



FALLA DE ORIGEN 58
**Universidad Nacional Autónoma
de México** zey

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
Z A R A G O Z A

**AISLAMIENTO Y ELUCIDACION ESTRUCTURAL
DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS DE
Esenbeckia berlandieri ssp *acapulcensis* (Rose).**

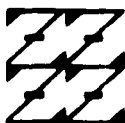
**TESIS PROFESIONAL
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
SERGIO RODRIGUEZ CAMPOS**

DIRECTOR: Q. ARTURO E. CAMO FLORES

MEXICO, D. F.

JULIO DE 1995

U N A M
F E S
Z A R A G O Z A



LO HERMANO E/2
DE NUESTRA SELECCION



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

A MI FAMILIA:

EMMA Y LEON ...
OZIEL, JOSE ANTONIO Y ALEJANDRO ...
ROSY Y ALMENDRA ...

POR SU APOYO, COMPRENSION Y PACIENCIA.

A MIS AMIGOS ...

A MIS MAESTROS...

INDICE

A. INDICE	I
B. NOTACION	IV
C. RESUMEN	V
I. INTRODUCCION	1
II. FUNDAMENTACION	4
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	30
IV. OBJETIVOS	32
V. HIPOTESIS	33
VI. METODOLOGIA	34
6.1 MATERIAL	35
6.2 EQUIPO	35
6.3 REACTIVOS	36
VII. PARTE EXPERIMENTAL	37
VIII. ESPECTROS.	52
5-Hidroxi-7-metoxi-6-(3",3"-dimetilalil)-flavanona	
8.1 Espectro 1. IR	53
8.2 Espectro 2. RMN- ¹ H	54
8.3 Espectro 3. RMN- ¹³ C	55
8.4 Espectro 3'.RMN- ¹³ C (DEPT)	56

5,7-dihidroxi-8-(3ⁿ,3ⁿ-dimetilalil)-flavanona		
8.5	Espectro 4. IR	57
8.6	Espectro 5. RMN- ¹ H	58
8.7	Espectro 6. RMN- ¹³ C	59
8.8	Espectro 6'.RMN- ¹³ C (DEPT)	60
5-Hidroxi-7-metoxi-8-(3ⁿ,3ⁿ-dimetilalil)-flavona		
8.9	Espectro 7. IR	61
8.10	Espectro 8. RMN- ¹ H	62
5-hidroxi-(6ⁿ,6ⁿ-dimetil)-4ⁿ,5ⁿ-dihidropirano flavanona		
8.11	Espectro 9. IR	63
8.12	Espectro 10. RMN- ¹ H	64
8.13	Espectro 11. RMN- ¹³ C	65
8.14	Espectro 11'.RMN- ¹³ C (DEPT)	66
8.15	Espectro 12. RMN- ¹ H	67
	(Producto de ciclización con DDQ)	
5,4'-dihidroxi-7-metoxi-8-(3ⁿ,3ⁿ-dimetilalil)flavanona		
8.16	Espectro 13. IR	68
8.17	Espectro 14. RMN- ¹ H	69
8.18	Espectro 15. RMN- ¹³ C	70
8.19	Espectro 15'.RMN- ¹³ C (DEPT)	71
5, 4 - dihidroxi- 7 -metoxi- 8 - (2ⁿ, 3ⁿ- dihidroxi-3ⁿ,3ⁿ- dimetilpropil)-flavanona		
8.20	Espectro 16. IR	72
8.21	Espectro 17. RMN- ¹ H	73

IX. RESULTADOS	74
9.1 Tabla. RMN- ¹ H	75
9.2 Tabla. RMN- ¹³ C	76
X. DISCUSION	77
XI. CONCLUSIONES	111
XII. BIBLIOGRAFIA	115

NOTACION EMPLEADA.

RMN	Resonancia magnética nuclear.
COSY	Correlación espectroscópica homonuclear (RMN-¹H).
TMS	Tetrametil silano (referencia).
δ	Desplazamiento químico.
J	Constante de acoplamiento.
s	Singulete.
d	Doblete.
t	Triplete.
c	Cuarteto.
v	Número de onda.
M+	Ion molecular.
I.E.	Impacto electrónico.
m/z	Relación masa carga.
ccf	Cromatografía en capa fina.
pf	Punto de fusión.
UV	Ultra violeta.
IR	Infra rojo.
[]	Número estructura.
()	Referencia bibliográfica.

RESUMEN

El Reino Vegetal tiene una gran importancia originada por el descubrimiento de los Productos Naturales, también llamados Metabólitos Primarios y Secundarios, siendo estos últimos los que cobran interés para el hombre, en México aún queda una considerable cantidad de especies vegetales por estudiar; esto es originado por la amplia riqueza que en este aspecto posee nuestro país aunado a que de cada especie se obtienen una infinidad de compuestos, en diferentes cantidades, lo que dificulta su separación e identificación; sin embargo, empleando las técnicas convencionales de separación, purificación y extracción (cromatografía, cristalización y filtración), se puede aislar a los Metabólitos secundarios mayoritarios. Estas técnicas fueron empleadas para el estudio químico del extracto etanólico de la planta *Esenbeckia berlandieri ssp acapulcensis* (Rose), del cual se aislaron cuatro sustancias, que de acuerdo a estudios anteriores no están presentes en plantas del mismo género y aun de la misma especie* (ver Cuadro I pag 114) . Estos compuestos fueron caracterizados e identificados, teniendo como fundamento los resultados obtenidos de sus espectros de RMN-¹H, RMN-¹³C, IR, EM., como: 5 - hidroxí - 7 - metoxi - 8 - (3^o,3^o- dimetilalil)-flavanona; 5,7 - dihidroxí - 8 - (3^o,3^o, dimetilalil)-flavanona; 5,4^o-dihidroxí-7-metoxi-8-(3^o,3^o-dimetilalil)-flavanona, y una flavonona similar a las anteriores que por sus datos espectroscópicos sugiere proponer la presencia de dos grupos hidroxilos unidos a los C-2^o y C-3^o del grupo prenilo, cuya sustancia se identificó como 5,4-dihidroxí-7-metoxi-8-(2^o,3^o-dihidroxí-3^o,3^o-dimetilpropil)-flavanona.

* *E. huertana*
E. xochipala
E. berlandieri ssp berlandieri
E. collina

INTRODUCCION

La química es una ciencia que ha tenido una gran influencia en las actividades socioeconómicas del ser humano en el último siglo, debido a las numerosas aplicaciones que de ella se derivan y que se han incorporado a la vida cotidiana de la sociedad moderna. Esto se ha logrado mediante una intensa investigación científica realizada por cada vez más numerosos y diversos grupos en todo el mundo.

En particular la Química Orgánica ha tenido un extraordinario desarrollo, basta recordar que esta área del conocimiento incluye a la química del petróleo, la química farmacéutica, la química de los polímeros y la química agrícola entre otras. Por lo que la química orgánica ha contribuido a la solución de importantes problemas de la sociedad, tales como la salud pública, la alimentación, el control de la natalidad, el aprovechamiento racional de las fuentes de energía y los recursos naturales (1).

Dentro de los recursos naturales con los que cuenta nuestro país, el cual posee una de las mayores diversidades biológicas y culturales del mundo, se encuentran los recursos vegetales. Sin embargo, el conocimiento y el estudio de la flora mexicana es aún muy deficiente desde diversos aspectos. El conocimiento de la vegetación y sobre todo de sus interrelaciones ecológicas con los diferentes factores del medio ambiente, constituye hoy en día la base indispensable para el adecuado aprovechamiento y la debida conservación de la flora mexicana.

Por lo anterior, es deseable que se desarrollen en nuestro país un mayor número de investigaciones que permitan acrecentar el conocimiento de la flora con la que cuenta México, para valorar racionalmente su potencial de aprovechamiento.

En este contexto se enmarca la investigación en la Química de los Productos Naturales, los cuales han originado amplios horizontes de investigación en varias áreas y ha propiciado un estudio interdisciplinario intenso de los mismos, aunque en la actualidad subsisten controversias sobre el papel específico que desempeñan los metabolitos secundarios en los propios vegetales (2).

Asimismo se han identificado áreas de investigación en productos naturales vegetales que son de importancia desde el punto de vista práctico, en particular, sobre plantas de interés económico y medicinal (3).

En el presente trabajo se describe el aislamiento, purificación, caracterización e identificación de los metabolitos secundarios mayoritarios presentes en *Esenbeckia berlandieri* ssp *acapulcensis* (Rose), especie vegetal perteneciente a la familia Rutaceae, la cual no ha sido previamente estudiada. De tal forma que los resultados obtenidos de esta investigación, se podrán integrar a los ya reportados para poder diseñar un perfil químico para este grupo de plantas (4 - 7).

FUNDAMENTACION DEL TEMA

El estudio químico del reino vegetal ha provocado el descubrimiento de varias sustancias propias del organismo vivo, denominadas Productos Naturales.

Los Productos Naturales se han clasificado en dos grupos:

- a) Metabolitos primarios.
- b) Metabolitos secundarios.

Los metabolitos primarios son considerados como necesarios para el desarrollo del organismo vegetal, ya que comprenden sustancias de amplia difusión en la naturaleza y que se encuentran en todo organismo vivo, siendo por lo tanto, metabólicamente esenciales (aminoácidos, proteínas comunes, nucleótidos, lípidos, etc.).

Un grupo reducido de estos metabolitos primarios sirven como precursores de todas las otras sustancias que no pertenecen a esta categoría y los cuales son considerados como "Metabolitos Secundarios"; [cuya función no ha podido ser esclarecida aún, si bien es posible que no sean esenciales para el organismo productor, pero en general deben tener algún significado biológico ya que son biosintetizados y biodegradados, por lo que se presume poseen alguna función específica (8)].

Los metabolitos secundarios tienen una distribución restringida en la naturaleza (en ocasiones es característico de un género dado o de alguna especie, en consecuencia son una manifestación de la individualidad del organismo que los contiene). Su significado biológico y bioquímico en el organismo que lo produce no está totalmente esclarecido; sin embargo la hipótesis más aceptada sobre este hecho es la propuesta por Dudley H. quien sugiere la existencia de una función de tipo metabólico, ya que atraen diversos agentes de polinización, intervienen en la adecuación de la planta a inclemencias del medio externo y sirven como defensas químicas contra microorganismos, insectos, predadores y aún contra otras plantas (2,9).

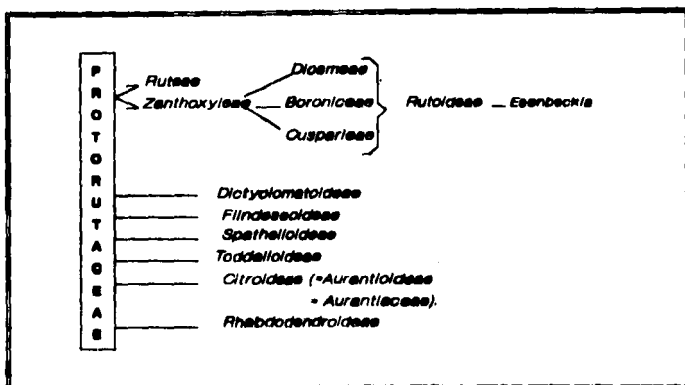
Los estudios sobre Metabolitos Secundarios continúan y es probable que muchos de los compuestos orgánicos que hoy en día se califican de Productos Naturales lleguen a ser reconocidos como parte fundamental de importantes funciones biológicas; por el momento la información obtenida de estos estudios, ha reforzado algunas clasificaciones taxonómicas, además de permitir la elaboración de hipótesis estructurales sobre las sustancias químicas aisladas de una determinada planta y auxiliando al químico a decidir sobre detalles configuracionales, fuentes de materias primas o rutas de algunos productos propios del organismo vegetal¹.

A pesar de que no ha sido esclarecido el significado biológico de los metabolitos secundarios para el organismo productor, éstos presentan gran interés para el hombre por sus diversas actividades y empleos como, fármacos, saborizantes, insecticidas, sedantes, fragancias, etc., de esto se origina el interés por el estudio químico, de diversas especies vegetales, por ejemplo las pertenecientes a la familia Rutaceae², (Esquema I); quien está conformada por 7 subfamilias y 150 géneros, de los cuales la mayoría se encuentra en 3 subfamilias (Rutoideae, Toddaloidea y Citroideae) (10).

¹ LA TAXONOMÍA QUÍMICA, QUIMIOTAXONOMÍA O SISTEMÁTICA QUÍMICA, ES UNA RAMA DE LA CIENCIA QUE UTILIZA LOS CARACTERES QUÍMICOS, EN PARTICULAR LOS LLAMADOS METABOLITOS SECUNDARIOS (ALCALOIDES, TERPENOIDES, FLAVONOS, ETC) DE UN CONJUNTO DE ORGANISMOS PARA DIFERENCIAR SU POSICIÓN EN UNA CLASIFICACIÓN JERÁRQUICA EVOLUTIVAMENTE DE LOS SERES VIVOS.

² LA FAMILIA RUTACEAE, ES UNA GRAN FAMILIA DE ARBUSTOS, ARBÓREOS Y EN ALGUNOS CASOS HERBAS DE GRAN IMPORTANCIA ECONOMICA POR SER PRODUCTOR DE LOS FRUTOS CÍTRICOS COMERCIALES (LÍMOS, NARANJAS, NARANJAS, NARANJAS, LÍMOS, ETC.), Y TAMBIÉN DE ALGUNAS ESPECIES COMERCIALES COMO *SARALIA JAPONICA* Y *SARALIA HIRAZIANA*.

ESQUEMA I. División intrafamiliar de la familia Rutaceae.



Como se indica en el Esquema I, el género *Esenbeckia* pertenece a la subfamilia Rutoideae; este género se encuentra ampliamente distribuido en el mundo; comprendiendo aproximadamente treinta especies, de las cuales diecisiete se localizan en México, principalmente en las zonas selváticas y tropicales de los estados de Veracruz, Guerrero, Michoacán, Oaxaca y Chiapas; así como en la Sierra de Tamaulipas (11 - 16). Hasta ahora, se han analizado químicamente 11 especies de *Esenbeckias* de las cuales 7 son originarias de México³.

3

Esenbeckias

ORIGINARIAS DE MÉXICO

E. hartamii
E. litoralis
E. berlandieri
E. flava
E. nesiotica
E. huertana
E. berlandieri ssp berlandieri

NO ORIGINARIAS DE MÉXICO

E. febrifuga (Argentina)
E. pilocarpoides
 (Guayana Francesa)
E. leiocarpa (Brasilña)
E. pumila (Brasilña)

De los estudios químicos realizados hasta ahora se puede concluir que los limonoides, las furanocumarinas, los alcaloides furoquinolinicos y alcaloides derivados de la acridona son los constituyentes característico del género *Esenbeckia* (TABLA I).

TABLA I. Constituyentes químicos del género *Esenbeckia*.

ESPECIE	CONSTITUYENTE	REFERENCIA
<i>E. febrifuga</i> (corteza)	[1] Rutaevina	17 - 18
	[3] Diosfenol	
	[6] Skimmianina	
	[10] Maculina	
	[11] Flindersamina	
<i>E. hartami</i> (tallos)	[1] Rutaevina	19
	[2] Limonina	
	[3] Diosfenol de la limonina	
	[6] Skimmianina	
	[7] Maculosidina	
<i>E. litoralis</i> (semillas) (cápsulas de semillas)	[1] Rutaevina	16
	[2] Limonina	
	[8] Kokusagina	
	[15] Bergapteno	
	[16] Isopimpinelinea	
(hojas y tallos) (corteza)	[8] Kokusagina	16
	[12] 1-hidroxi-3-metoxi-N-metilacridona	
	[16] Isopimpinelinea	
	[17] 8-hidroxibergapteno	
	[18] Imperatorina	
	[19] Felopterina	
[20] Alloimperatorina		

TABLA I. (Continuación)

ESPECIE	CONSTITUYENTE	REFERENCIA
<i>E. berlandieri</i> (semillas) (cáscara de frutos)	[1] Rutaevina [15] Bergapteno	16
<i>E. litoralis</i> (semillas, cápsulas hojas y tallos)	[4] Dictamina [5] Evolitrina [6] Skimmianina [9] Kokusaginina [10] Maculina [15] Bergapteno [18] Imperatorina [19] Felopterinina	16
<i>E. flava</i> (semillas, madera)	[1] Rutaevina [4] Dictamina [5] Evolitrina [6] Skimmianina [7] Maculosidina [11] Flindersiamina [13] 3-3-diisopentil-N-metil-2,4-quinoldiona	16
<i>E. pilocarpoides</i> (raíz)	[8] Kokusagina [9] Kokusaginina [10] Maculina [11] Flindersiamina [12] 1-hidroxil-3-metoxi-N-metil acridona [14] Isomaculina	16

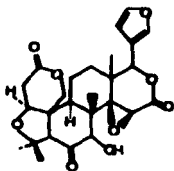
TABLA I. (Continuación)

ESPECIE	CONSTITUYENTE	REFERENCIA
<i>E. nesiotica</i> (partes aéreas: hojas y tallos)	[21] β -sitosterol	15
	[22] β -epóxido del cariofileno	
	[23] Fridelina	
	[24] Ester del β -sitosterol	
	[25] (Z,Z,Z,Z,Z,E,E,E,E)-decaprenol	
	[26] Lupeol	
	[27] (Z,Z,Z,Z,Z,E,Z,E,E,E,E)-tridecaprenol	
	[28] 1-(3-metilbutanoil)-3-geranil floroqlucinol	
	[29] 1-(2-metilpropanoil)-3-geranil floroqlucinol	
	[30] Clovandiol	
<i>E. belizensis</i> (partes aéreas: hojas y tallos)	[9] Kokusaginata	15
	[11] Flindersiamina	
	[21] β -sitosterol	
	[22] β -epóxido del cariofileno	
	[23] Fridelina	
	[24] Ester del β -sitosterol	
	[25] (Z,Z,Z,Z,Z,Z,E,E,E)-decaprenol	
	[31] Espatulanol	
[33] Lupenona		
<i>E. huertana</i> (hojas y tallo)	[15] Bergapteno	20
	[16] Isopimpineline	
	[19] Felopterina	
	[22] β -epóxido del cariofileno	
	[23] Fridelina	
	[26] Lupeol	
	[32] Criptomeridiol	
	[34] Nantotoxina	

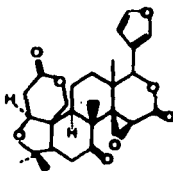
TABLA I. (Continuación)

ESPECIE	CONSTITUYENTE	REFERENCIA
<i>E. leiocarpa</i> (raíz)	[4] Dictamina	21-22
	[9] Kokusagininina	
	[10] Maculina	
	[11] Flindersiamina	
	[35] 4-metoxi-2-(3'-pentil) quinolinas	
	[36] 1,4-dihidro-1-metil-2-(3'pentil) quinolin-4-ona	
	[37] 5-isopentenilindol	
	[38] 6-isopentenilindol	
	[39] 7-isopentenilindol	
	[40] Annonidina A	
	[41] Annonidina C	
	[42] 7-indolcarbaldeshido	
	[43] 7-indol metanol	
	[44] Leiocarpol	
	[45] Leiocarpadiol	
	[46] Sesamina	
	[47] Metilpiperitol	
	[48] Marmesina	
	[49] 4-isopreniloxi-trans-cinamato de metilo	
	[50] Leiocarpona	
[51] Leiocarpatriol A		
[52] Leiocarpatriol B		
[53] 1,4-dihidro-5-metoxi-1-metil 2-tridecilquinolin-4-onas		
[54] Amida A		
[55] Amida B		
<i>E. pumila</i> (raíz)	[56] Rutina	23

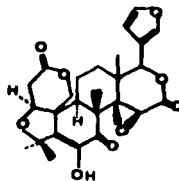
TABLA I. (Continuación). Estructuras



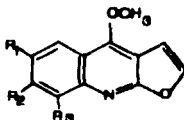
[1] Ruteavina



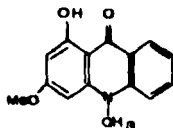
[2] Limonina



[3] Diostanol

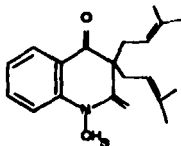


- | | |
|---------------------|----------------------------------|
| [4] Diotemina | $R_1; R_2; R_3 = H$ |
| [6] Evolltrina | $R_1; R_2 = H; R_3 = OCH_3$ |
| [6] Skimianina | $R_1; R_2; R_3 = OCH_3$ |
| [7] Maculoaldina | $R_1; R_2 = OCH_3; R_3 = H$ |
| [8] Kokusegina | $R_1 = H; R_2; R_3 = OCH_2O$ |
| [9] Kokusegina | $R_1; R_2 = OCH_3; R_3 = H$ |
| [10] Maculina | $R_1; R_2 = OCH_2O; R_3 = H$ |
| [11] Filinderiamina | $R_1; R_2 = OCH_2O; R_3 = OCH_3$ |

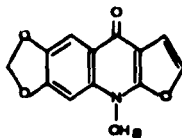


[12] 1-hidroxi-3-metoxi-N-metil acridona

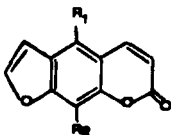
TABLA I. (Continuación). Estructuras



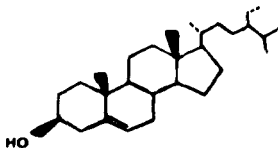
[13] 3,3-dialipentil-N-metil-2,4-quinoldiona



[14] isosauflina

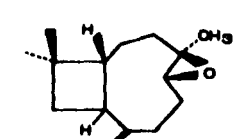


- | | |
|---------------------------|---|
| [16] Bergapteno | $R_1 = \text{OCH}_3; R_2 = \text{H}$ |
| [16] Isopimpinellina | $R_1, R_2 = \text{OCH}_3$ |
| [17] 8-hidroxi bergapteno | $R_1 = \text{OCH}_3; R_2 = \text{OH}$ |
| [18] Imperatorina | $R_1 = \text{H}; R_2 = \text{OCH}_2\text{CH-OCH}_3$ |
| [19] Felopterina | $R_1 = \text{OCH}_3; R_2 = \text{OCH}_2\text{CH-OCH}_3$ |
| [20] Alloimperatorina | $R_1 = \text{CH}_2\text{CH-OCH}_3; R_2 = \text{OH}$ |

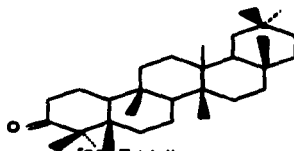


[21] β -sitosterol

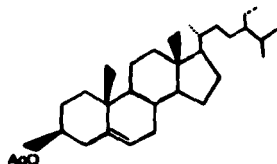
TABLA I. (Continuación). Estructuras



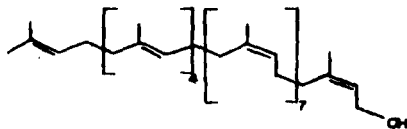
[22] β -epóxido del carotoflavo



[23] Fridellina



[24] Acetato del β -sitosterol

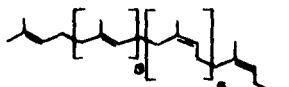


[25] (Z,Z,Z,Z,Z,E,E)-decaprenol



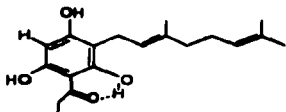
[26] R-OH Lupeol

[33] R-O Lupenona

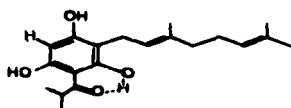


[27] (Z,Z,Z,Z,Z,Z,Z,E,E,E)-tridecaprenol

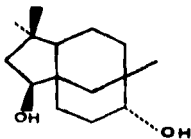
TABLA I. (Continuación). Estructuras



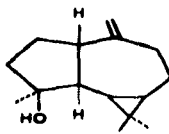
[28] 1-(3-metilbutanol)-
3-geraniil-floroglucinol



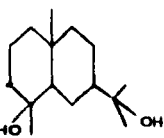
[29] 1-(2-metil-propanol)-
3-geraniil-floroglucinol



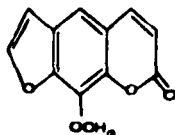
[30] Clovandiol



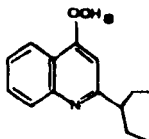
[31] Espatulanol



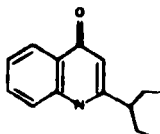
[32] Criptomerdol



[34] Xantoxina

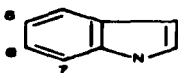


[35] 4-metoxi-2-(3'-pentil)
quinolinas



[36] 1,4-dihidro-1-metil-
2-(3'-pentil)-
quinolin-4-ona

TABLA I. (Continuación). Estructuras



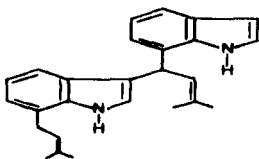
[37] 5-Isopentenil-Indol



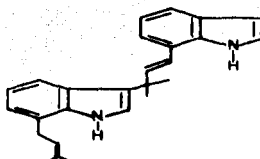
[38] 6-Isopentenil-Indol



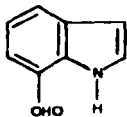
[39] 7-Isopentenil-Indol



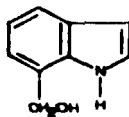
[40] Annonidina A



[41] Annonidina C

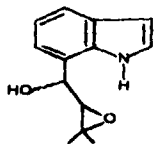


[42] 7-Indolcarbaldehido

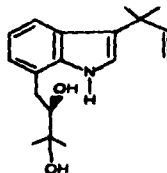


[43] 7-Indolmetanol

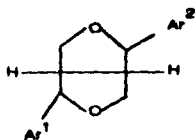
TABLE I. (Continuación). Estructuras



[44] Lelocarpol



[45] Lelocarpdiol

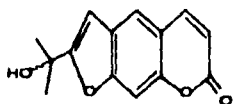


[46] Sesamina

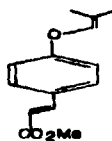
Ar¹ = Ar² = piperonil

[47] Metilpiperitol

Ar¹ = piperonil; Ar² = veratril

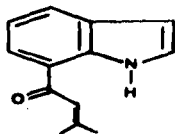


[48] Marmesina

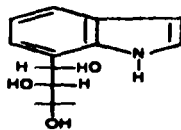


[49] 4-isopreniloxi-*trans*
olimatato de metilo

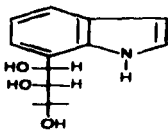
TABLA I. (Continuación). Estructuras



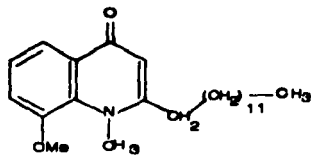
[50] Leiocarpone



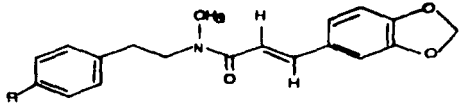
[51] Leiocarpatriol A



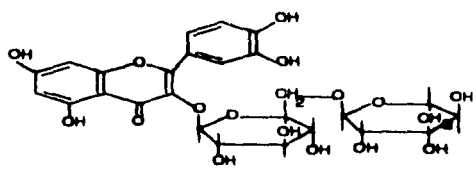
[52] Leiocarpatriol B



[53] 1,4-dihidro-5-metoxi-1-metil-2-tridecilquinolin-4-onas

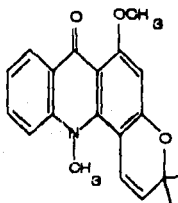


[54] Amida A R = OMe
[55] Amida B R = H

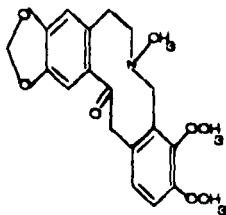


[56] Rutina

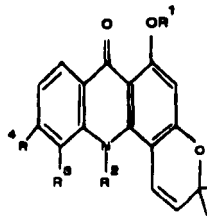
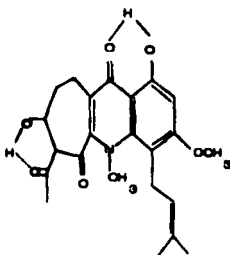
Del estudio químico de la familia de las Rutaceas se han obtenido algunos metabolitos secundarios con actividad biológica; entre los cuales podemos mencionar algunos alcaloides derivados del ácido antranílico, como la acridona que ha mostrado una gran actividad citotóxica; la citropone B y algunos derivados de la acridona poseen la propiedad de ser potentes inhibidores del desarrollo de "células causantes de la leucemia". Asimismo, se han reportado que las furoquinolinas simples poseen gran actividad mutagénica (24) y algunos alcaloides derivados de la acridona han manifestado una considerable actividad antipasmolítica (25). Por otro lado los alcaloides derivados de la tirosina específicamente las benzo-[c]-fenantridinas; han mostrado poseer una gran actividad como antibióticos (sanguinarias), mientras que la fagaronina ha despertado un importante interés debido a su gran actividad anticancerígena.



