

CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL PASO A PASO MEDIANTE FTIR, MASAS Y RMN EN 1 Y 2D DEL COMPUESTO BIOACTIVO 17α -(4-NITROFENIL)ETINIL-ESTRA-1,3,5(10)-TRIENE-3,17 β -DIOL

Juárez Niño, Elia Donají¹, Santillan Baca, Rosa ², Ochoa Becerra, Ma. Eugenia ², Soto Castro, Delia³

¹ Instituto Politécnico Nacional. Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional (CIIDIR) Unidad Oaxaca. Hornos No. 1003, Col. Noche Buena, C.P. 71230. Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca.

²Departamento de Química, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Apdo. Postal 14-740, 07000 México, CDMX., México.

³CONACyT- ¹ Instituto Politécnico Nacional. Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional (CIIDIR) Unidad Oaxaca. Hornos No. 1003, Col. Noche Buena, C.P. 71230. Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca.

Autor de correspondencia: dsotoc@ipn.mx

Recibido: 30 de agosto de 2022

Aceptado: 28 de octubre de 2022

Publicado en línea: 31 de octubre de 2022

Resumen

La resonancia magnética nuclear es una técnica de caracterización no invasiva ni destructiva, que permite elucidar estructuras moleculares, y en conjunto con la espectroscopía de infrarrojo y la espectrometría de masas es posible validar la estructura molecular de compuestos bioactivos. Por medio de una reacción de Sonogashira en condiciones clásicas se sintetizó el 17α -(4-nitrofenil)etnil-estra-1,3,5(10)-triene-3,17 β -diol, compuesto con actividad tripanocida. En este trabajo se muestra paso a paso la elucidación estructural del compuesto de manera inequívoca, mediante espectroscopía infrarroja se asignaron los modos normales de vibración de los grupos funcionales característicos (-OH y NO₂); por resonancia magnética nuclear (1D y 2D) se asignaron y correlacionaron todas las señales de ¹H y ¹³C en los espectros correspondientes y se

corroboró el acoplamiento entre el p-iodonitrobenzenceno y el 17 α -etinilestradiol; finalmente la espectrometría de masas permitió validar el peso molecular del compuesto.

Palabras clave: Actividad tripanocida, HMBC, HSQC, Sonogashira

Abstract

Nuclear magnetic resonance is a non-invasive and non-destructive characterization technique, which allows the elucidation of molecular structures and, in conjunction with infrared spectroscopy and mass spectrometry, it is possible to validate the molecular structure of bioactive compounds. By means of a Sonogashira reaction under classical conditions, 17 α -(4-nitrophenyl)ethinyl-ethinyl-estra-1,3,5(10)-triene-3,17 β -diol a compound with trypanocidal activity was synthesized. This work shows step by step the structural elucidation of the compound unambiguously, by infrared spectroscopy the normal modes of vibration of the characteristic functional groups (-OH and NO₂) were assigned; by nuclear magnetic resonance (1D and 2D) all the ¹H and ¹³C signals in the corresponding spectra were assigned and correlated; the coupling between p-iodonitrobenzene and 17 α -ethinylestradiol was corroborated. Finally, mass spectrometry allowed validation of the molecular weight of the compound.

Key words: Trypanocidal activity, HMBC, HSQC, Sonogashira

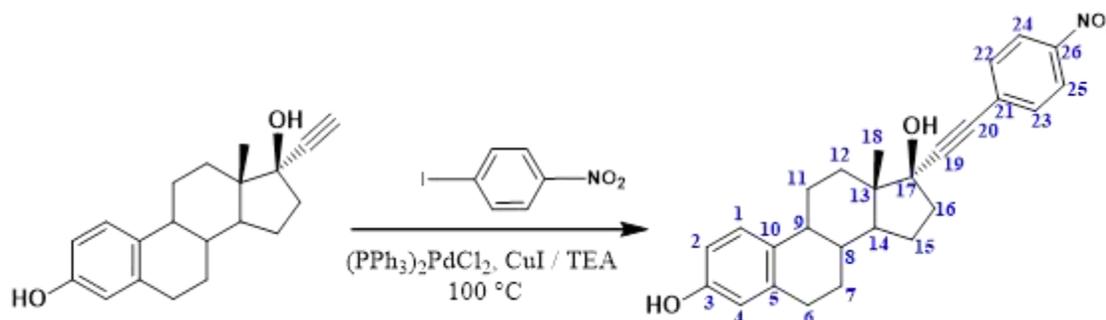
Introducción

Los antimicrobianos (antibióticos, los antivíricos, antifúngicos y antiparasitarios) son utilizados para prevenir y tratar infecciones en seres humanos, animales y plantas; sin embargo, el uso indiscriminado de este tipo de fármacos ha permitido que los microorganismos desarrollen resistencia. Lo que conduce a la búsqueda de nuevos antimicrobianos como alternativa o complementación a los ya existentes

