



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

69
7

FLAVONOIDES CON ACTIVIDAD BIOLÓGICA
AISLADOS DE *Prunus serotina* ssp. *capuli*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLÓGICA
P R E S E N T A
ADRIANA LOPEZ FERNANDEZ



MEXICO, D. F.

1996

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado asignado:


Presidente	Profesor Rafael Castillo Bocanegra
1er. vocal	Profesora María Isabel Aguilar Laurents
Secretario	Profesor José Serafín Calderón Pardo
1er. suplente	Profesor Baldomero Rodríguez Esquivel
2o. suplente	Profesor Gustavo Guevara Soto

Esta tesis se desarrolló en el **Laboratorio-7 (UIPM)** del
Instituto de Química de la
Universidad Nacional Autónoma de México

Director de Tesis


Dr. José Serafín Calderón Pardo

Sustentante


Adriana López Fernández

El presente trabajo se realizó en el Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. José S. Calderón Pardo, con una ayuda económica otorgada por el Sistema Nacional de Investigadores.

DEDICATORIAS

A mis padres : Por su cariño , apoyo y comprensión a lo largo de mi vida.

A mis hermanos: Paco, Mau, Paty, Pila , Chela y Anita,

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. José S. Calderón Pardo, por su infinita paciencia y tiempo dedicado en la realización del presente trabajo.

A mis asesores , el Dr. Rafael Castillo Bocanegra y a la maestra María Isabel Aguilar Laurents por su valiosa ayuda en la revisión de la tesis.

Con admiración y respeto al Dr. Leovogildo Quijano por su paciencia y por sus valiosos comentarios.

Al profesor Rafael Rión Arriola por sus sugerencias en la realización de la tesis.

A todas las personas que han confiado en mi a lo largo de mi vida académica.

AGRADECIMIENTOS

A mi mamá: Por ser la persona que ha estado conmigo en todo momento, con la que siempre he contado. Y sobre todo por ser mi amiga.

A mi hermana Paty : por ser mi mejor apoyo en los momentos difíciles.

A mis amigas : Gloria, Josefina , Guadalupe y Rosaura, por brindarme su amistad a lo largo de la carrera , y por compartir tanto tristezas como alegrías.

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

MeOH	Metanol
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
DMSO- <i>d</i> 6	Dimetilsulfóxido deuterado
Ac ₂ O	Anhídrido acético
AcOEt	Acetato de etilo
CH ₂ Cl ₂	Cloruro de metileno
DMSO	Dimetil sulfóxido
c.c.f	Cromatografía en capa fina
P.f	Punto de fusión
IR	Infrarrojo
RMN ¹ H	Resonancia magnética de hidrógeno
RMN ¹³ C	Resonancia magnética de carbono trece
E.M.	Espectrometría de masas
v máx	Frecuencia de onda máxima
J	Constante de acoplamiento
Hz	Hertz
p.p.m	Partes por millón
δ	Desplazamiento químico
d	Señal doble
dd	Señal doble de doble
s	Señal simple
m	Señal múltiple
V	Voltios
m/z	Masa/ carga
M ⁺	Ión molecular
μg	Microgramo
mg	Miligramo

INDICE

INTRODUCCION	1
OBJETIVOS	3
GENERALIDADES	4
PARTE TEORICA	34
PARTE EXPERIMENTAL	46
CONCLUSIONES	60
BIBLIOGRAFIA	61
ESPECTROS	65

INTRODUCCION

INTRODUCCION

Hasta el siglo XV las culturas del viejo mundo vivieron aisladas de las americanas, no obstante, los curanderos utilizaron muchas hierbas de manera semejante, tanto en el viejo como en el nuevo mundo.¹ Los químicos del siglo XIX aprovecharon ésta "convergencia herbolaria" para identificar las plantas de los cuales derivaron extractos para los primeros fármacos.¹

La medicina herbolaria en el mundo consta de cuatro tradiciones principales: la china, la ayurvédica (en la India), la europea (incluyendo Egipto), y la indígena americana. Nos referiremos a esta última, en especial, a la medicina herbolaria de nuestro país. La medicina tradicional mexicana es una importante manifestación cultural, característica de la vida del país. Sus prácticas y recursos, profundamente arraigados en la sociedad, son un aporte más a la configuración pluricultural de México.²

Herederas de una larga tradición prehispánica, las culturas indígenas de México han preservado y difundido formas y procedimientos eficaces para resolver importantes problemas de salud de la población. Las plantas medicinales son el recurso terapéutico por excelencia de la medicina tradicional mexicana.²

INTRODUCCION

La flora de nuestro país, aunque no totalmente conocida, se estima entre 15 000 y 30 000 especies de las 250,000-500,000, que los botánicos calculan que hay en el mundo.³

En la época contemporánea, a pesar de que han pasado 200 años de que se inició la química de los productos naturales, con lo que la ciencia quiere explicar miles de años de práctica herbolaria, sólo se ha demostrado científicamente el valor terapéutico del 1% de las plantas medicinales.

A pesar de que el estudio de metabolitos secundarios en plantas medicinales actualmente alcanza un alto grado de desarrollo y perfeccionamiento, debido al avance de las técnicas espectroscópicas (IR, RMN¹H, RMN ¹³C, EM). Lo cual ha permitido identificarlos, mejorar los métodos de obtención y establecer la biosíntesis de los mismos.

Por lo anterior y basándonos en la medicina tradicional de nuestro país, decidimos realizar un estudio con la planta *Prunus serotina ssp. capuli* de uso medicinal muy antiguo como antidiarreico, antipalúdico, astringente, sedante cardíaco entre otras aplicaciones terapéuticas, las cuales están muy difundidas entre la población.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

- Contribuir con el estudio químico de la subfamilia **prunoideae**

- Contribuir al estudio farmacológico de la especie en estudio.

- Realizar un estudio fitoquímico biondirigido de la especie
Prunus serotina ssp capuli
 - Identificar y elucidar las estructuras de los
compuestos aislados mediante
Técnicas espectroscópicas (**IR, RMN¹H, ¹³C, EM.**)

GENERALIDADES

GENERALIDADES

La familia Rosáceae

Las Rosáceas abarcan un sorprendente número de plantas, consta de 115 géneros y 3000 especies, que crecen en la mayor parte del mundo, pero son más comunes en las regiones templadas de Asia, América del Norte y Europa.⁴ Esta familia está subdividida en seis diferentes subfamilias o tribus: Spiraeoideae, Prunoideae, Chrysobalanoideae, Neuradoideae, Rosoideae, y Pomoideae.⁴

Los géneros importantes de la familia son: Spiraeae, Quillaja, Cotoneaster, Cydonia, Pirus, Crataegus, Mespilus, Rubus (más de 50 especies), Fragaria, Potentilla (200 especies), Filipendula, Rosa (más de 100 especies) y Prunus (más de 150 especies). Son hierbas, arbustos, árboles de diferentes tamaños, generalmente de hojas esparcidas y estípuladas, característicos de clima templado.⁴

Tienen importancia económica, aparte de los fresales, frambuesos y zarzamoras, los numerosos árboles frutales que comprenden esta familia: manzanos, perales, almendros, cerezos y ciruelos. Algunas plantas medicinales de las Rosáceas son: *Quillaja saponaria*; *Filipendula Ulmaria* (Spiraeae); *Potentilla erecta* (Rhizoma tormentillaeae); *Prunus armeniaca* y *persica*; *Prunus amygdalus*; *Prunus spinosa* (flores); *Prunus cerasus*; *Prunus laurocerasus*.⁵

La tribu prunoideae

Consta de alrededor de 200 especies, de regiones frías y templadas del hemisferio norte y trópicos de Asia y América.⁶ La rama de la familia de las rosáceas que engloba los *prunus*, tiene componentes de características tan diversas, que generalmente esta dividida en varios subgéneros distintos. En este caso los cerezos, llevan el nombre genérico de *Cerasus*, los almendros *Amygdalus*, los ciruelos *Prunus*; los albaricoqueros *Armeniaca* y los cerezos de hoja de laurel *Laurocerasus*.⁷ La distribución de los flavonoides en la corteza y madera de estas plantas generalmente justifica esta división⁸ (Tabla 1).

La *Prunoideae*, tiene drupas típicas, y se caracteriza por tener un glucósido que produce ácido cianhídrico, localizado principalmente en las semillas⁵.

Características de la especie *Prunus serotina ssp. capuli*

Es un árbol de 12 m de altura, de corteza rojiza o café, sus hojas son anchas en la punta, de color verde lustrosas. Los frutos son redondos de color rojo o negros. Se encuentra en bosque tropical, caducifolio y subcaducifolio, bosque espinoso, bosque mesófilo, bosque de encino, bosque de pino.

En la República mexicana se distribuye en los estados de Baja California Sur, Coahuila, Colima, Chiapas, Chihuahua, Distrito Federal, Durango, Estado de México, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Morelos, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Queretaro, San Luis Potosí, Sonora, Tamaulipas, Tlaxcala, Veracruz y Zacatecas.⁹

Algunos de sus nombres populares son: capollín (Estado de México), capulín (Colima, Chihuahua, D.F., San Luis Potosí etc.), cerezo (Michoacán).

GENERALIDADES

El árbol de capulín, de vistosos frutos es una variedad de cerezo cuyo uso alimenticio se haya muy difundido en México desde épocas prehispánicas. Nuestros antepasados reconocieron diversas especies de este árbol frutal, que los españoles denominaron como "cerezos dulces de Indias" y cuyas propiedades medicinales son también muy antiguas.¹⁰ La corteza (infusión) era utilizada por los indígenas para el tratamiento de la disentería y el polvo para padecimientos de los ojos, inflamaciones y visiones borrosas.¹⁰

Cabe destacar que en ninguna de estas tres referencias [Martín de la Cruz (1552), Sahagún(1575), Francisco Hernández (1570)] sobre herbolaria indígena del siglo XVI se refiere al uso de las hojas o semillas, sólo se reconoce la utilidad medicinal de la corteza en forma de infusión o del zúmo o jugo aplicado tópicamente.¹⁰ A finales del siglo XIX, la Sociedad Mexicana de Historia Natural lo indica como antipalúdico. El Instituto Médico Nacional lo describe como antidiarréico y antipalúdico.¹¹

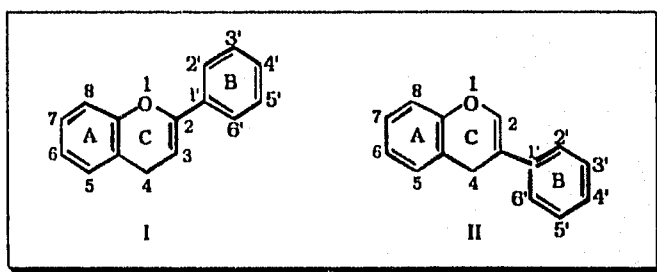
Para el siglo XX, Alfonso Herrera comenta que es sedativo y narcótico¹¹. Posteriormente Maximino Martínez (1934) reitera la información anterior sobre las propiedades antidiarréicas de la corteza de capulín bebida en infusión, además describe las siguientes aplicaciones terapéuticas: antidiséptico, antiespasmódico, antipalúdico, contra neumonía, refrescante.^{10, 12}

Prunus serotina ssp. capuli (McVaught) pertenece al género *Prunus* de la subfamilia *Prunoideae* (Rosáceas), este género se divide en cinco subgéneros distintos dado sus características tan diversas, esta división se apoya por la distribución de los **flavonoides**, por ello nos enfocaremos a algunas de sus propiedades.

Flavonoides

Se encuentran virtualmente en todas las partes de la planta, la raíz, corteza, tallos, polen, semillas, hojas, flores y frutos.^{13,14} Están ampliamente distribuidas en el reino vegetal, generalmente en la forma soluble de glicósidos. Ausentes prácticamente en las Algas, aparecen en las Biofritas. Se encuentran en Helechos y Gimnospermas, y ampliamente representados en las Angiospermas, donde su diversidad estructural es mayor.¹⁵

Los flavonoides son compuestos fenólicos, los cuales tienen 15 átomos de carbono en su núcleo básico (2-fenil cromano(I) o 3-fenil cromano (II)), los cuales son ordenados en una configuración C₆-C₃-C₆; es decir dos anillos aromáticos que por convención son llamados A y B unidos por tres átomos de carbono, que darán origen al anillo C, relacionados con un núcleo básico:^{15,16}



Los átomos de carbonos individuales son referidos por un sistema de numeración, en cual se utiliza números ordinarios para el anillo A,C y números prima para el anillo B.

GENERALIDADES

Los núcleos aromáticos se encuentran sustituidos según un esquema característico, impuesto por la biosíntesis; los sustituyentes pueden ser OH, OCH₃, OCH₂-O. El núcleo A generalmente está sustituido en 5 y en 7; un tercer oxígeno, está incluido en el puente de éter del pirano (2-fenil-cromano) o del furano central (2-bencil cumaranos). Raramente se encuentra monosustituido, o por el contrario, polisustituido.

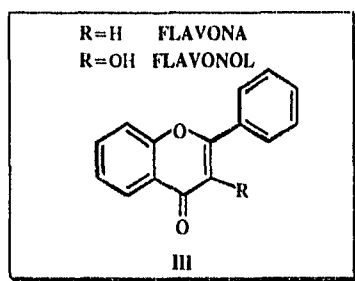
El núcleo del anillo B, en la mayoría de los casos se encuentra sustituido por un grupo funcional oxigenado (en para) o por dos (en meta y para). No es rara una tercera sustitución (una en para, dos en meta) pero excepcional la ausencia de sustituyentes. En el caso de los 2,3-dihidroxi derivados, normalmente el C-2 es S y cuando el carbono 3 está sustituido (dihidroflavonoles) la configuración generalmente es trans (2R, 3R).⁹

El término flavonoide es extenso y se aplica a las siguientes estructuras:

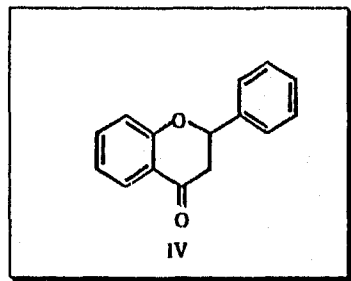
- 2 fenil cromonas : flavonas, flavonoles, flavanonas, dihidroflavonoles y formas dímeras (biflavonoides).
- 2 fenil cromanos (flavanos):3-flavanol, 4-flavanol y 3,4-flavandioles
- chalconas: formas isómeras abiertas de las flavanonas.
- auronas, homólogos de las flavonas con heterociclo pentagonal.
- 3 fenil cromonas: isoflavonas.

Flavonas y flavonoles:

Un flavonol (R=OH)(III), son simples flavonas (R=H), (III) cuya posición 3 esta substítuida por un grupo hidroxilo.

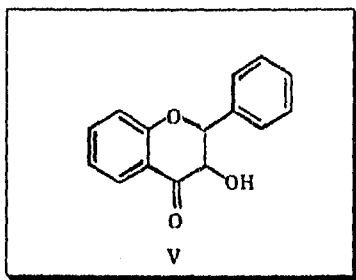
**Flavanonas:**

Estos flavonoides se basan en la estructura de la 2-fenil-benzopirano-4-ona (IV). La cual es denominada una flavanona. Este compuesto sin sustituyentes no se conoce en forma natural. La numeración del sistema del núcleo de las flavanonas es similar a la mayoría de los otros flavonoides y son isómeros de las chalconas, por lo que se pueden obtener sintéticamente o biosintéticamente a partir de ellas. Las flavanonas poseen un centro asimétrico en el C-2.



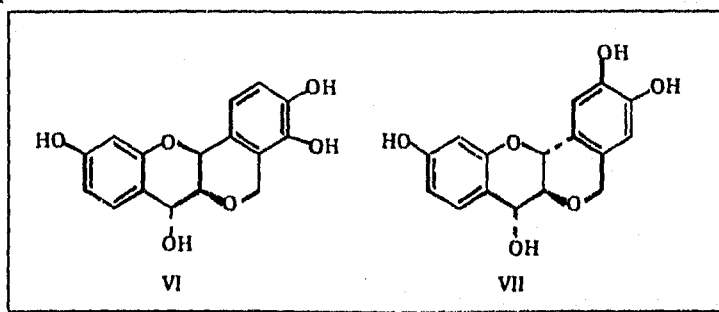
Dihidroflavonoles:

Los dihidroflavonoles son derivados del núcleo básico de la 2-fenil-3-hidroxipirano-4-ona (V). El sistema de numeración es el mismo que el de las flavanonas. El dihidroflavonol es el más sencillo que se conoce en la naturaleza. Estos compuestos tienen dos carbonos asimétricos (C-2 y C-3). Dado que son intermediarios obligatorios en la biogénesis de los flavonoides, pueden producir diferentes tipos de flavonoides; por una deshidrogenación producen flavonoles, la reducción del grupo carbonilo originan los 3,4-flavandioles, la enolización y oxidación dan antocianidinas.



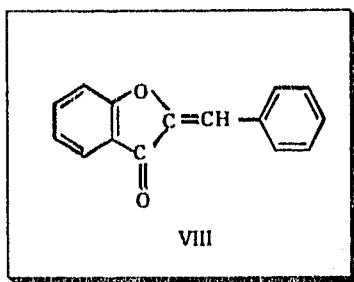
Leucoantocianidina:

Los 3,4-flavandioles son derivados de monopoles (VI) y peginoles (VII). Un factor notable de estos compuestos es el que se han encontrado en la madera y corteza de árboles, particularmente de las especies de *Acacia*.



Auronas:

Son compuestos coloridos, se han encontrado en especies con flores amarillas, sin embargo su distribución no está restringida a este tipo de tejidos, también se encuentran en la madera y corteza, químicamente son basadas en la estructura de la 2-bencilideno-cumaranona (VIII). Las auronas son reconocidas por su color amarillo y por su relación isomérica con las flavonas. Se encuentran distribuidas en los siguientes géneros: *Pityrogramma*, *Anacardiaceae*, *Acanthaceae*, *Gesneriaceae*, *Scrophulariaceae*, *Compositae*, *Leguminosae*, *Cyperaceae*.

**Isoflavonas:**

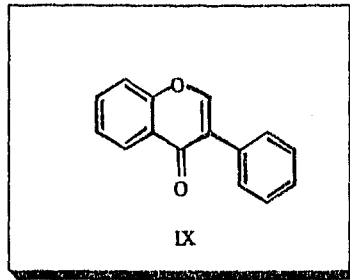
Es una clase importante y muy distintiva de los flavonoides. Estos compuestos se basan en el esqueleto de la 3-fenil-benzopirano-4-ona (IX). Biogénicamente derivan por una migración del grupo arilo del C-2 al C-3.

Tienen una distribución limitada en el reino vegetal, y se restringen a la subfamilia Papillinoideae de la familia Leguminosae. Se han encontrado en otras familias como: *Compositae*, *Iridaceae*, *Myristicaceae* y *Rosaceae*.

GENERALIDADES

Las isoflavanonas son mucho mas raras que las isoflavonas, los compuestos nuevos se han aislado vía fitoalexina, estas isoflavanonas tienen actividad antifúngica, un intermediario biosintético de esta ruta fitoalexina, son los pterocarpanos.

