

## Contribución al estudio de polifenoles y aceites esenciales en el genero *Thymus L.*

Roser Vila Casanovas

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tesisenxarxa.net](http://www.tesisenxarxa.net)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tesisenred.net](http://www.tesisenred.net)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tesisenxarxa.net](http://www.tesisenxarxa.net)) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

Universidad de Barcelona

Facultad de Farmacia

Laboratorio de Farmacognosia y Farmacodinamia

CONTRIBUCION AL ESTUDIO DE POLIFENOLES Y ACEITES

ESENCIALES EN EL GENERO THYMUS L.

*Memoria presentada por Dña.  
ROSER VILA CASANOVAS, diri-  
gida por los Dres. Tomás  
Adzet Porredón y Francesc  
Martínez Vergés, para optar  
al Grado de Doctor en Farma-  
cia.*

*Barcelona, Abril de 1987.*

ALS MEUS PARES

A EN SALVADOR



FACULTAD DE FARMACIA

Cátedra de Farmacognosia y Farmacodinamia

Núcleo Universitario de Pedralbes

08028 BARCELONA

TOMAS ADZET PORREDON, Doctor en Farmacia, Catedrático Numerario de Farmacología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona, y FRANCESC MARTINEZ VERGES, Doctor en Farmacia y Profesor Titular del Área de Farmacología en la Facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona,

C E R T I F I C A N Q U E :

Doña ROSER VILA CASANOVAS ha realizado bajo nuestra tutela y dirección el trabajo titulado: "CONTRIBUCION AL ESTUDIO DE POLIFENOLES Y ACEITES ESENCIALES EN EL GÉNERO THYMUS L.", que consideramos satisfactorio para ser presentado como Tesis Doctoral en la Facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona.

Para que así conste donde convenga, firmamos el presente certificado en

Barcelona, 3 de Abril de 1987.

Fdo. Dr. T. Adzet Porredón

Fdo. Dr. Francesc Martínez Verges

## AGRADECIMIENTOS

Al Prof. Tomás Adzet, Catedrático de Farmacología de la Facultad de Farmacia de Barcelona, por aceptar la dirección de la presente Tesis, sus inestimables consejos y la confianza que nos ha dispensado a lo largo de todos estos años.

Al Prof. José Iglesias, Catedrático de Farmacología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona, al que debemos nuestra iniciación en la investigación farmacognóstica, por su continuo apoyo.

Al Dr. Francesc Martínez, Profesor Titular de Farmacología de la Facultad de Farmacia de Barcelona, por aceptar la codirección de esta Tesis y brindarnos su valiosa experiencia.

A Salvador Cañigueral por su entusiasmo y dedicación en la realización del presente trabajo.

Al Dr. Albert Virgili, del Servicio de Espectroscopía de la Universidad Autónoma de Barcelona, que nos ha proporcionado la mayoría de los espectros de masas y de resonancia magnética nuclear de los flavonoides identificados, por sus orientaciones, interés y buena disposición. También, al resto de personal del Servicio, por su amabilidad.

A la empresa LUCTA S.A., por poner a nuestra disposición su instrumental analítico. Y especialmente a Carles Ibáñez, Director del Departamento de Investigación Analítica, por su decidida y valiosísima colaboración en el estudio de los aceites esenciales.

A los Dres. José Rivera y Albert Figueras, del Servicio de Espectrometría de Masas del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (Barcelona), por su entusiasta colaboración en la obtención de espectros de masas mediante ionización por FAB.

Al Dr. Reinhold Carle (Homburg, Frankfurt) y al Prof. Kurt Hostettmann (Université de Lausanne), por el registro de diversos espectros. A la Prof. Elisabeth Stahl (Universität Hamburg) que nos ha suministrado información espectroscópica y muestras de gran utilidad en el estudio experimental de los aceites esenciales.

Al Dr. Jean Passet (Centre National de la Recherche Scientifique, Montpellier) que en las reflexivas conversaciones mantenidas con él, nos ha dado preciosos consejos sobre la forma de orientar la investigación de las esencias.

A los Dres. F. Alcaraz (Murcia), C. Blanché (Barcelona), C. Casas (Barcelona), J. Molero (Barcelona), D. Rivera (Murcia), C. Sergio (Lisboa), S. Silvestre (Sevilla), O. Socorro (Granada) y J. Vallés (Barcelona) y a A. Sala (Barcelona), por su colaboración en el capítulo de provisión de material vegetal y determinación de las especies recogidas.

Al Dr. Manuel Serrano y a la Dra. M<sup>a</sup> Teresa Piñol, del Laboratorio de Fisiología Vegetal de nuestra Facultad de Farmacia, que nos han facilitado la utilización del instrumental del mismo, permitiéndonos agilizar nuestro trabajo de laboratorio.

A Xavier Batllori y Neus Gabaldà, por su cooperación en las tareas experimentales. Y también al Dr. Josep Lluís Massó y a las demás personas del Laboratorio de Farmacognosia y Farmacodinamia de esta Facultad que han contribuido a la realización del presente trabajo.

A Montserrat Vila, Abili Cañigüeral y Anna Ribas, por su ayuda en la confección de la presente memoria.

A todas aquellas personas que, de alguna manera, han contribuido a llevar a buen término la presente investigación y a la elaboración de esta memoria.

## INDICE





I	<u>INTRODUCCIÓN.</u>	1
II	<u>CONSIDERACIONES BOTÁNICAS.</u>	7
II.1	CARACTERÍSTICAS DEL GÉNERO THYMUS L.	9
II.2	DESCRIPCIÓN DE LAS ESPECIES ESTUDIADAS.	11
1.-	Sección <i>Pseudothymbra</i> Benth.	11
2.-	Sección <i>Thymus</i> (Sect. <i>Vulgare</i> Velen., Sect. <i>Zygis</i> Willk.).	15
3.-	Sección <i>Serpyllum</i> (Miller) Benth.	20
III	<u>OBTENCIÓN DE MATERIAL.</u>	23
III.1	RECOLECCIÓN, IDENTIFICACIÓN Y ACONDICIONAMIENTO DEL MATERIAL.	25
III.2	MATERIAL OBJETO DE ESTUDIO EN LA PRESENTE MEMORIA.	25
IV	<u>INVESTIGACIÓN DE LA COMPOSICIÓN POLIFENÓLICA.</u>	29
IV.1	METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.	31
IV.1.1	Introducción.	31
IV.1.2	Extracción.	37
IV.1.3	Técnicas cromatográficas analíticas.	38
A)	Introducción.	38
B)	Cromatografía en capa fina.	39
C)	Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).	43
IV.1.4	Técnicas cromatográficas preparativas.	47
A)	Introducción.	47
B)	Cromatografía en papel.	48
C)	Cromatografía en columna clásica.	49
IV.1.5	Espectroscopía ultravioleta-visible.	52
IV.1.6	Espectrometría de masas.	55
A)	Introducción.	55

B) Espectrometría de masas de impacto electrónico (EI-MS). -----	56
C) Espectrometría de masas por bombardeo con átomos rápidos (FAB-MS). -----	58
D) Thermospray. -----	60
IV.1.7 Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (NMR). -----	60
A) Resonancia magnética nuclear de protón ( <sup>1</sup> H-NMR). -----	60
B) Resonancia magnética nuclear de carbono <sup>13</sup> ( <sup>13</sup> C-NMR). -----	61
IV.1.8 Hidrólisis de los heterósidos y análisis de los azúcares. -----	63
IV.2 FLAVONOIDES DE THYMUS MORODERI PAU EX MARTÍ-NEZ. -----	66
IV.2.1 Extracción. -----	66
IV.2.2 Aislamiento. -----	66
A) Extracto clorofórmico. -----	66
B) Extracto etéreo. -----	68
C) Extracto "acetato de etilo + butanol . -----	71
IV.2.3 Determinación estructural de las sustancias aisladas. -----	72
A) Comportamiento cromatográfico. -----	72
B) Estructura de la sustancia A. -----	75
C) Estructura de la sustancia B. -----	78
D) Estructura de la sustancia C. -----	81
E) Estructura de la sustancia D. -----	84
F) Estructura de la sustancia E. -----	88
G) Estructura de la sustancia F. -----	92
H) Estructura de la sustancia G. -----	95
I) Estructura de la sustancia H. -----	99
J) Estructura de la sustancia I. -----	103
K) Estructura de la sustancia J. -----	106
L) Estructura de la sustancia K. -----	109

LL) Estructura de la substancia L. -----	112
M) Estructura de la substancia M. -----	115
N) Estructura de la substancia N. -----	118
Ñ) Estructura de la substancia Ñ. -----	121
O) Estructura de la substancia O. -----	124
P) Estructura de la substancia P. -----	127
Q) Estructura de la substancia Q. -----	132
R) Estructura de la substancia R. -----	135
S) Estructura de la substancia S. -----	138
T) Estructura de la substancia T. -----	141
U) Estructura de la substancia U. -----	144
V) Estructura de la substancia V. -----	149
W) Estructura de la substancia W. -----	154
X) Estructura de la substancia X. -----	159
Y) Estructura de la substancia Y. -----	164
Z) Estructura de la substancia Z. -----	167
IV.3 ESTUDIO COMPARATIVO DE LA COMPOSICIÓN POLI- FENÓLICA DE ESPECIES DE THYMUS L.-----	171
IV.3.1 Introducción. -----	171
IV.3.2 Obtención y purificación de los extractos. -----	171
IV.3.3 Análisis de los extractos. -----	174
IV.3.4 Resultados. -----	177
V <u>INVESTIGACIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES.</u> -----	183
V.1 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL. -----	185
V.1.1 Introducción. -----	185
V.1.2 Extracción. -----	190
V.1.3 Determinación del contenido en esencia. -----	193
V.1.4 Técnicas analíticas. -----	195
A) Introducción. -----	195
B) La cromatografía de gases y la espec- trometría de masas aplicadas al estu- dio de los aceites esenciales. -----	198

V.2 ESTUDIO CUALITATIVO Y CUANTITATIVO DE LOS ACEITES ESENCIALES DE DIVERSAS ESPECIES DE THYMUS L. -----	212
V.2.1 Introducción. -----	212
V.2.2 Resultados. -----	213
A) Aceite esencial de <i>Thymus moroderi</i> . -----	213
B) Aceite esencial de <i>Thymus membranaceus</i> . -----	222
C) Aceite esencial de <i>T. membranaceus</i> x <i>T. moroderi</i> . -----	230
D) Aceite esencial de <i>Thymus funkii</i> . -----	236
E) Aceite esencial de <i>Thymus camphoratus</i> . -----	239
F) Aceite esencial de <i>Thymus aestivus</i> . -----	242
G) Aceite esencial de <i>Thymus glandulosus</i> . -----	245
H) Aceite esencial de <i>Thymus baeticus</i> . -----	248
I) Aceite esencial de <i>Thymus willkomii</i> . -----	259
V.2.3 Espectros de masas y fórmulas de los compuestos identificados. -----	254
A) Hidrocarburos monoterpénicos. -----	254
B) Monoterpenos oxigenados. -----	257
C) Hidrocarburos sesquiterpénicos. -----	267
D) Sesquiterpenos oxigenados. -----	270
E) Otros. -----	273
 VI <u>DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS</u> . -----	 277
VI.1 POLIFENOLES. -----	279
VI.1.1 Introducción. -----	279
VI.1.2 Investigación de <i>Thymus moroderi</i> . -----	297
A) Flavonas. -----	297
B) Flavonoles y dihidroflavonoles. -----	298
C) Flavanonas. -----	299
D) Heterósidos. -----	299

VI.1.3 Análisis comparativo. -----	300
VI.1.4 Características flavónicas del género. -----	303
VI.2 ACEITES ESENCIALES. -----	304
VI.2.1 Introducción. -----	304
VI.2.2 Investigación de <i>Thymus moroderi</i> . -----	305
VI.2.3 Investigación de <i>Thymus membranaceus</i> . -----	313
VI.2.4 Investigación de <i>Thymus membranaceus</i> x <i>Thymus moroderi</i> . -----	314
VI.2.5 Investigación de <i>Thymus funkii</i> . -----	315
VI.2.6 Investigación de <i>Thymus camphoratus</i> . -----	316
VI.2.7 Investigación de <i>Thymus aestivus</i> . -----	316
VI.2.8 Investigación de <i>Thymus glandulosus</i> . -----	317
VI.2.9 Investigación de <i>Thymus baeticus</i> . -----	317
VI.2.10 Investigación de <i>Thymus willkomii</i> . -----	318
VI.2.11 Características globales de las especies estudiadas según sus aceites esenciales. -----	318
 VII <u>CONCLUSIONES</u> . -----	 321
 VIII <u>BIBLIOGRAFÍA</u> . -----	 327



Capítulo I  
**INTRODUCCION**





El género *Thymus* L., está ampliamente distribuido en la Península Ibérica. Constituye un grupo de plantas taxonómicamente muy complejo. Algunas de las especies que lo integran, como *T. vulgaris*, muestran una gran variabilidad morfológica y química, pues atendiendo a la composición de sus aceites esenciales se han reconocido hasta siete razas químicas en una misma especie [PASSET, 1971]. Los táxones de este género también se hibridan con facilidad entre ellos, lo que dificulta enormemente su correcta identificación.

La importancia del estudio de estos tomillos está justificada por ser la cuenca Oeste del Mediterráneo la zona origen del género, donde se localizan los representantes de las formas más primitivas. El número de endemismos presentes en nuestra área geográfica es notable, prueba del grado de diversificación alcanzado por este género.

Farmacológicamente, los tomillos tienen propiedades antitusivas, expectorantes, antisépticas y antimicrobianas, atribuidas en un principio exclusivamente al aceite esencial rico en fenoles. Estudios recientes, han puesto de manifiesto que la actividad espasmolítica de los extractos fluidos de tomillo se debe, en particular a la presencia de flavonas metiladas y no al timol y carvacrol que se encuentran en pequeña proporción [VAN DEN BROUCKE & LEMLI, 1981; VAN DEN BROUCKE et al., 1982a].

Los flavonoides, por su variabilidad estructural, estabilidad fisiológica, amplia distribución y su relativamente fácil detección, constituyen uno de los principales marcadores quimiotaxonómicos. Su importancia como tales, ha sido objeto de numerosas publicaciones [BATE-SMITH, 1962 y 1963; HARBORNE, 1966 y 1977a], a las que deben añadirse los trabajos realizados en nuestro Departamento sobre *Thymus* L. [MARTÍNEZ, 1980], *Salvia* L. [CAÑIGUERAL, 1986] y *Euphorbia* L. [CAMARASA, 1981], géneros con especies de composición flavónica característica.

Los aceites esenciales tienen una indudable importancia en el establecimiento de razas químicas debido a su variabilidad infraespecífica [ADZET et al., 1976a, 1977a y 1977b]. La presencia o ausencia de un determinado compuesto en una esencia, es tan importante como el conjunto de todos sus componentes y las concentraciones en que se encuentran, puesto que reflejan el resultado de una serie de procesos metabólicos producto de la dotación genética del vegetal.

El objeto de esta memoria es contribuir al estudio de la composición polifenólica y del aceite esencial de determinadas especies ibéricas de *Thymus* L.

Los táxones investigados pertenecen en su mayor parte a la sección *Pseudothymbra* Bentham, endémica de las penínsulas Ibérica y Balcánica, y a la sección *Thymus* (Sect. *Vulgare* Velen., sect. *Zygis* Willk). También se ha estudiado *T. willkomii* Ronniger, incluido en la sección *Serpyllum* (Miller) Bentham, morfológicamente muy distinta y no tan diversificada como en el Norte y Centro europeos.

A partir de *T. moroderi* Pau ex Martínez, se han aislado e identificado veintiun aglicones flavónicos, que junto con otras sustancias, ya descritas con anterioridad en *Thymus* han sido utilizados en el estudio cromatográfico comparativo de diversas especies.

Al investigar la composición cuali y cuantitativa de los aceites esenciales de estos táxones, se ha creído interesante analizar individuos de algunas poblaciones para estudiar su posible variabilidad. Los resultados obtenidos, sugieren la existencia de diversos grupos con distinta composición en sesquiterpenos. Ello abre nuevas perspectivas hacia la posible identificación de razas químicas, mediante el estudio de un mayor número de poblaciones y de sus individuos, y posterior tratamiento estadístico de los resultados.

Se describen primeramente las características botánicas de los táxones que se estudian, así como la recolección del material y su ulterior acondicionamiento e identificación.

El trabajo experimental se distribuye en dos partes. Por un lado, la investigación de la composición flavónica, donde después de las técnicas extractivas, cromatográficas y espectroscópicas utilizadas, se explica el aislamiento y determinación estructural de los flavonoides de *T. moroderi*, completándose con el estudio comparativo de los polifenoles de diversas especies de *Thymus*.

En una segunda parte, se exponen los métodos empleados para la obtención y análisis de los aceites esenciales, y a continuación el estudio cuali y cuantitativo de la esencia de varios táxones.

Consecuencia de todo ello, es la cuidadosa discusión de los resultados obtenidos, donde atendiendo también a los aportados por otros autores, se efectúan una serie de consideraciones acerca de la composición de las esencias y características flavónicas del género.



## Capítulo II

### CONSIDERACIONES BOTANICAS

1. Características del género *Thymus* L.
2. Descripción de las especies estudiadas.



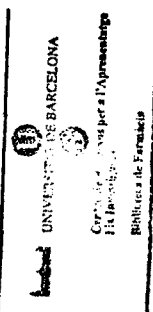
## II.1.- CARACTERÍSTICAS DEL GÉNERO THYMUS L.

El género *Thymus* comprende más de 60 especies europeas [JALAS, 1972] algunas de las cuales se incluyen en diversas farmacopeas por sus propiedades antisépticas y antiespasmódicas (Farmacopea Española, Farmacopea Francesa, Farmacopea Alemana, entre otras) El extracto fluido de tomillo (*Thymi extr. fluid.*) se utiliza en medicina por su actividad antitusiva y es, en muchos países, el constituyente básico de muchos preparados galénicos. Es bien conocido, también, el empleo del tomillo como condimento.

Pertenece, junto con otros géneros de interés medicinal (*Lavandula L.*, *Mentha L.*, *Salvia L.*, *Melissa L.*, ...), a la familia *Lamiaceae* Lindley o *Labiatae* Juss. (Lamiáceas o Labiadas) que forma parte del orden *Lamiales*. Briquet divide a las Labiadas en subfamilias, tribus y subtribus, incluyendo al género *Thymus* en la subfamilia *Stachioideae*, tribu *Thymineae* [WETTSTEIN, 1944].

El género *Thymus* [CADEVALL & FONT QUER, 1932; JALAS, 1972] está constituido por pequeños arbustos o plantas herbáceas perennes, leñosas por lo menos en la base, muy ramificadas y, generalmente, aromáticas. Los tallos, de sección cuadrangular o redondeada, suelen ser pilosos (goniótricos, alolótricos u holótricos). Las hojas son enteras, pequeñas, de forma y nerviación variable, planas o de margen revoluto; pueden ser o no ciliadas y suelen presentar glándulas de esencia en su superficie.

Las flores, purpúreas, rosadas o blancas, se encuentran dispuestas en número variable en verticilastros, más o menos densos, a menudo apretados en una inflorescencia terminal capitada. El cáliz, de cilíndrico a campanulado, es generalmente bilabiado con los tres dientes superiores distintos de los inferiores; el tubo es recto, no giboso. La corola, también de tubo recto y bilabiada, presenta el labio superior plano y emarginado y el inferior trilobado, con el lóbulo medio un poco mayor que los laterales. Los estambres suelen ser exértils, rectos, divergentes, subiguales o didínamos. Las anteras son biloculares, con tecas paralelas y elipsoideas. El gineceo, inserto en un simple disco sin ginóforo, pre-





senta un estilo bífido exerto. Las núculas, ovoides o elipsoidales, suelen ser de superficie lisa y glabra. El polen es hexacolpado, esferoidal, de 20 a 40  $\mu\text{m}$  de diámetro, reticulado o suprareticulado.

Según el criterio adoptado por JALAS [1972] en *Flora Europaea*, el género *Thymus* comprende dos subgéneros: *Coridothymus* (Reichenb. fil.) Borbás y *Thymus*, que difieren, principalmente, en las hojas, subtríquetras y de margen plano en el primero y no subtríquetras y de margen plano o revoluto en el segundo, y en el tubo del cáliz, aplanado dorsalmente y con 20-22 nerviaciones en *Coridothymus* y dorsalmente convexo con 10-13 nerviaciones en *Thymus*.

*Coridothymus* incluye una sola especie, *Thymus capitatus* (L.) Hoffmanns. & Link, que algunos autores separan del género *Thymus* [ELENA ROSELLÓ, 1976; MORALES, 1985]; mientras que *Thymus* comprende 8 secciones: *Mastichina* (Miller) Bentham, *Micantes* Velen., *Piperella* Willk., *Teucroides* Jalas, *Pseudothymbra* Bentham, *Thymus* (Sect. *Vulgares* Velen., Sect. *Zygis* Willk.), *Hyphodromi* (A. Kerner) Halácsy y *Serpyllum* (Miller) Bentham.

Muchas de las especies que lo integran son polimorfas y se hibridan fácilmente entre ellas. Este hecho dificulta la correcta nomenclatura infragenérica de los táxones y, a menudo, es motivo de divergencias entre distintos autores [JALAS, 1972; MENITSKY, 1973a y 1973b].

Existen varias revisiones sistemáticas atendiendo a caracteres morfológicos y fitogeográficos [HEGNAUER, 1948; JALAS 1973, 1974 y 1980; JALAS & KALEVA, 1970; MORALES, 1984; PONERT, 1974; SCHMIDT, 1973 y 1977] así como a caracteres cariológicos [BONNET, 1958, 1961a, 1961b y 1967; ELENA ROSELLÓ, 1976, 1980 y 1981; FERNANDEZ CASAS & LEAL, 1977; JALAS & KALEVA, 1967; JALAS & POHJO, 1965a y 1965b; JALAS & UOTILA 1966; KALEVA, 1969; MORALES, 1979 y 1986a; SIBILIO, 1961; WIDÉN et al., 1977], que contribuyen a aclarar algunas de las dudas.

## II-2.- DESCRIPCIÓN DE LAS ESPECIES ESTUDIADAS.

A continuación se describen los táxones estudiados en la presente memoria agrupados en secciones [BOISSIER, 1839; HUGUET DEL VILLAR, 1934; JALAS, 1972; MORALES, 1985 y 1986b; PEREIRA COUTINHO, 1939; RIGUAL, 1972; RIVAS-MARTÍNEZ, 1978; VICIOSO, 1974; WILLKOMM, 1868].

### 1.- SECCIÓN PSEUDOTHYMBRA BENTHAM.

***Thymus longiflorus* Boiss. (1838) (= *T. longiflorus* Boiss. subsp. *longiflorus*).**

Mata cano-pubescente, de 10-30 cm, con tallos erectos, leñosos en su parte inferior, que forma densos céspedes rojizos. Hojas lineares-lanceoladas o lineares, las superiores místicas, sésiles o cortamente pecioladas, de margen revuelto, algo ciliadas en la base, punteado-glandulosas. Entrenudos superiores del tallo iguales o mayores que las hojas. Brácteas coriáceas anchas, aovado-acuminadas, fuertemente nerviadas, purpúreas o verdes. Flores dispuestas en grandes capítulos cortamente pediceladas (fotografía II-1). Cáliz de 5-7 mm, glabrescente al exterior, poco glanduloso; dientes superiores estrechamente lanceolados. Corola 3 veces más larga que el cáliz, purpúrea, con el labio superior cortamente bífido y el inferior trilobado, siendo los lóbulos casi iguales; tubo cilíndrico y anteras rojas. Estilos bífidos, generalmente muy salientes. Endemismo bético-oriental basífilo.

***Thymus moroderi* Pau ex Martínez (1934) (= *T. longiflorus* Boiss. subsp. *ciliatus* (Sandwith ex Lacaíta) Rivas-Martínez).**

Taxon parecido a *T. longiflorus* Boiss. Difiere de éste, principalmente, por tener: hojas caulinares superiores mucronuladas y entrenudos superiores del tallo menores que las hojas; brácteas largamente aguzado-aristadas, ciliadas en el borde y de venación obsoleta (fotografía II-2); y corola algo menor (6-9 mm). Endemismo alicantino basífilo.

**Thymus membranaceus** Boiss. (1838).

Mata de 10-40 cm, ramosa, erecta o desparramada. Hojas cortamente pecioladas, lanceolado-lineares, de margen más o menos revoluta y escasamente ciliado; punteado-glandulosas. Capítulos grandes, laxos; brácteas membranáceas, blanquecinas, lampiñas o algo pestañosas en el borde, de nerviación más o menos marcada, las exteriores elípticas y muy agudas y las interiores lanceolado-lineares apenas ocultando los cálizos. Corola blanca, tres veces más larga que el cáliz, con el labio superior cortamente bífido y el inferior con tres lóbulos redondeados (fotografía II-3). Estambres y pistilo muy salientes. Endemismo alicantino-murciano-almeriense basífilo y gipsícola.

**Thymus membranaceus** Boiss. x **Thymus moroderi** Pau ex Martínez.

Se caracteriza por poseer flores de color rosa pálido o blanquecinas, y brácteas florales de moradas a verde-blanquecinas con nerviación morada; brácteas internas ciliadas en el borde y las externas lampiñas. Endemismo murciano-almeriense.

**Thymus funkii** Coss. (1851) (= **T. longiflorus** Boiss. subsp. **funkii** (Cosson) Rivas-Martínez.

Pequeña mata de unos 15 cm, muy ramosa, canescente, con los tallos desparramados. Hojas caulinares sésiles, lineares, agudas, de margen más o menos revoluta llegando en ocasiones a ser cilíndricas, cano-pubescentes, punteado-glandulosas, algo ciliadas en la base. Brácteas estrechamente oblongas, planas o revolutas, más cortas que el cáliz (fotografía II-4). Verticilastros paucifloros. Cáliz cortamente pedicelado, algo hirsuto al exterior, con los dientes del labio superior muy agudos y los del labio inferior alesnados. Corola purpúrea, casi tres veces más larga que al cáliz, de tubo arqueado, convexo dorsalmente; labios pequeños, el superior remellado y el inferior trilobado. Endemismo murciano-mancheño basífilo.



FOTOGRAFÍA II-1: *T. longiflorus*  
Boiss.



FOTOGRAFÍA II-2: *T. moroderi* Pau  
ex Martínez.



FOTOGRAFÍA II-3: *T. membranaceus*  
Boiss.



FOTOGRAFÍA II-4: *T. funkii* Coss.



2.- SECCIÓN THYMUS (SECT. VULGARE VELEN., SECT. ZYGIS WILLK.).

**Thymus capitellatus** Hoffmanns. & Link (1829).

Plantas erguidas de 20-40 cm; ramas leñosas con grupos de hojas axilares. Hojas pecioladas, oval-lanceoladas y tomentosas; márgenes revolutos no ciliados (figura II-1). Flores en cimas pedunculadas de 6-8 mm de diámetro. Brácteas anchamente ovadas y verdosas. Cáliz de 3-4 mm, campanulado; dientes superiores tan largos como anchos, no ciliados. Corola blanquecina. Endemismo de las regiones de los estuarios de los ríos Tajo y Sado (Portugal).

**Thymus camphoratus** Hoffmanns. & Link (1809).

Especie parecida a **T. capitellatus**, distinguiéndose de ésta principalmente por poseer: inflorescencia terminal de 10-18 mm de diámetro, brácteas tomentosas, a menudo purpúreas, y cáliz de 4-6 mm, con los dientes superiores triangular-subulados, generalmente ciliados (fotografía II-5). Endemismo de la zona costera del Sureste de Portugal.

**Thymus vulgaris** L. (1753) (**T. vulgaris** L. subsp. **vulgaris**).

Mata derecha o ascendente, de 7-30 cm, muy ramosa, con las ramas floríferas pubescentes o tomentosas (fotografía II-6). Hojas lineares o elípticas, obtusas, subpecioladas o claramente pecioladas y cano-tomentosas; margen revuelto no ciliado. Brácteas algo más anchas que las hojas, aovado-lanceoladas. Inflorescencias densas o algo laxas, oblongas o capituliformes; pedicelos cortos. Cáliz pubescente o lampiño, de tubo campanulado; dientes superiores tan largos como anchos, no ciliados. Corola poco más larga que el cáliz, rosada o blanquecina. Especie muy polimorfa. Europa mediterránea occidental.

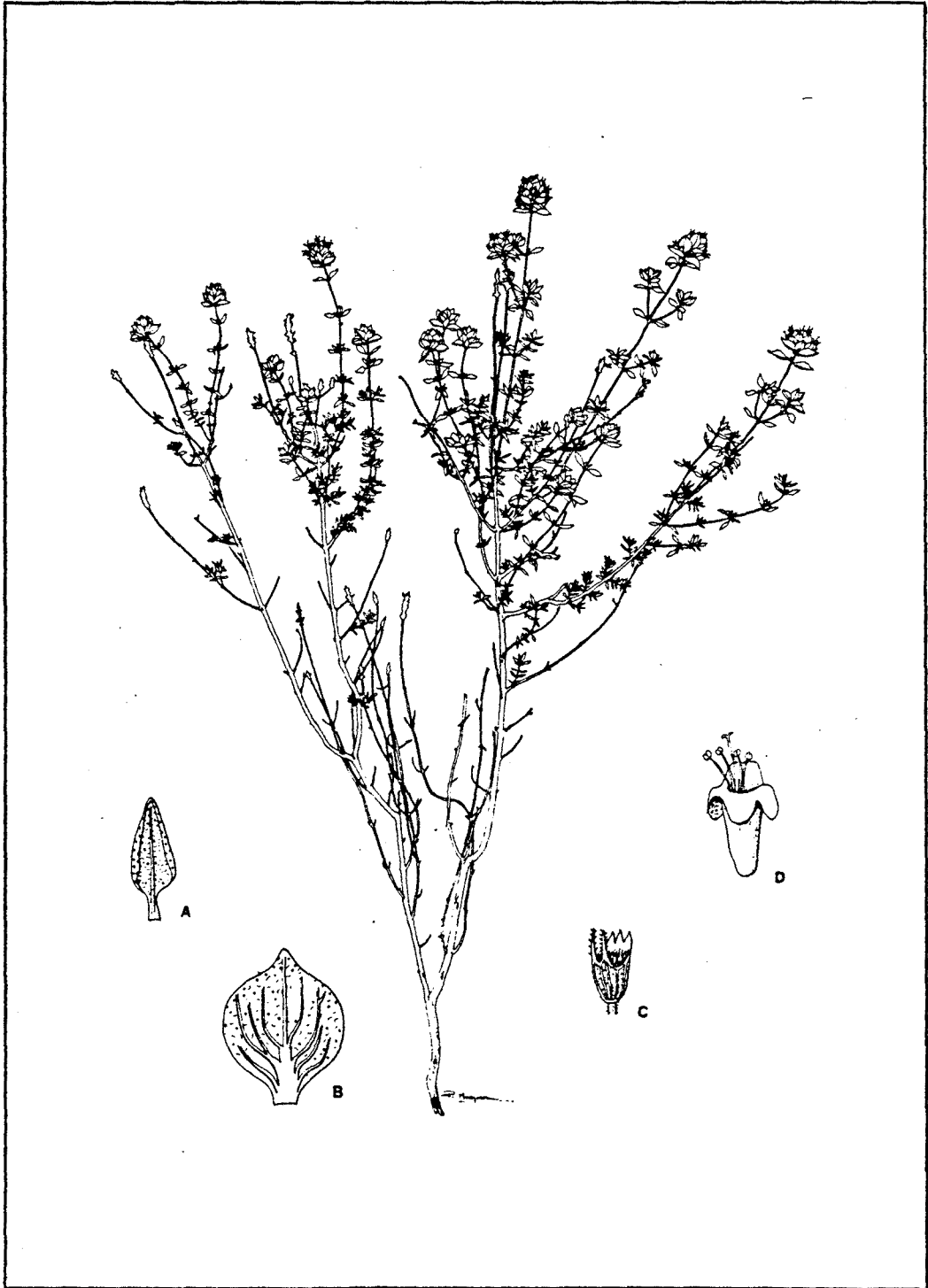


FIGURA II-1: *Thymus capitellatus*. A: hoja. B: bráctea. C: cáliz. D: corola.



