

**DETERMINACIÓN DE LAS CONSTANTES DE
ACIDEZ DE LA MANGIFERINA Y SU
INTERACCIÓN CON ALGUNOS IONES
METÁLICOS EN MEDIO ACUOSO**

**TESIS QUE PRESENTA LA
Q. BERENICE GÓMEZ ZALET
PARA LA OBTENCIÓN DEL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS**

ASESOR: DR. ALBERTO ROJAS HERNÁNDEZ

SEPTIEMBRE DE 2006



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA—División de Ciencias Básicas e Ingeniería

A mi abuela
– mi espíritu -.
A mi madre
- mi fuerza -.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. José Luis Gázquez M., Dr. Arturo Rojo D., Dr. Sigfrido Escalante T. y a la Dra. Guadalupe Pérez C., revisores de esta tesis quienes con sus sugerencias y comentarios enriquecieron el producto final.

Al Dr. Alberto Rojas H., asesor de este proyecto a quién le debo mi respeto y amor por la química analítica.

A la Dra. Marisol Güizado y al M. en C. Atilano Gutiérrez, por su invaluable ayuda y participación en la parte experimental con RMN.

Al Dr. Rodolfo Gómez, por su colaboración en el estudio teórico.

Al IMP a través del Dr. Isidoro García Cruz por las facilidades para utilizar el programa Accelrys MS 3.0.1 de Accelrys Inc.

A los Dres. Jorge Garza, Rubicelia Vargas, Rosario Moya, Julio Botello, Lourdes Pacheco, Ma. Teresa Ramírez, Laura Gasque y Enrique González, porque de muy diversas maneras se involucraron y ayudaron a que este trabajo llegara a término.

A los que han formado el Área de Química Analítica en la UAM-I, donde se realizó la mayor parte del trabajo experimental.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo financiero otorgado a través de la beca 164695.

En el ámbito personal, vaya mi agradecimiento a las siguientes personas.

A mi familia de sangre.

Memo y Adrián, gracias por permitirme ser parte de sus vidas. A Guillermo, por siempre estar presente.

A mi familia de vida.

Mildred, Jaz, Ale y Marce, porque el destino no es nada si no se comparte el camino.

A los que me han hecho parte de su familia.

Don Miguel Morales y Laura Pérez, así como Mireya y Ana Laura.

A la familia que uno decide conservar, sea de sangre o por extensión.

Vero, Rita, Adrián y Roger junto con sus padres Adrián y Verónica.

A mi familia académica: aquellos profesores que terminan significando mucho más.

Jacqueline y Arturo, siempre estaré en deuda con ustedes, gracias sensei. Nacho y Martín, por la empatía que cohesiona. Y a Rodolfo, por la casualidad que hace amigos.

A Ady, que cabe en todas y en ninguna de las clasificaciones anteriores.

ÍNDICE

ÍNDICE

	PÁGINA
RESUMEN	1
PARTE I INTRODUCCIÓN GENERAL	
CAPÍTULO 1 INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	5
1.1 PRESENTACIÓN	5
1.2 ANTECEDENTES	6
1.3 OBJETIVOS	8
1.4 REFERENCIAS	9
PARTE II MANGIFERINA	
CAPÍTULO 2 CONSTANTES DE ACIDEZ	15
2.1 INTRODUCCIÓN	15
2.2 DESARROLLO EXPERIMENTAL	16
2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	17
2.3.1 Estabilidad	17
2.3.2 Valoraciones espectrofotométricas ácido-base	19
2.3.3 Determinación de las constantes de acidez con el programa SQUAD	22
2.3.4 Evaluación y bondad del ajuste	25
2.4 CONCLUSIONES	28
2.5 REFERENCIAS	29
CAPÍTULO 3 ASIGNACIÓN DE LOS VALORES DE pKa	31
3.1 INTRODUCCIÓN	31
3.2 DESARROLLO EXPERIMENTAL	32
3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
3.3.1 Mangiferina	34
3.3.2 Experimento I: Adición de agua deuterada, D ₂ O	39
3.3.3 Experimento II: Incremento en la alcalinidad del medio	40
3.4 COMPARACIÓN ENTRE LAS CONSTANTES DE ACIDEZ, PARA LA MANGIFERINA, EN H ₂ O Y UNA MEZCLA H ₂ O-DMSO 70/30% (v/v)	45

3.4.1 Comportamiento espectral (UV/Vis) para la mezcla H ₂ O-DMSO (70/30% v/v)	46
3.4.2 Constantes de acidez de la mangiferina en la mezcla H ₂ O-DMSO (70/30% v/v)	47
3.5 CONCLUSIONES	49
3.6 REFERENCIAS	50
CAPÍTULO 4 ESTUDIO QUÍMICO CUÁNTICO DE LA MANGIFERINA	51
4.1 INTRODUCCIÓN	51
4.2 METODOLOGÍA	52
4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	52
4.3.1 Geometría optimizada para la mangiferina	52
4.3.2 Cálculo de la energía para las desprotonaciones de la mangiferina.	55
4.4 CONCLUSIONES	63
4.5 REFERENCIAS	64
PARTE III IONES METÁLICOS-MANGIFERINA	
CAPÍTULO 5 CONSTANTES DE COMPLEJACIÓN	67
5.1 INTRODUCCIÓN	67
5.2 ANTECEDENTES	68
5.3 DESARROLLO EXPERIMENTAL	69
5.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	71
5.4.1 Valoraciones espectrofotométricas.	71
5.4.2 Relaciones molares y variaciones continuas.	74
5.4.3 Estabilidad de los complejos Fe-mangiferina.	76
5.4.4 Determinación de constantes de complejación para Fe(III)-H ₄ (MGF).	81
5.5 ESTUDIO QUÍMICO CUÁNTICO PARA EL COMPLEJO Fe(III)-H ₄ (MGF).	86
5.5.1. Índice Fukui para ataque electrofílico en la mangiferina	87
5.5.2. Geometrías optimizadas y cálculo de la energía para el complejo Fe(III)-H ₄ (MGF).	87
5.6 CONCLUSIONES	91
5.7 REFERENCIAS	92

PARTE IV CONCLUSIONES GENERALES

CAPÍTULO 6 CONCLUSIONES	97
6.1 CONCLUSIONES GENERALES	97
6.2 PERSPECTIVAS	99

PARTE V ANEXOS

ANEXO 1 REACTIVOS Y EQUIPO	103
ANEXO 2 DESCRIPCIÓN DE LOS PROGRAMAS SQUAD, TRIANG, SIBYLA Y MEDUSA	105
A2.1 Descripción del programa SQUAD.	105
A2.2 Descripción del programa TRIANG.	106
A2.3 Descripción del programa SIBYLA	107
A2.4 Descripción del programa MEDUSA	108
A2.5 Referencias	109
ANEXO 3 MÉTODOS Y TÉCNICAS EN RMN	111
A3.1 Antecedentes.	111
A3.2 El método de pulsos en RMN.	112
A3.3 Métodos de RMN 2-D de correlación heteronuclear (H-C) inversa (HSQC;HMBC).	113
A3.4 Referencias	114
ANEXO 4 CALIBRACIÓN DE pH Y DETERMINACIÓN DE LA CONSTANTE DE AUTOPROTÓLISIS PARA LA MEZCLA H₂O-DMSO 70%/30% (v/v).	115
A4.1 Antecedentes	115
A4.2 Experimentación	115
A4.3 Resultados y discusión	116
A4.4 Conclusión	118
A.4.5 Referencias	119
ANEXO 5 ASPECTOS FUNDAMENTALES DE LA TEORÍA DE LOS FUNCIONALES DE LA DENSIDAD.	121
A5.1 Antecedentes	121

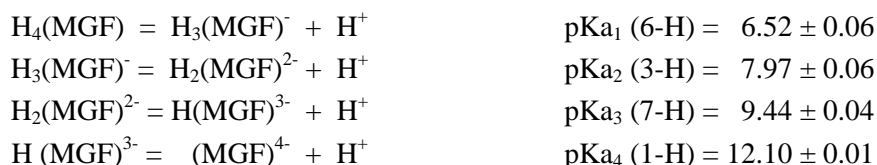
A5.2 Fundamentos de la teoría de los funcionales de la densidad (TDF)	121
A5.3 Aspectos emanados de la teoría de los funcionales de la densidad. Índices de Fukui	124
A5.4 Referencias	128
ANEXO 6 RESULTADOS PRELIMINARES PARA LOS SISTEMAS Al(III) Y Cu(II) CON MANGIFERINA.	129
A6.1 Antecedentes	129
A6.2 Resultados espectrofotométricos.	130
A6.3 Referencias	131

RESUMEN

RESUMEN

En el presente trabajo doctoral fueron determinadas las constantes de acidez de la mangiferina, un xantonioide de origen natural, en solución acuosa mediante espectroscopia UV/Vis utilizando el programa SQUAD como principal herramienta.

Los valores de las constantes de acidez se asignaron experimentalmente utilizando RMN y se realizó un estudio químico teórico, en el marco de la teoría de los funcionales de la densidad, que corrobora dicha asignación. Los valores de las constantes de acidez (pKa) así como su asignación, publicados por vez primera a través del presente trabajo, son los siguientes:



Donde se ha considerado a la mangiferina, $\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{O}_{11}$ como $\text{H}_4(\text{MGF})$.

Fue realizado un estudio espectroscópico UV/Vis de la mangiferina como especie quelante con Fe(III) y Fe(II) que llevó a la determinación de la constante de formación de un complejo Fe(III)-mangiferina con estequiometría 1:1, cuyo $\log \beta = 3.64 \pm 0.05$ fue calculado con SQUAD. Un estudio químico cuántico para el sistema Fe(III)-mangiferina señala la factibilidad de dicho complejo y permite la discusión sobre el sitio más probable de unión entre el ligando y el ion metálico.

Los resultados obtenidos implican un aporte de gran importancia hacia la comprensión de los mecanismos de acción relacionados con las bioactividades observadas para la mangiferina.

Finalmente se desarrolló un estudio preliminar con mangiferina como ligante con Cu(II) y Al(III) mediante espectrofotometría UV/Vis.

PARTE I

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1.1 PRESENTACIÓN

En la actualidad, la utilización de plantas en la búsqueda de nuevas sustancias con actividad farmacológica representa un área de gran interés donde se pueden interrelacionar la medicina, la biología y la química a través de sus diversas ramas que soportan y coadyuvan el trabajo científico [1,2].

Explicar los mecanismos de acción relacionados con la bioactividad de alguna de estas sustancias, además de enriquecer el universo científico, ayuda en la optimización de los procesos farmacéuticos; sin embargo, de manera general, esto resulta ser un camino arduo.

En este sentido, una de las aportaciones de importancia efectuada por el quehacer químico es el conocimiento del comportamiento en solución de las distintas especies en estudio, lo cual implica, desde el punto de vista termodinámico, el conocimiento de las constantes de equilibrio para dicho sistema.

Es por ello que el presente proyecto de investigación se enfocó en la determinación experimental de las constantes de acidez y algunas constantes de complejación, de una sustancia de origen vegetal que se ha relacionado en la actualidad con ciertos efectos farmacológicos: la mangiferina. Para la consecución de los objetivos se utilizaron diversas técnicas espectroscópicas (UV/Vis, RMN de ^1H , ^{13}C y ^{27}Al) así como varios programas computacionales (SQUAD, SIBYLA, MEDUSA y TRIANG).

El trabajo incluye además, un estudio químico cuántico en el marco de la teoría de los funcionales de la densidad cuyos resultados apoyan la asignación de los valores experimentales de pKa.

El conocimiento de estas constantes de equilibrio para la sustancia en cuestión, presentadas por primera vez a través de este trabajo [3], así como el estudio del comportamiento como quelante de la mangiferina con algunos iones metálicos, Fe(III), Fe(II), Al(III) y Cu(II), implica un aporte de gran importancia hacia la comprensión de los mecanismos de acción relacionados con las bioactividades observadas.

1.2 ANTECEDENTES

La 2-β-D-glucopiranosil-1,3,6,7-tetrahidroxixanten-9-ona es una xantona glucosilada ($C_{19}H_{18}O_{11}$, MM= 422 g/mol), figura 1.1, cuyo nombre común es mangiferina, se encuentra principalmente en las raíces, tallos y corteza de la planta del mango, *Mangifera indica* L. de la familia *Anacardiaceae* [4], aunque también en muchas otras plantas mayores, por ejemplo de las familias *Gentianaceae* [5] y *Guttiferae* [6].

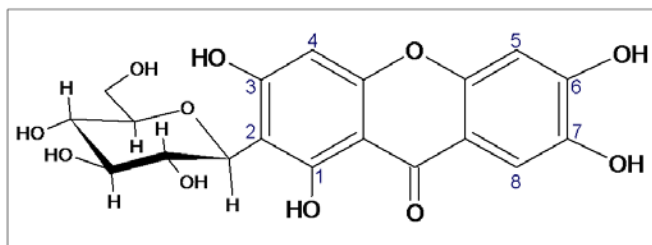


Figura 1.1. Mangiferina ($C_{19}H_{18}O_{11}$)

Estas plantas se han utilizado en muchos casos para tratar distintos padecimientos, como la disentería en Filipinas [7] o para la melancolía y debilidad nerviosa en la India [8]; en general estos tratamientos involucran la preparación de infusiones de acuerdo a la medicina tradicional particular del lugar.

El estudio formal de esta sustancia se remite a finales de los años 50 como un miembro singular, por ser glucosilado, de la familia de los xantonoides [4]; desde los primeros trabajos para su identificación [9-11] hasta los estudios farmacológicos más recientes [12] aparece un vacío en cuanto a su especiación en solución acuosa, no existiendo datos reportados sobre constantes de acidez o de formación de complejos, previos a este trabajo.

En las últimas décadas se han reportado distintos estudios que presentan a la mangiferina como una sustancia con efectos farmacológicos diversos, incluyendo actividades inmunomodulatorias [13] y antioxidantes [14, 15], donde antioxidante se ha definido como “cualquier sustancia que, estando presente a baja concentración comparada con la del sustrato oxidable, disminuye significativamente o previene la oxidación de dicho sustrato” [16]. De igual manera se han establecido actividades antiinflamatorias [17], antidiabéticas [18-21], anticancerígenas [22] y anti-VIH [23] para la mangiferina.

En respuesta al gran impacto que ha tenido con estos efectos, tanto en Sri Lanka como en Cuba existen marcas registradas de fitofármacos, Salaretin® [19] y Vimang® [24] respectivamente, que incluyen a la mangiferina en sus componentes principales, promoviendo y manteniendo el interés por esta sustancia que se traduce en más estudios para entender su funcionamiento [25], entre otras cosas.

Los mecanismos propuestos para entender las bioactividades de la mangiferina se enfocan en su capacidad para proveer protección celular a través de funciones de tipo antioxidante, captador de radicales libres e inmunomodulatorias [26].

En este sentido, varios estudios han mostrado cierta relación entre la formación de complejos de mangiferina con hierro y dichas actividades, donde los complejos se involucran en la cadena del estrés oxidativo y/o en la fase de propagación de la oxidación lipídica (lipoperoxidación) [26-28].

Dichos estudios, hechos en algunos casos desde la perspectiva farmacológica, dejan la puerta abierta hacia la especiación de los supuestos complejos formados dado que no se trabaja en este aspecto; no existen datos reportados sobre las constantes de complejación para mangiferina-hierro.

De esta manera, se propuso el estudio del efecto quelante entre la mangiferina y los iones Fe(II), Fe(III).

Considerando que el Fe(II) es un ácido de comportamiento intermedio mientras que el Fe(III) es un ácido duro, según la clasificación de Pearson [29, 30], se decidió ampliar el estudio para incluir a los iones Cu(II) y Al(III), ácidos intermedio y duro respectivamente, con el fin de comparar ácidos de distinto comportamiento.

Esto bajo la premisa de que la mangiferina, se comportaría como una base de dureza alta que permitirían la formación de los complejos correspondientes; la hipótesis surge de los resultados para la curcumina, otra sustancia de origen natural que presenta valor de dureza global alto, con características antioxidantes y antiinflamatorias semejantes a las de la mangiferina [31].

1.3 OBJETIVOS

Los objetivos generales que se han planteado en este proyecto son los siguientes:

- Determinar y asignar experimentalmente las constantes de acidez de la mangiferina (2- β -D-glucopiranosil-1,3,6,7-tetrahidroxixanten-9-ona) en medio acuoso.
- Estudiar el efecto quelante de la mangiferina con los iones metálicos di y trivalentes Fe(II), Fe(III), Cu(II) y Al(III), en medio acuoso.

Para ello, se ha dividido el trabajo experimental en varias etapas que se resumen a continuación:

- Estudio de la estabilidad del sistema mangiferina-agua.
- Determinación espectroscópica (UV/Vis) de las constantes de acidez de la mangiferina en medio acuoso utilizando el programa computacional SQUAD.
- Asignación de los valores de pKa mediante resonancia magnética nuclear (RMN).
- Estudio químico cuántico de la mangiferina enfocado hacia la determinación de la acidez relativa de los protones de la misma, para apoyar los resultados obtenidos experimentalmente en los puntos anteriores.

- Estudio espectroscópico (UV/Vis) para evidenciar la interacción entre la mangiferina y los iones metálicos Fe(II), Fe(III), Cu(II) y Al(III), en solución acuosa. En su caso, determinar las constantes de formación de los respectivos complejos.
- Estudio químico cuántico sobre los posibles sitios de unión de la mangiferina con el Fe(III).

1.4 REFERENCIAS

- [1] W. Kaim and B. Schwederski. "Bionorganic Chemistry of Life. An Introduction and Guide". Ed. Wiley; NY (1994).
- [2] N.R. Farnsworth. "Screening Plants for New Medicines". *Biodiversity*. pp 83-97. National Academy Press. (1988).
- [3] B Gómez-Zaleta, M.T. Ramírez-Silva, A. Gutiérrez, E. González-Vergara, M. Güizado-Rodríguez, A. Rojas-Hernández. *Spectrochimica Acta Part A*. **64**, 1002-1009 (2006).
- [4] J.C. Roberts. "Naturally Occurring Xanthenes". *Chem. Rev.* **61**, 591 (1961).
- [5] C.N. Lin, C.H. Chang, M. Arisawa, M. Shimizu, N. Morita. "Two New Xanthone Glycosides from *Tripterospermum Lanceolatum*". *Phytochemistry*. **21**, 205-208 (1982).
- [6] M.K. Gerassim and T.N. Paraskev. "Mangiferin and Isomangiferin in some *Hypericum* species". *Biochem. Syst. and Ecology*. **26**, 647-653 (1998).
- [7] E. Quisumbing. "Medicinal Plants of the Philippines". *Katha Publishing Co & JMC Press. Quezon*. 538-541 (1978).
- [8] S.K. Bhattacharya, A.K. Sanyal, S. Ghosal. "Monoamine oxidase-inhibiting activity in mangiferin isolated from *Cassia decussata*". *Naturwissenschaften*. **59**, 651 (1972).
- [9] S. Iseda, *Bull. Chem. Soc. Japan*. **30**, 625 (1957); *Chem. Abstracts*. **52**, 6329 (1958).
- [10] V. K. Bhatia, J.D. Ramanathan, T.R. Seshadri. "Constitution of Mangiferin". *Tetrahedron*. **23**, 1363-1368 (1967).
- [11] P.E. Nott and J.C. Roberts. "A Synthesis of Mangiferin". *Phytochemistry*. **6**, 1597-1599 (1967).

- [12] G.L. Pardo-Andreu, R. Delgado, A.J. Núñez-Sellés, A.E. Vercesi. “Dual mechanism of mangiferin protection against iron-induced damage to 2-deoxyribose and ascorbate oxidation”. *Pharmacological Research*. In press (2006).
- [13] J. Leiro, J.A. Arranz, M. Yáñez, F.M. Ubeira, M.L. Sanmartín, F. Orallo. “Expression profiles of genes involved in the mouse nuclear factor-kappa B signal transduction pathway are modulated by mangiferin”. *International Immunopharmacology*. **4**, 763-778 (2004).
- [14] T. Sato, A. Kawamoto, A. Tamura, Y. Tatsumi, T. Fujii. “Mechanism of Antioxidant Action of Pueraria Glycoside (PG)-1 (an Isoflavonoid) and Mangiferin (a Xanthonoid)”. *Chem. Pharm. Bull.*, **40**, 721 (1992).
- [15] R. Moreira, I.Z. Carlos, W. Vilega. “Release of intermediate reactive hydrogen peroxide by macrophage cells activated by natural products”. *Biol. Pharm. Bull.* **24**, 1-204 (2001).
- [16] B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge. “Role of Free Radicals in biology and medicine”. 3rd ed., Oxford, Oxford University Press. (1999).
- [17] G. Garrido, D. González, C. Deporte, N. Backhouse, G. Quintero. “Analgesic and anti-inflammatory effects of *Mangifera indica* L. extract (Vimang)”. *Phytother Res.* **15**, 18-21 (2001).
- [18] H. Ichiki, T. Miura, M. Kubo, E. Ishihara, Y. Komatsu, K. Tanigawa, M. Okada. “New Antidiabetic Compounds, Mangiferin and its Glucoside”. *Bio. Pharm. Bull.* **21**, 1389-1390 (1998).
- [19] T. Miura, H. Ichiki, N. Hashimoto, M. Kato, M. Kubo, E. Ishihara, Y. Komatsu, M. Okada, T. Ishida, K. Tanigawa. “Antidiabetic activity of a Xanthone compound, mangiferin”. *Phytomedicine*. **8**, 85-87 (2001).
- [20] N. Iwamoto, M. Kato, H. Ichiki, M. Kubo, Y. Komatsu, T. Ishida, M. Okada, K. Tanigawa, K. “The suppressive effect of mangiferin with exercise on blood lipids in type 2 diabetes”. *Biol. Pharm. Bull.* **24**, 1091-1092 (2001).
- [21] S. Muruganandan, K. Srinivasan, S. Gupta, P.K. Gupta, J. Lal. “Effect of mangiferin on hyperglycemia and atherogenicity in streptozotocin diabetic rats”. *Journal of Ethnopharmacology*. **97**, 497-501 (2005).
- [22] N. Yoshimi, K. Matsunaga, M. Katayama, Y. Yamada, T. Kuno, Z. Qiao, A. Hara, J. Yamahara, H. Mori. “The Inhibitory effects of Mangiferin, a Natural Occurring Glucosylxanthone, in Bowel Carcinogenesis of Male F344 rats”. *Cancer Letters*. **163**, 163-170 (2001).
- [23] S. Guha, S. Ghosal, U. Chattopadhyay. “Antitumor, immunomodulatory and anti-HIV effect of mangiferin, a naturally occurring glucosylxanthone”. *Chemotherapy*. **2**, 443-451 (1996).

- [24] A.J. Núñez-Sellés, H.T. Velez, J. Agüero-Agüero, J. González-González, F. Naddeo, F. De Simone, L. Rastelli. "Isolation and quantitative analysis of phenolic antioxidants, free sugars, and polyols from mango (*Mangifera indica* L.) stem bark aqueous decoction used in Cuba as a nutritional supplement". *J. Agric. Food. Chem.* **50**, 762-766 (2002).
- [25] G.L. Pardo-Andreu, D. Junqueira D., R. Delgado, R.A. Cavalheiro, A.C. Santos, A.E. Vercesi, C. Curti. "Vimang (*Mangifera indica* L. extract) induces permeability transition in isolated mitochondria, closely reproducing the effect of mangiferin, Vimang's main component". *Chemico-Biological Interactions.* **159**, 141-148 (2006).
- [26] S. Ghosal and G. Rao. "A plausible chemical mechanism of the bioactivities of mangiferin". *Indian Journal of Chemistry.* **35B**, 561-566 (1996).
- [27] G.L. Pardo-Andreu, R. Delgado, J. Velho, N.M. Inada, C. Curti, A.E. Vercesi. "*Mangifera indica* L. extract (Vimang) inhibits Fe²⁺-citrate-induced lipoperoxidation in isolated rat liver mitochondria". *Pharmacological Reserch.* (2004)
- [28] G.L. Pardo-Andreu, R. Delgado, J. Velho, C. Curti, A.E. Vercesi. "Iron complexing of mangiferin, a naturally occurring glucosylxanthone, inhibits mitochondrial lipid peroxidation induced by Fe²⁺-citrate". *European Journal of Pharmacology.* **513**, 47-55 (2005).
- [29] R.G. Pearson. *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 3533-3539 (1993).
- [30] J.E. Huheey, E.A. Keiter, R.L. Keiter. "Química Inorgánica. Principios de estructura y reactividad". Oxford University Press, Harla; 4ª edición. 365-370 (1997).
- [31] A.S. Cortés. *Tesis*. "Estudio *ab-initio* de anti-inflamatorios naturales y su interacción con Hierro(III)". Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (2003).

PARTE II

MANGIFERINA

La constante de equilibrio, y sus diferentes expresiones dependiendo del sentido fisicoquímico a tratar (K_a , K_c , etc), es el parámetro por excelencia que nos proporciona información sobre las especies involucradas en una reacción química, en nuestro caso particular, una reacción ácido-base en solución acuosa.

En esta segunda parte se presenta la determinación experimental de las constantes de acidez de la mangiferina, la asignación de los valores de pK_a y un estudio químico cuántico que permite la discusión de algunos de los resultados anteriores, desde el punto de vista energético.

CAPÍTULO 2 CONSTANTES DE ACIDEZ

2.1 INTRODUCCIÓN

En la determinación de las constantes de acidez de la mangiferina se realizaron valoraciones espectrofotométricas ácido base.

Dada la complejidad del sistema en cuestión, los trabajos previos de este grupo de investigación [1-3] y el desarrollo innegable de la informática; se utilizaron distintos programas computacionales en este proceso, donde SQUAD [4] fue la principal herramienta.

Los programas TRIANG [1] y SIBYLA [5] son auxiliares para elegir los modelos químicos utilizados en SQUAD y permiten probar la autoconsistencia de éstos; de manera semejante, se hace uso de MEDUSA [6] para calcular los diagramas de distribución de especies correspondientes para los modelos trabajados. Sin embargo, no se ha dejado fuera la aplicación de métodos gráficos tradicionales, en este caso el de altura media, para estimar los valores de pKa.

La descripción de los programas SQUAD, TRIANG, SIBYLA y MEDUSA se presenta en el Anexo 2.

2.2 DESARROLLO EXPERIMENTAL

Para los estudios de espectrofotometría UV/Vis se prepararon soluciones acuosas de mangiferina, H₄(MGF), a la concentración de trabajo elegida de 4.0×10^{-5} M. Todos los experimentos se realizaron por triplicado, a temperatura constante de $25 \pm 0.1^\circ\text{C}$ en un sistema de atmósfera inerte con N₂.

Al preparar la solución de mangiferina se observa baja solubilidad en agua, sin embargo, los coeficientes de absorptividad molar son suficientemente grandes para el estudio espectrofotométrico. Los reactivos, materiales y equipo se presentan en el Anexo 1.

Se realizaron experimentos de estabilidad y valoraciones espectrofotométricas a fuerza iónica variable $\leq 10^{-2}$ M.

Los experimentos de estabilidad se efectuaron a valores de pH ácido, básico y neutro siguiendo el comportamiento espectral en un intervalo de 24 h, mientras que las valoraciones espectrofotométricas tuvieron el siguiente diseño: a una alícuota de H₄(MGF) se le adicionaron volúmenes de HCl o NaOH según fuera el caso, a diferentes concentraciones, de manera que la variación en los valores de pH no fuera mayor a 0.3 unidades, tomando para cada lectura de pH el espectro de absorción correspondiente entre 200 a 750 nm. El intervalo trabajado de pH fue de $1.2 \leq \text{pH} \leq 12.5$.

En el análisis de resultados se han corregido los valores de absorbancia debido a la dilución, aunque ésta se cuida que sea $\leq 10\%$ del volumen total de la solución; los valores de pH se corrigen también, de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$pH_{corr} = pH_{exp} + \left[\frac{pH_{cal} - pH_{exp}}{pH_{cal}} \right] Ef * pH_{exp} \quad \text{Ecuación (1)}$$

Donde pH_{corr} = pH corregido, pH_{exp} = pH medido experimentalmente, pH_{cal} = pH de calibración del electrodo de vidrio, Ef = eficiencia electromotriz del electrodo de vidrio. Esta ecuación es análoga a la descrita por Bates [7] y Westcott [8].

2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.3.1 Estabilidad

El comportamiento espectral de la mangiferina a distintos tiempos después de su preparación, para la solución a pH neutro, se muestra a continuación en la figura 2.1.

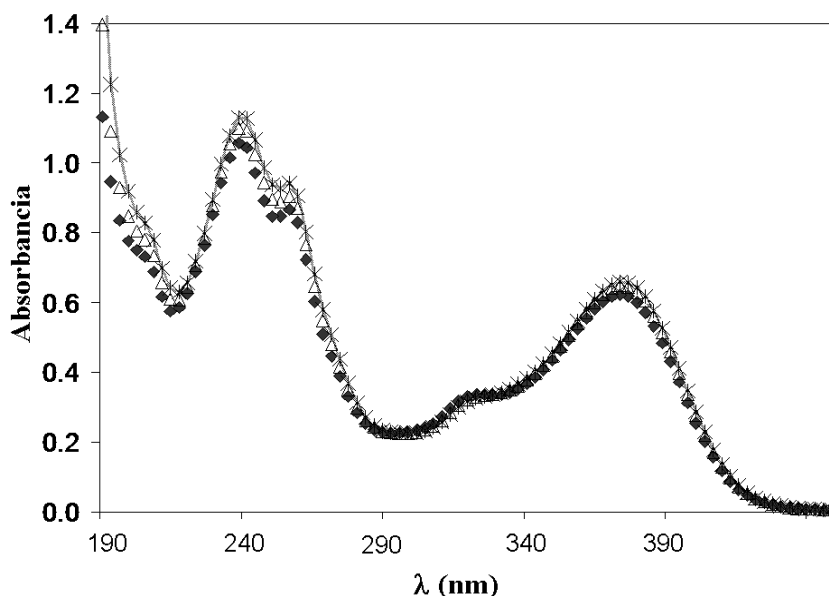


Figura 2.1. Espectros de absorción de mangiferina 4.0×10^{-5} M a diferentes tiempos (minutos), $t = 0.0$ (\blacklozenge), 120 (\blacktriangle), 1080 (*). Intervalo de pH $6.7 \leq \text{pH} \leq 7.2$.

Se puede observar una cierta variación en los espectros de absorción obtenidos. Sin embargo, esto puede ser atribuido al cambio de pH en la solución, remarcando el hecho de que la solución no ha sido amortiguada para evitar posibles interacciones con el sistema regulador.

Para analizar este comportamiento se construyeron las gráficas de pH contra tiempo y absorbancia contra tiempo, para las diferentes longitudes de onda que presentan máximos de absorbancia, λ_{max} ; figuras 2.2a y b.

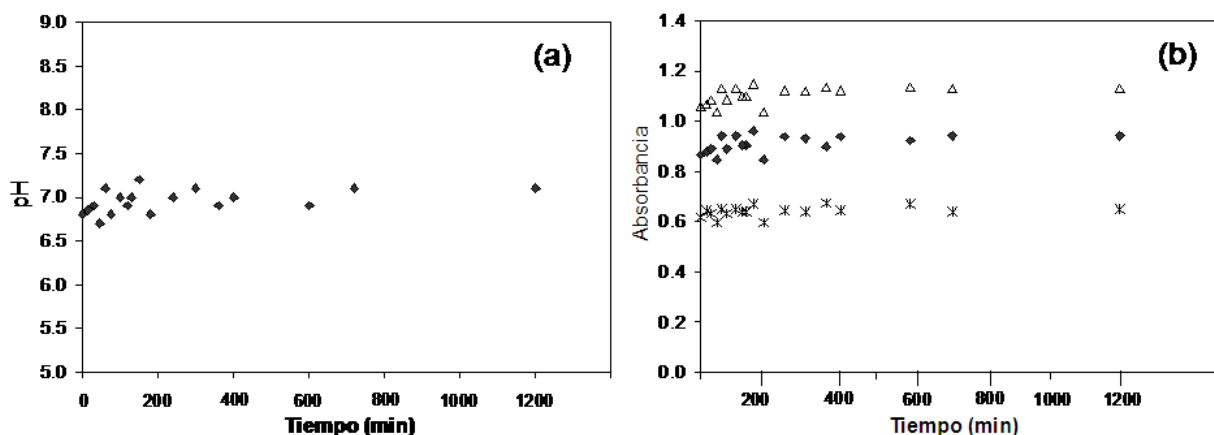


Figura 2.2. (a) pH vs. tiempo (b). Absorbancia vs. tiempo. $\lambda_{\max} = 240 (\Delta)$, $257 (\blacklozenge)$, $371 (*)$, para la solución neutra de mangiferina $4.0 \times 10^{-5} \text{ M}$. $6.7 \leq \text{pH} \leq 7.2$.

En estas gráficas se observa al principio, un aumento en el valor de pH en la solución con su consecuente cambio espectral, después el valor de pH continua fluctuando con una tendencia hacia un valor constante, es decir, tiende a estabilizarse después de cierto tiempo, aproximadamente 6 h.

La mayor fluctuación en la absorbancia se observa durante las cinco primeras horas (300 min) posteriores a la preparación de la solución, y esta fluctuación es menor al 5%. Como consecuencia de este análisis se decidió utilizar soluciones de trabajo después de doce horas de su preparación.

Los resultados de estabilidad correspondientes para las soluciones a pH ácido y básico son semejantes a la solución neutra, mostrando una mayor fluctuación en la solución básica y mucho menor en la solución ácida, con respecto a la neutra (figuras 2.3a y b).

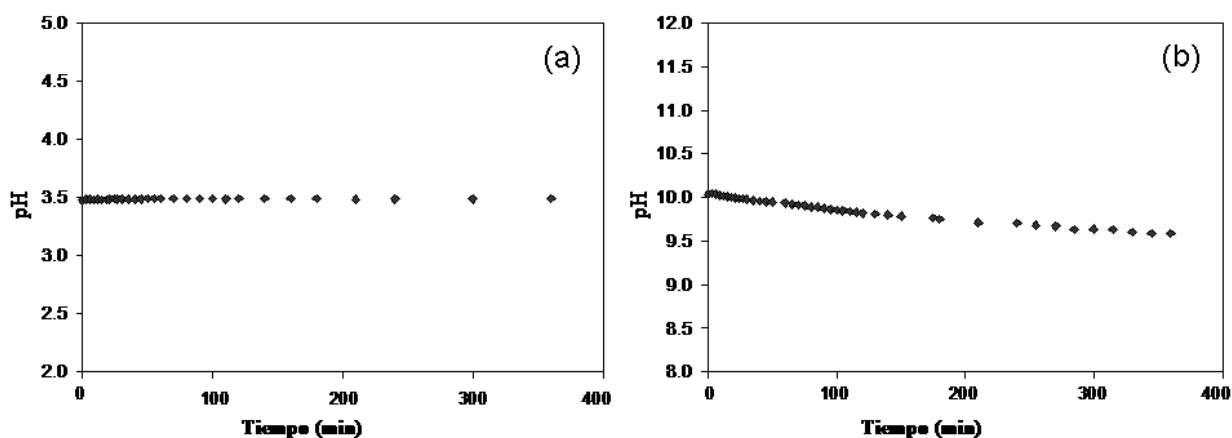


Figura 2.3. pH vs. tiempo, mangiferina $4.0 \times 10^{-5} \text{ M}$;
(a) solución ácida, (b) solución básica.

Sin embargo, la mayor variación en los valores de absorbancia, que corresponde a la solución básica, no excede el 7%. Teniendo en cuenta que en ninguno de los casos se han amortiguado las soluciones, se considera que los cambios espectrales corresponden a los ligeros cambios en pH mientras la solución se estabiliza; con lo cual para efectos del tiempo de análisis en los experimentos a realizar, esto es en las valoraciones ácido-base, se puede considerar que la solución se mantiene estable en estas condiciones de trabajo.

Cabe señalar que la solución almacenada a pH ácido fue probada también a las 24, 48 y 72 h después de su preparación mostrando un comportamiento espectral estable y consistente con el pH, incluso hasta una semana después.

Finalmente se menciona que se efectuó la prueba para azúcares reductores mediante la adición del reactivo de Fehling resultando negativa, lo que nos señala que en la solución de trabajo, el glucósido en la mangiferina no contiene un extremo reductor.

2.3.2 Valoraciones espectrofotométricas ácido-base

Para cada valoración ácido-base se obtuvieron un mínimo de 60 espectros de absorción, algunos de los cuales se muestran en la figura 2.4, con el objeto de mostrar el comportamiento espectral dentro del intervalo de pH de interés.

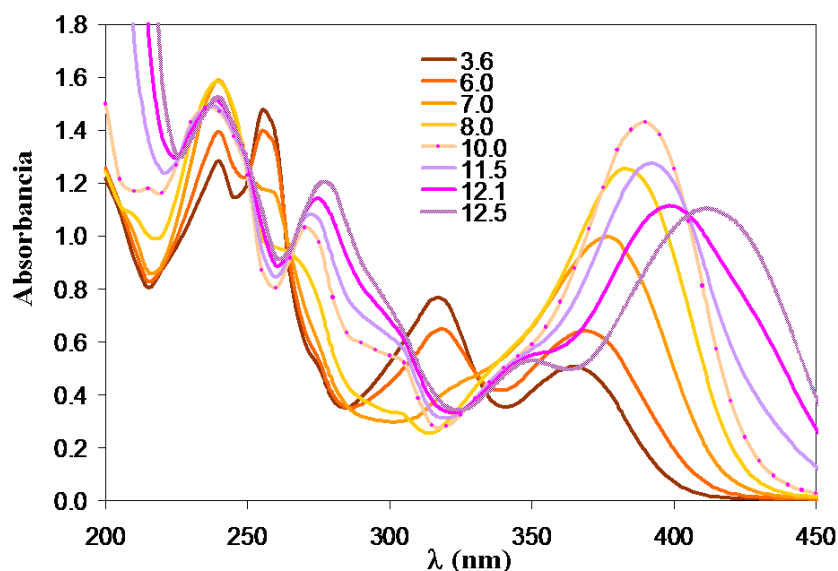


Figura 2.4. Espectros de absorción para la valoración de mangiferina $4.0 \times 10^{-5} \text{M}$, $3.6 \leq \text{pH} \leq 12.5$.

En estos resultados no se observó ningún cambio espectral entre $1.2 \leq \text{pH} \leq 4.0$, además en el intervalo de $500 \text{ nm} \leq \lambda \leq 750 \text{ nm}$ la absorbancia es cero. Se hace notar la presencia de 5 puntos isobásticos en 211, 250, 266, 330 y 405 nm respectivamente y cinco bandas de absorbancia máxima en 240, 257, 271, 317 y 390 nm.

El espectro de absorción a pH ácido está en acuerdo con los reportes previos relativos a la identificación de la mangiferina [9,10] con cuatro bandas principales de absorbancia.

La primera banda a $\lambda_{\text{máx}} = 240 \text{ nm}$ puede ser asignada a transiciones de energía media tipo $\pi \rightarrow \pi^*$ del anillo aromático mientras que la segunda en el intervalo de $\lambda = 230\text{-}260 \text{ nm}$ es debido a transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ por la presencia de la β -dicetona cíclica. La tercera banda menos intensa a $\lambda_{\text{máx}} = 317 \text{ nm}$ se asocia a las transiciones $n \rightarrow \pi^*$ del anillo aromático [11]. La última banda en el intervalo próximo al visible ($\lambda = 360\text{-}450 \text{ nm}$) puede ser asignada a una transferencia de carga intramolecular [12].

