



UNIVERSIDAD DE GRANADA

Tesis Doctoral

**FITOQUIMICA DE THYMELEACEAS:
COMPONENTES CUMARINICOS Y FLAVONICOS
EN HOJAS DE DAPHNE GNIDIUM L.**



01090378

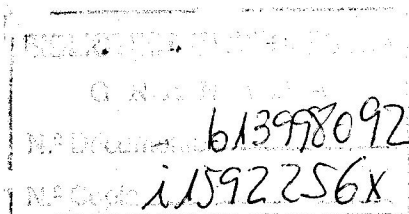
Eduardo Cabrera Torres

R-48.732
B-137-71

T-8 62
~~J.P. 4/80~~

FITOQUIMICA DE THYMELAEACEAE: COMPONENTES CUMARINI-
COS Y FLAVONICOS DE LA DAPHNE GNIDIUM L.

Eduardo Cabrera Torres



Memoria presentada
para optar al Gra-
do de Doctor en -
Ciencias, Sección
de Químicas.

Eduardo Cabrera

Visado en Granada, a
11 de Junio de 1.979

Fdo: Eduardo Cabrera Torres

Los directores de la
Tesis:

Fdo: Fidel Jorge López
Aparicio, Catedrático
de Química Orgánica.
Universidad de Granada.

Fdo: Andrés García-Grana-
dos López de Hierro, Pro-
fesor Adjunto de Química
Orgánica. Universidad de
Granada.



La presente tesis fué juzgada por el Tribunal que a continuación se indica, en Granada, el día 7 de Julio de 1979, obteniendo la calificación de SOBRESALIENTE CUM LAUDE.

TRIBUNAL DE TESIS

PRESIDENTE : Prof. Dr. D. Fidel Jorge López Aparicio,
Catedrático de Química Orgánica,
Universidad de Granada.

VOCALES : Prof. Dr.D. José L. Bretón Funes,
Profesor de Investigación del C.S.I C.,
La Laguna, Tenerife.

- Prof. Dr.D. Antonio Espinosa Ubeda,
Catedrático de Química Orgánica,
Universidad de Granada.

- Prof.Dr.D. Luis Castedo Exposito,
Catedrático de Química Orgánica,
Universidad de Santiago.

- Prof.Dr.D. Juan Varo Alcalá,
Agregado de Botánica,
Universidad de Granada.

Mi profundo agradecimiento al Prof. Dr. D. Fidel Jorge López Aparicio, Catedrático-Director del Departamento de Química Orgánica y al Prof. Adjunto Dr. D. Andrés García-Granados López de Hierro por - su inestimable ayuda y consejo en la realización de esta Tesis.

Al Prof. Dr. D. Juan Varo Alcalá, del Departamento de Botánica de la Universidad de Granada, por sus consejos en la parte Botánica de esta Tesis.

Al Departamento de Microbiología de la Universidad de Granada, por la ayuda prestada durante la realización de las pruebas microbiológicas.

A todos mis compañeros del laboratorio por - sus constantes discusiones y aliento a lo largo de este trabajo.

I N D I C E

	<u>Página</u>
I INTRODUCCION	9
II DESCRIPCION DE LA PLANTA	13
III ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS EN - THYMELEACEAS	17
3.1. Componentes flavónicos y cumaríni- cos	19
3.2. Propiedades de interés en cumari- nas y flavonas	29
IV BIOGENESIS	45
V TECNICAS USUALES EN LA DETERMINA- CION DE ESTRUCTURAS	49
5.1. Cumarinas	51
5.2. Flavonas	73
VI PARTE TEORICA Y DISCUSION DE RE- SULTADOS	89
6.1. Determinación de estructuras	91
6.2. Comentarios sobre H-RMN en Daphne- tina y derivados	181
6.3. Espectrometría de masas de flavo-	

	<u>Página</u>
nas 5-O-TMSi	191
6.4. Bioquímica sistemática	199
6.5. Actividad antimicrobiana	211
VII PARTE EXPERIMENTAL	219
7.1. Recolección y extracción de la planta	221
7.2. Fraccionamiento por disolventes	225
7.3. Procedimientos generales y aisla miento de los productos	226
7.3.1. Separaciones cromatográficas ...	239
7.3.2. Procedimientos de sublimación ..	245
7.3.3. Hidrólisis	246
7.3.4. Formación de derivados	247
7.3.5. Síntesis de Daphnetina	251
7.3.6. Determinación de actividad anti- microbiana	253
VIII CONCLUSIONES	259
IX BIBLIOGRAFIA	265

INTRODUCCION

El orden de Thymeleales constituye un grupo - de plantas, que aun constando de cerca de cuatrocientas especies, está sin embargo poco estudiado.

Dentro del orden de Thymeleales la única familia presente en Europa es la de las Thymeleaceas y a su vez solo existen de ellas los géneros Thymelea, Daphne y Triantron (Tutin 1972).

Esta memoria constituye parte de un trabajo - más general desarrollado en nuestro Departamento que tiene por objeto aportar datos sobre componentes de algunas Daphnes y Thymeleas.

En nuestro caso hemos estudiado los componentes cumarínicos y flavónicos y sus glucósidos de la Daphne gnidium L., planta en la que se podía suponer y de hecho existía algún dato (ver antecedentes bibliográficos), de la presencia de Daphnina, como en todas las Daphnes estudiadas, pero sin embargo no - se había realizado ningún estudio sobre otros componentes de los tipos citados.

En otros trabajos desarrollados simultáneamente se ha procedido al análisis de componentes flavónicos de la *Thymelea tartonraria* así como del estudio de la fracción lipídica de la *Thymelea hirsuta*. Con todos los datos obtenidos en estos trabajos, y contando además con los resultados publicados sobre Thymeleales en las fuentes bibliográficas de que disponemos, hemos abordado un primer intento de sacar algunas consecuencias en lo que a Bioquímica sistemática se refiere.

Por último y teniendo en cuenta la gran abundancia de la *Daphne gnidium*, así como la relativa comodidad con que puede aislarse su componente mayoritario, hemos procedido a unas pruebas de su actividad antimicrobiana.

DESCRIPCION DE LA PLANTA

Las Thymeleaceae, constituyen la única familia Europea del género Thymeleales. Por lo general son arbustos con hojas simples, casi siempre sentadas y sin estipúlas. Flores regulares; cáliz más o menos tubular y con cuatro-cinco piezas patentes, petaloideas; pétalos ausentes o escamosos, estambres casi siempre en número de ocho o diez, soldados al interior del tubo caliginal. Ovario súpero, generalmente unilocular; estigma sentado. Fruto en nuez, drupa o baya. De ellas si el fruto es seco, incluido en el cáliz, y las flores inconspicuas, amarillentas o verdosas, pertenecen al género Thymelaea. Por el contrario si el fruto es carnososo, no está incluido en el cáliz y las flores son vistosas, rosadas, blancas o verdes, la planta en cuestión pertenece al género Daphne.

Las Daphnes a su vez se suelen subdividir en dos grupos: Arbustos pequeños generalmente menores de veinticinco centímetros y arbustos que por lo general alcanzan o superan el medio metro. Dentro de este segundo grupo una de las especies que poseen las flores en racimos terminales es la Daphne gni-

dium L (nombre popular Torvisco, Torvizco o Matapollo).

La *Daphne gnidium* es un arbusto erecto, poco ramificado, siempre verde, de medio a dos metros de altura, propio de las regiones mediterráneas, con flores pequeñas y perfumadas, blancas, que crecen directamente en ramilletes terminales erectos, frecuentemente ramificados. Flores blancas interiormente y pardas por fuera ramas, de la inflorescencia y cálices densamente cubiertos de pubescencia blanca y sedosa. Hojas numerosas, de dos a cuatro centímetros, linearlanceoladas, con punta fina, coriáceas, glaucas y lampiñas. Fruto carnoso rojo o negro.

ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS

**COMPONENTES FLAVONICOS Y CUMARINICOS
EN THYMELEACEAS**

Los antecedentes bibliográficos que poseemos sobre la *Daphne gnidium* son escasos, constando sólo un trabajo de Martín Panizo, Valverde y Rodríguez - sobre las raíces del Torvisco, en el que aislan algunos componentes y un nuevo alcohol al que denominan Torviscol.

En cuanto al género *Daphne* en general, la bibliografía de que disponemos tampoco es muy amplia, y en general se limita al estudio de cumarinas y - sus glucósidos, salvo algunos trabajos sobre diterpenos co-carcinogénicos.

Ciñiéndonos a cumarinas y flavonas en el género *Daphne* diremos que ya en 1930 F. Wessely y K. Sturm (WESSELY, 1930) publican un artículo sobre la constitución de las Daphninas (7-OH-8-glucosil daphnetina y 8-OH-7-glucosil daphnetina), (I) y (II), pero al parecer trabajan con glucósidos sintetizados.

En 1954 Toshimira Nakabayashi (NAKABAYASHI, - 1954) identificó *Daphnina* (I) en la corteza de la *Daphne kiusiana*, *Wikstoroemia gampi* y *Edgerwortia* -

papífera, mediante cromatografía en papel, así como el aglucón de este glucósido por hidrólisis con ácido sulfúrico.

En 1963 Tscheche, Schacht y Legler (TCHESCHE, 1963) en un estudio sobre varias especies de Daphne: *Daphne merzereum*, *Daphne laureola*, *Daphne alpina*, - *Daphne odora* y *Daphnopsis racemosa*, describen una bicumarina, la Daphnoretina (III), de la que dan sus datos de UV e IR, asimismo preparan y estudian numerosos derivados.

Los mismos autores (TCHESCHE, 1963-b) poco despúés encuentran un glucósido de la Daphnoretina en bayas de *Daphne merzereum*, a la que llaman Daphnorina (IV) e identifican como 7-O- β -D-glucósido de la Daphnoretina.

En 1964 Sharma, Zaman y Kidwai (SHARMA 1964) aislaron Daphnina (I) de las raíces de la *Daphne pa*piracea e hidrolizando con Metanol/Clorhídrico obtu vieron la Daphnetina (V).

Años más tarde en 1967 Haiti y Roy (HAITI, - 1967) estudiando un extracto de hojas de la *Daphne*

cannabina obtienen la Taraxerona (VI).

En 1968 Kosheleva y Nikonov (KOSHELEVA, 1968) estudian la *Daphne mezereum* y detectan en ella el glucósido 7-hidroxycumarin-8-O- β -D-glucopiranosido (II) que aislan puro por primera vez. También aislaron un nuevo fenol-glucósido al que denominaron Daphnosida e intentaron identificarlo como 3-metoxihidroxibencil-4- α -D-glucopiranosido, así como Daphnina (I), β -Sitosterol (VII), sacarosa, Daphnetina (V) y Umbeliferona (VIII).

También en 1968 Kosheleva (KOSHELEVA, 1968-b) Nikonov y Perelson aislan por cromatografía sobre alúmina de una extracción acuosa de *Daphne julia* dos glucósidos que identifican como 7-O- β -D-glucopiranosil-8-hidroxycumarina y 8-O- β -D-glucopiranosil-7-hidroxycumarina de los que dan los espectros IR y UV.

De nuevo en 1969 Kosheleva (KOSHELEVA, 1969) estudiando las ramas de la *Daphne mezereum* establece la presencia de catorce manchas fluorescentes a la luz ultravioleta, de las cuales tres las relaciona con cumarinas e identifica una como Daphnina (I).

En este mismo año Kapoor, Kohli y Zaman (KAPOOR, 1969) realizan extracciones con álcalis hirviendo de *Daphne oleoides* y aislan e identifican sacarosa y Luteolina-7-O-glucósido (IX).

De nuevo Kosheleva, Nikonov y Pimenov en 1969 (KOSHELEVA, 1969-b) estudian un conjunto de varias partes de ocho especies de *Daphne*, recolectadas en diversas regiones y en diferentes épocas del año, - por cromatografía en papel con $\text{BuOH-ACOH-H}_2\text{O}$ (4:1:5) como líquido de desarrollo. Determinan las hidroxycumarinas de acuerdo con su fluorescencia a la luz ultravioleta con y sin vapores de amoníaco. Identifican así Umbeliferona (VIII), Daphnetina (V) y Daphnina (I), junto a algunos flavonoides, pero no especifican cuáles son éstos.

En 1971 Schildknecht, Herman, Mauver y Robert (SCHILDKNECHT 1971) por estudio espectroscópico de RMN de la Merzereina de la *Daphne merzereum* dan una estructura que se asemeja a la toxina de la *Daphne*.

En 1972 Martin Panizo, Valverde y Rodríguez - (MARTIN PANIZO, 1972) estudian las raíces de la *Daphne gnidium* caracterizando los siguientes compuestos:

Daphnoretina (III), un probable isomero de ésta, β -Sitosterol (VII), hexacosanol, y un nuevo alcohol que denominaron Torviscol. Determinaron también la composición de la fracción de ácidos grasos.

En 1975 Rizk, Hammouda e Ismail (RIZK, 1975) investigan las cumarinas de la *Thymelea hirsuta* encontrando Daphnorina (IV), Daphnina (I), Daphnetina (V), Daphnetina- β -glucósido, Umbeliferona (VIII), -Scopoletina (X), y Esculetina (XI) previamente habían descrito una lactona no identificada que resultó ser Daphnoretina (III). Asimismo dan los valores de Rf de treinta cumarinas en diversos disolventes.

En cuanto a Thymeleales se refiere la bibliografía de que disponemos se da en forma abreviada - en la siguiente tabla, en la que damos la sustancia aislada, la especie en la que se encontró y la referencia bibliográfica.

Producto

- (VIII) Umbeliferona
- (V) Daphnetina
- (II) Daphnetina-8-O-glucósido
- (I) Daphnina
- (III) Daphnoretina

- (IV) Daphnorina
- (III) Daphnoretina
- (II) Daphnetina-8-O-glucósido
- (I) Daphnina
- (II) Daphnetina-8-O-glucósido
- (V) Daphnetina
- (XXXI) Apigenina
- (XXXIII) Luteolina
- (VIII) Umbeliferona

Especie	Referencia
Daphne mezereum	Kosheleva, 1970
"	"
"	Kosheleva, 1968
"	Kosheleva, 1970
"	"
	Ronlan, 1970
	Stont, 1970
"	Tchesche, 1963
Daphne camabina	Majunder, 1968
Daphne acuminata	Zirvi, 1977
Daphne papyracea	Sharma, 1964
"	Masipuri, 1973
Daphne odora	Kurihara, 1973
"	"
"	"
"	Kosheleva, 1969

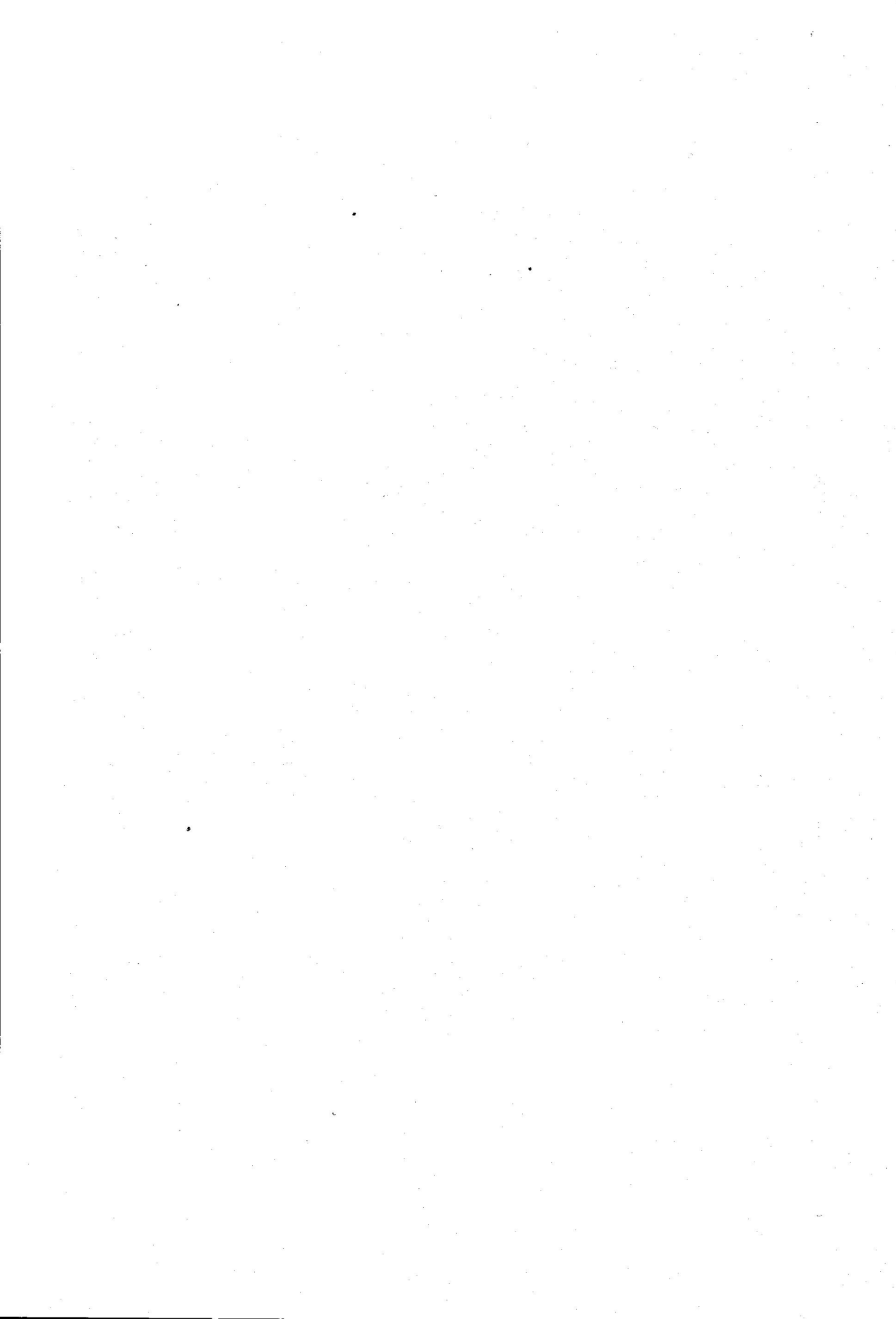
- (I) Daphnina
- (II) Daphnetina-8-O-glucósido
- (--) Genkwanina
Yuenkanin
- (I) Daphnina
- (V) Daphnetina
- (IX) Luteolina-7-O-glucósido
- (V) Daphnetina
- (I) Daphnina
- (--) Pilloina
- (--) 7,4'-dimetoxi-5-O-xilosilglucósido
- (--) 7,4'-dimetoxi-5-O-xilosilglucósido
- (--) 3'-hidroxi-7,4'-dimetoxi-5-xilosilglucósido
- (--) 3'-4'-dihidroxi-7-metoxi-5-xilosilglucósido
- (--) Genkwanina--5-xilosilglucósido

Daphne julia	Kosheleva, 1968
"	"
Daphne genkwa	
"	Chung-Liang, 1965
Daphne pontica	Ergenc, 1968
"	"
Daphne oleoides	Kapoor, 1969
Ovidia andina	Núñez-Alarcón, 1977
"	"
"	"
"	"
Ovidia pillopillo	Núñez-Alarcón, 1971
"	Núñez-Alarcón, 1973
"	"
"	"

(--)	Pilloina	<i>Ovidia pillopillo</i>	Núñez-Alarcón, 1973
(VIII)	Umbeliferona	<i>Thymelaea hirsuta</i>	Rizk, 1975
(V)	Daphnetina	"	"
(I)	Daphnina	"	"
(II)	Daphnetina-8-0-glucósido	"	"
(X)	Escopoletina	"	"
(XI)	Esculetina	"	"
(III)	Daphnoretina	"	"
(--)	Vicenina-2	"	Nawwar, 1977
(XXX)	Edgeworthina	<i>Edgeworthia gardneri</i>	Majunder, 1974
(III)	Daphnoretina	"	"
(--)	Gnidiacumarina	<i>Gnidia lamprata</i>	Kupchan, 1975
(--)	Lasiocephalina	<i>Lasiosiphon eriophalus</i>	Das, 1973
(--)	Kaemferol-3,7-disulfato	<i>Reamuria mucronata</i>	Newwar, 1977
(VIII)	Umbeliferona	<i>Arthrosolen polycephalus</i>	Vermenten, 1968

Los autores indican en el trabajo que la sustancia puede ser la genkwanina-5-0-xilosilglucósido, o bien la genkwanina-5-0-glucosilxilósido.

**PROPIEDADES DE INTERES DE CUMARINAS
Y FLAVONAS**



La utilidad de las cumarinas de plantas puede verse que es amplia. La primera propiedad de las cumarinas que llama la atención es que son un tóxico muy potente para los peces. Así por ejemplo la Imperatorina (XXIII) es ya tóxica en concentraciones de diez partes por millón.