Acronolina (*Acronyctia baneri*) (26)
Actividad citotóxica



Fagaronina (aislada de diferentes especies de *Fagara*)
anticancerígena (27)



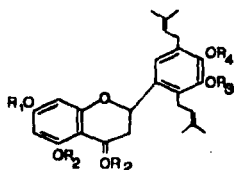
Citropona B (especie de *Citrus*) (84) (Derivados de la acridona) (86)

Otras sustancias características de la familia *Rutaceae* son los limonoides (30) sustancias que han demostrado tener una vasta actividad biológica, dentro de las cuales podemos mencionar su actividad antiviral, bactericida y antifúngica, así como la capacidad de inhibir el desarrollo de insectos y una variedad de efectos medicinales en animales y humanos. Igualmente a las cumarinas mencionadas en el presente trabajo se les ha determinado la actividad biológica, de donde destacan su acción bactericida, sus efectos diuréticos y vasodilatadores, así como sus propiedades anticoagulantes y como estimulante hepatotóxico y respiratorio (31). Mientras que los flavonoides aislados de diferentes especies de *Rutaceae* han presentado una amplia variedad farmacológica, antibacteriana, fungitóxica, entre otras como se reseña en la TABLA II.

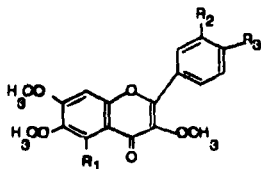
TABLA II. Flavonoides con actividad biológica.

COMPUESTO	ACTIVIDAD BIOLÓGICA	FUENTE	REF.
[57] Sigmoidina A	Antimicrobiano	(<i>Erythrina sigmoidea</i>)	32
[58] Sigmoidina B	Antimicrobiano	(<i>Erythrina sigmoidea</i>)	32
[59] Artemetina	Antiinflamatorio	(<i>Cordia verbenacea</i>)	33
	Cicatrizante		33
[60] Vitexina ramnosida	Acción sobre miocardio	(<i>Allophylus edulis</i>) (var <i>edulis</i>)	34
	Antihepatotóxico		35
[61] Galangina	Antibacterial	(<i>Elaeagnus glabra</i>)	36
[62] Quercetina	Antihepatotóxico	(<i>Gossypium arboreum</i>)	37
	Anticancerígeno		37
	Antidiabético		35
	Antimicrobiano		38
[63] Crisofenol D	Antimicrobiano	(<i>Psidia trinervia</i>)	39
[64] Isokaenferida	Antimicrobiano	(<i>Psidia trinervia</i>)	39
[65] Ayanina	Antimicrobiano	(<i>Psidia trinervia</i>)	39
[66] Gossypanten 8-o-ramnosida	Antibacterial	(<i>Gossypium arboreum</i>)	40

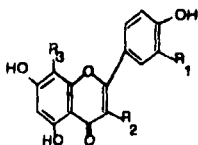
TABLE II. Estructuras (Continuación)



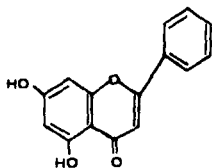
[55] Sigmoldina A $R^1 = R^2 = R^3 = R^4 = H_2$
 [56] Sigmoldina B $R^1 = R^3 = R^4 = Me, R^2 = H$



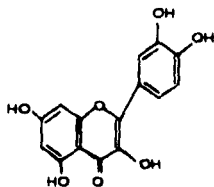
[57] Artemetina $R^1 = OH, R^2 = R^3 = OMe$
 [58] Crotefenol D $R^1 = R^2 = R^3 = OH$
 [59] Ayanina $R^1 = R^2 = CH, R^3 = OMe$



[60] Vitexina ramnosida $R^1 = R^2 = H, R^3 = 2''-O''-rhamnosyl-C-glucosyl$

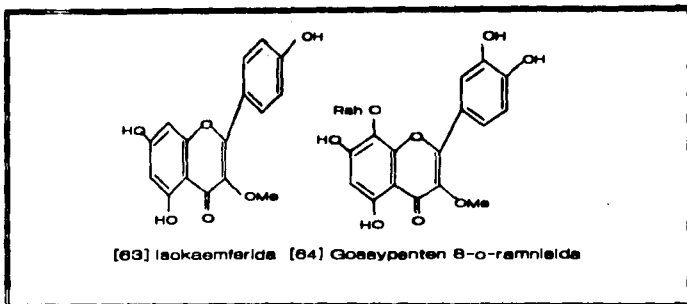


[61] Galangina



[62] Quercetina

TABLA II. (Continuación)



Desde el inicio de la química de Productos Naturales, ha existido el interés en conocer el origen de dichos productos, (es decir, descifrar el proceso por el cual son elaborados por el organismo vivo). Este interés guarda una interrelación con otra incógnita, el por qué o para qué son elaboradas estas sustancias.

A pesar de que, como ya se mencionó, no se ha elucidado la respuesta a la segunda interrogante; lo referente a la biosíntesis de estos metabolitos secundarios ha sido casi totalmente esclarecida. En este punto se describirá brevemente la biosíntesis de las flavanonas como parte importante en el estudio de la especie vegetal, que es objeto del presente estudio.

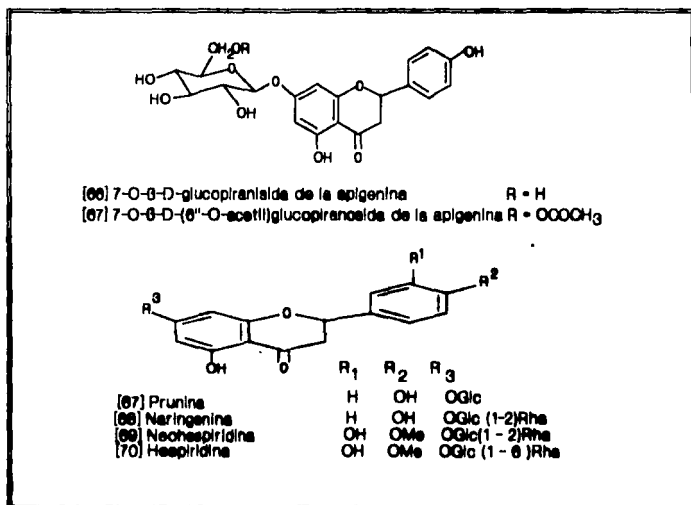
El término flavonoide se asigna a una clase muy grande de sustancias naturales derivadas de un mismo intermediario, los cuales se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal, tanto libres como en forma de glicósidos; estos últimos contribuyen a darle color a las flores, frutos y hojas, mientras que las agliconas son más frecuentes en los tejidos leñosos.

Como ya se indicó los flavonoides se pueden encontrar como O-glicosiflavonoides o C-glicosiflavonoides.

Los O-glicosiflavonoides son compuestos en los cuales uno o más grupos hidroxilo de un flavonoide se encuentran unidos a un azúcar o azúcares por un enlace hemiacetalico.

En la familia Rutaceae (género *Citrus*), se han aislado O-glicosiflavanonas con esqueleto de la prunina, naringenina, neohesperidina y hesperidina (ver figura 1), a partir de las semillas de *Citrus paradisi*.

FIGURA 1.



Mientras que los C-glicosiflavonoides son sustancias que presentan un azúcar o azúcares unidos directamente a los anillos bencénicos a través de un enlace C-C. Hasta ahora se han encontrado exclusivamente C-glicosiflavonoides que presentan el azúcar unido en las posiciones 6 y 8 del núcleo flavonoide⁴; los cuales son muy restringidos y ocasionalmente en la literatura se reporta el aislamiento y caracterización de C-glicosiflavonoides correspondientes a isoflavanonas, flavanonas y flavonas. (TAMA III)

TABLA III. C-glicosiflavonoides correspondientes a isoflavanonas, flavanonas y flavonas.

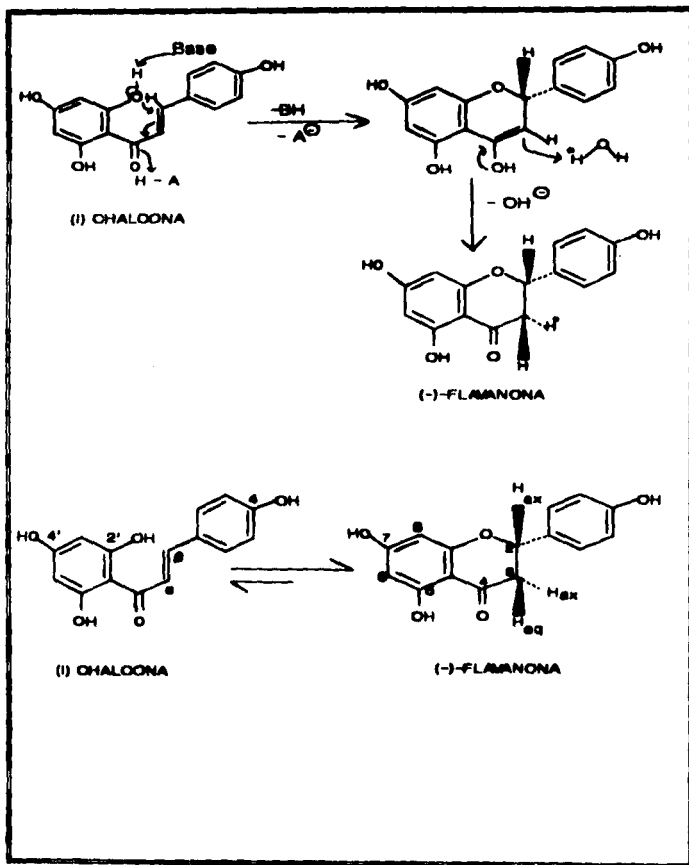
NOMBRE TRIVIAL	AGLICONA	ESQUELETO	C-6	C-8
Vitexina	Apigenina	Flavona	---	Glucosa
Isovitexina	Apigenina	Flavona	Glucosa	---
Vicenina-1	Apigenina	Flavona	Xilosa	Glucosa
Vicenina-2	Apigenina	Flavona	Glucosa	
Vicenina-3	Apigenina	Flavona	Glucosa	Xilosa
Violanthina	Apigenina	Flavona	Glucosa	Ramnosa
Orientina	Luteolina	Flavona	---	Glucosa
Isoorientina	Luteolina	Flavona	Glucosa	---
Keyakinina	7-Metilkaempferol	Flavonoles	Glucosa	---
Hemiphloina	Maringenina	Flavanonas	Glucosa	---

⁴ EN LA LITERATURA SE REPORTA QUE EL NÚMERO DE AZÚCARES QUE SE ENCUENTRAN UNIDOS A LOS C-Glicosiflavonoides EN LOS VEGETALES QUE EN LOS C-Glicosiflavonoides, SIEMPRE SE ENCUENTRA LA GLUCOSA, GALACTOSA, RAMNOSA, XILOSA Y ARABINOSA.

Las flavanonas son compuestos polifenólicos que poseen 15 átomos de carbono, los cuales conforman 2 anillos bencénicos unidos por una cadena lineal de 3 átomos de carbono ($C_5-C_3-C_6$); dicho esqueleto se forma de 2 partes que son diferentes en sus orígenes biosintéticos; el fragmento fenilpropanoide (C_6-C_3 , anillo B) puede derivar del aminoácido aromático fenilalanina, ácido shikímico, ácido p-hidroxicinámico y del ácido cumárico; y el anillo A que se origina por la condensación de 3 unidades de acetato para formar malonil-CoA.

La etapa clave en la biosíntesis de todos los flavonoides está relacionada con la formación de una chalcona (I) como intermediario, la cual es generada por la combinación de la p-cumaril-CoA con 3 unidades de malonil-CoA. La conversión estereoespecífica de la chalcona (I) a su correspondiente (-)-flavanona es catalizada *in vivo* por la enzima chalcona isomerasa, la cual es considerada como la segunda enzima clave en la biosíntesis de los flavonoides (41, 42) en plantas superiores (Esquema II).

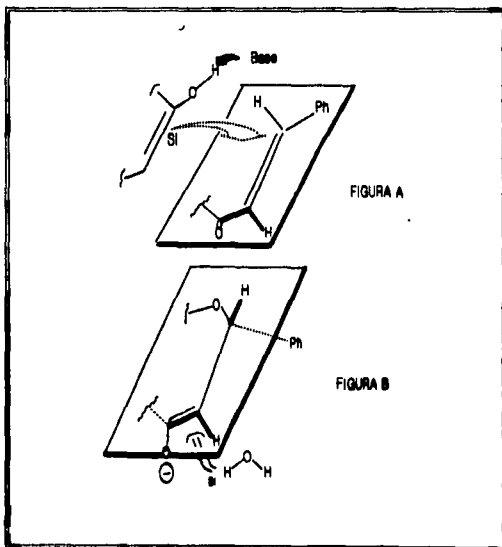
ESQUEMA II. Conversión estereoespecífica de la Chalcona en su correspondiente (-)-flavanona.



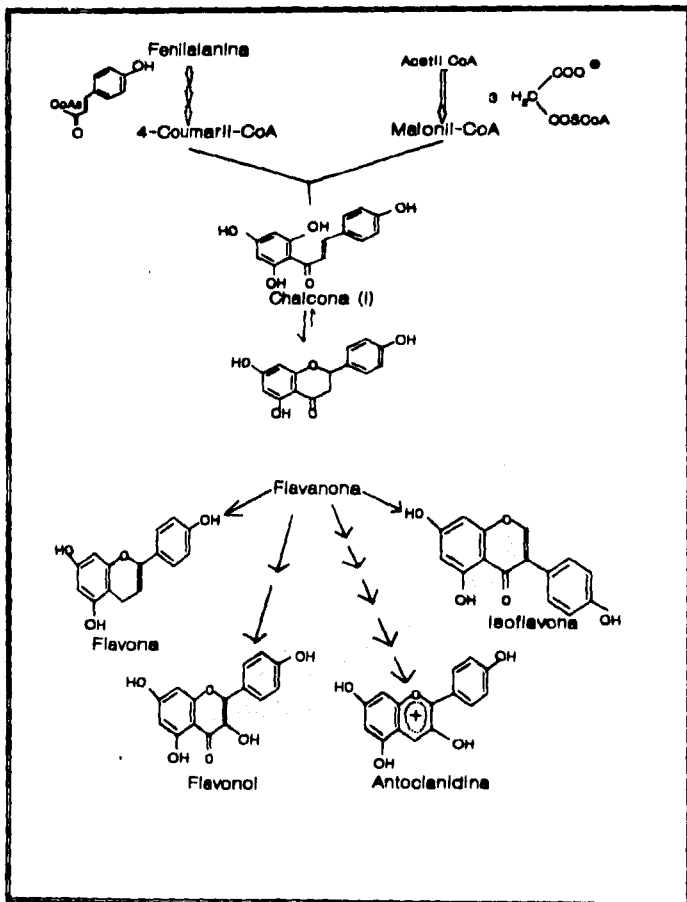
La ciclización para la formación del anillo C, tiene lugar mediante el ataque nucleofílico del fenoxi sobre la cara β (*si-re*) del doble enlace de la cetona α,β -insaturada para generar como intermediario al flavon-3-en-4-ol, el cual sufre una transferencia estereoespecífica de un protón por la cara α (*si, si*), para generar la flavanona, como se ilustra en la figura 2.

Finalmente la flavanona puede sufrir transformaciones adicionales que incluyen oxidaciones, alquilaciones, acilaciones y glicosilaciones, las cuales producen una gran diversidad estructural (esquema III).

FIGURA 2



ESQUEMA III. BIOSÍNTESIS DE LOS FLAVONOIDES, BIEN SE VE QUE LA CHALONA ES EL INTERMEDIO CENTRAL EN LA FORMACIÓN DE ESTOS COMPUESTOS.



PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

OBJETIVOS, HIPOTESIS

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

México tiene una de las mayores diversidades biológicas y culturales del mundo; sin embargo, el conocimiento sobre sus recursos naturales es muy deficiente y fragmentado, lo que ha originado como consecuencia una sobre explotación de muchos de ellos, de tal manera que hacen peligrar no sólo la producción industrial, sino la existencia del mismo y el equilibrio ecológico de una determinada zona geográfica. Tal es el caso de la flora mexicana, que es considerada dentro de las más diversificadas y abundantes del mundo. Por lo que en los últimos años, se han realizado esfuerzos multidisciplinarios tendientes al conocimiento integral de ella; así como a su preservación y eventual aprovechamiento.

Dentro de la flora mexicana se encuentra el género *Esenbeckia* (Rutaceae), que está constituido por aproximadamente 30 especies, 17 de las cuales son endémicas de nuestro país principalmente de las zonas selváticas y tropicales de los estados de Veracruz, Guerrero, Michoacán, Oaxaca y Chiapas.

Puesto que en nuestro país se encuentran la mayoría de las especies hasta ahora identificadas, además de ser fuente de una considerable variedad de metabolitos secundarios (alcaloides, cumarinas, flavanoides, cromenos, acetofenonas y limonoides); que presentan alto interés desde el punto de vista químico y biológico. Entonces resulta de suma importancia y gran utilidad realizar el estudio químico de dicho género. Por lo que en el presente proyecto se propone el análisis de *Esenbeckia berlandieri* ssp *acapulcensis* (Rose), con la finalidad de aislar, purificar, caracterizar e identificar sus constituyentes químicos mayoritarios, para generar conocimientos que integrados a los existentes, permitan determinar el perfil químico de este grupo de plantas.

OBJETIVOS.

1. Aislar y purificar los metabolitos secundarios mayoritarios de *Esenbeckia berlandieri ssp acapulcensis* (Rose).

2.- Caracterizar e identificar los metabolitos secundarios mayoritarios de *Esenbeckia berlandieri ssp acapulcensis*, empleando técnicas espectroscópicas y espectrométricas, así como transformaciones químicas (reacciones sobre determinado grupo funcional), que permitan confirmar la estructura de cada sustancia.

3.- Contribuir al conocimiento de los constituyentes químicos del género *Esenbeckia*, para determinar la presencia de metabolitos secundarios que puedan ser empleados como marcadores taxonómicos.

HIPOTESIS.

Estudios químicos realizados a plantas pertenecientes al género *Esenbeckia*, indican que los limonoides, las furanocumarinas, los alcaloides furoquinolinicos y los alcaloides derivados de la acridona, son los constituyentes principales de este género, por lo que mediante la aplicación de técnicas convencionales de extracción (sólido-líquido y líquido-líquido), destilación (a presión reducida y por arrastre con vapor de agua), cristalización (por par de disolventes y fraccionada), así como de técnicas cromatográficas (cromatografía capa fina, capa preparativa, en columna y cromatografía flash), se podrán aislar y purificar los metabolitos mayoritarios de *Esenbeckia berlandieri ssp acapulcensis* (Rose) y en base a sus propiedades físicas y constantes espectroscópicas, se logrará su caracterización e identificación.

Los conocimientos que se deriven de este proyecto aunados con los informados en la literatura química, permitirán delinear un perfil químico para este grupo de plantas, y así poder determinar si existen variaciones infra o intra específicas en cuanto a su constitución química dentro de dicho género.

METODOLOGIA

MATERIAL:

Material de vidrio básico [pipetas, vasos de precipitado, matraz kitasato y matraz erlenmeyer de diferentes capacidades (50, 125, 500 ml), embudo Büchner; embudo de filtración rápida, etc.]. Matraz balón (50, 100, 150, 500 y 1000 ml). Columnas de vidrio para cromatografía de diferentes tamaños y diámetros (en función a la cantidad de extracto a separar).

Placas con agitación magnética y/o calentamiento. Baño de agua. Canastillas de calentamiento de 100 y 250 ml.

Fisetas para cada disolvente.

EQUIPO:

Balanza analítica Ainsworth Mod. 100A. Balanza semianalítica Ohaus Mod E-400. Balanza granataria Ohaus (Triple Beam Balance) Serie 700. Aparato Fisher-Johns. Espectrofotómetro de IR Perkin Elmer Mod. 283 y 681. Espectrofotómetro Nicolet FT IR Mod 5 SX. Espectrofotómetro UV-Visible Perkin Elmer Mod 552. Espectrofotómetro de masas Hewlett Packard 5985 GC/Ms System 70 eV. Espectrofotómetro de RMN Varian VXR-300S. Rotavapor Yamato RE-47. Equipo necesario para destilaciones simples y fraccionadas. Equipo kit para la preparación de Diazald.

REACTIVOS:

Cromatofolios de sílica gel con soporte de aluminio (20 X 20) 60F₂₅₄. Placas de vidrio para ccp sílica gel 60F₂₅₄ (20 X 20), de 2 cm de espesor. Sílica gel 60GF₂₅₄ para capa fina, tamaño medio de partícula 15µm. Sílica gel 60PF₂₅₄ para fines preparativos. Sílica gel 60PF₂₅₄ con yeso.

Reveladores químicos específico (H₂SO₄ y sulfato cérico amoniacal), FeCl₃ en etanol al 1%.

Sólidos: Celita, carbón activado, permanganato de potasio, bicarbonato de potasio, hidróxido de sodio, bicarbonato de sodio, trióxido de cromo, sulfato cérico amoniacal, ácido, p-toluen sulfónico, DDQ.

Líquidos: Anhídrido acético, piridina, ácido clorhídrico, dimetilsulfóxido, dicloro metano, CH₂N₂, éteri etílico, benceno, hexano, acetato de etilo, acetona, cloroformo, etanol, metanol, propanol, éter etílico, éter isopropílico, acetonitrilo, benceno puro, solución de bicarbonato de sodio, grado reactivo y analítico.

