tal motivo, en este libro se incluye información relacionada con los métodos más empleados en la caracterización estructural de flavonoides, incluyendo tanto procedimientos generales como específicos. En todos los casos se aborda la teoría básica más general de las técnicas valoradas y sus posibles aplicaciones para la caracterización de flavonoides, con el objetivo de introducir al estudiante en la temática e incentivar su interés en este campo. La obra va dirigida a estudiantes universitarios y profesionales jóvenes que se involucran con la caracterización estructural de flavonoides.

El reto principal al escribir este libro lo constituyó la selección de los temas a considerar. Actualmente, existen muchas aplicaciones de la resonancia magnética nuclear y la espectrometría de masas en el campo de la caracterización estructural de flavonoides, pero acceder a estas técnicas es todavía difícil e incluso prohibitivo en algunas universidades y países. Por tal motivo, se consideró útil abordar también procedimientos como el tamizaje fitoquímico y la espectroscopia UV-Vis,

que aunque han sido desplazados por otras técnicas, también pueden aportar información valiosa en estadios iniciales de la investigación y son más asequibles en laboratorios con menos recursos económicos.

Agradecemos a los lectores por los señalamientos críticos que puedan realizarnos, para contribuir al mejoramiento de este libro.

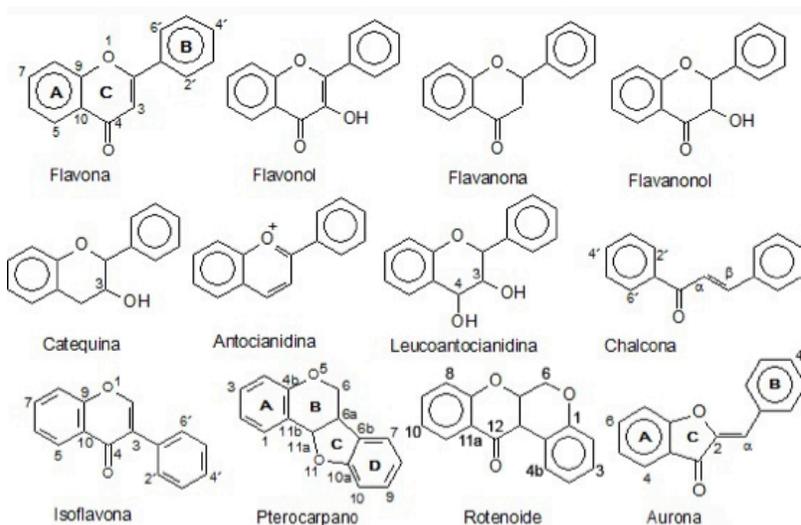
*Los autores*

## Generalidades

Los flavonoides son metabolitos secundarios distribuidos fundamentalmente en plantas superiores aunque se encuentran también en helechos y musgos. Están ausentes en algas, hongos y bacterias. Algunas bebidas y alimentos que el hombre consume con relativa frecuencia (té verde, té negro, vinos y frutas) contienen flavonoides. Desde un punto de vista estructural se caracterizan por presentar un esqueleto base del tipo  $C_6-C_3-C_6$ . Los sustituyentes más comunes del núcleo (aglicón) son grupos  $-OH$ ,  $-OCH_3$  y residuos de azúcares. Los azúcares se pueden unir al aglicón a través de enlaces  $C-O-C$  (O-glicósidos) o  $C-C$  (C-glicósidos). Glucosa y ramnosa son los monosacáridos más comunes en O-glicósidos.

En la biosíntesis de estos compuestos se combinan precursores de dos rutas biosintéticas: la ruta del acetato-malonato y la ruta del ácido shiquímico. El anillo A se biosintetiza a partir de tres residuos de malonil-CoA y un residuo fenilpropanoide (proveniente de fenilalanina) aporta los carbonos que forman los anillos B y C (núcleo de flavona).

En la figura 1 se muestran los principales tipos de flavonoides y la nomenclatura más empleada para designar el esqueleto base común a muchos de ellos.



**Figura 1: Nomenclatura más común de flavonoides y sus principales núcleos base.**

El anillo A usualmente muestra funciones oxigenadas en las posiciones C-5 y C-7, en el anillo B las funciones oxigenadas se observan con más frecuencia en las posiciones C-3' y C-4'. No obstante, prácticamente cualquier tipo de sustitución ha sido observada en ambos anillos.

El esqueleto base, caracterizado por la presencia de grupos hidroxilos, puede mostrar diferentes modificaciones estructurales. La presencia de grupos metoxilo, metilendioxi, acetilo y residuos de azúcares es frecuente y en la mayoría de los casos no acompleja apreciablemente el reconocimiento de una estructura tipo flavonoide. Otras modificaciones como condensaciones con restos fenilpropanoides, bencílicos, adición de restos de pirano y furano pueden entorpecer el rápido reconocimiento del núcleo base de los flavonoides. Algunos

ejemplos de flavonoides con diferentes modificaciones estructurales se muestran en la figura 2.

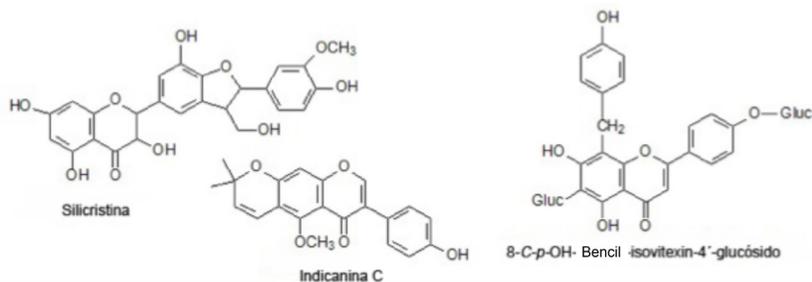


Figura 2: Flavonoides con diferentes modificaciones estructurales

Los flavonoides presentan una gran diversidad de efectos biológicos, sin embargo, son bien reconocidos por la capacidad de disminuir la fragilidad capilar y por su efecto antioxidante.

Son usados esencialmente para tratar desórdenes venosos o capilares, solos o en combinación con otras drogas; son ingredientes comunes de agentes protectores vasculares o tónicos venosos y de agentes tópicos usados en flebología.

Muchos flavonoides reaccionan con los radicales libres para prevenir las degradaciones asociadas a su intensa actividad sobre los fosfolípidos de las membranas, por lo que se les considera como excelentes antioxidantes. Dicha actividad depende de su afinidad por los radicales libres, por tanto, depende de su estructura. Los rasgos favorables para tal efecto incluyen la presencia de dos grupos o-hidroxilo sobre el anillo B y conjugación del anillo B con el grupo carbonilo de la posición 4, a través del enlace doble ( $\Delta^{2,3}$ ). Su poder antioxidante ha difundido su empleo como preventivo en afecciones cancerígenas. Adicionalmente, se les ha asociado con efectos hepatoprotectores, antiinflamatorios, diurético, etc.



## Tamizaje fitoquímico para la identificación de flavonoides

Los estudios fitoquímicos, considerando los recursos que en ellos se invierten, suelen ser costosos y en la mayoría de los casos, para llegar a la definición estructural de los metabolitos secundarios presentes en el extracto vegetal, se precisa un arduo trabajo. En tal sentido, el tamizaje o *screening* fitoquímico se puede emplear como técnica preliminar para detectar la presencia de los principales metabolitos secundarios de los extractos y de esta forma contribuye a definir los pasos a seguir en la investigación posterior.

Algunos investigadores consideran que la selección inicial de las plantas a investigar debe hacerse sobre la base de los productos naturales presentes en ellas, los que son responsables de la actividad biológica de sus extractos. Existen criterios donde se les da mayor importancia al tamizaje farmacológico, sin embargo, los factores económicos asociados a este tipo de ensayo, fuerzan al investigador a realizar un pesquisaje químico preliminar.

Los resultados del tamizaje fitoquímico constituyen únicamente una herramienta orientadora y de preferencia deben de interpretarse en conjunto con los resultados del *screening* farmacológico. Por ejemplo, cuando una planta revela acción antiinflamatoria en el tamizaje farmacológico y la presencia de flavonoides en el tamizaje fitoquímico, los procesos de aislamiento y caracterización podrían direccionarse, fundamentalmente, a este tipo de compuesto.

El tamizaje fitoquímico se describe como un método simple, rápido, que emplea un mínimo de equipamiento, sin embargo, no brinda información cuantitativa ni define la presencia o ausencia de miembros específicos del grupo que se evalúa.

No es un método de alta sensibilidad, por lo que los resultados, sobre todo negativos, no deben tomarse como definitivos. Uno de los factores que tributan negativamente es la alta pigmentación que suelen mostrar los extractos que se obtienen a partir de hojas y en menor medida de tallos, por la presencia de clorofila. El color verde intenso podría enmascarar la visualización de cambios de color, sobre todo, de tonalidades similares al verde. Por estas razones, dicho *screening* solo ofrece una visión general de la composición química de la planta y no debe asumirse como un resultado concluyente.

En la tabla I se muestran algunas de las pruebas de identificación más utilizadas para flavonoides.

Tabla I: Ensayos para la de identificación preliminar de flavonoides

Ensayo	Descripción del resultado
FeCl <sub>3</sub>	Es una prueba universal para fenoles, desarrolla una intensa coloración roja, marrón, verde, azul o negra con disoluciones (1 - 2 %) recién preparadas.
Reacción de cianidina de Willstätter (Shinoda)	Detecta la presencia de anillos y-benzopirona (flavonas, flavonoles, flavanonas, etc.) Ocurre la reducción en medio ácido del anillo C para dar una sal de flavilio, muy conjugada y coloreada (rojo, carmesí, magenta a naranja) Las chalconas, auronas y las isoflavonas no dan la reacción de cianidina bajo las condiciones reductoras de este ensayo
HCl (conc)	El ensayo es positivo si se añade ácido clorhídrico concentrado a un extracto etanólico de la planta que contenga chalconas o auronas, desarrollándose inmediatamente un color rojo.
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (conc)	Las flavonas y flavonoles producen coloración amarilla intensa, las flavanonas entre naranja y rojo, y las chalconas y auronas entre amarillo y carmín.

Los resultados incluidos en la tabla I no son exclusivos de flavonoides, otros metabolitos secundarios pueden originar resultados similares.

Para buscar una mayor confiabilidad en el análisis cualitativo, resulta de gran utilidad el método de cromatografía en capa delgada (CCD). Como cualquier técnica cromatográfica, es utilizada para separar los componentes de una muestra entre dos fases, una estacionaria y otra móvil.

La técnica no instrumental es fácil de realizar, efectiva y económica. En estudios fitoquímicos la CCD tiene diversas aplicaciones; con

mayor frecuencia se utiliza para el monitoreo de fracciones obtenidas mediante cromatografía en columna, como método semipreparativo y para evaluar la presencia de determinados grupos de metabolitos secundarios. En este último caso los reveladores juegan un papel esencial, sin dejar de considerar, lógicamente, la fase estacionaria empleada, la concentración de la muestra, la fase móvil, entre otros aspectos.

Antes de realizar cualquier proceso cromatográfico la preparación de la muestra es de vital importancia, puede ahorrar tiempo y esfuerzo en los siguientes pasos, así como lograr que el aislamiento sea más sencillo. En este sentido un paso muy útil es la eliminación de clorofila, la que, como antes se comentó, pudiera interferir en el resultado.

La detección de metabolitos por esta técnica puede ser destructiva, si se utilizan reveladores químicos, o no destructiva si se utiliza la detección UV (método físico).

Para facilitar la detección se emplean placas cromatográficas con indicadores fluorescentes. Las placas que contienen estos indicadores suelen ser identificadas en su carátula, por ejemplo: Sílica gel GF<sub>254</sub>. Este revelado físico se puede complementar con el revelado químico para aumentar las posibilidades de detección. Sin embargo, el revelado químico es un método destructivo y no se puede emplear en aquellos casos que se quiera recuperar la muestra de análisis.

Tanto la cromatografía de papel (CP) como la CCD (monodimensional y bidimensional) han sido ampliamente utilizadas, no obstante, las múltiples ventajas que ofrece esta última ha dejado en desuso la CP. En ambos casos se informan diversas fases móviles formadas por mezclas de disolventes en diferentes proporciones como: ácido acético, butanol, agua, acetato de etilo, ácido fórmico, cloroformo, etc. Dentro de las fases estacionarias se citan: celulosa, sílica gel y poliamida.

Para el revelado físico las placas pueden ser analizadas a la luz ultravioleta (254 nm y 365 nm). La literatura señala también la exposición de las cromatoplas a los vapores de amoníaco, seguido de la observación de la placa a la luz UV, observándose una fluorescencia intensa.

Adicionalmente, las placas pueden ser tratadas con reactivos cromogénicos como los que se señalan en la tabla II.

Tabla II: Algunos reveladores usados en la identificación de flavonoides mediante CCD

Reveladores para usar en CCD	Descripción del resultado
Tricloruro de aluminio (1%)	Fluorescencia a la luz UV
NaOH 2%, NH <sub>3</sub> , Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 0,2%	Múltiples compuestos fenólicos revelan de varios colores
p-nitroanilina 0,2% diazotada y Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 20%	Todos los compuestos fenólicos revelan con varios colores
Difenilborato al 1% en metanol	Todos los flavonoides pueden revelar mostrando colores amarillo, naranja o verde.
FeCl <sub>3</sub> , 1% en solución salina	Muchos compuestos fenólicos muestran colores azul, verde, marrón o rojo.
Vainillina/ H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Diversos compuestos fenólicos exhiben coloraciones amarillo o fucsia
Ce(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> / H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Revelador general que propicia un color generalmente pardo oscuro

Como ejemplo del uso de la vainillina/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> como revelador de flavonoides en CCD, se presenta el cromatograma de la figura 3.

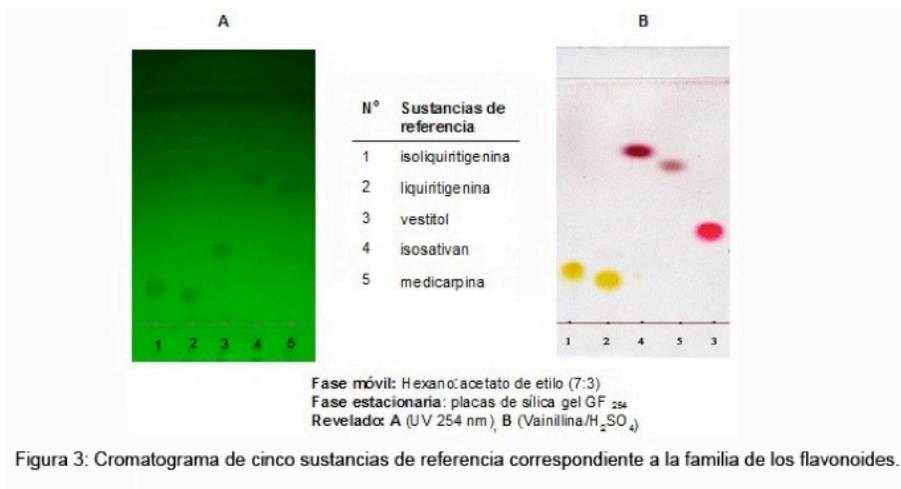


Figura 3: Cromatograma de cinco sustancias de referencia correspondiente a la familia de los flavonoides.

En el estudio cromatográfico se analizaron cinco productos naturales (sustancias de referencia) aislados a partir de una muestra de propóleos rojo cubano. Dichas sustancias de referencia fueron debidamente caracterizadas por técnicas espectroscópicas como: isoliquiritigenina (chalcona), liquiritigenina (flavanona), vestitol e isosativan (isoflavanos) y medicarpina (pterocarpano), todos de la familia de los flavonoides.

Inicialmente se realizó un revelado físico con luz UV a 254 nm y como se puede apreciar en el cromatograma de la izquierda, todos los compuestos son detectados, debido a la presencia en su estructura de grupos cromóforos conjugados (ej. anillos aromáticos).

Después de realizar el revelado químico combinado con calor, se logran visualizar las sustancias de referencia como manchas de color amarillo y fucsia. Estas tonalidades resultan características de flavonoides.



