



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
QUÍMICAS**

**ESTUDIO QUÍMICO DEL PROPÓLEO NEGRO DE LA REGIÓN DE
ZACATECAS**

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Q. JOSÉ JOAQUÍN GUERRERO GUTIÉRREZ



TUTOR: M. en C. Ricardo Jorge Cárdenas Pérez

INSTITUTO DE QUÍMICA

MÉXICO, D.F. ENERO 2013



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.

AGRADECIMIENTOS

El autor desea dar las gracias a:

Los miembros del jurado, por la cuidadosa revisión y por las contribuciones hechas al presente trabajo.

Presidente M. en C. Ana Lidia Pérez Castorena

Vocal M. en C. Baldomero Esquivel Rodríguez

Vocal Dr. Eduardo Guillermo Delgado Lamas

Vocal Dr. Carlos Martín Cerda García Rojas

Secretario Dr. José Fausto Rivero Cruz

Al CONACyT, por el apoyo económico otorgado a través de la beca número 245524

Al M. en C. Ricardo Jorge Cárdenas Pérez por aceptarme en su grupo de trabajo y por brindarme muchos de sus conocimientos.

Al Dr. Rubén Gaviño, a la M. en C. Carmen Márquez, a la Q. Eréndira García y a Rocío Patiño por el apoyo técnico espectroscópico y cromatográfico.

Al Dr. Antonio Morales Serna por sus recomendaciones y contribuciones al trabajo.

Al Ing. Servando Carranza Salinas de Apiarios Carranza por proporcionar la materia prima para el desarrollo de este trabajo.

El presente trabajo se realizó en el laboratorio 2-8 del departamento de productos naturales del Instituto de Química de la UNAM.

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

Simbología	Significado
AcOEt	Acetato de etilo
Ar	Aromático
$[\alpha]$	Rotación específica
ccv	Cromatografía en columna al vacío
ccf	Cromatografía en capa fina
CDCl_3	Cloroformo deuterado
CLAE-MS	Cromatografía de líquidos de alta eficiencia acoplado a un detector de masas
CLAE-UV	Cromatografía de líquidos de alta eficiencia acoplado a un detector de absorbancia
c	Concentración
δ	Desplazamiento químico
DEPT	Aumento sin distorsión de la transferencia de polarización (Distortionless Enhancement of Polarization Transfer)
d	Señal doble (doblete)
dd	Doble de dobles
ddd	Doble de dobles de dobles
dt	Doble de triples
DMSO	Dimetilsulfóxido
EM-IE	Espectrometría de masas de impacto electrónico
eV	Electrón volts
h	Horas
Hz	Hertz
IR	Infrarrojo

<i>J</i>	Constante de acoplamiento
KBr	Bromuro de potasio
lit.	Literatura
<i>m/z</i>	Relación masa carga
M ⁺	Ión molecular
m	Señal multiple (multiplete)
MeOH	Metanol
nm	Nanometros
ppm	Partes por millón
RMN	Resonancia magnética nuclear
s	Señal simple (singulete)
t	Señal triple (triplete)
UV	Ultravioleta

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	5
3. ANTECEDENTES	7
3.1 Generalidades de los propóleos	8
3.2 Composición química de los propóleos	10
3.3 Generalidades de los flavonoides	11
3.3.1 Biosíntesis de los flavonoides	14
3.4 Generalidades de los terpenoides	19
3.4.1 Biosíntesis de los terpenoides	20
3.4.2 Diterpenos	25
4. PARTE EXPERIMENTAL	30
4.1 Generalidades	31
4.2 Obtención y cromatografía en columna del extracto metanólico del propóleo	32
4.3 Aislamiento y purificación de los metabolitos	34
4.3.1 Aislamiento de la <i>5,7-dihidroxi flavanona 33</i> (pinocembrina)	34
4.3.2 Aislamiento del diterpeno 34 <i>8α-hidroxi-15,16-epoxilabda-13(16), 14-dien-12-ona</i>	37

4.3.3 Aislamiento del diterpeno 35 <i>15,16-epoxilabda-13(16),14-dien- 8α-ol</i>	39
4.3.4 Aislamiento de la <i>3-acetyloxy-5,7-dihidroxi flavanona</i> 36 (3 acetato de la pinobanksina)	41
4.3.5 Aislamiento del <i>5,7-dihidroxi flavonol</i> 37 (galangina)	43
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	45
5.1 Obtención de la <i>5,7-dihidroxi flavanona</i> 33 (pinocembrina)	46
5.2 Obtención del diterpeno 34 <i>8α-hidroxi-15,16-epoxilabda-13(16), 14-dien-12-ona</i>	52
5.3 Obtención del diterpeno 35 <i>15,16-epoxilabda-13(16),14-dien-8α-ol</i>	59
5.4 Obtención de la <i>3-acetyloxy-5,7-dihidroxi flavanona</i> 36 (3 acetato de la pinobanksina)	65
5.5 Obtención del <i>5,7-dihidroxi flavonol</i> 37 (galangina)	69
6. CONCLUSIONES	72
7. BIBLIOGRAFÍA	75
8. ESPECTROS DE LOS COMPUESTOS AISLADOS	79

1. INTRODUCCIÓN

El interés del hombre por las colmenas data de hace miles de años, si bien la miel es el producto apícola de uso más antiguo, existen otros de gran interés como la cera, el polen, la jalea real, el veneno y el propóleo.¹ En el pasado, el propóleo también llamado “El oro púrpura de las abejas”, constituía un obstáculo para los apicultores dada su naturaleza pegajosa. Con el tiempo su valor fue cambiando, hasta llegar a constituir uno de los productos más valiosos que producen las abejas, su empleo está descrito por griegos, egipcios, romanos e incas.¹

El propóleo es un material resinoso y aromático que las abejas elaboran a partir de exudados de diversas plantas. Su coloración varía dependiendo de su origen botánico y edad.^{2,3} No solo constituye un material de construcción, su mayor importancia es ser el “arma química” de las abejas en contra de microorganismos patógenos, ya que al barnizar con propóleo las paredes de su colmena favorecen en ella la desinfección.⁴

Basado en el uso que las abejas le dan a este producto, la acción antimicrobiana es común para propóleos de diversos orígenes geográficos,^{1,4,5,6} así se les han atribuido propiedades tales como: antibacteriana, antifúngica y antiviral; también se han utilizado como antiinflamatorios, antiulcerosos, antitumorales, hepatoprotectores, inmunoestimulantes y anestésicos locales.^{4,7,8,9}

El mayor problema que existe con los propóleos, a pesar de contar con grandes avances tecnológicos que permiten conocer la composición química de una muestra determinada, es la variabilidad de su composición química, la cual es dependiente del sitio de colecta, de los diferentes ecosistemas, de la época del año y de las secreciones que sirven como fuentes de los propóleos.^{5,6,7}

El conocimiento de la composición química de los propóleos se considera un aspecto muy importante, ya que permite correlacionar su composición química con la actividad biológica de los mismos. La importancia de estandarizar los propóleos según sus metabolitos ha cobrado importancia con el transcurso del tiempo.⁶ Las tendencias más actuales en la investigación de los propóleos van dirigidas al desarrollo de estudios biológicos con muestras caracterizadas químicamente, bioensayos realizados con principios activos aislados de los extractos,¹⁰ así como estudios biológicos comparativos de propóleos de diferente composición química y origen geográfico. Estos estudios son muy valiosos ya que hacen posible que el propóleo sea mejor aceptado en las unidades de salud, que se pueda recomendar para su uso adecuado y que al final se garantice su calidad, seguridad y eficacia.¹¹

En México los propóleos se utilizan como auxiliares en el tratamiento de enfermedades de las vías respiratorias, en productos cosméticos principalmente cremas, y como suplementos alimenticios, sin embargo, hasta ahora son escasos los estudios químicos y biológicos que puedan avalar la efectividad medicinal en el uso tradicional de los propóleos mexicanos.¹¹

La muestra de propóleo que se estudió en este trabajo provino de un apiario del estado de Zacatecas y es utilizado como materia prima para su comercialización en forma de jarabes, gotas y dulces con fines medicinales para el tratamiento de enfermedades respiratorias.¹¹ En México los apicultores han encontrado recientemente dificultades para poder comercializar aquellos productos que presentan propiedades medicinales como la jalea real y el propóleo, debido principalmente al desconocimiento de la composición química de dichos productos, por lo que no cuentan con herramientas que sustenten el uso de estos productos con fines terapéuticos. Por lo anterior, los apicultores mexicanos se encuentran en desventaja frente a apicultores extranjeros que pretenden incursionar en el mercado nacional, estos competidores muchas veces cuentan por lo menos con alguna referencia de la composición de sus productos, lo cual les brinda cierta confiabilidad y ventaja.¹¹

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 Hipótesis

Dado el alto aprecio en el uso tradicional (medicinal) del propóleo en el tratamiento de enfermedades respiratorias, el análisis químico convencional permitirá el aislamiento y la caracterización estructural de productos naturales que presumiblemente posean la bioactividad que correlacione con el uso tradicional.

2.2 Objetivo general

Generar conocimiento referente a la estructura molecular de los componentes químicos de una muestra de propóleo negro de la región de Zacatecas.

2.3 Objetivo particular

Analizar el extracto metanólico de una muestra de propóleo negro de la región de Zacatecas para lograr el aislamiento del mayor número de constituyentes.

3. ANTECEDENTES

3.1 Generalidades de los propóleos

Los propóleos son productos de composición compleja, las abejas los obtienen por adición de cera y secreciones salivales al material resinoso, gomoso o balsámico que recolectan de yemas, brotes y grietas de diversas plantas y árboles (Figura 1). La palabra propóleo deriva del griego *pro*, para o en defensa, y *polis*, la ciudad, por lo que significa “defensa de la ciudad” (o de la colmena).¹



Figura 1. Resina de arboles para la elaboración de propóleo

En la colmena, las abejas utilizan al propóleo con diversos fines, tales como: cerrar grietas, reducir al mínimo las vías de acceso, recubrir y aislar restos de animales que se hayan introducido en la colmena, evitando así su descomposición, barnizar el interior de las celdillas con fines desinfectantes.¹² Es

ha esmerado en la explotación de los productos fabricados por el insecto, es así que el uso del propóleo por parte del hombre data de los años 600 a. de C.⁷ época en que ya era utilizado en la elaboración de remedios en la medicina tradicional. Sin embargo, es sólo en los últimos 50 años que se han realizado la mayoría de los estudios científicos enfocados en determinar la composición química, propiedades curativas y en general, el uso farmacológico de los preparados a base de propóleos.⁸ Esto ha permitido que su uso en fitomedicina se haya incrementado, por lo tanto, es una materia prima valiosa para la industria farmacéutica, de cosméticos y de alimentos.¹³

De acuerdo a numerosos estudios, se ha determinado que los constituyentes principales del propóleo son ceras, resinas, bálsamos, aceites esenciales y polen, además de impurezas mecánicas como tierra y fibras vegetales. La proporción de cada componente es variable y depende tanto de la época de recolección como del origen vegetal de la resina, así como de la raza de las abejas que lo producen.¹³

3.2 Composición química de los propóleos

Se sabe que los compuestos en el propóleo se originan de tres fuentes:⁷ 1) exudado de plantas recolectados por las abejas, 2) productos metabólicos secretados por las abejas como saliva y ceras, y 3) materiales introducidos por las abejas durante su elaboración como polen, tierra y fibras vegetales. Su composición química es heterogénea y depende de la vegetación que predomine alrededor de la colmena (aproximadamente en un radio de 2 km), de la estación del año, así como de su origen geográfico.^{1,5,14}

En la actualidad se conoce que el propóleo es una mezcla compleja que puede estar constituida por más de trescientos componentes.^{2,9,15,16} De manera general contiene: resinas, cera de abejas, polen, aceites esenciales, minerales, aminoácidos¹⁷ y otros compuestos orgánicos como aldehídos alifáticos y aromáticos, ácidos y ésteres aromáticos y alifáticos, chalconas, dihidrochalconas, flavonoides, acetofena y algunos de sus derivados, terpenoides, esteroides y azúcares.^{9,18}

Los fenoles son el grupo más importante de compuestos encontrado en los propóleos, sus propiedades medicinales son atribuidas principalmente a compuestos fenólicos, dentro de los cuales se encuentran los flavonoides.^{19,20}

3.3 Generalidades de los flavonoides

Los flavonoides son la subclase de polifenoles más grande y abundante del mundo vegetal, la variedad de sus propiedades biológicas ha llamado poderosamente la atención de los investigadores, de modo que hoy día, es el grupo de polifenoles más estudiado.²¹ Son pigmentos vegetales que inhiben o matan a muchas cepas bacterianas, inhiben importantes enzimas virales, tales como transcriptasa y proteasa inversas, además, destruyen a algunos protozoos patógenos.²²

Poseen actividad antialérgica, antiinflamatoria,²³ antioxidante,^{20,24} antimutagénica y moduladora de actividad enzimática. Además, se puede decir que aportan grandes beneficios para la salud al actuar como agentes quimiopreventivos de cáncer^{10,25} y problemas cardíacos.²¹ Muchos investigadores están incrementando el uso de flavonoides para tratar importantes enfermedades debido a su habilidad para inhibir enzimas específicas, para simular algunas hormonas y neurotransmisores, y para atrapar radicales libres.²²

La estructura química básica de los flavonoides consiste en un esqueleto del tipo C₆-C₃-C₆, donde los componentes C₆ son anillos aromáticos unidos a través de una cadena de tres átomos de carbono que pueden formar o no un tercer anillo (anillo C) del tipo pirano o pirona, de tal manera que los distintos tipos de flavonoides se diferencian principalmente en el anillo C. De este modo se pueden tener flavonas (1), isoflavonas (2), flavonoles (3), flavanonas (4), flavanonoles (5), flavanoles (6), antocianidinas (7) y chalconas (8)^{26,27} (Figura 2).

Esta clase de compuestos en la naturaleza se pueden encontrar hidroxilados, metoxilados o bajo la forma de O/C-glicósidos; de esta forma se han identificado alrededor de 4000 compuestos diferentes.^{26,27}

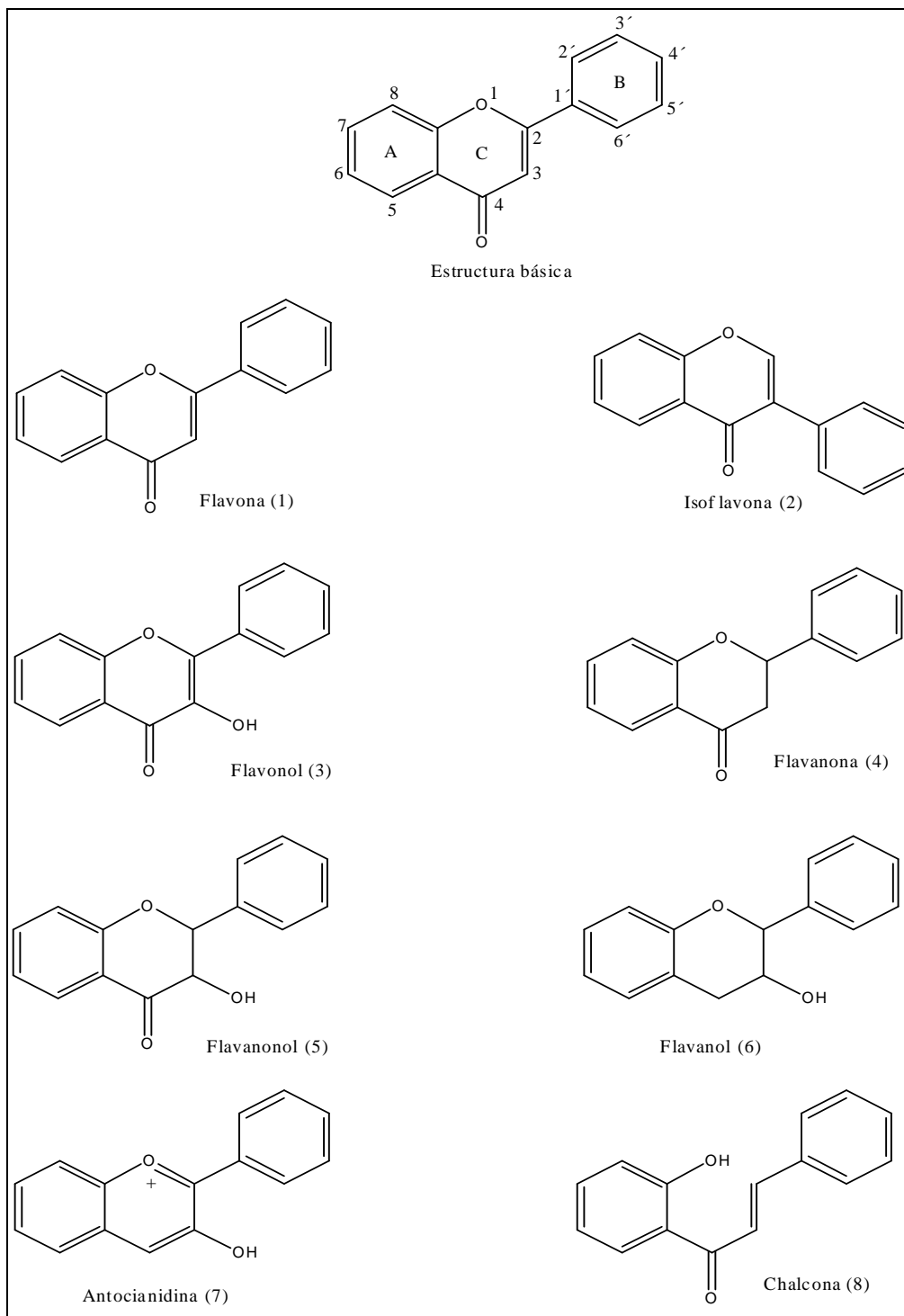


Figura 2. Estructura básica de flavonoides y su clasificación²⁶

3.3.1 Biosíntesis de los flavonoides

La biosíntesis de los flavonoides tiene la característica especial de ser un proceso mixto, debido a que intervienen dos rutas metabólicas: la del ácido shikímico y la del acetato-malonato, la primera de ellas es responsable de la secuencia C₆-C₃, que constituye el anillo B y la cadena lateral de la estructura de un flavonoide; el anillo A (C₆) se forma por la vía del acetato-malonato (Figura 3).

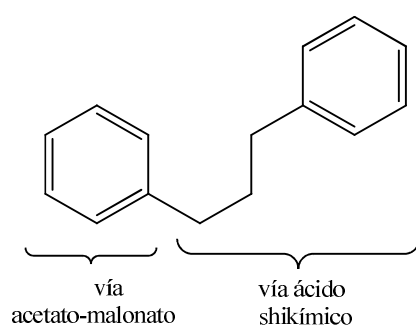
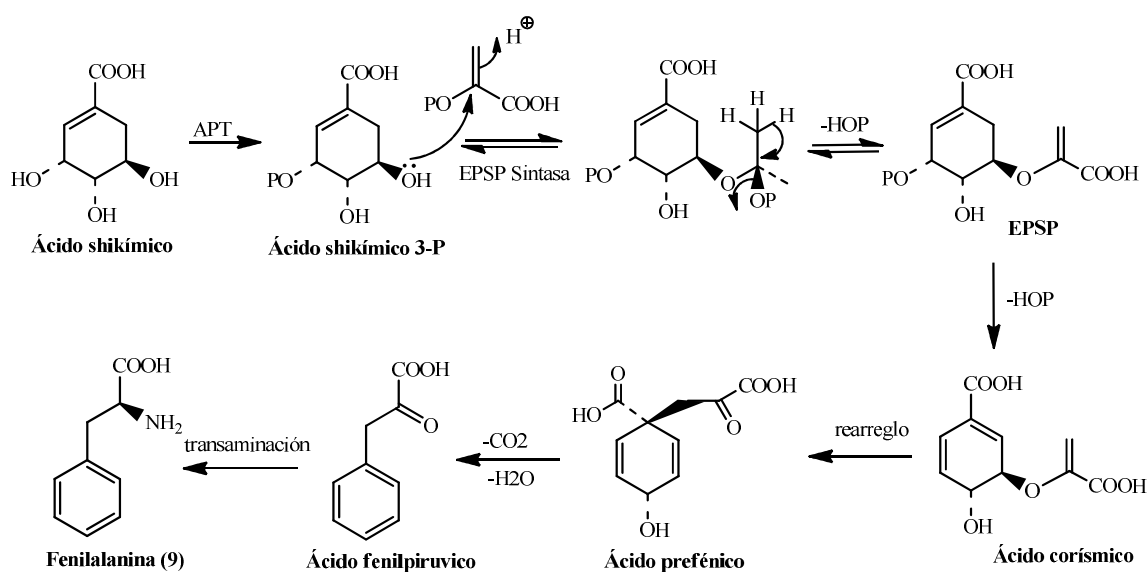


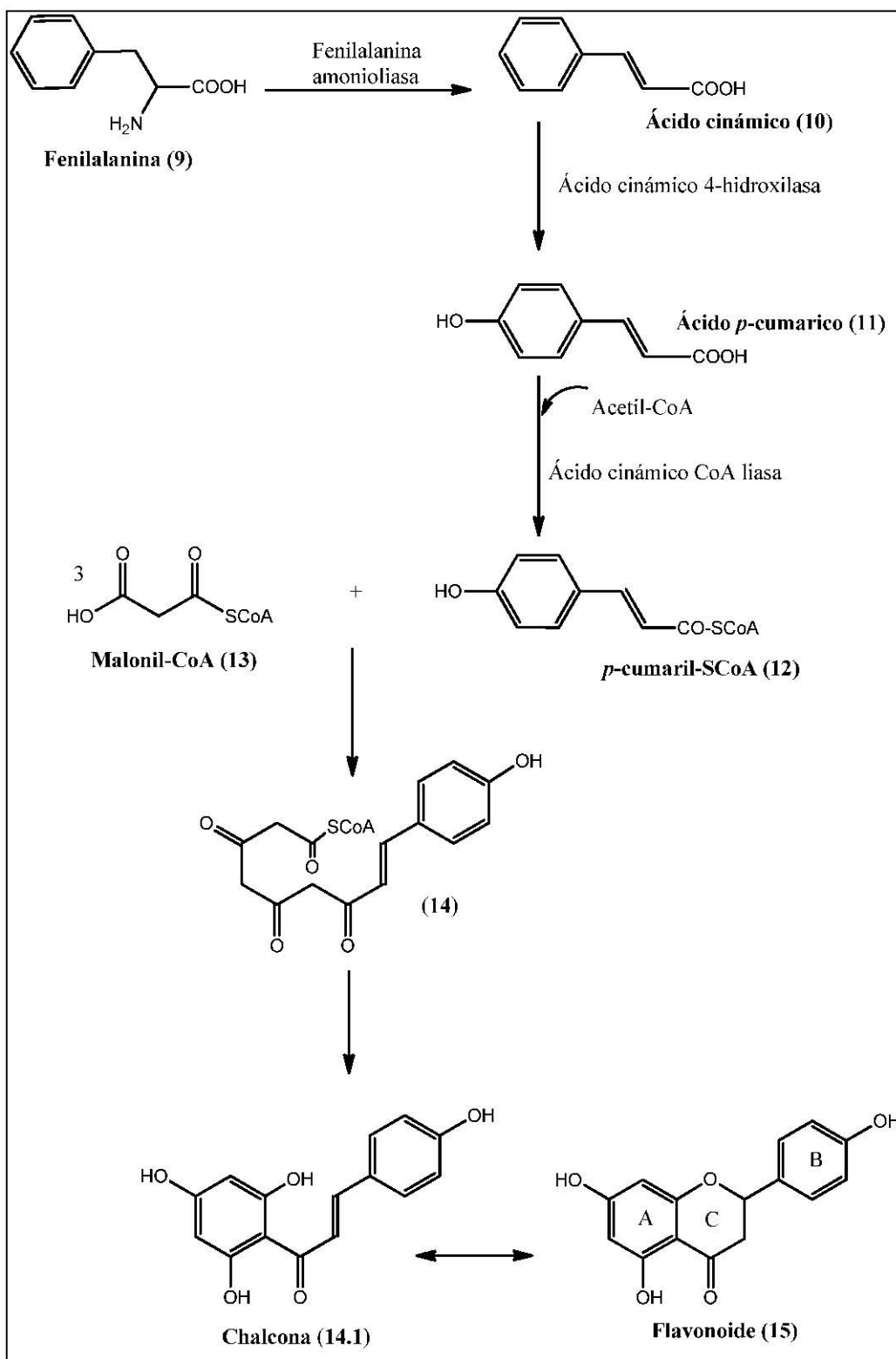
Figura 3. Origen biogénico de los flavonoides²⁸