PARTE EXPERIMENTAL

1634.6 g PLANTA SECA (HOJAS Y TALLOS)
EXTRACCION CON ETANOL CALIENTE

200g EXTRACTO + 200 g CELITA
HEXANO:AcOEt CROMATOGRAFIA EN COLUMNA
(PRESION REDUCIDA)

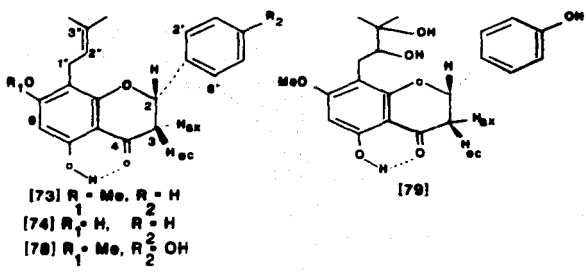
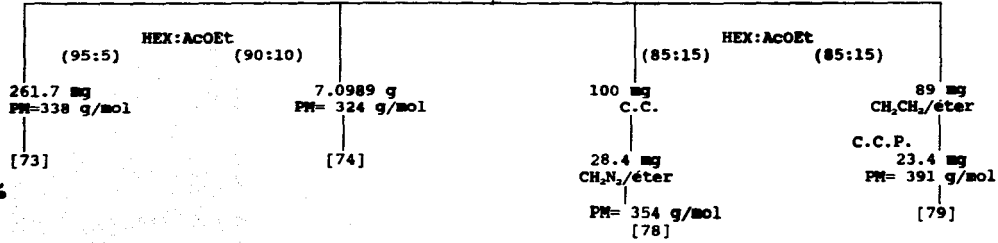
FRACCIONES:

55-58

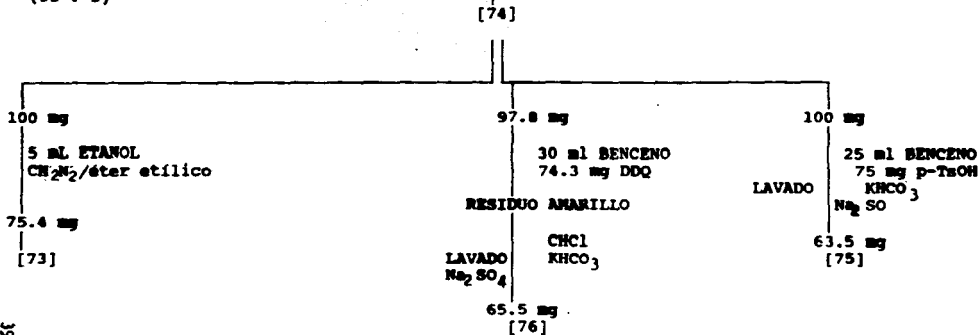
114-120

168-201

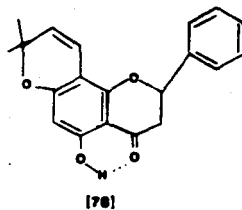
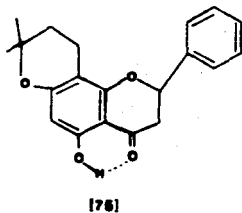
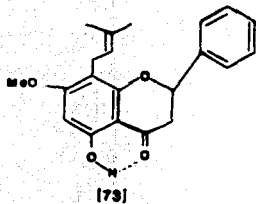
216-255



FRACCIONES 76-86
 HEXANO:AcOEt
 (95 : 5)



39



La planta *Esenbeckia berlandieri ssp. acapulcensis* (Rose), fue colectada y clasificada por la M. en C. Clara H. Ramos del Instituto de Biología, en el ejido "El Rebaljito" a 20 Km de Melaque, Jalisco. Clasificación CH-83 del Herbario MEXU del Instituto de Biología de la U.N.A.M. (12)

Se sometieron a extracción sólido-líquido (percolación) con etanol caliente, 1634.6 g de las partes aéreas secas (tallos y hojas) de *E. berlandieri ssp. acapulcensis*, para lo que se empleó una columna de vidrio (47 cm de largo por 8.6 cm de diámetro) empacada con la planta molida, a través de la cual se hizo pasar el disolvente caliente, dicha operación fue repetida en varias ocasiones, colectándose fracciones de 500 ml cada una, cada fracción se concentrará por destilación a presión reducida; obteniéndose 311 gramos de extracto etanólico.

Para la separación de los metabolitos secundarios mayoritarios se procedió de la siguiente manera: 200 g del extracto etanólico se adsorbieron en 200 g de celita y se aplicaron en una columna para cromatografía (47 cm de largo por 8.6 cm de diámetro) (43-46) por vía seca con ayuda de vacío [VLC]. El fraccionamiento de la columna se hizo empleando como eluyente mezclas de hexano: acetato de etilo de polaridad creciente, obteniéndose 456 fracciones de 500 ml cada una.

De las fracciones 55 a 58, obtenidas al eluir la columna con una mezcla de hexano:acetato de etilo (95:5) y de la recromatografía de las aguas madres de las fracciones 57 y 58 (3.112 g de residuo), se aislaron 261.7 mg (0.13%) de una sustancia que resultó soluble en CH_2Cl_2 , $CNCl_3$ y Acetato de etilo; la cual fue recristalizada de una mezcla CH_2Cl_2 -propanol y presentó un pf. 126 - 128 °C; en ccf mostraba una señal café oscura cuando se utilizaba como revelador químico una solución de $FeCl_3$ en etanol al 1%, su caracterización e identificación se logró en base a sus datos espectroscópicos y espectrométricos que sugieren una fórmula molecular $C_{21}H_{22}O_4$ para un peso molecular de

338 g/mol y 11 grados de insaturación, lo cual está de acuerdo con los datos referidos en la literatura (47-48) para la 5-hidroxi-7-metoxi-8-(3'',3''-dimetilalil)-flavanona [73].

$[\alpha]_D^{25} = +50.83$ (c=2.4 mg/ml, CHCl₃);

UV $\lambda_{CH_3-OH}^{MAX}$ nm: 203, 288, 335.

UV $\lambda_{CH_3-O-Cl_3Al}^{MAX}$ nm: 203, 310, 387.

UV $\lambda_{CH_3-OH+Cl_3Al+HCl}^{MAX}$ nm: 203, 310, 387.

IR $\nu_{MAX}^{CHCl_3}$ cm⁻¹ (espectro 1): 3005.52, 2966.90, 2926.15, 2853.96, 1634.31, 1583.83, 1444.52, 1373.97, 1168.08 y 1103.43.

RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃, TMS, espectro 2): δ 1.626 (s, 3H, CH₃-5''), δ 1.650 (s, 3H, CH₃-4''), δ 2.853 (dd, J=17 y 3.5 Hz, 1H, CH_{ec}-3), δ 3.055 (dd, J=17 y 12 Hz, 1H, CH_{ax}-3), δ 3.239 (d, J=7 Hz, 2H, CH₂-1''), δ 3.859 (s, 3H, CH₃OPh), δ 5.147 (tc, J=7 y 1.5 Hz, CH-2'') δ 5.418 (dd, J=12 y 3.5 Hz, CH-2), δ 6.102 (s, 1H, CH-6), δ 7.363 - 7.480 (señal compleja, 5H), δ 12.137 (s, 1H, C₅-OH).

RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃, TMS, espectro 3): δ 78.67 (d, C-2), δ 43.422 (t, C-3), δ 196.30 (s, C-4), δ 158.74 (s, C-5), δ 92.48 (d, C-6), δ 165.77 (s, C-7), δ 109.00 (s, C-8), δ 102.95 (s, C-8a), δ 162.64 (s, C-4a), δ 138.91 (t, C-1'), δ 128.52 (d, C-2' y C-6'), δ 128.70 (d, C-3' y d, C-5'), δ 125.92 (d, C-4'), δ 21.58 (t, C-1''), δ 122.40 (d, C-2''), δ 131.38 (s, C-3''), δ 17.64 (c, C-4''), δ 25.76 (c, C-5'') y 55.904 (c, PhOCH-3).

E.M.. (IE)m/z: 339 [M⁺+1, 14.63], 338 [M⁺, 73.17], 324 (10.97), 323 (53.66), 305 (7.32), 295 (24.39), 283 (17.07), 270 (39.02), 269 (14.63), 234 (7.32), 233 (14.63), 220 (15.85), 219 (100), 206 (23.17), 205 (13.51), 193 (26.83), 191 (78.05), 179 (52.44), 176 (26.83), 104 (36.58), 103 (48.78), 91 (40.24), 79 (25.61), 78 (36.59), 77 (59.76), 69 (47.56).

CRONATOGRAFIA DE LAS AGUAS MADRES DE LAS FRACCIONES 57-58.

3.112 g de residuo obtenido de las aguas madres de las fracciones 57-58 fueron adsorbidos en 3.112 g de celita y aplicada

en una cromatografía empacada con sílica gel para capa fina (con una altura de 15 cm que equivale a 34 g y diámetro de 3.7 cm), la elución se realizó a presión reducida, teniendo como eluyente hexano y mezclas de hexano-acetato de etilo de polaridad creciente [hexano:AcOet (95:5)], de donde se obtuvieron 174 fracciones de 10 ml cada una.

La recromatografía de las aguas madres de las fracciones 57-58, permitieron separar y purificar 116.3 mg de la 5-hidroxi-7-metoxi-8-(3",3",-dimetilalil)-flavanona [73] [fracciones 78-84, obtenidas con una mezcla de hexano:AcOEt (95:5)] y 117.8 mg de un triterpeno que incorpora en su esqueleto base a un ciclopropano, y el que no sera discutido en el presente trabajo, [fracciones 89-104, obtenidas al eluir la columna con una mezcla de hexano:AcOEt (95:5)].

De los eluatos 114 - 120, obtenidas al eluir la columna con una mezcla de hexano:acetato de etilo (90:10), se aislaron 7.0989g (3.55 %) de un sólido amarillo de pf 167 - 168°C; el cual fue recristalizado de una mezcla CH_2Cl_2 -propanol y posteriormente lavado con éter isopropílico, dicho compuesto fue identificado como 5,7-dihidroxi-8-(3",3"-dimetilalil)-flavanona [74], y da prueba positiva con una solución de FeCl_3 en etanol al 1%, a esta sustancia le corresponde una fórmula molecular $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{O}_4$, cuyo peso molecular es de 324 g/mol. Los datos espectroscópicos y espectrométricos son los siguientes:

$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +35$ (c=0.2 mg/ml, CHCl_3).

UV $\lambda_{\text{CH}_3\text{-OH}}^{\text{MAX}}$ nm: 203, 293, 334.

UV $\lambda_{\text{CH}_3\text{-OH}+\text{Cl}_3\text{Al}}^{\text{MAX}}$ nm: 205, 313, 386.

UV $\lambda_{\text{CH}_3\text{-OH}+\text{Cl}_3\text{Al}+\text{HCl}}^{\text{MAX}}$ nm: 207, 313, 386.

IR $\nu_{\text{MAX}}^{\text{CHCl}_3}$, cm^{-1} (espectro 4): 3583, 3379, 3080, 3057, 2968, 2918, 2860, 1639, 1442, 1254, 1155 y 1076.

RMN-1H (300 MHz, CDCl_3 , TMS; espectro 5) : δ 1.731 (s, 6H, CH_3 -5" y CH_3 -4"), δ 2.844 (dd, $J=18$ y 3 Hz, 1H, CH_{exo} -3), δ 3.058

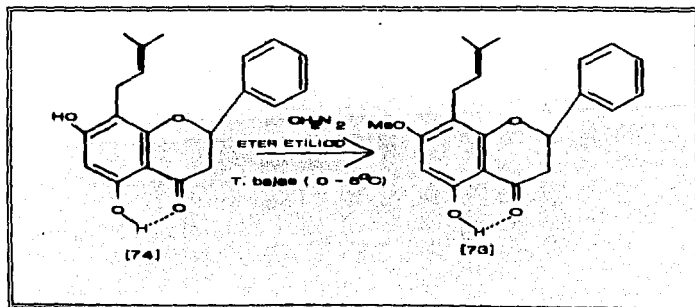
(dd, $J=18$ y 13.5 Hz, 1H, CH_{2x-3}), δ 3.366 (d, $J=8$ Hz, 2H, CH_2-1''); δ 5.221 (ddc, $J=7$ y 1.5 Hz, $\text{CH}-2''$); δ 5.423 (dd, $J=13.5$ y 3 Hz, 1H, $\text{CH}-2$); δ 6.036 (s, 1H, $\text{CH}-6$); δ 7.475-7.385 (señal múltiple, 5H, H del anillo C), δ 12.002 (s, 1H, $\text{C}_5\text{-OH}$).

RMN- ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , TMS, espectro 6): δ 78.971 (d, C-2), δ 43.288 (t, C-3), δ 196.225 (s, C-4), δ 159.619 (s, C-5), δ 46.924 (d, C-6), δ 163.766 (s, C-7), δ 106.261 (s, C-8), δ 103.716 (s, C-9), δ 162.233 (s, C-10), δ 138.682 (t, C-1'), δ 125.932 (d, C-2' y 6''), δ 128.668 (d, C-3' y 5'), δ 125.932 (d, C-4'), δ 21.976 (t, C-1''), δ 121.568 (d, C-2''), δ 134.919 (s, C-3''), δ 25.799 (c, C-4'') y δ 17.822 (c, C-5'').

E.M. (IE) m/z : 324 (M^+ , 100), 309 (51.21), 281 (26.83), 269 (26.83), 256 (19.51), 205 (70.73), 192 (31.70), 177 (70.73), 165 (63.41), 103 (17.07), 91 (14.63), 69 (34.15), 55 (21.95), 43 (19.51), 41 (17.07).

OBTENCION DE 5-HIDROXI-7-METOXI-8-(3'',3''-DIMETILALIL)-FLAVANONA [73].

ESQUEMA IV. Correlación química entre la 5,7-dihidroxi-8-(3'',3''-dimetil alil) flavanona [74] y 5-hidroxi-7-metoxi-8-(3'',3''-dimetil alil)-flavanona [73].



De las fracciones 76-86 obtenidas al eluir la columna con una mezcla de hexano:acetato de etilo (95:5), se obtuvo un sólido amarillo pálido de pf. 167 - 168 °C que reacciona con FeCl₃, dando una coloración café, cuando este reactivo se empleó como revelador en ccf., dicho sólido fue soluble en CHCl₃, acetato de etilo y parcialmente soluble en metanol y propanol, de ahí que para su recrystalización se utilizara la técnica de recrystalización por par de disolventes empleando para ello CH₂Cl₂/propanol.

Purificado e identificado este sólido, como 5,7-dihidroxi-8-(3",3"-dimetilalil)-flavanona [74] se sometió a una reacción de metilación, en la que se pesaron 100 mg y se disolvieron en 5 ml de etanol absoluto, la solución resultante se introdujo en una mezcla frigorífica (-4°C) adicionando lentamente el CH₃N₂ disuelto en éter etílico, siguiendo el curso de la reacción por ccf. Una vez terminada la reacción se procedió a eliminar el exceso de éter etílico, lo cual permitió que cristalizara un sólido amarillo pálido, soluble en CHCl₃, acetato de etilo y parcialmente soluble en metanol. De la recrystalización de esta sustancia se obtuvieron 75.4 mg del derivado metilado [73] que presentó un pf. 126-128 °C, cuyas constantes espectroscópicas concuerdan con las obtenidas para la 5-hidroxi-7-metoxi-8-(3,3-dimetilalil)-flavanona [73].

IR $\nu_{\text{max, CHCl}_3}$ cm⁻¹ (espectro 7) : 3003.64, 2969.70, 2913.67, 1633.90, 1583.58, 1444.27, 1373.65, 1303.67, 1168.15, 1103.26 y 817.03.

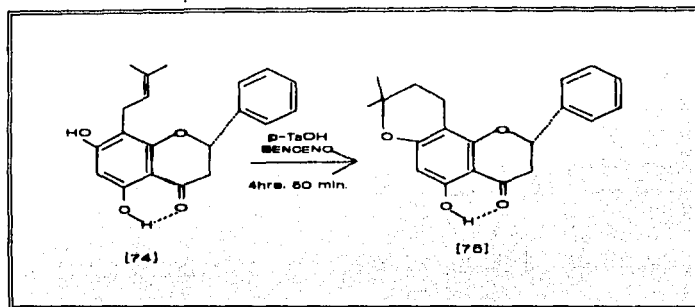
RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃, TMS, espectro 8): δ 1.626 (s, 3H, CH₃-5''), δ 1.650 (s, 3H, CH₃-4''), δ 2.853 (dd, J=17 y 3.5 Hz, 1H, CH_{ec}-3), δ 3.055 (dd, J=17 y 12 Hz, 1H CH_{ax}-3), δ 3.239 (d, J=7 Hz, 2H, CH₂-1''), δ 3.859 (s, 3H, CH₃OPh), δ 5.147 (tc, J=7 y 1.5 Hz, CH-2'') δ 5.418 (dd, J=12 y 3.5 Hz, CH-2), δ 6.102 (s, 1H, CH-6), δ 7.363 - 7.480 (señal compleja, 5H), δ 12.137 (s, 1H, C₁-OH).

⁵ LA PREPARACION DEL DIAZONIUM SE LLLEVO A CABO A PARTIR DEL [(N-METIL-N-NITROSO-P-TOLUENSULFONAMIDA). (C₈H₁₀N₂O₃S), PF 61-62°C.), DE ACUERDO A LA TECNICA REPORTADA EN ORGANIC SYNTHESIS, COLLECTIVE VOL IV, PP 290-53 (1963).

E.M. (I.E.) m/z: 339 (M+1, 30), 338 (100), 324 (17.5), 323 (72.5), 295 (31.25), 283 (17.5), 270 (35), 269 (22.5), 219 (77.5), 206 (17.5), 191 (61.25), 179 (30), 103 (22.5), 91 (15), 78 (23.75), 77 (23.75).

OBTENCION DEL COMPUESTO 5-HIDROXI-6",6"-DIMETIL-4",5"-DINIDROPIRANO-(2",3",7,8)-FLAVANONA [75].

ESQUEMA V. Reacción de ciclización de la 5-7-dihidroxi-8-(3",3"-dimetilalil)-flavanona con p-TsOH.



100 mg de la 5,7-dihidroxi-8-(3",3"-dimetilalil)-flavanona [74] se disolvieron en 25 ml de benceno seco, a la solución resultante se le adicionó 75 mg de ácido p-toluensulfónico para posteriormente calentarla a 70°C durante 4 horas 50 minutos, el curso de la reacción fue seguido mediante ccf empleando como fase móvil una mezcla de hexano:acetato de etilo (8:2). Concluida la reacción se eliminó el disolvente a baja presión y al residuo resultante se le adicionaron 25 ml de éter etílico. La eliminación del ácido p-toluensulfónico se logró mediante el lavado de la fase éterea con una solución de bicarbonato de sodio (10% w/v; 3 X 5 ml) seguido de 3 lavados con agua (5 ml) para finalmente secar la fase éterea con Na₂SO₄ anhidro obteniéndose

63.5 mg (63.5 %) de una sustancia amarilla de consistencia aceitosa y cuyas propiedades físicas se describen a continuación:

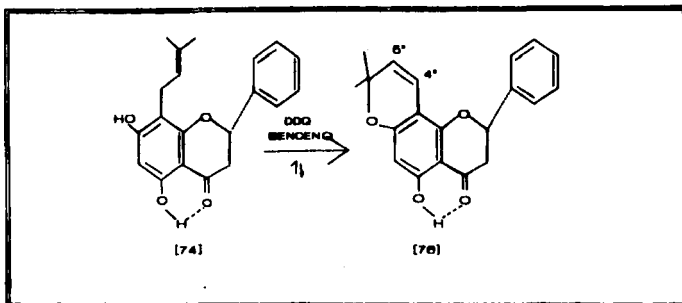
IR $\nu_{\text{max}}^{\text{CHCl}_3}$ cm^{-1} (espectro 9): 3070.93, 3040.82, 3035.18, 2979.50, 2943.14, 1642.42, 1586.24, 1484.15, 1447.15, 1342.19, 1318.96, 1159.49 y 1118.15.

RMN- ^1H (200 MHz, CDCl_3 , TMS, espectro 10): δ 1.2563 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-C-6}''$), δ 1.2584 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-C-6}''$), δ 1.7643 (t, $J=7\text{Hz}$, 2H, $\text{CH}_2\text{-5}''$), δ 2.6087 (t, $J=7\text{ Hz}$, 2H, $\text{CH}_2\text{-4}''$), δ 2.8207 (dd, $J=17.02$ y 3.4 Hz , 1H, CH-3_{ax}), δ 3.0472 (dd, $J=17.06$ y 12.9 Hz , 1H, CH-3_{ax}), δ 5.4421 (dd, $J=12.9$ y 3.4 Hz , 1H, CH-2), δ 5.9812 (s, 1H, CH-6), δ 7.4796-7.4055 (señal múltiple, 5H, H del anillo C') y δ 11.7516 (s, 1H, $\text{C}_5\text{-OH}$).

RMN- ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , TMS, espectro 11): δ 78.884 (d, C-2), δ 43.309 (t, C-3), δ 195.62 (s, C-4), δ 159.75 (s, C-5), δ 97.56 (d, C-6), δ 163.10 (s, C-7), δ 100.84 (s, C-8), δ 161.475 (s, C-9), δ 102.634 (s, C-10), δ 138.84 (s, C-1'), δ 125.893 (d, C-2' y 6'), δ 128.81 (d, C-3' y 5'), δ 128.67 (d, C-4'), δ 16.628 (t, C-5''), δ 31.856 (t, C-4''), δ 76.148 (s, C-6''), δ 26.377 y δ 27.075 (c, 2 Me-C6'').

E.M. (IR): 325 (M^{+1} , 26.83), 324 (M^+ , 100), 323 (29.27), 269 (43.90), 247 (43.90), 220 (19.51), 205 (24.39), 196 (24.39), 177 (29.27), 165 (51.22), 104 (34.15), 103 (21.95), 78 (24.39), 77 (25.60), 69 (30.95) y 41 (12.20).

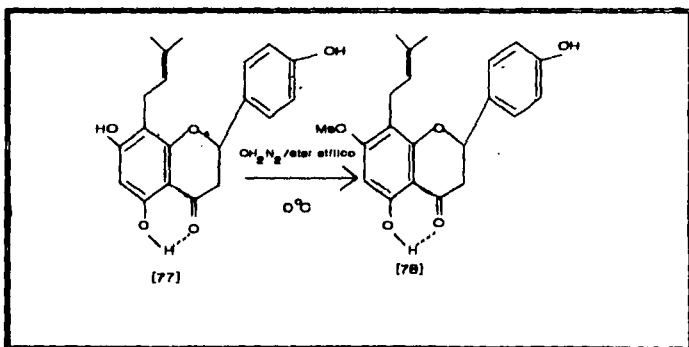
ESQUEMA VI. OBTENCION DE LA 5-HIDROXI-6^o, 6^o - DIMETILPIRANO (2^o,3^o,7,8) - FLAVANONA (50-51) [76].



En un matraz bola de 50 ml se hicieron reaccionar 97.8 mg de la 5, 7 - dihidroxi - 8 - (3^o,3^o-dimetilalil) flavanona [74], disueltos previamente en 30 ml de benceno seco con 74.3 mg de DDQ, los cuales se pusieron a reflujo durante 5 horas 21 minutos; el curso de la reacción fue seguido a través de ccf empleando como eluyente una mezcla de hexano:acetato de etilo (7:3). Terminada la reacción el matraz fue introducido en un baño con hielo hasta la sedimentación de un sólido blanco que fue eliminado por filtración a gravedad. Las aguas madres fueron concentradas a baja presión, de donde se obtuvo un residuo amarillo de consistencia aceitosa que fue disuelto en 15 ml de CHCl₃, posteriormente la fase clorofórmica fue lavada con una solución saturada de KHCO₃ (3X15 ml), seguida de 3 lavados de 5 ml de agua, la fase clorofórmica fue secada sobre Na₂SO₄ anhidro y concentrado a baja presión. El residuo obtenido fue insoluble en metanol y soluble en acetato de etilo, cloroformo y diclorometano. Finalmente se recrystalizó el sólido obtenido empleando para ello una mezcla de CH₂Cl₂/propanol, de donde se obtuvieron 65.5 mg (63.5 %) de una sustancia de consistencia aceitosa [76].

RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃, TMS, espectro 12): δ1.4314 (s, 3H, CH₃-6ⁿ), δ1.4517 (s, 3H, CH₃-6ⁿ), δ2.8337 (dd, J=17 y 4.0 Hz, CH_{2c}-3), δ3.071 (dd, J=17 y 12 Hz, 1H, CH_{2c}-3), δ5.4435 (dd, J=12 y 4 Hz, 1H, CH-2), δ6.0082 (s, 1H, CH-6), δ5.4792 (d, J=10, 1H, CH-5ⁿ), δ6.5543 (d, J=10, 1H, CH-4ⁿ), δ7.4810 - 7.4159 (señal múltiple, 5H, H del anillo C') y δ12.137 (s, 1H, C₅-OH).

ESQUEMA VII. OBTENCION DE LA 5,4'-DINIDROXI-7-METOXI-8-(3ⁿ,3ⁿ-DIMETILALIL)-FLAVANONA.