# Caracterización estructural de flavonoides

## Introducción

La espectroscopia de RMN es sin lugar a dudas una de las herramientas más poderosas con la que cuentan los científicos para la caracterización estructural de compuestos orgánicos y en particular de aquellos cuya estructura se desconoce totalmente. Sin embargo, la espectrometría de masas y la espectroscopia UV-Vis son herramientas útiles en la confirmación de estructuras o en la identificación de determinadas características estructurales. Aunque la espectroscopia UV-Vis ha sido desplazada por otros métodos espectroscópicos, puede ser útil en la determinación de algunas características estructurales de forma sencilla y con el empleo de recursos más económicos y asequibles a la mayoría de los laboratorios.

La espectroscopia UV-Visible, asistida por el empleo de reactivos de desplazamiento batocrómico, es una herramienta útil para definir un número apreciable de características estructurales. En aquellos casos donde se presenten variantes esteroisoméricas, además de la difracción de rayos X, las curvas de dicroísmo circular (DC) y el valor de rotación óptica pueden ser útiles en la determinación de la configuración. En algunos casos como flavanos, isoflavanos, flavanonas, isoflavanonas y pterocarpanos, donde las configuraciones posibles son opuestas, el empleo de las curvas de DC resulta un método muy sencillo para determinar la configuración.

La espectroscopia infrarroja y RAMAN, entre otras, también han sido empleadas con fines de caracterización estructural.



# Espectroscopia UV-Visible

## Fundamentos básicos generales

La espectroscopia UV-Vis molecular, al igual que otras técnicas espectroscópicas, se fundamenta en el estudio de la interacción de las radiaciones electromagnéticas (REM) con las moléculas. La energía de las REM procedentes de la región UV-Vis produce transiciones electrónicas (saltos electrónicos) entre un estado base y un estado excitado. Las transiciones electrónicas asociadas con electrones  $\pi$  ( $n-\pi^*$  y  $\pi-\pi^*$ ) son las de mayor valor práctico, ya que se pueden apreciar generalmente por encima de 200 nm, valor a partir del cual se comienzan a registrar los espectros UV-Vis, generalmente. Los electrones sigma ( $\sigma$ ), presentes en todos los compuestos orgánicos, absorben REM de mayor energía cuyas longitudes de onda se incluyen en el llamado UV lejano, donde adicionalmente absorben componentes del aire y los materiales (vidrio y cuarzo) que se emplean en la construcción de cubetas y otros aditamentos usados en el espectrofotómetro UV-Vis. Por estas razones, los espectros UV-Vis se obtienen a partir de los 200 nm donde los disolventes orgánicos saturados no muestran absorción. Los alcoholes muestran el llamado fenómeno de “absorción final” asociado con una transición  $n-\sigma^*$ , cuyo máximo de absorción habitualmente se encuentra por debajo de los 200 nm, pero parte de la banda se aprecia por encima de este valor. La absorción, generalmente, no excede los 210 nm y los alcoholes son frecuentemente empleados como disolventes en espectroscopia UV-Vis. En la tabla III se relacionan algunos disolventes usados en espectroscopia UV-V.

Tabla III: Disolventes utilizados en espectroscopia UV-Visible.

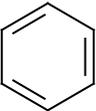
Disolvente	Longitud de onda de corte (nm)	Temperatura de ebullición (°C)	Viscosidad cps a 25°C
Agua	-	100	0,89
Acetona	330	56	0,30
Acetonitrilo	190	82	0,34
Ciclohexano	200	81	0,90
Ciclopentano	200	49	0,42
Cloroformo	245	61	0,53
Cloruro de metileno	233	40	0,41
Dimetilsulfóxido	268	189	2,00
Dioxano	215	101	1,20
Etanol	210	78	1,08
n-heptano	195	98	0,40
n-hexano	190	69	0,30
Isooctano	197	99	0,47
Isopropanol	205	82	1,90
Metanol	205	65	0,54
n-pentano	195	36	0,22
n-propanol	240	97	1,90
Tetrahidrofurano	212	66	0,46
Tolueno	285	110	0,55

Los grupos cromóforos son los responsables de la absorción de la energía procedente de las REM y en la mayoría de los casos incluyen grupos covalentes insaturados como el grupo carbonilo, etileno y anillos aromáticos. La conjugación de los cromóforos favorece la observación de las bandas de absorción en la mayoría de los casos, ya que estas se desplazan a mayores longitudes de onda y se aprecian por encima de los 200 nm. Muchos cromóforos aislados no muestran absorción intensa por encima de 200 nm, por lo que la conjugación juega un papel importante en la aplicación práctica de esta técnica espectroscópica (Tabla IV).

Tabla IV: Absorción de los principales grupos cromóforos.

Grupo cromóforo	Tipo de transiciones electrónicas	Características de la banda producida		
		Posición	Intensidad	Efecto del aumento de la polaridad del disolvente
Etileno (C=C)	$\pi-\pi^*$	Variable, depende del grado de sustitución y de la conjugación. Solo aparecen en UV cercano, si hay al menos dos enlaces dobles conjugados.	Generalmente intensas, valores típicos de $\epsilon_{\text{max}}$ del orden de 10000. Si son prohibidas por simetría, generalmente $\epsilon_{\text{max}}$ mayor de 200.	Variable. Puede ser débil o batocrómico
Carbonilo (C=O)	$\pi-\pi^*$	Variable, depende del grado de sustitución y de la conjugación. Solo aparecen en UV cercano, si hay al menos dos enlaces dobles conjugados.	Generalmente intensas, valores típicos de $\epsilon_{\text{max}}$ del orden de 10000. Si son prohibidas por simetría, generalmente $\epsilon_{\text{max}}$ mayor de 200.	Variable. Puede ser débil o batocrómico
	$n-\pi^*$	Variable, si aparecen lo hacen siempre a longitudes de onda mayores que las bandas $\pi-\pi^*$	Generalmente muy débiles. Valores típicos de $\epsilon_{\text{max}}$ del orden de 100. Para ciertos grupos puede ser mayor.	Desplazamientos hipsocrómicos

Tabla IV: Absorción de los principales grupos cromóforos (continuación).

Grupo cromóforo	Tipo de transiciones electrónicas	Características de la banda producida		
		Posición	Intensidad	Efecto del aumento de la polaridad del disolvente
Bencenoide 	$\pi-\pi^*$	Variable, da lugar a tres bandas:	Variable, depende del tipo de banda:	Variable. Puede ser débil o batocrómico
		1. Segunda banda primaria en 184 nm, dependiendo de la transferencia de carga que provoquen los sustituyentes sobre el anillo aromático.	$\epsilon_{\max} = 68000$	
		2. Banda primaria en 204 nm. Se desplaza batocrómicamente en el caso de bencenos sustituidos por cromóforos de extensa conjugación.	$\epsilon_{\max} = 8800$	
		3. Banda bencenoide aparece alrededor de 254 nm. Poco variable con respecto a su sustitución. En ocasiones es sumergida por la banda primaria.	$\epsilon_{\max} = 250$	

Los estudios basados en espectroscopia UV-Vis, generalmente, se realizan con muestras en disolución líquida. Las disoluciones se preparan con disolventes que deben tener un alto grado de pureza y ser transparentes en la zona de trabajo. El agua, acetonitrilo, dimetilsulfóxido y los alcoholes de bajo peso molecular son los disolventes más usados. Si el disolvente empleado muestra absorción en la zona de trabajo, se debe tener presente esta situación al valorar los espectros obtenidos.

La información relacionada con la interacción REM-molécula se puede presentar en un gráfico bidimensional llamado espectro UV-Vis, donde se grafica un parámetro que caracterice a la REM (generalmente su longitud de onda) y otro que permita evaluar la magnitud de la interacción REM-molécula (generalmente la absorbancia). Los espectros UV-Vis son espectros de bandas, cada banda muestra un máximo de absorción ( $\lambda_{\max}$ ) y su intensidad puede evaluarse a través

del coeficiente de extinción molar ( $\epsilon$ ). Bajo determinadas condiciones experimentales tanto la posición de la banda como su intensidad pueden variar. La variación de la apariencia del espectro UV-Vis permite deducir información estructural relacionada con el analito que se evalúa. En muchas ocasiones se combinan dos efectos Ej: Efecto hiperacrómico y batocrómico. En la figura 4 se resumen los principales efectos que pueden ocurrir en una banda.

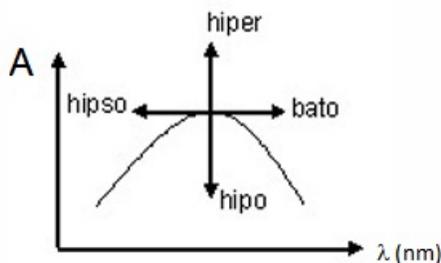


Figura 4: Principales efectos que pueden ocurrir en una banda UV-Vis.

La espectroscopia UV-Vis se emplea, frecuentemente, en el análisis cuantitativo, ya que la ley de Lambert-Beer establece una relación directamente proporcional entre la absorbancia y la concentración de disoluciones diluidas. Sin embargo, para el caso de los flavonoides se han establecido procedimientos experimentales sencillos, basados en el uso de reactivos de desplazamiento batocrómico, que permiten inferir características estructurales.

## Aplicaciones

La espectroscopia UV-Vis es una técnica útil en la diferenciación de flavonoides porque los máximos de absorción de sus espectros UV-Vis sufren desplazamientos bien establecidos con determinados reactivos. La posición de las bandas depende de la extensión de la conjugación y por tanto de la naturaleza del anillo C y de la posición del grupo fenilo denominado anillo B (sustituyente del C-2 o C-3). El número y posición

de los sustituyentes sobre el anillo aromático provoca cambios en la absorción y por tanto en la apariencia del espectro. Los grupos hidroxilos fenólicos son sustituyentes muy frecuentes en el núcleo de los flavonoides y su ionización provoca cambios en la absorción de REM en espectroscopia UV-Vis.

La mayor cantidad de información disponible sobre el comportamiento de flavonoides en espectroscopia UV-Vis se corresponde con flavonas y flavonoles. Por esta razón, las principales valoraciones que se realizarán se corresponden con estos núcleos. En este caso es meritorio destacar los trabajos de Markhan, Mabry, Harborne y otros autores respecto a la caracterización estructural de flavonoides.

## Flavonas y flavonoles

Tanto en flavonas como en flavonoles se aprecian tres cromóforos: etileno, carbonilo y benceno. El enlace doble del anillo C favorece la conjugación entre el anillo B y el grupo carbonilo de la posición C-4 (Figura 5). Esta conjugación provoca que estos flavonoides muestren bandas de absorción fuertes por encima de los 200 nm.

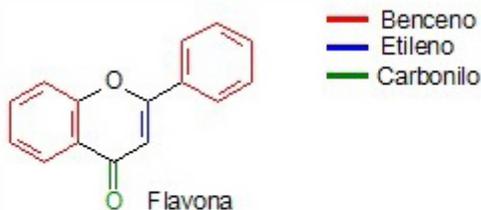


Figura 5. Cromóforos presentes en flavonas y flavonoles.

Es importante notar que la absorción de flavonas y flavonoles en 300-380 nm se designa como *banda I* y se asume que es originada por la conjugación del anillo B, enlace doble ( $\Delta^{2,3}$ ) y el grupo carbonilo en C-4. La llamada *banda II* es aquella con absorción en 240-280 nm, originada como resultado de la conjugación del anillo A con el grupo

carbonilo en C-4 (menor extensión de la conjugación). La posición de la *banda I* puede favorecer la identificación del tipo de flavonoide analizado y su patrón de sustitución (Tabla V).

Tabla V: Posición de la banda I en flavonas y flavonoles.

Tipo	Número de compuestos examinados	Banda I (rango) nm
Flavonas	50	304-350
Flavonoles (OH-3 sustituidos con grupos metoxi o azúcares)	26	328-357
Flavonoles OH-3 libres	27	352-385

La mayoría de las flavonas exhiben la *banda I* por debajo de 350 nm, mientras que la mayoría de los flavonoles (grupo hidroxilo en C-3) la muestran por encima de 350 nm. Resulta interesante destacar que ambos núcleos presentan el mismo cromóforo, la diferencia radica en la presencia de un grupo hidroxilo en C-3, el cual modifica la absorción del cromóforo aunque no es responsable de la misma (grupo auxocromo). Una simple inspección del espectro UV-Vis puede favorecer la diferenciación de estas estructuras. Si la banda I se aprecia en 344-352 nm requiere la consideración inicial de ambas posibilidades estructurales.

La posición de la *banda I* para otros tipos de flavonoides se aprecia en la tabla VI.

Tabla VI. Posición de la banda I en otros núcleos de flavonoides.

Esqueleto	$\lambda$ max.(nm), MeOH
Flavanonas	275-295
Isoflavonas	250-270
Chalconas	370-395
Auronas	385-415
Antocianinas	475-545

Es meritorio destacar la diferencia de absorción entre flavonas e isoflavonas. Las últimas muestran la *banda I* a menores valores de

longitud de onda ya que se afecta la conjugación entre el anillo B y el fragmento insaturado del anillo C, al pasar el grupo fenilo a sustituir al C-3. Por lo tanto, es muy fácil diferenciar 2-fenil cromonas de 3-fenil cromonas desde un simple espectro UV-Vis. Por otro lado, resultan evidentes las modificaciones que originan tanto el enlace doble como el grupo carbonilo en la diferenciación de varios núcleos.

## Efecto de los sustituyentes en el espectro de flavonas y flavonoles

Con el incremento de la oxigenación en el anillo B se produce un efecto batocrómico en la *banda I* por cada sustituyente adicional. El mayor efecto batocrómico se aprecia al adicionar los dos primeros grupos. A partir de un tercer sustituyente no se afecta marcadamente la posición de la *banda I*. Ejemplo: Al comparar un anillo B no sustituido con un anillo 3'4'-dioxisustituido se aprecia un marcado efecto batocrómico. Sin embargo, al pasar a un anillo 3'4'5'-trioxisustituido el corrimiento batocrómico adicional es pequeño. El patrón de oxigenación del anillo B usualmente no produce corrimiento de la *banda II*.

La *banda II* puede mostrar uno o dos picos (*Ila y I Ib*), siendo el pico *Ila* el de mayor  $\lambda$  y esta subdivisión parece depender del patrón de oxigenación del anillo B. Ejemplo: Los derivados con funciones oxigenadas en C-3' y C-4' y en menos extensión los 3', 4', 5'-trioxisustituidos usualmente muestran dos picos de absorción (o un máximo con un hombro en el lado de mayor  $\lambda$  de la banda) entre 250-275 nm. Los 4'-oxisustituidos no muestran esta subdivisión.

El incremento de la hidroxilación en el anillo A causa un efecto batocrómico en la *banda II* y poco efecto en la *banda I*. Ejemplo: Los compuestos 5'6'7'8-tetraoxigenados muestran una banda de absorción alrededor de 280 nm.

El grupo OH en C-5 (OH-5) tiene un marcado efecto en ambas bandas. Cuando el grupo OH-5 está ausente ambas bandas se corren hipsocrómicamente con respecto a los flavonoides equivalentes con el grupo 5-OH. Ej: 3-10 nm (*banda I*) y 6-17 nm (*banda II*). Se conoce que este grupo forma enlaces de hidrógeno con el grupo carbonilo de la posición 4.

## Efecto de la metilación y glicosilación

Si un grupo hidroxilo de las posiciones 3, 5, o 4' se metila o glicosila se aprecia un corrimiento hipsocrómico especialmente en la *banda I*. El corrimiento asociado con la sustitución de grupo hidroxilo es usualmente del orden de 12-17 nm y alcanza hasta 22-25 nm en flavonoles que no tienen OH-5. La metilación del grupo OH-5 resulta en un efecto hipsocrómico de 5-15 nm en ambas bandas. La metilación o glicosilación del grupo hidroxilo en 4' produce un corrimiento hipsocrómico de la banda I.

La sustitución de grupos OH en posiciones diferentes a 3, 5 y 4' no tienen o tienen poco efecto en el espectro UV-Vis.

## Efecto de la acetilación

La acetilación de los grupos fenólicos anula el efecto de este grupo sobre el espectro UV-Vis. Ej: Triacetato de diosmina (5,7-dihidroxi-4'-metoxiflavona) posee un espectro similar (257 y 320 nm) al observado en la 4'-metoxiflavona (253 y 317 nm). La acetilación anula el efecto batocrómico que produce el grupo hidroxilo en las bandas del anillo aromático ya que se afecta la conjugación entre el átomo de oxígeno y el anillo aromático.