Se sintetizan por la unión de una molécula de *p*-cumaril-CoA y tres moléculas de malonil-CoA. La molécula de *p*-cumaril-CoA proviene del ácido shikímico el cual a través de una serie de reacciones (Esquema 1), es transformado en el aminoácido fenilalanina (**9**), ésta por acción de la enzima fenilalanina amonioliasa (PAL) se transforma en ácido cinámico (**10**) (Esquema 2), que luego es transformado en ácido *p*-cumárico (**11**), por incorporación de un grupo hidroxilo en la posición 4 del anillo aromático y por la acción de una CoA liasa se transforma

en *p*-cumaril-S-CoA (**12**), el precursor de la mayoría de los fenoles de origen vegetal, entre los que se encuentran los flavonoides. Posteriormente, se condensa con tres unidades de malonil-CoA (**13**), para formar el policétido **14**; con la ciclización por acción de la enzima chalcona sintasa se obtiene la estructura de una chalcona (**14.1**); los flavonoides (**15**) se obtienen cuando el fenol del anillo A reacciona con el doble enlace de la cetona α,β insaturada para formar el anillo de pirona (anillo C).^{28,29}



Esquema 1. Biosíntesis de fenilalanina a partir de ácido shikímico²⁹



Esquema 2. Biosíntesis de flavonoides.^{28,29}

También se ha mostrado que los productos del metabolismo de los flavonoides por algunas cepas bacterianas y por la microflora de humanos, conejos y ratas,³⁰ contribuyen en los efectos de las diferentes actividades biológicas de los flavonoides, ya que poseen propiedades antioxidantes y de captación de radicales libres, estos metabolitos son derivados de ácidos fenólicos, algunos ejemplos son: el ácido *p*-hidroxifenilacético (**16**), el ácido 3,4-dihidroxibenzoico (**17**), ácido cafeico (**18**), 3,4-dihidroxicinámico (**19**), floroglucinol (**20**), ácido 4-hidroxicinámico (**21**), ácido *p*-hidroxibenzoico (**22**), ácido 3(*p*-hidroxifenil)propiónico (**23**) (Figura 4).³¹

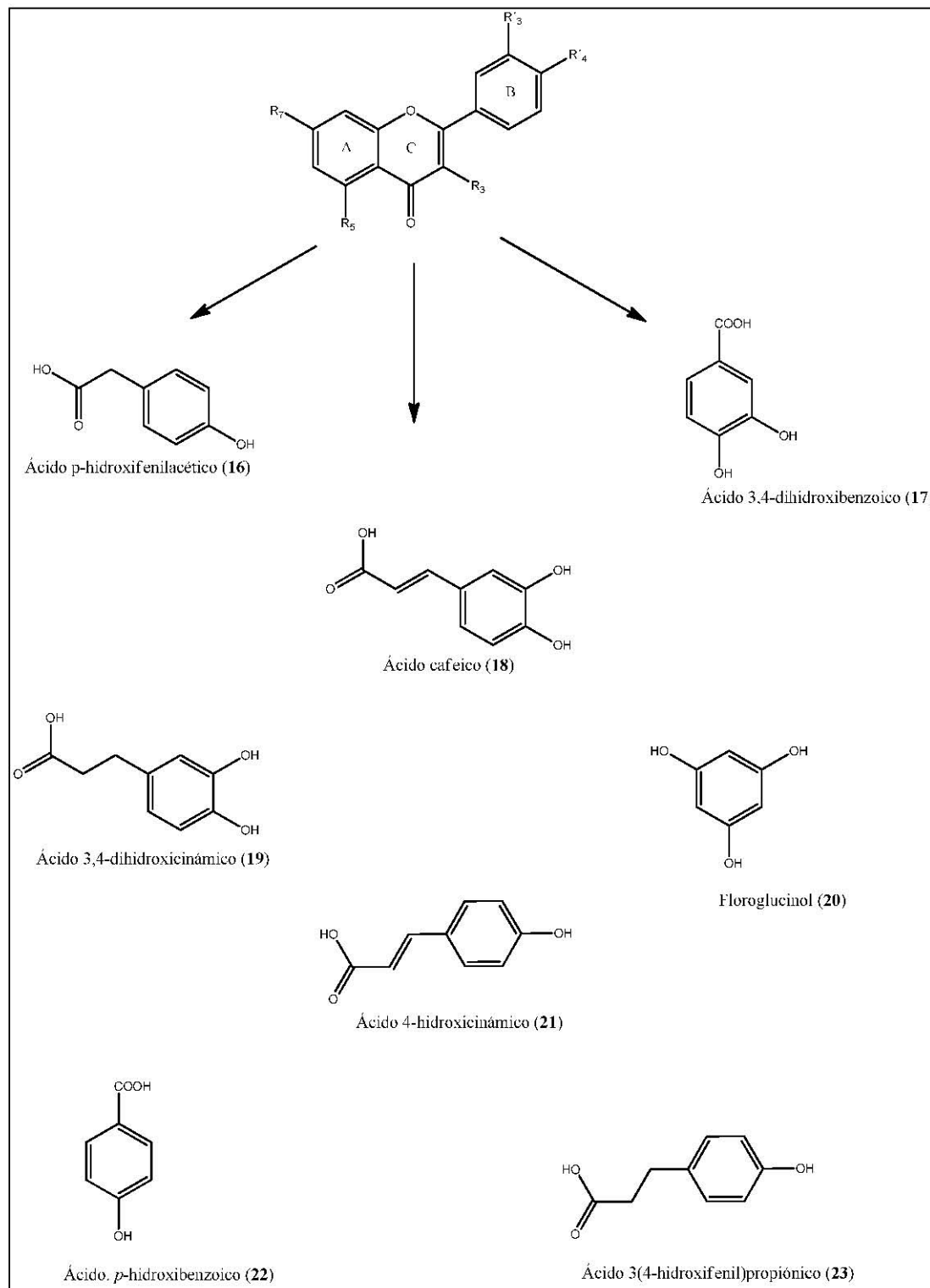


Figura 4. Compuestos derivados del metabolismo de flavonoides por la microflora intestinal humana de conejos, ratas y cepas bacterianas.³¹

3.4 Generalidades de los terpenoides

Son el grupo más grande de productos naturales con más de 22,000 compuestos y su número sigue en aumento. La mayoría de los terpenos provienen de plantas y un número pequeño es producido por algunas especies de hongos, bacterias e insectos.³²

Desde las primeras investigaciones químicas de estos compuestos se observó que la unidad a partir de la cual estaban constituidos, tenía cinco átomos de carbono (Figura 5) y se denominó isopreno (**24**) o isopentano (**25**). Así, Ruzicka propuso alrededor de 1960 la regla del isopreno, la cual indica que un terpeno debe estar formalmente constituido por unidades isoprénicas unidas en un arreglo cabeza-cola.³³



Figura 5. Estructuras del isopreno (**24**) y del isopentano (**25**).

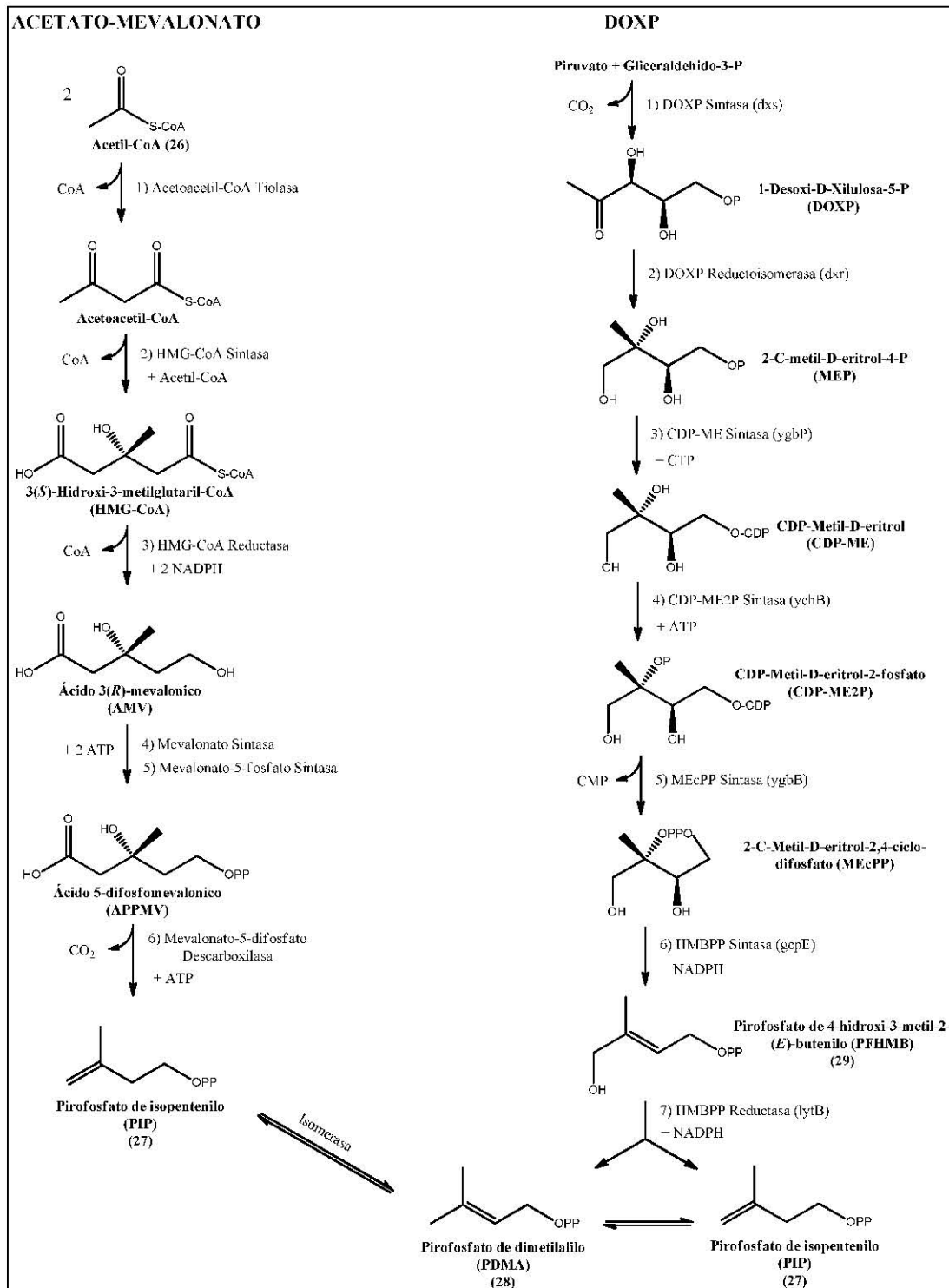
3.4.1 Biosíntesis de los terpenoides

En la década de los 50's el acetato y la acetil-CoA fueron detectados como precursores, el ácido mevalónico (AMV) como intermediario y el pirofosfato de isopentenilo (PIP) como la unidad C₅ activa en la biosíntesis de los terpenoides. Por más de tres décadas se creyó que todos los isoprenoides eran biosintetizados por la vía acetato-mevalonato, pero en los años 90's se propuso una ruta alterna para la síntesis de algunos isoprenoides (hemiterpenos, monoterpenos, diterpenos, plastoquinona-9 y carotenos) la cual se denominó vía mevalonato-independiente,^{29,34} se conoce también como vía no-mevalonato, vía gliceraldehido-3-fosfato/piruvato, vía metileritritol-fosfato o ruta 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato (DOXP).²⁹

Las plantas superiores poseen ambas rutas, en el citoplasma la vía AMV es responsable de la biosíntesis de sesquiterpenos, triterpenos, politerpenos y esteroides; y en los plástidos opera la vía DOXP en la que se biosintetizan los hemiterpenos, diterpenos, carotinoides y plastoquinona-9. La mayoría de las algas también posee ambas rutas.

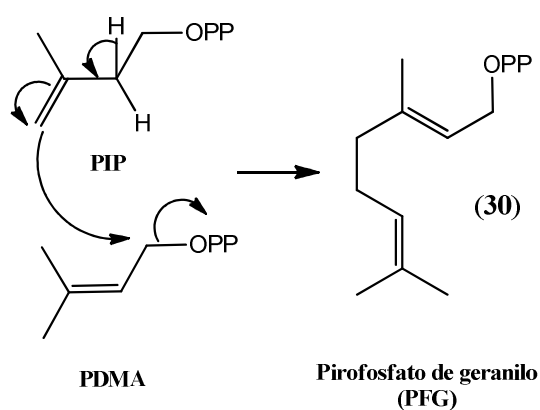
La ruta clásica de biogénesis acetato/AMV (Esquema 4) comienza con 3 moléculas de acetil-CoA (**26**), y se requieren 3 ATP, 2 NADPH y 6 enzimas. El producto final de esta vía es el pirofosfato de isopentenilo (PIP) (**27**), el cual se puede transformar por acción de una PIP-isomerasa en pirofosfato de dimetilalilo (PDMA) (**28**).

En contraste la ruta DOXP (Esquema 4) comienza con una molécula de piruvato y una de gliceraldehido-3-fosfato, requiere de 3 moléculas de ATP o CTP, 3 NADPH y 7 enzimas. El último intermediario de esta vía es el pirofosfato de 4-hidroxi-3-metil-2-(*E*)-butenilo (PHMB) (**29**), el cual puede generar al pirofosfato de isopentenilo (PIP) (**27**) y a su isómero pirofosfato de dimetilalilo (PDMA) (**28**).^{29,34}



Esquema 4. Biosíntesis del pirofosfato de isopentenilo (PIP) por las vías de Acetato-mevalonato(AMV) y 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato (DOXP)³⁵

La condensación, mediante unión cabeza-cola de estos dos últimos compuestos origina el pirofosfato de geranilo (PFG) (**30**) (Esquema 5) que posee 10 átomos de carbono y es precursor de un gran número de metabolitos vegetales (Figura 6).³⁶



Esquema 5. Formación de PFGG a partir de PIP y PDMA³⁶

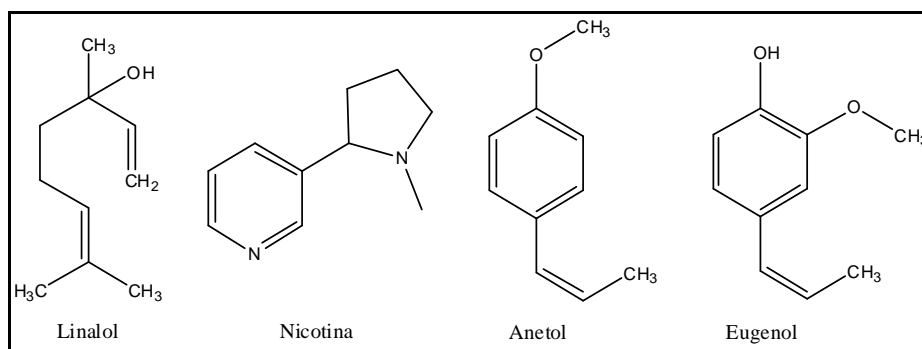


Figura 6. Ejemplos de productos formados a partir de pirofosfato de geranilo (PFG).

El acoplamiento de PFG a nuevas unidades de PIP origina moléculas de mayor peso molecular, incrementándose el número de carbonos de cinco en cinco: sesquiterpenos (C₁₅), diterpenos (C₂₀), sesteterpenos (C₂₅), triterpenos (C₃₀), etc.

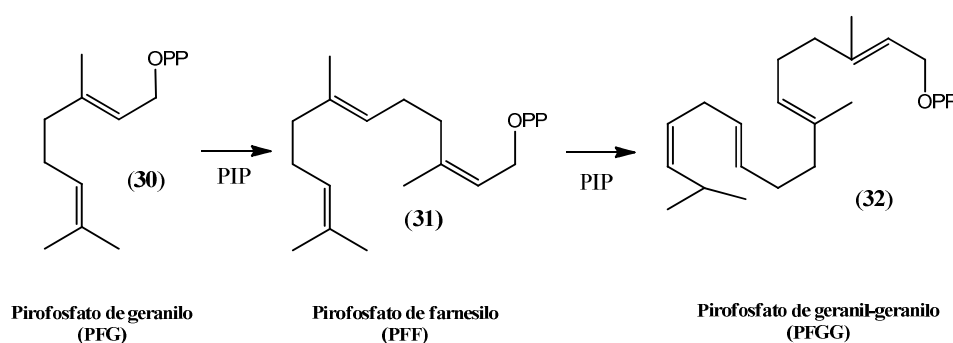
De este modo, los terpenoides se pueden clasificar en cíclicos y acíclicos, y por el número de átomos de carbono, es decir, por el número de unidades de isopreno que contenga en su estructura³² (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación de terpenos según las unidades de isopreno³²

Nombre	No. de carbonos en el esqueleto	No. de unidades de isopreno
Hemiterpeno	5	1
Monoterpeno	10	2
Sesquiterpeno	15	3
Diterpeno	20	4
Sesteterpeno	25	5
Triterpeno	30	6
Tetraterpenos (carotenos)	40	8
Politerpenos	>40	>8

3.4.2 Diterpenos

Este grupo de compuestos está constituido por cuatro unidades de isopreno (20 átomos de carbono) procedentes del metabolismo del pirofosfato de 2*E*,6*E*,10*E*-geranilgeranilo (PFGG). Se forman a partir de PIP y PDMA provenientes de la ruta DOXP (Esquema 4). La unión de PIP y PDMA genera el PFG, el cual al incorporar una molécula de PIP genera el pirofosfato de farnesilo (PFF) (31) y éste da origen al pirofosfato de geranilgeranilo (PFGG) (32) por la adición de otra molécula de PIP²⁹ (Esquema.6).



Esquema 6. Formación del precursor PFGG para la formación de diterpenos.²⁹

La estructura de los diterpenos es variable y depende estrechamente de su biogénesis, por lo que se pueden clasificar en función de la misma.

Diterpenos acíclicos

Pueden ser lineales como el capsianosido o contener una lactona o un éter cíclico procedente de la apertura de oxiranos (zoapatanol) (Figura 7).

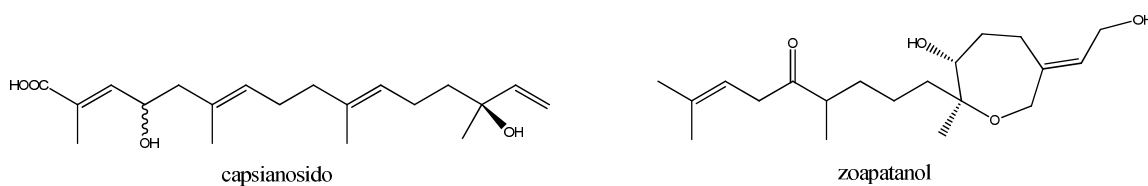


Figura 7. Ejemplos de diterpenos acíclicos³⁶

Diterpenos cíclicos

Existen dos modos de ciclación del precursor PFGG:

1) Ciclación inducida por la pérdida del grupo pirofosfato, la formación de un carbocatión y la alquilación de un doble enlace por éste. Generalmente es el doble enlace del isopropilideno terminal, lo que da lugar a la formación de un macrociclo. El catión macrocíclico poliinsaturado puede conducir a una estructura policíclica por sustitución nucleófila intramolecular generando estructuras de taxano, tigliano, dafnano, ingenano.²⁹ (Figura 8)

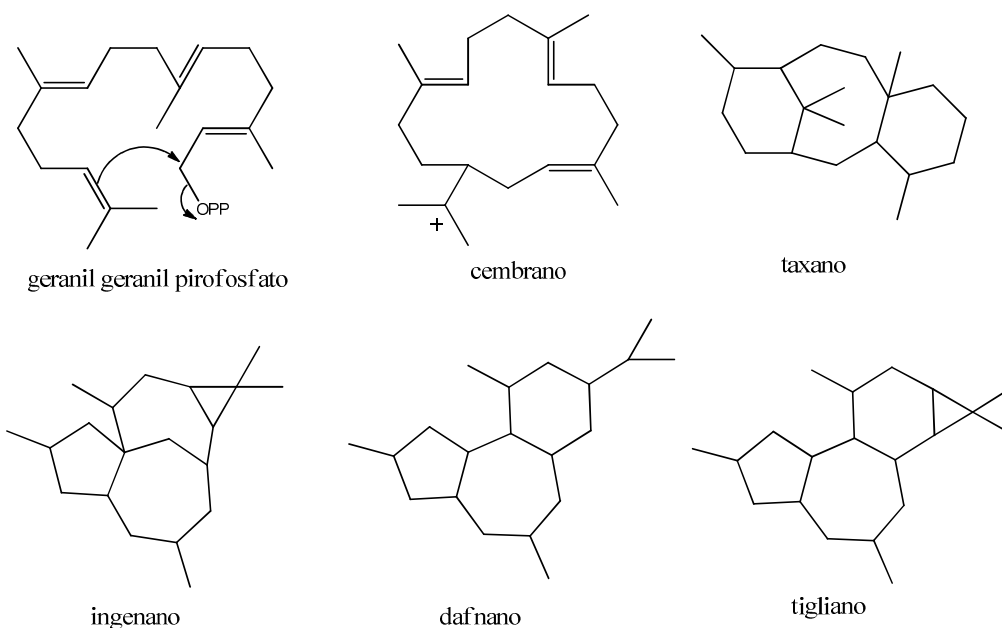
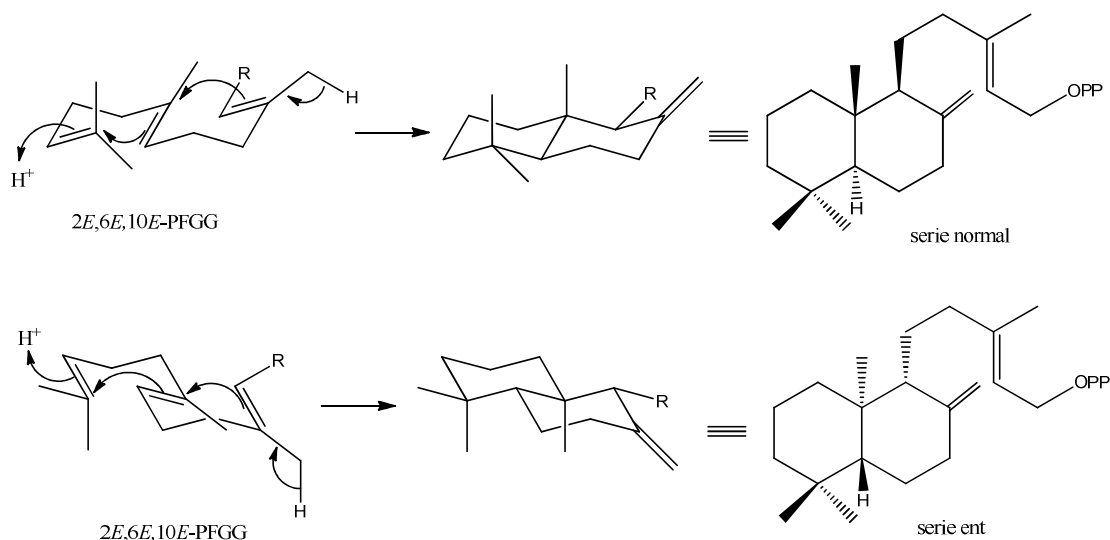


Figura 8. Diterpenos formados a partir de un catión macrocíclico²⁹

2) Ciclación ácido-catalizada del PFGG, formando una decalina sustituida. Este tipo de ciclación conduce a dos series enantioméricas, las cuales tienen configuraciones opuestas en los carbonos C-5, C-9 y C-10. Se le llama serie “normal” cuando la fusión de los ciclos A y B es idéntica a la de los esteroides; y se le llama *ent* (enantio) cuando es la antípoda (Esquema 7).^{29,36} La orientación hacia una u otra serie está dirigida por la conformación del precursor lineal (PFGG) sobre la superficie de la enzima que cataliza la ciclación.



Esquema 7. Ciclación de PFGG y formación de labdano y *ent*-labdano.²⁹

Los diterpenos cíclicos se clasifican tomando en cuenta el número de ciclos que presenta el esqueleto carbonado en: monocíclicos, bicíclicos, tricíclicos, tetracíclicos, pentacíclicos, macrocíclicos. Estas clases se han subdividido atendiendo al tipo de esqueleto carbonado; así por ejemplo, entre los bicíclicos hay diterpenos con esqueleto del tipo de labdano y clerodano; entre los tricíclicos se encuentran el pimareno, abietano, y cassano; en los tetracíclicos: kaurano, beyerano y atiserano etc²⁹ (Figura 9).