100 mg de las fracciones 168 - 201 obtenidas al eluir la columna con una mezcla de hexano:acetato de etilo (85:15), fueron reconmatografiadas empleando cromatografía a baja presión, para ello se empleó una columna de vidrio de 2.3 cm de diámetro empacada con 32 g (con una altura aproximada de 15 cm) de sílica gel 60GF₂₅₄ y como eluyente hexano y mezclas de hexano:acetato de etilo (9:1 a 7:3), de donde se obtuvieron 277 fracciones de 10 ml cada una.

En 28.4 mg de residuo de consistencia aceitosa de las fracciones 124-157 que se colectaron con una mezcla hexano:acetato de etilo (9:1), se observaba una mancha homogénea (ligeramente contaminada con sustancias de Rf similares) que revela amarillo con luz UV (onda larga) y con la mezcla de sulfato cármico de amonio-N₂SO₄; mientras que al revelar la ccf con una solución de FeCl₃ al 1% en etanol se observaba una mancha café muy bien definida. Por lo que para su purificación fue necesario proceder a la obtención del correspondiente éter metílico, suponiendo que se trataba de una flavanona.

Para la obtención del derivado metilado fue necesario disolver los 28.4 mg de residuo en 5 ml de etanol absoluto y adicionar CH₂N₂ en éter etílico a 0°C. Una vez concluida la reacción se procedió a concentrar la muestra, para posteriormente separar el compuesto mayoritario por medio de cromatografía en placa preparativa. Para lo cual, se requirió de una cromatoplaaca de 10 X 20 cm, y como eluyente se utilizó una mezcla de hexano:acetato de etilo (8:2), el desarrollo cromatográfico se siguió por medio de luz UV, después de eluir la placa 2 veces con la misma mezcla, se procedió a extraer el compuesto de interés de manera convencional, lo que permitió identificar y caracterizar a dicho compuesto como la 5,4'-dihidroxi-7-metoxi-8-(3",3"-dimetilalil)-flavanona [78], a quien le corresponde un peso molecular de 354 g/mol para una fórmula molecular C₂₁H₂₂O₅ y pf. 161 - 162°C.

IR ν_{max} (CCl₄) cm⁻¹ (espectro 13): 3593.47, 2964.99, 2926.14, 2854.56, 1633.07, 1583.50, 1517.13, 1484.82, 1462.85, 1443.97, 1374.58, 1303.29, 1264.07, 1168.32, 1102.24, 1076.91 y 833.47.

RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃, TMS, espectro 14): δ 1.6146 (s, 3H, CH₃-5^m), δ 1.6476 (s, 3H, CH₃-4^m), δ 2.8061 (dd, J=17, 3.5 Hz, CH₂-3), δ 3.054 (dd, J=17 y 12 Hz, CH₂-3), δ 3.2142 (d, J=7Hz 1H, CH₂-1^m), δ 3.856 (s, 3H, CH₃OPh), δ 4.9820 (s.a, 1H, COH-4'), δ 5.1272 (tc, J=7.5 y 1.5 Hz, 1H, CH-2^m), δ 5.3441 (dd, J=12 y 3.35 Hz 1H, CH-2), δ 6.095 (s, 1H, CH-6), δ 6.8762 (dd, J=9 y 1 Hz, 2H CH-3' y 5'), δ 7.327 (dd, J=9 1Hz, 2H, CH-2' y 6'), δ 12.142 (s, 1H C₃-OH).

RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃, TMS, espectro 15): δ 78.415 (d, C-2), δ 43.235 (t, C-3), δ 196.503 (s C-4), δ 162.522 (s, C-5), δ 92.406 (d, C-6), δ 165.720 (s, C-7), δ 108.982 (s, C-8), δ 102.924 (s, C-9), δ 155.818 (is, C-10), δ 131.001 (s, C-1'), δ 127.649 (d, C-2' y C-6'), δ 115.440 (d, C-3' y C-5'), δ 155.818 (s, C-4'), δ 21.616 (t, C-1^m), δ 122.329 (d, C-2^m), δ 131.308 (s, C-3^m), δ 17.709 (c, C-4^m), δ 25.829 (c, C-5^m).

E.M. (IE) m/z: [M⁺+1, 24.36], 354 (100), 340 (12.82), 339 (34.62), 311 (43.59), 300 (10), 299 (38.46), 297 (10.26), 286 (30), 285 (10.26), 247 (10.26), 234 (17.95), 133 (17.95), 220 (17.95), 219 (94.87), 206 (26.92), 205 (15.38), 193 (10.26), 192 (12.82), 191 (80.77), 180 (23.08), 179 (100), 176 (25.64), 149 (17.95), 147 (15.38), 121 (14.10), 120 (48.72), 119 (17.95), 107 (17.95), 91 (51.28).

De las fracciones 216-225, obtenidas al eluir la columna original con una mezcla de hexano:acetato de etilo (85:15), y después de la decoloración de la misma, se procedió a la separación por cromatografía de 1.7550 g de mezcla. Para resolver lo anterior se requirió de una columna de vidrio previamente empacada con 28 g de sílica gel para columna como fase estacionaria y como fase móvil, cloroformo y mezcla de cloroformo:acetato de etilo de polaridad creciente, lográndose obtener 194 fracciones.

Debido a la presencia de una banda café no definida que se observaba a lo largo de toda la cromatoplatea, cuando se empleaba $(\text{NH}_4)_2\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ en solución y al aspecto físico que mostraba la fracción 192 (280.0 mg), así como, la aparición de una mancha café definida al emplear una solución de FeCl_3 al 1% en etanol como revelador químico. A continuación se procedió a formar el correspondiente derivado metilado, con 89 mg de residuo de la fracción 192 en CH_2N_2 /éter etílico a 0°C durante 4 horas aproximadamente. Una vez que se dió por concluida la reacción se separó por ccp el correspondiente derivado metilado, empleando una mezcla de n-hexano:acetato de etilo (7:3).

La recuperación de la sustancia de interés se realizó de manera convencional, para obtener 23.4 mg de una sustancia de consistencia aceitosa de color amarillo y cuyas constantes espectroscópicas se describen a continuación:

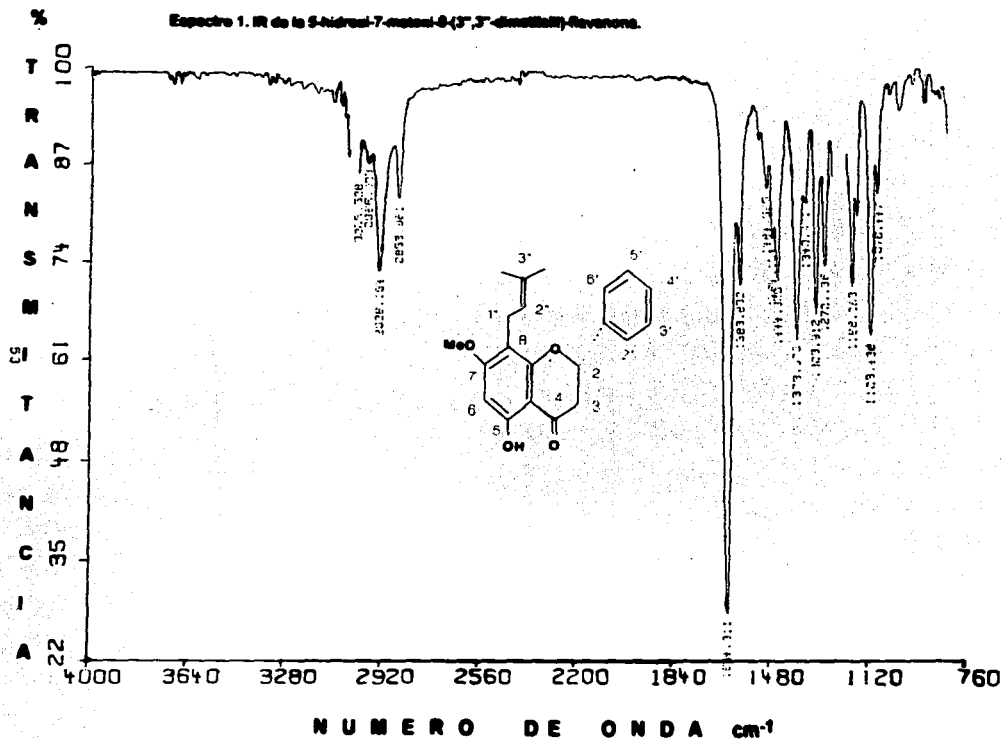
IR $\nu_{\text{max}}^{\text{CCl}_4}$ cm^{-1} (Espectro 16): 3585.58, 3055.92, 2976.86, 2931.68, 1643.77, 1516.84, 1474.56, 1383.49, 1250.05 y 1148.45.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3 , TMS, espectro 17): δ 1.198 (d, $J=1.8$, 2H, CH_3-4^{a}), δ 1.329 (d, $J=2.4$, 3H, CH_3-5^{a}), δ 2.785 (dd, $J=17.1$ y 3.3 Hz, 1H, CHec-3), δ 3.085 (dd, $J=17.1$ y 12.9 , 1H, CHax-3), δ 3.086-2.986 (señal múltiple, 2H, CH_2-1^{a}), δ 3.859 (s, 3H, C_7-OMe), δ 4.699 (dd, $J=10.2$ y 2.7 , CH-2^{a}), δ 6.032 (s, 1H CH-6), δ 6.941 (d, $J=9$, $\text{CH-2}'$ y $6'$), δ 7.374 (d, $J=9$, CH_2-3' y $5'$) y δ 12.320 (s, 1H, C_5-OH).

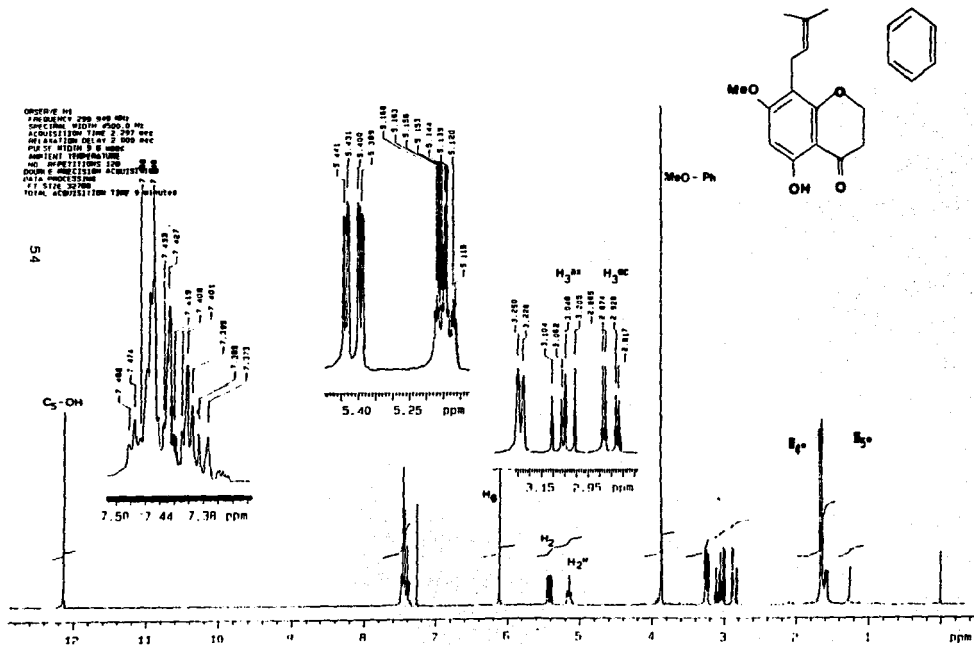
E.N. (IE) m/z: [$\text{M}^++1-\text{H}_2\text{O}$ 371 (22.95)], [$\text{M}^++\text{H}_2\text{O}$ 370 (100)], 369 (22.95), 337 (59.84), 312 (40.16), 311 (50), 219 (27.87), 203 (98.36), 178 (67.21), 177 (63.93), 176 (32.79), 150 (63.93), 134 (73.77), 121 (47.54), 119 (28.69), 91 (31.15), 59 (27.87).

ASPECTROS

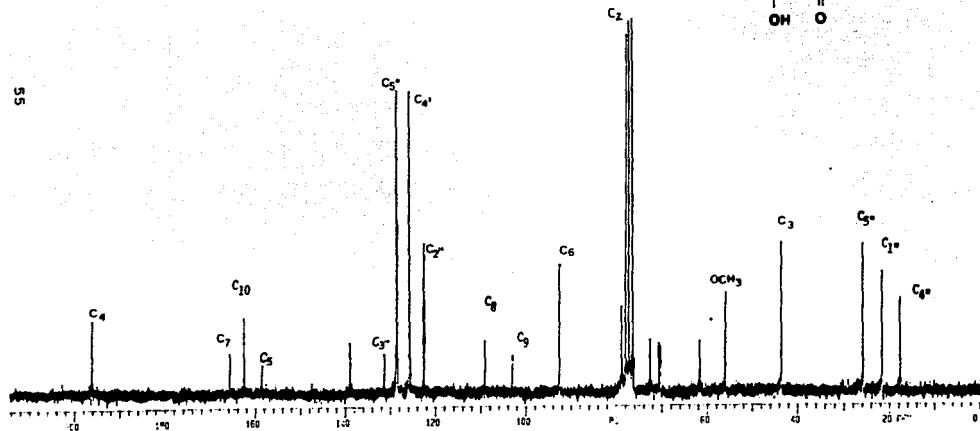
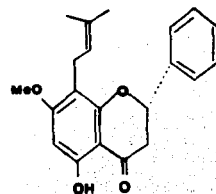
Espectro 1. IR de la 5-hidroxi-7-metoxi-8-(3',3'-dimetilallyl)-Reverona.



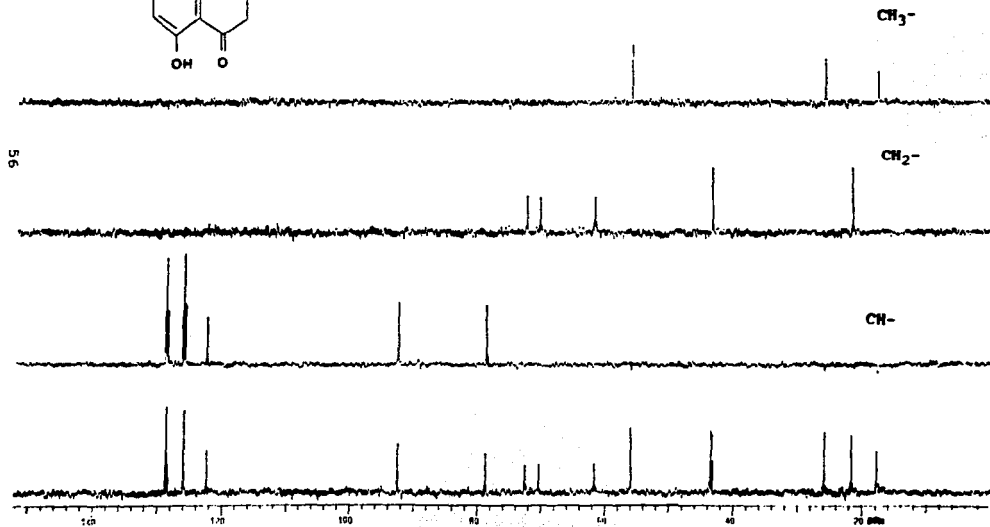
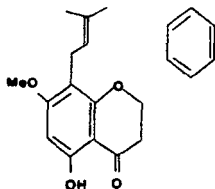
Espectro 2. RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃, TMS r.i.) de la 5-hidroxi-7-metoxi-8-(3'',3''-dimetilil) flavanona



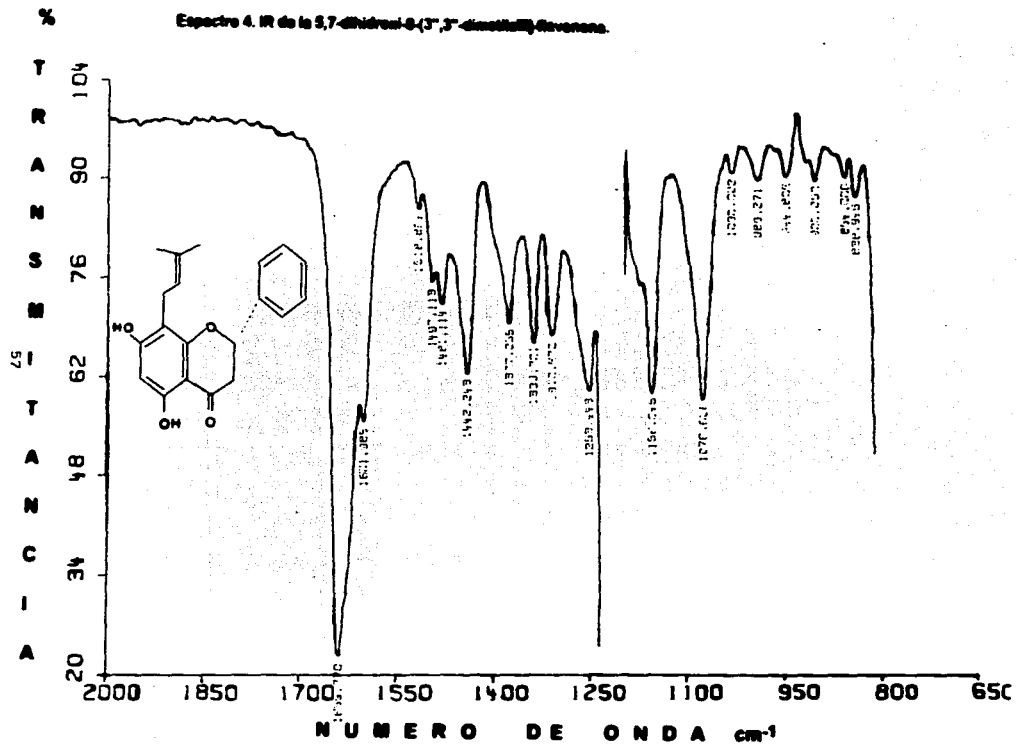
Espectro 3. RMN- ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , TMS r.i.) de la 5-hidroxi-7-metoxi-8-(3',3'-dimetil) flavanona



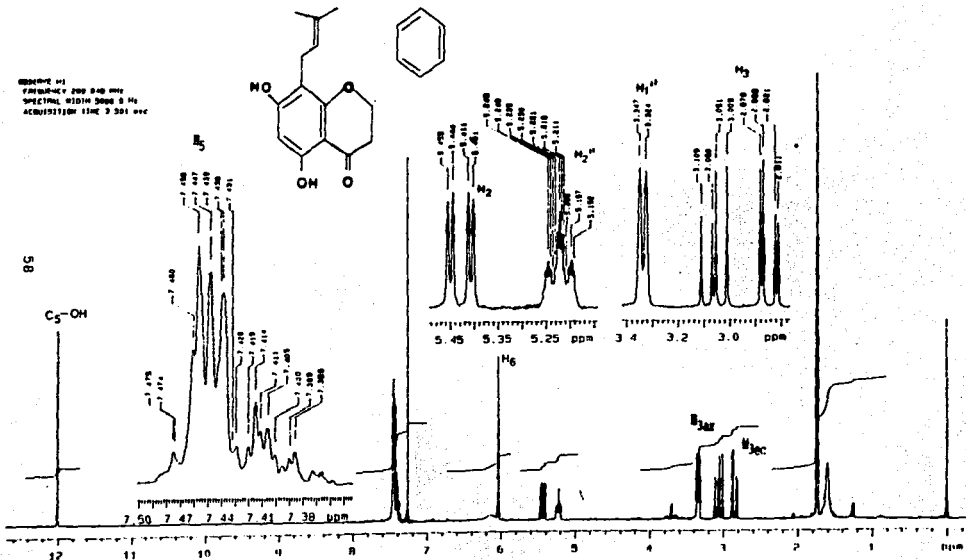
Espectro 3'. RMN-13C (DEPT) (75 MHz, CDCl₃, TMS r.i.) de la 5-hidroxi-7-metoxi-8-(3',3'-dimetilbutil) flavanona



Espectro 4. IR de la 8,7-dihidro-8-(3",3"-dimetilbut-2-en-1-yl)flavona.

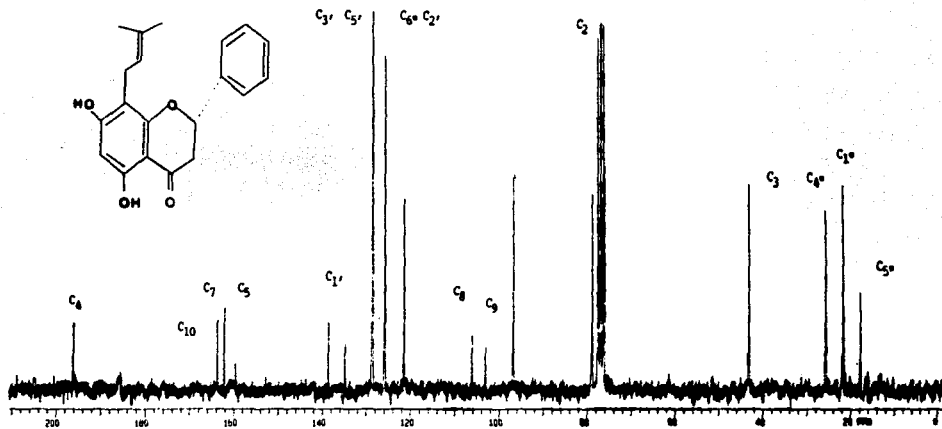


Espectro S. RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃, TMS r.i.) de la 5,7-dihidroxi-6-(3',3'-dimetilbutil) flavonona

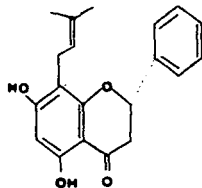


Espectre de RMN- ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , TMS r.l.) de la 5,7-dihydroxy-6-(3'',3''-diméthyl-2-oxoprop-1-en-1-yl)-2-oxo-1,4-benzoxone

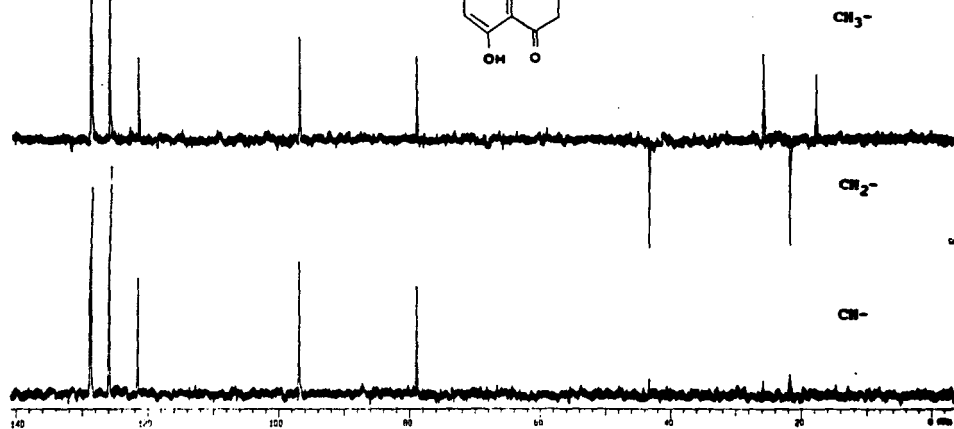
55



Espectro C' RMN-¹³C (DEPT) (75 MHz, CDCl₃, TMS r.i.) de la 5,7-dihidroxi-8-(3',3'-dimetilbut-2-enil)flavona



