



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE QUÍMICA**

**AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES EN  
EL PROPÓLEO NEGRO DEL ESTADO DE ZACATECAS**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA DE ALIMENTOS**

**PRESENTA**

**LADY OLIVIA PÉREZ VALERA**



**MÉXICO, D.F.**

**AÑO**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:**      **Profesor: Alejandrina Acosta Huerta**

**VOCAL:**              **Profesor: Adolfo García Osuna**

**SECRETARIO:**      **Profesor: Ricardo Jorge Cárdenas Pérez**

**1er. SUPLENTE:**    **Profesor: Reina García Sánchez**

**2° SUPLENTE:**      **Profesor: Silvia Citlalli Gama González**

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: INSTITUTO DE QUÍMICA,  
UNAM.**

**ASESOR DEL TEMA: M. EN C. RICARDO JORGE CÁRDENAS PÉREZ** \_\_\_\_\_

**SUPERVISOR TÉCNICO: Q. J. JOAQUÍN GUERRERO GUTIÉRREZ** \_\_\_\_\_

**SUSTENTANTE: LADY OLIVIA PÉREZ VALERA** \_\_\_\_\_

## ***Dedicatoria***

*A mis padres Victoria Valera y Florentino Pérez porque sin su apoyo y su constante dedicación no estaría aquí.*

*A mi hermano Joaquín Pérez Valera por su apoyo y consejos.*

## **Agradecimiento**

*Al Dr. Manuel Salmón Salazar por el apoyo económico otorgado a través del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) con la clave IN202211*

*A Mieles del jardín y al Ing. Servando Carranza Salinas por proporcionar las muestras de propóleo.*

*Al M. en C. Ricardo Jorge Cárdenas Pérez y al Dr. Antonio Morales Serna.*

*Al Q. J. Joaquín Guerrero Gutiérrez.*

*Al Dr. Rubén Luis Gaviño Ramírez por el apoyo espectroscópico brindado.*

*A la Q. Maricela Gutiérrez Franco.*

*A mis compañeros del laboratorio 2-8, Gris, Elia, Armando, Pavel y Sarai a los que hoy considero mis amigos.*

*A mis amigos Edgar, Cynthia, Brenda, Frida, Maricela, Lupita y Catalina.*



## Índice

1. Introducción .....	7
2. Hipótesis y objetivos .....	10
2.1. Hipótesis .....	11
2.2. Objetivo general .....	11
2.3. Objetivos particulares .....	11
3. Antecedentes .....	12
3.1. Panorama de la producción apícola mexicana .....	13
3.2. Composición química de los propóleos .....	15
3.3. Flavonoides .....	17
3.3.1. Generalidades .....	17
3.3.2. Estructura química y biosíntesis .....	19
3.3.3. Flavonoides en los alimentos .....	21
3.3.4. Flavonoides y su impacto sobre la salud humana .....	23
3.4. Cromatografía .....	28
4. Desarrollo experimental .....	32
4.1. Diagrama del trabajo experimental .....	33
4.2. Equipos .....	34
4.3. Técnicas de separación y purificación aplicadas en el aislamiento de los flavonoides procedentes del extracto metanólico del propóleo negro de Zacatecas. ....	35
4.3.1. Cromatografía en columna .....	35
4.3.2. Recristalización por par de disolventes .....	36
4.3.3. Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) .....	37
5. Resultados y Discusión .....	39
5.1. Elucidación estructural de los flavonoides aislados del extracto metanólico del propóleo negro de Zacatecas .....	40
5.1.1. Pinocembrina .....	42
5.1.2. Galangina .....	48
5.1.3. 3-AcO de Pinobanksina .....	54
5.1.4. Izalpinina .....	60
5.2. Análisis por cromatografía de líquidos de alta resolución en fase reversa (CLAR-FR) .....	66
6. Conclusiones .....	70
7. Espectros de los compuestos aislados .....	72



8. Referencias bibliográficas..... 90

## 1. Introducción



*Autora: Arminda San Martín*





Los propóleos son un material resinoso (Figura 1) colectado por las abejas (*Apis mellifera L.*) de las grietas de cortezas de árboles como: abedul, pino, sauce y aliso.

Una vez colectada la resina, ésta es masticada por las abejas y digerida parcialmente por la  $\beta$ -glucosidasa, enzima presente en la saliva de éstas y mezclada con cera para su uso posterior en la colmena, la mezcla resultante es un fuerte adhesivo empleado para rellenar agujeros y cubrir las paredes de los panales, además de proteger contra agentes externos como microorganismos e insectos<sup>1,2</sup>.



**Figura 1.** Propóleo.

Desde hace cientos de años los seres humanos han empleado los propóleos con diversos fines, desde los egipcios que los usaban para embalsamar cadáveres debido a sus propiedades anti-putrefactivas hasta las sociedades europeas de los siglos XVIII y XIX que los emplearon en el tratamiento de llagas.<sup>2,3</sup>

Debido a los beneficios observados a lo largo de la historia de la humanidad (propiedades antifúngicas, antibacterianas, antipiréticas y antiespasmódicas) el interés en el estudio de los propóleos se ha incrementado y en específico de los compuestos químicos que los integran, dichos beneficios están asociados específicamente a los flavonoides presentes en ellos.



Su uso no sólo se limita al campo de la salud, ya que en el área de la química de alimentos los propóleos se han probado como conservadores, en forma de extractos etanólicos, los compuestos que fungen como conservadores son los flavonoides presentes en dichos extractos, ya que estos compuestos tienen actividad antimicrobiana contra bacterias patógenas para el ser humano como algunas variedades de *Escherichia coli*, por lo que su uso como preservadores de alimentos es muy relevante, ya que se ha descrito su uso en productos cárnicos para evitar su deterioro durante el almacenamiento y alargar su vida de anaquel, además, muchos de los compuestos identificados en los propóleos reciben la denominación GRAS (Generalmente Reconocidos como Seguros) debido a que sus constituyentes están presentes en muchos alimentos<sup>4</sup>.

El interés de estudiar a los propóleos y en específico al propóleo negro de Zacatecas, no sólo corresponde a la búsqueda del conocimiento acerca de la composición química de este producto, sino que responde a la necesidad de los productores por entender desde el punto de vista científico, cuáles son los beneficios que puede otorgar a su producto la presencia de algunos compuestos en particular y de esta forma mejorar su comercialización.

## 2. Hipótesis y objetivos



*Autora: Arminda San Martín*



### **2.1. Hipótesis**

Sí se estudia la composición química del extracto metanólico del propóleo negro del estado de Zacatecas es posible determinar la presencia de compuestos fenólicos, como flavonoides, cuyo valor radica en su potencial biológico, por lo que influirán en la comercialización del propóleo.

### **2.2. Objetivo general**

- ❖ Estudiar la composición química del extracto metanólico del propóleo negro de Zacatecas.

### **2.3. Objetivos particulares**

- ❖ Aislar los metabolitos secundarios del extracto metanólico del propóleo negro de Zacatecas.
- ❖ Caracterizar los metabolitos secundarios encontrados en el extracto metanólico, los cuales pueden elevar el valor comercial del producto y formar parte de ensayos futuros para evaluar su potencial biológico



### 3. Antecedentes



*Autora: Arminda San Martín*

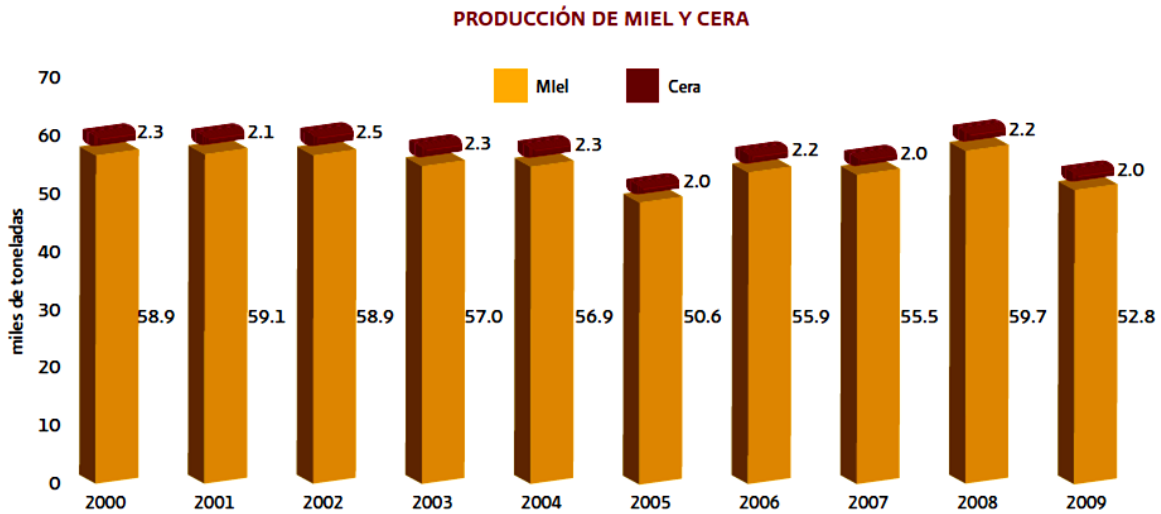
### 3.1. Panorama de la producción apícola mexicana.

Como consecuencia de la variedad climática y botánica que prevalecen en México, la producción apícola se encuentra segmentada en cinco zonas de producción<sup>5</sup> (Figura 2), al ser ecosistemas diferentes los productos generados también son distintos en cada región.



**Figura 2.** Regiones apícolas de México<sup>5</sup>.

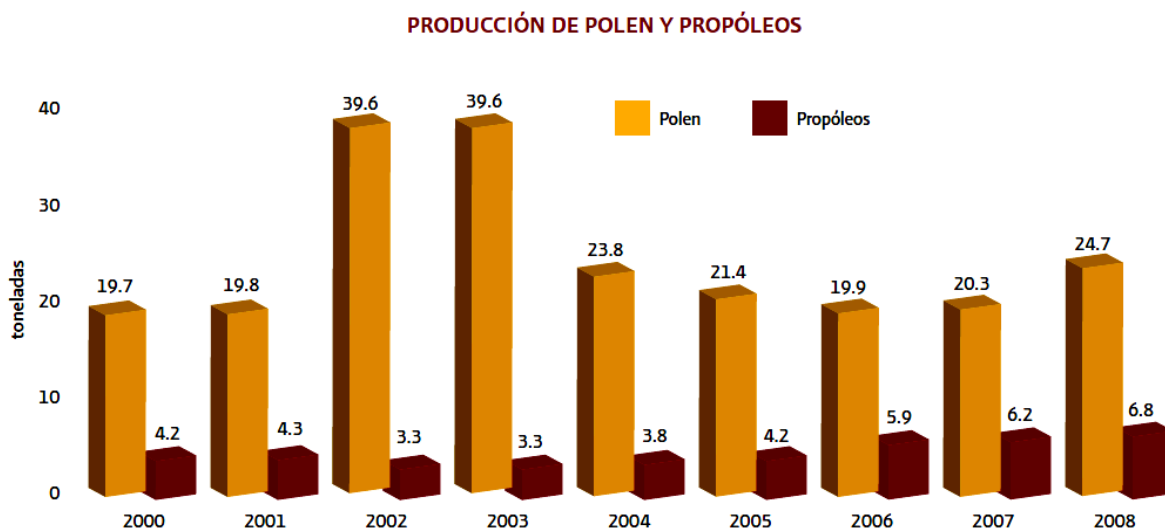
De acuerdo con datos reportados por SAGARPA en 2010, durante el año 2008 México se posicionó como uno de los principales productores de miel y otros productos procedentes de la colmena, siendo la miel (59.7 mil ton) y cera (2.2 mil ton) los que reportaron el mayor volumen de producción durante el año 2008 (Gráfica 1).



**Gráfica 1.** Producción de miel y cera durante el periodo 2000-2008 en México<sup>5</sup>.

Productos como el polen registraron una disminución de 3.52 % en su producción a partir del año 2005 (Gráfica 2), debido a los acontecimientos climáticos adversos que produjeron floraciones irregulares, sin embargo durante el año 2008 la producción de polen mexicano experimentó una recuperación del 24 % con respecto al año 2007 y se ubicó alrededor de las 25 mil toneladas nacionales<sup>5</sup>.

Tanto los propóleos (Gráfica 2) como la jalea real están ganando terreno en su comercialización y representan un área de oportunidad para incrementar los ingresos de los productores frente a un mercado interno en crecimiento<sup>5</sup>, por lo que el interés en el estudio de productos como los propóleos se ha incrementado en los últimos años, con el fin de conocer los posibles beneficios que brindan este tipo de productos con base en estudios científicos que los respalden.



**Gráfica 2.** Producción de propóleos y polen durante el periodo 2000-2008.<sup>5</sup>

### 3.2. Composición química de los propóleos

La composición química de los propóleos varía de acuerdo a su origen fitogeográfico. Los propóleos procedentes de Europa, China y Norte América contienen una mayor cantidad de flavonoides y ésteres de ácidos fenólicos, mientras que los componentes principales de los propóleos brasileños son diterpenos, lignanos, sesquiterpenos y derivados del ácido p-cumárico<sup>6</sup>.

Se han caracterizado cerca de 300 compuestos presentes en los propóleos, muchos de ellos son proporcionados por los exudados de las cortezas vegetales como los ácidos alifáticos de cadena larga (ácido esteárico y oleico), terpenos que son responsables del aroma particular de los propóleos, aldehídos (benzaldehído y p-hidroxibenzaldehído), ácidos aromáticos y sus ésteres relacionados con propiedades





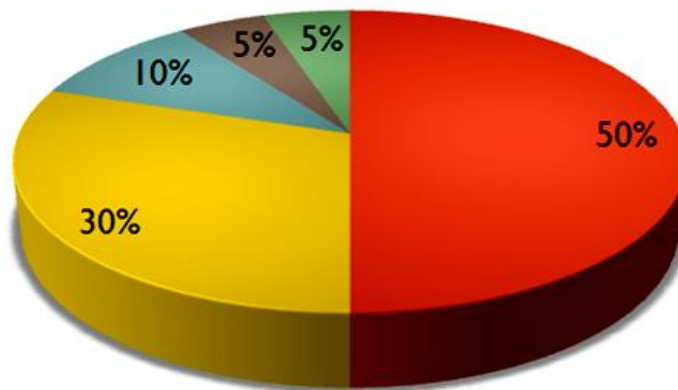
antifúngicas, antibacterianas y acción hemostática (ácido benzoico, ferúlico, cafeico, p-cumárico), polifenoles, quinonas, cumarinas y cetonas.

Otros compuestos como los ácidos y ésteres alifáticos de cadena corta como ácido butírico o el acetato de isopentilo son aportados por las ceras de las abejas, así como el glicerol, algunos alcoholes como el alfa y beta glicerofosfato se derivan del metabolismo de la abeja.

A pesar de la falta de uniformidad en su composición química, la mayoría de los propóleos consta de una composición general (Gráfica 3).

### Composición general de los propóleos (%)

■ Resina ■ Cera ■ Aceites esenciales ■ Polen ■ Otros compuestos



**Gráfica 3.** Composición general de los propóleos (%).

Los componentes de naturaleza fenólica forman la mayor parte del 50% que constituye la resina, como los flavonoides<sup>3, 7</sup>, los cuales están asociados con los beneficios que se atribuyen a los propóleos, en especial a los flavonoides



pinocembrina, galangina y pinobanksina<sup>7</sup>. En los propóleos encontramos otros compuestos que incluyen aceites volátiles (5-10%) y granos de polen los cuales son fuente de elementos esenciales como magnesio, níquel, calcio, hierro y zinc.<sup>8</sup>

### **3.3. Flavonoides.**

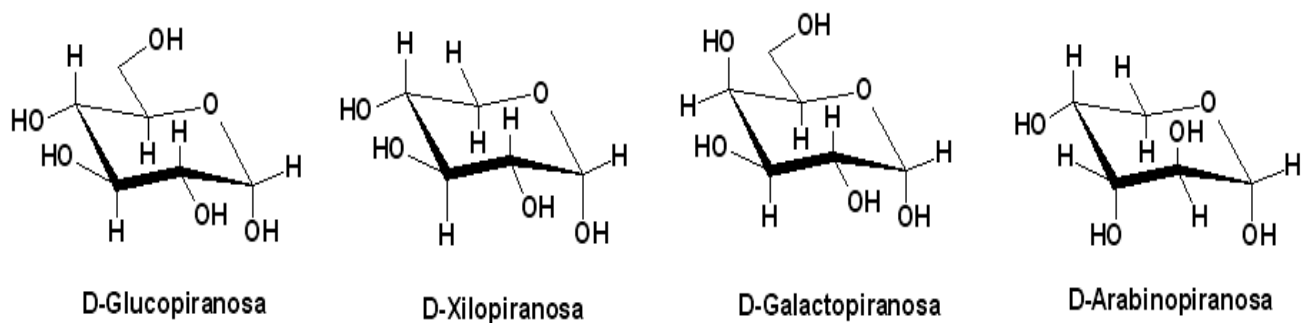
#### **3.3.1. Generalidades**

Los flavonoides encontrados frecuentemente en los propóleos son pinocembrina, pinobanksina, 3-acetato de pinobanksina, kaempferol, crisina, tectocrisina, apigenina, galangina, quercetina, miricetina y pinostrobina.<sup>8, 9,10</sup>. Por lo que es importante hacer mención de algunas de las características que identifican a este grupo de polifenoles.

Los flavonoides son metabolitos secundarios que se encuentran en plantas y frutos, generalmente glicosilados, los cuales se acumulan en las flores y frutos por lo que son responsables de su pigmentación, algunas flavonas que esencialmente no tienen color, proporcionan “blancura” a las flores blancas y también actúan como co-pigmentos con varias antocianinas. Además de brindar color a los tejidos vegetales, los flavonoides son sintetizados por las plantas como respuesta a infecciones microbianas, por lo que actúan contra un amplio espectro de microorganismos. También desempeñan un papel importante en el crecimiento de las plantas, ya que al responder a la luz controlan los niveles de auxinas, las cuales son hormonas que regulan el crecimiento de los tejidos vegetales. Se ha encontrado que los flavonoides presentes en

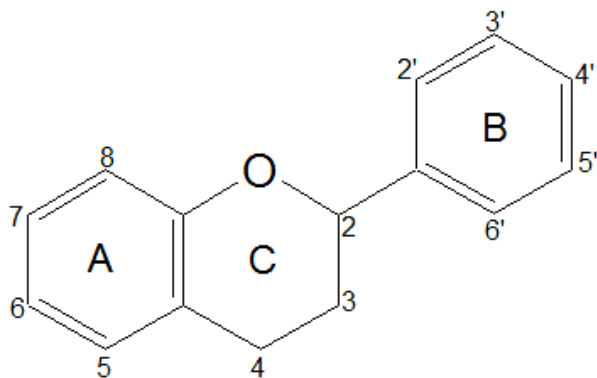
las raíces de las leguminosas tienen una función esencial de señalización en el proceso de simbiosis de la bacteria *Rhizobium* y por lo tanto en el mecanismo de fijación de nitrógeno<sup>11</sup>.

En la naturaleza se encuentran comúnmente como flavonoides O-glicosilados, en los cuales uno o más grupos hidroxilo de la aglicona están enlazados a un azúcar formando un enlace O-C glicosídico. El efecto de la glicosilación es para hacer al flavonoide menos reactivo y más soluble en agua, la glicosilación puede ser considerada como un mecanismo de protección que implementan las plantas para prevenir el daño citoplasmático y almacenarlos de forma segura en la vacuola, comúnmente se encuentra a la glucosa unida a los flavonoides, mientras que los azúcares menos comunes son la galactosa, ramnosa, xilosa y arabinosa<sup>12</sup> (Figura 3).



**Figura 3.** Estructuras químicas los azúcares más comunes unidos a flavonoides.

### 3.3.2. Estructura química y biosíntesis

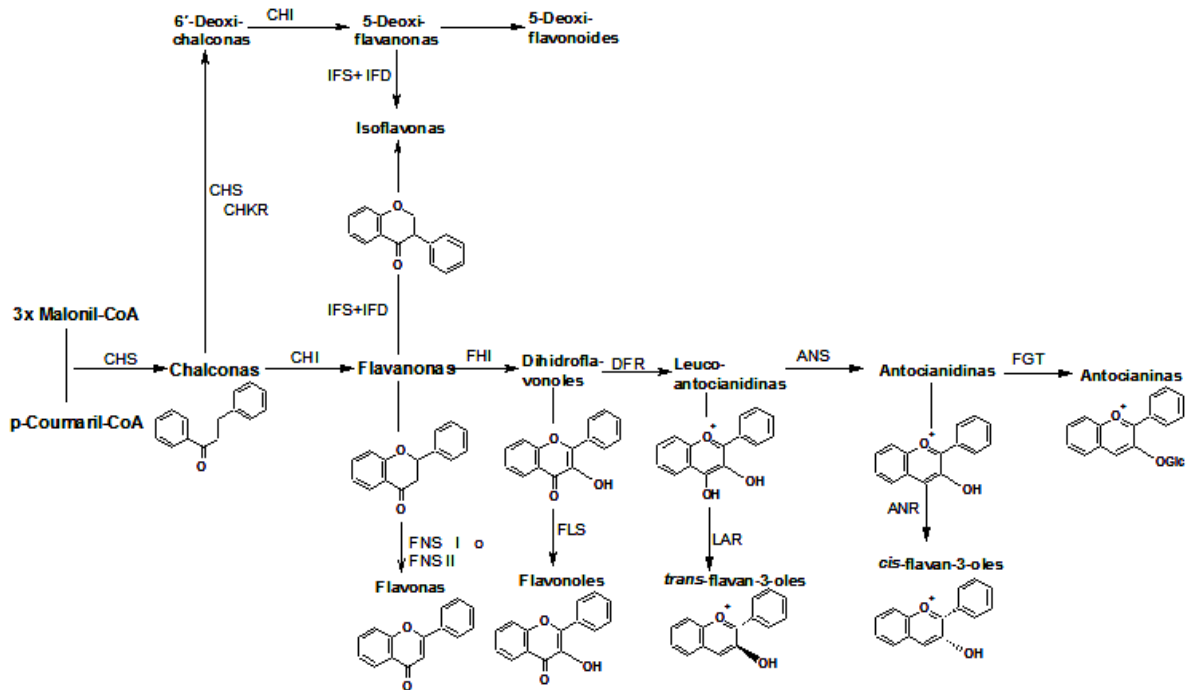


**Figura 4.** Estructura general de un flavonoide

La estructura química de 15 átomos de carbono de los flavonoides (Figura 4) se deriva de dos metabolitos básicos, malonil Co-A y p-cumaril Co-A. Básicamente los flavonoides son derivados de la 1,3-difenil-propan-1-ona ( $C_6-C_3-C_6$ ). La reacción crucial de biosíntesis es la

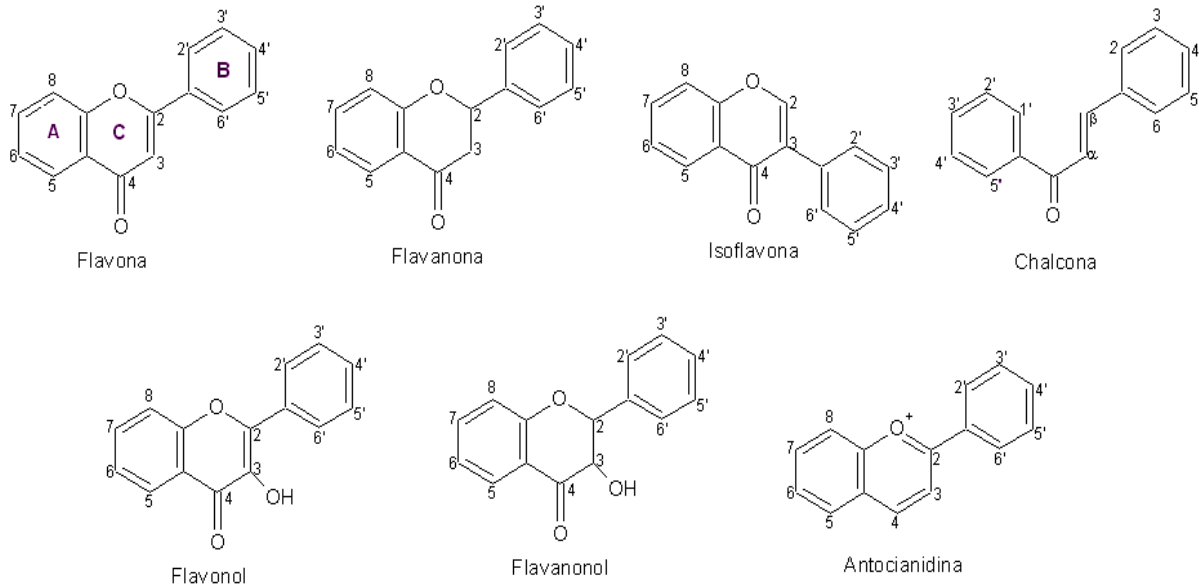
condensación de tres moléculas de malonil Co-A con una molécula de p-coumaroil Co-A (Figura 5), dicha reacción es catalizada por la chalcona sintasa (CHS) que genera una chalcona como intermediario, el cual consiste en dos grupos fenólicos conectados por un puente abierto de tres átomos de carbono, a partir de la estructura química de la chalcona se derivan otros grupos de flavonoides como las flavanonas, las cuales contienen en su estructura tres anillos, en este caso el puente de tres átomos de carbono es parte de un heterociclo adicional. De las isoflavonas, flavanoles, antocianidinas, flavonoles y flavonas, esta última familia de flavonoides se caracteriza por tener un enlace doble entre el C-2 y C-3 en el anillo C del esqueleto de flavan y el anillo B está unido al C-2 y usualmente el C-3 no está sustituido, dicha peculiaridad es la diferencia que existe con respecto a los flavonoles, donde el grupo hidroxilo se encuentra como sustituyente en el C3. Cada una de las reacciones donde se derivan otras categorías de flavonoides a

partir de las flavanonas está catalizada por enzimas, las cuáles se muestran en el esquema de la Figura 5. Los flavonoides están clasificados de acuerdo al nivel de oxidación del anillo central de pirano y varían de acuerdo al número y posición de sus sustituyentes, grupos hidroxilo, metoxilo entre otros (Figura 6).<sup>13,14</sup>



**Figura 5.** Esquema de la ruta general de síntesis de los flavonoides (Martens & Mithöfer, 2005).

Biosíntesis de los flavonoides a partir de la condensación de tres moléculas de Malonil-CoA y una molécula de p-Coumaril Co-A.