A medida que el valor de pH aumenta se observa lo siguiente:

- La primera banda de absorción aumenta en intensidad hasta llegar a un máximo en un valor de $\text{pH} = 7.6$, con un leve efecto hipocrómico posterior, así como un ensanchamiento probablemente provocado por la sobreposición de otra banda.
- Un corrimiento batocrómico en la banda K débil, $\lambda_{\text{máx}}=257 \text{ nm}$, hacia un valor de $\lambda_{\text{máx}}=271 \text{ nm}$ característico de las xantonas 1,3 dihidroxi sustituidas [13].
- Extinción de la tercera banda de absorción.
- Y para la última banda de absorción máxima, otro corrimiento hacia el rojo simultáneo a un efecto hipercrómico hasta llegar a un máximo en 390 nm y a un valor de $\text{pH} = 9.7$, seguido de un decrecimiento en la intensidad conforme el corrimiento batocrómico se mantiene; este corrimiento también es característico de la familia de las xantonas sustituidas [14].

Los cambios de la absorbancia con respecto al pH, a partir de los resultados espectrales obtenidos, para las bandas principales de absorbancia máxima, se muestran en la figura 2.5.

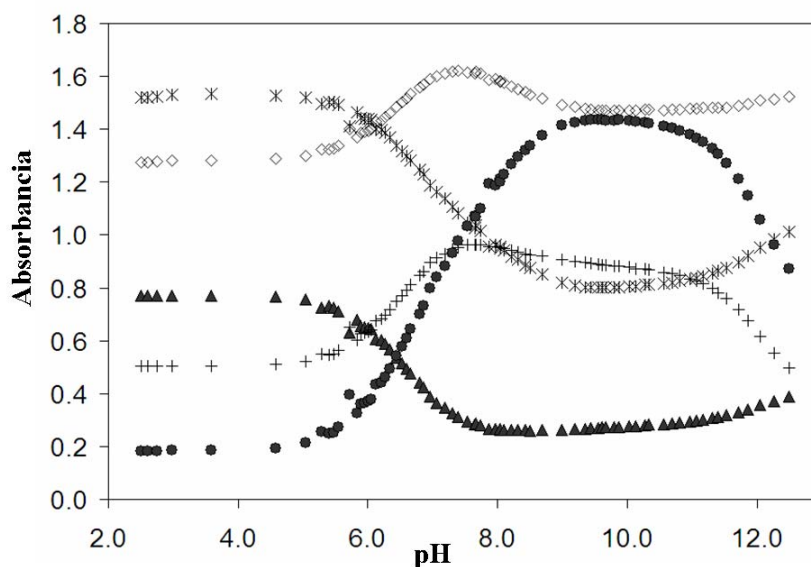


Figura 2.5. Absorbancia vs. pH a partir de la valoración de mangiferina $4.0 \times 10^{-5} \text{ M}$.
 $\lambda_{\text{máx}} = 240(\diamond), 257(*), 317(\Delta), 365(+), 390(\bullet) \text{ nm}$.

La gráfica construida de absorbancia contra pH muestra varios cruces entre las curvas de las principales bandas de absorción, lo cual, junto con los puntos isobésticos observados, es indicativo de la presencia de varios equilibrios ácido-base para la mangiferina en estas condiciones.

De manera gráfica se hicieron estimaciones de algunos de los valores de pKa, utilizando el método de altura media, obteniéndose por ejemplo un valor de pKa = 6.6, para $\lambda_{\text{max}} = 365\text{nm}$ en el intervalo de $4.0 \leq \text{pH} \leq 8.0$.

2.3.3 Determinación de las constantes de acidez con el programa SQUAD

Con los resultados espectrofotométricos y los valores de pH correspondientes se alimenta el programa computacional SQUAD para el refinamiento de las constantes de acidez.

Se utilizaron 48 puntos de absorbancia en el intervalo de 220 a 455 nm, cada 5 nm, para cada uno de los 24 valores de pH escogidos entre $4.60 \leq \text{pH} \leq 12.50$ donde se consideró que se tiene la mayor información espectral del sistema.

El programa SQUAD varía las constantes del modelo químico seleccionado hasta encontrar el mejor ajuste de acuerdo a los parámetros propios del programa los cuales son: la desviación estándar sobre la constante, desviación estándar total sobre las constantes y la suma de cuadrados de las absorbancias calculadas.

Los valores para las constantes de equilibrio global, $\log\beta$, obtenidas con SQUAD para varios modelos químicos se muestran en la tabla 2.1. Recordar que $\beta_1 = K_1$, $\beta_2 = K_1K_2$, $\beta_3 = K_1K_2K_3$, etc, dado que K_n es una constante de equilibrio sucesivo y K_a se refiere al equilibrio de disociación ácida.

Cabe señalar que no se encontró convergencia adecuada para modelos de cinco o más equilibrios.

Tabla 2.1. Constantes de formación de la mangiferina determinados para diferentes modelos químicos con el programa SQUAD.

Modelo: equilibrio químico	$\log \beta$	σ_{const}	σ_{tot}	U
I				
$\text{H}_3(\text{MGF})^- + \text{H}^+ = \text{H}_4(\text{MGF})$	$\log \beta_1=7.27$	0.02	5.02×10^{-2}	2.66
II				
$\text{H}_2(\text{MGF})^{2-} + \text{H}^+ = \text{H}_3(\text{MGF})^-$	$\log \beta_1=10.72$	0.10	6.690×10^{-3}	2.57×10^{-2}
$\text{H}_2(\text{MGF})^{2-} + 2\text{H}^+ = \text{H}_4(\text{MGF})$	$\log \beta_2=19.60$	0.10		
III				
$\text{H}(\text{MGF})^{3-} + \text{H}^+ = \text{H}_2(\text{MGF})^{2-}$	$\log \beta_1=10.30$	0.2	1.5×10^{-2}	1.3×10^{-1}
$\text{H}(\text{MGF})^{3-} + 2\text{H}^+ = \text{H}_3(\text{MGF})^-$	$\log \beta_2=18.60$	0.2		
$\text{H}(\text{MGF})^{3-} + 3\text{H}^+ = \text{H}_4(\text{MGF})$	$\log \beta_3=25.30$	0.2		
IV				
$(\text{MGF})^{4-} + \text{H}^+ = \text{H}(\text{MGF})^{3-}$	$\log \beta_1=12.10$	0.02	4.92×10^{-3}	2.20×10^{-2}
$(\text{MGF})^{4-} + 2\text{H}^+ = \text{H}_2(\text{MGF})^{2-}$	$\log \beta_2=21.54$	0.04		
$(\text{MGF})^{4-} + 3\text{H}^+ = \text{H}_3(\text{MGF})^-$	$\log \beta_3=29.51$	0.05		
$(\text{MGF})^{4-} + 4\text{H}^+ = \text{H}_4(\text{MGF})$	$\log \beta_4=36.03$	0.05		

σ_{const} = desviación estándar sobre la constante; σ_{tot} =desviación estándar total sobre las constantes;
U= suma de cuadrados de las absorbancias calculadas.

De la tabla se observa que el mejor ajuste corresponde al modelo IV, el cual supone cuatro equilibrios ácido-base de la molécula.

Si consideramos que en la estructura de la mangiferina (figura 1.1) existen ocho grupos hidroxilo, cuatro de ellos unidos en el sistema glucopiranosilo y los otros cuatro directamente a la estructura xantonóide, es de esperarse una acidez mucho menor para los primeros con respecto a los segundos, lo que nos lleva a inferir que los equilibrios del modelo IV se relacionarían con los protones fenólicos, es decir, los protones de OH en las posiciones 1, 3, 6 y 7 de la mangiferina.

Para continuar con el análisis de este modelo, se realizó una estimación de los valores de las constantes de disociación (pKa) con el programa ACD/pKa DB versión 5 (Advanced Chemistry Development, Inc., Toronto ON, Canada, www.acdlabs.com, 2003). Este software calcula los valores de pKa comparando los segmentos, estructuras o grupos semejantes para una molécula dada con su base de datos.

Para la mangiferina, dio como resultado las ocho desprotonaciones discutidas anteriormente, señalando valores de pKa mayores a 13.3 para los protones de OH glucosídicos.

La comparación entre los valores obtenidos experimentalmente y estimados con ACD/pKa DB se presenta en la tabla 2.2 (se han omitido los correspondientes a los OH glucosídicos).

Tabla 2.2. Valores de pKa para la mangiferina.

Equilibrio	Experimentales*	ACD
$H_4(MGF) = H_3(MGF)^- + H^+$	$pK_{a1} = 6.52 \pm 0.06$	6.04 ± 0.2
$H_3(MGF)^- = H_2(MGF)^{2-} + H^+$	$pK_{a2} = 7.97 \pm 0.06$	7.14 ± 0.2
$H_2(MGF)^{2-} = H(MGF)^{3-} + H^+$	$pK_{a3} = 9.44 \pm 0.04$	7.51 ± 0.2
$H(MGF)^{3-} = (MGF)^{4-} + H^+$	$pK_{a4} = 12.10 \pm 0.02$	11.92 ± 0.2

* Los valores de pKa fueron estimados como la diferencia entre los valores sucesivos de $\log\beta$, mientras que la incertidumbre se calculó de la manera usual.

Los primeros dos valores de pKa en ambos métodos son similares, pero significativamente diferentes para los dos últimos. Esto puede verse como parte de las dificultades inherentes en ACD/pKa DB cuando la estructura problema es más complicada, la información puede ser insuficiente dado que no se están considerando otros efectos de importancia, como la conjugación en el sistema o la formación de puentes de hidrógeno intramolecular.

Por ejemplo, la estimación arroja como resultado prácticamente el mismo valor para el pK_{a2} y pK_{a3} porque provienen de la desprotonación de grupos fenólicos que considera equivalentes. Esto es, el programa asigna el primer pKa al protón hidroxilo en la posición 1, implicando la formación del ion enolato, y dado que los OH en 6 y 7 son sustituyentes del mismo anillo, en las posiciones 3 y 6 quedarían protones de tipo fenólico, ambos con sustituciones en *orto*, por lo que en principio no se diferencian entre sí; de esta manera, la segunda y tercera desprotonación se estiman con el mismo valor para las posiciones 3 y 6.

En este sentido se evidencia la desventaja en la estimación con respecto a la determinación experimental.

2.3.4 Evaluación y bondad del ajuste

Con los resultados obtenidos con SQUAD, correspondientes al modelo IV, se construye el diagrama de distribución utilizando el programa MEDUSA (figura 2.6).

El diagrama muestra que la especie completamente protonada, $H_4(MGF)$, puede predominar en un intervalo amplio de pH, prácticamente en toda la zona ácida, mientras que el resto de las especies desprotonadas van sucediéndose en la zona básica de la escala de pH.

De hecho, esto es lo que se observa experimentalmente en la solución como un cambio de color, a través del intervalo de pH: en la zona ácida la solución es prácticamente transparente y se va tornando hacia el amarillo conforme nos movemos hacia la zona alcalina, desde un tono amarillo muy tenue alrededor de un valor de $pH=6.0$ hasta llegar a un amarillo-naranja intenso por arriba de un valor de $pH=12.0$.

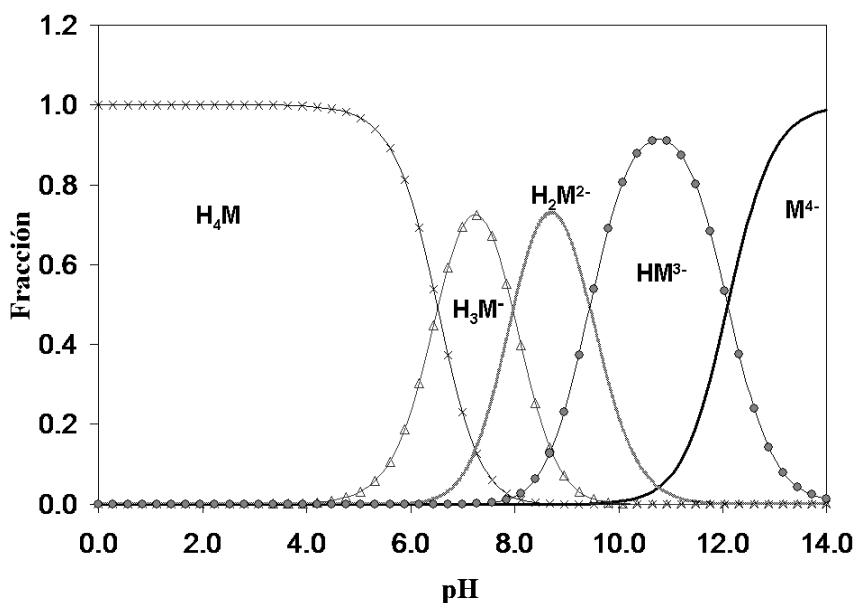


Figura 2.6. Diagrama de distribución calculado con MEDUSA a partir de resultados con SQUAD. $H_4(MGF) = 4.0 \times 10^{-5} M$. Se ha abreviado $M = (MGF)$.

Con los valores de $\log\beta$ y los coeficientes de absortividad molar obtenidos con SQUAD se construyen espectros simulados y se comparan con los experimentales con la intención de probar la auto consistencia del modelo, esto es si el modelo es capaz de reproducir congruentemente los datos experimentales. El programa MEDUSA ayuda en la construcción de los espectros simulados al proporcionar las fracciones molares para cada una de las especies y para cada valor de pH. En la figura 2.7 se presentan algunas de estas comparaciones.

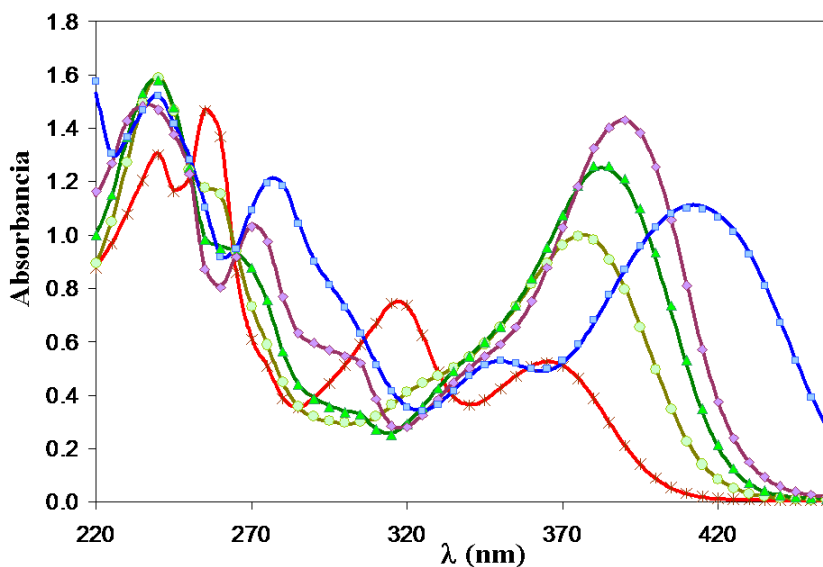


Figura 2.7. Espectros de absorción construidos con los resultados de SQUAD para pH =5.0, 7.0, 8.0, 10.0 y 12.5: Líneas sólidas. Espectros experimentales para pH = 5.1 (*), 7.0 (●), 8.0 (Δ), 10.0 (◇) y 12.5 (□).

Como puede verse, los espectros de absorción experimentales y los construidos son prácticamente superponibles, lo que nos señala la bondad del ajuste.

De manera semejante, se pueden comparar los coeficientes de absortividad molar. En la figura 2.8 se muestran los calculados por SQUAD.

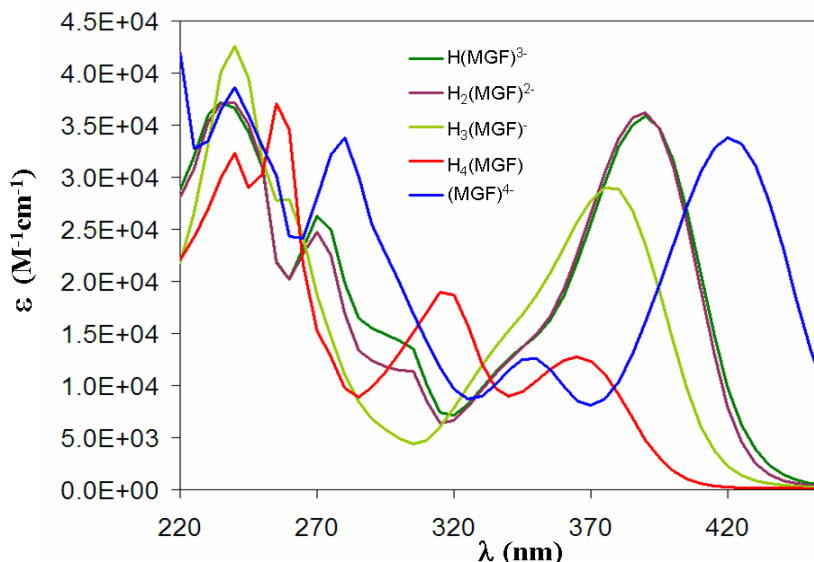


Figura 2.8. Coeficientes de absorptividad molar calculados por SQUAD para $H_4(MGF)$ 4.0×10^{-5} M.

Por otra parte, se confirma además el número de especies presentes en el sistema, dado que estos resultados son consistentes con lo calculado por los programas TRIANG y SIBYLA: a partir de la misma información experimental utilizada en SQUAD, se calculan cinco especies absorbentes para un $\Delta T = 0.003$ con TRIANG, donde $\Delta T =$ error en las lecturas de transmitancia, y cinco factores con una desviación estándar de 0.003 para SIBILA, donde los factores se traducen como especies absorbentes en el sistema (Anexo 2).

Adicionalmente, la incertidumbre relativa calculada para los coeficientes de absorptividad molar resulta en un valor máximo de 2.2% para los coeficientes con valores $>10^4$ y un máximo del 6.3% para aquellos de segundo orden.

Cabe señalar que las afirmaciones hechas hasta el momento consideran al menos, las tres repeticiones independientes del experimento y los mejores ajustes para cada repetición.

Con todo lo anterior se ha verificado la autoconsistencia del modelo evaluado y se confirma la buena calidad de los resultados obtenidos al mejor ajuste con SQUAD.

2.4 CONCLUSIONES

Los estudios con espectroscopía UV/Vis han servido para presentar, por primera vez, las constantes de acidez para la xantona glucosilada mangiferina.

La evidencia espectral ha sido consistente con los resultados obtenidos a través del programa SQUAD desde diversos puntos de vista.

Así mismo, los resultados fueron evaluados mostrando su calidad y la autoconsistencia en el modelo utilizado.

Este modelo supone la existencia de cuatro equilibrios de formación con los que se calculan los valores correspondientes de pKa que se muestran a continuación.

Valores de pKa para la mangiferina			
Equilibrio			
$H_4(MGF)$	$= H_3(MGF)^- + H^+$	$pK_{a1} =$	6.52 ± 0.06
$H_3(MGF)^-$	$= H_2(MGF)^{2-} + H^+$	$pK_{a2} =$	7.97 ± 0.06
$H_2(MGF)^{2-}$	$= H(MGF)^{3-} + H^+$	$pK_{a3} =$	9.44 ± 0.04
$H(MGF)^{3-}$	$= (MGF)^{4-} + H^+$	$pK_{a4} =$	12.10 ± 0.02

2.5 REFERENCIAS

- [1] A. Morales. *Tesis* “Estudio de sistemas químicos multirreaccionantes en soluciones acuosas por métodos espectrofotométricos con el programa computacional SQUAD y otros métodos computacionales”. Fac. Estudios Superiores de Cuautitlan, UNAM. (1993).
- [2] P. Salinas-Hernández, A. Rojas-Hernández, M.T. Ramírez-Silva. *Spectrochimica Acta Part A.: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, **59**, 2667 (2003).
- [3] M.R. Moya-Hernández, S. Mederos, A. Domínguez, A. Orlandini, C. Ghilardi, F. Cecconi, E. González-Vergara, A. Rojas-Hernández. *Journal of Inorganic Biochemistry*. **95**, 131 (2003).
- [4] D. Legget. “Computational Methods for the Determination of Formation Constants”, first ed., Plenum Press, New York, 1985.
- [5] J. Havel, L. Jančář. *Scripta*. **20**, 295 (1990).
- [6] Make Equilibrium Diagrams Using Sophisticated Algorithms (MEDUSA); 2004 Puigdomenech Ignasi. www.kemi.kth.se/medusa
- [7] R.G. Bates. “Determination of pH”, 2nd ed., John Wiley and Sons, (1973).
- [8] C.C. Westcott, “pH Measurements”, Academic Press, (1978).
- [9] S. Iseda. *Bull. Chem. Soc. Japan*. **30** (1957) 625; *Chem. Abstracts*. **52**, 6329 (1958).
- [10] S. Ghosal, G. Rao. *Indian J. Chem.* **35B**, 561-566 (1998).
- [11] R.M. Silverstein, B.G. Clayton, T.C. Morrill. “Spectrometric Identification of Organic Compounds”, 2nd. ed., Wiley Int. New York, 1967.
- [12] R.M. Issa, S.A. El-Daly, N.A. El-Wakiel. “UV/Vis, IR and ¹H NMR spectroscopic studies of bisazo-dianil compounds based on 5-(2-carboxyphenyl azo)-salicylaldehyde and primary diamines”. *Spectrochim. Acta, Part. A*. **59**, 723 (2003).
- [13] M.A.A Lins, C. De Barros, O.R. Gottlieb, M.M Taveira. “Methods for the Structural Investigation of Xanthenes; Part II. Location of Hydroxyl Groups by Ultraviolet and Visible Spectroscopy”. *Anal. Chim. Acta.*, **42**, 311 (1968).
- [14] J.C. Roberts. “Naturally Occurring Xanthenes”. *Chem. Rev.* **61**, 591 (1961).

CAPÍTULO 3 ASIGNACIÓN DE LOS VALORES DE pKa

3.1 INTRODUCCIÓN

La asignación completa de los valores de pKa no siempre resulta un trabajo sencillo, sobre todo cuando se trata de moléculas polipróticas con grupos funcionales semejantes, como fenoles en este caso.

Comenzando con la estimación hecha por ACDpKa DB, ésta asigna los valores de pKa, de acuerdo a la tabla 2.2 presentada en el capítulo anterior página 22, de la siguiente manera: pKa₁= 1-HO; pKa₂= 6-HO; pKa₃= 3-HO y pKa₄= 7-HO, según la acidez esperada por las posiciones de los grupos fenol recordando la nomenclatura utilizada para la estructura semidesarrollada de la mangiferina que se presenta en la figura 3.1. A su vez, 1-HO es la nomenclatura utilizada en RMN esto es, la posición seguida del átomo cuyo núcleo es responsable del efecto de resonancia, en este caso se eligió la del protón.

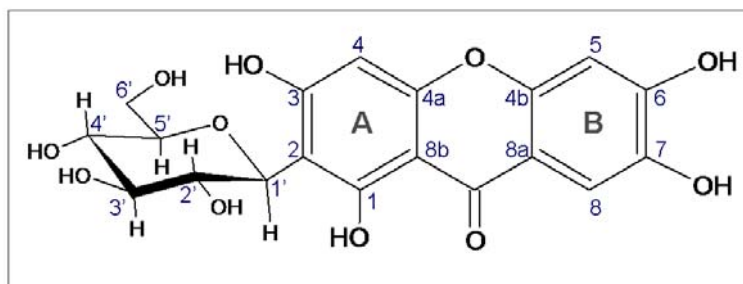


Figura 3.1. Estructura de la mangiferina, H₄(MGF)

Sin embargo, Roberts [1] en su revisión, nos habla de la baja reactividad del grupo carbonilo en la familia de los xantonoides con los reactivos que generalmente reaccionaría; indicando además, que el grupo hidroxilo en la posición 1 es el más difícil de metilar, comparado con las otras posiciones. Un grupo hidroxilo en las posiciones 3 o 6, es más ácido que uno en 2 o 7, de ahí la preferencia a la metilación por las primeras posiciones.

Esta misma situación aparece en los estudios hechos por el grupo de Lins [2], donde señala la mayor acidez del grupo hidroxilo en 3 (o su equivalente en 6) para xantonoides mono y di sustituidos.

Considerando esta discrepancia y dado que no existe mayor información sobre el comportamiento ácido de los grupos hidroxilo para la mangiferina, o ningún otro xantonoide tetrahidroxi sustituido, se propuso un estudio de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) para elucidar la asignación de los valores de pKa.

Finalmente, dado que los experimentos de RMN se realizaron utilizando DMSO como solvente, se presenta un estudio comparativo entre los valores de pKa obtenidos con espectrofotometría UV/Vis en agua (ver capítulo 2) y en una mezcla H₂O-DMSO al 70/30% (v/v) para la mangiferina.

3.2 DESARROLLO EXPERIMENTAL

En principio, la técnica de RMN de protón nos permitiría ver los cambios en el desplazamiento químico de los protones hidroxílicos al cambiar el valor de pH en una solución acuosa y de esta manera señalar la acidez relativa entre ellos que llevaría finalmente a la asignación de los valores de pKa, pero hubo que adecuar la experimentación debido a dos factores importantes.

Primero, los protones fenólicos por estar unidos directamente a un átomo de oxígeno, tienen un tiempo de relajación mayor con respecto a protones unidos a otros grupos, como los aromáticos por ejemplo, lo que da como resultado, señales anchas y de baja intensidad que pueden sobreponerse fácilmente entre sí, como consecuencia, no es posible resolver adecuadamente dichas señales, en estas condiciones de trabajo, para conseguir el objetivo buscado.

En este sentido, se propuso ver los cambios entre los protones fenólicos de manera indirecta, siguiendo los cambios en el desplazamiento químico de los protones aromáticos, en las posiciones 4, 5 y 8; así como también por medio de la técnica de ^{13}C podrían verse los cambios relativos para los carbonos tanto aromáticos (4-C, 5-C y 8-C) como aquéllos en los que se encuentran unidos directamente los grupos hidroxílicos (1-C, 3-C, 6-C y 7-C).

Segundo, debido a la baja abundancia relativa del isótopo ^{13}C que provoca la necesidad de muestras de mayor concentración o en su defecto, enriquecidas con ^{13}C , lo que en el caso de un producto natural como la mangiferina resulta mucho más difícil, y dada la baja solubilidad de la mangiferina en agua, el disolvente utilizado en estos experimentos fue DMSO- d_6 .

De esta manera, se desarrollaron dos experimentos independientes donde las soluciones iniciales se prepararon con 30 mg de mangiferina en 0.5 ml de solvente, 0.14 M aproximadamente, en tubos de prueba de 5 mm. Un espectrómetro Bruker AMX 500 a 25°C se utilizó en todos los espectros obtenidos.

Partiendo de soluciones de mangiferina al valor de pH que toma la disolución y a la concentración de trabajo se realizaron los siguientes experimentos:

- I. Se agrega agua deuterada, D_2O .
- II. Se incrementa la alcalinidad del medio en cuatro pasos mediante adiciones de NaOH.

En ambos casos se tomaron los espectros unidimensionales de ^1H RMN. Para el segundo inciso se tomaron además espectros unidimensionales de ^{13}C , bidimensionales de correlación $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ utilizando los métodos (g)-HSQC y (g)-HMBC, así como DEPT(90) y DEPT(135) en algunos casos[3].

En el anexo 3 se hace una descripción general de los métodos utilizados.

3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.3.1 Mangiferina

El análisis espectral inequívoco de la solución inicial de mangiferina es fundamental dado que significa la identificación estructural de la molécula y representa la base para los cambios esperados en el desplazamiento químico (δ) en los experimentos planteados.

En la asignación de las señales se aplican las reglas conocidas para el desplazamiento químico debido a diferentes sustituyentes [4], la comparación con espectros previamente reportados [5] y la información obtenida propiamente a través de los diferentes métodos utilizados [3] en dichos experimentos.

La elucidación de la estructura comienza con el análisis del espectro de protón continuando con el de carbono, donde se utilizan además el método DEPT con secuencias de pulsos a 90° y 135° para identificar los carbonos primarios, secundarios y terciarios; finalizando con los métodos de correlación $^1\text{H}/^{13}\text{C}$. Los resultados obtenidos se muestran a continuación.

Con el espectro de ^1H RMN, figura 3.2, se identifican las señales de los 18 protones, de los cuales ocho corresponden a hidroxilos, tres aromáticos y siete glucosídicos.

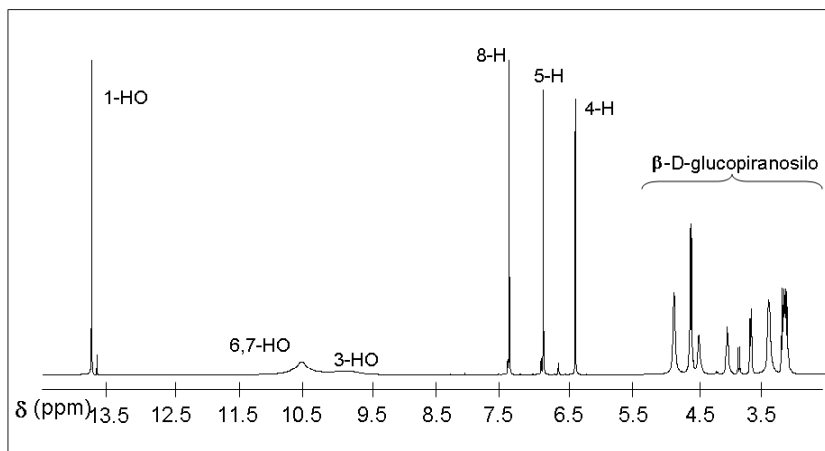


Figura 3.2. Espectro de ^1H -RMN para $\text{H}_4(\text{MGF})$ 0.14 M aprox, en DMSO-d_6 .

Lo primero que se observa es que el espectro de ^1H RMN muestra una gran diferencia entre la señal del 1-HO con respecto a los otros tres protones fenólicos 6-HO, 7-HO y 3-HO, que presentan el ensanchamiento y baja intensidad propios de los protones hidroxílicos [6]. Esta diferencia podría explicarse bajo la suposición de la formación de un puente de hidrógeno entre el oxígeno del grupo carbonilo y el protón del OH en 1-C.

Un protón enólico con este tipo de señal que aparece desplazada a campos más bajos de lo esperado en β -dicetonas, ha sido una de las pruebas que Gilli y colaboradores [7] han estudiado para proponer el modelo que denominan de resonancia asistida por la formación de un puente de hidrógeno, RAHB por sus siglas en inglés.

Dicho modelo supone la formación de un pseudoanillo de seis miembros con la formación del puente de hidrógeno que permite la resonancia de los electrones π , figura 3.3, lo que le confiere a la estructura mayor estabilidad y hace del puente de hidrógeno un enlace más fuerte con respecto a otros como en HF-HF o incluso $\text{H}_2\text{O}-\text{H}_2\text{O}$.

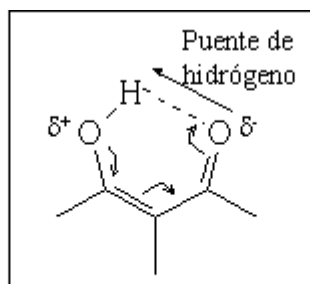


Figura 3.4. Esquema del modelo RAHB (tomado de Gilli et al, *J. Am. Chem. Soc.*, 111, 1989)

Continuando con el espectro de ^1H RMN, las señales de los tres protones aromáticos 4-H, 5-H y 8-H se ven claramente definidos, como los singuletes esperados, en el intervalo de 6.37 a 7.38 ppm. Mientras que los cuatro protones de los grupos OH y los otros 7 protones, correspondientes a la estructura glucosídica, dan señales más complicadas a campo alto que son congruentes con los acoplamientos esperados para una estructura β -D-piranososa [4].

La asignación completa para el espectro de ^1H RMN es la siguiente, (δ): 13.76 (s, 1H, 1-HO), 10.55 (s, 2H, 6,7-HO), 9.86 (s, 1H, 3-HO), 4.86 (s, 2H, 3',4'-HO), 4.49 (s, 1H, 6'-HO), 3.87 (d, 1H, 2'-HO), 7.38 (s, 1H, 8-H), 6.86 (s, 1H, 5-H), 6.37 (s, 1H, 4-H), 4.60 (d, $3J_{\text{H}1'}/\text{H}2' = 9.52\text{Hz}$, 1H, 1'-H), 4.05 (t, $3J_{\text{H}2'}/\text{H}3' = 9.23\text{Hz}$, 1H, 2'-H), 3.69 (d, $3J_{\text{H}6'}/\text{H}5' = 2.55\text{Hz}$, 1H, 6'-H), 3.41 (dd, $3J_{\text{H}6''}/\text{H}5' = 5.22\text{Hz}$, 1H, 6''-H), 3.18 (m, $3J_{\text{H}3'}/\text{H}4' = 9.19\text{Hz}$, $J_{\text{H}4'}/\text{H}5' = 9.17\text{Hz}$, 3H, 3', 4', 5'-H).

En la figura 3.4 se presenta el espectro de ^{13}C para la misma solución.

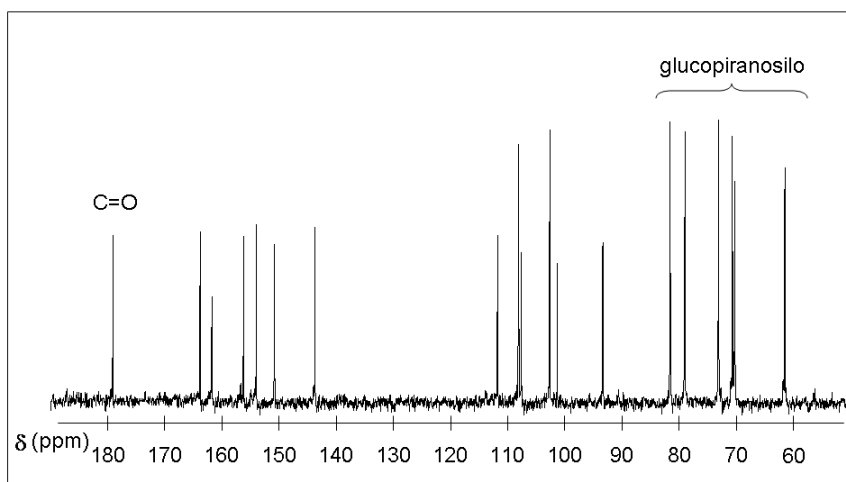


Figura 3.4. Espectro de ^{13}C -RMN para $\text{H}_4(\text{MGF})$ 0.14 M aprox, en DMSO-d_6 .

En este espectro se tiene claramente sólo una señal con el desplazamiento químico asociado a carbono del grupo carbonilo, la que aparece a campo más bajo, lo cual es congruente para la estructura de mangiferina completamente protonada.

También pueden observarse tres grupos de señales; las correspondientes a los carbonos del grupo piranosil por ser de un anillo no aromático aparecen a campo alto entre 60.5 y 81.1ppm, después aparecen dos grupos separados, de 92.0 a 112.0 ppm el primero y de 141.0 a 165.0 ppm el segundo, que no pueden ser tan fácilmente identificados ya que se tienen tanto carbonos cuaternarios como fenólicos y que lleva a buscar el apoyo de otros métodos, como el DEPT(135) que se muestra en la figura 3.5.

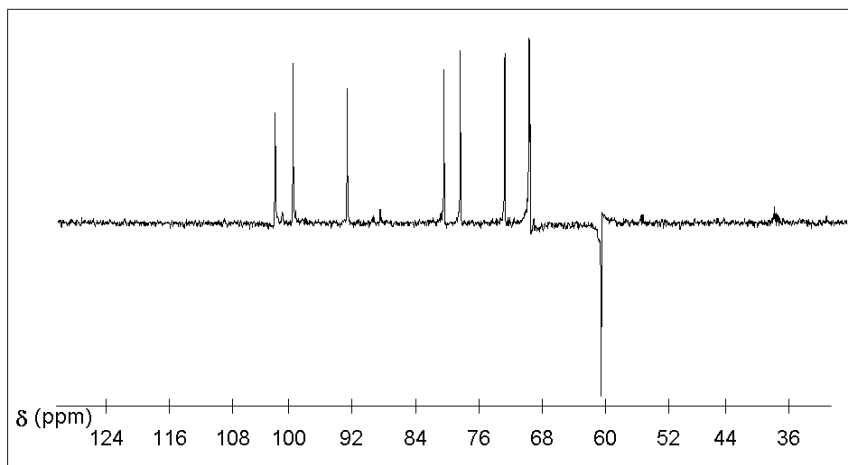


Figura 3.5. Espectro de ^{13}C -RMN para $\text{H}_4(\text{MGF})$ con el método de DEPT(135).

Con este método, DEPT(135), se discriminan los carbonos CH de los CH_2 , donde estos últimos aparecen como una señal invertida; en el caso de la mangiferina sólo se tiene un carbono de este tipo, el $6'$ -C del grupo piranosil. Los carbonos CH del azúcar aparecen además separados de los tres correspondientes a la estructura xantonóide, estos entre 92.0 y 103.0 ppm.

El espectro bidimensional de correlación de $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ obtenido con el método (g)-HSQC complementa al anterior y se presenta en la figura 3.6; se han colocado en la parte superior y lateral los espectros unidimensionales correspondientes.

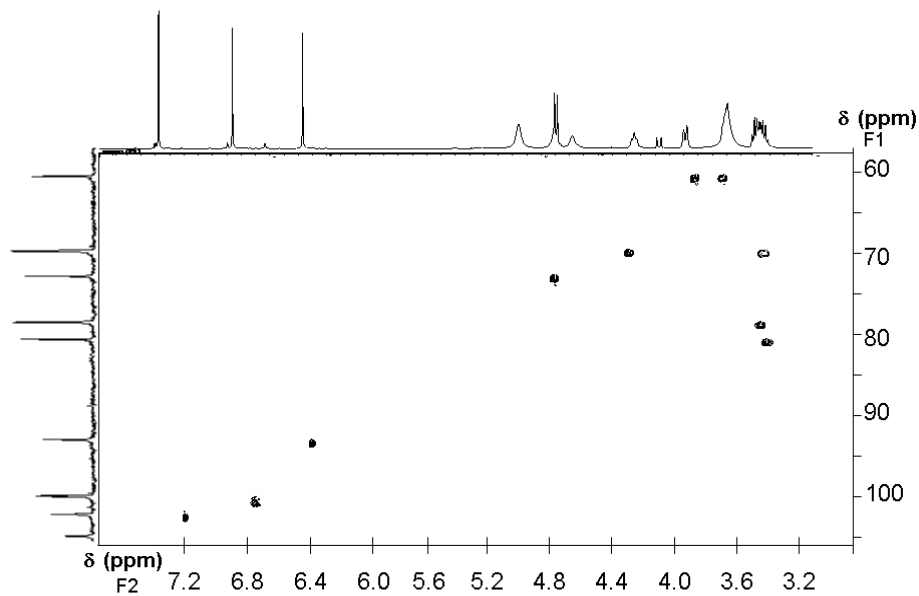


Figura 3.6. Espectro 2D de correlación ^1H - ^{13}C para $\text{H}_4(\text{MGF})$ por el método (g)-HSQC. Disolvente DMSO-d_6

Este método nos muestra los acoplamientos de C-H a corto alcance, es decir, entre átomos separados por un sólo enlace, con lo cual podemos terminar la asignación de estas diez señales, las tres señales correspondientes a los carbonos 4, 5 y 8, más las restantes para el glucósido; entre estas últimas se pueden observar los dos protones acoplados al mismo carbono, 6'-C, en $\delta=62\text{ppm}$ para ^{13}C RMN.

Finalmente, el método (g)-HMBC, figura 3.7, es usado para mostrar los acoplamientos de ^1H y ^{13}C a través de dos o más enlaces, lo que permite completar la información, en particular para los carbonos cuaternarios que no son posibles de diferenciar con ninguno de los métodos anteriores.

