

Esta página está disponible en los siguientes idiomas:



Abstract Licencia Creative Commons

**Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0
Internacional (CC BY-NC-SA 4.0)**

Este es un resumen legible por humanos de (y no un sustituto) de la licencia .

Usted es libre de:

Compartir — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato

Adaptar — remezclar, transformar y construir a partir del material

La licenciante no puede revocar estas libertades en tanto usted siga los términos de la licencia

Bajo los siguientes términos:



Atribución — Usted debe dar crédito de manera adecuada , brindar un enlace a la licencia, e indicar si se han realizado cambios . Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo de la licenciante.



NoComercial — Usted no puede hacer uso del material con propósitos comerciales .



CompartirIgual — Si remezcla, transforma o crea a partir del material, debe distribuir su contribución bajo la misma licencia del original.

No hay restricciones adicionales — No puede aplicar términos legales ni medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otras a hacer cualquier uso permitido por la licencia.

Avisos:

No tiene que cumplir con la licencia para elementos del material en el dominio público o cuando su uso esté permitido por una excepción o limitación aplicable .

No se dan garantías. La licencia podría no darle todos los permisos que necesita para el uso que tenga previsto. Por ejemplo, otros derechos como publicidad, privacidad o derechos morales pueden limitar la forma en que utilizan el material.

FLAVONOIDES Y DERIVADOS PRESENTES EN FLAVERIA
BIDENTIS (L) OTTO KUNTZE Y FLAVERIA BIDENTIS
VAR. ANGUSTIFOLIA O.K. (FAMILIA DE LAS COMPUESTAS)

JOSE LUIS CABRERA

Trabajo de tesis para optar al título de
DOCTOR EN QUIMICA ORGANICA

Consejero de Tesis:

Dr. Héctor Ramón Juliani

Comisión de Tesis :

Dr. Oscar A. Orio

Dr. Martín J. Fumarola

Dr. Otto A. Orsingher

Dra. Rosaura Diez de Sanz

INV. 1978

INV. 1973

1980

1989

BIBLIOTECA CIENCIAS QUIMICAS

Signatura
Tercera fila 547.7
.....
N.º inventario 4884
Agente
Conocido del autor
Precio \$
Expediente
Origen
Licitación
Región
Fecha de compra 4-11-77.....

AY

| | | |
|--|--|--|
| | | |
|--|--|--|

Mi más sincero reconocimiento al Profesor Dr. Héctor Ramón Juliani, de quien recibí la orientación certera, el consejo oportuno y la comunicación de su propio entusiasmo, durante la realización del presente trabajo.

Deseo expresar mi más profundo agradecimiento al Sr. Prof. Dr. Venancio Deulofeu (Universidad Nacional de Buenos Aires), por el interés demostrado en el desarrollo del presente trabajo.

A la Sra. Dra. Blanca de Deferrari (Dto. de Química Orgánica-Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de Buenos Aires), por el análisis elemental cuantitativo de azufre realizado para el 3-7-disulfato de isorhamnetina.

Al Sr. Prof. Ingeniero Armando T. Huntziker (Museo Botánico-Universidad Nacional de Córdoba), por la clasificación sistemática de las plantas.

A los Sres. Profesores Dres. Martín J. Pumarola, Oscar A. Orio y Otto A. Orsingher por la discusión y correcciones hechas a esta tesis.

Al Sr. Prof. Dr. O.J. Pereyra de Santiago por las muestras de 3-7-3'-4'-tetrasulfato de quercetina y de 5-O-metil quercetina (Azaleatina).

Al Sr. Prof. Dr. Oscar A. Orio por la confección y discusión del modelo molecular correspondiente al 3-acetil-7-3'-4'-trisulfato de quercetina.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas por los fondos provistos mediante subsidio N° 6198/74, que hicieron posible la realización de la mayor parte de este trabajo.

A Empresa Transax por permitirme el uso de su espectrofotómetro infrarrojo.

A mis compañeros, quienes con su sincera amistad y colaboración facilitaron la tarea realizada.



a : RAQUEL

y ANA CAROLINA

| | |
|----------------------------------------------------------------|---------|
| RESUMEN | pág. 1 |
| INTRODUCCION | pág. 3 |
| PARTE EXPERIMENTAL | pág. 14 |
| MATERIAL Y METODO | pág. 15 |
| A.-FLAVERIA BIDENTIS (L) O.K. -HOJAS- | pág. 18 |
| a) Extracción de flavonoides sulfatados | pág. 18 |
| Aislamiento y purificación del compuesto A | pág. 20 |
| Hidrólisis del compuesto A | pág. 22 |
| Espectros UV del aglucón | pág. 22 |
| Cromatografías del aglucón | pág. 23 |
| Sobrenadante de la hidrólisis ácida del compuesto A | pág. 24 |
| Espectro IR del compuesto A | pág. 24 |
| Espectros UV del compuesto A | pág. 24 |
| Espectro RMN del compuesto A | pág. 34 |
| Metilación del compuesto A | pág. 38 |
| Hidrólisis del metilado | pág. 38 |
| Análisis elemental cuantitativo del compuesto A | pág. 40 |
| Aislamiento, purif., e identif. del tetrasulfato de quercetina | pág. 45 |
| b) Extracción de flavonoides glicosilados y aglucones | pág. 46 |
| Aislamiento, purificación e identificación | pág. 46 |
| B.-FLAVERIA BIDENTIS (L) O.K. -FLORES- | pág. 52 |
| Extracción de flavonoides | pág. 52 |
| Aislamiento, purificación e identificación | pág. 54 |
| Flaveria bidentis (L) O.K. | pág. 56 |
| C.-FLAVERIA BIDENTIS VAR. ANGUSTIFOLIA O.K. -FLORES- | pág. 58 |
| a) Flavonoides sulfatados | pág. 58 |
| Aislamiento y purificación | pág. 58 |
| Cromatografías del compuesto C | pág. 60 |
| Hidrólisis del compuesto C | pág. 60 |
| Espectros UV del aglucón del compuesto C | pág. 60 |
| Cromatografías del aglucón | pág. 61 |
| Sobrenadante de la hidrólisis ácida del compuesto C | pág. 62 |

| | |
|---------------------------------------------------------------------------|---------|
| Espectro IR del compuesto C | pág. 62 |
| Espectros UV del compuesto C | pág. 62 |
| Metilación del compuesto C | pág. 68 |
| Hidrólisis del metilado | pág. 68 |
| Espectros UV del derivado metilado del compuesto C | pág. 70 |
| Degradación alcalina del 3'-4'-5-tri-O-metil quercetina | pág. 70 |
| Hidrólisis parcial del compuesto C | pág. 74 |
| Análisis cuantitativo de azufre del compuesto C | pág. 76 |
| Espectro RMN del compuesto C | pág. 76 |
| Aislamiento, purif., e identif. del 3-sulfato de isorhamnetina | pág. 80 |
| b) Aislamiento e identificación del flavonoide agluconado | pág. 81 |
| D.-FLAVERIA BIDENTIS VAR. ANGUSTIFOLIA O.K. -HOJAS- | pág. 82 |
| Extracción, aislamiento, purificación e identificación de sus flavonoides | pág. 82 |
| Flaveria bidentis var. angustifolia O.K. | pág. 83 |
| BIBLIOGRAFIA | pág. 84 |

ABREVIATURAS

| | |
|--------------------------------|---------------------------------------------------------------|
| AcOH | Acido acético |
| AcONa | Acetato de sodio |
| BO ₃ H ₃ | Acido bórico |
| BAW | n-Butanol-Acido acético-Agua destilada (4:1:5) capa superior. |
| BrK | Bromuro de potasio |
| Cl ₃ Al | Cloruro de aluminio |
| ClH | Acido clorhídrico |
| DMS | Dimetil sulfóxido |
| D ₂ O | Agua deuterada |
| EtOH | Alcohol etílico |
| Forestal | Acido acético-Agua destilada-Acido clorhídrico (30:10:3) |
| Fenol sat. | Fenol-Agua destilada (73:27 p/p). |
| Glu | Glucosa |
| Gal | Galactosa |
| Gluc. | Acido glucurónico |
| Hz | Hertz |
| infl. | Inflección |
| J | Constante de acoplamiento |
| MeOH | Alcohol metílico |
| MeONa | Metóxido de sodio |
| MHz | Megahertz |
| N ₂ CH ₂ | Diazometano |
| n-ButOH | Butanol normal |
| O.K. | Otto Kuntze |
| ppm | Parte por millón |
| P.M. | Peso molecular |
| PMN | Resonancia Magnético Nuclear |
| Rba | Rhamnosa |
| TMS | Tetrametilsilano |
| TBA | t-Butanol-Acido acético-Agua destilada (3:1:1) |
| U.V. | Ultravioleta |

RESUMEN

El estudio del contenido en flavonoides en Flaveria bidentis (L) O.K. (Compuestas) y Flaveria bidentis var. angustifolia O.K., también de la familia de las Compuestas, llevó a descubrir dos nuevas y curiosas estructuras con características inusuales para esta familia de compuestos dentro de los productos naturales

La primera de ellas, el 3-acetil-7-3'-4'-trisulfato de quercetina aislado de flores y hojas de Flaveria bidentis (L) O.K., representa el tercer flavonol encontrado naturalmente con un alto grado de sulfatación y el primero con un grupo acetilo que esterifica directamente al aglucón. Su dilucidación, detallada en la primera parte de este trabajo, fue llevada a cabo por aplicación de métodos espectroscópicos en el UV, RMN e IR, además del análisis elemental cuantitativo y formación de su derivado metilado.

La segunda de ellas, el 3-7-disulfato de isorhamnetina, se aisló de las flores y hojas de Flaveria bidentis var. angustifolia O.K. y constituye el primer derivado natural disulfatado dentro de la familia de los flavonoles. El estudio de su estructura se desarrolló en forma similar que para el anterior compuesto, aplicando métodos físicos (UV, IR, RMN), químicos (formación de derivados) y análisis elemental cuantitativo.

Los restantes flavonoides resultaron todos ellos de estructura conocida, por lo que para su identificación se recurrió a la espectroscopía UV y cromatografía en papel sembrando contra muestra auténtica (caso de aglucones y tetrasulfato de quercetina).

Para los derivados glicosilados, por no contar con muestras testigos, se buscó además de las coincidencias espectroscópicas y cromatográficas señaladas por bibliografía, ratificar la composición molecular del compuesto, por hidrólisis total, para de esta manera confirmar el aglucón y su fracción glicosídica. Para el 3-sulfato de isorhamnetina (Persicarina) también se recurrió a la obtención de su derivado metilado correspondiente.

De acuerdo a este esquema de trabajo se obtuvieron, para el contenido de flavonoides en hojas y flores de las dos plantas estudiadas los resultados que se detallan en el siguiente cuadro.

H O J A S

FLAVERIA BIDENTIS (L) O.K.

3-ACETIL-7-3'-4'-TRISULFATO DE QUERCETINA

3-7-3'-4'-tetrasulfato de quercetina

Quercetina-3-O-glucosa

Kaemferol

Quercetina

FLAVERIA BIDENTIS VAR.

ANGUSTIFOLIA O.K.

3-7-DISULFATO DE ISORHAMNETI

3-sulfato de isorhamnetina

Quercetina

F L O R E S

FLAVERIA BIDENTIS (L) O.K.

3-ACETIL-7-3'-4'-TRISULFATO DE QUERCETINA

Kaemferol-3-O-glucosa

Kaemferol

FLAVERIA BIDENTIS VAR.

ANGUSTIFOLIA O.K.

3-7-DISULFATO DE ISORHAMNETI

3-sulfato de isorhamnetina

Isorhamnetina

INTRODUCCION

Los flavonoides representan una importante familia de compuestos dentro de los pigmentos naturales, cuya distribución en las plantas se extiende a todas sus partes: hojas, flores, leños, frutos, etc.. Sus estructuras son las principales responsables, conjuntamente con las clorofilas, de las distintas coloraciones que se presentan en el reino vegetal.

Los primeros estudios referentes a la composición química de este tipo de pigmentos fueron iniciados por Perkin y S. Von Kostanecki¹ a fines del siglo pasado; a partir de entonces los trabajos se fueron multiplicando abarcando distintos temas, conociéndose hoy con profundidad lo relativo a su esteoquímica, biosíntesis, actividad fisiológica, síntesis, etc.^{2,3,4,5}

El esqueleto carbonado fundamental de los flavonoides responde básicamente al esquema de C₆-C₃-C₆, donde los C₆ son anillos bencénicos (A y B fig.1)

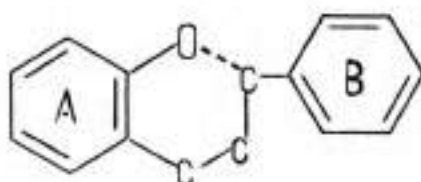
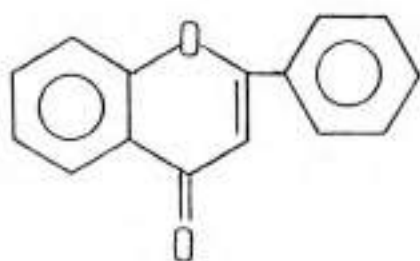
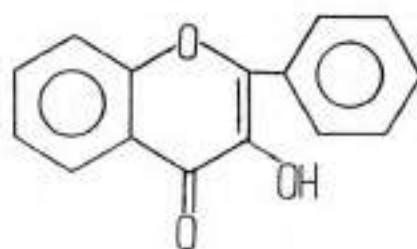


FIGURA 1: Núcleo fundamental de los flavonoides

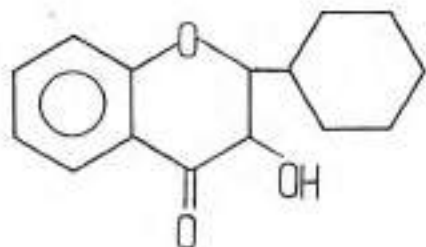
y C₃ puede presentarse con distintas variaciones estructurales (cíclica, abierta, saturada, insaturada etc.), dando origen así a las distintas familias de compuestos que se conocen genéricamente como flavonoides y cuyas fórmulas se detallan a continuación.



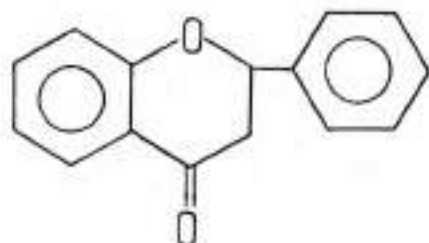
Flavona



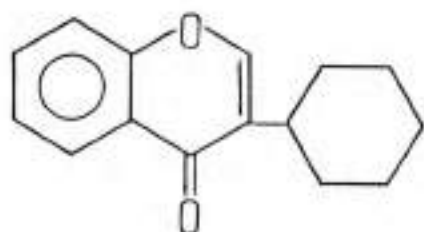
Flavonol



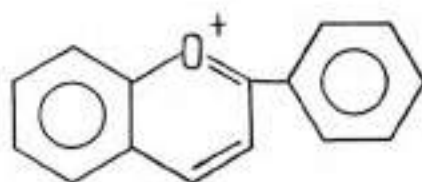
Flavanonol



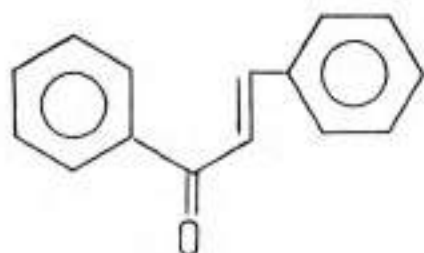
Flavanona



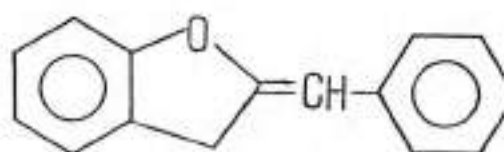
Isoflavona



Sal de flavilio
(antocianinas)



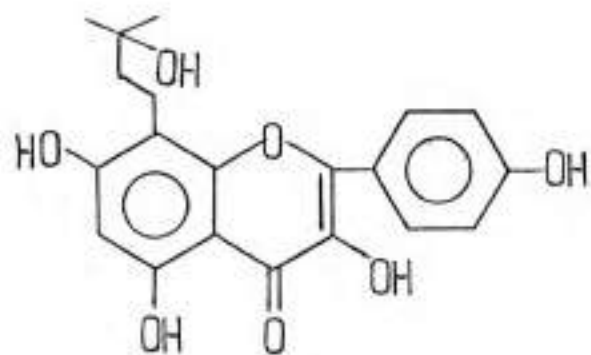
Chalcona



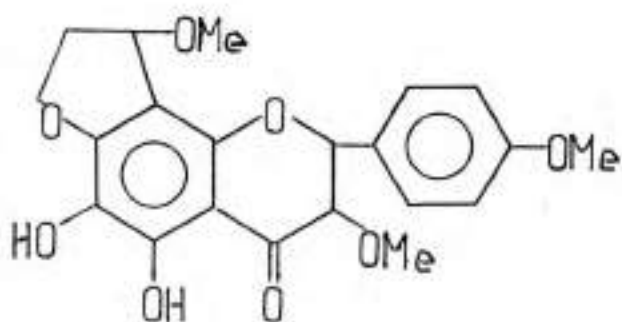
Aurona

Estas estructuras se presentan en la naturaleza generalmente en forma polihidroxilada o como derivados metoxilados y/o glicosilados. Los de mayor abundancia son los flavonoles, flavonas y antocianinas, especialmente los dos primeros, de los que se conocen más de 200 y 300 derivados respectivamente. Los restantes, chalconas, flavanonas, isoflavonas etc., son conocidos también como flavonoides menores por su escasa distribución y además por su limitada contribución como colorantes naturales.

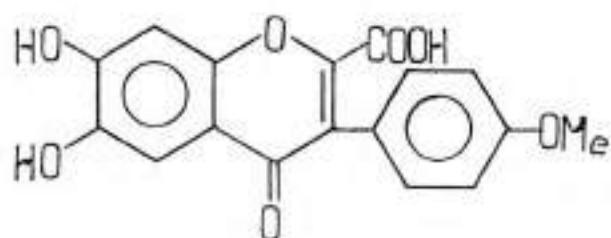
La forma en que mayormente se encuentran difundidos los flavonoides en los jugos vegetales es, sin duda, bajo la forma glicosilada. Pero existen otras estructuras que por ser poco frecuentes, se las considera rarezas; ejemplo de ello son los que contienen restos: isoprenoide (I), furanósico (II), ácido (III), alcaloidal (IV), y otros.



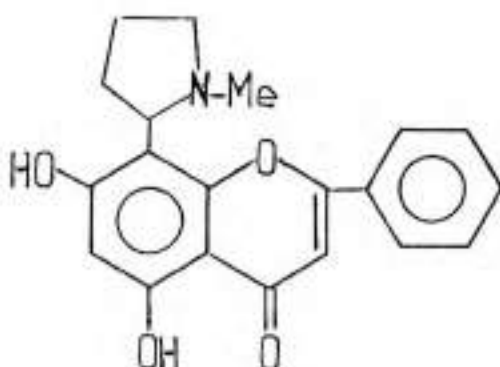
(I)



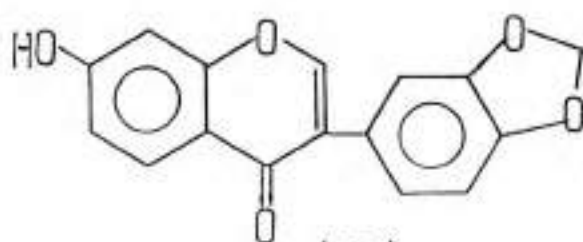
(II)



(III)

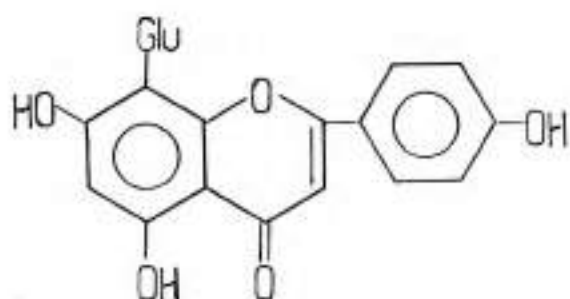


(IV)

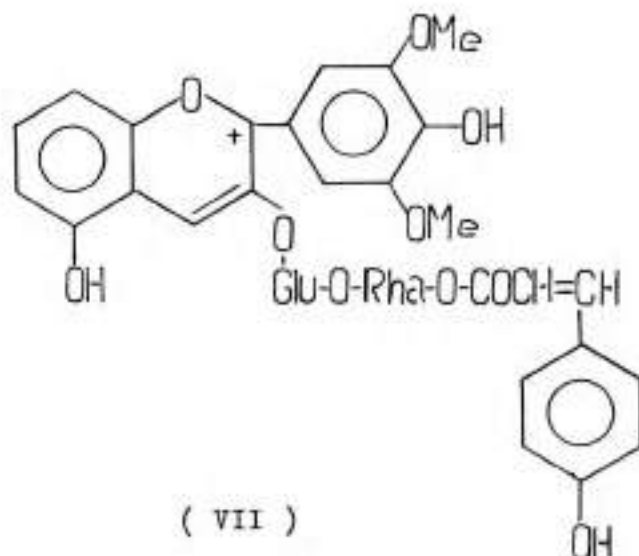


(V)

Además de estos restos poco comunes, pueden presentarse otras variaciones, que si bien no son tan notables, suelen considerarse curiosidades para algunos grupos, mientras que para otros resultan estructuras comunes; como ejemplo de ello podemos citar a los derivados C-glicosilados que se encuentran casi con exclusividad en las flavonas (VI) mientras que en contados casos hacen su aparición en otros tipos de flavonoides⁶, no hallándose hasta ahora, derivados de esta naturaleza entre las antocianinas. En estas últimas en cambio son frecuentes las estructuras relacionadas a los acil-derivados⁷, en donde un ácido orgánico (generalmente p-cumárico, ferúlico o cafeico) se une al aglucón a través de un resto azucarado (VII), pero esta clase de sustitución es raramente encontrada en el resto de los flavonoides.



(VI)



(VII)

Otras estructuras consideradas hasta hace poco tiempo como curiosidades y que se creía que solamente estaban confinadas a plantas de los géneros *Polygonum* y *Oenanthe*⁸, es la de los flavonoides sulfatados. En este tipo de compuestos el resto sulfato se une al aglucón por medio de una unión ester.

Estudios realizados durante estos últimos años relacionados al descubrimiento de nuevas estructuras con estas características, así también como a su distribución en distintas familias de plantas, han tenido un extraordinario adelanto, enriqueciendo de esta forma un campo que había sido poco explorado en productos naturales. Como consecuencia de ello se conocen en la actualidad 45 derivados sulfatados, 17 de los cuales corresponden a flavonoles y 28 a flavones (tablas I y II), expuestos la mayoría, recientemente, a través de una revisión que al respecto efectuara J.B. Harborne⁹.

TABLA I

- Derivados sulfatados de flavonoles -

| <u>Compuesto</u> | <u>Referencia</u> | <u>Año de comunicación de su estructura</u> |
|-------------------------|-------------------|---------------------------------------------|
| Quercetina | | |
| 3-7-3'-4' tetrasulfato | -11- | 1972 |
| 3-rutinósido-sulfato | -13- | 1973 |
| 3-sulfato | -10- | 1975 |
| 7-sulfato-3-glucurónico | -12- | 1975 |

| | | |
|----------------------------------|------|------|
| Isorhamnetina | | |
| 3-sulfato | -14- | 1937 |
| 3-rutinósido-sulfato | -13- | 1973 |
| 7-sulfato-3-glucurónico | -12- | 1975 |
| 7-sulfato | -12- | 1975 |
| Kaemferol | | |
| 7-sulfato | -12- | 1975 |
| 7-sulfato-3-glucurónico | -12- | 1975 |
| 7-4'-dimetil eter-3-sulfato | -15- | 1975 |
| Patuletina | | |
| 7-sulfato | -16- | 1971 |
| 7-sulfato-3-glucósido | -16- | 1971 |
| Rhamnetina | | |
| 3-5-4'-trisulfato-3'-glucurónico | -17- | 1975 |
| Rhamnazina | | |
| 3-sulfato | -18- | 1953 |
| Tamarixetina | | |
| 3-sulfato | -19- | 1966 |
| Gossypina | | |
| 3-sulfato | -24- | 1977 |

TABLA II

- Derivados sulfatados de flavonas -

| <u>Compuesto</u> | <u>Referencia</u> | <u>Año de comunicación de su estructura</u> |
|---------------------|-------------------|---------------------------------------------|
| Apigenina | | |
| 7-glucósido-sulfato | -20- | 1974 |
| 7-sulfato | -12- | 1975 |

Luteolina

| | | |
|-------------------------|------|------|
| 7-sulfato-3'-glucósido | -13- | 1973 |
| 7-sulfato-3'-rutinósido | -13- | 1973 |
| 7-glucósido-sulfato | -13- | 1973 |
| 7-rutinósido-sulfato | -13- | 1973 |
| 7-sulfato | -12- | 1975 |
| 4'-sulfato | -10- | 1975 |
| 7-3'-disulfato | -12- | 1975 |
| 3'-sulfato | -21- | 1976 |

Diosmetina

| | | |
|----------------|------|------|
| 3'-sulfato | -21- | 1976 |
| 7-3'-disulfato | -21- | 1976 |

Chrisoeriol

| | | |
|---------------------|------|------|
| 7-glucósido-sulfato | -22- | 1974 |
| 7-sulfato | -12- | 1975 |

Tricina

| | | |
|---------------------|------|------|
| 7-glucósido-sulfato | -23- | 1974 |
|---------------------|------|------|

Hypolaetina

| | | |
|------------------------|------|------|
| 8-sulfato | -12- | 1975 |
| 8-glucósido-3'-sulfato | -24- | 1977 |

Vitexina

| | | |
|----------------------|------|------|
| 7-sulfato | -13- | 1973 |
| 7-glucósido-sulfato | -13- | 1973 |
| 7-rutinósido-sulfato | -13- | 1973 |

Isovitexina

| | | |
|-----------|------|------|
| 7-sulfato | -13- | 1973 |
|-----------|------|------|

Orientina

| | | |
|---------------------|------|------|
| 7-sulfato | -13- | 1973 |
| 7-glucósido-sulfato | -13- | 1973 |

Iso-Orientina

| | | |
|-----------|------|------|
| 7-sulfato | -13- | 1973 |
|-----------|------|------|

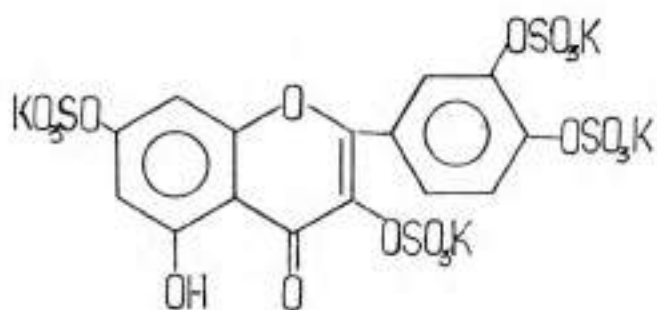
Tricetina

| | | |
|----------------|------|------|
| 3'-sulfato | -21- | 1976 |
| 7-sulfato | -21- | 1976 |
| 7-3'-disulfato | -21- | 1976 |

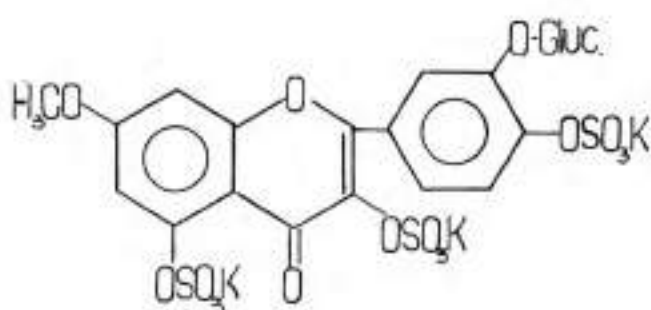
Desde 1937, fecha en que fue aislado el 3-sulfato de isorhamnetina (Persicarina) hasta 1971, solamente se dieron a conocer cuatro estructuras nuevas relacionadas a este tipo de compuestos, todas ellas monosulfatadas. El primer derivado polisulfatado de origen natural, el 3-7-3'-4'-tetrasulfato de quercetina, se obtuvo de la Flaveria bidentis (L) O.K. en nuestro Laboratorio en el año 1972¹¹. Entre 1973 y 1977 se publican las 12 estructuras restantes : lacionadas a los flavonoles, también en este corto período de tiempo se dan a conocer la totalidad de los derivados asociados a las flavonas, citados en la tabla II.

Los flavonoides sulfatados pueden ser divididos en dos grupos de acuerdo a la forma en que el resto inorgánico se une al aglucón: 1) Los que lo esterifican directamente y 2) los que se unen a él por intermedio de un resto azucarado, en forma similar a lo visto para los acil-derivados (ver página 6 En general los flavonoides sulfatados muestran mayor predilección por la primera de estas dos opciones, en especial los flavonoles, en donde la sustitución se realiza preferentemente sobre las posiciones 3 o 7; cuando en una misma molécula se presentan un grupo sulfato y otro azucarado, invariablemente el primero de ellos ocupa la posición 7, dejando la 3 al otro sustituyente.

