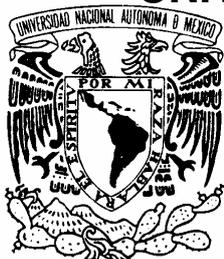


**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**



---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“Estudio Fitoquímico de la Cáscara del  
Limón Real, *Citrus limonia Osbeck*”.**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**P R E S E N T A**

**CÁRDENAS RODRÍGUEZ ULISES**



**México, D.F.**

**2007.**



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.

## DEDICATORIAS

**A Dios....**

**A la vida....**

A mis padres: **Alfredo Cárdenas** y **Ma. Antonieta Rodríguez**

A mi hermano: **Israel Cárdenas**, la Psicología y la Química no sean áreas afines, pero nos llevamos bien.

A José Sergio Sandoval, Arturo Martínez, Yeri Pérez, Ricardo Castañeda, Aidee Ibáñez, Marco Polo García y Antonio Flores por su amistad.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Manuel Salmón, por la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo, por la dedicación que puso al asesorar este trabajo de tesis, por el apoyo en todos los aspectos y por ser un amigo.

Al H. Jurado, por sus valiosas sugerencias durante la revisión del presente trabajo y por el tiempo dedicado al mismo

A las siguientes personas por sus sugerencias, aportaciones y comentarios al presente trabajo:

M. en C. Carlos Damián, Dr. Hiram Beltrán, M. en C. Jorge Cárdenas, Dr. José Calderón y al Dr. Jorge Peón

A mis Padres Alfredo Cárdenas y Ma. Antonieta Rodríguez por su amor como padres

A Israel Cárdenas por su comprensión como hermano

Al equipo de Judo de la UNAM por tantas alegrías

A mis amigos del lab.1-6: Jorge, Iván, Carlos, Mauricio e Hirám

A todos mis amigos de la Facultad de Química

Al M. en C. Carlos Damián por su apoyo en la realización de esta tesis

A los técnicos de Resonancia Magnética Nuclear, Espectrometría de Masas, Espectroscopia de Infrarrojo y al Departamento de Rayos X.

A la UNAM, especialmente al Instituto de Química

Al CONACYT, especialmente al Sistema Nacional de Investigadores por las becas otorgadas y al apoyo financiero del proyecto DGAPA-PAPIIT-IN5005

## INDICE

Glosario	
1. Introducción	1
2. Objetivos	3
3. Antecedentes	4
3.1. Generalidades de <i>Citrus limonia Osbeck</i>	4
3.2. Compuestos químicos que se encuentran dentro del genero Citrus	5
3.2.1. Generalidades de las cumarinas	6
3.2.2. Generalidades de los flavonoides	8
3.3. Propiedades fluorescentes de los derivados de la 3-hidroxi-5, 6, 7, 8-flavona	11
4. Parte experimental	16
4.1. Materiales y disolventes	16
4.2. Equipo Analítico	16
4.3. Recolección del material biológico	17
4.4. Preparación del material biológico, cáscara de <i>Citrus limonia Osbeck</i> , para el aislamiento de los metabolitos	18
4.5. Aislamiento de los metabolitos secundarios de la cáscara del <i>Citrus limonia Osbeck</i> .	20
4.5.1 Aislamiento de 5,7-Dimetoxicumarina, Compuesto 1	20
4.5.2 Aislamiento del Ácido <i>p</i> -metoxibenzoico, Compuesto 2	21
4.5.3 Aislamiento de la 3-hidroxi-5, 6, 7, 8, 4'-pentametoxiflavona, Compuesto 3	22
4.5.4 Aislamiento de la 3-hidroxi-5, 6, 7, 8, 3', 4'-hexametoxiflavona, Compuesto 4	23
4.5.5 Aislamiento de Isoescopoletina, Compuesto 5	24
4.6 Estudio de la fluorescencia de las polimetoxiflavonas encontradas en la cáscara de <i>Citrus limonia Osbeck</i> .	25
4.6.1 Preparación de las disoluciones del Compuesto (3).	25
4.6.2 Preparación de las disoluciones del Compuesto (4)	26

5. Resultados	27
5.1. Metabolitos aislados de la cáscara de la <i>Citrus limonia Osbeck</i>	27
5.2. Espectros de Fluorescencia de emisión de las disoluciones de las polimetoxiflavonas	27
6. Discusión de resultados	29
6.1. Espectroscopia de los compuestos aislados	29
6.1.1. Grupo I. Derivado del ácido benzoico	29
6.1.2. Grupo II. Cumarinas	29
6.1.2.1. Generalidades.	29
6.1.2.2. Compuesto 1,	30
6.1.2.3. Compuesto 5,	31
6.1.3. Grupo III, 3-hidroxi-polimetoxiflavonas	33
6.1.3.1. Compuesto 3	33
6.1.3.2. Compuesto 4	37
6.2. Fluorescencia de emisión de las soluciones de las polimetoxiflavonas Efecto del disolvente.	39
6.2.1. Fluorescencia de emisión para las soluciones de acetonitrilo	40
6.2.2. Fluorescencia de emisión para las soluciones alcohólicas	41
7. Conclusiones	48
8. Referencias	49
9. Apéndice	52

## GLOSARIO

%v	Porcentaje en volumen
mg	miligramos
%	Por ciento
AcOEt	Acetato de Etilo
IR	Espectroscopia de Infrarrojo
UV-VIS	Espectroscopia de Ultravioleta-Visible
RMN <sup>1</sup> H	Resonancia Magnética Nuclear de Protón
RMN <sup>13</sup> C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13
EMIE	Espectrometría de Masas de Impacto Electrónico
$\lambda_{\text{max}}^{\text{abs}}$ ex	Longitud de onda de mayor Absorción/Longitud de onda de excitación en Espectroscopia de Fluorescencia de Emisión
$\epsilon_{326\text{nm}}$	Coefficiente de extinción molar
$\epsilon$	Constante dieléctrica
$\Delta_{\text{u}}\text{OHcm}^{-1}$	Capacidad de formar puentes de hidrógeno de los alcoholes
$\eta$ , Cp	viscosidad, centipoise
Kpt	Constante de transferencia de protón
3HF	3-Hidroxiflavona
ESPT	Transferencia de protón en estado excitado (Exited-State Proton Transfer)
GSRPT	transferencia de protón del estado excitado al estado basal
CCF	Cromatografía en Capa Fina
N*	Estado excitado de la forma normal - forma ceto de las polimetoxiflavonas
T*	Estado excitado de la forma tautomerica – forma enolica de las polimetoxiflavonas
$\Phi$	Rendimiento de fluorescencia, no tiene unidades

## RESUMEN

México se encuentra dentro de los 10 países productores de cítricos a nivel Mundial<sup>1,2</sup>. Del total de la producción de cítricos en México, el limón real ocupa solamente el 0.015%<sup>2</sup>, concentrándose su producción en los estados de Guerrero, Jalisco y algunas zonas de Veracruz. La producción de limón real se destina principalmente a la alimentación, mientras que sus cáscaras son un subproducto de desecho que no se ha estudiado y no tiene registrado algún uso industrial, caso contrario a lo que ocurre con las cáscaras de Naranja (*Citrus sinensis*) y de Limón (*Citrus lemon*)<sup>3</sup>.

Los metabolitos secundarios encontrados en el género *Citrus*, algunos aislados únicamente en este género, son mayoritariamente: flavonas, terpenoides, derivados del limoneno y cumarinas<sup>3,4</sup>; de estos compuestos, las flavonas son las que presentan un amplio espectro de actividad biológica, incluyendo efectos antiinflamatorios, anticarcinogénicos<sup>5</sup> y antioxidantes<sup>6</sup>. En este estudio se aislaron e identificaron cinco productos, el ácido *p*-metoxibenzoico, aislado por primera vez en el género *Citrus*, dos cumarinas (la 5,7-dimetoxicumarina y la isoescopoletina), ambas moléculas se han aislado de los aceites esenciales del *Citrus sinensis*<sup>8</sup> y *Citrus limon*<sup>8,9</sup>, y dos polimetoxiflavonas: 3-hidroxi-5,6,7,8,'4-pentametoxiflavona, encontrada en las hojas y cáscaras de la *Citrus Sinensis*<sup>10</sup> y 3-hidroxi-5,6,7,8,'3,'4-hexametoxiflavona, aislada de las hojas de la *Citrus limonia Osbeck*. Las estructuras de todos los compuestos se determinaron por los métodos espectroscópicos usuales y se detallan en el texto. En este trabajo se incluyen los estudios de difracción de Rayos X de la 5,7-dimetoxicumarina y las

dos polimetoxiflavonas, estudios que no se reportan en la literatura.

En el presente trabajo se describe por primera vez el fenómeno de fluorescencia dual de la 3-hidroxi-5,6,7,8,'4-pentametoxiflavona y la 3-hidroxi-5, 6, 7, 8, '3, '4-hexametoxiflavona, polimetoxiflavonas de origen natural.

**LOS RESULTADOS DEL PRESENTE TRABAJO SE PRESENTARON EN LOS SIGUIENTES CONGRESOS**

**“AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE UN COMPUESTO FLUORESCENTE EN UN CITRICO”**

SIMPOSIUM INTERNO DEL INSTITUTO DE QUIMICA

**“Ulises Cárdenas, Rubén Toscano y Manuel Salmón”**,  
México D.F. 26 Y 27 de Abril del 2006

**“AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE COMPUESTOS FLUORESCENTES EN UN CITRICO”**

12<sup>a</sup> JORNADA DE QUIMICA, 10<sup>o</sup> ANIVERSARIO DEL CENTRO DE INVESTIGACIONES QUIMICAS

**“Ulises Cárdenas, Rubén Toscano y Manuel Salmón”**,  
Cuernavaca, Morelos, 11 al 13 de Mayo del 2006

## 1. INTRODUCCIÓN

La producción mundial de cítricos fue de 73.1 millones de toneladas en el periodo de 2003-2004, en ese tiempo México contribuyó con una producción total de 1 998 000 toneladas, cifra que coloca a nuestro país dentro de los 10 países más importantes en la producción de cítricos<sup>1</sup>.

Del total de producción de cítricos en México, el limón real (*Citrus limonia Osbeck*) ocupa solamente el 0.015%, su producción alcanzó en el año del 2004 las 260 toneladas<sup>2</sup>, cosechados en los estados de Guerrero, Jalisco y algunas zonas de Veracruz. La producción de limón real, al contrario de lo que sucede con otros productos del género *Citrus* como la naranja o el limón, se destina principalmente al área alimenticia, quedando sus cáscaras como un subproducto de desecho.

La importancia de estudiar las cáscaras del limón Real (*Citrus limonia Osbeck*) es debido a que no se han realizado estudios de su contenido, por otra parte en algunas regiones del mundo, las cáscaras de la naranja (*Citrus sinensis*), fruto perteneciente a la misma familia del limón real, se usan en la medicina tradicional para combatir males estomacales, inflamación e infecciones en la piel<sup>11</sup>. Los metabolitos secundarios encontrados en el género *Citrus*, en algunos casos desconocidos, son mayoritariamente: flavonas, terpenoides, derivados del limoneno y otros aceites volátiles<sup>11</sup> compuestos de este tipo presentan un amplio espectro de actividad biológica, incluyendo efectos antiinflamatorios, anticarcinogénicos, antivirales y antioxidantes.

El estudio de metabolitos secundarios en especies vegetales, es el de establecer su clasificación taxonómica, por consiguiente estos estudios aumentan la capacidad para caracterizar mejor las especies pertenecientes al mismo género taxonómico<sup>12</sup>.

En este estudio realizado de las cáscaras del *Citrus limonia Osbeck* se aislaron y determinaron las estructuras de la 3-hidroxi-5,6,7,8,'4-pentametoxiflavona y la 3-hidroxi-5,6,7,8,'3,'4-hexametoxiflavona, pertenecientes a la familia de los flavonoides, la isoescopoletina y la 5,7-dimetoxicumarina, pertenecientes a la familia de las cumarinas y el ácido *p*-metoxibenzoico.

Al analizar una parte de la planta que no se había estudiado<sup>13,14</sup> con anterioridad, los compuestos obtenidos ayudan a la identificación quimiotaxonómica de la planta y permiten aumentar el conocimiento sobre los constituyentes químicos de la vegetación que se cultiva en nuestro país.

## 2. OBJETIVOS

- El objetivo del presente trabajo es profundizar el conocer de los constituyentes químicos de los cítricos que se cultivan en nuestro país.
- Aislar y caracterizar los metabolitos secundarios que se encuentran como componentes de la cáscara de la fruta de la planta *Citrus limonia Osbeck*, conocida en México como limón real.
- Contribuir a la caracterización quimiotaxonómica de la planta *Citrus limonia Osbeck* cultivada en México.
- Se pretende generar antecedentes fisicoquímicos de los compuestos químicos encontrados en esta especie.

### 3. ANTECEDENTES

#### 3.1. Generalidades del *Citrus limonia Osbeck*

El limón real (*Citrus limonia Osbeck*) es una planta originaria del suroeste asiático, que al igual que otras especies del género *Citrus* fue introducida en nuestro continente en la colonización española, cultivándose desde entonces en México.

Debido a la fácil hibridación de los cítricos, se cree que la *Citrus Limonia Osbeck* es producto de una hibridación del limón agrio (*Citrus limón*) y la mandarina (*Citrus reticulata*), esta hibridación se considera que probablemente se dio en la India <sup>14</sup>.

El limón real es un árbol perennifolio que al igual que otras especies de cítricos, no es resistente al frío y su cultivo solo se realiza en zonas comprendidas entre los paralelos 40 N y 40 S, en condiciones soleadas y húmedas. Estas plantas producen frutos comestibles, en México ocurre en los meses de septiembre a diciembre. Cuando la planta se encuentra en su madurez puede alcanzar una altura que promedia entre los 4.5 a 6 metros, sus hojas son de un verde oscuro brillante, elípticas, lanceoladas, de borde entero, las dimensiones de la hoja están entre 6 a 8 cm en la parte mas larga, mientras que en la parte mas delgada mide de 4 a 5 cm.

La fruta del *Citrus limonia Osbeck* tiene forma semiesférica, de superficie irregular, cuyo diámetro promedio es de 4 a 7 cm, la cáscara es de color amarillo-verde cuando se encuentra madura y produce una gran cantidad de jugo pero su sabor es agridulce.

La clasificación taxonómica del *Citrus limonia Osbeck* es la siguiente:

Reino: Plantae

Subreino: Tracheobionta

Superdivision: Spermatophyta

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Rosidae

Orden: Sapindales

Familia: Rutaceae

Genero: Citrus

Especie: Citrus Limonia Osbeck.

Esta especie en particular ha sido identificada previamente por el profesor Maximinio Martínez en su obra *Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas*<sup>15</sup>



**Figura 1. Hojas y frutos de Citrus Limonia Osbeck**

### **3.2. Compuestos químicos aislados dentro del genero Citrus**

Los grupos químicos que se han encontrado dentro del genero Citrus son las cumarinas (distribuidas ampliamente en el reino Plantae), terpenoides, derivados del limoneno, aceites esenciales y derivados de los flavonoides cuya sustitución en las posiciones 5 y 7 se encuentran frecuentemente en la familia Rutaceae<sup>4</sup>. Las cumarinas y flavonoides provienen de la ruta metabólica del ácido shikimico, Figura 2, ambas familias químicas tienen los mismos intermediarios hasta el ácido trans-cinámico.

### 3.2.1. Generalidades de las cumarinas

Las cumarinas son metabolitos secundarios derivados de la  $\alpha$ -benzopirona que encuentran ampliamente distribuidas en el reino vegetal; se ha encontrado que las Leguminosas, Rubiáceas, Apocináceas y Rutaceae<sup>4,5,10,16-21</sup> contienen una gran cantidad de estos compuestos.

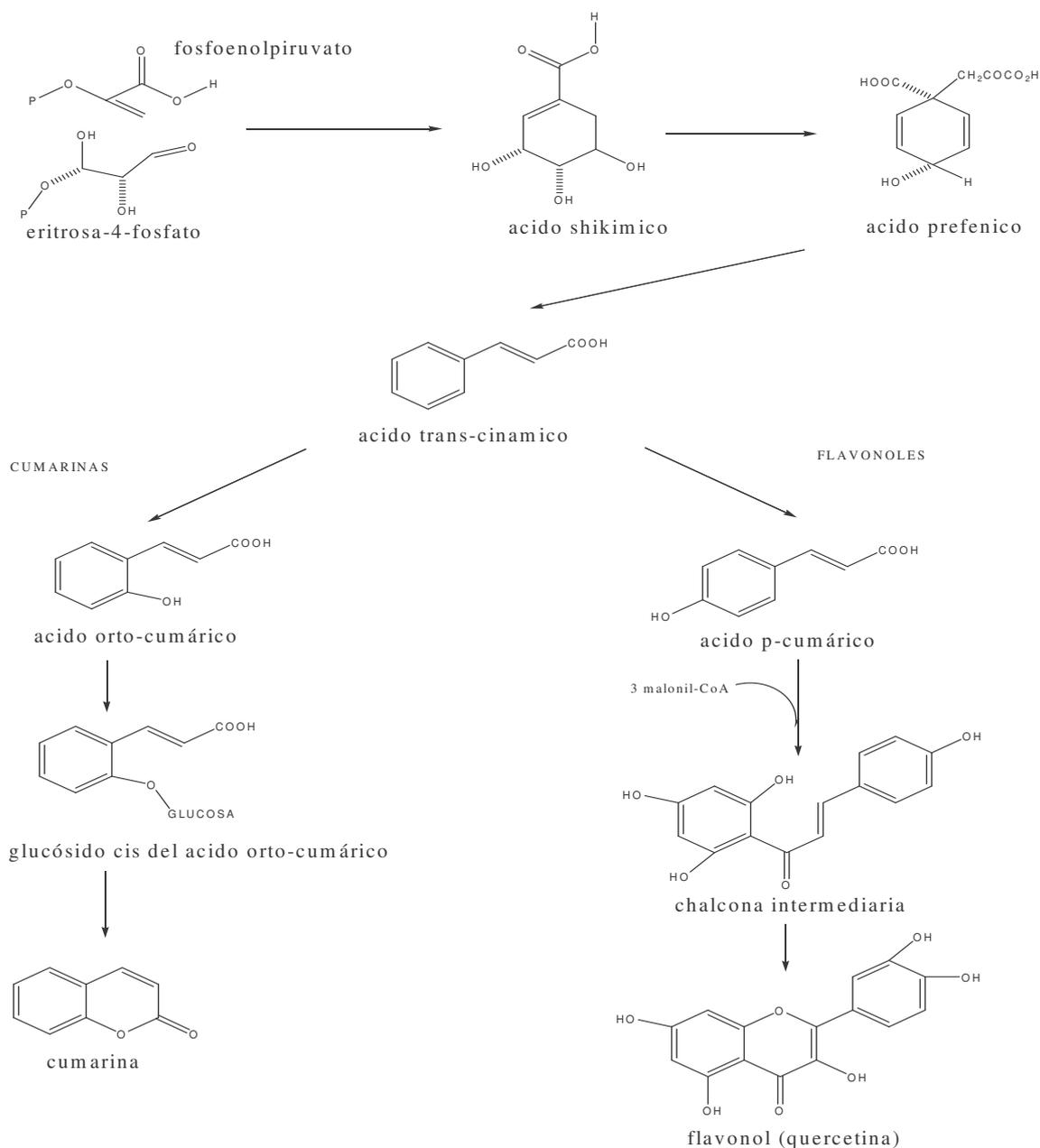
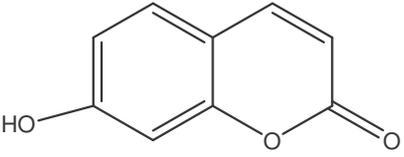
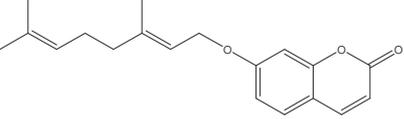
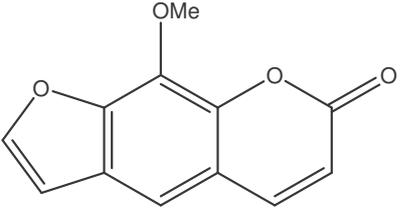
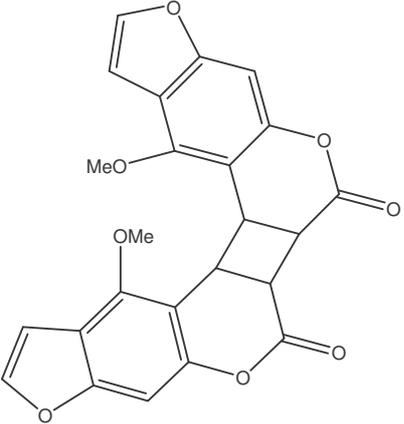


Figura 2. Biosíntesis de las cumarinas y de los flavonoles a partir del ácido shikímico<sup>4,5</sup>

Las cumarinas se clasifican en cinco grupos principales: las cumarinas sencillas, cumarinas con unidades isopreno, piranocumarinas y las dicumarinas. Dentro del género *Citrus* se han encontrado las siguientes cumarinas, Ver Figura 3.

Tipo de cumarinas/ Especies / Ejemplos.	Estructura química
<p>Cumarinas sencillas (sustitución en las posiciones 5,6,7 y 8 con H, OH o OMe)</p> <p>Ejemplo: 7-hidroxycumarina</p> <p><i>Citrus natsudaïdaï</i><sup>9,8</sup></p> <p><i>Citrus limon</i><sup>8,9</sup></p>	 <p>The structure shows a coumarin core with a hydroxyl group (-OH) at the 7-position.</p>
<p>Cumarinas con unidades isopreno.</p> <p>Ejemplo: aurapteno.</p> <p><i>Citrus Citrus grandis</i><sup>9</sup></p>	 <p>The structure shows a coumarin core with a long prenyl chain at the 3-position.</p>
<p>Furanocumarinas, unión de un furano en las posiciones 6 y 7 de una cumarina sencilla.</p> <p>Ejemplo: metoxsaleno</p> <p><i>Citrus limon</i><sup>9</sup></p>	 <p>The structure shows a coumarin core with a furan ring fused at the 6 and 7 positions and a methoxy group (-OMe) at the 8-position.</p>
<p>Dicumarinas, dímeros de cumarina</p> <p>Ejemplo: dímero del 6-metoxifuranocumarina</p> <p><i>Citrus limonia Risso</i><sup>22</sup></p>	 <p>The structure shows two furanocoumarin units linked together at their 2-positions.</p>

**Figura 3. Cumarinas encontradas en el género *Citrus***

### 3.2.2. Generalidades de los flavonoides

Los flavonoides son compuestos fenólicos basados en un esqueleto de 15 átomos de carbono distribuidos en una relación del tipo C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>. Todos los flavonoides poseen un origen biosintético común, comenzando con tres unidades de acetato (acetil-CoA, proveniente de la ruta acetato-malonato) y el ácido *p*-cumárico, metabolito que proviene de la ruta del ácido shikímico<sup>4,5</sup> (Ver Figura 2).

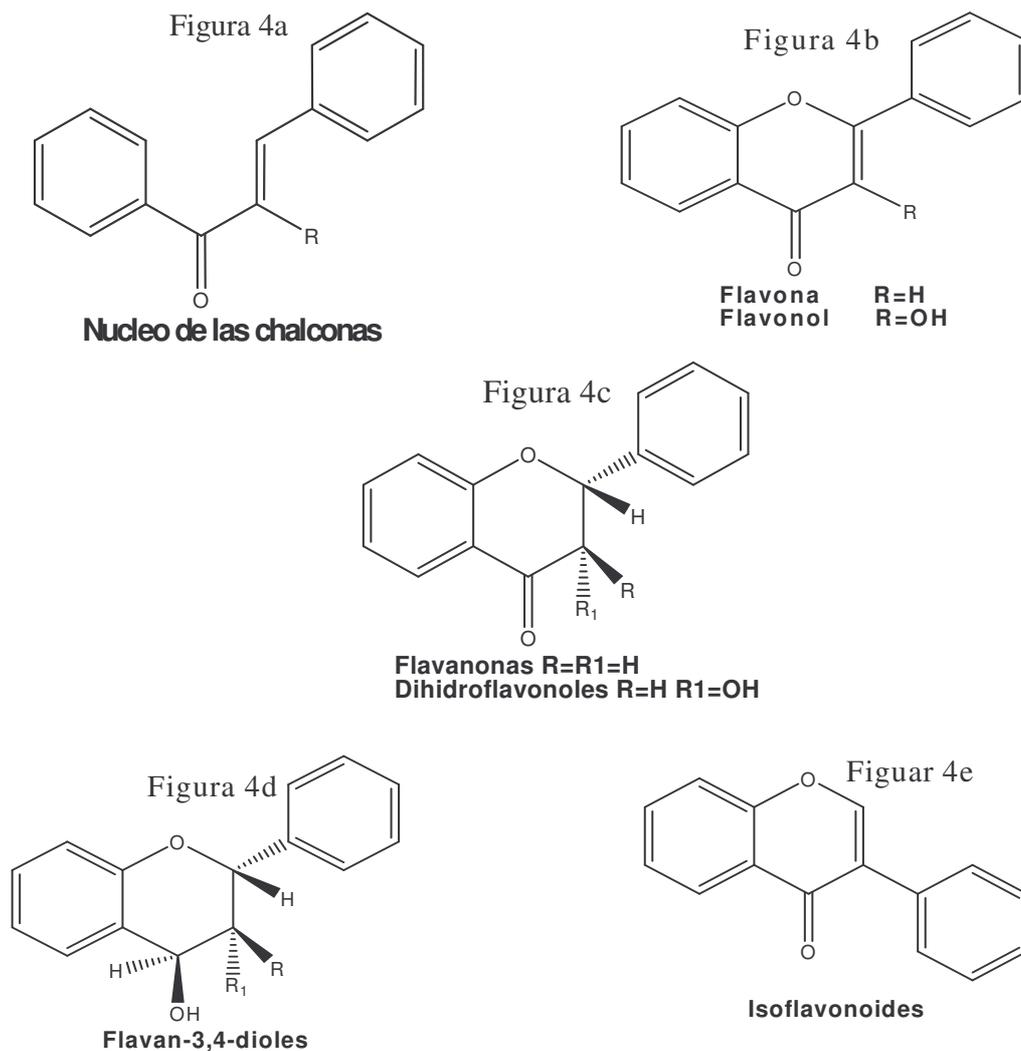
Los flavonoides se clasifican de acuerdo a sus variaciones estructurales:

**Chalconas.** Estructura C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> donde no existe el anillo C, debido a que no existe un oxígeno enlazado con el carbono 2 del anillo A y el carbono 3 de la parte 2-propen-1-ona, (Ver Figura 4a)

**Flavonas.** 2-fenil-γ-cromona con doble enlace en la posición 2 y 3, se dividen en flavonas (H en la posición 3) flavanonol (OH en la posición 3). (Ver Figura 4b)

**Flavanonas y dihidroflavonoles.** Flavonas sin el doble enlace en la posición 2 y 3, en este grupo se agrupan las flavanonas, los dihidroflavonoles (OH en la posición 3), Ver Figura 4c, así como las flavan-3,4-dioles (OH en la posición 3 y en la posición 4), Ver Figura 4d.

**Isoflavononas.** Flavonas que provienen de la 3-fenil-γ-cromona, el anillo B se encuentra unido al carbono 3 y no al carbono 2 como ocurre con las flavonas, ver Figura 4e.

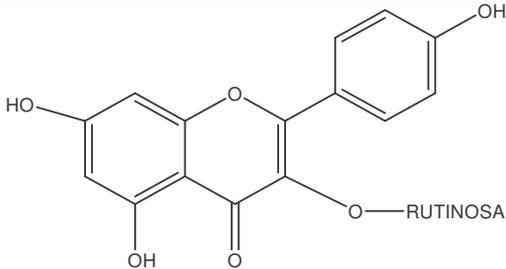
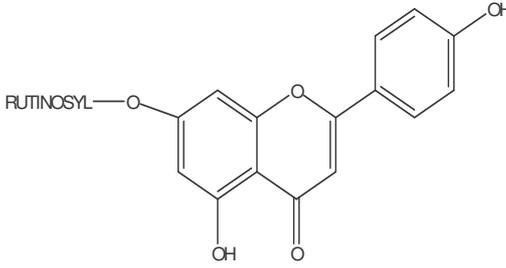
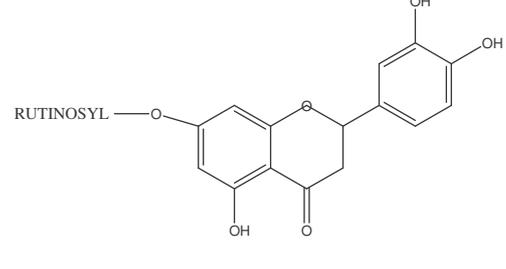
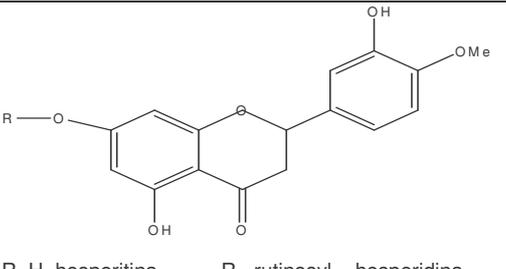
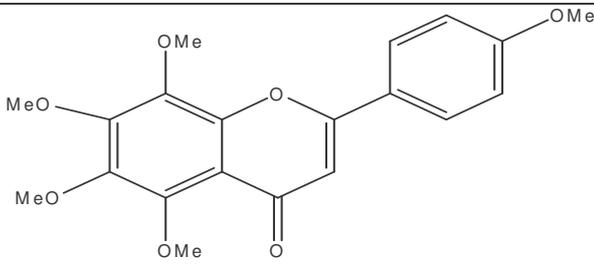


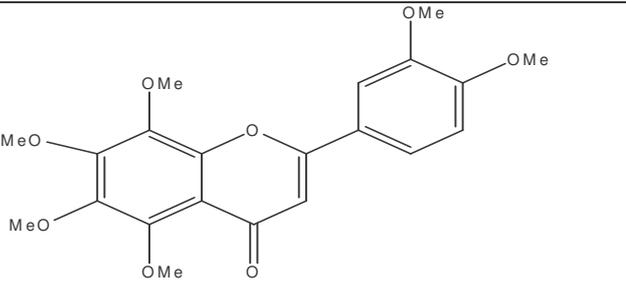
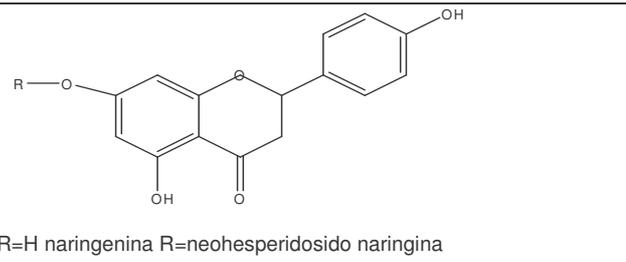
**Figura 4. Estructuras principales de derivados relacionados con los flavonoides<sup>5</sup>**

Además de encontrarse en forma libre, también se les ha aislado unidos a glucosa en las posiciones 3 y 7.

La distribución de las flavonas, flavonoles y sus glucósidos correspondientes es universal, pero algunos esquemas de sustitución se encuentran restringidos a familias o a grupos de familias, de ahí su interés en términos de quimiotaxonomía, como en el caso de las flavonas sustituidas en la posición 5 y 7 comprendidas en la familia Rutaceae, mencionado previamente.

Algunas de las flavonas encontradas en los frutos de los cítricos se mencionan en la figura 5.

Compuesto / tipo de flavona	Estructura química	Especie*/rendimiento**
Rutin Flavona		<i>Citrus limon</i> (0.6%) <i>Citrus limonia</i> (0.74%) <i>Citrus sinensis</i> (0.21%)
Isorhoifolin Flavona		<i>Citrus latifolia</i> (0.097) <i>Citrus limon</i> (0.14%) <i>Citrus sinensis</i> (0.23%)
Eriocitrina Flavanona		<i>Citrus limón</i> (0.25%)
Hesperitina y hesperidina Flavanona	 <p>R=H hesperitina      R= rutinosyl hesperidina</p>	<i>Citrus sinensis</i> (0.49%) <i>Citrus limonia</i> (0.19%)
Tangerinina Polimetoxiflavona		<i>Citrus sinensis</i> (0.072%) <i>Citrus aurantium</i> (0.069%)

Nobeletina Polimetoxiflavona		<i>Citrus limonia</i> (0.02%) <i>Citrus sinensis</i> (0.03%) <i>Citrus aurantium</i> (0.02%)
Naringenina y naringina Flavanona		<i>Citrus limonia</i> (0.02%)

\*Especies que se mencionan en la figura 4: *C. limón* (limón dulce), *C. limonia* (lima), *C. sinensis* (naranja valenciana), *C. latifolia* (limón agrio) *C. aurantium* (naranja dulce)

\*\*cantidad de producto en 100mg de extracto natural.

### Figura 5. Ejemplos de algunas flavonas encontradas en el género *Citrus*<sup>13</sup>

En años recientes, los flavonoides aislados del genero *Citrus* han demostrado gran actividad antitumoral, anticarcinogénica<sup>6</sup> y antioxidante<sup>7</sup> con baja toxicidad en mamíferos, son este tipo de productos los que confieren las propiedades curativas y de prevención que se le atribuye al consumo de frutas del genero *Citrus*<sup>11,13,14</sup>

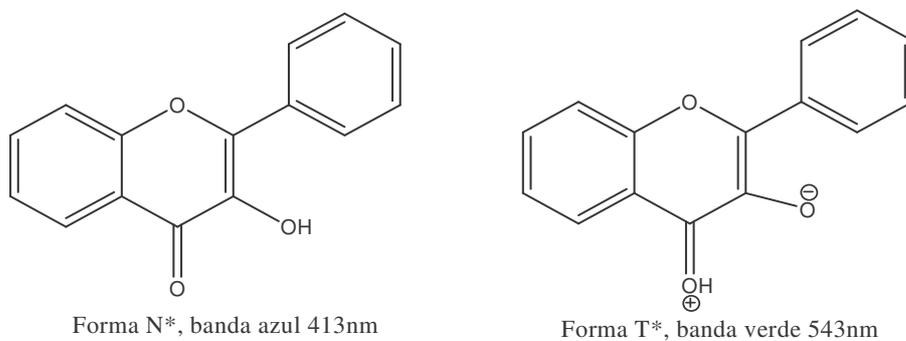
### 3.3 Propiedades fluorescentes de los derivados de las 3-hidroxi flavonas

Los flavonoides son pigmentos casi universales en los vegetales y son responsables de la coloración de flores, frutos y hojas, por ejemplo las chalconas, auronas y flavonoles dan a las plantas coloraciones amarillas<sup>4</sup>

Las flavonas se caracterizan por mostrar una fuerte absorción en la región UV y los flavonoles (cuyo núcleo base es la 3-hidroxi flavona) exhiben fluorescencia con excitación a los 350-370 nm. Se ha observado que la 3-hidroxi flavona en diferentes disolventes práticos muestra dos bandas de fluorescencia de emisión<sup>23-25</sup>, la primera banda aparece en los 400-440 nm y la otra en los 510-540 nm.