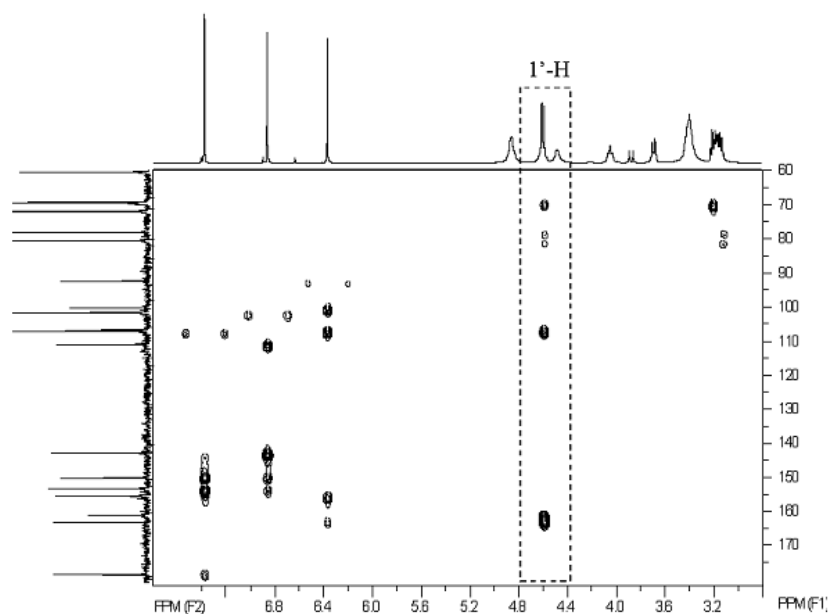


Figura 3.7. Espectro 2D de correlación ^1H - ^{13}C para $\text{H}_4(\text{MGF})$ por el método (g)-HMBC. Disolvente DMSO-d_6

Las señales de los carbonos acoplados al 1'-H son especialmente importantes para diferenciar los desplazamientos químicos correspondientes al anillo A del B, ya que sólo los carbonos unidos al primer anillo presentarán acoplamientos con dicho protón; lo cual fue utilizado como parte medular en los experimentos realizados.

Con esto se completa la siguiente asignación para los carbonos de la mangiferina en estas condiciones de trabajo, (δ): 179.13 (C=O), 163.86 (3-C), 161.82 (1-C), 156.25 (4a-C,) 154.03 (6-C), 150.81 (4b-C), 143.74 (7-C), 111.77 (8a-C), 108.11 (8-C), 107.62 (2-C), 101.34 (8b-C), 93.35 (4-C); señales adicionales debido a los carbonos del grupo glucopiranosilo (δ): 81.59 (5'-C), 79.00 (3'-C), 73.11 (1'-C), 70.66 (4'-C), 70.28 (2'-C), 61.52 (6'C).

Este procedimiento, para elucidar la estructura y asignar sin ambigüedad todas las señales de la mangiferina, se siguió para cada una de las adiciones de NaOH en el segundo experimento descrito más adelante.

3.3.2 Experimento I: Adición de agua deuterada, D₂O

Al agregar agua deuterada se espera que los protones ácidos en la molécula, particularmente los de OH, se intercambien rápidamente con los deuterados, lo que implica la desaparición de las señales de dichos protones en el espectro de ¹H RMN, como se puede observar en las figuras 3.8a y b.

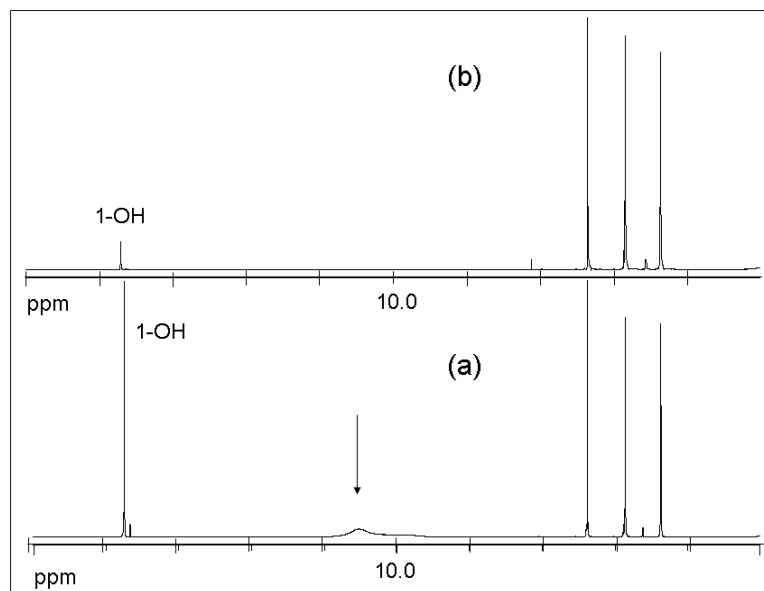


Figura 3.8. Espectro de ¹H RMN para la mangiferina (a) antes y (b) después de la adición de D₂O. La flecha indica la señal de H hidroxílico que desaparece.

Lo que resulta sumamente importante en este experimento es que una señal de protón OH no desaparece completamente después de la adición de D₂O. La señal en 13.82 ppm se ve disminuida, pero persiste; aun siendo el protón más desprotegido es también el último en intercambiarse, lo que nos señala que este protón no es tan lábil como se supondría, y que además implica un ambiente químico muy diferente con respecto a los otros protones fenólicos, como se había mencionado en la sección anterior.

Esta observación supondría una evidencia de la formación de un puente de hidrógeno entre el OH en la posición 1 y el grupo carbonilo próximo.

3.3.3 Experimento II: Incremento en la alcalinidad del medio

Las adiciones de NaOH cambian el ambiente químico de la molécula y su efecto se ve reflejado claramente en el desplazamiento químico. En la tabla 3.1 se presentan los desplazamientos químicos de ¹³C obtenidos en este experimento.

Tabla 3.1 Desplazamiento químico de ¹³C RMN para la mangiferina al valor de pH que toma la disolución (adición cero) y después de tres adiciones de NaOH.

Anillo A*		δ (ppm)				
Adiciones de NaOH	1-C	2-C	3-C	4-C	4a-C	8b-C
0	161.82	107.62	163.86	93.35	156.25	101.34
1	162.00	107.28	164.90	93.77	156.43	100.77
2	161.90	108.12	173.70	95.94	157.35	97.81
3	162.07	108.61	176.60	96.87	157.75	97.08

Anillo B*		δ (ppm)					
Adiciones de NaOH	4b-C	5-C	6-C	7-C	8-C	8a-C	C=O
0	150.81	102.66	154.03	143.74	108.11	111.77	179.13
1	154.28	100.62	166.07	147.12	102.91	105.58	177.71
2	154.38	100.62	166.96	147.00	102.39	104.53	177.16
3	153.48	101.32	169.40	149.41	103.11	105.35	176.76

(*) Los anillos A y B para la mangiferina se definieron en la figura 3.1 página 29.

Dado que estamos especialmente interesados en el comportamiento ácido de los grupos hidroxílicos 1, 3, 6 y 7, el análisis se centra en estos carbonos y los aromáticos 3-C, 5-C y 8-C.

Lo primero que se subraya es que 1-C no presenta cambio significativo al incremento de la alcalinidad en el medio, lo cual es congruente con lo observado previamente y que puede interpretarse como una mayor estabilidad de este protón por la formación de un puente de hidrógeno en esta posición.

En cuanto a los otros carbonos con protones fenólicos, se pueden observar ciertas tendencias diferentes para cada anillo, que se muestra en el cambio del desplazamiento químico con respecto al incremento en la alcalinidad del medio en las gráficas de la figura 3.9.

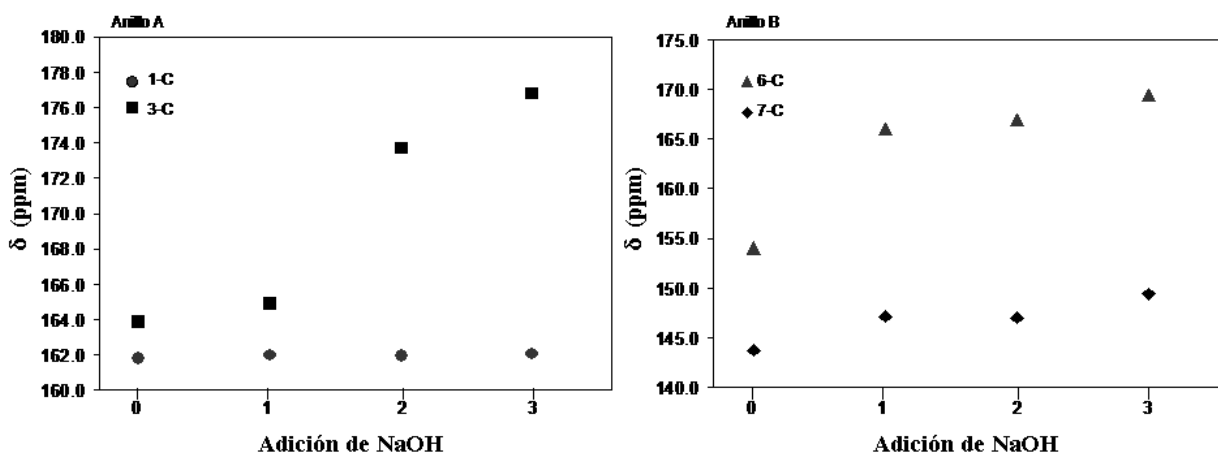


Figura 3.9. Desplazamiento químico de ^{13}C RNM (δ) vs número de adición de NaOH. Carbonos fenólicos 1, 3, 6 y 7.

La mayor diferencia $\Delta\delta$ ($\delta_i - \delta_{i-1}$) ocurre en adiciones distintas para cada carbono; mientras que para el 3-C se ve después de la segunda adición, para 6-C y 7-C se observa después de la primera; de hecho el cambio $\Delta\delta$ observado para 7-C es más pequeño que aquél para el 6-C y 3-C.

El desplazamiento químico para 3-C cambia de 164.90 a 173.70 ppm después de la segunda adición. Dado que este segundo valor es más propio de un sustituyente $-\text{O}^-$, o cercano al característico para $\text{C}=\text{O}$ [3], entonces este cambio señalaría justamente el efecto esperado del producto de una desprotonación.

Algo similar ocurre en la señal de 6-C, mostrando un valor de 166.07 ppm después de la primera adición; esto puede verse como un valor promedio entre un carbono fenoxi y uno carbonílico.

Para el análisis de los carbonos aromáticos, y sus correspondientes protones, se construyen las gráficas pertinentes que se muestran en las figuras 3.10 y 3.11.

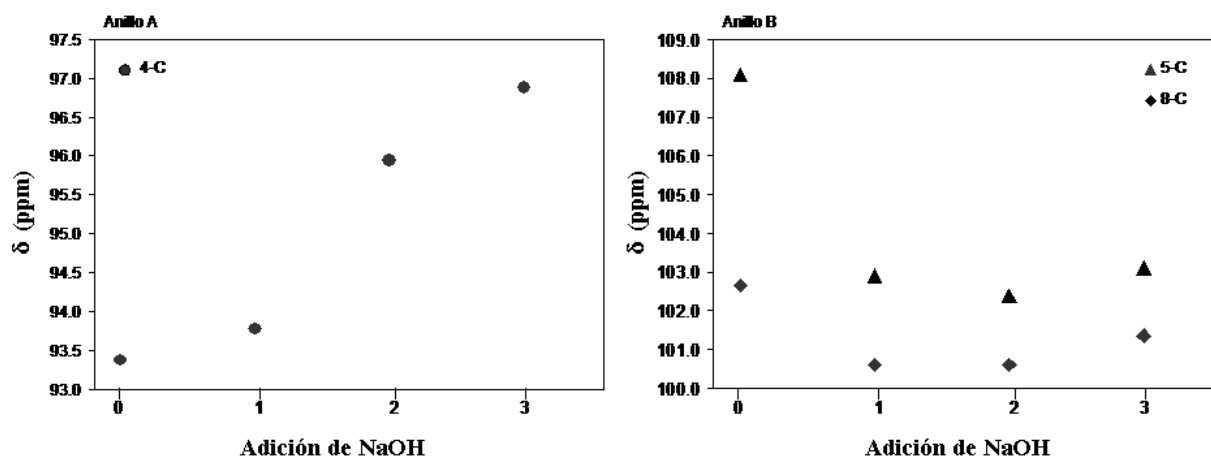


Figura 3.10. Desplazamiento químico de ^{13}C RNM (δ) vs número de adición de NaOH. Carbonos aromáticos 4, 5 y 8.

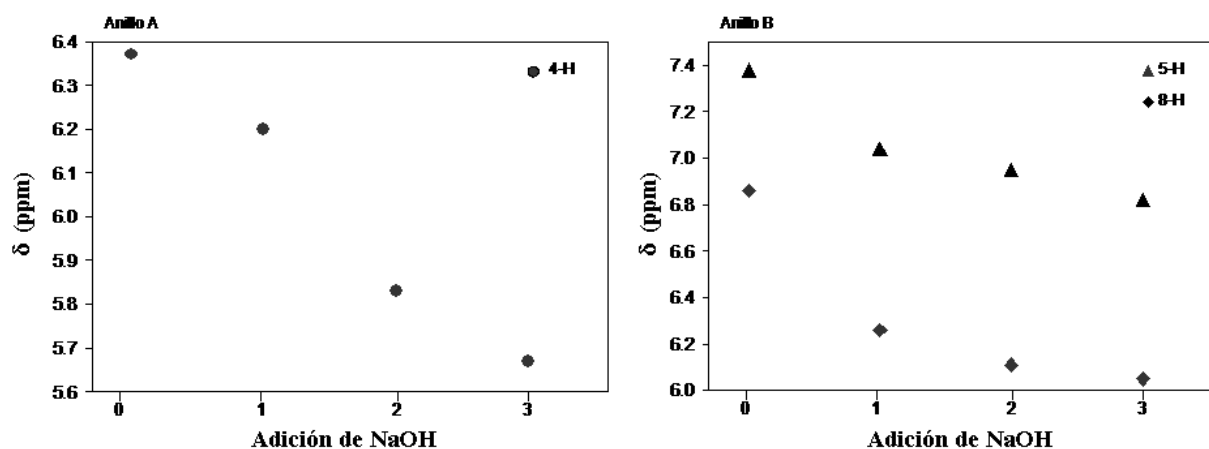


Figura 3.11. Desplazamiento químico de ^1H RNM (δ) vs número de adición de NaOH. Protones aromáticos 4, 5 y 8.

En este caso se observan tendencias distintas entre los carbonos aromáticos de cada anillo debido a los sustituyentes y sus posiciones.

Una sustitución *orto* del grupo β -D-glucopiranosil en el anillo A le da un ambiente químico muy distinto comparado con el anillo B que no tiene un grupo glucosídico sustituido, además de la sustitución en *meta*, del OH, en lugar de *para*, lo que provoca una tendencia hacia campos bajos para el 4-C, contrario a lo observado para 5-C y 8-C.

Con respecto al cambio en el desplazamiento químico $\Delta\delta$, el 4-C presenta un valor absoluto mayor después de la segunda adición, mientras que 5-C y 8-C después de la primera. Esta es la misma observación para el $\Delta\delta$ de ^1H mostrado en la figura 3.1.

Estas tendencias indican que al aumentar la alcalinidad en el medio, los cambios moleculares ocurren primero en el anillo B y después en el anillo A.

Se tiene entonces que, después de la primera adición de NaOH hay un cambio significativo en 6-C, después de la segunda adición el cambio se observa en 3-C y se ha mostrado la estabilidad de 1-C durante el experimento; en cuanto a 7-C no se tiene mayor información excepto que ocurren después de la segunda adición.

Por lo tanto, estos resultados conducirán a la asignación de los valores de pKa. Con lo que se propone el modelo de la figura 3.12 para la desprotonación de la mangiferina.

Si consideramos que la primera desprotonación ocurre en la posición 6, este modelo nos presenta la posibilidad de estructuras resonantes, lo que explicaría los valores promedio de desplazamiento químicos encontrados para algunas de las señales ya discutidas.

Buscando si habría, entre las resonantes, una estructura más probable, se calcularon los espectros correspondientes con el programa ACD/RMN DB(**) y se compararon con los experimentales.

(**) ACD/RMN DB version 5 (Advanced Chemistry Development, Inc., Toronto ON, Canada, www.acdlabs.com, 2003).

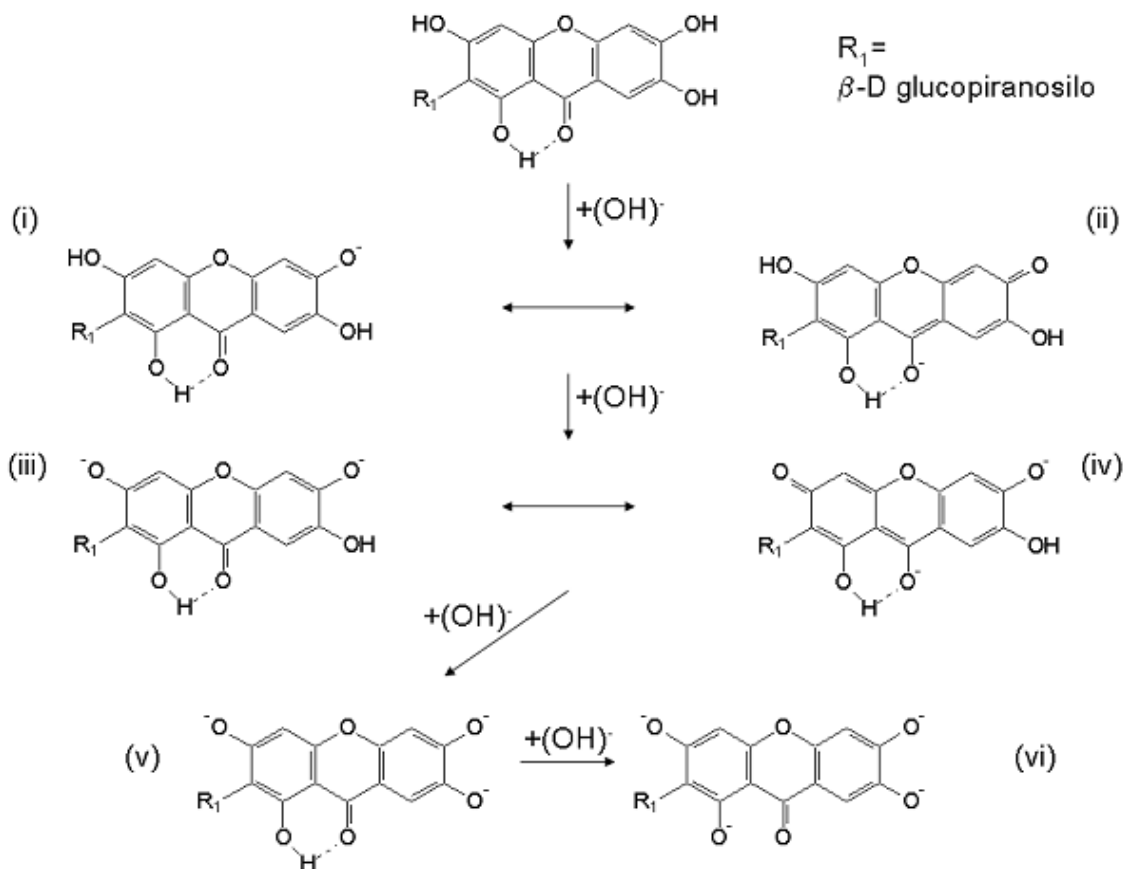


Figura 3.12. Modelos químicos para la asignación de los valores de pKa de la mangiferina.

De acuerdo a esta comparación, la primera estructura más probable sería la (i), desplazando el equilibrio a la izquierda; después de la segunda desprotonación, asignada a la posición 3, la estructura más probable sería la (iii). Las estructuras (v) y (vi) no se observaron experimentalmente a través de RMN, pero la tendencia observada después de la tercera adición de NaOH más la estabilidad del 1-H y la menor acidez esperada para los protones en los grupos OH glucosídicos nos permite completar la asignación de los valores de pKa obtenidos experimentalmente y reportados en la tabla 2.2 página 22. Las asignaciones se muestran en la tabla 3.2.

Tabla 3.2. Valores y asignación de las constantes de acidez para la mangiferina.

Equilibrio	pKa
$\text{H}_4(\text{MGF}) = \text{H}_3(\text{MGF})^- + \text{H}^+$	$\text{pKa}_1 (6\text{-H}) = 6.52 \pm 0.06$
$\text{H}_3(\text{MGF})^- = \text{H}_2(\text{MGF})^{2-} + \text{H}^+$	$\text{pKa}_2 (3\text{-H}) = 7.97 \pm 0.06$
$\text{H}_2(\text{MGF})^{2-} = \text{H}(\text{MGF})^{3-} + \text{H}^+$	$\text{pKa}_3 (7\text{-H}) = 9.44 \pm 0.04$
$\text{H}(\text{MGF})^{3-} = (\text{MGF})^{4-} + \text{H}^+$	$\text{pKa}_4 (1\text{-H}) = 12.10 \pm 0.02$

3.4 COMPARACIÓN ENTRE LAS CONSTANTES DE ACIDEZ, PARA LA MANGIFERINA, EN H₂O Y UNA MEZCLA H₂O-DMSO 70/30% (v/v)

Considerando que el cambio de solvente pudiera dar resultados no comparables para la asignación de los valores de pKa [8], se decide evaluar, en lo posible, el efecto del solvente sobre las constantes de acidez y tener así más elementos para su discusión.

La proporción 70% de agua por 30% de DMSO en volumen ha obedecido a razones tanto de solubilidad como de simplificación en el proceso, siendo la limitante la obtención de un espectro de RMN de ¹³C, en tiempo de adquisición razonable, para la mayor concentración de H₄(MGF) en agua; lo anterior con el fin de establecer si la estructura inicial de la mangiferina en DMSO es la misma que en agua. El espectro de RMN correspondiente se muestra en la figura 3.13.

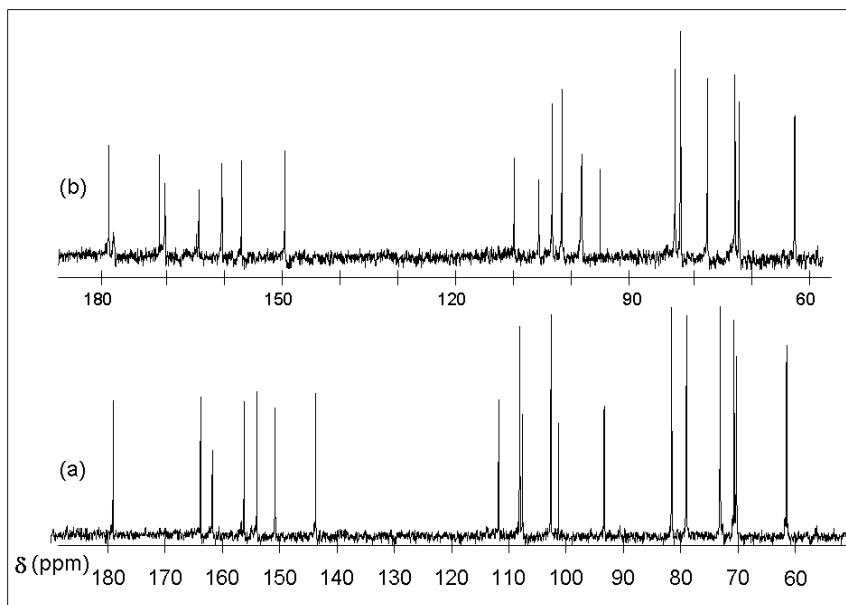


Figura 3.13. Espectro unidimensional de ¹³C-RMN para H₄(MGF). (a) En DMSO-d₆; (b) en mezcla H₂O-DMSO (70/30% v/v) a pH=4.0

En esta figura, se puede observar un ligero corrimiento de las señales, que se infiere precisamente por el cambio en el ambiente químico en la solución, sin embargo, la estructura resultante es la misma para ambos espectros: la especie neutra H₄(MGF) de acuerdo a la figura 3.1.

Entonces, la mangiferina en la mezcla H₂O-DMSO 70/30% (v/v) se trabaja con espectroscopía UV/Vis en la determinación de las constantes de acidez para su comparación.

Las condiciones de trabajo, así como el procedimiento experimental son los mismos descritos en el capítulo anterior, considerando sólo el cambio del medio por la mezcla mencionada.

En este caso se realizó un estudio para calibrar los valores de pH, mostrado en el anexo 4, encontrándose que, para efectos prácticos, no difieren significativamente con los valores de pH en agua pura, por lo que se utiliza la misma ecuación 1, capítulo 2, para corregir los valores experimentales en la mezcla.

3.4.1 Comportamiento espectral (UV/Vis) para la mezcla H₂O-DMSO (70/30% v/v)

En la figura 3.14 se presentan algunos espectros de absorción de la mangiferina en agua pura y en la mezcla; los espectros han sido escogidos en los intervalos de pH y de longitud de onda de interés utilizados para la determinación con SQUAD.

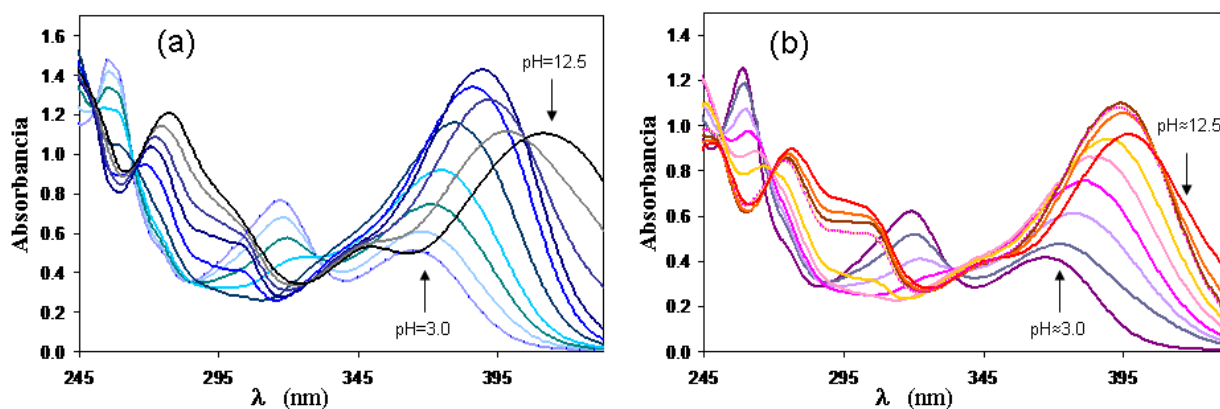


Figura 3.14. Espectros de absorción para la mangiferina 4.0×10^{-5} M; (a) en H₂O, (b) en mezcla H₂O-DMSO (70/30% v/v). $3.0 \leq \text{pH} \leq 12.5$.

El comportamiento espectral entre ambas resulta, como puede observarse, muy semejante. En cuanto a las diferencias, se puede notar un ligero corrimiento al rojo, con respecto al comportamiento en agua, en los valores de absorbancia máxima, así como un ligero efecto hipocrómico.

Sin embargo, a medida que el pH se incrementa, el mayor cambio se presenta en la banda de absorción en 271 nm, con la definición de un hombro en 295 nm, mientras que para la banda de absorción en 390 nm, el desplazamiento batocrómico completo simultáneo al efecto hipocrómico no se observa como en la mezcla como en el agua.

De igual manera puede constatararse la similitud entre ambos comportamientos al observar el cambio en la absorbancia con respecto al pH en las gráficas correspondientes, figura 3.15, construidas a partir de los datos experimentales.

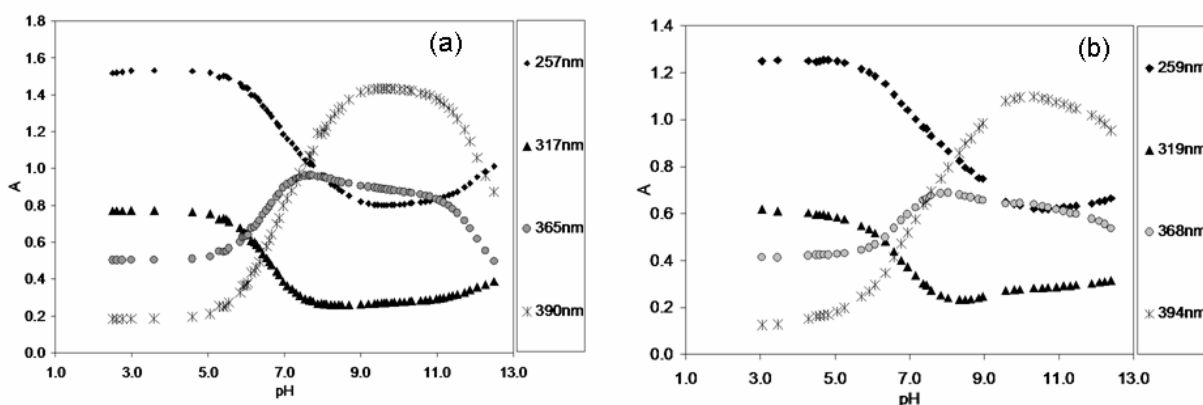


Figura 3.15. Absorbancia vs pH para la mangiferina 4.0×10^{-5} M; (a) en agua, (b) en mezcla H₂O-DMSO 70/30% (v/v).

Con estas gráficas, se evidencia que los equilibrios ácido-base presentes en medio acuoso para la mangiferina, deben ser equivalentes a aquellos en la mezcla H₂O-DMSO 70/30% (v/v), dado que se observa la misma cantidad de puntos de intersección en ambos medios, con comportamientos espectrales muy semejantes.

3.4.2 Constantes de acidez de la mangiferina en la mezcla H₂O-DMSO 70/30% (v/v)

Finalmente, en la tabla 3.3 se muestran los valores para las constantes de formación en este medio, determinadas con SQUAD. Cabe señalar que éste es el mejor ajuste encontrado (el modelo con cinco equilibrios no presenta un buen ajuste).

Tabla 3.3 Constantes de formación de la mangiferina determinados con SQUAD.

	H₂O	70% H₂O – 30% DMSO
log β₁	12.10	11.80
log β₂	21.54	20.54
log β₃	29.51	27.45
log β₄	36.03	32.40
U=	2.20×10^{-2}	5.64×10^{-2}
σ_{tot}=	4.92×10^{-3}	7.88×10^{-3}

σ_{tot}=desviación estándar total sobre las constantes;
 U= suma de cuadrados de las absorbancias calculadas.

En estos resultados se ve que los valores de $\log\beta$ no son iguales, donde además los parámetros estadísticos para el cálculo en la mezcla indican un buen ajuste, semejante al obtenido en agua, es decir, no se puede asociar la diferencia entre los valores de las constantes al error.

La presencia del DMSO afecta la acidez de los protones de la mangiferina, con respecto a la misma en medio acuoso, lo que se traduce en una disminución de los valores de pKa, como se observa en la tabla 3.4.

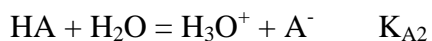
Tabla 3.4. Valores de pKa para la mangiferina determinados con SQUAD.

	H₂O	70% H₂O – 30% DMSO
pKa₁	6.52 ± 0.06	4.92 ± 0.07
pKa₂	7.97 ± 0.06	6.92 ± 0.08
pKa₃	9.44 ± 0.04	8.74 ± 0.05
pKa₄	12.08 ± 0.02	11.80 ± 0.04

* Los valores de pKa fueron estimados como la diferencia entre los valores sucesivos de $\log\beta$, mientras que la incertidumbre se calculó de la manera usual.

Si consideramos la expresión definida por Popovych [9] para relacionar escalas de pH en agua y en solventes no acuosos: $pa_H^* = pa_H + \log_m \gamma_H$, donde a_H se refiere a la actividad del protón en agua, a_H^* a la actividad del protón en el solvente no acuoso y $m\gamma_H$ se conoce como el coeficiente de actividad del medio o el efecto del medio, se llega a que si se conoce el valor de $\log_m\gamma_H$ se pueden comparar dichas escalas, lo que permite a su vez, relacionar ambos medios en términos de acidez y basicidad.

Para DMSO puro, $\log_m \gamma_H = -3.3$ y el signo negativo implica que el DMSO es más básico que el agua o bien, que el H_2O es menos básico que el DMSO, entonces para los equilibrios de hidrólisis de una especie HA:



se tendría que el primer equilibrio estaría más desplazado hacia la derecha con respecto al segundo equilibrio, esto es, $K_{A1} > K_{A2}$ y por lo tanto $pK_{A1} < pK_{A2}$.

El resultado al que se ha llegado experimentalmente es congruente con lo anterior: en la estimación de los valores de pKa en la mezcla H_2O -DMSO 70/30% (v/v) éstos son menores con respecto a los mismos en agua.

Sin embargo, a pesar de que los valores de pKa cambian en este medio, no debe perderse de vista que la asignación sigue siendo la misma, dado que se tienen cuatro equilibrios de formación que implican la misma cantidad de desprotonaciones en este medio y en agua. Por lo tanto, se puede discutir el efecto del solvente sobre la acidez de los protones, pero la asignación se mantiene.

3.5 CONCLUSIONES

En los experimentos de espectroscopía RMN realizados, el cambio en el desplazamiento químico debido al aumento en la alcalinidad del medio ha llevado a la asignación de los valores de pKa para la mangiferina, una molécula con grupos funcionales semejantes.

La evidencia espectral subraya la estabilidad del protón fenólico en 1-C, lo cual indica la presencia de un puente de hidrógeno que lo define como el menos ácido.

La acidez relativa de los protones para la mangiferina, siguiendo la evidencia espectral, sería: 6-H > 3-H > 7-H > 1-H.

De igual forma se mostró que aun cuando los valores de pKa pueden verse afectados por el cambio de solvente, la especie H₄(MGF) en ambos medios presenta la misma estructura a un valor de pH ácido y de acuerdo a los resultados con espectroscopía UV/Vis y SQUAD, se corrobora la presencia de cuatro equilibrios ácido-base, lo que hace suponer que las especies involucradas son las mismas en ambos medios, apoyando la asignación mencionada.

Los valores de pKa quedan asignados con los experimentos de RMN de acuerdo a la tabla 3.2, donde se muestran los equilibrios de disociación ácida correspondientes a lo obtenido previamente con SQUAD.

Tabla 3.2. Valores y asignación de las constantes de acidez para la mangiferina.

Equilibrio	pKa
$H_4(MGF) = H_3(MGF)^- + H^+$	pKa ₁ (6-H) = 6.52 ± 0.06
$H_3(MGF)^- = H_2(MGF)^{2-} + H^+$	pKa ₂ (3-H) = 7.97 ± 0.06
$H_2(MGF)^{2-} = H(MGF)^{3-} + H^+$	pKa ₃ (7-H) = 9.44 ± 0.04
$H(MGF)^{3-} = (MGF)^{4-} + H^+$	pKa ₄ (1-H) = 12.10 ± 0.02

Se ha considerado a la mangiferina C₁₉H₁₈O₁₁, como H₄(MGF).

Cabe subrayar que la asignación obtenida experimentalmente no es la que resulta de la estimación inicial hecha por el programa ACDpKa DB.

La diferencia fundamental se centra en el protón en la posición 1: mientras la estimación del software lo señala como el más ácido, los experimentos llevan a la conclusión de que éste es el menos ácido y por tanto, se le asigna el último valor de pKa.

Lo anterior, prueba la importancia de este tipo de experimentos en la asignación de valores de pKa cuando se trabaja con moléculas polipróticas más complejas, que contienen en su estructura grupos funcionales semejantes, como fenoles en este caso.

3.6 REFERENCIAS

- [1] J.C. Roberts. "Naturally Occurring Xanthenes". *Chem. Rev.* **61**, 591 (1961).
- [2] M.A.A Lins, C. De Barros, O.R. Gottlieb, M.M. "Methods for the Structural Investigation of Xanthenes; Part II. Location of Hydroxyl Groups by Ultraviolet and Visible Spectroscopy". *Anal. Chim. Acta.* **42**, 311 (1968).
- [3] H. Friebolin. "Basic One- and Two- Dimensional NMR Spectroscopy". 3rd edition; Wiley-VCH, Federal Republic of Germany (1998).
- [4] E. Pretsch, P. Bühlmann, C. Affolter. "Structure Determination of Organic Compounds". Springer Ed. Germany (2000).
- [5] A. W. Frahm and R.K. Chaudhuri. *Tetrahedron.* **35**, 2035 (1979).
- [6] R.J. Abraham, J. Fisher and P. Loftus. "Introduction to NMR Spectroscopy". 2nd edition, John Wiley & Sons; Great Britain (1988).
- [7] G. Gilli, F. Bellucci, V. Ferretti, V. Bertolasi. "Evidence for Resonance-Assisted Hydrogen Bonding from Crystal-Structure Correlations on the Enol Form of the β -Diketone Fragment". *J. Am. Chem. Soc.* **111**, 1023 (1989).
- [8] P. Mukerjee and J.D. Ostrow. "Effects of Added Dimethylsulfoxide on pKa Values of Uncharged Organic Acids and pH Values of Aqueous Buffers". *Tetrahedron Letters.*, **39**, 423 (1998).
- [9] O. Popovych, R.P.T Tomkins. "Nonaqueous Solution Chemistry". John Wiley & Sons; Great Britain (1981).

CAPÍTULO 4 ESTUDIO QUÍMICO CUÁNTICO DE LA MANGIFERINA

4.1 INTRODUCCIÓN

En la búsqueda de mayor información sobre la reactividad de la mangiferina y dado que la estructura molecular de los complejos formados no ha sido establecida con técnicas experimentales, como Rayos X, se realizó el estudio químico cuántico del presente capítulo.

En particular, la aportación de resultados teóricos, los cuales no se encuentran publicados en la literatura, permitiría discutir sobre la acidez relativa de los protones en la mangiferina para proveer, en su caso, elementos de apoyo a la asignación de los valores de pKa obtenidos experimentalmente.

Por otro lado, también se estudió la factibilidad de la formación de complejos entre la mangiferina y el Fe(III), estudiando tres posiciones de unión, esto en relación al segundo objetivo general del presente trabajo. Los resultados del cálculo para la formación de los complejos del sistema Fe(III)-H₄(MGF) se presentan en el apartado 5.5.2 correspondiente al siguiente capítulo.

El estudio se realizó en el marco de la teoría de los funcionales de la densidad (TFD), utilizando el funcional BLYP con la base numérica DNP para los átomos C, H y O. El cálculo se efectuó buscando la mejor calidad que el programa podía ofrecer para los intereses del trabajo, en ese sentido, la base utilizada corresponde a una doble base numérica que incluye una función-p de polarización para todos los átomos de hidrógeno, lo que implica la mayor precisión para el cálculo, con mayor esfuerzo computacional, pero que es importante para la definición de puentes de hidrógeno.

En el anexo 4 se presentan los aspectos generales al respecto.

El programa empleado para las optimizaciones y el cálculo de la energía electrónica final, fue Accelrys MS Modeling 3.0.1 de Accelrys Inc.

4.2 METODOLOGÍA

La optimización de la geometría de $H_4(MGF)$ se obtuvo como primer paso. Con ésta se realiza el análisis con base en los parámetros geométricos en cuanto a la posible formación de puentes de hidrógeno.

Partiendo de la geometría optimizada para la molécula totalmente protonada se remueve un protón por vez y se calcula la energía del ion, tanto de manera puntual como permitiendo la relajación de la molécula. De esta manera se comparan las energías de desprotonación para cada posición de interés y, de entre ellas, se elige la de menor energía para remover un segundo protón, continuando con el proceso.

Después de analizar los resultados de la primera desprotonación se decidió calcular la energía para las especies $H_2(MGF)^{2-}$ posibles a un solo punto dado que no se encontró diferencia significativa con respecto al cálculo optimizando la geometría y, de esa manera, el esfuerzo computacional es menor.

4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.3.1 Geometría optimizada para la mangiferina

Se consideran dos geometrías a optimizar, la geometría (A), donde el protón de la posición 6 se encuentra formando un ángulo inicial C-O-H de 110° y el protón en 7 con un ángulo inicial C-O-H de 250° ; y la geometría (B), donde los protones 6 y 7 se colocan en posición inicial inversa a la de la geometría A. Lo anterior para poder evaluar la posibilidad de formación de puentes de hidrógeno con ambos protones (6-H y 7-H).

Cabe señalar que en el caso del grupo glucósido se probaron tres posiciones, en configuración de silla, girando el grupo completo sobre el enlace 1'C-2C, las discusiones siguientes consideran la posición de mínima energía resultante.

En la figura 4.1 se muestra la geometría optimizada (A) de acuerdo a lo señalado anteriormente, se han etiquetado las posiciones de interés así como los posibles puentes de hidrógeno formados de acuerdo al cálculo.