(OMS, 2022). En este sentido se diseñaron derivados del 17 α -etinilestradiol (EE), los cuales teóricamente son buenos candidatos para actuar como antimicrobianos de administración oral y absorción por difusión pasiva. Dichos derivados pueden ser sintetizados a través de una reacción de Sonogashira en condiciones clásicas a partir del EE y un iodoareno. Específicamente el 17 α -(4-nitrofenil)etnil-estra-1,3,5(10)-triene-

3,17 β -diol, sintetizado a partir p-iodonitrobenceno y el 17 α -etinilestradiol (Esquema 1, Juárez-Niño, 2021), mostró

una buena actividad anti *T. cruzi* para la cepa TH con un IC₅₀ 78.09 \pm 0.01.



Esquema 1. Obtención del 17 α -(4-nitrofenil)etnil-estra-1,3,5(10)-triene-3,17 β -diol por medio de una reacción de Sonogashira en condiciones clásicas (Tomado de: Juárez-Niño, 2021)

La espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN) es un tipo de espectroscopía de absorción no destructiva como la espectroscopía de Ultravioleta - visible (UV) o Infrarroja (IR), bajo las condiciones adecuadas y dependiendo de las características de la muestra, esta absorbe la radiación electromagnética en la región de radiofrecuencia (3 MHz a 30.000 MHz) (Kaliva & Vamvakaki, 2020; Silverstein et al., 2005; Yadav, 2005). Así, la RMN se ocupa de las transiciones magnéticas nucleares entre los niveles de energía magnética de los núcleos atómicos en las moléculas para detectar su entorno químico, y permite la construcción de un gráfico con las frecuencias de absorción (desplazamiento químico expresado en

ppm) y las intensidades de los picos (espectro de RMN) (Silverstein et al., 2005; Yadav, 2005). Existen aproximadamente 100 isótopos para los que es posible la espectroscopia de RMN, sin embargo, los más utilizados son los isótopos hidrogeno-1 (¹H-RMN) y carbono-13 (¹³C-RMN) (Yadav, 2005). Esta técnica se desarrolló inicialmente para identificar las propiedades químicas de compuestos pequeños, pero los avances tecnológicos la han convertido en la herramienta más útil en el desarrollo y descubrimiento de nuevos fármacos, ya que permite determinar la pureza y estructura molecular a nivel atómico de una muestra, sus cambios de fase, alteraciones conformacionales y configuracionales, la solubilidad y potencial de difusión e

incluso los mecanismos enzimáticos (Mohamed et al., 2020; Singh & Singh, 2022). Junto con la RMN, la espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR) y la espectrometría de masas (MS), complementan la información estructural de cualquier compuesto bioactivo (Yadav, 2005). Mediante FTIR es posible determinar las vibraciones fundamentales de los grupos funcionales presentes en las moléculas, mientras que con la MS se obtiene el peso molecular de compuesto y es posible identificar los iones derivados de la fragmentación en el proceso de ionización (Silverstein et al., 2005; Yadav, 2005).

Para entender el funcionamiento, mecanismo de acción, interacciones, biodisponibilidad y otras características de un antimicrobiano es indispensable determinar la estructura de los compuestos, realizar evaluaciones de bioactividad y posteriormente correlacionar la estructura con la actividad. Por lo anterior, en el presente trabajo se muestra paso a paso el uso de la RMN como una herramienta básica en la caracterización y elucidación estructural de un compuesto bioactivo de origen sintético, así como la asignación de las

bandas de vibración en el espectro de FTIR, junto con la asignación del espectro de masas.

