

77



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

Obtención y Evaluación Biológica de los derivados
químicos de la Glabranina, producto natural de
Esenbeckia berlandieri ssp acapulcensis.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

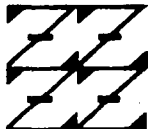
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

ROMAN ISRAEL VERA DEBRAY

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

DIRECTOR: M. en C. ARTURO EDUARDO CANO FLORES



LO HUMANO EJE
DE NUESTRA REFLEXION

MEXICO, D.F.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

2002



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

PAGINACION DISCONTINUA

Doy gracias a Dios por darme salud y paciencia para cumplir uno de los objetivos más importantes de mi vida.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Dedicatorias

A mis Padres.

Ricardo y Balbina

A quienes han sacrificado gran parte de su vida por darme la herencia más grande que puede existir que es mi educación.

A quienes me apoyaron hasta el último momento.

A quienes nunca podre pagarles todos sus desvelos ni aun con las riquezas mas grandes del mundo. GRACIAS.

A Martín Vera Debray

Que del lugar donde te encuentras siempre me apoyaste y estabas en todo momento junto a mi. GRACIAS

A mis Hermanos

Ricardo, Marlen y Diego

Gracias, por su confianza, apoyo y sus palabras de aliento en los momentos más difíciles de mi carrera, ya que no podría haber tenido mejores hermanos que ustedes.

A mi Sobrina

Andrea

Gracias, por todos los momentos de alegría que has dado a mi familia.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

A María Villanueva

Gracias, por las palabras de aliento que me diste, ya que gracias a ellas logré concluir uno de los objetivos más importantes de mi vida y que ahora comparto contigo.

A Erika García

Gracias, por estar conmigo en los momentos tristes y alegres durante la elaboración de esta tesis, por toda la ayuda que me has dado y porque sé que siempre podré contar contigo.

A Vladimir Vargas y Familia

Gracias, por su confianza, apoyo en la realización de esta tesis y sobre todo muchas gracias por ser mis amigos.

A Ernesto Rivera

Gracias, por la ayuda, apoyo y palabras de aliento que me diste para poder terminar mi tesis, muchas gracias amigo.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

A Maribel Fabida

Gracias, por todo el apoyo dado, durante tu estancia en el laboratorio y porque sé que a pesar de la distancia siempre seremos amigos.

A Marina Espinosa y Mara Elizalde

Gracias, por compartir conmigo todos sus conocimientos y consejos durante la elaboración de esta tesis.

A mis amigos y compañeros de laboratorio *José Manuel, Dulce, Gladys, Eloy* quienes de una u otra manera contribuyeron a la realización de este trabajo. MUCHAS GRACIAS.

A mis amigos

Margarita, Jacobo, Elvira, Arlinda, America y Roberto.

Gracias, por su apoyo y sobre todo por su amistad.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Agradecimientos

Al M. en C. Arturo E. Cano Flores por su confianza, apoyo y asesoría durante la elaboración de esta tesis. Gracias

Al Dr. Guillermo Delgado Lamas del Instituto de Química de la UNAM por el apoyo prestado para la realización de este proyecto.

Al personal técnico-administrativo del Instituto de Química de la UNAM por las facilidades prestadas en la realización del presente trabajo.

A la Q.F.B. Rocio Patiño y la M. en C. Isabel Chávez del Instituto de Química de la UNAM por el apoyo prestado para la realización de este proyecto.

Al Dr. Luis Sánchez de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza por la realización de las pruebas antitumorales.

A la Carrera de Biología por las facilidades prestadas en la realización del presente trabajo.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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

JEFATURA DE LA CARRERA DE QUÍMICO
FARMACÉUTICO BIÓLOGO

ASUNTO: ASIGNACIÓN DE SINODALES.

ESTIMADOS MAESTROS :

La Dirección de la Facultad de Estudios Superiores "Zaragoza", ha nombrado a ustedes como Sinodales del Examen Profesional del (la) señor (ita):

VERA DEBRAY ROMÁN ISRAEL

Para obtener el Título de Químico Farmacéutico Biólogo.

Les agradeceré se sirvan revisar el trabajo escrito intitulado: **Obtención y Evaluación Biológica de los derivados químicos de la Glabranina, producto natural de *Esenbeckia berlandieri ssp acapulcensis*.**

Y asistir en la fecha que después se les hará saber al Examen de Recepción Profesional.

PRESIDENTE Q.F.B. FELIPE PÉREZ VEGA
VOCAL M. en C. ARTURO EDUARDO CANO FLORES
SECRETARIO M. en C. SAMUEL SOSOL MÉNDEZ
SUPLENTE Q. MARTHA TRINIDAD J. OLIVEROS GARCÍA
SUPLENTE Q.F.B. VICTOR HUGO BECERRA LÓPEZ

ATENTAMENTE.
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
México, D.F., a 26 de junio de 2002.

Q.F.B. ROBERTO CRUZ GONZÁLEZ MELÉNDEZ.
JEFE DE LA CARRERA

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Biotransformaciones y Química de Productos Naturales L-314 de la F. E. S. "Zaragoza", Campus II, UNAM, bajo la asesoría del M. en C. Arturo E. Cano Flores.

INDICE

	pág.
NOTACIONES EMPLEADAS.....	i
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES.....	3
1. FLAVONOIDES.....	3
1.1. 1,3-diarilpropanos.....	4
1.2. 1,2-diarilpropanos.....	5
1.3. 1,1-diarilpropanos.....	5
1.4. Flavonoides Glicosilados	7
1.4.1. O-glicósidos.....	7
1.4.2. C-glicósidos.....	8
2. BIOGÉNESIS.....	9
2.1. Via Siquimato/Arogenato	10
2.2. Via fenilalanina-hidroxicinámato	12
2.3. Biogénesis de Flavonoides	14
3. ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS FLAVONOIDES	18
3.1. Flavonoides y el Color de las Flores.....	18
3.2. Flavonoides y la Protección UV-B en las Plantas.....	22
3.3. Actividad Antimicrobiana.....	24
3.4. Actividad Antioxidante.....	27
3.5. Actividad Antiinflamatoria.....	31
3.6. Actividad Citotóxica-Antitumoral.....	35
3.7. Otras Actividades.....	37
4. FLAVONOIDES PRENILADOS	39
4.1. Actividad biológica.....	40
5. PROPIEDADES ÓPTICAS DE LOS FLAVONOIDES.....	43

6. MÉTODOS QUIROÓPTICOS DE ALGUNOS FLAVONOIDES.....	45
7 GENERALIDADES DE LOS ENSAYOS BIOLÓGICOS.....	47
7.1. Bioensayo frente a <i>Artemia salina</i> L.....	49
7.2. Pruebas Antimicrobianas.....	49
7.2.1. Método de dilución.....	50
7.2.2. Método de difusión.....	50
7.2.3. Método bioautográfico.....	51
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	52
IV. OBJETIVOS.....	53
1. OBJETIVO GENERAL.....	53
1.1. Objetivos particulares.....	53
V. HIPÓTESIS.....	54
VI. MATERIAL.....	55
1. MATERIAL PARA LA PURIFICACIÓN, CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE REACCIÓN.....	55
2. MATERIAL PARA ENSAYO MICROBIOLÓGICO.....	57
VII. METODOLOGÍA.....	58
1. TRANSFORMACIONES QUÍMICAS DE LA GLABRANINA.....	60
1.1. 5-hidroxi-7-metoxi-8-(3'',3''-dimetilalil)-flavanona.....	60
1.2. 7-acetil-5-hidroxi-8-(3'',3''-dimetilalil)-flavanona.....	61
1.3. 5,7-dihidroxi-8-(3''-metil-2'',3''-epoxibutano)-flavanona.....	63
1.4. 7,8-(6'',6''-dimetilcromano)-de la glabranina.....	64
1.5. 7,8-(6'',6''-dimetilcromeno)-de la glabranina.....	65
1.6. 5''-hidroxi-7,8-(6'',6''-dimetilcromano)-de la glabranina.....	67
1.7. 5-acetil-7-metoxi-8(3'',3''-dimetilalil)-flavanona y 2',6'-diacetil-4'-metoxi-3'-(3'',3''-dimetilalil)-chalcona.....	68
1.8. 7-metoxi-8-(3''-metil-2'',3''-epoxibutano)-glabranina.....	70
1.9. 7-metoxi-8-(2''-hidroxi-3''-metil-3''-buten)-glabranina.....	72

2. EVALUACIÓN BIOLÓGICA.....	73
2.1. Bioensayo frente a <i>Artemia salina</i> L.....	73
2.2. Evaluación Antimicrobiana.....	74
2.2.1. Método de Mitscher.....	74
2.3. Actividad Antitumoral en línea celular HeLa.....	75
VIII. RESULTADOS	78
1. Tabla 10. Datos de IR de derivados de la glabranina.....	78
2. Tabla 11. Desplazamientos químicos de RMN- ¹ H de derivados de la glabranina....	79
3. Tabla 12. Desplazamientos químicos de RMN- ¹³ C de derivados de la glabranina...	80
4. Tabla 13. Datos de IR de derivados de la 7-metoxiglabranina.....	81
5. Tabla 14. Desplazamientos químicos de RMN- ¹ H de derivados de la 7-metoxiglabranina.....	81
6. Tabla 15. Desplazamientos químicos de RMN- ¹³ C de derivados de la 7-metoxiglabranina.....	82
7. Tabla 16. Actividad Antimicrobiana.....	83
8. Tabla 17. Actividad Antitumoral.....	84
IX. ANÁLISIS DE RESULTADOS	85
1. ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DE DERIVADOS DE LA GLABRANINA.....	85
1.1. 5-hidroxi-7-metoxi-8-(3'',3''-dimetilalil)-flavanona.....	85
1.2. 7-acetil-5-hidroxi-8-(3'',3''-dimetilalil)-flavanona.....	87
1.3. 5,7-dihidroxi-8-(3''-metil-2'',3''-epoxibutano)-flavanona.....	88
1.4. 7,8-(6'',6''-dimetilcromano)-de la glabranina.....	90
1.5. 7,8-(6'',6''-dimetilcromeno)-de la glabranina.....	92
1.6. 5''-hidroxi-7,8-(6'',6''-dimetilcromano)-de la glabranina.....	93
1.7. 5-acetil-7-metoxi-8(3'',3''-dimetilalil)-flavanona y 2',6'-diacetil-4'-metoxi-3'-(3'',3''-dimetilalil)-chalcona.....	96
1.8. 7-metoxi-5-hidroxi-8-(3''-metil-2'',3''-epoxibutano)-glabranina.....	98
1.9. 7-metoxi-8-(2''-hidroxi-3''-metil-3''-buten)-glabranina.....	100

2. ANÁLISIS DE LOS DESPLAZAMIENTOS QUÍMICOS DE RMN- ¹³ C DE FLAVANONAS.....	102
3. ANÁLISIS ÓPTICO DE FLAVANONAS.....	109
4. EVALUACIÓN BIOLÓGICA.....	112
4.1. Evaluación antimicrobiana (Método de Mitscher).....	112
4.2. Bioensayo frente a <i>Artemia salina</i> L.....	112
4.3. Evaluación Antitumoral en línea celular HeLa.....	113
X. CONCLUSIONES.....	114
XI. ESPECTROS.....	115
XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	155

NOTACIONES EMPLEADAS

p-TsOH	Ácido p-toluensulfónico.	
AMCPB	Ácido <i>meta</i> -cloroperbenzoico.	
AcOEt	Acetato de etilo.	
Ac ₂ O	Anhídrido acético.	
CDCl ₃	Cloroformo deuterado.	
J	Constante de acoplamiento.	Hz
<i>c</i>	Cuarteto.	
CCF	Cromatografía en capa fina.	
CCP	Cromatografía en capa fina preparativa.	
CCV	Cromatografía en columna a vacío.	
COSY	Correlación Espectroscópica (RMN- ¹ H) Homonuclear Bidimensional.	
COLOC	Correlación Espectroscópica (¹ H- ¹³ C) Heteronuclear Bidimensional.	
HETCOR	Correlación Espectroscópica (¹ H- ¹³ C) Heteronuclear Bidimensional.	
δ	Desplazamiento químico.	ppm
DC	Dicroísmo circular.	
DOR	Dispersión óptica rotatoria.	
DEPT	Distorsión aumentada por una transferencia de polarización.	
DDQ	2,3-Dicloro-5,6-diciano- <i>p</i> -benzoquinona.	
<i>d</i>	Doblete.	
<i>dd</i>	Doble de doble.	
IR	Espectroscopía de Infrarrojo.	
IC ₅₀	Concentración inhibitoria media.	
Et ₂ O	Éter etílico.	
Hex.	Hexano.	
LC ₅₀	Concentración letal media.	ppm
MIC	Concentración mínima inhibitoria.	
λ	Longitud de onda.	nm

<i>m</i>	Multiplete.	
ν	Número de onda.	
APT	Prueba de un protón unido.	
PrOH	Propanol.	
ϕ	Rotación molecular.	
θ	Elipticidad molecular.	
pf.	Punto de fusión.	°C
RMN- ¹ H	Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno.	
RMN- ¹³ C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13.	
<i>s</i>	Singlete.	
TMS	Tetrametilsilano.	
<i>t</i>	Triplete.	
<i>tc</i>	Triple de cuarteto.	
Ω	Grados de insaturación.	

I. Introducción

Los flavonoides se forman en las plantas a partir de los aminoácidos fenilalanina, tirosina y malonato. Sus estructuras químicas están basadas en un esqueleto de C-15 (C₆-C₃-C₆) que consiste en dos anillos aromáticos (A y B) y un anillo heterocíclico (C) con un átomo de oxígeno. Estos son clasificados de acuerdo al patrón de sustitución que presente el anillo "C" y a la posición de los grupos hidroxilo en el anillo "B". Los flavonoides pueden encontrarse en forma de aglicona y glicósido.

En la actualidad se tienen datos de más de 4000 flavonoides que han sido aislados e indentificados. Estos muestran una gran variedad de funciones tanto bioquímicas, fisiológicas y ecológicas, como por ejemplo en la coloración de los pétalos de las flores, frutos y en la germinación de las mismas, defensa contra microorganismos (fitoalexinas), participación en el proceso de fijación del nitrógeno y protección contra la radiación ultravioleta del tipo B (UV-B).

Además de las funciones fisiológicas en las plantas, los flavonoides son componentes importantes en la dieta humana. El nivel adecuado en la dieta es considerablemente alto (50 a 800 mg/día) dependiendo del consumo de vegetales y frutas, evitando de esta manera contraer enfermedades coronarias y cáncer.

La gran diversidad de estos compuestos —hidroxilados, metilados, sulfonados, glicósilados, prenilados, entre otros— ha permitido un mayor conocimiento en la determinación de su estructura-actividad en actividades biológicas como: antioxidantes, antiinflamatorio, estrogénica, antimalárica, hipoglucémica, antimicrobiana, antihepatotóxica, antiviral, entre otras.

La presencia de diferentes grupos prenilo —geranil, lavandulil, dimetilalil, farnesil, derivados del cromano y furano— dentro del esqueleto del flavonoide permite un incremento en la relación estructura-actividad en propiedades biológicas importantes como: antifúngicas,

antimicrobianas, antioxidantes y antivirales (VIH); siendo las flavanonas preniladas la clase más abundante de los flavonoides prenilados, las cuales pueden encontrarse di- ó tri-preniladas.

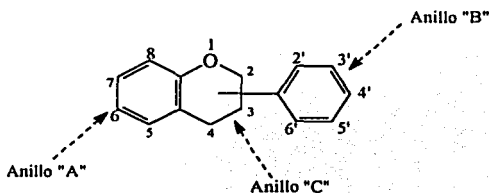
Por lo anterior, el presente trabajo tiene como finalidad obtener algunos de los derivados de la glabranina (flavonona prenilada) para poder evaluar su potencialidad como posibles agentes antimicrobianos y antitumorales, ya que la glabranina es el flavonoide mayoritario aislado de las partes aéreas de *Esenbeckia berlandieri ssp acapulcensis*, planta endémica de México.

II. Marco Teórico

1. FLAVONOIDES.

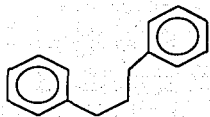
Los flavonoides son un grupo de productos naturales, químicamente derivados del núcleo de la fenilbenzopirona, se localizan en varias partes de la planta, como en frutas, hojas y tallos, además de semillas, nueces, flores. Actualmente, son considerados constituyentes importantes en la dieta humana [1].

Los flavonoides constituyen uno de los compuestos más característicos de las plantas y de mayor distribución en el reino vegetal como se ha mencionado. Sus estructuras químicas tienen como esqueleto base quince átomos de carbono — C₆-C₃-C₆— con un anillo de pirano (el anillo "C"), que sostiene al anillo aromático (anillo "B") en la posición 2, 3 ó 4 (1) [2]. Varios subgrupos de flavonoides son clasificados de acuerdo a la sustitución que presente el anillo "C" y al patrón de hidroxilación del anillo "B"; así como en las posiciones 5 y 7 del anillo "A" [2, 3].

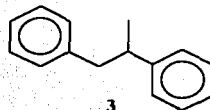


1

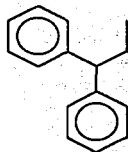
De esta manera se pueden distinguir: 1,3-diarilpropanos (flavonoides, 2), 1,2-diarilpropanos (isoflavonoides, 3) y 1,1-diarilpropanos (neoflavonoides, 4) [4, 5].



2



3

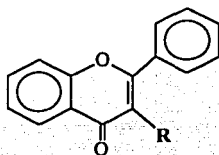


4

1.1). 1,3-diarilpropanos.

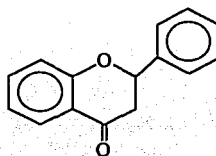
El elemento común de estos compuestos está relacionado con el núcleo básico del 2-fenilcromano. Cabe mencionar que el término 1,3-diarilpropanos abarca una gran diversidad de estructuras, de las cuales destacan:

- a) 2-Fenilcromonas: flavonas (5), flavonoles (6) y flavanonas (7).
- b) 2-Fenilcromanos (flavanos): 3-flavanol (8) y 3,4-flavandioles (9).
- c) Flavilios: antocianos (10).
- d) Chalconas: formas abiertas isoméricas de las flavanonas (11).
- e) Auronas: homólogos de las flavonas con heterociclo pentagonal (2-bencilideno cumaranonas, 12).

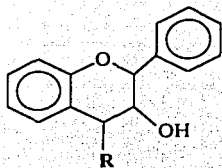


5 R=H

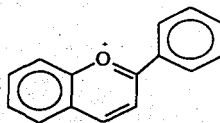
6 R=OH



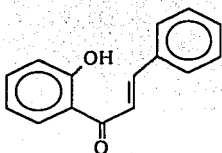
7



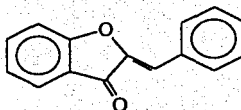
8 R= H
9 R=OH



10



11



12

1.2). 1,2-diarilpropanos.

Los isoflavonoides tienen la característica al igual que los flavonoides de poseer un esqueleto C₆-C₃-C₆, pero estos corresponden al tipo 1,2-diarilpropanos.

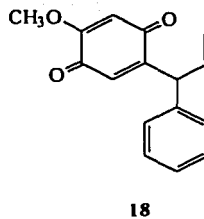
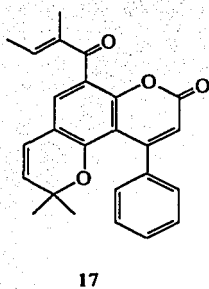
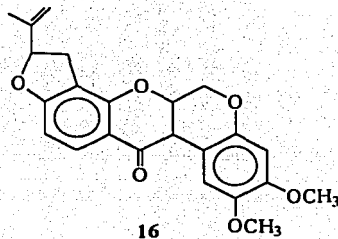
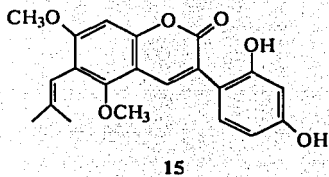
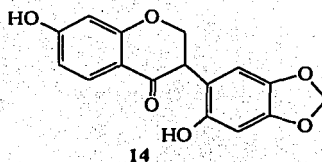
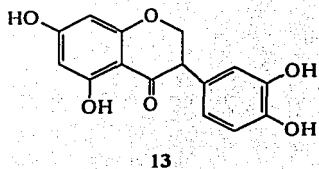
En los vegetales, la mayoría de los isoflavonoides corresponden a sustancias producidas por la planta en respuesta a una infección por un agente patógeno, denominadas fitoalexinas.

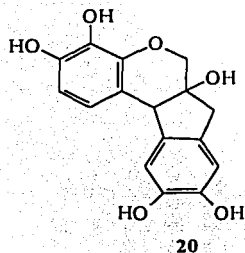
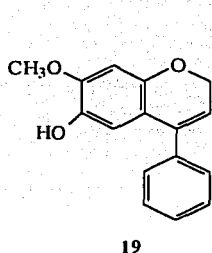
Los 1,2-diarilpropanos poseen una diversidad estructural de compuestos muy importante como las isoflavonas (13), isoflavanonas (14), 3-arilcumarinas (15) y los rutenoides (16), los cuales tienen la característica de poseer un carbono adicional.

1.3). 1,1-diarilpropanos.

El término neoflavonoide se le da a los compuestos de quince átomos de carbono, del tipo C₆-C₃-C₆, cuyo esqueleto base es el 1,1-difenilpropano. La diversidad estructural de este

tipo de compuestos es limitado, algunos ejemplos característicos de estos metabolitos son: las 4-arilcumarinas (17), dalbergionas (18), neoflavanos (19) y 4-arilcromanos (20).



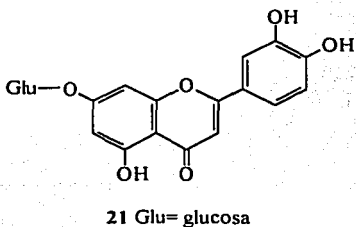


1.4). Flavonoides Glicosilados.

Los flavonoides pueden encontrarse en su forma libre (aglicona) ó flavonoides O-glicosilados o C-glicosilados.

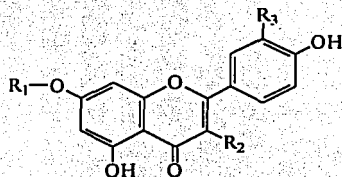
1.4.1). Flavonoides O-glicosilados.

Los flavonoides se presentan generalmente como flavonoides O-glicosilados, en los cuales uno o más grupos hidroxilo se encuentran unidos a uno o varios azúcares por medio de un enlace hemiacetalico (21).



El efecto de glicosidación es hacer al flavonoide menos reactivo y más soluble en agua, lo cual permite que los flavonoides sean almacenados en las vacuolas de las células (donde comúnmente son encontrados).

El patrón de glicosilación más común es en el C-7 (22) en compuestos como, flavonas, isoflavonas y dihidroflavonas; sin embargo, también se pueden encontrar glicósidos en los C-3 y C-7 (23) y en los C-3 y C-5 (antocianidinas).



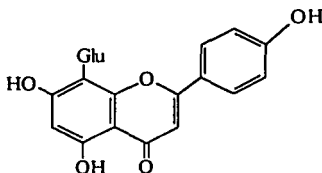
22 $R_1 = H$; $R_2 = \text{ramnosa}$; $R_3 = OH$

23 $R_1 = \text{glucosa}$; $R_2 = \text{O-acetilrutinosido}$; $R_3 = H$

El azúcar identificado con mayor frecuencia en la glicosilación de los flavonoides, es la glucosa, aunque también se ha determinado la presencia de galactosa, xilosa, arabinosa y ramnosa¹ [1, 6].

1.4.2). Flavonoides C-glicósidos.

Los azúcares también pueden estar ligados al carbono del núcleo del flavonoide, mediante un enlace C-C, que no puede ser hidrolizado en medio ácido y generalmente se encuentran unidos a los C-6 y C-8 del núcleo del flavonoide (24) [6].



24

¹ Otros azúcares encontrados ocasionalmente son: manosa, fructosa, opiosa y ácidos galacturónicos.

La extracción de los flavonoides generalmente se realiza 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, silica, entre otras—. Su identificación se realiza a través de métodos espectroscópicos en donde la espectroscopia de UV tiene una importancia especial, ya que presenta espectros característicos dependiendo de la naturaleza y posición del sustituyente, los cuales pueden ser modificados por ionización, reacciones con ácidos de Lewis o formación de complejos [6].

Dentro de los reactivos empleados en la identificación de los flavonoides se encuentran AlCl_3 (color amarillo fluorescente), los vapores de NH_3 (amarillo pálido, amarillo verdosa o azul intenso) y con sales de zirconio IV (color amarillo-verde). Para detectar la presencia de flavonoles se utiliza el ácido 2-aminoetilsterdifenilbórico produciendo un color amarillo [7, 8].

2. BIOGÉNESIS.

En la naturaleza, la formación del núcleo aromático se realiza únicamente en vegetales y microorganismos, en raras ocasiones (síntesis de estrógenos), los animales requieren de la alimentación para elaborar todas las sustancias que poseen este elemento estructural: aminoácidos, vitaminas, pigmentos, toxinas, entre otras.

Para la génesis del núcleo aromático se conocen tres vías:

1. Vía Siquimato/Arogenato: Conduce a la formación de aminoácidos, fenilalanina, tirosina, triptófano ($\text{C}_6\text{-C}_3$) y sus derivados (fenilpropanoides); después por desaminación de los ácidos cinámicos y sus numerosos derivados: ácido benzoico, fenoles simples, cumarinas, ligninas, lignanos, entre otros.
2. Vía de Acetato/Malonato: Por esta ruta se generan las quinonas, y la elongación de un lado de la cadena de los fenilpropanoides da lugar a la formación de los flavonoides ($\text{C}_6\text{-C}_3\text{-C}_6$).

3. Vía de Acetato/Mevalonato: Es la aromatización de compuestos del metabolismo de terpenos: mono, sesqui, diterpeno, entre otros; compuestos que provienen de metabolitos del isopreno, en los cuales la aromatización es un fenómeno secundario [9].

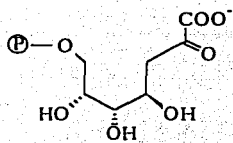
El anillo A del esqueleto de los flavonoides se deriva de tres unidades de acetato (malonato), mientras el anillo B y los tres carbonos del anillo C son de la fenilalanina. De esta manera la biogénesis de los flavonoides involucra la participación simultánea de las vías siquímato/arogenato y acetato/malonato, al igual que para la elaboración de compuestos mixtos como por ejemplo: estilbenos, pirona, xantona. También es posible la participación del ácido siquímico y del mevalonato, en la biogénesis de ciertas quinonas y furo- o piranocumarinas [10].

2.1). Vía Siquímato/Arogenato.

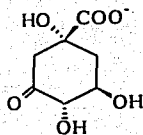
Esta ruta conduce a la formación de tres aminoácidos: L-fenilalanina, L-tirosina y L-triptófano. Esta vía es muy importante para la formación de hormonas y de varios compuestos secundarios incluyendo a los fenilpropanoides.

La secuencia de reacciones para la obtención de fenilalanina y tirosina necesita de un total de 11 enzimas (E-1 a E-11). La vía comienza con la condensación de la eritrosa-4-fosfato y del fosfoenolpiruvato (PEP) como precursores, y es catalizada por la enzima E-1, para obtener 2-dihidro-3-deoxiarabinoheptulonato-7-fosfato (DAHP) (25) [9, 11, 12].

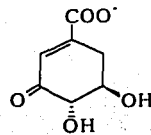
El segundo paso consiste en la conversión de DAPH al 3-dehidroquinato (26) mediante la acción de E-2, y que conlleva una serie de reacciones químicas —oxidación, eliminación (1,2), reducción y condensación intramolecular— posteriormente, (26) sufre una deshidratación catalizada por E-3 para dar 3-dehidrosiquímato (27).



25

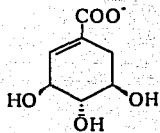


26

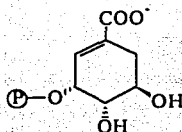


27

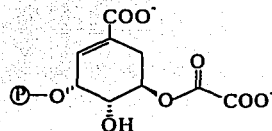
El 3-dehidrosiquimato es reducido a siquimato (28) por la enzima E-4, el cual sufre una fosforilación en el C-3 por E-5, resultando el siquimato-3-fosfato (29) que reacciona con PEP catalizado por la enzima E-6 para la producción del enoléter 5-enolpiruvilsiquimato-3-fosfato (EPSP) (30) [9, 12].



28

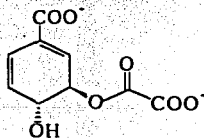


29

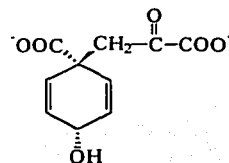


30

La eliminación del fosfato del EPSP catalizado por la corismato mutasa (E-7), da la formación del corismato (31), que sufre una transposición intramolecular en presencia de la cumarato mutasa (E-8) para dar lugar a la formación del prefenato (32).

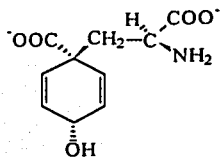


31

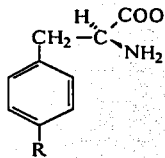


32

La conversión del prefenato a arogenato (**33**), es catalizada por la prefenato aminotransferasa (E-9). Posteriormente se dará lugar a dos aminoácidos a partir del arogenato por las enzimas arogenato-dehidrogenasa (E-10) y arogenato-dehidratasa (E-11) que catalizan la formación de tirosina (**34**) y fenilalanina (**35**) respectivamente, *ver esquema 1* [9, 12].



33



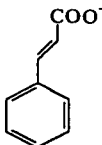
34 R= OH
35 R= H

La vía siquimato/arogenato se desarrolla en los plástidos que se encuentran en los cloroplastos y en el citoplasma de las células vegetales [12, 13].

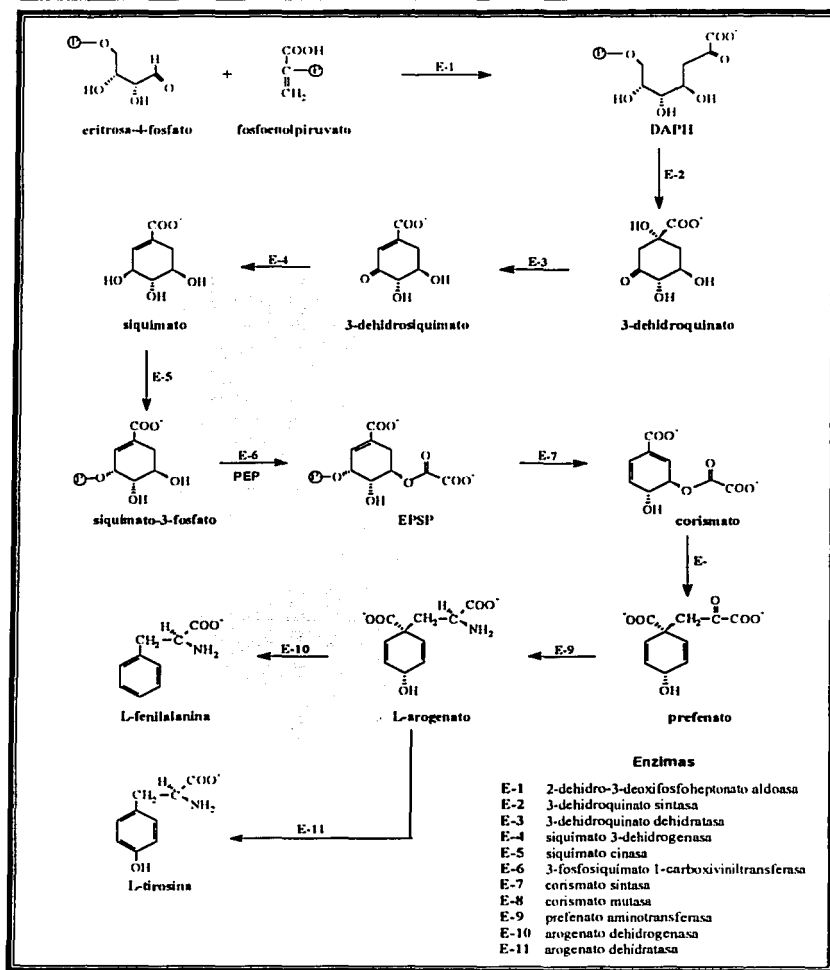
2.2). Vía fenilalanina/hidroxicinámatos.

La vía fenilalanina/hidrocinámatos es definida como "metabolismo general de los fenilpropanoides", en donde se incluyen reacciones que proceden de la fenilalanina a los hidroxicinámatos y sus derivados.

El primer paso consiste en una desaminación de la fenilalanina catalizada por la enzima fenilalanina amonía-lias (PAL, A-1). La enzima es finalmente regenerada por la liberación de amonio, el cual es reasimilado por la acción de la glutamina sintasa para obtener cinámato (**36**).



36



Esquema 1. Via Siquimato/Arogenato para la formación de L-fenilalanina y L-tirosina

Una serie de reacciones de hidroxilación y metilación, son catalizadas por cuatro enzimas de la A-2 a la A-5, que llevan a la formación secuencial de hidroxicinámatos comunes, ver *esquema 2* [9].

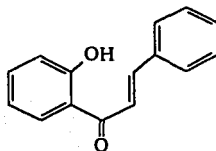
El paso final del "metabolismo general de los fenilpropanoides" es la adición carboxílica de hidroxicinámatos, catalizada por la CoA-ligasa (A-6) o por la acción de la transferasa O-glucosil (A-7), los hidroxicinámatos CoA formados entran a sucesivas reacciones específicas de fenilpropanoides tales como la condensación con malonilCoA, llevada a cabo para la formación de los flavonoides, reducciones para la obtención de ligninas o reacciones de conjugación en la formación de ésteres y amidas entre otras, ver *esquema 3* [9, 12].

2.3). Biogénesis de Flavonoides.

La biogénesis de los flavonoides involucra dos rutas metabólicas que son:

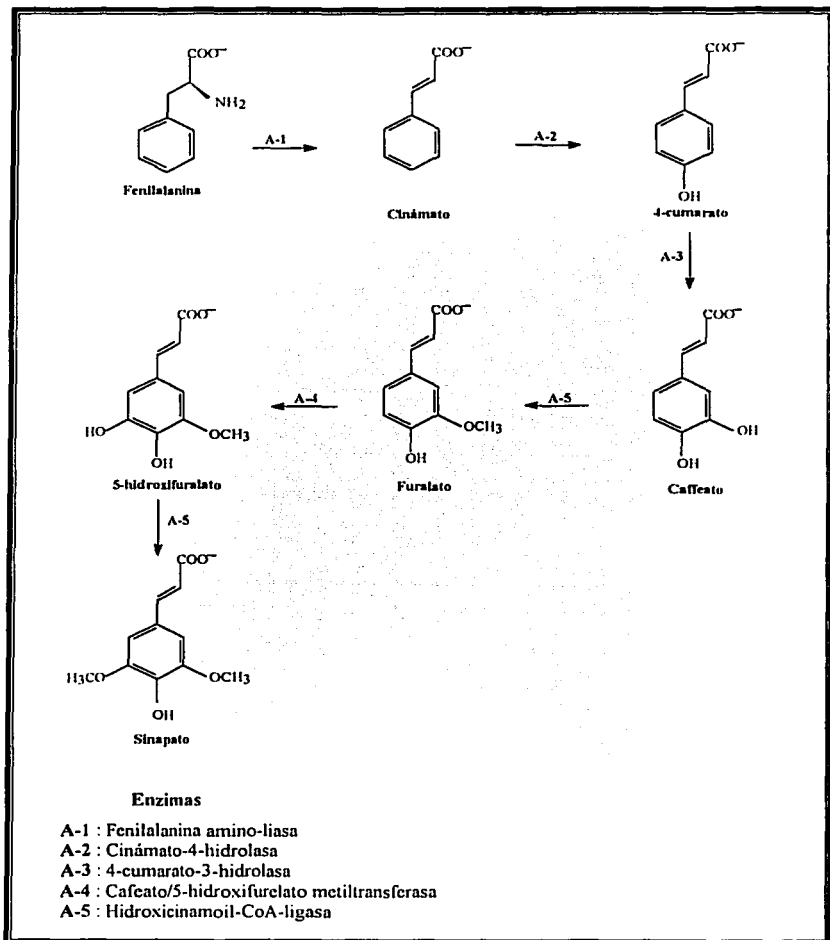
- a) ácido siquímico: Proporciona los productos fenilalanina y ácido cinámico.
- b) acetato/malonato; Proporciona tres moléculas de malonil-CoA.

La combinación de estas vías da la formación de la chalcona que es el intermediario común de todos los flavonoides (37), utilizando a la enzima chalcona sintasa como catalizador.

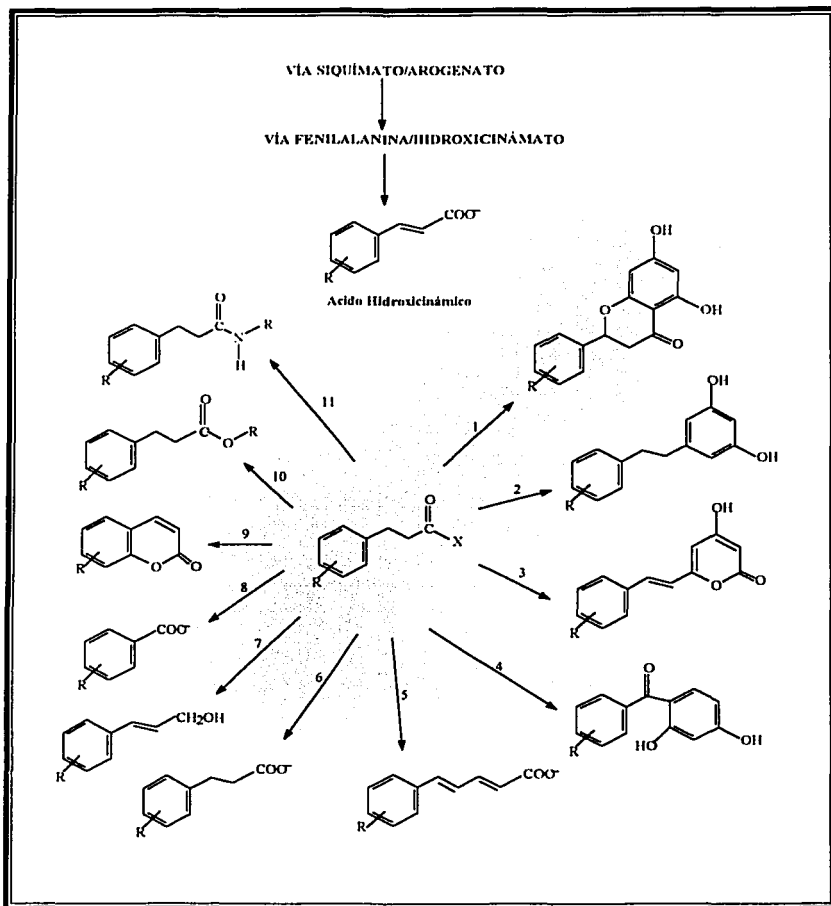


37

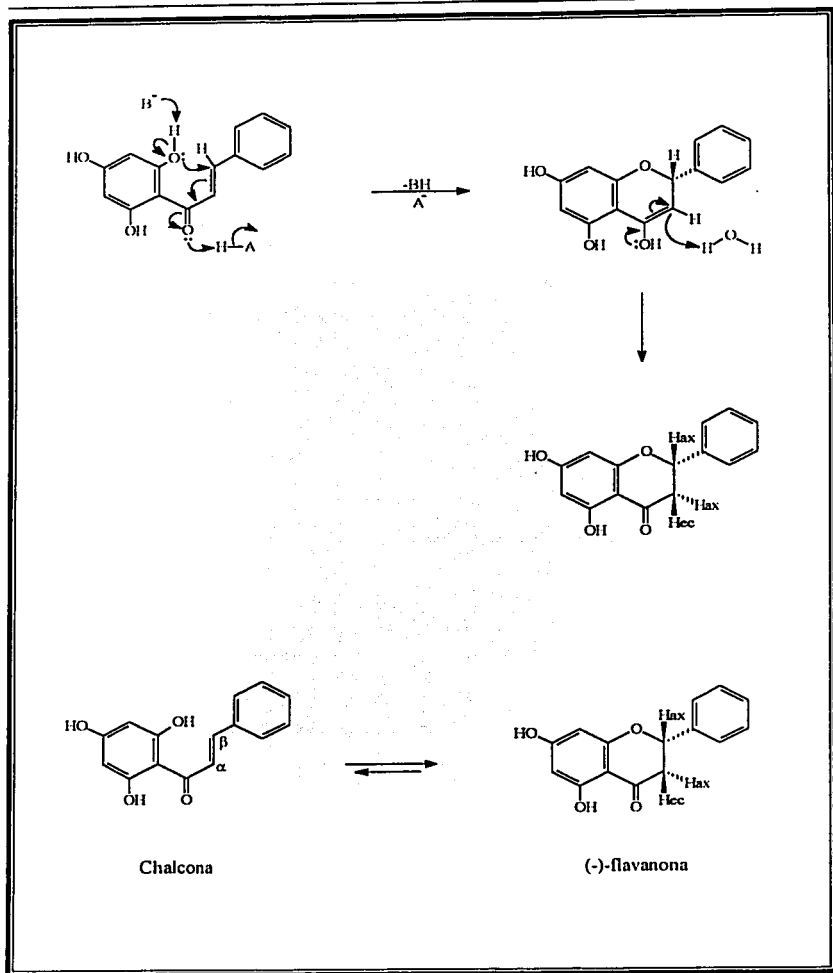
La conversión estereoespecífica de la chalcona a la (-)-flavanona, es catalizada *in vivo* por la enzima chalcona isomerasa que es considerada como la segunda enzima clave en la biosíntesis de los flavonoides, ver *esquema 4*; todo esto se ha confirmado mediante marcadores de nivel enzimático.



Esquema 2. Via de fenilalanina/hidroxicinámatos.



Esquema 3. Formación de fenilpropanoides utilizando hidroxicinámato. X= OH o glucosa (1-O-acilglucósido).



Esquema 4. Conversión estereoespecífica de la chalcona a (-)-flavanona.

Finalmente, la flavanona puede modificarse por reacciones adicionales que incluyen oxidaciones, alquilación, acilación y glicosilación, las cuales producen una gran diversidad estructural de estos compuestos, *ver esquema 5* [3, 10, 12-15].

Posiblemente la síntesis de los flavonoides se da 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, entre otros órganos [16].