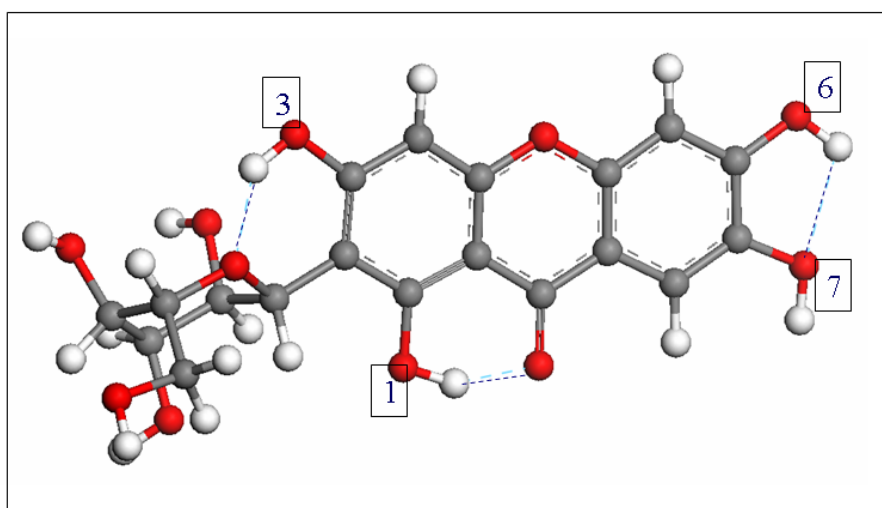


Figura 4.1. Geometría (A) optimizada para la molécula de $[H_4(MGF)]$.

El cálculo señala la posibilidad de tres puentes de hidrógeno intramoleculares para la mangiferina completamente protonada, los cuales involucran precisamente a los protones ácidos en cuestión, los de las posiciones 1, 3, y 6, recordando que el puente equivalente para 7-H se discute en el análisis de la geometría (B).

Se consideran para el análisis, tres parámetros geométricos propios de dicha interacción: el ángulo y dos distancias entre los tres átomos de interés, O—H---O en este caso. En la tabla 4.1 se presenta el resumen que incluye los resultados reportados para un puente de hidrógeno intramolecular [1].

Tabla 4.1. Parámetros geométricos para los posibles puentes de hidrógeno en la geometría optimizada (A) de la molécula de $[H_4(MGF)]$.

Posición puente de H	Ángulo (°)	Distancia (Å)	Distancia (Å)
	O—H---O	O---H	O---O
1-O—1-H---O=C	152.4	1.62	2.57
3-O—3-H---gluc-O	145.6	1.76	2.64
6-O—6-H---7-O	114.4	2.14	2.69
[1] O—H----O=C	172.0	1.51	2.54

Aunque hoy en día todavía existen discrepancias sobre los estándares para un puente de hidrógeno intramolecular [2,3], los reportes [4] indican que, con respecto a las moléculas de agua, éste se ve favorecido mientras más cercano a 180° sea el ángulo formado y la distancia entre el hidrógeno y el oxígeno aceptor, hacia 2.0Å, recordando que la distancia típica es de 1.97Å con un ángulo de 162° [5] para dichas moléculas.

De acuerdo con ello el puente más favorecido sería el formado con el protón en la posición 1 y el menos favorecido, el formado con 6-H.

En la figura 4.2 y en la tabla 4.2 se muestran los resultados correspondientes al cálculo para la geometría (B).

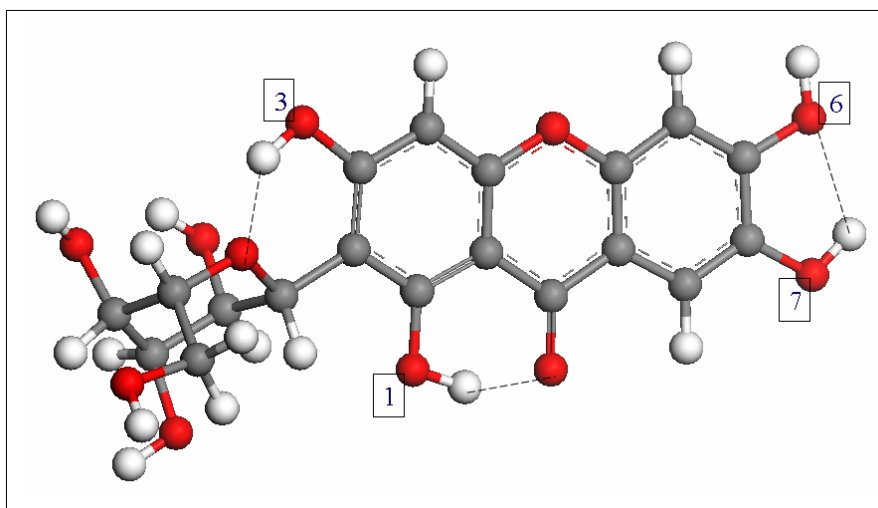


Figura 4.2. Geometría (B) optimizada para la molécula de $[H_4(MGF)]$.

Tabla 4.2. Parámetros geométricos para los posibles puentes de hidrógeno en la geometría optimizada (B) de la molécula de $[H_4(MGF)]$.

Posición puente de H	Ángulo (°) O—H---O	Distancia (Å) O—H	Distancia (Å) O---O
1-O—1-H---O=C	152.3	1.62	2.56
3-O—3-H---gluc-O	146.0	1.76	2.64
6-O—6-H---7-O	113.5	2.17	2.71

Se observa claramente que no existe diferencia significativa en los valores presentados para ambas geometrías, lo que implica que son equivalentes entre sí.

De tal forma que, en principio, sería igualmente probable que se forme el puente de hidrógeno con el protón en 6 o en 7. Recordar que todos los resultados para los cálculos teóricos en este trabajo son en fase gas, lo cual significa que se está tratando con la estabilidad intrínseca de la molécula.

Por otra parte, el cálculo de las energías finales para ambas geometrías muestra una diferencia entre ellas de 5.70 kJ/mol que confirmaría la afirmación anterior: son prácticamente equivalentes.

Por lo tanto, teniendo como base los parámetros geométricos analizados, para la formación de puentes de hidrógeno, el más favorecido en la molécula neutra de mangiferina sería el de la posición 1.

Tal afirmación resulta muy interesante ya que es la formación de este puente de hidrógeno lo que se ha supuesto con los resultados en RMN, con lo que se infiere la menor acidez del 1-H con respecto a los otros, es decir, este resultado teórico parece apoyar a aquél obtenido a través de la experimentación. Para continuar y poder confirmar lo anterior, se procede a evaluar energéticamente cada una de las desprotonaciones de interés.

4.3.2 Cálculo de la energía para las desprotonaciones de la mangiferina.

1ª Desprotonación

Se calcula la energía final para los cuatro aniones posibles de acuerdo a la figura 4.3, utilizando dos métodos; en el primero se calcula la energía permitiendo que la molécula se relaje, es decir, optimizando la geometría, en el segundo se obtiene a un solo punto (single point).

Las dos geometrías optimizadas para la molécula neutra, (A) y (B), se tomaron como base para dichos cálculos.

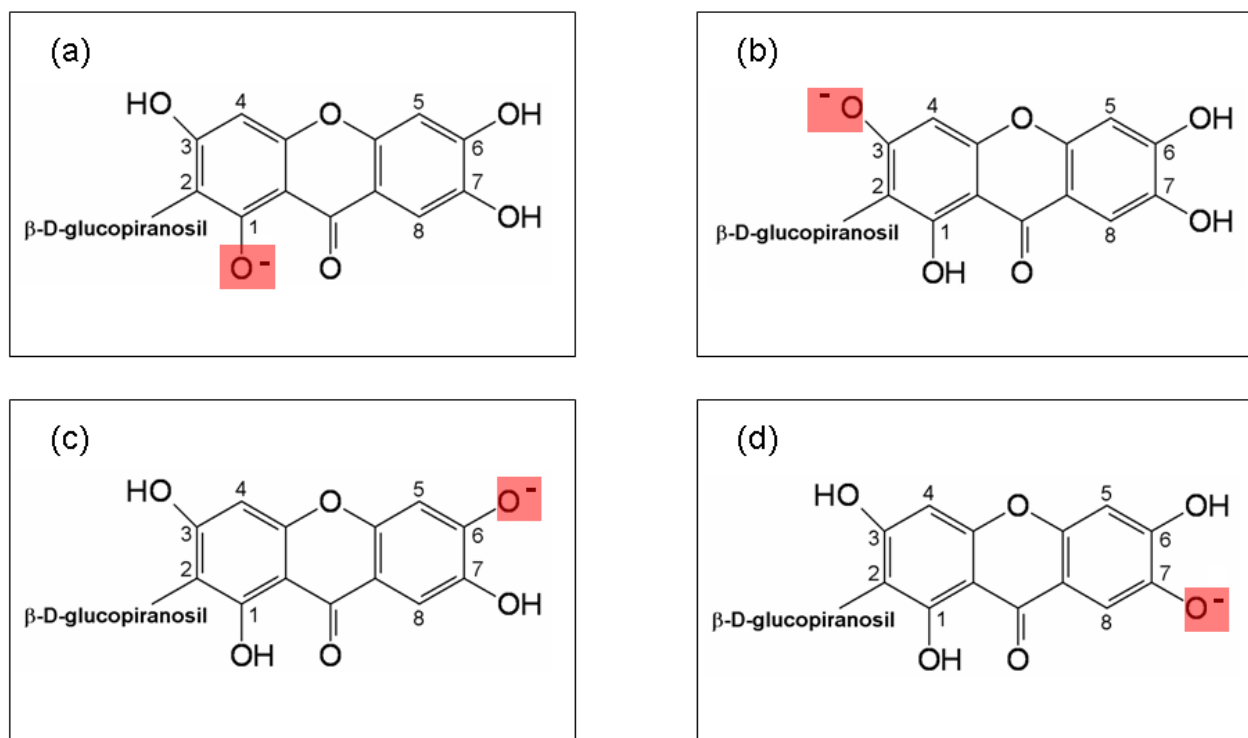


Figura 4.3. Posiciones de los distintos iones de interés para la especie $H_3(MGF)^-$: (a) 1-O, (b) 3-O, (c) 6-O, (d) 7-O.

Considerando la Ley de Hess se calculan las energías de desprotonación (ΔE_{despt}) para cada ion, de acuerdo con el siguiente equilibrio de acidez:



$$\Delta E_{despt} = (E_{H_3(MGF)^-} + E_{H}) - E_{H_4(MGF)}$$

En la figura 4.4 se muestra el cálculo resultante bajo una escala de energía relativa, dejando relajar ambas geometrías, (A) y (B).

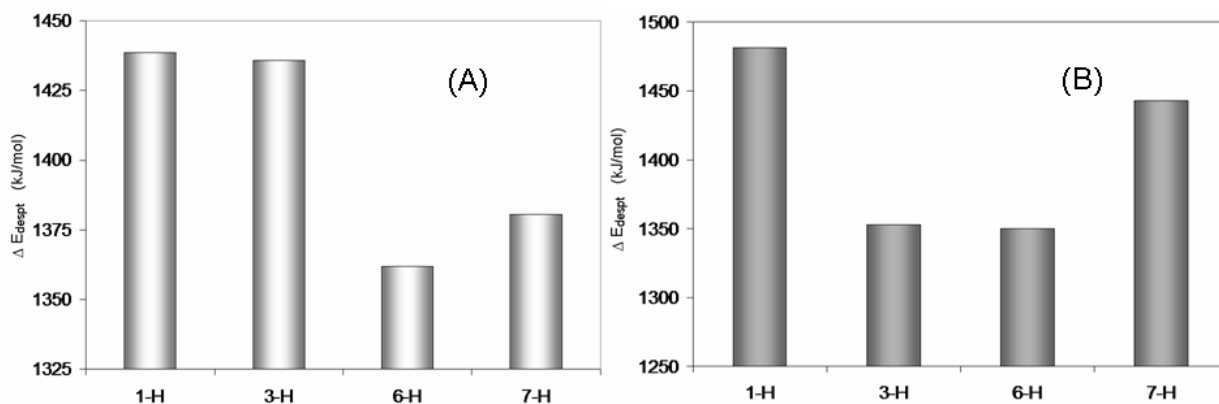


Figura 4.4. Energía relativa de desprotonación, calculada a partir de la optimización de las geometrías (A) y (B) para la especie $\text{H}_3(\text{MGF})^-$. Bajo cada barra se señala el protón que se ha removido.

Como se puede observar, estos resultados indican que no son equivalentes estos cuatro protones, es decir, aunque en principio todos son fenólicos, el proceso de remover uno de ellos implica una cantidad de energía diferente.

Para la geometría (A), el protón fenólico en la posición 6 resulta el más favorecido energéticamente para ser desplazado con respecto a los otros, como se puede observar en la tabla 4.3; mientras que remover los protones 1 ó 3 requiere prácticamente la misma energía con tan solo una diferencia absoluta de 2.81 kJ/mol entre ambos procesos.

La diferencia absoluta en la tabla 4.3 definida como $|\Delta E_{\text{despt}(i\text{H})} - \Delta E_{\text{despt}(ii\text{H})}|$ se refiere al valor absoluto de la diferencia entre dos procesos de desprotonación, con distintos protones removidos (iH, iiH).

Tabla 4.3. Energías relativas de desprotonación para $H_3(MGF)^-$, cálculo optimizando geometría.

Protón removido	Energía relativa de desprotonación (kJ/mol) ΔE_{despt}		Diferencia absoluta (kJ/mol) $ \Delta E_{despt(iH)} - \Delta E_{despt(iiH)} $	
	(A)	(B)	(A)	(B)
1-H	1438.73	1481.32	2.81	128.52
3-H	1435.92	1352.79	73.90	2.74
6-H	1362.02	1350.06	18.53	92.77
7-H	1380.55	1442.83		

Entre el proceso de desprotonación para 6-H y 7-H hay una diferencia absoluta de 18.53kJ/mol, lo que implica que, partiendo de la geometría (A), el protón en 6 requiere significativamente menor energía para ser removido en comparación con el más cercano, energéticamente hablando.

En el análisis para la geometría (B) se tiene que, aún cuando el 6-H sigue apareciendo como el de menor energía requerida en el proceso, éste es equivalente al 3-H, existiendo una diferencia absoluta de 2.74kJ/mol entre ambos, seguidos de 7-H con una diferencia absoluta de 92.77kJ/mol con respecto a 6-H.

Cabe subrayar también el hecho de que en ambos casos el protón en la posición 1 es el más estable, donde se veía justamente la formación del puente de hidrógeno más favorecida, señalado en el punto anterior (sección 4.3.1).

De modo semejante se realiza el análisis de los resultados para el mismo proceso de desprotonación pero utilizando el cálculo de la energía de manera puntual (a un solo punto), presentando en la figura 4.5 lo correspondiente.

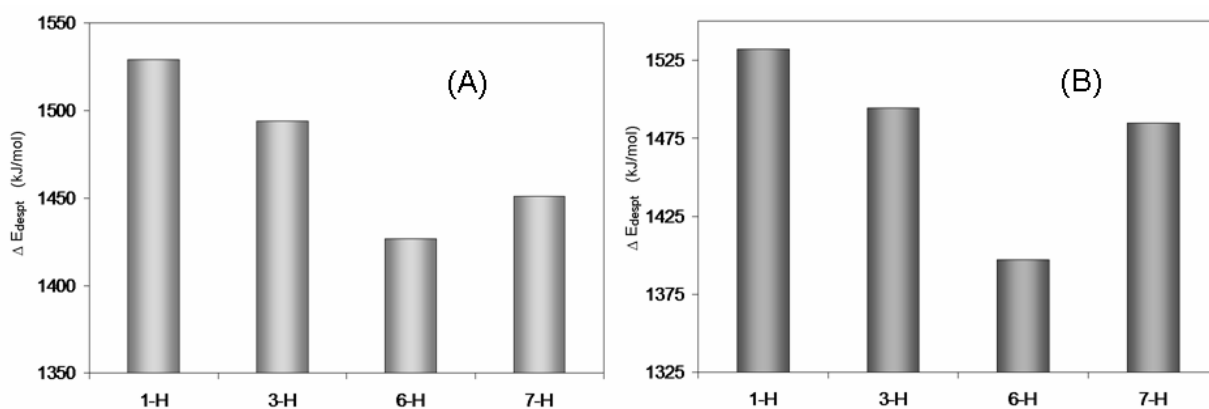


Figura 4.5. Energía relativa de desprotonación, calculada con las energías a un solo punto de las geometrías (A) y (B), para la especie $H_3(MGF)^-$. En el eje de las "x" se señala el protón que se ha removido.

En este caso se puede observar un resultado muy semejante para ambas geometrías, aún cuando las energías relativas no son exactamente las mismas, la tendencia es la misma, como se muestra en la tabla 4.4.

Tabla 4.4. Energías relativas de desprotonación para $H_3(MGF)^-$, cálculo a un solo punto,

Protón removido	Energía relativa de desprotonación ΔE_{despt} (kJ/mol)		Diferencia absoluta (kJ/mol) $ \Delta E_{despt(iH)} - \Delta E_{despt(iiH)} $	
	(A)	(B)	(A)	(B)
1-H	1529.23	1532.26	35.10	37.64
3-H	1494.13	1494.62	67.66	97.27
6-H	1426.46	1397.35	24.46	87.47
7-H	1450.92	1484.82		

El protón en la posición 6 resulta ser el que requiere menor energía para ser removido, en ambas geometrías, teniendo una diferencia absoluta significativa con respecto al 7-H; mientras que la mayor energía requerida en el proceso de desprotonación corresponde a la posición 1.

Entonces, la evaluación de la energética en el proceso de desprotonación hecha a través de dos métodos para dos geometrías nos lleva a una tendencia clara, donde el equilibrio de acidez más favorecido sería aquel que involucra la salida del protón en la posición 6, es decir, el protón 6-H resultaría el más ácido, en comparación con 1-H, 3-H y 7-H.

Debe recordarse que solamente cuando se permite la relajación de la geometría (B) aparecen como equivalentes el 3-H y el 6-H.

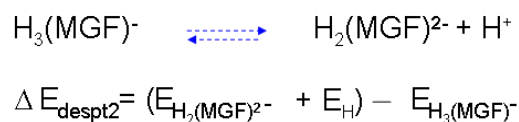
Además, se subraya que en todos los cálculos, el 1-H es el que requiere mayor energía en el proceso, al menos cuando se encuentran los cuatro protones ácidos de la mangiferina presentes.

Una vez discutido el primer proceso, se prosigue a remover un segundo protón a partir de la especie $H_3(MGF)^-$; considerando que en principio, la energía necesaria para una segunda desprotonación no es directamente la suma de los procesos independientes para remover un solo protón por no ser equivalentes entre sí.

Dado que las tendencias son semejantes con ambos métodos, se decide utilizar únicamente el cálculo de la energía a un solo punto para los siguientes procesos, disminuyendo de esta manera el costo computacional.

2ª Desprotonación.

De manera semejante a lo anterior, la energía necesaria para remover un segundo protón en la mangiferina se calcula de acuerdo con el siguiente equilibrio de acidez:



Donde lo más importante es que el protón removido en $H_3(MGF)^-$ es el 6-H dado que, de los resultados previos, se ha considerado como el que requiere menor energía. Los iones $H_2(MGF)^{2-}$ posibles se muestran en la figura 4.6.

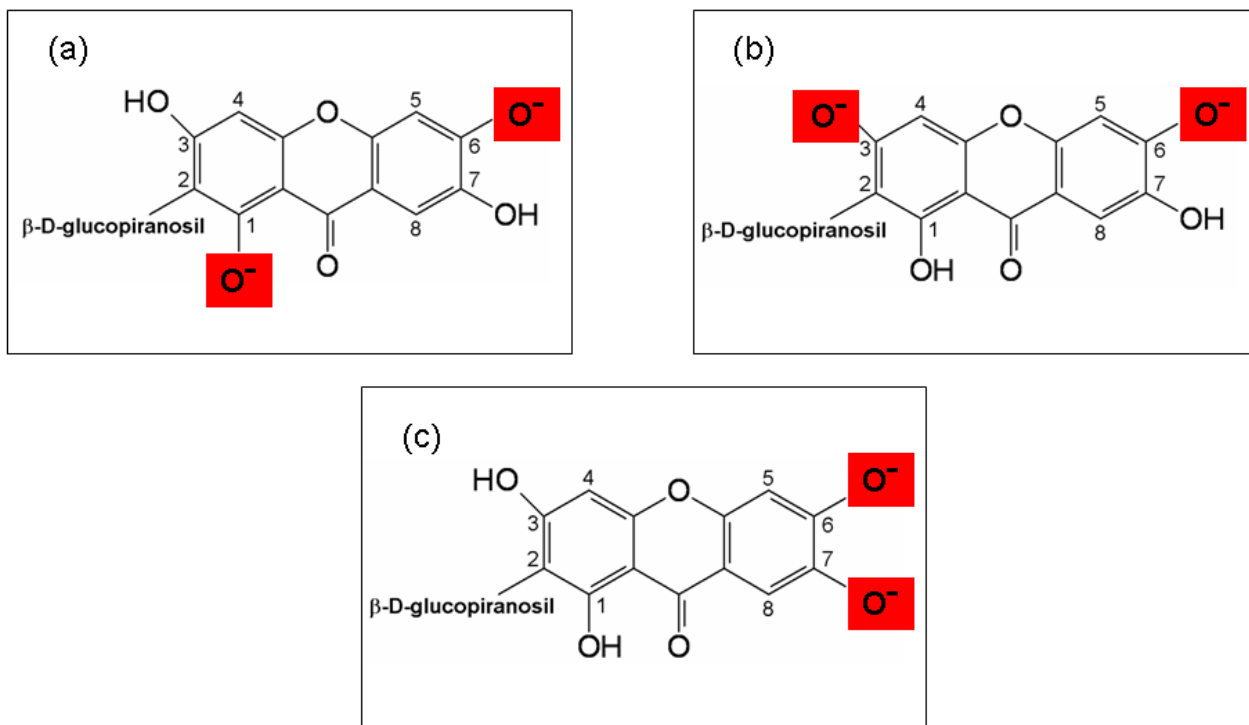


Figura 4.6. Posiciones de los distintos iones de interés para la especie $H_2(MGF)^2-$; (a) 6,1-O, (b) 6,3-O, (b) 6,7-O.

La energía relativa para remover un segundo protón, habiendo removido 6-H primero, se presenta en la figura 4.7.

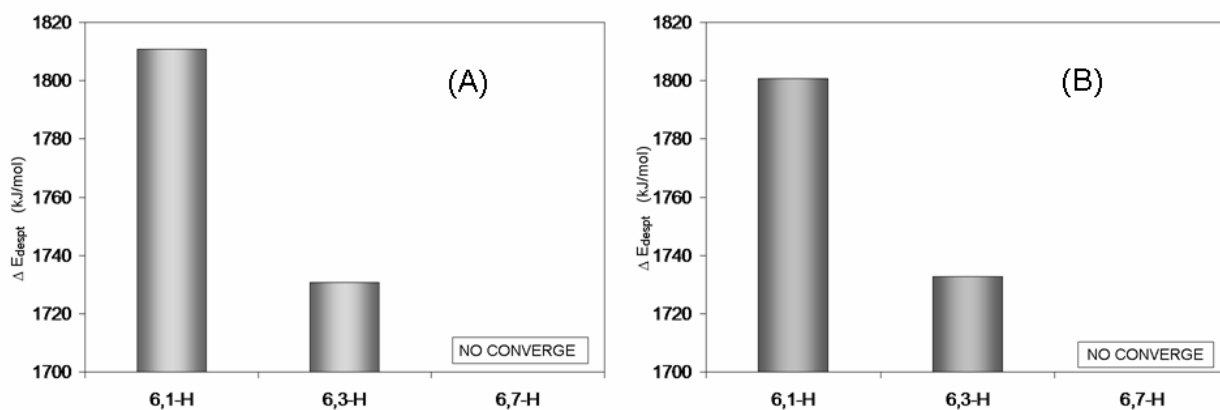


Figura 4.7. Energía relativa para la especie $H_2(MGF)^2-$ calculada de manera puntual para las geometrías (A) y (B). En el eje de las "x" se señalan los protones removidos.

De aquí se desprende que la segunda desprotonación es claramente más favorecida en 3-H, respecto de la 1-H, con una diferencia absoluta de 80.12 y 68.09 kJ/mol para las geometrías (A) y (B) respectivamente.

Mientras que para la especie $H_2(MGF)^{2-}$ el cálculo no converge cuando se han removido los protones 6 y 7; el hecho de tener dos cargas negativas en esta configuración parece exceder el alcance del método utilizado. Esto no implica que el bi-anion 6-7 no sea posible de formarse, sino que probablemente no tenemos la herramienta de cálculo adecuada para alcanzar la convergencia con la precisión definida y por tanto, no es posible el análisis de la energética involucrada en el proceso.

Por consiguiente, el cálculo propio para la tercera desprotonación se vuelve inalcanzable por estos métodos.

Sin embargo, los resultados obtenidos hasta el momento nos han proporcionado suficiente información para hacer las inferencias pertinentes, de manera similar como se realizó con el experimento.

4.4 CONCLUSIONES

Primero se ha mostrado que la formación del puente de hidrógeno en la posición 1 es la más favorecida, incluyendo el hecho de que en todos los cálculos efectuados para la primera y segunda desprotonación señalan al 1-H como el que requiere mayor energía para ser removido, lo que apoya lo observado con los experimentos de RMN, tanto a lo concerniente al puente de hidrógeno como la mayor estabilidad del 1-H con respecto a los otros protones ácidos.

En cuanto a la acidez relativa de los protones 3, 6 y 7, se observa que el protón en 6 es el que requiere menor energía para ser removido, aun cuando en un caso particular aparece como equivalente al 3-H, este resultado es justamente el que se desprende de las observaciones experimentales con RMN.

Para la segunda desprotonación, dos resultados muestran que los protones 6-H y 3-H son los más favorecidos; aunque no fue posible analizar el proceso correspondiente a las desprotonaciones que involucran 6-H y 7-H.

Por lo tanto, de acuerdo con estas tendencias se tiene que, el protón más ácido es el que se encuentra en la posición 6, seguido del 3-H y dado que se ha mostrado la mayor estabilidad aparente del 1-H, señalándolo como el menos ácido, nos quedaría por eliminación, el 7-H como el tercero en acidez relativa.

Así pues para la mangiferina, el estudio químico teórico indica la misma asignación de los valores de pKa que la que se infirió a través de los experimentos con RMN, estos valores se presentan en la tabla 4.5.

Tabla 4.5. Asignación de los valores de pKa para la mangiferina a través del estudio químico cuántico.

Equilibrio	pKa *
$H_4(\text{MGF}) = H_3(\text{MGF})^- + H^+$	pKa₁ (6-H) = 6.52 ± 0.06
$H_3(\text{MGF})^- = H_2(\text{MGF})^{2-} + H^+$	pKa₂ (3-H) = 7.97 ± 0.06
$H_2(\text{MGF})^{2-} = H(\text{MGF})^{3-} + H^+$	pKa₃ (7-H) = 9.44 ± 0.04
$H(\text{MGF})^{3-} = (\text{MGF})^{4-} + H^+$	pKa₄ (1-H) = 12.10 ± 0.02

* Los valores de pKa son los obtenidos previamente de manera experimental.

4.5 REFERENCIAS

- [1] K. Reza, E. Ahmadsreza, H. Sybolt. “Intramolecular hydrogen bonding and tautomerism in 1-[(2-hydroxy phenylamino)methylene]-2-(1H)-5-phenylazo salicylaldehyde”. *Acta Cryst. A* **60**, S267 (2004).
- [2] G.A. Jeffrey. “An introduction of Hydrogen Bonding (Topics in Physical Chemistry)”. Oxford University Press, USA (1997).
- [3] L. Pauling. “The nature of the Chemical Bond”. 2nd edition; Cornell University Press, USA (1948).
- [4] E. Espinosa, E. Malins, C. Lecomte. “Hydrogen bond strengths revealed by topological analyses of experimentally observed electron densities”. *Chem. Phys. Lett.* **285**, 170 (1998).
- [5] C.N.R. Rao. Theory of hydrogen bonding in water, in “Water, A comprehensive treatise”. Vol. 1, Ed F. Franks, Plenum Press, New York. 93 (1972).

PARTE III

IONES METÁLICOS-MANGIFERINA

En esta tercera parte se presenta un estudio espectrofotométrico sobre la interacción entre el sistema hierro-mangiferina, que lleva a la determinación de las constantes de formación del complejo encontrado, así como un estudio químico teórico, utilizando la teoría de los funcionales de la densidad, para evaluar los posibles sitios de unión del Fe(III) con la mangiferina.

CAPÍTULO 5 CONSTANTES DE COMPLEJACIÓN

5.1 INTRODUCCIÓN

Día a día aumenta el número de enfermedades en cuya etiología está involucrado el estrés oxidativo, el cual se produce cuando el ataque oxidativo supera las defensas antioxidantes, es por ello que en la actualidad existe una amplia difusión acerca de productos farmacéuticos o cosmetológicos que exaltan los beneficios del uso de antioxidantes con fines muy diversos, tales como prevención ante dichas enfermedades y mejoría en la calidad de vida [1].

En el caso de la mangiferina, se ha demostrado su efecto antioxidante, siendo el principal componente en la fórmula conocida y comercializada como Vimang® [2].

El tejido nervioso parece ser un blanco propicio para los compuestos prooxidantes, dada sus características químicas, tales como alto contenido en ácidos grasos poliinsaturados, altas concentraciones de hierro y bajo contenido en enzimas antioxidantes.

Muchas investigaciones en marcha están tratando de explicar la participación de las especies reactivas de oxígeno (EROs) en el desarrollo y características clínicas de varias enfermedades, tales como diabetes, cirrosis alcohólica, hipertiroidismo, cáncer, etc. [3-5].

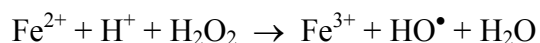
De los resultados obtenidos se sugieren nuevas estrategias para el tratamiento de estas enfermedades, y en algunos de estos casos se recomienda el uso de antioxidantes como medicina preventiva o adicional al tratamiento específico de las mismas.

Una alternativa en general, es el uso de agentes quelantes para formar complejos con especies reactivas no deseadas, en particular por ejemplo, el hierro es una sustancia que se puede convertir en una especie no deseada, cuando se encuentra en exceso, por su relación con el estrés oxidativo [3].

5.2 ANTECEDENTES

El estrés oxidativo es un estado de la célula en la cual se encuentra alterada la homeostasis óxido-reducción intracelular, es decir el balance entre prooxidantes y antioxidantes. Este desbalance se produce a causa de una excesiva producción de EROs o por deficiencia en los mecanismos antioxidantes, conduciendo a daño celular [6].

Las principales especies reactivas de oxígeno son: el radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el peróxido de Hidrógeno (H_2O_2) y el radical oxidrilo (HO^{\cdot}). Una de las principales fuentes de EROs es la cadena respiratoria, donde pueden ocurrir diferentes transferencias de electrones. Por otra parte, el H_2O_2 puede reaccionar con metales divalentes (libres o unidos a proteínas) y producir HO^{\cdot} , vía reacción de Fenton. El ejemplo tipo es la reacción con Fe^{2+} libre, que ocurre según la siguiente reacción:



En forma similar, puede reaccionar también con el grupo prostético de metaloproteínas conteniendo hierro. En este tipo de reacciones la hidroxilación y la abstracción de hidrógeno son las modificaciones más comunes que sufre el sustrato orgánico involucrado y se generan otros radicales libres orgánicos tales como: los radicales alcohoxilos (RO^{\cdot}), peroxilos (ROO^{\cdot}) y sulfoderivados. En general se han estudiado los procesos y mecanismos relacionados con los efectos de éstas y otras especies reactivas, pero la mayoría aún permanecen sin conocerse de manera definitiva [3].

Con respecto a la mangiferina, se han propuesto algunos mecanismos que involucran la formación de complejos con hierro [7-8] y que se pueden relacionar a su vez con las bioactividades encontradas para dicha sustancia, aunque cabe subrayar que no existen datos reportados sobre las constantes de complejación correspondientes.

Por tal motivo se propuso el estudio del efecto quelante entre la mangiferina y los iones Fe(II) y Fe(III).

En este sentido fue desarrollado además, un estudio químico cuántico para evaluar los posibles sitios de unión del Fe(III) con la mangiferina y apoyar los resultados experimentales.

En el anexo 6, se incluye un estudio espectrofotométrico preliminar con los iones Cu(II) y Al(III), ácidos intermedio y duro respectivamente, pensados en principio con intenciones de comparación entre ácidos de distinto comportamiento; el anexo también contiene la preparación de soluciones.

5.3 DESARROLLO EXPERIMENTAL

Se realizó un estudio espectrofotométrico UV/Vis por medio de valoraciones ácido base, para evidenciar la interacción entre los diferentes iones metálicos y la mangiferina en medio acuoso, así como experimentos de relaciones molares y variaciones continuas para obtener información sobre las posibles estequiometrías de los complejos. De igual manera se confirmaron las constantes de hidrólisis del Fe(III) bajo el mismo proceso.

En el caso de los sistemas con Fe(III) y Fe(II) se desarrollaron experimentos de estabilidad en presencia y ausencia de H₂O₂ para discutir la posible formación de dos complejos, uno para cada ion con mangiferina o de uno sólo, considerando que el Fe(II) es una especie oxidable. Con los resultados obtenidos se determinan constantes de complejación.

Valoraciones espectrofotométricas.

Las alícuotas se preparan por dilución, a partir de soluciones acuosas concentradas (generalmente 2.0×10^{-4} M), tanto de los iones como de mangiferina; en la estequiometría 1:1 la concentración de trabajo fue 4.0×10^{-5} M. Las titulaciones se realizan a temperatura constante y bajo atmósfera inerte con N_2 (g) para evitar posibles oxidaciones de los reactivos, mientras que la absorbancia y el pH fueron igualmente corregidos, todo de acuerdo a lo señalado para la mangiferina, descrito en el capítulo 2 (anexos 1 y 2).

Con respecto al intervalo de pH trabajado, éste fue entre 1.0 y 6.0, a menos que se indique de otra forma, por las siguientes consideraciones:

- En este intervalo la especie predominante de la mangiferina correspondería a la totalmente protonada dado el $pK_{a1} = 6.52 \pm 0.06$, la cual no presenta cambios espectrales antes de $pH=5.0$.
- Los iones metálicos solubles, Fe^{2+} y Fe^{3+} , prácticamente no absorben en estas condiciones y se ha buscado evitar en lo posible la precipitación de los hidróxidos correspondientes, especialmente para el Fe(III) [9].

Relaciones molares.

Estos experimentos se realizan manteniendo la concentración del ion metálico constante y variando la concentración del ligante, para un valor de $pH=4.0$ aproximado, sin amortiguar. En algunos casos se realizaron además, a valores de pH mayor.

Variaciones continuas.

Para estos experimentos se preparan mezclas de metal-ligante manteniendo la suma de las concentraciones constante en el sistema. Se preparan sistemas donde la suma de las concentraciones es 8.0×10^{-5} M. El pH se mantienen entre $4.0 \leq pH \leq 4.5$ sin amortiguar y se toman los espectros correspondientes.

Estabilidad de los complejos Fe-mangiferina.

Se preparan soluciones de $H_4(MGF)$, Fe(III) y Fe(II), 4.0×10^{-5} M, con exceso de H_2O_2 , 0.01 M aprox, a pH= 3.0, así como sistemas Fe(III)- $H_4(MGF)$ - H_2O_2 y Fe(II)- $H_4(MGF)$ - H_2O_2 , y se monitorea su comportamiento espectral durante 24 h.

Determinación de constantes de complejación.

La determinación de las constantes de complejación para los distintos sistemas, en su caso, se efectúa con los resultados de las valoraciones espectrofotométricas de manera semejante a lo realizado para la mangiferina sola.

Finalmente, se presentan los resultados de los cálculos cuánticos para el sistema Fe(III)- $H_4(MGF)$.

5.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.4.1 Valoraciones espectrofotométricas.

A continuación se presentan los espectros de absorción correspondientes para los distintos sistemas ion metálico-ligante así como el de la mangiferina sola.

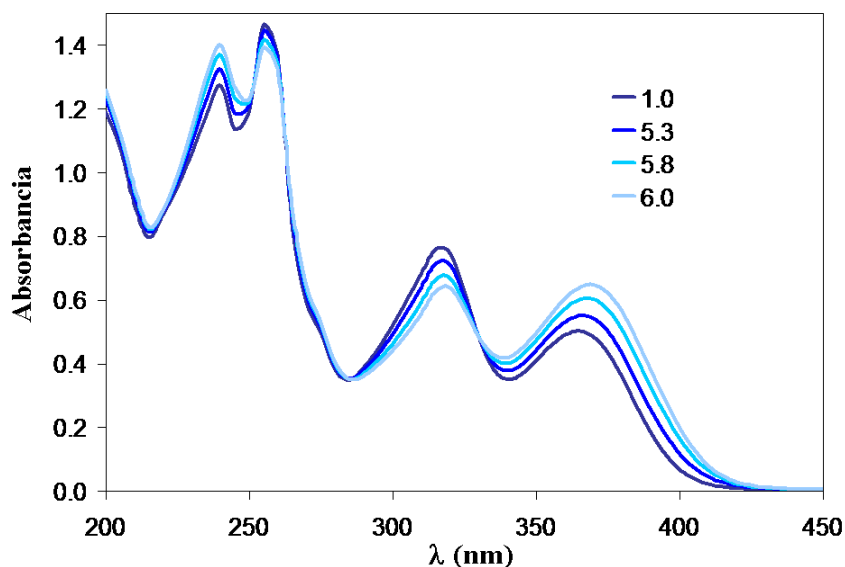


Figura 5.1. Espectros de absorción para $H_4(MGF)$, $1.0 \leq pH \leq 6.0$ $4.0 \times 10^{-5} M$.

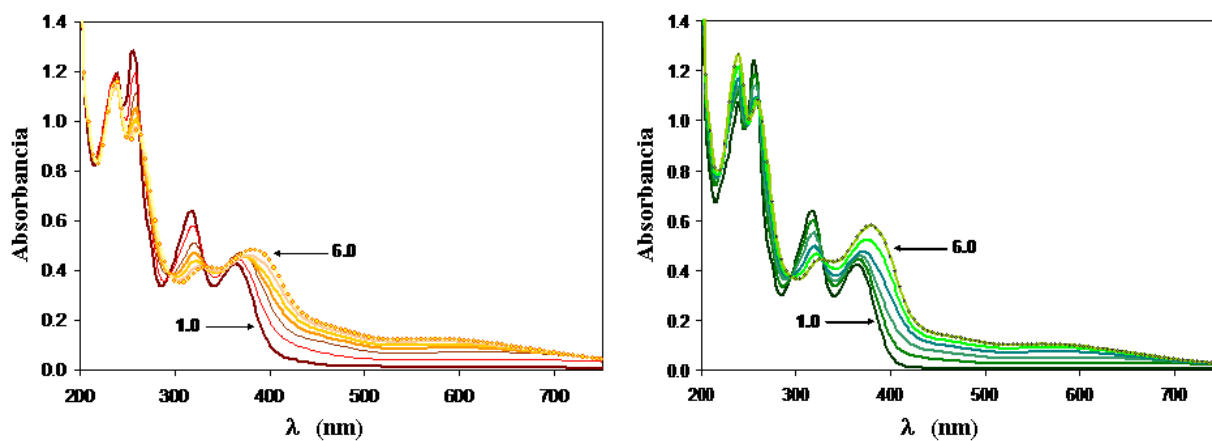


Figura 5.2. Espectros de absorción de (a) $Fe(III)-H_4(MGF)$, $1.0 \leq pH \leq 5.8$; (b) $Fe(II)-H_4(MGF)$, $1.2 \leq pH \leq 6.0$; $Fe(III)=Fe(II)=H_4(MGF)= 4.0 \times 10^{-5} M$.