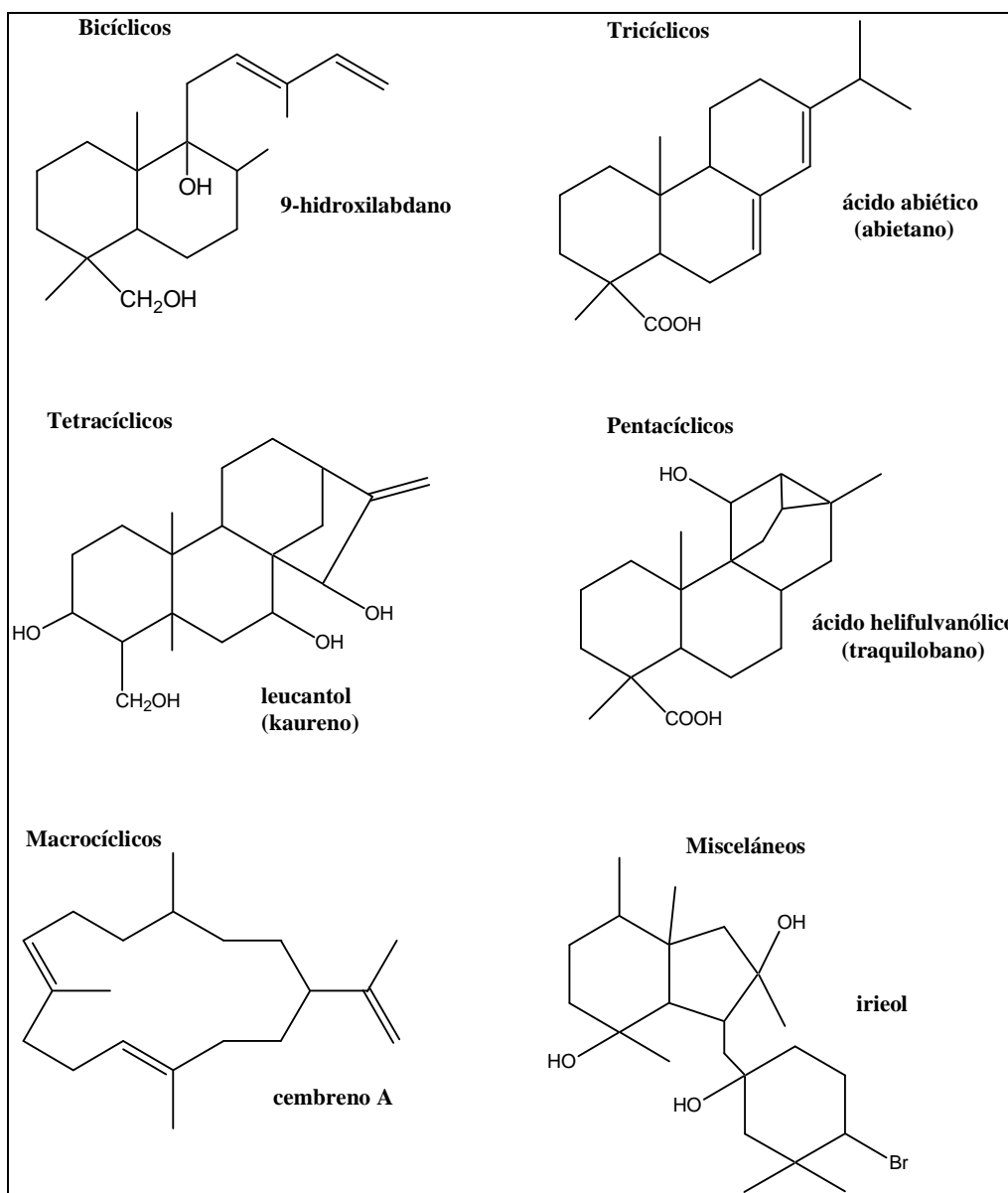


Figura 9. Ejemplos de diterpenos^{29,36}

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1 GENERALIDADES

El aislamiento y la purificación de los compuestos se llevaron a cabo mediante las técnicas de cromatografía en columna al vacío (ccv) y cromatografía en capa fina (ccf), así como por cristalización y recristalización por par de disolventes. Para la técnica de ccv se utilizó como fase estacionaria sílica gel kiesegel 60. Los procesos de separación y purificación se monitorearon usando placas cromatográficas de aluminio Alugram con sílica gel 60 F₂₅₄ (0.25 mm de espesor), como revelador se utilizó una solución de Ce(SO₄)₂ al 1% en H₂SO₄ 2N. Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fisher-Johns y son valores no corregidos. Los espectros de IR se determinaron en pastilla de bromuro de potasio en un espectrómetro FT-IR Bruker Tensor 27. Los espectros de masas se obtuvieron en un espectrómetro de resolución media Jeol AX505HA por la técnica de impacto electrónico a 70 eV. La rotación óptica se determinó en un polarímetro modelo Perkin Elmer 343. Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) de ¹H y ¹³C se obtuvieron en espectrómetros Bruker Avance III de 300 y 400 MHz, se utilizó como disolvente CDCl₃ y en algunos casos se adicionó DMSO. Los desplazamientos químicos se reportan en partes por millón (ppm) y las constantes de acoplamiento en Hertz (Hz).

4.2 Obtención y cromatografía en columna del extracto metanólico del propóleo

Se colocaron 60 gramos de propóleo crudo y 700 mL de metanol en un matraz bola de 1000 mL. La mezcla se dejó en agitación por 48 h. El material sólido se separó por filtración y se lavó con metanol (3 X 100 mL). Las fases metanólicas se combinaron y el disolvente se evaporó en un rotavapor con vacío.

El extracto metanólico (45 g) se purificó por ccv, para ello se disolvió el extracto en diclorometano (300 mL) y se absorbió en celita (la suficiente) agitando hasta la eliminación del disolvente. Se empacó una columna de vidrio de 7 cm de diámetro con sílica gel al vacío hasta una altura de 7 cm, después se agregó el extracto absorbido en celita, y se eluyó con mezclas de hexano/acetato de etilo y acetato de etilo/metanol en un orden de polaridad creciente, colectando fracciones de 50 mL.

La elución de la columna se llevó a cabo como se muestra en la tabla 2. Las fracciones obtenidas se reunieron en 5 grupos (Tabla 3).

Tabla 2. Cromatografía (ccv) del extracto metanólico del propóleo

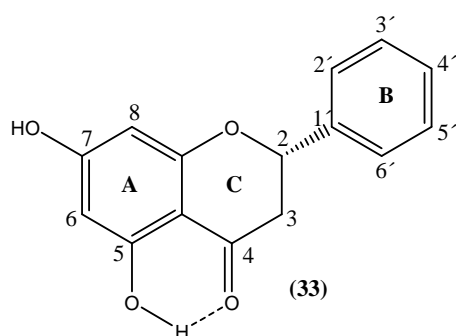
Fracciones	Mezcla % (hexano/AcOEt)	Volumen total (mL)
1-6	100/0	500
7-16	90/10	500
17-27	80/20	500
28-39	70/30	500
40-52	60/40	500
53-65	50/50	500
66-77	40/60	500
78-89	30/70	500
90-101	20/80	500
102-113	10/90	500
114-125	0/100	500
AcOEt/MeOH		
126-138	95/5	500
139-150	90/10	500
151-156	85/15	250

Tabla 3. Pesos obtenidos de cada grupo de fracciones.

Grupo	Fracciones	Peso de la muestra (g)
1	1-13	0.52
2	16-23	8.70
3	24-47	24.75
4	48-81	14.10
5	82-156	8.27

4.3 AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE LOS METABOLITOS

4.3.1 Aislamiento de la 5,7-dihidroxi flavanona 33 (pinocembrina)



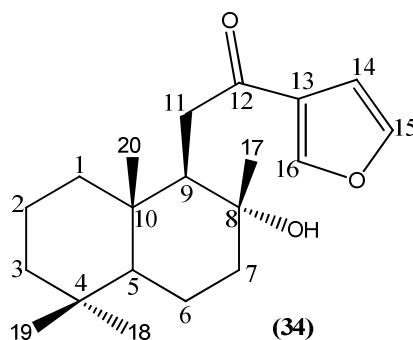
Al grupo 3 (24.75 g) de la primer columna se le realizó una separación por ccv utilizando una columna de vidrio de 8 cm de diámetro, la cual se empacó con sílica gel hasta una altura de 6 cm, posteriormente se depositó la muestra absorbida en celita y se eluyó con mezclas de hexano/AcOEt en un orden de polaridad creciente, obteniendo fracciones de 25 a 30 mL. La separación se muestra en la tabla 4.

Tabla 4. Cromatografía (ccv) del grupo 3 de la primera columna

Fracciones	Mezcla % (Hexano/AcOEt)	Volumen total (mL)
1-7	100/0	500
8-19	98/2	500
20-34	96/4	500
35-52	94/6	500
53-69	92/8	500
70-84	90/10	500
85-99	88/12	500
100-116	86/14	500
117-132	84/16	500
133-148	82/18	500
149-163	80/20	500
164-178	78/22	500
179-195	76/24	500
196-213	70/30	500
214-231	0/100	300

De las fracciones 99 a 114 (polaridad 12 a 14 % AcOEt/hexano) de la purificación del grupo 3 se aislaron dos productos por la técnica de recristalización por par de disolventes; el primer producto es un sólido cristalino (800 mg) el cual presentó un punto de fusión de 192 a 194 °C cuando se recristalizó de hexano/AcOEt, $[\alpha]_D^{25}$ -45 (MeOH, c 2 mg/mL), lit.³⁷ $[\alpha]_D^{25}$ -45.63 (MeOH, c 0.5 mg/mL) El compuesto se identificó como la flavanona **5,7-dihidroxi**flavanona (pinocembrina).³⁷ (C₁₅H₁₂O₄). **IR** (KBr) cm⁻¹ (Espectro 1): En 3000-3100 banda ancha, 1635, 1600, 1300, 1169. **EM-IE** (70 eV), *m/z* (intensidad relativa) (Espectro 2) 256 [M⁺] (100), 238 (9), 179 (70), 153 (21), 152 (64), 124 (39), 104 (16), 77 (11). **RMN ¹H** (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) (integral, multiplicidad, *J* (Hz), asignación) (Espectro 3): 12.03 (1H, s, OH en C-5), 10.0 (1H, s, OH en C-7), 7.42 (5H, m, Ar anillo B), 6.03 (1H, d, *J* = 2.1, H-8), 6.02 (1H, d, *J* = 2.1, H-6), 5.4 (1H, dd, *J* = 12.9, 3.0, H-2), 3.05 (1H, dd, *J* = 17.1, 12.9, H-3b), 2.78 (1H, dd, *J* = 17.1, 3.0 H-3a). **RMN ¹³C** (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) (asignación) (Espectro 4): 43.15 (CH₂, C-3), 78.81 (CH, C-2), 95.52 (CH, C-8), 96.68 (CH, C-6), 102.27 (C, C-10) 125.97 (CH, C-3' y C-5'), 128.56 (CH, C-4'), 128.62 (CH, C-2' y C-6'), 138.45 (C, C-1'), 162.79 (C, C-9) 164.06 (C, C-5), 166.87 (C, C-7), 195.15 (C, C-4).

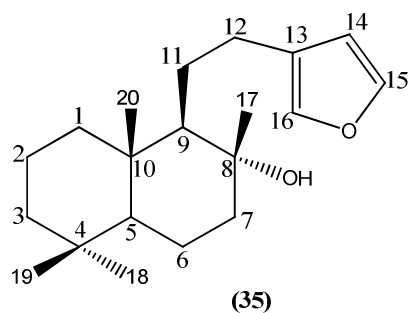
4.3.2 Aislamiento del diterpeno 34 *8 α -hidroxi-15,16-epoxilabda-13(16), 14-dien-12-ona*



De las fracciones 99-114 de la purificación del grupo 3 se aisló un segundo compuesto (180 mg) al llevar a cabo sucesivas recristalizaciones con hexano/acetona. El compuesto obtenido fue un sólido cristalino con forma de agujas con punto de fusión de 135-137 °C, el cual se identificó como el diterpeno bicíclico *8 α -hidroxi-15,16-epoxilabda-13(16),14-dien-12-ona* (C₂₀H₃₀O₃), $[\alpha]_D^{25} +16$ (CHCl₃, c 2.5 mg/mL), lit.³⁹ $[\alpha]_D^{25} +21.3$ (CHCl₃, c 2.5 mg/mL) IR (KBr) cm⁻¹ (Espectro 5): 3555, 1652, 1461, 1156, 1034, 828, **EM-IE** (70 eV), *m/z* (intensidad relativa) (Espectro 6). 318 [M⁺] (21), 300 (18), 285 (9), 257 (19), 215 (11), 177 (64), 137 (32), 124 (53), 109 (30), 95 (100), 69 (53), 55 (28), 43 (18). **RMN** ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) (integral, multiplicidad, *J* (Hz), asignación) (Espectro 7). 8.10 (1H, t, *J* = 0.9, H-16), 7.43 (1H, t, *J* = 1.5, H-15), 6.78 (1H, dd, *J* = 1.8, 0.6 Hz, H-14), 2.80 (1H, dd, *J* = 17.4, 4.8 Hz, H-11a) 2.86 (1H, dd, *J* = 17.4, 4.8 Hz, H-11b), 2.13 (1H, t, *J* = 4.8 Hz, H-9), 1.15 (3H, s, CH₃-17), 0.88 (3H, s, CH₃-18), 0.86 (3H, s, CH₃-19), 0.80 (3H, s, CH₃-20). **RMN** ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) (asignación)

(Espectro 8): 15.7 CH₃, 18.4 CH₂, 20.6 CH₂, 21.4 CH₃, 23.3 CH₃, 33.2 C, 33.3 CH₃, 36.3 CH₂, 38.6 C, 39.4 CH₂, 41.7 CH₂, 44.7 CH₂, 55.8 CH, 55,9 CH, 73.1 (C, C-8), 108.9 (CH, C-14), 127.7 (CH, C-13), 144.1 (CH, C-15), 147.0 (CH, C-16), 196.3 (C, C-12).

4.3.3 Aislamiento del diterpeno 35 *15,16-epoxilabda-13(16),14-dien-8 α -ol*



Al grupo 2 de la primera columna (8.7 g) se le realizó una separación por ccv en la cual se utilizó una columna de vidrio de 5.5 cm de diámetro empacada con sílica gel hasta una altura de 5 cm, posteriormente se depositó la muestra absorbida en celita y se llevo a cabo la elución con mezclas de hexano/AcOEt (Tabla 5). Se colectaron fracciones de 25 mL.

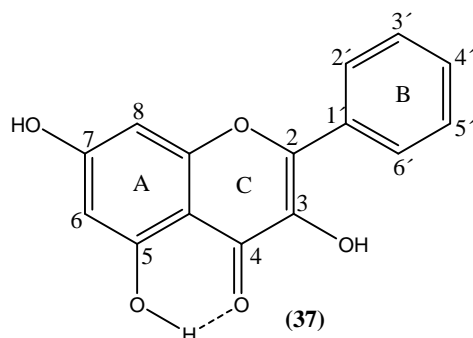
Tabla 5. Cromatografía (ccv) del grupo 2 de la primera columna.

Fracciones	Mezcla % (hexano/ AcOEt)	Volumen total (mL)
1-15	100/0	400
16-34	98/2	400
35-54	96/4	400
55-74	94/6	400
75-94	92/8	400
95-113	90/10	400
114-125	85/15	200
126-138	50/50	300

De las fracciones 49-81 (polaridad 4 a 8 % AcOEt/hexano) se obtuvo un producto sólido cristalino ligeramente amarillo en forma de paralelepipedo (2.5 g), con un punto de fusión de 66-68 °C y se identificó como el diterpeno bicíclico **15,16-epoxilabda-13(16),14-dien-8 α -ol** (C₂₀H₃₂O₂). $[\alpha]_D^{20}$, -0.8 (CHCl₃; c 5 mg/mL); lit.⁴⁰ $[\alpha]_D^{20}$, 0.8 (CHCl₃; c 0.44 mg/mL); **IR** (KBr) cm⁻¹ (Espectro 9): 3330 (OH), 2923, 2869, 1458 y 722 (CH₂), 2997, 2870 y 1388 (CH₃), 1500 y 872 (furano), 1122; **EM-IE** (70 eV), *m/z* (intensidad relativa) (Espectro 10): 286 [M-18] [M-H₂O], (16), 271 (16), 192 (68), 177 (83), 163 (16) 149 (33), 133 (38), 123 (43), 109 (37), 95 (51), 82 (61), 81 (100), 69 (64), 55 (36), 43 (30); **RMN** ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) (integral, multiplicidad, *J* (Hz), asignación) (Espectro 11): 7.27 (1H, t, *J* = 1.6, H-16), 7.25 (1H, dd, H-15), 6.31 (1H, dd, *J* = 0.8 Hz, H-14), 2.52 (2H, m, 12a y 12b), 1.88 (1H, dt, *J* = 2.8, 12.0 Hz, H-7a), 1.16 (3H, s, CH₃-17), 0.89 (3H, s, CH₃-18), 0.82 (3H, s, CH₃-19), 0.81 (3H, s, CH₃-20). **RMN** ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) (Espectro 12): δ 15.5 CH₃, 18.5 CH₂, 20.6 CH₂, 21.5 CH₃, 23.9 CH₃, 26.0 CH₂, 28.0 CH₂, 33.3 C, 33.4 CH₃, 39.2 C, 39.8 CH₂, 42.0 CH₂, 44.7 CH₂, 56.1 CH, 61.4 CH, 74.1 (C, C-8), 111.1 (CH, C-14), 125.6 (CH, C-13) 138.8 (CH, C-15) 142.6 (CH, C-16).

Se juntaron las fracciones 90 a 105 (polaridad 10 a 12.5 % AcOEt/hexano) y una vez eliminado el disolvente, se les realizaron recristalizaciones sucesivas por par de disolventes (hexano/acetona) hasta obtener un producto puro (100 mg). Se identificó como la flavanona **3-acetiloxy-5,7-dihidroxi flavanona** (3 acetato de la pinobanksina) (C₁₇H₁₄O₆), son cristales incoloros en forma de aguja con punto de fusión 173-175 °C; p.f. lit.⁴¹ 173-175 °C. $[\alpha]_D^{25} +47.2$ (MeOH. c 2.5 mg/mL), lit.⁴¹ $[\alpha]_D^{25} +42$ (MeOH. c 1.7 mg/mL) **IR** (KBr) cm⁻¹ (Espectro 13): 3161, 1763, 1643, 1500, 1171, 1218, 1288. **EM-IE** (70 eV), *m/z* (intensidad relativa) (Espectro 14) 314 [M⁺] (15), 272 (18), 254 (96), 243 (17), 226 (9), 208 (8), 195 (10), 166 (27), 153 (100), 120 (68), 118 (27), 91 (35), 77 (19), 69 (18), 43 (19). **RMN ¹H** (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) (integral, multiplicidad, *J*, asignación) (Espectro 15): δ 11.47 (1H, s, OH en C-5), 7.45 (5H, m, H-2'-H-6'), 6.29 (1H, s, OH en C-7), 6.05 (1H, d, *J* = 2 Hz, H-8), 6.01 (1H, d, *J* = 2 Hz, H-6), 5.82 (1H, d, *J* = 12 Hz, H-3), 5.36 (1H, d, *J* = 12 Hz, H-2), 2.03 (3H, s, CH₃ de acetilo). **RMN ¹³C** (100 MHz CDCl₃) δ (ppm) (asignación) (Espectro 16): 20.3 (CH₃), 72.5 (CH, C-3), 81.3 (CH, C-2), 95.9 (CH, C-8), 97.4 (CH, C-6), 101.9 (C, C-10), 127.4 (CH, C-3' y C-5'), 128.8 (CH, C-4'), 129.6 (CH, C-2' y C-6'), 135 (C, C-1'), 162.5 (C, C-9) 164.2 (C, C-5), 165.3 (C, C-7), 169.6 (C, C=O de acetilo), 191.6 (C, C-4).

4.3.5 Aislamiento del 5,7-dihidroxi flavonol 37 (galangina)



A las fracciones 116 a 139 (polaridad 14 a 18 % AcOEt/hexano) de la purificación del grupo 3 se le realizó una ccv, en la cual se utilizó una columna de 3 cm de diámetro y se empaco al vacío con 6 cm de sílica. La muestra se adsorbió en celita y se depositó en la columna. Para la elución se utilizaron mezclas de AcOEt/hexano en un orden de polaridad creciente, se colectaron fracciones de 20 a 25 mL (Tabla 7).

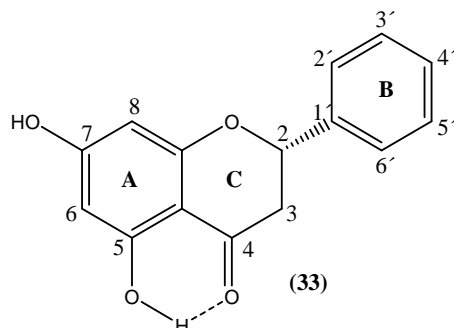
Tabla 7. Cromatografía (ccv) de las fracciones 116 a 139 del grupo 3
Fracciones Mezcla % (hexano/AcOEt) Volumen total (mL)

Fracciones	Mezcla % (hexano/AcOEt)	Volumen total (mL)
1-4	100/0	200
5-12	95/5	200
13-20	92.5/7.5	200
21-64	90/10	750
65-74	87.5/12.5	200
75-83	85/5	200
84-91	50/50	200
92-97	0/100	150

Se reunieron las fracciones 36 a 45 (polaridad 90/10 hexano/AcOEt) y luego de evaporar el disolvente, se sometieron a sucesivas recristalizaciones por par de disolventes (hexano/acetona). Se obtuvo un producto sólido cristalino con forma de agujas de color amarillo (80 mg) con punto de fusión de 219-221 °C. Se identificó como el **5,7-dihidroxi flavonol** (galangina).⁴² (C₁₅H₁₀O₅). **IR** (KBr) cm⁻¹ (Espectro 17): 3310, 3150, 1659, 1565, 1611, 1316, 1177. **EM-IE** (70 eV), m/z (intensidad relativa) (Espectro 18): 270 [M⁺] (100), 269 (52), 242 (17), 213 (12), 197 (5), 168 (6), 153 (4), 135 (6), 121 (9), 105 (12), 91 (11), 77 (16), 69 (8), 51 (4). **RMN ¹H** (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) (integral, multiplicidad, *J*, asignación) (Espectro 19): 11.85 (1H, s, OH en C-5), 10.01 (1H, s, OH en C-7), 8.1 (2H, dd, *J* = 8.0, 1.2 Hz, H-2', H-6'), 7.64 (1H, s, OH en C-3), 7.36 (3H, m, H-3', H-4', H-5'), 6.35 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-8), 6.21 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-6). **RMN ¹³C** (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) (asignación) (Espectro 20): 93.5 (CH, C-8), 98.5 (CH, C-6), 102.9 (C, C-10), 127.0 (CH, C-3' y C-5'), 127.9 (CH, C-2' y C-6'), 129.3 (CH, C-4'), 130.6 (C, C-3), 136.3 (C, C-1'), 144.6 (C, C-2), 156.5 (C, C-9), 160.5 (C, C-5), 164.1 (C, C-7), 175.3 (C, C-4).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Obtención de la 5,7-dihidroxi flavanona 33 (pinocembrina)



En el espectro de infrarrojo (Espectro 1) de la pinocembrina se observan las siguientes señales características: 3091 cm^{-1} una banda ancha, se asigna a OH; 1635 cm^{-1} una banda que se asigna al C=O de la γ -pirona y en 1600 cm^{-1} una banda que se asigna a los enlaces C-C de anillo aromático, 1300 y 1169 cm^{-1} bandas finas que se asignan a enlaces C-O de fenol.

En el espectro de masas (Espectro 2) obtenido por impacto electrónico se obtiene un ion molecular M^+ en m/z 256 el cual corresponde con la masa esperada para este compuesto de fórmula molecular $C_{15}H_{12}O_4$. El fragmento en m/z 179 confirma la pérdida de anillo bencénico $[M-77]^+$.

En el espectro de RMN ^1H (Espectro 3) la señal que se observa en 7.42 ppm integra para 5 protones y se asigna a los hidrógenos aromáticos H-2'-H-6' del anillo B monosustituido de esta flavanona. También en 6.03 ppm y 6.02 ppm hay dos señales dobles que se identifican como un sistema AB donde cada una de las señales integra para un hidrógeno, la constante de acoplamiento entre estos dos protones es 2.0 Hz, este valor es característico de hidrógenos en posición *meta*.

La señal de 6.03 ppm se asigna a H-8, mientras que la señal en 6.02 ppm se asigna a H-6 del anillo A. El desplazamiento químico que ambas señales presentan a campo alto con respecto al benceno se explica por el efecto de protección de los oxígenos en posición *orto*, pero el mayor efecto de protección de los dos grupos OH en posición *orto* a H-6 provoca que la señal de este hidrógeno se encuentre ligeramente a campo más alto que la señal de H-8 que sólo tiene la protección en posiciones *orto* de un grupo OH y un grupo OR.

Se observan también tres señales dobles de dobles (dd) en 5.40, 3.05 y 2.78 ppm que se encuentran acopladas entre sí, este sistema de acoplamiento se conoce como sistema ABX. El desplazamiento químico de la señal en 5.40 ppm es característico de un hidrógeno geminal a un oxígeno y a un anillo aromático, por lo que esta señal se asigna a H-2. La señal en 3.05 ppm presenta constantes de acoplamiento de 17.2 y 12.8 Hz mientras que la señal en 2.78 ppm tiene constantes de acoplamiento de 17.2 y 3.2 Hz. Ambas señales se asignan a los hidrógenos geminales del carbono 3 y conforman la parte AB del sistema de acoplamiento ABX; el acoplamiento entre ambas señales implica una $J = 17.2$ Hz, valor característico de una constante de acoplamiento entre dos hidrógenos geminales.

El acoplamiento que presenta la señal en 5.40 ppm asignada a H-2 y la señal en 3.05 ppm asignada a H-3b ($J = 12.8$ Hz) implica un acoplamiento característico entre hidrógenos vecinos que se encuentran en una conformación *anti*-periplanar (con un ángulo diedro de aproximadamente 180°). De este modo se establece que

ambos hidrógenos se encuentran en posiciones pseudoaxiales en el anillo C de la pinocembrina. De la misma forma el acoplamiento de 3.2 Hz entre H-2 (5.40 ppm) y la señal en 2.78 ppm asignada a H-3a indica que la conformación de ambos hidrógenos es de naturaleza *syn*-clinal (conformación gauche), con un ángulo diedro de aproximadamente 60° (Figura 7).