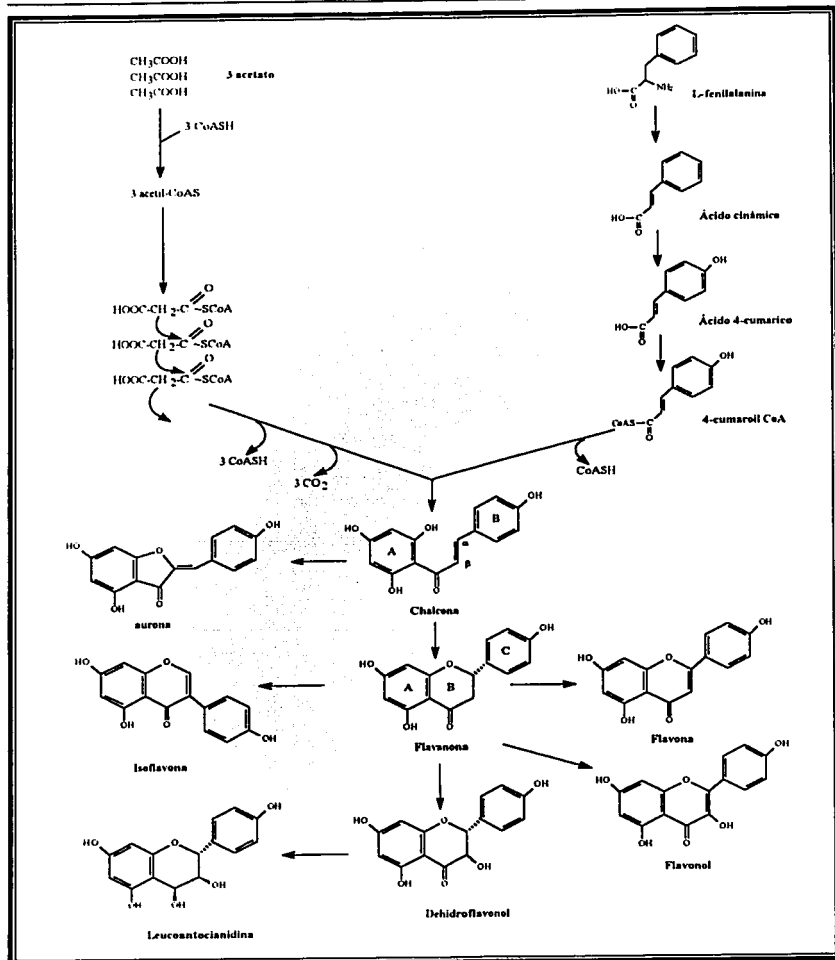
3. ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS FLAVONOIDES.

Los flavonoides se han aislado de muchas drogas vegetales debido a su amplia distribución. Su presencia en una droga vegetal no necesariamente explica sus propiedades farmacológicas.

Aunque todavía no se conoce exactamente el papel que los flavonoides desempeñan en las plantas. En la literatura especializada se ha reseñado una gran diversidad biológica entre las que se encuentran: antitumorales, antiinflamatorias, antihepatotóxica, antimicrobiana, antiviral, antialérgica, antiulceroza, analgésica, antimalárica, hipoglucémico, antioxidantes, anticoagulantes, desordenes gastrointestinales, sobre el sistema vascular y neuroactivos [17-20].

3.1). Flavonoides y el color de las flores.

Los flavonoides juegan un papel importante en la reproducción de las flores, ya que estos forman parte de los pétalos y son los responsables de la atracción de diferentes vectores de polinización (abejas, pajaros, mariposas, etc.). Los flavonoides junto con el olor y el néctar son los principales atractores, para la fertilización de las flores y por tanto la preservación de la especie.



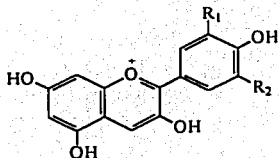
Esquema 5. Mecanismo general de la biogénesis de los flavonoides.

Las antocianinas son las más importantes en la coloración de las plantas y el efecto de la hidroxilación es más evidente por el sistema flavilium. La contribución de las antocianinas es representada por tres de estas: pelargonidina (38), cianidina (39) y delphinidina (40). La presencia de delphinidina glicósilada produce el color guinda, por lo que para dar el color azul requiere de la presencia de un copigmento de flavona y ocasionalmente de uno o más cationes metálicos, entre los que están el magnesio (Mg^{2+}), aluminio (Al^{3+}) y hierro (Fe^{3+}). Ejemplo de estas sustancias es la malonilwabanina (41) que tiene al copigmento flavo-comelinin y dos metales que son Fe^{3+} y Mg^{2+} [21].

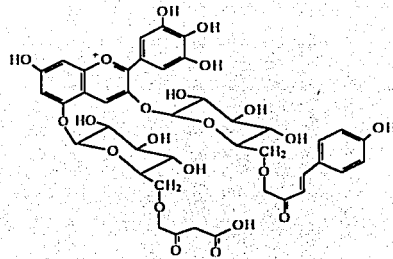
El color producido por los flavonoides se ve influenciado por la posición de los grupos hidroxilo en los anillos del esqueleto de los flavonoides, provocando un aumento en el efecto batocrómico, cambiando las propiedades en la formación del color, *ver tabla 1* [18].

FLAVONOIDE	POSICIÓN DE HIDROXILACIÓN	COLOR	ESTRUCTURA
Flavonas			
Apigenina	5, 7, 4'	Ante	42
Luteolina	5, 7, 3', 4'	Ante	43
Flavonol			
Quercetina	3, 5, 7, 3', 4'	Crema	44
Gossipetina	3, 5, 7, 8, 3', 4'	Amarillo	45
Chalcona			
Betuina	3, 4, 2', 4'	Amarillo	46
Okanina	3, 4, 2', 4', 5'	Amarillo	47
Auronas			
Sulfuretina	6, 3', 4'	Amarillo intenso	48
Maritimetina	6, 7, 3', 4'	Amarillo intenso	49
Antocianinas			
Apigenidina	5, 7, 4'	Amarillo-Naranja	50
Luteolinidina	5, 7, 3', 4'	Naranja	51
Pelarginidina	5, 7, 3', 4', 5'	Naranja-Rojo	52
Tricetinidina	3, 5, 7, 4'	Escarlata	53
Cianidina	3, 5, 7, 3', 4'	Carmesi	39
Delphinidina	3, 5, 7, 3', 4', 5'	Azul	40

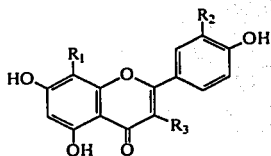
Tabla 1. Efecto del grupo hidroxilo en la producción del color de las flores.



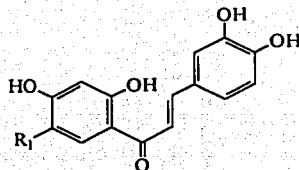
- 38 $R_1=R_2=H$
 39 $R_1=OH; R_2=H$
 40 $R_1=R_2=OH$



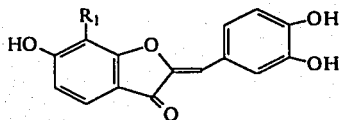
41



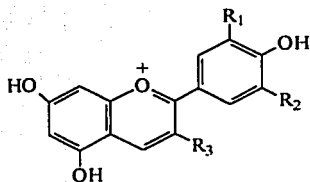
- 42 $R_1=R_2=R_3=H$
 43 $R_1=R_3=H; R_2=OH$
 44 $R_1=H; R_2=R_3=OH$
 45 $R_1=R_2=R_3=OH$



- 46 $R_1=H$
 47 $R_1=OH$



- 48 $R_1=H$
 49 $R_1=OH$



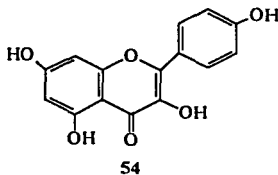
- 50 $R_1=R_2=R_3=H$
 51 $R_1=OH; R_2=R_3=H$
 52 $R_1=R_2=OH; R_3=H$
 53 $R_1=R_2=H; R_3=OH$

3.2). Flavonoides y Protección UV-B en las Plantas.

Por convención, la radiación ultravioleta es dividida en tres bandas, cada una con diferente energía y significancia ecológica. En este caso la radiación UV-B es la de mayor importancia, ya que esta puede penetrar la capa de ozono de la estratósfera y causar daños a la vida de las plantas.

La resistencia a la radiación UV-B puede darse de diferentes formas, pero una de estas es la que proporcionan los flavonoides que se encuentran presentes en las hojas de las plantas.

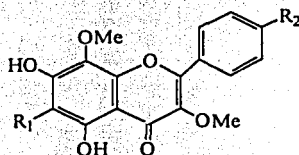
Estos flavonoides generalmente absorben a una longitud de onda de 280-315 nm, que corresponde a la de los rayos UV-B, por lo que estos son capaces de actuar como filtros, proporcionándole una protección contra los daños que causaría dicha radiación en las plantas, como por ejemplo el Kamferol (54).



Se han realizado numerosos experimentos fisiológicos que han proporcionado evidencias de que los flavonoides están involucrados dentro de la protección de la radiación UV-B. Algunos flavonoides en estado libre (aglicona) dan diferentes características de protección contra la radiación UV-B, ya que absorben a una longitud de onda de 250-320 nm.

Los flavonoides que son generalmente protectores de la radiación UV-B, son las flavanonas y flavonoles glicosilados [21].

Se han estudiado a dos especies de *Gnaphalum* (*vira-vira* y *luteo album*) de la familia Compositae, de las cuales se aislaron flavonoides con una alta capacidad de protección contra la radiación UV-B como son: araneol (55), caticopterina (56) y gnafalina (57) [21].



55 R₁ = OCH₃; R₂ = H
 56 R₁ = OCH₃; R₂ = OH
 57 R₁ = R₂ = H

Así como en estas especies de plantas, en otras se han encontrado una amplia gama de flavonoides que sirven de protección contra los rayos del tipo UV-B, los cuales se localizan en diferentes partes de la planta, como puede ser en las hojas onduladas, vellocidades y en las células de la epidermis, ver tabla 2 [21].

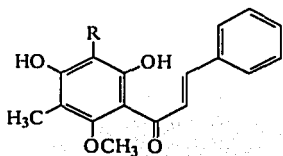
ESPECIE DE PLANTA	LOCALIZACIÓN DEL FLAVONOIDE	FLAVONOIDE PROTECTOR
<i>Arabidopsis thaliana</i>	células epidermales	Kamferol-3-gentiobiosido-7-ramnósido
<i>Brassica napus</i>	células epidermales	Quercetina-3-soforósido-7-glucósido
<i>Brassica oleracea</i>	células epidermales	Glicósido de la cianidina
<i>Gnaphalum luteo-album</i>	hojas onduladas	Calicopterina
<i>Hardeum vulgare</i>	células epidermales	Saponarina y Lutonarina
<i>Quercus ilex</i>	vellocidades de las hojas	Glicósido del kamferol acetilado
<i>Zea mays</i>	células epidermales	Antocianinas

Tabla 2. Flavonoides con efecto protector a la radiación UV-B.

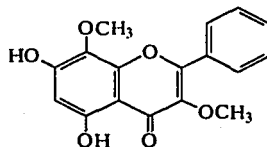
3.3). Actividad Antimicrobiana.

Las plantas son capaces de defenderse por si mismas de hongos y bacterias; o bien después de haber sufrido algún daño causado por agentes químicos o mecánicos, mediante la biosíntesis de metabolitos secundarios —fitoalexinas— en respuesta a estas nuevas condiciones de estrés.

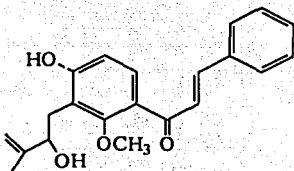
Dentro de las fitoalexinas se han caracterizado fenoles, polifenoles, diterpenos y flavonoides. Estos últimos han demostrado poseer propiedades antifúngicas, antibacteriales y como agentes antivirales, *ver tabla 3* [21].



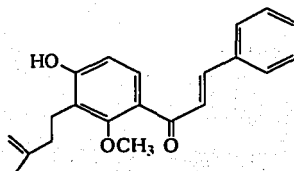
58 R = CH₃
59 R = H



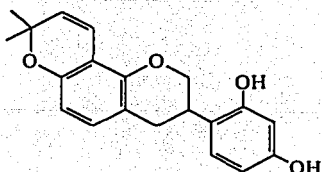
60



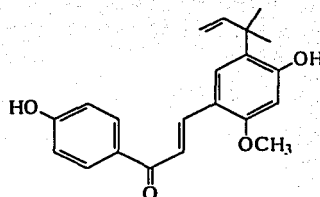
61



62



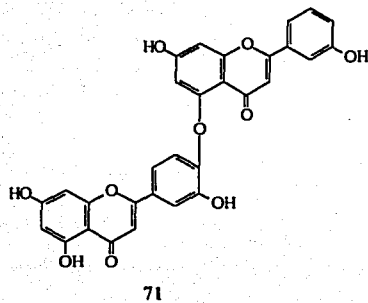
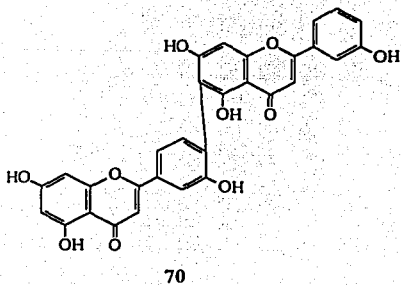
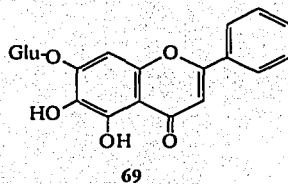
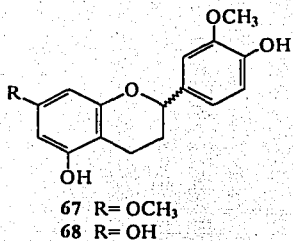
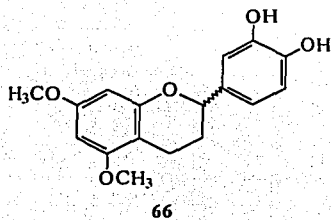
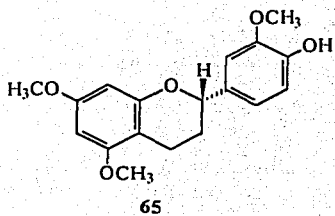
63

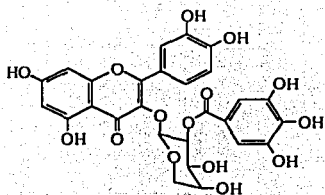


64

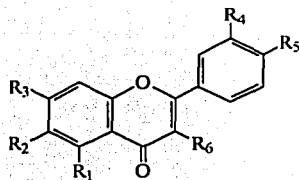
Planta	Sustancia	Actividad	Ref.
<i>Myrica serrata</i>	2',4'-dihidroxi-6'-metoxi-3',5'-dimetilchalcona (58) 2',4'-dihidroxi-6'-metoxi-5'-metilchalcona (59)	<i>Cladosporium cucumerinum</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Escherichia coli</i>	22
<i>Helichrysum picardii</i>	5,7-dihidroxi-3,8-dimetoxiflavona (60)	<i>Staphylococcus epidermis</i> <i>Bacillus ssp</i> <i>E. coli</i> <i>Serratia marcescens</i>	23
<i>Maclura tictoria</i>	2',4',4,2''-tetrahidroxi-3'-[3''-metilbut-3''-enil]-chalcona (61) Isobachalcona (62)	<i>C. albicans</i> <i>Cryptococcus neoformans</i>	24
<i>Glycyrrhiza glabra</i>	glabridina (63)	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>B. subtilis</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Mucro pusillus</i>	25
<i>Glycyrrhiza inflata</i>	licochalcona A (64)	<i>S. aureus</i> <i>B. subtilis</i>	25
<i>Mariscus pilostachys</i>	(2S)-4'-hidroxi-5,7,3'-trimetoxiflavano (65) (±)-3',4'-dihidroxi-5,7-dimetoxiflavano (66) (±)-5,4'-dihidroxi-7,3'-dimetoxiflavanona (67) (±)-5,7,4'-trihidroxi-3'-metoxiflavanona (68)	<i>C. albicans</i> <i>C. cucumerinum</i>	26
<i>Scutellaria baicalensis</i>	7-O-β-D-glucósido de baicalina (baicalina) (69)	virus VIH	21
<i>Rhus succedanea</i>	robustaflavona (70) hinokiflavona (71)	VIH-1 transcriptasa reversa	27
<i>Acer okamotoanum</i>	quercetina 3-O-(2''-galoil)-a-L-arabinopiranosida (72)	VIH-1 integrasa	28
	6-hidroxiluteolina (73)	virus de mieloblastosis	29
	pedalitina (74)	virus de mieloblastosis	29
	scutelareina (75)	virus de leucemia	29
	amentoflavona (76)	virus de leucemia	29
	quercetagina (77)	virus de leucemia	29

Tabla 3. Flavonoides con actividad antifúngica-antibacteriana y antiviral.





72

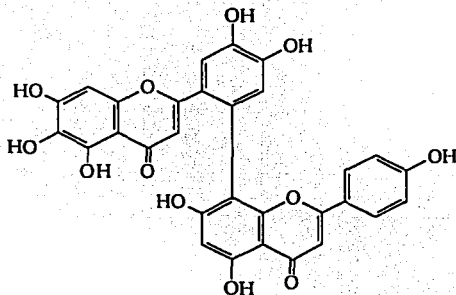


73 $R_1=R_2=R_3=R_4=R_5=OH$; $R_6=H$

74 $R_1=R_2=R_3=R_5=OH$; $R_4=CH_3$; $R_6=H$

75 $R_1=R_2=R_3=R_5=OH$; $R_4=R_6=H$

76 $R_1=R_2=R_3=R_4=R_5=OH$; $R_6=OCH_3$

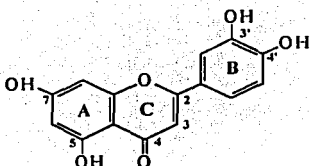


77

3.4). Actividad Antióxidante.

La actividad antioxidante de los flavonoides está determinada por la presencia de ciertos grupos en su estructura base: hidroxilación en el anillo B, C-3 y C-5, grupo carbonilo en C-4 y por la doble ligadura entre C₂-C₃ (78) [30].

A los flavonoides se les ha demostrado la capacidad de remover varias especies oxidantes como el anión superóxido (O₂^{•-}), los radicales hidroxilo (HO[•]), los radicales peróxil (ROO[•]) y la formación de enlaces con los cationes de Fe³⁺ endógenos que actúan en la peroxidación [21].

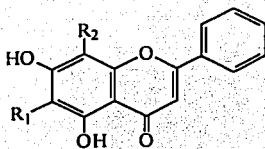


78

En trabajos previos se ha demostrado que las 3,4-dihidrochalconas son más activas que en su forma de flavanonas, ya que estos poseen la habilidad de una mayor deslocalización de electrones. Algo similar ocurre con las isoflavonas que son mucho más activas que las flavonas, esto por los efectos del grupo carbonilo del C-4 y del grupo hidroxilo del C-5. En la *tabla 4*, se muestran algunos flavonoides con propiedades antioxidantes.

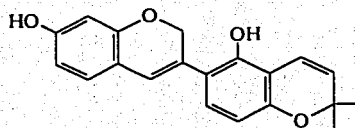
Planta	Sustancia	Ref.
<i>Sideritis haicalensis</i>	wogonina (79)	21
	baicalcina (80)	
<i>Glycyrrhiza glabra</i>	glabrena (81)	25
<i>Glycyrrhiza inflata</i>	licochalcona B (82)	25
<i>Lespedeza homoloba</i>	lespedazol A2 (83)	20
	lespedazol A3 (84)	
	lespedazol B2 (85)	
<i>Sideritis javalambrensis</i>	gossipina (86)	31
	7-[6"-acetilalopiranosil (1-2)glucopiranosal]-5,8-dihidroxi-4'-metoxiflavona (87)	
	7-[alopiranosil (1-2)glucopiranosal]-5,8-dihidroxi-4'-metoxiflavona (88)	
	7-[6"-acetilalopiranosil (1-2)glucopiranosal]-5,8,3'-trihidroxiflavona (89)	
	7-[6"-acetilalopiranosil (1-2)glucopiranosal]-5,8,4'-trihidroxiflavona (90)	
7-[alopiranosil (1-2)glucopiranosal]-5,7,3',4'-tetradroxi-4'-metoxiflavona (91)		

Tabla 4. Flavonoides con actividad antioxidante.

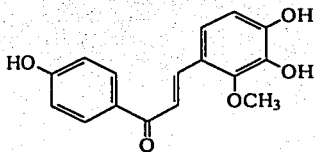


79 $R_1 = H$; $R_2 = OCH_3$

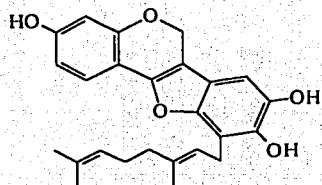
80 $R_1 = OH$; $R_2 = H$



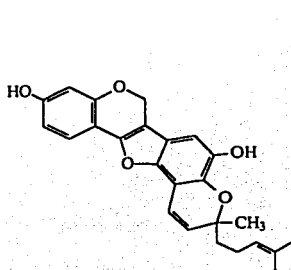
81



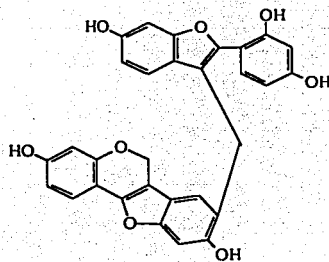
82



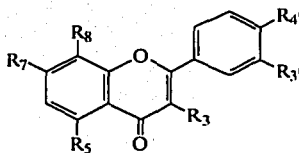
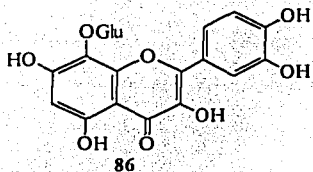
83



84



85

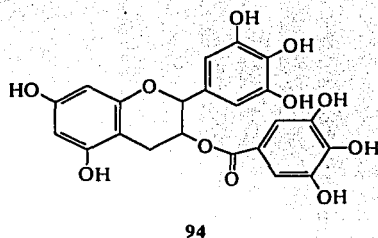
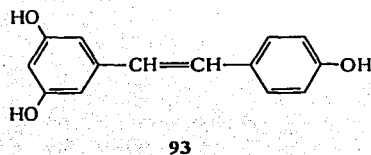
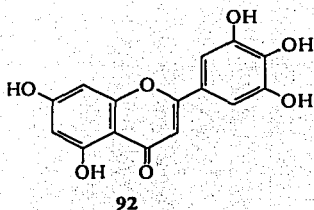


	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆
87	H	OH	OAAG	OH	H	OCH ₃
88	H	OH	OAG	OH	H	OCH ₃
89	H	OH	OAAG	OH	OH	OCH ₃
90	H	OH	OAAG	OH	H	OH
91	H	OH	OH	OG	OH	OH

AAAG= 6'''-acetilalopiranosil(1:2)glucopiranosil
 AG= alopiranosil(1:2)glucopiranosil
 G= Glucosa

Se ha comparado el efecto antioxidante de los flavonoides y de los α -tocoferoles, en donde se encontró que los flavonoides son capaces de inhibir en mayor proporción la formación de productos reactivos derivados del ácido tiobarbitúrico (TBAROs); estos efectos son atribuidos a la capacidad que tienen los flavonoides para atrapar los radicales libres, formados durante la autooxidación y formar enlaces con los cationes Fe^{3+} endógenos que activan la peroxidación, el mecanismo de acción de los flavonoides aislados de *Plectranthus amboinicus* fue determinada por comparación con la de los α -tocoferoles [32].

Un aspecto muy importante es el consumo de frutas y vegetales que poseen flavonoides antioxidantes, ya que estos pueden reducir el riesgo de contraer enfermedades del corazón y de cáncer, se ha demostrado que la cebolla, manzana, té, contienen antioxidantes más fuertes que las vitaminas antioxidantes. Algunos flavonoides con estas características son luteolina (43), miricetina (92), resveratrol (93) para la prevención de enfermedades del corazón y el galato de la epigallocatequina (94) para el cáncer [33, 34].



3.5). Actividad Antiinflamatoria.

Los flavonoides como antiinflamatorios naturales, presentan ventajas muy importantes en comparación con los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (NSAID), ya que estos presentan un alto margen de seguridad, una mínima capacidad ulcerogénica y baja toxicidad cuando se emplean en tratamientos prolongados [35]. Se piensa que los flavonoides pueden inhibir la ciclooxigenasa (CO) y/o la 5-lipoxigenasa (LO) dentro de la ruta del metabolismo del ácido araquidónico.

El mecanismo de acción de los flavonoides, son atribuidos a los siguientes aspectos:

- Inhibición en la liberación de histamina.

La liberación de histamina se lleva a cabo por agentes como la concanavalina A, antígeno, lectinas, ATP, dextranos de alto peso molecular. Todos estos agentes son

dependientes de la presencia de calcio extracelular. Algunos flavonoides incrementan la eficiencia de la bomba de iones dependientes de ATP, inhibiendo la ATPasa-Na/K⁺ y la ATPasa-Ca²⁺ mitocondrial, la cual es responsable para el mantenimiento de niveles bajos de calcio intracelular, inhibiendo la secreción de histamina que es dependiente de un incremento de calcio libre intracelular [35].

- Efectos en leucocitos.

La quercetina es un inhibidor potente de la quimiotaxis, desgranulación de neutrófilos, producción de superóxidos y también bloquea varias C-cinasas, que son necesarias para la activación de neutrófilos. Asimismo, inhibe la reacción de fosforilación dependiente de calmodulina que es importante para la activación de neutrófilos, mastocitos y basófilos.

- Metabolismo del ácido araquidónico.

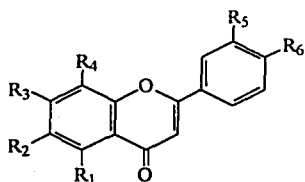
Los flavonoides inhiben a la enzima (fosfolipasa A₂) involucrada en el metabolismo del ácido araquidónico, inhibiendo por tanto la síntesis de prostaglandinas y leucotrienos [35].

Las antocianinas como la cianidina, son compuestos con alta actividad antiinflamatoria, las cuales tiene la capacidad de inhibir a la Prostaglandina Endoperóxido Hidrógeno Sintasa-1 y 2 (PGHS-1 y 2). Un efecto adverso que producen los fármacos antiinflamatorios no esteroideos es la ulcerogenicidad —inhibición de la PGHS-1—, sin embargo la inhibición preferencial de la enzima PGHS-2 por parte de la cianidina, hace que se reduzca considerablemente el efecto adverso provocado por la inhibición de la enzima PGHS-1 [35]. En la *tabla 5*, se enlistan algunos flavonoides y su mecanismo de acción.

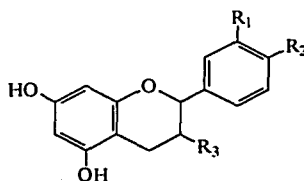
La actividad antiinflamatoria de los flavonoides está relacionada con su poder como agentes antioxidantes, ya que estos poseen la característica de atrapar radicales libres impidiendo la unión con enzimas específicas.

Sustancia	Mecanismo de acción	Ref.
nepetrina (95) taxifolina (96) 3-O-soforósido del kamferol (97) timonina (98)	Inhibición de histamina	36-39
sideritoflavona (99) diosmetina (100)	inhibición de las enzimas CO y LO	37,39.
cirsiliol (101) fisetina (102) chrisina (103) orabol (104)	inhibición de las enzimas CO y LO	39
galangina (105) hesperetina (106) morina (107)	inhibición de las enzimas CO y LO	35
3,6,4'-trimetoxikamferol (108) 3,6,3'-trimetoxiquercetina (109) 6-metoxiluteolina (110)	inhibición de las enzimas CO y LO	40
artemetina (111)	inhibición del edema producida por carragenina	41
apigenina (112) genisteina (113)	inhibición de crecimiento de fibroblastos inhibición de las enzimas CO y LO	42
4-metoxidalbergiona (114) ccaroína (115)	liberación de histamina	43

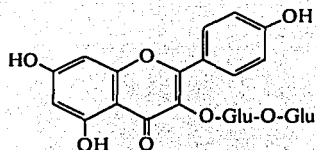
Tabla 5. Flavonoides con actividad anti-inflamatoria.



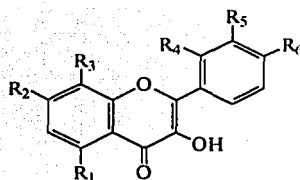
- 95 $R_1=R_3=R_6=OH$; $R_2=OCH_3$; $R_4=H$
 98 $R_1=R_2=OH$; $R_3=R_4=R_5=R_6=OCH_3$
 99 $R_1=R_3=R_6=OH$; $R_2=R_3=R_4=OCH_3$
 100 $R_1=R_3=R_6=OH$; $R_2=R_4=H$; $R_6=OCH_3$
 101 $R_1=R_3=R_6=OH$; $R_2=R_3=OCH_3$; $R_4=H$
 103 $R_1=R_3=OH$; $R_2=R_4=R_5=R_6=H$
 110 $R_1=R_3=R_5=R_6=OH$; $R_2=OCH_3$; $R_4=H$
 112 $R_1=R_3=R_6=OH$; $R_2=R_4=R_5=H$



- 96 $R_1=R_2=R_3=OH$
 106 $R_1=R_2=R_3=H$



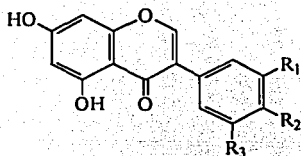
97



102 $R_1=R_3=R_4=H$; $R_2=R_5=R_6=OH$

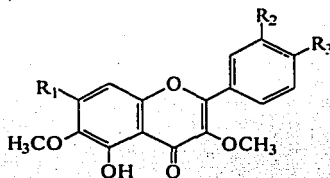
105 $R_1=R_2=OH$; $R_3=R_4=R_5=R_6=H$

107 $R_1=R_3=R_4=OH$; $R_2=R_5=H$; $R_6=OCH_3$



104 $R_1=R_3=OH$; $R_2=H$

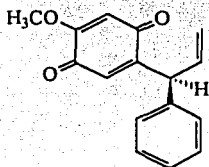
105 $R_1=R_3=H$; $R_2=OH$



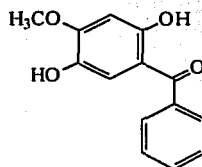
108 $R_1=R_3=OH$; $R_2=H$

109 $R_1=R_3=OH$; $R_2=OCH_3$

111 $R_1=R_2=R_3=OCH_3$



114

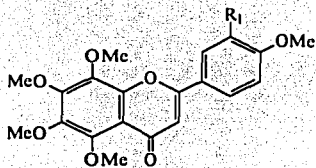


115

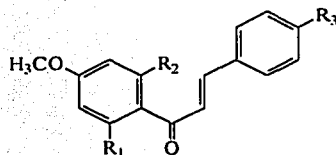
En el mecanismo de acción sobre la lipoxigenasa, se ha sugerido que los grupos hidroxilos en C-3' y C- 4' permiten la formación de quelatos con Cu^{2+} y otros iones divalentes que conducen a la formación de radicales libres [35].

3.6). Actividad Citotóxica-Antitumoral.

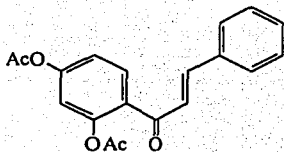
Bioensayos realizados para determinar la actividad citotóxica de diferentes extractos de plantas empleados en la medicina tradicional China, han mostrado estar constituidos principalmente por catequinas, dihidrochalconas, flavanos, chalconas, flavanonas, dihidroflavonoles, flavonas, biflavonoides y flavonoles [21]. Por ejemplo: tangeretina (116) y la nobiletina (117), que se encuentran en las frutas cítricas, han mostrado poseer actividad anticarcinogénica y antitumoral [21]. En la *tabla 6*, se muestran algunos ejemplos de flavonoides con actividad citotóxica-antitumoral.



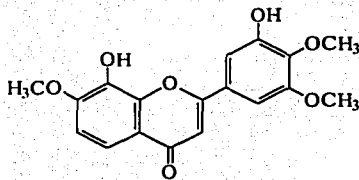
116 R₁= H
117 R₁= OH



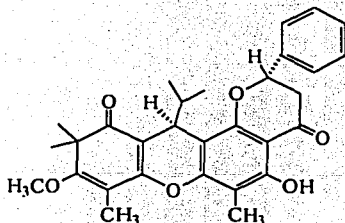
118 R₁=R₂=R₃= OH
119 R₁=R₂= OH; R₃= H



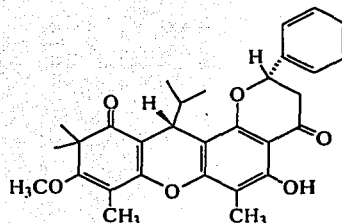
120



121



122 R= α-H

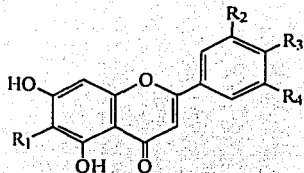


123 R= β-H

Planta	Sustancia	Actividad	Ref.
<i>Ononis natrix ssp ramosissima</i>	4,2',6'-trihidroxi-4'-metoxidihidrochalcona (118) 2',6'-dihidroxi-4'-metoxidihidrochalcona (119) 2',4'-diacetoxichalcona (120)	P-388, A-549, HT-29	44
<i>Muntingia calabura</i>	3',8-dihidroxi-7,4',5'-trimetoxiflavona (121)	P-388	21
<i>Baeckea frutescens</i>	BF-4 (122) BF-5 (123)	L-1210	45
<i>Arnica montana y Arnica chamissonis</i>	jaceosidina (124)	GLC ₄ COLO 320	46
<i>Scutellaria indica</i>	(2S)-5,7-dihidroxi-8,2'-dimetoxiflavanona (125) wogonina (79) (2S)-5,2',5'-trihidroxi-7,8-dimetoxiflavanona (126)	L-1210, SNU-1, HL-60 y K562	47
<i>Muntingia calabura</i>	(2S)-7,8,3',4',5'-pentametoxiflavano (127) (2S)-5'-hidroxi-7,8,3',4'-tetrametoxiflavano (128) (2S)-8-hidroxi-7,3',4',5'-tetrametoxiflavano (129) 7,8,3',4',5'-pentametoxiflavona (130)	Me12, KB y P-388	48
<i>Scutellaria baicalensis</i>	5,7,2'-trihidroxiflavona (131) 5,7,2',3'-tetrahidroxiflavona (132)	antitumoral (tumor EBV-EA)	21
<i>Amorpha fruticosa</i>	amorfispironona (133) tefosina (134) 3,7-dimetoxiflavona (135)	antitumoral (tumor EBV-EA) células cancerosas de mama	21

Tabla 6. Flavonoides con actividad citotóxica y anti-tumoral.

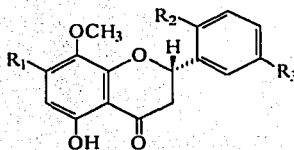
P-388= células de leucemia; A-549= células cancerígenas; HT-29= cáncer de colon humano; L-1210= leucemia de ratón; GLC₄= carcinoma de pulmón humano; COLO 320= adenocarcinoma de colon humano; SNU-1= carcinoma humano; HL-60 y K562= leucemia humana; Me12= melanoma humano y KB= carcinoma humano nefaríngeo.



124 $R_1=R_3=OCH_3$; $R_2=H$; $R_4=OH$

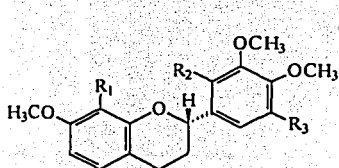
131 $R_1=R_3=R_4=H$; $R_2=OH$

132 $R_1=R_4=H$; $R_2=R_3=OH$



125 $R_1=OH$; $R_2=OCH_3$; $R_3=H$

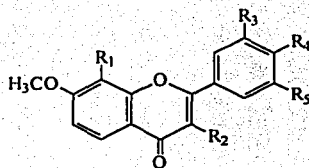
126 $R_2=R_3=OH$; $R_1=OCH_3$



127 $R_1=R_3=OCH_3$; $R_2=H$

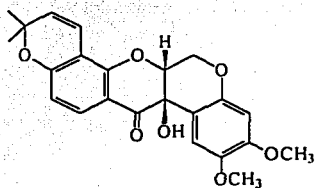
128 $R_1=OCH_3$; $R_2=H$; $R_3=OH$

129 $R_1=OH$; $R_2=H$; $R_3=OCH_3$

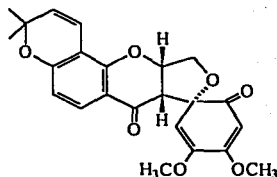


130 $R_1=R_3=R_4=R_5=OCH_3$; $R_2=H$

135 $R_1=R_3=R_4=R_5=H$; $R_2=OCH_3$



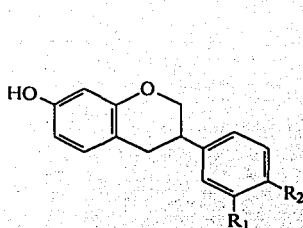
133



134

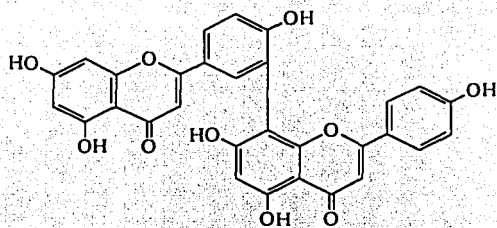
3.7). Otras actividades biológicas.

Por otro lado, también se ha informado de flavonoides con propiedades neuroactivas, la primera referencia de un flavonoide con estas propiedades fue informada en 1983 por *Luk y col.*, al aislar de la orina bovina dos isoflavanos —4',7-dihidroxi flavano (136) y 3',7-dihidroxi flavano (137)— los cuales sirven como receptores de benzodiazepinas (BDZ-Recep). Otro ejemplo es la amonoflavona (138), la cual tiene una alta afinidad por los BDZ-R en el cerebro, y presenta características similares a las del diazepam [19].



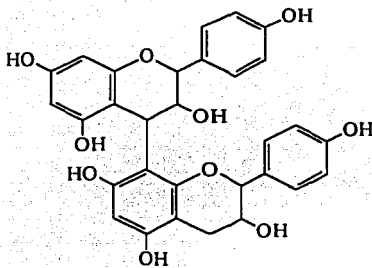
136 R₁= H; R₂= OH

137 R₁= OH; R₂= H

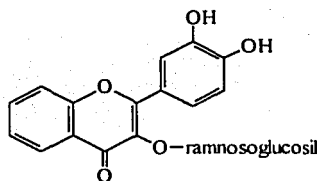


138

Flavonoides como la gossipina, epicatequina (139), morina (107) y rutina (140), tienen actividad analgésica muy significativa. En estudios realizados para evaluar la relación estructura actividad de las flavonas, se ha demostrado que la hidroxilación en el C-5 incrementa la potencia analgésica, la cual se ve desfavorecida por el grupo metoxilo en el C-3. La metoxilación en los C-6 o C-4' producen un incremento en la actividad; sin embargo si los grupos metoxilo se localizan en las posiciones C-7 o C-2', disminuye la actividad del flavonoido [21].



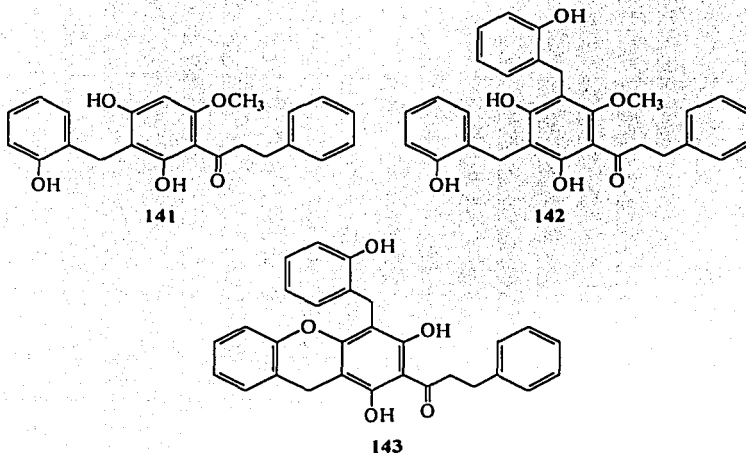
139



140

En China, la *Artemisia annua* es usada tradicionalmente para el tratamiento de la malaria, de donde se han aislado artemisina —lactona sesquiterpénica— y la artemitina —flavonoido— las cuales han demostrado poseer una actividad antimalárica similar.

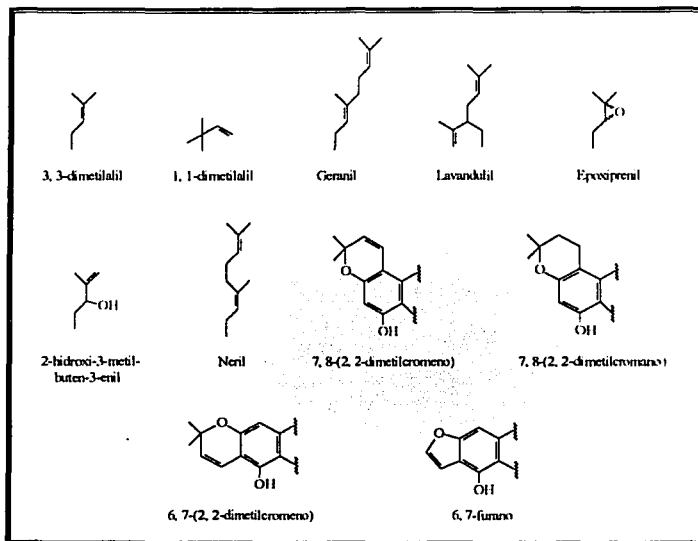
Por otro lado, en diferentes especies de *Uvaria* se han aislado flavonoides con propiedades antimaláricas entre los que destacan la uvaretina (141) y sus derivados —diuvaretina (142) y chamuvaretina (143)— [21].



4. FLAVONOIDES PRENILADOS.

En los últimos 20 años ha habido un gran incremento en la descripción de flavonoides prenilados, especialmente en flavanonas, chalconas y flavonas. Los sustituyentes más frecuentemente encontrados son: el 3,3-dimetilalilo, 1,1-dimetilalilo, geranilo, lavandulilo, farnesilo, entre otros, *ver esquema 6* [49].

Las flavanonas (2S) preniladas pueden encontrarse di- y tri-preniladas —prenilo, geranilo, lavandulilo, dimetilalilo, entre otros— la presencia de este tipo de sustituyentes les permite tener propiedades biológicas importantes como son: antimicrobianas, antifúngicas, antioxidantes y antivirales [49].



Esquema 6. Grupos prenilo presentes en flavonoides.

4.1). Actividad biológica

La actividad biológica de los flavonoides prenilados es muy importante, principalmente como sustancias antimicrobianas, antioxidantes y antivirales, *ver tabla 7*.