En los estudios previamente citados<sup>23-25</sup> se demostró que este fenómeno se debe al equilibrio ceto-enol del grupo carbonilo (en posición 4) y el grupo hidroxilo (en

posición 3) del anillo C de la flavona en el estado excitado, las estructuras responsables en la 3HF (3-hidroxiflavona, ver glosario) se muestran en la Figura 6.



**Figura 6. Estructuras de la forma N\* y T\* de la 3-Hidroxiflavona.**

Sengupta y Kasha<sup>26</sup> fueron los primeros que asignaron las estructuras presentadas en la Figura 5 a las bandas observadas en el espectro de fluorescencia de emisión.

La banda que se encuentra entre los 400-440 nm fue denominada azul (por la longitud de onda donde aparece) o N\*, debido a que en esta banda la flavona se encuentra en su forma normal excitada, la banda que aparece en los 510-540 nm se denomina verde o T\* debido a que en esta banda, la molécula se encuentra en forma tautomérica excitada.

La excitación de la 3HF, facilita la transferencia del protón intramolecular, mecanismo denominado ESPT (excited-state proton transfer, en sus siglas en inglés) y ocurre como se representa en la Figura 7.

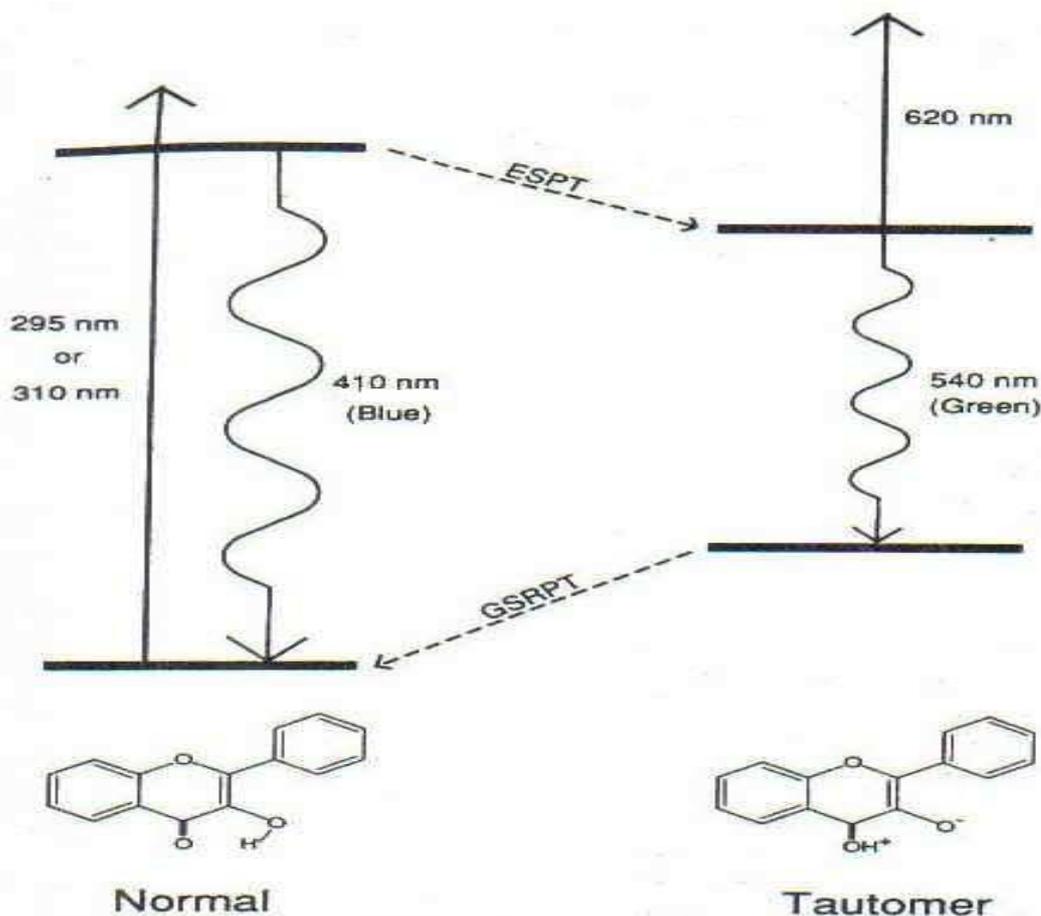


Figura 7. Mecanismo del ESPT en la 3HF<sup>27</sup>

**ESPT: excited-state proton transfer, transferencia de proton en estado excitado**

**GSRPT: ground state reverse proton transfer, regreso del estado excitado al estado basal**

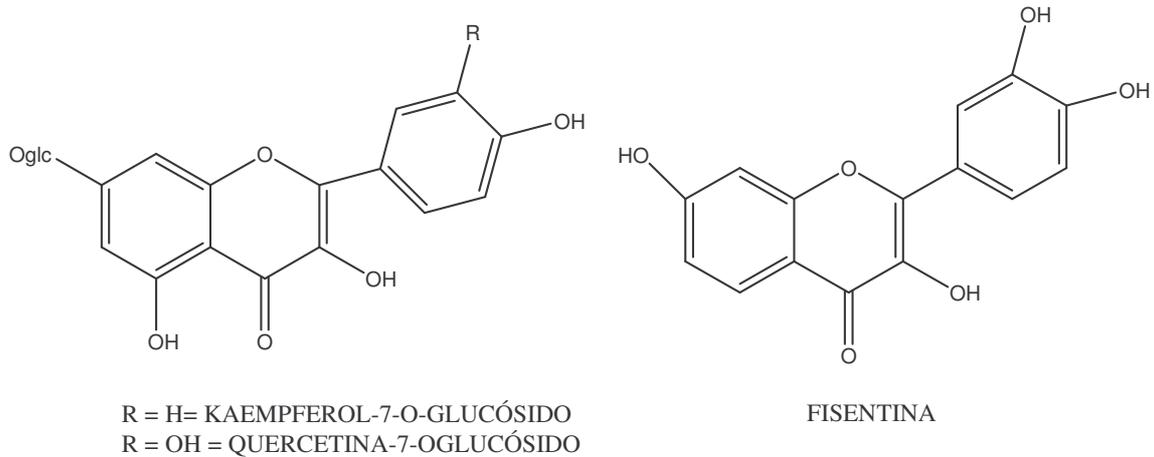
La ESPT en la 3HF tiene ciertas características particulares:

- La transferencia del protón del hidroxilo de la posición 3 al carbonilo de la posición 4 ocurre en velocidades rápidas ( $k_{pt} > 10^{-11} \text{ s}^{-1}$ )<sup>15</sup> esto se presenta aun a temperaturas muy bajas. Por lo que la medición de las características dinámicas de la reacción solo se puede medir con espectroscopia láser.

- La ESPT es influenciada por efectos de solvatación de los disolventes y de su capacidad de donar H, aquellos disolventes que pueden donar protones (por ejemplo los alcoholes) interactúan con la 3HF, y ocasiona que la transferencia del protón sea mas lenta ( $k_{pt} > 10^{-8} \text{s}^{-1}$ )<sup>28</sup> al compararse cuando se realiza con disolventes no donadores de protones ( $k_{pt} > 10^{-11} \text{s}^{-1}$ )<sup>27</sup>. La temperatura tiene influencia en la velocidad a la que ocurre la ESPT, se disminuye la velocidad de transferencia del protón a bajas temperaturas<sup>28</sup>.
- El equilibrio ceto-enol, y por lo tanto la ESPT, no se produce en derivados de la 3HF que tienen sustituyentes en la posición 2 y 5 del anillo B de los flavanoles<sup>29</sup> debido a la atracción que ejerce cualquier grupo en estas posiciones al protón del hidroxilo de la posición 3.

Este fenómeno de fluorescencia dual no solamente se ha estudiado en la 3HF, se han realizado experimentos con derivados sintéticos de la 3HF para el desarrollo de pigmentos fluorescentes ultrasensibles<sup>30,31</sup> con aplicaciones en la Química Analítica, a la Ciencia Macromolecular, a la Química de los Coloides y a la Biología Celular<sup>32</sup>.

Los fenómenos de fluorescencia dual también se han estudiado en moléculas derivadas de la 3HF de origen natural como es el caso de la 7-glucósido-querceptina, 7-glucósido-kaempferol<sup>33</sup> y en la fisentina, (Figura. 8), utilizando las propiedades fluorescentes de este ultimo producto como referencia para la evaluación de la interacción con ciclodextrinas<sup>34</sup>.



**Figura 8. Moléculas de origen vegetal que se ha observado el ESPT**

La propiedad de fluorescencia dual, provee a los derivados de 3HF de origen natural la capacidad de estudiar los microambientes biológicos, en las que interaccionan estas moléculas con sus blancos como membranas lipídicas, ácidos nucleicos o proteínas<sup>35</sup>.

## 4. PARTE EXPERIMENTAL

### 4.1 Materiales y disolventes

Para la purificación de los compuestos se utilizó cromatografía en columna, empleando sílice tipo Merck 60-45 $\mu$ m, el seguimiento de la separación de los compuestos fue realizado por cromatografía en capa fina (CCF) utilizando placas de aluminio cubiertas con gel de sílice 60 F254 con revelador, Merck Co. Como reveladores se utilizaron: lámpara de luz ultravioleta Minera Light Lamp Multiband UV-254/364 nm, solución de sulfato cerico al 1% en una solución de ácido sulfúrico al 10% y calentamiento.

Para el estudio de UV-VIS y de Fluorescencia, se utilizaron matraces volumétricos de 50 ml, 100 ml Pirex, pipetas volumétricas de 1.0 ml y celdas de cuarzo.

Los disolventes utilizados para la separación de los compuestos así como la medición de UV-VIS y de fluorescencia de la polimetoxiflavonas se adquirieron de Aldrich. A continuación se indican los disolventes con su respectiva especificación.

Metanol grado HPLC

Acetonitrilo grado HPLC

1-Hexanol grado técnico

Acetato de etilo grado técnico

N-hexano grado técnico, se purificó por destilación fraccionada

Acetona grado técnico.

### 4.2 Equipo Analítico.

Los espectros de resonancia para hidrógeno (RMN  $^1\text{H}$ ) y carbono trece (RMN  $^{13}\text{C}$ ) se obtuvieron en un equipo Varian Unity a 200 Mhz para  $^1\text{H}$  y 75 Mhz para  $^{13}\text{C}$ , para indicar la multiplicidad de las señales se utiliza las abreviaturas: s, para señal simple, d para señal doble y dd para señal correspondiente a doble doblete. Mediante la Espectrometría de Masas de Impacto Electrónico (EMIE) se determinó el peso molecular de los compuestos obtenidos, empleando un espectrómetro JEOL JMS AX 505 HA.

Con un espectrofotómetro Tensor 27 Bruker se adquirieron los espectros de infrarrojo en solución de CHCl<sub>3</sub>, excepto en el infrarrojo de la 3-hidroxi-5, 6, 7, 8, '4-pentametoxiflavona que se realizó en película.

Para la determinación de los espectros de ultravioleta se utilizó un espectrofotómetro Shimadzu UV 160 para el caso de las cumarinas, para las flavonas se empleó un espectrofotómetro Cary 50 BIO UV-VIS Spectrophotometer Varian.

Los espectros de fluorescencia de emisión de las flavonas se realizaron en un fluorímetro Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer Varian.

### 4.3 Recolección del material biológico

La planta fue identificada como *Citrus limonia* Osbeck, caracterizada por el profesor Maximino Martínez<sup>15</sup>, sus frutos se usan en la alimentación humana. El material biológico (frutas del limón real) fue adquirido en la Central de Abastos de la Ciudad de México local 38, el propietario del lugar informó que la fruta era importada de la comunidad de La Ceiba, Km 38 de la carretera Poza Rica-Gazones en el estado de Veracruz. Dato que fue confirmado con la visita que se realizó a dicho lugar.



**Fig. 9 *Citrus limonia* Osbeck  
La Ceiba, Veracruz**

La recolección de la fruta usada ocurrió en el periodo de Octubre- Noviembre del 2005, final de la temporada de producción.

Los árboles donde se recolectó la fruta tenían una altura de 3 a 5 metros de altura (figura 9), los frutos utilizados tenían un diámetro entre los 4.8 cm a 7 cm en su estado de madurez, de color entre amarillo y verde. A diferencia de la naranja valenciana (*Citrus sinensis*) o

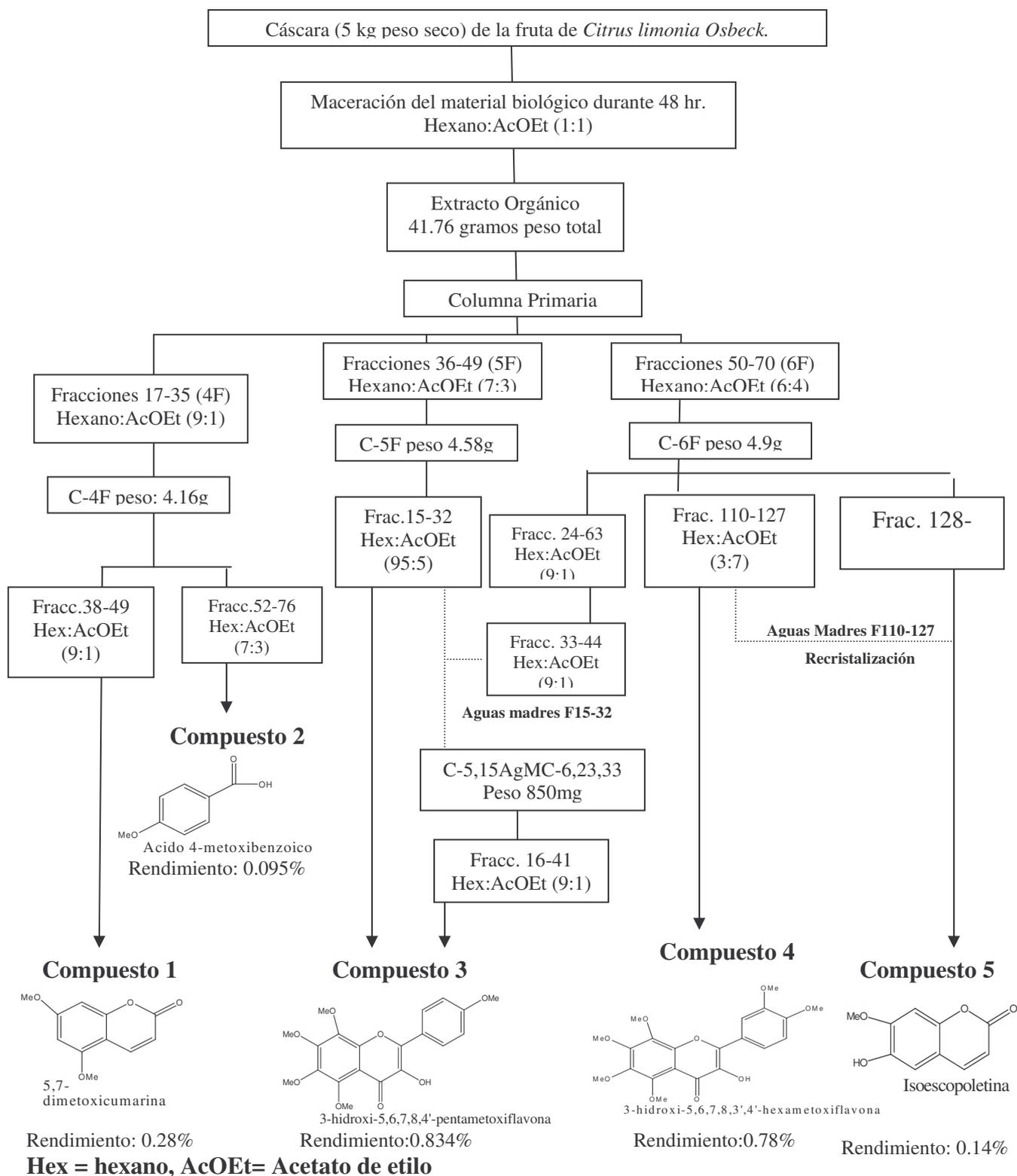
naranja dulce (*Citrus aurantifolia*), el jugo de la fruta del *Citrus limonia Osbeck* es mas acido y agrio que la de las especies citadas, pero no tanto como la fruta del limón (*Citrus lemon*). Las cáscaras fueron retiradas de la fruta y se dejaron secar a temperatura ambiente durante 5 días para después macerarlas en disolventes orgánicos.

#### **4.4 Preparación del material biológico, cáscara de *Citrus limonia Osbeck*, para el aislamiento de los metabolitos secundarios.**

El material biológico, 5 kilogramos de peso seco, fue puesto en maceración durante 5 días con una mezcla 1:1%v de disolventes Hexano/Acetato de etilo (AcOEt), se realizaron de esta manera tres extracciones, posteriormente se concentraron utilizando un rotovapor a presión reducida.

El extracto concentrado tuvo un peso de 41.76 gramos (peso seco), muy viscoso y de color café claro, al exponerlo al UV (364 nm) cambiaba de color a verde intenso.

## Diagrama del aislamiento de los compuestos mayoritarios del extracto de la cáscara de *Citrus Limonia Osbeck*



#### **4.5. Aislamiento de los metabolitos secundarios de la cáscara del *Citrus limonia Osbeck*.**

El fraccionamiento de 41.76 gramos del extracto se realizó en una columna empacada con gel de sílice (169 gramos). A esta columna la llamaremos Columna Primaria. La fase móvil inicial fue hexano 100%, posteriormente se incremento la polaridad usando mezclas de hexano y acetato de etilo en diferentes porciones hasta llegar a una concentración AcOEt. 100%. De este fraccionamiento se obtuvieron 119 fracciones de 200 ml cada una, se concentraron a presión reducida, después fueron analizadas por CCF y reunidas de acuerdo al Rf de cada fracción.

De la Columna Primaria, se reunieron las fracciones 17-35 designada como 4F, las fracciones 36-48 se identificaron como 5F, al conjunto de las fracciones 49-70 se les nombró 6F. Las demás fracciones presentaron varios compuestos que no se pudieron aislar, en algunos casos los compuestos quedaban retenidos en la sílice gel, en otros, la cantidad de producto era insuficiente para purificarse e identificarlo por técnicas espectroscópicas.

##### **4.5.1 Aislamiento de 5,7-Dimetoxicumarina, Compuesto 1**

La fracción 4F, de peso 4.16 gramos, se purificó en una columna de sílice 60G, a esta cromatografía se le llamo C-4F y se obtuvieron 72 fracciones.

De las fracciones 38-49 eluidas con hexano/AcoEt (9:1%v) se obtuvo un aceite de color amarillo, cuando se irradiaba con una lámpara UV a 364 nm cambiaba su color a azul intenso. Este aceite tenía un producto principal con pequeñas impurezas, se purificó por recristalización usando hexano/acetona (9:1%v), obteniendo cristales blanco con un peso de 120 mg y con un punto de fusión de 148-150°C. Las características espectroscópicas indican que este compuesto, es la 5,7-dimetoxicumarina que se ha denominado **Compuesto 1**:

Rendimiento: 0.28%, peso total: 120 mg.

RMN<sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 3.85 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.89 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 6.16 (d, J=9.8Hz, 1H, 3-H), 6.28 (d, J= 2Hz, 1H, ArH), 6.42 (d, J= 2.2Hz, 1H, ArH), 7.96 (d, J =10.2Hz, 1H, H-4). (Ver apéndice, Espectro 1)

RMN<sup>13</sup>C (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 163.63 (C-7), 161.516 (C-2), 156.908 (C-5), 156.735 (C-9), 138.715 (C-4), 110.895 (C-3), 103.936 (C-10), 94.784 (C-8), 92.732 (C-6), 55.918 (-OMe), 55.776 (-OMe) (ver apéndice Espectro 2, para el DEPT ver apéndice Espectro 3),

EMIE *m/z* (fragmento, intensidad relativa %): 206 (C<sub>11</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub> 100), 178 (C<sub>10</sub>H<sub>10</sub>O<sub>3</sub> 75), 163 (C<sub>10</sub>H<sub>7</sub>O<sub>3</sub> 35.6), 135 (C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>O<sub>2</sub> 20). (Ver apéndice Espectro 4)

IR (CHCl<sub>3</sub>): 1720 (R-COO-R), 1612, 1465 (C=C Ar), 1154, 1120, 1099 (R-O-R) cm<sup>-1</sup> (ver apéndice, Espectro 5)

UV λ<sub>max</sub>/abs: 326 (0.699), 246 (0.295) 208 (1.43) ε<sub>326nm</sub> (MeOH)= 91.97 (ver apéndice, Espectro 6)

Con los cristales se pudo obtener la estructura por medio de Rayos X (ver apéndice, Espectro 7), estudio que no ha sido reportado en la literatura<sup>10,16-21</sup>.

#### 4.5.2 Aislamiento del Ácido-p-metoxibenzoico, Compuesto 2

Las fracciones 52-76 de la columna C-4F se recromatografiaron (columna C-4F-52). Se purificó en esta columna un aceite muy viscoso de color naranja con un peso de 250 mg. De las fracciones 3-5, obtenidas con una mezcla de hexano/AcOEt (9:1%v), se aisló un polvo de color blanco con un peso total de 40 mg. En la CCF se apreciaba un solo producto, con punto de fusión de 184-188°C, por lo que al compuesto se le hicieron los estudios espectroscópicos de RMN de protón y carbono 13, infrarrojo y de espectrometría de masas.

El compuesto en cuestión se determinó como el ácido 4-metoxibenzoico, **Compuesto 2**, las características espectroscópicas son las siguientes:

Rendimiento: 0.095%, peso total: 40 mg

RMN<sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 3.88 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>) 6.95 (2H Ar-H), 8.07 (2H Ar-H) (ver apéndice Espectro 9)

RMN<sup>13</sup>C (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 171.64 (C-1'CO<sub>2</sub>H) 164.01 (C-4), 132.34 (C-2,6) 121.62 (C-1) 113.73 (C-3,5) 55.49 (-OMe) (ver apéndice Espectro 10, el DEPT es el Espectro 11, ver apéndice)

EMIE *m/z* (especie, intensidad relativa %): 152 (C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>O<sub>3</sub> 100) 135 (C<sub>8</sub>H<sub>7</sub>O<sub>2</sub> 97.2) 107 (C<sub>7</sub>H<sub>7</sub>O 12) 77 (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub> 17) (ver apéndice Espectro 12)

IR (CHCl<sub>3</sub>): 3526 (-OH) 3079 (Ar-H) 2988 (torsión simétrica-CH<sub>3</sub>), 2842 (R-OCH<sub>3</sub>), 1688 (-C=O), 1605, 1580, 1513, 1424, 1288 (torsión del ácido)

carboxílico), 1258 (-C=C-O-R), 1168, 1031(-C=C-O-R), 849 (Ar, 1,4-di sustitución)  $\text{cm}^{-1}$  (ver apéndice Espectro 13)

Este compuesto es ampliamente conocido<sup>3+-38</sup>, pero es la primera vez que se encuentra dentro del genero *Citrus*<sup>16,39</sup>.

#### **4.5.3 Aislamiento de la 3-hidroxi-5, 6, 7, 8, 4'-pentametoxiflavona, Compuesto 3**

El residuo de las fracciones 36-49 (5F) de la Columna Primaria (4.58 gramos) fue adsorbido en una columna empacada de gel de sílice, a esta columna se le asignó el nombre C-5, el total de fracciones de esta columna fue de 140. Las fracciones 15-32 eluidas con hexano/ AcOEt (9.5:0.5%v) se recrystalizarón usando una mezcla hexano/acetona (95:5%v) obteniéndose cristales de color amarillo que al aplicarle luz ultravioleta (364 nm) da un color amarillo-verde muy intenso, la cantidad obtenida en esta recrystalización fue de 165.6 mg. Al realizar una comparación entre las aguas madres y el producto recrystalizado, usando CCF, se observó que en las aguas madres todavía se encontraban residuos del compuesto recién recrystalizado, por otra parte se observo que las fracciones 33-44 de la columna C-6,24 (ver mas adelante detalles de esta columna) contenían el mismo compuesto al ser similares sus Rf, por lo que se decidió reunir las aguas madres con las fracciones 33-44 de C-6,24 el peso total del residuo utilizado fue de 850 mg. A esta columna se le dio el nombre de C-5,15AgM/C-6,24, de la que se obtuvieron 70 fracciones.

De las fracciones 16-41 de la columna C-5,15AgM/C-6,24 se obtuvieron cristales con un peso total de 169.1 mg que presentaba las mismas características de los cristales obtenidos de las fracciones 15-32 de la columna C-5, para confirmar que se trataban del mismo compuesto se compararon los Rf (0.47 hexano/AcoEt 7:3%v), punto de fusión (151-152°C) y picos de RMN<sup>1</sup>H, con esto se demostró que los productos son el mismo compuesto. La flavona 3-hidroxi-5, 6, 7, 8, 4'-pentametoxiflavona, aislada previamente en la cáscara de la *Citrus Natsudaia*<sup>11,13</sup>, se identificó como Compuesto 3 y presento las características espectroscópicas :

Rendimiento: 0.834%, peso total: 348.5 mg

RMN<sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 3.89 (s, 3H OMe), 3.96 (s, 3H OMe), 3.99 (s, 3H OMe), 4.03 (s 3H OMe), 4.12 (s 3H OMe) 7.06 (2H ArH) 8.24 (2H ArH). (Ver apéndice, Espectro 14)

RMN<sup>13</sup>C (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>):δ 171.81 (C-4), 160.84 (C-4c) 151.5 (C-7), 147.49 (C-2) 146.49 (C-5), 143.45 (C-9), 143.17 (C-6), 137.85 (C-3), 137.18 (C-8), 129.06 (C-2c, 6c), 123.56 (C-1c) 114.11 (C-3c,5c), 111.69 (C-10), 62.3 (-OMe), 61.99 (-OMe), 61.82 (-OMe), 61.66 (-OMe), 55.37 (-OMe). (Ver apéndice, Espectro 15)

EMIE *m/z* (especie, intensidad relativa %):388 (C<sub>20</sub>H<sub>20</sub>O<sub>8</sub> 100), 373 (C<sub>19</sub>H<sub>17</sub>O<sub>8</sub> 82.3%) 327 (C<sub>18</sub>H<sub>15</sub>O<sub>6</sub>). (Ver apéndice, Espectro 17)

IR (película):3293 (-OH), 3092 (ArH), 2846 (CH<sub>3</sub>-O-R), 1602 (C=O), 1563, 1513, 1488, 1461, 1402,1370 (-CH<sub>3</sub> torsión simétrica) 1294, 1264 (C-O-CH<sub>3</sub>), 1209 (Ar-OH), 1055 (C-O-C). (Ver apéndice, Espectro, 18)

Se realizaron estudios de difracción de Rayos X (Espectro 19), confirmando que la molécula aislada y purificada de la cáscara de la fruta de *Citrus Limonia Osbeck* se trata de la 3-hidroxi-5, 6, 7, 8, 4'-pentametoxiflavona (Compuesto 3)

#### **4.5.4 Aislamiento de la 3-hidroxi-5,6,7,8,3',4'-hexametoxiflavona, Compuesto 4**

Las fracciones 50-70 (6F) de la Columna Primaria obtenidas con hexano:AcOEt(6:4%v) se recromatografiaron, a la recromatografía se le llamo C-6, se trabajo con un liquido oscuro y muy viscoso con un peso de 4.9 gramos. De C-6 se obtuvieron dos grupos de fracciones con productos que presentaban una coloración amarilla-verdosa en el momento de irradiar a la muestra a 364 nm, las fracciones 24-63 que eluyeron con hexano/AcOEt (9:1%v) presentaban un solo compuesto, mientras que las fracciones 110-127 se observaron dos compuestos fluorescentes, uno de color verde y otro de color azul en la CCF.

Como se menciona previamente, de la columna de la fracciones 24-63 (C-6,24) las fracciones 33-44 presentaba el mismo compuesto de las aguas madres de las fracciones 15-32 de la recromatografía C-5, por lo que se reunieron todas estas fracciones en la columna C-5,12AgM/C-6,24, los resultados de esta columna se menciona en párrafos anteriores.

En las fracciones 110-124 aparecieron cristales de color amarillo de gran tamaño, por CCF se observó que estos cristales tenían pequeñas impurezas, se recristalizó usando una mezcla Hexano/Acetona (9:1) obteniéndose cristales de color amarillo con un peso total de 326 mg. A partir de estos cristales se realizaron los estudios espectroscópicos correspondientes, el compuesto aislado y purificado resultó ser la 3-hidroxi-5, 6, 7, 8, 3',4'-hexametoxiflavona, con punto de fusión de 149-150°C, Compuesto 4.

Rendimiento: 0.78%, peso total: 326.9 mg.

RMN<sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 3.96 (s 3H OCH<sub>3</sub>), 3.98 (s 3H OCH<sub>3</sub>), 3.99 (s 3H OCH<sub>3</sub>), 4.03 (s 3H OCH<sub>3</sub>) 4.12 (s 3H OCH<sub>3</sub>) 7.03 (d 1H ArH meta J=8.6Hz) 7.92 (d 2H ArH para J=10Hz) (ver apéndice, Espectro 23)

RMN<sup>13</sup>C (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>):δ 171.76 (C-4), 151.6 (C-2), 150.48 (C-OMe3c), 148.82 (C-OMe4c), 147.57 (C-7), 146.82 (C-5), 143.94 (C-9), 142.98 (C-3), 137.76 (C-8), 137.33 (C-6), 123.78 (C-1c), 120.98 (C-6c), 111.63 (C-5c), 110.99 (C-2c), 110.13 (C-10), 62.31, 61.4, 61.83, 61.70, 55.96, 55.86 (-OMe) (ver apéndice Espectro 24)

IR (película): 3340 (-OH), 2940 (ArH), 2841 (CH<sub>3</sub>-O-R), 1649 (C=O), 1601 (C=C), 1148 (R-O-R) (ver apéndice, Espectro 27)

EMIE *m/z* (especie, intensidad relativa %): 418 (C<sub>21</sub>H<sub>22</sub>O<sub>9</sub> 100), 403 (C<sub>20</sub>H<sub>19</sub>O<sub>9</sub> 74), 400 (C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>8</sub> 30.6) 357 (C<sub>19</sub>H<sub>20</sub>O<sub>7</sub> 25) (ver apéndice Espectro 26)

Se realizaron estudios de difracción de rayos X (ver apéndice, Espectro 28) a los cristales obtenidos con recristalizaciones utilizando mezcla de Acetona/Hexano (9:1%v).

#### 4.5.5 Aislamiento de Isoescopoletina, Compuesto 5

Las aguas madres de la 3-hidroxi-5, 6, 7, 8, 3', 4'-hexametoxiflavona se mezclaron con las fracciones 128-135 de la columna C-6F debido a que presentaban un compuesto fluorescente de color azul que tenían el mismo rf (0.21 hexano/acetato de etilo(7:3%v)). Después de dejar que el disolvente se evaporara, se observó la formación de cristales blancos muy pequeños, por lo que se intentó recristalizar usando Éter de petróleo/AcOEt (8:2%v), el resultado fue un polvo de color blanco con un peso de 60 mg cuyo punto de fusión fue de

185-187°C, este compuesto es la isoescopoletina, Compuesto 5. Las características espectroscópicas son las siguientes:

Rendimiento: 0.14% peso total: 60 mg

RMN<sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 2.85(-OH), 3.89 (s 3H OCH<sub>3</sub>), 6.16 (d 1H H-3 J=9.6Hz), 6.78 (s 1H H-8), 7.18 (s 1H H-5) 7.82 (s 1H H-4 J=9.4Hz) (ver apéndice, Espectro 32)

RMN<sup>13</sup>C (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 161.18 (C-2), 151.06 (C-7), 145.83 (C-6, C-9), 144.55 (C-4), 113.24 (C-3), 112.03 (C-10), 109.87 (C-8), 103.62 (C-5), 56.64 (-OMe) (ver apéndice, Espectro 33)

EMIE *m/z* (especie, intensidad relativa %): 192 (C<sub>10</sub>H<sub>8</sub>O<sub>4</sub> 100), 177 (C<sub>9</sub>H<sub>5</sub>O<sub>4</sub> 57.5), 164 (C<sub>9</sub>H<sub>8</sub>O<sub>3</sub> 35) 149 (C<sub>8</sub>H<sub>5</sub>O<sub>3</sub> 63.8) (ver apéndice, Espectro 35)

IR (película): 3528 (-OH), 1717 (C=O), 1575, 1515, 1463 (-C=c- Ar), 1463, 1376 (-CH<sub>3</sub> torsión simétrica y asimétrica), 1263 (-C=C-O-) cm<sup>-1</sup> (ver apéndice, Espectro 36)

UV λ<sub>max</sub>/abs: 344 (0.351), **298 (0.150)** 253 (0.147) 229 (0.415) 206 (0.832)

Coeficiente de extinción en metanol: ε<sub>344nm</sub>= 35.1 (ver apéndice, Espectro 37)

#### 4.6 Estudio de la fluorescencia de las polimetoxiflavonas encontradas en la cáscara de *Citrus limonia* Osbeck.

Una vez confirmadas las estructuras de las flavonas, se procedió a realizar los estudios de UV-Visible y Fluorescencia de las flavonas en tres diferentes disolventes orgánicos, ver Tabla 1.

Disolvente	ε (cte dieléctrica)	ΔuOHcm-1 Formación de puentes de H	η,cP Viscosidad,
MeOH	33.7	-19.8(alcohol primario)	0.59
Acetonitrilo	38	-no determinado	0.36
Hexanol	13.3	-19.8(alcohol primario)	5.1

Tabla 1. Características de los disolventes utilizados<sup>41</sup>

##### 4.6.1 Preparación de las disoluciones del Compuesto (3).

Se pesaron 14.3 mg que fueron aforados a 50 ml con metanol (concentración 7.37x10<sup>-4</sup>M), después se tomó 1.0 ml de esta disolución y se aforó a 100 ml con metanol (concentración 7.37x10<sup>-6</sup>M) esta última disolución fue la que se tomó para la medición del UV-VIS y del espectro de Fluorescencia de emisión.