Muchas cumarinas poseen efectos narcóticos - cuando son suministradas a ratones, perros y otros animales (SETHNA, 1945).

Su empleo actual más importante, en función - de su actividad como anticoagulantes, es el de raticida, consumiéndose en enormes cantidades en las - grandes ciudades. (TRAKHANOV, 1970) (SILKO, 1971). Esta actividad como anticoagulantes, de efecto contrario a la vitamina K ha sido objeto de muchas investigaciones (BURGER, 1960) (SHORTE, 1965) (HOCH--MAN, 1967) (SMITH, 1968).

El Dicumarol (XIX) es el principio amargo causante de la enfermedad del trebol dulce (CAMPBELL, 1941) que se caracteriza por un bajo poder de coa--

gulación de la sangre, originando hemorragias internas, que causan perjuicios al ganado vacuno y ovino (PILLARD, 1965). Esta misma propiedad de las cumarinas hace que muestren actividad uterotrópica (PANACHENSKO, 1970) (ROLL, 1966) (LEDNICER, 1965), siendo utilizadas como anticonceptivos y para combatir la tromboflebitis.

En individuos de edad madura prolongan el tiempo de protrombina y hacen decrecer la actividad del factor X (NERED, 1967).

Muchas cumarinas ejercen acción dilatadora sobre los vasos sanguíneos, incluso la propia Cumarina (NITZ, 1964) y el Osthol (XXIV) actúa específicamente como vaso dilatador de coronarias (SHVAREV, 1965) (MATHUR, 1965) (RITTER, 1966) (MURA KAMI, 1970) (RITTER, 1966-b) (BAYERLE, 1970) (BABIANE, 1970) (RITTER, 1970) (BAUBKUR, 1970).

La umbeliferona(VIII) y la Herniarina (XXV) presentan actividad espasmolítica, y la Imperatorina(XXIII) entre otras es hipotensora actuando de forma similar a la Papaverina, haciendo decrecer la tensión arterial con un efecto tóxico menor.

Los japoneses KITAGAWA e IWAKI que han estudiado la actividad fisiológica de un gran número de cumarinas, encuentran que la mayor parte de ellas - actúan sobre el sistema cardiovascular con acción - hipotensora y adrenalítica, así como hipnótica y antipirética (BOSCHETTI, 1970) (MELANCHIER, 1966) (BOSCHETTI, 1970-b) (HARNAKITAGAWA, 1964) y a su vez HIGUS y colaboradores han tratado la angina de pecho con hidroxycumarinas (HUGUES, 1964).

Otra utilidad de las cumarinas es en el tratamiento de las enfermedades de la piel, ya que por - sus efectos antiinflamatorios (FONTAINE, 1966) (MADDAUS, 1965) o principalmente para repigmentar la - piel en el tratamiento de Vitiligo Ideopático, pues hacen que se incremente la producción de melanina - cuando la piel se expone a la radiación ultravioleta (BURGER, 1960) (KHADZHAI, 1966) (ABIDOV, 1966).

CAPORALE y col., (CAPORALE, 1960) encuentran que la administración de Psoraleno (XXVI) Bergapteno (XXVII) y Xantotoxina (XXVIII) reducen marcadamente el efecto hemolítico de la luz ultravioleta.

Los rusos NIKONOV y col. (NIKONOV, 1962) han

estudiado el poder antitumoral de la Peucedanina - (XXIX), Xantotoxina (XXVIII) y otras cumarinas así como la relación existente entre la estructura y la actividad anticancerígena (ALDERFELD, 1967). Las cumarinas han sido usadas como antihelmínticos (BUR--GER, 1960), contra la gota (ROUSSEL UCLAF, 1966) como diuréticos (SELLERI, 1966) (HOPPS, 1968), como antihistamínicos (DANIGRAHI, 1966), etc...

Algunas cumarinas han mostrado caracteres de antibióticos (DADAK, 1968) (HODAK, 1967) (KRISHNG, 1965), bactericidas (OKUMURA, 1967) (KEIL, 1970) - (BAELIMAN, 1970) (ICHIKAWA, 1970), fungicidas (CHA--KRABORTY, 1962) (KUHN, 1970) (Mc INTYRE, 1970) pes--ticias (Mc INTYRE, 1970), nematocidas (BUSHONG, - 1966), etc...

Especial consideración merece la propiedad de la Daphnetina (v) aglucón mayoritario y muy abundante en la planta objeto de estudio en la presente memoria, y que se ha revelado eficaz contra los es--tafilococos resistentes a la penicilina, especial--mente el Estafilococcus aureus (DADAK, 1967). Asi--mismo algunas cumarinas han sido usadas en el tratatamiento contra la tuberculosis (SEIYAKEN, 1967) (TA-

KASHI, 1970) (AKIRA MITANI, 1964) (SEIYAKU, 1967).

Por otra parte en agricultura han sido aplicadas ciertas cumarinas como estimulantes del crecimiento de las raíces y tubérculos de algunas plantas, y otras como retardadoras del crecimiento de plantas procedentes de semillas (MEYER, 1965) (KHAN, 1966) (MOHAN, 1966) (DADAK, 1966) (FERRER, 1967) (KNYPL, 1968) (BERRIE, 1968) (KNYPL, 1969) (PALEG, 1970) (MURADYAN, 1970) (KNYPL, 1970) (MORGAN, 1970).

En análisis químico se emplean cumarinas como indicadores (MARENS, 1970) (SALAM KHAN, 1970) o en determinaciones gravimétricas de metales como el cobre, cobalto y otros, ya que forman complejos de coordinación sólidos y estables (MOHAN, 1969) (RASROSI, 1970) (RAM CHAND, 1970). Asimismo ya hemos hablado de su utilidad como reactivos en Espectroscopia de Fluorescencia. En fotografía se usan como reductores en el proceso de revelado (KHAIKIN, 1968) (REIL, 1968) (SHAMILSKAYE, 1970), y en perfumería en alguna ocasión (RISTIC, 1971).

Añadidas en pequeñas cantidades a los baños electrolíticos de níquelado, hacen que aumente la

resistencia del niquelado a la corrosión dando una superficie brillante al hacer que cambie favorablemente la microestructura de la deposición (DOKTORINE, 1965) (TAYLOR, 1965) (VAÑENTEL, 1966) (YA POPE-REKE, 1966) (HARSHAW CHEM Co, 1968) (BELERS, 1970) (BODNEVAS, 1970).

Ciertas cumarinas añadidas en muy pequeña proporción a los dentríficos sirven como abrillantadores ópticos al adherirse a los dientes e incluso la cumarina se ha usado para prevenir la caries (CARL E.A. STRALFORS, 1970), también se han añadido a los detergentes como abrillantadores ópticos (LINDERMER, 1968) (BLOEDRING, 1968).

Algunas cumarinas adicionadas en cantidades - del orden de 0,01-0.1% a las materias plásticas (poliesteres, poliacrilonitrilo) hacen de abrillantadores ópticos o fluorescentes al tiempo que actúan de estabilizadores frente a la luz (SANDOZ LTD, 1965) (KOBAYASKI, 1965) (GEIGY, 1966) (FARBENFABRIKEN, BAYER, 1967) (GEIGY, 1968) (RODERIAR, 1968) (OKADA, - 1970) (HORIZUCHI, 1970) (FARBENFABRIKEN BAYER, 1971) (SAKAME, 1970).

Propiedades farmacológicas de Flavonas

SINGLETON y ESAU (1969), después de recabar - una gran cantidad de información sobre actividad fisiológica de polifenoles en los animales, llegaron a la conclusión, que mientras los flavonoides pueden tener un número de efectos fisiológicos generalmente beneficiosos, no presentan una actividad fisiológica destacada.

EHRlich y RAVEN (1964) indicaron, que los flavonoides y otros metabolitos secundarios, tienen un papel fundamental en las plantas en que se desarrollan ciertas larvas, aunque en otras ocasiones, -- otros flavonoides sirven como repelentes de insectos.

En lo que a su aspecto antibiótico se refiere, se ha visto que la mayor parte de los antocianos y leucoantocianos son inhibidores, en presencia de glucosa, de bastantes tipos de microorganismos (POWERS, 1964); sin embargo, la actividad antibiótica - de los compuestos flavónicos parece ser totalmente nula.

Ciertos flavonoides, parece ser, que demues--

tran actividad en su aspecto antivírico, especialmente la quercetina (PUSZATAI y col., 1966). Este producto es activo frente al Herpesvirus hómínis, a niveles de 300 μ g/ml. Por otra parte, algunos flavonoides se muestran moderadamente inhibidores del crecimiento de ciertos carcinomas: Eupatina y eupatoretina (KUPCHAN, 1969), centauredina o la 6-demetoxi centauredina (KUPCHAN y BAUERSCHMIDT, 1971), quercetina y sus glicosidos (DITTMAN y col., 1972), quercetina pentametil eter y la rutina (WATTENBERG y LEONG, 1970).

Quizás, la mayor atención farmacológica que se ha prestado a los flavonoides, ha sido como inhibidores de la fragilidad capilar subcutánea. RUSZNYAK y SZENT-GYORGYI, (1936), comprobaron que una muestra de ácido ascorbico impuro, suministrado por ellos a un médico para el tratamiento de un paciente que sufría fragilidad capilar, logró la curación completa del paciente. Posteriormente se vió, que muestras del ácido, totalmente purificado, no eran efectivas, y encontraron que los contaminantes flavónicos que acompañaban al ácido ascorbico, preparado a partir del Capsicumannuum y del Citrus limon, eran los verdaderos responsables de la restauración

de la resistencia capilar lo cual fue comprobado en trabajos posteriores. La preparación, rica en biflavonoides, la llamaron Vitamina P, y probaron que reduce las hemorragias, extiende el efecto del ácido ascorbico y reduce la extensión del área enrojecida. Investigaciones posteriores, han demostrado este - efectos terapéutico por varios flavonoides, fundamentalmente la rutina y sus derivados metilados, y flavonas procedentes del limón (GRIFFITH y col. - 1955 KEFFORD y CHADLER, 1970).

DEEDS (1968), después de hacer una revisión - de más de 100 publicaciones sobre actividad fisiológica de flavonoides, llega a la conclusión que, los compuestos que poseen hidroxilos libres en los carbonos 3' y 4', ejercen un efecto fisiológicamente - beneficioso en los capilares. SRINIVASAN (1971) y ROBBINS (1973), han presentado evidencias de que los flavonoides pueden desempeñar otro importante papel en el sistema circulatorio, actuando en la agregación de los eritrocitos.

Los aspectos terapéuticos de los flavonoides, pueden atacar otros aspectos distintos a los ejercicios sobre la pared de los capilares. VOGEL (1971) ha

indicado, que varios de estos compuestos, modifican la permeabilidad capilar, el test más aplicado para medir la resistencia capilar, añadiendo, que deben influir sobre el sistema linfático y la transferencia de solutos que provienen de otros tejidos. Los flavonoides, cuya actividad en el incremento de la resistencia capilar se ha comprobado, incluye - flavanonas, flavonoles, isoflavonas, catequinas, - flavandioles y chalconas (GABOR, 1971). HENDRICKSON y KESTERSON, (1964), han tabulado hasta 52 grados de respuesta a los flavonoides que tienen la propiedad de incrementar la resistencia capilar.

Se ha comprobado que los compuestos flavoni--cos que poseen efecto biológico, sobreviven a los - enzimas digestivos y a la flora intestinal, y son trasladados a los sitios activos. BENKO (1970), dijo, que un régimen alimenticio libre o muy deficiente en flavonoides, provoca edemas y hemorragias en ratas, problema que se ve eliminado si existe la - presencia de rutina o esperidina, en dosis de 50 - mg/Kg.

Por otra parte, GABOR (1972) ha encontrado que si se usa indiscriminadamente estos compuestos para

corregir problemas vasculares, sin tenerse en cuenta la causa del desorden, los resultados, en muchos casos, no son satisfactorios.

CHARI y SESHADRI (1948) encontraron que la crisina (5,7-dihidroxi flavona) y la galangina (3,5,7-trihidroxi flavona) son consideradamente tóxicas para los peces, mientras que, flavonas más hidroxiladas, poseen un carácter tóxico más limitado. La metilación de un grupo hidroxilo, incrementa la toxicidad; así, la 7-metoxi flavona, es alrededor de 10 veces más tóxica, en los peces, que la rotenona, y la 5,6,7-trimetoxi flavona, lo es para algunos peces a concentraciones de 5 ppm.

Los rotenoides tienen una baja toxicidad en mamíferos (LD_{50} para la rotenona en conejos es de 3 g/Kg). Igualmente, en el hombre no parece que exista toxicidad por parte de los flavonoides, aunque OGISO (1972) ha indicado que los glicosidos macroclicos flavónicos, llamados "poriolido e isoporiolido", aislados del *Leucothoe keiskei*, poseen una LD_{50} de 1 mg por cada kilogramo de peso, cuando se inyecta intravenosamente en monos.

En la década de los años 40 se comprobó, fundamentalmente en Australia, que ciertas plantas forrajeras, iniciaban antes de tiempo el "estro" en animales inmaduros, e interferían en su reproducción normal, comprobándose que, el *Trifolium subterraneum* era el causante de estos hechos (BENNETTS, 1946). - BRADBURY y WHITE (1951), aislaron la isoflavona genisteína, en cantidad aproximada al 0,7% de las hojas de una variedad del *Trifolium*, viéndose posteriormente (BIGGERS y CURNOW, 1954), que era estrógena - en el mono, llamando a esta causa de infertilidad, la enfermedad del trébol. Del *Trifolium repens* y del *Medicago sativa*, se aisló el cumestrol, producto de 30 a 100 veces más estrogénico que la genisteína.

Se ha estudiado la actividad estrogénica de otros muchos tipos de flavonoides, encontrándose que la quercetina y el kaempherol-3-rhamnosilgalactosido-7-rhamnosido, poseen una pequeña actividad (PRETORIUS, 1958). En contraste, YAMASHITA (1965), al examinar la actividad mediante bioensayos, deduce que no son de por sí estrógenos; sin embargo, cuando se administran con progesterona la hesperitina y la morina, a nivel de 1 a 10 mg., bloquean el efecto de la progesterona.

En los últimos años ha tomado gran interés el carácter antifúngico de determinados flavonoides - que se producen como respuesta por parte de determinadas plantas al ataque de microorganismos, fundamentalmente de hongos. Estos productos reciben el nombre de "Phytoalexinas" (Phyton = planta; alexin = defender). Así pueden ser definidas como sustancias de defensa, con propiedades antimicrobianas que son producidas post-infeccionalmente por las plantas.

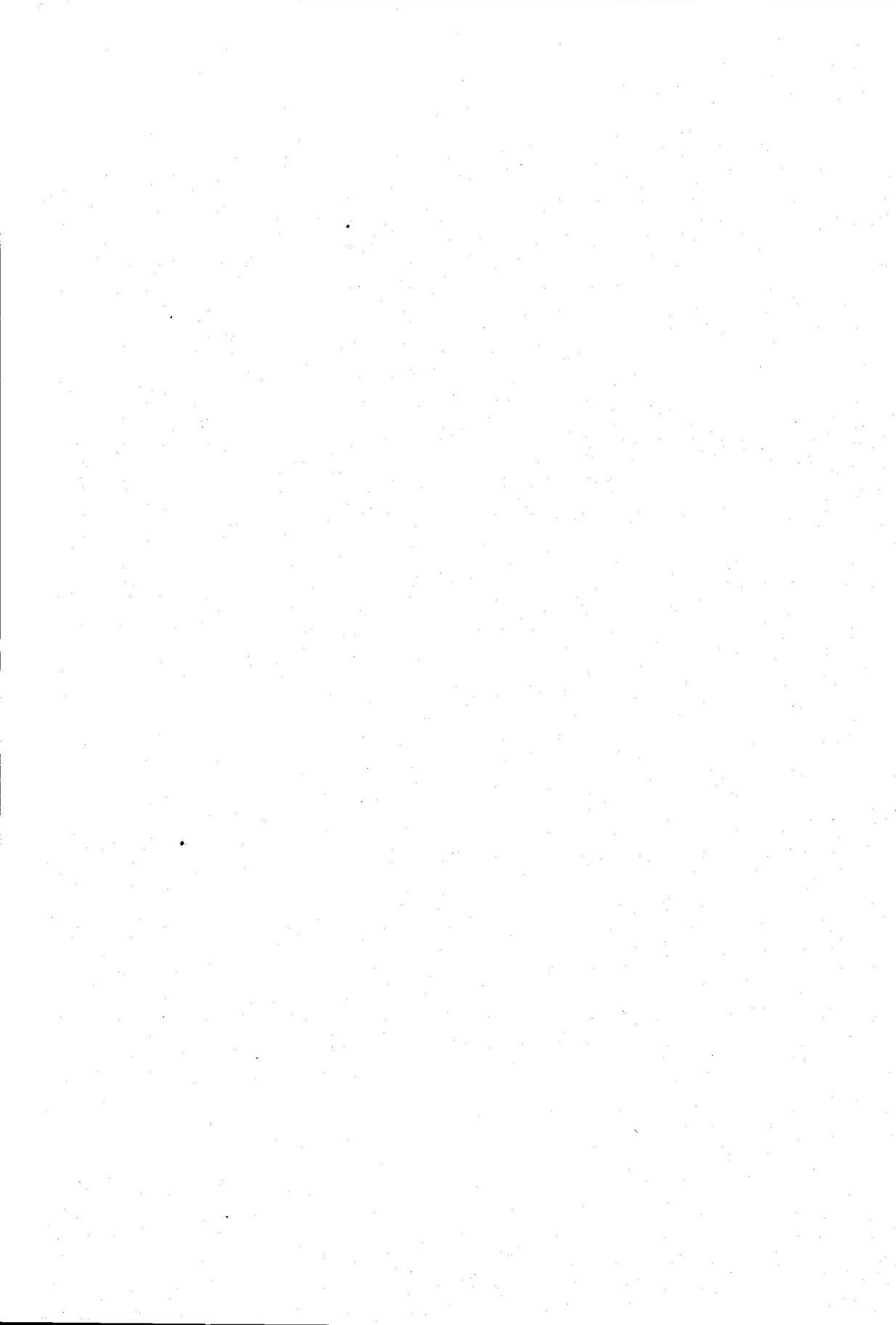
El primer progreso decisivo en lo que a este tipo de productos se refiere, fueron los estudios - realizados por MÜLLER (1940) referentes a la resistencia a las patatas con respecto al hongo *Phytophthora infestans*. Entre otros puntos interesantes se hizo notar que la defensa de la planta frente al hongo, conlleva la alteración en los tejidos, que se conoce con el nombre de "necrosis de defensa".

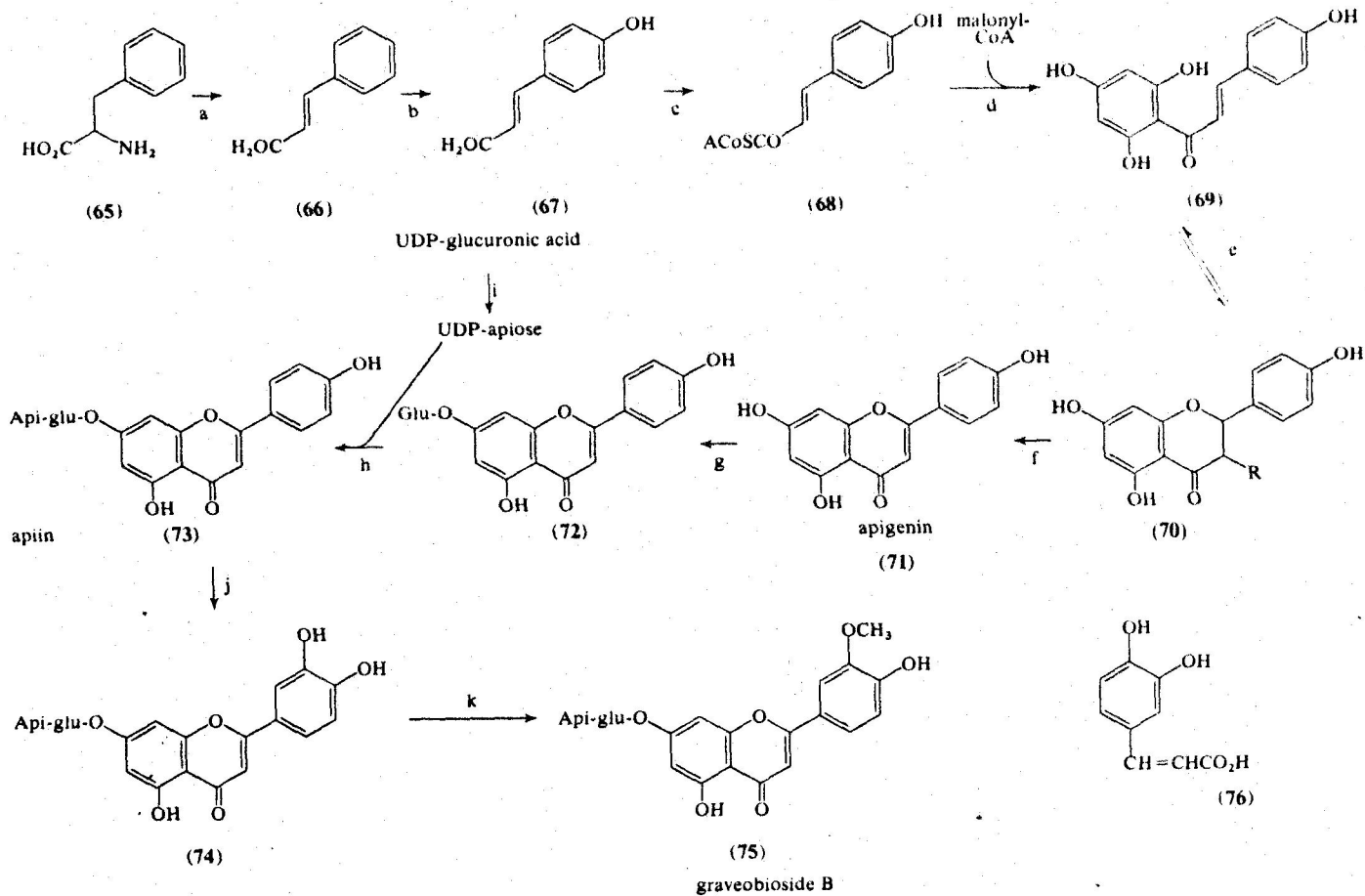
Las fitoalexinas no son un único tipo de sustancias, sino que incluye varios grupos de productos naturales. Se conoce que en las leguminosas generalmente producen isoflavonas; las solanaceas, diterpenos; las compuestas, poliacetilenos y las or--

quidacaeas, dihidro fenantrenos (INGHAN, 1976).