La actividad antifúngica-antimicrobiana, es atribuida a la presencia del hidroxilo fenólico, que presenta una gran afinidad por proteínas y en consecuencia actúa inhibiendo enzimas, no permitiendo la fosforilación oxidativa [49].

La adición de los grupos prenilo dentro de la molécula de los flavonoides, permite un incremento en la lipofilidad y por lo tanto un aumento en la actividad antimicrobiana, debido a la interacción de estos con la membrana celular de los microorganismos [49].

Planta	Sustancia	Actividad	Ref.
<i>Eysenhardtia texana</i>	4',5,7-trihidroxi-8-metil-6-(3'',3''-dimetilalil)-flavanona (144) 4',5,7-trihidroxi-6-metil-8-(3'',3''-dimetilalil)-flavanona (145)	<i>Candida albicans</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	50
<i>Derris scandes</i>	derrisisoflavona (146) 5,7,4'-trihidroxi-6,8-diprenilisoflavona (147) lupalbigenina (148)	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	51
<i>Glycyrrhiza inflata</i>	licochalcona C (149)	<i>Bacillus subtilis</i> <i>S. aureus</i> <i>Micrococcus luteus</i>	52
<i>Physena madagascariensis</i>	remangiflavanona A (150) remangiflavanona B (151)	<i>S. aureus</i> y <i>epidermis</i> <i>Listeria monocytogenes</i> <i>Enterococcus sp</i>	53
<i>Monotes engleri</i>	6-(1,1-dimetilalil)-naringenina (152) 6-(1,1-dimetilalil)-eriodictyol (153) 3'-O-metil-6-(1,1-dimetilalil)-eriodictyol (154) 6,8-diprenileriodictyol (155) ^a hivanona (156)	A431, BC1, Col2, HT, KB, LNCaP, Lu1, Me12 y U373	54
<i>Monotes africanus</i>	6,8-diprenilaromadendrina (157) 6,8-diprenilkaempferol (158) lonchocarpol A (159)	ciclo de replicación viral de VIH ^b	55
<i>Anaxagorea luzonensis</i>	(2S)-8-isopentenilnaringenina (160)	estrogénica	56

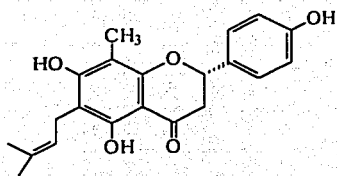
Tabla 7. Actividad biológica de flavonoides prenilados.

a. Aumento de la actividad al presentar dos grupos prenilo en la molécula.

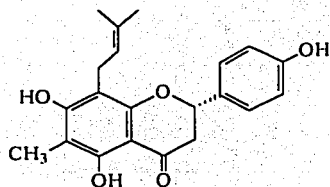
b. Puede presentarse en solo dos etapas de este: adsorción del virus y transcripción reversa.

A431= carcinoma; BC1= cáncer de mama; Col2= cáncer de colon; HT= fibrocarcinoma; KB= carcinoma oral; LNCaP= cáncer de prostata.

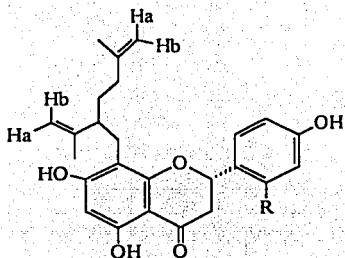
Lu1= cáncer de pulmón; Me12= melanoma y U373= glioma.



144

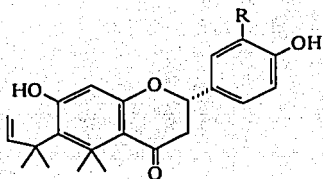


145



150 R= H

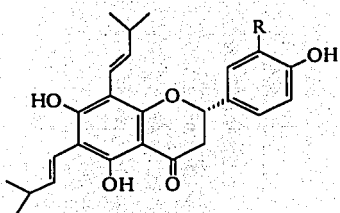
151 R= OH



152 R= H

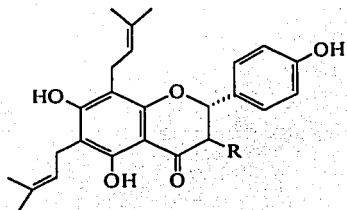
153 R= OH

154 R= OCH₃



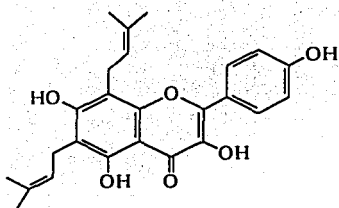
155 R= OH

156 R= OCH₃

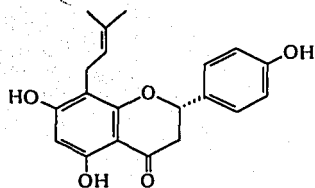


157 R= OH

159 R= H



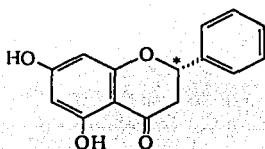
158



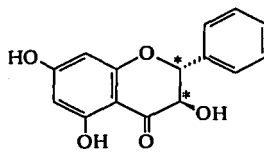
160

5. PROPIEDADES ÓPTICAS DE LOS FLAVONOIDES.

La actividad óptica de los flavonoides se manifiesta en las flavanonas y flavonoles, ya que presentan centros estereogénicos en los C-2 y C-3 respectivamente.



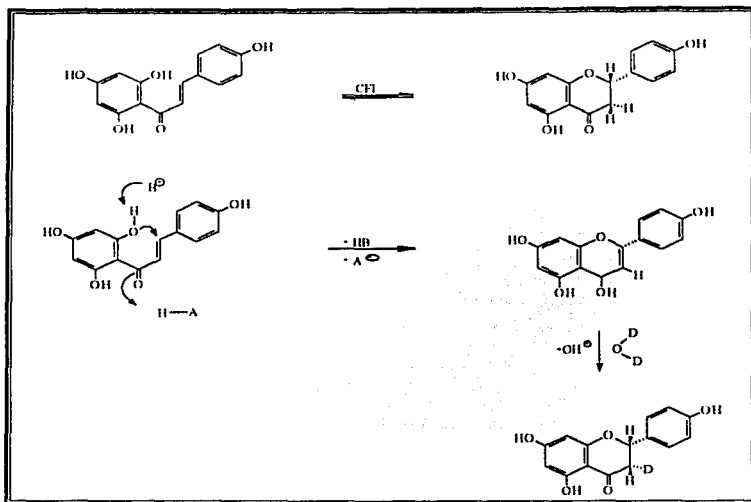
flavanona



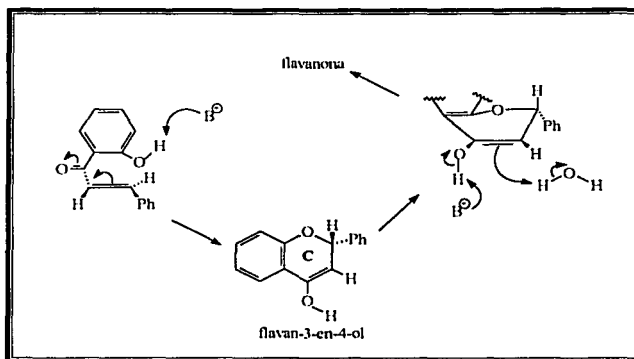
flavonol

Para la determinación de la configuración absoluta en el C-2 de las flavanonas se debe tomar en cuenta su mecanismo de formación a partir de la chalcona catalizada *in vivo* por la enzima chalcona flavanona isomerasa (CFI), ver *esquema 7* [57,58].

La formación del anillo C tiene lugar mediante un ataque nucleofílico sobre la cara *si* del doble enlace de la cetona α , β -insaturada para generar el flavan-3-en-4-ol como intermediario, el cual sufre la adición estereoespecífica de un protón por la cara *si*. La adición global es una reacción de tipo *syn*. El producto generado por la CFI corresponde al enantiómero (2*S*), ver *esquema 8*.



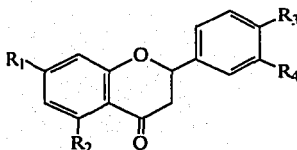
Esquema 7. Mecanismo propuesto para la formación de una flavanona.



Esquema 8. Detalle estereoquímico en el mecanismo propuesto en la formación del anillo C de las flavanonas.

La utilización de los métodos ópticos ha permitido establecer la posible configuración absoluta del C-2 de las flavanonas.

En estudios realizados a flavanonas de configuración conocida [(-)-hesperetina (161), (-)-liquiritigenina (162), (-)-eriodictiol (163) y la (+)-sakuranetina (164)] por DC y DOR y auxiliándose en la regla del octante permitió determinar que los tres primeros presentan una configuración 2*S* y el último 2*R*, presentando al grupo arilo en la posición pseudoequatorial en el anillo C [59].



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
161	OH	OH	OCH ₃	OH
162	OH	H	OH	H
163	OH	OH	OH	OH
164	OCH ₃	OH	OH	H

Gaffield (1975) realiza un estudio para determinar la configuración absoluta del C-2 de la naringenina en la toronja (*Citrus paradisi*), en donde demuestra que la configuración del C-2 se ve afectada por la maduración, esto en virtud de la presencia de los carbohidratos [60].

6. MÉTODOS QUIROÓPTICOS DE FLAVONOIDES.

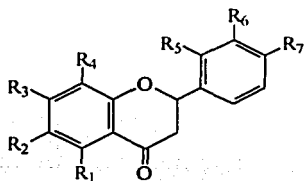
Alrededor de ciento cincuenta grupos funcionales y derivados cromofóricos encontrados frecuentemente en química orgánica se pueden investigar fácilmente por Dicroísmo Circular y Dispersión Óptica Rotatoria.

Cualquier sustancia que posea un grupo funcional que dé lugar a un efecto Cotton que permita medirse, puede investigarse por estos métodos. Entre estas sustancias se hallan los terpenos, esteroides, carotenoides, alcaloides, antibióticos, flavanonas, aminoácidos,

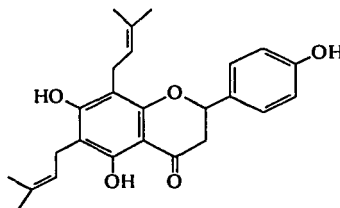
prostaglandinas, péptidos, proteínas, carbohidratos, nucleósidos y hormonas naturales y sintéticas [62-64]. En la *Tabla 8*, se presentan los datos de DC para algunas flavanonas.

Sustancia	Conc.	Datos de Dicroísmo Circular	Ref.
5,6,7-trihidroxi flavanona (165)	0.065	$[\theta]_{345} + 5260$; $[\theta]_{290} - 27800$; $[\theta]_{215} + 32400$	60
Pinoembrina (166)	0.062	$[\theta]_{325} + 13100$; $[\theta]_{285} - 50800$; $[\theta]_{235} + 28800$	
Strobopinina (167)	0.020	$[\theta]_{330} + 5410$; $[\theta]_{288} - 25000$; $[\theta]_{219} + 27000$; $[\theta]_{210} + 14900$	65
Poriol (168)	0.007	$[\theta]_{330} + 7800$; $[\theta]_{290} - 40000$; $[\theta]_{253} + 5300$; $[\theta]_{215} + 37000$; $[\theta]_{205} + 10600$	
Artocarpanona (169)	0.047	$[\theta]_{325} + 520$; $[\theta]_{290,295} - 1040$; $[\theta]_{275} + 880$; $[\theta]_{235} - 3380$; $[\theta]_{232} - 1820$	56
Dihidrotectochrisina (170)	0.010	$[\theta]_{325,330} + 2700$; $[\theta]_{285} - 8110$; $[\theta]_{255} 0$	
Percicogenina (171)	0.036	$[\theta]_{330} + 4570$; $[\theta]_{290} - 20600$; $[\theta]_{250,255} + 2640$; $[\theta]_{240} - 3080$; $[\theta]_{220} + 13600$	65
Sakuranetina (172)	0.036	$[\theta]_{325} - 3180$; $[\theta]_{285} + 10300$; $[\theta]_{235} - 5960$	
Isosakuranetina (173)	0.041	$[\theta]_{325} + 10800$; $[\theta]_{287} - 43600$; $[\theta]_{250} + 6630$; $[\theta]_{235} + 6980$	65
Liquiritigenina (174)	0.046	$[\theta]_{330} + 17100$; $[\theta]_{305} - 28200$; $[\theta]_{240} + 12400$	
Lonchocarpol A (175)	—	$[\theta]_{340} + 5900$; $[\theta]_{323} + 4000$; $[\theta]_{317} + 5400$; $[\theta]_{293} - 37600$	56
Lupinenol (176)	0.035	$[\theta]_{362} + 3300$; $[\theta]_{291} - 15600$; $[\theta]_{230} + 15100$	
(2S)-8-isopentenil naringenina (177)	—	$[\theta]_{312} + 6600$; $[\theta]_{288} - 37100$; $[\theta]_{233} + 7200$; $[\theta]_{215} + 25700$	56
(2R)-8-isopentenil naringenina (178)	—	$[\theta]_{312} - 6800$; $[\theta]_{288} + 35000$; $[\theta]_{235} - 6700$; $[\theta]_{213} - 25600$	

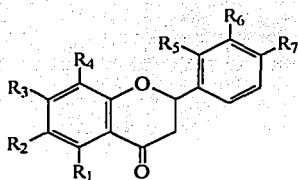
Tabla 8. Datos de Dicroísmo Circular para flavanonas.



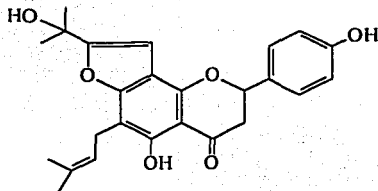
165 $R_1=R_2=R_3= OH$; $R_4=R_5=R_6=R_7= H$
 166 $R_1=R_3= OH$; $R_2=R_4=R_5=R_6=R_7= H$



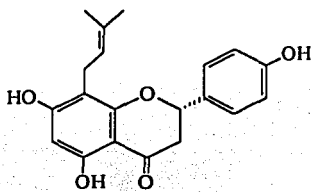
175



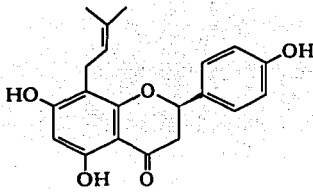
- 167 R₁=R₃= OH; R₄= CH₃; R₅=R₆=R₇= H
 168 R₁=R₃= OH; R₂= CH₃; R₄=R₅=R₆= H; R₇= OH
 169 R₁=R₅=R₇= OH; R₃= OCH₃; R₂=R₄=R₆= H
 170 R₁= OH; R₃= OCH₃; R₂=R₄=R₅=R₆=R₇= H
 171 R₁=R₆= OH; R₃=R₇= OCH₃; R₂=R₄=R₅= H
 172 R₁=R₇= OH; R₃= OCH₃; R₂=R₄=R₅=R₆= H
 173 R₁=R₃= OH; R₇= OCH₃; R₂=R₄=R₅=R₆= H
 174 R₃=R₇= OH; R₁=R₂=R₄=R₅=R₆= H



176



177



178

7. GENERALIDADES DE LOS ENSAYOS BIOLÓGICOS

Cuando se decide realizar un ensayo biológico a los extractos y/o las sustancias puras, obtenidos de las plantas, el primer paso consiste en escoger el organismo blanco adecuado. Estos pueden ser organismos inferiores (microorganismos, insectos, crustáceos o moluscos), sistemas subcelulares (enzimas, receptores, organelos), cultivo de células de origen humano, organismos aislados de vertebrados o animales íntegros [66].

Debido a la complejidad para realizar los bioensayos, estos estarán en función de las facilidades, fuentes y personal disponible, así como proponer ensayos simples y económicos para el monitoreo de extractos de plantas, fracciones y sustancias puras. En la *tabla 9*, se encuentra una selección de este tipo de bioensayos que cubren una gran variedad de blancos que permiten investigar diferentes propiedades y tipos de enfermedades [66].

TIPOS DE ENSAYOS BIOLÓGICOS	
ACTIVIDAD	BLANCO
Antibacterial	Bacterias patógenas (<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Erwinia ssp</i>)
Antifúngica	Hongos y levaduras patógenos (<i>Aspergillus sssp</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Cladosporium sssp</i>)
Toxicidad del camarón de mar	<i>Artemia salina</i> L.
Inhibición de desarrollo de tumores (ensayos de discos de papa)	Células de papa (<i>Solanum tuberosum</i>) tubérculo transformado por <i>Agrobacterium tumerfaciens</i> .
Actividad antimitótica	Erizo de mar (<i>Strongylocentrotus ssp</i>) huevecillo.
Actividad insecticida	<i>Spodoptera ssp.</i> (gusano africano), <i>Epilachna varivestis</i> (escarabajo de haba mexicano).
Actividad larvicida	<i>Aedes aegypti</i> (mosquito vector de la fiebre amarilla).
Actividad moluscocida	Caracol transmisor de la esquistosomiasis (<i>Bromphalaria glabrata</i>).

Tabla 9. Tipos de ensayos biológicos utilizados en una investigación biodirigida [66]

Los bioensayos en las primeras etapas de una investigación biodirigida², no son específicos, sólo se refieren a toxicidad o inhibición de microorganismos. El bioensayo de toxicidad frente a *Artemia salina* L. de Meyer [68] y el ensayo antimicrobiano de Mitscher [69] que continuación se describen.

² Un estudio biodirigido tiene como finalidad seguir la actividad biológica durante el fraccionamiento de extractos. La actividad biológica a través de un ensayo permite conocer la naturaleza, constitución o potencia de un material o sustancia a través de la dosis empleada [67].

7.1). Bioensayo frente a *Artemia salina* L.

Artemia salina L. es el nombre de *Anastrocan crustaceans*, pertenece a la subclase Branchiopoda —filópodos— comúnmente llamado camarón hada o camarón salmuera.

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

Sus características físicas dependen en gran medida de las condiciones en las que se encuentre, ya que sus dimensiones varían con la temperatura —10-12 mm— en tanto que el color varía dependiendo de la cantidad de oxígeno presente —rojo claro con poco oxígeno y de rojo a rosa pálido con alta oxigenación— [70].

Las características por las cuales es usado este crustáceo son las siguientes [68]:

- Los huevecillos son de bajo costo y se mantienen viables por varios años en estado seco.
- Proporcionan una prueba de toxicidad a corto plazo debido a su rápido crecimiento.
- Se obtienen poblaciones homogéneas sincronizadas en diferentes estadios de desarrollo.

El bioensayo frente a *Artemia salina* L. determina la toxicidad — CL_{50} — en productos naturales; tanto extractos como en productos aislados del mismo [68]. Este método ha mostrado una gran utilidad en análisis de residuos de pesticidas y micotoxinas, anestésicos, compuestos como la morfina entre otros.

7.2). Pruebas antimicrobianas.

Existen diferentes métodos para determinar la actividad antimicrobiana y pueden ser clasificados en tres grupos: dilución, difusión y bioautográfica; los cuales presentan diferentes características y difieren en su sensibilidad [71].

7.2.1). Método de dilución.

El método de dilución puede efectuarse de dos maneras: en un medio líquido y en un medio sólido, ambos métodos se fundamentan en la dispersión homogénea de la muestra en un medio de cultivo. Se recomienda utilizar esta técnica cuando las muestras a evaluar son solubles en agua o son muestras lipofílicas, suspensiones de sólidos o emulsiones y sustancias antimicrobianas que no pueden difundirse a través del agar y que no pueden ser incorporadas directamente dentro del agar [72].

El método de dilución en medio líquido es recomendado para la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) de una muestra pura y la Concentración Mínima Bactericida (MBC), ya que la técnica tiene la característica de ser más precisa que la técnica en un medio sólido.

El método de dilución en agar tiene la ventaja de ser un método simple, en el cual se pueden evaluar muestras solubles e insolubles en agua; así como evaluar seis microorganismos en el mismo bioensayo [72].

7.2.2). Método de difusión.

En este método se emplea un disco, un cilindro o perforación en el agar como reservorio y se basa en medir el diámetro de la zona de inhibición. La desventaja de la utilización de este método es que no se pueden emplear sustancias poco solubles en agua o extractos no polares. Una ventaja importante de la utilización de este método es que pueden ser utilizados cinco o seis compuestos por caja de petri contra un simple microorganismo.

El método de perforación, se usa para suspensiones acuosas de extractos de plantas; el método de disco en papel filtro permite ensayar antibióticos solubles en agua [73, 74].

7.2.3). Método bioautográfico.

Consiste en localizar la actividad antimicrobiana en un cromatograma. La mayoría de los procedimientos empleados se basan en la técnica de difusión en agar, en el cual los compuestos antibacteriales son transferidos desde la capa cromatográfica a una caja de agar inoculado, seguido de un proceso de difusión del compuesto, las zonas de inhibición son después visualizadas. Otra técnica consiste en realizar una suspensión del microorganismo en un caldo, para posteriormente ser aplicado a la cromatografía en capa fina (CCF) desarrollada.

El método bioautográfico generalmente se describe utilizando la CCF, ya que presenta una mayor resolución y es mucho más rápido en comparación con la cromatografía en papel (CP) la cual presenta desventajas como lo es la separación no satisfactoria de diversos compuestos [75-77].

El Método de Mitscher se fundamenta en la inhibición del crecimiento de diversos microorganismos cuando son expuestos a un medio de cultivo que contiene el extracto o sustancias puras a probar, en este método la concentración final para los extractos crudos es de 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para sustancias purificadas.

III. Planteamiento del Problema

Los flavonoides son un grupo de productos naturales, químicamente derivados del núcleo de la fenilbenzopirona; aislados de una gran variedad de plantas, semillas, frutas, flores, hojas y tallos. En la literatura química, se han descrito más de 4000 flavonoides, el número de estas sustancias va en constante incremento debido a su diversidad estructural, la cual surge de los diferentes patrones de sustitución presentes en estas sustancias, —hidroxilación, metoxilación, sulfonación, glicosilación y prenilación— [30, 49].

La actividad biológica de estas sustancias es muy amplia, ya que presentan propiedades : antitumorales, antiinflamatorias, antimicrobiana, antiviral, antimalárica, antioxidante, analgésica, antihepatotóxica, vasculares y neuroactivas [17-20].

Especialmente, los flavonoides prenilados han demostrado poseer propiedades biológicas entre las que destacan: antifúngica, antimicrobiana y antiviral (VIH) [29, 49, 55].

Debido a que la búsqueda de antibióticos y análogos sintéticos siguen siendo fuente de estudio dentro del área clínica en la prevención de enfermedades infecciosas, además de que el cáncer cérvico uterino es una enfermedad de gran incidencia en nuestro país, ya que ocupa el primer lugar como causa de muerte entre las mujeres.

Por lo anterior, el presente trabajo tiene como finalidad obtener algunos derivados de la glabranina³ (flavonona prenilada) y evaluar su actividad biológica como posibles agentes antimicrobianos y antitumorales, ya que la glabranina es el flavonoide mayoritario aislado de las partes aéreas de *Esenbeckia berlandieri ssp acapulcensis*, planta endémica de México [16].

³ Primera vez que se informa la existencia de flavanonas en el género *Esenbeckia* [16]

IV. Objetivos

1. OBJETIVO GENERAL

Obtención química y evaluación biológica —antimicrobiana y frente a la línea celular HeLa— de los derivados de la glabranina —flavanona prenilada de *Esenbeckia berlandieri ssp acapulcensis*.

1.1. Objetivos particulares.

- 1.1.1. Revisión bibliográfica sobre las propiedades físicas, químicas y biológicas de los flavonoides.
- 1.1.2. Purificación de las fracciones del extracto etanólico de *E. berlandieri ssp acapulcensis*⁴.
- 1.1.3. Obtención de la metilglabranina, a partir de la glabranina y diazometano.
- 1.1.4. Obtención del epóxido de la glabranina, a partir de la glabranina y AMCPB.
- 1.1.5. Obtención del 7, 8-(2, 2-dimetilcromano) de la glabranina con ácido p-toluensulfónico.
- 1.1.6. Obtención del 7, 8-(2, 2-dimetilcromeno) de la glabranina con DDQ.
- 1.1.7. Obtención del 3-hidroxi-7, 8-(2, 2-dimetilcromano) de la glabranina con AMCPB/H₃O⁺.
- 1.1.8. Obtención del epóxido de la metilglabranina, con AMCPB y metilglabranina.
- 1.1.9. Apertura del epóxido de la metilglabranina en medio ácido.
- 1.1.10. Determinación de la actividad antimicrobiana de los derivados químicos de la glabranina.
- 1.1.11. Determinación de la actividad antitumoral en la línea celular HeLa, proveniente de carcinoma cérvico-uterino⁵.

⁴ Sustancia previamente caracterizada e identificada del extracto etanólico de *E. berlandieri ssp acapulcensis* [16].

⁵ La actividad antitumoral fue determinada en el Laboratorio L-324 de Biología Celular y Molecular del Cáncer, FES. Zaragoza, Campus II, UNAM.

V. Hipótesis

Los flavonoides son un grupo de productos naturales, aislados de una diversa variedad de plantas. Estos presentan una gran diversidad estructural, debido a los diferentes patrones de sustitución presentes —metoxilación, hidroxilación, sulfonación y prenilación—.

Dentro del grupo de los flavonoides prenilados, destacan las flavanonas preniladas como la clase más abundante de estos. La adición o sustitución de derivados del grupo prenilo —geranil, lavandulil, farnesil, dimetilalil, derivados del dimetilcromano y furano— en el esqueleto de la flavanona en el C-6 y en el C-8 permiten un incremento en la relación estructura-actividad, ampliando de esta manera sus propiedades biológicas, entre las que destacan: antimicrobiana, antioxidante y antiviral (VIH).

Por lo anterior, en el presente trabajo se pretende realizar las transformaciones químicas en el grupo prenilo de la Glabranina (*Esenbeckia berlandieri ssp acapulcensis*) para determinar la actividad biológica como agentes antimicrobianos y antitumorales de los derivados químicos obtenidos.

VI. Material

1. MATERIAL PARA LA PURIFICACIÓN, CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE REACCIÓN.

◆ Disolventes.

- Acetato de etilo (grado técnico)⁶.
- Benceno (grado analítico).
- Cloroformo (grado analítico).
- Diclorometano (grado técnico)⁶.
- Etanol (grado analítico).
- Eter etílico (grado analítico).
- Hexano (grado técnico)⁶.
- Propanol (grado analítico).

◆ Reactivos.

- Acido *meta*-cloro perbenzoico (AMCPB).
- Acido clorhídrico (HCl, solución al 10%).
- Acido *para*-toluensulfónico (*p*-TsOH).
- Bicarbonato de sodio (NaHCO₃, solución saturada).
- Bisulfito de sodio (NaHSO₃, solución al 10 %).
- Celita 545 (tamaño de partícula 0.001-0.004 mm).
- Cloruro férrico (FeCl₃, al 1% en etanol).
- Diazald (N-metil-N-nitroso-*p*-toluensulfónamida).
- 2,3-Dicloro-5,6-diciano-*p*-benzoquinona (DDQ).
- Sulfato cérico amónico (NH₄Ce(SO₄)₂).
- Sulfato de sodio anhidro (Na₂SO₄).
- Sulfito de sodio (Na₂SO₃, al 10%).
- Silica gel para cromatografía en capa fina 60G.

⁶ Estos disolventes fueron purificados por medio de una destilación fraccionada

◆ Equipo.

- Aparato para determinar el punto de fusión (Fisher Johns).
- Balanza analítica (100A, Ainswort).
- Balanza granataria (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.
- 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.
- 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.
- Cromatoplasas 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 y 500 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.

2. MATERIAL PARA ENSAYO MICROBIOLÓGICO.

- ◆ Reactivos.

 - Tween 80.

 - Cloruro de sodio (NaCl).

- ◆ Material de vidrio.

 - Cajas de Petri.

 - Frascos viales estériles (10 mL).

 - Matraz Erlenmeyer 25 mL.

 - Matraz bola 24/40 100 mL.

 - Pipeta 5 mL.

 - Pipeta 10 mL.

 - Probeta 50 mL.

- ◆ Equipo.

 - Autoclave.

 - Incubadora.

 - Balanza analítica (100A, Ainswort).

 - Balanza semianalítica (Ohaus-E 400)

- ◆ Material biológico

 - Bacillus subtilis.*

 - Candida albicans.*

 - Escherichia coli.*

 - Pseudomona aeruginosa.*

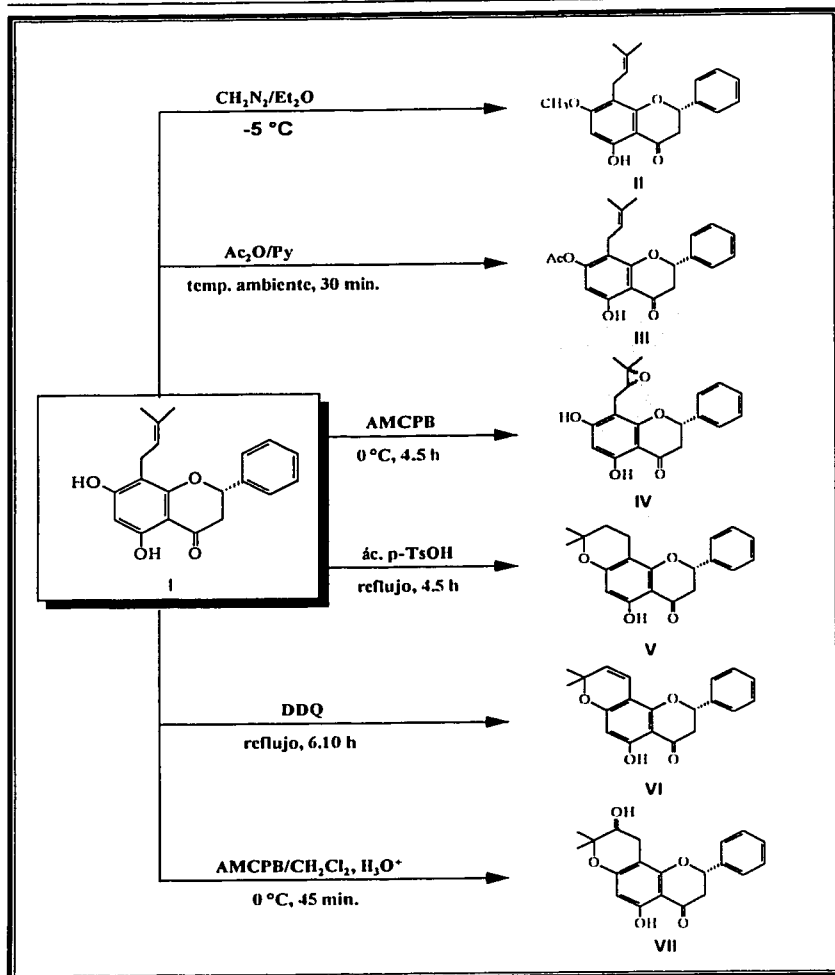
 - Micrococcus luteus.*

 - Staphylococcus aureus.*

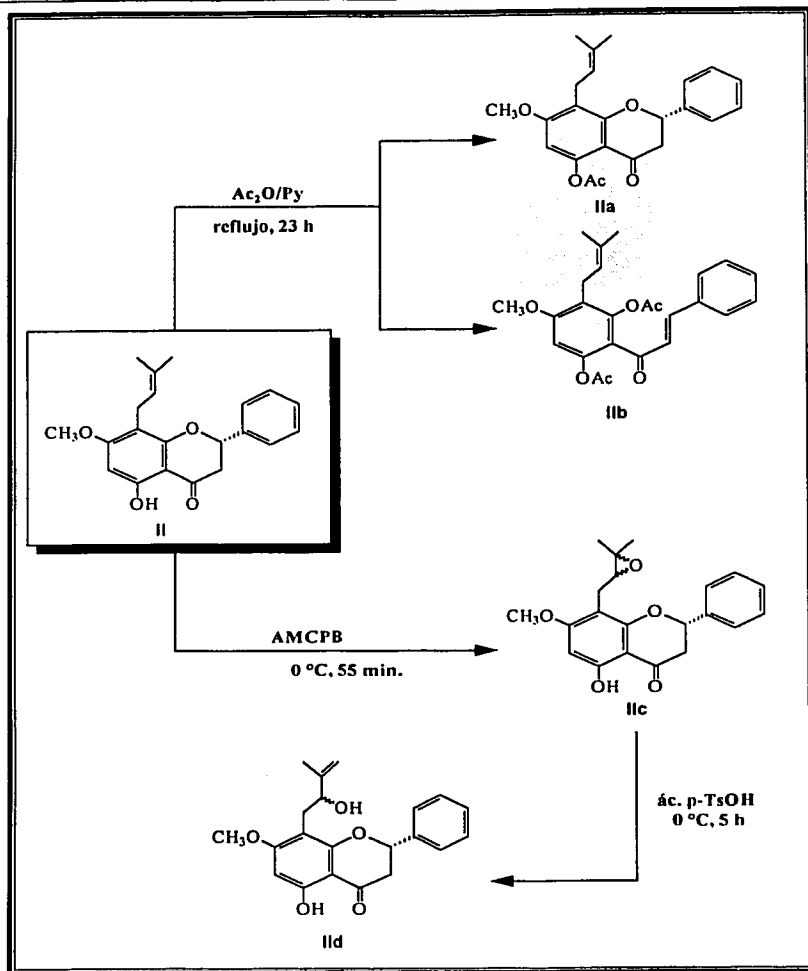
 - Streptococcus faecalis.*

 - Salmonella typhi.*

VII. Metodología



Esquema 9. Transformaciones químicas de la glabranina.

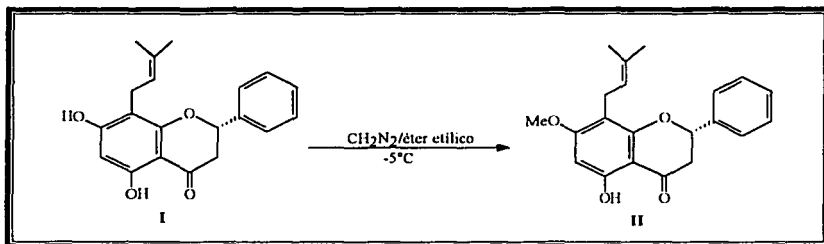


Esquema 10. Transformaciones químicas de la metilglabranina.

1. TRANSFORMACIONES QUÍMICAS DE LA GLABRANINA.

1.1). Obtención de 5-hidroxi-7-metoxi-8-(3'',3''-dimetilalil)-flavanona (II).

En un matraz Erlenmeyer de 50 mL se disolvieron 168 mg de glabranina en 10 mL de etanol absoluto, la solución resultante se introdujo a una mezcla frigorífica (-5°C), adicionando a continuación diazometano⁷ disuelto en éter etílico lentamente, *ver esquema 11*. El curso de la reacción fue seguida por CCF, una vez terminada la reacción, el producto fue recrystalizado con n-Hex/cOEt obteniéndose 158.8 mg (99.52 %) de un sólido amarillo de pf. 126-128 °C y cuyas propiedades espectroscópicas corresponde a la 5-hidroxi-7-metoxi-8-(3'',3''-dimetilalil)-flavanona (II).



Esquema 11. Reacción de metilación de la Glabranina.

DC (c= 0.04 mg/mL, Hex): $[\theta]_{331} -292$; $[\theta]_{288} +1576$; $[\theta]_{239} +360$; $[\theta]_{221} -2104$.

IR $\nu_{\text{máx}}$ (CHCl₃, espectro 5) cm⁻¹: 3006, 2926, 2853, 1654, 1583, 1444, 1373, 1303, 1270, 1162 y 1103.

⁷ A 4.01 g de KOH disueltos en 10 mL de H₂O se agregaron por medio de un embudo de adición 10 mL de Et₂O y 15 mL de EtOH absoluto. A esta solución se le adicionaron 10.75 mg de Diazald (N-metil-N-nitroso-p-toluensulfonamida) disueltos en 75 mL de Et₂O y se destiló a 36°C.

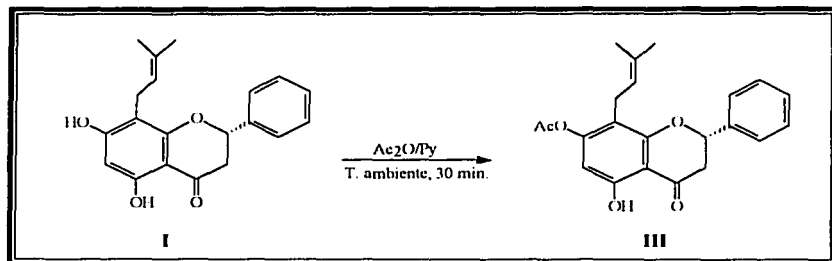
RMN-¹H (300MHz, CDCl₃, TMS, espectro 6): δ 1.63 (s, 3H, CH₃-4"), δ 1.65 (s, 3H, CH₃-5"), δ 2.85 (dd, J=17.1 y 3.6 Hz, 1H, CH-3_{ψac}), δ 3.06 (dd, J=17.3 y 12.3 Hz, 1H, CH-3_{ψac}), δ 3.24 (d, J=6.9 Hz, 2H, CH₂-1"), δ 3.86 (s, 3H, CH₃Oph), δ 5.18 (tc, J=7.2 y 1.5 Hz, CH-2"), δ 5.41 (dd, J=13 y 3.3 Hz, CH-2), δ 6.10 (s, 1H, CH-6), δ 7.48-7.36 (señal compleja, 5H), δ 12.14 (s, 1H, C₅-OH).

RMN-¹³C (75 MHz, CHCl₃, TMS, espectro 7): 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 128.52 (d, C-2', 4' y 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), 233(14.63), 220(15.83), 219 (100), 209 (23.17), 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).

1.2. Obtención de 7-acetil-5-hidroxi-8-(3",3"-dimetilalil)-flavanona (III)

La glabranina (49.3 mg) fue disuelta en la mínima cantidad de CHCl₃; a la solución resultante se le adicionaron 1 mL de anhídrido acético y 0.5 mL de piridina seca. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente, siguiendo el curso de la reacción por CCF, *ver esquema /2*. Una vez terminada la reacción, se adicionaron 5 mL de agua, para posteriormente extraer el producto de reacción con CHCl₃ (7 x 5 mL), la fase orgánica resultante se lavó con una solución de HCl al 10% (9 x 3.5 mL), seguido de un tratamiento con una solución saturada de NaHCO₃ (9 x 3 mL) y finalmente lavados con agua. La fase orgánica fue secada sobre Na₂SO₄ anhidro, purificando el producto de reacción por CCF preparativa. De donde se obtuvieron 22.5 mg (45.6%) de un sólido amarillo claro de pf. 89-90°C cuyas propiedades espectroscópicas corresponden al 7-acetil-5-hidroxi-8-(3",3"-dimetilalil)-flavanona (III).



Esquema 12. Reacción de acetilación de la Glabranina con $\text{Ac}_2\text{O/Py}$.

IR ν_{max} (CHCl_3 , espectro 9) cm^{-1} : 2970, 2916, 1769, 1649, 1625, 1593, 1456, 1372, 1298, 1186, 1137, 1078 y 1062.

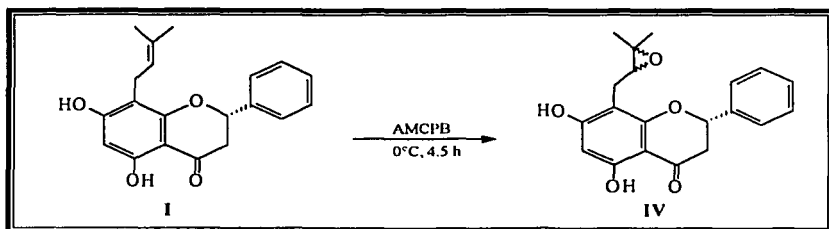
RMN- ^1H (200 MHz, CDCl_3 , TMS, espectro 10): δ 1.65 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-4}''$), δ 1.66 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-5}''$), δ 2.31 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-CO}$), δ 2.88 (dd, $J = 17.2$ y 3.3 Hz, 1H, CH-3_{vec}), δ 3.12 (dd, $J = 17.1$ y 12.9 Hz, 1H, CH-3_{var}), δ 3.17 (d, $J = 7.7$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-1}''$), δ 5.05 (tc, $J = 7.1$ y 1.4 Hz, 1H, $\text{CH-2}''$), δ 5.44 (dd, $J = 12.9$ y 3.3 Hz, 1H, CH-2), δ 6.30 (s, 1H, CH-6), δ 7.47-7.41 (señal múltiple, 5H) y δ 11.74 (s, 1H, $\text{C}_5\text{-OH}$).

RMN- ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , TMS, espectro 11): 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', 4' y 6'), 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, $\text{CH}_3\text{CO-}$).

EM (IE) m/z : 367 [$\text{M}^+ + 1$, 20.4], 323 (100), 309 (28.77), 281 (17.54), 269 (21.75), 219 (35.79), 205 (30.88), 177 (24.56), 165 (21.40).

1.3). Obtención de 5,7-dihidroxi-8-(3"-metil-2",3"-epoxibutano)-flavanona (IV).

Se disolvieron 1.02 g de 5,7-hidroxi-8-(3"-metil-2",3"-dimetilalil)-flavanona (I) en 37 mL de CH_2Cl_2 , a continuación se adicionaron 1.0 g de AMCPB a una temperatura de 0°C , ver *esquema 13*. El curso de la reacción se siguió por CCF^R, una vez terminada la reacción (4.5 h), se agregaron 3 g de hielo a la reacción, posteriormente se realizaron extracciones con CH_2Cl_2 (4 x 5 mL), la fase orgánica resultante se lavó con una solución de NaHSO_3 10% (4 x 25 mL), seguido de una solución saturada de NaHCO_3 (4 x 25 mL) y finalmente con agua (4 x 25 mL), se secó la fase orgánica con Na_2SO_4 anhidro. El producto de la reacción fue purificado utilizando CCV, obteniéndose 1.0 g (98.03 %) de una sustancia de consistencia aceitosa de color amarillo, cuyas constantes espectroscópicas corresponden a la 5,7-dihidroxi-8-(3"-metil-2",3"-epoxibutano)-flavanona (IV).



Esquema 13. Reacción de epoxidación de la Glabranina con AMCPB.

IR ν_{max} (CHCl_3 , espectro 13) cm^{-1} : 3591, 3066, 2978, 2929, 1642, 1475, 1383, 1249, 1144 y 1078.