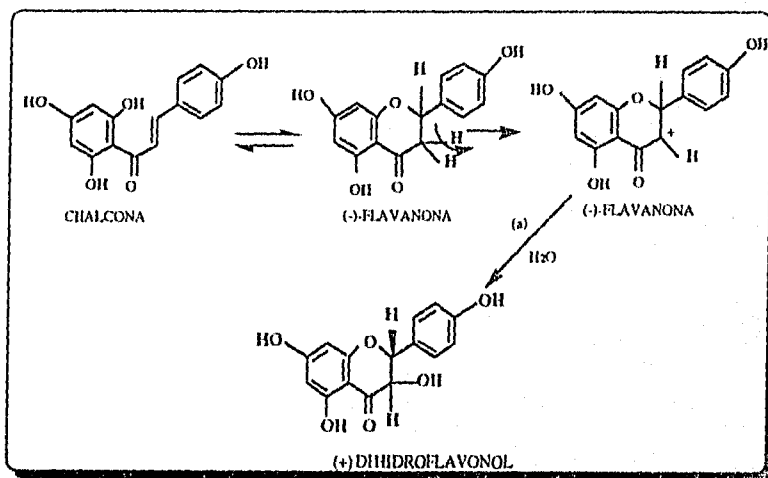
Los rotenoides son una clase de isoflavonoides caracterizados por la presencia de un carbono extra adicionado al anillo heterocéfico.



Biogénesis de flavonoides

No obstante la gran variedad de flavonoides (núcleo I, II), que se conocen, todos ellos se relacionan por una ruta biosintética en común^{15, 16} (Esquema I). En esta ruta intervienen tres unidades de acetato (provenientes de la ruta acetato-malonato), de tal manera que el anillo A del núcleo de los flavonoides es formado por la condensación cabeza-cola de 3 unidades de acetato, en tanto que el anillo "B" así como los átomos de carbono C-2, C-3 y C-4 provienen de la ruta del ácido shiquímico originando un precursor fenilpropanoide.¹⁴

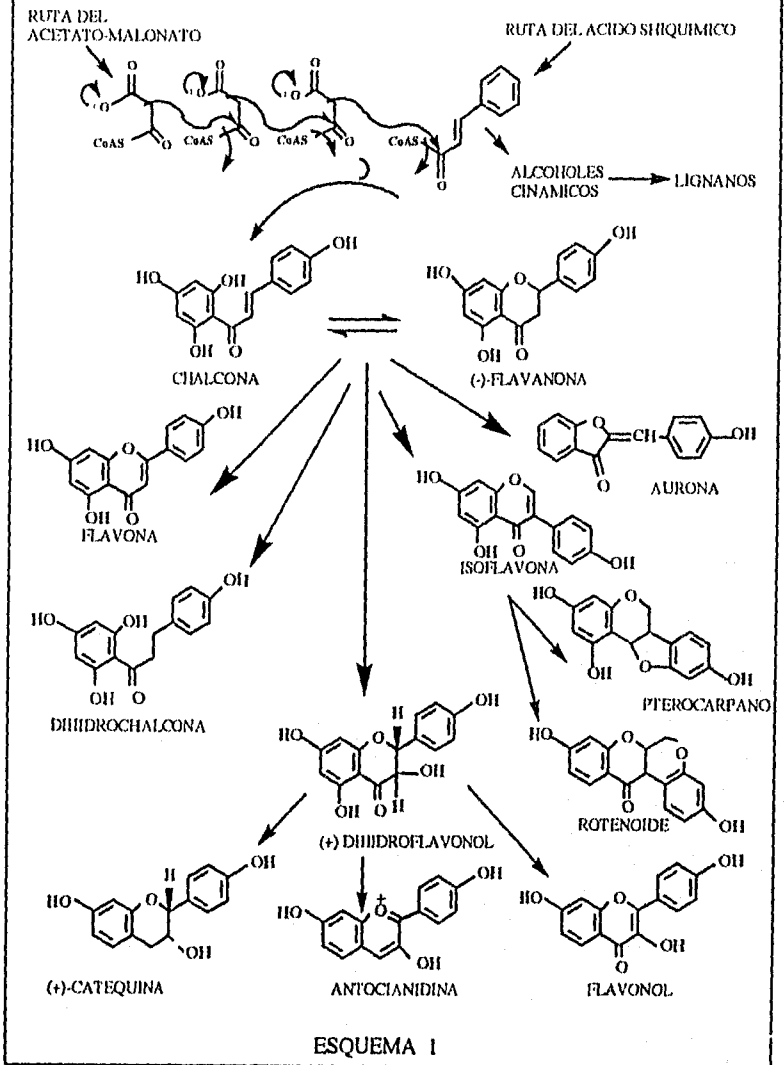
El intermediario de estas dos rutas metabólicas es el precursor biogénico de 15 átomos de carbono llamado chalcona, la cual está en isomería con la flavanona. Los grupos 3-hidroxilo es posible que se introduzcan como el resultado de una oxidación de la flavanona, presuntamente con la formación del catión, para dar origen a los dihidroflavonoles.



**TABLA 1.- DISTRIBUCION DE LOS FLAVONOIDES EN LA
MADERA Y CORTEZA DEL GENERO *PRUNUS* ⁸**

<i>Armeniaca</i>	
<i>P. Armeniaca</i>	madera: Aromadendrina-glucósido y dihidroquercetina- glucósido.
<i>P. Mume</i>	madera: kaempferido-7-glucósido, naringenina, prunina, catequina, epicatequina y leucocianidina.
<i>P. Spinosa</i>	madera y corteza: aromadendrina y dihidroquercetina.
<i>Prunus</i>	
<i>P. Serotina</i>	madera: aromadendrina y naringenina
<i>P. ssiori</i>	madera: luteolina, glucoluteolina, aromadendrina, naringenina, pinocembrina, eriodictiol, catequina, epicatequina, quercetina, quercetina- glucósido, eriodictiol-glucósido, aromadendrina- glucósido y dihidroquercetina-glucósido.
<i>Amygdalus</i>	
<i>P. persica</i>	madera: percosida, pinobanksina, aromadendrina y dihidroquercetina. corteza: naringenina y aromadendrina.
<i>Cerasus</i>	
<i>P. avium</i>	madera: aromadendrina, aromadendrina-glucósido, 7-metil-aromadendrina, catequina, crisina, crisina-7-glucósido, dihidrotectocrisina, dihidrowogonina, eriodictiol, genisteina, naringenina, pinocembrina, pinostrobina, prunetina, prunina, quercetina, sakuranetina, dihidroquercetina y tectocrisina. corteza: aromadendrina, pinobanksina y dihidroquercetina.
<i>P. campulata</i>	Madera: naringenina, eriodictiol y dihidroquercetina.
<i>P. cerasoides</i>	Madera: genkwanina, prunetina, sakuranetina, dihidroquercetina y 7 metil- dihidroquercetina. corteza: genkwanina, padmakasteina, prunetina, sakuranina, sakuranetina.

BIOGENESIS



Actividad biológica de los flavonoides

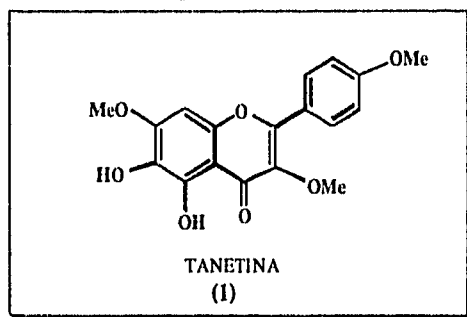
Los flavonoides dado su diversidad estructural, constituyen uno de los grupos más extensos de metabolitos secundarios en plantas, están presentes en ella no sólo como parte constitutiva de la misma, si no que funcionan como defensa para el ataque de infecciones por hongos, dan pigmentación a las flores y a los frutos.

Además han despertado un gran interés, por sus propiedades farmacológicas. no sólo en México, ya que este estudio se ha generalizado a diferentes partes del mundo, en donde se han aislado flavonoides de plantas que se utilizan en la herbolaria tradicional. Las actividades farmacológicas principales que mostraron son: actividad antimicrobiana, citotóxica en diferentes líneas celulares (KB, P-388,) y antiinflamatoria.

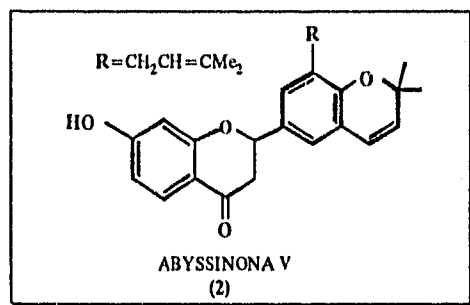
A continuación se presentan los resultados más recientes sobre la actividad biológica de los flavonoides aislados de diversas plantas, las cuales pertenecen a diferentes familias (*Leguminosae*, *Compositae*, *Rutacea*, etc.).

GENERALIDADES

Un flavonol lipofílico nuevo es el 6-hidroxicaempferol-3,7,4'-trimetil éter, llamado **Tanetina (1)**, característico en hojas, flores y semillas de *Tanacetum parthenium*. Las pruebas farmacológicas indican que puede contribuir a las propiedades antiinflamatorias, al inhibir la generación de eicosanoides proinflamatorios, esto se probó en leucocitos de rata, e inhibieron la ruta de las enzimas ciclo-oxigenasa y 5 lipo-oxigenasa del metabolismo araquidónico.¹⁷



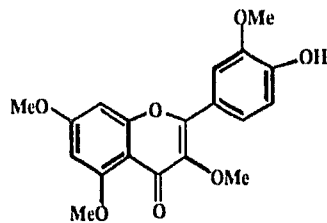
La flavona **Abissinona-V (2)** aislado de *Mundulea monantha* y *Tephrosia linearis*, tiene actividad bacteriostática y bactericida contra bacterias Gram (+). Es importante resaltar la relación estructura-actividad en esta flavona, ya que la presencia del grupo hidroxilo libre en el C-7 es necesario para la actividad biológica.¹⁸



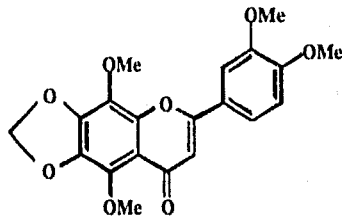
GENERALIDADES

Como parte de las investigaciones de agentes antitumorales se aislaron dos flavonoides citotóxicos de la planta *Melicope triphylla*.

Los flavonoides 4'-hidroxi-3,5,7,3'-tetrametoxiflavona (3), Melicofillina (4), presentaron actividad citotóxica contra la línea celular P-388 (leucemia linfocítica de ratón) con una DE₅₀ de 4,88 y 4,36 µg/ml respectivamente.¹⁹



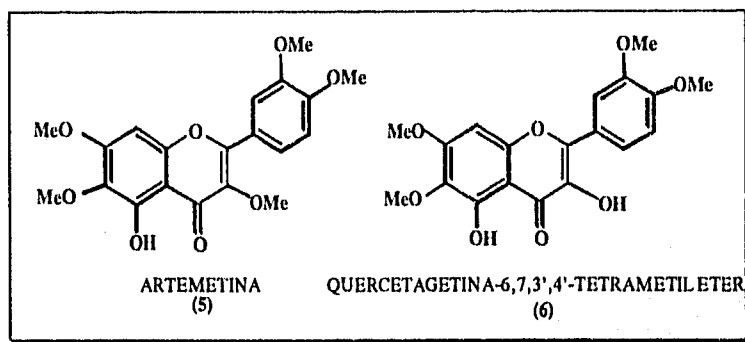
4'-HIDROXI-3,5,7,3'-TETRAMETOXIFLAVONA
(3)



MELICOFILLINA
(4)

GENERALIDADES

Como continuación de las investigaciones sobre agentes antitumorales en plantas, se estudiaron los constituyentes activos de *Artemisia annua*. Esta planta se utiliza en la medicina tradicional china en el tratamiento de la malaria. Los constituyentes más activos fueron las flavonas: Artemetina (5) y la quercetagetina- 6,7,3',4'-tetrametil éter (6).²⁰

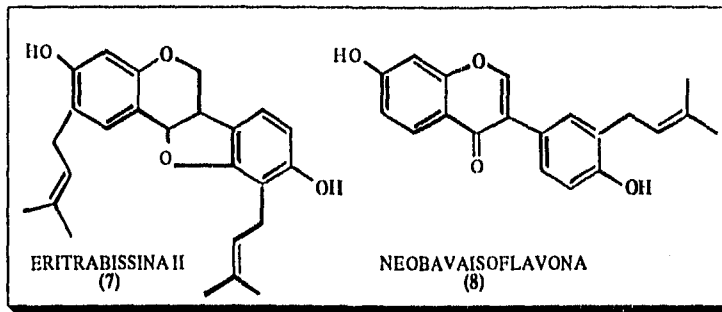


Ambas presentaron actividad citotóxica en las líneas celulares: P-388 (leucemia linfocítica murina), A-549 (Carcinoma pulmonar), MCT-7 (Adenocarcinoma de mama humano), HT-29 (Adenocarcinoma de colon) y el KB (carcinoma nasofaríngeo). Los valores de la $DE_{50} < 4 \mu\text{g/ml}$ se consideraron significativos.²⁰

El género *Erithrina* contiene numerosas especies distribuidas en regiones tropicales y subtropicales.²¹ Los extractos de hojas, de corteza y raíz se utilizan en la medicina indígena, para el tratamiento de varias enfermedades, en especial infecciones microbianas. Los estudios realizados, demuestran que la corteza de estas especies contienen flavonoides: isoflavonas, flavanonas y pterocarpanos, los cuales poseen la potencia suficiente *in vitro* contra patógenos humanos.²¹

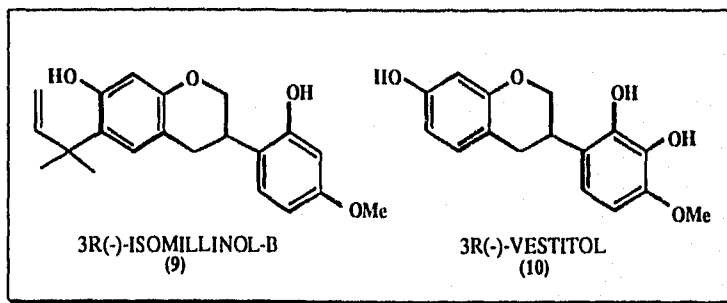
GENERALIDADES

En estudios recientes de *E. sigmoidea* se encontraron dos isoflavonas activas, la eritrabissina II (7) y la neobavaisoflavona (8). Su CMI es de 3.1 y 2.5 $\mu\text{g/ml}$ frente a *Staphylococcus aureus* respectivamente.²¹



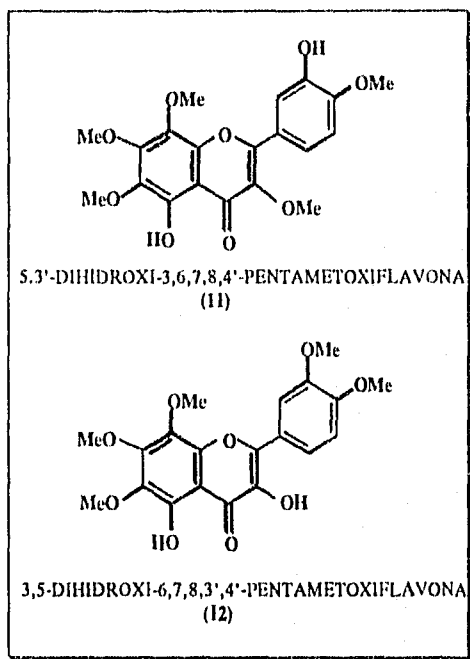
Los flavonoides 3R(-)-Isomillinol-B (9) y el 3R(-)-vestitol (10), inhiben el crecimiento celular de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.²²

Los dos isoflavanos aislados de *Milletia racemosa* fueron altamente tóxicos en concentraciones de 0.1 $\mu\text{g/ml}$ para ambos microorganismos.



GENERALIDADES

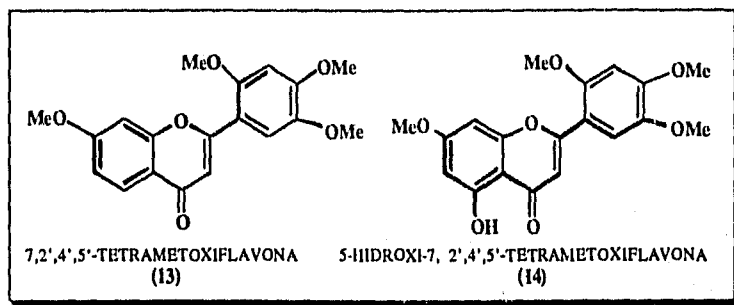
De un estudio biodirigido de *Zieridium pseudobtusifolium* y *Acronychia porteri*. Se obtuvieron la 5,3'-dihidroxi-3,6,7,8,4'-penta-metoxiflavona (11) y la 3,5-dihidroxi-6,7,8,3',4'-pentametoxiflavona (12). Estos compuestos fueron los más activos y presentaron actividad citotóxica *in vitro*, contra las células KB ($IC_{50} = 0.04$ y $0.1 \mu\text{g/ml}$ respectivamente). Además el primer compuesto inhibe la unión de la tubulina dentro de los microtúbulos durante la mitosis ($IC_{50} = 12 \mu\text{M}$).²³



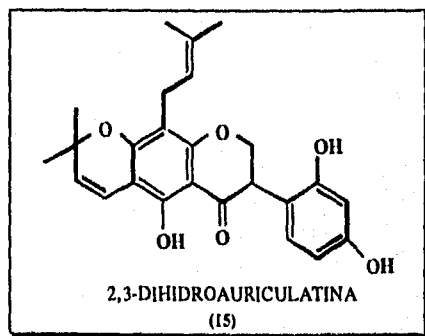
De la planta *Calliandra californica* se aislaron dos nuevos compuestos: 7,2',4',5'-tetrametoxiflavona (13), 5-hidroxi-7,2',4',5'-tetrametoxiflavona (14).