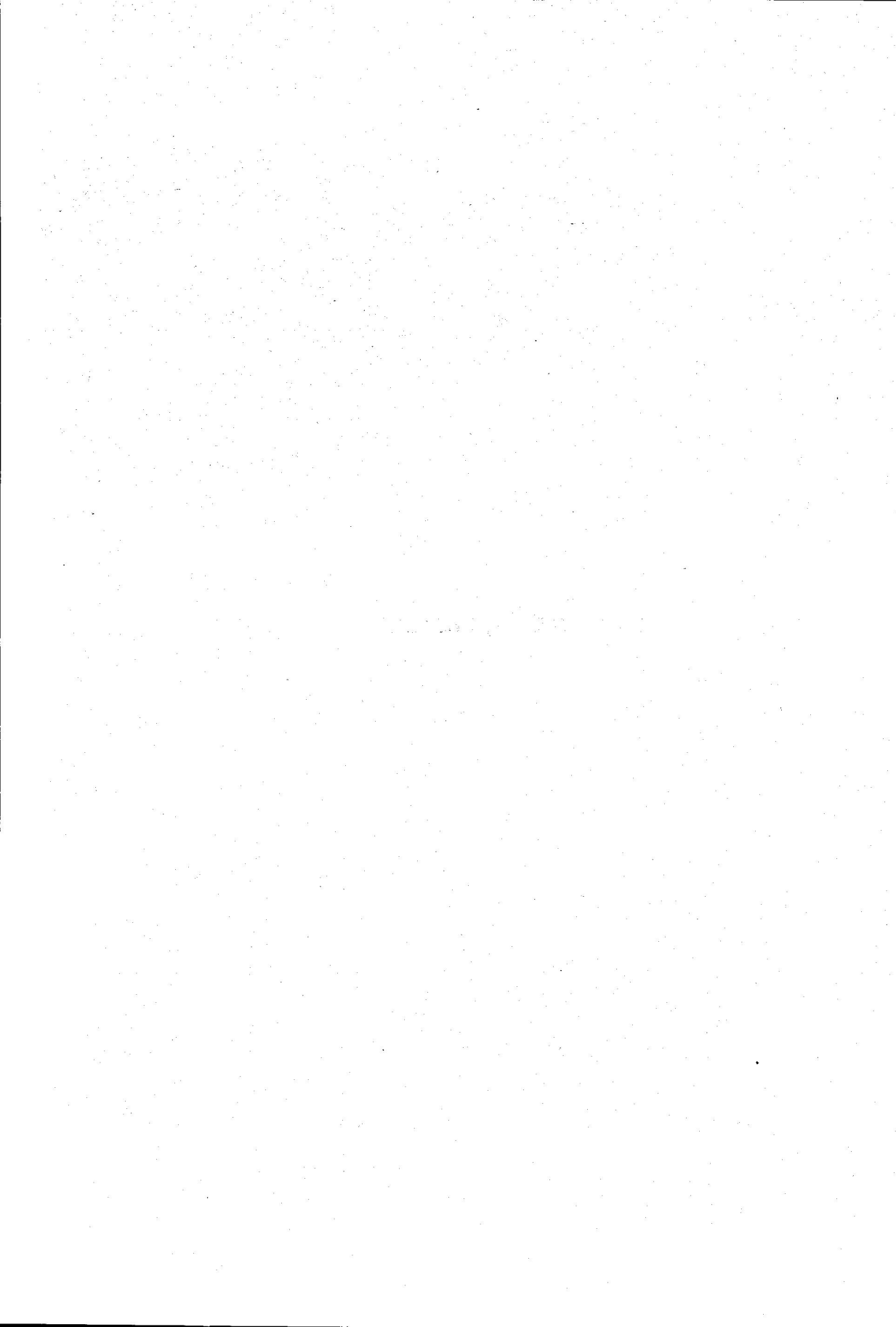
Centrándonos en los flavonoides, tenemos que indicar que las estructuras más representativas con actividad fitoalexinica son: la 2'-metoxi-isoflavanas, aislada del *Trifolium arbense* (INGHAN, 1977), 2'-hidroxi-isoflavona, de la *Betavulgaris*, (GEIPERT, 1973) y los pterocarpanos, encontrados en el *Pisum sativan* (ROBENSON, 1977).

BIOGENESIS

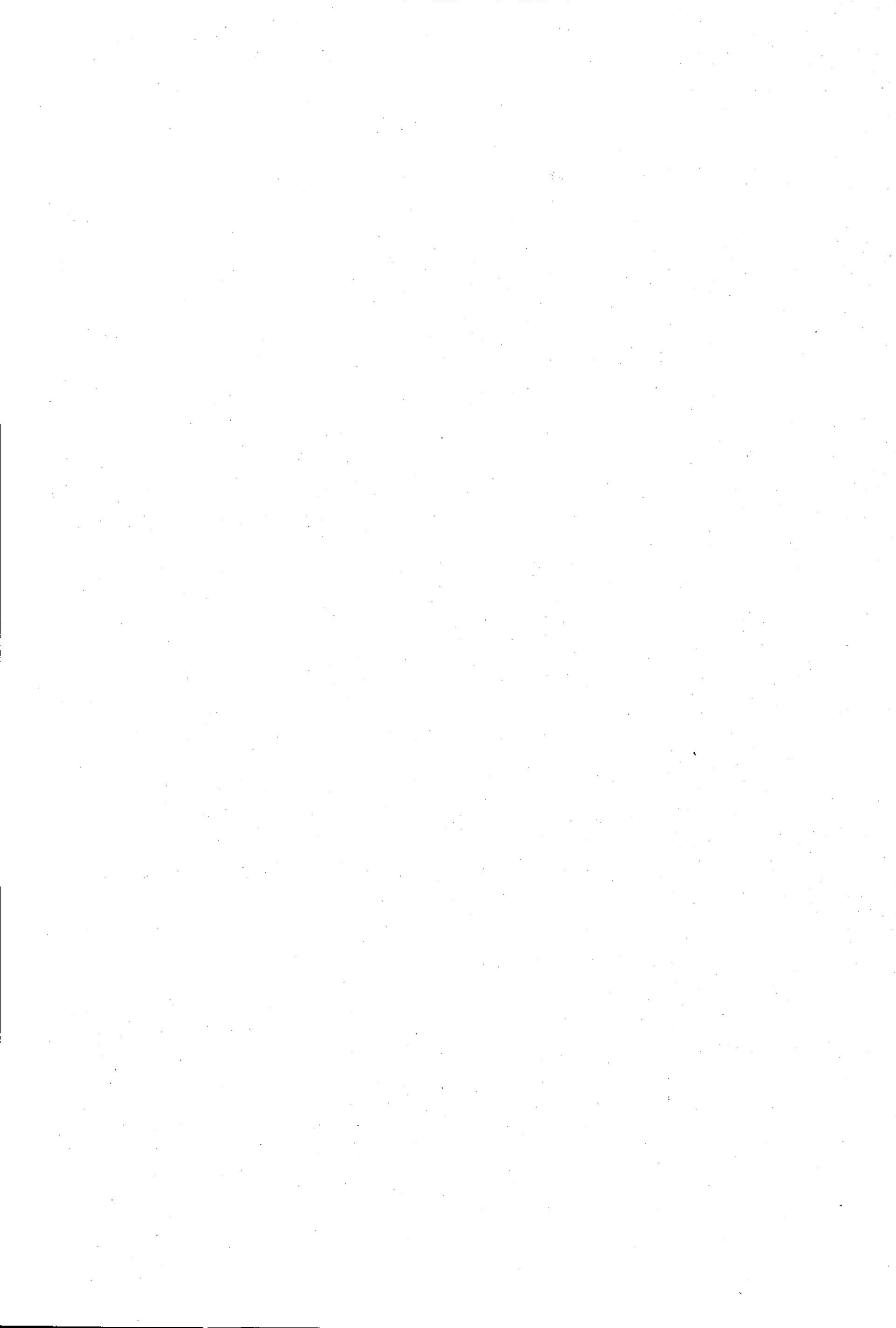




TECNICAS USUALES

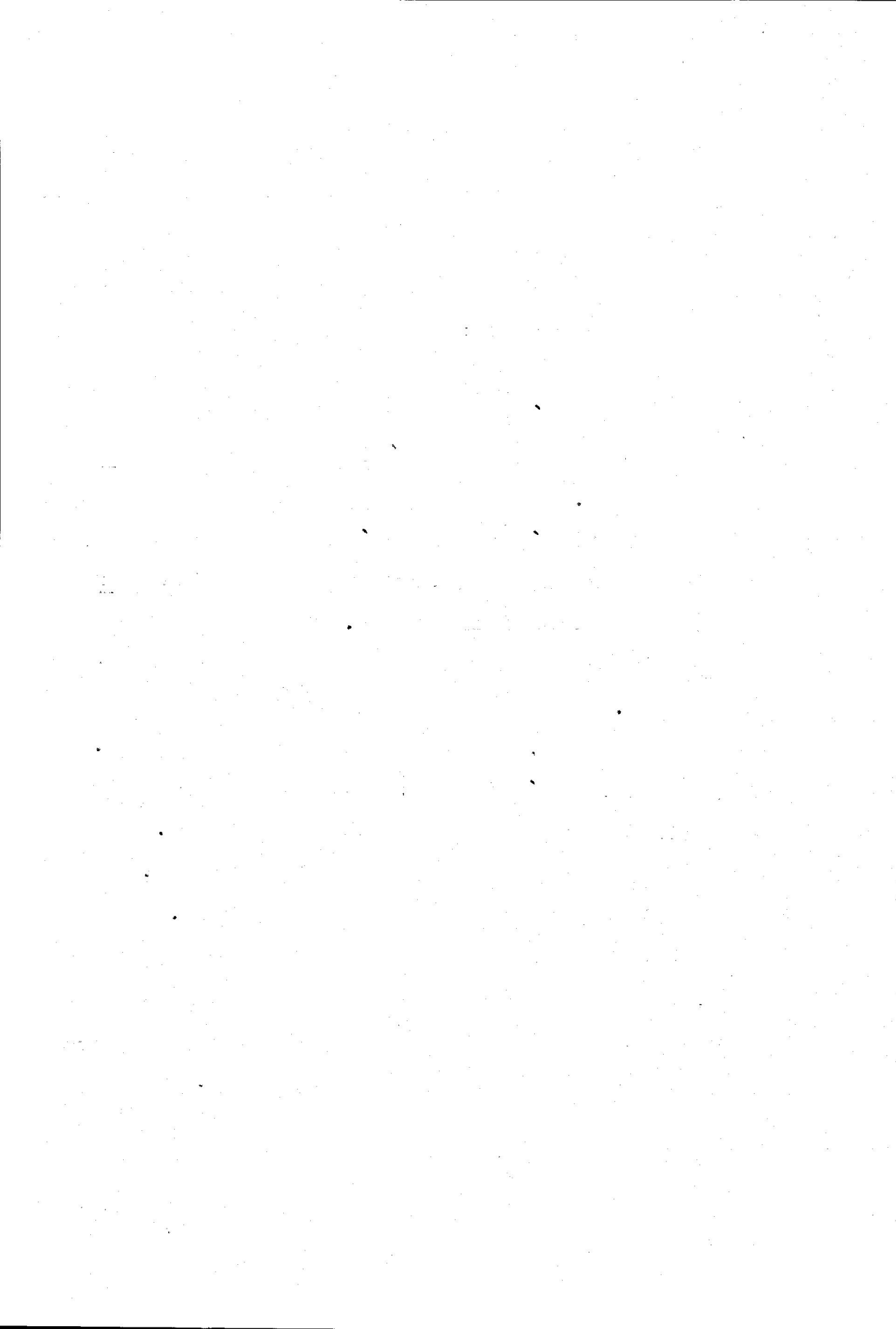


CUMARINAS

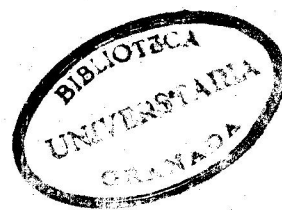


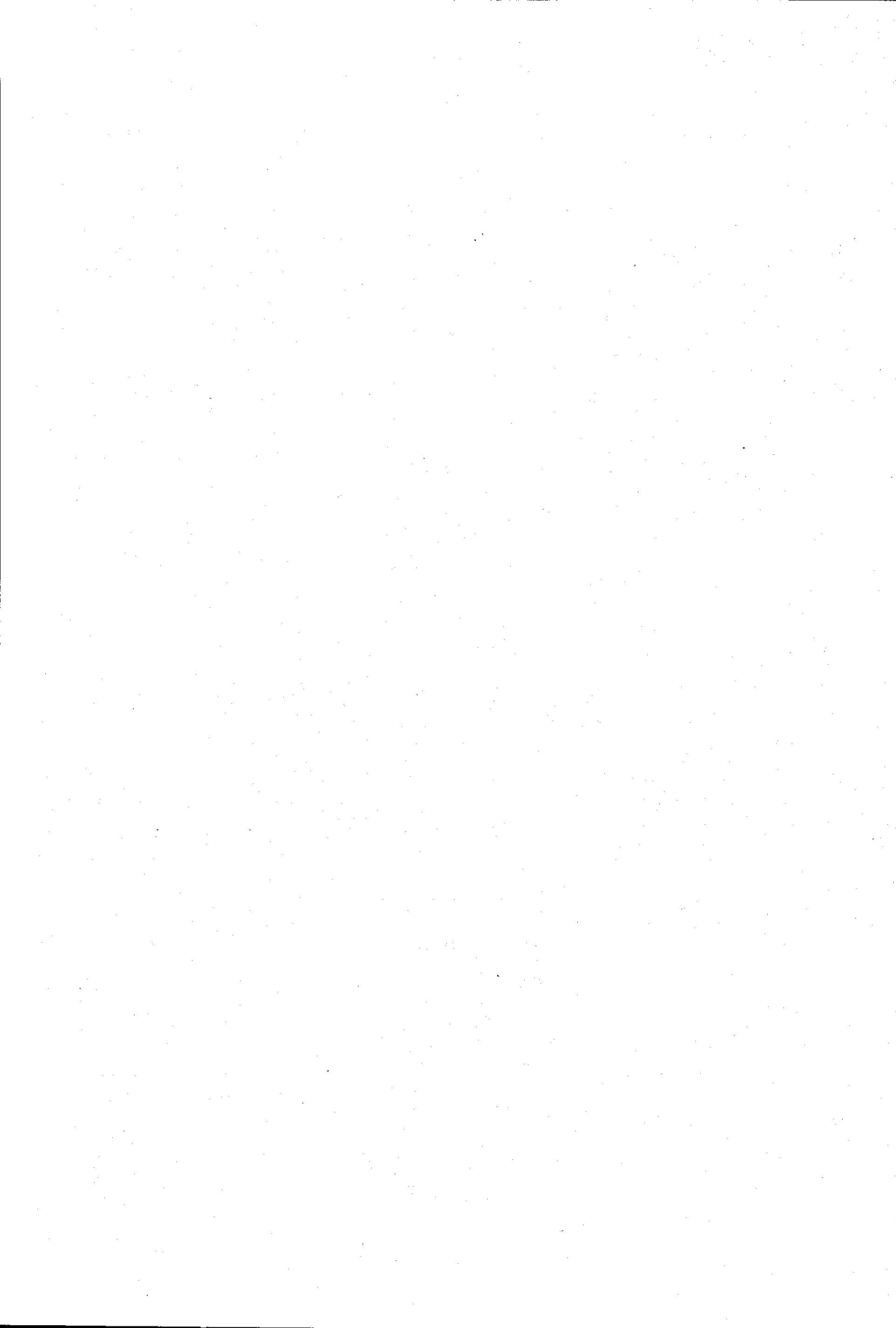
Las cumarinas naturales pueden ser clasificadas en la forma siguiente:

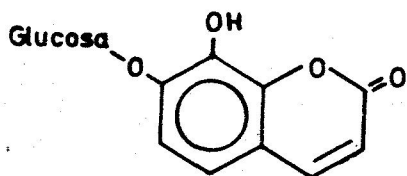
- a) Cumarinas sustituidas en uno o mas hidroxilos y/o metoxilos en el anillo bencénico (Ejemplo Umbeliferona) (VIII).
- b) Cumarinas sustituidas con residuos isoprenoides (Ejemplo Aurapteno (XII), Suberosina (XIII), Xantiletina (XIV), Samidina (XV)).
- c) Furocumarinas o Furanocumarinas (Ejemplo Angelicina) (XVI).
- d) 3-fenil cumarinas. (Ejemplo Pachirricina) (XVII).
- e) Cumarinas sustituidas en 4:
 - 4-alquilocumarinas (Ejemplo Mameina) (XVIII).
 - 4-hidroxycumarinas (Ejemplo Dicumarol) (XIX).
 - 4-fenilocumarinas (Ejemplo Dalbergina) (XX).
- f) 3-fenil-4-hidroxycumarinas (Ejemplo Escandenina) (XXI).
- g) 3,4-Benzocumarinas (Ejemplo Acido Elagico) (XXII).
- h) Bicumarinas (Ejemplo Daphnoretina) (III).



