

UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN
NICOLÁS DE HIDALGO

FACULTAD DE QUÍMICO FARMACO-
BIOLOGÍA

“EUPALINA Y EUPATOLINA DE *Ageratina brevipes* (DC.) King & Rob”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUÍMICO FARMACO-BIÓLOGO

PRESENTA:

BENJAMIN SILVA SÁNCHEZ

ASESOR DE TESIS

D.C. ROSA ELVA NORMA DEL RÍO TORRES

MORELIA MICHOACÁN, JUNIO 2009

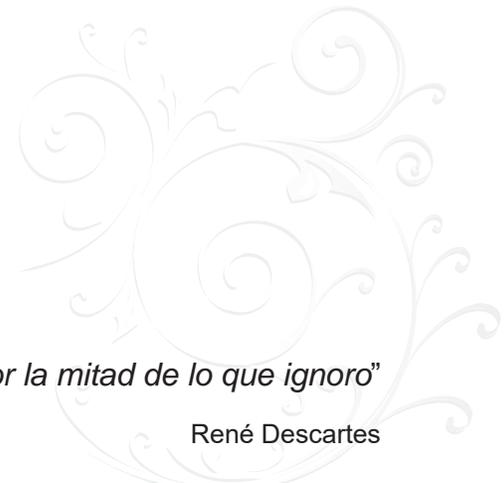


Dedicatoria:

*A mis padres, por su
confianza, comprensión
y apoyo durante todo
este tiempo.*

“Daría todo lo que sé, por la mitad de lo que ignoro”

René Descartes

Una decoración floral elegante y sutil en la parte inferior derecha de la página, con volutas y líneas curvas que se entrelazan.



AGRADECIMIENTOS

A **Dios** por la vida, por el camino recorrido, por la fuerza y perseverancia que nos infunde cada día para seguir adelante.

A mis padres: **Maximiliano Silva Zamudio** y **Lucila Sánchez Vargas**, por qué cada uno buscó lo mejor para mí, aun que no siempre lo mire de esa forma, por qué cultivaron en mí valores y principios, por sus sacrificios, consejos, apoyo moral y económico que me permitió llegar a esta parte de mi camino. Por eso y más Gracias!...

A mis hermanos **José, Saray** y **Miguel**, por la convivencia, su apoyo, confianza, su paciencia y solidaridad, que indirectamente o directamente me ayudaron a redoblar esfuerzos cuando las cosas no eran como se esperaba, pero que con trabajo arduo siempre se pueden mejorar.

A mis compañeros y amigos de la facultad que con sus gratos momentos amenizaron cada día, mostrando siempre que es posible sonreír incluso en el día más nublado. A una persona en especial que siempre estuvo caminando junto a mí brindándome apoyo y amistad gracias **Mariela**.

A mis compañeros y amigos del laboratorio que con su convivencia aprendimos juntos cosas nuevas, cometimos errores y nos reímos de los ellos, a ellos gracias por su amistad.



A mi asesora de tesis **Dra. Rosa Elva Norma del Río Torres**. No hay palabras para agradecer el valor del tiempo, su paciencia, motivación y ayuda incondicional en el desarrollo de este trabajo, por sus consejos y el invaluable conocimiento que compartió conmigo, por su amistad y confianza.



Al **Dr. Jerzy Rzendowski** del Instituto de Ecología A.C. en Pátzcuaro, Mich. por la clasificación de la planta.

Al **Dr. Pedro Joseph Nathan** y al **Dr. Carlos M. Cerda García-Rojas** del departamento de Química del CINVESTAV por las facilidades otorgadas en la determinación de espectros de UV e IR y rotación óptica. Y Por su apoyo con el estímulo económico otorgado agradezco al *Dr. Pedro Joseph Nathan*.

A la **Q.F.B Verónica Reyes Olivares** del departamento de Química del CINVESTAV por la determinación de los espectros de UV e I R, así como su amistad, consejos y conocimiento compartido.

A la **Q.F.B. Concepción Armenta Salinas** del IIQB de la UMSNH por los espectros de RMN a 400 MHz.

A los Q.F.B. **Gerardo Morán López** e **Isaías Tapia Quintero** del IIQB del UMSNH por sus enseñanzas, consejos y técnicas de laboratorio que han compartido.

A mis sinodales **D.C. Consuelo Cortez Penagos**, **D.C. Judit A. Aviña Verduzco** y la **D.C. Luisa Urania Roman Marín**, por su participación y valiosas correcciones del presente trabajo. A la *Dra. Consuelo Cortez Penagos* por haber sido mi tutora durante la carrera, por su compromiso, su ayuda y motivación para una superación constante.

A **BEC@NET SUPERIOR** por su apoyo económico en la modalidad de Beca de titulación 2008-2009 bajo la referencia **SXUSU0S31382**



ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	
2.1 LOS FLAVONOIDES	3
2.1.1 Estructura química	4
2.1.2 Distribución	7
2.1.3 Propiedades físicas	8
2.1.4 Biogénesis	8
2.1.5 Síntesis de flavonoides	10
A) Método de Von Kostanecki	10
B) Método de Baker- Venkataraman	11
C) Síntesis de flavonas de Ganguly	12
D) Reacción de Allan-Robinson	13
E) Otras síntesis de flavonoides	14
F) Síntesis de chalconas mediante reacciones de acoplamiento de Suzuki	16
2.1.6 Actividad biológica de los flavonoides	17
Actividad anticancerígena	18
Actividad antioxidante	21
Actividad sobre el sistema cardiovascular	23
2.1.7 Flavonoides en el Género <i>Eupatorium</i>	25
2.2 <i>Ageratina brevipes</i> (DC.) King & Rob	28



3. OJETIVO	30
4. DISCUSIÓN Y RESULTADOS	31
4.1 DETERMINACIÓN DEL ACETATO DE EUPALINA	35
4.2 DETERMINACIÓN DEL ACETATO DE EUPATOLINA	43
4.3 PREPARACIÓN DE DERIVADOS DE LAS FLAVONAS	
4.3.1 Hidrólisis de las flavonas	46
4.3.2 Acetilación de la eupalitina y la eupatolitina	50
5. PARTE EXPERIMENTAL	53
5.1 AISLAMIENTO DE LA EUPALINA Y EUPATOLINA	
5.1.1. Obtención de los extractos de hoja y flores de <i>A. brevipes</i>	54
5.1.2. Cromatografía de las flavonas del extracto metanólico	55
5.2 PERACETILACIÓN DEL EXTRACTO METANÓLICO	56
5.2.1 Cromatografía de las flavonas peracetiladas	58
5.3 REACCIÓN DE HIDRÓLISIS DE LAS FLAVONAS	60
5.4 PERACETILACIÓN DE LAS AGLICONAS	61
5.5 ANÁLISIS ESPECTRAL UV	62
6. CONCLUSIONES	63



El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Química de Productos Naturales del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo bajo la asesoría de la D.C. Rosa Elva Norma del Río Torres.

Con apoyo económico por parte de:

Proyecto PROMEP PTC 117: "Aislamiento, purificación e identificación de principios activos en plantas medicinales de Michoacán".

Proyecto 2.32 CORDINACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN CIENTIFICA DE LA UMSNH: "Búsqueda de nuevos productos naturales con actividad biológica en especies de los Géneros *Eupatorium* y *Ageratina*".



1. INTRODUCCIÓN

Las plantas han tenido un papel muy importante a largo del desarrollo de la historia del hombre, nuestros antepasados no necesitaban ser expertos botánicos para advertir y valorar la notable fortaleza y la diversidad del mundo vegetal. La necesidad los convirtió en agudos observadores de la flora que les proporcionaba alimento, vestido y remedios para su bienestar.

En el trascurso del tiempo el hombre fue acumulando un extenso conocimiento sobre el uso tradicional de las plantas medicinales, un claro ejemplo de esto fueron los aztecas, que no solo se limitaban al uso simple de estas, si no que tenían formulaciones que llegaron a ser verdaderas especialidades que mostraban sus adelantos en el arte de curar, desarrollaron también una clasificación de las plantas similar a la usada por los europeos, pero todo este conocimiento fue primero olvidado y en gran parte perdido durante la conquista, tachándose inclusive de brujería y expulsada del cuerpo de conocimientos aceptables.¹

Con el tiempo ha nacido la inquietud de determinar qué es lo que le da a las plantas la propiedad de curar al organismo, qué es lo que la hace tóxica, qué le da el color y sobre todo como se producen éstos.

Los propósitos de la ciencia actual llevan a la transformación del conocimiento tradicional en científico, los hábitos y costumbres en terapias comprobadas y los preparados, remedios, infusiones y conocimientos tradicionales en suplementos nutricionales y productos farmacéuticos.

¹ Márquez Alonso C.; Lara Ochoa F.; Esquivel Rodríguez B.; Mata Essayag R., "PLANTAS MEDICINALES DE MÉXICO II. COMPOSICIÓN, USOS Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA", Universidad Nacional Autónoma de México, Méx 1999.



Las plantas han provisto muchos fármacos durante el paso del tiempo y son una fuente potencial de agentes terapéuticos novedosos. A pesar de las técnicas analíticas disponibles, la mayoría de las especies de plantas no han sido investigadas química o biológicamente a detalle y aún las plantas conocidas requieren estudios clínicos adicionales.²

Como se sabe los vegetales mediante el proceso de la fotosíntesis producen las sustancias necesarias para llevar a cabo su ciclo vital, mediante complejos y cada vez más conocidos mecanismos bioquímicos, que constituyen verdaderas fábricas de carbohidratos, proteínas, grasas, vitaminas y oligoelementos (como hierro y magnesio), denominados *Metabolitos primarios*, dado que estos se encuentran en todas las formas de vida y cumplen funciones básicas para la misma.

Solo a ciertas familias de compuestos como los alcaloides, saponinas esteroides, aceites esenciales, terpenoides, flavonoides, entre otros, se les denomina *Metabolitos secundarios*, que solo son producidos por un género o especie en cantidades relativamente pequeñas y sus funciones varían de acuerdo a su entorno, algunos sirven para atraer polinizadores, ahuyentar o matar parásitos, prevenir enfermedades infecciosas, confiriéndoles así a una especie o género una ventaja competitiva.³

El género *Eupatorium* pertenece a la tribu Eupatorieae y comprende cerca de 1200 especies distribuidas en las regiones tropicales de América, Europa, África y Asia. Muchas de las plantas pertenecientes a este género son usadas en la medicina tradicional.⁴ El presente trabajo se enfoca al estudio de *Ageratina brevipes*, la cual pertenece a este género.

² Phillipson JD., *Planta Med.* **69**,491-495 (2003).

³ Dewick PM., "MEDICINAL NATURAL PRODUCTS A BIOSYNTHETIC APPROACH", John Wiley & Sons, 1997.

⁴ Zhang M-L.; Wu M.; Zhang J-J.; Irwin D.; Gu Y-C.; Shi Q-W. *Chemistry & Biodiversity.* **5.** 2008



2. ANTECEDENTES

2.1 LOS FLAVONOIDES

Los flavonoides constituyen una de las subclases de polifenoles más grande y abundante del mundo vegetal, generadas por el metabolismo secundario de la ruta biosintética mixta (ruta del ácido shiquímico y la ruta de los acetatos). Se les denominaron así ya que los primeros aislados tenían un color amarillo (del latín *flavus* “amarillo”), pero en la actualidad se han encontrado flavonoides de colores rojos, violetas y azules.

Se distribuyen ampliamente entre los vegetales superiores (plantas que producen flor y semilla). Se encuentran en frutas, verduras (Fig. 1), semillas y flores, en la cerveza, el vino, té verde, té negro y la soya, los cuales son consumidos en la dieta humana de forma habitual o como suplementos nutricionales.⁵



Figura 1. Flavonoides en frutas y vegetales.

⁵ Martínez-Flóres S.; González-Gallego J.; Culebras J.M.; Tuñón M.J., *Nutr. Hosp.* **17**, 271-278 (2002).



Desempeñan un papel importante en la biología vegetal respondiendo a la luz y controlando los niveles de las auxinas reguladoras del crecimiento y diferenciación de las plantas, son los responsables de la coloración de flores, frutos y hojas, intervienen en la polinización atrayendo insectos, algunos tienen actividad fungicida y bactericida y tienen la capacidad de fijar metales como el hierro y el cobre.⁶ Por este motivo sus propiedades biológicas se han hecho notar en los insecticidas, siendo así uno de los grupos más estudiados.

2.1.1 Estructura química

Los flavonoides son compuestos fenólicos di-aril-propánicos, es decir su estructura básica es de tipo C₆-C₃-C₆ (Fig. 2), con dos anillos aromáticos unidos entre sí por una cadena de 3 carbonos ciclada a través de un oxígeno. Se considera que su estructura deriva de la γ -cromona (benzo- γ -pirona) con un fenilo en posición 2, así pues son 2-fenil- γ -cromonas.⁷

De los tres anillos, el A (formado por 4a, 5, 6, 7, 8, 8a) se biosintetiza a través de la ruta de los policétidos y el B (formado por 1', 2'... 6') y la unidad C₃ proceden de la ruta del ácido shiquímico, que puede o no formar un tercer anillo pirano o pirona, anillo C (1, 2, 3, 4).⁸

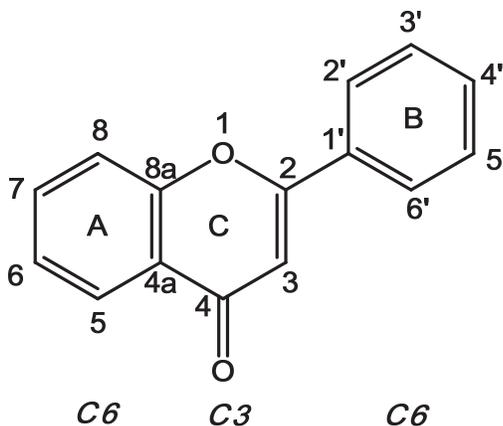


Figura 2. Estructura básica de la 2-fenil- γ -cromona.

⁶ Formica J V.; Regelson W., *Food Chem Toxicol.* **33**, 1061-1080 (1995).

⁷ Carretero-Accame M.E., *Panorama Actual Med.* **24**. 525-528 (2000).

⁸ López-Luengo M.T., *Offarm*, **21**. 108-114 (2002).



La mayoría de los flavonoides poseen nombres triviales con la terminación OL o INA, sin embargo esta clase de nombres no son muy útiles cuando se requiere información sistemática de estas sustancias, por lo cual se ha convenido llamarlos con nombres que representen la estructura química.

Así, la flavona Acacetina le corresponde el nombre de 5,7-dihidroxi-4'-metoxiflavona, y la Quercetina el nombre de 5,7,3',4'-tetrahidroxi flavonol (Fig. 3), y así los demás flavonoides.

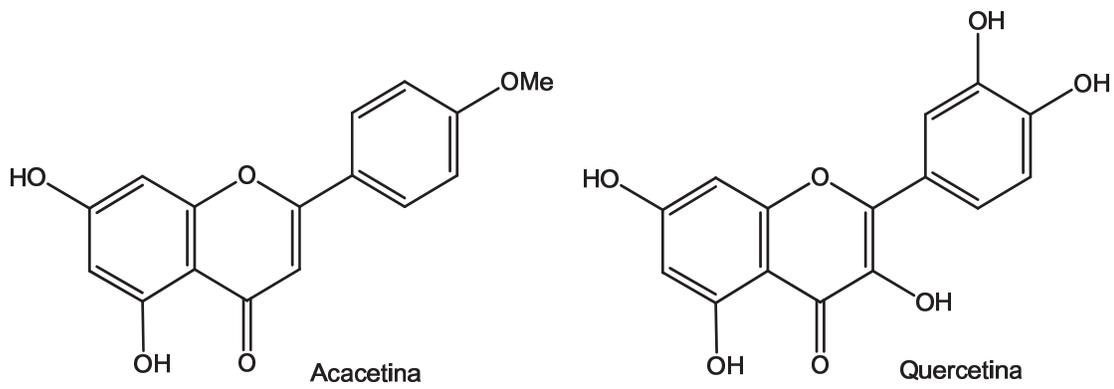
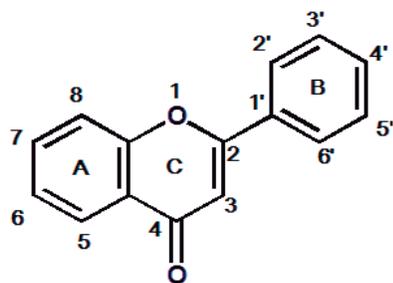


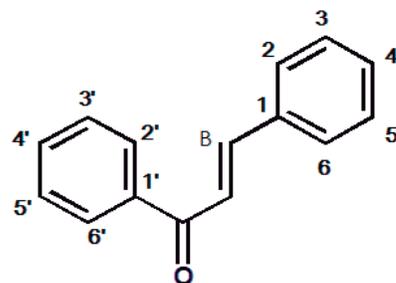
Figura 3. Estructuras de la Acacetina y la Quercetina.

Los flavonoides poseen un carbonilo en la posición 4 y las variaciones se producen en las posiciones 1,2 y 3 de la unidad C3 y en el anillo B. Cuando el segundo anillo bencénico se halla en posición 2 se trata de flavonoides propiamente dichos, si se está en la posición 3 son isoflavonoides (Fig. 4).

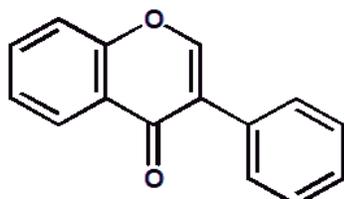
Los flavonoides se clasifican a partir de sus variaciones estructurales, (Fig. 4.) de las cuales las más destacables por su interés farmacológico son las flavonas, flavanonas y sus correspondientes heterósidos; también se ha encontrado que algunos isoflavonoides tienen efecto estrogénico.



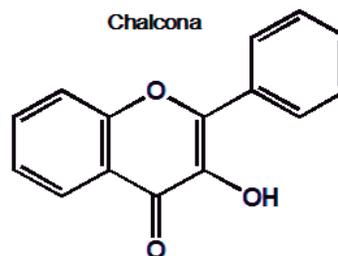
Flavona



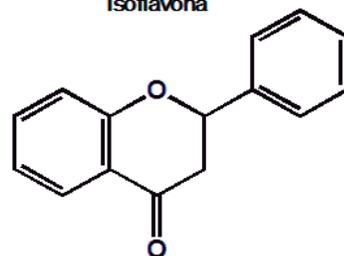
Chalcona



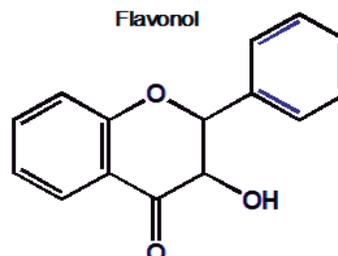
Isoflavona



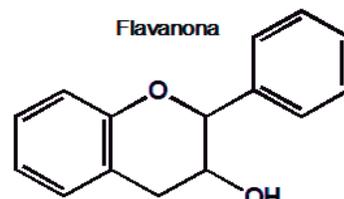
Flavonol



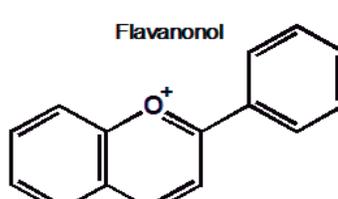
Flavanona



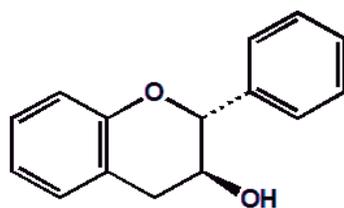
Flavanonol



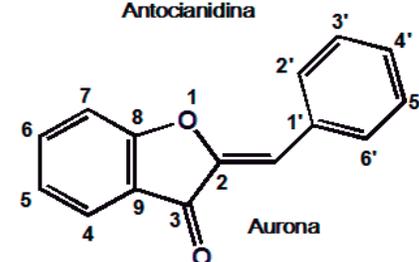
Flavanol



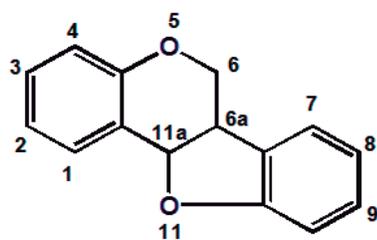
Antocianidina



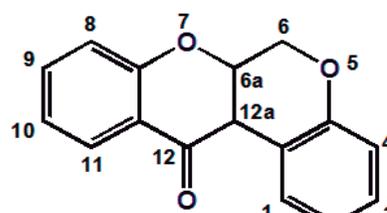
(+) -Catequina



Aurona



Pterocarpano



Rotenoide

Figura 4. Estructuras básicas de diferentes tipos de flavonoides.



2.1.2. Distribución

Los flavonoides son ampliamente distribuidos en las plantas verdes, siendo las rutáceas, poligonáceas, compuestas y umbelíferas las principales familias que las contienen y sólo algunos pocos se han detectados en hongos y algas. Se encuentran principalmente en las partes aéreas (flores, hojas, frutos, semillas) jóvenes y más expuestas al sol, el cual favorece su síntesis. Se les encuentra en forma libre (como agliconas flavonoides) o como glicósidos generalmente unido a glucosa aunque también pueden estar unidos a ramnosa, galactosa, arabinosa, xilosa y a otras sustancias como sulfatos y algunas veces como dímeros⁹ y polímeros.¹⁰

Las antocianinas por su parte se encuentran como sales principalmente en flores, frutos y tejidos que van del rojo hasta el violeta y el azul.¹¹

Los glicósidos pueden ser de dos clases, con los carbohidratos ligados a través un enlace C-C como C-heterósido, o ligados de átomos de oxígeno C-O, como O-heterósido (Fig. 5), siendo este último tipo de enlace el más común dentro de los flavonoides.

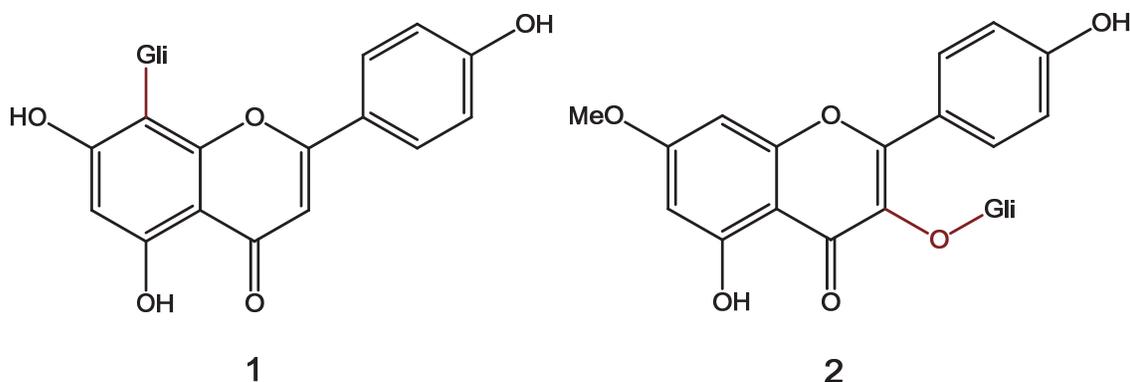


Figura 5. Ejemplos de enlaces glicósidicos.
1) C-heterósido (VITEXINA¹²), 2) O-heterósido (RAMNOCITRINA¹³).