## Obtención de espectros UV-Vis con reactivos de desplazamiento batocrómico

La comparación de los espectros UV-Vis obtenidos en diferentes condiciones experimentales permite deducir información estructural de un flavonoide. Inicialmente, se obtiene un espectro UV-Vis empleando metanol como disolvente y posteriormente se registran otros espectros después de añadir diferentes reactivos químicos que afectan la apariencia del espectro inicial. Generalmente, se aprecian corrimientos batocrómicos o hipsocrómicos que pueden ir acompañados de variación en la intensidad de la banda.

La concentración de la disolución del flavonoide se puede valorar experimentalmente, para obtener valores de absorbancia en los máximos de absorción que permitan apreciar con facilidad los corrimientos de las bandas UV-Vis.

### Espectro MeOH/HCl

Algunos flavonoides y en particular aquellos producidos por plantas acuáticas, producen flavonoides sulfatados. En estos casos el grupo hidroxilo ha sido modificado a un grupo sulfato.

La presencia de grupos sulfatos como sustituyentes del núcleo del flavonoide pueden ser detectados al añadir un ácido fuerte como el HCl(2N). El medio ácido favorece la hidrólisis del grupo sulfato y la aparición del grupo hidroxilo que ocasiona un efecto batocrómico.

Después de preparar la disolución en MeOH y registrar el espectro UV-Visible se añaden 4 gotas de HCl 2N a la cubeta y se obtiene un nuevo espectro. La aparición de un efecto batocrómico de 20-30 nm en la banda I puede indicar la presencia de un grupo sulfato, más probablemente en la posición 3. Los flavonoides que presentan grupo sulfato en posición 7 muestran un espectro UV-Vis muy similar al espectro en MeOH.

### Espectro en MeONa

El metóxido de sodio(MeONa) es una base fuerte capaz de ionizar en alguna extensión todos los grupos hidroxilos del flavonoide. Por esta razón es difícil correlacionar los corrimientos espectrales con el patrón de sustitución del flavonoide. Sin embargo, esta variante se ha usado para reconocer la presencia de hidroxilos libres en las posiciones 3 y 4'.

La adición de MeONa produce usualmente un efecto batocrómico en todas las bandas. Sin embargo, un efecto batocrómico de la banda I de 40-65 nm (flavonas y 3-O-flavonoles sustituidos con 4'-OH) sin disminución de la intensidad sugiere la presencia de un grupo hidroxilo en la posición 4'. En flavonoles que no tienen grupo hidroxilo en 4' también se observa un corrimiento de 50-60 nm, pero se aprecia una

disminución de la intensidad. En este último caso el efecto batocrómico se asocia con la presencia del grupo hidroxilo de la posición 3.

Cuando existe una función oxigenada en C-4' diferente al grupo hidroxilo y hay otros grupos hidroxilos en el anillo B, el efecto batocrómico puede alcanzar valores cercanos a 45 nm pero la intensidad de la absorción decrece.

Si el flavonol tiene grupos OH tanto en 3 como el 4' es inestable y los picos del espectro degeneran en pocos minutos. Los flavonoles que presentan grupos hidroxilos en las posiciones 3, 3' y 4' se descomponen aún más rápido. La descomposición se aprecia al repetir los espectros de 5-10 min. después de realizar el primer experimento.

La presencia de alguna de las siguientes combinaciones de grupos hidroxilos en flavonas y flavonoles produce la descomposición del flavonoide: 3,4'; 3,3',4'; 5,6,7; 5,7,8, y 3',4',5'. La segunda y última combinación ocasiona rápida descomposición que se monitorea por una disminución de la intensidad de la *banda I*.

## Espectro $AlCl_3$ y $AlCl_3/HCl$

El  $AlCl_3$  forma complejos estables en medio ácido con flavonoides que tengan grupos hidroxilos en la posición 3 o 5 y el carbonilo de la posición 4. Las moléculas que muestran hidroxilos en posición *orto* también forman complejos que producen efectos batocrómicos, pero estos son inestables en medio ácido.

Inicialmente, se obtiene el espectro UV-Vis con metanol y posteriormente se registra un espectro después de añadir la disolución de Cloruro de aluminio ( $AlCl_3$ ) a la cubeta que contiene la muestra. Si el compuesto analizado posee grupos hidroxilos en posición *orto* o las combinaciones hidroxilo en 3-carbonilo en 4 e hidroxilo en 5-carbonilo en 4, se aprecia un efecto batocrómico en el espectro. Posteriormente, se añade el medio ácido y se registra un tercer espectro donde se evalúa la permanencia del efecto batocrómico apreciado al añadir  $AlCl_3$  o la aparición de un efecto hipsocrómico. El primer caso se justifica con la existencia de un complejo estable al medio ácido y el efecto hipsocrómico ocurre si el complejo formado no es estable en medio ácido.

Esta secuencia de experimentos permite detectar la presencia de alguno de los siguientes patrones de sustitución: 3', 4'-dihidroxi; 3-hidroxi; 5-hidroxi y y 3-O flavonoles sustituidos 5-OH libres.

La presencia del sistema 3', 4'-dihidroxi se indica cuando *la banda I* (o *banda I* si consiste de 2 picos) del espectro obtenido con  $\text{AlCl}_3$  muestra un efecto hipsocrómico de 30-40 nm con la adición de HCl. La presencia de 3 grupos hidroxilos adyacentes en el anillo B origina un corrimiento hipsocrómico de 20 nm.

Si después de adicionar HCl al espectro con  $\text{AlCl}_3$  se mantiene el efecto batocrómico en las *bandas I y II* con respecto al espectro metanólico, se deduce la presencia de grupos hidroxilo en 3 y/o 5, los cuales forman un complejo ácido estable donde interviene también el grupo carbonilo de la posición 4. Si se regenera el espectro original obtenido en metanol, entonces se deduce que no existen grupos hidroxilos en posición 3 y/o 5 o existen otros sustituyentes en estas posiciones que no forman el complejo antes mencionado.

El espectro  $\text{AlCl}_3/\text{HCl}$  de 5-OH flavonas está formado típicamente por 4 picos principales de absorción. Las bandas *Ia*, *Ib*, *IIa* y *IIb* están corridas batocrómicamente con respecto a sus bandas de origen (presumiblemente *las bandas Ia y Ib* se originan a partir de *la banda I*, y *las bandas IIa y IIb* a partir de *la banda II*)

La apariencia de los espectros  $\text{AlCl}_3/\text{HCl}$  de 3-hidroxiflavonas y 3,5-dihidroxi flavonas es similar a aquella de 5-hidroxiflavonas, pero en los primeros casos *las bandas Ib y IIa* reducen su intensidad considerablemente.

Hay una clara distinción entre la magnitud del corrimiento batocrómico asociado con 5-hidroxiflavonas y 5-hidroxiflavonoles (3-hidroxisustituidos) y aquellos observados para 3-hidroxiflavonas (flavonoles). En 5-hidroxiflavonas y flavonoles 3-O-sustituidos (con pocas excepciones) el desplazamiento batocrómico ocurre en el rango de 35-55 nm. Este se mide como la diferencia entre la posición de la *banda I* en MeOH y la banda *Ia* en  $\text{AlCl}_3/\text{HCl}$ . En contraste, un corrimiento consistente de 60 nm se aprecia en 3-hidroxiflavonas (flavonoles).

El corrimiento batocrómico observado en la *banda I* (al pasar a la *banda Ia*) en 3,5 di-OH flavonas (rango 50-60 nm) es usualmente intermedio entre aquellos corrimientos observados para sus 3-OH y 5-OH equivalentes.

La presencia de un grupo hidroxilo en posición 3 se indica cuando, con  $\text{AlCl}_3$ , se obtiene la formación de un complejo ácido estable que resulta en un efecto batocrómico para *la banda I* de 55-60 nm, respecto a *la banda I* del espectro metanólico. El complejo ácido estable no se forma con el grupo OH-5 cuando también existe un OH-3.

## Espectro en AcONa

El Acetato de sodio (AcONa) es una base mucho más débil que el MeONa y por tanto tiende a ionizar los grupos OH más ácidos (hidroxilos en 3,7 y 4'). Como la ionización del OH-7 afecta esencialmente *la banda II* y la ionización de los grupos hidroxilo en 3 y 4' afectan *la banda I*, este reactivo se usa para sugerir la presencia de un grupo OH en posición 7.

Si *la banda II* muestra un efecto batocrómico de 5-20 nm relativo al espectro en MeOH, se sugiere un grupo OH-7 (pocas excepciones). La oxigenación en 6 y 8 (en flavonas) puede enmascarar este efecto, probablemente por la acidez reducida del OH-7 originada por el aumento de la densidad electrónica que producen los grupos OH en 6 y 8 sobre el anillo aromático.

Si el espectro con NaOAc cambia después de varios minutos, entonces denota descomposición por la presencia de grupos sensibles a álcalis. Los patrones de sustitución más sensibles son aquellos que tienen grupos hidroxilos en: 5,6,7; 5,7,8 y 3,3', 4' (en este último la función en 3' puede ser  $\text{OCH}_3$ ). Por esta razón, es difícil determinar la presencia o ausencia del grupo OH-7 libres en flavonoides que posean estos patrones, a no ser que el espectro se realice inmediatamente después de añadir el reactivo a la cubeta.

## Espectro AcONa/ $\text{H}_3\text{BO}_3$

En presencia de AcONa el ácido bórico quelará los hidroxilos en *orto* en todas las posiciones del núcleo del flavonoide (excepto en C-5, 6).

Grupos OH en *orto* en el anillo B muestran un efecto batocrómico consistente de *la banda I* entre 12-30 nm. Grupos hidroxilos en posición *orto* en C-6,7 y C-7,8 (anillo A) también son detectables.

Esta combinación se utiliza para corroborar la presencia de grupos hidroxilos en posición orto en 3',4'. Este patrón de sustitución queda evidenciado cuando se aprecia un efecto batocrómico en la *banda I* (5-25) nm con respecto al espectro en MeOH. Si el grupo está ausente, el espectro es casi idéntico al metanólico.

## Espectroscopia infrarroja (IR)

La región infrarroja del espectro electromagnético se extiende entre la zona del visible y las microondas. La sección de mayor utilidad práctica de la extensa región IR, para la caracterización estructural, es la que se extiende entre  $4000$  y  $650\text{ cm}^{-1}$ , denominada región infrarroja media.

Una molécula relativamente sencilla puede dar lugar a un espectro de absorción IR muy complejo. Puede decirse que el espectro IR caracteriza a una estructura molecular: dos moléculas diferentes deben mostrar espectros IR diferentes (a excepción de los isómeros ópticos). Esta propiedad ha sido utilizada ampliamente en la caracterización de compuestos orgánicos.

La existencia de extensas bases de datos de espectros IR permite el uso de esta técnica acoplada a sistemas cromatográficos en la identificación rápida de componentes de mezclas orgánicas. Aunque el espectro IR caracteriza a cada compuesto, se encuentra que ciertas agrupaciones atómicas dan lugar siempre a bandas en un determinado intervalo de frecuencias, independiente de la naturaleza del resto de la molécula. La existencia de estas bandas, características de grupos funcionales, permite una amplia utilización de la espectroscopia IR en la determinación estructural. La espectroscopia IR también encuentra aplicaciones en determinaciones cuantitativas basadas en la ley de Beer.

En espectroscopia IR las moléculas experimentan transiciones o saltos vibracionales entre un estado base y un estado excitado. Las señales en los espectros se aprecian como bandas aunque menos anchas que en espectroscopia UV-Vis. Los grupos de átomos excitados pueden originar dos movimientos fundamentales que se denominan

modos normales de vibración: tensión (*stretching*) y flexión (*bending*). Los espectros IR son útiles para confirmar la presencia de determinados agrupamientos funcionales, brindando información más detallada que los espectros UV-Vis.

Para el caso particular de los flavonoides, la espectroscopia IR no ha sido utilizada rutinariamente. La información estructural que esta técnica brinda no aporta características adicionales a las que pueden tributar, de manera más precisa y amplia, otras técnicas espectroscópicas como la RMN. Fundamentalmente, los espectros IR pueden brindar información de los siguientes agrupamientos funcionales (frecuencias de grupo):

3500-3300  $\text{cm}^{-1}$ , tensión O-H: grupos fenólicos asociados

3100-3000  $\text{cm}^{-1}$ , tensión  $\text{C}_{\text{sp}2}$ -H: carbonos aromáticos

3000-2850  $\text{cm}^{-1}$ , tensión  $\text{C}_{\text{sp}3}$ -H: grupos  $\text{CH}_3$  y  $\text{CH}_2$

1750-1680  $\text{cm}^{-1}$ , tensión CO: grupo carbonilo

~1600-1450  $\text{cm}^{-1}$ , tensión  $\text{C}_{\text{sp}2}$ - $\text{C}_{\text{sp}2}$ : anillos aromáticos

~1460-1370  $\text{cm}^{-1}$ , flexión  $\text{C}_{\text{sp}3}$ -H: grupos  $\text{CH}_3$  y  $\text{CH}_2$

En años recientes, se ha ampliado el uso de la espectroscopia IR y RAMAN en el campo de los flavonoides. Estos métodos se han extendido debido al desarrollo de microespectrómetros, con excitación por láser, acoplados a otras técnicas como por ejemplo: cromatografía líquida-IR de transformada de Fourier y la correlación IR bidimensional.

## Espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN)

La RMN es un método físico-químico que se basa en las propiedades magnéticas de los núcleos atómicos. Muchos núcleos poseen espín nuclear (rotan sobre su propio eje) y sus momentos magnéticos nucleares se orientan de diferente forma (poseyendo diferentes energías) bajo la acción de un campo magnético externo  $B_0$ . Cuando los núcleos se irradian con REM de la zona de las radiofrecuencias, en condiciones apropiadas, se originan transiciones entre los niveles energéticos (fenómeno de resonancia) y se obtiene una señal. Las poblaciones de los núcleos en un estado energético u otro son muy similares, lo que provoca que la RMN sea un método de muy baja sensibilidad ya que el exceso de núcleos en el estado de menor energía es muy pequeño. Sin embargo, es una de las técnicas espectroscópicas que más información estructural brinda.

Los núcleos más estudiados en química orgánica son los núcleos de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ . El  $^1\text{H}$  tiene una alta abundancia natural (99,98%), lo que favorece la obtención de los espectros de RMN  $^1\text{H}$ . Por otra parte, el núcleo de  $^{13}\text{C}$  tiene una baja abundancia natural (1,1%) y la obtención de los espectros de RMN correspondientes requiere de mayor cantidad de muestra y/o tiempo de experimentación.

En RMN se emplea una escala adimensional conocida como escala  $\delta$  (corrimiento químico) que se expresa en ppm. Los núcleos de  $^1\text{H}$ , generalmente, resuenan entre 0 y 12 ppm (algunos protones pueden mostrar valores mayores) y los núcleos de  $^{13}\text{C}$  entre 0 y 220 ppm. La posición de la señal del núcleo en el espectro de RMN depende del entorno electrónico del núcleo. La hibridación del átomo de carbono origina rangos de corrimiento tanto en RMN  $^1\text{H}$  como RMN  $^{13}\text{C}$ . Los efectos

electrónicos de los sustituyentes (efectos inductivos y de conjugación) influyen determinantemente en la posición de las señales.

En la tabla VII se muestran rangos de corrimiento químico de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ .

Tabla VII: Rangos de corrimientos químicos de núcleos de  $^1\text{H}$  y de  $^{13}\text{C}$ .