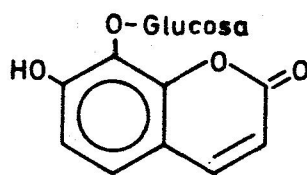
FORMULAS



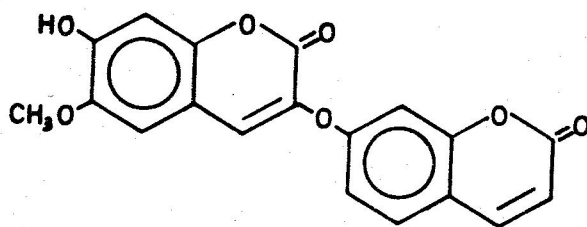




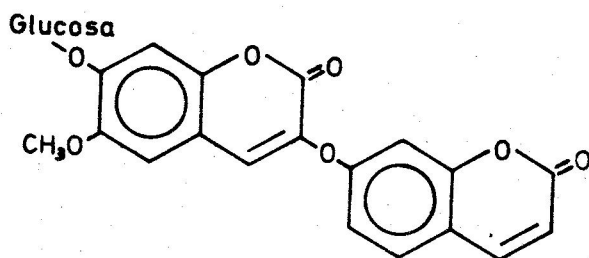
(I)



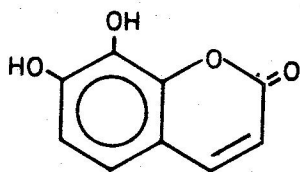
(II)



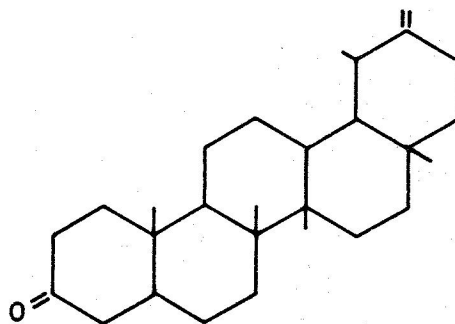
(III)



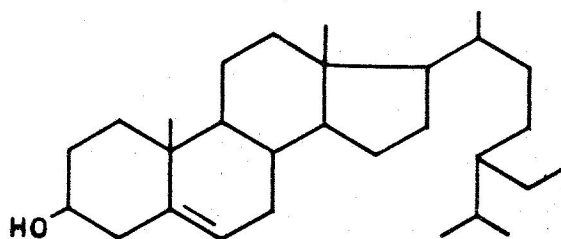
(IV)



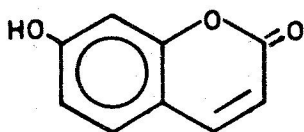
(V)



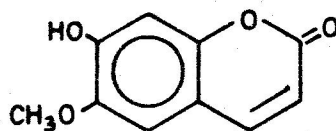
(VI)



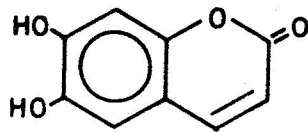
(VII)



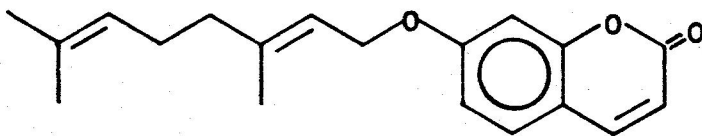
(VIII)



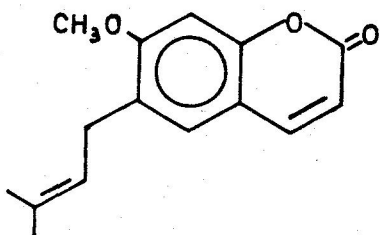
(X)



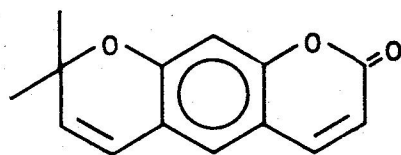
(XI)



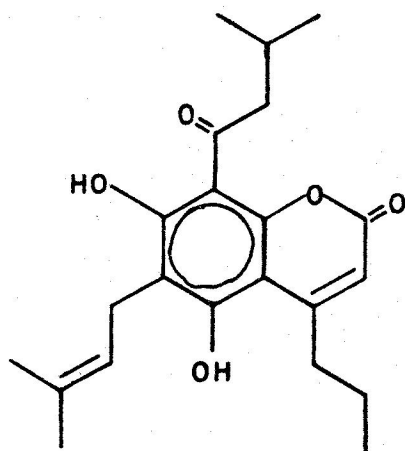
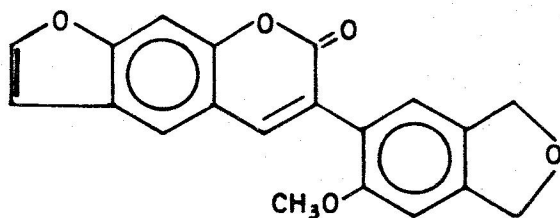
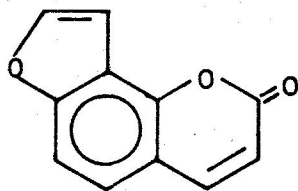
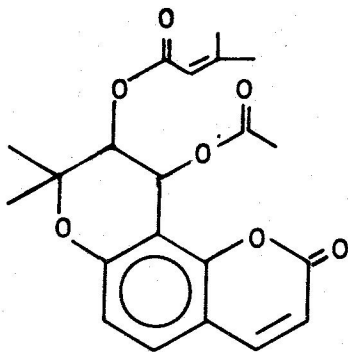
(XII)

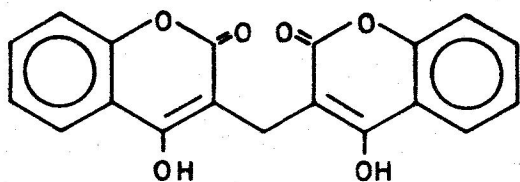


(XIII)

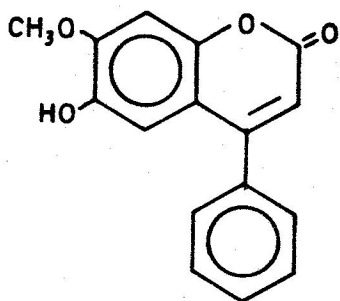


(XIV)

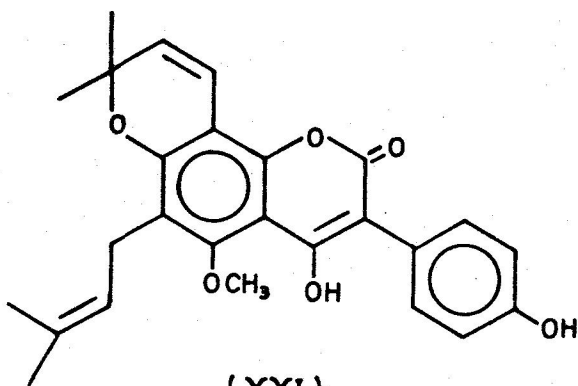




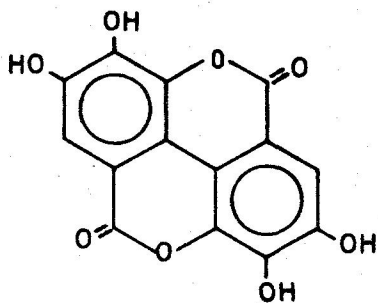
(XIX)



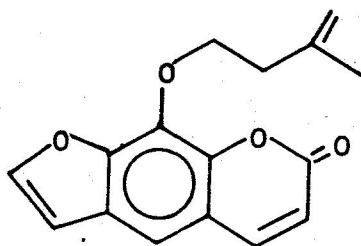
(XX)



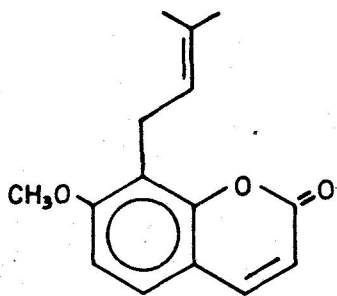
(XXI)



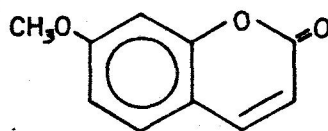
(XXII)



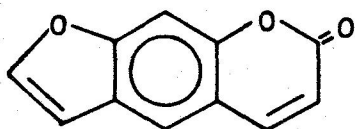
(XXIII)



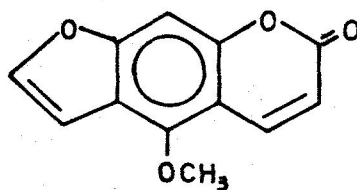
(XXIV)



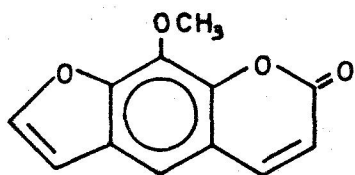
(XXV)



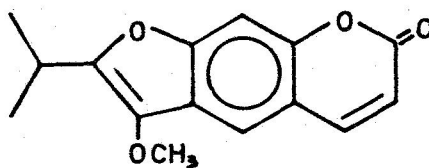
(XXVI)



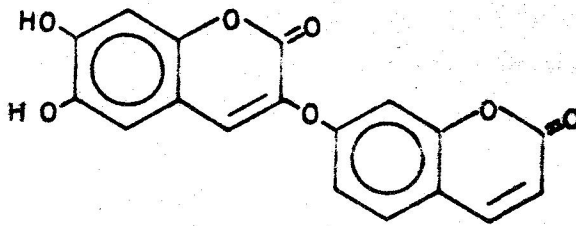
(XXVII)



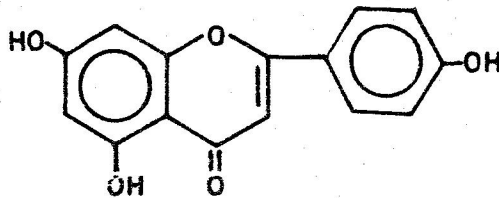
(XXVIII)



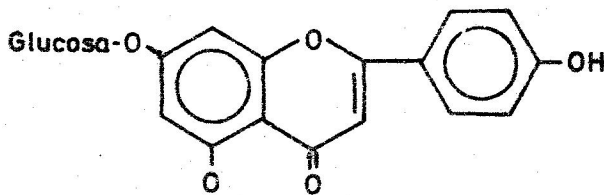
(XXIX)



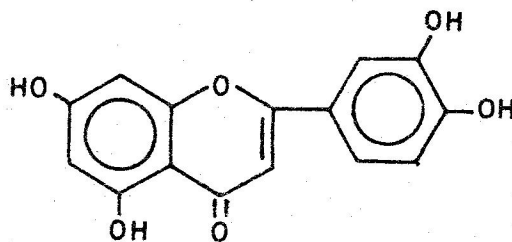
(XXX)



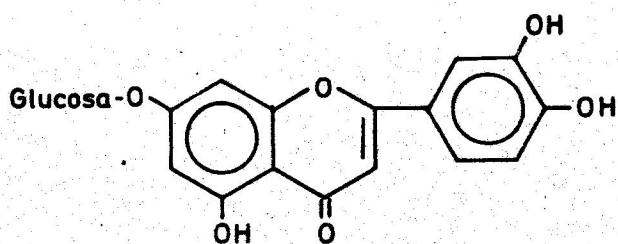
(XXXI)



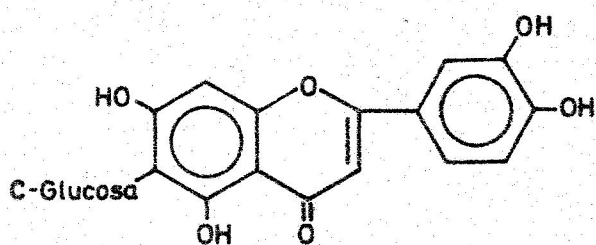
(XXXII)



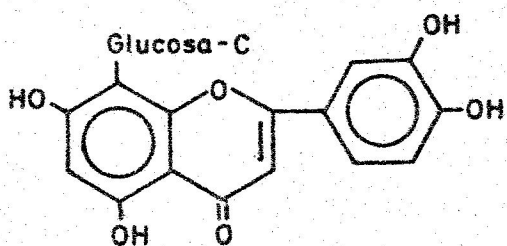
(XXXIII)



(IX)



(XXXIV)



(XXXV)

En lo que a propiedades químicas se refiere - hay que indicar que poseen muchas propiedades de - las α -pironas pero otras están muy modificadas.

La absorción característica en el IR la constituye una banda a 1720 cm^{-1} , aunque la posición - exacta depende en ocasiones de los sustituyentes del anillo bencénico. Poseen asimismo fuertes bandas de absorción en la región del doble enlace (1660 cm^{-1}) (NIELSEN, 1970). En el espectro de UV, se caracterizan por una banda aproximadamente a $300\text{ m}\mu$, aunque esto depende bastante de los sustituyentes, usualmente poseen bandas adicionales alrededor de 250 y $340\text{ m}\mu$. De todas formas el problema de la relación estructura-espectroscopia de UV no está sistematizada como en el caso de los flavonoides (MENDEZ, 1969).

Las cumarinas exhiben fluorescencias características del tipo azul-amarillo-verde que varía en medio básico. Precisamente esta propiedad unida a - su usual carácter fenólico y a la ruptura del anillo en medio básico, se aplica en el análisis de cationes inorgánicos.

En lo que se refiere a sus espectros de RMN

hay que hacer constar que existen publicaciones de estudio sistemático de RMN de protón y carbono-13. El primer estudio de este tipo debido al grupo de Productos Naturales de la Universidad de La Laguna (GONZALEZ, 1973) queda resumido en el esquema III.

TIPO DE SUSTITUC.	PROTON-3	PROTON-4		
7	6,18	7,64		
7 y 8	6,22	7,63		
6 y 7	6,21	7,62		
5 y 5,7 y 8	6,13	7,97		
Furocumarinas lineales sustituídas en 5.	6,26	8,16	Proton 2' 7,62	Proton 3' 7,00
Furocumarinas lineales sustituídas en 8.	6,37	7,82	7,78	6,85
Furocumarinas lineales sustituídas en 5 y 8.	6,27	8,11	7,64	6,97
Furanocumarinas angu- lares	6,32	7,76	7,64	7,04
Pirano cumarinas li- neales	6,19	7,60	Proton 3' 5,74	Proton 4' 6,48
Pirano cumarinas an- gulares.	6,15	7,90	5,69	6,83
RESUMEN	Poca varia- ción solo an- gulares	se distinguen bien las sim- ples y las - condensadas.	permite distinguir - los distintos grupos se suele ayudar con el estudio de sus - productos de hidrogeno- nación.	

Debido a la simplicidad relativa de sus espectros y con el estudio de sus constantes de acoplamiento, normales para los sistemas aromáticos, es el procedimiento espectroscópico más potente de que se disponía hasta la aparición y difusión de los espectros de RMN de carbono-13. (GONZALEZ, 1969) (LEE, 1969) (NIELSEN, 1970) (PEREL'SON, 1970-1972) (REISCH, 1967) (JARVIS, 1968) (GRIGG, 1966) (NAKAYAMA, 1969) (GRAY, 1974) (CUSSANS, 1975).

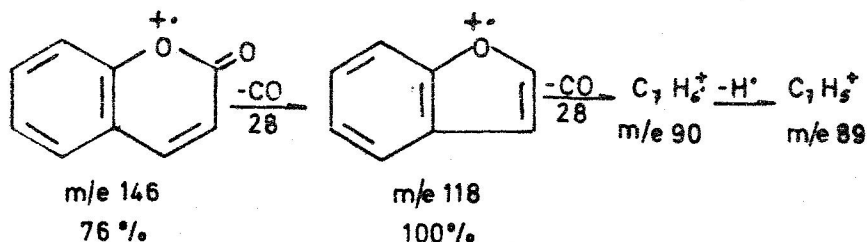
En lo que a espectrometría de Masas se refiere se conoce perfectamente el esquema de fragmentación general (BARNES, 1964) (BUDZIKIEWICZ, 1964) (KUTNEY, 1970) (ZAKHAROV, 1970-71-72) (MERCIER, 1969).

CUMARINAS

La fragmentación característica de las cumarinas se hace por pérdida directa de una molécula de monóxido de carbono a partir del núcleo de pirona con formación de un ión de estructura benzofuránica, correspondiente las más de las veces al pico base, seguido de una pérdida ulterior del oxígeno restan-

te en forma de monóxido de carbono.

Así para la propia cumarina:

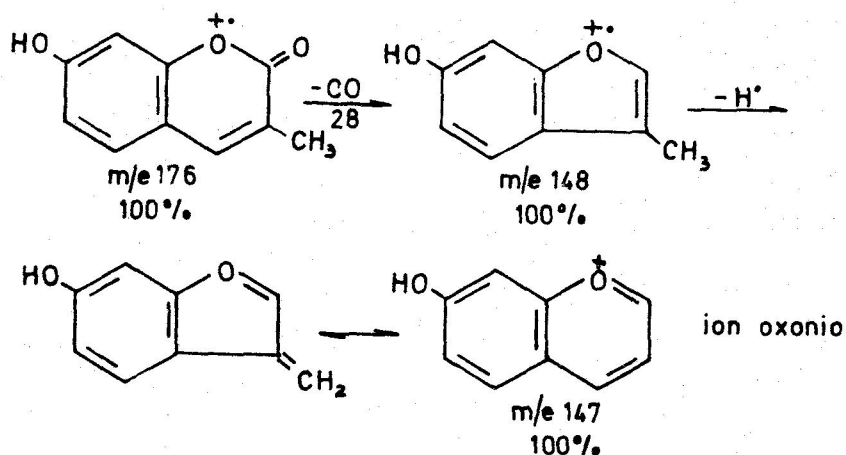


La influencia de los sustituyentes sobre el núcleo aromático es clásica.

METIL-4-CUMARINAS

Como para las cumarinas simples estos compuestos pierden enseguida una molécula de CO a partir del ión molecular, pero la fragmentación es enseguida modificada por el metilo en 4. Así en el caso de la metil-4-hidroxi-7-cumarina el ión molecular pierde una molécula de CO, el ión resultante correspondiente al pico base se estabiliza enseguida por pérdida de un átomo de hidrógeno del grupo metilo -

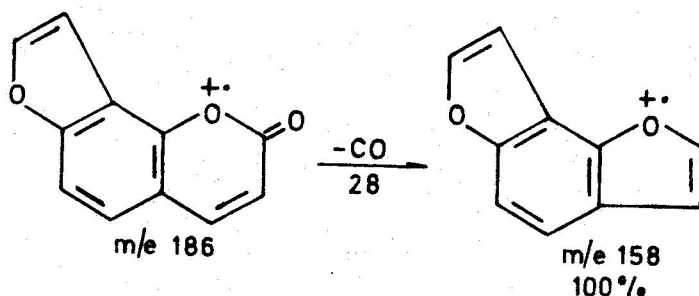
para dar un ión oxonio, reagrupamiento clásico de los alquil-3-benzofuranos.



FURANOCUMARINAS

Las furanocumarinas siguen muy de cerca el mismo esquema de fragmentación que las cumarinas simples.

Así la angelicina da el ión $M-CO^\bullet$ como pico base.



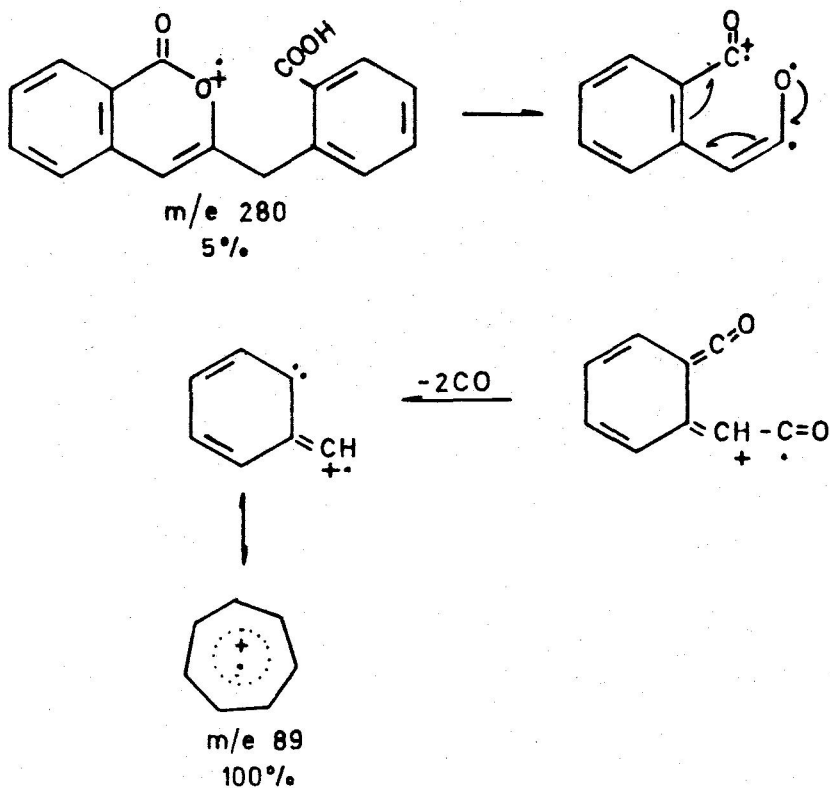
PIRANOCUMARINAS

En este caso hay una pérdida sucesiva de cuatro moléculas de monóxido de carbono. Ciertos iones formados pueden estabilizarse enseguida por pérdida de un átomo de hidrógeno.