Para las disoluciones de acetonitrilo se pesaron 6.5 mg aforando a 50 ml, de aquí se tomó 1 ml para aforarla a 100 ml, la concentración final fue de  $3.35 \times 10^{-6} \text{M}$ . En las disoluciones de hexanol se utilizaron 6.9 mg, se siguió el mismo procedimiento de las disoluciones de metanol y acetonitrilo, la concentración final fue de  $7.11 \times 10^{-6} \text{M}$ .

#### **4.6.2 Preparación de las disoluciones del Compuesto (4)**

Para la disolución de metanol se pesaron 14.3 mg que se aforaron a 50 ml, de esta disolución se tomó 1.0 ml y se aforo a 100 ml, la concentración final fue de  $7.37 \times 10^{-6} \text{M}$ , para el acetonitrilo se pesaron 6.5 mg aforados a 50 ml, después se tomo 1 ml y se aforó a 100 ml, la concertación es de  $3.35 \times 10^{-6} \text{M}$ ; para las disoluciones de hexanol se siguió el mismo procedimiento de las disoluciones de acetonitrilo, la concentración de la disolución mas diluida de hexanol fue de  $7.11 \times 10^{-6} \text{M}$ .

Después de tener los espectros de UV-VIS y de Fluorescencia del Compuesto 3 y 4, se evaporaron los disolventes utilizando presión reducida a temperatura ambiente, esto para evitar la posible descomposición de los compuestos. Una vez concentrados los productos, se realizó una CCF para observar la pureza de los compuestos, para confirmar que no existan otros compuestos que puedan alterar los resultados de los espectros de fluorescencia o que se formaron al irradiar la muestra con luz.

## 5. Resultados

### 5.1. Metabolitos aislados de la cáscara de la *Citrus limonia Osbeck*

Del extracto orgánico de la cáscara de *Citrus limonia Osbeck* fue posible aislar cinco compuestos: dos cumarinas, dos flavonas y un derivado del ácido benzoico. Los nombres de las sustancias aisladas son:

5,7-dimetoxicumarina (Compuesto 1)

Ácido 4-metoxibenzoico (Compuesto 2)

3-hidroxi-5, 6, 7, 8, '4,-pentametoxiflavona (Compuesto 3)

3-hidroxi-5, 6, 7, 8, '3,'4-hexametoxiflavona (Compuesto 4)

Isoescopoletina (Compuesto 5).

### 5.2 Espectros de fluorescencia de emisión de las disoluciones de las polimetoxiflavonas.

En el espectro de absorción de UV-VIS (Ver apéndice los Espectros 21 y 30) del Compuesto 3 y Compuesto 4 respectivamente, las disoluciones metanólicas presentaron dos picos de máxima absorción, el primero aparece a los 420 nm, mientras que el segundo pico se encuentra en los 347 nm en el compuesto 3 y en los 360 nm en el compuesto 4.

El espectro de fluorescencia de emisión de Compuesto 3 disuelto en metanol con excitación a los 347 nm presento dos componentes de máxima intensidad en los 390 nm y los 488 nm (Ver apéndice Espectro 22). Para el compuesto 4, el espectro de fluorescencia de emisión con excitación a los 360 nm disuelto en metanol también presenta dos bandas, en 424 nm y 490 nm (Ver Apéndice Espectro 31).

El rendimiento de fluorescencia para el compuesto 3 en metanol es 5.3, mientras que para el compuesto 4 el rendimiento de fluorescencia en metanol es de 1.7, ambos valores solo se presentan cuando existen las dos especies tautoméricas.

Los espectros de fluorescencia de emisión de las disoluciones de acetonitrilo de ambos compuestos, que fueron excitados alrededor de los 360 nm (ver apéndice Espectro 21 y 30, del compuesto 3 y compuesto 4 respectivamente), solo presentan una sola banda intensa, para el Compuesto 3 se observa la banda en los 535 nm, mientras en el compuesto 4 se encuentra en los 538 nm.

En el caso de las disoluciones realizadas con hexanol como disolvente, se observa que las moléculas tienen un máximo de absorción cercano a los 370 nm. El espectro de fluorescencia de emisión del compuesto 3 excitado a 367 nm aparecen dos bandas fluorescentes una a los 408 nm y la otra en los 536 nm, con un rendimiento de fluorescencia del 9.41, mientras que el espectro de fluorescencia de emisión del compuesto 4 excitado a los 370 nm las bandas aparecen en los 408 nm y en los 540 nm, el rendimiento de fluorescencia es de 9.46, los resultados obtenidos se encuentran resumidos en la tabla 2.

Polimetoxiflavona	Medio (disolvente)	$\lambda_{\text{max}}^{\text{abs}}$ ex./abs.	$\lambda_{\text{max}}^{\text{em}}$ (azul)nm	$\lambda_{\text{max}}^{\text{em}}$ (verde)nm	$I_{\text{I}}/I_{\text{II}}$
Compuesto 3	Metanol	420nm	-	485	-
		347nm	390	488	5.36
	Acetonitrilo	360nm	-	535	-
	Hexanol	367nm	408	536	9.41
Compuesto 4	Metanol	420nm	-	492	-
		360nm	424	490	1.723
	Acetonitrilo	360nm	-	538	-
	Hexanol	370nm	420	540	9.46

**Tabla 2. Parámetros de fluorescencia de emisión de los polimetoxiflavonoides en diferentes disolventes orgánicos.**

Por CCF se demostró que todas las disoluciones utilizadas en los estudios de fluorescencia se encontraban puras y que no se formaron productos de descomposición que pudiera alterar los resultados obtenidos. Con esto se demuestra que la aparición de las dos bandas en medio alcohólico, se debe exclusivamente al tautomerismo en estado excitado característico de los derivados de la 3-hidroxi flavona.

## 6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

### 6.1 Espectroscopia de los compuestos aislados.

La elucidación y discusión de las estructuras propuestas se realizó analizando las propiedades espectroscópicas de los productos naturales y la comparación de estas con las descritas en la literatura.

Para la discusión del comportamiento de las flavonas en los espectros de fluorescencia de emisión se analizarán los datos obtenidos y se comparará su comportamiento con respecto a la 3HF y sus derivados que se encuentran descritos en la literatura.

Para facilitar el análisis de la espectroscopia de los compuestos aislados, se clasificaran en tres grupos:

Grupo I. Derivados del ácido benzoico

Grupo II. Cumarinas

Grupo III. 3-hidroxi-polimetoxiflavonas

#### 6.1.1 Grupo I. Derivados del ácido benzoico.

El ácido 4-metoxibenzoico (Compuesto 2) se aisló de las fracciones 4 y 5 de la columna original, las propiedades físicas y espectroscópicas se encuentran descritas en la sección experimental. Se compararon los espectros de IR, RMN  $^1\text{H}$ , RMN  $^{13}\text{C}$  y EMIE obtenidos, ver espectros 9 al 13 en el apéndice, con lo citado en la literatura <sup>36-38</sup>, correspondiendo los valores reportados con los nuestros. Se debe mencionar que este compuesto no se ha aislado de *Citrus limonia Osbeck*<sup>14,16,39</sup>.

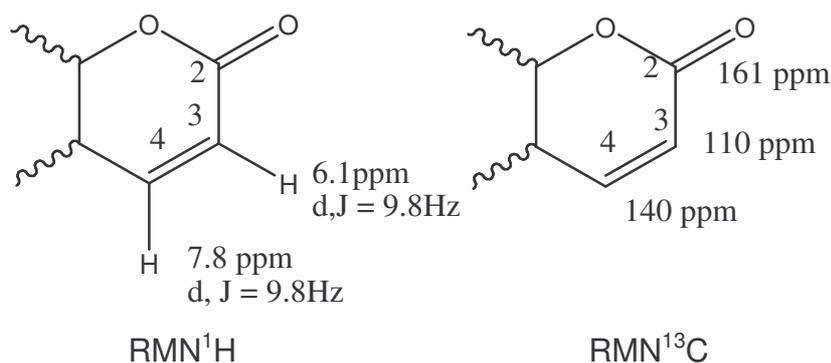
#### 6.1.2 Grupo II. Cumarinas,

##### 6.1.2.1 Generalidades

Este grupo está constituido por el Compuesto 1 y el Compuesto 5, el aislamiento, purificación y características espectroscópicas de ambos compuestos se encuentran descritos en la sección experimental correspondiente.

### 6.1.2.2 Compuesto 1,

La integración del área bajo la curva en el espectro de resonancia magnética de hidrógeno (ver apéndice Espectro 1) indica la presencia de 10 hidrógenos, dos señales simples con una integración para tres hidrógenos en cada una de ellas se encuentran en 3.89 ppm y 3.86 ppm, este desplazamiento a campo bajo lo presentan hidrógenos sobre carbono base de oxígeno, por lo que se deduce la presencia de dos metoxilos; un sistema AB en 6.4 ppm y 6.3 ppm con  $J = 2\text{Hz}$  que de acuerdo a su desplazamiento químico e integración, deben de corresponder a hidrógenos pertenecientes a dos hidrógenos aromáticos correspondientes a los hidrógenos H-6 y H-8. Dos protones involucrados en el grupo vinílico de las cumarinas simples aparecen en el espectro de  $\text{RMN}^1\text{H}$  como dobletes con una constante de acoplamiento de 9.8 Hz, el protón H-3 aparece en 6.1 ppm, mientras que el protón H-4 aparece aproximadamente 7.9 ppm, ver figura 10.



**Figura 10. Valores de  $\text{RMN}^1\text{H}$  y  $\text{RMN}^{13}\text{C}$  característicos del anillo A de las cumarinas.**

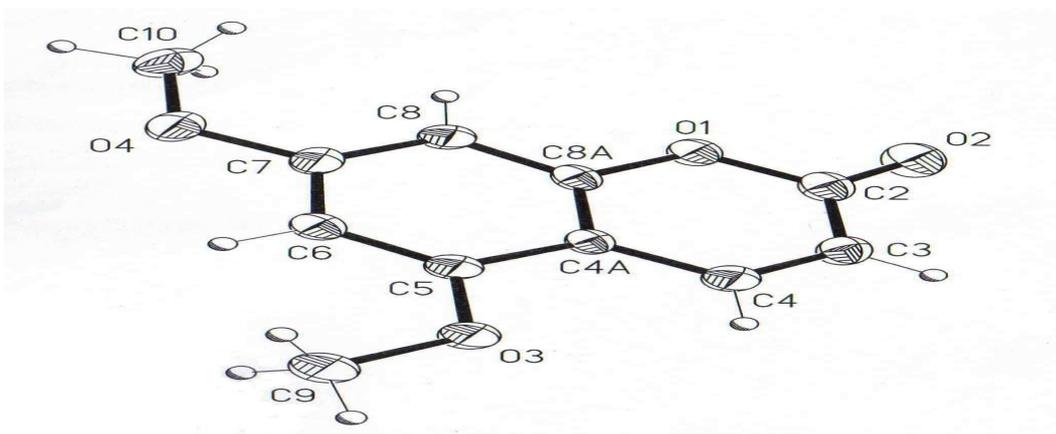
El espectro de resonancia magnética de carbono 13 (ver apéndice Espectro 2) presenta las señales correspondientes a 11 carbonos. Con la información proporcionada con el DEPT (ver apéndice Espectro 3) la aparición de dos picos 55.92 ppm y 55.79 ppm, los cuales corresponden a la unión  $\text{O}-\text{C}-3\text{H}$ , y los picos 156.9 ppm y 156.73 ppm de la resonancia  $\text{C}_{\text{aromático}}-\text{O}$ , indican la presencia de dos grupos metoxilos en la molécula en los carbonos C-5 y C-7. En el espectro de  $\text{RMN}^{13}\text{C}$  la resonancia  $\text{C}_{\text{aromático}}-\text{H}$  se observa en dos señales (94 ppm, 92 ppm) para los carbonos C6 y C8.

Las señales 161 ppm (C-2), 138 ppm (C-3) y 110 ppm (C-4) corresponden a los carbonos constituyentes del anillo A de las cumarinas sencillas, ver figura 10.

Conjuntando la información espectroscópica de la RMN con el peso molecular obtenido del espectro de masas (ver apéndice Espectro 4) se puede deducir que la fórmula molecular condensada es  $C_{11}H_{10}O_4$ .

En el espectro de IR (ver apéndice Espectro 5) de la molécula se observa la existencia del grupo carbonilo en  $1720\text{ cm}^{-1}$ , y del grupo metoxilo en  $1235\text{ cm}^{-1}$ .

Con la cristalización del producto, señalada en la parte experimental, se obtuvieron cristales adecuados para el estudio difracción de Rayos X, obteniendo de esta manera una figura tridimensional de la molécula, figura 11. De esta manera se pudo conocer la posición de los grupos metoxilos.



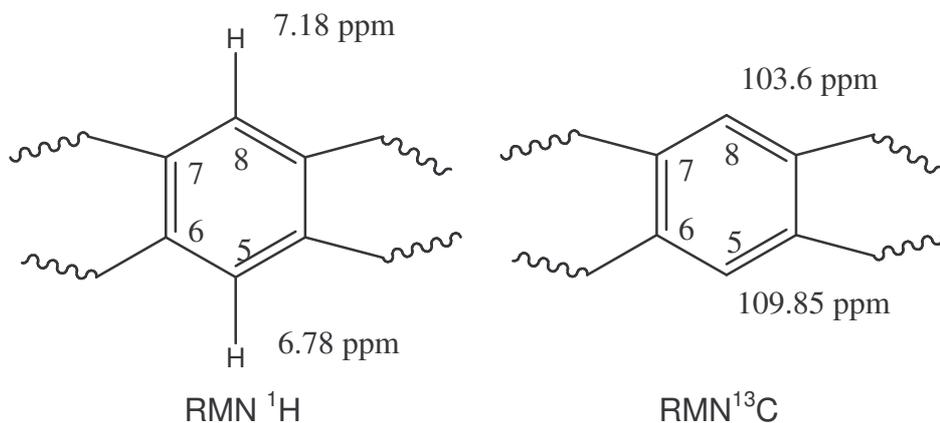
**Figura 11. Molécula de la 5,7-dimetoxicumarina. Rayos X**

Se hace notar que en la literatura<sup>28, 29-30</sup>, no existen estudios de Rayos X de esta molécula. Por otra parte, como se comentó en los antecedentes, este producto no es característico del *Citrus limonia Osbeck*, ya que se ha encontrado en otras plantas del género citrus como la *Microcitrus australe* y *Citrus aurantifolia Swingle*<sup>31</sup>.

### 6.1.2.3 Compuesto 5.

El área bajo la curva del espectro de resonancia magnética nuclear de hidrógeno (ver apéndice Espectro 32) integra para 11 hidrógenos, en primer lugar se observa una señal simple que integra 3 hidrógenos, que por su desplazamiento químico 3.03 ppm hace suponer que se trata de hidrógenos del grupo metoxilo. Dos señales simples en 7.18 ppm y 6.78

ppm corresponden a hidrógenos (H-5 y H-8) unidos a un anillo bencénico que se encuentran cerca de grupos que contienen C-O, ver figura 12.



**Figura 12. Valores de RMN<sup>1</sup>H y RMN<sup>13</sup>C para las posiciones 5 y 8, donde no se encuentran sustituyentes**

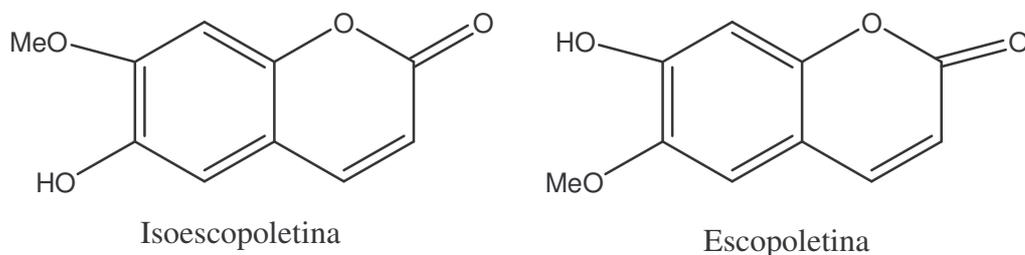
Dos protones vinílicos como dobletes con una constante de acoplamiento de 9.8 Hz, el protón H-3 aparece en 6.1 ppm, mientras que el protón H-4 aparece en 7.9 ppm.

En el espectro de RMN<sup>13</sup>C (ver apéndice Espectro 33) se observa la existencia de 10 carbonos, la señal de 56.64 ppm corresponde al metilo del grupo metoxilo. Las señales desplazadas en 161 ppm, 140 ppm y 110 ppm pertenecen a los carbonos C-2, C-4 y C-3 respectivamente, las señales observadas en el espectro DEPT (ver apéndice Espectro 34) de 109.85 ppm y 103.6 ppm son los carbonos aromáticos unidos a protones.

Por EMIE (ver apéndice Espectro 35) se determinó un ion molecular de 192, esto junto con la información de los espectros de RMN de protón y carbono 13 se determinó que la formula molecular del compuesto es C<sub>9</sub>H<sub>11</sub>O<sub>4</sub>.

El numero de protones discutidos en párrafos anteriores, no corresponde a la formula molecular condensada determinada por el EMIE, la espectroscopia de IR (ver apéndice Espectro 36) es donde se observa el grupo hidroxilo, señal de 3528 cm<sup>-1</sup>, este dato complementa el número de hidrógenos del compuesto, otros grupos que se observan en el espectro de IR son el grupo carbonilo 1720 cm<sup>-1</sup> y el grupo metoxilo en 1235 cm<sup>-1</sup>

Se encuentra con un problema en el momento de decidir si el compuesto número 5 se trata de la escopoletina o la isoescopoletina, isómero de la primera.- Figura 13.



**Figura 13. Isómeros: isoescopoletina y escopoletina**

En esta molécula no se pudo obtener cristales que tuvieran las características apropiadas para el estudio de Rayos X, tampoco se pudo realizar en estudio COSY o HETCOR, el criterio que se tomó para decidir cual de los isómeros se aisló, se determinó con el pico máximo que aparece en los 298 nm en el espectro de UV (ver apéndice Espectro 37), según la literatura<sup>20</sup>, la escopoletina no presenta este pico y la isoescopoletina si lo presenta, por lo tanto el compuesto aislado fue la isoescopoletina.

Este compuesto al igual que el Compuesto 1, se ha aislado de otras plantas pertenecientes al genero *Citrus*<sup>38,39</sup>, además se le ha encontrado en otras plantas no pertenecientes al genero *Citrus* como la *Heracleum mantegazzianum*<sup>33</sup> y la *Skimmia laureola*<sup>34</sup>.

### 6.1.3 Grupo III.3-hidroxi-polimetoxiflavonas

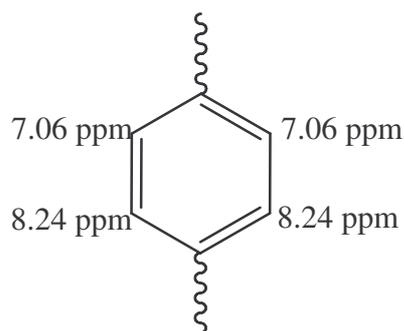
De la cáscara de *Citrus limonia Osbeck* se aislaron dos compuestos polimetoxilados que presentan un grupo hidroxilo en la posición 3, el aislamiento, purificación y características espectroscópicas de ambas moléculas ya se han comentado dentro de la sección experimental.

#### 6.1.3.1 Compuesto 3.

Una vez purificado este compuesto se observó cristales de color amarillo claro, en forma de rombos, fueron utilizados para los estudios de Rayos X. La integración del área bajo la curva en el espectro de resonancia magnética nuclear de protón (ver apéndice Espectro 14) corresponde a 19 hidrógenos, cinco señales simples con desplazamiento entre 4.12 ppm a 3.89 ppm, que integran para 15 hidrógenos, por el tipo de desplazamiento y la cantidad de hidrógenos involucrados se tratan de 5 metoxilos.

Por otra parte se presentan protones aromáticos en un sistema AA'BB' para sistema aromático 1-4 disustituido asimétrico con desplazamiento en

8,24 ppm y 7.06 ppm, estos protones se presentan en las posiciones 2,6 para 8,24 ppm y 7.06 ppm para las posiciones 3,5. Figura 14



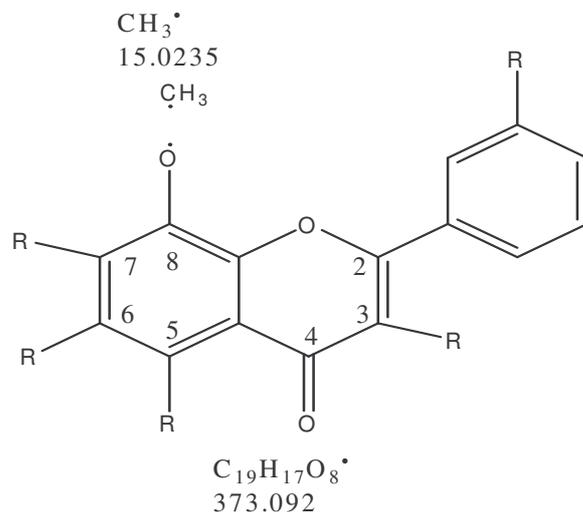
**Figura 14. Posición de los hidrógenos en uno de los sistemas bencenoides**

Este tipo de multiplicidad hace suponer la existencia de dos sistemas aromáticos: en uno de ellos se encuentran cuatro hidrógenos en posiciones 2,3,5,6 indicando que se encuentra disustituido, mientras que el otro se encuentra totalmente sustituido, ver figura 16.

A diferencia de otras polimetoxiflavonas, el espectro de RMN  $^1\text{H}$  de la muestra no contiene la señal en los 6.6 ppm como ocurre con la tangerina, indicando que el carbono en la posición 3 se encuentra sustituido ya sea por un grupo metoxilo o un hidroxilo, grupos más comunes en los flavonoides<sup>4,5,11</sup>.

En el espectro de resonancia magnética de carbono 13 (ver apéndice Espectro 15) se observa la presencia de 18 señales, cinco de ellas pertenecen a los metilos de metoxilos entre 62.30 ppm a 55.37 ppm.

La espectrometría de masas (ver apéndice Espectro 17) muestra un peso molecular de 388, el pico con 373( $\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{O}_8$  82.3%) indica la pérdida del grupo metilo de uno de los metoxilos,  $\{M-15\}^*$ , este pico es característico de flavonas metoxiladas con un grupo metoxilo en la posición 8<sup>10</sup>, metoxilos en otras posiciones tienen picos con intensidades muy bajas. Ver figura 15

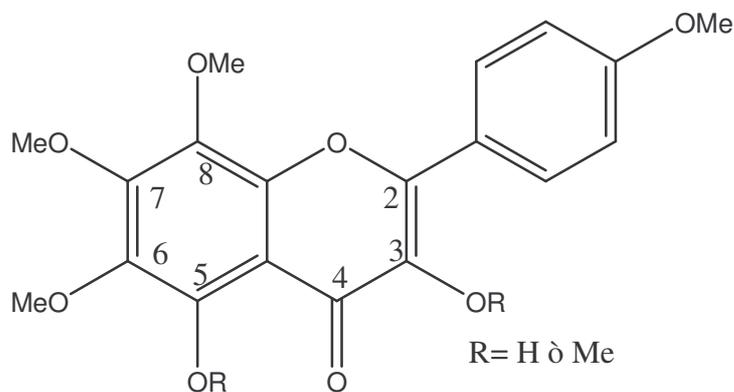


**Figura 15. Ion molecular  $\{M-15\}^+$  del pico correspondiente a 373 (ver apéndice Espectro 17) característico de flavonas polimetoxiladas**

El espectro de IR (ver apéndice Espectro 18), muestra una señal los  $3293\text{ cm}^{-1}$  indicando la presencia de un grupo hidroxilo, aparece una señal en  $1602\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a un grupo carbonilo que mantienen un equilibrio ceto-enol con un grupo hidroxilo, la banda  $1055\text{ cm}^{-1}$  del IR corresponde a un enlace  $\text{C}_{\text{aromático}}-\text{O}-\text{C}$  indica la presencia de un heterociclo dentro de la molécula, los grupos metoxilos aparecen en los  $1264\text{ cm}^{-1}$ . Con esta información se propone la fórmula condensada de la molécula:  $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{O}_8$

El máximo de absorción en ultravioleta  $359\text{ nm}$  (ver apéndice Espectro 21) junto a la evidencia de los dos sistemas bencenoides en la molécula así como siete insaturaciones hace suponer que se trata de un flavonoide.

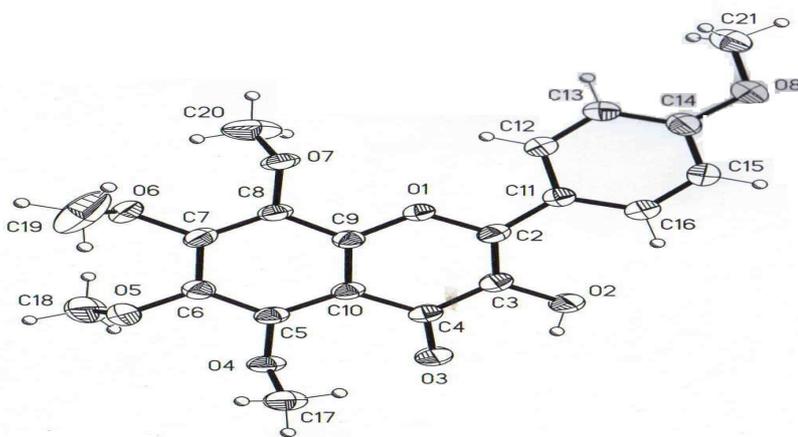
Esto nos demuestra que el anillo A, se encuentra saturado con grupos oxigenados, las posiciones 6, 7 y 8 deben de tener grupos metoxilos, ya que las posiciones 3 y 5 con hidroxilos son las únicas posiciones donde puede ocurrir el equilibrio ceto-enol con el carbonilo de la posición 4 de las flavonas. El efecto del hidroxilo cercano al carbonilo se puede observar en el IR y en las características fisicoquímicas del compuesto. Añadiendo esta información con la monosustitución del anillo C se tiene que la molécula se puede representar con la siguiente estructura, figura 16:



**Figura 16. Estructura de la polimetoxiflavona sin el conocimiento de la posición del grupo hidroxilo**

La determinación del grupo que se encuentra en la posición 3, se determinó de dos formas:

- A) Los compuestos derivados de la 5-hidroxi-5,6,7,8,4'-pentametoxiflavona presentan en su espectro de fluorescencia de emisión dos bandas, correspondientes a la forma normal y tautomérica, alrededor de los 400 y 700 nm respectivamente, disueltos en metanol. Nuestra molécula disuelta en metanol presenta bandas a los 436 y 533 nm, datos que presentan los derivados de la 3-hidroxi-5,6,7,8,4'-pentametoxiflavona.
- B) Los estudios de Rayos X demuestran que la posición del grupo hidroxilo está en la posición 3 de la flavona encontrada, como se puede observar en la figura 17.



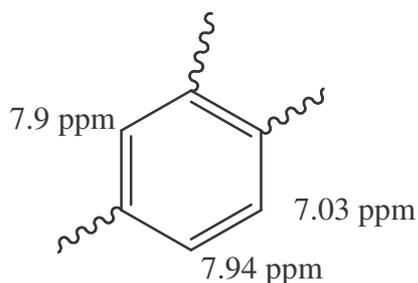
**Figura 17. Modelo en 3 dimensiones de la 3-hidroxi-5,6,7,8,4'-pentametoxiflavona**

El compuesto 3 fue identificado como la 3-hidroxi-5, 6, 7, 8, '4'-pentametoxiflavona, de esta forma se verifica que los datos presentados en la literatura<sup>3,35</sup>, donde no se publican estudios de Rayos X,

corresponden a la molécula identificada con anterioridad en otras especies del género Citrus.

### 6.1.3.2 Compuesto 4

El área bajo la curva del espectro de resonancia magnética de hidrógeno (ver apéndice Espectro 23) integra para 21 hidrógenos, se observan cinco señales simple que integran para un total de 18 hidrógenos, que por desplazamiento químico entre 4.12 ppm a 3.89 ppm pertenecen a seis metoxilos. A diferencia del Compuesto 3, la RMN<sup>1</sup>H del compuesto 4 presenta 3 señales para un protón cada uno, dos son dobletes, el primero presenta un desplazamiento químico de 7.94 ppm con una constante de acoplamiento de 2 Hz, la otra señal se encuentra a 7.03 ppm con una constante de acoplamiento de 8.3 Hz, la otra señal se encuentra en 7.90 ppm el sistema descrito anteriormente es característico de un anillo aromático que se encuentran sustituido en las posiciones 1,3 y 4. Ver figura 18.



**Figura 18. Posición de los hidrógenos en el sistema aromático que se encuentra en el compuesto 4**

En el espectro de resonancia magnética de carbono 13 (Ver apéndice Espectro 24) podemos observar la aparición de algunas señales parecidas al compuesto 3, los picos  $\delta$  171.76(C-4), 151.6(C-2), 147.57(C-7), 146.82(C-5), 143.94(C-9), 142.98(C-3), 137.76(C-8), 137.33(C-6), 123.78(C-1a), 120.98(C-6a), 111.63(C-5a), 110.13(C-10) confirmando que la molécula tiene un esqueleto de tipo flavonoide. Las señales que aparecen entre 55.88 ppm a 62.32 ppm corresponden a seis grupos metoxilos.

Este producto natural presentó un ion molecular de 418 en EMIE (Ver apéndice Espectro 26).

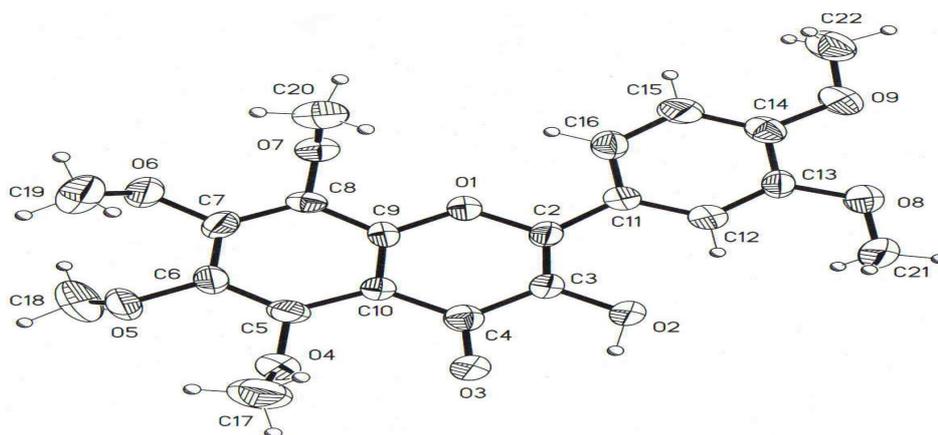
En el espectro de IR (Ver apéndice Espectro 27) aparece un grupo hidroxilo que no se observa en el RMN<sup>1</sup>H y que se encuentra en los 3340

$\text{cm}^{-1}$ . Se debe mencionar que en el espectro de IR de este compuesto se observaron los mismos grupos que en el Compuesto 3.

La fórmula molecular condensada propuesta de la molécula es  $\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{O}_9$ . Esta propuesta se refuerza al observar el máximo de absorción de UV-VIS en metanol a 360 nm, característica de los derivados de la 3-hidroxi flavona.

La determinación de la posición del hidroxilo se realizó de la misma manera que en Compuesto 3.

El Compuesto 4 fue identificado como la 3-hidroxi-5, 6, 7, 8, '3, '4-hexametoxiflavona, ver figura 19. Se debe indicar que este trabajo es el primero en donde se realizan estudios de Rayos X de esta molécula, que previamente se había identificado dentro de la cáscara del híbrido *Citrus Natsudaidai*, planta que crece en el suroeste asiático y que no se cultiva en América, de esta manera se corrobora que la interpretación de los espectroscopia realizada con anterioridad es correcta<sup>11,40</sup>.



**Figura 19. Modelo tridimensional de la 3-hidroxi-5,6,7,8,3',4'-hexametoxiflavona**

Se debe señalar que a esta molécula se le han realizado estudios biológicos para determinar sus propiedades antitumorales en líneas celulares (carcinoma de pulmón humano, melanoma en células productoras de pigmento en ratón y leucemia)<sup>6</sup> con buenos resultados en estudios in Vitro, aun que su efecto de inhibición de esta molécula se encuentra por debajo de otras flavonoides estudiados como la nobeletina o la luteolina<sup>6,13</sup>.

Las polimetoxiflavonas tienen mayor promesa de uso en organismos vivos, debido principalmente a su capacidad de traspasar más fácilmente la

membrana celular que otras flavonas que tienen un mayor número de grupos hidroxilos<sup>4,5,11,13</sup>.

Las propiedades fluorescentes de las polimetoxiflavonas encontradas (Compuesto 3 y Compuesto 4) se pueden utilizar para determinar el tipo de unión de estas con blancos biológicos como es la membrana celular, proteínas o ácidos nucleicos, de manera similar a como se determina la unión de la fisentina con moléculas de la célula o con ciclodextrinas<sup>34</sup>.