FOTOGRAFÍA II-5: *T. camphoratus*  
Hoffmanns. & Link.



FOTOGRAFÍA II-6: *T. vulgaris* L.



FOTOGRAFÍA II-7: *T. aestivus* Reut ex Willk.





**Thymus aestivus** Reut. ex Willk. (1868) (= *T. vulgaris* L. subsp. *aestivus* Reut.).

Planta muy parecida a *T. vulgaris*, generalmente de mayor altura y de porte irregular. Hojas obtusas muy verdes por el haz y blanco-tomentosas por el envés, donde resalta el nervio medio. Brácteas iguales a las hojas caulinares (fotografía II-7). Verticilastros paucifloros, formando racimos cortos y flojos que pueden componer panículas piramidales en los extremos de los ramos. Flores pedunculadas. Cáliz algo hinchado, con los tres dientes superiores agudos y, a menudo, purpurescentes. Anteras moradas. Endemismo de la región levantina.

**Thymus glandulosus** Lag. ex H. del Villar (1934).

Matas leñosas y ramosas con largos entrenudos. Hojas de 8-10 mm, espatulado-lanceoladas, con glándulas de esencia de color rojizo; margen revoluto y ciliadas en la base. Inflorescencias capitadas, densas o laxas; hojas florales algo más anchas que las caulinares. Cáliz hirsuto, muy coloreado, con los dientes inferiores ciliados. Corola de purpúrea-violácea a blanca (fotografía II-8). Florece en primavera, a diferencia de *T. hyemalis*, taxon muy parecido a *T. glandulosus*, que florece en invierno. Sureste de España y Norte de África.

**Thymus baeticus** Boiss. ex Lacaíta (1930)

Planta leñosa con tallos arcuados a erectos (fotografía II-9), con indumento largo y grueso. Hojas sésiles, linear-lanceoladas, subobtusas, pubescentes, ciliadas en la base. Brácteas de hasta 3 mm de ancho, de forma variable. Inflorescencia capituliforme, a veces ramificada. Cáliz pubescente a hirsuto, con los labios tan largos como el tubo; dientes superiores generalmente lanceolados. Corola blanquecina, claramente más larga que el cáliz. Endemismo del Sur y Sureste de España.

**Thymus orospedanus** H. del Villar (1934).

Pequeña mata con ramas floríferas pubescentes. Hojas muy estrechas y puntiagudas, punteado-glandulosas, ciliadas en la base; las inferiores cortas y revolutas, las superiores más largas y planas. Hojas florales lanceoladas, subplanas. Inflorescencias capitadas más o menos laxas; verticilastros paucifloros. Cáliz a veces coloreado o totalmente verde; dientes inferiores relativamente largos trinervados en la base. Corola rojo-púrpura. Sierras y tierras altas de las provincias de Albacete, Jaen y Granada.

**3.- SECCIÓN SERPYLLUM (MILLER) BENTHAM.**

**Thymus willkomii** Ronniger (1930).

Planta leñosa en la base, con escasas ramas, largas, arcuadas a procumbentes, o rastreras (fotografía II-10). Tallos florales de 2-5 cm, pubescentes. Hojas ovadas a ovado-elípticas, glabras y no ciliadas en la base; venas laterales poco visibles. Flores en inflorescencias no definidas; verticilastros con 2-6 flores; cimas a veces pedunculadas. Brácteas similares a las hojas. Cáliz algo hirsuto, de 4-5 mm, con el tubo subcilíndrico, aproximadamente tan largo como los labios; dientes superiores lanceolados, no ciliados. Corola rosada o blanquecina, de 6-7 mm. Endemismo del Noreste de la Península Ibérica.



FOTOGRAFÍA II-8: *T. glandulosus* Lag. ex H. del Villar.



FOTOGRAFÍA II-9: *T. baeticus* Boiss. ex Lacaita.

FOTOGRAFÍA II-10: *T. willkomii* Ronniger.



## Capítulo III

### OBTENCIÓN DE MATERIAL

1. *Recolección, identificación y acondicionamiento del material.*
2. *Material objeto de estudio en la presente memoria.*



### III.1.- RECOLECCIÓN , IDENTIFICACIÓN Y ACONDICIONAMIENTO DEL MATERIAL

El material investigado ha sido recolectado en el campo, personalmente en la mayoría de casos. Para ello, se han efectuado varias campañas de recolección en primavera de 1983, 1984, 1985 y 1986, época en que florecen la mayoría de tomillos.

Se recolectó al azar parte aérea de las plantas en floración de cada población estudiada. Para la investigación de los aceites esenciales, se recolectaron además, en algunos casos, individuos aislados de dicha población.

La clasificación del material recolectado ha sido realizada en nuestro laboratorio y, en el caso de los táxones más conflictivos, la identificación ha sido efectuada por botánicos concedores de la zona donde se llevó a cabo la recolección. Un pliego testigo de cada muestra ha sido incluido en el herbario BCF del Departamento de Botánica de la Facultad de Farmacia de Barcelona.

El material recolectado ha sido desecado al aire, protegido de la acción directa de la luz. En las campañas de más de dos días de duración fue depositado, con este fin, en centros universitarios, del C.S.I.C. o industrias que, posteriormente, una vez seco, lo enviaron a nuestro laboratorio.

De las muestras ya desecadas, destinadas al estudio de los flavonoides, se separaron las hojas, órgano investigado, y se trituraron hasta un tamaño adecuado para la extracción.

### III.2.- MATERIAL OBJETO DE ESTUDIO EN LA PRESENTE MEMORIA.

En la tabla III.1 se muestra una relación de los táxones investigados en el presente trabajo, indicando el lugar y la fecha de recolección, el número de registro del pliego de herbario correspondiente, así como el tipo de compuestos estudiado en cada uno de ellos.



En el mapa de la figura III.1 se indican las localidades donde fueron recolectados los diversos táxones de *Thymus*.

MUESTRA Nº	REF.	NOMBRE CIENTÍFICO	LUGAR Y FECHA DE RECOLECCIÓN	REGISTRO HERBARIO	COMPUESTOS QUE SE INVESTIGAN
Sección <i>Pseudothymra</i> Bentham					
1	T-39	<i>T. longiflorus</i> Boiss.	Ctra. Orjiva-Vélez de Benaudalla (GR), 16-06-1984.	BCF 31503	P.
2	T-16	<i>T. moroderi</i> Pau ex Martínez.	El Boquerón, Jumilla (MU), 01-06-1983.	BCF 31498	P.
3	T-17	<i>T. moroderi</i> Pau ex Martínez.	Xixona (400 m.s.m.) (A), 12-06-1984 y 27-05-1985.	BCF 31500	P., A.E.
4	T-54	<i>T. membranaceus</i> Boiss.	Baños de Fortuna (MU), 29-05-1985.	BCF 33105	P., A.E.
5	T-60	<i>T. membranaceus</i> Boiss. x <i>T. moroderi</i> Pau ex Martínez.	Ctra. Fortuna-Pinoso, Km 4 (MU), 29-05-1985.	---	A.E.
6	T-13	<i>T. funkii</i> Coss.	Ctra. Murcia-Hellín (AB), 01-06-1983 y 28-05-1985.	BCF 33587	P., A.E.
Sección <i>Thymus</i> (Sect. <i>Vulgare</i> Velen., Sect. <i>Zygis</i> Willk.)					
7	T-57	<i>T. capitellatus</i> Hoffmanns. & Link.	Seixal (Estremadura, Portugal) 07-1983.	BCF 31506	P.
8	T-46	<i>T. camphoratus</i> Hoffmanns. & Link.	Cabo S. Vicente (Algarve, Portugal), 22-06-1984.	BCF 31502	P., A.E.
9	T-1	<i>T. vulgaris</i> L.	Alcañiz (TE), 07-06-1983	BCF 33582	P.
10	T-52	<i>T. aestivus</i> Reut. ex Willk.	Atzuba (V), 24-09-1983 y 27-05-1985.	BCF 33586	P., A.E.
11	T-33	<i>T. glandulosus</i> Lag. ex H. del Villar.	Ctra. Cartagena-Mazarrón, Los Marfagones (MU), 14-06-1984.	BCF 33585	P., A.E.
12	T-48	<i>T. baeticus</i> Boiss. ex Lacaíta.	Ctra. Adra-La Parra (AL), 30-05-1985.	BCF 33583	P., A.E.
13	T-36	<i>T. orospedanus</i> H. del Villar.	Sierra de Alfacar (GR), 15-06-1984.	BCF 33584	P.
Sección <i>Serpyllum</i> (Miller) Bentham					
14	T-63	<i>T. willkomii</i> Ronniger.	Monte Caro (T), 06-06-1986.	BCF 33588	P., A.E.

TABLA III-1: Táxones estudiados en la presente memoria. En la columna contigua al nº de muestra se indica la referencia de control para nuestro trabajo de laboratorio. P=Polifenoles. A.E.= Componentes del aceite esencial.

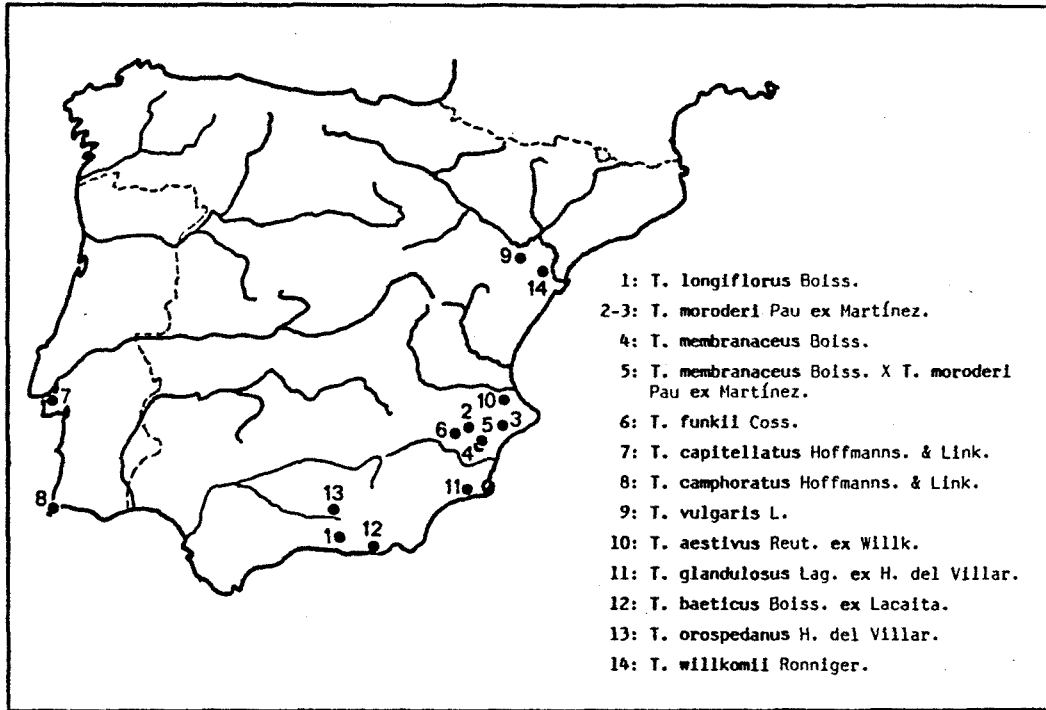


FIGURA III-1: Localidades de recolección del material estudiado.



## Capítulo IV

### INVESTIGACION DE LA COMPOSICION POLIFENOLICA

1. Metodología experimental.
2. Flavonoides de *Thymus moroderi* Pau ex Martínez.
3. Estudio comparativo de la composición polifenólica de especies de *Thymus* L.



## IV.1.- METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.

### IV.1.1.- INTRODUCCIÓN.

Los flavonoides constituyen uno de los grupos más amplios de fenoles naturales, encontrándose ampliamente extendidos entre las plantas verdes. Aproximadamente, un 2% del carbono fotosintetizado por las plantas es convertido en flavonoides o compuestos estrechamente relacionados. Se encuentran prácticamente en todos los órganos del vegetal: hojas, corteza, flores, frutos, etc.... Aunque se han encontrado, también, flavonoides en animales (en alas de lepidópteros, por ejemplo) se considera que se originan en las plantas a partir de las cuales se alimentan los animales, y no que sean biosintetizados *in situ* [HARBORNE, 1967a].

Los aglicones flavónicos pueden presentar diversos tipos de estructuras. Todos ellos contienen 15 átomos de carbono en su núcleo básico dispuestos en una configuración  $C_6-C_3-C_6$ , es decir, dos anillos aromáticos unidos por una cadena de tres carbonos, que puede o no formar un tercer anillo. En la tabla IV-1 se muestran los principales tipos de aglicones flavónicos.

Estrechamente relacionados, tanto estructural como biogénicamente, con los flavonoides e isoflavonoides, se encuentran los neoflavonoides [DONNELLY, 1975 y 1985], de limitada distribución taxonómica entre las plantas superiores.

Todas estas estructuras se encuentran relacionadas por un camino biosintético común (figura IV-1), que incorpora precursores tanto de la vía del ácido shikímico como de la ruta de los policétidos [EBEL & HAHLBROCK, 1982; GRISEBACH, 1985a y 1985b; HAHLBROCK & GRISEBACH, 1975].

El primer flavonoide se forma inmediatamente después de la confluencia de los dos caminos y parece ser que se trata de la chalcona. A partir de ella derivan las demás estructuras por distintas vías.

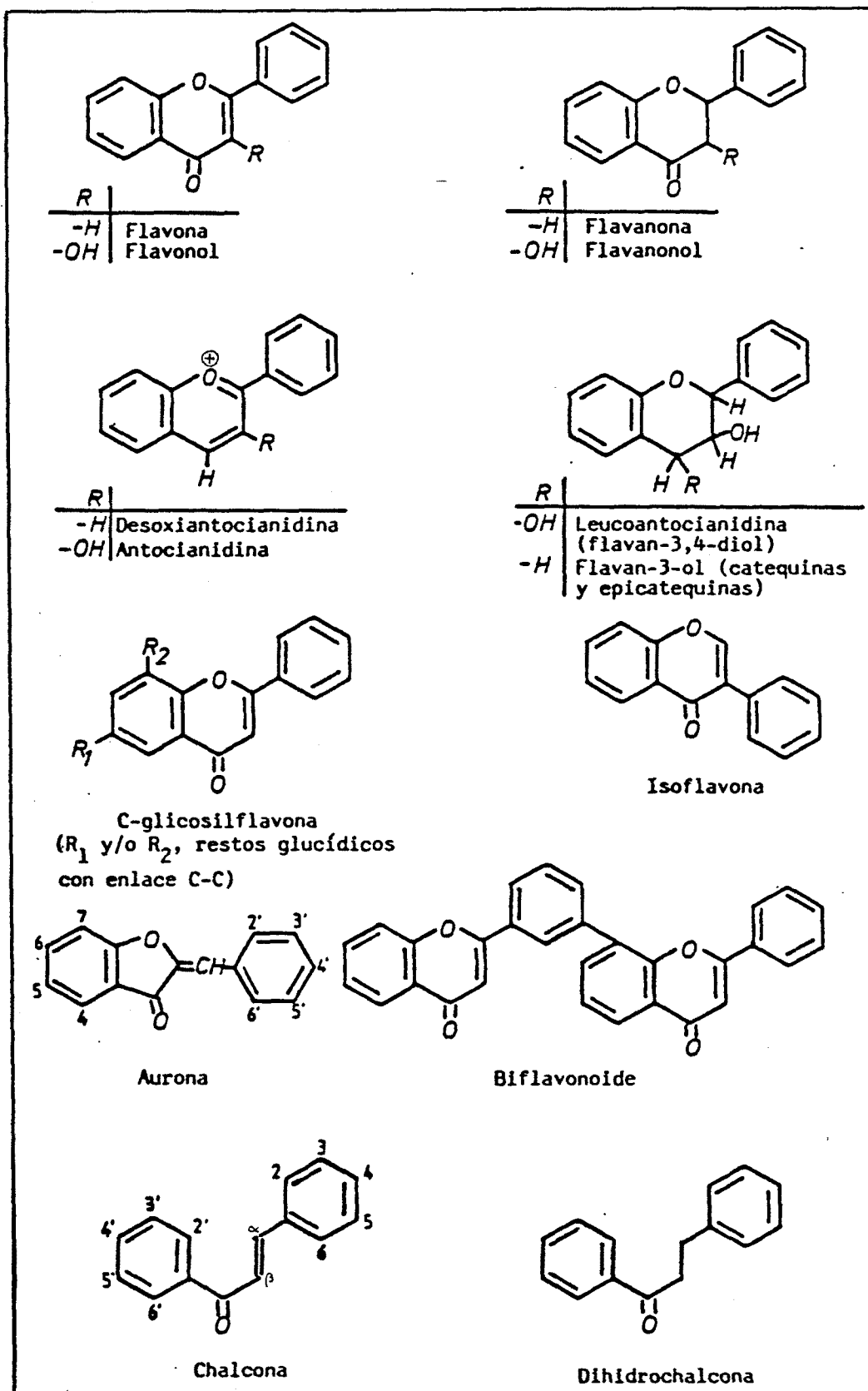


TABLA IV-1: Estructura de las principales clases de derivados flavónicos.

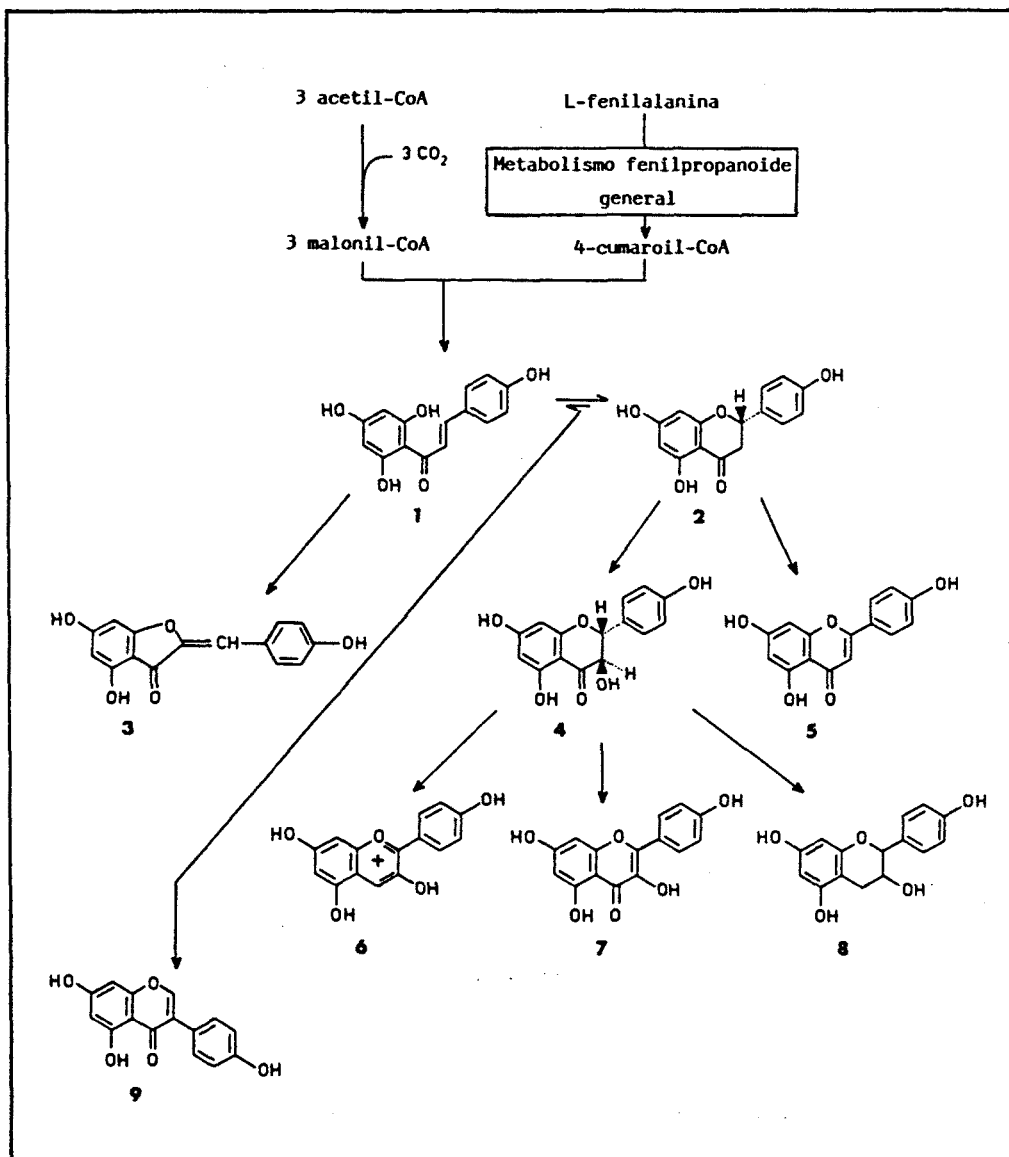


FIGURA IV-1: Relaciones biogénicas entre distintos flavonoides.  
 1: chalcona; 2: flavanona; 3: aurona; 4: dihidroflavonol; 5: flavona; 6: antocianidina; 7: flavonol; 8: catequina; 9: isoflavona.

Durante el proceso biosintético pueden tener lugar, a distintos niveles, reacciones de adición o pérdida de grupos hidroxilo, metilación o isoprenilación, dimerización, formación de bisulfatos y, lo que es más importante, glicosilación de grupos



hidroxilo o del núcleo flavónico, que conducen a infinidad de estructuras (en la actualidad se conocen unos dos mil flavonoides) recopiladas en varias revisiones [HARBORNE & MABRY, 1982; HARBORNE *et al.*, 1975; WOLLENWEBER, 1985a; WOLLENWEBER & DIETZ, 1981].

En los vegetales, los flavonoides pueden encontrarse en forma de aglicón (libres) o, más frecuentemente, en forma de heterósido, ya sea O-heterósidos [HARBORNE & WILLIAMS, 1975 y 1982] en los que uno o más de los hidroxilos fenólicos está unido a azúcar/es por medio de un enlace tipo hemiacetal que es hidrolizado por los ácidos, o C-heterósidos [CHOPIN, 1971; CHOPIN & BOUILLANT, 1975; CHOPIN *et al.*, 1982; FRANZ & GRUN, 1983; WAGNER, 1966] en los que los azúcares se encuentran directamente unidos a la molécula de flavonoide por medio de un enlace C-C resistente a los ácidos.

Aunque cualquier posición del flavonoide es susceptible de ser glicosilada, algunas tienen mayor probabilidad que otras, así: -OH en posición 7 de flavonas, isoflavonas y flavanonas, -OH en 3 y en 7 de flavonoles y dihidroflavonoles, y C de las posiciones 6 y/u 8 en los C-heterósidos.

En cuanto a los azúcares, podemos encontrar tanto hexosas como pentosas y ácidos urónicos (tabla IV-2), siendo el más común la glucosa.

PENTOSAS	HEXOSAS	ÁCIDOS URÓNICOS
D-apiosa	D-allosa	Ác. glucurónico
L-arabinosa	D-galactosa	Ác. galacturónico
L-ramnosa	D-glucosa	
D-xilosa	D-manosa	

TABLA IV-2: Monosacáridos de los heterósidos flavónicos [HARBORNE & WILLIAMS, 1982].

La glicosilación, así como la metilación, tiene lugar en los últimos estadios de la biosíntesis y es catalizada por enzimas de alta especificidad.

A menudo, los heterósidos pueden presentar radicales acilo unidos a uno o más grupos hidroxilo de los azúcares por un enlace de tipo éster [HERRMANN, 1978]. Más raramente, se encuentran radicales acilo unidos al aglicón flavónico [WOLLENWEBER, 1985a]. Entre los substituyentes acilo se encuentran ácidos alifáticos (ácido acético, ácido malónico, ácido succínico), así como ácidos aromáticos (ácido benzoico, ácido gálico, ácido p-cumárico, ácido caféico, ácido fenílico) [AGUINAGALDE & PERO MARTÍNEZ, 1982; ANHUT et al., 1984; HARBORNE, 1986; WOLLENWEBER et al., 1978].

La glicosilación tiene por objeto hacer que la molécula de flavonoide sea menos reactiva y más soluble en el agua. Precisamente esta última propiedad permite que sean almacenados en las vacuolas celulares, donde suelen encontrarse [HRAZDINA & WAGNER, 1985].

Por lo que se refiere al papel que desempeñan los flavonoides y, en general, los compuestos fenólicos en el vegetal, no está completamente establecido. Es indiscutible su función pigmentaria, gracias a la cual atraen a zoopolinizadores y zoodispersores [HARBORNE, 1985a]. Se les atribuyen, además, efectos antioxidantes, antimutagénicos y sobre la regulación del crecimiento y la resistencia a las enfermedades vegetales [HARBORNE, 1985b; McCLURE, 1975].

Es significativo el creciente interés de los flavonoides en el campo de la farmacología debido a sus acciones antihemorrágica, antialérgica, antiinflamatoria, antihepatotóxica, colerética, colagoga, antiviral, antibacteriana, antifúngica, espasmolítica, estrogénica y anticancerígena [ADZET, 1986; CAMARASA, 1984; MIDDLETON, 1984; SCHIMMER, 1986; WAGNER, 1985].

Por otra parte cabe destacar la importancia de los flavonoides en quimiotaxonomía y en el establecimiento de líneas

filogenéticas [IGLESIAS, 1986].

Por su variabilidad estructural, estabilidad fisiológica, amplia distribución en el reino vegetal y fácil detección, los flavonoides constituyen uno de los grupos de polifenoles de mayor interés quimiotaxonómico [HARBORNE, 1966] como lo demuestran numerosas investigaciones realizadas en este sentido [HARBORNE, 1967b y 1969; HARBORNE & WILLIAMS, 1971; HUSAIN & MARKHAM, 1981; MARKHAM & PORTER, 1979; WOLLENWEBER, 1985b; WOLLENWEBER & DIETZ, 1981].

La distribución más o menos restringida de tipos concretos de flavonoides o de patrones de substitución en grupos sistemáticos determinados permite su aplicación quimiotaxonómica [HARBORNE, 1975; HARBORNE & TURNER, 1984] y posiblemente filogenética [SWAIN, 1975]. Esta última se basa en aceptar el hecho de que las plantas capaces de sintetizar estructuras situadas en lugares más avanzados de las rutas biogénicas dispondrán de una dotación enzimática superior y más compleja. En general, la evolución conlleva un aumento del número de tipos de flavonoide presentes en cada grupo sistemático, a la vez que aumenta la complejidad estructural de los mismos.

HARBORNE (1967a), aceptando que la evolución de los caracteres químicos mantiene correlación con los morfológicos, clasifica el grado evolutivo de las diversas clases de flavonoides y algunos de sus caracteres estructurales, tal como se indica en la tabla IV-3.

<p>a) Caracteres primitivos.</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1.- 3-deoxiantocianidinas.</li> <li>2.- Flavonoles.</li> <li>3.- Leucoantocianidinas.</li> <li>4.- Chalconas, flavanonas y dihidrochalconas.</li> <li>5.- C-sustitución (C-metilación, C-prenilación, C-glicosilación, formación de biflavonoides).</li> </ol> <p>b) Caracteres avanzados.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Ganancia de mutaciones. <ol style="list-style-type: none"> <li>1.- O-glicosilación compleja (incluyendo la acilación de azúcares).</li> <li>2.- 6- y 8-hidroxilación.</li> <li>3.- Hidroxilación del anillo B en 2'.</li> <li>4.- O-metilación.</li> <li>5.- Oxidación de chalconas a auronas.</li> <li>6.- Trihidroxilación del anillo B de las antocianidinas (en las flores).</li> </ol> </li> <li>- Pérdida de mutaciones. <ol style="list-style-type: none"> <li>1.- Sustitución de flavonoles por flavonas.</li> <li>2.- Eliminación de leucoantocianidinas.</li> <li>3.- Eliminación de la trihidroxilación del anillo B de flavonoles (en hojas).</li> </ol> </li> </ul> <p>c) Caracteres aislados.</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1.- Sustitución de antocianidinas por betacianinas.</li> <li>2.- Formación de isoflavonas.</li> <li>3.- Eliminación del 5-OH.</li> </ol>
---

TABLA IV-3: Grado evolutivo de los caracteres flavónicos.

#### IV.1.2.- EXTRACCIÓN.

Los disolventes empleados en la extracción se escogen atendiendo a la polaridad de los flavonoides que se van a estudiar.

Así pues, los flavonoides que poseen grupos hidroxilo libres o azúcares son polares y, en general, son solubles en disolventes como etanol, metanol, acetato de etilo, butanol, acetona y agua, entre otros. La presencia de azúcares en la molécula hace que ésta sea más soluble en agua y, por ello, en el caso de los heterósidos son más adecuadas combinaciones de los solventes mencionados con agua.

Los aglicones menos polares (isoflavonas, flavanonas y

flavonas y flavonoles muy metilados) son más solubles en disolventes orgánicos apolares como el éter etílico y el cloroformo.

La extracción del material vegetal suele efectuarse con disolventes de polaridad creciente siguiendo una secuencia del tipo: éter de petróleo, cloroformo, metanol y metanol:agua (1:1).

Los extractos obtenidos con éter de petróleo y cloroformo contienen los aglicones más apolares, mientras que los extractos metanólico e hidrometanólico contienen los aglicones más polares y los heterósidos. Estos últimos extractos reunidos pueden fraccionarse, a su vez, con cloroformo, éter etílico, acetato de etilo y butanol. De esta forma, los heterósidos se encuentran en los extractos "acetato de etilo" y butanólico, y los aglicones en los extractos etéreo y clorofórmico.

Con el fin de eliminar sustancias ácidas (principalmente, ácidos fenoles) que podrían interferir en el análisis cromatográfico de los extractos, éstos se someten a un tratamiento con  $\text{NaHCO}_3$  0,5M.

#### IV.1.3.- TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS ANALÍTICAS.

##### A) Introducción.

En la actualidad se dispone de gran variedad de técnicas cromatográficas analíticas de elevada eficacia y resolución que permiten el análisis cualitativo y cuantitativo de extractos vegetales. Entre las más utilizadas en el campo de los polifenoles se encuentran [HARBORNE, 1985c]: la **cromatografía en papel** (excelente para screening de extractos crudos), la **cromatografía en capa fina** (útil para detección y para monitorización de separaciones; más flexible que la cromatografía en papel), la **cromatografía en fase gaseosa** (principalmente aplicada a los fenoles más volátiles que no requieren derivatización), la **cromatografía líquida de alta**

**resolución** (excelente para cuantificación en una columna analítica tipo  $C_8$  o  $C_{18}$ ) y la **electroforesis en papel** (para detección de conjugados como sulfatos, malonatos, etc...).

La más importante es la cromatografía líquida de alta resolución, que permite obtener gran cantidad de información; sin embargo, resulta más cara que otras técnicas cromatográficas por lo que se utiliza más como complemento de éstas.

En la presente investigación hemos empleado como técnicas analíticas la cromatografía en capa fina y la cromatografía líquida de alta resolución.