RMN $^1\text{H}$	
Corrimiento químico (ppm)	Asignación
0-4	Alifáticos (H-Csp $^3$ )
4-7	Olefinicos (H-Csp $^2$ )
6,5-9	Aromáticos (H-Csp $^2$ )
9-10,5	Aldehídos
1,3-3,2	H-Csp
10-13	Ácidos carboxílicos
10-12	Ácidos sulfónicos
4-8	Fenoles
0,5-4	Alcoholes
0,6-3	Alquilaminas
3-5	Arilamidas
5-8,5	Amidas
2,7-3,7	Tiofenoles
RMN $^{13}\text{C}$	
Corrimiento químico (ppm)	Asignación
0-50	Metilos unido a halógenos
10-30	Metilos unido a azufre
30-40	Metilos unido a NR $_2$
50-60	Metilos unido a oxígeno
0-60	R $_2$ CH-halógenos
25-35	R $_2$ CH-azufre
30-55	R $_2$ CH-NR $_2$
60-70	R $_2$ CH-O
40-80	R $_3$ C-halógenos
45-60	R $_3$ C-azufre
55-70	R $_3$ C-NR $_2$
70-80	R $_3$ C-O
0-50	Alcanos (C sp $^3$ )
70-85	C sp
90-130	C sp $^2$ de alquenos
90-140	C sp $^2$ de aromáticos
90-160	C sp $^2$ de heteroaromáticos
90-110	Acetales y cetales
105-120	Cianatos
120-135	Isocianatos
120-130	Tiocianatos
125-140	Isotiocianatos
120-130	Cianuros
135-150	Isocianuros
150-160	Iminas y oximas
150-160	CO de ureas y carbonatos
175-185	CO de Tioureas
160-180	CO de derivados de ácidos carboxílicos
180-190	CO de quinonas
180-200	CO de aldehídos
190-220	CO de cetonas

## Resonancia magnética nuclear protónica (RMN $^1\text{H}$ )

Los espectros de RMN  $^1\text{H}$  se caracterizan por tres parámetros fundamentales:

- Posición de la señal: Definida por la escala  $\delta$  (corrimiento químico) y expresada en ppm.
- Intensidad de la señal: El área bajo la señal es proporcional al número de protones que le dan origen.
- Multiplicidad: La apariencia de las señales en RMN  $^1\text{H}$  depende de un fenómeno conocido como *acoplamiento de espines* y origina que las señales se desdoblén. Generalmente, la multiplicidad de la señal depende de los átomos de hidrógeno que se encuentran a dos o tres enlaces de aquellos que originan la señal. Los acoplamientos se caracterizan por la llamada constante de acoplamiento (J), cuyo valor depende de diferentes factores como: distancia entre los átomos que se acoplan, ángulo formado entre los protones que se acoplan, presencia de elementos electronegativos, entre otros.

En el caso de los flavonoides, el espectro de RMN  $^1\text{H}$  aporta información fundamental sobre el tipo de sustitución en los anillos aromáticos y las características estructurales del anillo C, que permiten definir el tipo de flavonoide estudiado. La región más informativa del espectro es la región entre 6-9 ppm.

Los H-6 y H-8, generalmente, resuenan entre 6,0-6,4 ppm y 6,3-6,9 ppm para el sistema 5,7-dioxisustituido, respectivamente. El acoplamiento meta se observa con  $^4J \sim 2,5$  Hz. Cuando el grupo OH en C-7 se sustituye, tanto el H-6 como el H-8 se corren al extremo superior de los rangos establecidos. El efecto es similar para 5,7-dihidroxi flavanonas y 5,7-dihidroxi flavanoles y sus 7-O glicósidos. La ausencia del enlace doble en C2-C3 disminuye el corrimiento químico de los H-6 y H-8.

El otro protón que con frecuencia aparece en el rango de H-6 y H-8, es el H-3 de flavonas. Ocasionalmente, los protones H-3 y H-5 pueden aparecer en la misma región. En el caso que el anillo A presente el patrón 5,7-dioxisustituido es fácil la diferenciación ya que los protones H-6 y H-8 muestran apariencia de doblete mientras la multiplicidad del H-3 es singlete. Sin embargo, en sistemas 5,6,7 o 5,7,8 trisustituídos, el protón del anillo A (H-8 o H-6) aparece como un singlete que a menudo está en la misma región del H-3. En estos casos se puede acudir al

análisis de otros experimentos de RMN para lograr la diferenciación. Ej: HMQC, HMBC, NOESY entre otros.

Protones del anillo B

Usualmente aparecen en el rango 6,7-7,9 ppm, es decir más desblindados que los del anillo A. Como es lógico, el patrón de sustitución define el sistema de spines a observar.

### 4'-oxiflavonoides

Cuando el anillo B solo presenta un sustituyente en C-4 se identifica con mucha facilidad, ya que se aprecian dos dobletes ( $^3J \sim 8,5$  Hz). Los protones H-3 y H-5 se blindan con respecto a los H-2' y H-6' y, generalmente, se aprecian en el rango 6,65 -7,10 ppm para todos los tipos de flavonoides. El corrimiento químico de H-2' y H-6' depende en alguna medida del nivel de oxidación del anillo C, sin embargo, habitualmente se observan entre 7,1-8,1 ppm.

### 3', 4'-dioxiflavonoides

Otro patrón de sustitución muy común en el anillo B es la disustitución en las posiciones 3' y 4'. En estos casos el H-5' muestra básicamente apariencia de doblete ( $^3J \sim 8,5$  Hz) entre 6,7-7,1 ppm; las señales de los H-2' y H-6' se encuentran desblindadas entre 7,2-7,9 ppm y en ocasiones se solapan o tienen corrimiento químicos muy similares. Los protones H-2', H-5' y H-6' deben mostrar apariencia de doblete de doblete (dd) pero en la práctica esta multiplicidad se aprecia mejor en el H-6'.

Las posiciones relativas de las señales de los H-2' y H-6' pueden ser usadas para diferenciar 3'-metoxi-4'-hidroxiflavonoles de 4'-metoxi-3'-hidroxiflavonoles. El H-2' se encuentra ligeramente más blindado que H-6' en 4'-metoxi-3-hidroxiderivados y ocurre lo inverso en 3'-metoxi-4-hidroxiderivados.

### 3',4', 5'-trioxisustituciones

En flavonoides 3',4', 5'-trioxisustituidos, el anillo B muestra un sistema de espines compuesto por solo dos protones. Los protones H-2'y H-6', usualmente, se solapan en la región 6,5-7,5 ppm. Si hay simetría en la sustitución del anillo B se aprecia un singlete que integra 2 protones, si no hay simetría se deben apreciar dos dobletes de corrimiento químico muy similar cuyo posible solapamiento puede entorpecer el reconocimiento de la multiplicidad de la señal.

### Anillo C

Las señales alifáticas relacionadas con el esqueleto base de los aglicones están definidas por el anillo C. Los espectros de RMN, tanto protónicos como de  $^{13}\text{C}$ , son particularmente útiles para definir el tipo de flavonoide que se analiza. En ocasiones algunos de los átomos de carbono del anillo C pueden coincidir en corrimiento químico con aquellos de grupos metoxilos, pero una simple valoración de los espectros de RMN  $^1\text{H}$  facilita la diferenciación entre grupos metilos, metilenos y metino.

El anillo C define el tipo de flavonoide analizado. Si se tienen presentes las características estructurales del mismo es sencillo definir el tipo de flavonoide a partir del espectro RMN  $^1\text{H}$ .

Flavonas y flavonoles no poseen protones unidos a carbonos con hibridación  $\text{sp}^3$  en el anillo C. Flavanonas e isoflavanonas poseen un sistema de espines compuesto por 3 protones (1CH y 1CH<sub>2</sub>). Flavanos e isoflavanos contienen 5 protones (2CH<sub>2</sub> y 1CH) formando parte del residuo alifático. El núcleo de los pterocarpanos posee tres protones (3CH) y las chalconas poseen dos protones olefinicos con apariencia de doblete que se reconocen con facilidad por su elevada constante de acoplamiento ( $^3J_{\text{trans}}$ ).

Al tener en cuenta las variaciones estructurales del anillo C, se pueden comprender las considerables variaciones en el corrimiento químico de los protones de este anillo. El H-3 de flavonas ( $\delta_{\text{H}}$ -6,3 ppm, s), usualmente, se solapa con las señales del anillo A. El H-2 de isoflavanos ( $\delta_{\text{H}}$  7,6-7,8 ppm, CCL<sub>4</sub>) se diferencia, apreciablemente, del H-3 de flavonas.

El corrimiento químico de los protones puede variar con el disolvente empleado en la obtención de los espectros. Ejemplo: H-2 de isoflavonas.

Tabla VIII: Corrimientos químicos del H-2 de isoflavonas.

Disolvente	H-2 (ppm)
CCl <sub>4</sub>	7,6-7,8
CDCl <sub>3</sub>	7,8-8,1
DMSO-d <sub>6</sub>	8,5-8,7

En el caso de las chalconas el sistema olefinico se muestra como un sistema de espines AB ( $^3J \sim 17$  Hz) compuesto por dos dobletes que se observan en  $\delta_H$  6,7-7,4 ppm (H- $\delta$ ) y  $\delta_H$  7,3-7,7 ppm (H- $\delta$ ). En auronas el protón bencílico aparece como singlete en el rango  $\delta_H$  6,5-6,7 ppm.

En la tabla IX se muestran algunos rangos para protones correspondientes al anillo C.

Tabla IX: Algunos rangos de corrimiento químico para protones correspondientes al anillo C.

Flavonoide	H-2 (ppm)	H-3 (ppm)
Flavanona	5,0-5,5	2,8
Flavanonol	4,8-5,0	4,1-4,3
Flavanonol-3-O-Gluc	5,0-5,6	4,3-4,6

## Glicósidos

Los residuos de azúcares producen señales alifáticas en los espectros de RMN <sup>1</sup>H de flavonoides, siendo común el solapamiento de las señales de grupos metinos y metileno provenientes del azúcar. El corrimiento químico del protón anomérico permite diferenciar rápidamente O-glicósidos de C-glicósidos, ya que en el primer caso la señal está más desblindada.

La posición del glicósido también puede ser determinada a partir del corrimiento químico del protón anomérico. Ej: En O- glicósidos el corrimiento químico del protón anomérico da información sobre el tipo de glicósido [7-O-glucósidos ( $\delta_{\text{H}}$  4,8-5,2 ppm), 3-O-glucósidos ( $\delta_{\text{H}}$  5,7-6 ppm) y 7-O-ramnósidos ( $\delta_{\text{H}}$  5,1-5,3 ppm)]

## Resonancia magnética nuclear de carbono 13 (RMN $^{13}\text{C}$ )

Generalmente, los espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  que se obtienen son espectros de desacoplamiento a banda ancha, donde todos los átomos de carbono se aprecian como singletes al destruir el acoplamiento C-H por irradiación directa de los átomos de hidrógeno (se origina el efecto nuclear Overhauser, NOE). Esta práctica se justifica por la baja abundancia natural del núcleo de  $^{13}\text{C}$  y la baja sensibilidad del método. De esta forma, se facilita la obtención de las señales de  $^{13}\text{C}$ . La información estructural que se pierde en el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  debido a la eliminación del acoplamiento C-H es bien recompensada con otros experimentos de RMN.

Para un núcleo atómico de tan baja abundancia natural, la cantidad de muestra puede llegar a ser una limitante importante. En muchas ocasiones la cantidad de muestra disponible no permite obtener buenos espectros y los átomos de carbono se deducen a través de otros experimentos de RMN como las técnicas bidimensionales HMQC, HMBC, entre otras.

El esqueleto base de los flavonoides sugiere la presencia de 15 señales de carbono en el espectro RMN  $^{13}\text{C}$ . En ocasiones dos átomos de carbono pueden ser químicamente equivalentes y la coincidencia de corrimiento químico disminuye el número de señales totales. En el anillo B es común observar un sistema de espines AA'BB' cuando hay un sustituyente en C-4'. La simetría provoca que el número total de señales asociadas al núcleo descienda a 13. Aunque en los espectros de RMN 13 con desacoplamiento a banda ancha el efecto NOE no permite inferir información precisa de la intensidad de las señales, generalmente las señales de los CH químicamente equivalentes se observan con una intensidad mucho mayor que el resto de los CH aromáticos. En estos casos, el espectro de RMN  $^1\text{H}$  muestra los protones de los grupos CH de

las posiciones C-2' y C-3' con apariencia de doblete y sus intensidades también permiten predecir el sistema de espines antes mencionado.

La determinación de la presencia de un grupo carbonilo resulta muy importante para reconocer el tipo específico de flavonoide y además permite valorar el tipo de sustitución en C-5. La hidroxilación en C-5 favorece la formación de puentes de hidrógeno con el carbonilo de la posición C-4 y estos pueden ser definidos tanto por RMN  $^1\text{H}$  como por RMN  $^{13}\text{C}$ . Cuando hay puente de hidrógeno este se deduce desde el espectro de RMN  $^1\text{H}$  por la presencia de una señal, apreciablemente desblindada ( $\delta_{\text{H}} \sim 12-14$  ppm). En el caso del espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  el grupo carbonilo se corre a campos más bajos con la formación del puente de hidrogeno, generalmente, el corrimiento es de 5-7 ppm. En la tabla X se muestra el corrimiento químico de los carbonos 2, 3 y 4 de algunos núcleos de flavonoides.

Tabla X: Corrimiento químico de los carbonos 2, 3 y 4 de algunos núcleos de flavonoides.

Flavonoide	C-2 (ppm)	C-3 (ppm)	C-4 (ppm)
Flavonas	157,4-165,8 (s)	102,3-113,7 (d)	175,2-183,4 (s)
Flavonas 3-preniladas	156,7-160,3 (s)	117,1-121,8 (s)	176,2-183,6 (s)
Flavanonas	71,3-80,3 (d)	39,5-46,4 (t)	186,4-198,5(s)
Isoflavonas	150,6-155,4 (d)	122,0-126,1 (s)	174,2-181,2 (s)
Isoflavanonas	69,2-72,5 (t)	44,6-52,3 (d)	190,1-198,8 (s)
Flavonoles	140,0-151,2 (s)	133,5-140,0 (s)	167,9-179,6 (s)
Flavanonoles	78,3-85,6 (d)	71,0-74,1 (d)	184,6-198,7 (s)
Chalconas	136,9-146,8 (d)	116,6-130,58(d)	188,6-198,9 (s)

Legenda: singlete (s); doblete (d); triplete (t)

En flavonas y flavonoles el rango de corrimiento químico de  $^{13}\text{C}$  predominante se aprecia entre 90-185 ppm. Los carbonos carbonílicos o aromáticos unidos a oxígenos resuenan entre 130-185 ppm. El efecto de los sustituyentes resulta útil en la determinación estructural(Tabla XI).

Tabla XI: Efectos de los sustituyentes sobre el corrimiento químico de  $^{13}\text{C}$ 

Sustituyente	C-ipso	Orto	Meta	Para
Hidroxilo	+26,9	-12,7	+1,4	-7,3
Metoxilo	+31,4	-14,4	+1	-7,7
Metilo	+8,9	+0,7	-0,1	-

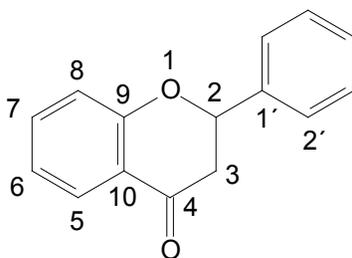
Un patrón de sustitución muy común en el anillo A de flavonoides es la presencia de sustituyentes oxigenados en posición C-5 y C-7, lo que origina un anillo A tipo floroglucinol donde las señales de las posiciones 6 y 8 muestran un apreciable blindaje tanto en RMN  $^1\text{H}$  como en RMN  $^{13}\text{C}$ . Los corrimientos químicos de  $^{13}\text{C}$  de los C-6 y C-8 se observan por debajo de 100 ppm y este comportamiento es independiente de la naturaleza del anillo C y por tanto del tipo de flavonoide específico, siempre y cuando se observe el patrón de sustitución tipo floroglucinol. Este comportamiento se cumple cuando los sustituyentes son hidroxilos y/o metoxilos. La acetilación de alguna de las posiciones desblinda la señal y el carbono ipso muestra corrimiento químico por encima de 100 ppm.

En la tabla XII se muestran los  $\delta$  de C-6 y C-8 de algunos flavonoides con el residuo de floroglucinol en el anillo A.

Tabla XII: Corrimientos químicos de C-6 y C-8 de algunos flavonoides con el residuo de floroglucinol en el anillo A.

Flavonoide	C-6	C-8	Tipo
pinocembrina	96,1	95,1	Flavanona (5,7-dihidroxi)
alpinetina	95,8	93,5	Flavanona (5-metoxi-7-hidroxi)
pinobanksina	96,9	96	Flavanonol (5,7-dihidroxi)
-----	95	93,9	Flavanonol (5-hidroxi-7-metoxi)
luteolina	99,2	94,2	Flavona (5,7-dihidroxi)
-----	93,3	96,1	Flavona (5,7-dimetoxi)
quercetina	98,3-99,6	92,2-95,0	Flavonol (5,7-dihidroxi)
-----	95,5	92,2	Flavonol (5,7-dimetoxi)
dihidrobiochanina	97	95,6	Isoflavanona (5,7-dihidroxi)
genisteina	99,7	94,3	Isoflavona (5,7-dihidroxi)
-----	98,1	92,2	Isoflavona (5-hidroxi-7-metoxi)
-----	94,4	96,2	Rotenoide (5-hidroxi-7-metoxi)
Serratina	99	94,4	Neoflavona (5,7-dihidroxi)
-----	94,1	89,3	Aurona (5,7-dimetoxi)
-----	95,8	94,6	Homoisoflavanona (5-metoxi-7-hidroxi)

## Flavanonas



Poseen un esqueleto base del tipo 2-fenil cromanona. En estas el C-2 es un centro asimétrico y por lo tanto hay dos posibles enantiómeros.