⁹ Kan H.; Timmermann B.N.; Aladesanmi A.J.; Lu Z., *Phytochemistry*. **42**,1199-1201 (1996).

¹⁰ Pan H.; Lundgren L.N., *Phytochemistry*. **42**, 1185 (1996).

¹¹ Brouillard R.; George F.; Fougousse A., *Phytochemistry*. **22**, 1311-1323 (1983).

¹² Gaitan E.; Cooksey R.C.; Legan J.; Lindsay R.H., *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. **80**, 1444-1447 (1995).



2.1.3. Propiedades Físicas

Sus propiedades físicas dependen de la clase de flavonoide y el estado en que se encuentran, por ejemplo las flavonas, flavonoles y auronas debido a su sistema conjugado son compuestos sólidos con colores que van desde el amarillo tenue hasta el rojo; las antocianidinas son de colores rojo intenso, morado, violeta y azul.

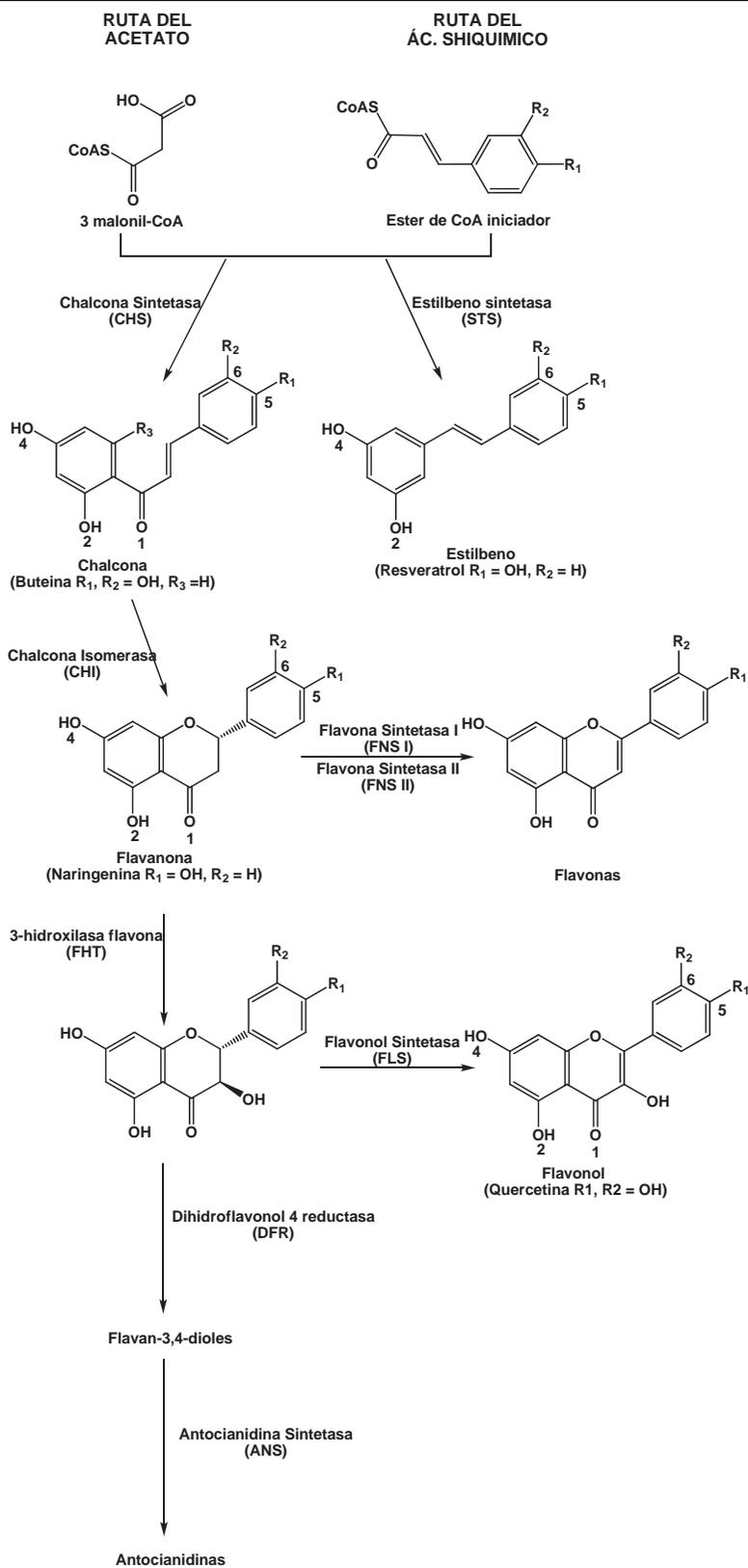
Los glicósidos son generalmente sólidos amorfos que funden por descomposición, mientras que las agliconas y los altamente metoxilados son cristalinos y sus puntos de fusión son elevados.

La solubilidad depende de la forma en que se encuentran y de la clase de sustituyentes presentes. Las antocianidinas, los glicósidos, y los sulfatos son solubles en agua y alcohol; las agliconas altamente hidroxiladas son solubles en disolventes menos polares que el agua; las agliconas flavonoides altamente metoxiladas son solubles en éter de petróleo y cloroformo. Los flavonoides con hidroxilos fenólicos son solubles en soluciones alcalinas pero los altamente hidroxilados se descomponen por acción de las bases fuerte, lo cual permite hacer una diferenciación con otros.

2.1.4. Biogénesis

Los flavonoides son metabolitos secundarios de origen mixto, el anillo A proviene de la ruta del acetato vía Malonil CoA y el anillo B y la cadena C3 provienen de la ruta del ácido shiquímico. Un tricétido se cicla y se condensa con una molécula de ácido *para*-cumárico por acción de la enzima chalcona sintetasa (Esquema 1).

¹³ Cambron Rosas Jairo Isac., "DITERPENOS DE *Stevia suppubescens* Lag Y ANÁLISIS DE GLICÓSIDOS FLAVONOIDES DE *Stevia connata* MEDIANTE HPLC", Tesis de licenciatura presentada en la Facultad de Químico Farmacobiología de la UMSNH (1996).



Esquema 1. Biogénesis de los flavonoides.¹⁴

¹⁴ McArdle M.B.; Campitelli R.M.; Quinn J.R., *J. Nat. Prod.* **69**, 14-17 (2006).



La enolización del ciclo proveniente de la ruta de la malonil CoA da origen al anillo aromático A en las chalconas y flavonas, las cuales son precursoras de las demás clases de flavonoides.

La vía del malonil Co A proporciona el anillo *meta*-oxigenado que tienen algunas flavonoides, mientras que por la ruta del ácido shiquímico se obtiene un anillo B *orto*-oxigenado característico de algunos flavonoides.

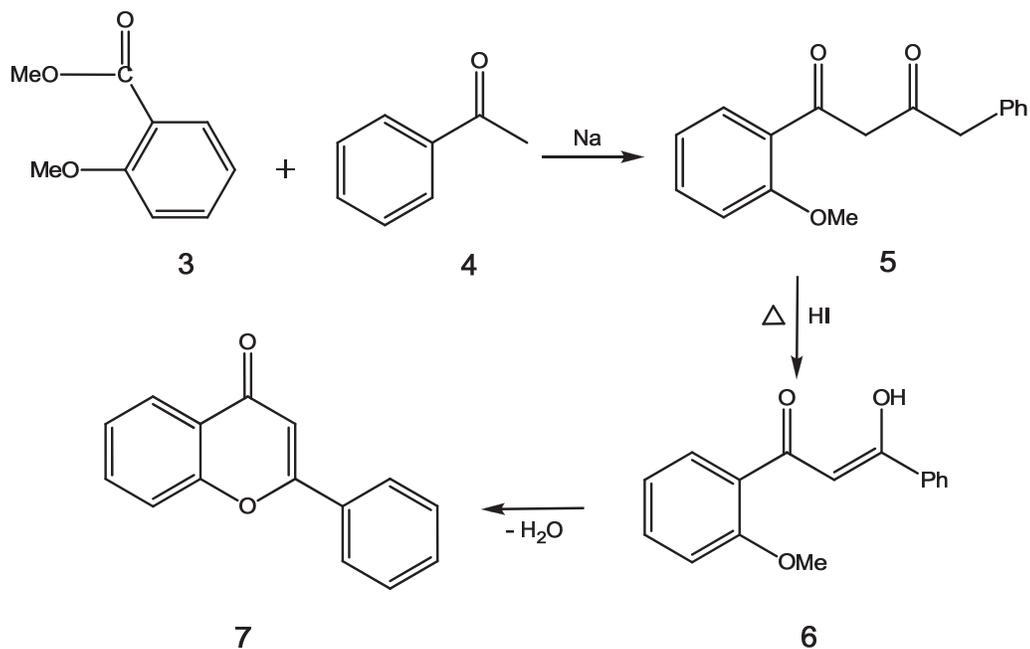
2.1.5. Síntesis de flavonoides

El interés en las propiedades biológicas de las flavonas ha dado como resultado un enorme esfuerzo en la síntesis de estas. Hay diferentes métodos para la síntesis de las flavonas hasta la fecha reportados.

A) Método de Von-Kostanecki

Este es uno de los primeros métodos utilizados para sintetizar flavonas, que implica una reacción de *orto*-metoxibenzoato de metilo (**3**) y acetofenona (**4**), en presencia de sodio para formar el compuesto **5** como se muestra en el Esquema 1. La reacción que ocurre es una condensación de Claisen: esto es seguido por el tratamiento de **5** con un ácido para formar el compuesto **6** que por una eliminación de agua se obtiene la flavona **7**.¹⁵

¹⁵ Von Kostanecki St.; Lampe V.; Tambor J., *Ber. Dtsch. Chem Ges.*, **37**, 2803-2806 y 1402-1404(1904).



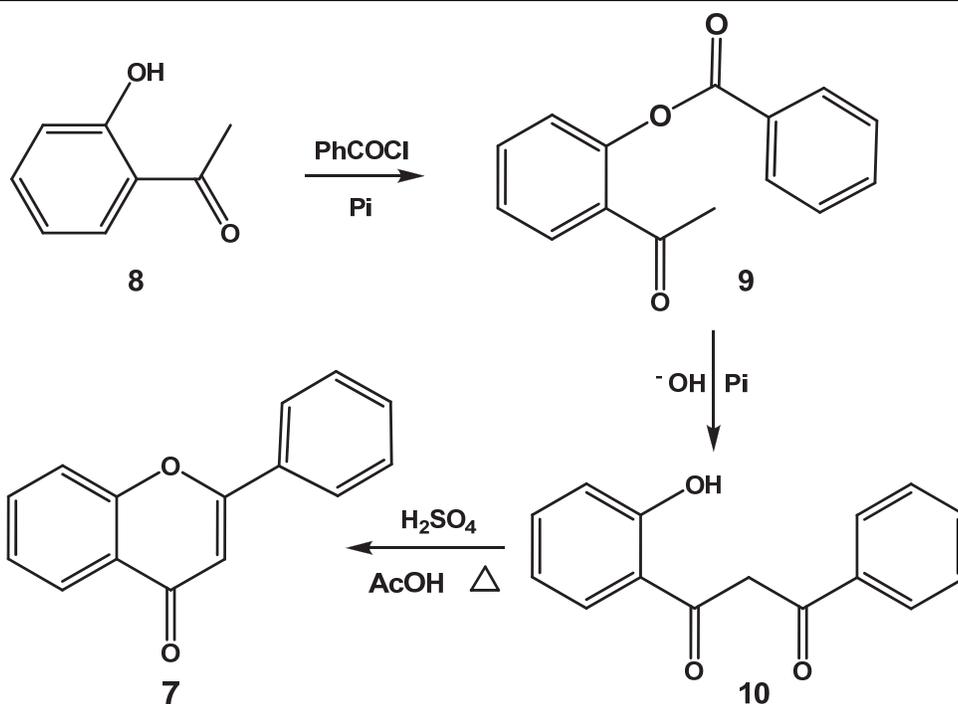
Esquema 2. Método de Von-Kostanecki.

B) Método de Baker-Venkataraman.

Este es uno de los métodos más convenientes para la síntesis de flavonas, se recomienda por su alto rendimiento en todos sus pasos y la reproducibilidad de sus resultados.

En la reacción de Baker-Venkataraman, la 2-hidroxiacetofenona (**8**) es convertida en el éster **9**, posteriormente sufre un re-ordenamiento intramolecular por la condensación de Claisen en presencia de hidróxido de potasio y piridina para formar la 1,3-dicetona **10**. Este compuesto se cicla para dar paso a la flavona **7**.¹⁶

¹⁶ W. Barker., *J. Chem. Soc.* 138 (1933).



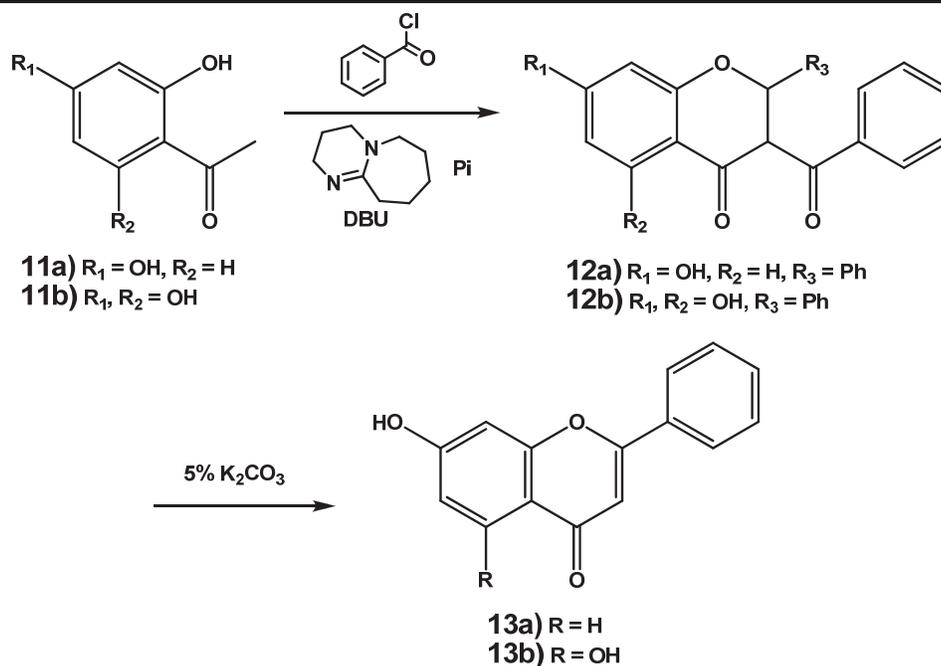
Esquema 3. Método de Barker-Venkataraman.

C) Síntesis de flavonas de Ganguly

Esta síntesis es una modificación del método de Barker-Venkataraman la cual fue hecha por Ganguly y colaboradores,¹⁷ permite obtener flavonas sustituidas en posiciones específicas.

En su procedimiento compuestos como el 2',4'-dihidroxiacetofenona (**11a**) y la 2',4',6'-trihidroxiacetofenona (**11b**) son calentadas con cloruro benzoilo, en presencia de 1,8-diazabicyclo [5.4.0] undec-7-eno (DBU) y piridina para obtener la 3-acil flavona **12a** y **12b**. Al calentar estos compuestos bajo reflujo en una solución acuosa al 5% de carbonato de potasio los compuestos **12a** y **12b** producen a **13a** y **13b** respectivamente, como se muestra en el Esquema 4.

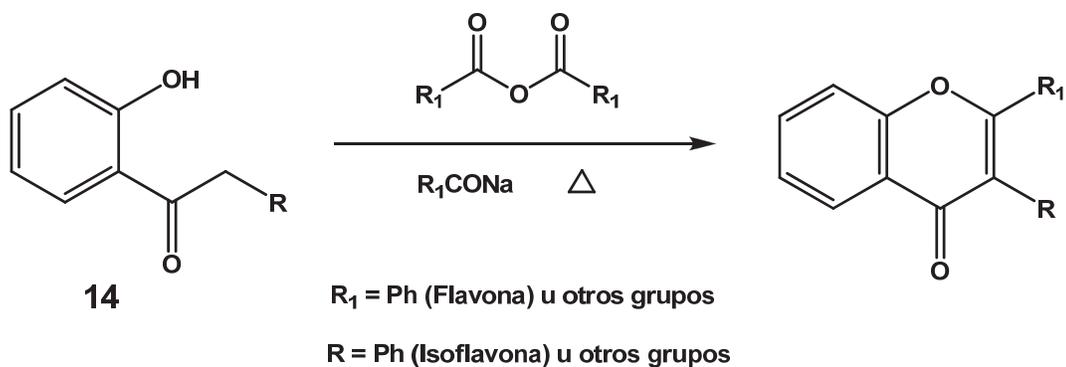
¹⁷ Ganguly A.K.; Kaur S.; Mahata P.K.; Biswas, D.; Pramanik, B.N.; Chan T.M., *Tetrahedron Letters*. **46**: 4119- 4121. (2005).



Esquema 4. Síntesis de flavonas de Ganguly y col.

D) Reacción de Allan-Robinson

Este es un método para la preparación de flavonas o isoflavonas por condensación de *orto*-hidroxiarilcetonas (**14**) con anhídridos de ácidos aromáticos, en la cual sucede una enolización como primer paso seguida de una acilación con una enolización subsecuente para formar flavonas e isoflavonas. Esquema 5.¹⁸



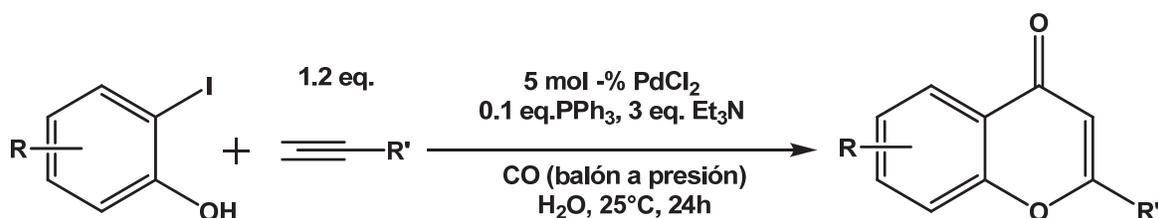
Esquema 5. Reacción de Allan-Robinson.

¹⁸ Allan J.; Robinson R., *J. Chem. Soc.* **125**, 2192 (1924).



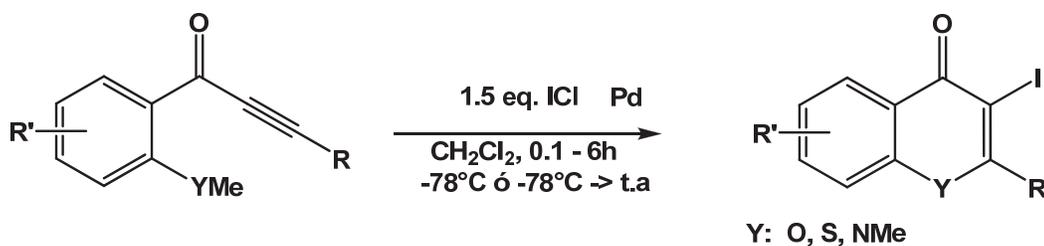
E) Otras síntesis de flavonoides

Se aplica un método mediante una reacción de acoplamiento de Sonogashira con un catalizador de Pd libre de cobre, usando agua como disolvente, en un balón bajo presión de CO y Et₃N como base a temperatura ambiente. Esquema 6.¹⁹



Esquema 6. Esquema de reacción empleado por Liang B y col.¹⁹

Una ciclación promovida por cloruro de yodo (ICl) de algunos compuestos con sustituciones de hetero-átomos mostró una sencilla y muy eficiente forma de obtener 3-yodocromonas y análogos. Se efectúa en condiciones suaves, tolera diversos grupos funcionales y en general tienen buenos rendimientos. Transformaciones posteriores catalizadas con Pd permite un rápido aumento en la complejidad molecular. Esquema 7.²⁰



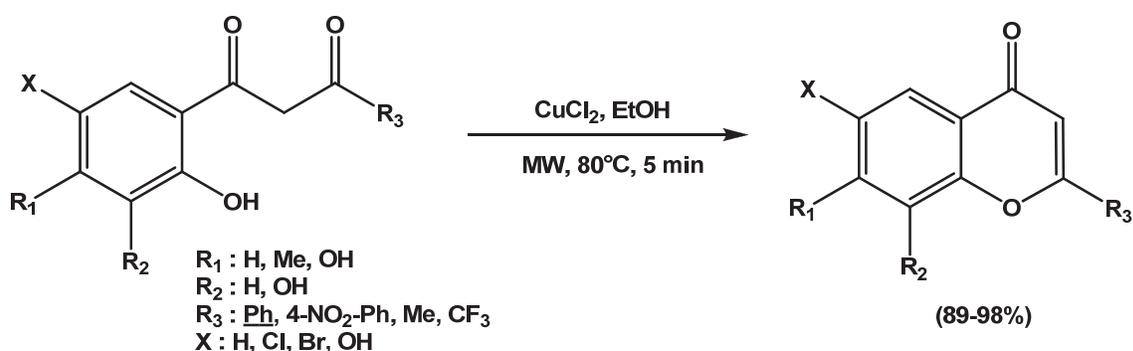
Esquema 7. Esquema de reacción empleado por Zhou C. y col.²⁰

¹⁹Liang B.; Huang M.; You Z.; Xiong Z.; Lu K.; Fathi R.; Chen J.; Yang Z., *J. Org. Chem.* **70**: 6097-6100 (2005).

²⁰Zhou C.; Dubrovsky A.V.; Larock R.C., *J. Org. Chem.*, **71**: 1728-1731 (2006).

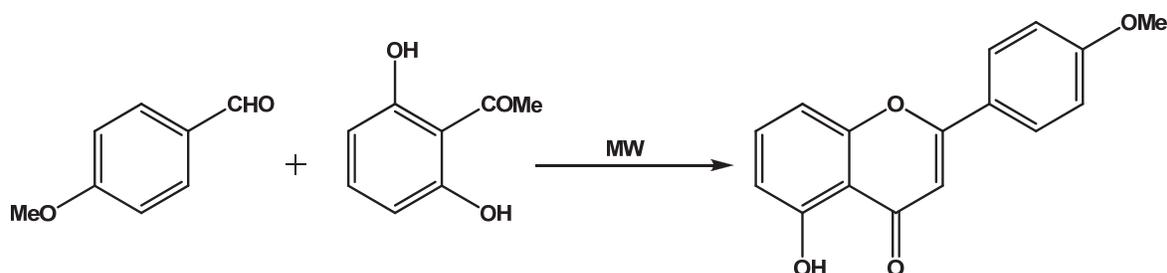


Utilizando el protocolo de microondas en el Esquema 8, George W. Kabalka y Arjun R. Mereddy de la Universidad de Tennessee fueron capaces de sintetizar una variedad de flavonas funcionalizadas en muy altos rendimientos por la ciclación de 1-(2-hidroxiaril)-1,3-propanodionas.²¹



Esquema 8. Esquema de reacción empleado por Kabalka y col.²¹

Hay estudios de síntesis de flavonoides²², en reacciones de dos componentes y usando calor de microondas



Esquema 9. Esquema de reacción usando MW.