Materiales y métodos

Instrumentación y equipo

Los espectros de ^1H y ^{13}C se adquirieron en un espectrómetro de imán permanente Spinsolve de 80 MHz (Magritek, Alemania) y en un espectrómetro de imán superconductor ECA de 500 MHz (JEOL, Japón) en metanol deuterado (CD_3OD) como disolvente. Los desplazamientos químicos (δ) se expresaron en partes por millón (ppm) y las constantes de acoplamiento (J) fueron dadas en Hertz (Hz). Para asignar las señales se utilizaron los espectros de ^1H (32 escaneos), ^{13}C (621 escaneos), PENDANT- ^{13}C (1410 escaneos), HSQC (1024 escaneos) y HMBC (1024 escaneos) con las siguientes abreviaturas: s= señal simple, d= señal doble, dd= señal doble de dobles y m= señal múltiple. El espectro de FTIR fue adquirido en un Nicolet 6700 (ThermoScientific, USA) con un ART (Attenuated Total Reflectance), mientras que las masas fueron obtenidas en un espectrómetro Agilent G1969A.

Síntesis del 17 α -(4-nitrofenil)etnil-estra-1,3,5(10)-triene-3,17 β -diol

La síntesis se realizó siguiendo metodología descrita en la tesis de Juárez-Niño (2021) en un matraz de vidrio de 10 mL, se pesaron 100 mg (0.34 mmol) de EE2, 84.01 mg (0.34 mmol) de 1-yodo-4-nitrobenzoceno, 5 mg (0.03 mmol) de CuI, y 11.84 mg (0.02 mmol) de $(PPh_3)_2PdCl_2$; se introdujo al matraz una barra de agitación magnética de 15 mm de PTFE (Fisher); y se le acopló un refrigerante de 10 cm; el sistema resultante se purgó con Ar. Posteriormente, se agregaron 2 mL de trietilamina (TEA) seca y se burbujeó el sistema de reacción con Ar por 10 min. La mezcla de reacción se sometió a agitación y calentamiento a 100 °C por 16h. Al finalizar la reacción se adicionaron 10 mL de AcOEt para obtener una fase orgánica, ésta se lavó con solución saturada de (NH_4Cl) , hasta que ya no se observó el azul característico del Cu^{2+} . Posteriormente, la fase orgánica se lavó con agua destilada (4 x 10 mL) y se secó con Na_2SO_4 anhidro. El AcOEt se removió a vacío y el producto se purificó mediante cromatografía en columna con AcOEt/Hex 4:6.

Resultados y discusión

El 17α -(4-nitrofenil)etnil-estra-1,3,5(10)-triene-3,17 β -diol (Esquema 1) se obtuvo

mediante una reacción de Sonogashira en condiciones clásicas con 62.2% de rendimiento en 16 horas; con un Rf de 0.61 en un sistema de elución AcOEt/Hex 4:6. El compuesto obtenido fue un sólido de color amarillo con punto de fusión de 118-119 °C; el cual se caracterizó por ATR-FTIR, RMN (80 y 500 MHz) de 1H y ^{13}C en 1 y 2 dimensiones, y espectrometría de masas como indica.

La espectroscopía de infrarrojo permitió identificar algunas de las vibraciones normales de la molécula. En el espectro de la Figura 1 se distingue la frecuencia de tensión del OH del anillo A en 3608 cm^{-1} , en 3430 cm^{-1} la tensión del OH en la posición 19 (anillo D); las bandas en 3308 y 3104 cm^{-1} corresponden a las tensiones C-H de los anillos aromáticos E y A, respectivamente; mientras que las bandas de 3051 a 2862 cm^{-1} corresponden a las vibraciones de tensión simétrica y asimétrica C-H de los carbonos alifáticos. La vibración de tensión del alquino se observa en 2218 cm^{-1} y las vibraciones del grupo NO_2 , asimétricas y simétricas se observan en 1518 y 1339 cm^{-1} , respectivamente. Aunque es posible distinguir las bandas de vibración características esperadas, el FTIR no es la técnica que de manera inequívoca nos

permita elucidar la estructura, por lo que se realizó RMN.