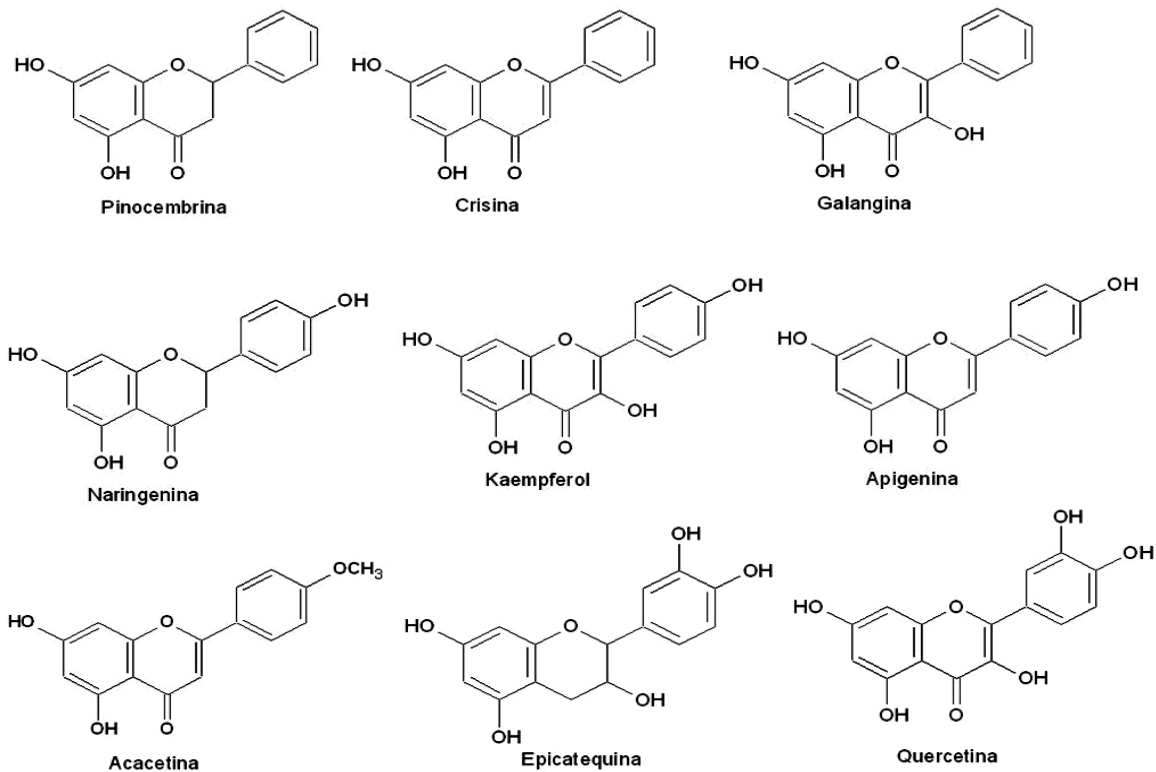


**Figura 6.** Clasificación de los flavonoides (Martens & Mithöfer, 2005). Estructuras químicas de los principales flavonoides presentes en los propóleos y algunos tejidos vegetales.

### 3.3.3. Flavonoides en los alimentos.

Todos los alimentos de origen vegetal potencialmente contienen flavonoides, en las frutas se encuentran catequinas, flavonoles y proantocianidinas<sup>15</sup>, en contraste las flavanonas y flavonas están en frutas cítricas como naranjas y limones, vegetales como apio, pimientos dulces y lechuga, tomate también son fuente de flavanonas como naringenina y hesperitina. En algunas frutas los flavonoles están presentes principalmente en la piel y en vegetales como cebolla, brócoli, lechuga y algunas variedades de tomates, primordialmente quercetina y kaempferol. En la miel encontramos flavonas, flavonoles y flavanonas principalmente naringenina. En las bebidas también podemos encontrar dichos compuestos, ejemplo de ello son el té y el vino, éste último es una fuente muy importante de catequinas<sup>15, 16</sup>.

De los flavonoides encontrados en los propóleos destaca la presencia de la flavanona pinocebrina, otros flavonoides también han sido descritos como los compuestos más comunes encontrados en los extractos metanólicos y etanólicos de los propóleos, de los cuales destacan crisina, pinobanksina, kaempferol, naringenina, acacetina, apigenina y galangina<sup>9</sup> (Figura 7), debido a que los propóleos son sistemas complejos, los flavonoides enlistados anteriormente no son los únicos presentes en ellos, sino existen otros que se encuentran en menor proporción y otros que no han sido identificados.



**Figura 7.** Flavonoides presentes en los alimentos



### **3.3.4. Flavonoides y su impacto sobre la salud humana.**

Los flavonoides juegan un papel importante en el campo de la salud humana, ya que intervienen en la disminución en el padecimiento de enfermedades crónicas, como enfermedad coronaria y algunos tipos de cáncer. La evidencia de estudios *in vivo* e *in vitro* indican que los flavonoides son buenos antioxidantes debido a su capacidad para capturar radicales libres, quelar iones metálicos e inhibir la lipoxidación y en especial los flavonoles tienen la habilidad de inducir las enzimas de detoxificación de la Fase II de los mecanismos de biotransformación, los cuales son esenciales para la absorción y/o eliminación de agentes externos, también han mostrado inhibir el crecimiento de células cancerosas, que ocasionan cáncer de colon, ovarios y gástrico.

Estudios epidemiológicos en animales sugieren que una alta ingesta de flavonoides, en específico flavonas, reduce el riesgo de sufrir cáncer de colon, enfermedades coronarias, osteoporosis e inflamación crónica. Las flavonas son abundantes en nuestra dieta diaria y son componentes que se encuentran en los vegetales comestibles como frutas, nueces, semillas y derivados vegetales como jugos y té<sup>16</sup>.

#### **3.3.4.1. Capacidad antioxidante**

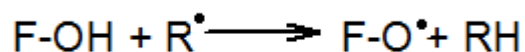
La mayoría de los efectos benéficos sobre la salud que brindan los flavonoides son atribuidos a su capacidad antioxidante, habilidad para quelar iones y por inhibir la oxidación de la lipoproteína de baja densidad (LDL). Una dieta rica en flavonoides disminuye el riesgo de muerte por enfermedad coronaria y baja incidencia de infartos al miocardio. Las especies reactivas de oxígeno (ERO) son las responsables de muchas





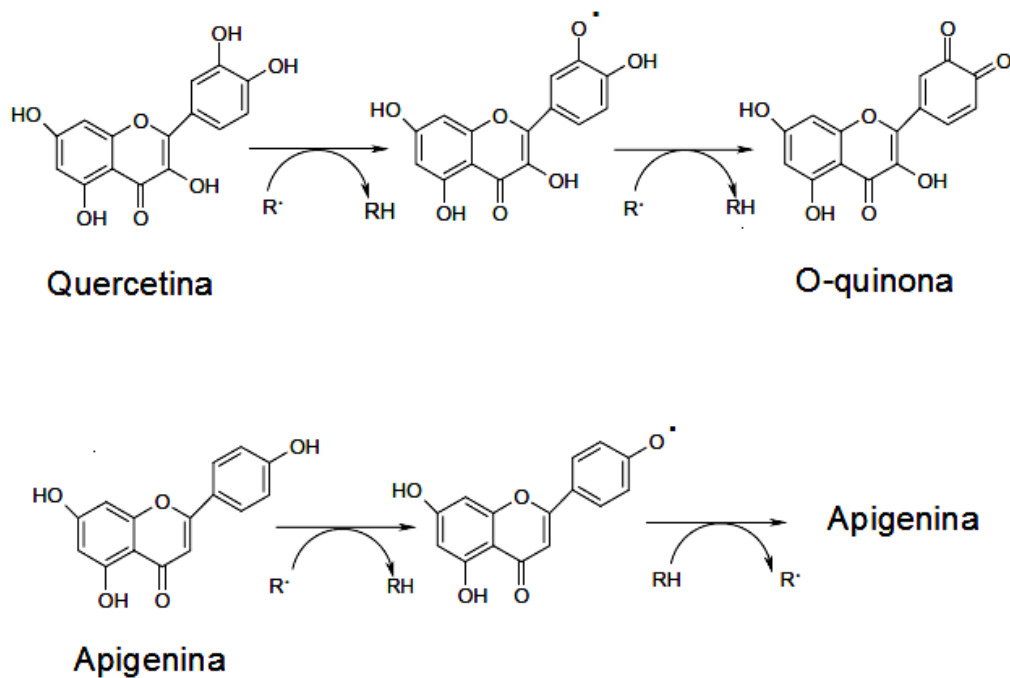
afecciones humanas, debido a su capacidad para oxidar a las proteínas, ácidos nucleicos y lípidos. La peroxidación de lípidos es mediada por la propagación de radicales libres lo que produce el daño oxidativo de ácidos grasos poliinsaturados involucrando radicales libres. Las especies reactivas de oxígeno contribuyen al envejecimiento celular, mutagénesis, carcinogénesis, enfermedad coronaria, daño en el ADN y la oxidación de la lipoproteína de baja densidad (LDL). Las especies reactivas de nitrógeno (ERN) también contribuyen a las patologías cardiovasculares<sup>16</sup>.

La capacidad antioxidante de los flavonoides depende en gran medida del arreglo de sus grupos funcionales sobre su estructura nuclear. El arreglo espacial de sus sustituyentes es quizás el factor determinante de la actividad antioxidante del esqueleto de flavan. Tanto la configuración y el número total de grupos hidroxilo influyen sustancialmente muchos mecanismos de la actividad antioxidante. La captura de radicales libres es primordialmente atribuida a la alta reactividad de los sustituyentes hidroxilo que participan en la siguiente reacción<sup>14</sup>:



Algunos grupos de flavonoides han demostrado tener mejor actividad antioxidante que otros, ya que su capacidad antioxidante no sólo está influenciada por la sustitución de grupos hidroxilo, sino que es afectada por la interacción entre el grupo carbonilo de la posición 4 y el enlace doble entre los C-2 y C-3. Se ha observado que los flavonoides que presentan estructura de catecol en el anillo B como quercetina, taxifolina o catequina son capaces de inhibir al radical peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>) promotor

de la oxidación de tirosina, la toxicidad del peroxinitrito está asociada con enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas. Otros flavonoides como apigenina a pesar de tener grupos hidroxilo libres muestran tener actividad pro-oxidante, ya que no pueden estabilizar el radical que se forma, a diferencia de los flavonoides con estructura de catecol en su anillo B, los cuáles estabilizan mejor al radical que se forma generando una O-quinona<sup>18</sup> (Figura 8).



**Figura 8.** Formación y estabilización de radicales de los flavonoides quercetina y apigenina<sup>18</sup>



### **3.3.4.2. Flavonoides en la inhibición de la oxidación de Lipoproteína de Baja Densidad (LDL).**

La aterosclerosis es la principal causa de morbilidad y mortalidad entre personas con un estilo de vida sedentario. La aterosclerosis se caracteriza por la acumulación de espuma arterial derivada de macrófagos cargados de colesterol. La mayoría del colesterol acumulado en las arterias se origina del plasma de la lipoproteína de baja densidad (LDL), la cual es internalizada en la célula por medio de receptores LDL. La LDL nativa no induce la acumulación del colesterol en las arterias porque la actividad del receptor de LDL es regulada por el contenido de colesterol presente en la célula, pero la LDL tiende a experimentar una modificación oxidativa, la especie oxidada de LDL no puede ser introducida a la célula por medio de los receptores, por lo que promueve la acumulación de colesterol en las arterias, ya que al no ser la LDL la encargada del transporte de colesterol hacia las células y al oxidarse la LDL no puede cumplir su función de transporte de colesterol al interior de la célula<sup>15</sup>.

Los flavonoides son antioxidantes más potentes que los carotenos y la vitamina E, por lo que la ingesta de flavonoides evita la mortalidad por enfermedad coronaria.

Los flavonoides son multifuncionales ya que actúan como agentes reductores, como antioxidantes debido a su propiedad de donar un átomo de hidrógeno o por su capacidad de quelar metales, reduciendo de esta forma la capacidad de los



metales para originar radicales libres. Los Flavonoides pueden actuar como inhibidores de la oxidación de LDL, por medio de diversos mecanismos:

- 1.- Captura de radicales libres.
- 2.- Regeneración de la Vitamina E de la forma oxidada del  $\alpha$ -tocoferol.
- 3.- Protección de antioxidantes asociados a la lipoproteína de baja densidad (LDL) como la  $\alpha$ -tocoferol (Vitamina E) y carotenoides de la oxidación.
- 4.- Quelación de iones de metales de transición.
- 5.- Protección de células contra el daño oxidativo, logrado por la habilidad de los flavonoides para inhibir a la xantina oxidasa, NDPH oxidasa y a la lipoxigenasa.

#### **3.3.4.3. Regulación de la glucosa en el plasma. Índice glucémico.**

Existe evidencia que sugiere que una dieta rica en compuestos polifenólicos, en específico de flavonoides influencia la absorción y metabolismo de la glucosa, resultando en una disminución del índice glucémico, el cual se define como la velocidad con que se absorbe la glucosa en el organismo a partir de un alimento. Al consumir porciones normales de alimentos ricos en flavonoides, existe una reducción en la concentración de insulina en plasma después de la comida, así como la disminución del polipéptido insulínico dependiente de glucosa, lo que sugiere que una dieta rica en polifenoles reduce la velocidad de absorción de glucosa en el organismo (Índice glucémico) y por lo tanto la incidencia de nefropatías en la diabetes tipo II<sup>16</sup>.

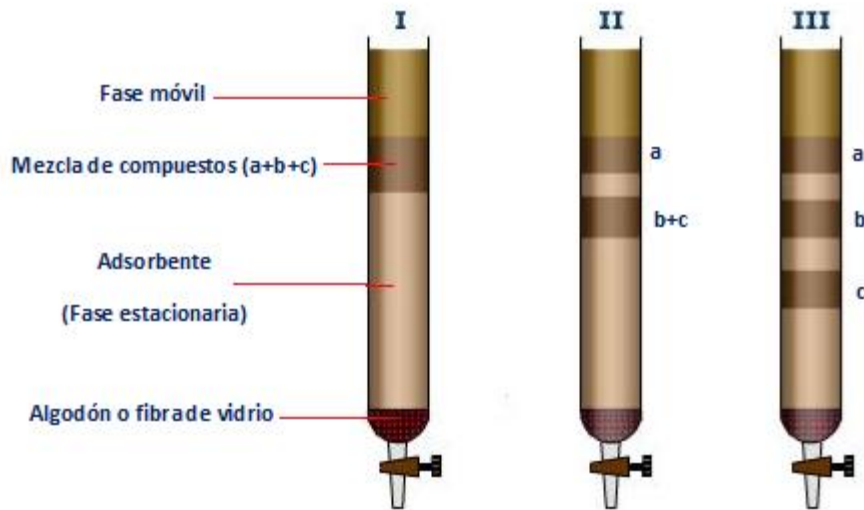


### 3.4. Cromatografía.

La **cromatografía** es una técnica física de separación, en la cual los componentes de una mezcla para ser separados son distribuidos entre dos fases inmiscibles, una fase móvil que fluye a través de una fase estacionaria<sup>19</sup>.

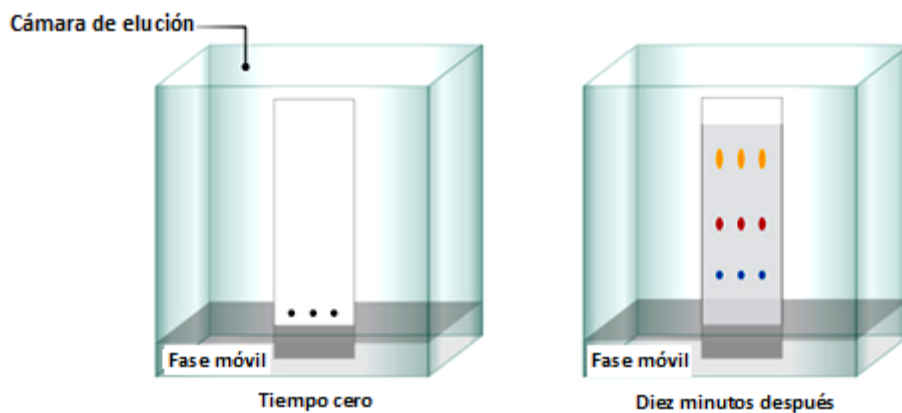
El proceso cromatográfico ocurre como el resultado de múltiples pasos de adsorción/desorción durante el movimiento de analitos a lo largo de la fase estacionaria, la separación se debe a los diferentes coeficientes de reparto de los analitos individuales en la muestra. La técnica cromatográfica es nombrada de acuerdo a la fase móvil que se emplee, cuando ésta es un líquido se le denomina **cromatografía de líquidos** y cuando se trata de un gas se le denomina **cromatografía de gases**<sup>19</sup>.

En la separación a clásica preparativa se emplea la **cromatografía en columna** (Figura 9), donde la fase estacionaria está soportada en un tubo de vidrio denominado columna, tanto la altura como el diámetro de la columna son elegidos en función de la cantidad de muestra a purificar y la fase móvil se deposita dentro de la columna, la fuerza motriz que impulsa su paso a través de la fase estacionaria en la columna es la gravedad e induce la separación de los analitos aunada a la polaridad de la mezcla de elución.



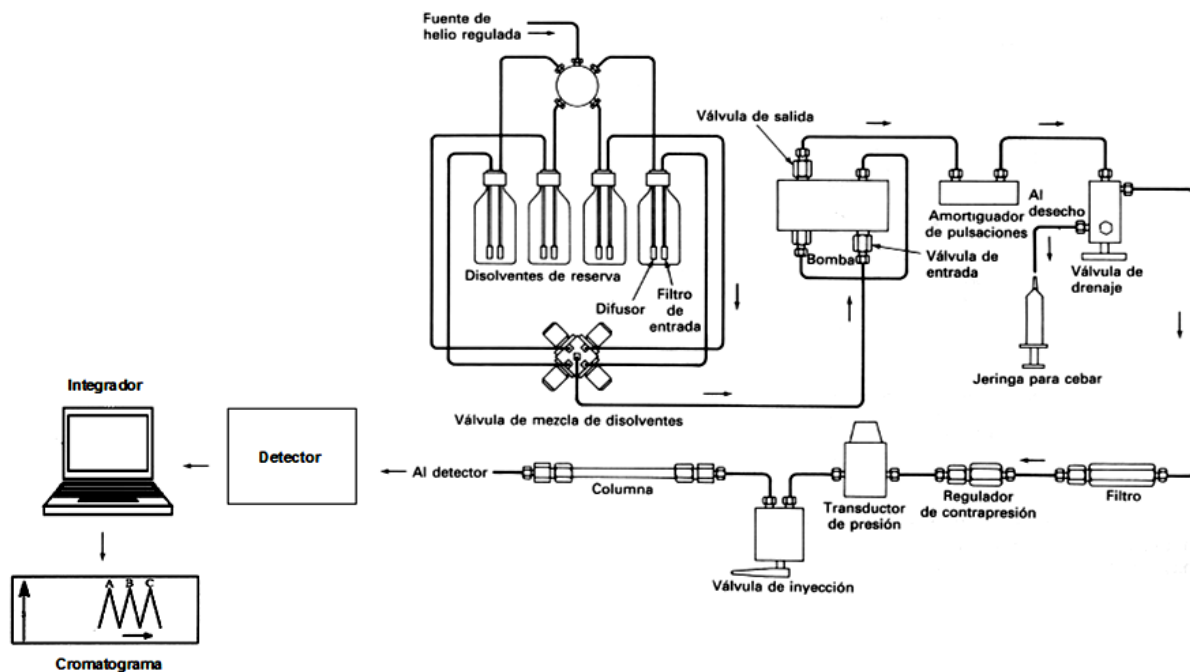
**Figura 9.** Cromatografía en columna.

La cromatografía en columna es monitoreada por medio de **cromatografía en capa fina** (Figura 10), la diferencia entre ambas es que la fase estacionaria está soportada en una placa y la fuerza que impulsa a la fase móvil sobre la separación de los analitos es la capilaridad de la fase estacionaria, que hace subir a la fase móvil desde un depósito situado al final de la placa, consiguiendo de tal manera la separación de la mezcla.



**Figura 10.** Cromatografía en capa fina.

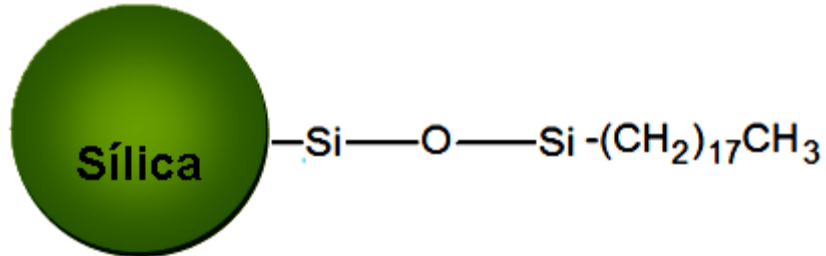
Dentro de la cromatografía de líquidos existe la **cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR)** la cual puede proporcionar un perfil cromatográfico más completo en menor tiempo, donde los equipos (Figura 11) tienen detectores que brindan información para la identificación de los compuestos, como detectores con principios de fluorescencia, absorbancia de radiación electromagnética, espectrometría de masas o electroquímicos; en esta técnica la fase estacionaria está formada por partículas muy pequeñas empacadas en columnas de acero inoxidable y para impulsar el paso de la fase móvil a través de la columna es esencial aplicar alta presión, por lo que a la técnica se le conoce por sus siglas en inglés como high-performance liquid chromatography (HPLC)<sup>19</sup>.



**Figura 11.** Instrumentación de un equipo de cromatografía de líquidos alta resolución (CLAR)



La identificación y cuantificación de compuestos polares provenientes de extractos herbales y suplementos alimenticios derivados de plantas, como los flavonoides, se hace por medio de ***cromatografía de líquidos de alta resolución en fase reversa (CLAR-FR)***, se le denomina “fase reversa” porque la fase estacionaria es apolar, la más empleada es la fase estacionaria de fase químicamente modificada de octadecilo (C<sub>18</sub>), ya que es extremadamente no polar, ésta se obtiene por la modificación de la sílice que se realiza por medio de la reacción entre los grupos silanol y el octadecilsilano, generando una sílice modificada con ligandos de n-octadecilo<sup>19</sup> (Figura 12).