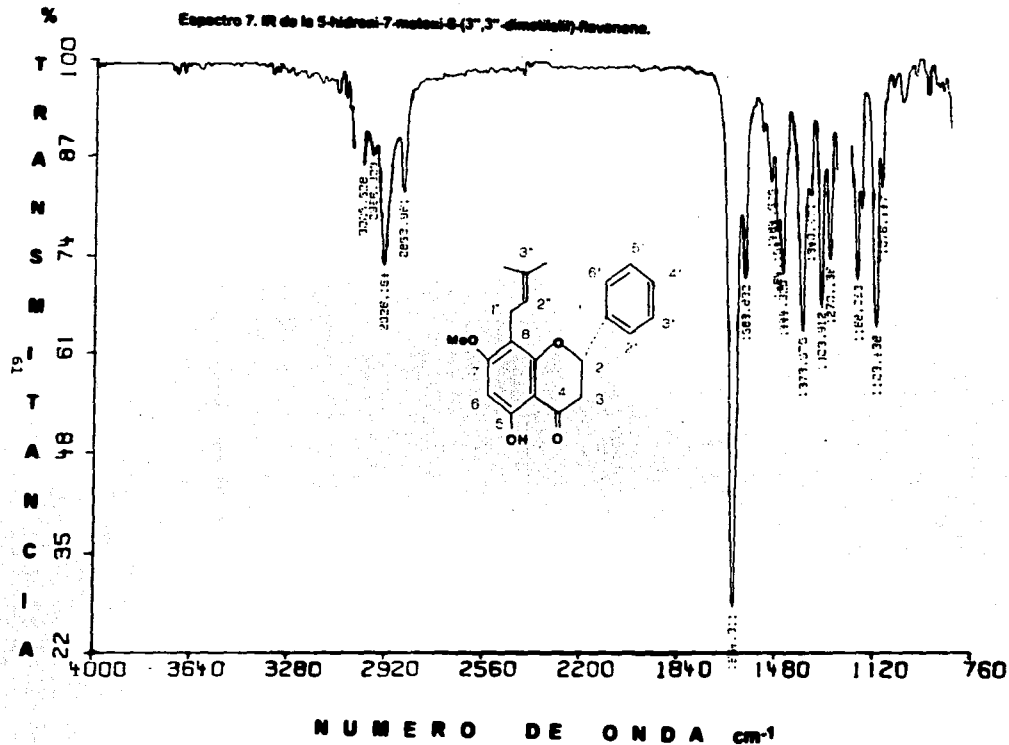
0.9



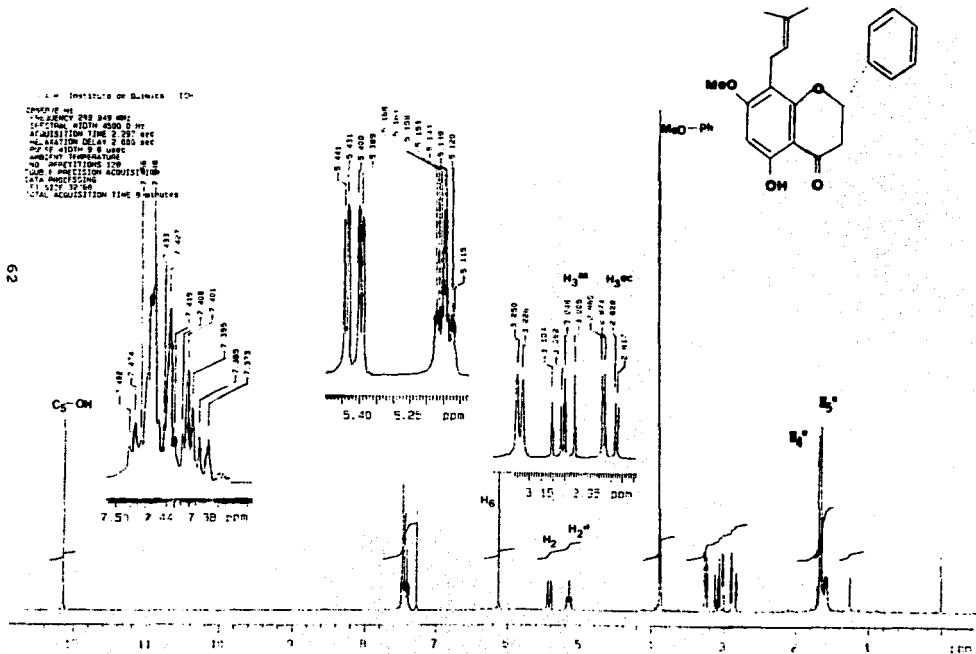
CH₃-

CH₂-

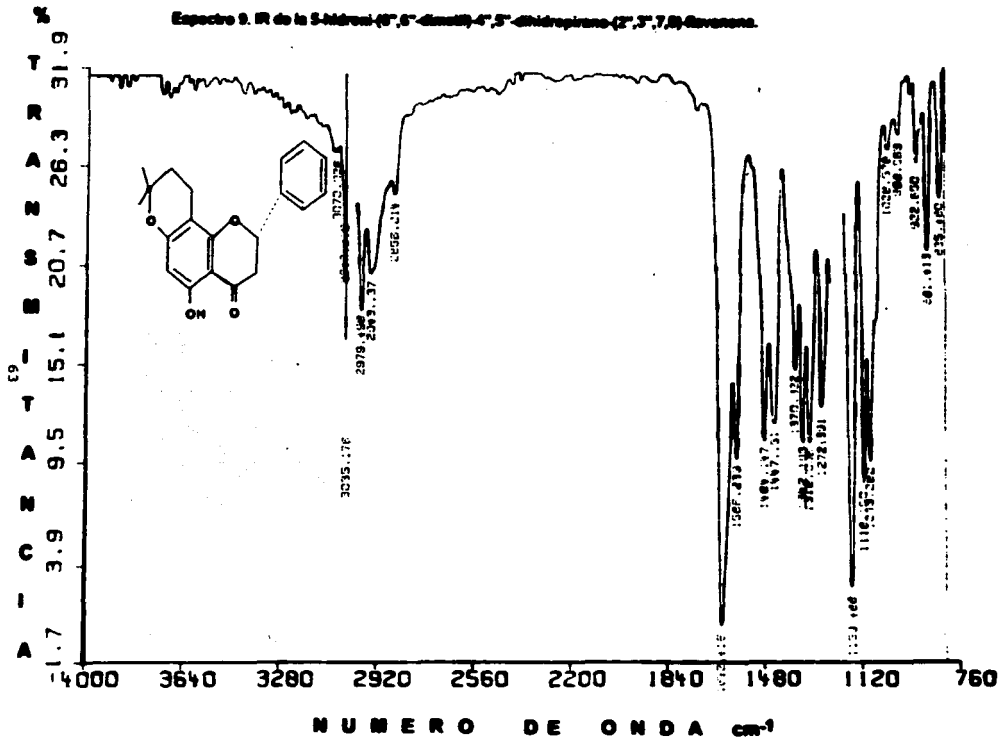
CH-



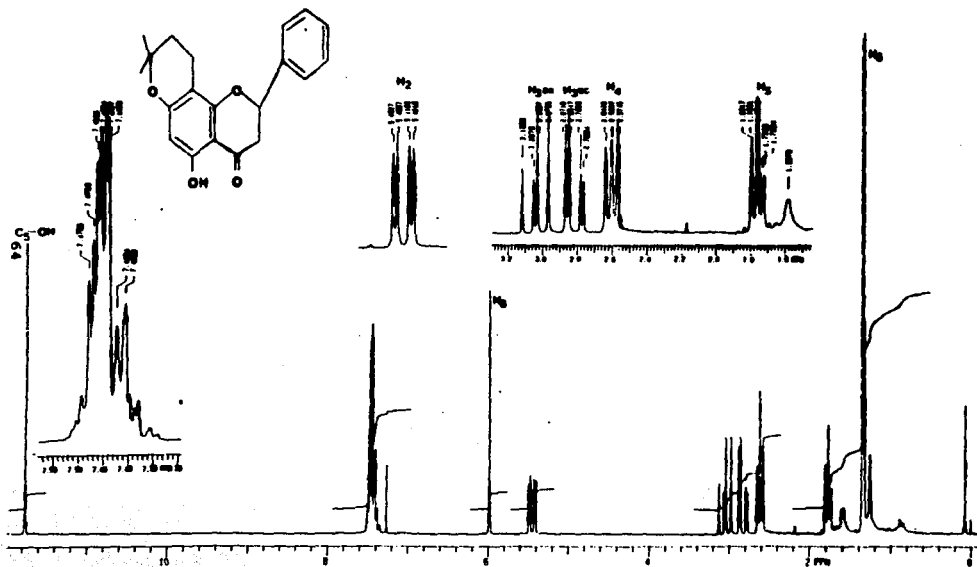
Espectro de RMN-1H (300 MHz, CDCl₃, TMS r.i.) de la 5-álcool-7-metil-8-(3',3'-dimetil)-Reverona



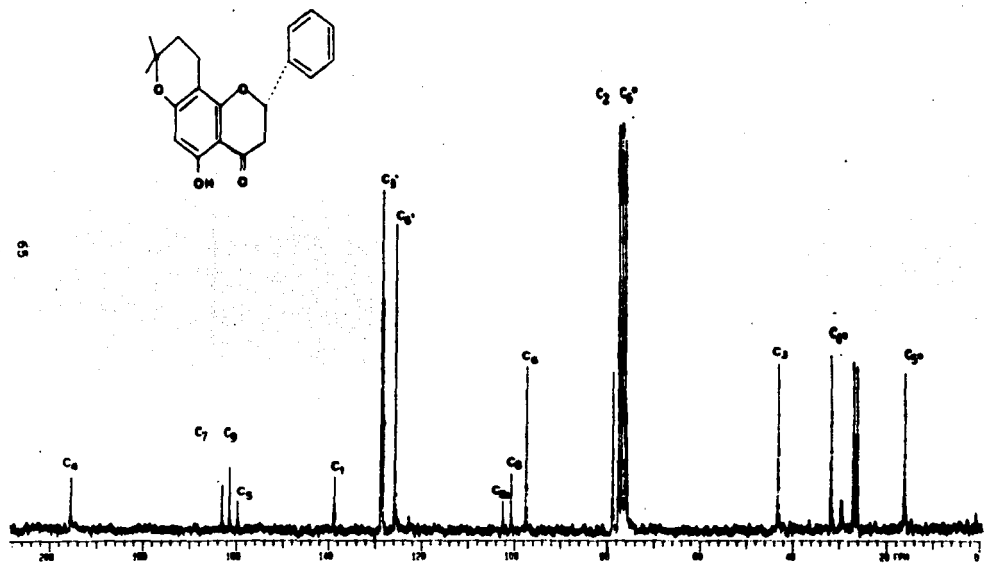
Espectro IR de la 5-Metilo-(6',6'-dimetil)-4',5'-dihidropirano-(2',3',7,8)-Cavonona.



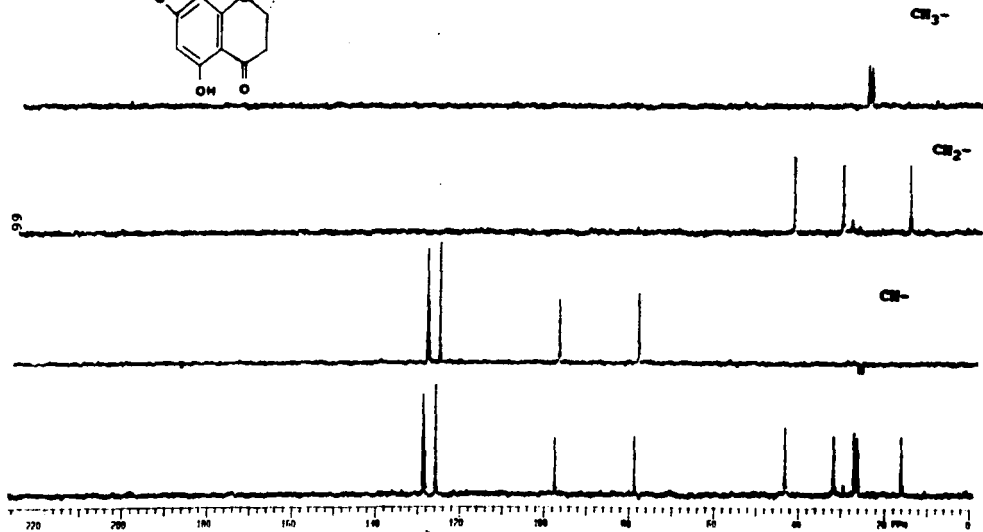
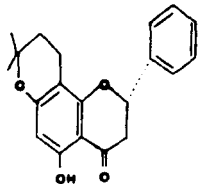
Espectro 10. RMN-1H (200 MHz, CDCl₃, TMS r.l.) de la 5-oxo-1-(4'-fenantilo)-4',5'-dimetil-4",5"-dihidroquinazolin-2(1H)-ona



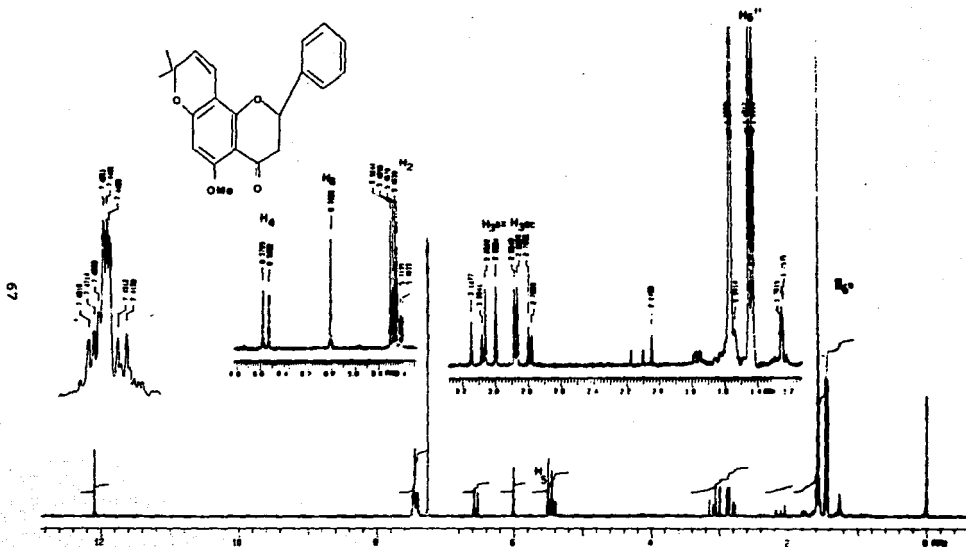
Espectro 11. RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃, TMS r.l.) de la 5-Nicotil-(6',5'-dimetil-6'',5''-dihidropirano-(2'',3'',7,8)-flavonona



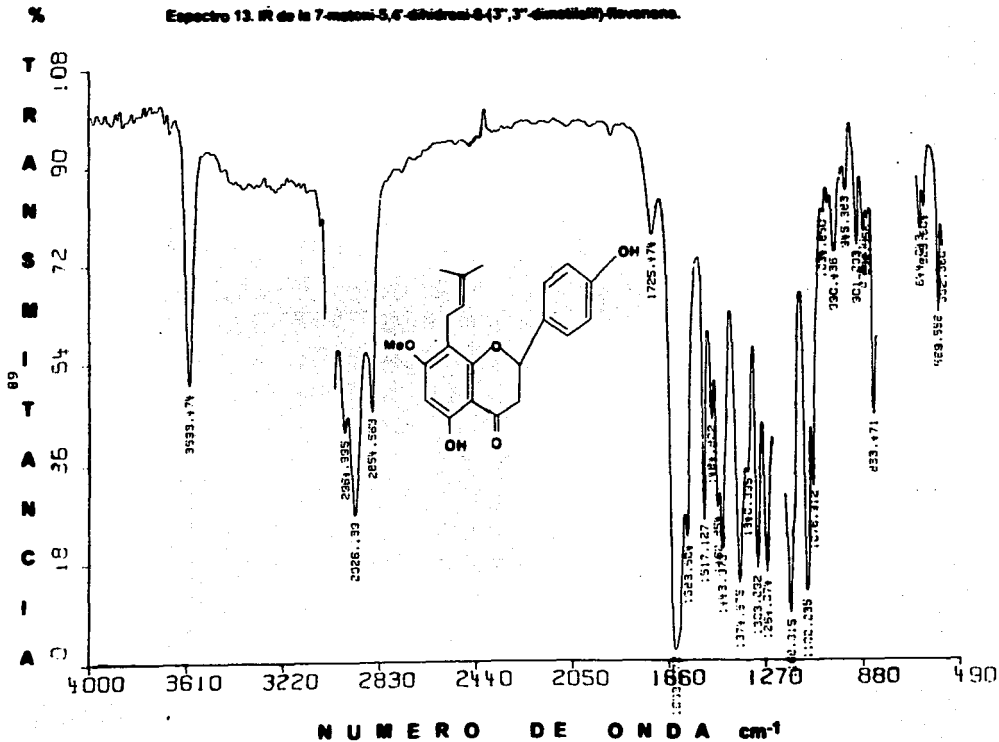
Espectro 11'. RMN-¹³C (DEPT) (75 MHz, CDCl₃, TMS r.l.) de la 8-Hidroxi-4',5'-dimetil-4'',5''-dihidroquinone-(2'',3'',7,8)-
 flavonona



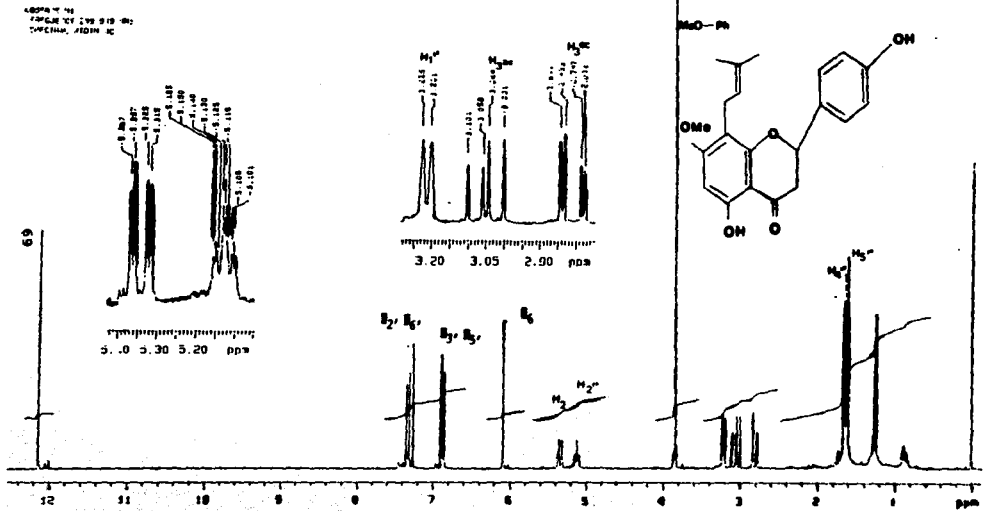
Espectro 12. RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃, TMS r.i.) de la 5-hidroxi-6''-dimetil-pirano-(2'',3'',7,8)-flavonona



Espectro IR de la 7-metoxi-5,6-dihidro-8-(3',3'-dimetil)flavone.

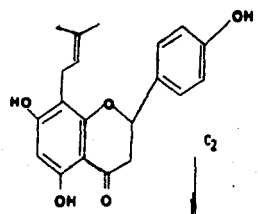


Espectro 14. RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃, TMS r.l.) de la 7-metil-5,4'-dihidro-8-(3',3'-dimetil-6-oxo-5-hidroxi-2-fenilprop-1-en-1-ilo)flavona

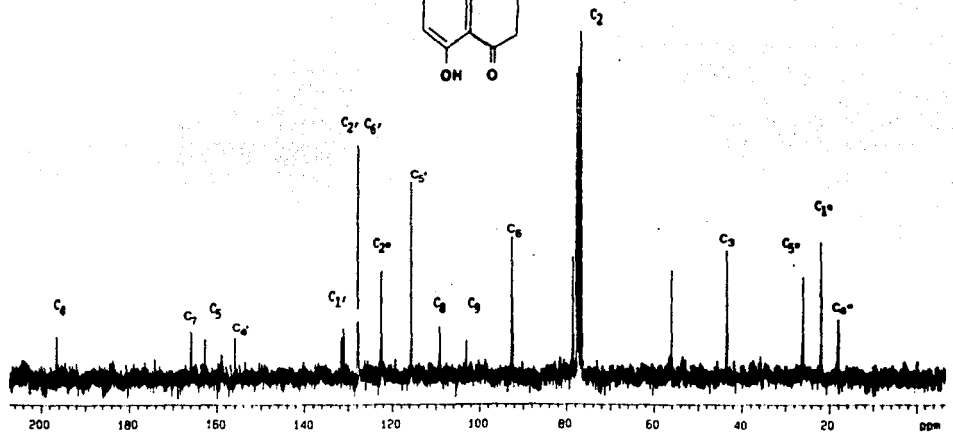


Espectre 15. RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃, TMS r.l.) de la 7-méthyl-5,6'-dihydro-8-(3',3'-diméthyl)-flavone

EXPANSE 013
 FIDELITY 75.420 MHz
 ACQUISITION 210° 10000 9 00
 000117110

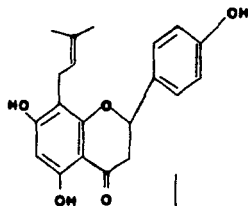


70

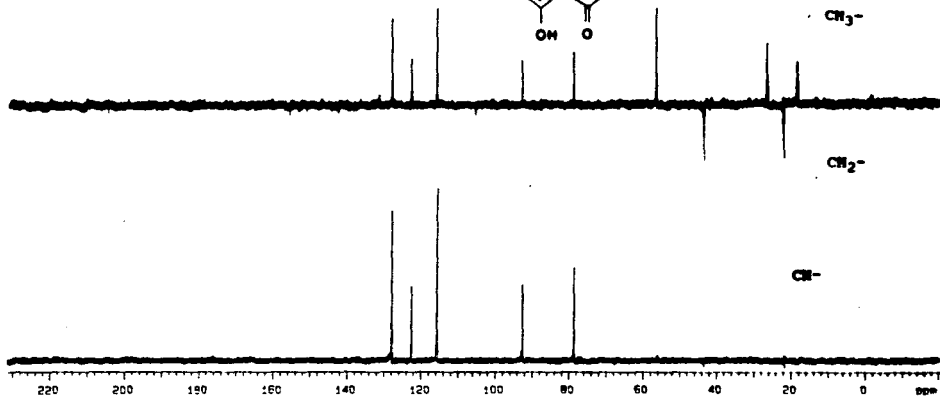


Espectro 15: RMN-13C (DEPT) (75 MHz, CDCl₃, TMS r.l.) de la 7-metoxi-5,6'-dihidro-8-(3',3'-dimetilbutil)lavona

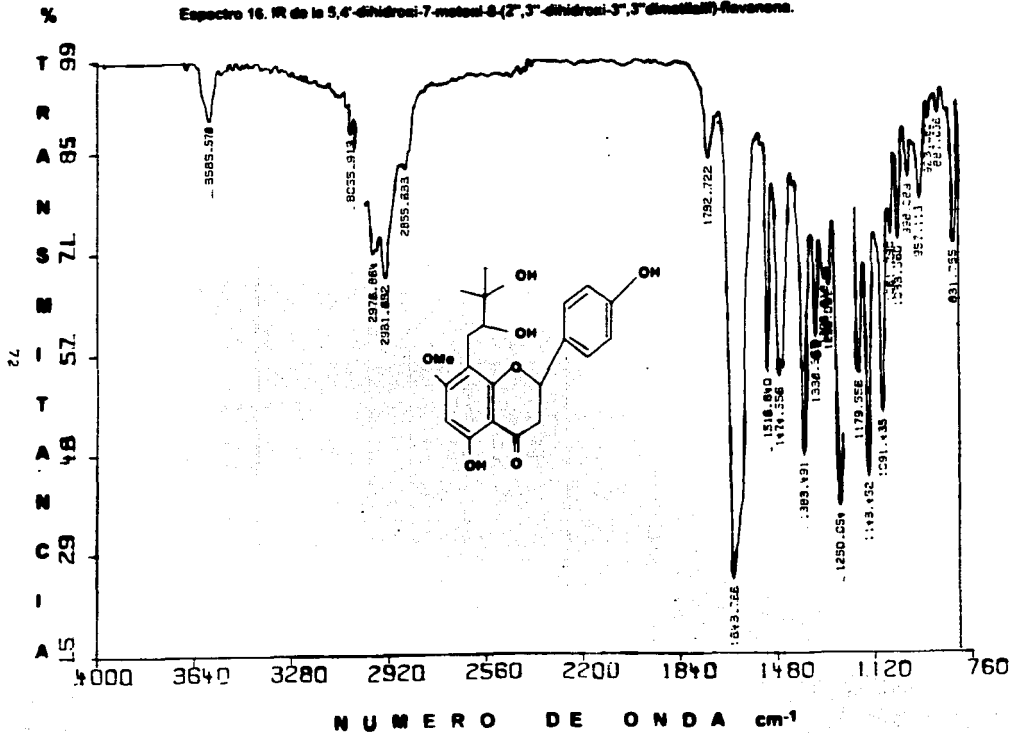
13C NMR (75 MHz, CDCl₃)
 125.0 (s), 124.5 (s), 123.5 (s), 122.5 (s), 121.5 (s),
 120.5 (s), 119.5 (s), 118.5 (s), 117.5 (s), 116.5 (s),
 115.5 (s), 114.5 (s), 113.5 (s), 112.5 (s), 111.5 (s),
 110.5 (s), 109.5 (s), 108.5 (s), 107.5 (s), 106.5 (s),
 105.5 (s), 104.5 (s), 103.5 (s), 102.5 (s), 101.5 (s),
 100.5 (s), 99.5 (s), 98.5 (s), 97.5 (s), 96.5 (s),
 95.5 (s), 94.5 (s), 93.5 (s), 92.5 (s), 91.5 (s),
 90.5 (s), 89.5 (s), 88.5 (s), 87.5 (s), 86.5 (s),
 85.5 (s), 84.5 (s), 83.5 (s), 82.5 (s), 81.5 (s),
 80.5 (s), 79.5 (s), 78.5 (s), 77.5 (s), 76.5 (s),
 75.5 (s), 74.5 (s), 73.5 (s), 72.5 (s), 71.5 (s),
 70.5 (s), 69.5 (s), 68.5 (s), 67.5 (s), 66.5 (s),
 65.5 (s), 64.5 (s), 63.5 (s), 62.5 (s), 61.5 (s),
 60.5 (s), 59.5 (s), 58.5 (s), 57.5 (s), 56.5 (s),
 55.5 (s), 54.5 (s), 53.5 (s), 52.5 (s), 51.5 (s),
 50.5 (s), 49.5 (s), 48.5 (s), 47.5 (s), 46.5 (s),
 45.5 (s), 44.5 (s), 43.5 (s), 42.5 (s), 41.5 (s),
 40.5 (s), 39.5 (s), 38.5 (s), 37.5 (s), 36.5 (s),
 35.5 (s), 34.5 (s), 33.5 (s), 32.5 (s), 31.5 (s),
 30.5 (s), 29.5 (s), 28.5 (s), 27.5 (s), 26.5 (s),
 25.5 (s), 24.5 (s), 23.5 (s), 22.5 (s), 21.5 (s),
 20.5 (s), 19.5 (s), 18.5 (s), 17.5 (s), 16.5 (s),
 15.5 (s), 14.5 (s), 13.5 (s), 12.5 (s), 11.5 (s),
 10.5 (s), 9.5 (s), 8.5 (s), 7.5 (s), 6.5 (s),
 5.5 (s), 4.5 (s), 3.5 (s), 2.5 (s), 1.5 (s),
 0.5 (s)



71

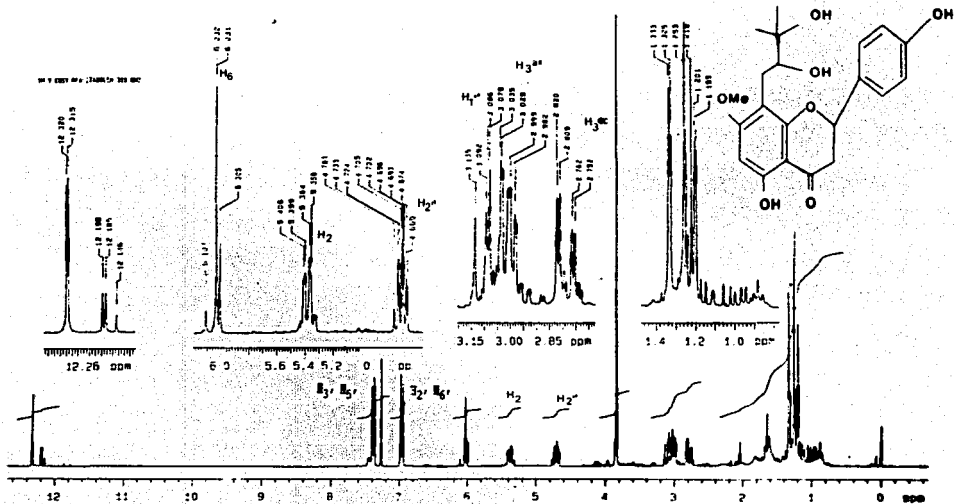


Espectro 16. IR de la 5,4'-dihidroxi-7-metoxi-8-(2'',3''-dihidroxi-3'',3''-dimetil)flavona.