GENERALIDADES

Los primeros de esta planta, ya que se caracteriza por la presencia de aminoácidos, ácidos monohidroxipipcólicos y dihidropipcólicos. Las pruebas farmacológicas demostraron que el segundo flavonoide (14) es activo contra la bacteria *Staphylococcus aureus* (1 mg/disco dan 8mm de halo de inhibición) y con *Bacillus subtilis* (1 mg/disco dan 11 mm de inhibición), mientras que el primero es inactivo.²⁴

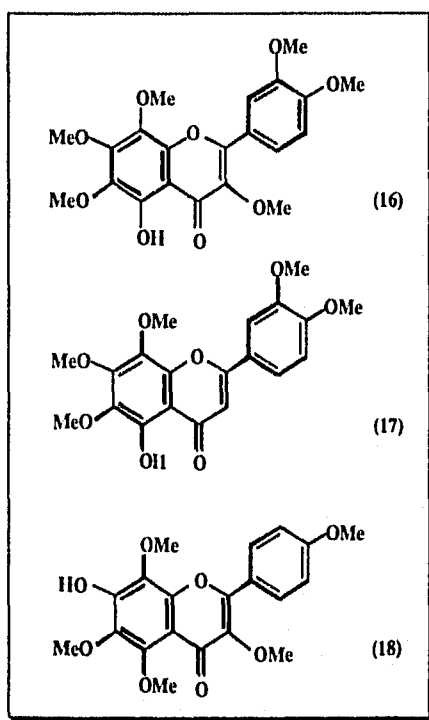


La actividad biológica del isoflavonoide 2,3-dihidroauriculatina (15), uno de los 10 compuestos aislados de *Ormosia monosperma*, mostró una actividad moderada contra los siguientes microorganismos: *Streptococcus mutans*, *Prophyromonas gingivalis* y *Actinomyces actinomycetemcomitans* a concentraciones de 6.3 µg/ml.²⁵



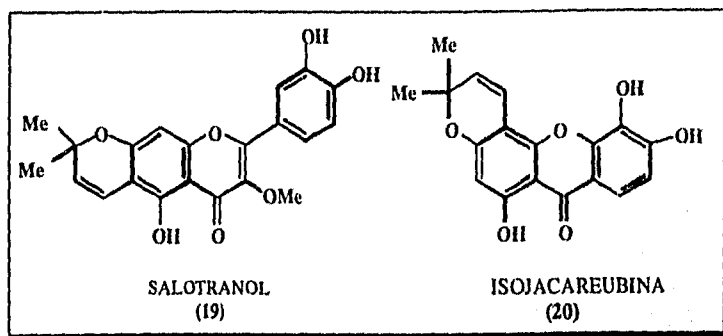
GENERALIDADES

Todos los compuestos activos de *Aurintii nobilis* fueron flavonas metoxiladas. $50\mu\text{M}$ de estas flavonas polimetoxiladas inducen la diferenciación de células M_1 en un alto % y $5\mu\text{M}$ pueden inducir en las células M_1 , actividad fagocítica. En las flavonas metoxiladas, la actividad no fue alterada por la posición de los grupos metoxilos.²⁶

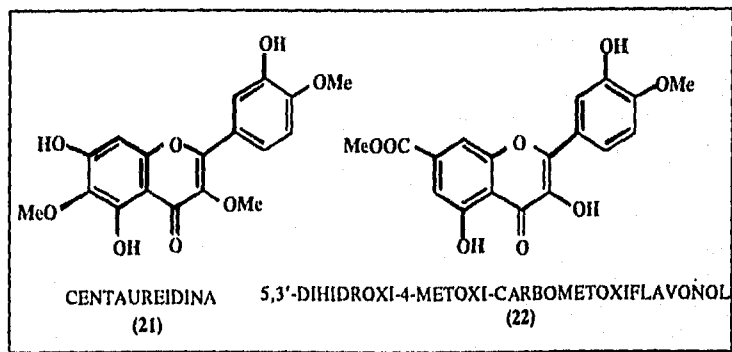


Los compuestos (16), (17), los cuales contienen un grupo OH en el carbono 5, muestran una alta actividad antiproliferativa y menor actividad de diferenciación. En este mismo estudio se aislaron flavonas altamente oxigenadas de la planta *Citrus reticulata*, en donde también se observa la relación estructura-actividad, la presencia de un hidroxilo en C-7 (18), aumenta la inducción de las células M_1 .

De *Hipericum japonicum*, utilizado en la herbolaria china para el tratamiento de padecimientos bacterianos, hepatitis y tumores fué estudiado fitoquímicamente aislándose dos compuestos con actividad antimicrobiana. Salotranol (19) e Isojacareubina (20) presentan actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus*. La concentración mínima inhibitoria (CMI) fue de $125\mu\text{g/ml}$.²⁷



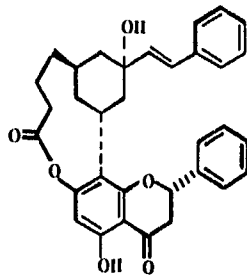
El flavonoide Centaureidina (21) y el 5,3'-dihidroxi-4'-metoxi-7-carbometoxiflavonol (22) tienen actividad antiinflamatoria. Producen un alto % de inhibición del edema en pata de rata a dosis de 25 y 10 mg/Kg. Este efecto continúa hasta después de 7 horas, exhibiendo una alta duración del mismo, aún mejor que el de la fenilbutazona.²⁸



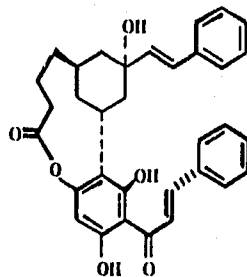
GENERALIDADES

El estudio de las hojas del árbol malasio *Cryptocarya kurzzi* dió cuatro flavanonas complejas y un chalcona.²⁹

La flavanona **Kurziflavolactona B(23)** y la chalcona **Kurzichalcolactona (24)** mostraron actividad citotóxica contra células KB, con valores de CI_{50} de 4 y 15 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente.²⁹

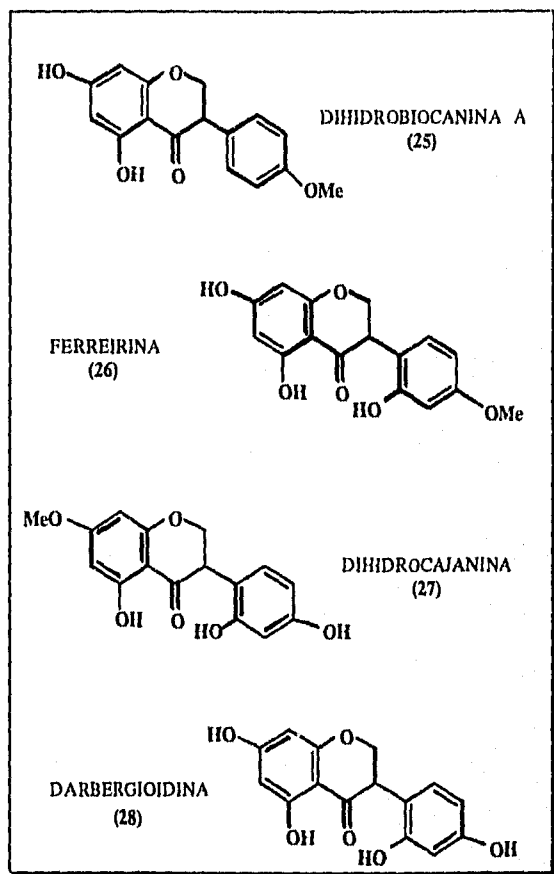


KURZIFLAVOLACTONA B
(23)



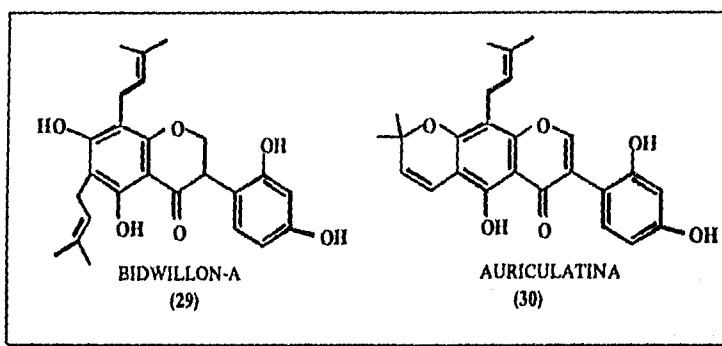
KURZICHALCOLACTONA
(24)

Las isoflavanonas **Dihidrobiojanina A (25)**, **Ferreirina (26)**, **Dihidrocajanina (27)** y **Darbergioidina (28)**, poseen actividad antibacteriana, estas son los principales constituyentes del duramen de *Swartzia polyphylla*.³⁰ Quizá la falta del enlace vinílico entre el carbono C-2 y el C-3, sea el responsable de la actividad de estos cuatro compuestos.³⁰

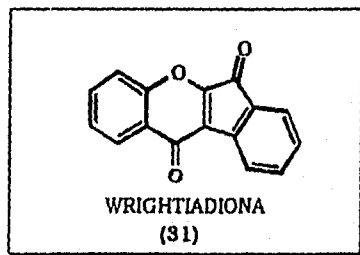


GENERALIDADES

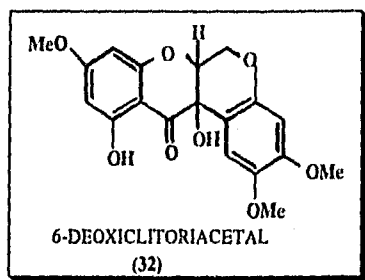
El estudio de la corteza de la raíz de *Erythrina bidwilli* dió como resultado el aislamiento de dos nuevos isoflavonoides: **Bidwillon A (29)** tiene actividad biológica, contra *Prevotella intermedia* y la isoflavona **Auriculatina (30)** contra *Fusobacterium nucleatum* (CMI de 3.2 µg/ml) para ambos compuestos. ³¹



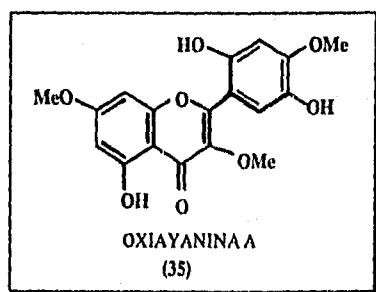
La novedosa isoflavona **Wrightiadiona (31)** contiene un nuevo esqueleto se aisló de la corteza de *Wrightia tomentosa*. Este compuesto exhibió actividad citotóxica contra la línea celular leucemia linfocítica P-388 ($DE_{50} = 1.1$ mg/ml). ³²



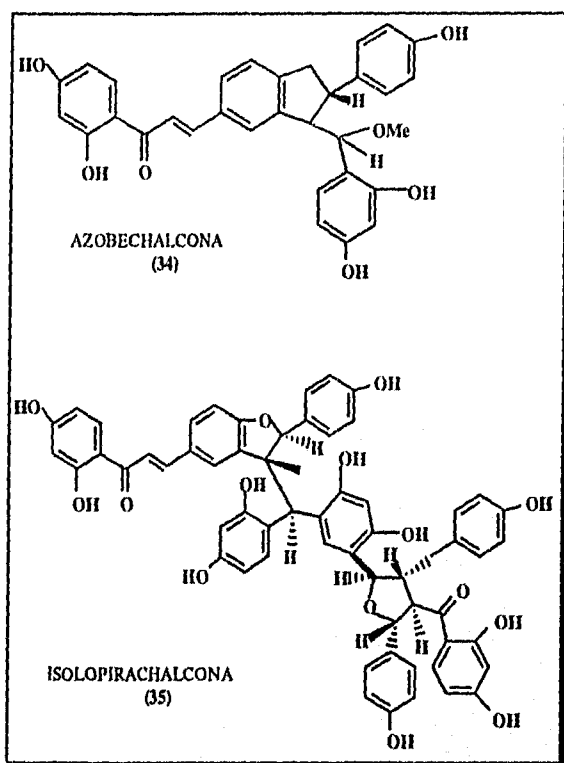
La raíz de *Clitoria macrophylla*, se usa tradicionalmente en el tratamiento de enfermedades de la piel y para el control de plagas en horticultura. La investigación fitoquímica dió como resultado el aislamiento de un rotenoide nuevo 6-deoxiclitoriactal (32), el cual presentó actividad citotóxica en cultivos de células leucémicas P-388, pero no fué activo contra las células KB.³³



Oxiyanina A (33) un flavonol lipofílico, citotóxico *in vitro* contra la línea celular KB con una $DE_{50} = 1.99 \pm 0.1 \mu\text{g/ml}$ se aisló de las fracciones bioactivas del extracto metanólico de *Chrysosplenium grayanum*.³⁴

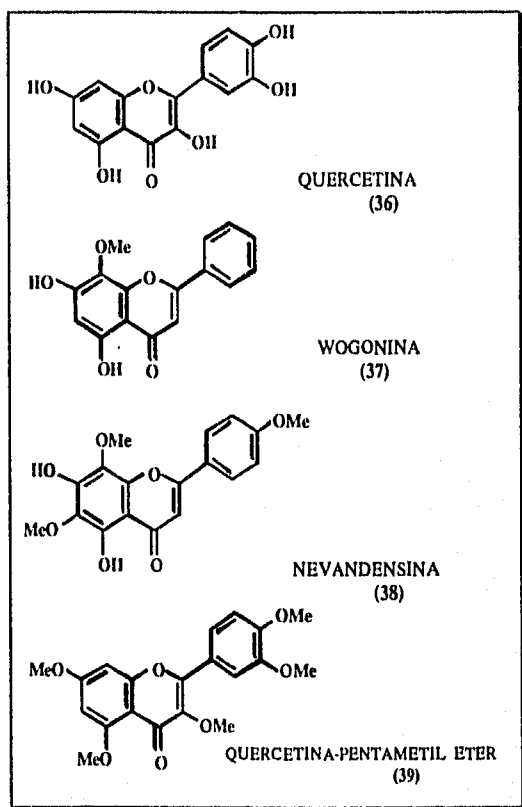


Los flavonoides con actividad antitumoral *in vitro* fueron aislados de la corteza de *Lophira alata*.³⁵ Los compuestos son la Azobechalcona A (34) y la Isolofirachalcona (35), que mostraron potentes actividades inhibitorias (83% y 65% respectivamente).³⁵

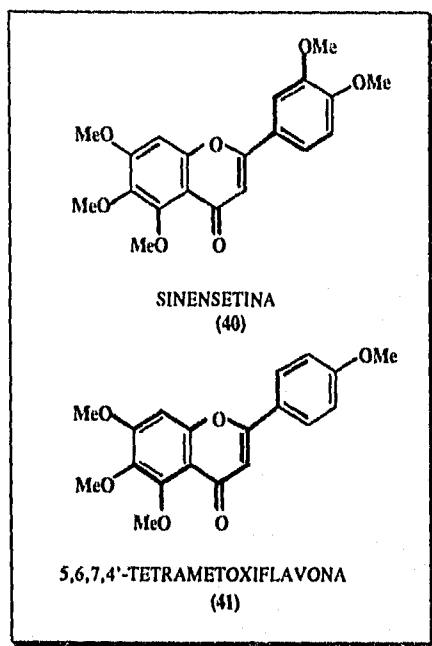


GENERALIDADES

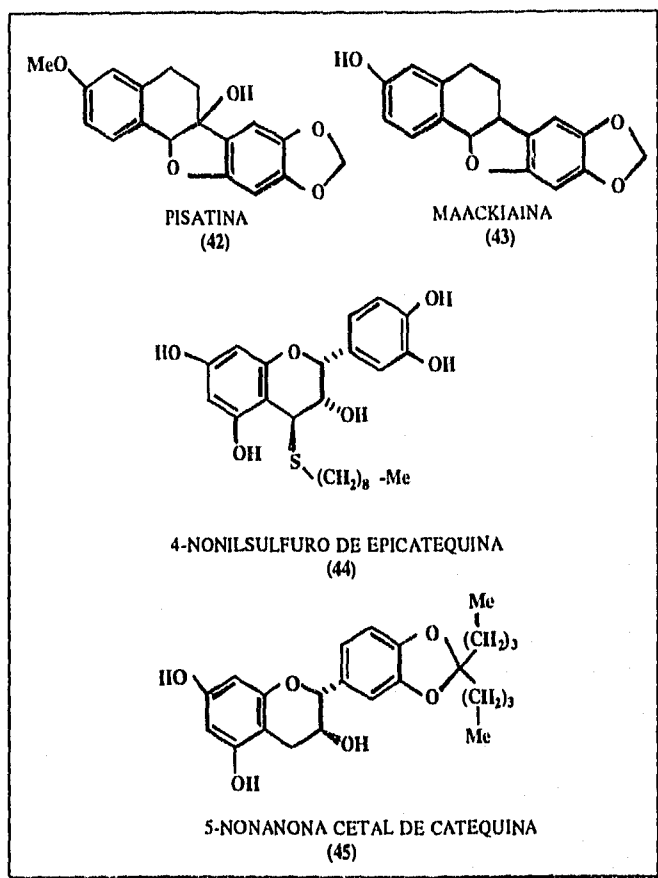
La actividad antiinflamatoria de quercetina (36), wogonina(37), nevandensina(38) y quercetina-pentametil éter (39) se probó en el edema de pata de rata inducido por carragenina. Se debe señalar la importancia de la presencia de grupos metoxilos para la actividad biológica. Conforme aumenta el número de sustituyentes aumenta la actividad antiinflamatoria.³⁶



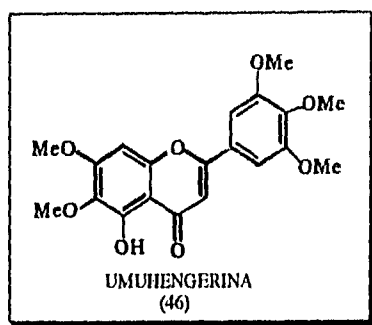
Varios flavonoides polimetoxilados han sido aislados del extracto de acetato de etilo de la planta *Orthosiphon spicatus*. Sinensetina (40) y tetrametil-scutellareína (41) mostraron actividad citostática en células tumorales de cultivos en suspensión, en dosis de 30 $\mu\text{g/ml}$ (40) y 15 $\mu\text{g/ml}$ (41) inhiben el 50% del crecimiento. Además el compuesto (40) presenta actividad *in vitro* sobre las células KB ($\text{DE}_{50} = 27 \mu\text{g/ml}$). ³⁷



Varios flavonoides análogos de fitoalexinas fueron sintetizados y su actividad antibacteriana y fungicida fué relacionada con su lipofilidad (RM). Dos fitoalexinas naturales **pisatina** (42), **maackiaina** (43) y los flavonoides semisintéticos **4-nonilsulfuro de epicatequina** (44) y **5-nonanona cetal de catequina** (45) fueron los más activos.³⁸



La flavona polimetoxilada Umuhengerina (46) fué aislada del extracto metanólico de *Lantana trifolia*, exhibió *in vitro* actividad antibacteriana y fungicida en concentraciones por debajo de 200mg/ml contra *Staphylococcus aureus*, *S.typhimurium*, *C.tropicalis*, *A.niger*, *A.fumigatus*, *T.mentagrophytes* y *M.canis*. La CMI para *salmonella typhimurium* fué de 5mg/ml.³⁹



La actividad biológica de diversos metabolitos como diterpenos, triterpenos y en particular los flavonoides, han cobrado vital importancia porque presentan la posibilidad de encontrar nuevos fármacos o materias primas para la síntesis de compuestos que sean farmacológicamente más potentes, los cuales puedan contribuir a resolver grandes problemas de salud, no sólo en la población mexicana sino a nivel mundial.

PARTE
TEORICA

*PARTE TEORICA*Determinación de la estructura de la 5,7,4'-trihidroxi flavanona
(Naringenina)

De las fracciones 6-31 eluidas con hexano AcOEt del extracto de AcOEt de la planta se aisló por cromatografía un sólido cristalino (compuesto I) de color amarillo, con un punto de fusión de 248-249 °C.

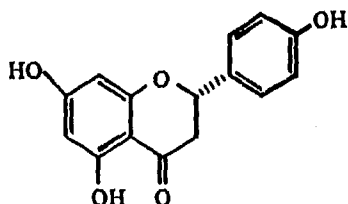
Su espectro de IR mostró bandas de absorción de dobles enlaces aromáticos en 1639, 1604 cm^{-1} , las bandas en 3400 y 1163 cm^{-1} indicaron la presencia de grupos fenólicos y la banda en 1694 cm^{-1} fue asignada a un grupo carbonilo.

Esto se comprueba al observar en el espectro de RMN¹H (Espectro 2), el sistema ABX característico de la flavanona⁴⁰, confirmando la información del IR, el protón X se observó como una señal dd en $\delta=5.16$ ($J=3.1, J=12.8$ Hz), mientras que los protones AB aparecen como dos señales en $\delta=2.89$ (dd $J=12.8$ y 17.1) y $\delta=2.3$ (dd, $J=3.1, 17.1$ Hz).

El espectro de masas exhibió un ión molecular 272 que corresponde a una fórmula molecular $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_5$, confirmando la presencia del esqueleto carbonado de una flavanona, la cual debe de estar trisustituida, ya que por acetilación con Ac_2O y piridina, se obtuvo el correspondiente triacetato,⁴⁰ su espectro de RMN¹H (Espectro3), mostró las tres señales simples en 2.30, 2.36 y 2.8 ppm para los metilos de los grupos acetato.