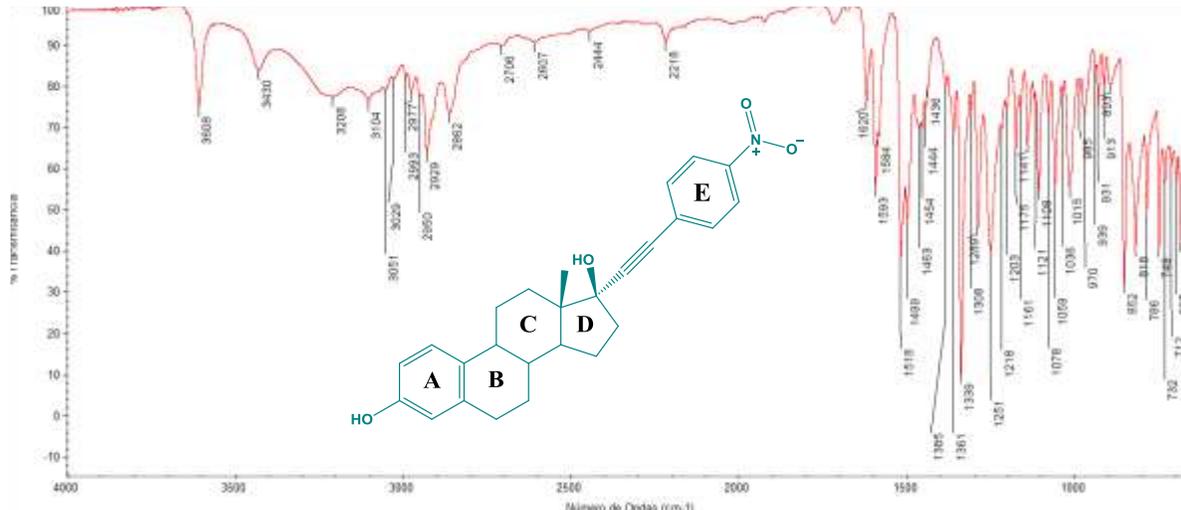


Figura 1. Espectro FTIR-ATR del 17 α -(4-nitrofenil)etnil-estra-1,3,5(10)-triene-3,17 β -diol

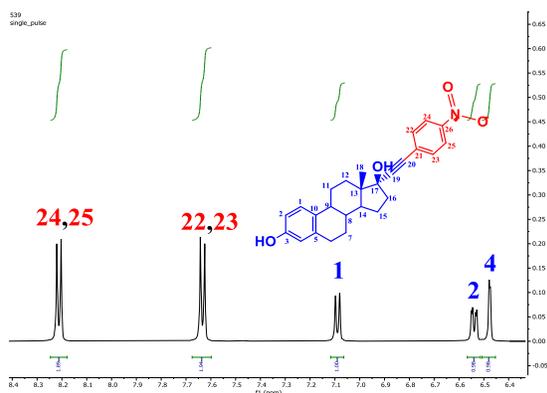
La elucidación estructural de la molécula comenzó a partir de las cinco señales ubicadas en la región aromática del espectro ^1H -RMN (Figura 2a). Se pudo asociar al anillo aromático del nitrobenzeno el primer juego de señales dobles localizado en 7.63 (H-22, H-23) y 8.21 (H-24, H-25) ppm debido a que cada una de las señales integraba para dos hidrógenos, además que ambas señales están más desplazadas por la presencia del grupo nitro y presentan una constante de acoplamiento (J) de 9 Hz, indicando acoplamientos de hidrógenos en posición orto. Posteriormente, se asignaron las tres señales restantes con el anillo aromático del EE2, primero se estableció un acoplamiento orto entre la señal ubicada en 7.09 ppm (d, J = 8.2 Hz, H1) y la señal

en 6.54 ppm (dd, J = 8.5, 2.7 Hz, H-2); esta última señal también presentó un acoplamiento meta con la señal doble en 6.48 ppm (d, J =2.7 Hz, H-4), por lo cual corresponde al protón de la posición 4.