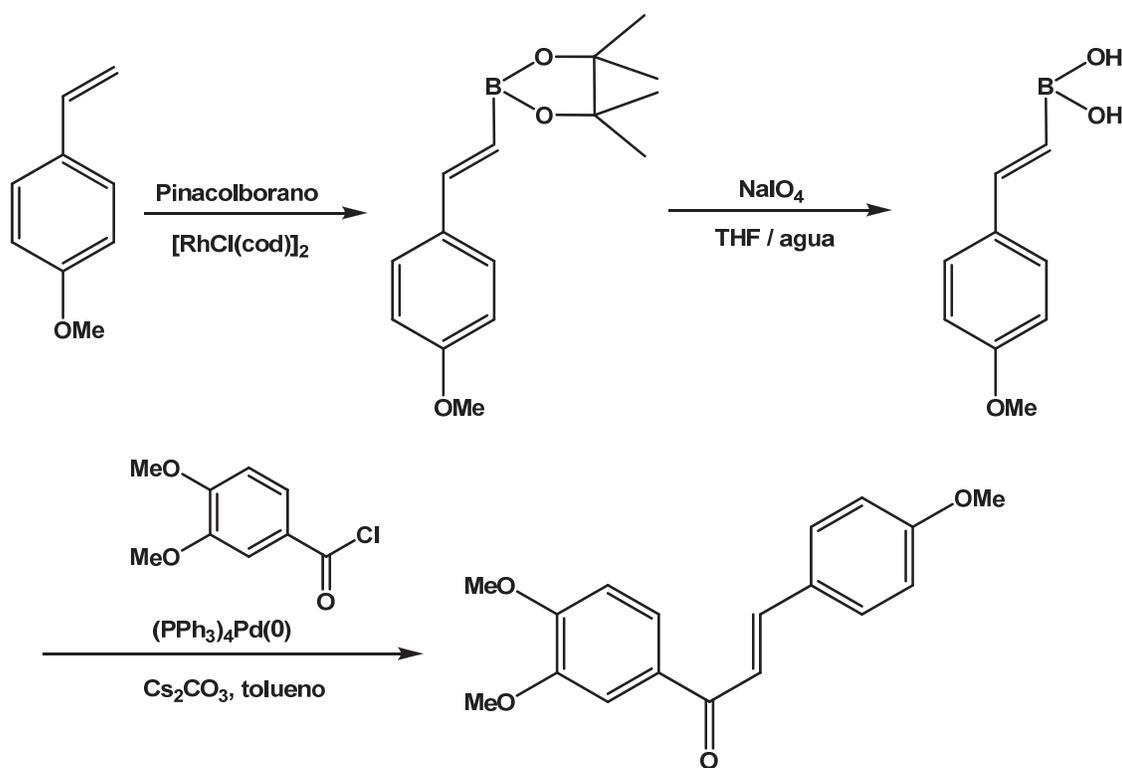
²¹ Kanalka G W.; Mereddy A R., *Tetrahedron Letters*, **46**, 6315 (2005).

²² Seijas J A.; Vazquez-Tato M P.; Carballido-Reboredo R., "Studies on the synthesis of flavonoids by a two component reaction using microwave heating". Medio[Online] URL: <http://www.mdpi.net/ecsoc/ecsoc-6/Papers/E007/E007_files/202.htm>.



F) Síntesis de chalconas mediante reacciones de acoplamiento de Suzuki.

Las chalconas ó 1,3-difenil 1,2-propen-1-ona y especialmente las chalconas con grupos funcionales hidroxilo en los anillos aromáticos son precursores de todos los flavonoides. En 2003 Edrarir y colaboradores reportaron una síntesis eficiente de chalconas, en base a la reacción de acoplamiento de Suzuki entre un cloruro de benzoilo y el ácido fenilvinilborónico. Esquema 10.²³



Esquema 10. Síntesis de chalconas por acoplamiento de Suzuki.

²³ Edrarir S.; Cotelle N.; Bakkour Y.; Rolando C., *Tetrahedron Letters*. **44**: 5359- 5363 (2003).



2.1.6. Actividad biológica de los flavonoides

Los flavonoides constituyen una de las más intrigantes familias de compuestos naturales, su amplia bioactividad, su baja toxicidad y su elevada presencia en la dieta humana los hace ser objeto de estudio farmacológico para enfermedades cardiovasculares y cáncer, no siendo estas las únicas actividades farmacológicas que se le atribuyen; tienen una gran acción antioxidante que depende principalmente de su capacidad de reducir los radicales libres y quelar metales que impiden las reacciones catalizadoras de los radicales libres; pueden inhibir la peroxidación lípida y las enzimas relacionadas con la funcionalidad vascular, el catecol O-metil transferasa aumentando la acción de las catecolaminas incidiendo en la resistencia vascular, la histidina descarboxilasa afectando la acción de la histamina (acción antiinflamatoria), las fosfodiesterasas por lo que inhiben la agregación y adhesividad plaquetaria; ejercen acción diurética, antiespasmódica, anti-ulcerosa gástrica.²⁴

La capacidad de modular la actividad de muchas enzimas y, consecuentemente interferir en los mecanismos de señalización y otros procesos celulares puede deberse, al menos en parte, a las características fisicoquímicas de estos compuestos. La presencia de grupos hidroxilos aromáticos que son relativamente reactivos, permiten el establecimiento de puentes de hidrógeno o uniones covalentes y la posibilidad de formar complejos con iones metálicos como el cobre y el hierro. Esto último limita la concentración de los iones para interactuar con proteínas, para hacerlo con moléculas simples (radicales) o intervenir en reacciones de oxidación y reducción.

²⁴ Álvarez-Castro E.; Orallo-Cambeiro F., *Offarm.* **22.** 130-140 (2003).



Actividad anticancerígena

Tal vez una de las principales actividades biológicas de los flavonoides y de mayor estudio en la actualidad sea la actividad anticancerígena, se ha descubierto que interfieren *in vitro* y por diferentes mecanismos en el proceso oncogénico, lo que las hace posibles agentes de utilidad en las primeras fases del cáncer o en la inhibición de las etapas posteriores de progresión o invasión.

Los inhibidores tumorales pueden actuar en cualquiera de las etapas de la carcinogénesis (iniciación, promoción, progresión e invasión) o en varios de ellos. Los mecanismos anticancerígenos de los flavonoides en la etapa de iniciación incluyen modulación de la actividad y detoxificación de carcinógenos, pueden actuar como protección frente a mutágenos activos. Pueden inhibir la proliferación al inhibir las cinasas e interactuar con receptores estrogénicos; puede inhibir la actividad de los oncogenes, confinamiento del ciclo celular y acción pro-diferenciadora. La genisteína ha demostrado ser un inhibidor de la proteína cinasa de tirosina y de la topoisomerasa II, lo que confina la progresión del ciclo celular en la fase de crecimiento celular G₂ o en la fase de mitosis celular.²¹ También se han descrito propiedades citostáticas para algunos flavonoides que, por medio de un mecanismo no tóxico para las células normales, impiden la síntesis del ADN, del ARN o de las proteínas en células tumorales.



Se han encontrado flavonas (Fig. 8) con potencial quimiopreventivo contra el cáncer aisladas del extracto de acetato de etilo de los tallos de la *Tephrosia toxicaria*. Las cuales se probaron mediante un bioensayo basado en la inducción de la quinona reductasa en un cultivo de células de hepatoma de ratón.²⁷

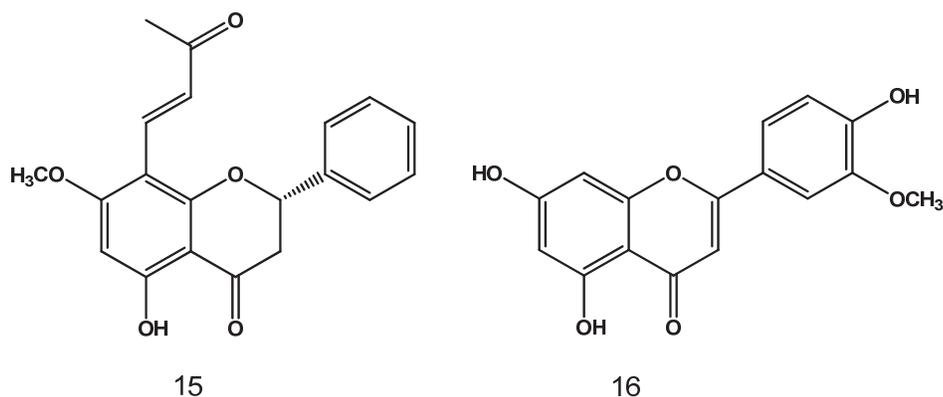


Figura 8. Flavonas aisladas de *Tephrosia toxicaria*.

La naringina (Fig. 9) y otros flavonoides que poseen un glucósido en la posición 7 del esqueleto muestran habilidad para activar a los leucocitos polimorfonucleares (PMN) e inducir la actividad citotóxica de estos en contra de células tumorales *in vitro*.²⁸

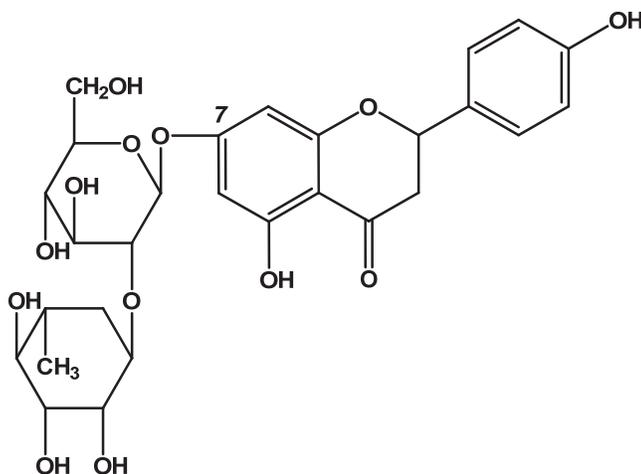


Figura 9. Estructura de la naringina.

²⁷ Sik Jang D.; Jung Park E.; Kang Y-H.; Hawthorne M.E.; Schunke Vigo J.; G. Graham J.; Cabieses F.; S. Fong H.H. G. Mehta R.; M. Pezzuto J.; Douglas Kinghorn A., *J. Nat. Prod.* **66**.1166-1170 (2003).

²⁸ Ishii K.; Furuta T.; Kasuya Y., *J. Agric. Food Chem.* **48**. 56-59 (2000).



Actividad antioxidante

Su acción antioxidante es una de las más reconocidas, aisladas de diferentes géneros de vegetales las flavonas son unos de los compuestos más eficaces reduciendo el efecto de los radicales libres.

Glicósidos flavonoides (Fig. 10) aislados de las partes aéreas de la *Abacopteris penangiana* presentaron actividad antioxidante cuando fueron evaluados usando ensayos de TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity).²⁹

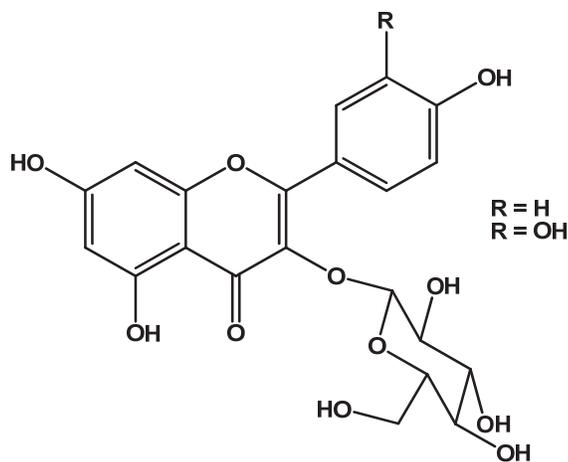


Figura 10. Compuestos aislados de *Abacopteris penangiana*.

²⁹ Zhao Z.; Jin J.; Ruan J.; Zhu C.; Lin C.; Fang W.; Cai Y., *J. Nat. Prod.* **70**. 1683-1686 (2007).



Los glicósidos flavonoides 5,6,7,4'-tetrahidroxiflavonol 3-O-rutinosido (**17**) y el 3-O-neohesperidósido de k aempferol (**18**) (Fig. 11) aislados de las hojas de *Daphniphyllum caycinum*, mostraron una marcada actividad antioxidante al ser evaluados con 1,1-difenil 2-picrilhidrazona (DPPH).³⁰

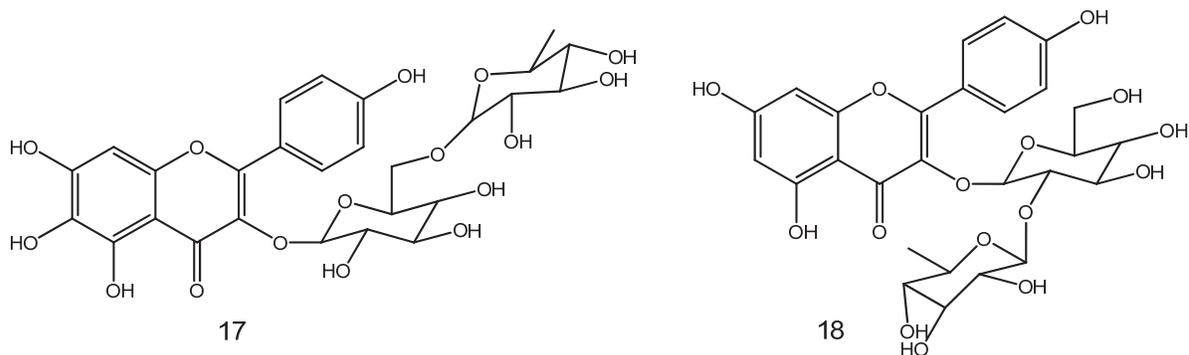


Figura 11. Glicósidos flavonoides antioxidantes de *Daphniphyllum caycinum*.

Flavonoides con efectos inhibitorios en la producción de óxido nítrico evaluados en macrófagos activados se han encontrado en el extracto etanólico (EtOH 80%) del cáliz de la *Physalis alkekengi* va. *Franchettii* (Fig.12).³¹

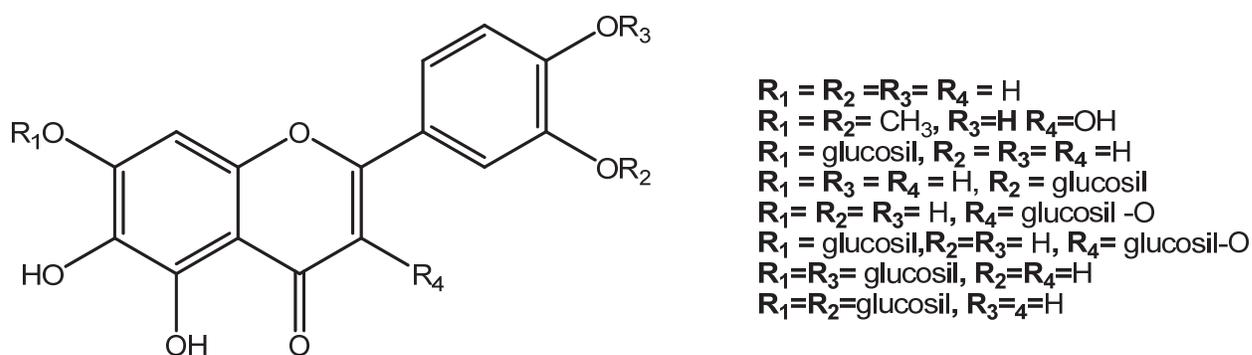


Figura 12. Flavonoides inhibidores de la producción de óxido nítrico.

³⁰ Gamez E.J.; Luyengi, L.; Lee S.K.; Zhu L.F.; Zhou B.N.; Fong H.H.; Pezzuto J.M.; Kinghorn A.D., *J. Nat. Prod.* **61**. 706-708 (1998).

³¹ Qui L.; Ahaio F.; Jiang Z-H.; Chen L-X; Zhao Q.; Liu H-X.; Yao X-S.; Qiu F., *J. Nat. Prod.* **71**. 642-646 (2008).



La acción antiinflamatoria es debida a sus efectos antioxidantes, a su capacidad de actuar contra la histamina y otros mediadores de los procesos inflamatorios como las prostaglandinas y leucotrienos.

Actividad sobre el sistema cardiovascular

Sobre el sistema cardiovascular, estos regulan la permeabilidad, incrementan la resistencia de los capilares, ejercen una acción relajante del músculo liso que conlleva la disminución de la presión sanguínea, su efecto antioxidante evita la oxidación del colesterol LDL previniendo la formación de la denominada placa arterioesclerótica, su acción contra la agregación plaquetaria puede evitar la acumulación de estas de forma excesiva y la coagulación la sangre.³²

Aunque de forma general los flavonoides comparten muchas acciones biológicas comunes entre ellos, algunos tienen propiedades específicas como la actividad estrogénica.

Flavonoides con actividad inhibitoria de plásmidos fueron aislados del extracto metanólico de una planta tropical *Blumea balsamifera* (Fig. 13).

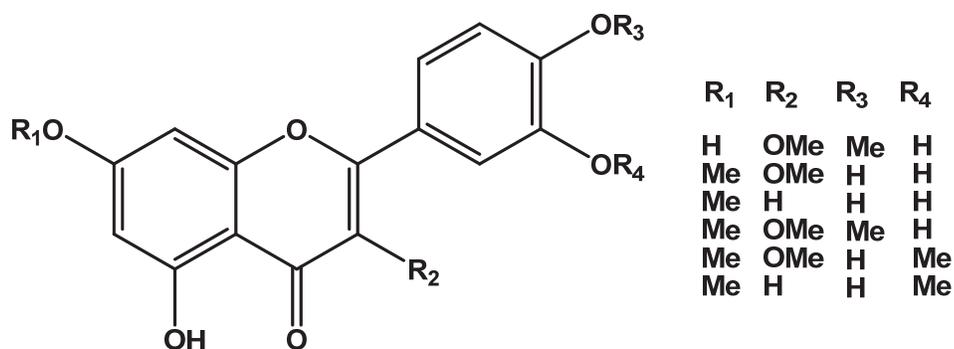


Figura 13. Flavonoides de *Blumea balsamifera*.

³² Álvarez-Castro E.; Orallo-Cambeiro F., *Offarm.* 22. 102-110 (2003).



Del extracto de CH_2Cl_2 -MeOH (1:1) de la raíz de *Hildegardia barteri* que presentaba actividad antifúngica, se aisló una flavona conocida como farrerol, a la cual se le confiere parte de la actividad mostrada en el extracto (Fig. 14).³³

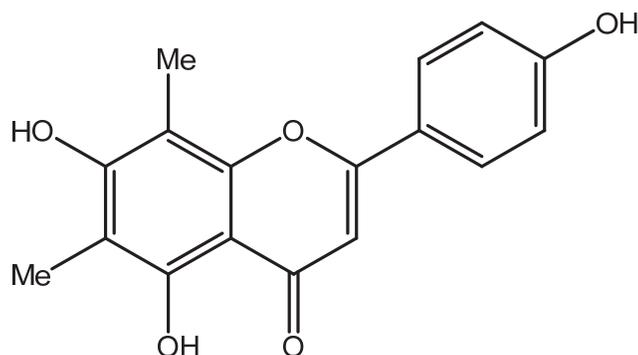


Figura 14. Estructura del farrerol aislado de la *Hildegardia barteri*.

Flavonas aisladas de las fracciones etanólicas de las semillas de *Aesculus chinensis* (Fig. 15), fueron probados contra actividad viral del virus RSV (Respiratory Syncytial Virus), el virus de la para influenza tipo 3 (PIV3), y virus de la influenza tipo A (Flu A), mostrando gran actividad contra el RSV y el Flu A.³⁴

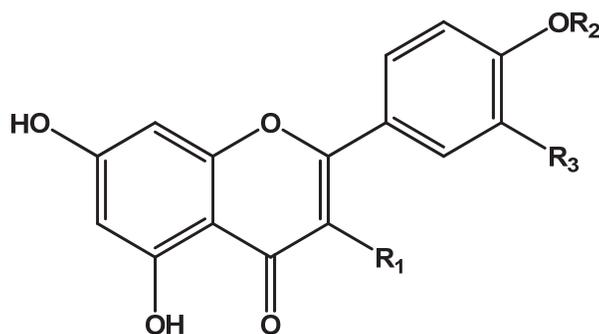


Figura 15. Agentes antivirales portenciales.
 $R_1 = \beta$ - glucopiranosil $-(1 \rightarrow 4)$ α - ramnopiranosil, $R_2=R_3 = \text{H}$

³³ Meragelman T.L.; Tucker K.D.; McCloud T.G.; Cardellina II J.H.; Shoemaker R.H., *J. Nat. Prod.* **68**. 1790-1792 (2005).

³⁴ Wei F.; Ma S-C.; Ma L-Y.; But P. P-H.; Lin R-C. . Khan I.A., *J. Nat. Prod.* **67**. 650-653 (2004).



2.1.7. Flavonoides en el Género *Eupatorium*

Estudios reportados sobre este género han encontrado una gran variedad de metabolitos secundarios con lo cual se considera una fuente importante de nuevas drogas biológicas de gran actividad

Recientemente tres compuestos anti-inflamatorios identificados como nepetina **19**, jaceosidina **20** e hispidulina **21** (Fig. 16) fueron aislados del extracto en diclorometano de *Eupatorium arnottianum* Griseb, mostraron actividad en los ensayos de edema de oreja de ratón inducida por TPA (13-acetato de 12-O-tetradecanoilforbol).³⁵ La nepetina también fue aislada de *Eupatorium ballatadefolium*. La cual mostró actividad inhibitoria del crecimiento de cinco líneas tumorales.³⁶

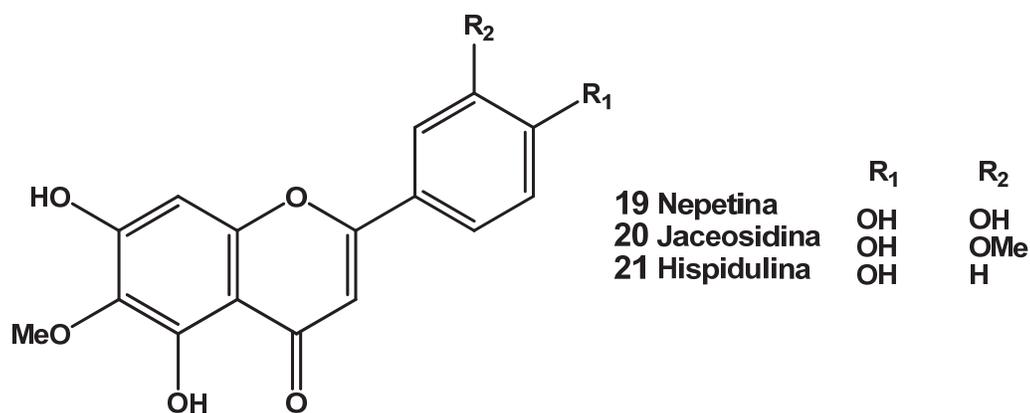


Figura 16. Flavonas aisladas de *Eupatorium arnottianum*.