RMN- ^1H (300 MHz, CDCl_3 , TMS, espectro 14): δ 1.21 (s, 3H, CH_3 -4"), δ 1.19 (s, 3H, CH_3 -5"), δ 2.82 (dd, $J = 17.1$ y 3.3 Hz, 1H, CH-3 $_{\text{vec}}$), δ 3.06-2.99 (señal compleja, 2H, CH $_2$ -1"), δ 3.07 (dd, $J = 17.1$ y 12.6 Hz, 1H, CH-3 $_{\text{ax}}$), δ 4.71 (t, $J = 8.9$ Hz, 1H, CH-2"), δ 5.44 (dd, $J = 12.7$ y 3.2 Hz, 1H, CH-2), δ 6.04 (s, 1H, CH-6), δ 7.47-7.43 (señal multiple, 5H), δ 12.00 (s, 1H, C $_3$ -OH).

* Sistema de elución [Hex-AcOEt (8:2)].

RMN- ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , TMS, espectro 15): δ 79.13 (*d*, C-2), δ 43.59 (*t*, C-3), δ 195.12 (*s*, C-4), δ 165.10 (*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 103.10 (*s*, C-10), δ 138.00 (*s*, C-1'), δ 126.07 (*d*, C-2', 4' y 6'), 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 23.92 (*c*, C-4'') y δ 25.92 (*c*, C-5'').

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).

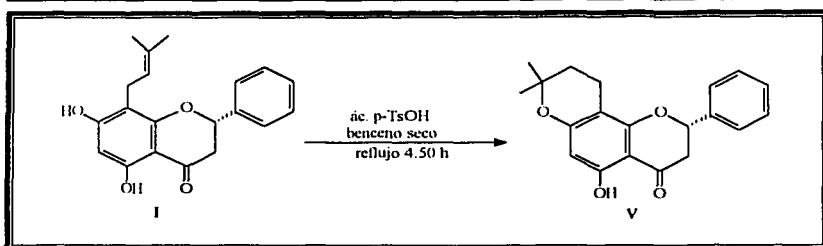
1.4). Obtención de 7, 8-(6'',6''-dimetilcromano) de la glabranina (V).

En 40 mL de benceno seco se disolvieron 500.9 mg de glabranina (I), a la solución resultante se le adicionaron 501.1 mg de ácido p-TsOH, posteriormente se calentó a 70°C durante 4.50 h, *ver esquema 14*. El curso de la reacción fue seguida por CCF⁹, una vez terminada la reacción se eliminó el disolvente a baja presión y al residuo resultante se le adicionaron 25 mL de éter etílico. El exceso de ácido p-toluensulfónico fue eliminado mediante lavados con una solución de NaHCO_3 al 10 % (7 x 15 mL), seguido de seis lavados con agua de 15 mL cada uno, para finalmente secar la fase etérea con Na_2SO_4 anhidro, el producto final de la reacción fue recristalizado utilizando $\text{CHCl}_3/\text{PrOH}$, obteniéndose 386 mg (77.2 %) de un sólido de color amarillo pálido de *pf.* 128-130 °C, cuyas propiedades espectroscópicas corresponde al 7, 8-(6'',6''-dimetilcromano) de la glabranina (V).

$[\alpha]_D^{25} = +39.28$ (*c* = 4.2 mg/mL, CHCl_3)

IR $\nu_{\text{máx}}$ (CHCl_3 , espectro 17) cm^{-1} : 3070, 3040, 3035, 2979, 2943, 1642, 1586, 1484, 1447, 1324, 1318 y 1159.

⁹ Sistema de elución [Hex-AcOEt (8:2)].



Esquema 14. Reacción de ciclización de la Glabranina con p-TsOH.

RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃, TMS, espectro 18): δ 1.26 (s, 6H, 2CH₃-C-6"), δ 1.76 (dd, J=7 y 2 Hz, 2H, CH₂-5"), δ 2.61 (t, J=7 Hz, 2H, CH₂-4"), δ 2.52 (dd, J=17 y 3.4 Hz, 1H, CH-3_{vec}), δ 3.05 (dd, J=17 y 13 Hz, 1H, CH-3_{var}), 5.44 (dd, J= 13 y 4 Hz, 1H, CH-2), δ 5.98 (s, 1H, CH-6), δ 7.48-7.41 (señal múltiple, 5H) y δ 11.75 (s, 1H, C₅-OH).

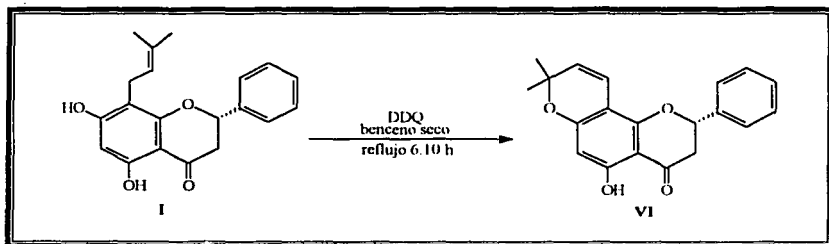
RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃, TMS, espectro 19): δ 78.89 (d, C-2), δ 43.32 (t, C-3), δ 195.62 (s, C-4), δ 161.48 (s, C-5), δ 97.56 (d, C-6), δ 163.10 (s, C-7), δ 100.84 (s, C-8), δ 159.75 (C-9), δ 102.63 (C-10), δ 138.84 (s, C-1'), δ 128.67 (d, C-2' y C-6'), δ 128.80 (C-3' y C-5'), δ 125.91 (C-4') δ 31.86 (t, C-4"), δ 16.29 (t, C-5"), δ 76.15 (s, C-6"), δ 26.38 y 27.10 (c, 2CH₃-C-6").

EM (IE) m/z: 325 [M⁺ +1, 26.8], 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).

1.5). Obtención de 7, 8-(6",6"-dimetilcromeno) de la glabranina (VI).

El compuesto I (520.6 mg), se disolvió en 40 mL de benceno seco, a la solución resultante se le adicionaron 389.7 mg de DDQ y se colocó a reflujo durante 6.10 h, ver *esquema 15*. Una vez terminada la reacción, el matraz se introdujo en un baño de hielo,

formándose un sólido blanco que se eliminó por filtración a vacío. Las aguas madres se concentraron a baja presión, el residuo fue disuelto en 20 mL de CHCl_3 . La fase orgánica se lavó con una solución saturada de NaHCO_3 (4 x 15 mL), seguida de tres lavados con agua de 15 mL cada uno, la fase clorofórmica se secó sobre Na_2SO_4 anhidro y se concentró a baja presión. El residuo obtenido fue recristalizado con $\text{CHCl}_3/\text{PrOH}/\text{Et}_2\text{O}$, obteniéndose 280.7 mg (53.82 %) de un sólido de color amarillo de pf. 110-112 °C.



Esquema 15. Reacción de ciclización de la Glabranina con DDQ.

$[\alpha]_D^{25} = -3.68$ ($c = 3.8$ mg/mL, MeOH)

Difracción de rayos X: $\text{C}_{10}\text{H}_{36}\text{O}_8$; PM = 644.7, monoclinico; space group $P2_1$, $a = 12.401(6)$ Å, $b = 10.409(5)$ Å, $c = 12.567(6)$ Å, $\beta = 90.2707(10)$ Å, $V = 1622.8(15)$ Å³, $Z = 2$, $D_c = 1.319$ mg/cm³, MOK α radiación, $\lambda = 0.7107$ Å, dimensiones del cristal 0.56 x 0.42 x 0.30.

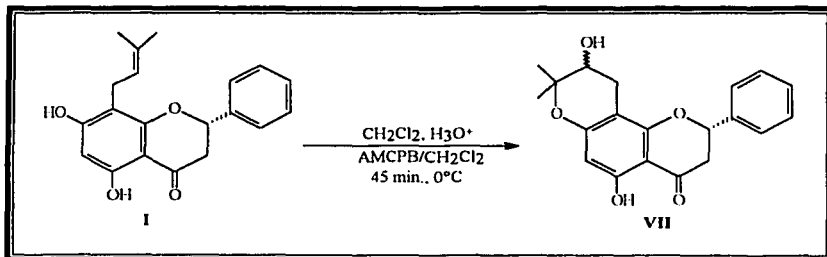
IR $\nu_{\text{máx}}$ (CHCl_3 , espectro 21) cm^{-1} : 3016, 2981, 1640, 1589, 1478, 1374, 1161, 1115, 1091 y 1070.

RMN-¹H (200 MHz, CDCl_3 , TMS, espectro 22): δ 1.43 (s, 3H, CH_3 -6"), δ 1.45 (s, 3H, CH_3 -6"), δ 2.83 (dd, $J = 17$ y 4 Hz, CH-3_{ax}), δ 3.07 (dd, $J = 17$ y 12 Hz, 1H, CH-3_{ax}), δ 5.44 (dd, $J = 13$ y 4 Hz, 1H, CH-2), δ 5.48 (d, $J = 10$ Hz, 1H, CH-5"), δ 6.01 (s, 1H, CH-6), δ 6.55 (d, $J = 10$ Hz, 1H, CH-4"), δ 7.48-7.42 (señal múltiple, 5H) y δ 12.14 (s, 1H, C₅-OH).

RMN-¹³C.(75 MHz, CDCl₃, TMS, espectro 23): 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*, 2C_H₃-C-6'').

1.6). Obtención de 5''-hidroxi-7,8-(6'',6''-dimetilcromano) de la glabranina (VII).

En un matraz Erlenmeyer de 50 mL se disolvieron 200 mg de glabranina (I) en 10 mL de CH₂Cl₂, la solución resultante fue colocada en un baño de hielo a 0-5°C, al que se le adicionaron 4 mL de CH₂Cl₂ acidificado¹⁰, lentamente y con agitación. Posteriormente se agregaron 10 mL de AMCPB¹¹, el curso de la reacción fue seguido por CCF, *ver esquema 16*. Al terminar la reacción (45 min) se adicionaron al matraz 12 mL de una solución de Na₂SO₃ al 10 % lentamente y con agitación a 0°C; el producto de la reacción fue recuperado por medio de extracciones con CH₂Cl₂ (4 x 7 mL), posteriormente se realizaron lavados con NaHCO₃ (4 x 7 mL) y agua (3 x 5 mL), finalmente la fase orgánica fue secada con Na₂SO₄ anhidro, la cual fue concentrada obteniéndose 171.5 mg (85.75%) de un residuo de consistencia aceitosa de color café cuyas propiedades espectroscópicas corresponden a 5''-hidroxi-7,8-(6'',6''-dimetilcromano) de la glabranina (VII).



Esquema 16. Reacción de la Glabranina con AMCPB en medio ácido

¹⁰ 2 gotas de HCl conc. [δ= 1.18 g/mL, 37.0% de pureza] en 50 mL de CH₂Cl₂.

¹¹ 200 mg de AMCPB en 10 mL de CH₂Cl₂.

IR ν_{max} (CHCl_3 , espectro 25), cm^{-1} : 3583, 3426, 3019, 2981, 1645, 1476, 1387, 1339, 1215, 1144, 1093 y 758.

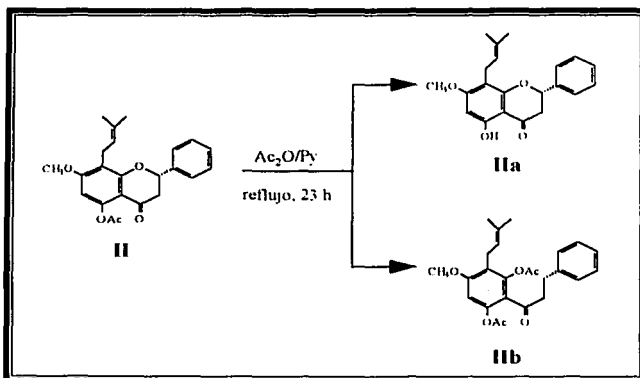
RMN- ^1H (300 MHz, CDCl_3 , TMS, espectro 26): δ 1.21 (s, 3H, CH_3 -6"), δ 1.33 (s, 3H, CH_3 -6"), δ 2.82 (dd, J= 17.1 y 3.3 Hz, 1H, CH-3 $_{\text{vax}}$), δ 3.07 (dd, J=17.1 y 12.9 Hz, 1H, CH-3 $_{\text{vax}}$), δ 3.12-2.99 (señal oscurecida, 2H, CH_2 -4"), δ 4.71 (td, J=8.7 y 1 Hz, 1H, CH-5"), δ 5.44 (dd, J=12.9 y 3 Hz, 1H, CH-2), δ 6.04 (s, 1H, CH-6), δ 7.46-7.41 (señal múltiple, 5H), δ 12.30 (s, 1H, C_5 -OH).

RMN- ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , TMS, espectro 27): 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 156.90 (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: 341 [M^+ +1, 35.6], 307 (62.71), 281 (66.10), 205 (22.88), 203 (35.59), 178 (66.10), 177 (44.91), 150 (55.93).

1.7). Obtención de 5-acetil-7-metoxi-8-(3'',3''-dimetilalil)-flavanona (IIa) y 2',6'-diacetil-4'-metoxi-3'-(3'',3''-dimetilalil)-chalcona (IIb).

Al compuesto II (140.3 mg) disuelto en la mínima cantidad de CHCl_3 , se le adicionó lentamente y con agitación 2 mL de anhídrido acético y 0.5 mL de piridina seca a reflujo durante 2 h, siguiendo el curso de reacción por CCF. Una vez concluida la reacción, se adicionaron 5 mL de agua, los productos de reacción fueron recuperados por medio de extracciones con CHCl_3 (2 x 3 mL). La fase clorofórmica obtenida fue lavada con una solución de HCl al 10% (2 x 3 mL) y posteriormente con una solución saturada de NaHCO_3 (5 x 5 mL) y finalmente con agua (5 x 3 mL), se secó sobre Na_2SO_4 anhidro, obteniendo una mezcla constituida de dos productos, *ver esquema 17*, los cuales fueron purificados por CCP.



Esquema 17. Reacción de acetilación de la metilglabranina con Ac₂O/Py.

El producto menos polar **IIa** (42.6 mg, 30.4%) es un sólido de color amarillo claro, mientras que el producto de mayor polaridad **IIb** (12 mg, 8.55%) es un aceite de color amarillo. Ambos fueron caracterizados con base a sus propiedades espectroscópicas y espectrométricas como: 5-acetil-7-metoxi-8-(3'',3''-dimetilalil)-flavanona (**IIa**) y 2',6'-diacetil-4'-metoxi-3'-(3'',3''-dimetilalil)-chalcona (**IIb**).

Los datos espectroscópicos y espectrométricos para la 5-acetil-7-metoxi-8-(3'',3''-dimetilalil)-flavanona (**IIa**)

IR ν_{\max} (CHCl₃, espectro 29) cm⁻¹: 3016, 3008, 2970, 2914, 1766, 1679, 1607, 1573, 1411, 1367, 1290, 1168 y 1097.

RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃, TMS, espectro 30): δ 1.65 (s, 3H, CH₃-4''), δ 1.65 (s, 3H, CH₃-5''), δ 2.39 (s, 3H, CH₃CO), δ 2.75 (dd, J = 16.8 y 3.0 Hz, 1H, CH-3_{acet}), δ 2.99 (dd, J = 16.7 y 13 Hz, 1H, CH-3_{acet}), δ 3.32 (d, J = 6.8 Hz, 2H, CH₂-1''), δ 3.87 (s, 3H, CH₃O-C₇), δ 5.15 (tc, J = 7.3 y 1.4 Hz, 1H, CH-2''), δ 5.44 (dd, J = 13 y 3.1 Hz, 1H, CH-2), δ 6.30 (s, 1H, CH-6), δ 7.44-7.42 (señal multiple, 5H).

RMN-¹³C (50 MHz, CDCl₃, TMS, espectro 31): 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*, CH₂OPh), δ 169.78 (*s*, -COO) y δ 25.78 (*c*, CH₃CO).

EM (I.E) m/z: 381 [M⁺ +1, 3.59], 338 (100), 323 (44.60), 295 (15.11), 283 (12.59), 270 (23.74), 219 (34.53), 191 (15.11), 179 (14.75).

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

IR ν_{max} (CHCl₃, espectro 33) cm⁻¹: 3007, 2968, 2928, 1770, 1669, 1610, 1576, 1448, 1369, 1286, 1165, 1125 y 1096.

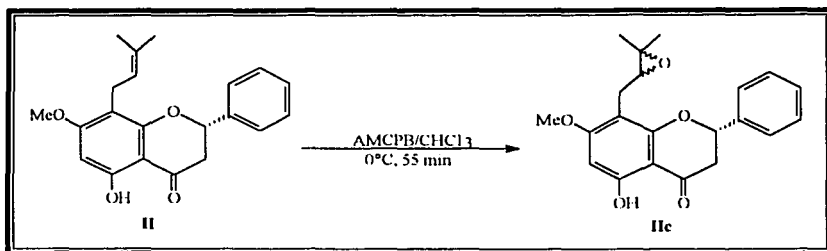
RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃, TMS, espectro 34): δ 1.67 (*s*, 3H, CH₃-4''), δ 1.72 (*s*, 3H, CH₃-5''), δ 2.12 (*s*, 3H, CH₃CO), δ 2.17 (*s*, 3H, CH₃CO), δ 3.24 (*d*, J= 7 Hz, 2H, CH₂-1''), δ 3.87 (*s*, 3H, CH₂OPh), δ 5.10 (*rc*, J=7 y 1.3 Hz, 1H, CH-2''), δ 6.59 (*s*, 1H, CH-6), δ 6.94 (*d*, J= 16.1 Hz, 1H, H-α), δ 7.48 (*d*, J= 16.5 Hz, 1H, H-β), δ 7.40-7.27 (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).

1.8). Obtención de 7-metoxi-8-(3''-metil-2'',3''-epoxibutano)-glabranina (**IIc**).

A 158.8 mg de metilglabranina (**II**) se disolvieron en 4.5 mL de CHCl₃, la solución resultante fue colocada en una mezcla frigorífica (-12°C) adicionando 159.0 mg de AMCPB, el curso de la reacción fue seguido por CCF, *ver esquema 18*. Una vez terminada la reacción (4 h) se agregaron 3 g de hielo. El producto de la reacción fue recuperado mediante extracciones con CHCl₃ (4 x 5 mL), posteriormente se realizaron lavados con Na₂HPO₄ (4 x 15 mL), la fase

orgánica se lavó con NaHCO_3 (4 x 15 mL) y agua (4 x 15 mL). finalmente se secó con Na_2SO_4 anhidro y el exceso de disolvente se eliminó a baja presión, obteniéndose 154.3 mg de un sólido amarillo de pf. 106-109 cuyas propiedades espectroscópica y espectrométrica corresponden a la 7-metoxi-8-(3"-metil-2",3"-epoxibutano)-glabranina (**IIc**).



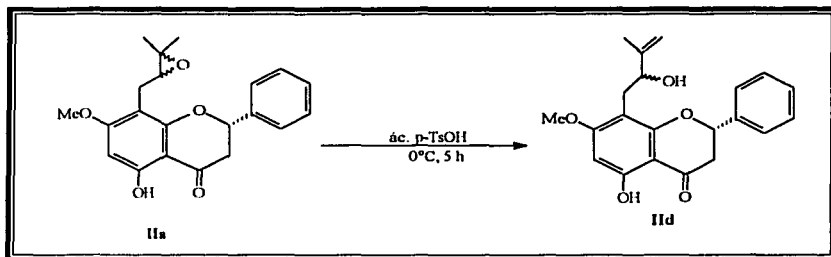
Esquema 18. Reacción de epoxidación de la metilglabranina con AMCPB.

RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃, TMS, espectro 35): δ 1.25 (s, 3H, CH₃-4"), δ 1.26 (s, 3H, CH₃-5"), δ 2.90 (dd, J= 17.4 y 3.3 Hz, 1H, CH-3_{quc}), δ 3.09 (dd, J= 17.4 y 12.6 Hz, 1H, CH-3_{var}), δ 3.0-5.4 señal compleja (CH₂-1"), δ 3.87 (s, 3H, CH₃O-C₇), δ 3.0-5.4 (señal compleja CH-2"), δ 5.42 (dd, J= 12.6 y 3.0 Hz, 1H, CH-2), δ 6.13 (s, 1H, CH-6), δ 7.45-7.38 (señal múltiple, 5H).

RMN-¹³C (50 MHz, CDCl₃, TMS, espectro 36): δ 78.99 (d, C-2), δ 43.06 (t, C-3), δ 196.28 (s, C-4), δ 163.24 (s, C-5), δ 92.59 (d, C-6), δ 166.07 (s, C-7), δ 105.13 (s, C-8), δ 159.48 (s, C-9), δ 102.95 (s, C-10), δ 138.39 (s, C-1'), δ 126.15 (d, C-2', 4' y 6'), δ 128.75 (d, C-3' y C-5'), δ 22.21 (t, C-1"), δ 63.44 (d, C-2"), δ 59.04 (s, C-3"), δ 18.92 (c, C-4"), δ 18.89 (c, C-5"), δ 55.93 (c, PhOCH₃).

1.9). Obtención de 7-metoxi-8-(2''-hidroxi-3''-metil-3''-buten)-glabranina (IId).

En un matraz Erlenmeyer de 25 mL se colocaron 129.2 mg disueltos en 10 mL de CHCl_3 , y la solución resultante se colocó en una mezcla frigorífica (-5°C), adicionando 152.2 mg de $p\text{-TsOH}$, ver *esquema 19*, el curso de la reacción de siguió por CCF. Una vez terminada la reacción se procedió a extraer el producto de reacción utilizando CHCl_3 (3 x 10 mL). Posteriormente se trató con una solución de NaHSO_3 (4 x 15 mL), NaHCO_3 (4 x 15 mL) y agua (4 x 15 ml). La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 anhidro y se concentró a baja presión. La purificación del producto mayoritario fue realizada utilizando CCV, obteniéndose 42 mg de una sustancia de consistencia aceitosa de color amarillo, cuyas propiedades espectroscópicas y espectrométricas corresponde a la mezcla del 7-metoxi-8-(2''-hidroxi-3''-metil-3''-buten)-glabranina (IId₁ y IId₂).



Esquema 19. Reacción de apertura de epóxido de la metilglabranina con $p\text{-TsOH}$.

RMN-¹H compuesto IId₁ (200 MHz, CDCl_3 , TMS, espectro 38): δ 4.89 (t, J = 3 Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-4''}$), δ 1.71 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-5''}$), δ 2.85 (dd, J = 17.4 y 3.3 Hz, 1H, CH-3_{vec}), δ 3.06 (dd, J = 17.1 y 12.6 Hz, 1H, CH-3_{var}), δ 2.87 (d, J = 17.01 Hz, 1H, $\text{CH}_2\text{-1''}$), δ 2.78 (d, J = 8.22 Hz, 1H, $\text{CH}_2\text{-1''}$), δ 3.87 (s, 3H, MeO-C_7), δ 4.22 (ddd, J = 17.4 y 8.22 Hz, 1H, CH-2''), δ 5.40 (dd, J = 12.9 y 3.3 Hz, 1H, CH-2), δ 6.14 (s, 1H, CH-6), δ 7.43-7.35 (señal múltiple, 5H).

RMN-¹H compuesto **IId**₂ (200 MHz, CDCl₃, TMS, espectro 38): δ 4.81 (t, J= 3 Hz, 2H, CH₂-4"), δ 1.71 (s, 3H, CH₃-5"), δ 2.85 (dd, J= 17.4 y 3.3 Hz, 1H, CH-3_{ax}), δ 3.06 (dd, J= 17.1 y 12.6 Hz, 1H, CH-3_{eq}), δ 2.87 (d, J= 17.01 Hz, 1H, CH₂-1"), δ 2.78 (d, J= 8.22 Hz, 1H, CH₂-1"), δ 3.87 (s, 3H, MeO-C₇), δ 4.22 (ddd, J= 17.4 y 8.22 Hz, 1H, CH-2"), δ 5.38 (dd, J= 12.9 y 3.3 Hz, 1H, CH-2), δ 6.14 (s, 1H, CH-6), δ 7.43-7.35 (señal multiple, 5H).

RMN-¹³C (50 MHz, CDCl₃, TMS, espectro 39): δ 78.99 (d, C-2), δ 44.45 (t, C-3), δ 196.22 (s, C-4), δ 163.11 (s, C-5), δ 92.74 (d, C-6), δ 166.30 (s, C-7), δ 105.83 (s, C-8), δ 159.52 (s, C-9), δ 103.03 (s, C-10), δ 138.60 (s, C-1'), δ 128.74 (d, C-2', 4' y 6'), δ 128.82 (d, C-3' y C-5'), δ 29.28 (t, C-1"), δ 110.28 (d, C-2"), δ 147.40 (s, C-3"), δ 18.12 (c, C-4"), δ 125.85 (c, C-5"), δ 56.06 (c, CH₃OPh).

2. EVALUACIÓN BIOLÓGICA.

2.1). Bioensayo con *Artemia salina* L. [68]

- Preparación de la muestra.

Se pesaron 20 mg de cada sustancia, las cuales se disolvieron en 2 mL de disolvente, a continuación se tomaron por triplicado 5, 50 y 500 μL, colocandolos en viales de 20 mL. El disolvente se dejó evaporar para posteriormente utilizarlos en el bioensayo.

- Incubación de *Artemia salina*.

Se incubaron 50 mg de huevecillos de *Artemia salina* L. en agua de mar artificial a una temperatura de 27-28 °C, con un sistema de aereación continuo y bajo una lámpara eléctrica por 48 h.

- Bioensayo.

A cada vial con muestra se le adicionaron 200 μL de DMSO y 2 mL de agua de mar artificial, en seguida se colocaron 10 *Artemias* por vial, aforando posteriormente a 5 mL con agua de mar, para tener finalmente las concentraciones de 10, 100 y 1000 ppm. A la par se realizó un blanco bajo las mismas condiciones.

Los viales fueron colocados bajo iluminación por 24 h, transcurrido este tiempo, se contaron las larvas muertas y se calculó la LC_{50} mediante un programa de cómputo que utiliza el análisis de Probitas, descrito por Finney.

2.2). Pruebas antimicrobianas

2.2.1). Método de Mitscher [69, 78].

- Preparación de los microorganismos.

Los microorganismos mantenidos en agar nutritivo, fueron inoculados al medio de cultivo caldo soya tripticaseína (CST) en tubos de ensayo, incubandolos a 37°C por 24-48 h.

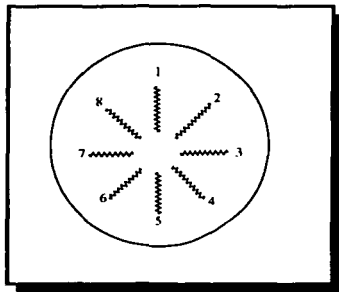
Después de la incubación, se tomó una alícuota de 0.1 mL de medio de cultivo y se diluyó en 9.9 mL de solución salina estéril para alcanzar una dilución final de 1:100 misma que se utilizó para el bioensayo.

- Preparación de la muestra para la prueba.

4 mg de muestra, se disolvieron en 0.5 mL de Tween-80 y 1.5 mL de solución salina al 0.8% en un vial de 10 mL, una vez solubilizado se adicionó la mezcla a un matraz Erlenmeyer que contenía 38 mL del medio agar soya tripticaseína (AST) a una temperatura de 50°C, se mezcló y se vertió por partes iguales en dos cajas de Petri. Una vez solidificado el agar, se incubó a 37°C durante 24 h para realizar la prueba de esterilidad.

- Prueba microbiológica.

Las dos cajas de Petri con extracto, fueron divididas en ocho sectores cada una, procediéndose a realizar la siembra por la técnica de estria, *ver esquema 20*. Finalmente se incubaron las muestras a 37°C por 24 h y se procedió a observar la inhibición del microorganismo en las cajas Petri. A la par fue realizado un blanco y un control positivo con estreptomycin.



Esquema 20. Forma de sembrado de los diferentes microorganismos

1. *Bacillus subtilis* (Bs), 2. *Candida albicans* (Ca), 3. *Escherichia coli* (Ec), 4. *Pseudomona aeruginosa* (Pa), 5. *Micrococcus luteus* (MI), 6. *Staphylococcus aureus* (Sa), 7. *Streptococcus faecalis* (Sf) y 8. *Salmonella tify* (St).

2.3). Actividad antitumoral en línea celular HeLa.

La actividad antitumoral se considera como la disminución de la proliferación presentada por las células estimuladas por los compuestos químicos en comparación con la proliferación presentada por las células en condiciones de control.

En una placa de 96 pozos que contiene RPMI al 10% de suero fetal bovino, se sembraron 5×10^3 células HeLa por pozo, incubándose a 37°C, en una atmósfera de 5% de CO₂ y una humedad a punto de rocío, con la finalidad de que las células se adhieran al plato de cultivo. Una vez adheridas, se retira el medio de cultivo.

Posteriormente las células son inducidas con las sustancias a probar de la siguiente manera:

Se preparan cuatro concentraciones diferentes [0.1, 1, 10, 25 µg/mL en RPMI al 10% de suero fetal bovino] y se colocan en un mínimo de tres pozos por condición y se incuban por 48 h bajo las mismas condiciones establecidas previamente. Al mismo tiempo se realiza un control con etanol (sustancias IV, V, VI, VII y IIc), metanol (sustancia I) y acetato de etilo (sustancia II) que es considerado como el 100% de crecimiento celular.

Transcurrido el periodo de incubación las células se lavan tres veces con solución salina buffer de fosfatos (PBS) y son fijadas con una solución de glutaraldehído al 1.1% por 15 min., el exceso es retirado mediante lavados con PBS, finalmente se dejan secar al aire libre.

Una vez secas, las células son teñidas con el colorante cristal violeta durante 20 min., el exceso es retirado con lavados de agua desionizada y se dejaron secar al aire. posteriormente el colorante retenido es solubilizado con una solución de ácido acético al 10% y se mide la absorbancia a una longitud de onda de 590 nm.

- Determinación del número celular.

La medición del efecto de proliferación se realizó por espectrofotometría, utilizando la técnica de cristal violeta. Utilizando placas de 96 pozos se realizó una curva estándar (número celular vs absorbancia) sembrando una cantidad conocida de células por pozo, manteniendose el tiempo necesario para que las células se adhieran al piso, después se procedio a realizar una tinción con cristal violeta, finalmete se midió la absorbancia a una longitud de onda de 590 nm.

La determinación del número celular así como su desviación estándar de los cultivos evaluados se realizó con base a la ecuación de la curva estándar. Los datos obtenidos de los estímulos de cada compuesto se compararon con las mediciones de los controles (100% de proliferación). El número celular y la desviación estándar son convertidos a porcentajes de esta manera la actividad antitumoral obtenida por la disminución de la proliferación se expresa en porcentaje celular.

VIII. Resultados

Tabla 10. Datos de espectroscopia de infrarrojo de productos de reacción de la 5,7-dihidroxi-8-(3",3"-dimetilalil)-flavanona.

Sustancia	cm ⁻¹
I	3583, 3379, 3080, 3957, 2968, 2918, 2860, 1639, 1442, 1254, 1155 y 1103
II	3006, 2926, 2853, 1654, 1583, 1444, 1373, 1303, 1270, 1162 y 1103
III	2970, 2916, 1769, 1649, 1625, 1593, 1456, 1372, 1298, 1186, 1137 y 1062
IV	3591, 3066, 2978, 2929, 1642, 1475, 1383, 1249, 1144 y 1078
V	3070, 3040, 3035, 2979, 2943, 1642, 1586, 1484, 1447, 1324, 1318 y 1159
VI	3016, 2981, 1640, 1589, 1478, 1374, 1161, 1115, 1091 y 1070
VII	3583, 3426, 3019, 2981, 1645, 1476, 1387, 1339, 1215, 1144, 1093 y 758

Espectrofotómetro Nicolet Ft IR, modelo 5 Sx, disolvente: CHCl₃.

Tabla 11. Datos de RMN-¹H de productos de reacción de la 5,7-dihidroxi-8-(3'',3''-dimetilalil)-flavanona.

H	Sustancia						
	I	II	III	IV	V	VI	VII
H-2	5.43 <i>dd</i> (12.6 y 3.3)	5.41 <i>dd</i> (13 y 3.3)	5.44 <i>dd</i> (12.9 y 3.3)	5.44 <i>dd</i> (12.7 y 3.2)	5.44 <i>dd</i> (13 y 4)	5.44 <i>dd</i> (13 y 4)	5.44 <i>dd</i> (12.9 y 3)
H-3 _{quc}	2.84 <i>dd</i> (17.1 y 3.0)	2.85 <i>dd</i> (17.1 y 3.6)	2.88 <i>dd</i> (17.2 y 3.3)	2.82 <i>dd</i> (17.1 y 3.3)	2.52 <i>dd</i> (17 y 3.4)	2.83 <i>dd</i> (17 y 4)	2.82 <i>dd</i> (17.1 y 3.3)
H-3 _{max}	3.06 <i>dd</i> (17.3 y 12.9)	3.06 <i>dd</i> (17.1 y 12.3)	3.12 <i>dd</i> (17.1 y 12.9)	3.07 <i>dd</i> (17.1 y 12.6)	3.05 <i>dd</i> (17 y 13)	3.07 <i>dd</i> (17 y 12)	3.07 <i>dd</i> (17.1 y 12.9)
H-6	6.04 <i>s</i>	6.10 <i>s</i>	6.30 <i>s</i>	6.04 <i>s</i>	5.98 <i>s</i>	6.01 <i>s</i>	6.04 <i>s</i>
H-1''	3.37 <i>d</i> (7.2)	3.24 <i>d</i> (6.9)	3.17 <i>d</i> (7.7)	3.06-2.99 señal compleja	—	—	—
H-2''	5.22 <i>tc</i> (7.2 y 1.5)	5.18 <i>tc</i> (7.5 y 1.5)	5.05 <i>tc</i> (7.1 y 1.4)	4.71 <i>t</i> (8.9)	—	—	—
H-4''	1.73 <i>s</i>	1.63 <i>s</i>	1.65 <i>s</i>	1.21 <i>s</i>	2.61 <i>t</i> (7)	6.55 <i>d</i> (10)	3.12-2.99 señal oscurecida
H-5''	1.73 <i>s</i>	1.65 <i>s</i>	1.66 <i>s</i>	1.19 <i>s</i>	1.76 <i>dd</i> (7 y 2)	5.48 <i>d</i> (10)	4.71 <i>td</i> (8.7 y 1)
H-6''	—	—	—	—	1.26 <i>s</i> 1.26 <i>s</i>	1.43 <i>s</i> 1.45 <i>s</i>	1.21 <i>s</i> 1.33 <i>s</i>
C ₅ -OH	12.00 <i>s</i>	12.14 <i>s</i>	11.74 <i>s</i>	12.00 <i>s</i>	11.75 <i>s</i>	12.14 <i>s</i>	12.30 <i>s</i>
C ₇ -OCH ₃	—	3.86 <i>s</i>	—	—	—	—	—
CH ₃ CO	—	—	2.31 <i>s</i>	—	—	—	—
H-2' y H-6'	7.48-7.39	7.48-7.36	7.47-7.41	7.47-7.43	7.48-7.41	7.48-7.42	7.46-7.41
H-3' y H-5'	s.m.	s.m.	s. m.	s.m.	s.m.	s.m.	s.m.
H-4'	5 H	5 H	5 H	5H			

Espectrofotómetro de RMN Varian FT8A y VXR-3005

Tabla 12. Datos de RMN-¹³C de productos de reacción de la 5,7-dihidroxi-8-(3'',3''-dimetilalil)-flavonona.

C	Sustancia						
	I	II	III	IV	V	VI	VII
C-2	78.91	78.67	79.15	79.13	78.89	79.02	79.05
C-3	43.29	43.42	43.57	43.59	43.32	43.35	43.38
C-4	196.23	196.30	197.47	195.12	195.62	195.66	195.10
C-5	162.23	162.64	159.95	165.10	161.48	162.31	165.05
C-6	96.92	92.48	103.94	91.67	97.56	98.59	91.64
C-7	163.77	165.77	160.78	168.63	163.10	163.79	168.23
C-8	106.26	109.00	113.51	104.76	100.84	102.89	104.74
C-9	159.17	158.74	156.72	157.11	159.75	156.75	156.90
C-10	103.72	102.95	105.59	103.10	102.63	101.97	103.08
C-1'	138.68	138.91	138.30	138.00	138.84	138.54	138.45
C-2'	125.93	128.52	125.99	126.07	128.67	128.76	126.06
C-3'	128.69	128.70	128.82	128.85	128.80	128.82	128.02
C-4'	125.93	128.52	125.99	126.07	125.91	126.52	126.06
C-5'	128.69	128.70	128.52	128.85	128.80	128.82	128.02
C-6'	125.93	128.52	125.99	126.07	128.67	128.76	126.06
C-1''	21.97	21.58	20.90	26.78	—	—	—
C-2''	121.57	122.40	121.53	29.71	—	—	—
C-3''	134.92	131.38	131.99	71.86	—	—	—
C-4''	17.82	17.64	17.33	23.92	31.86	97.67	26.77
C-5''	25.80	25.76	22.62	25.92	16.29	115.57	71.83
C-6''	—	—	—	—	76.15	78.17	78.99
CH ₃ -C-6	—	—	—	—	27.10	28.53	25.94
					26.38	28.28	23.88
CH ₃ O-Ph	—	55.88	—	—	—	—	—
-COO	—	—	168.44	—	—	—	—
CH ₃ CO	—	—	25.70	—	—	—	—

Espectrofotómetro de RMN Varian FT8A y VXR-3005

Tabla 13. Datos de RMN-¹H de productos de reacción de la 5-hidroxi-7-metoxi-8-(3'',3''-dimetilalil)-flavanona (II)

Sustancia	cm ⁻¹
IIa	3016, 3008, 2970, 2914, 1766, 1679, 1607, 1573, 1411, 1367, 1290, 1168 y 1097.
IIb	3007, 2968, 2928, 1770, 1669, 1610, 1576, 1448, 1369, 1286, 1165, 1125 y 1096.

Espectrofotómetro Nicolet Ft IR, modelo 5 Sx, disolvente: CHCl₃.

Tabla 14. Datos de RMN-¹H de productos de reacción de la 5-hidroxi-7-metoxi-8-(3'',3''-dimetilalil)-flavanona (II)

H	Sustancia				
	IIa	IIb	IIc	II _{d1}	II _{d2}
H-2	5.44 <i>ddl</i> (13 Y 3.1)		5.42 <i>ddl</i> (12.6 y 3.0)	5.40 <i>ddl</i> (12.9 y 3.3)	5.38 <i>ddl</i> (12.9 y 3.3)
H-3 _{wcc}	2.75 <i>ddl</i> (16.8 y 3.0)		2.90 <i>ddl</i> (17.4 y 3.3)	2.85 <i>ddl</i> (17.4 y 3.3)	2.85 <i>ddl</i> (17.4 y 3.3)
H-3 _{wax}	2.99 <i>ddl</i> (16.7 y 3.0)		3.09 <i>ddl</i> (17.4 y 12.6)	3.06 <i>ddl</i> (17.1 y 12.6)	3.06 <i>ddl</i> (17.1 y 12.6)
H-6	6.30 <i>s</i>	6.59 <i>s</i>	6.13 <i>s</i>	6.14 <i>s</i>	6.14 <i>s</i>
H ₂ 1''	3.32 <i>d</i> (6.8)	3.24 <i>d</i> (7)	3.0-5.4 <i>s.c.</i>	2.87 <i>d</i> (17.0) 2.78 <i>d</i> (8.2)	2.87 <i>d</i> (17.0) 2.78 <i>d</i> (8.2)
H-2''	5.15 <i>tc</i> (7.3 y 1.4)	5.10 <i>tc</i> (7 y 1.3)	3.0-5.4 <i>s.c.</i>	4.22 <i>ddd</i> (17.4 y 8.2)	4.22 <i>ddd</i> (17.4 y 8.2)
H-4''	1.65 <i>s</i>	1.67 <i>s</i>	1.25 <i>s</i>	4.89 <i>t</i> (3)	4.81 <i>t</i> (3)
H-5''	1.65 <i>s</i>	1.72 <i>s</i>	1.26 <i>s</i>	1.71 <i>s</i>	1.71 <i>s</i>
C ₇ -OCH ₃	3.87 <i>s</i>	3.87 <i>s</i>	3.87 <i>s</i>	3.87 <i>s</i>	3.87 <i>s</i>
H-2' y H-6'	7.44-7.42	7.40-7.27	7.45-7.38	7.43-7.35	7.43-7.35
H-3' y H-5'	<i>s.m.</i>	<i>s.m.</i>	<i>s.m.</i>	<i>s.m.</i>	<i>s.m.</i>
H-4'	5H	5H	5H	5H	5H
CH ₃ -CO-	2.39 <i>s</i>	2.17 <i>s</i> 2.12 <i>s</i>			
H-α		6.94 <i>d</i> (16.1)			
H-β		7.48 <i>d</i> (16.5)			

Espectrofotómetro de RMN Varian FT8A y VXR-3005

Tabla 15. Datos de RMN-¹³C de productos de reacción de la 5-hidroxi-7-metoxi-8-(3'',3''-dimetilalil)-flavanona (II)

C	Sustancia		
	IIa	IIc	IId
C-2	78.02	78.99	78.99
C-3	45.28	43.06	44.45
C-4	189.64	196.28	196.22
C-5	150.54	163.24	163.11
C-6	100.18	92.59	92.74
C-7	162.80	166.07	166.30
C-8	115.95	105.13	105.83
C-9	149.9	159.48	159.52
C-10	108.06	102.95	103.03
C-1'	138.92	138.39	138.60
C-2'	128.51	126.15	128.74
C-3'	128.68	128.75	128.82
C-4'	125.94	126.15	128.74
C-5'	128.68	128.75	128.82
C-6'	128.51	126.15	128.74
C-1''	21.18	22.21	29.28
C-2''	121.84	63.44	110.28
C-3''	131.87	59.04	147.40
C-4''	17.72	18.92	18.12
C-5''	22.17	18.89	125.85
C-6''			
CH3-C-6			
CH3-OPh	55.95	55.93	56.06
-COO	169.78		
CH3-CO	25.78		

Espectrofotómetro de RMN Varian FT8A y VXR-3005

Tabla 16. Resultados de la evaluación antimicrobiana de derivados de la 5, 7-hidroxi-8-(3'', 3''-dimetilalil)-flavonona por el Método de Mitscher

Sustancia	Microorganismo							
	Bs	Ca	Ec	Pa	MI	Sa	Sf	St
I	-	-	-	-	-	+	-	-
IV	-	+	-	-	-	-	-	-
V	-	-	-	-	+	-	-	-
VI	-	-	-	-	-	-	-	-
VII	-	-	-	-	+	-	-	-
Hc	-	-	-	-	-	-	-	-
IId	-	-	-	-	-	-	-	-

Bs: *Bacillus subtilis* ATCC 6633, Ca: *Candida albicans* ATCC 10231, Ec: *Escherichia coli* ATCC 536, Pa: *Pseudomona aeruginosa* ATCC 25019. MI: *Aficrococcus luteus* ATCC 9341, Sa: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, Sf: *Streptococcus faecalis* ATCC 6130 y St: *Salmonella tiphy* ATCC 6539.