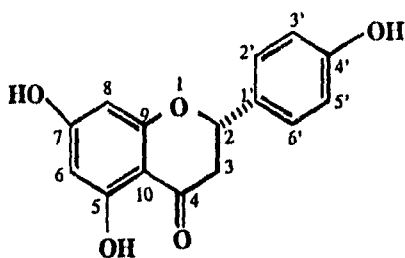
La señal simple $\delta=11.9$ intercambiable con H_2O deuterada es característica de un grupo hidroxilo unido al C-5, el cual se encuentra quelatado con el grupo carbonilo. La señal simple en $\delta= 5.80$ ppm, que integra para dos protones equivalentes, se pueden asignar a los protones H-6, H-8 , estableciendo la sustitución del anillo A.

Por otra parte la sustitución del anillo B, se observa en el espectro de RMN^1H , como dos señales dobles en $\delta=7.09$ y $\delta=6.70$ ($J=8.4$ Hz), las cuales integraron para dos protones cada una, característicos de una para-disustitución. Con esta información, la estructura de la flavanona debe ser la 5,7,4'-trihidroxi flavanona.^{40, 41}



Finalmente la identidad del compuesto se comprobó por su espectro de $RMN^{13}C$ (Espectro 4),^{42, 14} el cual mostró señales para 15 átomos de carbono, así como desplazamientos químicos idénticos a los descritos en la literatura para la naringenina (Tabla 2), los cuales coinciden con los del compuesto I y por su patrón de fragmentación mostrado en el esquema 2.

TABLA 2.-Desplazamientos químicos de RMN ^{13}C en (ppm)
del compuesto I



No. de Carbono	COMPUESTO I CDCl_3	Naringenina DMSO-d_6 ⁴²
2	78.6	78.4
3	42.6	42.0
4	195.43	196.2
5	163.78	163.6
6	96.22	95.9
7	166.672	166.7
8	95.20	95.0
9	162.80	162.9
10	101.097	101.8
1'	128.71	128.5
2'	127.42	128.2
3'	115.35	115.2
4'	157.42	157.85
5'	115.35	115.2
6'	127.42	128.2

Determinación de la estructura de la 3,5,7,4' tetrahidroxiflavanona
(Aromadendrina)

De las fracciones 32-41 de la cromatografía del extracto de acetato de etilo se aisló el compuesto II, como un sólido cristalino blanco, que se recrystalizó de etanol-éter etílico, obteniendo cristales con un punto de fusión 230-231 °C.

El compuesto exhibió en el IR, una banda ancha en 3391 cm^{-1} para grupos hidroxilo, una banda fuerte y aguda en 1633 cm^{-1} asignada a un carbonilo fuertemente quelatado y en 1614 y 1596 cm^{-1} bandas asignadas a dobles enlaces aromáticos. El espectro de masas mostró un ión molecular a m/z 288, congruente con la fórmula molecular $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_6$ indicándonos la presencia de un esqueleto flavonoide, sustituido por varios grupos hidroxilos (Esquema 3).

El espectro de RMN^1H (Espectro 7) mostró un sistema AB, como dos señales dobles en 4.31 y 4.79 ppm con una constante de acoplamiento ($J = 11.5$) característico de un dihidroflavonol⁴³, además se observaron cuatro señales simples que se intercambian con agua deuterada en 3.39, 8.8, 10.05 y 11.34 ppm, lo que sugiere la presencia de cuatro grupos hidroxilo, tres aromáticos y un alifático.

La acetilación del compuesto con Ac_2O en piridina, dió el correspondiente tetraacetato^{44,45} (Espectro 8), confirmando químicamente la presencia de los cuatro hidroxilos, uno de los hidroxilos debe de estar en el C-5 puesto que su desplazamiento químico fue idéntico al de la naringenina.

Las señales dobles en $\delta = 5.77$ y 5.82 ppm con una $J = 2.0$ Hz característica de un acoplamiento meta⁴³, se asignaron a los protones 6 y 8 del anillo A, mientras que las señales dobles en $\delta = 6.69$ y 7.15 ppm ($J = 8.5$) confirman la para-sustitución como en la naringenina.

Finalmente la estereoquímica del flavonol se confirmó comparando su espectro de RMN¹³C (Espectro 9) con lo descrito en la literatura para el compuesto II⁴⁶ (Tabla 3).

De esta forma se puede establecer la estructura del compuesto como 3,5,7,4'-tetrahidroxiflavanona (aromadendrina), la cual ha sido aislada de las siguientes especies: *Morus alba*, *Larix decidua*, *Prunus persica*, *Prunus cerasus*, *Prunus avium*, *Salix caprea*⁴⁷, *Flindersia australis*⁴⁴, *Thujopsis dolobrata*. Su punto de fusión reportado es de $219-221^\circ\text{C}$ (Acetona).⁴⁴

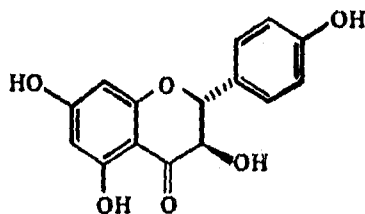
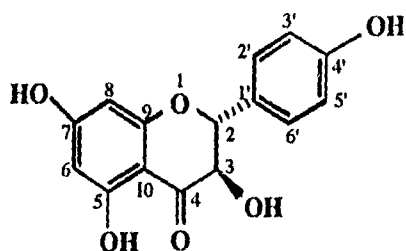


TABLA 3 .-Desplazamientos químicos de RMN ^{13}C en (ppm)
del compuesto II



No. de carbono	COMPUESTO II CDCl ₃	Aromadendrina DMSO-d ₆ ⁴⁶
2	84.3	85.0
3	73.1	73.70
4	198.2	198.41
5	167.8	168.78
6	97.0	97.46
7	165.0	165.34
8	96.0	96.4
9	164.4	164.58
10	101.5	101.93
1'	129.1	129.37
2'	130.3	130.37
3'	115.9	116.26
4'	158.8	159.21
5'	115.9	116.26
6'	130.3	130.37

Determinación de la estructura del 3,5,7,3',4'-pentahidroxi flavanona
(Taxifolina)

De las últimas fracciones de la cromatografía del extracto de acetato de etilo, se aisló un sólido de color ligeramente amarillo se identificó como compuesto III, el cual mostró un punto de fusión de 224-225°C.

En el espectro de IR presentó bandas en 3430 y 1639 cm^{-1} asignadas a grupos fenólicos y un carbonilo quelatado respectivamente, además una banda en 1605 cm^{-1} atribuible a dobles enlaces aromáticos. En el espectro de masas se observó un ión molecular en m/z 304, el cual corresponde a una fórmula molecular de $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_7$, sugiriendo la presencia de un esqueleto flavonoide con cinco grupos OH.

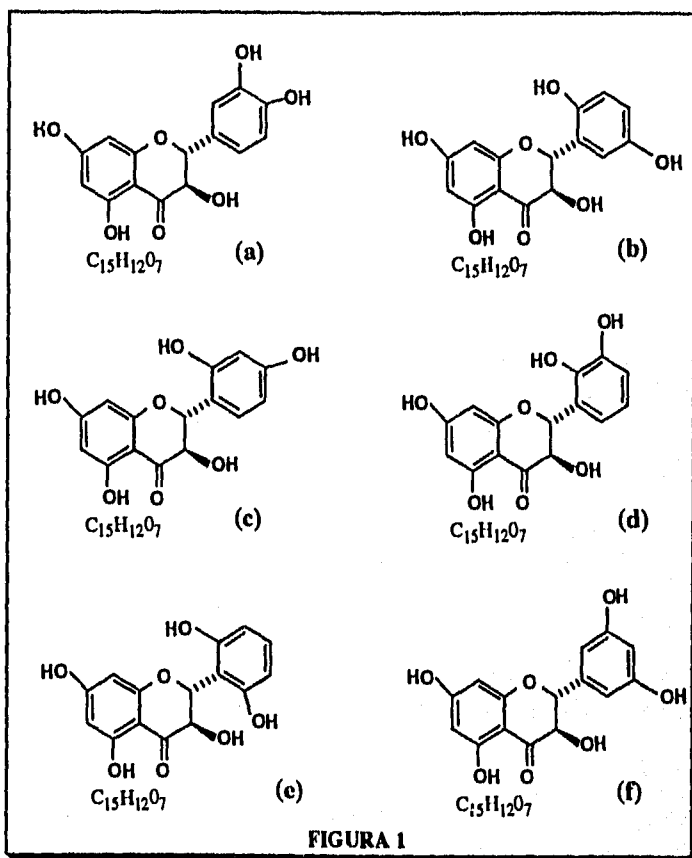
El espectro de RMN^1H (CDCl_3 -DMSO) (Espectro 13) mostró dos señales dobles características para un dihidroflavonol⁴³ en 4.29 y 4.74 ppm, con una constante de acoplamiento de $J=11.4$ Hz, asignadas a los protones H-2 y H-3 .

Además se observan dos señales simples en 6.84 y 6.68 ppm que integran para uno y dos protones respectivamente, indicando que el anillo B del dihidroflavonol se encuentra disustituido. Por otra parte, el anillo A debe de estar sustituido con dos grupos hidroxilos en 5 y 7⁴³ puesto que se observan en la región de protones aromáticos, dos señales dobles en 5.76 y 5.81 ppm con una constante de acoplamiento meta (2.1 Hz).

Hasta aquí se pueden plantear 6 estructuras diferentes para el dihidroflavonol (**Figura1**).

Cuando se obtuvo el espectro de RMN¹H en acetona deuterada (Espectro 12), nos permitió observar en la región de protones aromáticos un sistema ABX para los tres protones del anillo B que en el espectro obtenido en CDCl₃-DMSO, aparecen como dos señales simples.

Esto nos permite eliminar las estructuras d, e y f quedándonos solamente con las estructuras a,b y c.



Una búsqueda en la literatura química de los tres isómeros,^{48,49,50} nos permitió establecer la estructura A para el dihidroflavonol, al comparar los datos de RMN¹H en acetona deuterada del compuesto III con los descritos para la 3,5,7,3',4'-pentahidroxiflavanona (Tabla 4).^{51,52,53}

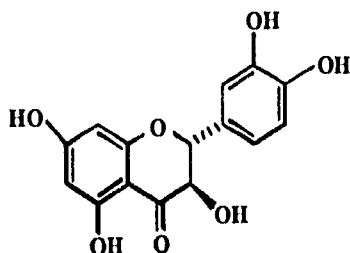
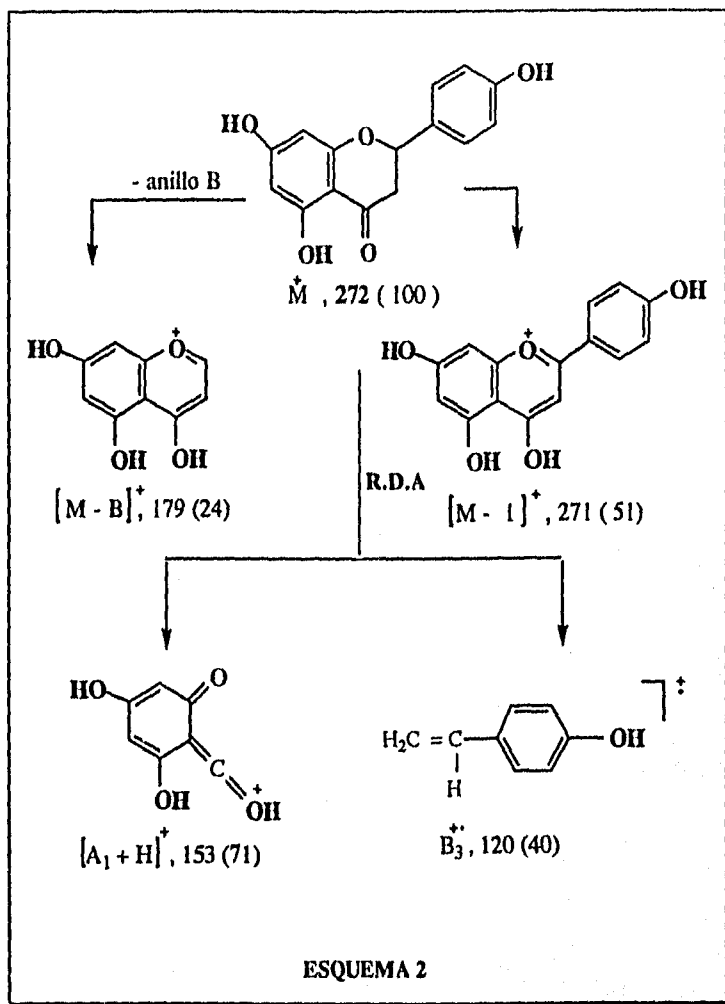
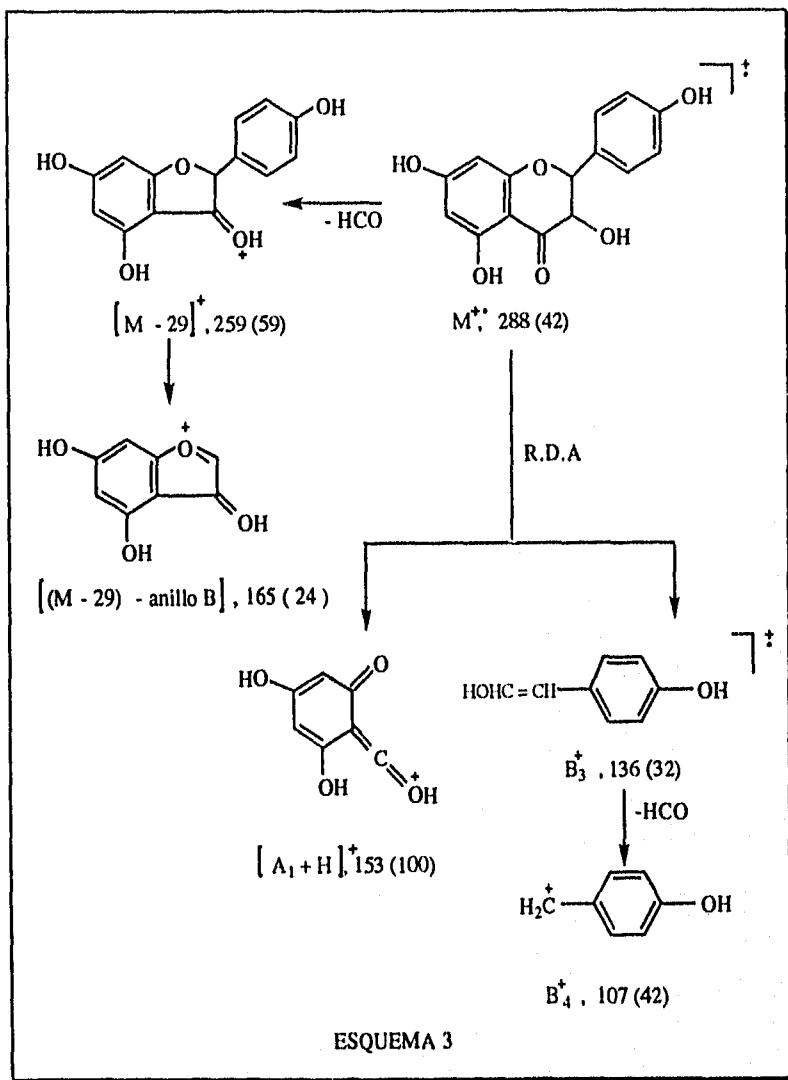


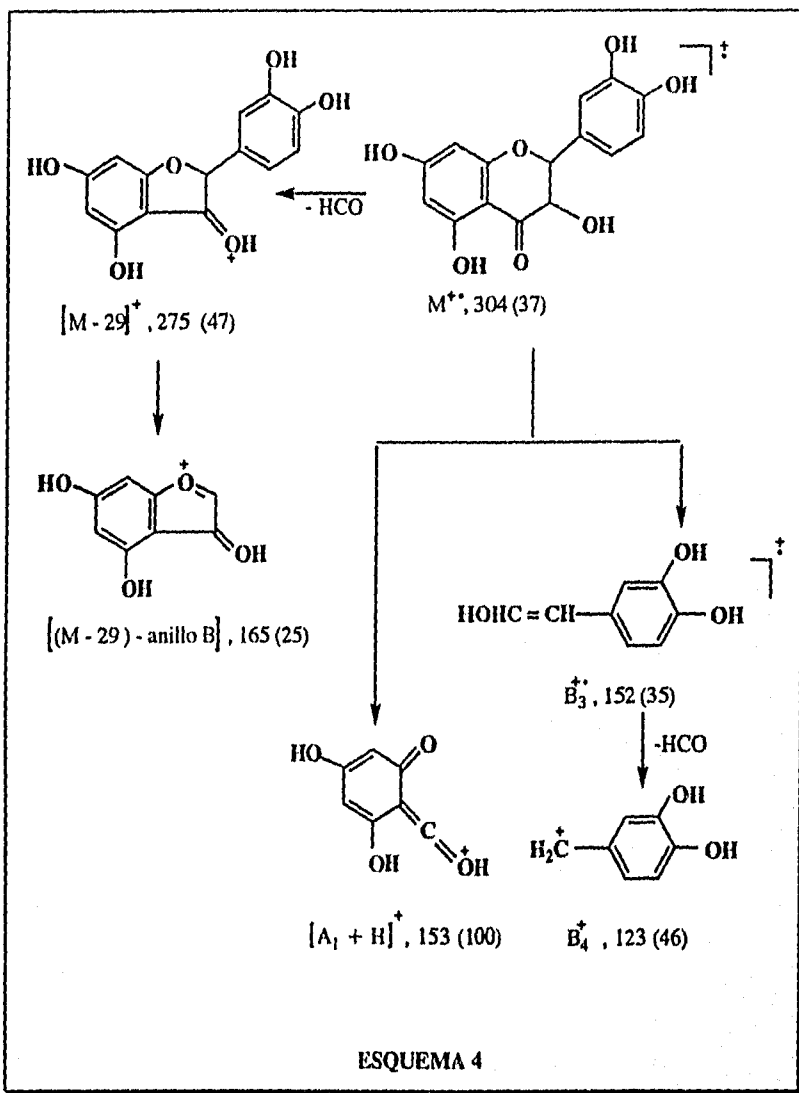
TABLA 4.-Desplazamientos químicos de RMN¹H en (ppm) del compuesto III

No de hidrógeno	Compuesto III d (ppm)	III J(Hz)	Taxifolina ⁵¹ d (ppm)	J(Hz)
3 _{axial}	4.61, dd	11.5, 3.5	4.51-4.65, m	
C ₃ -OH	4.69, dd	3.5	4.51-4.65, m	
2	5.02, d	11.5	5.02, d	11.0
6	5.94, d	2.1	5.92-6.00, m	
8	5.82, d	2.1	5.92-6.00, m	
5'	6.85, d	8.1	6.79-6.97, m	
6'	6.92, dd	8.1, 1.9	6.79-6.97, m	
2'	7.06, d	1.9	7.06, d	2.1
C ₅ -OH	11.71, s		11.71, s	

Acetona -d₆







**PARTE
EXPERIMENTAL**

PARTE EXPERIMENTAL

Material y equipo

Los puntos de fusión fueron determinados en un aparato Fisher Jones y no están corregidos.

