

18
24



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

Caracterización, identificación y determinación
de la actividad biológica de flavanonas
preniladas aisladas de *Esenbeckia berlandieri*
ssp acapulcensis (Rose).

T E S I S
Que para obtener el Título de:
Químico Farmacéutico Biólogo
S u s t e n t a:
MARINA ESPINOZA CANO

Director: Q. ARTURO E. CANO FLORES

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



LO HUMANO ES
DE NUESTRA OBLACION

MEXICO, D. F.

1996

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Doy gracias a Dios por darme la vida, la salud y por haberme permitido cumplir un objetivo más en la vida. Por todo lo que me ha dado y hasta donde me permita llegar.

DEDICATORIAS.

**Con mucho cariño a mis padres,
quienes han sacrificado gran parte de su vida
para poder darme una educación.**

**Con gran admiración y respeto a dos profesores
excepcionales: Al M. en C. Alejandro Ruiz
Cancino y al Q. Arturo E. Cano Flores. Por
todas sus enseñanzas y consejos que han sido de
un valor incalculable, por ésto y más.**

AGRADECIMIENTOS.

Se agradece al personal Técnico-Académico del Instituto de Química de la UNAM por las facilidades brindadas en la realización del presente trabajo.

Se agradece al Dr. A. J. Vlietinck de la Universidad de Antwerpen de Bélgica, por la realización de las pruebas antimicrobianas y antivirales.

El presente trabajo se realizó en colaboración con el Dr. Guillermo Delgado Lamas del Instituto de Química de la UNAM.

El presente trabajo fue presentado en:

*** El Primer Congreso Internacional de Ciencias e Ingenierías del Área Químico Biológicas. Cholula, Puebla. Marzo de 1995.**

*** El XII Seminario Científico. Centro Nacional de Investigaciones Científicas. Habana, Cuba. Junio de 1995.**

*** El IX Simposio de Estudiantes de Posgrado en Química "Fernando Romo". Puebla. Noviembre de 1995.**

*** El XIII Taller de Otoño. Centro de Investigación Científica de Yucatán. Mérida, Yucatán. Noviembre de 1995.**

INDICE

	Pág.
NOTACIONES EMPLEADAS.	i
I. INTRODUCCION.	1
II. ANTECEDENTES.	5
2.1. FAMILIA DE LAS RUTACEAS.	6
2.2. GENERO <i>ESENBECKIA</i> :	28
2.3. ACTIVIDAD BIOLOGICA DE PRODUCTOS NATURALES	30
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	34
IV. HIPOTESIS.	36
V. OBJETIVOS.	38
5.1. OBJETIVO GENERAL.	39
5.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS.	39
VI. MATERIAL.	40
VII. PARTE EXPERIMENTAL.	44
7.1. PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS.	45
7.2. TRANSFORMACIONES QUIMICAS.	54
7.3. BIOENSAYOS FRENTE <i>Artemia salina</i> .	63
VIII. RESULTADOS.	64
IX. DISCUSION DE RESULTADOS.	76
9.1. ELUCIDACION ESTRUCTURAL.	77
9.2. ESTUDIO DE RMN- ¹³ C DE LAS FLAVANONAS PRENILADAS Y SUS DERIVADOS.	104
9.3. BIOENSAYOS FRENTE <i>Artemia salina</i> Y PRUEBAS ANTIMICROBIANAS.	114
X. CONCLUSIONES.	116
XI. ESPECTROS.	119
XII. BIBLIOGRAFIA.	172

NOTACIONES EMPLEADAS

Abreviaturas y símbolos

AMCPB	Acido <i>meta</i> -cloroperbenzoico.	
AcOEt	Acetato de etilo.	
CDCl ₂	Clorofórmio deuterado.	
J	Constante de acoplamiento.	Hz
c	Cuarteto.	
C	Concentración en la determinación de la rotación óptica.	mg/ml
MIC	Concentración Mínima Inhibitoria.	mg/ml
MBC	Concentración Mínima Bactericida.	mg/ml
Cl ₅₀	Concentración Letal Media.	ppm
COSY	Correlación Espectroscópica (RMN- ¹ H) Homonuclear Bidimensional.	
HETCOR	Correlación Espectroscópica (¹ H- ¹³ C) Heteronuclear Bidimensional.	
COLOC	Correlación Espectroscópica (¹ H- ¹³ C) Heteronuclear Bidimensional.	
CCF	Cromatografía en capa fina.	
CCP	Cromatografía en capa fina preparativa.	
CCV	Cromatografía en columna a vacío.	
δ	Desplazamiento químico.	ppm
DEPT	Distorsión aumentada por una transferencia de polarización.	
DDQ	2,3-Dicloro-5,6-diciano- <i>p</i> -benzoquinona.	
d	Doblete.	
dd	Doble de doble.	
EM	Espectroetría de Masas.	
UV	Espectroscopia de Ultravioleta.	
IR	Espectroscopia de Infrarrojo.	
Hex.	Hexano.	
M'	ión molecular.	
IE	Impacto Electrónico.	
λ	Longitud de onda.	nm
m	Multiplete.	
ν	Número de onda.	
APT	Prueba de un protón unido.	
pf.	Punto de fusión.	°C
m/z	Relación masa-carga.	
RMN- ¹ H	Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno.	
RMN- ¹³ C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13.	
[α] _D ²⁵	Rotación óptica.	
s	Singulete.	
TMS	Tetrametilsilano.	
t	Triplete.	
tc	Triple de cuarteto.	

I. INTRODUCCION.

INTRODUCCION.

El objetivo de la quimiotaonomía es dar a conocer las relaciones entre las clasificaciones filogenéticas de los vegetales y la naturaleza química de las sustancias que contienen o pueden contener, en particular los llamados metabolitos secundarios¹.

Las proteínas, los lípidos, polisacáridos, etc, son los constituyentes fundamentales para la sobrevivencia del organismo y éstos son considerados como metabolitos primarios². Los metabolitos secundarios o productos naturales, son sustancias características de un determinado grupo de plantas y los cuales se derivan de los metabolitos primarios. Hasta el momento se desconoce la función que desempeñan los metabolitos secundarios en las plantas; sin embargo, actualmente revisten de una gran importancia desde el punto de vista químico, farmacológico y económico¹.

Para el botánico, la información sobre los componentes químicos de las plantas le es indispensable cuando los caracteres morfológicos externos o internos fácilmente determinables, son insuficientes para decidir la posición taxonómica de ciertos vegetales.

Así mismo, resulta ventajoso o útil para el químico apoyarse en criterios quimiotaonómicos al seleccionar las plantas a estudiar, al decidir los tipos de sustancias que puede aislar y al escoger la metodología más apropiada para su aislamiento y caracterización¹.

No obstante, una característica importante de los métodos fitoquímicos es que no existe uno exclusivo para atacar el problema del aislamiento de sustancias presentes en las plantas. De esta forma, en el trabajo de investigación se requiere el empleo de diversas técnicas; ya que para aislar un compuesto químico de un

vegetal es necesario en primer lugar extraerlo. el extracto "crudo" obtenido contendrá numerosas sustancias, para lograr su aislamiento y purificación es necesario conformar una estrategia de separación. Una vez obtenidas las sustancias puras se procederá a determinar sus propiedades físicas, químicas y espectroscópicas³.

Hasta la Segunda Guerra Mundial, los métodos comúnmente utilizada para la separación y purificación de las sustancias era la cristalización, destilación y extracción con disolventes selectivos. De 1930-1940, fue empleada la distribución Current-Counter y más ampliamente usada la cromatografía de adsorción y partición. Martin y Syngé desarrollaron la cromatografía de partición y papel; mientras que James y Martin dieron a conocer el uso de la cromatografía gas-líquido, la cual influyó considerablemente en el trabajo de la química de productos naturales.

En 1940, la determinación estructural de una sustancia se lograba por medio de la aplicación de las técnicas de ultravioleta -Gillan, Morton y Brande- e infrarrojo -Thompson, Price y Bellamy-, y por la aplicación de ciertas transformaciones químicas. En 1950 se da a conocer el primer instrumento de Resonancia Magnética Nuclear -RMN-. La espectrometría de masas por ionización química e impacto electrónico proveen el peso molecular del compuesto. En 1960 el mejoramiento de la RMN y otras técnicas espectrales -difracción de rayos X- coadyuvan a una deducción estructural más precisa⁴.

Los grandes avances realizados durante las últimas dos décadas en las técnicas espectroscópicas, aceleraron los estudios en la química de los productos naturales. Estos avances son particularmente en el campo de la RMN -espectroscopia de RMN en dos dimensiones- y en espectrometría de masas -nuevas técnicas de ionización, tales como bombardeo atómico positivo o negativo, etc.-⁵.

Cabe mencionar, que el estudio de las plantas actualmente tiene como propósito el aislamiento de sustancias que poseen una determinada utilidad para el ser humano -colorante, agroquímico, fármaco, etc.-. Así mismo, ha propiciado un desarrollo en la síntesis orgánica por la gran gama de sustancias aisladas, algunas de las cuales han sido objeto de metodologías sintéticas totales y parciales; que

han coadyuvado al desarrollo de la química orgánica en particular y de la química como una ciencia que esta involucrada muy estrechamente con el desarrollo de las sociedades modernas ^{6, 7}.

En el presente trabajo se realizó un estudio químico y biológico del extracto etanólico de *Esenbeckia berlandieri* Baill ssp *acapulcensis* (Rose), de donde fue posible aislar 8 sustancias, 4 de las cuales fueron obtenidas de un estudio preliminar; todas identificadas y caracterizadas como flavanonas preniladas; la posición del grupo prenilo en el C-8 de las flavanonas se determinó mediante métodos espectroscópicos y reacciones de ciclización. Adicionalmente, las transformaciones químicas realizadas, permitieron detectar las variaciones en los desplazamientos químicos, que presentaban los átomos de hidrógeno y carbono. Cabe mencionar, que la asignación de las señales en RMN-¹³C para cada uno de los átomos de carbono de las sustancias obtenidas como productos naturales, se realizó por comparación con los desplazamientos químicos de sustancias similares estructuralmente, los cuales se encuentran informados en la literatura científica. Así mismo, fue posible determinar la concentración letal media en *Artemia salina* y la actividad antimicrobiana, tanto del extracto etanólico como de algunas de sus sustancias aisladas.

II. ANTECEDENTES.

2.1. FAMILIA DE LA RUTACEAE.

El orden de las Rutales, incluye varias familias de amplia distribución en todo el mundo, entre las que se encuentran la familia: Rutaceae, Meliaceae, Simaroubaceae, Cneoraceae y Ptaeroxylaceae; siendo la Rutaceae una de las familias de mayor diversidad botánica, como se observa en la tabla 1⁸.

ORDEN	FAMILIA	NUMERO APROXIMADO DE:	
		GENEROS	ESPECIES
R U T A L E S	Rutaceae	150	1600
	Meliaceae	50	1400
	Ptaeroxylaceae	2	8
	Simaroubaceae	20	150
	Cneoraceae	2	3

Tabla 1. Grupos taxonómicos dentro de las Rutales.

Rutaceae es una gran familia de árboles y arbustos, que en algunos casos son hierbas, de gran importancia económica por ser productora de los frutos cítricos comerciales -limones, naranjas, limas, etc.-; la que presenta además una amplia aplicación en el campo de la medicina⁹. Esta familia está constituida por aproximadamente 150 géneros y 1600 especies; tiene una distribución cosmopolita, pero se localizan principalmente en las regiones templadas y tropicales, desarrollándose especialmente en Australia, Sudáfrica y América⁸⁻¹⁰.

La división intrafamiliar aceptada para esta familia comprende 7 subfamilias, como se ilustra en la tabla II 1, 8.

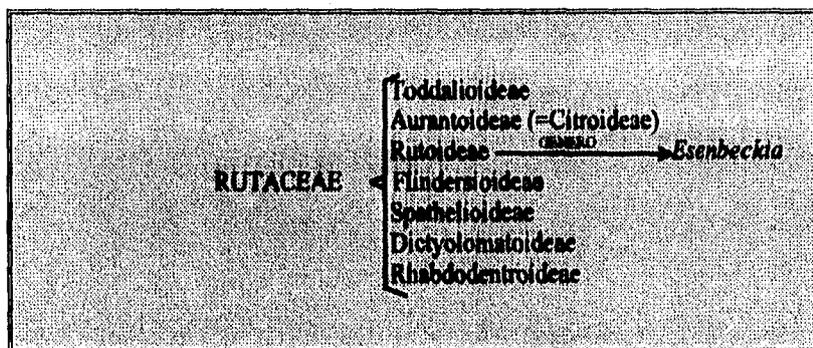


Tabla II. División intrafamiliar de la familia Rutaceae.

La mayoría de los géneros de la Rutaceae pertenecen a las subfamilias Rutoideae, Toddalioideae y Aurantoideae; en tanto que las Spathelioideae, Dictyolomatoideae y Rhabdodentroideae corresponden a 3 pequeñas subfamilias^{8, 11}.

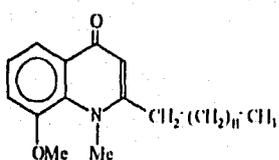
Cabe mencionar que el desarrollo de glándulas aceitosas que pueden observarse a contraluz de las hojas como puntos transparentes, es una característica distintiva de la familia Rutaceae, ya que éstas segregan un aceite esencial, y el cual en algunos casos desprende un olor desagradable⁹.

Así mismo, la familia Rutaceae es una de las más interesantes y complejas con respecto a la química de los alcaloides, a la formación de los limonoides, flavonoides, furocumarinas y otros metabolitos secundarios, que pueden estar presentes en sus frutos, semillas, hojas, tallos y raíces.

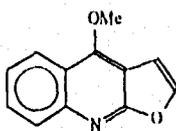
A. Alcaloides

Entre los alcaloides biosintetizados dentro de la familia Rutaceae se han identificado como metabolitos característicos a los derivados de la tirosina, del ácido antranílico, del triptófano y los de tipo quinolínicos.

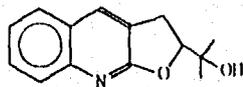
Los alcaloides derivados del ácido antranílico constituyen un grupo grande confinado al orden de las Rutaes, entre los que se encuentran los quinolínicos (1), furoquinolínicos (2), dihidrofuroquinolínicos (3), piranoquinolínicos lineales y angulares (4 y 5 respectivamente) y los derivados de la acridona (6). Estos compuestos se pueden encontrar comunmente oxigenados en las posiciones C-2, C-4 y sustituidos en el anillo aromático por grupos metoxilo o más raramente por grupos hidroxilo, C-prenilo u O-prenilo⁸.



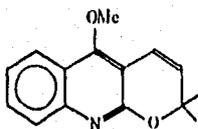
(1)



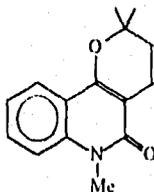
(2)



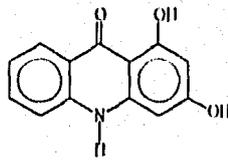
(3)



(4)



(5)

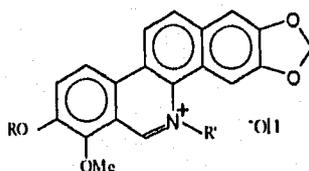


(6)

Se ha informado que algunos de estos grupos de alcaloides pueden mostrar actividad biológica significativa, como los alcaloides furoquinolínicos, los cuales presentan actividad mutagénica; mientras que algunos derivados de la acridona exhiben actividad antiespasmolítica¹⁰.

Sin embargo, se ha descrito que la fototoxicidad y resultados mutagénicos de las furoquinolinas es menos pronunciado que el de las correspondientes furocumarinas ¹⁰.

En contraste con los productos del antranilato, los alcaloides derivados de tirosina no son muy comunes en las Rutales; pero se han identificado en 5 géneros de la familia Rutaceae: *Zanthoxylum*, *Toddalia*, *Phellodendron*, *Tetradium* y *Fagaropsis*; encontrándose más comúnmente las benzo (C) fenantridinas, las que en su mayoría poseen actividad antibiótica pronunciada, en tanto que sólo algunas de ellas presentan actividad anticancerígena¹. Ejemplo de este tipo de alcaloides son la decarina (7), queleritrina (8), etc. aislados de la raíz de *Zanthoxylum spinosum* ¹³.

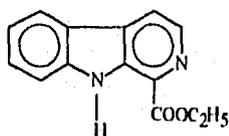


	R	R'
(7)	H	H
(8)	Me	Me

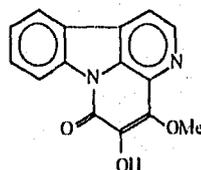
Entre los derivados del triptófano es posible localizar compuestos indolquinazolinicos, tipo carbolina -kumujianina A, 9- y tipo cantinona -nigakinona, 10- los cuales se pueden encontrar, más comúnmente en la familia Simaroubaceae que en la Rutaceae¹. Estos últimos alcaloides -cantinona- pueden presentar alguna actividad antibiótica, antifúngica o citotóxica ¹⁴.

Otros compuestos derivados del triptófano son los carbazoles, que se encuentran comúnmente en algunos géneros de la familia Rutaceae: *Clausena*, *Glycomis*, *Micromelum* y *Murraya*; un ejemplo de éstos es la heptazolina (11). Igualmente este tipo de alcaloides puede exhibir diversas actividades biológicas, como son: antibacterianas, antimicóticas, antivirales, actividades antiinflamatorias, analgésicas, antipiréticas y anticancerígenas ¹⁵.

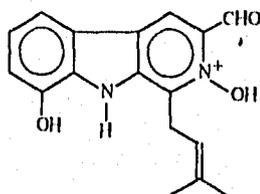
Encontrándose también tanto aminas alifáticas simples como aromáticas.



(9)



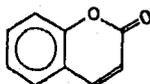
(10)



(11)

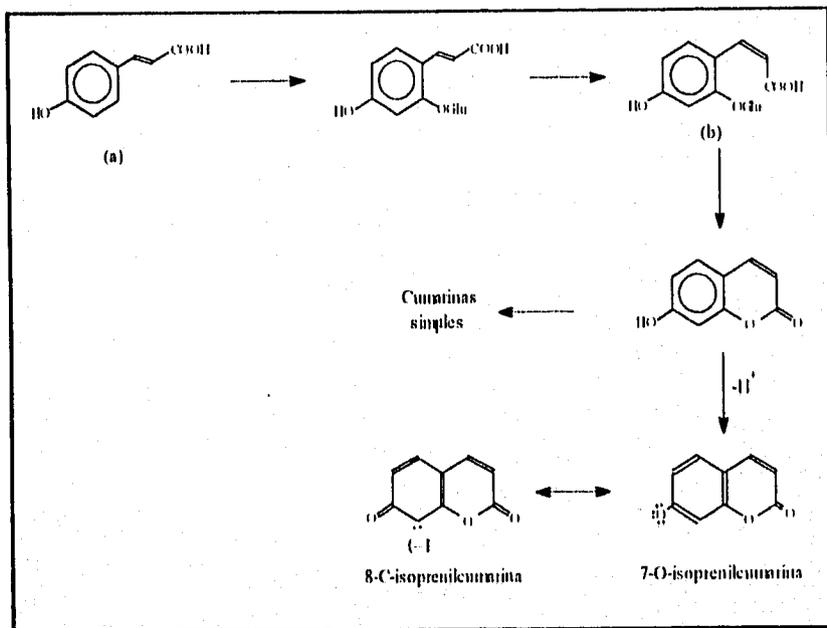
B. Cumarinas

Las cumarinas son sustancias muy comunes dentro del reino vegetal, que presentan como esqueleto base a la 2H-1-benzopirán-2-ona (12); sin considerar los mecanismos biosintéticos se les considera como derivados de las lactonas de los ácidos *orto*-hidroxi(3)-cinámicos 16, 17.



(12)

Una característica distintiva de las cumarinas aisladas de Rutaceae es que presentan una función oxigenada en el C-7, lo que sugiere que los ácidos *trans* y *cis* *p*-cumáricos son los precursores de las cumarinas aisladas de Rutaceae, como se muestra en el esquema 1.



Esquema 1. Origen de las cumarinas

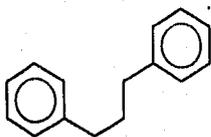
El ácido *p*-hidroxi-*trans*-cinámico (a), formado de la deaminación de la fenilalanina sufre una oxidación en la posición *ortho*- (b), seguido de una glucosilación e isomerización al correspondiente derivado del ácido *cis*-cinámico.

Las cumarinas simples corresponden a compuestos hidroxilados, así como a sus ésteres. Otras cumarinas presentan la adición de una unidad de 5-C, generando cumarinas preniladas y sus derivados furano- y piranocumarinas, las cuales son sustancias características de la familia Umbelliferae y Rutaceae 8, 17.

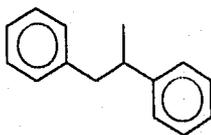
Su papel fisiológico se conoce parcialmente, pese a su abundancia en la naturaleza y a su diversidad estructural, pero se ha encontrado que pueden tener efectos tóxicos en animales -efectos diuréticos, vasodilatadores y propiedades anticoagulantes-, algunas otras pueden estimular el desarrollo de plantas, o bien inhibir la germinación de las semillas como en el caso de las furanocumarinas.

C. Flavonoides

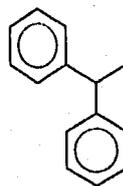
Los flavonoides son compuestos que poseen 15 átomos de carbono, en los cuales 2 núcleos bencénicos están unidos por un eslabón de 3 carbonos: $Ar-C_3-Ar$; de esta manera se pueden distinguir: 1,3-diaril propanos (flavonoides, 13), 1,2-diaril propanos (isoflavonoides, 14) y 1,1-diaril propanos (neoflavonoides, 15) ¹⁷.



(13)



(14)



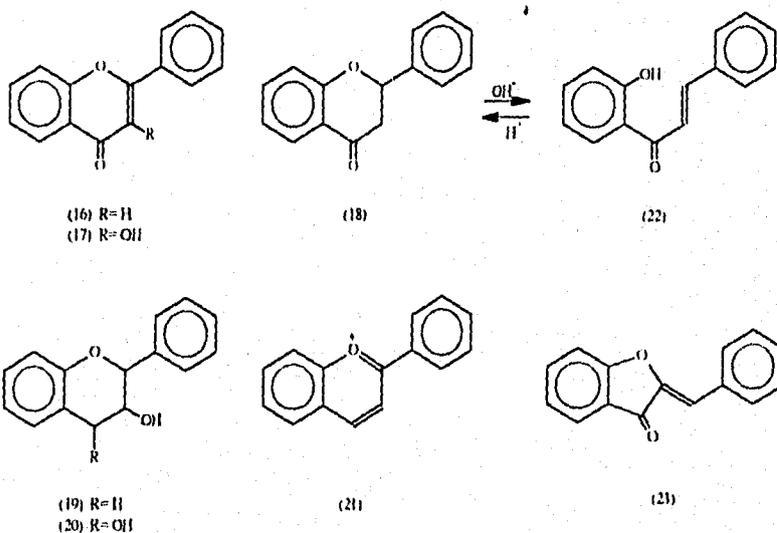
(15)

Los flavonoides son en su mayoría pigmentos responsables de la coloración de numerosas hojas, flores y de algunos frutos; por tanto se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal, generalmente en la forma soluble de glucósidos. Probablemente son sintetizados a nivel de los plástidos citoplasmáticos, acumulándose en el jugo vacuolar. Se encuentran en el mesófilo y la epidermis de las hojas, en la cutícula epidérmica de los frutos y se pueden encontrar también en otros órganos ^{18, 19}.

La extracción se realiza generalmente con disolventes de polaridad creciente, su separación y purificación se logra a través de las diferentes técnicas cromatográficas empleando diferentes tipos de fase estacionaria -poliamida, celulosa, sílica, etc.-. Su identificación se realiza a través de métodos espectroscópicos y espectrométricos, donde la espectroscopia de U.V tiene una importancia especial, ya que presentan espectros característicos dependiendo de la naturaleza y posición del sustituyente, los cuales pueden ser modificados por ionización, reacciones con ácidos de Lewis o por formación de complejos ^{18, 20}.

Cabe mencionar que el término flavonoide abarca estructuras muy diversas como son:

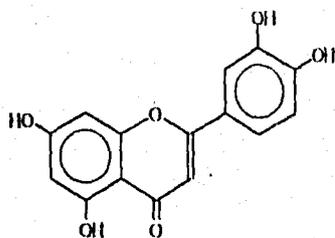
- 2-Fenilcromonas: flavonas (16), flavonoles (17) y flavanonas (18).
- 2-Fenilcromanos (flavanos): 3-flavanol (catecol, 19) y 3,4-flavandioles (20).
- Flavilios: antocianos (21).
- Chalconas: formas isómeras abiertas de las flavanonas (22).
- Auronas: homólogos de las flavonas con heterociclo pentagonal (2-bencilideno cumaranonas, 23) 17.



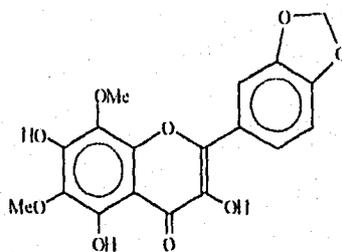
Además, este tipo de compuestos pueden encontrarse en su forma libre o como glicósidos.

A pesar de la gran diversidad de los flavonoides su presencia en las Rutales no es muy conocida; encontrándose hasta este momento únicamente dentro de algunos géneros de las Rutaceae: *Citrus*, *Murraya*, *Merrilia*, *Micromelum* y *Melicope*, los cuales producen flavonas (16), flavonoles (17) y flavanonas polioxigenadas (24); encontrándose en muchos casos compuestos altamente metilados; así por ejemplo, del género *Melicope* se ha aislado melimervina (25), mientras que del género *Merrilia* se ha obtenido eupatorina (26) 8, 17.

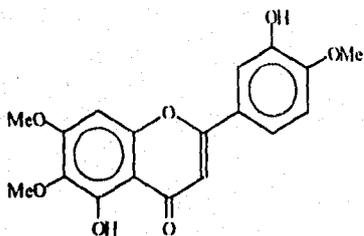
En lo que respecta al género *Citrus*, se han aislado principalmente flavanonas glicosídicas, tales como: naringina (27), neohesperidina (28) y hesperidina (29), y en algunos otros casos flavanonas en su forma libre, como la hesperitina (30) ²¹.



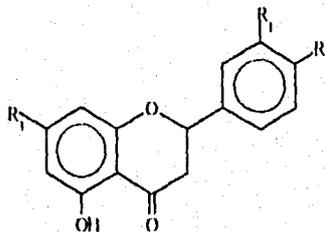
(24)



(25)



(26)



	R ₁	R ₂	R ₃
(27)	H	OH	OCH ₂ (1-2)Rha
(28)	OH	OMe	OCH ₂ (1-2)Rha
(29)	OH	OMe	OCH ₂ (1-6)Rha
(30)	OH	OMe	OH

Dentro de las principales actividades biológicas que presentan algunos flavonoides es que son antioxidantes, otros son inhibidores enzimáticos o bien pantalla frente a radiaciones nocivas ¹⁹.

Por otro lado, se ha informado que la administración de mezclas de flavanonas tal como hesperidina (29) y eridictiol (24), llamada citrina conducen a un decremento en la permeabilidad y fragilidad de capilares sanguíneos ²².

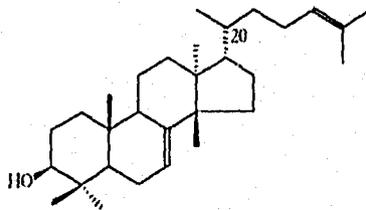
En algunos otros casos se ha descrito que ciertos flavonoides prenilados presentan importantes actividades biológicas -antifúngicas-²³.

D. Limonoides y Quassinoides

Los limonoides y quassinoides son conjuntamente con los alcaloides derivados del ácido antranílico, los metabolitos más característicos de las Rutales. Además, por su diversidad estructural y por su actividad biológica, éstos han despertado un gran interés desde el punto de vista químico y biológico²⁴.

Cabe mencionar que la actividad biológica exhibida por los quassinoides es comparable a la de los limonoides; pero en términos de citotoxicidad y en particular de la actividad antimalárica y amebicida, los quassinoides son más interesantes⁸.

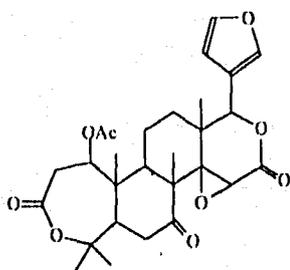
Los limonoides y quassinoides parten de un origen común, el triterpeno tetracíclico tirucalol (31, 20-S, H-20 α) y más raramente eufol (31, 20-R, H-20 β)⁸.



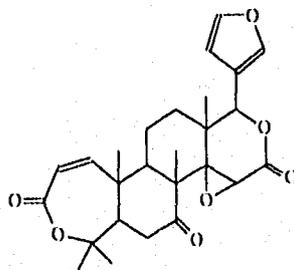
(31)

Los limonoides están relacionados principalmente con las familias Rutaceae, Meliaceae y Simaroubaceae. Dentro de la Rutaceae es posible localizarlos en las tres subfamilias más grandes: Toddaliodeae, Aurantiodeae y Rutoideae; así mismo, se encuentran ampliamente distribuidos en 6 géneros de estas subfamilias: *Casimiroa*, *Phellodendrom*, *Euodia*, *Vepris*, *Dictamnus* y

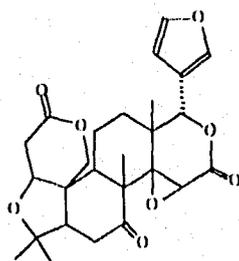
Citrus, a partir de los cuales se han aislado principalmente nomilina (32), obacunona (33) y limonina (34) ²⁵.



(32)



(33)



(34)

Otros metabolitos secundarios encontrados en la familia Rutaceae son las acetofenonas y cromonas.

Un rasgo característico de algunos de estos metabolitos secundarios, como se ha visto, es la presencia del hemiterpeno de 5-C, el cual juega un papel importante en la diversificación de metabolitos secundarios, particularmente en la Rutaceae⁸, como se discutirá más adelante.

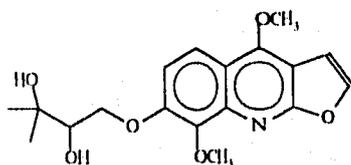
Este tipo de sustituyentes se pueden encontrar unidos mediante una C-prenilación u O-prenilación, tanto en alcaloides como en cumarinas, flavonoides, cromonas y esqueletos de acetofenona, como se indica en la tabla III.

Tabla III. Metabolitos secundarios prenilados, aislados de la familia Rutaceae

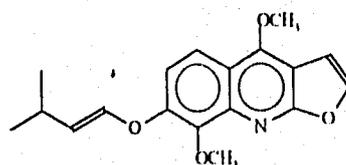
ALCALOIDES FUROQUINOLINICOS PRENILADOS.			
Metabolito secundario	Fig.	Fuente natural	Ref.
Evovina	35	<i>Euodia zanzibaroides</i>	26
7-Isopentenil- δ -fagarina	36	<i>Euodia zanzibaroides</i>	26
Evovordina	37	<i>Euodia zanzibaroides</i>	26
Teclea verdouriana	38	<i>Teclea verdouriana</i>	27
Tecleavardina	39	<i>Teclea verdoorniana</i>	27
Nobilina	40	<i>Teclea nobilis</i>	28
ALCALOIDES DERIVADOS DE LA ACRIDONA			
Metabolito secundario	Fig.	Fuente natural	Ref.
Citropous-B	41	<i>Citrus sp.</i>	8
Gravacridondiolacetato	42	<i>Ruta graveolans</i>	29
Gravacridonitrol	43	<i>Ruta graveolans</i>	29
Gravacridondiol	44	<i>Ruta graveolans</i>	29
Rutaacridona	45	<i>Ruta graveolans</i>	29

ALCALOIDES DERIVADOS DE LA TIROSINA Y AMIDA			
Metabolito secundario	Fig	Fuente natural	Ref
6-(4-metil-2-oxopentil)- dihidroqueleritrina	46	<i>Zanthoxylum spinosum</i>	30
O-(3,3-dimetilalil)halfordinol	47	<i>Amyris breviensis</i>	31
p-O-(3,3- dimetilalil)benzamida	48	<i>Amyris breviensis</i>	31
ALCALOIDES DERIVADOS DEL TRIPTOFANO			
Metabolitos secundarios	Fig	Fuente natural	Ref
Heptazolina	49	<i>Clauseria heptaphylla</i>	8
CUMARINAS			
Metabolitos secundarios	Fig	Fuente natural	Ref
Gravilliferona metil éter	50	<i>Ruta pinnata</i>	32
Balsámifera	51	<i>Amyris balsamifera</i>	33
FUROCUMARINAS			
Metabolitos secundarios	Fig	Fuente natural	Ref
Imperatorina	52	<i>Ruta pinnata</i>	34
Faloplerina	53	<i>Thamnosma montana</i>	34

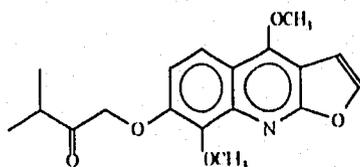
FLAVONOLES			
Metabolito secundario	Fig.	Fuente natural	Ref.
Fellaturina	54	<i>Psittacanthus</i> y <i>Phorbolium</i>	8



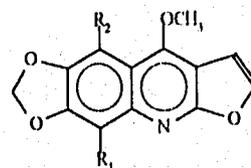
(35)



(36)

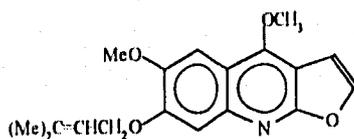


(37)

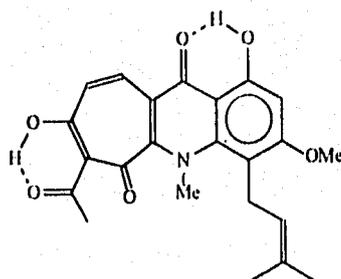


(38) R¹ = OH R² = CH₂CH₂CM₂

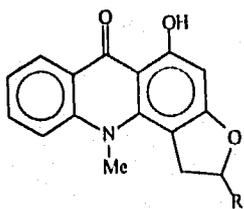
(39) R¹ = OH R² = CH₂CH₂C(OH)Me₂



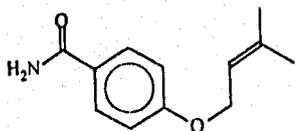
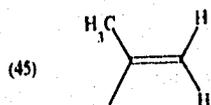
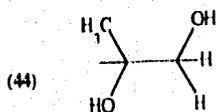
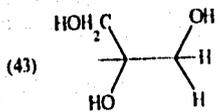
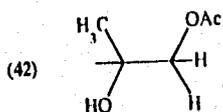
(40)



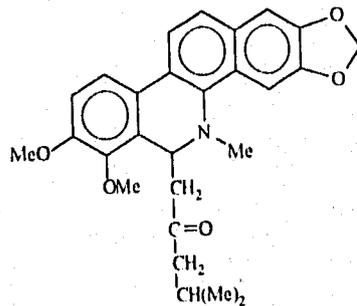
(41)



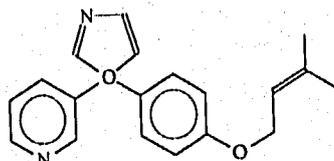
R



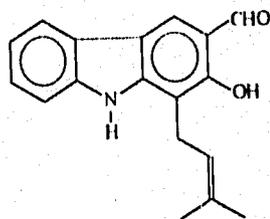
(48)



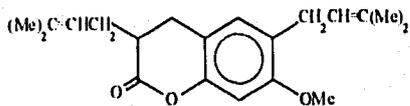
(46)



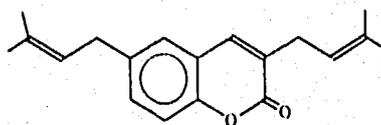
(47)



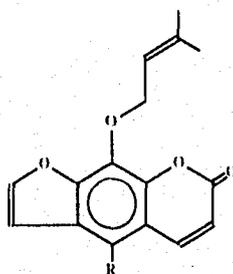
(49)



(50)

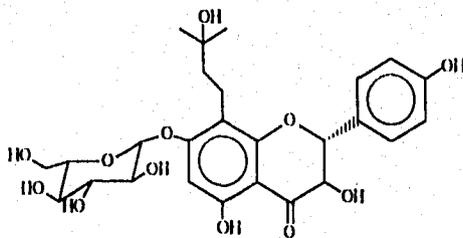


(51)



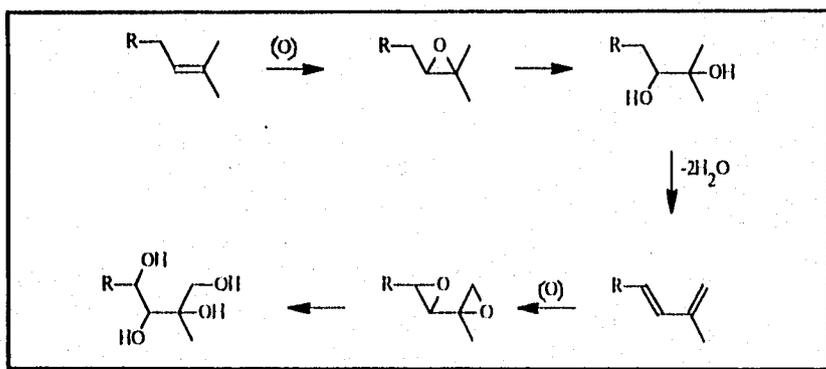
(52) R=H

(53) R=OMe



(54)

La gran diversidad estructural en la familia Rutaceae, se debe a la facilidad de biosintetizar intermediarios prenilados que pueden ocurrir por varios caminos. El sustituyente de 5-C (prenilo) o más raramente de 10-C (geranilo) puede someterse a un gran número de reacciones de oxidación, reducción, deshidratación y de esterificación que comienzan con la epoxidación del enlace doble, ver esquema 2.

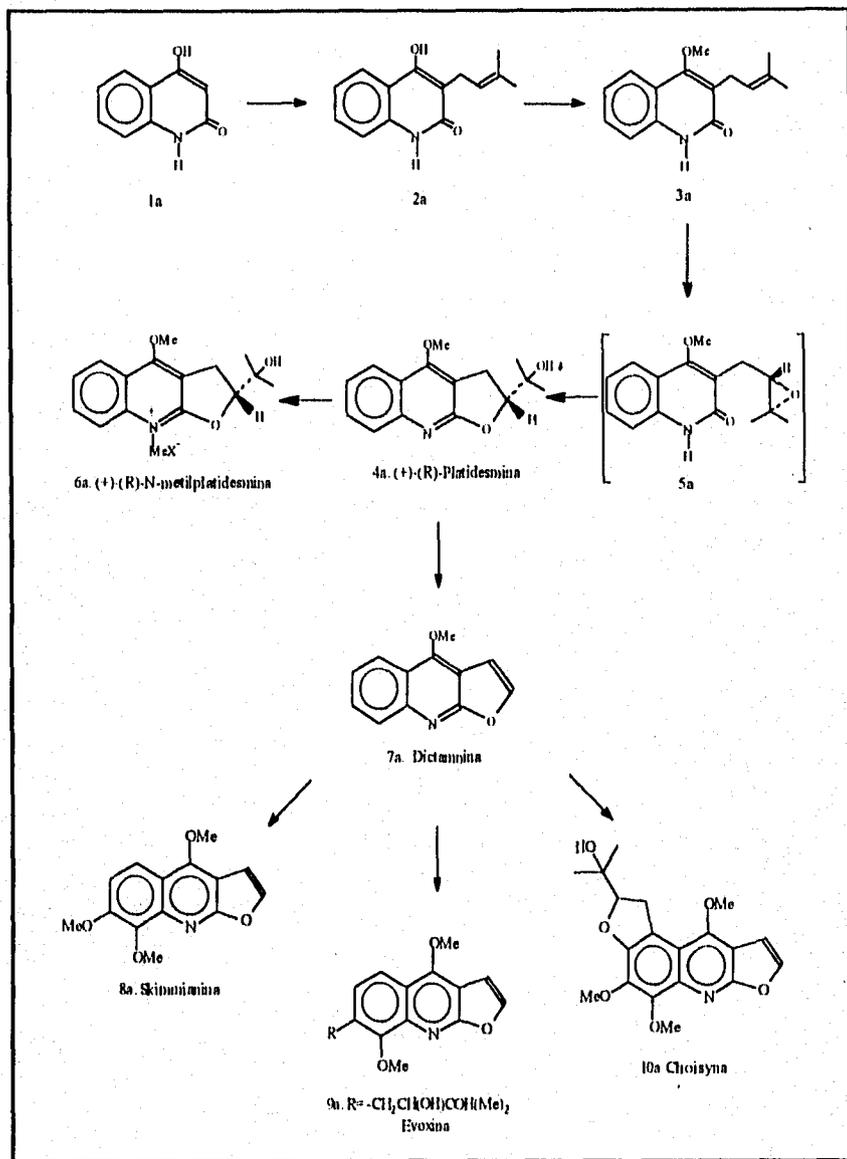


Esquema 2: Posibles interconversiones biogénicas en el 3-metil-but-2-enil.

La cadena isoprenilica además de estar epoxidada, monohidroxilada, dihidroxilada, puede encontrarse ciclizada, como en el caso de furo- y piranocompuestos, lo cual explica el gran número de estructuras descritas 8, 35.

Las furocumarinas y alcaloides furoquinolínicos son muy característicos de las Rutaceae. En cambio las piranocumarinas y alcaloides piranoquinolínicos son frecuentes pero menos comunes que su isómero furano 35. Sin embargo, el sistema pirano es más común en alcaloides tipo acridona, carbazol, acetofenonas y cromonas 8, 34.

En años pasados, se había asumido que el anillo del furano era obtenido *in vivo* por ciclización oxidativa de un grupo prenilo adyacente a una función oxigenada. Pero en 1969, evidencias experimentales dan a conocer la secuencia de ciclización considerada para la obtención de la sal alcaloide N-metil platidesmina al ser estudiada de *Skimmia japonica* -Rutaceae-, ver esquema 3 36.



Esquema 3. Secuencia de ciclización para la obtención del alcaloide N-metilplatidesmina

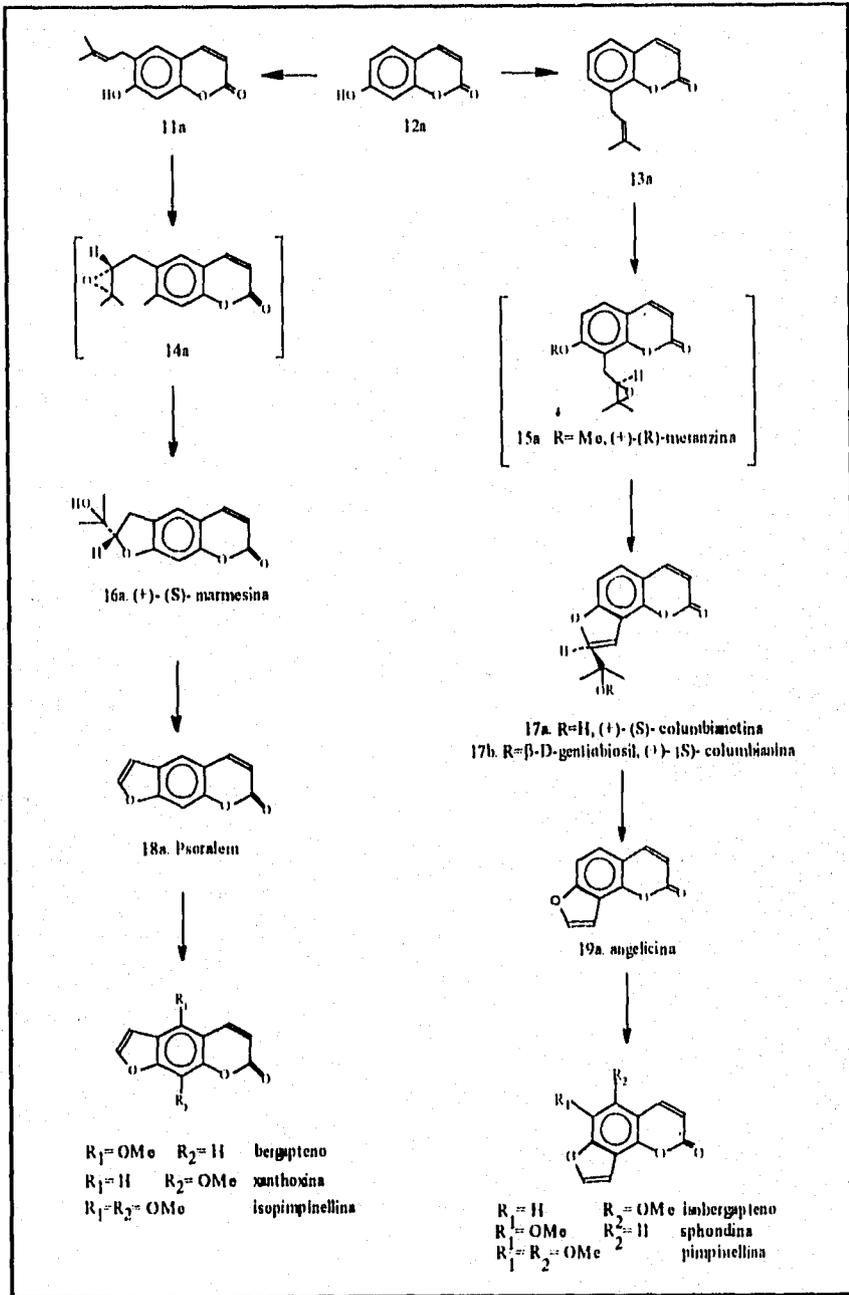
Algunos de estos intermediarios y productos finales han sido aislados de algunos géneros de Rutaceae, los cuales pueden apoyar esta ruta biosintética propuesta: (+)-(R)-platidesmina -*Zanthoxylum parviflorum* y *Comptonella sessilifoliata*, Platidesmina campulata-, dictamina -*Z. parviflorum* y *C. sessilifoliata*-, skimmianina -*Agathasma bisulca*, *A. capensis*, *A. thymifolia*, *A. peglerae* y *Choisya ternata*-, evoxina -*Ch. ternata*- y choisyna -*Ch. ternata*-^{36, 37}.

Algo análogo sucede con las cumarinas, como se ilustra en el esquema 4, para el caso de la dihidroxifurocumarina -marmesina, 16a- obtenida de *Ruta graveolans*³⁶.

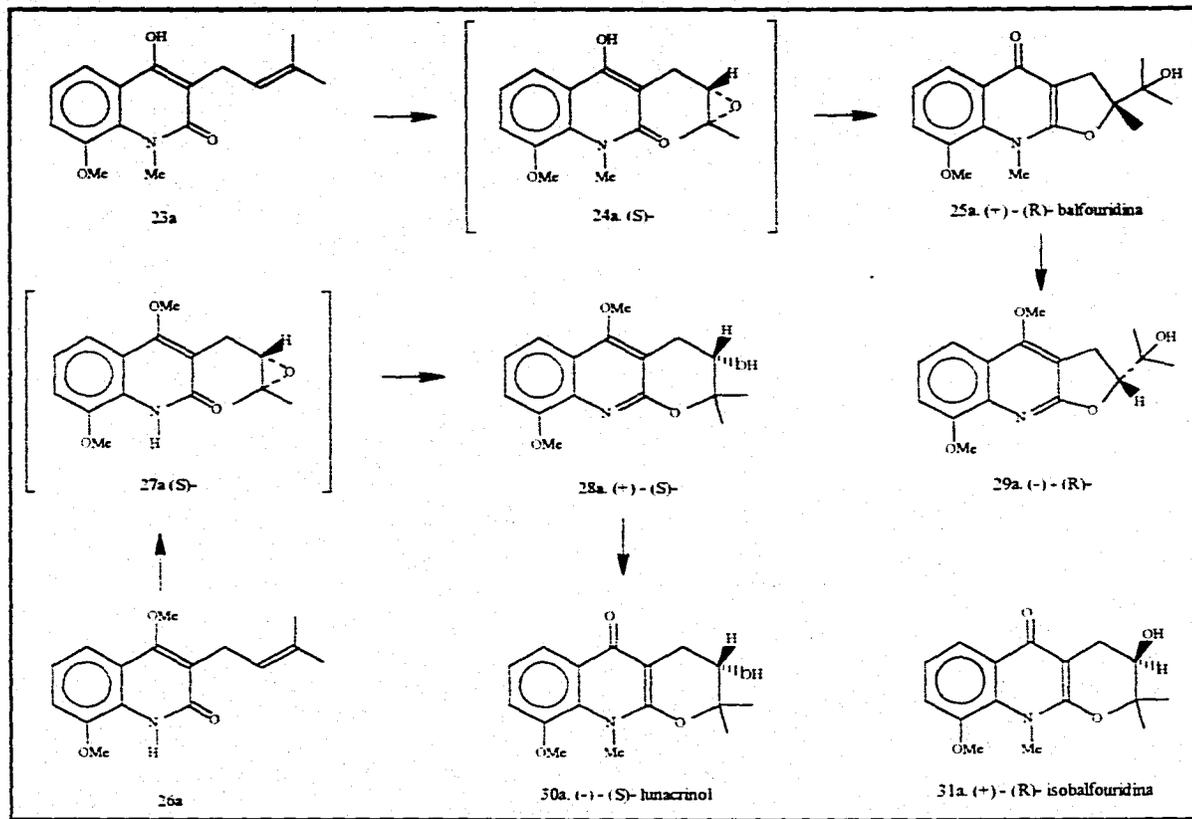
La participación de la dimetilsuberosina (14a) como intermediario en la biosíntesis de furanocumarinas lineales ha sido mostrado por Brown y Steck. La dimetilsuberosina aislada de *Toddalia aculeata* y meranzina (15a) obtenida de *Comptonella aurantium* son precedentes que confirman la formación del epóxido. De esta manera, la formación de las furanocumarinas involucra directamente a la dimetilsuberosina y meranzina como precursores de las furanocumarinas lineales o angulares ^{38, 39}. De igual manera, este esquema es apoyado al encontrar que la marmesina (16a) es transformada a una furocumarina lineal en *Ruta graveolans* y columbiametina (17a) en furocumarinas angulares en *Heracleum lanatum* y en *Angelica archangelica*.

En lo que respecta a los derivados aromáticos dihidropiranos, se ha informado que en algunos casos pueden encontrarse como isómeros de los furanocompuestos, esto ha sido demostrado en algunas de las especies de las Rutaceae ya estudiadas; como es el caso de *Balforodendro riedelianum* de la cual se han obtenido isómeros: (+)-balfauridina (25a) y (+)-isobalfauridina (31a), mientras que en otros casos se han obtenido de *Lunasia amara* pares de enantiómeros: (-)-hidroxilunacrina (ver 25a) y (-)-lunacrinol (30a), ver esquema 5 ^{35, 37, 40}.

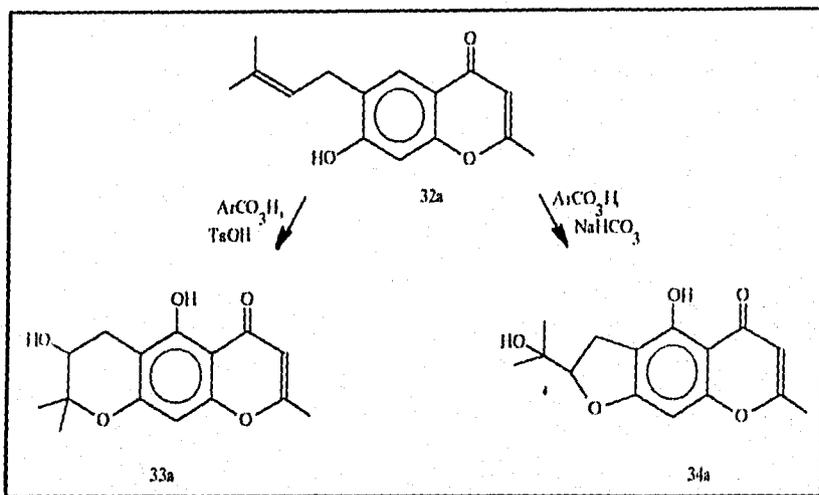
Se ha propuesto, de acuerdo a evidencias *in vitro* que la epoxidación del grupo prenilo es un paso involucrado en la ciclización biosintética, como se muestra en el esquema 6, en el que la prenileromona (32a) produce hamaulol (33a) y visaminol (34a) en presencia de perácidos con sus medios específicos - CHCl_3/H^+ y NaHCO_3 - ^{36, 41}.



Esquema 4. Secuencia de ciclización para la formación de furanocumarinas.



Esquema 5. Compuestos aromáticos dihidropiranos y sus isómeros dihidrofuranos.



Esquema 6. Formación de pirano y furocromonas apartir del haumaadol.

De esta manera, se ha observado que la epoxidación del grupo prenilo, tiende a presentar una ciclización espontánea; al considerar la estereoquímica de esta ciclización, se puede proveer el soporte para la obtención de dihidrofuro y dihidropiranoderivados, así como su configuración absoluta respectiva, tal como se ilustra en el esquema 5.

Además, estudios experimentales realizados a más de 12 especies de plantas, en los que se obtuvieron más de 15 furocumarinas y furoquinolinas, apoyan la biosíntesis de estos 2 grupos (esquemas 3 y 4) ³⁶.

2.2. GENERO *ESENBECKIA*.

De acuerdo con Engler el género *Esenbeckia* se encuentra dentro de la tribu Cusparieas, una de las 5 tribus pertenecientes de la subfamilia Rutoideae, ver Tabla IV ¹⁰.

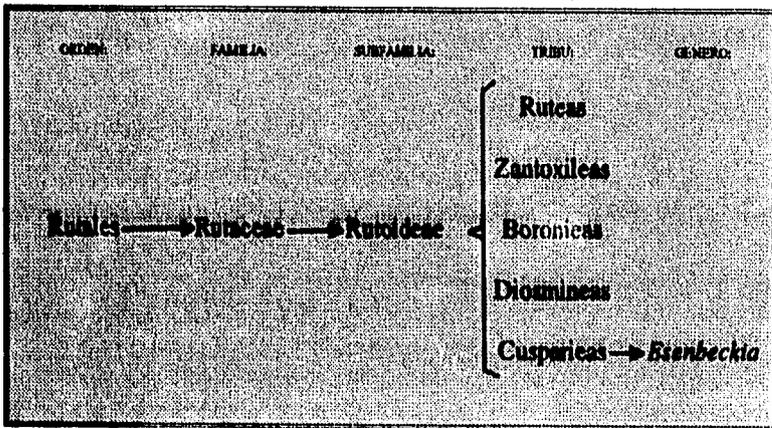


Tabla IV. Tribus pertenecientes a la subfamilia Rutoideae.