³⁵ Clavin M., Gorzalczy S., Macho A., Muñoz E., Ferraro G., Acevedo C., Martino V. *Journal of Ethnopharmacology*.112. 585-589 (2007).

³⁶ Militao G.C.G.; Albuquerque M.R.J.R.; Pessoa O.D.L.; Moraes M.E.A.; de Moraes M.O.; Costa-Lotufu L.V., *Pharmazie*, 59. 965-966 (2004).



En ensayos similares se encontró que el extracto de diclorometano de las partes aéreas de *Eupatorium buniifolium* mostró la inhibición significativa de la respuesta inflamatoria, los compuestos fueron identificados como 5,7,5'-trihidroxi-3,6,2',4'-tetrametoxiflavona (**22**) y 5,7,3'-trihidroxi-3,6,4'-trimetoxiflavona (**23**) conocida como centaureidina (Fig. 17), inhiben el edema en un porcentaje mayor al 59% y 49% respectivamente.³⁷

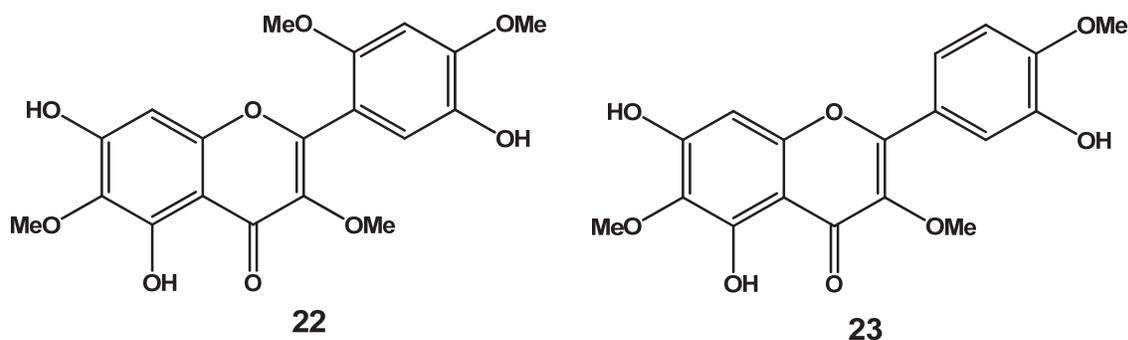


Figura 17. Compuestos identificados en *Eupatorium buniifolium*.

Se han aislado e identificado nepetina (Fig. 16) e hispidulina (Fig. 18) de las hojas secas de *Eupatorium littorale* (Asteraceae), usando el método de HPLC.³⁸ También fueron identificados con anterioridad en la *Eupatorium cannabinum*.³⁹

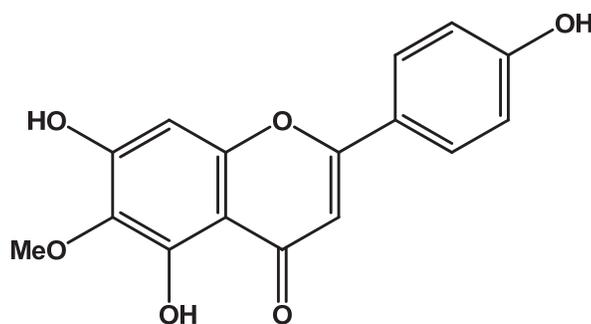


Figura 18. Estructura de la hispidulina.

³⁷ Muschietti L, Gorzalczy S, Ferraro G, Acevedo C, Martino V. *Planta Med.* **67**. 743-4 (2001).

³⁸ De Oliveira, B.H.; Nakashima, T.; De Souza Filho, J.D.; Frehse, F.L., *Journal of the Brazilian Chemical Society* **12**. 243-246. (2001).

³⁹ Sato, M.E.O.; Moreira, E.A., *Tribuna Farmaceutica.*, **53**. 13-27. (1985).



Compuestos flavonoides de las partes aéreas de *Eupatorium odoratum* L., fueron aislados por purificación cromatográfica en sílica gel y sephadex LH-20 y sus estructuras fueron elucidadas, dando como resultado los siguientes compuestos (Fig. 19).⁴⁰

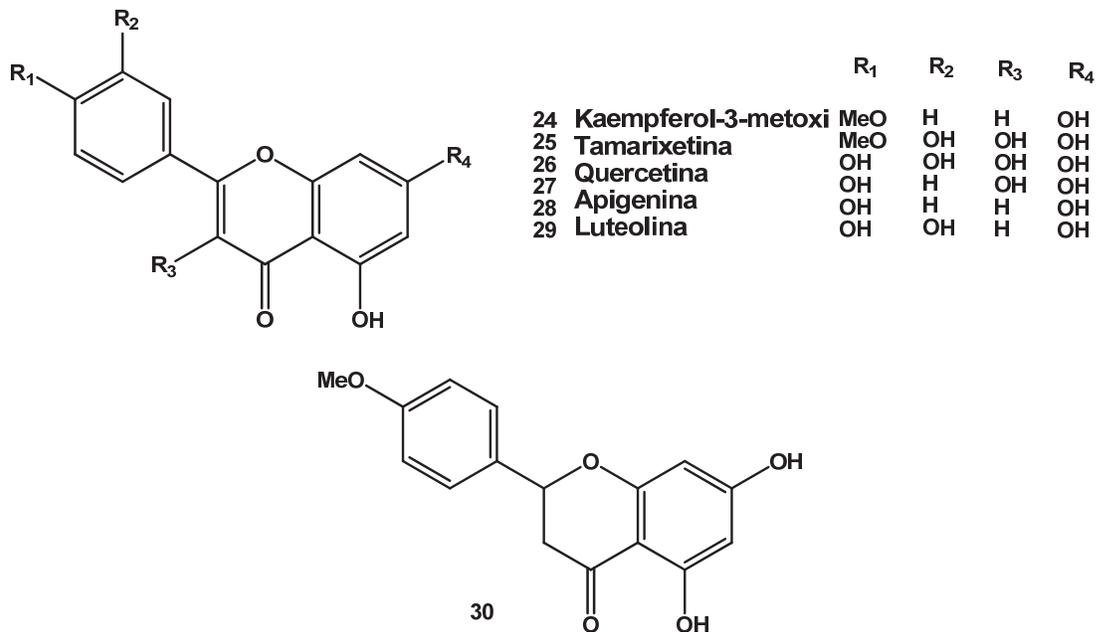


Figura 19. Flavonoides encontrados de *Eupatorium odoratum* L.

⁴⁰Jing-Quan, Y.; Jun-Shan, Y.; Jian-Hua, M., *Journal of Chinese medicinal materials*. **30**. 657-60. (2007).



2.2 *Ageratina brevipes* (DC.) King & Rob

El Género *Eupatorium* es bastante complejo, por lo que algunas de sus especies han sido reclasificadas como es el caso de la planta en la cual se basa esta tesis, así *Eupatorium brevipes* (DC.) King & Rob., actualmente clasificada como *Ageratina brevipes* (DC.) King & Rob.



Figura 20. *Ageratina brevipes* (DC.) King & Rob

A. brevipes es un arbusto de hasta de 2.5m de altura; tallos cilíndricos, estriados, café-amarillento, puberulentos; hojas opuestas o algunas alternas, casi sésiles, pecíolo de 1 a 3 mm de largo, puberulento, lámina lanceolada-elíptica, de 2.5 a 8 cm de largo por 8 a 25 mm de ancho, ápice agudo o algo acuminado, borde crenado-aserrado, base cuneada, haz asper o, puberulento, envés reticulado pubescente con algunos glóbulos resinosos, 2 nervios laterales prominentes salen cerca de la base del nervio central, membranácea.



Numerosos capítulos de 7 a 8 mm de largo forman corimbos dispuestos en racimos terminales, pedicelos vellosos; involucro campanulado, de 4 a 5 mm de largo por 3 a 4 mm de ancho, de la mitad del largo de las corolas, sus brácteas dispuestas en 2 series de aproximadamente de la misma longitud, lineares, agudas, verdes, pubescentes, con algunos glóbulos resinosos y 2 costillas prominentes; flores 20 a 25; corola de 4 a 5 mm de largo, blanca, glabra; aquenio de 2.5 a 3.5 mm de largo, piloso en las costillas prominentes; vilano ligeramente más corto que la corola, cerdas blanco-amarillentas, a veces con ligero tinte rojizo en la base.⁴¹

Actualmente existe solo un estudio químico sobre la *A. brevipes* realizado en el año 1988 donde se reportó una sesquiterpenolactona denominada brevipenina (Fig. 21), la cual presentó una actividad molusquicida, bactericida, espermicida, actividad antitumoral, se encontró también que este compuesto retardaba la germinación de la lechuga.⁴²

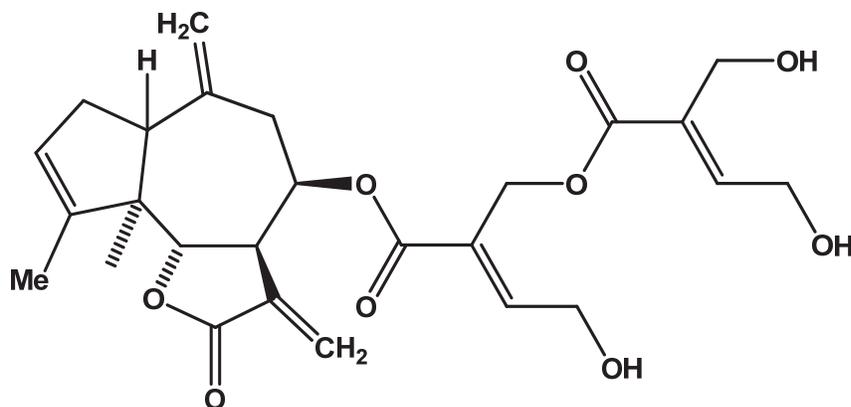


Figura 21. Estructura de la brevipenina.

⁴¹ Calderón de Rzedowski, Graciela.; Rzedowski, Jerzy., "FLORA FANEROGÁMICAS DEL VALLE DE MÉXICO". Instituto de Ecología, A.C., Centro Regional del Bajío. CONABIO. Pátzcuaro, Michoacán, México. 2005.

⁴² Guerrero, C.; Campos G.; Taboada J., *Revista Latinoamericana Química* **19**. 147-9 (1988).



3. OBJETIVO

Objetivo General

Realizar el estudio químico de *Ageratina brevipes* (DC.) King & Rob.

Objetivos Particulares

Llevar a cabo la extracción con diferentes disolventes de la planta.

Realizar la separación cromatográfica de los compuestos mayoritarios del extracto.

Purificar y elucidar la estructura de los componentes mayoritarios



4. DISCUSIÓN Y RESULTADOS

La planta fue colectada el 1ro. de Noviembre de 2007 a 1Km. del poblado de San Sebastián, municipio de Chucándiro, Michoacán. Fue clasificada como *Ageratina brevipes* (DC) King & Rob por el Dr. Jerzy Rzendoski del Instituto de Ecología A.C. del Centro Regional del Bajío, en Pátzcuaro Michoacán.

Un lote de 280g de hojas y de 150g de flores se secaron a la sombra, se sometieron a maceración por separado empleado como disolventes hexano, diclorometano y metanol, durante 8 días después del cual se filtraron y concentraron en rotavapor, repitiendo el proceso por cada disolvente en tres ocasiones.

Los extractos hexánicos y de diclorometano se realizaron para hacer la búsqueda de la brevipenina, antes reportada.³⁷ En estos extractos se encontraron compuestos de tipo terpenoide, pero la naturaleza inestable de los extractos imposibilitaron continuar con el estudio por lo cual se concretó al estudio del extracto metanólico de la planta.

El extracto metanólico de hojas y flores se lavó con metanol hasta obtener un polvo de color verde claro para el caso de las hojas, con un peso de 1.091g, con un punto de fusión de 211-213°C y de flores un total de 1.832g de un polvo ligeramente amarillo con un punto de fusión de 207-213°C.

Una muestra de los extractos metanólicos se llevó a resonancia magnética nuclear para comprobar su estado y la abundancia de sus componentes, observándose el mismo espectro de los extractos metanólicos de flor y hoja (Fig. 22).

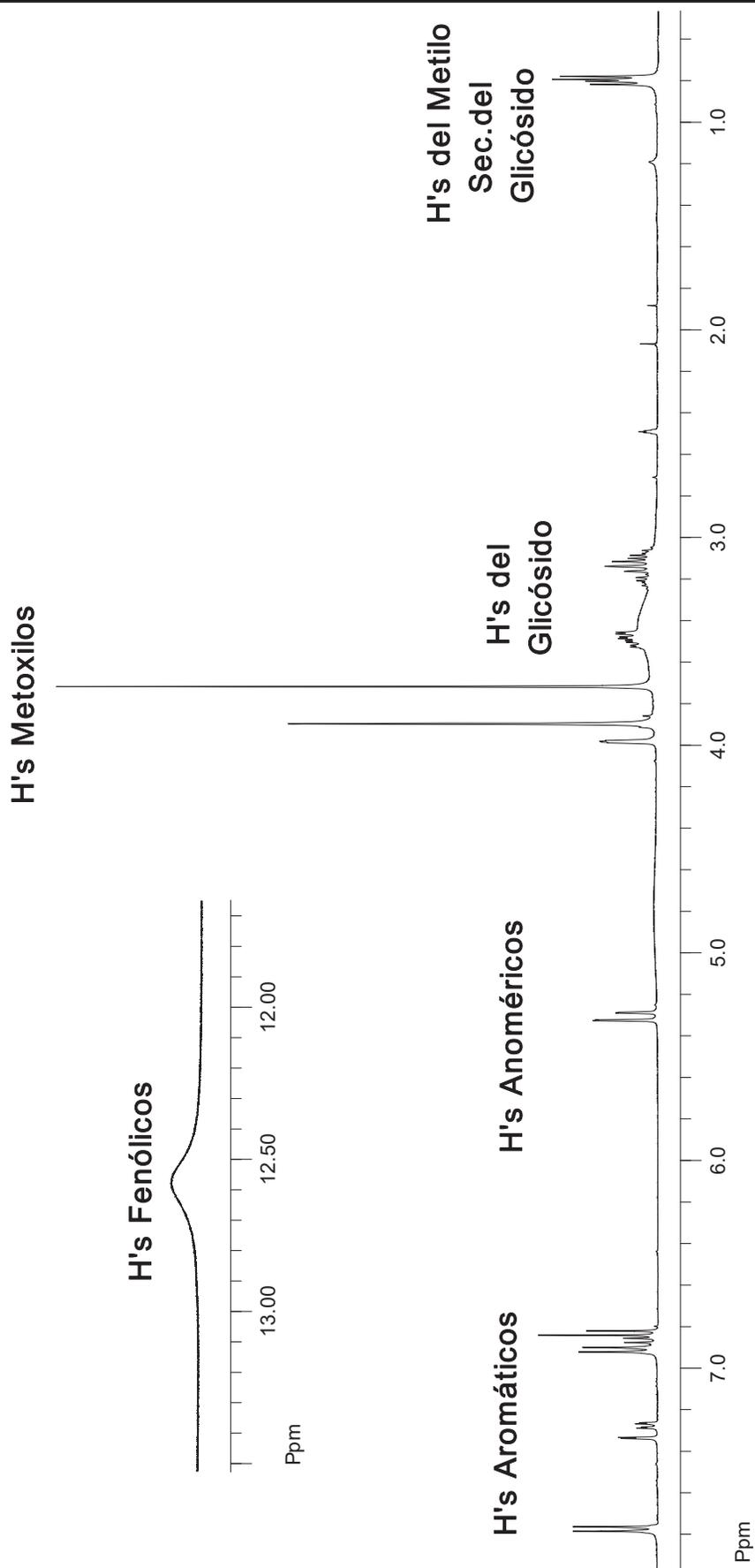


Figura 22. Espectro de $^1\text{H-RMN}$ a 400 MHz del extracto metanólico de hojas de *A. brevipes*



En el espectro de ^1H -RMN (Fig. 22) se muestra señal correspondiente a protones fenólicos en 12.5 ppm aproximadamente, en la región de 6.8 a 8 ppm se aprecian señales de protones aromáticos, cerca de 5.3 ppm las señales correspondientes a protones anoméricos de un glicósido, en 3.7 a 3.9 señales características de protones de grupos metoxilo, entre 3 y 3.6 ppm señales de los protones de un glicósido, en 0.8 ppm una señal que corresponde a los protones de un metilo secundario del glicósido. Con este espectro se determina que los componentes mayoritarios de los extractos metanólicos de *A. brevipes* corresponden a glicósidos flavonoides.

Se realizó una cromatografía en columna con 50mg. de la mezcla de flavonas, en una columna de 1cm de diámetro empacada con 5g de gel de sílice de 230-400 mallas, empleando como disolventes hexano y acetato de etilo, colectándose fracciones de aproximadamente 10ml. Una vez que el disolvente se evaporó las fracciones se enviaron a resonancia magnética nuclear, mostrando la misma mezcla.

Con la finalidad de conocer la cantidad de grupos hidroxilo en la molécula y para facilitar su separación se procedió a peracetilar la mezcla de flavonas con anhídrido acético y piridina en baño maría por una hora, después de la cual se extrajo con acetato de etilo. El espectro de resonancia magnética de protón (Fig. 23) nos muestra que la reacción de acetilación se llevó a cabo de manera eficiente, las señales de los protones aromáticos se mantuvieron, las señales correspondientes a la ramnosa se aprecian mejor debido al desplazamiento de sus señales, la aparición de las señales correspondientes a los grupos acetato cerca de 2.6 a 1.9 ppm y la desaparición de los protones fenólicos son los cambios más significativos.

A la mezcla peracetilada se le realizaron cromatografías en columna sucesivas, una columna de 1cm de diámetro empacada con 3g de gel de sílice de 60-230 mallas, se utilizaron como disolventes hexano y acetato de etilo.

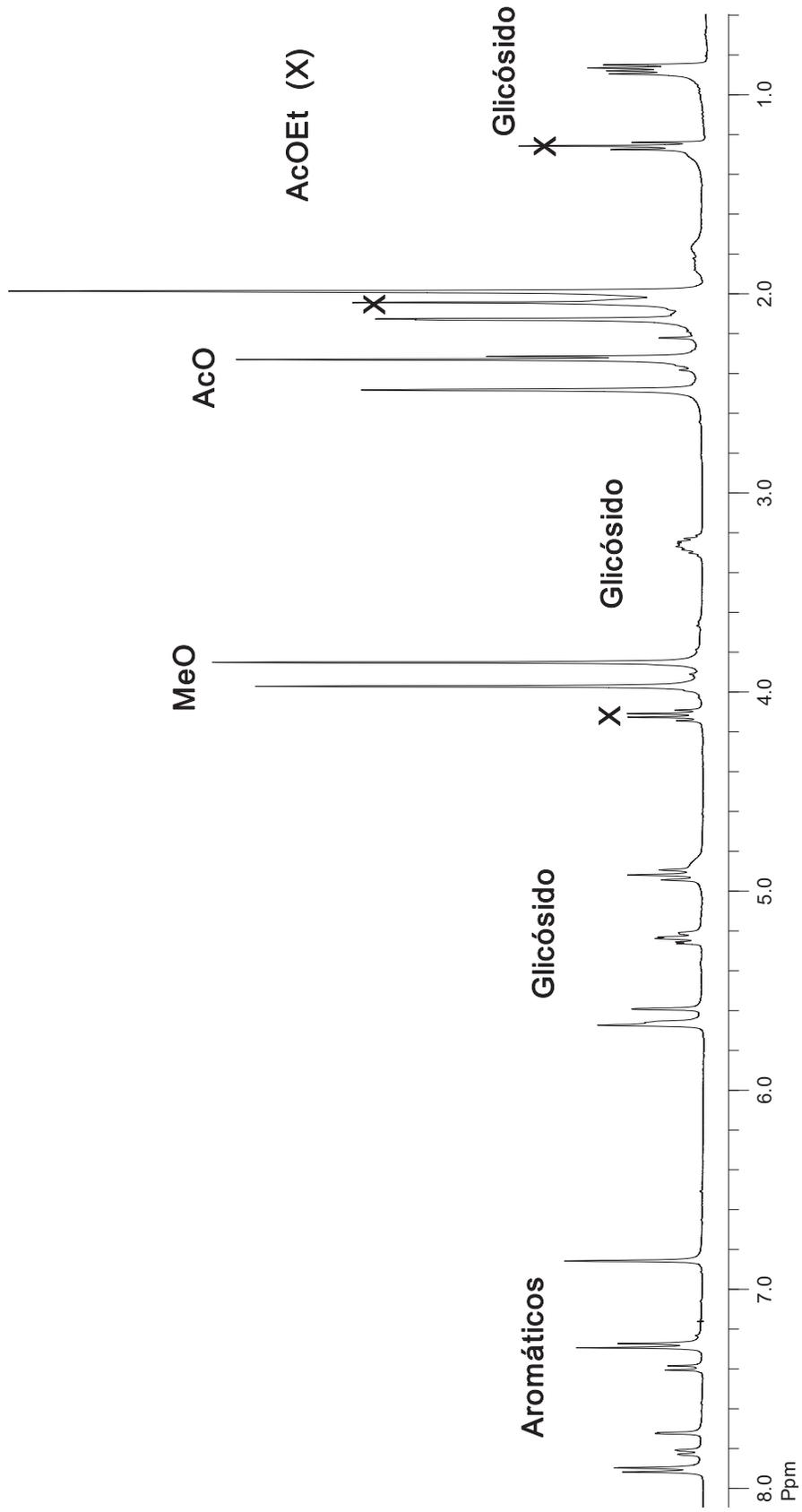


Figura 23. Espectro de ¹H-RMN a 400 MHz del derivado peracetilado



Las fracciones obtenidas 14-32 eluidas con hexano-acetato de etilo 6:4, se le realizó una nueva cromatografía de columna, de 1cm de diámetro empacada con 4 gramos de gel de sílice de 230- 400 mallas de la cual de las fracciones 202-235 se obtuvo el primer compuesto y en las fracciones 277-291 el segundo compuesto, correspondiendo sus estructuras a dos *glicósidos flavonoides*, que pueden poseer un gran potencial en cuanto actividad biológica como nos deja ver los antecedentes de este grupo de compuestos.