-: no inhibe crecimiento.

+: inhibe crecimiento.

Tabla 17. Actividad antitumoral de derivados de la Glabranina utilizando línea celular HeLa.

Sustancia	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Proliferación celular	% Inhibición de crecimiento celular
I ^a	0.1	141.9 \pm 0.8	—
	1	148.1 \pm 5.8	—
	10	142.8 \pm 2.4	—
	25	263.4 \pm 1.7	—
II ^b	0.1	1579.1 \pm 46	—
	1	1489.5 \pm 41.6	—
	10	1290 \pm 42.3	—
	25	222.7 \pm 12.6	—
IV ^c	0.1	167.88 \pm 10	—
	1	144.41 \pm 1.6	—
	10	157.49 \pm 0.2	—
	25	85.5 \pm 1.7	14.5
V ^c	0.1	102.4 \pm 0.16	—
	1	104.9 \pm 2.5	—
	10	101.4 \pm 0.7	—
	25	37.4 \pm 2	62.6
VI ^c	0.1	138.6 \pm 6.7	—
	1	144.0 \pm 2.2	—
	10	103.5 \pm 3.7	—
	25	22.6 \pm 1.5	77.4
VII ^c	0.1	9.7 \pm 1.1	90.3
	1	22.0 \pm 5.9	88
	10	24.7 \pm 0.3	75.3
	25	6.4 \pm 0.4	93.6
IIc ^c	0.1	97.7 \pm 2.9	2.3
	1	132.2 \pm 5	—
	10	66.8 \pm 0.7	33.2
	25	7.6 \pm 2	92.4

^a Control= Metanol

^b Control= Acetato de etilo.

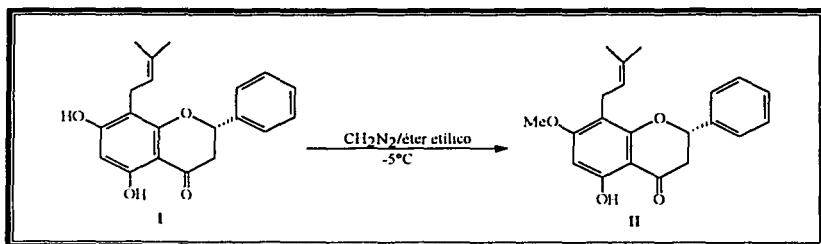
^c Control= Etanol.

IX. Análisis de Resultados

1. ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DE DERIVADOS DE LA GLABRANINA.

1.1). Obtención de 5-hidroxi-7-metoxi-8-(3'', 3''-dimetilalil)-flavanona (II).

De la reacción de metilación de la glabranina (I), se aisló un sólido amarillo, de pf. 126-128°C, ver *esquema 21*, que por sus propiedades espectroscópicas fue identificado como la metilglabranina, sustancia aislada de *Esenbeckia berlandieri ssp acapulcensis* [16].



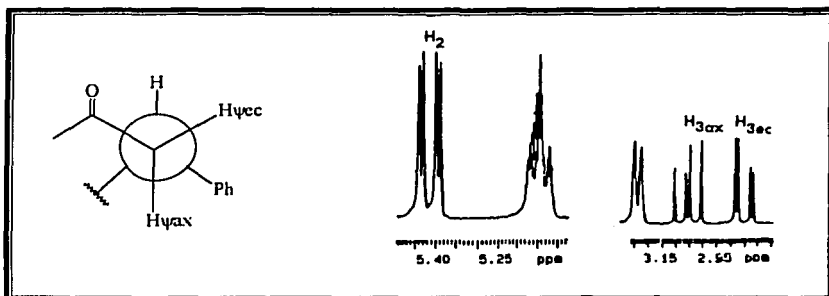
Esquema 21. Reacción de metilación de la Glabranina con CH_2N_2 .

En el espectro de IR (espectro 5); en 1654 cm^{-1} se observa la presencia de una cetona; la interacción del grupo carbonilo con el grupo hidroxilo del C-5 a través de un puente de hidrógeno, provoca el desplazamiento de la banda de absorción hacia un número de onda más bajo que el informado en la literatura ($1680\text{-}1750\text{ cm}^{-1}$) [24, 25]. Las bandas de absorción en 3006 y 1583 cm^{-1} corresponden a las $\nu(\text{C-H})$ y (C-C) de C_{sp^2} , las bandas en 1444.67 y 1373.91 cm^{-1} son atribuidos a las $\nu(\text{C-O})$. La presencia de los metilenos alílicos y vinílicos quedan de manifiesto por las bandas en 1444 y 1373 cm^{-1} que son característicos de estos grupos respectivamente [79].

En su RMN- ^1H (espectro 6), se observaron las señales características para el esqueleto de la flavanona.

- a) La señal simple en δ 12.14 corresponde al hidrógeno del grupo hidroxilo en C₅-OH.
- b) Una señal doble de doble (*dd*, $J = 13$ y 3.3 Hz, 1H) en δ 5.41, corresponde a la parte X de un sistema ABX, la cual muestra acoplamiento con las señales en δ 3.06 (*dd*, $J = 17$ y 12 Hz, 1H) y δ 2.85 (*dd*, $J = 17.1$ y 3.6 Hz, 1H).

Los valores de sus constantes de acoplamiento sugieren que el sistema AB esta formado por dos hidrógenos geminales, mientras que la parte X del sistema corresponde a un hidrógeno bencílico, que de acuerdo con sus constantes de acoplamiento, permiten situarlo con una disposición trans ($J = 12$ Hz) y cis ($J = 3.6$ Hz), con respecto al C-2 (sistema AB), ver *esquema 22*

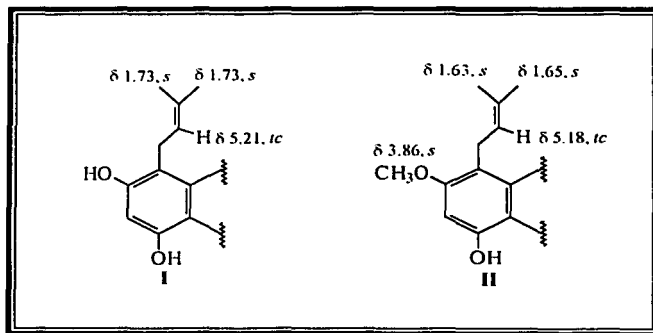


Esquema 22. Acoplamientos químicos de los H-2 e H-3 en el sistema ABX.

- c) Dos señales doble de doble para los H-3_{ψax} (δ 3.06, $J = 17.3$ y 12.3 Hz, 1H) y H-3_{ψcc} (δ 2.85, $J = 17.1$ y 3.6 Hz, 1H), tomando en consideración que los hidrógenos en posición ecuatorial aparecen a campo más alto que los hidrógenos en posición axial, ver *esquema 22* [80].
- d) La presencia de una señal compleja entre δ 7.48-7.36 ppm que integra para cinco hidrógenos que corresponde a un anillo aromático monosustituido.

Asimismo se observan las señales correspondientes al grupo prenilo, en δ 5.18 una señal triple de cuartetos (*tc*, $J = 7$ y 1.5 Hz) que corresponden al hidrógeno vinílico, el cual se acopla con el H-1" (δ 3.34, *d*, $J = 6.9$ Hz) de este fragmento. Los grupos metilos se observan como señales simples en δ 1.65 y 1.63 respectivamente.

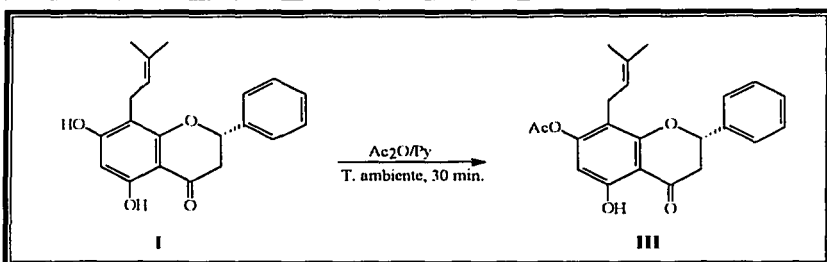
La diferencia en los espectros de RMN- ^1H del producto (II) y el de la glabranina (I), es la presencia de una señal simple en δ 3.86 que corresponde a un éter aromático, *ver esquema 23*. Por lo que se concluyó que la sustancia obtenida corresponde a la 5-hidroxi-7-metoxi-8-(3", 3"-dimetilalil)-flavanona (II), la cual ya había sido previamente caracterizada de *Tephrosia villosa* (Leguminosa) [81].



Esquema 23. Desplazamientos químicos de la Glabranina y II.

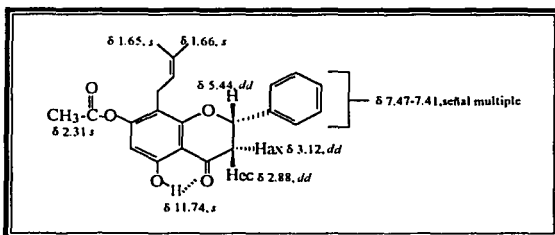
1.2). Obtención de 7-acetil-5-hidroxi-8-(3", 3"-dimetilalil)-flavanona (III).

Al realizar el tratamiento de la glabranina (I) con $\text{Ac}_2\text{O}/\text{Py}$, *ver esquema 24*, se aisló un sólido de color amarillo, que en infrarojo (IR) se observan las siguientes bandas: 1769 cm^{-1} $\nu(\text{COO})$, 1649 cm^{-1} $\nu(\text{C}=\text{O})$ y $1456, 1372\text{ cm}^{-1}$ que corresponde a los metilenos alílicos y vinílicos respectivamente.



Esquema 24. Reacción de acetilación de la Glabranina con $\text{Ac}_2\text{O/Py}$.

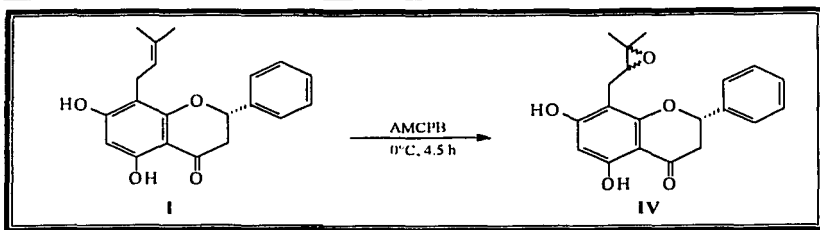
En el espectro de RMN- ^1H (espectro 10) se observan las señales características al esqueleto de la flavanona, además de la presencia de una señal simple (*s*) en δ 2.31 que corresponde a los hidrógenos del metilo del grupo acetato, *ver esquema 25*, que confirma que la sustancia obtenida corresponde a la 7-acetil-5-hidroxi-8-(3'',3''-dimetilalil)-flavanona (III), sustancia no descrita previamente en la literatura [82]



Esquema 25. Desplazamientos químicos del producto III

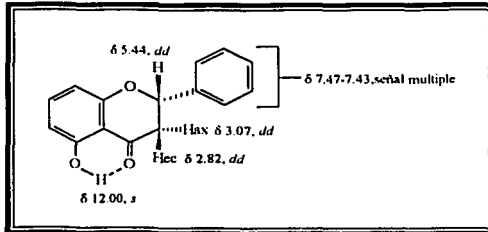
1.3. Obtención de 5,7-dihidroxi-8-(3''-metil-2'',3''-epoxibutano)-flavanona (IV).

De la reacción de epoxidación de la glabranina (I) con AMCPB, *ver esquema 26*, se aisló una sustancia de aspecto aceitoso de color amarillo, que en su espectro de infrarrojo (IR) se observan en 3591 cm^{-1} $\nu(\text{O-H})$ de los alcoholes, una banda de absorción en 3066 cm^{-1} $\nu(\text{C}_{\text{sp}^2}\text{-H})$ y la banda en 1642 cm^{-1} $\nu(\text{C=O})$ del grupo carbonilo en C-4.



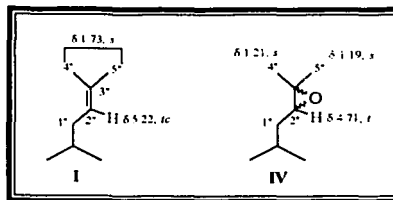
Esquema 26. Reacción de epoxidación de la Glabranina con AMCPB

En el espectro de RMN-¹H (espectro 14) se observan las señales características del esqueleto de la flavanona, como se muestra en el *esquema 27*.



Esquema 27. Desplazamientos químicos del núcleo de la flavanona.

Al comparar el espectro de RMN-¹H de I con IV, en este último se observa una señal triple (*t*) en δ 4.71 ppm que integra para un hidrógeno geminal a un átomo de oxígeno como se indica en el *esquema 28*. Con base en estos resultados se confirma como estructura al epóxido de la glabranina (IV).

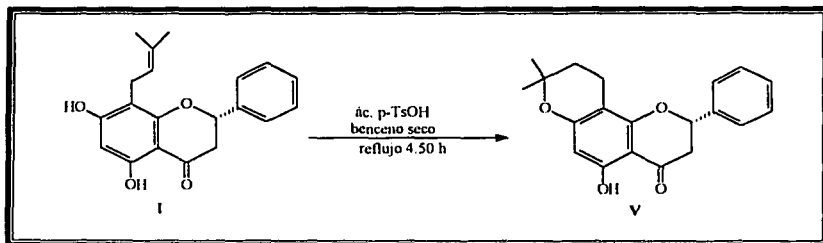


Esquema 28. Desplazamientos químicos del grupo prenilo en la Glabranina (I) y IV.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

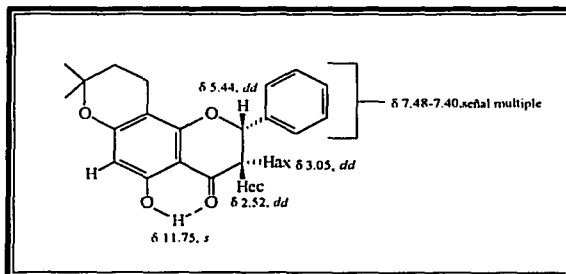
1.4). Obtención del 7,8-(6'',6''-dimetilcromano) de la glabranina (V).

La caracterización e identificación del producto de reacción de la glabranina (I) con ácido p-TsOH, *ver esquema 29*, se logró mediante el análisis de sus datos espectroscópicos y espectrométricos.



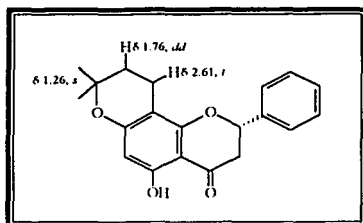
Esquema 29. Reacción de ciclización de la Glabranina con p-TsOH.

En su espectro de IR (espectro 17), se observan en 1642 cm^{-1} la banda correspondiente a las $\nu(\text{C}=\text{O})$, que interaccionan con el grupo hidroxilo de la posición 5. Asimismo en su espectro de RMN- ^1H (espectro 18), se muestran las señales correspondientes al núcleo de la flavanona, *ver esquema 30*.



Esquema 30. Desplazamientos químicos de la flavanona.

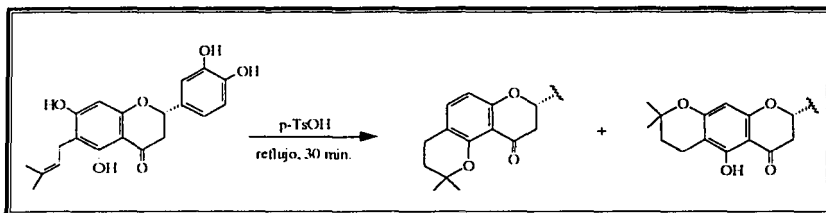
La reacción de la glabranina permitió la formación de un anillo de seis miembros (anillo del pirano), el cual se puede predecir de acuerdo a las reglas de Baldwin (6-endo-trigonal) [83] y comprobarse por las señales en δ 1.76 (d, J= 7 y 2 Hz, 2H) y δ 2.61 (t, J= 7 Hz, 2H), que corresponden a los metilenos del C-5'' y C-4'' respectivamente, ver *esquema 31*.



Esquema 31. Desplazamientos químicos de los H-4'' y 5''.

La formación de un solo producto de ciclización permitió confirmar químicamente la posición del grupo prenilo en la posición 8 del esqueleto de la flavanona. La posición del grupo prenilo fue precisada por métodos espectroscópicos (NOESY, COLOC y HETCOR) [82].

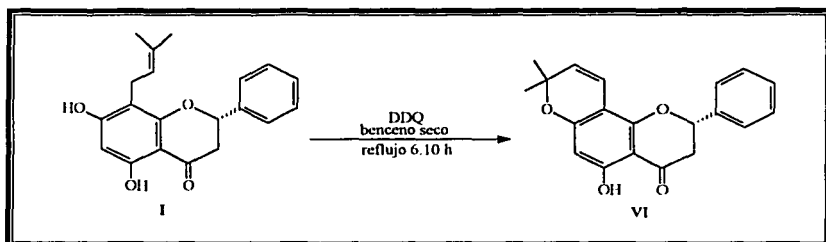
Cabe señalar que en la literatura química, se han informado reacciones de ciclización para flavanonas preniladas en la posición 6 con ácido fórmico [84]. El tratamiento de la 3,4',5',7'-tetrahidroxi-6-(3',3'-dimetilalil)-flavanona con ác. p-TsOH se ilustra en el *esquema 32*



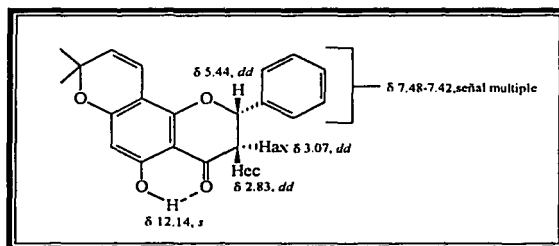
Esquema 32. Reacción de ciclización de la 3,4',5',7'-tetrahidroxi-6-(3',3'-dimetilalil)-flavanona con p-TsOH

1.5). Obtención del 7,8-(6'',6''-dimetilcromeno) de la glabranina (VI).

El tratamiento de la glabranina (I) con DDQ permitió la caracterización de un sólido amarillo de pf. 110-120°C, de acuerdo con lo indicado en el *esquema 33*. En su espectro de RMN-¹H (espectro 22), se observan las señales características de una flavanona, como se observa en el *esquema 34*.

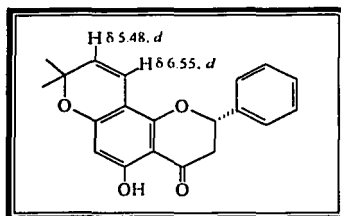


Esquema 33. Reacción de ciclización de la Glabranina con DDQ.

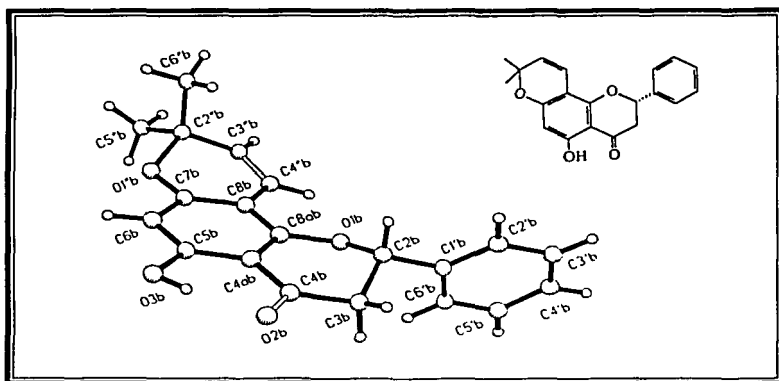


Esquema 34. Desplazamientos químicos de la flavanona.

La formación del anillo de seis miembros se puede predecir con base en las reglas de Baldwin (6-endo-trigonal) [83] y comprobarse por las señales en δ 5.48 ($J=10$ Hz) y δ 6.55 ($J=10$) que aparecen como una señal doble que integra para un protón cada una y que corresponde a los hidrógenos vinílicos de las posiciones C-4'' y C-5'' de acuerdo al *esquema 35*. Los datos de difracción de rayos X, para dicha sustancia son las que se enlistan en la página 67; su arreglo molecular determinado por esta técnica, se encuentra en el *esquema 36*.



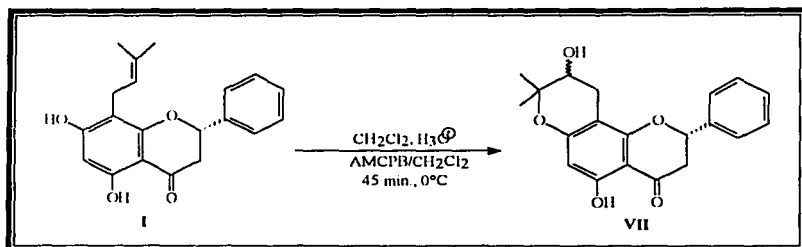
Esquema 35. Desplazamientos químicos de los hidrógenos vinílicos de los C-4'' y 5''.



Esquema 36. Arreglo molecular de la sustancia VI, determinado por rayos X.

1.6). Obtención del 5''-hidroxi-7,8-(6'',6''-dimetilcromano) de la glabranina (VII).

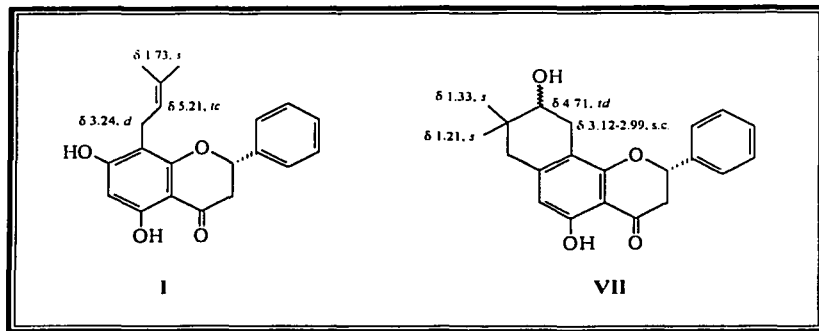
De la reacción de la glabranina (I) con AMCPB en medio ácido, *ver esquema 37*, se obtuvo una sustancia amarilla de consistencia aceitosa. En su espectro de masas [EM (IE)], se observa un ión molecular de 340 uma, que corresponde a un compuesto de fórmula $C_{20}H_{20}O_5$, con 11 Ω .

Esquema 37. Reacción de la Glabranina con AMCPB/H⁺.

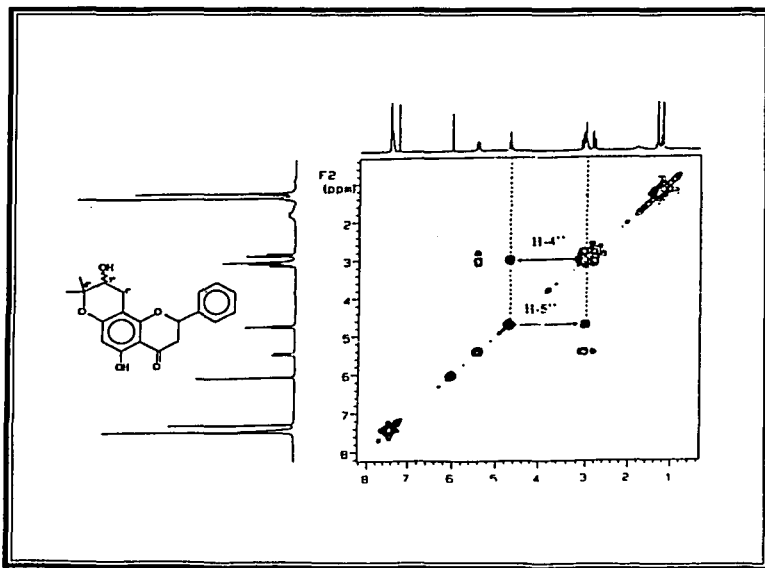
En su espectro de IR (espectro 25), se observan las bandas correspondientes a: $\nu(\text{O-H})$ 3583 cm^{-1} , $\nu(\text{C=O})$ 1645 cm^{-1} y $\nu(\text{C}_{\text{sp}^3-\text{H}})$, $\nu(\text{C}_{\text{sp}^2-\text{H}})$ en 3019 y 2981 cm^{-1} respectivamente. En su espectro de RMN-¹H (espectro 26), se observan las señales características del esqueleto de la flavanona: H-2 en δ 5.44 (*dd*, $J = 12.9$ y 3.0 Hz), H-3_{ax} δ 2.82 (*dd*, $J = 17.1$ y 3.3 Hz), H-3_{eq} δ 3.07 (*dd*, $J = 17.1$ y 12.9 Hz) y C₅-OH δ 12.30 (*s*).

Sin embargo al comparar el espectro de RMN-¹H de la glabranina (I) con el del compuesto VII, se observa la ausencia de las señales correspondientes al grupo prenilo, como se muestra en el *esquema 38*. La presencia de una señal a campo bajo en δ 4.71 (*td*, $J = 8.7$ y 1 Hz), la cual integra para un hidrógeno es asignada al H-5'' y entre δ 3.12-2.99 se observa una señal compleja correspondiente a los dos hidrógenos diastereotópicos de la posición H-4''.

Las señales simples en δ 1.33 y 1.21 corresponden a los metilos en la posición 6'', el acoplamiento de los hidrógenos de la posición 4'' y 5'' se confirma al aplicar la técnica del COSY, *ver esquema 39*, por lo que se puede concluir que el producto aislado es el 5''-hidroxi-7,8-(6'',6'')-dimetilcromano de la glabranina (VII).



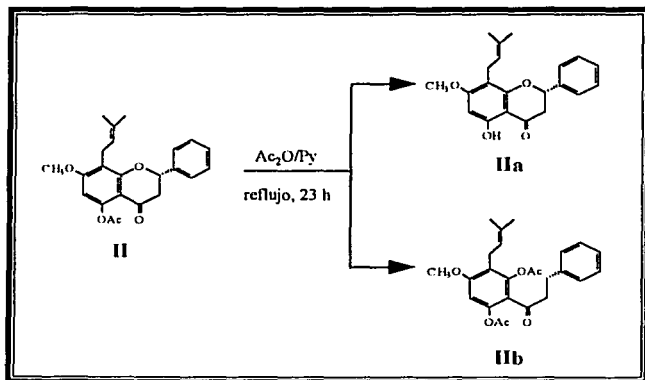
Esquema 38. Desplazamientos químicos del grupo prenilo de los compuestos I y VII.



Esquema 39. COSY (300 MHz, CDCl₃, TMS) de la 5''-hidroxi-7,8-(6'',6''-dimetilcromano) de la glabranina (VII).

1.7. Obtención de la 5-acetil-7-metoxi-8-(3'',3''-dimetilalil)-flavanona (IIa) y 2',6'-diacetil-4'-metoxi-3'-(3'',3''-dimetilalil)-chalcona (IIb).

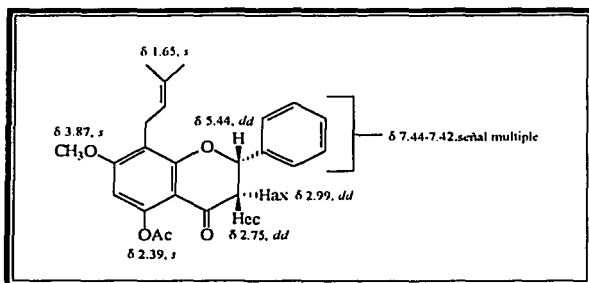
Del tratamiento de la 5-hidroxi-7-metoxi-8-(3'',3''-dimetilalil)-flavanona (II) con Ac_2O a reflujo, se obtuvieron dos productos, ver *esquema 40*. El producto menos polar muestra en su espectro de infrarrojo (espectro 29), las siguientes señales: 1766 cm^{-1} $\nu(\text{COO})$, 1679 cm^{-1} $\nu(\text{C}=\text{O})$, 3016 cm^{-1} $\nu(\text{C}_{\text{sp}^2}\text{-H})$, 1573 cm^{-1} $\nu(\text{C}_{\text{sp}^2}\text{-C}_{\text{sp}^2})$ y $1097\text{-}1168\text{ cm}^{-1}$ $\nu(\text{C}-\text{O})$.



Esquema 40. Reacción de acetilación de la metilglabranina con $\text{Ac}_2\text{O}/\text{Py}$.

En el espectro de RMN^{-1}H (espectro 30) muestra las señales correspondientes a la metilglabranina, con la ausencia de la señal en δ 12.37 para el hidrógeno fenólico y la presencia en δ 2.39 que es asignado a los hidrógenos del grupo acetato, ver *esquema 41*.

Con base en lo anterior, se caracterizó como la 5-acetil-7-metoxi-8-(3'',3''-dimetilalil)-flavanona (IIa).

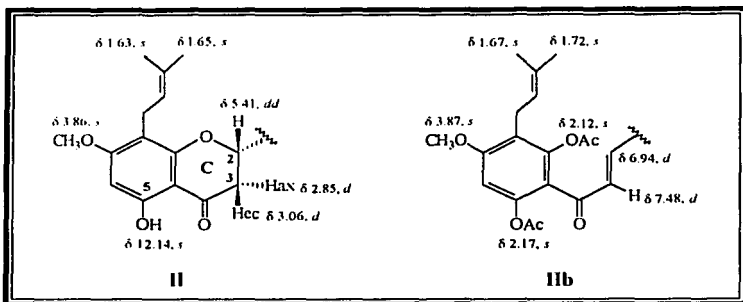


Esquema 41. Desplazamientos químicos del producto de **IIa**.

El producto de mayor polaridad mostró las siguientes señales de infrarrojo (espectro 33) que corresponden a: 3007 cm^{-1} $\nu(\text{C}_{\text{sp}^3-\text{H}}$), 1770 cm^{-1} $\nu(\text{COO})$, 1610 cm^{-1} $\nu(\text{C}=\text{O})$, 1576 cm^{-1} ($\text{C}=\text{C}$) y 1448 y 1369 cm^{-1} que son atribuidos a los metilenos alílicos y vinílicos.

Al comparar el espectro de RMN^{-1}H de la 7-metoxiglabranina (**II**) con la del compuesto **IIb** (espectro 34) muestra la presencia de dos señales simples (*s*) en δ 2.17 y 2.12 que fueron asignadas a los metilos de dos grupos acetato, el de la posición 5 fue determinado en comparación con el producto **IIa**; así como la ausencia de los hidrógenos de las posiciones 2 y 3 respectivamente, ya que las condiciones de reacción permitieron la apertura del anillo "C" —formación de la chalcona, precursor en la biogénesis de los flavonoides—. Lo anterior fue confirmado por la presencia de dos señales dobles en δ 6.94 y δ 7.48 que corresponden a los hidrógenos de una cetona α - β insaturada, como se ilustra en el *esquema 42*.

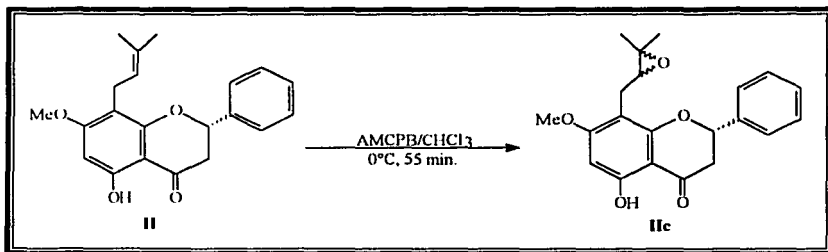
Con base en sus propiedades espectroscópicas fue caracterizado como la 2',6'-diacetil-4'-metoxi-3'-(3'',3''-dimetilalil)-chalcona (**IIb**).



Esquema 42. Comparación de los desplazamientos químicos entre la metilglabranina (II) y el compuesto IIb.

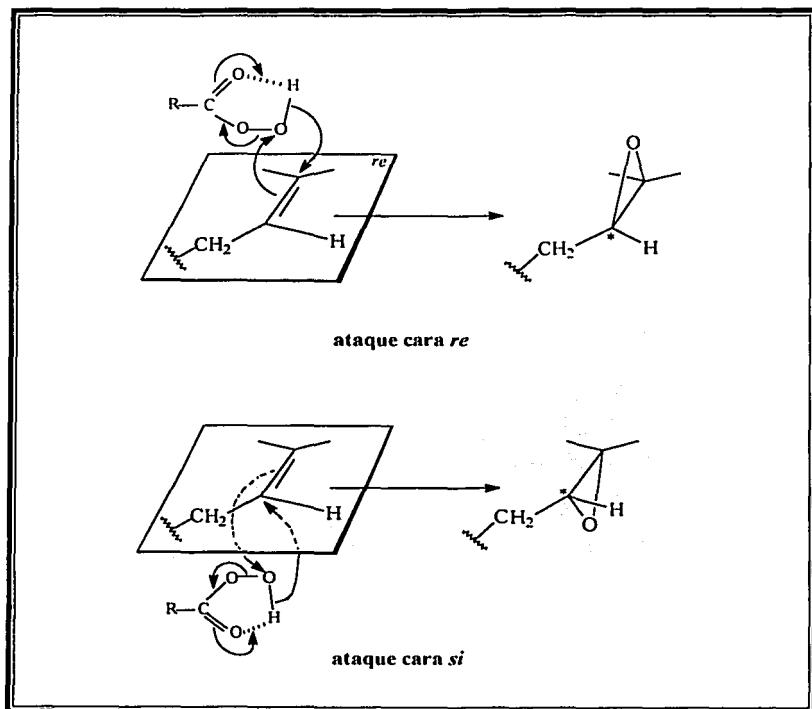
1.8). Obtención de 7-metoxi-8-(3"-metil-2",3"-epoxibutano)-glabranina (IIc).

De la reacción de epoxidación de la metilglabranina (II), *ver esquema 43*, se aisló una mezcla de productos diastereoisoméricos. En su espectro de RMN-¹H (espectro 35) se observan las señales características del esqueleto de la flavanona. Sin embargo con respecto a las señales observadas para la sustancia II se observan la desaparición de la señal en δ 5.18 (*tc*), que corresponde al H-2 y la señal en δ 3.17 (*d*) sufre un desplazamiento a campo alto debido al cambio en el grupo funcional entre los C-2" y C-3".



Esquema 43. Reacción de epoxidación de la metilglabranina con AMCPB.

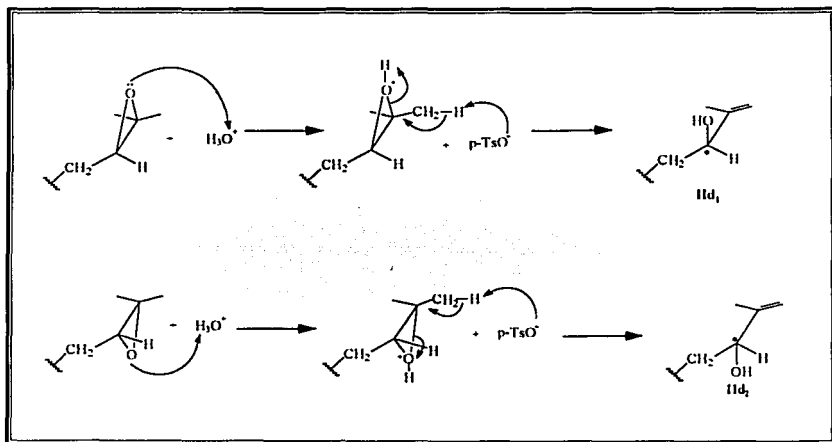
Las señales correspondientes al H-1'' e H-2'' son señales que se encuentran traslapadas con los H-3 de la metilglabranina. Esto está de acuerdo con la entrada del oxígeno electrofílico presente en el perácido, sobre la ligadura del grupo prenilo para generar un centro quiral adicional en la molécula, como se muestra en el *esquema 44*. La presencia de este centro quiral incide en la naturaleza diastereotópica de los hidrógenos en el C-1''.



Esquema 44. Formación de productos en la reacción de epoxidación de la metilglabranina (II).

La apertura del epóxido conduce a la obtención de sustancias diastereoisómeras debido a la adición de un centro estereogénico que presenta la sustancia IIc.

La explicación en la formación de la mezcla diastereoisómerica del compuesto IIId es considerar que la apertura del epóxido en medio ácido esta determinada por factores de tipo electrónico, en el *esquema 47* se indica un posible mecanismo de reacción.



Esquema 47. Posible mecanismo de reacción para la apertura del epóxido en medio ácido.

2. ANÁLISIS DE DESPLAZAMIENTOS QUÍMICOS DE RMN-¹³C EN FLAVANONAS

Los desplazamientos químicos de RMN-¹³C de los derivados de la glabranina se dan a conocer en la *tabla 12* (pp. 80) y *15* (pp. 82). Las asignaciones de las diferentes señales de cada uno de los átomos de carbono (metilo, metino, metileno y carbono cuaternario), se realizó con ayuda de los experimentos de DEPT y APT. Asimismo se compararon los desplazamientos químicos con algunos compuestos estructuralmente similares, permitiendo la asignación de cada una de las señales observadas en su espectro de C-13.

Las flavanonas presentan como núcleo básico a la 2-fenilcromona, donde el C-2 de la molécula es un centro estereogénico, por lo que los dos estereoisómeros de esta estructura son posibles; la utilización de métodos ópticos han permitido determinar la configuración absoluta de algunas flavanonas que se encuentran en la naturaleza como (2*S*) [60], donde el grupo fenilo de la posición del C-2 adquiere una orientación α -pseudoequatorial, *ver figura 1*.

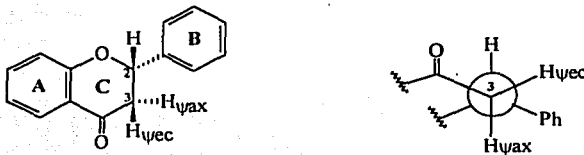
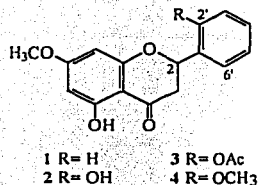


Fig. 1.

De esta manera el anillo C de la flavanona está conformado por un oximetino (C-2), un metileno alifático (C-3) y un grupo carbonilo (C-4), los cuales aparecen entre los siguientes intervalos δ 80.3-71.3, 46.4-39.5 y 198.5-186.4 respectivamente [85].

El C-2 para los derivados de la glabranina aparece en $\delta 78.97 \pm 0.16$ ppm, sin embargo en estudios realizados a flavanonas sustituidas o disustituidas en los C-2' y 6' demuestran el efecto sobre el C-2, donde su desplazamiento químico es de aproximadamente 75.03 ± 0.09 ppm, como se ilustra en la *tabla 18*.

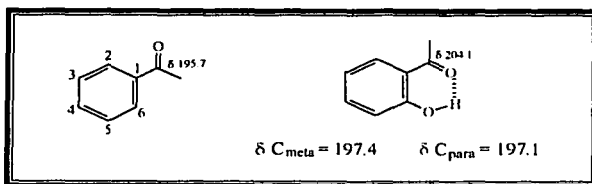


Sustancia	δ (C-2)	$\Delta\delta$ ($\delta_x - \delta_1$)
1	79.9	—
2	74.9	-5.0
3	75.1	-4.8
4	75.1	-4.8

Tabla 18. Influencia de los sustituyentes del C-2' en el desplazamiento químico del C-2 en las flavanonas.

Mientras que el desplazamiento químico para el C-3, de las sustancias obtenidas como producto de reacción es de $\delta 43.42 \pm 0.11$ ppm.

La introducción de un grupo hidroxilo en el anillo aromático de la acetofenona ejerce un efecto de protección sobre el grupo carbonilo, debido a factores de tipo estérico; ya que los sustituyentes de las posiciones *orto*, *orto'* en el anillo aromático impiden la coplanaridad del doble enlace del grupo carbonilo y el grupo fenilo [86], mientras que la formación de puentes de hidrógeno intramoleculares, causan un efecto de desprotección en el carbono del grupo carbonilo, *ver esquema 48*.



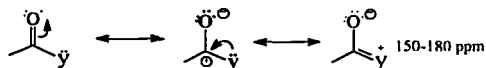
Esquema 48. Influencia de la formación de puentes de hidrógeno en los desplazamientos químicos.

El desplazamiento químico observado para el C-4¹² para las sustancias obtenidas es de 195.93 ± 0.77 ppm; el cual queda determinado por el tipo de hibridación del carbono carbonílico (sp^2), así como la ausencia o presencia de un sustituyente en la posición C-5.

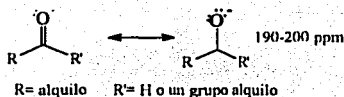
La formación del puente de hidrógeno entre el grupo carbonilo y el grupo hidroxilo del C-5, es el responsable del aumento en la densidad electrónica del C-3, ejerciendo un efecto de protección sobre este átomo de carbono. En la *tabla 19*, se puede observar que el átomo de C-3 en el compuesto **B**, muestra un δ 45.50 ($\Delta\delta = 1.0$) con respecto a **C**, dicha situación esta de acuerdo con el desplazamiento químico del C-3 (δ 45.28) de la 5-acetilmetilglabranina (**IIa**) con respecto al C-3 (δ 43.42) de la metilglabranina (**II**), donde $\Delta\delta = -1.86$, tendencia similar se observa en los datos informados en la literatura para el derivado metoxilado ($\Delta\delta = -1.0$).

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 **B** por Wagner y colaboradores [87].

¹² Los desplazamientos químicos de C-13 para aldehídos, cetonas, ácidos carboxílicos y derivados, aparecen entre 150 y 200 ppm. Los grupos carbonilo de aldehídos y cetonas resuenan a campo más bajo (190-220 ppm) que los grupos carbonilo de los ácidos y sus derivados, lo cual se explica con base en las formas resonantes que presenta cada grupo funcional.

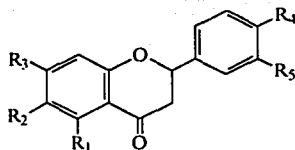


Y = O, N, halógeno



R = alquilo

R' = H o un grupo alquilo



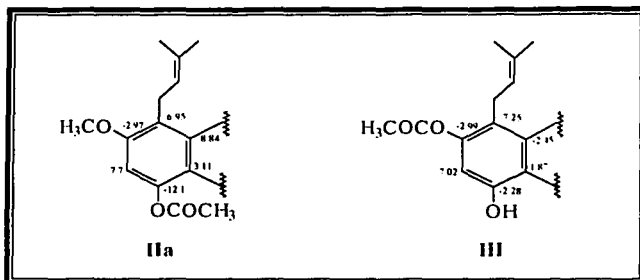
Flavanona	C-3	$\Delta\delta$
A. $R_1 = R_4 = \text{OH}$; $R_2 = \text{H}$; $R_3 = R_5 = \text{OCH}_3$	43.20	-1.3
B. $R_1 = R_3 = R_5 = \text{OCH}_3$; $R_2 = \text{H}$; $R_4 = \text{OH}$	45.50	1.0
C. $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = R_5 = \text{H}$	44.50	
D. $R_1 = R_3 = \text{OH}$; $R_2 = R_4 = R_5 = \text{H}$	42.20	-2.3

Tabla 19. Variaciones en el desplazamiento químico del C-3 de la flavanona, ocasionados por el sustituyente de la posición C-5.