El género *Esenbeckia* es un género cosmopolita que esta constituido por aproximadamente 30 especies, 17 de las cuales se localizan en México, principalmente en las zonas selváticas y tropicales de los estados de Veracruz, Guerrero, Michoacán, Oaxaca y Chiapas ⁴². Son arboles o arbustos de 1-15 m de altura, con tronco de 5-50 cm de diametro, hojas alternadas u opuestas, inflorescencia en forma de panfcula, las flores presentan un diámetro de 5-7 mm, con fruto capsulado ⁴¹.

Los estudios quimicos realizados para este género, indican que los limonoides, las furanocumarinas y los alcaloides derivados de la acridona son los constituyentes principales de las mismas. La tabla V muestra los tipos de metabolitos secundarios de las especies del género *Esenbeckia* aislados hasta ahora.

ESPECIE VEGETAL	TIPO DE COMPUESTO												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
<i>Esenbeckia febrifuga</i> ²⁶	X								X				
<i>Esenbeckia kawasumi</i> ^{26,27}	X								X				
<i>Esenbeckia starbuckii</i> ²⁶	X	X				X			X				
<i>Esenbeckia terminalis</i> ²⁶						X			X				
<i>Esenbeckia flava</i> ²⁶	X	X							X				
<i>Esenbeckia pilocarpoides</i> ²⁶	X	X											
<i>Esenbeckia senftenii</i> ²⁶							X			X	X		
<i>Esenbeckia pumila</i> ²⁶								X					
<i>Esenbeckia acapulcensis</i>								X			X		
<i>Esenbeckia baltica</i> ²⁷	X									X	X		
<i>Esenbeckia leiocarpa</i> ^{26,28}	X		X	X	X						X	X	X

1.- Alcaloides furoquinolinicos

2.- Alcaloides derivados de la acridona

3.- Alcaloides quinolinicos

4.- Alcaloides indólicos

5.- Cumannas

6.- Furanocumarinas

7.- Fluroglucinos

8.- Flavonoides

9.- Limonoides

10.- Poliprenoles

11.- Triterpenos

12.- Lignanos

13.- Amidas

TABLA V. METABOLITOS SECUNDARIOS AISLADOS DE ESPECIES DEL GENERO *ESENBECKIA*.

2.3. ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE PRODUCTOS NATURALES.

Como se indicó anteriormente, en algunos casos, no sólo se ha informado del aislamiento de compuestos químicos novedosos dentro de la familia Rutaceae; sino que además, se menciona el uso farmacológico o la actividad biológica que presentan algunos de estos metabolitos.

Es un hecho que las plantas medicinales son fuente potencial de principios activos o bien que sus extractos pueden presentar una actividad farmacológica.

En algunos casos, cuando el principio activo no se puede separar y para facilitar la localización de esta actividad, el estudio se hace biodirigido; es decir se va siguiendo la actividad biológica tanto de los extractos obtenidos como de los productos aislados de ellos ⁵⁰.

Los métodos de seguimiento incluyen bioensayos, que en esta etapa no son específicos, puesto que se busca sólo una respuesta de toxicidad frente a diversos organismos de prueba, ya que pueden dar indicio de una actividad específica que se investigará posteriormente ⁶.

Es recomendable que estos métodos sean rápidos, seguros, baratos y convenientes como una herramienta general de bioensayo.

Un bioensayo general que detecta una posible actividad farmacológica de plantas o de productos químicos naturales, rápido, de bajo costo y que se puede realizar en cualquier laboratorio de investigación, es el método basado en la utilización de un diminuto crustáceo: La larva de *Artemia salina* ⁵¹.

A. *Artemia salina*

Artemia es el nombre de el *Anastrocan crustaceans* -comunmente es llamado camarón hada-, que pertenece a la subclase *Branchiopoda* -los filópodos-. Esta *Artemia* es también comunmente llamada camarón salmuera.

Son de cuerpo ligero, con una característica que es la ausencia de un caparazón, desarrollan una clara segmentación y son evidentes 3 regiones: cabeza, tórax y abdomen.

El tórax contiene 11 segmentos, cada uno de los cuales sirve como de locomoción, alimentación y de respiración; 8 segmentos componen el abdomen, la transmisión entre el torax y el abdomen es muy claro, los primeros dos segmentos abdominales contienen al útero en las hembras y en los machos la vesícula seminal y una pareja de penes.

Las dimensiones de la *Artemia* dependen de la especie, del medio que las rodea, además de que son afectadas grandemente por la temperatura; pudiendo medir en algunos casos 10-12 mm.

El color es usualmente un rojo claro en agua con poco oxígeno, pero en medio con alta oxigenación tienden a tener un color rojo pálido para hembras y un rosa pálido para machos ⁵².

B. Bioensayos frente *Artemia salina*.

El bioensayo frente *Artemia salina*, es un método que determina la toxicidad - CL_{50} en ppm- de productos naturales: tanto del extracto, como de las sustancias aisladas del mismo; algunos ejemplos recientes en los que se demuestra la aplicación de este método, se dan a conocer a continuación:

- Algunos metabolitos secundarios aislados de *Esenbeckia nesiatica*, tales como los floroglucinoles, presentan una actividad moderada frente a los bioensayos de *Artemia salina* ⁴⁶.

- Kokusagininina aislada de *Esenbeckia belicensis* muestra actividad frente *Artemia salina* ⁴⁷.
- Los extractos metanólicos de *Chiococca alba*, *Ocimum basilicum*, *Cnidocolus acanitifolius*, *Ocimum micranthum* y *Bursera simaruba*, muestran actividad biológica frente a algunos microorganismos y *Artemia salina* ⁵³.
- Los extractos de *Iostephane madrensis*, *Roldana sessilifolia*, *Liatris punctata* e *Iostephane heterophylla*, así como sustancias aisladas de estas especies - diterpenos policíclicos, bisabolonas, cromonas, cumarinas y lactonas sesquiterpénicas- presentan efectos importantes durante un cernimiento bioactivo realizado, en el que se usaron pruebas de *Artemia salina*, evaluaciones microbiológicas y citotóxicas ⁵⁴.
- Metabolitos secundarios obtenidos de *Casearia corymbosa*, tales como mezclas de poliisoprenilalcanos, muestran ser no tóxicos frente *Artemia salina* mientras que (+)-catequina si posee actividad ⁵⁵.
- El extracto diclorometánico de *Cantarella achalensis* muestra una notable toxicidad en los ensayos de *Artemia salina* ⁵⁶.
- De las fracciones obtenidas del extracto diclorometánico de *Chomolaena adorata* y de las sustancias obtenidas de los mismos -5,7-dihidroxi-4'-metoxi, 6-hidroxi-5,7,4'-trimetoxi y 5,7,4'-trihidroxi-6-metoxi flavonas- fue determinada su actividad biológica frente a bioensayos realizados con *Artemia salina* y pruebas de antibiosis ⁵⁷.

Para este estudio farmacológico preliminar es necesario realizar otros tipos de bioensayos que sean un poco más específicos, como las pruebas antimicrobianas, antivirales, antifúngicas, citotóxicas, etc., las cuales permiten determinar la actividad biológica que poseen estas sustancias.

La inquietud de encontrar los principios activos que existen en estas plantas, y que son los responsables de sus propiedades curativas, marcó el paso definitivo para el rápido desarrollo de la fitoquímica.

Así pues, un estudio completo e integrado de las plantas medicinales, requiere de una investigación etnobotánica -uso medicinal de la planta-, de su identificación botánica, de un análisis fitoquímico que permita aislar algún principio activo o bien determinar la actividad biológica de sus extractos, y como último paso la determinación de su actividad farmacológica.

De esta forma, mediante una investigación interdisciplinaria, en donde se conjuntan la etnobotánica, la fitoquímica y la farmacología, se pueden confirmar por métodos modernos el conocimiento que nuestros antepasados dejaron sobre el uso de las plantas medicinales ⁶.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

México es un país que posee una gran riqueza y variedad de recursos vegetales - más de 30 000 especies -; sin embargo, uno de los principales problemas que se enfrenta en la actualidad, es la información que se tiene sobre las plantas existentes en nuestro país, la cual resulta ser escasa en su literatura científica, en cuanto al tipo y contenido de compuestos químicos presentes en las diversas especies vegetales; así como también, en relación a los aspectos farmacológicos y toxicológicos.

Estudios químicos realizados a especies vegetales del género *Esenbeckia*, indican que entre sus principales constituyentes químicos se encuentran los alcaloides furoquinólicos, los alcaloides derivados de la acridona, cumarinas, furauocumarinas, limonoides, flavonoles y flavonoides.

Una característica particular que presentan las cumarinas, alcaloides y flavonoides aislados de esta familia, es la incorporación de un grupo prenilo o geranilo en su estructura base mediante una C- u O-alkilación.

Por otro lado, estudios farmacológicos realizados a algunos de estos compuestos, han demostrado que éstos poseen alguna actividad biológica o farmacológica.

Dado que en nuestro país se encuentra la mayoría de las especies vegetales de *Esenbeckia*, las cuales son fuente de una gran variedad de metabolitos secundarios que presentan gran interés desde el punto de vista químico y farmacológico - como ya se señaló anteriormente -; entonces, resulta de gran importancia y utilidad realizar en el presente proyecto el estudio químico y la determinación de la actividad biológica de las flavanonas presentes en el extracto etanólico de *Esenbeckia berlandieri* ssp *acapulcensis* (Rose), especie vegetal endémica de México.

IV. HIPOTESIS.

HIPOTESIS.

El género *Esenbeckia* está conformado por aproximadamente 30 especies; 17 de las cuales se localizan en nuestro país, principalmente en las zonas selváticas y tropicales de los Estados de Veracruz, Guerrero, Michoacán, Oaxaca y Chiapas ⁴².

Estudios químicos realizados a este género de plantas, indican que entre los principales constituyentes químicos se encuentran los alcaloides furoquinolínicos, alcaloides derivados de la acridona, cumarinas, furocumarinas, limonoides y flavonoides ⁸. Además, en la literatura científica se informa que algunos de estos metabolitos secundarios poseen cierta actividad biológica o farmacológica.

Entonces al realizar el estudio químico del extracto etanólico de las partes aéreas de *Esenbeckia berlandieri* ssp *acapulcensis* (Rose), mediante el empleo de técnicas convencionales de purificación y separación, se podrán caracterizar e identificar flavanonas preniladas con diferentes patrones de sustitución; así como el determinar su posible actividad biológica al realizar un estudio biodirigido frente *Artemia salina* y mediante pruebas antimicrobianas y antivirales.

V. OBJETIVOS.

5.1. OBJETIVO GENERAL.

Caracterizar e identificar las flavanonas preniladas, aisladas del extracto etanólico de las partes aéreas -hojas y tallo- de *Esenbeckia berlandieri* Baill ssp *acapulcensis* (Rose), por medio de métodos espectroscópicos, espectrométricos y transformaciones químicas que confirmen su estructura molecular. Así mismo, determinar la actividad biológica de estas sustancias mediante bioensayos con *Artemia salina*, pruebas antimicrobianas y antivirales.

5.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS.

1. Determinar la toxicidad del extracto etanólico, acetónico y hexánico frente *Artemia salina*.
2. Aislar y purificar flavanonas preniladas, presentes en el extracto etanólico de las partes aéreas -hojas y tallo- de *Esenbeckia berlandieri* ssp *acapulcensis*.
3. Caracterizar e identificar flavanonas preniladas empleando técnicas espectroscópicas (IR, RMN-¹H, RMN-¹³C), espectrométricas (EM) y transformaciones químicas que confirmen su estructura molecular.
4. Realizar bioensayos de las flavanonas preniladas aisladas del extracto etanólico frente *Artemia salina*.
5. Realizar una evaluación de estas sustancias como posibles agentes antimicrobianos y antivirales (éstas evaluaciones se realizarán en el Departamento de Farmacia de la Universidad de Antwerpen en Bélgica, por el Dr. A. J. Vlietinck).

VI. MATERIAL.

MATERIAL.

A. Material vegetal.

Partes aéreas -hojas y tallo- secas de *Esenbeckia berlandieri* ssp *acapulcensis*.

B. Material para el aislamiento, purificación, caracterización e identificación de los metabolitos secundarios.

● Disolventes.

Acetato de etilo (grado técnico)⁽¹⁾.

Acetona (grado técnico)⁽¹⁾.

Benceno (grado analítico).

Cloroformo (grado analítico).

Diclorometano (grado técnico)⁽¹⁾.

Etanol (grado analítico).

Eter etílico (grado analítico).

Hexano (grado técnico)⁽¹⁾.

Propanol (grado analítico).

Metanol (grado analítico).

● Reactivos.

Acido *meta*-cloro perbenzoico (AMCPB).

Acido clorhídrico (HCl, solución al 10%).

Acido *para*-toluensulfónico (*p*-T'sOH).

Acido perclórico (HClO₄).

Acido sulfúrico (H₂SO₄).

Anhídrido acético (Ac₂O).

Bicarbonato de sodio (NaHCO₃, solución saturada).

⁽¹⁾ Estos disolventes fueron purificados por medio de una destilación fraccionada

Bisulfito de sodio (NaHSO_3 , solución al 10 %).
Carbón activado.
Carbonato de potasio anhidro (K_2CO_3).
Celita 545 (tamaño de partícula 0.001-0.004 mm).
Cloruro férrico (FeCl_3 , al 1% en etanol).
Diazald.
2,3-Dicloro-5,6-diciano-*p*-benzoquinona (DDQ).
Piridina (reactivo analítico).
Sulfato céreo amónico ($\text{NH}_4\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$).
Sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4).
Sulfito de sodio (Na_2SO_3 , al 10%).
Sílica gel para cromatografía en capa fina 60G.

● **Equipo.**

Aparato para determinar el punto de fusión (Fisher Johns).
Balanza analítica (100A, Ainswort).
Balanza gramataria (Ohaus, serie 700-800).
Balanza semianalítica (Ohaus-E 400)
Equipo de diazald.
Espectrofotómetro de IR Perkin Elmer, modelo 283 y 681.
Espectrofotómetro Nicolet FT IR, modelo 5 Sx.
Espectrómetro de Masas Hewlett Packard 5985 GC/Ms system
70 eV.
Espectrofotómetro de RMN varian FT 8A y VxR-3005 (200 y 300
MHz para ^1H y de 50 y 75 MHz para ^{13}C).
Lámpara de Ultravioleta listed INSA & MEAS 399-J.
Polarímetro.
Rotavapor Büchi B-481.

● **Material de vidrio.**

Cámaras de elución de 100 y 500 ml.
Cámara de elución para placa preparativa.
Capilares.
Columnas de vidrio para cromatografía en columna de diferentes
tamaños.
Cromatoplaacas de sílica gel para cromatografía en capa preparativa,
espesor de 2mm (20x20, G-200 UV₂₅₄) y 0.2mm (10x20).
Cromatofolios de aluminio con sílica gel 60F₂₅₄ para cromatografía en
capa fina, espesor de 0.2 mm.

Embudo de separación de 125 ml.
Matraces erlenmeyer de 50 y 25 ml.
Matraces de kitazato de 500 y 125 ml.
Matraces bola de 500 ml, 250 ml y 100 ml.
Pinzas de tres dedos con nuez.
Probetas de 500 ml, 100 ml y 10 ml.

C. Material para los bioensayos frente *Artemia salina*.

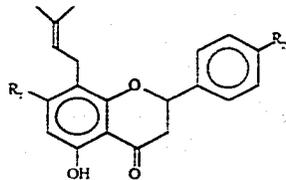
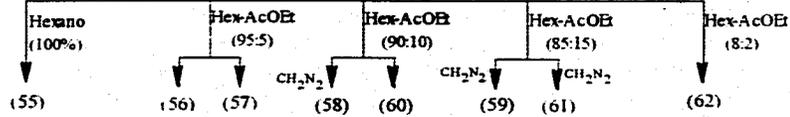
- **Material biológico.**
Larvas de *Artemia salina*.
- **Sustancias.**
Sal marina.
Agua purificada.
- **Disolventes.**
Acetato de etilo.
Cloroformo.
- **Equipo.**
Aerador.
Calentador.
Balanza analítica (Ainswort, 100A).
Balanza semianalítica (Ohaus-E 400).
Lámpara eléctrica.
- **Material de vidrio.**
Jeringas de 500 μ l, 50 μ l y 10 μ l.
Pipetas Pasteur.
Pipetas graduadas de 10 ml y 5 ml.
Pecera de vidrio.
Vasos de precipitado de 500 ml y 100 ml.
Termómetro -10 a 100°C.

VII. PARTE EXPERIMENTAL.

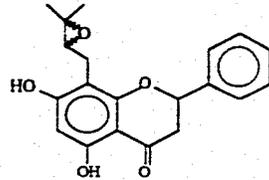
1634.6 g. de las partes aéreas de
Esenbeckia berlandieri ssp *acapulcensis*

Extracción sólido-líquido.
con etanol caliente.

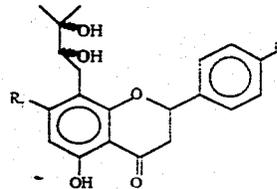
Separación cromatográfica (ccv)
y purificación (ccf., ccv., ccp., cristalización).



- (55) $R_1 = CH_3O$ $R_2 = H$
- (56) $R_1 = OH$ $R_2 = H$
- (58) $R_1 = CH_3O$ $R_2 = CH_3O$
- (59) $R_1 = CH_3O$ $R_2 = OH$
- (60) $R_1 = OH$ $R_2 = OH$



(57)



- (61) $R_1 = CH_3O$ $R_2 = OH$
- (62) $R_1 = OH$ $R_2 = OH$

- (58-61) Obtenidas de un estudio preliminar.
- (55, 57, 59) Obtenidas como producto natural y producto de reacción
- (58, 61) Obtenidas como producto de reacción.

Esquema 7. Flavanonas preniladas aisladas de *Esenbeckia berlandieri* ssp *acapulcensis*.

7.1. PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS.

La planta *Esenbeckia berlandieri* Baill ssp. *acapulcensis* (Rose) fue recolectada en el mes de octubre de 1987 por la M. en C. Clara H. Ramos del Instituto de Biología, en el ejido "El Rebasito" a 20 Km de Melaque, Jalisco. Fue clasificada como CH-83 y depositado en el Herbario MEXU del Instituto de Biología de la UNAM.

Las partes aéreas -hojas y tallo- de esta especie vegetal se secaron a temperatura ambiente; para posteriormente triturar 1634.6 g de este material y ser sometidos enseguida a una extracción sólido-líquido, por percolación con etanol caliente y de esta manera obtener 311 g de extracto crudo.

Para la separación de los metabolitos secundarios mayoritarios se emplearon 31.8 g del extracto, los cuales fueron adsorbidos en 31.8 g de celita y aplicados posteriormente a una columna de vidrio para cromatografía -15 cm de largo y 8.6 cm de diámetro- previamente empacada con 354.6 g de sílica gel para capa fina, por vía seca y con ayuda del vacío. El fraccionamiento de la columna se hizo empleando como eluyente n-hexano y mezclas de n-hexano:acetato de etilo de polaridad creciente, obteniéndose un total de 675 fracciones, de 300 ml cada una.

5-hidroxi-8-(3",3"-dimetilalil)-7-metoxiflavanona (55).

De las fracciones 80-163 obtenidas al eluir la columna con n-hexano (100%), se aisló un sólido que resultó ser soluble en acetato de etilo y cloroformo e insoluble en n-hexano y propanol, el cual fue purificado por cristalización fraccionada con mezclas de acetato de etilo:n-hexano y cloroformo:propanol; obteniéndose en total 166.0 mg (0.52 %) de un sólido amarillo pálido, que presentó un pf. de 126-129°C.

En ccf. mostraba una mancha café oscura cuando se utilizaba como revelador químico una solución de FeCl₃ en etanol al 1%. Su caracterización e identificación se logró con base a sus datos espectroscópicos y espectrométricos que sugieren una

insaturaciones, la cual esta de acuerdo con los datos referidos en la literatura para la 5-hidroxi-8-(3",3"-dimetilalil)-7-metoxiflavanona - ó 7-metilglabranina, 55-

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

IR $\nu_{\text{máx}}$ (CHCl₃, espectro 1) cm⁻¹: 3006, 2926, 2853, 1654, 1583, 1444, 1373, 1303, 1270, 1162, 1103.

RMN-¹H (300 MHz, CHCl₃, TMS, espectro 2): δ 1.626 (s, 3H, CH₃-4"), δ 1.650 (s, 3H, CH₃-5"), δ 2.850 (dd, J=17 y 3.5 Hz, 1H, CH-3ec), δ 3.055 (dd, J=17 y 12 Hz, 1H, CH-3ax), 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 5.413 (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, CHCl₃, TMS, espectro 3): δ 78.67 (d, C-2), δ 43.42 (t, C-3), δ 196.30 (s, C-4), δ 162.64 (s, C-5), δ 92.48 (d, C-6), δ 165.77 (s, C-7), δ 109.00 (s, C-8), δ 158.74 (s, C-9), δ 102.95 (s, C-10), δ 138.91 (t, C-1'), δ 125.92 (d, C-4'), δ 128.52 (d, C-2' y C-6'), δ 128.70 (d, C-3' y C-5'), 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"), δ 55.88 (c, PhOCH₃).

EM (IE) m/z: 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(15.83), 219 (100), 209 (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) y 69 (47.56).

5,7-dihidroxi-8-(3",3"-dimetilalil)-flavanona (56).

De las fracciones 203-328 obtenidas al eluir la columna con una mezcla de n-hexano:acetato de etilo (95:5), se aisló un sólido que resultó ser soluble en acetato de etilo, metanol, propanol y cloroformo e insoluble en n-hexano, el cual fue recristalizado empleando la técnica por par de disolventes -acetato de etilo:hexano-; obteniéndose 660.3 mg (2.1%) de una sustancia de color amarillo, la cual presentó un pf. de 167-168°C, dando prueba positiva⁽²⁾ al revelar con una solución de FeCl₃

⁽²⁾ . Algunas otras reacciones cualitativas para la identificación de flavonoides son las siguientes: Con cloruro de aluminio adquieren un color amarillo fluorescente; mientras que con vapores de amonio adquieren un color amarillo pálido, amarillo verdoso o un azul intenso y con el reactivo cloruro óxido de

en etanol al 1%; dicho compuesto fue identificado como 5,7-dihidroxi-8-(3'',3''-dimetilalil)-flavanona -glabranina, 56-, sustancia de fórmula molecular $C_{20}H_{20}O_4$ y peso molecular de 324; los datos espectroscópicos y espectrométricos se dan a conocer a continuación:

$[\alpha]_D^{25} = +35$ (C= 0.2 mg/ml, $CHCl_3$).

IR $\nu_{m\acute{a}x}$ ($CHCl_3$, espectro 4) cm^{-1} : 3583, 3374, 3080, 3057, 2968, 2918, 2860, 1639, 1480, 1442, 1373, 1339.

RMN- 1H (300 MHz, $CDCl_3$, TMS, espectro 5): δ 1.731 (s, 6H, CH_3 -4'' y CH_3 -5''), δ 2.844 (dd, J=17.1 y 3 Hz, 1H, CH-3ec), δ 3.058 (dd, J=17.25 y 12.9 Hz, 1H, CH-3ax), δ 3.366 (d, J=6.9 Hz, 2H, C11-1''), δ 5.221 (tc, J= 7.2 y 1.5 Hz, 1H, C11-2''), δ 5.427 (dd, J= 13 y 3.3 Hz, 1H, C11-2), δ 6.036 (s, 1H, C11-6), δ 7.385-7.475 (señal múltiple, 5H), δ 12.002 (s, 1H, C₅-OH).

RMN- ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$, TMS, espectro 6): δ 78.97 (d, C-2), δ 43.29 (t, C-3), δ 196.23 (s, C-4), δ 162.23 (s, C-5), δ 96.92 (d, C-6), δ 163.77 (s, C-7), δ 106.26 (s, C-8), δ 159.17 (s, C-9), δ 103.72 (s, C-10), δ 138.68 (s, C-1'), δ 125.93 (d, C-2', C-4' y C-6') δ 128.69 (d, C-3' y C-5') δ 21.98 (s, C-1'') δ 121.57 (d, C-2''), δ 134.92 (s, C-3''), δ 25.80 (c, C-5'') y δ 17.82 (c, C-4'').

EM (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).

5,7-dihidroxi-8-(3-metil-2,3-epoxibutano)-flavanona (57).

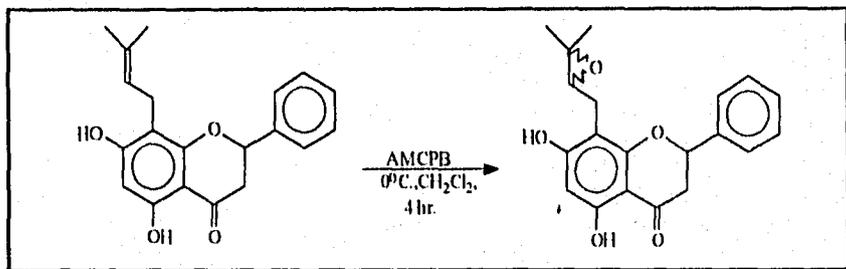
De los eluatos 362-393 (216.2 mg) obtenidos al eluir la columna con una mezcla de n-hexano:acetato de etilo (95:5), se purificó una sustancia mediante recromatografías en capa fina preparativa⁽¹⁾. De donde se obtuvieron 45.2 mg (0.14%) de una sustancia de aspecto aceitoso, color amarillo claro; que se

zirconio IV se detecta un color amarillo-verde. En presencia de flavonoles con el ácido 2-aminoetilsteridifenilbórico se produce un color amarillo⁴⁸.

⁽¹⁾ Placa preparativa de 20 x 20 cm con 2mm de espesor y para la cual se empleo una mezcla eluyente de n-hexano: acetato de etilo (8:2).

caracterizó e identificó como la 5,7-dihidroxi-8-(3-metil-2,3-epoxibutano)-flavanona (57).

Lo anterior fue corroborado al realizar la reacción de epoxidación de la glabranina con AMCPB, tal como se indica en el esquema 8.



Esquema 8: Reacción de epoxidación de la glabranina.

IR ν_{\max} (CHCl_3 , espectro 7), cm^{-1} : 3591, 2978, 1725, 1641, 1475, 1451, 1383, 1339, 1290, 1249, 1144, 1093, 956.

RMN- ^1H (300 MHz, CDCl_3 , TMS, espectro 8): δ 1.199 (s, 3H, CH_3 -5"), δ 1.212 (s, 3H, CH_3 -4"), δ 2.819 (dd, $J=17.1$ y 3.3 Hz, 1H, CH -3 $_{ec}$), δ 3.061-2.999 (señal compleja, 2H, CH_2 -1"), δ 3.073 (dd, $J=17.1$ y 12.7 Hz, 1H, CH -3 $_{ax}$), δ 4.709 (t, $J=8.9$ Hz, 1H, CH -2"), δ 5.441 (dd, $J=12.7$ y 3.2 Hz, 1H, CH -2), δ 6.040 (s, 1H, CH -6), δ 7.469-7.425 (señal multiple, 5H), δ 12.003 (s, 1H, C_5 -OH).

RMN- ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , TMS, espectro 9): δ 79.13 (d, C-2), δ 43.59 (t, C-3), δ 195.12 (s, C-4), δ 165.08 (s, C-5), δ 91.67 (d, C-6), δ 168.63 (s, C-7), δ 104.76 (s, C-8), δ 157.11 (s, C-9), δ 103.09 (s, C-10), δ 138.00 (s, C-1'), δ 126.07 (d, C-2', 6' y 4'), δ 128.85 (s, C-3' y 5'), δ 26.78 (t, C-1"), δ 29.71 (d, C-2"), δ 71.86 (s, C-3"), δ 25.92 (c, C-5") y δ 23.92 (c, C-4").

EM (IE) m/z: 340 [M^+ , 86.59], 307 (68.29), 282 (51.22), 281 (82.93), 263 (21.95), 205 (36.58), 203 (70.73), 191 (29.27), 178 (100), 177 (64.63), 176 (51.22), 165 (48.78), 150 (76.83), 149 (28.05), 103 (26.83), 81 (34.15), 78 (24.39), 77 (24.39) y 43 (24.39).

7,4'-dimetoxi-8-(3",3"-dimetilalil)-flavanona (58).

De las fracciones 141-193 (a excepción de la fracción 155), obtenidas al eluir la columna con una mezcla de n-hexano:acetato de etilo (90:10), se tomó una alícuota de 905.9 mg para ser sometida a una reacción de metilación; para esto se disolvió la muestra en 5 ml de etanol absoluto, adicionando posteriormente una solución etérea de diazometano a baja temperatura (0-5°C). Una vez concluida la reacción (6 hr), se procedió a su purificación por medio de cromatografía en columna.

De los eluatos 8-13 recolectados al eluir la columna con n-hexano:cloroformo (8:2) se obtuvieron 77.3 mg de un sólido, color amarillo pálido con *pf.* 122-124°C; que resultó ser insoluble en n-hexano y etanol, pero soluble en diclorometano, acetato de etilo y acetona. Sus datos espectroscópicos y espectrométricos permitieron caracterizar a esta sustancia como la 7,4'-dimetoxi-8-(3",3"-dimetilalil)-flavanona, sustancia que revela café oscuro en *cef.* con una solución de FeCl₃ al 1% en etanol.

IR ν_{\max} (CHCl₃, espectro 10), cm⁻¹: 2963, 2914, 2853, 1637, 1585, 1516, 1444, 1373, 1303, 1253, 1205 y 1105.

RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃, TMS, espectro 11): δ 1.617 (*s*, 3H, CH₃-4"), δ 1.646 (*s*, 3H, CH₃-5"), δ 2.813 (*dd*, *J*= 17.1 y 3.3 Hz, 1H, C11-3*ec*), δ 3.054 (*dd*, *J*= 17.1 y 12.6 Hz, 1H, CH-3*ax*), δ 3.216 (*d*, *J*= 7.2 Hz, 2H, C11₂-1"), δ 3.835 (*s*, 3H, PhOCH₃), δ 3.857 (*s*, 3H, PhOCH₃), δ 5.132 (*tc*, *J*= 7.26 y 1.38 Hz, 1H, C11-2"), δ 5.359 (*dd*, *J*= 12.4 y 3.5 Hz, 1H, C11-2), δ 6.089 (*s*, 1H, CH-6), δ 6.941 (*d*, *J*= 9 Hz, 2H, CH-3' y 5'), δ 7.374 (*d*, *J*=9 Hz, 2H, C11-2' y 6') y δ 12.135 (*s*, 1H, C₅-OH).

RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃, TMS, espectro 12): δ 78.48 (*d*, C-2), δ 43.29 (*t*, C-3), δ 196.52 (*s*, C-4), δ 162.63 (*s*, C-5), δ 92.44 (*d*, C-6), δ 165.73 (*s*, C-7), δ 108.99 (*s*, C-8), δ 158.87 (*s*, C-9), δ 102.99 (*s*, C-10), δ 131.32 (*s*, C-1'), δ 127.47 (*d*, C-2' y 6'), δ 114.06 (*d*, C-3' y 5'), δ 158.87 (*s*, C-4'), δ 21.61 (*t*, CH₂-1"), δ 122.33 (*d*, C-2"), δ 130.98 (*s*, C-3"), δ 17.70 (*e*, CH₃-4"), δ 25.79 (*e*, CH₃-5"), δ 55.87 (*e*, CH₃OPh) y δ 55.32 (*e*, CH₃OPh).

EM (IE) m/z: 368 [M⁺, 10.78], 367 (53.66), 353 (17.03), 325 (23.17), 312 (21.95), 299 (9.76), 219 (100), 206 (41.46), 191 (51.22), 179 (74.39), 176 (15.85), 134 (25.61), 121 (29.27), 119 (15.85) y 91 (18.29).

5,4'-Dihidroxi-7-metoxi-8-(3'',3''-dimetilalil)-flavanona (59).

100 mg de las fracciones 168-211, obtenidas al eluir la columna con una mezcla de n-hexano-acetato de etilo (85:15), fueron recromatografiados por ccv, empleando para ello 32 g de sílica gel para cromatografía en capa fina y como eluyente n-hexano y mezclas de n-hexano:acetato de etilo (9:1 a 7:3), obteniéndose 277 fracciones de 10 ml cada una.

De los elutos 124-157, que se colectaron con una mezcla de n-hexano:acetato de etilo (9:1), se observó una mancha amarilla muy bien definida al revelar la cef. con sulfato cérico de amonio-ácido sulfúrico, mientras que al utilizar una solución de FeCl_3 al 1% en etanol se visualizó una mancha café. Para su purificación se procedió a la obtención del derivado metilado correspondiente.

Para llevar a cabo la metilación se disolvieron 28.4 mg de residuo en 5 ml de etanol absoluto, adicionando a continuación diazometano en éter etílico a 0°C. Finalizada la reacción se procedió a concentrar la muestra, para posteriormente purificar el compuesto mayoritario por ccv, la recuperación de la sustancia se realizó de manera convencional, y fue caracterizada como 5, 4'-dihidroxi-7-metoxi-8-(3'', 3''-dimetilalil)-flavanona (59), con un peso molecular de 354, para una fórmula molecular $\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{O}_5$ y un pf. 161-162°C.

IR. $\nu_{\text{máx}}$ (CHCl_3 , espectro 13), cm^{-1} : 3593, 2964, 2926, 2854, 1633, 1583, 1517, 1484, 1462, 1443, 1374, 1303, 1264, 1168, 1102, 1076 y 833.

RMN-¹H (200 MHz, CDCl_3 , TMS, espectro 14): δ 1.615 (s, 3H, CH_3 -5''), δ 1.648 (s, 3H, CH_3 -4''), δ 2.806 (dd, J= 17.1 y 3.3 Hz, 1H, CH -3 ee), 3.054 (dd, J=17.1 y 12.9 Hz, CH -3 ax), 3.214 (d, J= 7Hz, 1H, CH_2 -1''), δ 3.856 (s, 3H, CH_3OPh), δ 4.982 (s.a., 1H, C_1 -OH), δ 5.127 (tc, J=7.3 y 1.4 Hz, 1H, CH -2''), δ 5.344 (dd, J=12.4 y 3.3 Hz, 1H, CH -2), δ 6.095 (s, 1H, CH -6), δ 6.876 (dd, J=8.9 y 1 Hz, 2H, CH -3' y 5') y δ 7.334 (cdl, J=9 y 1Hz, 2H, CH -2' y 6') y δ 12.143 (s, 1H, C_5 -OH).

RMN-¹³C (75 MHz, CDCl_3 , TMS, espectro 15): δ 78.42 (d, C-2), δ 43.24 (t, C-3), δ 196.50 (s, C-4), δ 162.52 (s, C-5), δ 92.41 (d, C-6), δ 165.72 (s, C-7), δ 108.98 (s, C-8), δ 155.82 (s, C-9), δ 102.92 (s, C-10), δ 131.00 (s, C-1'), δ 127.65 (d, C-2' y 6'), δ 115.44 (d, C-3' y 5'), δ 155.89 (s, C-4'), δ 21.62 (t, C-1''), δ 122.33 (d, C-2''), δ 131.31 (s, C-3''), δ 17.71 (c, C-4''), δ 25.79 (c, C-5'') y δ 55.09 (s, CH_3OPh).

EM (IE) m/z: 354 [M^+ , 95.12], 339 (34.15), 311 (41.46), 299 (36.59), 286 (21.95), 219 (90.24), 206 (24.39), 191 (75.61), 180 (21.95), 179 (100), 176 (24.39), 120 (45.12) y 91 (48.78).

5,7,4'-Trihidroxi-8-(3'',3''-dimetilalil)-flavanona (60).

De las fracciones 141-167 que se obtuvieron al eluir la columna con una mezcla de n-hexano:acetato de etilo (90:10); y después de una serie de recromatografías se obtuvo un residuo de consistencia aceitosa, el cual estaba conformada por dos sustancias que revelaban café, cuando se empleaba como revelador químico una solución de FeCl₃ al 1% en etanol. La recuperación de la sustancia mayoritaria con menor polaridad, se realizó de manera convencional, obteniéndose 8 mg de la 5,7,4'-trihidroxi-8-(3'',3''-dimetilalil)-flavanona (60).

IR $\nu_{\text{máx}}$ (CHCl₃, espectro 16) cm⁻¹: 3592, 2925, 2852, 1643, 1453, 1383, 1259, 1184, 1142, 1092 y 832.

RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃, TMS, espectro 17): δ 1.608 (s, 3H, C₁₁-4''), δ 1.636 (s, 3H, C₁₁-5''), δ 2.743 (dd, J= 16.9 y 3.3 Hz, 1H, C₁₁-3ec), δ 3.028 (dd, J= 17.1 y 12.6 Hz, 1H, C₁₁-3ax), δ 3.196 (d, J= 7.2 Hz, 2H, C₁₁-1''), δ 5.178 (tc, J= 7.2 y 1.5 Hz, 1H, C₁₁-2''), δ 5.306 (dd, J= 12.6 y 3 Hz, 1H, C₁₁-2), δ 6.062 (s, 1H, C₁₁-6), δ 6.876 (d, J= 8.7 Hz, 2H, C₁₁-3' y 5'), δ 7.271 (d, J= 8.4 Hz, 2H, C₁₁-2' y 6') y δ 12.03 (s, 1H, C₇-OH).

EM (IE), m/z: 356 [M⁺, 40], 323 (17.5), 298 (15), 297 (16.25), 203 (42.50), 178 (40), 165 (53.75), 150 (40), 149 (68.75), 121 (25), 120 (50), 111 (28.75), 97 (47.5), 83 (46.25), 81 (40.9), 71 (62.5), 69 (53.75), 59 (40), 57 (90), 55 (95) y 43 (100).

5,4'-dihidroxi-7-metoxi-8-(2'',3''-dihidroxi-3''-metil,etil)-flavanona (61).

El residuo obtenido de las fracciones 216-255, al eluir la columna con una mezcla de n-hexano:acetato de etilo (85:15), fue decolorado de manera convencional, y del cual se derivó la recromatografía de 1.755g de extracto. Para esto se utilizó una columna de vidrio empacada con 28 g de sílica gel para columna y como eluyentes cloroformo y mezclas de cloroformo:acetato de etilo de polaridad creciente, colectándose 194 fracciones.

Para la purificación del compuesto se procedió a metilar el residuo (89 mg) de la fracción 192 con diazometano en éter etílico a 0°C durante aproximadamente 4 hr. Una vez concluida la reacción, se llevó a cabo la separación del producto mayoritario por ccp. de donde se obtuvieron 23.4 mg (1.33 %) de una sustancia de consistencia aceitosa de color amarillo y cuyas constantes espectroscópicas se describen a continuación.

IR. ν_{\max} (CHCl_3 , espectro 18) cm^{-1} : 3585, 3055, 2976, 2931, 1643, 1516, 1474, 1383, 1250 y 1148.

RMN- ^1H (300 MHz, CDCl_3 , TMS, espectro 19): δ 1.198 (*d*, $J=1.8$ Hz, 3H, CH_3-4''), δ 1.329 (*d*, $J=2.4$ Hz, 3H, CH_3-5''), δ 2.785 (*dd*, $J=17.1$ y 3.3 Hz, 1H, $\text{CH}-3\text{ec}$), δ 3.085 (*dd*, $J=17.1$ y 12.9 Hz, 1H, $\text{CH}-3\text{ax}$), δ 3.086-2.986 (señal múltiple, 2H, CH_2-1''), δ 3.859 (*s*, 3H, $\text{C}_7\text{-OMe}$), δ 4.699 (*dd*, $J=10.2$ y 2.7 Hz, $\text{CH}-2''$), δ 5.381 (*dd*, $J=12.7$ y 2.1 Hz, $\text{CH}-2$), δ 6.032 (*s*, 1H, $\text{CH}-6$), δ 6.941 (*d*, $J=9$ Hz, $\text{CH}-3'$ y $5'$), δ 7.373 (*d*, $J=9$ Hz, $\text{CH}-2'$ y $6'$) y δ 12.320 (*s*, 1H, $\text{C}_5\text{-OH}$).

RMN- ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , TMS, espectro 20): δ 78.95 (*d*, C-2), δ 43.22 (*t*, C-3), δ 195.35 (*s*, C-4), δ 165.14 (*s*, C-5), δ 91.59 (*d*, C-6), δ 168.60 (*s*, C-7), δ 104.69 (*s*, C-8), δ 160.06 (*s*, C-9), δ 103.13 (*s*, C-10), δ 130.56 (*s*, C-1'), δ 127.67 (*d*, C-2' y 6'), δ 114.24 (*d*, C-3' y 5'), δ 157.29 (*s*, C-4'), δ 29.70 (*t*, C-1''), δ 90.51 (*d*, C-2''), δ 71.86 (*s*, C-3''), δ 23.96 (*c*, C-4''), δ 25.89 (*c*, C-5'') y δ 55.38 (*c*, CH_3OPh).

EM (IE) m/z: [$\text{M}^+-\text{H}_2\text{O}$, 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) y 59 (27.87).

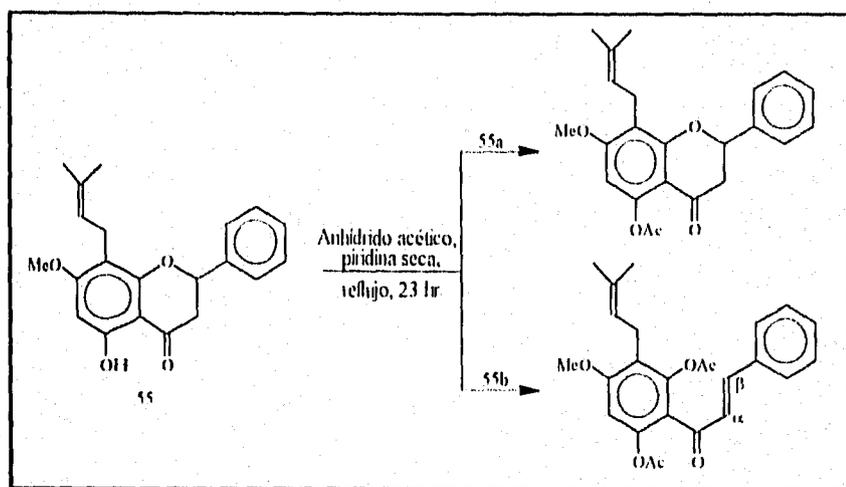
5,7,4'-trihidroxi-8-(2'',3''-dihidroxi-3''-metil,butil)-flavanona (62).

De los eluatos 516-531 (357.3 mg) obtenidos al eluir la columna con una mezcla de n-hexano:acetato de etilo (8:2), fueron decolorados de manera convencional para posteriormente purificar la sustancia de interés por medio de recromatografías en ccp, obteniendo así 23.41 mg (0.073%) de una sustancia de aspecto aceitoso; que fue caracterizada e identificada como la 5,7,4'-trihidroxi-8-(2'',3''-dihidroxi,3''-metil-butil)-flavanona.

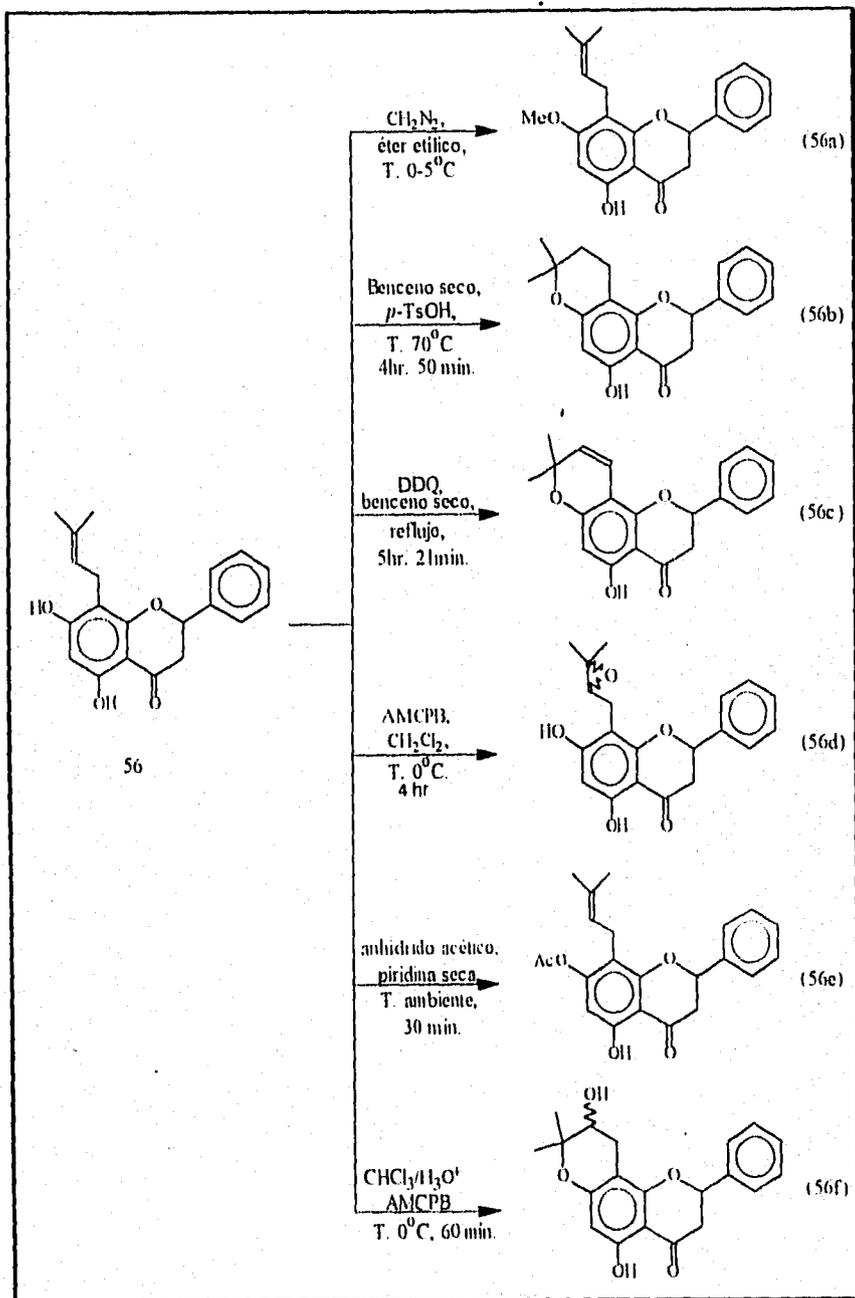
IR ν_{\max} (CHCl_3 , espectro 21) cm^{-1} : 3595, 3037, 3007, 2981, 1645, 1476, 1385, 1338, 1144, 1091, 808.

RMN- ^1H (300 MHz, CDCl_3 , TMS, espectro 22): δ 1.206 (*d*, $J=1.8$ Hz, 1H, CH_3-4''), δ 1.336 (*d*, $J=1.5$ Hz, 1H, CH_3-5''), δ 2.776 (*d*, $J=3$ y 17.1 Hz, 1H, $\text{CH}-3\text{ec}$), δ 3.046 (*dd*, $J=17.1$ y 23.2 Hz, 1H, $\text{CH}-3\text{ax}$), δ 3.114-2.985 (señal compleja, 2H, CH_2-1''), δ 4.700 (*td*, $J=8.1$ y 2.4 Hz, 1H, $\text{CH}-2''$), δ 5.361 (*dd*, $J=12.7$ y 3.3 Hz, 1H, $\text{CH}-2$), δ 6.032 (*s*, 1H, $\text{CH}-6$), δ 6.885 (*d*, $J=8.4$ Hz, 2H, $\text{CH}-3'$, $\text{CH}-5'$), δ 7.313 (*d*, $J=8.4$ Hz, 2H, $\text{CH}-2'$, $\text{CH}-6'$), δ 12.308 (*s*, 1H, $\text{C}_5\text{-OH}$).

7.2. TRANSFORMACIONES QUIMICAS.



Esquema 9. Transformaciones químicas realizadas a la 7-metilglabranina.



Esquema 10. Transformaciones químicas realizadas a la glabranina.

5-acetil-7-metoxi-8-(3",3"-dimetilalil)-flavanona (55a) y 2',6'-diacetil-4'-metoxi-3'-(3",3"-dimetilalil)-chalcona (55b).

140.3 mg de 7-metilglabranina fueron disueltos en la mínima cantidad de CHCl_3 , posteriormente se adicionó lentamente y con agitación 2 ml de anhídrido acético y 0.5 ml de piridina anhidra; la mezcla resultante se sometió a reflujo durante 23 hr, siguiendo el curso de reacción por cef. Una vez concluida la reacción, se adicionaron 5 ml de agua, extrayendo el producto de reacción con CHCl_3 -2 x 3 ml-; la fase clorofórmica obtenida fue lavada con una solución de HCl al 10% y posteriormente con una solución saturada de NaHCO_3 , finalmente la fase orgánica se lavó con agua -5 x 3 ml- y se secó sobre Na_2SO_4 anhidro; obteniendo así 121.7 mg de una mezcla constituida de dos productos -ver esquema 9-, los cuales fueron purificados por cromatografía en capa fina preparativa (107.6 mg).

El producto menos polar (42.6 mg, 30.4%) es un sólido de color amarillo claro, mientras que el producto de mayor polaridad (12 mg, 8.55%) tuvo un aspecto aceitoso de color amarillo.

Los datos espectroscópicos y espectrométricos para la 5-acetil-7-metoxi-8-(3",3"-dimetilalil)-flavanona (55a) se dan a conocer a continuación:

IR ν_{mix} (CHCl_3 , espectro 23), cm^{-1} : 3016, 3008, 2970, 2914, 1766, 1679, 1607, 1411, 367, 1290, 1186, 1168, 1097.

RMN- ^1H (200 MHz, CDCl_3 , TMS, espectro 24): δ 1.648 (s, 3H, CH_3 -4"), δ 1.653 (s, 3H, CH_3 -5"), δ 2.393 (s, 3H, CH_3CO), δ 2.754 (dd, $J = 16.8$ y 3.0 Hz, 1H, CH -3ec), δ 2.991 (dd, $J = 16.7$ y 13 Hz, 1H, CH -3ax), δ 3.318 (d, $J = 6.8$ Hz, 2H, CH_2 -1"), δ 3.873 (s, 3H, MeO-C_7), δ 5.147 (tc, $J = 7.28$ y 1.38 Hz, 1H, CH -2"), δ 5.444 (dd, $J = 13$ y 3.1 Hz, 1H, CH -2), δ 6.297 (s, 1H, CH -6), δ 7.440-7.419 (señal múltiple, 5H).

RMN- ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , TMS, espectro 25): δ 78.02 (d, C-2), δ 45.28 (t, C-3), δ 189.64 (s, C-4), δ 160.54 (s, C-5), δ 100.18 (d, C-6), δ 162.80 (s, C-7), δ 115.95 (s, C-8), δ 149.90 (s, C-9), δ 108.06 (s, C-10), δ 138.92 (s, C-1'), δ 128.51 (d, C-2' y C-6'), δ 128.68 (d, C-3' y C-5'), δ 125.94 (d, C-4'), δ 21.18 (t, C-1"), δ 121.84 (d, C-2"), δ 131.87 (s, C-3"), δ 17.72 (c, C-4"), δ 22.17 (c, C-5"), δ 55.95 (c, CH_3OPh), δ 169.78 (s, -COO) y δ 25.78 (c, CH_3CO).

EM (I.E) m/z: 380 [M $^+$, 12.95], 338 (100), 323 (44.60), 295 (15.11), 283 (12.59), 270 (23.74), 247 (2.16), 219 (34.53), 191 (15.11), 179 (14.75), 165 (4.32), 131 (3.59), 125 (2.88), 104 (4.32), 77 (3.59), 69 (2.88), 43 (6.47) y 41 (2.52).

Mientras que los datos correspondientes para la 2',6'-diacetil-4'-metoxi-3'-(3'',3''-dimetilalil)-chalcona (55b) son los siguientes:

IR ν_{\max} (CHCl₃, espectro 26) cm⁻¹: 3007, 2968, 2928, 1770, 1669, 1610, 1448, 1369, 1286, 1165, 1125, 1096.

RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃, TMS, espectro 27): δ 1.676 (s, 3H, CH₃-4''), δ 1.719 (s, 3H, CH₃-5''), δ 2.120 (s, 3H, CH₃CO), δ 2.165 (s, 3H, CH₃CO), δ 3.238 (d, J= 7 Hz, 2H, CH₂-1''), δ 3.870 (s, 3H, CH₃OPh), δ 5.100 (tc, J=7 y 1.3 Hz, 1H, CH-2''), δ 6.588 (s, 1H, CH-6), δ 6.940 (d, J= 16.1 Hz, 1H, H- α), δ 7.475 (d, J= 16.5 Hz, 1H, H- β), δ 7.405-7.268 (señal múltiple, 5H).

EM (I.E) m/z: 422 [M⁺, 43.22], 379 (60.17), 362 (4.23), 337 (100), 323 (52.54), 295 (24.58), 283 (34.75), 249 (10.17), 233 (43.22), 219 (30.08), 179 (32.20), 165 (5.93), 149 (4.23), 131 (22.03), 103 (14.41), 77 (7.63), 69 (5.08) y 43 (19.49).

5-hidroxi-8-(3'',3''-dimetilalil)-7-metoxiflavanona (56a).

Una vez purificado e identificado el compuesto 56, se sometió a una reacción de metilación; para ello 100 mg de esta sustancia se disolvieron en 5 ml de etanol absoluto, la cual fue introducida posteriormente a una mezcla frigorífica a -4°C, adicionando a continuación diazometano disuelto en éter etílico. El curso de la reacción fue seguido 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 que resultó ser soluble en cloroformo, acetato de etilo y parcialmente soluble en metanol.

De la recristalización de este derivado metilado se obtuvieron 75.4 mg (74.4 %) de un sólido de pf. 126-128°C, cuyas constantes espectroscópicas concuerdan para las obtenidas para la 5-hidroxi-8-(3'',3''-dimetilalil)-7-metoxiflavanona.