4.1 DETERMINACIÓN DEL ACETATO DE EUPALINA 31

El espectro de $^1\text{H-RMN}$ a 400 MHz (Fig. 24) del primer compuesto flavonoide (F202-235) mostró, una señal doble en 7.91 ppm con una constante de acoplamiento de $J= 8.8\text{Hz.}$, en 7.29 ppm otra señal doble con constante de acoplamiento de igual valor $J= 8.8\text{Hz.}$ señales características de un anillo *para*-sustituido, una señal simple en 6.88 ppm de un protón aromático, dos señales simples en 3.98 y 3.85 ppm corresponden a las señales de grupos metoxilos, en la región de 2.5 a 1.9 ppm se encuentran las señales que corresponden a los metilos de los grupos acetato, tres señales en 2.49, 2.33 y 2.13 ppm que integran para tres protones y una señal de doble intensidad en 1.99 ppm que integra para seis protones, siendo en total 5 grupos, con esto sabemos que la molécula contiene cinco grupos hidroxilo que se acetilaron, de los cuales 3 corresponden al azúcar y dos al esqueleto de la flavona. El resto de las señales corresponden al esqueleto de la ramnosa las cuales fueron asignadas mediante experimentos de dos dimensiones COSY (Correlación Homonuclear) y comparados con datos de literatura de un ramnósido (3-O-ramnósido de mircetina) aislado de *Bursera sarukhanii*.⁴³

La asignación mediante el espectro COSY (Fig. 25) fue de la siguiente manera: tomando la señal asignada para el metilo secundario (H-6'') de la ramnosa como referencia, localizada en 0.85 ppm, observamos que tiene correlación con la señal ubicada en 3.24 ppm, siendo esta señal la correspondiente al H-5' de la ramnosa.

⁴³ García Heredia Leticia. "GLICÓSIDOS FLAVONOIDES DE HOJAS DE CUATRO ESPECIES DEL GÉNERO BURSEREA". Tesis de licenciatura presentada en la Facultad de Químico Farmacobiología de la UMSNH (1996).

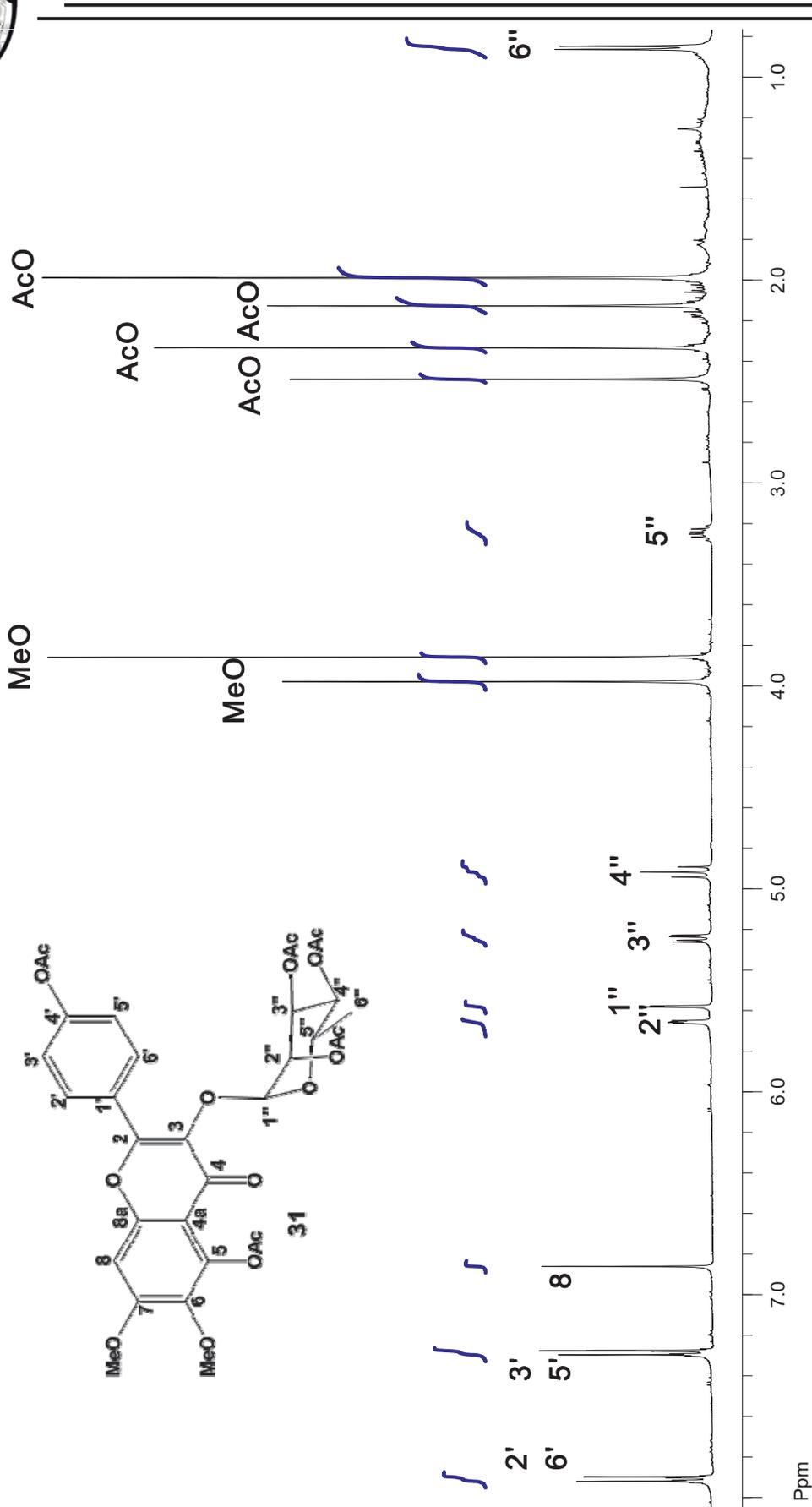


Figura.24. Espectro de $^1\text{H-NMR}$ a 400 MHz del acetato de eupalina 31.



La señal H-5'' tiene correlación con tres señales, con su reflejo, con la señal localizada a 0.85 ppm (H-6'') y con la señal ubicada en 4.92 ppm correspondiente al H-4''; esta señal a su vez correlaciona con H-5'' en 3.24 ppm y con una señal en 5.24 ppm correspondiente a H-3'', el protón H-3'' correlaciona en 4.92 ppm con el protón H-4'' y con la señal localizada en 5.66 ppm siendo esta la señal correspondiente al protón H-2'', El protón H-2'' correlaciona con H-3'' a 5.24 ppm y con el protón H-1'' en 5.58 ppm, quedando así asignada las señales de la estructura de la ramnosa.

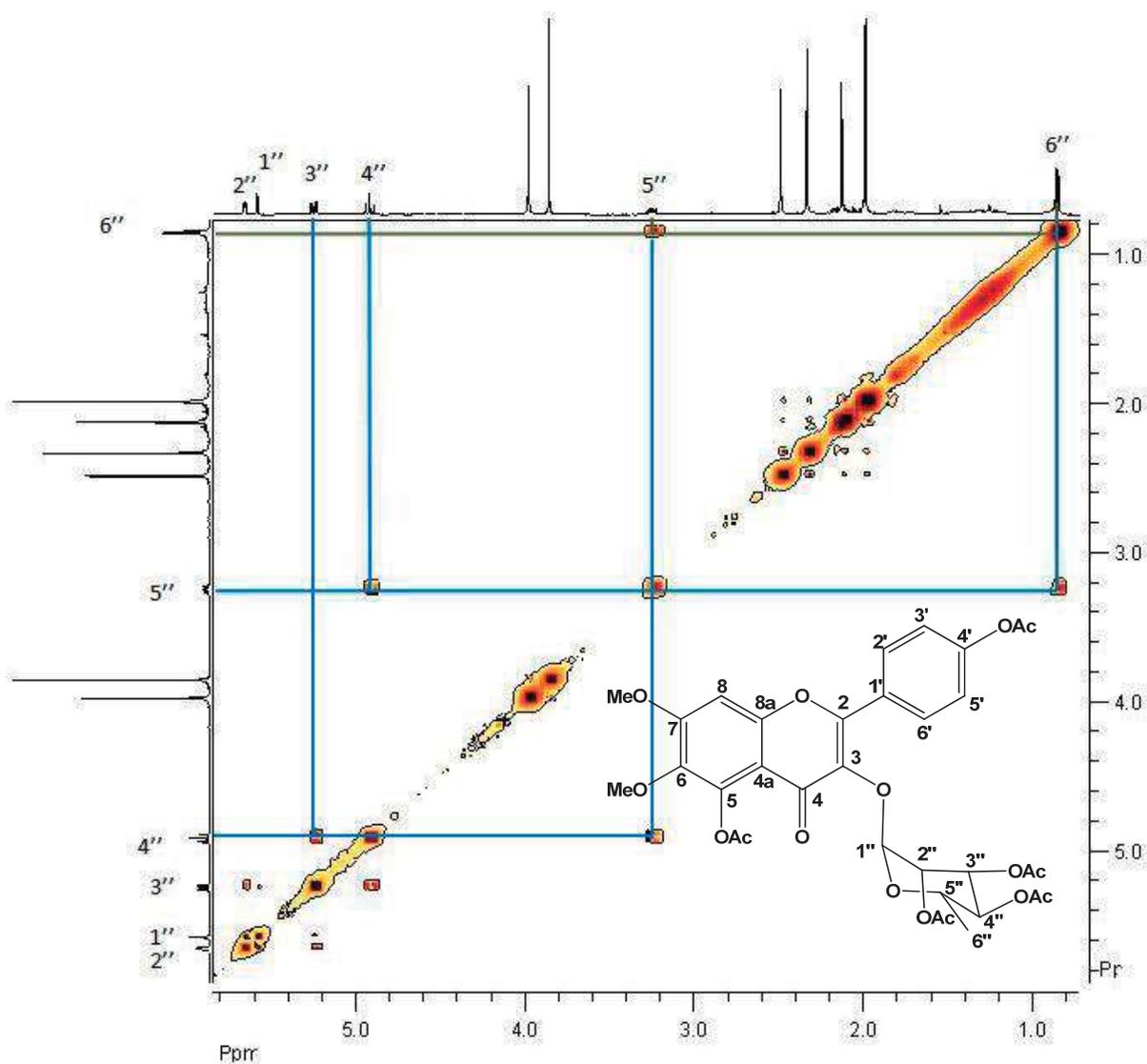


Figura 25. Expansión del experimento de correlación homonuclear (COSY) del acetato de eupalina **31**.



El espectro de resonancia magnética nuclear de ^{13}C (Fig. 26), presenta en 172 ppm una señal del carbonilo de la flavona, de 170 a 168 ppm encontramos las señales de los carbonos correspondientes al carbonilo de los grupos acetato, en 130 y 122 ppm dos señales grandes correspondientes a los carbonos aromáticos, en 98 ppm la señal del carbono anomérico, entre 70 y 68 ppm se encuentran las señales correspondientes a los carbonos de la azúcar, en 61.5 y 56.4 ppm las señales de los carbonos de los grupos metoxilo, en 21 ppm se encuentran las señales correspondientes a los metilos de los grupos acetilo, y en 16.96 ppm la señal del metilo secundario de la ramnosa. El resto de las señales corresponde al esqueleto de la flavona y fueron asignados mediante experimentos de dos dimensiones de correlación heteronuclear (HETCOR).

Al igual que el espectro de dos dimensiones COSY en el HETCOR (Fig. 27) también debemos de seguir las manchas de correlación, una vez asignado el espectro de protón, la asignación del espectro de carbono es sencilla, por ejemplo la señal de los protones del metilo secundario de la ramnosa (0.85ppm), correlaciona con una señal en 16.96 ppm en la escala de carbono, con lo cual sabemos que esa señal corresponde al carbono C-6"; el resto de las señales se asigna de igual manera, partiendo del espectro de protón previamente asignado.

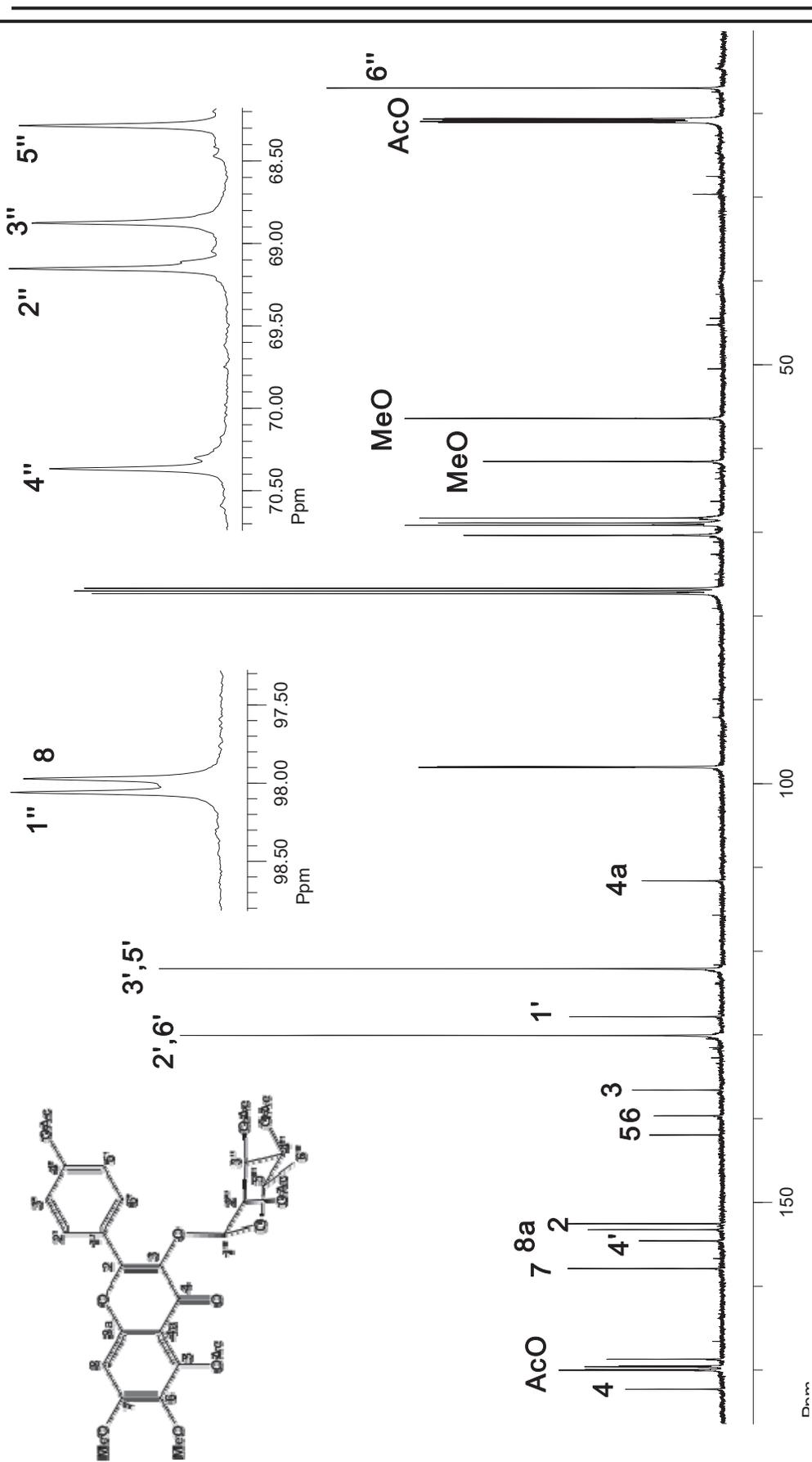


Figura 26. Espectro de ^{13}C -RMN a 100 MHz del acetato de eupalina 31.

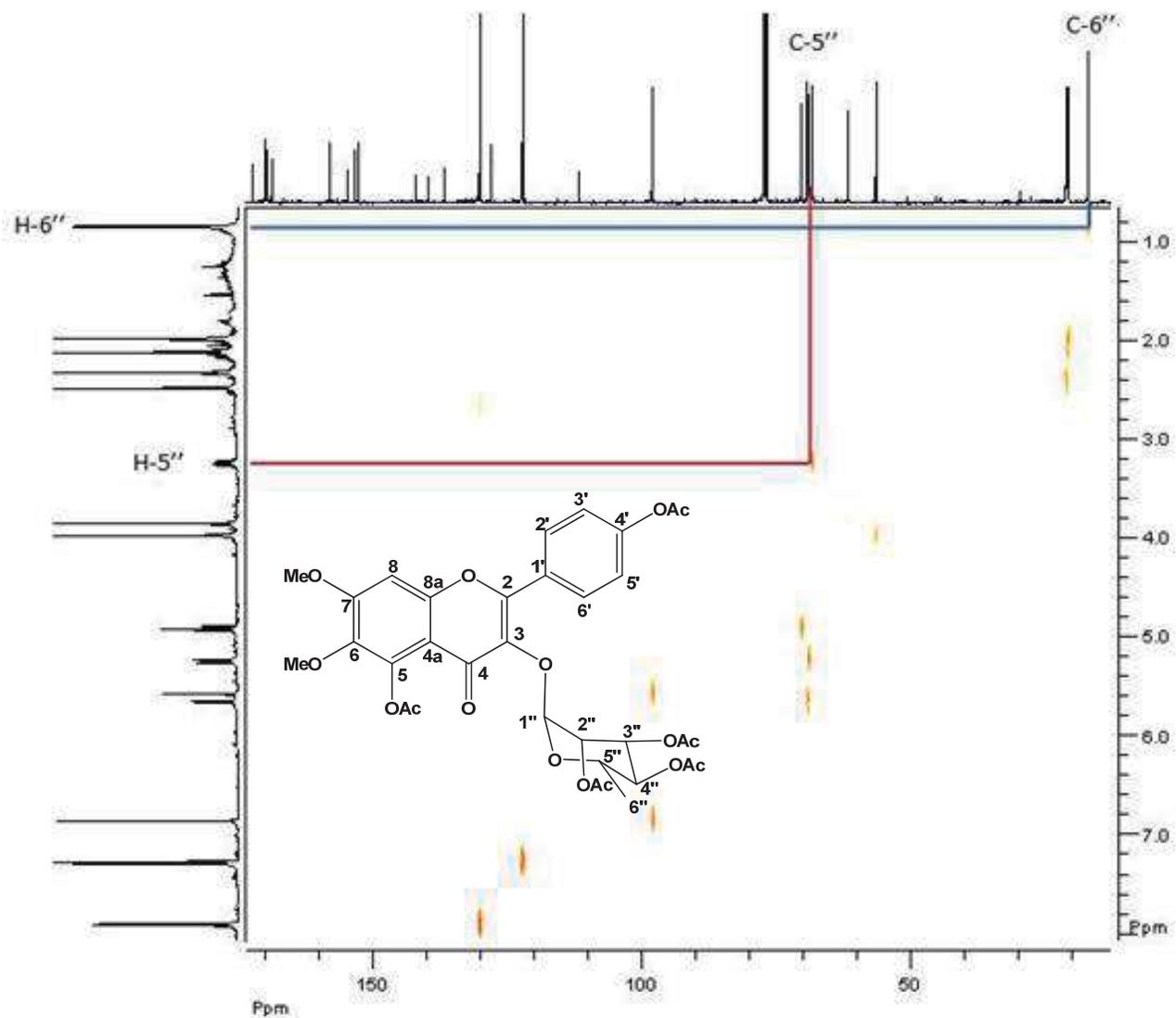


Figura 27. Espectro HETCOR del acetato de eupalina 31.

El espectro de correlación heteronuclear a larga distancia (HETCOR LD) (Fig. 28) nos permite conocer las correlaciones a más de un enlace, por lo cual nos ayuda a saber que átomo está conectado a que otro átomo a más de un enlace, lo cual nos ayudó en la asignación de aquellos carbonos cuaternarios dentro de la molécula que un HETCOR normal no es posible asignar.



Así por ejemplo podemos tomar la señal correspondiente para H-8 en 6.86 ppm correlaciona con las señales en 157.88, 153.23, 139.64, 111.61 y 97.97 ppm en escala de carbono correspondientes a los carbonos C-7, C-8a, C-6, C-4a y C-8 respectivamente, como se trata del protón 8 correlaciona con su carbono (C-8), y el resto de las señales con correlaciones con los carbonos vecinos.

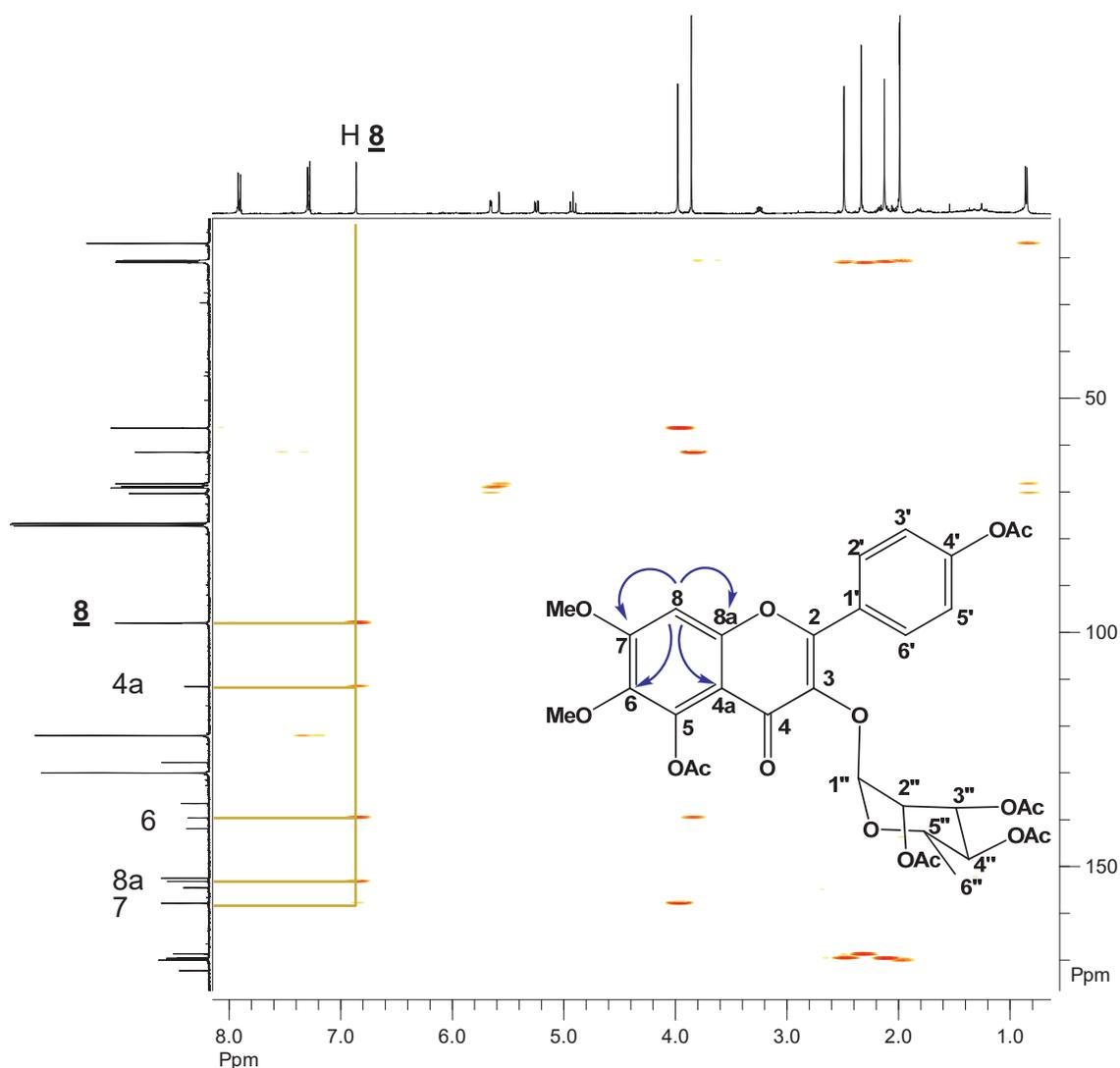


Figura 28. Espectro HETCOR LD del acetato de eupalina 31.