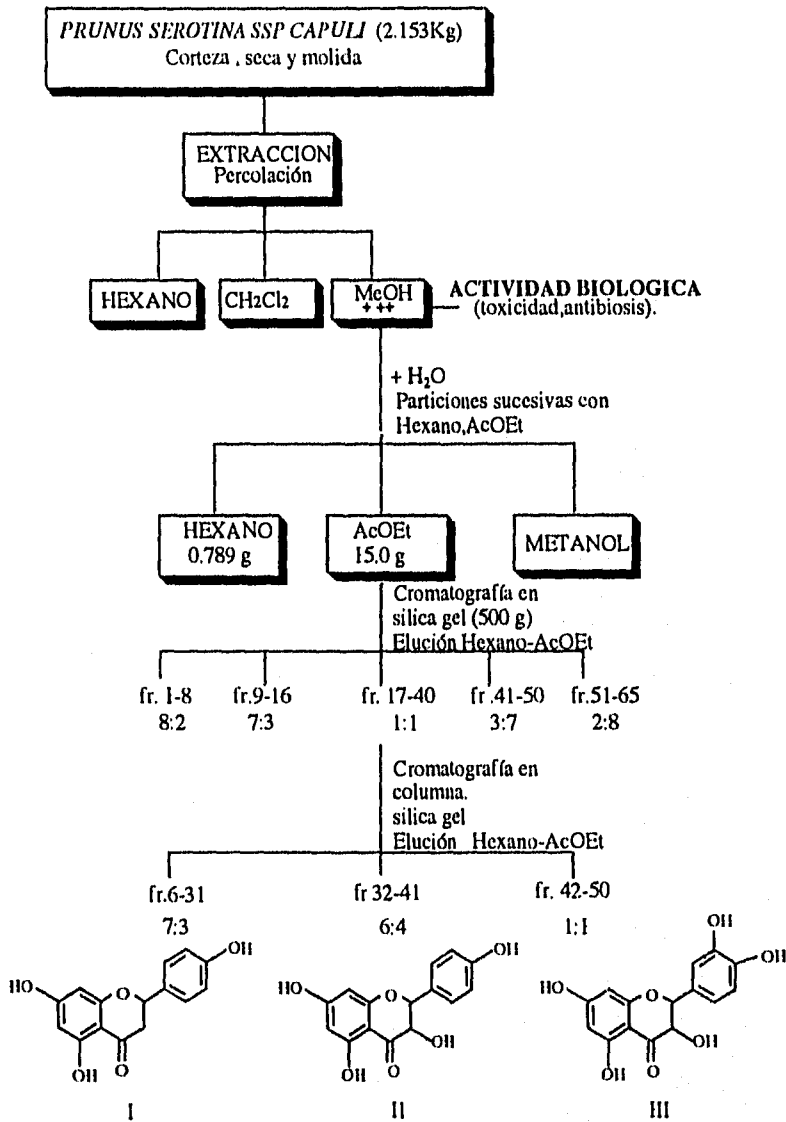
La pureza de los productos y el avance de las reacciones se siguió por cromatografía en capa fina, usando como revelador una solución de sulfato cérico al 1% en solución de ácido sulfúrico 2N.

Los espectros de IR fueron determinados en una espectrofotómetro Nicolet FTIR Mod. 55X o en un Perkin Elmer Mod. 283 B y Magna 750 Nicolet.

Los espectros de masas (EM) se determinaron en un espectrofotómetro Hewlett Packard, Mod 5985-B mediante la técnica de impacto electrónico, a una temperatura de 250°C.

Los espectros de RMN¹H, RMN¹³C se obtuvieron en los espectrofotómetros Varian: Gemini FT-200 A o VXR-300 S. Los desplazamientos químicos de los espectros de RMN ¹H estan dados en ppm con respecto a la muestra de referencia TMS, y los de RMN ¹³C con respecto al CDCl₃ (77 ppm). Las constantes de acoplamiento están dadas en Hertz.

DIAGRAMA DE TRABAJO



La corteza de *Prunus serotina ssp capuli* se recolectó en el Estado de México el 24 de Noviembre de 1994 se dejó secar a temperatura ambiente y una vez seca fué molida, obteniéndose 2.155 Kg de un polvo color café oscuro. La corteza molida se colocó en una columna de vidrio y se eluyó sucesivamente con 5 litros (aproximadamente) de hexano, diclorometano y metanol. Después de la evaporación de los disolventes a presión reducida se obtuvieron 3.03g de extracto de hexano, 12.0 g de extracto de diclorometano y 120.0 g de extracto metanólico.

Los extractos obtenidos fueron evaluados biológicamente, determinando su toxicidad frente a *Artemia salina* y su actividad antibacteriana en las cepas patógenas de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Los resultados fueron positivos solamente para el extracto metanólico (Tabla 5).

Al extracto de metanol 120.0g se diluyó en agua y se sometió a particiones sucesivas con hexano y acetato de etilo. El extracto acuoso-metanólico se extrajo con hexano (3 veces con 250 ml c/u) y se evaporó el disolvente, dejando un residuo de 789.0 mg. Después se extrajo con acetato de etilo (3 veces con 250 ml c/u) se evaporó el disolvente al vacío y se obtuvo 15.0 g de un residuo viscoso de color verde oscuro.

El extracto de acetato de etilo (15.0g) fue fraccionado por cromatografía en columna, empacada con 500g de sílica gel de malla 200-325. Para esta columna se utilizó como sistema de eluyentes hexano y después mezclas de hexano-acetato de etilo, se obtuvieron 65 fracciones de 500 ml cada una, se eliminó disolvente por destilación a presión reducida. El desarrollo de la cromatografía se monitoreó usando cromatoplasmas de sílica gel sobre aluminio.

PARTE EXPERIMENTAL

Las fracciones 17-40 eluidas con hexano-AcOEt (1:1), se reunieron dando un peso de 6.4 g .

Los 6.4g del residuo anterior fueron recromatografiadas en una columna de silica gel (270.0 g), utilizando como eluyentes hexano y mezclas de hexano-acetato de etilo, se obtuvieron 55 fracciones en total de 250 ml cada una, se evaporó el disolvente por destilación a presión reducida, de esta cromatografía se prosiguió con el aislamiento de los compuestos de la manera siguiente:

Aislamiento de la 3,5,7-trihidroxi flavanona (Naringenina)

De las fracciones 6-31, las cuales fueron obtenidas por la elución de la columna con hexano-AcOEt (7:3), precipitó el compuesto al adicionarle hexano, se filtró al vacío. Se recrystalizó en una mezcla de CH_2Cl_2 -MeOH y se obtuvieron 400 mg de un sólido cristalino. Con un punto de fusión de 247-248 °C. Se identificó como la 5,7,4'-trihidroxi flavanona,^{30,40,41,42}

El compuesto presenta las siguientes características espectroscópicas:

KBr
IR ν_{max} cm^{-1} : 3400 (OH asociado), 2943 (C-H ,alifático),
1694(C=O quelatado),1639(CH=CH aromático),
1604 (CH=CH, aromático), 1271 (C-O-C, anillo
de pirano), 1163(C-O fenol)

EMIE 70 eV m/z: (Int.rel): 272 [M]⁺(C₁₅H₁₂O₅) (100),
271 [M-1]⁺(51), 179[M⁺ - anillo B](24),
153 [C₇H₅O₄]⁺(71),120 [C₈H₈O](40) .

PARTE EXPERIMENTAL

RMN ^1H (200 MHz)(Acetona deuterada) (ESPECTRO 2) δ (ppm):

- 2.3(H,dd, $J=3.1, 17.1$ Hz, H-3 ecuatorial)
- 2.89(H, dd, $J=12.8, 17.1$ Hz, H-3 axial)
- 5.12(H,dd, $J=3.1, 12.8$ Hz, H-2)
- 5.80(2H, s, H-6, H-8)
- 6.70 (2H, d, $J=8.62$, H-3',-5')
- 7.09 (2H, d, $J=8.62$, H-2',-6')
- 11.9 (H, s, OH quelatado)

RMN ^{13}C (CDCl_3) (50 MHz)(ESPECTRO 4) δ (ppm):

- 78.6(C-2), 42.7(C-3),195.4 (C-4), 163.8(C-5),
- 96.2 (C-6), 166.6(C-7), 95.2(C-8), 162.8 (C-9),
- 102.0(C-10), 128.7 (C-1'), 127.4 (C-2'),
- 115.4(C-3'),157.5(C-4'),115.4(C-5'),127.4(C-6').

Acetilación de la 5,7,4'-trihidroxi flavanona

La flavanona (50 mg) se acetiló con anhídrido acético 0.8 ml y 6 gotas de piridina, se dejó en una baño de vapor durante 4 horas. La acetilación se monitoreó por c.c.f. Transcurrido el tiempo de la reacción se eliminó el exceso de anhídrido acético y piridina al alto vacío. El residuo se purificó en una placa preparativa de sílica gel (20 x 20 cm) de 2.0 mm de espesor en un medio de elución (hexano-AcOEt 1:1), obteniéndose 27.4 mg de acetato.

RMN ^1H (200 MHz)(Acetona deuterada) (ESPECTRO 3) δ (ppm):

- 2.36, 2.30, 2.8 (9H, s, 3H x Acetato)
- 2.75 (H, dd, $J=3.0, 16.8$ Hz, H-3 ecuatorial)
- 3.02 (H, dd, $J=13.4, 16.8$ Hz, H-3axial)
- 5.47 (H, dd, $J=3.0, 13.4$ Hz, H-2)
- 6.52 (H, d, $J=2.1$, H-6)
- 6.76(H, d, $J=2.1$, H,8)
- 7.12 (2H, d, $J=8.6$, H-3',-5')
- 7.44 (2H, d, $J=8.6$, H-2',-6')

Aislamiento del 3,5,7,4'-tetrahidroxiflavanona (Aromadendrina).

Las fracciones 32-41, eluidas con hexano-AcOEt (6:4), se reunieron para dar un peso de 640 mg, los cuales se purificaron en una columna pequeña empacada con gel de sílice 70/230. Las fracciones que se recolectaron fueron de 25 ml, se monitoreó la cromatografía por c.c.f. Las fracciones se reunieron y se obtuvo 180 mg de un polvo cristalino blanco (Compuesto II), se recrystalizó en una mezcla de EtOH-éter, mostró un punto de fusión de 230-231°C, se caracterizó como 3,5,7,4'-tetrahidroxiflavanona. ^{44,45,46,47}

El compuesto presenta las siguientes características espectroscópicas:

IR ν_{\max} (CHCl₃)cm⁻¹ : 3391 (OH, asociado), 2918 (C-H, alifático),
1633 (C=O quelatado), 1614 (CH=CH aromático),
1596 (CH=CH, aromático).

EMIE 70 eV m/z (Int.rel): 288 [M]⁺(C₁₅H₁₂O₆)(42),
259 [M-CHO]⁺(59), 165 [M-CHO- anillo B](24),
153 [C₇H₅O₄]⁺(100), 136 [C₈H₈O₂]⁺(32),
134 [C₈H₆O₂](39), 107 [C₇H₇O]⁺(42).

RMN ¹H (200 MHz)(Acetona deuterada) (ESPECTRO 7) δ (ppm):
3.39 (H, d, J=3.5 Hz, C3-OH)
4.31 (H, dd, J=11.5, 3.5 Hz, H-3)
4.79 (H, d, J=11.5 Hz, H-2)
5.77 (H, d, J= 2.0 Hz, H-6)
5.82 (H, d, J=2.0 Hz, H-8)
7.15 (2H, d, J=8.5 Hz, H-2',-6')
8.8 (H, s, C7-OH ó C4'-OH)
10.05 (H, s, C7-OH ó C4'-OH)
11.34 (H, s, C5 - OH quelatado)

PARTE EXPERIMENTAL

RMN ^{13}C (CDCl_3) (50 MHz)(ESPECTRO 9) δ (ppm):

84.3(C-2), 73.1(C-3), 198.2(C-4), 167.8(C-5),
97.0(C-6), 165.0(C-7), 96.0(C-8), 164.2(C-9),
101.5(C-10), 129.1(C-1'), 130.3(C-2'),
115.9(C-3'), 158.8 (C-4'), 115.9(C-5'),
130.3(C-6').

Acetilación del 3,5,7,4'-tetrahidroxiflavanona

La acetilación del compuesto (piridina-anhídrido acético), produce el correspondiente tetra-acetato 456 [M]⁺. Para este compuesto se siguió la misma metodología que para la 5,7,4'-trihidroxiflavanona.

RMN ^1H (200 MHz)(CDCl_3) (ESPECTRO 8) δ (ppm):

1.99 (3H, s, C-3, Ac), 2.28(3H, s, Ac)
2.29 (3H, s, Ac) , 2.35 (3H, s, C-5, Ac)
5.41 (H, d, J=12.2 Hz, H-3 axial)
5.69 (H, d, J= 12.2 Hz, H-2)
6.58 (H, d, J=2.2, H-6),
6.75 (H, d, J=2.2, H-8)
7.14 (2H, d, J=8.6, H-3',-5')
7.46 (2H, d, J=8.6, H-2',-6')

Aislamiento de 3,5,7,3',4'-pentahidroflavanona (Taxifolina).

Las últimas fracciones 42-50, eluidas con hexano-AcOEt (1:1) en la segunda columna, se reunieron lo cuál nos proporcionó 88 mg de compuesto impuro se purificó en una placa preparativa de sílica gel (20 x 20 cm) de 2.0 mm de espesor, desarrollándola en un medio de elución hexano-AcOEt (1:1). Se obtuvo 56.9 mg del compuesto III, polvo cristalino de color amarillo con punto de fusión de 224-225 °C, sus datos espectroscópicos coinciden con los descritos en la literatura para el dihidroflavonol Taxifolina.^{51,52,53}

El compuesto presenta las siguientes características espectroscópicas:

KBr
 IR ν_{\max} cm^{-1} : 3429(OH asociado), 2929 (C-H, alifático)
 1639 (C=O quelatado), 1605 (CH=CH aromáticos),
 1278 (C-O-C).

EMIE 70 eV m/z (Int.rel): 304 [M]⁺(C₁₅H₁₂O₇)(37),
 276 [M-CO]⁺(26), 275 [M-CHO]⁺(47),
 165 [M- CHO - anilloB](25), 153 [C₇H₅O₄]⁺(100),
 152 [C₈H₈O₃]⁺(35), 123 [C₇H₇O₂]⁺(46).

RMN ¹H (200 MHz)(Acetona deuterada) (ESPECTRO 12) δ (ppm):

4.61 (H, dd, J=11.4, 3.0 Hz, H-3);
 4.69 (H, d, J= 3.0 Hz, C₃-OH);
 5.02 (H, d, J=11.4 Hz, H-2);
 5.94 (H, d, J=2.1, H-6);
 5.98 (H, d, J=2.1, H-8);
 6.85 (H, d , J= 8.1 Hz, H-5');
 6.92 (H, dd, J=8.1, 1.9 Hz, H-6')
 7.06 (H, d, J=1.9, H-2')
 11.71 (H, s, C₅- OH)

PARTE EXPERIMENTAL

RMN ^1H (200 MHz)(CDCl_3 , DMSO) (ESPECTRO 13) δ (ppm):

- 4.29 (H, d, $J=11.4$ Hz, H-3);
- 4.74 (H, d, $J=11.4$ Hz, H-2);
- 5.76 (H, d, $J=2.1$, H-6);
- 5.81 (H, d, $J=2.1$, H-8);
- 6.68 (2H, s, H-2',5');
- 6.84 (H, s, H-6')
- 11.40 (H, s, $\text{C}_5\text{-OH}$)

**Actividad biológica
de los compuestos aislados**

SCREENING:

Actividad antimicrobiana

Se realizaron los ensayos con la finalidad de determinar la actividad antimicrobiana de cada extracto: hexano, CH₂Cl₂, MeOH, posteriormente de los compuestos aislados del extracto más activo.

Se probó en este ensayo Penprocilina G (224 µg/disco frente a *E.coli* y 50 µg frente a *S. aureus*) la cantidad utilizada de los extractos fué de 1000 µg/disco, mediante el método de halo de inhibición en disco ⁵⁴. Se utilizó como medio de cultivo Agar para antibióticos No. 1 (BIOXON).

Se obtuvieron los siguientes resultados: el extracto de hexano, al igual que el extracto de CH₂Cl₂ no presentan actividad antimicrobiana, el extracto de metanol si presentó actividad frente a los microorganismos probados, los resultados se describen en la tabla 5.

TABLA 5.- Actividad antimicrobiana de los extractos de *Prunus serotina ssp. capuli*

MICROORGANISMO	HEXANO	CH ₂ Cl ₂	METANOL	PENPROCILINA
<i>S.aureus</i> Gram (+)	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	28 mm
<i>E.coli</i> Gram (-)	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	12 mm

Como el extracto de MeOH mostró actividad antimicrobiana, se realizó el mismo ensayo para los compuestos aislados de él, además se probaron frente a la cepa de *Mycobacterium smegmatis*, se siguió la misma metodología, con una variante se probaron los compuestos I,II,III a una concentración de 500 µg/ml(Tabla 6).

TABLA 6-- Actividad antimicrobiana de los compuestos aislados de *Prunus serotina ssp. capuli*

MICROORGANISMO	COMPUESTO I	COMPUESTO III
<i>S.aureus</i> Gram (+)	Halo pequeño	8.5 mm
<i>E.coli</i> Gram (-)	NEGATIVO	NEGATIVO
<i>M. smegmatis</i>	12 mm	11 mm

Ensayo de toxicidad en Artemia salina

Este ensayo se realizo con larvas del crustáceo *Artemia salina*⁵⁵ de 48 horas de incubación , se colocan en un frasco vial, el cual contendrá la solución con la cantidad exacta de extracto a probar o de los compuestos (la prueba se realiza por triplicado.). Del extracto se probaron 200 µg y para los compuestos I, II, III fueron 100, 50, 25, 12.5 µg /ml. Los resultados se leen a las 24 horas para determinar el % de mortalidad. (Tabla 7).

TABLA 7.- Toxicidad de los extractos de *Prunus serotina ssp. capuli*

Extracto	Concentración mg /ml	% Mortalidad
HEXANO	200	6.6
CH ₂ Cl ₂	200	6.6
METANOL	200	13.6

Los compuestos I,II,III, no presentaron toxicidad a los dosis probadas.

Screening de Actividad antiinflamatoria

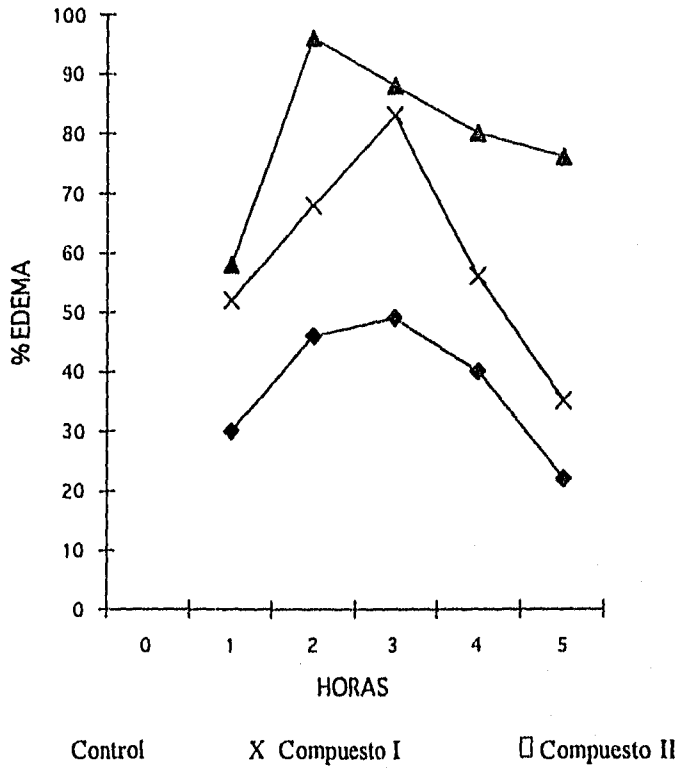
La actividad antiinflamatoria se determinó por el método de Winter⁵⁶, usando tres ratas por compuesto. Los animales se dividieron en dos grupos [control (grupo tratado con el vehículo) y muestra (grupo tratado con el compuesto I,II)]. Tanto los compuestos como el vehículo se administraron 60 minutos antes de inyectar la carragenina, la vía de administración fué oral, las dosis probadas fueron de 100 mg/Kg, la disminución del edema que provocaron los compuestos I,II, se comparó de 0 a 5 horas con respecto al control (Tabla 8).