Con excepción de los dos polisulfatos conocidos, tetrasulfato de quercetina (VIII) y trisulfato glucuronato de rhamnetina (IX) todos los flavonoles sulfatados obtenidos naturalmente son derivados monosulfatados.

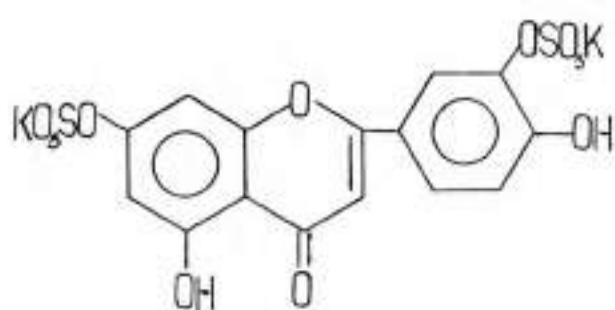


(VIII)

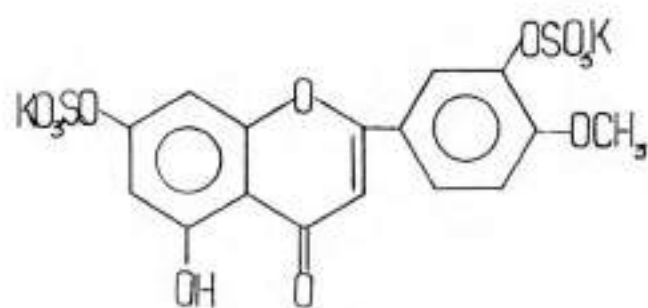


(IX)

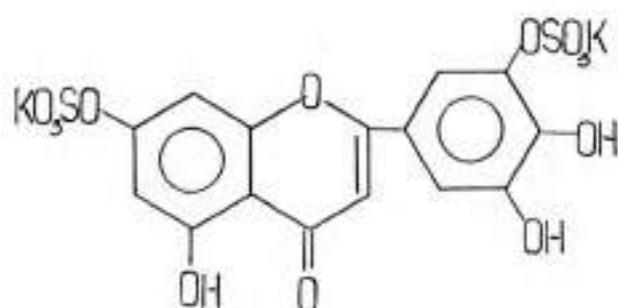
En las flavonas se acentúa la preferencia del resto inorgánico sobre la posición 7 del aglucón ya que solamente 5 de los 28 compuestos tabulados presentan otras alternativas. Mientras que la polisulfatación en este grupo de derivados es una variable que todavía no ha sido encontrada, la máxima conocida la disulfatación ; 7-3'-disulfato de: luteolina (X), diosmetina (XI) y tricetina (XII).



(X)

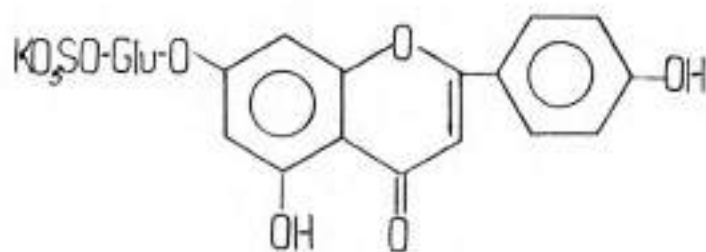


(XI)



(XII)

La otra forma de unión, por intermedio de un resto azucarado, resulta frecuente entre las flavonas (XIII) ya que aproximadamente un tercio de los derivados conocidos presentan estas características, siendo en cambio escasos (dos) los encontrados entre los flavonoles. En estos casos el ácido inorgánico esterifica un oxidrilo alcohólico del azúcar, que se supone es el unido al carbono seis, por analogía con los polisacáridos sulfatados naturales, los que tienen predominantemente este tipo de unión en esa posición.



(XIII)

Finalmente también existen las C-glicosil flavonas sulfatadas (con el grupo sulfato esterificando al aglucón) y las flavonas C y O-glicosiladas sulfatadas (con el grupo inorgánico esterificando uno de los glúcidos), resultando en estos casos poco clara la posición del sulfato ya que no se sabe con certeza a cual de los azúcares se encuentra unido.

Por vía sintética se ha llegado a obtener un número considerable de estos compuestos, siendo los primeros trabajos en este orden los efectuados por Yamaguchi²⁵, quien usó para ello ácido sulfámico disuelto en piridina y como aglucones, entre otros, isorhamnetina y quercetina. Así obtuvo del primero los derivados sulfatados en las posiciones 3 y 4' y del segundo el sustituido en 3. Harborne⁹ repitió la síntesis utilizando el último de los aglucones, obteniendo como producto principal quercetina 3'-sulfato y como producto secundario los derivados sulfatados en las posiciones 7 y 3. Entre los productos de reacción el autor hace mención a la presencia de diversos compuestos disulfatados y resalta que la única sustitución que no se logra por esta vía es en la posición 5, debido presumiblemente al puente hidrógeno que existe entre el oxidrilo allí ubicado y el carbonilo del carbono 4. El mismo autor extendió esta síntesis a algunas flavonas, obteniendo los siguientes resultados:

TABLA III

- Flavonas sulfatadas obtenidas por síntesis -

| <u>Flavonas</u> | <u>P.principal</u> | <u>P.secundario</u> |
|-----------------|---------------------------------------|------------------------------|
| Apigenina | 4'-sulfato | *7-sulfato y 7-4'-disulfato |
| Luteolina | 3 y 4'-sulfato | *7-sulfato y *7-3'-disulfato |
| Diosmetina | *3' y *7-sulfato y *7-3'-disulfato | *3'-sulfato y 7-4'disulfato |

Los productos marcados con asteriscos, además de estar sintetizados se los corren naturalmente.

Las flavonas y flavonoles sulfatados se caracterizan cromatográficamente por tener alta movilidad en solventes acuosos (H₂O, AcOH 15%) y escasa movilidad en solventes alcohólicos (BAW, TEA). Las manchas visualizadas bajo luz UV y con vapores de amoníaco son generalmente de forma arriñonada y muestran las mismas reacciones de coloración que los correspondientes metil-eteres o glicosidos. Otro comportamiento similar entre flavonoides sulfatados y glicosilados.

se presenta al comparar las características espectrales de ambos tipos de derivados, por ejemplo el 3-sulfato de isorhamnetina presenta sus máximos de absorción en: 256, 273 *infl.*, 302 *infl.* y 352 nm, mientras que la isorhamnetina 3-*glucósido* los tiene en: 255, 268 *infl.*, 303 *infl.* y 357 nm respectivamente.

Las propiedades en que difieren los derivados glicosilados y sulfatados, son las relativas a su solubilidad y punto de fusión. La solubilidad en agua de los esterificados con el anión inorgánico, es generalmente mayor que la de su equivalente glicosilado; del mismo modo que son más altos sus puntos de fusión (con descomposición en algunos casos). Como ejemplo de ello podemos citar nuevamente los derivados de la isorhamnetina: el 3-sulfato funde a 280°C mientras que su 3-*glucósido* lo hace a 240°C.

Harborne⁹ en un reciente trabajo relacionado a estos compuestos, se refiere a las uniones de los flavonoides sulfatados, observando que éstas son normalmente más débiles y por lo tanto más susceptibles a la hidrólisis ácida que las uniones glicosídicas, de manera que es posible distinguir entre estas dos tipos de uniones midiendo sus velocidades relativas de hidrólisis, por otro lado la energía de unión de los sulfatos a los distintos oxidrilos de las flavonoles y flavonoles muestran el mismo orden que para las uniones glicosídicas, es decir que el enlace de la posición 3 es más débil que el de la 7, etc..

Los numerosos trabajos fitoquímicos referidos a este tipo de derivados dan cuenta de su profusa distribución en la naturaleza, desvirtuando así la creencia de que solamente se encontraban confinados en algunos géneros de plantas; lo demuestra el hecho que estos compuestos han sido encontrados en 161 especies pertenecientes a 10 familias de dicotiledoneas y 7 monocotiledoneas.

Es interesante destacar que el contenido en flavonoides sulfatados en algunas especies no se presentan con regularidad, produciéndose variaciones de acuerdo al sitio geográfico en que se desarrolle dicha especie, sumándose a la misma, pequeñas variaciones de tipo intrapoblacional.

La función que estos derivados cumplen en las plantas también es motivo de conjeturas, suponiendo algunos autores que actuarían como depósito de iones sulfato en aquellos lugares donde el medio es rico en este tipo de sales. Este hecho le permitiría actuar, a su vez, como agente de transferencia de azufre de la forma inorgánica a la orgánica. Otros investigadores sugieren que la sulfatación al igual que la glicosilación actuarían conjunta o alternativamente asociadas al mecanismo de desintoxicación, bloqueando y anulando el efecto nocivo

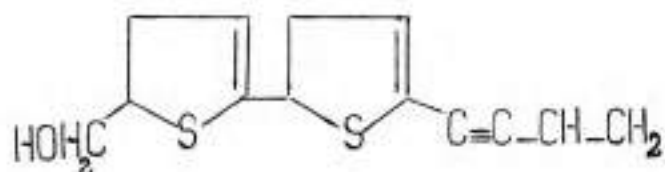
vo de los grupos fenólicos en el tejido vegetal.

Prosiguiendo con la línea de trabajo de nuestro Laboratorio referente al estudio de flavonoides y derivados sulfatados contenidos en el género *Flaveria* (Familia de las Compuestas), que comprende dos variedades profusamente distribuidas en nuestro país (y que mostró ser muy rico en estos compuestos se logró la separación e identificación de dos nuevos derivados sulfatados, cuyas estructuras se discutirán conjuntamente con la de los flavonoides conocidos en la parte experimental.

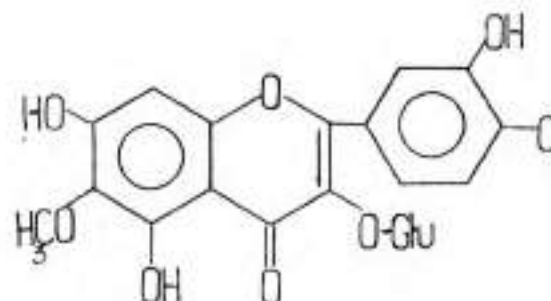
Respecto de esta planta diremos que su habitat comprende desde el centro de nuestro país hasta el sud de EE.UU.²⁶, creciendo espontáneamente a la vera de los caminos o en los campos incultos. Por lo vistoso de su follaje de un verde lustroso y hermosos capítulos florales amarillos oro se la encuentra en jardines como planta ornamental. Se trata de una planta anual.

En nuestro país se la conoce con los nombres vernáculos de "fique" o "fisque", "contrayerba", "chasca" y "balda". Los indígenas usaban la infusión de las hojas para curar las heridas producidas por mordeduras de víboras y arañas, empleando además emplastos de ellas para heridas infectadas. Otra utilización dada por las mujeres aborígenes era la de teñir lanas de color amarillo.

En cuanto a los estudios fitoquímicos sobre especies de este género, puede decirse que son escasos y recientes; habiendo sido el primero de ellos realizado por Bholman y Kleine en 1963 sobre compuestos sulfurados derivados de poliacetilenos (XIV) presentes en *Flaveria repanda*²⁷. Otras publicaciones están referidas a flavonoides: en *Flaveria linearis* y *trinaria*²⁸ se aisló la pautetina-3-O-glucósido (XV) y en el mismo año (1972) el tetrasulfato de quercetina en *Flaveria bidentis*¹¹.



(XIV)



(XV)

P A R T E E X P E R I M E N T A L

- 1.- Molino a cuchillas Retsch-Mühle.
- 2.- Sílica Gel "G" Macherey y Nagel.
- 3.- Poliamida DC 11 Macherey y Nagel.
- 4.- Papel Whatman N°1 y 3MM para cromatografía.
- 5.- Geles filtrantes: "Bio-Gel" P-4 y "Sephadex" G-10.
- 6.- Los puntos de fusión fueron determinados según el micrométodo del tubo capilar y no son corregidos.
- 7.- Los espectros IR fueron realizados en los siguientes aparatos: Perkin-Elmer mod.735 (espectro fig.3) y Beckman IR-8 (espectro fig.17) en pastillas de bromuro de potasio.
- 8.- Los espectros UV se efectuaron en un aparato Beckman DBG en los solventes indicados en cada caso.
- 9.- Los espectros de RMN en un Varian T 60, empleando como solvente D_2O o DMS de acuerdo a lo referido para cada espectro, y las señales de TMS o DMS como standard de referencia.
- 10.- El análisis elemental cuantitativo para el 3-acetil-7-3'-4'-trisulfato de quercetina, fue realizado en el Laboratorio de Microanálisis Alfred Bernhardt (Elbach über Engelskirchen-Alemania Occidental), salvo el de potasio que fue realizado en nuestros laboratorios en un fotómetro de llama Crudo Caamaño.
- 11.- Reactivos para espectroscopía ultravioleta de flavonoides:
 - a) Metóxido de sodio ($MeONa$) : 2,5 gr de sodio metálico en 100 ml de metanol grado espectroscópico.
 - b) Acetato de sodio ($AcONa$) : Acetato de sodio proanálisis finamente dividido.
 - c) Cloruro de aluminio (Cl_3Al) : 5 gr de cloruro de aluminio anhidro en 100 ml de etanol grado espectroscópico.
 - d) Acido clorhídrico (ClH) : 50 ml de ácido clorhídrico proanálisis en 100 ml de agua destilada.
 - e) Acido bórico (BO_3H_3) : Acido bórico anhidro proanálisis finamente dividido.
- 12.- Diazometano: fue preparado haciendo reaccionar N-nitroso metil urea en medio alcalino y recogiendo el N_2CH_2 formado en eter etílico anhidro, mantenido en baño de hielo.

13.- Quercetina testigo: obtenida por hidrólisis ácida de Rutina (quercetina-3-rhamnoglucósido).

Isorhamnetina y Kaemferol: de nuestro laboratorio.

14.- Dimetil sulfóxido "Baker Analyzed", destilado previo a su uso.

15.- Testigos de glúcidos Merck, para glucosa y galactosa.

16.- Cromatografías de placa fina boratadas, se prepararon usando como soporte sílica Gel "G", la que fue suspendida en una solución de borato de sodio 0,02M. Las placas se hicieron con un espesor de 0,25 mm usando esparcidor de Desaga.



Flaveria bidentis (L) Otto Kuntze (Compuestas)

Material botánico

Para el presente trabajo fueron utilizadas flores y hojas de ambas plantas, Flaveria bidentis (L) Otto Kuntze y Flaveria bidentis var. angustiflora O.K. (Compuestas).

La primera de ellas fue recolectada en la época de floración (meses de febrero-marzo), en las inmediaciones de la Ciudad Universitaria (Ciudad de Córdoba). La segunda se recolectó en los alrededores de la laguna Mar Chiquita (Provincia de Córdoba), en la misma época que la anterior. En todos los casos el material fue extendido y secado a la sombra a temperatura ambiente, para posteriormente molerlo en un molino a cuchillas Retach Mühle usando tamiz de 0,5

Ensayo preliminar

Los extractos de EtOH-H₂O (1:1) de flores y hojas de las dos plantas que se estudian dieron positivo (color rojo-cereza) el test de Shinoda²⁹, el cual consiste en tratar el extracto con limaduras de magnesio y ácido clorhídrico concentrado. Al efectuarse la reacción, si ésta es positiva, se producen colores que pueden variar desde el amarillo al rosado o rojo-cereza.

A.- PLAVERIA BIDENTIS (L) O.K.

HOJAS

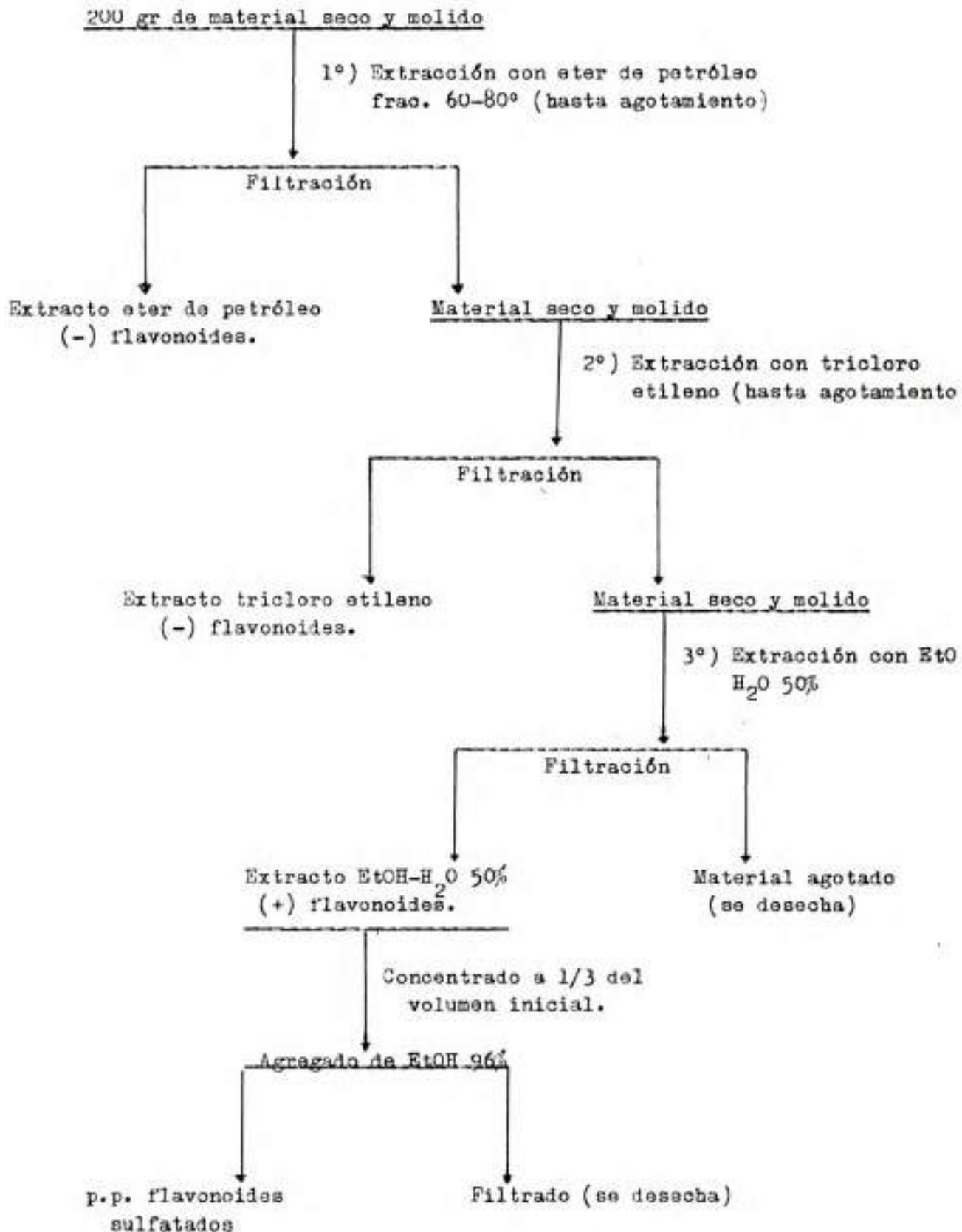
a) Flavonoides sulfatados

Extracción (esquema operativo en tabla IV)

200 gr de este material fueron tratados primeramente con eter de petróleo, fracción 60°-80°, lixiviando el polvo de hojas hasta su agotamiento. Luego de filtrar, se repitió la extracción con tricloro etileno. Consiguiendo de esa manera eliminar sustancias cerasas y clorofilas que actúan como impurezas en el proceso de extracción de flavonoides. Finalmente se procedió a una nueva extracción pero esta vez con EtOH-H₂O (1:1) con volumen suficiente para cubrir el material. Se lo dejó en maceración a temperatura ambiente durante 24 horas, procediendo posteriormente a filtrar a través de un embudo de Büchner. Este procedimiento se repitió tres veces para posteriormente reunir los extractos y concentrarlos a un tercio de su volumen inicial, a presión reducida y a una temperatura no mayor a los 40°C.

TABLA IV

Esquema operativo para la extracción de flavonoides sulfatados realizado sobre hojas de Flaveria bidentis (L) O.K.





Al extracto crudo obtenido se le agregó igual volumen de alcohol etílico 96°, apareciendo entonces un abundante precipitado, el que fue filtrado y lavado con el mismo solvente. Una vez seco pesó 7 gr, siendo muy soluble en agua caliente, poco soluble en agua fría e insoluble en etanol.

Una porción de los cristales fue cromatografiada en forma monodimensional sobre papel Whatman N°1, usando agua destilada como solvente. El cromatograma secado y visualizado con luz UV, presentaba dos manchas opacas a Rf 0,92 (coincidente con el tetrasulfato de quercetina¹¹) y 0,88. Con tratamiento con vapores de amoníaco y expuestas nuevamente a la luz UV, la de mayor Rf se mantiene opaca mientras que la otra se torna amarillo brillante.

Aislamiento y purificación

Para la separación de la zona de interés (Rf 0,88 y que en adelante llamaremos compuesto A), se procedió de dos maneras: 1) por cromatografía monodimensional preparativa sobre papel Whatman 3MM, sembrando la solución en banda y utilizando para su desarrollo el solvente antes mencionado. Obtenido el cromatograma y visualizada la banda de interés bajo luz UV, se la cortó en finas tiras, las que colocadas en un erlenmeyer fueron eluidas con agua destilada con agitación magnética durante 15 minutos, se filtró a través de un embudo de placa filtrante y la solución así obtenida fue llevada a sequedad en evaporador rotatorio. El producto resultante se recrystalizó de agua.

2) Otra forma de separación empleada, fue mediante el uso de geles filtrantes, para lo que se recurrió a Sephadex G-10, cuyo límite de exclusión es para sustancias de peso molecular 700. Esta técnica fue llevada a cabo de la siguiente manera: en la parte superior de una columna de vidrio rellena con el citado soporte (10 X 150 mm), se depositó una dilución de mezcla de cristales (90 mg) y se eluyó con agua, recogién dose fracciones de 0,2 ml cada cinco minutos. Los primeros quince tubos contenían impurezas y fueron descartados, recogién dose desde el número 16 al 38, cuyos contenidos resultaron cromatográficamente homogéneos, tratándose del tetrasulfato de quercetina puro. Los tubos 39 al 41 contenían una mezcla de los dos compuestos y los tubos 42 al 53 la fracción correspondiente al flavonoide A que es motivo de estudio (fig. 2).

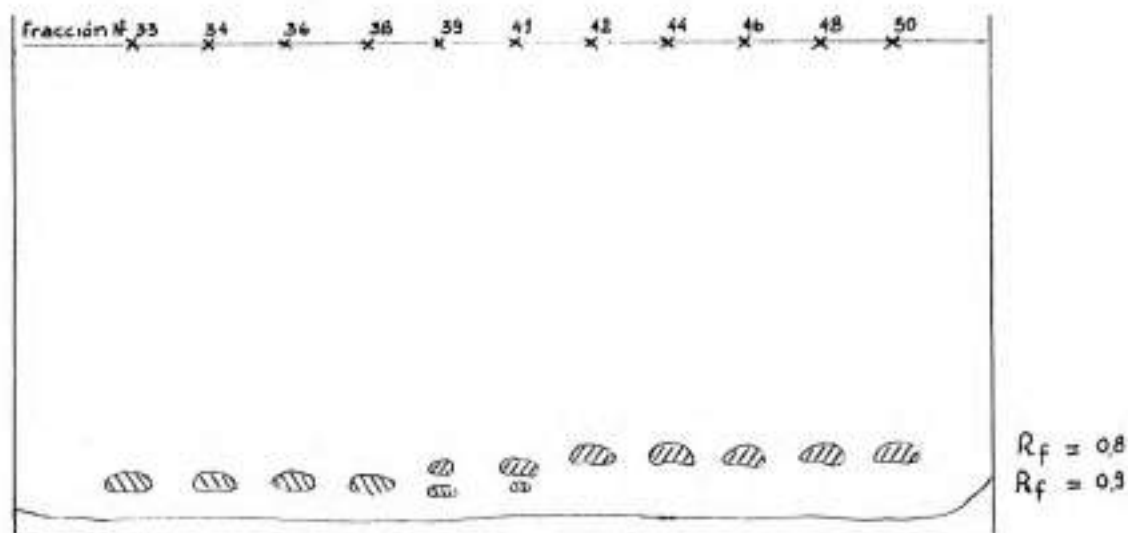


FIGURA 2. Resultado cromatográfico de las fracciones colectadas de la columna de Sephadex G-10. Manchas con R_f 0,92= tetrasulfato de quercetina; Manchas con R_f 0,88= Compuesto A. (x indica lugar de siembra). Solvente: H_2O .

Teniendo en cuenta que los geles filtrantes³⁰ separan a los componentes de una mezcla de acuerdo a sus pesos moleculares, migrando en primer lugar los de mayor peso, queda en evidencia el primer dato significativo respecto a compuesto A, y es que su P.M. es necesariamente menor que el del tetrasulfato

Los contenidos correspondiente a la última serie de tubos fueron reunidos y concentrados a presión reducida siempre con la ayuda del agregado de etanol. El producto seco acusó un peso de 15 mg y fue recristalizado de agua. Dicho precipitado fue secado al vacío (15 mm y 60°C) hasta peso constante. El punto de fusión del compuesto fue de 332°C con descomposición, produciéndose la carbonización de la sustancia para luego fundir en forma parcial.

Esta forma de obtención del compuesto puro por medio de Sephadex, fue repetido hasta obtener cantidad suficiente para realizar los estudios que en este trabajo se describen.

Estos cristales fueron sometidos a cromatografía descendente en pap Whatman N°1. Los distintos sistemas de solventes empleados y los respectivos R_f calculados para el nuevo flavonoide figuran en la tabla V. Para revelar los cromatogramas se recurrió a los siguientes métodos: a) Por irradiación con luz ultravioleta (se observa una mancha opaca); b) Con vapores de amoníaco e inmediata irradiación con luz UV (la mancha antes opaca se torna ahora de intenso

color amarillo) y c) Con solución metanólica de cloruro férrico al 9% (la mancha toma coloración azul oscuro).

TABLA V. Solventes y Rf del compuesto A

| <u>Solvente</u> | <u>Rf</u> |
|-----------------|-----------|
| Agua destilada | 0,88 |
| TBA | 0,11 |
| AcOH 15% | 0,86 |
| BAW | 0,14 |

Hidrólisis del compuesto A

Con el propósito de determinar la estructura fundamental del flavon de, se procedió a someterlo a una hidrólisis ácida total. Para ello en un tubo de centrífuga se disolvieron 20 mg del compuesto en 1 ml de ClH 0,1N, se tapó llevó a baño maría hirviendo durante una hora. En el transcurso de los primeros minutos comenzaron a aparecer cristales de color amarillo que fueron aumentando gradualmente con el tiempo. Enfriado el tubo de hidrólisis se procedió luego a centrifugar durante 10 minutos, los cristales así separados (aglucon), fueron lavados con dos porciones de 1 ml de agua destilada y secados en desecador a vacío.

Espectros ultravioleta del aglucon

La espectroscopía ultravioleta aplicada a flavonoides resulta de gran valor en la elucidación de nuevas estructuras, los máximos de absorción de cada banda, su intensidad y los desplazamientos que ocurren por la adición de reactivos alcalinos y complejantes, permiten hacer útiles especulaciones respecto a la posición y características de los sustituyentes en el núcleo³¹. Los datos tenidos por la aplicación de esta técnica resultan además, básicos para la identificación de las estructuras que son ya conocidas.

En la tabla VI se dan los λ máximos del espectro normal (MeOH) así también como de los corrimientos producidos por el agregado de los reactivos que allí se detallan. Todos ellos resultan coincidentes con los obtenidos por quercetina testigo.

TABLA VI.

máx. de los espectros UV del aglucón de A en MeOH y con distintos reactivos.

| <u>MeOH</u> | <u>MeONa</u> | <u>Cl₃Al</u> | <u>Cl₃Al/ClH</u> |
|-------------|--------------|-------------------------|-----------------------------|
| 369 | 320 | 454 | 425 |
| 300 infl. | 243 infl. | 270 | 357 |
| 268 infl. | | | 300 infl. |
| 254 | | | 264 |

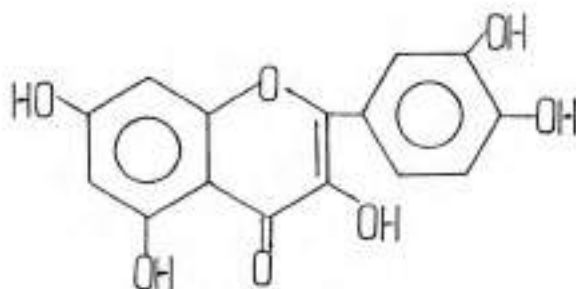
Cromatografías del aglucón

Se realizaron sobre papel en forma descendente, en los sistemas de solvente que se indican en tabla VII. En todos los casos se cromatografió el aglucón obtenido contra muestra auténtica, sembrando: quercetina testigo, el precipitado proveniente de la hidrólisis y la mezcla de ambas. Los cromatogramas una vez desarrollados se revelaron de acuerdo a lo descrito en la página 21, visualizándose en todos los casos una sola mancha con igual Rf, corroborándose de esa forma la identidad del aglucón como quercetina.