Las polimetoxiflavonas son moléculas características de las especies del género *Citrus*, que se pueden utilizar para la clasificación de las especies pertenecientes al género. Las especies pueden caer en dos grupos: aquellas que tienen altas concentraciones de nobeletina-tangerina y aquellas que tienen altas concentraciones de 3, '3, '4, 5, 6, 7, 8-heptametoxiflavona y 3-hidroxi-5, 6, 7, 8, '3, '4,-hexametoxiflavona.<sup>40</sup>

De acuerdo con la literatura<sup>40</sup>, *Citrus limonia Osbeck* se clasifica como una especie de alta concentración de 3, '3, '4, 5, 6, 7, 8-heptametoxiflavona y 3-hidroxi-5, 6, 7, 8, '3, '4-hexametoxiflavona, la cantidad encontrada en este estudio (326 mg/41.6 g) es 3950 veces mayor que la reportada en la literatura en el jugo de la fruta del *Citrus limonia Osbeck* (0.2 µg/100 mg)<sup>11,13</sup>

## **6.2 Fluorescencia de emisión de las soluciones de las polimetoxiflavonas. Efecto del disolvente.**

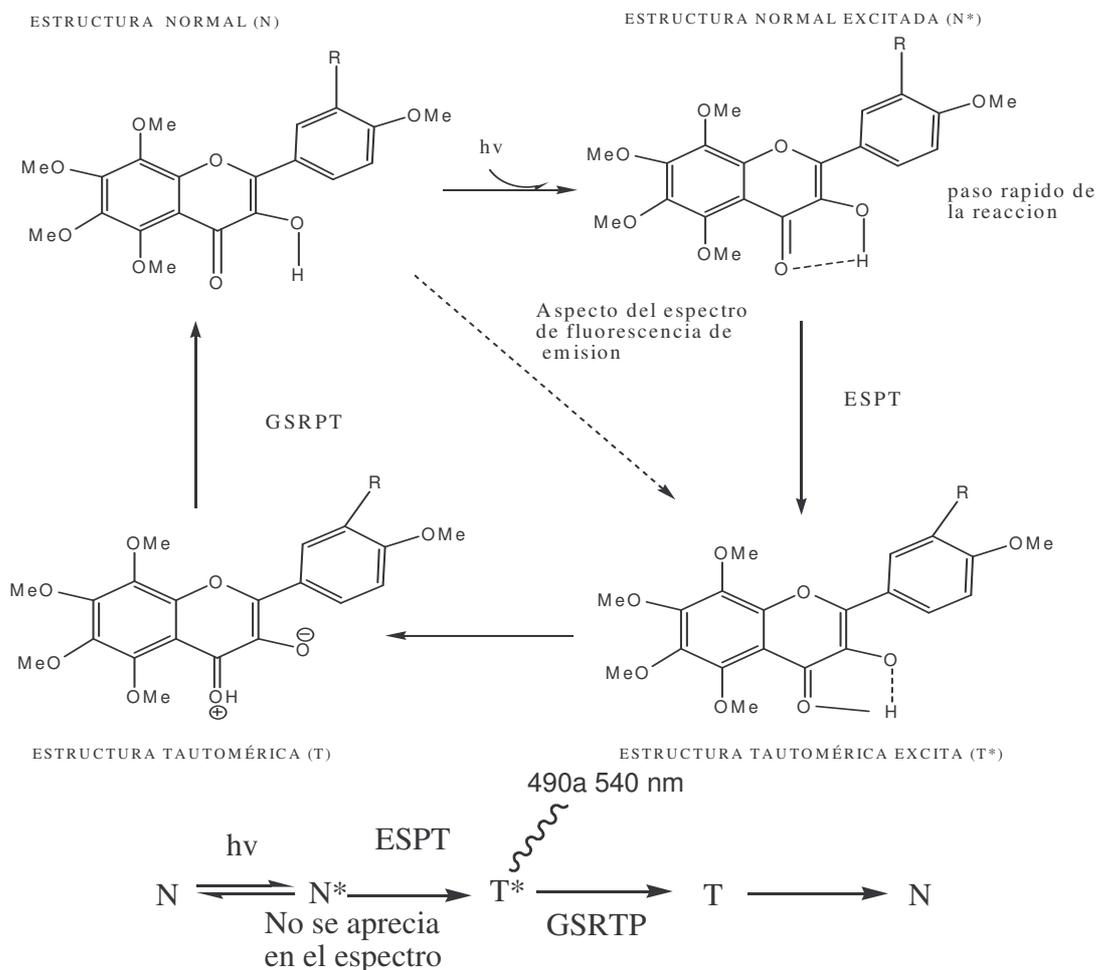
Este estudio es la primera ocasión donde se informa la fluorescencia dual en polimetoxiflavonas de origen natural en soluciones de metanol.

La aparición de algunas bandas en los espectros de fluorescencia de emisión obtenidos para ambas polimetoxiflavonas son muy parecidos, algunas con una diferencia de 5 nm. Este fenómeno se debe a que la diferencia entre ambas moléculas es solamente el metoxilo de la posición '3 del anillo B del compuesto 4. En la literatura<sup>17</sup> se describe que los derivados de la 3HF con sustituyentes en las posiciones 3, 4, 5, del anillo B no afectan la transferencia de protón en estado excitado o ESPT en sus siglas en inglés. Por esto, en algunas partes de la discusión de resultados, el análisis de los datos obtenidos se realizará de manera conjunta para ambas moléculas.

### 6.2.1 Fluorescencia de emisión para las disoluciones de acetonitrilo

Para determinar cual es la banda correspondiente al tautómero, se siguió la interpretación realizada en la 3-hidroxi flavona por Sengupta<sup>14</sup> (3HF), en los espectros de fluorescencia de emisión de ambas moléculas en acetonitrilo se observó la aparición de una sola banda intensa cercana a los 535 nm con una excitación de 360 nm, esta banda (en la zona del color verde) corresponde a la forma tautomérica de la molécula en estado excitado ( $T^*$ ), debido a que en condiciones donde no existe la interacción de protones de la molécula con el disolvente donador de protones, como es el caso del acetonitrilo, la transferencia del protón del grupo hidroxilo de la posición 3 al carbonilo de la posición 4 ocurre por un Efecto Túnel, ver figura 20, sin que ocurra la formación de un complejo solvente/molécula que implica un paso extra en el mecanismo y que por lo tanto hace que la transferencia del protón en derivados de la 3HF sea más rápida en disolventes apróticos que en disolventes próticos<sup>23</sup>. La velocidad de la transferencia del protón por el Efecto Túnel, ocurre en estos casos en el orden los femtosegundos, por este motivo el espectro de fluorescencia de emisión no se detecta la forma  $N^*$  o forma normal de la molécula en estado excitado, en el espectro solamente se puede observar la forma enólica, es decir la banda verde (535 nm).

La aparición de un pequeño pico en los espectros de fluorescencia en los compuestos 3 y 4, ver espectros 22 y 31, en alrededor de los 400 nm se debe a impurezas propias del disolvente<sup>11</sup>, esta impurezas pueden realizar interacciones de puente de hidrogeno para formar un complejo solvente/molécula, el acetonitrilo utilizado que pudo haberse contaminado con humedad del ambiente en el momento de preparar las disoluciones correspondientes, a pesar que se trabajo en todo momento con guantes de látex.



R = H = compuesto 3

R = OMe = compuesto 4

ESPT: Transferencia de protón en estado excitado

GSRTP: Transferencia de protón en estado basal

**Figura 20. Transferencia del protón en estados excitados de las polimetoxiflavonas en acetonitrilo**

### 6.2.2 Fluorescencia de emisión para las soluciones alcohólicas

Como en el caso de otros derivados de la 3HF en disoluciones metanólicas<sup>23-34</sup>, la aparición de las dos bandas fluorescentes en soluciones alcohólicas de los compuestos 3 y 4 pueden ser atribuidos a la emisión de los estados excitados de las formas tautoméricas ceto –enol de ambas polimetoxiflavonas.

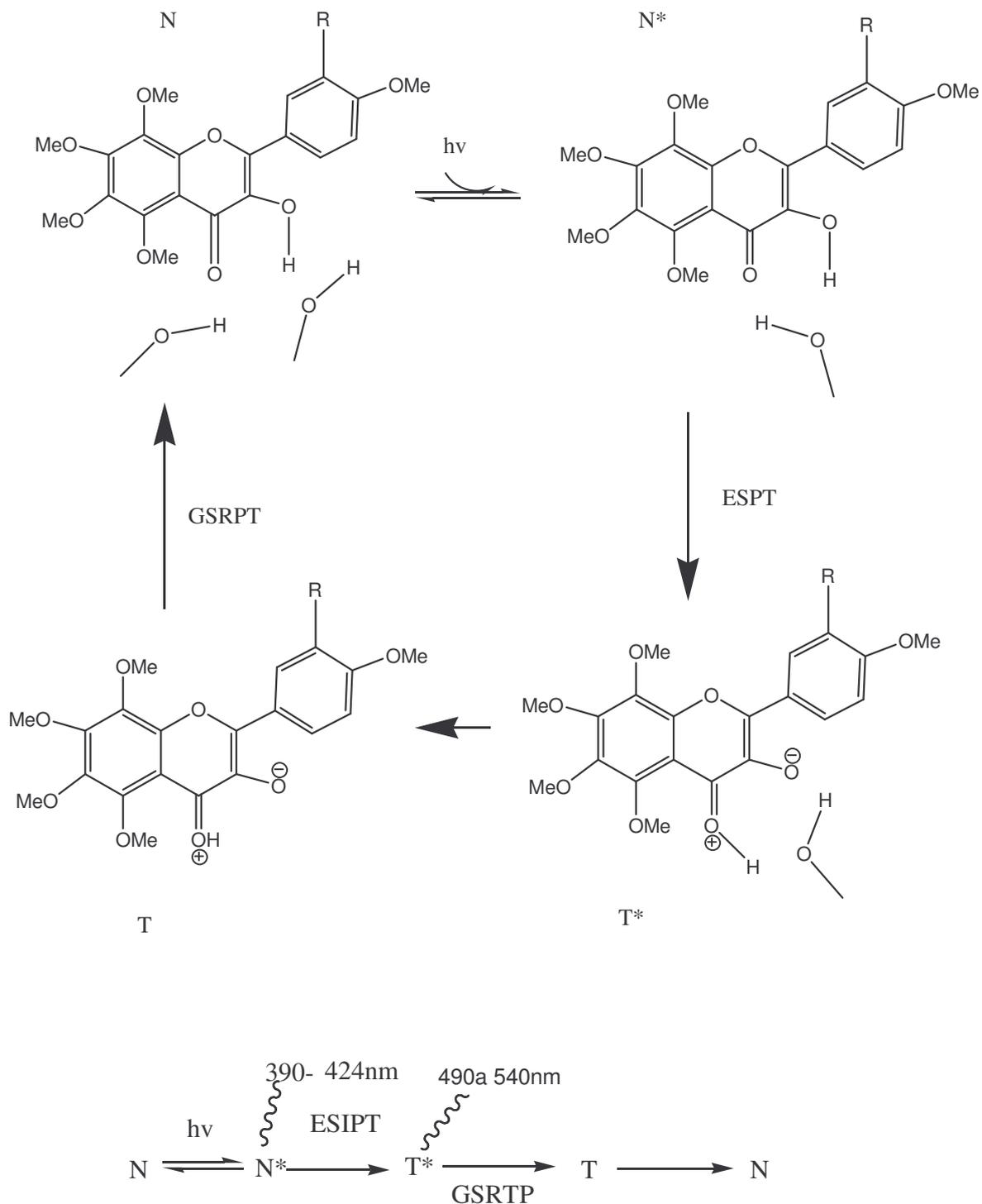
La aparición de las dos bandas no solamente ocurrió en las disoluciones de metanol (excitada a 347 nm para el compuesto 3 y a 360 nm para el compuesto 4), si no también con las disoluciones de hexanol (con excitación a 367 nm-370 nm) para ambos compuestos, aunque la diferencia de estas últimas con las disoluciones de metanol, es que la intensidad de las bandas que aparecen en intervalos de 400-440 nm es menos intensa, además la otra banda aparece en los 488-490nm en las

disoluciones de metanol, mientras que la de hexanol aparece entre 535 nm- 540 nm. (Ver el espectro 22, espectro 31 y cuadro 3 de los resultados).

Con las disoluciones de acetonitrilo, se dedujo que la banda que aparece en la región de los 535 nm pertenece a las formas tautoméricas excitadas sin la solvatación del disolvente, por lo tanto las bandas que aparecen en las disoluciones de hexanol a 536 nm (compuesto 3) y 540 nm (compuesto 4) pertenecen a las moléculas de las polimetoxiflavonas que se encuentran en estado T\* parecidas a las moléculas de estado T\* en acetonitrilo, la diferencia del T\* de las polimetoxiflavonas en acetonitrilo y hexanol se debe a efectos solvatocrómicos, mientras que la pequeña banda que aparece en 408 nm – 420 nm pertenece al estado N\* <sup>23</sup>.

El rendimiento de fluorescencia ( $\Phi$ ) para el compuesto 3 en hexanol fue de 9.41, este mismo valor fue obtenido para el rendimiento de fluorescencia ( $\Phi$ ) del compuesto 4 en el mismo disolvente, ambos resultados indican que la banda correspondiente a T\* es más intensa que la banda N\*, lo cual hace pensar que una gran cantidad de moléculas pasan a la forma tautomérica excitada, mientras que solo algunas regresan de la forma N\* a la forma normal.

Para el caso de las disoluciones metanólicas, se observa que el rendimiento de fluorescencia es mas bajo que las observadas en las soluciones con hexano y significa que en estas soluciones existe un mayor numero de moléculas que realizan el paso de la forma excitada normal a la forma normal, en el caso del compuesto 4, cuyo rendimiento de fluorescencia es de 1.7, es donde se encuentra la mayor cantidad de moléculas que emiten la banda de color azul, las cuales realizan el paso N\* a N, ver la siguiente figura 21.



**Figura 21. Esquema de los estados en el que se encuentran las polimetoxiflavonas en soluciones de metanol al ser excitadas en sus máximos de absorción.**

Este aumento de la intensidad de la banda Azul puede ser atribuido a la disminución de la constante de tautomerización, es decir al paso de  $N^*$  a  $T^*$ , por la interacción del metanol con las formas excitadas de las polimetoxiflavonas. La validez de tal afirmación debe ser confirmada por la medición de la constante de decaimiento de la especie  $N^*$  a  $N$  y de la

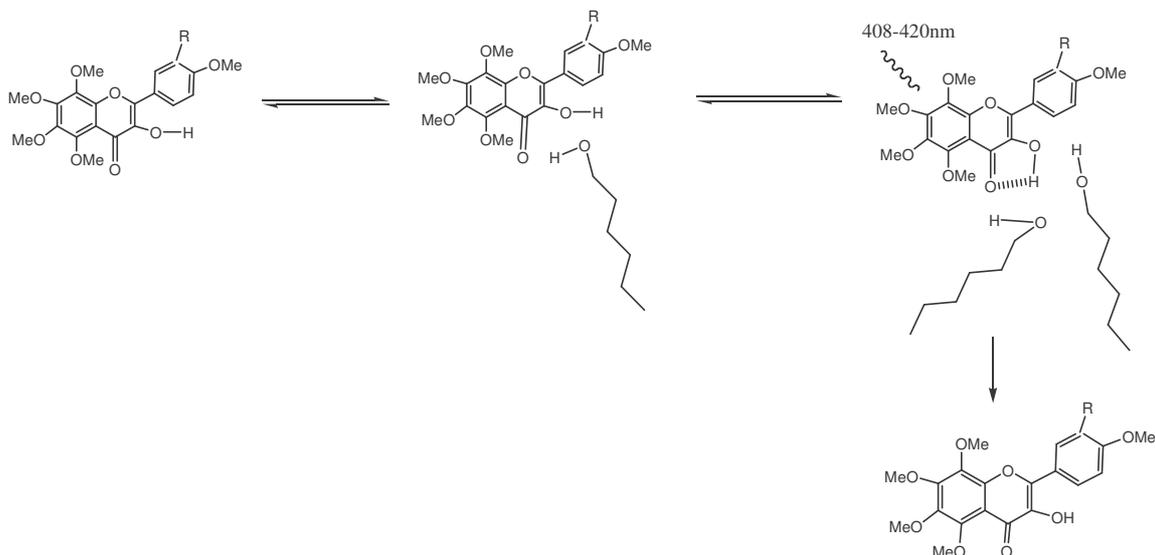
formación de  $T^*$ , ambos procesos solo se pueden medir con técnicas de fluorescencia de absorción/emisión con resolución de pico y femtosegundos<sup>27</sup>.

La diferencia en el rendimiento de fluorescencia en las soluciones de metanol y hexanol se deben a las características de los disolventes (ver parte experimental Figura 9) y el efecto que estas tienen sobre ESPT.

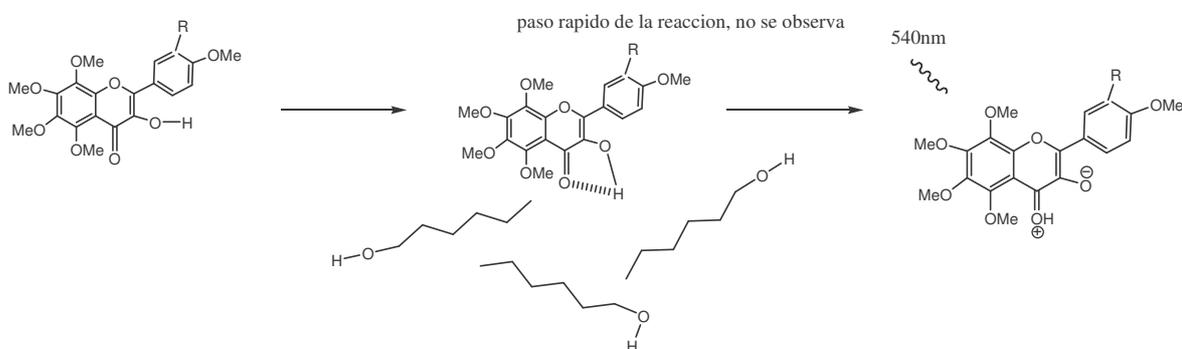
La diferencia de viscosidades, así como su estructura de los disolventes es el factor clave para la explicación de los datos observados, se puede ver en la tabla 1 (parte experimental), que el hexanol es 10 veces más viscoso que el metanol, además de que tiene cinco unidades extra de  $-CH_2-$  que el metanol, lo que ocasiona que la orientación de la molécula de hexanol hacia el hidroxilo de la posición 3 y el carbonilo de la posición 4 de las polimetoxiflavonas sea más difícil que la del metanol, que es una molécula mas pequeña y fácil de orientar.

La dificultad para que se oriente el grupo hidroxilo del hexanol, puede ocasionar que las polimetoxiflavonas se comporten como si estuvieran en un ambiente sin donadores de protones, ocasionando que muchas de las moléculas intercambien su protón del grupo hidroxilo al grupo carbonilo por Efecto Túnel.(Ver figura 22). Aquellas polimetoxiflavonas donde se produce el complejo soluto / solvente son las únicas capaces de pasar de la forma  $N^*$  a  $N$  (banda azul) (Ver figura 22). La comparación de la banda atribuida a  $T^*$  en los espectros de fluorescencia de emisión de las polimetoxiflavonas en metanol y las bandas  $T^*$  de los espectros de fluorescencia de emisión en hexanol y acetonitrilo arroja una diferencia de 50 nm, esta diferencia no es debido a un efecto solvatocrómico si no que el tautómero  $T^*$  en metanol se encuentra solvatado por el disolvente, cambiando la estructura de la molécula y por lo tanto su emisión (ver figura 23).

A) CASO EN EL QUE LAS MOLÉCULAS LOGRAN UN COMPLEJO DE SOLUTO/DISOLVENTE (BANDA AZUL)



B) CASO EN EL QUE LAS MOLÉCULAS SE COMPORTAN COMO SI FUERAN AMBIENTES APRÓTICOS (BANDA VERDE)

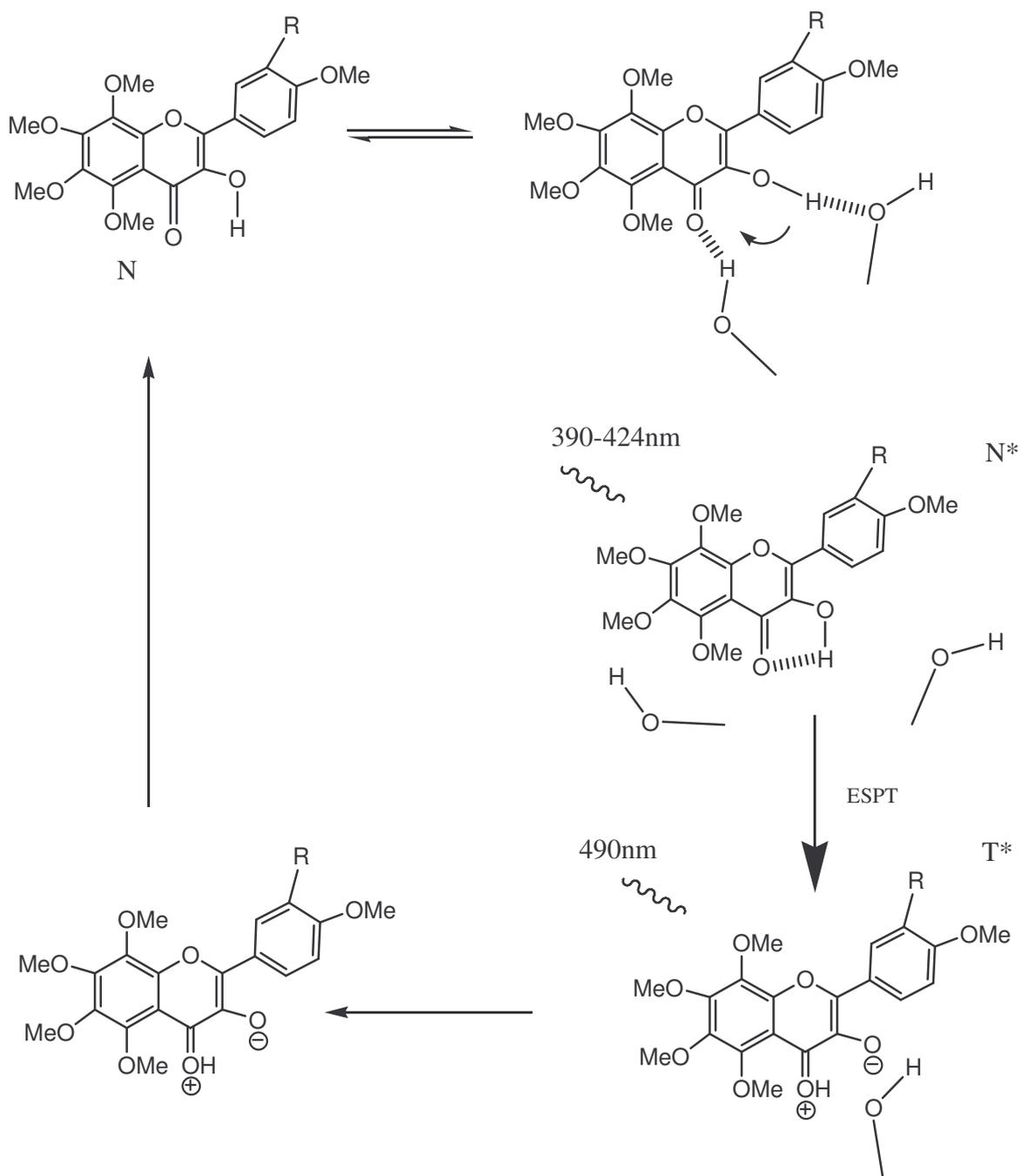


R = H = compuesto 3

R = OMe = compuesto 4

**Figura 22. A) Formación del complejo polimetoxiflavona/hexanol y B) Transferencia del protón del hidroxilo sin la formación de un complejo polimetoxiflavona/hexanol**

En el caso de las disoluciones de metanol, existen un mayor numero de moléculas que se encuentran en la forma  $N^*$  (forma solvatada por el disolvente) lo que ocasiona que un mayor número de moléculas excitadas regresen a la forma cetónica normal, (emisión de 390-420 nm, banda azul) y otras cambien a la forma enólica excitada (emisión de 490-536 nm), ver figura 23, este tipo de comportamiento se ha estudiado con mayor profundidad en la 3HF en los estudios de Strandjord Andrew<sup>28-32</sup>



R = H = compuesto 3

R = OMe = compuesto 4

**Figura 23. Paso del protón de las polimetoxiflavonas en metanol y la aparición de las dos bandas en el espectro de fluorescencia de emisión en metanol excitadas en su máximo de longitud de onda**

Debido a la cantidad aislada de los Compuesto 3 y 4 de la cáscara de la *Citrus limonia Osbeck*, así como su gran capacidad de absorción dentro de la región de UV y su actividad biológica intrínseca, se cree que este tipo de moléculas le sirven a la planta como protección a estructuras que son vulnerables a la radiación UV y a los radicales libres como es caso del material genético o bien detener alguna posible proliferación cancerígena dentro de la fruta<sup>7,42</sup>.

### 7. CONCLUSIONES.

- De la cáscara de la Citrus Limonia Osbeck se obtuvieron 5 metabolitos secundarios, el ácido *p*-metoxibenzoico, dos cumarinas, la 5,7-dimetoxicumarina y la isoescopoletina; dos polimetoxiflavonas, la 3-hidroxi-5,6,7,8, '4-pentametoxiflavona y la 3-hidroxi-5,6,7,8,'3,'4-hexametoxiflavona.
- En el presente trabajo se informan estudios de Rayos X de la 5,7-dimetoxicumarina, la 3-hidroxi-5, 6, 7, 8, '4-pentametoxiflavona y la 3-hidroxi-5, 6, 7, 8, '3, '4-hexametoxiflavona, los datos reportados en la literatura de IR, RMN <sup>1</sup>H, RMN <sup>13</sup>C, EM concuerdan con nuestros datos obtenidos. Que confirma la estructura de los estudios previos.
- No se encontró un nuevo compuesto, pero se contribuyó a la quimiotaxonomía de la *Citrus limonia Osbeck*.
- Este estudio es el primer informe sobre la aparición de dos bandas en los espectros de fluorescencia de emisión en solución metanólica de polimetoxiflavonas de origen natural.
- Los datos obtenidos en el espectro de fluorescencia de emisión para ambas moléculas en metanol son datos importantes para estudios posteriores sobre la dinámica de la transferencia del protón en polimetoxiflavonas de origen natural.
- Estos datos no solo se pueden aplicar para el estudio fisicoquímico de las moléculas estudiadas, también pueden ser usadas para el monitoreo de la unión de este tipo de moléculas, las cuales presentan actividad biológica, con blancos como el ADN, membranas plasmáticas y proteínas o bien para la investigación sobre la protección que realizan este tipo de moléculas dentro de los organismos vivos, como son las plantas.

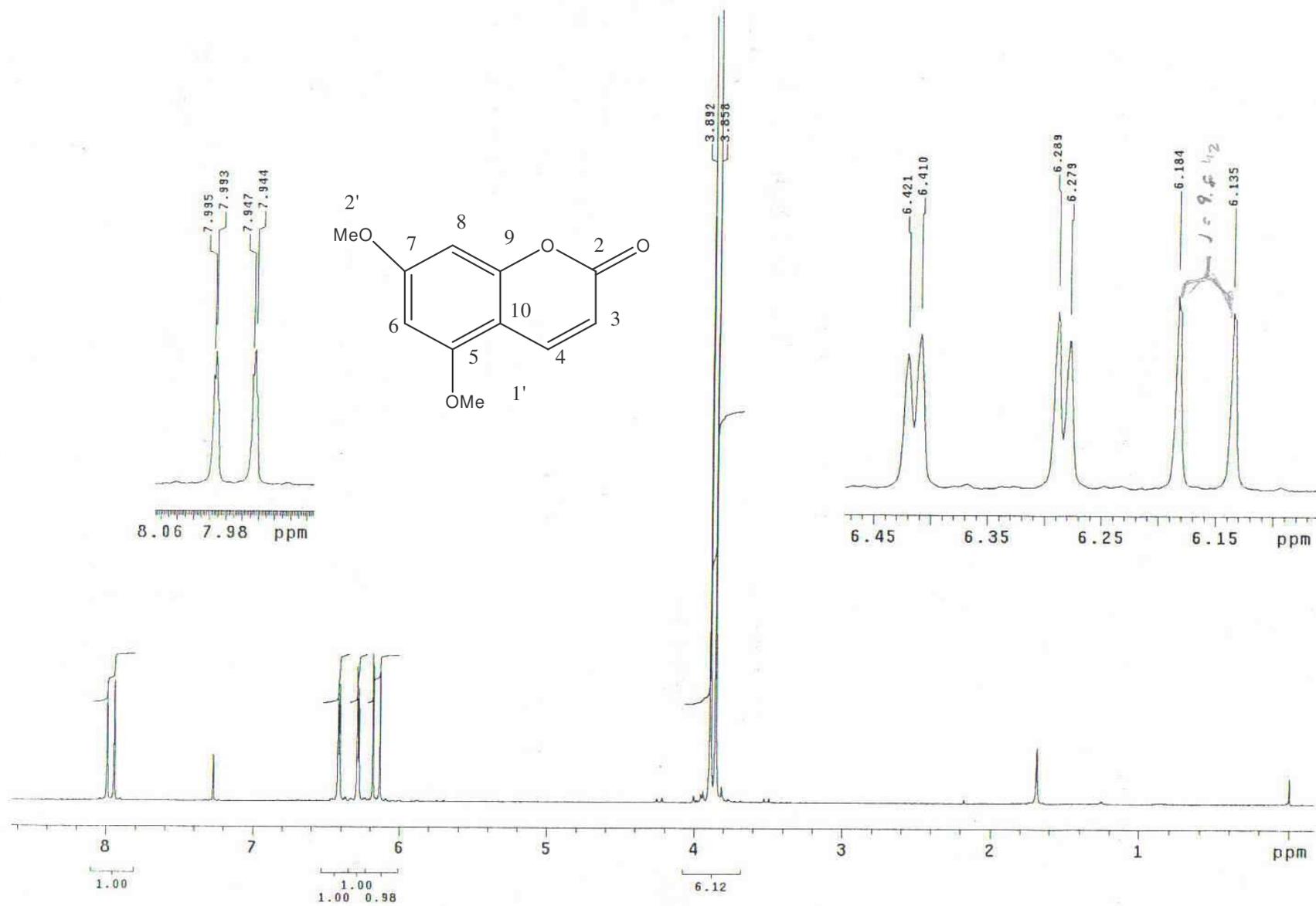
## 8. REFERENCIAS

1. FAO. Dirección estadística de producción de hortalizas en México.  
[http://fao.org/index\\_es.html](http://fao.org/index_es.html), <http://apps.fao/faostat>
2. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, [www.siap.sagarpa.gob.mx](http://www.siap.sagarpa.gob.mx)
3. Duke A. James. *Handbook of phytochemical constituents as GRAS Herb and other economic plant*. CRC press London 2001.
4. Bruneton Jean. *Pharmacognosy*, Lavoiser, Londres, 1999, Capitulo 2.
5. Kuklinski Claudia. *Farmacognosia*. Omega, España, Capítulos 13 y 14.
6. Saturo Kawaii, Yasuhiho Tomomo, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63, 896-899, 1999.
7. Danila Di Majo, Giammanco Marco. *Food research International*, 38, 1161-1166, 2005.
8. Kawaii S. *Fruit Processing*, 7, 213-216, 1997
9. Dalida Ch. Danielle B. *Journal of Chromatography A*, 672, 177-183, 1994
10. Roitman J. *Phytochemistry*. 24, 835-848, 1985
11. Shiming Li, Chin-Yo Lo, *J. Agric .Food. Chem.* 54, 4176-4185, 2006
12. Harbone. *Chemeotaxonomy of the leguminosae*. Academic Press, London, 1971.
13. Saturo Kawaii, Yasuhiho Tomomo. *J. Agric .Food. Chem.* 48, 3865-3871, 2000.
14. Chávez Maria, *FACENA* 18, 23-30, 2002

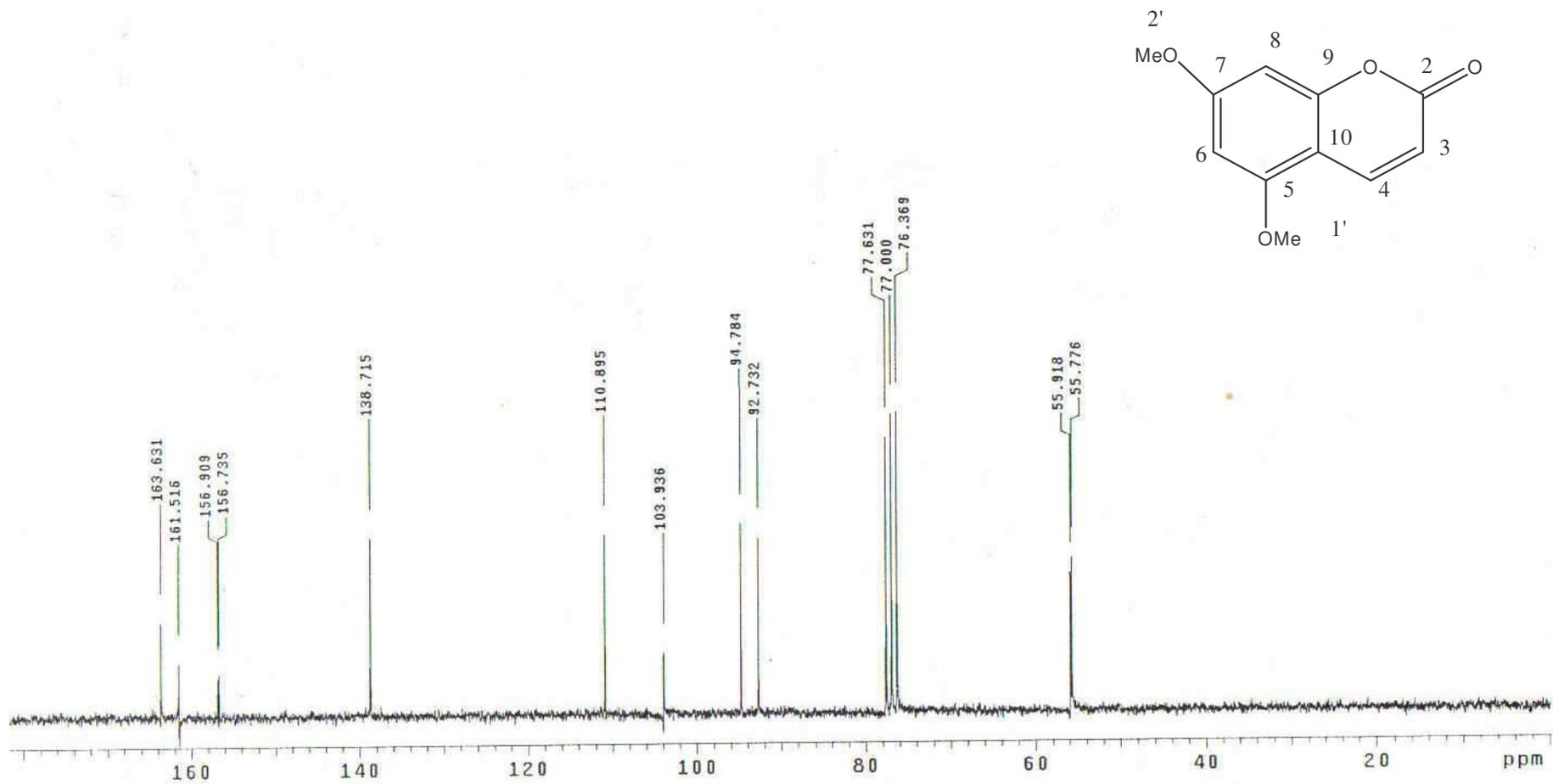
15. Martínez Maximino. *Catalogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas*. Ed. Botas, México, 1937M.
16. Goryaev M. Seriya I. *Khimichskaya* 29, 47-51, 1979.P.K
17. Chu Jianuing, *Zhiwu xuebao* 30, 228, 1988.
18. Kotani, Masashi. *Synthesis* 9, 1466-1470, 2004
19. Craske J. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85, 522-525, 2005
20. Razdan T.K. Qadri B. *Phytochemistry*, 26, 2063-2069, 1987
21. Casimires G. *Pharmacology Biology*. 38, 308-312, 2000
22. Kawaii Saturo. *J. Agric. Food Chem.* 49, 3982-3986, 2001
23. D. McMorrow, M. Kasha, *J. Phys. Chem.* 88, 2235, 1984
24. G.J. Wolfe, P.J. Thistlethwaite. *J. Am. Chem. Soc.* 103, 6916, 1981.
25. Itoh, K. Tokumura, Y. Tanimoto. *J. Am. Chem. Soc.* 104, 4146, 1984
26. Senguptu, M. Kasha, *Chem. Phys. Lett.* 68, 382, 1979.
27. Scwartz Benjamin, Peteanu A. Linda *J. Phys. Chem.* 96, 3591-3598, 1992
28. Strandjord A.J.G. *J. Phys. Chem.* 87, 1125-1133, 1983.
29. Strandjord Andrew. J. G, Smith David E. *J. Phys. Chem.* 89, 2362-2366, 1985.
30. Klymchenko A. Demchenko A. *J. Am. Chem. Soc.* 124, 12372-12379, 2002
31. Klymchenko A. Demchenko A. *New Journal Chemistry*, 28, 687-692, 2004