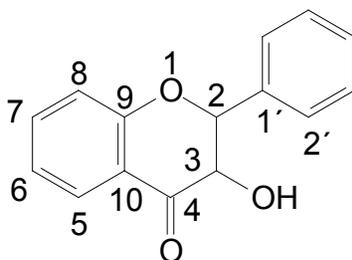
El residuo de tres átomos de carbono proveniente del fenilpropanoide y que constituye parte del anillo C presenta los siguientes rangos de corrimientos químicos: C-2 ( $\delta_c$  71,3-80,3 ppm); C-3 ( $\delta_c$  39,5-46,4 ppm) y C-4 ( $\delta_c$  186,4-198,5 ppm).

El corrimiento químico del C-2 depende de la sustitución en los C-2' y C-6'. En particular, la sustitución de estas posiciones causa un blindaje apreciable de alrededor de  $4,5 \pm 1,0$  ppm. Ejemplo, en 7-metoxi flavanona (C-2; 79,9 ppm); 7-metoxi-2'-hidroxiflavanona (C-2; 74,9 ppm); 7-metoxi -2'-acetoxiflavanona (C-2; 75,1 ppm) y 7-metoxi-2'-metoxiflavanona (C-2; 75,1 ppm).

La resonancia del C-4 muestra dependencia del sustituyente en el C-5. En el caso de flavanonas no sustituidas en C-5 se aprecia el rango  $\delta_c$  189,7-191,7 ppm, excepto en 7,8,3',4'-tetrahidroxi flavanona ( $\delta_c$  194,5 ppm). Sin embargo, en 5-OH flavanonas la señal se desblinda hasta  $\delta_c$  195,6-197,3 ppm debido a la formación de un puente de hidrógeno intramolecular. Si el grupo hidroxilo pasa a metoxilo o acetoxi no se forma el puente de hidrogeno y el corrimiento químico permanece casi idéntico a aquellas no sustituidas.

El corrimiento químico del C-3 no muestra una dependencia apreciable con respecto al patrón de sustitución de los anillos aromáticos. Se ha demostrado que las sustituciones en el anillo A no provocan cambios en el  $\delta^{13}C$  de los átomos del anillo B y viceversa.

## Flavanonoles



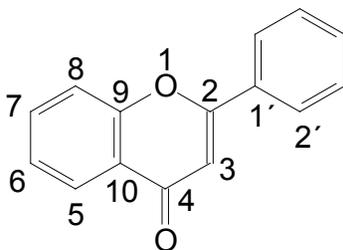
Se corresponden con las 3-hidroxi-flavanonas. La sustitución del C-3 por un grupo OH produce un desblindaje del C-3 en, aproximadamente, 30,5 ppm y del C-2 en 5,0 ppm. Mientras el C-4 permanece casi sin influencia. En estos compuestos el anillo C muestra dos oximetinos pero sus rangos de corrimiento químico se diferencian apreciablemente [C-2 ( $\delta_c$  78,3-85,6) y C-3 ( $\delta_c$  71,0-74,1)].

Oxisustituyentes en el C-2' ejercen influencia en el corrimiento químico del C-2, cuando hay sustitución la señal se blindada en 3-4 ppm. En C-2' no sustituidos el C-2 resuena entre 82,4-85,6 ppm y en C-2' oxisustituidos entre 75,5-79,2 ppm (tanto hidroxilo como metoxilo). Similar efecto se observa en C-6' oxi-sustituidos. Por lo tanto, el corrimiento químico del C-2 puede ser usado para predecir sustituciones en C-2' o C-6'.

El corrimiento químico del C-4 no depende del patrón de sustitución de los anillos aromáticos pero si depende de OH (efecto desblindante) en C-5, de forma similar a flavanonas, producto de la formación del puente de hidrógeno (efecto de 5 ppm). La acetilación del C-3 (efecto  $\delta$ ), bloqueo del OH en C-5 o ambos blindada la señal del carbonilo en C-4 ( $\delta_c$  184,8-185,9 ppm).

En estos compuestos hay dos centros asimétricos y por lo tanto las posibilidades estereoisoméricas aumentan. Tanto la geometría *cis* 2,3 como la *trans* han sido reportadas. En *trans* 2,3-derivados tanto el arilo como el hidroxilo ocupan posiciones ecuatoriales. En *cis* 2,3-derivados el arilo ocupa una posición axial, esta inusual preferencia parece ser explicada por la probable estabilización por formación de puentes de hidrógeno.

## Flavonas



Son los 2,3-dehidro derivados de las flavanonas y por lo tanto los carbonos C-2 ( $\delta_c$  157,4-165,8) y C-3 ( $\delta_c$  102,3-113,7) muestran corrimientos químicos de carbonos olefinicos y desblindajes de alrededor de  $86 \pm 2$  ppm y  $64 \pm 3$  ppm con respecto a sus equivalentes en flavanonas. También el enlace doble obliga a una naturaleza de carbono cuaternario para el C-2 y de metino para el C-3. El enlace doble favorece un blindaje de la señal del carbonilo del C-4 en  $13 \pm 2$  ppm ( $\delta_c$  175,2-183,4).

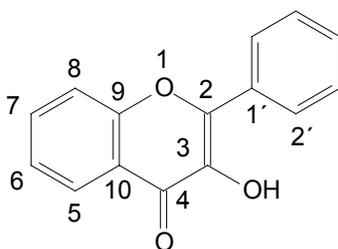
El efecto desblindante del OH en C-5 ( $5,5 \pm 1,5$ ) se mantiene en estos casos y la señal del C-4 aparece en  $182,5 \pm 0,7$  ppm.

El C-3 es dependiente de la sustitución en C-2' y/o C-6' de forma similar a los casos antes expuestos (excepto en 5,6,7,8,5'-pentametoxi-3',4'-metilendioxi-flavona que resuena en 100,4 ppm). Se aprecian rangos de 102,0-108,6 ppm en flavonas C-2' y C-6' no sustituidas y de 110-115,5 ppm en C-2' y/o C-6' oxisustituidas.

Varias flavonas muestran cadenas preniladas (C-prenilación) en el C-3 y por lo tanto este carbono pasa a cuaternario y por efecto alfa la señal se desblindada en  $\sim 15$  ppm (C-3, 117,1-123,2 ppm). Los corrimientos químicos del C-2 y C-4 no cambian apreciablemente con este efecto.

## Flavonoles

Son los 3-hidroxi derivados de las flavonas. Los corrimientos químicos de los C-2 y C-3 son, apreciablemente, afectados con la introducción del OH en C-3.



El C-3 se desblinda en 32 ppm y C-2, C-4 se blindan en 18 y 5 ppm, respectivamente, cuando se compara con una flavona. Aunque los dos son carbonos cuaternarios oxiolefinicos (C-2 y C-3) pueden ser diferenciados en base a sus  $\delta_c$ . El C-2, usualmente, es más desblindado en un rango de 5,0-13,0 ppm. Los corrimientos químicos más usuales son C-2 ( $\delta_c$  140,0-151,2) y C-3 ( $\delta_c$  133,5-140,0).

La tabla XII muestra las diferencias de corrimiento químico entre el núcleo de flavona y flavonol no sustituido.

Tabla XIII: Diferencias de corrimiento químico (ppm) de flavonoles con respecto a flavonas

C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-4'	C-8	C-9	C-10	C-1'	C-2'6'	C-3'5'
-18	+31,4	-5,4	-3,9	-3,2	-1,7	+0,2	-4,7	-2,7	+0,5	-1,3	+0,5

La presencia de un oxisustituyente en C-2' no causa desblindaje del C-2 sino un ligero blindaje (0,9-2,3 ppm). El C-3 no se afecta apreciablemente.

El desblindaje en C-4 producto de la sustitución en C-5 por OH también se observa en flavonoles ( $\delta_c$  177,3  $\pm$  1,5) no sustituidos o bloqueados para formar puente de hidrógeno ( $\delta_c$  172,4  $\pm$  1,4).

La acilación del C-3 induce pequeños efectos sobre el corrimiento químico de los carbonos del anillo A pero causa apreciable blindaje en C-3 (~5,5 ppm) y gran desblindaje en C-2 (~10,4 ppm). Este efecto es probablemente causado por la electronegatividad incrementada del grupo acilo con respecto al hidrógeno.

En el caso de 3-metoxiflavonoles lo más característico es la señal del OCH<sub>3</sub> en  $\delta_c$  59,5  $\pm$  0,5 ppm. Normalmente este metoxilo no se solapa con los metoxilos aromáticos. Su rango es muy similar a metoxilos sobre posiciones aromáticas que tienen *di-orto* oxigenaciones ( $\delta_c$  61,5  $\pm$  1,5 ppm). Los metoxilos que no tienen *di-orto* oxigenaciones o solo una sustitución en *orto* pueden ser diferenciados ( $\delta_c$  55,5  $\pm$  1,0 ppm).



y R. Debido a la sustitución del C ipso, este muestra un desblindaje de  $13,0 \pm 0,5$  ppm y por lo tanto el sitio de la C-prenilación puede ser fácilmente reconocido (figura 6)

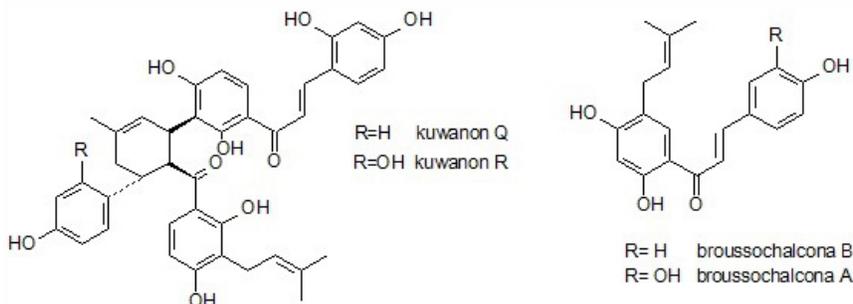
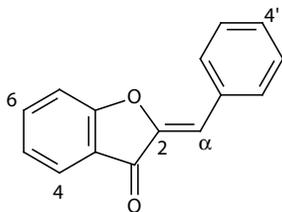


Figura 6: Estructuras químicas de brousochalconas A y B; kuwanom Q y R.

Los núcleos de chalconas pueden incorporar sustituyentes de diversa naturaleza que acomplejan la estructura básica. La prenilación, introducción de restos bencilo y condensaciones con fragmentos C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> son algunos ejemplos. C- y O-glicósidos han sido reportados también.

## Auronas



La presencia de un enlace doble origina isómeros geométricos. Muchas auronas de origen natural poseen configuración Z y pueden ser asignadas como Z-auronas.

Un carbono olefinico cuaternario y un carbonilo constituyen el anillo heterocíclico C. Adicionalmente, existe un metino olefinico exocíclico (C-2).

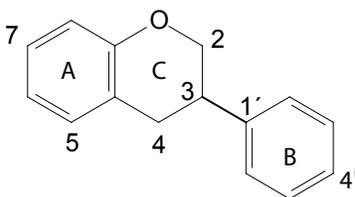
Ambos tipos de auronas pueden ser fácilmente diferenciadas considerando el corrimiento químico del carbono olefinico exocíclico. En Z-isómeros la posición de la señal se presenta ~ 10 ppm más blindada con respecto a las E-auronas (tabla XIV)

Tabla XIV: Rangos de corrimientos químicos de C-2, C-3 y C-4 en Z-auronas y E-auronas.

Posición	Z-auronas (ppm)	E-auronas (ppm)
C-2	104-112,8	119,8-122,2
C-3	145,8-148,7	147-148
C-4	178,9-185,8	182,8-184,2

Como se aprecia en la tabla la diferenciación entre ambos isómeros viene dada por el corrimiento químico del C-2 pues los C-3 y C-4 resuenan en rangos muy similares.

### Isoflavanos



El anillo C está compuesto por 2 CH<sub>2</sub> (C-2 y C-4) y un metino (C-3). El C-2 se encuentra más desblindado que el C-4 en ~40 ppm por el efecto  $\delta$  de la función oxigenada.

Los corrimientos químicos para esas posiciones son: C-2 ( $\delta_c$  69,6-70,4 ppm), C-3 y C-4 ( $\delta_c$  31,2-32,5 ppm).

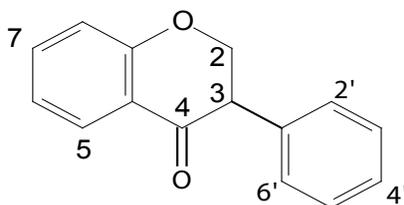
Usualmente el C-4 resuena en una posición relativamente blindada con respecto al C-3. El primero es un CH<sub>2</sub> y el segundo un CH por lo que son fácilmente diferenciables. Los protones en C-2 y C-4 no son químicamente equivalentes por lo que se aprecian muy bien en los espectros RMN<sup>1</sup>H y la asignación con el carbono correspondiente es sencilla.

Las resonancias de los carbonos de los anillos aromáticos conservan un comportamiento típico de sistemas aromáticos. Sin embargo, la pérdida del carbonilo en C-4 y la ausencia del enlace doble C2-C3, influye en el corrimiento químico. Ejemplo: al comparar una 7-metoxi isoflavona con un 7-metoxi isoflavano se observan las siguientes diferencias de corrimiento químico en el anillo A (Tabla XV).

Tabla XV: Diferencias de corrimiento químico (ppm) del isoflavano respecto a la isoflavona.

C-5	C-6	C-7	C-8	C-9	C-10
+2,4	-7,3	-3,9	+1,3	-2,8	-4

### Isoflavanonas (3-fenil cromanonas)



El sustituyente fenilo en C-3 muestra, predominantemente, una disposición ecuatorial y causa un desblindaje de 14,4; 4,4 y 0,3 ppm en las resonancias del C-3, C-2 y C-4, respectivamente, con respecto al núcleo de cromanona.

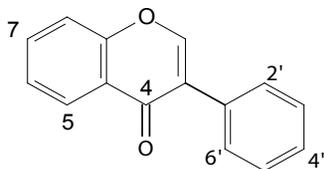
El anillo C está constituido por un oximetileno (C-2), un metino alifático (C-3) y un carbono carbonílico (C-4). [( $\delta$ C-2: 69,2-72,5 ppm); ( $\delta$ C-3: 44,6-52,6 ppm); ( $\delta$ C-4: 190,1-198,8 ppm)].

En isoflavanonas 2' o 6' no sustituidas, el C-3 resuena a  $\delta$ c 52,1  $\pm$  1,2 ppm mientras que en 2' o 6'-isoflavanonas oxisustituidas, lo hace en  $\delta$ c 46,4  $\pm$  2 ppm. Esta diferencia de  $\sim$  5 ppm se corresponde con interacciones estéricas entre el sustituyente en 2' y el H-3.

El corrimiento químico del C-4 es indicativo de la ausencia o presencia de oxisustituyentes en C-5. Isoflavanonas 5-no sustituidas y 5-acetoxiladas muestran el rango  $\delta$ C 191,7  $\pm$  0,9 ppm y en 5-OH sustituidas se aprecian en  $\delta$ C 198,4  $\pm$  0,4 ppm. La quelación desblinda la señal del grupo carbonilo en, aproximadamente, 7 ppm.

El corrimiento químico de carbonos aromáticos exhibe dependencia del sustituyente y el sitio de la sustitución de forma similar a isoflavanos. Sin embargo, la ausencia del enlace doble entre C-2 y C-3 con respecto a isoflavanos provoca desblindaje de  $\sim$ 16 ppm del C-4 y de 2-6 ppm para C-5, C-7, C-9, C-1' y de 2-4 ppm para C-6 y C-10. En el C-8 no se aprecian cambios significativos.

### Isoflavonas (3-fenil cromonas)



El anillo heterocíclico C está constituido por un metino oxiolefínico ( $\delta$  C-2: 150,6-155,4 ppm), un carbono cuaternario olefínico ( $\delta$  C-3: 122,0-126,1 ppm) y un carbono carbonílico ( $\delta$  C-4: 174,2-181,2 ppm), respectivamente.