TABLA 8.- Actividad antiinflamatoria de los compuestos aislados de *Prunus serotina ssp. capuli*

GRUPO	DOSIS (oral)	% Actividad anti-inflamatoria
CONTROL	Vehículo	----
COMPUESTO I	100 mg/ Kg	16.6 %
COMPUESTO II	100 mg/ Kg	-----

Screening: Inflamación en la pata de la rata inducido con carragenina

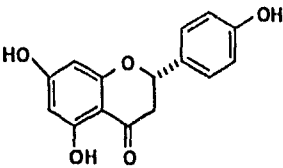
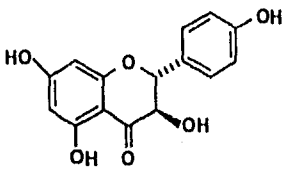
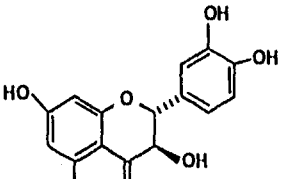
Gráfica del curso temporal del edema inducido por carragenina.



Cada punto de la gráfica representa el promedio de tres animales

Figura 2.- Gráfica de % de edema contra tiempo (horas) de la actividad de 2 de los compuestos aislados de la corteza de *Prunus serotina ssp. capuli*. Se observó que el compuesto II tiene posible actividad antiinflamatoria con respecto al control, a el cual sólo se le administró el vehículo (Dimetil sulfóxido 1% + metil celulosa 0.5 %), y en donde no se observó disminución del edema.

TABLA 9.- Actividad biológica descrita en la literatura para los compuestos aislados

ESTRUCTURA	NOMBRE	ACTIVIDAD	Ref.
 <p>$C_{15}H_{12}O_5$</p>	NARINGENINA	Antifúngica Antibacteriana Antiulcerosa Inhibidor de la AMPcíclico fosfodiesterasa	57 30, 57 58 59
 <p>$C_{15}H_{12}O_6$</p>	AROMADENDRINA	Fungicida	57
 <p>$C_{15}H_{12}O_7$</p>	TAXIFOLINA	Fungicida Inhibición del desarrollo de larvas.	57 60

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Del extracto de acetato de etilo de la planta se aislaron tres compuestos de tipo flavonoide, los cuales estan descritos en la literatura, una flavanona (Naringenina) y dos dihidroflavanoles (aromadendrina y taxifolina).

Los resultados de la actividad biológica nos dejan ver que quizá sean los responsables de la actividad farmacológica que se le atribuye a la planta (corteza), ya que presentaron posible actividad antibacteriana y antiinflamatoria a las dosis probadas.

Prunus serotina ssp. capuli es una planta originaria de América, cuyo uso medicinal se haya muy difundido en México, de la cual no existen datos farmacológicos que validen dicha utilización.

Sin embargo los resultados de la presente investigación abren la puerta a realizar pruebas farmacológicas para los compuestos aislados, estudiar las hojas y raíces de la planta para poder encontrar una correlación entre los posibles metabolitos de éstos con los aislados de la corteza.

BIBLIOGRAFIA

Bibliografía

- 1.- Castleman Michael , *Hierbas curativas*
Editorial Diana , México 1994
- 2.- Aguilar Abigail, *Herbario Medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social*,
Primera edición, México 1994, p. 173
- 3.- J. Rzedowski, *La vegetación de México* , Editorial Limusa,
3era. reimpresión , México 1983, p.74.
- 4.- Lawrence George, *Taxonomy of vascular plants*
The Macmillan company, New York, 1959, p.p. 542-545
- 5.- Strasburger, *Tratado de botánica*
Ediciones Omega , México 1988, p.p. 480-483
- 6.- Jisaburo Ohwi, *Flora of Japan*
Smithsonian Institution Washington D.C 1965, p.p. 518,541-544
- 7.- Hugh Johnson, *Los arboles*
Editorial Blume , Barcelona 1980, p.p. 190, 191, 200-203
- 8.- Gueissman T.A, *Comparative biochemistry of flavonoid compounds*,
Macmillan company, New York 1962, p.p.560-561
- 9.- Aguilar Contreras Abigail, Zolla Carlos, *Plantas tóxicas de México*,
Instituto Mexicano del seguro Social , Primera edición , Méx.1982,p.p.173
- 10.- Lozoya, *Plantas medicinales de México*
IMSS, México 1982, p.p. 80-91
- 11.- *Atlas de las plantas de la medicina Tradicional Mexicana. Vol. I*
Instituto Nacional Indígenista, México 1994, p.p. 319-320
- 12.- Martínez Maximino, *Las plantas medicinales de México*
Ediciones botas 6 edición , México 1989, p.p 64
- 13.- Domínguez A. Xavier, *Métodos de Investigación Fitoquímica*,
Editorial Limusa, 3era. reimpresión , México 1985, p.p.81-89
- 14.- *The flavonoids:Advances in research*, (Eds. Harborne, J.B. et al)
Chapman and Hall, London 1982
- 15.- Bruneton J., *Elementos de fitoquímica y de farmacognosia*
Editorial Acribia S.A, España 1984, p.p. 159-161

BIBLIOGRAFIA

- 16.- Marckham K.R. **Techniques of flavonoids**, Ident. Academic press (1982), p.p. 1-3
- 17.- C. A. Williams, J. R. S. Hoult, J. B. Harborne, J. Grenham and J. Eagles
Phytochemistry, 38, 267-270, 1995
- 18.- S. Ratsimamanga-Urverg, P. Rasoanivo, C. Rabemanantsoa, Rakoto Ratsimamanga
FITOTERAPIA, LXV, 551-553, 1994
- 19.- How Rei-Sheu, Dult Chanl-Yih, Wang Shan-Kwei,
Phytochemistry, 35, 271-272, 1994
- 20.- Guo-Quiang Zheng
Planta Médica, 60, 54-57, 1994
- 21.- A. E. Nkengfack, J. Kouam, T. W. Vouffo
Phytochemistry, 35, 521-526, 1994
- 22.- Ch. Prakash Rao and G. L. David Krupadanam
Phytochemistry, 35, 1597-1599, 1994
- 23.- J. J. Lichius, O. Thoison, A. Montagnac, M. Païs, F. Gueritte- Voegelien,
T. Sévenet, Jean-Pierre cosson, and Abdul Hamid A. Hadi
J. Nat. Prod., 57, 1012-1016, 1994
- 24.- R. Encarnación D., N. Ochoa A., U. Anthoni, C. Christophersen, and
P.H.Nielsen
J. Nat. Prod., 57, 1307-1309, 1994
- 25.- M. Iinuma, Y. Okawa, T. Tanaka, Feng-Chi Ho, Y. Kobayashi and Ken-Ichi
Miyachi
Phytochemistry, 37, 889-891, 1994
- 26.- S. Sugiyama, K. Umehara, M. Kuroyanagi, A. Ueno and T. Taki
Chem. Pharm. Bull., 41, 714-719, 1993
- 27.- K. Ishiguro, S. Nagata, H. Fukumoto, M. Yamaki, K. Isoi and Y. Oyama
Phytochemistry, 32, 1583-1585, 1993
- 28.- M. J. Abad, P. Bermejo, A. Villar and S. Valverde
J. Nat. Prod., 56, 1164-1167, 1993
- 29.- M. Taniguchi, and I. Kubo
J. Nat. Prod., 56, 1539-1546, 1993
- 30.- K. Osawa, H. Yasuda, T. Maruyama, H. Morita, K. Takeya and H. Itokawa
Chem. Pharm. Bull., 40, 2970-2974, 1992
- 31.- M. Inuma, T. Tanaka, M. Mizuno, H. Yamamoto, Y. Kobayashi, and S. Yonemori
Chem. Pharm. Bull., 40, 2749-2752, 1992

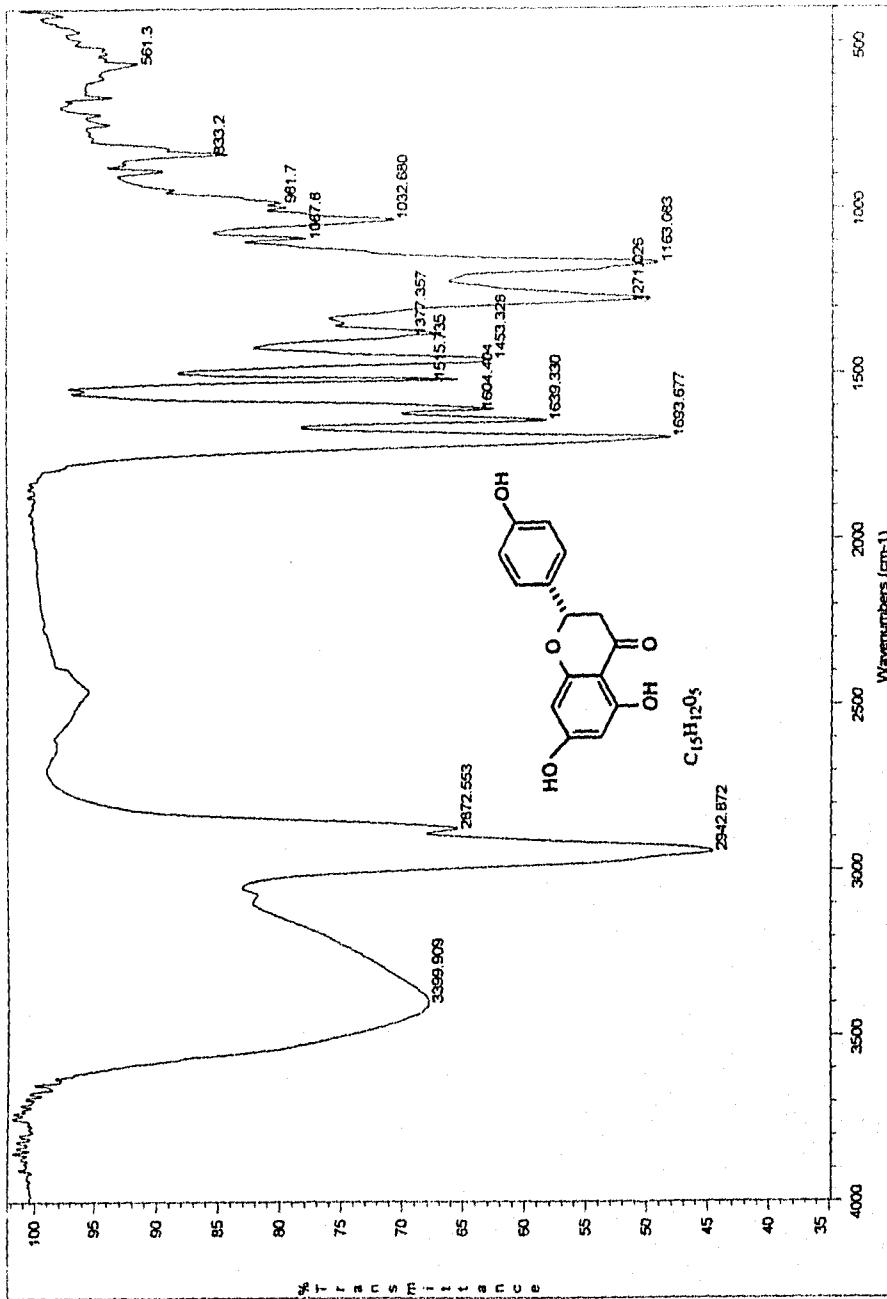
BIBLIOGRAFIA

- 32.- Lee-Juiian Lin, G. Topcu, H. Lotter, N. Ruangrungsi, H. Wagner,
J. M. Pezzuto and G. A. Cordell
Phytochemistry, 31, 4333-4335, 1992
- 33.-Lee-Juiian Lin, N. Ruangrungsi, G.A. Cordell, Hui-Ling Shieh, M.You and J.M.
Phytochemistry, 31, 4329-4331, 1992
- 34.-M. Arisawa, T. Hayashi, M. Shimizu, N. Morita, H. Bai, S. Kuze, and Y. Ito
J. Nat. Prod., 54, 898-901, 1991
- 35.-A. Murakami, S. Tanaka, H. Ohigashi, M. Hirota, R. Irie, N. Takeda,
A. Tatematsu and K. Koshimizu
Phytochemistry, 31, 2689-2693, 1992
- 36.-G. B. S. Reddy, A. L. Udupa, A. Shirwaikar, K. Srinivasa, K.Srinivasan
FITOTERAPIA, LXI, 460-461, 1990
- 37.-K. E. Malterud, I. M. Hanche-Olsen, and I. Smith-Kielland
Planta Medica, 55, 569-570, 1989
- 38.-P. E. Laks and M. S. Pruner
Phytochemistry, 28, 87-91,1989
- 39.- M. Claeys, L. Pieters, J. Corthout, D. A. Vanden Berghe and A. J. Vlietnick
J. Nat. Prod., 51, 966-968, 1988
- 40.- A.D Barros, A. de Alveranga, Otto R. Gottlieb
Phytochemistry ,21, 2107-2109, 1982
- 41.- Yoshiaki Shirataki, Ichiro Yokoe, Massaki Endo and Manki Kamatsu.
Chem Pharm. Bull, 33, 444-445, 1985
- 42.- Bahuguna R.P., J.S.Jangwan,
J. Nat. Prod, 50, 232-235, 1987
- 43.- Virinder S. Parmar, Anand Vardhhan, G.R. Nagarajan and Rajni Jain,
Phytochemistry, 31, 2185-2186, 1992
- 44.- Johannes Reisch, Raouf A. Hussain and Juliu Mester,
Phytochemistry, 23, 2114-2115, 1984
- 45.- HiroshiTakahashi, Yumiko Kubota, Mieko Iguchi, Lin Fang and M. Onda,
Heterocycles, 24, 373-374, 1986
- 46.- Zhaobang Shen and Olof Theander
Phytochemistry ,24,155-158, 1985
- 47.- Akiyo Sakushima and Sansei Nishibe
Phytochemistry ,27,948-950, 1988

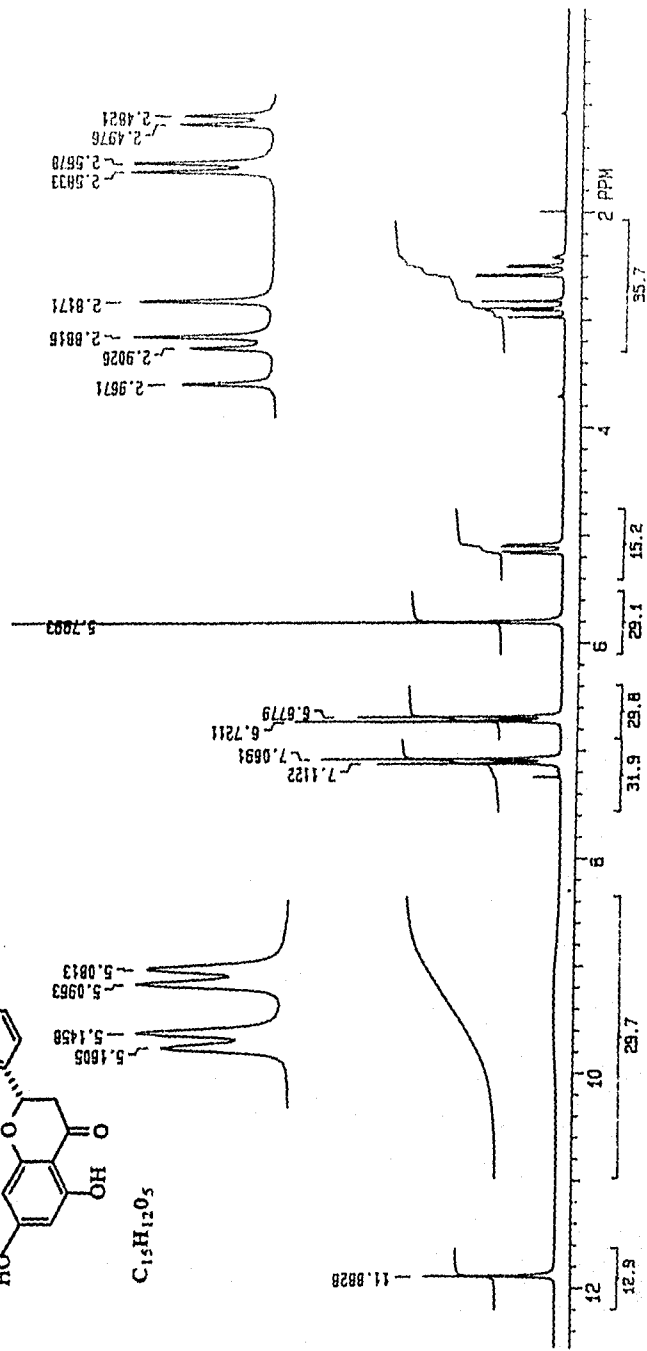
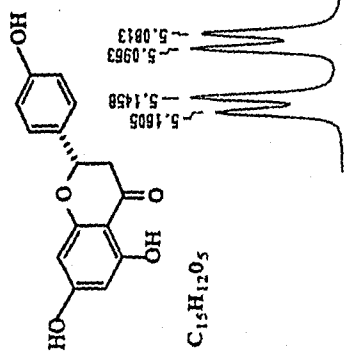
BIBLIOGRAFIA

- 48.- Yoshiyuki Kimura, Hiromichi Okuda, Tadato Tani and Shigeru Arichi
Chem. Pharm.Bull, 30,1792-1795, 1982
- 49.- Nabin C. Baruah, Ram P. Sharma, Gopalakrishna Thyagarajan, Werner Herz and Serengolam V. Govidan ,
Phytochemistry, 18, 2003-2006, 1979
- 50.- Harborne J.B, Mabry T,S
The flavonoids, Chapman and Hall. London, 1975
- 51.- Hiroshi Takahashi,
Heterocycles 24, 1152, 1984
- 52.-Nonaka Gen-ichiro, Goto Yuko, Jun- ei Kinjo, Toshirohiro Nohara.
Chem Pharm. Bull, 35, 1105-1108, 1987
- 53.- Kasai, R et al.,Chem. Pharm. Bull, 39 , 1871-1882, 1991
- 54.- Colegate M. Steven , J. Molyneux Russell,
Bioactive Natural Products, P.C.R. Press. Inc 1993, pp.441-454
- 55.- Litter M, **Compendio de Farmacologia**
Editorial El Ateneo Buenos Aires, Argentina,1986 p.709
- 56.- Winter C.A., Risley E.A., Nuass G.W.,
Proc. Soc. Exp. Biol. Med, 11, 544, 1962
- 57.- K.E. Malterud , Torgunn E. Bremnes, Agnete Faegri, Turid Moe,
E.K Sandanger.
J. Nat. Prod, 48, 559-563, 1985
- 58.- Farkas L. Gábor M. and Kallay F. **Flavonoids and biflavonoids**
Library of Congress Cataloging in Publication Data, New York, 1985
- 59.- A. Beretz, R. Anton and J. C. Stoclet
Experientia, 34, 1054-1055, 1978
- 60.- C.A Elliger, Bc. chan and A.C Waiss
Naturwissenschaften, 67, 358-359,1980