Comparando las figuras figura 5.2a y b con respecto al espectro de absorción de la mangiferina, figura 5.1, se pueden observar diversos cambios espectrales en los sistemas trabajados; estos son indicativos de interacción entre los iones metálicos y la mangiferina en solución.

Los mayores cambios son observados en las transiciones electrónicas de tipo $n \rightarrow \pi^*$ ($\lambda=317$ nm) [10] y las correspondientes a la zona del visible, $\lambda > 350$ nm, mientras que la banda de absorción asociada a los anillos aromáticos en el intervalo de $220 \text{ nm} \leq \lambda \leq 270$ nm, asociadas a transiciones de energía media $\pi \rightarrow \pi^*$, presentan cambios menores relativos.

En todos los casos, el incremento en el valor del pH provoca corrimientos de tipo batocrómico en las bandas de absorción referentes a $\lambda=257, 317$ y 365 nm.

Estos sistemas de hierro presentan además, la formación de una banda de absorción de baja intensidad pero muy amplia, a partir de $\lambda=450$ nm, lo que es congruente con las transiciones de electrones tipo d esperadas para el hierro [11].

La solución muestra también un cambio de color de amarillo tenue muy pálido, característico de la mangiferina a valores de pH ácidos, hacia verde claro al inicio de la titulación y oscureciéndose conforme se incrementa el pH. Un cambio de color también se observa en el sistema con Fe(II) aunque el tono verde es más claro.

La presencia de puntos isobésticos, diferentes en posición y cantidad para los sistemas con iones metálicos son una evidencia espectral más de la existencia de equilibrios químicos involucrados.

A partir de la información de la figura 5.2, se construyen las gráficas de absorbancia contra pH, figuras 5.3, y 5.4, para las longitudes de onda de absorbancia máxima de la mangiferina a pH ácido: 240, 257, 317 y 365 nm, y $\lambda=390$ nm, que es $\lambda_{\text{máx}}$ a pH básico.

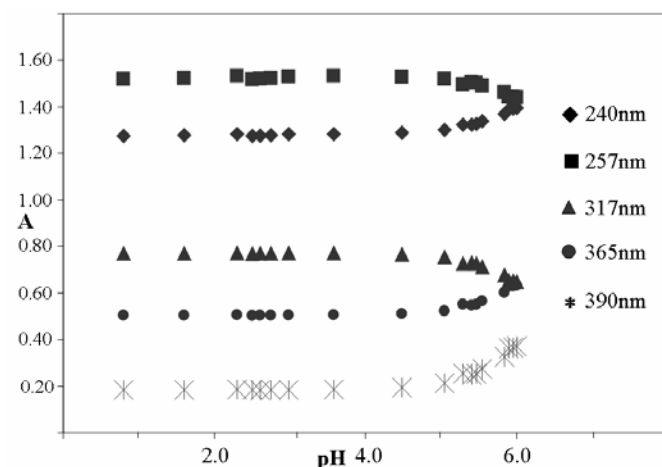


Figura 5.3. Absorbancia vs pH; mangiferina 4.0×10^{-5} M.

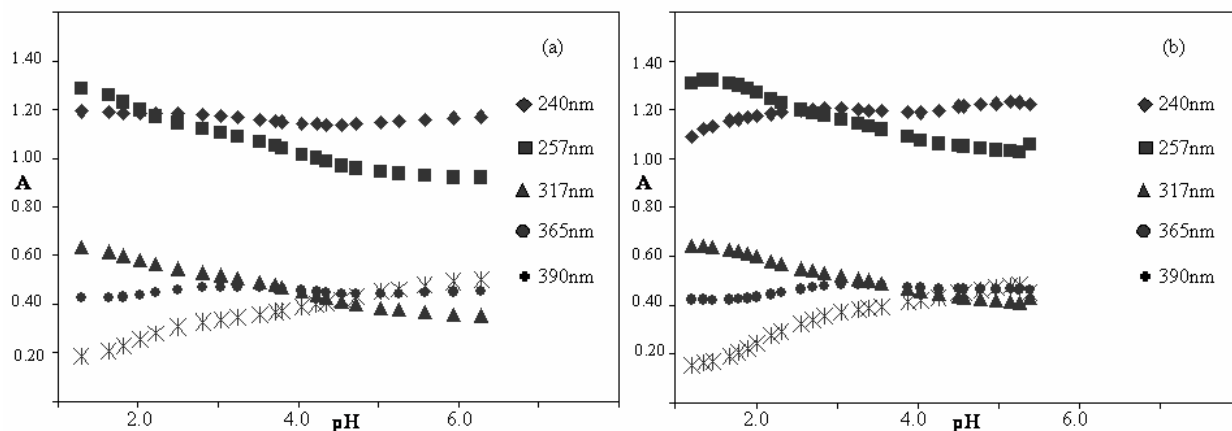


Figura 5.4. Absorbancia vs pH; Fe(III)-H₄(MGF), (b) Fe(II)-H₄(MGF);
Fe(III)=Fe(II)=H₄(MGF)= 4.0×10^{-5} M.

En estas figuras se observa claramente el cambio en el comportamiento espectral para las longitudes de onda estudiadas cuando se tienen iones metálicos en el sistema, con respecto a la mangiferina sola.

En el sistema con Fe(III), se observan cruces en valores de pH=2.2, 3.8 y 4.5, figura 5.4a.; mientras que para Fe(II)-H₄(MGF) los cruces aparecen en los valores de pH=2.5, 3.7 y 4.3, figura 5.4b. Estos resultados, aunados a lo discutido anteriormente, son evidencia de interacción entre los iones metálicos y la mangiferina, que implican la formación de complejos.

Por otra parte, de los resultados preliminares (anexo 6) para los sistemas Al-H₄(MGF) y Cu-H₄(MGF), se quiere mencionar que el comportamiento espectral de estos sistemas resulta muy semejante entre sí, como se observa en la figura 5.5. Lo que ocurre de manera similar con los sistemas Fe(III)-H₄(MGF) y Fe(II)-H₄(MGF) en la figura 5.4.

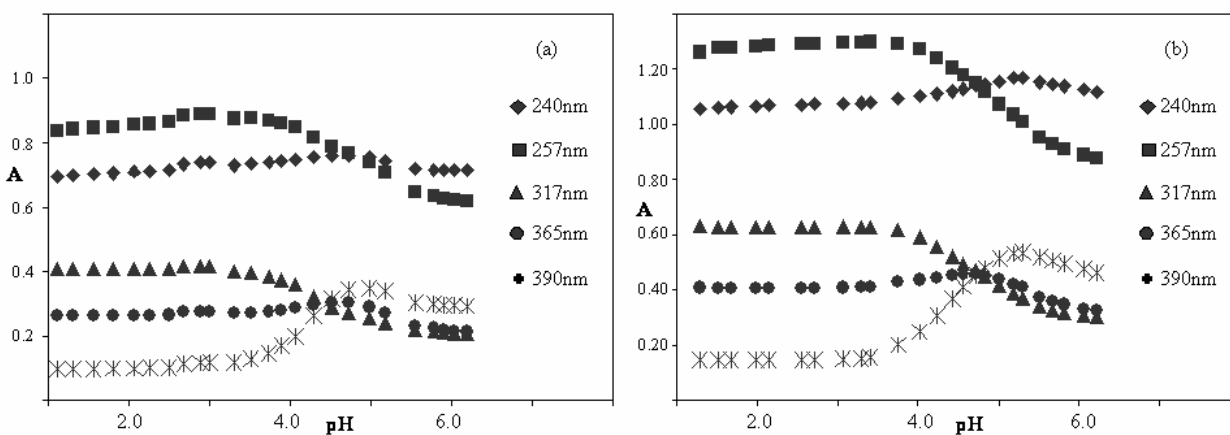


Figura 5.5. Absorbancia vs pH; (a) Al(III)-H₄(MGF), (b) Cu(II)-H₄(MGF);
Al(III)=Cu(II)=H₄(MGF)=4.0x10⁻⁵ M.

Como se mencionó anteriormente, los iones Fe(III) y el Al(III) son ácidos duros, así como el Fe(II) y el Cu(II) son ácidos de comportamiento intermedio; para la mangiferina se está suponiendo que, como base, presenta una dureza alta, hipótesis que se discute en el apartado 5.5. Es por ello que en principio se esperaban comportamientos espectrales semejantes entre los sistemas de dureza-blandura semejante y no como se ha mostrado en estas gráficas.

En el caso particular del hierro, otra posibilidad es que en realidad no exista un complejo con Fe(III) y otro con Fe(II), sino que sean el mismo, tal vez vía una reacción de tipo redox.

Siendo clara la necesidad de elucidar lo anterior, se realizaron los experimentos sobre estabilidad que se discuten más adelante.

Entonces puede decirse, hasta el momento, que en los complejos formados con Fe(III) y/o Fe(II) se observa un comportamiento espectral con transiciones electrónicas semejantes entre sí, como por su parte en los sistemas con Al(III) y Cu(II).

5.4.2 Relaciones molares y variaciones continuas.

Con el propósito de adquirir mayor información acerca de la estequiometría más probable para los sistemas metal-ligante, se realizaron los experimentos de relaciones molares y variaciones continuas.

En el caso de los sistemas con hierro, la aparición de una banda de absorbancia a valores de $\lambda > 450$ nm donde la mangiferina no absorbe, hace suponer que dicha banda se debe a la formación de una nueva especie; es por ello que se escoge la longitud de onda de 570 nm para el análisis de estos experimentos.

Se presentan los resultados correspondientes a Fe(III) para variaciones continuas en la figura 5.6, es decir, la gráfica de absorbancia, a la longitud de onda de máxima absorbancia escogida, en función de la fracción mol de $H_4(MGF)$.

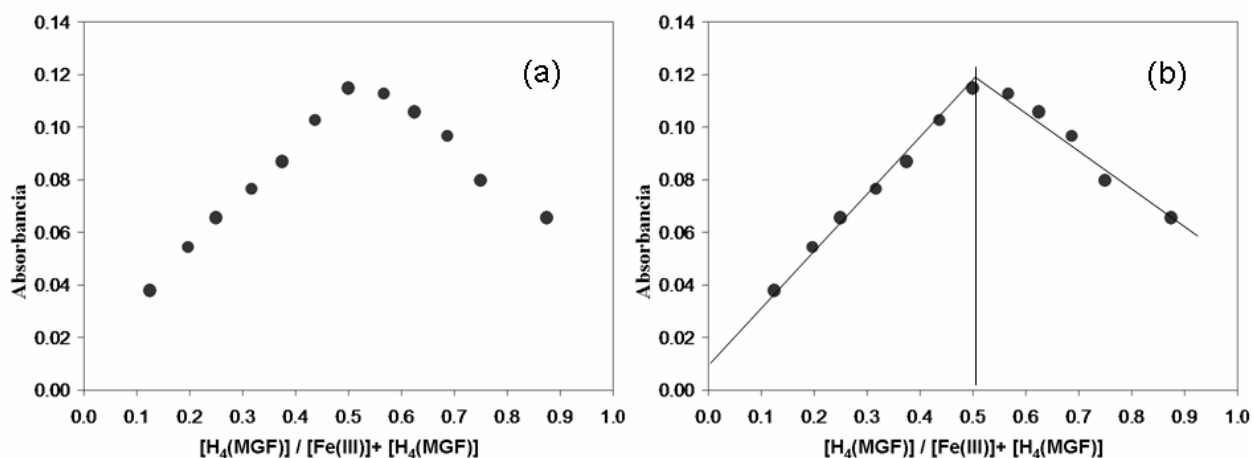


Figura 5.6. Método de variaciones continuas para el sistema Fe(III)- $H_4(MGF)$ a 570 nm; (a) resultados experimentales, (b) trazado de rectas; $pH_{promedio} = 4.0$.

De acuerdo con este método gráfico, el cambio en la pendiente indica, primero la formación de al menos un complejo y segundo, el punto de intersección de las rectas con respecto al eje de las abscisas nos señala la estequiometría más probable. En este caso la intersección de las rectas que se han trazado señala un valor aproximado de 0.5 en fracción mol, lo cual implica que la estequiometría más favorecida sería la 1:1. En el experimento de relaciones molares se obtiene un resultado similar, es decir con una estequiometría probable de 1:1.

Cabe señalar que en ambos métodos la estequiometría 1:2 no se puede eliminar por completo ya que se observan pequeños indicios al respecto pero que implica una población menor aparente a la de los complejos 1.1.

Por otra parte, ambos experimentos dan resultados semejantes para el sistema con Fe(II), siendo la estequiometría 1:1 la más probable.

5.4.3 Estabilidad de los complejos Fe-mangiferina.

Dado que durante los experimentos con el sistema hierro-mangiferina se ha observado que el comportamiento espectral Fe(III)-H₄(MGF) y Fe(II)-H₄(MGF) es muy semejante y que existe la posibilidad de reacciones redox tanto para el hierro como para la mangiferina, se decidió realizar experimentos de estos sistemas que involucran la presencia de una especie oxidante fuerte como lo es el peróxido de hidrógeno, H₂O₂.

A continuación se presentan los espectros de absorción para H₄(MGF) en presencia, ausencia de H₂O₂, y para diferentes tiempos después de efectuada la mezcla, figura 5.7. En estos sistemas no se observa absorbancia entre $450 \text{ nm} \leq \lambda \leq 900 \text{ nm}$.

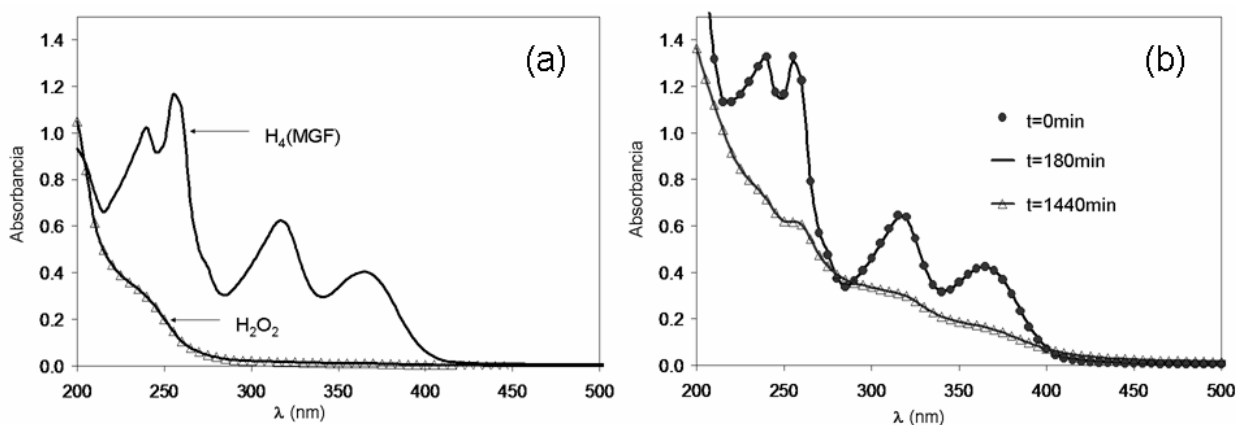


Figura 5.7. Sistema H₄(MGF)-H₂O₂ pH=3.0; (a) H₄(MGF) 4.0x10⁻⁵ M y H₂O₂ 4.0x10⁻⁴ M, (b) H₄(MGF)+H₂O₂ a diferentes tiempos.

De la figura 5.7 se ve que la presencia de H_2O_2 provoca un cambio espectral tal, en la mangiferina, que se podría asociar a la especie oxidada correspondiente [12], figura 5.8; aunque debe subrayarse el hecho de que fue necesario agregar una cantidad en exceso de peróxido de hidrógeno para poder observar el cambio y éste no es claro durante, al menos, las tres primeras horas después de la preparación de la mezcla.

Lo anterior puede deberse a la formación de especies intermediarias no absorbentes en UV/Vis, de tal manera que sólo se observa el producto final de la oxidación.

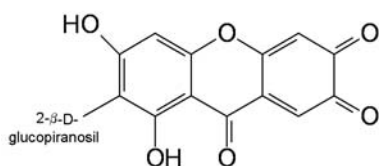


Figura 5.8. Estructura de la especie mangiferina oxidada.

Este resultado, aunado al obtenido con ^{13}C -RMN (apartado 3.4, figura 3.12) para la solución de mangiferina, prueba que ésta en medio acuoso, se encuentra en su forma reducida a valores de pH ácido, $H_4(MGF)$ de acuerdo a la nomenclatura propuesta, como se había venido afirmando.

En seguida se presentan los resultados obtenidos para los sistemas con hierro. Los sistemas de la figura 5.9 no absorben entre $450\text{ nm} \leq \lambda \leq 900\text{ nm}$.

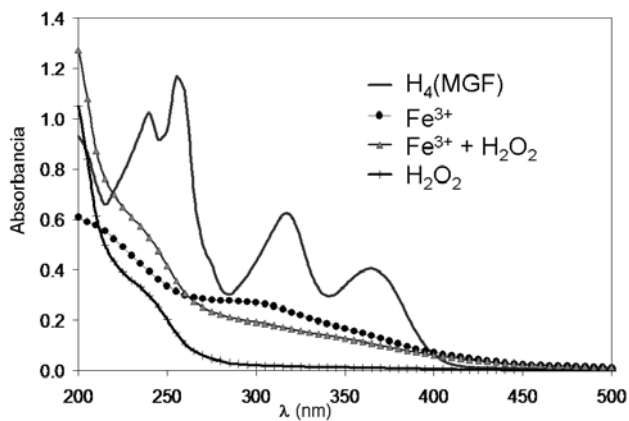


Figura 5.9. Espectros de absorción para el sistema $Fe(III)$ - $H_4(MGF)$ - H_2O_2 ; $Fe(III)$ y $H_4(MGF)$ = 4.0×10^{-5} M, H_2O_2 = 4.0×10^{-4} M; pH=3.0.

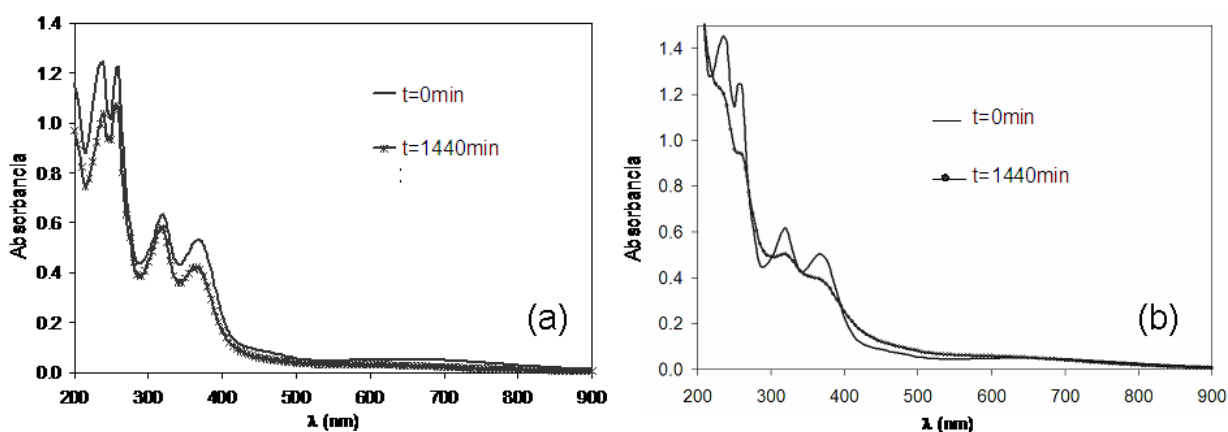


Figura 5.10. Espectros de absorción a diferentes tiempos para (a) Fe(III)-H₄(MGF) y (b) Fe(III)-H₂O₂-H₄(MGF); pH=3.0; Fe(III) y H₄(MGF) = 4.0×10^{-5} M, H₂O₂ = 4.0×10^{-4} M.

El sistema Fe(III)-H₄(MGF) a pH=3.0, presenta cambios espectrales con respecto al tiempo, tanto en ausencia como en presencia de H₂O₂, figuras 5.10a y b respectivamente, sin embargo, el comportamiento espectral es diferente para cada caso.

En ausencia de H₂O₂, el cambio espectral sugiere que el sistema Fe(III)-H₄(MGF) tiene una cinética asociada, mientras que el espectro obtenido, cuando se agrega el peróxido de hidrógeno, es muy semejante al de la mangiferina oxidada, lo que nos llevaría a suponer que el complejo formado en un principio, se descompone con la presencia de dicha sustancia.

La inestabilidad sugerida por el experimento anterior, en ausencia de H₂O₂, no implica que el complejo no se forme, pero sí motiva un cambio en el desarrollo experimental para la determinación de las constantes de complejación correspondientes.

En cuanto al experimento con Fe(II), éste nos ha proporcionado resultados muy interesantes, como se observa a continuación:

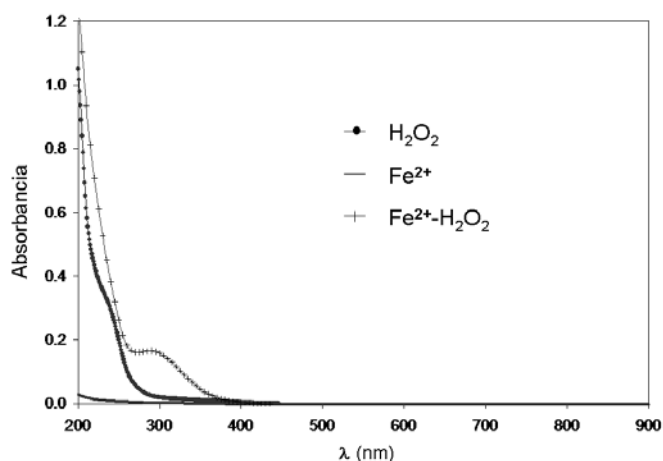


Figura 5.11. Sistema Fe(II)-H₂O₂; Fe(II) = 4.0x10⁻⁵ M, H₂O₂ = 4.0x10⁻⁴ M; pH=3.0.

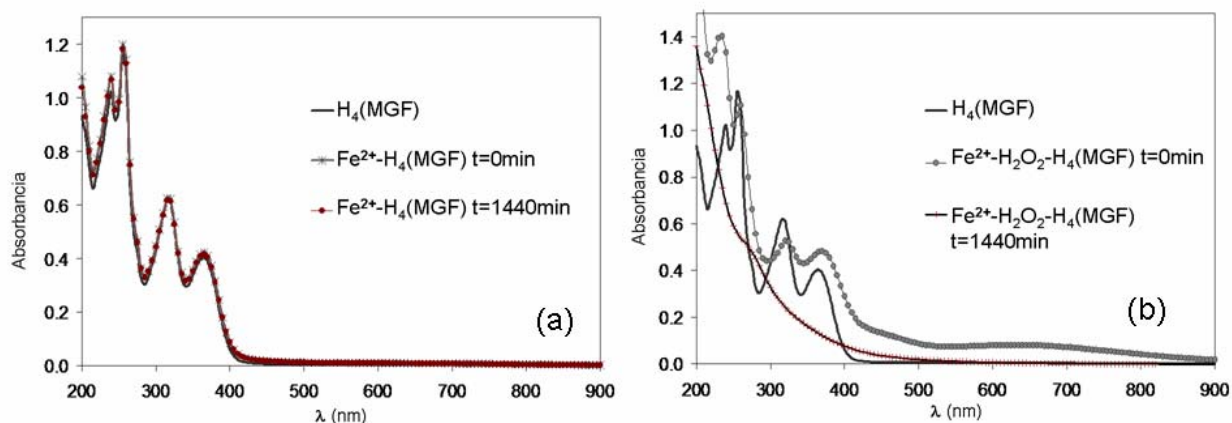


Figura 5.12. Espectros de absorción a diferentes tiempos (a) Fe(II)- H₄(MGF); (b) Fe(II)- H₂O₂- H₄(MGF); Fe(II) = H₄(MGF) = 4.0x10⁻⁵ M, H₂O₂ = 4.0x10⁻⁴ M; pH=3.0.

La solución de Fe(II) con mangiferina a un valor de pH=3.0, con relación estequiométrica de 1:1, no presenta cambio espectral alguno con respecto a la mangiferina, tanto al momento de la preparación, como 24 h más tarde, figura 5.12a. Sin embargo, si se agrega H₂O₂ al sistema se observa un cambio espectral importante que sugiere la formación de un complejo, figura 5.12b.

Sabiendo que el Fe(II) es factible de oxidarse por acción del H₂O₂, como se muestra en la figura 5.11, y que el espectro obtenido de la mezcla es muy semejante a aquél análogo con Fe(III), figura 5.9, se llega a la conclusión de que a pH=3.0, no se observa la formación de un complejo Fe(II)-H₄(MGF), en al menos 24h.

Se observa además, que la solución Fe(II)-H₂O₂-H₄(MGF), presenta un cambio espectral con respecto al tiempo, figura 5.12b, lo que hace suponer que el exceso de H₂O₂ actúa de alguna manera sobre el complejo formado, recordando que esta sustancia es justamente una de las especies reactivas de oxígeno relacionadas con el estrés oxidativo y la mangiferina, precisamente por su reactividad.

Así mismo, debe mencionarse que el orden inverso, H₄(MGF)-H₂O₂-Fe(II), en la preparación del sistema, lo hace aún más inestable, obteniéndose un espectro tipo Fe(II)-H₂O₂-H₄(MGF) para t=1440 min (figura 5.12b), habiendo transcurrido cinco minutos de su preparación.

Por otra parte, si se compara el espectro de Fe(II)-H₂O₂-H₄(MGF) con aquel obtenido en la valoración ácido-base, ambos al valor de pH=3.0, figura 5.13, se puede ver que prácticamente se sobreponen, lo que llevaría a suponer que se trata de la misma especie.

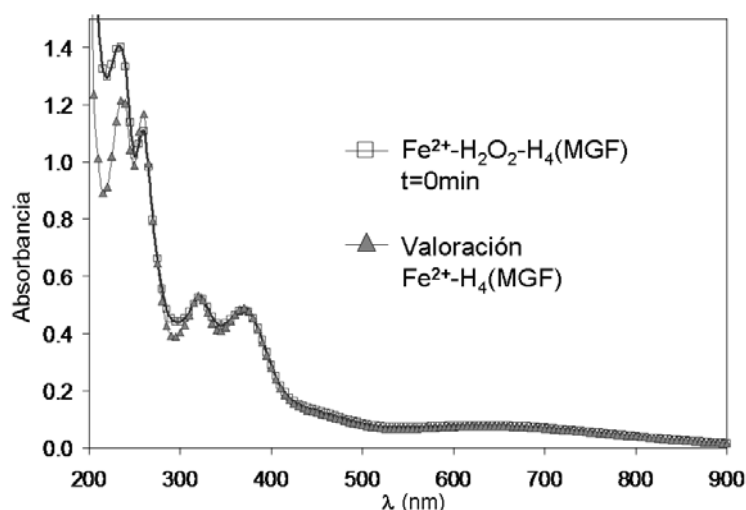


Figura 5.13. Espectros de absorción a pH=3.0 para Fe(II)-H₂O₂-H₄(MGF) y a partir de la valoración de Fe(II)-H₄(MGF); Fe(II) = H₄(MGF) = 4.0x10⁻⁵ M, H₂O₂ = 4.0x10⁻⁴ M.

Estos resultados llaman la atención, ya que por un lado supone que de alguna forma, a través de la valoración del sistema Fe(II)-H₄(MGF), se está llegando a la misma especie formada en el sistema Fe(III)-H₄(MGF), lo que podría explicarse por la presencia de oxígeno en el medio durante la valoración que provocara la oxidación del Fe(II), y que implica que el complejo con Fe(II) o bien no existe, o la reacción es lenta con respecto a la de Fe(III).

Por otro lado, considerando el experimento $H_4(MGF) + H_2O_2$, se llega primero, a que la oxidación de la mangiferina requiere un exceso de H_2O_2 y es relativamente lenta, y segundo, que el complejo formado con Fe(III) supone a la especie mangiferina reducida. Es decir, lo anterior sugiere que la reacción vía redox es poco probable.

De esta manera, en el presente trabajo no se halló evidencia suficiente para confirmar la formación de un complejo con Fe(II), en estas condiciones de trabajo.

Cabe mencionar que tanto el grupo de Ghosal [7], como el grupo de Pardo-Andreu [8] manejan la hipótesis de un complejo Fe(II)- $H_4(MGF)$ como primer paso para la formación posterior del complejo Fe(III)- $H_4(MGF)$, sin embargo, las condiciones experimentales que trabajan son diferentes.

Por lo tanto, se prosigue con la determinación de las constantes de complejación únicamente del sistema Fe(III)- $H_4(MGF)$.

5.4.4 Determinación de constantes de complejación para Fe(III)- $H_4(MGF)$.

Con lo observado en los experimentos anteriores, se decide hacer la valoración espectrofotométrica con un conjunto de soluciones a diferentes valores de pH preparadas de manera independiente, tomando los espectros correspondientes 24 horas después.

En la figura 5.14 se presentan algunos espectros escogidos de este experimento.

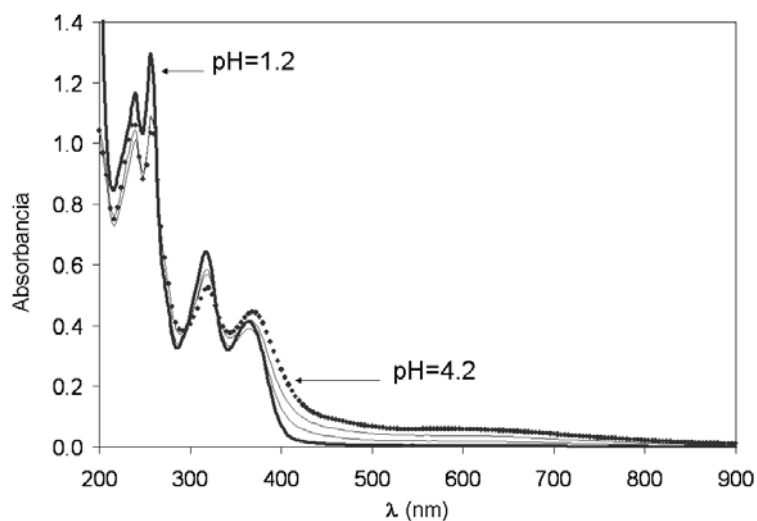


Figura 5.14. Espectros de absorción para Fe(III)-H₄(MGF) a partir de soluciones independientes, t=24 h; Fe(III) = H₄(MGF) = 4.0x10⁻⁵ M; 1.2 ≤ pH ≤ 4.2.

Además, el número de especies solubles utilizado como punto de partida en la construcción de modelos congruentes para la determinación con el programa SQUAD se tomó con base en los resultados de los programas TRIANG [13] y SIBYLA [14]; los cuales fueron alimentados con la información de las valoraciones espectrofotométricas realizadas. Los datos experimentales fueron tratados con los tres programas de acuerdo a lo siguiente:

- Todos los resultados que se muestran en esta discusión corresponden a la valoración con soluciones independientes, 24 h después de su preparación.
- Los juegos de datos espectrales fueron integrados por 48 puntos de absorbancia en el intervalo de 250 a 438 nm, cada 4 nm, para cada uno de los 24 valores de pH escogidos entre $1.0 \leq \text{pH} \leq 4.1$. A valores de pH mayor, no era posible controlar la precipitación del Fe(OH)₃.
- Un mismo juego de datos es utilizado en los cálculos con los programas TRIANG, SIBYLA y SQUAD, para cada determinación.
- El intervalo de longitudes de onda, así como los valores de pH, se selecciona por contener la mayor información espectral posible con los cambios significativos, como puntos isobásticos.

- Se buscaron opciones que incluyeran la nueva banda de absorbancia asociada al complejo, sin embargo ésta es muy ancha y con baja intensidad, lo que dificulta el cálculo, por ello fueron descartados intervalos a menor energía.

En la tabla 5.1 se resume los resultados obtenidos con los programas TRIANG y SIBYLA.

Tabla 5.1. Número de especies absorbentes probables de acuerdo a los programas TRIANG y SIBYLA

SISTEMA	TRIANG		SIBYLA	
	No. de especies absorbentes probables	Error (ΔT)	No. de factores	(σ)
Ion metálico-ligante 1:1				
Fe(III)-H₄(MGF)	2	0.003	2	0.005

Con esta información se proponen varios modelos químicos de trabajo para SQUAD buscando el que mejor se adecue a lo observado experimentalmente y que sean capaces de reproducir dichos resultados.

En la información proporcionada al programa SQUAD se ha incluido, como valores fijos, los coeficientes de absortividad molar obtenidos para la especie completamente protonada H₄(MGF), ya que en este intervalo de pH sería la especie predominante, como se ha mencionado.

El resumen de los modelos utilizados y los valores para las constantes de complejación obtenidos se presenta en la tabla 5.2.

Tabla 5.2. Constantes de complejación para el sistema Fe(III)-H₄(MGF) determinados con el programa SQUAD.

Modelo: equilibrio	log β	σ _{const}	σ _{tot}	U
I Fe ³⁺ + H ₄ (MGF) = [FeH ₄ (MGF)] ³⁺	log β ₁ =4.081	0.03	3.60x10 ⁻²	1.33
II Fe ³⁺ + H ₄ (MGF) + H ₂ O = [FeH ₄ (MGF)(OH)] ²⁺ + H ⁺	log β ₁ = 3.64	0.05	3.01	9.5x10 ⁻¹
III Fe ³⁺ + H ₄ (MGF) + H ₂ O = [FeH ₄ (MGF)(OH)] ²⁺ + H ⁺	log β ₁ = 4.0 log β ₂ = 0.66	0.01 0.05	1.56x10 ⁻²	2.44x10 ⁻¹
Fe ³⁺ + H ₄ (MGF) + 2 H ₂ O = [FeH ₄ (MGF)(OH) ₂] ⁺ + 2H ⁺				

σ_{const}= desviación estándar sobre la constante; σ_{tot}=desviación estándar total sobre las constantes; U= suma de cuadrados de las absorbancias calculadas.

Éste es uno de los casos en donde, con el mejor juego de valores de los parámetros estadísticos no necesariamente se llega al mejor ajuste: el modelo III, de dos equilibrios, tiene los valores más bajos con respecto a los otros modelos, pero no es capaz de reproducir adecuadamente los resultados experimentales; lo cual se puede ver en la figura 5.15, en una comparación con el modelo II. Las gráficas se construyen con los coeficientes de absorptividad molar dados por SQUAD.

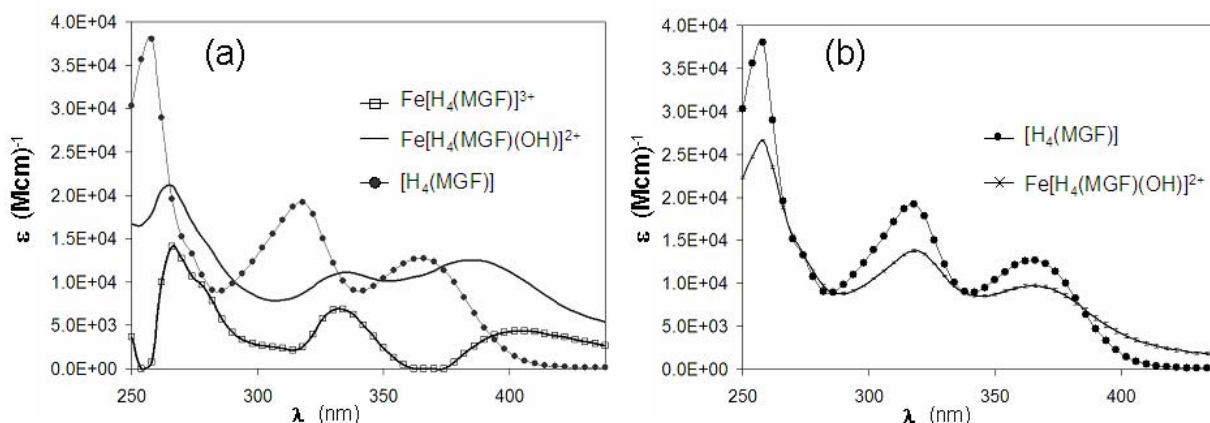


Figura 5.15. Coeficientes de absorptividad molar calculados por SQUAD; (a) Modelo III, (b) Modelo II, de acuerdo a la tabla 5.2.

Además, en la figura 5.15b, se han incluido como barras de error la desviación calculada para los coeficientes de la especie $\text{Fe}[\text{H}_4(\text{MGF})(\text{OH})]^{2+}$, que en el caso de $\text{H}_4(\text{MGF})$ no aparecen por ser valores fijos. Como puede apreciarse el error asociado es muy pequeño.

Con este modelo se construye el diagrama de distribución de especies correspondiente, figura 5.16, utilizando el programa MEDUSA [15] incluyendo los valores de las constantes de formación para todas las especies solubles tanto de la mangiferina como de Fe(III).

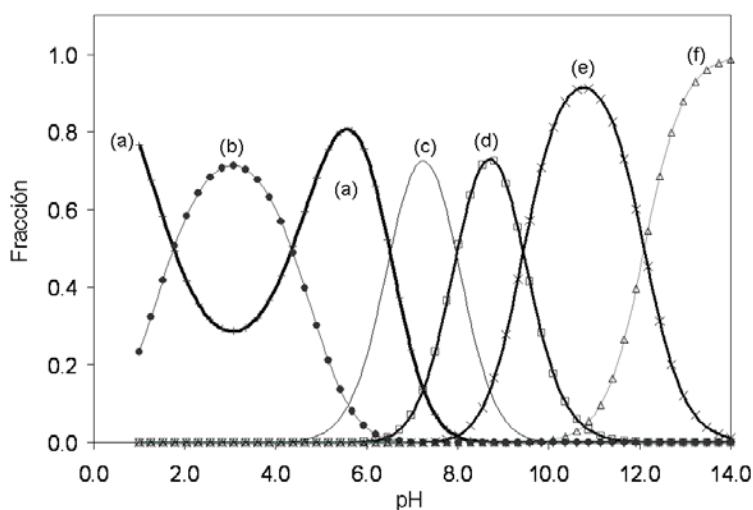


Figura 5.16. Diagrama de distribución para las especies de Fe(III)- $\text{H}_4(\text{MGF})$ 1:1; (a) $\text{H}_4(\text{MGF})$; (b) $[\text{FeH}_4(\text{MGF})(\text{OH})]^{2+}$; (c) $\text{H}_3(\text{MGF})$; (d) $\text{H}_2(\text{MGF})^{2-}$; (e) $\text{H}(\text{MGF})^{3-}$; (f) $(\text{MGF})^{4-}$.
 $\text{H}_4(\text{MGF}) = \text{Fe}^{3+} = 4.0 \times 10^{-5} \text{ M}$

De acuerdo con este diagrama, las especies de Fe^{3+} libre, así como sus hidróxidos solubles $[\text{Fe}(\text{OH})]^{2+}$ y $[\text{Fe}(\text{OH})_2]^+$, no podrían predominar y después del valor de $\text{pH}=6.7$ aparecen las especies desprotonadas de la mangiferina. Mientras que para el intervalo de pH trabajado con SQUAD entre $1.0 \leq \text{pH} \leq 4.2$, se suceden las especies de $\text{H}_4(\text{MGF})$ y $[\text{FeH}_4(\text{MGF})(\text{OH})]^{2+}$, donde además reaparece $\text{H}_4(\text{MGF})$ como especie predominante después de $\text{pH}= 4.4$.

Esto podría entenderse como que el complejo se rompe después de $\text{pH}= 4.4$, dejando a la mangiferina libre, sin embargo, se debe recordar que no fue posible obtener espectros confiables en el intervalo de $4.4 \leq \text{pH} \leq 6.5$ por la aparición de un precipitado.

Lo anterior deja abierta la especulación sobre cuáles serían las especies predominantes en este intervalo; lo cierto es que la coloración verde tenue en la solución, prevalece hasta un valor de $\text{pH}=5.5$ aproximadamente.

Entonces se puede decir que, para $\text{pH} \leq 4.4$, los resultados son congruentes tanto con lo observado experimentalmente como con el número de especies esperadas según lo señalado por TRIANG y SIBYLA.