32. Klymchenko A. Stoeckel Herrade. *J. Phys. Chem. B.* 110, 13624-13632, 2006
33. Smith Gerald, Kenneth Markham, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry.* 118, 99-105, 1998.
34. Banerjee Anwasha, Sangupta P. *Chem. Phys. Lett.* 424, 379-386, 2006
35. Dennison M., Guharay J. Sengupta P. *Spectrochimica Acta Part A,* 55, 1127-1132, 1999.
36. Rumiko Kamaya. *Chem. Pharm. Bull,* 38, 342-346, 1990
37. Hideo Tanaka, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 77, 1745-1755, 2004
38. Fei Wang, *Helvetica Chimica Acta.* 87, 1912-1915, 2004
39. Chu Jianuing, *Zhiwu xuebao* 30, 326, 1988
40. Tokunaru H. Yoshizumi O. *Phytochemistry,* 47, 865-874, 1998
41. National Research Council. *International critical tables of numerical data physics, chemistry and technology.* McGraw-Hill Book Company. New York, 1993-
42. Buchanan B. *Biochemistry molecular biology of plants* American Society of Plants Physiologists, USA, 2001

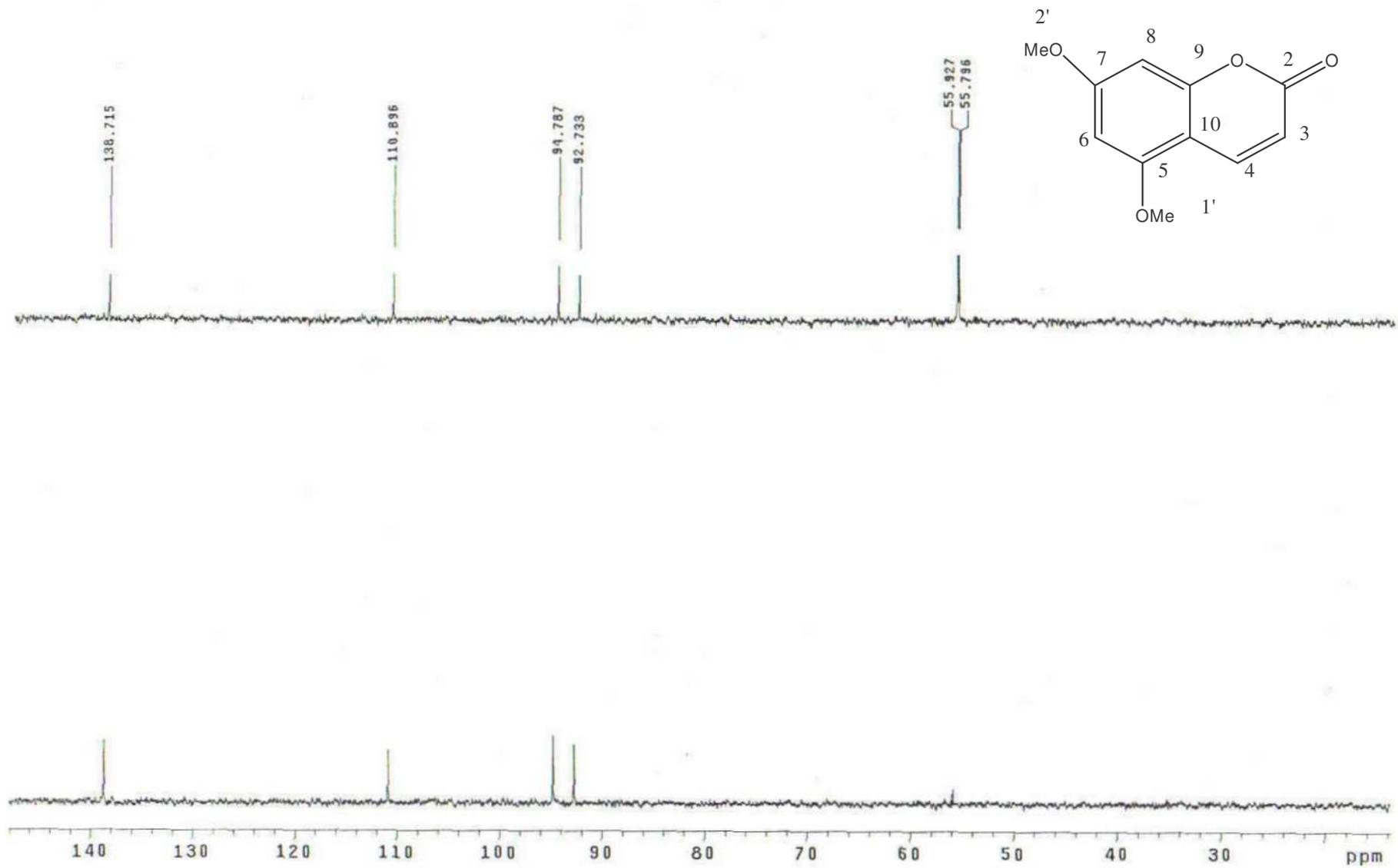
# APENDICE I



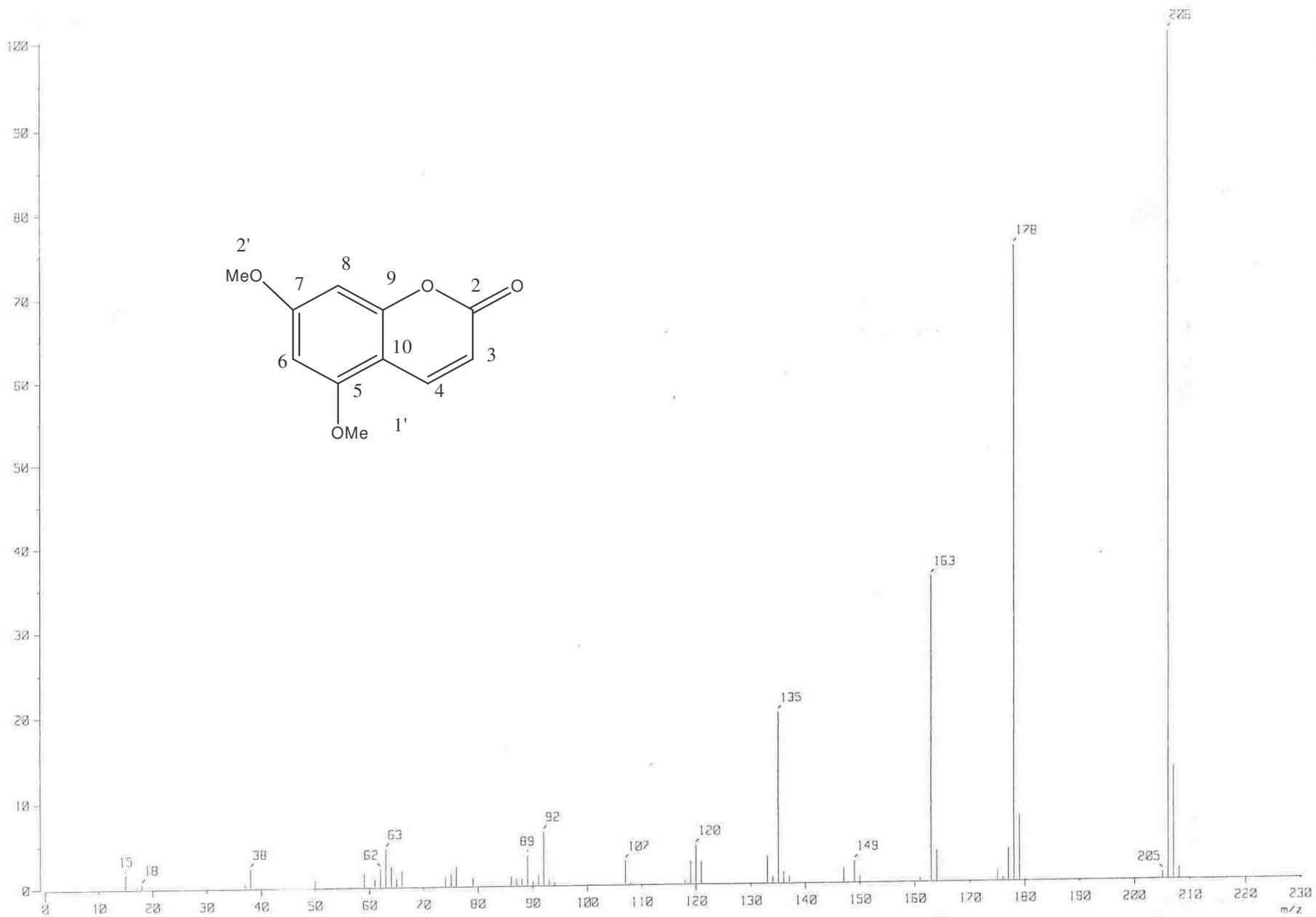
**Espectro 1 RMN<sup>1</sup>H 200Hz CDCl<sub>3</sub> de 5,7-dimetoxicumarina**



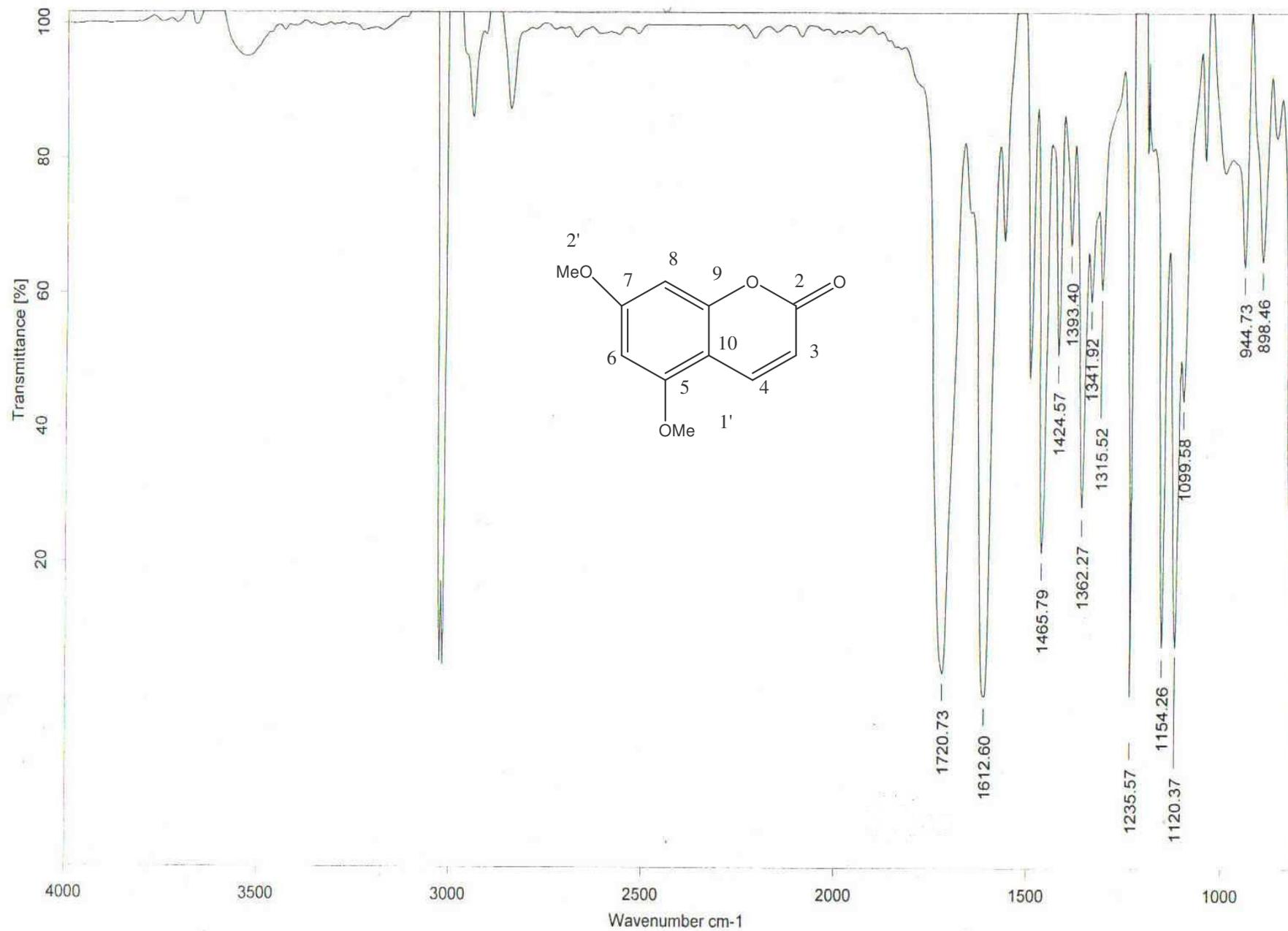
**Espectro 2 RMN<sup>13</sup>C 200Hz CDCl<sub>3</sub> de 5,7-dimetoxicumarina**



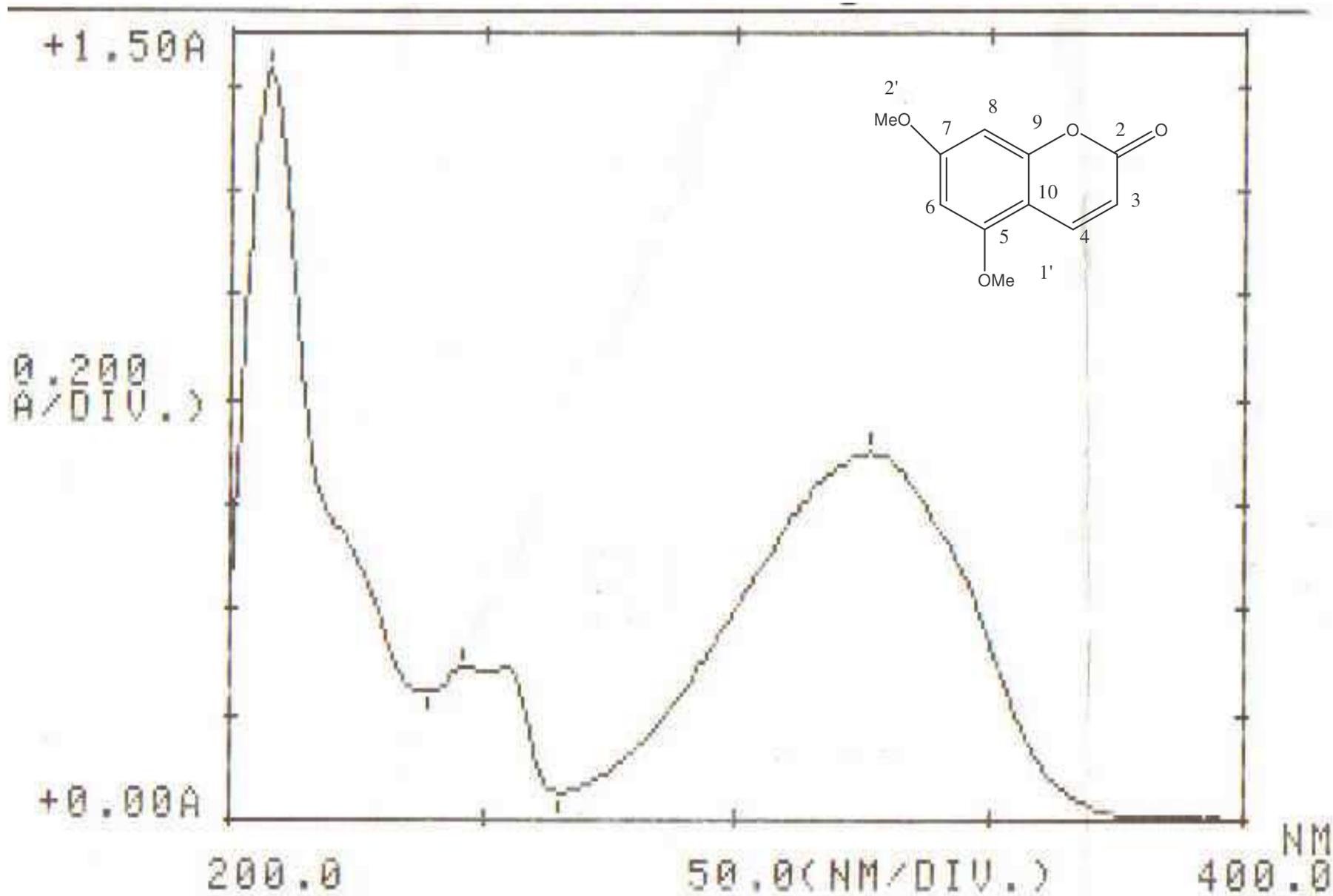
**Espectro 3 DEPT 200Hz CDCl<sub>3</sub> de 5,7-Dimetoxicumarina**



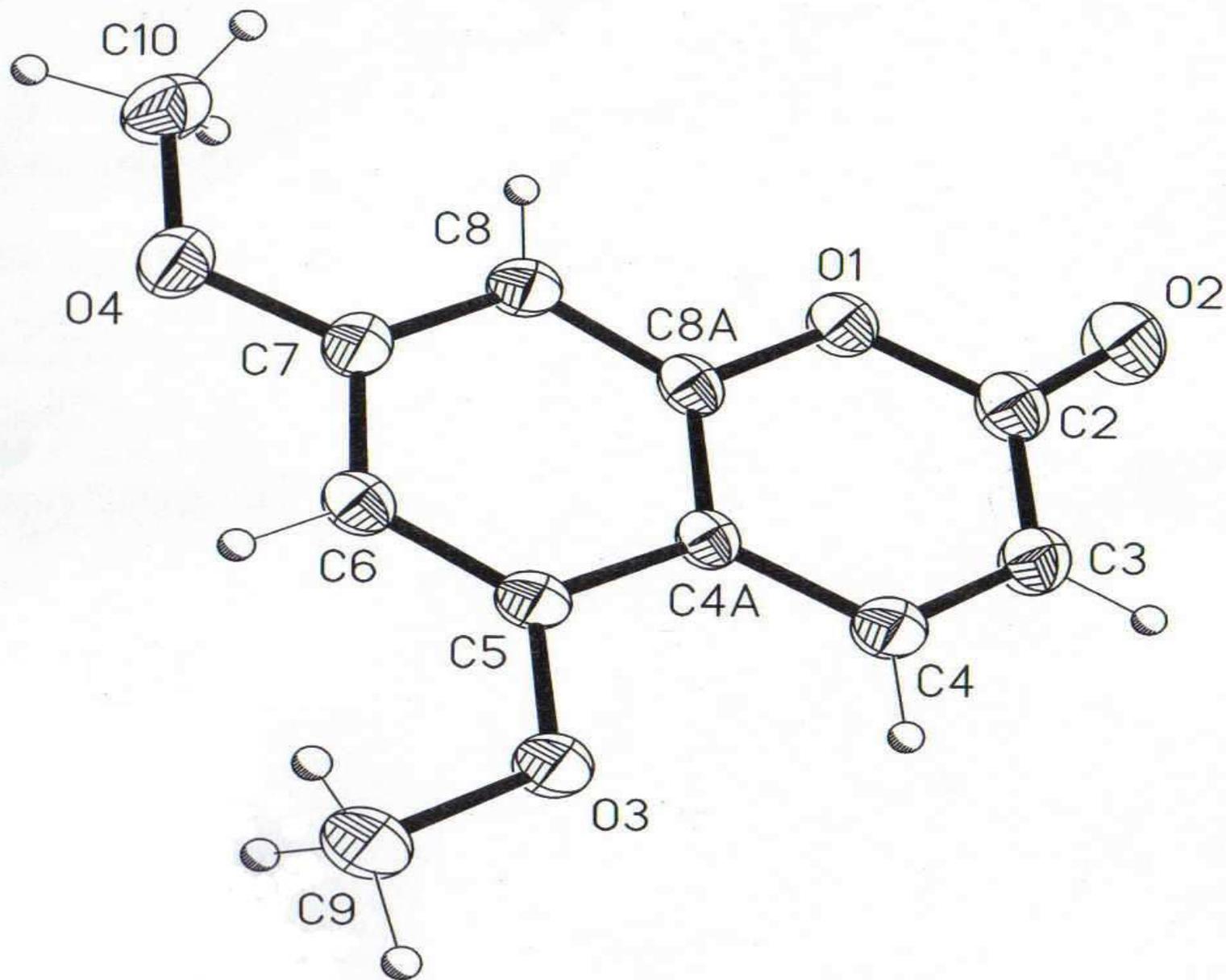
**Espectro 4 EM M+ de 5,7-Dimetoxicumarina**



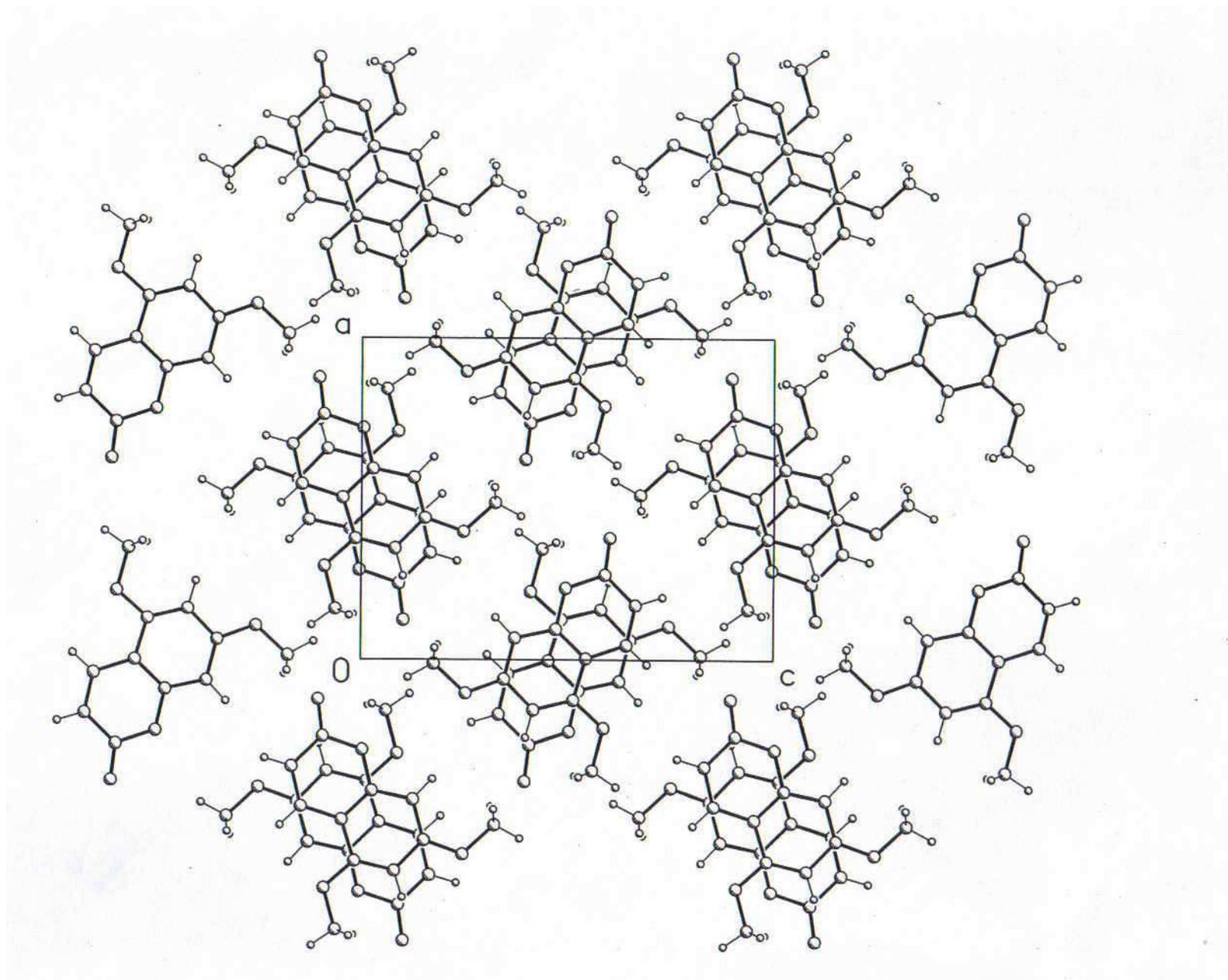
**Espectro 5 IR sol.  $\text{CHCl}_3$  de 5,7-Dimetoxicumarina**



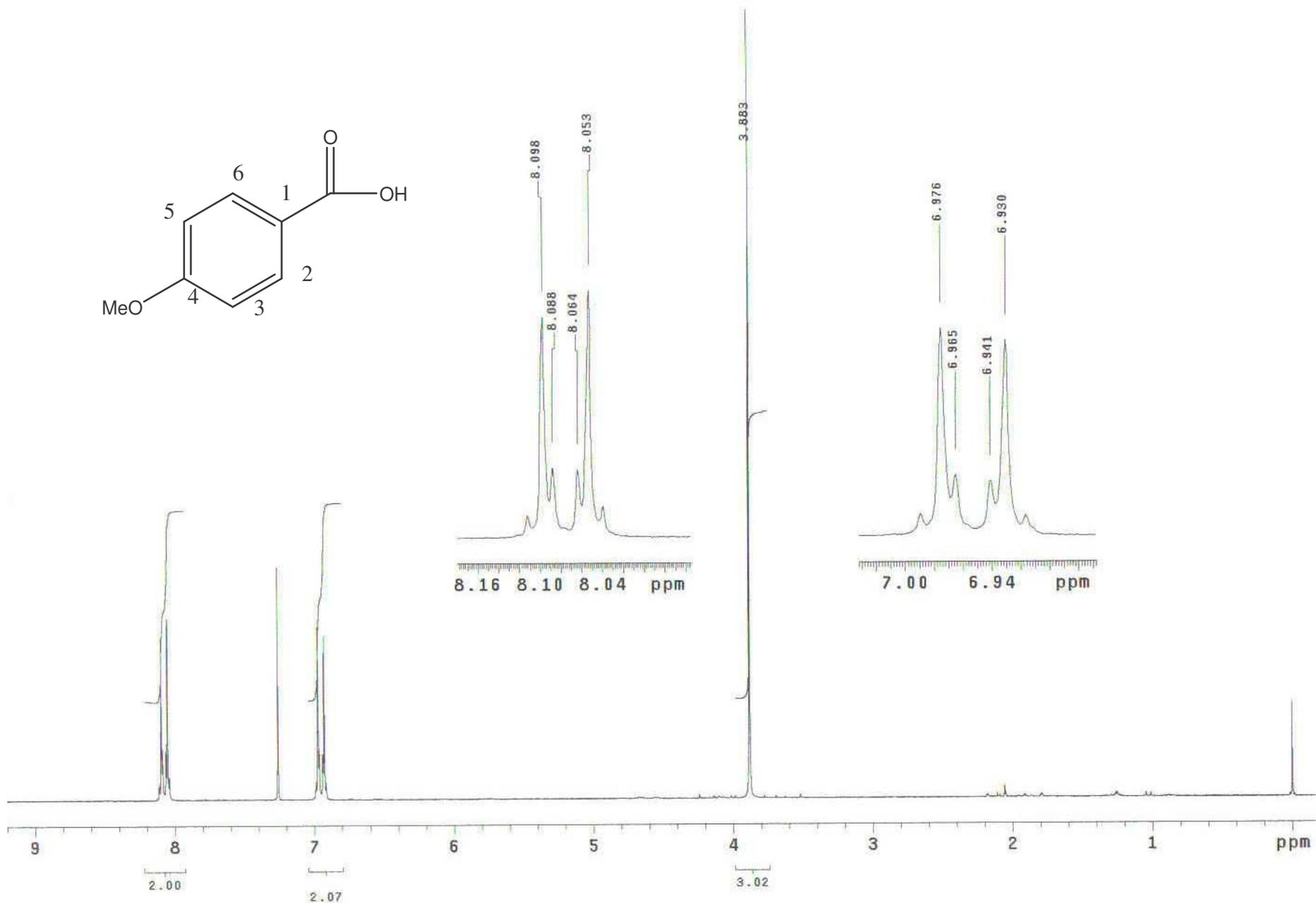
**Espectro 6 UV-Vis sol. Metanol de 5,7-Dimetoxicumarina**



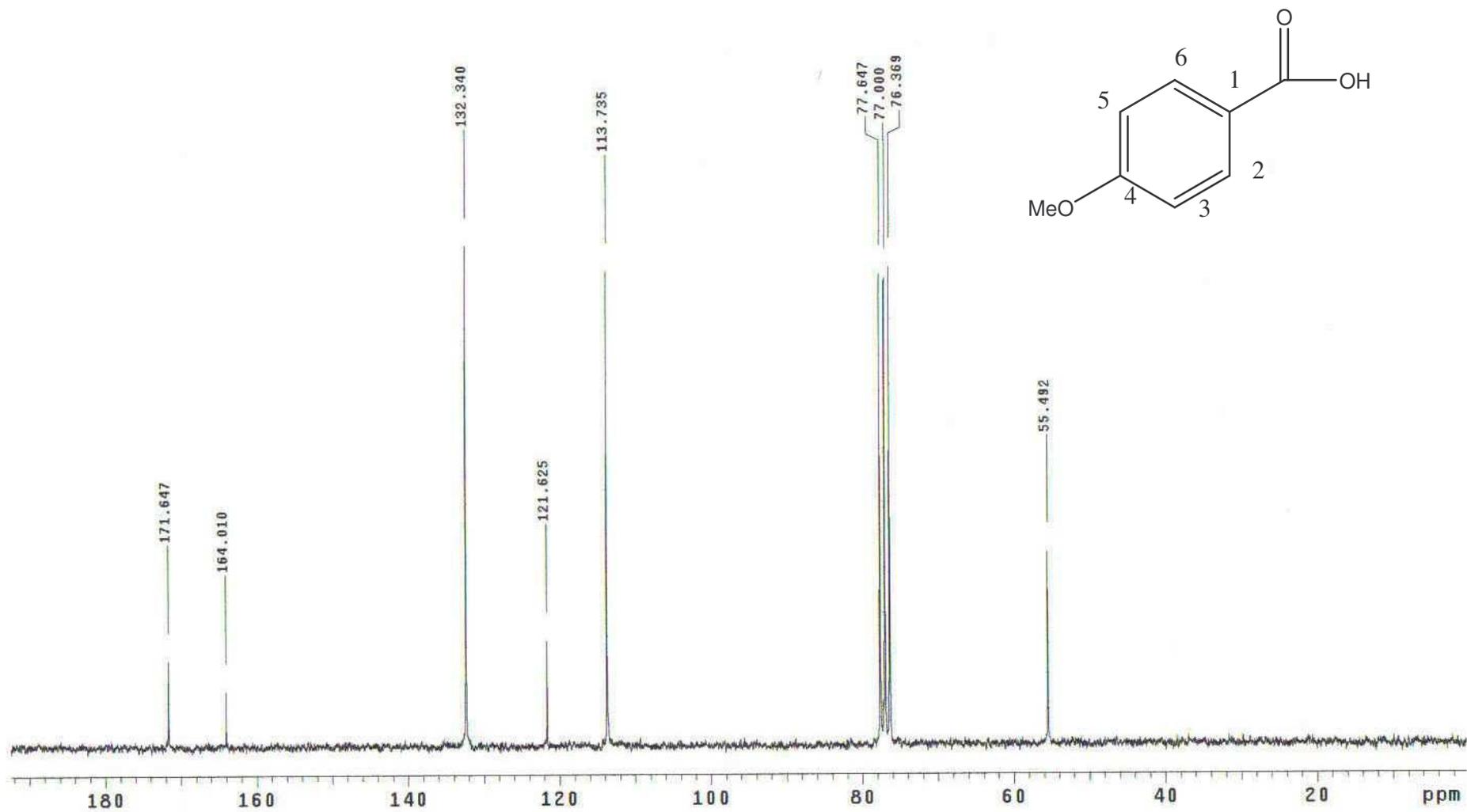
**Espectro 7 Rayos X molécula de 5,7-Dimetoxicumarina**