TABLA VII. Rf comparativos entre el aglucón del compuesto A y la quercetina.

| | <u>BAW</u> | <u>Fenol</u> | <u>Forestal</u> |
|------------|------------|--------------|-----------------|
| Problema | 0,62 | 0,30 | 0,42 |
| Quercetina | 0,62 | 0,30 | 0,42 |

El punto de fusión obtenido fue de 312°-313°C, coincidente con el de la quercetina testigo. Así mismo el punto de fusión mezcla con muestra auténtica no acusó depresión.



Aglucón = Quercetina

Sobrenadante de la hidrólisis ácida del compuesto A

Del líquido proveniente de la hidrólisis del compuesto A, se tomaron dos alícuotas, una de ellas fue sometida a diversas reacciones cualitativas (alfa naftol sulfúrico, antrona y fenol sulfúrico) tendientes a poner en evidencia la presencia de restos azucarados en la molécula, resultando aquéllas negativas. Este resultado se corrobora más adelante con el espectro de RMN del compuesto, ya que no aparecen en su trazado señales de protones de azúcares.

La otra alícuota fue tratada con solución acuosa de cloruro de bario obteniéndose un precipitado blanco que corresponde a los ensayos analíticos de solubilidad correspondiente al sulfato de bario.

Espectros infrarrojo del compuesto A

El trazado del espectro infrarrojo del compuesto A, se muestra en la figura 3. Los máximos de absorción más significativos que presenta son los ubicados en: 3.325 cm^{-1} , banda de absorción ancha y de gran intensidad atribuida a la vibración de tensión del hidroxilo³² del carbono 5 unido por puente hidrógeno con el carbonilo del carbono 4 de la quercetina; en 1.635 cm^{-1} se observa otra banda de absorción intensa correspondiente a la vibración del grupo carbonilo del carbono 4 de la quercetina. Otras dos bandas, también de fuerte intensidad en 1.250 y 1.040 cm^{-1} son atribuidas a la vibración de tensión del enlace S=O de los grupos sulfatos³³.

Espectros ultravioleta del compuesto A

Los espectros ultravioleta se efectuaron solubilizando el flavonoide en EtOH-H₂O (1:1). Los reactivos para lograr los corrimientos en las bandas de absorción de los distintos espectros se prepararon según Mabry y col³⁰.

Los espectros de flavonas y flavonoles presentan en el ultravioleta dos bandas de absorción que se encuentran comprendidas entre 240 y 400 nm. De ellas se denomina Banda I la comprendida entre 300 y 380 nm y Banda II la que se encuentra entre 240 y 280 nm.

Se considera además que la Banda I se halla asociada con el sistema cinamófilo (anillo B, fig. 4), ya que cualquier variación de la estructura en esta parte de la molécula produce desplazamientos sobre la primera de estas bandas de absorción. De igual forma y por las mismas razones el sistema benzodioxoleno (anillo A) se encuentra asociado a la Banda II.

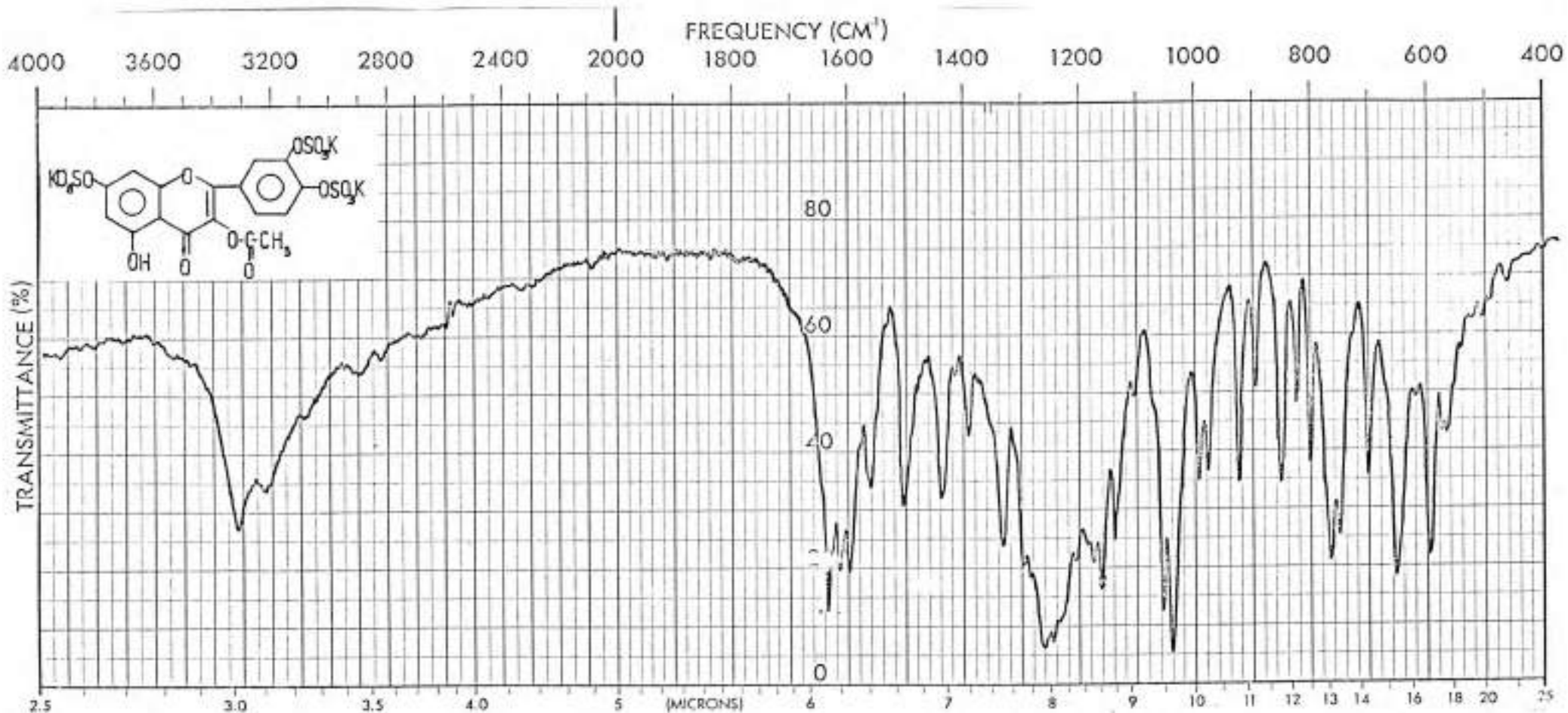


FIGURA 3. Espectro infrarrojo correspondiente al compuesto A.

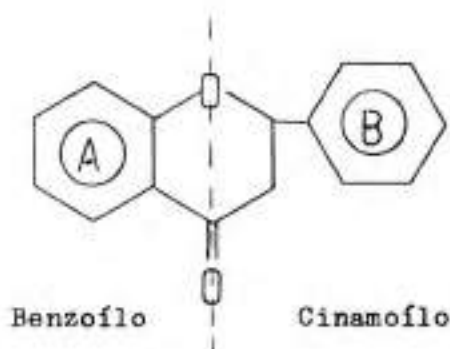


FIGURA 4. Sistemas asociados a las bandas de absorción de los flavonoides, en espectroscopía UV.

Resultan fácilmente distinguibles mediante espectroscopía ultravioleta, las flavonas de los flavonoles por comparación de sus espectros normales (sin el agregado de ningún reactivo). Las flavonas tienen su Banda I de absorción corrida hacia longitudes de onda más baja (304-350 nm) que los flavonoles (352-385 nm), por no poseer las primeras el auxócromo (OH) en posición 3, lo que da como resultado una menor contribución de la forma cinamofilo a la resonancia total de la molécula; esto no ocurre en los flavonoles pues tienen aquel sustituyente en la posición indicada que condiciona el desplazamiento batocrómico apuntado. Si esta posición se encontrara bloqueada por un grupo metilo, glicosídico o sulfato, el flavonol absorbe en forma similar a las flavonas³¹.

La Banda I del nuevo derivado sulfatado se presenta en 344 nm (fig. 5), es decir que se encuentra afectada por un corrimiento hipsocrómico de 25 respecto de la quercetina, que como ya hemos visto constituye su aglucón. Por lo anteriormente expuesto se desprende que indudablemente nos encontramos frente a un flavonol cuya posición 3 se halla sustituida.

Acción del metóxido de sodio (MeONa)

Realizado el espectro normal se adicionaron en la cubeta del blanco del problema tres gotas de solución de MeONa y se corrió nuevamente el espectro.

El agregado de este reactivo, produce un medio fuertemente alcalino que provoca la ionización de la totalidad de los oxidrilos fenólicos de la molécula, acusando un desplazamiento batocrómico de ambas bandas pero sin una clara correlación con el tipo de hidroxilación del flavonoide. De todas maneras

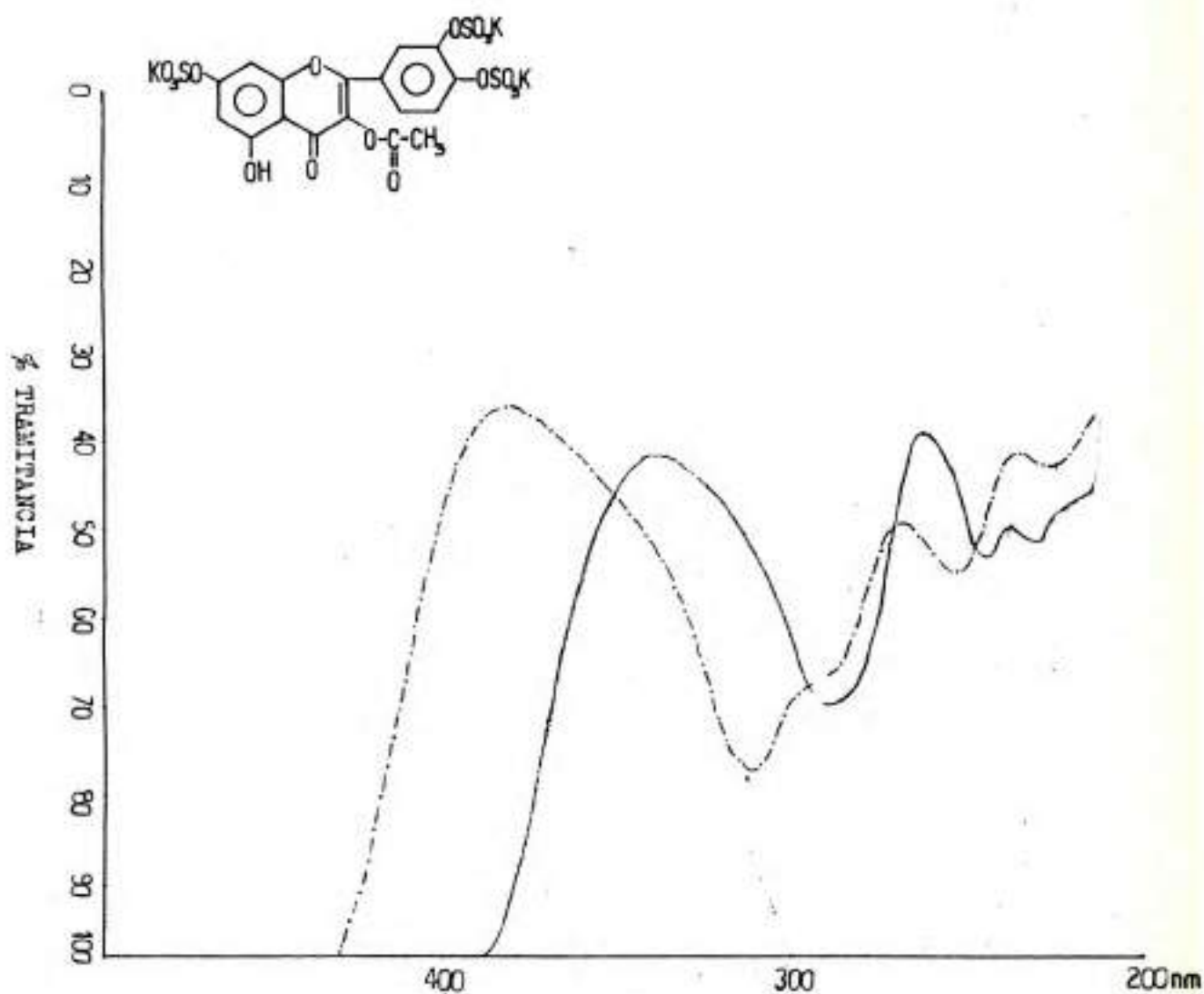


FIGURA 5. Espectros UV correspondientes al compuesto A.

- a) ——— espectro normal
 b) - - - - - espectro con el agregado de MeONa

posible diagnosticar la presencia del oxidrilo de la posición 4' ya que si éste se encuentra libre, el corrimiento de la Banda I es aproximadamente de 40 a 60 nm, sin que decrezca el $\log \epsilon$. Si por el contrario la intensidad de la absorción fuera menor que la normal, es posible que dicho oxidrilo se encuentre sustituido. Estas generalizaciones no son totalmente rígidas y existen excepciones a las reglas anteriormente citadas.

Si bien el comportamiento del compuesto A frente a la acción del metóxido de sodio sugiere que el oxidrilo de la posición 4' se encuentra libre (fig. 5), esta consideración resultará finalmente equívoca, de acuerdo a las evidencias aportadas más adelante por RMN y por "señalamiento" del oxidrilo libre por formación del derivado metilado correspondiente.

Acción del acetato de sodio (AcONa)

A la solución que contiene el flavonoide y al blanco, se le agregará acetato de sodio (fundido) finamente pulverizado, hasta saturación.

Se considera que esta sal, por ser una base débil, provoca una ionización parcial en la molécula, especialmente sobre el oxidrilo fenólica que presenta mayor acidez, que resulta ser el de la posición 7. Este reactivo es por lo tanto específico para el oxidrilo de esta posición, que si se encuentra libre produce un corrimiento batocrómico de la Banda II que puede ir de 5 a 20 nm respecto de la misma banda del espectro normal.

El nuevo derivado sulfatado no acusa variaciones en el máximo de absorción de la referida banda por el agregado de AcONa (fig. 6), indicativo que en esta posición se encuentra sustituida.

Acción del acetato de sodio + ácido bórico (AcONa + BO_3H_3)

Después de realizar el espectro con el agregado de acetato de sodio se le adicionó, al blanco y al problema, ácido bórico; procedimiento efectuado en igual forma que con el anterior reactivo.

Este ácido nos permite obtener información acerca de la existencia de oxidrilos fenólicos que se encuentran en posición orto. Si la molécula contiene hidroxilos en este ordenamiento, el ácido bórico forma con ellos quelatos tal como se esquematiza a continuación (página 31).

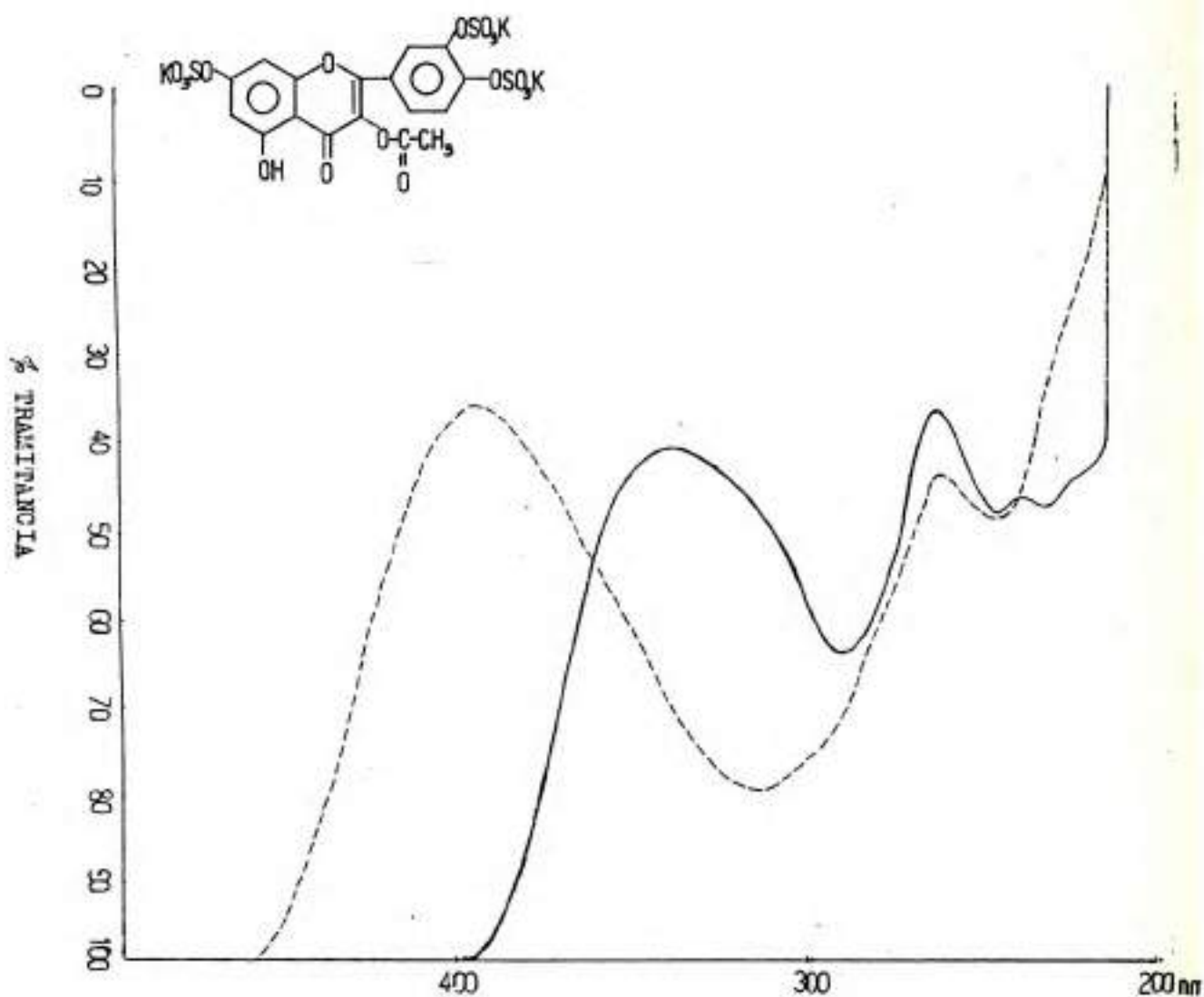


FIGURA 6. Espectros UV correspondientes al compuesto A.

- a) ——— espectro normal
 b) - - - - - espectro con el agregado de AcONa

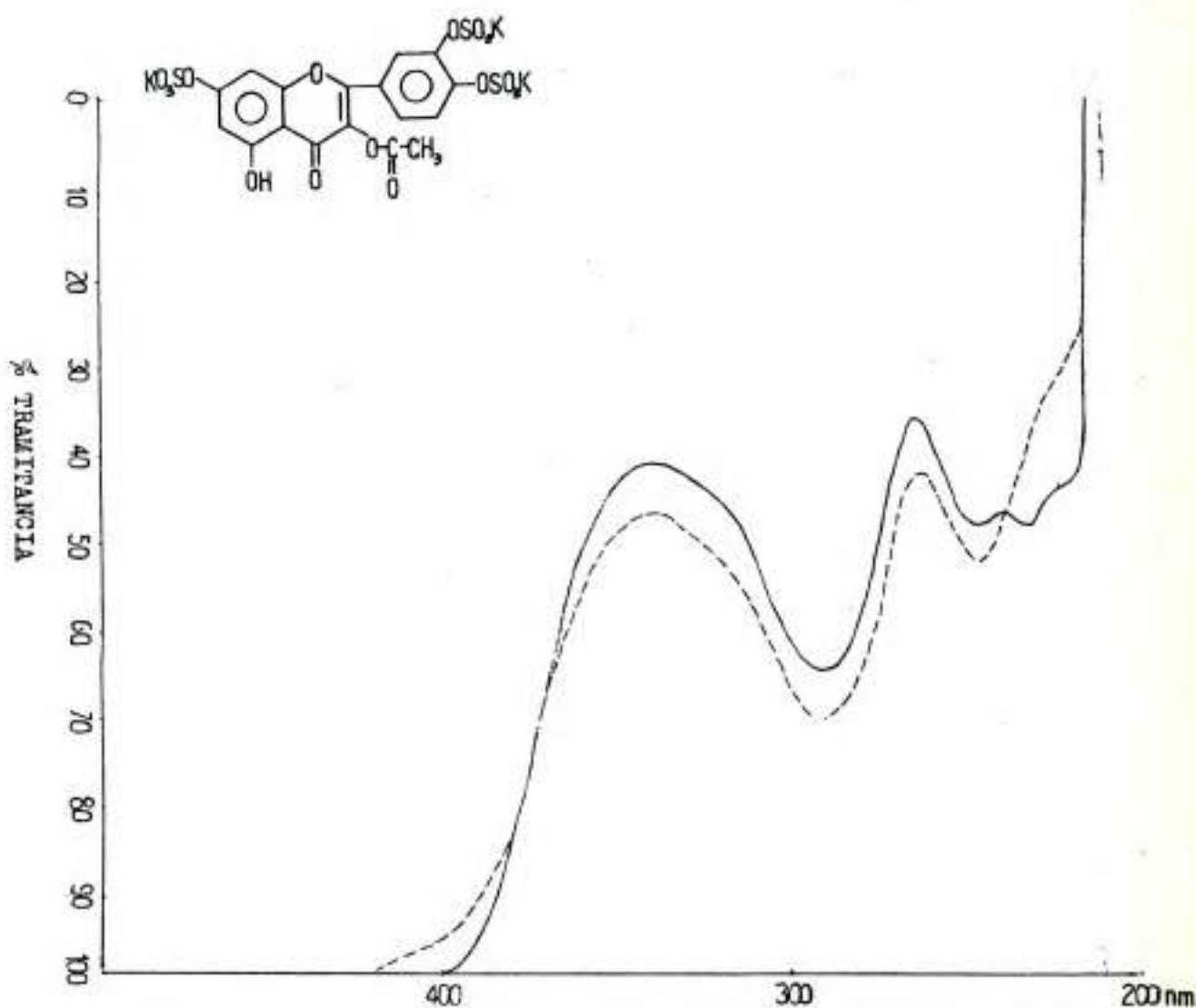
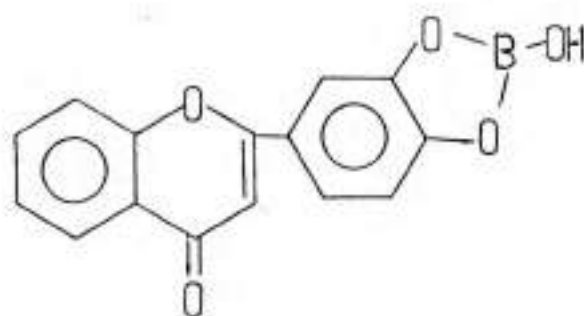


FIGURA 7. Espectros UV correspondientes al compuesto A.

- a) ——— espectro normal
 b) - - - - - $\text{AcONa} + \text{B}_3\text{H}_3$

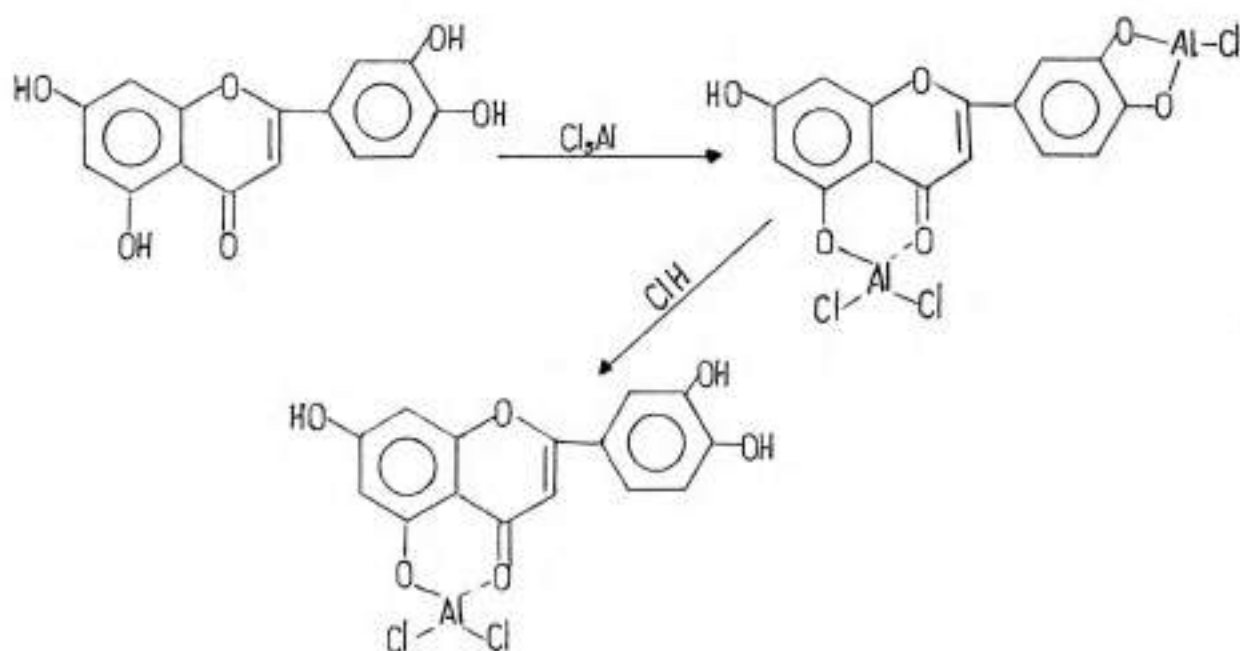


Este efecto se manifiesta en un corrimiento batocrómico de la Banda de 20 a 30 nm respecto del espectro normal.

El reactivo revela en este caso, la inexistencia de oxidrilos en posición orto, es decir que los oxidrilos de las posiciones 3' y/o 4' de la quercetina no se encontrarían libres, (fig. 7).

Acción del cloruro de aluminio y cloruro de aluminio + clorhídrico

El cloruro de aluminio forma con las flavonas y flavonoles, que contienen oxidrilos en posición orto, complejos que son látiles en medio ácido y además, si el flavonoide posee oxidrilos en las posiciones 3 o 5, forma complejos entre estos grupos y la función ceto del carbono 4 que son estables en medio ácido. Aprovechando esta diferencia de estabilidad en ese medio, es posible diagnosticar la presencia de hidroxilos en posición orto y además también la existencia de estos grupos libres en las restantes antedichas posiciones. A continuación se muestra gráficamente la formación de estos compuestos y su comportamiento en medio ácido.



A la solución problema y al blanco se agregaron seis gotas de solución metanólica de cloruro de aluminio al 5%. Obtenido este espectro se agregan en cada cubeta tres gotas de solución de ácido clorhídrico al 30% y se traza nuevamente el espectro (fig. 8), donde vemos que la adición del primero de los reactivos corre batocrómicamente los máximos de absorción respecto del normal por formación de complejo, que no se altera por la presencia de clorhídrico tal como se encuentra graficado en la misma figura.

Por lo anteriormente expuesto y de acuerdo a las características de los espectros obtenidos se corrobora la inexistencia de oxidrilos en posición orto y pone de manifiesto que el complejo se forma entre el oxidrilo de la posición 5 con el carbonilo vecino, ya que la otra alternativa de complejarse con el hidroxilo del carbono 3 no es posible por encontrarse sustituido.

De acuerdo a estas primeras especulaciones que podemos hacer mediante la aplicación de espectroscopía ultravioleta, es posible asignarle al compuesto que se estudia, la estructura de un derivado polisustituido de la quercetina. Las posiciones afectadas por los sustituyentes y aquellas que permanecen libres resultan en algunos casos claramente identificadas (por ejemplo, las sustituciones en carbonos 3 y 7, como así también el carácter de libre del oxidrilo de carbono 5). Las dudas que pueden plantearse están referidas al grado de sustitución real que presenta el anillo B ya que si bien es indudable la existencia de un sustituyente sobre las posiciones 3' o 4', también puede sospecharse que ambas se encuentran ocupadas. Lo que hace necesario aportar mayores evidencias para de esto debidamente aclarado.

Los λ máximos, sus $\log. \epsilon$ y las inflecciones de cada uno de los espectros obtenidos se resumen en la tabla VIII.