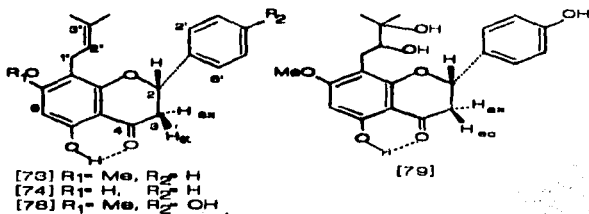
Espectro 17. RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃, TMS r.i.) de la 5,4'-dihidroxi-7-metoxi-8-(2'',3''-dihidroxi-3'',3''-dimetilalil)-flavanona

73



RESULTADOS

Datos de RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz, TMS) de las Flavanonas aisladas de *E. berlandieri ssp acapulcensis*.

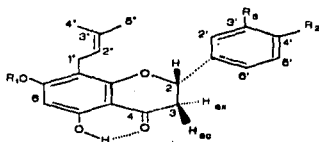


#	73*	74*	78**	79**
2	5.418dd (12.6 y 13.5)	5.427dd (13 y 3.3)	5.344dd (12.4 y 3.3)	5.359dd (12.4 y 3.5)
3ec	2.850dd (17.1 y 3.6)	2.844dd (17.1 y 3)	2.896dd (17.1 y 3.3)	2.813dd (17.1 y 3.3)
3ax	3.055dd (17.1 y 12.3)	3.058dd (17.25 y 12.9)	3.054dd (17.1 y 12.5)	3.545dd (17.1 y 12.6)
6	6.102s	6.036s	6.095s	6.089s
1*	3.239d (7.2)	3.366d (6.9)	3.214d (7.38)	3.216d (7.2)
2*	5.174tc (7.5 y 1.5)	5.221tc (7.2 y 1.5)	5.127tc (7.28 y 1.38)	5.131tc (7.26 y 1.38)
4*	1.626s	1.731s	1.615s	1.195s
5*	1.650m	1.731s	1.643s	1.3195m
C ₅ -OH	12.137m	12.002s	12.143s	12.135s
C ₇ -OH C ₇ -OCH ₃	- 3.859m	- -	- 3.856s	- 3.857s
2',6' 3',5' 4'	7.363-7.480 s.b. 5H	7.385-7.475 s.b. 5H	6.8763d (8.6 y 1) 7.334dd (8.6 y 1) -	6.941d (9) 7.374d (9) -
Ph-OCH ₃	-	-	-	3.835s

* Espectro de 300 MHz

** Espectro de 200 MHz

DATOS DE RMN-¹³C (75 Mhz, CDCl₃, TMS) DE LAS FLAVANONAS.



C	[73] $\delta_{1-\text{Me}}$	[74] $\delta_{1-\text{H}}$	[78] $\delta_{1-\text{Me}}$
	$\delta_{2-\text{H}}$	$\delta_{2-\text{H}}$	$\delta_{2-\text{H}}$
2	78.67	79.971	78.415
3	43.422	43.288	43.235
4	196.30	196.225	196.503
5	158.74	159.619	155.818
6	92.48	46.924	92.406
7	165.77	163.766	165.720
8	109.00	106.261	108.982
9	162.64	162.233	162.522
10	102.95	103.716	102.924
1'	138.91	138.682	131.001
2'	128.52	125.932	127.649
3'	128.70	128.668	115.440
4'	125.92	128.668	155.818
5'	128.70	128.668	115.440
6'	128.52	125.932	127.694
1 ⁿ	21.58	21.976	121.616
2 ⁿ	122.40	121.568	122.329
3 ⁿ	131.38	134.919	131.308
4 ⁿ	17.64	25.799	17.709
5 ⁿ	25.76	17.882	25.829
-OCH ₃	55.90		55.095

DISCUSION DE RESULTADOS

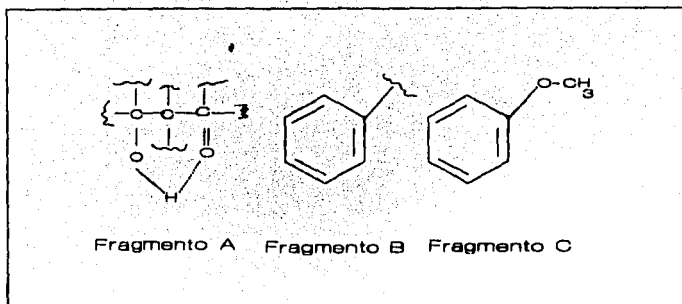
A partir de los 1634.6 g de la planta seca, de donde mediante extracciones con etanol caliente se obtuvieron 3311 g de extracto, 200 g se adsorbieron en celita y por cromatografía en columna, se realizó la primer separación colectandose fracciones de 500 ml cada una.

De las fracciones 55-58, obtenidas al eluir la columna con una mezcla de hexano-acetato de etilo (95:5), y de la recromatografía de las aguas madres de las fracciones 57 y 58, se aisló un sólido que en ccf presentaba una coloración amarilla al revelar la placa con luz UV (onda larga), mientras que al emplear como revelador químico una solución de FeCl_3 en etanol al 1%, mostraba una señal café oscura. Por otro lado, en su espectro de masas se observa un ión molecular con m/z 338 (73.17) al que se le puede asociar una fórmula molecular $\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{O}_4$ y que le corresponden 11 grados de insaturación.

La presencia de un grupo carbonilo que interacciona a través de puentes de hidrógeno queda de manifiesto en su espectro de IR (espectro 1), al observarse una banda en 1634.31 cm^{-1} , mientras que las bandas en 1444.6 y 1373.9 cm^{-1} pueden ser atribuidas a la presencia de metilenos alílicos y metilos vinílicos respectivamente, en tanto que la banda 3005.5 y 1583.2 cm^{-1} corresponden precisamente a las vibraciones $\text{C}(\text{sp}^2)\text{-H}$ y $\text{C}(\text{sp}^2)\text{-C}(\text{sp}^2)$.

Los datos obtenidos de su espectro de RMN^{-1}H (espectro 2), confirman la presencia de un grupo hidroxilo en 12.127 ppm , los cuales interacciona con un grupo carbonilo a través de puentes de hidrógeno (fragmento A). Además se observa una señal compleja entre δ 7.363 - 7.840 que integra para 5 hidrógenos para un anillo aromático monosustituido (fragmento B) adicionalmente se observa una señal simple que integra para 3 hidrógenos en δ 3.859 que corresponde al metilo de un fragmento metil fenil éter (fragmento C).

FIGURA 3.



Las señales adicionales fueron asignadas con ayuda de su espectro de Correlación Homonuclear de Hidrógeno (Esquema IX). Donde la señal doble de doble (*dd*) ($J=12$ y 3.5 Hz) con un desplazamiento químico en 5.418 ppm, que integra para 1 H y que forma parte de un sistema ABX (figura 4) muestra acoplamiento con las señales en $\delta 3.055$ (*dd*, $J=17$ y 12 Hz, $1H$) y $\delta 2.853$ (*dd*, $J=17$ y 3.5 Hz, $1H$), lo cual está de acuerdo para un fragmento molecular en que los hidrógenos presentan una disposición *trans* y *cis* respectivamente (fragmento D, figura 5), sugiriendo que se trata de hidrógenos que son parte de un anillo de 6 miembros.

Figura 4. SISTEMA ABX.

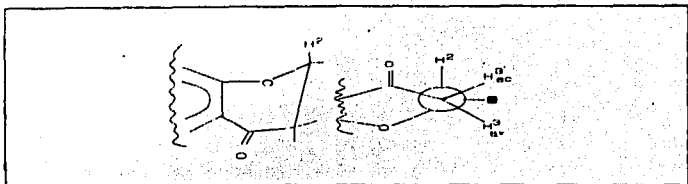
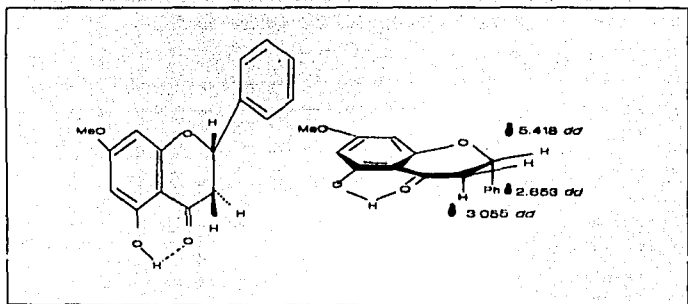
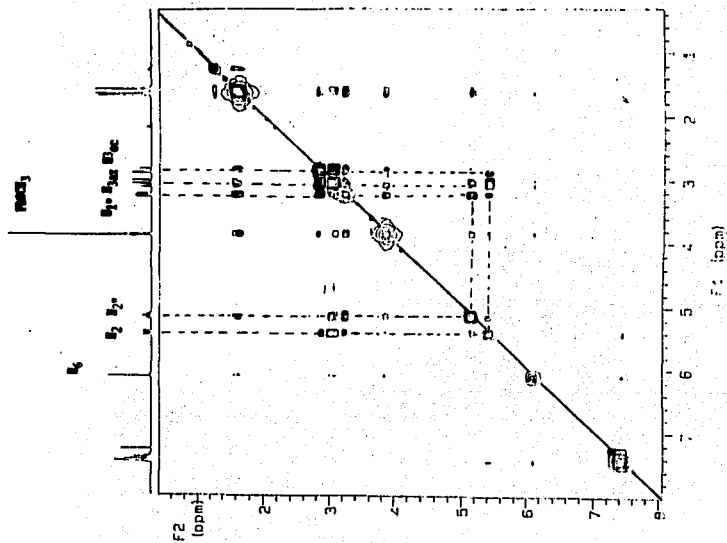


Figura 5. FRAGMENTO D.





PULSE SEQUENCE: zgpg30
 OBSERVE: 1H
 P1: 12.00 nsec
 SPECTRAL WIDTH: 800.0 MHz
 2D SPECTRAL WIDTH: 800.0 MHz
 ACQUISITION TIME: 0.258 sec
 RELAXATION DELAY: 1.000 sec
 SPECTRAL CENTER: 100.625 MHz
 F1 HET PULSE WIDTH: 15.3 usec
 AMBIENT TEMPERATURE: 300.2 K
 NO. REPEATS: 16
 NO. INCREMENTS: 16
 SINE BELL: 0.084 sec
 FT SIZE: 1024
 F1 DATA PROCESSING: SINE BELL: 0.021 sec
 F2: SIZE: 1024
 TOTAL ACQUISITION TIME: 48.74 minutes

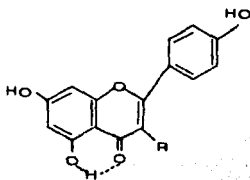
ESQUEMA IX. Espectro de Correlación Homonuclear ¹H-¹H del compuesto [73]

en donde cada uno de los carbonos adyacentes se encuentran totalmente sustituidos, lo que permitió proponer como esqueleto base al de una flavanona⁶, al que le corresponden 10 grados de insaturación, lo que está de acuerdo con su espectro de UV que presenta un desplazamiento batocrómico (22 y 52 nm), cuando se le adiciona AlCl₃ al 5% a una solución metanólica del compuesto [73], dicho desplazamiento se mantiene al adicionar una solución de ácido clorhídrico, lo que significa que el quelato (5-hidroxi-4-ceto-AlCl₃) permanece inerte después de la adición del ácido (esquema X).

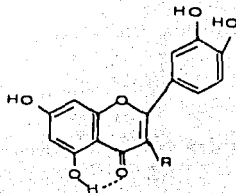
6 DESPLAZAMIENTOS QUÍMICOS PARA LOS HIDRÓGENOS PRESENTES EN FLAVONAS Y FLAVANONAS.

PROTON	δ	MULTPLICIDAD
H-3 (flavonas)	6.3	s (singlete)
H-6	6.2	d, J=2.5 cuando H-8 esta presente, de lo contrario como s (singlete)
H-8	6.5	d J=2.5, cuando H-6 esta presente, de lo contrario como s (singlete)
H-3',5' (1)	6.9	d J=9 Hz
H-2',6' (1)	7.4	d J=9 Hz
H-5' (2)	6.9	d J=9 Hz
H-2, 6' (2)	7.4	H-2' d, J=2.5 Hz; H-6' dd, J=2.5 y 9 Hz.

- (1) PARA ESQUELETOS DEL TIPO DEL KAMPUFOL Y APIGENINA
 (2) PARA ESQUELETOS DEL TIPO DE LA QUERCETINA Y LUTEOLINA.



R = H; Apigenina
 R = OH; Kaempferol

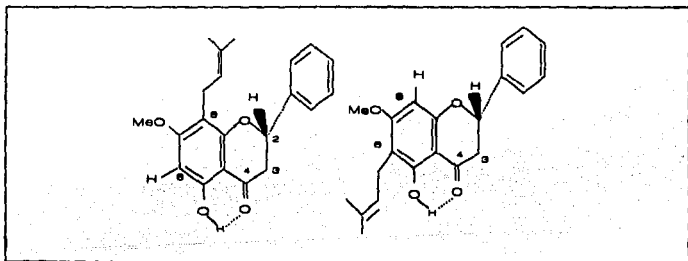


R = H; Luteolina
 R = OH; Quercetina

De lo anterior se propuso como hipótesis estructural una flavanona 5-hidroxi-7-metoxi sustituida, donde el fragmento C_5H_7 restante, identificado como el grupo prenilo, en el espectro de RMN- 1H (espectro 2), ya que se observa una señal en 5.147 ppm como un triplete de cuartetos (tc) ($J=7$ y 1.5 Hz) que corresponde al hidrógeno vinílico de este fragmento, el cual se acopla con la señal doble (d) que aparece en 3.239 ppm ($J=7$). Mientras que las señales simples en 1.626 y 1.650 ppm que integran para tres hidrógenos, fueron asignadas a los grupos metilo de las posiciones 5" y 4" respectivamente.

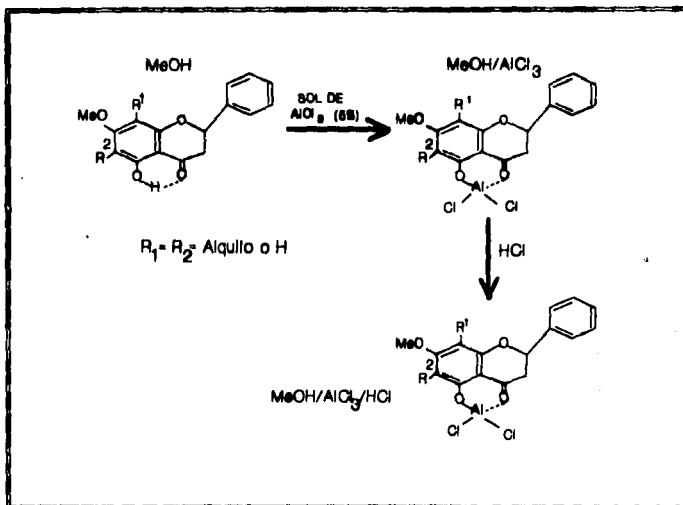
Asimismo se observa una señal simple que integra para un Hidrógeno que por su desplazamiento químico y multiplicidad corresponde al hidrógeno aromático ubicado en el anillo A de la flavanona, que presenta una alta densidad electrónica debido a la presencia de los átomos de oxígeno, lo que sugiere la posibilidad de situar al grupo prenilo en las posiciones 6 u 8 de la flavanona (figura 6)⁷.

FIGURA 6.



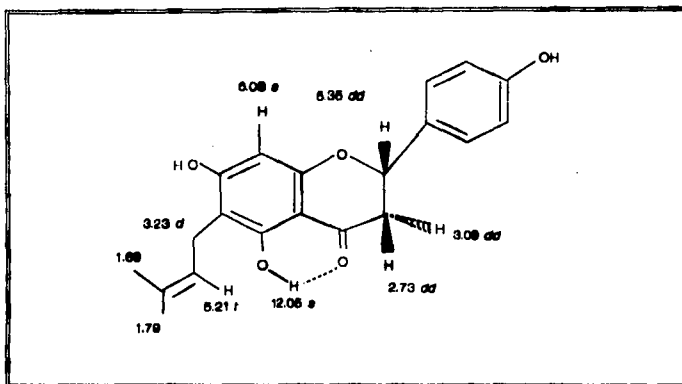
⁷ UNA EXPLICACION MAS DETALLADA SE DA EN LA DISCUSION DE LA 5,7-DIHIIDROXI-8-(3",3"-DIMETILALIL)- FLAVANONA [74], PAGINA 91.

ESQUEMA X. Adición de AlCl₃ al compuesto [73].



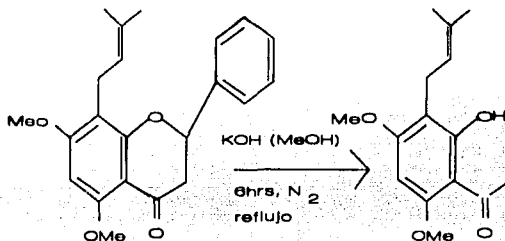
En la literatura química se han reportado diferentes metodologías basadas en reacciones químicas y técnicas espectroscópicas, que se han empleado para definir la posición correcta del grupo prenilo, donde cabe señalar las observaciones sugeridas por Bohlmann and Zdero (49), en el sentido de que las señales de los grupos metilo de las posiciones 4^a y 5^a aparecen con el mismo desplazamiento químico (s) cuando el grupo prenilo se encuentra en la posición 8, mientras que los compuestos que poseen un grupo prenilo en la posición 6, muestran desplazamientos químicos diferentes para los metilos 4^a y 5^a (50) (ver esquema XI)

ESQUEMA XI. Desplazamientos químicos para una flavanona con un grupo prenilo en la posición 6.



Sin embargo, en este estudio se encontró que en su espectro de RMN-¹H aplicando la técnica NOESY (esquema XII), se observa que existe una correlación entre H-2 y H-2", esto confirma la posición del grupo prenilo en el C-8; así como también entre el hidrógeno en 6.102 ppm que se localiza en el anillo A y el grupo metoxilo del C-7, lo que permitió concluir que esta sustancia ya se había aislado y caracterizado previamente de *Tephrosia villosa* (Leguminosa) (51) y fue identificada como 7-metilglabranina.

Jayaraman y colaboradores (51) confirmaron la sustitución en el anillo A mediante la degradación alcalina de la 7-metilglabranina.



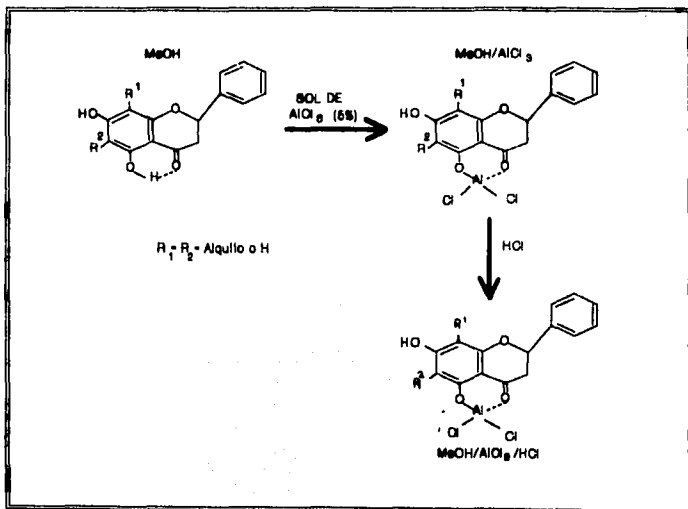
δ 3.79 (s, 6H, OMe-2, OMe-4)
 δ 2.82 (s, 3H, COMe-1)
 δ 5.82 (s, 1H, C-3)

De las fracciones 114-120, que se obtuvieron al eluir la columna con una mezcla de hexano:acetato de etilo (95:5) y (90:10); se aisló un sólido cristalino de color amarillo de pf. 167-168 °C, que muestra en su espectro de masas por impacto electrónico un ión molecular a m/z 324 (100 %), al que se le puede asociar una fórmula molecular $C_{20}H_{20}O_4$ con 11 grados de insaturación.

El espectro de IR, muestra dos bandas en 3583 y 3374 cm^{-1} , que son características para los alcoholes cuya región está establecida entre 3200 y 3600 cm^{-1} ; la absorción en estos números de onda se debe al alargamiento O-H. Mientras que la señal que se presenta en 1639 cm^{-1} son producidas por el grupo -C=O cuyo intervalo de aparición característico es entre 1690 y 1760 cm^{-1} .

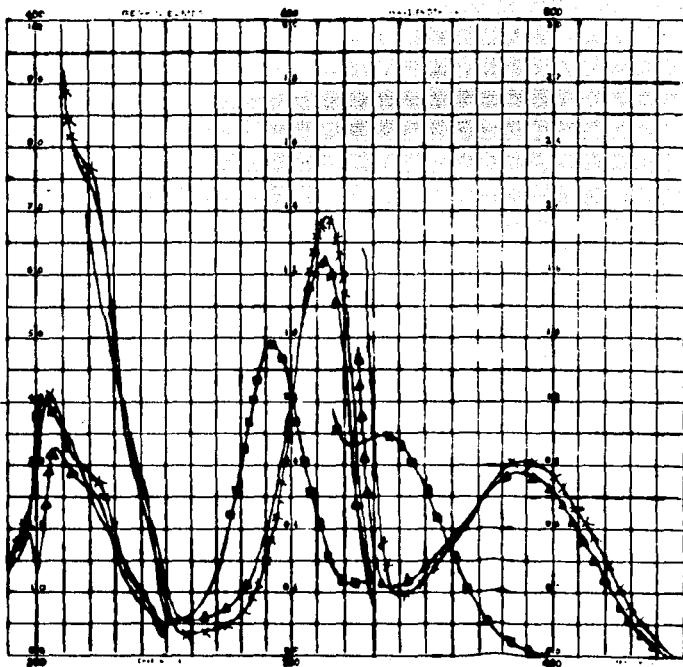
La interacción del grupo carbonilo con el ión hidroxilo del C-5 a través de un puente de hidrógeno, fue corroborada por su espectro de UV (Esquema XIV) (51-52). La adición de AlCl_3 al 5% a una solución metanólica del compuesto [74], causó un desplazamiento batocrómico de aproximadamente 20 y 52 nm; dicho desplazamiento es conservado al adicionar una solución de ácido clorhídrico, lo que significa que el quelato (5-hidroxi-4-ceto AlCl_3) permanece inerte después de la adición del ácido, lo cual está de acuerdo con el desplazamiento químico observado para el $\text{C}_5\text{-OH}$ y que se indica en el Esquema XIII.

ESQUEMA XIII. REACCIONES QUÍMICAS DEL COMPUESTO [74] CON AlCl_3 Y AlCl_3/HCl , PARA DETERMINAR EL EFECTO DE LOS REACTIVOS DE DESPLAZAMIENTO EN LA LONGITUD DE Onda MÁXIMA DEL COMPUESTO [74].