Se realizaron estudios adicionales de UV para corroborar la posición de los grupos OH, de acuerdo con la literatura, cuando una flavona incrementa su oxigenación en el anillo B sufre un efecto batocrómico en la banda I, el cual aumenta con cada grupo hidroxilo adicional. La presencia o ausencia de un grupo hidroxilo en la posición 5 tiene un efecto marcado en la Banda I y II, cuando el grupo 5-hidroxilo está ausente de la flavona ambas bandas parecen a longitudes de onda más cortas que las 5-hidroxiladas.

Cuando grupos hidroxilo se encuentran en las posiciones 3 y/o 4' el espectro de UV muestra un efecto batocrómico en la banda I cuando se emplea metóxido de sodio, como ejemplo podemos mencionar la robinina (Fig. 29) el cual en su espectro de UV en metanol presenta dos bandas principales en 350 y 265 nm (Banda I y II respectivamente), en adición del metóxido de sodio la banda I sufre un efecto batocrómico pasando de 350 a 389 nm mientras que la banda II se mantiene sin cambio significativo (269 nm).⁴⁴

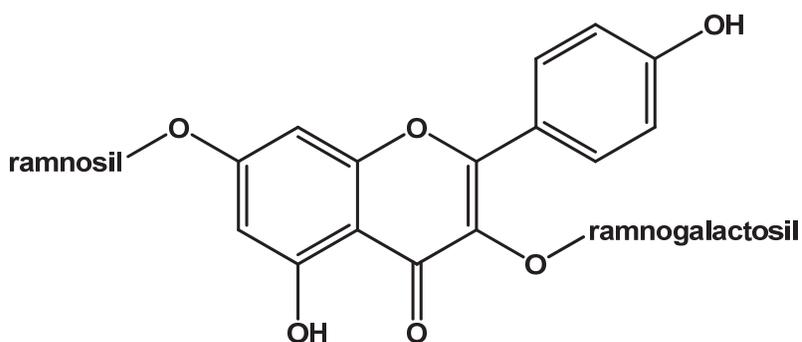


Figura 29. 3-O-Robinosido,7-O-Ramnósido de Kaemferol (Robinina)

Con estos antecedentes decidimos realizar un estudio de espectroscopía de UV observándose los siguientes resultados (Tabla 1).

⁴⁴ Geissman T.A., "THE CHEMISTRY OF FLAVONOIDS COMPOUNDS", Oxford: Pergamon, 1962, pp 41-46, 121



Tabla1. Bandas de absorción de UV de la muestra.

	Banda I	Banda II
MeOH	336nm	268nm
NaOMe	389nm	269nm

En la Tabla 1 se puede apreciar el efecto batocrómico de la Banda I de 336nm (MeOH) a 389nm (MeOH + NaOMe) la comparación de estos resultados con los desplazamientos observados para la Robina nos permitieron deducir que los grupos fenólicos, se encontraban en las posiciones 5 y 4'.

4.2 DETERMINACIÓN DEL ACETATO DE EUPATOLINA 32

De las fracciones 277-291 de la última columna del derivado per acetilado se obtuvo el segundo compuesto flavonoide, el cual posee el mismo esqueleto que la eupalina diferenciándose únicamente en que el anillo B del flavonol está trisustituido y posee un señal adicional correspondiente a un grupo acetato como lo muestra el espectro de resonancia magnética de protón (Fig. 30).

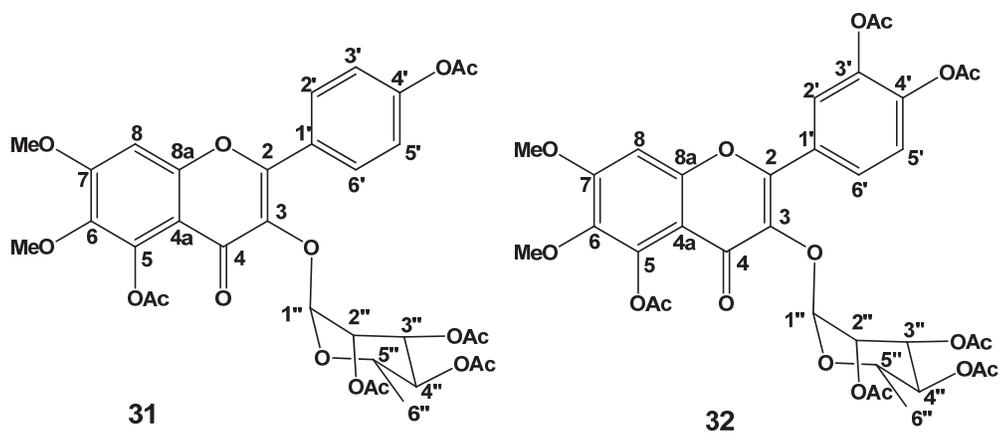


Figura.30. Estructuras del acetato de eupalina **31** y del acetato de eupatolina **32**.



Las señales características del anillo trisustituido se muestran sobre: 7.83 ppm una señal doble de dobles correspondiente al protón H-6', con una constante de acoplamiento *orto* con H-5' de $J=8.6\text{Hz}$, y una constante de acoplamiento *meta* con H-2' de $J=1.1\text{Hz}$. Una señal doble en 7.72 ppm correspondiente al H-2' con una constante de acoplamiento con 6' de $J=1.1\text{Hz}$, y una señal doble en 7.39 ppm con una constante de acoplamiento de $J=8.6\text{Hz}$ para la señal del H-5', en 6.86 ppm una señal simple ancha correspondiente al protón aromático H-8.

En 5.58 ppm tenemos un señal simple que integra para dos protones, H-1'' y H2''; en 5.31 una señal doble de dobles correspondiente a H3'', con constantes de acoplamiento de $J= 10.0\text{ Hz}$ con H-4'' y $J= 2.3\text{Hz}$ con H-2''. en 4.92 ppm una señal triple que integra para un protón con constante de acoplamiento de $J= 10.0\text{Hz}$ con H-3'' y 10.0Hz con H-5'', en 3.98 ppm una señal simple que integra para 3 protones correspondiente a un grupo metoxilo, en 3.85 ppm la señal correspondiente a otro grupo metoxilo que integra para tres protones, en 3.38 ppm tenemos la señal múltiple que integra para un solo protón correspondiente al H-5'', en 2.49, 2.33, 2.31, 2.13 ppm se encuentran las señales simples que integran para tres protones cada una correspondientes a los grupos metilo de l acetato, en 1.90 un señal de mayor intensidad que integra para 6 protones muestra que la molécula de acetato de eupatolitina contiene 6 grupos acetato, uno más que la eupalina por su anillo trisustituido. En 0.87 la señal doble con una $J=6.2\text{Hz}$ con H-5'', correspondiente para los protones del grupo metilo de la ramnosa H-6''.

La presencia de un grupo acetato adicional en la estructura del acetato de eupatolina **32** nos permite afirmar la estructura con respecto al acetato de eupalina **31** lo cual se muestra en la Fig. 31.

La cantidad que se logró separar por cromatografía de este compuesto fue insuficiente para realizar estudios de resonancia magnética nuclear de ^{13}C , dada la dificultad de la separación del compuesto, por lo cual solo se presenta el espectro de protón.

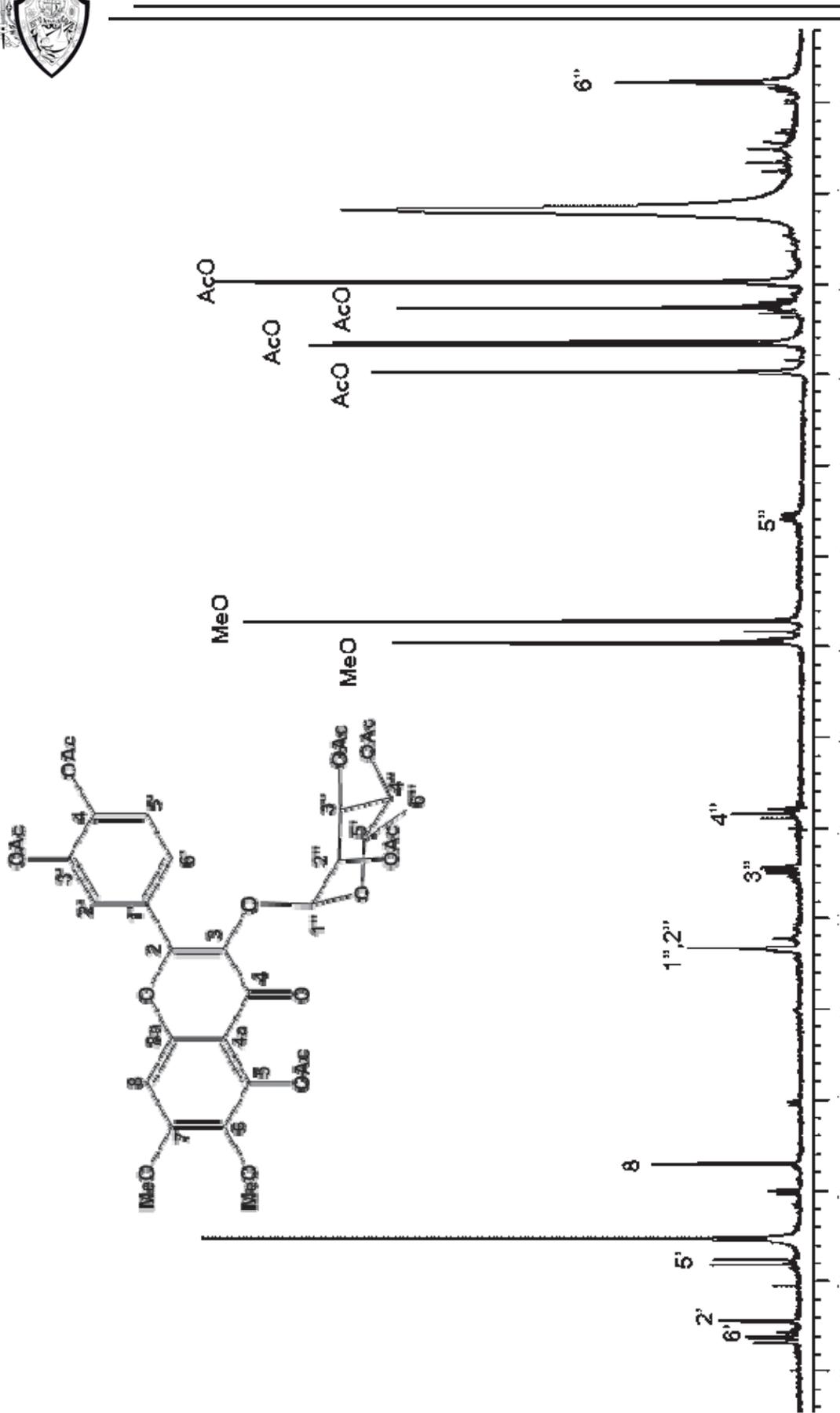


Figura 31. Espectro de ¹H-RMN a 400 MHz del acetato de eupalina 32



4.3 PREPARACIÓN DE DERIVADOS DE LAS FLAVONAS

4.3.1 Hidrólisis de las flavonas

Se llevó a cabo una reacción de hidrólisis de la mezcla de eupalina y eupatolina con metanol y ácido sulfúrico concentrado a reflujo por una hora, el compuesto se recuperó por filtrado ya que comenzó a precipitar al concentrarse en rotavapor, se tomó una muestra de este precipitado y se envió a resonancia magnética nuclear mostrándose el siguiente espectro (Fig. 32). En el espectro se pueden observar las señales correspondientes a las agliconas de las flavonas, conocidas como *eupalitina* para la aglicona de la eupalina y *eupatolitina* correspondiente a la eupatolina, lográndose apreciar en su espectro la pérdida de los protones de la ramnosa.

En el espectro $^1\text{H-RMN}$ (Fig.33) de la mezcla de agliconas se pueden observar las señales correspondientes a los grupos hidroxilos como señales simples a partir de 9.2 ppm, tres señales para la eupatolitina como compuesto mayoritario y 4 señales para la eupatolitina. Las agliconas se diferencian entre sí no solo en la cantidad de grupos hidroxilo si no en la zona de los protones aromáticos, la eupalitina muestra una señal doble en 8.08 ppm con una $J=8.9$ Hz correspondiente a los protones H-2' y H-6', en 6.92 otra señal sobre con $J=8.9$ Hz para los protones H-3' y H-5', una señal simple en 6.88 ppm para el protón aromático H-8, en 3.91 y 3.73 ppm se encuentran las señales correspondientes a los grupos metoxilos, las cuales integran para 3 protones cada una.

Para la eupatolitina se muestra una señal doble en 7.73 ppm que integra para el protón H-2' con una constante de acoplamiento *meta* con H-6' de $J=2.0$ Hz, una señal doble de dobles en 7.57 ppm para el protón H-6' con una constante de acoplamiento *orto* con H-5' de $J=8.8$ Hz y una constante de acoplamiento *meta* con H-2' de $J=2.0$ Hz, en 6.92 ppm una señal doble que corresponde al protón H-5 con una constante de acoplamiento *orto* con H-6' de $J=8.8$ Hz, las señales correspondientes a los grupos metoxilos se encuentran en 3.91 y 3.73 ppm.

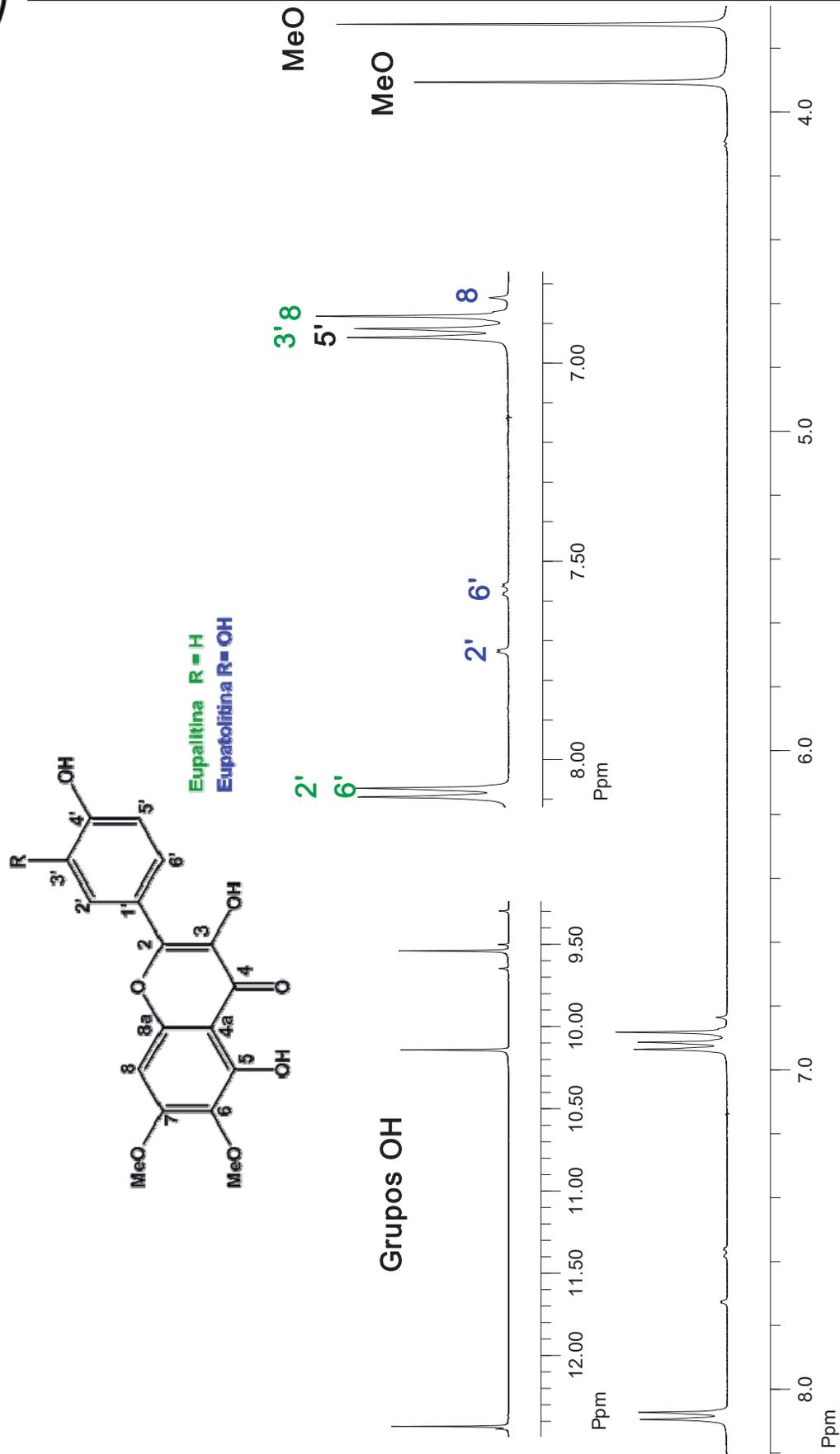


Figura 32. Expansión del espectro de $^1\text{H-NMR}$ a 400 MHz de la eupalitina y eupatolitin



En el espectro de ^{13}C -RMN (Fig. 33) se muestran las señales de la mezcla de agliconas, las cuales fueron asignadas con ayuda de experimentos de dos dimensiones y de la literatura,⁴⁵ así las señales del espectro se muestran en la siguiente tabla.

Tabla2. Desplazamientos de las señales de las agliconas en ^{13}C -RMN a 100MHz.

	Eupalitina (δ ppm)
C-2	158.53
C-3	135.79
C-4	176.15
C-4a	104.35
C-5	151.05
C-6	131.24
C-7	159.34
C-8	91.22
C-8a	151.57
C-1'	121.62
C-2'	129.58
C-3'	155.46
C-4'	147.32
C-5'	155.46
C-6'	129.58
MeO-	60.09, 56.43

NOTA: Las señales de la segunda flavona no son apreciadas debido a que la concentración mínima para este estudio no fue alcanzada.

⁴⁵ Lang Günter., "PHYTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNG DER BLÄTTER VON *Eupatorium semialatum* Benth., EINER IN ZENTRALAMERIKA TRADITIONELL VERWENDETE ARZNEIPFLANZE ("BACCHÉ"), Tesis de doctorado presentada en Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (2001).

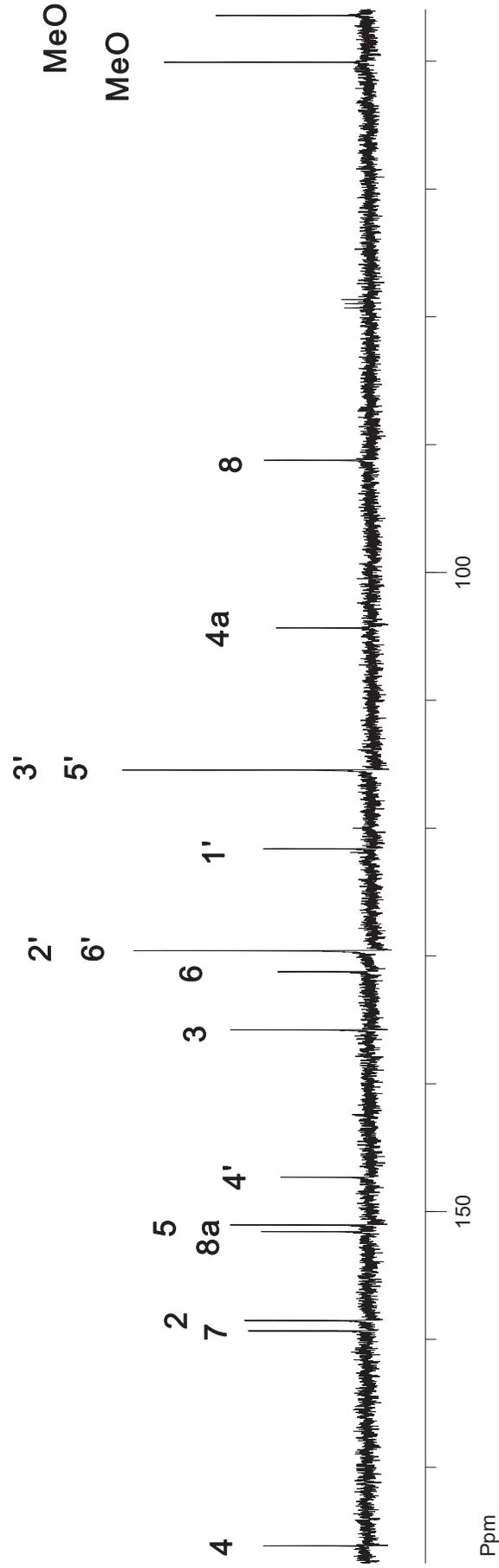
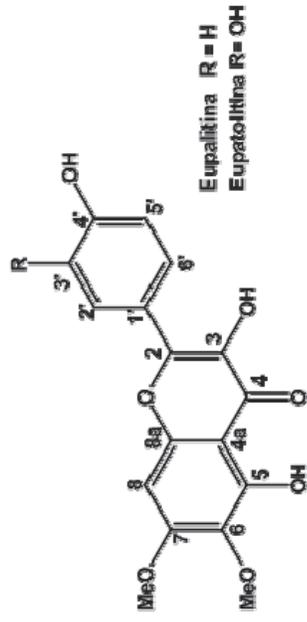


Figura 33. Expansión del espectro de ^{13}C -RMN a 100 MHz de la Hidrólisis de la flavonas.



4.3.2 Acetilación de la eupalitina y la eupatolitina.

Las agliconas resultantes de la hidrólisis se sometieron a una acetilación con piridina y anhídrido acético a baño maría por una hora (Esquema 11), se tomó una alícuota y se envió a resonancia magnética nuclear, el cual mostró el siguiente espectro de $^1\text{H-RMN}$ (Fig. 34).