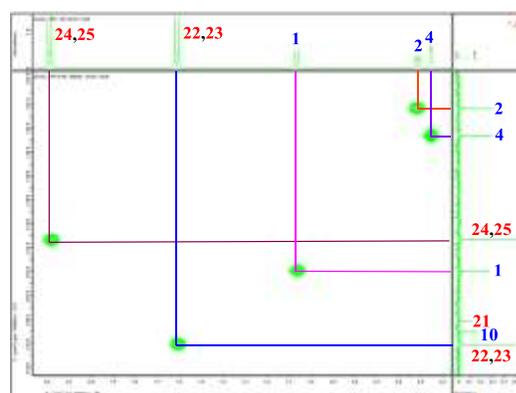
Una vez asignadas las señales de los anillos aromáticos en el espectro ^1H -RMN se correlacionaron los carbonos correspondientes a través del espectro de dos dimensiones HSQC (Figura 2b) ubicando a las señales desplazadas en 133.4, 127.1, 124.7, 116.0 y 113.8 ppm con los carbonos de las posiciones 22-23, 1, 24-25, 4 y 2, respectivamente. Posteriormente, con ayuda del espectro HMBC se logró establecer las correlaciones a dos y tres enlaces con otros carbonos y protones de la molécula, por ejemplo, la asignación del C-26 se

identificó por la correlación a 2 distancias de enlace con H-24 y H-25, así como la correlación a tres enlaces con H-22 y H-23, estos últimos correlacionan a dos distancias de enlace con C-21, lo que permitió su asignación (Figura 2c). De manera análoga se asignaron C-5 y C-1. La región de los alquinos, resulta de suma

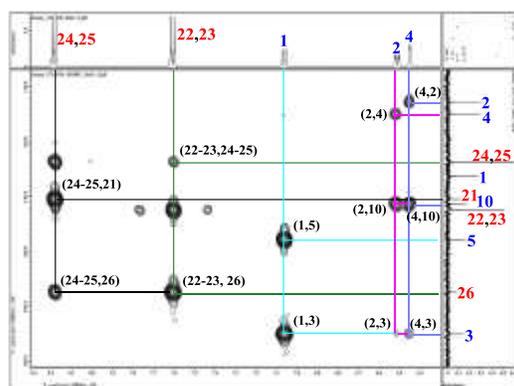
importancia, ya que ésta dio cuenta inequívoca del acoplamiento entre el EE2 y el nitrobencono. Al analizar la estructura se espera la correlación de C-20 con H-22 y H-23, misma que se observa claramente en la Figura 2d.



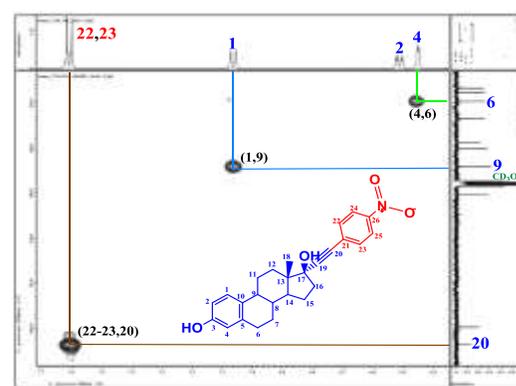
a) Región aromática del espectro ^1H



b) Región aromática del espectro HSQC



c) Región aromática del espectro HMBC



d) Región aromática-alifática del espectro HMBC

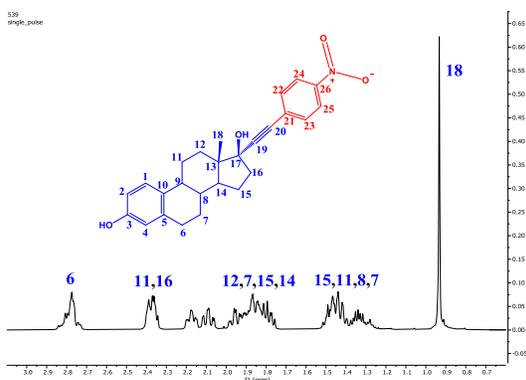
Figura 2. Ampliaciones de la región aromática de los espectros RMN (500 y 126 MHz, CD_3OD) del 17 α -(4-nitrofenil)etnil-estra-1,3,5(10)-triene-3,17 β -diol

Para la parte alifática de la molécula la reconstrucción comenzó a partir de H-1 que correlaciona a tres distancias de