**Figura12.** Sílice modificada con ligandos de n-octadecilo (C-18)<sup>19</sup>



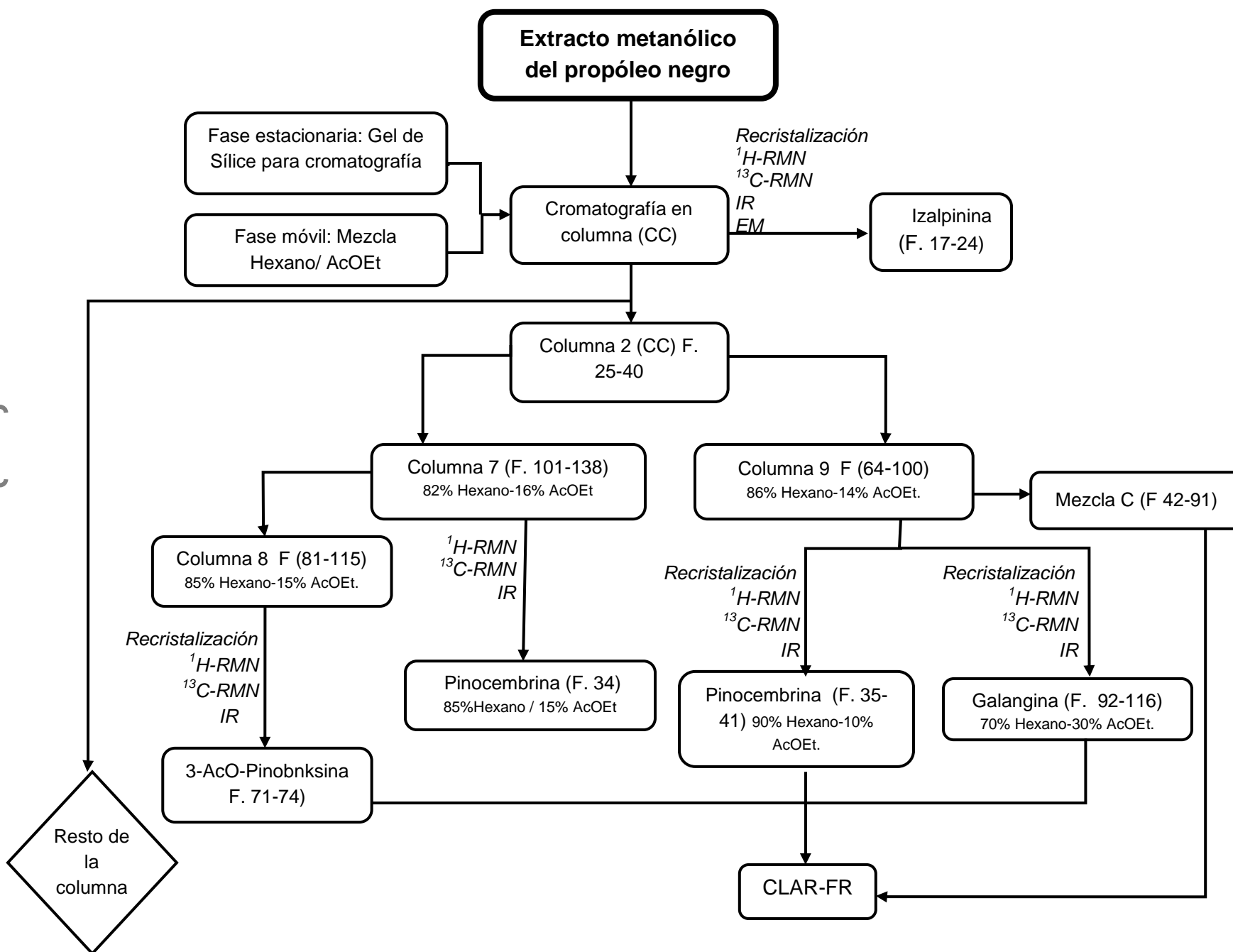
**4. Desarrollo experimental**



*Autora: Arminda San Martín*



4.1. Diagrama del trabajo experimental





## 4.2. Equipos

Los puntos de fusión, que no están corregidos, se determinaron en un aparato de Fisher-Johns.

Los espectros de Infrarrojo (IR) fueron obtenidos en un espectrofotómetro Perkin Elmer®, Spectrum 400, FT-IR/ATR, con la técnica de Reflectancia Total Atenuada (ATR).

Las espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear de Protón ( $^1\text{H}$ -RMN) se llevó a cabo en los equipos VARIAN Gemini® de 200 MHz y VARIAN Unity de 300 MHz. Se empleó como disolvente cloroformo deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ) y tetrametilsilano (TMS) como sustancia de referencia. Para muestras cuya disolución en  $\text{CDCl}_3$  era deficiente se utilizó sulfóxido de dimetilo deuterado (DMSO).

La espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13 ( $^{13}\text{C}$ -RMN) se realizó en equipo Brüker Advance® de 300 MHz.

La espectrometría de masas se llevó a cabo en un espectrómetro de resolución media Jeol AX505HA, empleando la fuente de electroionización (70 eV).

Para la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución en Fase Reversa (CLAR-FR) se empleó un cromatógrafo Agilent Technologies® modelo 200-Series acoplado a un detector de Espectrometría de Masas (Brüker-Daltonics®, 6000), la separación se llevó a cabo en una columna Eclipse Plus® de octadecilo ( $\text{C}_{18}$ ) (2.1mm de diámetro interno x 100 mm de longitud; tamaño de partícula de 3.5  $\mu\text{m}$ ) se trabajó por gradiente de elución (Ver Figura 14).



### **4.3. Técnicas de separación y purificación aplicadas en el aislamiento de los flavonoides procedentes del extracto metanólico del propóleo negro de Zacatecas.**

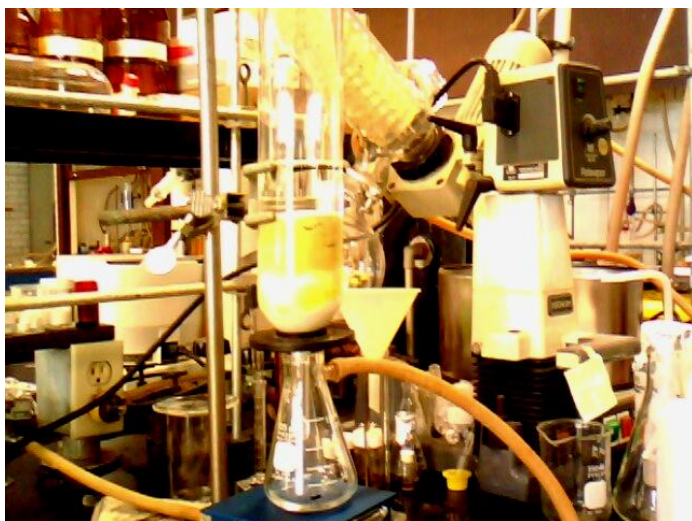
#### **4.3.1. Cromatografía en columna**

La primer separación se realizó con 37.5 g del extracto metanólico del propóleo negro de Zacatecas. La muestra fue disuelta con diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) y mezclada con celita lavada hasta formar una pasta y obtener un sólido manejable.

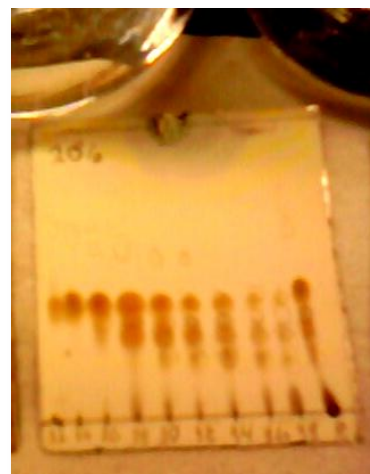
Se esperó un periodo de 24 hrs para que el disolvente presente en el sólido resultante se evaporara. La columna (6.3 cm de diámetro interno y 35.5 cm de altura) se empacó con la fase estacionaria (gel de sílice) hasta una altura de 7 cm, con la ayuda del vacío y ejerciendo presión con una varilla de vidrio para evitar fracturas en la sílice, posteriormente se agregó la muestra adsorbida en celita lavada y se empacó usando el mismo procedimiento. Una vez montada la columna se le adaptó un matraz kitazato de 125 mL conectado al vacío para colección de las fracciones. Dicho procedimiento fue aplicado para el montaje de las nueve columnas cromatográficas (Figura 13).

La elución de las columnas se realizó con mezclas de hexano / acetato de etilo, variando la concentración de cada disolvente, por lo que la polaridad para las columnas fue distinta dependiendo del compuesto que se quería separar, como se indica en el diagrama de trabajo (Sección 4.1). Se colectaron fracciones de un volumen aproximado de 25-30 mL, para cada columna se obtuvieron alrededor de 110 a 120 fracciones, las cuáles fueron agrupadas en conjuntos de fracciones

dependiendo de la separación obtenida visualizada mediante cromatografía en capa fina (Figura 13 b) durante la elución de las columnas.



a.



b.

**Figura 13.** a. Cromatografía en columna de vacío y b. Cromatografía en capa fina.

#### **4.3.2. Recristalización por par de disolventes**

Para purificar los compuestos separados mediante las columnas cromatográficas se realizaron recristalizaciones por par de disolventes, en la purificación de los flavonoides pinocembrina, galangina y 3-AcO-pinobanksina el par de disolventes fue hexano/acetona, mientras que en el caso del flavonoide izalpinina se usó hexano/acetato de etilo. Las muestras fueron disueltas primero en los disolventes en los que eran solubles en caliente (acetato de etilo o acetona), se calentó la disolución a ebullición y se filtró, posteriormente se agregaron unas gotas de hexano para inducir la turbidez y después se agregaron unas gotas de acetona o





acetato de etilo, según el caso, para redissolver. Los productos recristalizados se dejaron reposar por un día hasta la aparición de cristales, los cuales fueron lavados con un poco de hexano, posteriormente a cada uno de los productos se les determinó el punto de fusión. Para determinar la identidad de los compuestos se emplearon técnicas espectroscópicas IR,  $^1\text{H}$ -RMN,  $^{13}\text{C}$ -RMN y EM.

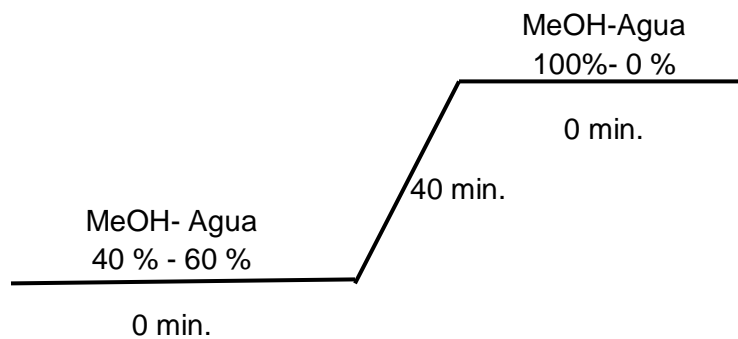
#### **4.3.3. Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR)**

Una vez finalizada la purificación e identificación de algunos metabolitos encontrados en el extracto metanólico del propóleo negro, se eligió una mezcla de fracciones (Columna 9; F.42-91; eluyente: hexano 90% AcoEt. 10%) para su análisis por cromatografía de líquidos de alta resolución. Se seleccionó dicha mezcla porque con análisis de  $^1\text{H}$ -RMN se observaron señales particulares de tres de los cuatro flavonoides purificados, por lo que se quería saber si en dicha mezcla estaban presentes únicamente esos tres flavonoides o si se podían encontrar otros compuestos, cuya purificación pueda llevarse a cabo en el futuro.

**Preparación de referencias y mezcla:** Se disolvieron 2 mg de muestra (referencia o mezcla) en 200  $\mu\text{L}$  de metanol grado HPLC, posteriormente se inyectaron 10  $\mu\text{L}$  de la disolución en el cromatógrafo de líquidos para su análisis y su posterior detección con el espectrómetro de masas, donde se obtuvieron espectros de masas en modo de iones negativos, este tipo de adquisición es recomendada para el análisis de flavonoides, ya que proporciona un nivel más elevado de sensibilidad que en el modo de iones positivo para este tipo de compuestos<sup>20</sup>.



**La elución de la mezcla** se llevó a cabo en gradiente, como se indica en la figura 14. Se inyectaron 10  $\mu$ L de la mezcla y/o referencia por corrida con un flujo de 0.2 mL/min, el tiempo de análisis para cada muestra fue de 40 min (Figura 14). Los compuestos separados por medio de ésta técnica fueron comparados con tres referencias de compuestos que se encuentran presentes en los propóleos (pinocembrina, galangina y 3-acetato de pinobanksina).



**Figura 14.** Diagrama de las condiciones de trabajo del análisis por CLAR de la mezcla C9 F. (42-91)

## 5. Resultados y Discusión

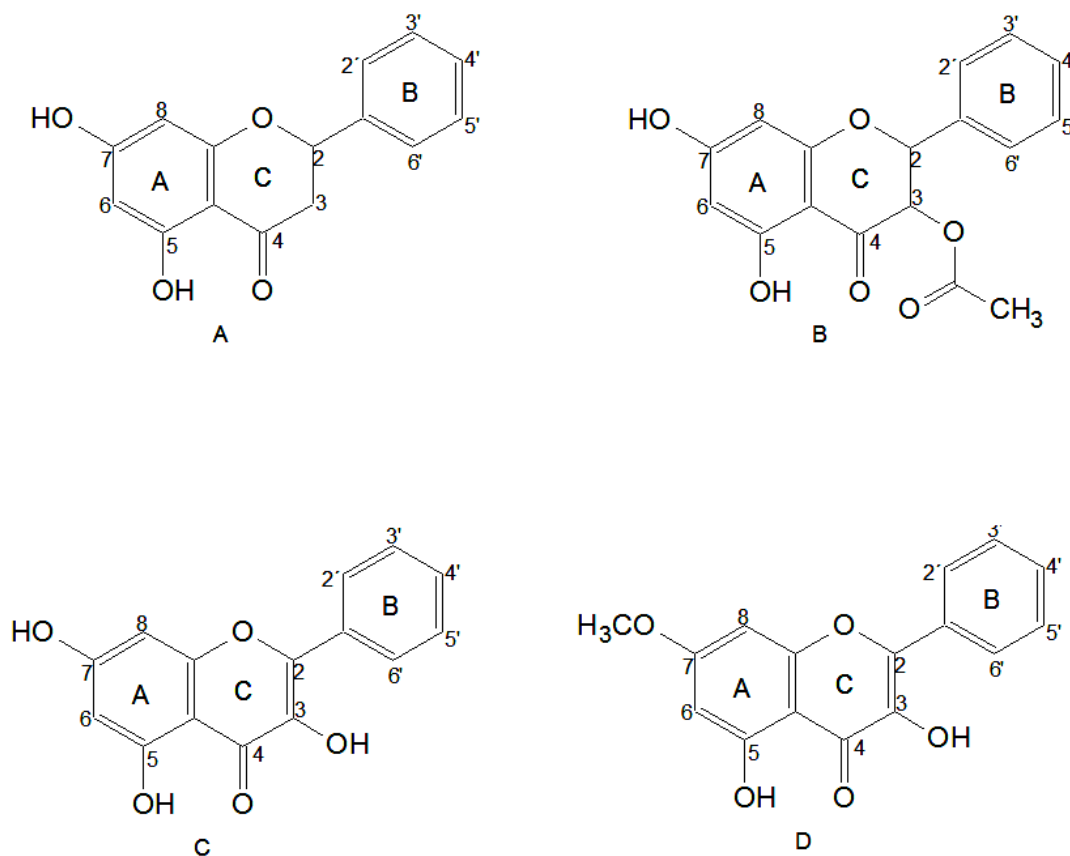


*Autora: Arminda San Martín*



### 5.1. Elucidación estructural de los flavonoides aislados del extracto metanólico del propóleo negro de Zacatecas.

Del extracto metanólico del propóleo negro de Zacatecas se separaron los flavonoides, pinocembrina, galangina, 3-AcO-pinobanksina e izalpinina (Figura 15). De acuerdo con los resultados obtenidos por el equipo de trabajo, en éste extracto también se encuentran presentes los flavonoides pinobanksina y crisina.



**Figura 15.** Flavonoides aislados del extracto metanólico del propóleo negro de Zacatecas.

**A.** Pinocembrina. **B.** 3-AcO-pinobanksina. **C.** Galangina y **D.** Izalpinina.

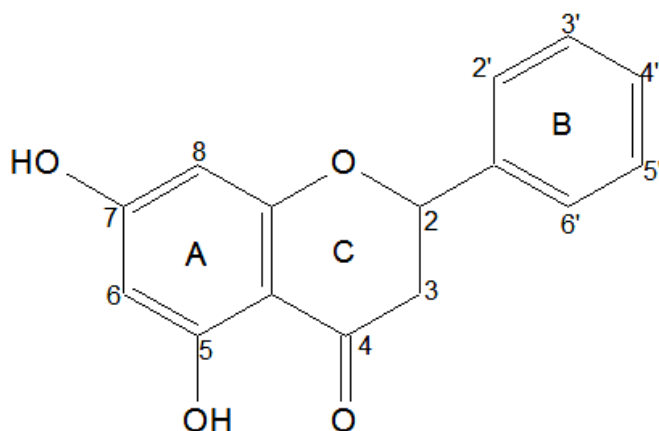


Los resultados de los análisis espectroscópicos de IR,  $^1\text{H}$ -RMN y  $^{13}\text{C}$ -RMN de los flavonoides aislados fueron comparados con los descritos en la literatura para flavonoides aislados de muestras de propóleos y otros tejidos vegetales, que nos permitieron asociarlos con las estructuras químicas propuestas para cada uno de ellos, además del análisis espectroscópico, estos compuestos fueron sometidos a un análisis de CLAR-EM con el propósito de emplearlos como referencias para determinar la ausencia o presencia de los compuestos obtenidos en una fracciones de cromatografía en columna al vacío.

Los flavonoides aislados e identificados son de suma importancia, ya que se ha descrito que la mayoría de ellos tienen efectos benéficos sobre la salud y pueden ser empleados para el tratamiento de algunas enfermedades o, incluso presentan actividad inhibitoria sobre microorganismos dañinos para algunos cultivos<sup>21</sup> o para el ser humano<sup>22</sup>, otros han sido probados en suplementos alimenticios<sup>23</sup>.

### 5.1.1. Pinocebrina

Pinocebrina o 5,7-dihidroxiflavanona (Figura 16), es un flavanona que se aísla frecuentemente en muestras de propóleos<sup>24, 25</sup> y a partir de cortezas de algunas especies de pino como *Pinus armandii* o *Pinus taeda*<sup>26</sup>. La actividad biológica de pinocebrina cubre efectos antimicrobianos, antioxidantes y antiinflamatorios, aunque se ha descrito que este flavonoide tiene un efecto neuroprotector, ya que el tratamiento con pinocebrina aplicado a células neuronales muestra un incremento en la inhibición de genes y proteínas que inducen la apoptosis de células neuronales, la cual es responsable de enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer y Parkinson<sup>27</sup>.



**Figura 16.** Estructura química de la flavanona pinocebrina.

De acuerdo a la elucidación estructural realizada por medio de los análisis de Infrarrojo (IR), Resonancia Magnética Nuclear Protónica (<sup>1</sup>H-RMN) y Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13 (<sup>13</sup>C-RMN), se determinó la estructura que corresponde a la Figura 16. Su descripción física es la de un sólido de color amarillo pálido con punto de fusión de 193-194°C.

Las señales más representativas que se observan en el análisis de IR de pinocebrina (Tabla 1; Espectro 1) son las bandas en 3010 cm<sup>-1</sup> que corresponden a



un grupo hidroxilo -OH, difieren de las reportadas en la literatura para el flavonoide pinocembrina, que se han reportado entre 3436 y 3092  $\text{cm}^{-1}$  para éste flavonoide<sup>25</sup>. Los grupos -OH de fenoles muestran bandas de absorción en 3610  $\text{cm}^{-1}$ , pero cuando el átomo de hidrógeno del grupo hidroxilo esta quelatado con un grupo carbonilo, la frecuencia de absorción del -OH disminuye<sup>28</sup> de 3200 a 2500  $\text{cm}^{-1}$ , lo que explica el hecho de que la señal del grupo -OH de la flavanona pinocembrina se observe en 3010  $\text{cm}^{-1}$ , ya que dicho valor entra en el intervalo referido anteriormente. La formación del enlace intramolecular puede ser verificada con el espectro de  $^1\text{H}$ -RMN (Espectro 2), donde el singulete en 12.05 ppm que integra para un protón es característico de un protón quelatado con grupo carbonilo, ya que estas interacciones inducen un corrimiento hasta de 12 ppm de protones de -OH de fenoles<sup>30</sup>.

Por otro lado, la banda intensa en 1628  $\text{cm}^{-1}$  corresponde a la señal de estiramiento entre el átomo carbono y oxígeno del grupo carbonilo (C=O) de cetona, entre 1580 y 1485  $\text{cm}^{-1}$  se observan las bandas de las vibraciones del enlace doble C=C que corresponden a las de anillo aromático y por último se observan las bandas del estiramiento del enlace C-O de fenol que se sitúan en 1356 y 1168  $\text{cm}^{-1}$ <sup>25</sup>.

**Tabla 1.** Resultados del análisis de espectroscopia de IR de la flavanona pinocembrina.

<b>Espectroscopia de Infrarrojo (ATR)</b>	
<b>Frecuencia (cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>Grupo funcional</b>
2635-3010	Hidroxilo (-O-H)
1628	Carbonilo (C=O)
1580-1485	Enlace doble (C=C)
1167	Enlace (C-OH)

Los datos obtenidos en el análisis de <sup>1</sup>H-NMR (Tabla 2; Espectro 2) fueron comparados con datos reportados para el flavonoide pinocembrina, que no sólo ha sido aislado de muestras de propóleos o cortezas de árboles, sino a partir de rizomas como *Boesenbergia rotunda*<sup>29</sup>.

A campo bajo se observa un singulete en 12.04 ppm que integra para un protón y se asigna al grupo –OH en la posición 5 (Anillo A) que está quelatado con el oxígeno del grupo carbonilo (Anillo C)<sup>30</sup>.

El singulete en 10.12 ppm que integra para un protón corresponde al del grupo –OH que se encuentra en la posición 7 (anillo A), en 7.43 ppm se observa un multiplete característico de protones unidos a un anillo aromático monosustituido que integra para 5 protones, dichos protones corresponden a los que se encuentran en las posiciones 2', 3', 4', 5' y 6' del anillo en C. Mientras que la señal en 6.02 ppm corresponde a los protones en las posiciones 6 y 8 del anillo A de la flavanona<sup>20</sup>.



A un desplazamiento químico de 5.41 ppm (dd,  $J = 12.8, 3.4$  Hz) se observa un doble de dobles que integra para un protón en la posición 2 del anillo C y por último las señales que se encuentran en 3.07 ppm (dd,  $J = 17.2$  Hz, 12.8 Hz) y en 2.78 ppm (dd,  $J = 17.2$  Hz, 3.4 Hz) integran para un protón cada una y corresponden a los hidrógenos de la posición 3 del anillo C alfa al grupo carbonilo<sup>25</sup>.

**Tabla 2.** Resultados del análisis de <sup>1</sup>H-RMN del flavonoide pinocembrina

<b>Espectroscopia de <sup>1</sup>H-RMN ( 200 MHz; CDCl<sub>3</sub>; Me<sub>4</sub>Si)</b>	
<b>Desplazamiento químico (ppm)</b>	<b>Posición</b>
2.78 (1H, dd, $J = 17.2$ Hz, $J = 3.4$ Hz)	H-3
3.06 (1H, dd, $J = 17.2$ Hz, $J = 12.8$ Hz )	H-3'
5.42 (1H, dd, $J = 12.8$ Hz, $J = 3.4$ Hz )	H-2
6.02 (2H, s)	H-6 y H-8
7.41 (1H, m)	H-2', H-3'.H-4', H-5' y H- 6'
10.11 (1H, s)	7-OH
12.04 (1H, s)	5-OH

En el experimento de <sup>13</sup>C-RMN (Tabla 3; Espectro 3) se observan trece señales que corresponden al esqueleto de 15 átomos de carbono, dos de estas señales son de dos carbonos cada una, por simetría, las cuales corresponden a los C-2' y C-6' (125.69 ppm) y a los C-3'y C5' (128.27 pm). La señal en 194.76 ppm corresponde al C-4, dicho desplazamiento químico es característico del carbono del grupo cetona de las flavanonas o dihidroflavonas<sup>31</sup>. En el espectro se observan dos señales de dos



carbonos con hibridación  $sp^3$ , la primera se aprecia en 42.69 ppm que corresponde al C-3 y la segunda en 78.39 ppm que corresponde al C-2.