A partir del análisis de las constantes de acoplamiento se puede establecer que el H-2 se encuentra en posición pseudoaxial, mientras que el grupo arilo se encuentra en posición pseudoecuatorial, lo cual es congruente con previos estudios estructurales.⁴³

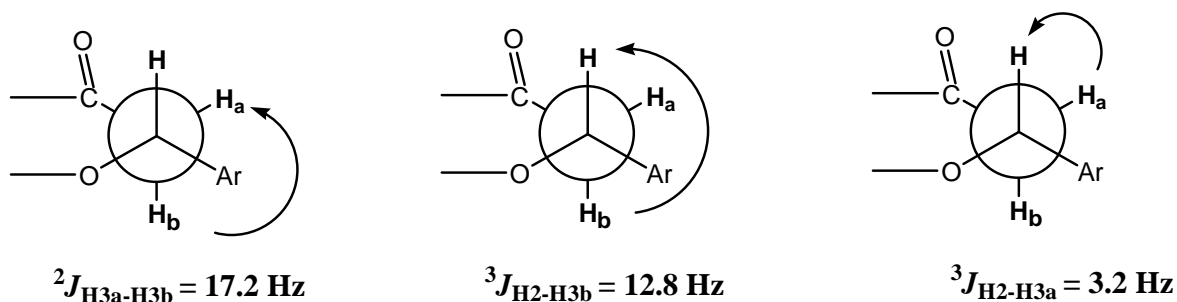


Figura 7. Constantes de acoplamiento del sistema ABX de la flavanona pinocembrina.

En el espectro también se observan dos señales simples que se asignan a los hidrógenos de los grupos OH del anillo A de la pinocembrina. Una de las señales simples se observa en 12.03 ppm e integra para un hidrógeno, esta señal se asigna al hidrógeno del OH unido a C-5, este hidrógeno se encuentra en forma quelatada, es decir, que interacciona electrostáticamente con el oxígeno del grupo carbonilo de C-4, esto provoca un efecto de desprotección sobre dicho hidrógeno, lo cual da lugar a que el desplazamiento químico de la señal se encuentre a campo muy bajo. El otro singulete se observa en 10.0 ppm igualmente integra para un hidrógeno, esta señal se asigna al grupo OH que está unido a C-7.

En el espectro de RMN ^{13}C (Espectro 4) se observan 13 señales, sin embargo por la intensidad de dos de ellas (128.6 y 126.0 ppm) y en concordancia con la molécula propuesta, corresponden a dos carbonos equivalentes cada una, por lo tanto se tienen señales para una molécula con 15 carbonos. En la zona de campo bajo a 195 ppm hay una señal que es característica de un carbono de carbonilo de cetona conjugada, de modo que esta señal se asigna a C-4. También se observan dos señales de carbono alifático (sp^3), una en 78.8 ppm, característica de un carbono unido a un átomo de oxígeno (base oxigenada), que se asigna por lo tanto a C-2 (CH), y la otra señal en 43.2 ppm se asigna a C-3 (CH_2).

Las demás señales corresponden a carbonos aromáticos (sp^2) de los anillos A y B, dentro de estas señales se pueden distinguir tres grupos. 1) Aquellos carbonos aromáticos que están unidos directamente a función oxigenada, como son C-7 (166.9 ppm), C-5 (164.1 ppm) y C-9 (162.8 ppm). Estas señales

presentan un desplazamiento a campo bajo con respecto a las otras debido a la desprotección que sufren por efecto inductivo, ya que los átomos que las generan están unidos directamente a un átomo electronegativo en este caso el oxígeno. 2) Las señales de los carbonos sp^2 no protonados C-1' y C-10 se observan en 138.5 ppm y 102.3 ppm respectivamente, donde C-10 se encuentra a campo alto por el efecto de protección del carbonilo en C-4, así como el efecto de protección de los oxígenos en posiciones *orto* (OH en C-5 y OR en C-9) y *para* (OH en C-7). 3) Por último, a campo alto con respecto a las anteriores aparecen las señales de los carbonos sp^2 unidos a hidrógeno C-6 (96.68 ppm), C-8 (95.52 ppm), C-4' (128.56 ppm) y los carbonos equivalentes C-2'/C-6' (128.62 ppm) y C-3'/C-5' (125.97 ppm).

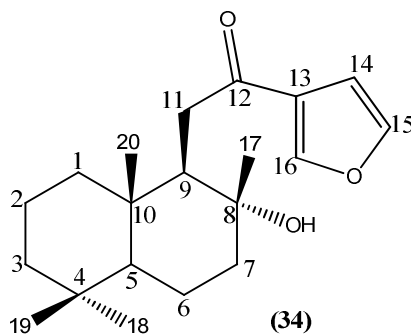
Con los datos anteriores el compuesto se caracterizó como pinocembrina, pero al haber un centro quiral en la molécula, el cual corresponde al carbono 2 (anillo C), se tienen dos posibilidades configuracionales es decir, se puede tener cualquiera de los enantiómeros ya sea *R* o *S*. Debido a que ya existen reportes³⁷ que incluyen datos físicos para ambos enantiómeros de la pinocembrina, solo fue necesario comparar el valor de la rotación específica del producto obtenido con los descritos previamente para determinar a cuál de los enantiómeros corresponde. En este caso se obtuvo un valor de -45° mismo que corresponde al enantiómero *S*.⁴⁴

Tabla 8. Datos espectroscópicos de RMN de ^1H de la pinocembrina.

Desplazamiento químico en ppm (δ_{H})	Asignación	Multiplicidad	Integral
2.78	3a	dd, $J = 17.2, 3.0$ Hz	1
3.05	3b	dd, $J = 17.2, 12.8$ Hz	1
5.40	2	dd, $J = 12.8, 3.2$ Hz	1
6.02	6	d, $J = 2.0$ Hz	1
6.03	8	d, $J = 2.0$ Hz	1
7.42	2'-6'	m	5
10.00	7-OH	s	1
12.03	5-OH	s	1

400 MHz, CDCl_3

5.2 Obtención del diterpeno **34** *8 α -hidroxi-15,16-epoxilabda-13(16), 14-dien-12-ona*.



Este compuesto se aisló como cristales blancos en forma de agujas y no ha sido reportado en la literatura como producto aislado de propóleos, ha sido obtenido de la planta chilena *Baccharis santelisis*.³⁹ También el compuesto **34** ha sido obtenido como intermediario en la síntesis de chinensina a partir de (+)-sclareólida,³⁸ un producto enantioméricamente puro.

En el espectro de infrarrojo (Espectro 5) de este diterpeno labdánico se observa una banda fina en 3555 cm^{-1} la cual se asigna para OH, la señal de 1652 cm^{-1} se asigna al grupo carbonilo (C=O) conjugado, las señales en $1461, 828\text{ cm}^{-1}$ se asignan al anillo aromático de furano, en 1034 cm^{-1} para el enlace C-O-C del furano, y en 1156 cm^{-1} una banda fina que se asigna al enlace C-O de alcohol.

El espectro de masas (Espectro 6) de este diterpeno muestra un ión molecular $[M^+]$ en m/z 318 el cual corresponde con una fórmula $C_{20}H_{30}O_3$ y con la masa esperada para este compuesto. El pico base del espectro a m/z 95, se asigna al fragmento del furano unido al carbonilo $[C_5H_3O_2]$.

En el espectro de RMN de ^1H (Espectro 7) hay cuatro señales simples que integran para 3 hidrógenos cada una, en 0.80, 0.86, 0.88, 1.15 ppm, éstas corresponden a los metilos 20, 19, 18, y 17 respectivamente.^{40,48} En 2.79 y 2.86 ppm se observan dos señales dobles de dobles traslapadas las cuales corresponden a los dos hidrógenos diasterotópicos del carbono 11 y en 2.13 ppm se observa un triplete que corresponde al hidrógeno del carbono 9, estas tres señales conforman un sistema de acoplamiento ABX. Los dos dobles de dobles que se observan alrededor de 2.83 ppm integran para dos protones y tienen constantes de acoplamiento de 4.8 y 17.4 Hz, el desplazamiento químico de estas señales se debe a que el carbono 11 está unido por un lado a un grupo carbonilo conjugado con el anillo de furano y por otro lado está unido a un metino (CH) quiral. Estas dos señales dobles de dobles conforman la parte AB del sistema de acoplamiento ABX; una de las constantes de acoplamiento de estas dos señales es de 17.1 Hz con lo que se confirma que pertenecen a dos hidrógenos geminales.

En 6.78 ppm se observa una señal doble de dobles que integra para un protón y se asigna a H-14; en 8.1 ppm se observa un doble de dobles que integra también para un protón y que no se alcanza a resolver adecuadamente, se asigna a H-16, y en 7.43 ppm se observa una señal triple que de igual forma integra para un protón, esta señal se asigna a H-15. El desplazamiento químico de estos tres hidrógenos se debe a la presencia del grupo carbonilo que se encuentra conjugado con el anillo de furano, éste carbonilo es capaz de extender la

conjugación del furano y con ello generar un efecto de desprotección; también la anisotropía del carbonilo genera un efecto desapantallante sobre los hidrógenos del furano, todo esto genera que las señales del anillo aromático aparezcan a campo más bajo que aquellas de un grupo furano no conjugado.

En el espectro de RMN de ^{13}C (Espectro 8) de este labdano (**34**) hay 20 señales, una de ellas se observa 196.3 ppm y por su desplazamiento corresponde a un carbonilo de cetona α,β no saturado, la única forma de que esto sea posible es que el carbono 12 se encuentre oxidado a cetona; también se observan cuatro señales que corresponden a los carbonos de furano, 108.9 ppm (C-14), 127.7 ppm (C-13), 144.1 ppm (C-15), 147.0 ppm (C-16). La señal de 73.1 ppm corresponde al carbono 8 el cual está unido a un grupo hidroxilo lo que ocasiona su desplazamiento a campo bajo.

Con los datos descritos anteriormente se establece que el producto es un diterpeno con esqueleto de labdano con la estereoquímica relativa del carbono 8 en la que el metilo-17 es axial y el hidroxilo es ecuatorial, por lo que queda por determinar si el esqueleto corresponde a la serie del labdano o a la del *ent*-labdano.

La estereoquímica que se asignó al carbono 8 de **34** es *R*, esto se pudo determinar por comparación de su valor de rotación específica $[\alpha]_{\text{D}}^{25} +16$ (CHCl_3 , *c* 2.5 mg/mL) con el producto obtenido en la síntesis del producto natural chinensina $[\alpha]_{\text{D}}^{25} +21.3$ (CHCl_3 , *c* 2.5 mg/mL), a partir de una lactona enantioméricamente

pura y con estereoquímica conocida llamada (+)-sclareolida (Figura 8).³⁸ En ésta reacción el centro quiral C-8 de la (+)-sclareolida no es afectado en el transcurso de la adición de furano a la γ -lactona (Figura 8), por lo tanto el producto que se obtiene presenta el grupo hidroxilo en posición α -ecuatorial, y el grupo metilo en posición β -axial. De este modo como la rotación específica ($[\alpha]^{25}_D +16$) de **34** aislado del propóleo es similar a la determinada para el producto de reacción ($[\alpha]^{25}_D +21.3$)³⁸, se concluye que se trata del mismo compuesto, es decir, que los centro quirales tienen la misma estereoquímica absoluta.

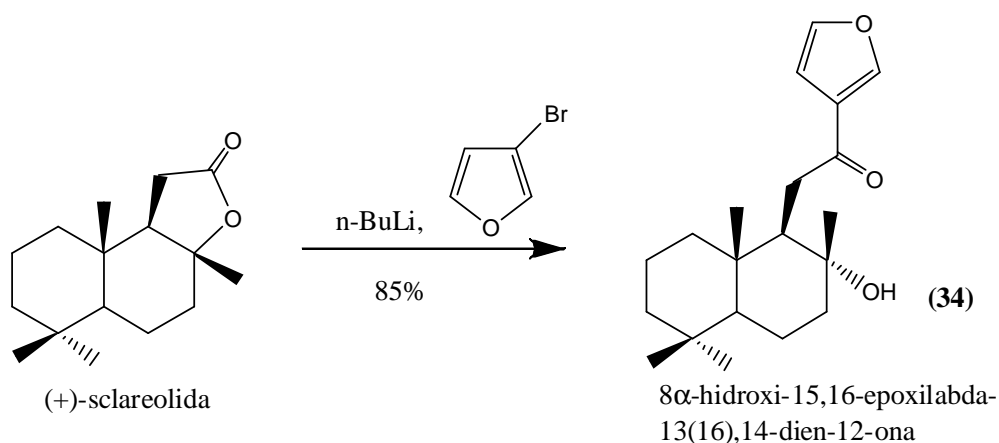


Figura 8. Reacción de obtención del diterpeno **34** a partir de (+)-sclareolida.³⁸

El resultado que se obtuvo de la rotación específica del producto natural difiere en 5° del descrito para **34**.³⁸ Esta pequeña diferencia puede deberse a impurezas o bien a errores en el peso de la muestra. Sin embargo, en este trabajo se tiene la certeza de que no hubo error al obtener el peso de la muestra y se repitió dos veces la determinación de la rotación óptica y en ambos casos se obtuvo el mismo

resultado. También se tiene la certeza de que el producto se encuentra 100 % puro, ya que se analizó por cromatografía de líquidos de alta eficiencia acoplado a un detector de masas CLAE-MS (Figura 9) donde se obtienen dos iones, uno de m/z 341 que corresponde a $[M+23]^+$ (C_{20},H_{30},O_3+Na) y otro de m/z 659.5 que corresponde al dímero del compuesto **34** más una contribución de 23 unidades por parte de sodio; se analizó también con un detector dual de absorbancia CLAE-UV donde se observa un solo producto en un tiempo de retención de 11.28 minutos y que absorbe en 210 nm (Figura 10).

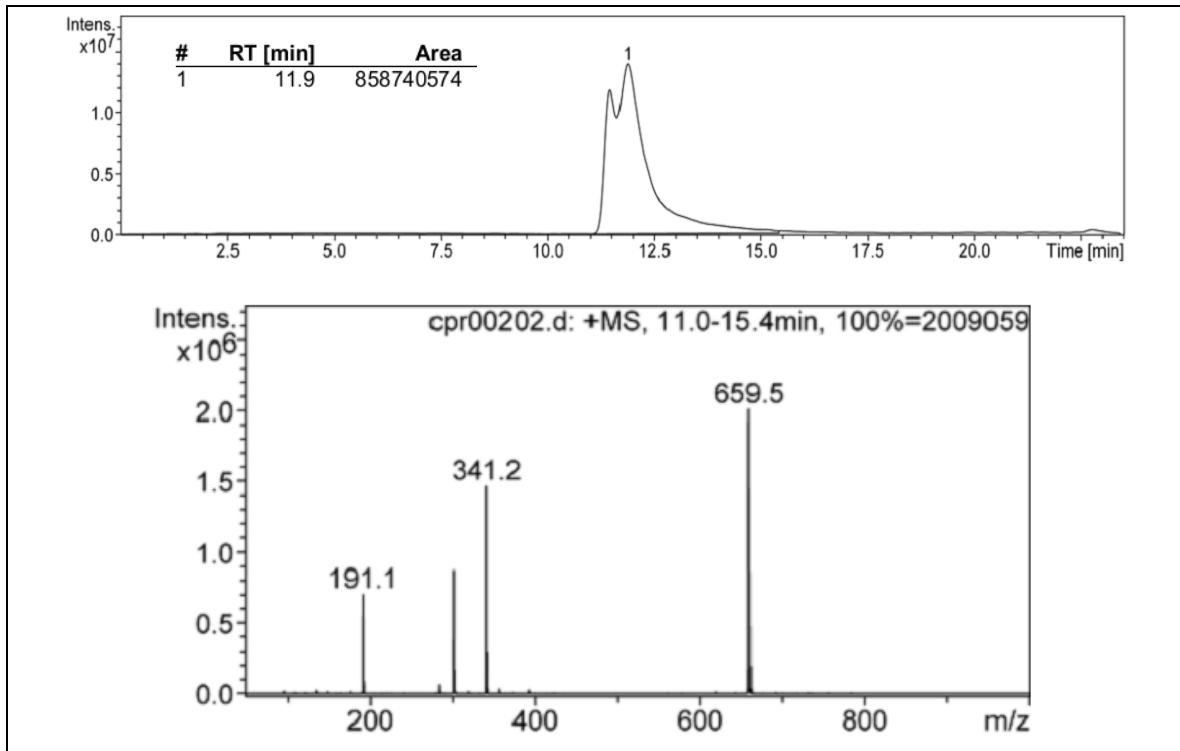


Figura 9. CLAE-MS de cetofurolobdano

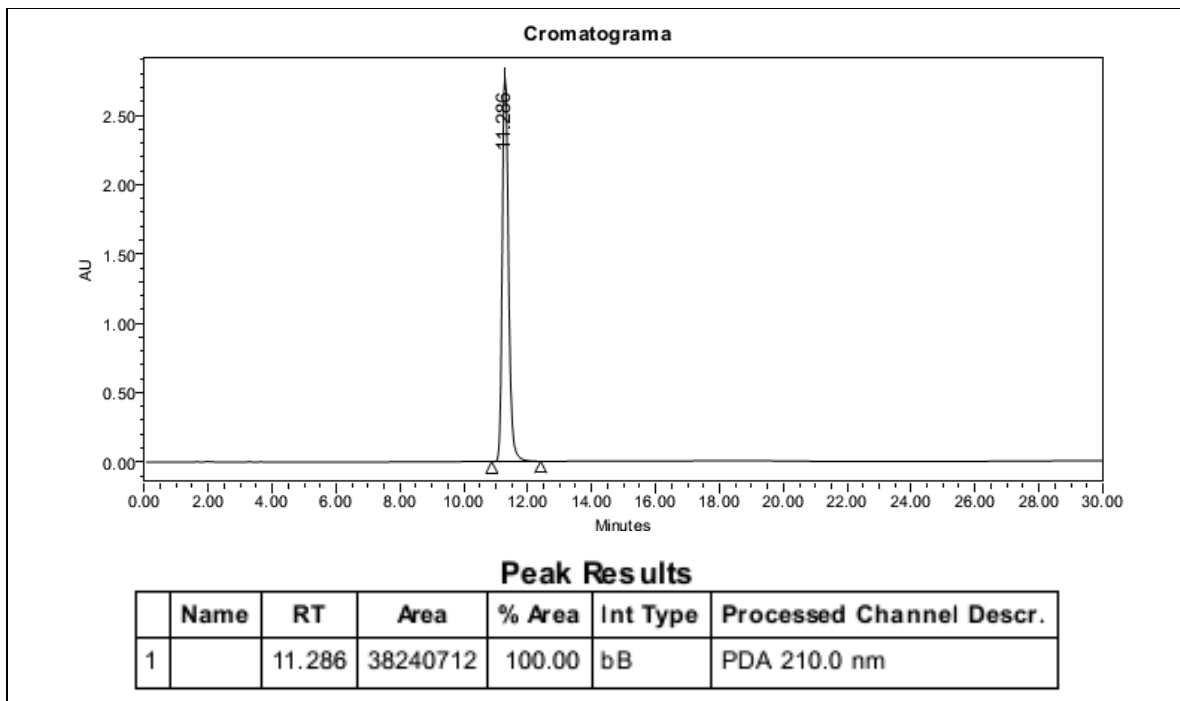


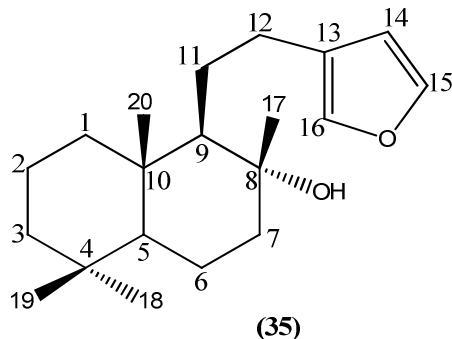
Figura 10. CLAE-UV de cetofurolobdano

Tabla 9. Datos espectroscópicos de RMN de ^1H del diterpeno **34**

Desplazamiento químico en ppm (δ_{H})	Asignación	Multiplicidad	Integral
0.80	CH ₃ -20	s	3
0.86	CH ₃ -19	s	3
0.88	CH ₃ -18	s	3
1.15	CH ₃ -17	s	3
2.13	H-9	t	1
2.86	H-11b	dd	1
2.80	H-11a	dd	1
6.78	H-14	dd	1
7.43	H-15	t	1
8.10	H-16	t	1

400 MHz, CDCl₃

5.3 Obtención del diterpeno 35 *15,16-epoxilabda-13(16),14-dien-8 α -ol*



Este compuesto se aisló como cristales ligeramente amarillos con forma de paralelepípedo y no existen informes de haber sido aislado previamente de muestras de propóleo, el compuesto solamente ha sido reportado en dos ocasiones, una en 2006 donde lo aislaron en muy poca cantidad y en forma de aceite de una planta llamada *Acalypha plicata*⁴⁰ y otro en 1987 donde se obtienen 3.3 mg como subproducto en una ruta de síntesis.⁴⁴

En el espectro de infrarrojo (Espectro 9) de este producto se observa una banda ancha en 3330 cm^{-1} que se asigna a OH, las bandas en 1459 y 872 cm^{-1} se asignan al anillo aromático de furano, la banda en 1023 cm^{-1} se asigna al fragmento C-O-C del furano, y la banda en 1122 cm^{-1} se asigna a enlace C-O de alcohol.

En el espectro de masas (Espectro 10) que se obtuvo por la técnica de impacto electrónico se observa un ion $[M^+ - 18]$ con una m/z 286, el cual corresponde con la pérdida de agua $[M - H_2O]^+$ del labdano. El pico base del espectro a m/z 81 $[C_5H_5O]^+$ confirma la presencia del furano.

En el espectro de RMN ^1H (Espectro 11) se puede observar que la suma de las integrales da para un total de 32 hidrógenos presentes en el labdano. En 0.81 y 0.82 ppm hay dos señales simples que corresponden a los metilos 20 y 19 respectivamente, otra señal simple en 0.89 ppm corresponde al metilo 18 y uno más en 1.16 ppm que se asigna al metilo 17, este último presenta un desplazamiento químico a campo más bajo que los otros tres, ya que el grupo OH que se encuentra a dos enlaces de distancia provoca un efecto de desprotección sobre dicho metilo. En 2.52 ppm se observa una señal múltiple que integra para dos protones y el desplazamiento que presenta se debe al efecto de desprotección del grupo furano, esta señal se asigna a los dos hidrógenos geminales del carbono 12.

En 6.31 ppm se observa una señal que integra para un protón pero no se resuelve adecuadamente, el desplazamiento químico que presenta es característico de un hidrógeno en posición 3 o 4 de un anillo de furano, por lo tanto, esta señal se asigna al hidrógeno que se encuentra en el carbono 14 del esqueleto de labdano.

En 7.25 ppm se observa una señal doble de dobles que integra para un protón y que se asigna al hidrógeno del carbono 16, las constantes de acoplamiento que presenta son $J = 0.8$ y 1.2 Hz, la primera pertenece al acoplamiento a 4 enlaces de distancia con el hidrógeno del carbono 14 y la segunda constante pertenece al acoplamiento a través del oxígeno con el hidrógeno del carbono 15, también a 4 enlaces de distancia. La señal en 7.35 ppm es una señal triple ($J = 1.6$ Hz) y se

asigna al hidrógeno 15 del anillo furánico. Las señales de los hidrógenos del furano en posición 2 y 5 aparecen a campo más bajo que el de la posición 3 debido a la presencia del oxígeno el cual provoca un efecto de desprotección en dichos hidrógenos.

En el espectro de RMN de ^{13}C (Espectro 12) se observan 20 señales lo cual es congruente con la estructura propuesta del diterpeno. En 74.1 ppm se observa una señal que corresponde a un carbono unido a un átomo de oxígeno, y la intensidad pequeña de la señal indica que se trata de un carbono no unido a hidrógenos, esto se confirmó con la ayuda del experimento DEPT, por lo que la señal se asigna a C-8 del labdano. En la zona de carbonos sp^2 se observan 4 señales, 111.1 ppm (C-14), 125.6 ppm (C-13), 138.8 ppm (C-15) y 142.0 ppm (C-16), estas corresponden a los carbonos del anillo de furano.

Este compuesto se recristalizó de heptano frío y se obtuvieron cristales adecuados para su análisis por difracción de rayos X, donde se puede observar que en efecto se tiene un diterpeno con esqueleto de labdano (Figura 10). Bajo las condiciones en que se realizó el análisis de difracción de rayos X, solo se pudo obtener la estereoquímica relativa de los centros asimétricos de la molécula. Para determinar la estereoquímica absoluta, es necesario generar derivados con el uso de algún reactivo quiral, pero al tener un alcohol terciario se hace complicada la derivatización. Otra forma es conocer el valor de la rotación específica y compararlo con algún reporte previo del mismo producto del cual ya haya sido determinada su estereoquímica.