La  $^1J_{CH}$  para C-2 es de 184-199 Hz y la apariencia del C-4 es doblete en el espectro acoplado debido al acoplamiento con el H-2 ( $^3J_{CH} = 5-7,5$  Hz).

El corrimiento químico del C-2 no se modifica, apreciablemente, por los sustituyentes sobre los anillos aromáticos. Sin embargo, C-3 y C-4 exhiben dependencia sobre la sustitución tanto sobre los anillos A como B, particularmente por un oxi sustituyente. El C-3 se corre a campos altos ( $\sim 2$  ppm) con 2'-oxi sustituyentes como OH, OCH<sub>3</sub> y OCOCH<sub>3</sub>. También provoca desblindaje de  $\sim 3$  ppm en los C-3 y C-4.

El desblindaje del C-2 y C-4 por la presencia del OH-2' sugiere la presencia de un puente de hidrógeno entre el OH-2' y el carbonilo en C-4.

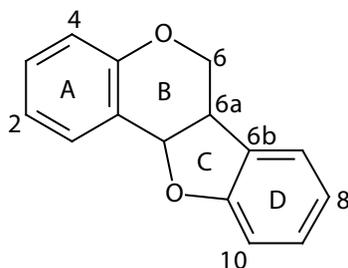
Se sugiere que en las 2'-hidroxi-5-hidroxiisoflavonas existe un equilibrio entre las formas quelatadas y no quelatadas.

El OH en C-5 también influye en el corrimiento químico del C-4 por la formación del puente de hidrógeno. Las isoflavonas OH-5 sustituidas presentan un  $\delta$  C-4 179,2-181,5 ppm excepto orobol ( $\delta$  177,9 ppm); en las no sustituidas el  $\delta$  C 174,2-177,1 ppm. El desblindaje del C-4 en isoflavonas por formación de puentes de hidrógenos con OH en C-5 es de 5-7 ppm. La metilación y acetilación del OH corre la señal al rango 173,9-175,4 ppm.

### Pterocarpanos

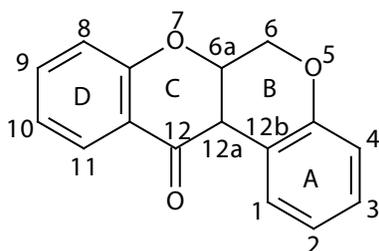
Contienen un heterociclo adicional de 5 miembros (anillo C).

En pterocarpanos el anillo heterocíclico B presenta un metileno



(C-6) que resuena en el rango  $\delta_c$  65,5-67,2 ppm y dos metinos entre  $\delta_c$  39,3-41,3 ppm (C-6a) y  $\delta_c$  77,4-79,4 ppm (C-11a). Los carbonos cuaternarios del anillo D suelen resonar a valores entre  $\delta_c$  117,3-119,4 ppm (C-6b) y  $\delta_c$  153,6-160,6 ppm (C-10a). En el caso de presentar el C-8 un sustituyente oxigenado, se afecta el corrimiento del C-10a ( $\delta_c$  153,5-155,6 ppm) por el efecto para del oxisustituyente, de no presentar dicho sustituyente, entonces el corrimiento del C-10a es de  $\delta_c$  159,0-160,5 ppm.

## Rotenoides



Es un nombre general para identificar una clase de isoflavonoides que contienen un átomo de carbono más formando parte de un heterocíclico adicional y por lo tanto se corresponden con un sistema tetracíclico.

La fusión entre los anillos B y C es usualmente *cis*. El CH<sub>2</sub> adicional resuena entre  $\delta_c$  62,4-67,7 ppm. La presencia de oxisustituyentes tanto en C-4 como en C-2 (*orto* y para respecto al C-4a) provoca que la señal del C-4a aparezca entre  $\delta_c$  144,0-148,4 ppm, debido al efecto blindante de estos sustituyentes.

El efecto *orto* del oxisustituyente sobre el C-4a es el responsable de que el C-12b resuene entre  $\delta_c$  103,0-121,5 ppm. El corrimiento

químico del C-12b depende también de la presencia de oxisustituyentes en C-3. En rotenoides 3-metoxilados el C-12b resuena entre  $\delta\text{C}$  103,0-111,1 ppm, mientras muestra desblindaje a  $\delta\text{C}$  ~121,5 ppm en los que no poseen oxisustituyentes en C-3.

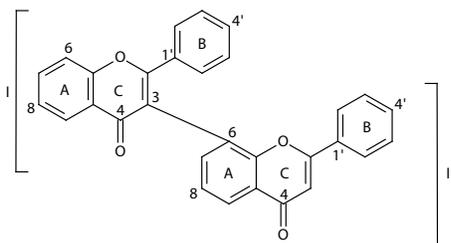
Los corrimientos químicos observados para los átomos de carbono del anillo B son: C-6a ( $\delta\text{C}$  71,6-72,2 ppm), C-12a ( $\delta\text{C}$  43,5-45,3 ppm), C-6 ( $\delta\text{C}$  65,1-66,8 ppm).

El corrimiento químico del C-12 depende de la presencia de sustituyentes en C-11. En el caso de rotenoides 11- hidroxisustituidos se aprecia el rango  $\delta\text{C}$  183,9-194,3 ppm y los no sustituidos resuenan entre  $\delta\text{C}$  186,6-190,5 ppm. Muchos de los rotenoides estudiados muestran residuos de furano o pirano en el anillo D en las posiciones C-8 y C-9. En el caso de dihidrofuranos no sustituidos y furanos se introducen 2 señales adicionales en  $\delta\text{C}$  26,3 ppm (C-3'') y  $\delta\text{C}$  73,0 ppm (C-2'') como en el caso de la rotenona; y  $\delta\text{C}$  103,0- 104,3 ppm (C-3'') y  $\delta\text{C}$  142,5-143,9 ppm (C-2'') como en elliptona, respectivamente.

#### 12a-hidroxi rotenoides

El C-12a pasa a ser cuaternario y resuena en  $\delta\text{C}$   $67,7 \pm 0,7$  ppm revelando el efecto  $\delta$  de ~23 ppm, producido por el grupo hidroxilo. El C-6a resuena a campos más bajos (efecto  $\delta$ ) ~5 ppm, debido al OH en C-12a y se aprecia a  $\delta\text{C}$   $76,5 \pm 0,6$  ppm. El CH<sub>2</sub> del anillo B se observa en  $\delta\text{C}$   $63,2 \pm 0,8$  ppm, 4 ppm más blindado con respecto a rotenoides.

## Biflavonoides



La mayoría de los biflavonoides naturales contienen monómeros enlazados a través de enlaces C-C.

El enlace interflavonoide puede existir entre: 2 flavanonas, 2 flavonas, flavanona-flavona, flavanona-flavanonol, flavonol-flavanonol, isoflavona-flavona, y 2 isoflavanos. Durante la metilación de las biflavanonas se pueden originar dímeros tipo flavanona-chalcona por apertura del anillo C.

Las principales combinaciones encontradas en la naturaleza son: (I-6, II-6), (I-6, II-8), (I-3', II-6), (I-3', II-8), (I-8, II-8), (I-3, II-8), (I-6', II-8), (I-5', II-5) y (I-3, II-3). Se han observado todas las posibles uniones entre los anillos A, B y C. Las proantocianidinas poseen unidades de flavan-3-ol (catequinas) como la unidad monomérica.

Los biflavonoides con enlaces C-O-C también han sido aislados y se agrupan en tres categorías fundamentales: I-4'-O-II-6, I-3'-O-II-4' y I-4'-O-II-3, ejemplos: hinokiflavona, ochraflavona y podoverina C, respectivamente.

Los carbonos incluidos en el enlace interflavonoide se desblindan con respecto a los correspondientes de los monómeros, mientras el resto de las señales no se afectan marcadamente.

## Flavonoides glicosídicos

La presencia de azúcares enlazados al aglicón de naturaleza flavonoide acompleja el análisis estructural de estas moléculas. Existen razones de diversa índole que justifican este señalamiento. Algunas de ellas se mencionan a continuación:

Disolvente: Generalmente los espectros de glicósidos son registrados en DMSO  $d_6$  o  $CD_3OD$ . El primero es muy útil para apreciar los OH libres y en especial para detectar la presencia del OH-5, quelatado con el carbonilo en C-4. La señal de este disolvente no interfiere en la observación de las señales del azúcar. El inconveniente fundamental es la recuperación de la muestra una vez disuelta, ya que el DMSO presenta un alto punto de ebullición (189 °C) y es difícil de eliminar de la muestra analizada, sobre todo cuando esta se encuentra en pequeñas cantidades.

Una variante para recuperar el flavonoide y eliminar el DMSO es añadir agua a la disolución y pasar la mezcla a través de una columna

de extracción en fase sólida (C-8 o C-18) con suficiente agua como fase móvil. El flavonoide retenido en la columna se puede recuperar lavando la columna con metanol.

El CD<sub>3</sub>OD es de fácil eliminación pero no permite observar las señales de los protones hidroxílicos presentes en estos glicósidos flavonoides. Por otra parte, además de las señales asociadas a este disolvente, los espectros habitualmente muestran una señal muy intensa debida al agua (~4,8 ppm) y que en no pocas ocasiones solapa señales del compuesto que se analiza, en particular aquellas relacionadas con el azúcar. En estos casos resulta conveniente eliminar el agua que pueda contener la muestra bajo una corriente de nitrógeno gaseoso.

Posición del azúcar: El azúcar puede estar enlazado a OH fenólicos y/o alcohólicos y en ocasiones puede resultar compleja la determinación del grupo sustituido. La presencia de picos cruzados en el experimento HMBC, que evidencien acoplamiento heteronucleares entre el resto del azúcar y el aglicón, resultan muy importantes en la localización precisa del resto del azúcar. En caso de no observarse esta interacción, el análisis de los espectros UV y corrimientos químicos de <sup>13</sup>C del aglicón y el glicósido, pueden ser útiles en la determinación de la posición de la unión.

Naturaleza del azúcar: Mono, di y trisacáridos han sido observados enlazados al aglicón flavonoide. Inclusive, la glicosilación puede estar asociada a más de una unión con el aglicón. En los casos que se presenta más de un resto de azúcar, los datos de  $\delta^{13}\text{C}$  y los corrimientos químicos de los protones anoméricos, juegan un papel fundamental en la determinación de la naturaleza del azúcar. La constante de acoplamiento del protón anomérico habitualmente permite determinar el anómero.

Los flavonoides son a menudo encontrados como O-glicósidos, donde el resto del azúcar puede estar enlazado a un hidroxilo alcohólico o fenólico. C-glicósidos han sido también encontrados. Estructuras donde se combinan ambas posibilidades y flavonoides con restos de azúcares más grandes también han sido aislados.

## Diglicósidos

En estos casos el azúcar que se encuentra enlazado directamente al aglicón se denomina azúcar interior y el azúcar terminal se denomina azúcar exterior.

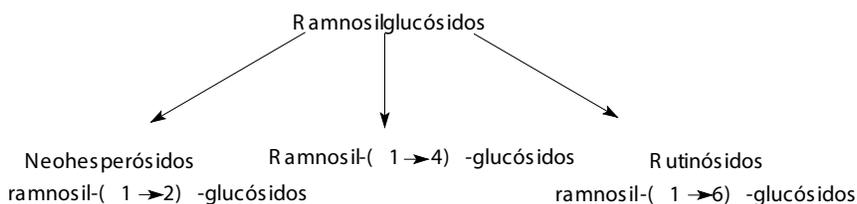
Azúcares interiores más comunes: glucosa, galactosa, arabinosa y xilosa

Azúcares exteriores: ramnosa, glucosa, xilosa, allosa, apiosa y arabinosa. Estos se encuentran enlazados generalmente al C-2, C-4 o C-6 del azúcar interior.

Los diglicósidos más comunes son:

Ramnosilglucósido, glucosilglucósido, xilosilglucósido, allosilglucósido, apiosilglucósido, apiosilgalactósido, xilosilgalactósido, arabinosilgalactósido, ramnosilgalactósido, ramnosilarabinósido, apiosilarabinósido y apiosilsilósido.

Más frecuentes: Ramnosilglucósidos y glucosilglucósidos.



Neohesperósidos: C-1 de la glucosa experimenta blindaje ( $\sim 2$  ppm) debido al efecto  $\delta$  del residuo de ramnosa en C-2 y por lo tanto el corrimiento químico del C-1 de la glucosa es importante para reconocer el enlace  $1 \rightarrow 2$ .

Rutinósidos: El C-6 de la glucosa aparece en  $\delta C \sim 66,0$  ppm debido al efecto  $\delta$  del residuo de ramnosa, mientras que en otros casos resuena alrededor de  $61,0$  ppm

En ramnosyl-( $1 \rightarrow 4$ )-glucósidos el C-1 y el C-6 resuenan normalmente, mientras los C-3 y C-5 aparecen más blindados ( $1-3$  ppm).

Corrimientos químicos cualitativamente similares a aquellos informados para la ramnosilación de la glucosa han sido notados para la glucosilación, xilosilación, allosilación y apiosilación de glucósidos. La señal del C-6 de la glucosa se aprecia en  $\delta C \sim 66$  ppm en enlaces ( $1 \rightarrow 6$ ) mientras el C-1 de la glucosa aparece a  $\sim 2$  ppm más blindado en uniones ( $1 \rightarrow 2$ ). Cuando existe la unión ( $1 \rightarrow 4$ ) los C-3 y C-5 muestran señales a campos relativamente altos.

Los corrimientos químicos de  $^{13}C$  del azúcar terminal son usualmente independientes del azúcar interior y del sitio de la

sustitución, por lo que los corrimientos químicos de  $^{13}\text{C}$  de los metil-O-glicósidos pueden ser útiles para determinar el azúcar terminal, quedando las resonancias restantes para la asignación del azúcar interior. En este caso la comparación con datos reportados puede ser útil.

El C-1 del azúcar unido al residuo de fenol se desblinda entre 3-6 ppm, menos que la glicosilación entre azúcares (7-8 ppm). En diglicósidos las diferencias entre el corrimiento del C-1 del azúcar terminal y el interior es de 2-4 ppm, la señal más desblindada se corresponde con el azúcar externo.

#### C-glicosilación

El efecto más significativo de la C-glicosilación sobre el espectro del aglicón es un desblindaje de  $\sim 10$  ppm del carbono *ipso*, por lo que la comparación entre los corrimientos químicos del glicósido analizado y su aglicón resulta muy útil para la fácil determinación del sitio de la C-glicosilación.

#### Flavonoides-O-glicósidos

En términos generales, el corrimiento químico del carbono fenólico se corre a campos altos y los átomos de carbono en posiciones *orto* y *para* se corren a campos bajos.

El efecto de la glicosilación varía apreciablemente para la glicosilación del OH-5 con respecto a otros hidroxilos en el anillo A y B. La justificación es la ruptura del puente de hidrógeno entre el OH-5 y el carbonilo en 4. Cuando el C-4 se corre a campos altos (aprox. 5 ppm) se asocia con la glicosilación en 5-OH. Por lo tanto, el C-4 está más desblindado ( $\sim 5$  ppm) en flavonoides que tienen la glicosilación en una posición diferente al C-5.

La glicosilación de grupos hidroxilos en posiciones 7, 3' o 4' causa un corrimiento a campos altos del C-*ipso* y a campos bajos del carbono *orto* (0,2-2 ppm) y del *para* cuya magnitud es usualmente superior (3-5 ppm) y por lo tanto estos efectos proveen una forma rápida para el reconocimiento del sitio de la glicosilación.

#### Flavonoides C-glicósidos

El C-1 aparece en la misma región del resto de los oximetinos del azúcar. Por lo tanto, con excepción de los 6-desoxy derivados (ejemplo: ramnosil derivados) todos los carbonos resuenan entre  $\delta\text{C}$  60,0-

85,0 ppm. El número de restos de azúcares se puede predecir por el número de señales de RMN  $^{13}\text{C}$ . Este rango puede ser complicado por resonancias de  $\text{OCH}_3$ , C-2 de flavanonas, C-2 y C-3 de flavanonoles.