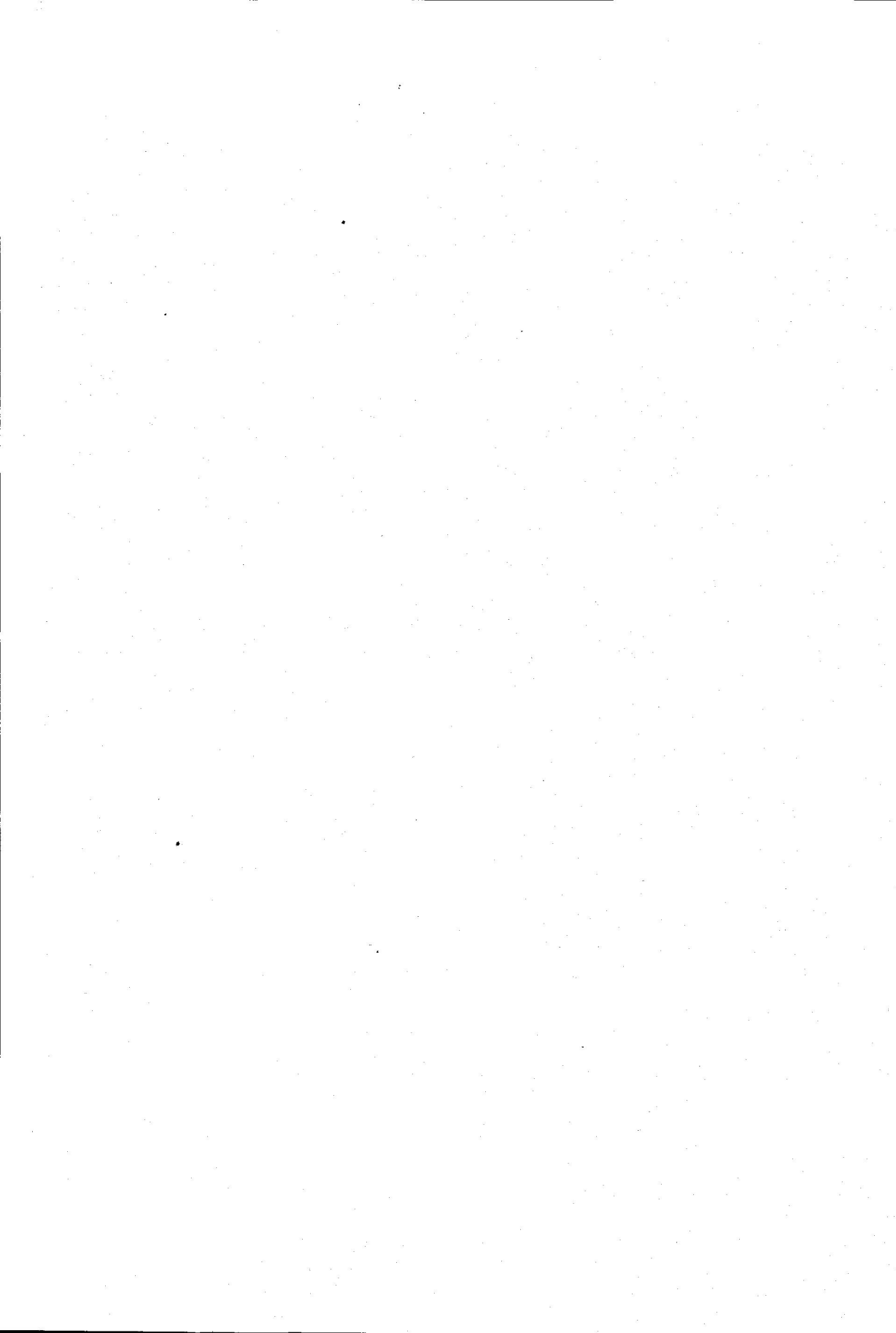
Así para el ión molecular de la Metil-4-pirano-2-(5'6': 3,4)-cumarina:

ISOCUMARINAS

Se observa aquí la pérdida simultánea de dos moléculas de monóxido de carbono con formación de un ión dehidrotropilio que representa el pico base. En el caso de la carboxi-2'-benzil-3-isocumarina tenemos:



FLAVONAS



El esqueleto carbonado de los flavonoides se compone de tres anillos ($C_6-C_3-C_6$) llamados A, B y C respectivamente.

Los flavonoides en su distribución, representan un gran número de tipos con propiedades diferentes y se encuentran en todas las partes de las plantas: raíces, yemas, hojas, flores, frutos, semillas, etc... generalmente como glicósidos.

Identificación preliminar

La simple prueba del color es bastante útil - para una identificación preliminar. Generalmente la prueba del color de los grupos hidroxilo es la determinación de la posición de los hidroxilos. Un ejemplo típico es la reacción del cloruro férrico.

En las tablas 1 y 2 se ven algunas pruebas de color:

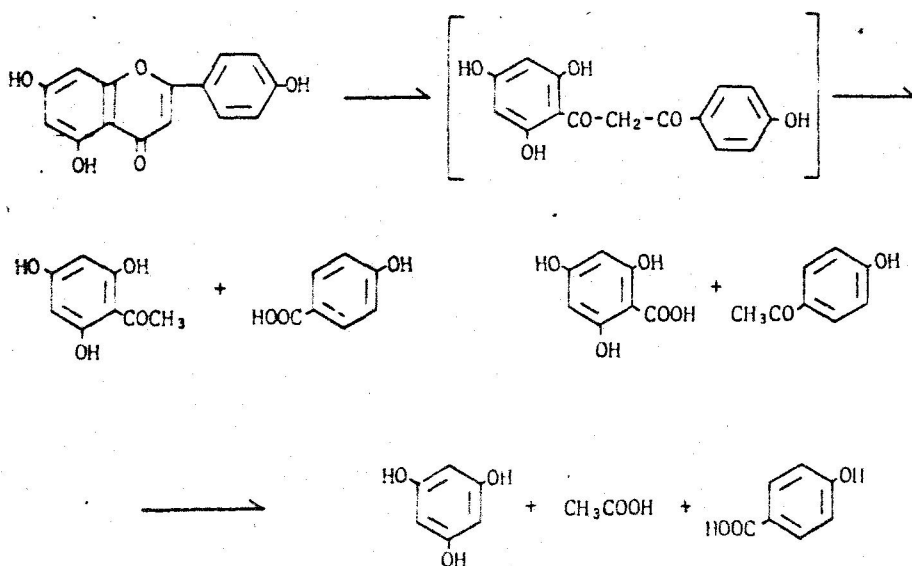
TABLA 1. PRUEBAS DE COLOR PARA IDENTIFICACION PRELIMINAR

Tipos de Flavonoides	NaOH	SO ₄ H ₂ conc.	Mg-HCl en MeOH	Na/Hg-Aci en MeOH
Flavanonas.	Amarillo a naranja → rojo - intenso o púrpura	Naranja	Rojo Magenta Violeta	Rojo
Flavonas	Amarillo	Amarillo a Naranja	Amarillo a Rojo	Rojo
Flavonoles	Amarillo-Naranja		Rojo a Magenta	Amarillo rojo pálido
Isoflavonas	Amarillo	Amarillo	Amarillo	Rojo pálido a rosa

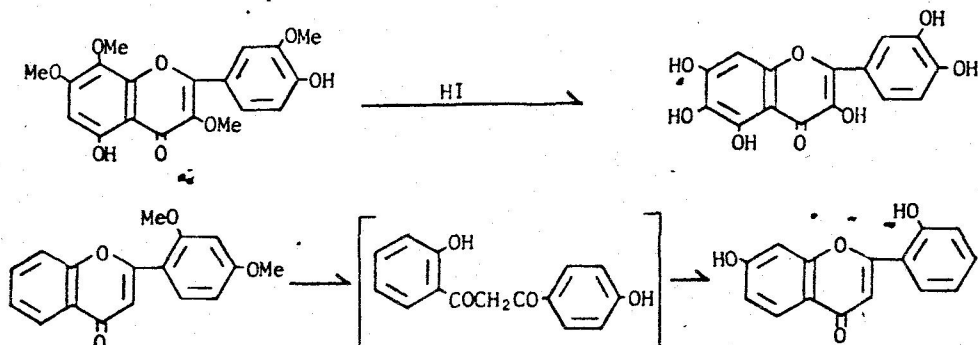
TABLA 2. PRUEBAS DE COLORACION FENOLICA PARA FLAVONOIDES

Reacción o Prueba	Formaciones detectables	Color	Referencias
Reacción de Gibbs	Ausencia de p-sustitución para OH	Azul	(GIBBS, 1972) (KING, 1957)
ZrOCl ₂ -Acido cítrico	Flavonoles (3OH)	Amarillo	(HORHAMMER, 1953)
Reacción de la Gossypetina	Tipo p-Quinol	Rojizo - marrón	(PERKIN, 1913) (MORITA, 1968)
Cl ₂ Sr/NH ₃	Grupo ortodifenol	Amarillo-marrón verde-negro.	(IRATANI, 1964) (SHIMIZU, 1968)
Prueba del Agua de Barita	Grupo 5,6,7-hidroxilo	Verde	

La degradación alcalina de los flavonoides con KOH al 30-50% o en tubo cerrado con NaOH alcohólico al 30% o por fusión, da un fenol para el anillo A y un derivado del ácido benzoico para el anillo B (un ácido benzoico sustituido) aunque a veces se aislan o identifican acetofenonas cromatográficamente.



Hay que hacer notar que los flavonoides oxigenados en 5-8 se transponen (se agrupan) con demetilación con hidruro de iodo. Esta transposición da 5,6-hidroxi derivados y generalmente se llama transposición de Wessely-Moser (WESSELEY, 1930; BRIGGS, 1949; DONNELLY, 1956; WHALEY, 1953).



También los 2' metoxiflavonoides se transponen con hidruro de iodo (Gallagher, 1953).

Espectros UV

La espectroscopía ultravioleta es una herramienta muy útil para la determinación de estructuras de flavonoides.

Los espectros de estos compuestos tienen dos picos principales de absorción en la región 240-400 nm. Estos dos picos se identifican comúnmente como

Banda I (300-380 nm) y Banda II (240-280 nm).

La Banda I se considera asociada con la absorción debida al anillo B y la Banda II con la absorción debida al sistema benzoilo del anillo A (Jurd, 1962). La Banda II de las isoflavonas generalmente se encuentra en la región de 250-275 nm. (Horowitz, 1961). En general la Banda I de las flavonas muestra una intensa absorción a 320-350 nm y la máxima absorción para flavonoles está entre 340-380 nm.

Se han desarrollado una serie de reactivos de diagnóstico que adicionados a las soluciones de flavonoides producen corrimientos en la posición del máximo (Jurd, 1956; Jurd, 1956; Jurd, 1957). Entre estos reactivos se encuentran: metóxido sódico, acetato sódico, ácido bórico, cloruro de aluminio y ácido clorhídrico. Su principal utilidad está en la determinación de la posición de los grupos hidroxilos en la molécula, por ejemplo, en el caso de glicósidos de flavonas un corrimiento batocrómico con acetato sódico de la Banda I indica que el hidróxido en C-7 no está glicosidado, de la misma manera un corrimiento batocrómico de la banda II con tricloruro de aluminio, indica que el hidroxilo en C-5

está libre. La Banda II experimenta corrimiento con bórico sólo si la flavona tiene grupos hidroxilos - en C-3' y C-4', así el 5 y 7 glucósido de la Luteolina experimenta un corrimiento batocrómico de 20nm, mientras que los 3' 4' glucósidos no responden a este reactivo. El uso de estos reactivos ha sido estudiado con detalle en los trabajos de L. Jurd (MAJUNDER, 1974) y de T.J. Mabry y col. (MABRY, 1970).

La espectroscopía infrarroja se ha usado en - flavonas más para la identificación de la "huella - digital", que para las determinaciones estructura-- les, pues la interpretación es generalmente difícil-- tosa y no se pueden predecir los corrimientos.

H. Wagner (WAGNER, 1965) ha trabajado con IR de flavonas.

R.M.N.

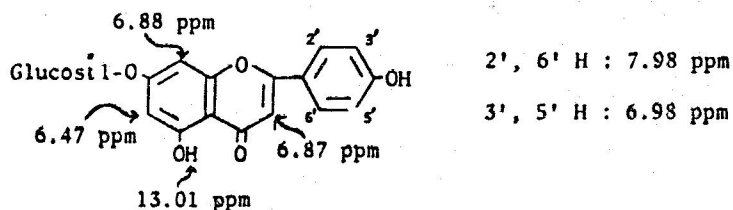
El principal método empleado hoy para el análisis estructural de flavonas es la RMN de protón y Carbono-13 (P.M.R. y C-13 R M.N.).

Muchos aglucones son lo suficientemente solubles en deuterocloroformo Cl_3CD , como para permitir el análisis directo. Sin embargo, la mayoría de los flavonoides se encuentran como glicósidos, y estos tienen una bajísima solubilidad en Cl_3CD , por lo que la mayoría de los investigadores se limitaron al análisis por R.M.N. de los metil, etil y acetil derivados, más solubles en este disolvente.

En 1964 A.C. Waiss y col. (WAISS, 1964) demostraron la utilidad del uso de los trimetilsililéteres (TMS) muy solubles en Cl_3CD . Casi al mismo tiempo T.J. Batterman y R.J. Highet (BATTERMAN, 1964) introdujeron el hexadeuterodimetilsulfóxido (DMSO-d_6) como disolvente para el análisis directo de flavonoides.

Estos investigadores examinaron las señales - de los protones aromáticos olefínicos e hidroxílicos de 41 flavonas.

Los corrimientos químicos de la cosmosiina se describen en el esquema III.



En flavonoides oxigenados en 5.7 los protones de las posiciones C-6 y C-8 aparecen como un doblete ($J = 2,5 \text{ Hz}$) y se distinguen fácilmente del singulete debido al protón en C-3.

Los flavonoides oxigenados en 5, 6, 7 ó en 5, 7, 8, tienen aún un protón C-8 aparece 7,77 ppm y - la del protón C-6 a 6,46 ppm de esta manera pueden detectarse fácilmente las posiciones de los carbonos oxigenados (HENNICK, 1964).

No obstante, el DMSO- d_6 tiene una serie de inconvenientes, tales como la dificultad de recuperar la muestra, absorbe rápidamente la humedad atmosférica, y penetra en la piel arrastrando con él cualquier sustancia que lleve disuelta.

T.J. Mabry y col. (MABRY, 1970) ha publicado un libro sobre determinación sistemática de flavonoides, mediante el uso de PMR de TMS éters junto a espectroscopia UV con varios reactivos e identificación cromatográfica.

Los corrimientos químicos aproximados para los protones de TMS de flavones se dan en el esquema IV.

Tabla 3

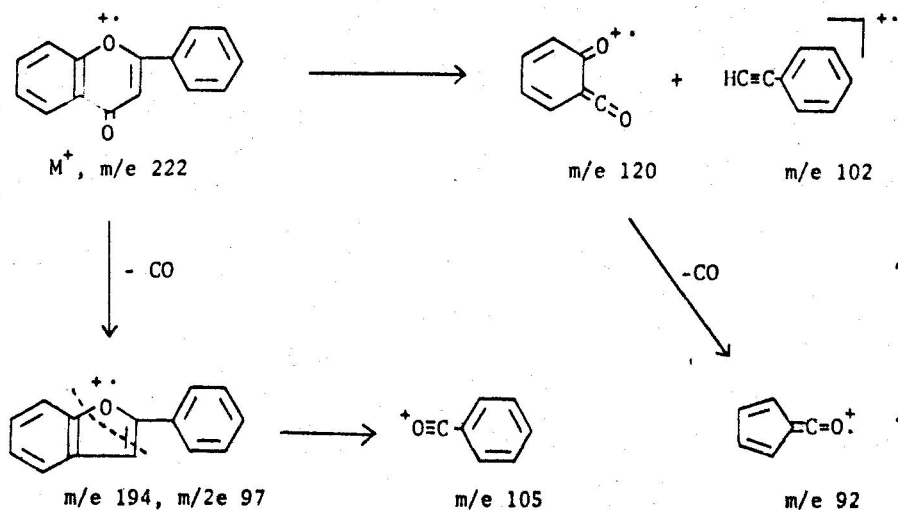
<u>Protones anillo B</u>									
<u>Protones anillo A</u>									
<u>H-2 (Isoflavonas)</u>									
<u>H-3 H-1" (3-O-glicosilo)</u>									
<u>H-2 (flavanonas)</u>									
<u>H-1" (7- y 4'-O- ó 6- y 8-C-glicosilo)</u>									
<u>Mayoría de los protones del azúcar</u>									
<u>Metoxilos</u>									
<u>H-3 (flavanonas)</u>									
<u>CH₃ (Ramosil)</u>									
<u>SiO(Me)₃</u>									
C-5 OH (12-14 ppm)									
8.0	7.0	6.0	5.0	4.0	3.0	2.0	1.0	TMS	

ppm()

Espectros de masas

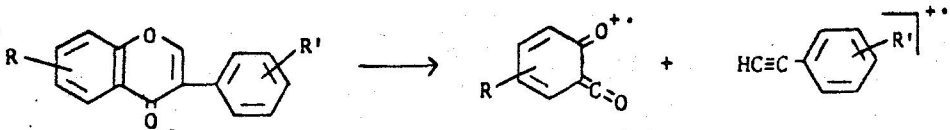
Los espectros de masa de flavonas se caracterizan por un intenso ión molecular (en la mayoría de los casos es el pico base), lo cual es indicativo de un sistema heterocíclico estable, el cual no posee enlaces fáciles de romper.

La fragmentación más usual es la que reproducimos en el esquema V para la propia flavona: la reacción de retro-Diels-Alder da un fragmento muy abundante debido al anillo A que se fragmenta posteriormente por las usuales pérdidas de CO, y otro fragmento menos abundante debido al anillo B, el ión radical fenilacetileno (BARNES, 1964) (AUDIER, 1966).



La pérdida de CO por el ión molecular está también muy marcada dando un ión fenilbenzofurano, el cual está asociado con un ión de doble carga a $m/2e$ 97.

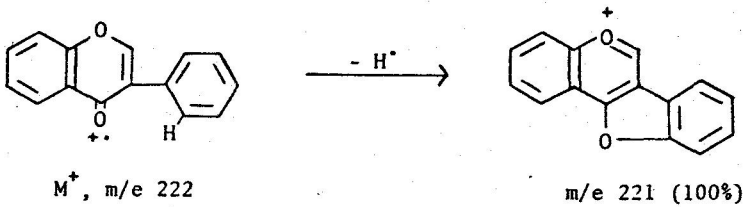
Los espectros de las isoflavonas simples se asemejan a los de las flavonas siendo el proceso de fragmentación más importante, la reacción de retro-Diel-Alder, y al igual que las flavonas, la distribución de cargas en los dos fragmentos depende de la sustitución en los anillos A y B (ITAGAKI, 1966).



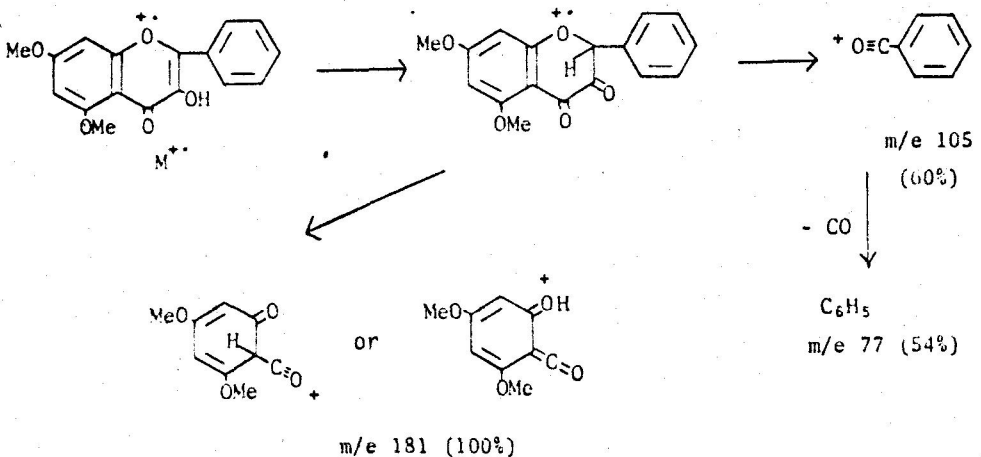
Las isoflavonas se caracterizan también por un ión M-1, más bien intenso, que es el pico base en la isoflavona y en la 7-metoxi-isoflavona.

Se ha sugerido que la pérdida del átomo de hi

drógeno de la posición C2', puede dar lugar a la formación de un ión oxonio estabilizado por resonancia, y cuya estabilidad se refleja en la falta de fragmentaciones posteriores (ITAGAKI, 1966).



Los iones debidos a la fragmentación retro -Diels-Alder, en el caso de los flavonoles, son muy débiles o no se observan en absoluto. Sin embargo - las reacciones de transferencia de hidrógeno son importantes y de fácil explicación si el ión molecular existe en forma dicetónica.

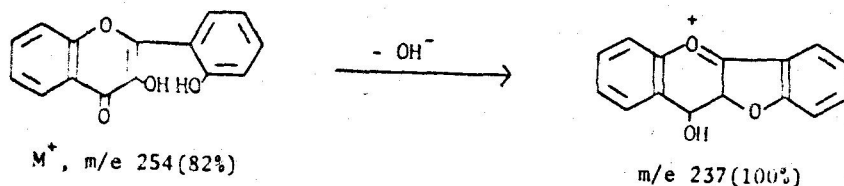


La reacción de retro-Diels-Alder con transferencia de hidrógeno al anillo A, suele producirse generalmente. El ión benzoilo es también un fragmento importante, éste a su vez puede perder CO dando lugar a la formación de un ión fenilo.

Los iones correspondientes son característicos de los espectros de flavonoles (AUDIER, 1966).