TABLA VIII. λ máx. y $\log. \epsilon$ de los espectros UV del compuesto A

| | <u>λ máx.</u> | <u>$\log. \epsilon$</u> |
|--------------------------------------|-------------------------------------|------------------------------------|
| EtOH-H ₂ O 50% | 344; 266; 241 | 4.29; 4.34; 4. |
| MeONa | 383; 300 infl.; 272; 237 | 4.38; 4.24; 4. |
| Cl ₃ Al | 389; 340; 296 infl.; 275; 254 infl. | 4.16; 4.27; 4. |
| Cl ₃ Al/ClH | 389; 340; 296 infl.; 275; 254 infl. | |
| AcONa | 400; 265 | 4.35; 4.25 |
| AcONa/BO ₃ H ₃ | 344; 266; 241 | |

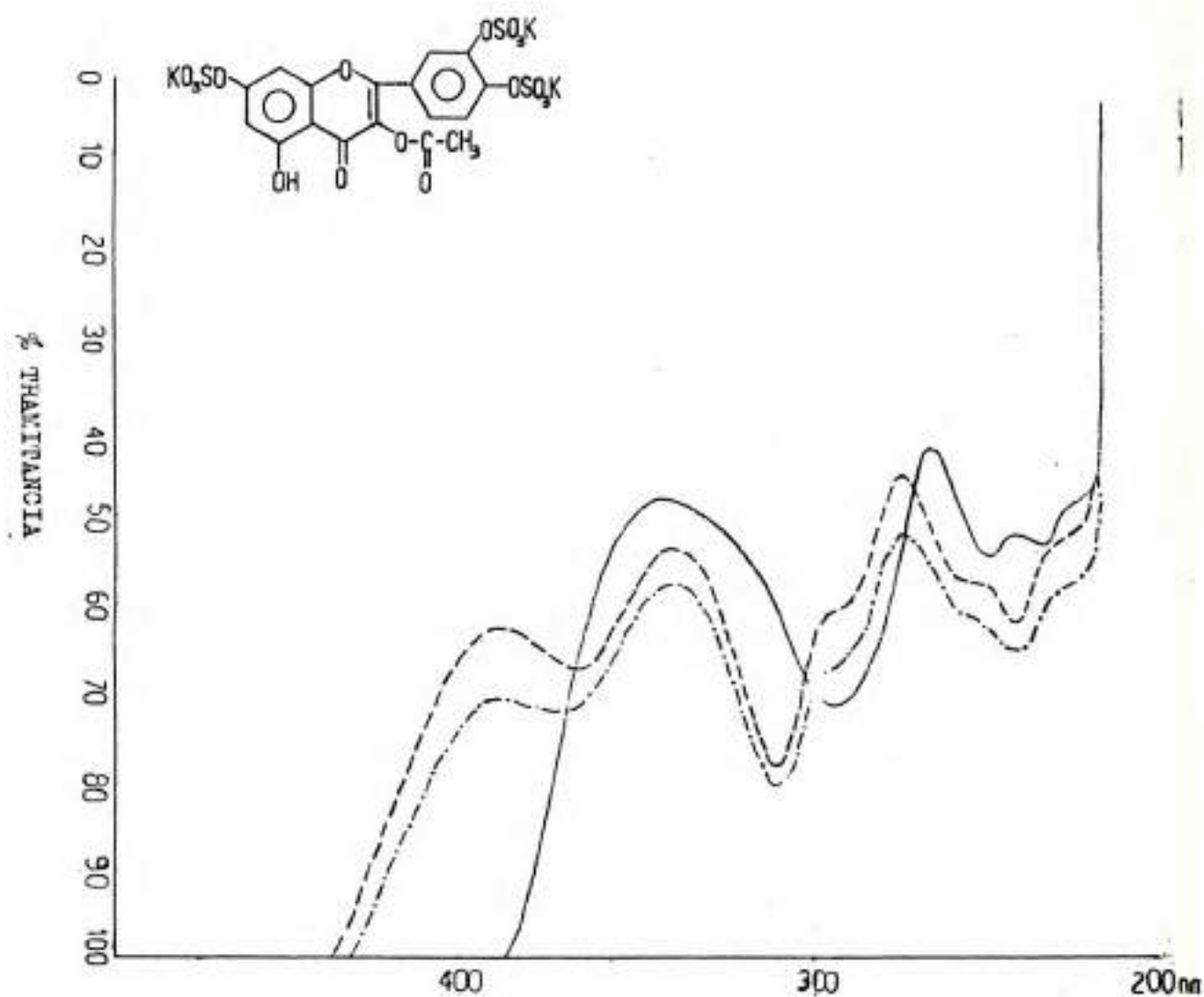


FIGURA 8. Espectro UV correspondientes al compuesto A.

- a) ——— espectro normal
- b) - - - - - espectro con el agregado de Cl_3Al
- c) - · - · - $\text{Cl}_3\text{Al} + \text{ClH}$

Espectros de Resonancia Magnético Nuclear³⁴

El trazado completo, correspondiente al compuesto A, puede verse a través de los espectros que se muestran en las figuras 9, 10 y 11. En el primero de ellos la sustancia fue disuelta en D_2O , donde se observa claramente la presencia de un singlete a δ 2,50 característico de un metilo de grupo acetilo. La parte aromática sin embargo no muestra detalladamente las características de los protones de cada anillo, debido probablemente a la baja solubilidad del compuesto en el citado solvente a temperatura de trabajo. Pero es observable la presencia de cuatro señales cuyas alturas de integración dan una relación con respecto a los primeros de 5,18 para 2,81. Pudiendo apreciarse además en este trazado la ausencia de señales fuertes alrededor de δ 3,5, afirmando así la ausencia de restos glicosídicos en la molécula.

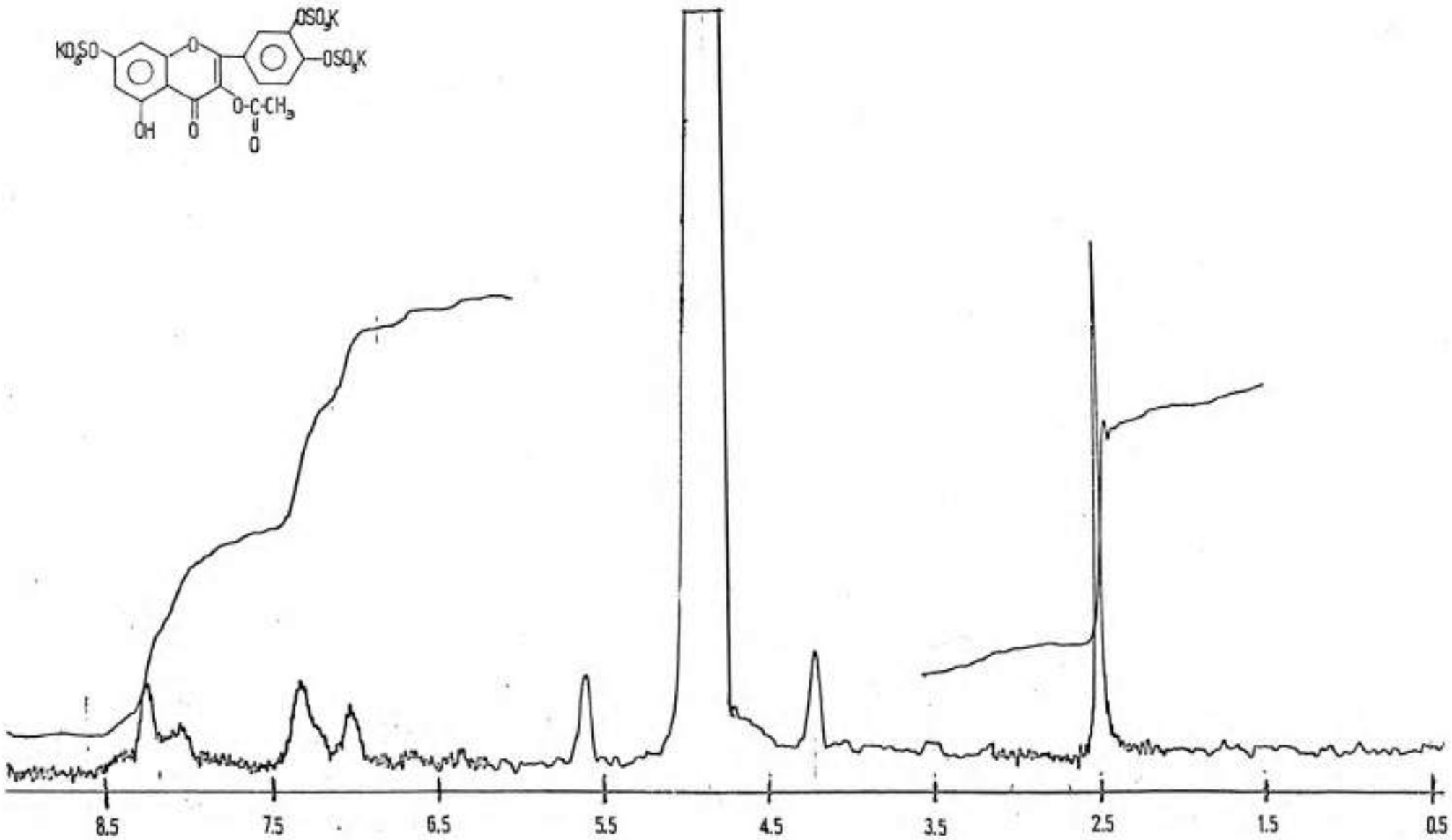
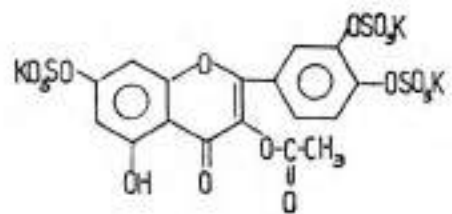
Un espectro más claro de la zona correspondiente a los protones aromáticos se obtuvo al realizarlo con la muestra disuelta en DMS (fig. 10). La señal del acetilo aquí no aparece debido a que se encuentra enmascarada por la del solvente (δ 2,5), la cual se ha atenuado convenientemente para que no salga fuera de escala.

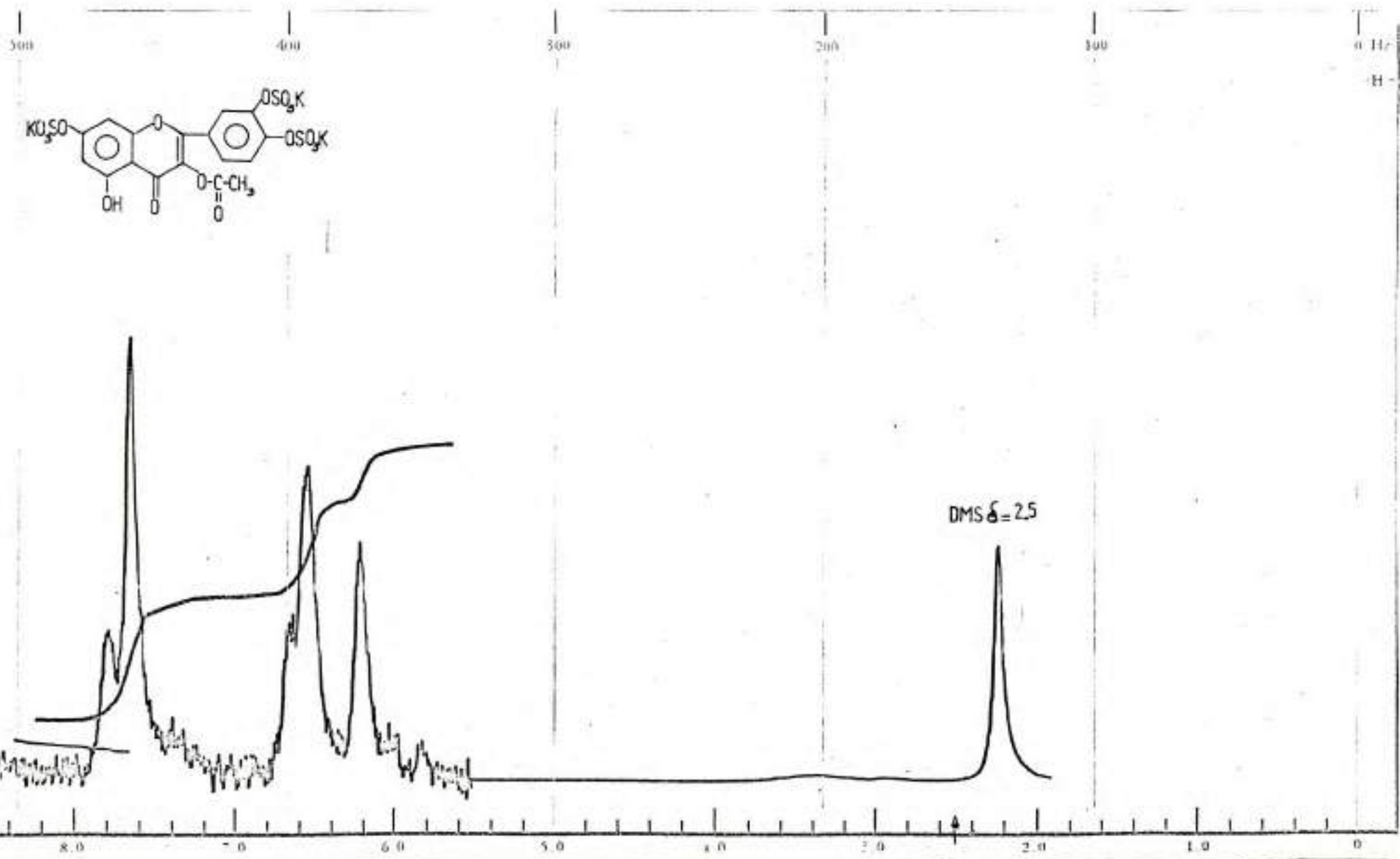
Un segundo espectro con este mismo solvente es el que se muestra en figura 11, barriendo también campos más bajos, en donde se distingue una señal ancha a δ 12,5 correspondiente a un protón de oxidrilo fenólico (de acuerdo a integración) para cinco de la parte aromática.

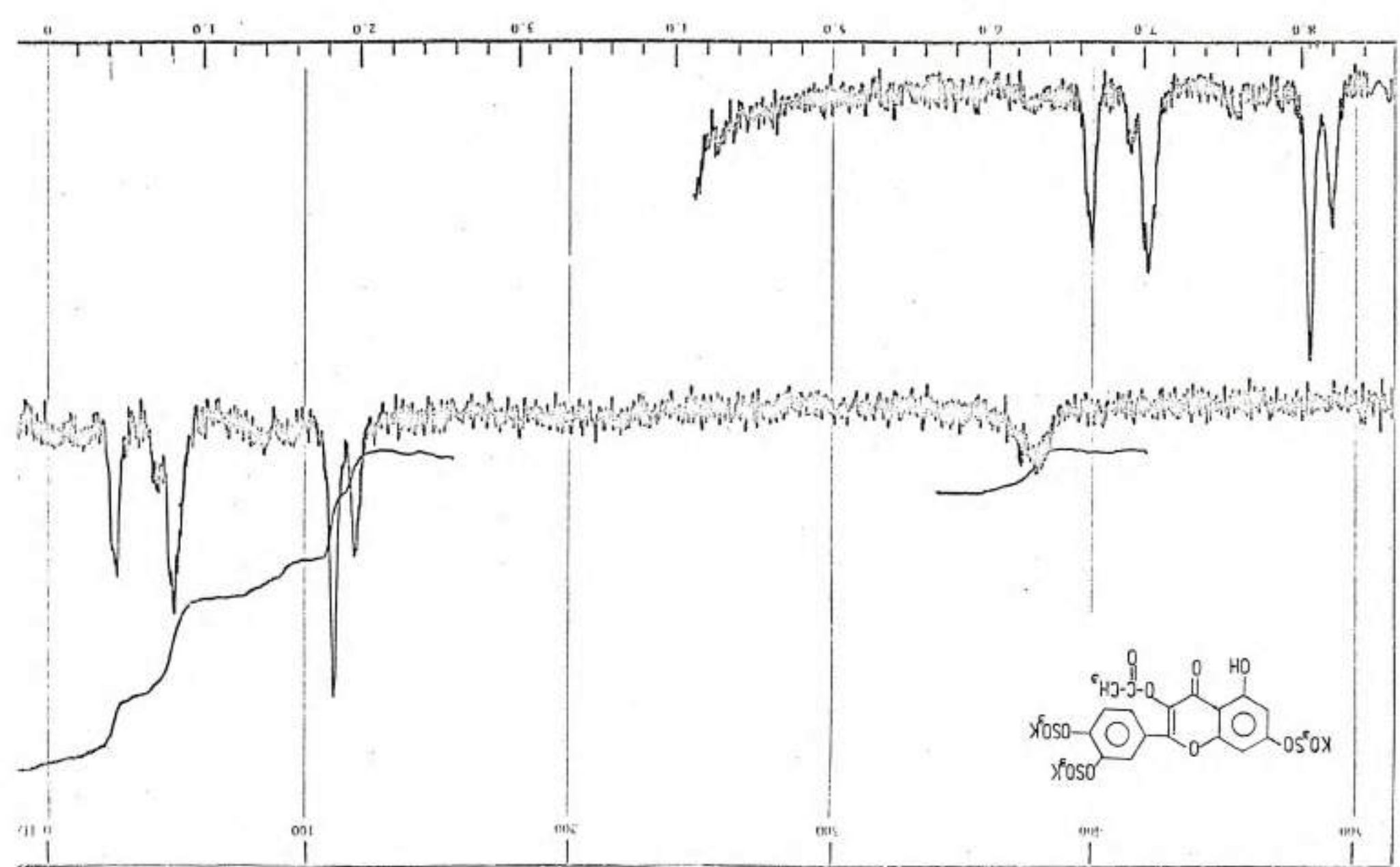
En la tabla IX se dan los valores de las asignaciones hechas para cada señal del espectro RMN del nuevo derivado polisustituido de la quercetina.

TABLA IX. Valores de las señales de RMN correspondiente al compuesto A.

| <u>Solvente</u> | <u>δ</u> | <u>Nº de H</u> | <u>Señal</u> | <u>J Hz</u> | |
|-----------------|----------------------------|----------------|----------------|---------------|-----------|
| D_2O | 2,50 | 3 | s | ----- | Acetilo |
| DMS | 6,58 | 1 | d | $J_{6,8}$ 2 | H-6 |
| " | 6,80 | 2 | señal ancha | ----- | H-8 y H-5 |
| " | 7,90 | 1 | d | $J_{2',6'}$ 2 | H-2' |
| " | 8,05 | 1 | d | $J_{6',2'}$ 2 | H-6' |
| " | 12,50 | 1 | señal ancha | ----- | OH fenóli |







De los datos aportados por estos espectros obtenemos tres nuevas e importantes conclusiones:

- Que la molécula además de sulfatos, contiene un resto acetilo.
- Que solamente posee un oxidrilo fenólico libre.
- Es posible también establecer la posición que el grupo acetilo ocupa en la molécula, como se verá en detalles en página 41.

Metilación del acetil-sulfato

Para dilucidar finalmente la posición del oxidrilo libre, se procedió a la metilación exhaustiva del acetil sulfato de quercetina.

60 mg del compuesto se disolvieron en 2 ml de DMS, la solución se introdujo en un tubo de vidrio grueso especialmente preparado, en el que se agregaron 8 ml de solución etérea de diazometano y se cerró a la llama y dejó a temperatura ambiente. Se lo dejó reposar durante 24 horas (con agitación periódica al cabo del mismo, se abrió el tubo, se eliminó la capa etérea y se le agregó de nuevo igual cantidad de la solución del reactivo antedicho, se cerró nuevamente a la llama siendo sometido a igual tratamiento por idéntico tiempo. El procedimiento se repitió una vez más, metilando en total por espacio de 72 horas. Al cabo de este período el tubo se reabrió nuevamente y se eliminó la capa etérea, la solución remanente se diluyó con tres veces su volumen en etanol absoluto, obteniéndose de inmediato un precipitado amarillo que se separó por centrifugación, se lavó con el solvente precipitante que posteriormente se eliminó a presión reducida. Se puso de manifiesto la metilación total del compuesto mediante el trazado del espectro UV en EtOH-H₂O (1:1), no produciéndose ninguna variación en la posición de los λ máximos (322 y 258 nm) mediante el agregado de los reactivos anteriormente indicados (fig. 12). Además no reaccionó con solución metanólica de cloruro férrico.

Hidrólisis del metilado

El producto proveniente de la metilación, fue sometido a una hidrólisis ácida total, de la misma manera que la realizada para el producto de partida (pág. 22). Los cristales aislados fueron analizados espectroscópicamente en el ultravioleta, resultando su trazado idéntico al de azaleatina (5-O-metil quercetina) testigo, tal como se muestra en la tabla X. Los R_f en los sistemas que se detallan en tabla XI son coincidentes también en este caso con los de muestra auténtica.

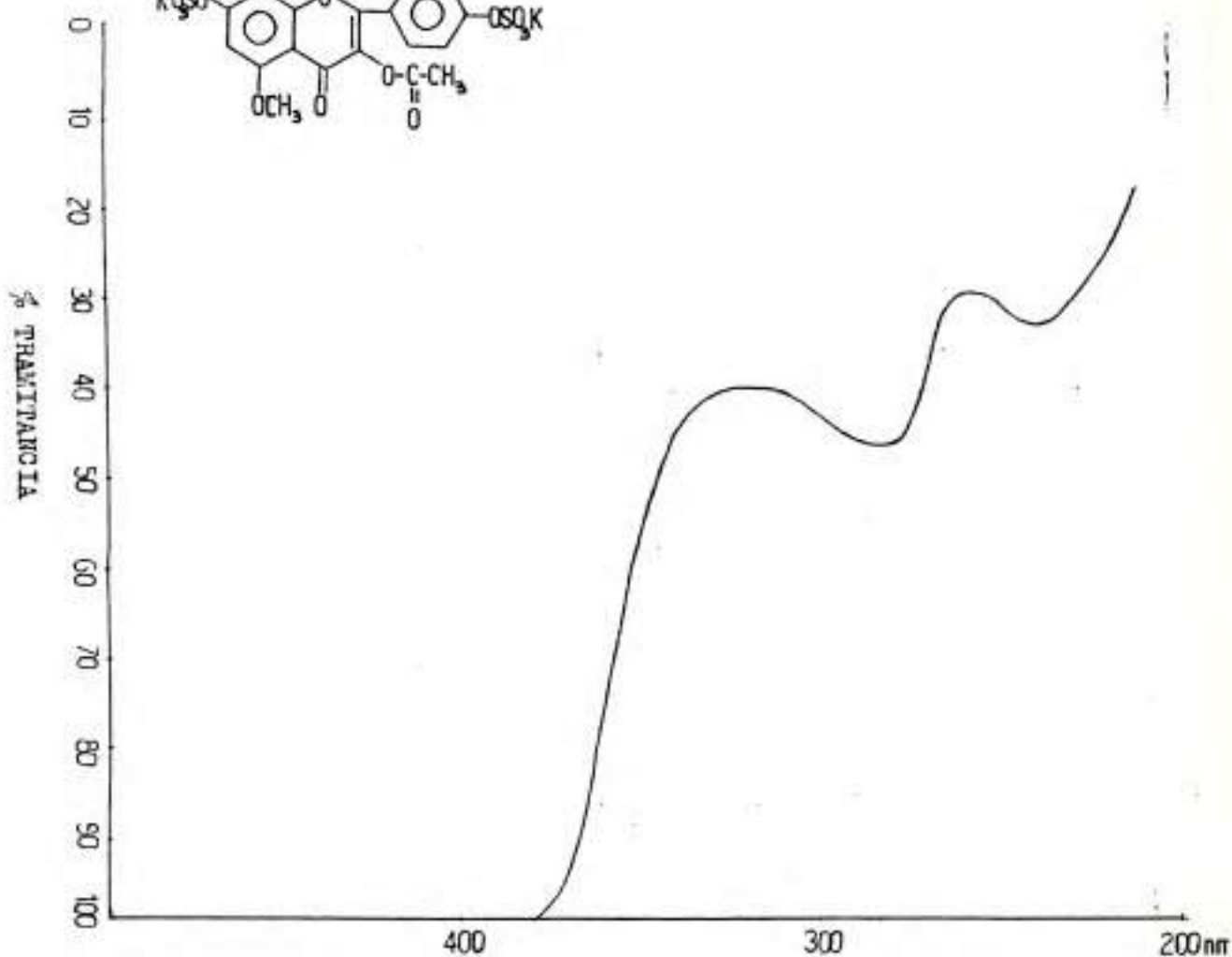
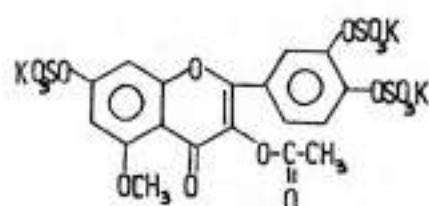


FIGURA 12. Espectro UV correspondiente al compuesto A, metilado y sin hidrolizar.

- a) — el mismo trazado para el espectro normal (EtOH-H₂O 1:1) y con el agregado de cada uno de los reactivos: MeONa, Cl₃Al, Cl₃Al+ClH, AcONa y AcONa+BO₃H₃.

TABLA X. λ máx. del espectro UV de Azaleatina testigo comparada contra muestra auténtica.

| | <u>λ máximos en MeOH</u> | | |
|--------------------|---------------------------------------------|-----|-----|
| Azaleatina testigo | 375 | 318 | 272 |
| Problema | 373 | 318 | 270 |

TABLA XI. Rf comparativos entre Azaleatina testigo y muestra problema.

| | <u>BAW</u> | <u>AcOH 15%</u> |
|--------------------|------------|-----------------|
| Azaleatina testigo | 0,60 | 0,30 |
| Problema | 0,60 | 0,30 |

Análisis elemental cuantitativo

Las determinaciones efectuadas fueron las siguientes: Carbono, Hidrógeno, Sulfato (luego de hidrólisis), Acetilo y Potasio. Los resultados hallado y calculados para la fórmula $C_{17}H_9O_{17}S_3K_3$, correspondientes a una relación sulfato/acetilo/quercetina igual a 3:1:1 se detalla en la tabla XII.

TABLA XII. Análisis elemental cuantitativo del compuesto A para $C_{17}H_9O_{17}S_3K_3$.

| | <u>% Calculado</u> | <u>% Hallado</u> |
|-----------|--------------------|------------------|
| Carbono | 29,23 | 28,29 |
| Hidrógeno | 1,29 | 1,14 |
| Sulfato | 41,26 | 39,85 |
| Acetilo | 6,15 | 5,42 |
| Potasio | 16,79 | 16,50 |

Los valores encontrados por el Laboratorio Bernhardt (para Carbono, Hidrógeno, Sulfato y Acetilo) muestran resultados que están por debajo de los calculados teóricamente, sugiriendo este hecho que las condiciones a que fue s

metido para su secado (50°C/2mm) no fueron suficientes y como consecuencia de ello podría atribuirse la presencia de dos moléculas de agua de cristalización en el flavonoide, modificando de esta manera los valores teóricos, ajustándolos así a los encontrados (tabla XIII).

TABLA XIII. Análisis elemental cuantitativo del compuesto A corregido.

| | <u>% Calculado</u> | <u>% Hallado</u> |
|-----------|--------------------|------------------|
| Carbono | 27,79 | 28,29 |
| Hidrógeno | 1,22 | 1,14 |
| Sulfato | 39,24 | 39,85 |
| Acetilo | 5,85 | 5,42 |

Como conclusión de los resultados experimentales obtenidos de los distintos métodos físicos y químicos aplicados, se derivan dos importantes rasgos estructurales:

- a) El nuevo compuesto presenta características que lo identifican como un derivado tetrasustituido de la quercetina, cuyo oxidrilo libre demostró ser el de la posición 5.
- b) Los sustituyentes fueron identificados como grupos sulfatos y acetilo. El análisis elemental cuantitativo condujo a establecer una relación aproximada quercetina/sulfato de 1:3 y quercetina/acetilo de 1:1.