Como ya se menciona, la naturaleza electrónica del grupo hidroxilo es la que determina el desplazamiento químico de los carbonos aromáticos a los que se encuentra unido. En las flavanonas se observan que los carbonos oxiarilos (C-5, C-7 y C-9) se encuentran entre 166.7-162.9 ppm [86]. Para las sustancias obtenidas en el presente estudio (II-VIII), la señal desplazada a campo bajo corresponde al C-7 (164.87 ± 2.63 ppm), mientras que el C-5 y el C-9 aparece en 162.68 ± 1.72 y 158.30 ± 1.24 ppm respectivamente.

La acetilación de los grupos hidroxilo fenólicos introduce dos átomos de carbono que corresponden al grupo carboxilo del éster (168-172 ppm) y el grupo metilo (18-22 ppm).

Las flavanonas poseen grupos hidroxilo unidos al anillo aromático, que al ser acetilados cambian los desplazamientos químicos de los carbonos bencénicos, debido a la naturaleza electrónica del grupo acetato —grupo electrodonador— el efecto producido queda de manifiesto principalmente en las posiciones *orto* y *para*, la cual queda demostrado en los derivados acetilados (IIa y III), ver esquema 49.



Esquema 49. $\Delta\delta$ de las sustancias con respecto a los compuestos I y II respectivamente.

El efecto de protección sobre los carbonos *ipso*; para el compuesto IIa es de $\Delta\delta(\text{II-IIa}) = -12.10$ ppm mientras que para el compuesto III es de $\Delta\delta(\text{I-III}) = -2.99$ ppm.

La acetilación del grupo hidroxilo de la posición C-5, causa un efecto de protección sobre C-4 en 6.66 ppm, como se ilustra en la *figura 2*.

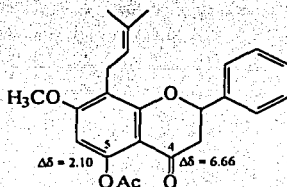
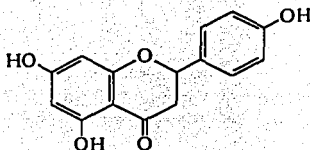


Fig. 2

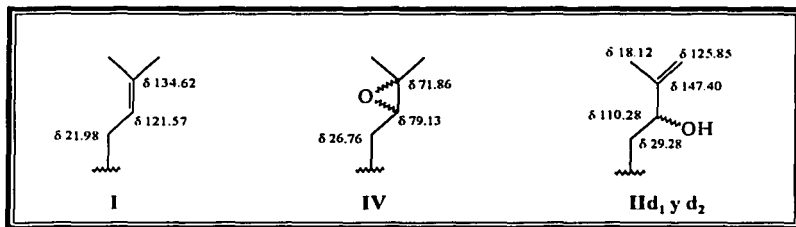
La posición del grupo prenilo en la posición 8, fue determinada por métodos espectroscópicos (COLOC, HETCOR, NOESY). Por lo que la señal en 94.29 ± 3.71 ppm corresponde al C-6 en las 5,7-dihidroxi-flavanonas preniladas, mientras que la 7-metoxi-5-hidroxi-flavanonas preniladas es de 92.23 ± 3.42 ppm. El C-8 en estos compuestos se presenta en 105.51 ± 1.06 ppm y en 107.91 ± 2.15 ppm respectivamente, el cual sufre un

desplazamiento químico a campo bajo en aproximadamente $\Delta\delta = 10.91$ ppm con respecto al C-8 de la naringenina (179), debido al efecto α que ejerce el grupo prenilo en dichas sustancias.



179

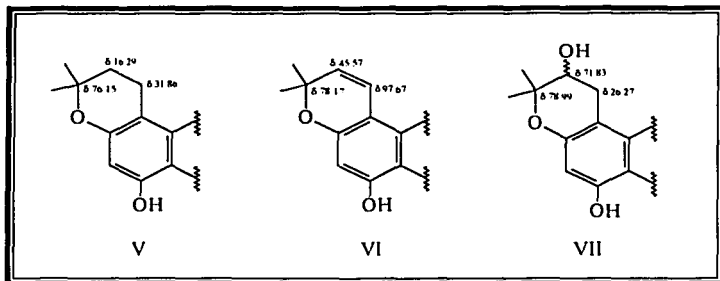
En el espectro de C-13 aplicando la técnica del APT o DEPT para las compuestos del presente estudio se observan las señales correspondientes al grupo prenilo y sus derivados, las cuales pueden justificarse con base al cambio en el tipo de hibridación — sp^2 a sp^3 — y a la naturaleza del sustituyente en las posiciones del C-2'' y C-3'', tal como se muestra en el *esquema 50*.



Esquema 50. Desplazamientos químicos de RMN- ^{13}C para el grupo prenilo.

Los productos de ciclización de la glabranina (V, VI, VII) en los que se llevó a cabo la formación del anillo del pirano, los desplazamientos químicos de los C-4'' y C-5'' en dichas sustancias varían de acuerdo al tipo de hibridación o el tipo de sustituyente presente, así por ejemplo el C-5'' de la sustancia VI se encuentra en $\delta 115.57$ ppm por poseer una hibridación

sp^2 ; mientras que para el compuesto **VII** aparece en δ 71.83 debido a la presencia del grupo hidroxilo y para el compuesto **V** el C-5" se presenta en δ 16.29, como se indica en el *esquema* 51



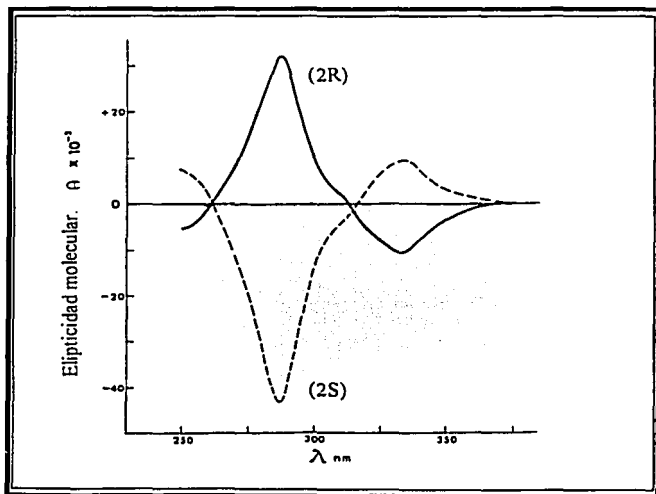
Esquema 51. Desplazamientos químicos de RMN-¹³C en los productos de ciclización de la glabranina (I).

Con lo que respecta al desplazamiento del C-6" este se ve influenciado por la funcionalización del C-5", lo cual queda de manifiesto por el efecto de desprotección que sufre este carbono en las sustancias **VI** ($\Delta\delta = 2.02$) y **VII** ($\Delta\delta = 2.84$), con respecto al desplazamiento químico del C-6" del compuesto **V**. En la *tabla 12*, se puede observar que los grupos metilos unidos al C-6", se ven protegidos en las sustancias **V** y **VI**, mientras que en **VII**, se observa una desprotección con respecto a **V**; 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".

3. ANÁLISIS ÓPTICO DE FLAVANONAS.

En estudios realizados de DC a flavanonas de configuración absoluta $2(S)$, en donde el grupo arilo se encuentra en configuración pseudoequatorial, exhiben un efecto Cotton positivo debido a la transición $n \rightarrow \pi^*$, en aproximadamente 330 nm y un efecto Cotton negativo producido por la transición $\pi \rightarrow \pi^*$ en la región de 280-290 nm [60].

Al determinar la configuración del C-2 de los enantiómeros de la 8-(3'',3''-dimetilalil)-naringenina (177, 178), el enantiómero con configuración $2(S)$ muestra los efectos Cotton en : (+) 330 nm y (-) 280-290 nm; mientras que el compuesto $2(R)$, muestra efectos Cotton inversos, como se ilustra en el *esquema 52*, [56].

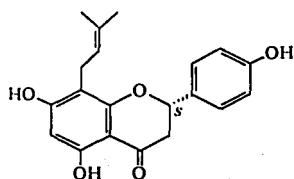


Esquema 52. Curva de DC de la 8-(3'',3''-dimetilalil)-naringenina

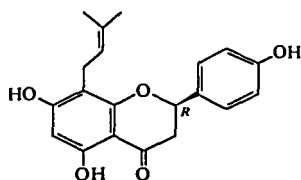
En la *tabla 20*, se describen los valores de DC de los enantiómeros de la 8-(3'',3''-dimetilalil)-naringenina y de los compuestos I y II, observándose que las sustancias estudiadas en el presente trabajo muestran efectos Cotton similares a la 2(*R*)-8-(3'',3''-dimetilalil)-naringenina.

Sustancia	Datos de DC	Tipo de Efecto Cotton
2(<i>S</i>)-8-(3'',3''-dimetilalil)-naringenina (177)	$[\theta]_{312} +6600$; $[\theta]_{288} -3710$.	(+) 312; (-) 288
2(<i>R</i>)-8-(3'',3''-dimetilalil)-naringenina (178)	$[\theta]_{312} -6800$; $[\theta]_{288} +3500$.	(-) 312; (+) 288
Glabranina (I)	$[\theta]_{311} -1618$; $[\theta]_{288} +8201$.	(-)311; (+) 288
Metilglabranina (II)	$[\theta]_{331} -292$; $[\theta]_{288} +1576$.	(-) 331; (+) 288

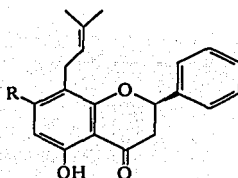
Tabla 20. Datos de DC de la 8-(3'',3''-dimetilalil)-naringenina, Glabranina y Metilglabranina.



177

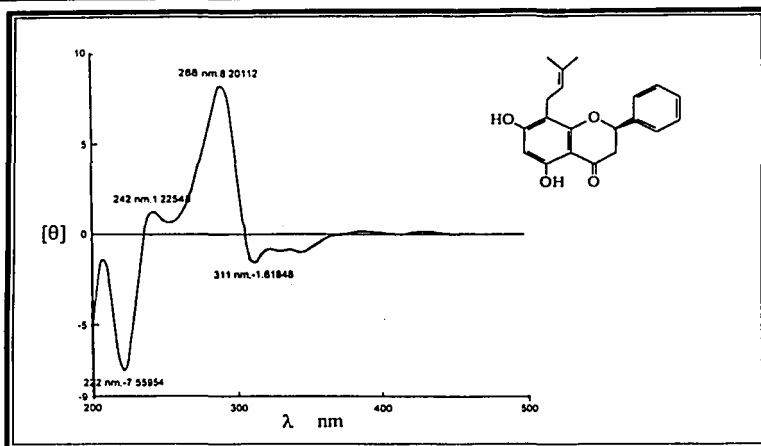


178

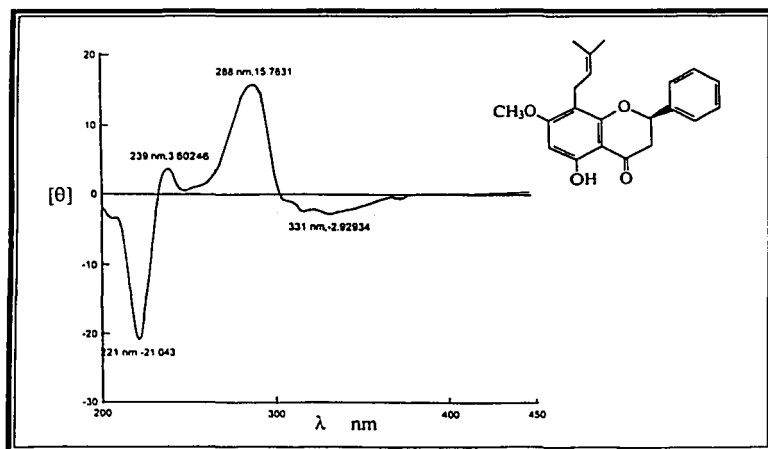


I R=OH
II R=OCH₃

Por lo tanto, se podría proponer que estas sustancias poseen una configuración absoluta 2(*R*), *ver esquema 53, 54*, contrario a lo que se indica en la bibliografía [60, 61] y que se encuentra sustentada por el mecanismo biogénético, ilustrado en el *esquema 4* (pp.17). Por lo que se sugiere, realizar el análisis de los otros derivados de la Glabranina con la finalidad de poder concluir de manera contundente.



Esquema 53. Curva de DC de la Glabranina (I)



Esquema 53. Curva de DC de la Metilglabranina (II)

4. EVALUACIÓN BIOLÓGICA.

4.1). Actividad Antimicrobiana.

Al realizar la evaluación antimicrobiana de los derivados de la glabranina (IV, V, VI y VII) y productos de reacción de la metilglabranina (II), utilizando el Método de Mitscher, y de acuerdo a la *tabla 16* (pp. 83), se puede mencionar que las sustancias IIc, IId y V, no presentan actividad hacia ningún microorganismo de prueba, no así el epóxido de la glabranina (IV) que presenta actividad contra *Candida albicans*, de igual manera dos de los productos de ciclización [7,8-(6",6"-dimetilcromano)-de la glabranina (V) y 5"-hidroxi-7,8-(6",6"-dimetilcromano)-de la glabranina (VII)] muestran actividad frente a *Micrococcus luteus*.

Al someter a la glabranina (I) a la evaluación antimicrobiana, esta muestra inhibición en el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, lo cual ya ha sido informado en la literatura [88].

4.2). Bioensayo frente a *Artemia salina* L.

Solo fueron evaluadas dos de las sustancias obtenidas como productos de reacción (II y IV) y la glabranina (I).

Para poder determinar que la sustancia evaluada presenta actividad tóxica utilizando a la *Artemia salina* como organismo blanco, su CL_{50} deberá ser menor a 1000 ppm.

La sustancia caracterizada como la 5,7-dihidroxi-8-(3"-metil-2",3"-epoxibutano)-flavanona (IV) y la glabranina (I) mostraron toxicidad frente a este crustáceo — CL_{50} = 298.27 y CL_{50} = 252.28 ppm respectivamente—. Por lo que se procedió a realizar el análisis sobre la línea celular HeLa.

4.3). Evaluación sobre línea celular HeLa.

La actividad antitumoral de los derivados de la Glabranina (I) fue determinada en función de la capacidad de inhibir la proliferación celular de la línea celular HeLa, proveniente de carcinoma cérvico-uterino humano.

Con base en los resultados obtenidos (*ver tabla 17*, pp 84) se puede mencionar que tres de las sustancias evaluadas (IV, V y VI) presentan una disminución en el número celular (14.5, 62.6 y 77.4%) utilizando la concentración de 25 µg/mL en cada una. Al ser utilizada la sustancia IIc en las concentraciones de 0.1, 10 y 25 µg/mL, estas muestran una inhibición de las células en un 2.3, 33.2 y 92.4% respectivamente. La Glabranina (I) y la 7-metilglabranina (II) no presentan inhibición alguna en ninguna de las concentraciones utilizadas

El producto de ciclización de la glabranina con AMCPB/H₃O⁺ [5''-hidroxi-7,8-(6'',6''-dimetilcromano) de la glabranina (VII)] muestra actividad en la proliferación de las células en las cuatro concentraciones utilizadas, teniendo un porcentaje de inhibición de 90.3, 88.0, 75.3 y 93.6 respectivamente. Por lo que se sugiere realizar otros estudios para determinar su función como citotóxico o citostático en la replicación celular de la línea celular HeLa

X. Conclusiones

Se logró la purificación y la caracterización estructural de diez sustancias como productos de reacción de la glabranina (I), compuesto mayoritario de *Esenbeckia berlandieri* ssp *acapulcensis*, especie endémica de México, las cuales fueron identificadas como:

- 5-hidroxi-7-metoxi-8-(3'',3''-dimetilalil)-flavanona (II).
- 7-acetil-5-hidroxi-8-(3'',3''-dimetilalil)-flavanona (III).
- 5,7-dihidroxi-8-(3''-metil-2'',3''-epoxibutano)-flavanona (IV).
- 7,8-(6'',6''-dimetilcromano) de la glabranina (V).
- 7,8-(6'',6''-dimetilcromeno) de la glabranina (VI).
- 5'-hidroxi-7,8-(6'',6''-dimetilcromano) de la glabranina (VII).
- 5-acetil-7-metoxi-8-(3'',3''-dimetilalil)-flavanona (IIa).
- 2',6'-diacetil-4'-metoxi-3'-(3'',3''-dimetilalil)-chalcona (IIb).
- 7-metoxi-8-(3''-metil-2'',3''-epoxibutano)-glabranina (IIc).
- 7-metoxi-8-(2''-hidroxi-3''-metil-3''-buten)-glabranina (IId).

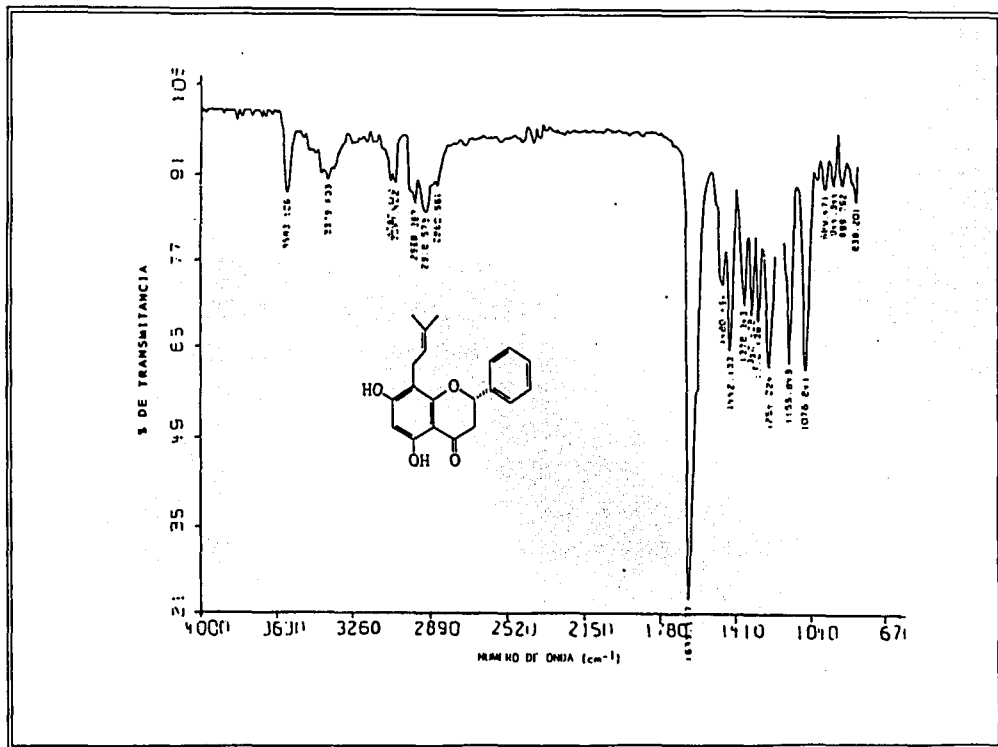
Por otra parte las sustancias VII, IIa, IIb, IIc y IId son por primera vez descritos como productos de reacción, ya que en el presente trabajo se informan sus propiedades espectroscópicas, espectrométricas y evaluación biológica — antimicrobiana, antitumoral— de algunas de ellas.

De la evaluación antimicrobiana, el epóxido de la glabranina (IV) presentó actividad antimicrobiana frente a *Candida albicans*, de igual manera dos de los productos de ciclización (V y VII) mostraron inhibición en el crecimiento de *Micrococcus luteus*. La glabranina (I) presentó actividad contra *Staphylococcus aureus*.

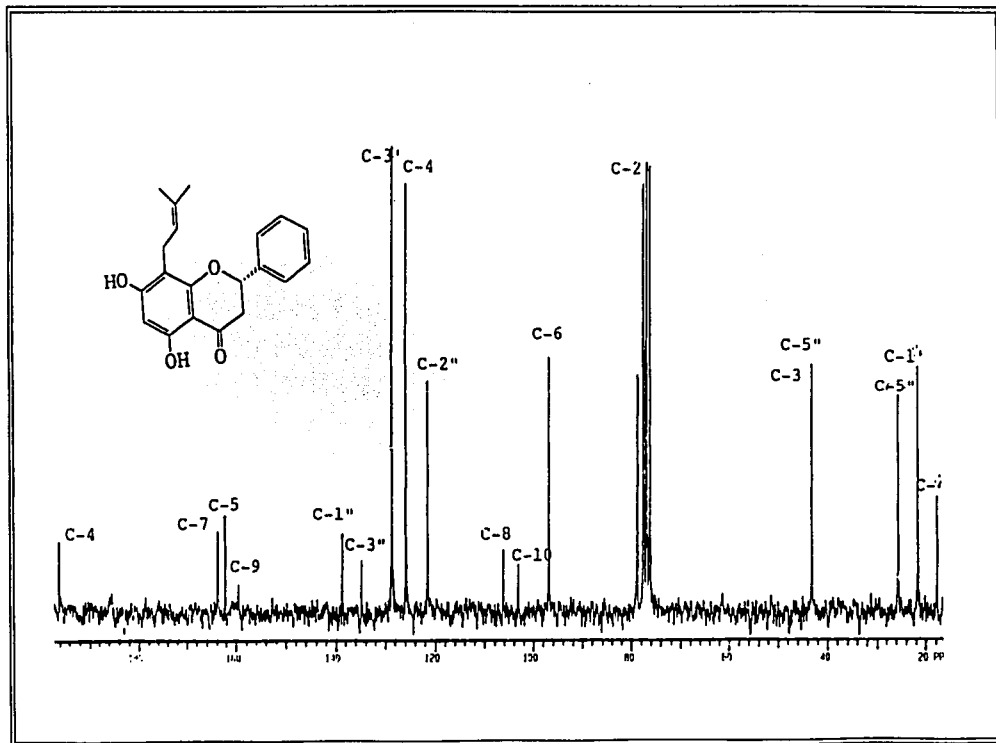
El producto de ciclización de la glabranina en medio ácido (VII), presenta actividad antitumoral frente a la línea celular HeLa proveniente de carcinoma cérvico-uterino en concentraciones de 0.1, 1.0, 10 y 25 µg/mL.

XI. Espectros

Espectro I. IR (CHCl₃) de la 5, 7-dihidroxi-8-(3", 3"-dimetilalil)-flavanona (I).



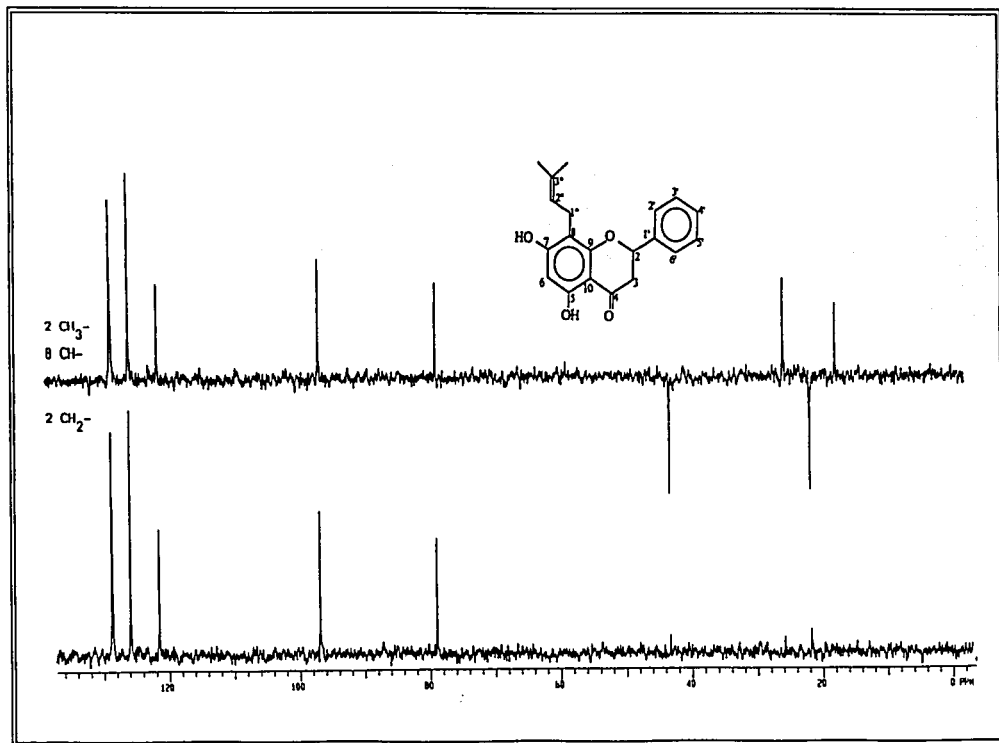
Espectro 3. RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃, TMS) de la 5, 7-dihidroxi-8-(3'', 3''-dimetilalil)-flavanona (1).



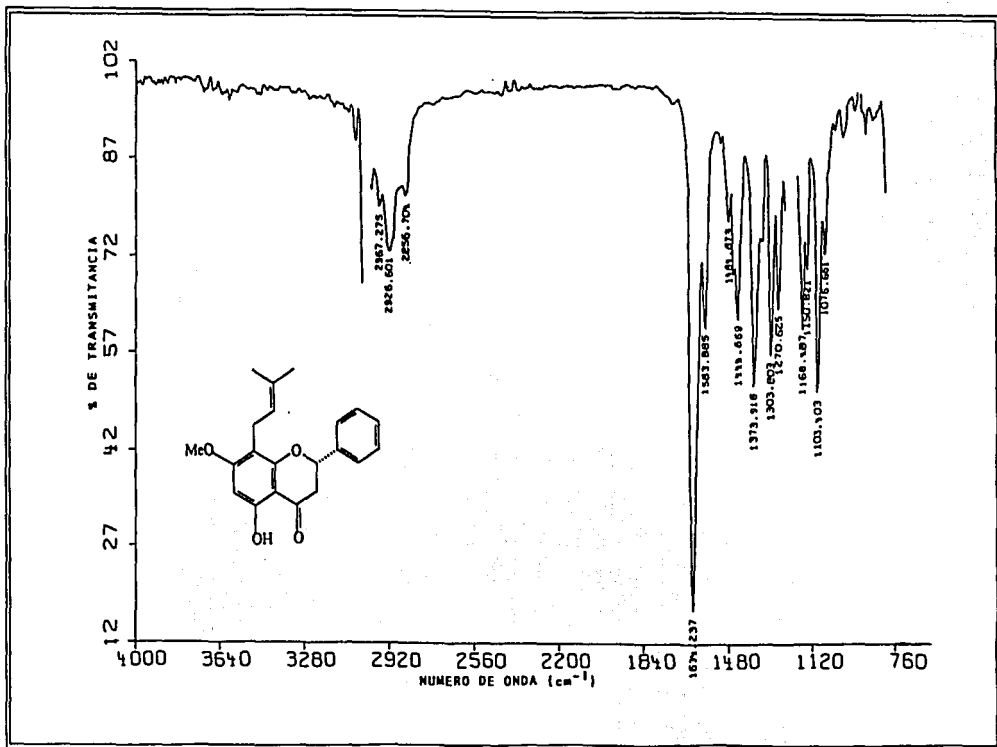
117

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

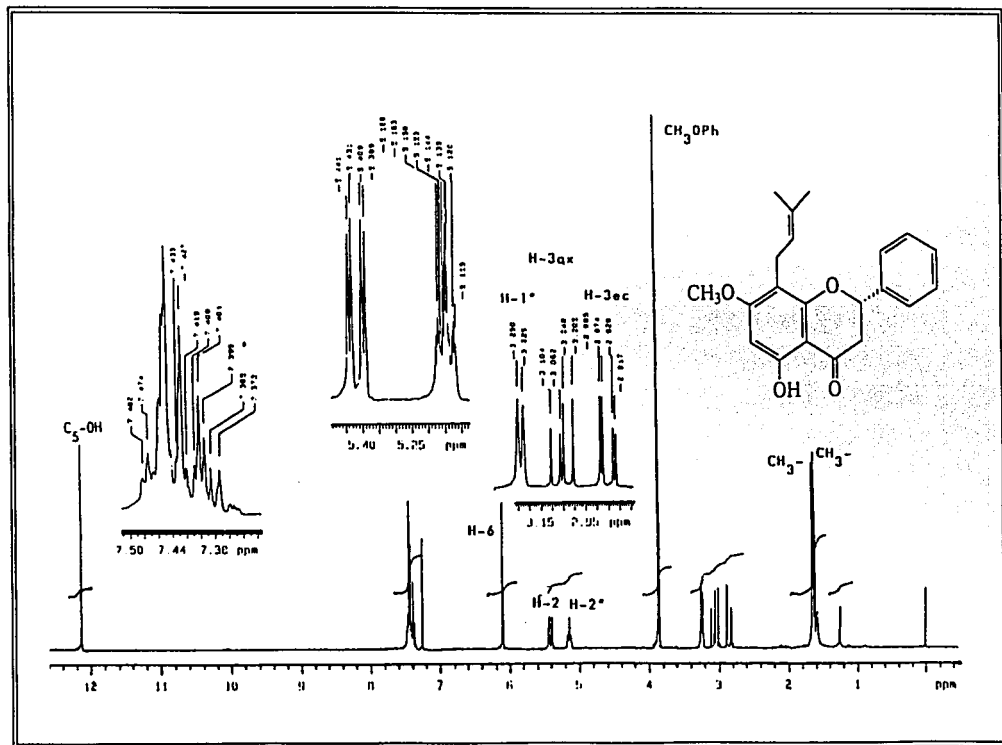
Espectro 4. RMN-¹³C, TÉCNICA APT (75 MHz, CDCl₃, TMS) de la 5, 7-dihidroxi-8-(3'', 3''-dimetilalil)-flavanona (1).



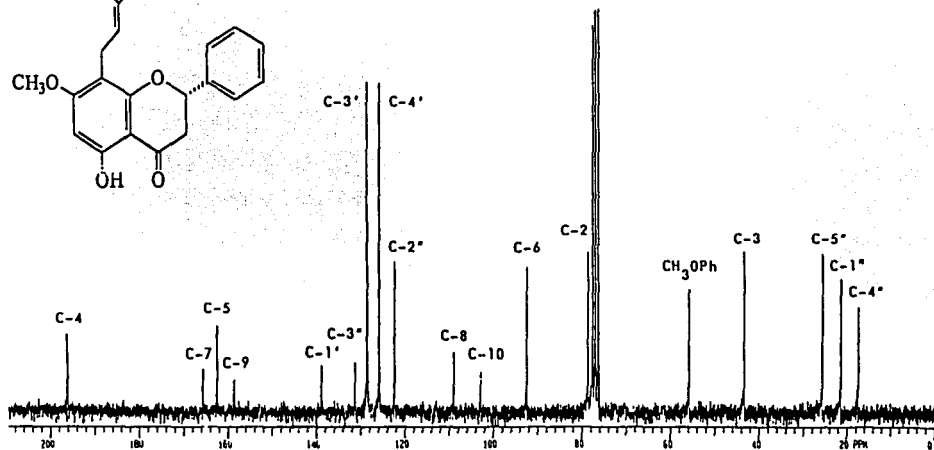
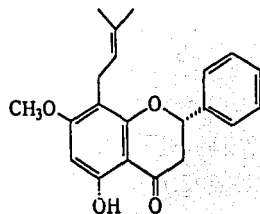
Espectro 5. IR (CHCl₃) de la 5-hidroxi-7-metoxi-8-(3", 3"-dimetilalil)-flavanona (II).



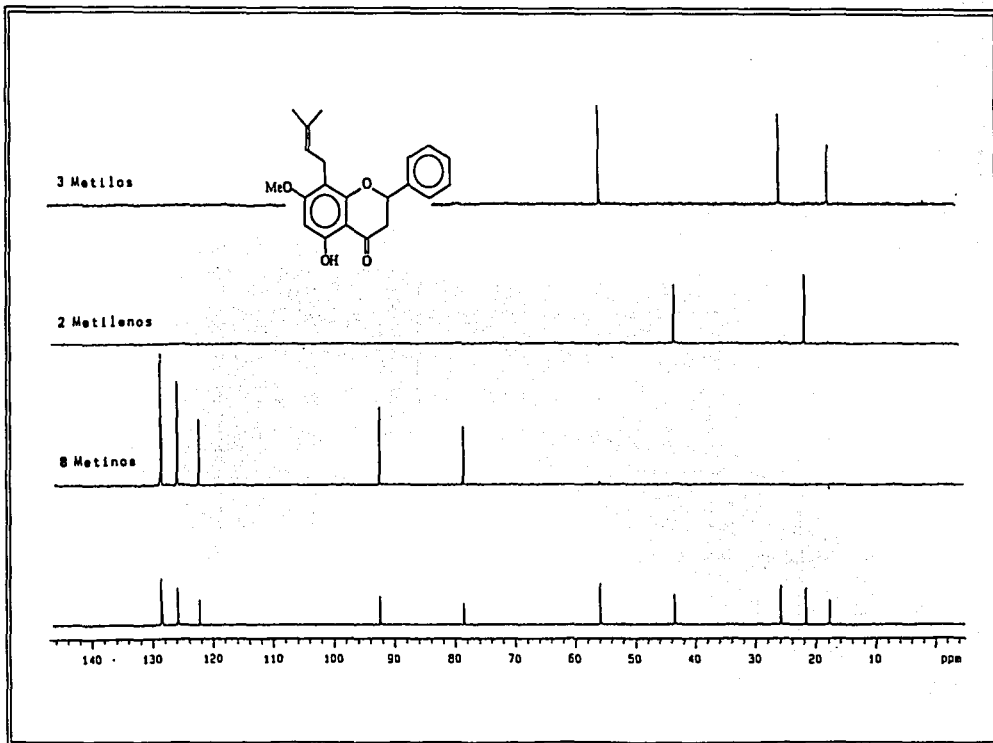
Espectro 6. RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃, TMS) de la 5-hidroxi-7-metoxi-8-(3'', 3''-dimetilalil)-flavanona (II).



Espectro 7. RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃, TMS) de la 5-hidroxi-7-metoxi-8-(3'', 3'''-dimetilalil)-flavanona (II).



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

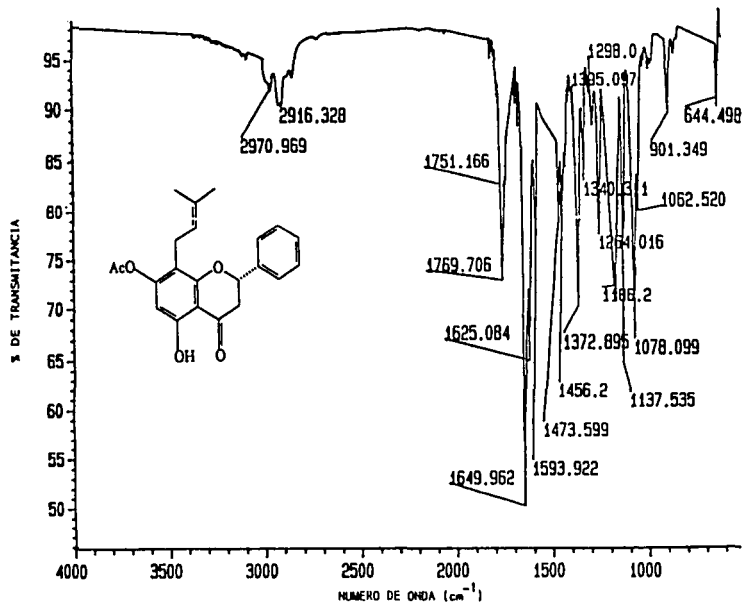


122

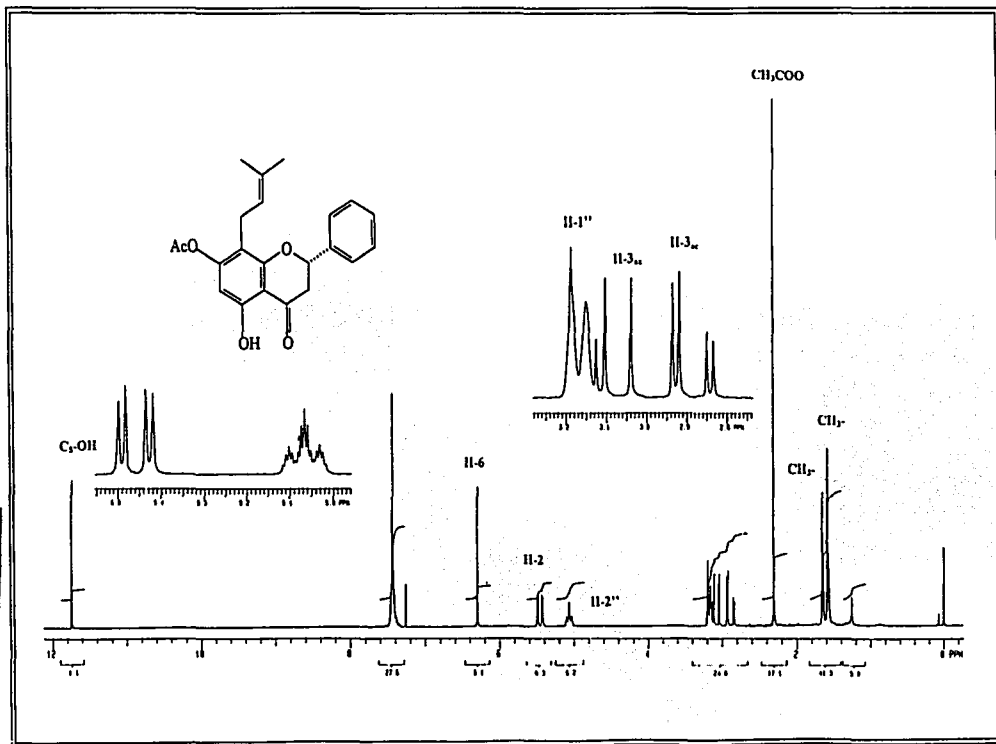
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Espectro 8

Espectro 9. IR (CHCl₃) de la 7-acetil-5-hidroxi-8-(3'', 3''-dimetilalil)-flavanona (III).



Espectro 10. RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃, TMS) de la 7-acetil-5-hidroxi-8-(3'', 3''-dimetilalil)-flavanona (III).

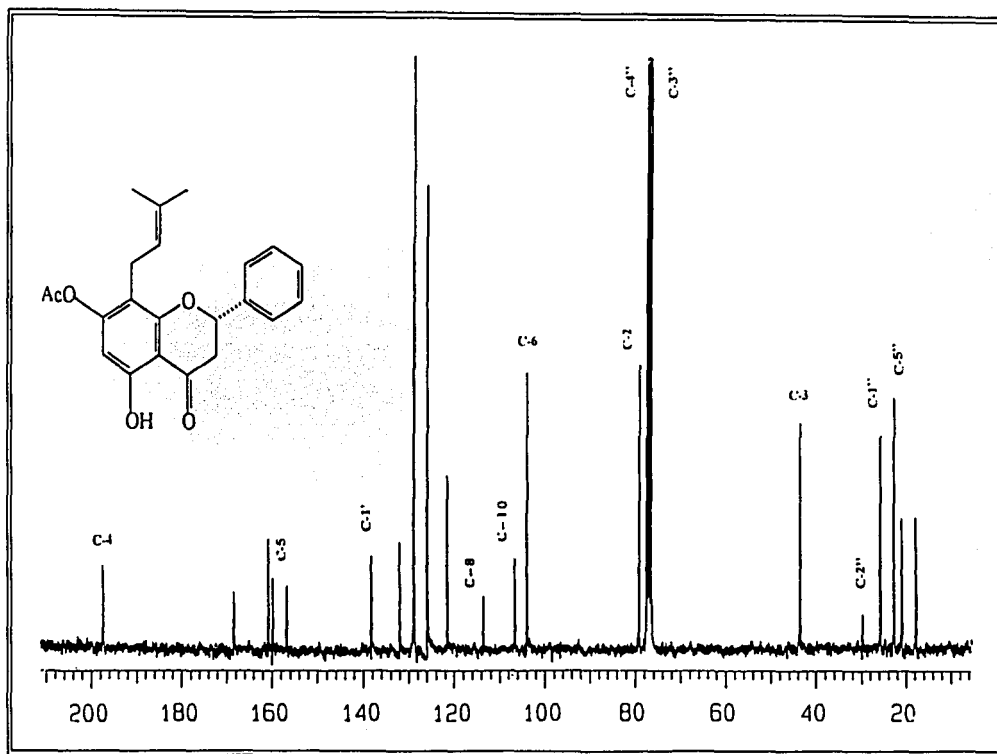


124

TESIS CON
FALTA DE ORIGEN

Espectros

Espectro 11. RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃, TMS) de la 7-acetil-5-hidroxi-8-(3'', 3'''-dimetilalil)-flavanona (III).