El acetato de eupalitina presenta una señal doble que integra para dos protones en 7.84 ppm con una constante de acoplamiento de $J=8.7$ Hz la cual corresponde a los protones H-2' y H-6', una señal doble que integra también para dos protones en 7.25 ppm con una $J=8.7\text{Hz}$ para H-3' y H-5', una señal simple en 6.88 ppm perteneciente a H-8, y las señales correspondientes a los grupos metoxilos en 3.99 y 3.86 ppm, así como las señales de los grupos acetato tres señales que integran para tres grupos acetato, en 2.48 ppm una señal simple que integra para 3 protones correspondientes a un grupo acetilo, en 2.35 ppm una señal simple que integra para 3 protones de un grupo acetilo, en 2.34 ppm una señal que integra para 3 protones correspondientes a otro grupo acetilo, teniendo en total tres grupos dentro de la estructura.

El acetato de eupatolitina presenta una señal doble de dobles en 7.71 ppm correspondiente al H-6' con una constante de acoplamiento *orto* $J=8.5\text{Hz}$ con H5' y con una constante de acoplamiento *meta* $J=2.1$ Hz con H-2', en 7.68 ppm una señal simple que integra para H-2', en 7.34 ppm una señal doble con una $J=8.5$ Hz para el protón H-5', en 6.88 ppm una señal simple correspondiente al protón aromático de la posición 8, en 3.99 y 3.86 ppm las señales correspondientes a los protones de los grupos metoxilo, en 2.48, 2.35, 2.34 y 2.32 ppm señales simple que integra para 3 protones cada una correspondiente a un grupo acetilo cada teniendo un acetato adicional al espectro del acetato de eupalitina.

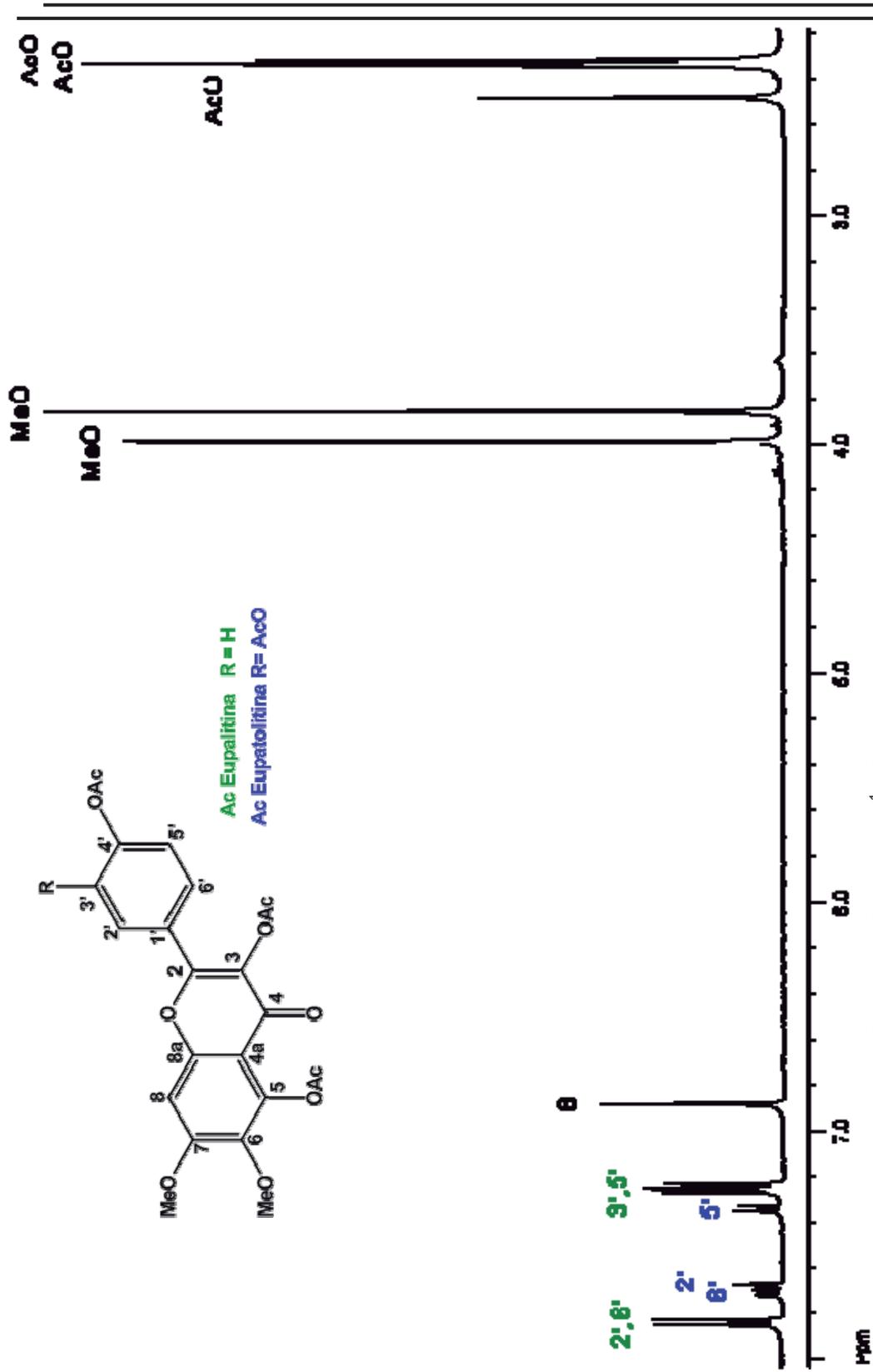
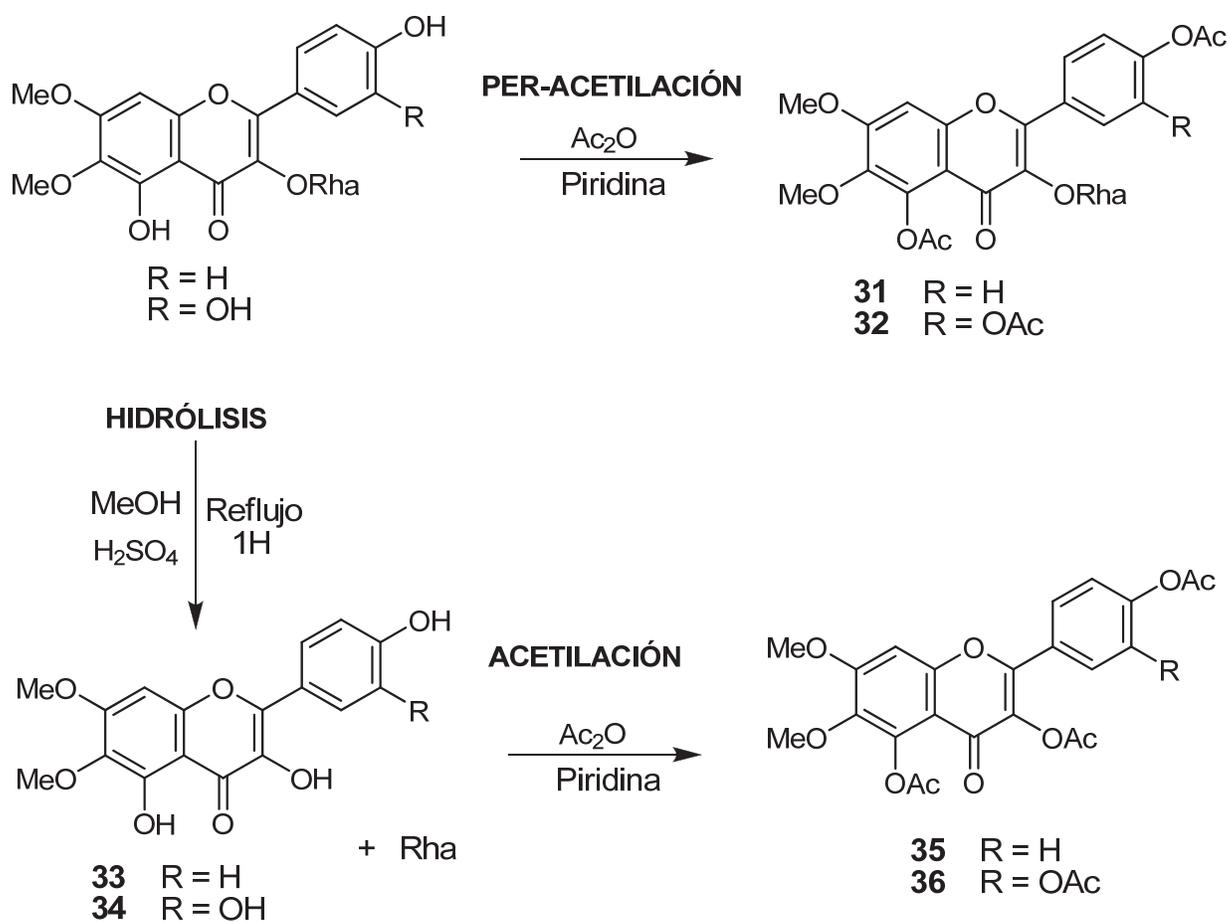


Figura 34. Espectro de ¹H-RMN a 400 MHz del acetato de la hidrólisis



La mezcla de flavonas obtenidas del extracto metanólico de *A. brevipes* fueron sometidas a ciertas reacciones que ayudaron a esclarecer la estructura de las flavonas, como breve resumen de las reacciones realizadas se presenta en el siguiente Esquema.



Esquema 11. Secuencia de reacciones para la obtención de los derivados de la Eupalina y Eupatolina.



5. PARTE EXPERIMENTAL

Los espectros de resonancia magnética nuclear de ^1H a 400 MHz y de ^{13}C a 100 MHz, así como los diagramas bidimensionales de correlación $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ (HETCOR), $^1\text{H}/^1\text{H}$ (COSY), se determinaron en un aparato Varian Mercury Plus-400, Usando como disolventes CDCl_3 o DMSO.

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fisher-Scientific y no están corregidos.

Los espectros de absorción UV se determinaron en un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 12, empleando como disolvente metanol.

Para las separaciones cromatográficas se utilizó silic a gel de la marca Merck de 60-230 y 230-400 mallas, utilizando principalmente como disolventes hexano y acetato de etilo a distintas proporciones.

Los espectros de IR se determinaron en un espectrofotómetro Perkin Elmer 16F PC FT-IR utilizando como disolvente DMSO ó KBr.

Los espectros de masas se llevaron a cabo en un cromatógrafo de gases HP 5890 series II Plus, acoplado a un espectrófotometro de Masas HP 5989-B.

La rotación óptica se determino en un aparato Perkin Elmer 241 usando CHCl_3 y DMSO como disolvente.



5.1 AISLAMIENTO DE LA EUPALINA Y EUPATOLINA

5.1.1 OBTENCION DE LOS EXTRACTOS DE HOJAS y FLORES DE *Ageratina brevipes*.

Un lote de 280 g de hojas secas y molidas y un lote de 150 g de flores secas de *Ageratina brevipes* (DC.) King & Rob se sometieron a extracción por el método de maceración a temperatura ambiente, utilizando como disolventes hexano, diclorometano y metanol, durante tres ocasiones con cada disolvente por un período de 8 días. Una vez transcurrido el tiempo se filtró y concentró en rotavapor, esto para cada extracto diferente.

El extracto metanólico de hojas se resuspendió en metanol para eliminar el color, precipitando una pasta verde la cual se filtró y el filtrado se refrigeró, el precipitado obtenido se resuspendió en metanol en repetidas ocasiones, lavando el precipitado de color verde oscuro hasta obtener al final un polvo amorfo ligeramente verde con un peso de 1.091g, con un punto de fusión de 211- 213°C. Al cual se le realizó estudios de resonancia magnética nuclear para conocer el estado del producto y la abundancia de los componentes. Para el extracto metanólico de flores un polvo amorfo de color ligeramente amarillo precipitó, se filtró obteniéndose un peso de 1.9g del polvo amorfo con un punto de fusión de 207-213°C.



5.1.2 CROMATOGRAFÍA DE LAS FLAVONAS DEL EXTRACTO METANÓLICO

Una columna de vidrio de un 1 cm de diámetro se empacó con 5 g de gel de sílice de 230-400 mallas (Merck), 50mg. del polvo obtenido de 1 extracto de flor, se colocó en la columna de forma directa (sin disolver). Se emplearon como disolventes hexano, acetato de etilo y metanol como disolventes a diferentes proporciones, colectándose fracciones de 10 mL aproximadamente.

Tabla5. Mezclas de disolventes utilizadas en la separación cromatográfica.

Fracciones	Disolvente	Relación	Volumen (mL.)
1-2	Hexano	-	20
3-7	Hexano-AcOEt	1:1	40
8-11	Hexano-AcOEt	3:7	40
12-29	AcOEt	-	130
30-39	AcOEt-MeOH	99:1	100
40-47	AcOEt-MeOH	98:2	50
48-55	AcOEt-MeOH	97:3	50
56-62	AcOEt-MeOH	96:4	50
63-68	AcOEt-MeOH	95:5	50
69-74	AcOEt-MeOH	9:1	50
75-79	AcOEt-MeOH	8:2	50
80-86	AcOEt-MeOH	7:3	50
87-91	AcOEt-MeOH	6:4	50
92-102	AcOEt-MeOH	1:1	50
103-108	AcOEt-MeOH	2:8	100
109-115	MeOH	-	50



Mezcla de flavonas. Polvo ligeram ente amarillo. P.F. 207-213°C. UV_{MeOH}: 335.95nm, 268.32nm. UV_{MeOH+NaOMe}: 389.37nm, 269.12nm. IR_{vmax} (KBr) cm⁻¹: 3386 (O-H), 1654 (C=O), 1596 (C=C).

$$[\alpha]^{\lambda} = \frac{589 \quad 578 \quad 546 \quad 436 \quad 365}{-140 \quad -149.4 \quad -181.7 \quad \text{BE} \quad \text{BE}} \quad (\text{C}=3.5, \text{DMSO})$$

BE = Baja energía

1er. Compuesto mayoritario, EUPALINA (3,4',5-Trihidroxi-6,7-dimetoxiflavon-3-O- α -ramnopiranosido): ¹H-RMN (400MHz,DMSO), δ ppm 12.58 (sa 1H,OH), 7.77 (d, J= 8.8Hz, 2H, H-2'/H-6'), 6.91 (d, J= 8.8Hz, 2H, H-3'/ H-5'), 6.84 (s, 1H, H-8), 5.32 (d, J₁₋₂=1.3Hz 1H, H-1''), 3.89 (s, 3H, CH₃O) 3.712 (s, 3H, CH₃O), 0.78 (d, J_{6'',5''}= 5.9Hz, 3H, H-6'').

2do. Compuesto mayoritario, EUPATOLINA (3,3',4',5-Tetrahidroxi-6,7-dimetoxiflavon-3-O- α -ramnopiranosido): ¹H-RMN: 12.58 (sa, 1H, OH), 7.33 (d, J_{2'-6'}= 2.0Hz 1H, H-2'), 7.27 (dd, J_{6',5'}= 8.3Hz, J_{6,-2'}= 2.0Hz, 1H, H-6'), 6.86 (d, J_{5',6'}= 8.3Hz, 1H, H-5'), 6.82 (s, 1H, H-8), 5.28 (s, 1H, H-1''), 3.89 (s, 3H, CH₃O) 3.71 (s, 3H, CH₃O), 0.81 (d, J_{6'',5''}=6.0Hz, 1H, H-6'').

5.2 PERACETILACIÓN DEL EXTRACTO METANÓLICO

230g del polvo del extracto metanólico se depositó en un matraz y se colocó a baño de hielo, se le añadió 3.5mL. de piridina y 3.5mL. de anhídrido acético de forma lenta y agitando. Se tapó el matraz y se llevó a baño maría por 1 hora agitándose de vez en cuando para disolver totalmente el compuesto.



Pasado el tiempo se vertió sobre un vaso de precipitados con hielo para detener la reacción, se le añadió agua, se llevó a un embudo de separación, se enjuagó el vaso de precipitado y el matraz donde se llevó a cabo la reacción con acetato de etilo y se vertió en el embudo de separación, se le añadió acetato de etilo hasta tener una fase orgánica mayor a la acuosa y se procedió a realizar la extracción. Se agitó y separó la fase acuosa, se lavó dos veces con agua, cuatro ocasiones con ácido clorhídrico al 10%, dos ocasiones más con agua, cuatro ocasiones con solución saturada de bicarbonato de sodio, y por último dos más con agua, separando cuidadosamente la fase acuosa en el último lavado, la fase orgánica se depositó en un matraz y se le adicionó sulfato de sodio anhidro, se filtró y se concentró en rotavapor. Dando un peso de 300mg de compuesto peracetilado. IR ν_{\max} (DMSO) cm^{-1} : 1748 (C=O, éster), 1628 (C=O), 1202 (C-O). EM, m/z (%): 331 $[\text{M}^+ - \text{Rha y AcO}]$ (10)

$$[\alpha]_D^{25} = \frac{589 \quad 578 \quad 546 \quad 436 \quad 365}{-102.6 \quad -108.4 \quad -127.8 \quad -288.2 \quad \text{BE}} \quad (\text{C} = 7.7, \text{CHCl}_3)$$

BE = Baja energía

1er. Compuesto mayoritario: $^1\text{H-RMN}$ (400MHz, CDCl_3) δ ppm: 7.90 (*d*, $J=8.5\text{Hz}$, 2H, H-2'/H-6'), 7.28 (*d*, $J=8.2\text{Hz}$, 2H, H-3'/H-5'), 6.86 (*s*, 1H, H-8), 5.67 (*sa*, 1H, H-2''), 5.59 (*sa*, 1H, H-1''), 5.25 (*dd*, $J=10.0, 2.9\text{Hz}$, 1H, H-3''), 4.92 (*t*, $J=10.0, 10.0\text{Hz}$, 1H, H-4''), 3.97 (*s*, 3H, $\text{CH}_3\text{O}-$), 3.85 (*s*, 3H, $\text{CH}_3\text{O}-$), 3.26 (*m*, 1H, H-5''), 2.48 (*s*, 1H, $\text{CH}_3\text{CO}-$), 2.33 (*s*, 3H, $\text{CH}_3\text{CO}-$), 2.13 (*s*, 3H, $\text{CH}_3\text{CO}-$), 1.97 (*s*, 6H, $\text{CH}_3\text{CO}-$), 0.86 (*d*, $J=6.2\text{Hz}$, 1H, H-6'').



2do. Compuesto mayoritario. $^1\text{H-RMN}$ (400MHz, CDCl_3) δ ppm: 7.82 (*dd*, $J=8.5, 1.1\text{Hz}$, 1H, H-6'), 7.72 (*d*, $J=1.4\text{Hz}$, 1H, H-2'), 7.40 (*d*, $J= 8.4\text{Hz}$, 1H, H-5'), 6.86 (*s*, 1H, H-8), 5.67 (*d*, $J=5.0\text{Hz}$, 1H, H-2''), 5.59 (*s*, 1H, H-1''), 5.25 (*dd*, $J= 9.9\text{Hz}$, 2.9Hz , 1H, H-3''), 4.92 (*t*, $J=10.0\text{Hz}$, 1H, H-4''), 3.97 (*s*, 3H, $\text{CH}_3\text{O-}$), 3.85 (*s*, 3H, $\text{CH}_3\text{O-}$), 3.26 (*m*, 1H, H-5''), 2.48 (*s*, 1H, $\text{CH}_3\text{CO-}$), 2.33 (*s*, 3H, $\text{CH}_3\text{CO-}$), 2.31 (*s*, 3H, $\text{CH}_3\text{CO-}$), 2.13 (*s*, 3H, $\text{CH}_3\text{CO-}$), 1.97 (*s*, 6H, $\text{CH}_3\text{CO-}$), 0.89 (*d*, $J=6.2\text{Hz}$, 1H, H-6'').

5.2.1 CROMATOGRAFÍA DE LAS FLAVONAS PERACETILADAS

Una columna de un centímetro de diámetro se empaco con 3.0g de gel de sílice 60-230 mallas (Merck), con 400mg del derivado peracetilado, usando como disolventes hexano y acetato de etilo.

Tabla 6. Mezclas de disolventes utilizados en la separación cromatográfica del compuesto peracetilado (COLUMNA1).

Fracciones	Disolventes Relación	Volumen (mL)
1-8	Hexano -	50
9-38	Hexano-AcOEt 6:4	200
39-53	Hexano-AcOEt 1:1	100
54-83	Hexano-AcOEt 4:6	200
84-88	AcOEt -	50

Se realizó una segunda cromatografía en una columna de vidrio de un centímetro de diámetro que se empacó con 4g de gel de sílice de 230-400 mallas (Merck) con la muestra de las fracciones 14 -32. Se usaron como disolventes hexano y acetato de etilo a diferentes proporciones.



Tabla 7. Mezclas de disolventes utilizados en la separación cromatográfica del compuesto peracetilado (COLUMNA2).

Fracciones	Disolvente Relación	ión	Volumen (mL)
1-9	Hexano	-	50
10-43	Hexano-AcOEt	9:1	200
44-161	Hexano-AcOEt	8:2	700
162-248	Hexano-AcOEt	75:25	510
249-323	Hexano-AcOEt	7:3	500
324-339	AcOEt	-	100

De las fracciones 202-235 eluidas con hexano y acetato de etilo 75:25 se aisló y logró identificar mediante el análisis espectroscópico a la eupalina.

Acetato de Eupalina. $^1\text{H-RMN}$ (400MHz, CDCl_3), δ ppm 7.91 (*d*, $J=8.8\text{Hz}$, 2H, H-2'/H-6'), 7.29 (*d*, $J=8.8\text{Hz}$, 2H, H-3'/H-5'), 6.86 (*s*, 1H, H-8), 5.66 (*dd*, $J_{2'',3''}=3.3\text{Hz}$, $J_{2'',1''}=1.7\text{Hz}$, H1, H-2''), 5.58 (*d*, $J_{1'',2''}=1.7\text{Hz}$, 1H, H-1''), 5.24 (*dd*, $J_{3'',4''}=10.0\text{Hz}$, $J_{3'',2''}=3.3\text{Hz}$, 1H, H-3'') 4.92 (*t*, $J_{4'',3''}=10.0\text{Hz}$, $J_{4'',5''}=10.0\text{Hz}$, 1H, H-4''), 3.98 (*s*, 3H, $\text{CH}_3\text{O-}$), 3.85 (*s*, 3H, $\text{CH}_3\text{O-}$), 3.25 (*dq*, $J_{5'',4''}=10.0\text{Hz}$, $J_{5'',6''}=6.2\text{Hz}$, $J_{5'',6''}=6.2\text{Hz}$, $J_{5'',6''}=6.2\text{Hz}$, 1H, H-5''), 2.49 (*s*, 3H, $\text{CH}_3\text{CO-}$), 2.33 (*s*, 3H, $\text{CH}_3\text{CO-}$), 2.13, (*s*, 3H, $\text{CH}_3\text{CO-}$) 1.99 (*s*, 6H, CH_3CO), 085 (*d*, $J=6.2\text{Hz}$, 1H, H-6''). $^{13}\text{C-RMN}$ (100MHz, CDCl_3) δ ppm 172.28 (C, C-4), 170.01 (C, $\text{CH}_3\text{-CO-}$), 169.93 (C, $\text{CH}_3\text{-CO-}$), 169.60 (C, $\text{CH}_3\text{-CO-}$), 169.49 (C, $\text{CH}_3\text{-CO-}$), 168.69 (C, $\text{CH}_3\text{-CO-}$), 157.88 (C, C-7), 154.57 (C, C-4'), 153.23 (C, C-8a), 152.53 (C, C-2), 141.93 (C, C-5), 139.64 (C, C-6), 136.57 (C, C-3), 130.05 (CH, C-2'/C-6'), 127.82 (C, C-1'), 122.08 (CH, C-3'/C-5'), 111.61 (C, C-4a), 98.06 (CH, C1''), 97.97 (CH, C-8), 70.37 (CH, C-4''), 70.30 (CH, C-2''), 69.15 (CH, C-3''), 68.29 (C, C-5''), 61.54 (CH_3 , $\text{CH}_3\text{O-}$), 56.41 (CH_3 , $\text{CH}_3\text{O-}$), 21.06 (CH_3 , $\text{CH}_3\text{CO-}$), 20.96 (CH_3 , CH_3CO), 20.83 (CH_3 , $\text{CH}_3\text{CO-}$), 20.69 (CH_3 , $\text{CH}_3\text{CO-}$). 20.59 (CH_3 , $\text{CH}_3\text{CO-}$), 16.96 (CH_3 , C-6'').