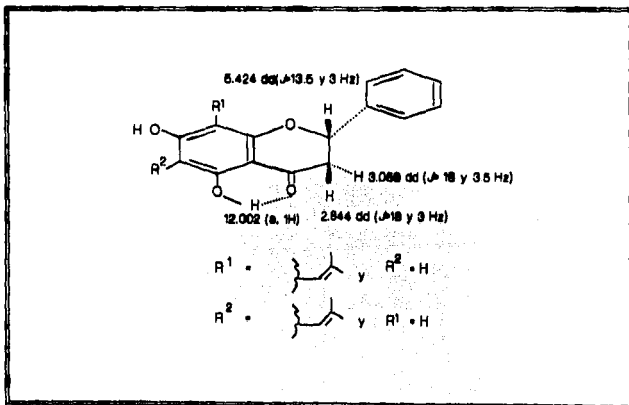
ESQUEMA XIV. ESPECTRO DE UV DEL COMPUESTO [74] DONDE SE MUESTRAN LOS DESPLAZAMIENTOS EN LONGITUD DE ONDA BAJO LA PRESENCIA DE $AlCl_3$ Y $AlCl_3/HCl$.

- = MUESTRA
- X = MUESTRA + $AlCl_3$
- ▲ = MUESTRA + $AlCl_3$ + HCl



Lo anterior se complementa y fundamenta con los datos obtenidos de su espectro de RMN- ^{13}C (espectro 3), que muestra en desacoplamiento total de hidrógeno la presencia de 18 átomos de carbono. La naturaleza del grupo funcional así como el grado de hidrogenación de estos átomos se dedujo en base a su desplazamiento químico y por la multiplicidad mostrada en su espectro de RMN- ^{13}C , en donde se aplicó el experimento DEPT (Distortionless Enhancement by Polarisation Transfer). Con base en esto se pudo establecer la presencia de un grupo carbonilo de cetona, 7 carbonos cuaternarios, 6 metinos, 2 metilenos y 2 metilos. La presencia de 2 carbonos adicionales se puede justificar al considerar que éstos presentan un ambiente químico y magnético similar. En su espectro de RMN- ^1H (espectro 5), se observan las señales correspondientes al esqueleto de una flavanona (como se ilustra en el Esquema XV).

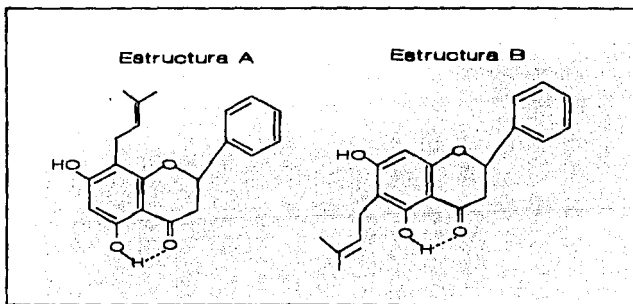
ESQUEMA XV: SEÑALES CARACTERÍSTICAS QUE EVIDENCIAN PROPORCIÓN COMO ESQUELETO BASE AL DE UN FLAVANONA OCHRODETILADA.



Por otro lado, se observa una señal compleja entre 7.385 y 7.475 ppm que integra para 5H y que corresponden a los hidrógenos del anillo B. Asimismo se observan las señales correspondientes al grupo prenilo; esto es, la señal en 3.66 ppm que aparece como un doblete que se asignó a los hidrógenos del C-1", mientras que la señal en 5.221 ppm como triple de cuarteto (tc) corresponde al hidrógeno vinílico del C-2" y la señal simple que aparecen en δ 1.731 y que integra para 6 hidrógenos se le asignó a los metilos unidos al C-3".

Finalmente la señal simple en 6.036 fue asignada a un hidrógeno aromático, el cual puede situarse en la posición 6 y situar al grupo prenilo en la posición 8, como se indica en la estructura A; o bien ubicar al grupo prenilo en la posición 6 y al hidrógeno en la posición 8 como en la estructura B (figura 7).

FIGURA 7



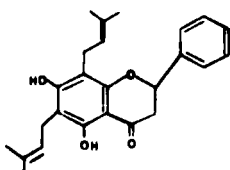
Lo anterior puede explicarse en función del efecto electrodonador de los átomos de oxígeno que se ubican en las posiciones orto y para con respecto al hidrógeno, mientras que en la posición meta se localiza el grupo acilo, el cual ejerce un efecto electroattractor mínimo sobre el mismo hidrógeno.

La información reportada en la literatura química, indica que existe la posibilidad de encontrar flavanonas preniladas tanto en el C-6 como en el C-8 (TAMA IV), las cuales han sido aisladas y caracterizadas principalmente de especies pertenecientes a las familias de las Leguminosae [80-84], Compositae [85-87] y Rutaceae [88-89].

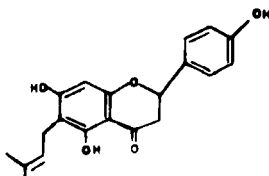
La C-prenilación es un proceso común que ocurre en la familia Rutaceae, de donde se han aislado cumarinas (furanó y piranocumarinas) (62 - 63) alcaloides (furo y piranoquinolínicos), alcaloides derivados de la acridona y carbazol. Cabe señalar que las piranocumarinas y alcaloides piranoquinolínicos, son menos frecuentes en las Rutáceas que las cumarinas y alcaloides que incorporan en su estructura al anillo del furano (62).

Por otro lado, se han reportado algunas evidencias experimentales para determinar la presencia del grupo prenilo (3,3-dimetil alilo) o geranilo [(E)-3,7-dimetil-2,6-octadienilo] en las posiciones 6 u 8 del esqueleto de la flavanona que se basa en reacciones químicas de ciclización (47 - 48), en los desplazamientos químicos de los hidrógenos de los metilos vinílicos (54) o del C₅-OH (55), en los desplazamientos químicos observados en RMN-¹³C (56), en los desplazamientos químicos a campo alto de los hidrógenos benzoílicos (64), en los hidrógenos de los cromenos después de la acetilación del C₅-OH (65).

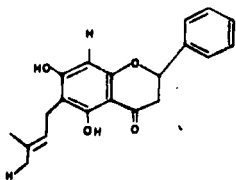
TABLE IV STRUCTURES OF FLAVANONE FRUITANS.



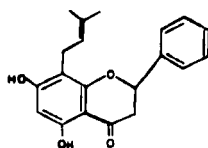
[80] *Lonchocarpus minimiflora* (80)



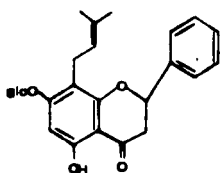
[81] *Sophora flavescens B* (81-82)



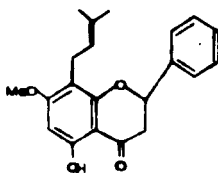
[82] *Helichrysum thapsus* (82)



[83] *Glycyrrhiza lepidota*
(83, 84-85)

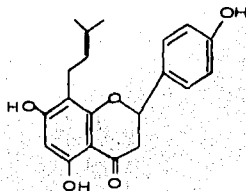


[84] *Flavopina* (84)

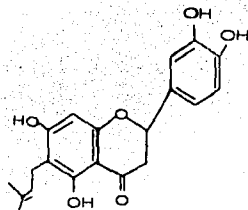


[85] 7-methylglabranin (*T. villosa*) (85)

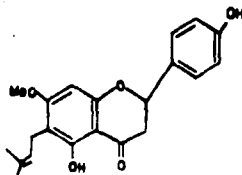
TABLA IV ESTRUCTURAS DE FLAVONOS PENSIANAS.



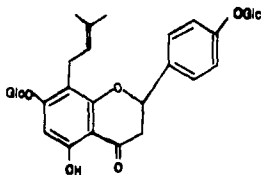
[66] Wyethia helenoids (66)



[67] Wyethia helenoids (67)



[68] 4',5-Dihidroxi-6-(3,3-dimetil)-7-metoxiflavanona (*Lonicocarpus minimiflorus*) (68)

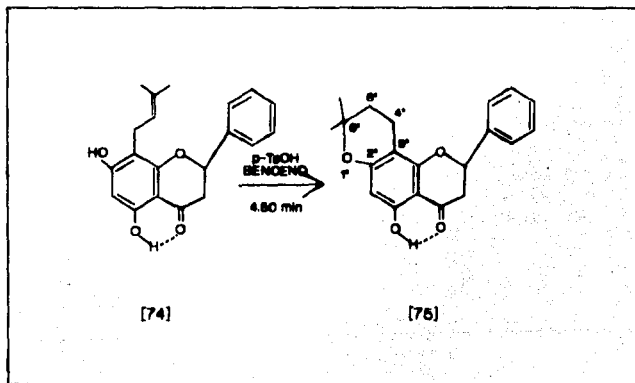


[69] 4,7-diglucosido 8-(3-metilbut-2-enil)-4',6,7-trihidroxi flavanona (*Euodia rutescarpa*) (69)

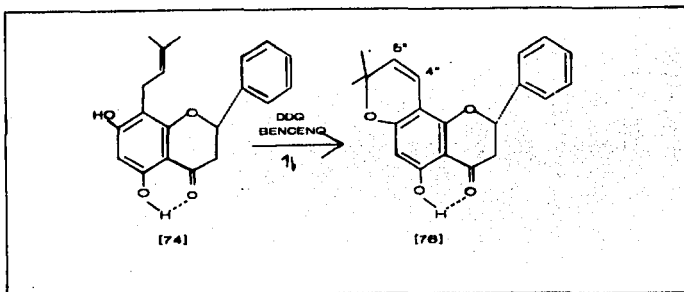
y más recientemente por acoplamiento a largo alcance (^{13}C - ^1H) y por desacoplamiento a largo alcance de manera selectiva de los hidrógenos (LSPD) (66).

Para situar con precisión la posición del grupo prenilo en el esqueleto de la flavanona, se procedió a realizar la reacción de ciclización con ácido p-toluensulfónico y DDQ (2,3-dicloro-5,6-diciano 1,4-benzoquinona) de acuerdo con los siguientes esquemas de reacción (Esquema XVI y Esquema XVII).

ESQUEMA XVI: REACCIÓN DE CICLIZACIÓN DE [74] CON p-TsOH.



ESQUEMA XVIII. Reacción de ciclización de [74] con DDQ.



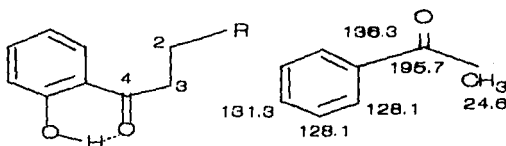
La obtención de los compuestos [75] y [76], sugiere que la ubicación del grupo prenilo se encuentra en la posición 8, lo que fue corroborado por su espectro NOESY de C-13.

Los desplazamientos de C-13 para la pinocembrina [90] (67), naringenina [91] (67) y lonchocarpol A [92] (54) se presentan en la tabla V y servirán de referencia en la discusión presente. En el espectro de desacoplamiento total del compuesto [74] se observa la presencia de 18 átomos de carbono; lo cual confirma, que el anillo B de la flavanona se encuentra monosustituída y que los carbonos 2' y 6'; así como, los carbonos 3' y 5' presentan el mismo desplazamiento químico 125.932 y 120.688 ppm respectivamente, lo que indica que estos hidrógenos (H-2' y H-6'; H-3' y H-5') son magnéticamente equivalentes; de igual forma se observa que no existe ninguna influencia del sustituyente (C-1') sobre los carbonos meta (C-3' y 5') [los cuales presentan su desplazamiento en 120±0.5 ppm], mientras que los carbonos 2' y 6' se ven ligeramente protegidos por el efecto γ que desarrolla el sustituyente en dicha posición, situación similar es observada en el C-4 (68).

Por otro lado se observa en 78.971 ppm una señal doble que en el espectro de RMN-¹³C[DEPT, espectro 6], que indica que se trata de un grupo metino, que por su desplazamiento químico y multiplicidad corresponde al C-2⁸, mientras que el C-3 (t, CH₂), aparece en 43.288 ppm. El desplazamiento químico del C-3 se ve ligeramente afectado (protección de 1-2 ppm) en las 5-hidroxi flavanona, lo cual queda de manifiesto al comparar el desplazamiento químico de las 5-metoxi, 5-acetoxi flavanonas o de flavanonas no sustituidas en la posición 5.

Las señales restantes se pueden asignar en función de la conectividad del fragmento A. El desplazamiento químico del C-4 queda determinado por el tipo de hibridación de

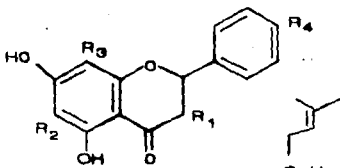
FRAGMENTO A



⁸ SE HA REPORTADO QUE EL DESPLAZAMIENTO QUÍMICO DEL CARBONO 2 ESTÁ DETERMINADO POR LA SUSTITUCIÓN DE LOS C-2' Y C-6'. EN FLAVANONAS NO SUSTITUIDAS EL DESPLAZAMIENTO QUÍMICO DEL C-2 APARECE EN 79±1.5, MIENTRAS QUE EN FLAVANONAS 2' O 6' OXIHIDROXILADAS Y 2',6'-DIOXIHIDROXILADAS, EL δ C-2 OSCILA APROXIMADAMENTE EN 75.4±1.6 PPM. TAMBIÉN EN LA LITERATURA SE HA IMPUTADO EL δ QUÍMICO DEL C-2 EN LOS SIGUIENTES COMPUESTOS.

C-2	COMPUESTO	δ δ
79.9	7-metoxiflavanona	--
75.1	7,2'-dimetoxiflavanona	4.6
75.1	7-metoxi-2'-acetoxiflavanona	4.6
74.9	7-metoxi-2'-hidroxiflavanona	

TABLE V. Desplazamientos de C-13 para los compuestos [90], [91], [92] y [74].

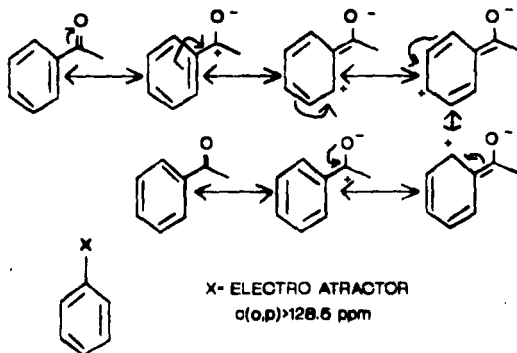
				
	[90]	[91]	[92]	[74]
R ₁	H	H	H	H
R ₂	H	H	H	H
R ₃	H	H	C ₆ H ₅	C ₆ H ₅
R ₄	H	OH	C ₆ H ₅	H
				C ₆ H ₅
ATOMOS DE C	[90]	[91]	[92]	[74]
2	87.4	78.4	78.57	78.971
3	42.2	42.0	43.13	43.288
4	195.8	196.2	196.79	196.225
5	100.6	163.6	156.19	159.619
6	98.1	95.9	107.41	98.824
7	166.6	166.7	157.89	163.766
8	95.1	95.0	106.65	106.260
9	162.7	162.9	159.35	162.233
10	101.9	101.8	102.88	103.712
1'	138.0	128.9	130.82	138.682
2'	126.5	128.2	127.66	125.932
3'	128.5	115.2	115.61	128.668
4'	128.5	157.8	162.49	128.668
5'	128.5	115.2	115.61	128.668
6'	126.5	128.2	127.66	125.932

[92] C-1ⁿ, C-1^{n'}, 25.76; C-2ⁿ, C-2^{n'}, 121.77, 122; C-3ⁿ, C-3^{n'}, 133.80, 136.56; C-4ⁿ, C-4^{n'}, 17.80, 17.85, 21.33, 21.93.

[74] C-1ⁿ 21.976; C-2ⁿ 121.568; C-3ⁿ 134.919, C-4ⁿ y C-5ⁿ 25.799 y 17.822.

éste, de acuerdo a las formas canónicas representadas en la figura 8 y con el desplazamiento químico reportado para cetonas aromáticas (69).

Figura 8.



El desplazamiento químico que exhibe el C-4 en las flavanonas se ve afectado por la ausencia o presencia de un sustituyente *peri* en las posiciones C-5. En el caso de las flavanonas no sustituidas en el C-5 muestran un desplazamiento químico entre 189.7-191.7.

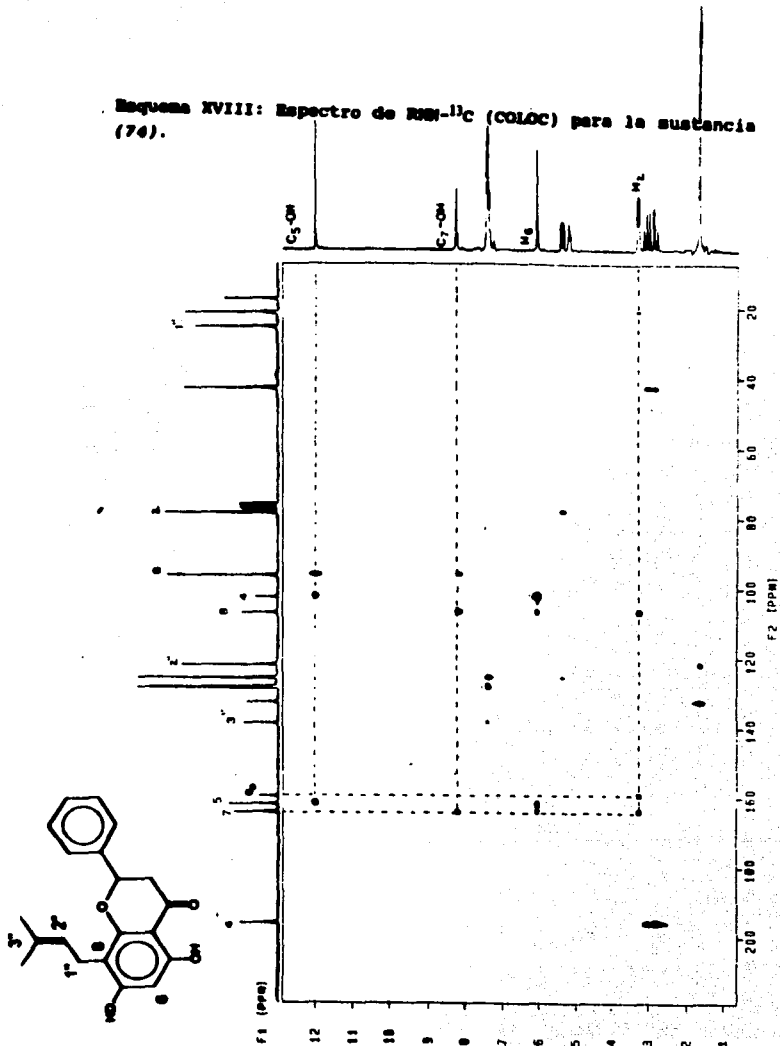
Sin embargo, en flavanonas hidroxiladas en la posición 5, el C-4 presenta una desprotección bastante apreciable debido a la formación del quelato (enlace de hidrógeno intramolecular) con el ión hidroxilo de la posición C-5.

Lo anterior se confirma por los datos de RMN-13C reportados para el C-4 en las 5-metoxi y 5-acetoxiflavanonas, las cuales presentan desplazamiento químicos iguales a las flavanonas no

Los 6 carbonos del anillo A muestran señales bien determinadas; ya que se observa una señal a campo bajo que corresponde al C-7 (163.766) debido a la presencia del grupo carbonilo (C-4) en posición para, mientras que los C-6 y C-8 sufren un efecto de protección ejercido por el grupo hidroxilo del C-5, que se ubica en posición orto y para con respecto a cada átomo de carbono. Wagner et.al. (67) reportan el desplazamiento químico de los carbonos de la pinocembrina, destacando que el C-6 presenta un desplazamiento químico menor que el del C-8 y que las señales correspondientes a los carbonos oxiarilos C-5, C-7 y C-9, aparecen entre 162.9 y 166.7 ppm, siendo la señal a campo bajo lo que corresponde al C-7, mientras que el C-9 aparece más protegido ($\approx 162 \pm 0.1$) como en el caso de la naringenina.

La confirmación del grupo prenilo en la posición 8 del esqueleto de la flavanona en la sustancia aislada de *Esenbeckia berlandieri ssp acapulcensis* se logró mediante el espectro de RMN- ^{13}C realizando el experimento denominado COLOC (Correlation via long-range coupling); que se presenta en el esquema XVIII, donde se muestra la correlación vía un acoplamiento a tres enlaces de los H-2" con el C-7 y C-9; también se observa una correlación vía un acoplamiento a dos enlaces entre H-6 con C-7 y C-5, y a un enlace entre C₃-OH y C-5. De acuerdo a lo anterior, se concluye que la sustancia aislada es la 5,7-dihidroxi-8-(3",3"-dimetilalil)-flavanona [74].

Esquema XVIII: Espectro de RMN- ^{13}C (COLOC) para la sustancia (7a).



Obtención del compuesto 5-hidroxi-6',6'-dimetil-4',5'-dihidropirano (2',3',7,8) flavanona [75].

El tratamiento de la 5,7-dihidroxi-8-(3",3"-dimetilalil) flavanona [74] con ácido p-toluensulfónico, como se ilustra en el esquema XVI, permitió la obtención del compuesto [75], que muestra un ión molecular m/z 324 y en su espectro de RMN-¹H (espectro 2), se observan las señales características del esqueleto de la flavanona, además de una señal en 2.608 ppm (t, $J=7$ Hz, 2H) que se asigna a los hidrógenos bencílicos del CH₂-4" y una señal doble de triplete en 1.7643 ppm (dt, $J=7$ y 2 Hz) que integra para 2 hidrógenos y que corresponde al grupo metileno del C-5", por último 2 señales simples que integran para 3 hidrógenos cada uno fue asignada a los grupos metilos del C-6" y cuyos desplazamientos se encuentran en 1.256 y 1.258 ppm.

Como ya se indicó anteriormente, la existencia del grupo prenilo en la familia Rutaceae es un rasgo distintivo de la misma, ya que permite la formación de anillos de 5 y 6 miembros en cumarinas (63), rotenoides (65) y cromenos (51).

Obtención de la 5-hidroxi-6',6'-dimetil-pirano-(2',3',7,8)-flavona [76].

En un matraz balón de 50 ml se hicieron reaccionar 97.8 mg de la 5,7-dihidroxi-8-(3",3"-dimetilalil)-flavanona [74], disueltos en 30 ml de benceno seco con 74.3 mg de DDQ, en un sistema a reflujo durante un tiempo aproximado de 5.5 horas.

Las diferencias en cuanto al producto de reacción obtenido, se establecieron con base en el espectro de RMN-¹H; el cual presenta una señal en 6.554 ppm en forma de doblete, que integra para un hidrógeno y que se asigna al C-4", en 5.479 ppm aparece

un doblete que integra para 1 hidrógeno y que corresponde al CH-5"; finalmente en 1.4313 y 1.4517 ppm se observan dos singuletes que integran para 3 H y son asignados a los metilos unidos al C-6".

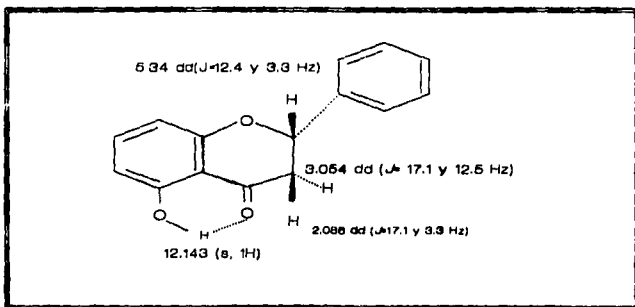
El resto de los datos espectroscópicos corresponden a las señales características del esqueleto de una flavanona.

De la recromatografía de las fracciones 168-201, se obtuvieron 28.4 mg de un residuo de consistencia aceitosa en las fracciones 124-157 [obtenidas de la elución con una mezcla hexano: acetato de etilo (9:1)], que fue sometido a una reacción de metilación con $\text{CH}_3\text{N}_2/\text{éter}$ etílico previamente disueltos en etanol absoluto a temperatura baja. Después de concluida la reacción se procedió a purificar el producto de reacción por cromatografía en capa fina preparativa, de donde se aislaron 17.4 mg de un sólido de pf 161-162 °C, con peso molecular 354 g/mol; al que le corresponde una fórmula $\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{O}_5$ con 11 grados de insaturación.

Este producto fue caracterizado e identificado como la 5, 4'-dihidroxi-7-metoxi-8-(3",3"-dimetilalil)-flavanona [78]. A partir de sus datos espectroscópicos, quienes sugieren en su espectro de IR (espectro 13), la presencia de un grupo carbonilo en 1633.07 cm^{-1} , observándose una disminución en el número de onda y por un aumento en el carácter de enlace simple del grupo carbonilo, debido a la formación de puentes de hidrógeno; la banda de 3599.47 cm^{-1} corresponde a los grupos hidroxilo, mientras que las señales en 3000.99 y 1583.30 cm^{-1} corresponden a las vibraciones $\text{Csp}^2\text{-H}$ y $\text{Csp}^2\text{-Csp}^2$.