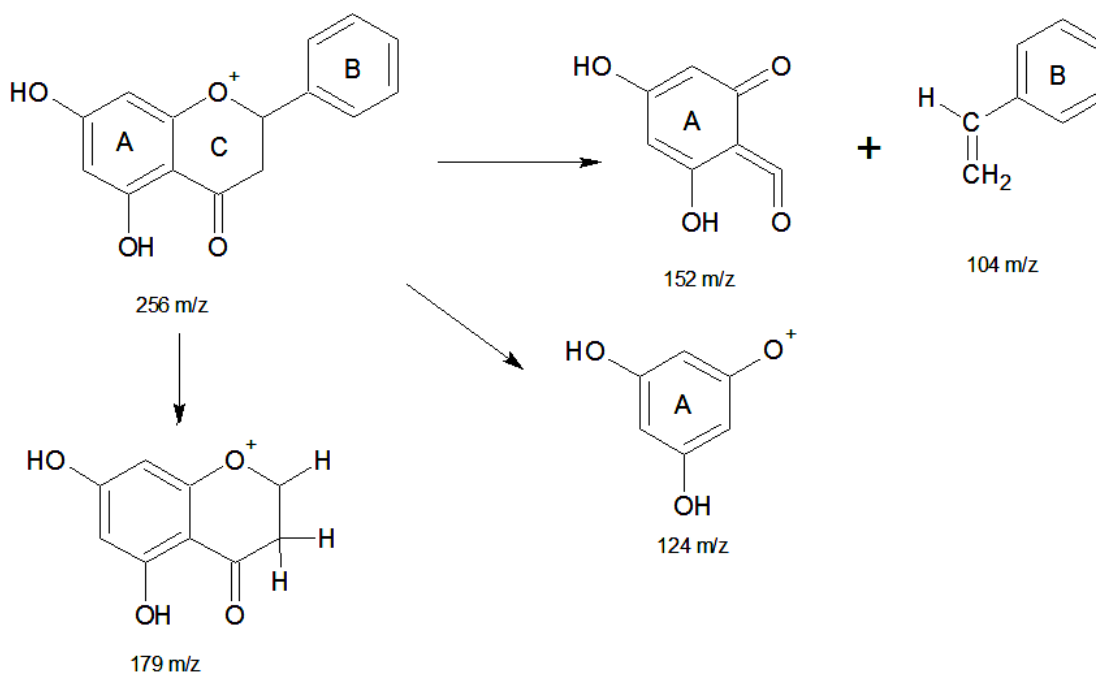
**Tabla 3.** Resultados de  $^{13}C$ -RMN de la flavanona pinocembrina.

<i>Espectroscopia de <math>^{13}C</math>-RMN (200 MHz; <math>CDCl_3</math>; DMSO)</i>	
<b>Desplazamiento químico (ppm)</b>	<b>Posición</b>
42.69	C-3
78.39	C-2
95.11	C-8
96.22	C-6
101.82	C-10
125.69	C-2' y C-6'
128.27	C-3' y C-5'
128.21	C-4'
138.13	C-1'
162.42	C-9
163.66	C-5
166.61	C-7
195.78	C-4

Por otro lado, las señales observadas para C-6 y C-8 con hibridación  $sp^2$  y desplazamientos químicos en 96.22 ppm y 95.11 respectivamente, se observan a campo más alto con respecto a los carbonos del anillo aromático (anillo B) 125.69 ppm

(C-2', C-6'), 128.21 ppm (C-4'), 128.27 ppm (C-3' y C-5') y 138.13 ppm (C-1'), ya que en el caso de los 5,7-dihidroxiflavonoides, estos carbonos se encuentran menos protegidos<sup>31</sup>.

Por último, por espectrometría de masas se obtiene el ion molecular (Espectro 4), que fue de 256 m/z, las señales más representativas son la observadas en 179 m/z [M-C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>] que corresponde a la pérdida de un fragmento que pesa 77 una que pertenece al anillo aromático (anillo B), mientras que en 152 m/z corresponde al anillo A<sup>29</sup> completo, y parte del heterociclo del anillo C que incluye al grupo carbonilo y al heteroátomo de oxígeno y finalmente el fragmento en 104 m/z es corresponde al estireno o vinilbenceno formado por el anillo B y parte de la ruptura del anillo C (Figura 17).



**Figura 17.** Patrón de fragmentación de la flavanona pinocembrina<sup>42</sup>.



### 5.1.2. Galangina

Galangina o 5,7-dihidroxi-2,3-dihidroflavonol (Figura 18), tiene en la posición 3 del anillo C un grupo hidroxilo como sustituyente y un enlace doble entre las posiciones 2 y 3 del mismo anillo. Galangina al igual que pinocembrina ha sido aislado de muestras de propóleos y de cortezas de árboles como el álamo<sup>24</sup>. La apariencia del compuesto aislado es de cristales de color amarillo con un punto de fusión de 212-214°C.

Este flavonol es capaz de inhibir algunos microorganismos patógenos, como *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus sp.*, los cuales son bacterias causantes de

enfermedades intrahospitalarias<sup>22</sup>, tiene efecto antiproliferativo sobre líneas celulares de cáncer, ya que se ha descrito que una concentración de 100 µM de galangina produce una disminución en la viabilidad de dichas células en un periodo de 24 hrs de incubación<sup>23</sup>. También se le relaciona con potencial antioxidante, la cual se atribuye a la presencia del enlace doble entre el C-2 y C-3 y al grupo hidroxilo (-OH) sobre el C-3, gracias a ésta propiedad, el flavonol galangina previene el estrés oxidativo y por lo tanto tiene un efecto benéfico contra la resistencia a la insulina, la cual es una patología, donde el tejido del riñón es menos sensible a la insulina, lo cual es promotor de enfermedades como diabetes tipo II<sup>23</sup>.

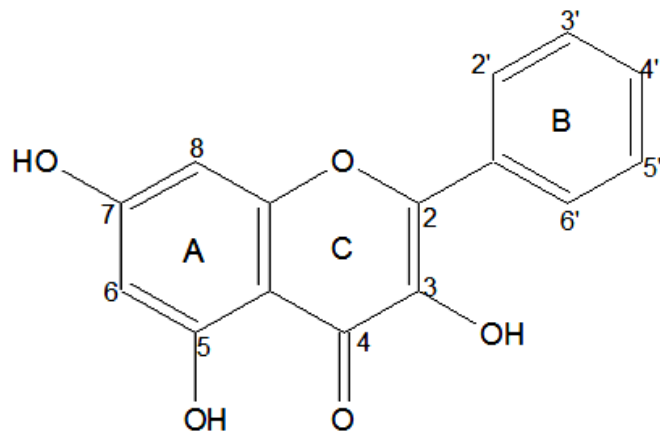


Figura 18. Estructura química del flavonol galangina.



En el análisis de IR (Tabla 4; Espectro 5), el conjunto de bandas entre 3303 y 3547  $\text{cm}^{-1}$  corresponden a la señal de estiramiento del enlace -O-H, pero la peculiaridad de esta región del espectro de IR (ver espectro 5) son las bandas en 3503-3547  $\text{cm}^{-1}$ , las cuales indican la presencia de un grupo hidroxilo libre (-OH) es decir aquel que no se encuentra formando un enlace tipo puente de hidrógeno<sup>30</sup>. Por otro lado, la banda de intensidad media que denota la presencia de un grupo carbonilo de cetona conjugada en 1696  $\text{cm}^{-1}$ , la que fue igual al descrito para este compuesto<sup>24</sup>. Las bandas que corresponden a las vibraciones de tensión del enlace C=C de un anillo aromático se localizan en 1600  $\text{cm}^{-1}$ <sup>30</sup> lo cual es congruente con la señal obtenida (Ver espectro 5) y por último la señal en 1156  $\text{cm}^{-1}$  indica la presencia de un enlace de tensión C-O correspondiente a un alcohol, ya que éstas señales se observan entre 1200 y 1000  $\text{cm}^{-1}$ <sup>30, 34</sup>.

**Tabla 4.** Resultados de espectroscopia de IR del flavonol galangina.

Espectroscopia de IR (ATR)	
Frecuencia ( $\text{cm}^{-1}$ )	Grupo funcional
3303-3547	Hidroxilo (-OH)
1696	Carbonilo (C=O)
1600-1439	Enlace doble (C=C)
1156	Enlace C-OH



Con los experimentos de  $^1\text{H}$ -RMN (Tabla 5; Espectro 6) y  $^{13}\text{C}$ -RMN (Tabla 6; Espectro 7) fue posible establecer de forma precisa la estructura del flavonoide galangina. El singulete en 11.96 ppm es de un protón de un grupo hidroxilo de fenol<sup>30</sup>, ya que para este tipo de hidrógeno las señales se sitúan entre 10-16 ppm, se trata de un protón quelatado con un grupo carbonilo, lo que induce un corrimiento hasta ~12 ppm<sup>31</sup> como se observa en el espectro 6, se trata del protón del grupo hidroxilo en la posición 5, ya que a este desplazamiento químico aparece el protón antes mencionado para los flavonoides, esta información fue comparada con las señales obtenidas para dicho flavonoide 12.32 ppm y 12.15 ppm<sup>25</sup>, los resultados obtenidos difieren muy pocos de los reportados, ya que los desplazamientos químicos de los protones procedentes de grupos hidroxilo suelen estar afectados por el disolvente, la concentración y la temperatura<sup>30</sup>. La señal que integra para un protón en la posición 7 del anillo A identificada como un singulete en 10.21 ppm<sup>25</sup> corresponde al protón de un grupo hidroxilo. El multiplete en 7.50 ppm que integra para 3 protones y las señales en 8.20 ppm que integran para dos protones se refieren a los protones en las posiciones 3', 4' y 5' y para los protones 2' y 6' respectivamente, el desdoblamiento de la señal de protones de anillo aromático, se debe a la presencia del enlace doble entre el C-2 y C-3 del anillo C, ya que los electrones pi de dicho enlace se deslocalizan sobre el anillo lo que genera la desprotección de los protones 2' y 6', por lo que se observan a desplazamiento químico mayor<sup>35</sup>, con respecto a los protones 3', 4' y 5'.

El singulete que integra para un protón que se observa en 7.87 ppm se atribuye al hidrógeno del grupo hidroxilo en la posición 3, aunque en la bibliografía consultada la



señal de este protón se reporta a un desplazamiento químico de 9.59 ppm, la diferencia del desplazamiento químico obtenido experimentalmente con respecto al reportado se atribuye a que las señales de los protones de grupos -OH, -NH<sub>2</sub>, -COOH tienen intervalos amplios de desplazamientos químicos<sup>30</sup>.

Por último, el sistema AB en 6.32 y 6.46 ppm, corresponden a los protones en las posiciones 6 y 8 y presentan una constante de acoplamiento de 2 Hz, lo que indica que se trata de protones unidos a un anillo aromático en posición meta<sup>34</sup>.

**Tabla 5.** Resultados de <sup>1</sup>H-RMN del flavonoide galangina

<b>Espectroscopia de <sup>1</sup>H-RMN (200 MHz; CDCl<sub>3</sub>; DMSO)</b>	
<b>Desplazamiento químico (ppm)</b>	<b>Posición</b>
6.32 (1H, d, J = 2 Hz)	H-6
6.46 (1H, d, J = 2 Hz)	H-8
7.50 (3H, m)	H-3', H-4' y H-5'
8.20 (2H, dd)	H-2' y H-6'
7.87 (1H, s)	3-OH
10.21 (1H, s)	7-OH
11.96 (1H,s)	5-OH

En el espectro 7 (<sup>13</sup>C-RMN) se observan trece señales, una señal en 175.55 ppm que corresponde a un carbono de grupo carbonilo de cetona conjugada (C=O) α, β, α', β' y se asigna al C-4 de la molécula propuesta. En los flavonoles habitualmente



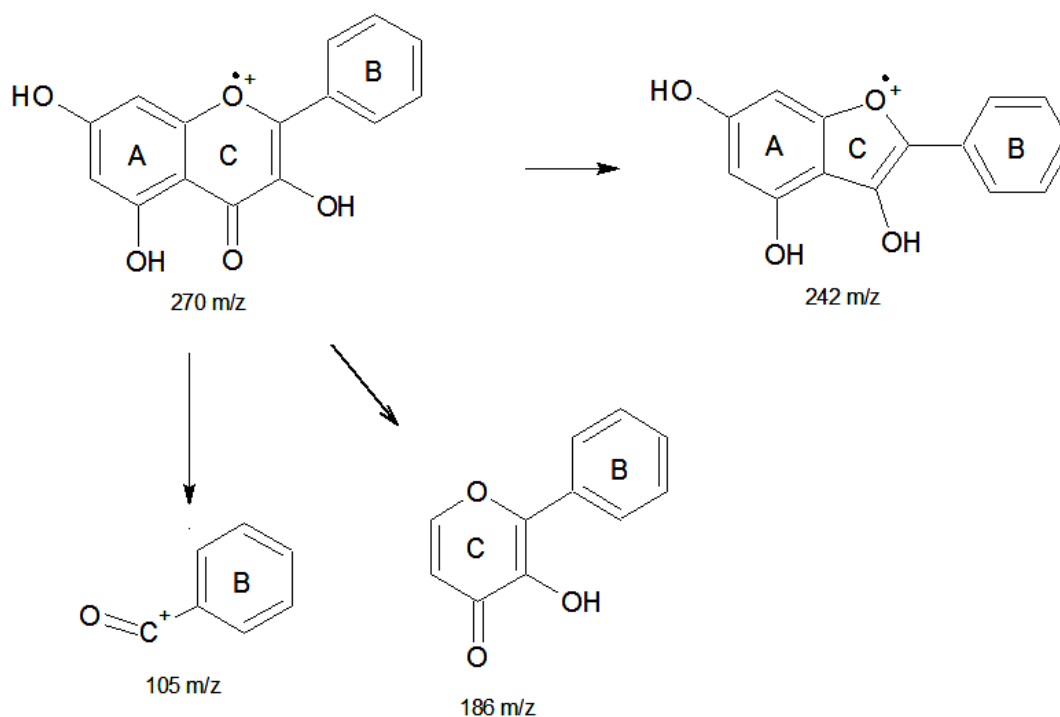
se observa la señal alrededor de 176 ppm <sup>31</sup> la señal del carbono de cetona se observa a campo más alto con respecto al que se observan las flavanonas debido a la presencia de electrones pi del enlace doble entre los C-2 y C-3 del anillo C que al deslocalizarse en el anillo hacen que el átomo de carbono (C-4) sea menos deficiente en electrones y por lo tanto se observe a campo más alto<sup>36</sup>.

**Tabla 6.** Resultados de Espectroscopia de <sup>13</sup>C-RMN del flavonol galangina.

<b>Espectroscopia de <sup>13</sup>C-RMN (300 MHz; CDCl<sub>3</sub>; DMSO)</b>	
<b>Desplazamiento químico (ppm)</b>	<b>Posición</b>
135.58	C-3
144.79	C-2
93.94	C.8
98.38	C-6
103.02	C-10
127.88	C-2' y C-6'
129.28	C-4'
130.71	C-1'
127.16	C3'- C-5'
156.45	C-9
160.63	C-5
164.02	C-7
175.55	C-4

El ión molecular del flavonol galangina es 270 m/z (Espectro 8), que corresponde a su masa atómica, 270 uma<sup>32</sup>. La señal en 242 m/z corresponde a la pérdida de 28 uma, lo que indica pérdida de un grupo carbonilo (C=O)<sup>42</sup>, mientras que el pico en 105 m/z corresponde al ion benzoilo [C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>O]<sup>+</sup> el cuál coincide con el peso del anillo B de la estructura del flavonol unida al C-2 y al átomo de oxígeno del heterociclo y por último el fragmento en 186 m/z corresponde al anillo C unido al anillo B (Figura 19).

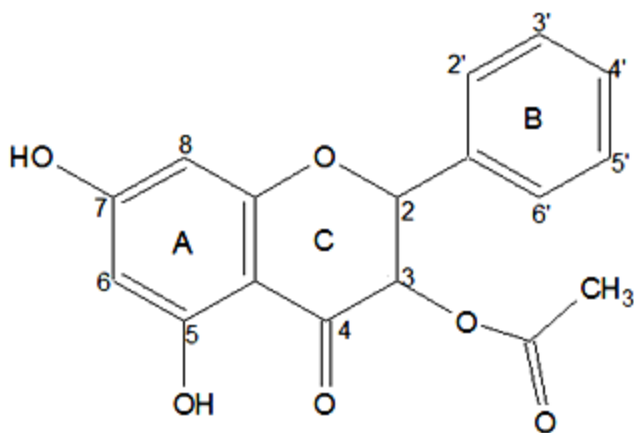
En 186 m/z se observa la señal referente al fragmento del anillo C que se encuentra unido al anillo B (ver figura 19)



**Figura 19.** Patrón de fragmentación del flavonol galangina<sup>42</sup>.

### 5.1.3. 3-AcO de Pinobanksina

El 3-AcO-pinobanksina pertenece a la familia de las flavanonas (Figura 20), ya que entre el C-2 y C-3 del anillo de pirano (anillo C) no presenta la insaturación característica de las flavonas. Al igual que pinocembrina y galangina, el 3 -AcO-pinobanksina se ha encontrado en muestras de propóleos y cortezas de pino (*Pinus armandii* y *Pinus banksina*). Éste compuesto es conocido por su actividad contra *Staphylococcus aureus*, microorganismo patógeno contaminante de leche además que produce toxinas termorresistentes y causante de enfermedades como neumonía, endocarditis y osteomielitis<sup>26</sup>.



**Figura 20.** Estructura química de la flavanona 3-AcO-pinobanksina.

La apariencia del 3-AcO-pinobanksina es la de cristales de color blanco con p.f. 173-174°C<sup>26</sup>.

El espectro de IR (Espectro 9) proporciona la información de los grupos funcionales presentes en el compuesto aislado, en 3540-3144 cm<sup>-1</sup> las señales observadas

corresponden al estiramiento del enlace entre oxígeno e hidrógeno de grupo hidroxilo (-OH), las bandas entre 3540 y 3500 cm<sup>-1</sup> corresponden al estiramiento del enlace entre oxígeno e hidrógeno de grupo -OH libre, estas bandas comúnmente aparecen alrededor de 3600 cm<sup>-1</sup>, mientras que la banda ancha en 3144 cm<sup>-1</sup> son del grupo



hidroxilo que está formando un enlace de puente de hidrógeno con el grupo carbonilo, ya que dicha señal aparece entre 3100 y 3200  $\text{cm}^{-1}$ <sup>30</sup>. Las bandas en 1760 y 1632  $\text{cm}^{-1}$  señalan la presencia de grupos carbonilo (C=O) en la molécula, los cuales son de diferente naturaleza química, ya que la señal intensa de 1760  $\text{cm}^{-1}$  corresponde a un grupo carbonilo de éster, la cual se confirma con los sobretonos observados entre 1111 y 1125  $\text{cm}^{-1}$ . Por otro lado la señal en 1632  $\text{cm}^{-1}$  corresponde a grupo carbonilo de una cetona  $\alpha$ - $\beta$  insaturada<sup>30</sup> (Tabla 7).

**Tabla 7.** Resultados del análisis de IR del flavonoide 3-AcO-pinobanksina.

<b>Espectroscopia de IR (ATR)</b>	
<b>Frecuencia (<math>\text{cm}^{-1}</math>)</b>	<b>Grupo Funcional</b>
3144-3540	Estiramiento de enlace -OH
1760 y 1632	C=O
1610-1455	C=C de anillo aromático
1168	Estiramiento del enlace C-OH

Con los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN (Espectro 10; Tabla 8) y  $^{13}\text{C}$ -RMN (Espectro 11; Tabla 9) se concretó la estructura propuesta para el 3-AcO-pinobanksina, los desplazamientos químicos de la  $^1\text{H}$ -RMN proporcionan información acerca del entorno químico de los protones, por ejemplo el singulete en 2.03 ppm corresponde a tres protones equivalentes, los cuales son del grupo metilo ( $-\text{CH}_3$ ) presente en el grupo acetato ( $\text{CH}_3\text{COO}-$ ) que está en la posición 3 del anillo C.





Los dos dobletes del sistema AB que se observan en 6.01 y 6.05 ppm ( $J = 2$  Hz) son de los protones en las posiciones 6 y 8 del anillo A<sup>38</sup>. La constante de acoplamiento de 2 Hz corresponde a protones unidos a un anillo aromático en posición meta uno con respecto a otro<sup>34</sup>, lo cual corresponde a los protones en las posiciones 6 y 8. En 5.36 y 5.82 ppm también se tienen dos dobletes que integran para un protón cada uno, estos corresponden a las posiciones 2 y 3 del anillo C respectivamente y la constante de acoplamiento para ambas señales fue de 12 Hz<sup>26</sup>.

El multiplete en 7.45 ppm corresponde a los protones unidos a un anillo aromático monosustituido, la señal integra para cinco protones, que se encuentran en las posiciones 2',3',4',5' y 6', dicha señal es similar a las descrita en la literatura de 7.42 ppm<sup>26</sup>. Por otra parte se observa un singulete ancho en 6.31 ppm, esta señal integra para un protón y corresponde al grupo hidroxilo en la posición 7 del anillo A, a diferencia de la flavanona pinocembrina donde el protón aparece alrededor de 10 ppm, en este caso no sucede así, como ya se mencionó, los protones de grupos hidroxilo (-OH) aparecen en intervalos muy amplios de desplazamientos químicos, incluso algunos autores no reportan la señal de éste protón para la flavanona 3-AcO-pinobanksina<sup>26, 34</sup>.

**Tabla 8.** Resultados de espectroscopia de  $^1\text{H}$ -RMN del flavonoide 3-AcO-pinobanksina

<b>Espectroscopia de <math>^1\text{H}</math>-RMN (300 MHz; <math>\text{CDCl}_3</math>; TMS)</b>	
<b>Desplazamiento químico (ppm)</b>	<b>Posición</b>
2.03 (3H, s)	AcO-3
5.36 (1H, d, $J = 12$ Hz)	H-2
5.82 (1H, d, $J = 12$ Hz)	H-3
6.01 (1H, d, $J = 2$ Hz)	H-6
6.05 (1H, d, $J = 2$ Hz)	H-8
6.31 (1H, s)	OH-7
7.45 (5H, m)	H-2',H-3',H-4', H-5' y H-6'
11.47 (1H, s)	OH-5

En la tabla 9 se enlistan las 15 señales obtenidas del espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN (Espectro 11) de las cuáles, tres son de carbonos con hibridación  $\text{sp}^3$ , la primera en 20.32 ppm pertenece al carbono del metilo presente en el grupo acetato que se encuentra en la posición tres de la molécula<sup>37, 38</sup>, la segunda en 72.45 ppm que corresponde al C-3 y la tercera en 81.31 ppm que pertenece al C-2. La señal en 191.60 ppm se encuentra en la zona de carbono de grupo carbonilo de cetona (C-4), ésta habitualmente se observa alrededor de 196 ppm en las flavanonas<sup>31</sup>, también se observa otra señal de grupo carbonilo del grupo éster en 169.60 ppm<sup>38</sup>. Se observan dos señales de carbonos simétricos 127.35 ppm del C-2' y C-6' y la de los C-3' y C-5' en 127.35 ppm.