La C-glicosilación por lo general causa corrimiento a campos bajos del carbono enlazado directamente al residuo del azúcar y corrimiento a campos altos de los carbonos en posiciones *orto* y *para*. Se aprecian significativos corrimientos para el C-*ipso* (7-12 ppm) por efecto  $\delta$



## Espectrometría de masas

La espectrometría de masas permite determinar la masa de la molécula y a partir de esta se infiere la fórmula molecular. La necesidad de convertir las moléculas neutras en iones para realizar el espectro de masas ha condicionado el desarrollo de diversos modos de ionización. Las especies ionizadas pueden ser fragmentadas, lo que origina patrones de fragmentación que favorecen la caracterización estructural. Se conoce que el modo de ionización influye en el modo de fragmentación de las moléculas. La ionización electrónica (EI) y la ionización por electronebulización (ESI) son dos de los modos de ionización más empleados en el análisis estructural de flavonoides. EI es un modo de ionización muy empleado en sistemas de cromatografía gaseosa acoplada a masas, donde los analitos deben mostrar cierta volatilidad. ESI es un modo de ionización muy empleado para sustancias no volátiles y, frecuentemente, se emplea en espectrómetros de masas acopladas a cromatógrafos líquidos. Los espectros de masas se pueden obtener, también, por infusión directa con ambos modos de ionización.

### Ionización electrónica (EI)

Es un modo de ionización “duro” donde un haz de electrones interactúa con la molécula y favorece la formación de un ion radical denominado ion molecular  $M^+$ , originado por la pérdida de un electrón. Este modo de ionización favorece fragmentaciones ulteriores y los espectros de masas se caracterizan por presentar varios iones fragmentos. La intensidad del ion molecular es variable y depende de la facilidad con que este se fragmenta. La energía de ionización influye de forma determinante en la fragmentación de la molécula. Generalmente, se selecciona una energía (70 eV) muy superior a la

necesaria para ionizar a cualquier compuesto orgánico. En aquellos casos donde la intensidad del ion molecular es baja o no se aprecie su señal, se realizan espectros de masas con menor energía de ionización (12 eV) para favorecer el aumento de la intensidad del ion molecular y su detección.

La derivatización de muestras es una práctica común que permite la obtención de derivados volátiles. De esta forma se obtienen derivados más volátiles, menos polares y de mayor estabilidad térmica. En estos casos se debe considerar el aumento de la masa ocasionado por esta modificación estructural. En el caso de los flavonoides, los grupos hidroxilo se derivatizan a los correspondientes trimetilsilil éteres, produciendo un aumento de 72 Da en la masa de la molécula por cada grupo OH derivatizado. Algunos derivados de la acetamida se emplean como reactivos derivatizantes [N-metil-N-trimetilsililtrifluoroacetamida (MSTFA) y bis N,O-(trimetilsilil) trifluoroacetamida (BSTFA)].

Los flavonoides, de manera general, no fragmentan fácilmente por lo que el ion molecular generalmente es intenso (50-100 %) y la EM se puede emplear para determinar fácilmente la masa molecular.

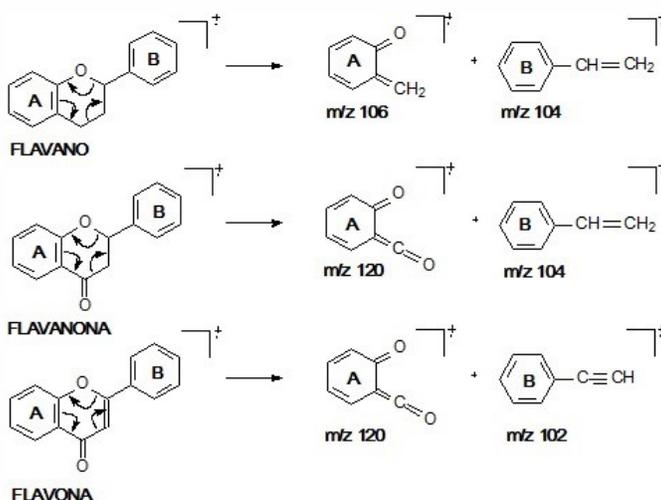


Figura 7: Ejemplo de fragmentación por rDA

Una ruptura rDA (retro Diels- Alder) a nivel del anillo C produce fragmentos asociados a los anillos A y B, que, generalmente, caracterizan los espectros de los flavonoides. Los fragmentos derivados del anillo A y del anillo B son los más frecuentes. Es posible la ruptura de los fragmentos correspondientes a los anillos A y B para producir iones de menor relación  $m/z$  pero los picos son de baja intensidad (Figura 7).

Algunas características asociadas a los espectros de masas son:

- El ion molecular generalmente aparece como uno de los picos principales del espectro de aglicones.
- El ion  $[M-1]^+$  es común en muchos flavonoides y se asocia a la pérdida de un átomo de hidrógeno.
- El ion  $[M-17]^+$  indica la pérdida de OH y comúnmente se asocia a una 2'-hidroxilación.
- El ion  $[M-18]^+$  es común en flavonoles y C-glicósidos y sugiere la pérdida de agua.
- En la serie de las isoflavanonas con la sustitución 2'-metoxi, el fragmento del anillo A no se observa o es de baja intensidad.

Algunos flavonoides no muestran el patrón de fragmentación originado por la reacción rDA. Según la literatura, esta fragmentación no ocurre en pterocarpanos debido a la estabilidad que le proporciona a la molécula el O-5, C-6 y el enlace entre el C-6 y el C-6a. Los fragmentos sugeridos para este tipo de compuestos se presentan en la figura 8.

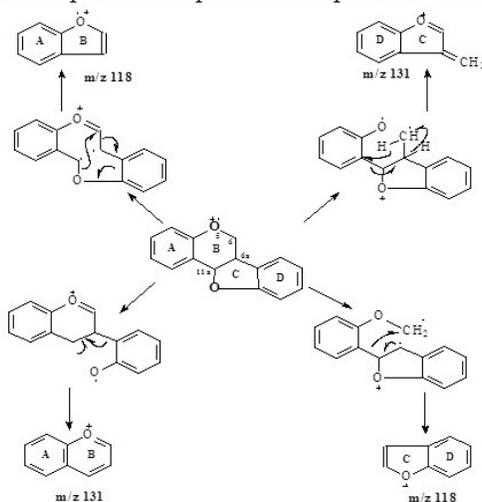


Figura 8: Fragmentación para pterocarpanos

Tóth y col. (2000) realizaron un estudio de la fragmentación por impacto electrónico (IE) de pterocarpanos y sus análogos deuterados, con fusión de anillos cis. Se demostró que el pico de mayor abundancia en el espectro era el correspondiente al ion molecular. Le continuaban en abundancia el ion  $[M-H]^+$ , el cual se forma con mayor probabilidad por la pérdida del átomo de H-6 o del H-11a como radical y el ion fragmento  $[M-H-H2]^+$ .

### IONIZACIÓN POR ELECTRONEBULIZACIÓN (ESI)

El modo de ionización ESI se emplea con frecuencia en el análisis de moléculas no volátiles o termosensibles. El empleo de la espectrometría de masas como sistema de detección en cromatografía líquida ha generado mucho volumen de información con respecto al análisis de flavonoides por ionización ESI. Este modo de ionización provoca la ionización de la molécula y produce poca o ninguna fragmentación, favoreciendo la identificación de la masa molecular. Adicionalmente, es posible una fragmentación ulterior del ion pseudo molecular, a través de una disociación inducida por colisión con un gas inerte, lo que permite la obtención de información estructural valiosa. Tanto el modo positivo como negativo han sido empleados en el análisis de flavonoides. Sin embargo, el carácter ácido de los flavonoides favorece la obtención de iones más abundantes por deprotonación, generalmente.

Las condiciones experimentales empleadas influyen de forma determinante en las características del espectro obtenido y es posible que diferentes autores obtengan resultados diferentes en cuanto a la fragmentación. Los espectros ESI no muestran la misma reproducibilidad que los espectros obtenidos por IE y por tanto las comparaciones deben ser realizadas de forma cuidadosa.

Básicamente, este modo de ionización genera iones pseudo moleculares por sustracción o adición de un átomo de hidrógeno. También es posible la formación de aductos con  $Na^+$  y  $K^+$ ,  $NH_4^+$ , entre otros. Habitualmente, se generan iones con una sola carga pero se han reportado iones multicargados en algunos derivados de flavonoides.

Fabre y col. (2001) compararon la fragmentación de aglicones de flavonas, flavonoles y flavanonas empleando el modo de ionización ESI.

Los principales modos de fragmentación apreciados se presentan en la figura 9.

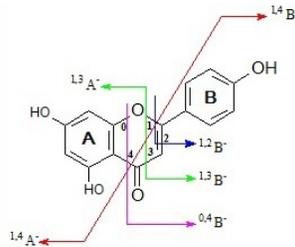


Figura 9: Representación de modos de fragmentación de aglicones de flavonas, flavonoles y flavanonas

Los iones fragmentos observados se obtienen al romperse los enlaces del anillo C, dando origen a fragmentos que contienen a los anillos A o B. Los enlaces del anillo C que pueden escindirse se denotan con los números 0-4 y en cada caso se especifica la localización de la ruptura ubicando el número correspondiente a cada enlace sobre la letra que identifica al anillo que conserva la carga negativa. En las rupturas relacionadas con los enlaces 1-3 y 1-4 se aprecia que la carga negativa puede quedar retenida tanto en el anillo A como en el B. El dominio de un modo de fragmentación y las intensidades relativas de los iones fragmentos originados depende del tipo de flavonoide y del patrón de sustitución.

ESI también ha sido aplicada con éxito en el análisis de glicósidos de flavonoides. El número de residuos de azúcares, el tipo de glicósido (O- o C-glicósido) y la posición de la glicosilación se puede definir con relativa facilidad. En algunos casos ha sido posible diferenciar isómeros mediante la comparación de las intensidades de los iones fragmentos obtenidos en experimentos EM<sup>n</sup>

Para el análisis de las fragmentaciones que ocurren en los glicósidos se emplea la nomenclatura propuesta por Cuyckens y Claeys (2004), que se resume en la figura 10.

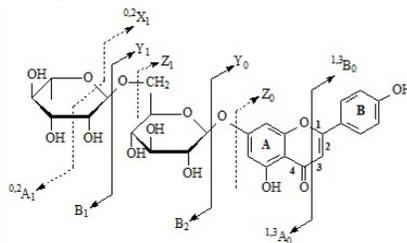


Figura 10: Nomenclatura propuesta para las fragmentaciones de flavonoides glicosilados.



## Bibliografía

1. Agrawal, P.K., *Carbon-13 NMR of Flavonoids*, Elsevier, Amsterdam, 1989.
2. Aksnes, D.W., Standnes, A., and Andersen, Ø.M., Complete assignment of the  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra of flavone and its A-ring hydroxyl derivatives, *Magn. Reson. Chem.*, 34, 820, 1996.
3. Albornoz, A. "Productos naturales: Estudio de las sustancias y drogas extraídas de las plantas". Publicaciones UCV. Caracas, 1980.
4. Andersen, O. M., & Markham, K. R. (Eds.). *Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications*. CRC Press, 2005.
5. Bandeira, M.A.M., Matos, F.J. de A., and Brazfilho, R., Structural elucidation and total assignment of the  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra of new chalcone dimmers, *Magn. Reson. Chem.*, 41, 1009, 2003.
6. Bohm, B.A., *Introduction to Flavonoids*, Harwood Academic Publisher, Singapore, 1998.
7. Briggs, L. and Colebrook, L., Infrared spectra of flavanones and flavones. Carbonyl and hydroxyl stretching and CH out-of-plane bending absorption, *Spectrochim. Acta*, 18, 939, 1962.
8. Careri, M., Bianchi, F., and Corradini, C., Recent advances in the application of mass spectrometry in food-related analysis, *J. Chromatogr. A*, 970, 3, 2002.
9. Chen, J., Leng, H., Duan, Y., Zhao, W., Yang, G., Guo, Y. & Hu, Q. Three new flavonoids from the leaves of oriental tobacco and their cytotoxicity. *Phytochemistry Letters*, 6(1), 144-147, 2013.
10. Chen, Y. J., Li, Z. M., & Gao, K. (2015). Iridoids, flavonoids, and monoterpene diglycoside from the roots of *Triosteum himalayanum* Wall. *Biochemical Systematics and Ecology*, 59, 26-30, 2015.

11. Claus, E. P; Tyler, V.E.: "Farmacognosia". Edición Revolucionaria, 1985.
12. Cole, R.B., Ed., *Electrospray Ionization Mass Spectrometry: Fundamentals, Instrumentation and Applications*, Wiley, New York, 1997.
13. Cuyckens, F. and Claeys, M., Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids, *J. Mass Spectrom.*, 39, 1, 2004.
14. Davis, A.L. et al., <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR assignments of some green tea polyphenols, *Magn. Reson.Chem.*, 34, 887, 1996.
15. De Souza, L. M., Cipriani, T. R., Iacomini, M., Gorin, P. A., & Sasaki, G. L. HPLC/ESI-MS and NMR analysis of flavonoids and tannins in bioactive extract from leaves of *Maytenus ilicifolia*. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 47(1), 59-67, 2008.
16. Dierksmeier, G. *Métodos cromatográficos*. Capítulo 1. Origen y desarrollo de los métodos cromatográficos. Ed. Científico Técnica, 2005.
17. Fabre, N. et al., Determination of flavone, flavonol, and flavanone aglycones by negative ion liquid chromatography electrospray ion trap mass spectrometry, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 12, 707, 2001.
18. Farnsworth, N. R. Biological and Phytochemical Screening of Plants. *Journal of Pharmaceutical Science*. Vol. 55, 3, 225-276, 1966.
19. Ferreira, D. et al., Circular dichroic properties of flavan-3,4-diols, *J. Nat. Prod.*, 67, 174, 2004.
20. Fongang, Y. S., Bankeu, J. J., Ali, M. S., Awantu, A. F., Zeeshan, A., Assob, C. N., & Tsamo, E. Flavonoids and other bioactive constituents from *Ficus thonningii* Blume (Moraceae). *Phytochemistry Letters*, 11, 139-145, 2015.
21. Forkmann, G., Genetics of flavonoids, in *The Flavonoids: Advances in Research Since 1980*, Harborne, J.B., Ed., Chapman & Hall, London, 1994, 538.
22. García-Martínez, C. et al., Further nuclear magnetic resonance studies of flavone, *Spectroscopy*, 12, 85, 1994.
23. Harborne, J.B. and Baxter, H., *The Handbook of Natural Flavonoids*, John Wiley, Chichester, 1999.