IR ν_{\max} (CHCl₃, espectro 28) cm⁻¹: 3005, 2926, 2853, 1634, 1538, 1444, 1373, 1303, 1270, 1162, 1103.

RMN-¹H (300MHz, CDCl₃, TMS, espectro 29): δ 1.626 (s, 3H, CH₃-4''), δ 1.650 (s, 3H, CH₃-5''), δ 2.853 (dd, J=17 y 3.5 Hz, 1H, CH-3ec), δ 3.055 (dd, J=17 y 12 Hz, 1H, CH-3ax), 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).

**5-hidroxi-6",6"-dimetil-4",5"-dihidropirano-(2",3",7,8)-
flavanona (56 b).**

Se disolvieron 100 mg de la 5,7-dihidroxi-8-(3",3"-dimetilalil)-flavanona en 25 ml de benceno seco, a esta solución resultante se le adicionaron 75 mg de ácido *p*-toluensulfónico para posteriormente calentarla a 70°C durante 4.50 hr. El curso de la reacción fue seguido mediante ccf., empleando como fase móvil una mezcla de *n*-hexano:acetato de etilo (8:2). Concluida la reacción el disolvente fue eliminado a baja presión y al residuo resultante se le adicionaron 25 ml de éter etílico. La eliminación del ácido *p*-toluensulfónico se realizó mediante lavados de la fase éterea con una solución de bicarbonato de sodio al 10% -3 x 5 ml-, seguido de 3 lavados con agua de 5 ml cada uno, para finalmente secar la fase éterea con sulfato de sodio anhidro, obteniéndose 63.5 mg (63.5 %) de una sustancia de consistencia aceitosa.

Las propiedades espectroscópicas y espectrométricas para el producto de reacción son las que se enlistan a continuación:

$[\alpha]_D^{25} = + 39.28$ (C= 4.2 mg/ml, CHCl₃)

IR $\nu_{\text{máx}}$ (CHCl₃, espectro 30) cm⁻¹: 3070, 3040, 3035, 2979, 2943, 1642, 1586, 1484, 1447, 1388, 1324, 1159 y 1118.

RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃, TMS, espectro 31): δ 1.256 (*s*, 3H, CH₃-C-6"), δ 1.258 (*s*, 3H, CH₃-C-6"), δ 1.764 (*tc*, J=7 y 2 Hz, 2H, CH₂-5"), δ 2.609 (*t*, J=7 Hz, 2H, CH₂-4"), δ 2.521 (*dd*, J=17 y 3.4 Hz, 1H, CH-3*ec*), δ 3.047 (*dd*, J=17 y 13 Hz, 1H, CH-3*ax*), 5.442 (*dd*, J= 13 y 4 Hz, 1H, CH-2), δ 5.981 (*s*, 1H, CH-6), δ 7.480-7.406 (señal múltiple, 5H) y δ 11.752 (*s*, 1H, C₅-OH).

RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃, TMS, espectro 32): δ 78.89 (*d*, C-2), δ 43.32 (*t*, C-3), δ 195.62 (*s*, C-4), δ 161.48 (*s*, C-5), δ 97.56 (*d*, C-6), δ 163.10 (*s*, C-7), δ 100.84 (*s*, C-8), δ 159.75 (C-9), δ 102.63 (C-10), δ 138.84 (*s*, C-1'), δ 128.67 (*d*, C-2' y C-6'), δ 128.80 (C-3' y C-5'), δ 125.91 (C-4') δ 16.29 (*t*, C-5"), δ 31.86 (*t*, C-4"), δ 76.15 (*s*, C-6"), δ 26.38 y 27.10 (*c*, 2Me-C-6").

EM (IE) m/z: 324 [M⁺, 100], 323 (29.27), 269 (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).

5-hidroxi-6",6"-dimetilpirano-(2",3",7,8)-flavanona (56 c).

En un matraz bola de 50 ml se disolvieron 97.8 mg de la 5,7-dihidroxi-8-(3",3"-dimetilalil)-flavanona, en una solución de 30 ml de benceno seco con 74.3 mg de DDQ. La mezcla obtenida se puso a reflujo durante 5.21 hr., siguiendo el curso de la reacción a través de cef. Finalizada la reacción el matraz fue introducido en un baño con hielo, formándose un sólido blanco que fue eliminado por filtración a gravedad. Las aguas madres se concentraron a baja presión, de donde se obtuvo un residuo amarillo de consistencia aceitosa que fue disuelto en 15 ml de CHCl_3 ; posteriormente la fase clorofórmica fue lavada con una solución saturada de KHCO_3 (3 x 15 ml), seguida de 3 lavados con agua de 5 ml cada uno; la fase clorofórmica se secó sobre Na_2SO_4 anhidro y se concentró a baja presión. El residuo obtenido resultó ser insoluble en metanol y soluble en acetato de etilo, cloroformo y diclorometano. Finalmente, éste sólido fue recristalizado empleando para ello una mezcla de diclorometano:propanol; de donde se obtuvieron 65.5 mg (66.97%) de una sustancia de consistencia aceitosa que fue caracterizada en base a su análisis espectroscópico y espectrométrico.

$[\alpha]_D^{25} = -3.68$ (C= 3.8 mg/ml, metanol).

IR $\nu_{\text{máx}}$ (CHCl_3 , espectro 33) cm^{-1} : 3016, 2981, 1640, 1589, 1478, 1374, 1161, 1115, 1091 y 1070.

RMN- ^1H (200 MHz, CDCl_3 , TMS, espectro 34): δ 1.431 (s, 3H, CH_3 -6"), δ 1.452 (s, 3H, CH_3 -6"), δ 2.834 (dd, J=17 y 4 Hz, CH-3ec), δ 3.071 (dd, J=17 y 12 Hz, 1H, CH-3ax), δ 5.443 (dd, J=12 y 4 Hz, 1H, CH-2), δ 5.479 (d, J=10 Hz, 1H, CH-5"), δ 6.008 (s, 1H, CH-6), δ 6.554 (d, J=10 Hz, 1H, CH-4"), δ 7.481-7.416 (señal múltiple, 5H) y δ 12.137 (s, 1H, C_5 -OH).

RMN- ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , TMS, espectro 35): δ 79.02 (d, C-2), δ 43.35 (t, C-3), δ 195.66 (s, C-4), δ 162.31 (s, C-5), δ 98.59 (d, C-6), δ 163.79 (s, C-7), δ 102.89 (s, C-8), δ 156.75 (s, C-9), δ 101.97 (s, C-10), δ 138.54 (s, C-1'), δ 128.76 (d, C-2' y C-6'), δ 128.82 (d, C-3' y C-5'), δ 126.52 (d, C-4'), δ 97.67 (d, C-4"), δ 115.57 (d, C-5"), δ 78.17 (c, C-6"), δ 28.53 y δ 28.28 (c, 2CH_3 -C-6").

5,7-dihidroxi-8-(3-metil-2,3-epoxibutano)-flavanona (56d).

Se disolvieron 200.9 mg de glabranina en 7 ml de CH_2Cl_2 , en un matraz Erlenmeyer de 50 ml, a continuación se adicionó con agitación 199.7 mg de AMCPB a una temperatura de 0°C . El curso de reacción se siguió por cef, una vez concluida la reacción (4 hr), se agregaron 5 ml de agua al matraz de reacción; posteriormente se realizaron extracciones con CH_2Cl_2 -2 x 3 ml-; la fase orgánica resultante se lavó con una solución de NaHSO_3 al 10 % -4 x 3 ml- y a continuación la fase diclorometánica se trató con una solución saturada de NaHCO_3 -3 x 3 ml- seguido de 2 lavados con agua -3 ml cada uno-, finalmente se secó la fase orgánica sobre Na_2SO_4 anhidro. El producto de reacción fue purificado por cep., obteniendo así 131.9 mg (65.65 %) de una sustancia de aspecto aceitoso, cuyas constantes espectroscópicas y espectrométricas corresponden con la 5,7-dihidroxi-8-(3-metil-2,3-epoxibutano)-flavanona.

IR ν_{max} (CHCl_3 , espectro 7), cm^{-1} : 3591, 2978, 1725, 1641, 1475, 1451, 1383, 1339, 1290, 1249, 1144, 1093, 956.

RMN- ^1H (300 MHz, CDCl_3 , TMS, espectro 8): δ 1.199 (s, 3H, CH_3 -5"), δ 1.212 (s, 3H, CH_3 -4"), δ 2.819 (dd, J= 17.1 y 3.3 Hz, 1H, CH-3ec), δ 3.061-2.999 (señal compleja, 2H, CH_2 -1"), δ 3.073 (dd, J= 17.1 y 12.7 Hz, 1H, CH-3ax), δ 4.709 (t, J= 8.9 Hz, 1H, CH-2"), δ 5.441 (dd, J= 12.7 y 3.2 Hz, 1H, CH-2), δ 6.040 (s, 1H, CH-6), δ 7.469-7.425 (señal múltiple, 5H), δ 12.003 (s, 1H, C_5 -OH).

RMN- ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , TMS, espectro 9): δ 79.13 (d, C-2), δ 43.59 (t, C-3), δ 195.12 (s, C-4), δ 165.08 (s, C-5), δ 91.67 (d, C-6), δ 168.63 (s, C-7), δ 104.76 (s, C-8), δ 157.11 (s, C-9), δ 103.09 (s, C-10), δ 138.00 (s, C-1'), δ 126.07 (d, C-2', 6' y 4'), δ 128.85 (s, C-3' y 5'), δ 26.78 (t, C-1"), δ 29.71 (d, C-2"), δ 71.86 (s, C-3"), δ 25.92 (c, C-5") y δ 23.92 (c, C-4").

EM (IE) m/z: 340 [M^+ , 86.59], 307 (68.29), 282 (51.22), 281 (82.93), 263 (21.95), 205 (36.58), 203 (70.73), 191 (29.27), 178 (100), 177 (64.63), 176 (51.22), 165 (48.78), 150 (76.83), 149 (28.05), 103 (26.83), 81 (34.15), 78 (24.39), 77 (24.39) y 43 (24.39).

7-acetil-5-hidroxi-8-(3",3"-dimetilalil)-flavanona (56e).

49.3 mg de glabranina (56) fueron disueltos en la mínima cantidad de CHCl_3 ; posteriormente, se hicieron reaccionar con 1 ml de anhídrido acético y 0.5 ml de piridina anhidra. La reacción fue llevada a cabo a temperatura ambiente por 30 min., siguiendo el curso de la reacción por cef. Una vez terminada la reacción, se adicionaron 5 ml de agua, extrayendo el producto de reacción con CHCl_3 (7 x 5 ml), posteriormente se realizaron lavados con una solución de HCl al 10% -9 x 3.5 ml-, seguido de un tratamiento con una solución saturada de NaHCO_3 (9 x 3 ml) y finalmente lavados con agua. La fase orgánica fue secada sobre Na_2SO_4 anhidro, purificando el producto (42 mg) de reacción por ccp. De donde se obtuvieron 22.5 mg (45.6%) de una sustancia que presentó ser un sólido de color amarillo claro con pf. 89-90°C.

IR $\nu_{\text{máx}}$ (CHCl_3 , espectro 36), cm^{-1} : 2970, 2916, 1769, 1649, 1625, 1593, 1372, 1186, 1137, 1078 y 1062.

RMN- ^1H (200 MHz, CDCl_3 , TMS, espectro 37): δ 1.647 (s, 3H, CH_3 -4"), δ 1.663 (s, 3H, CH_3 -5"), δ 2.307 (s, 3H, CH_3 -CO), δ 2.885 (dd, J= 17.2 y 3.3 Hz, 1H, CH-3 α), δ 3.115 (dd, J= 17.1 y 12.9 Hz, 1H, CH-3 α), δ 3.171 (d, J= 7.7 Hz, 2H, CH_2 -1"), δ 5.052 (tc, J= 7.1 y 1.4 Hz, 1H, CH-2"), δ 5.461 (dd, J= 12.9 y 3.3 Hz, 1H, CH-2), δ 6.302 (s, 1H, CH-6), δ 7.467-7.412 (señal múltiple, 5H) y δ 11.740 (s, 1H, C_5 -OH).

RMN- ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , TMS, espectro 38): δ 79.15 (d, C-2), δ 43.57 (t, C-3), δ 197.47 (s, C-4), δ 159.95 (s, C-5), δ 103.94 (d, C-6), δ 160.78 (s, C-7), δ 113.51 (s, C-8), δ 156.72 (s, C-9), δ 106.59 (s, C-10), δ 138.30 (s, C-1'), δ 125.99 (d, C-2', C-6' y C-4'), δ 128.82 (d, C-3' y C-5'), δ 20.90 (t, C-1"), δ 121.53 (d, C-2"), δ 131.99 (s, C-3"), δ 17.33 (c, C-4"), δ 22.62 (c, C-5"), δ 168.44 (s, -CO), δ 25.70 (c, CH_3CO -).

EM (IE) m/z: 366 [M^+ , 82.46], 351 (2.81), 323 (100), 309 (28.77), 281 (17.54), 269 (21.75), 256 (8.42), 247 (5.61), 219 (35.79), 205 (30.88), 177 (24.56), 165 (21.40), 149 (4.21), 131 (4.91), 104 (5.61), 103 (5.61), 69 (7.02), 43 (11.23), 41 (4.21).

5,5"-dihidroxi-6",6"-dimetil-4",5"-dihidropirano-(2",3",7,8)-flavanona (56 f).

En un matraz Erlenmeyer de 50 ml 117.3 mg de glabranina (56) fueron disueltos en 4.5 ml de CHCl_3 , la solución resultante fue colocada en un baño de hielo (0°C), a la que se le adicionó lentamente y con agitación 1 ml de CHCl_3 acidificado (50 ml de CHCl_3 con 2 gotas de HCl concentrado); seguido de 2 ml de una solución de AMCPB (119.9 mg en 2 ml de CHCl_3). El curso de la reacción fue seguido por cef, dando por concluida la reacción a los 60 minutos.

Terminada la reacción se adicionaron al matraz de reacción 8 ml de una solución de Na_2SO_3 al 10%, lentamente y con agitación a 0°C ; extrayendo a continuación el producto de reacción con CHCl_3 (4 x 3 ml), posteriormente se realizaron lavados con una solución saturada de NaHCO_3 (3 x 3 ml), seguido de 2 lavados con agua de 3 ml cada uno, secando finalmente la fase orgánica sobre Na_2SO_4 anhidro.

Una vez eliminado el disolvente, se obtuvieron 105.7 mg (90.11 %) de una sustancia de aspecto aceitoso de color café, que de acuerdo a su espectrometría de masas le corresponde un peso molecular de 340 y una fórmula de $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{O}_5$.

IR ν_{max} (CHCl_3 , espectro 39), cm^{-1} : 3583, 3426, 3019, 2981, 1645, 1476, 1387, 1339, 1215, 1144, 1093, 758, 669.

RMN- ^1H (300 MHz, CDCl_3 , TMS, espectro 40): δ 1.205 (s, 3H, CH_3 -6"), δ 1.333 (s, 3H, CH_3 -6"), δ 2.824 (dd, J= 17.1 y 3.3 Hz, 1H, CH -3ec), δ 3.070 (dd, J=17.1 y 12.9 Hz, 1H, CH -3ax), δ 3.120-2.992 (señal oscurecida, 2H, CH_2 -4"), δ 4.709 (td, J=8.7 y 1 Hz, 1H, CH -5"), δ 5.438 (dd, J=12.9 y 3 Hz, 1H, CH -2), δ 6.040 (s, 1H, CH -6), δ 7.460-7.408 (señal múltiple, 5H), δ 12.300 (s, 1H, C_5 -OH).

RMN- ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , TMS, espectro 41): δ 79.05 (d, C-2), δ 43.38 (t, C-3), δ 195.10 (s, C-4), δ 165.05 (s, C-5), δ 91.64 (d, C-6), δ 168.23 (s, C-7), δ 104.74 (s, C-8), δ 156.99 (s, C-9), δ 103.08 (s, C-10), δ 138.45 (s, C-1'), δ 126.06 (d, C-2', 4' y 6'), δ 128.02 (d, C-3' y 5'), δ 26.77 (t, C-4"), δ 71.83 (d, C-5"), δ 78.99 (s, C-6"), δ 25.94 (c, CH_3 -C-6"), δ 23.88 (c, CH_3 -C-6").

EM (IE), m/z: 340 [M^+ , 100], 325 (13.55), 307 (62.71), 281 (66.10), 263 (18.64), 254 (4.23), 236 (8.47), 205 (22.88), 203 (35.59), 178 (66.10), 177 (44.91), 150 (55.93), 149 (7.62), 131 (6.77), 104 (11.86), 103 (9.32), 59 (29.66), 43 (7.62).

7.3. BIOENSAYOS FRENTE *Artemia salina*.

La determinación de la actividad biológica de los extractos hexánico, acetónico y etanólico, así como de las fracciones obtenidas durante la elución de la columna y de las sustancias purificadas, se realizó de la siguiente manera:

Se incubaron los huevecillos de *Artemia salina* en agua de mar artificial a 28°C. con un sistema de aereación por 48 hrs y bajo una lámpara eléctrica.

De cada muestra se pesaron 20 mg, los cuales fueron disueltos y de donde se tomaron a continuación los siguientes volúmenes: 5 µl, 50 µl, 500 µl, cada uno por triplicado. Una vez concluida las 48 hrs de incubación, se colocaron 10 *Artemias* en cada muestra con ayuda de una pipeta Pasteur, aforando posteriormente a 5 ml con agua de mar artificial, realizándose a la par un blanco.

La lectura de las muestras se realizó después de 24 hrs -número de *Artemias* muertas-, y se determinó la CI_{50} , por el método Probits, utilizando un programa de cómputo.

VIII. RESULTADOS.

TABLA VI : DATOS DE ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO (CHCl_3 , ν_{max} , cm^{-1}) DE LAS FLAVANONAS
 CARACTERIZADAS DE *Esenbeckia berlandieri* ssp *acapulcensis*.

SUSTANCIA	
55	3006, 2926, 2853, 1654, 1583, 1444, 1373, 1303, 1270, 1162, 1103.
56	3583, 3374, 3080, 3057, 2968, 2918, 2860, 1639, 1480, 1442, 1373, 1339.
57	3591, 2978, 1725, 1641, 1475, 1451, 1383, 1339, 1290, 1249, 1144, 1093, 956.
58	2963, 2914, 2853, 1637, 1585, 1516, 1444, 1373, 1303, 1253, 1205, 1105.
59	3593, 2964, 2926, 2854, 1633, 1583, 1484, 1443, 1374, 1303, 1264, 1168, 1102.
60	3592, 2925, 2852, 1643, 1453, 1383, 1259, 1184, 1142, 1092, 832.
61	3585, 3055, 2976, 2931, 1643, 1516, 1474, 1383, 1250, 1148.
62	3595, 3037, 3007, 2981, 1645, 1476, 1385, 1338, 1144, 1091, 808.

TABLA VII : DATOS DE ESPECTROMETRIA DE MASAS POR IMPACTO ELECTRONICO. 70 eV. DE LAS FLAVANONAS CARACTERIZADAS DE *Esenbeckia berlandieri* ssp *acapulcensis*.

SUSTANCIA	m/z (% Abundancia Relativa)
55	338[M⁺, 73.17] , 323(53.66), 270(39.02), 219(100), 191(78.05), 179(52.44), 104(36.58), 103(48.78), 77(59.76), 69(47.56).
56	324[M⁺, 100] , 309(51.21), 281(26.83), 269(26.83), 205(70.73), 192(31.70), 177(70.73), 165(63.41), 69(34.15), 43(19.51).
57	340[M⁺, 86.59] , 307(68.29), 282(51.22), 205(36.58), 203(70.73), 178(100), 177(64.63), 176(51.22), 165(48.78), 150(76.83).
58	368[M⁺, 0.78] , 367(53.66), 325(23.17), 312(21.95), 219(100), 206(41.46), 191(51.22), 179(74.39), 134(25.61), 121(29.27).
59	354[M⁺+1, 92.12] , 339 (34.15), 311(41.46), 299(36.59), 219(90.24), 191(75.61), 179(100), 176(24.39), 120(45.12), 91(48.78).
60	356[M⁺, 40] , 203(42.50), 165(53.75), 149(68.75), 120(50), 97(47.5), 71(62.5), 57(90), 55(95), 43(100).
61	370[M⁺-H₂O, 100] , 337(59.84), 312(40.16), 311(50), 219(27.87), 203(98.36), 178(67.21), 177(63.93), 150(63.93), 134(73.77).

TABLA VIII : DATOS DE RMN-¹H(*300 MHz. **200 MHz. CDCl₃, TMS) DE LAS FLAVANONAS PRENILADAS AISLADAS DE *Esenbeckia berlandieri* ssp *acapulcensis*.

SUSTANCIA	55*	56*	57**	58*	59**	60*	61*	62*
H								
2	5.413 <i>dd</i> (12.6 y 3.3)	5.427 <i>dd</i> (13 y 3.3)	5.441 <i>dd</i> (12.7 y 3.2)	5.359 <i>dd</i> (12.4 y 3.5)	5.344 <i>dd</i> (12.6 y 3.3)	5.306 <i>dd</i> (12.6 y 3)	5.381 <i>dd</i> (12.7 y 2.1)	5.361 <i>dd</i> (12.7 y 3.3)
3 _{ec}	2.850 <i>dd</i> (17.1 y 3.6)	2.844 <i>dd</i> (17.1 y 3.0)	2.819 <i>dd</i> (17.1 y 3.3)	2.813 <i>dd</i> (17.1 y 3.3)	2.806 <i>dd</i> (17.1 y 3.3)	2.743 <i>dd</i> (16.9 y 3.3)	2.785 <i>dd</i> (17.1 y 3.3)	2.776 <i>dd</i> (17.1 y 3)
3 _{ac}	3.055 <i>dd</i> (17.1 y 12.3)	3.058 <i>dd</i> (17.25 y 12.9)	3.073 <i>dd</i> (17.1 y 12.7)	3.054 <i>dd</i> (17.1 y 12.6)	3.054 <i>dd</i> (17.1 y 12.5)	3.028 <i>dd</i> (17.1 y 12.6)	3.085 <i>dd</i> (17.1 y 12.9)	3.047 <i>dd</i> (23.2 y 17.1)
6	6.102 <i>s</i>	6.036 <i>s</i>	6.040 <i>s</i>	6.089 <i>s</i>	6.095 <i>s</i>	6.062 <i>s</i>	6.032 <i>s</i>	6.032 <i>s</i>
1"	3.239 <i>d</i> (7.2)	3.366 <i>d</i> (6.9)	3.061-2.999 señal compleja	3.216 <i>d</i> (7.2)	3.214 <i>d</i> (7.38)	3.196 <i>d</i> (7.2)	3.086-2.986 s.m.	3.114-2.985 s.m.
2"	5.147 <i>tc</i> (7.5 y 1.5)	5.221 <i>tc</i> (7.2 y 1.5)	4.709 <i>t</i> (8.9)	5.132 <i>tc</i> (7.26 y 1.38)	5.127 <i>tc</i> (7.28 y 1.38)	5.178 <i>tc</i> (7.2 y 1.5)	4.699 <i>dd</i> (10.2 y 2.7)	4.700 <i>tc</i> (8.1 y 2.4)
4"	1.626 <i>s</i>	1.731 <i>s</i>	1.212 <i>s</i>	1.617 <i>s</i>	1.615 <i>s</i>	1.608 <i>s</i>	1.198 <i>d</i> (1.8)	1.206 <i>d</i> (1.8)
5"	1.650 <i>s</i>	1.731 <i>s</i>	1.199 <i>s</i>	1.646 <i>s</i>	1.648 <i>s</i>	1.636 <i>s</i>	1.329 <i>d</i> (2.4)	1.336 <i>d</i> (1.5)
C₅-OH	12.137 <i>s</i>	12.002 <i>s</i>	12.003 <i>s</i>	12.135 <i>s</i>	12.143 <i>s</i>	12.030 <i>s</i>	12.320 <i>s</i>	12.308 <i>s</i>
C₇-OCH₃	3.859 <i>s</i>	—	—	3.857 <i>s</i>	3.856 <i>s</i>	—	3.859 <i>s</i>	—
2' y 6'	7.480-7.363	7.475-7.385	7.469-7.425	—	—	—	—	—
3' y 5'	s.m.	s.m.	s.m.	—	—	—	—	—
4'	5H	5H	5H	—	—	—	—	—
2' y 6'	—	—	—	7.374 <i>d</i> (9)	7.334 <i>dd</i> (8.6 y 1)	7.271 <i>d</i> (8.4)	7.374 <i>d</i> (9)	7-313 <i>d</i>
3' y 5'	—	—	—	6.941 <i>d</i> (9)	6.876 <i>dd</i> (8.6 y 1)	6.876 <i>d</i> (8.7)	6.941 <i>d</i> (9)	6.885 <i>d</i>
PbOCH₃	—	—	—	3.835 <i>s</i>	—	—	—	—

TABLA IX : DATOS DE RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃) DE LAS FLAVANONAS PRENILADAS AISLADAS DE
Esenbeckia berlandieri ssp acapulcensis.

SUSTANCIA	55	56	57	58	59	61
C-2	78.67	78.97	79.02	78.48	78.42	78.95
C-3	43.42	43.29	43.59	43.29	43.24	43.22
C-4	196.30	196.23	195.12	196.52	196.50	195.35
C-5	162.64	162.23	165.08	162.63	162.52	165.14
C-6	92.48	96.92	91.67	92.44	92.41	91.59
C-7	165.77	163.77	168.63	165.73	165.72	168.60
C-8	109.00	106.26	104.76	108.99	108.98	104.69
C-9	158.74	159.17	157.11	158.87	158.82	160.06
C-10	102.95	103.72	103.09	102.99	102.92	103.13
C-1'	138.91	138.68	138.00	131.32	131.00	130.56
C-2'	128.52	125.93	126.07	127.47	127.65	127.67
C-3'	128.70	128.69	128.85	114.06	115.44	114.24
C-4'	125.92	125.93	126.07	158.87	155.82	157.29
C-5'	128.70	128.69	128.85	114.06	115.44	114.24
C-6'	128.52	125.93	126.07	127.47	127.65	127.67
C-1''	21.58	21.98	26.78	21.61	21.62	29.70
C-2''	122.40	121.57	79.13	122.33	122.33	90.51
C-3''	131.38	134.92	71.86	130.98	131.31	71.86
C-4''	17.64	17.82	23.92	17.702	17.71	23.96
C-5''	25.76	25.79	25.92	25.79	25.79	25.89
PhOCH ₃	55.88	—	—	55.87	55.09	55.38
				55.32		

TABLA X : DATOS DE ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO (CHCl_3 , $\nu_{\text{máx}}$, cm^{-1}). DE LAS FLAVANONAS
 COMO PRODUCTO DE REACCIÓN.

SUSTANCIA	
55a	3016, 3008, 2970, 2914, 1766, 1679, 1607, 1411, 1367, 1290, 1186, 1168, 1097.
55b	3007, 2968, 2928, 1770, 1669, 1610, 1448, 1369, 1286, 1165, 1125, 1096.
56a	3005, 2926, 2853, 1634, 1538, 1444, 1373, 1303, 1270, 1162, 1103.
56b	3070, 3040, 3035, 2979, 2943, 1642, 1586, 1484, 1447, 1388, 1324, 1159, 1118.
56c	3016, 2981, 1640, 1589, 1438, 1374, 1161, 1115, 1091, 1070.
56d	3591, 2978, 1725, 1641, 1475, 1451, 1383, 1339, 1290, 1249, 1144, 1093, 956.
56e	2970, 2916, 1769, 1649, 1625, 1456, 1372, 1298, 1186, 1137, 1078, 1062.
56f	3583, 3426, 3019, 2981, 1645, 1476, 1387, 1339, 1215, 1144, 1093, 758, 669.

TABLA XI : DATOS DE ESPECTROMETRIA DE MASAS POR IMPACTO ELECTRONICO. 70 eV. DE LAS FLAVANONAS COMO PRODUCTOS DE REACCION.

SUSTANCIA	m/z (% Abundancia Relativa)
55a	381 [M ⁺ +1, 3.59], 380 (12.95), 338 (100), 323 (44.60), 295 (15.11), 270 (23.74), 219 (34.53), 191 (15.11), 179 (14.75).
55b	423 [M ⁺ +1, 12.29], 422 (43.22), 379 (60.17), 337 (100), 323 (52.54), 283 (34.75), 233 (43.22), 219 (30.08), 179 (32.20).
56a	339 [M ⁺ +1, 1.30], 338 (100), 324 (17.5), 323 (72.5), 295 (31.25), 270 (35), 219 (77.50), 191 (61.25), 103 (22.5).
56b	325 [M ⁺ +1, 26.83], 324 (100), 323 (29.27), 269 (43.90), 177 (29.27), 165 (51.22), 104 (34.15), 78 (24.39), 69 (30.95).
56d	340[M ⁺ , 86.59], 307(68.29), 282(51.22), 205(36.58), 203(70.73), 178(100), 177(64.63), 176(51.22), 150(76.83).
56e	367 [M ⁺ +1, 20.35], 366 (82.46), 323 (100), 309 (28.77), 269 (21.75), 219 (35.79), 205 (30.88), 177 (24.56), 165 (21.40).
56f	341 [M ⁺ +1, 35.59], 340 (100), 307 (62.71), 281 (66.10), 203 (35.59), 178 (66.10), 177 (44.91), 150 (55.93), 59 (29.66).

TABLA XII : DATOS DE RMN-¹H (*300 MHz **200 MHz, CDCl₃, TMS) DE LAS FLAVANONAS COMO PRODUCTO DE REACCION.

Substancia	**55a	**55b	*56a	**56b	**56c	*56d	**56e	*56f
H								
2	5.444 <i>dd</i> (13 y 3.1)	—	5.418 <i>dd</i> (12 y 3.5)	5.442 <i>dd</i> (13 y 4)	5.443 <i>dd</i> (12 y 4)	5.441 <i>dd</i> (12.4 y 3.5)	5.461 <i>dd</i> (12.9 y 3.3)	5.438 <i>dd</i> (12.9 y 3)
3 _{cc}	2.754 <i>dd</i> (16.8 y 3)	—	2.835 <i>dd</i> (17 y 3.5)	2.521 <i>dd</i> (17 y 3.4)	2.834 <i>dd</i> (17 y 4)	2.819 <i>dd</i> (17.1 y 3.3)	2.885 <i>dd</i> (17.2 y 3.3)	2.824 <i>dd</i> (17.1 y 3.3)
3 _{ax}	2.991 <i>dd</i> (16.7 y 13)	—	3.055 <i>dd</i> (17 y 12)	3.047 <i>dd</i> (17 y 13)	3.071 <i>dd</i> (17 y 12)	3.054 <i>dd</i> (17.1 y 12.7)	3.115 <i>dd</i> (17.1 y 12.9)	3.070 <i>dd</i> (17.1 y 12.9)
6	6.297 <i>s</i>	6.588 <i>s</i>	6.102 <i>s</i>	5.981 <i>s</i>	6.008 <i>s</i>	6.040 <i>s</i>	6.302 <i>s</i>	6.040 <i>s</i>
1"	3.318 <i>d</i> (6.8)	3.238 <i>d</i> (7)	3.239 <i>d</i> (7)	—	—	3.061-2.999 señal compleja	3.171 <i>d</i> (7.7)	—
2"	5.147 <i>tc</i> (7.28 y 1.38)	5.100 <i>tc</i> (7 y 1.3)	5.147 <i>tc</i> (7 y 1.5)	—	—	4.709 <i>t</i> (8.9)	5.052 <i>tc</i> (7.1 y 1.4)	—
4"	1.648 <i>s</i>	1.676 <i>s</i>	1.650 <i>s</i>	2.609 <i>t</i> (7)	6.554 <i>d</i> (10)	1.212 <i>s</i>	1.647 <i>s</i>	3.120-2.992 señal ocurrecida
5"	1.653 <i>s</i>	1.719 <i>s</i>	1.626 <i>s</i>	1.764 <i>td</i> (7 y 2)	5.479 <i>d</i> (10)	1.199 <i>s</i>	1.663 <i>s</i>	4.709 <i>td</i> (8.7 y 1)
6"	—	—	—	1.256 <i>s</i>	1.431 <i>s</i>	—	—	1.205 <i>s</i>
6"	—	—	—	1.258 <i>s</i>	1.452 <i>s</i>	—	—	1.333 <i>s</i>
C ₅ -OH	—	—	12.137 <i>s</i>	11.752 <i>s</i>	12.137 <i>s</i>	12.003 <i>s</i>	11.740 <i>s</i>	12.300 <i>s</i>
C ₇ -OCH ₃	3.873 <i>s</i>	3.870 <i>s</i>	3.859 <i>s</i>	—	—	—	—	—
2', 6'	7.440-7.419	7.405-7.268	7.363-7.480	7.480-7.406	7.481-7.416	7.469-7.425	7.467-7.412	7.460-7.408
3', 5'	s.m.	s.m.	s.m.	s.m.	s.m.	s.m.	s.m.	s.m.
4'	—	—	—	—	—	—	—	—
CH ₃ CO-	2.393 <i>s</i>	2.165 <i>s</i>	—	—	—	—	2.307 <i>s</i>	—
CH ₃ CO-	—	2.120 <i>s</i>	—	—	—	—	—	—
α	—	6.940 <i>d</i> (16.1)	—	—	—	—	—	—
β	—	7.475 <i>d</i> (16.5)	—	—	—	—	—	—

TABLA XIII : DATOS DE RMN-¹³C (*75MHz, **50 MHz, CDCl₃, TMS) DE LAS FLAVANONAS COMO PRODUCTO DE REACION.

Entancia	**55a	*56b	*56c	*56d	*56e	*56f
C						
2	78.02	78.89	79.02	79.13	79.15	79.05
3	45.28	43.32	43.35	43.59	43.57	43.38
4	189.64	195.62	195.66	195.12	197.47	195.10
5	160.54	161.48	162.31	165.08	159.95	165.05
6	100.18	97.56	98.59	91.67	103.94	91.64
7	162.80	163.10	163.79	168.63	160.78	168.23
8	115.95	100.84	102.89	104.76	113.51	104.74
9	149.90	159.75	156.75	157.11	156.72	156.99
10	108.06	102.63	101.97	103.09	106.59	103.08
1'	138.92	138.84	138.54	138.00	138.30	138.45
2'	128.51	128.67	128.76	126.07	125.99	126.06
3'	128.68	128.80	128.82	128.85	128.82	128.02
4'	125.94	125.91	126.52	126.07	125.99	126.06
5'	128.68	128.80	128.82	128.85	20.90	128.02
6'	128.51	128.67	128.76	126.07	125.99	126.06
1''	21.18	---	---	26.78	20.90	---
2''	121.84	---	---	29.71	121.52	---
3''	131.87	---	---	71.86	131.99	---
4''	17.72	31.86	97.67	23.92	17.33	26.77
5''	22.17	16.29	115.57	25.92	22.62	71.83
6''	---	76.15	78.17	---	---	78.99
Me-C-6''	--	27.10	28.53	---	---	25.94
		26.38	28.28			23.88
MeO-	55.95	---	---	---	---	---
-COO	169.78	---	---	---	168.44	---
CH₂CO	25.78	---	---	---	25.70	---

TABLA XIV. VALORES DE LA DOSIS LETAL MEDIA DE LOS BIOENSAYOS REALIZADOS FRENTE *Artemia salina*.

MUESTRA	CL ₅₀ (ppm)	LSC	LIC
EXTRACTO			
Hexánico	> 1000	----	----
Acelónico	907.72	3033.90	439.58
Etanólico	767.15	1166.58	551.75
FRACCIONAMIENTO DEL EXTRACTO ETANOLICO			
Fracción 60-75	> 1000	----	----
Fracción 164-187	> 1000	----	----
Fracción 265-281	205.39	283.36	151.14
Fracción 306-324	348.17	866.00	182.98
Fracción 347-415	53.92	84.41	32.77
Fracción 451-490	> 1000	----	----
Fracción 539-546	> 1000	----	----
Fracción 610-618	> 1000	----	----
SUSTANCIAS PURIFICADAS			
7-Metilglabranina (55)	> 1000	----	----
Glabranina (56)	289.27	877.09	137.56
Epóxido de la glabranina (57)	252.18	383.49	174.85

LSC: Limite Superior Confiable.
LIC: Limite Inferior Confiable.

TABLA XV. PRUEBAS ANTIMICROBIANAS*.

MICROORGANISMO / MUESTRA	EXTRACTO ETANOLICO		SUSTANCIA 55		SUSTANCIA 56		SUSTANCIA 59	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
<i>Bacillus cereus</i>	0.03	0.25	P	>1	0.03	0.06	P>1	P
<i>Candida albicans</i>	P	>1	P	>1	P	>1	P	>1
<i>Escherichia coli</i>	P	>1	P	>1	P	>1	P	>1
<i>Enterobacter cloacae</i>	P	>1	P	>1	P	>1	P	>1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	P	>1	P	>1	P	>1	P	>1
<i>Mycobacterium fortuitum</i>	P	>1	P	>1	P	>1	P	>1
<i>Streptococcus pyogenes</i>	<0.016	<0.01	P	>1	<0.016	0.03	1	1
<i>Salmonella sp.</i>	P	>1	P	>1	P>1	>1	P>1	>1
<i>Proteus vulgaris</i>	P	>1	P	>1	>1	>1	P	>1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	>1	>1	P	>1	>1	>1	P>1	>1
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.03	0.06	P	>1	0.06	0.5	P	>1

P= precipitación

MIC= Concentración mínima inhibitoria

MBC= Concentración mínima bactericida

1= 1 mg/ml

* PRUEBAS REALIZADAS EN EL DEPARTAMENTO DE FARMACIA DE LA UNIVERSIDAD DE ANTWERPEN EN BELGICA

TABLA XVI . PRUEBAS ANTIVIRALES*.

MUESTRA	HERPES SIMPLEX	COXSACKIE	MEASLES	FOLIO	SEMLIKI FOREST	VESICULAR STOMATITIS
EXTRACTO ETANOLICO	100-25 : T 100-1 : 1	100-25 : T 10-1 : 1	100-25 : T 100 : P 10-1 : 1	100-25 : T 10-1 : 1	100-25 : T 10-1 : 1	100-25 : T 10 : 10 1 : 1
SUSTANCIA 55	100-50 : T(P) 25-1 : 1	100-50 : P 100 : T 50-1 : 1	100-50 : P 100 : T 50-1 : 1	100-50 : P 100 : T 50-1 : 1	100-50 : P 100 : T 50-1 : 1	100-50 : P 100 : T (P) 50-1 : 1
SUSTANCIA 56	100-50 : T 25-1 : 1	100-25 : T 100 : P 10-1 : 1	100-25 : T 100 : P 10-1 : 1	100-25 : T 100-50 : P 10-1 : 1	100-25 : T 100 : P 10-1 : 1	100-25 : T (P) 10 : 10 1 : 1
SUSTANCIA 59	100-25 : T 100-1 : 1	100-25 : T 100 : P 10-1 : 1	100-25 : T 100 : P 10-1 : 1	100-25 : T 100 : P 10-1 : 1	100-25 : T 100-50 : P 10-1 : 1	100-25 : P 100-50 : T 25 : T/2 : 1

T → T/4 Decrece la escala de citotoxicidad

Rango de concentración : 100-25 µg/ml

Resultados antivirales expresados como el factor de reducción de el titulo viral : 1, 10, 100, etc.

P= Precipitación durante la incubación

IX. DISCUSION DE RESULTADOS.

9.11. ELUCIDACION ESTRUCTURAL.

El análisis de las propiedades físicas, espectroscópicas y espectrométricas, así como la comparación de éstas con las informadas en la literatura, permitieron la elucidación estructural de 6 sustancias (55-57, 59, 60, 62) que fueron aisladas del extracto etanólico de las partes aéreas de *Esenbeckia berlandieri* Baill ssp *acapulcensis* (Rose), y de 11 compuestos como productos de reacción. Algunos de estos metabolitos secundarios y transformaciones químicas realizadas, se obtuvieron de un estudio preliminar ⁵⁹.

De las fracciones **80-163**, obtenidas al eluir la columna con n-hexano, se aisló un sólido cristalino amarillo pálido, de pf. 126-128°C. En su espectro de masas se observa un ion molecular con m/z 338, al que se le puede asociar una fórmula molecular $C_{21}H_{22}O_4$, con 11 grados de insaturación.

En el espectro de IR (espectro 1); se observa la presencia de un grupo carbonilo de cetona en 1654 cm^{-1} , el desplazamiento de la banda de absorción hacia un número de onda más baja, con respecto al desplazamiento informado en la literatura (1715 cm^{-1}), se debe a la formación de un puente de hidrógeno con un grupo hidroxilo, lo cual explica la coloración café oscura observada en ccf, cuando ésta se revela con una solución de $FeCl_3$ en etanol al 1%. Así mismo, se visualiza una banda de absorción a 3006 cm^{-1} que corresponde a la vibración C-H con una hibridación sp^2 (-C=C-H), y dos bandas a 1444 y 1373 cm^{-1} características de metilenos alílicos y metilos vinílicos respectivamente.

Lo anterior se complementa al analizar el espectro de RMN-¹H (espectro 2), en el cual se detecta una señal simple (s) a campo bajo (δ 12.137), que corresponde a un grupo hidroxilo quelatado con el grupo carbonilo (fórmula parcial A), como se ilustra en la figura 63.

Fórmula parcial A

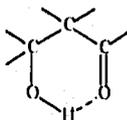


Figura 63

La señal compleja entre 7.840-7.363 ppm que integra para 5 hidrógenos, corresponde a un anillo aromático monosustituido (fórmula parcial B, figura 64). Además, se detecta una señal simple (*s*) que integra para 3 hidrógenos con un δ 3.859, que corresponde a un grupo metoxilo sobre un anillo aromático (fórmula parcial C), como se indica en la figura 65. De esta manera se explican 9 de los 11 grados de insaturación que presenta dicho compuesto.

Fórmula parcial B

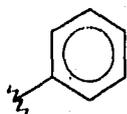


Figura 64

Fórmula parcial C

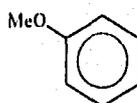


Figura 65

La señal doble de doble (*dd*) en δ 5.413 que integra para 1H ($J= 12.6$ y 3.3 Hz, CH-2), muestra tener interacciones con las señales en δ 3.055 (*dd*, $J=17.1$ y 12.3 , 1H, CH-3ax) y δ 2.850 (*dd*, $J=17.1$ y 3.6 Hz, 1H, CH-3ec), lo cual queda debidamente demostrado en su espectro COSY (esquema 11), y que corresponde a un fragmento molecular en que los hidrógenos presentan una disposición antiperiplanar (H-2, H-3ax) y *syn*clinal (H-2, H-3ec), tal como se ilustra en la figura 66; esto permite sugerir que se trata de hidrógenos que forman parte de un anillo de 6 miembros. Donde el H-2 se encuentra más desplazado a campo bajo por encontrarse cercano a un grupo muy electronegativo (oximetino); mientras que el H-3ax se localiza más desprotegido con respecto al H-3ec, debida al efecto de anisotropía ejercido por el grupo fenilo que presenta una orientación α -pseudoequatorial, como se indica en las figuras 67 y 68.

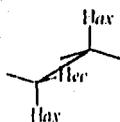


Figura 66

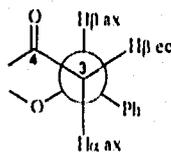
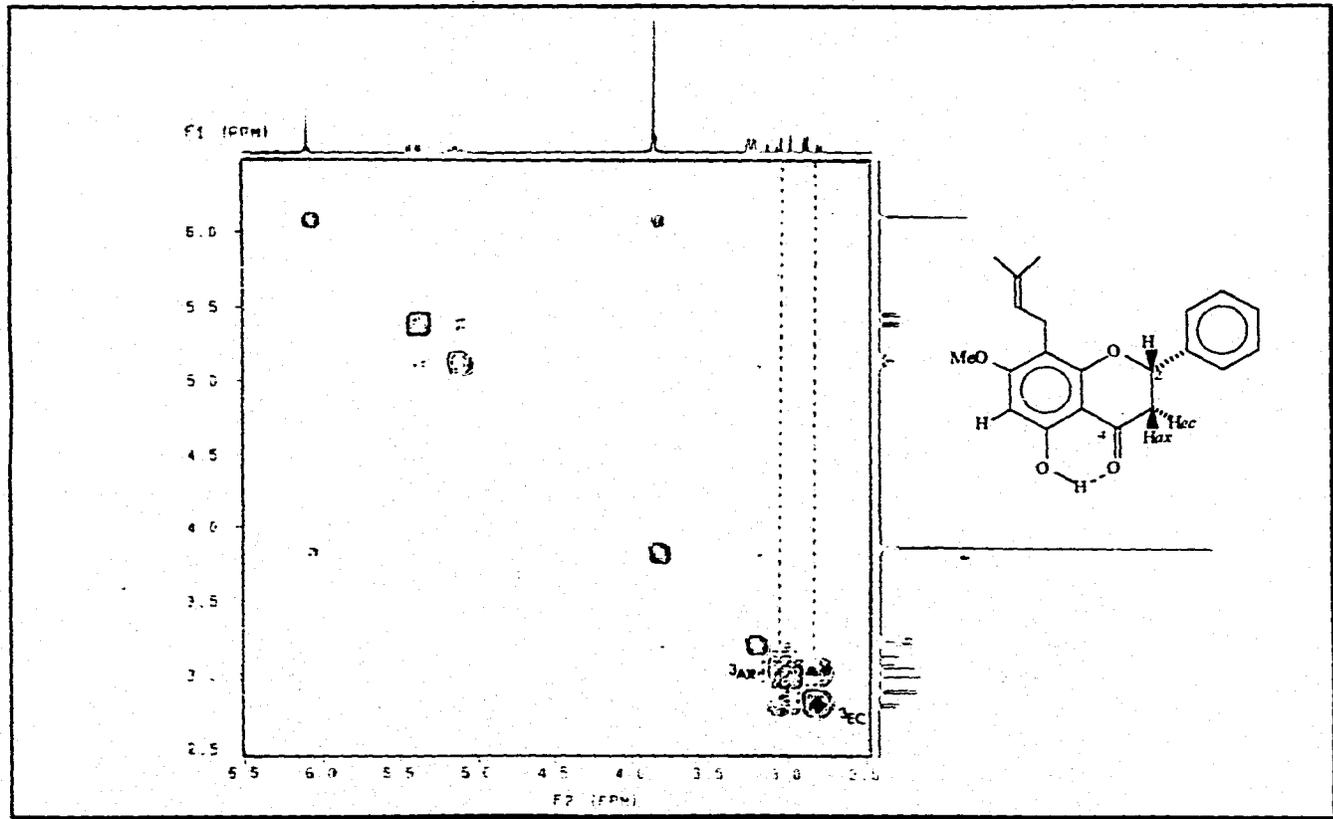


Figura 67



Esquema 11. COSY (200 MHz, CDCl₃, TMS) de la 7-metilglabranina.

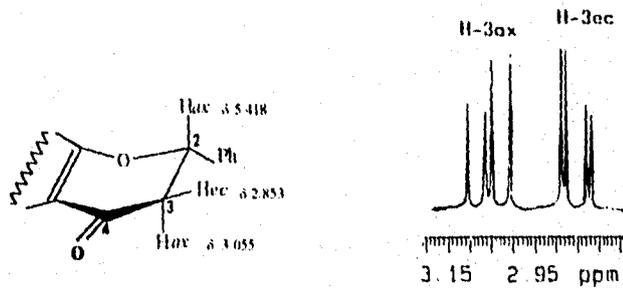


Figura 68

De acuerdo a lo anterior, se propuso como hipótesis estructural el esqueleto de una flavanona metoxilada en la posición 7 (figura 69), cuya fórmula molecular es $C_{16}H_{13}O_4$. Las flavanonas son compuestos que poseen 15 átomos de carbono, en los cuales dos núcleos benzénicos están unidos por un eslabón de 3 átomos de carbono, y al que se le pueden asociar 10 grados de insaturación.

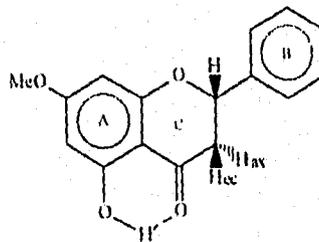


Figura 69

El fragmento restante (C_5H_8) se identificó como el grupo prenilo; ya que en el espectro de RMN-¹H, se observa una señal en δ 5.147 como un triple de cuartetos (*tc*, $J=7.5$ y 1.5 Hz), que corresponde al hidrógeno vinílico de este fragmento, el cual se acopla con la señal doble (*d*) que aparece en δ 3.239 ($J=7.2$ Hz), correspondiente a 2 hidrógenos alílicos y/o benéficos. Las 2 señales simples en 1.626 y 1.650 ppm que integran para tres protones cada una, son asignadas a los grupos metilos de las posiciones 4'' y 5'' respectivamente (figura 70).

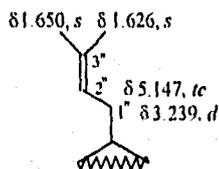
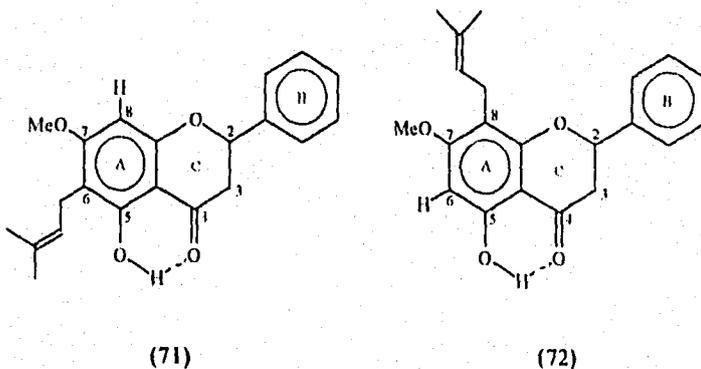


Figura 70

Finalmente la señal simple en δ 6.102 que integra para un hidrógeno, corresponde a un hidrógeno aromático con una alta densidad electrónica, debido a la presencia de los átomos de oxígeno de las posiciones 5, 7 y 9, lo que sugiere la posibilidad de situar al grupo prenilo en las posiciones 6 u 8 de la flavanona, como se ilustra en la figura 71 y 72 respectivamente.



Para definir la posición correcta del grupo prenilo se han descrito en la literatura química metodologías basadas en reacciones químicas y técnicas espectroscópicas. Donde cabe señalar las observaciones sugeridas por Bohlmann y Zdero⁴⁰, quienes proponen que las señales de los metilos de las posiciones 4'' y 5'' aparecen con el mismo desplazamiento químico 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'' y 5'' (ver figura 73).

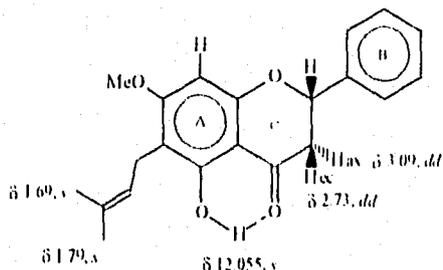
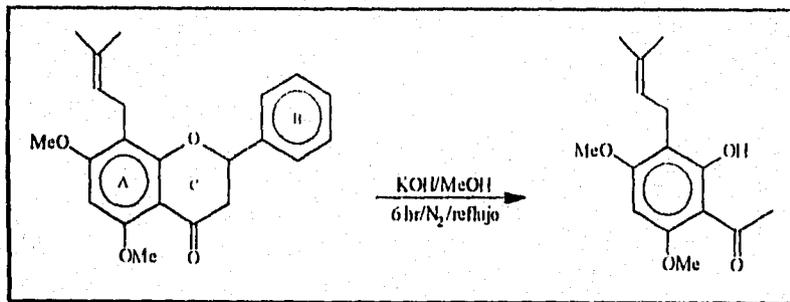


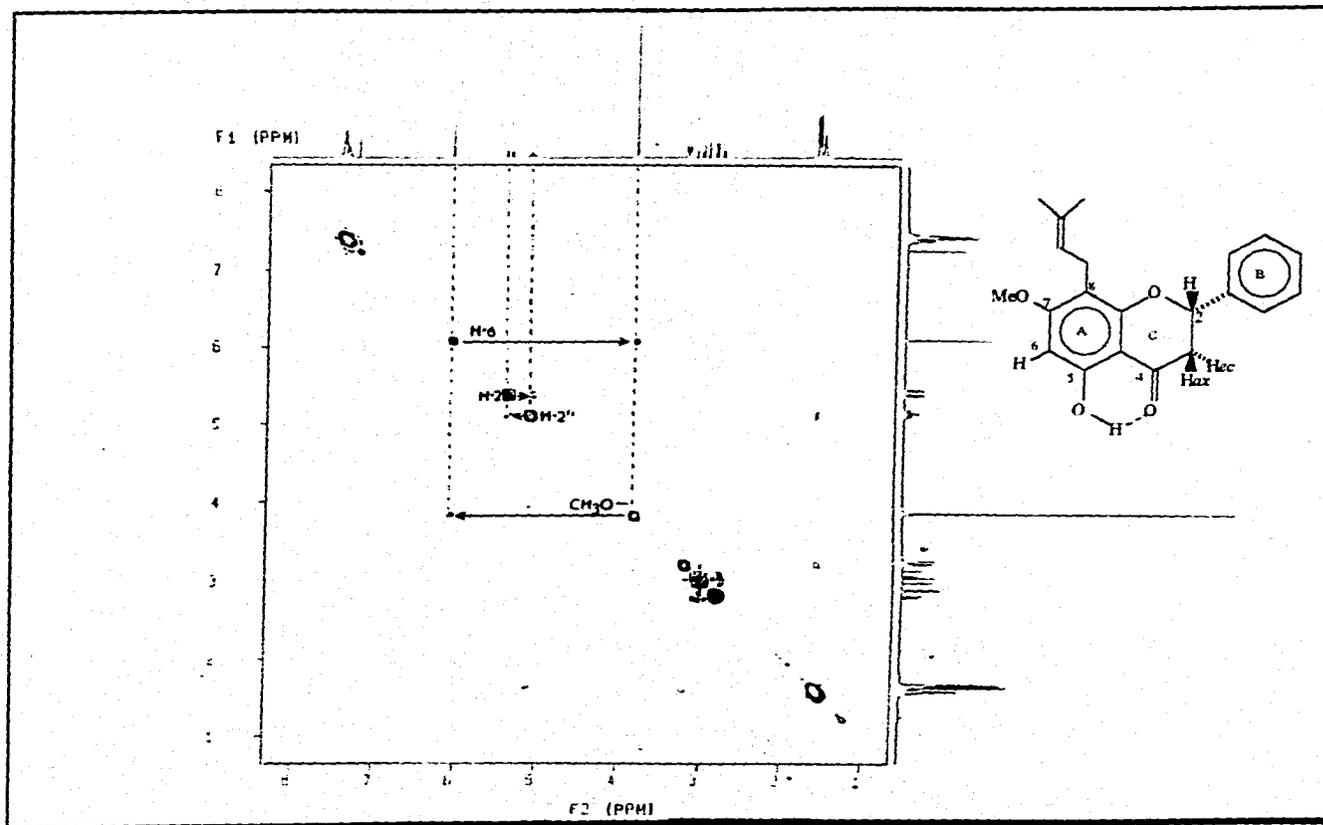
Figura 73

Por otro lado, Jaraman y colaboradores ⁶¹ confirmaron la sustitución en el anillo A, mediante la degradación de la 5,7-dimetilglabranina, de acuerdo a lo que se indica en el esquema 12.