Determinados cada uno de los componentes de la estructura en estudio, resta establecer la posición del grupo acetilo dentro de las cuatro alternativas que presenta la molécula. De todas ellas la más probable resulta ser la 3, esto se sugiere tras comparar los espectros UV normales correspondiente a: quercetina tetrasulfato de quercetina y el compuesto aislado en esta oportunidad. El segundo de ellos muestra su Banda I con un fuerte desplazamiento hipsocrómico respecto del primero (de 370 a 310 nm, fig. 13), indicio de una coplanaridad restringida entre los anillos B y C tal como se ha demostrado que ocurre en el caso de derivados bifenílicos sustituidos en posición orto³⁵. En el compuesto estudiado en cambio, el corrimiento de esta banda es batocrómico respecto de la del tetrasulfato (de 310 a 344 nm), con un incremento del log.É de 4.09 a 4.29; indicativo de acuerdo a la literatura citada, de una mayor tendencia a lograr la planaridad

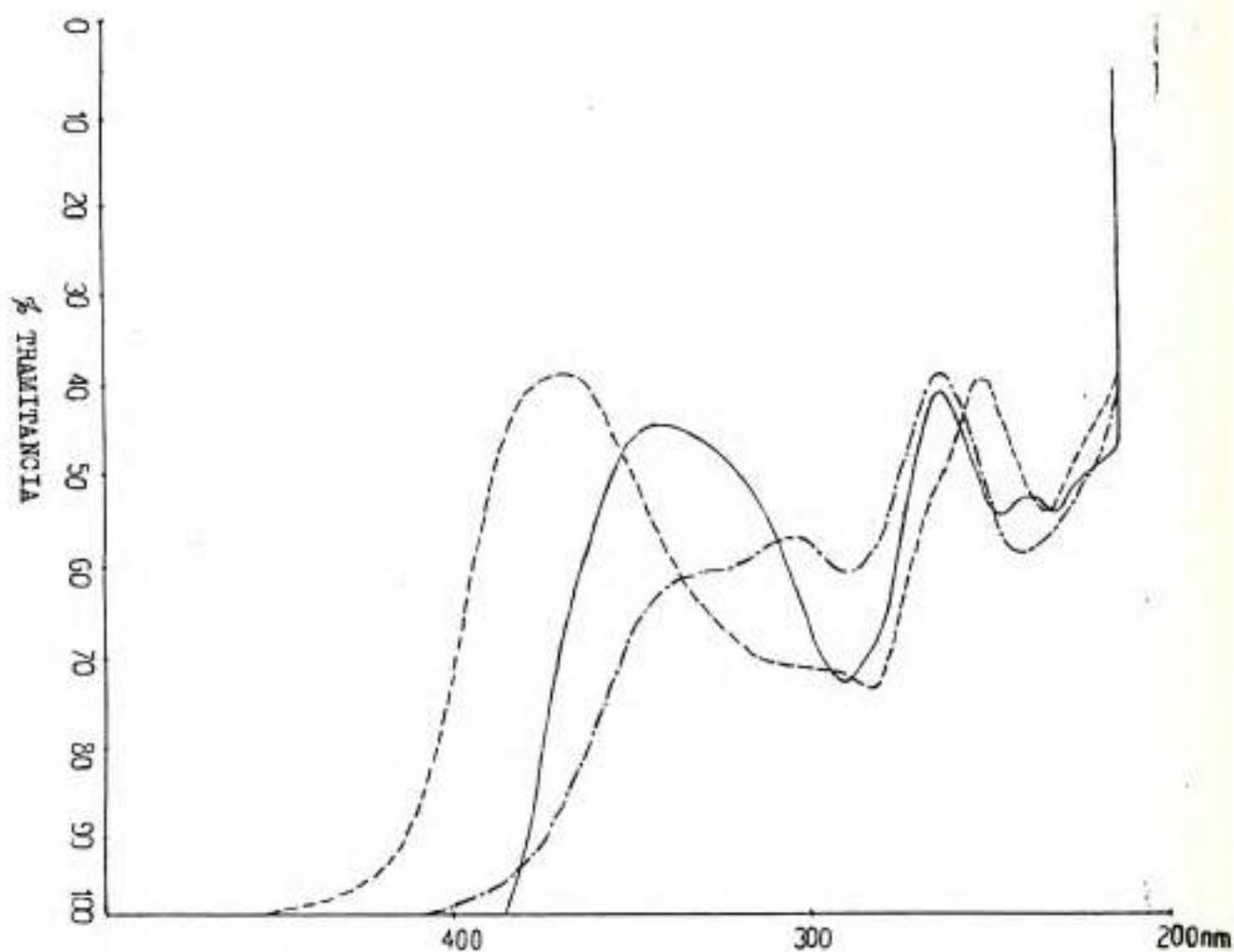


FIGURA 13. Espectros UV normales correspondientes a:

- a) ——— 3-acetil-7-3'-4'-trisulfato de quercetina
 b) - - - - - 3-7-3'-4'-tetrasulfato de quercetina
 c) - · - · - Quercetina

entre los anillos mencionados, por sustitución de un voluminoso grupo sulfato por otro menor, en este caso un acetilo.

El hecho de que el grupo acetilo ocupe la posición 3 de la quercetina permite dar una explicación de la parte aromática del espectro de RMN del nuevo derivado (figuras 10 y 11 de páginas 36 y 37). En estos trazados es evidente el solapamiento de dos señales que según se había especulado anteriormente pertenecerían a la de los protones de los carbonos 5' y 8. El desplazamiento de la señal del primero de estos protones sería causada por el pantallamiento que produce el carbonilo del grupo acetilo, situado en posición 3, sobre el protón del carbono 5' (fig. 14) cuya señal se corre por esta causa, a campos altos superponiéndose con la del carbono 8.

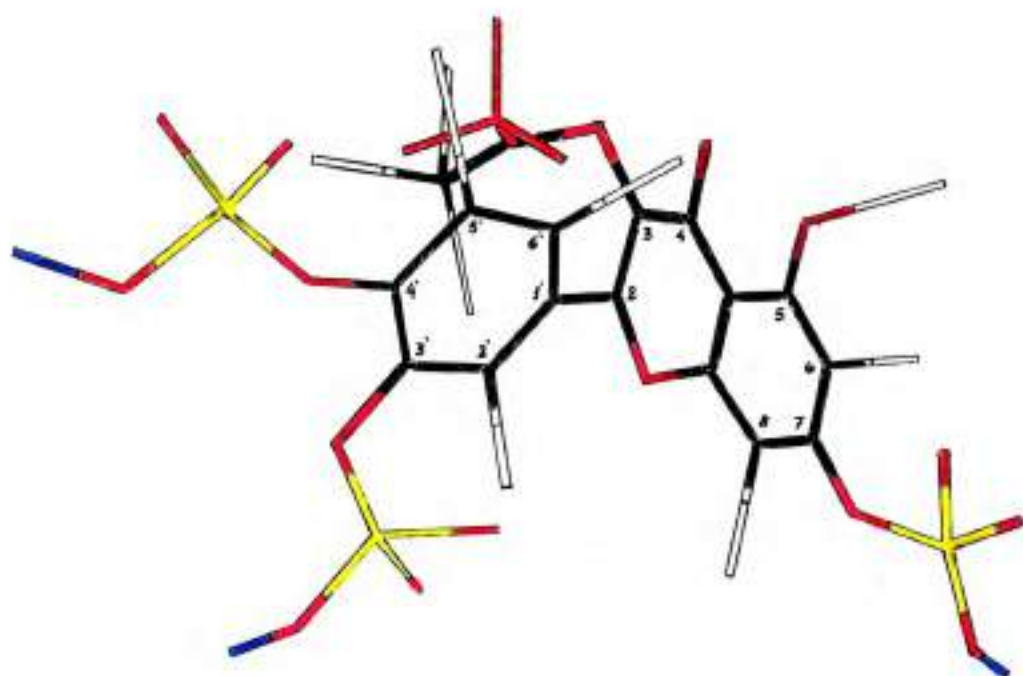


FIGURA 14. Modelo molecular del 3-acetil-7-3'-4'-trisulfato de quercetina (compuesto A).
- Framework Molecular Models, Prentice Hall Int.-

Este mismo efecto del grupo acetilo sobre el protón del mencionado carbono del anillo B, puede observarse a través de los trabajos realizados por Pacheco y col.³⁶ referentes a estudios espectroscópicos en RMN de quercetina derivados acetilados y metilados.

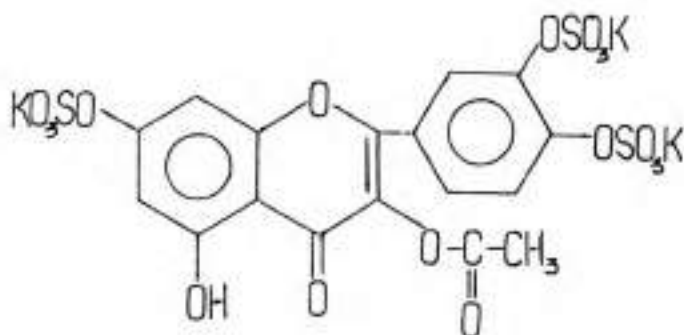
En la tabla XIV se resumen los datos de RMN más significativos de l

referida publicación y se le suman los del tetrasulfato y del acetyl-trisulfato de quercetina, por nosotros obtenidos, de modo que resulte comparativo.

TABLA XIV. Efecto del grupo acetyl -en RMN- ubicado en la posición 3 de la quercetina, sobre la señal del H de C-5'.

| <u>Derivados quercetina</u> | <u>δ H-6</u> | <u>δ H-8</u> | <u>δ H-5'</u> | <u>δ H-2'</u> | <u>δ H-6'</u> |
|-----------------------------|--------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| Pentaacetyl | 6,88 | <u>7,31</u> | <u>7,32</u> | 7,70 | 7,71 |
| 3-O-metyl tetraacetyl | 6,82 | 6,30 | 6,37 | 7,92 | 7,92 |
| Acetyl trisulfato | 6,58 | <u>6,80</u> | <u>6,80</u> | 7,90 | 8,05 |
| Tetrasulfato | 6,78 | 7,13 | 7,66 | 7,96 | 8,16 |

De acuerdo a los hechos anteriormente expuestos se le atribuye al nuevo derivado la siguiente fórmula estructural³⁷:



Aislamiento, purificación e identificación del tetrasulfato de quercetina

Aislado el tetrasulfato mediante el empleo de geles filtrantes, tal como se ha detallado en página 20, se procedió a concentrar las fracciones reunidas a presión reducida. El producto obtenido se recrystalizó de agua consiguiéndose un precipitado amarillo que una vez seco pesó 65 mg.

Los cristales fueron cromatografiados sobre papel en forma descendente tomando como referencia muestra auténtica de tetrasulfato de quercetina. Los R_f tomados en los distintos sistemas de solventes son indicados en tabla XV.

TABLA XV. R_f comparativos entre tetrasulfato de quercetina testigo y sustancia problema.

| | <u>H₂O</u> | <u>BAW</u> | <u>AcOH 60%</u> |
|----------------------|-----------------------|------------|-----------------|
| Tetrasulfato testigo | 0,92 | 0,05 | 0,75 |
| Sustancia problema | 0,92 | 0,05 | 0,75 |

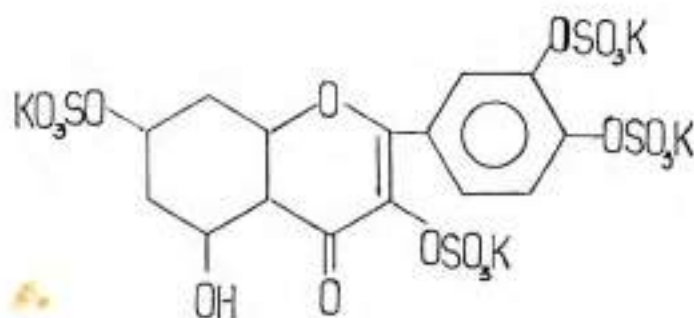
Las características espectrales en el ultravioleta como así también por RMN confirmaron su identidad¹¹ (tablas XVI y XVII respectivamente).

TABLA XVI. λ máx. de los espectros UV del tetrasulfato de quercetina en EtOH-H₂O 50% y con distintos reactivos.

| <u>EtOH-H₂O 50%</u> | <u>MeONa</u> | <u>Cl₃Al</u> | <u>AcONa</u> |
|--------------------------------|--------------|-------------------------|--------------|
| 270 | 280 | 280 | 280 |
| 310 | 380 | 368 | 325 |
| 340 infl. | | | 390 |

TABLA XVII. Valores de RMN correspondientes al tetrasulfato de quercetina.

| <u>Solvente</u> | <u>δ</u> | <u>Nº de H</u> | <u>Señal</u> | <u>JHz</u> | |
|------------------|----------------------------|----------------|--------------|-------------------|------|
| D ₂ O | 6,78 | 1 | d | $J_{6,8} = 2,5$ | H-6 |
| " | 7,13 | 1 | d | $J_{8,6} = 2,5$ | H-8 |
| " | 7,96 | 1 | d | $J_{2',6'} = 2,5$ | H-2' |
| " | 8,16 | 1 | d | $J_{6',2'} = 2,5$ | H-6' |
| " | 7,66 | 1 | d | $J_{5',6'} = 8,5$ | H-5' |



Tetrasulfato de quercetina

b) Flavonoides glicosilados y agluconesExtracción (esquema operativo en tabla XVIII)

1,100 kilogramos de hojas secas finamente molidas se extrajeron en un extractor continuo con eter de petróleo (fracción 60°-80°C) hasta agotamiento. Posteriormente y luego de filtrar y secar el material se procedió a una nueva extracción con tricloro etileno, estos extractos dieron negativo el test de Shinoda por lo que fueron descartados.

A continuación, el material molido se colocó en maceración a temperatura ambiente con cuatro litros de etanol comercial, procedimiento que se repitió por cuatro veces. Los extractos fueron separados por filtración a través de un embudo de Büchner y los líquidos así obtenidos se juntaron y concentraron a presión reducida en evaporador rotatorio, a no más de 45°C, hasta sequedad. El extracto crudo resultante fue tomado con 100 ml de agua tibia (60°C), enfriado y sometido a extracción con tricloro etileno (3 X 50 ml). La finalidad de este último tratamiento es la de eliminar clorofilas que habían quedado retenidas en el extracto acuoso y que interfirieran en el proceso de separación de los principios buscados.

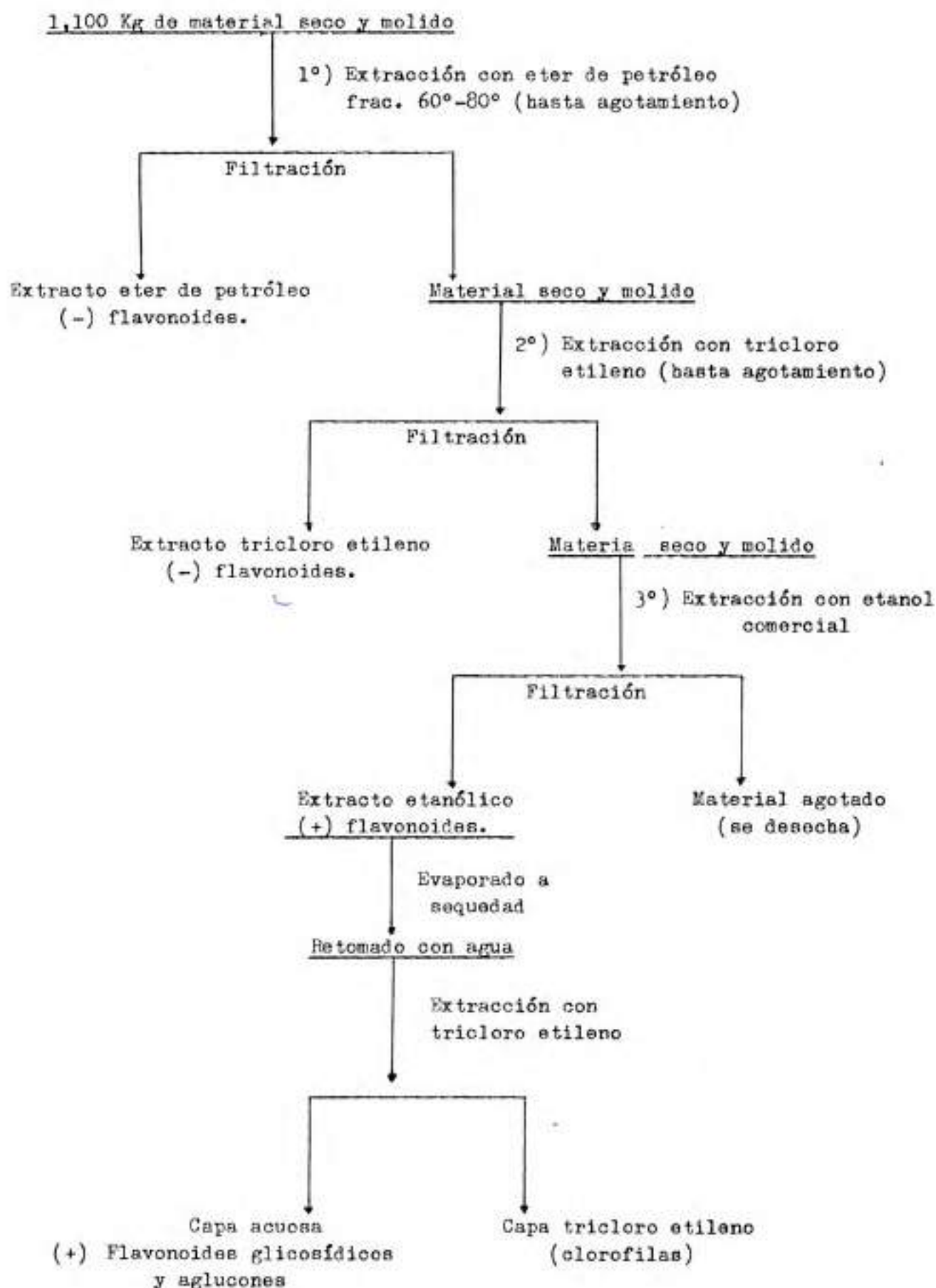
Una cromatografía en papel de este extracto, utilizando como solvente agua destilada, reveló el contenido de dos manchas cuyos R_f son: 0,00 y 0,10 respectivamente.

Aislamiento, purificación e identificación

Los compuestos arriba visualizados fueron separados recurriendo al empleo de geles filtrantes de origen sintético, Bio-Gel P-4, cuyo límite de exclusión es de 3.600.

TABLA XVIII

Esquema operativo para la extracción de flavonoides glicosilados y aglucones, realizado sobre hojas de Flaveria bidentis (L) O.K.



23 gr de este producto convenientemente hidratado se empaquetaron en una columna de vidrio de 2,5 X 30,5 cm y sobre ella se sembraron cuatro ml del extracto acuoso anteriormente obtenido. Para su desarrollo se empleó agua destilada con un flujo de 15 gotas por minuto.

De esta manera fue posible separar tres fracciones, la primera de ellas de color marrón, migró con el frente de solvente, reaccionando negativamente frente al test de Shinoda, por lo que fue descartada. La segunda, de coloración amarilla y que se desplazó lentamente a través de la columna dió resultado positivo a este ensayo. La tercera de las fracciones, presentaba las mismas características cromáticas que la anterior pero quedaba retenida en el origen la columna, por lo que fue necesario cambiar la polaridad del solvente (EtOH-H₂O 50%) para movilizarlo.

Los eluidos de cada fracción fueron concentrados a presión reducida. Este procedimiento repetido varias veces condujo a obtener aproximadamente 20-30 mg de cada una de ellas, que fueron recristalizadas en agua la primera y en alcohol-agua la siguiente. A estos cristales los llamaremos respectivamente A y B.

Los cristales A fueron cromatografiados en papel en forma monodimensional y en distintos sistemas de solventes, comprobándose que se trata de un solo flavonoide.

Los R_f obtenidos de cada cromatograma como así también el espectro UV del compuesto son coincidentes, de acuerdo a la bibliografía^{38,39}, con los de quercetina-3-glucósido o galactósido. (tablas XIX y XX).

TABLA XIX. R_f comparativos entre la sustancia problema y quercetina: 3-O-glu. y 3-O-gal..

| | <u>H₂O</u> | <u>AcOH 15%</u> | <u>BAW</u> |
|---------------------|-----------------------|-----------------|------------|
| Compuesto A | 0,10 | 0,35 | 0,60 |
| Quercetina-3-O-glu. | 0,08 | 0,37 | 0,58 |
| Quercetina-3-O-gal. | 0,09 | 0,35 | 0,55 |

TABLA XX. $\lambda_{\text{máx.}}$ de los espectros UV del compuesto A en MeOH y con distintos reactivos.

| <u>MeOH</u> | <u>MeONa</u> | <u>Cl₃Al</u> | <u>Cl₃Al/ClH</u> | <u>AcONa</u> | <u>BO₃H₃</u> |
|-------------|--------------|-------------------------|-----------------------------|--------------|------------------------------------|
| 357 | 411 | 431 | 400 | 381 | 373 |
| 302 infl. | 330 | 335 infl. | 360 infl. | 322 | 300 1 |
| 266 infl. | 273 | 302 infl. | 300 infl. | 272 | 260 |
| 257 | | 270 | 270 | | |

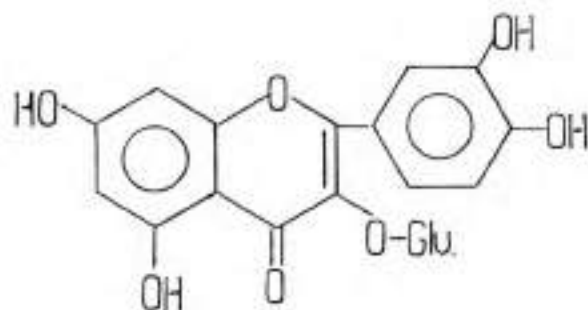
Para corroborar que se trata de la estructura propuesta y determinar con exactitud el azúcar que lleva unido, se sometió dicho compuesto a una hidrólisis total en las condiciones expuestas en página 22 para el acetyl-trisulfato de quercetina. Como resultado de ello se obtuvo un sólido (aglucon) y un sobrenadante. El aglucon fue sometido a análisis espectral en el UV y cromatográfico en diversos sistemas de solventes, contra muestra auténtica de quercetina, con resultados idénticos a los obtenidos en tablas VI y VII en página 23. En el sobrenadante, luego de concentrado, se investigó el resto azucarado por comparación cromatográfica ascendente en capa fina boratada y en papel (descendente) sembrando contra muestras testigos.

Para las cromatografías de capa fina se usó como reactivo revelador difenilamina-ácido fosfórico, de acuerdo a la técnica utilizada por Gal⁴⁰ para la separación e identificación de monosacáridos. Los papeles fueron revelados con ftalato de anilina según técnica indicada por Stahl⁴¹.

Los R_f resultantes (tabla XXI) mostraron identidad con los de la glucosa, por lo que se demuestra que la estructura del principio aislado es el de la quercetina-3-glucósido.

TABLA XXI. R_f comparativos entre el hidrolizado del compuesto A y glucosa y galactosa testigos.

| | <u>Capa fina</u> | | <u>Papel</u> |
|------------------|-------------------------------------------------------|---------------------------------|-------------------------------------------------------|
| | <u>n-propanol-H₂O²</u> (7:1) | <u>Cloroformo-MeOH</u> (6:4) | <u>Acetato de etilo-Piridina-H₂O</u> (8:2) |
| Hidrolizado de A | 0,55 | 0,37 | 0,32 |
| Glucosa | 0,55 | 0,37 | 0,32 |
| galactosa | 0,49 | 0,26 | 0,27 |



Quercetina-3-O-glucosa

El sólido B demostró a través de diversas corridas cromatográficas, ser en realidad una mezcla de dos flavonoides. Con el fin de obtener algunos ligramos puros de esta sustancia se procedió a separarlas por cromatografía preparativa en papel Whatman 3MM siguiendo el procedimiento descrito a continuación. El precipitado disuelto en metanol, se sembró en banda sobre papeles de 15 X 35 cm, utilizando como solvente fenol saturado con agua que resultó ser sistema de desarrollo más eficaz.

Obtenido el cromatograma y una vez seco el papel, se revelaron (con luz UV) y marcaron cada una de las manchas, cortándolas en finas tiras para luego eluirlas en primer lugar con agua, para eliminar los restos de fenol retenidos en el papel. Posteriormente (luego de secar) se extrajeron los aglucones con metanol grado espectroscópico. Después de filtrar, cada uno de los sobrenadados fue sometido al análisis espectral en el UV. Por los trazados de los espectros normales y los corrimientos producidos por el agregado de los reactivos usuales, estos compuestos fueron identificados como quercetina (tabla VI pág. 23) y kaemferol respectivamente. Los λ máximos de éste último se muestran en la tabla XXII.

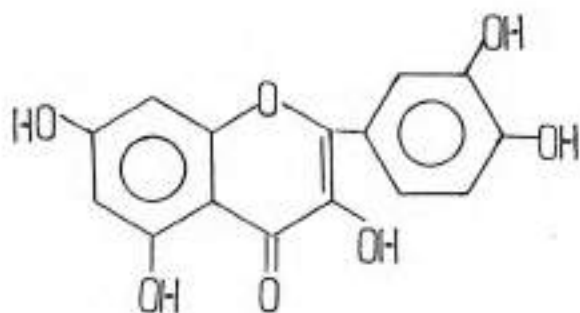
TABLA XXII. λ máx. de los espectros UV de kaemferol en MeOH y con distintos reactivos.

| MeOH | MeONa | $\frac{Cl_3Al}{3}$ | $\frac{Cl_3Al}{3}/ClH$ | AcONa |
|-----------|-------|--------------------|------------------------|-------|
| 365 | 419 | 424 | 424 | 385 |
| 322 infl. | 320 | 352 | 352 | 300 |
| 298 infl. | 278 | 306 infl. | 306 infl. | 274 |
| 253 infl. | | 270 | 270 | |
| 266 | | 260 infl. | 260 infl. | |

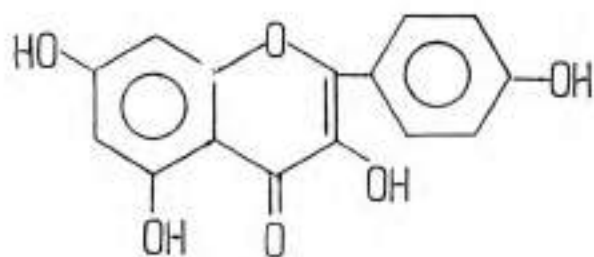
Finalmente, estas estructuras fueron confirmadas cromatográficamente sembrando los problemas contra quercetina y kaemferol testigos (tabla XXIII).

TABLA XXIII. Rf comparativos entre las sustancias problemas y quercetina y kaemferol testigos.

| | <u>BAW</u> | <u>Fenol</u> | <u>Forestal</u> |
|------------|------------|--------------|-----------------|
| Problema 1 | 0,62 | 0,30 | 0,42 |
| Quercetina | 0,62 | 0,30 | 0,42 |
| Problema 2 | 0,80 | 0,61 | 0,56 |
| Kaemferol | 0,80 | 0,61 | 0,56 |



Quercetina



Kaemferol



B.- FLAVERIA BIDENTIS (L) O.K.

FLORES

Extracción de flavonoides (esquema operativo en tabla XXIV)

500 gr del material seco fueron sometidos a tratamiento de desengrasado con idéntico procedimiento que para las hojas (pág. 18). Posteriormente fueron realizadas dos nuevas extracciones a temperatura ambiente; la primera de ellas con eter etílico y la segunda con EtOH-H₂O 50%, ambas hasta agotamiento.

El segundo de estos extractos se llevó a un evaporador rotatorio para eliminar su parte alcohólica y obtener un volumen acuoso de aproximadamente 4 ml, el que a su vez fue extraído con acetato de etilo en un extractor continuo líquido-líquido.

De esta manera se contó con tres extractos: uno etéreo, otro acuoso y un tercero de acetato de etilo. Mediante este procedimiento se logró fraccionar los compuestos buscados de acuerdo a sus polaridades, esto puede apreciarse en la figura 15 donde se reproduce las cromatografías en papel de los distintos extractos.

Solvente de desarrollo: agua.

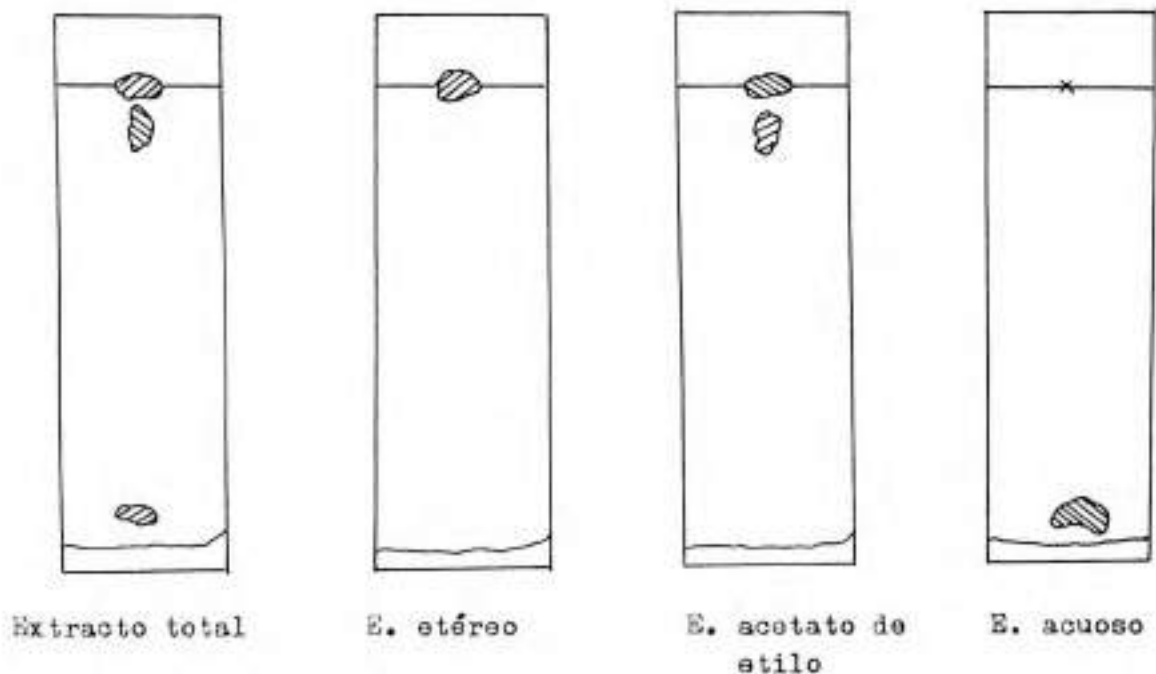
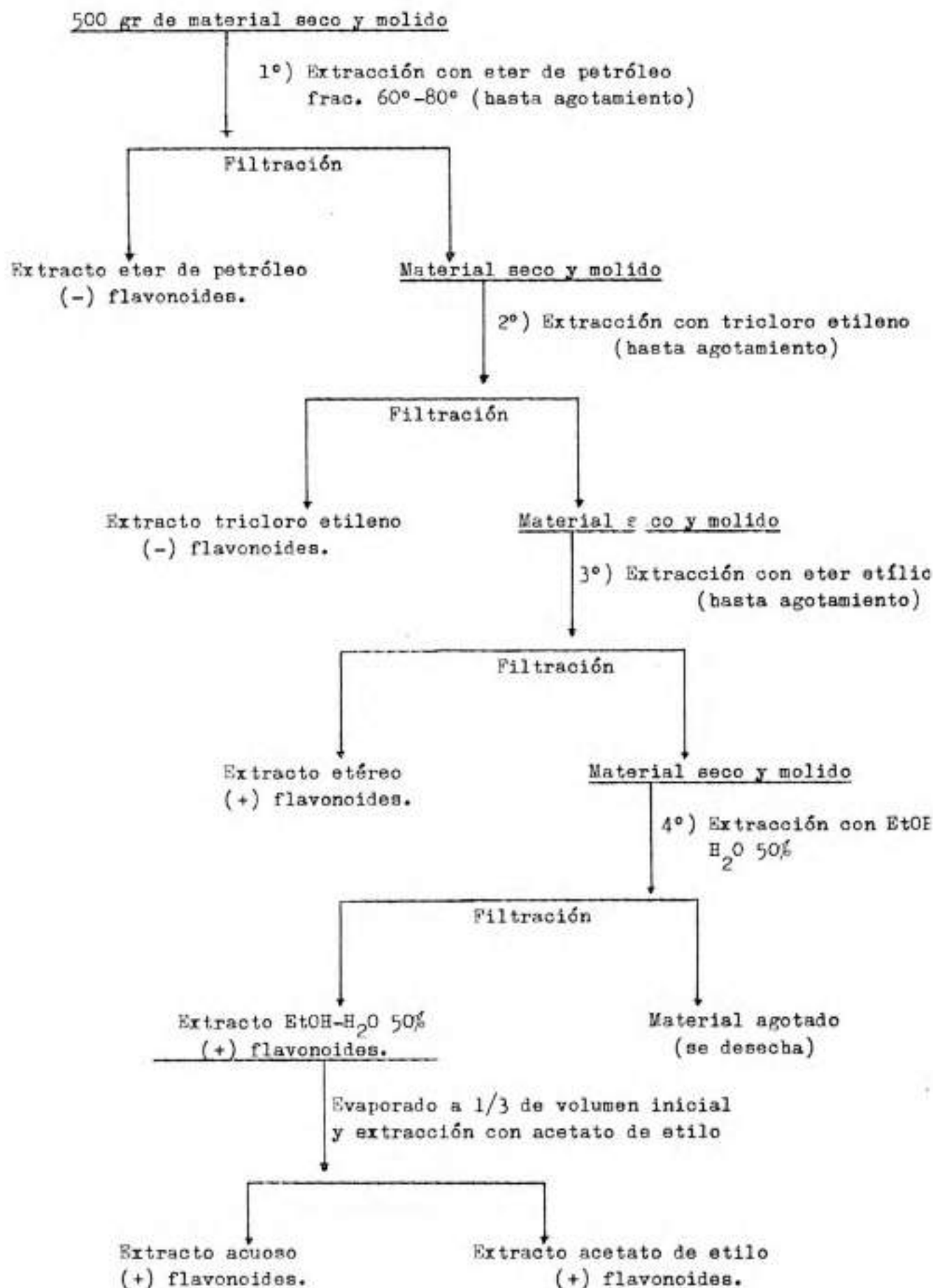


FIGURA 15. Comportamiento cromatográfico de los distintos extractos de flores de Flaveria bidentis.