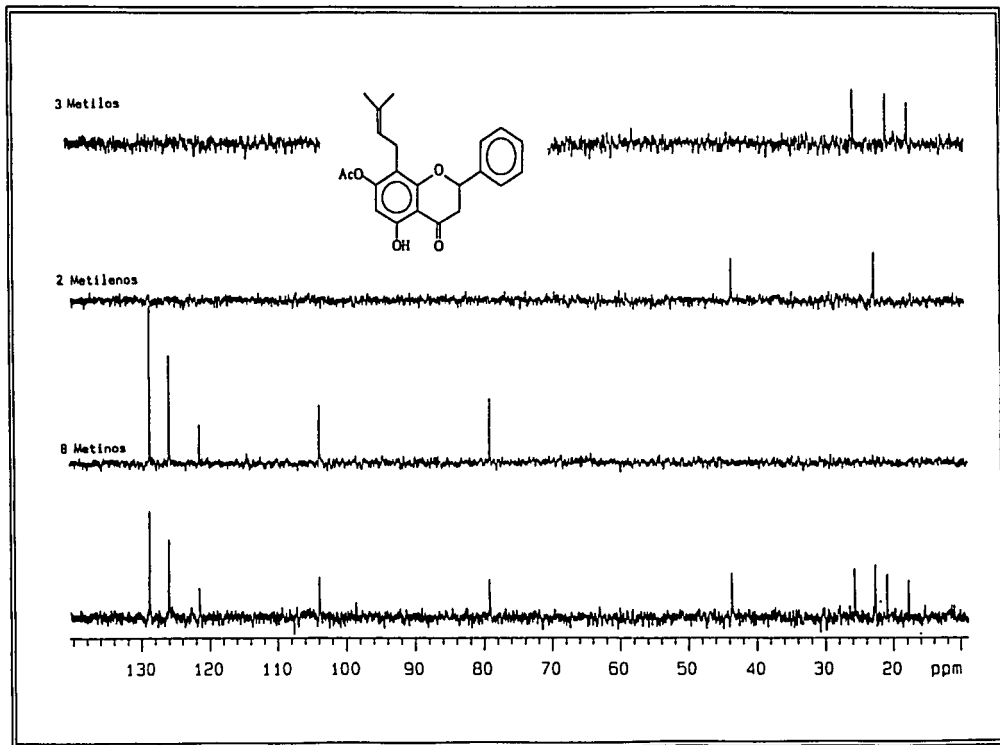


125

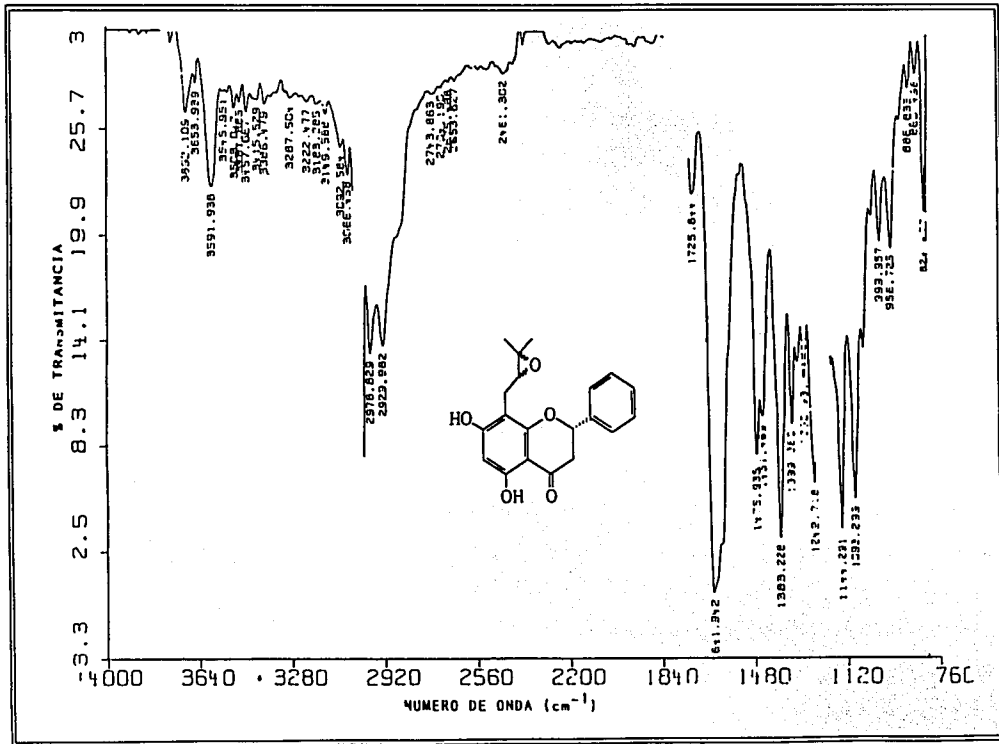
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Espectros

Espectro 12. RMN-¹³C, TÉCNICA DEPT (75 MHz, CDCl₃, TMS) de la 7-acetil-5-hidroxi-8-(3'', 3''-dimetilalil)-flavanona (III).

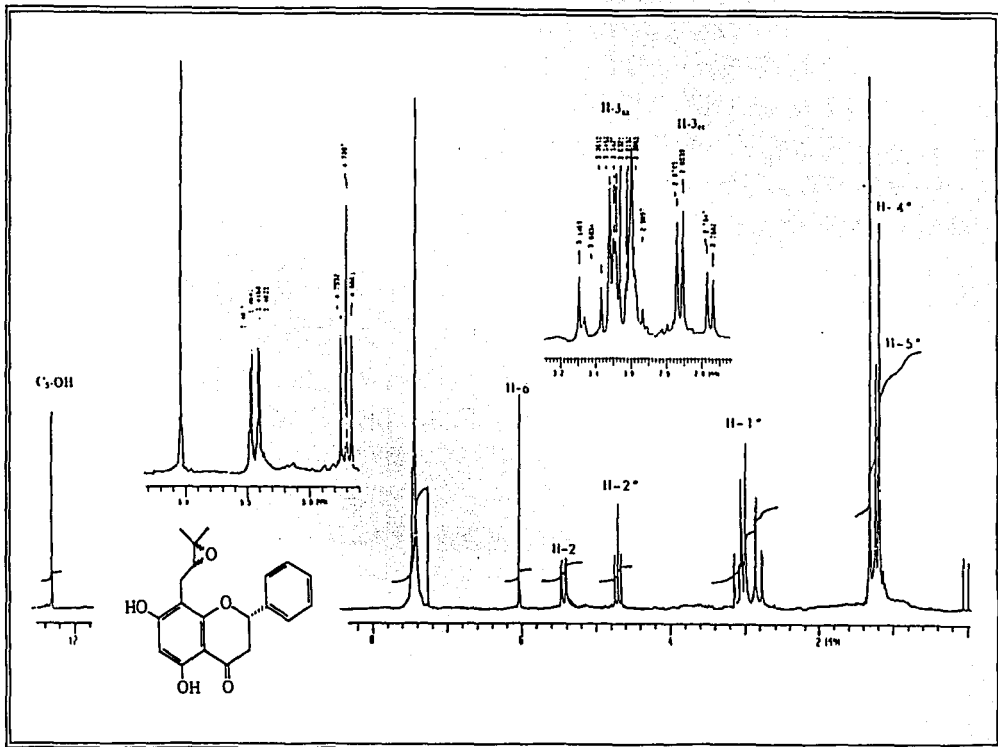


Espectro 13. IR (CHCl₃) de la 5, 7-dihidroxi-8-(3"-metil-2", 3"-epoxibutano)-flavanona (IV).

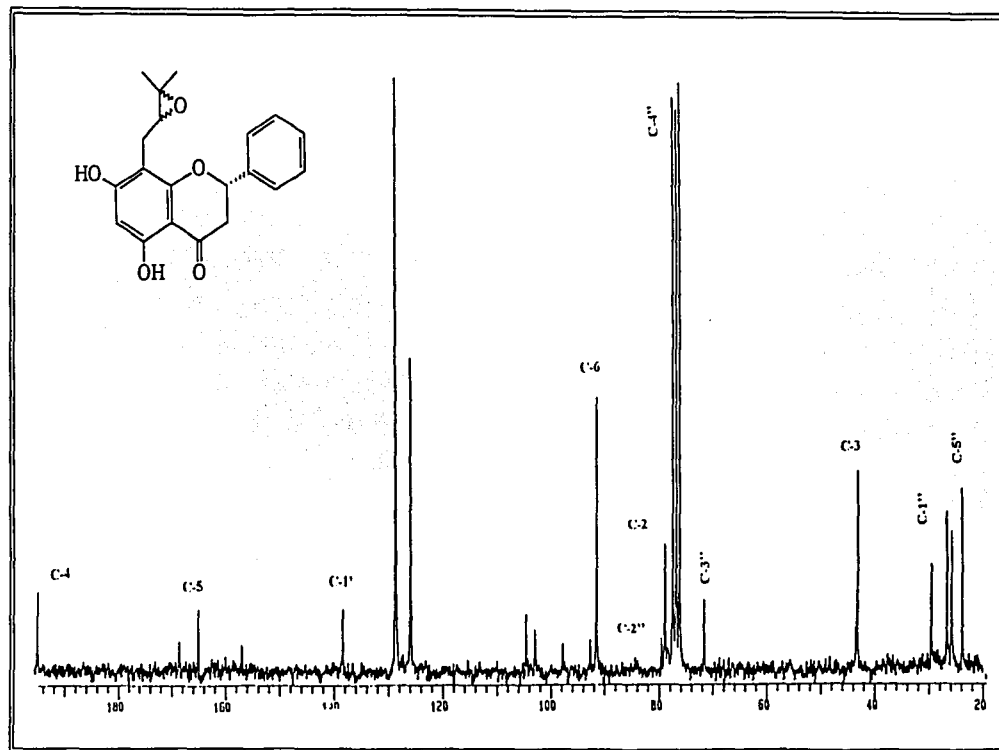
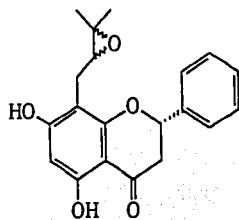


TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

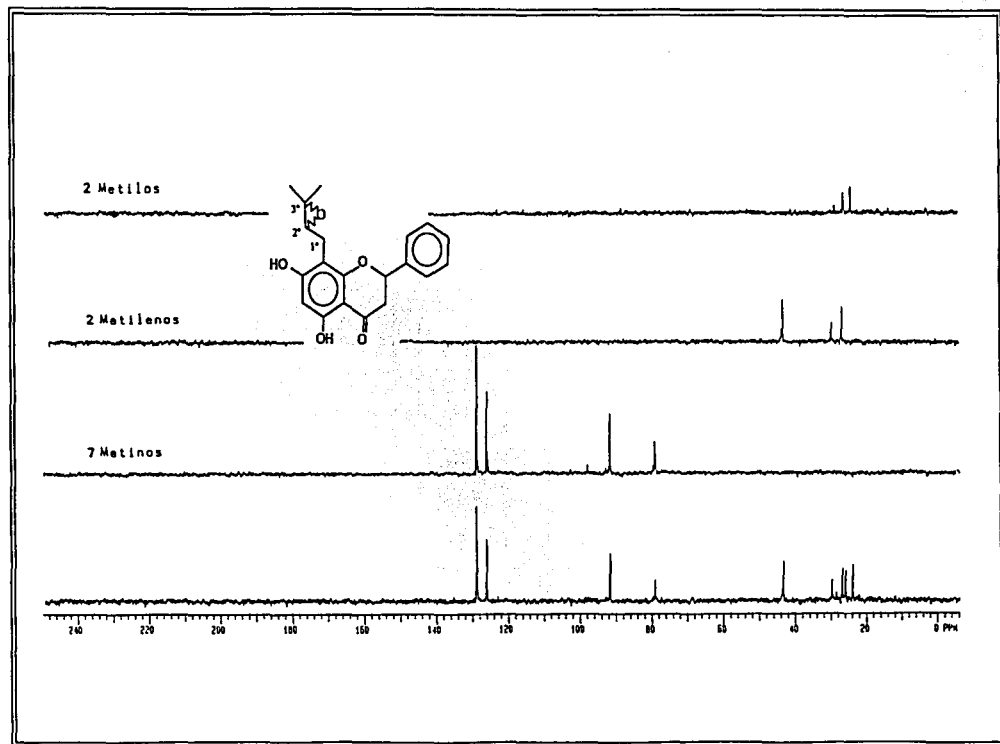
Espectro 14. RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃, TMS) de la 5, 7-dihidroxi-8-(3"-metil-2", 3"-epoxibutano)-flavanona (IV).



Espectro 15. RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃, TMS) de la 5, 7-dihidroxi-8-(3"-metil-2", 3"-epoxibutano)-flavanona (IV).



Espectro 16. RMN-¹³C, TÉCNICA DEPT (75 MHz, CDCl₃, TMS) de la 5, 7-dihidroxi-8-(3"-metil-2", 3"-epoxibutano)-flavanona (IV).

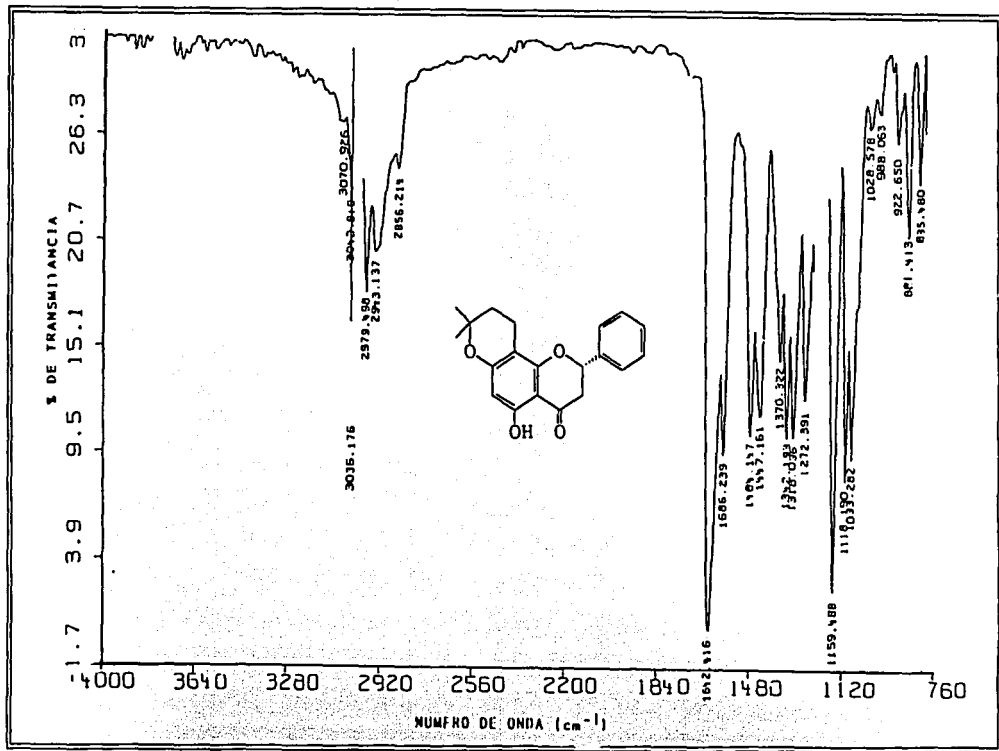


130

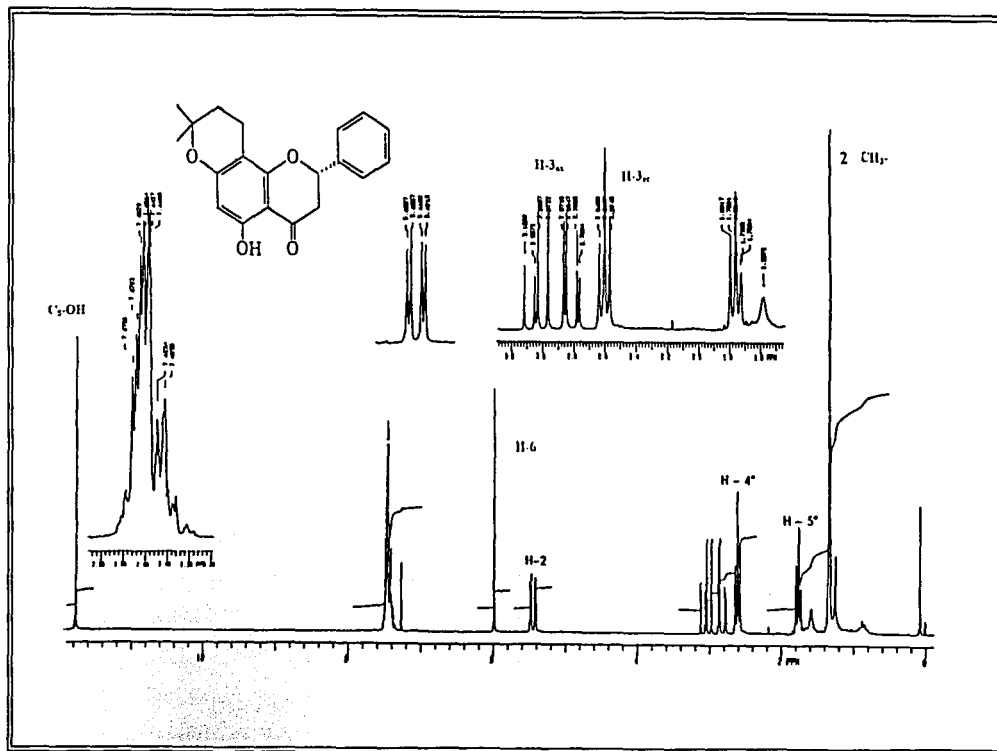
TESIS CON
FALTA DE ORIGEN

Espectros

Espectro 17. IR (CHCl₃) de la 7, 8-(6'', 6''-dimetilcromano)-de la glabranina (V).



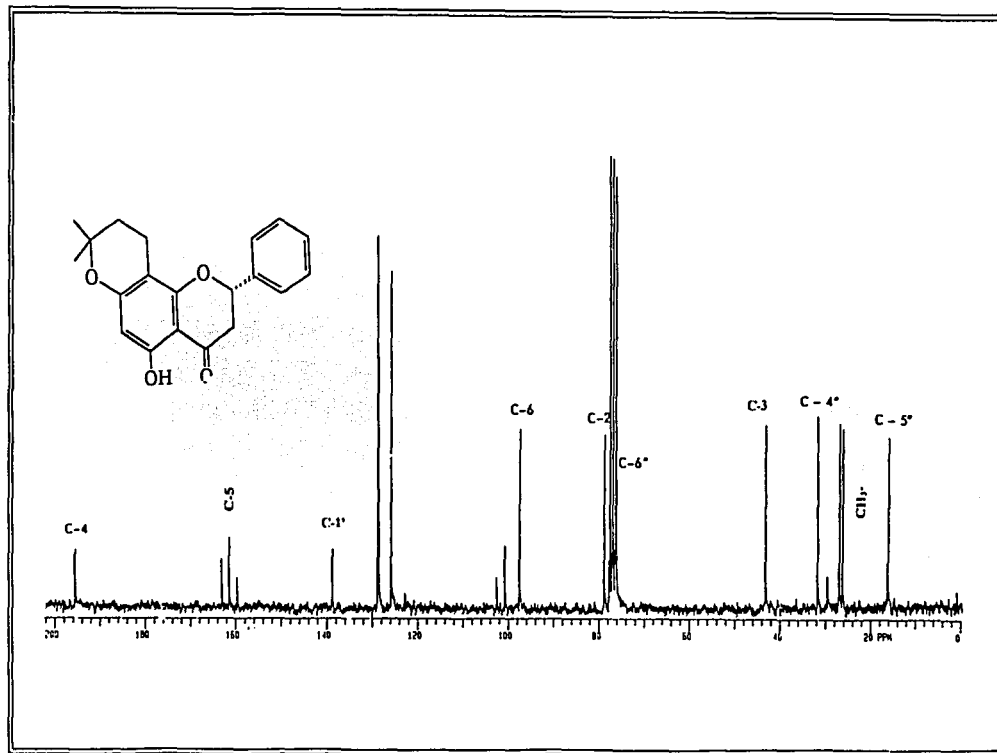
Espectro 18. RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃, TMS) de la 7, 8-(6'',6''-dimetilcromano)-de la glabranina (V).



132

TESIS CON
FALTA DE ORIGEN

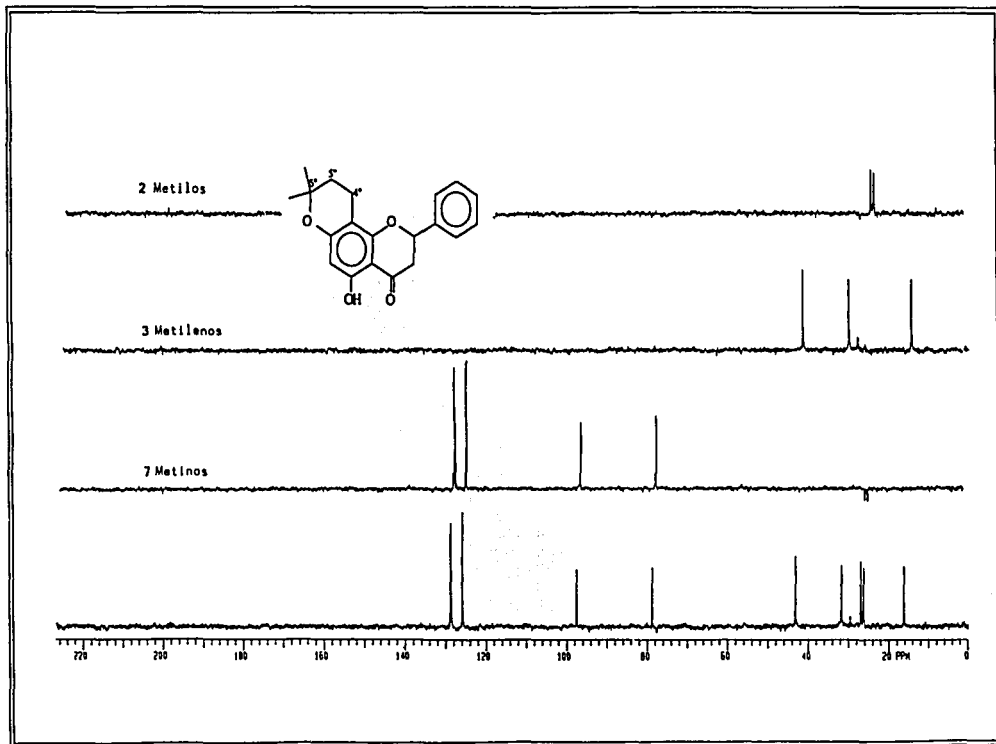
Spectro 19. RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃, TMS) de la 7, 8-(6'',6''-dimetilcromano)-de la glabranina (V).



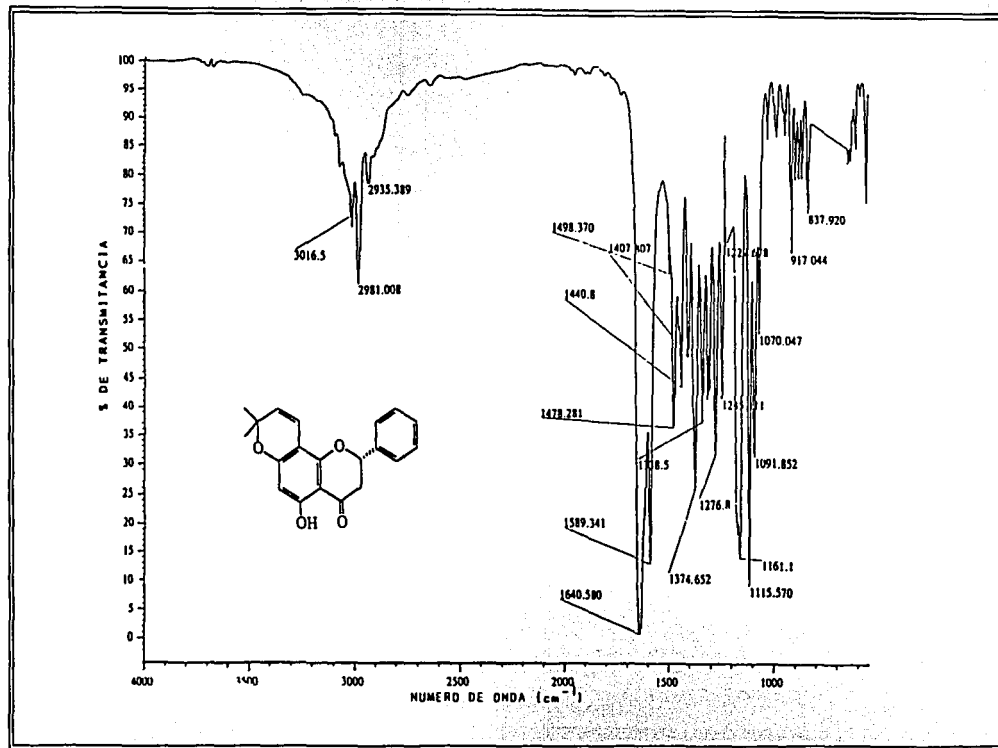
133

TESIS CON
FALTA DE ORIGEN

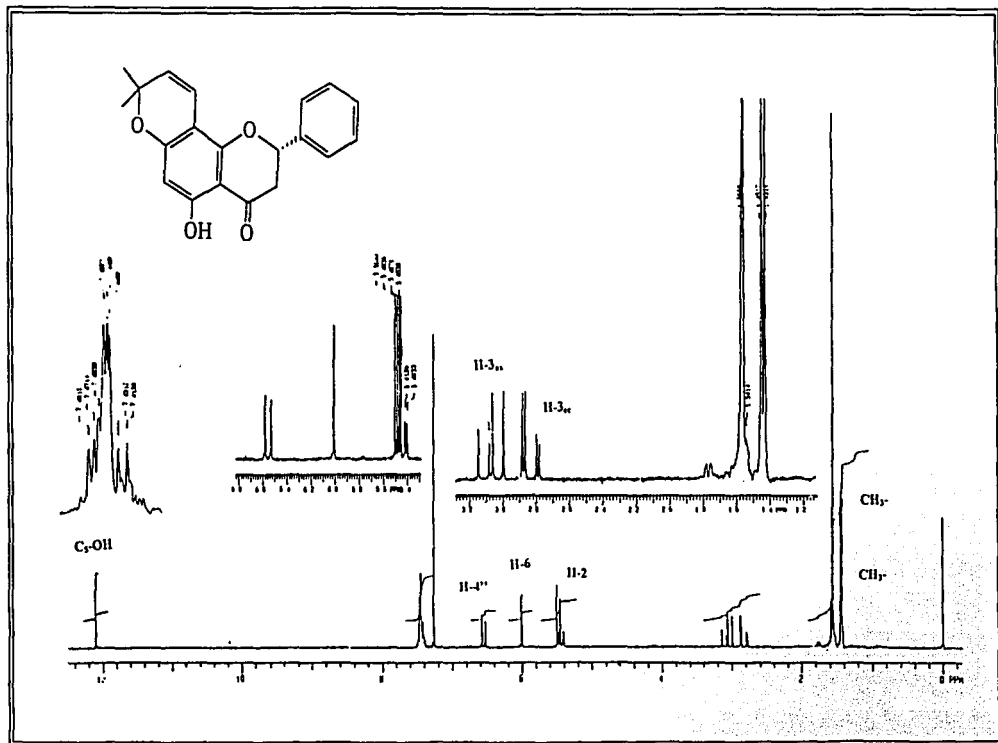
Espectro 20. RMN-¹³C, TÉCNICA DEPT (75 MHz, CDCl₃, TMS) de la 7, 8-(6'',6''-dimetilcromano)-de la glabranina (V).



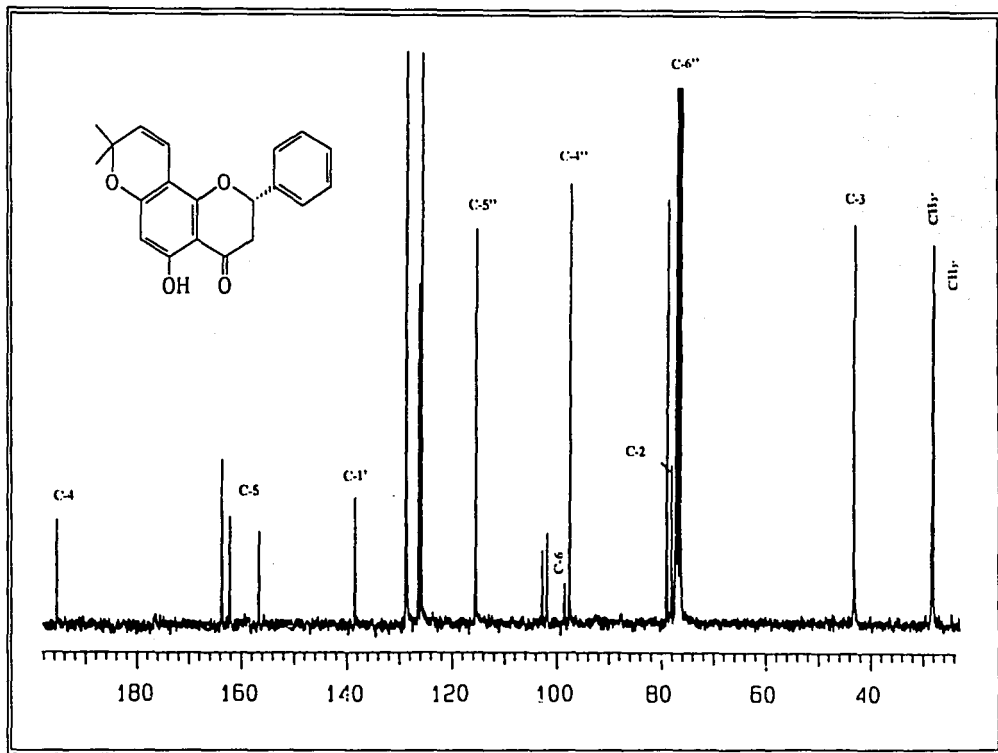
Espectro 21. IR (CHCl₃) de la 7, 8-(6'', 6''-dimetilcromeno)-de la glabranina (VI).



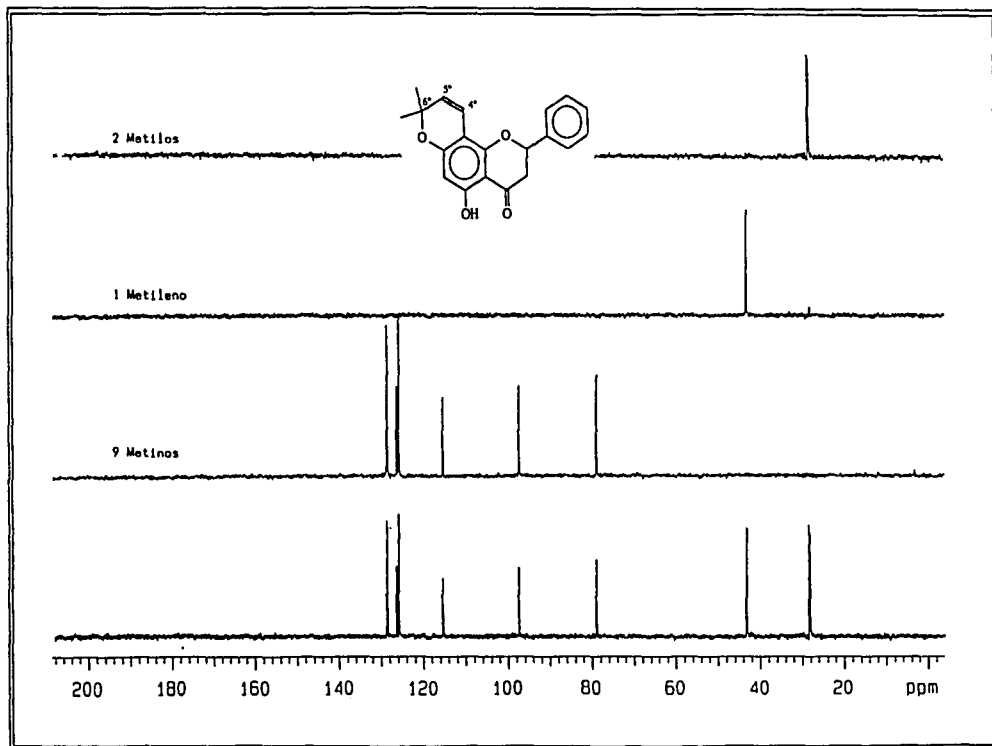
Espectro 22. RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃, TMS) de la 7, 8-(6'',6''-dimetilcromeno)-de la glabranina (VI).



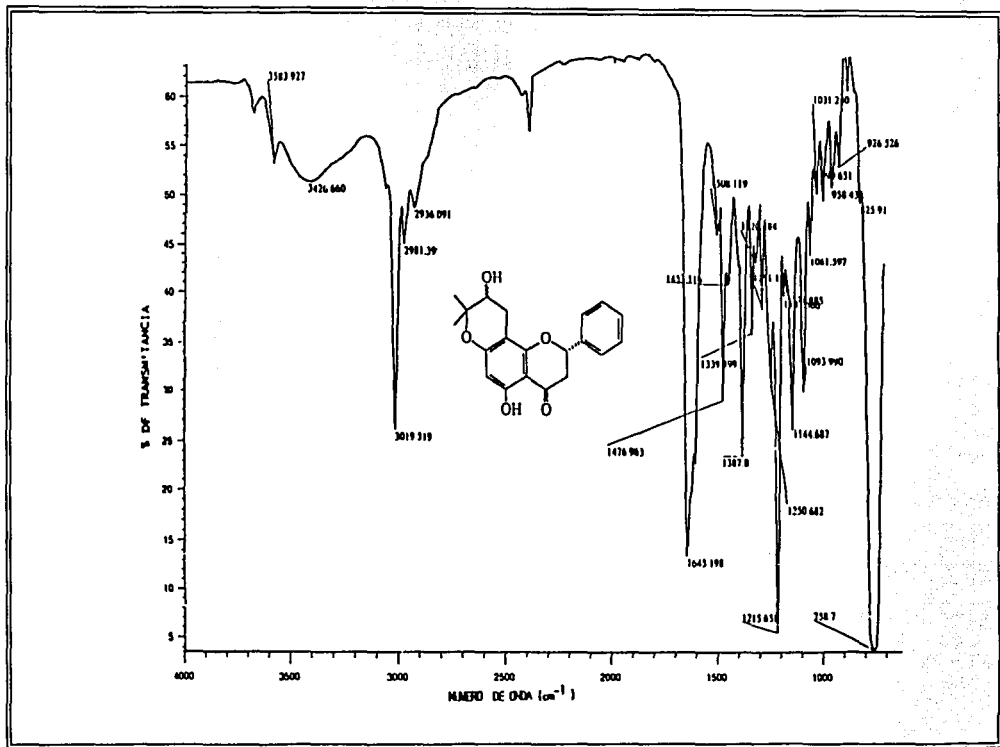
Espectro 23. RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃, TMS) de la 7, 8-(6'',6''-dimetilcromeno)-de la glabranina (VI).



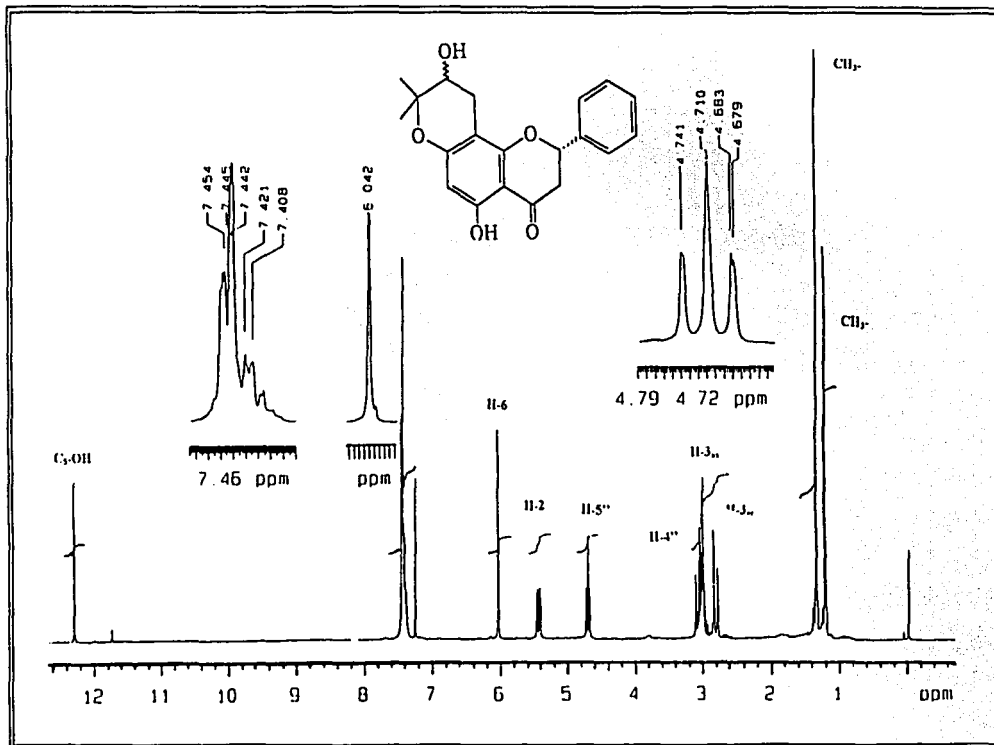
Espectro 24. RMN-¹³C, TÉCNICA DEPT (75 MHz, CDCl₃, TMS) de la 7, 8-(6'',6''-dimetilcromeno)-de la glabranina (VI).



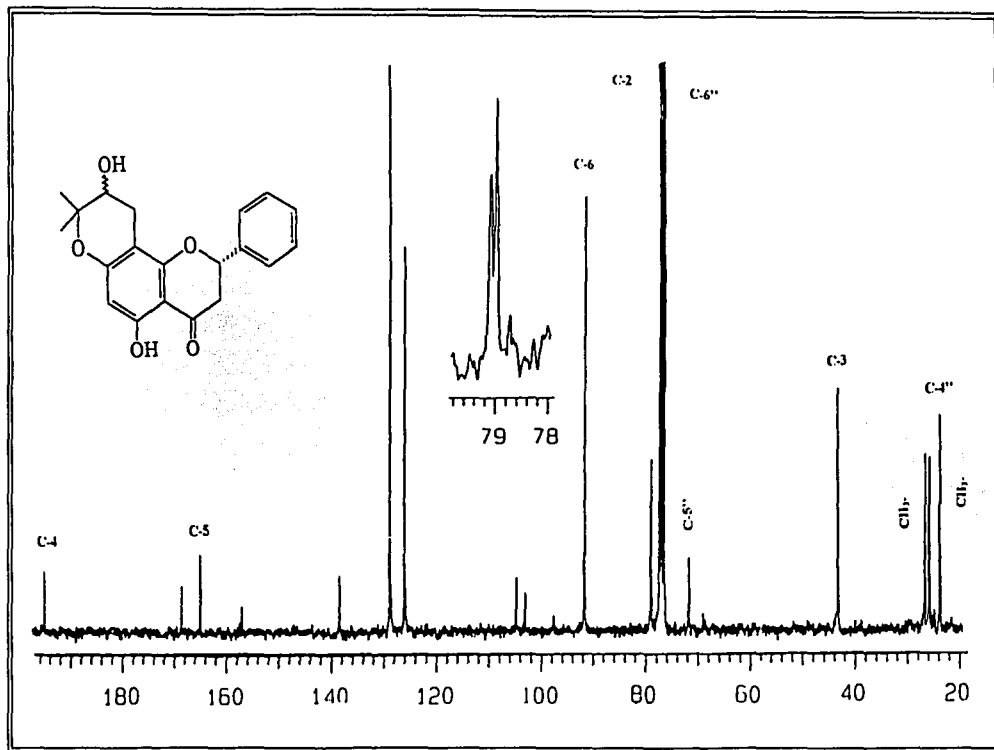
Espectro 25. IR (CHCl₃) de la 5^o-hidroxi-7, 8-(6'', 6''-dimetilcromano)-de la glabranina (VII).



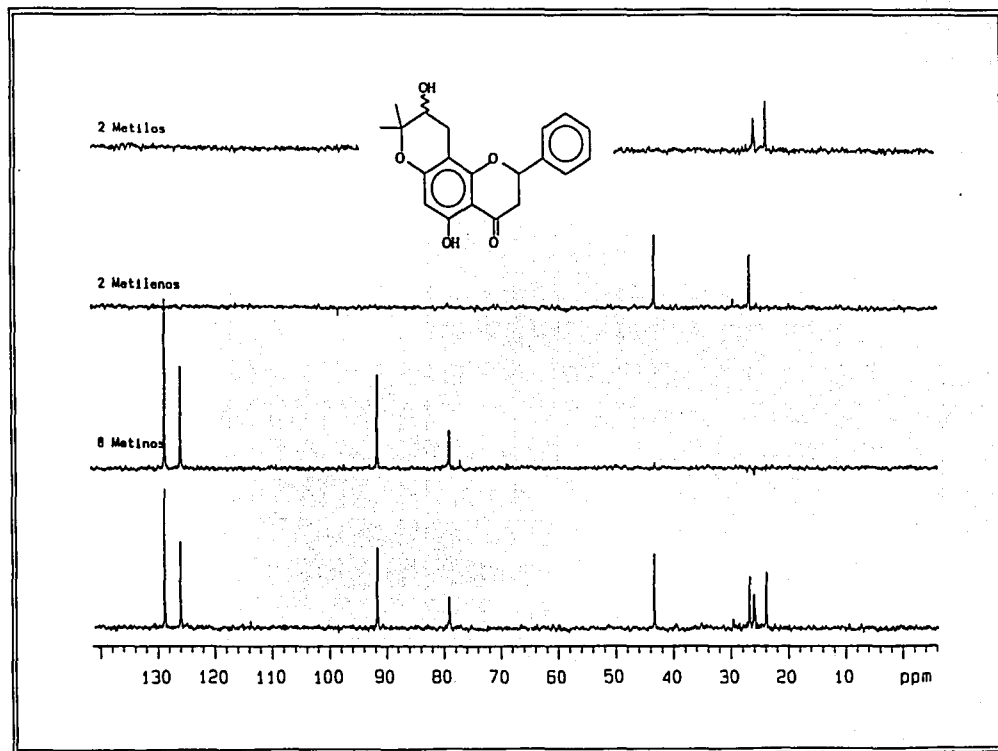
Espectro 26. RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃, TMS) de la 5''-hidroxi-7, 8-(6'', 6''-dimetilcromano)-de la glabranina (VII).



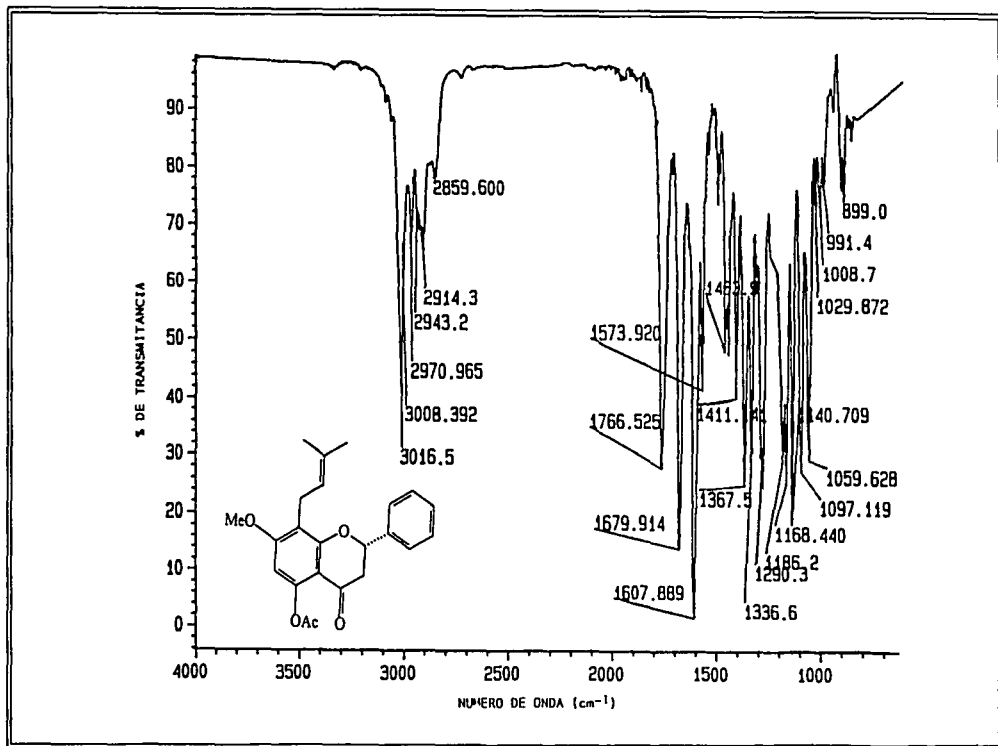
Espectro 27. RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃, TMS) de la 5''-hidroxi-7, 8-(6'', 6''-dimetilcromano)-de la glabranina (VII).