24. Harborne, J.B. and Baxter, H., *The Handbook of Natural Flavonoids*, vol. 1. Wiley & Sons, Chichester, 1999
25. Harborne, J.B. and Mabry, T.J., Eds., *Flavonoids: Advances in Research*, Chapman & Hall, London, 1982.
26. Harborne, J.B. and Williams, C.A., Anthocyanins and other flavonoids, *Nat. Prod. Rep.*, 12, 639, 1995.
27. Harborne, J.B. and Williams, C.A., Anthocyanins and other flavonoids, *Nat. Prod. Rep.*, 15, 631, 1998.
28. Harborne, J.B. and Williams, C.A., Anthocyanins and other flavonoids, *Nat. Prod. Rep.*, 18, 310, 2001.
29. Harborne, J.B. and Williams, C.A., Anthocyanins and other flavonoids, *Nat. Prod. Rep.*, 18, 310, 2004.
30. Harborne, J.B. *Phytochemical Methods: a guide to modern techniques of plant analysis*. 2 da. Ed. Chapman and Hall. 37-99, 1984.
31. Harborne, J.B., Ed., *Flavonoids: Advances in Research Since 1986*, Chapman & Hall, London, 1994.
32. Harborne, J.B., Ed., *Methods in Plant Biochemistry*, Vol. 1, Plant Phenolics, Academic Press, London, 1989.
33. Harborne, J.B., Ed., *The Flavonoids: Advances in Research Since 1980*, Chapman & Hall, London, 1988.
34. Harborne, J.B., General procedures and measurement of total phenolics, in *Methods in Plant Biochemistry*, Vol. 1, Plant Phenolics, Harborne, J.B., Ed., Academic Press, London, chap. 1. 1989.
35. Harborne, J.B., Mabry, T.J., and Mabry, H., Eds., *The Flavonoids*, Chapman & Hall, London, 1975.
36. Heller, W. and Forkmann, G., Biosynthesis of flavonoids, in *The Flavonoids: Advances in Research Since 1980*, Harborne, J.B., Ed., Chapman & Hall, London, 399, 1988.
37. Heller, W. and Forkmann, G., Biosynthesis of flavonoids, in *The Flavonoids: Advances in Research Since 1986*, Harborne, J.B., Ed., Chapman & Hall, London, 499, 1994.
38. Heneczowski, M. et al., Infrared spectrum analysis of some flavonoids, *Acta Pol. Pharm.*, 58, 415, 2001.
39. Horie, T. et al., <sup>13</sup>C NMR spectral assignment of the A-ring of polyoxygenated flavones, *Phytochemistry*, 47, 865, 1998.
40. Horie, T., Ohtsuru, Y., Shibata, K., Yamashita, K., Tsukayama, M., & Kawamura, Y. <sup>13</sup>C NMR spectral assignment of the A-ring of

- polyoxygenated flavones. *Phytochemistry*, 47(5), 865-874, 1998.
41. Ibrahim, L. F., El-Senousy, W. M., & Hawas, U. W. NMR spectral analysis of flavonoids from *Chrysanthemum coronarium*. *Chemistry of Natural Compounds*, 43(6), 659-662, 2007.
  42. Ibrahim, R. and Towers, G. H. N. *Arch Biochem. Biophys.* 87, 125, 1960.
  43. Ibrahim, R.; Barron D. Phenylpropanoids. *Methods in plant biochemistry* vol. 1. Academic Press. 75-111, 1989.
  44. Jaisankar, P., Gajbhiye, R. L., Mahato, S. K., & Nandi, D. Flavonoid Natural Products: Chemistry and Biological Benefits on Human Health: A Review. *Asian J. of Adv. Basic Sci*, 3(1), 164-178, 2014.
  45. Jiang, C. L., Tsai, S. F., & Lee, S. S. Flavonoids from *Curcuma longa* leaves and their NMR assignments. *Natural product communications*, 10(1), 63-66, 2015.
  46. Jiang, C. L., Tsai, S. F., & Lee, S. S. Flavonoids from *Curcuma longa* leaves and their NMR assignments. *Natural product communications*, 10(1), 63-66, 2015.
  47. Jiang, J. H., Yang, J. H., Zhang, X. J., Wang, W. J., Zhang, Y. M., Liu, Y., & Chen, Y. G. Flavonoids from the Fern *Pronephrium penangianum*. *Chemistry of Natural Compounds*, 50(5), 912-914, 2014.
  48. Jork, H., Funk, W., Fischer, W., and Wimmer, H., *Thin-Layer Chromatography: Reagents and Detection Methods*, 2nd ed., VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, 1994.
  49. Justesen, U., Collision-induced fragmentation of deprotonated methoxylated flavonoids, obtained by electrospray ionization mass spectrometry, *J. Mass Spectrom.*, 36, 169, 2001.
  50. Kiss, L. et al., Chiroptical properties and synthesis of enantiopure cis and trans pterocarpan skeleton, *Chirality*, 15, 558, 2003.
  51. Komoto, N., Nakane, T., Matsumoto, S., Hashimoto, S., Shiota, O., Sekita, S., & Kuroyanagi, M. Acyl flavonoids, biflavones, and flavonoids from *Cephalotaxus harringtonia* var. *nana*. *Journal of natural medicines*, 1-8, 2015.
  52. Lathiff, S. M., Jemaon, N., Abdullah, S. A., & Jamil, S. Flavonoids from *Artocarpus anisophyllus* and their bioactivities. *Natural product communications*, 10(3), 393-396, 2015.

53. Li, M. L., Xu, L. Y., Li, Z. L., Qian, S. H., & Qin, M. J. Flavonoids from *Mentha haplocalyx*. *Chemistry of Natural Compounds*, 50(1), 124-125, 2014.
54. Lima, A. F., Ferreira, D. A., Monte, F. J. Q., & Braz-Filho, R. Flavonoids from *Lonchocarpus araripensis* (Leguminosae)-isolation, unequivocal assignment of NMR signals  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  and conformational analysis. *Química Nova*, 37(4), 672-676, 2014.
55. Liu, Y.L.; Neuman, P.; Timmermann B. and Mabry, T. J. Techniques for flavonoid analysis. *Rev. Latinoamer. Quim. Suppl.* 1. 90-130, 1989.
56. Lu, Y., & Foo, L. Y. Flavonoid and phenolic glycosides from *Salvia officinalis*. *Phytochemistry*, 55(3), 263-267, 2000.
57. Ma, Y.-L. et al., Mass spectrometric methods for the characterization and differentiation of isomeric O-diglycosyl flavonoids, *Phytochem. Anal.*, 12, 159, 2001.
58. Mabry, T.J., Markham, K.R., and Thomas, M.B., *The Systematic Identification of Flavonoids*, Springer-Verlag, New York, 1970.
59. Manoj, C. et al., Complete  $^{13}\text{C}$  and  $^1\text{H}$  NMR spectral assignments of two isoflavones from the roots of *Dalbergia horrida*, *Magn. Reson. Chem.*, 41, 227, 2003.
60. March, R., & Brodbelt, J. Analysis of flavonoids: tandem mass spectrometry, computational methods, and NMR. *Journal of mass spectrometry*, 43(12), 1581-1617, 2008.
61. Markham, K., Isolation techniques for flavonoids, in *The Flavonoids*, Harborne, J.B., Mabry, T.J., and Mabry, H., Eds., Academic Press, New York, chap. 1, 1975,
62. Markham, K.R. and Bloor, S.J., Analysis and identification of flavonoids in practice, in *Flavonoids in Health and Disease*, Rice-Evans, C.A. and Packer, L., Eds., Marcel Dekker, 1, 1998.
63. Markham, K.R. and Chari, V.M., Carbon-13 NMR spectroscopy of flavonoids, in *The Flavonoids: Advances in Research*, Harborne, J.B. and Mabry, T.J., Eds., Chapman & Hall, London, 19, 1982.
64. Markham, K.R. and Geiger, H.,  $^1\text{H}$  nuclear magnetic resonance spectroscopy of flavonoids and their glycosides in hexadeuterodimethylsulfoxide, in *The Flavonoids: Advances in Research Since 1986*, Harborne, J.B., Ed., Chapman & Hall, London, 441, 1993.

65. Markham, K.R., Flavones, flavonols and their glycosides, *Meth. Plant Biochem.*, 1, 197, 1989.
66. Markham, K.R., *Techniques of Flavonoid Identification*, Academic Press, London, 1982.
67. *Methods in biotechnology. Natural Products Isolation. Second Edition.* Edited by Satyajit D. Sarker, Zahid Latif, Alexander I. Humana Press Inc.Gray, 2006.
68. Miranda M, Cuellar A. *Farmacognosia*. ENPES, Ciudad de La Habana, 2001.
69. Mok, S. Y., & Lee, S. Identification of flavonoids and flavonoid rhamnosides from *Rhododendron mucronulatum* for. *albiflorum* and their inhibitory activities against aldose reductase. *Food chemistry*, 136(2), 969-974, 2013.
70. Mošovská, S., Nováková, D., & Kališák, M. Antioxidant activity of ginger extract and identification of its active components. *Acta Chimica Slovaca*, 8(2), 115-119, 2015.
71. Muhaisen, H. M. Introduction and Interpretation of Flavonoids. *Advanced Science, Engineering and Medicine*, 6(12), 1235-1250, 2015.
72. Okada, Y., Okita, M., Murai, Y., Okano, Y., & Nomura, M. Isolation and identification of flavonoids from *Coreopsis lanceolata* L. petals. *Natural product research*, 28(3), 201-204, 2014.
73. Okada, Y., Okita, M., Murai, Y., Okano, Y., & Nomura, M. Isolation and identification of flavonoids from *Coreopsis lanceolata* L. petals. *Natural product research*, 28(3), 201-204, 2014.
74. Parejo, I. et al., Characterization of acylated flavonoid-O-glycosides and methoxylated flavonoids from *Tagetes Maxima* by liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 18, 2801, 2004.
75. Parhiz, H., Roohbakhsh, A., Soltani, F., Rezaee, R., & Iranshahi, M. Antioxidant and Anti-inflammatory Properties of the Citrus Flavonoids Hesperidin and Hesperetin: An Updated Review of their Molecular Mechanisms and Experimental Models. *Phytotherapy Research*, 29(3), 323-331, 2015.
76. Pelter, A., Ward, R. S., & Gray, T. I. The carbon-13 nuclear magnetic resonance spectra of flavonoids and related compounds. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, (23), 2475-2483, 1976

77. Petersen, M., Strack, D., and Matern, U., Biosynthesis of phenylpropanoids and related compounds, in *Biochemistry of Plant Secondary Metabolism*, Wink, M., Ed., Sheffield Academic Press, Sheffield, 151, 1999.
78. Piccinelli, A. L.; Campo, M.; Cuesta-Rubio, O.; Márquez, I.; De Simone, F.; Rastrelli, L. Isoflavonoids Isolated from Cuban Propolis. *J. Agric. Food Chem.*, 53(23), 9010-9016, 2005.
79. Pietta, P. and Mauri, P., Analysis of flavonoids in medicinal plants, *Meth. Enzymol.*, 335, 26, 2001.
80. Roger, B., Jeannot, V., Fernandez, X., Cerantola, S., & Chahboun, J. Characterisation and quantification of flavonoids in *Iris germanica* L. and *Iris pallida* Lam. Resinoids from Morocco. *Phytochemical Analysis*, 23(5), 450-455, 2012.
81. Saldanha, L. L., Vilegas, W., & Dokkedal, A. L. Characterization of flavonoids and phenolic acids in *Myrcia bella* Cambess. Using FIA-ESI-IT-MSn and HPLC-PAD-ESI-IT-MS combined with NMR. *Molecules*, 18(7), 8402-8416, 2013.
82. Sen, A., Gurbuz, B., Gurer, U. S., Bulut, G., & Bitis, L. Flavonoids and Biological Activities of *Centaurea stenolepis*. *Chemistry of Natural Compounds*, 50(1), 128-129, 2014.
83. Sivam, G., Analysis of flavonoids, in *Methods of Analysis for Functional Foods and Nutraceuticals*, Hurst, W.J., Ed., CRC Press, Boca Raton, 363, 2002.
84. Srivastav, A. K., Singh, R., Manimegalai, S., & Rajeswari, V. D. Identification of Flavonoids in Methanolic Extract of *Caryota urens* (Fish Tail Palm): A Phytochemical Screening Involving Structure Analysis by FTIR Spectroscopy. *Research Journal of Phytochemistry*, 9(3), 127-136, 2015.
85. Srivastav, A. K., Singh, R., Manimegalai, S., & Rajeswari, V. D. Identification of Flavonoids in Methanolic Extract of *Caryota urens* (Fish Tail Palm): A Phytochemical Screening Involving Structure Analysis by FTIR Spectroscopy. *Research Journal of Phytochemistry*, 9(3), 127-136, 2015.
86. Stobiecki, M. and Makkar, H.P.S., Recent advances in analytical methods for identification and quantification of phenolic compounds, *EAAP Publ.*, 110, 11-28, 2004.

87. Stobiecki, M., Application of mass spectrometry for identification and structural studies of flavonoid glycosides, *Phytochemistry*, 54, 237, 2000.
88. Tolonen, A. and Uusitalo, J., Fast screening method for the analysis of total flavonoid content in plants and foodstuffs by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry with polarity switching, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 18, 3113, 2004.
89. Trease G, Evans WCh. "Tratado de Farmacognosia". 14 Edición. Interamericana, 1996.
90. Wagner, H. and Bladt, S., *Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas*, 2nd ed., Springer-Verlag, Berlin, 1996
91. Wagner, H.; Bladt, S.; Zgainski, E. M. *Plant Drug Analysis. A Thin Layer Chromatography Atlas*. Springer-Verlag, 1984.
92. Wang, Q. H., Wu, J. S., & Wu, R. J. Two new flavonoids from *Artemisa sacrorum* Ledeb and their antifungal activity. *Journal of Molecular Structure*, 1088, 34-37, 2015.
93. Waterman, P.G. and Mole, S., *Analysis of Phenolic Plant Metabolites*, Blackwell, Oxford, 1994.
94. Waterman, P.G. and Mole, S., *Analysis of Phenolic Plant Metabolites*, Blackwell, Oxford, 1994.
95. Wollenweber, E., Flavones and flavonols, in *The Flavonoids — Advances in Research since 1986*, J.B. Harborne, Ed., Chapman and Hall, London, Chap. 7, 1994.
96. World Health Organization. "Quality Control Methods for Medicinal Plant Materials". WHO/Pharm 92 559, 1990.
97. Wu, Z. B., Yao, X. Y., Wang, W., Li, Y. T., Xu, Y. H., & Chen, W. Flavonoids from *Nitraria tangutorum*. *Chemistry of Natural Compounds*, 49(6), 1125-1126, 2014.
98. Xie, G., Lin, B., Qin, X., Wang, G., Wang, Q., Yuan, J. & Qin, M. New flavonoids with cytotoxicity from the roots of *Flemingia latifolia*, *Fitoterapia*, 2015.
99. Yoon, H., Eom, S., Hyun, J., Jo, G., Hwang, D., Lee, S. & Lim, Y. <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR data on hydroxy/methoxy flavonoids and the effects of substituents on chemical shifts. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 32(6), 2101-2104, 2011.

100. Zehl, M., Braunberger, C., Conrad, J., Crnogorac, M., Krasteva, S., Vogler, B. & Krenn, L. Identification and quantification of flavonoids and ellagic acid derivatives in therapeutically important *Drosera* species by LC–DAD, LC–NMR, NMR, and LC–MS. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 400(8), 2565-2576, 2011.
101. Zhang, J. et al., Structural characterization and improved detection of kale flavonoids by electrospray ionization mass spectrometry, *Anal. Chem.*, 75, 6401, 2003.
102. Zhang, K. and Zuo, Y., GC–MS determination of flavonoids and phenolic and benzoic acids in human plasma after consumption of cranberry juice, *J. Agric. Food Chem.*, 52, 222, 2004.



## Biografía

Osmany Cuesta Rubio.

Cubano, Lic. en Ciencias Farmacéuticas. Doctor en Ciencias Farmacéuticas por la Universidad de la Habana-Cuba. Actualmente, investiga en la línea de Farmacognosia y Química de Productos Naturales. Es docente de la Unidad Académica de Ciencias Químicas y de la Salud, de la Universidad Técnica de Machala.

Ingrid Márquez Hernández.

Cubana, Lic. en Ciencias Farmacéuticas. Doctora en Ciencias Farmacéuticas por la Universidad de la Habana-Cuba. Actualmente, investiga en la línea de Farmacognosia y Química de Productos Naturales. Es docente de la Unidad Académica de Ciencias Químicas y de la Salud, de la Universidad Técnica de Machala.

Mercedes Campo Fernández.

Cubana, Lic. en Ciencias Farmacéuticas. Doctora en Ciencias Farmacéuticas por la Universidad de la Habana-Cuba. Actualmente, investiga en la línea de Farmacognosia y Química de Productos Naturales. Es docente de la Unidad Académica de Ciencias Químicas y de la Salud, de la Universidad Técnica de Machala.



*Introducción a la Caracterización  
Estructural de Flavonoides*

Se terminó de imprimir en marzo de 2016 en la  
imprenta de la UTMACH, calle Loja y 25 de Junio  
(campus Machala)

Esta edición consta de 300 ejemplares.

[www.utmachala.edu.ec](http://www.utmachala.edu.ec)

El programa de Reingeniería del Conocimiento en la Universidad Técnica de Machala (UTMACH) es un modelo emergente de gestión de la investigación que promueve saberes científicos con pertinencia social. Desde el Vicerrectorado Académico impulsamos la investigación colectivista, donde docentes y estudiantes se engranan en la construcción y divulgación del resultado de sus ejercicios pedagógicos, heurísticos y de vinculación social, en aras de contribuir con el fortalecimiento de nuestras ventajas comparativas y competitivas a nivel transfronterizo.

Mediante este programa estratégico la UTMACH impacta sus imaginarios respecto a la relación de la docencia con la investigación, muestra de ello es la presente obra donde se cristaliza el empoderamiento y profesionalismo de sus actores y redes al servicio de la formación crítica de profesionales de avanzada.

En la UTMACH seguimos conquistando el conocimiento a través de la investigación, por ello en cada acción emprendida *proyectamos nuestra historia*.

Ing. Amarilis Borja Herrera, Mg. Sc.  
VICERRECTORA ACADÉMICA



ISBN: 978-9978-316-61-0



9 789978 316610