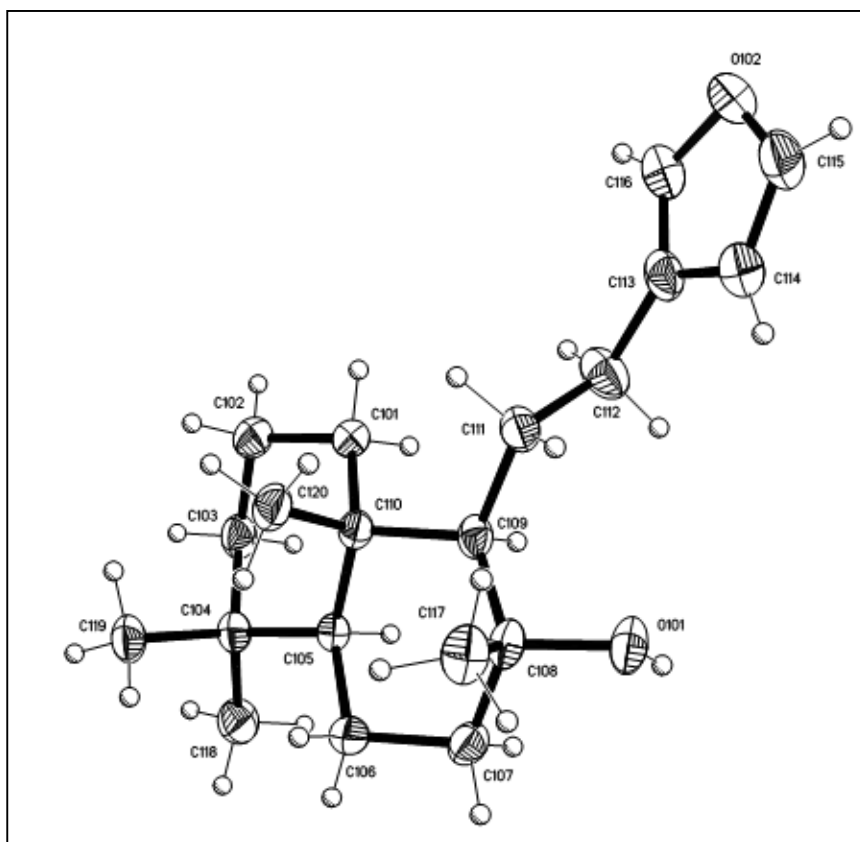


Figura 10. Estructura de **35** obtenida por difracción de rayos X de monocristal.

Tabla 10. Datos del cristal del diterpeno **35**

Formula empírica	$C_{20}H_{32}O_2$
Peso fórmula	304.46
Temperatura	123(2) K
Longitud de onda	0.71073 Å
Sistema cristalino	Monoclínico
Grupo especial	$P2_1$
Dimensiones de la celda unitaria	
a	10.1559(11) Å
b	28.739(3) Å
c	13.4040(15) Å
α	90°
β	110.511(2)°
γ	90°

Debido a que del análisis de la muestra de propóleo que se trabajó en la presente investigación se obtuvo el compuesto diterpénico **34** cuya estereoquímica absoluta fue determinada su en este trabajo, se asume que por provenir de la misma muestra de propóleo y por lo tanto del mismo tipo de vegetación, los compuestos labdánicos presentes en dicha muestra pertenecen a la misma serie, lo anterior es posible ya que se sabe que en una determinada zona o región del planeta, las plantas sintetizan solamente uno de los enantiómeros. Con lo anterior se puede proponer que el diterpeno **35** que se obtuvo en el presente trabajo pertenece a la serie del los labdanos (Figura 11a) $[\alpha]_D^{20}$, -0.8 (CHCl₃, c 5 mg/mL), y por lo tanto, el diterpeno que se aisló de *Acalypha plicata*⁴⁰ pertenece a la serie *ent*-labdano (Figura 11b), ya que presenta un valor de rotación específica de la misma magnitud pero de signo contrario $[\alpha]_D^{20}$, 0.8 (CHCl₃, c 0.44 mg/mL)⁴⁰ al que se obtuvo en este trabajo para **35**.

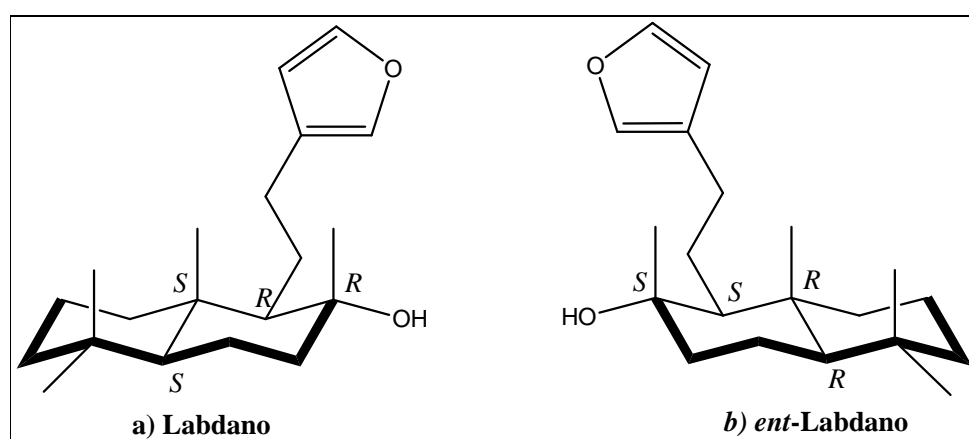


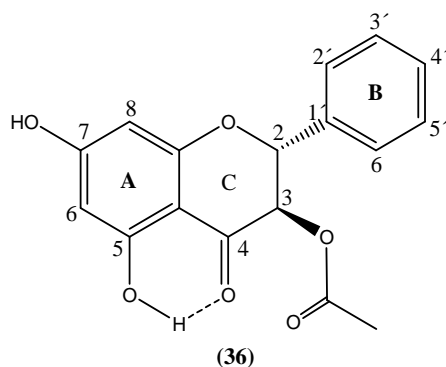
Figura 11. Estructuras de labdano y *ent*-labdano

Tabla 11. Datos espectroscópicos de RMN de ^1H del diterpeno **35**

Desplazamiento químico en ppm (δ_{H})	Asignación	Multiplicidad	Integral
0.81	CH ₃ -20	s	3
0.82	CH ₃ -19	s	3
0.89	CH ₃ -18	s	3
1.16	CH ₃ -17	s	3
2.53	H-12	m	2
6.31	H-14	dd	1
7.25	H-15	dd	1
7.27	H-16	t	1

400 MHz, CDCl₃

5.4 Obtención de la 3-acetyloxy-5,7-dihidroxi-flavanona **36** (3 acetato de la pinobanksina)



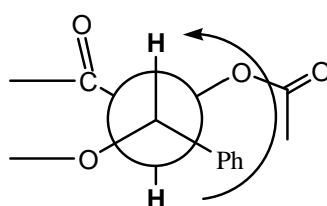
La estructura de la flavanona **36** es muy similar a la de la pinocembrina, la única diferencia estructural radica en el átomo de carbono 3 donde la pinocembrina tiene dos hidrógenos geminales mientras que **36** como su nombre lo indica tiene un sustituyente acetato.

En el espectro de infrarrojo (Espectro 13) de **36** se observan las siguientes señales: 3161 cm^{-1} una banda ancha que se asigna a los grupos hidroxilo, 1643 cm^{-1} se asigna al carbonilo de la γ -pirona, 1763 cm^{-1} se asigna a un grupo carbonilo de de éster, en 1500 cm^{-1} a enlaces C-C de anillo aromático, y en 1171, 1218, 1288, tres bandas finas que se asignan a enlace C-O de fenol.

En el espectro de masas (Espectro 14) obtenido por impacto electrónico se obtiene el ión molecular de m/z 314 $[M^+]$ el cual corresponde con la masa esperada para **36** ($C_{17}H_{14}O_6$). El ion a m/z 254 se asigna a la pérdida de ácido acético $[M-AcOH]$.

En el espectro de RMN de ^1H (Espectro 15) se observa una señal simple en 11.47 ppm e integra para un protón, este desplazamiento es característico de hidrógenos quelatados por lo que se asigna al hidrógeno del hidroxilo del carbono 5. Se observa además el mismo patrón de señales tanto en el anillo A como en el B que presenta la flavanona pinocembrina, es decir, una señal en 7.45 ppm que integra para 5 protones y se asigna a los hidrógenos aromáticos H-2'-H-6' del anillo B monosustituido; Dos señales dobles en 6.05 y 6.01 ppm que se identifican como un sistema AB, cada una de las señales integra para un hidrógeno, la constante de acoplamiento entre estos dos protones es de 2.0 Hz, valor característico de hidrógenos en posición *meta*. La señal de 6.05 ppm se asigna a H-8, mientras que la señal en 6.01 ppm se asigna a H-6. Se observan también dos señales dobles en 5.36 y 5.82 ppm, conformando otro sistema de acoplamiento AB. El desplazamiento químico de la señal en 5.82 ppm es característico de un hidrógeno geminal a un oxígeno y α a un grupo electroattractor como lo es un carbonilo, por lo tanto esta señal se asigna a H-3, la señal doble en 5.36 ppm, se asigna a H-2. En 2.03 ppm se observa una señal simple que integra para 3 protones y se asigna a los hidrógenos del metilo del grupo acetato unido a la posición 3 de la flavanona.

La constante de acoplamiento que presentan las señales asignadas a H-2 y H-3, (12.0 Hz) es característica de hidrógenos vecinos que se encuentran en una conformación *anti*-periplanar (con un ángulo diedro de aproximadamente 180°). De este modo se establece que para esta flavanona ambos hidrógenos se encuentran en posiciones pseudoaxiales en el anillo C (Figura 12).



$${}^3J_{\text{H}2\text{-H}3} = 12.0 \text{ Hz}$$

Figura 12. Constante de acoplamiento del sistema AB de la flavanona 3-AcO-pinobanksina.

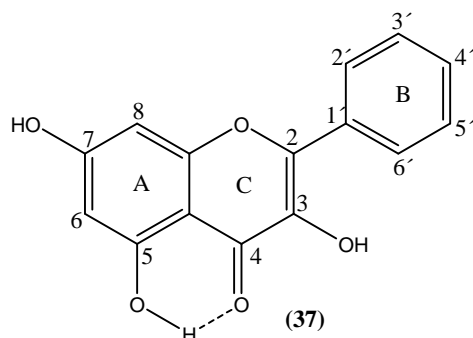
En el espectro de RMN de ^{13}C (Espectro 16) se pueden ver siete señales correspondientes a carbonos no unidos a hidrógenos, dos de ellas corresponden a grupos carbonilo, el de 191.6 ppm corresponde a cetona α, β insaturada y el de 169.6 ppm al carbonilo del éster. Nueve señales corresponden a carbonos unidos a un hidrógeno; y la señal en 20.3 ppm que se asigna al grupo metilo del acetato.

Tabla 12. Datos espectroscópicos de RMN de ^1H de la flavanona **36**.

Desplazamiento químico en ppm (δ_{H})	Asignación	Multiplicidad	Integral
2.03	CH_3	s	3
5.36	2	d, $J = 12.0$ Hz	1
5.82	3	d, $J = 12.0$ Hz	1
6.01	6	d, $J = 2.0$ Hz	1
6.05	8	d, $J = 2.0$ Hz	1
6.30	7-OH	s	1
7.45	2'-6'	m	5
11.47	5-OH	s	1

400 MHz, CDCl_3

5.5 Obtención del 5,7-dihidroxi flavonol 37 (galangina)



La estructura de este flavonol presenta una insaturación en los carbonos 2 y 3 del anillo C, esta insaturación hace la diferencia entre una flavona y una flavanona, en este caso al haber también un hidroxilo en el carbono 3 se clasifica como un flavonol.

En el espectro de infrarrojo (Espectro 17) se observan las siguientes bandas: 3310 cm^{-1} una banda fina y 3150 cm^{-1} una banda ancha que se asignan a los grupos hidroxilo, 1659 cm^{-1} se asigna al carbonilo de la γ -pirona, 1565 y 1611 cm^{-1} a la vibración C-C aromáticos, y 1316 , 1177 cm^{-1} se asignan a enlace C-O de fenol.

En el espectro de masas obtenido por la técnica de impacto electrónico (Espectro 18) se observa el ion molecular de m/z 270 [M^+], este valor corresponde con la masa esperada para el flavonol galangina ($C_{15}H_{10}O_5$).

El espectro de RMN de H^1 (Espectro 19) muestra el mismo sistema de acoplamiento AB del anillo A que aquel observado en los espectros de los

anteriores flavonoides **(33)** y **(36)**, es decir, dos señales dobles en 6.21 y 6.35 ppm que se asigna a H-6 y H-8 respectivamente, el valor de la constante de acoplamiento ($J = 2.0$ Hz) indica que los hidrógenos se encuentran en una posición relativa *meta*. En este mismo espectro se observa un desdoblamiento en las señales que corresponden a los hidrógenos del anillo B, esto se debe a la presencia del enlace doble entre los carbonos 2 y 3, lo que extiende la conjugación del anillo aromático y modifica los desplazamientos químicos de dichos hidrógenos. Se observa una señal que integra para 3 protones en 7.36 ppm que corresponde a los hidrógenos H-3', H-4' y H-5', y se observa una señal doble ancha que integra para dos protones y que se asigna a los hidrógenos H-2' e H-6', el desplazamiento a campo bajo de esta señal doble se debe a que los hidrógenos quedan desprotegidos por el carbonilo de C-4. En 7.64 ppm y en 10 ppm se observan dos señales simples que integran para un protón cada uno, estas señales se asignan a los hidrógenos de los grupos hidroxilo, de C-3 y de C-7, respectivamente. En 11.84 ppm se observa un singulete que corresponde al hidrógeno del hidroxilo del carbono 5 que se encuentra quelatado con el átomo de oxígeno del carbonilo del carbono 4.

En el espectro de RMN ^{13}C (Espectro 20) como en el caso de la flavanona pinocembrina se observan señales para 15 carbonos, pero en esta molécula todos los carbonos tienen hibridación (sp^2), en 175.29 ppm se tiene una señal que corresponde a un carbonilo y se asigna a C-4, su desplazamiento a campo más alto que aquel en la pinocembrina se debe a que se encuentra doblemente

conjugado, por un lado con el anillo aromático y por otro lado con el enlace doble entre los carbonos C-2 y C-3 en el anillo C. En 144.6 ppm se tiene una señal de carbono no unido a hidrogeno que se asigna a C-2, en la pinocembrina el C-2 es un carbono con hibridación sp^3 , pero en la galangina es un carbono con hibridación sp^2 de modo que su desplazamiento se modifica de 78.8 ppm a 144.6 ppm. Por otro lado, el carbono 3 en la pinocembrina tiene hibridación (sp^3) mientras que en la galangina es (sp^2) además está unido directamente a un grupo hidroxilo, por lo tanto su desplazamiento se modifica de 43.2 ppm a 130.6 ppm. Las demás señales de la galangina tienen prácticamente el mismo desplazamiento que sus correspondientes señales en la pinocembrina, ya que solamente hay diferencias en el anillo C entre ambos flavonoides.

Tabla 13. Datos espectroscópicos de RMN de 1H del flavonol **37**.

Desplazamiento químico ppm (δ_H)	Asignación	Multiplicidad	Integral
6.21	6	d, $J = 2.0$ Hz	1
6.35	8	d, $J = 2.0$ Hz	1
7.36	3' - 5'	m	3
7.64	3-OH	s	1
8.10	2', 6'	dd, $J = 1.2, 8.4$ Hz	2
10.00	7-OH	s	1
11.85	5-OH	s	1

400 MHz, $CDCl_3$

6. CONCLUSIONES

- Del extracto metanólico del propóleo estudiado se aislaron flavonoides (1.6%) y diterpenos (4.6%) en una buena cantidad, lo que permitirá llevar a cabo estudios de actividad biológica.
- Se aislaron dos diterpenos que poseen un esqueleto de labdano, éstos no han sido descritos previamente como componentes de otras muestras de propóleo.
- Se concluye que el diterpeno **34** corresponden al enantiomeros *R* en el carbono 8 del esqueleto base de labdano, lo anterior se pudo corroborar con datos de rotación específica y con reportes previos.³⁸
- Se propone que el diterpeno **35** también tiene configuración *R* en el carbono 8 del esqueleto de labdano, ya que ambos compuestos provienen del mismo tipo de vegetación.
- Se aislaron y purificaron 3 flavonoides, uno de ellos se identificó como el flavonol galangina (**37**)⁴² y los dos restantes como las flavanonas 3 acetato de la pinobanksina (**36**)⁴¹ y pinocembrina (**33**)³⁷.
- La muestra de propóleo negro comercial de la región de Zacatecas posee compuestos fenólicos y diterpenos labdánicos con potencial actividad biológica ya que los flavonoides han mostrado en reportes previos^{25,45,46,47} tener actividad como antioxidantes, antimicrobianos, antiinflamatorios y la galangina, además ha mostrado tener actividad sobre líneas celulares de leucemia.¹⁰

- Este trabajo aporta información valiosa para los apicultores que comercializan los propóleos de la misma región de Zacatecas que éste, ya que los compuestos encontrados pueden justificar su uso en el tratamiento de enfermedades respiratorias.

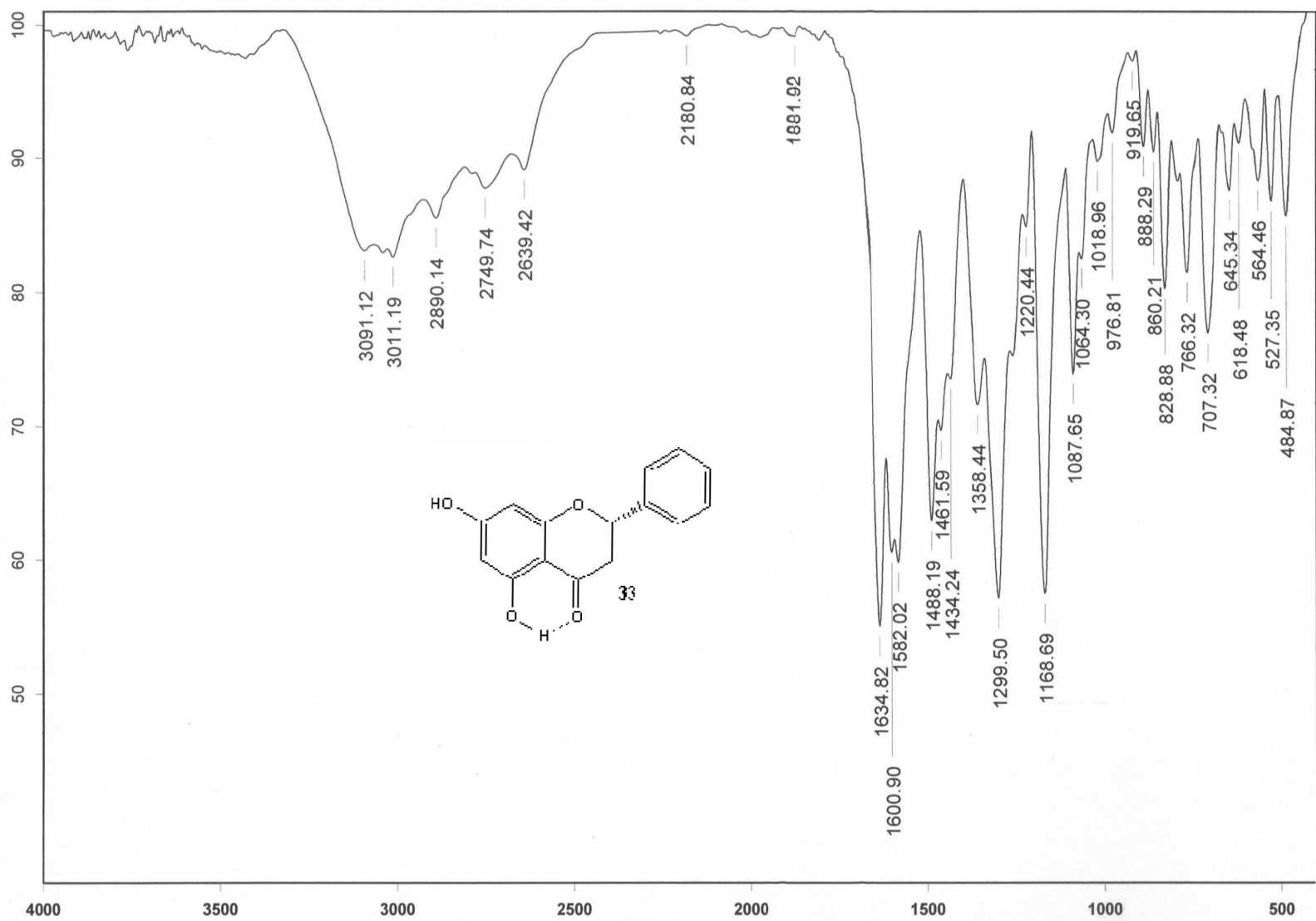
7. BIBLIOGRAFÍA

1. Asis, M. *Propóleo. El oro púrpura de las abejas*. Ed. CIDA. Ciudad de la Habana, **1989**, 55-89.
2. Banskota, A. H.; Tezuka, Y.; Prasain, J. K.; Matsushige, K.; Saiki, I.; Kadota, S. *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 896-900.
3. Banskota, A. H.; Tezuka, Y.; Kadota, S. *Phytother. Res.* **2001**, *15*, 561-571.
4. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1062152/>
5. Bankova, V. *J. Ethnopharm.* **2005**, *100*, 114-117.
6. Bankova, V.; De Castro, S. L.; Marcuccic, M. C. *Apidologie* **2000**, *31*, 3-15.
7. Burdock, L. *Food Chem Tox.* **1998**, *36*, 347-363.
8. Ghisalberti, E.L. *Bee world* **1979**, *60*, 59-84.
9. Marcucci, M. C. *Apidologie* **1995**, *26*, 83-99.
10. Barbaric, M.; Miskovic, K. *J Ethnopharm.* **2011**, *135*, 772-778.
11. Ing. Servando Carranza Salinas, *Miel del Jardín S. de R. L. MI*. Apiaros Carranza,
http://www.sicde.gob.mx/portal/bin/proyectosExitososFichaTecnica.php?from=20&accion=buscar&subrutina=pagina_1&column=2&busqueda=&orderBy=NivelProyecto&order=ASC&proyectoExitosold=1060624034435ebaf39367c
12. Ghisalberti, E. L.; Jefferies, P. R.; Lanteri, R.; Matisons, J. *Experientia* **1978**, *34*, 157-158.
13. Chaillou, L. L.; Herrera, H.; Maidana, J. *Cienc. Tecnol. Aliment, Campinas*, **2004**, *24*, 11-15.
14. Trusheva, B.; Popova, M.; Bankova, V.; Tsvetkova, I.; Naydenski, C.; Sabatini, A. G. A new type of European propolis, containing bioactive labdanes. *Rivista Italiana EPPOS*, **2003**, *36*, 3-7
15. Aga, H.; Shibuya, T.; Sugimoto, T.; Kurimoto, M.; Nakajima, S. *Bio. Biot Biochem.* **1994**, *58*, 945-946.
16. Lotfy, M. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, **2006**, *7*, 22-31.
17. Greenaway, W.; Scaysbrook, T.; Whatley, F.R. *Bee world* **1990**, *71*, 107-118.
18. Pietta, P. G.; Gardana, C.; Pietta, A. M. *Fitoterapia*, **2002**, *73*, S7-S20.