#### B) Cromatografía en capa fina.

La cromatografía en capa fina analítica presenta diversas ventajas sobre otros métodos cromatográficos [TREIBER, 1986], entre las cuales destacan la simplicidad del equipo instrumental, bajo coste, tiempo relativamente corto para la obtención de los resultados a partir de pequeñas cantidades de muestra y posibilidad de utilizar gran variedad de eluyentes y fases estacionarias.

En el campo de los flavonoides, resulta una técnica especialmente útil para su detección y separación a partir de extractos brutos, a la vez que puede permitir su cuantificación [SCHMID, 1978].

En nuestro caso, hemos utilizado la cromatografía en capa fina para:

- Investigación de posibles eluyentes a emplear en cromatografía en columna.
- Análisis de las fracciones obtenidas en cromatografía en columna.
- Seguimiento de las reacciones de hidrólisis en la identificación de heterósidos.
- Identificación de los flavonoides aislados.
- Análisis de los extractos, previos al aislamiento de sus componentes o en estudios comparativos entre diversas especies.

En la tabla IV-4 se indican los sistemas de eluyentes utilizados en el presente trabajo para el análisis de flavonoides.

<u>FASE ESTACIONARIA</u>	<u>ELUYENTE</u>	<u>APLICACIÓN</u>
Celulosa	H <sub>2</sub> O	Heterósidos.
	AcOH 15% aq.	Heterósidos, flavanonas y dihidroflavonoles.
	AcOH 30% aq.	Heterósidos y aglicones más apolares.
	AcOH 50% aq.	Aglicones.
Silicagel	CHCl <sub>3</sub> :MeOH:H <sub>2</sub> O (65:45:12)	Heterósidos.
	AcOEt:MeCOEt:AcOH:H <sub>2</sub> O (5:3:1:1)	Heterósidos.
	AcOEt:HCOOH:AcOH:H <sub>2</sub> O (100:11:11:27)	Heterósidos.
	Mezclas de cloroformo y metanol.	Aglicones.
	Mezclas de cloroformo, hexano y metanol.	Aglicones.
	Benceno:Dioxano:AcOH (90:25:4)	Aglicones.
	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :AcOH:H <sub>2</sub> O (*) (2:1:1) Fase inferior	Aglicones.

TABLA IV-4: Principales eluyentes utilizados en el análisis de flavonoides por cromatografía en capa fina. (\*): [SCHMIDTLEIN & HERRMANN, 1976].

Las fases estacionarias han sido:

- Celulosa Macheray & Nagel (MN 300) para cromatografía en capa fina en placas preparadas por nosotros.

- Silicagel 60F<sub>254</sub> en comatofolios (Merck 5554).
- Poliamida DC-6 Macheray & Nagel en placas preparadas por nosotros para la investigación de eluyentes para cromatografía en columna.

El empleo de la poliamida DC-11 como fase estacionaria adicionada de un 15% de celulosa MN-300 permite obtener buenas separaciones de aglicones flavónicos apolares [WOLLENWEBER, 1982a y 1982b]. Sin embargo, este tipo de poliamida ya no se comercializa y sólo se encuentra en el mercado en forma de placas preparadas.

Recientemente, con el fin de mejorar la separación de los compuestos por cromatografía en capa fina, se ha propuesto un método de optimización de la fase móvil llamado "PRISMA" [NYIREDY et al., 1985a], aplicado con anterioridad a la cromatografía líquida de alta resolución [NYIREDY et al., 1985b], que permite acceder, tras varios pasos, a un sistema de eluyentes que proporciona la máxima resolución.

Al igual que otras técnicas cromatográficas, la cromatografía en capa fina está en continuo desarrollo y ofrece nuevas posibilidades en la analítica de flavonoides. Así: la cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC) en fase normal [HIERMANN & KARTNIG, 1977; VANHAELEN & VANHAELEN-FASTRÉ, 1980] y en fase reversa [BECKER et al., 1979; HIERRMANN, 1979], y la cromatografía en capa fina a alta presión (OPTLC) [DALLENBACH-TOLKE et al., 1986] ampliamente descrita por TIYAK et al. (1979) y WITKIEWICZ & BLADEK (1986).

#### **Revelado de los cromatogramas.**

La mayoría de flavonoides no son visibles a la luz natural por lo que para su detección es necesario observar las placas a la luz ultravioleta (360 nm) y utilizar reveladores que permitan tanto aumentar el nivel de detección como obtener información sobre el tipo y estructura del flavonoide [MARKHAM, 1975 y 1982].

Se utilizan, principalmente, dos tipos de reveladores:



- Ionizantes: El más importante es el amoníaco, aplicado en forma de vapores; la observación se realiza a la luz visible y ultravioleta (366 nm); se utiliza sólo en cromatografía en capa fina de celulosa y en cromatografía en papel.
- Quelantes: Se utiliza el  $\text{AlCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$  al 6% en MeOH y el reactivo de Neu o Naturstoffreagenz A (éster del ácido difenilbórico y la etanolamina) al 1% en MeOH. Este último, proporciona mucha información estructural, viendo aumentada su especificidad y sensibilidad al utilizarlo junto con PEG 400 [BRASSEUR & ANGENOT, 1986]. Observación a la luz visible o ultravioleta de 366 nm.

La observación de las manchas en distintas condiciones (luz visible, UV366nm,  $\text{NH}_3$ /UV366nm,  $\text{AlCl}_3$ /UV366nm, etc...) proporciona información sobre la estructura del flavonoide. Así: 5-OH-flavonas y 5-OH-flavonoides substituidos en la posición 3 aparecen de color violáceo oscuro a la luz ultravioleta de 366 nm, mientras que los 5-OH-flavonoles con el 3-OH libre presentan fluorescencia amarilla. Los flavonoides que carecen del 5-OH suelen mostrar fluorescencia azul.

El  $\text{AlCl}_3$ , al igual que los vapores de amoníaco, revela la mayoría de 5-OH-flavonoides produciendo fluorescencia amarilla. En cambio, no revela las flavonas 5,6-dioxigenadas, principalmente si carecen de o-dihidroxisilos libres en el anillo B del flavonoide.

El reactivo de Neu confiere fluorescencia anaranjada a las 3',4'-dihidroxisilavonas y flavonoles, y amarillo-verdosa a los flavonoides 4'-hidroxilados.

#### **Relación entre $R_f$ y estructura.**

Según RIBEREAU-GAYON (1968), en el caso de los flavonoides, en cromatografía en papel y capa fina de celulosa la relación entre comportamiento cromatográfico y estructura en solventes acuosos ( $\text{AcOH}$ :

H<sub>2</sub>O, por ejemplo) y alcohólicos (BuOH:AcOH:H<sub>2</sub>O, por ejemplo) sería la siguiente:

- el aumento del número de hidroxilos disminuye el Rf tanto en solventes acuosos como alcohólicos.
- la metilación de grupos hidroxilo aumenta el Rf en ambos solventes.
- la acilación por un ácido cinámico aumenta los Rf en los dos tipos de solventes.
- la glicosilación disminuye el Rf en solventes alcohólicos y lo aumenta en los acuosos. El efecto es tanto mayor cuanto mayor es el número de azúcares unidos a la molécula.

### C) Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

La HPLC es uno de los métodos de elección para la separación de mezclas complejas de todo tipo de polifenoles.

El análisis de flavonoides por HPLC permite obtener excelentes resultados en poco tiempo y a partir de pequeñas cantidades de muestra, al mismo tiempo que proporciona una selectividad, resolución y sensibilidad superiores a las de las técnicas cromatográficas clásicas.

Desde que WARD & PELTER (1974) publicaron la primera aplicación de la HPLC al análisis de flavonoides, han sido muchos los trabajos realizados en este campo, destacando las revisiones de KINGSTON (1979), DAIGLE & CONKERTON (1983) y HOSTETTMANN & HOSTETTMAN (1982), entre otras.

Se ha utilizado, principalmente, como técnica analítica: en determinaciones cuantitativas [McMURROUGH & HENNIGAN, 1982; ROUSSEFF & TING, 1979], para verificar la pureza de sustancias aisladas y para realizar comparaciones quimiotaxonómicas [NIEMANN & KOERSELMANN-KOORY, 1977; TAMMA & MILLER, 1985; VAN SUMERE et al., 1985], aunque también es interesante su empleo como técnica preparativa o semi-preparativa [DUBOIS & ZOLL, 1982].

En la actualidad existe una gran variedad de fases estacionarias y eluyentes empleados en HPLC. En la analítica de flavonoides se han utilizado tanto columnas de fase normal (silicagel 60) como de fase reversa ( $C_8$  o  $C_{18}$ , sobre todo).

Las columnas de silicagel suelen emplearse en el caso de los flavonoides más apolares como flavonas polimetoxiladas [BIANCHINI & GAYDOU, 1980 y 1981], isoflavonas [CARLSON & DOLPHIN, 1980] y biflavonoides [BRIANÇON-SCHEID et al., 1983], eluyendo con mezclas de hexano:tetrahidrofurano, heptano:isopropanol, hexano:CHCl<sub>3</sub>:tetrahidrofurano, entre otras.

La mayoría de separaciones tiene lugar, no obstante, mediante el empleo de columnas de fase reversa y mezclas de agua:acetonitrilo, agua:metanol o agua:tetrahidrofurano adicionados de una pequeña cantidad de ácido (ác. acético, ác. fórmico o ác. fosfórico) como eluyentes, útiles tanto para el análisis de aglicones como de heterósidos [ADAMOVICS & STERMITZ, 1976; DAIGLE & CONKERTON, 1982; KAIZUKA & TAKAHASHI, 1983; NIEMANN & VAN BREDERODE, 1978; STRACK & KRAUSE, 1978; VANDE CASTEELE et al., 1982; WULF & NAGEL, 1976].

Como detectores suelen emplearse espectrofotómetros UV-visible de longitud de onda variable.

En general, para la separación de mezclas complejas se requiere una combinación de elución isocrática y elución con gradiente, como ha sido nuestro caso.

Según VANDE CASTEELE et al. (1982), en el caso de los flavonoides, la elución puede interpretarse considerando que son retenidos por la fase estacionaria gracias a una interacción hidrofóbica y, posteriormente, eluidos por la fase móvil según su capacidad de formar puentes de hidrógeno con ella. De tal manera que debe tenerse en cuenta la capacidad de formar puentes de hidrógeno o de contribuir a la interacción hidrofóbica de cada sustituyente del flavonoide. Así pues, en un grupo metoxilo, por ejemplo, el oxígeno es capaz de formar puentes de hidrógeno, mientras que el grupo metilo contribuye a la interacción hidrofóbica.

En un aglicón flavónico el grupo que tiene mayor capacidad de formar puentes de hidrógeno es el carbonilo en posición 4. Si en la posición 5 existe un grupo hidroxilo, se establece un fuerte puente de hidrógeno entre ambos, con lo cual el grupo carbonilo ya no puede interaccionar con el eluyente. Como consecuencia, el tiempo de retención (tr) de los 5-OH-flavonoides es mayor que el de aquellos flavonoides que carecen de 5-OH libre.

La capacidad de formar puentes de hidrógeno de los -OH en 3 es más débil y, en general, flavonas y flavonoles con igual patrón de sustitución suelen ser difíciles de separar. En cambio, en las flavanonas la introducción de un hidroxilo en 3 disminuye considerablemente el tr.

La introducción de -OH en posiciones distintas a la 3 y la 5 disminuye el tr, siempre que no exista otro -OH en posición orto, en cuyo caso la disminución es mucho menor.

La metilación de los grupos -OH, en general, retrasa la elución. Sin embargo, la adición de un grupo metoxilo al núcleo del flavonoide apenas tiene ningún efecto sobre el tr, a menos que se introduzca en la posición 4' del anillo B, en cuyo caso aumenta el tiempo de retención [BANKOVA et al., 1982].

Por otra parte, mientras que un incremento del número de metoxilos en el anillo A del flavonoide conduce a un aumento del tr, la introducción de varios metoxilos en el anillo B lo disminuye [DAIGLE & CONKERTON, 1982].

La presencia de azúcares en la molécula del flavonoide se traduce en una elución más rápida, siendo distinta según se trate de hexosas, pentosas o metilpentosas.

En nuestro caso, hemos observado que el orden en que eluyen las flavonas se mantiene en las flavanonas correspondientes, es decir: luteolina, apigenina, xantomicrool y genkwanina eluyen en el mismo orden que eriodictiol, naringenina, 5,4'-(OH)<sub>2</sub>-6,7,8-(OMe)<sub>3</sub>-flavanona y sakuranetina (ver apartado IV.3).

La HPLC permite no sólo identificar una sustancia por su tr, sino también combinándola con un detector de barrido de fotodiodos ("Photodiode Array Detector") obtener el espectro UV-visible de cada pico eluido [ALFREDSON & SHEEHAN, 1986; ALONSO SANPEDRO, 1986; JONES 1985a y 1985b; MILLER et al., 1982.]. Este detector presenta numerosas ventajas frente a los detectores UV-visible convencionales. Por una parte, permite efectuar la detección de un análisis cromatográfico a varias longitudes de onda simultáneamente, a partir de una sola inyección de la muestra problema. Por otra, obtiene automática y continuamente espectros UV-visible durante todo el análisis sin necesidad de detener el flujo de eluyente, gracias al acoplamiento a un sistema de tratamiento de datos que permite una rápida adquisición de los espectros.

En el caso particular de los flavonoides, dado que muchos de ellos poseen espectros similares, para caracterizarlos es necesaria la adición de reactivos que produzcan desplazamientos de los máximos de absorción (ver apartado IV.1.5). En HPLC-UV esta adición de reactivos puede conseguirse mediante una bomba suplementaria que los introduce gracias a una derivatización situada entre la columna y el detector. Es necesario modificar los reactivos clásicos adaptándolos a las condiciones impuestas por los eluyentes utilizados en HPLC [HOSTETTMANN et al., 1984a y 1986a]. Esta técnica tiene interés en investigaciones quimiotaxonómicas para el estudio de polifenoles a partir de extractos crudos [LENHERR et al., 1984].

El empleo de varios detectores en serie o de detectores multifuncionales que permiten detectar simultáneamente en una sola célula la absorbancia UV, la fluorescencia y la conductividad de las sustancias que eluyen de la columna, aumenta notablemente las posibilidades analíticas de la HPLC [GANT & PERRONE, 1985; SCHMIDT & SCOTT, 1985]. Así, se ha empleado con éxito la HPLC acoplada a un detector de barrido de fotodiodos y a un detector electroquímico para la identificación de diversos tipos de flavonoides [LUNTE, 1987].

En los análisis efectuados por HPLC en el presente trabajo se ha utilizado el siguiente instrumental:

- Sistema de bombas y programador de gradiente: Liquid Chromatograph Perkin-Elmer Series 2.
- Horno: Perkin-Elmer Column Oven LC-100.
- Detector espectrofotométrico: Perkin-Elmer LC-85B con LC Autocontrol.
- Registrador-Integrador: SIGMA 15 Chromatography Data Station (Perkin-Elmer).

#### IV.1.4.- TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS PREPARATIVAS.

##### A) Introducción.

Aunque el rápido progreso de las técnicas espectroscópicas ha permitido que la determinación estructural de las sustancias aisladas se convierta en una relativa rutina, el aislamiento y purificación de compuestos a partir de extractos vegetales sigue siendo un difícil objetivo. La elección de la técnica cromatográfica adecuada, la fase estacionaria y fase móvil, etc... nunca es una rutina, ya que requiere el conocimiento previo de las características de cada extracto particular.

A pesar de que en los últimos años han aparecido nuevas técnicas cromatográficas preparativas, los métodos clásicos de separación basados en la cromatografía en capa fina, cromatografía en papel y cromatografía en columna juegan un importante papel en el aislamiento y separación de los compuestos fenólicos.

Entre las más recientes técnicas preparativas aplicables al aislamiento de polifenoles vegetales se encuentran la cromatografía en capa fina centrífuga [HOSTETTMANN et al., 1980], la cromatografía en capa fina centrífuga secuencial (SCLC) [NYIREDY et al., 1985c y 1986], técnicas de cromatografía en columna como la flash chromatography [STILL et al., 1978] o la cromatografía líquida a baja (LPLC) [MERCK], media (MPLC) [LEUTERT & VON ARX, 1984] o alta

presión (HPLC) y técnicas de cromatografía en contra-corriente como la **cromatografía contra-corriente en gotas (DCCC)** [HOSTETTMANN, 1980; HOSTETTMANN et al., 1984b], la **cromatografía contra-corriente locular en rotación (RLCCC)** [SNYDER et al., 1984] y la **cromatografía contra-corriente en gotas centrífuga** [MURAYAMA et al., 1982; ITO & CONWAY, 1984], ampliamente tratadas por HOSTETTMANN (1985), HOSTETTMANN & HOSTETTMANN (1982) y HOSTETTMANN et al. (1986b). CAÑIGUERAL (1986) hace una completa clasificación de las técnicas cromatográficas preparativas actualmente disponibles.

Todas estas técnicas son complementarias, de modo que sólo combinándolas de forma adecuada se podrán llegar a aislar sustancias puras a partir de extractos vegetales crudos.

En el presente trabajo hemos empleado como técnicas de separación la cromatografía en papel y la cromatografía en columna clásica.

## **B) Cromatografía en papel.**

La cromatografía en papel, tanto analítica como preparativa, ha sido durante años la técnica cromatográfica más ampliamente utilizada en la investigación de flavonoides.

La cromatografía preparativa en papel utiliza grandes hojas de papel de un cierto grosor (0,3-0,8mm) en los que se siembra la muestra en forma de banda. La elución se realiza en cubetas herméticamente cerradas, y puede ser en forma ascendente o descendente. Esta última permite una elución continua a fondo perdido, cortando el extremo inferior del papel en forma de diente de sierra para facilitar el goteo del eluyente. De esta forma, se consigue un recorrido más largo y, como consecuencia, una mejor separación.

Las sustancias quedan separadas en forma de bandas que se recortan del cromatograma seco. Se recuperan utilizando MeOH o MeOH:H<sub>2</sub>O (1:1) extrayendo con agitación la banda cortada a trozos, o bien eluyendo, ya estos trozos colocados en una columna cromatográfica, ya la banda entera en la misma cubeta cromatográfica recogiendo el líquido en un vaso de precipitados.

El eluyente a emplear puede investigarse previamente por cromatografía en capa fina de celulosa o cromatografía analítica en papel. Para polifenoles, generalmente, se trata de eluyentes acuosos ácidos: AcOH:H<sub>2</sub>O (desde 5:95 a 50:50), BAW (fase superior de n-BuOH:AcOH:H<sub>2</sub>O, 4:1:5), CAW (CHCl<sub>3</sub>:AcOH:H<sub>2</sub>O, 30:15:2), Forestal (AcOH:H<sub>2</sub>O:HCl, 30:10:3), ... [MARKHAM, 1982].

En el presente trabajo hemos empleado papel Whatman 3MM Chr (técnica descendente) y cubetas de vidrio Chromatank 500 (Shandon).

### C) Cromatografía en columna clásica.

La cromatografía en columna clásica ha demostrado ser uno de los sistemas de mayor utilidad para la purificación preliminar o para el aislamiento de cantidades relativamente grandes de flavonoides a partir de extractos vegetales crudos.

Básicamente, consiste en aplicar la muestra a separar en la parte superior de una columna rellena de la fase estacionaria y, a continuación, eluir secuencialmente los componentes de la muestra con una fase móvil adecuada. Ésta circula exclusivamente por gravedad y por la presión hidrostática ejercida por ella en la parte superior de la columna.

Según DALMASES & BONET (1984) los principales factores a tener en cuenta al efectuar una cromatografía en columna son:  
- Elección de la fase estacionaria y del eluyente: Ambos se escogen ensayando previamente por cromatografía en capa fina dis-



tintas combinaciones de los dos. Se elige aquella que proporcione la mejor separación de las sustancias que queremos aislar, de las cuales la de  $R_f$  más alto no lo debe tener superior a 0,5 en el eluyente escogido. Si alguna de ellas tiene  $R_f$  muy bajo será necesario efectuar una elución en gradiente. En este último caso, la elución se iniciará con el sistema de disolventes menos polar finalizando con el más polar.

Es muy importante la elección del tamaño de partícula de la fase estacionaria: si es demasiado pequeño el flujo de eluyente será muy lento; por el contrario, si es demasiado grande la separación de las sustancias será deficiente.

- Geometría de la columna: En general, se utilizan columnas rectas de vidrio con una placa porosa sinterizada en el extremo inferior que actúa a modo de soporte de la fase estacionaria, y una llave de teflon para regular el flujo de eluyente.

La eficacia de las columnas rectas crece en función de  $L/D^2$ , siendo  $L$  la longitud de fase estacionaria y  $D$  el diámetro de la columna. Ello conduce a la utilización de columnas largas y estrechas para un peso de adsorbente dado, desaconsejándose las columnas excesivamente largas.

- Empaquetamiento de la columna: Debe efectuarse cuidadosamente para conseguir un empaquetado homogéneo. Puede ser húmedo, si se realiza a partir de una suspensión de la fase estacionaria en la fase móvil, o en seco, si la fase estacionaria se vierte directamente al interior de la columna humectándose, a continuación, ya sea previamente a la aplicación de la muestra o al mismo tiempo que se eluye ésta, en cuyo caso se trata de una cromatografía en columna seca [LOEV, 1967].
- Aplicación de la muestra: Generalmente, la muestra se aplica en solución, disuelta en el mínimo volumen de eluyente posible. Cuando existen problemas de solubilidad puede aplicarse mediante introducción sólida.

Entre las fases estacionarias más adecuadas para el aislamiento de polifenoles se encuentran la celulosa, la silicagel, la

poliamida y los geles de filtración molecular (Sephadex LH-20 o G-25, por ejemplo), siendo las dos últimas las más utilizadas.

En el presente trabajo hemos empleado la poliamida, la silicagel y el Sephadex LH-20 especialmente indicado para solventes orgánicos, y columnas rectas de vidrio de 1,5-6 x 25-100 cm.

La poliamida permite separar tanto aglicones como heterósidos de flavonoides, presentando como ventajas, especialmente frente a la celulosa, su elevada capacidad de carga y la posibilidad de reutilización después de la elución, gracias a un lavado sucesivo con NaOH 5% aq., H<sub>2</sub>O, AcOH 5% aq. y H<sub>2</sub>O hasta pH neutro. Como eluyentes suelen utilizarse gradientes de H<sub>2</sub>O a MeOH o de CHCl<sub>3</sub>:MeOH a MeOH, en el caso de heterósidos, y mezclas de cloroformo, metanol, etilmetilcetona y acetona disminuyendo el cloroformo para aglicones [MARKHAM, 1982].

A menudo el empleo de la poliamida conlleva dos tipos de problemas: eluciones lentas, que pueden prolongar la elución de una columna hasta tres semanas, y contaminación de las fracciones obtenidas por monómeros o polímeros de poliamida de bajo peso molecular al eluir con solventes metanólicos. Por ello se recomienda tamizar previamente la poliamida y efectuar un prelavado con metanol y agua, con objeto de evitar en lo posible la contaminación de las fracciones [MABRY et al., 1970].

Nosotros hemos empleado Poliamida CC-6 (Perlon) de Macheray-Nagel, de tamaño de partícula inferior a 0,07 mm.

A pesar de que la silicagel puede utilizarse tanto para la separación de aglicones como de heterósidos, proporciona mejores resultados con los primeros, y sobre todo en el caso de aglicones apolares (flavanonas, isoflavanonas y flavonas y flavonoles metoxilados). Como eluyentes suelen emplearse mezclas de cloroformo y metanol, hexano y cloroformo, éter de petróleo y acetato de etilo, ... Para heterósidos se utilizan eluyentes que contengan agua.

En nuestro caso, hemos utilizado Silicagel 60 de tamaño de

partícula entre 0,040 y 0,063 mm (Merck 9385) y entre 0,063 y 0,200 mm (Merck 7734).

La cromatografía de gel filtración emplea como fase estacionaria geles de exclusión molecular (Sephadex<sup>R</sup>) que separan por tamaño molecular [PHARMACIA, 1985], primero eluyen las moléculas mayores y después las más pequeñas. Existen diversos tipos, de los cuales el más útil para la separación de polifenoles es el Sephadex serie LH<sup>R</sup>, que permite trabajar con solventes orgánicos [JOHNSTON et al., 1968; JOUSTRA et al., 1967; REPAS et al., 1969] combinando los fenómenos de adsorción y exclusión molecular. Tiene elevada capacidad de carga y se recupera por simple lavado. Es de gran utilidad para efectuar una última purificación de aglicones o heterósidos aislados por otros sistemas cromatográficos (papel, poliamida, silicagel,...) ya que permite eliminar restos de fases estacionarias o de impurezas de éstas, o bien para recuperar una sustancia disuelta en DMSO-d<sub>6</sub> después de registrar el espectro de resonancia magnética nuclear [HIERRMANN, 1978].

En el presente trabajo se ha utilizado Sephadex LH-20 y como eluyente metanol o metanol acuoso en el caso de heterósidos.

#### IV.1.5.- ESPECTROSCOPIA ULTRAVIOLETA-VISIBLE.

La espectroscopía UV-visible es una de las técnicas más útiles para la determinación estructural de los flavonoides, ya que requiere una cantidad de sustancia muy pequeña (0,1 mg, aproximadamente) y proporciona una valiosa información sobre la naturaleza del flavonoide y localización de substituyentes en su molécula, ya sean grupos hidroxilo libres o substituidos por metilos o azúcares, gracias a la adición de reactivos a la solución de la muestra problema que producen desplazamientos en los máximos de absorción [MABRY et al., 1970].

En general, los espectros se registran en solución metanólica; en el caso de las antocianidinas se emplea una solución de HCl 0,4M en MeOH.

El espectro UV-visible presenta dos máximos de absorción: uno comprendido entre 240-285nm (banda II) y otro entre 300-550 nm (banda I). La posición e intensidad relativa de los mismos proporcionan información sobre el tipo de flavonoide y posiciones oxigenadas.

En la figura IV-2 se muestran los espectros UV-visible de distintos tipos de flavonoides con igual patrón de sustitución (5,7,4'). En ella se observa como flavanonas, dihidroflavonoles e isoflavanos poseen una banda I de muy baja intensidad, debido principalmente a que no hay conjugación entre los anillos A y B, mientras que chalconas, auronas y antocianinas se caracterizan por presentar una banda I a longitudes de onda elevadas.

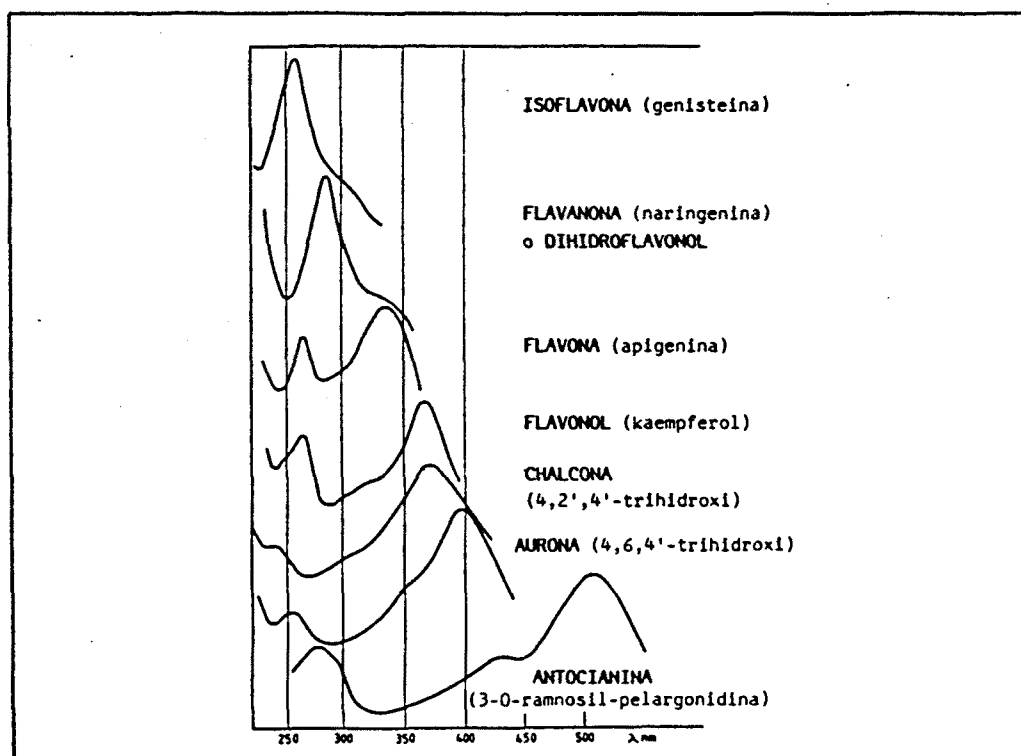


FIGURA IV-2: Espectros UV-visible típicos de diversos tipos de flavonoide con patrón de oxigenación equivalente [MARKHAM, 1982].

Las variaciones dentro de estos límites dependerán de la posición de los grupos hidroxilo y del grado de sustitución de éstos. Generalmente, cambios en la sustitución del anillo A se reflejarán en la banda II, mientras que alteraciones en la sustitución de los anillos B y C afectan más a la banda I.

La adición de reactivos que producen desplazamientos hipsochromos o batocromos y/o efectos hipercromos o hipocromos, proporciona información adicional importantísima. Suelen utilizarse el metilato sódico, el cloruro de aluminio, el cloruro de aluminio + ácido clorhídrico, el acetato sódico y el acetato sódico + ácido bórico.

El metilato sódico (NaOMe) es una base fuerte que ioniza todos los grupos hidroxilo presentes en la molécula. La degradación del espectro con el tiempo es indicativa de la presencia de grupos alcali-sensitivos. Resulta especialmente útil para la detección de hidroxilos libres en las posiciones 3 y 4'.

El cloruro de aluminio ( $\text{AlCl}_3$ ) forma complejos estables al tratamiento ácido entre grupos hidroxilo y cetonas vicinales, y lábiles al tratamiento ácido con grupos  $\text{o}-(\text{OH})_2$  [MARKHAM & MABRY, 1968]. Además, los espectros registrados en  $\text{AlCl}_3$  y  $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$  proporcionan información sobre los hidroxilos en las posiciones 3 y 5 del flavonoide, a la vez que permiten determinar la posición de otros posibles substituyentes en los anillos A y B [MEARS & MABRY, 1972; JURD, 1969; VOIRIN, 1983].

El acetato sódico ( $\text{NaOAc}$ ) es una base débil que ioniza los hidroxilos más ácidos de la molécula, es decir, los que se encuentran en las posiciones 3, 7 y 4'. Principalmente, permite detectar un grupo 7-(OH) libre, así como grupos sensibles a álcalis ( $6,7-(\text{OH})_2$ ,  $7,8-(\text{OH})_2$  y  $3',4'-(\text{OH})_2$ ) cuando se produce degradación del espectro con el tiempo. Los resultados obtenidos pueden variar según la procedencia del acetato sódico anhidro utilizado [ROSLER et al., 1985].

El borato sódico ( $\text{AcONa} + \text{H}_3\text{BO}_3$ ) forma quelatos con todos los grupos  $\text{o}-(\text{OH})_2$  excepto entre los -OH de las posiciones 5 y 6.

En el presente trabajo, los reactivos han sido preparados y utilizados según las indicaciones de MABRY *et al.* (1970). Los espectros han sido registrados en un espectrofotómetro UV-visible Perkin-Elmer modelo 5505, a 120 nm/min entre 200 y 500 nm.

La interpretación de los espectros se ha realizado atendiendo a los datos aportados por AVERETT (1977), COMBIER *et al.* (1974), JURD (1962), LEBRETON *et al.* (1967), MARKHAM (1982), MARKHAM & MABRY (1975) y WOLLENWEBER (1982b), además de los autores ya citados en este mismo apartado, parcialmente tabulados por MARTÍNEZ (1980).