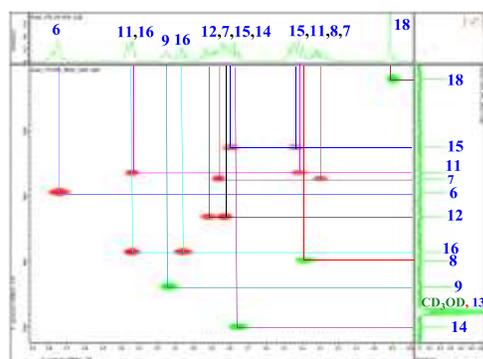
enlace con C-9, y de igual forma la correlación de H-4 con C-6 (Figura 2d). Conforme se fueron asignando las nuevas

señales en el espectro HMBC, estas se registraron tanto en el espectro HSQC como en el de ^1H . Iterativamente se repitió el proceso de asignación de señales en los distintos espectros (Figura 3a, b, c y d) para poder asignar toda la región alifática. A la par se fueron corroborando las señales en el espectro con la secuencia de PENDANT- ^{13}C

(Figura 3e) el cual permitió distinguir entre carbonos cuaternarios y secundarios (señales hacia abajo), así como entre primarios y terciarios (señales hacia arriba); y mediante una ampliación del espectro ^{13}C (Figura 3f) fue posible identificar la señal correspondiente al C-13 que se encontraba traslapada con la señal del CD_3OD .



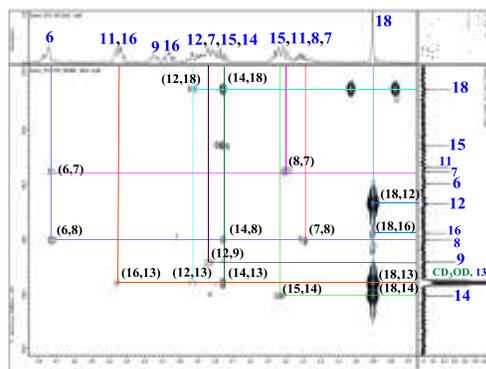
a) Región alifática del espectro ^1H



b) Región alifática del espectro HSQC



c) Región alifática-aromática del espectro HMBC



d) Región alifática del espectro HMBC

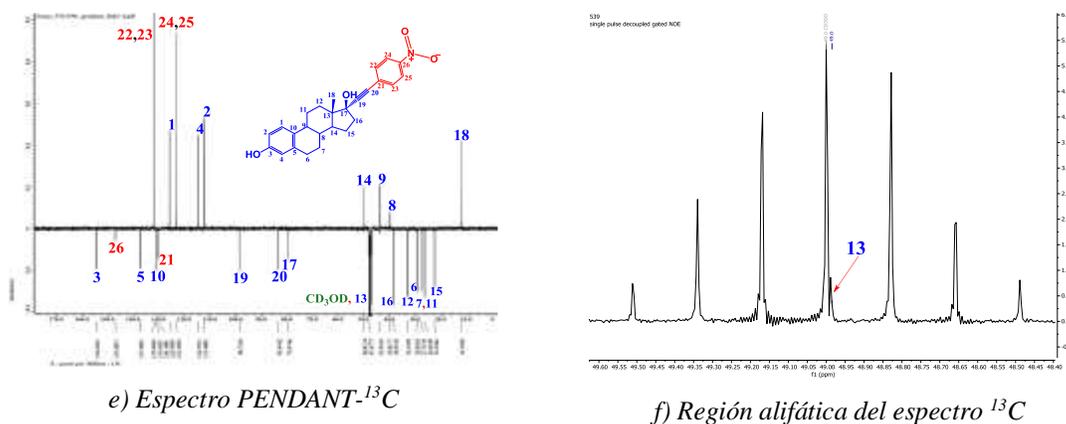
e) Espectro PENDANT- ^{13}C f) Región alifática del espectro ^{13}C

Figura 3. Ampliaciones de la región alifática de los espectros RMN (500 y 126 MHz, CD_3OD) del 17α -(4-nitrofenil)etnil-estra-1,3,5(10)-triene-3,17 β -diol

En la Tabla 1 se muestran los desplazamientos químicos de las señales características y diferenciadas del compuesto obtenido; cabe destacar que los espectros obtenidos a 80 MHz permiten ver claramente los productos de acoplamiento, incluso en los espectros de ^{13}C existe una coincidencia casi exacta

con los desplazamientos obtenidos en el equipo de 500 MHz (Tabla 1).

Además de la asignación de todas las señales esperadas de los núcleos de protón y de carbono, en los espectros de RMN no existen señales adicionales que correspondan a impurezas, evidenciando que al nivel de detección de RMN la muestra es un compuesto puro.