Esquema 12. Degradación de la 5,7-metilglabranina.

Sin embargo, en el presente estudio se encontró que en su espectro de RMN-¹H aplicando el experimento del NOESY (esquema 13), se observa que existe interacción a través del espacio entre H-2 y H-2'', lo que confirma la posición del grupo prenilo en el C-8; así mismo, se visualiza la interacción que existe entre el H-6 y el grupo metoxilo, lo cual permitió concluir que esta sustancia ya había sido aislada previamente de *Tephrosia villosa* (Leguminosa) y caracterizada como la 7-metilglabranina ⁶¹.



Esquema 15. NOESY (200 MHz, CDCl₃, TMS) de la 7-metilglabranina.

De las fracciones 203-328, que se obtuvieron al eluir la columna con una mezcla de n-hexano:acetato de etilo (95:5), se aisló un sólido amarillo de pl. 167-168°C, que muestra en su espectro de masas por impacto electrónico un ión molecular de m/z 324, al que se le puede asociar una fórmula molecular $C_{20}H_{20}O_4$, con 11 grados de insaturación.

En el espectro de IR (espectro 4), se visualiza una banda de absorción a 3583 cm^{-1} características de los alcoholes. Además se detecta una banda de absorción a 3057 cm^{-1} correspondiente a la vibración C-H con una hibridación sp^2 ($-C=C-H$) y otra banda a 1639 cm^{-1} asignada a un grupo carbonilo, el cual forma un puente de hidrógeno con el grupo hidroxilo. Las bandas a 1442 y 1373 cm^{-1} corresponden a los metilenos alílicos y metinos vinílicos respectivamente.

Mientras que en el espectro de RMN- 1H (espectro 5), se observan las señales características correspondientes al esqueleto de la flavanona, como se muestra en la figura 74.

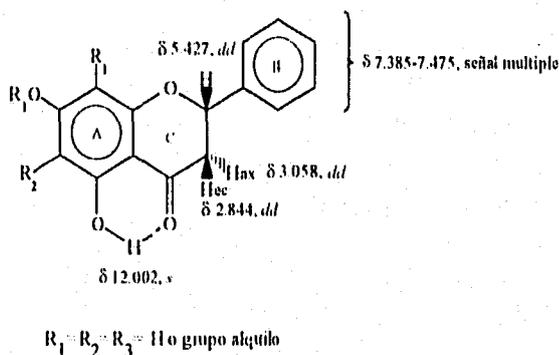
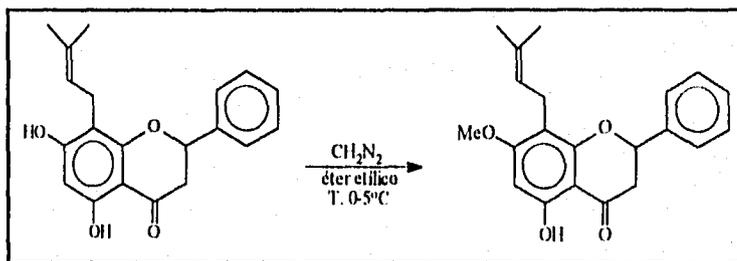


Figura 74

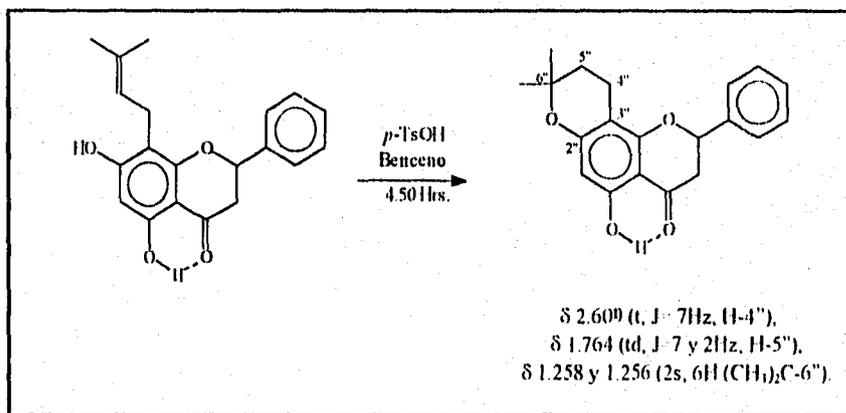
Sin embargo, a diferencia del espectro de RMN- 1H de la 7-metilglabranina, no se detecta la señal característica del grupo metilo presente en el metil-fenil-éter. La comprobación del grupo hidroxilo en la posición 7, se corroboró al realizar la correlación química por medio de la reacción de metilación de la sustancia (56) con CH_3N_2 /éter etílico (esquema 14).



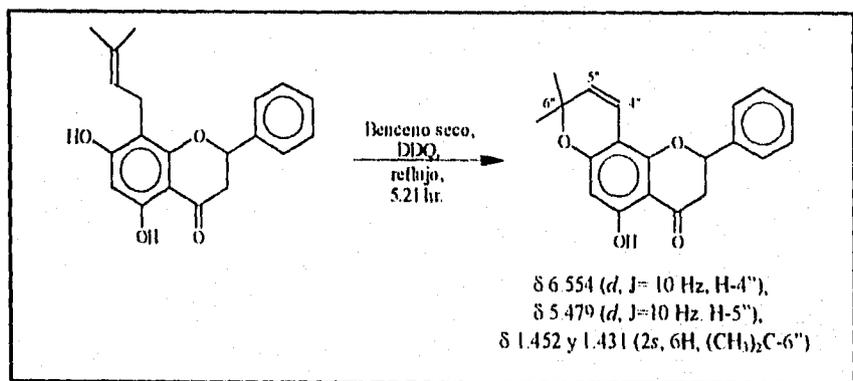
Esquema 14. Reacción de metilación de la glabranina con diazometano.

De acuerdo a lo reportado con Bohlman y Zdeiro ⁶⁰. El grupo prenilo se ubicará en la posición 8, ya que las señales simples correspondientes a los grupos metilos 4'' y 5'' respectivamente, presentan un mismo desplazamiento químico a 1.731 ppm. Así mismo, para determinar con precisión la posición del grupo prenilo, en la literatura química se han descrito una serie de metodologías basadas en reacciones de ciclización, en los desplazamientos químicos de los hidrógenos de los metilos vinílicos o del C₅-OH, en los desplazamientos químicos observados en RMN-¹³C y más recientemente por acoplamiento a largo alcance (¹³C-¹H) y por desacoplamiento a largo alcance de manera selectiva de los hidrógenos (LSPD) ⁶².

En este trabajo, la posición del grupo prenilo en el carbono 8, se determinó por medio de reacciones de ciclización con ácido *p*-toluensulfónico y DDQ, como se ilustra en los esquemas 15 y 16 respectivamente.



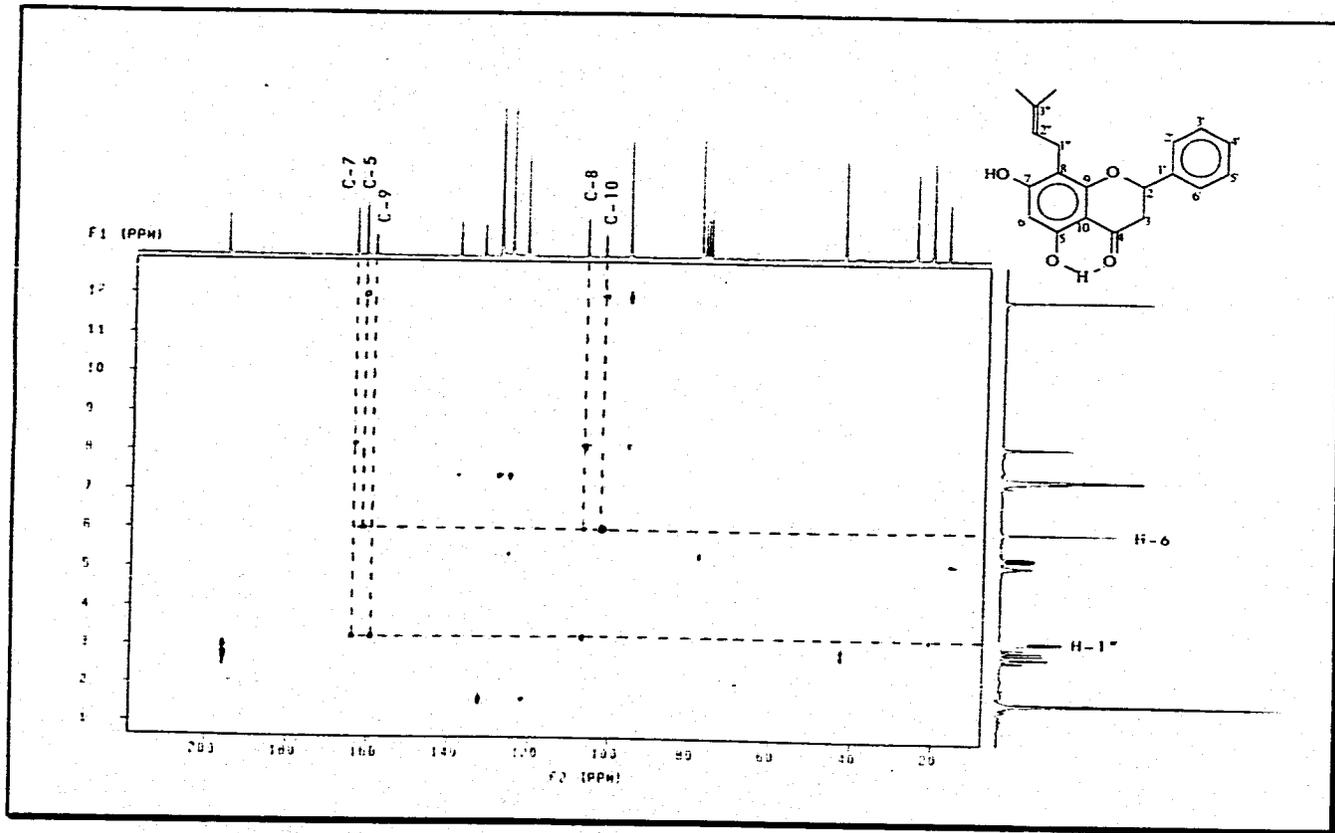
Esquema 15. Reacción de ciclización con *p*-TsOH.



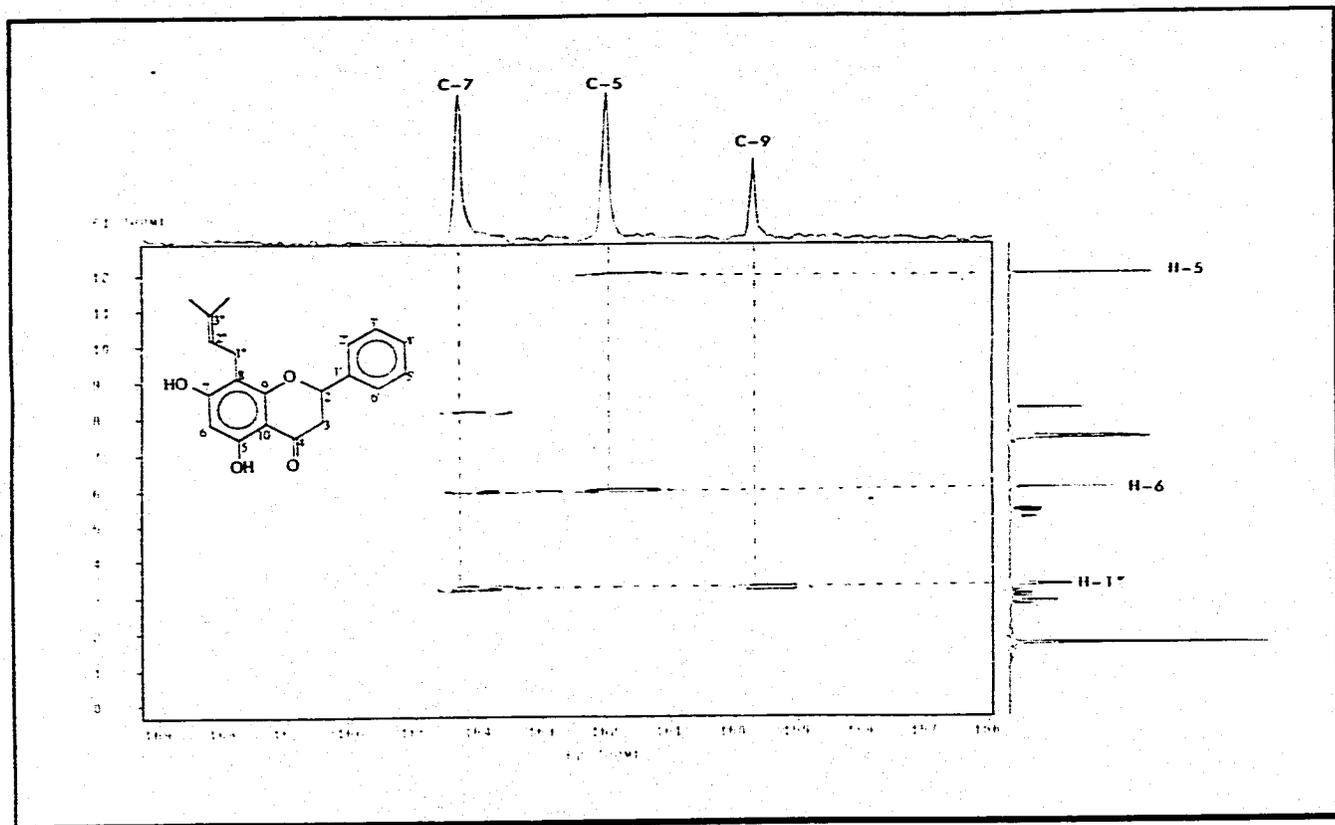
Esquema 16. Reacción de ciclización con DDQ.

Por otro lado la determinación del grupo prenilo en la posición 8, también se logró por medio de métodos espectroscópicos, como son las técnicas de acoplamiento a largo alcance (¹³C-¹H): COLOC (esquema 17) y HETCOR (esquema 18); donde se puede observar, que en ambos esquemas C-7 y C-9 interactúan con los hidrógenos del carbono 1", mientras que C-7 y C-5 interactúan con el hidrógeno del C-6, a través de 3 y 2 enlaces respectivamente. Finalmente en su espectro de Correlación Homonuclear ¹H-¹H (NOESY, esquema 19), se visualiza que existe una interacción a través del espacio entre el H-2 y el H-2". Por lo que se concluyó que la sustancia aislada corresponde a la **5,7-dihidroxi-8-(3",3"-dimetilalil)-flavanona (glabranina, 56)**.

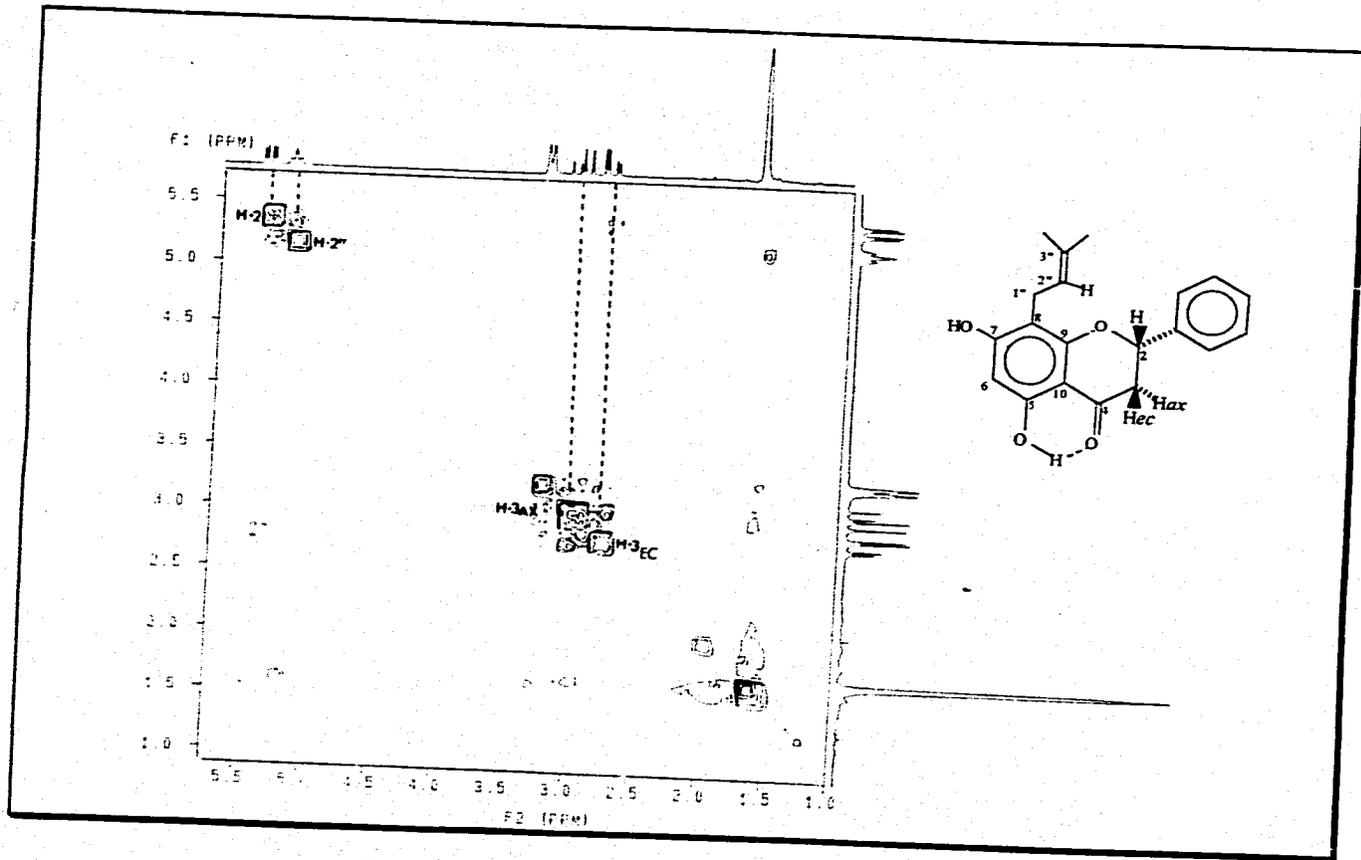
De las fracciones 362-393, obtenidas al eluir la columna con n-hexano:acetato de etilo (95:5), se aisló una sustancia de aspecto aceitoso, la cual revela café oscuro en cef. con una solución de FeCl₃ al 1% en etanol. La identificación y caracterización de esta sustancia, se logró por medio de sus constantes espectroscópicas y espectrométricas, las cuales sugieren que se trata de una flavanona 5,7-dihidroxilada y a quien le corresponde una fórmula molecular C₂₀H₂₀O₅, con un peso molecular de 340 y 10 grados de insaturación.



Esquema 17. COLOC de la glabranina.

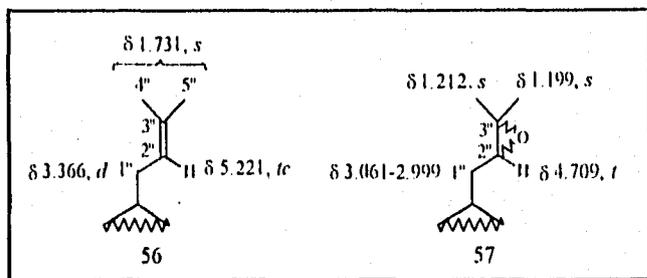


Esquema 18. HETCOR de la glabranina.



Esquema 19. NOESY (200MHz, CHCl₃, TMS) de la glabranina.

Su espectro de RMN-¹H (espectro 8), muestra a diferencia de las flavanonas preniladas descritas anteriormente, una señal triple (δ 4.709, 1H, J=8.9 Hz), que por su desplazamiento químico sugiere que se trata de un hidrógeno geminal a un átomo de oxígeno, como se indica en el esquema 20.



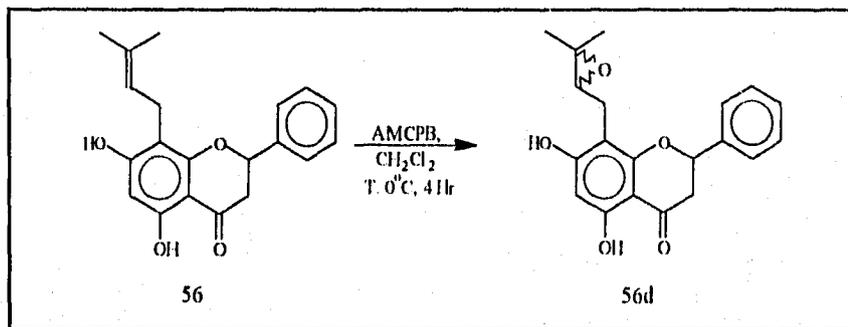
Esquema 20. Desplazamientos químicos (RMN-¹H) del grupo prenilo de la sustancia 56 y 57.

Lo descrito anteriormente, permitió proponer como hipótesis estructural al **epóxido de la glabranina (57)**. Esta estructura fue confirmada por medio de su espectro de RMN-¹³C, que muestra como diferencias notables con respecto al de la glabranina (ver tabla XVII), una señal en δ 71.86; al aplicar en el mismo espectro la técnica DEPT, indica que se trata de un carbono cuaternario. Además se visualiza en δ 79.13 la señal correspondiente a un metino base de oxígeno. Al C-1'' se le asignó la señal de δ 26.78, observándose un efecto de desprotección de $\Delta\delta = -4.804$ ppm con respecto al desplazamiento químico mostrando por el mismo átomo de carbono en la glabranina. Finalmente la señal del grupo metilo (δ 23.92) de la posición 4''; se ve desplazado a campo bajo ($\Delta\delta = -6.098$ ppm); mientras que C-5'' (δ 25.92), mostró una ligera desprotección por la presencia del anillo del oxirano.

SUSTANCIA/C	C-1''	C-2''	C-3''	C-4''	C-5''
56	21.96	121.57	134.92	17.82	25.79
57	26.78	79.13	71.86	23.92	25.92

Tabla XVII

Las constantes espectroscópicas de RMN-¹H, presentadas por el producto natural son iguales a las encontradas en el producto de reacción, obtenido de la epoxidación de la glabranina con ácido *m*-cloroperbenzoico (esquema 21).



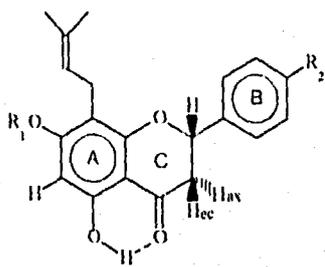
Esquema 21. Reacción de epoxidación de la glabranina.

De la **recromatografía de una alícuota de las fracciones 168-211**; se obtuvieron 28.4 mg de un residuo de consistencia aceitosa, que fueron sometidos a una reacción de metilación con CH_2N_2 /éter etílico; de donde se aisló un sólido amarillo de pf. 161-162°C, que fue caracterizada e identificada como la **5,4'-dihidroxi-8-(3'',3''-dimetilalil)-7-metoxiflavanona (59)**, de fórmula molecular $\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{O}_5$.

Por otro lado, después de una serie de **recromatografías** para la purificación de la sustancia mayoritaria presente en las **fracciones 141-167**, se lograron obtener 8 mg de una sustancia de consistencia aceitosa, que fue identificado y caracterizado como la **5,7,4'-trihidroxi-8-(3'',3''-dimetilalil)-flavanona (60)**.

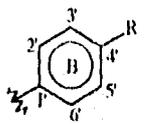
Finalmente, la **7,4'-dimetoxi-8-(3'',3''-dimetilalil)-flavanona (58)**, se obtuvo después de purificar el producto de **reacción de metilación de las fracciones 141-193** (a excepción del eluato 155), obtenidas al eluir la columna con una mezcla n-hexano:acetato de etilo (90:10). Dicho compuesto, resultó ser un sólido amarillo pálido que revelaba café oscuro en ccf. cuando se empleaba como revelador químico una solución de FeCl_3 al 1% en etanol y con pf. 122-124°C. En su espectro de masas por impacto electrónico presenta un ion molecular con m/z de 368, cuya fórmula molecular corresponde a $\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{O}_5$.

Las sustancias 58, 59 y 60 muestran en su espectro de RMN^1H (espectro 11, 14 y 17 respectivamente), las señales características de los hidrógenos presentes en el esqueleto de una flavanona, ver tabla VIII -página 67-.



- (58) R₁ = Me, R₂ = OMe
- (59) R₁ = Me, R₂ = OH
- (60) R₁ = H, R₂ = OH

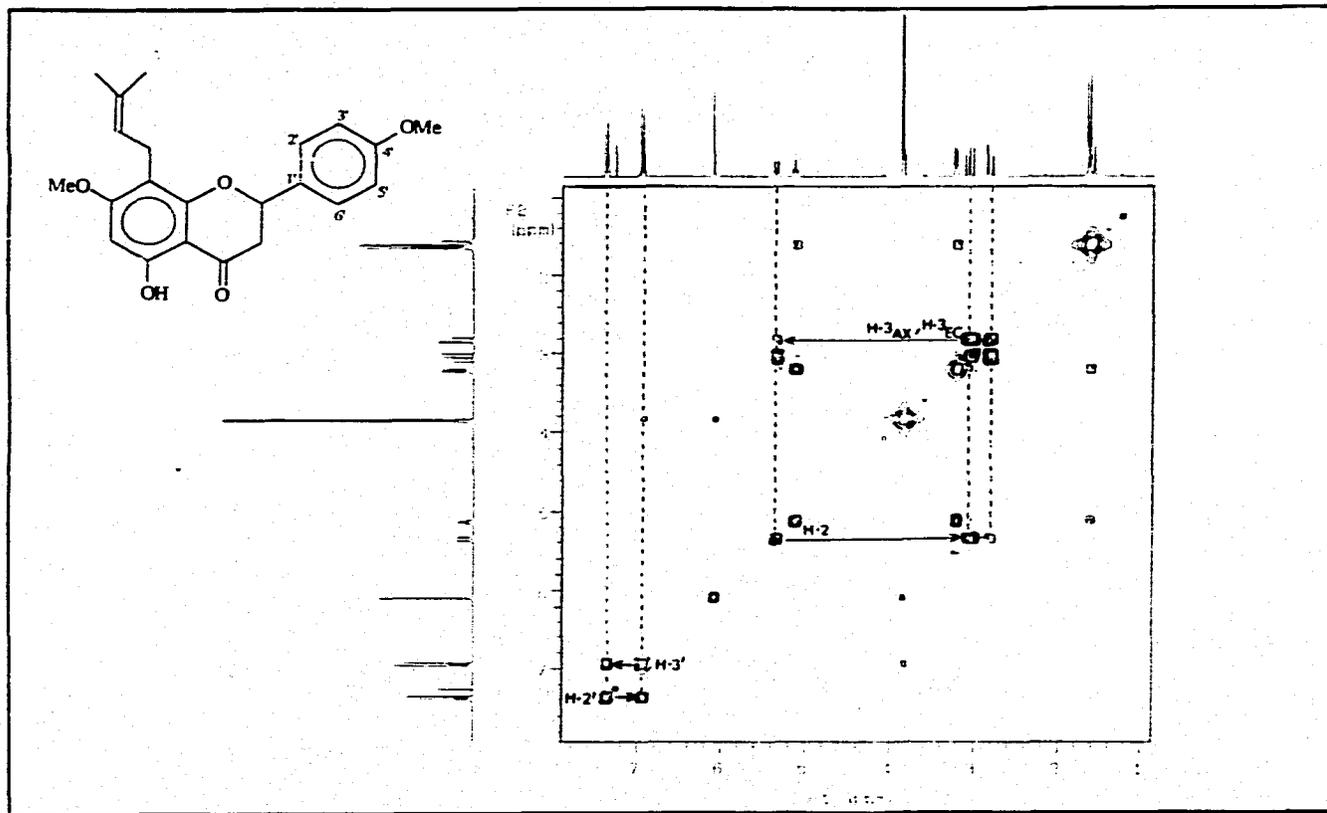
Sin embargo, a diferencia de las flavanonas ya descritas, en sus espectros de RMN-¹H se detecta un patrón de sustitución diferente en el anillo B; la presencia de dos señales dobles que forman parte de un sistema AB con una constante de acoplamiento de aproximadamente 9 Hz, sugiere que se trata de un anillo disustituido en las posiciones 1' y 4'. La presencia de grupos electrodonadores en la posición 4', afecta el desplazamiento químico de los hidrógenos 2',6' y 3',5'; como se indica en la tabla XVIII; lo anterior queda confirmado por el espectro COSY, como se muestra en los esquemas 22, 23 y 24.



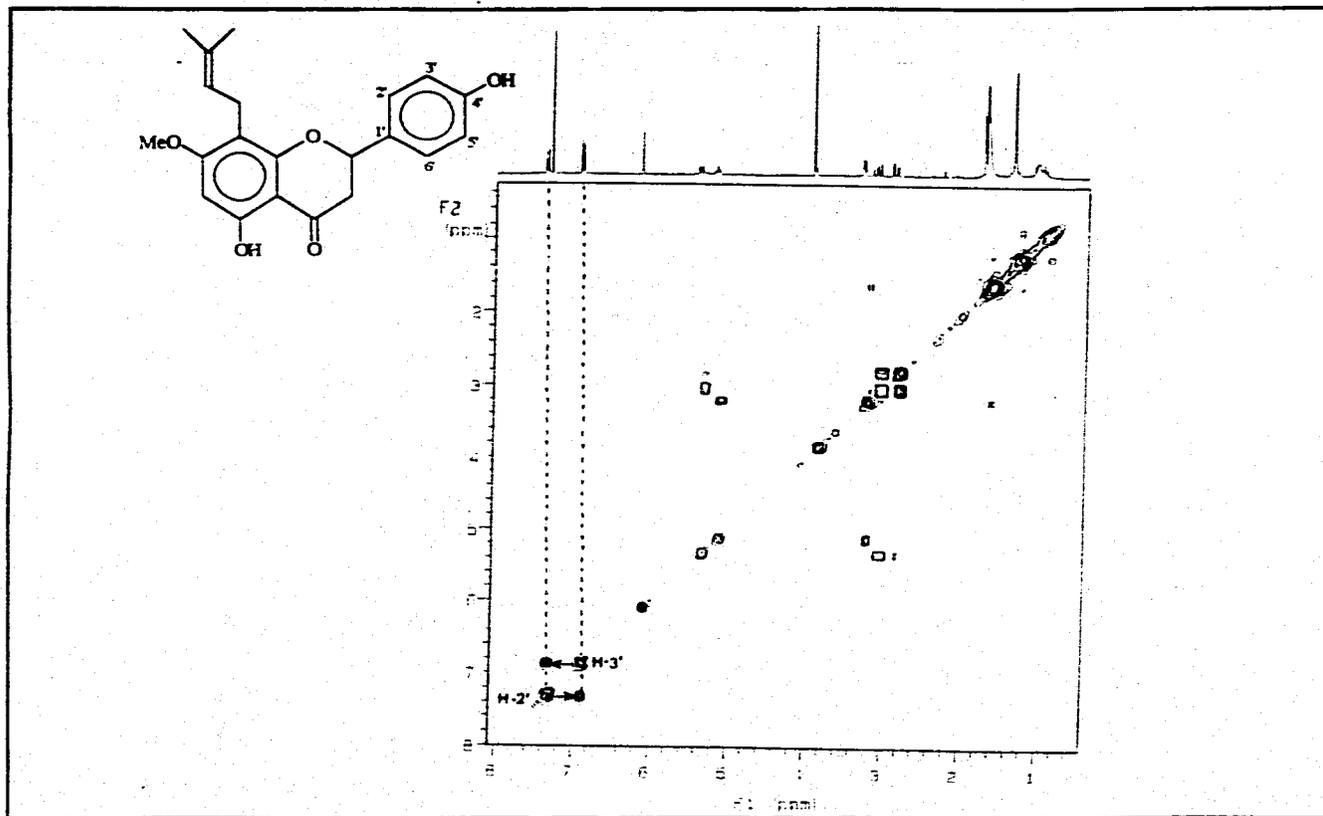
- 55 R = H
- 58 R = OMe
- 59, 60 R = OH

SUSTANCIA	H-2' y 6'	H-3' y 5'
55	7.363-7.480 (s.m.)	
58	7.374 <i>d</i> (J = 9 Hz)	6.941 <i>d</i> (J = 9 Hz)
59	7.334 <i>dd</i> (J = 8.6 y 1 Hz)	6.876 <i>dd</i> (J = 8.6 y 1 Hz)
60	7.271 <i>d</i> (J = 8.4 Hz)	6.876 <i>d</i> (J = 8.7 Hz)

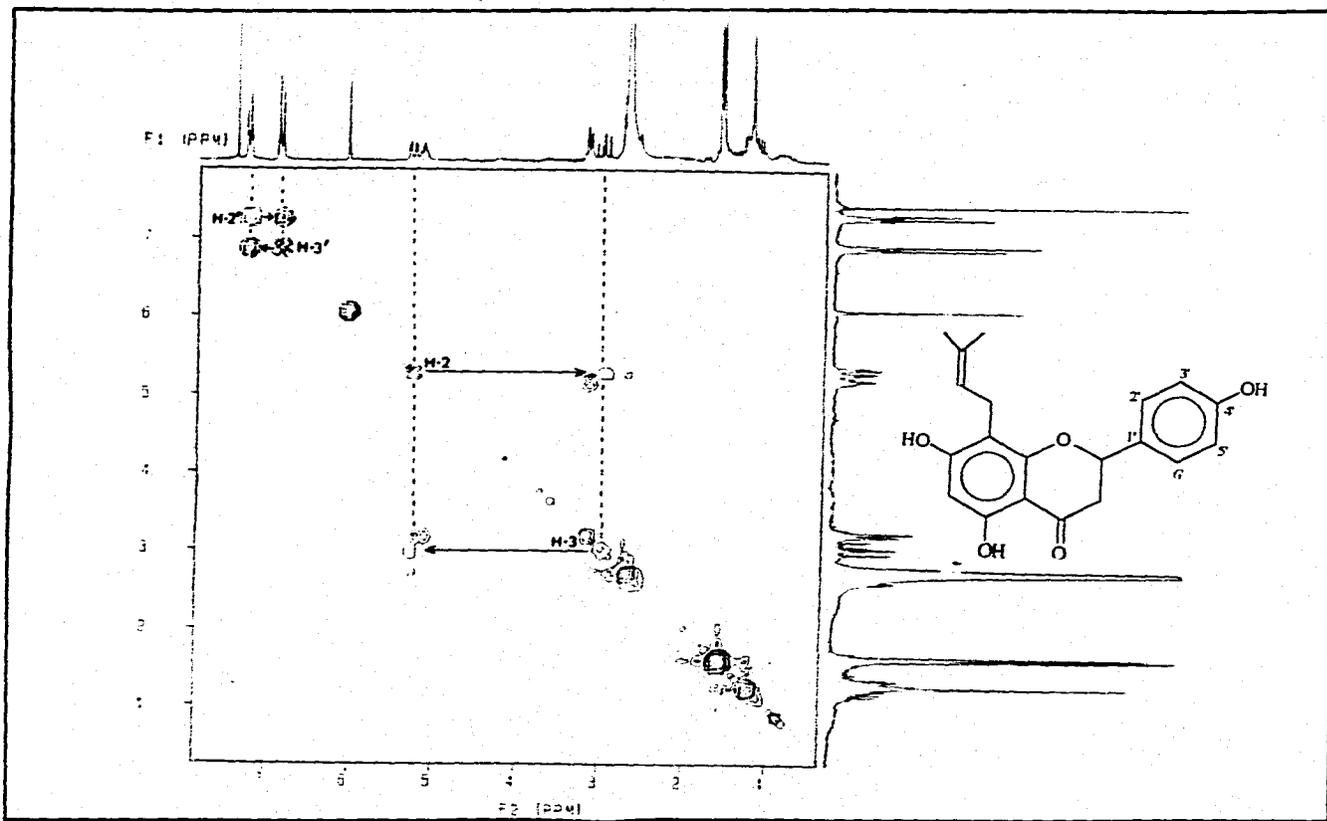
Tabla XVIII



Esquema 22. COSY (300 MHz, CDCl₃, TMS) de la 7,4'-dimetoxi-8-(3'',3''-dimetilalil)-flavanona.



Esquema 23. COSY (200 MHz, CDCl₃, TMS) de la 5,4'-dihidroxi-7-metoxi-8-(3'',3''-dimetilalil)-flavanona.



Esquema 24. COSY (200 MHz, CDCl₃, TMS) de la 5,7,4'-trihidroxi-8-(3',5'-dimetilalil)-flavanona.

Estas propuestas estructurales se ven apoyados por sus datos de RMN-¹³C (tabla XIX), de donde se puede observar que C-4', para la sustancia 59 aparece en δ 158.82, ejerciendo un efecto de protección sobre C-3' y C-5', debido al efecto electrodonador que se desarrolla por la presencia del grupo hidroxilo; lo cual queda además comprobado, si se compara el desplazamiento químico de estos carbonos cuando el sustituyente es el grupo metoxilo (sustancia 58) o el hidrógeno (55).

C-4'-R	C-4'	C-2' y 6'	C-3' y 5'
-H	125.92	128.52	128.70
-OH	158.82	127.65	115.44
-OMe	158.87	127.47	114.06

Tabla XIX

De las fracciones 216-255, se obtuvo un residuo amarillo de consistencia aceitosa; que posteriormente fue tratado con CH_2N_2 en éter etílico a baja temperatura, aislandose de la mezcla del producto de reacción una sustancia de fórmula molecular $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{O}_7$ con 10 grados de insaturación; la cual muestra en su espectro de masas por impacto electrónico un pico base en m/z 370, que puede corresponder al fragmento originado por la pérdida de una molécula de agua.

Además, su espectro de RMN-¹H (espectro 19) presenta las señales correspondientes al esqueleto de una flavanona 5,4'-dihidroxi-7-metoxiflavanona, como se puede ver en la figura 75.

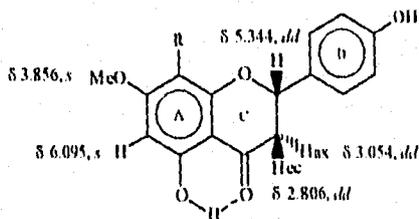
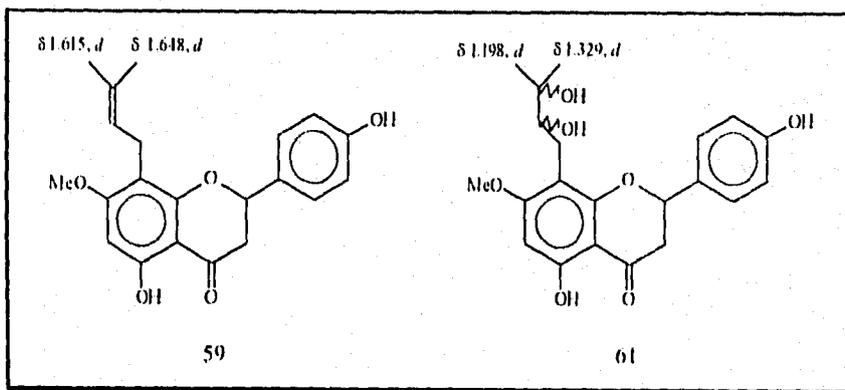


Figura 75

El patrón de sustitución del anillo B, fue determinado por las señales dobles que conforman un sistema AB, y que aparecen en δ 7.374 (d , $J = 9\text{Hz}$, 2H) y δ 6.941 (d , $J = 9\text{Hz}$, 2H), correspondientes a los hidrógenos de las posiciones 2',6' y 3',5' respectivamente.

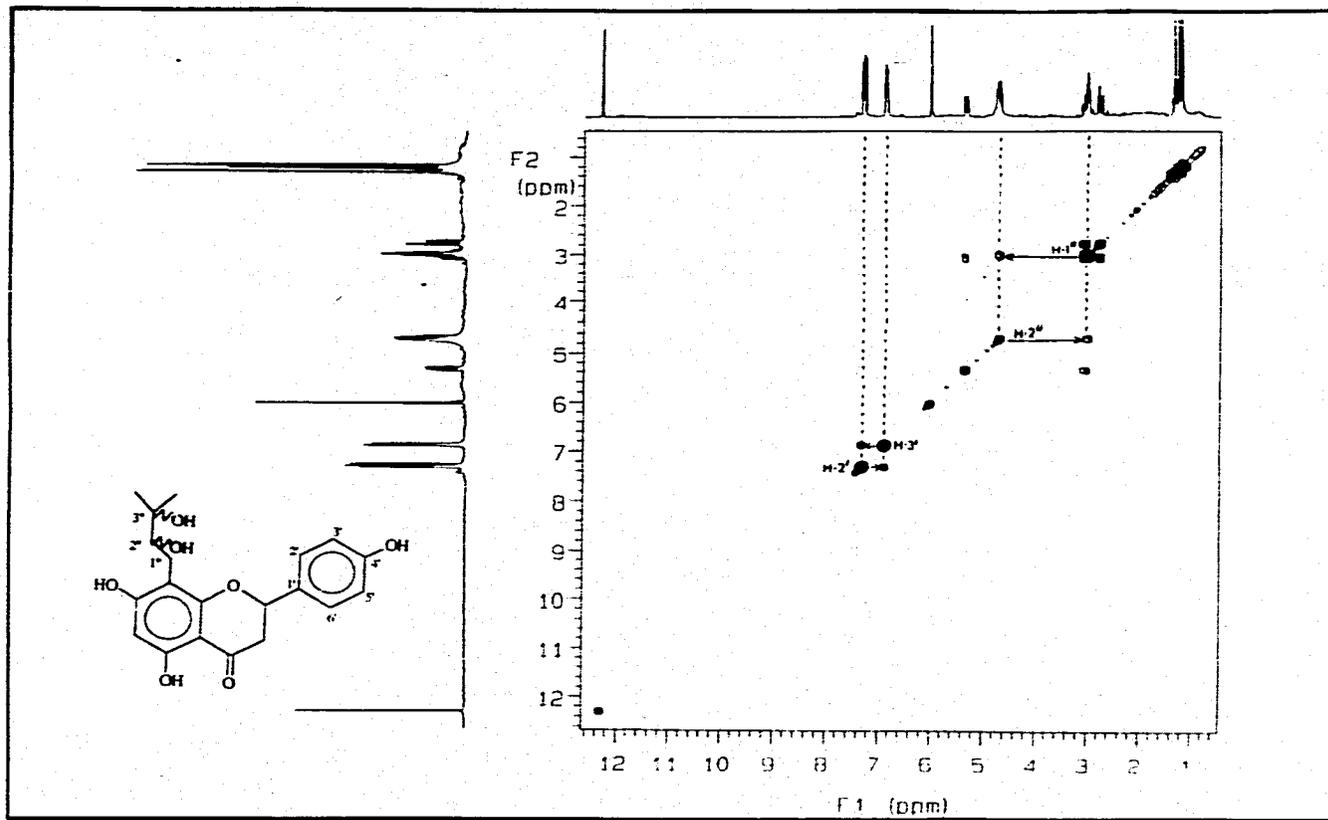
Adicionalmente, se percibe una señal múltiple que integra para 2 hidrógenos entre 3.086-2.986 ppm; una señal doble de doble (*dd*), que integra para un hidrógeno en δ 4.699 ($J = 10.2$ y 2.7 Hz), la cual muestra una multiplicidad diferente y un desplazamiento a campo alto en aproximadamente $\Delta\delta = 0.448$ ppm, con respecto a las flavanonas preniladas ya descritas. También se observa un efecto de protección sobre los grupos metilos ubicados en C-3", al comparar su desplazamiento químico con las mostradas en la 5,4'-dihidroxi-7-metoxi-8-(3",3"-dimetilalil)-flavanona (59), tal como se ilustra en el esquema 25.

Lo anterior sugiere la presencia de 2 grupos hidroxilo unidos a C-2" y C-3", lo que indica que se trata del compuesto dihidroxilado en el grupo prenilo; lo cual tiene implicaciones biogénéticas importantes en la biosíntesis de hemiterpenos aromáticos en la familia Rutaceae.



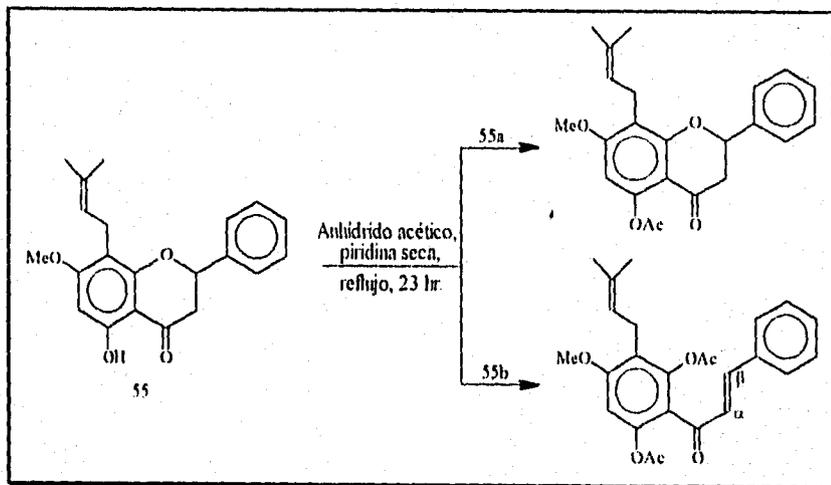
Esquema 25. Comparación de los desplazamientos químicos de los metilos ubicados en la posición 3".

De los **eluatos 516-531**, obtenidos al eluir la columna con una mezcla de n-hexano:acetato de etilo (8:2), se purificó una sustancia de aspecto aceitoso; la cual presenta una gran similitud en su espectro de RMN-¹H (espectro 22) al de la sustancia 61 descrita anteriormente; observándose como única diferencia la ausencia de la señal simple que corresponde al grupo metilo del fenil-metil-éter (δ 3.859), lo que sugiere que la sustancia aislada es el producto natural de donde se deriva la 5,4'-dihidroxi-7-metoxi-8-(2",3"-dihidroxi-3"-metilbutil)-flavanona. En el esquema 26 se muestra su espectro COSY, el cual indica que la sustancia aislada del extracto etanólico de las partes aéreas de *Esenbeckia berlandieri* ssp *acapulcensis* (Rose) es la 5,7,4'-trihidroxi-8-(2",3"-dihidroxi-3"-metilbutil)-flavanona (62).



Esquema 26. COSY (300 MHz, CDCl₃, TMS) de la 5,7,4'-trihidroxi-8-(2'',3''-dihidroxi-3''-metilbutil)-flavanona.

Obtención de la 5-acetil-7-metoxi-8-(3'',3''-dimetilalil)-flavanona y de la 2',6'-diacetil-4'-metoxi-3'-(3'',3''-dimetilalil)-chalcona. De la reacción de acetilación de la 7-metilglabranina (55), se obtuvo una mezcla constituida de 2 productos, como se ilustra en el esquema 27, los cuales fueron purificados por cep.



Esquema 27. Reacción de acetilación de la 7-metilglabranina.

La sustancia de menor polaridad fue un sólido amarillo claro. En su espectro de masas por impacto electrónico presentó un ion molecular de m/z 380, al que le corresponde una fórmula molecular $C_{21}H_{24}O_5$. En el espectro de IR (espectro 23), se localiza una banda de absorción a 1766cm^{-1} , asignada al grupo carbonilo de un éster. La banda de absorción correspondiente a la cetona se encuentra desplazada hacia un mayor número de onda (1679cm^{-1}), con respecto al espectro de la 7-metilglabranina (1634cm^{-1}), debido a la ausencia del quelato formado entre este grupo y el hidroxilo del C-5.

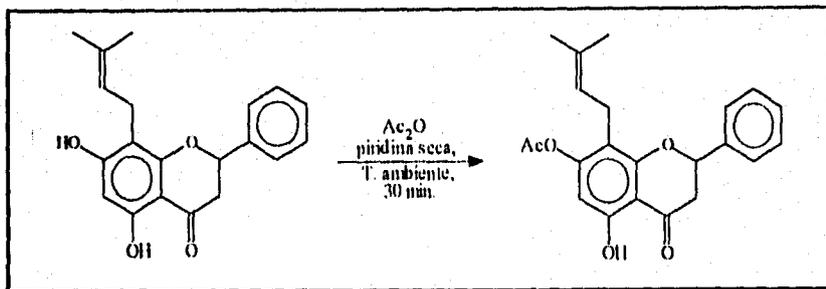
En RMN- ^1H (espectro 24), se visualizan las señales correspondientes a la 7-metilglabranina (55), presentando como diferencia la ausencia de la señal en δ 12.137, perteneciente al hidrógeno quelatado del grupo hidroxilo, y la presencia en δ 2.393 de una señal simple que integra para tres hidrógenos, asignada al grupo acetato; por lo que se concluyó que dicha sustancia corresponde a la 5-acetil-7-metoxi-8-(3'',3''-dimetilalil)-flavanona (55a).

El producto de reacción de mayor polaridad fue caracterizado como la 2',6'-diacetil-4'-metoxi-3'-(3'',3''-dimetilalil)-chalcona (55b), de consistencia

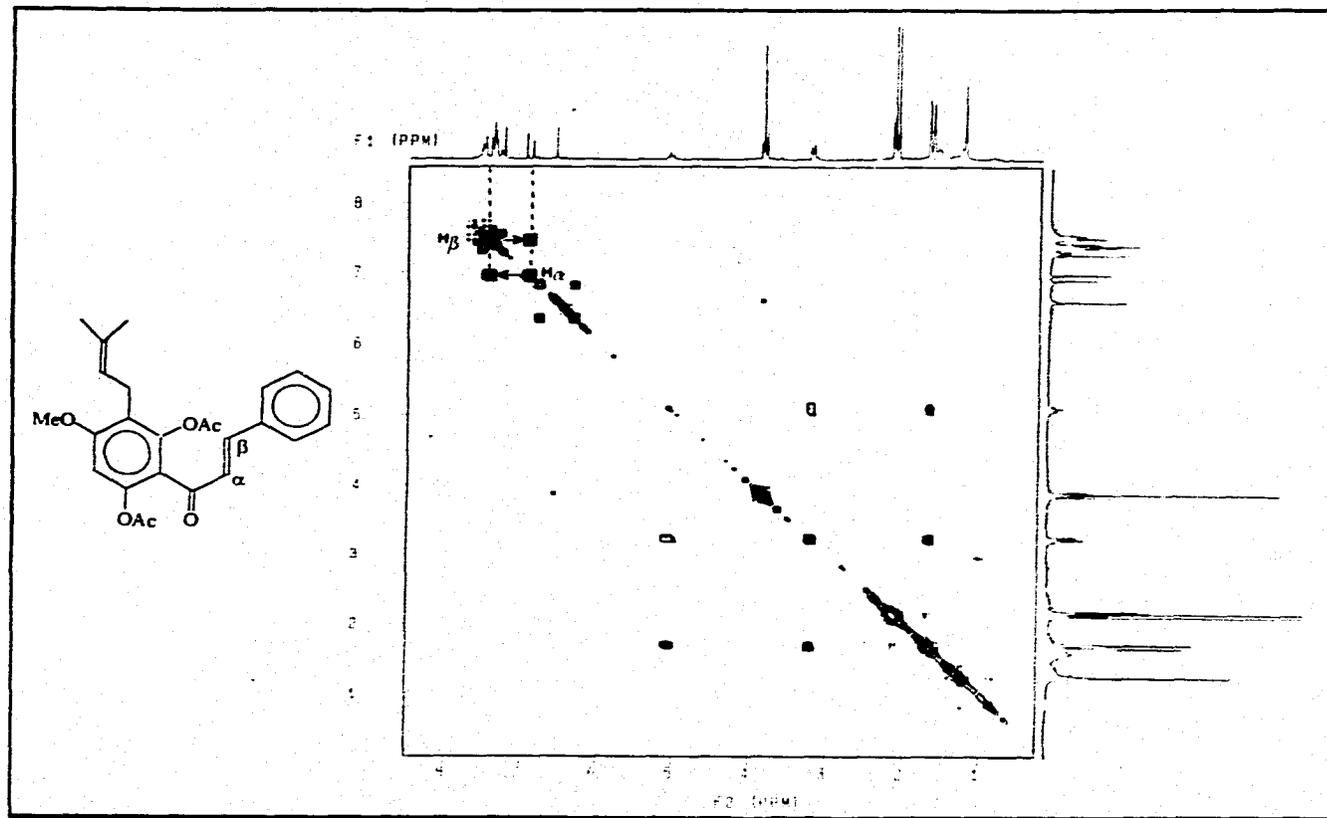
aceitosa, que de acuerdo a su espectro de masas por impacto electrónico le corresponde un peso molecular de 422, para una fórmula molecular $C_{25}H_{26}O_6$. En su espectro de IR (espectro 26) al igual que en el compuesto 55a, se observa a 1770 cm^{-1} una banda de absorción característica al grupo carbonilo de un éster; mientras que ha 1610 cm^{-1} se detecta otra banda de absorción asignada al grupo carbonilo de una cetona α, β insaturada.