#### IV.1.6.- ESPECTROMETRÍA DE MASAS (MS).

##### A) Introducción.

La espectrometría de masas constituye, sin duda, una de las técnicas más útiles en la elucidación estructural de los flavonoides. Proporciona información sobre el peso molecular, la distribución de los sustituyentes entre los anillos A y B, y sobre la naturaleza y puntos de unión de los azúcares en los C- y O-heterósidos; todo ello a partir de cantidades de muestra inferiores al milígramo [MARKHAM, 1982].

Las técnicas clásicas de ionización, por impacto electrónico (EI) o ionización química (CI), requieren una volatilización previa de la muestra problema. La mayoría de aglicones flavónicos son suficientemente volátiles en las condiciones de alto vacío del espectrómetro de masas. Sin embargo, los heterósidos, antocianidinas y biflavonoides no lo son y requieren una derivatización previa (por ejemplo: permetilación) [BOUILLANT *et al.*, 1974 y 1980] dando lugar a mezclas de productos parcialmente derivatizados y masas moleculares muy elevadas.

En la actualidad se dispone de nuevas técnicas de ionización suave que permiten el estudio de sustancias polares, no volátiles y termolábiles, no derivatizadas [BUSH & COOKS, 1982; SCHULTEN, 1985], como la desorción de campo (FD) [DAVES, 1979], la desorción ionización química (DCI) [BOMBICK & ALLISON, 1987], el bombardeo por átomos rápidos (FAB), la desorción de plasma (PD), la desorción por láser [POSTHUMUS et al., 1978], la ionización electrodinámica (EH), la desorción flash, la espectrometría de masas de iones secundarios (SIMS) [PETTIT et al., 1984] y la espectrometría de masas en tándem (MS-MS) [CROW et al., 1986]. Varias de ellas se han aplicado al estudio de los heterósidos flavónicos [CHRISTEN, 1986; DOMON & HOSTETTMANN, 1985; DOMON et al., 1982; FAVRE-BONVIN, 1982; STEIN et al., 1985].

En los últimos años el empleo de la espectrometría de masas como sistema de detección en HPLC ha adquirido una gran importancia en la investigación biológica [ERNI, 1982; FRIGERIO, 1985].

En el presente trabajo hemos utilizado la EI-MS para la identificación de los aglicones, registrando los espectros en un espectrómetro de masas Hewlett-Packard modelo 5985 B, con una energía de ionización de 70 eV. Para el estudio de los heterósidos hemos empleado la FAB-MS y el Thermospray.

## **B) Espectrometría de masas de impacto electrónico (EI-MS).**

La EI-MS es la técnica de elección para el estudio de los aglicones flavónicos, que suelen dar un pico molecular intenso que permite determinar su peso molecular y el número y tipo de sustituyentes, y una serie de iones diagnósticos característicos resultantes de la fragmentación de la molécula, cuyos valores  $m/z$  e intensidades permiten asignar los sustituyentes a los anillos de la molécula e incluso fijar sus posiciones.

La fragmentación de la molécula se produce por pérdida de radicales y por vía Retro-Diels-Alder (RDA). Ésta última es ca-

racterística para cada tipo de flavonoide y, en nuestro caso, nos ha permitido distinguir entre flavonas, flavonoles, flavanonas y dihidroflavonoles (figura IV-3).

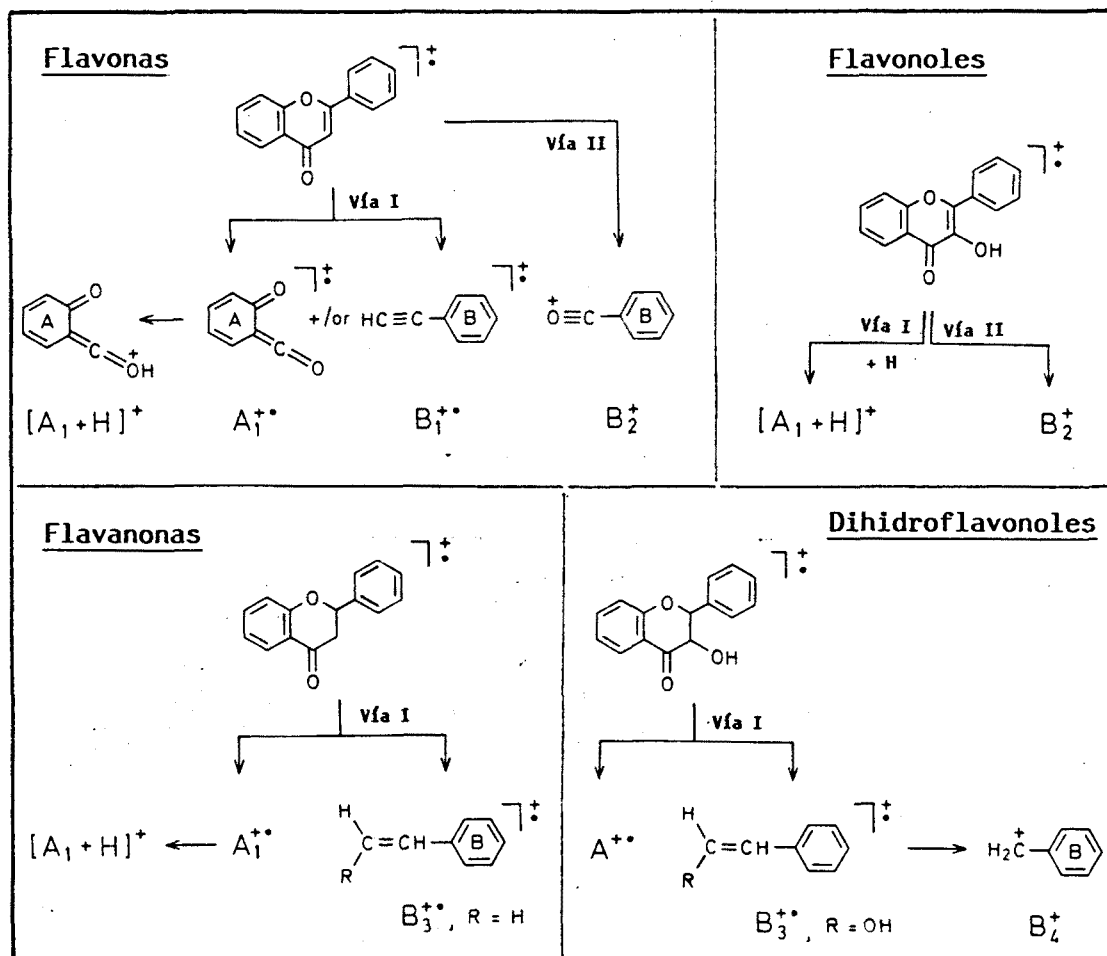


FIGURA IV-3: Vías de fragmentación diagnósticas para distintos tipos de aglicones flavónicos [MABRY & MARKHAM, 1975].

Entre los fragmentos que se forman por pérdida de radicales se encuentran: M-1 =  $(M-H)^+$ , M-15 =  $(M-CH_3)^+$ , M-17 =  $(M-OH)^+$ , M-18 =  $(M-H_2O)^+$ , M-28 =  $(M-CO)^{+\bullet}$ , M-29 =  $(M-CHO)^+$ , M-31 =  $(M-CH_3O)^+$ , M-43 =  $(M-CH_3-CO)^+$  y M-46 =  $(M-CO-H_2O)^{+\bullet}$ . El fragmento a M-15 es característico de los flavonoles metoxilados y es particularmente intenso en los 6- y/u 8-metoxiflavonoides.



Para efectuar la interpretación de los espectros obtenidos hemos utilizado los datos y recopilaciones aportados por AUDIER (1966), GOUDARD et al. (1978 y 1979), KINGSTON (1971), MABRY & MARKHAM (1975), MABRY & ULUBELEN (1980), MARTÍNEZ (1980) y WOLLENWEBER & DIETZ (1979).

### C) Espectrometría de masas por bombardeo con átomos rápidos (FAB-MS).

En pocos años la FAB-MS ha demostrado ser una de las técnicas más útiles para la determinación estructural de compuestos orgánicos polares, poco volátiles o termolábiles [BARBER et al., 1983].

Básicamente, consiste en bombardear la muestra, que suele encontrarse en suspensión sobre una matriz polar (por ejemplo: glicerol o tioglicerol), con un haz de átomos de xenon o argon de alta energía (5 a 10 KeV). La energía transferida en las colisiones ioniza la substancia, que produce, además, iones secundarios, tanto positivos como negativos, que son expedidos y canalizados hacia el detector [RINEHART, 1982]. La ionización de la muestra se efectúa a temperatura ambiente evitando fenómenos de pirólisis. En la figura IV-4 se muestra un esquema de una cámara de ionización FAB.

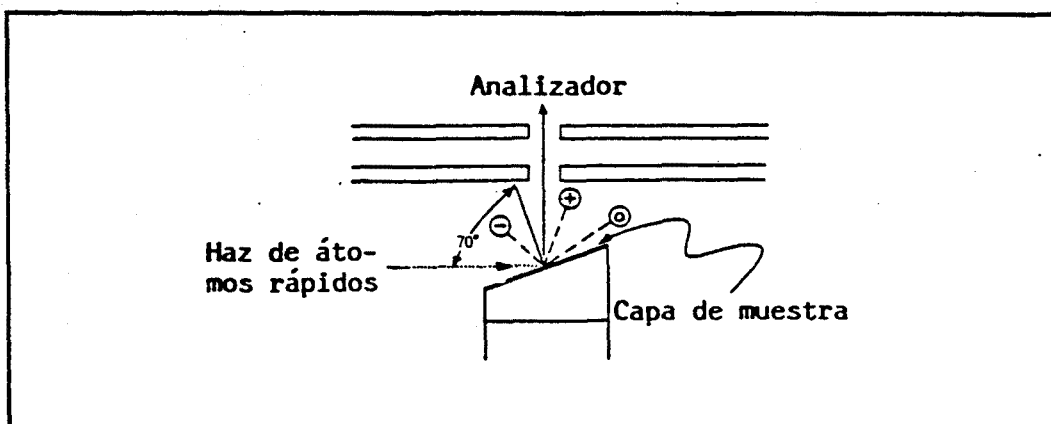


FIGURA IV-4: Esquema de una cámara de ionización para FAB-MS [FENSELAU, 1984].

Deben tenerse en cuenta diversos factores, como la naturaleza del gas que colisiona, el ángulo de incidencia del haz de átomos rápidos, fuente de iones y naturaleza de la matriz y de la muestra problema [LEHMANN et al., 1984; MAHONEY et al., 1984].

En el campo de los polifenoles, la FAB-MS es de gran utilidad en la determinación estructural de los heterósidos, ya sea a partir de espectros de iones positivos o de iones negativos, siendo en general de mayor utilidad éstos últimos. Proporciona información tanto sobre el peso molecular del heterósido y del aglicón, como sobre la cadena osídica.

Por lo que se refiere a esta última, cuando está formada por varios azúcares con un solo punto de unión al aglicón, se observan los fragmentos debidos a la pérdida secuencial de cada uno de ellos (162 unidades de masa para las hexosas, 146 en las metilpentosas, 176 para los ácidos hexurónicos, ...) así como la pérdida de toda la cadena. También resulta útil en el caso de cadenas osídicas unidas a diferentes posiciones del aglicón [DOMON et al., 1982; FAVRE-BONVIN, 1982].

El principal problema que presenta la FAB-MS es la producción de señales interferentes que proceden de la matriz ( $(M_n - H)^-$  o  $(M_n + H)^+$ , siendo M = glicerol o tioglicerol) y pueden dificultar la interpretación del espectro. En algunos casos, la adición de ácidos o bases a la matriz puede aumentar la calidad de los espectros, ya que favorecen la formación de los iones  $(M+H)^+$  o  $(M-H)^-$ , respectivamente [DOMON & HOSTETTMANN, 1985].

La combinación de FAB-MS y MS-MS se ha aplicado con éxito al análisis de mezclas de flavonoides (heterósidos y/o aglicones) sin necesidad de separarlos previamente [CROW et al., 1986; DE KOSTER et al., 1985].

#### D) Thermospray.

Es una técnica de ionización desarrollada inicialmente como interfase en HPLC-MS [BLAKLEY & VESTAL, 1983], útil para la determinación estructural de sustancias polares de elevado peso molecular.

Se basa en vaporizar, parcial o completamente, una solución de la muestra problema y una sal volátil (por ejemplo: acetato amónico) a medida que pasa a través de un capilar, calentando mediante una fuente de energía eléctrica controlada por un sistema "feed-back" que permite mantener constante el nivel de vaporización. La temperatura óptima depende de la composición del disolvente, del flujo, de las dimensiones del capilar y de la muestra que se analiza [PILOSOF et al., 1984].

La presencia de sales amortiguadoras en la solución favorece la ionización de la muestra. Generalmente se obtienen iones  $(M+H)^+$  y  $(M-H)^-$ .

Tiene la ventaja de permitir la detección de niveles bajos de sustancia [VOYKSNER & HANEY, 1985].

#### IV.1.7.- ESPECTROSCOPIA DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (NMR).

##### A) Resonancia magnética nuclear de protón ( $^1\text{H-NMR}$ ).

La  $^1\text{H-NMR}$  es una técnica de gran valor en la determinación estructural de flavonoides, como lo demuestran los trabajos de MARKHAM (1982) y MARKHAM & MABRY (1975).

Proporciona información sobre el tipo y entorno químico de los protones de la molécula, permitiendo determinar las posiciones oxigenadas en los tres anillos del flavonoide y el número y posición de grupos metoxilo, distinguir entre isoflavonas, flavanonas y dihi-

droflavonoles, determinar el número de azúcares presentes en la molécula y el tipo de unión ( $\alpha$  o  $\beta$ ) y detectar posibles cadenas carbonadas laterales (metilo, isoprenilo, ...) directamente unidas al núcleo del flavonoide [MARKHAM, 1982].

En los últimos años la posibilidad de utilizar campos magnéticos elevados (de hasta 500 MHz) y la aparición de técnicas de NMR bidimensionales han aumentado notablemente las aplicaciones de la NMR [SCHILLING, 1985], al mismo tiempo que se requieren cantidades de muestra cada vez menores (de hasta 0,1 mg en los instrumentos más modernos).

#### B) Resonancia magnética nuclear de carbono 13 ( $^{13}\text{C}$ -NMR).

La  $^{13}\text{C}$ -NMR ha sido una de las técnicas de más reciente aplicación en la determinación estructural de los flavonoides. Desde el primer trabajo realizado en este campo por JOSEPH-NATHAN et al. (1974), han sido muchos los datos aportados posteriormente por otros autores [KINGSBURY & LOOKER, 1975; CHANG, 1978; MARKHAM & TERNAI, 1976a y 1976b; PELTER et al., 1976; WAGNER et al., 1976; WEHRLI, 1975; WENKERT & GOTTLIEB, 1977].

Proporciona información que no es posible obtener mediante otras técnicas espectroscópicas. Permite: establecer el número total de átomos de carbono de la molécula, el número de C oxigenados, así como el número de C del azúcar o azúcares presentes; identificar los azúcares, tanto en O- como en C-heterósidos; determinar las posiciones de los enlaces interglucosídicos; identificar grupos acilo y su punto de unión; y determinar uniones C-C [MARKHAM, 1982; MARKHAM & CHARI, 1982].

Por ello, resulta útil especialmente en la identificación de heterósidos, ya que permite definir los azúcares y sus posibles substituyentes, sobre todo en el caso de C-heterósidos, cuyos azúcares son difíciles de identificar por otros métodos.

En la tabla IV-5 se indican las posiciones de las señales correspondientes a los distintos tipos de átomos de carbono de los flavonoides, tomando como referencia el tetrametilsilano (TMS, 0ppm).

Tipo de Carbono	ppm respecto a TMS
Carbonilo (C=O en 4, acilo)	210-170
Aromático y olefínico:	
- oxigenado	165-155 (sin o/p oxigenación); 150-130 (con o/p oxigenación)
- no oxigenado	135-125 (sin o/p oxigenación); 125-90 (con o/p oxigenación)
Alifático:	
- oxigenado (azúcares)	83-69 (C-1 de O-heterósidos, aprox. a 100 ppm)
- no oxigenado (C-2 y C-3 de flavanonas)	80-40 (C-4 de epicatequinas a 28 ppm)
Metilendioxi	aprox. 100
O-CH <sub>3</sub>	55-63 (60-63 en o-disubstituidos)
C-CH <sub>3</sub> , COCH <sub>3</sub>	aprox. 17-20
Isoprenilo (-CH <sub>2</sub> CH=C(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> )	21(CH <sub>2</sub> ), 122(CH), 131(C), 18(CH <sub>3</sub> )

TABLA IV-5: Posiciones de los distintos tipos de carbonos de los flavonoides en <sup>13</sup>C-NMR [MARKHAM, 1982].

En el presente trabajo se han obtenido espectros de <sup>13</sup>C-NMR normales (con desacoplamiento total de protón) que proporcionan información directa del carbono estudiado. Se ha utilizado, también, la técnica Spin Echo Transform Fourier (SEFT), que permite diferenciar los átomos de carbono según el número par o impar de protones que llevan unidos: CH y CH<sub>3</sub> dan señales en fase inversa respecto a las de C y CH<sub>2</sub> [SHOOLERY, 1984].

Los espectros han sido registrados en dos aparatos Bruker de 80 MHz (<sup>1</sup>H-NMR) y 20,14 MHz (<sup>13</sup>C-NMR), y 50,29 MHz (<sup>13</sup>C-NMR) respectivamente, centrados según el disolvente o bien tomando δ=0 ppm para el tetrametilsilano.

#### IV.1.8.- HIDRÓLISIS DE LOS HETERÓSIDOS Y ANÁLISIS DE LOS AZÚCARES.

Los heterósidos flavónicos, una vez estudiada su movilidad en distintos sistemas de cromatografía en capa fina y obtenido su espectro UV-visible, deben someterse a hidrólisis total para separar el azúcar o azúcares del aglicón.

En general, se pueden realizar tres tipos de hidrólisis: ácida, enzimática o alcalina. En nuestro caso, la hidrólisis ácida en distintas condiciones ha sido suficiente para estudiar los azúcares y aglicones de los heterósidos flavónicos aislados. En la figura IV-5 se ilustra la técnica seguida para la hidrólisis y separación de los componentes. El aglicón obtenido se analiza por cromatografía en capa fina, comparando con patrones, por espectroscopía UV-visible y, si es necesario, por otros métodos espectroscópicos (EI-MS, <sup>1</sup>H-NMR).

Los azúcares pueden analizarse por cromatografía en papel, cromatografía en capa fina o cromatografía de gases previa derivatización. En el presente trabajo se han analizado por cromatografía en capa fina utilizando diversos sistemas de eluyentes y fases estacionarias, frente a patrones de glucosa, galactosa, manosa, arabinosa, xilosa, ácido glucurónico, ácido galacturónico, allosa, ribosa y ramnosa (ver Rfs en la tabla IV-6). Los cromatogramas se han revelado sucesivamente con reactivo de Neu y ftalato de anilina (1 g de anilina + 1,66 g de ácido o-ftálico + 100 ml de etanol de 96°), calentando las placas 5 min a 110°C después de pulverizar.

El empleo del reactivo de Neu previamente al ftalato de anilina aumenta la sensibilidad de la detección, al mismo tiempo que permite diferenciar pentosas de hexosas por el color; las primeras aparecen de color rojizo y las últimas de color amarillo [NIEMANN, 1979].

Las abreviaciones utilizadas para el revelado son las siguientes:

A = Amarillo	R-A = Rojo-amarillento
R = Rojizo	P-R = pardo-rojizo

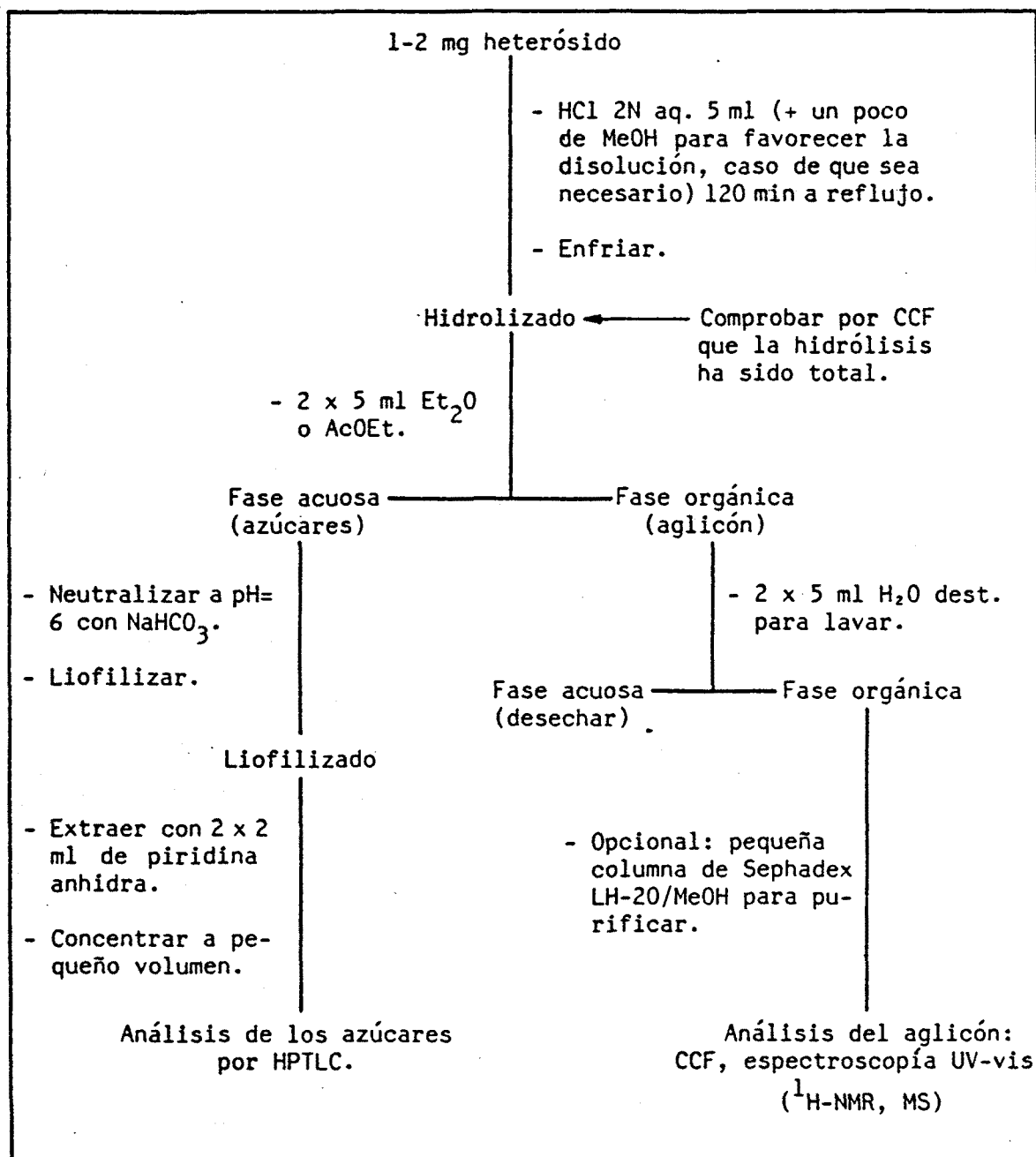


FIGURA IV-5: Pauta seguida en la hidrólisis total de los heterósidos flavónicos.

MONOSACÁRIDO	COLOR DESPUÉS DE REVELAR	Rf X 100 TLC		
		CELULOSA	SILICAGEL-1	SILICAGEL-2
Glucosa	A	43	31	12
Galactosa	A	44	32	14
Manosa	A	52	34	14
Arabinosa	R	54	39	25
Xilosa	R	56	47	28
Allosa	A	51	35	19
Ramnosa	A	66	50	28
Ribosa	R-A	62	42	29
Ác. glucurónico	P-R	79	59	61
Ác. galacturónico	P-R	13	15	2

TABLA IV-6: Características cromatográficas de los monosacáridos utilizados como patrones en el análisis de los azúcares heterosídicos. Eluyentes utilizados: Celulosa: AcOEt: Piridina:AcOH:H<sub>2</sub>O (36:36:7:21); Silicagel-1: AcOEt:H<sub>2</sub>O: MeOH:AcOH (65:15:15:20); Silicagel-2: Acetonitrilo:H<sub>2</sub>O (85:15).

El sistema utilizado hidroliza todos los O-glicósidos, pero no los C-heterósidos, en cuyo caso es más conveniente identificar los azúcares por <sup>13</sup>C-NMR.

Por otra parte, si se trata de O-glucurónidos, el ácido glucurónico liberado en las condiciones de hidrólisis empleadas, es destruido y no se puede detectar por cromatografía en capa fina. Para la identificación de este tipo de heterósidos hemos llevado a cabo una hidrólisis ácida de menor duración, que aunque puede ser parcial, permite detectar el ácido glucurónico sin que sea destruido. Consiste en calentar a reflujo durante unos 60 min, con agitación, uno o dos mg del heterósido en unos 4-5 ml de HCl 2N aq.



## IV.2.- FLAVONOIDES DE THYMUS MORODERI PAU EX MARTÍNEZ.

### IV.2.1.- EXTRACCIÓN.

El material utilizado han sido las hojas desecadas de *Thymus moroderi* Pau ex Martínez (muestra nº3) de la tabla III-1) recolectado en Xixona (Alicante) en junio de 1984. Un ejemplar testigo se ha depositado en el herbario BCF (pliego nº 31500).

La extracción se ha realizado a partir de 250 g de material, mediante solventes de polaridad creciente, tal como se muestra en la figura IV-6, con el rendimiento siguiente:

Extracto "éter de petróleo" -----	15,10 g
Extracto clorofórmico -----	21,15 g
Extracto etéreo -----	1,67 g
Extracto "acetato de etilo+butanol" -----	18,16 g

El análisis de los extractos obtenidos por cromatografía en capa fina ha dirigido nuestra atención hacia los extractos clorofórmico, etéreo y "acetato de etilo+butanol", de los que se han aislado los flavonoides, tal como se indica en los siguientes apartados.

### IV.2.2.- AISLAMIENTO.

#### A) Extracto clorofórmico.

El extracto clorofórmico (21,15 g), previa investigación de diversos sistemas de eluyentes por cromatografía en capa fina ha sido fraccionado por cromatografía en columna de poliamida CC6 en 26 fracciones, mediante la siguiente elución con disolventes de polaridad creciente: hexano:CHCl<sub>3</sub> (80:20) a CHCl<sub>3</sub>, y CHCl<sub>3</sub>:MeOH (100:5) a MeOH.

Las fracciones obtenidas, tras sucesivas purificaciones por cromatografía en columna de silicagel y Sephadex LH-20, y cromato-

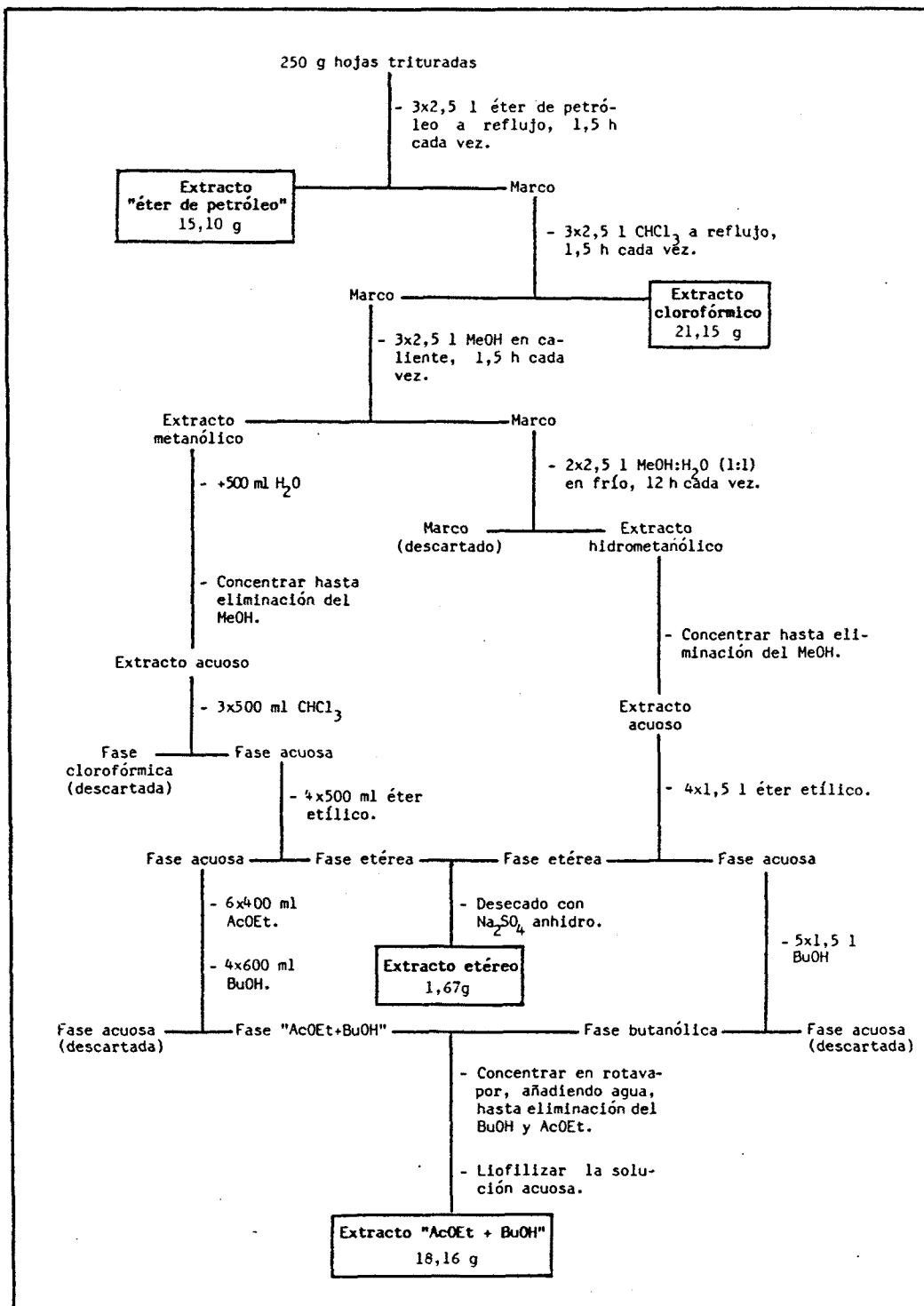


FIGURA IV-6: Pauta de extracción seguida para las hojas de *Thymus moroderi*.

grafía en papel Whatman 3 (según se indica en la figura IV-7), han proporcionado 15 sustancias. Las cantidades obtenidas y el resultado de la identificación posterior han sido los siguientes:

Substancia A	(6,0 mg):	5-desmetilnobiletina
Substancia B	(21,8 mg):	8-OMe-cirsilineol
Substancia C	(13,5 mg):	cirsilineol
Substancia D	(4,0 mg):	5,4'-(OH) <sub>2</sub> -6,7,8-(OMe) <sub>3</sub> -flavona.
Substancia E	(6,0 mg):	sakuranetina
Substancia F	(0,7 mg):	pilloína
Substancia G	(347,0 mg):	xantomicrol
Substancia H	(4,0 mg):	5,4'-(OH) <sub>2</sub> -7,8-(OMe) <sub>2</sub> -flavona
Substancia I	(16,3 mg):	genkwanina
Substancia J	(3,6 mg):	sideritoflavona
Substancia K	(1,0 mg):	apigenina
Substancia L	(0,5 mg):	sorbifolina
Substancia M	(15,4 mg):	naringenina
Substancia N	(1,0 mg):	kempferol
Substancia Ñ	(6,4 mg):	eriodictiol