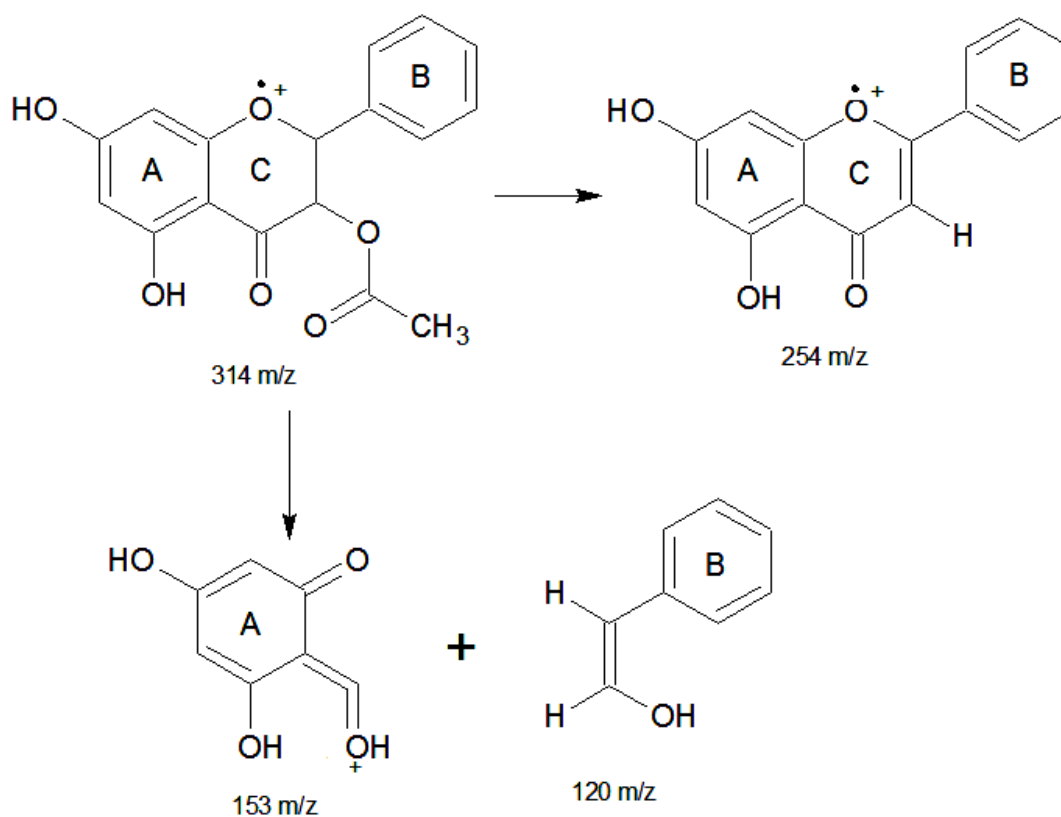


**Tabla 9.** Resultados de espectroscopia de  $^{13}\text{C}$ -RMN del flavonoide 3-AcO-pinobanksina.

<i>Espectroscopia de <math>^{13}\text{C}</math>-RMN (300 MHz; <math>\text{CDCl}_3</math>; TMS)</i>	
<b>Desplazamiento químico (ppm)</b>	<b>Posición del Carbono</b>
20.32	CH <sub>3</sub> -3
72.45	C-3
81.31	C-2
95.89	C-8
97.39	C-6
101.86	C-10
127.35	C-2',6'
128.76	C-3',5'
129.60	C-4'
135.05	C-1'
162.52	C-9
164.25	C-5
165.28	C-7
169.60	COO-3
191.60	C-4

Por la espectrometría de masas se obtiene el ión molecular de la flavona 3-AcO pinoibanksina es de 314 m/z (Espectro 12), la señal en 254 m/z, indica la

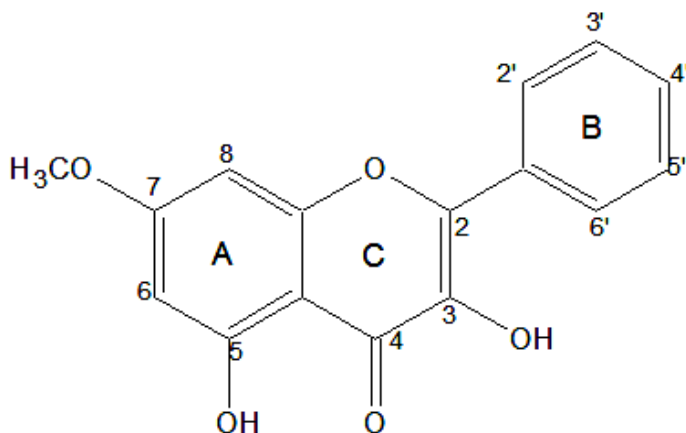
pérdida del grupo acetato en forma de ácido acético [M-CH<sub>3</sub>COOH] ya que entre ambas señales existe una diferencia de 60 uma (Figura 21), congruente con el peso de dicha especie química, por otro lado, con una intensidad relativa del 100% en 153 m/z se observa el pico base<sup>26</sup> que corresponde al peso del anillo A de la estructura incluyendo los grupos hidroxilo en las posiciones 5 y 7, y parte del anillo C, es decir el heteroátomo (oxígeno) y el grupo carbonilo.



**Figura 21.** Patrón de fragmentación de la flavanona 3-AcO de Pinobanksina<sup>42</sup>.

#### 5.1.4. Izalpinina

El último compuesto aislado se conoce como 3,5-dihidroxi-7-metoxiflavona o izalpinina (Figura 22), con un punto de fusión de 189-193°C, físicamente se reconoce como un sólido de color amarillo<sup>39</sup>, la estructura química fue determinada por medio de <sup>1</sup>H-RMN, <sup>13</sup>C-RMN, IR y espectrometría de masas. Como se observa en la figura 25 en la posición 7 del anillo A está sustituido con un grupo metoxilo (-OCH<sub>3</sub>), además de un enlace doble entre los C2-C3 y se refiere a la estructura como un flavonol al tener un grupo hidroxilo sustituido en la posición 3 del anillo C.



**Figura 22.** Estructura química del flavonol  
Izalpinina

Con el análisis de espectroscopia de infrarrojo (Espectro 13) se caracterizaron los grupos funcionales presentes en la molécula aislada (Tabla 10), la banda fina en 3313 cm<sup>-1</sup>, corresponde a

grupo hidroxilo (-OH) de un fenol, en 1631 cm<sup>-1</sup> se observa la banda de estiramiento del enlace C-O del grupo carbonilo (C=O) característico en los flavonoides, las bandas en 1600-1485 cm<sup>-1</sup> que corresponden a las vibraciones del enlace doble C=C de anillo aromático y por último en 1166 cm<sup>-1</sup> la señal de estiramiento del enlace C-O que corresponden a la unión (C-OH).



**Tabla 10.** Resultados del análisis de IR del flavonol izarpinina.

<b>Espectroscopia de IR (ATR)</b>	
<b>Frecuencia (cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>Grupo funcional</b>
3313	-O-H
1631	C=O (cetona)
1600-1485	C=C (anillo aromático)
1165	C-OH

De acuerdo con el análisis de <sup>1</sup>H-RMN (Espectro 14) en 11.66 ppm se observa un singulete e integra para un protón, que corresponde al del grupo hidroxilo (-OH) quelatado en la posición 5 del anillo A. Las señales de protones de anillo aromático monosustituido se desdoblan en el multiplete en 7.5 ppm (3', 4' y 5') que integra para tres protones y el doble de dobles en 8.19 ppm (2' y 6')<sup>40</sup> que integra para dos protones, el desdoblamiento de 8.19 ppm indica que los protones en las posiciones 2' y 6' se encuentran en un ambiente químico distinto con respecto a los de las posiciones 3', 4' y 5', que se observan a campo más alto (7.5 ppm), ya que los electrones pi del enlace doble de las posiciones 2 y 3 del anillo C se deslocalizan sobre el anillo, lo que induce un fenómeno de desprotección de los protones sobre los C-2' y C-6' lo que genera que las señales de dichos protones se aprecien a campo más bajo.

Los dos dobletes en 6.39 y 6.52 ppm corresponden a los protones de las posiciones 6 y 8 del anillo A respectivamente, en ambos casos la constante de



acoplamiento es de 2.2 Hz, por lo tanto se trata de protones en posición meta uno con respecto a otro<sup>30, 40</sup> (Figura 22). En 6.65 ppm se observa un singulete que integra para un protón que corresponde a un grupo hidroxilo (-OH) en la posición 3 (anillo C)<sup>40</sup>.

**Tabla 11.** Resultados del análisis de <sup>1</sup>H-RMN del flavonol izalpinina

<b>Espectroscopia de <sup>1</sup>H-RMN (200 MHz; CDCl<sub>3</sub>; TMS)</b>	
<b>Desplazamiento químico (ppm)</b>	<b>Posición</b>
3.89 (3H, s)	OCH <sub>3</sub> -7
6.38 (1H, d, J = 2.2 Hz)	H-8
6.52 (1H, d, J = 2.2 Hz)	H-6
6.65 (1H, s)	OH-3
7.50 (3H, m)	3'-H, 4'-H y 5'-H
8.19 (2H, d)	2'-H y 6'-H
11.66 (1H, s)	5-OH

En el espectro de <sup>13</sup>C-RMN (Espectro 15) se observan catorce señales, la señal en 175.47 ppm corresponde a un carbono de grupo carbonilo de cetona conjugada  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\alpha'$ ,  $\beta'$ , generalmente en el caso de los flavonoles la señal se observa alrededor de 176 ppm<sup>31</sup>, la señal del carbono de cetona (C=O) se observa a campo más alto con respecto al de las flavanonas, ya que, los electrones pi entre las posiciones 2 y 3 del anillo C al deslocalizarse en el anillo hacen que el átomo de carbono (C-4) sea menos deficiente en electrones y su señal es observada a campo más alto<sup>40</sup>. En 55.85 ppm se observa la señal de un átomo de carbono que es base



de oxígeno con hibridación  $sp^3$  que corresponde al de un grupo metoxilo<sup>39, 41</sup> y las señales de carbonos con hibridación  $sp^2$  que corresponden a señales de anillo aromático se observan en 127.59 ppm (C-3' y C-5'), 128.62 ppm (C-2' y C-6') , 130.27 ppm (C-4') y 130.73 ppm (C-1') las cuales corresponden a los átomos de carbono del anillo B, la asignación específicas de los carbonos se muestra en la tabla 12.

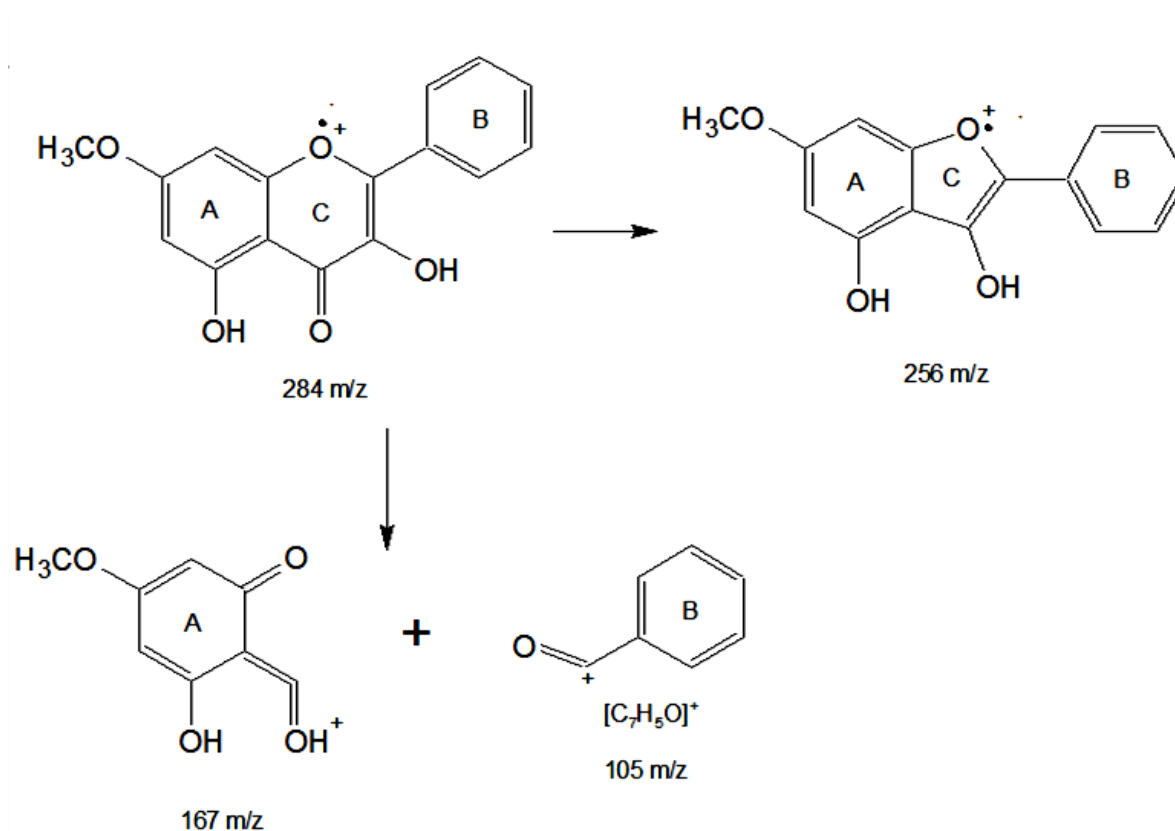
**Tabla 12.** Resultados del análisis de  $^{13}C$ -RMN del flavonoide izalpinina.

<b>Espectroscopia de <math>^{13}C</math>-RMN (300 MHz; <math>CDCl_3</math>; TMS)</b>	
<b>Desplazamiento química (ppm)</b>	<b>Posición del átomo de Carbono</b>
55.85	OCH <sub>3</sub> -7
92.27	C-8
98.03	C-6
104.02	C-10
127.62	C-3'-C-5'
128.62	C-2'-C-6'
128.89	C-4'
130.73	C-1'
136.58	C-3
145.23	C-2
157.05	C-9
160.88	C-5
165.99	C-7
175.47	C-4





En el espectro de masas se observa el ion molecular de [M] 284 m/z (Espectro 16) que corresponde a la masa del flavonol izalpinina<sup>43</sup>, donde las pérdidas más significativas son para los fragmentos observados en 256 m/z que corresponde a la pérdida del grupo carbonilo [M-CO], ya que hay una pérdida de 28 uma<sup>42</sup>. El pico observado en 105 m/z corresponde al ion benzoilo [C<sub>7</sub>H<sub>5</sub>O]<sup>+</sup> generado por el anillo B y el heteroátomo del anillo de pirano (Figura 23). Por último, la señal observada en 167 m/z confirma la sustitución del grupo metoxilo (-OCH<sub>3</sub>) en la posición 7 del anillo A y el grupo hidroxilo (-OH) en la posición 5, como se observa en la figura 23.



**Figura 23.** Patrón de fragmentación del flavonol izalpinina<sup>42</sup>.



Empleando de manera conjunta la espectrometría de masas y el análisis de  $^1\text{H-RMN}$  fue posible establecer las diferencias entre el flavonol izalpinina y el flavonol galangina. Estructuralmente difieren en que el flavonol izalpinina presenta un metoxilo en la posición 7 del anillo A, mientras que galangina posee un grupo hidroxilo en ésta misma posición. Como se observa en el espectro de  $^1\text{H-RMN}$  de izalpinina (ver espectro 14) hay un singulete en 3.89 ppm que integra para tres protones, lo que indica que se trata de un grupo ( $-\text{OCH}_3$ ), pero no es suficiente para determinar su posición en el esqueleto de 15 átomos de carbono, por lo que la espectrometría de masas fue fundamental para la asignación de la posición de este grupo funcional, en el análisis de masas se observa un fragmento de 167 m/z (ver espectro 16), el cual corresponde al anillo A y parte del anillo central (ver figura 23), dicho fragmento es crucial para establecer la posición del grupo metoxilo en el esqueleto del flavonol, ya que no se observa otro fragmento que pueda indicar que el grupo metoxilo este situado en una posición distinta del esqueleto de flavan. Otro indicio que nos condujo a la estructura propuesta, fue que en el análisis de  $^1\text{H-RMN}$  del flavonol izalpinina no se observa el singulete en 10 ppm, característico del protón de grupo hidroxilo sustituido en la posición 7 del anillo A, al contrario del flavonol galangina que sí presenta dicha señal en 10.21 ppm (ver espectro 6).



## **5.2 Análisis por cromatografía de líquidos de alta resolución en fase reversa (CLAR-FR).**

Además de la elucidación estructural de los compuestos mencionados anteriormente, también se realizó el análisis por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución en Fase Reversa (CLAR-FR) de una mezcla de fracciones (fracciones 42-91, columna 9), guiados por el ensayo de  $^1\text{H-RMN}$  de la mezcla (Espectro 17), se observaron señales particulares de pinocembrina, como el singulete en 12.02 ppm así como el doble de dobles en 5.42 ppm con una constante de acoplamiento de 3 Hz que corresponde al protón en la posición 2 del anillo C de acuerdo al resultado obtenido en el análisis estructural, también se observan los dos dobles de dobles en 3.05 ppm ( $J = 13$  Hz y  $J = 17$ ) y en 2.78 ppm ( $J = 3.3$  Hz y  $J = 13$ ) que corresponden a los dos protones en la posición 3 del anillo C.

También se observaron señales de la flavanona 3-AcO-pinobanksina, en 5.36 ppm se observa un doblete con una  $J = 11.7$  Hz esta señal corresponde al protón en la posición 2 anillo C, en 5.75 ppm se observa un doblete con una  $J = 11.7$  Hz que corresponde al protón en la posición 3 del anillo C y el singulete en 2.00 ppm es de los protones del metilo del grupo acetato.

Por otra parte, como se observa en el espectro, el desdoblamiento de las señales de protones unidos a anillo aromático indican que en la mezcla hay una flavona, ya que, al existir una insaturación entre los C-2 y C-3 del anillo C, los protones del anillo B en C2' y C-6' resultan afectados por la presencia de electrones pi adicionales que indican la desprotección de dichos protones y por lo tanto inducen un desplazamiento



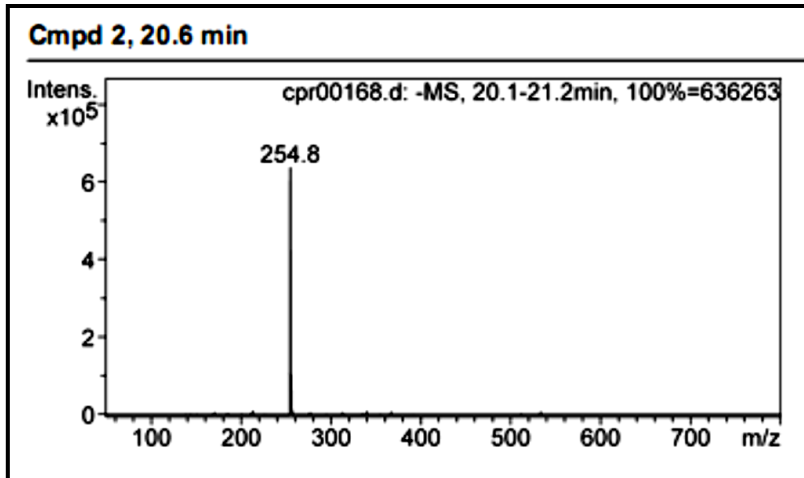
en la señal a campo más bajo, 8.18 ppm, es parecido al caso de la flavonol galangina donde ésta señal la observamos en 8.20 ppm (ver espectro 6).

En el espectro  $^1\text{H-RMN}$  de la mezcla también es posible observar señales de cadena hidrocarbonada, a campo alto hay un triplete en 0.8 ppm que corresponde a protones acoplados a dos protones vecinos ( $-\text{CH}_2$ ) y en 1 ppm se observa otro triplete que también corresponde a protones acoplados a dos protones vecinos ( $-\text{CH}_2$ ), pero no hay evidencia suficiente para determinar con exactitud si existe algún flavonide que presente una cadena hidrocarbonada como sustituyente en su estructura.

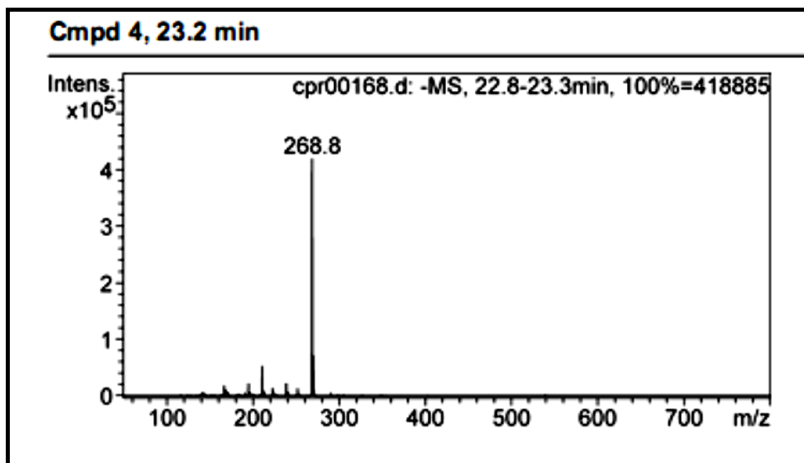
Al evaluar la mezcla por CLAR-FR se emplearon como estándares tres flavonoides, las flavanonas pinocembrina y 3-AcO de pinobanksina y el flavonol galangina (Tabla 13).

**Tabla 13.** Resultados del análisis de CLAR-FR de los flavonoides empleados como referencias. Gradiente 40% MeOH/ 60% Agua. Ionización por electrospray.

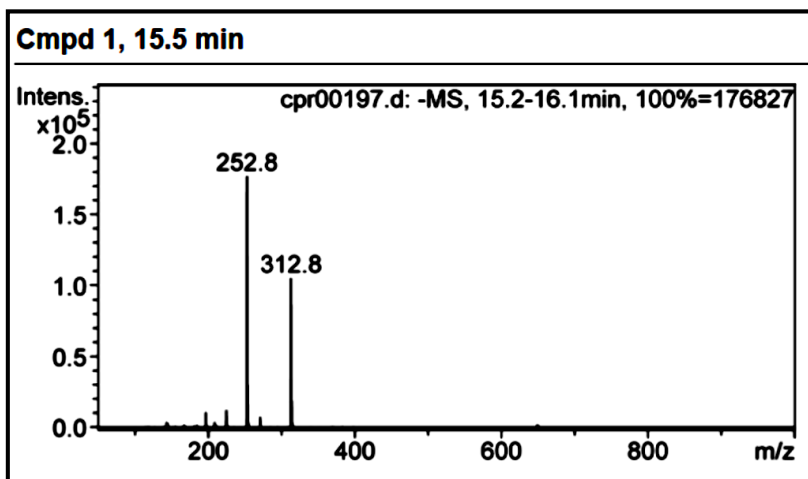
Referencias	Tiempo de retención (min)	[M-H] <sup>-</sup>
Pinocembrina	20.6	255
Galangina	21.1	269
3-AcO-pinobanksina	23.2	313



a. Pinocembrina



b. Galangina

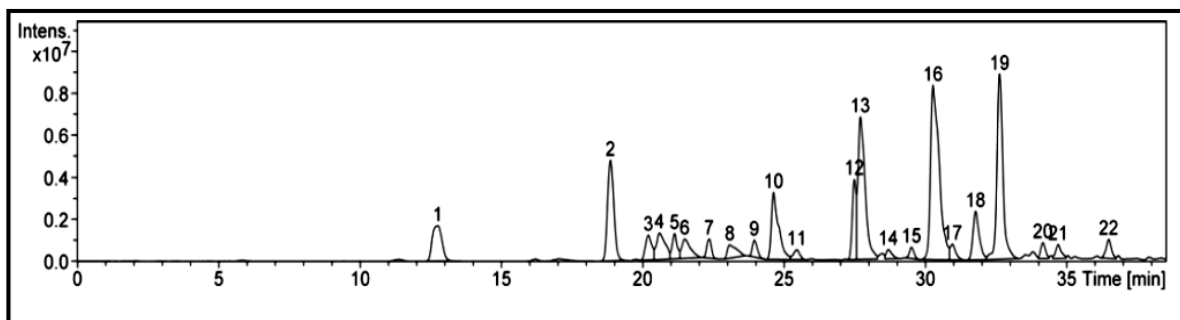


c. 3-Acetato de pinobanksina

**Figura 24.** Espectros de masas de los flavonoides empleados como estándares en el análisis de CLAR-FR. a. Pinocembrina. b. Galangina y c. 3-Acetato de pinobanksina.



El resultado del análisis indica que en la mezcla se encuentran presentes los tres flavonoides usados como estándares, los criterios empleados para determinar su presencia fueron tiempo de retención y ión molecular [M-1]. En el cromatograma obtenido para la mezcla (Figura 25) los picos que coinciden con el ión molecular y los tiempos de retención de los estándares son los picos 4 (pinocembrina), 5 (galangina) y 8 (3-acetato de pinobanksina). La mezcla evaluada es compleja ya que en ella se observan 22 compuestos distintos y de acuerdo con el análisis de CLAR-RF y dada la complejidad del propóleo no es posible determinar la identidad de los compuestos faltantes, ya que debido a que la ionización por electrospray no genera en sí fragmentación suficiente para establecer la estructura química de los compuestos restantes en la mezcla.



**Figura 25.** Cromatograma de las fracciones 42-91, Columna 9. Pico 4, pinocembrina. Pico 5, 3-AcO-pinobanksina y Pico 8, galangina.