En el espectro de RMN- ^1H (espectro 27), se visualizan las señales correspondientes al grupo prenilo, al anillo bencénico monosustituido y al grupo metil-fenil-éter presentes en la 7-metilglabranina. Así misma, se detectan dos señales simples a campo bajo que integran para tres hidrógenos cada una de ellas con δ 2.165 y δ 2.120, asignadas a los metilos de 2 grupos acetatos. Adicionalmente se observa la presencia de dos señales como dobles en δ 6.940 ($J=16.1\text{ Hz}$, III, H- α) y δ 7.475 ($J=16.5\text{ Hz}$, III, H- β) correspondientes a los hidrógenos de una cetona α, β -insaturada, como se muestra en el esquema 28 -página 101-.

Del tratamiento de la glabranina (56) con anhídrido acético y piridina, se obtuvo una mezcla de reacción constituida por tres sustancias. La sustancia mayoritaria es un sólido amarillo de pf. $89-91^\circ\text{C}$, que fue caracterizada como la **7-acetil-5-hidroxi-8-(3'',3''-dimetilalil)-flavanona**, como se ilustra en el esquema 29. En su espectro de masas se observa un ion molecular de m/z 366, y a quien le corresponde una fórmula molecular $C_{22}H_{22}O_5$. Mientras que en el espectro de RMN- ^1H (espectro 37), se visualizan además de las señales características de la glabranina, una señal simple en δ 2.307 que corresponde a los hidrógenos del grupo metilo del acetato. La presencia de éste grupo queda confirmada por su espectro de RMN- ^{13}C (espectro 38), donde se visualizan dos señales con δ 168.44 (-COO-) y δ 25.70 ($\text{CH}_3\text{-COO-}$) correspondientes a los dos carbonos del grupo acetato. En el espectro de IR (espectro 36), se localiza una banda de absorción en 1769 cm^{-1} característica del grupo carbonilo de un éster.

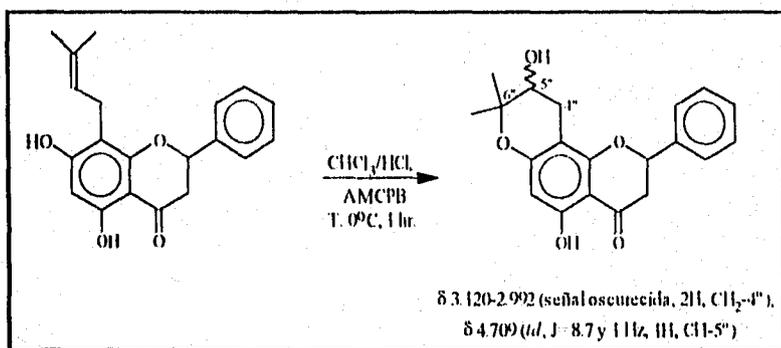


Esquema 29. Reacción de acetilación de la glabranina.

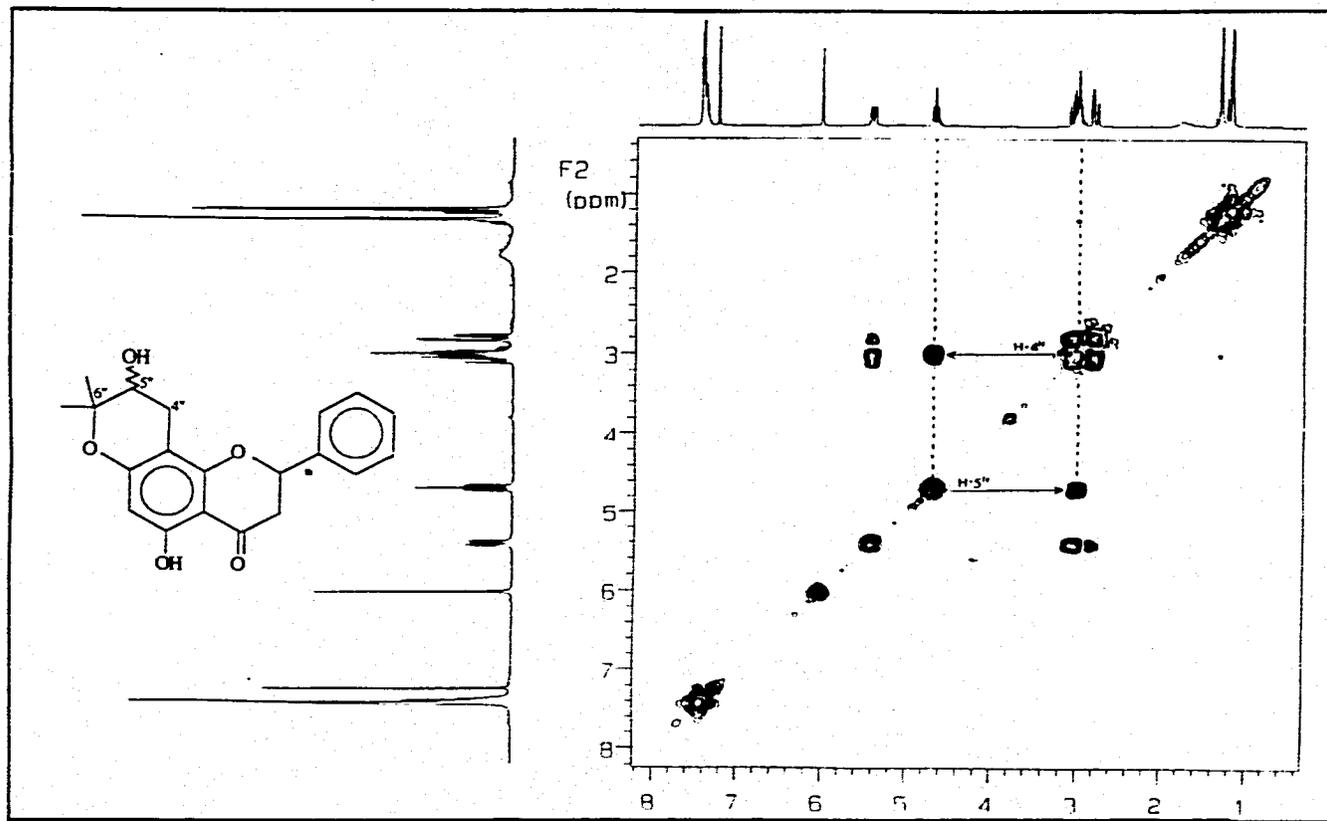


Esquema 28. COSY (200 MHz, CDCl_3 , TMS) de la 2',6'-diacetil-4'-metoxi-3''-(3'',3''-dimetilalil)-chalcona.

De la reacción de ciclización de la glabranina con AMCPB en $\text{CHCl}_3/\text{H}_2\text{O}$ se obtuvo a la **5,5"-dihidroxi-6",6"-dimetil-4",5"-dihidropirano-(2",3",7,8)-flavanona** -como se ilustra en el esquema 30-; la cual presentó un aspecto aceitoso de color café. En su espectra de masas se observa un ion molecular de m/z 339, para una fórmula molecular $\text{C}_{20}\text{H}_{14}\text{O}_5$. Mientras que en el espectro de RMN- ^1H (espectro 40), a diferencia del espectro de la glabranina se visualiza la ausencia de las señales correspondientes al grupo prenilo y la presencia de una señal a campo bajo en δ 4.709 (*td*, $J= 8.7$ y 1.0 Hz), la cual integra para un hidrógeno y que es asignada al H-5"; entre 3.120-2.992 ppm se observa una señal oscurecida correspondiente a los dos hidrógenos diastereotópicos de la posición 4", a campo alto se detectan 2 señales simples con δ 1.205 y δ 1.333, asignadas a los metilos de la posición 6". El acoplamiento de los hidrógenos de la posición 4" y 5" se confirma al aplicar la técnica del COSY, como se ilustra en el esquema 31.



Esquema 30. Reacción de ciclización de la glabranina para la obtención de la 5,5"-dihidroxi-6",6"-dimetil-4",5"-dihidropirano-(2",3",7,8)-flavavona.



Esquema 31. COSY (300 MHz, CDCl₃, TMS) de la 5,5'-dihidroxi-6,6'-dimetil-4',5'-dihidropirano-(2',3',7,8)-flavanona.

9.2. ESTUDIO DE RMN-¹³C DE LAS FLAVANONAS PRENILADAS Y SUS DERIVADOS.

Los desplazamientos químicos de RMN-¹³C de las flavanonas preniladas y de sus productos de reacción se dan a conocer en la tabla IX y XIII. La asignación de las señales de cada uno de los átomos de carbono (metilo, metileno, metino) se realizó con ayuda de los experimento DEPT y APT. Así mismo, se realizó la comparación de los desplazamientos químicos con algunos compuestos estructuralmente similares, lo que también contribuyó a la asignación de cada una de las señales.

Como ya se indicó con anterioridad, las flavanonas son compuestos que poseen 15 átomos de carbono; en los cuales, dos núcleos bencénicos están unidos por un eslabón de 3 átomos de carbono (Ar-C₃-Ar). El C-2 de una flavanona es un centro estereogénico, por lo cual dos estereoisómeros son posibles; sin embargo, las flavanonas que se encuentran en la naturaleza presentan una configuración absoluta (2S), ya que el grupo fenilo tiene una orientación α-pseudoeccuatorial, como se ilustra en la figura 76 y 77.⁶³

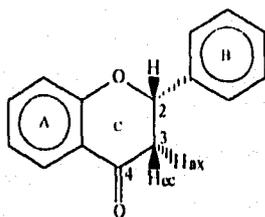


Figura 76

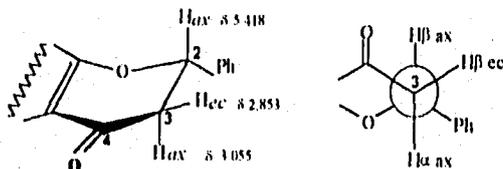
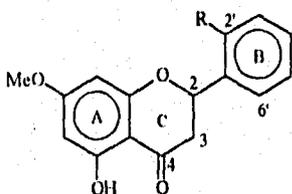


Figura 77

Así mismo, el anillo C de una flavanona está conformado por un oximetino (C-2), un metileno alifático (C-3) y un grupo carbonilo (C-4), los cuales muestran δ 71.3-80.3, 39.5-46.4 y 186.4-198.5 respectivamente⁶¹.

El C-2 para las sustancias aisladas de *Esenbeckia berlandieri* ssp *acapulcensis* aparece en δ 78.73 \pm 0.27, debido a que se trata de flavanonas no sustituidas en las posiciones 2' y 6'; ya que en flavanonas sustituidas o disustituidas en dichas posiciones, su desplazamiento químico es aproximadamente de 75.03 \pm 0.09 ppm; lo que indica que el desplazamiento químico del C-2, puede ser modificado por la sustitución en las posiciones 2' y 6', como se muestra en la tabla XX⁶⁴.



78. R=H 80. R=OAc
79. R=OH 81. R=OMe

Sustancia	δ (C-2)	$\Delta\delta$
78	79.9	---
79	74.9	5.0
80	75.1	4.8
81	75.1	4.8

Tabla XX.

Mientras que el desplazamiento químico para C-3, de las sustancias obtenidas como producto natural, se encuentra en 43.36 \pm 0.12 ppm.

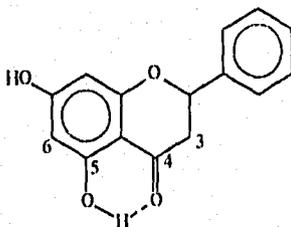
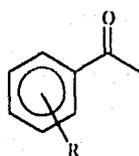


Figura 82

El grupo carbonilo⁽⁴⁾ de la posición 4 interacciona con el grupo hidroxilo del C-5, a través de la formación de un puente de hidrógeno, como se muestra en la figura 82. Al comparar los desplazamientos químicos para las sustancias 83-86, derivados de la acetofenona -ver tabla XXI-⁶⁵, se visualiza que la formación de un enlace de hidrógeno intramolecular -compuesto 84-, ocasiona un efecto de desprotección sobre el carbono carbonílico.



83 R=H
 84 R= *o*- OH
 85 R= *m*- OH
 86 R= *p*- OH

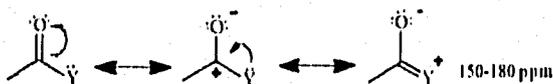
Sustancia	δ (carbonilo)	$\Delta\delta$
83	195.7	---
84	204.1	-8.7
85	197.4	-1.7
86	197.1	-1.4

Tabla XXI.

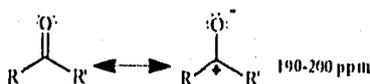
El desplazamiento químico del C-4 en las flavanonas, puede ser determinado por la presencia del sustituyente en el C-5 (-H, -OMe, -OAc e -OH).

En base a los datos reportados en la literatura⁶⁶ y los obtenidos experimentalmente, los cuales se muestran en la tabla XXII, se puede concluir que la pérdida de la interacción por puente de hidrógeno entre C-5 y el grupo carbonilo ocasiona un efecto de protección sobre C-4 con respecto a las 5-hidroxi flavanonas. Así mismo, se puede observar que la formación del puente de hidrógeno entre el grupo carbonilo y el grupo hidroxilo del C-5, es responsable del aumento en la

⁽⁴⁾ Los desplazamientos químicos de C-13 para aldehídos, cetonas, ácidos carboxílicos y derivados, aparecen entre 150 y 200 ppm⁶⁵. Los grupos carbonilo de aldehídos y cetonas aparecen a campo más bajo (190-200 ppm) que los grupos carbonilo de los ácidos y sus derivados, lo cual se explica en base a las formas resonantes que presenta cada grupo funcional.

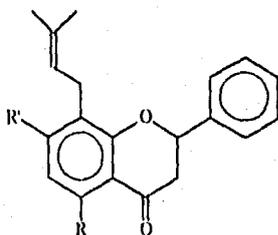


Y: O, N, Halógeno

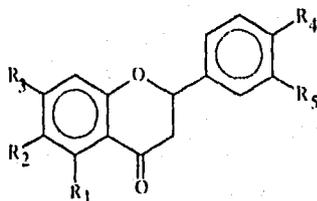


R= alquilo R': H o un grupo alquilo

densidad electrónica de C-3, ejerciendo un efecto de protección (43.13 ± 0.48 ppm) sobre dicho carbono.



55. R' = OMe R = OH
 56. R' = OH R = OH
 55a. R' = OMe R = OAc
 56e. R' = OAc R = OH



87. R₁ = OH R₂ = H R₃ = OMe R₄ = OH R₅ = OMe
 88. R₁ = OMe R₂ = H R₃ = OMe R₄ = OH R₅ = OMe
 89. R₁ = R₂ = R₃ = R₄ = R₅ = H
 90. R₁ = R₅ = OH, R₂ = R₄ = R₃ = H

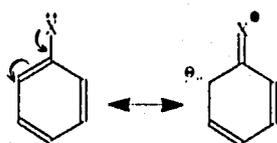
Sustancia	C-4	$\Delta\delta$	C-3	$\Delta\delta$
55	196.30	---	43.42	44.50-43.42= 1.08
56	196.23	---	43.29	44.50-43.29= 1.21
55a	189.64	196.30-189.64=6.66	45.28	44.50-45.28= -0.78
56e	197.47	---	43.57	44.50-43.57= 0.93
87	196.50	---	43.20	44.50-43.20= 1.3
88	189.20	196.50-189.20=7.3	45.50	44.50-45.50= -1.0
89	191.60	---	44.50	---
90	195.80	191.60-195.80=-4.2	42.20	44.50-42.20= 2.3

87-90. Datos obtenidos de la literatura⁶⁰.

Tabla XXII.

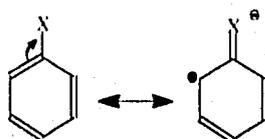
Por otro lado, los desplazamientos químicos para los átomos de carbono del anillo B, quedan determinados por el tipo y naturaleza del sustituyente presente en dicho anillo. Por ejemplo, en las sustancias químicas aisladas de *Esenbeckia berlandieri* ssp *acapulcensis* y sus derivados, se encontraron flavanonas mono- y disustituidas; donde C-2' y C-3' son magnéticamente equivalentes a C-6' y C-5' respectivamente; por lo tanto, se detectan solo 4 señales correspondientes a los 6 carbonos benzenicos del anillo B. El C-1' muestra un δ 138.53 ± 0.39 en flavanonas monosustituidas (55, 56, 57) y δ 130.96 ± 0.31 para flavanonas disustituidas (58, 59, 61).

Los sustituyentes que liberan electrones [(+)-M, electrodonadores] incrementan la densidad electrónica en las posiciones *orto*- y *para*- , como se indica en la figura 91; ejerciendo así, un efecto de protección sobre dichas posiciones [$\delta C(o, p) < 128.5$ ppm]⁽⁵⁾. Mientras que los grupos que atraen electrones [(-)-M, electroattractores], disminuyen la densidad electrónica en las posiciones *orto*- y *para*- , tal como se muestra en la figura 92, presentando con ello un efecto de desprotección en estas posiciones [$\delta C(o, p) > 128.5$ ppm].



X= grupo que libera electrones
 $\delta C(o, p) < 128.5$ ppm

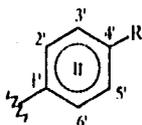
Figura 91



X= grupo que atrae electrones
 $\delta C(o, p) > 128.5$ ppm

Figura 92

Con base en lo anterior, en flavanonas monosustituidas se asignaron a C-2', C-4' y C-6', las señales aparecidas a campo alto, mientras que para C-3' y C-5' las señales a campo bajo, como se indica en la tabla XXIII.



55, 56, 57. R= H
58. R= OMe
59, 61. R= OH

Carbono	Sustancia					
	55	56	57	58	59	61
1'	138.91	138.68	138.00	131.32	131.00	130.56
2'	128.52	125.93	126.07	127.47	127.65	127.67
3'	128.70	128.69	128.85	114.06	115.44	114.24
4'	125.92	125.93	126.06	127.47	127.65	127.67
5'	128.70	128.69	128.85	114.06	115.44	114.24
6'	128.52	125.93	126.07	127.47	127.65	127.67

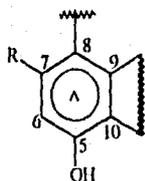
Tabla XXIII.

⁽⁵⁾ Los desplazamientos químicos para los carbonos de un anillo benzénico es de 128.5 ppm; para compuestos aromáticos es de 120-150 ppm⁽⁵⁾.

Mientras que el anillo B para flavanonas disustituidas, C-2' y C-6' aparecen en aproximadamente 127.65 ± 0.01 ppm, y los C-3' y C-5' se localizan en 114.84 ± 0.60 ppm, cuando el sustituyente en C-4' es un grupo hidroxilo. En flavanonas 4'-metoxiladas los desplazamientos químicos son de 127.27 ppm (C-2' y C-6') y 114.06 ppm (C-3' y C-5').

El efecto de protección observado en C-1' de las flavanonas disustituidas, se debe al efecto electrodonador ejercido por el grupo hidroxilo o metoxilo unido a C-4'.

Los desplazamientos químicos para los carbonos del anillo A, se visualizan en la tabla XXIV.

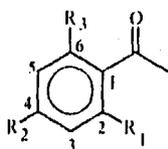


R
55, 58, 59, 61 -OMe
56, 57 -OH

Carbono	Sustancia					
	55	56	57	58	59	61
5	162.64	162.23	165.09	162.62	162.52	165.14
6	92.48	96.92	91.67	92.44	92.41	91.59
7	165.77	163.77	168.63	165.73	165.72	168.60
8	109.00	106.26	104.76	108.99	108.98	104.69
9	158.74	159.17	157.11	158.887	158.82	160.06
10	102.95	103.72	103.09	102.99	102.92	103.13

Tabla XXIV.

Para llevar a cabo la asignación de las señales de C-13 del anillo A, se tomó como referencia los desplazamientos químicos asignados a los carbonos de la pinocembrina (90) por Wagner y colaboradores⁶⁶; así como, los desplazamientos químicos mostrados por la 2,4,6-trihidroxiacetofenona (figura 93), 2,4-dihidroxiacetofenona (figura 94) y la 2-hidroxiacetofenona (figura 95).



93. $R_1, R_2, R_3 = OH$

94. $R_1, R_2 = OH$ $R_3 = H$

95. $R_1 = OH$ $R_2, R_3 = H$

Compuesto	δ (ppm)					
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
93	105.67	165.25	96.08	165.49	96.08	165.25
94	114.34	165.00	103.67	165.61	109.67	135.21
95	121.14	161.91	116.65	138.25	118.95	132.91

Tabla XXV.

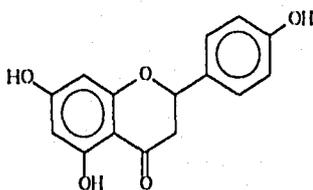
Por ejemplo, la introducción de un grupo hidroxilo en la posición 6, de la 2,4-dihidroxiacetofenona (94), causa un efecto de desprotección en C-6 de -30.04 ppm, mientras que a los C-5, C-3 y C-1 los desplaza a campo alto en 13.59, 7.59 y 8.67 ppm respectivamente.

Lo anterior se explica en base a la naturaleza electrónica del grupo hidroxilo, cuando éste se encuentra unido a un anillo aromático. La misma tendencia se observa para la sustancia 95, al sustituir un hidrógeno por un grupo hidroxilo en la posición 4. Esta situación se observa en las flavanonas, donde los carbonos oxarilos (C-5, C-7 y C-9) se encuentran entre 166.7-162.9 ppm⁶⁷. Para las sustancias obtenidas en este estudio (55-61, 55a, 56d y 56e), la señal desplazada a campo bajo corresponde a C-7 (165.60 \pm 2.62 ppm), mientras que C-5 se localiza en 162.86 \pm 1.81 ppm, la señal desplazada a campo más alto (157.38 \pm 2.84 ppm) corresponde a C-9.

La posición del grupo prenilo en la posición 8, fue determinada por métodos espectroscópicos (COLOC, NOESY y HETCOR) y transformaciones químicas. En la literatura se mencionan varias técnicas que pueden diferenciar al C-6 del C-8, en flavanonas no sustituidas en dichas posiciones⁽⁶⁾. De ahí que la señal en 96.05 \pm 5.03 ppm corresponde a C-6 para las 5,7-dihidroxi flavanonas preniladas; mientras que en las 7-metoxi-5-hidroxi flavanonas preniladas es de 93.82 \pm 3.19. El C-8 en éstos compuestos aparece en 105.51 \pm 0.71 ppm y en 107.91 \pm 1.86 ppm

⁽⁶⁾ El acoplamiento spin-spin a 2,3 y 4 enlaces entre ¹³C e ¹H de los grupos hidroxilo (identificados por intercambio de deuterio) ha permitido determinar los desplazamientos químicos de C-13 para 5,7,4'-trihidroxi flavanonas y en particular la diferenciación entre C-6 y C-8 de los 5-hidroxi flavonoides; ya que en el espectro, C-6 aparece como un par de tripletes amplios y C-8 como un par de dobletes.

respectivamente; sufriendo un desplazamiento a campo bajo de aproximadamente $\Delta\delta = -10.91$ ppm, con respecto al C-8 de la naringenina (96); debido al efecto α que ejerce el grupo prenilo en dichas sustancias.



96

Las asignaciones de las señales correspondientes, para las 5,7-dihidroxi-flavanonas, como en el caso de la naringenina (96), fueron confirmadas por Shirataki y colaboradores⁶², en base a los estudios de acoplamiento de largo alcance ^{13}C - ^1H y desacoplamiento de hidrógeno de largo alcance (LSPD). Estos estudios permitieron concluir que C-6, aparece más desplazado a campo bajo que C-8 ($\Delta\delta = -1$). La señal de C-6 se localiza en δ 96.8 (*ddd*, $J = 161.9, 7.3$ y 4.2 Hz) y el C-8 a δ 95.8 (*dd*, $J = 164$ y 4.2 Hz). La señal del C-6 cambió hacia un doble de doble (*dd*, $J = 161.9$ y 4.2 Hz), mientras que la de C-8 no se modificó después de realizar el experimento LSPD con C₅-OH. Así mismo, el C-6 se transformó a una señal doble (*d*, $J = 7.3$ Hz) y C-8 hacia una señal simple después de LSPD del C_{6,8}-H.

La acetilación de los grupos hidroxilos fenólicos introduce 2 carbonos más, que corresponden al grupo carbonilo (168-172 ppm) y al grupo metilo (18-22 ppm), tales grupos aparecen en un rango de desplazamiento químico que pueden ser reconocidos de manera inmediata. Las flavanonas poseen grupos hidroxilos fenólicos que al acetilar cambian los desplazamientos químicos de los carbonos bencénicos, debido a la naturaleza electrónica del grupo acetato -grupo electroattractor de electrones-; este efecto electroattractor que poseen dichos grupos se manifiesta principalmente en las posiciones *orto*- y *para*-, lo cual queda evidenciado para los derivados acetilados de la 7-metoxiglabranina y glabranina, como se ilustra en las figuras 97 y 98 respectivamente. Por otra parte, se puede visualizar un efecto de protección sobre los carbonos *ipso*; Para el compuesto 55a es de 2.10 ppm, mientras que para el compuesto 56c es de 2.99 ppm.

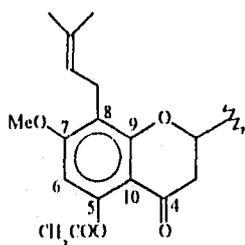


Figura 97

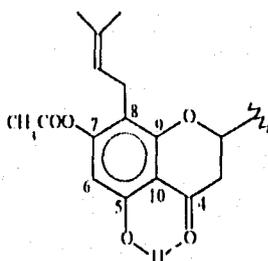


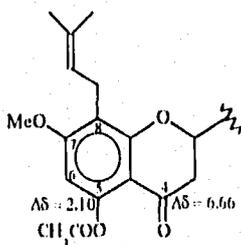
Figura 98

Figura	$\Delta\delta$						
	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9	C-10
97	6.66	2.10	-7.7	2.97	-6.95	8.84	-5.11
98	-1.24	2.28	-7.02	2.99	-7.25	2.89	-3.42

97, $\Delta\delta = \delta(55) - \delta(55a)$. 98, $\Delta\delta = \delta(56) - \delta(56e)$.

Tabla XXVI

Además, la acetilación del grupo hidroxilo de la posición 5, causa un efecto de protección sobre C-4 en 6.66 ppm, como se indica en la figura 99.

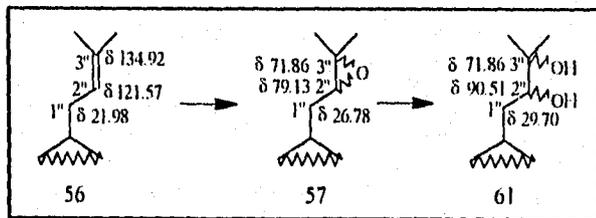


$\Delta\delta = \delta(55) - \delta(55a)$

Figura 99

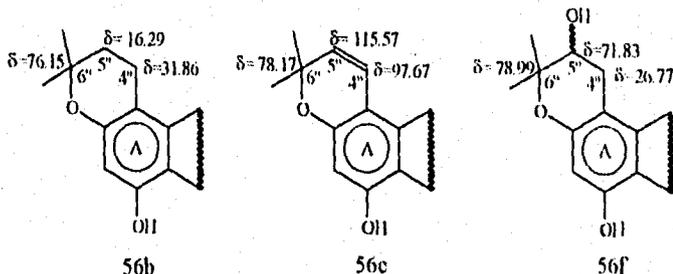
Por otra parte, en los espectros de ^{13}C para las flavanonas preniladas y al aplicar la técnica del APT o DEPT, como en el caso de la sustancia 56, se observa una señal en δ 121.57 (*t*) correspondiente a un grupo metino y que es asignado a C-2"; por otra parte la señal en δ 134.92 (*s*) se asignó a C-3", debido a que se trata de un carbono cuaternario. Los desplazamientos químicos correspondientes al grupo prenilo y derivados presentes en las sustancias 56, 57 y 61 pueden

justificarse en base al cambio en el tipo de hibridación sp^2 a sp^3 y a la naturaleza del sustituyente en las posiciones, de C-2'' y C-3'', tal como se muestra en el esquema 31.



Esquema 31. Comparación de los desplazamientos químicos (RMN- ^{13}C) de los grupos prenilos

Las sustancias 56b, 56c y 56f, que son producto de ciclización de la glatranina (56a), conllevan a la formación de un anillo del pirano. Los desplazamientos químicos de los C-4'' y C-5'' en dichas sustancias varía debido al tipo de hibridación o al tipo de sustituyente; así por ejemplo C-5'' de la sustancia 56b se encuentra en 115.57 ppm por poseer una hibridación sp^2 , mientras que para el compuesto 56f aparece en 71.83 ppm debido a la presencia del grupo hidroxilo y para el compuesto 56b el C-5'' se presenta en 16.29 ppm.



Por otro lado, el desplazamiento químico del C-6'' se ve determinado también por la funcionalización del C-5'', lo cual queda de manifiesto por el efecto de desprotección que sufre dicho carbono en las sustancias 56c ($\Delta\delta = -2.2$ ppm) y 56f ($\Delta\delta = -2.84$), con respecto al desplazamiento químico de C-6'' del compuesto 56b. Así misma, se puede observar en la tabla XIII, que los grupos metilos unidos al C-6'', se ven protegidos en la sustancia 56f con respecto a 56b; mientras que en 56c, se observa una desprotección con respecto a 56b; lo anterior se puede explicar debido a la distorsión que sufre el anillo debido a la presencia de la doble ligadura entre C-4'' y C-5''.

9.3. BIOENSAYOS FRENTE *Artemia salina* PRUEBAS ANTIMICROBIANAS Y ANTIVIRALES.

Al evaluar los extractos hénanico, acetónico y etanólico frente *Artemia salina*, se observó que el último extracto presenta una mayor toxicidad, como se indica en la tabla XIV; lo que presumiblemente se deba, a que la cantidad y variabilidad de metabolitos secundarios es mucho mayor en dicho extracto, debido a la naturaleza química del disolvente⁶⁸. Además, en estudios biológicos realizados con ciertos flavonoides, han mostrado poseer algún tipo de actividad biológica - como ya se indicó en el marco teórico-; motivos por los cuales se decidió realizar el estudio biodirigido del extracto etanólico.

De este estudio farmacológico preliminar, se observa que únicamente las fracciones 265-281 ($CL_{50}=205.3940$ ppm), 306-314 ($CL_{50}= 348.17$ ppm) y 347-415 ($CL_{50}= 53.92$ ppm) poseen toxicidad para *Artemia salina*; mientras que las demás fracciones resultaron ser no tóxicas para este crustáceo, ya que presentaron una $CL_{50} > 1000$ ppm (ver tabla XIV).

De las fracciones que resultaron ser activas, se evaluaron las sustancias purificadas que se encontraban en éstas, y de las cuales las sustancias caracterizadas como glabranina (56) y 5,7-dihidroxi-8-(3-metil-2,3-epoxi-butano)-flavanona (57) mostraron toxicidad frente a este crustáceo - $CL_{50}= 289.27$ y $CL_{50}= 252.28$ respectivamente.

De las pruebas antivirales realizadas al extracto etanólico y a las sustancias caracterizadas como 7-metilglabranina (55), glabranina (56) y 5,4'-dihidroxi-7-metoxi-8-(3",3"-dimetilalil)-flavanona (59), ninguna presentó actividad antiviral ya que las muestras precipitaban durante la incubación, impidiendo de esta forma que estuvieran en contacto con el virus. Con respecto a las pruebas antimicrobianas, sólo el extracto etanólico y la glabranina (56) tuvieron actividad biológica frente a bacterias Gram positivas -*Bacillus cereus*, *Streptococcus pyogenes* y *Staphylococcus aureus*-, presentando el *Streptococcus pyogenes* una mayor sensibilidad frente a éstas muestras con respecto a la de los otros 2 microorganismos, tal como se indica en la tabla XV. Cabe mencionar que ninguna muestra tuvo actividad hacia las bacterias Gram negativas utilizadas en la prueba, ya que éstas precipitaban durante la

incubación al determinar la MIC o bien se requería de concentraciones elevadas -mayor de 1 mg/ml- para producir la muerte del microorganismo.

El epóxido de la glabranina (57), no pudo ser evaluado para determinar su actividad antimicrobiana, ya que no se contaba con la cantidad suficiente; sin embargo, se puede esperar que esta sustancia muestre al igual que la glabranina actividad antimicrobiana, ya que la fracción en la que se encontraban juntas estas sustancias (fracción 347-415) presentó una mayor toxicidad frente *Artemia salina* con respecto a las fracciones 265-281, en las que se encontraban la 7-metilglabranina y la glabranina, ver tabla XIV.

X. CONCLUSIONS.

CONCLUSIONES.

Se logró la purificación y la elucidación estructural de 6 sustancias como producto natural, las cuales fueron caracterizadas como:

- 7-metilglabranina (55).
- glabranina (56).
- 5,7-dihidroxi-8-(3-metil-2,3-epoxibutano)-flavanona (57).
- 5,4'-dihidroxi-7-metoxi-8-(3'',3''-dimetilalil)-flavanona (59).
- 5,7,4'-trihidroxi-8-(3'',3''-dimetilalil)-flavanona (60).
- 5,7,4'-trihidroxi-8-(2'',3''-dihidroxi-3''-metilbutil)-flavanona (62).

Mientras que las sustancias caracterizadas como 7,4'-dimetoxi-8-(3'',3''-dimetilalil)-flavanona (58) y 5,4'-dihidroxi-7-metoxi-8-(2'',3''-dihidroxi-3''-metilbutil)-flavanona (61) fueron obtenidas como producto de reacción. Cabe mencionar que las sustancias 58-61 se obtuvieron de un estudio preliminar.

La determinación del grupo prenilo en el carbono 8 se llevo a cabo mediante reacciones de ciclización (DDQ y *p*-T'sOH) y métodos espectroscópicos (COLOC, HETCOR y NOESY).

Dichas sustancias, no se habían aislado anteriormente en especies del género de *Esenbeckias*. Encontrándose así, durante el desarrollo de este trabajo experimental flavanonas preniladas, sustancias nuevas para este género de plantas, pero ya encontradas en las familias de las Leguminosas y Compositae.

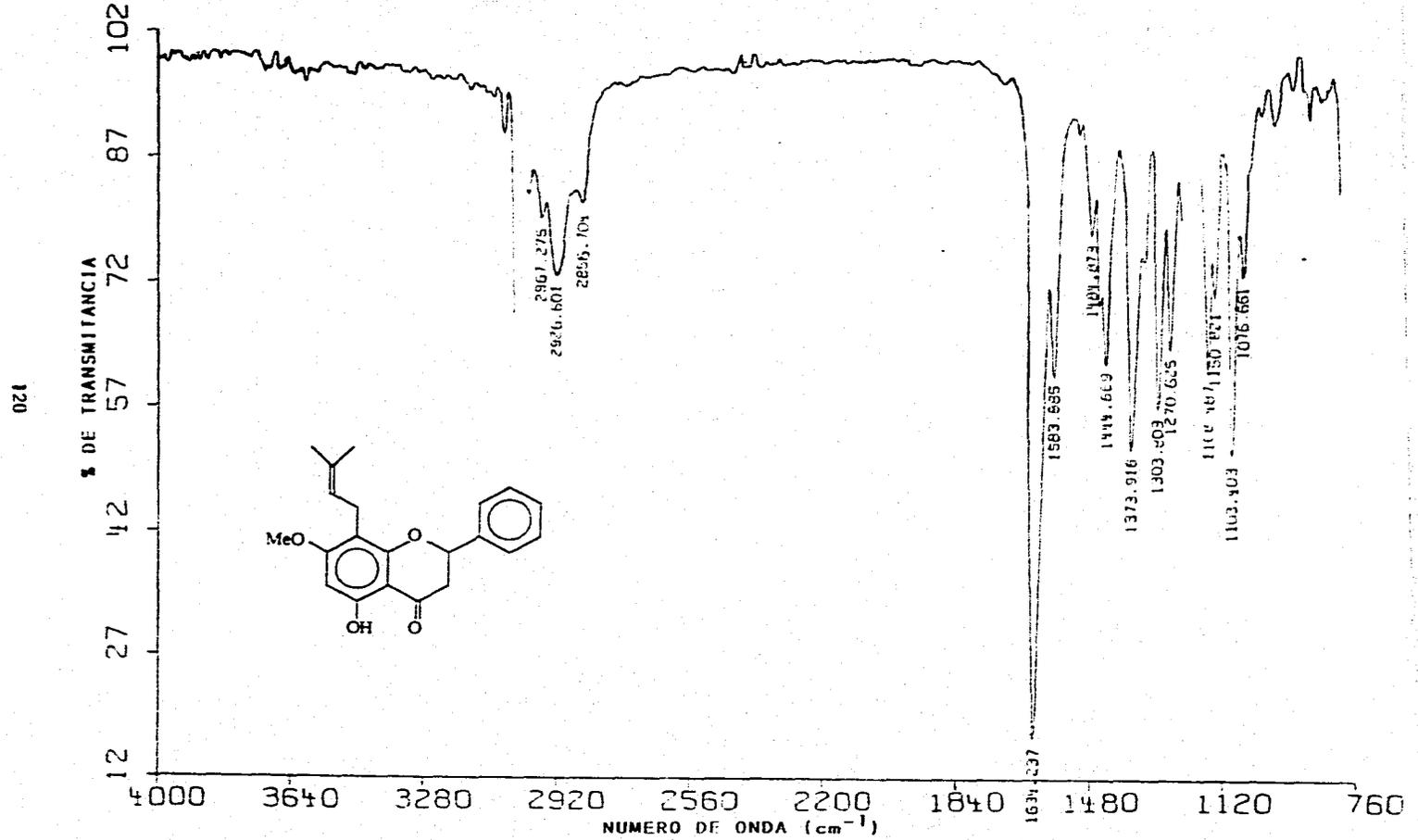
De esta manera los resultados del presente estudio se pueden incorporar a los ya informados en la literatura química, en los que se ha reportado que la familia Rutaceae tiene como característica distintiva la presencia del grupo prenilo, localizado tanto en cumarinas, furanocumarinas, alcaloides furanoquinolínicos, alcaloides derivados de la acridona, alcaloides derivados de la tirosina y triptófano y en flavonoles; mientras que en este trabajo de investigación se incorporan flavanonas preniladas, hayazgo importante dentro de los estudios fitoquímicos hasta ahora realizados.

Los productos de reacción obtenidos, permitieron detectar las variaciones que presentaban los desplazamientos químicos de ^1H y ^{13}C con respecto al esqueleto base de la flavanona prenilada.

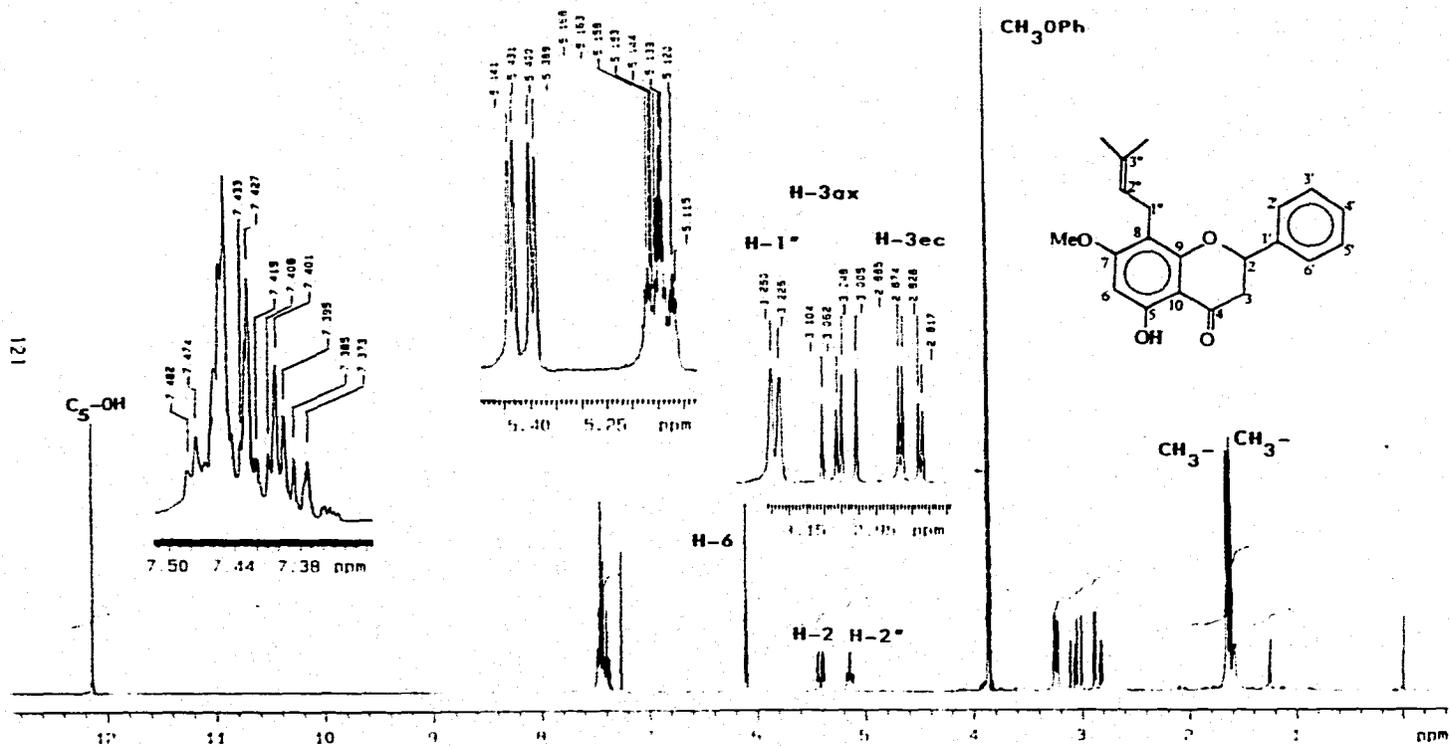
Por otro parte, del estudio biológico realizado se determinó la toxicidad de los extractos hexánico, acetónico, etanólico y de las sustancias aisladas de este último extracto, al ser evaluados frente *Artemia salina*, dando estos bioensayos un indicio de una posible actividad biológica. Al realizar las pruebas antimicrobianas, se encontró que el extracto etanólico y una de las sustancias aisladas como producto natural (56) poseen actividad frente a *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus*. Estos resultados de igual forma se pueden anexar a la literatura científica ya existente, siendo que de esta planta no se ha informado alguna actividad biológica.

XI. ESPECTROS.

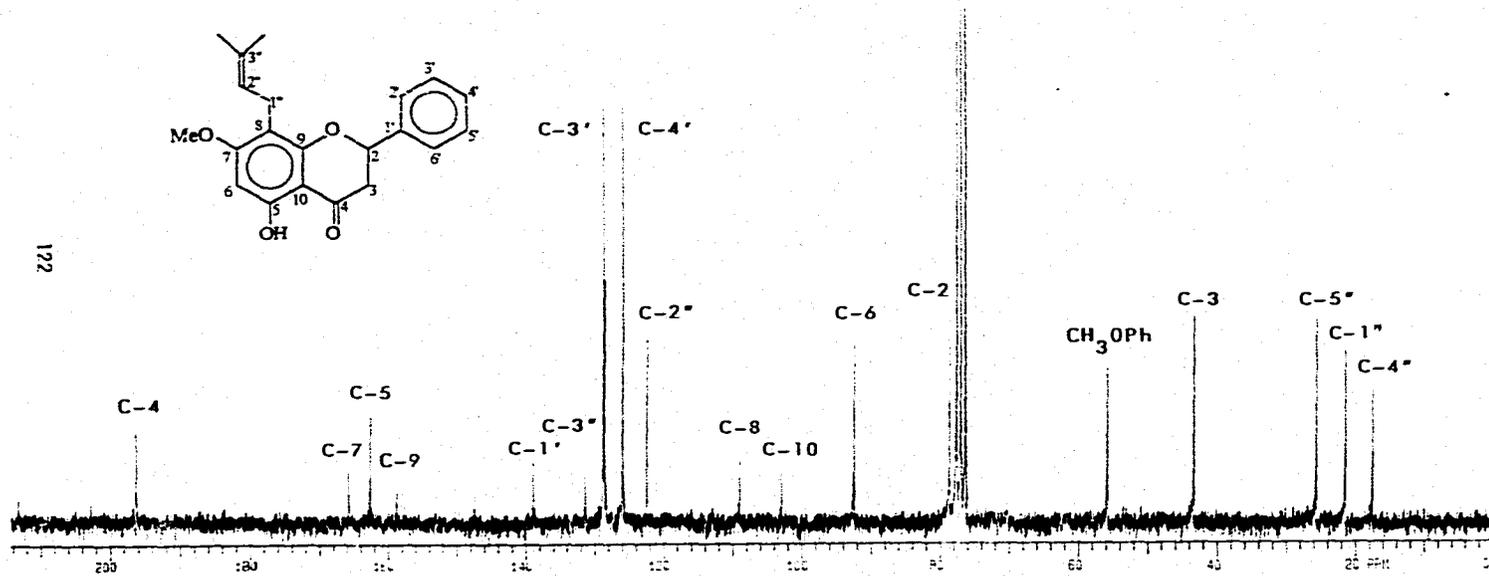
ESPECTRO I. IR (CHCl₃) DE LA 7-METILGLABRANINA (Tabla VI).



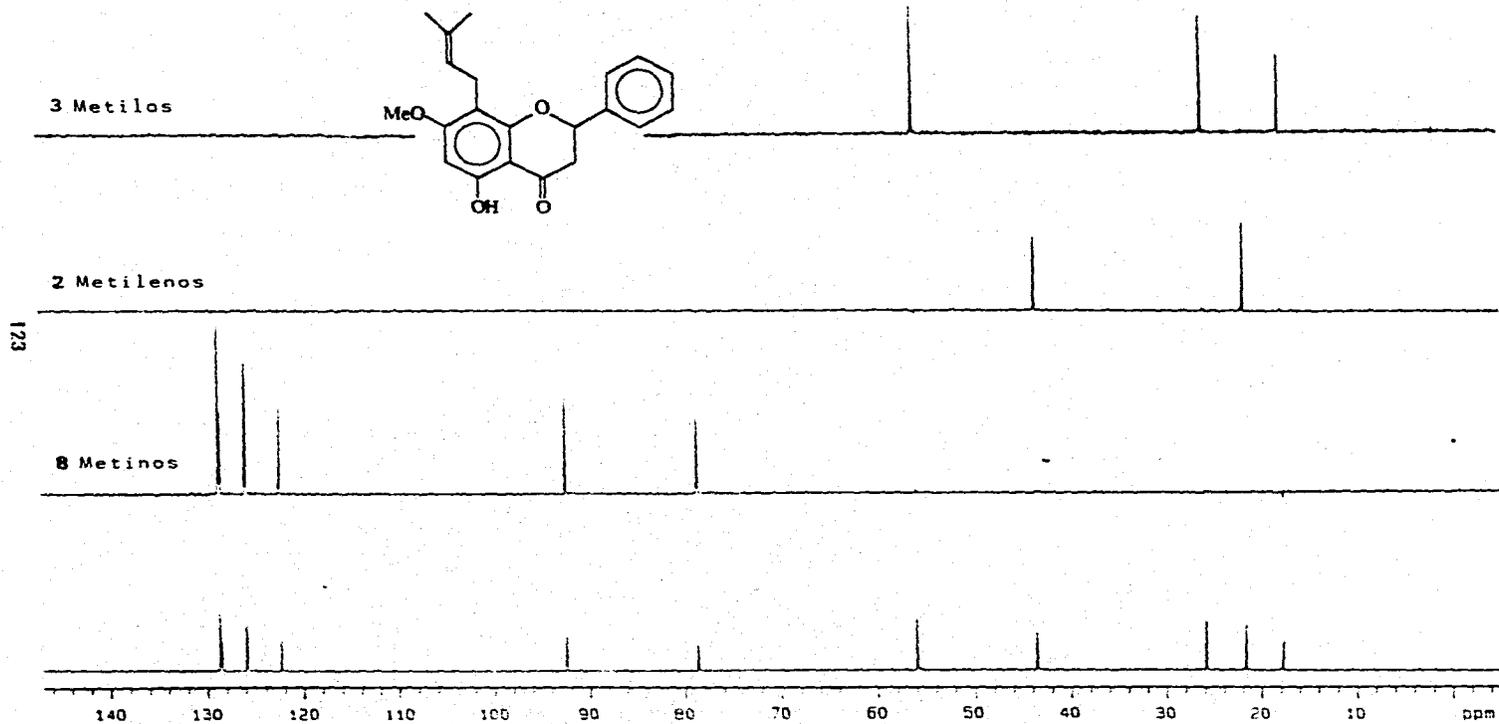
ESPECTRO 2. RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃, TMS) DE LA 7-METILGLABRANINA (Tabla VIII).



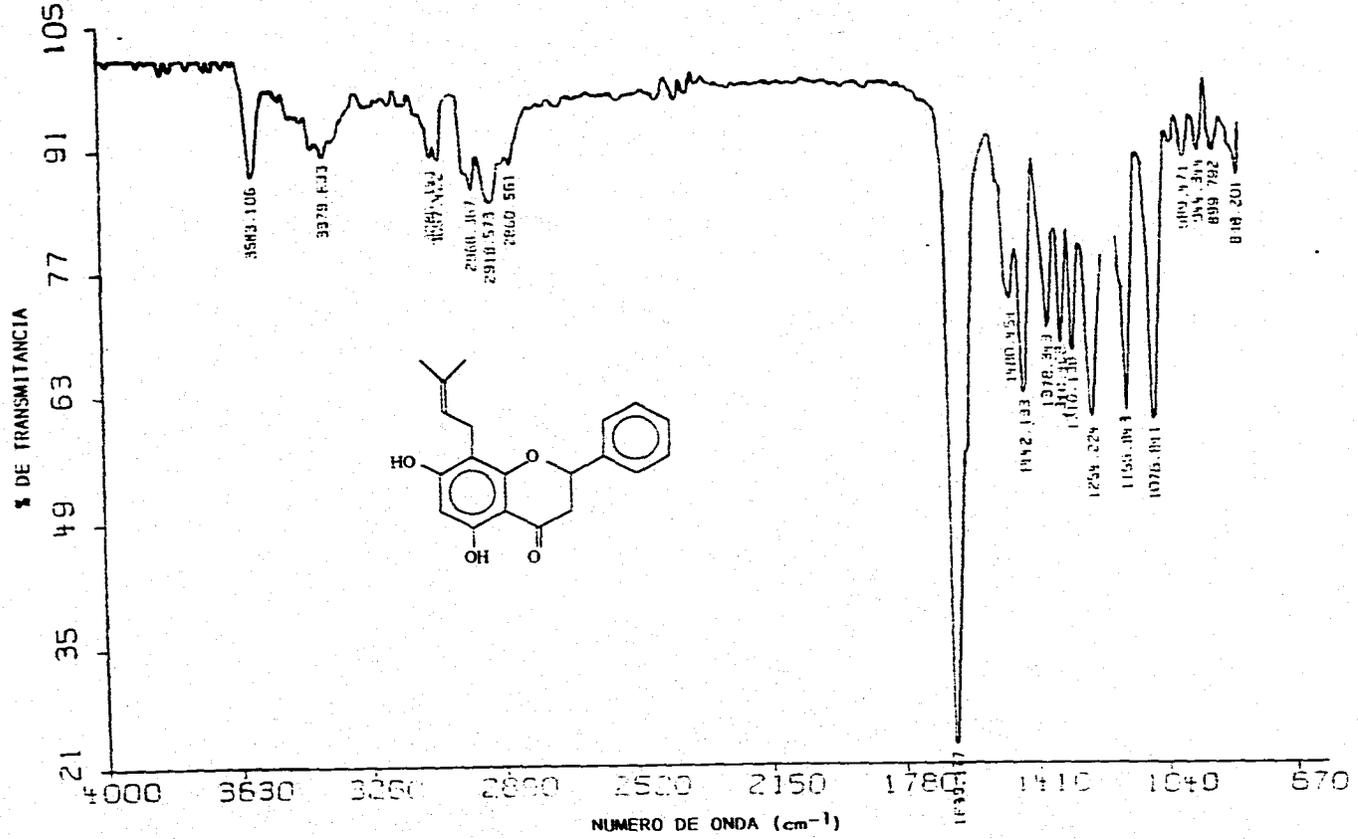
ESPECTRO 3. RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃, TMS) DE LA 7-METILGLABRANINA (Tabla IX).



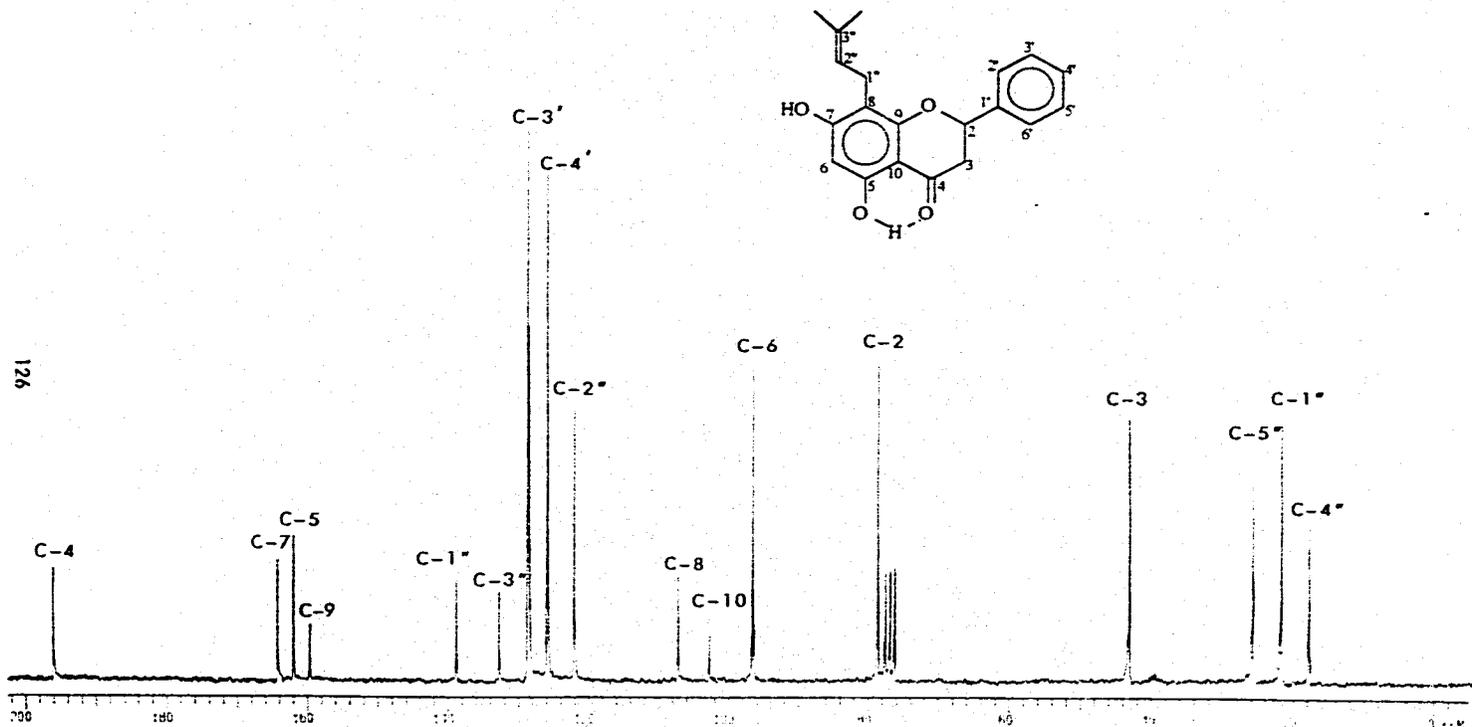
ESPECTRO 3a. RMN-¹³C, TECNICA DEPT (75 MHz, CDCl₃, TMS) DE LA 7-METILGLABRANINA.