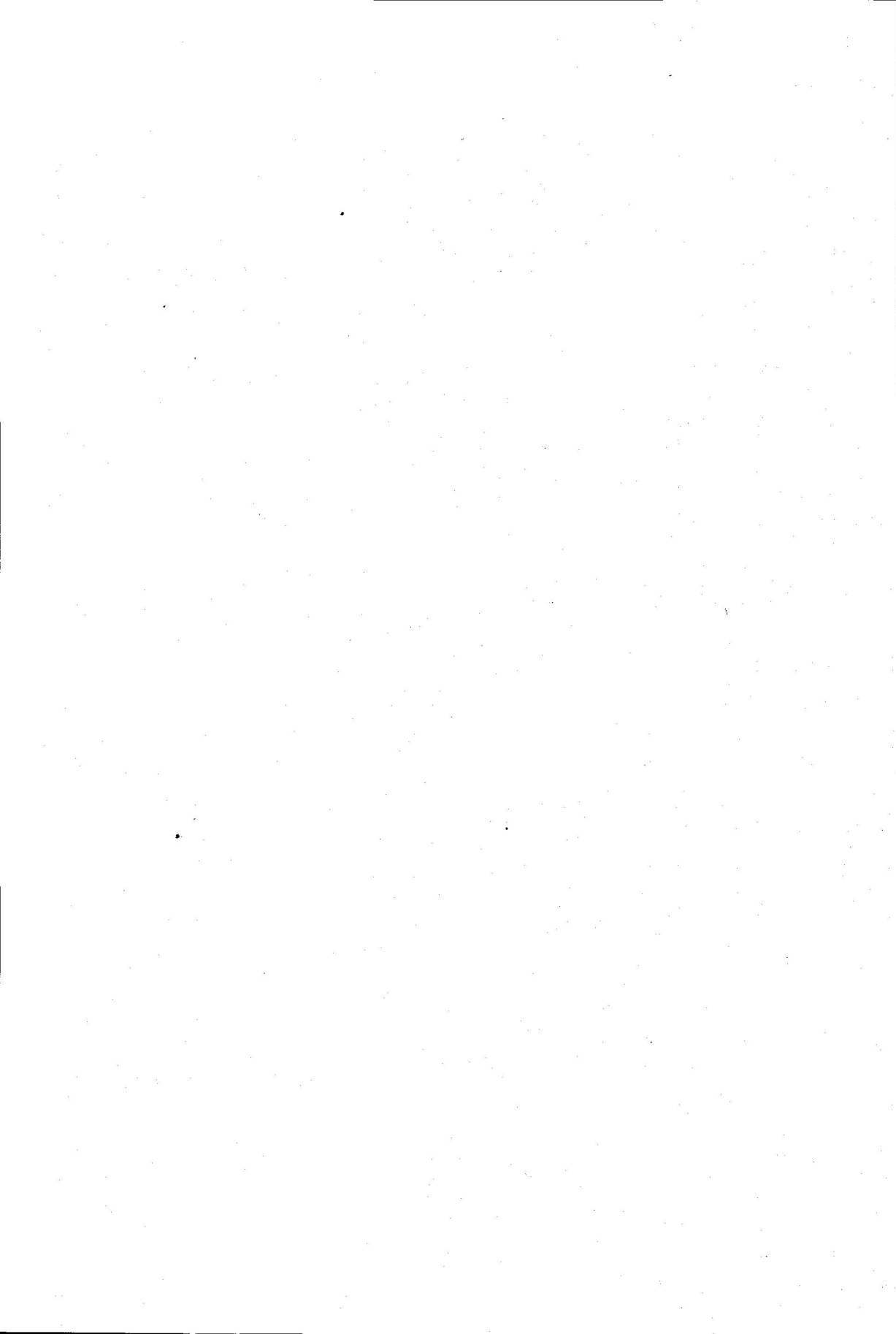
La presencia de un grupo hidroxilo en posición 2' en los 2'-hidroxiflavonoles, tiene como resultado el poseer una gran facilidad para la pérdida de OH^- , más probablemente con formación de un ión hidroxicromenilo estable.

Marcando con deuterio, se ve que tanto el grupo hidroxilo en 2' como el grupo hidroxilo en 4, están igualmente involucrados en la pérdida de OH (PELTER, 1967).



Una sustitución más extensa como en el caso - de la quercetina, (AUDIER, 1966) y la isorhammetina (PELTER, 1965), aumenta la estabilidad del ión mole_ucular (pico base) y se observa relativamente escasa fragmentación.

PARTE TEORICA Y DISCUSION DE RESULTADOS



Daphnetina

De la fracción 2^aACOEt se logra aislar un sólido amarillento que sublima al tratar de hallarle el punto de fusión, se purifica por este método, sublimándolo en baño de aceite a 170-200°C al vacío de la trompa de agua.

Se obtiene así una gran cantidad de un sólido incoloro o ligeramente blanco que se comporta como un producto único en cromatografía en papel y capa fina frente a los diversos reactivos empleados.

Punto de fusión: Sublima

Su espectro U.V. da los siguientes máximos de absorción:

	λ máxima
MeOH	324, 261
MeOH + MeONa	416, 283
MeOH + ACONa	380, 343, 278
MeOH + ACONa + BO ₃ H ₃	338, 270
MeOH + Cl ₃ Al	345, 273
MeOH + Cl ₃ Al + ClH .	324, 261

de estos valores se deduce que puede tratarse de una cumarina hidroxilada y seguramente con dos hidroxilos en posición orto.

Su espectro I.R. hecho en BrK da las siguientes bandas:

I.R. \checkmark BrK
 max 1700, 1630, 1610, 1520, 1430, 1355,
 1315, 1295, 1245, 1210, 1180, 1155,
 1080, 1020, 870, 840, 800, 765,
 700, etc. cm^{-1} .

lo que también concuerda con estructura de cumarina.

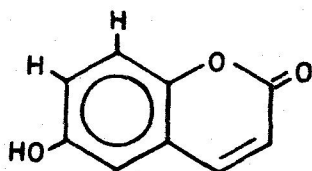
El espectro de R.M.N. en Dimetilsulfóxido da los siguientes valores:

δ	J	$n^{\circ}\text{H}$	Asignación
7,83 (d) ...	9,5 ...	1 H-4
7,00 (d) ...	9,5 ...	1 H- } 5 y 6; 6 7 y 8
6,72 (d) ...	9,5 ...	1 H- }
6,11 (d) ...	9,5 ...	1 H-3
9,30	-	1 OH- } 8 - 6 6 7 - 5
9,90	-	1 OH- }

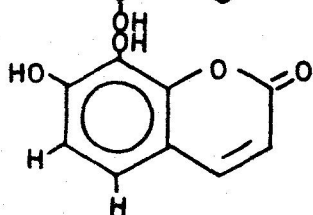
Los valores de los protones 5 y 6 no se asig-

nan pues difieren algo de los datos en bibliografía (STECK 1972) como también los demás para la Daphnetina.

Con los datos obtenidos hasta ahora caben dos estructuras:



5-6, dihidroxicumarina



7-8, dihidroxicumarina (Daphnetina)

creyendo que la estructura de la sustancia aislada debe corresponder a la Daphnetina, por ser Daphne la planta objeto de estudio se decide sintetizar la Daphnetina, a partir de una receta de H. von Pechman a partir de pirogalol y ácido málico (VON PECHMAN 1884).

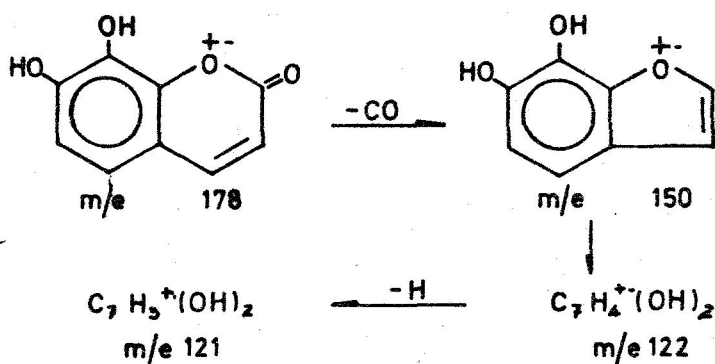
El producto sintetizado y sublimado, da unos espectros U.V., I.R. y R.M.N. totalmente superponibles con los de la sustancia aislada del Torvisco, por lo que a esta se le asigna la estructura de 7-8

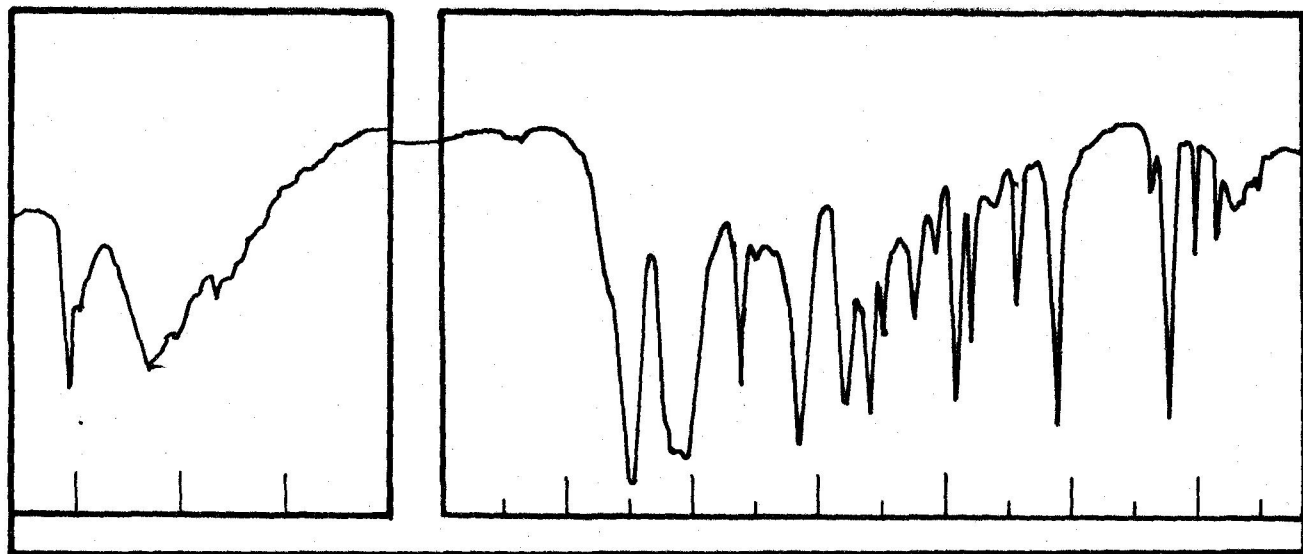
dihidroxycumarina, y se identifica como Daphnetina.

Su espectro de masas da las siguientes señales:

<u>m/e</u>	<u>%</u>
179	13,7
178	100 (pico base)
151	13,7
150	83,7
149	16,2
122	25,0
121	30,0

que coinciden plenamente con la Daphnetina y su fragmentación.





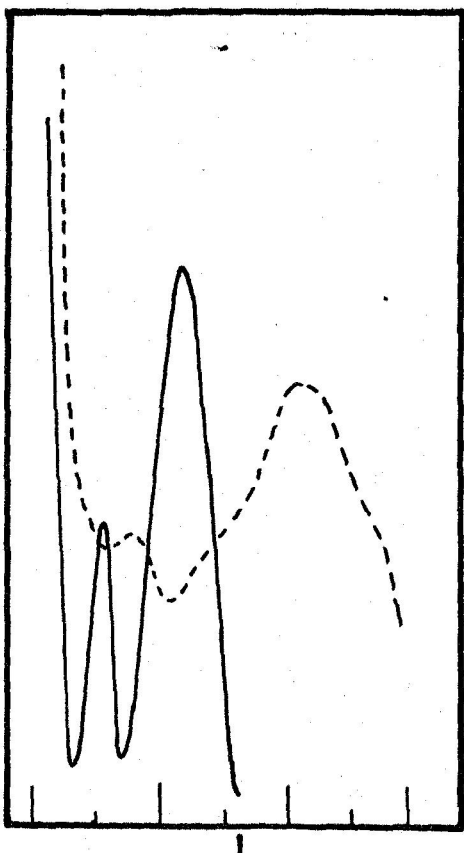
Espectro de I.R. de Daphnetina. .

ESPECTRO U.V. .

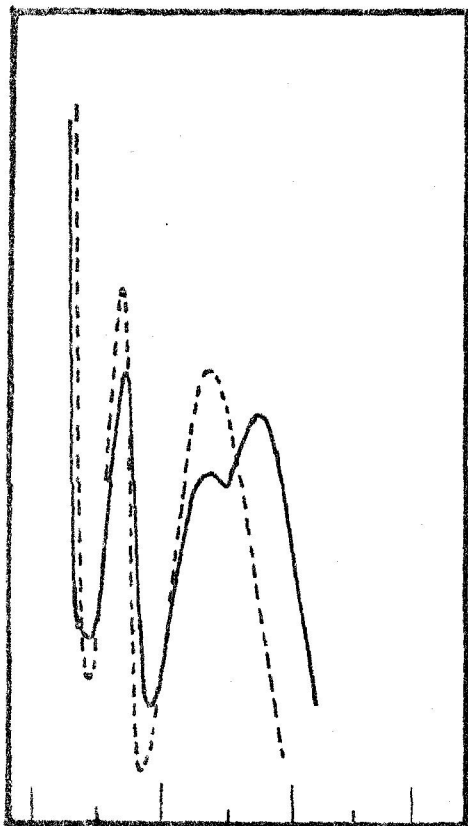
DE

DAPHNETINA

	λ máxima
MeOH	324, 261
MeOH + MeONa	416, 283
MeOH + ACONa	380, 343, 278
MeOH + ACONa + BO_3H_3	338, 270
MeOH + Cl_3Al	345, 273
MeOH + Cl_3Al + ClH .	324, 261

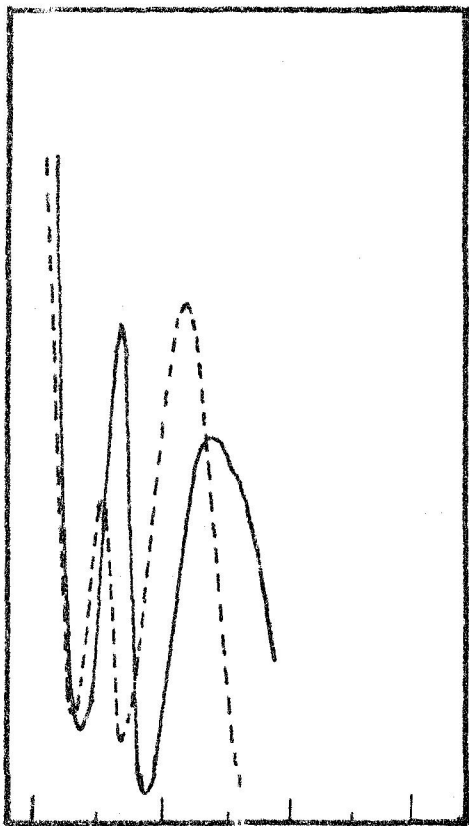


— MeOH
- - - MeONa



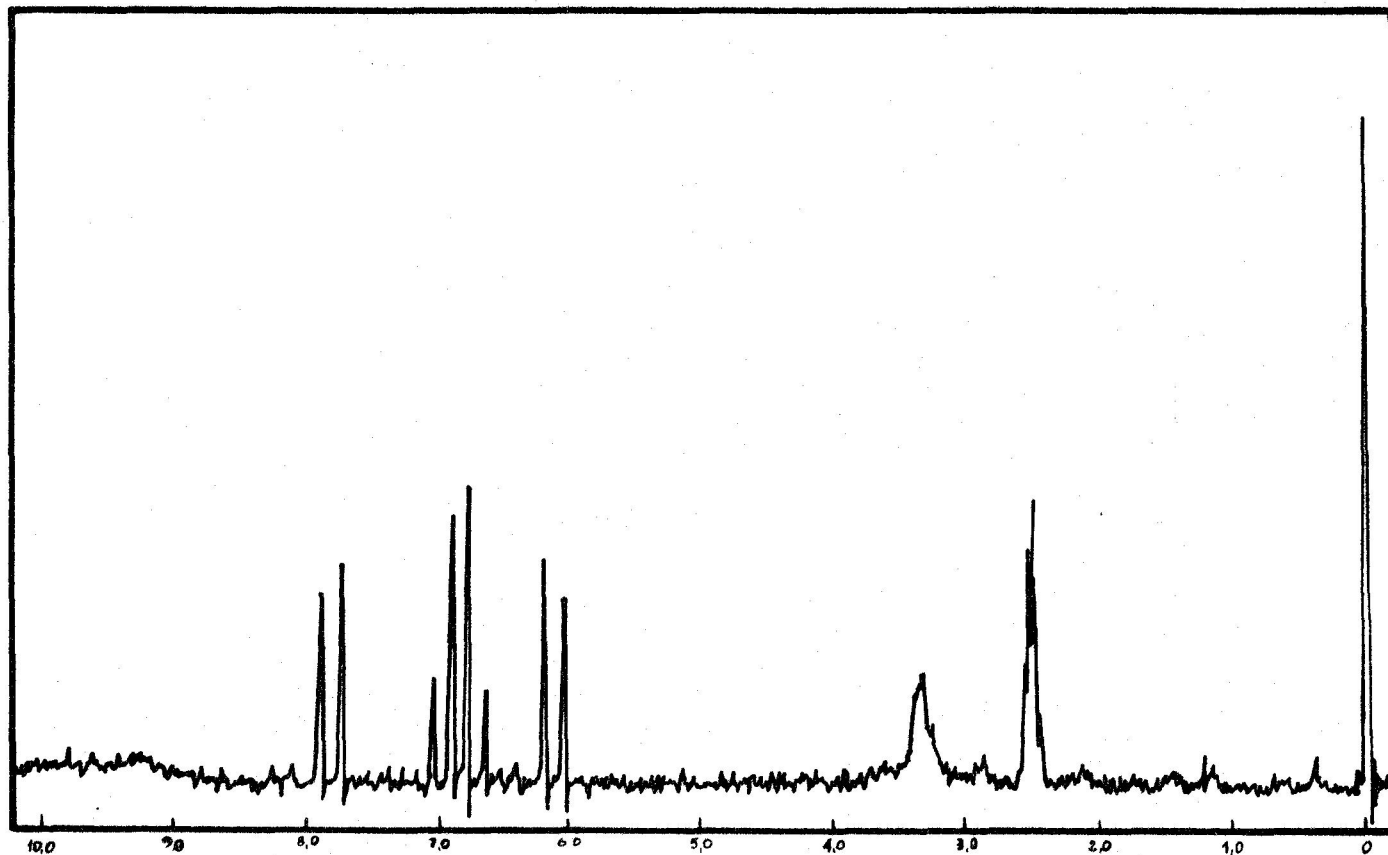
———— MeOH + AcONa

- - - - MeOH + AcONa + BO_3H_3

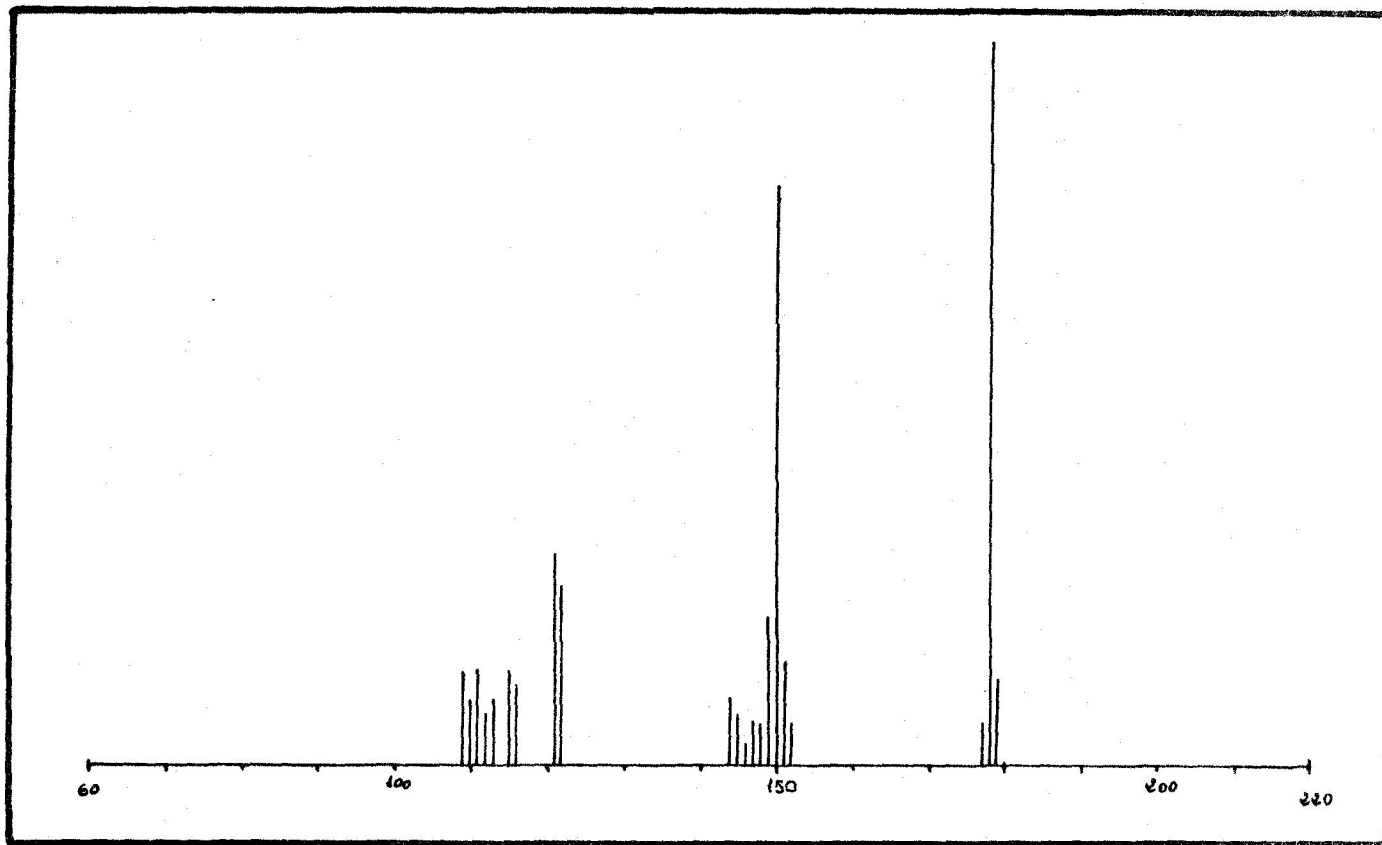


— MeOH + Cl₃Al

- - - MeOH + Cl₃Al + ClH



Espectro de RMN de Daphnetina.