En cuanto al modelo, en la especie denominada $[\text{FeH}_4(\text{MGF})(\text{OH})]^{2+}$ la ganancia de hidroxilos se puede interpretar como desprotonaciones con dos escenarios posibles:

1°. Al unirse el Fe(III) a la mangiferina lo hace con una esfera de coordinación de agua, que se esperaría octaédrica [11]; la especie $[\text{FeH}_4(\text{MGF})(\text{OH})]^{2+}$ sería entonces producto de las desprotonaciones sucesivas de moléculas de esta agua de coordinación, dejando al ligante sin desprotonar.

2°. La desprotonación ocurre en la mangiferina, quedando el agua de coordinación en el Fe(III) intacta, con la cantidad adecuada de moléculas de ésta.

De acuerdo con lo observado experimentalmente para este sistema, figura 5.14, el comportamiento espectral es más semejante al de la mangiferina completamente protonada $\text{H}_4(\text{MGF})$ que al de la especie $\text{H}_3(\text{MGF})^-$, lo que podría sugerir que la interpretación más adecuada fuera la primera; sin embargo se piensa poco probable, desde la perspectiva de la química de solución, que el hierro se enlace con el ligante sin desprotonarlo. En su lugar, se cree más adecuado suponer que la formación del complejo involucra una desprotonación por parte del ligante.

Aún así, la elección de una interpretación más probable resulta no concluyente por el momento.

Buscando mayor información para discutir ambas interpretaciones y dado que la estructura molecular de los complejos formados no ha sido establecida, se realizó el estudio químico cuántico siguiente.

5.5 ESTUDIO QUÍMICO CUÁNTICO PARA EL COMPLEJO Fe(III)-H₄(MGF).

En este apartado se discuten las posibles posiciones del hierro al formar un complejo con la mangiferina desde el punto de vista energético para el sistema Fe(III)-H₄(MGF) con estequiometría 1:1, así como el análisis de la blandura de la mangiferina. Todo en el marco de la teoría de los funcionales de la densidad (TDF). Para el ion Fe(III) se utilizó el pseudopotencial ECP (Effective Core potencial).

Los pseudopotenciales se utilizan en particular para reducir esfuerzo computacional cuando es posible, en este caso, reemplazando algunas funciones de base por una forma numérica o analítica simplificada. En dicha aproximación se considera a los electrones cercanos al núcleo (o del *core*) como si estuvieran congelados, tomando solo los electrones de valencia o externos para el cálculo. Esto se basa en la idea de que en la formación de una molécula los electrones internos de los iones no están involucrados en el enlace químico y que no cambian por modificaciones estructurales en la molécula.

El programa empleado para las optimizaciones y el cálculo de la energía electrónica final, es el Accelrys MS Modeling 3.0.1 de Accelrys Inc. Y se sigue una metodología semejante a la utilizada en el capítulo 4, en particular, en el apartado 4.3.2.

A partir de la geometría optimizada para la mangiferina, se optimiza la geometría y se calcula la energía, a un solo punto, del complejo con hierro. Se han escogido tres posiciones de unión más probables con respecto a la mangiferina, en 1-O, 3-O y 6-O. El hierro se ha supuesto octaédrico.

Se inicia con la discusión de las posibles posiciones de unión, bajo el criterio de reactividad local dado por los índices de Fukui (Anexo 5).

5.5.1 Índices de Fukui para ataque electrofílico en la mangiferina.

La función de Fukui electrofílica $f^-(r)$, es un parámetro de tipo local, que se relaciona con los sitios donadores de electrones del sistema. Además, la blandura local está asociada a dichos índices [16], de tal manera que los valores mayores implican una mayor blandura local.

En la tabla 5.3 se presentan los valores correspondientes para los oxígenos de interés: 1, 3, 6 y 7.

Tabla 5.3. Índices de Fukui, $f^-(r)$, para $H_4(\text{MGF})$

Átomo	$f^-(r)$
1-O	0.079
3-O	0.040
6-O	0.039
7-O	0.049

La blandura local relativa entre ellos, entonces sería 1-O > 7-O > 3-O > 6-O. Donde la diferencia entre 3-O y 6-O es mínima, por lo que podrían considerarse casi equivalentes.

Como el Fe(III) está clasificado como un ácido duro, éste reaccionaría preferentemente con los oxígenos de menor blandura [16], por lo que el orden preferente de los sitios de unión sería 6-O \approx 3-O > 7-O > 1-O; lo cuál es congruente con las asignaciones de los valores de pKa que se han presentado.

5.5.2. Geometrías optimizadas y cálculo de la energía para el complejo Fe(III)- $H_4(\text{MGF})$.

Al optimizar las geometrías se encuentra que, el modelo donde se propone que el Fe(III) se una con la mangiferina completamente protonada, $H_4(\text{MGF})$, no converge, sin importar la posición en la que se una el hierro; por lo que el análisis energético se realiza únicamente con el modelo que supone al Fe(III) unido a la mangiferina después de la primera desprotonación.

Las figuras 5.17 y 5.18 muestran las geometrías optimizadas para dicho modelo, con el hierro unido en la posición 1 ó 3.

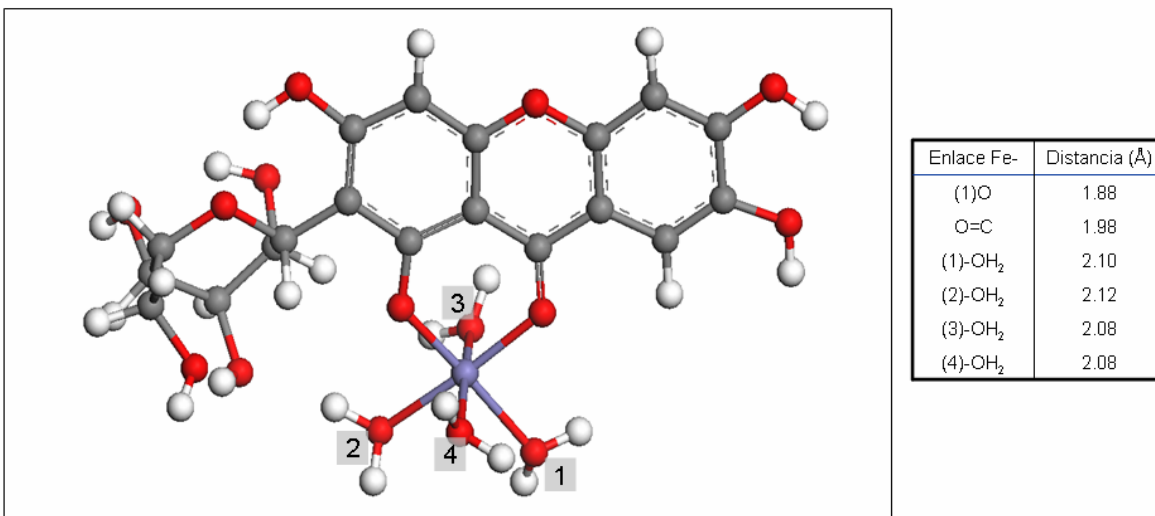


Figura 5.17. Geometría optimizada y distancias de enlace para el complejo $\text{Fe}[\text{H}_3(\text{MGF})]^{2+}$.

El Fe(III) unido en O-1.

En este resultado, las distancias de enlace alrededor del centro metálico nos indican que el Fe(III) se enlaza tanto al 1-O como al oxígeno carbonílico.

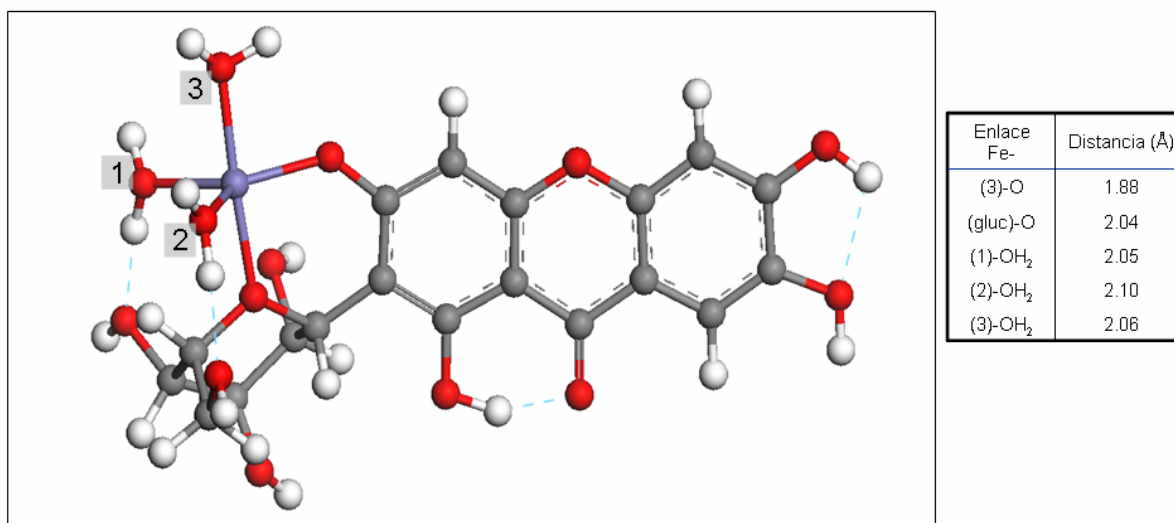


Figura 5.18. Geometría optimizada y distancias de enlace para el complejo $\text{Fe}[\text{H}_3(\text{MGF})]^{2+}$.

El Fe(III) unido en O-3.

En este caso, la geometría optimizada nos indica una estructura donde el Fe(III) es trigonal bipyramidal, y al enlazarse con el 3-O, provoca un acomodo tal del grupo glucosídico que le permite enlazarse con el oxígeno de este anillo. Además, se observa la formación de dos puentes de hidrógeno entre las moléculas de agua, coordinadas al Fe(III), con los grupos hidroxilo del glucósido.

En cuanto a la energética, el cálculo se efectúa utilizando la Ley de Hess, recordando que los procesos de desprotonación no son equivalentes, dependen de la posición del protón a remover, de acuerdo a lo discutido en el apartado 4.3.2.

El análisis de la estabilidad relativa para las dos posiciones de complejación se muestra en la tabla 5.4.

Tabla 5.4. Energías relativas de desprotonación para $H_3(MGF)^-$, cálculo a un solo punto,

Posición de unión del Fe(III)	Energía relativa de complejación ΔE_{comp} (kJ/mol)	Diferencia absoluta (kJ/mol) $ \Delta E_{\text{comp}(1)} - \Delta E_{\text{comp}(3)} $
1-O	-4101270.41	130.09
3-O	-4101140.32	

De donde se puede observar que el modo de complejación para la mangiferina con Fe(III) más estable es cuando el ion metálico se enlaza en la posición 1-O.

Por una parte, de acuerdo a los índices de Fukui, el oxígeno que presentaría una blandura local mayor y por lo tanto sería el sitio menos favorecido para unirse al Fe(III) es el 1-O, pero por el otro lado, de acuerdo a la energética analizada, éste sería justamente el sitio más estable para el Fe(III) en el complejo. Ahora bien, en el cálculo de la energía relativa para cada proceso de formación del complejo, se está considerando la desprotonación pertinente, lo que implica que tiene mayor información específica, así que la diferencia de 130 kJ/mol en energía relativa entre ambas posiciones del Fe(III), 1-O y 3-O es significativa.

Es decir, de acuerdo a estos resultados en vacío, la posición de unión más probable para el Fe(III) en la mangiferina sería en el 1-O.

Finalmente, se señala que no fue posible analizar la energética para el complejo formado con Fe(III) en la posición 6; primero porque solamente cuando se han removido los dos protones 6 y 7, figura 5.19, este modelo converge, y segundo, porque no se tiene la energía relativa para la segunda desprotonación de éste caso particular (apartado 4.3.2), necesaria para el cálculo de la energía total del proceso vía la Ley de Hess.

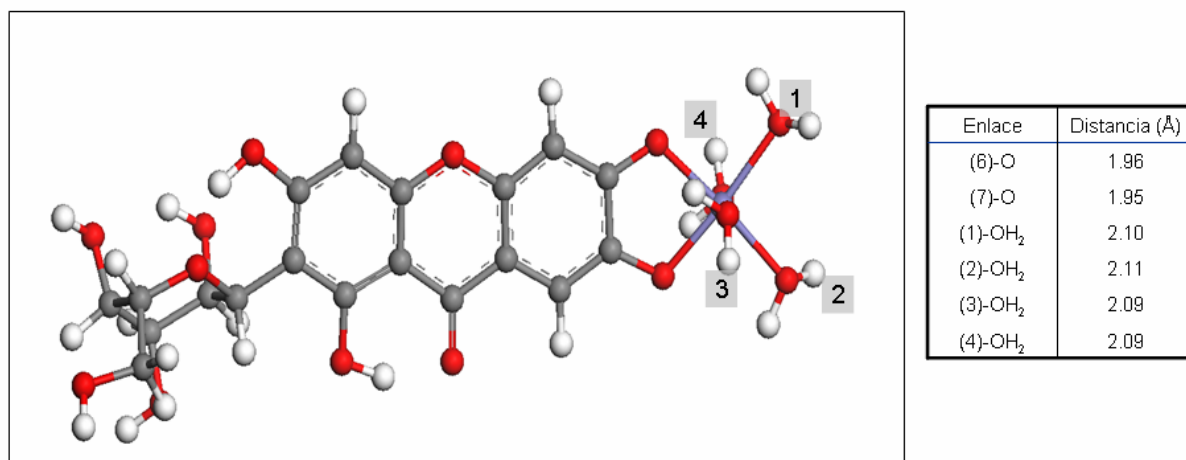


Figura 5.19. Geometría optimizada y distancias de enlace para el complejo $\text{Fe}[\text{H}_3(\text{MGF})]^{2+}$.
El Fe(III) unido en O-6 y O-7.

De esta manera, el cálculo teórico nos ha dado información que no sólo es congruente con las observaciones experimentales, como en el caso con la mangiferina, sino que nos da una pauta para discutir los modelos químicos propuestos en la determinación de las constantes de complejación.

5.6 CONCLUSIONES

Se ha mostrado evidencia espectral de UV/Vis que señala la presencia de nuevos equilibrios dependientes del pH para el sistema Fe(III)-H₄(MGF) en medio acuoso.

Esta evidencia aunada a la obtenida de los experimentos con H₂O₂, han llevado a la conclusión de que, bajo estas condiciones de trabajo, únicamente se forma el complejo Fe(III)-mangiferina.

Se determinaron entonces, las constantes de complejación para el sistema Fe(III)-H₄(MGF) en agua, utilizando el programa SQUAD. El log β obtenido es de 3.64 ± 0.05 .

El modelo químico con el mejor ajuste, de estequiometría 1:1, fue evaluado con un estudio teórico, lo que permitió una mejor interpretación del mismo, donde la nueva especie formada implica la desprotonación de la mangiferina por la unión con el Fe(III) que da lugar a una especie más estable.

El estudio teórico da como resultado que la posición más probable para la unión del Fe(III) con la mangiferina es también aquella a la que se ha asignado como la menos ácida: la posición en 1. Lo cual podría explicarse suponiendo que la formación del complejo en esta posición se ve altamente favorecida por tener mayor estabilidad relativa con respecto a la posición en 3-O.

5.7 REFERENCIAS

- [1] Ma. del C. Ríos de Molina. *Revista Química Viva*. Vol.2, número 1, 2003. quimicaviva@qb.fcen.uba.ar
- [2] A.J. Núñez-Sellés, H.T. Velez, J. Agüero-Agüero, J. González-González, F. Naddeo, F. De Simone, L. Rastelli. "Isolation and quantitative análisis of phenolic antioxidants, free sugars, and polyols from mango (*Mangifera indica* L.) stem bark aqueous decoction used in Cuba as a nutritional supplement". *J. Agric. Food. Chem.* **50**, 762 (2002).
- [3] E.S. Henle, S. Linn. "Formation, prevention, and repair of DNA damage by Iron/Hydrogen peroxide". *J. Biol. Chem.* **272**, 19095 (1997).
- [4] B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge. "Role of Free Radicals in biology and medicine". 3rd ed., Oxford, Oxford University Press. (1999).
- [5] B.S. Berlett, E.R. Stadtman. "Protein oxidation in aging, disease and oxidative stress". *J. Biol. Chem.* **272**, 20313 (1997).
- [6] A. Bermúdez Fajardo. "Estrés oxidativo en Biomedicina". Libro electrónico. Ed. Biomed-CECAM. La Habana. Cuba. (2001).
- [7] S. Ghosal and G. Rao. "A plausible chemical mechanism of the bioactivities of mangiferin". *Indian Journal of Chemistry.* **35B**, 561 (1996).
- [8] G.L. Pardo-Andreu, R. Delgado, J. Velho, C. Curti, A.E. Vercesi. "Iron complexing of mangiferin, a naturally occurring glucosylxanthone, inhibits mitochondrial lipid peroxidation induced by Fe²⁺-citrate". *European Journal of Pharmacology.* **513**, 47 (2005).
- [9] C.F. Baes, Jr. and R.E. Mesmer, "The hydrolysis of cations", Wiley, NY, (1976).
- [10] R.M. Silverstein, B.G. Clayton, T.C. Morrill. "Spectrometric Identification of Organic Compounds", second ed., Wiley Int. New York, 1967.
- [11] Huheey, J.E., Keiter, E.A., Keiter, R.L. "Química Inorgánica. Principios de estructura y reactividad". Oxford University Press, Harla; 4^a edición. 365 (1997).
- [12] M. Born, P.A. Carrupt, R.Zini, F. Bree, J.P. Tillerpent, K. Hostectmann, B. Testa. "Electrochemical Behaviour and Antioxidant Activity of Some Natural Polyphenols". *Helvetica Chimica Acta.* **79**, 1147 (1996).

[13] A. Morales. Tesis “Estudio de sistemas químicos multirreaccionantes en soluciones acuosas por métodos espectrofotométricos con el programa computacional SQUAD y otros métodos computacionales”. Fac. Estudios Superiores de Cuautitlan, UNAM. (1993).

[14] J. Havel. *Jančář L. Scripta.* **20**, 295 (1990).

[15] Make Equilibrium Diagrams Using Sophisticated Algorithms (MEDUSA); Vers. 2004. Ignasi Puigdomenech. www.kemi.kth.se/medusa

[16] F. Méndez, J.L. Gázquez. *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 9298 (1994).

PARTE IV

CONCLUSIONES GENERALES

CAPÍTULO 6 CONCLUSIONES

6.1 CONCLUSIONES GENERALES

Se ha presentado un estudio amplio para la mangiferina, una xantona glucosilada, desde el punto de vista termodinámico y estructural, utilizando diversas técnicas espectroscópicas e incluyendo un estudio teórico en el marco de la teoría de los funcionales de la densidad.

Los estudios con espectroscopía UV/Vis han servido para mostrar por primera vez, las constantes de acidez para dicha sustancia [1]. La evidencia espectral ha sido consistente con los resultados obtenidos con el programa SQUAD desde diversos ángulos.

Se asignaron los valores de pKa a través de un estudio con RMN que además evidencia la estabilidad del protón en la posición 1, lo que supone la presencia de un puente de hidrógeno entre dicho protón y el oxígeno del grupo carbonilo próximo.

Tanto la asignación anterior como el puente de hidrógeno han sido apoyados en el marco de la teoría de los funcionales de la densidad, con los cálculos moleculares realizados para la mangiferina.

La asignación completa y los valores de las constantes de acidez son:

Equilibrio	pKa
$H_4(\text{MGF}) = H_3(\text{MGF})^- + H^+$	$pK_{a1} (6\text{-H}) = 6.52 \pm 0.06$
$H_3(\text{MGF})^- = H_2(\text{MGF})^{2-} + H^+$	$pK_{a2} (3\text{-H}) = 7.97 \pm 0.06$
$H_2(\text{MGF})^{2-} = H(\text{MGF})^{3-} + H^+$	$pK_{a3} (7\text{-H}) = 9.44 \pm 0.04$
$H(\text{MGF})^{3-} = (\text{MGF})^{4-} + H^+$	$pK_{a4} (1\text{-H}) = 12.10 \pm 0.01$

Donde se ha considerado a la mangiferina, $C_{19}H_{18}O_{11}$ como $H_4(\text{MGF})$

[1] B Gómez-Zaleta, M.T. Ramírez-Silva, A. Gutiérrez, E. González-Vergara, M. Güizado-Rodríguez, A. Rojas-Hernández. *Spectrochimica Acta Part A*. **64**, 1002-1009 (2006).

Con respecto al estudio de la interacción de algunos iones metálicos con la mangiferina se ha mostrado evidencia espectral de UV/Vis que señala la presencia de nuevos equilibrios dependientes del pH para los sistemas en estudio, en particular el correspondiente a Fe(III)-H₄(MGF) en medio acuoso.

Se ha demostrado que, bajo estas condiciones de trabajo, el complejo con Fe(III) es el único que se forma de manera estable, para el correspondiente complejo con Fe(II) no se ha observado evidencia significativa.

Por lo tanto, se determinó la constante de complejación en medio acuoso para el sistema Fe(III)-H₄(MGF), utilizando el programa SQUAD. El log β obtenido para el complejo es de 3.64 ± 0.05 .

Los modelos químicos utilizados han mostrado congruencia con los resultados experimentales.

Dichos modelos han sido evaluados mediante un estudio químico teórico que apoya la formación de complejos de estequiometría 1:1. La interpretación del mejor modelo obtenido con SQUAD combinado con los resultados teóricos, implica que la nueva especie se forma por la desprotonación de la mangiferina, dando lugar a una especie muy estable.

Con el estudio teórico se señala la posición más probable para la unión del Fe(III) con la mangiferina, en 1-O. Aunque esta posición sea a su vez la relacionada con el protón menos ácido, se justifica por la gran estabilidad del complejo formado.

6.2 PERSPECTIVAS

Dado lo poco que se conoce de la mangiferina desde el punto de vista químico, debido tal vez a la complejidad del sistema, existen muchas rutas más que seguir, aquí sólo se mencionan algunas que continúan con lo iniciado en este proyecto:

- Sería conveniente determinar las constantes de acidez de la mangiferina, utilizando otra técnica analítica, por ejemplo electroforesis capilar, para corroborar los valores obtenidos.
- De manera semejante se podría confirmar la constante de complejación encontrada para el sistema Fe(III)-mangiferina.
- Para el sistema con Fe(II) es necesario un estudio en atmósfera totalmente inerte para evitar el contacto con el oxígeno, tal vez en sistema de flujo continuo y/o utilizando una caja de guantes, con el propósito de obtener mayor información sobre dicho sistema y eventualmente confirmar o no la existencia de un complejo con este ion.
- Se han realizado estudios espectroscópicos preliminares con Cu(II) y Al(III), que señalan la interacción entre éstos y la mangiferina, por lo cual se pretende continuar el estudio de especiación correspondiente, que incluiría experimentos de estabilidad de los sistemas y la determinación de las constantes de complejación.
- En todos los sistemas con iones metálicos sería necesario explorar las relaciones estequiométricas mayores y la posibilidad de formación de especies polinucleares.
- Se sugiere también, un estudio de estado sólido, para los sistemas ion metálico-mangiferina que pretendería la obtención de especies sólidas cristalinas para su análisis por difracción de rayos X.
- En cuanto a los estudios teóricos, se propone la utilización de otros métodos que permitieran confirmar los resultados y probar los modelos que quedaron en incógnita.
- Finalmente, sería deseable realizar un estudio electroquímico, con el fin de calcular los potenciales REDOX y con esta información sustentar los experimentos realizados en presencia de H₂O₂.

PARTE V

ANEXOS

ANEXO 1

Reactivos y equipo

Para los estudios de espectrofotometría UV/Vis, se preparan soluciones con agua desionizada (U.S Filter, Purelab Plus UV) que ha sido previamente burbujeada con N_2 (10 min/10 ml de H_2O), este procedimiento se emplea en todas las soluciones utilizadas.

Los reactivos que se han utilizado son grado analítico: H_4MGF , $AlCl_3 \cdot xH_2O$, $CuCl_2 \cdot 4H_2O$ (Sigma, pureza del 99.5%), NaOH, HCl, $FeCl_3$ anhidro y $FeCl_2 \cdot 4H_2O$, ISOMerck; buffer de fosfatos Beckman pH=7.0 y pH=4.0. H_2O_2 comercial, 11 volúmenes de oxígeno $\approx 0.9M$.

Para la determinación de constantes en mezcla $H_2O/DMSO$: $(CH_3)_2SO$ Merck grado espectroscópico, la calibración se hace con buffer de fosfatos Radiometer analytical SAS trazable a escala de pH de acuerdo con IUPAC/NIST, valor certificado de pH: 7.000 ± 0.010 a $25^\circ C$.

El equipo es un espectrofotómetro Perkin-Elmer.

La solución de trabajo se mantiene en atmósfera inerte (N_2) en una celda de doble camisa y a temperatura controlada con un baño termostatado digital Cole Palmer a $25 \pm 0.1^\circ C$. Las lecturas de pH y potencial se efectúan con un electrodo de vidrio combinado con referencia interna de $Ag/AgCl_{(s)}$ conectado a un potenciómetro Mettler Toledo MP230.

Un espectrómetro Bruker AMX 500 a $25^\circ C$ se utilizó para los experimentos de RMN.

ANEXO 2

Descripción de los programas SQUAD, TRIANG, SIBYLA y de la aplicación MEDUSA

A2.1 Descripción del programa SQUAD.

SQUAD es un programa computacional creado por Legget[1] escrito en lenguaje FORTRAN. Está diseñado para refinar constantes de equilibrio de un modelo químico propuesto, a partir de datos de absorbancia obtenidos a diferentes longitudes de onda y a diferente composición química del sistema. El modelo químico puede ser dependiente o independiente del pH.

El refinamiento de las constantes se realiza por medio de una minimización de la suma de los cuadrados de la diferencia de los residuos de absorbancia empleando el algoritmo de Gauss-Newton.

$$U = \sum_{i=1}^I \sum_{k=1}^{NW} (A_{i,k}^T - A_{i,k}^E)^2$$

Donde i = todas las soluciones; NW = todas las longitudes de onda; $A_{i,k}^T$ = absorbancia calculada por SQUAD en la i -ésima solución a la k -ésima longitud de onda; $A_{i,k}^E$ = absorbancia experimental en la i -ésima solución a la k -ésima longitud de onda. La resolución de la minimización requiere el cálculo de las absorbancias a la k -ésima longitud de onda en la i -ésima solución.

Para conocer los valores de absorbancia se necesita resolver la ecuación de Beer; SQUAD propone los coeficientes de absorptividad molar por especie y determina la concentración de cada una empleando el algoritmo de Newton-Raphson. La convergencia se da si la diferencia en la minimización de un ciclo iterativo a otro difiere como máximo 0.001 unidades. Que el criterio anterior se cumpla no significa que se tiene el mejor refinamiento de constantes, debido a que se puede caer en el caso de una convergencia en un mínimo local.

SQUAD emplea distintos parámetros estadísticos para determinar si el modelo químico propuesto puede explicar la información experimental.

El parámetro de correlación; la desviación estándar sobre los datos de absorbancia (σ_{datos}), la desviación estándar sobre la constante (σ_{const}); la desviación estándar total sobre las constantes (σ_{tot}), la suma de cuadrados de las absorbancias calculadas (U) y la desviación estándar sobre los coeficientes de absortividad molar (σ_{coef}), son todos parámetros estadísticos.

A2.2 Descripción del programa TRIANG.

El programa TRIANG está escrito en lenguaje FORTRAN [2]. Estima el número de especies que absorben radiación electromagnética en el sistema a partir de los valores de absorbancia a diferentes longitudes de onda y diferente composición química del sistema, considerando el error en las lecturas de transmitancia (ΔT).

Considerando que se cumple la Ley de Beer y la Ley de aditividad para el sistema de estudio, TRIANG establece la existencia de una especie química absorbente comparando entre valores de absorbancia y errores asociados a la misma.

Se calculan los elementos de una matriz de error, considerando el valor de ΔT , la ecuación del error en la absorbancia y la teoría de la propagación del error. Después se busca la diagonalización a cero de dicha matriz comparando los elementos de la diagonal con la matriz de absorbancia (P): si el elemento diagonal de la matriz del error E_{jj} multiplicado por tres es menor que el elemento P_{jj} correspondiente entonces se considera este $P_{jj} \neq 0$. El número de especies que absorben en el sistema se estima como la suma de los elementos P_{jj} diferentes de cero.

Considerando que el error en las lecturas de transmitancia es igual a un medio de la diferencia entre el cuadrado del error instrumental y el cuadrado del error volumétrico, entonces para datos espectrofotométricos obtenidos experimentalmente el valor de ΔT debe encontrarse en el intervalo de $0.003 \leq \Delta T \leq 0.010$.

A2.3 Descripción del programa SIBYLA

SIBYLA es un programa escrito en Basic que permite estimar el número de componentes en un sistema químico [3].

Para tal efecto se utiliza el análisis de factores FA, por sus siglas en inglés, o el análisis del componente principal (PCA) que son técnicas de estadística multivariante.

Las técnicas de PCA y FA se refieren al análisis de una matriz de datos A de $m \times n$. Donde m podría ser el conjunto de espectros de absorbancia, o cualquier otra observación, para cada valor n (variable) de pH. Cada espectro puede ser entonces representado como un punto en un espacio multidimensional. Tanto FA como PCA, se ocupan de encontrar un sub-espacio dimensional p ($p < n$) en el que el espectro pueda ser aproximadamente representado. La técnica provee tal sub-espacio donde se tiene el mejor ajuste por mínimos cuadrados para los datos cuando éstos se proyectan en él. La meta principal es encontrar el valor más bajo de p con el que sea posible explicar suficientemente los datos. Los eigenvectores normalizados p de la matriz $A^T A$ con los mayores eigenvalores correspondientes son tomados como vectores base y son llamados componentes principales (de aquí el nombre para PCA).

Por otra parte, PCA y FA sirven para propósitos sutilmente diferentes: mientras FA intenta expresar las observaciones como combinaciones lineales de nuevas variables, pequeñas en número, denominadas factores, PCA se utiliza únicamente para encontrar los factores candidatos y para determinar su número [3,4].

Partiendo de que el rango de una matriz de absorbancias se relaciona con el número de componentes en el sistema, según ha sido demostrado en otros trabajos [5,6], entonces, suponiendo que se tiene una matriz A de valores de absorbancia para n_w longitudes de onda de n_s muestras, donde se tienen n_c componentes que absorben en el intervalo elegido, la matriz puede escribirse como (1) donde E es la matriz de absorptividades molares $n_w \times n_c$ y C es la matriz de concentraciones $n_c \times n_s$.

$$A=E \cdot C \dots \dots \dots \text{ecuación (1)}$$

Además se puede decir para el rango de A que:

$$\text{Rango de (A)} = \min[\text{rango(E)}, \text{rango(C)}] \leq \min(n_w, n_c, n_s) \quad \text{ecuación (2)}$$

Entonces, si se garantiza que n_w y n_s sean iguales o mayores que n_c , se tiene que

$$\text{Rango(A)} \leq n_c$$

Y dado que el rango de la matriz es el orden del mayor determinante diferente de cero formado a partir de A, o igual al número de columnas (o filas) linealmente independientes de A, uno de los objetivos consiste en encontrar dicho determinante.

Existen diferentes formas para encontrar el determinante, uno de ellos es el método descrito por Wallace y Katz [7] que involucra diagonalizaciones tanto de la matriz A como de la matriz del error, dicha aproximación es la que se utiliza también en el programa TRIANG.

Finalmente, se menciona que en caso de SIBYLA con FA, se utilizan varios criterios para estimar el rango, en particular el propuesto por Kankare [8] que involucra los residuales de la desviación estándar de las absorbancias.

A2.4 Descripción de la aplicación MEDUSA

Como su nombre lo dice más que un solo programa, MEDUSA (Make Equilibrium Diagrams Using Sophisticated Algorithms) [9] es una interfase que funciona en ambiente Windows para calcular y graficar diagramas de equilibrio. Los programas principales que componen MEDUSA son:

- INPUT, SED, PREDOM o, dependiendo de la versión, PREDOM2. Son paquetes de software MS-DOS para crear los diagramas de equilibrio.
- HYDRA (Hydrochemical Equilibrium Data Base). Es una base de datos en ambiente Windows que puede construir los archivos de entrada para INPUT, SED y PREDOM.

Utiliza una base de datos de constantes de equilibrio desarrollada por el *Department of Inorganic Chemistry, Royal Institute of Thechnology (KTH)* en Estocolmo Suiza.

INPUT. Es el programa que se encarga de crear, editar, etc., los archivos de entrada que deben ir en un formato específico, sin embargo, éste ha sido absorbido por MEDUSA por lo que el archivo de entrada puede ser modificado por el usuario directamente sin llamar específicamente al programa; de manera semejante se puede prescindir de la base de datos HYDRA.

SED. Puede generar diagramas de fracción, logarítmicos y de solubilidad. En estos diagramas las concentraciones calculadas se grafican como una función de una variable principal (usualmente pH, potencial redox o la concentración total). Utiliza una versión modificada del algoritmo SOLGASWATER [10] el cual está basado en un método que involucra minimización de la energía libre (con $\Delta G^\circ = -RT \ln K$).

PREDOM y PREDOM2. Construyen los diagramas de zonas de predominio, puede ser en $\log(Ct)$ o $\log(a)$, donde Ct =concentración total y a = actividad. PREDOM utiliza el algoritmo HALTAFALL [11, 12] para determinar la distribución de especies resolviendo los sistemas de ecuaciones no-lineales del balance de materia punto por punto. PREDOM2 es más poderoso que su antecesor y utiliza el algoritmo SOLGASWATER completo; es más adecuado para sistemas químicos más complicados aunque el tiempo de ejecución se incrementa.

Finalmente, algunos de los elementos que constituyen el archivo de entrada son: el número de componentes del sistema, número de complejos formados y especies sólidas tanto de complejos como componentes, información correspondiente de las constantes de equilibrio así como la estequiometría para los complejos. La concentración de trabajo, la fuerza iónica y la temperatura son otros parámetros a considerar.

A2.5 Referencias

- [1] D. Legget, "Computational Methods for the Determination of Formation Constants", first ed., Plenum Press, New York, 1985.
- [2] F.R Hartley, C. Burgués, R.M. Alcock. "Solution Equilibria". Wiley Chinchester, (1880).
- [3] J. Havel, L. Jančář. *Scripta*. **20**, 7, 295 (1990).
- [4] E.R. Malinowski, D.G. Howery. "Factor Analysis in Chemistry". Wiley, New York (1980).
- [5] S. Ainsworth. *J. Phys. Chem.* **65**, 1968 (1961).
- [6] D. Katakis. *Anal. Chem.* **37**, 876 (1965).
- [7] R.M. Wallace, S.M. Katz. *J. Phys. Chem.* **68**, 3890 (1964).
- [8] J.J Kamkare. *Anal. Chem.* **43**, 1322 (1970).
- [9] I. Puigdomenech. "INPUT, SED and PREDOM: Computer programs drawing equilibrium diagrams". Technical report TRITA-OOK-3010 (ISSN 0348-825X), Sept. 1983, 12pp. Royal Institute of Technology, Dept. Inorg. Chemistry, S-100 44 Stockholm, Sweden www.kemi.kth.se/medusa
- [10] G. Eriksson. "An algorithm for the computation aqueous multicomponent, multiphase equilibria". *Anal. Chim. Acta.* **112**, 375 (1979).
- [11] N. Ingri, W. Kalolowicz and B. Warnquist. "High-speed computers as a supplement to graphical methods—V. HALTAFALL, a general program for calculating the composition of equilibrium mixtures". *Talanta*. **14**, 1261 (1967).
- [12] R. Ekelund, L.G. Sillén and O. Wahlberg. "Fortran editions of HALTAFALL and Letagrop". *Acta Chem. Scand.* **24**, 3073 (1970).

ANEXO 3

Métodos y técnicas en RMN

A3.1 Antecedentes.

En este apartado se revisan los aspectos generales y descriptivos de las técnicas utilizadas en el presente proyecto.

Para que exista RMN es requisito indispensable que el núcleo del correspondiente elemento, tenga espín nuclear diferente de cero y como resultado de éste, un momento magnético. Después es necesario someter a estos núcleos a la presencia de un campo magnético en el que se efectúan dos fenómenos: la orientación debida al campo y el movimiento precesional [1].

Al analizar las propiedades de los núcleos que influyen en el fenómeno de RMN, se debe considerar aquellas asociadas tanto a fenómenos mecánicos como a fenómenos eléctricos y cuánticos. Entre los primeros se encuentran el momento angular, mientras que la carga eléctrica del núcleo, el momento magnético y el momento cuadrupolar eléctrico serían los principales entre los segundos, y finalmente, el espín nuclear corresponde a los fenómenos cuánticos.

De aquí se sigue que cada núcleo absorbe energía a una intensidad de campo determinada y con una frecuencia característica, pero lo que hace a la RMN una herramienta poderosa en diversas áreas, son los fenómenos de protección que desembocan a su vez en la multiplicidad de señales. Sin estos parámetros todos los núcleos de un mismo isótopo darían la misma señal.

Los fenómenos de protección están asociados con la densidad electrónica que rodea al núcleo en cuestión, o con la corriente electrónica en la cual se encuentra el núcleo, de tal manera que se tiene protección debida a los electrones inmediatos al núcleo y protecciones o efectos a larga distancia.

La multiplicidad de señales se da debido a interacciones magnéticas espín-espín entre núcleos de diferentes tipos.

En cuanto a la escala, en RMN no hay una escala absoluta, dado que la frecuencia de resonancia y la densidad de flujo magnético son interdependientes como una consecuencia de la condición de resonancia:

$$\nu_1 = \frac{\gamma}{2\pi}(1 - \sigma)B_0 \quad (\text{ec A3.1})$$

Donde ν_1 es la frecuencia, σ es la constante de protección y B_0 es el campo aplicado. Entonces se define una cantidad adimensional denominada el desplazamiento químico (δ) como sigue:

$$\delta = \frac{\nu_{muestra} - \nu_{referencia}}{\nu_{referencia}} \times 10^6 \quad (\text{ec A3.2})$$

A3.2 El método de pulsos en RMN.

En este método todos los núcleos de una especie en la muestra, por ejemplo todos los protones o todos los núcleos de ^{13}C , son excitados simultáneamente por un pulso de radiofrecuencia.

Un generador de radiofrecuencia opera usualmente a una frecuencia fija ν_1 , sin embargo, si éste es movido por un tiempo muy corto τ_p , se obtiene un pulso que contiene no solamente la frecuencia ν_1 sino una banda de frecuencias simétrica centrada en ν_1 , aunque solamente una parte de la banda de frecuencias es efectiva para la excitación de los núcleos la cual es aproximadamente τ_p^{-1} . En RMN la duración de un pulso es del orden de pocos microsegundos.

La frecuencia del generador es escogida dependiendo del tipo de núcleo a analizar y el valor del campo externo aplicado, B_0 .

El segundo factor de importancia es el ángulo del pulso que, al variarse, proporcionara diferente información dependiendo de las interacciones con distintas propiedades del sistema, por ejemplo con la magnetización macroscópica (M_0), que tiene lugar durante el fenómeno de precesión, en la dirección del campo.

Finalmente, una secuencia de pulsos significa una serie que combina tanto los tiempos como los ángulos en que se aplica cierta frecuencia. Diferentes secuencias han dado lugar a los diferentes métodos en RMN que permiten obtener una gama de información sobre el sistema en cuestión.

A3.3 Métodos de RMN 2-D de correlación heteronuclear (H-C) inversa (HSQC;HMBC).

Los métodos bidimensionales de correlación heteronuclear en general consumen mucho tiempo, es por ello que se diseñan alternativas para disminuir dicho tiempo de análisis. Una forma común son los llamados procedimientos inversos, donde primero se genera la fase coherente en el canal correspondiente al núcleo insensible (por ejemplo ^{13}C) y ésta es entonces transferida al núcleo denominado sensible, normalmente ^1H . Estos métodos no aportan información diferente comparada con los métodos normales como (C-H)-COSY, pero la sensibilidad de la detección se aumenta considerablemente [2].