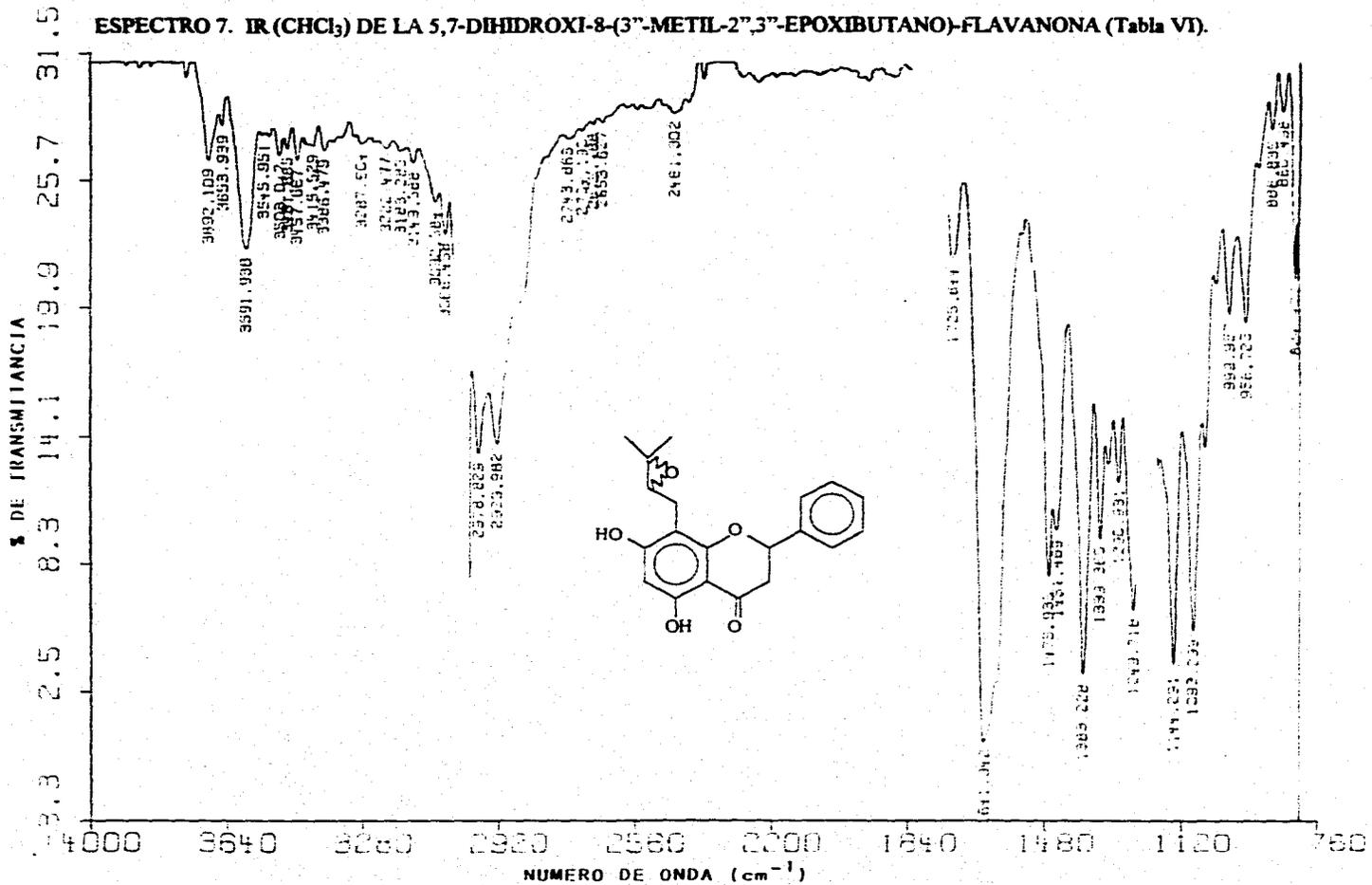


ESPECTRO 4. IR (CHCl₃) DE LA GLABRANINA (Tabla VI).

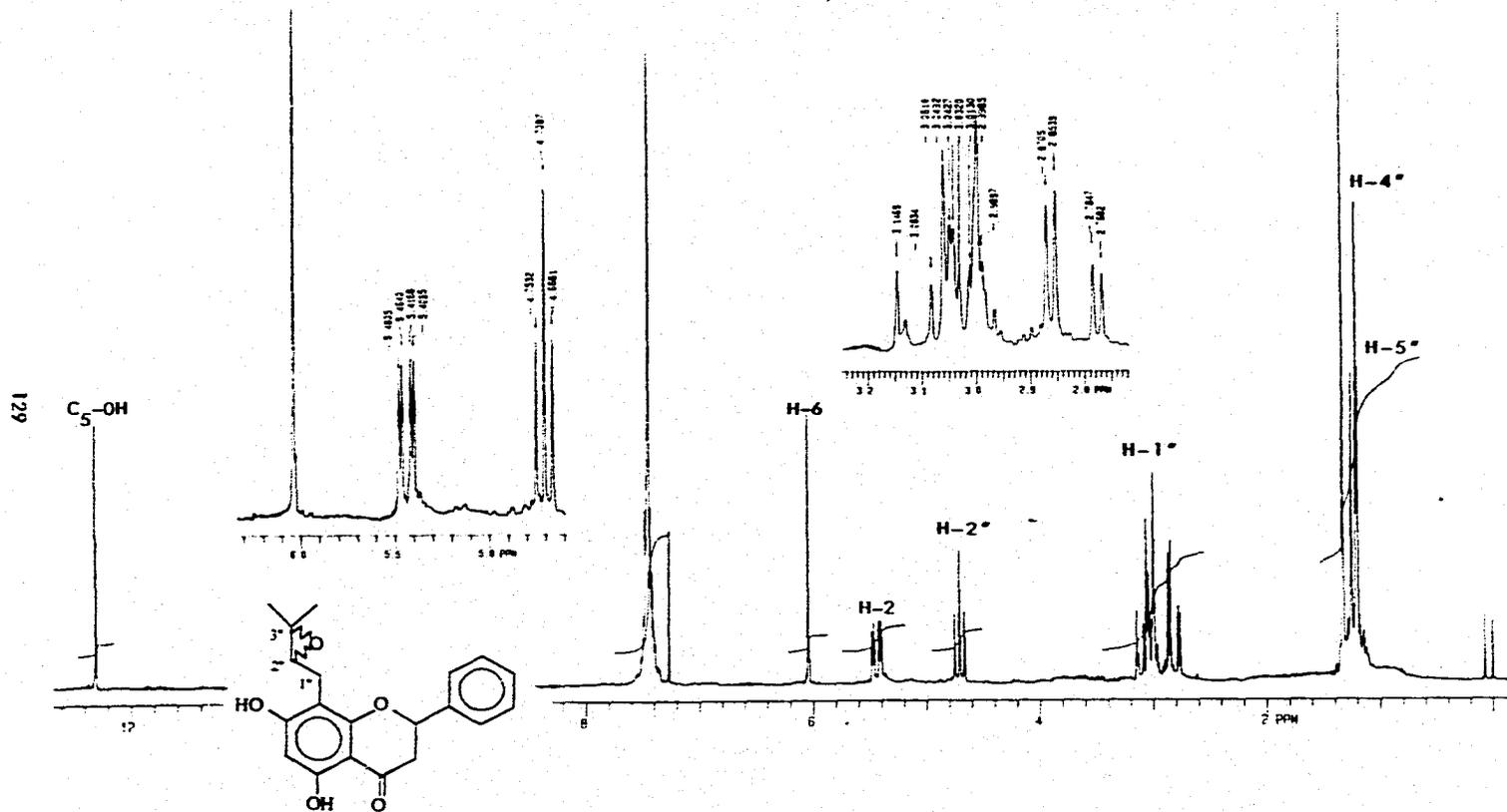


ESPECTRO 6. RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃, TMS) DE LA GLABANINA (Tabla IX).

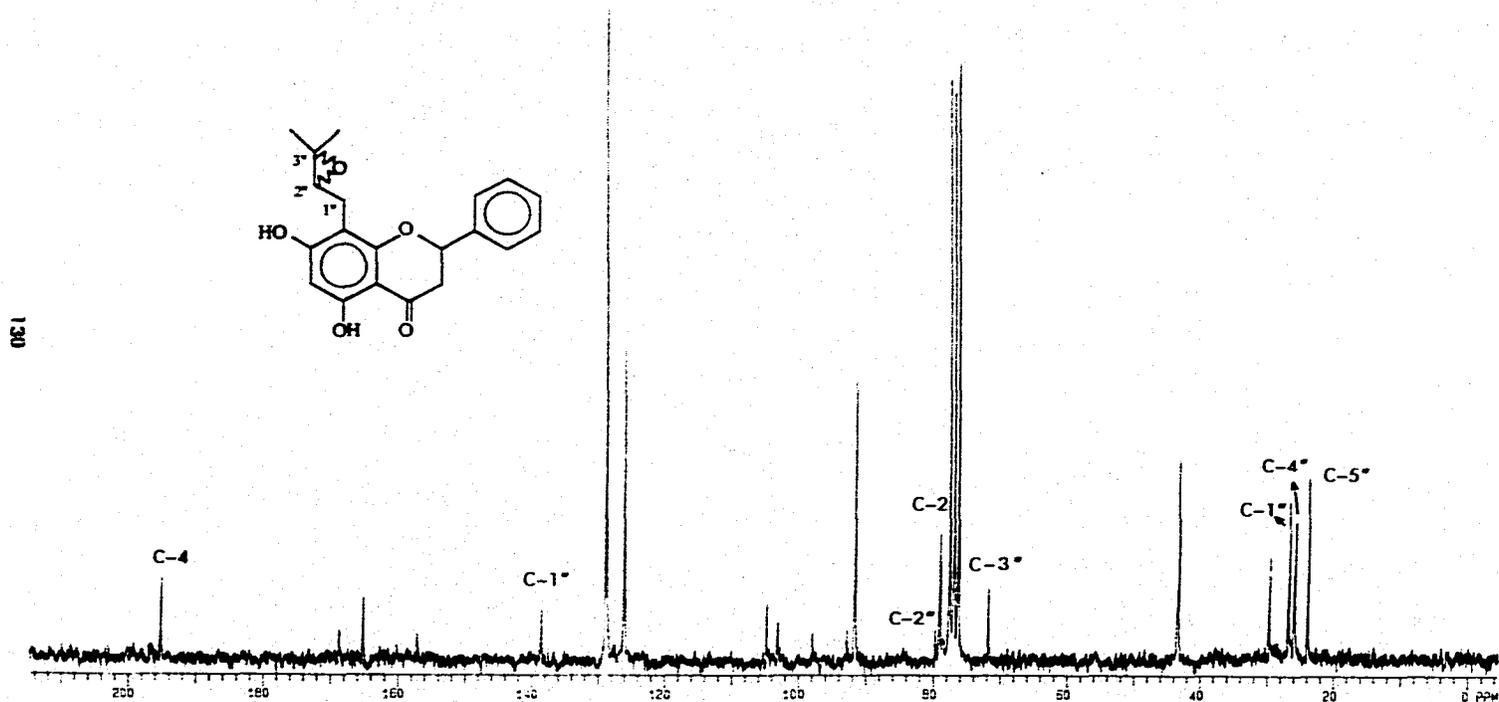




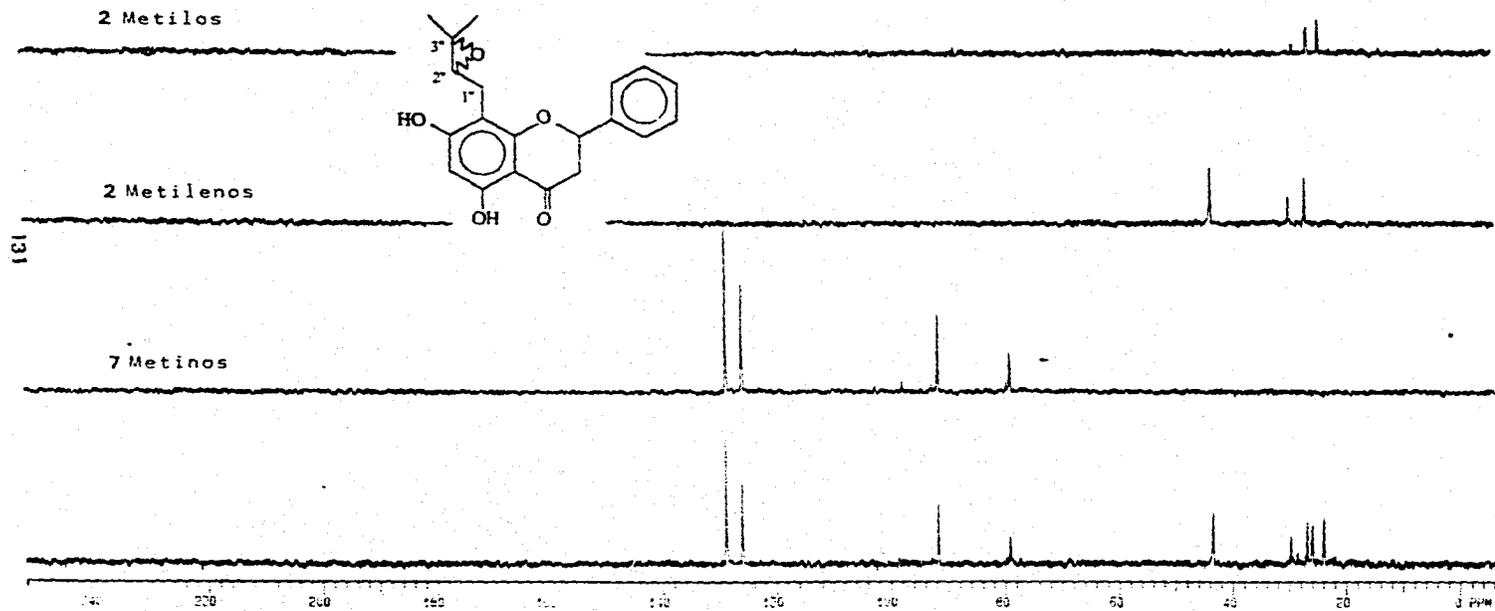
ESPECTRO 8. RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃, TMS) DE LA 5,7-DIHIIDROXI-8-(3''-METIL-2'',3''-EPOXIBUTANO)-FLAVANONA
(Tabla VIII).



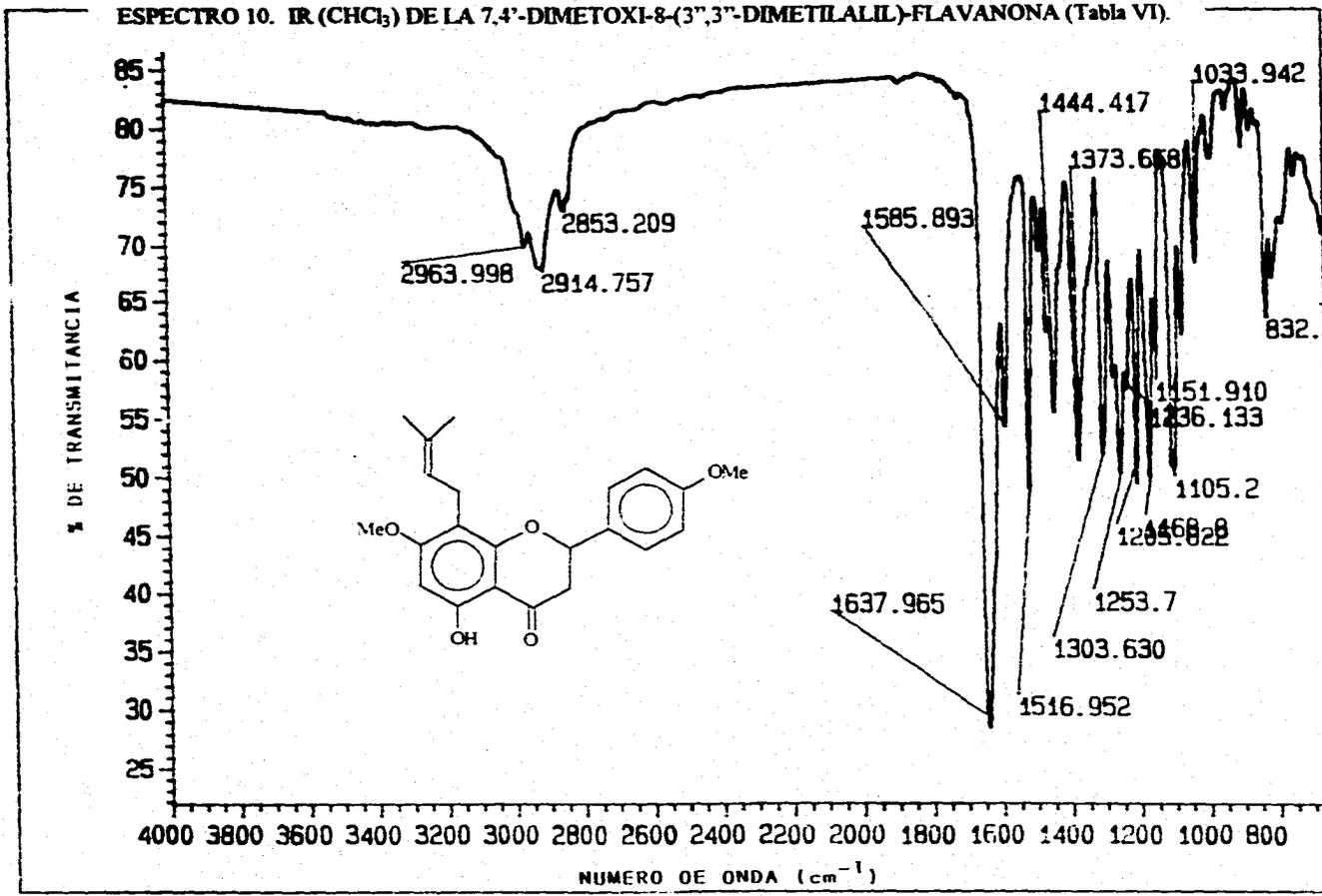
ESPECTRO 9. RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃, TMS) DE LA 5,7-DIHIIDROXI-8-(3"-METIL-2",3"-EPOXIBUTANO)-FLAVANONA
(Tabla IX).



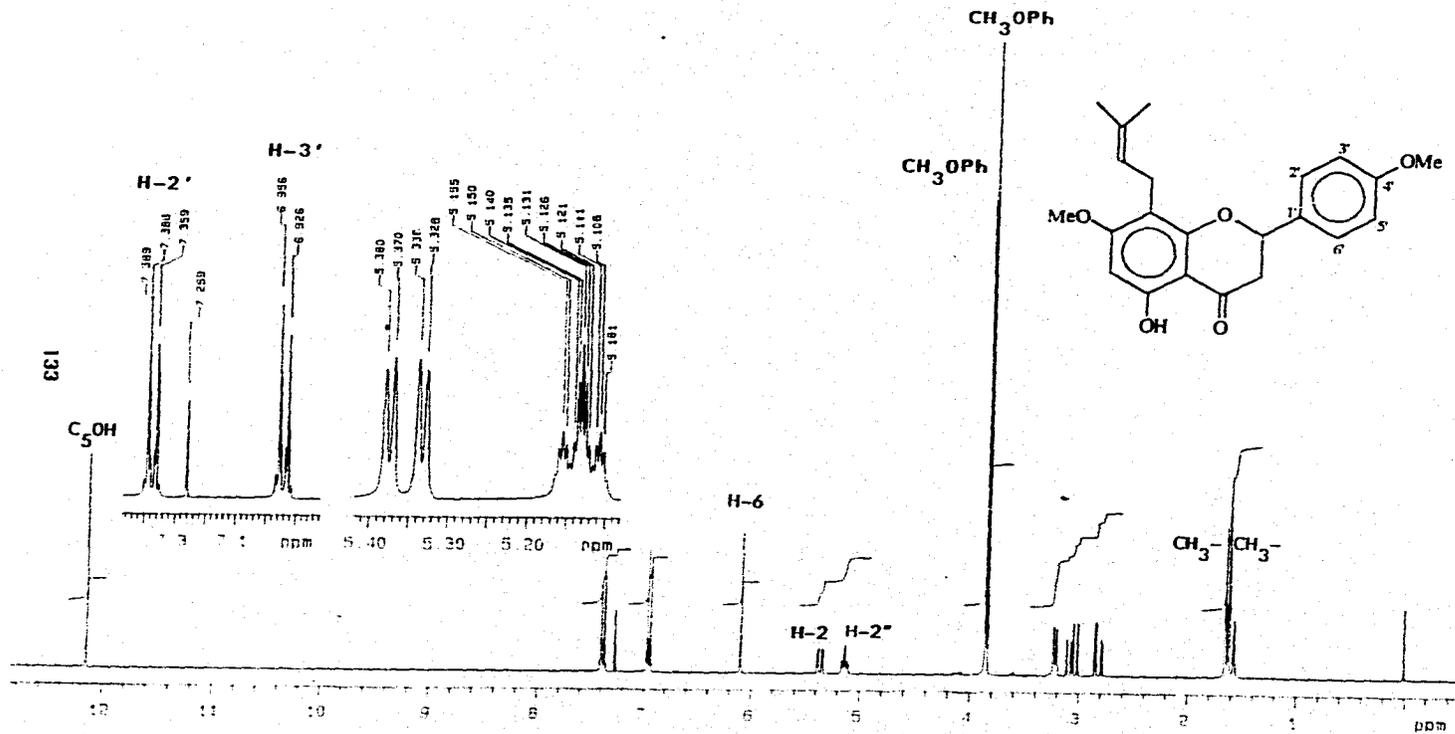
ESPECTRO 9a. RMN-¹³C, TECNICA DEPT (75 MHz, CDCl₃, TMS) DE LA 5,7-DIHIIDROXI-8-(3''-METIL-2'',3''-EPOXIBUTANO)-
FLAVANONA.



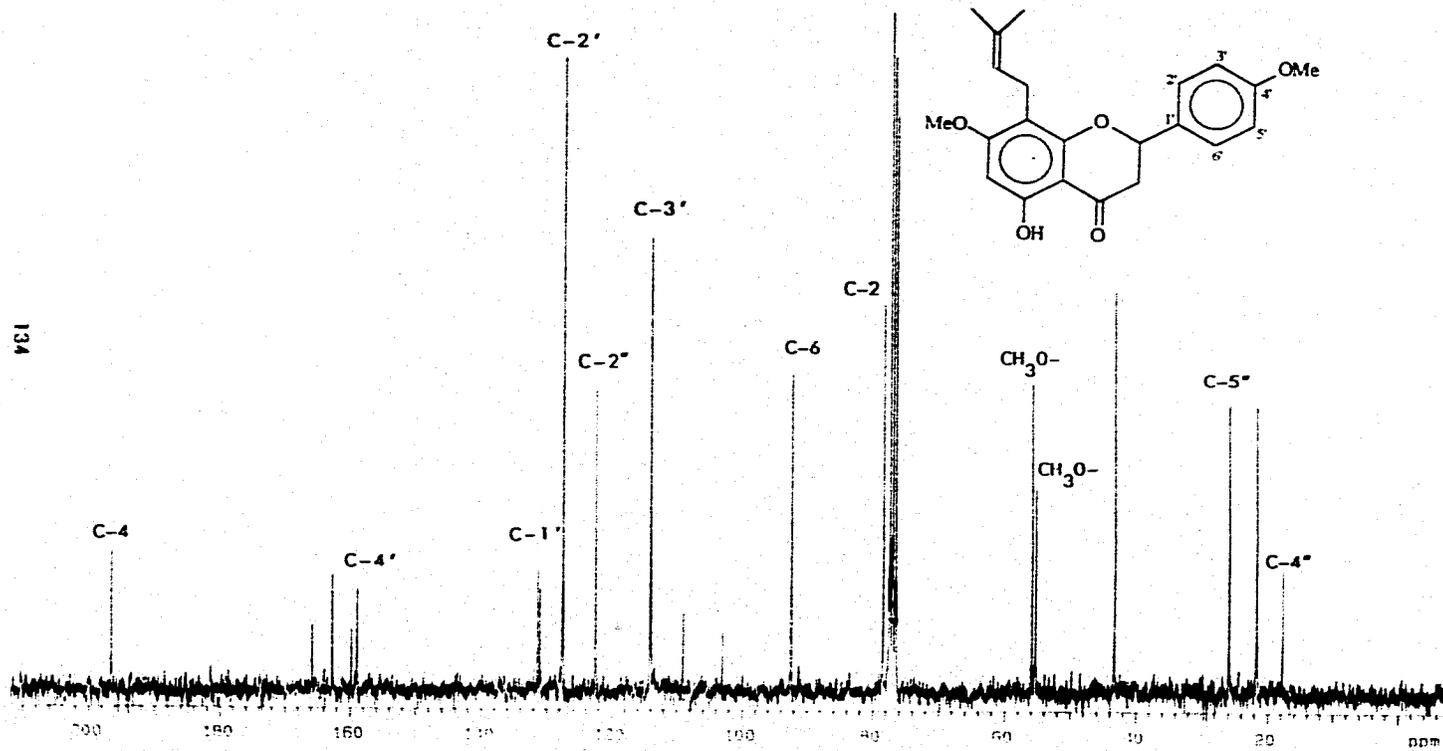
ESPECTRO 10. IR (CHCl₃) DE LA 7,4'-DIMETOXI-8-(3'',3''-DIMETILALIL)-FLAVANONA (Tabla VI).



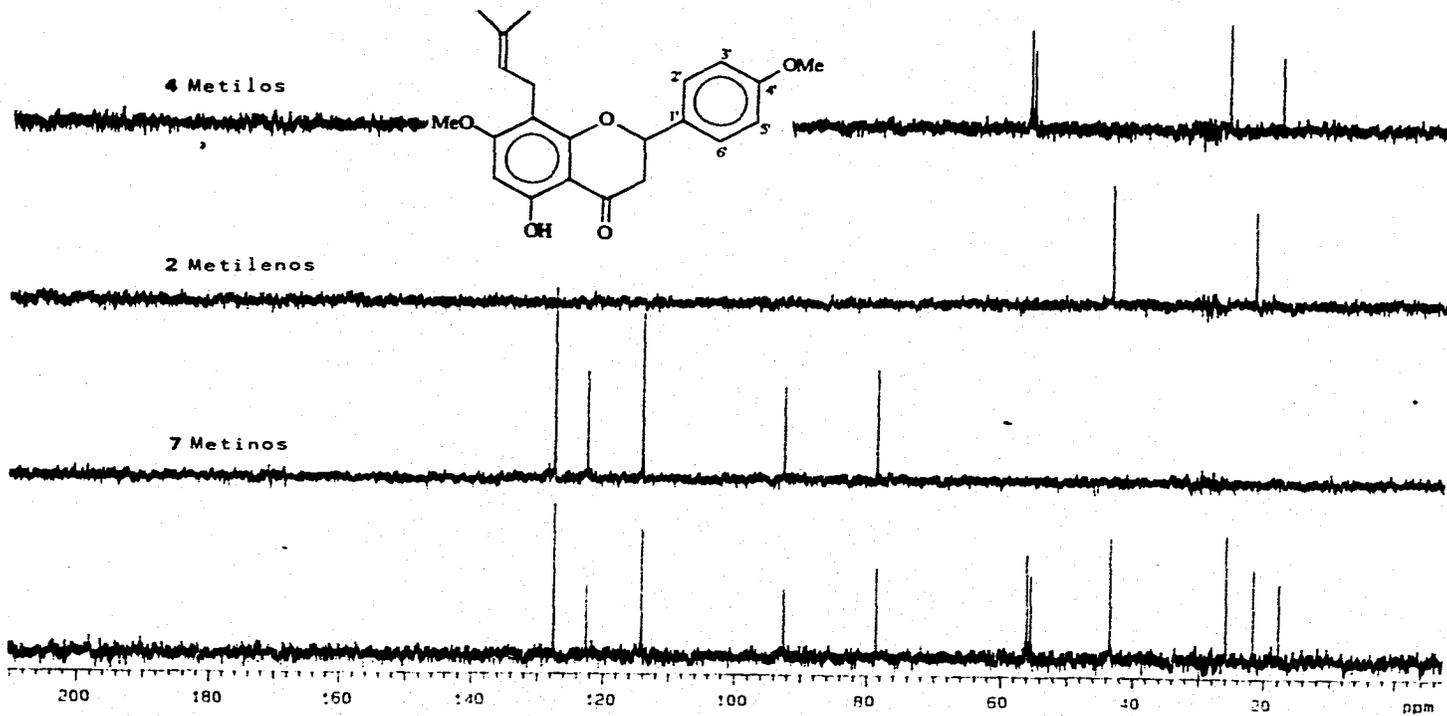
ESPECTRO 11. RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃, TMS) DE LA 7,4'-DIMETOXI-8-(3'',3''-DIMETILALIL)-FLAVANONA (Tabla VIII).



ESPECTRO 12. RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃, TMS) DE LA 7,4'-DIMETOXI-8-(3'',3''-DIMETILALIL)-FLAVANONA (Tabla IX).



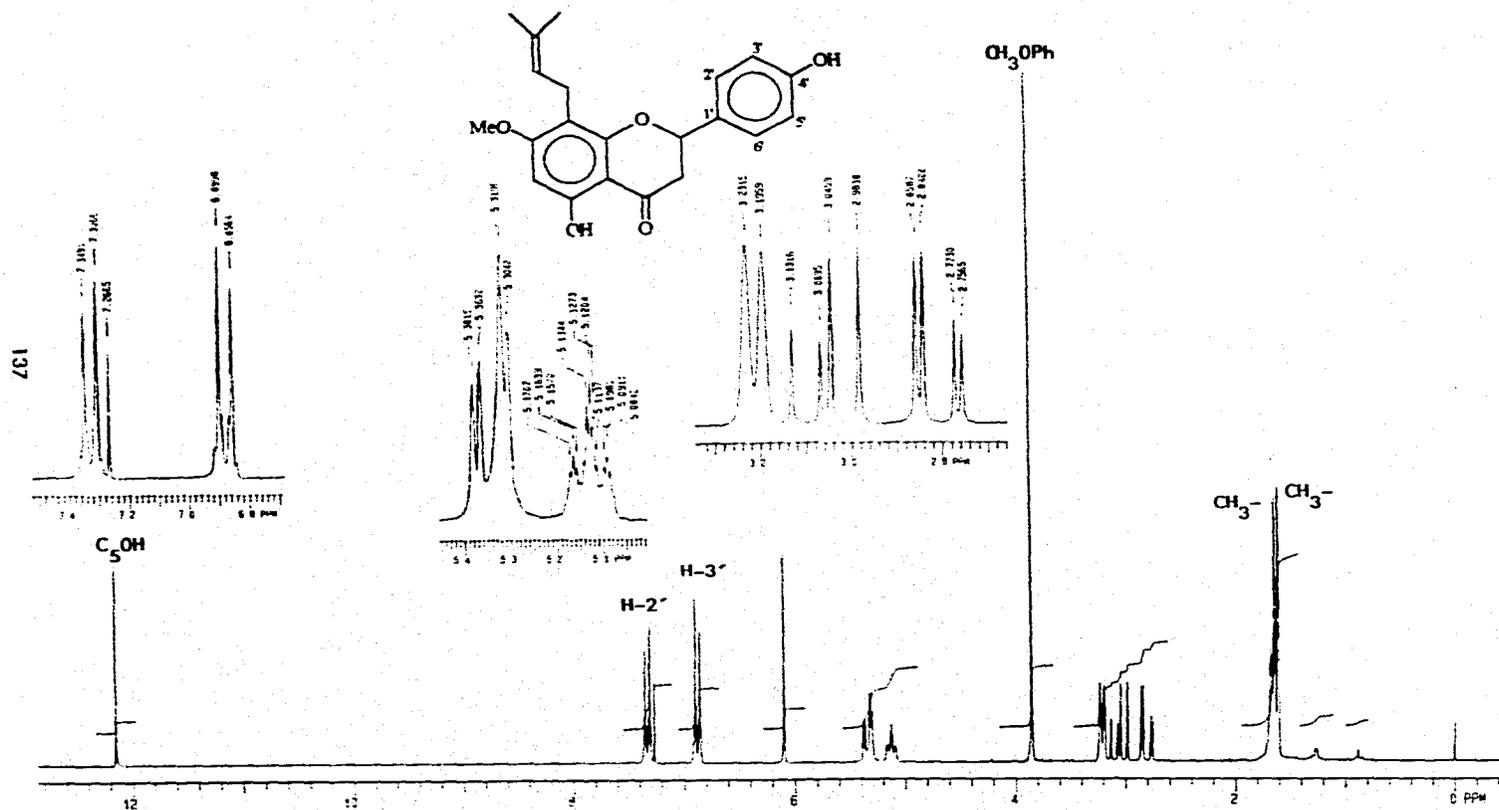
ESPECTRO 12a. RMN-¹³C, TECNICA DEPT (75 MHz, CDCl₃, TMS) DE LA 7,4'-DIMETOXI-8-(3'',3''-DIMETILALIL)-
FLAVANONA .



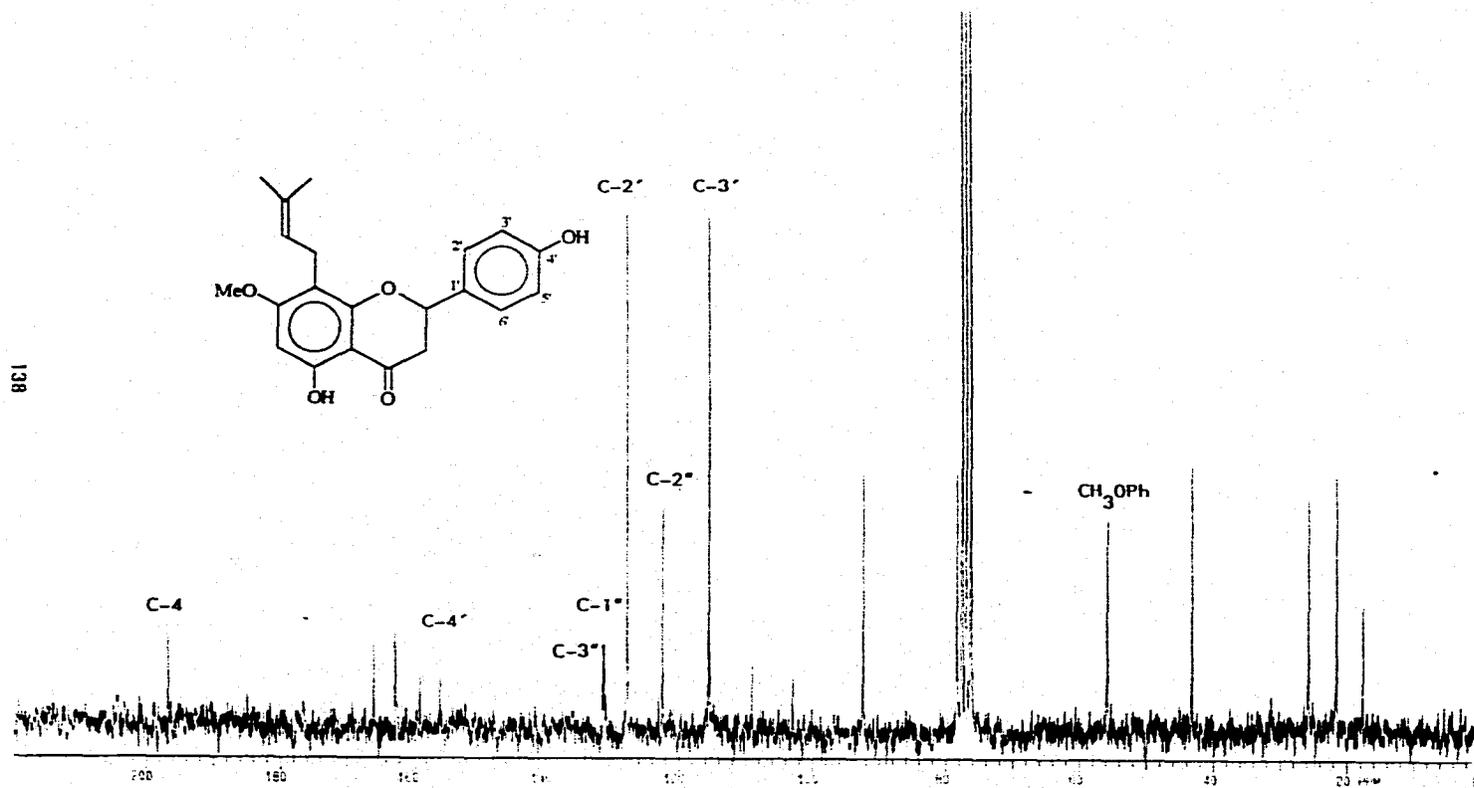
FALTA PAGINA

No. 136

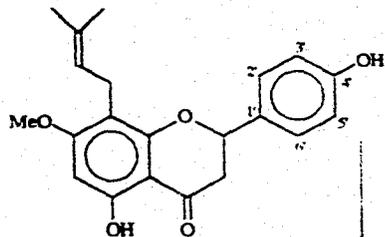
ESPECTRO 14. RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃, TMS) DE LA 5,4'-DIHIDROXI-7-METOXI-8-(3'',3''-DIMETILALIL)-FLAVANONA (Tabla VIII).



ESPECTRO 15. RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃, TMS) DE LA 5,4'-DIHIDROXI-7-METOXI-8-(3'',3''-DIMETILALIL)-FLAVANONA
(Tabla IX).



ESPECTRO 15a. RMN-¹³C, TECNICA APT (75 MHz, CDCl₃, TMS) DE LA 5,4'-DIHIDROXI-7-METOXI-8-(3'',3''-DIMETILALIL)-
FLAVANONA.

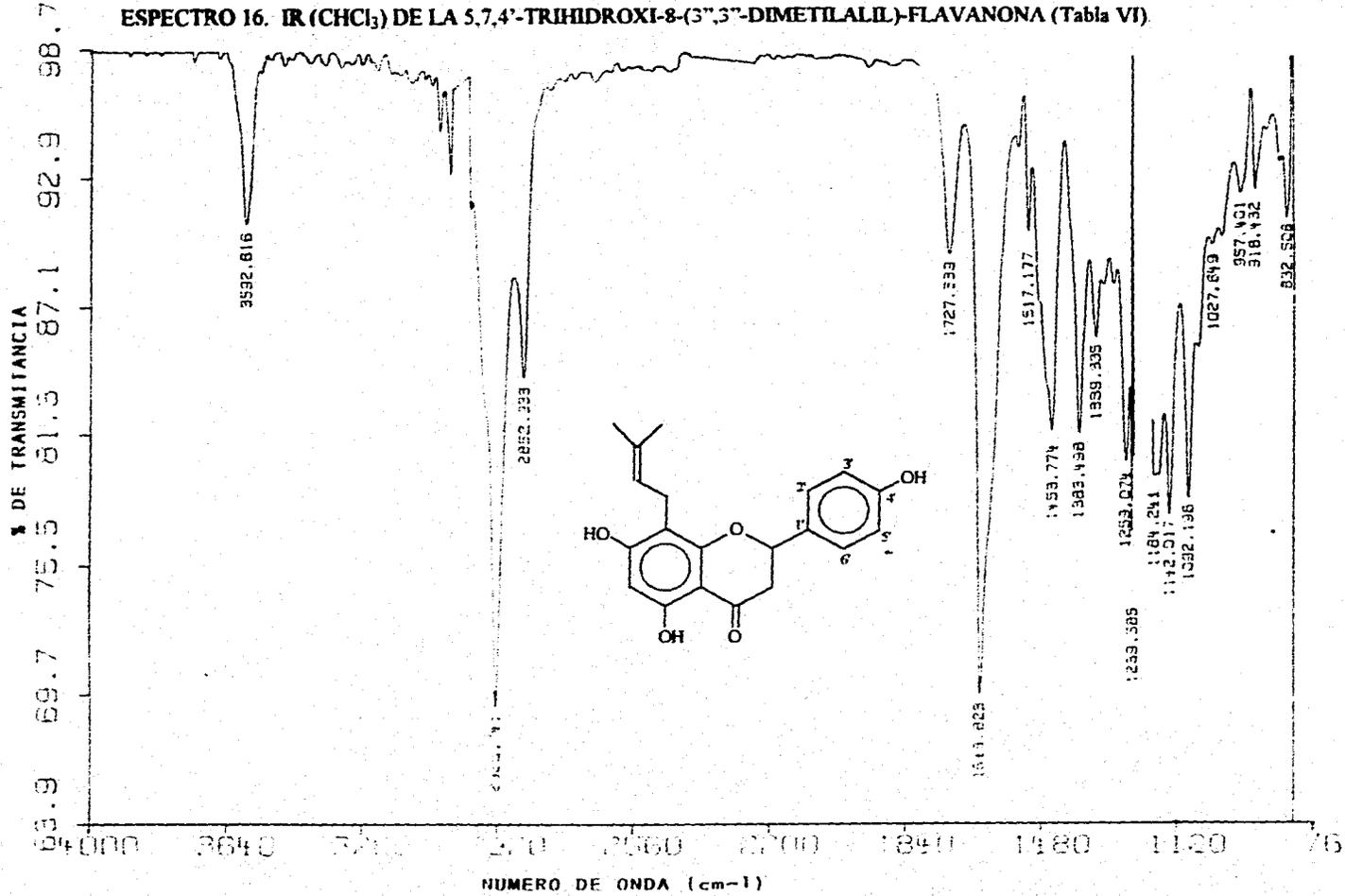


3 CH₃-
7 CH-

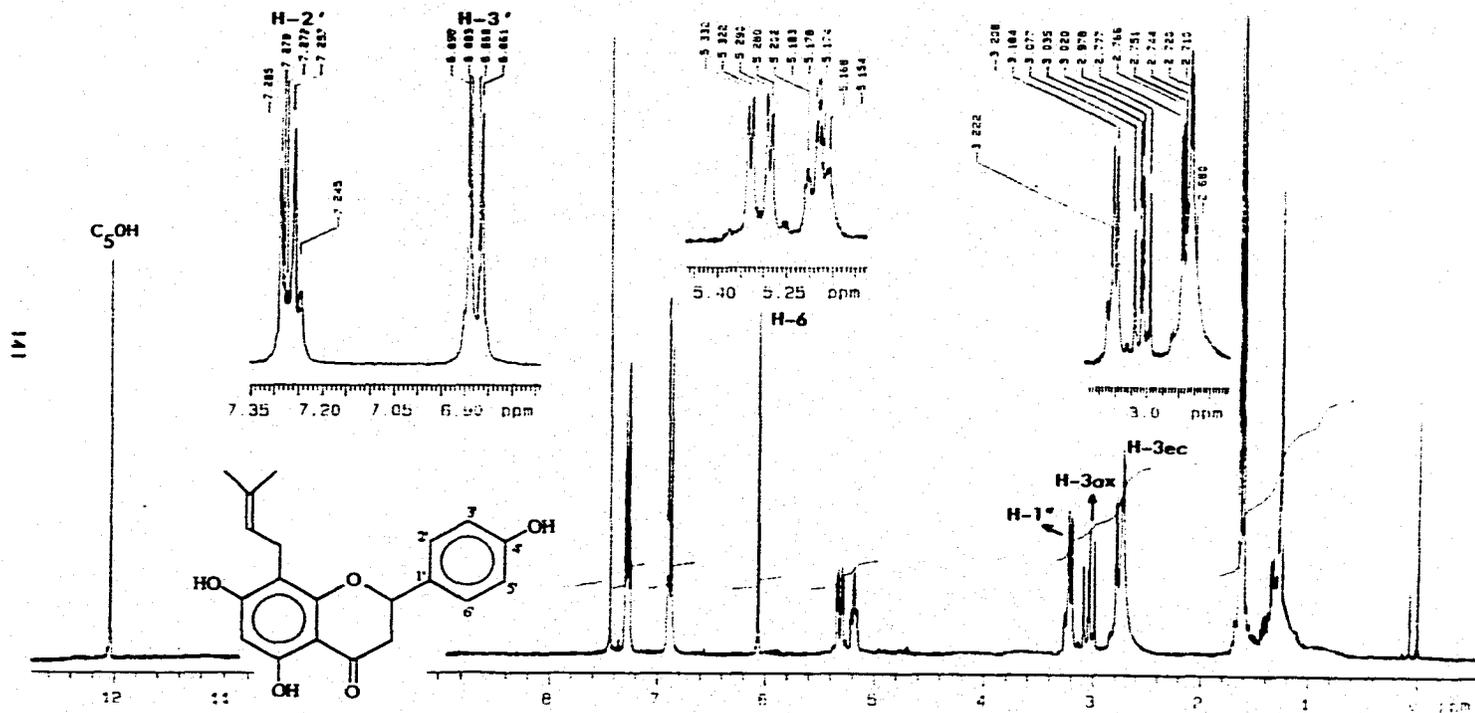
139
2 CH₂-

7 CH-

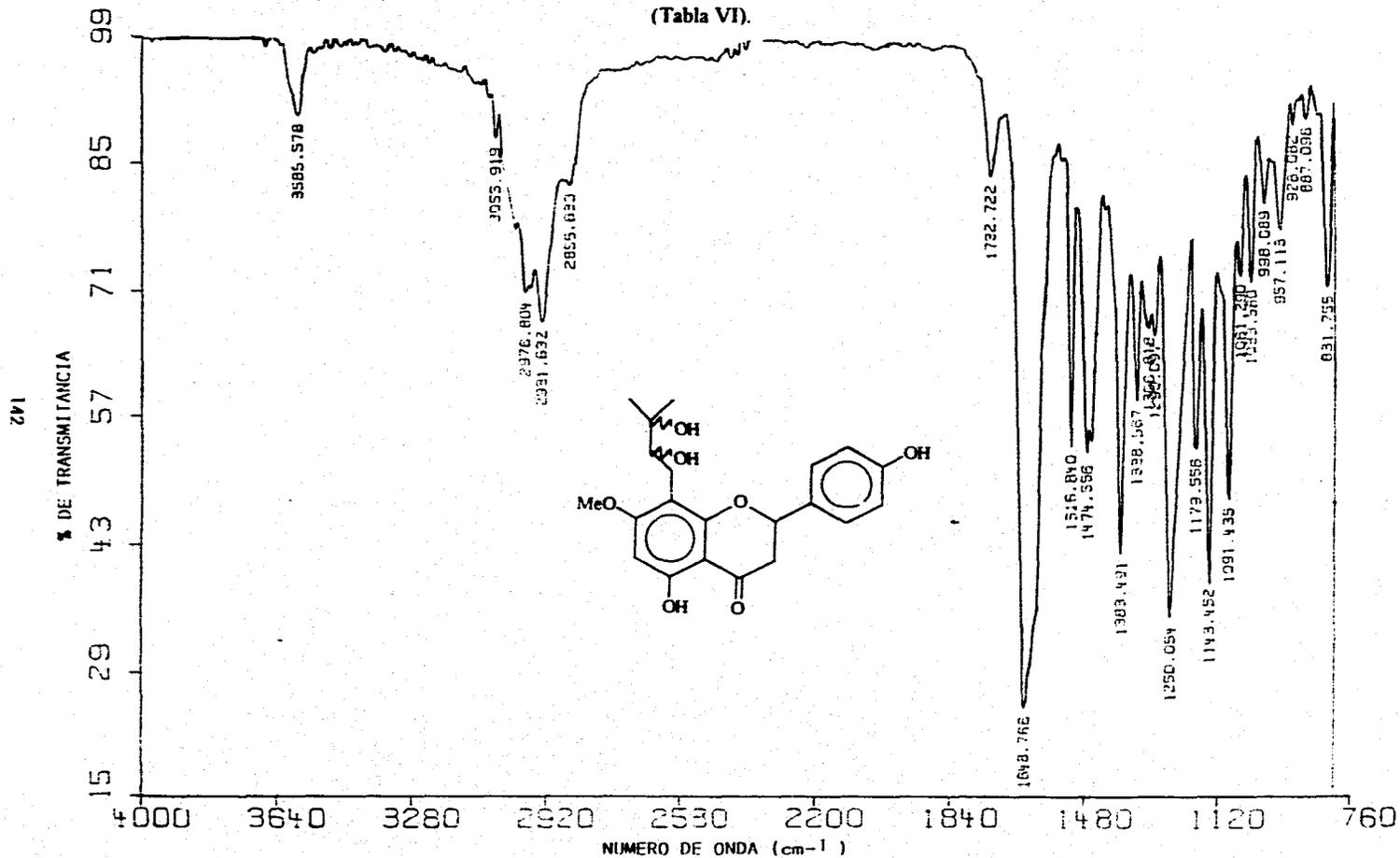
220 200 180 160 140 120 100 80 60 40 20 0 ppm



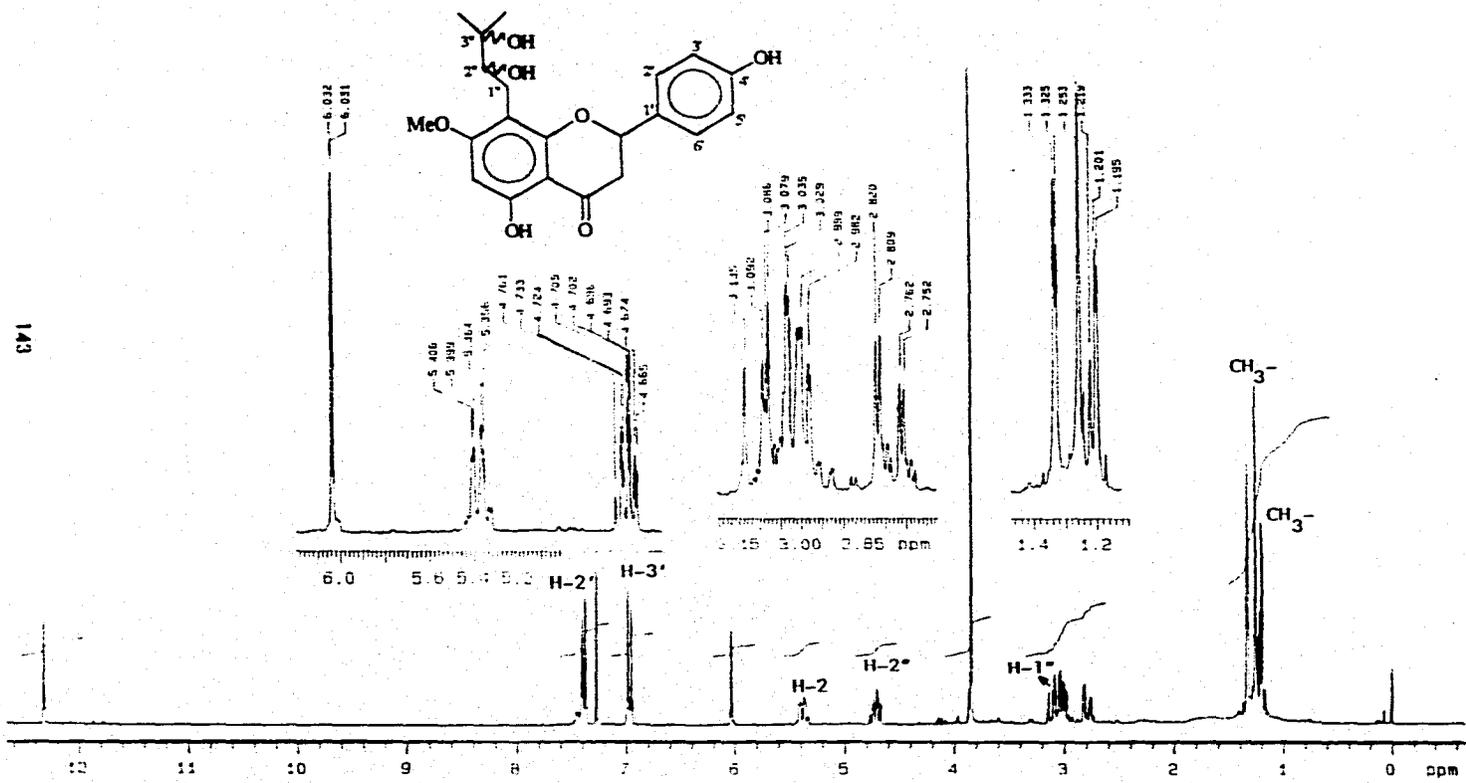
ESPECTRO 17. RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃, TMS) DE LA 5,7,4'-TRIHIIDROXI-8-(3'',3''-DIMETILALIL)-FLAVANONA
(Tabla VIII).