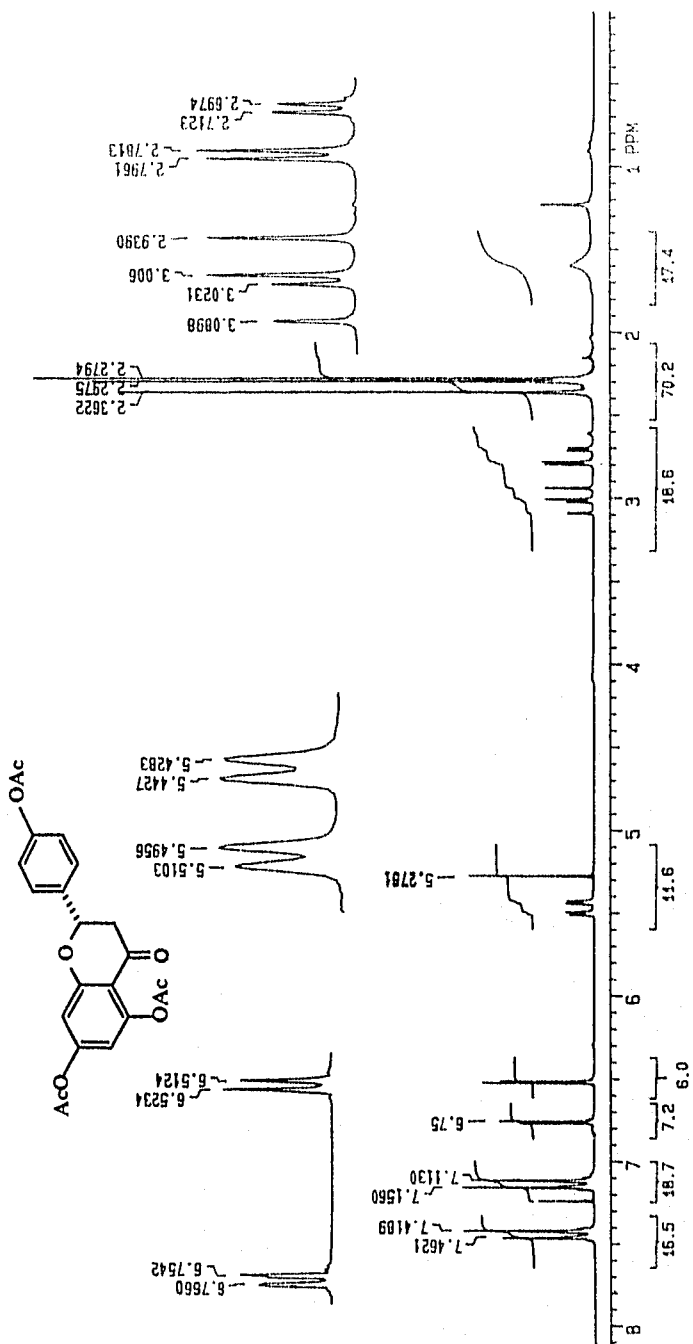
ESPECTROS



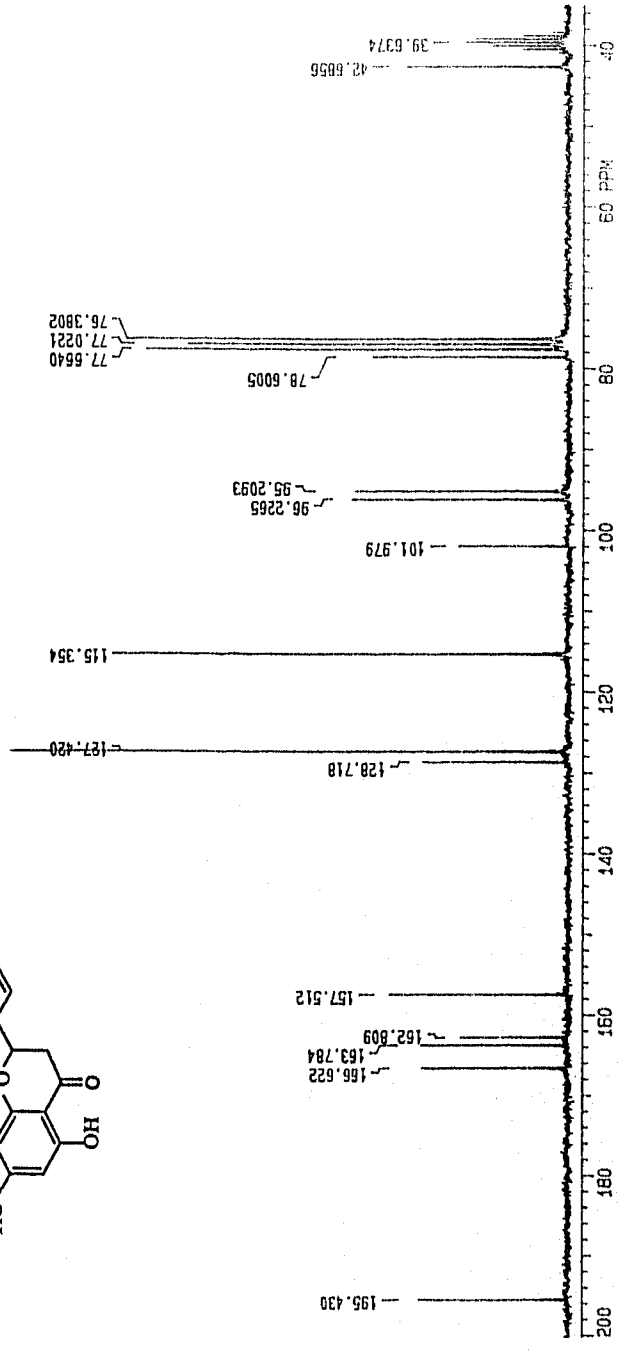
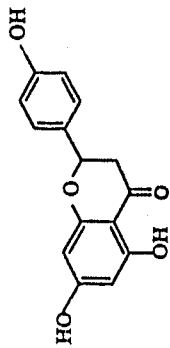
ESPECTRO 1



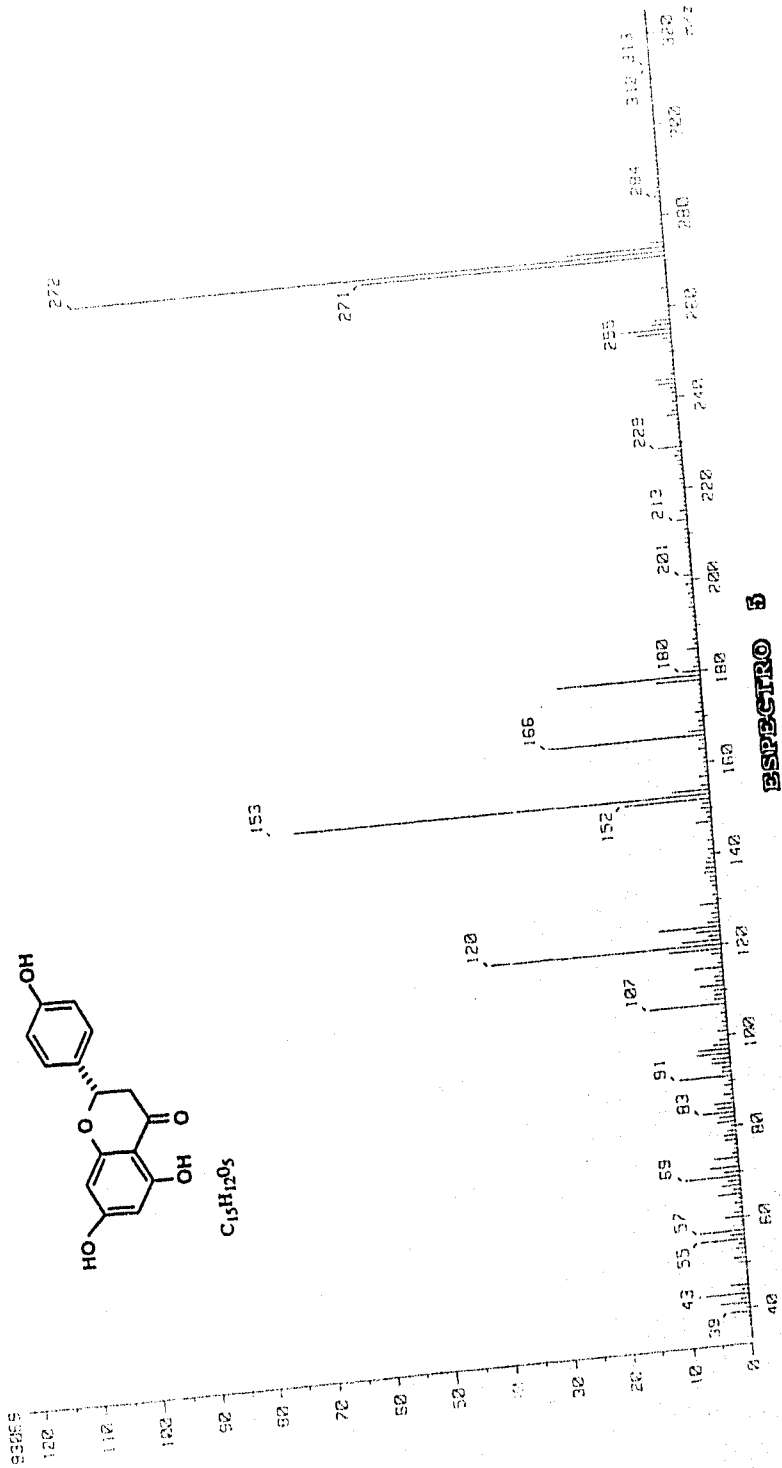
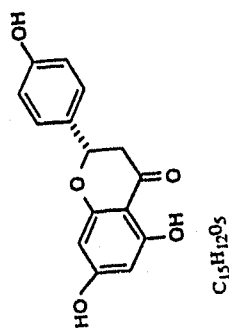
ESPECTRO 2

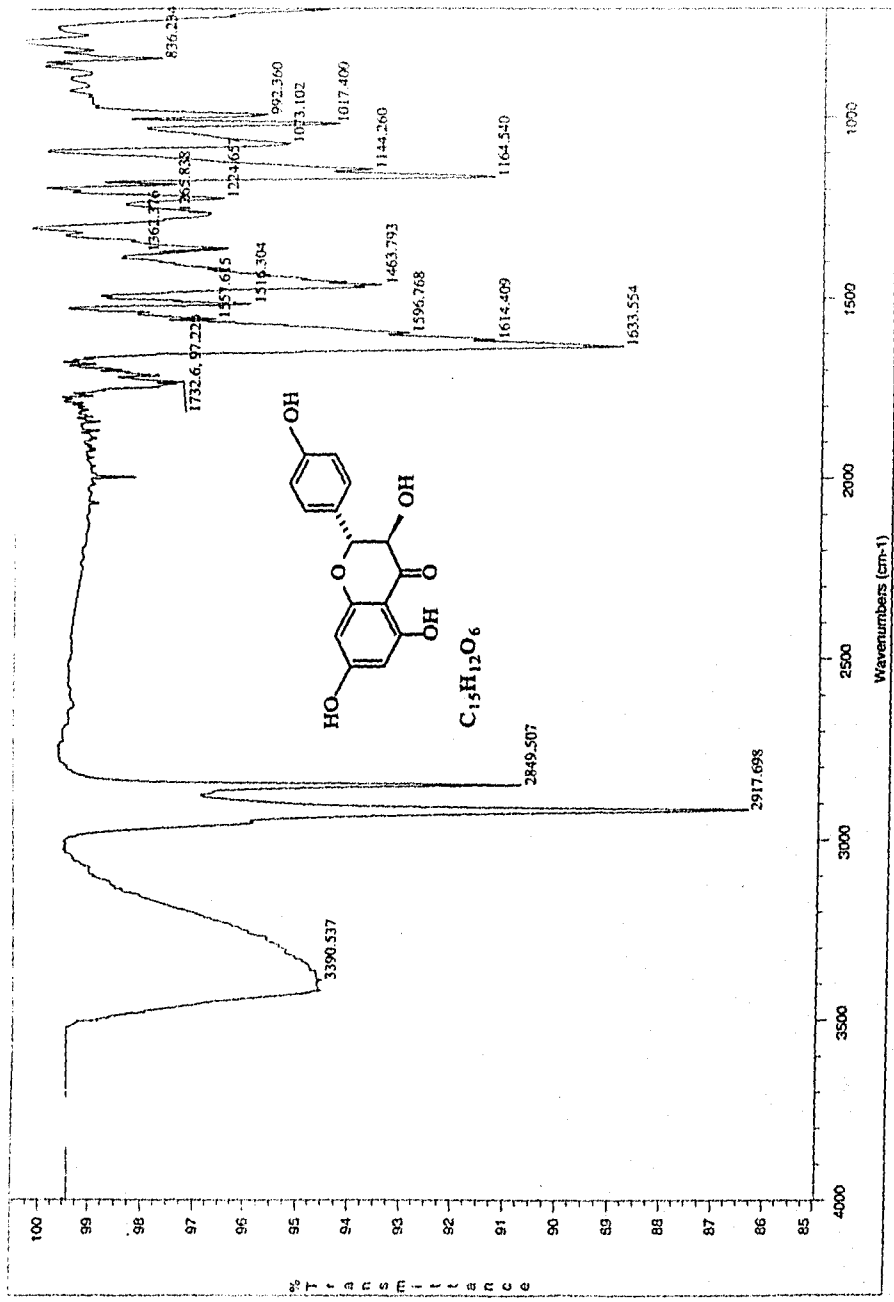


ESPECTRO 3

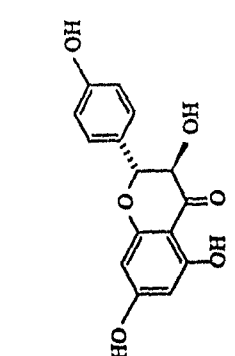


ESPECTRO 4

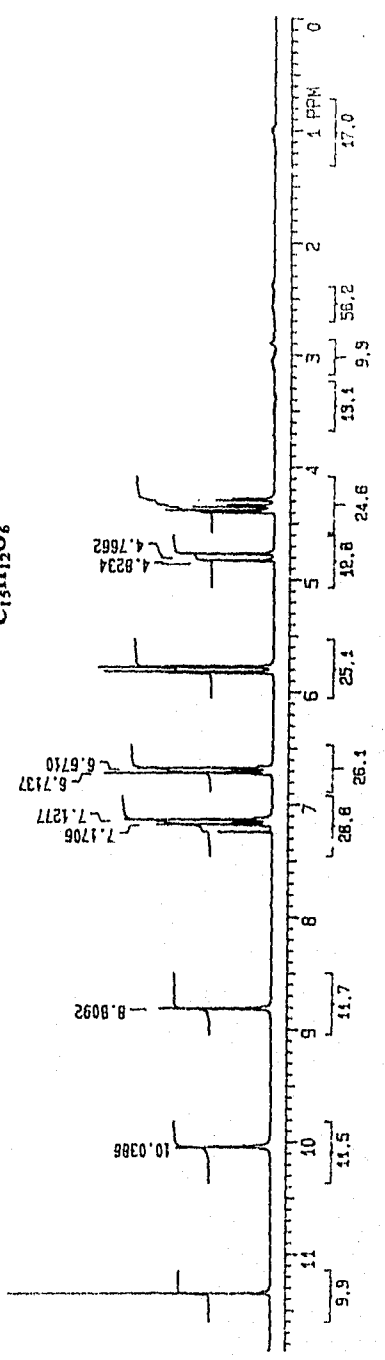
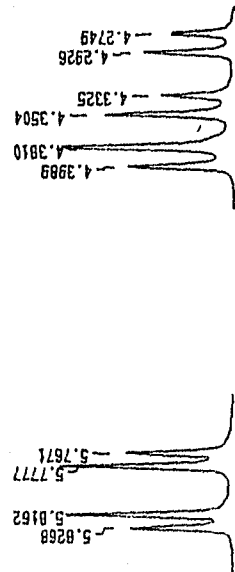




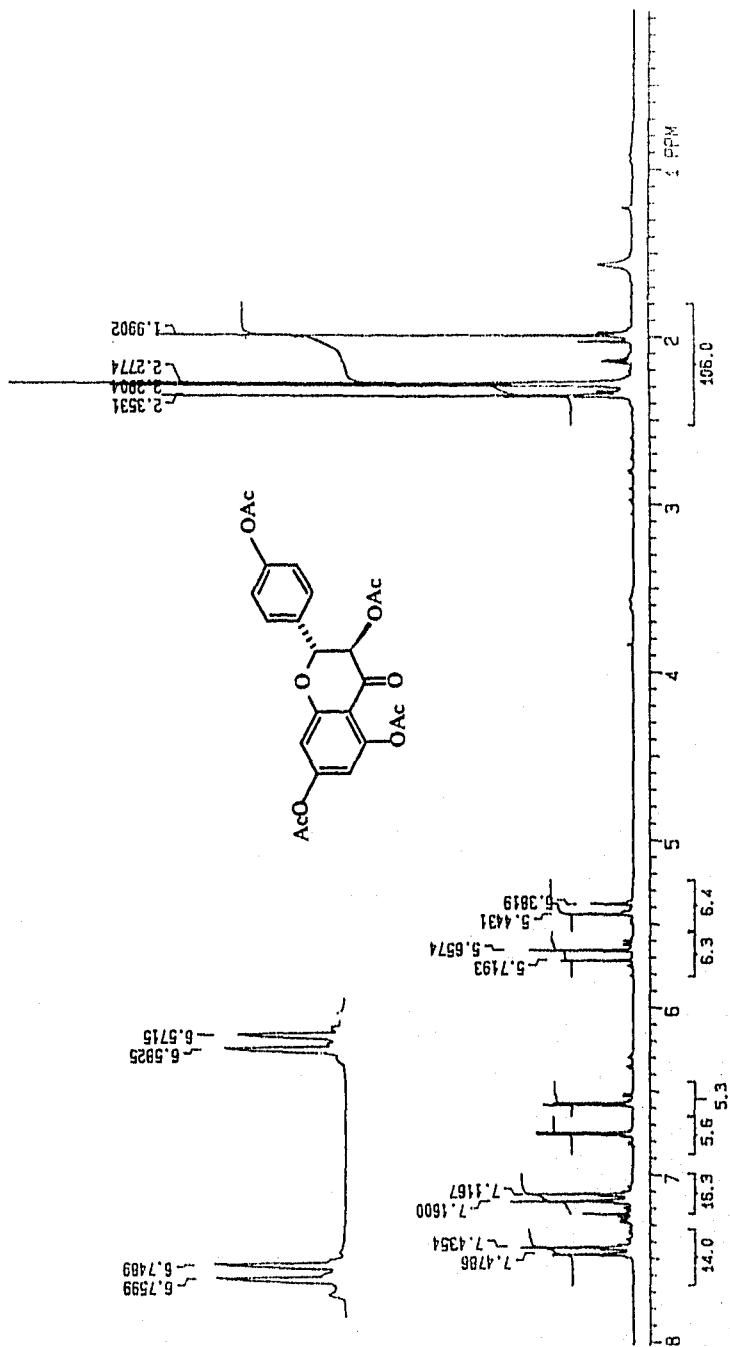
ESPECTRO 6



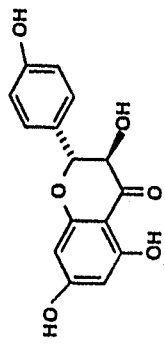
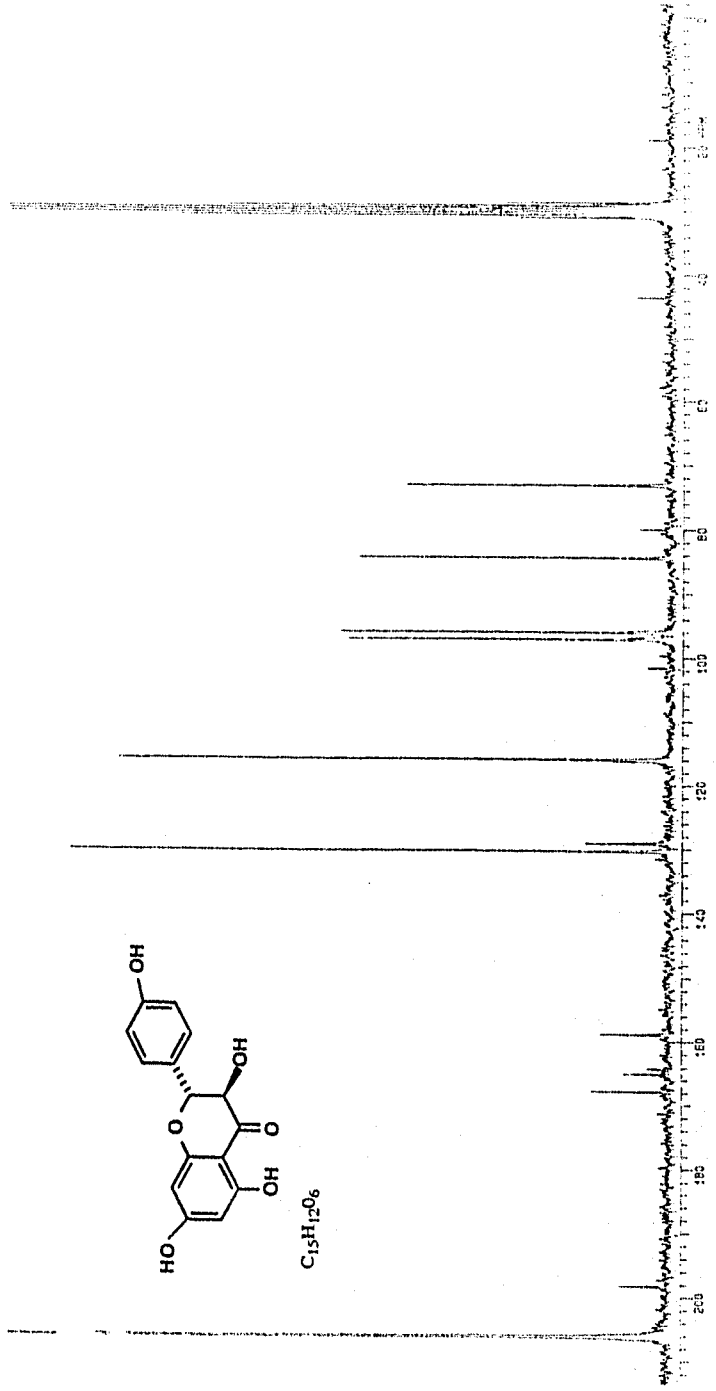
$C_{15}H_{12}O_6$