En general, estos métodos proporcionan información sobre los acoplamientos H-C de corto (un enlace) y largo alcance (dos a cuatro enlaces), HSQC y HMBC respectivamente. Las secuencias se pueden consultar en el libro de Friebolin [3].

En cuanto a los denominados DEPT, dependiendo del ángulo principal en la secuencia de pulsos, 90° o 135° , es posible observar las señales filtradas para carbonos primarios, secundarios y terciarios.

A3.4 Referencias

- [1] P. Joseph-Nathan, E. Diaz T. “Introducción a la Resonancia Magnética Nuclear”. Editorial Limusa, Mexico, (1980).
- [2] R.J. Abraham, J. Fisher and P. Loftus. “Introduction to NMR Spectroscopy”. John Wiley & Sons , Chinchester, (1993) Update version from the first published in 1978.
- [3] H. Friebolin. “Basic One- and Two- Dimensional NMR Spectroscopy”. 3rd edition; Wiley-VCH, Federal Republic of Germany (1998).

ANEXO 4

Calibración de pH y determinación de la constante de autoprotólisis para la mezcla H₂O-DMSO 70/30% (v/v).

A4.1 Antecedentes

Normalmente la determinación exacta del valor de pH en alguna mezcla requiere del conocimiento de la constante de autoprotólisis del solvente no acuoso, o al menos resulta conveniente su conocimiento para poder evaluar el efecto de dicho solvente con respecto al pH. Las recomendaciones de la Unión de Química Pura y Aplicada [1], IUPAC, por sus siglas en inglés, a este respecto, implican el uso de soluciones estándares específicas para cada solvente distinto, lo cual resulta muy poco práctico y costoso.

En el caso particular para las mezclas H₂O-DMSO no existen datos aceptados por la IUPAC para la constante de autoprotólisis correspondiente. Por ello se muestra a continuación un método operacional de calibración de pH y determinación de la constante de autoprotólisis, de manera experimental, para la mezcla H₂O-DMSO 70/30% (v/v).

Cabe señalar que la constante determinada no se refiere estrictamente a la mezcla; si consideramos que el agua se encuentra en mayor proporción, entonces el valor de la constante calculada sería una cierta medida del efecto que tiene la presencia del DMSO sobre el equilibrio de autoprotólisis del agua.

A4.2 Experimentación

Se realizaron valoraciones de ácido fuerte con base fuerte de concentraciones estandarizadas, tanto en agua como en la mezcla H₂O-DMSO 70/30% (v/v) tomando los valores de pH y potencial. En el caso de la mezcla, solamente el titulado se prepara en ella, el titulante se prepara en agua a una concentración tal que la dilución final no exceda el 10% del volumen inicial.

La preparación de soluciones siguen las indicaciones del anexo 1. Subrayando que la calibración del electrodo de vidrio combinado, con referencia interna de $\text{Ag}/\text{AgCl}_{(s)}$, se hace con buffer de fosfatos Radiometer analytical SAS trazable a escala de pH de acuerdo con IUPAC/NIST, valor certificado de $\text{pH}: 7.000 \pm 0.010$ a 25°C

A4.3 Resultados y discusión

Para cada valoración se calibra el pH obtenido, corrigiendo los valores experimentales de acuerdo a la ecuación 1, figura A1.

$$\text{pH}_{\text{corr}} = \text{pH}_{\text{exp}} + \left[\frac{\text{pH}_{\text{cal}} - \text{pH}_{\text{exp}}}{\text{pH}_{\text{cal}}} \right] Ef * \text{pH}_{\text{exp}} \quad (1)$$

Donde pH_{corr} representa el pH corregido por eficiencia de la celda, pH_{exp} simboliza el pH medido experimentalmente, pH_{cal} es el pH de calibración del electrodo de vidrio y Ef es el factor de eficiencia de la celda. Esta ecuación es análoga a la descrita por Bates [2] y Westcott [3].

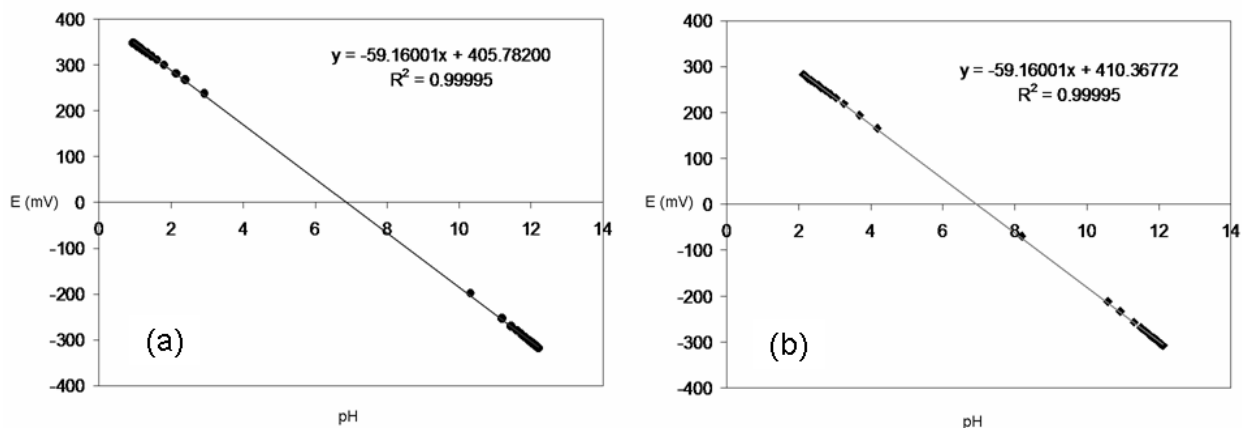


Figura A1. Calibración de pH; (a) H_2O , (b) mezcla H_2O -DMSO 70/30% (v/v).

En las figuras A1a y b se puede observar que las curvas obtenidas para ambos medios son muy semejantes, desplazadas en aproximadamente 5 unidades, lo que nos indica que para esta mezcla en particular, los valores de pH no se ven sustancialmente afectados por el cambio en el medio.

Para el cálculo de la constante de autoprotólisis en la mezcla se construyen las gráficas de pH como una función del balance de materia para antes y después del punto de equivalencia dado que se conoce, para cada adición, los valores de volumen inicial (V_0), concentración inicial (C_0), volumen agregado (V) y concentración del valorante (C).

De esta manera se tiene:

$X = -\log[(V_0C_0 - VC)/(V_0 + V)]$ Para antes del punto de equivalencia (figura A2a).

$X = +\log[(VC - V_0C_0)/(V_0 + V)]$ Para después del punto de equivalencia (figura A2b).

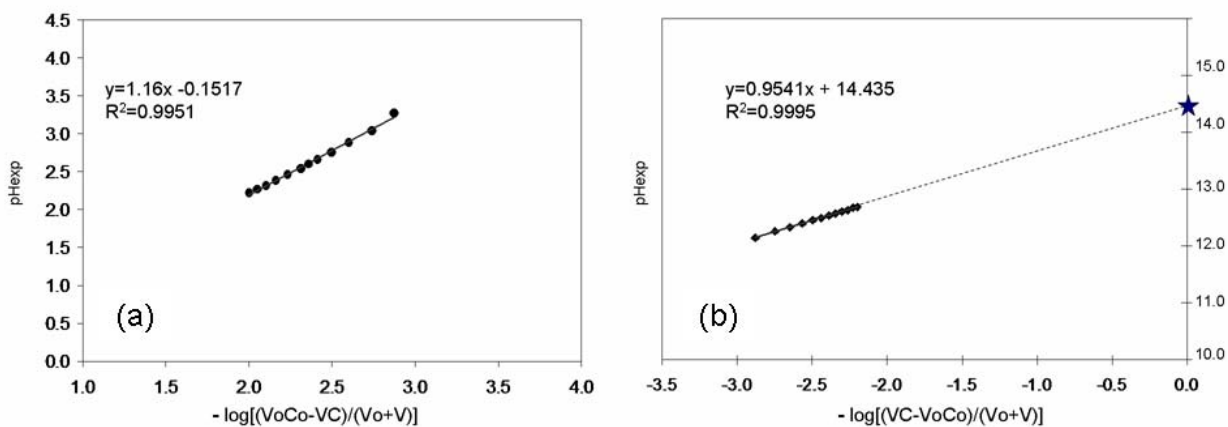


Figura A2. $pH_{\text{experimental}}$ vs (a) $-\log[(V_0C_0 - VC)/(V_0 + V)]$ antes del punto de equivalencia, (b) $+\log[(VC - V_0C_0)/(V_0 + V)]$ después del punto de equivalencia.

En ambos casos se ha agregado una línea de tendencia, considerando la cantidad de puntos donde aún se pueden cumplir las expresiones previamente señaladas para antes y después del punto de equivalencia.

Entonces, si se tiene la gráfica de la recta $pH = pK_{\text{aut}} + \log[(VC - V_0C_0)/(V_0 + V)]$ con valor de la pendiente igual a 1, se tendría el valor de la constante en la ordenada al origen. En este caso al construirse la gráfica se realizó el análisis de la regresión lineal para los datos experimentales, mediante la herramienta propia del programa Excell.

Como se puede ver en la figura A2b, la recta ajustada por mínimos cuadrados tiene una pendiente con valor de 0.95 sin embargo, de acuerdo al análisis mencionado, el intervalo de confianza para esta pendiente es de 0.96 a 1.02 lo cual implica que efectivamente el valor pasa por 1. De aquí se hace la extrapolación para obtener el valor de la ordenada al origen, señalado con una estrella en la misma figura.

En la tabla A4.1 se muestra el resumen de los valores obtenidos para tres experimentos independientes.

Tabla A4.1. Constante de de autoprotólisis (pK) determinada a partir de experimentos independientes

	pKautoprotólisis	σ
Experimento 1	14.3 ± 0.1	0.020
Experimento 2	14.44 ± 0.06	0.004
Experimento 3	14.3 ± 0.1	0.030
Considerando las 3 repeticiones	14.35 ± 0.15	0.036

A4.4 Conclusión

Al determinar de manera gráfica la constante de autoprotólisis de la mezcla, se observa que la diferencia debida a la presencia del DMSO es 0.35 unidades mayor con respecto al agua pura, aunque debe recordarse que se trata de unidades logarítmicas por una parte, y que el intervalo de error implica una varianza grande, lo que se ve reflejado de manera indirecta cuando se hace la lectura para los valores de pH. Es claro que existen varios factores, desde la calibración del electrodo por ejemplo, que están contribuyendo a incrementar el error.

Lo anterior es parte de los resultados esperados por el diseño del experimento, sin embargo, se cumple el objetivo operacional a bajo costo: estos datos permiten trabajar sistemas en esta mezcla conociendo el pH aparente de la misma.

A.4.5 Referencias

- [1] S. Rondinini, P. Longhi, P.R. Mussini, T. Mussini. *Pure & Appl. Chem.* **59**, 1693 (1987).
- [2] R.G. Bates. "Determination of pH". John Wiley and Sons, 2nd ed. New York. (1973).
- [3] C.C. Westcott. "pH Measurements". Academic Press. New York. (1978).

ANEXO 5

Aspectos fundamentales de la teoría de los funcionales de la densidad.

A5.1 Antecedentes

En el sentido de la química computacional, un cálculo de la estructura electrónica se caracteriza por la combinación de un procedimiento teórico y un conjunto de base [1].

Los programas de cálculo comunes incluyen varios procedimientos teóricos, generalmente llamados niveles de teoría. Entre éstos se encuentran el método de Hartree-Fock (HF), MP2 y MP4 (para la teoría de perturbaciones de segundo y cuarto orden en el marco de Moller-Plesset), etc, que pertenecen a los métodos basados en la función de onda; métodos semiempíricos como MNDO, AM1, PM3, etc. y los métodos de la teoría de los funcionales de la densidad.

La mayoría de las implementaciones de dichos métodos utilizan conjuntos de base, donde el conjunto de funciones de base permite obtener una representación de los orbitales de un sistema químico.

El desarrollo de una función desconocida, como un orbital molecular, en un conjunto de funciones conocidas, no es una aproximación si se tiene una base completa, sin embargo, en el espacio vectorial utilizado, una base completa significa un número infinito de funciones de base. Es por ello que la elección del conjunto de base conlleva el compromiso de ser el más adecuado para el problema en cuestión.

A5.2 Teoría de los funcionales de la densidad (TDF)

En 1964, Hohenberg y Kohn [2] probaron un teorema que establecía que para moléculas con estados basales no degenerados, la energía del estado basal, la función de onda y las demás propiedades electrónicas son determinadas únicamente por la densidad electrónica de ese estado $\rho_0(x,y,z)$, por lo que se puede decir que la energía del estado basal E_0 es funcional de la densidad electrónica $E_0 = E_0[\rho_0]$.

Entonces la energía total de un sistema puede escribirse de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$E[\rho(r)] = F[\rho(r)] + \int \rho(r)\nu(r)dr, \quad (1)$$

En donde, $F[\rho(r)]$ es un funcional universal de la densidad que contiene los términos de la energía cinética $T[\rho(r)]$ y la repulsión electrónica $E_{ee}[\rho(r)]$; $\nu(r)$ se conoce como el potencial externo que actúa sobre un electrón dado (e_i) y sólo depende de las coordenadas electrónicas, ya que tiene un origen exterior al sistema de electrones, bien a partir de los núcleos del sistema y/o posibles campos externos.

Una vez que se establece el potencial externo $\nu(r)$ y el número de electrones del sistema, se puede determinar la función de onda y la energía de la molécula al solucionar la ecuación de Schrödinger a través de diferentes métodos.

En principio, de la ecuación (1) sólo se conoce $\nu(r)$ pero no las cantidades $T[\rho(r)]$ y $E_{ee}[\rho(r)]$, de ahí que Kohn y Sham [3] propusieran un método práctico para encontrar la densidad y, a partir de ella, la energía E_0 (1965).

Kohn y Sham (KS) consideran un sistema de referencia (s) y denominado sistema no interactuante de n electrones, los cuales experimentan el mismo potencial externo, que es una cantidad elegida de tal manera que la densidad sea igual a la densidad electrónica exacta de la molécula de estudio $\rho_s = \rho_0$.

Si se considera a la energía cinética del sistema de referencia como una parte de la energía cinética real, entonces el funcional HK puede ser descrito como sigue:

$$F[\rho] = T_s + J[\rho] + E_{xc}[\rho] \quad (2)$$

En donde $J[\rho]$ representa la energía de interacción coulombica, y $E_{xc}[\rho]$ se le conoce como el funcional de intercambio y correlación que puede escribirse como

$$E_{xc}[\rho] = (T[\rho] - T_s[\rho]) + (E_{ee}[\rho] - J[\rho]) \quad (3)$$

Finalmente, la energía cinética del sistema de referencia se puede escribir en los siguientes términos

$$T_s = \sum_{i=1}^N \left\langle \phi_i \left| -\frac{1}{2} \nabla^2 \right| \phi_i \right\rangle \quad (4)$$

Es decir, el funcional de la energía de intercambio y correlación E_{xc} contiene la interacción electrónica y una parte de la energía cinética. Sin embargo, el funcional E_{xc} no se conoce, por lo que se hacen aproximaciones de éste.

A partir de lo dicho con KS, la energía de un sistema se puede escribir como

$$E = T_s + J[\rho(r)] + E_{xc}[\rho(r)] + \int \rho(r)v(r)dr \quad (5)$$

Y la densidad de un sistema de partículas no interactuantes se puede expresar en términos de un conjunto de orbitales $\{|\phi_i(r)\rangle\}$ llamados orbitales KS

$$\rho_s(r) = \sum_i |\phi_i(r)|^2 \quad (6)$$

Los orbitales KS, de manera semejante a los orbitales que se utilizan en el método Hartree-Fock (HF), son orbitales para el sistema de referencia y, de manera estricta, no tienen un significado físico; su utilidad es la de permitir que la densidad molecular exacta del estado basal pueda ser calculada a partir de (6).

Los orbitales KS se obtienen siguiendo el teorema de HK que propone que se puede encontrar la energía del estado basal variacionalmente, es decir, cambiando la densidad con el fin de minimizar $E_v[\rho]$, lo que es equivalente a variar los orbitales KS para determinar la densidad.

El problema en este punto es que, como se mencionó previamente, el funcional de intercambio y correlación no se conoce.

Entre las aproximaciones más comunes se pueden mencionar la aproximación local (LDA), y de ella la más utilizada es la que contiene la aproximación de Dirac para la parte de intercambio y la parametrización de Vosko, Wilk y Nusair (VWN) para la correlación [4], ya que tiene buenos resultados cuando se comparan contra datos experimentales.

En la aproximación por gradientes (GGA) los funcionales de intercambio y correlación dependen tanto de la densidad como de su gradiente, considerando que en un sistema dado la densidad no es necesariamente homogénea. Un funcional de intercambio puede ser combinado con un funcional de correlación, por ejemplo BLYP.

Finalmente, un funcional híbrido mezcla los funcionales de intercambio y correlación corregidos por el gradiente con otro tipo de expresiones. Un ejemplo de estos es el B3LYP.

Los funcionales corregidos por el gradiente y los híbridos no sólo proporcionan buenos resultados en las geometrías al equilibrio, frecuencias vibracionales y momentos bipolares, sino también en la energía de atomización [5].

A5.3 Conceptos emanados de la teoría de los funcionales de la densidad. Índices de Fukui.

Los conceptos proporcionados por la teoría de los funcionales de la densidad han hecho posible el entendimiento de algunos aspectos de la estructura molecular y la reactividad química.

Con el fin de establecer índices de reactividad, esta teoría hace uso de cantidades en términos locales y globales. Así, el potencial químico, la dureza y blandura globales son cantidades fundamentales para estudiar reacciones químicas.

Por otra parte, ha sido posible introducir conceptos locales que permiten diferenciar regiones moleculares y que están asociados con la selectividad con la que ocurren ciertas reacciones. Estas cantidades locales son la función de Fukui, la dureza y blandura locales.

Para un sistema de N electrones, de densidad $\rho(r)$ y con un potencial externo $V(r)$, el cambio de la energía de un estado basal a otro está dado por la expresión diferencial [6]:

$$dE = \mu dN + \int \rho(r) \delta V(r) d(r) \dots \dots \dots (7)$$

donde μ es el potencial químico del sistema cuya definición exacta es [7]:

$$\mu = \left[\frac{\partial E}{\partial N} \right]_{V(r)} \dots \dots \dots (8)$$

El potencial químico es un parámetro global, pues caracteriza a todo el sistema y describe la tendencia de los electrones a escapar.

Si ahora se considera que el potencial químico es una función del número de electrones y un funcional del potencial externo, se tiene:

$$d\mu = \eta dN + \int f(r) \delta V(r) d(r) \dots \dots \dots (9)$$

donde η es igual a la derivada del potencial químico con respecto al número de electrones, cuando el potencial externo es constante, y se denomina dureza química:

$$\eta = \left[\frac{\partial^2 E}{\partial N^2} \right]_{V(r)} = \left[\frac{\partial \mu}{\partial N} \right]_{V(r)} \dots \dots \dots (10)$$

En similitud al potencial químico, la dureza es una propiedad global que caracteriza al sistema como un todo y que señala la resistencia a la redistribución de los electrones de dicho sistema. Por otro lado, la blandura global no es sino el inverso de la dureza global y está definida de la forma:

$$S = \left[\frac{\partial N}{\partial \mu} \right]_{V(r)} = \frac{1}{\eta} \dots \dots \dots (11)$$

El término $f(r)$, de la ecuación 9, se define como la función de Fukui y es igual a la derivada funcional del potencial químico con respecto al potencial externo, cuando se mantiene constante el número de electrones:

$$f(r) = \left[\frac{\partial \mu}{\partial V(r)} \right]_N = \left[\frac{\partial \rho(r)}{\partial N} \right]_{V(r)} \dots \dots \dots (12)$$

Esto es fundamental, ya que una reacción química implica un cambio en la densidad electrónica [8], y este término permite definir el cambio en la densidad electrónica en una región determinada, cuando cambia el número de electrones o el cambio en el potencial químico, debido a una perturbación externa. Para un sistema finito, la derivada de la densidad con respecto al número de electrones es diferente al acercarnos por la derecha o la izquierda, esto es, cuando N incrementa o disminuye.

Parr y Yang propusieron asociar a la función de Fukui con índices de reactividad: ataque nucleofílico cuando N se incrementa (ecuación 13), y ataque electrofílico cuando N disminuye (ecuación 14).

$$f^+(r) = \left[\frac{\partial \rho}{\partial N} \right]_{V(r)}^+ \dots \dots \dots (13)$$

$$f^-(r) = \left[\frac{\partial \rho}{\partial N} \right]_{V(r)}^- \dots \dots \dots (14)$$

En las ecuaciones anteriores, los superíndices + y - se refieren a las derivadas por la derecha y por la izquierda, respectivamente. Para reactivos neutros (radicales, por ejemplo), la función de Fukui ha sido propuesta como un promedio de la dos derivadas anteriores.

$$f^0(r) = \frac{1}{2} \left[f^+(r) + f^-(r) \right] \dots \dots \dots (15)$$

En la aproximación por diferencias finitas, f^+ y f^- se reducen a los índices de Fukui originales cuando se desprecian los términos de relajación por el cambio en el número de electrones:

$$f^+(r) \approx \rho_{N+1}(r) - \rho_N(r) \approx \rho_{LUMO}(r) \dots \dots \dots (16)$$

$$f^-(r) \approx \rho_N(r) - \rho_{N-1}(r) \approx \rho_{HOMO}(r) \dots \dots \dots (17)$$

donde ρ_{LUMO} y ρ_{HOMO} corresponden a las densidades electrónicas del orbital molecular más bajo desocupado y al más alto ocupado, respectivamente. Los términos ρ_N , ρ_{N+1} y ρ_{N-1} son la densidad electrónica de los sistemas con N , $N+1$ y $N-1$ electrones, respectivamente, manteniendo la misma geometría del sistema de referencia.

La función de Fukui es un índice de reactividad local importante dado que involucra variaciones en la densidad electrónica producto de cambios en los orbitales frontera.

La blandura local está definida de la siguiente manera:

$$s(r) = \left[\frac{\partial \rho(r)}{\partial \mu} \right]_{V(r)} = \left[\frac{\partial \rho(r)}{\partial N} \right]_{V(r)} \left[\frac{\partial N}{\partial \mu} \right]_{V(r)} = Sf(r) \dots \dots \dots (18)$$

La blandura local se puede condensar mediante un análisis de población apropiado, de tal manera que se puede cuantificar la blandura local por átomo. Las blanduras locales condensadas están definidas por:

$$s_A^+ = Sf_A^+$$

$$s_A^- = Sf_A^-$$

$$s_A^0 = Sf_A^0 \dots \dots \dots (19)$$

donde S es la blandura global del sistema y A es el átomo correspondiente. Esta blandura local, así como la función de Fukui, es una cantidad importante que puede ser utilizada para medir la reactividad local.

5.4 Referencias.

- [1] P.v.R. Scheleyer; N.L. Allinger; T. Clarck; J. Gasteiger; P.A. Kolman; H.F Schaefer III; P.R. Schreiner, (comps). “Encyclopedia of Computational Chemistry”. John Wiley & Sons, Chichester, R.U. vol 1 (1998).
- [2] P. Hohenberg, W. Kohn. *Phys. Rev.* **136**, B864 (1964).
- [3] W. Kohn, L.J. Sham. *Phys. Rev.* **140**, A1133 (1965).
- [4] S.H. Vosko, L. Wilk, M. Nusair. *Can. J. Phys.* **58**, 1200 (1980).
- [5] G. Cuevas, F. Cortés. “Introducción a la Química Computacional” 1° edición, Fondo de Cultura Económica, México (2003).
- [6] R.G. Parr, W. Yang. “Density-Functional Theory of Atoms and Molecules”. Oxford University Press, Nueva York (1989).
- [7] R.G. Parr, R.A. Donnelly, M. Levy, W.E. Palke. *J. Chem. Phys.* **68**, 3801 (1978).
- [8] R.G. Parr, W. Yang. *J. Am. Chem. Soc.* **106**, 4049 (1984).

ANEXO 6

Resultados preliminares para los sistemas Al(III) y Cu(II) con mangiferina.

A6.1 Antecedentes.

Cu(I)/Cu(II). El cobre es el tercer metal de transición más abundante en el cuerpo humano, luego del hierro y del zinc y se han identificado un número relativamente grande de metaloproteínas que lo contienen [1-3]. También está asociado a sistemas y procesos que involucran la utilización del oxígeno al estar presente en la hemocianina (un transportador de oxígeno), en diversas oxidasas y oxigenasas y en la superóxido-dismutasa; además se encuentra en sistemas transportadores de electrones.

Por otro lado se tienen ciertos elementos de abundancia relativa grande en la naturaleza y, sin embargo, no resultan esenciales para la vida, de hecho, son mejor conocidos por su condición de contaminantes o elementos tóxicos. Tal es el caso del aluminio.

Al(III). De manera muy reciente el aluminio ha comenzado a llamar la atención como elemento tóxico. En ausencia de agentes complejantes, por ejemplo en los suelos pobres en materia orgánica, este ión puede ser liberado por efecto de precipitaciones suficientemente ácidas y de esta manera hacerse biodisponible provocando la formación de productos perjudiciales a la flora y a los sistemas biológicos en general. El Al(III), en el organismo, convenientemente complejoado puede atravesar las barreras del tracto gastrointestinal y eventualmente ser transportado por la transferrina, dadas las analogías con el Fe(III) [1].

A6.2 Resultados espectrofotométricos.

Utilizando el mismo procedimiento que con el sistema Fe(III)-H₄(MGF), apartado 5.3, se llegan a las siguientes familias de espectros para los sistemas con Al(III) y Cu(II), figura A1.

Un resumen de los cambios en el comportamiento espectral para los distintos sistemas trabajados, se muestra en la tabla A1: las λ_{\max} a dos valores de pH para cada sistema así como la longitud de onda de los respectivos puntos isosbéticos.

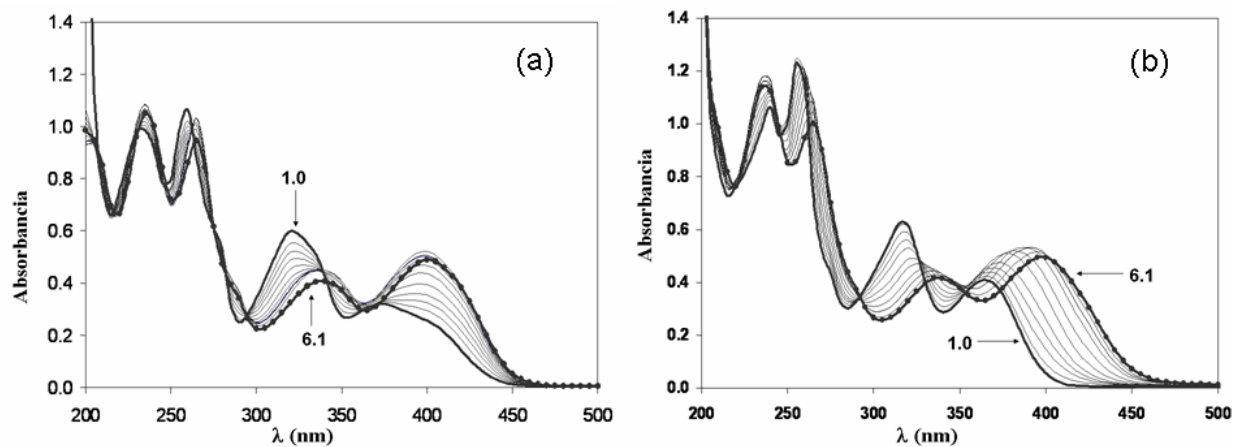


Figura A1. Espectros de absorbancia de (a) Al(III)-H₄(MGF), 1.0 ≤ pH ≤ 6.1; (b) Cu(II)-H₄(MGF), 1.0 ≤ pH ≤ 6.1; [Al(III)] = [H₄(MGF)] = [Cu(II)] = 4.0×10⁻⁵ M.

Tabla 1. Longitudes de onda de absorbancia máxima ($\lambda_{\text{máx}}$) y de puntos isobésticos ($\lambda_{\text{p.isb}}$) para los diferentes sistemas ion metálico- mangiferina a dos valores de pH.

Sistema	pH	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)					$\lambda_{\text{p.isb}}$ (nm)
H ₄ (MGF)	4.0	240	257	317	365		250, 330
	6.0	240	257	317	370		
Fe(III)- H ₄ (MGF) 1:1	4.0	240	257	320	365	600(ba)	217, 230, 263
	6.0	240	260	340(hb)	380	600(ba)	
Al(III)- H ₄ (MGF) 1:1	4.0	240	257	319	370		290
	6.0	235	263	335	395		
Cu(II)- H ₄ (MGF) 1:1	4.0	240	257	320	367		293
	6.0	235	265	340	400		

(ba) banda ancha de absorbancia.

(hb) hombro de absorbancia.

La presencia de puntos isobésticos diferentes en posición y cantidad para los sistemas con iones metálicos son una evidencia espectral de las interacciones de éstos con la mangiferina.

Finalmente se muestran las gráficas de absorbancia contra pH para los sistemas con Al(III) y Cu(III), figura A2. Se presentan intersecciones en los valores de pH=7.8, 4.4 y pH=4.7 respectivamente.

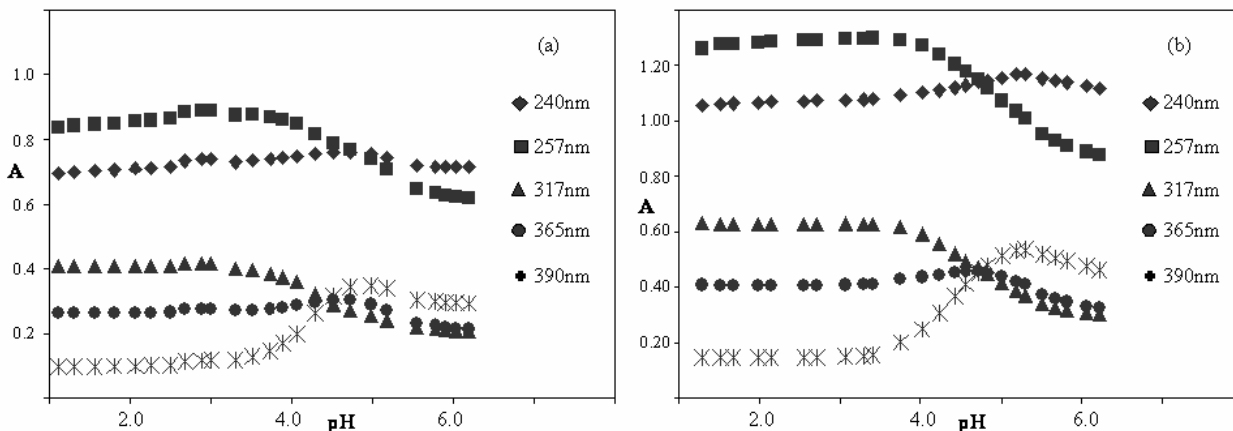


Figura A2. Absorbancia vs pH; (a) Al(III)-H₄(MGF); (b) Cu(II)-H₄(MGF).

$$[\text{Al(III)}] = [\text{H}_4(\text{MGF})] = [\text{Cu(II)}] = 4.0 \times 10^{-5} \text{ M}$$

El trabajo experimental a continuar, incluye un estudio de estabilidad para ambos sistemas, la determinación de las especies formadas y sus constantes de complejación, así como definir un estudio alternativo con ²⁷Al RMN para ese sistema.

A6.3 Referencias.

- [1] E.J. Baran. "Química Bioinorgánica". McGraw-Hill, 1ª edición. Cap. 1,3,8,10,18 (1995).
- [2] I. Bertini, H.B. Gray, S.J. Lipapard, J.S. Valentine. "Bioinorganic Chemistry". University Science Books. Chap. 1 (1994).
- [3] J.J.R. Da Silva, R.J.P. Williams. "The biological Chemistry of the Elements. The Inorganic Chemistry of Life". Clarendon Press-Oxford. Chap. 1,12,13,15 (1991).

PUBLICACIONES



UV/vis, ^1H , and ^{13}C NMR spectroscopic studies to determine mangiferin $\text{p}K_{\text{a}}$ values

Berenice Gómez-Zaleta^a, María Teresa Ramírez-Silva^a, Atilano Gutiérrez^a, Enrique González-Vergara^b, Marisol Güizado-Rodríguez^c, Alberto Rojas-Hernández^{a,*}

^a Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Depto. Química, Área de Química Analítica,
Apdo. Postal 55-534, 09340 México DF, México

^b Centro de Química, Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, México

^c Depto. de Química Inorgánica, Instituto de Química, UNAM, Ciudad Universitaria, México DF, México

Received 14 June 2005; accepted 12 September 2005

Abstract

The acid constants of mangiferin (a natural xanthonoid) in aqueous solution were determined through an UV/vis spectroscopic study employing the SQUAD program as a computational tool. A NMR study complements the $\text{p}K_{\text{a}}$ values assignment and evidences a H-bridge presence on 1-C. The chemical model used was consistent with the experimental data obtained. The $\text{p}K_{\text{a}}$ values determined with this procedure were as follows: $\text{H}_4(\text{MGF}) = \text{H}_3(\text{MGF})^- + \text{H}^+$, $\text{p}K_{\text{a}_1}(6\text{-H}) = 6.52 \pm 0.06$; $\text{H}_3(\text{MGF})^- = \text{H}_2(\text{MGF})^{2-} + \text{H}^+$, $\text{p}K_{\text{a}_2}(3\text{-H}) = 7.97 \pm 0.06$; $\text{H}_2(\text{MGF})^{2-} = \text{H}(\text{MGF})^{3-} + \text{H}^+$, $\text{p}K_{\text{a}_3}(7\text{-H}) = 9.44 \pm 0.04$; $\text{H}(\text{MGF})^{3-} = (\text{MGF})^{4-} + \text{H}^+$, $\text{p}K_{\text{a}_4}(1\text{-H}) = 12.10 \pm 0.01$; where it has been considered mangiferin $\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{O}_{11}$ as $\text{H}_4(\text{MGF})$. Mangiferin UV/vis spectral behavior, stability study in aqueous solution as well as NMR spectroscopy studies: one-dimensional ^1H , ^{13}C , 2D correlated $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ performed by (g)-HSQC and (g)-HMBC methods; are also presented. $\text{p}K_{\text{a}}$ values determination of $\text{H}_4(\text{MGF})$ in aqueous solution is a necessary contribution to subsequent pharmacokinetic study, and a step towards the understanding of its biological effects.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Mangiferin; Acidity constants; UV/vis spectroscopic determination; ^1H NMR; ^{13}C NMR

1. Introduction

Mangiferin (1,3,6,7-tetrahydroxyxanthone- C_2 - β -D-glucoside) (Scheme 1) is a glucoside xanthone widely distributed in higher plants in families such as Anarcardiaceae [1], Gentianaceae [2] and Guttiferae [3]. Some of these have been recommended as traditional medicinal plants [4,5]. Recently, in Cuba, it has been developed an aqueous decoction of mango (*Mangifera indica* L.) stem bark used as a nutritional supplement and phytomedicine registered as Vimang® [7]. The Cuban studies underline its anti-tumoral effect. Something similar occurs with Salaretin®, a Sri Lanka's product that can be used in the obesity treatment and particularly on diabetes type II [8,9]. Actually, in the present, the impact about the mangiferin is due to its pharmacological effects as an anti-tumoral, anti-viral, and anti-

diabetic agent [6,10–16]. The mangiferin bioactivities observed have been related to some antioxidative as well as free radical captodative functions [17–19] since its structure seems to be associated with certain flavonoid systems and their activities [20,21].

However, the studies about mangiferin generally are done from the pharmacological perspective, not from the physico-chemical point of view. The previous UV/vis and NMR studies were focused on its identification [22–25]. There is no information about the mangiferin equilibrium constants, $\text{p}K_{\text{a}}$ values or complexation constants with inorganic cations. The present work is focused on obtaining at least some of this information. In this study, we considered some graphic methods and the use of computational programs to determine the equilibrium constants. SQUAD [26] program has been used before by our research group, and excellent results for UV/vis spectroscopic data [27–29] have been obtained. Thus, a similar approach was undertaken for the equilibrium constants of mangiferin in aqueous solution. $\text{p}K_{\text{a}}$ values determination of $\text{H}_4(\text{MGF})$ in aqueous

* Corresponding author. Tel.: +52 55 58044670; fax: +52 55 58044666.
E-mail address: suemi918@xanum.uam.mx (A. Rojas-Hernández).

solution is a necessary contribution to subsequent pharmacokinetic study, and a step towards the understanding of its biological effects.

2. Experimental

2.1. UV/vis studies

2.1.1. Stability

Aqueous solutions of mangiferin, H₄(MGF), at different concentrations were prepared, pH measured and UV/vis spectrum was recorded for each one. The spectral behavior, at acid, neutral, and basic pH, was followed within 24 h interval; these solutions were not buffered.

Deionized water was used (U.S. Filter, Purelab Plus UV) and previously degassed with N₂ bubbling, 10 min per 10 mL of H₂O. This is a general procedure for every prepared solution.

2.1.2. Titrations

Two steps spectroscopic titration were done. From neutral to acid pH values: HCl 1.0, 0.1, or 0.01 M volumes were added to 25 mL aliquot containing H₄(MGF) 4.0×10^{-5} M in order to keep pH value steps less than 0.3 unit. UV/vis absorption spectra were recorded for each one.

From neutral to alkaline pH values: instead of HCl, NaOH 1.0, 0.1 or 0.01 M was added.

Mangiferin analytical reagent was purchased from Sigma, 99.5% pure; NaOH and HCl from ISOMerck and Phosphates solution buffer, pH 7.0, from Beckman. Spectroscopic measurements were recorded on a Perkin-Elmer Lambda 20 spectrophotometer equipped with a PC for data acquisition. Samples were measured in quartz cells with a 1.0 cm path length, relative to a blank of water. Spectra were carried out in the range 190–600 nm at 960 nm/min.

Working system was kept inert by circulating N₂ gas and temperature was controlled with a Cole Palmer Bath with thermostat at 25 ± 0.1 °C. Potential and pH values were obtained in the same system with a combined glass electrode Ag/AgCl Corning connected to a potentiometric unit Mettler Toledo MP230.

2.1.3. Equilibrium constants determination

SQUAD program was employed and the experimental data were analyzed on a PC using the titration series results. The spectra were corrected by dilution and the pH values were also corrected using the following equation:

$$\text{pH}_{\text{corr}} = \text{pH}_{\text{exp}} + \left[\frac{\text{pH}_{\text{cal}} - \text{pH}_{\text{exp}}}{\text{pH}_{\text{cal}}} \right] \text{Ef} \times \text{pH}_{\text{exp}}$$

where pH_{corr} is the corrected pH, pH_{exp} the experimental pH; pH_{cal} the calibration pH from glass electrode, and Ef is the fem efficiency for factor measurement system. This equation is an analogue of the equation described by Bates [30] and Westcott [31].

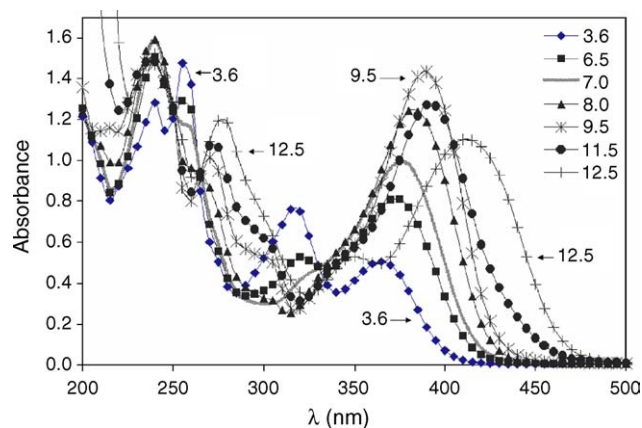


Fig. 1. Spectrophotometric titration of mangiferin 4.0×10^{-5} M; $3.6 \leq \text{pH} \leq 12.5$.