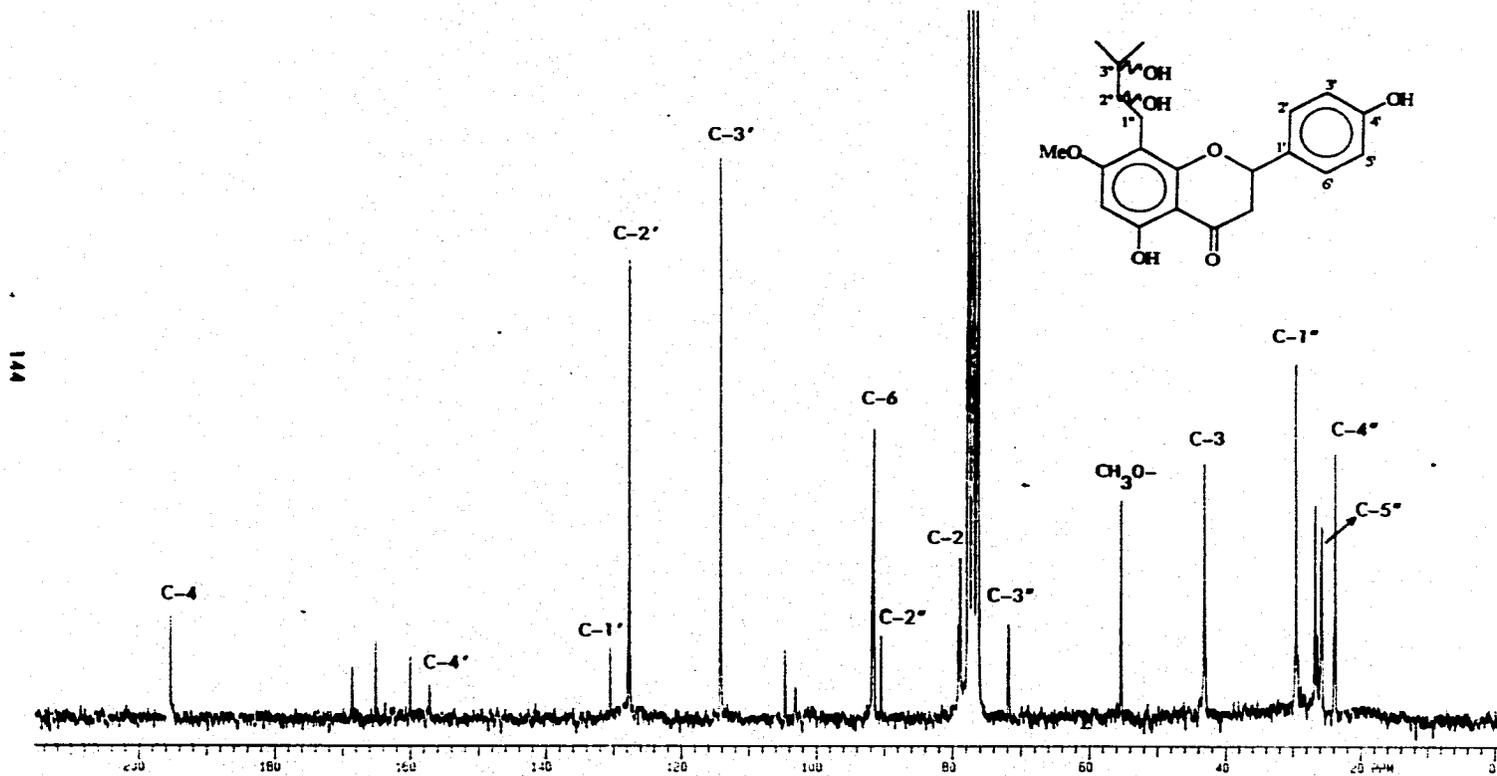
ESPECTRO 18. IR (CHCl₃) DE LA 5, 4'-DIHIDROXI-7-METOXI-8-(2'',3''-DIHIDROXI-3''-METILBUTIL)-FLAVANONA
(Tabla VI).



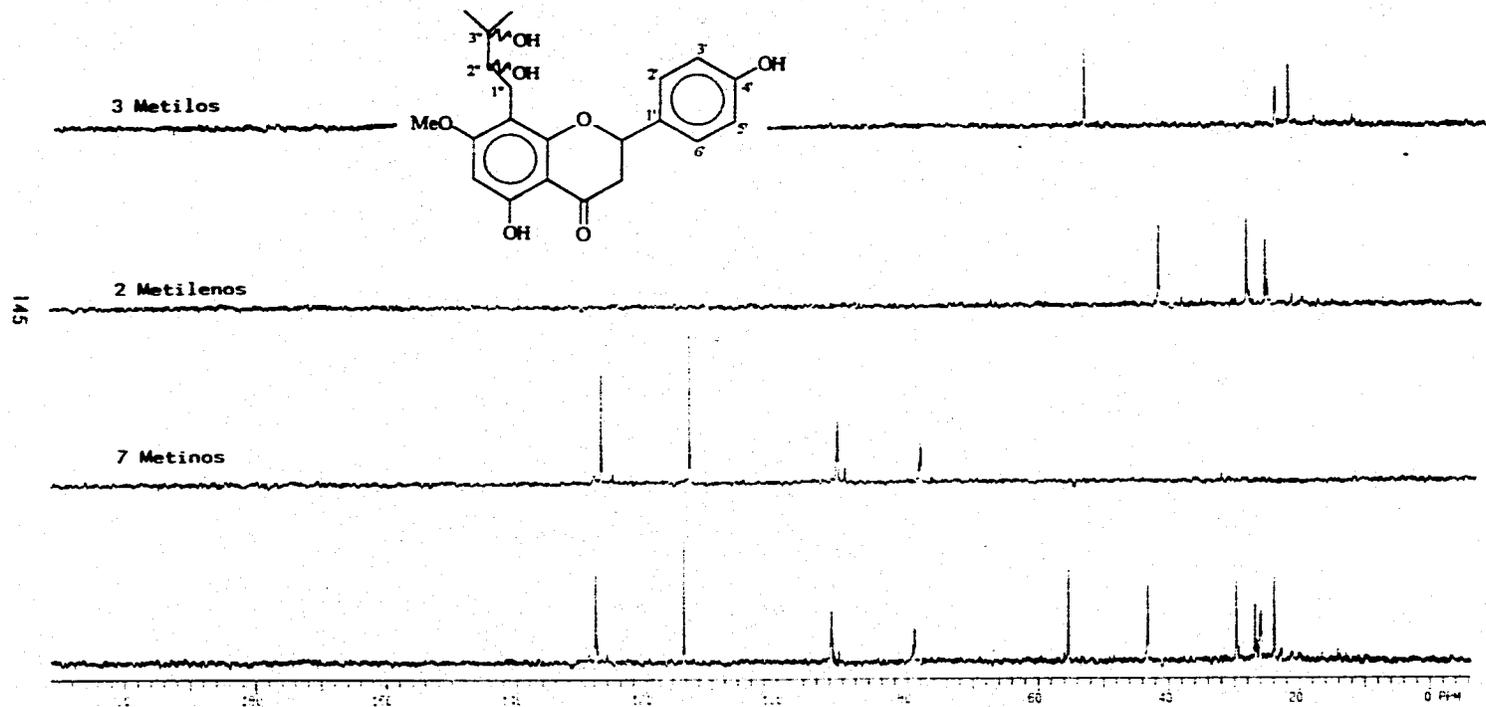
ESPECTRO 19. RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃, TMS) DE LA 5, 4'-DIHIDROXI-7-METOXI-8-(2'',3''-DIHIDROXI-3''-METILBUTIL)-FLAVANONA (Tabla VIII).



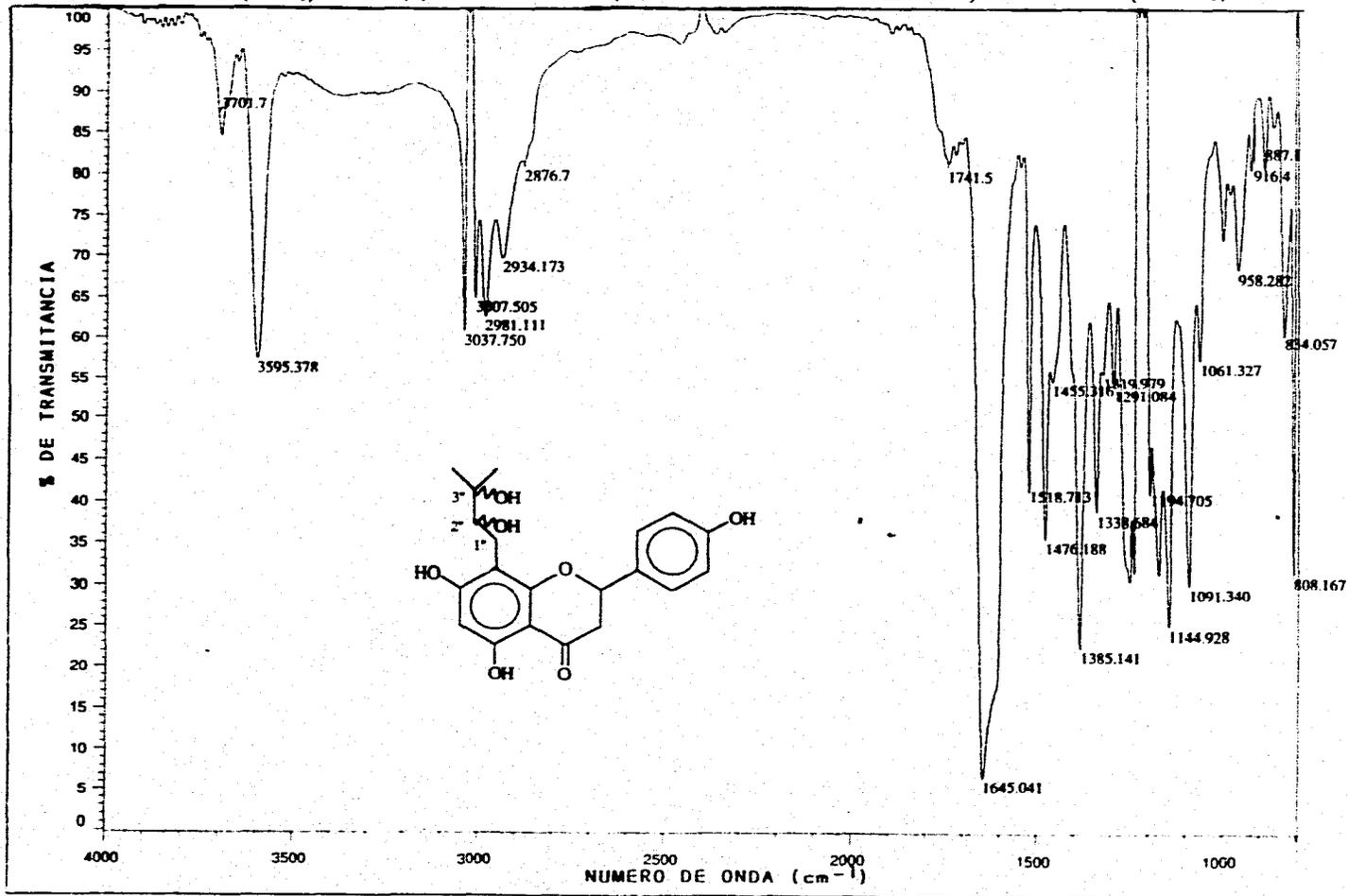
ESPECTRO 20. RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃, TMS) DE LA 5, 4'-DIHIDROXI-7-METOXI-8-(2'',3''-DIHIDROXI-3''-METILBUTIL)-
FLAVANONA (Tabla IX).



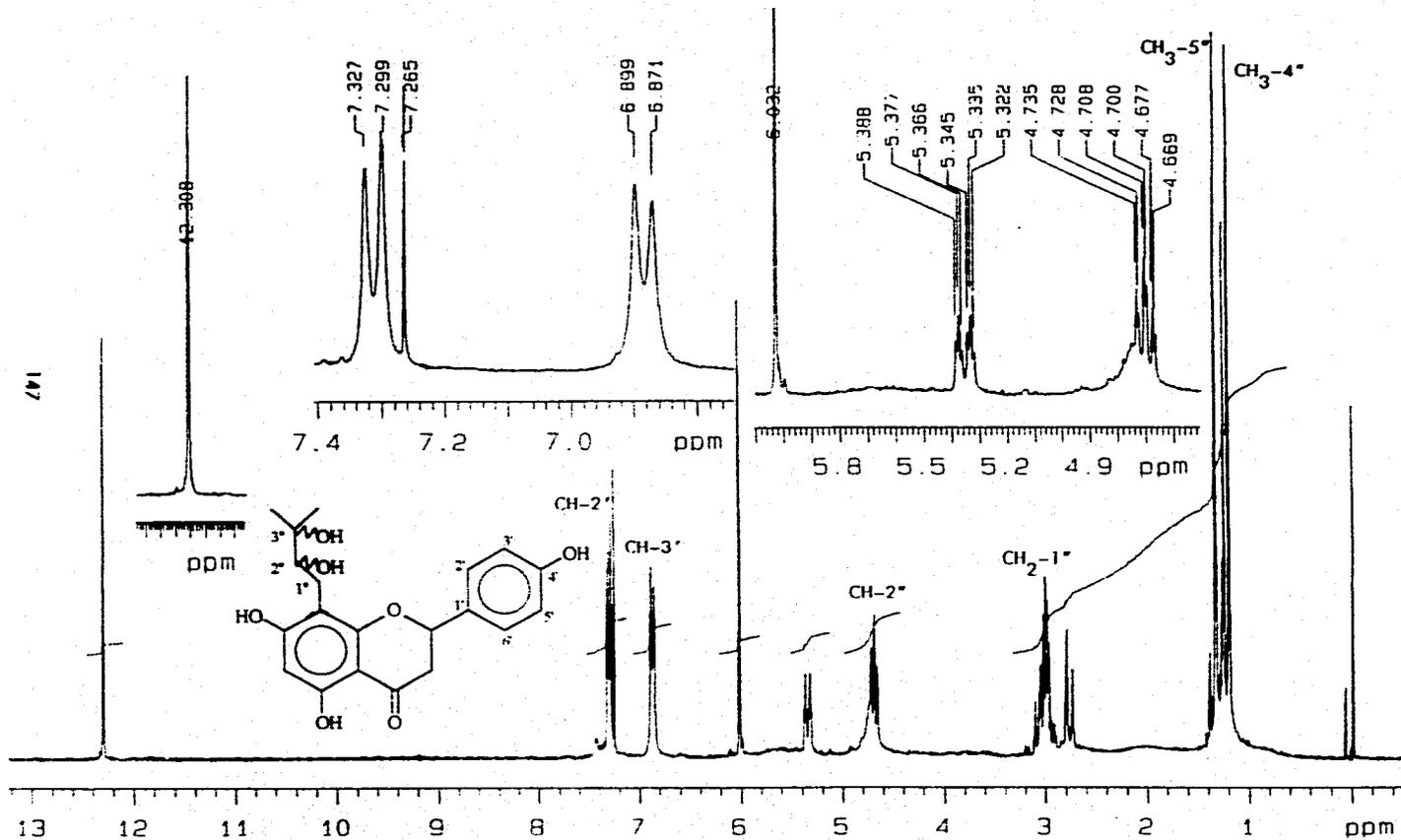
ESPECTRO 20a. RMN-¹³C, TECNICA DEPT (75 MHz, CDCl₃, TMS) DE LA 5,4'-DIHIDROXI-7-METOXI-8-(2'',3''-DIHIDROXI-3''-METILBUTIL)-FLAVANONA .



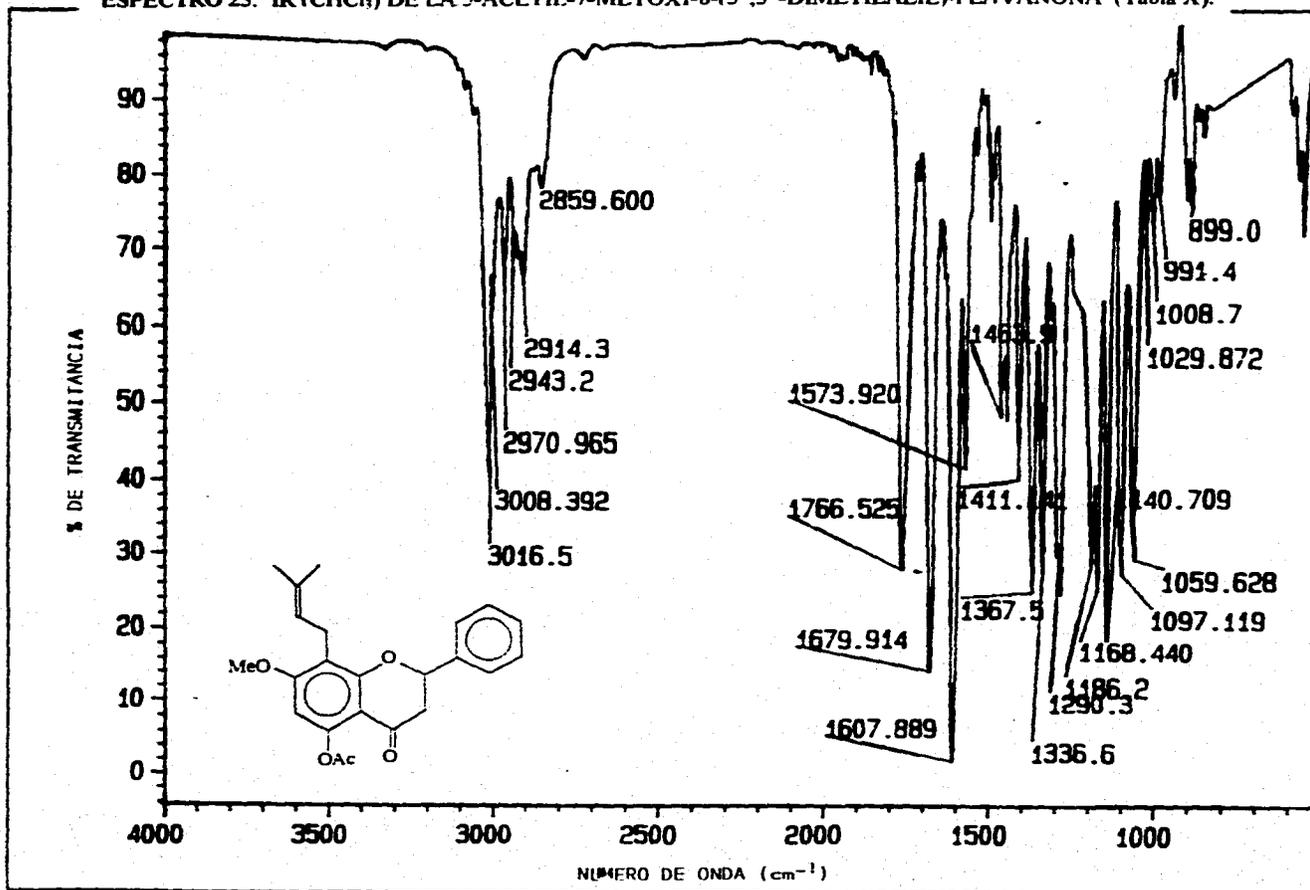
ESPECTRO 21. IR (CHCl₃) DE LA 5,7,4'-TRIHIDROXI-8-(2'',3''-DIHIDROXI-3''-METILBUTIL)-FLAVANONA (Tabla VI)



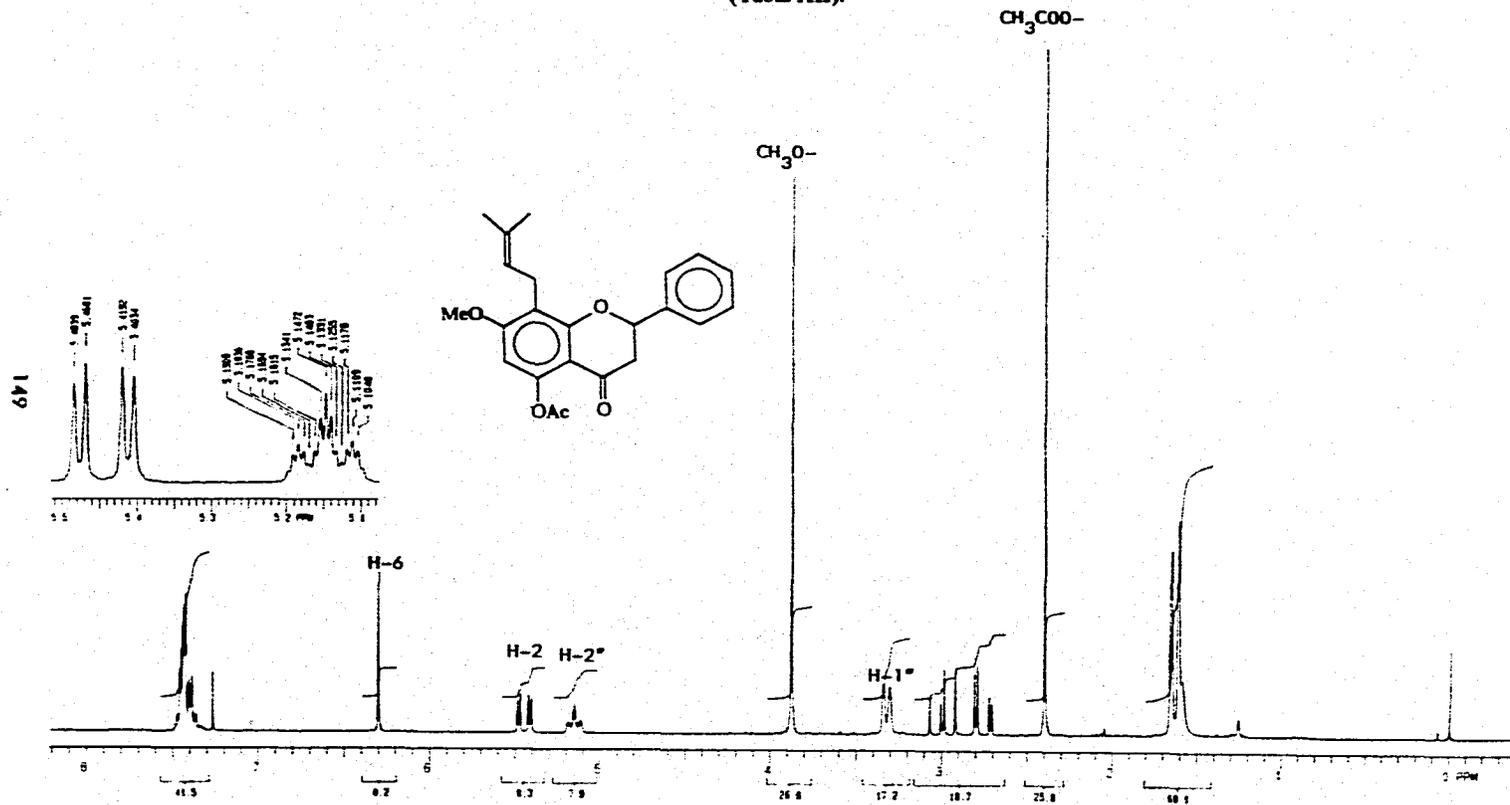
ESPECTRO 22. RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃, TMS) DE LA 5,7,4'-TRIHIDROXI-8-(2'',3''-DIHIDROXI-3''-METILBUTIL)-
FLAVANONA (Tabla VIII).



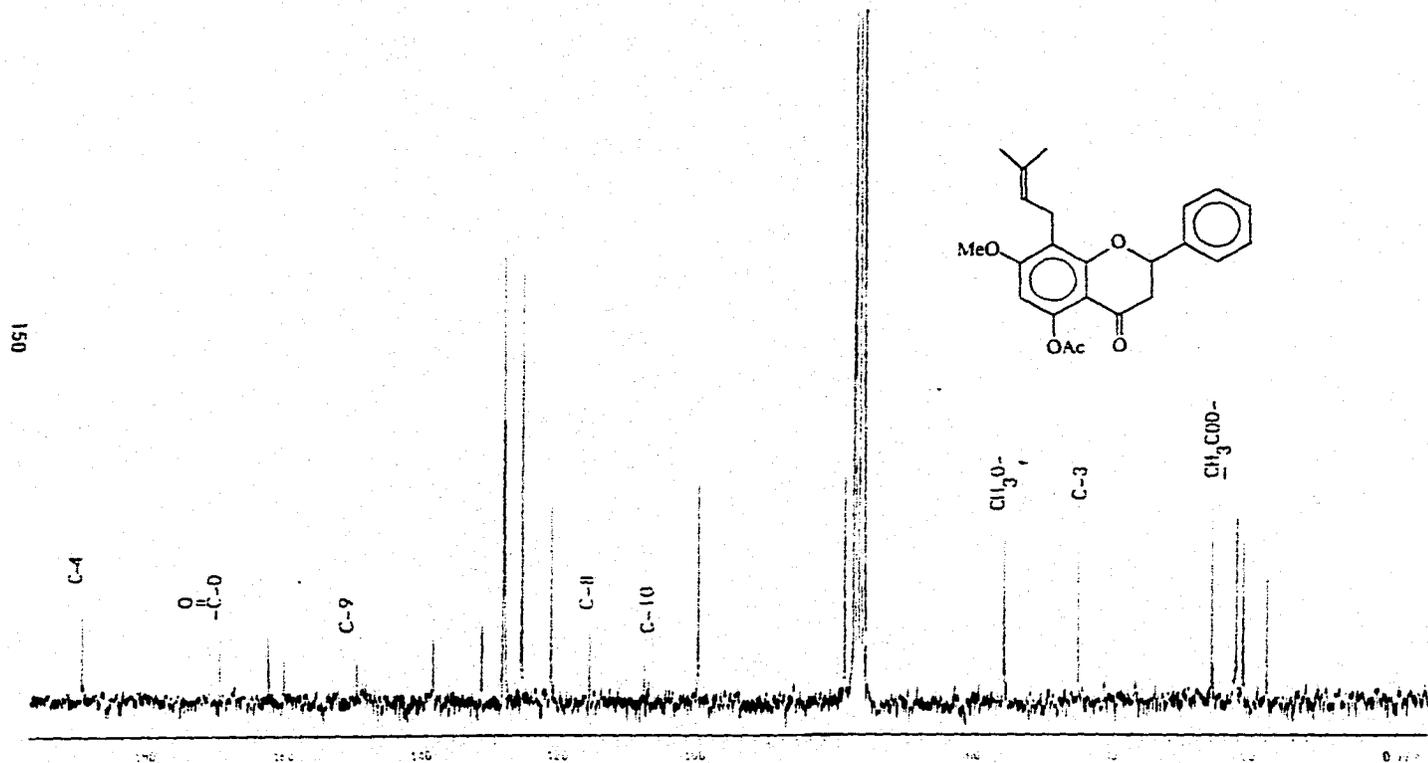
ESPECTRO 23. IR (CHCl₃) DE LA 5-ACETIL-7-METOXI-8-(3",3"-DIMETILALIL)-FLAVANONA (Tabla X).



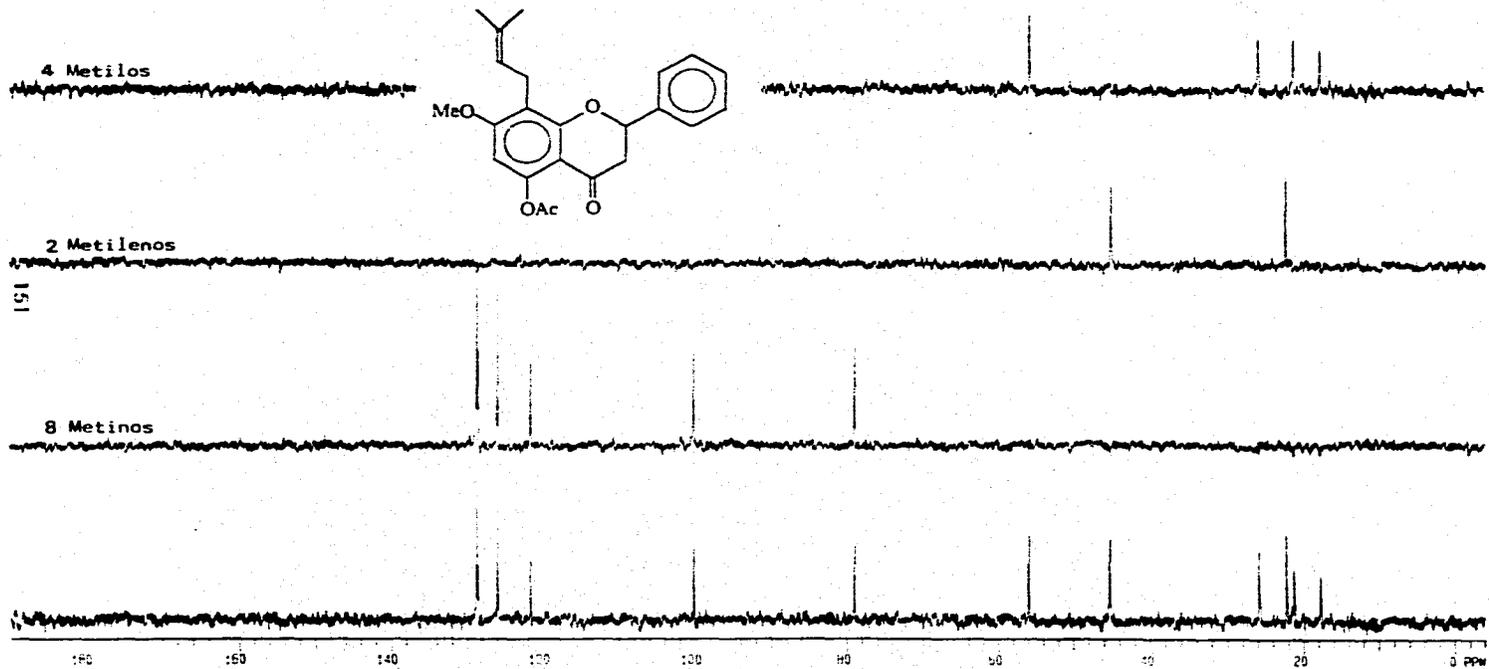
ESPECTRO 24. RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃, TMS) DE LA 5-ACETIL-7-METOXI-8-(3'',3''-DIMETILALIL)-FLAVANONA
(Tabla XII).



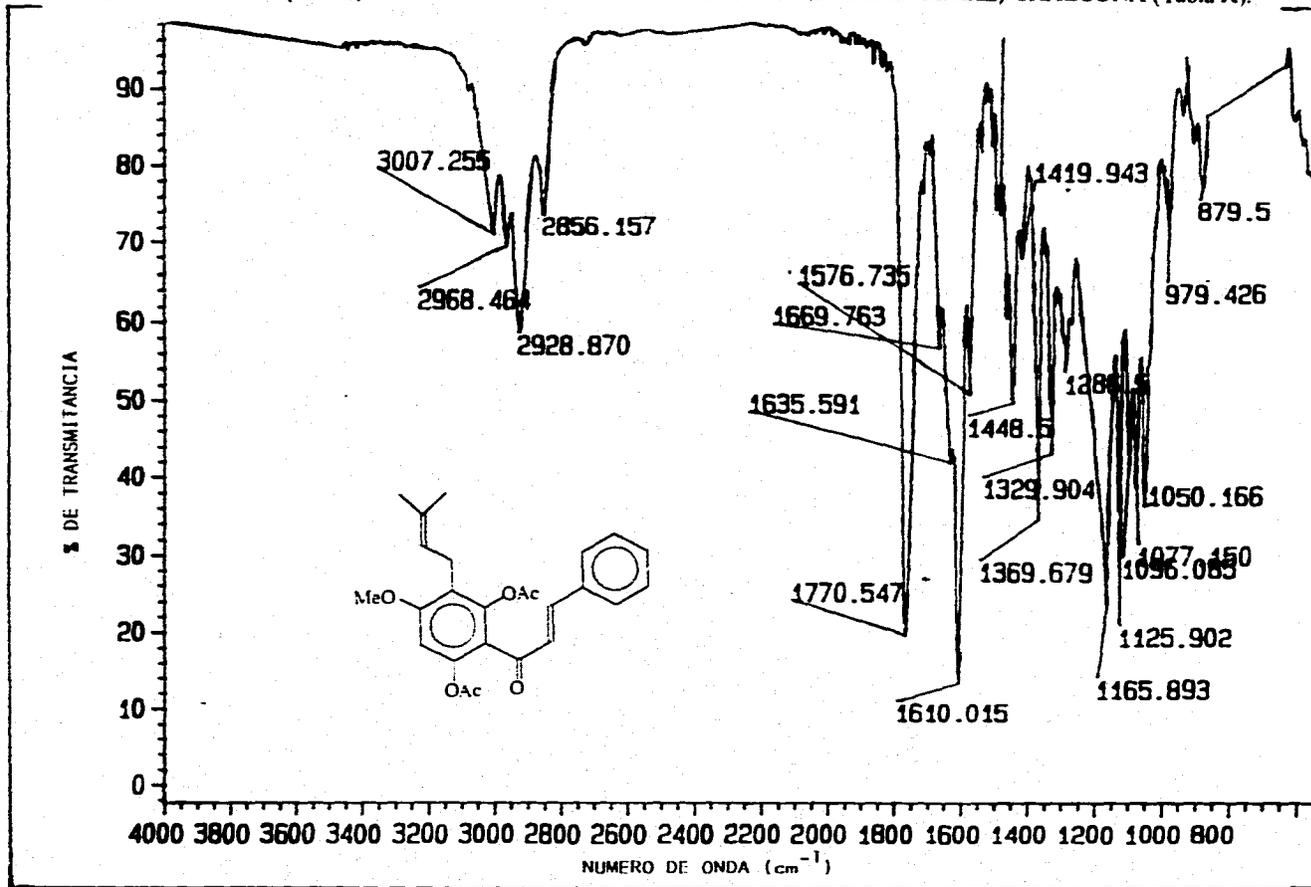
ESPECTRO 25. RMN-¹³C (50 MHz, CDCl₃, TMS) DE LA 5-ACETIL-7-METOXI-8-(3",3"-DIMETILALIL)-FLAVANONA
(Tabla XIII).



ESPECTRO 25a. RMN-¹³C, TECNICA DEPT (50 MHz, CDCl₃, TMS) DE LA 5-ACETIL-7-METOXI-8-(3'',3''-DIMETILALIL)-FLAVANONA.

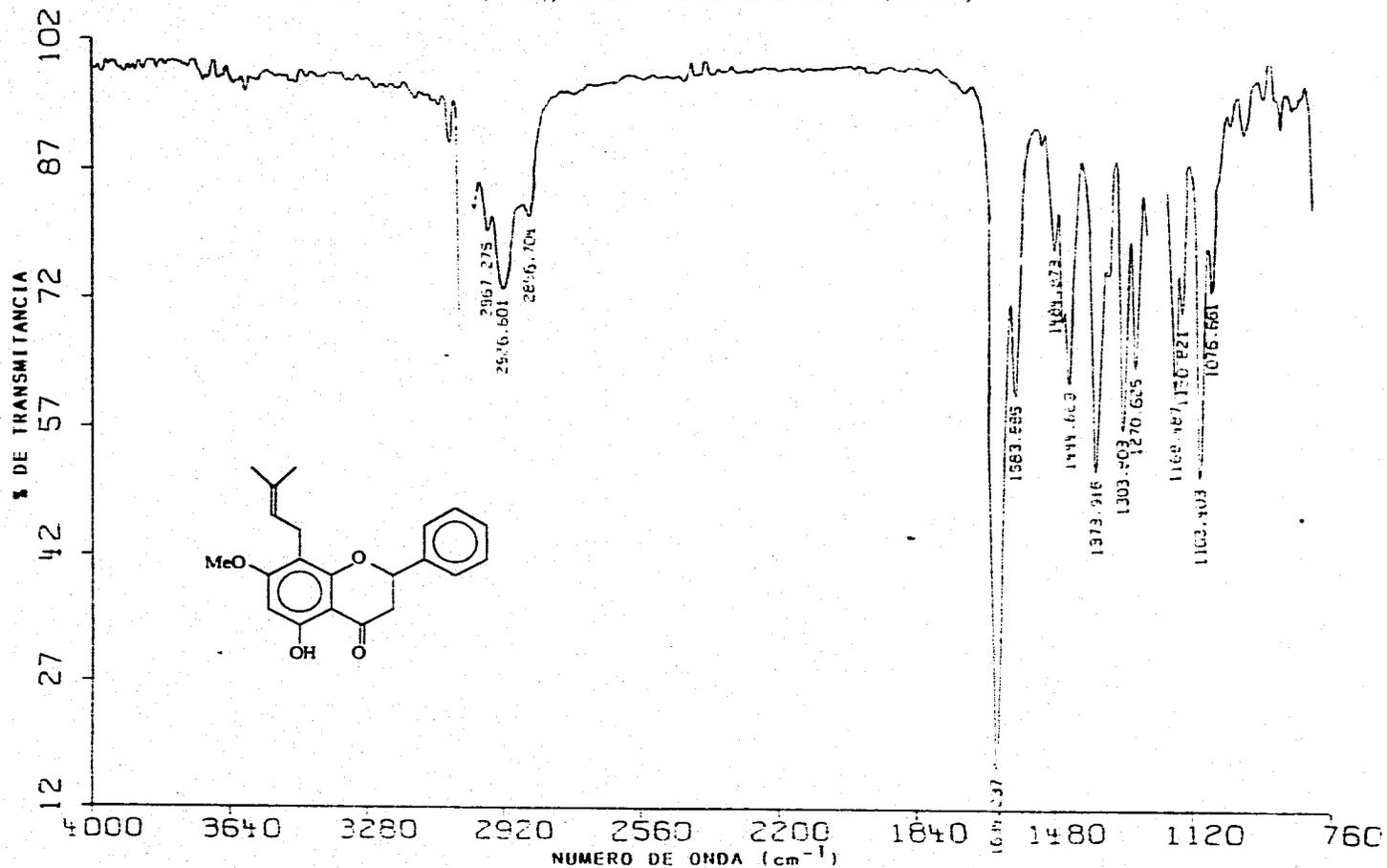


ESPECTRO 26. IR (CHCl₃) DE LA 2'.6'-DIACETIL-4'-METOXI-3'-(3",3"-DIMETILALIL)-CHALCONA (Tabla X).

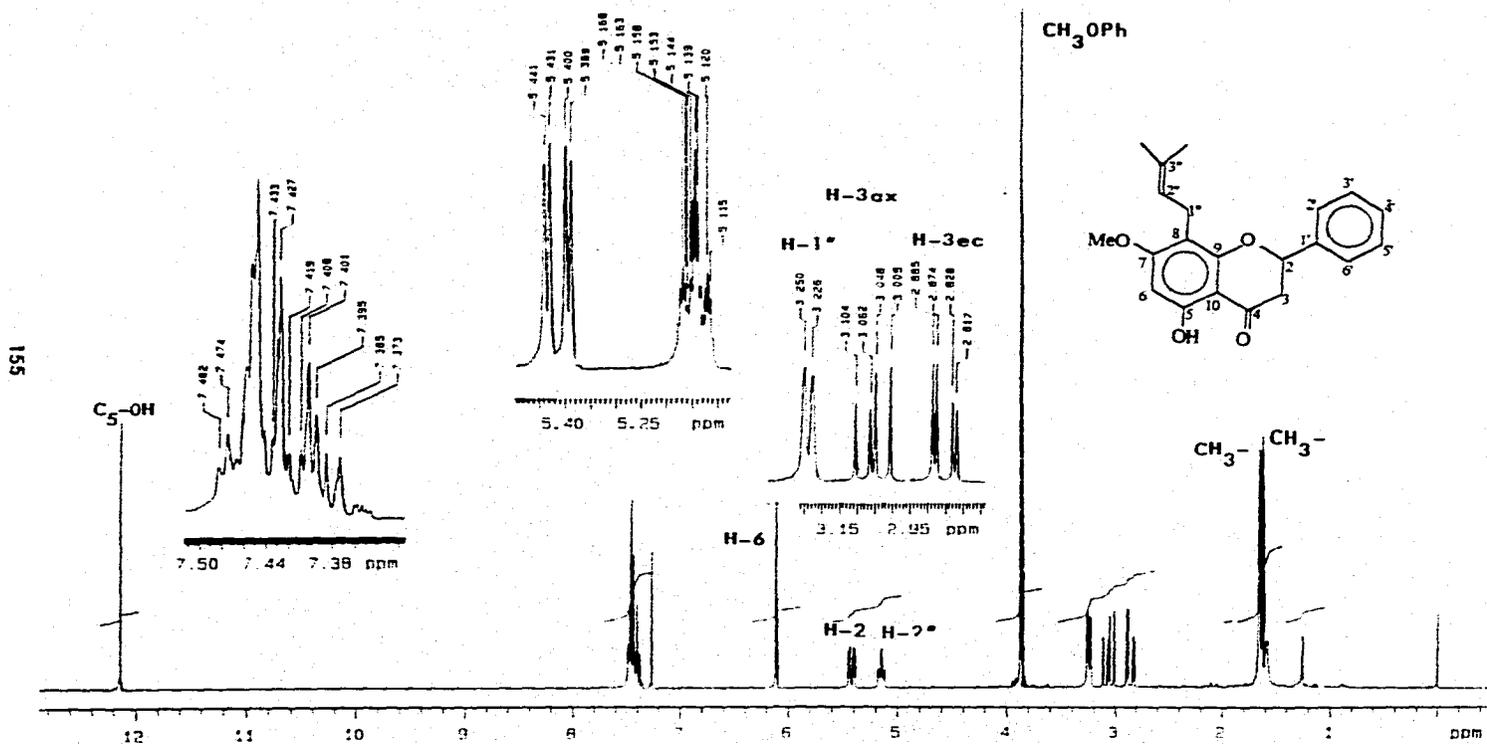


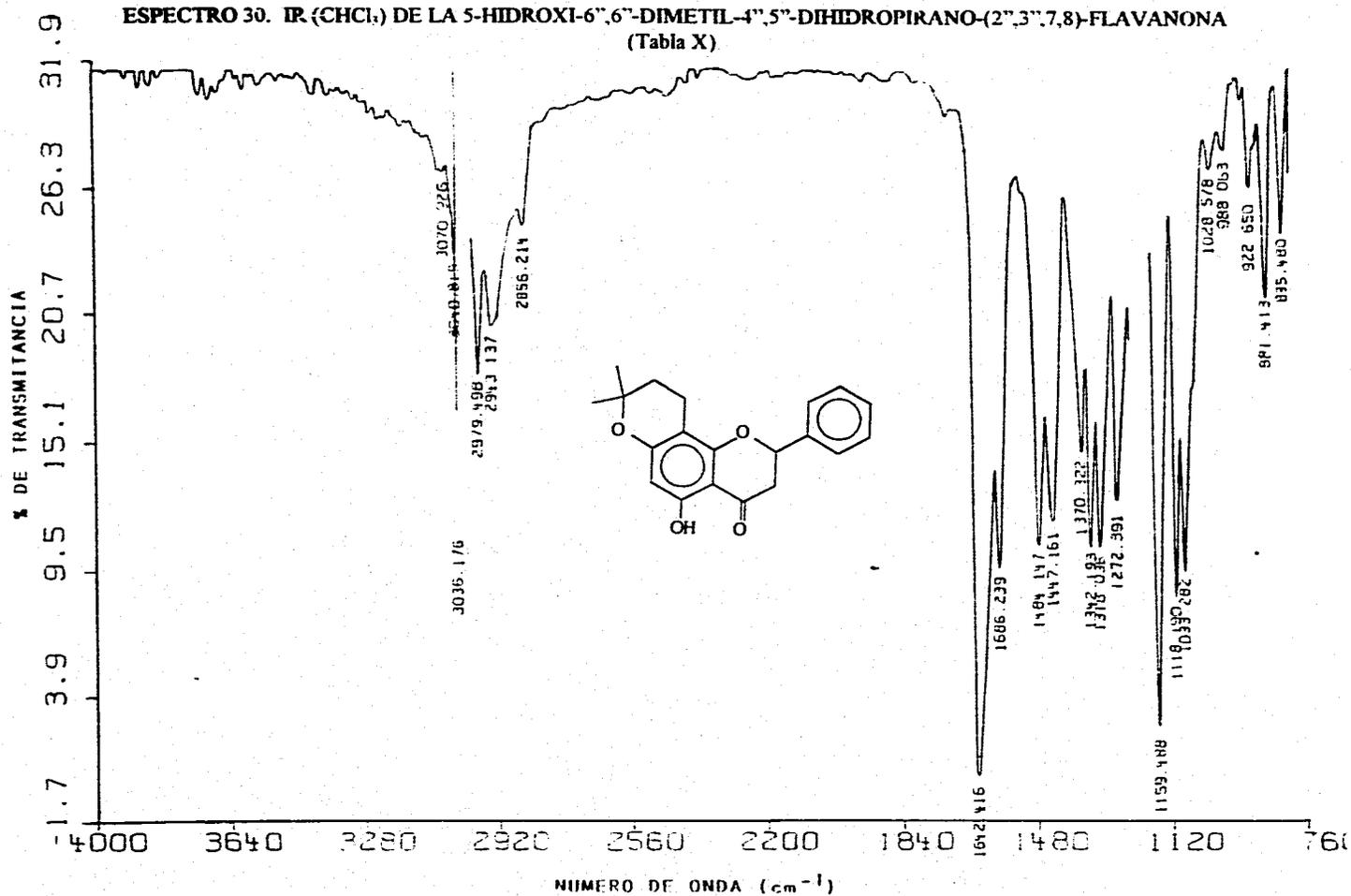
ESPECTRO 28. IR (CHCl₃) DE LA 7-METILGLABRANINA (Tabla X).

154

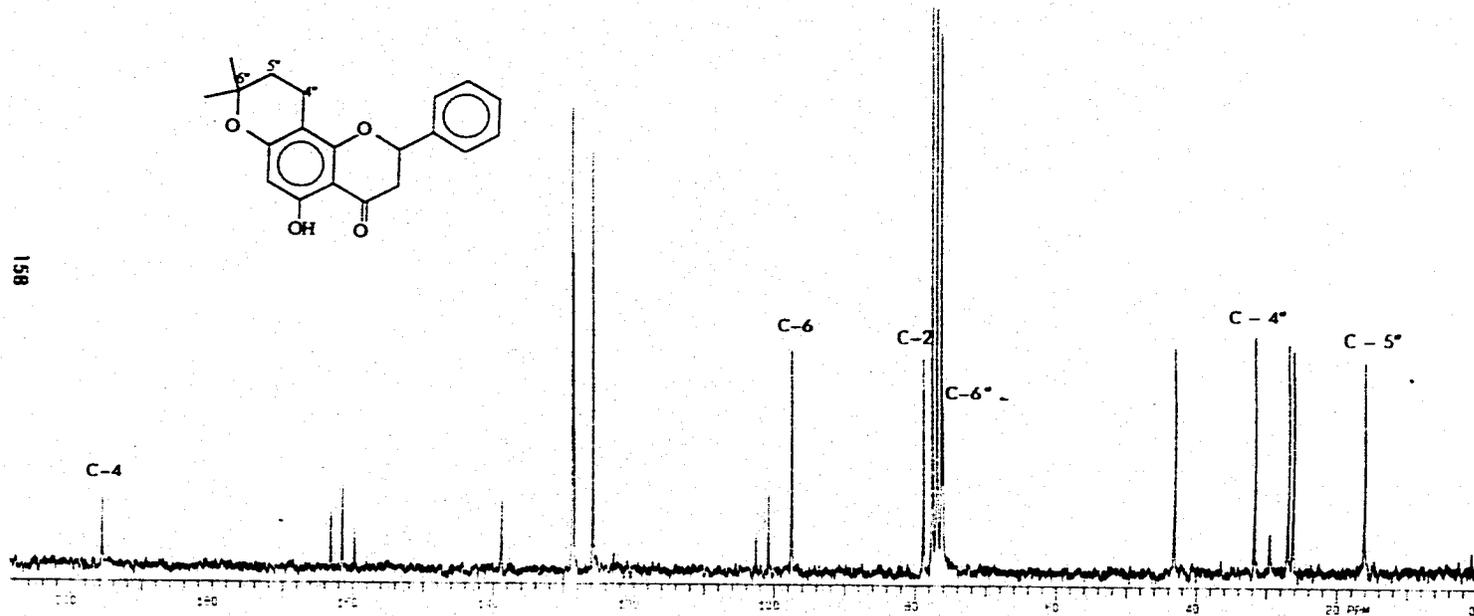


ESPECTRO 29. RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃, TMS) DE LA 7-METILGLABRANINA (Tabla XII).

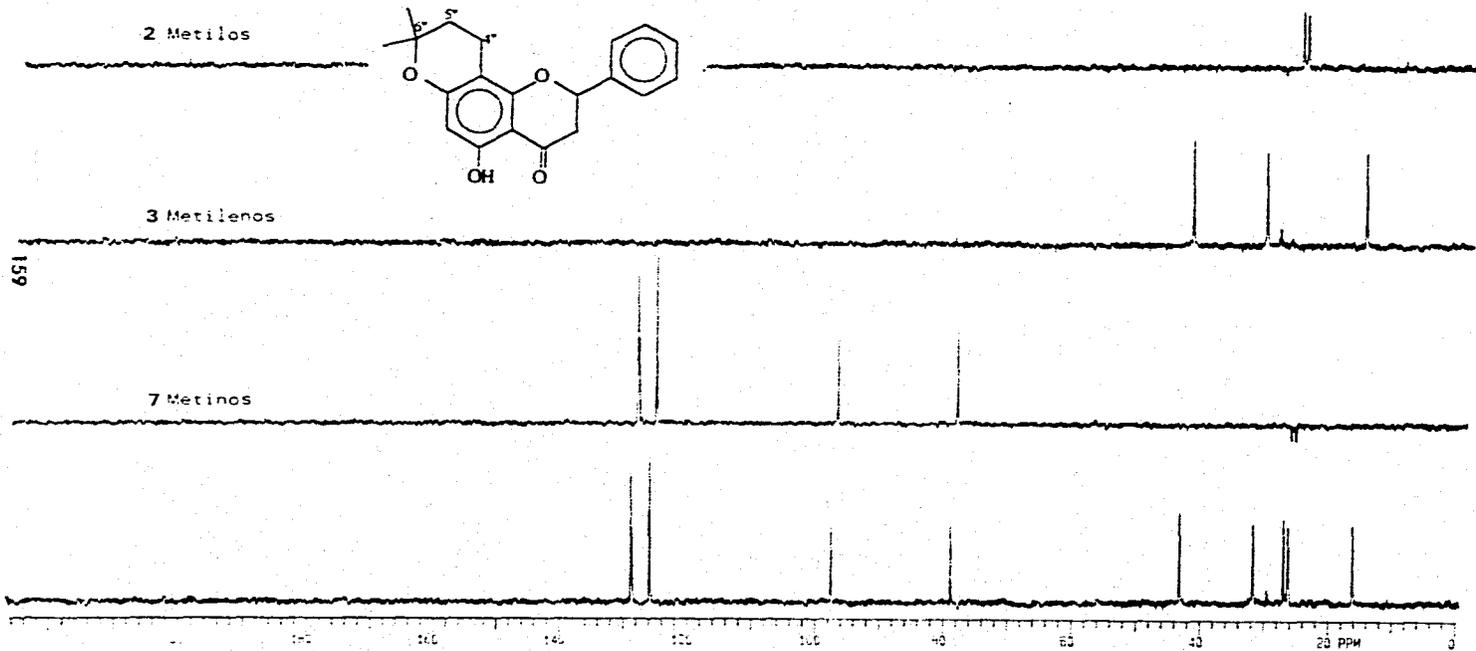


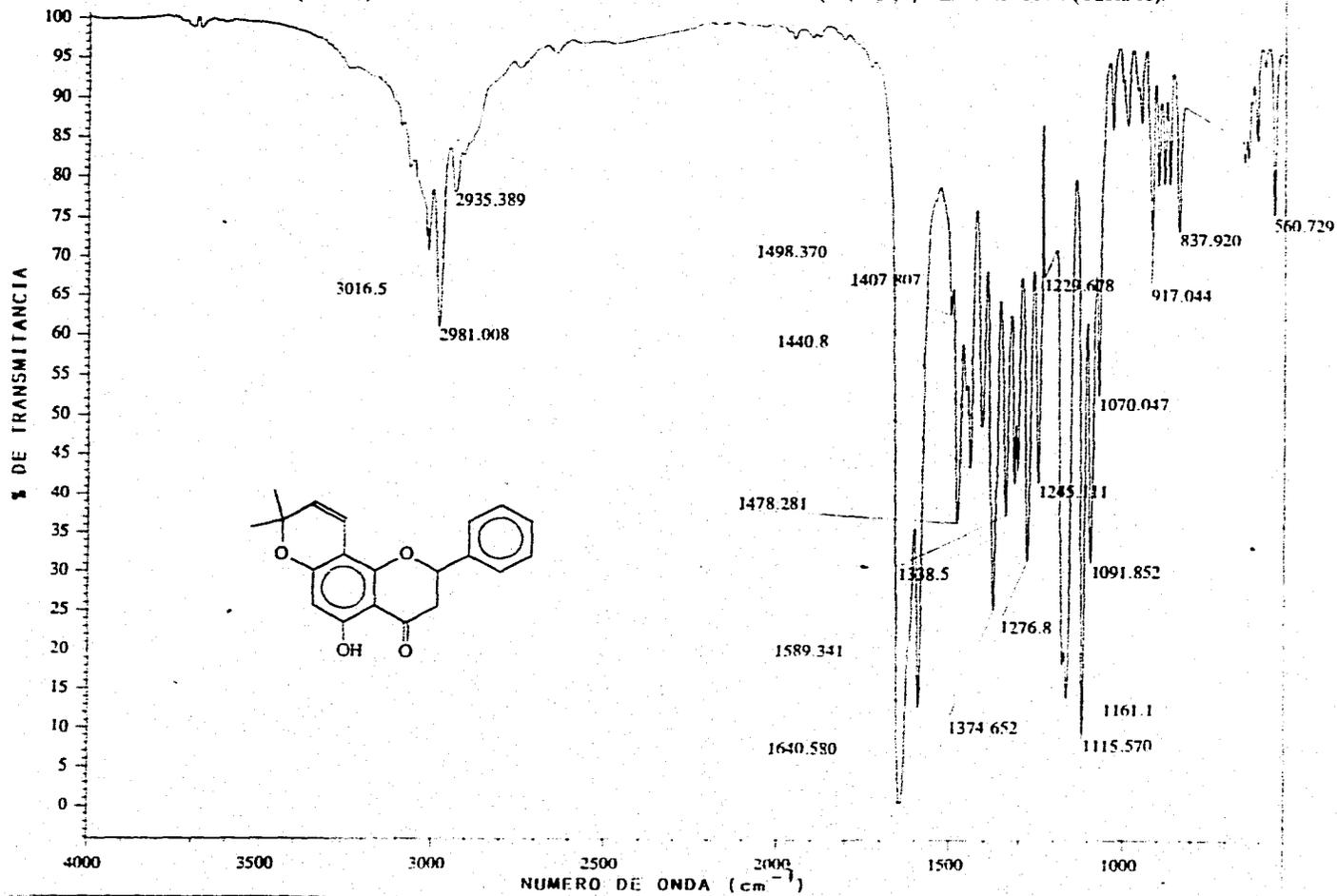


ESPECTRO 32. RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃, TMS) DE LA 5-HIDROXI-6",6"-DIMETIL-4",5"-DIHIDROPIRANO-(2",3",7,8)-
FLAVANONA (Tabla XIII).