Tabla 1. Desplazamientos químicos de las señales características del 17α -(4-nitrofenil)etnil-estra-1,3,5(10)-triene-3,17 β -diol a 500 MHz en metanol deuterado. (entre paréntesis las correspondientes de ^{13}C a 20 MHz)

Posición	δ_{H} (ppm) (multiplicidad, J en Hz)	δ_{C} (ppm)
1	7.09 (d, J=8.2 Hz)	127.1 (127.2)
2	6.54 (dd, J = 8.5, 2.7 Hz)	113.8 (113.8)
4	6.48 (d, J = 2.7 Hz)	116.0 (116.1)
17	-	80.9 (80.9)
18	0.93 (s)	13.5 (13.5)
19	-	100.1

20	-	84.8
22, 23	7.63 (d, J=9.0 Hz)	133.4 (133.4)
24, 25	8.21 (d, J=9.0 Hz)	124.7 (124.6)
26	-	148.5 (148.4)

Por otro lado, se obtuvo el espectro de masas donde se aprecia el pico con un valor de m/z de 418.2, correspondiente al ión molecular más un hidrógeno, con el cual la molécula adopta la carga positiva y es detectada por el equipo [M+H],

además de otros picos asociados a la pérdida de una molécula de agua [M-H₂O, m/z 400.2], y la carga por complejación de un átomo de Na (m/z, 440.2) (Figura 4).