2.2. NMR studies

All the spectra were obtained on a Bruker AMX 500 NMR spectrometer. DMSO-*d*₆ was used as solvent due to the low mangiferin solubility in water. One-dimensional ¹H and ¹³C NMR spectra, DEPT (135 and 90) technique, as well as ¹H/¹³C correlation methods, gradient-HSQC and gradient-HMBC, were performed.

Two separate experiments involving additions of (i) D₂O and (ii) NaOH to mangiferin solutions were accomplished. The alkalinity increases were monitored using pH paper. The corrected pH values for these media are not necessary for the studies presented in this work.

3. Results and discussion

3.1. UV/vis

3.1.1. Stability

The working concentration solution was chosen 4.0×10^{-5} M since the spectra maximums are below 1.5 absorbance units and the solution is enough diluted. The spectroscopic behavior at pH acid, neutral and alkali values were observed for this concentration and it follows the Beer's law. From the absorption spectra taken at different times at neutral pH, it was showed small variation within the 24 h experimental interval. The pH value fluctuates minimally, less than 1%, during the first 5 h before its complete stabilization; it is reflected on the corresponded spectra (not shown). As a result, it was decided to use mangiferin solutions at least after 12 h preparation to assure it will be stable. The experiments done at acid and basic pH gave the same behavior.

3.1.2. Titration series

Series of 70 absorption spectra from each titration were obtained. In order to see the spectral behavior along the interested pH range, some of these are shown in Fig. 1. The absorption spectral behavior between 2.5 and 4.0 pH values does not exhibit any change.

The absorption spectrum at acid pH is in agreement with the identification in previous reports [22,23]. The four main absorption bands on it can be described as: the first band at $\lambda_{\max} = 240$ nm can be assigned to the medium energy $\pi \rightarrow \pi^*$ transition of the aromatic ring, while the second at $\lambda_{\max} = 230$ – 260 nm is due to $\pi \rightarrow \pi^*$ transition in the s-trans enone system by the cyclic β -diketone presence. The less intense third band at $\lambda_{\max} = 317$ nm is related to the $n \rightarrow \pi^*$ transitions by the aromatic ring [32]. The last band near to the visible range can be assigned to intramolecular charge-transfer absorption [33].

As the pH increases, it can be observed:

- From pH 4.0, the first band shows a hyperchromic effect followed by a hypochromic effect after maximum at pH 7.6. A small bandwidth increase could be the result of an overlap.
- A bathochromic shift is observed in the weak K-band from $\lambda_{\max} = 257$ to 271 nm that could be related to the formation of the enolate ion (also characteristic behavior from substituted 1,3-dihydroxyxanthenes [22]).
- The third band extinction occurs.
- Another red shift of the last band goes to its maximum absorption intensity at pH 9.6 ($\lambda_{\max} = 390$ nm) following by a hypochromic effect while the bathochromic shift is sustained. This is a typical xanthenes derivatives shift [22].

The UV/vis spectra (Fig. 1) also exhibit four isosbestic points at $\lambda = 250, 266, 330$ and 405 nm, respectively.

The absorbance versus pH plots shows different crossing points for λ_{\max} (Fig. 2). This behavior as well as the isosbestic points observed, indicates the presence of more than one acid–base equilibrium for mangiferin at this conditions. It was used the half-height method to estimate graphically the pK_a values, e.g. for $\lambda_{\max} = 365$ nm between $4.0 \leq \text{pH} \leq 8.0$ it gives a $pK_a = 6.6$.

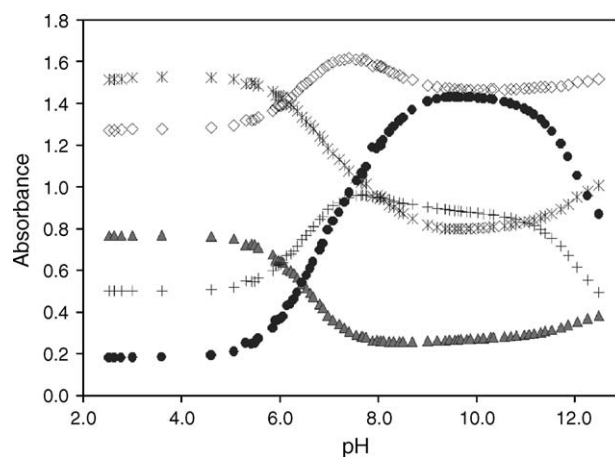


Fig. 2. Absorbance vs. pH from mangiferin titration 4.0×10^{-5} M. $\lambda_{\max} = 240$ nm (\diamond), 257 nm (*), 317 nm(Δ), 365 nm (+), 390 nm (\bullet).

3.1.3. Equilibrium constants

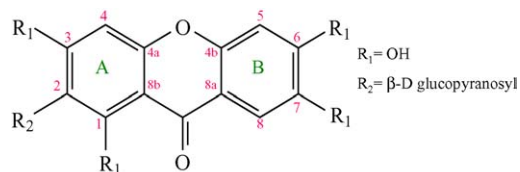
The spectroscopic titration results were given to the SQUAD program in order to determine the formation constants. The chemical model was varying to find the best one; the results are summarizing in Table 1. The main criteria to choose the best data adjustment for every model was the statistic parameters provides by the program, which are the standard deviation of the constant, total standard deviation and sum of the squares in the calculated absorbance data. It was found no-converged adjustment for five or higher equilibrium model.

The mangiferin molecular structure (Scheme 1) presents eight hydroxyl-groups; since four of them are within the glucopyranosyl system, the concomitant less acidic effect is expected; the other four are directly engaged on the xanthen skeleton, therefore, a higher acidity is expected. Indeed, one of them (hydroxyl at 1-C) could be related to the enolate ion formation. Considering those four hydroxyl-groups (1,3,6,7) deprotonation, the best chemical model, as it showed, would

Table 1
Mangiferin acid dissociation constants obtained with the aid of SQUAD

Model: equilibrium	$\log \beta$	σ_{const}	σ_{tot}	U
I $\text{H}_3(\text{MGF})^- + \text{H}^+ = \text{H}_4(\text{MGF})$	$\log \beta_1 = 7.27$	0.02	5.02×10^{-2}	2.66
II $\text{H}_2(\text{MGF})^{2-} + \text{H}^+ = \text{H}_3(\text{MGF})^-$ $\text{H}_2(\text{MGF})^{2-} + 2\text{H}^+ = \text{H}_4(\text{MGF})$	$\log \beta_1 = 10.72$ $\log \beta_2 = 19.60$	0.10 0.10	6.690×10^{-3}	2.57×10^{-2}
III $\text{H}(\text{MGF})^{3-} + \text{H}^+ = \text{H}_2(\text{MGF})^{2-}$ $\text{H}(\text{MGF})^{3-} + 2\text{H}^+ = \text{H}_3(\text{MGF})^-$ $\text{H}(\text{MGF})^{3-} + 3\text{H}^+ = \text{H}_4(\text{MGF})$	$\log \beta_1 = 10.30$ $\log \beta_2 = 18.60$ $\log \beta_3 = 25.30$	0.2 0.2 0.2	1.5×10^{-2}	1.3×10^{-1}
IV $(\text{MGF})^{4-} + \text{H}^+ = \text{H}(\text{MGF})^{3-}$ $(\text{MGF})^{4-} + 2\text{H}^+ = \text{H}_2(\text{MGF})^{2-}$ $(\text{MGF})^{4-} + 3\text{H}^+ = \text{H}_3(\text{MGF})^-$ $(\text{MGF})^{4-} + 4\text{H}^+ = \text{H}_4(\text{MGF})$	$\log \beta_1 = 12.10$ $\log \beta_2 = 21.54$ $\log \beta_3 = 29.51$ $\log \beta_4 = 36.03$	0.01 0.04 0.05 0.05	4.92×10^{-3}	2.20×10^{-2}

σ_{const} : the constant standard deviation; σ_{tot} : total constants standard deviation; U : sum of the squares of the absorbance data calculated. Mangiferin $\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{O}_{11} = \text{H}_4(\text{MGF})$.



Scheme 1. Mangiferin structure.

be IV. The acid dissociation constants were calculated from this model.

3.1.4. Software ACD estimation

An equilibrium constant value estimation was done using the software ACD/pK_a DB version 5 (Advanced Chemistry Development, Inc., Toronto, Ont., Canada, www.acdlabs.com, 2003). The program calculates the pK_a values by comparing segments, moieties or groups from a given structure with its large data base. For the mangiferin, it gave us the eight possible deprotonations discussed before. The ACD/pK_a DB results are resumed and presented together with the experimental ones in Table 2 (the last four pK_a values, from the glucoside moiety, were omitted).

The first and second pK_a values from both methods are similar but significant despair on the third and fourth. It can be seen as the difficulties the software presents when the structure is more complicated: the information could be insufficient; it does not consider other important effects as a conjugation system would exhibit or space ones (e.g., an H-bridge formation). To the ACD/pK_a DB the pK_{a2} and pK_{a3} have the same value because they came from an equivalent phenolic deprotonation.

3.1.5. Goodness of fit

The experimental absorption spectra and the fitted spectra constructed using the SQUAD program are superimposable as can be seen in Fig. 3.

The molar absorptivity coefficients obtained by SQUAD (Fig. 4) fit very well with the experimental ones and it confirms the number of species involved in the system. This information was also supported by the TRIANG [27] and SIBYLA [34] programs: given to both the same data set from UV/vis experiments, used on SQUAD determination, it was found out five absorbing species with $\Delta T = 0.002$ by TRIANG, and five factors by SIBYLA (with a standard deviation of 0.003).

In addition, the relative uncertainty for the obtained molar absorptivity coefficients were found. The maximum relative uncertainty value was 2.15% for coefficient values $>10^4$ and 6.30% maximum for those of second order. Thereby, it can be

Table 2
Mangiferin pK_a values

Equilibrium	Experimental ^a	ACD
$H_4(\text{MGF}) = H_3(\text{MGF})^- + H^+$	$pK_{a1} = 6.52 \pm 0.06$	6.04 ± 0.2
$H_3(\text{MGF})^- = H_2(\text{MGF})^{2-} + H^+$	$pK_{a2} = 7.97 \pm 0.06$	7.14 ± 0.2
$H_2(\text{MGF})^{2-} = H(\text{MGF})^{3-} + H^+$	$pK_{a3} = 9.44 \pm 0.04$	7.51 ± 0.2
$H(\text{MGF})^{3-} = (\text{MGF})^{4-} + H^+$	$pK_{a4} = 12.10 \pm 0.01$	11.92 ± 0.2

^a The pK_a values were calculated as the difference between the successive log(β)s while the assigned uncertainty as usual.

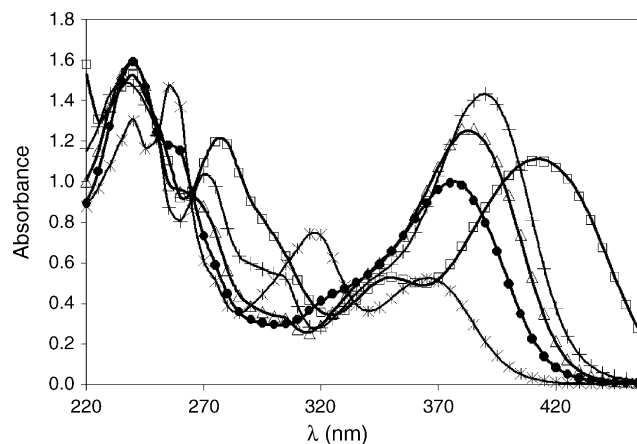


Fig. 3. Fitted absorption spectra from SQUAD program results for pH 5.0, 7.0, 8.0, 10.0 and 12.5: solid lines. Experimental absorption spectra for pH 5.1 (*), 7.0 (●), 8.0 (Δ), 10.0 (+) and 12.5 (□).

affirmed that the obtained molar absorptivity coefficients are consistent.

Looking for the pK_a assignment we could begin with the ACD estimation due to the expected acidity for these phenols. It would be pK_{a1} = 1-C; pK_{a2} in 6-C; pK_{a3} = 3-C and pK_{a4} = 7-C. But Roberts's review [1] said about the inertness of the carbonyl group toward reagents that ordinarily react with it. He indicates that compared with the other positions, the hydroxyl-group in 1-C is the most difficult to methylate. A hydroxyl-group in the 3- or 6-position is more acidic than one in the 2- or 7-position; hence the former may preferentially be methylated. The same issue appears with Lins et al. studies [24]. It indicates the pronounced acidity of the 3-(or equivalent 6)- hydroxyl-group and also the acidity differences between others dihydroxy systems. Since there are no much studies about this hydroxy-acidity behavior related to mangiferin or another tetrahydroxyxanthenes to elucidate the pK_a assignment we developed a NMR study.

3.2. NMR

The signals were assigned by means of single-frequency decoupling technique [35], application of known chemical shift

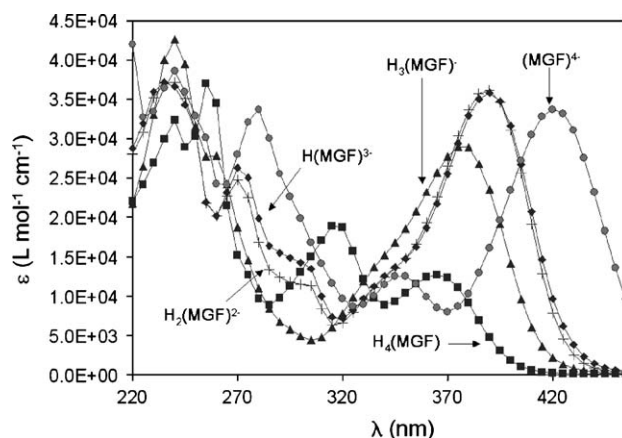


Fig. 4. Molar absorptivity coefficients given by SQUAD.

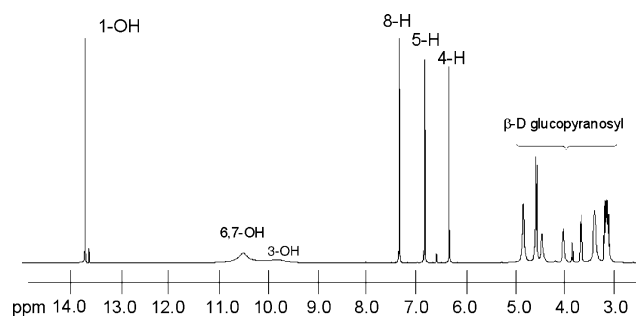


Fig. 5. ^1H NMR spectra of mangiferin at pH-dilution.

rules for substituted groups [36] and from spectra reported comparison [25]; the ACD/Labs software, now the version to predict the NMR spectra, was also used to compare with the experimental ones. For each experiment, we followed the chemical shift changes between the mangiferin solution (addition-step zero) and its following addition steps. Thus, spectral analysis begins with the corresponding mangiferin at pH dilution and its ^1H NMR data are as follows: δ 13.76 (s, 1H, 1-OH), 10.55 (s, 2H, 6,7-OH), 9.86 (s, 1H, 3-OH), 4.86 (s, 2H, 3',4'-OH), 4.49 (s, 1H, 6'-OH), 3.87 (d, 1H, 2'-OH), 7.38 (s, 1H, 8-H), 6.86 (s, 1H, 5-H), 6.37 (s, 1H, 4-H), 4.60 (d, $^3J_{\text{H}1'/\text{H}2'} = 9.52$, 1H, 1'-H), 4.05 (t, $^3J_{\text{H}2'/\text{H}3'} = 9.23$ Hz, 1H, 2'-H), 3.69 (d, $^3J_{\text{H}6'/\text{H}5'} = 2.55$ Hz, 1H, 6'-H), 3.41 (dd, $^3J_{\text{H}6''/\text{H}5'} = 5.22$ Hz, 1H, 6''-H), 3.18 (m, $^3J_{\text{H}3'/\text{H}4'} = 9.19$ Hz, $J_{\text{H}4'/\text{H}5'} = 9.17$ Hz, 3H, 3', 4', 5'-H). The ^1H NMR spectra (Fig. 5) shows the remarkable difference between the 1-OH and the other OH-protons from the xanthonoid moiety (3,6,7-OH), this is the first evidence of the H-bridge formation on 1-C. We will be focused on the three aromatic protons 4-H, 5-H and 8-H because it is easier to see the alkali increase effect on their molecular chemical media. The four hydroxyl-groups, and the other 7 protons attached to the β -D-glucopyranosyl moiety give more complicated signals, which appear at higher field.

The two-dimensional H,C-correlated spectrum of mangiferin recorded by the (g)-HSQC method leads to the C–H signals assignment, three of them corresponding to the C–H aromatics and the rest for the sugar moiety. The (g)-HMBC method is used to show the coupled ^{13}C and ^1H through two or more bonds and complete the signals assignment. The carbons coupled to the 1'-H signal are especially important in order to difference the chemical shifts from ring A to ring B, therefore, for the next experiments, this method gave us valuable information (Fig. 6). Tables 3 and 4 comprise the complete carbon signal assignment for the experimental solutions.

3.2.1. D_2O addition

As it was expected, the proton signals for OH groups disappear after D_2O addition, all of them but one (Fig. 7). The signal at 13.76 ppm diminishes but persists, even when it is the most deshielding proton, it is also the less acidic; this observation is congruent about Roberts [1] reports and it can be explained through the H-bridge formation by the OH attached to 1-C and the carbonyl group.

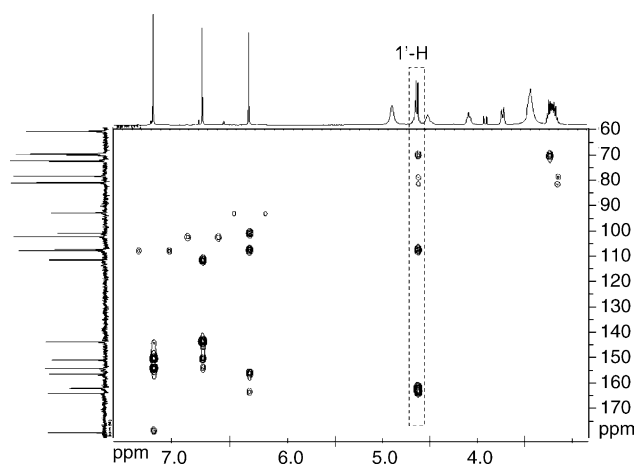


Fig. 6. 2D H,C-correlated spectrum of mangiferin (pH-dilution) by (g)-HMBC method. ^1H NMR spectrum is shown at the top edge and the ^{13}C NMR spectrum at the left-hand edge.

3.2.2. NaOH additions

Since we are especially interested about the acidic behavior of 1,3,6,7-hydroxyl-groups, a shift changes analysis was focused on these carbons and the aromatic ones, 4-C, 5-C and 8-C.

1-C chemical shift exhibits no significant change throughout this experiment (Fig. 8) confirming what was seen on the

Table 3

^{13}C NMR chemical shifts of mangiferin at pH-dilution (NaOH addition 0) and three NaOH additions (1, 2, and 3)

NaOH addition	δ (ppm)						
	1-C	2-C	3-C	4-C	4a-C	8b-C	
Ring A							
0	161.82	107.62	163.86	93.35	156.25	101.34	
1	162.00	107.28	164.90	93.77	156.43	100.77	
2	161.90	108.12	173.70	95.94	157.35	97.81	
3	162.07	108.61	176.60	96.87	157.75	97.08	
δ (ppm)							
	4b-C	5-C	6-C	7-C	8-C	8a-C	C=O
Ring B							
0	150.81	102.66	154.03	143.74	108.11	111.77	179.13
1	154.28	100.62	166.07	147.12	102.91	105.58	177.71
2	154.38	100.62	166.96	147.00	102.39	104.53	177.16
3	153.48	101.32	169.40	149.41	103.11	105.35	176.76

^a Additional signals due to glucopyranosyl carbons δ : 81.59 (5'-C), 79.00 (3'-C), 73.11 (1'-C), 70.66 (4'-C), 70.28 (2'-C), 61.52 (6'-C).

Table 4

^1H NMR chemical shifts of mangiferin at pH-dilution (NaOH addition 0) and three NaOH additions (1, 2, and 3)

NaOH addition	δ (ppm)		
	4-H	5-H	8-H
0	6.37	6.86	7.38
1	6.20	6.26	7.04
2	5.83	6.11	6.95
3	5.67	6.05	6.82

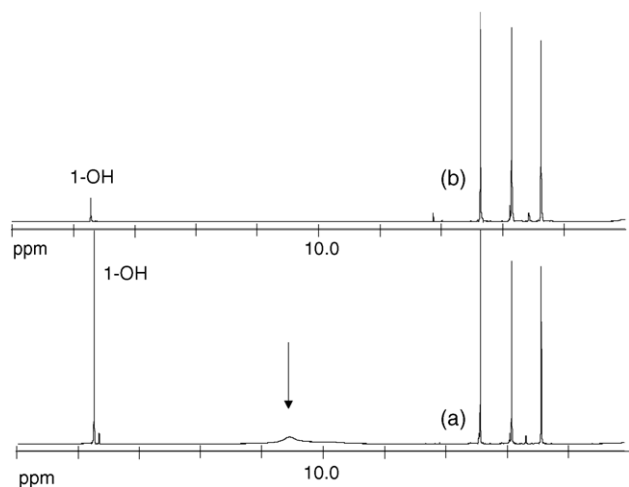


Fig. 7. ^1H NMR spectrum for mangiferin (a) before and (b) after D_2O addition. The arrow indicates the OH signals that disappear.

previous one. This result points on the expected stability for an H-bridge formation.

The other phenolic carbons follow a deshielding tendency but it can be seen differences among them. The major $\Delta\delta$ ($\delta_i - \delta_{i-1}$) occurs on different addition step for each carbon, while it happens on the second addition for 3-C; for 6-C and 7-C happens on the first one, also the $\Delta\delta$ change observed for 7-C is smaller than that for 6-C and 3-C. A deshielding effect can indicate the substituent change, from OH to O^- anion or even to carbonyl. The chemical shift for 3-C changes from 164.90 ppm to 173.70 ppm (after second step) which is a carbonyl signal value. Something

similar occurs to 6-C chemical shift changes showing an interesting 166.07 ppm value after the first NaOH addition; it could be seen as an average value between the phenolic and carbonyl ones.

The deshielding tendency shown by 4-C against the shielding tendency for 5-C and 8-C (Fig. 9) could be explained through the effect for different substituents and its position for ring A compared to ring B. On ring A, it has an *ortho*- β -D-glucopyranosyl substitution, among the *meta* instead of *ortho*-OH substitution. About the $\Delta\delta$, 4-C presents the major value after the addition number 2, while 5-C and 8-C after the number 1. This is the same observation for the ^1H $\Delta\delta$ shown in Fig. 10.

These tendencies indicate that, for an alkaline media increase steps, the molecular change occurs first on ring B and later on ring A. Thus, the first addition provides a special change on 6-C, and it follows by the 3-C change after the second addition. The chemical shift change on the 7-C gives no further information except that it happens after the second addition. Finally, it has been clearly shown the 1-C, and therefore, the 1-OH, stability.

The models for the mangiferin deprotonation steps presented in Fig. 11 involves all the discussed results. The anion structures would be stabilized by the Na cations in the media.

The first $\text{p}K_a$ would be assigned to the proton from the 6-OH, this deprotonation could give a resonant structure (iii) that would explain the ^{13}C average shift value. However, the ACD calculated spectra for both structures (ii) and (iii) compared to the experimental one, indicates that the most probable structure would be (ii), thereby the equilibrium would be displaced to the left. The same occurs about the (iv) and (v) structures, where (iv) would be the most stable one and the $\text{p}K_{a2}$ assignment corre-

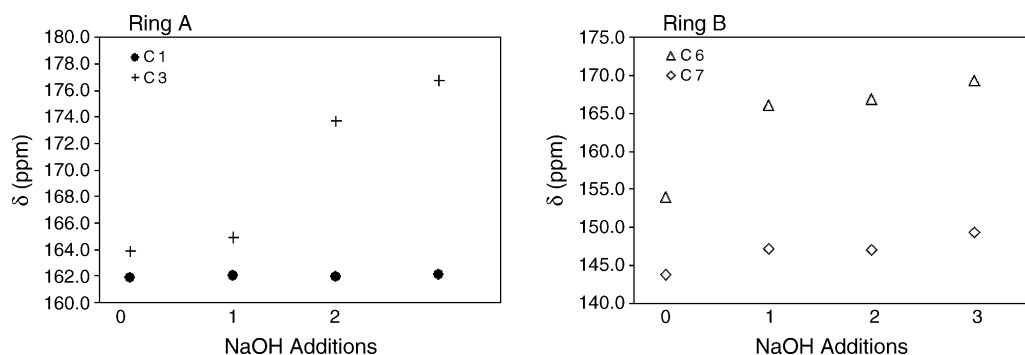


Fig. 8. ^{13}C NMR chemical shift vs. NaOH addition for mangiferin phenolics carbons 1-C, 3-C, 6-C and 7-C.

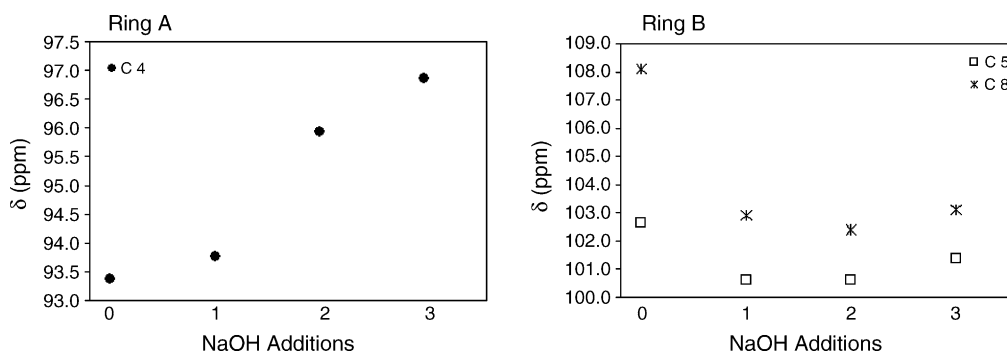


Fig. 9. ^{13}C NMR chemical shift vs. NaOH addition for mangiferin aromatics carbons 4-C, 5-C and 8-C.

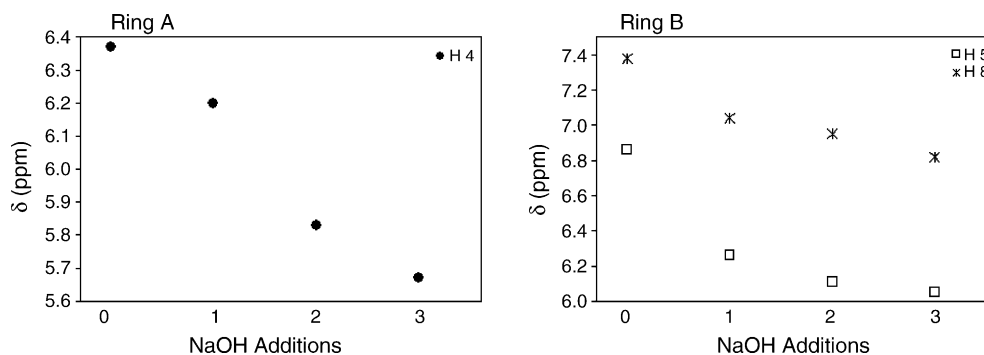


Fig. 10. ^1H NMR chemical shift vs. NaOH addition for mangiferin aromatics hydrogen 4-H, 5-H and 8-H.

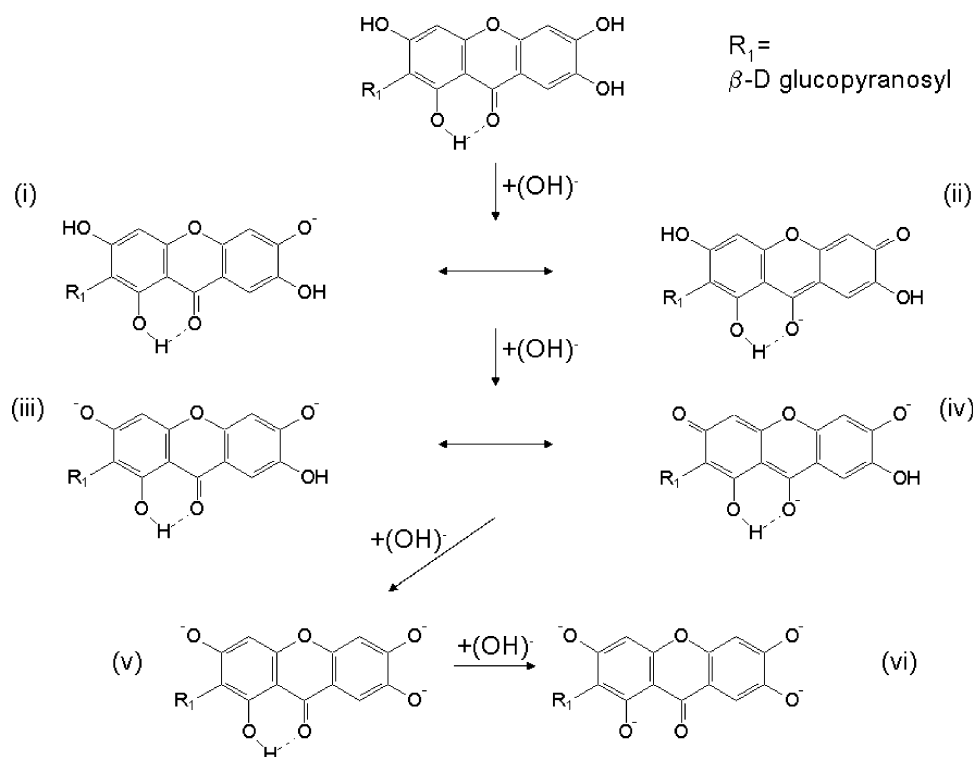


Fig. 11. Chemical model for mangiferin $\text{p}K_{\text{a}}$'s assignment.

sponds to 3-OH. The NMR evidence from this experiment does not show the (vi) and (vii) structures, but the tendency after the third addition plus the 1-OH stability and the less acidic expected behavior for the glucoside protons, give us the basis to complete the $\text{p}K_{\text{a}}$ assignment: $\text{p}K_{\text{a}3}$ for 7-OH and $\text{p}K_{\text{a}4}$ for 1-OH.

4. Conclusions

UV/vis spectral studies were used to present, for the first time, the equilibrium constants and $\text{p}K_{\text{a}}$ values for the glucoside xanthone mangiferin. The absorption spectra evidence was consistent with the SQUAD program results through several points of view and also supported by TRIANG and SIBYLA programs.

In the NMR performed experiments, the chemical shift changes due to the alkali media increase effect over the molecule, led to the $\text{p}K_{\text{a}}$ assignment. All the NMR evidences underline the 1-C stability that supposes the H-bridge presence; it would

be consistent with the previous observations discussed before by other authors. The high discrepancy in the $\text{p}K_{\text{a}}$ assignment for this 1-H is also exhibited; for ACD/ $\text{p}K_{\text{a}}$ estimation it is the most acid proton, therefore $\text{p}K_{\text{a}1}$ is conferred while we have proved, based on the NMR results, that this is the less acid proton, assigning the last $\text{p}K_{\text{a}}$ to it.

The complete assignment and acid equilibrium constant values are: $\text{H}_4(\text{MGF}) = \text{H}_3(\text{MGF})^- + \text{H}^+$, $\text{p}K_{\text{a}1}(6\text{-H}) = 6.52 \pm 0.06$; $\text{H}_3(\text{MGF})^- = \text{H}_2(\text{MGF})^{2-} + \text{H}^+$, $\text{p}K_{\text{a}2}(3\text{-H}) = 7.97 \pm 0.06$; $\text{H}_2(\text{MGF})^{2-} = \text{H}(\text{MGF})^{3-} + \text{H}^+$, $\text{p}K_{\text{a}3}(7\text{-H}) = 9.44 \pm 0.04$; $\text{H}(\text{MGF})^{3-} = (\text{MGF})^{4-} + \text{H}^+$, $\text{p}K_{\text{a}4}(1\text{-H}) = 12.10 \pm 0.01$; where it has been considered mangiferin $\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{O}_{11}$ as $\text{H}_4(\text{MGF})$.

Acknowledgments

We wish to thank professors R. Delgado-Hernández and A.J. Núñez-Sellés for helpful comments. We also acknowledge

CONACyT for financial support through the scholarship 164695 and 46124 project.

References

- [1] J.C. Roberts, *Chem. Rev.* 61 (1961) 591–605.
- [2] L. Chun-Nan, Ch. Cheng-Hsiung, A. Munehisa, Sh. Mineo, N. Morita, *Phytochemistry* 21 (1) (1982) 205–208.
- [3] M.K. Gerassim, T.N. Paraskev, *Biochem. Syst. Ecol.* 26 (1998) 647–653.
- [4] E. Quisumbing, *Medicinal Plants of the Philippines*, Katha Publishing Co. and JMC Press, Quezon, 1978.
- [5] S.K. Bhattacharya, A.K. Sanyal, S. Ghosal, *Naturwissenschaften* 59 (1972) 651.
- [6] G.M. Sánchez, R.L. Núñez-Sellés, G.P. Davison, O.S. León-Fernández, *Pharmacol. Res.* 42 (6) (2000) 565–573.
- [7] A.E. Beltrán, R. Hernanz, J. Rodríguez, A.J. Núñez, M.J. Alonso, M. Salaices, *Eur. J. Pharmacol.* 499 (2005) 297–305.
- [8] T. Miura, H. Ichiki, N. Hashimoto, M. Kato, M. Kubo, E. Ishihara, Y. Komatsu, M. Okada, T. Ishida, K. Tanigawa, *Phytomedicine* 8 (2) (2001) 85–87.
- [9] N. Iwamoto, M. Kato, H. Ichiki, M. Kubo, Y. Komatsu, T. Ishida, M. Okada, K. Tanigawa, *Biol. Pharm. Bull.* 24 (9) (2001) 1091–1092.
- [10] H. Ichiki, T. Miura, M. Kubo, E. Ishihara, Y. Komatsu, K. Tanigawa, M. Okada, *Biol. Pharm. Bull.* 21 (1998) 1389–1390.
- [11] S. Guha, S. Ghosal, *Chemotherapy* 2 (1996) 443–451.
- [12] N. Yoshimi, K. Matsunaga, M. Katayama, Y. Yamada, T. Kuno, Z. Qiao, A. Hara, J. Yamahara, H. Mori, *Cancer Lett.* 163 (2001) 163–170.
- [13] J.M. Leiro, E. Álvarez, J.A. Arranz, I.G. Siso, F. Orallo, *Biochem. Pharmacol.* 65 (8) (2003) 1361–1371.
- [14] A. Sarkar, Y. Sreenivasan, G.T. Ramesh, S.K. Manna, *J. Biol. Chem.* 279 (32) (2004) 33768–33781.
- [15] G.C. Jagetia, M.S. Baliga, *Phytomedicine* 12 (2005) 209–215.
- [16] S. Muruganandan, K. Srinivasan, S. Gupta, P.K. Gupta, J. Lal, *J. Ethnopharmacol.* 97 (2005) 497–501.
- [17] G.P. Andreu, R. Delgado, J. Velho, N.M. Inada, C. Curti, A.E. Vecesi, *Pharmacol. Res.* 51 (2005) 427–435.
- [18] S. Muruganandan, S. Gupta, M. Cataría, J. Lal, P.K. Gupta, *Toxicology* 176 (3) (2002) 165–173.
- [19] S.Y. Tang, M. Whiteman, Z.F. Peng, A. Jenner, E.L. Yong, B. Halliwell, *Free Radical Biol. Med.* 36 (2004) 1575–1587.
- [20] T. Sato, A. Kawamoto, A. Tamura, Y. Tatsumi, T. Fujii, *Chem. Pharm. Bull.* 40 (1992) 721–724.
- [21] M.T. Fernández, M.L. Mira, M.H. Florêncio, K.R. Jennings, *J. Inorg. Biochem.* 92 (2002) 105–111.
- [22] S. Iseda, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 30 (1957) 625; S. Iseda, *Chem. Abstr.* 52 (1958) 6329.
- [23] S. Ghosal, G. Rao, *Indian J. Chem.* 35B (1998) 561–566.
- [24] M.A.A. Lins-Mesquita, C. De Barros, O.R. Gottlieb, M.M. Taveira, *Anal. Chim. Acta* 42 (1968) 311–323.
- [25] A.W. Frahm, R.K. Chaudhuri, *Tetrahedron* 35 (1979) 2035–2038.
- [26] D. Legget, *Computational Methods for the Determination of Formation Constants*, 1st ed., Plenum Press, New York, 1985.
- [27] A. Morales, Tesis “Estudio de sistemas químicos multireaccionantes en soluciones acuosas por métodos espectrofotométricos con el programa computacional SQUAD y otros métodos computacionales”, Fac. Estudios Superiores de Cuautitlán, UNAM, 1993.
- [28] P. Salinas-Hernández, A. Rojas-Hernández, M.T. Ramírez-Silva, *Spectrochim. Acta, Part A* 59 (2003) 2667–2675.
- [29] M.R. Moya-Hernández, S. Mederos, A. Domínguez, A. Orlandini, C. Ghilardi, F. Ceconi, E. González-Vergara, A. Rojas-Hernández, *J. Inorg. Biochem.* 95 (2003) 131–140.
- [30] R.G. Bates, *Determination of pH*, 2nd ed., John Wiley and Sons, New York, 1973.
- [31] C.C. Westcott, *pH Measurements*, 1st ed., Academic Press, New York, 1978.
- [32] R.M. Silverstein, B.G. Clayton, T.C. Morrill, *Spectrometric Identification of Organic Compounds*, 2nd ed., Wiley Int., New York, 1967.
- [33] R.M. Issa, S.A. El-Daly, N.A. El-Wakiel, *Spectrochim. Acta, Part A* 59 (2003) 723–728.
- [34] J. Havel, L. Jancár, *Scripta* 20 (1990) 295–302.
- [35] E. Wenkert, A.O. Clouse, D.W. Cohran, D. Dodrell, *J. Am. Chem. Soc.* 91 (1969) 6879–6880.
- [36] E. Pretsch, P. Bühlmann, C. Affolter, *Structure Determination of Organic Compounds*, 3rd ed., Springer-Verlag, Berlin, 2000.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00015

DETERMINACION DE LAS
CONSTANTES DE ACIDEZ DE LA
MANGIFERINA Y SU INTERACCION
CON ALGUNOS IONES METALICOS
EN MEDIO ACUOSO

En México, D.F., se presentaron a las 0:00 horas del día 20 del mes de septiembre del año 2006 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. JOSE LUIS GAZQUEZ MATEOS

DR. ALBERTO ROJAS HERNANDEZ

DR. SIGFRIDO ESCALANTE TOVAR

DRA. GUADALUPE PEREZ CABALLERO

DR. ARTURO ROJO DOMINGUEZ

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, obtención del grado de:



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
DIRECCION DE SISTEMAS ESCOLARES



Casa abierta al tiempo

DOCTORA EN CIENCIAS (QUIMICA)

DE: BERENICE GOMEZ ZALET A

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

APROBAR

Berenice Gomez Zaleta
BERENICE GOMEZ ZALET A
FIRMA DE LA ALUMNA

REVISÓ

Julio Cesar de Lara Isassi
LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBI

Veronica Medina Banuelos

DRA. VERONICA MEDINA BANUELOS

PRESIDENTE

Jose Luis Gazquez Mateos

DR. JOSE LUIS GAZQUEZ MATEOS

VOCAL

Alberto Rojas Hernandez

DR. ALBERTO ROJAS HERNANDEZ

VOCAL

CANCELADO

DR. SIGFRIDO ESCALANTE TOVAR

VOCAL

Guadalupe Perez Caballero

DRA. GUADALUPE PEREZ CABALLERO

SECRETARIO

Arturo Rojo Dominguez

DR. ARTURO ROJO DOMINGUEZ