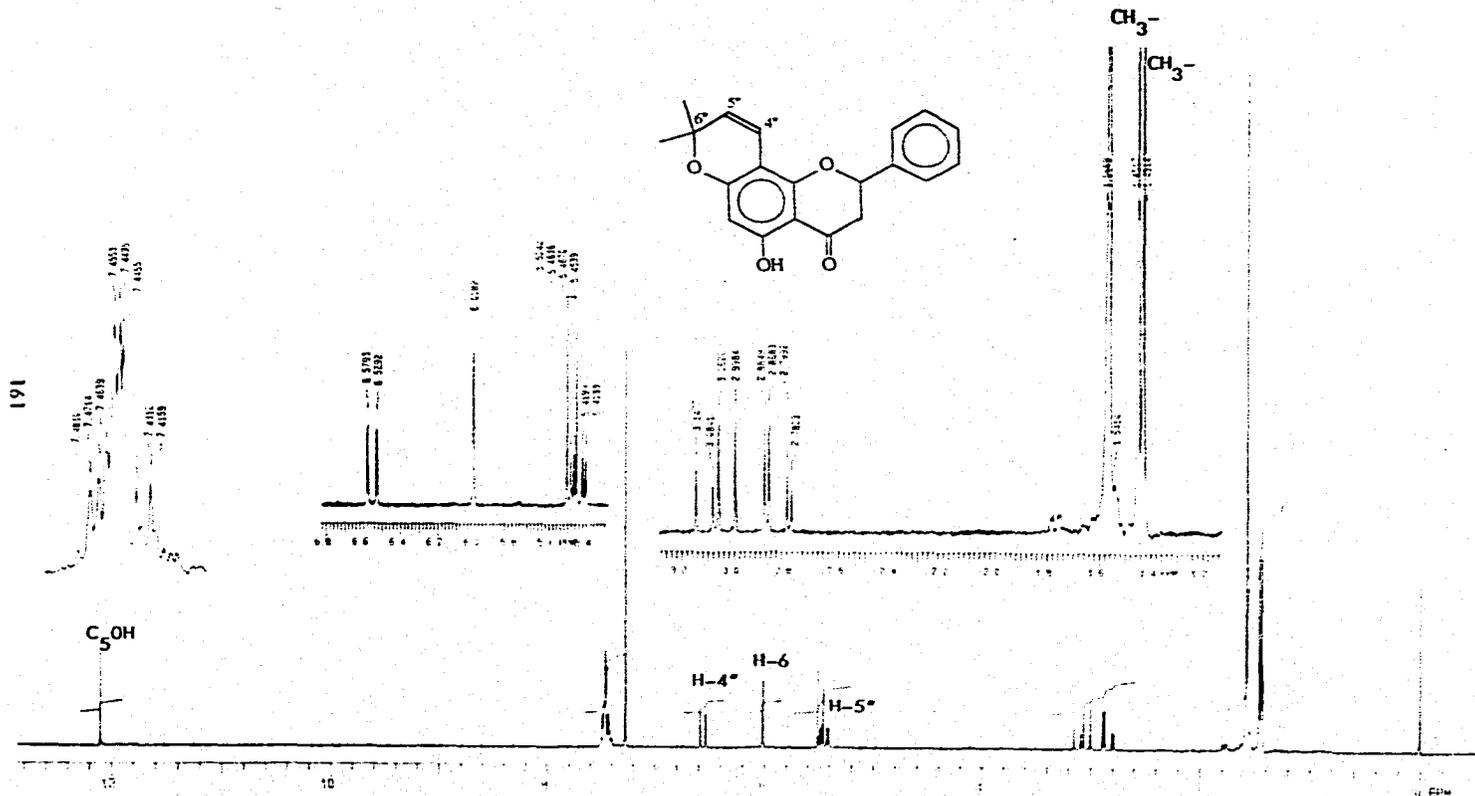


ESPECTRO 32a. RMN-¹³C, TECNICA DEPT (75 MHz, CDCl₃, TMS) DE LA 5-HIDROXI-6''-6''-DIMETIL-4'',5''-DIHIDROPIRANO-(2'',3'',7,8)-FLAVANONA.

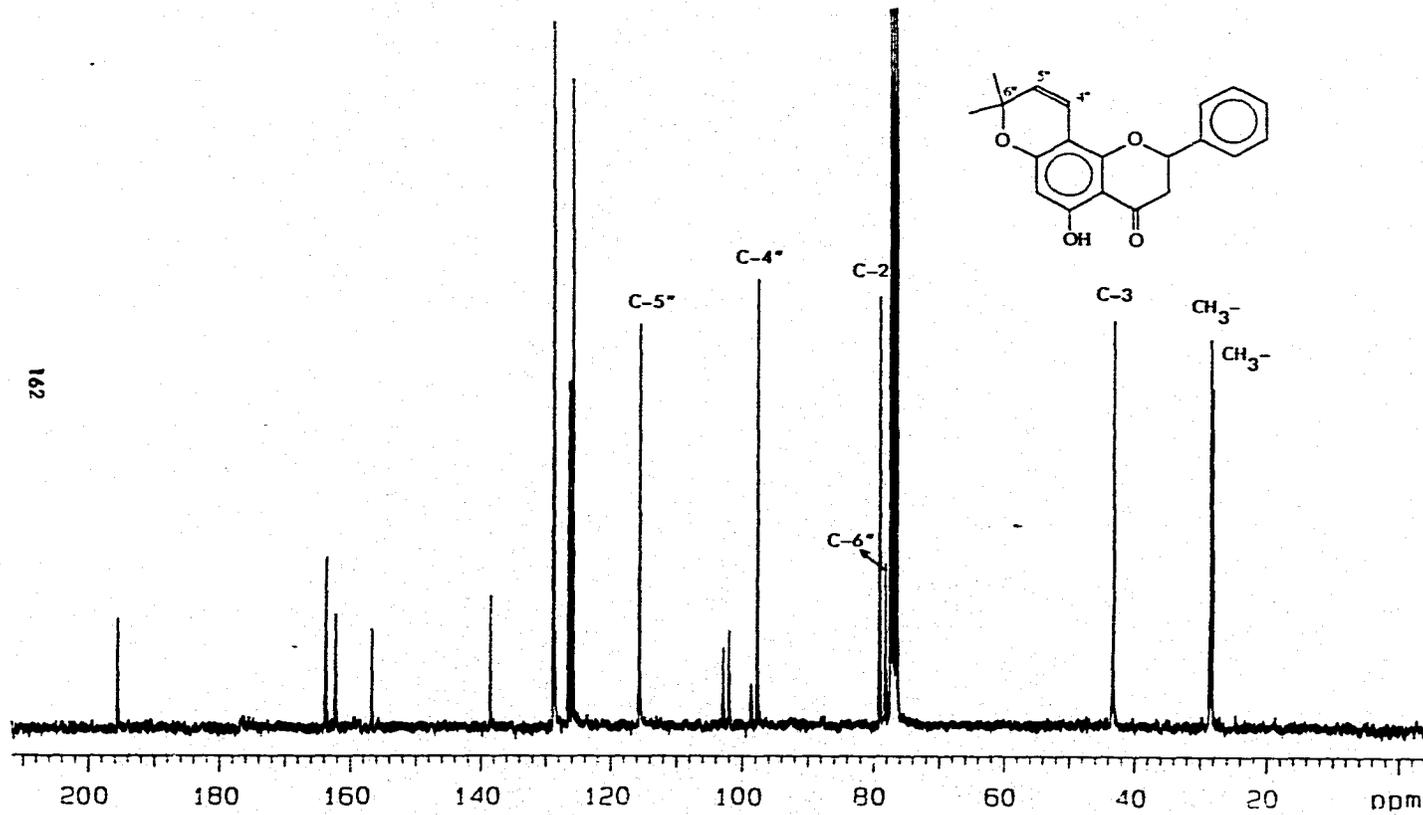


ESPECTRO 33. IR (CHCl₃) DE LA 5-HIDROXI-6"-6"-DIMETILPIRANO-(2"-3"-7,8)-FLAVANONA (Tabla X).

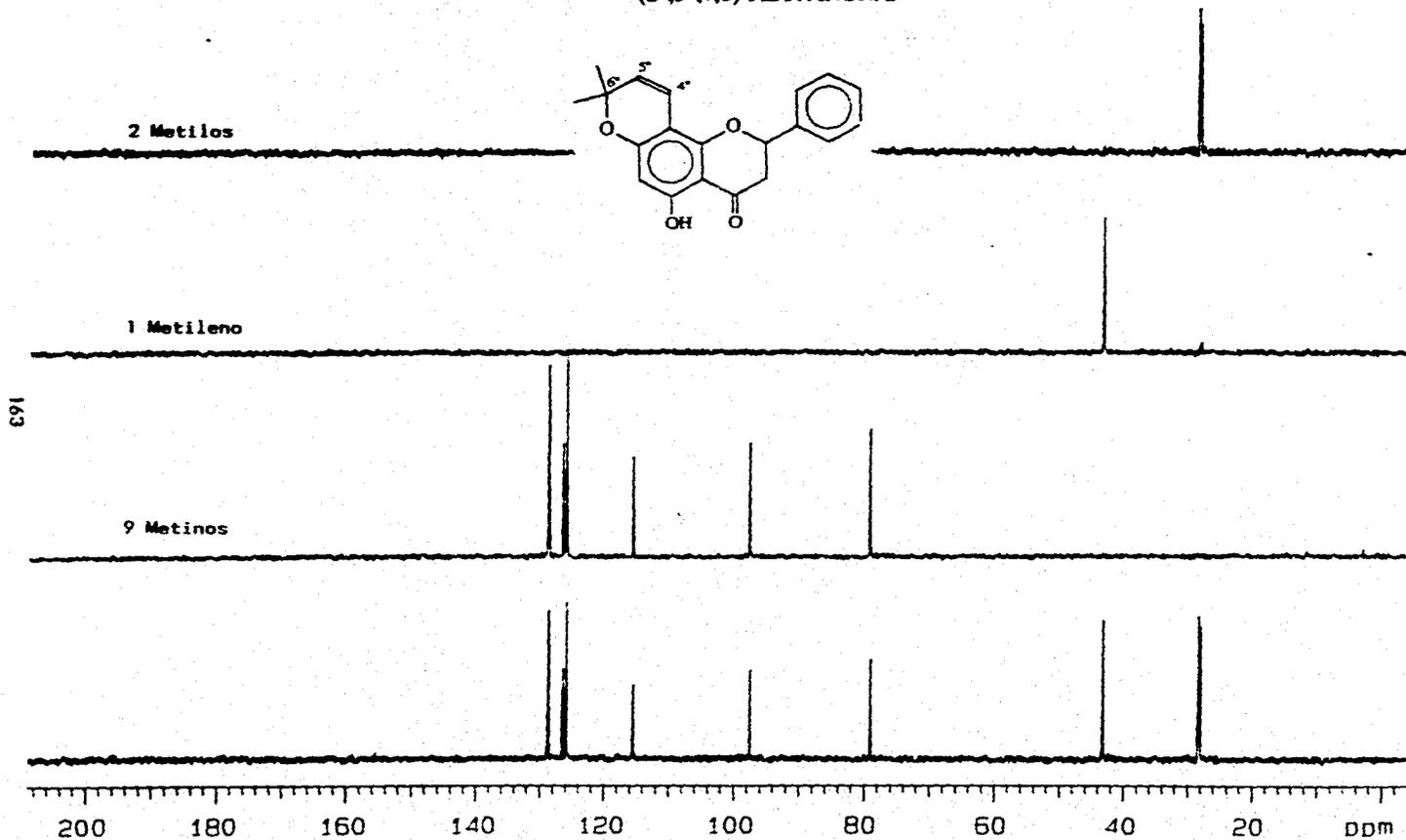
ESPECTRO 34. RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃, TMS) DE LA 5-HIDROXI-6'',6''-DIMETILPIRANO-(2'',3'',7,8)-FLAVANONA (Tabla XII).

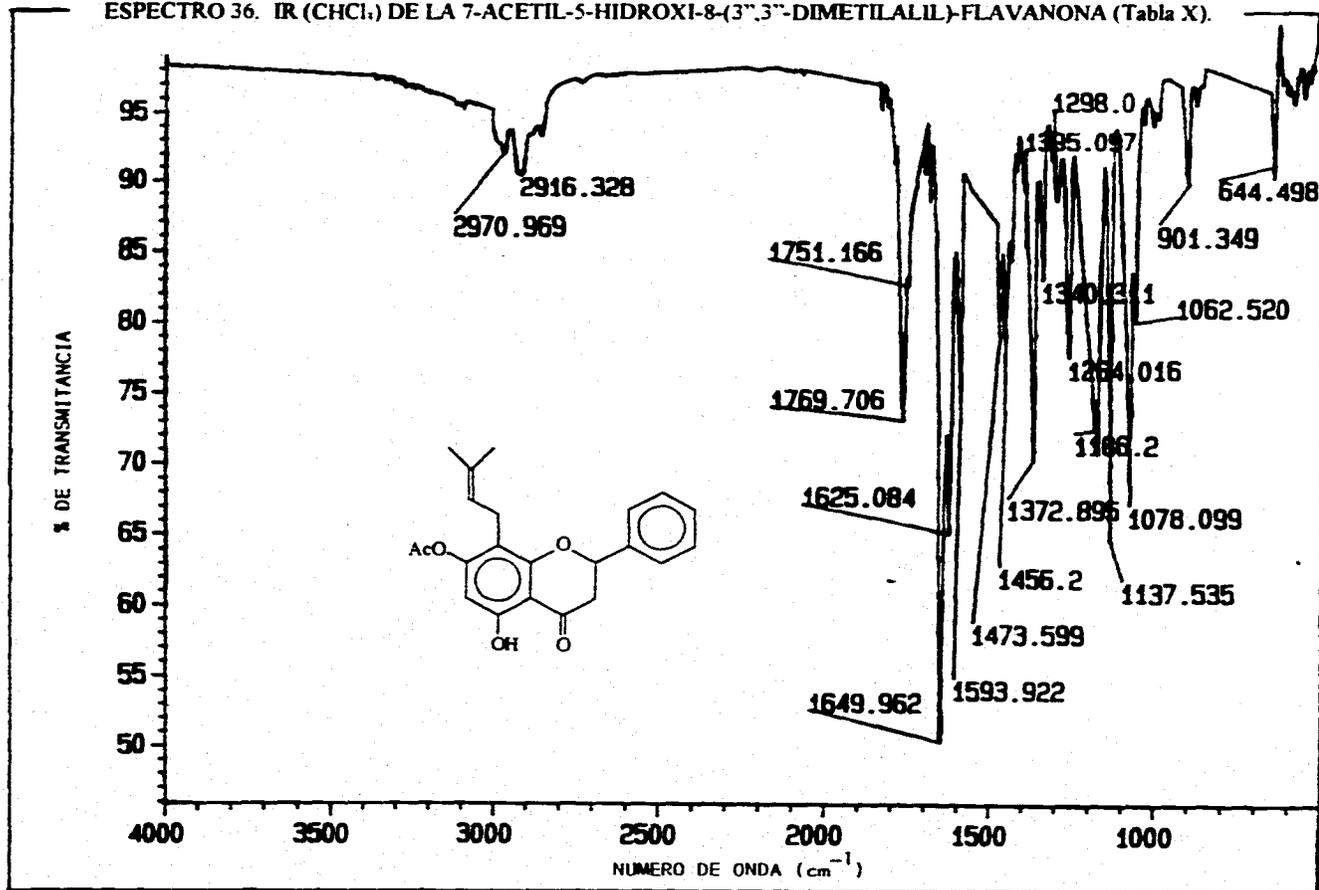


ESPECTRO 35. RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃, TMS) DE LA 5-HIDROXI-6'',6''-DIMETILPIRANO-(2'',3'',7,8)-FLAVANONA (Tabla XIII).

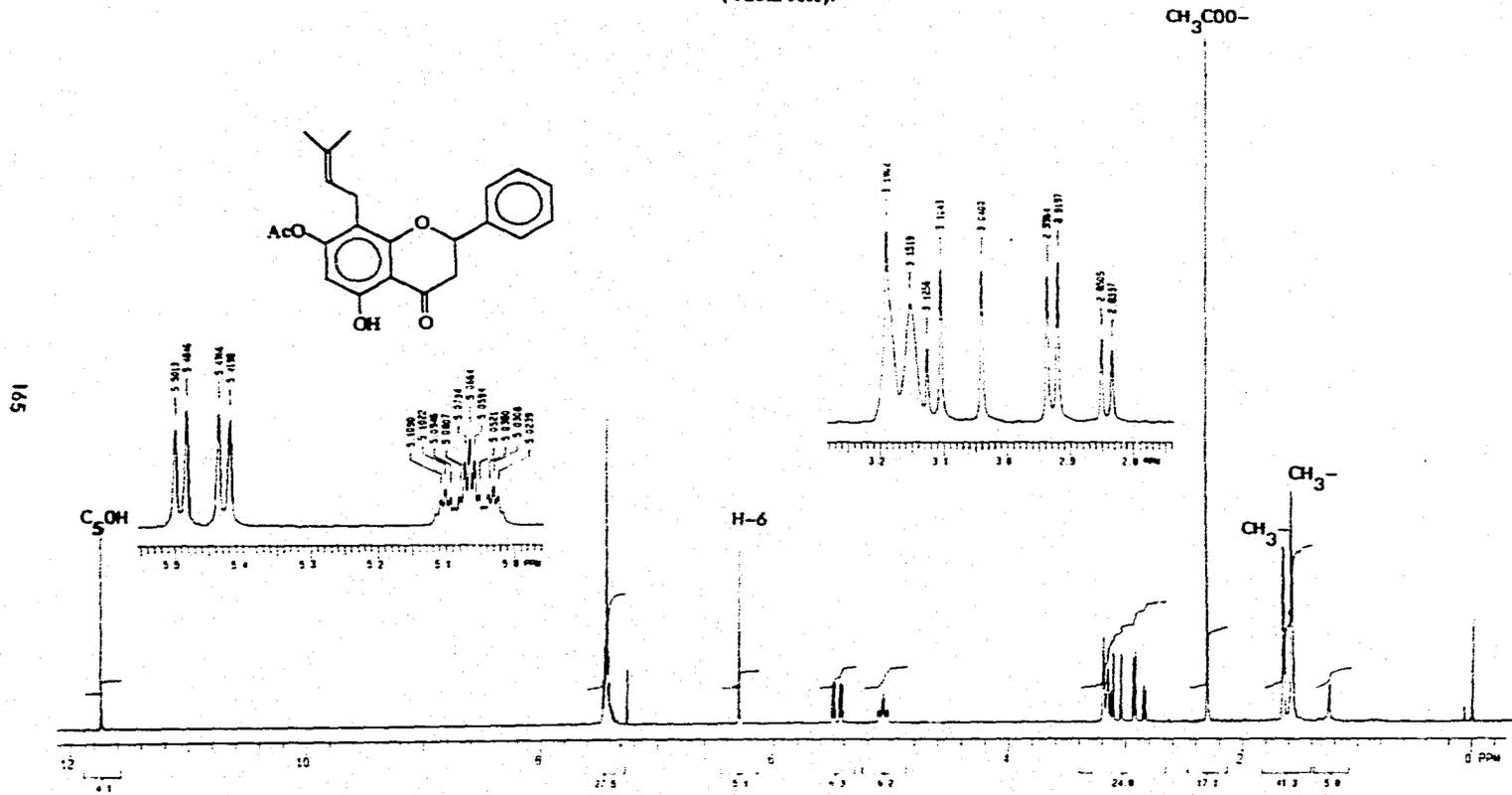


ESPECTRO 35a. RMN-¹³C, TECNICA DEPT (75 MHz, CDCl₃, TMS) DE LA 5-HIDROXI-6",6"-DIMETILPIRANO-(2",3",7,8)-FLAVANONA.

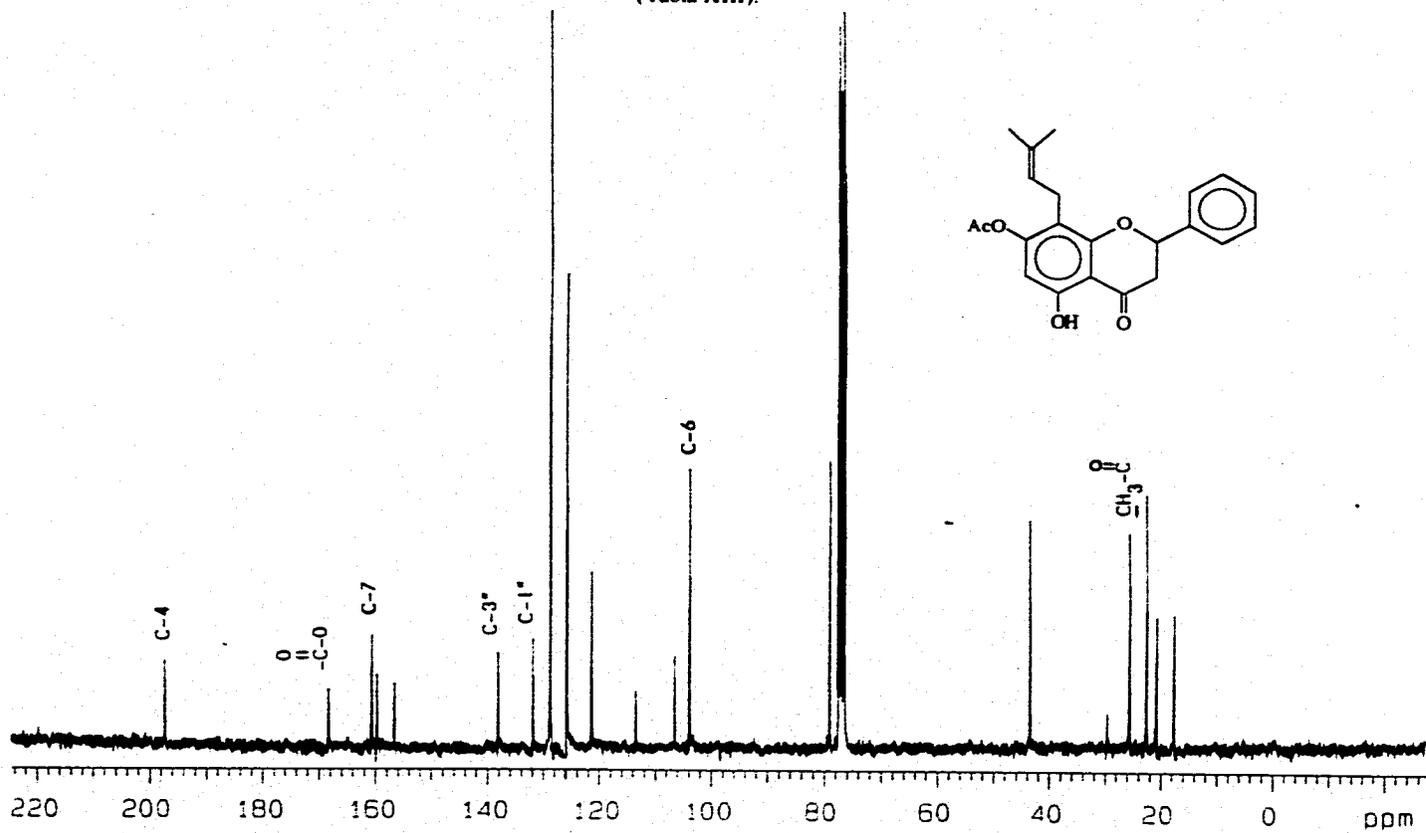


ESPECTRO 36. IR (CHCl₃) DE LA 7-ACETIL-5-HIDROXI-8-(3",3"-DIMETILALIL)-FLAVANONA (Tabla X).

ESPECTRO 37. RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃, TMS) DE LA 7-ACETIL-5-HIDROXI-8-(3'',3''-DIMETILALIL)-FLAVANONA (Tabla XII).

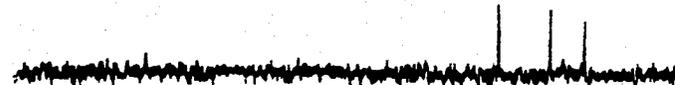
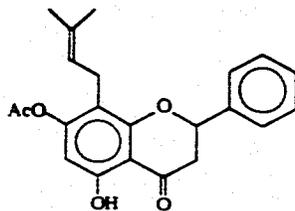


ESPECTRO 38. RMN-¹³C (75 MHz CDCl₃, TMS) DE LA 7-ACETIL-5-HIDROXI-8-(3'',3''-DIMETILALIL)-FLAVANONA
(Tabla XIII).

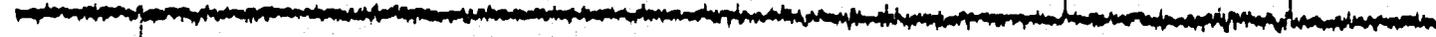


ESPECTRO 38a. RMN-¹³C, TECNICA DEPT (75 MHz, CDCl₃, TMS) DE LA 7-ACETIL-5-HIDROXI-8-(3",3"-DIMETILALIL)-FLAVANONA.

3 Metilos



2 Metilenos



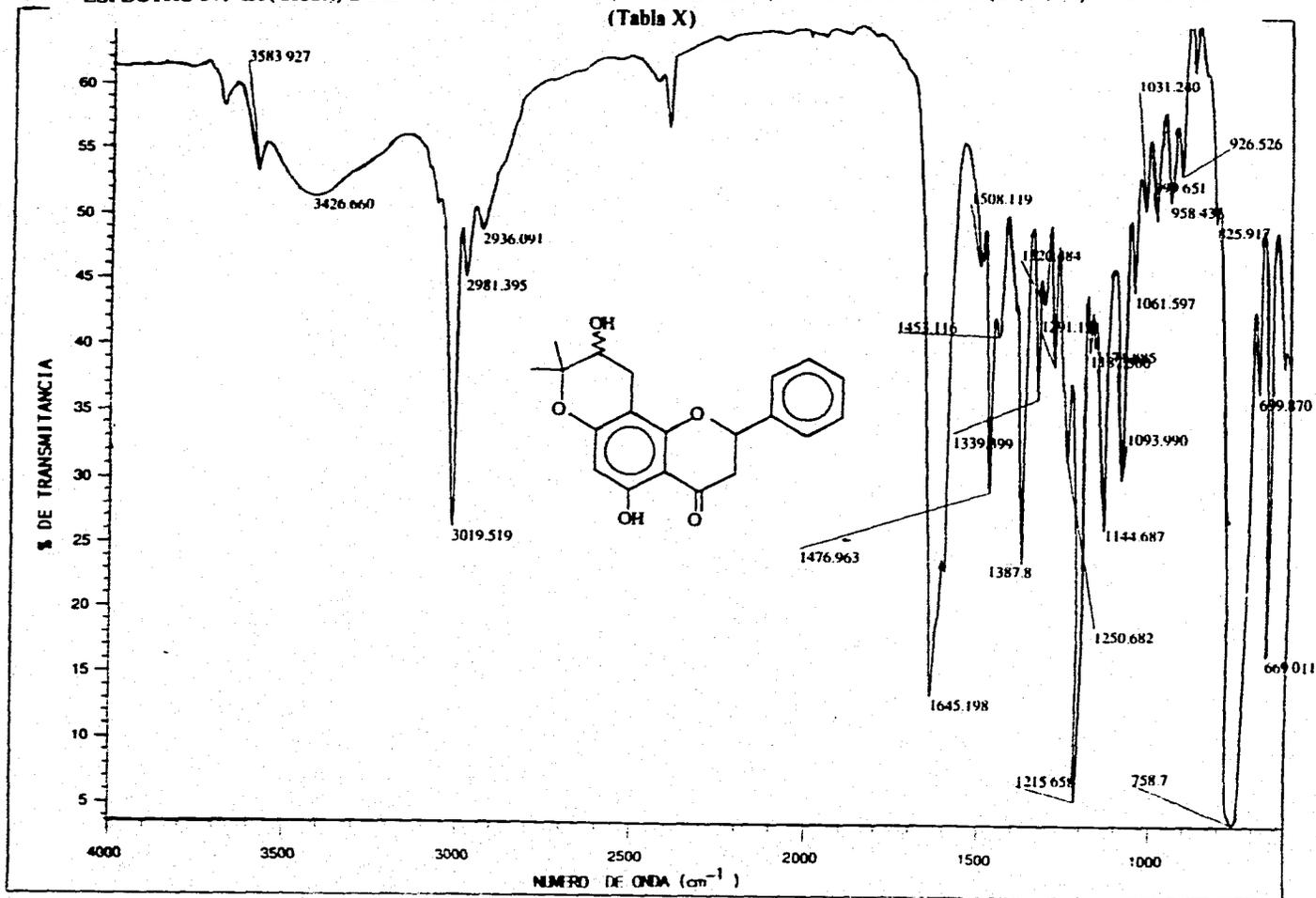
8 Metinos



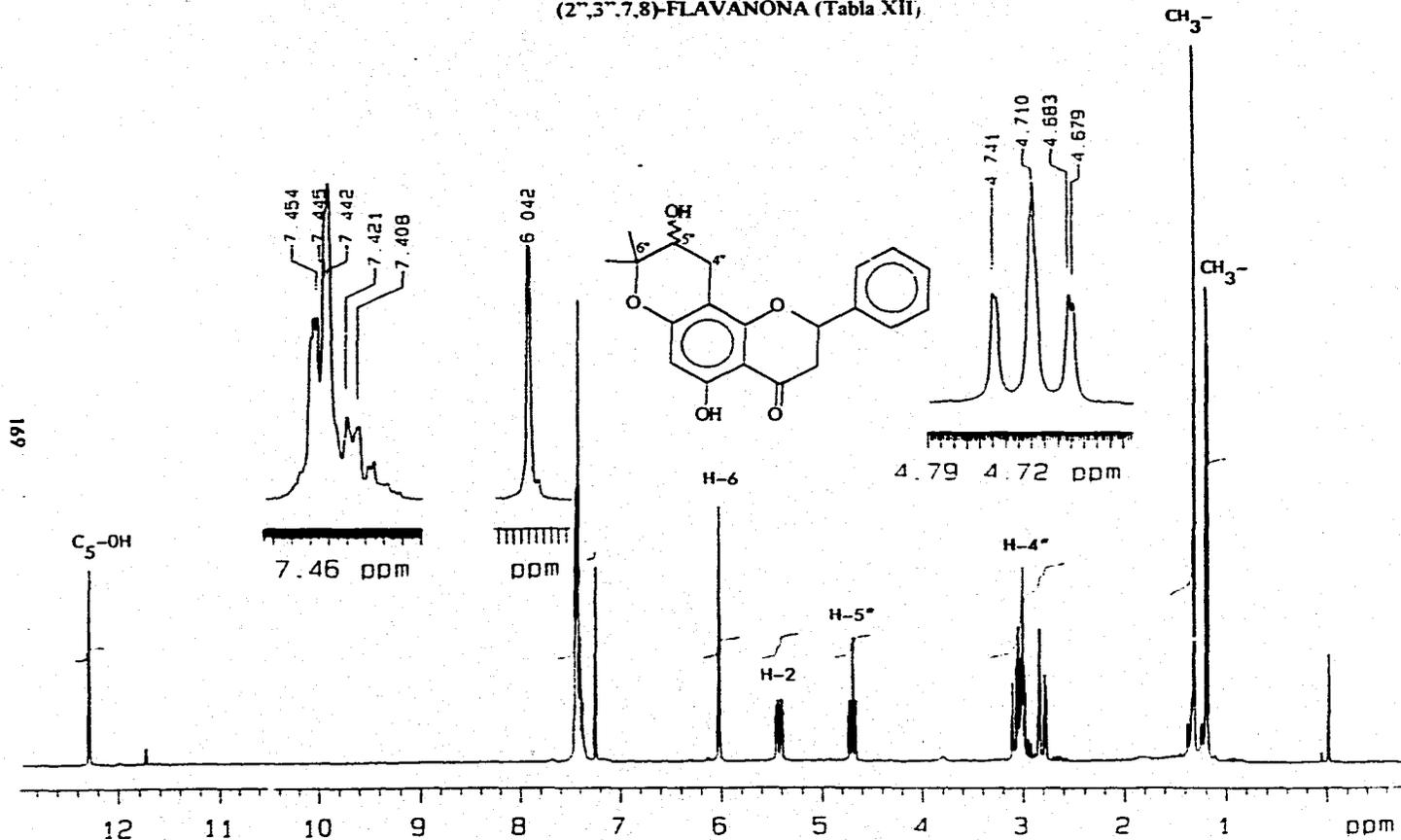
167

130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20 ppm

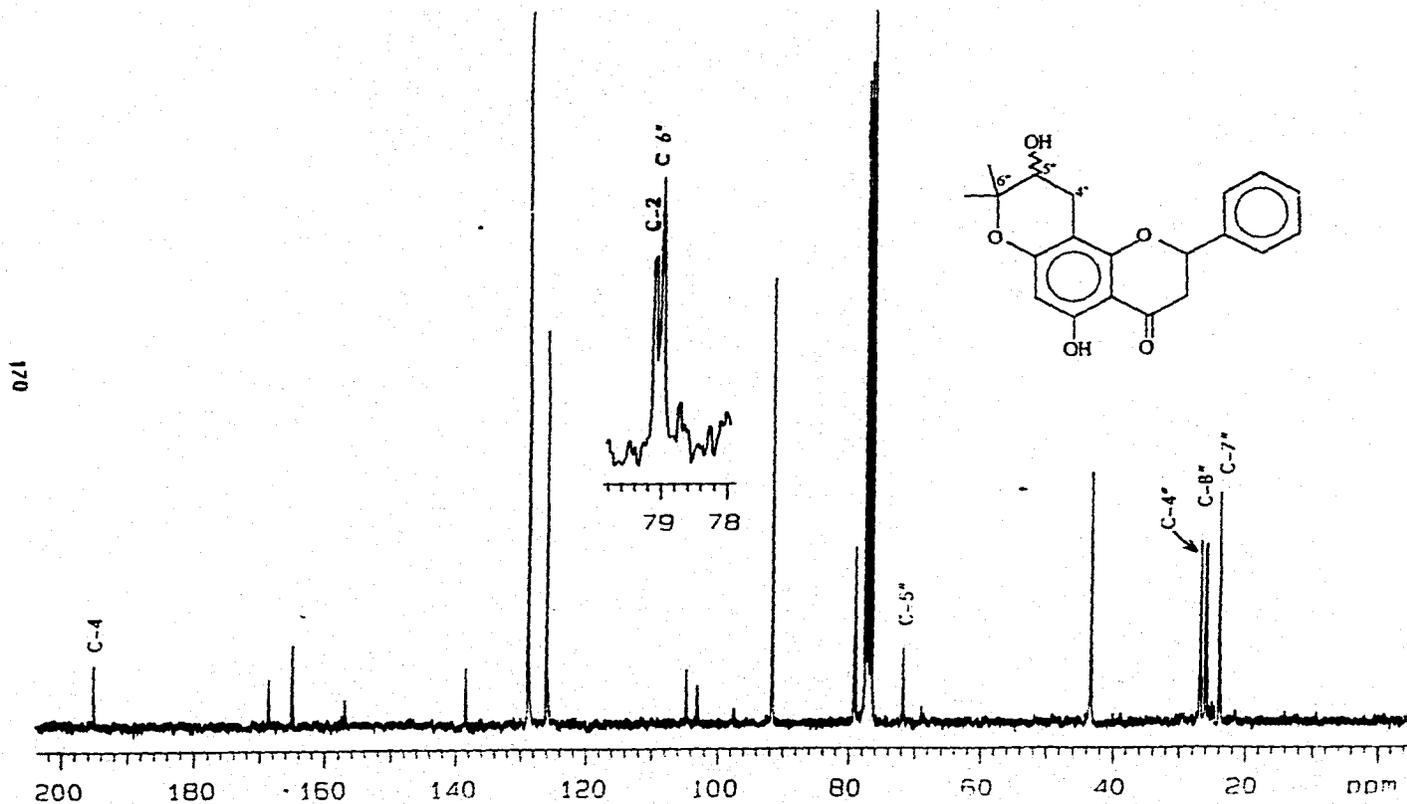
ESPECTRO 39. IR (CHCl₃) DE LA 5,5'-DIHIDROXI-6,6'-DIMETIL-4'',5''-DIHIDROPIRANO-(2'',3'',7,8)-FLAVANONA
(Tabla X)



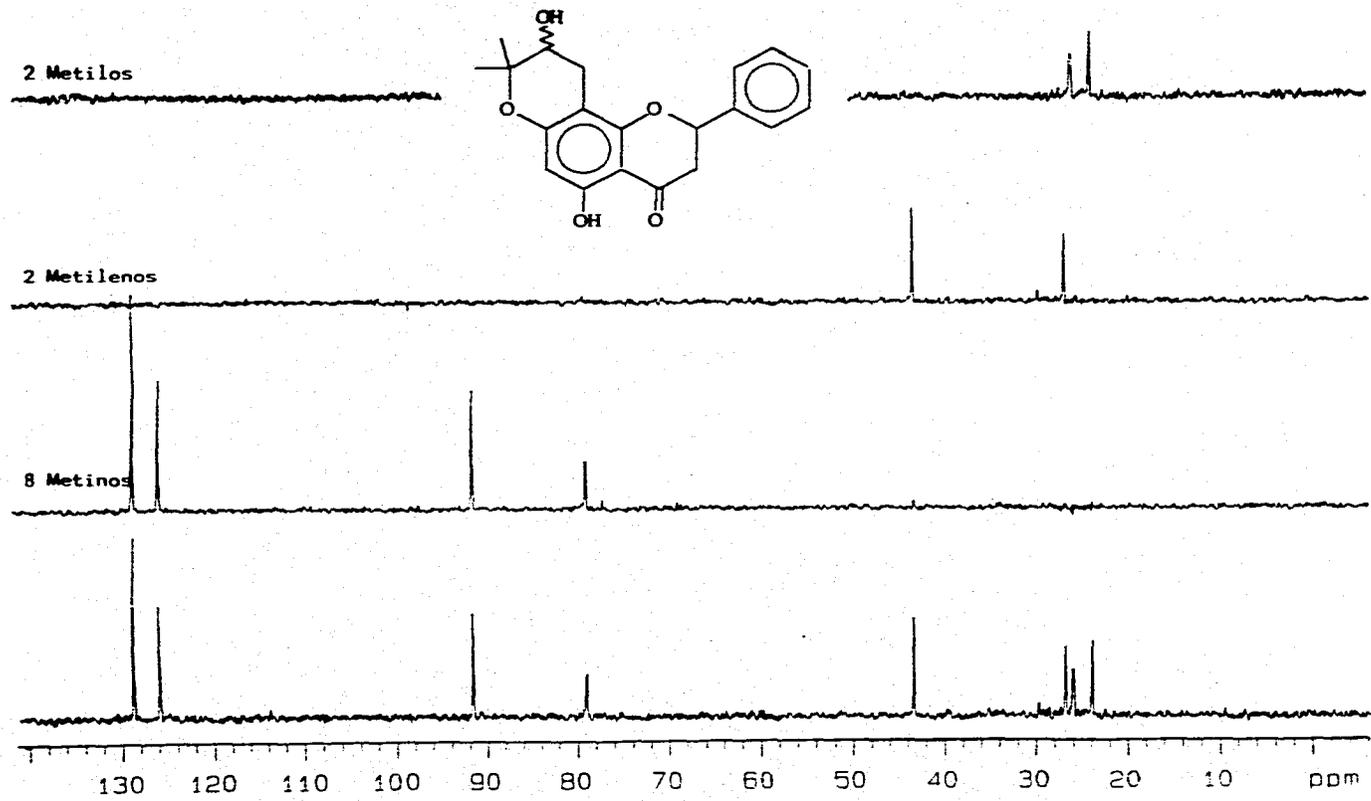
ESPECTRO 40. RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃, TMS) DE LA 5,5'-DIHIDROXI-6,6'-DIMETIL-4'',5''-DIHIDROPIRANO-(2'',3'',7,8)-FLAVANONA (Tabla XII),



ESPECTRO 41. RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃, TMS) DE LA 5,5'-DIHIDROXI-6,6'-DIMETIL-4,5'-DIHIDROPIRANO-(2',3',7,8)-FLAVANONA (Tabla XIII).



ESPECTRO 41a. RMN-¹³C. TECNICA DEPT (75 MHz, CDCl₃, TMS) DE LA 5,5''-DIHIDROXI-6'',6''-DIMETIL-4'',5''-DIHIDROPIRANO-(2'',3'',7,8)-FLAVANONA .



XII. BIBLIOGRAFIA.

BIBLIOGRAFIA.

1. Domínguez, A. X.; Importancia de la quimiotaxonomía en la investigación fitoquímica. *Medicina Tradicional* 2, 37-43 (1980).
2. Manitto, P.; Biosynthesis of NATural Products, Ed. Ellis Horwood Limited, New York, 10-11 (1980).
3. Enriquez, R.; Apuntes para una metodología en el estudio de las plantas medicinales. *Fitoquímica. Medicina Tradicional* 7, 79-83 (1979).
4. Crombie, I.; Natural products and the sesquicentenary of the Royal Society of Chemistry: some random comments. *Natural Product Reports*, 193-198 (1992).
5. Atta-ur-Rahman; Studies in natural products chemistry, Ed. El Servier Science Publishers, New York, 1988.
6. Pérez, A. C.; Plantas medicinales, etnobotánica y fitoquímica: importancia de la investigación interdisciplinaria. *Folium* 7, 2-3 (1994).
7. Capasso, F., Balestrieri, B. y Mascolo, N.; Actualidad de las plantas medicinales. *Medicina Tradicional* 3, 53-61 (1980).
8. Waterman, P. G.; Phytochemical potential of tropical plants, Ed. Plenum Press, New York, 203-233 (1993).
9. Heywood, V. H.; Las plantas con flores, Ed. Reverté, Barcelona, 198-200 (1985).
10. Rendle, A. D.; The classification of flowering plants, Vol. II, Ed. Cambridge, Great Britain, 285-289, 815-817 (1956).
11. Dreyer, L. D., Pickering, V. M. and Cohan, P.; Distribution of limonoids in the Rutaceae. *Phytochemistry* 11, 705-713 (1972).

12. Grundon, M. F.; Quinoline, acridone and quinazoline alkaloids: Chemical and biological perspectives, Volume VI (Pelletier, S. W.), John Wiley & Sons, New York, 448-451, 484, 485, 509, 510 (1982).
13. Mink, K., Gray, I. A. and Waterman, G. P.; Benzophenanthridine alkaloids from the stem bark of a *Zanthoxylum* species. *Phytochemistry* **26**, 3251-3354 (1987).
14. Ohmoto, T., Koike, K.; Canthin-6-one alkaloids in: The alkaloids (A. Brossi ed). Vol. 36, Academic press, New York, 135-170 (1989).
15. Bhattacharyya, P., Chakraborty, D. P.; Carbazole alkaloids in: Fortsch, Chem. Orgn. Naturstoffe, Vol. 52 (Herz, Grusebach, H. and Kirby G. W eds) New York, 159-209.
16. Dominguez, A. X.; Métodos de investigación fitoquímica, Ed. Limusa, México, 81-87, 111-115, 211-213 (1973).
17. Brunton, J.; Elementos de fitoquímica y farmacognosia, Ed. Acribia, España, 141-148, 157-164 (1991).
18. Markham, K. R.; Techniques of flavonoid identification, Ed. Academic press, New York, (1982).
19. Liu, Y. L., Neuman, P., Timmermann, B. and Mabry, T.; Techniques for flavonoid analysis: Phytochemistry method frontiers (Dr. Dominguez X. A.) Revista Latinoamericana de Química, 90 (1990).
20. Zabel, A. M.; Ultraviolet influences quantities and quality of coumarins extracted as cell protection. *Reunión Anual de la Soc. Fitoquímica de América del Norte*, Cd. México, 1994.
21. Lewinsohn, E., Berman, E., Mazur, Y. and Gressel Y.; Glucosylation of exogenous flavanones by grapefruit (*Citrus paradisi*) Cell cultures. *Phytochemistry* **25**, 2531-2535 (1986).
22. Charnichart, C. A.; Estudio químico de *Esenbeckia imertana*; Tesis Ingeniero Químico. Facultad de Química, UNAM, 10 (1991).
23. Barron, D., Desfougères, A., Nonguvé-Tachamo, D. and Raguénat, H.; Claisen rearrangements in the organic synthesis of prenil flavonoids. *Phytochemical Society of North America* **35**, 19 (1995).

24. Champagne, D. E., Koul, O., Isman, M. B., Swdder, G. and Towers, N.; Biological activity of limonoids from the Rutales, *Phytochemistry* **31**, 377-394 (1992).
25. Dreyer, L. D.; Botanical distribution and chemotaxonomy in the Rutaceae. *Phytochemistry* **5**, 367-378 (1966).
26. Dreyer, L. D.; Chemotaxonomy of the Rutaceae VII alkaloids in *Euodia zanthoxyloides*. *Journal of Organic Chemistry* **35**, 2420-2422 (1970).
27. Campbell, E. W., Finch, P. K. and Beant, P. A.; Isolation and identification of tree new phenolic furoquinoline alkaloids from *Teclea verdoorniana* exell & mendonca (Rutaceae). *Journal Chemistry Society, Perkin I*, 909-915 (1992).
28. Yenesew, A. and Dadne, E.; Alkaloids of *Teclea nobilis*. *Phytochemistry* **27**, 651-653 (1988).
29. Paulini, H., Waibel, R. and Keifer, J. and Shimmer, O.; Gravaeridondiolacetato a new dihidrofuroacridone alkaloids from *Ruta graveolans*. *Planta Medica* **57**, 82 (1991).
30. Ming, K., Gray, I. A. and Waterman, G. P.; Benzophenanthridine alkaloids from the stem bark of a *Zanthoxylum* species. *Phytochemistry* **26**, 3251-3354 (1987).
31. Hasbum, C. and Castro, O. A.; New benzamide from bark of *Amyris brenessi*. *Journal of Natural Products* **51**, 817, 818 (1988).
32. González, G. A., Estévez, R. and Jaraiz, I.; Structure of subandinin and other coumarins isolated from the roots of *Ruta pinnata*. *Phytochemistry* **10**, 1621-1626 (1971).
33. Burke, A. B. and Parkins, H.; Coumarins from *Amyris balsamifera*. *Phytochemistry* **18**, 1073-1075 (1979).
34. Gray, I. A. and Waterman, G. P.; Coumarins in the Rutaceae. *Phytochemistry* **17**, 845-864 (1978).
35. Bowman, R. M., Collins, J. F. and Grundon, M. F.; The role of asygenated isoprenoid. *Chemical Communication*, 1131-1132 (1987).
36. Grundon, F. M.; The biosynthesis of aromatic hemiterpenos. *Tetrahedron* **34**, 143-161 (1978).

37. Bowman, R. M. and Grundon, M. F.; Quinoline alkaloids part VIII. The synthesis and Nuclear Resonance Spectra of (+)-platidesmine (\pm)-isobalfouridine, and related compounds. *Journal of Chemical Society. (C)* 1504-1507 (1966).
38. Brown, S. A. and Steck, W.; 7-dimethylsuberosin and osthenol as intermediates in furocumarin biosynthesis. *Phytochemistry* **12**, 1315 (1973).
39. Gray, A. I.; Coumarins and chromones of the Rutales in: Chemistry and chemical taxonomy of the Rutales (Waterman G. P. and Grundon, M. F. edo), Academic press, London, 97-146 (1983).
40. Clarke, E. A. and Grundon, M. F.; The synthesis of Lunasia alkaloids. Parte III, (\pm)-balfouridine and (\pm)-O-methylbalfouridinium perchlorate. The biogenesis of some Rutaceae alkaloids, 4196-4200 (1964).
41. Grundon, F. M. and Okely, M.; Synthesis and chromone and quinoline series. *Journal Chemical Society Perkin I*, 150-154 (1975).
42. Ramos, H. C.; Revisión taxonómica de *Esenbeckia* (Rutaceae) de México. Tesis de maestría, Facultad de Ciencias, UNAM, 1991.
43. Kaastra, R. C.; Flora Neotrópica, Pilocarpinae (Rutaceae) Monograph number 33, Ed. Organization for flora Neotropica by The New York Botanical Garden (1982).
44. Dreyer, L. D., Alkaloids, limonoids and furanocumarins from three mexican *Esenbeckia* species. *Phytochemistry* **19**, 941-944 (1980).
45. Bevalot, F., Fournet, A., Moretti, C. and Vaquette, J.; Alcaloids from *Esenbeckia pilocarpoides*. *Planta Medica* **50**, 522-523 (1984).
46. Rios, M. Y. and Delgado, G.; Poliprenols and acylphloroglucinols from *Esenbeckia nesiotica*. *Phytochemistry* **1**, 1-4 (1992).
47. Rios, M. Y. and Delgado, G.; Terpenoids and alkaloids from *Esenbeckia belizensis* spontaneous oxidation of furoquinoline alkaloids. *Journal of Natural Products* **55**, 1307-1309 (1992).
48. Delle, M. F. and Delle M. G.; Isopentenylindole derivatives and other components of *Esenbeckia leiocarpa*. *Gazzetta Chimica Italiana* **119**, 435-439 (1989).

49. Delle, M. F., Alves De M. and Sander, P.; *Esenbeckia leiocarpa*: II^a. Further components. *Gazzeta Chimica Italiana* **120**, 387-389 (1990).
50. Hostettmann, K., Hostettmann, M. and Martson, A., Modern phytochemical methods, Ed. Plenum Press, U.S.A., 1-3 (1991).
51. Meyer, B. N., Ferrini, N. R., Putman, J. E., Jacobsen, J. B., Nichols, D. E. and McLaughlin, J. L.; *Brine Shrimp*: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica* **45**, (1983) 31-34.
52. Flores G. A.; Sinergismo de la actividad larvicida del α -sanshool sobre *Culex quinquefasciatus* y *Artemia salina* por compuestos metilendioxfenilos. Tesis Químico Farmacéutico Biólogo, FES-Zaragoza, UNAM, 17-20 (1995).
53. Peña, R.; Bioactive metabolites from Yucatecan medicinal plants. *Reunion Anual de la Sociedad Fitoquímica del Norte*, Cd. México, 1994.
54. Aguilar, M. I., and Delgado, G., Bye, R.; Comparative phytochemical analysis and preliminar pharmacological evaluation of some especies of the "cachuna" complex of medicinal plants. *Reunion Anual de la Sociedad Fitoquímica del Norte*, Cd. México, 1994.
55. Linding, R., Rios, M. and Delgado, G.; Molecular structure of the foliar secondary metabolites of *Casearia corymbosa* (Flacourteaceae). *Reunion Anual de la Sociedad Fitoquímica del Norte*, Cd. México, 1994.
56. Nadicnic, E., Mongelli, E., Debenedetti, S., Sánchez, P., Ciccia, G., Givlietti, A. and Coussia, J.; Bioactive molecules from *Gentianella achalensis*. *Reunion Anual de la Sociedad Fitoquímica del Norte*, Cd. México, 1994.
57. Crescente, O., Henríquez, W., Hidalgo, D. and Romero, A. R.; Biological activity of flavonoids from *Chromolaena odorata*, *Phytochemical Society of North America* **35**, 6 (1995).
58. Jork, H., Funk, W., Fischer, W. and Wimmer, H.; Thin-layer chromatography, reagents and detection methods, Volume 1a, Ed. VCH, New York, 1990.
59. Rodríguez, C. S.; Aislamiento y elucidación estructural de los metabolitos secundarios de *Esenbeckia berlandieri* ssp *acapulcensis* (Rose). Tesis profesional, UNAM, FES-Zaragoza, 1995.

60. Bohlmann, F. and Zdero, Ch.; Flavanones from *Helichrysum thapsus*. *Phytochemistry* **22**, 2877-2878 (1983).
61. Jayaraman, A., Ghanim, A. and Hamid, A., A new Prenylated flavanone from *Tephrosia villosa*. *Phytochemistry* **22**, 1267, 1268 (1980).
62. Shirataki, Y., Yokoe, I. and Endo, M.; Determination of C-6 or C-8 substituted flavanone using ^{13}C - ^1H long range coupling and the revised structures of some flavanones, *Chemical Pharmaceutical Bulletin* **33**, 444-447 (1985).
63. Hohlbrock, K., Zilg, H. and Grisebach, H.; Stereochemistry of the enzymatic cyclisation of 4,2',4'-trihydroxichalcone to 7,4'-dihydroxiflavanone by isomerases from mung bean seedlings. *Eur. Journal Biochemistry* **15**, 13-18 (1970).
64. Pelter, A., Word, R. and Gray, T.; The carbon-13 nuclear magnetic resonance spectra of flavonoids and related compounds. *Journal of Chemical Society Perkin I*, 2475-2483 (1976).
65. Breitmaier, E. and Voelter, W.; Carbon-13 NMR spectroscopy, 3a ed., Ed. Verlagsgesellschaft, Federal Republic of Germany, 215-222 (1987).
66. Wagner, H. and Chari, V.; ^{13}C -NMR spektren natürlich vorkommender flavonoide. *Tetrahedron letter*, 1799-1802 (1976).
67. Ternai, B. and Markham, K.; Carbon-13 NMR studies of flavonoids-I. *Tetrahedron* **32**, 565-569 (1976).
68. Harborne, B. J. *Phytochemical Methods*. 2 ed., Ed. Chapman and Hall, New York, (1984).