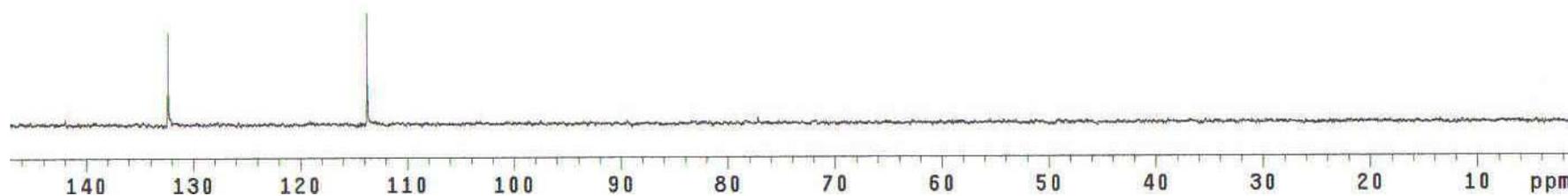
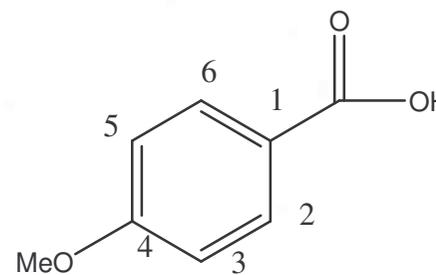
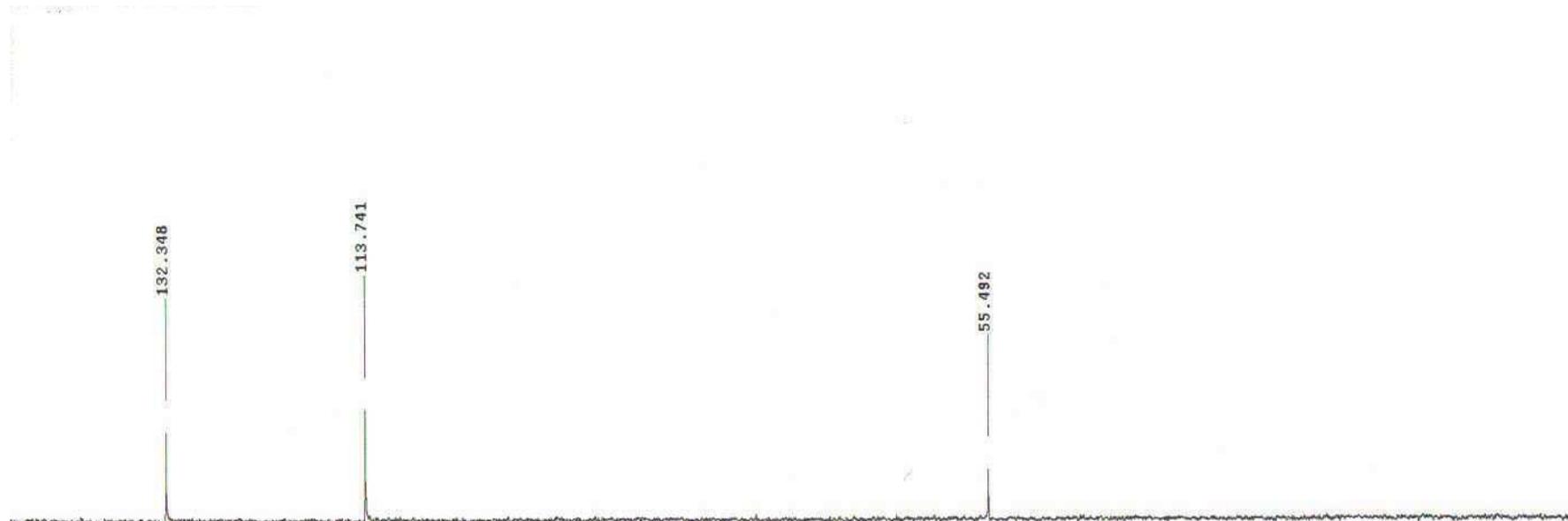
**Espectro 8 Rayos X red cristalina de 5,7-Dimetoxicumarina**



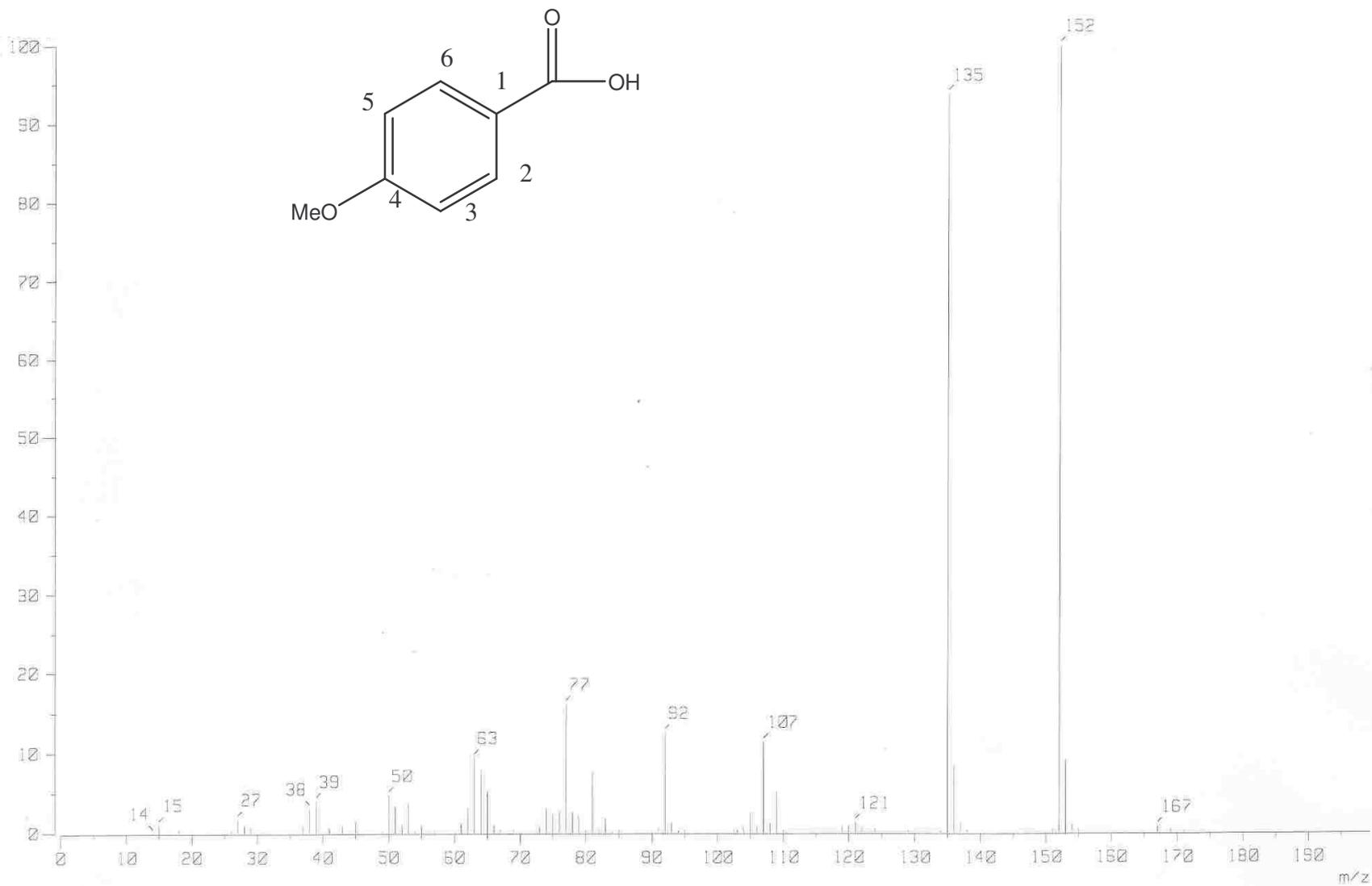
**Espectro 9 RMN<sup>1</sup>H 200Hz CDCl<sub>3</sub> de Acido 4-metoxibenzoico**



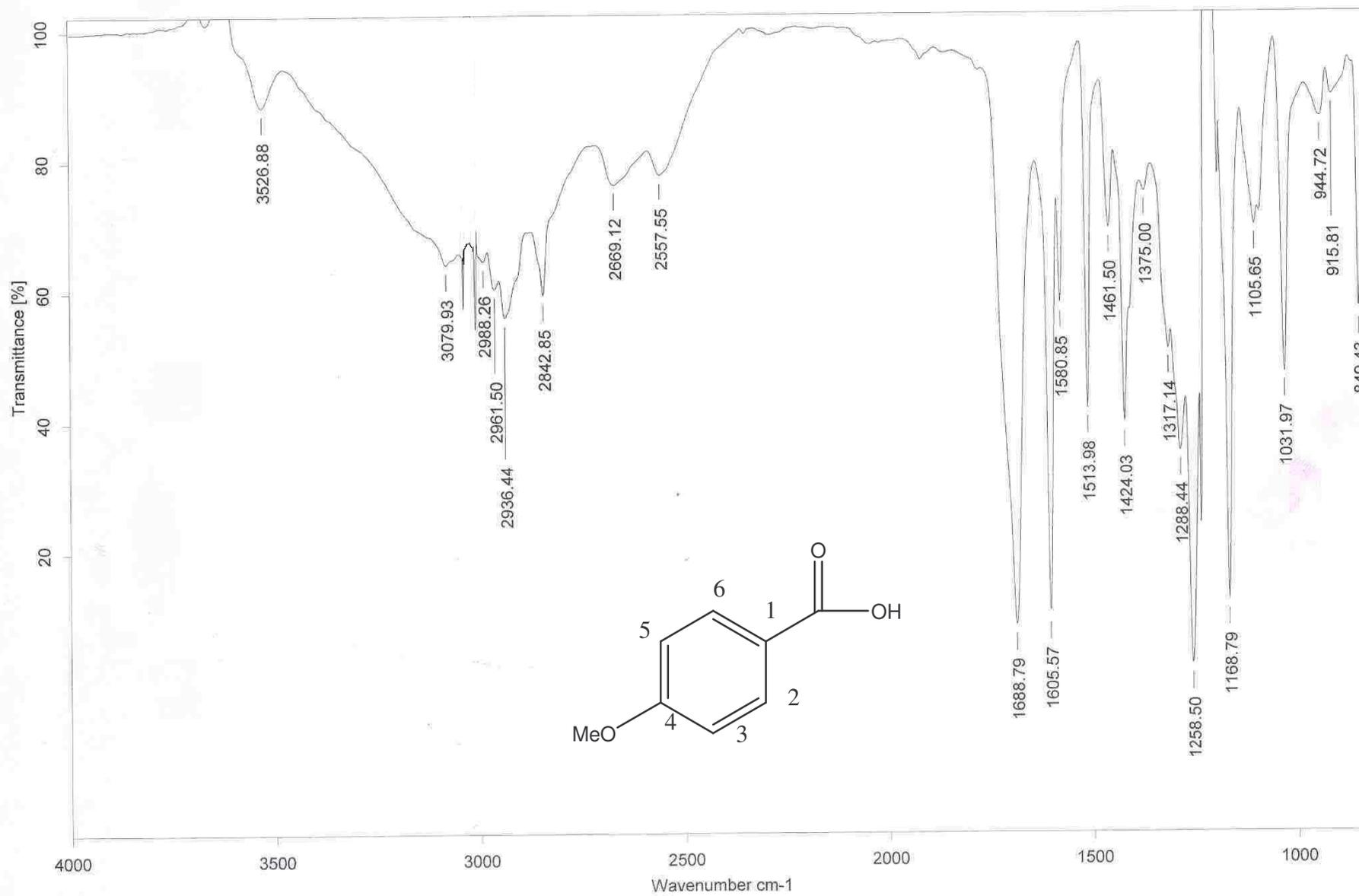
Espectro 10 RMN<sup>13</sup>C 200Hz CDCl<sub>3</sub> de Acido 4-metoxibenzoico



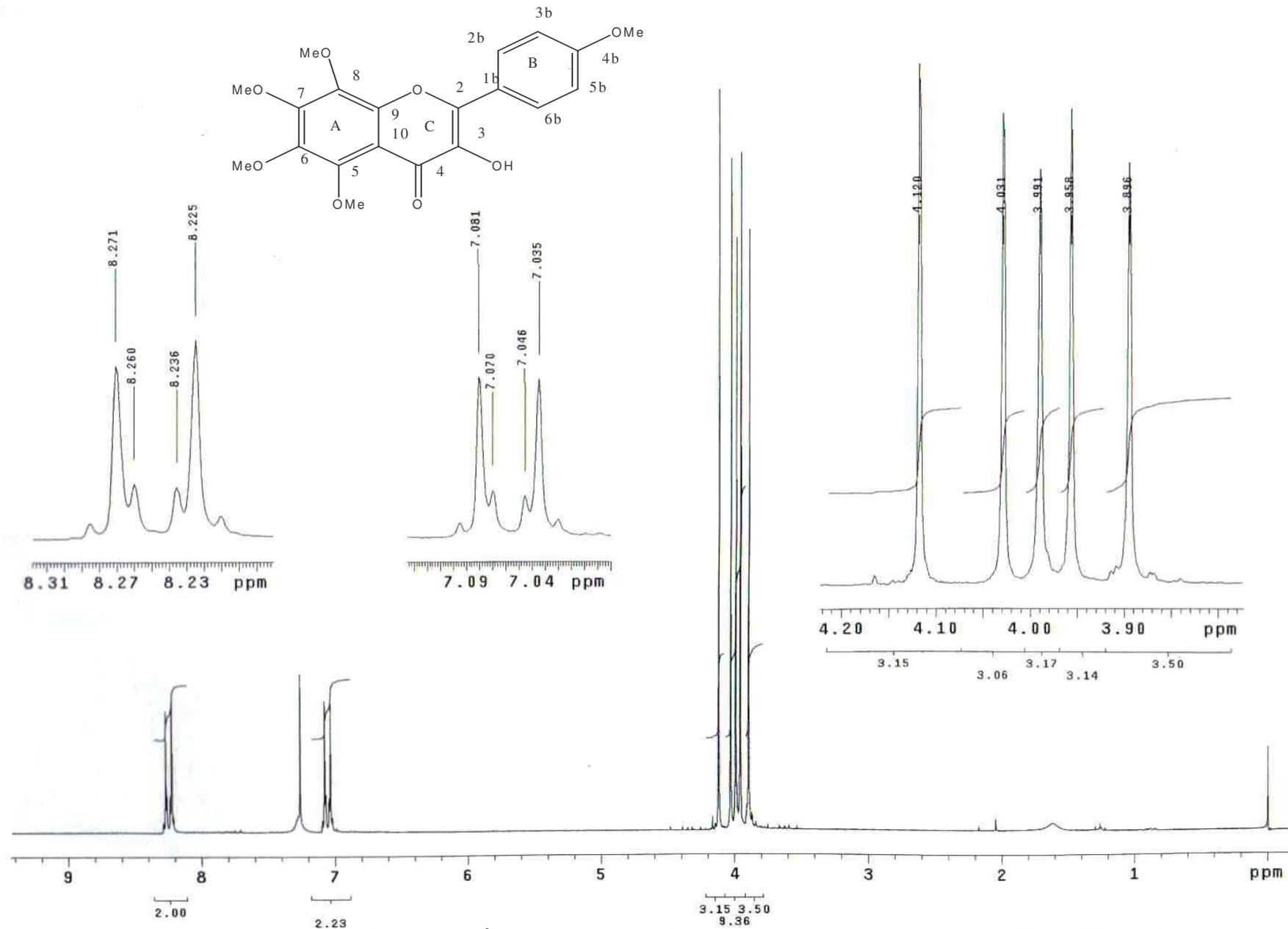
**Espectro 11 DEPT 200Hz CDCl<sub>3</sub> de Acido 4-metoxibenzoico**



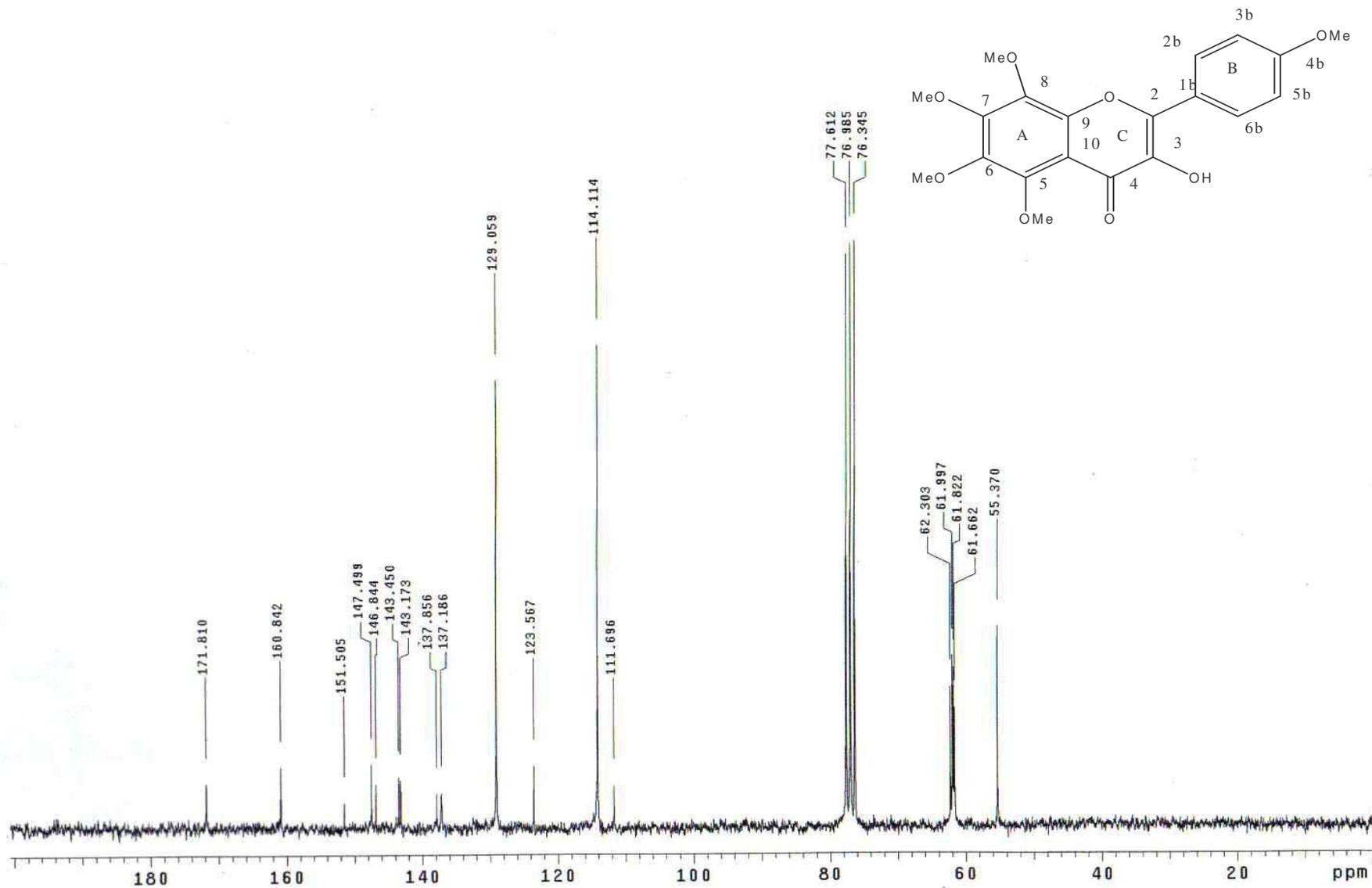
**Espectro 12 EM M+ de Acido 4-metoxibenzoico**



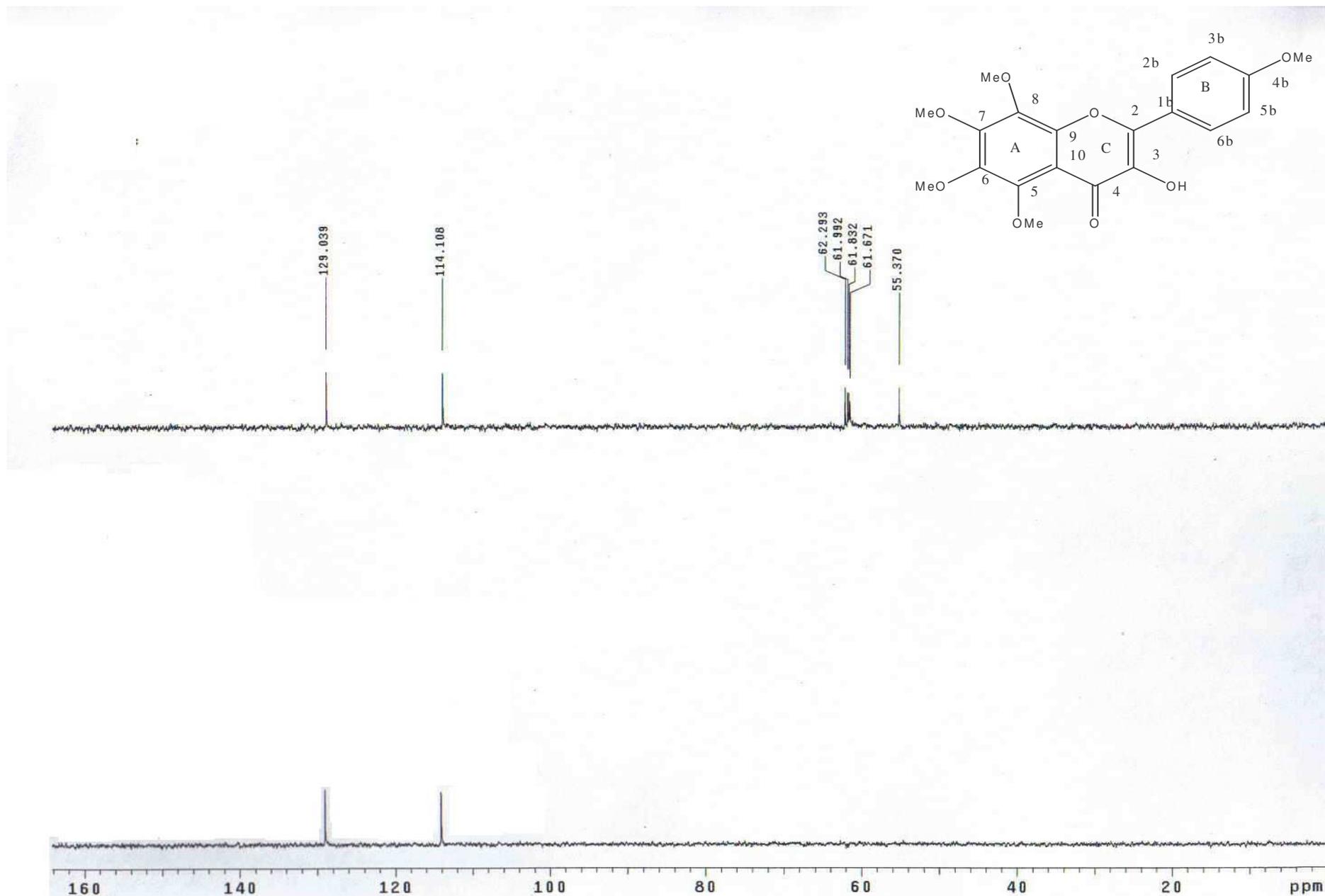
**Espectro 13 IR sol.  $\text{CHCl}_3$  de Acido 4-metoxibenzoico.**



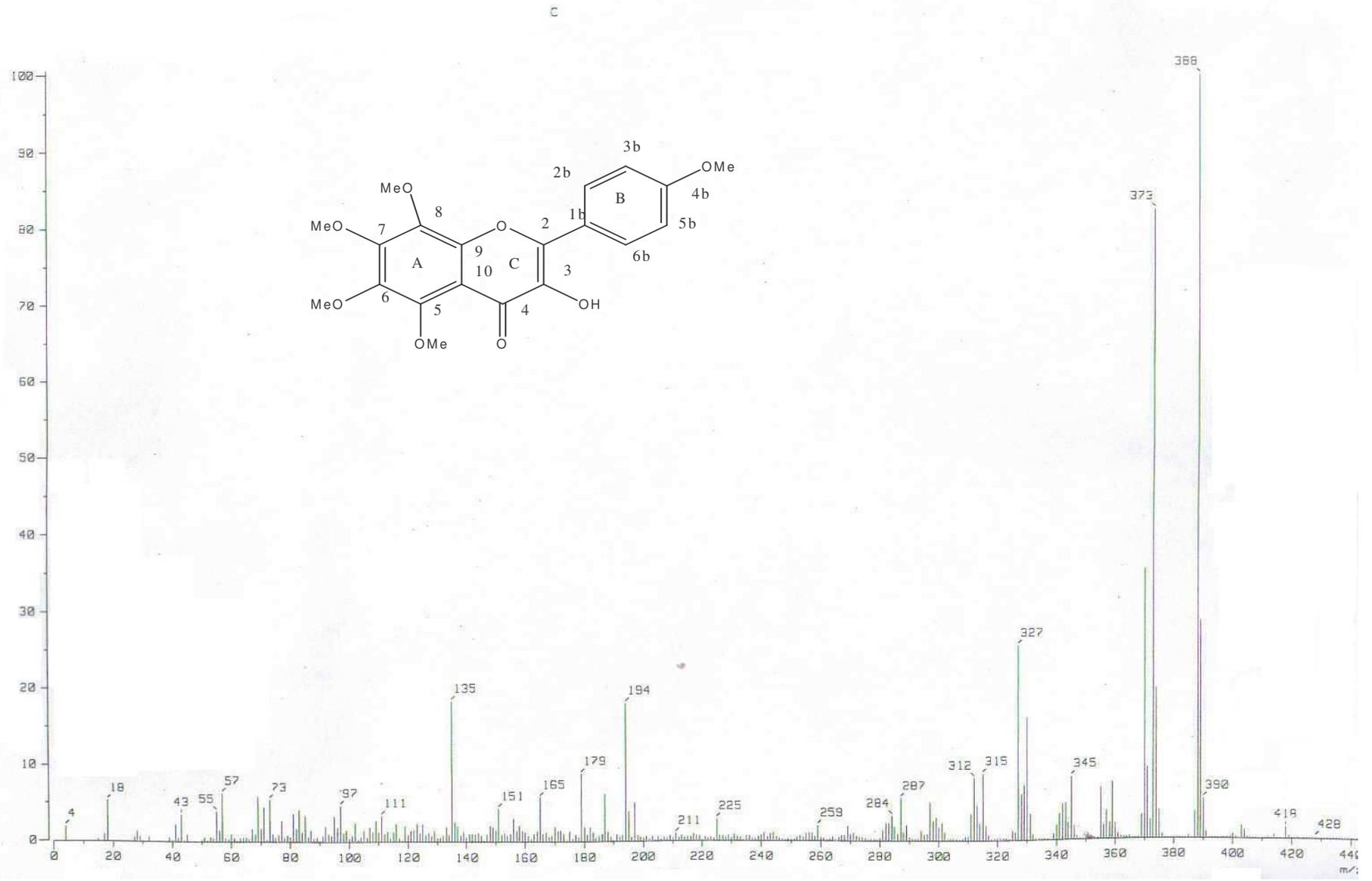
**Espectro 14 RMN<sup>1</sup>H 200Hz CDCl<sub>3</sub> de 3-Hidroxi-5,6,7,8,4'-pentametoxiflavona**



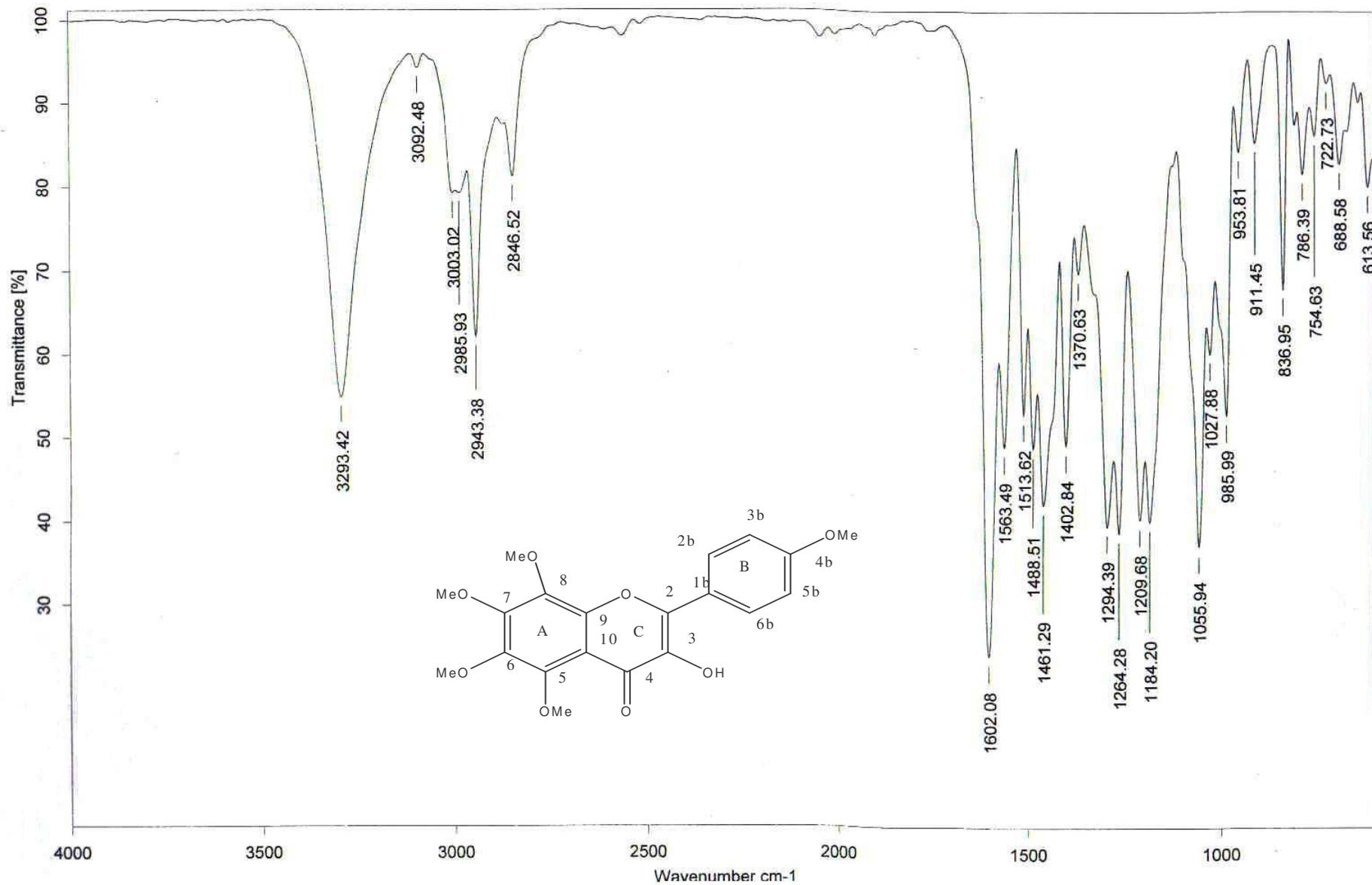
**Espectro 15 RMN<sup>13</sup>C 200Hz CDCl<sub>3</sub> de 3-Hidroxi-5,6,7,8,4'-pentametoxiflavona**



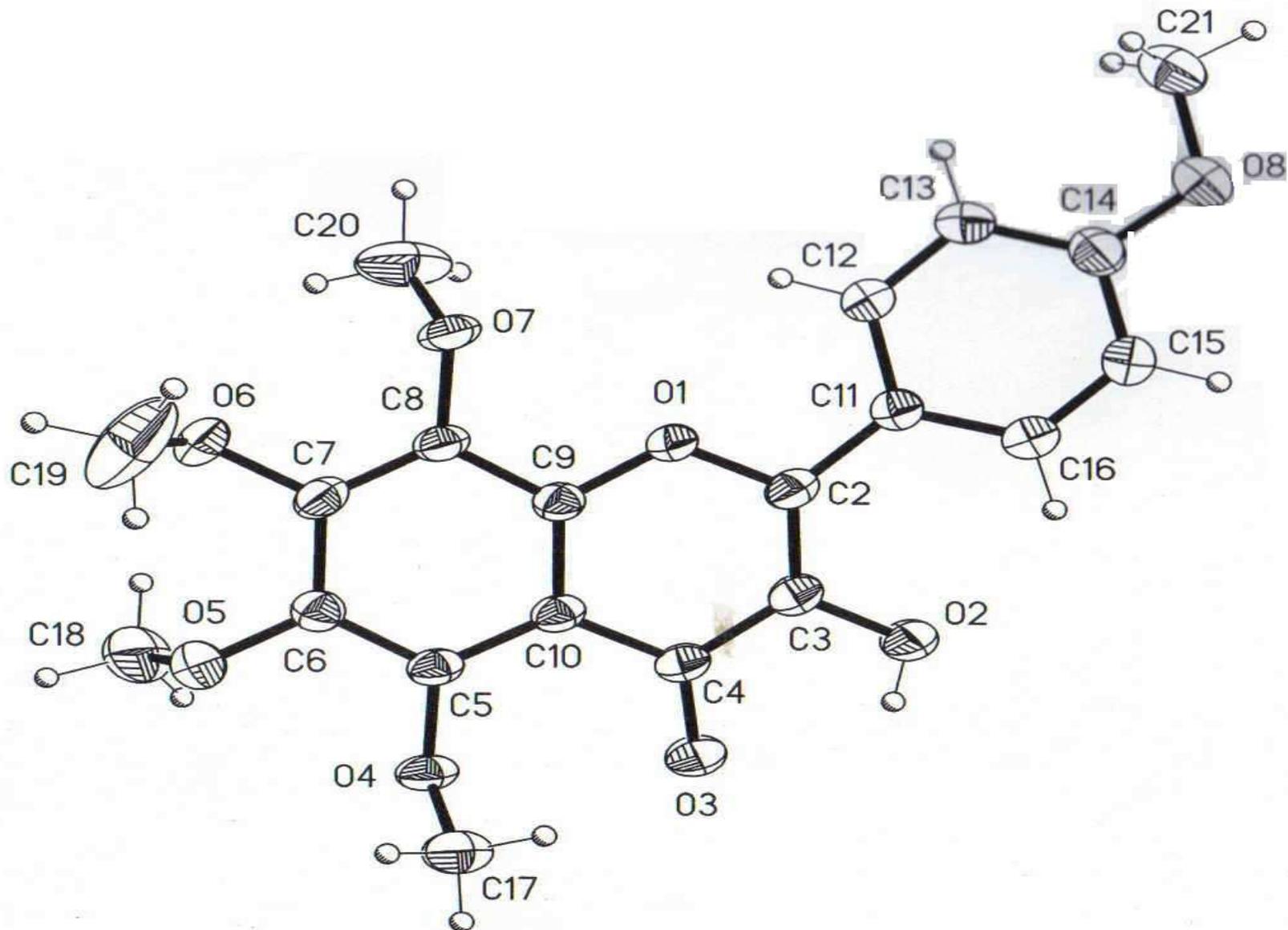
Espectro 16 DEPT 200Hz  $\text{CDCl}_3$  de 3-Hidroxi-5,6,7,8,4'-pentametoxiflavona