## B) Extracto etéreo.

El extracto etéreo (1,67 g) ha sido fraccionado en una columna de poliamida CC6 utilizando como eluyente el siguiente sistema de disolventes:

CHCl<sub>3</sub>:EtOH:MeCOEt:Me<sub>2</sub>CO (40:20:5:1 a 5:20:5:1)

Se han obtenido 11 fracciones que, previa purificación por cromatografía en columna de poliamida CC6, silicagel y Sephadex LH-20 y cromatografía en papel Whatman 3 (figura IV-8), han dado lugar a 9 sustancias, posteriormente identificadas como sigue:

Substancia K	(8,5 mg):	apigenina
Substancia N	(4,0 mg):	kempferol

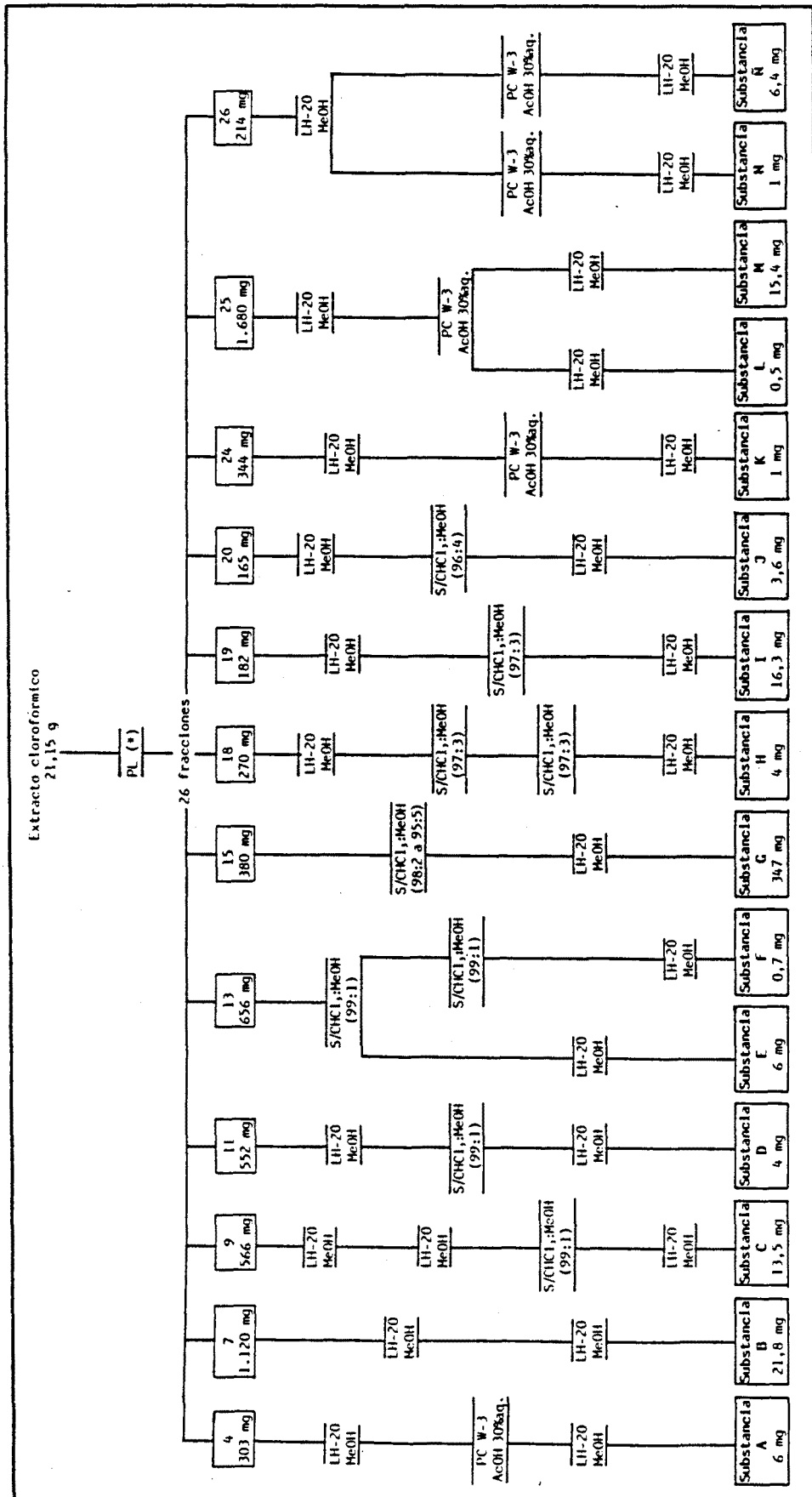


FIGURA IV-7: Aislamiento de las sustancias A,B,C,D,E,F,G,H,I,J,K,L,M,N y Ñ a partir del extracto clorofórmico de *Thymus moroderi*. LH-20: columna de Sephadex LH-20. PL: columna de Sephadex LH-20. S: columna de silicagel. PC W-3: cromatografía en papel Whatman 3. (\*): Para elución, ver texto.

Substancia Ñ (4,1 mg): eriodictiol  
 Substancia O (1,0 mg): timusina  
 Substancia P (44,0 mg): dihidrokempferol  
 Substancia Q (2,4 mg): 7-OMe-luteolina  
 Substancia R (18,0 mg): luteolina  
 Substancia S (9,0 mg): taxifolina  
 Substancia T (4,0 mg): 6-OH-luteolina

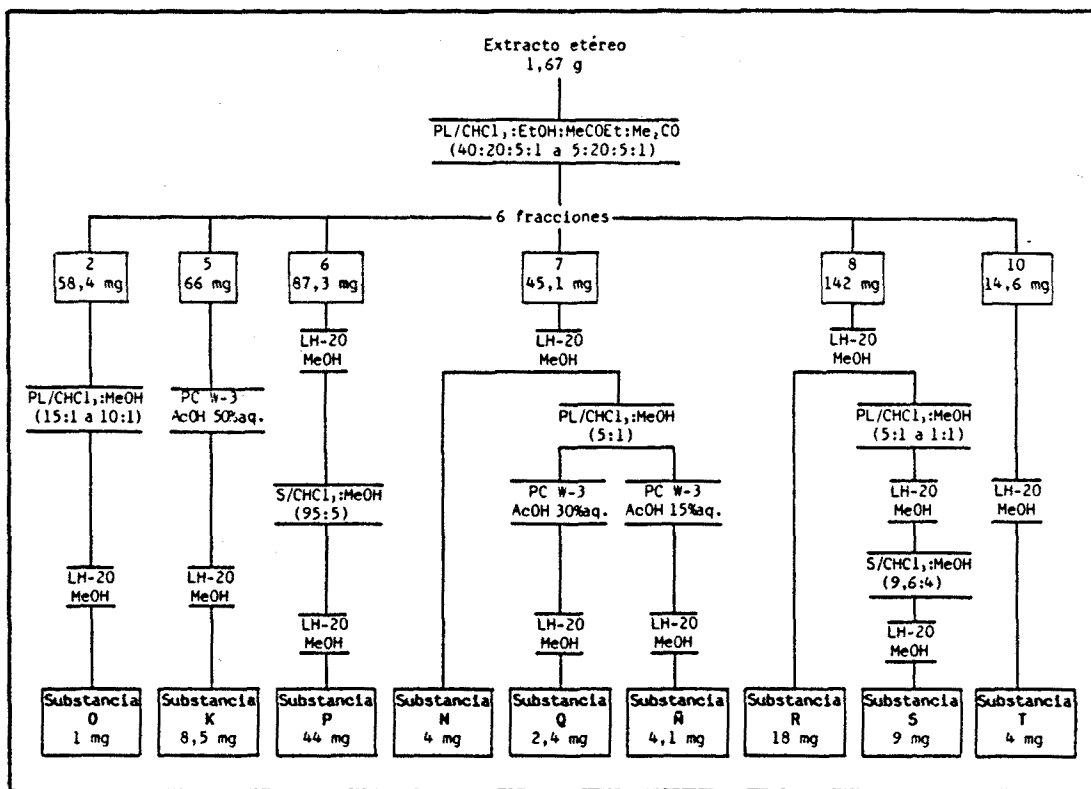


FIGURA IV-8: Aislamiento de las sustancias K,N,Ñ,O,P,Q,R,S y T a partir del extracto etéreo de las hojas de *Thymus moroderi*. LH-20: columna de Sephadex LH-20. PL: columna de poliamida . S: columna de silicagel. PC W-3: cromatografía en papel Whatman 3.

C) Extracto "acetato de etilo + butanol".

El fraccionamiento del extracto "acetato de etilo + butanol" (18,16 g) se ha efectuado por cromatografía en columna de poliamida CC6, eluida con mezclas hidrometanólicas de concentración alcohólica creciente.

Las fracciones obtenidas (veintitres) se han sometido a purificaciones sucesivas por cromatografía en columna de poliamida CC6 y Sephadex LH-20, según se muestra en la figura IV-9, proporcionando las siguientes sustancias:

- Substancia U (15,0 mg): vicenina-2
- Substancia V (80,0 mg): 7-0-glucuronil-luteolina
- Substancia W (107,0 mg): 7-0-glucosil-luteolina
- Substancia X (47,7 mg): diglicósido acetilado de luteolina
- Substancia Y (5,6 mg): 3'-0-allosil-luteolina
- Substancia Z (5,7 mg): 7-0-xilosil-luteolina

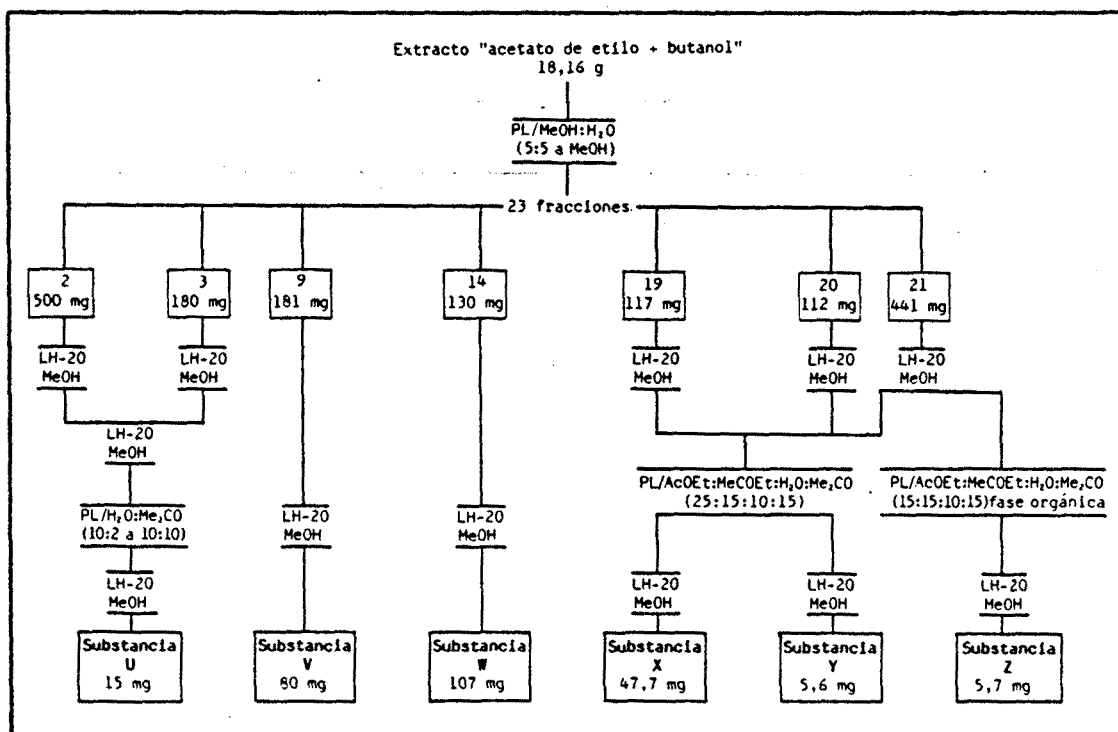


FIGURA IV-9: Aislamiento de las sustancias U,V,W,X,Y y Z a partir del extracto "acetato de etilo + butanol" de las hojas de *Thymus moroderi*. LH-20: Sephadex LH-20. PL: columna de poliamida.

#### IV.2.3.- DETERMINACIÓN ESTRUCTURAL DE LAS SUBSTANCIAS AISLADAS.

##### A) Comportamiento cromatográfico.

En las tablas IV-7 (aglicones flavónicos), IV-8 (heterósidos flavónicos) y IV-9 (aglicones de los heterósidos liberados por hidrólisis con HCl 2N, 120 min a 100°C) se resumen las características de revelado y Rf de las sustancias aisladas de las hojas de *Thymus moroderi*.

Las abreviaturas utilizadas para el revelado son las siguientes:

A = Amarillo	AO = Amarillo oscuro	NG = Negro
AB = Amarillo brillante	MO = Marrón oscuro	PO = Pardo oscuro
ACF = Amarillo claro fluorescente	N = Naranja	VO = Violáceo oscuro

Y para los sistemas cromatográficos:

CL-1 = TLC Celulosa/AcOH 50%aq.	CL-2 = TLC Celulosa/AcOH 30%aq.
CL-3 = TLC Celulosa/AcOH 15%aq.	CL-4 = TLC Celulosa/H <sub>2</sub> O
S-1 = TLC Silicagel/Benceno:Dioxano:AcOH (90:25:4)	
S-2 = TLC Silicagel/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :AcOH:H <sub>2</sub> O (2:1:1) fase inferior	
S-3 = TLC Silicagel/CHCl <sub>3</sub> :MeOH (93:7)	
S-4 = TLC Silicagel/CHCl <sub>3</sub> :MeOH:H <sub>2</sub> O (65:45:12)	
S-5 = TLC Silicagel/AcOEt:MeCOEt:AcOH:H <sub>2</sub> O (5:3:1:1)	
S-6 = TLC Silicagel/AcOEt:HCOOH:AcOH:H <sub>2</sub> O (100:11:11:27)	

La determinación estructural de las sustancias aisladas se ha realizado a partir de los datos cromatográficos y espectroscópicos, de acuerdo con las indicaciones citadas en los apartados IV.1.3, IV.1.5, IV.1.6, IV.1.7 y IV.1.8.

A continuación, sigue una relación de todos los flavonoides identificados en el presente trabajo y sus estructuras, así como sus datos espectroscópicos, incluyendo alguna explicación sobre la determinación estructural en aquellos casos que nos han parecido más interesantes.

Subs- tancia	REVELADO				Rf X 100 TLC					
	UV366nm	NH <sub>3</sub> /UV 366nm	AlCl <sub>3</sub> /UV 366nm	NEU/UV 366nm	CL-1	CL-2	CL-3	S-1	S-2	S-3
A	VO	VO	VO	VO	85	49	-	57	90	74
B	VO	MO	NG	VO	77	44	-	48	92	57
C	VO	MO	NG	VO	74	42	-	42	89	56
D	PO	PO	VO	VO	95	85	53	52	80	51
E	PO	ACF	ACF	AO	87	60	21	54	84	51
F	VO	VO	A	A	58	28	-	-	90	65
G	VO	VO	NG	VO	81	49	-	43	67	47
H	VO	VO	NG	VO	78	46	-	36	63	42
I	VO	A	A	A	65	29	-	43	70	46
J	VO	VO	VO	N	66	37	-	21	38	24
K	VO	AO	A	AV	57	28	-	29	24	26
Api.	VO	AO	A	AV	57	27	-	28	24	26
L	VO	VO	VO	VO	48	19	-	-	25	47
M	PO	VO	ACF	AO	82	66	30	42	36	30
N	A	A	AB	AB	44	20	-	36	28	22
Ñ	PO	VO	ACF	N	74	61	28	24	14	10
O	VO	VO	VO	VO	64	32	-	11	25	20
P	PO	AO	A	VO	82	74	52	30	19	18
Q	VO	A	A	N	51	22	-	-	-	-
R	VO	A	A	N	39	18	-	12	11	12
Lut.	VO	A	A	N	40	18	-	13	11	12
S	PO	AO	A	VO	76	71	-	15	5	7
T	VO	A	MO	N	21	10	50	-	-	-

TABLA IV-7: Características cromatográficas de los aglicones flavónicos aislados de *Thymus moroderi*. Api.: apigenina. Lut.: luteolina. Para otras abreviaturas, ver texto.



Subs- tancia	REVELADO				Rf X 100 TLC				
	UV366nm	NH <sub>3</sub> /UV 366nm	AlCl <sub>3</sub> /UV 366nm	NEU/UV 366nm	CL-2	CL-4	S-4	S-5	S-6
U	VO	VO	A	VO	69	21	36	10	16
V	VO	A	A	N	33	25	38	20	51
W	VO	A	A	N	30	0	42	32	58
7GLu.	VO	A	A	N	30	0	43	32	60
X	VO	A	A	N	61	3	70	48	66
Y	VO	AO	A	AO	58	3	53	40	60
Z	VO	A	A	N	23	0	39	46	73

TABLA IV-8: Características cromatográficas de los heterósidos flavónicos aislados de *Thymus moroderi*. 7GLu.: 7-glucosil-luteolina. Para otras abreviaturas, ver texto.

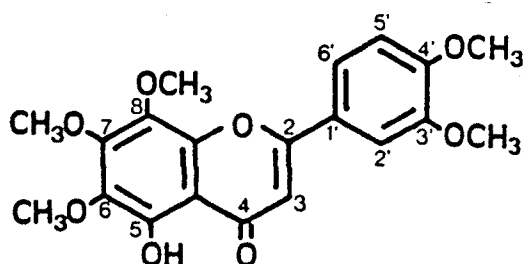
Subs- tancia	REVELADO				Rf X 100 TLC			
	UV366nm	NH <sub>3</sub> /UV 366nm	AlCl <sub>3</sub> /UV 366nm	NEU/UV 366nm	CL-1	CL-2	S-2	S-3
V-A	VO	A	A	N	40	18	11	12
W-A	VO	A	A	N	40	18	10	12
Lut.	VO	A	A	N	40	18	11	12
X-A	VO	A	A	N	39	18	11	11
Y-A	VO	A	A	N	40	18	11	12
Z-A	VO	A	A	N	40	17	10	12

TABLA IV-9: Características cromatográficas de los aglicones liberados por hidrólisis (HCl 2N, 120 min, 100°C) de los heterósidos aislados de *Thymus moroderi*. La letra del heterósido seguida de A indica el aglicón correspondiente. Lut.: luteolina. Para otras abreviaturas, ver texto.

## B) Estructura de la sustancia A.

El compuesto A ha sido aislado del extracto clorofórmico e identificado como la 5-OH-6,7,8,3',4'-(OMe)<sub>5</sub>-flavona o 5-desmetilnobiletina, en base a los siguientes datos analíticos:

- Comportamiento cromatográfico: tabla IV-7.
- Espectroscopía UV-visible: figura IV-11.
- Espectrometría de masas (EI-MS): figura IV-12.
- Espectroscopía <sup>1</sup>H-NMR: figura IV-10.



Sustancia A: 5-OH-6,7,8,3',4'-(OMe)<sub>5</sub>-flavona (5-desmetilnobiletina).

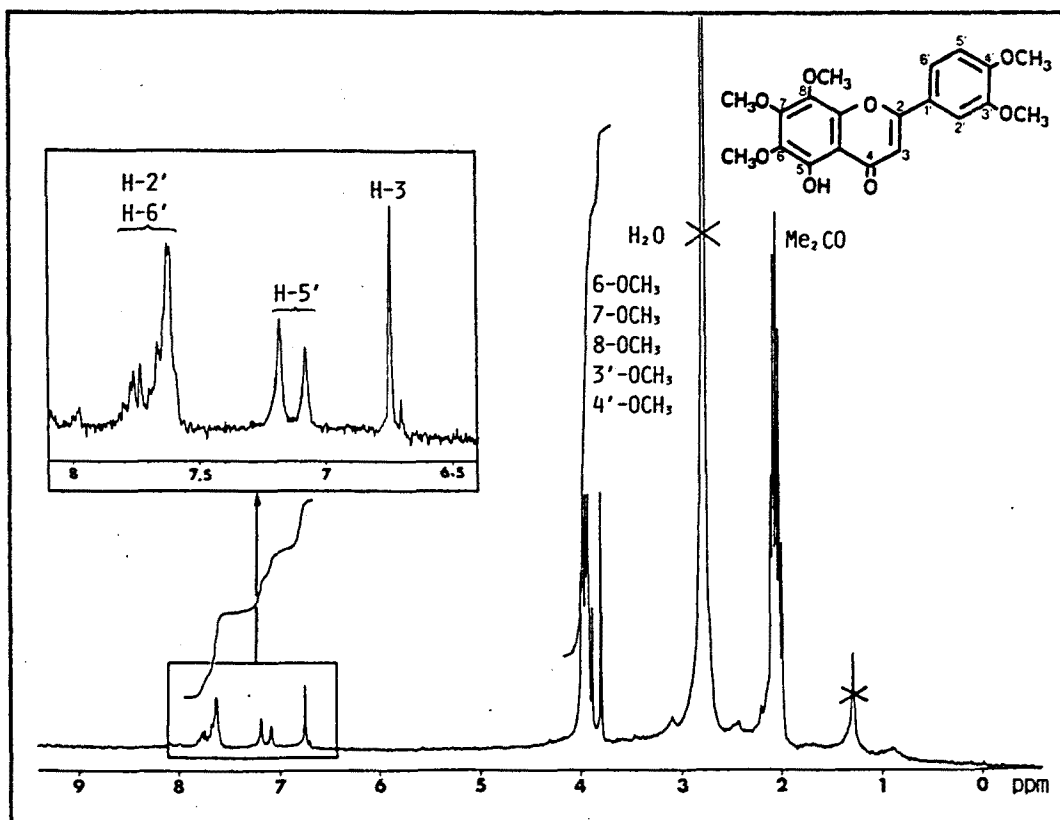
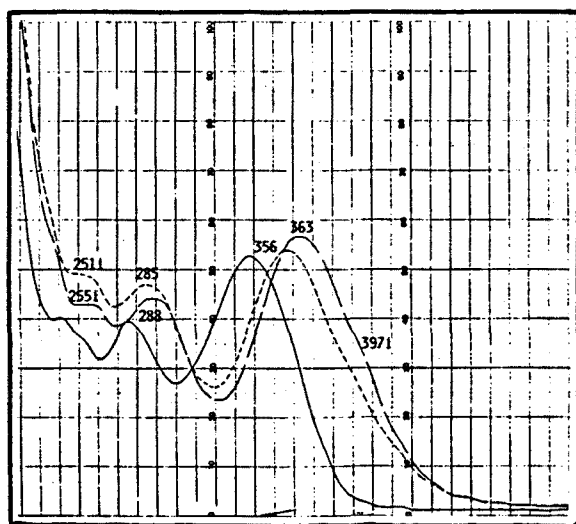
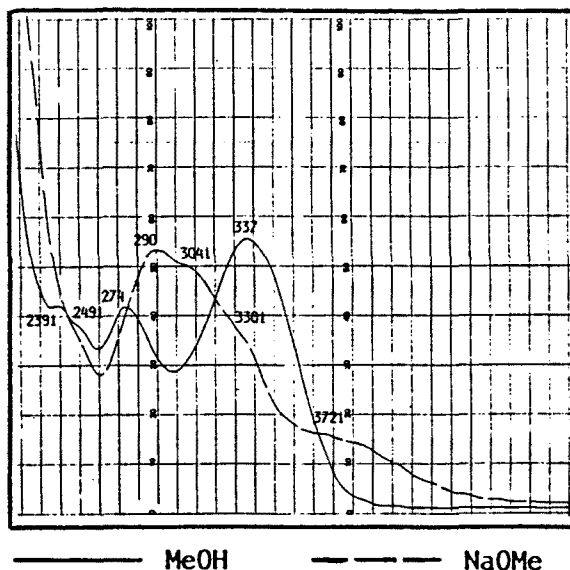
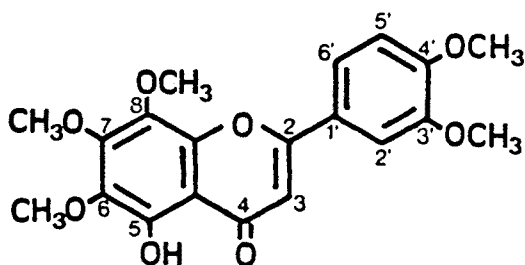
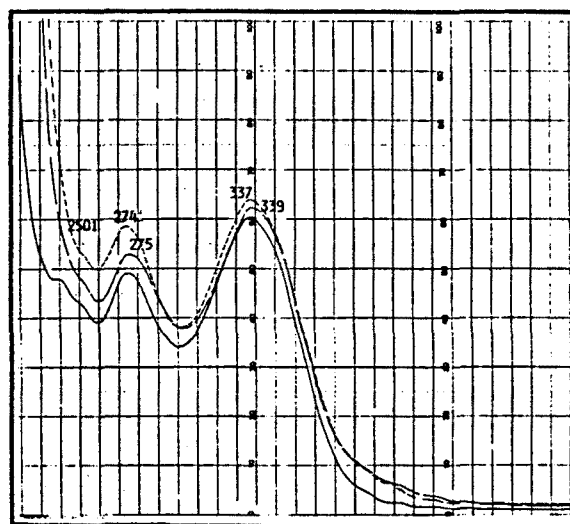


FIGURA IV-10: Espectro de <sup>1</sup>H-NMR (80 MHz, d-Me<sub>2</sub>CO) de la sustancia A.

FIGURA IV-11: Espectros UV-visible de la sustancia A.



————— MeOH      - - - - - AlCl<sub>3</sub>,  
 - . - . - AlCl<sub>3</sub> + HCl



————— MeOH      - - - - - NaOAc  
 - - - - - NaOAc + H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>

Datos espectrales:  $\lambda$  en nm, i = inflexión.

MeOH:	239i	249i	274	337
NaOMe:	290	304i	330i	372i
AlCl <sub>3</sub> :	255i	288	363	397i
AlCl <sub>3</sub> + HCl:	251i	285	356	
NaOAc:	250i	275	339	
NaOAc + H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> :	250i	274	337	

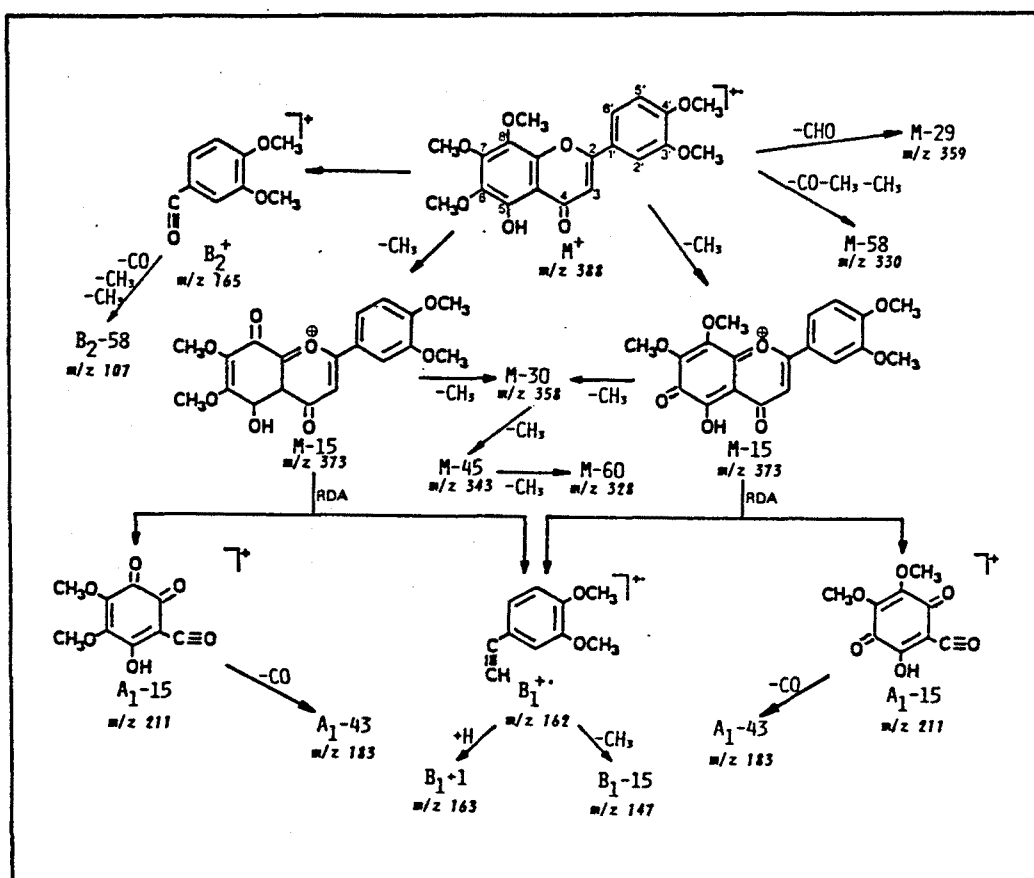
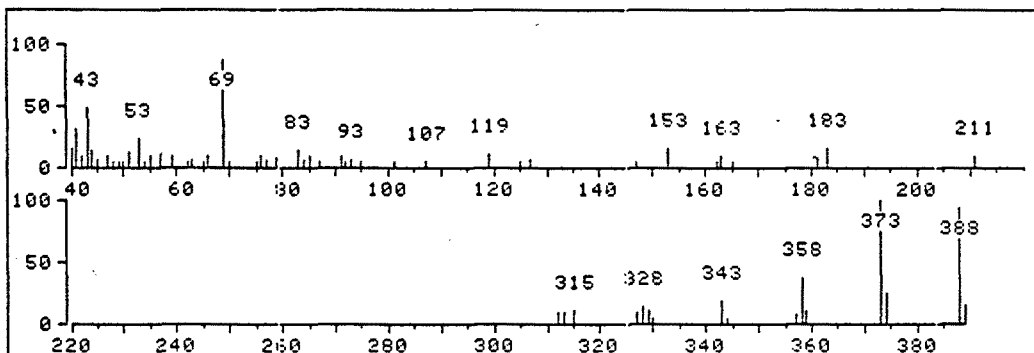
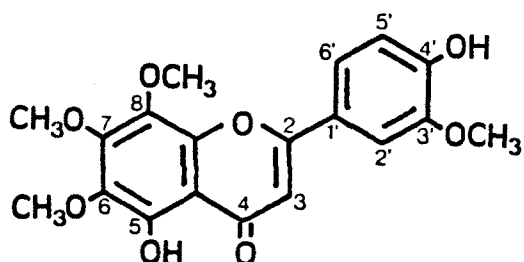


FIGURA IV-12: Espectro EI-MS y fragmentación de la sustancia A.

C) Estructura de la sustancia B.

La sustancia B ha sido aislada, también, del extracto cloro-  
fórmico, e identificada como la 5,4'-(OH)<sub>2</sub>-6,7,8,3'-(OMe)<sub>3</sub>-flavona  
o 8-OMe-cirsilineol a partir de los siguientes datos analíticos:

- Comportamiento cromatográfico: tabla IV-7.
- Espectroscopía UV-visible: figura IV-14.
- Espectrometría de masas (EI-MS): figura IV-15.
- Espectroscopía <sup>1</sup>H-NMR: figura IV-13.



Sustancia B: 5,4'-(OH)<sub>2</sub>-6,7,8,3'-(OMe)<sub>3</sub>-flavona (8-OMe-cirsili-  
neol).