19. Brushi, M. L.; Franco, S. L.; Gremiao, M. P. *J. Liq. Chrom. Rel. Tech.* **2003**, *26*, 2399-2409.
20. Yang, H.; Dong, Y.; Du, H.; Shi, H.; Peng, Y.; Li X. *Molecules* **2011**, *16*, 3444-3455.
21. Alvarez, E.; Orallo, F., *Bioquimica* **2003**, *22*, 130-140.
22. Havsteen, B. *Pharmacology & Therapeutics.* **2002**, *96* 67-202.
23. Nakamura, R.; Watanabe, K.; Oka, K.; Otha, S.; Mishima, S. *Int. Immunopharm.* **2010**, *10*, 1107-1112.
24. Modak, B.; Contreras, L. M.; González, F.; Torres, R. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 309-312.
25. Suresh, M. A.; Nair, M. *Molecular Carcinogenesis* **2007**, *46*, 231-241.
26. Middleton, E.; Kandaswami, C.; Theoharis, C. *Pharm. rev.* **2000**, *52*, 673-751.
27. Nijveldt, R.; Van Nood, E.; Van Hoorn, D.; Boelens, P.; Van Norren, K.; Van Leeuwen, P. *Am. j. clin. nut.* **2001**, *74*, 418-425.
28. Wagner, H.; Farkas, L. *Synthesis of flavonoids. in The Flavonoids.* Part I, Ed Harborne **1975**, pp 127-213.
29. Dewick, P. M. *Medicinal Natural Products.* 2^a ed. Ed. John Wiley, **2002**, pp 121-130, 149-151, 167-230.
30. Baba, S.; Osakabe, N. *J. Nutr.* **2001**, *131*, 2885-2891.
31. Li, Y.; Wang L-Q. *Chem. Pharm. Bull.* **2000**, *48*, 1239-1245.
32. Alfonso Romo de Vivar, *Química de la Flora Mexicana*, investigaciones en el instituto de química de la UNAM, **2006**, pp 1-39.
33. Newman A. *Chemistry of terpenes and terpenoids*, 1a ed. Ed. Academic Press USA, **1972**.
34. Lichtenthaler, H. K. *Ann. Rev. Plant Mol. Biol.* **1999**, *50*, 47-65.
35. <http://www.ugr.es/~quiorred/pnatu/terpenoides.htm>
36. Bruneton, J. *Farmacognosia. Fitoquímica. Plantas medicinales.* 2a ed. Ed. Acriba, S.A. España, **2001**, pp 455-761.
37. Yue, Y.; Qing-Yun, T. *J. As. Nat. Prod. Res.* **2008**, *10*, 999-1002
38. Margaros, I.; Vassilikogiannakis, G. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 4826-4831

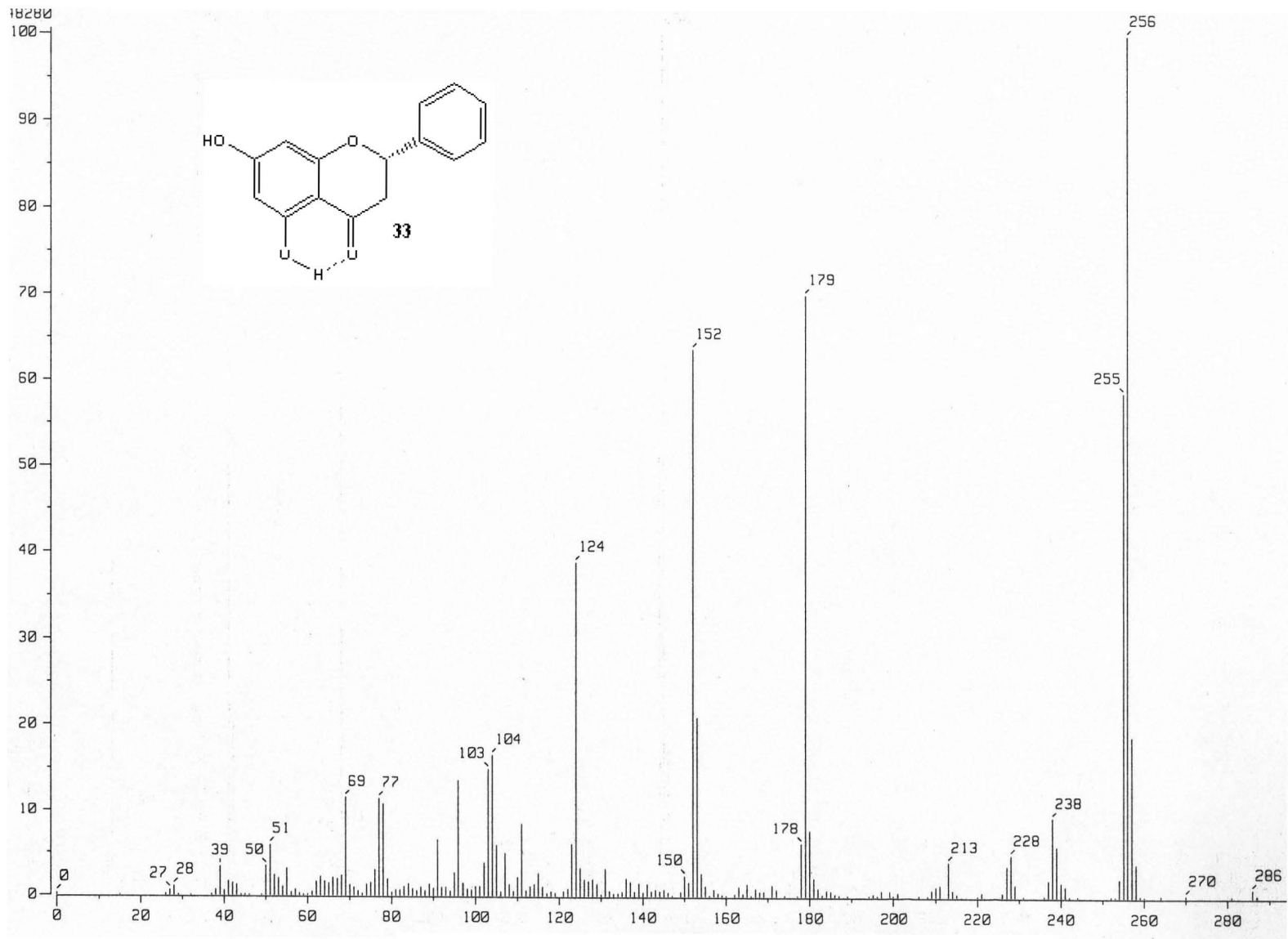
39. Zdero, C.; Bohlmann, F. *Phytochem.* **1991**, *30*, 1597-1601.
40. Meccia, G.; Rosquete, C.; Rojas, L. B.; Feliciano, A. *Flavour and Fragrance Journal* **2006**, *21*, 559-561
41. Fang, J. M.; Su, W. C.; Cheng, Y. S. *Phytochem.* **1988**, *27*, 1395-1397.
42. Takayuki, S.; Nobuo, I.; Yoshinori, A. *Bull. Chem. Soc. Jap.* **1972**, *45*, 2058-2060.
43. Gaffield, W. *Tetrahedron* **1970**, *26*, 4093-4108.
44. Nishizawa, M.; Yamada, H.; *J. Org. Chem.* **1987**, *52*, 4878-4884.
45. Han, M. S. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* **2010**, *53*, 512-515.
46. Yan, R.; Cao, Y. Y. *Fitoterapia* **2011**, *82*, 841-848.
47. Dudonne, S. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 4527-4536
48. Romero, G. Y. Estudio químico de *Physalis nicandroides* Schltdl. Tesis, 2008, pp 50-65. UNAM.

8. ESPECTROS DE LOS COMPUESTOS AISLADOS

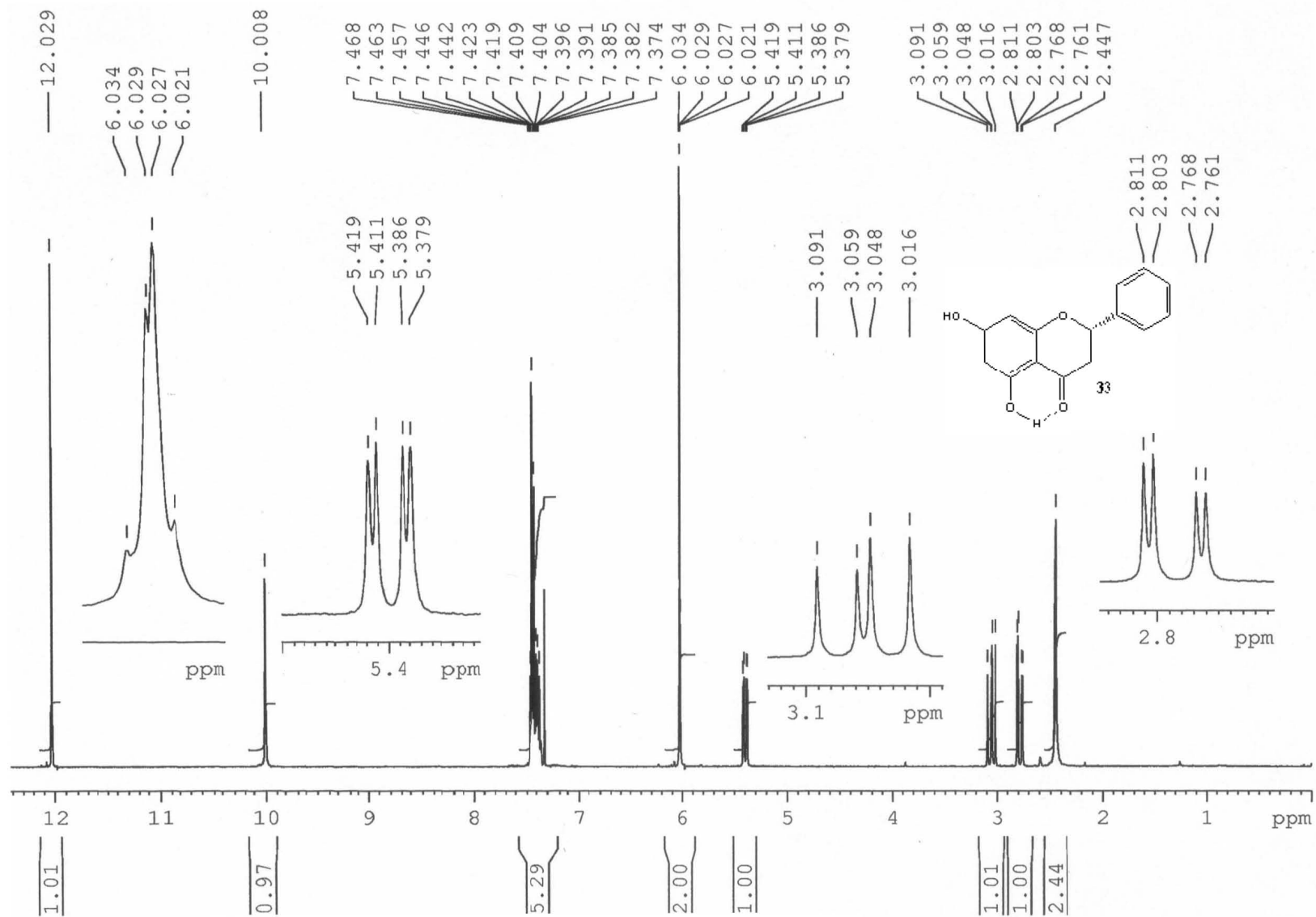


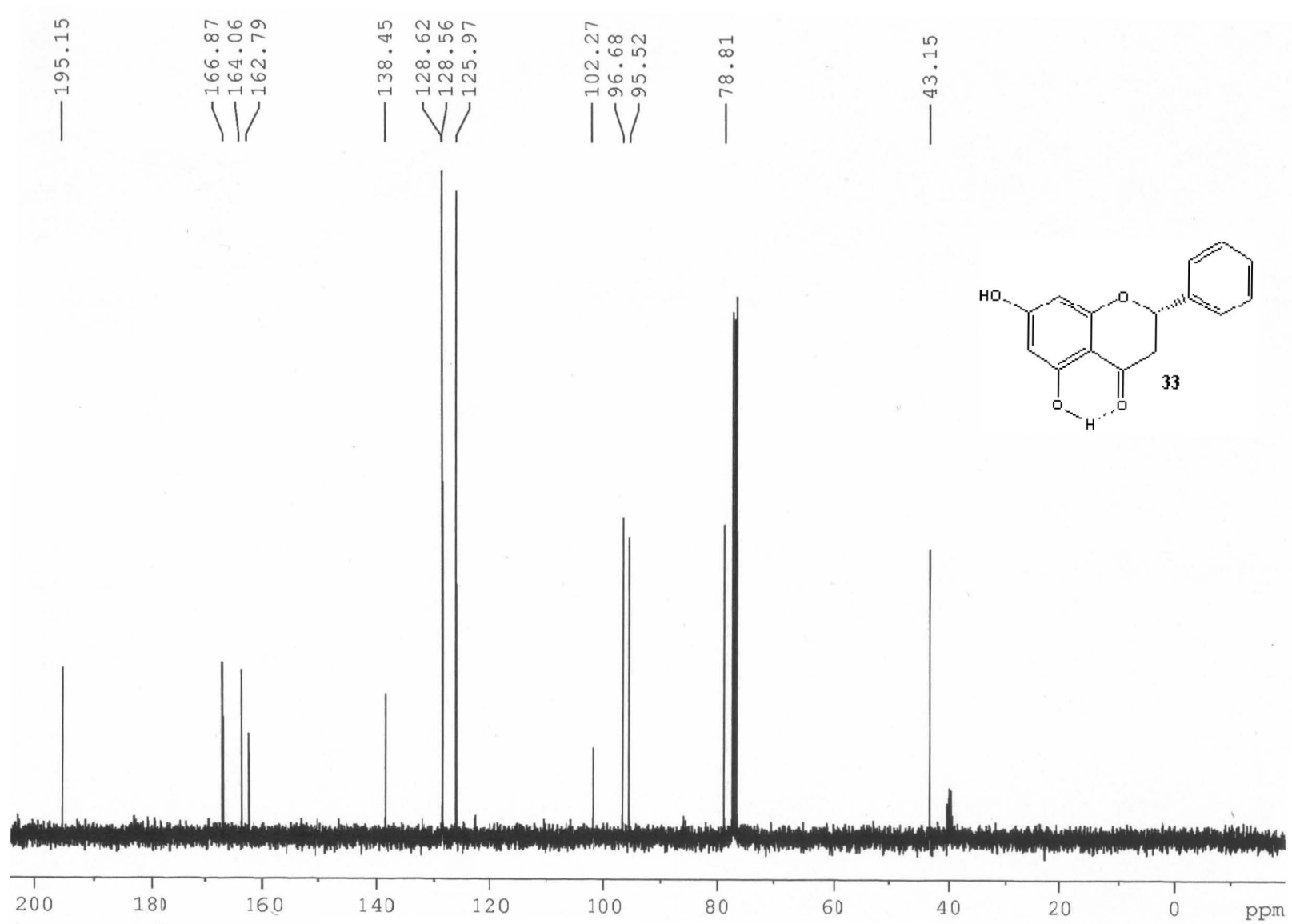
Espectro 1. IR de la pinoembrina (33)

8.1 Pinoembrina (33)

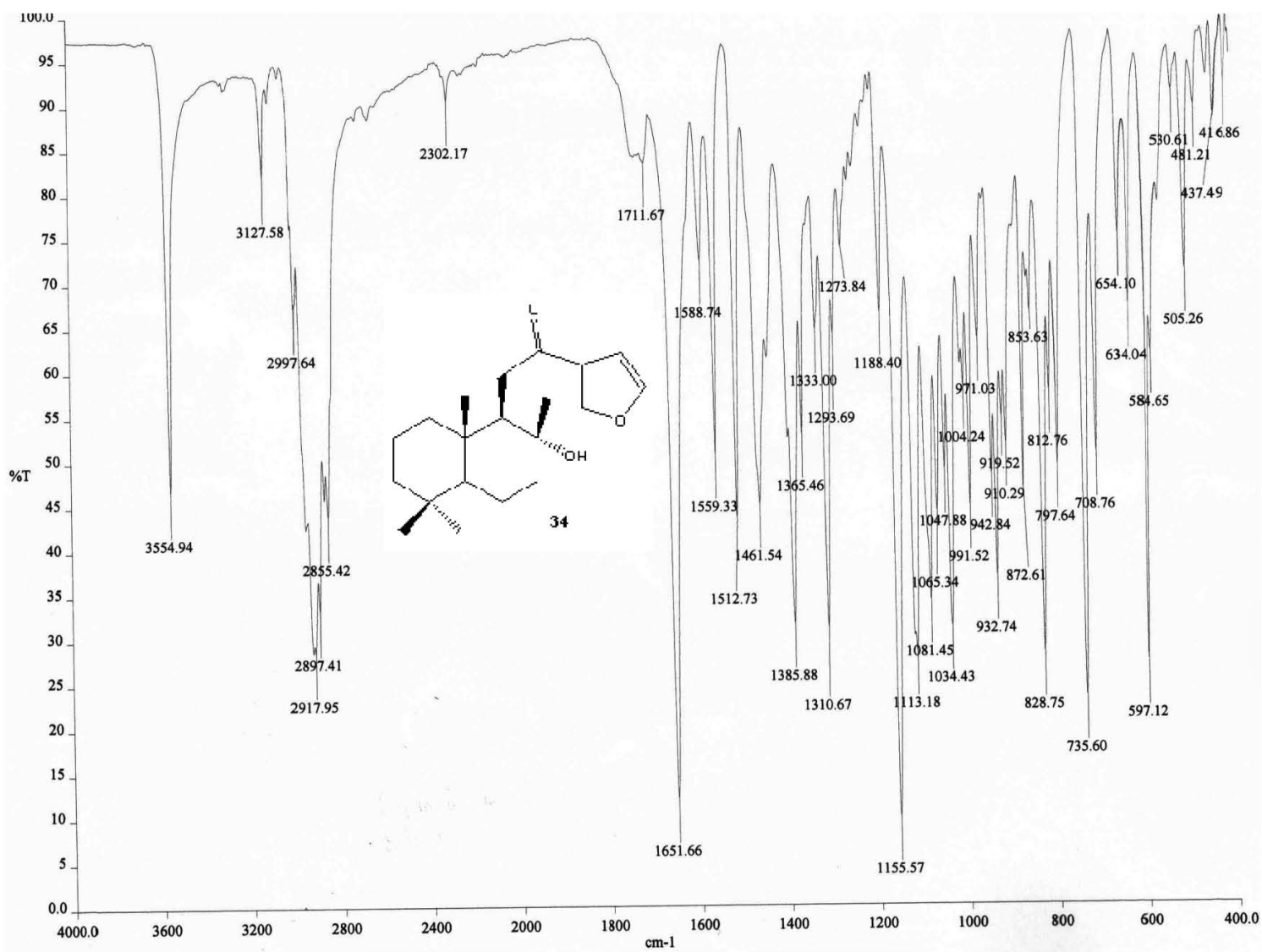


Espectro 2. EM-IE de la pinocembrina (33)

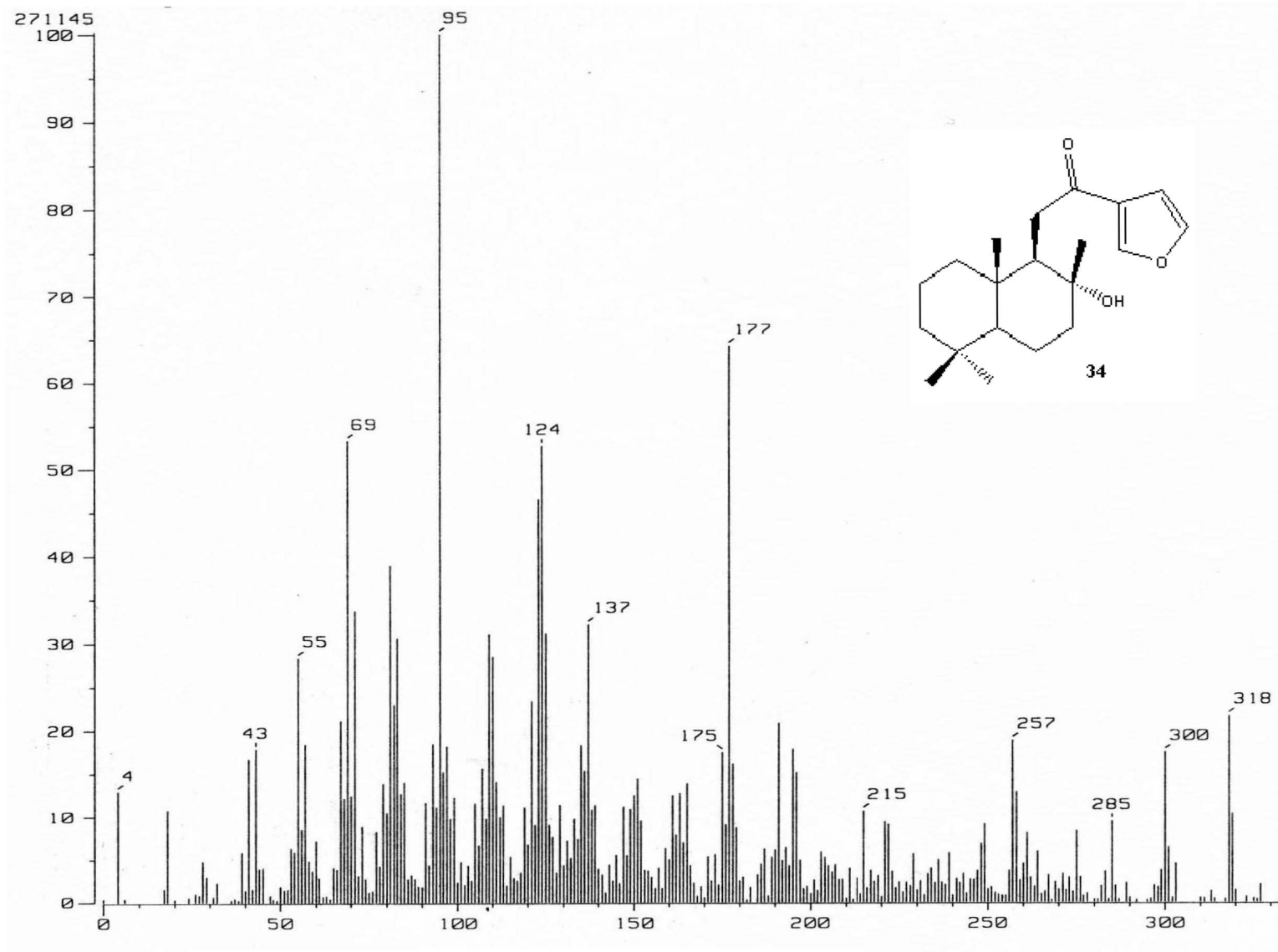
Espectro 3. RMN de ^1H de la pinocembrina (33)

Espectro 4. RMN de ^{13}C de la pinocembrina (33)

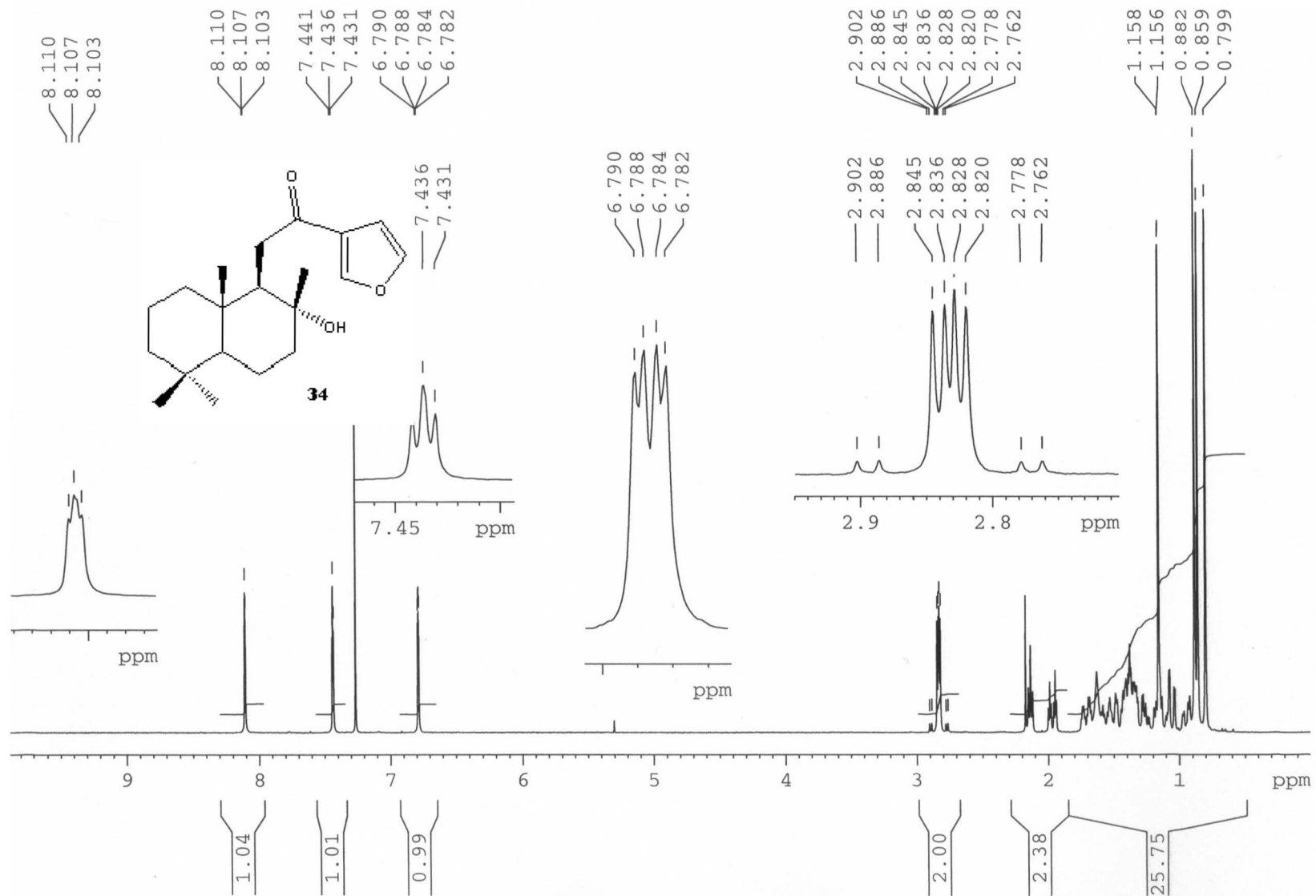
8.2 Diterpeno labdánico (34)