## 6. Conclusiones



*Autora: Arminda San Martín*



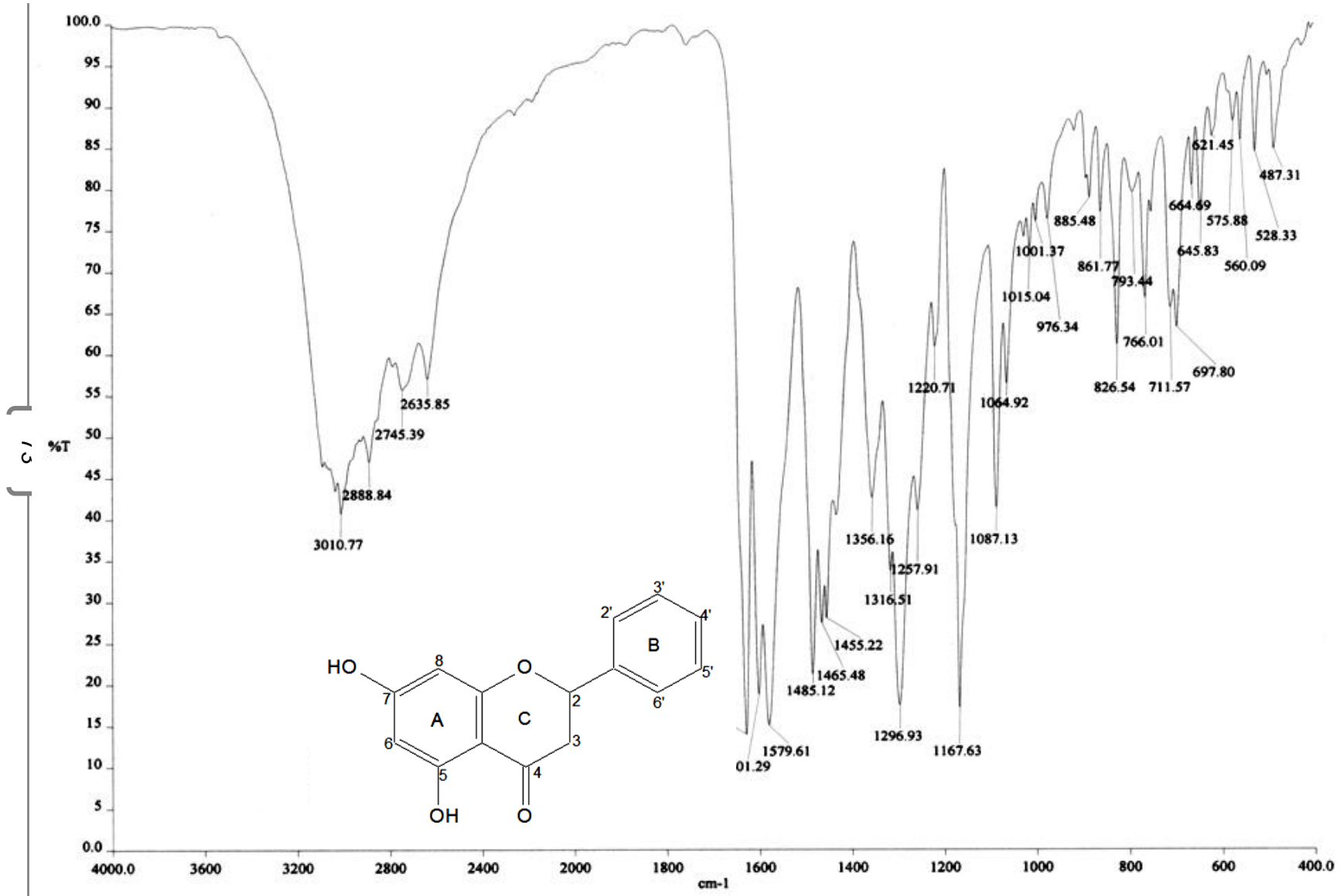


- ❖ A partir del extracto metanólico del propóleo negro de Zacatecas se aislaron, purificaron y caracterizaron cuatro metabolitos secundarios, dos flavanonas: pinocembrina y 3-Acetato de pinobanksina y dos flavonoles: izalpinina y galangina, los cuales no sólo proporcionan información acerca de la clase de compuestos que se encuentran presentes en el propóleo, sino, su caracterización proporciona herramientas al apicultor para mejorar la comercialización de su producto, ya que algunos pueden ser biológicamente activos.
  
- ❖ Al ser aislados, purificados y caracterizados los flavonoides presentes en el propóleo negro de Zacatecas, pueden ser aplicados en estudios futuros que demuestren su potencial biológico, y por lo tanto, ser considerados en el desarrollo de alternativas que contribuyan a combatir algunos padecimientos.
  
- ❖ Dada la complejidad química del propóleo negro de Zacatecas su estudio fitoquímico no se limita a la caracterización de los cuatro flavonoides purificados y caracterizados, ya que, aún puede ser fuente importante de otros compuestos con algún tipo de beneficio o incluso que puedan hablarnos acerca del entorno vegetal de la colmena.

**7. Espectros de los compuestos aislados**

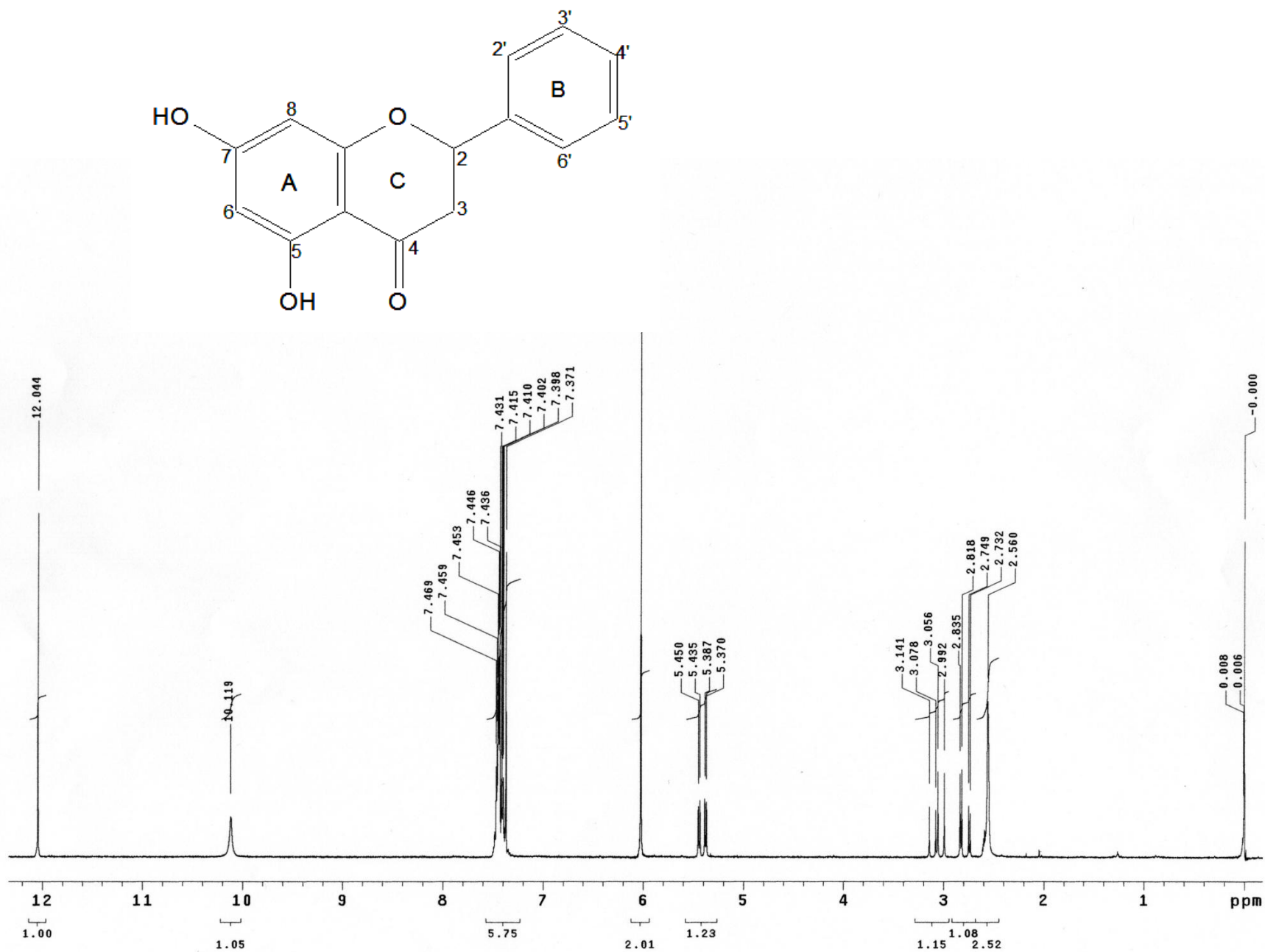


*Autora: Arminda San Martín*



**Espectro 1. IR. Pinocembrina.**

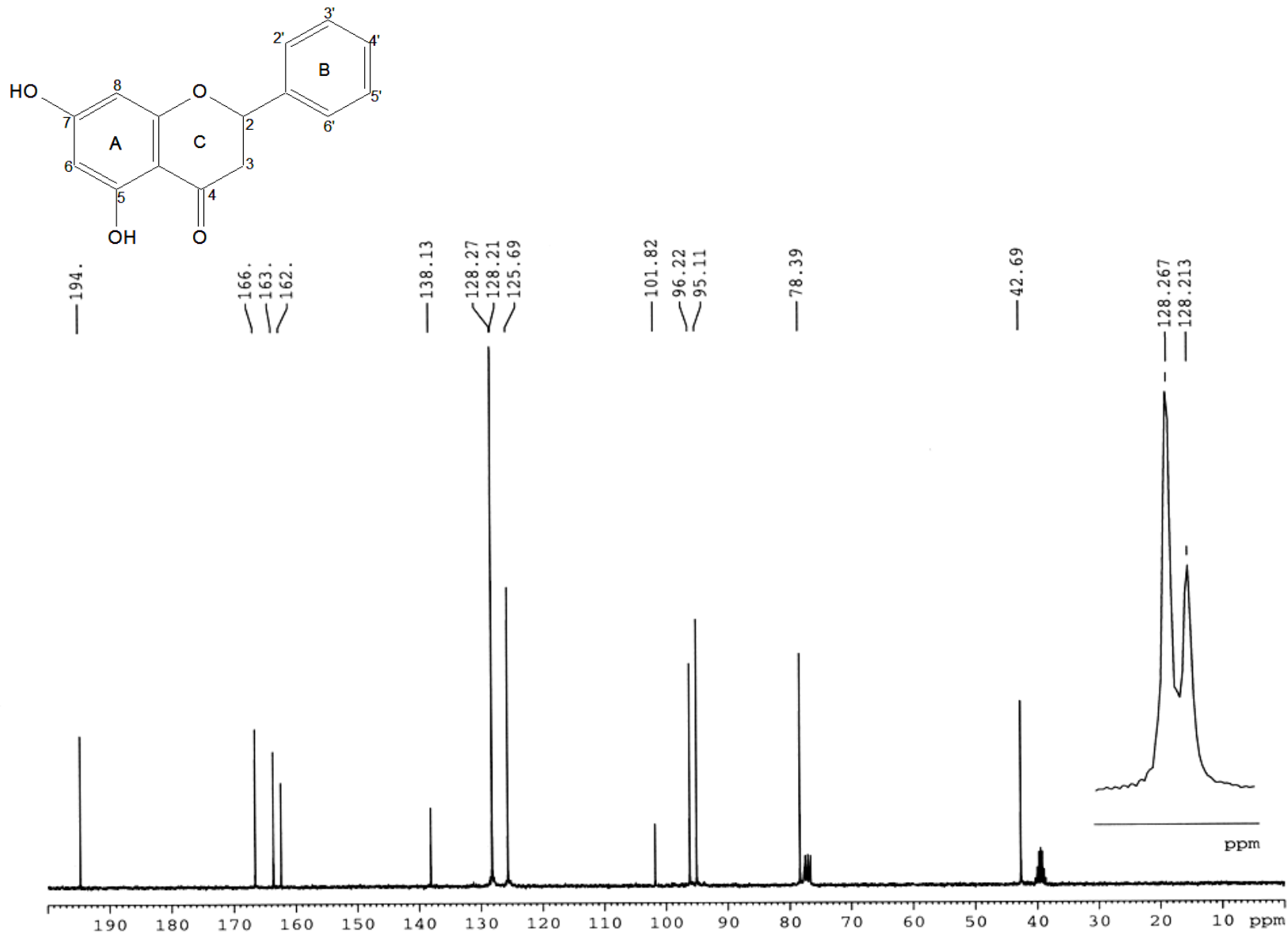




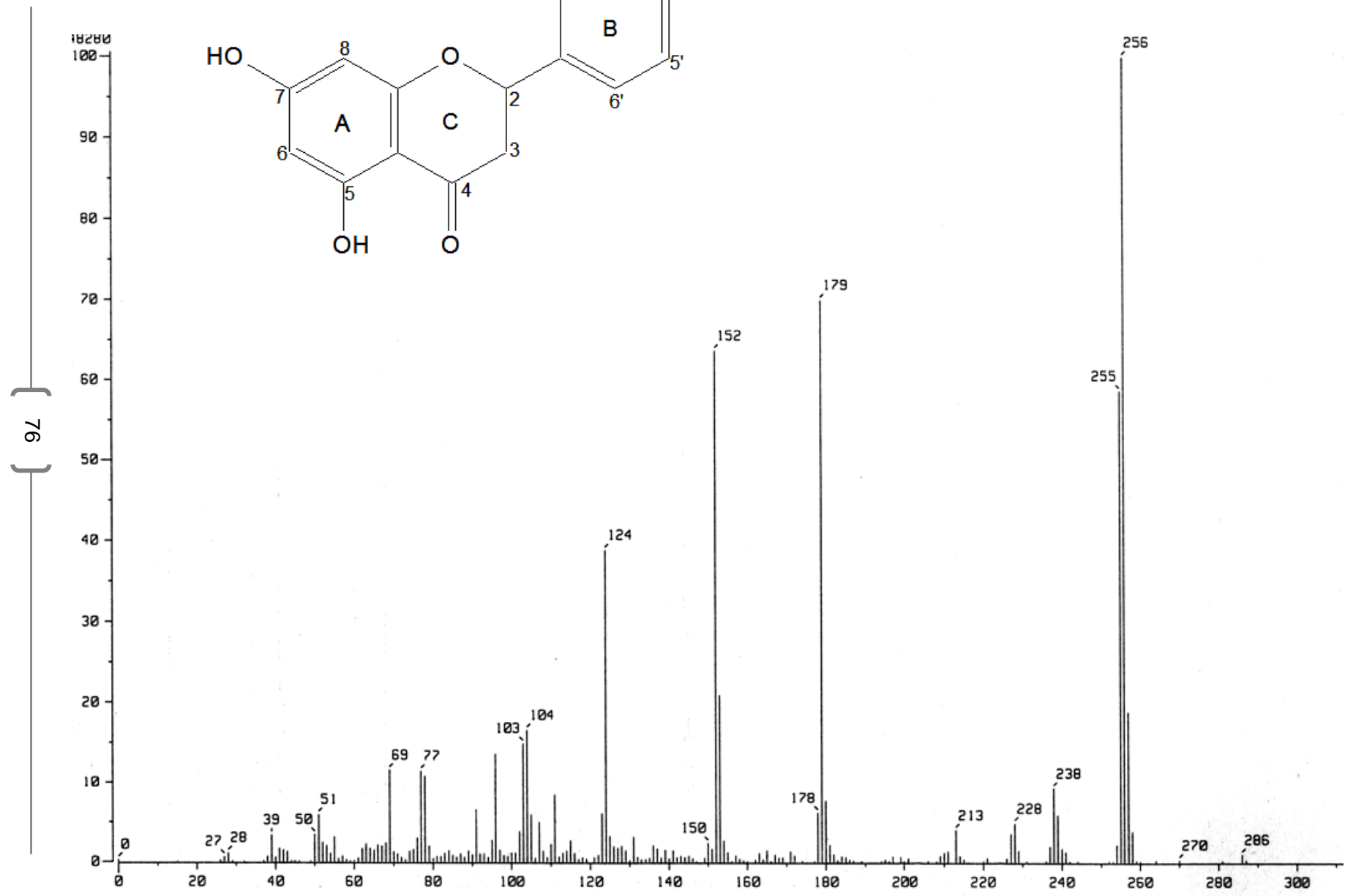
**Espectro 2. H-RMN. Pinocembrina.**



{ 75 }



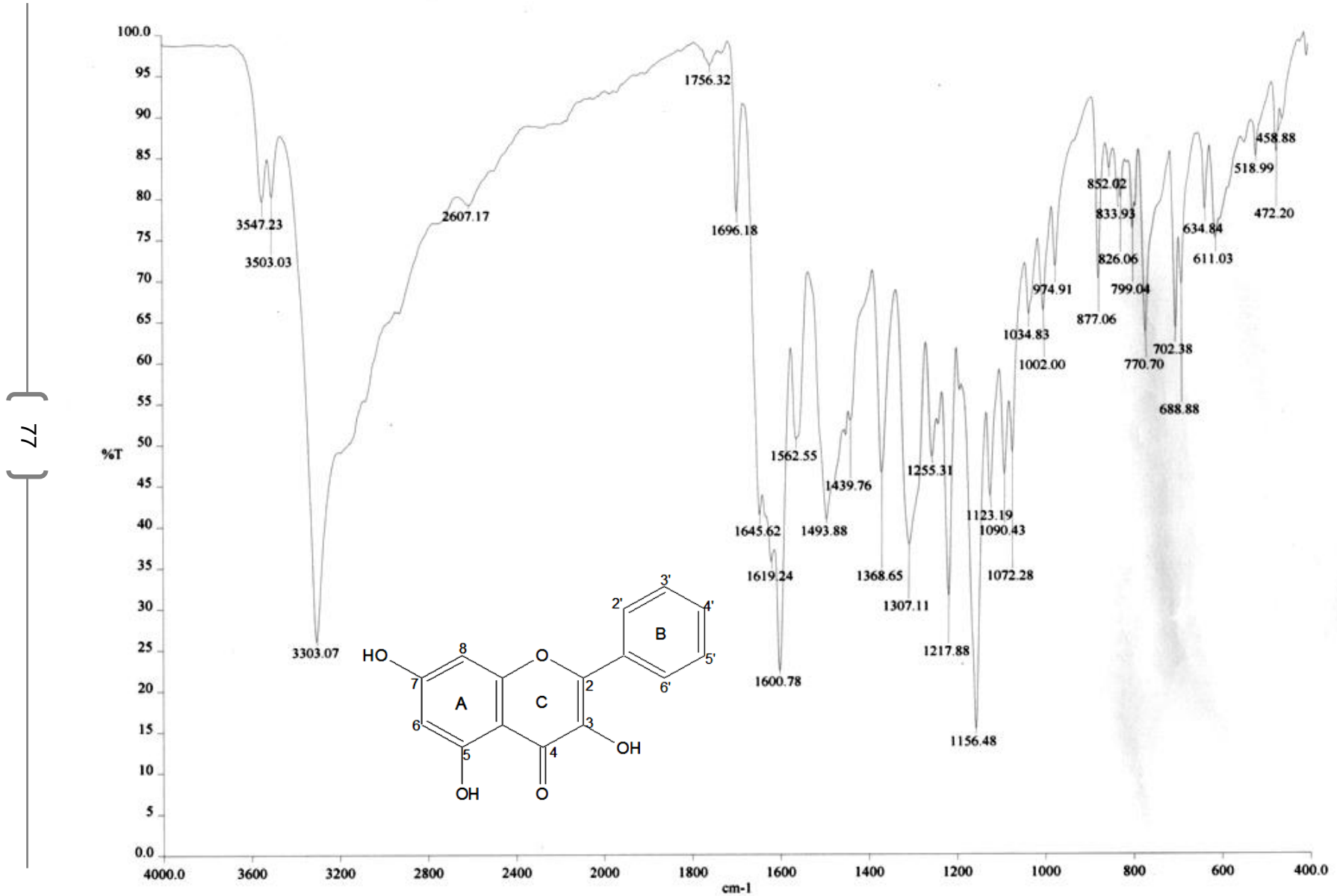
**Espectro 3. C-RMN. Pinocembrina.**



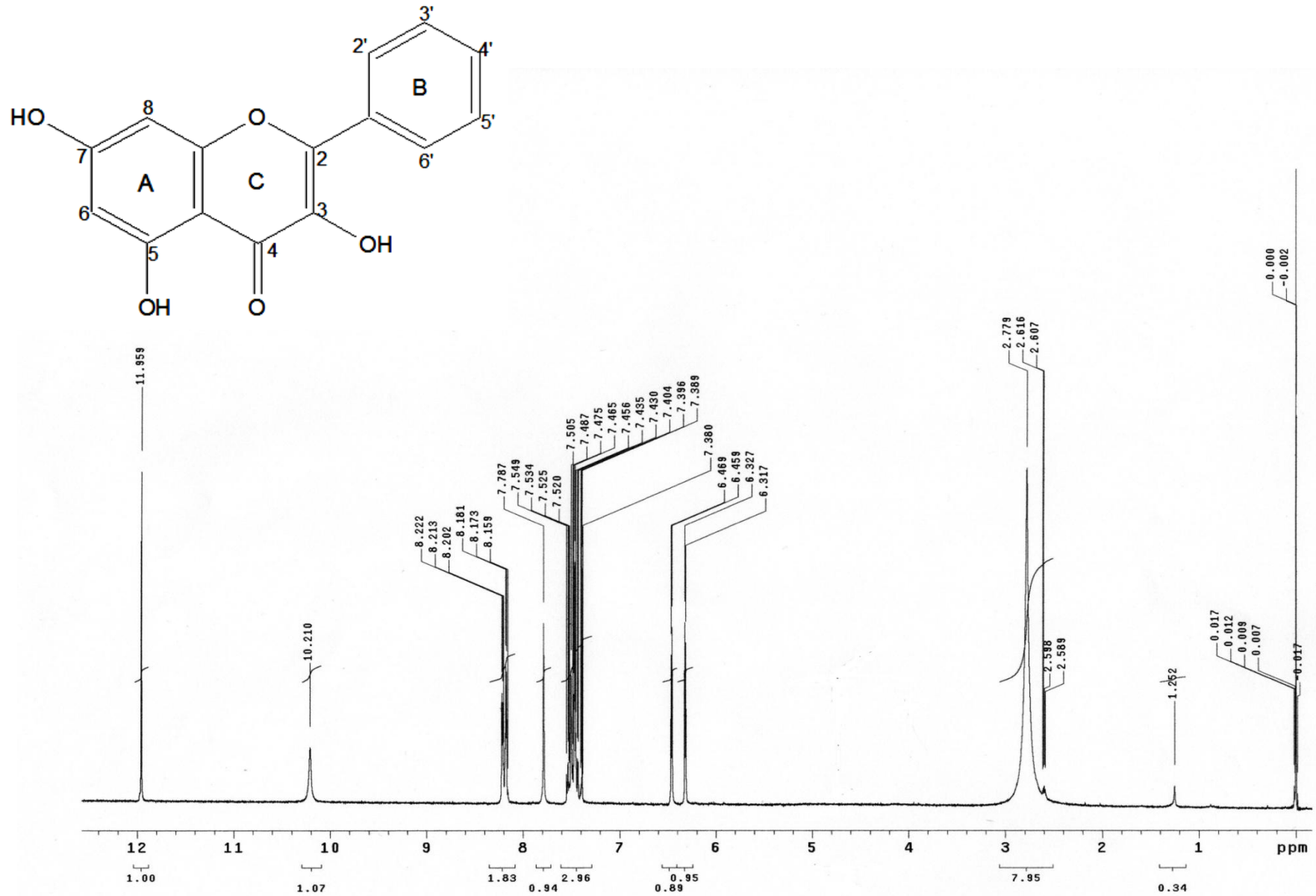
**Spectro 4. EM. Pinocembrina.**

[ 76 ]