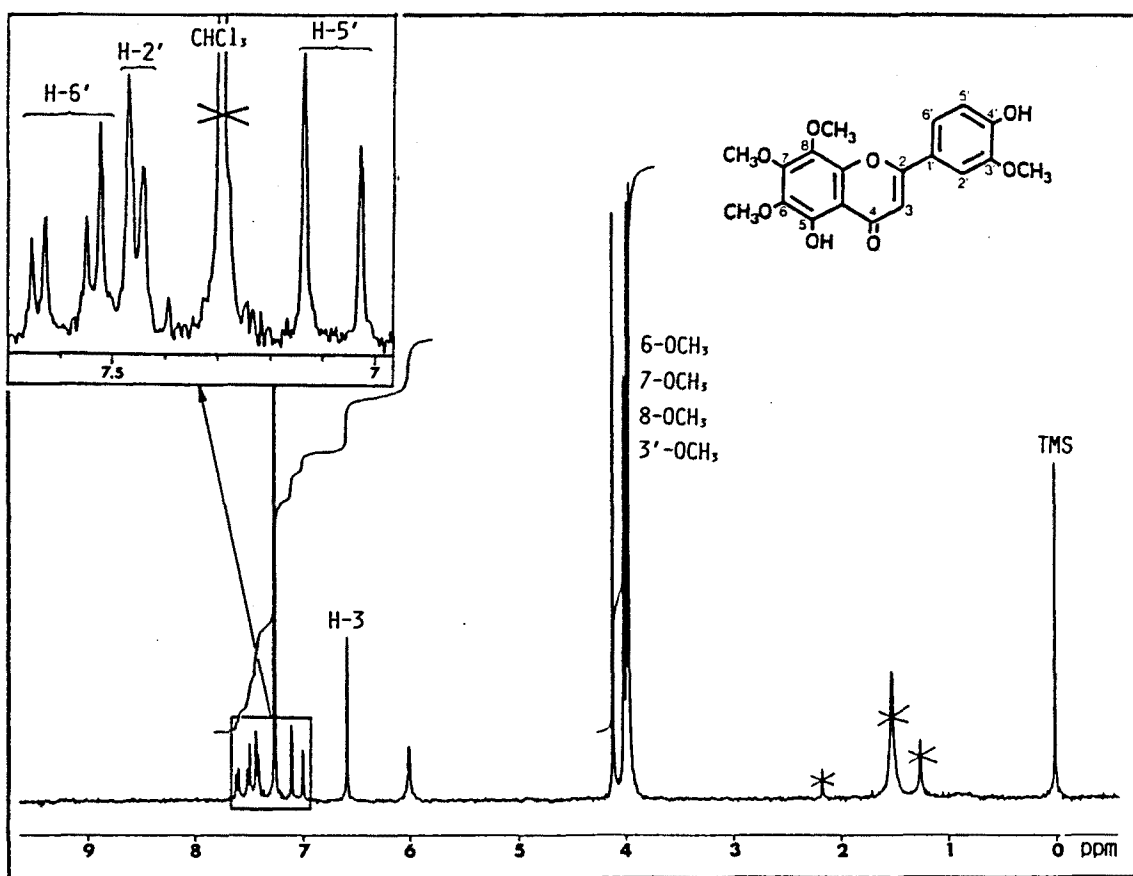
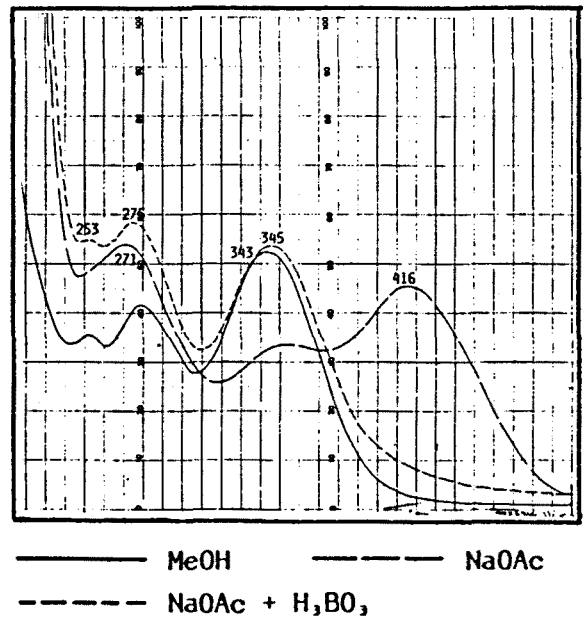
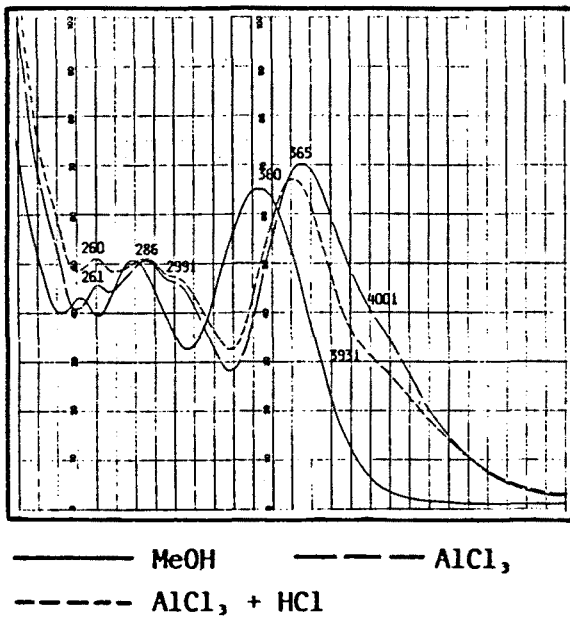
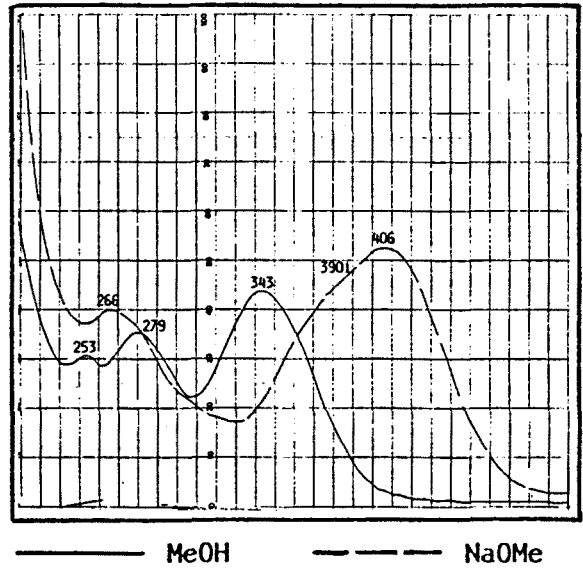
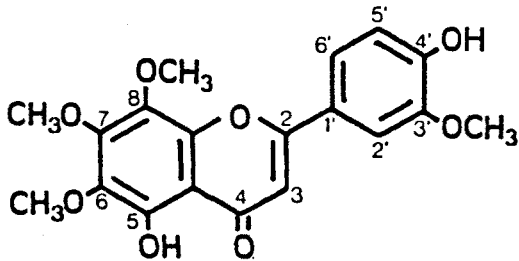


FIGURA IV-13: Espectro <sup>1</sup>H-NMR (80 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de la sustancia B.

FIGURA IV-14: Espectros UV-visible de la sustancia B.



Datos espectrales:  $\lambda$  en nm, i = inflexión.

MeOH:	253	279	343		
NaOMe:	266	390i	406		
AlCl <sub>3</sub> :	261	286	299i	365	400i
AlCl <sub>3</sub> + HCl:	260	286	299i	360	393i
NaOAc:	271	343	416		
NaOAc + H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> :	253	275	345		

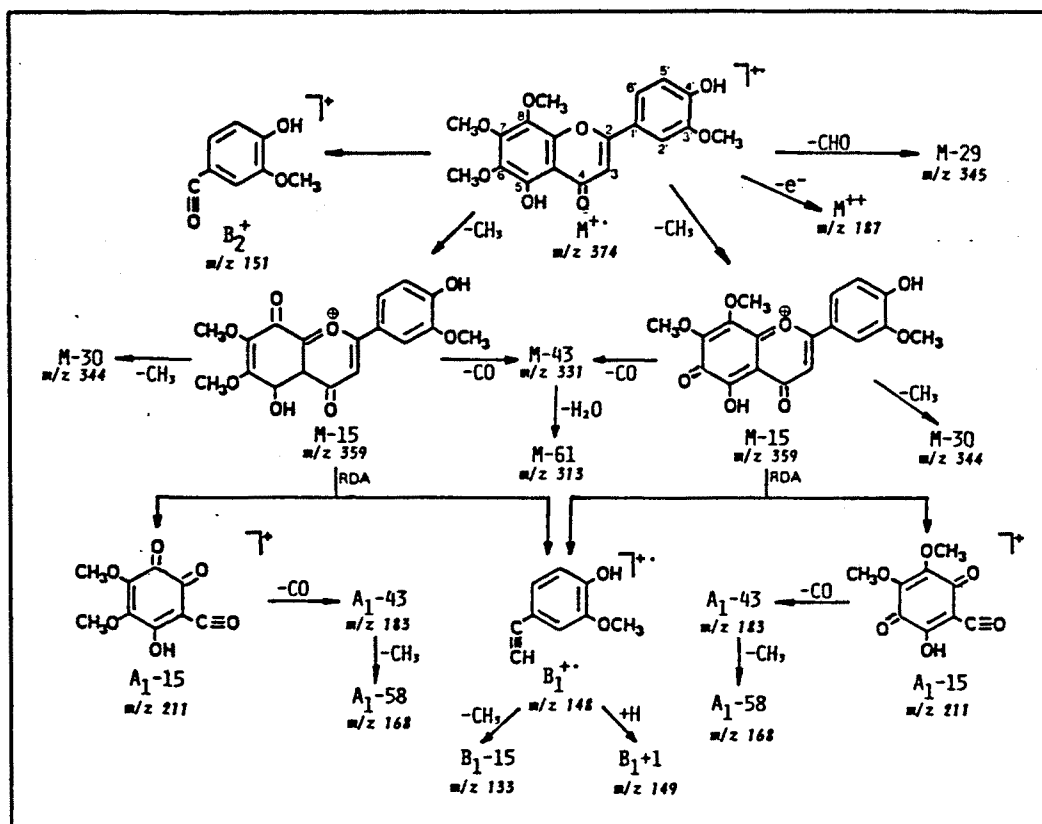
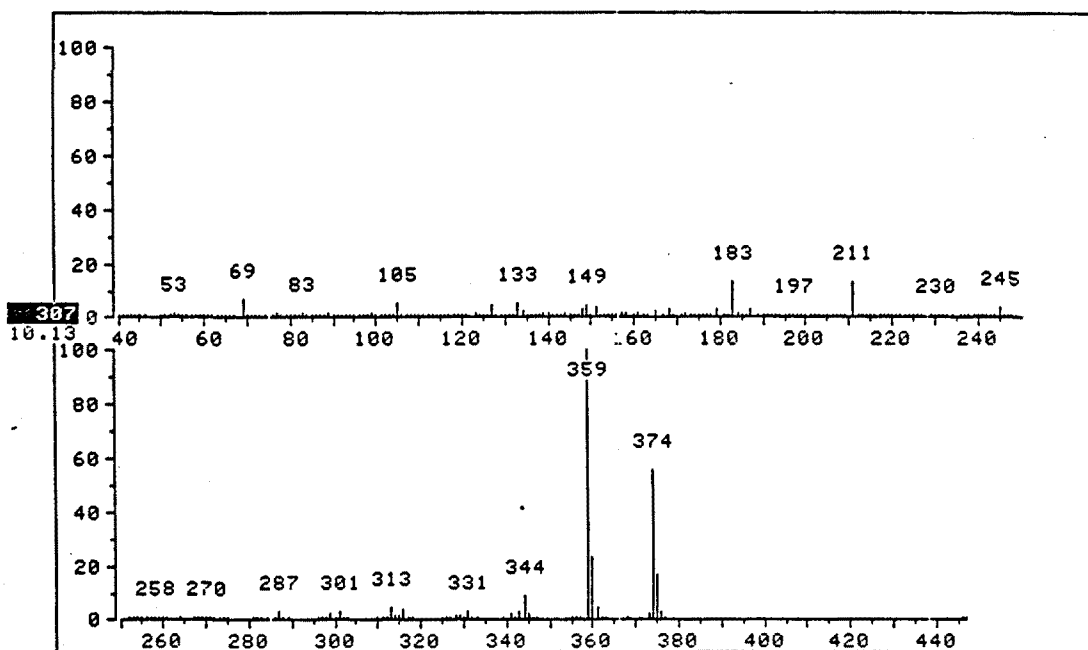
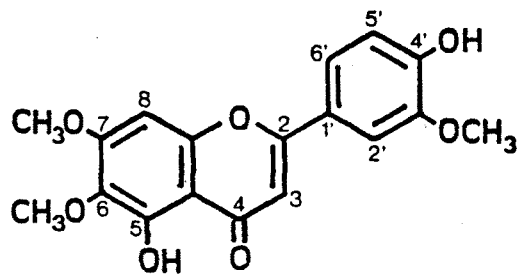


FIGURA IV-15: Espectro EI-MS y fragmentación de la sustancia B.

#### D) Estructura de la sustancia C.

Este compuesto se ha aislado del extracto clorofórmico e identificado como la 5,4'-(OH)<sub>2</sub>-6,7,3'-(OMe)<sub>3</sub>-flavona o cirsilineol, a partir de sus datos analíticos:

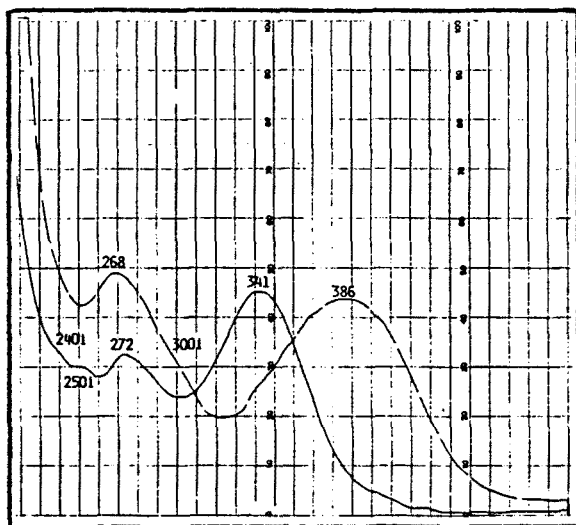
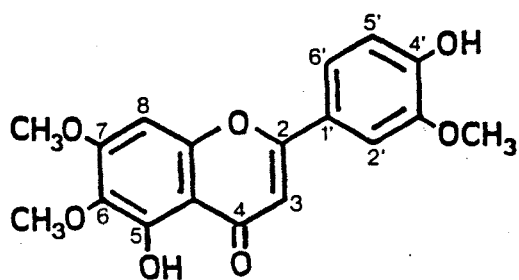
- Comportamiento cromatográfico: tabla IV-7.
- Espectroscopía UV-visible: figura IV-16.
- Espectrometría de masas (EI-MS): figura IV-17.



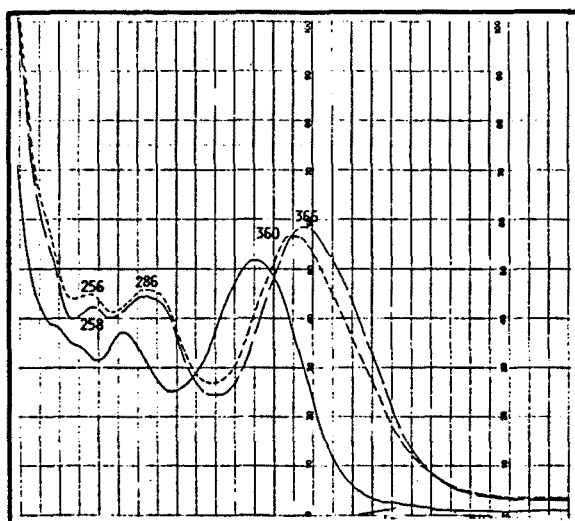
Substancia C: 5,4'-(OH)<sub>2</sub>-6,7,3'-(OMe)<sub>3</sub>-flavona  
(cirsilineol).



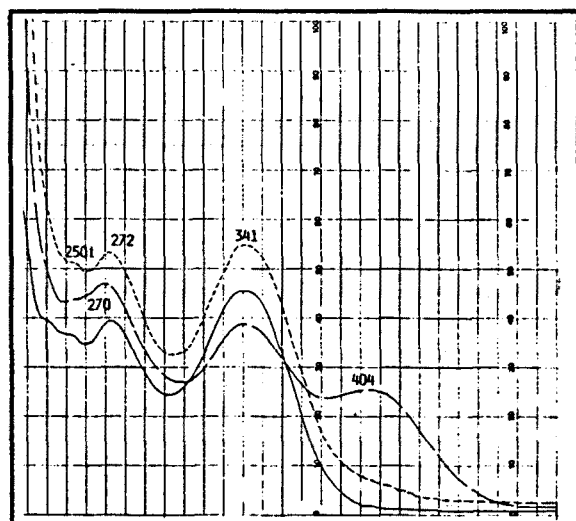
FIGURA IV-16: Espectros UV-visible de la sustancia C.



———— MeOH      - - - - NaOMe



———— MeOH      - - - - AlCl<sub>3</sub>,  
 - · - · AlCl<sub>3</sub>, + HCl



———— MeOH      - - - - NaOAc  
 - - - - NaOAc + H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>

Datos espectrales:  $\lambda$  en nm, i = inflexión.

MeOH:	240i	250i	272	341
NaOMe:	268	300i	386	
AlCl <sub>3</sub> :	258	286	366	
AlCl <sub>3</sub> , + HCl:	256	286	360	
NaOAc:	270	341	404	
NaOAc + H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> :	250i	272	341	

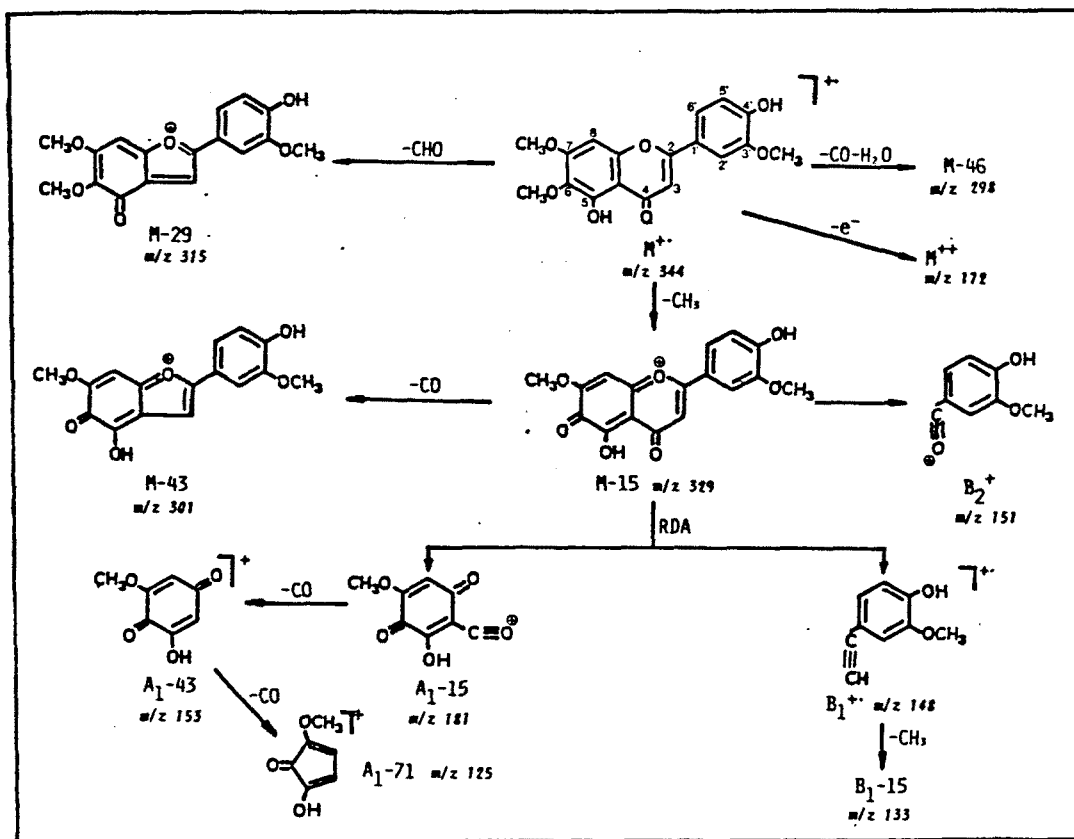
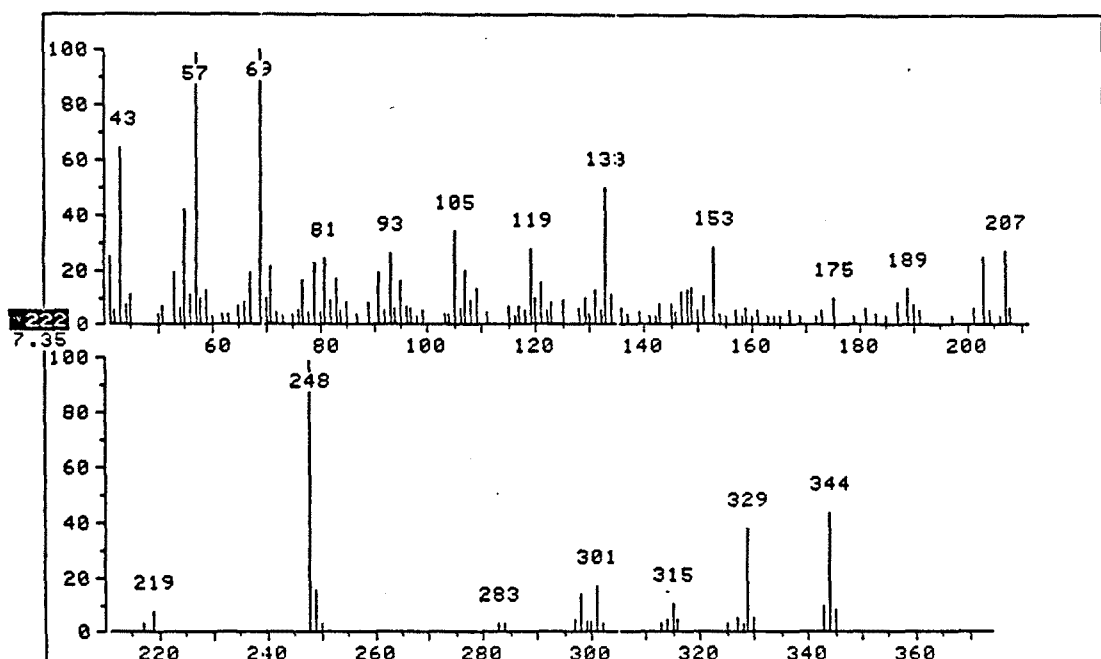


FIGURA IV-17: Espectro EI-MS y fragmentación de la sustancia C.

## E) Estructura de la sustancia D.

La sustancia D ha sido aislada a partir del extracto cloro-fórmico.

Datos analíticos:

- Comportamiento cromatográfico: tabla IV-7.
- Espectroscopía UV-visible: figura IV-19.
- Espectrometría de masas (EI-MS): figura IV-20.
- Espectroscopía  $^1\text{H-NMR}$ : figura IV-18.

El comportamiento cromatográfico de la sustancia D es el de una flavanona bastante apolar o dihidroflavonol substituidos en las posiciones 6 y/u 8, ya que no se revela.

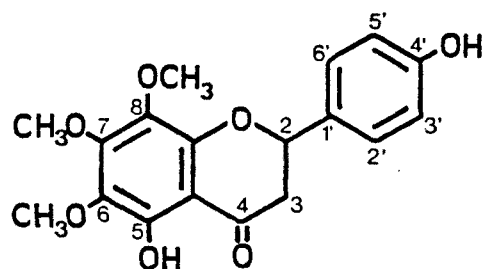
Sus espectros UV-visible nos indican que se trata de una flavanona o dihidroflavonol (banda I de muy baja intensidad) con un hidroxilo libre en la posición 5 ( $\Delta\lambda_{\text{II}}$  en  $\text{AlCl}_3+\text{HCl}$  respecto al MeOH de 27 nm) y sin grupos  $\text{o}-(\text{OH})_2$  en el anillo A ( $\Delta\lambda_{\text{II}}$  en  $\text{NaOAc}+\text{H}_3\text{BO}_3$  respecto al MeOH de cero nm). La ausencia de desplazamiento de la banda II en NaOAc respecto al MeOH indica que no se trata de una 5,7- $(\text{OH})_2$ -flavanona.

El EI-MS presenta un  $\text{M}^{+\cdot}$  a  $m/z$  346 ( $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{O}_7$ ) correspondiente a una flavanona o dihidroflavonol con 2 hidroxilos y 3 metoxilos. Los iones  $\text{A}_1^{+\cdot}$ ,  $\text{A}_1-15$  y  $\text{A}_1-43$  a  $m/z$  226, 211 y 183, respectivamente, caracterizan un anillo A con un hidroxilo y tres metoxilos. El anillo B posee un hidroxilo tal como lo indica el ión  $\text{B}_3^{+\cdot}$  a  $m/z$  120, típico de esta clase de flavonoides.

El espectro de  $^1\text{H-NMR}$  es característico de una flavanona. En él, el protón H-2 aparece como cuarteto (2 dobletes correspondientes a  $J_{\text{cis}} = 5,3$  Hz y  $J_{\text{trans}} = 10,6$  Hz) a 5,4 ppm como resultado del acoplamiento del H-2 con los dos protones del carbono 3. Los protones en C-3, además, acoplan entre ellos, dando lugar a dos cuartetos superpuestos entre 2,6 y 3,3 ppm. Se observan, también, los protones del anillo B, que dan un sistema simétrico típico de benceno p-disustituido, y tres metoxilos (señales entre 3,7 y

4,2 ppm) correspondientes a los de las posiciones 6, 7 y 8.

Todos estos datos permiten establecer la estructura de la sustancia D como la de la 5,4'-(OH)<sub>2</sub>-6,7,8-(OMe)<sub>3</sub>-flavanona o dihidroxantomicol.



Sustancia D: 5,4'-(OH)<sub>2</sub>-6,7,8-(OMe)<sub>3</sub>-flavanona (dihydroxantomicol).

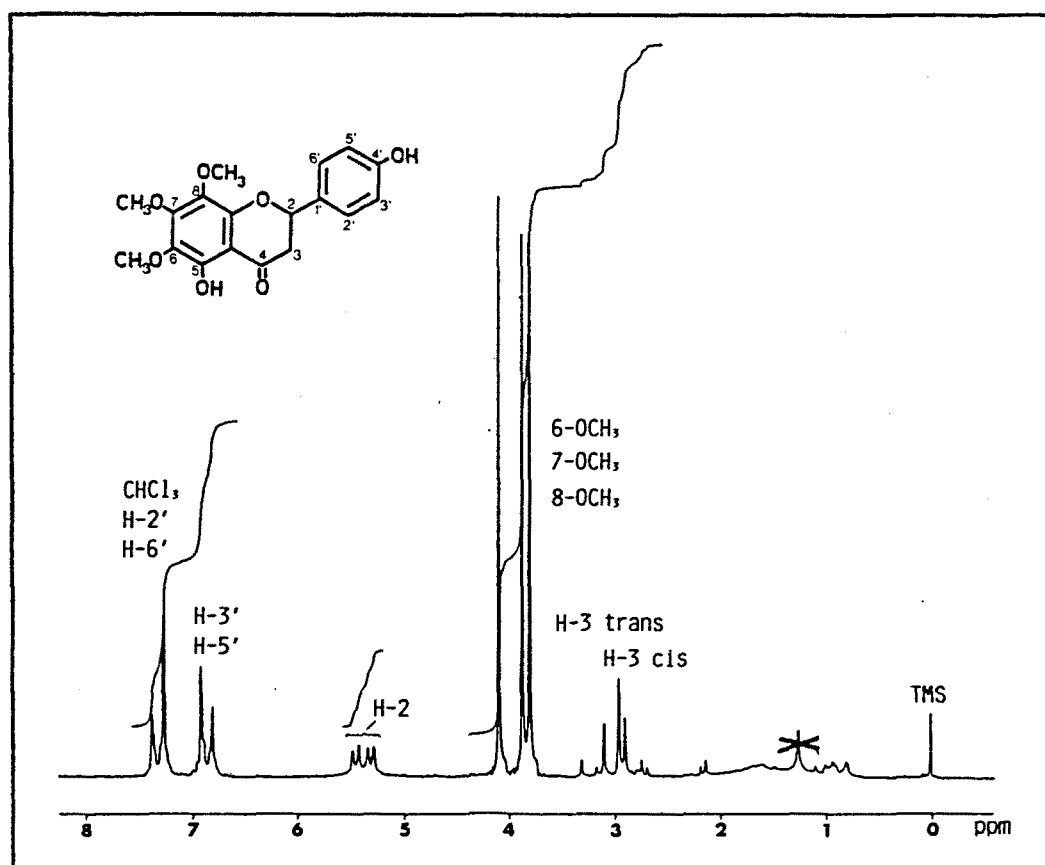
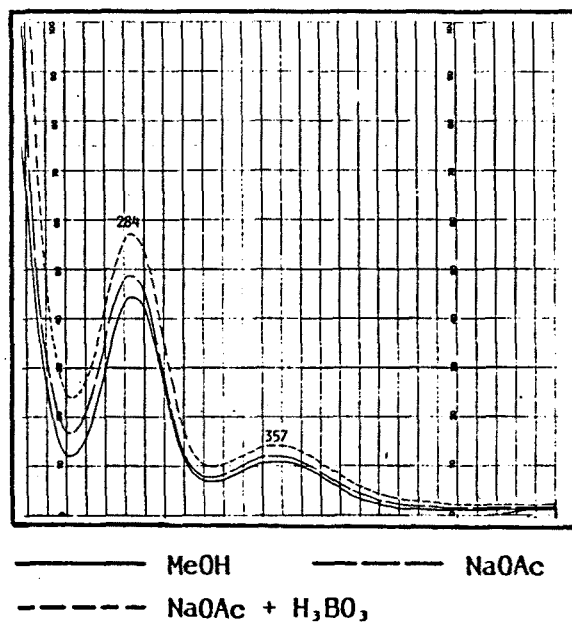
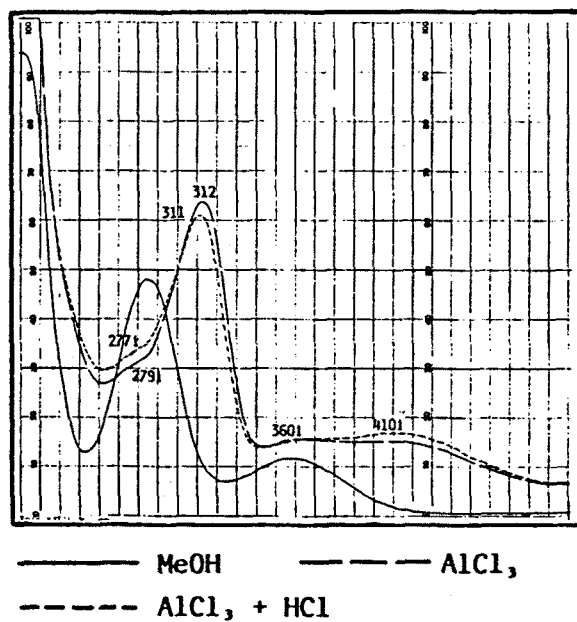
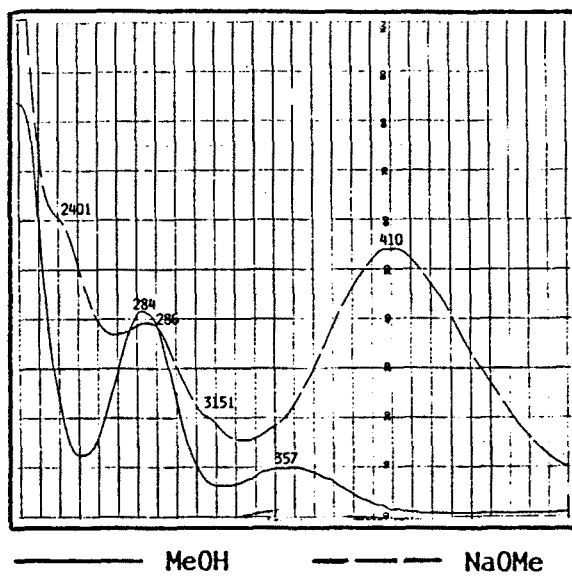
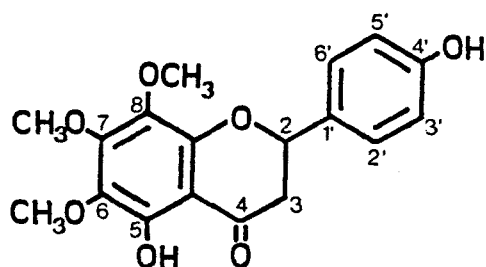


FIGURA IV-18: Espectro de <sup>1</sup>H-NMR (80 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de la sustancia D.