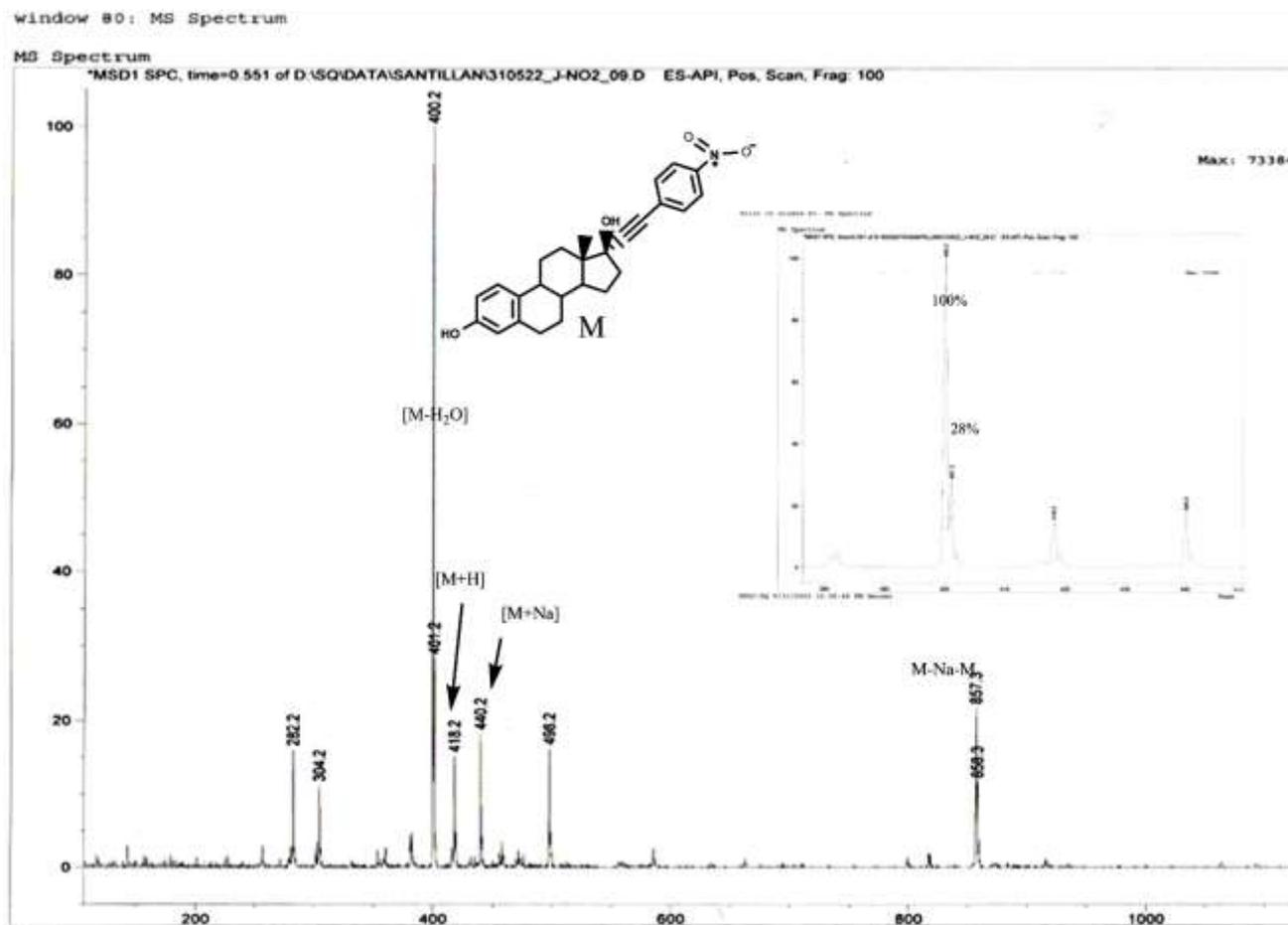


Figura 4. Espectro de masas del 17 α -(4-nitrofenil)etnil-estra-1,3,5(10)-triene-3,17 β -diol

Conclusiones

En este trabajo, se evidencia paso a paso el uso de la resonancia magnética nuclear como una poderosa herramienta espectroscópica no invasiva ni destructiva que permite conocer la estructura de moléculas desconocidas mediante las determinaciones cuantitativas de parámetros moleculares como los desplazamientos químicos, la multiplicidad de las señales, las constantes de acoplamiento y sus relaciones atómicas. La RMN junto con la espectroscopía infrarroja y la espectrometría de masas permitieron la elucidación estructural inequívoca del compuesto tripanocida 17α -(4-nitrofenil)etnil-estra-1,3,5(10)-triene-3,17 β -diol, lo que convierte a estas técnicas en herramientas básicas para la caracterización estructural de cualquier compuesto bioactivo.

Agradecimientos

Elia Donají Juárez Niño agradece al CONACYT por la beca de Maestría y Doctorado en Ciencias No. CVU 1008405. Los autores agradecen al CONACYT (Proyecto INFRA 300802) y al IPN (SIP20210814, y SIP20220864) por el apoyo financiero. Se agradece

especialmente al Doctor Prisciliano Cano Barrita del CIIDIR Oaxaca por las facilidades para adquirir los espectros FTIR y a CINVESTAV Zacatenco por las facilidades para la caracterización en RMN y Masas.

Referencias

- Juárez-Niño, E. D. (2021). *Diseño in silico y obtención de derivados del 17α -etinilestradiol como potenciales antimicrobianos* [Maestría en Ciencias en Conservación y Aprovechamiento de Recursos Naturales]. Instituto Politécnico Nacional.
- Kaliva, M., & Vamvakaki, M. (2020). Nanomaterials characterization. *Polymer Science and Nanotechnology: Fundamentals and Applications*, 401–433. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816806-6.00017-0>
- Mohamed, M. A., Mohd Hir, Z. A., Wan Mokhtar, W. N. A., & Osman, N. S. (2020). Features of metal oxide colloidal nanocrystal characterization. *Colloidal Metal Oxide Nanoparticles*, 83–122. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813357-6.00008-5>

- OMS. (2022). *Resistencia a los antimicrobianos*. Organización de Las Naciones Unidas.
<https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance#:~:text=%C2%BFQu%C3%A9%20son%20los%20antimicrobianos%3F,los%20animales%20y%20las%20plantas>.
- Silverstein, R. M., Webster, F. X., & Kiemle, D. J. (2005). *Spectrometric Identification of Organic Compounds 7th ed* (D. Brennam, J. Yee, P. Kennedy, S. Wolfman-Robichaud, A. Wygal, M. Lesure, S. Rigby, & S. Warner, Eds.; 7th ed.). Jon Wiley & Sons.
- Singh, M. K., & Singh, A. (2022). Nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Characterization of Polymers and Fibres*, 321–339.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823986-5.00011-7>
- Yadav, L. D. S. (2005). *Organic Spectroscopy*. Springer-Science+Business Media, B.V.
<https://doi.org/10.1007/978-1-4020-2575-4>