TABLA XXIV

Esquema operativo para la extracción de flavonoides
en hojas de Flaveria bidentis (L) O.K.



Aislamiento, purificación e identificación

Extracto etéreo:

Por evaporación a presión reducida este extracto fue llevado a sequedad, el residuo siruposo remanente en el balón contenía un solo flavonoide (determinado cromatográficamente) que era insoluble en benceno y soluble en acetona. El tratamiento con el primero de estos solventes se hizo con el fin de extraer clorofilas que pudieran haber quedado retenidas a pesar del procesamiento inicial; mientras que el compuesto buscado fue solubilizado en acetona, refluído con carbón vegetal y luego filtrado, concentrado y precipitado por el agregado de agua. Los 60 mg del sólido obtenido fueron pasados a través de una columna cromatográfica (1,5 X 35 cm) rellena con poliamida, empleando EtOH como solvente de elución. Desechada la primera fracción por contener impurezas, la restante fue colectada y sometida al mismo procedimiento anterior para precipitarla, obteniéndose aproximadamente 40 mg de un sólido de color amarillo verdoso. Su identificación fue realizada por aplicación de métodos espectroscópicos en el UV, RMN y cromatográficos contra muestra auténtica.

El compuesto fue identificado como kaemferol y las constantes para obtenidas coinciden con las indicadas en las tablas (XII y XXIII de las páginas 50 y 51, referidas a dicho aglicón. Además se incluyen en la tabla XXV los valores de su espectro RMN, concordante con el de la bibliografía⁴².

TABLA XXV. Valores de RMN correspondientes al kaemferol.

| <u>Solvente</u> | <u>δ</u> | <u>Nº de H</u> | <u>Señal</u> | <u>J Hz</u> | |
|-----------------|----------------------------|----------------|--------------|-------------------|--------|
| DMS | 6,13 | 1 | d | $J_{6,8} = 2,5$ | H-6 |
| " | 6,40 | 1 | d | $J_{8,6} = 2,5$ | H-8 |
| " | 6,86 | 2 | d | $J_{5',6'} = 9,5$ | H-5' y |
| " | 8,03 | 2 | d | $J_{6',5'} = 8,0$ | H-6' y |

Extracto acuoso:

Este extracto contenía un solo flavonoide cromatográficamente puro, el que fue separado de sus impurezas por aplicación de esta técnica en forma preparativa sobre papel Whatman 3MM, empleando agua como solvente de desarrollo. El extracto concentrado fue sembrado en banda y una vez obteni

el cromatograma, la mancha correspondiente al principio buscado fue recortada y eluida con EtOH-H₂O 50%. Las propiedades espectrales de dicho compuesto, así también las cromatográficas realizadas en distintos sistemas de solventes comparadas con sustancia testigo (tabla XXVI), revelaron que se trata del 3-acetil-7-3'-4'-trisulfato de quercetina cuya estructura, encontrada en hojas, ha sido ya discutida.

TABLA XXVI. Rf comparativos entre sustancia problema y 3-acetil-7-3'-4'-trisulfato de quercetina.

| | <u>H₂O</u> | <u>AcOH 15%</u> | <u>TBA</u> | <u>BAW</u> |
|---------------------------------|-----------------------|-----------------|------------|------------|
| Problema | 0,88 | 0,86 | 0,11 | 0,14 |
| Acetil-trisulfato de quercetina | 0,88 | 0,86 | 0,11 | 0,14 |

Extracto de acetato de etilo:

De acuerdo al esquema cromatográfico en página 52, este extracto presenta dos flavonoides, uno de ellos con Rf 0,00 y el siguiente 0,16. El primero resulta ser el aglucón ya extraído en la fracción etérea y el segundo se procedió a aislarlo por medio de cromatografía en papel preparativa de idéntica manera que la detallada anteriormente. El comportamiento cromatográfico y espectroscópico en el ultravioleta de este compuesto demostró similitud con los datos indicados por bibliografía^{38,39} para el kaemferol-3-glucósido (tablas XXVII y XXVIII). Su estructura fue ratificada por hidrólisis del glucósido y posterior reconocimiento de sus partes, de la manera descrita en página 49.

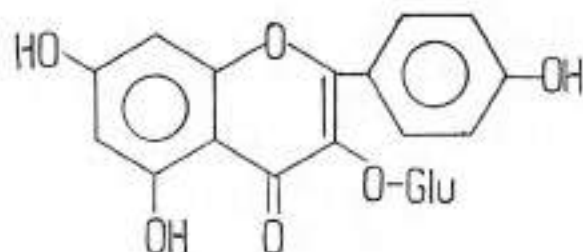
TABLA XXVII. λ máx. de los espectros UV correspondientes al kaemferol-3-O-glu., en MeOH y con distintos reactivos.

| <u>MeOH</u> | <u>MeONa</u> | <u>Cl₃Al</u> | <u>Cl₃Al/ClH</u> |
|-------------|--------------|-------------------------|-----------------------------|
| 352 | 401 | 401 | 395 |
| 300 infl. | 326 | 352 | 350 |
| 268 | 272 | 300 infl. | 300 infl. |
| | | 274 | 272 |



TABLA XXVIII. Rf comparativos entre los de la sustancia problema y los de kaemferol-3-O-glucosa.

| | $\frac{H_2O}{2}$ | AcOH 15% | BAW |
|--------------------|------------------|----------|------|
| Problema | 0,13 | 0,44 | 0,71 |
| Kaemferol-3-O-glu. | 0,16 | 0,46 | 0,70 |



Kaemferol-3-O-glucosa

Flaveria bidentis (L) O.K.

El contenido de flavonoides de esta planta se detallan, a modo de resumen, en tabla XXIX.

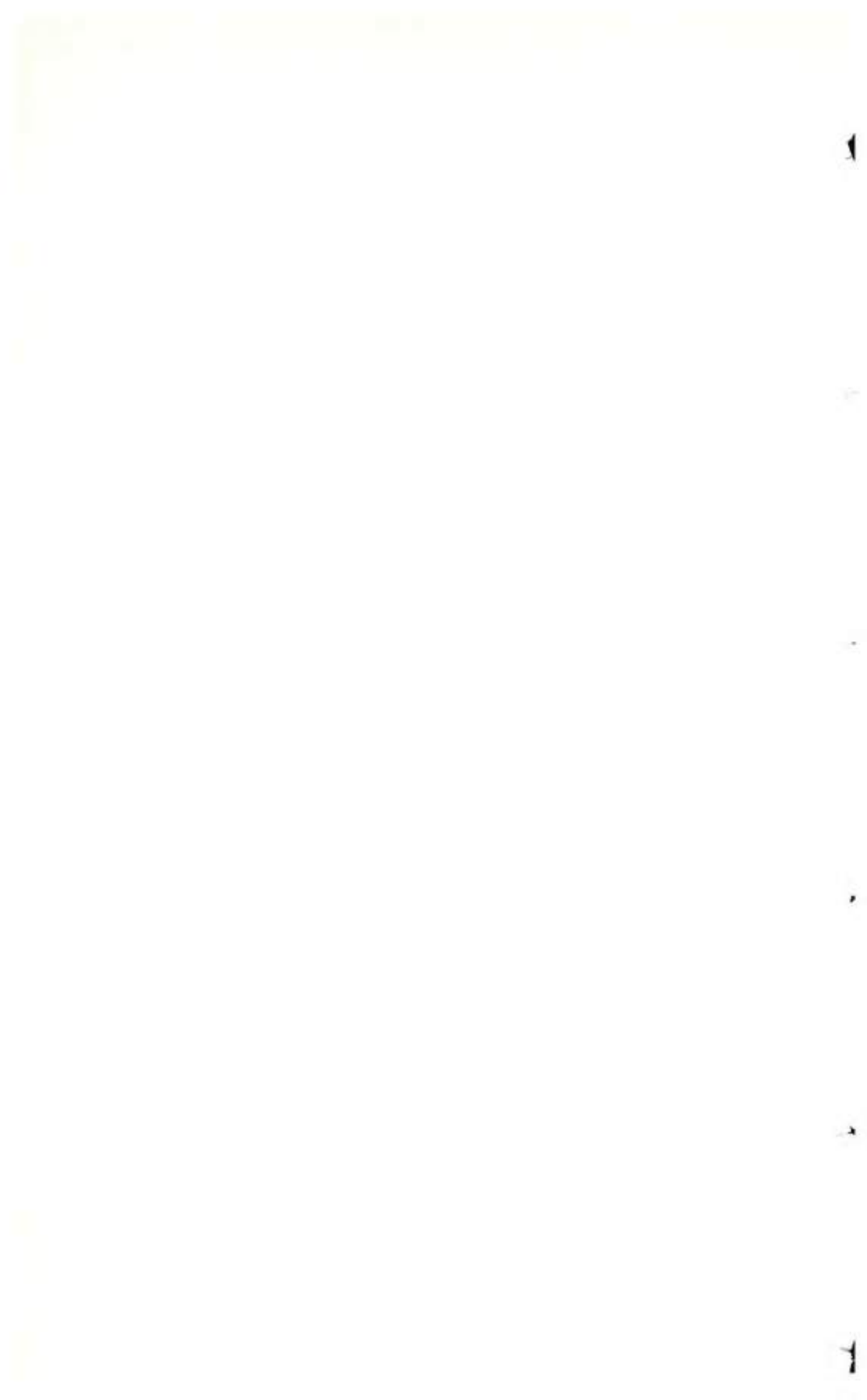
TABLA XXIX. Contenido flavonólico de hojas y flores de Flaveria bidentis (L) O.K.

| | |
|----------------|-------------------------------------------|
| | 3-acetil-7-3'-4'-trisulfato de quercetina |
| | 3-7-3'-4'-tetrasulfato de quercetina |
| <u>HOJAS :</u> | Quercetina-3-O-glucosa |
| | Kaemferol |
| | Quercetina |
| | 3-acetil-7-3'-4'-trisulfato de quercetina |
| <u>FLORES:</u> | Kaemferol-3-O-glucosa |
| | Kaemferol |





Flaveria bidentis var. angustifolia Otto Kuntze (Compositas)



FLORESa) Flavonoides sulfatadosExtracción (esquema operativo en tabla XXX)

250 gr de este material finamente pulverizado fue sometido al procedimiento de desengrasado y posterior maceración a temperatura ambiente con EtOH-H₂O (1:1), repitiendo la metodología aplicada en anteriores extracciones.

El extracto reunido en último término fue cromatografiado en forma mono y bidimensional, en los sistemas de solventes apuntados en figura 16, revelando (bajo luz UV) la presencia de tres flavonoides.

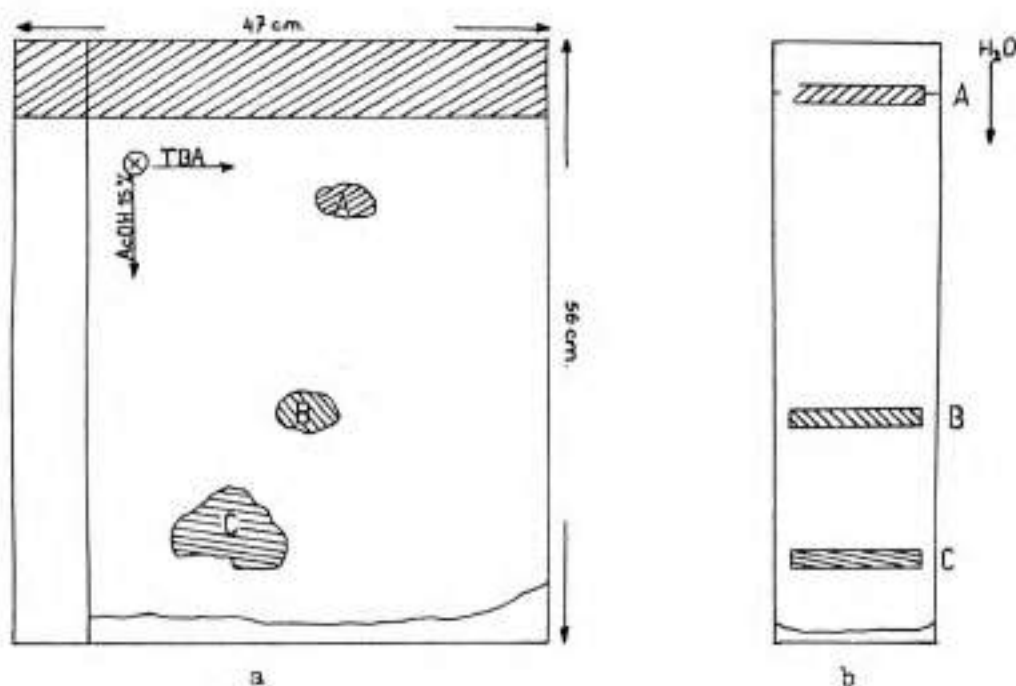


FIGURA 16. Cromatografías del extracto de EtOH-H₂O 50% de flores de Flaveria bidentis var. angustifolia.

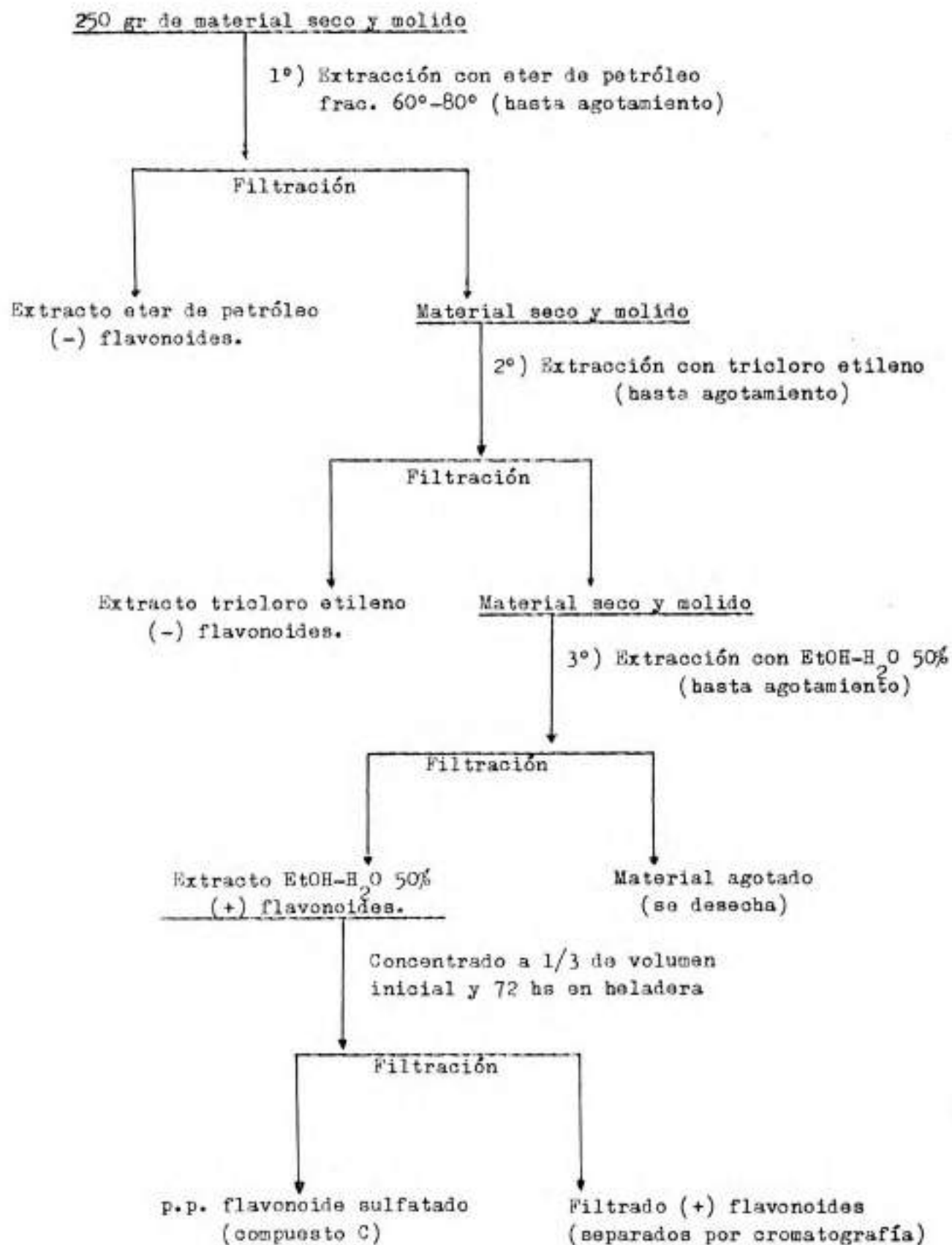
Aislamiento y purificación

El extracto flavonólico fue concentrado a presión reducida a no más de 40°C a 1/3 de su volumen inicial, enfriado y dejado en heladera por espacio de 72 horas, transcurrido este tiempo se obtuvo un abundante precipitado am:



TABLA XXX

Esquema operativo para la extracción de flavonoides en flores de Flaveria bidentis var. angustifolia O.K.





llo. El mismo fue separado por filtración y secado a presión reducida sobre cloruro de calcio anhidro, acusando un peso de 200 mg. La recristalización se llevó a cabo usando como solvente agua.

Este sólido cromatográficamente puro, al que identificaremos como compuesto C, es el de mayor Rf señalado en la figura 16 con la misma letra.

Cromatografías del compuesto C

Algunos cristales de este compuesto fueron sometidos al análisis cromatográfico en los sistemas de solventes indicados en tabla XXXI, en donde también se incluyen los Rf respectivos. El revelado de estos cromatogramas por irradiación con luz UV mostró la presencia de una mancha opaca; con vapores de amoníaco e inmediata irradiación con luz UV, la mancha antes opaca se tornó ahora de color amarillo brillante; con solución metanólica de cloruro férrico al 9% la mancha tomó coloración azul oscuro.

TABLA XXXI. Solventes y Rf correspondientes al compuesto C.

| <u>Solvente</u> | <u>Rf</u> |
|------------------|-----------|
| H ₂ O | 0,78 |
| TBA | 0,12 |
| AcOH 15% | 0,72 |
| BAW | 0,47 |

Hidrólisis del compuesto C

20 mg de este derivado se disolvieron en 1 ml de ClH 0,1N en un tubo de hidrólisis, y llevado a baño maría hirviente durante una hora. El precipitado formado (aglucon) se separó por centrifugación y luego de secado sobre cloruro de calcio, fue analizado cromatográficamente en diversos sistemas de solventes y espectroscópicamente en el UV.

Espectros UV del aglucon del compuesto C

Los máximos de absorción e inflexiones de cada uno de los trazados realizados por la adición de los reactivos ya conocidos como así también el espectro normal, se encuentran tabulados a continuación.



TABLA XXXII. λ máx. de los espectros UV del aglucón del compuesto C en MeOH y con distintos reactivos.

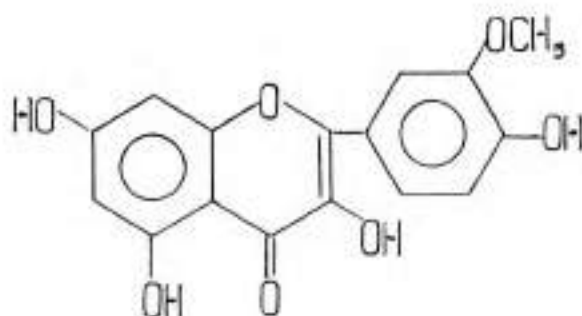
| <u>MeOH</u> | <u>MeONa</u> | <u>Cl₃Al</u> | <u>Cl₃Al/ClH</u> |
|-------------|--------------|-------------------------|-----------------------------|
| 370 | 430 | 433 | 428 |
| 326 infl. | 330 | 361 infl. | 357 infl. |
| 306 infl. | 270 infl. | 304 infl. | 302 infl. |
| 268 | | 266 | 270 infl. |
| 253 | | | 264 |

Cromatografías del aglucón del compuesto C

TABLA XXXIII. Solventes y Rf correspondientes al aglucón del compuesto C.

| <u>Solvente</u> | <u>Rf</u> |
|------------------|-----------|
| H ₂ O | 0,00 |
| BAW | 0,75 |
| AcOH 15% | 0,02 |
| Fenol sat. | 0,70 |

Los resultados arriba mencionados conjuntamente con el punto de fusión: 306-308°C (lit. 308-310°C)⁴⁴, determinado para esta fracción insoluble, condujeron a individualizarlo (de acuerdo a bibliografía)^{45,46}, como isorhamnetina. Flavonoide que se diferencia de la quercetina por poseer un grupo metoxilo en posición 3'.



Aglucón = Isorhamnetina



Para confirmar por otra vía la identidad de la estructura aislada, se procedió a demetilar el aglucón problema con piridina-ácido clorhídrico⁴⁷ (170°C durante una hora, en tubo cerrado), condiciones éstas que llevaron a obtener quercetina. La cual fue reconocida cromatográficamente sembrando el producto de reacción contra muestra auténtica del derivado polihidroxiado. Los valores de esta experiencia se reúnen en tabla XXXIV.

TABLA XXXIV. Rf comparativos entre el aglucón del compuesto C, antes y después de demetilarlo y quercetina testigo.

| <u>Compuesto</u> | <u>Rf BAW</u> | <u>Rf fenol sat.</u> |
|------------------------|---------------|----------------------|
| Isorhamnetina problema | 0,75 | 0,70 |
| Producto de reacción | 0,66 | 0,25 |
| Quercetina | 0,66 | 0,25 |

Sobrenadante de la hidrólisis del compuesto C

La fracción soluble proveniente de la referida hidrólisis, se dividió en dos alícuotas. Sobre la primera de ellas se practicaron reacciones (alfa na tol sulfúrico, antrona y fenol sulfúrico), tendientes a poner en evidencia la presencia de restos azucarados, resultando aquellas negativas.

Sobre la segunda se adicionó cloruro de bario en solución, produciéndose inmediatamente un abundante precipitado blanco que responde a los ensayos analíticos de solubilidad correspondiente al sulfato de bario.

Espectro infrarrojo del compuesto C

El espectro infrarrojo del compuesto C, se reproduce en la figura 17. En él se distinguen las siguientes características: 3.400 cm^{-1} , banda de absorción ancha y de gran intensidad atribuida a la vibración de tensión del oxidrilo³² de carbono 5 unido por puente hidrógeno con el carbonilo de carbono 4; de bandas de fuerte intensidad a 1.250 y 1.040 cm^{-1} atribuidas a la vibración de tensión del enlace S=O de grupos sulfatos³³.

Espectros ultravioleta del compuesto C

Los espectros UV fueron realizados solubilizando el flavonol en MeOH grado espectroscópico.

El espectro normal y los obtenidos por el agregado de los reactivos



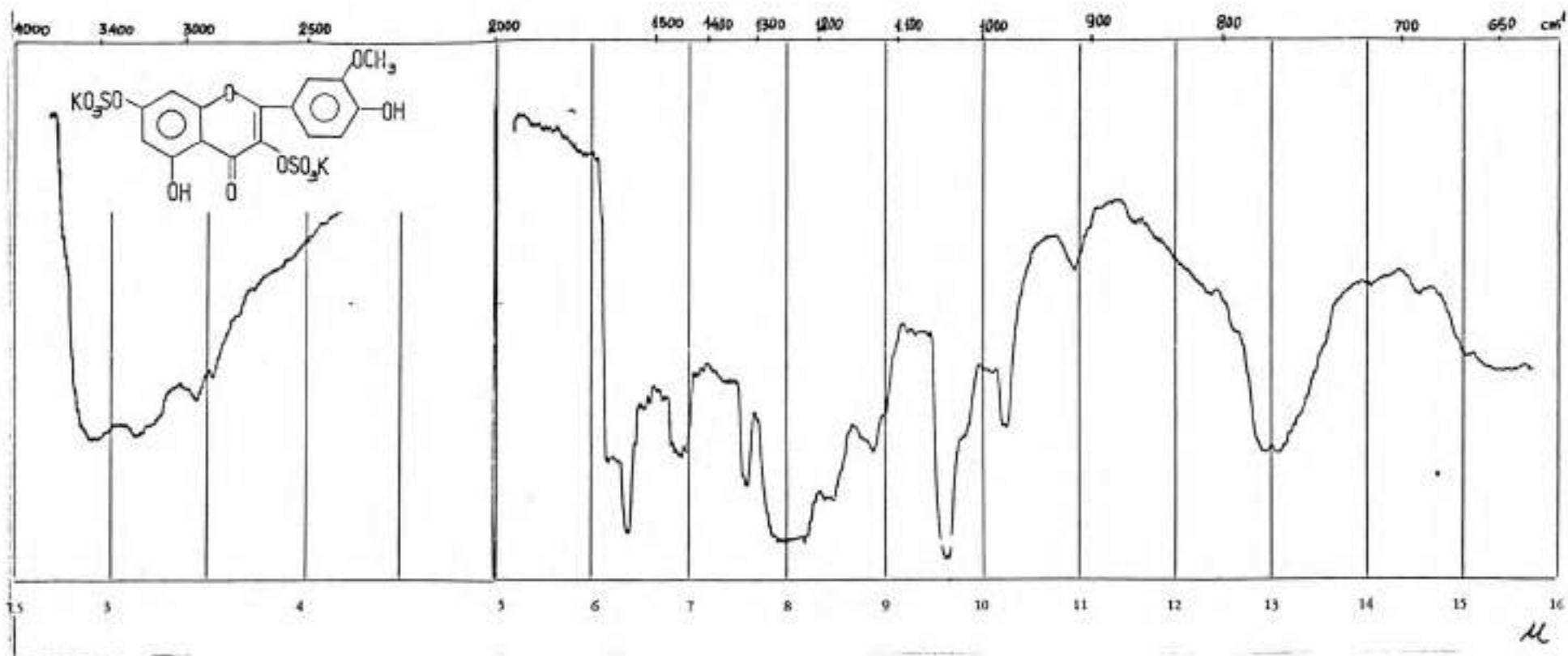


FIGURA 17. Espectro infrarrojo del compuesto C.

ya especificados anteriormente se reproducen en las figuras 18, 19, y 20 resumiéndose en tabla XXXV las inflexiones, los máximos de absorción correspondiente a cada banda y los $\log. \epsilon$ de cada uno de los trazados.