FIGURA IV-19: Espectros UV-visible de la sustancia D.



Datos espectrales:  $\lambda$  en nm, i = inflexión.

MeOH:	284	357		
NaOMe:	240i	286	315i	410
AlCl <sub>3</sub> :	279i	312	360i	410i
AlCl <sub>3</sub> + HCl:	277i	311	360i	410i
NaOAc:	284	357		
NaOAc + H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> :	284	357		

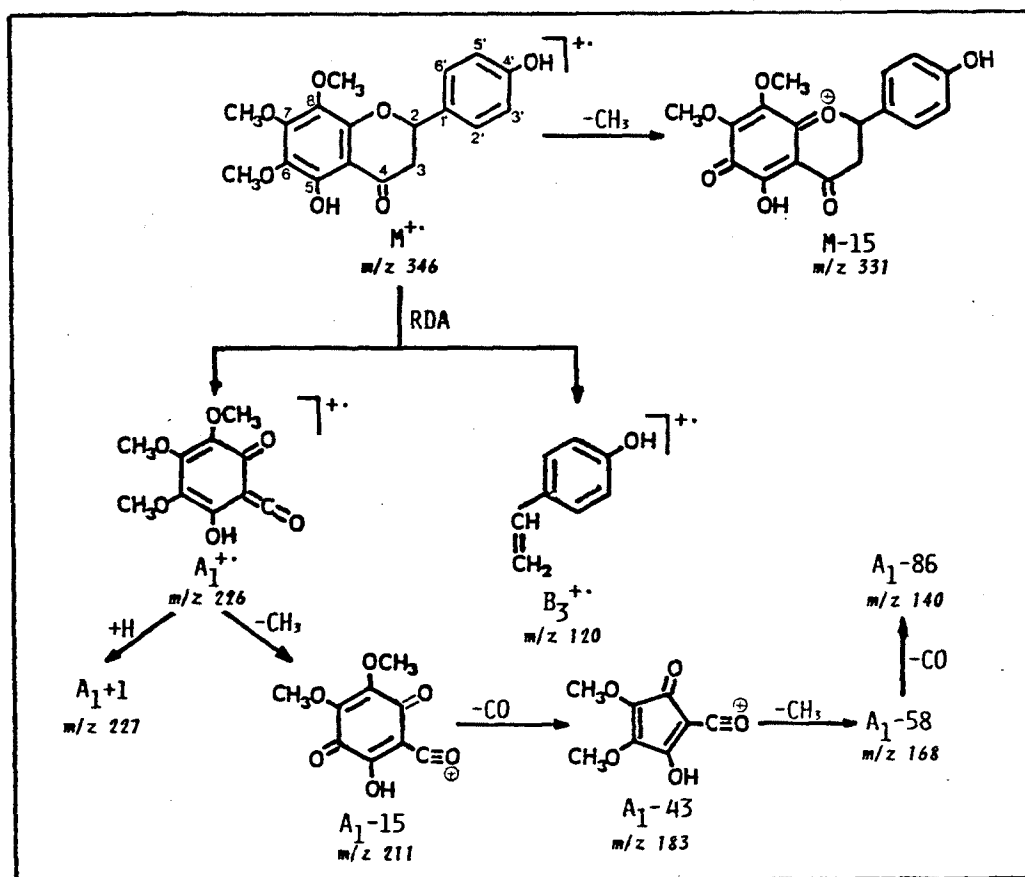
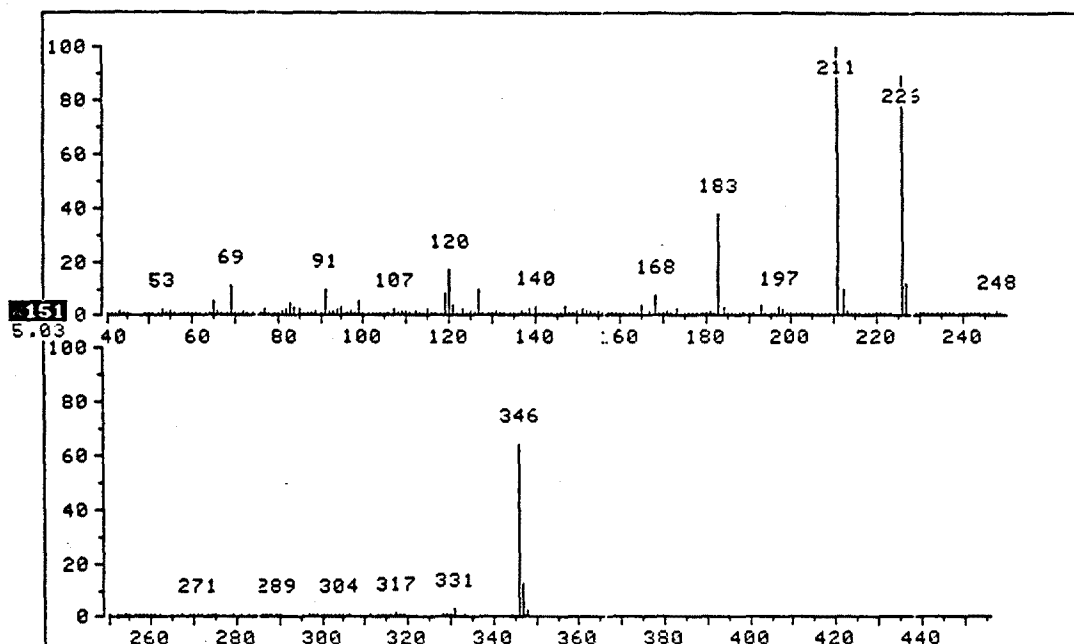


FIGURA IV-20: Espectro EI-MS y fragmentación de la sustancia D.

## F) Estructura de la sustancia E.

La sustancia E ha sido aislada del extracto clorofórmico.

Datos analíticos:

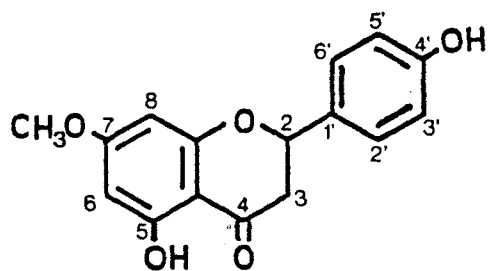
- Comportamiento cromatográfico: tabla IV-7.
- Espectroscopía UV-visible: figura IV-22.
- Espectrometría de masas (EI-MS): figura IV-23.
- Espectroscopía  $^1\text{H-NMR}$ : figura IV-21.

El comportamiento cromatográfico del compuesto E así como sus espectros UV-visible indican que se trata de una flavanona o dihidroflavonol (banda I de muy baja intensidad) con hidroxilo libre en 5 ( $\Delta\lambda_{\text{II}}$  en  $\text{AlCl}_3+\text{HCl}$  respecto a  $\text{MeOH}$  de 21 nm) y sin grupos  $\text{o}-(\text{OH})_2$  en el anillo A (ausencia de desplazamiento de la banda II en  $\text{NaOMe}$  y  $\text{NaOAc}+\text{H}_3\text{BO}_3$  respecto a  $\text{MeOH}$ ).

La sustancia E tiene un peso molecular de 286 ( $\text{M}^{+\cdot}$  en EI-MS), con una fórmula molecular  $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_5$ , correspondiente a una dihidroxi-metoxiflavanona o dihidroflavonol. Los fragmentos  $\text{A}_1^{+\cdot}$ ,  $\text{A}_1+1$ ,  $\text{A}_1-28$  y  $\text{A}_1-43$  a  $m/z$  166, 167, 138 y 123, respectivamente, manifiestan la presencia de un hidroxilo en 5 y un metoxilo en 7 en el anillo A. El hidroxilo restante se encuentra en el anillo B, como lo demuestra el ión  $\text{B}_3^{+\cdot}$  a  $m/z$  120. El espectro EI-MS muestra, también, el fragmento a  $m/z$  193 correspondiente a  $[\text{M-anillo B}]^{+\cdot}$  característico de este tipo de flavonoides.

El espectro de  $^1\text{H-NMR}$  confirma que se trata de una flavanona (protón H-2 a 5,3 ppm y dos protones en C-3, señales entre 2,3 y 3,3 ppm) monometoxilada (señal a 3,8 ppm), con las posiciones 6 y 8 del anillo A libres. El anillo B presenta un sistema simétrico típico de benceno  $p$ -disustituido.

La sustancia E resulta ser, pues, la 5,4'-(OH) $_2$ -7-OMe-flavanona o sakuranetina.



Substancia E: 5,4'-(OH)<sub>2</sub>-7-Ome-flavanona  
(sakuranetina).

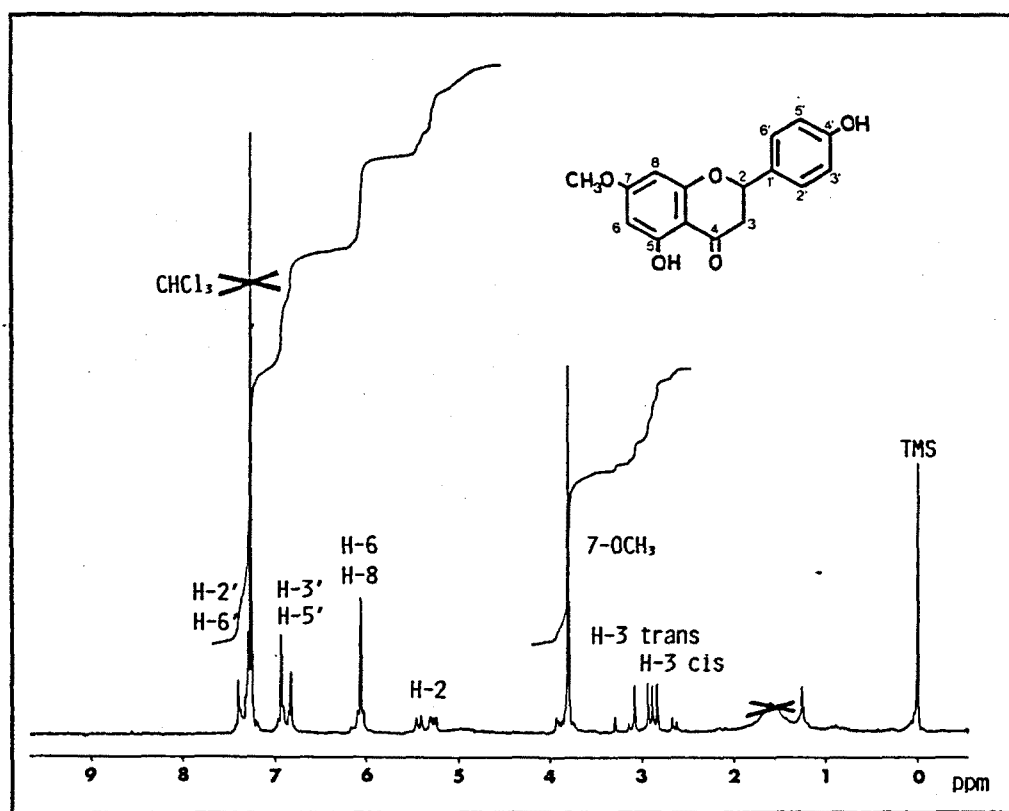
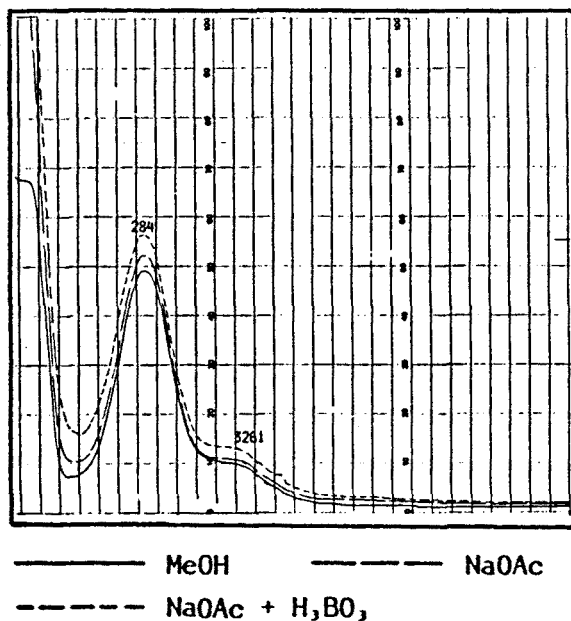
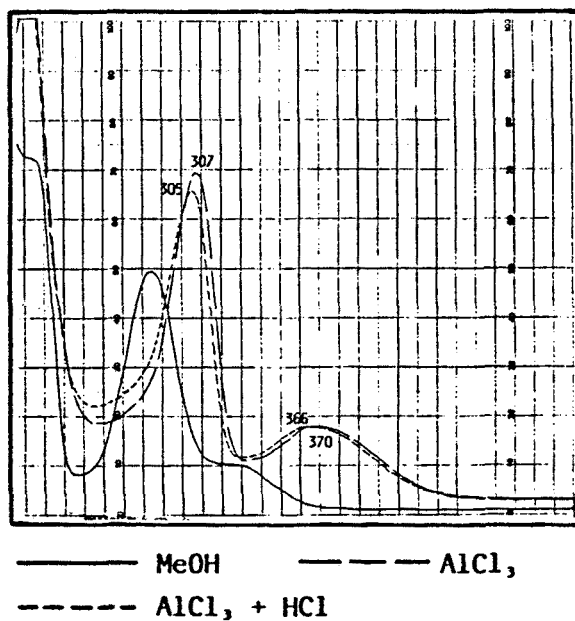
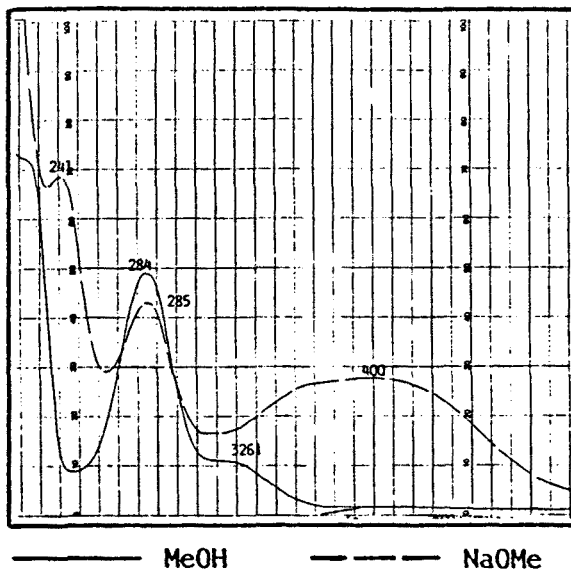
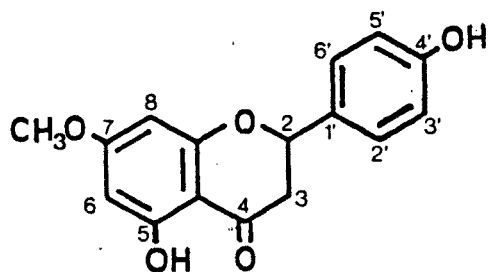


FIGURA IV-21: Espectro <sup>1</sup>H-NMR (80 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de la substancia E.



FIGURA IV-22: Espectros UV-visible de la sustancia E.



Datos espectrales:  $\lambda$  en nm, i = inflexión.

MeOH:	284	326i	
NaOMe:	241	285	400
AlCl <sub>3</sub> :	307	370	
AlCl <sub>3</sub> + HCl:	305	366	
NaOAc:	284	326i	
NaOAc + H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> :	284	326i	

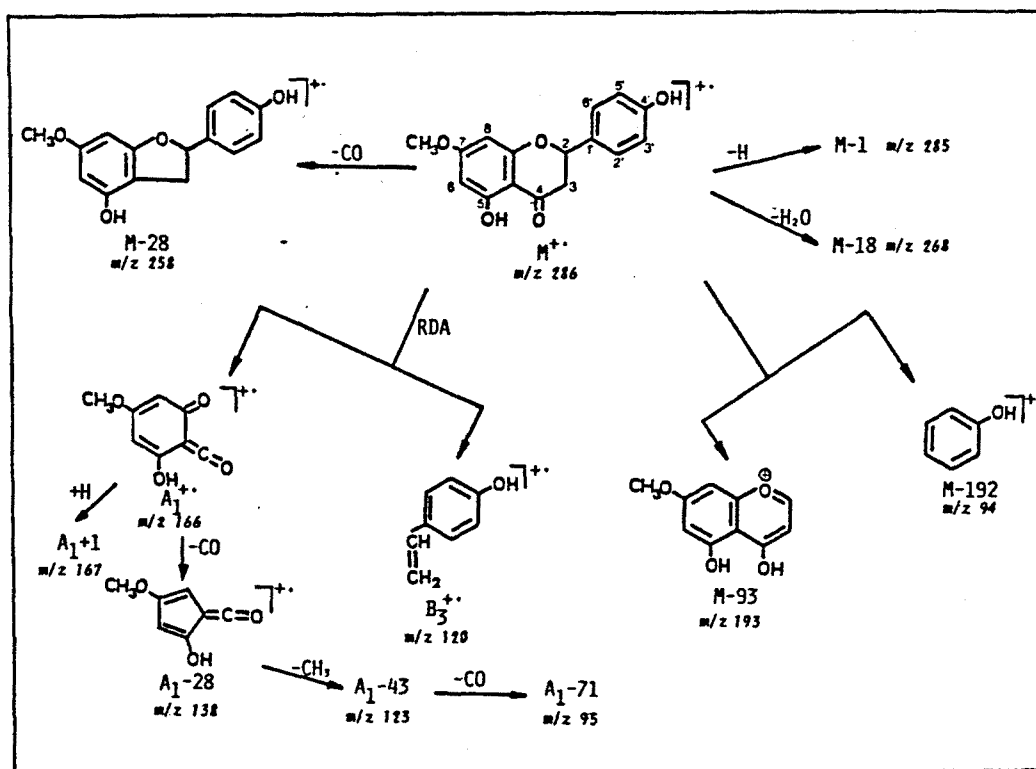
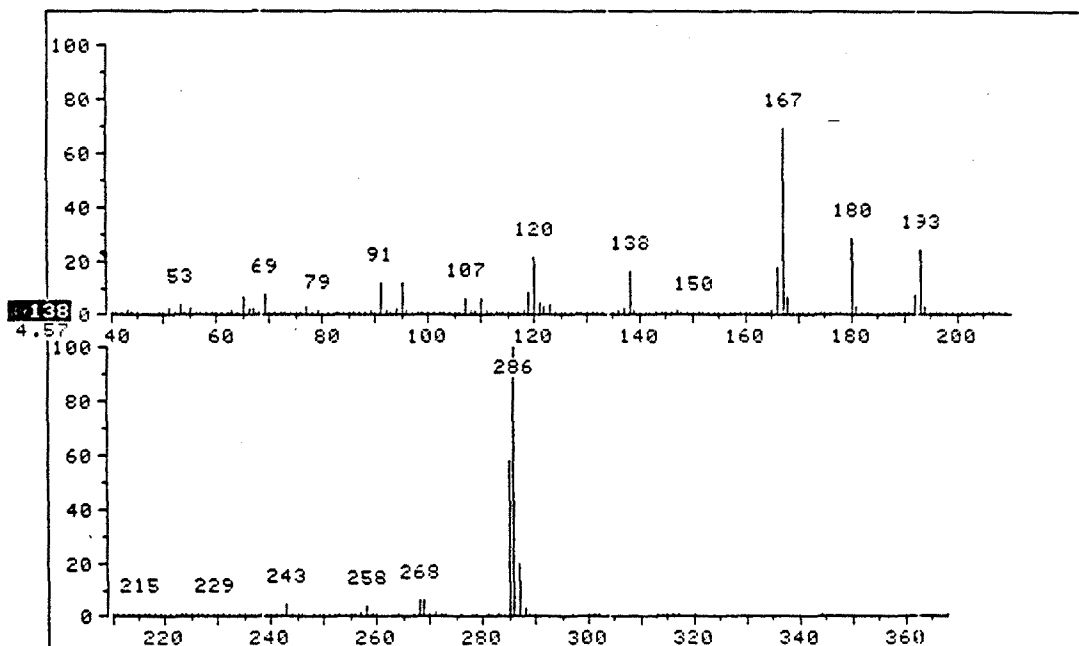
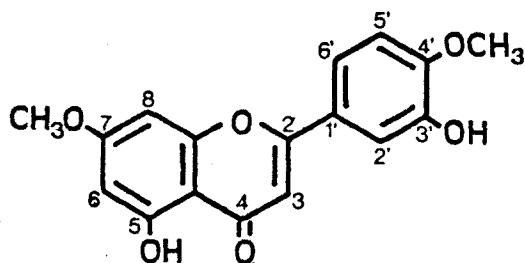


FIGURA IV-23: Espectro EI-MS y fragmentación de la sustancia E.

### G) Estructura de la sustancia F.

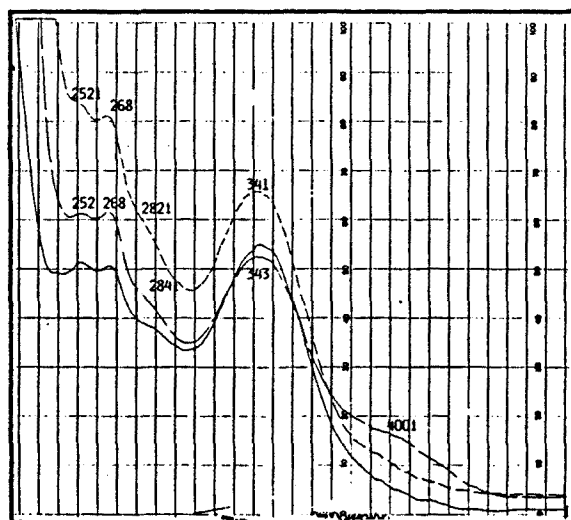
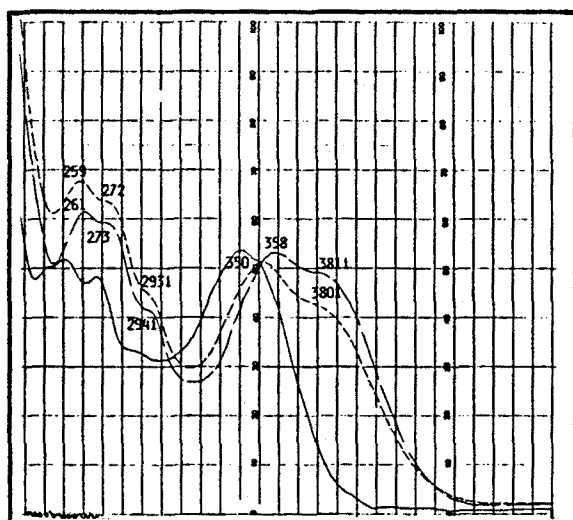
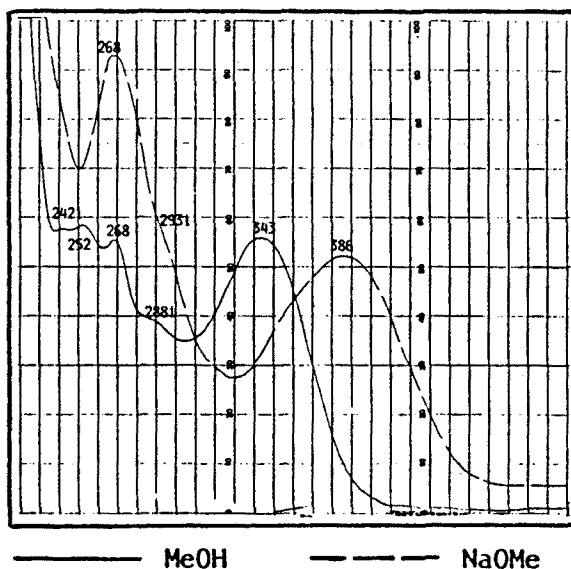
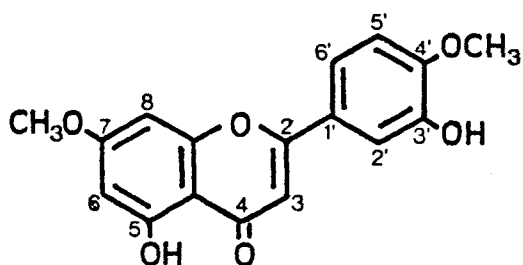
El compuesto F ha sido aislado del extracto clorofórmico en cantidad inferior al milígramo, por lo que no ha sido posible registrar su espectro de  $^1\text{H-NMR}$ . Ha sido identificado como la 5,3'-(OH)<sub>2</sub>-7,4'-(OMe)<sub>2</sub>-flavona a partir de los siguientes datos analíticos:

- Comportamiento cromatográfico: tabla IV-7.
- Espectroscopía UV-visible: figura IV-24.
- Espectrometría de masas (EI-MS): figura IV-25.



Substancia F: 5,3'-(OH)<sub>2</sub>-7,4'-(OMe)<sub>2</sub>-flavona  
(pilloína)

FIGURA IV-24: Espectros UV-visible de la sustancia F.



———— MeOH      - - - - AlCl<sub>3</sub>,  
 - - - - AlCl<sub>3</sub>, + HCl

———— MeOH      - - - - NaOAc  
 - - - - NaOAc + H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>

Datos espectrales:  $\lambda$  en nm, i = inflexión.

MeOH:	242i	252	268	288i	343
NaOMe:	268	293i	386		
AlCl <sub>3</sub> :	261	273	294i	358	381i
AlCl <sub>3</sub> , + HCl:	259	272	293i	351	380i
NaOAc:	252	268	284i	343	400i
NaOAc + H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> :	252i	268	282i	341	

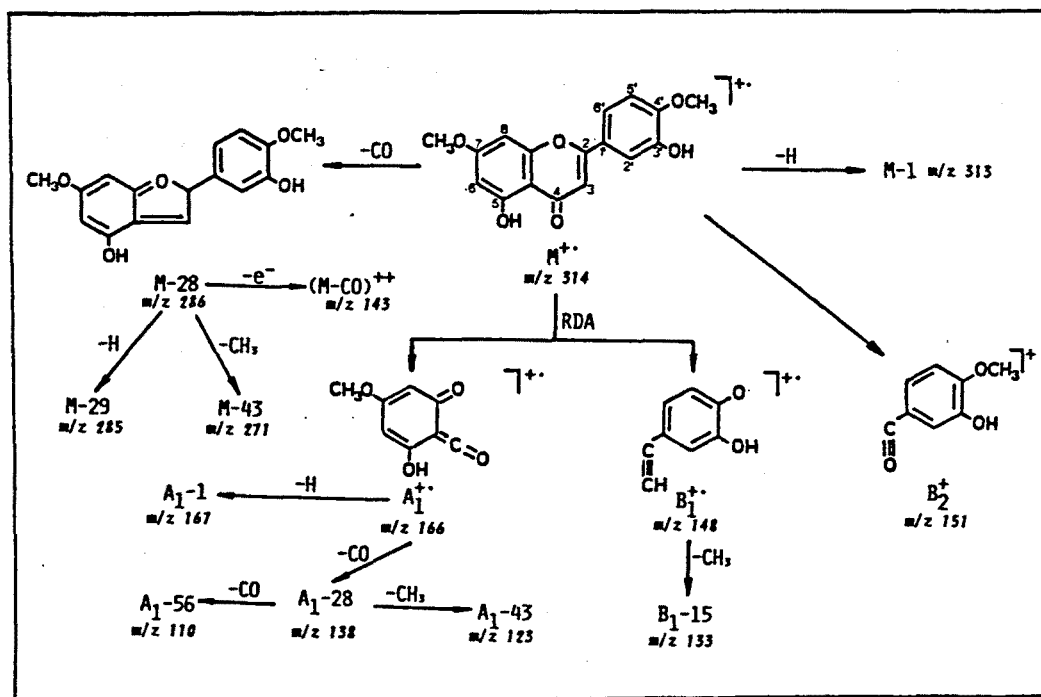
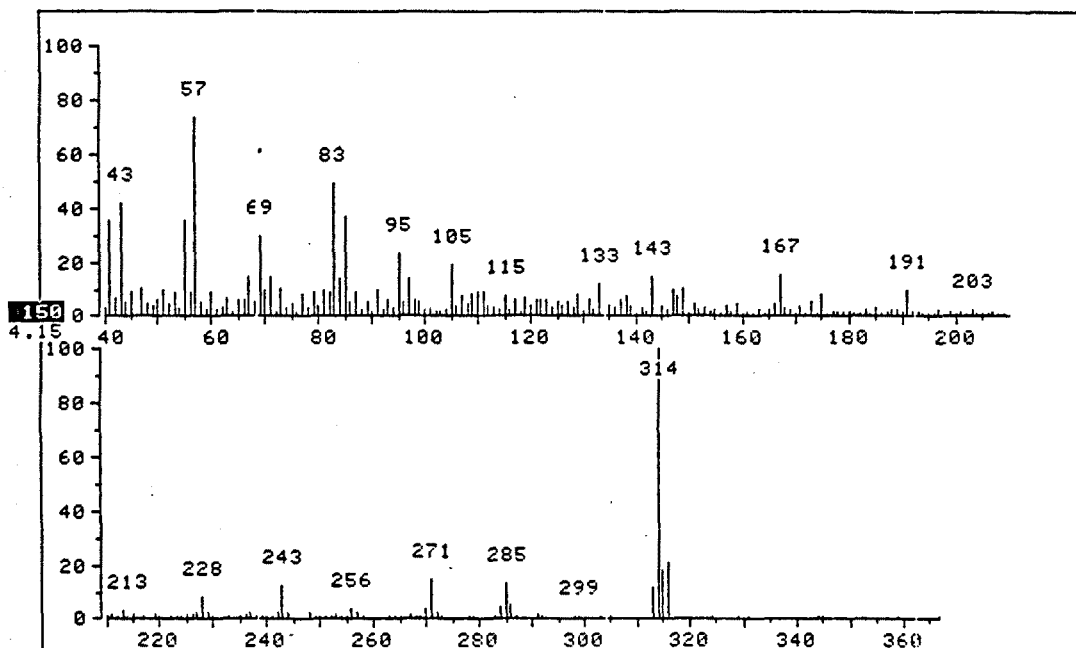
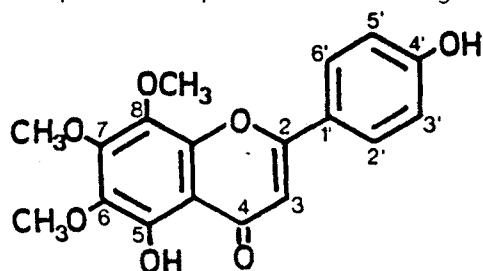


FIGURA IV-25: Espectro EI-MS y fragmentación de la sustancia F.