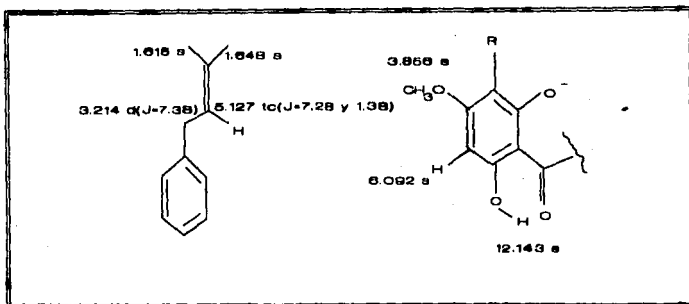
En su espectro de RMN-¹H (espectro 14), muestra las señales correspondientes a los hidrógenos que forman parte del esqueleto de una 5-hidroxi-flavanona, como se ilustra en el esquema XIX.

Esquema XIX. Señales características que evidencian proponer como esqueleto base al de una flavanona.



Además se observan dos señales simples una en 63.856 que corresponde al metilo del fragmento fenil-metil éter ubicado en el C-7 y en 6.092 ppm atribuible al hidrógeno aromático de la posición 6. También se observan las señales correspondientes al grupo prenilo, como se muestra en la figura (9), que permiten concluir que los anillos A y C presentan un patrón de sustitución similar a las flavanonas ya descritas anteriormente.

Figura 9. Sustituyentes adicionales presentes en el esqueleto de la 5-hidroxi flavanona.



Cabe señalar que los acoplamientos ya descritos se apoyan en el espectro COSY de dicha sustancia, el cual se ilustra en el esquema XX, donde además se pueden observar dos señales dobles que por su desplazamiento químico corresponde a los hidrógenos presentes en el anillo aromático de la flavanona, su integral sugiere que se trata de un anillo disustituido en las posiciones 1' y 4'; los desplazamientos químicos de los hidrógenos 2', 6' y 3',5' aparecen en 7.334 ppm ($J=9$ Hz) y 6.876 ppm ($J=9$ Hz) respectivamente.

Esta propuesta estructural se ve apoyada por sus datos de RMN- ^{13}C (Tabla VI), de donde se puede observar que el C-4' aparece en 155.818 ppm, ejerciendo un efecto de protección sobre los carbonos 3' y 5' debido a sus efectos electrónicos que presentan cuando se encuentran directamente unido a un anillo aromático, lo cual queda probado al comparar su desplazamiento químico con los que se observan, si el sustituyente es hidrógeno o el grupo metoxilo (tabla VII)

TABLA VI. Datos de RMN-¹³C de la 5,4'-dihidroxi-7-metoxi-8-(3'',3''-dimetilelil)-flavonona [78].

	ppm
C-2	78.415
C-3	43.235
C-4	106.503
C-6	162.522
C-8	92.406
C-7	165.720
C-8	106.982
C-9	102.924
C-10	155.818
C-1'	131.001
C-2'	127.849
C-3'	115.818
C-4'	155.818
C-5'	155.440
C-6'	127.849
C-1''	21.618
C-2''	122.329
C-3''	131.308
C-4''	17.709
C-5''	25.829
PhOCH ₃	56.098

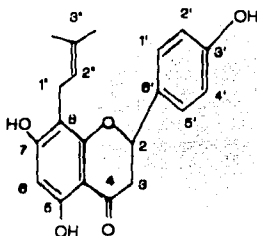


TABLA VII. Desplazamientos químicos de ¹³C para el anillo B de la flavanona monosustituída.

	C-3' Y 5'	C-2' Y 6'
C4-OH	115.440	127.649
C4-OMe	114.081	127.470
C4-H	128.700	128.520

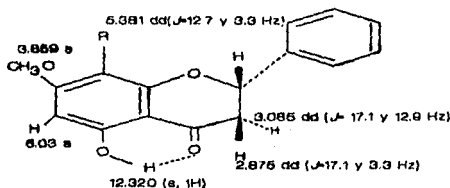
De las fracciones 216 - 255, obtenidas al eluir la columna original con una mezcla de n-hexano:acetato de etilo (85:15) y después de la recromatografía de dichas fracciones, se obtuvieron 280.9 mg [fracción (192)] de un residuo aceitoso; de donde se tomo una alicuota de 89 mg que fueron disueltos en 5 ml de etanol absoluto, para posteriormente agregar CH_2N_2 en éter etílico lentamente a baja temperatura (0 a -5°C).

Una vez que se dio por concluida la reacción se procedió a la purificación de la sustancia de interés, que al revelar con FeCl_3 (1%) en etanol presentaba una coloración café en cromatografía en capa preparativa; de donde se lograron separar 23.4 mg de una sustancia de consistencia aceitosa de color amarillo, la que fue caracterizada e identificada por medio de sus constantes espectroscópicas y espectrométricas.

En su espectro de masas por impacto electrónico se observa el pico base en 370 uma , que puede corresponder al fragmento originado por la pérdida de una molécula de agua.

Además su espectro de RMN^{-1}H , muestra las señales correspondientes al esqueleto de una flavanona 5,4'-dihidroxi-7-metoxiflavanona, como se puede observar en el esquema XXI, donde se indican los desplazamientos químicos de los hidrógenos que forman parte del esqueleto de una flavanona. Lo anterior permitió proponer una fórmula molecular $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{O}_7$, a la cual le corresponde 10 grados de insaturación.

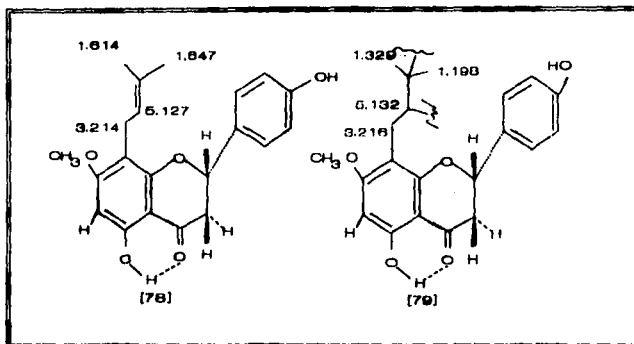
ESQUEMA XXI. Señales correspondientes al esqueleto de una flavanona 5,4'-dihidroxi-7-metoxi flavanona.



El patrón de sustitución del anillo B, fue determinado por las señales dobles que conforman un sistema AB y que aparecen en 67.374 δ ($J=9$ Hz, 2H) y 66.941 δ ($J=9$ Hz, 2H) que corresponden a los hidrógenos de las posiciones 2',6' y 3',5'.

Por otro lado, se observa una señal múltiple que integra para 2 hidrógenos entre 3.086 y 2.986 ppm, además una señal doble de doble (dd), que integra para un hidrógeno en 64.699 ($J=10.2$ y 2.7 Hz), dicha señal muestra una multiplicidad diferente y un desplazamiento a campo alto en aproximadamente 60.448 ppm, con respecto a las flavanonas preniladas ya descritas. Asimismo se observa un efecto de protección sobre los grupos metilos ubicados en el C-3^o, al comparar su desplazamiento químico mostrado en la 5,4'-dihidroxi-7-metoxi-8-(3^o,3^o-dimetilalil)-flavanona [78], tal como se ilustra en el esquema XXII.

ESQUEMA XXII. Desplazamientos químicos de los grupos metilo en las prenilflavononas, aisladas de *Esenbeckia berlandieri ssp acapulcensis*.



Lo anterior sugiere la presencia de dos grupos hidroxilo unido en los C-2" y C-3" que indica que la sustancia aislada de *Esenbeckia berlandieri ssp acapulcensis* corresponde al compuesto dihidroxilado, lo cual tiene implicaciones biogénicas importantes en la biosíntesis de los hemiterpenos aromáticos, por lo que se concluye que la sustancia aislada es la flavanona dihidroxilada en las posiciones 2" y 3", caracterizada como 5, 4' - dihidroxi - 7- metoxi - 8 - (2' ,3" - dihidroxi - 3",3"-dimetilpropil)-flavanona [79] con un peso molecular de 391 g/mol y fórmula C₂₁H₂₄O₇.

CONCLUSIONES

A partir de las fracciones obtenidas de la elución de la columna principal del extracto etanólico, se logró el aislamiento, purificación y caracterización de los siguientes compuestos:

1. De las fracciones 55-58 y de la recromatografía de las aguas madres de las fracciones 57 - 58, se aislaron 261.7 mg del compuesto 5-hidroxi-7-metoxi-8-(3",3"-dimetilalil)-flavanona [73] con PM=338 g/mol y una fórmula $C_{21}H_{22}O_4$.

2. De los eluatos 114-120 se aislaron 7.0989 g del compuesto 5,7-dihidroxi-8-(3",3"-dimetilalil)-flavanona [74] $C_{20}H_{20}O_4$ y PM=324 g/mol.

3. De las fracciones 76-86 se obtuvo el compuesto 5,7-dihidroxi-8-(3",3"-dimetilalil)-flavanona [74], y por medio de una reacción de metilación se obtuvo el 5-hidroxi-8-(3",3"-dimetilalil)-flavanona [73] que ya se había aislado como producto natural.

4. De las fracciones 168-201 se obtuvo, mediante una reacción de metilación al compuesto caracterizado como 5,4'-dihidroxi-7-metoxi-8-(3",3"-dimetilalil)-flavanona [78].

5. El compuesto 5,4'-dihidroxi-7-metoxi-8-(2",3"-dihidroxi-3",3"-dimetilpropil)-flavanona [79] $C_{21}H_{24}O_7$ PM=391 g/mol se extrajo de las fracciones 216-255.

El grupo prenilo dentro de la estructura de la flavanona, fue ubicado en la posición C-8, esto se logró principalmente por la obtención de dos derivados de reacción realizadas en el compuesto 5,7-dihidroxi-8-(3",3"-dimetilalil)-flavanona [74]:

1. Con ácido p-toluensulfónico se realizó una ciclización para obtener el primer derivado, caracterizado como 5-hidroxi-(6",6"-dimetil)-4,5-dihidropirano-(2",3",7,8)-flavanona [75].

2. Con DDQ se obtuvo el segundo derivado: 5-hidroxi-6",6"-
dimetil-pirano-(2",3",7,8)-flavanona [76].

Los compuestos obtenidos no se han aislado de alguna otra
planta del género *Esenbeckia*, únicamente se han obtenido
flavonoides de la especie *pumila* (Cuadro I).

CUADRO 1.- Metabólitos Secundarios aislados de diferentes especies de *Eschbeckia*.

TIPO DE COMPUESTO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
ESPECIE VEGETAL													
<i>E. febrifuga</i>	⊗								⊗				
<i>E. hartmanii</i>	⊗								⊗				
<i>E. Maralis</i>	⊗	⊗				⊗			⊗				
<i>E. berlandieri</i>						⊗			⊗				
<i>E. flava</i>	⊗	⊗							⊗				
<i>E. pilocarpoides</i>	⊗	⊗											
<i>E. nesiotica</i>							⊗			⊗	⊗		
<i>E. pumila</i>								⊗					
<i>E. acapulconsis</i>								⊗			⊗		
<i>E. balizensis</i>	⊗									⊗	⊗		
<i>E. leiocarpe</i>	⊗		⊗	⊗	⊗						⊗	⊗	⊗

- 1) ALCALOIDES FUROQUINOLINICOS
- 2) ALCALOIDES DERIVADOS DE LA ACRIDONA
- 3) ALCALOIDES QUINOLINICOS
- 4) ALCALOIDES INDOLICOS
- 5) CUMARINAS
- 6) FURANOCUMARINAS

- 8) FLAVONOIDES
- 9) LIRONOIDES
- 10) POLIPRENOS
- 11) TRITERPENOS
- 12) LIGNANOS
- 13) AMIDAS

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Crabbé, P. Pasado y futuro de la Ciencia Mexicana : Punto de vista de un extranjero, *Ciencia (México)* 11, 73 (1981).
- 2.- Williams, D.H., Stone, M.J., Hank, P.R. and Rahman, S.K. Why are secondary metabolites (Natural Products) Biosynthesized?. *J. Nat. Prod.* 52, 1189 (1989).
- 3.- Sarukhán, J. *Ciencia Cultura y Sociedad en México*. *Ciencia (México)* 11, 5 (1981).
- 4.- Ming N.G., K.; Pui-Nay, B.P., Gray, A.I., Hartley, T.G., Kong, Yung-cheung and Waterman, P.G. The biochemical systematics of *Tetradium*, *Buodia* and *Melicope* and their significance in the Rutaceae. *Biochemical Systematics and Ecology* 15 587-593 (1987).
- 5.- Waterman, P.G. and Khalid, S.A. The Biochemical Systematics of *Fagaropsis amplexensis* and its significance in the Rutaceae. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2 45 - 51 (1981).
- 6.- Dagne E., Yenesew, A., Waterman, P.G. and Gray, A. I. The chemical Systematics of the Rutaceae, subfamily *Toddalidaceae* in Africa. *Biochemical Systematics and Ecology* 16, 179-188 (1988).
- 7.- Arrada, M.S.P., Fernandes, J.B., Vicira, P.C., Fatima Das G.F. De Silva, M. and Perami, J.R. Chemistry of *Santhorylus rhoifolius*: a new serofuroquinoline alkaloid. *Biochemical Systematics and Ecology* 20 173-178 (1993).
- 8.- Gros, E. G., Pomillo B. A., Seldes A. M. et.al. Introducción al Estudio de los Productos Naturales. Buenos Aires, 1 (1985).
- 9.- Paredes, L. O. La Biotecnología de Plantas: Una Herramienta Estratégica en los Programas Agroalimentarios de México. *Ciencia y Desarrollo* [68], 27 (1986).
- 10.- Hegnauer, R. *Chemotaxonomie der Pflanzen*. Vol 7 Ed. Birkhausen Verlag Basii. London, 174 (1973).

- 11.- Kasstra, R.C. New taxa and combinations in Rutaceae., *Acta Bot. Neerl.* 26, 471 (1977).
- 12.- Clara H. Ramos. Comunicación Personal; Centro de Ecología de la U.N.A.M.
- 13.- Rzedowski, J. *Vegetación de México*. Ed. Limusa, México. (1983).
- 14.- Gómez - Pompa A. *Ecología del Estado de Veracruz*, Ed. Continental, México. (1978).
- 15.- Rios, M.Y and Delgado, G. Polyprenols and Acylphloroglucinols from *Esenbeckia nesiota*. *Phytochemistry* 21 3491 - 3494 (1992).
- 16.- Dreyer, D. L. Alkaloids, limonoids and furocoumarins from three mexican *Esenbeckia* species. *Phytochemistry* 12, 941 - 944 (1980).
- 17.- Vitagliano, J. C. and Comin, J., *Anales Asoc. Quim. Argentina* 58, 59(1970).
- 18.- Vitagliano, J. C. and Comin, J., *Anales Asoc. Quim. Argentina* 58, 273(1970).
- 19.- Dreyer, D. L. Distribution of limonoids in the Rutaceae, *Phytochemistry* 11, 705-713 (1972).
- 20.- Delgado, G. *Phytochemistry en prensa*.
- 21.- Delle Monache, F. Delle Monache, G., De Moraes E Souza, W. A. et.al., Isopentenylindole Derivates and other Components of *Esenbeckia leiocarpa*, *Gazz. Chim. Ital.* 119, 435 (1989).

- 22.- Delle Monache, F. Di Benedetto, R., de Moraes E Souza, M. A., *Esenbeckia leiocarpa*: II. Further Components, *Gazz. Chim. Ital.* **120**, 387-389 (1990).
- 23.- Kubo, I. Recent Applications of counter - current chromatography to the Isolation of Biocative Natural Products. *J. of Chromatography* **538**, 188 (1991).
- 24.- Paulini, H., Weibel R. and Schimmer, O. Mutagenicity and structure-mutagenicity relationships of furoquinolines, naturally occurring alkaloids of the Rutaceae. *Mutation Res.*, **222** 179-186 (1989).
- 25.- Yang, M-S, Wu, T-S, Wang, G.H. Citracidone-I. A new antiparasitic from Root bark of *Citrus depressa*. *Planta Medica* **143** - 147 (1987).
- 26.- Gerson, K., Suoboda, G. H. 1983. Acridone alkaloids: Experimental antitumor activity of Acronycine in the Alkaloids. (A. Brossi, ed.). vol **21**, Academic Press, New York, 1-28.
- 27.- Arisawa, M., Pesutto, J.N. Bevelle, C., Cordell, G.A.; Potential anticancer agents XXXI. N-dimethylation of fagorine. *J. Nat. Prod.* **42** 453 - 458 (1984).
- 28.- McPhail, A.T., Ju-ichi, M., Fujitani, Y., Onoue, M. Wu, T-S, Furukawa, H. 1985 Isolation and structure of citropone A and B from citrus plants, first examples of naturally occurring homocridone alkaloids containing a tropone ring system. *Tet. Letters.* **26** 3271-72 (1985).
- 29.- Michael, J.P. Linaline, Linaloline and acridone alkaloids. *Nat Prod. Reports* **2** 25-35 (1992).
- 30.- Champagne, D.E., Koul, O., Issan, M.B. Saidler, G.G.E., Towers, G.H.N. Biological activity of limonoids from the Rutaceae. *Phytochemistry* **21** 377-394 (1992).

- 31.- Berenbaum, M.R. 1991. Coumarins in: Herbivores their interaction with secondary plant metabolites. (G.A. Rosenthal, M.R.Berenbaum, eds). 2a ed., Vol I. Academic Press, N. York 241-249.
- 32.- Biyit, L., Pesando, D., Puisieux-Dao, S., Antimicrobial Activity of Two Flavanones Isolated From the Cameroonian Plant *Erythrina Sigmoides*. *Planta Medica*. 126 (1988).
- 33.- Sertié, J. A. A. Anti-inflammatory Activity and Sub-acute Toxicity of Artemisin. *Planta Medica*. 56, 36 (1990).
- 34.- Schuessler M., Fricke U., Hölzl J. Effects of Flavonoids From *Crataegus* Species in Langendorff Perfused Isolated Guinea Pig Hearts. *Planta Medica*. 58 Suppl Issue 1, 646(1992).
- 35.- Hoffman-Bohin K., Lotter H., Seligmann O. Antihepatotoxic C-Glycosylflavones from the Leaves of *Allophylus edulis* var *obtusis* and *Gracilis*. *Planta Medica*. 58, 544 (1992).
- 36.- Nishina C., Nobuyasu E., Shinkichi T. et.al. Antibacterial Activity of Flavonoids Against *Staphylococcus Epidermis*, a Skin Bacterium. *Agric. Biol. Chem.* 51, 139 (1987). *Chem. Abs.* 106, 382 (1987).
- 37.- Mii C. S., Howell S. L. Effects of Flavonoids on Insulin Secretion and Calcium-45 ion Handling in Rat Islets of Langerhans. *J. Endocrinol.* 102, 1 (1985).
- 38.- Brantner A., Brantner H. Screening of Flavonoid Aglycones and Glycosides for Antimicrobial Activity. *Planta Medica*, 57, Suppl Issue 2 43 (1991).
- 39.- Wang Y.; Hamburger M. Hostettman K., Antimicrobial Flavonoids From *Psidium Trimarvium* and Their Methylated and Acetylated Derivates. *Phytochemistry* 28, 2323 (1989).

- 40.- Waage S.K.; Hedin P.A. **Biologically-active Flavonoids From *Gossypium arboreum***. *Phytochemistry* **23**, 2509 (1984).
- 41.- Mol, J.N.M.; Robbins, M.P. Dixon, R.A. and Veltkamp, E. **Spontaneous and enzymatic rearrangement of naringina chalcone to flavanone**. *Phytochemistry* **24** 2267 (1985).
- 42.- Halbrock, K.; Zilg, H. and Grisebach, H. **Stereochemistry of the enzymatic cyclisation of 4,2',4'-trihydroxychalcone to 7,4'-dihydroxyflavanone by isomerases from mung bean seedlings**. *Eur. J. Biochem.* **15** 13 (1970).
- 43.- Coll, J.C. and Bowdu, B.F. **The application of vacuum liquid chromatography to the separation of terpene mixtures**. *J. Nat. Prod.* **42**, 934-936 (1986).
- 44.- Targett, N.W; Kilcoyne; J.p. and Green B. **Vacuum liquid chromatography: An Alternative to common chromatographic methods**. *J. Org. Chem.* **44**, 4962 - 4964 (1971).
- 45.- Clark Still W; Kahn M. and Mitra A. **Rapid chromatography technique for preparative separations with moderate resolution**. *J. Org. Chem.* **41**, 2923 - 2925 (1978).
- 46.- Pelletire S. W.; Chokshi H.P., and Desai H.K. **Separation of diterpenoid alkaloid mixtures using vacuum liquid chromatography**. *J. Nat. Prod.* **42**, 892 - 900 (1986).
- 47.- Cardillo, G., Cricchio, R. and Merlini, L. **Synthesis of d,L-cannabichromene Franklinone and other natural chromenes**. *Tetrahedron* **24** 4825 - 4831 (1968).
- 48.- Jain, A.C., Gupta, R.C. and Sarpal, P.D. **Synthesys of (±) lupinifolin, di-o-methyl xanthohumol and iso-xanthohumol and related compounds**. *Tetrahedron* 3563 - 3567 (1978).

- 49.- Bohlmann, F., Zdero, Ch., Abraham, W.R., Suwita, A. and Grenz, M. Neue diterpene and neue dihydrochalkon. Derivate sowie weitere inhaltsstoffe aus *Helichrysum* - arten. *Phytochemistry* **19** 873-879 (1980).
- 50.- Jayaraman, J.; Ghania, A. and Khan, H.A. A new prenylated flavanone from *Tephrosia villosa*. *Phytochemistry* **19**, 1267 - 1268 (1980).
- 51.- Markham, K.R. and Mabry, T.J. A procedure for ultraviolet spectral detection of ortho-dihydroxyl groups in the flavonoids. *Phytochemistry* **7**, 1197 (1968).
- 52.- Voirin, B. UV spectral differentiation of 5-hydroxy and 5-hydroxy-3-methoxy flavones with mono (4''), di(3',4'') o tri (3',4'5') substituted B rings. *Phytochemistry* **22**, 2103 (1987).
- 53.- Roussis, V., Ampofo, S.A., and Wiemer, D.F. Flavanones from *Linchocarpus minimiflorus*. *Phytochemistry* **26**, 2371 - 2375 (1987).
- 54.- Komatsu, M.; Yokoe, I. and Shirataki, Y. Studies on the constituents of *Sophora* species. XIII constituents of the aerial parts of *Sophora tomentosa* L.; *Chem. Pharm. Bull.* **26**, 3863 - 70 (1978).
- 55.- Shirataki, Y. Endo, M. Yokoe, I. and Komatsu, M. Studies on the constituents of *Sophora* species XVIII. Constituents of the root of *Sophora tomentosa* L.; *Chem. Pharm. Bull.* **31**, 2859 - 2863 (1983).
- 56.- Bohlmann, F. and Zdero, Ch. Flavanones from *Helichrysum thapson*. *Phytochemistry* **22**, 2877 - 2878 (1983).
- 57.- Mitchenr, L.A., Raghav Rao, G.S., Khanna, I., Veysogw, T., and Drake, S. Antimicrobial agents from higher plants: Prenylated flavonoids and other phenols from *Glycyrrhiza lepidota*. *Phytochemistry*, **22**, 573 - 576 (1983).

- 58.- Bohlman, F. Zdero, Ch., Robinson, H. and King, R.M. A diterpene a sesquiterpene quinone and flavanones from *Nyctias helenioides*. *Phytochemistry* **20** 2245 - 2248 (1981).
- 59.- Bohlmann, F. and Hoffmann, E. Cannabigerol - Ähnliche Verbindungen aus *Helichrysum umbraculigerum*. *Phytochemistry* **18**, 1371- 1374 (1979).
- 60.- Mahmound, E.M. and Waterman, P.G. Minimiflorin: A new 2'-hydroxi flavanone from *Lochocarpus minimiflorus* seed. *J. Nat. Prod.* **48** 648 - 650 (1985).
- 61.- Grimshaw, J. and Zarawska, E.L. An isopentenylflavanone from *Evodia rutescarpa*. *Phytochemistry* **14** 838-39 (1975).
- 62.- Gray, A.I. and Waterman, P.G. Coumarins in the Rutaceae. *Phytochemistry* **17** 845-64 (1978).
- 63.- Waterman, P.G. Phytochemical diversity in the order Rutales. *Phytochemical Potential of tropical plants. Plenum Press. N. York* 203 - 233 (1993).
- 64.- Yakushijin, K., Shibayama, K., Murata, H. and Furukawa, H. New prenylflavanones from *Normandia nymphaeifolia*. *Heterocycles* **14** 397-401 (1980).
- 65.- Smalberger, T.M., Vleggaar, R., and Neber, J.C. Flavonoids from *Tephrosia* - VII. *Tetrahedron* **10**, 3927 (1974).
- 66.- Komura, H., Mizukawa, K., Minakata, H. Huang, G. *Chem. Pharm Bull.* **31** 4206 (1983).
- 67.- Wagner, H., Mahan, Ch.V. and Sonnenbichler, J. ¹³C-NMR Spektren Natürlich vorkommender flavonoids. *Tetrahedron letters* 1799 (1976).

68.- Breitmaier, E. and Voelter, W. Carbon-13 NMR spectroscopy.
3a ed. Federal Republic of Germany (1987) 110-118.