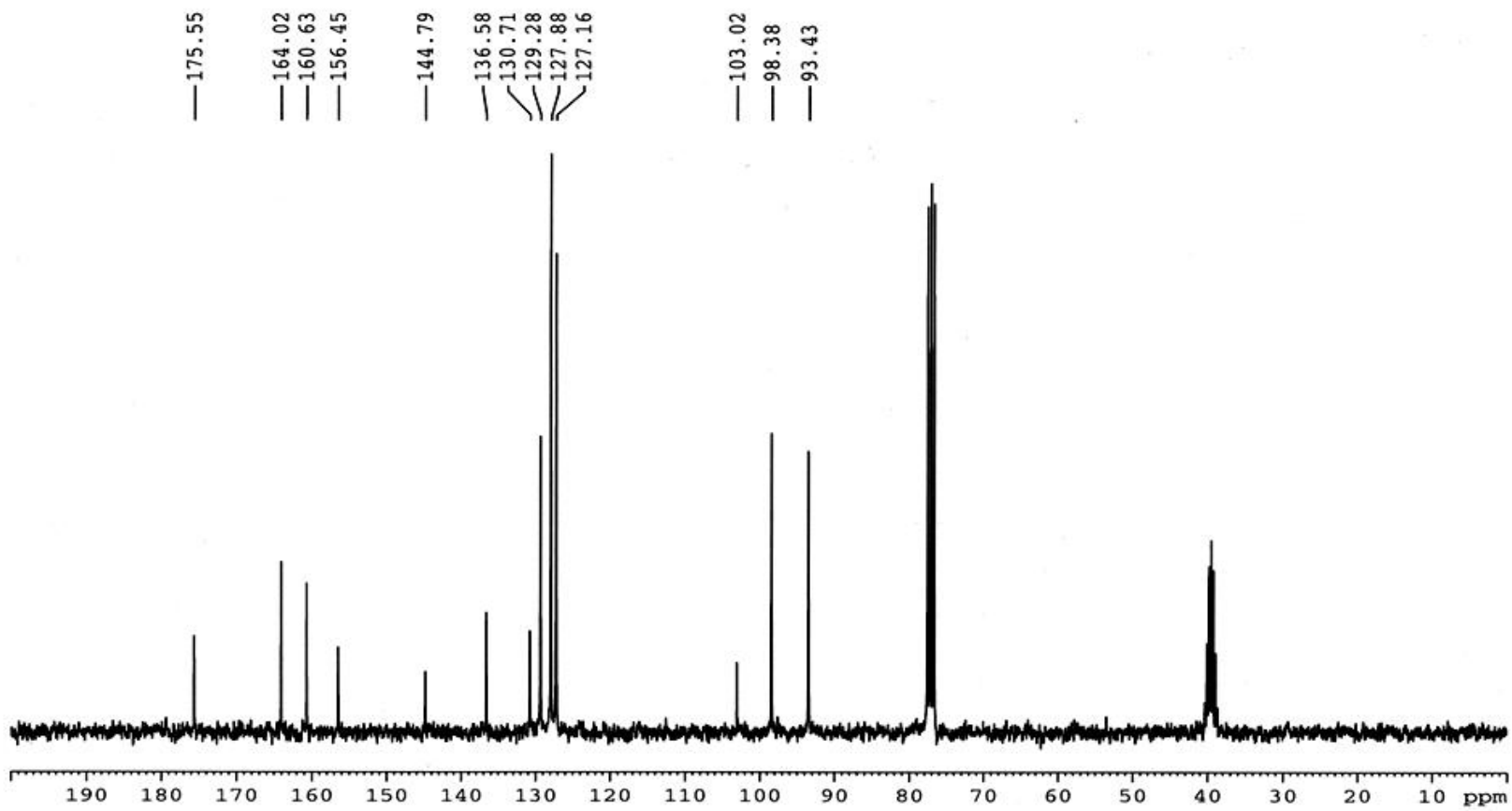
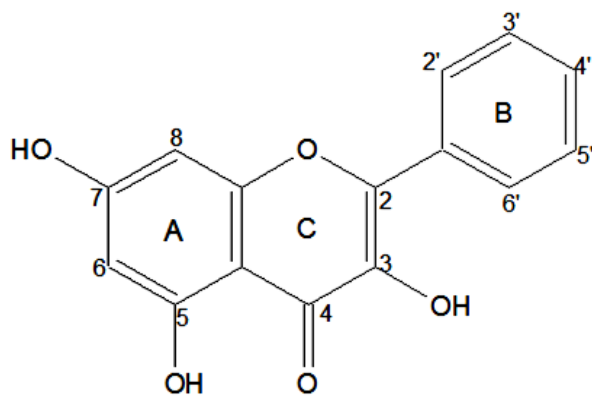


**Espectro 5. IR. Galangina.**



**Spectro 6.  $\text{H}^1$ -RMN. Galangina.**

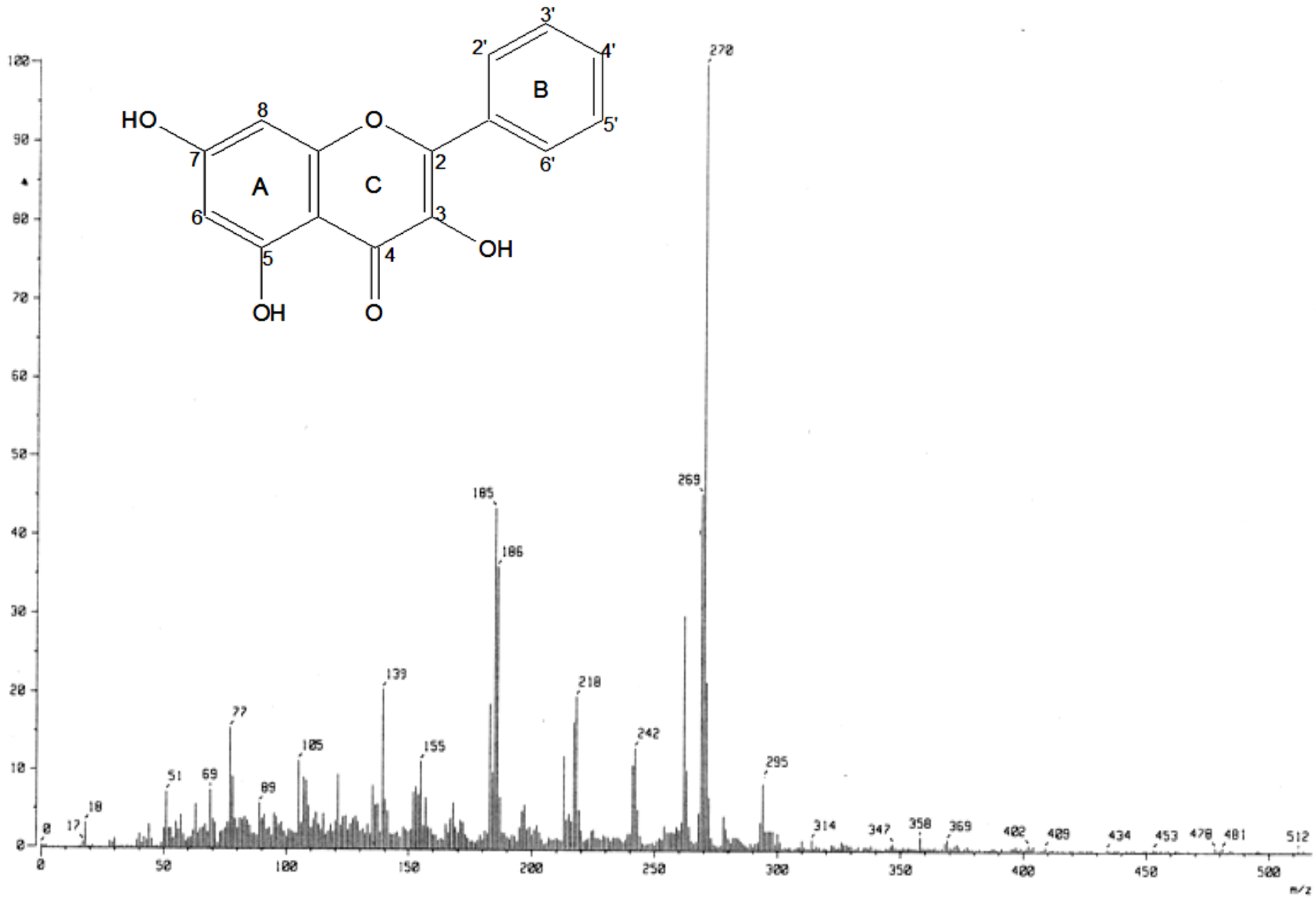




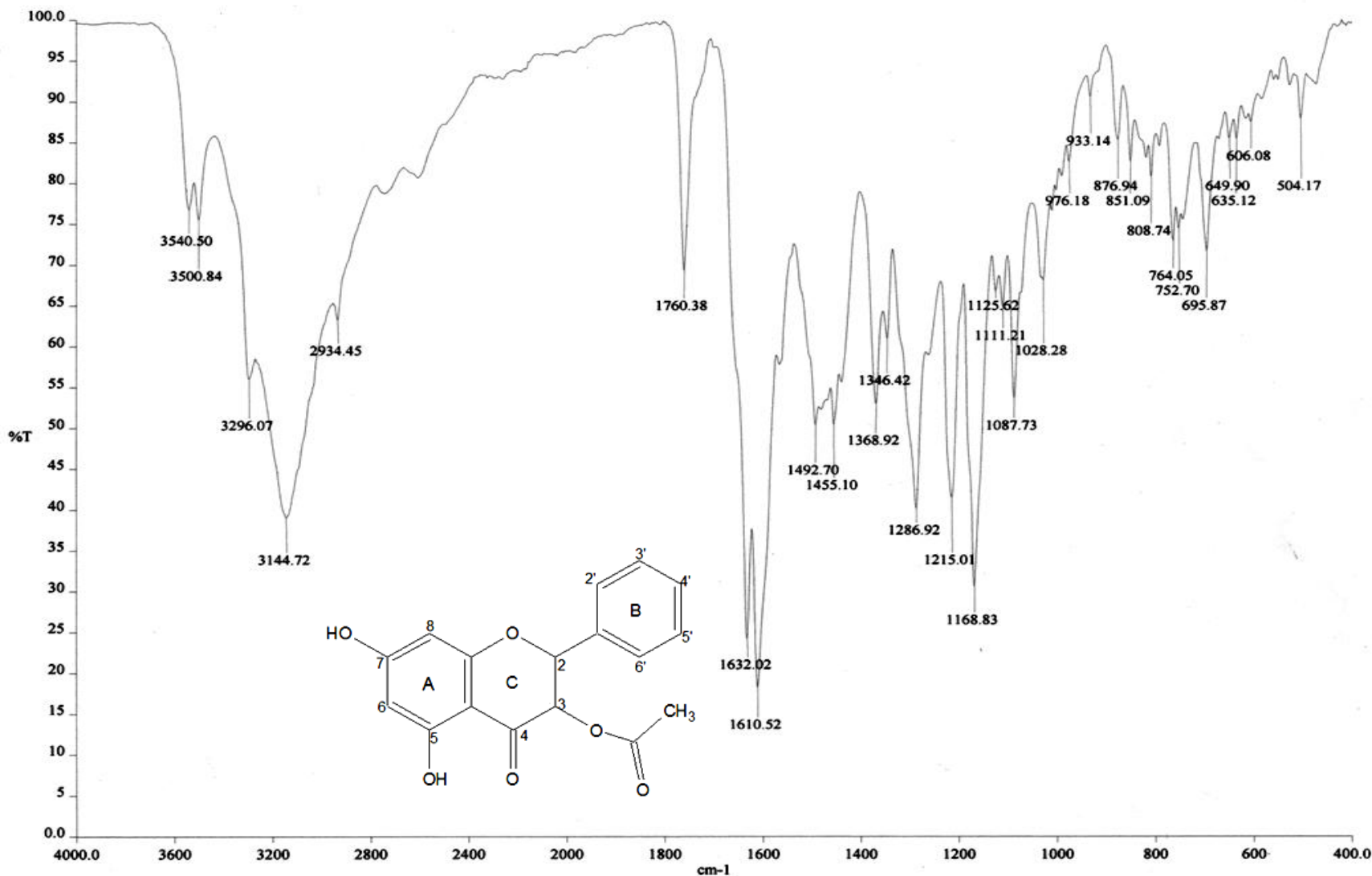
*Espectro 7.  $^{13}\text{C}$ -RMN. Galangina*



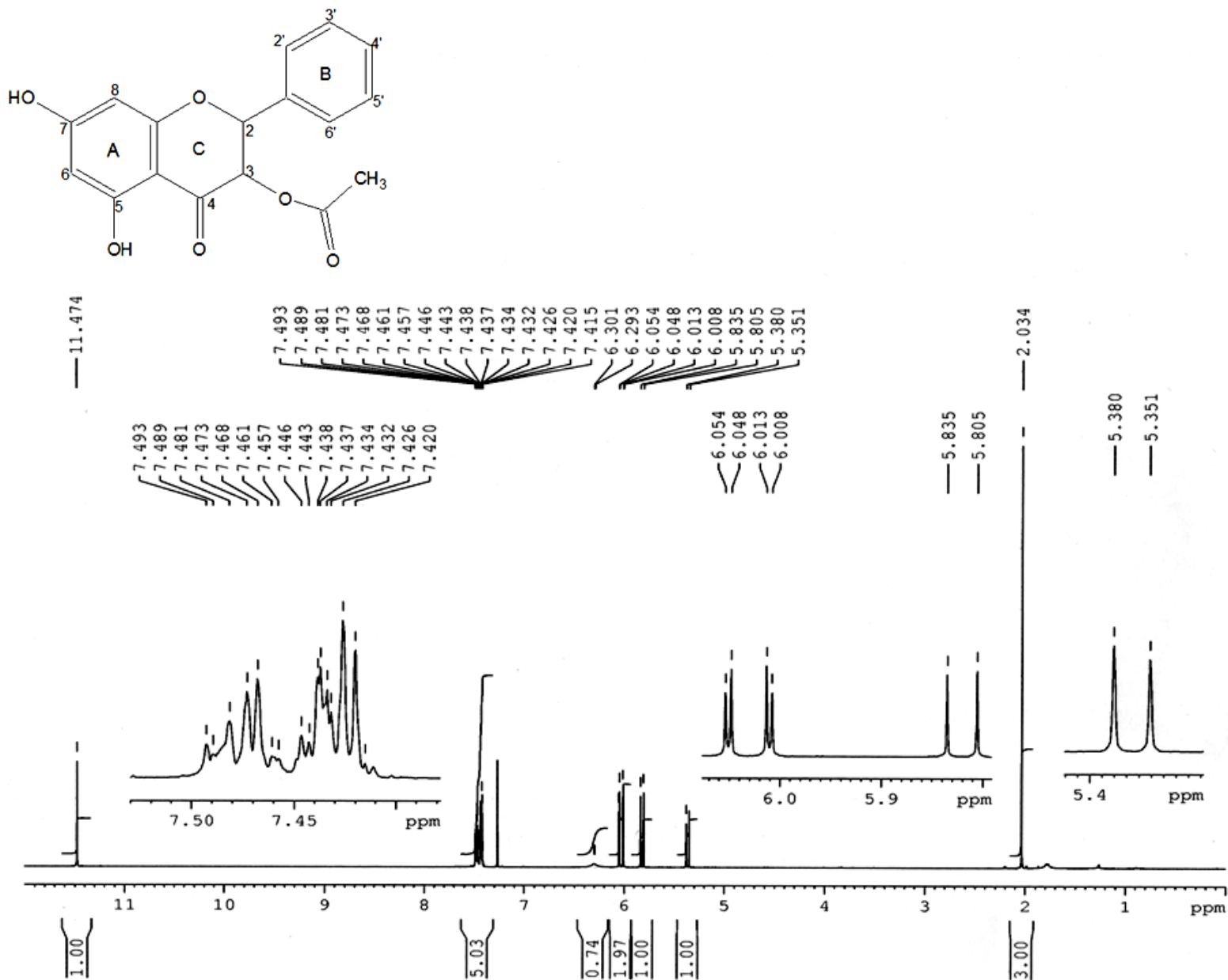
{ 80 }



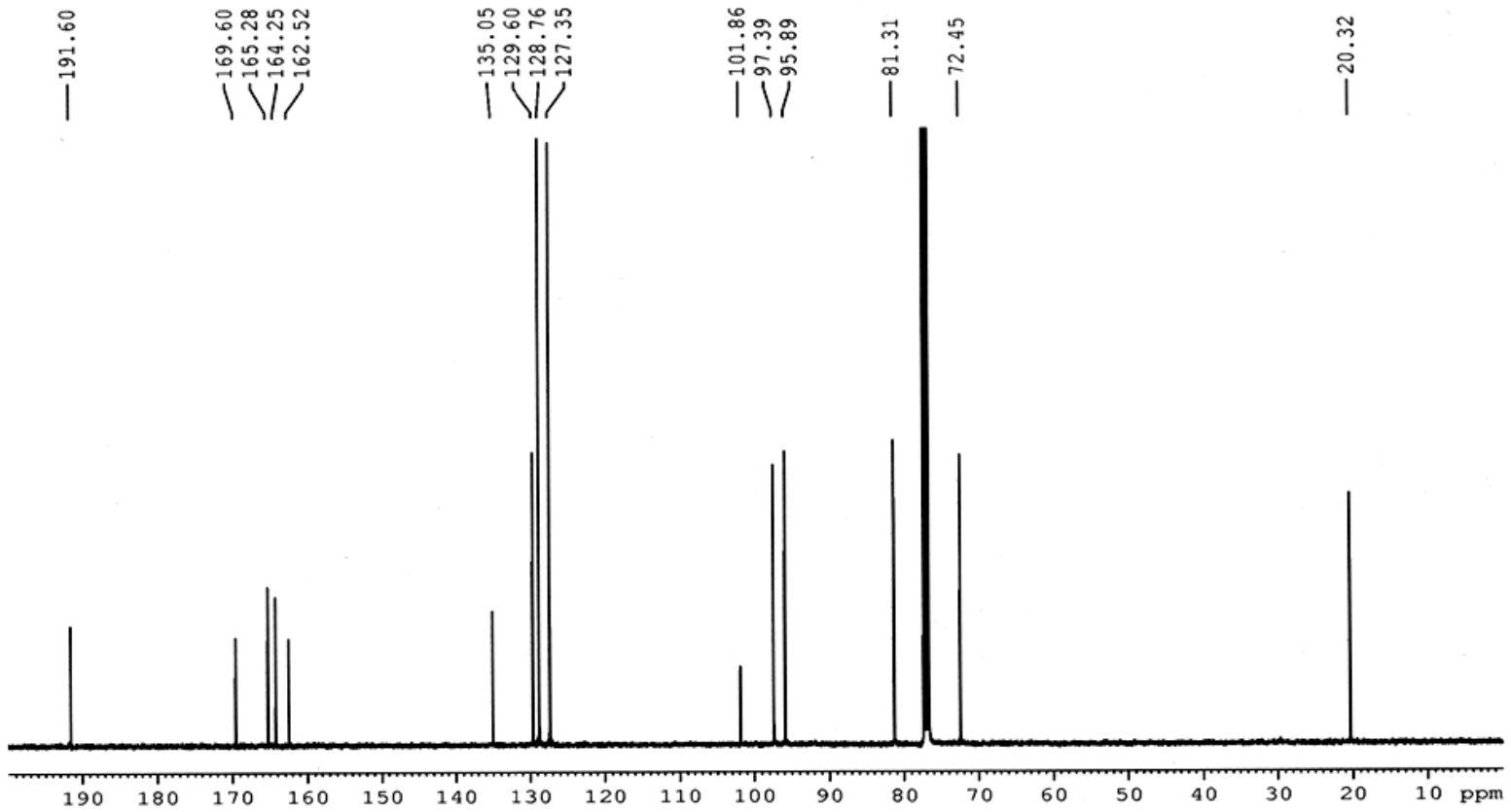
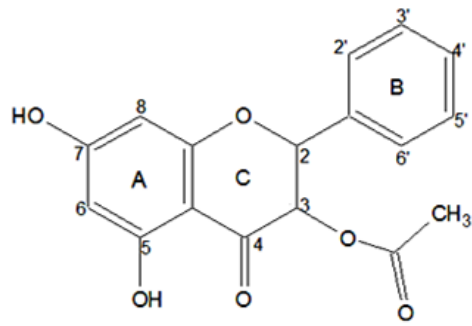
*Espectro 8. EM. Galangina*



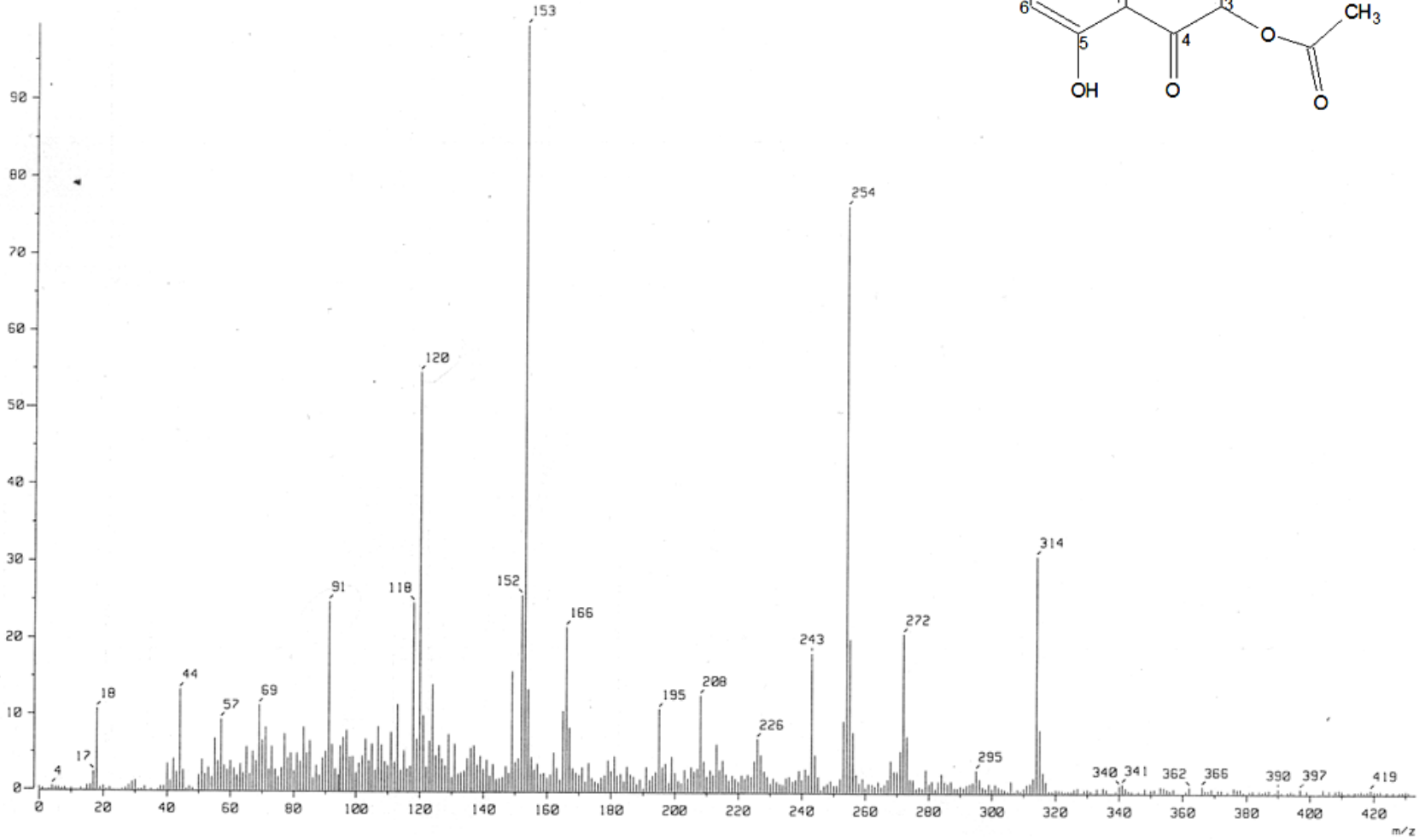
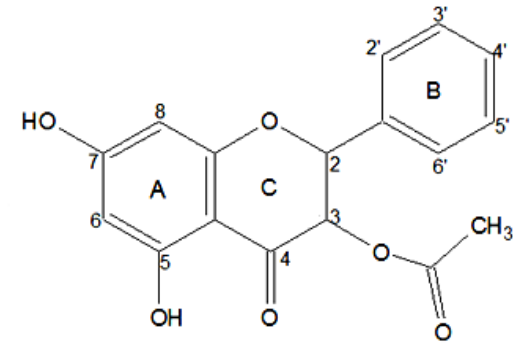
**Espectro 9. IR. 3-AcO-pinobanksina**