ESPECTRO 7

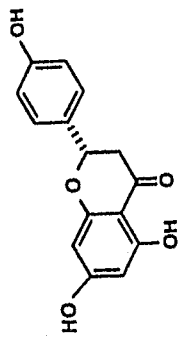
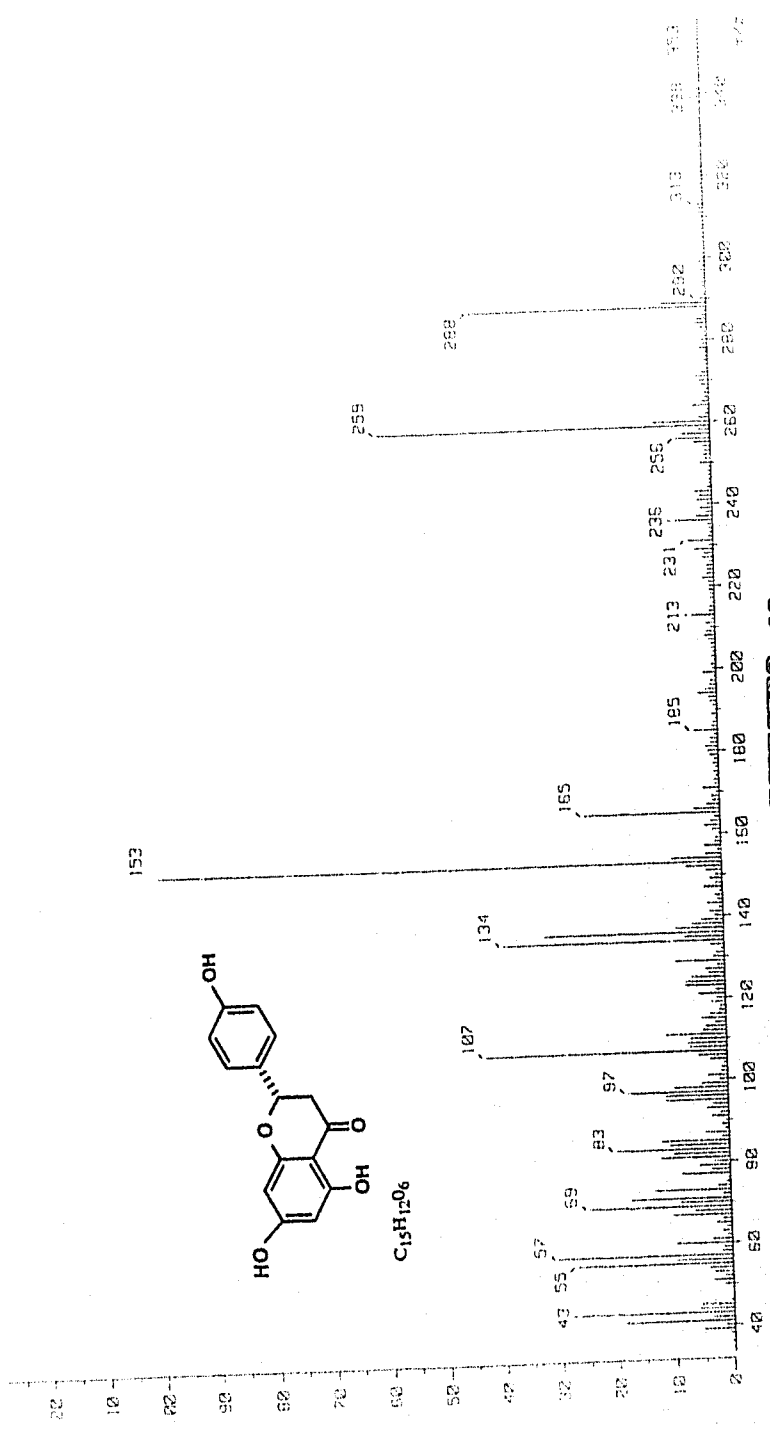


ESPECTRO 8



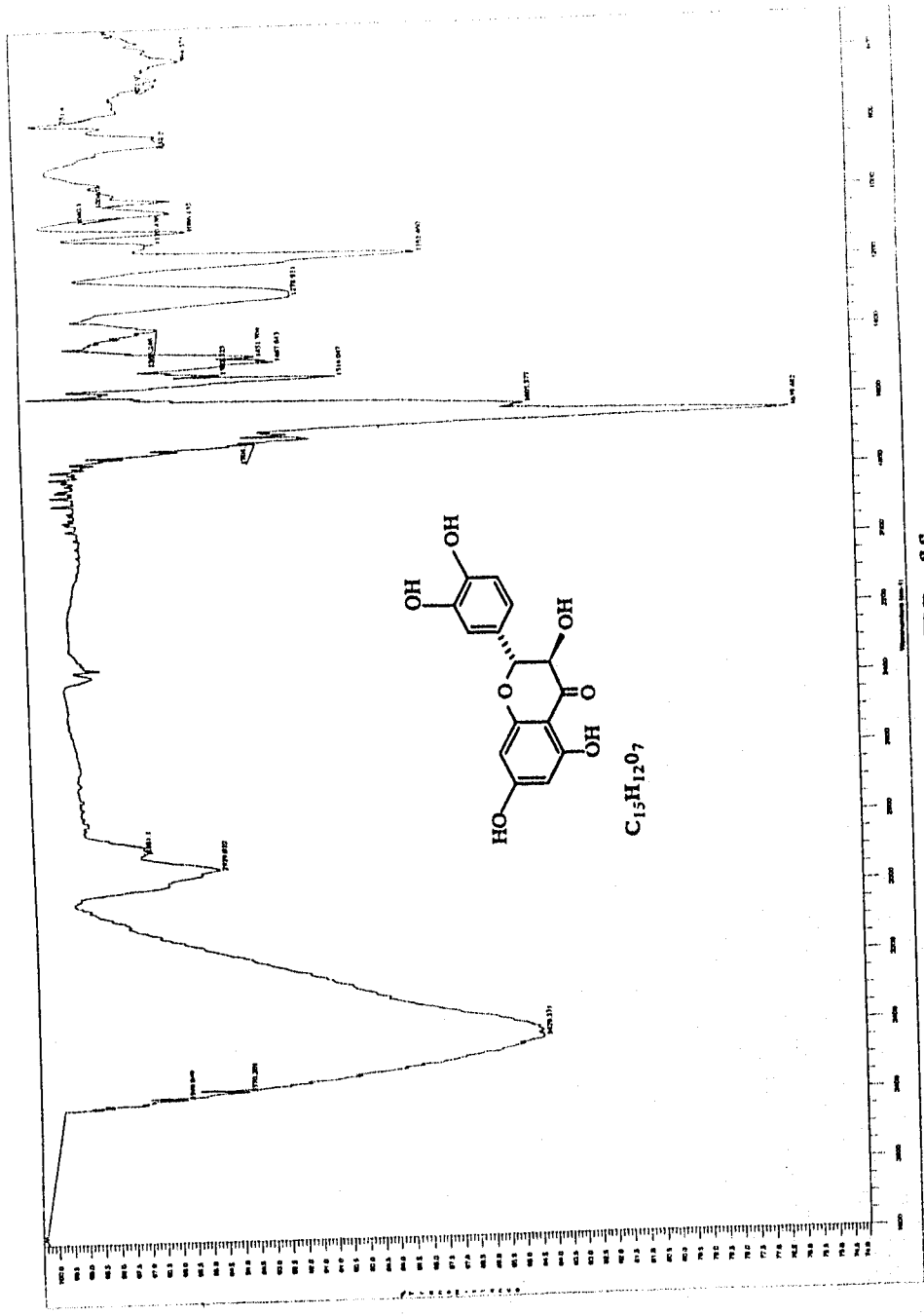
C₁₅H₁₂O₆

ESPECTRO 9

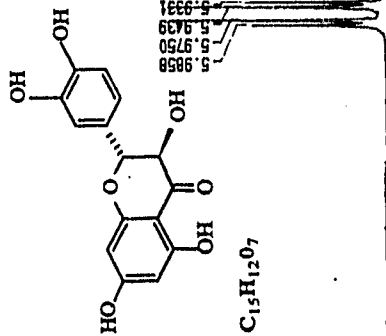


C₁₅H₁₂O₆

ESPECTRO 10



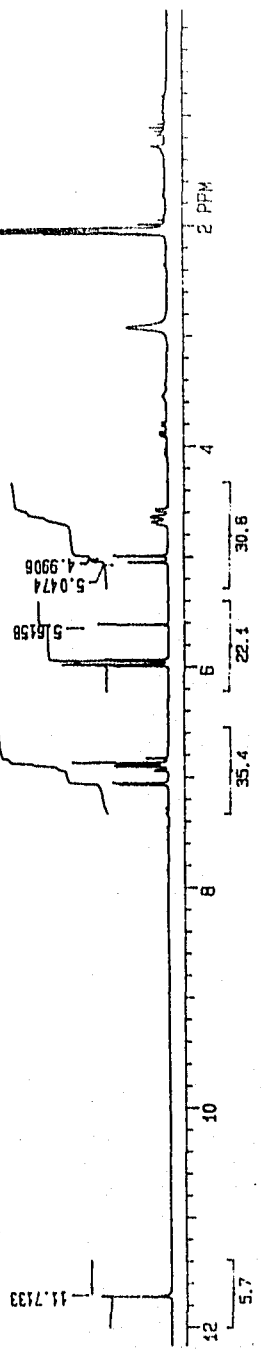
ESPECTRO 11



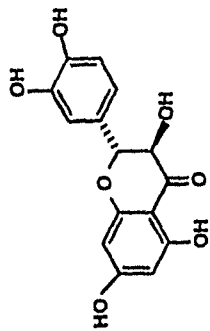
7.0545
 6.9003
 6.8905
 6.8282
 6.8689

5.9858
 5.9750
 5.9439
 5.9331

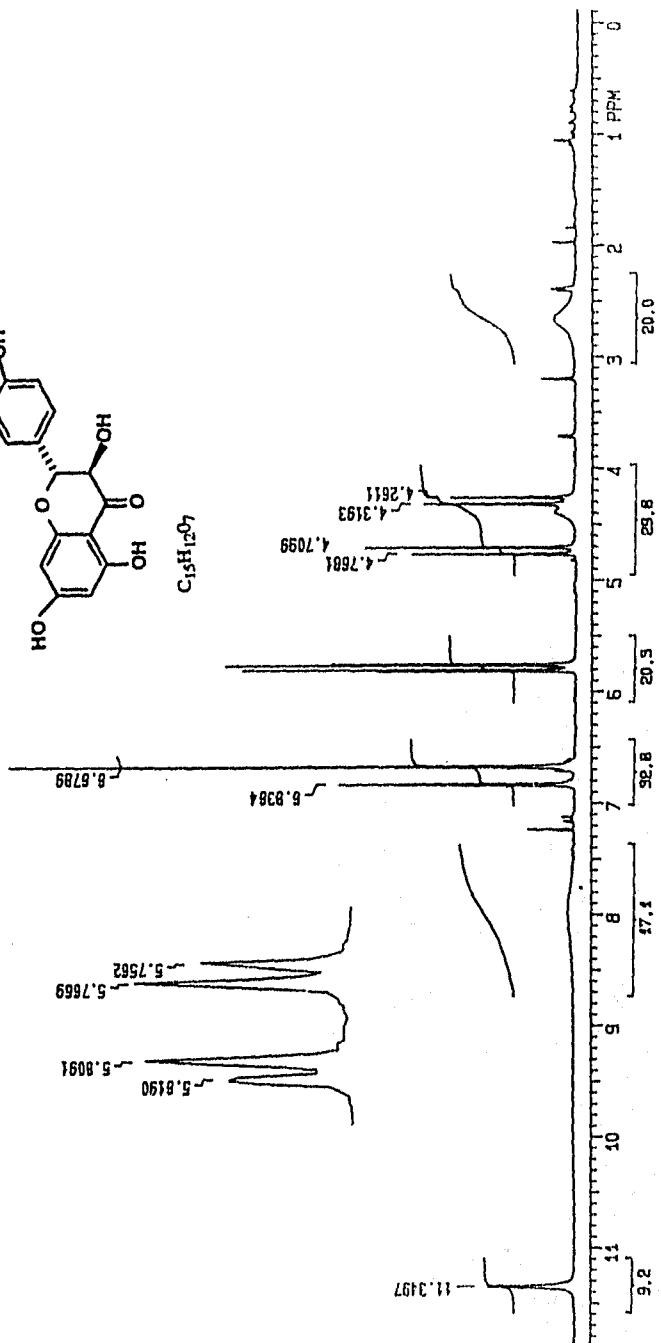
4.7020
 4.6823
 4.6430
 4.6283
 4.5852
 4.5701



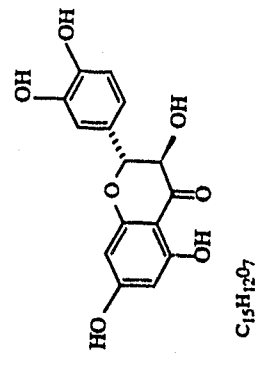
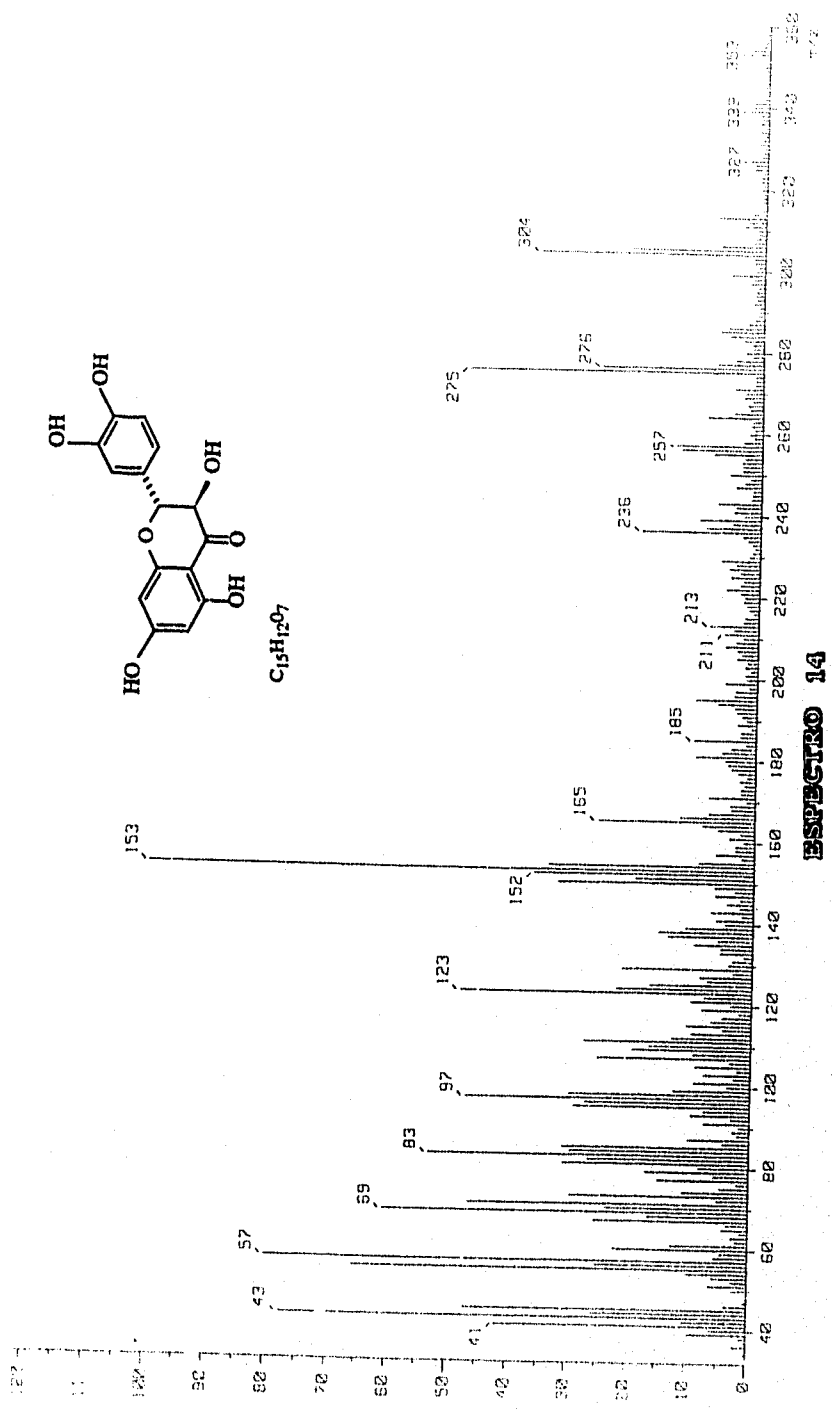
ESPECTRO 12



$C_{15}H_{12}O_7$



ESPECTRO 18



ESPECTRO 14