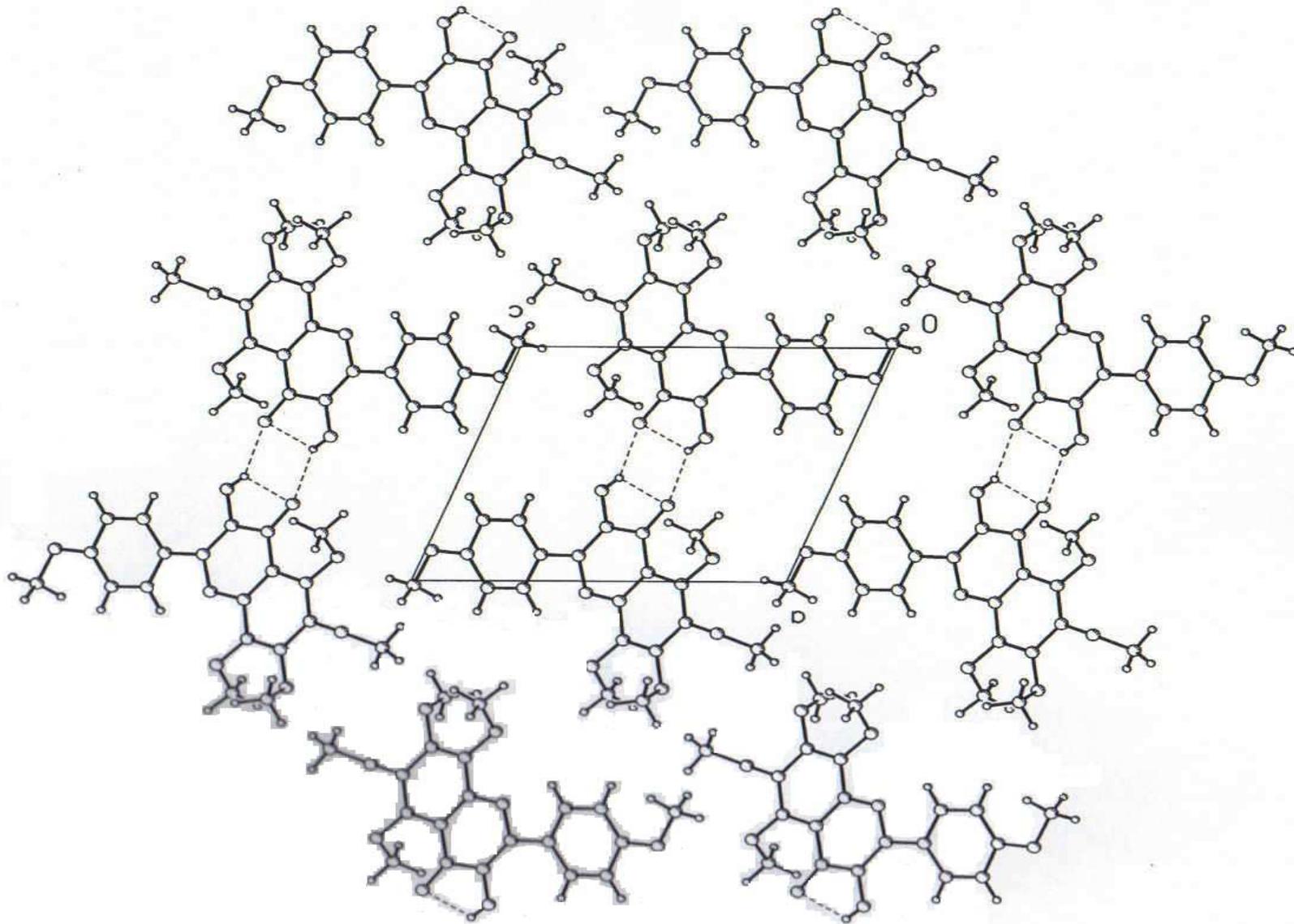
**Espectro 17 EM M+ de 3-Hidroxi-5,6,7,8,4'-pentametoxiflavona**



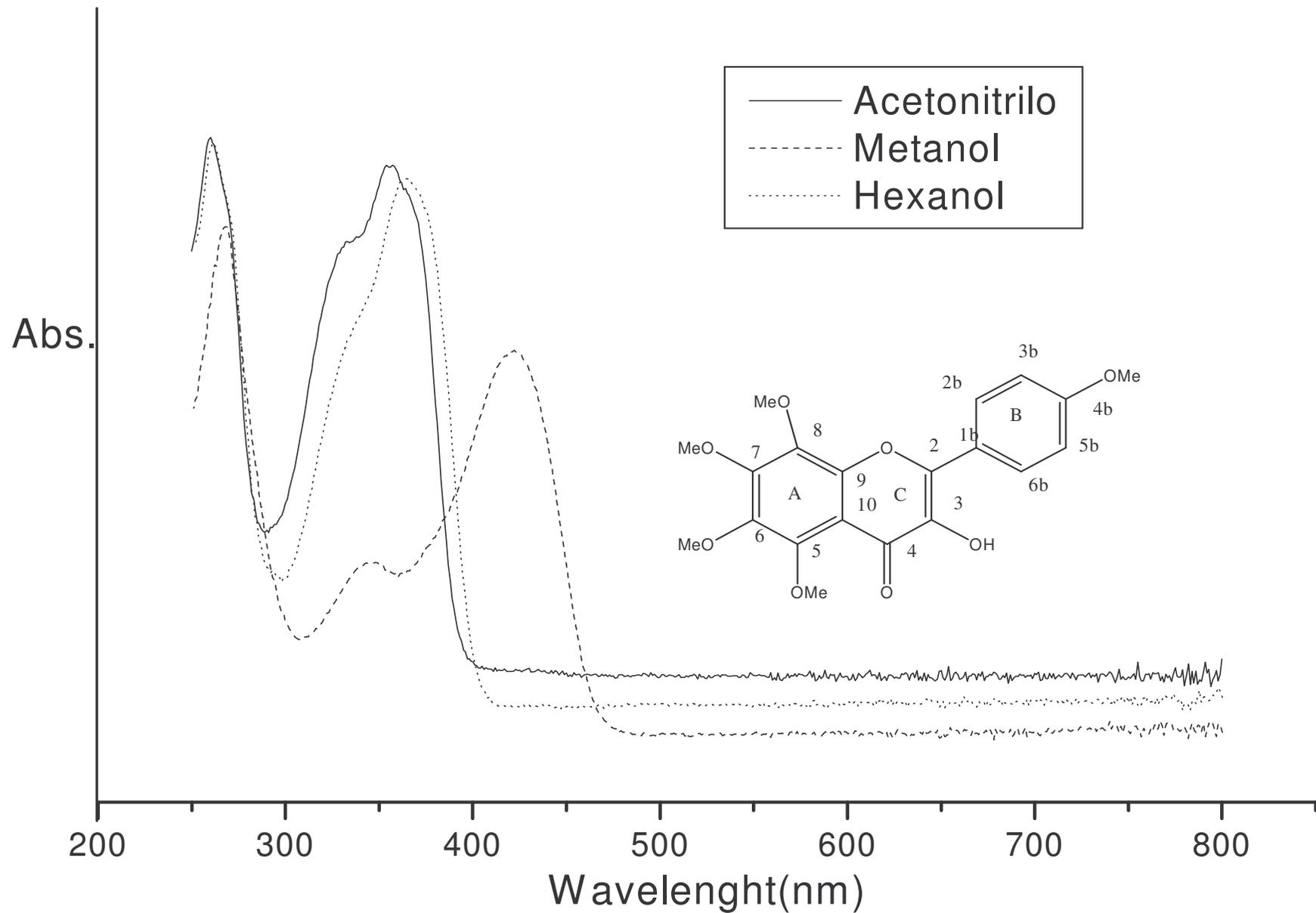
**Espectro 18 IR película de 3-Hidroxi-5,6,7,8,4'-pentametoxiflavona**



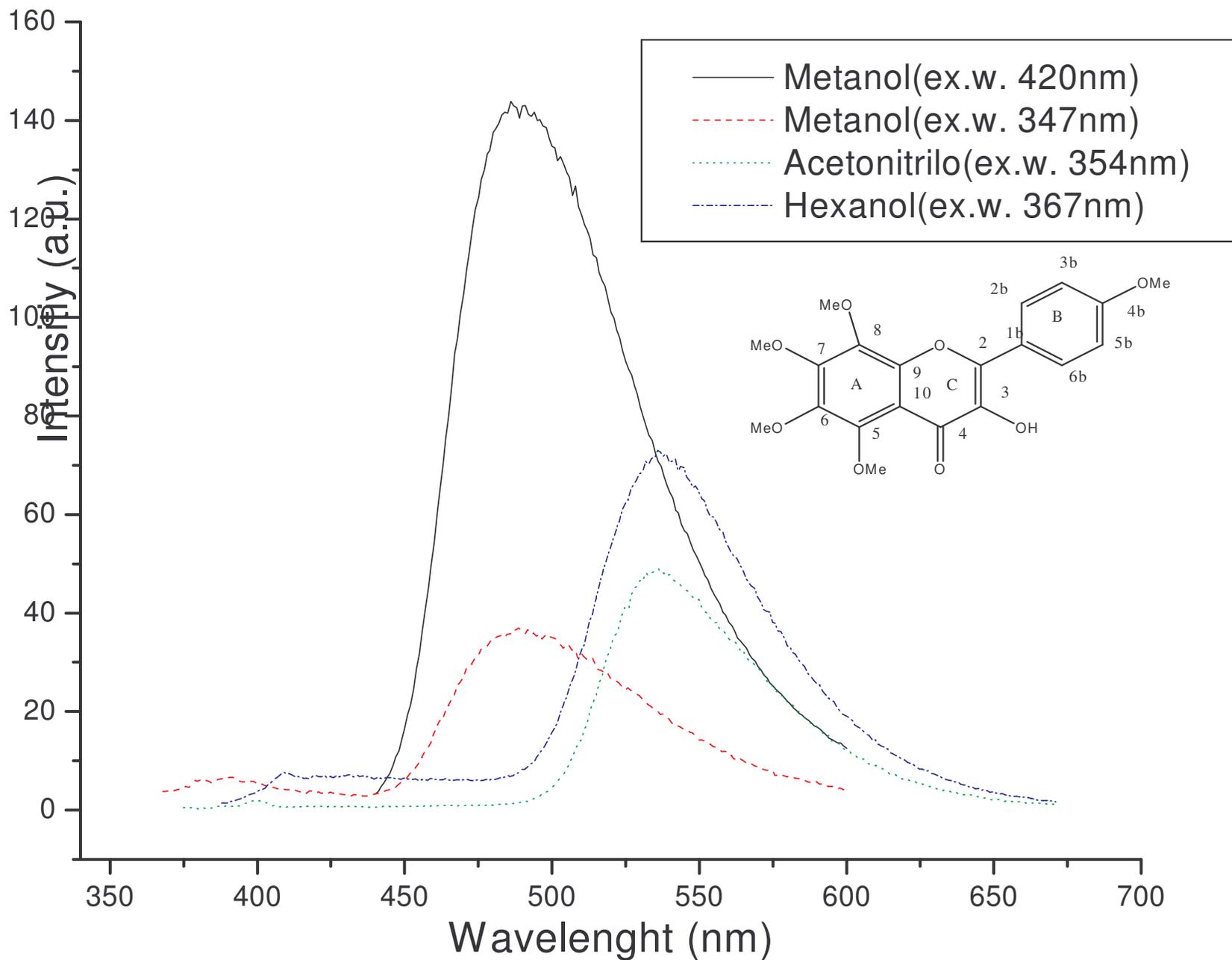
**Espectro 19 Rayos X molécula de 3-Hidroxi-5,6,7,8,4'-pentametoxiflavona**



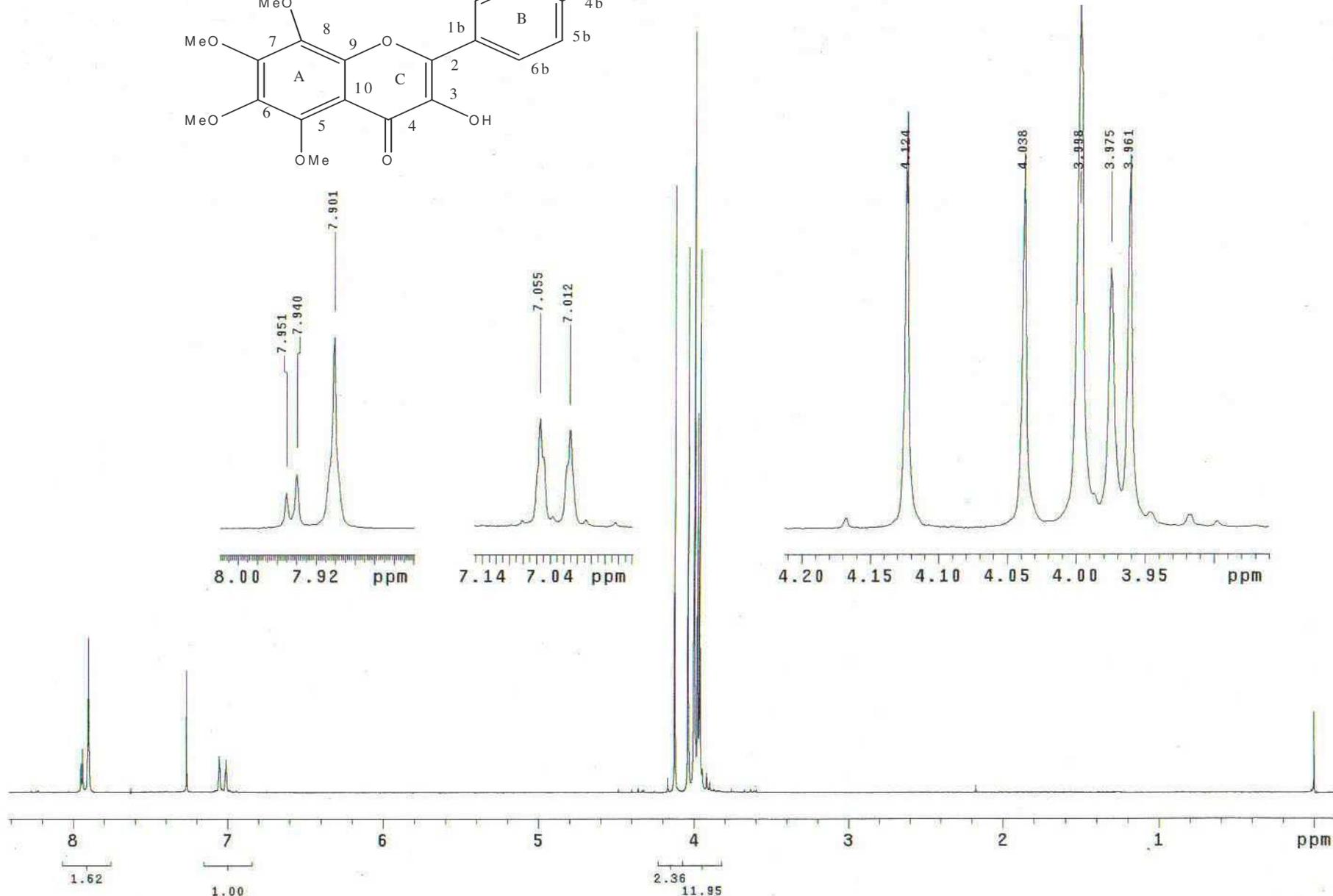
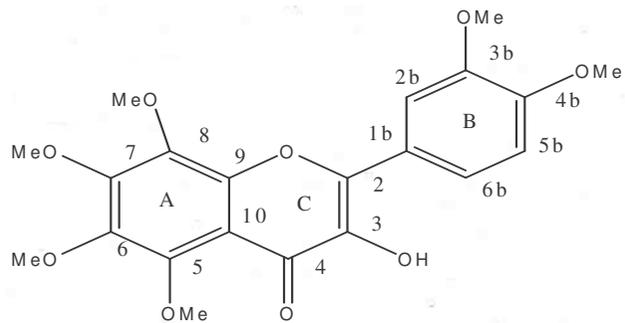
**Espectro 20 Rayos X red cristalina de 3-Hidroxi-5,6,7,8,4'-pentametoxiflavona**



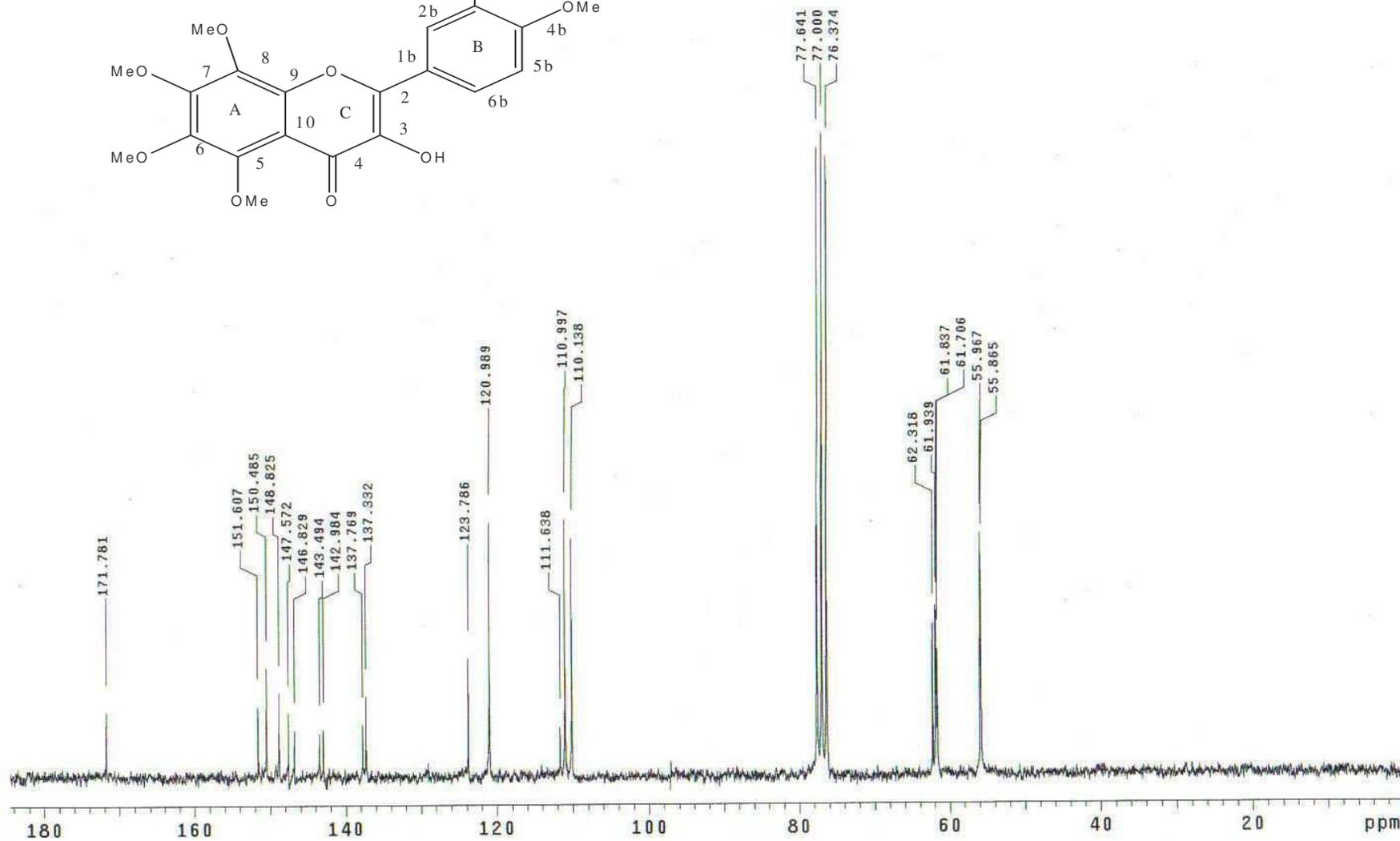
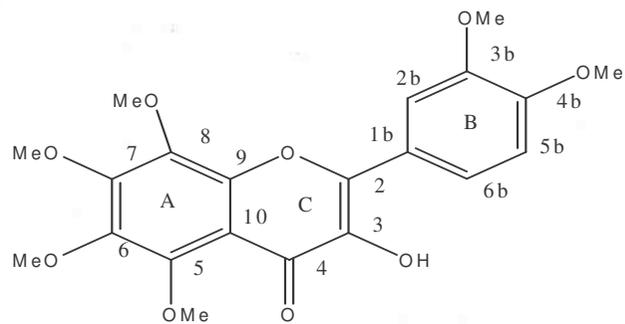
**Espectro 21. Espectro UV-Vis de 3-hidroxi-5,6,7,8,4'-pentametoxiflavona**



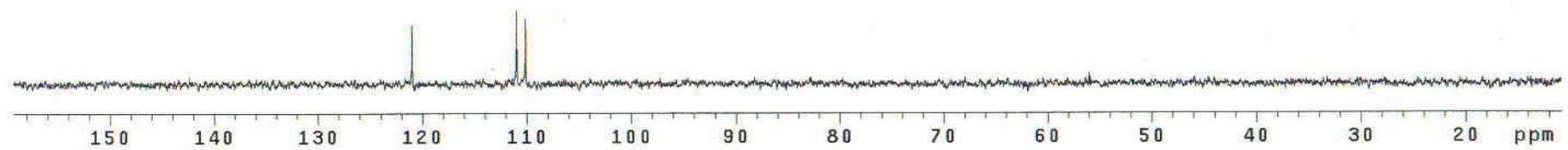
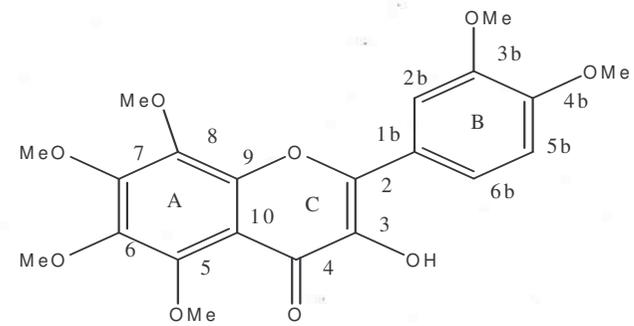
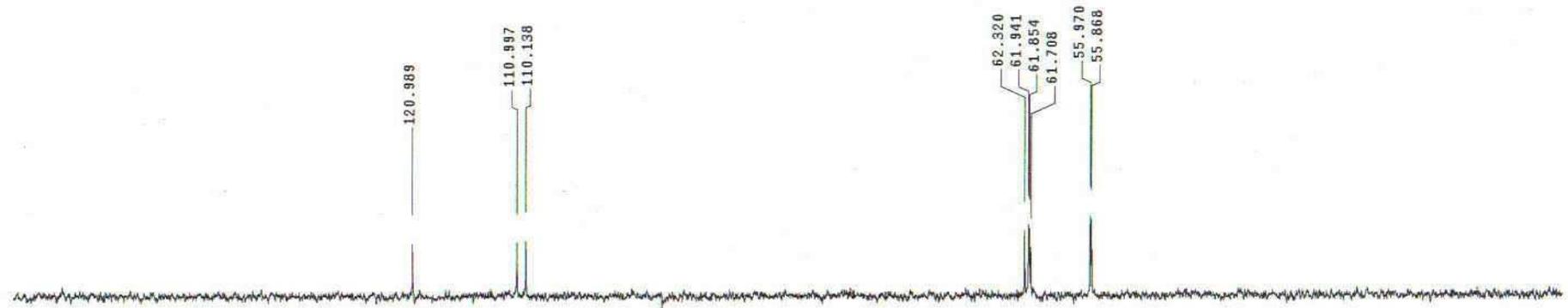
**Espectro 22. Espectro de fluorescencia de emision de 3-hidroxi-5,6,7,8,'3,'4-pentametoxiflavona**



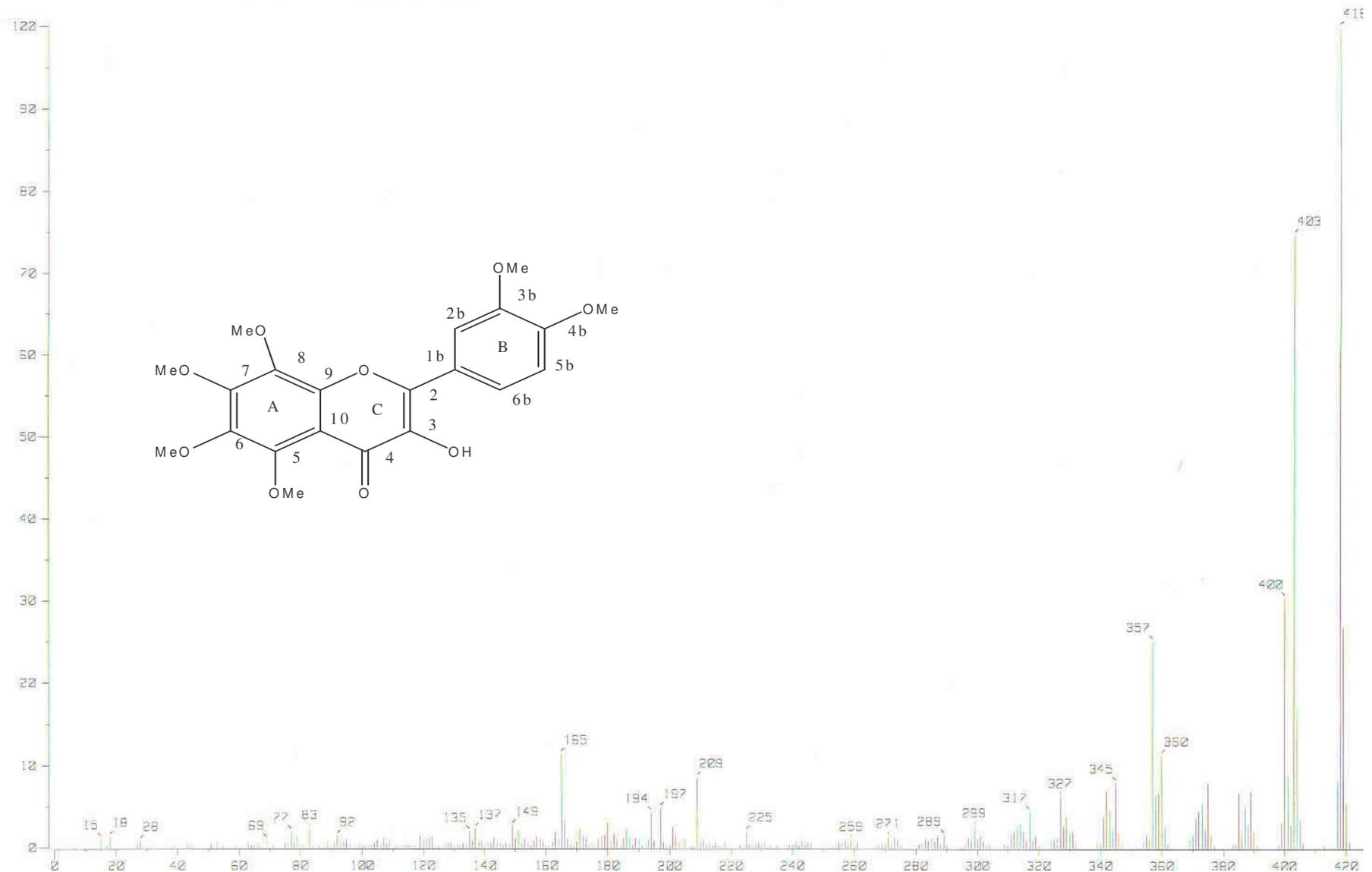
**Espectro 23 RMN<sup>1</sup>H 200Hz CDCl<sub>3</sub> de 3-Hidroxi-5,6,7,8,3',4'-hexametoxiflavona**



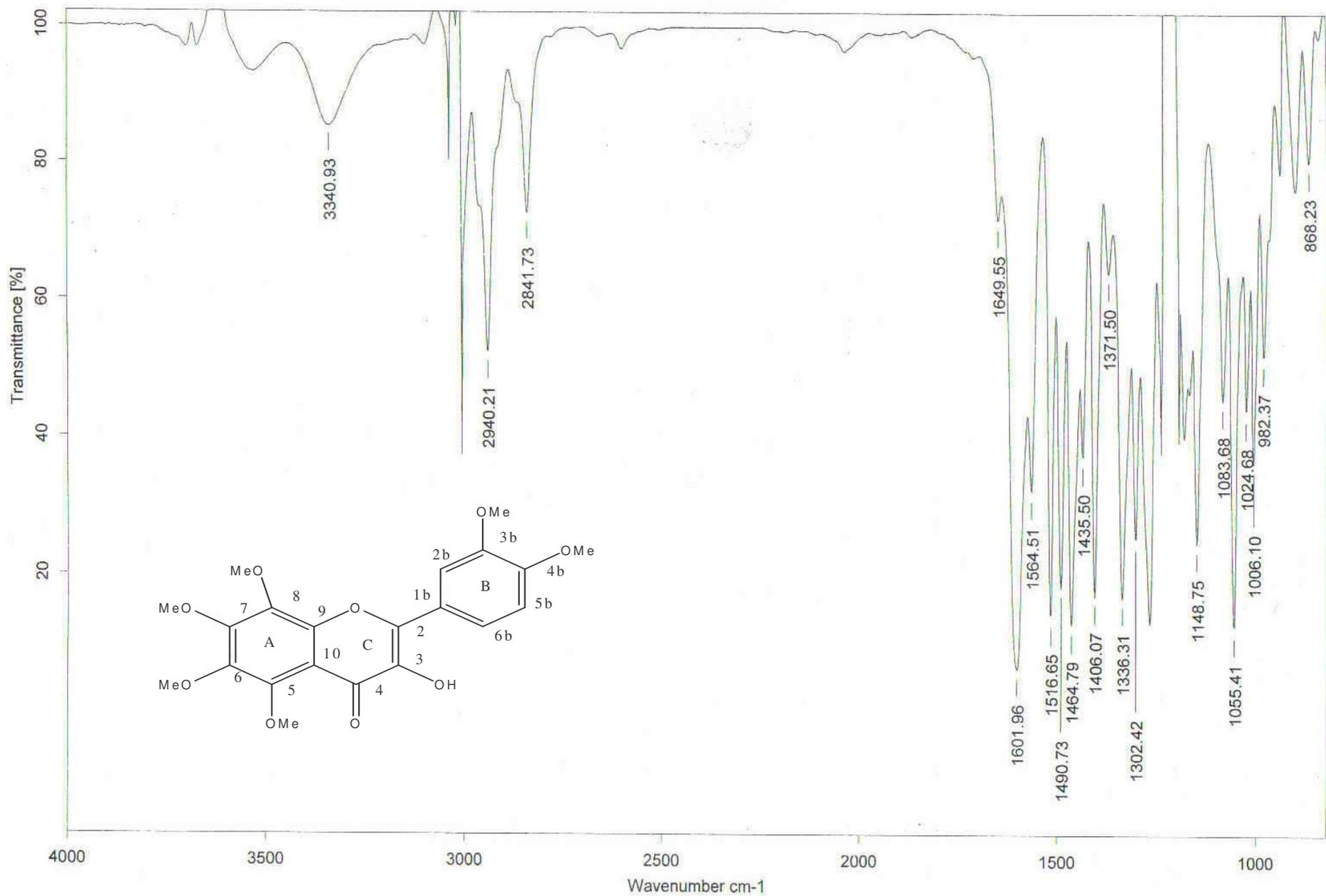
**Espectro 24 RMN<sup>13</sup>C 200Hz CDCl<sub>3</sub> de 3-Hidroxi-5,6,7,8,3',4'-hexametoxiflavona**



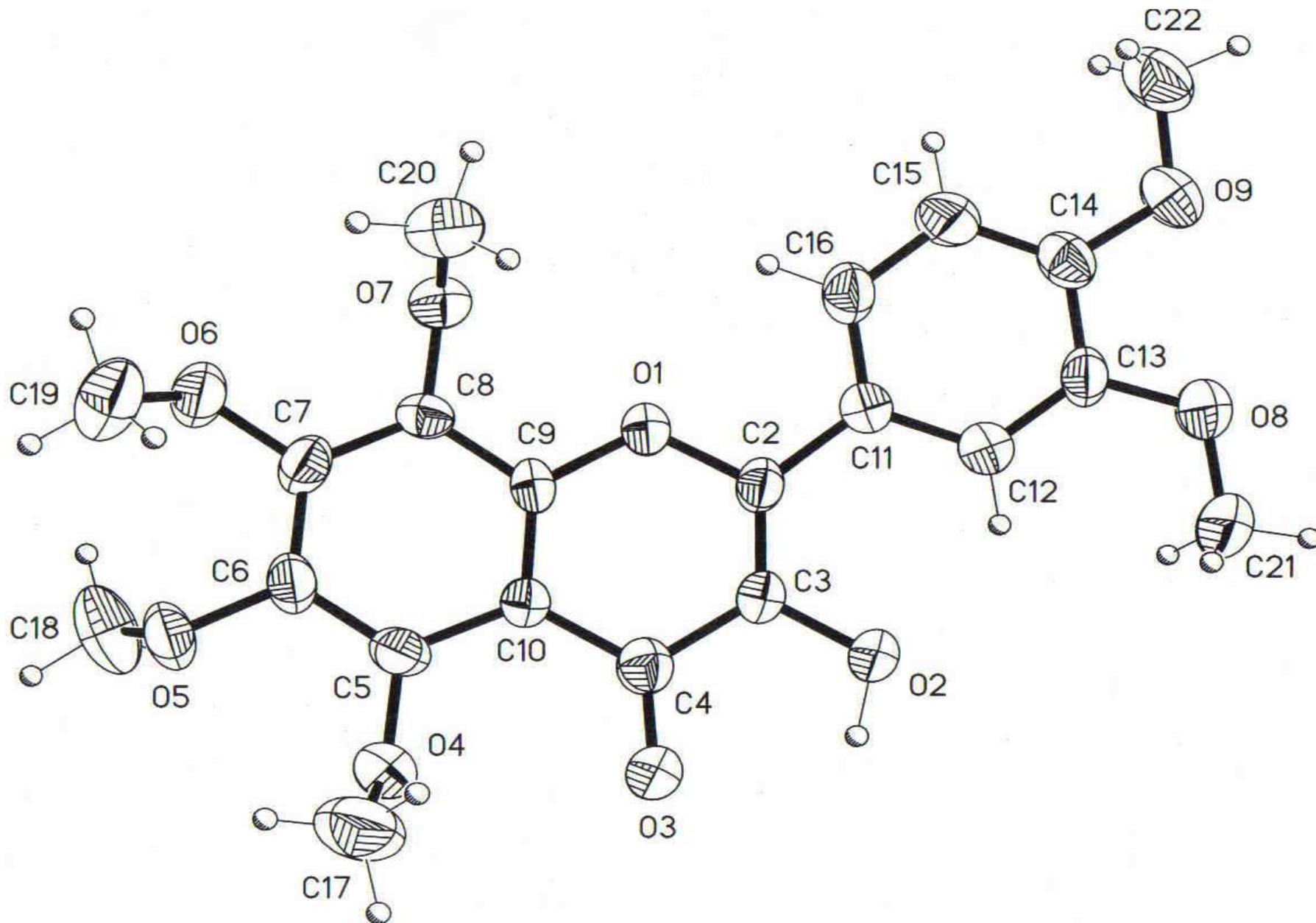
**Espectro 25 DEPT 200Hz CDCl<sub>3</sub> de 3-Hidroxi-5,6,7,8,3',4'-hexametoxiflavona**