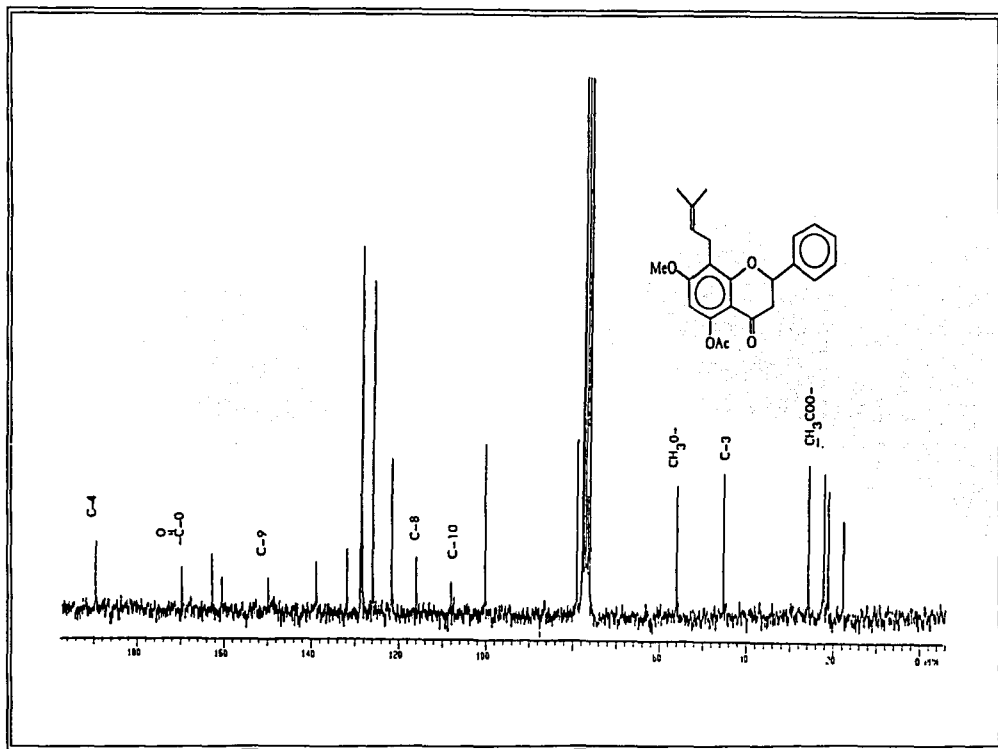
Espectro 28. RMN-¹³C, TÉCNICA DEPT (75 MHz, CDCl₃, TMS) de la 5^o-hidroxi-7, 8-(6^o, 6^o-dimetilcromano)-de la glabranina (VII).



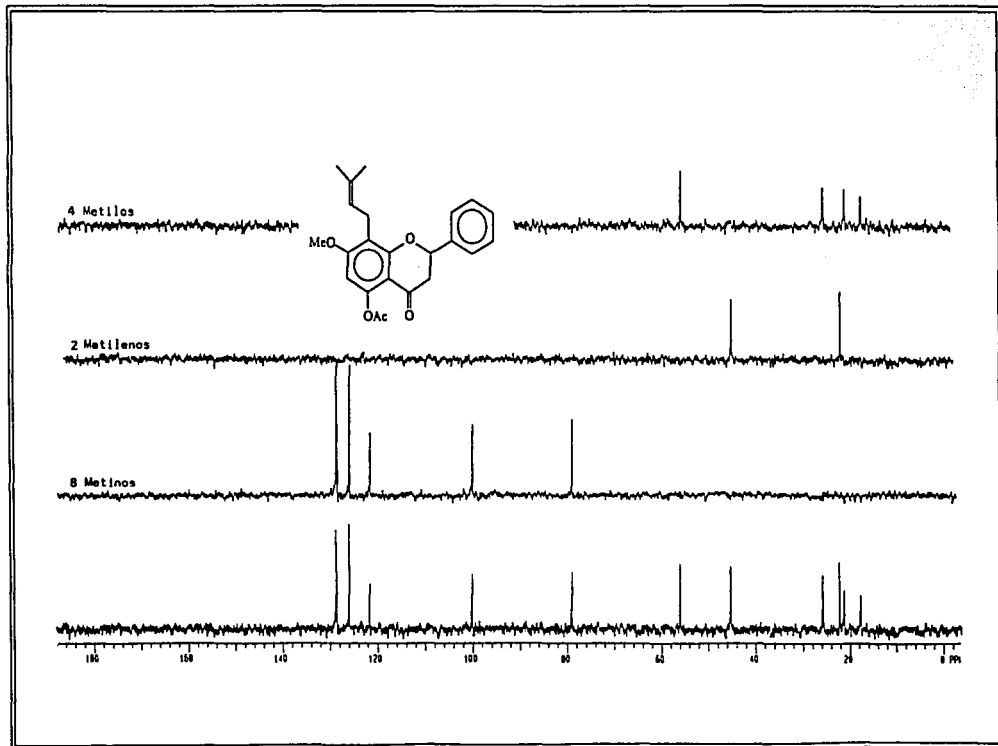
Espectro 29. IR (CHCl₃) de la 5-acetil-7-metoxi-8-(3'', 3''-dimetilalil)-flavanona (IIa).



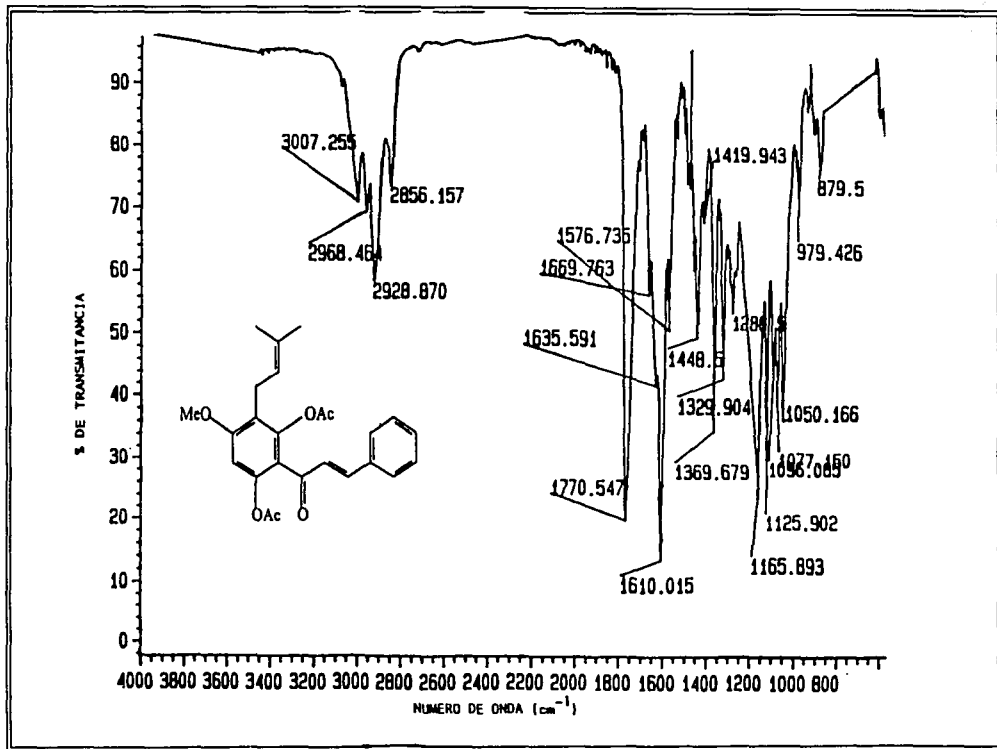
Espectro 31. RMN-¹³C (50 MHz, CDCl₃, TMS) de la 5-acetil-7-metoxi-8-(3'', 3''-dimetilalil)-flavanona (IIa).



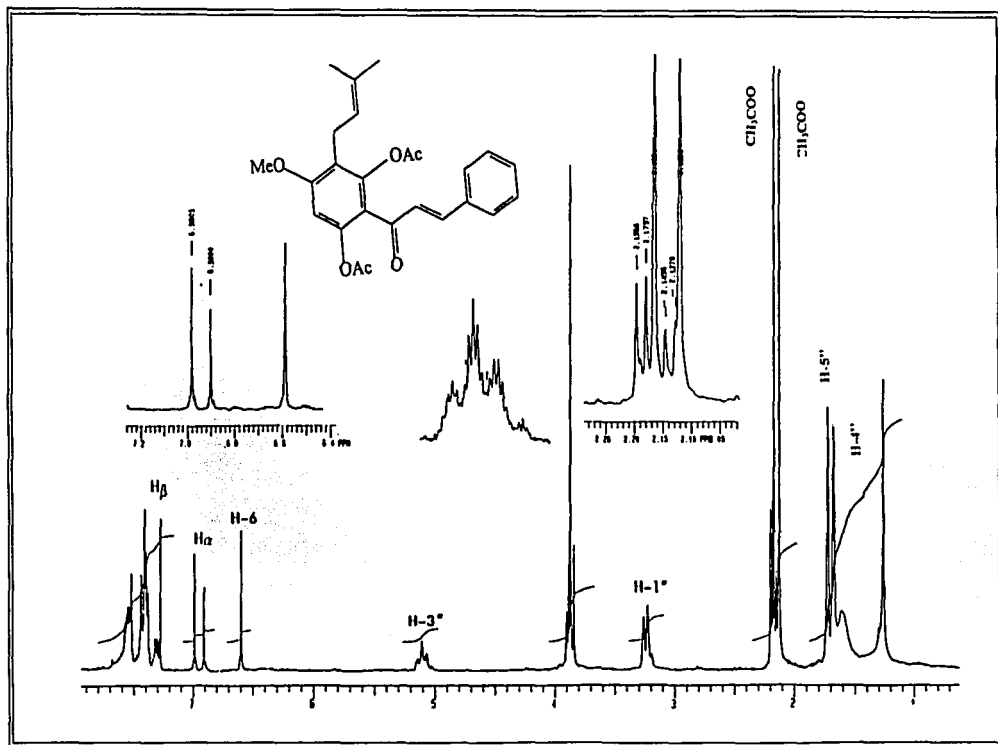
Espectro 32. RMN-¹³C, TÉCNICA DEPT (50 MHz, CDCl₃, TMS) de la 5-acetil-7-metoxi-8-(3'', 3''-dimetilalil)-flavanona (IIa).



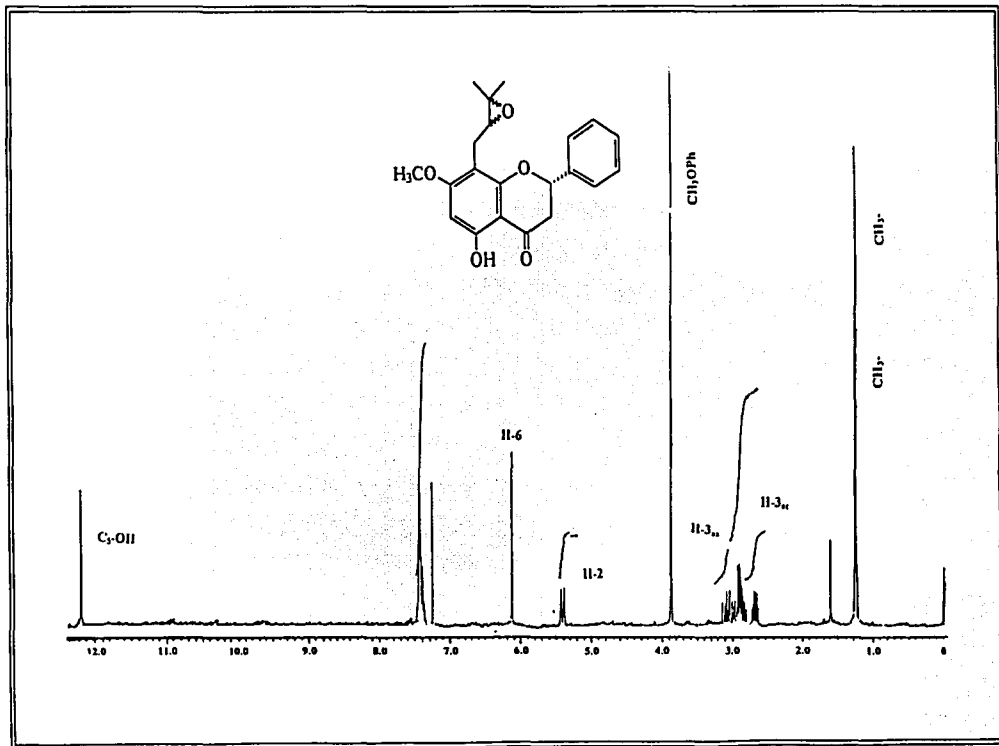
Espectro 33. IR (CHCl_3) de la 2',6'-diacetil-4'-metoxi-3'-(3'',3''-dimetilalil)-flavanona (11b).



Espectro 34. RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃, TMS) de la 2',6'-diacetil-4'-metoxi-3'-(3'',3''-dimetilalil)-flavanona (IIb).

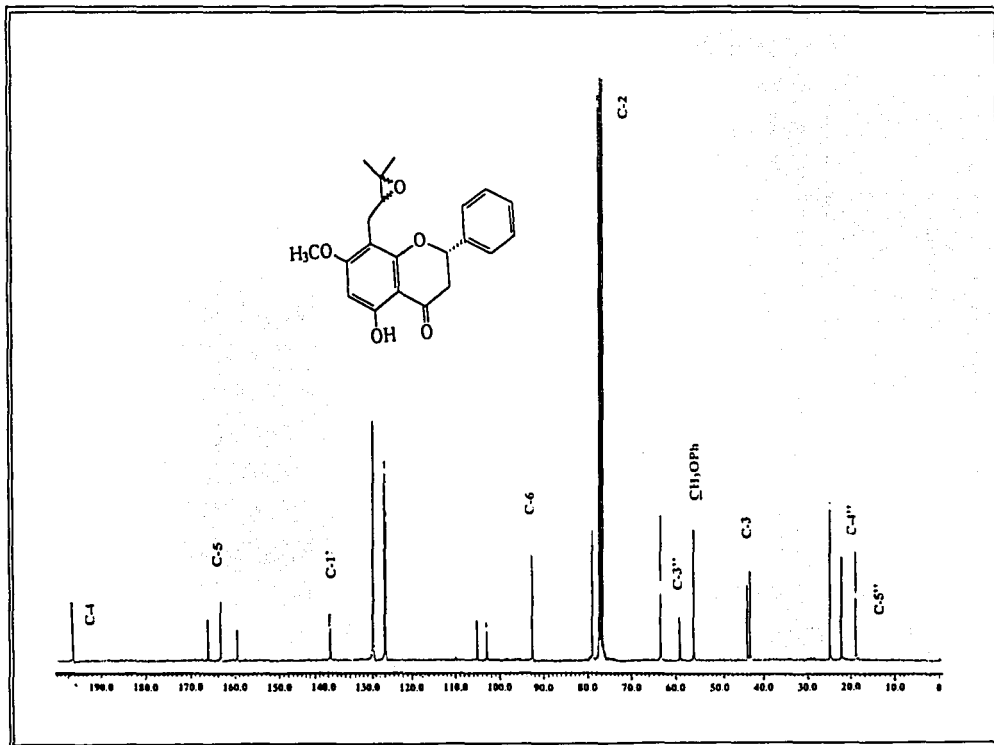


Espectro 35. RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃, TMS) de la 5-hidroxi-7-metoxi-8-(3"-metil-2", 3"-epoxibutano)-flavanona (IIc).

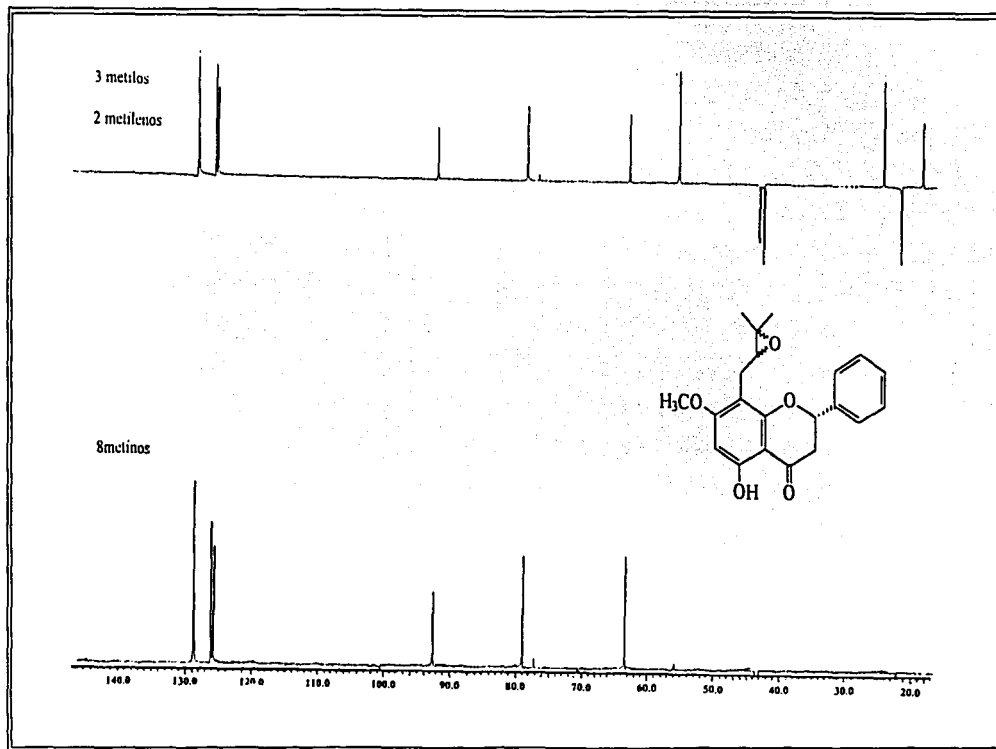


Espectro 36. RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃, TMS) de la 5-hidroxi-7-metoxi-8-(3"-metil-2", 3"-epoxibutano)-flavanona (IIc).

150



Espectro 37. RMN-¹³C, TÉCNICA DEPT (75 MHz, CDCl₃, TMS) de la 5-hidroxi-7-metoxi-8-(3"-metil-2", 3"-epoxibutano)-flavanona (IIc).

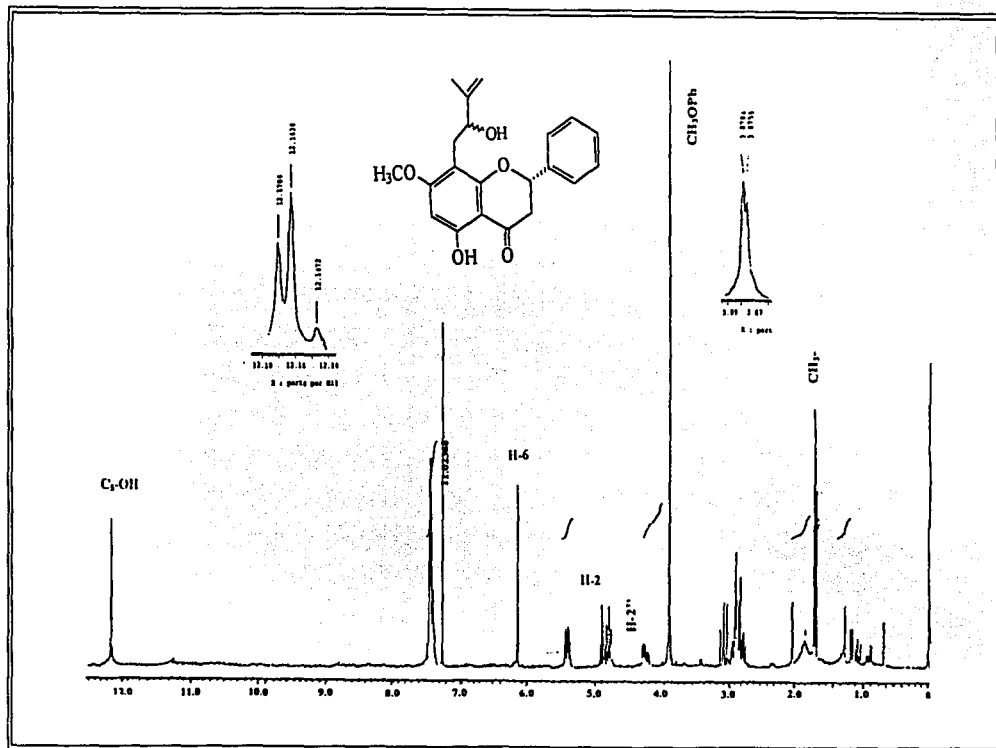


151

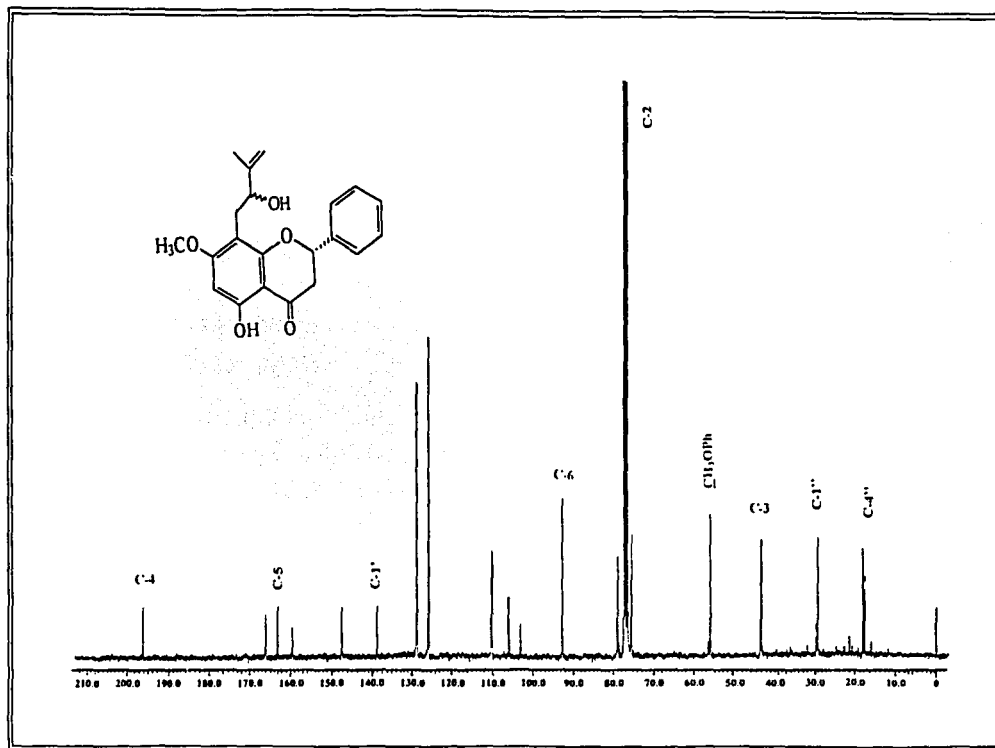
Espectro

TESIS CON
FALTA DE ORIGEN

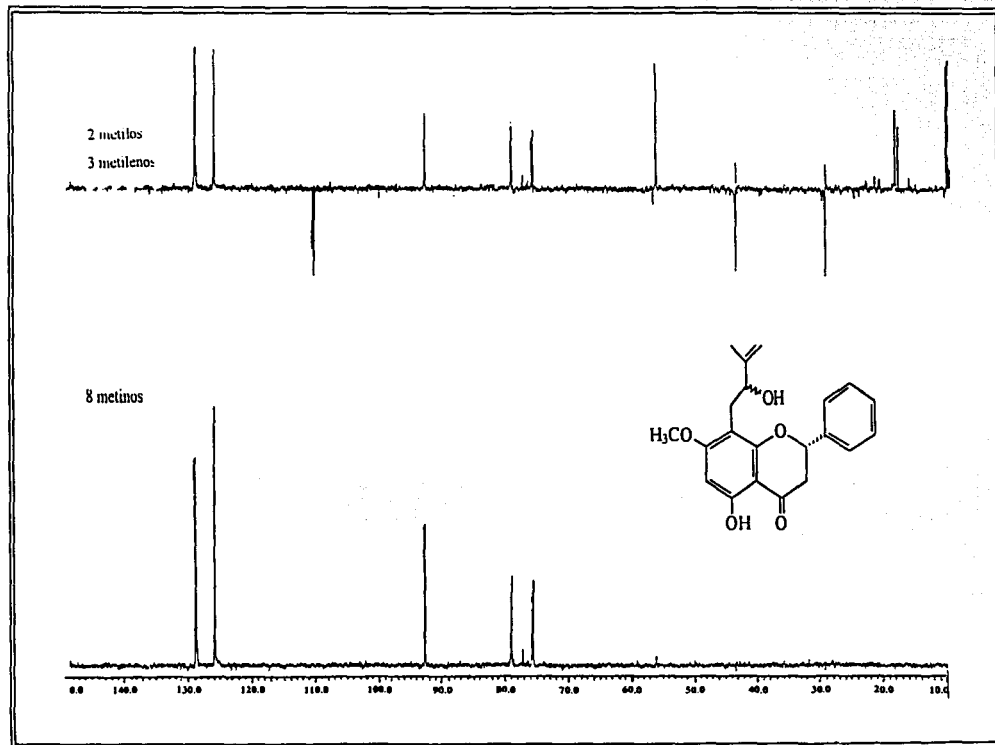
Espectro 38. RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃, TMS) de la 5-hidroxi-7-metoxi-8-(2''-hidroxi-3''-metil-3''-buten)-glabranina (II_d).



Espectro 39. RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃, TMS) de la 5-hidroxi-7-metoxi-8-(2''-hidroxi-3''-metil-3''-buten)-glabranina (IIId).



Espectro 40. RMN-¹³C, TÉCNICA DEPT (75 MHz, CDCl₃, TMS) de la 5-hidroxi-7-metoxi-8-(2"-hidroxi-3"-metil-3"-buten)-glabranina (IIId).



154

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Espectro

XII. Referencias bibliográficas

1. Harborne, J. B. (1994) *The Flavonoids, advances in research since 1986*. Chapman and Hall. New York, 589-618.
2. Dereck, B. and Nakanishi, K. (1999) *Comprehensive Natural Product Chemistry*. Vol. 1. Pergamon. New York, 714-747.
3. Geissman, T. A. and Croot, D. G. (1969) *Organic Chemistry of Secondary Plant Metabolism*. Cooper and Company. U.S.A. 183-230.
4. Bruneton, J. (1991) *Elementos de Fitoquímica y Farmacognosia*. Acribia. España. 163-163.
5. Manitto, P. (1981) *Biosynthesis of Natural Products*. John Wiley and Sons. New York. 347-363.
6. Markham, R. K. (1982) *Techniques of Flavonoids Identification*. Academic Press. New York, 25-28.
7. Harborne, J. B. (1991) *Phytochemical Methods*. 2a ed. Chapman and Hall. New York. 55-83.
8. Dominguez, X. A. (1979) *Métodos de Investigación Fitoquímica*. Limusa. México. 81-87.
9. Dey, P. M. and Harborne, J. B. (1997) *Plant Biochemistry*. Academic Press. USA. 387-416.
10. Vickerg, M. L. and Vickerg B. (1981) *Secondary Plant Metabolism*. University Park Press. Baltimar, USA. 183-205.

11. Dennis, D. T. and Turpin, D. (1990) *Plant Physiology Biochemistry and Molecular Biology*. Lengman Scientific and Technical. New York. 416-417.
12. Knaggs, R. A. (2000) The biosynthesis of shikimate metabolites. *Natural Product Report* 17, 269-292.
13. Morh, H. and Schopfer, P. (1995) *Plant Physiology*. Springer. Berlin. 275-282.
14. Forkmann, G. and Kuhn, B. (1979) Genetic control of chalcone isomerase activity in anthers of *Petunia hybrida*. *Planta* 142, 189-192.
15. Mol, M. N., Robbins, P. M., Dixon, A. R. and Veltkamp, E. (1985) Spontaneous and enzymic rearrangement of naringenin chalcone to flavanone. *Phytochemistry* 24, 2267-2269.
16. Cano, F. A. (1998) *Estudio químico de tres especies vegetales mexicanas del género Esenbeckia (Rutaceae)*. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
17. Simmonds, S. J. (2001) Importance of flavonoids in insect-plant interactions feeding and oviposition. *Phytochemistry* 56, 245-252.
18. Harborne, J. B. (1972) *Recent Advances in Phytochemistry*. Vol. 4. Appleton-Century-Crofts. New York. 108-141.
19. Medina, H. J., Viola, H. and Wolfman, C. (1998) Neuroactive flavonoids: new ligands for Benzodiazepine receptor. *Phytochemistry* 5, 235-243.
20. Miyase, T., et al. (1999) Antioxidants from *Lespedeza homoloba* (L). *Phytochemistry* 52 303-310.

21. Harborne, J. B. and Williams, A. C. (2000) Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* **55**, 481-504.
22. Gafner, S., Wolfender, J. L., Mavi, S. and Hostettmann, K. (1996) Antifungal and antibacterial chalcones from *Myrica cerrata*. *Planta Medica* **62**, 67-69.
23. Iniesta-Sanmartin, E., Barberan, F. and Lorents, F. F. (1990) Antibacterial flavonoids from *Helichrysum picardii* and *H. italicum*. *Planta Medica* **56**, 648-649.
24. ElSohly, H. N., Joshi, A. S., et al. (2001) Antifungal chalcones from *Maclura tinctoria*. *Planta Medica* **67**, 87-88.
25. Okada, K., Tamura, V., et al. (1989) Identification of antimicrobial and antioxidant constituents from Licorice of Russian and Xinjiang origin. *Chemical Pharmaceutical Bulletin* **37**, 2528-2530.
26. Garo, E., Mallard, M., et al. (1996) Five flavans from *Mariscus psilostachys*. *Phytochemistry* **43**, 1265-1269.
27. Lin, Y. M., Anderson, H., Flavin, M. T. and Pai, Y. H. (1997) In vitro anti-HIV activity of biflavonoids from *Rhus succedanea*. *Journal of Natural Products* **60**, 884-88.
28. Kim, H. J., Wood, E. R., Shin, C. G. and Park, H. (1998) A new flavonol galleate ester from *Acer* and its inhibitory activity against HIV-1 integrase. *Journal of Natural Products* **61**, 145-148.
29. Vlietinck, T., De Bruyne, T., Aspens, S. and Pieters, L. A. (1998) Plant-Derived leading compound for chemotherapy of Human Immunodeficiency Virus (HIV) infection. *Planta Medica* **64**, 97-109.

30. Dugas, J. A., Castañeda-Acosta, J., *et. al.* (2000) Evaluation of the total peroxil radical-scavenging capacity of flavonoids: structure-activity relationship. *Journal of Natural Products* **63**, 327-331.
31. Rios, J. L., Mañez, S., Paya, M. and Alcaraz, M. J. (1992) Antioxidant activity of flavonoids from *Sideritis javalambrensis*. *Phytochemistry* **31**, 1947-1950.
32. Garcia, D., Garcia, E., *et. al.*, (1996) Efecto antioxidante de los extractos fluido y de flavonoides del *Plectranthus amboinicus* (orégano francés). *Rev. Cubana Planta Medica* **1**, 27-30.
33. Justesen, V. and Knuthsen, P. (2001) Composition of flavonoids in fresh herbs and calculation of flavonoid intake by use of herbs in traditional Danish dishes. *Food Chemistry* **73**, 245-250.
34. Gordon, M. H. and An, J. (1995) Antioxidant activity of flavonoids isolated from licorice. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* **43**, 1784-1788.
35. Espinoza, C. M. (2000) *Estudio químico y biológico de dos especies vegetales empleadas en la medicina tradicional: Aloysia triphylla y Cirsium jorullense*. Tesis de Maestria. UNAM.
36. Pathak, D., Pathak, K. and Singla, A. (1991) Flavonoids as medicinal agents. Recent advances. *Fitoterapia* **LXII**, 371-389.
37. Alcaraz, M. J. and Jiménez, M. J. (1988) Flavonoids as anti-inflammatory agents. *Fitoterapia* **LIX**, 25-38.

38. Palanichamy, S. and Nagarajan, S. (1988) Anti-inflammatory activity of *Cassia alata* leaf extract and Kaempferol 3-O-sophoroside. *Fitoterapia* **LXI**, 44-47.
39. Alcaraz, M. J. and Ferrándiz, M. L. (1987) Modification of arachidonic metabolism by flavonoids. *Journal of Ethnopharmacology* **21**, 209-229.
40. Williams, A. C., Harborne, J. B., Geiger, A. and Hoult S. R. (1999) The flavonoids of *Tanacetum parthenium* and *T. vulgare* and their anti-inflammatory properties. *Phytochemistry* **51**, 417-423.
41. Sertie, J. A., Basile, A. C., et al. (1990) Anti-inflammatory activity and sub-acute toxicity of artemetin. *Planta Medica* **56**, 36-46.
42. Koganov, M. M., Dueva, O. V. and Tsorin, B. L. (1999) Activities of plant derived phenol in a fibroblast cell culture model. *Journal of Natural Products* **62**, 481-483.
43. Chan, S., Chang, Y., et al. (1998) Three new flavonoids and anti-allergic, anti-inflammatory constituents from the heartwood of *Dalbergia odorifera*. *Planta Medica* **64**, 153-158.
44. Bairero, A. F., Herrador, P., et al. (1997) Cytotoxic activity of flavonoids from *Carthamus arborens*, *Ononis natrix* ssp *ramosissima* and *Centaurea malcinata*. *Fitoterapia* **68**, 281-283.
45. Makino, M. and Fujimoto, Y., (1999) Flavanones from *Baeckea frutescens*. *Phytochemistry* **50**, 273-277.
46. Woerdenbag, H. J., Merfort, I., et al. (1994) Cytotoxicity of flavonoids and sesquiterpene lactones from *Arnica* species against the GLC₄ and the COLOC lines. *Planta Medica* **60**, 434-4377

47. Bae, H. K., Byung, S. M., Park, K. L. and Ahn, B. Z. (1994) Cytotoxic flavonoids from *Scutellaria indica*. *Planta Medica* 60, 280-281.
48. Kaneda, N., Pezuto, J., et al. (1991) Plant anticancer agents, XLVIII. New cytotoxic flavonoids from *Muntingia calabura* roots. *Journal of Natural Products* 54, (1) 196-206.
49. Barron, D. and Ibrahim, K. R., (1996) Isoprenylated flavonoids- A survey. *Phytochemistry* 43, 921-982.
50. Wächter, A. G., Hoffmann, J., et al. (1999) Antibacterial and antifungal flavanones from *Eysenhardtia texana*. *Phytochemistry* 52, 1469-1471.
51. Sekine, T., Inagaki, M., et al. (1999) Six diprenylisoflavones, derrisisiflavones A-F, from *Derris scandes*. *Phytochemistry*, 52, 87-94.
52. Haraguchi, H., Tanimoto, K., et al. (1998) Mode of antibacterial action of retrochalcones from *Glycyrrhiza inflata*. *Phytochemistry*, 48, 125-129.
53. Deng, Y., Lee, P. J., and Snyder, K. J. (2000) New antimicrobial flavanones from *Physena madagascariensis*. *Journal of Natural Products*. 63, 1082-1089.
54. Seo, E., Silva, G. L., et al. (1997) Cytotoxic prenylated flavanones from *Monetes engleri*. *Phytochemistry* 45, 509-515.
55. Meragelman, M. K., Mckee, T. C. and Boyd, R. M. (2001) Anti-HIV prenylated flavonoids from *Monotes africanus*. *Journal of Natural Products* 64, 546-548.

56. Miyamoto, M., Matsushita, Y., *et al.* (1998) Prenylflavonoids: A new class of non-steroidal phytoestrogen (part. 2). Estrogenic effects of 8-isopentenylnaringenin on bone metabolism. *Planta Medica* **64**, 519-519.
57. Mathée, G., Wright, D. A. and König, G. (1999) HIV reverse transcriptase inhibitors of natural origin. *Planta Medica* **65**, 493-506.
58. Hahlbrock, K., Zilg, H. and Grisebach, H. (1970) Stereochemistry of the enzymatic cyclisation of 4, 2', 4'-trihydroxychalcone to 7, 4'-dihydroxyflavanone by isomerases from mung bean seedlings. *Eur. Journal Biochemistry* **15**, 13-18.
59. Moustafa, E. and Wong, E. (1967) Purification and properties of chalcone-flavanone isomerase from soya beab seed. *Phytochemistry* **6**, 625-632.
60. Gaffield, W. (1970) Circular dichroism, optical rotatory dispersion and absolute configuration of flavanones, 3-hydroxyflavanones and their glycosides. *Tetrahedron* **26**, 4093-4108.
61. Gaffield, W. and Lundin, E. R. (1975) C-2 stereochemistry of naringin and relation to taste and biosynthesis in maturing grapefruit. *Bioorganic Chemistry* **4**, 259-269.
62. Crabbé, P. (1972) *ORD and CD, in Chemistry and Biochemistry*. Academic Press. New York. 1-15; 185-191.
63. Crabbé, P. (1967) Recent applications of optical rotatory dispersion and optical circular dichroism in organic chemistry. *Topics. Stereochemistry* **1**, 93-197.
64. Klyne, W. (1961) Optical Rotatory Dispersion. *Tetrahedron* **13**, 29-47.

65. Verbit, L. and Carl-Lewis, W. J. (1968) Optically active aromatic chromophores-VIII. *Tetrahedron* **24**, 5519-5527.
66. Hoslettman, K., Margton, A. and Wolfender, J. (1995) Strategy in the search for new biologically active constituents. In *phytochemistry on plants used in traditional medicine*. Oxford University Press, U.S.A., 22-26.
67. McLaughlin, J. (1991) Crown gall tumors on potato disc and Brine Shrimp lethality: Two simple bioassay for higher plant screening and fractionation. *Methods in Plant Biochemistry*, Vol. 6. Assay for bioactivity. Academic Press Limited, U.S.A., 1-30.
68. Meyer, B., Ferrigni, N., *et. al.* (1982) Brine Shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica* **45**, 31-34.
69. Mitscher, A. L., Leu, P. R., *et. al.* (1972) Antimicrobial agents from higher plants. I. introduction, rationale and methodology. *Llodya* **35**, 157-166.
70. Flores, G. (1995) Sinergismo de la actividad larvicida de a-sanshool sobre *Culex quinquefasciatus* y *Artemia salina* por compuestos metilendioxiifenilos. Tesis Químico Farmacéutico Biólogo. FES, Zaragoza, UNAM, 17-20.
71. Rios, L. J., Recio, M. C. and Villar, A. (1988) Screening methods for natural products with antimicrobial activity: A review of the literature. *Journal of Ethnopharmacology* **23**, 127-149.
72. Marymont, H. J. and Wentz, M. B. (1966) Serial dilution antibiotic sensitivity testing with the microtiterator system. *American Journal of Clinical Pathology* **45**, 548-550.

73. Sokomba, E., Wambee, Ch., *et. al.* (1986) Preliminary phytochemical, pharmacological and antibacterial studies of the alkaloidal extracts of the leaves of *Syncliaia scabrida* miers. *Journal of Ethnopharmacology* **18**, 173-185.
74. Bauer, W. A., Kirby, M. M., Sherris, C. J. and Turck, M. (1966) Antimicrobial susceptibility testing by standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*, **45**, 493-496.
75. Betina, V. (1973) Bioautography in paper and tin-layer chromatography and its scope in the antibiotic field. *Journal of Chromatography* **78**, 41-51.
76. Homans, L. A. and Fuchs, A. (1970) Direct bioautography on the tin-layer chromatograms as a method for detecting fungitoxic substance. *Journal of Chromatography* **51**, 327-329.
77. Vaden, D. and Vlientinck, A. (1991) Screening methods for antibacterial and antiviral agent from higher plants. *Methods in Plant Biochemistry*. Vol. 6, Assay for bioactivity. Academic Press Limited, U.S.A., 47-67.
78. Mitscher, A. L., Drake, S., Gallapudi, R. S. and Okwute, K. S. (1987) A modern look at folkloric use of anti-infective agents. *Journal of Natural Products* **50**, 1025-140.
79. Gómez, F., Quijano, G., Calderón, J. S. and Rios, T. (1983) A prenylated flavan from *Tephrosia madrensis*. *Phytochemistry* **22**, (5) 1305-1306.
80. Nathan, J. y Díaz, E. (1970) Introducción a la RMN-¹H. Limusa, México, 170-171.
81. Jarayaman, Y., Ghanim, A. and Khan, H. A. (1980) A new prenylated flavanone from *Tephrosia villosa*. *Phytochemistry* **19**, 1267-1268.

82. Cano, A., Espinosa, M., Debray, R. and Delgado, G. Prenylated flavanonas from *E. herlandieri* ssp *acapulcensis*. *Journal of Natural Products*. En prensa.
83. Baldwin, J., E. (1976) Rules for ring closure. *J. Chem. Soc. Chem. Comm.*, 734-738.
84. Jain, A. C., Gupta, R. C. and Sarpal, P. D. (1978) Synthesis of (-) lupenifolin, di-O-methylxanthohumol and Isoxanthohumol and related compounds. *Tetrahedron*, **34**, 3563-3566.
85. Pelter, A., Word, R. and Gray, T. (1976) The carbon-13 nuclear magnetic resonance spectra of flavonoids and related compounds. *Journal of Chemical Society*, 2475-2483.
86. Ternai, B. and Markham, K., R. (1976) Carbon-13 NMR studies of flavonoids-I. *Tetrahedron* **32**, 565-580.
87. Wagner, H. and Chari, V. (1976) ¹³C-NMR spektren natürlich vorkommender flavonoide. *Tetrahedron Letter*, 1799-1802.
88. Mitscher, A. L., Raghar, S. G., et. al. (1983) Antimicrobial agents from higher plants: Prenylated flavonoids and other phenols from *Glycyrrhiza lepidota*. *Phytochemistry* **22**, 573-576.