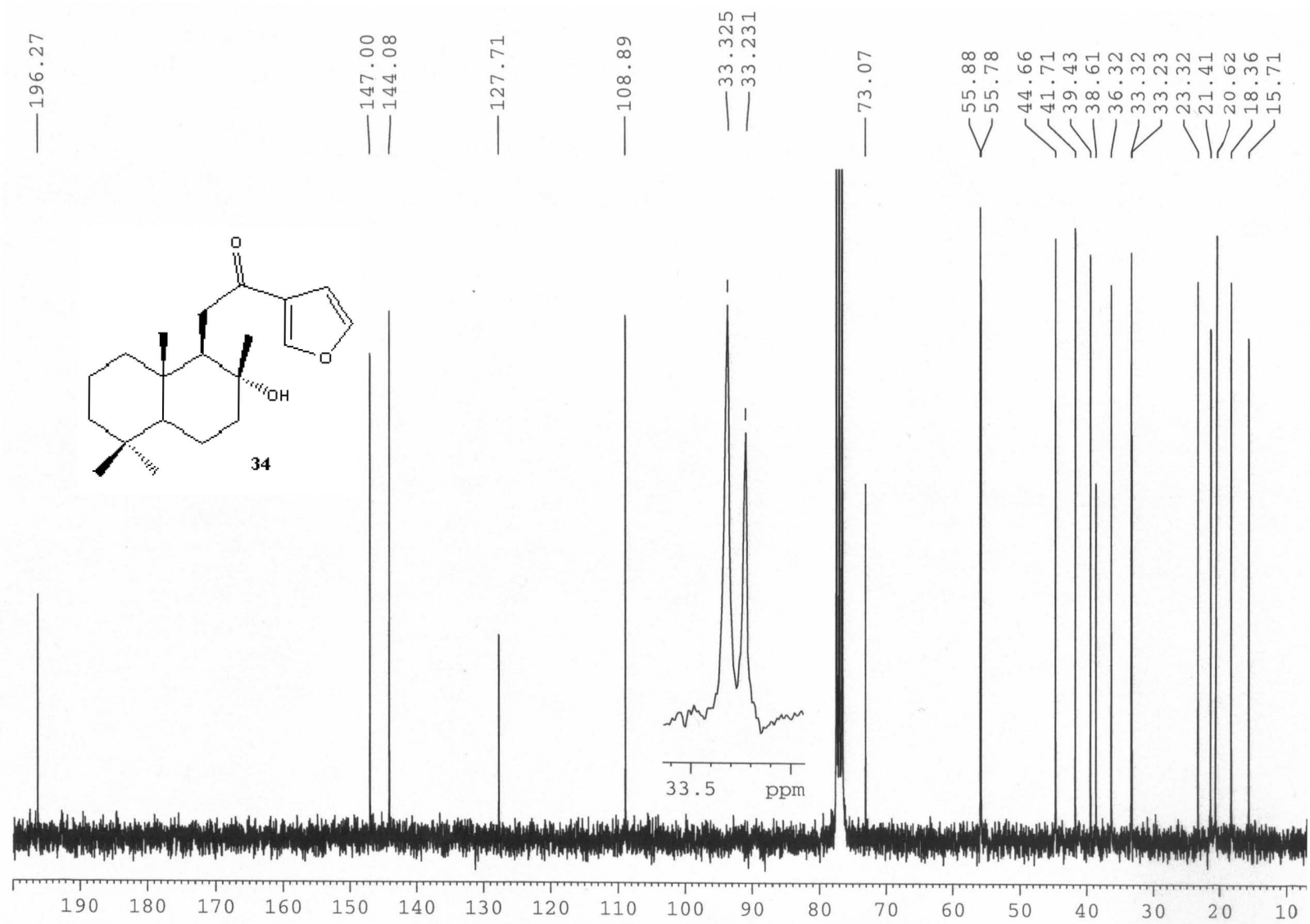


Espectro 5. IR del labdano 34

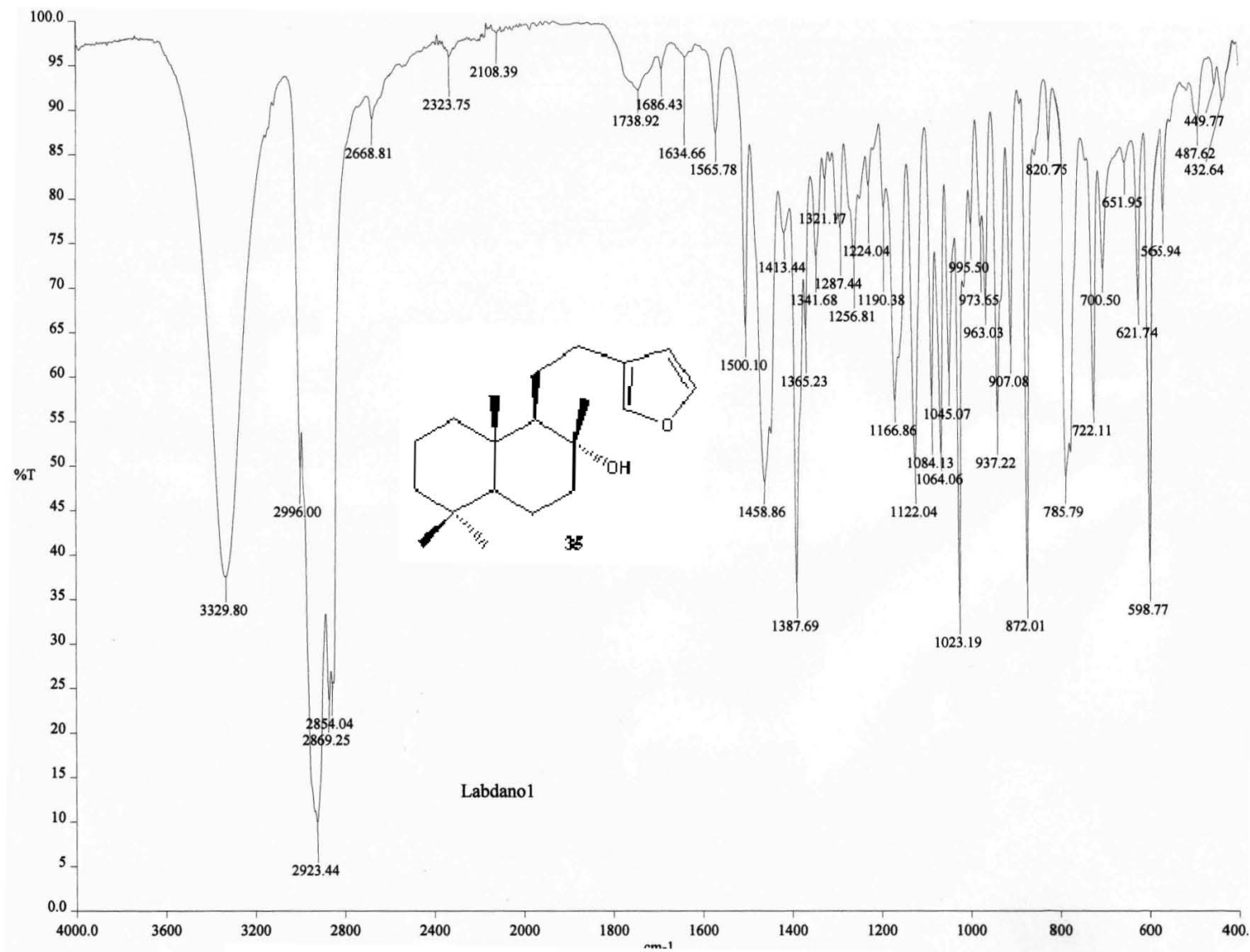


Espectro 6. RMN de ^{13}C del labdano 34

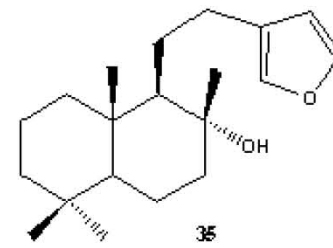
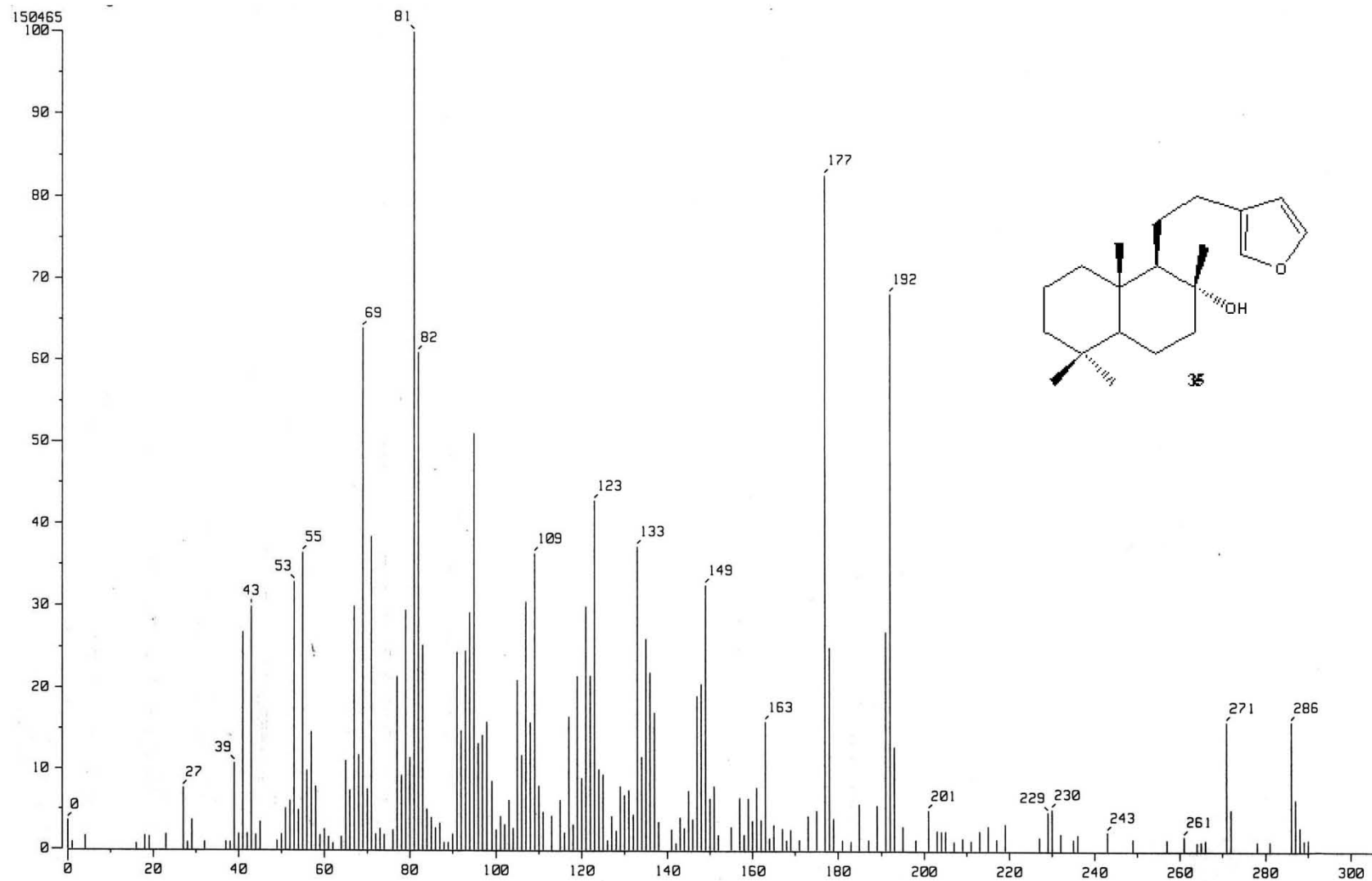
Espectro 7. RMN de ^1H del labdano 34

Espectro 8. RMN de ^{13}C del labdano 34

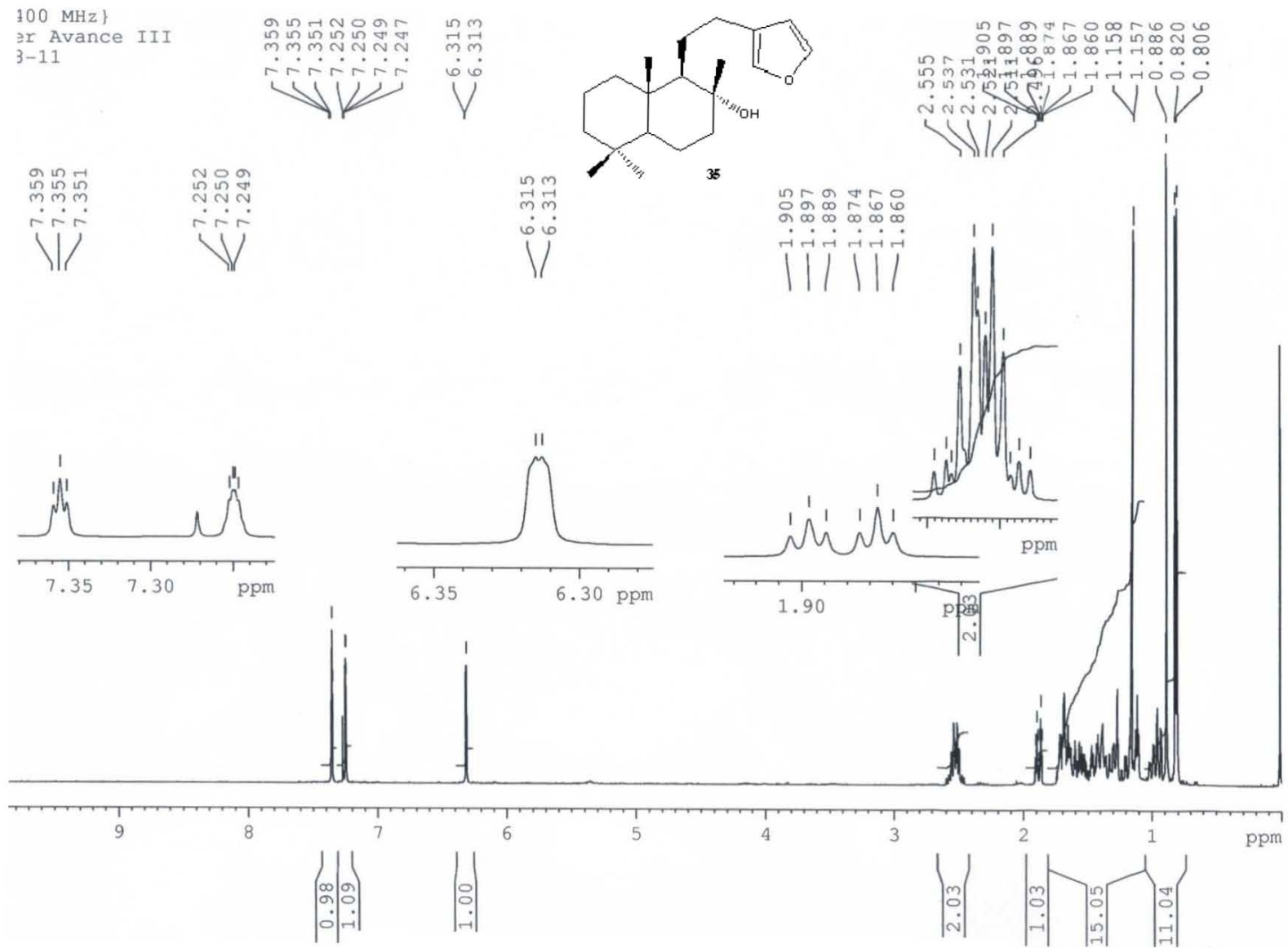
8.3 Diterpeno labdánico (35)