Espectro de Masas de Daphnetina.

Acetato de Daphnetina

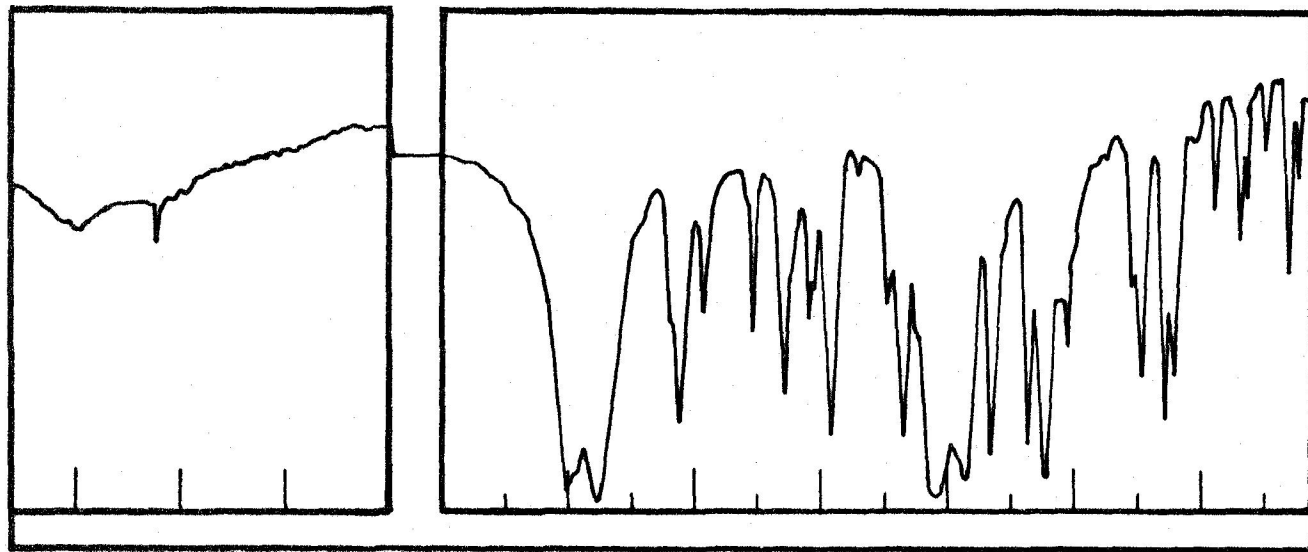
50 mg. de Daphnetina se acetilan de la forma habitual con piridina/anhídrido acético para dar un producto cristalino blanco de punto de fusión 124-125°C.

Su espectro I.R. da bandas a:

I.R. ✓	Brk max	3115, 1800, 1750, 1635 h, 1620, 1580
		1450, 1415, 1405, 1380, 1335, 1285,
		1265, 1210, 1165, 1065, 1040, 1005,
		885, 850, 837, 770, 730, 720,
		690, 655, 640, etc. cm ⁻¹ .

Su espectro U.V. da los siguientes máximos:

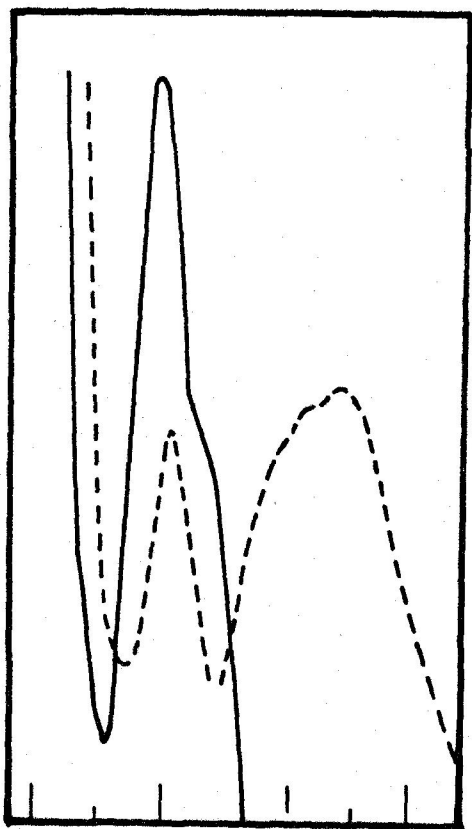
	λ máxima
MeOH	310, 279, 240 h
MeOH + MeONa	390, 368, 280
MeOH + AcONa	369, 329, 278
MeOH + AcONa + BO ₃ H ₃	335, 270
MeOH + Cl ₃ Al	308, 278, 240 h
MeOH + Cl ₃ Al + ClH .	308, 278, 240 h



Espectro de I.R. de Acetato de Daphnetina.

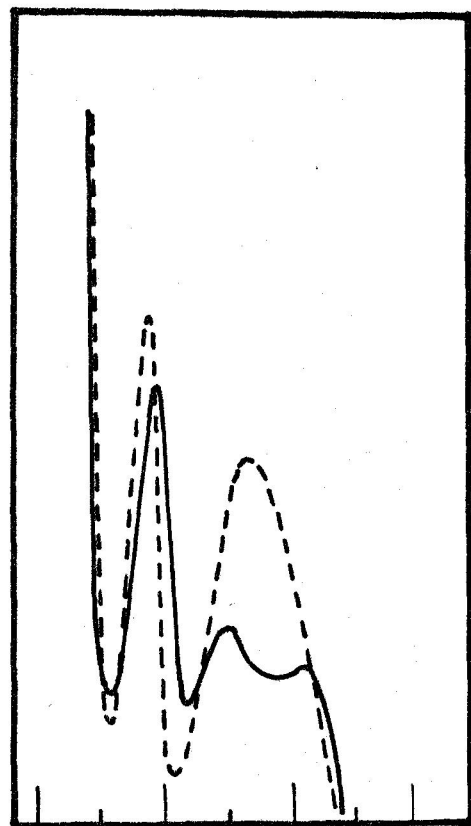
ESPECTRO U.V.
DE
ACETATO DE DAPHNETINA

	λ máxima
MeOH	310, 279, 240 h
MeOH + MeONa	390, 368, 280
MeOH + ACONa	369, 329, 278
MeOH + ACONa + BO_3H_3	335, 270
MeOH + Cl_3Al	308, 278, 240 h
MeOH + Cl_3Al + ClH .	308, 278, 240 h

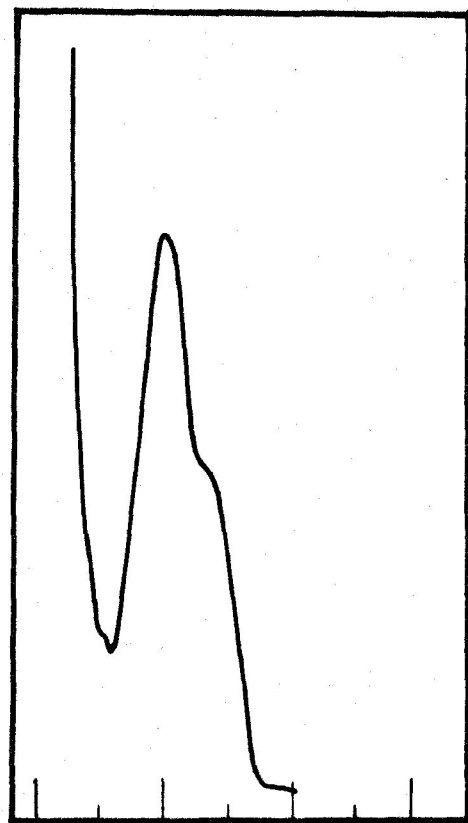


— MeOH

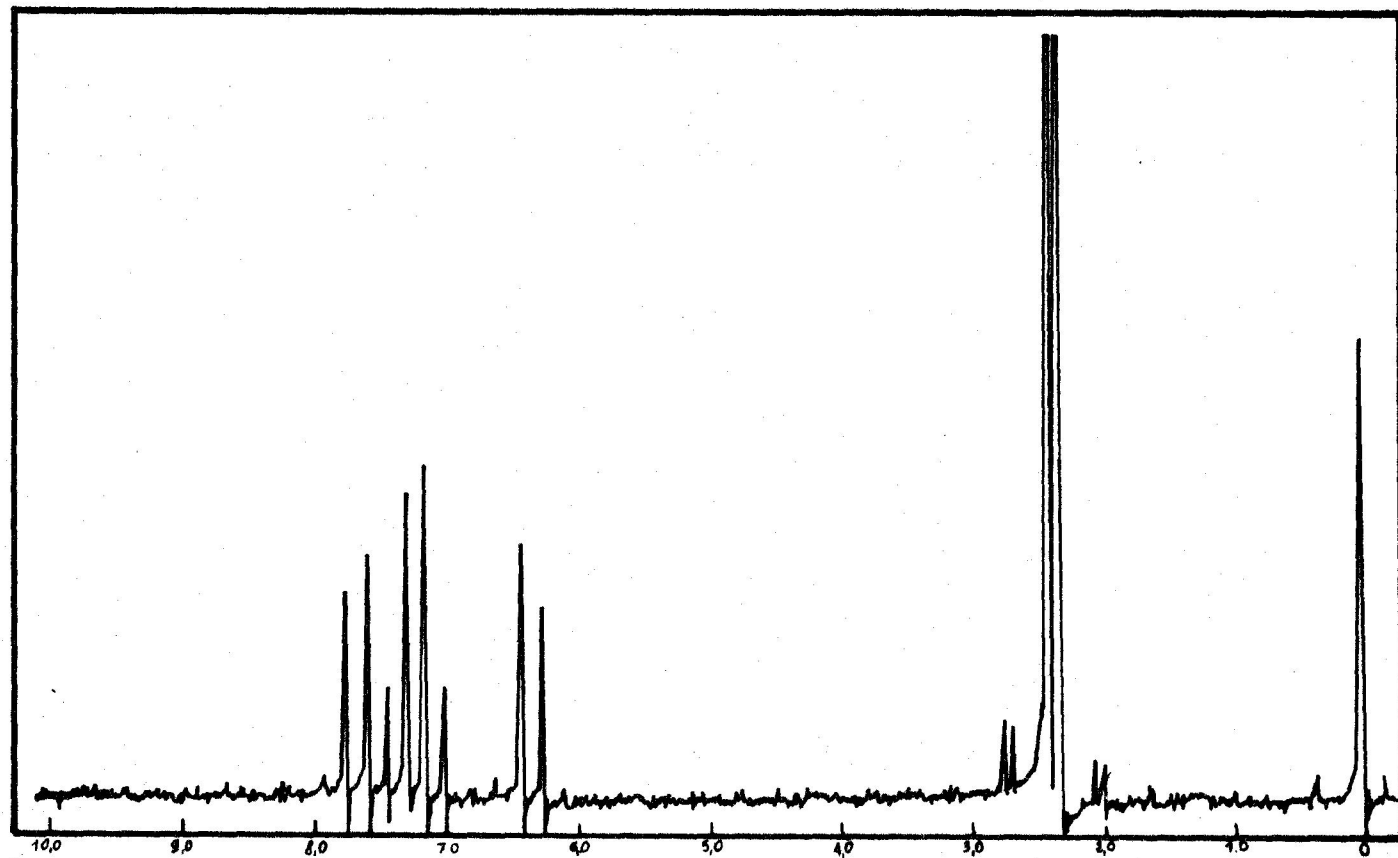
- - - MeONa



— MeOH + AcONa
- - - MeOH + AcONa + BO_3H_3



— MeOH + Cl_3Al
- - - MeOH + Cl_3Al + ClH



Espectro de RMN de Acetato de Daphnetina.

En cuanto a su espectro de R.M.N. en cloroformo deuterado tenemos:

δ	J	n ^o H	Asignación
7,69 (d) ...	9,5 ...	1	H-4
7,38 (d) ...	9,5 ...	1	H-5
7,09 (d) ...	9,5 ...	1	H-6
6,36 (d) ...	9,5 ...	1	H-3
2,42	- ...	3	8 - acetilo
2,35	- ...	3	7 - acetilo

Daphnina. (Daphnetina-7-O-glucósido)

De la fracción 3^a EtOH se obtienen unos cristales en forma de agujas muy finas, casi incoloras, que al quemar dan un fuerte olor a azúcar quemado, y que tienen un punto de fusión de 235-237°C.

Su espectro I.R. muestra bandas a:

I.R.	BrK
✓ max	3340, 2940, 1725, 1685, 1635, 1580,
	1505, 1470, 1420, 1385, 1300, 1220,
	1185, 1160, 1110, 1080, 1055, 1030,
	910, 840, 775, 730, 720, etc.
	cm ⁻¹ .

Su espectro U.V. muestra los siguientes máximos de absorción:

	<u>λ máxima</u>
MeOH	307, 257
MeOH + MeONa	320, 275
MeOH + ACONa	320, 275
MeOH + ACONa + BO_3H_3	308, 257
MeOH + Cl_3Al	307, 257
MeOH + Cl_3Al + ClH .	307, 257

En su espectro de R.M.N. se ven las siguientes señales: Dimetil Sulfoxido Deuterado.

<u>δ</u>		<u>J</u>	<u>$n^{\circ}\text{H}$</u>	<u>Asignación</u>
7,90 (d) ...	9,5 ...	1	H-4	
7,15	- ...	2	H-5; H-6	
6,30 (d) ...	9,5 ...	1	H-3	
5,10	- ...	1	Anomérico	
3,20	-	6	H - Azúcar	
3,70	-			

Por su espectroscopia se ve que el producto es un glicósido de una cumarina, y por la gran cantidad que hay de él debe tratarse de un glicósido de la Daphnetina.

Hecha la hidrólisis con ácido clorhídrico, e investigado el aglucón, vemos que este es idéntico a la Daphnetina, el azúcar se identifica como glucosa frente a glucosa patrón por cromatografía de gases.

Con los datos que se poseen; punto de fusión, U.V., I.R. y al compararlos con los datos de bibliografía (KOSHELEVA, 1968) se identifica la sustancia como Daphnina.

Su espectro de masas nos da los siguientes picos:

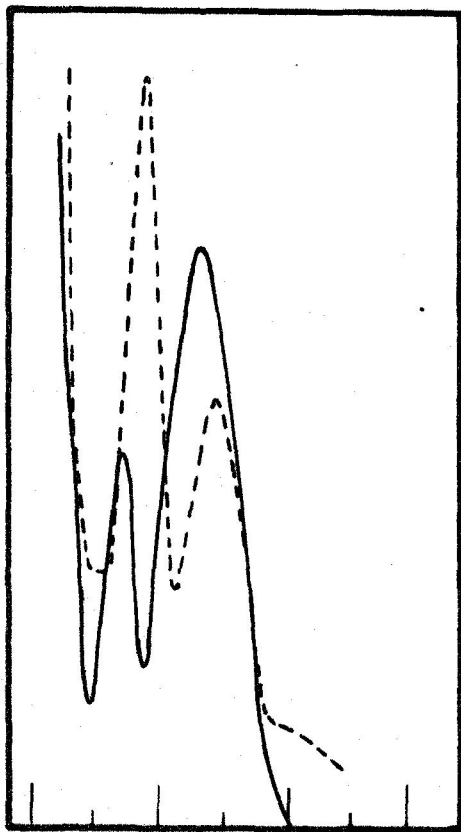
<u>m/e</u>	<u>%</u>
295	100% (pico base)
282	6
267	12
257	12
251	8
239	8
229	8
213	36
207	16
201	16
199	20
197	24
191	40
185	54
183	40
179	40
178	66
177	36

ESPECTRO U.V.

DE

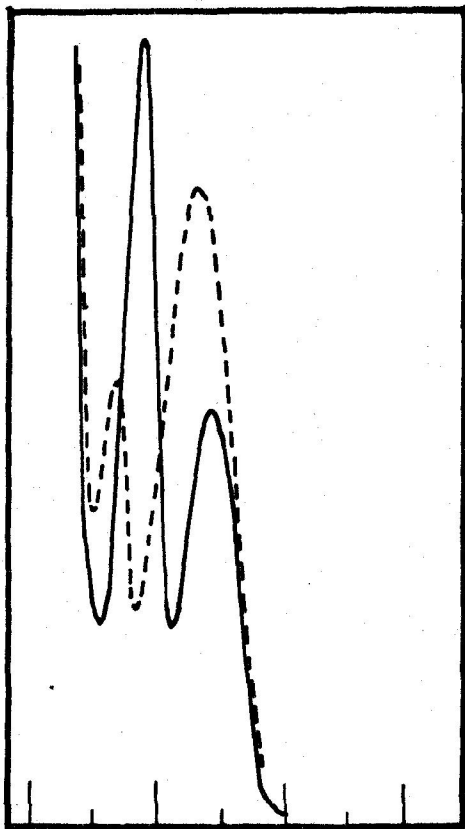
DAPHNINA

	<u>λ máxima</u>
MeOH	307, 257
MeOH + MeONa	320, 275
MeOH + ACONa	320, 275
MeOH + ACONa + BO ₃ H ₃	308, 257
MeOH + Cl ₃ Al	307, 257
MeOH + Cl ₃ Al + ClH .	307, 257