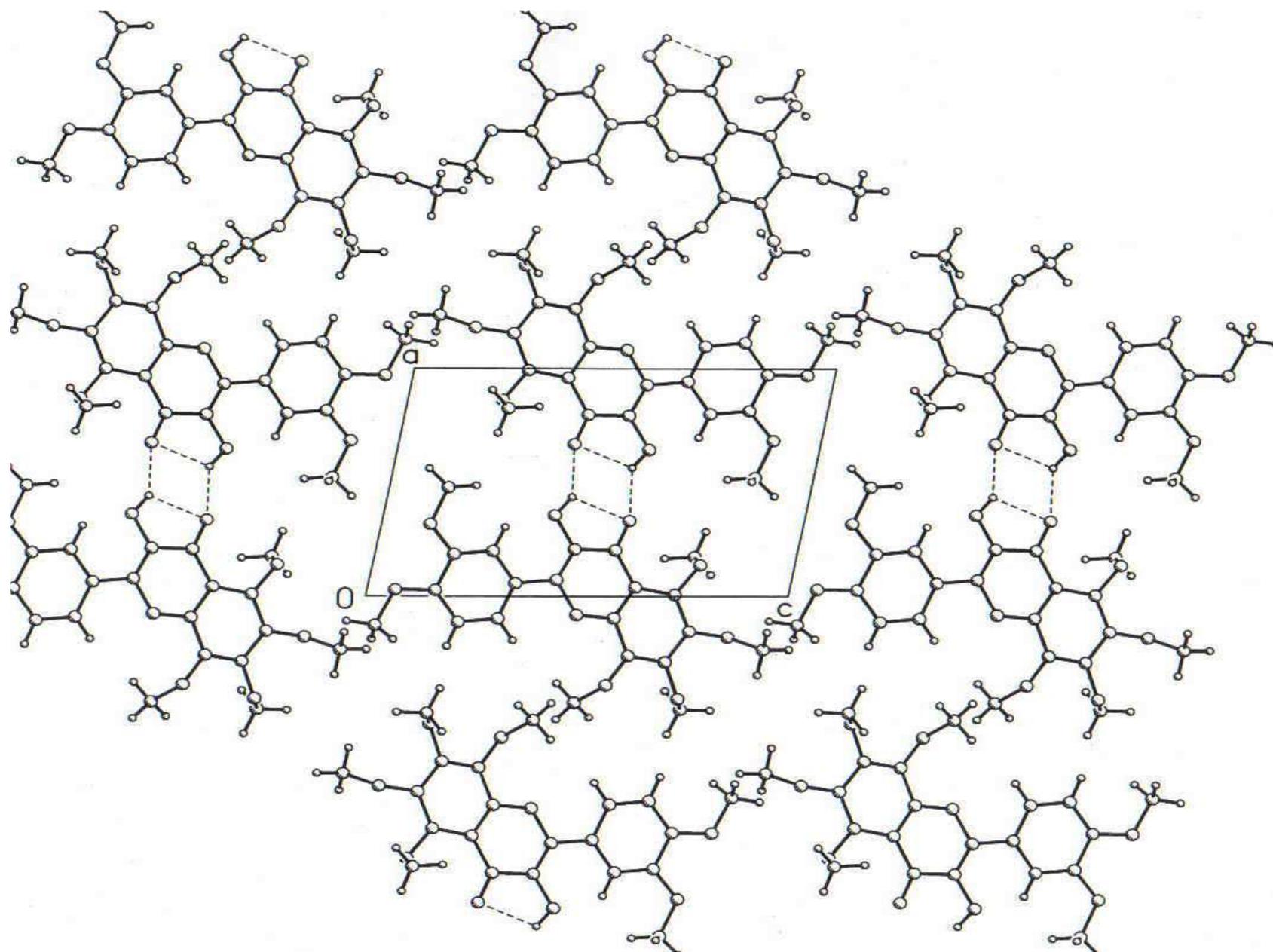
**Espectro 26 EM M<sup>+</sup> de 3-Hidroxi-5,6,7,8,3',4'-hexametoxiflavona**



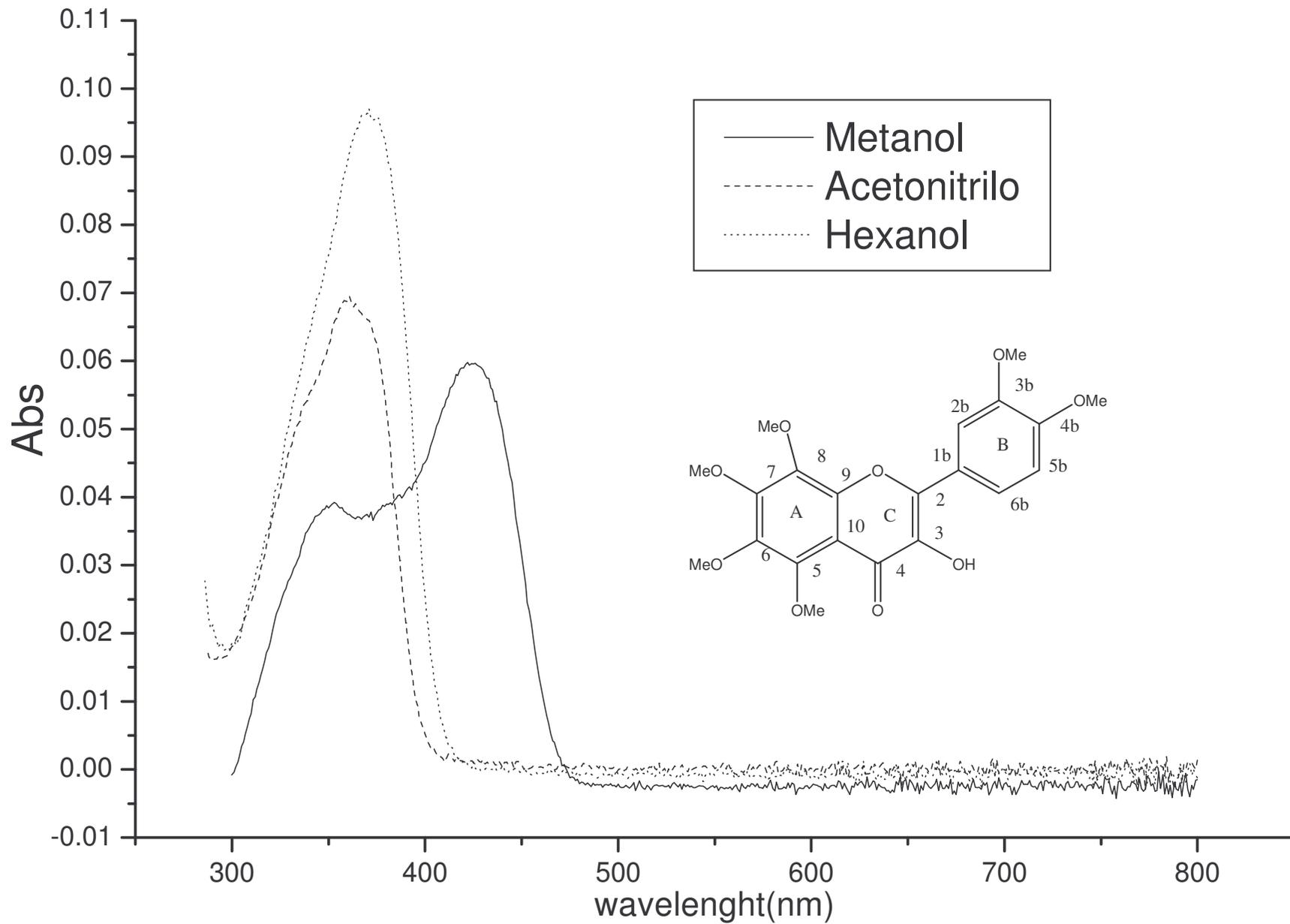
**Espectro 27 IR película de 3-Hidroxi-5,6,7,8,3',4'-hexametoxiflavona**



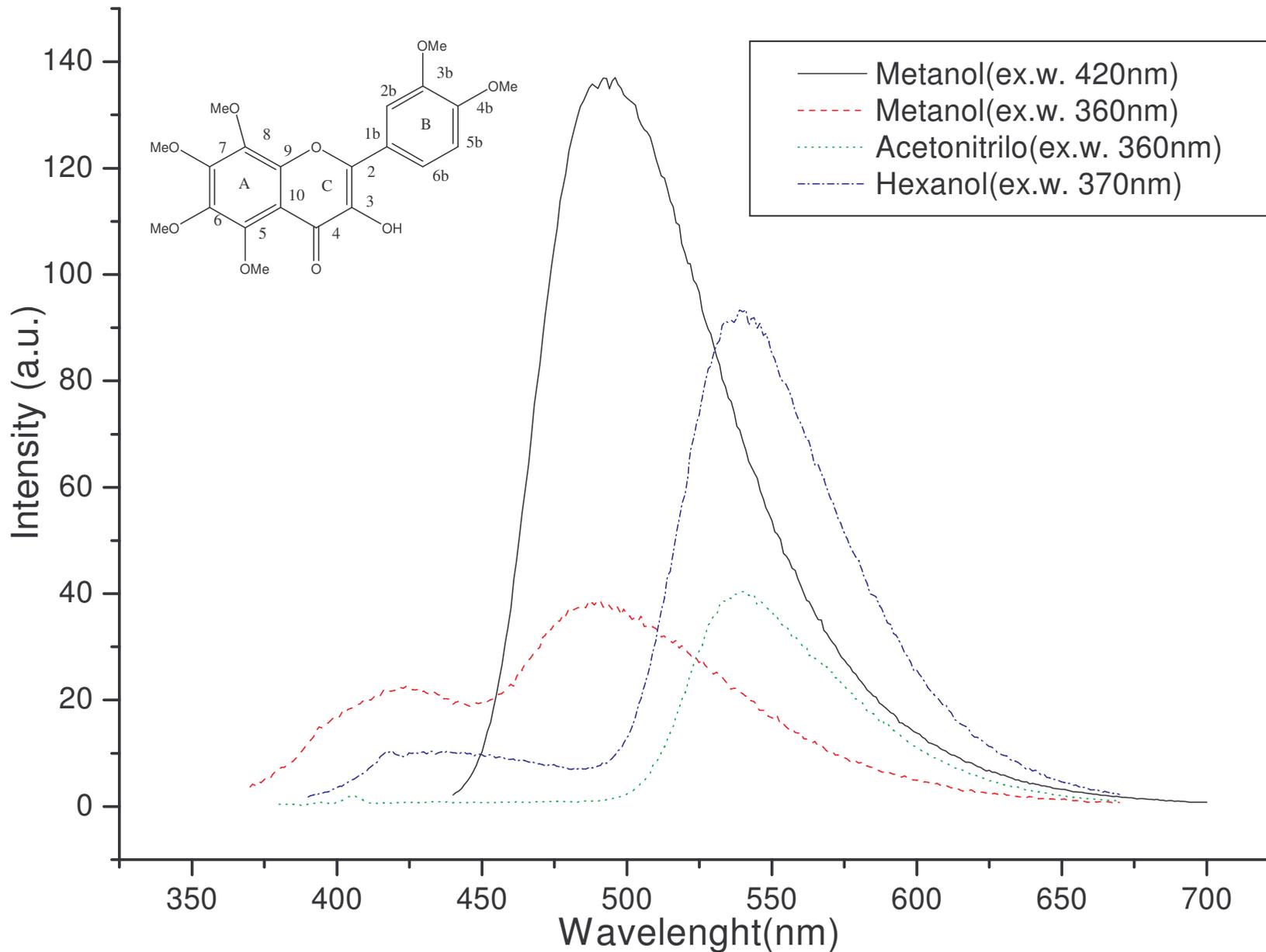
**Espectro 28 Rayos X molécula de 3-Hidroxi-5,6,7,8,3',4'-hexametoxiflavona**



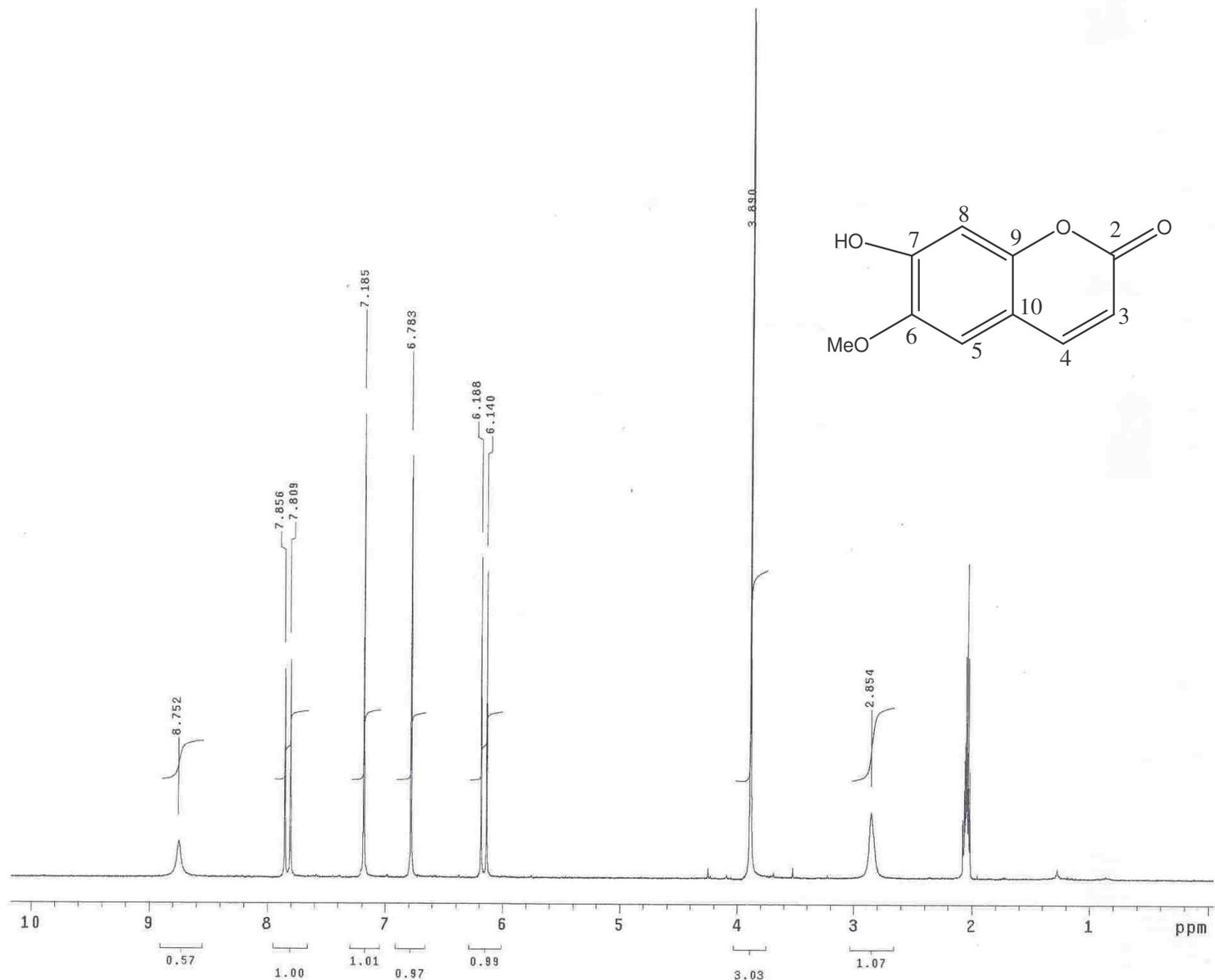
**Espectro 29 Rayos X red cristalina de 3-Hidroxi-5,6,7,8,4'-  
hexametoxiflavona**



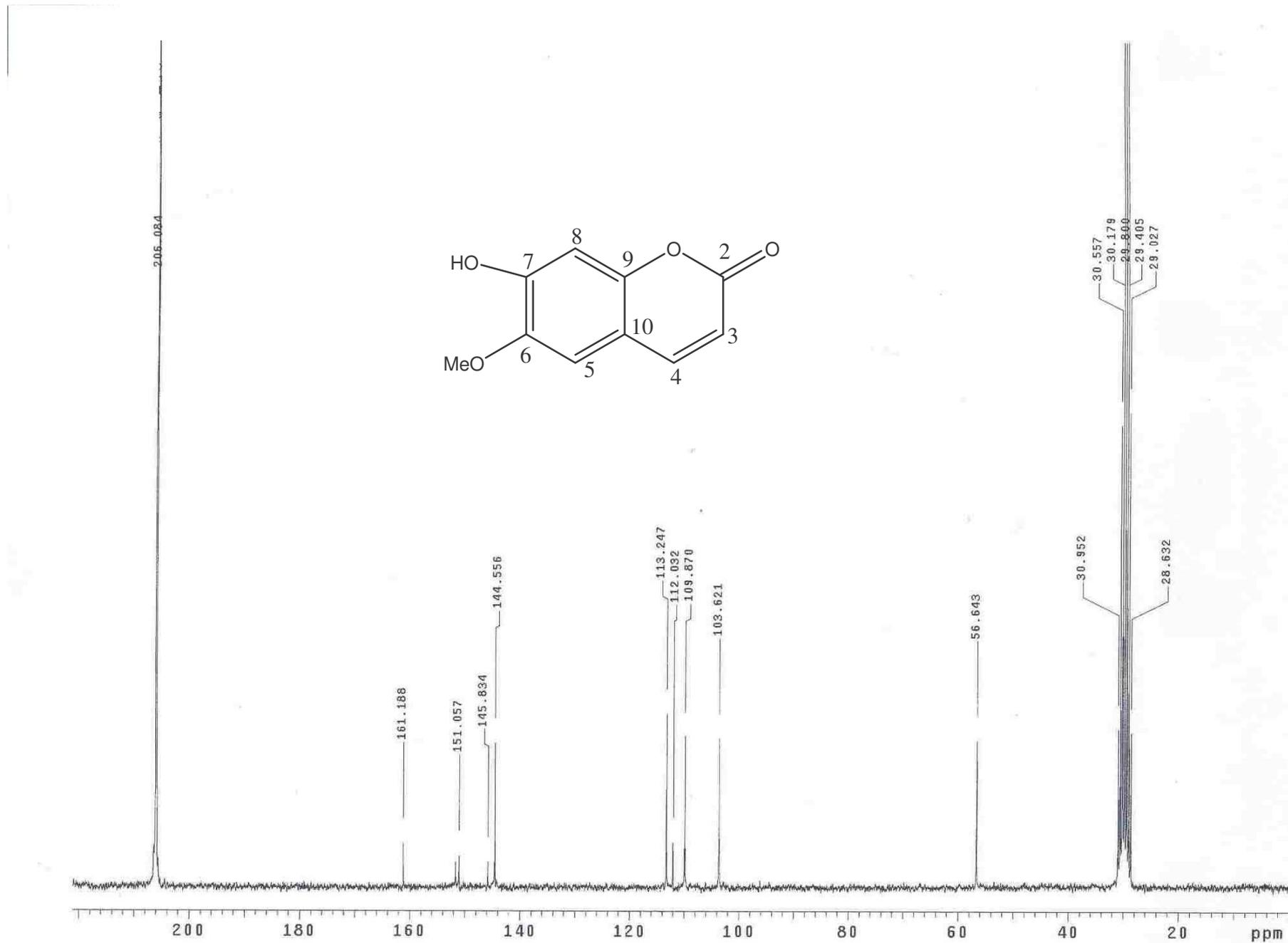
**Espectro 30. Espectro de UV-Vis de 3-hidroxi-5,6,7,8,'3,'4-hexametoxiflavona**



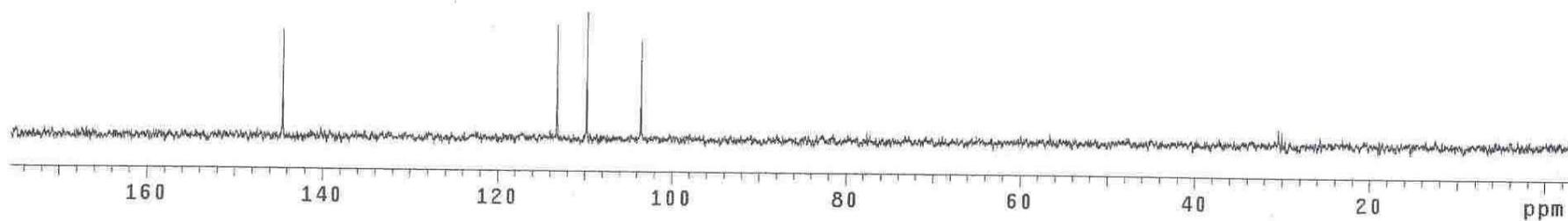
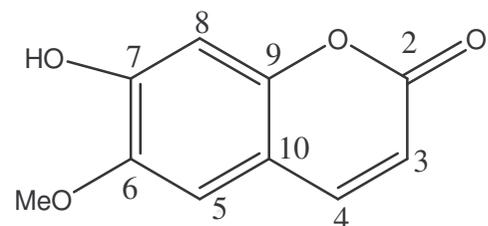
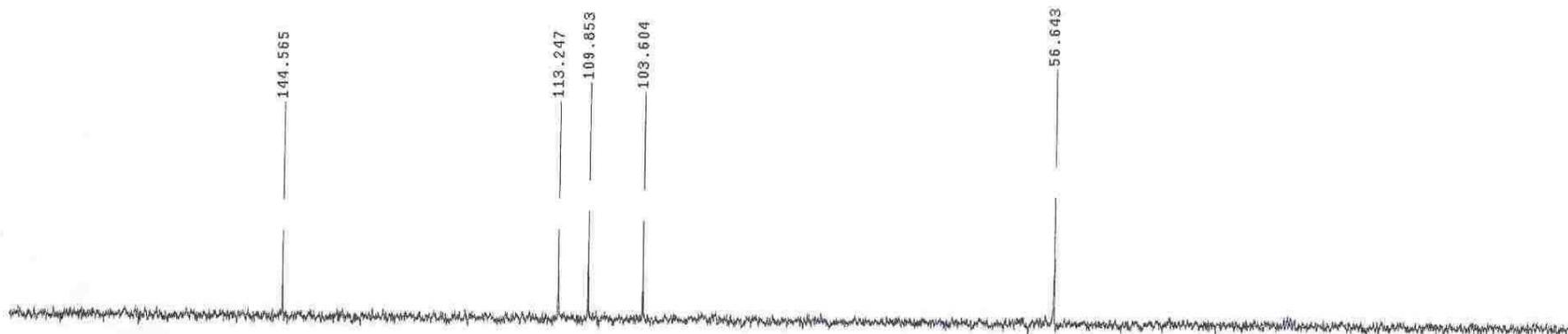
**Espectro 31. Espectro de Fluorescencia de Emision de 3-hidroxi-5,6,7,8,'3,'4-hexametoxiflavona**



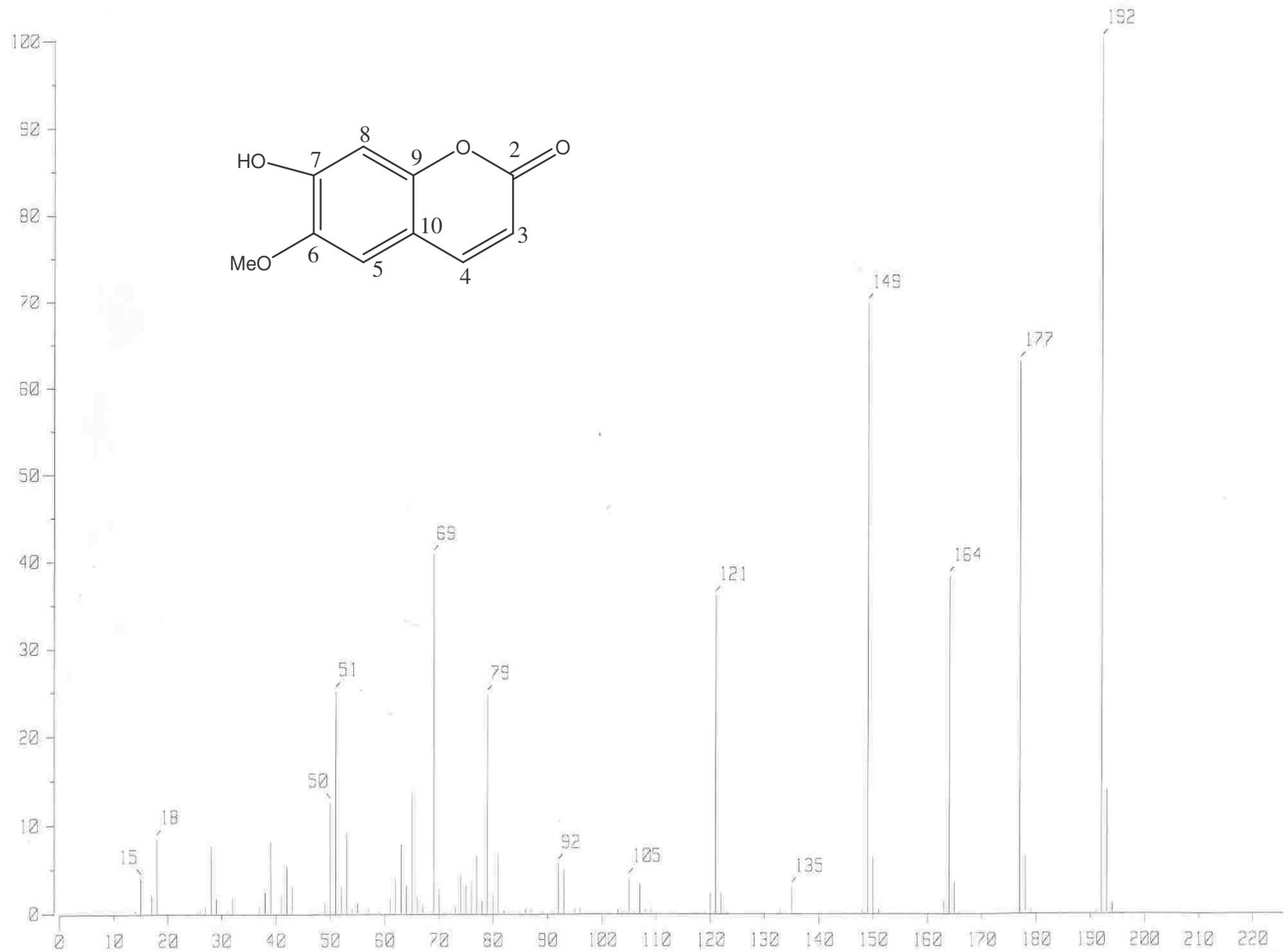
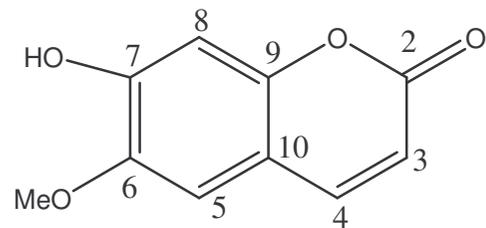
**Espectro 32 RMN<sup>1</sup>H 200Hz CD<sub>3</sub>COCD<sub>3</sub> de Isoescopoletina**



**Espectro 33 RMN<sup>13</sup>C 200Hz CD<sub>3</sub>COCD<sub>3</sub> de Isoescopoletina**

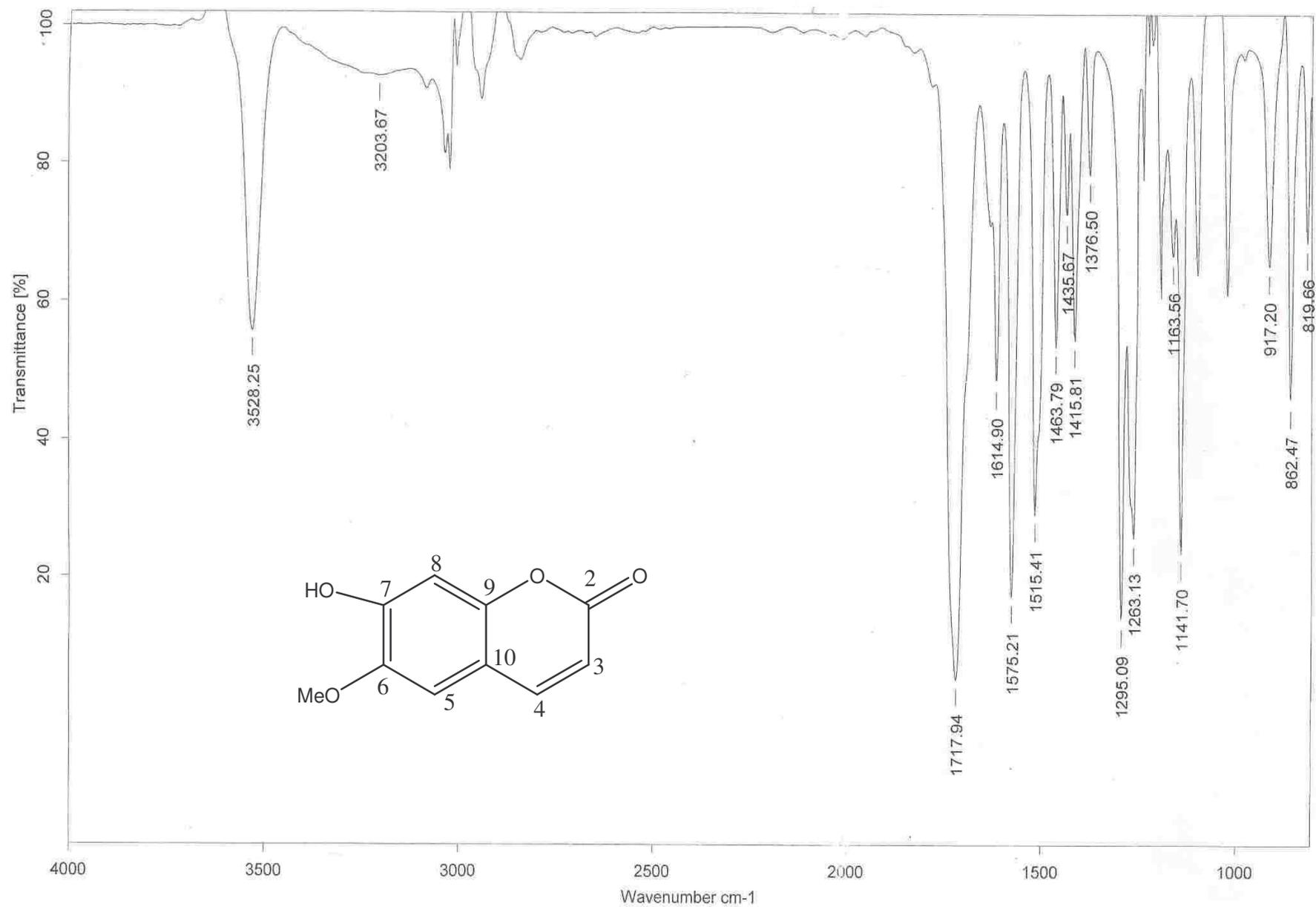


**Espectro 34 DEPT 200Hz  $\text{CD}_3\text{COCD}_3$  de Isoescopoletina**

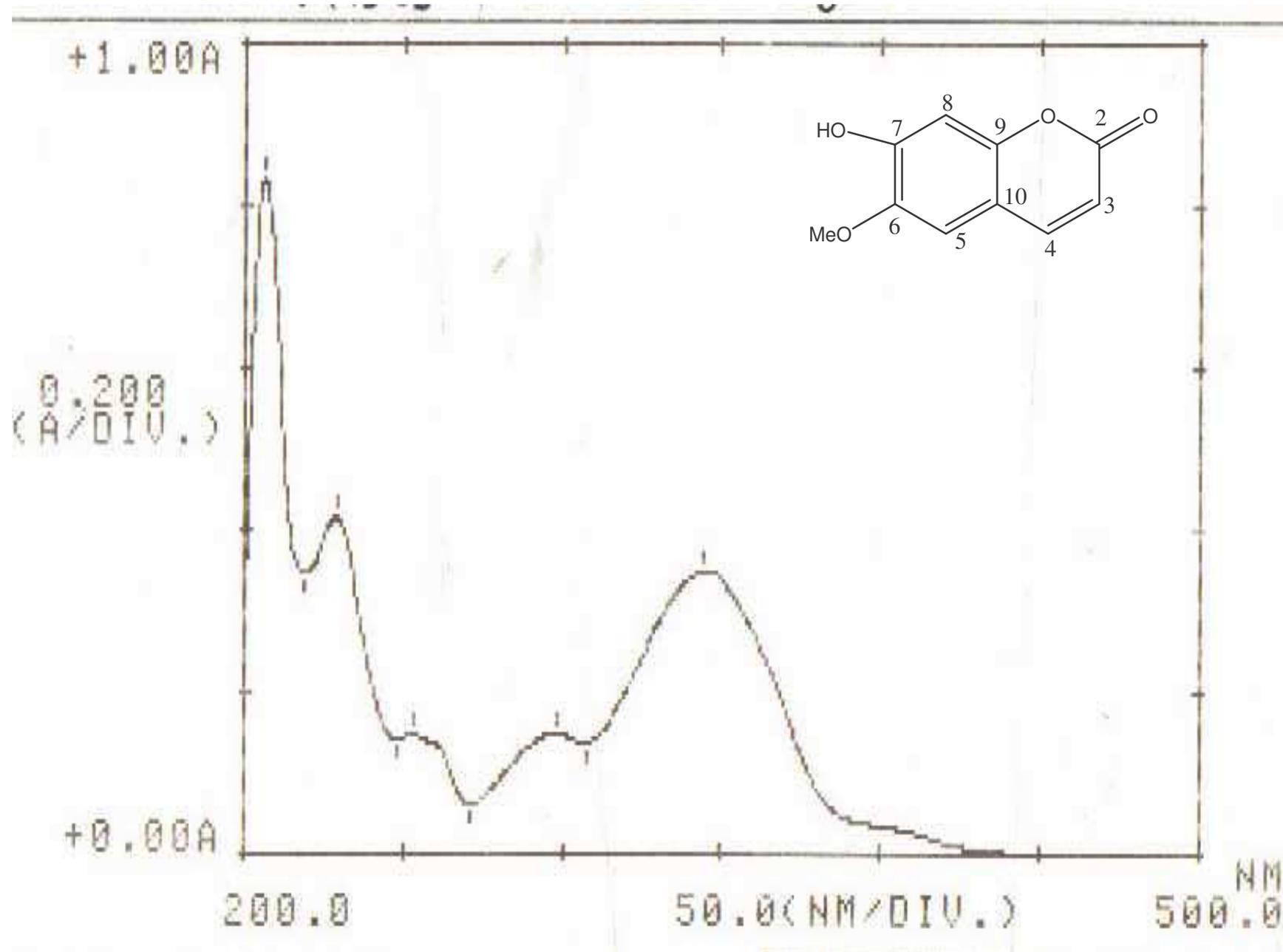


**Espectro 35 EM M+ de Isoescopoletina**

m/z



**Espectro 36 IR película de Isoescopoletina**



**Espectro 37 UV-Vis sol. Metanol de 5,7-Dimetoxicumarina**