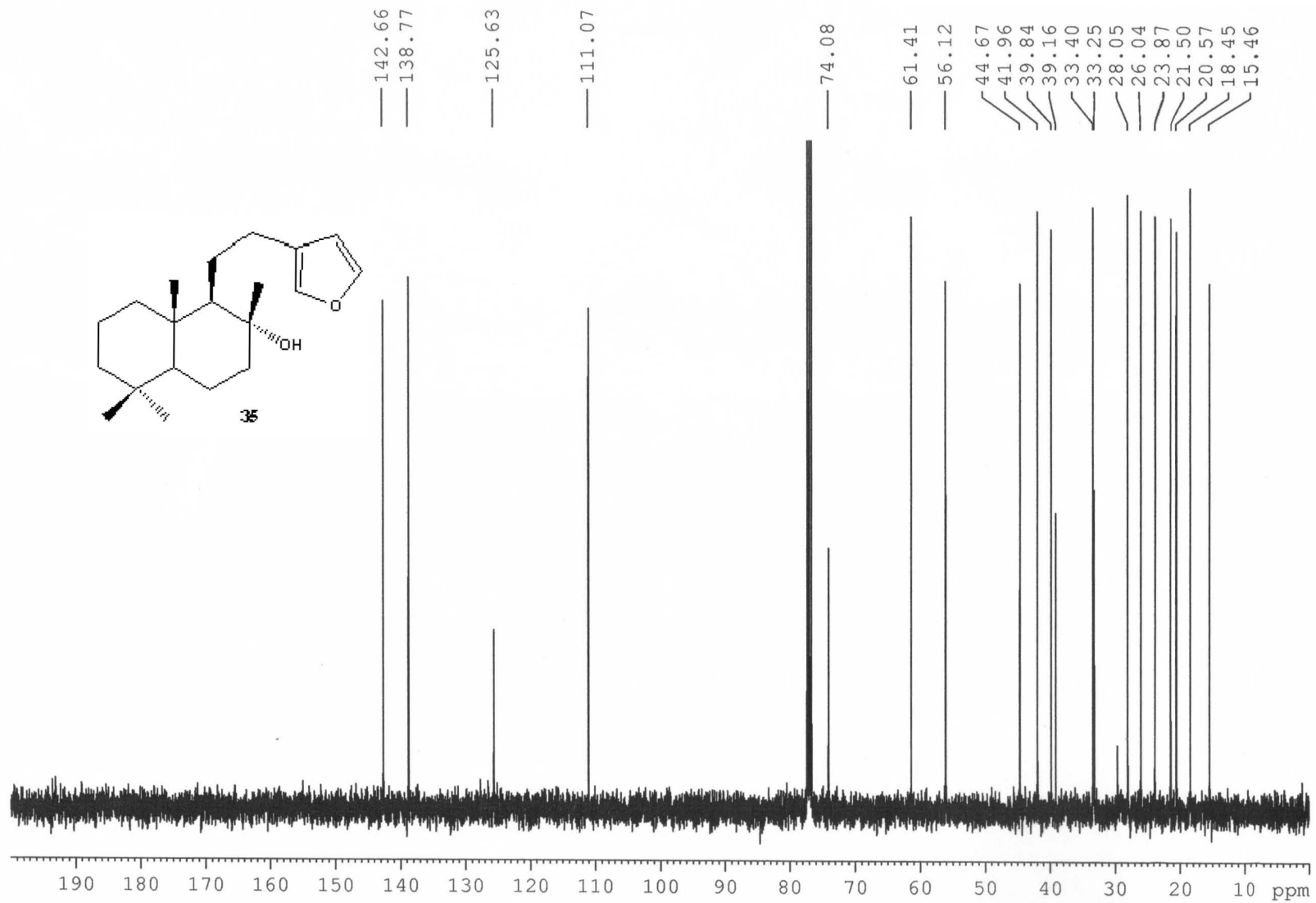


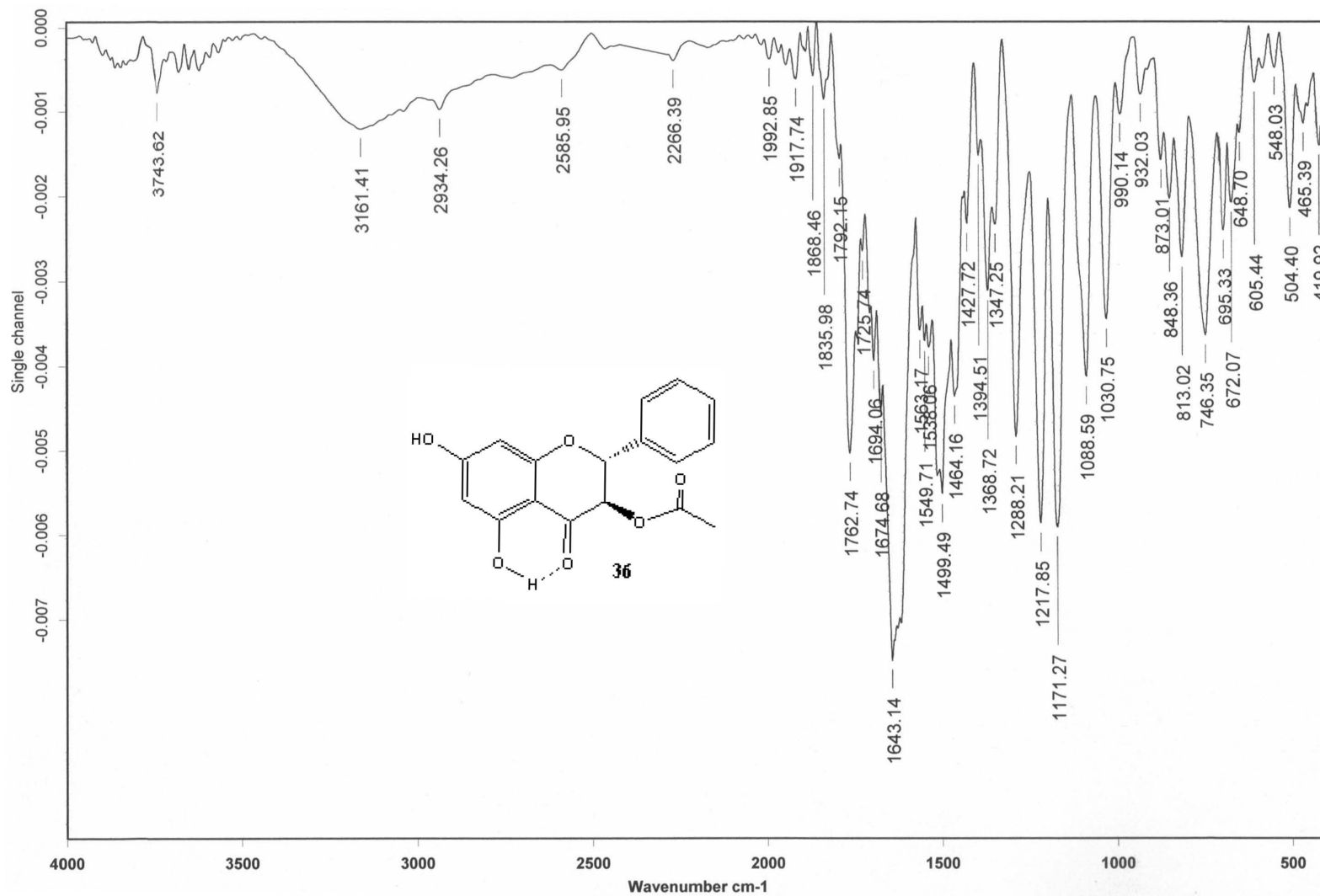
Espectro 9. IR del labdano 35



Espectro 10. EM-IE del labdano 35

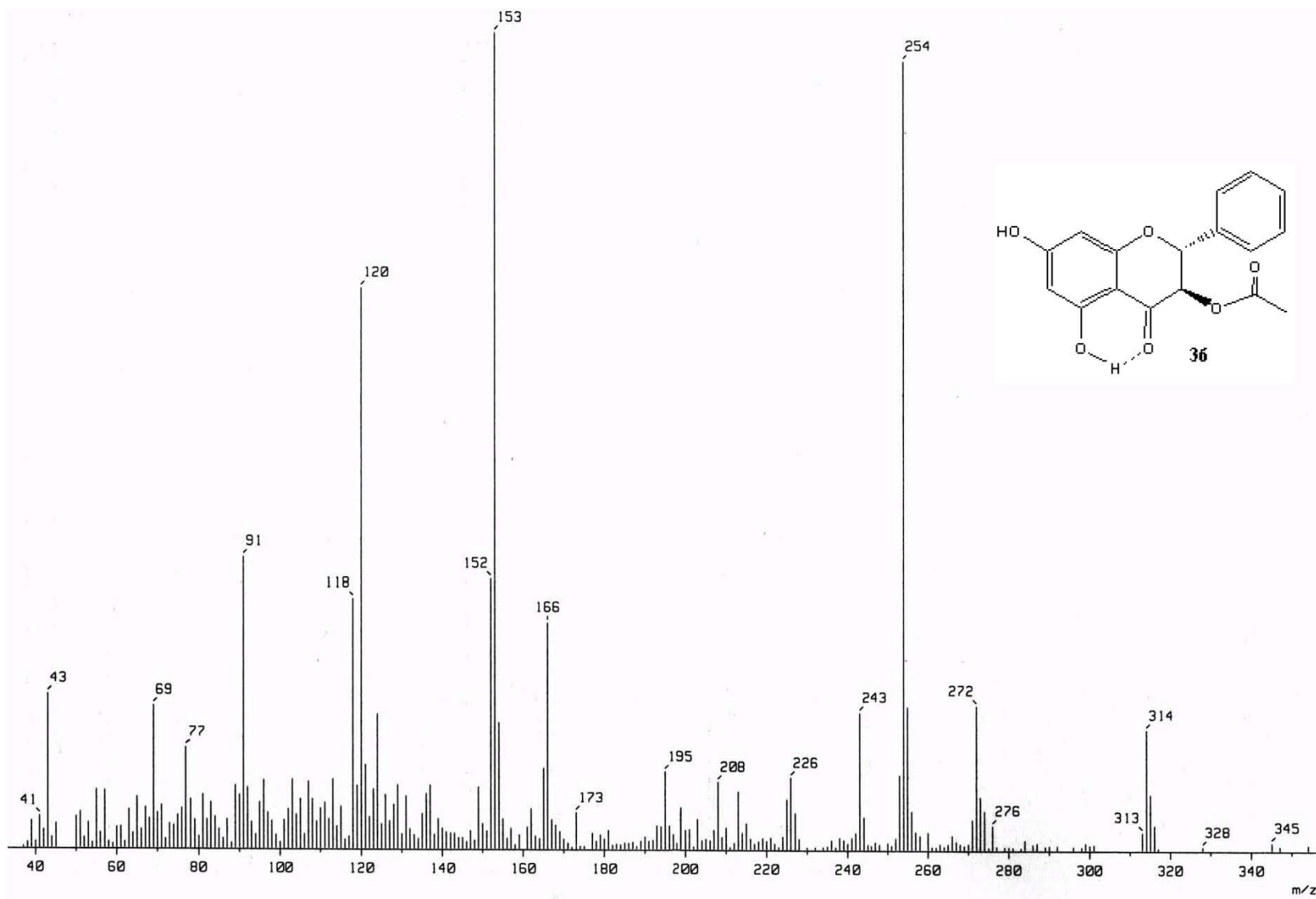
Espectro 11. RMN de ^1H del labdano 35

Espectro 12. RMN de ^{13}C del labdano 35

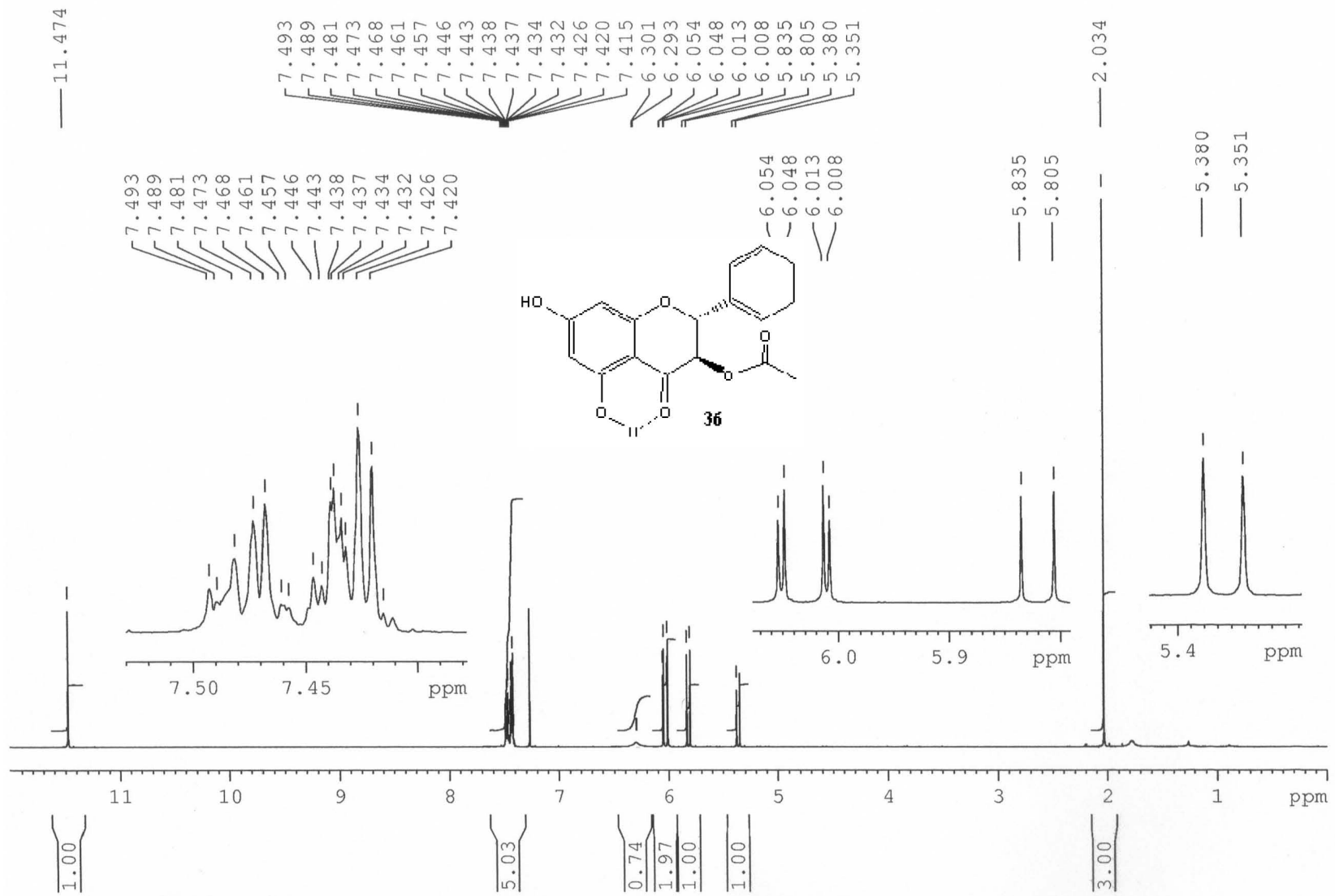


Espectro 13. IR del 3 acetato de la pinobanksina (36)

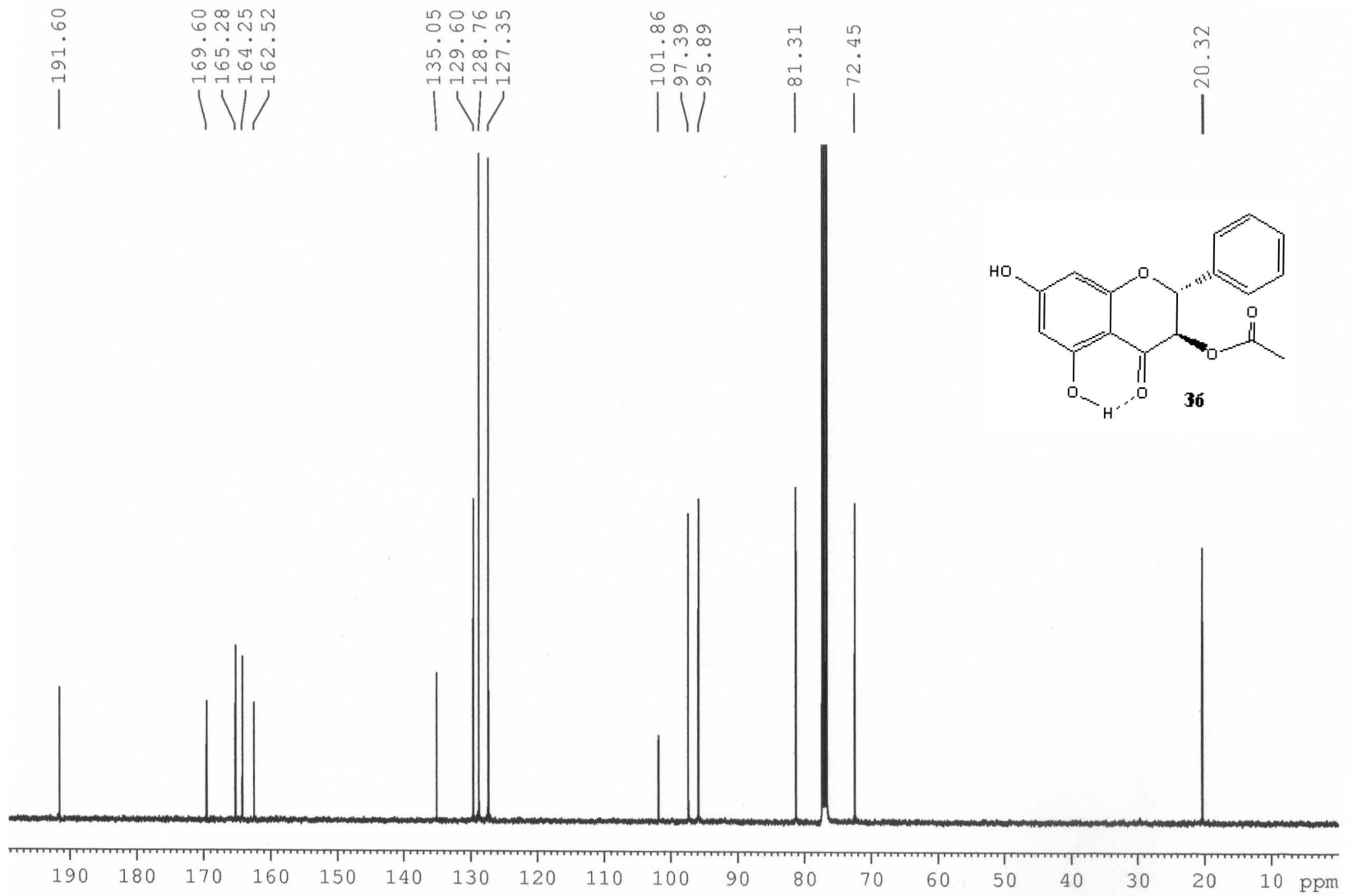
8.4 3-acetato de la pinobanksina (36)



Espectro 14. EM-IE del 3 acetato de la pinobanksina (36)

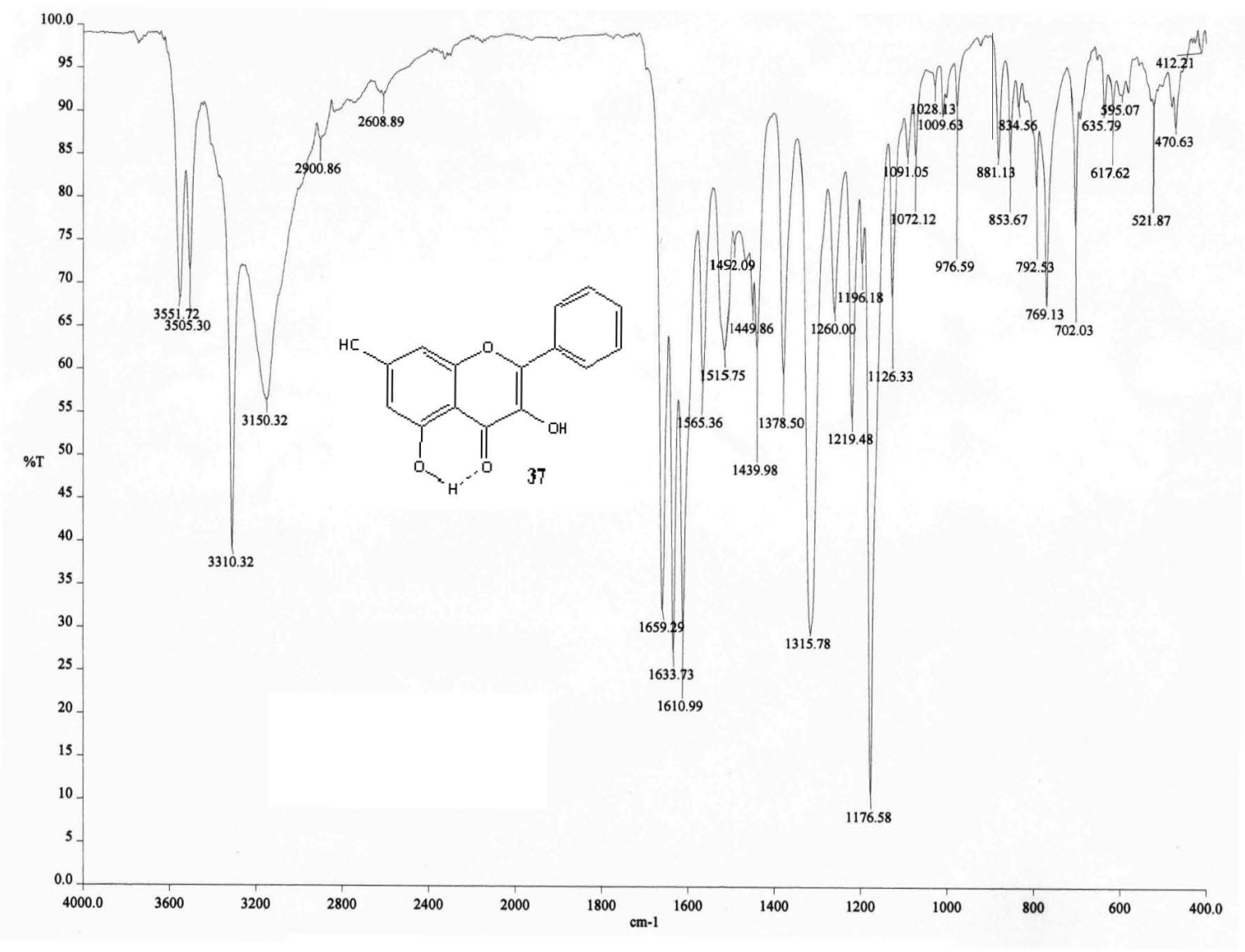


Espectro 15. RMN de ^1H del 3 acetato de la pinobanksina (36)



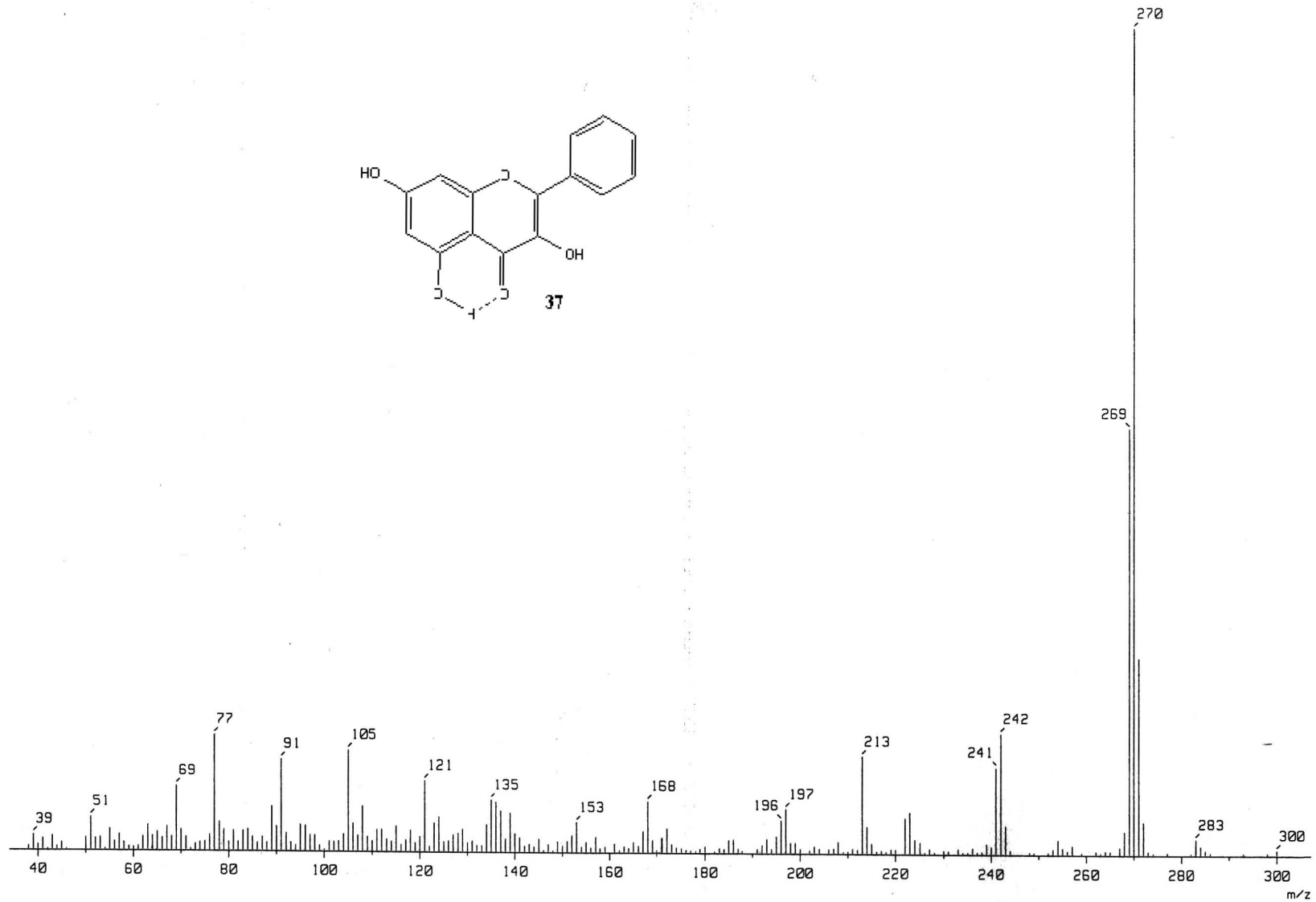
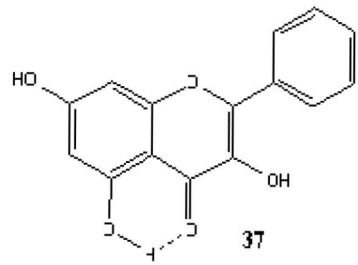
56

Espectro 16. RMN de ^{13}C del 3 acetato de la pinobanksina (36)

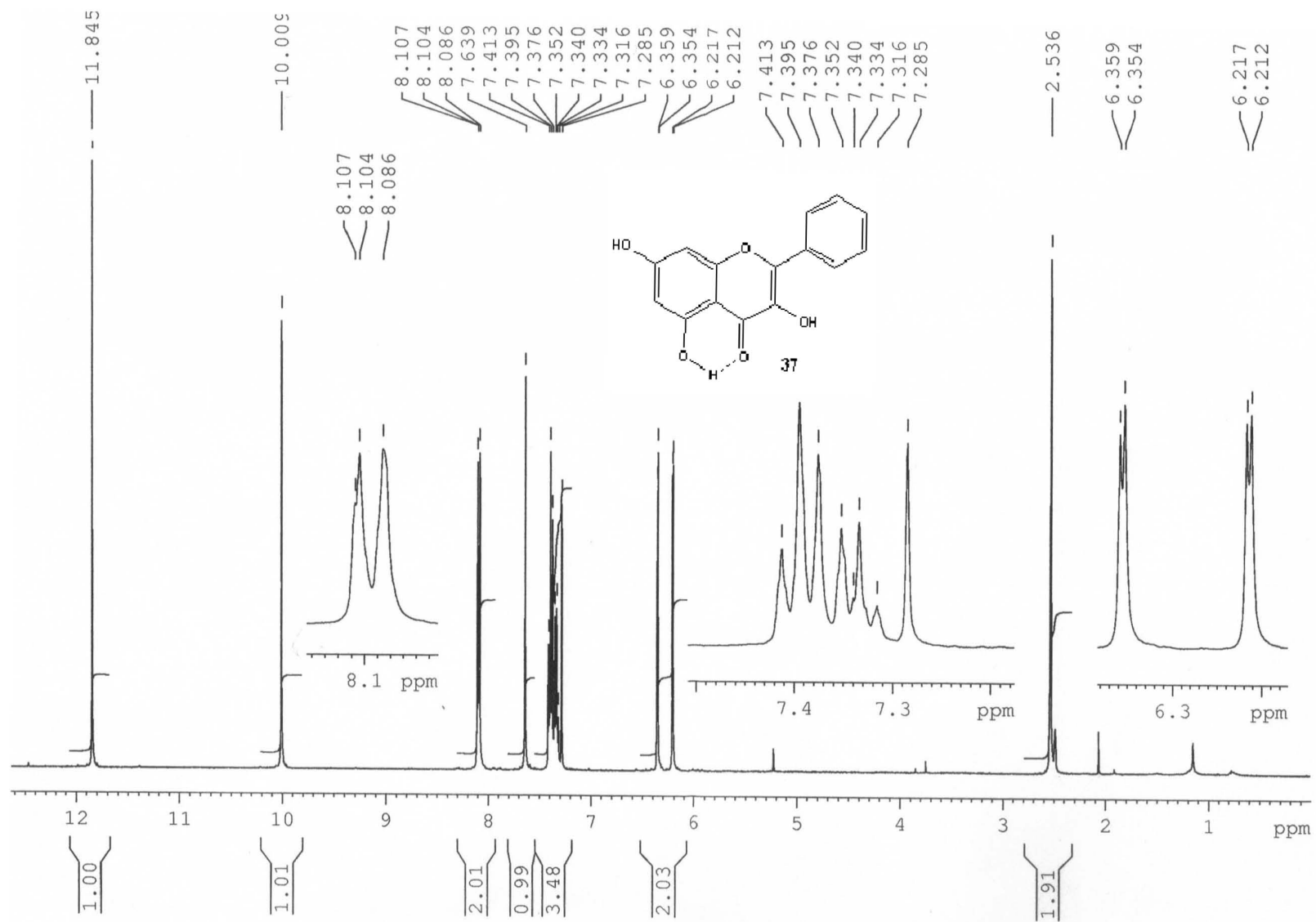


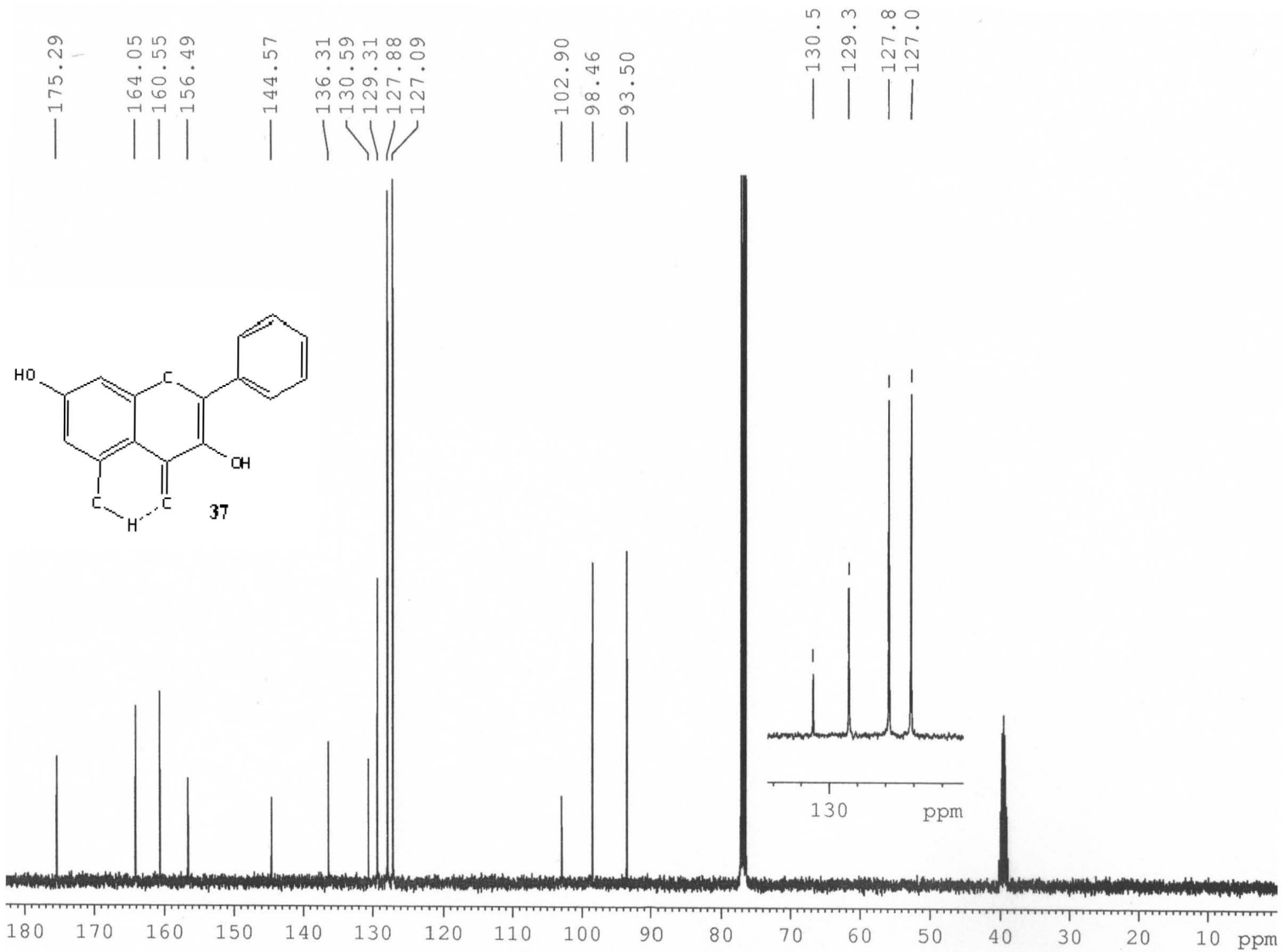
8.5 Galangina (37)

Espectro 17. IR de la galangina (37)



Espectro 18. EM-IE de la galangina (37)

Espectro 19. RMN de ^1H de la galangina (37)



Espectro 20. RMN de ¹³C de la galangina (37)