TABLA XXXV. λ máx. y $\log. \epsilon$ de los espectros UV del compuesto C.

| | <u>λ máx.</u> | <u>Log. ϵ</u> |
|-----------------------------------|-------------------------------------------|-----------------------------------|
| MeOH | 353; 266 infl.; 253 | 4.35; 4.28 |
| MeONa | 415; 266; 245 infl. | 4.31; 4.36 |
| Cl_3Al | 401; 361 infl.; 302 infl.; 278 infl.; 269 | 4.30; 4.20 |
| $\text{Cl}_3\text{Al}/\text{ClH}$ | 401; 361 infl.; 302 infl.; 278 infl.; 269 | 4.27; 4.15 |
| AcONa | 419 infl.; 363; 267 infl.; 254 | 4.15; 4.28 |
| AcONa/ BO_3H_3 | 359; 266 infl.; 256 | |

Las consideraciones efectuadas teniendo en cuenta los resultados arriba obtenidos y cuyos fundamentos fueron explicados anteriormente (páginas 24-32), se resumen brevemente a continuación:

1) Espectro normal (fig. 18)

La Banda I del espectro metanólico del compuesto C se encuentra situada dentro de la zona de absorción de los flavonoles sustituidos en posición 3 (ver página 26), permitiendo afirmar que nuestro compuesto presenta dicha sustitución.

2) Frente al MeONa (fig. 18)

Se produjo un corrimiento batocrómico de ambas bandas con un incremento del $\log. \epsilon$ de la Banda I respecto de su similar de la del normal, sugiriendo por lo visto en la página 26 que el oxidrilo de la posición 4' se encuentra libre.

3) Frente al Cl_3Al y $\text{Cl}_3\text{Al}/\text{ClH}$ (fig. 19)

Por la adición de cada una de los reactivos se obtuvieron dos espectros que son prácticamente superponibles entre sí, con sus dos bandas de absorción corridas batocrómicamente respecto del trazado metanólico.

Este comportamiento (ver página 31) aporta dos nuevos datos respecto a la estructura del flavonoide en estudio. En primer lugar se ratifica la ine-

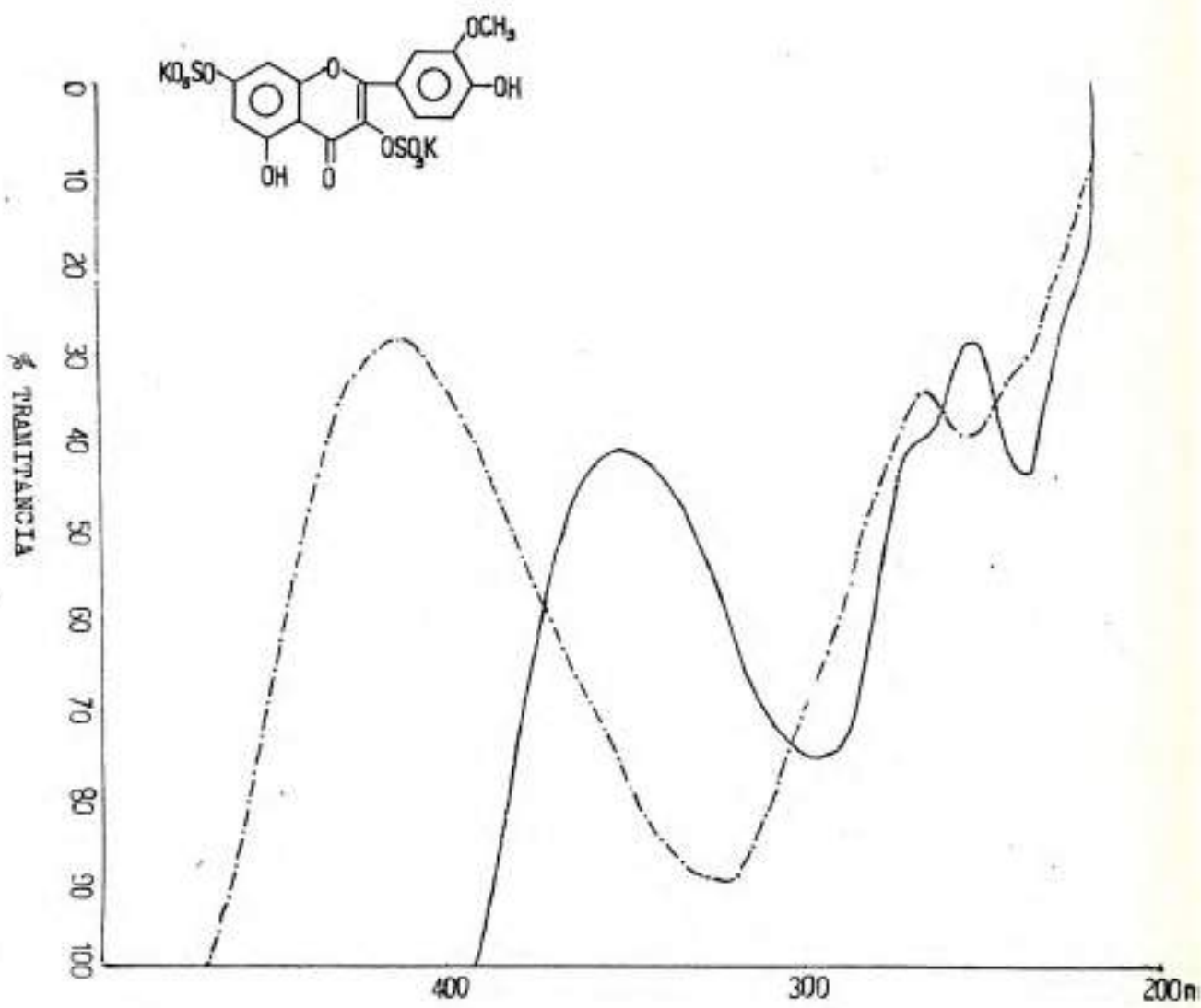


FIGURA 18. Espectros UV correspondientes al compuesto C.

- a) ——— espectro normal
- b) - - - - - espectro con el agregado de MeONa

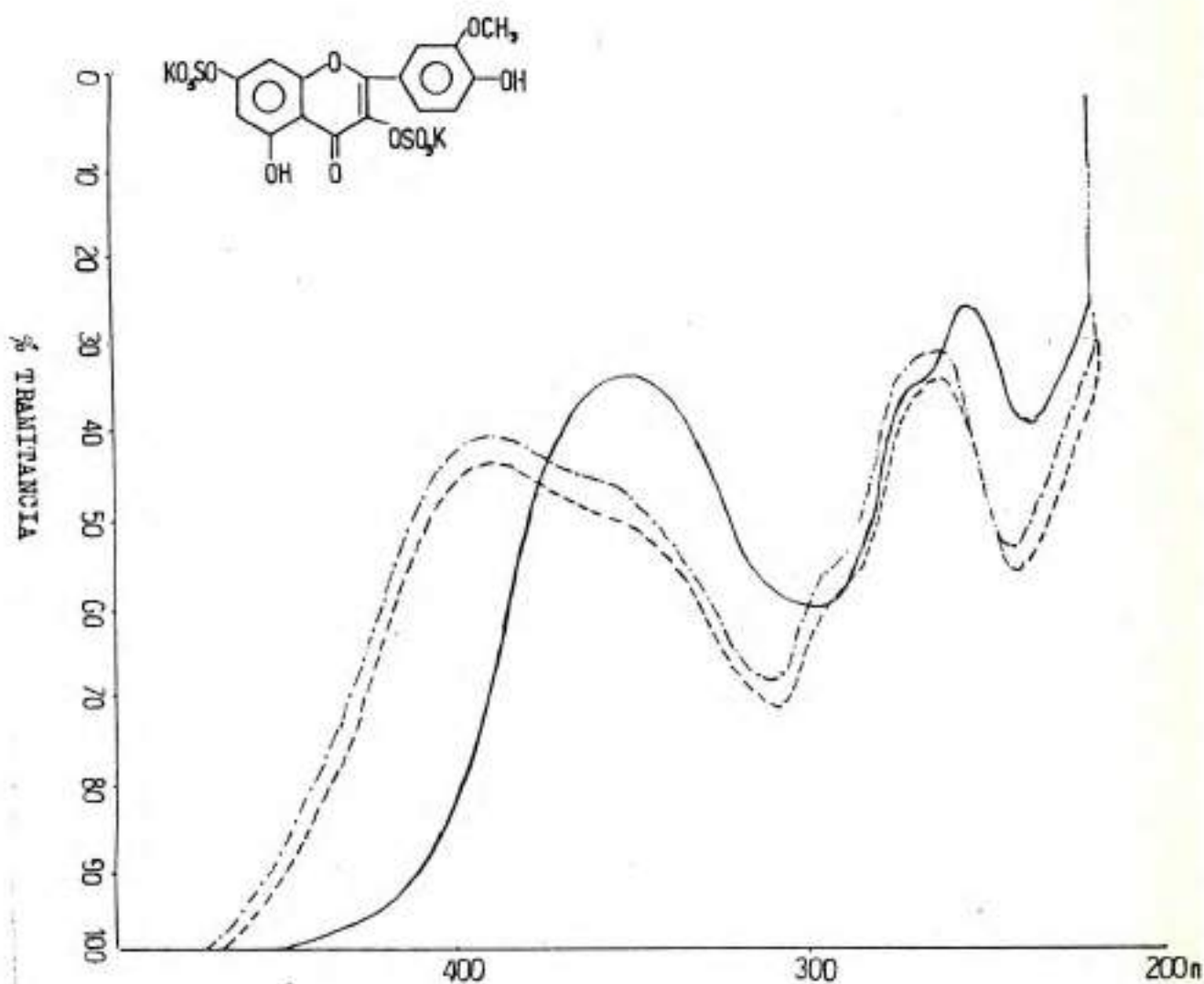


FIGURA 19. Espectros UV correspondientes al compuesto C.

- a) ——— espectro normal
 b) - - - - - espectro con el agregado de Cl_3Al
 c) - · - · - $\text{Cl}_3\text{Al} + \text{ClH}$

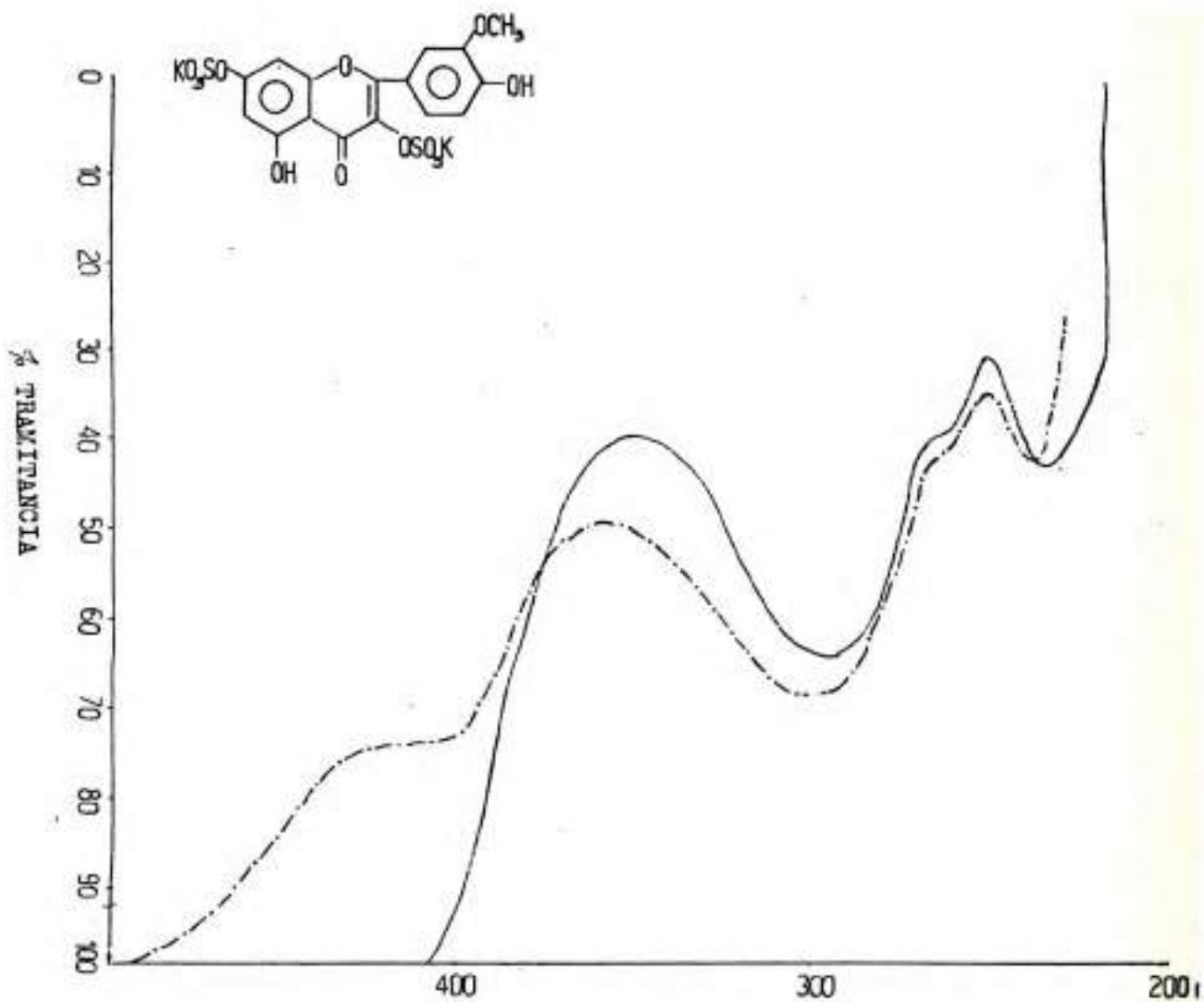


FIGURA 20. Espectros UV correspondientes al compuesto C.

- a) ——— espectro normal
- b) - - - - - espectro con el agregado de AcONa

tencia de oxidrilos en posición orto (el complejo formado por el agregado de Cl_3Al no se altera frente al ácido clorhídrico), hecho este que era predecible ya que el aglucón del cual deriva (isorhamnetina) carece de este tipo de oxidrilo, por poseer en posición 3' un grupo metoxilo.

La siguiente información que se desprende, es la que pone en claro que la única posibilidad que tiene la molécula de formar un complejo estable en medio ácido, es la debida a la interacción del ión metálico entre el carbonilo de C-4 y el oxidrilo de C-5. La otra alternativa que involucra el oxidrilo de carbono 3 queda descartada por lo expuesto en parte (1).

4) Frente al AcoNa (fig. 20)

El comportamiento espectroscópico que exhibe el compuesto C frente a esta base débil, al no modificar apreciablemente el máximo de absorción de la Banda II, respecto de la del normal (pág. 28), revela inequívocamente una sustitución sobre el oxidrilo de la posición 7.

La evaluación de los resultados provenientes del análisis espectroscópicos realizados, nos permite suponer que la estructura del compuesto C corresponde con la de un derivado disustituído de la isorhamnetina, cuyos lugares ocupados demuestran ser los de las posiciones 3 y 7.

Metilación del compuesto C

50 mg del derivado sulfatado de la isorhamnetina fueron disueltos en 1,5 ml de dimetil sulfóxido, para luego introducirlo en un tubo de vidrio, donde se le agregaron 5 ml de solución etérea de diazometano, operaciones que se realizaron de idéntica manera a la detallada en página 38 para el acetyl-trisulfato de quercetina. Concluido el período de reacción, el tubo fue reabierto, eliminada la capa etérea y la solución de DMS diluida con tres veces su volumen en acetona, precipitando un sólido de color amarillo, que separado por centrifugación, demostró no poseer grupos oxidrilos libres ya que el trazado metanólico en el ultravioleta (338, 262 μ y 248 nm, fig. 21) no fue alterado por el agregado de los reactivos usuales; no reaccionó además con solución de cloruro férrico.

Hidrólisis del metilado

El sólido anteriormente obtenido fue disuelto y refluído durante 45 minutos con 2 ml de ácido clorhídrico 0,1N. El precipitado resultante de esta operación fue secado al vacío y sometido al análisis espectral en el UV.

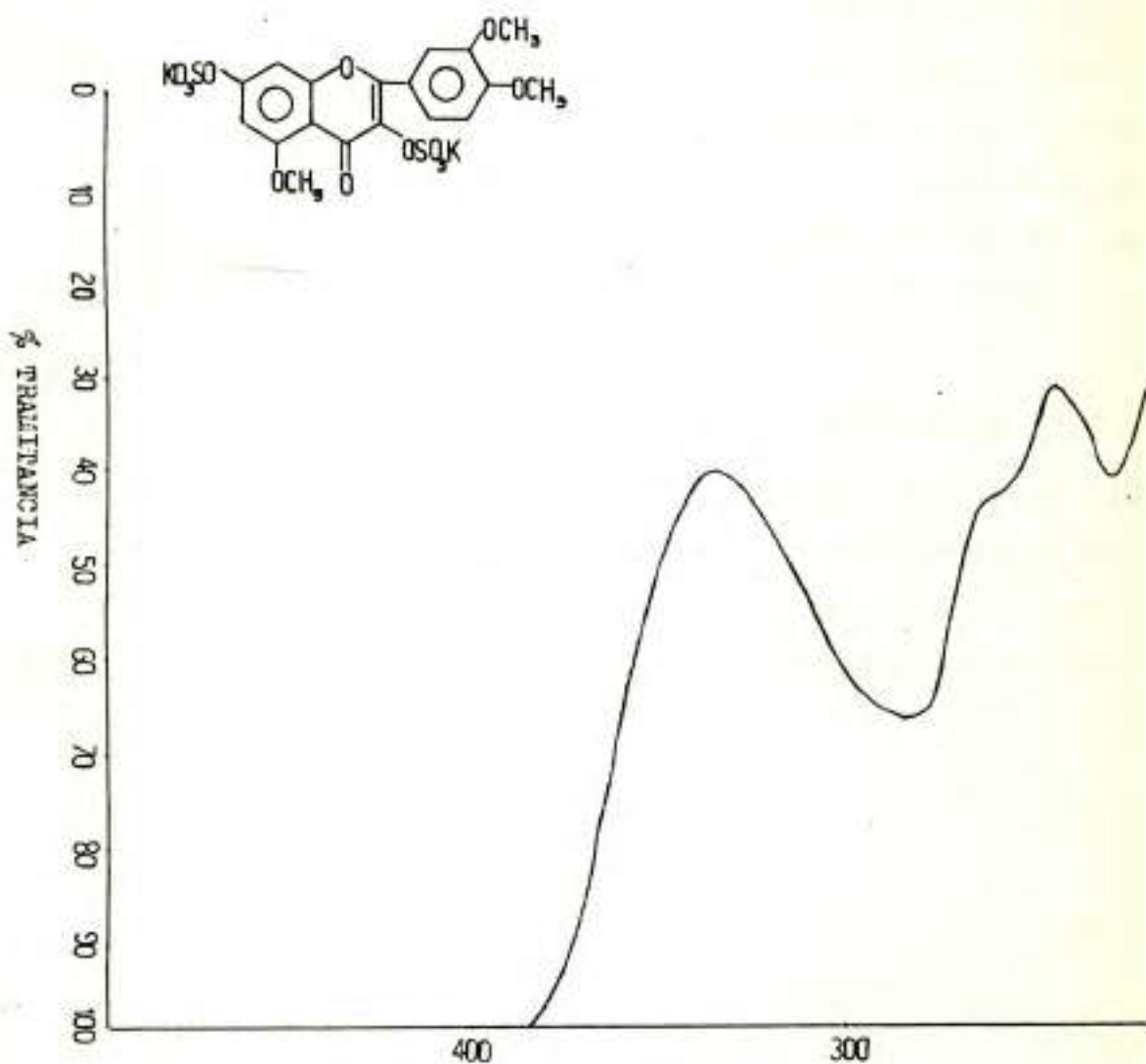


FIGURA 21. Espectro UV correspondiente al compuesto C, metilado y sin hidrolizar.

- a) — el mismo trazado para el espectro normal (MeOH), y con el agregado de cada uno de los reactivos: MeONa, Cl_3Al , $Cl_3Al+ClH$, AcONa y AcONa+ BO_3H_3 .



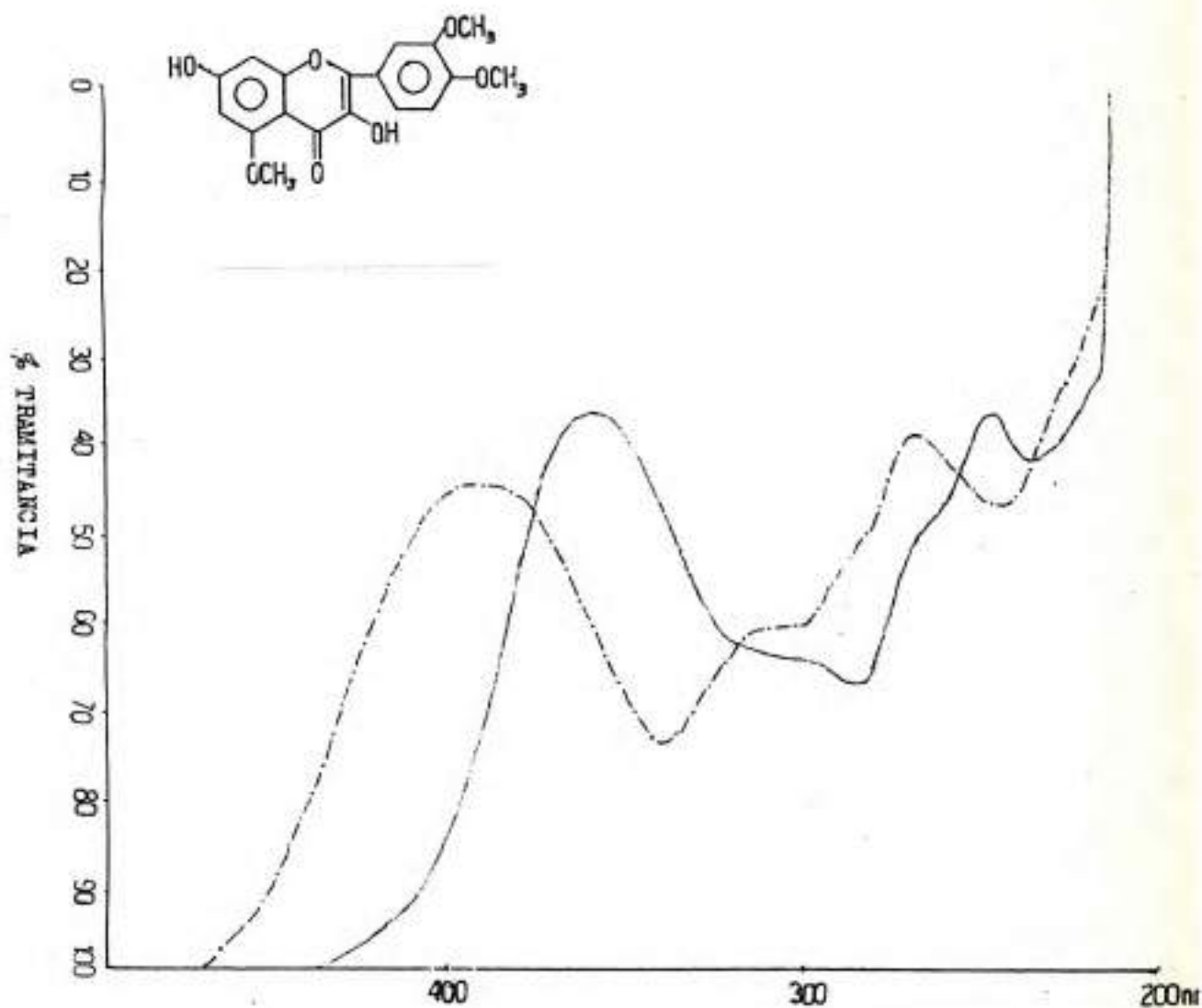


FIGURA 22. Espectros UV correspondientes al 3'-4'-5-tri-O-metil quercetina.

- a) ——— espectro normal
- b) - - - - - espectro con el agregado de MeONa

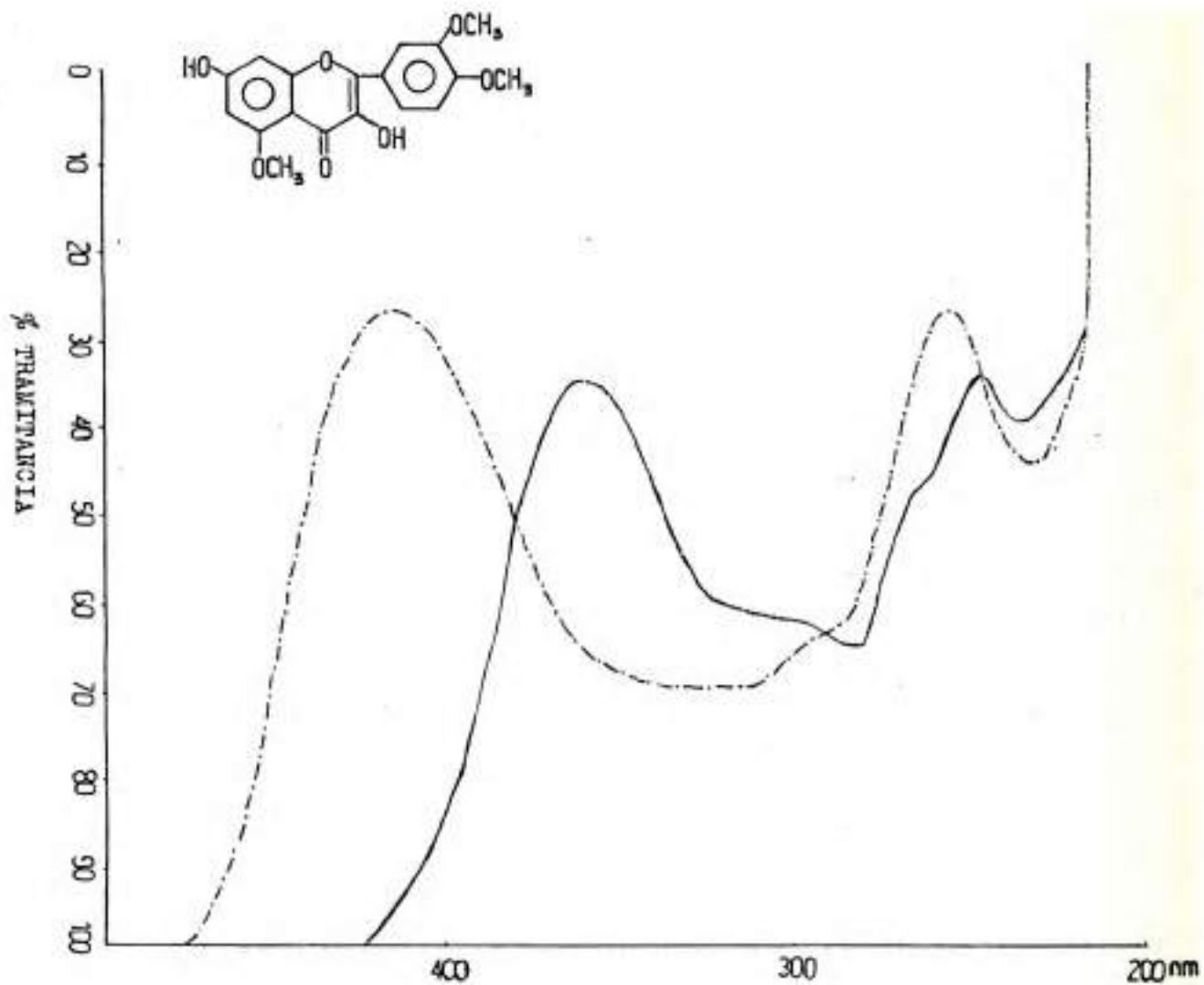


FIGURA 23. Espectros UV correspondientes al 3'-4'-5-tri-O-metil quercetina.