Espectro 10. <sup>1</sup>H-RMN. 3-AcO-pinobanksina



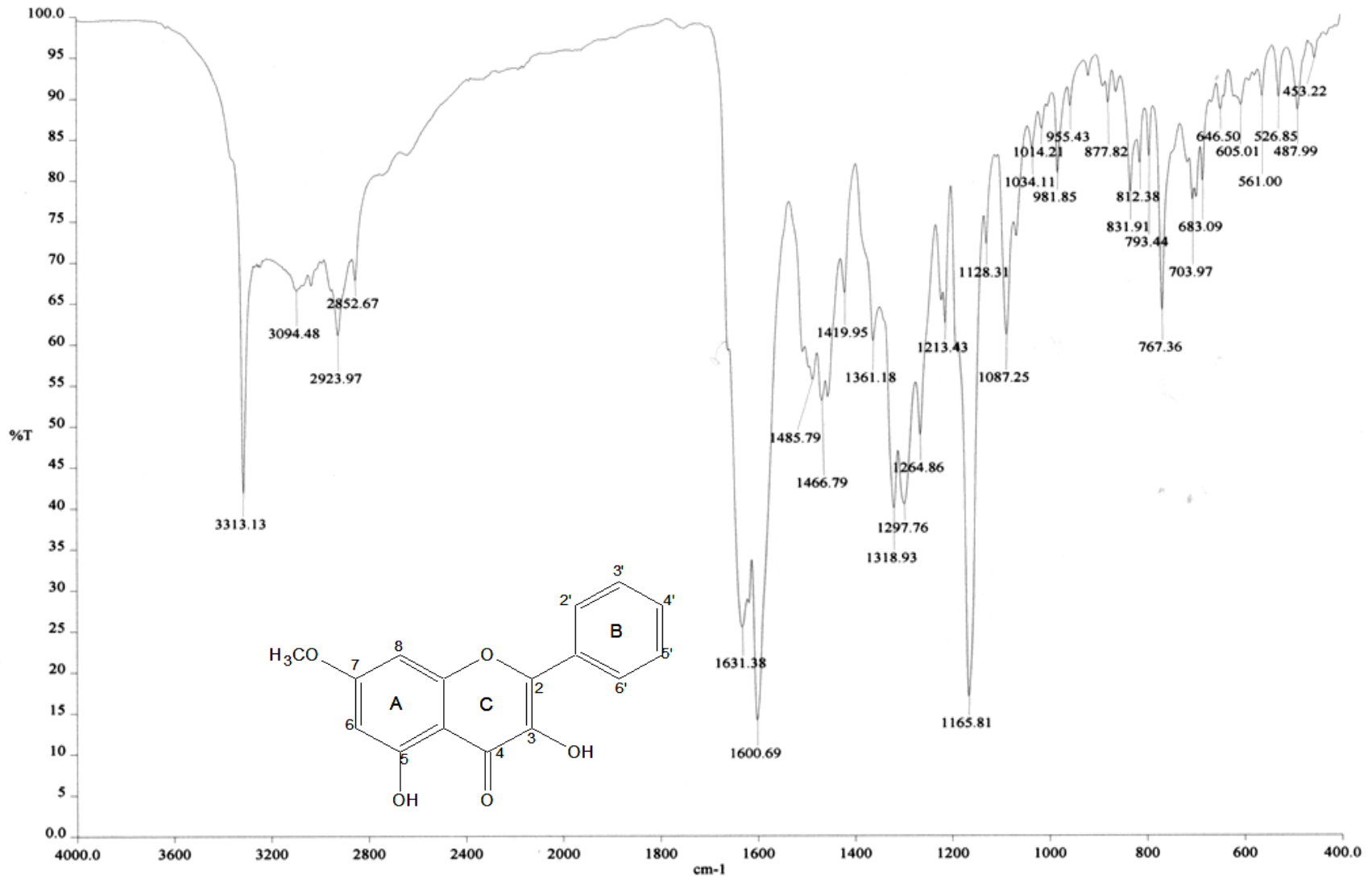
Espectro 11.  $^{12}\text{C}$ -RMN. 3-AcO-pinobanksina



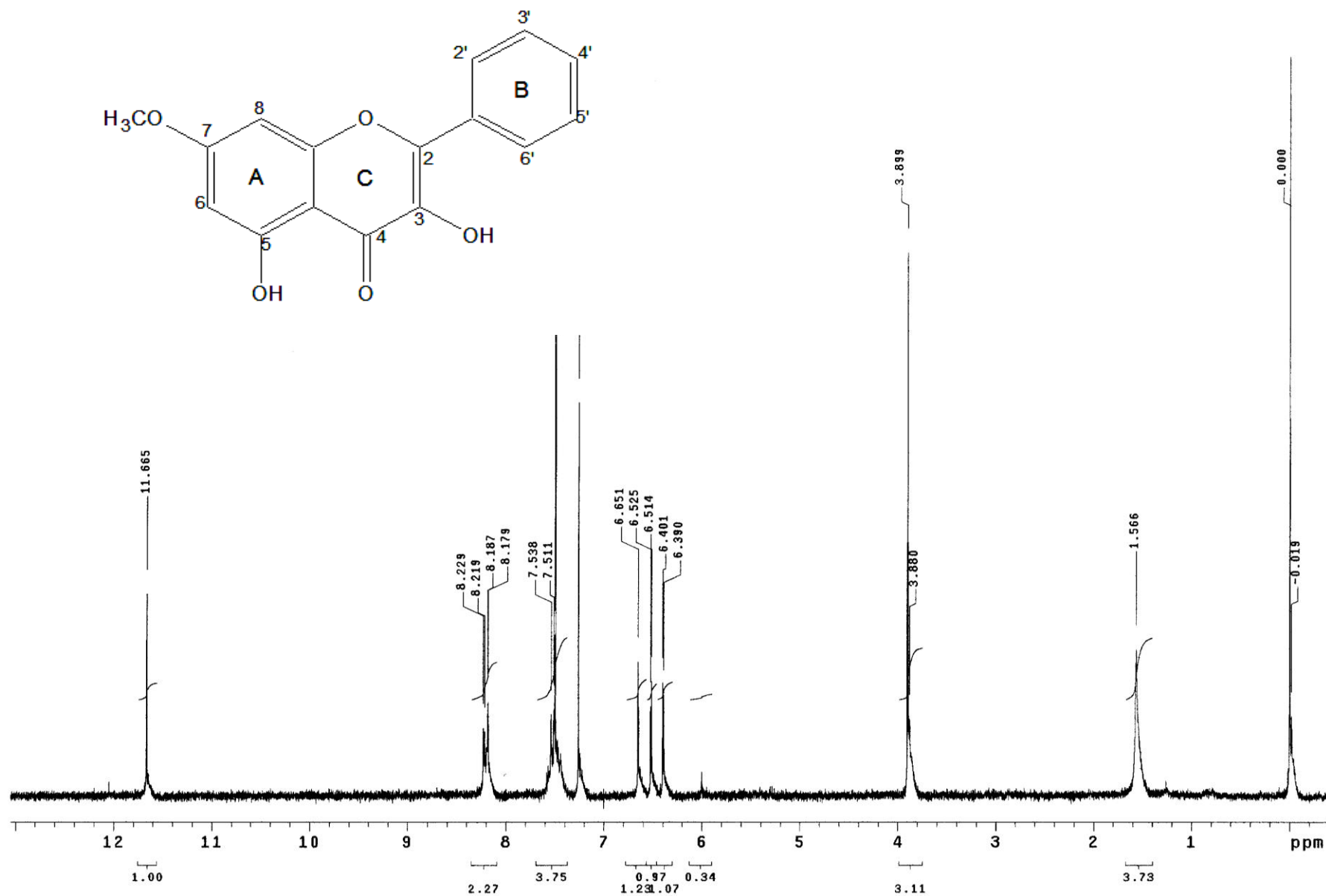
**Espectro 12. EM. 3-Acetoato de pinobanksina**



{ 85 }

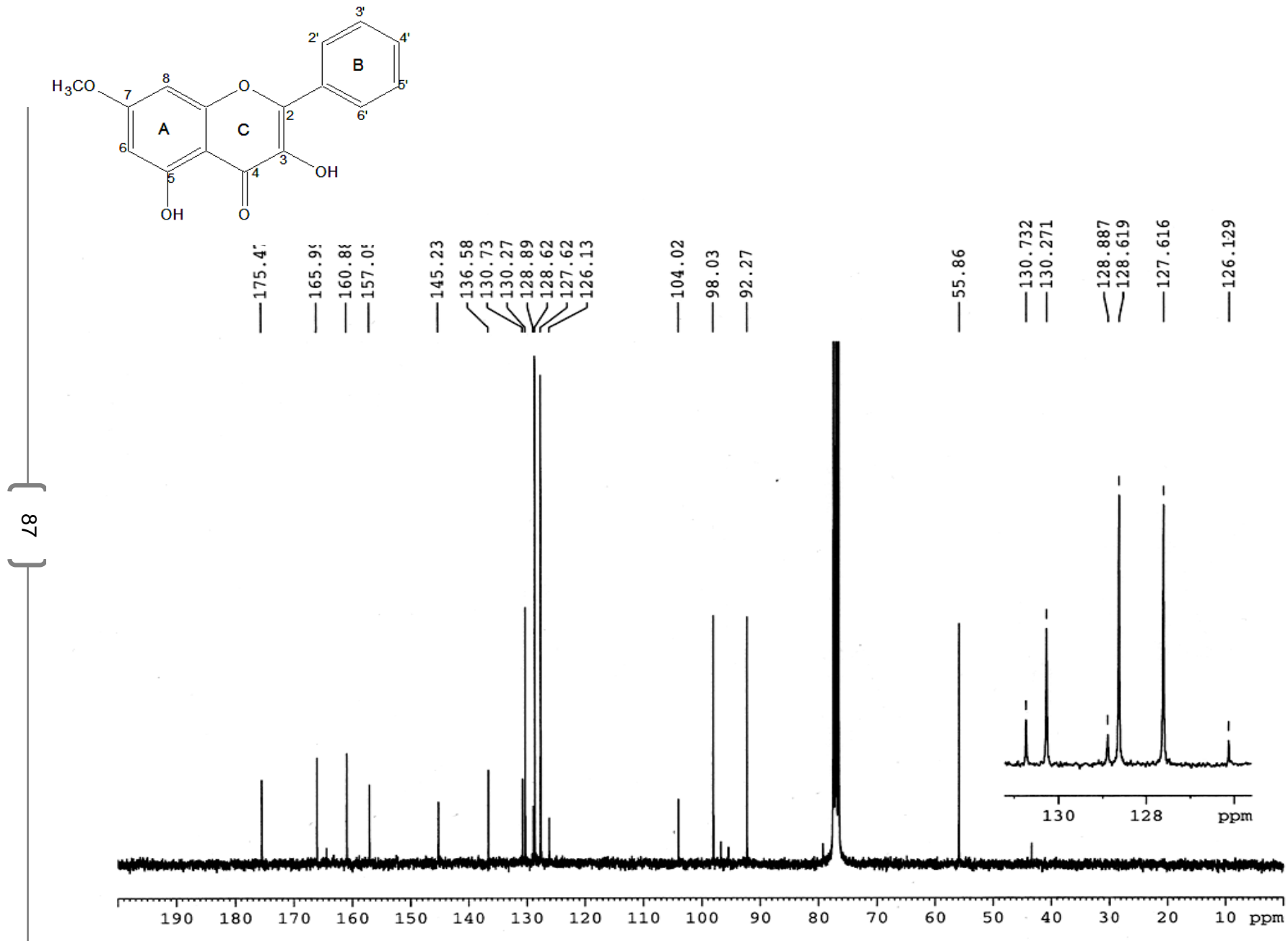


**Espectro 13. IR. Izalpinina.**

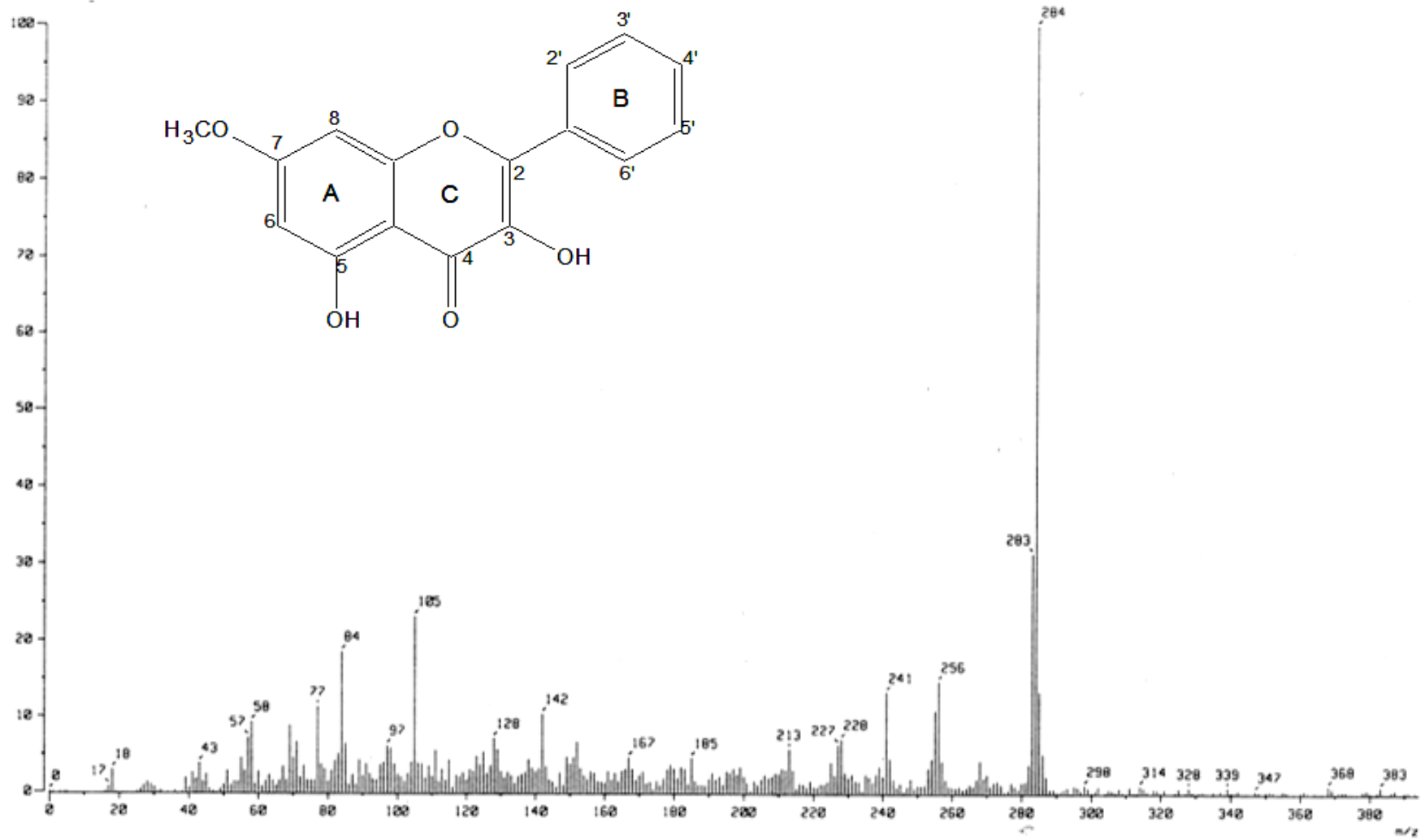


**Espectro 14. <sup>1</sup>H-RMN. Izalpinina.**



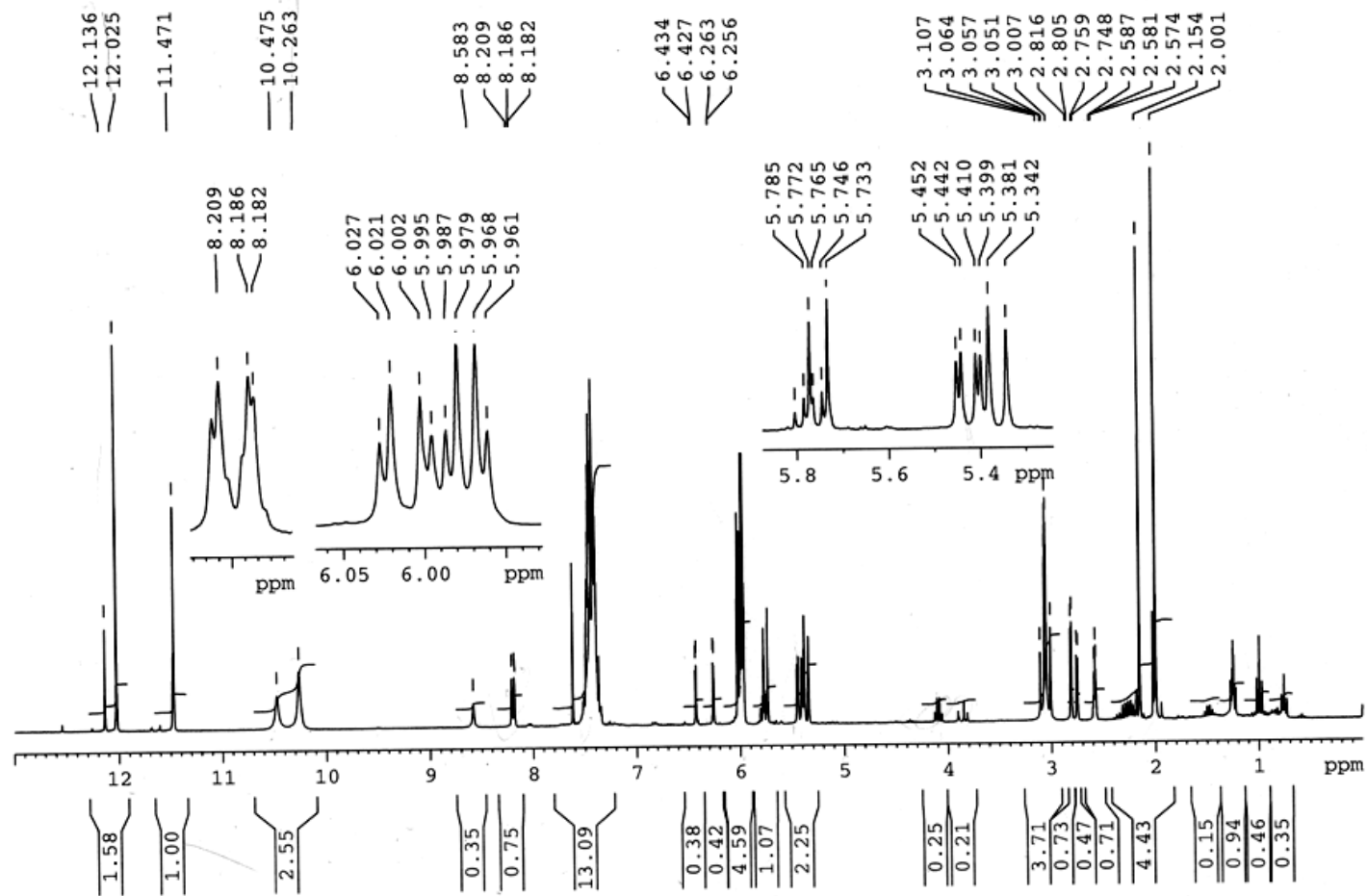


Espectro 15. <sup>13</sup>C-RMN. Izalpinina



**Espectro 16. EM. Izalpinina.**

Instituto de Química UNAM  
 M. en C. J. Cardenas - Olivia  
 Clave: C9F(42-91)  
 No Registro 2216  
 Experimento: 1H  
 Disolvente: CDCl3  
 Bruker-Avance (F) 300 MHz  
 26-09-2012



**Espectro 17. 1H-RMN mezcla C9 F (42-91).**



**8. Referencias bibliográficas**



*Autora: Arminda San Martín*



1. Burdock, G. *Food Chem. Tox.* **1998**, 36, 347-363.
2. Castaldo, S; Capasso, F. *Fitoterapia.* **2002**, 73, 1-6.
3. González, A. & Bernal, R. *Propóleos: Un camino hacia la salud.* 3<sup>era</sup> ed. Ediciones Cuarto Día. México. 1997.
4. Tosi, E.; Ré, E.; Ortega, M.; Cazzoli, A. *Food Chem.* **2007**, 104, 10025-10029.
5. [www.sagarpa.gob](http://www.sagarpa.gob). Panorama apícola. 2008
6. Valencia, D.; Alday, E.; Robles-Zepeda, R.; Garibay-Escobar, A., Galvez-Ruiz, J., Salas-Reyes M., Jiménez-Estrada, M., Velázquez-Contreras, E., Hernández, J., Velázquez C. *Food Chem.* **2011**, 131, 645-651.
7. Pietta, P.; Gardana, C.; A. Pietta. *Fitoterapia.* **2002**, 73, S7-S20.
8. Gómez, A.; Gómez, M.; Arráez, D.; Segura, A.; Fernández A.; J. *Pharm. Biomed. Analys.* **2006**, 41, 220-1234.
9. Volpi, N. & Bergonzini, G. *J. Pharm. Biomed. Analys.* **2006**, 42, 354-361.
10. Sulaiman, M.; Khulood W.; Sammarrae A.; Ad`hiah A.; Zucchetti, M. *Food Chem. Tox.* **2011**, 49, 2415-2421
11. Harborne, J. *The Handbook of Natural Flavonoids.* Vol. 1. Wiley. England. **1999**.
12. Cuyckens F.; Claeys M. *J. Mass Spectrom.* **2004**, 39, 1-15.
13. Mann, J., Davidson, R.S., Hobbs, J.B. *Natural products: their chemistry and biological significance.* Longman. UK. **1994**.
14. Martens, S; Mithöfer, A. *Phytochemistry.* **2005**, 60, 1326-1336.
15. Rice, C. & Packer, L. *Flavonoids in Health and Disease.* Marcel Dekker. New York. **2003**.
16. Andersen, Ø & Markham, K. *Flavonoids. Chemistry, Biochemistry and Applications.* Tylor & Francis. United States of America. **2006**.
17. Escamilla, C., Cuevas, E. & Guevara J. *Rev. Fac. Med. UNAM.* **2009**, 52, 73-75.
18. Sadeghipur, M; Terreux, R.; Phipps, J. *Tox. in Vit.* **2005**. 19. 155-156.
19. Meyer, Veronika R. *Practical High-Performance Liquid Chromatography.* Jhon Wiley & sons. Chichester. **1988**.
20. Pellati, F.; Orlandini, G; Pinetti, D.; Benvenuti, S. *J. Pharma. Biomed. Anal.* **2011**, 55, 934-948.





21. Yang, S.; Peng, L.; Su, X.; Chen, F.; Cheng, Y.; Fan, G.; Pan, S. *Food Chem.* **2010**, *157*, 210-215.
22. Pepeljnjak, S., Kosalec, I. *Microbiol. Lett.* **2004**, *240*, 111-116.
23. Sivakumar, A., Anuradha, C. *Chemico-Biological Interactions.* **2011**, *193*, 141-148.
24. Laskar, R.; Sk, I.; Roy, N.; Begum., N. *Food Chem.* **2009**, *122*, 233-237.
25. Bertelli, D.; Papotti, G.; Bortolotti, L.; Marcazzan G. & Pless. *Phytochem. Anal.* **2011**, *23*, 260-266.
26. Fang, J., Chiung, W. & Cheng, Y. *Phytochemistry.* **1988**, *27*, 1395-1397
27. Gao, M.; Zhang, W.; Liu Q.; Hu, J.; Liu G.; Du, G. *Eu. J. Pharm.* **2007**, *591*, 73-79.
28. Nakanishi, K. Infrared absorption spectroscopy. Practical. Holden-Day, Inc. San Francisco. **1962**.
29. Ching, A.; Wah, T.; Sukari, M.; Lian, G.; Rahmani, M. & Khalid, K. *Mal. J. Anal. Sci.* **2007**, *11*, 154-159.
30. Simon, W. Elucidación Estructural de Compuestos orgánicos por Métodos Espectroscópicos. Tomo I. Alhambra. Madrid, **1977**.
31. Breitmaier, E.; Voelter W. *Carbon-13- NMR Spectroscopy. High resolution methods and Applications in Organic Chemistry and Biochemistry.* VCH. New York. **1990**.
32. Gardana, C., Scaglianti, M., Pietta, P. & Simoneti, P. *Pharm. Biomed. Anal.* **2007**, *45*, 390-399.
33. Kumar, J. & Mandal. M. J. *Biomed. Biotech.* **2009**, 1-11.
34. Field, L.D., Sternhell, S., Kalman, J.R. Organic Structures from Spectra. Gran Bretaña. Wiley. **2008**.
35. Wade, L. Química Orgánica. Madrid. Pearson Education. **2004**.
36. Silverstein, R.M., Webster, F.X., Kiemle, D.J. Spectrometric identification of Organic Compounds. United States of America. **2005**.
37. Han, M.; Lee, K.; Kim, Y.; Kim, J.; Ryul, K. & Yun, B. *J. Kor. Soc. App. Biol. Chem.* **2010**, *53*, 512-515.
38. Neacsu, M.; Eklund, P.; Sjöholm, R.; Pietarinen, S; Ahotupa, M.; Holmbom B. & Willför, S. *Eu. J. Wood and wood prod.* **2007**, *65*, 1-6.



39. Asakawa, Y. *The. Bull. Chem. Soc. J.* **1971**, *44*, 2761-2766.
40. Lambert, J.; Shurvell, H.; Lightner, D. & Cooks, R. *Organic Structural Spectroscopy*. Prentice-Hall. US. **2001**..
41. Jeong, Y. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **2005**, *34*, 162-166.
42. Budzikiewicz, H. *Structure Elucidation of Natural Products by Mass Spectrometry*. Vol. II. Steroids, terpenoids, sugars and miscellaneous classes. Holden-Day Inc. California, US. **1964**.
43. Wollenweber, E. *Phytochemistry*. **1972**. Vol. II. 425.