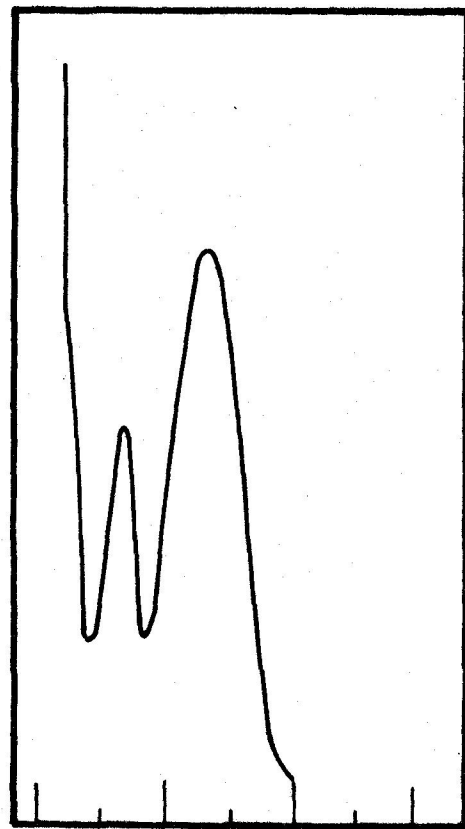


— MeOH

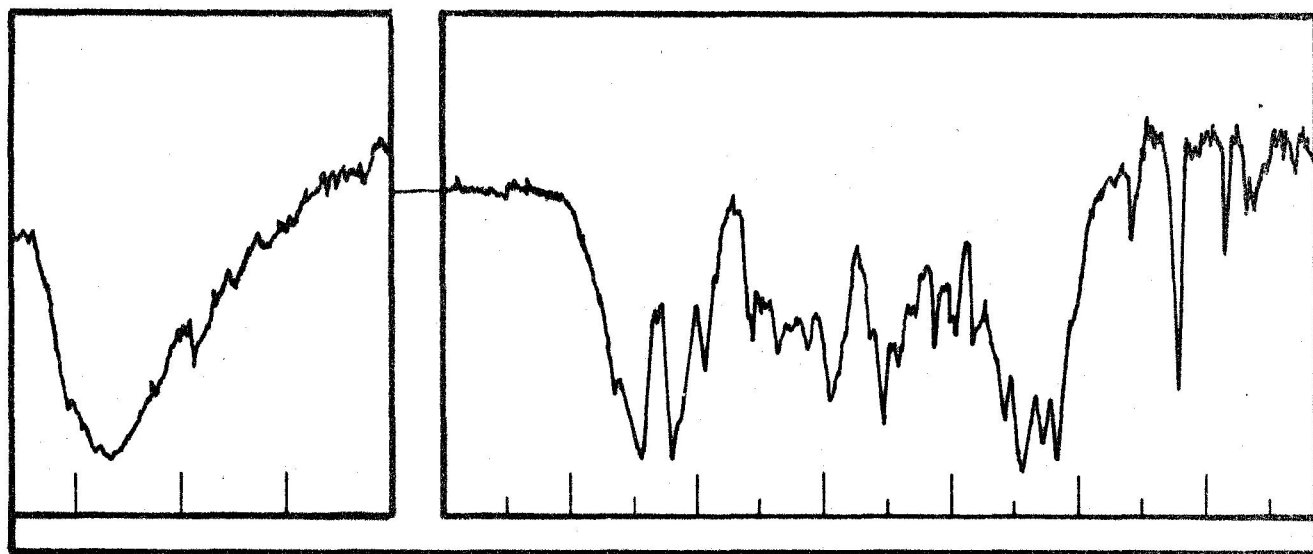
- - - MeONa



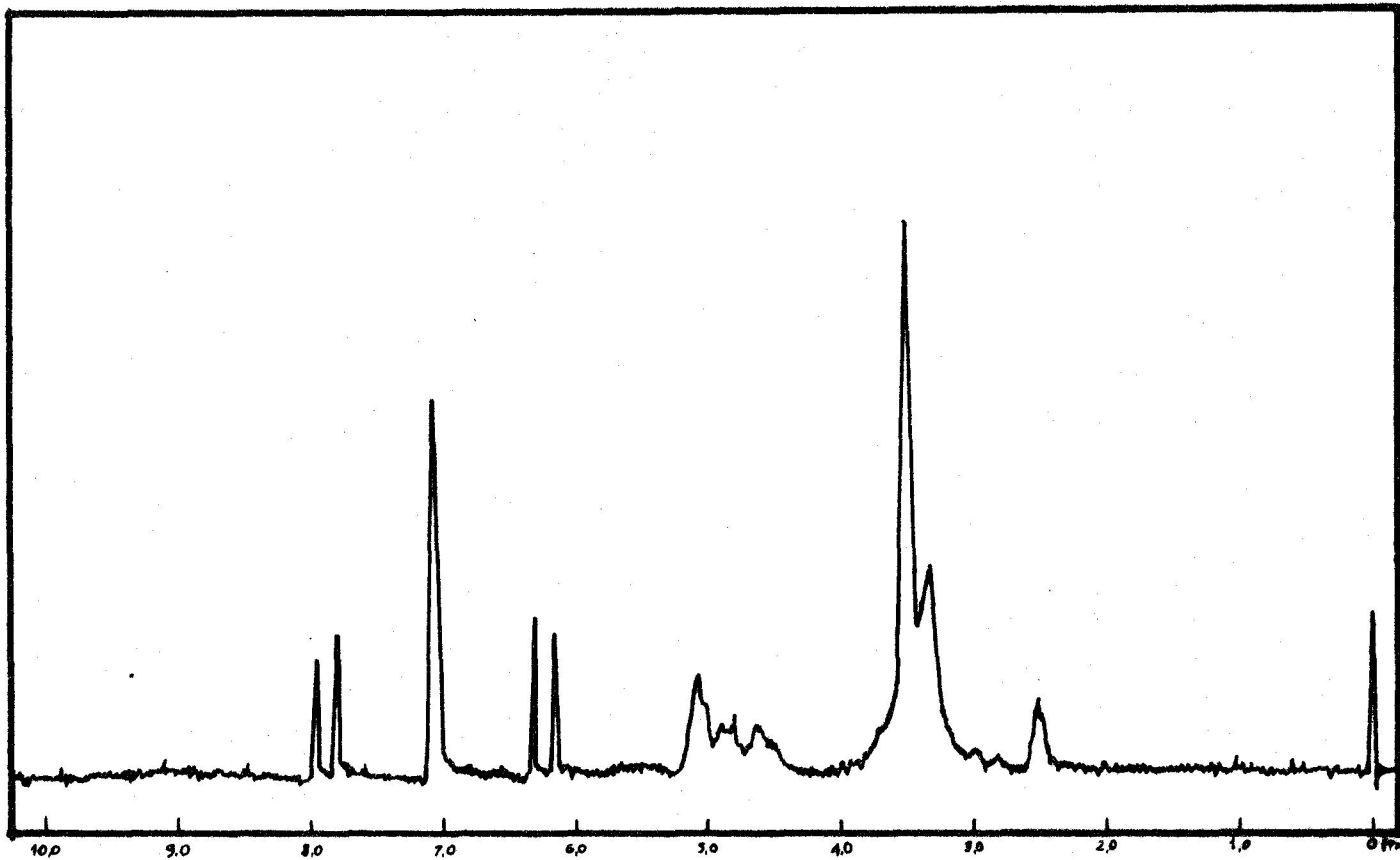
— MeOH + AcONa
 - - - MeOH + AcONa + BO_3H_3



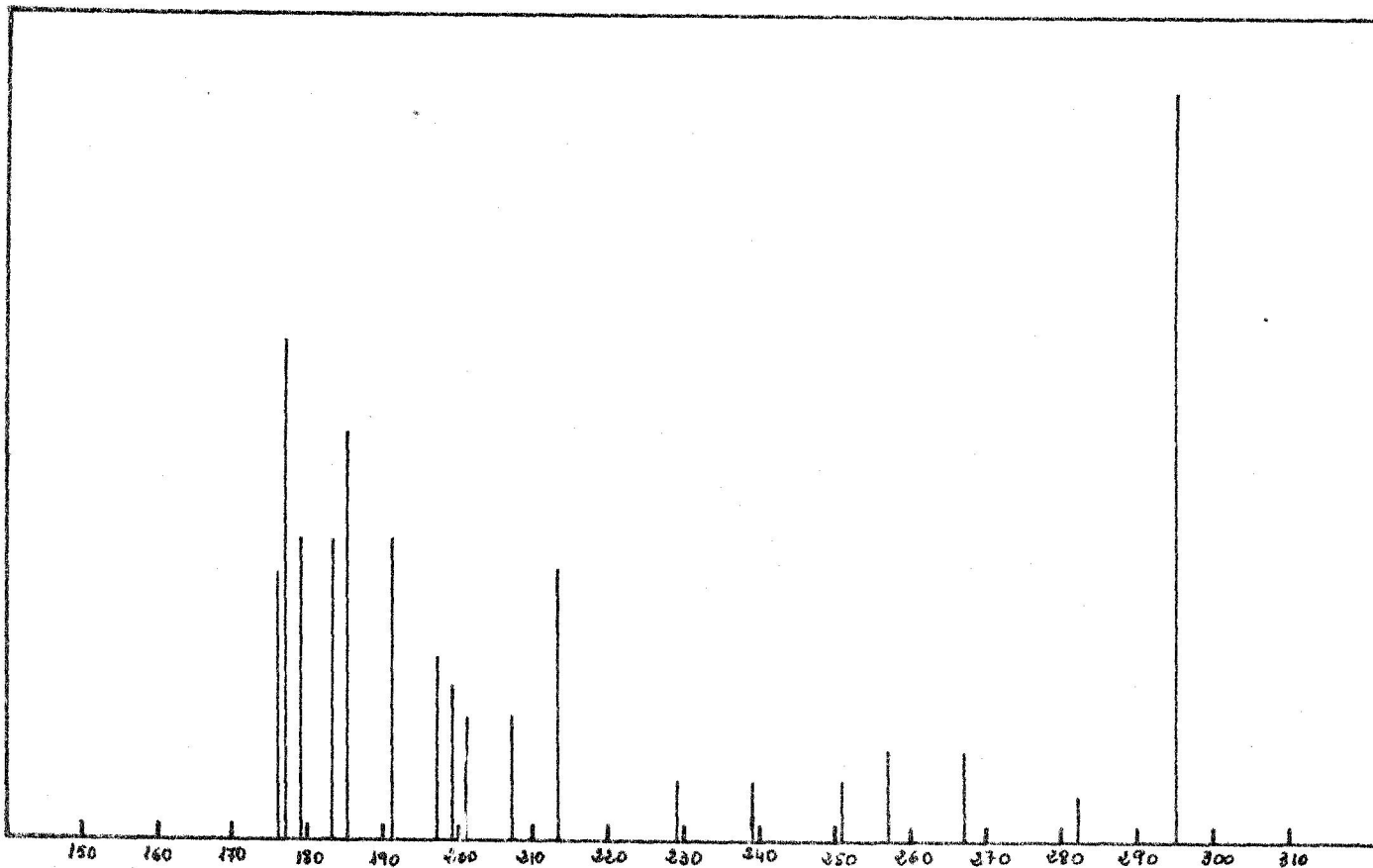
— MeOH + Cl_3Al
 - - - MeOH + Cl_3Al + ClH



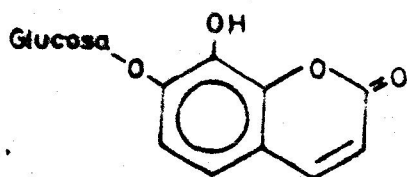
Espectro de I.R. de Daphnia.



Espectro de RMN de Daphnia.



Espectro de Masas de Daphnia.



(1)

Acetato de Daphnina

100 mg. de Daphnina se acetilan en la forma habitual dando un producto blanco en agujas de punto de fusión 208-210°C.

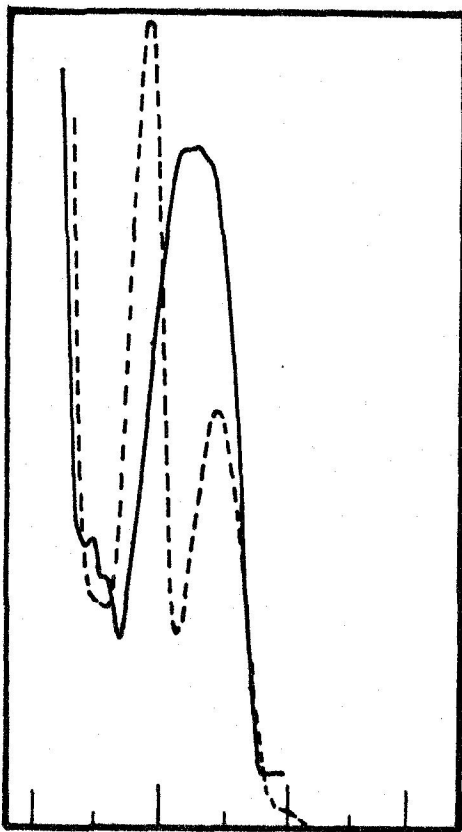
Su espectro ultravioleta nos da los siguientes máximos:

	λ máxima
MeOH	304, 248, 237
MeOH + MeONa	320, 275,
MeOH + ACONa	304, 247 h,
MeOH + ACONa + BO_3H_3	304, 247 h,
MeOH + Cl_3Al	304, 247, 237
MeOH + Cl_3Al + ClH .	304, 247, 237

Su espectro infrarrojo nos da bandas a:

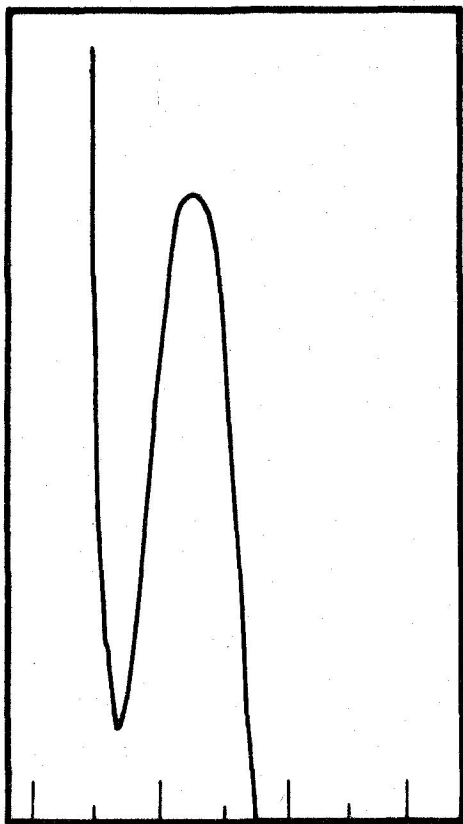
ESPECTRO U.V.
DE
ACETATO DE DAPHNINA

	λ máxima
MeOH	304; 248; 237
MeOH + MeONa	320; 275
MeOH + AcONa	304; 247 h
MeOH + AcONa + BO_3H_3	304; 247 h
MeOH + Cl_3Al	304; 247; 237
MeOH + Cl_3Al + ClH .	304; 247; 237

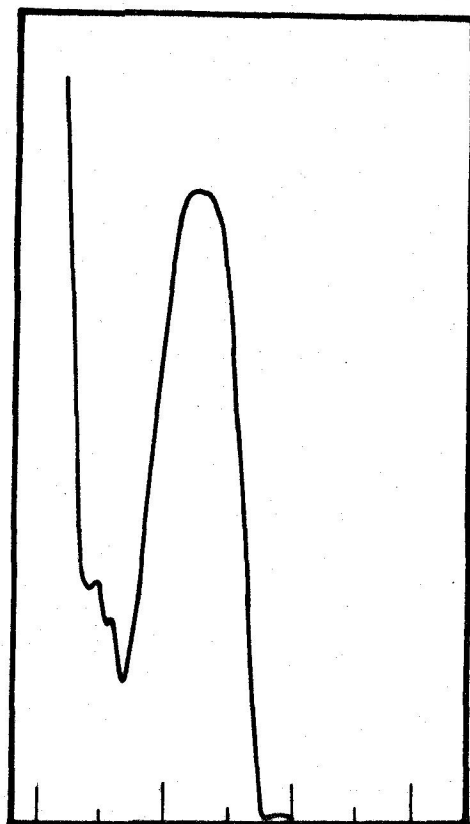


— MeOH

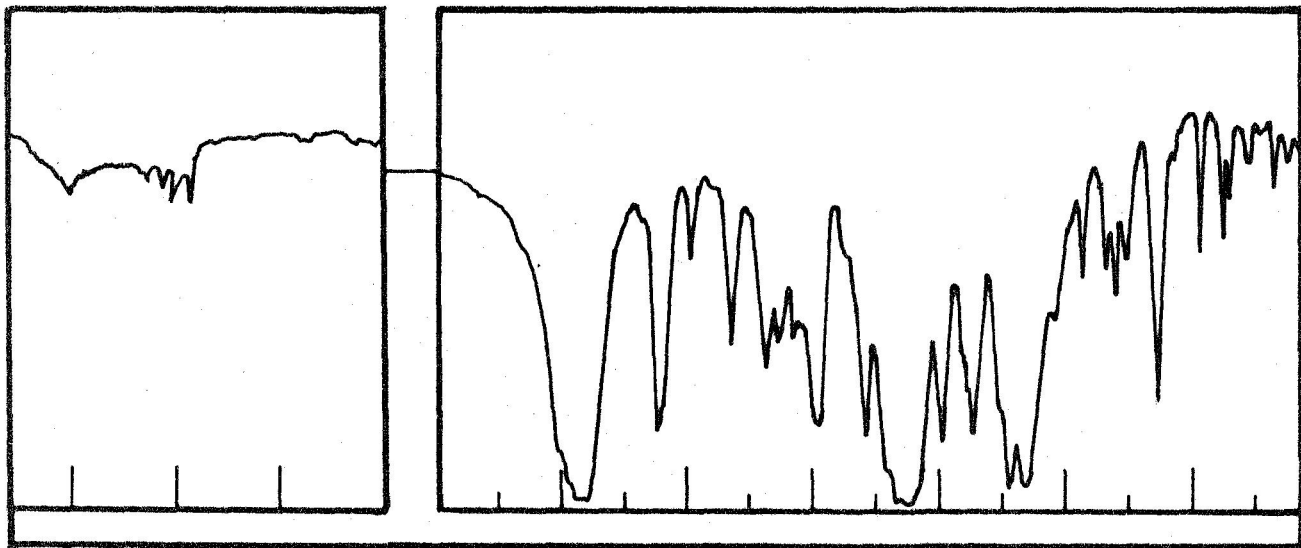
- - - MeONa



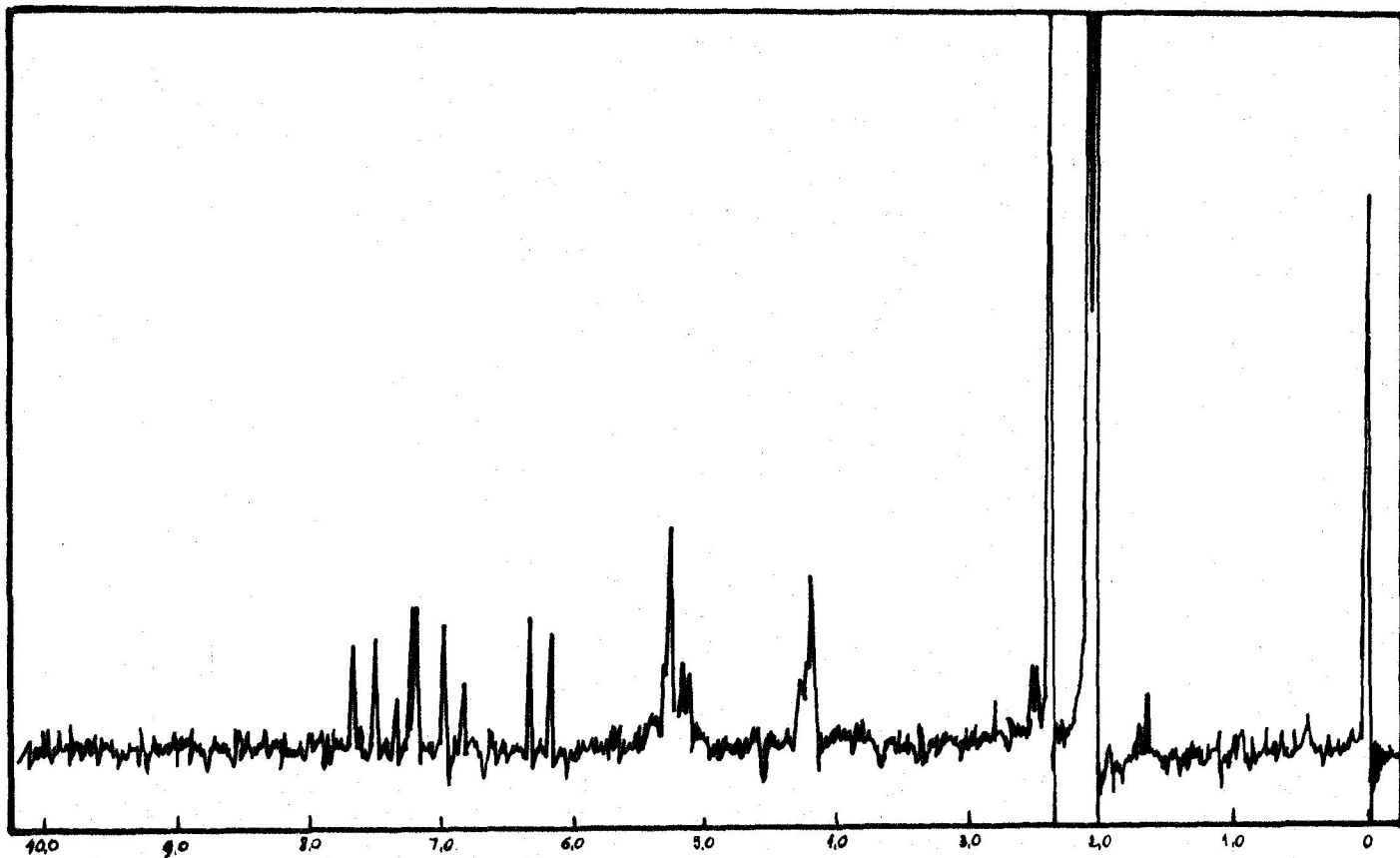
— MeOH + AcONa
- - - MeOH + AcONa + BO_3H_3



— MeOH + Cl_3Al
- - - MeOH + Cl_3Al + ClH



Espectro de I.R. de Acetato de Daphnia.



Espectro de RMN de Acetato de Daphnia.