- a) ——— espectro normal
- b) - - - - - espectro con el agregado de Cl_3Al
- c) - · - · - $Cl_3Al + ClH$



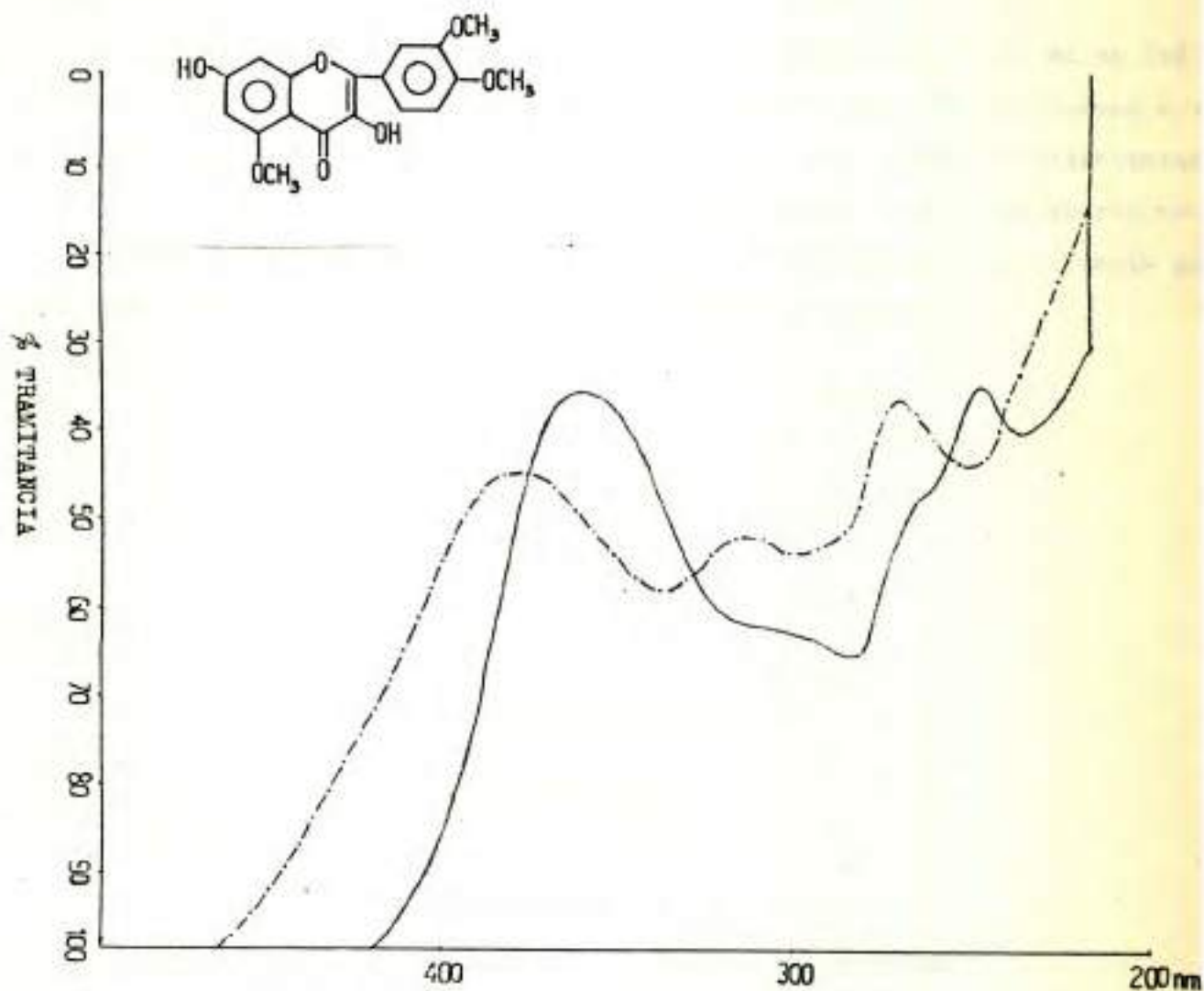


FIGURA 24. Espectros UV correspondientes al 3'-4'-5-tri-O-metil quercetina.

- a) ——— espectro normal
 b) - - - - - espectro con el agregado de AcONa

tabla XXXVII son concordantes con los datos por Harborne⁹ para el 7-sulfato de isorhamnetina.

TABLA XXXVI. λ máx. de los espectros correspondientes al 7-sulfato de isorhamnetina.

| <u>MeOH</u> | <u>MeONa</u> | <u>C1₃Al</u> | <u>C1₃Al/C1H</u> | <u>AcONa</u> |
|-------------|--------------|-------------------------|-----------------------------|--------------|
| <u>375</u> | 433 | 429 | 425 | 413 |
| 334 infl. | 320 infl. | 369 | 361 | 332 infl. |
| 272 infl. | 262 infl. | 300 infl. | 300 infl. | <u>258</u> |
| <u>257</u> | 243 infl. | 266 | 264 | |

TABLA XXXVII. Solventes y Rf del 7-sulfato de isorhamnetina.

| <u>Solvente</u> | <u>Rf</u> |
|------------------|-----------|
| H ₂ O | 0,12 |
| BAW | 0,44 |
| AcOH 15% | 0,08 |

La mancha N°3 con Rf 0,65 probó a través de su análisis espectral que se trata de un derivado de la isorhamnetina sustituido en posición 3, respondiendo a los λ máximos y Rf en papel (sol.:BAW) dados por Tatsuta⁵⁰ para el 3-sulfato de isorhamnetina (Persicarina) -tabla XXXVIII-.

TABLA XXXVIII. λ máx. de los espectros UV correspondientes al 3-sulfato de isorhamnetina.

| <u>MeOH</u> | <u>MeONa</u> | <u>C1₃Al</u> | <u>C1₃Al/C1H</u> | <u>AcONa</u> |
|-------------|--------------|-------------------------|-----------------------------|--------------|
| <u>352</u> | 411 | 401 | 395 | 379 |
| 302 infl. | 328 | 367 | 363 | <u>274</u> |
| 273 infl. | 270 | 302 infl. | 302 infl. | |
| 256 | | 280 infl. | 280 infl. | |
| | | 268 | 266 | |

Finalmente, la N°4 con Rf 0,78 coincide espectroscópicamente con el

producto de partida sin hidrolizar.

Análisis cuantitativo de azufre

El resultado hallado y calculado para la fórmula $C_{16}H_{10}O_{13}S_2K_2$ se comparan a continuación:

TABLA XXXIX. Análisis cuantitativo de azufre del compuesto C.

| | <u>% Azufre</u> |
|-----------|-----------------|
| Hallado | 11,60 |
| Calculado | 11,59 |

Confirmando estos valores la existencia de dos grupos sulfatos por cada molécula de isorhamnetina.

Espectro RMN del compuesto C

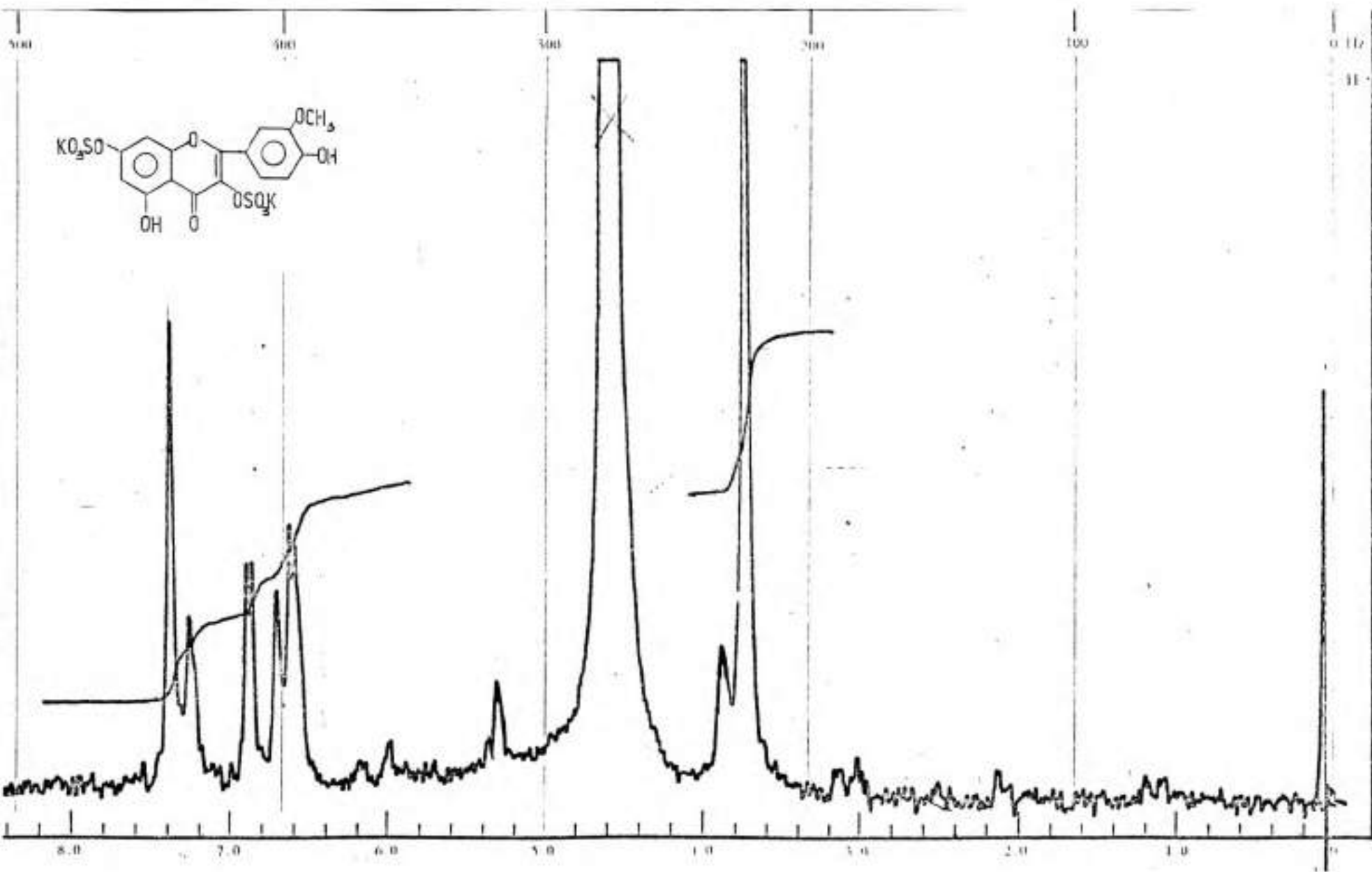
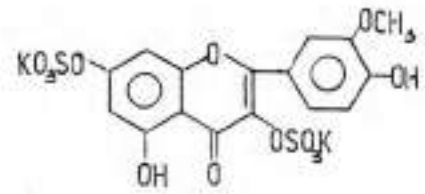
Para el trazado del espectro que se muestra en la figura 26, se solubilizó la sustancia en D_2O . En él se distinguen claramente las siguientes señales: un singlete a δ 3,6 característico de protones metoxílicos, y a campos más bajas las correspondientes a los protones aromáticos; cuya integración respecto de la primera es de 5,14/3,14. Coincidiendo este resultado con la estructura del núcleo fundamental (isorhamnetina), que contiene un metoxilo para cinco protones aromáticos.

Los valores y asignaciones para cada señal, pertenecientes al espectro RMN del compuesto C, se indican en la siguiente tabla.

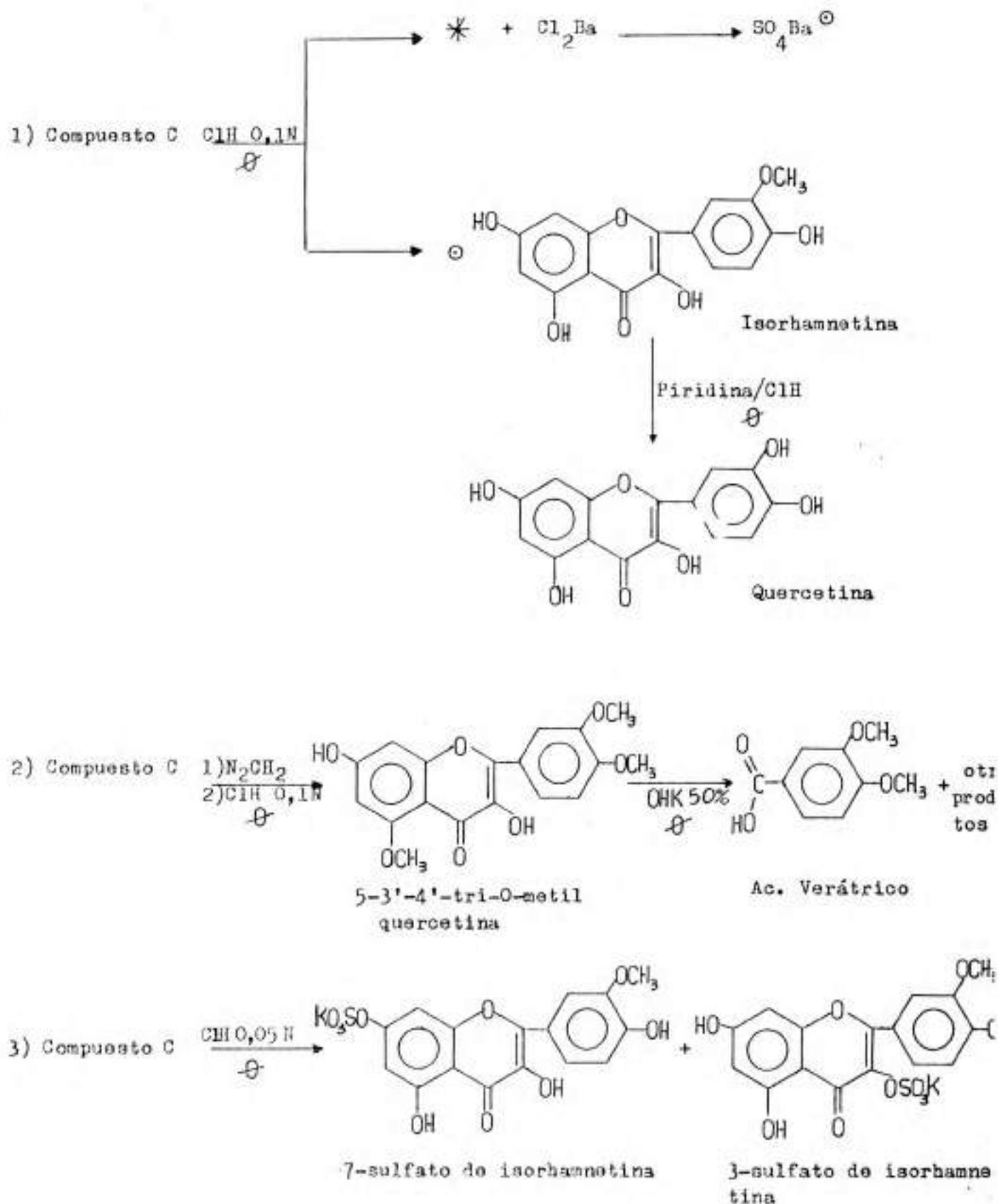
TABLA XL. Valores de las señales RMN correspondientes al compuesto C.

| <u>Solvente</u> | <u>δ</u> | <u>Nº de H</u> | <u>Señal</u> | <u>JHz</u> | |
|-----------------|----------------------------|----------------|--------------|---------------------|------------------|
| D_2O | 3,6 | 3 | s | --- | Metoxilo C-3' |
| " | 6,5 | 2 | d | $J_{6,8-8,6} = 2,5$ | H-6 y H-4 |
| " | 6,7 | 1 | d | $J_{5'-6'} = 10$ | H-5' |
| " | 7,2 | 1 | d | $J_{2'-6'} = 2,5$ | H-6' |
| " | 7,3 | 1 | d | $J_{6'-2'} = 2$ | H-2' |



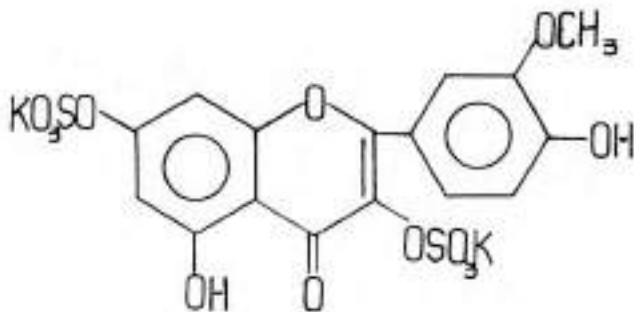


Los métodos químicos aplicados para la dilucidación de la estructura del compuesto C se resumen esquemáticamente en el siguiente cuadro:



4) Análisis elemental de azufre concordante para la fórmula $\text{C}_{16}\text{H}_{10}\text{O}_{13}\text{S}_2\text{K}_2$.

Por los hechos anteriores podemos concluir que la estructura del nuevo derivado sulfatado de la isorhamnetina es la siguiente⁵⁰:



Aislamiento, purificación e identificación del 3-sulfato de isorhamnetin

En las figuras 16 a y b se esquematizaron las cromatografías que revelan el contenido flavonólico del extracto acuoso inicial, del cual precipita el 3-7-disulfato de isorhamnetina (visualizado en el esquema como mancha C). Los dos restantes flavonoides que en él aparecen fueron aislados y purificados recurriendo para ello a papeles cromatográficos preparativos (Whatman 3MM, 20 x 45 cm), aplicando la metodología que fuera detallada en la página 20 para el cetil-trisulfato de quercetina. Con la salvedad de que el solvente utilizado para eluir el flavonoide del papel es ahora EtOH-H₂O (1:1), para la mancha B y MeOH para la A.

El sólido resultante (20 mg), correspondiente a la mancha B fue recristalizado de agua. La identidad del compuesto B como 3-sulfato de isorhamnetina (Persicarina) fue corroborada a través de las siguientes experiencias:

Punto de fusión: 275°-278°C. Citado por bibliografía⁵¹: 280°C.

Espectros UV y cromatografía: Los espectros UV de este compuesto resultan superponibles con los correspondientes trazados que se obtuvieron para el 3-sulfato de isorhamnetina proveniente de la hidrólisis parcial efectuada sobre el 3-7-disulfato del mismo aglucón, visto en página 74. Los valores espectrales y cromatográficos se ajustan a los valores citados por Tatsuta⁴⁹ para Persicarina (tabla XXXVI, página 75).

Hidrólisis de B: Como producto de la hidrólisis, llevada a cabo con ClH O,1N y reflujo, se obtuvieron dos fracciones, una sólida y otra soluble. La primera de ellas (correspondiente al aglucón) fue reconocida por su comportamiento cromatográfico y espectroscópico en el UV como isorhamnetina (tablas XXXII y XXXIII).

En la fracción soluble fueron ensayadas reacciones con alfa naftol sulfúrico y cloruro de bario, con el fin de evidenciar la naturaleza del sustituyente, desprendiéndose de sus resultados que la fracción acuosa contiene únicamente grupos sulfatos.

Derivado metilado: Como experiencia final, se procedió a metilar y posteriormente hidrolizar al compuesto B, con el objeto de obtener el derivado metilado que corresponde al grado de sustitución del compuesto original, resultando de esta operación el 3'-4'-5-7-tetra-O-metil quercetina.

En las tablas XLI y XLII se encuentran anotados los valores de los

pectros UV y Rf de cromatografías realizadas en los sistemas de solventes que en ellas se indican, que son coincidentes con los citados por Mabry⁵² para el referido compuesto.

TABLA XLI. $\lambda_{\text{máx.}}$ de los espectros UV correspondientes al 3-7-3'-4'-tetra-O-metil quercetina.

| <u>MeOH</u> | <u>MeONa</u> | <u>Cl₃Al</u> | <u>Cl₃Al/ClH</u> | <u>AcONa</u> |
|-------------|--------------|-------------------------|-----------------------------|--------------|
| <u>362</u> | 401 | 423 | 419 | 421 |
| 272 infl. | 263 | 264 | 258 | 363 |
| 300 infl. | | 300 infl. | 300 infl. | <u>253</u> |
| <u>253</u> | | 344 infl. | 344 infl. | |

TABLA XLII. Solventes y Rf del 3-7-3'-4'-tetra-O-metil quercetina.

| <u>Solvente</u> | <u>Rf</u> |
|-----------------|-----------|
| TBA | 0,57 |
| AcOH 15% | 0,41 |

b) Flavonoide A

El eluido metanólico correspondiente a la mancha A, demostró cromatográficamente contener un solo flavonoide que responde por sus Rf en varios sistemas de solventes, al igual que por el espectro normal y los corrimientos resultantes de la adición de los reactivos usuales, a los de isorhamnetina testigo (tablas XXXII y XXXIII).

D.- FLAVERIA BIDENTIS VAR. ANGUSTIFOLIA O.K.HOJASExtracción

El extracto flavonólico perteneciente a las hojas de Flaveria biden var. angustifolia fue preparado siguiendo el esquema general ya aplicado en anteriores extracciones (páginas 58 y 59), empleando para tal fin 200 gr del referido material.

Aislamiento, purificación e identificación de flavonoides

Los filtrados de EtOH-H₂O (1:1) resultante de las últimas extraccio fueron juntados y concentrados a 1/3 de su volumen inicial, procediendo luego cromatografiarlo sobre papel Whatman 3MM en forma bidi ensional. Su contenido revelado bajo luz UV se reproduce en la figura 27.

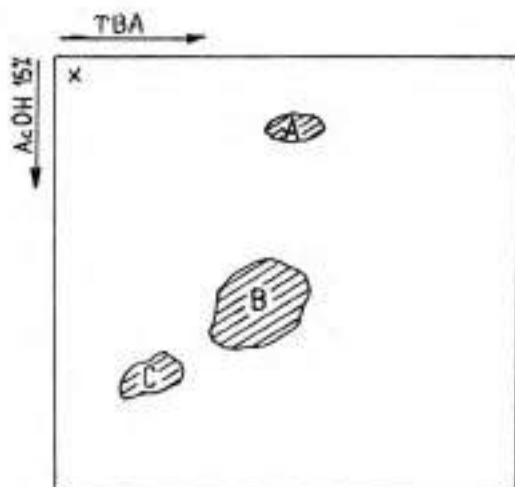


FIGURA 27. Comportamiento en cromatografía bidimensional del extracto de EtOH-H₂O 50% de hojas de Flaveria bidentis var. angustifolia.

Cada una de las manchas fueron cortadas, eluídas y estudiado su comportamiento espectroscópico y cromatográfico, confrontando cada uno de los resultados con los de muestra testigo, arribando a las siguientes conclusiones:

| | |
|----------|--------------------------------|
| Mancha A | Quercetina |
| Mancha B | 3-sulfato de isorhamnetina |
| Mancha C | 3-7-disulfato de isorhamnetina |

Es decir que excepto el aglucón, el contenido flavonólico de flores y hojas es el mismo, observándose sin embargo variaciones cuantitativas respecto de los derivados sulfatados. Así en flores predomina el 3-7-disulfato sobre el de Persicarina, mientras que en hojas, este último prevalece sobre el primero.

Flaveria bidentis var. angustifolia O.K.

El contenido de flavonoides en flores y hojas de Flaveria bidentis var. angustifolia se sintetiza en la siguiente tabla.

TABLA XLIII. Flavonoides presentes en flores y hojas de Flaveria bidentis var. angustifolia.

| | |
|-----------------|--------------------------------|
| | 3-7-disulfato de isorhamnetina |
| <u>FLORES</u> : | 3-sulfato de isorhamnetina |
| | Isorhamnetina |
| | 3-7-disulfato de isorhamnetina |
| <u>HOJAS</u> : | 3-sulfato de isorhamnetina |
| | Quercetina |

B I B L I O G R A F I A

- 1.- Geissman A.T., "The Chemistry of Flavonoid Compounds", Mac. Millan (1962) U.S.A.
Finar I.L., "Química Orgánica", vol.2, ed. Alhambra (1960) España.
- 2.- Whalley B.W., "The Chemistry of Flavonoid Compounds", cap.14, p.441 (1962 ed. A.T.Geissman, Mac. Millan (U.S.A.)).
- 3.- Grisebach H., "Recent Advances in Phytochemistry", vol.1, cap.11, p.379 (1968) ed. Mabry T.J., Apleton-Century-Crofts (U.S.A.).
- 4.- Harborne J.B., "Comparative Biochemistry of the Flavonoids", cap.9, p.289 (1967) ed. Academic Press (U.S.A.).
- 5.- Shimokoriyama M., "The Chemistry of Flavonoid Compounds", cap.10, p.308 (1967) ed. A.T.Geissman, Mac. Millan (U.S.A.).
- 6.- Harborne J.B., "Comparative Biochemistry of the Flavonoids", cap.2, p.51 (1967) Academic Press (U.S.A.).
- 7.- Idem, cap.1, p.27.
- 8.- Idem, cap.2, p.64.
- 9.- Harborne J.B., Phytochemistry, 14, p.1147, (1975).
- 10.- Harborne J.B. y King L., Phytochemistry, en preparación (ref.9).
- 11.- Pereyra de Santiago O.J. y Juliani H.R., Experientia, 28, P.380 (1972).
- 12.- Harborne J.B., Phytochemistry, 14, p.1331 (1975).
- 13.- Williams C.A., Harborne J.B. y Clifford H.T., Phytochemistry, 12, p.2417 (1973).
- 14.- Kawaguchi H. y Kim K.W., J.Pharm. Soc. Japan, 57, p.108 (1937).
- 15.- El Ansari, Nawwar, El Sherbeiny y El Sissi, Phytochemistry, 15, p.231 (1976).
- 16.- Saleh N.A.M., Bohm B.A. y Ornduff R., Phytochemistry, 10, p.611 (1971).
- 17.- Saleh N.A.M., El Sissi H.I. y Nawwar M.A.M., Phytochemistry, 14, p.312 (1975).
- 18.- Hörhammer L. y Hänsel R., Arch. Pharm. Berl., 286, p.153 (1953).
- 19.- Utkin L.M., Khim. Prir. Soedin, 2, p.162 (1966).
- 20.- Harborne J.B., Williams C.A., Greenham J. y Moyna P., Phytochemistry, 13 p.1557 (1974).
- 21.- Williams C.A., Harborne J.B. y Crosby T., Phytochemistry, 15, p.349 (1976).
- 22.- Williams C.A., Ph. D. Thesis, Univ. Reading (1974).

- 23.- Williams C.A., Harborne J.B. y Smith P., Phytochemistry, 13, p.1141 (1977).
- 24.- Nawwar A.N., El Dein A., El Sherbeiry A., El Ansari M. y El Sissi H., Phytochemistry, 16:1, p.145 (1977).
- 25.- Yamaguchi S., Nippon Kagaku Zasshi, 81, p.1332-6 (1960), Cf. C.A. 54-24687 y 56-445.
- 26.- Parodi L.R., "Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería", 1, p.845 (Acmé) 1959.
- 27.- Bohlmann F., Seyberlich, Chem. Ber., 98 (9), p.3010-14 (1965), Cf. C.A. 63-16200.
- 28.- Wagner H., Iyengar M., Hoerhammer L. y Herz W., Phytochemistry, 10 (11) p.2824 (1975).
- 29.- Shinoda J., J. Pharm. Soc. Japan, 48, p.214 (1929).
- 30.- Determan H., "Gel Chromatography", cap.3, p.64 (1969) Springer Verlag (U.S.A.).
- 31.- Mabry T.J., Markham K.R. y Thomas M.B., "The Systematic Identification of Flavonoids", cap.5, p.41 (1970) Springer Verlag (U.S.A.).
- 32.- Pasto D.J. y Johnson C.R., "Determinación de Estructuras Orgánicas", ca 4, p.134-7 (1974) ed. Reverté (España).
- 33.- Jayle M.F., "Analyse des Steroides Hormonaux", vol.3, Spectres infrarou par Weinman S. y Weinman J. (1965) ed. Masson y Cie (Francia).
- 34.- Mabry T.J., Markham K.R. y Thomas M.B., "The Systematic Identification of Flavonoids", cap.8, p.253 (1970) Springer Verlag (U.S.A.).
- 35.- Braude E.A., Sondheimer F. y Forbes W.F., Nature, 173, p.117 (1954).
- 36.- Grouiller A. y Pacheco H., Bull. Soc. Chim. France, 6, p.1938 (1967).
- 37.- Cabrera J.L. y Juliani H.R., Lloydia, 39, nº4, p.253 (1976).
- 38.- Harborne J.B., "Comparative Biochemistry of the Flavonoids", cap.2, p.6 (1967) Academic Press (U.S.A.).
- 39.- Mabry T.J., Markham K.R. y Thomas M.B., "The Systematic Identification of Flavonoids", cap.5, esp.67, p.128 (1970) Springer Verlag (U.S.A.).
- 40.- Gal A.E., Anal. Biochem., 24, p.452 (1968).
- 41.- Krebs K.G., Heusser D. y Wimmer H., "Thin-Layer Chromatography", p.856 (1969) ed. por Stahl E., Springer Verlag (U.S.A.).
- 42.- Mabry T.J., Markham K.R. y Thomas M.B., "The Systematic Identification of Flavonoids", cap.8, esp.25, p.292 (1967) Academic Press (U.S.A.).
- 43.- Shizuo Hattori, "The Chemistry of Flavonoid Compounds", cap.11, p.328 (1962) ed. por A.T. Geissman, Mac. Millan (U.S.A.).

- 44.- Gripenberg J., "The Chemistry of Flavonoids Compounds", cap.13, p.424 (1962) ed. por A.T.Geissman, Mac. Millan (U.S.A.).
- 45.- Mabry T.J., Markham K.R. y Thomas M.B., "The Systematic Identification o Flavonoids", cap.5, esp.77, p.138 (1970) Springer Verlag (U.S.A.).
- 46.- Harborne J.B., "Comparative Biochemistry of the Flavonoids", cap.2, p.54 (1967) Academic Press (U.S.A.).
- 47.- Markham K.R., Mabry T.J. y Voirin V., Phytochemistry, 8, p.472 (1969).
- 48.- Guerreiro E., Kavka J. y Giordano O.S., Anales Asoc. Quím. Argentina, 61 p.161 (1973).
- 49.- Tatsuta H., J. Chem. Soc Japan, 75, p.720 (1954), Cf. C.A. 48-12930.
- 50.- Cabrera J.L. y Juliani H.R., Phytochemistry, 16, p.400 (1977).
- 51.- Karrer W., "Konstitution und Vorkommen der Organischen Pflanzenstoffe", p.618, (1958) Birkhäuser Verlag (Suiza).
- 52.- Mabry T.J., Markham K.R. y Thomas M.B., "The Systematic Identification o Flavonoids", cap.8, esp.75, p.136 (1970) Springer Verlag.