Acetato de Eupatolina. $^1\text{H-RMN}$ (400MHz, CDCl_3), δ ppm 7.83 (*dd*, $J_{6',5'}=8.6\text{Hz}$, $J_{6',2'}=1.1\text{Hz}$, 1H, H-6'), 7.72 (*d*, $J_{2',6'}=1.1\text{Hz}$, 1H, H-2'), 7.39 (*d*, $J_{5',6'}=8.6\text{Hz}$, 1H, H-5'), 6.86 (*s*, 1H, H-8), 5.78 (*sa*, 2H, H-2'', H1''), 5.31 (*dd*, $J_{3'',4''}=10.0\text{Hz}$, $J_{3'',2''}=2.3\text{Hz}$, 1H, H-3''), 4.92 (*t*, $J_{4'',3''}=10.0\text{Hz}$, $J_{4'',5''}=10.0\text{Hz}$, 1H, H-4''), 3.98 (*s*, 3H, $\text{CH}_3\text{O-}$), 3.85 (*s*, 3H, $\text{CH}_3\text{O-}$), 3.38 (*m*, 1H, H-5''), 2.49 (*s*, 3H, $\text{CH}_3\text{CO-}$), 2.33 (*s*, 3H, $\text{CH}_3\text{CO-}$), 2.31 (*s*, 3H, CH_3CO), 2.13 (*s*, 3H, $\text{CH}_3\text{CO-}$), 1.90 (*s*, 6H, $\text{CH}_3\text{CO-}$), 0.87 (*d*, $J_{6'',5''}=6.2\text{Hz}$, 1H, H-6'').

5.3 REACCIÓN DE HIDRÓLISIS DE LAS FLAVONAS.

250mg de los polvos del extracto metanólico de flor, se llevaron a reflujo por una hora con 10ml. de metanol y una gota de ácido sulfúrico concentrado. Terminado el tiempo de reacción, se concentró en rotavapor y comenzó a precipitar, se retiró del rotavapor y se filtró, se lavó el precipitado con hexano y unas gotas de acetato de etilo. El precipitado correspondía a la aglicona (caracterizada después por resonancia magnética nuclear), con un peso total de 95mg. IR_{vmax} (KBr) cm^{-1} : 3282 (O-H), 1654 (C=O), 1648 (C=C).

$$[\alpha]_D^{25} = \frac{589 \quad 578 \quad 546 \quad 436 \quad 365}{+0.22 \quad +0.11 \quad +0.11 \quad \text{BE} \quad \text{BE}} \quad (\text{C} = 9.0, \text{DMSO})$$

BE = Baja energía



Aglicona de la Eupalina (Eupalitina). Cristales Agujas finas amarillas, P.F. 272-275°C, $^1\text{H-RMN}$ (400MHz, DMSO), δ ppm 12.43 (s, 1H, -OH), 10.14 (s, 1H, -OH), 9.54 (s, 1H, -OH), 8.08 (d, $J=8.9\text{Hz}$, 2H, H-2'/H-6'), 6.92 (d, $J=8.9\text{Hz}$, 2H, H-3'/H-5'), 6.88 (s, 1H, H-8), 3.91 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{O-}$), 3.73 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{O-}$), $^{13}\text{C-RMN}$ (100MHz, DMSO) δ ppm 176.15 (C, C-4), 159.34 (C, C-7), 158.53 (C, C-2), 151.57 (C, C8a), 151.05 (C, C-5), 147.32 (C, C-4'), 135.79 (C, C-3), 131.24 (C, C-6), 129.58 (CH, C-2'/C-6'), 121.62 (C, C-1'), 115.46 (CH, C-3'/C-5'), 104.35 (C, C-4a), 91.22 (CH, C-8), 60.09 (CH_3 , $\text{CH}_3\text{O-}$), 56.43 (CH_3 , $\text{CH}_3\text{O-}$).

Aglicona de la Eupatolina (Eupatolitina). Miel clara, P.F. 278-281°C, $^1\text{H-RMN}$ (400MHz, DMSO), δ ppm 12.45 (s, 1H, -OH), 9.65 (s, 1H, -OH), 9.50 (s, 1H, -OH), s, 9.30 (1H, -OH), 7.73 (d, $J_{2',6'}=2.0\text{Hz}$, 1H, H-2'), 7.57 (dd, $J_{6',5'}=8.8\text{Hz}$ $J_{6',2'}=2.0\text{Hz}$, 1H, H-6'), 6.92 (d, $J_{5',6'}=8.8\text{Hz}$, 1H, H-5'), 6.84 (s, 1H, H-8), 3.91 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{O-}$), 3.73 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{O-}$).

5.4 PERACETILACIÓN DE LAS AGLICONAS.

Se pesaron 20mg de la aglicona que se llevaron a reaccionar con 1ml de piridina y 1ml de anhídrido acético a baño maría por una hora según el procedimiento anteriormente descrito para la acetilación de las flavonas. Se realizó la extracción. Obteniéndose un peso de 36.3g. IR ν_{max} (DMSO) cm^{-1} : 1774 (C=O, éster), 1736 (C=O), 1202 (C-O)

Acetato de Eupalitina. $^1\text{H-RMN}$ (400MHz, CDCl_3) δ ppm 7.84 (d, $J=8.7\text{Hz}$, 2H, H-2'/H-6'), 7.25 (d, $J=8.7\text{Hz}$, 2H, H-3'/H-5'), 6.88 (s, 1H, H-8), 3.99 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{O-}$), 3.86 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{O-}$), 2.48 ppm (s, 3H, $\text{CH}_3\text{CO-}$), 2.35 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{CO-}$), 2.34 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{CO-}$).



Acetato de Eupatolitina. $^1\text{H-RMN}$ (400MHz, CDCl_3) δ ppm 7.71 (*dd*, $J_{6'',5''}=8.5\text{Hz}$, $J_{6'',2''}=2.1\text{Hz}$, 1H, H-6'), 7.68 (*d*, $J_{2'',6''}=2.1\text{Hz}$ 1H, H-2'), 7.34 (*d*, $J=8.5\text{Hz}$, 1H, H-5'), 6.88 (*s*, 1H, H-8), 3.99 (*s*, 3H, $\text{CH}_3\text{O-}$), 3.86 (*s*, 3H, $\text{CH}_3\text{O-}$), 2.45 ppm (*s*, 3H, $\text{CH}_3\text{CO-}$), 2.35 (*s*, 3H, CH_3CO), 2.34 (*s*, 3H, $\text{CH}_3\text{CO-}$), 2.32 (*s*, 3H, $\text{CH}_3\text{CO-}$).

5.5ANÁLISIS ESPECTRAL UV.

PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES:

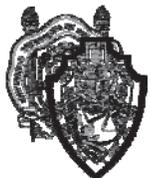
Solución problema (sol. de la flavona): 0.1mg de la flavona en 10mL de metanol

NaOMe: A 125mg de sodio metálico en trozos se le adiciona lentamente 5 mL. de metanol seco grado espectroscópico.

METODOLOGÍA.

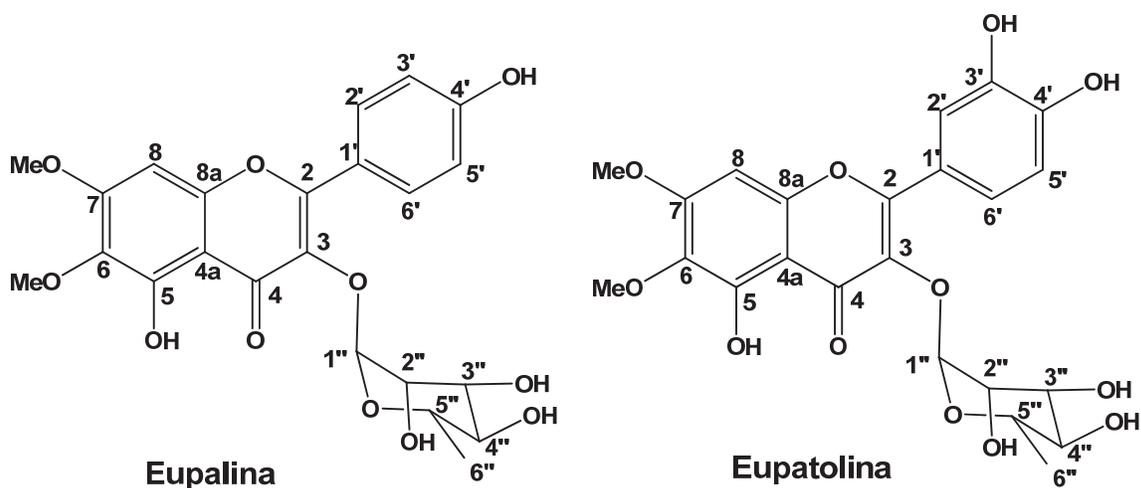
- Espectro UV en metanol barrido normal (50nm x min.): a 2-3mL de la solución problema.
- Espectro de UV en NaOMe: Tomar la solución anterior y agregar tres gotas de NaOMe, medir inmediatamente y después de 5 minutos. (Factor de tiempo crítico).

UV_{MeOH} : 335.95nm, 268.32nm. $\text{UV}_{\text{MeOH}+\text{NaOMe}}$: 389.37nm, 269.12nm



6. CONCLUSIÓN

Se logró extraer, separar y elucidar la estructura de los glicósidos flavonoides como componentes mayoritarios del extracto metanólico de las flores y hojas de *Ageratina brevipes*, la Eupalina y la Eupatolina las cuales han sido aisladas también de *Ageratina ligustrina* (*Eupatorium. ligustrinum*)⁴⁶, *Ageratina calophylla*⁴⁷, *A. saltillensis*⁴⁸, *Brickellia vernicosa*⁴⁹, *Rudbeckia bicolor*⁵⁰, *Eupatorium. areolare* var. *leiocarpum*⁵¹, *Tephrosia albifoliolis*^{52,53}, *T. deflexa*⁵³, *Achillea santolina*⁵⁴, *Artemisia ordosica*⁵⁵. Se determinaron sus respectivas estructuras a través de métodos espectroscópicos como son Resonancia Magnética Nuclear, UV e IR. Sus estructuras fueron confirmadas por comparación con datos en la bibliografía.



⁴⁶ Quijano L.; Malanco F.; Ríos T., *Tetrahedron*, **26**, 2851-2859 (1970).

⁴⁷ Fang N.; Yu S.; Mabry T.J., *Phytochemistry*, **25** 2684-2686, (1986).

⁴⁸ Yu S.; Fang N.; Mabry T.J., *J Nat Prod*, **49** 1178-1179, (1986).

⁴⁹ Ahmed A.A.; Norris J.A.; Mabry T.J., *Phytochemistry*, **25** 1501-1502, (1986).

⁵⁰ Horie T.; Tsukayama M.; Kawamura Y.; Yamamoto S., *Phytochemistry*, **27** 1491-1495, (1988).

Bukovsky M.; Magnusova R.; Kostalova D.; Suchy V.; Budesinsky M.; Ubik K., *Fitoterapia* **65** 131-136 (1994).

⁵¹ Yu S.G.; Gage D.A.; Fang N.; Mabry T.J., *J Nat Prod*, **49** 181-182, (1986).

⁵² Um B.; Losbtein A.; Anton R.; Kone M E K., *Journal de la Societe Ouest-Africaine de Chimie* **1145-49** (2006).

⁵³ Niassy B.; Lobstein A.; Um B H.; Anton R.; Kone M E K., *Biochemical Systematics and Ecology* **33** 309-312 (2005).

⁵⁴ Balboul B A A A.; Ahmed A A.; Otsuka H.; Bando M.; Kido M.; Takedat Y., *Phytochemistry* **46** 1045-1049 (1997).

⁵⁵ Zhang W.; Zhao D-B.; Li M-J.; Liu X-H.; Wang H-G., *China journal of Chinese materia medica* **31**1959-61 (2006).



Se prepararon derivados de la eupalina y eupatolina para favorecer la elucidación de la estructura y la separación de los compuestos.

Parte de este trabajo se presentó en el “XII Verano de Investigación Científica del Pacífico.” Celebrado del 22 al 24 de Agosto de 2007, en Nuevo Vallarta, Nayarit. **“Flavonoides de *Ageratina brevipes*”**. Benjamín Silva Sánchez, Rosa Elva N. del Rio Torres.



7. BIBLIOGRAFÍA

1. Márquez Alonso C.; Lara Ochoa F.; Esquivel Rodríguez B.; Mata Essayag R., "PLANTAS MEDICINALES DE MÉXICO II. COMPOSICIÓN, USOS Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA"., Universidad Nacional Autónoma de México, Méx 1999.
2. Phillipson JD., *Planta Med.* **69**,491-495 (2003).
3. Dewick PM., "MEDICINAL NATURAL PRODUCTS A BIOSYNTHETIC APPROACH"., John Wiley & Sons, 1997.
4. Zhang M-L.; Wu M.; Zhang J-J.; Irwin D.; Gu Y-C.; Shi Q- W. *Chemistry & Biodiversity.* **5.** 2008.
5. Martínez-Flóres S.; Gonzáles-Gallego J.; Culebras J .M.; Tuñón M.J., *Nutr. Hosp.* **17**, 271-278 (2002).
6. Formica J V.; Regelson W., *Food Chem Toxicol.* **33**, 1061-1080 (1995).
7. Carretero-Accame M.E., *Panorama Actual Med.* **24.** 525-528 (2000).
8. López-Luengo M.T., *Offarm*, **21.** 108-114 (2002).
9. Kan H.; Timmermann B.N.; Aladesanmi A.J.; Lu Z., *Phytochemistry.* **42**,1199-1201 (1996).
10. Pan H.; Lundgren L.N., *Phytochemistry.* **42**, 1185 (1996).
11. Brouillard R.; George F.; Fougerousse A., *Phytochemistry.* **22**, 1311-1323 (1983).
12. Gaitan E.; Cooksey R.C.; Legan J.; Lindsay R.H., *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.* **80**, 1444-1447 (1995).
13. Cambron Rosas Jairo Isac., "DITERPENOS DE *Stevia suppubescens* Lag Y ANÁLISIS DE GLICÓSIDOS FLAVONOIDEOS DE *Stevia connata* MEDIANTE HPLC"., Tesis de licenciatura presentada en la Facultad de Químico Farmacobiología de la UMSNH (1996).
14. McArdle M.B.; Campitelli R.M.; Quinn J.R., *J. Nat. Prod.* **69**, 14-17 (2006).
15. Von Kostanecki St.; Lampe V.; Tambor J., *Ber. Dtsch. Chem Ges.*, **37**, 2803-2806 y 1402-1404(1904).



16. W. Barker., *J. Chem. Soc.* 138 (1933).
17. Ganguly A.K.; Kaur S.; Mahata P.K.; Biswas, D.; Pramanik, B.N.; Chan T.M., *Tetrahedron Letters*. **46**: 4119- 4121. (2005).
18. Allan J.; Robinson R., *J. Chem. Soc.* **125**, 2192 (1924).
19. Liang B.; Huang M.; You Z.; Xiong Z.; Lu K.; Fathi R.; Chen J.; Yang Z., *J. Org. Chem.* **70**: 6097-6100 (2005).
20. Zhou C.; Dubrovsky A.V.; Larock R.C., *J. Org. Chem.*, **71**: 1728-1731 (2006).
21. Kanalka G W.; Mereddy A R., *Tetrahedron Letters.*, **46**. 6315 (2005).
22. Seijas J A.; Vazquez-Tato M P.; Carballido-Reboredo R., "Studies on the synthesis of flavonoids by a two component reaction using microwave heating". Medio[Online] URL: <http://www.mdpi.net/ecsoc/ecsoc-6/Papers/E007/E007_files/202.htm>.
23. Edrarir S.; Cotelle N.; Bakkour Y.; Rolando C., *Tetrahedron Letters*. **44**: 5359-5363 (2003).
24. Álvarez-Castro E.; Orallo-Cambeiro F., *Offarm.* **22**. 130-140 (2003).
25. Rajkapoor B.; Murugesh N.; Lalitha K.; Devarakonda R.K., *J. Nat. Med.* **61**. 80-83 (2007).
26. C Falcão.M.J.; M Poulinquem Y.B.; S Lima M.A.; Gramosa N.V.; Costa-Lotufo L.V.; G. Militão G.C.; Pessoa C.; Odorico de Moraes M.; R. Silveira E., *J. Nat. Prod.* **28**. 423-426 (2005).
27. Sik Jang D.; Jung Park E.; Kang Y-H.; Hawthorne M.E.; Schunke Vigo J.; G. Graham J.; Cabieses F.; S. Fong H.H. G. Mehta R.; M. Pezzuto J.; Douglas Kinghorn A., *J. Nat. Prod.* **66**.1166-1170 (2003).
28. Ishii K.; Furuta T.; Kasuya Y., *J. Agric. Food Chem.* **48**. 56-59 (2000).
29. Zhao Z.; Jin J. ; Ruan J.; Zhu C.; Lin C.; F ang W.; Cai Y., *J. Nat. Prod.* **70**. 1683-1686 (2007).
30. Gamez E.J.; Luyengi, L.; Lee S.K.; Zhu L.F.; Zhou B.N.; Fong H.H.; Pezzuto J.M.; Kinghorn A.D., *J. Nat. Prod.* **61**. 706-708 (1998).
31. Qui L.; Ahao F.; Jiang Z-H.; Chen L-X; Zhao Q.; Liu H-X.; Yao X-S.; Qiu F., *J. Nat. Prod.* **71**. 642-646 (2008).



32. Álvarez-Castro E.; Orallo-Cambeiro F., *Offarm.* **22**. 102-110 (2003).
33. Meragelman T.L.; Tucker K.D.; McCloud T.G.; Cardellina II J.H.; Shoemaker R.H., *J. Nat. Prod.* **68**. 1790-1792 (2005).
34. Wei F.; Ma S-C.; Ma L-Y.; But P. P-H.; Lin R-C. . Khan I.A., *J. Nat. Prod.* **67**. 650-653 (2004).
35. Clavin M., Gorzalczany S., Macho A., Muñoz E., Ferraro G., Acevedo C., Martino V. *Journal of Ethnopharmacology.* **112**. 585–589 (2007).
36. Militao G.C.G.; Albuquerque M.R.J.R.; Pessoa O.D.L.; Moraes M.E.A.; de Moraes M.O.; Costa-Lotufo L.V., *Pharmazie*, **59**. 965-966 (2004).
37. Muschietti L, Gorzalczany S, Ferraro G, Acevedo C, Martino V. *Planta Med.* **67**. 743-4 (2001).
38. De Oliveira, B.H.; Nakashima, T.; De Souza Filho, J.D.; Frehse, F.L., *Journal of the Brazilian Chemical Society* **12**. 243-246. (2001).
39. Sato, M.E.O.; Moreira, E.A., *Tribuna Farmaceutica.*, **53**. 13-27. (1985).
40. Jing-Quan, Y.; Jun-Shan, Y.; Jian-Hua, M., *Journal of Chinese medicinal materials.* **30**. 657-60. (2007).
41. Calderón de Rzedowski, Graciela.; Rzedowski, Jerzy., "FLORA FANEROGÁMICAS DEL VALLE DE MÉXICO". Instituto de Ecología, A.C., Centro Regional del Bajío. CONABIO. Pátzcuaro, Michoacán, México. 2005.
42. Guerrero, C.; Campos G.; Taboada J., *Revista Latinoamericana Química* **19**. 147-9 (1988).
43. García Heredia Leticia. "GLICÓSIDOS FLAVONOIDES DE HOJAS DE CUATRO ESPECIES DEL GÉNERO BURSERA". Tesis de licenciatura presentada en la Facultad de Químico Farmacobiología de la UMSNH (1996).
44. Geissman T.A., "THE CHEMISTRY OF FLAVONOIDS COMPOUNDS", Oxford: Pergamon, 1962, pp 41-46, 121
45. Lang Günter., "PHYTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNG DER BLÄTTER VON *Eupatorium semialatum* Benth., EINER IN ZENTRALAMERIKA TRADITIONELL VERWENDETEN ARZNEIPFLANZE ("BACCHÉ")", Tesis de doctorado presentada en Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (2001).



-
46. Quijano L.; Malanco F.; Ríos T., *Tetrahedron*, **26**, 2851-2859 (1970).
47. Fang N.; Yu S.; Mabry T.J., *Phytochemistry*, **25** 2684-2686, (1986).
48. Yu S.; Fang N.; Mabry T.J., *J Nat Prod*, **49** 1178-1179, (1986).
49. Ahmed A.A.; Norris J.A.; Mabry T.J., *Phytochemistry*, **25** 1501-1502, (1986).
50. T.; Tsukayama M.; Kawamura Y.; Yamamoto S., *Phytochemistry*, **27** 1491-1495, (1988). 50 b. Bukovsky M.; Magnusova R.; Kostalova D.; Suchy V.; Budesinsky M.; Ubik K., *Fitoterapia* **65** 131-136 (1994).
51. Yu S.G.; Gage D.A.; Fang N.; Mabry T.J., *J Nat Prod*, **49** 181-182, (1986).
52. Um B.; Losbtein A.; Anton R.; Kone M E K., *Journal de la Societe Ouest-Africaine de Chimie* **11**45-49 (2006).
53. Niassy B.; Losbtein A.; Um B H.; Anton R.; Kone M E K., *Biochemical Systematics and Ecology* **33** 309-312 (2005).
54. Balboul B A A A.; Ahmed A A.; Otsuka H.; Bando M.; Kido M.; Takadat Y., *Phytochemistry* **46** 1045-1049 (1997).
55. Zhang W.; Zhao D-B.; Li M-J.; Liu X-H.; Wang H-G., *China journal of Chinese materia medica* **31**1959-61 (2006).