## H) Estructura de la sustancia G.

La sustancia G ha sido aislada del extracto clorofórmico e identificada en base a sus datos analíticos como la 5,4'-(OH)<sub>2</sub>-6,7,8-(OMe)<sub>3</sub>-flavona o xantomicol:

- Comportamiento cromatográfico: tabla IV-7.
- Espectroscopía UV-visible: figura IV-28.
- Espectrometría de masas (EI-MS): figura IV-29.
- Espectroscopía <sup>1</sup>H-NMR: figura IV-26.
- Espectroscopía <sup>13</sup>C-NMR: figura IV-27.



Sustancia G: 5,4'-(OH)<sub>2</sub>-6,7,8-(OMe)<sub>3</sub>-flavona (xantomicol).

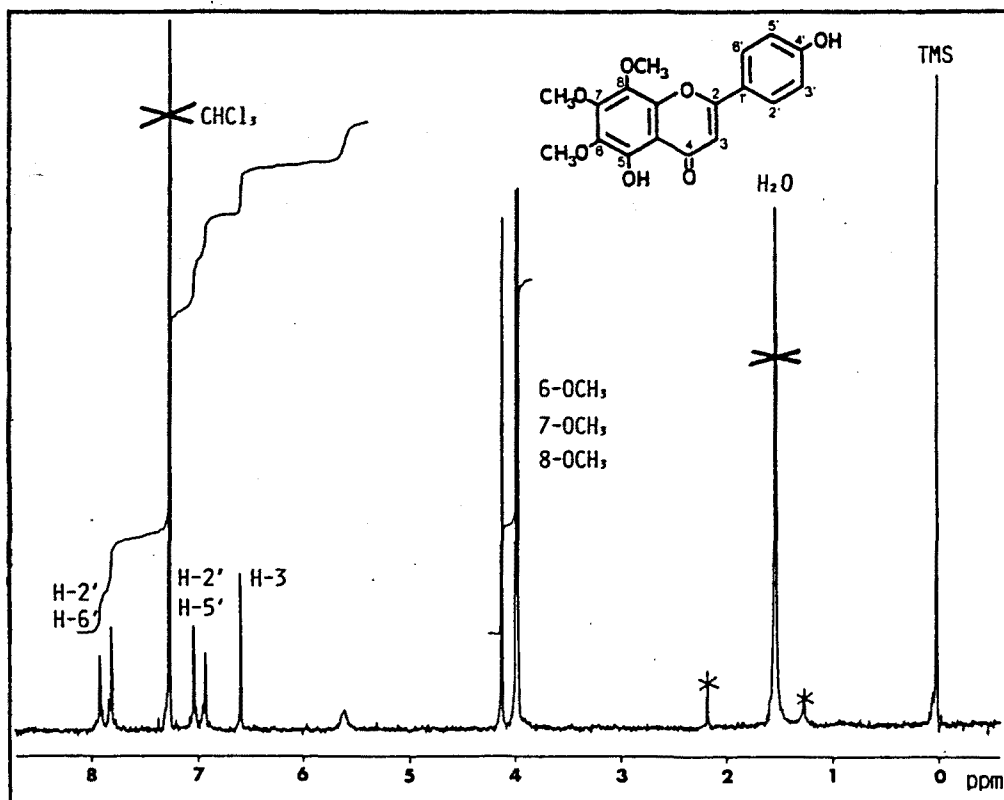


FIGURA IV-26: Espectro <sup>1</sup>H-NMR (80 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de la sustancia G.

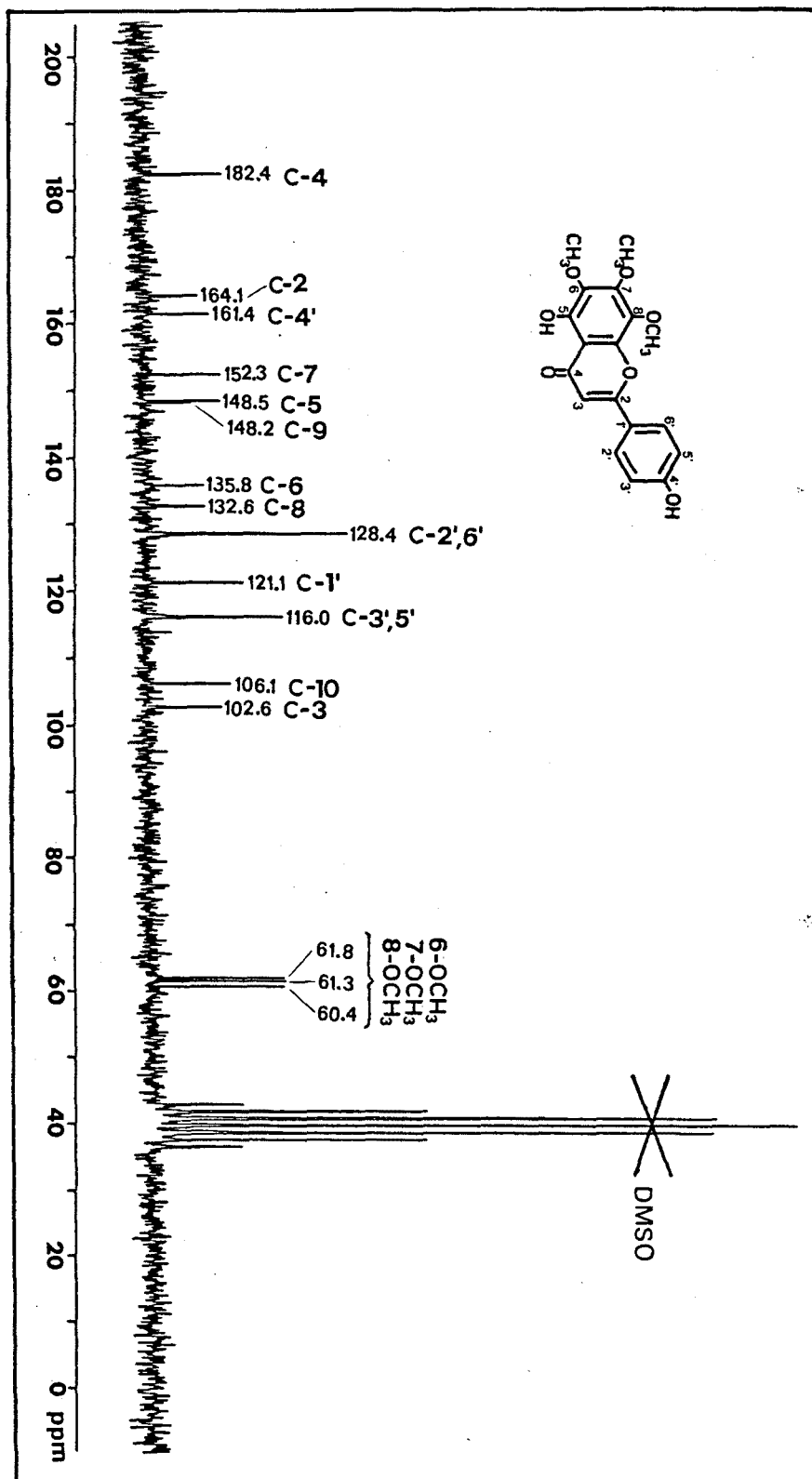
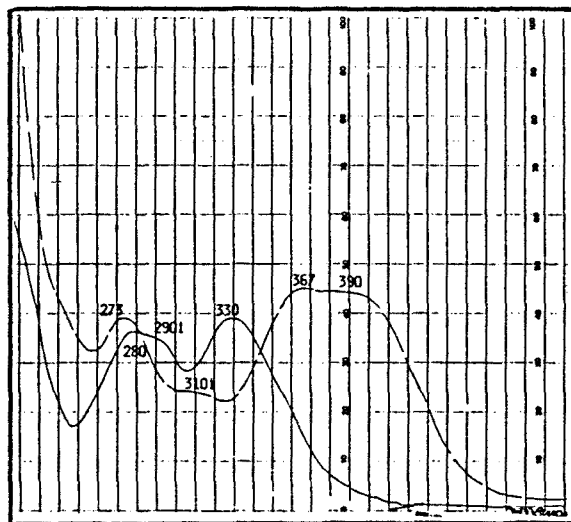
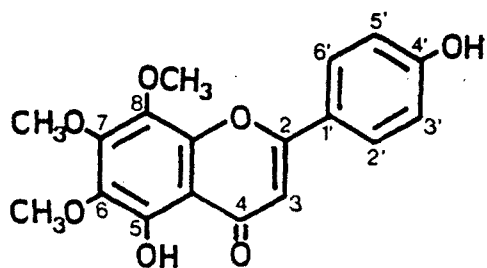
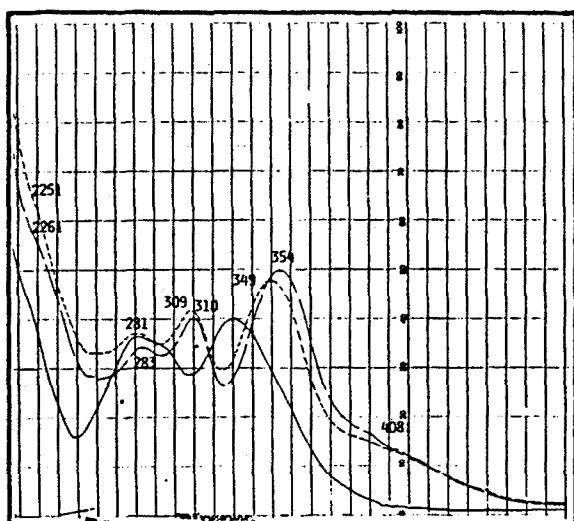


FIGURA IV-27: Espectro de  $^{13}\text{C}$ -NMR (20,14 MHz, d-DMSO) de la substancia G.

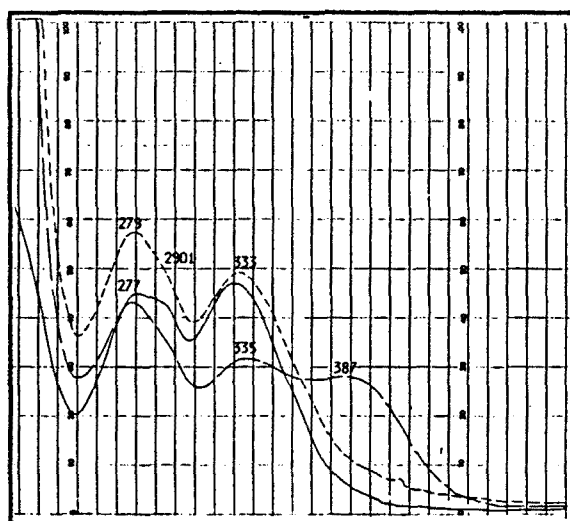
FIGURA IV-28: Espectros UV-visible de la sustancia G.



———— MeOH      - - - - NaOMe



———— MeOH      - - - - AlCl<sub>3</sub>,  
 - . - . AlCl<sub>3</sub>, + HCl



———— MeOH      - - - - NaOAc  
 - . - . NaOAc + H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>,

Datos espectrales:  $\lambda$  en nm, i = inflexión.

MeOH:	280	290i	330		
NaOMe:	273	310i	367	390	
AlCl <sub>3</sub> :	226i	283	310	354	408i
AlCl <sub>3</sub> , + HCl:	225i	281	309	349	408i
NaOAc:	277	335	387		
NaOAc + H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> :	279	290i	333		



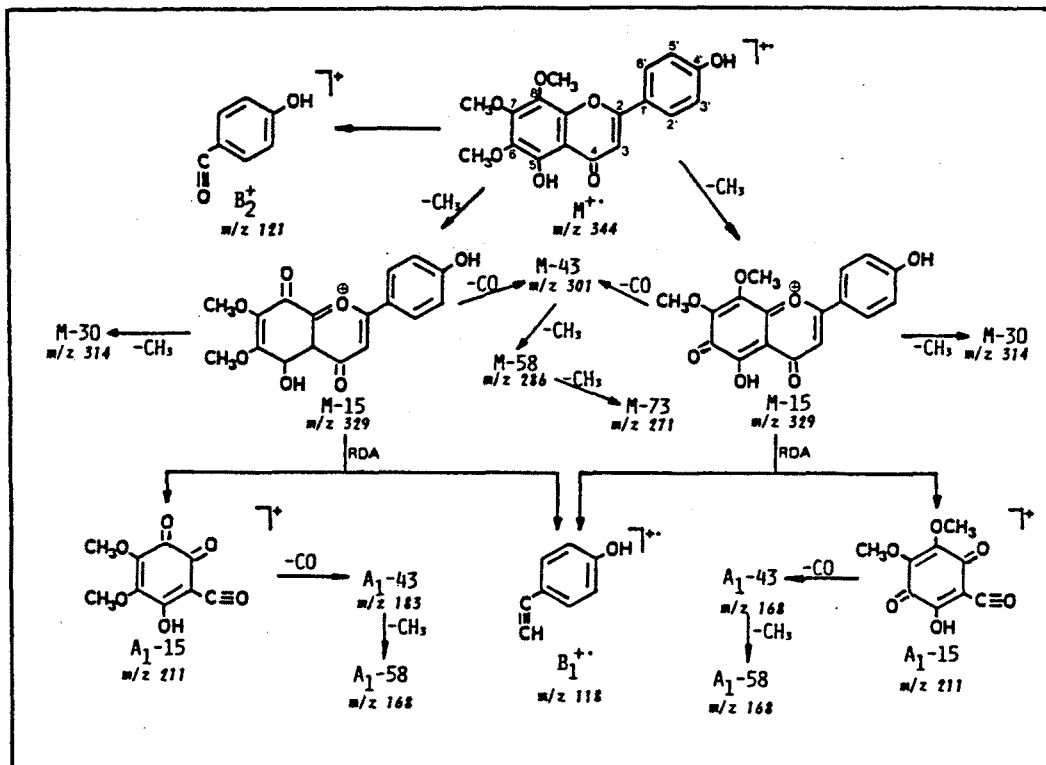
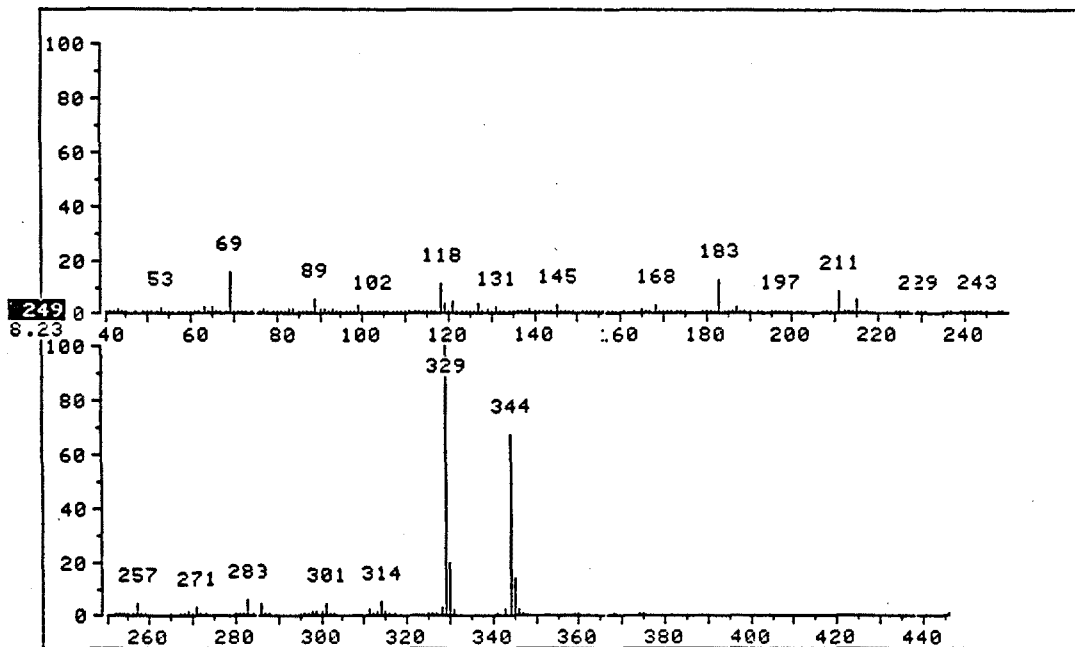


FIGURA IV-29: Espectro EI-MS y fraccionamiento de la sustancia G.

## I) Estructura de la sustancia H.

La sustancia H ha sido aislada, también, del extracto clorofórmico.

Datos analíticos:

- Comportamiento cromatográfico: tabla IV-7.
- Espectroscopía UV-visible: figura IV-31.
- Espectrometría de masas (EI-MS): figura IV-32.
- Espectroscopía  $^1\text{H-NMR}$ : figura IV-30.

La sustancia H tiene un comportamiento cromatográfico correspondiente a una flavona relativamente apolar, substituida en las posiciones 6 y/u 8, ya que no se revela con  $\text{AlCl}_3$ , ni con el reactivo de Neu.

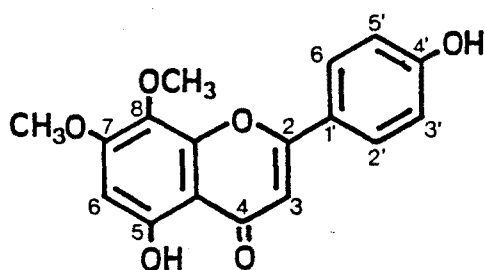
El espectro UV-visible indica que se trata de una 5-hidroxi-flavona (espectro en  $\text{AlCl}_3+\text{HCl}$  con cuatro bandas) substituida en 7 (ausencia de desplazamiento batocrómico de la banda II en  $\text{NaOAc}$  respecto a  $\text{MeOH}$ ) y con el anillo B monohidroxilado en 4' ( $\Delta\lambda\text{I}$  en  $\text{NaOAc}+\text{H}_2\text{BO}_3$  respecto a  $\text{MeOH}$  de cero nm, e  $\Delta\lambda\text{I}$  en  $\text{NaOMe}$  respecto a  $\text{MeOH}$  de 49 nm). El anillo A posee un metoxilo en 8 tal como lo demuestran los espectros en  $\text{AlCl}_3+\text{HCl}$  y en  $\text{MeOH}$ :  $\lambda\text{Ia}$  en  $\text{AlCl}_3+\text{HCl}$  entre 395 y 435 nm, en forma de pico, y  $\lambda\text{II}$  en  $\text{MeOH}$  igual o mayor que 271 nm.

El EI-MS presenta un  $\text{M}^+$  a  $m/z$  314, correspondiente a la fórmula molecular  $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{O}_6$ , característica de las dihidroxidimetoxiflavonas. La existencia de un solo hidroxilo en el anillo B viene confirmada por los valores de  $m/z$  de los fragmentos  $\text{B}_1^+$  (118),  $\text{B}_2^+$  (121) y  $\text{B}_2-28$  (93). Los fragmentos  $\text{A}_1-15$ ,  $\text{A}_1-43$  y  $\text{A}_1-71$  a  $m/z$  181, 153 y 71 respectivamente, indican un anillo A monohidroxilado y dimetoxilado. El espectro muestra, también, un  $\text{M}-15$  ( $m/z$  299) importante, característico de flavonoides metoxilados en 6 y/u 8.

En el espectro de  $^1\text{H-NMR}$  se observan los protones H-3 (6,8 ppm) y H-6 (6,6 ppm), así como dos señales de los metoxilos de las

posiciones 7 y 8 entre 3,8 y 4 ppm. Los protones del anillo B forman un sistema simétrico constituido por dos dobletes ( $J = 9,3$  Hz), que integran dos protones cada uno, y centrados a 7 ppm (H-3' y H-5') y 8 ppm (H-2' y H-6').

Todo ello permite afirmar que la sustancia H es la 5,4'-(OH)<sub>2</sub>-7,8-(OMe)<sub>2</sub>-flavona o 8-OMe-genkwanina.



Substancia H: 5,4'-(OH)<sub>2</sub>-7,8-(OMe)<sub>2</sub>-flavona (8-OMe-genkwanina).

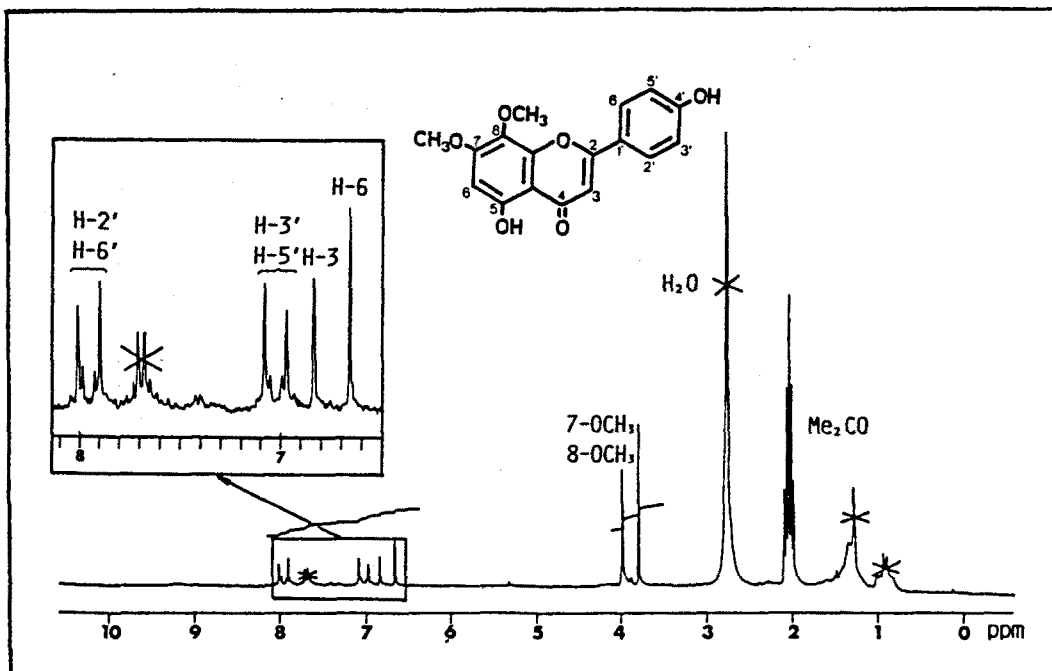
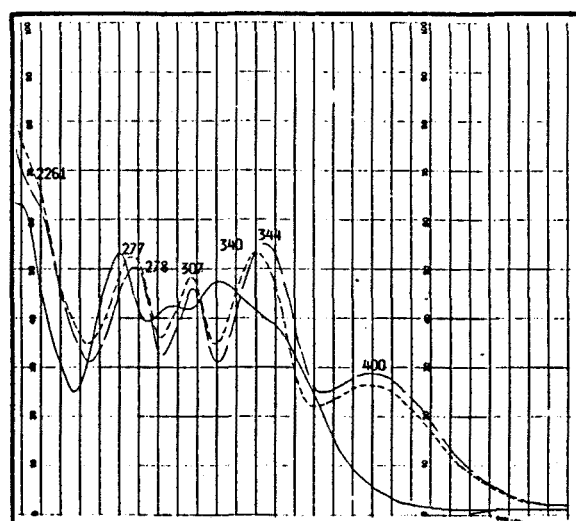
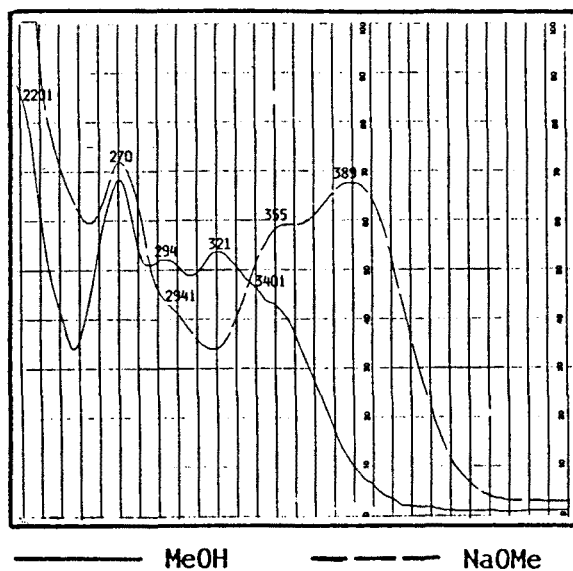
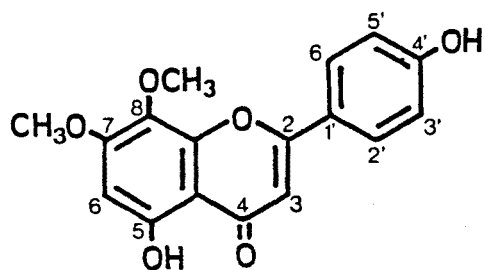
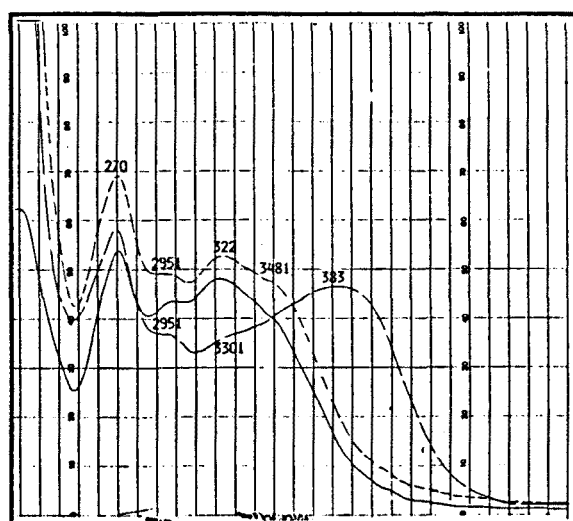


FIGURA IV-30: Espectro <sup>1</sup>H-NMR (80 MHz, d-Me<sub>2</sub>CO) de la sustancia H.

FIGURA IV-31: Espectros UV-visible de la sustancia H.



— MeOH      - - - AlCl<sub>3</sub>  
 - - - AlCl<sub>3</sub> + HCl



— MeOH      - - - NaOAc  
 - - - NaOAc + H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>

Datos espectrales:  $\lambda$  en nm, i = inflexión.

MeOH:	220i	270	294	321	340i
NaOMe:	270	294i	355	389	
AlCl <sub>3</sub> :	226i	278	307	344	400
AlCl <sub>3</sub> + HCl:	226i	277	307	340	400
NaOAc:	270	295i	330i	383	
NaOAc + H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> :	270	295i	322	348i	

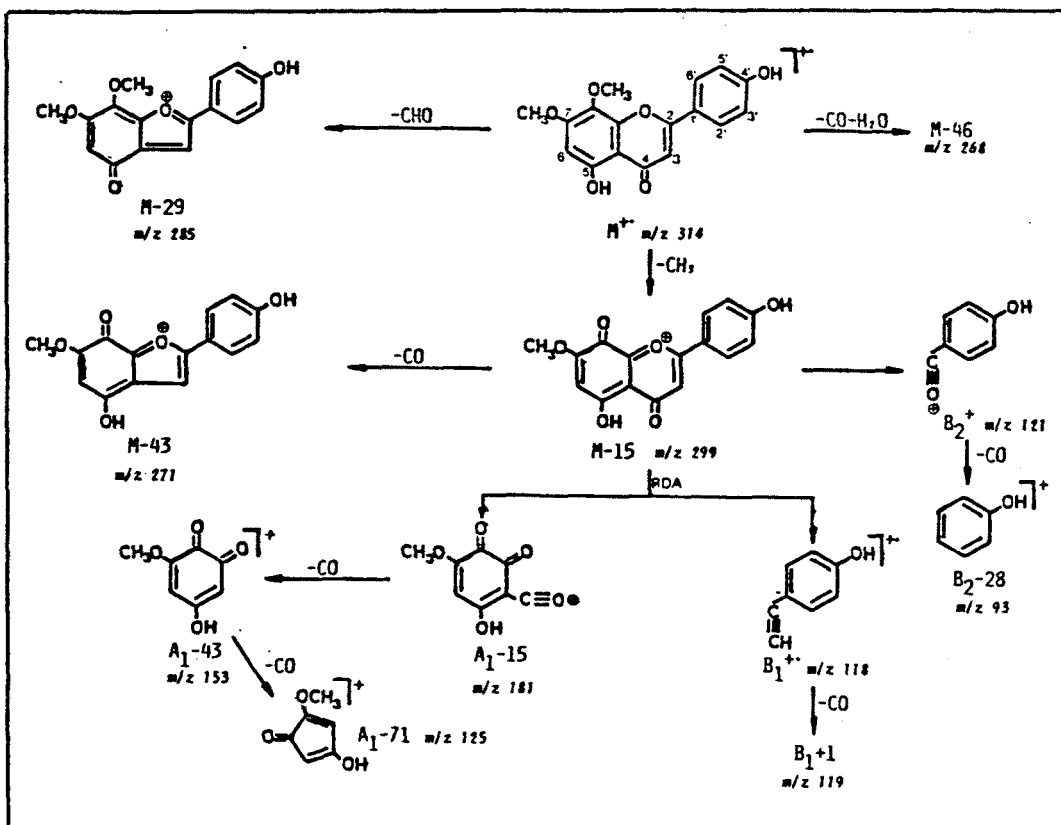
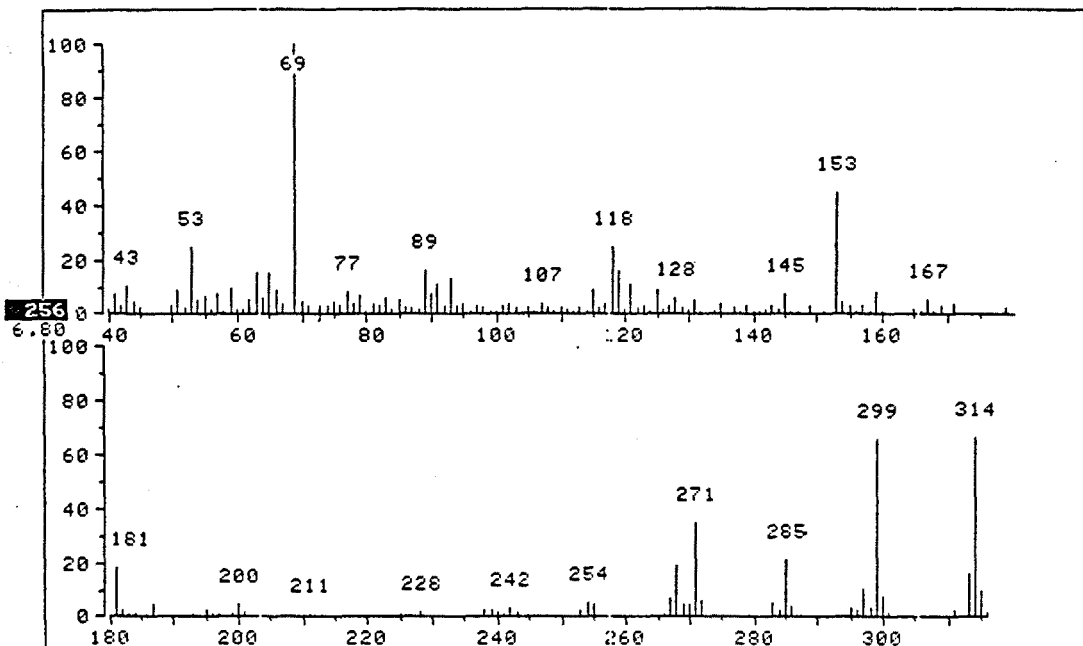


FIGURA IV-32: Espectro EI-MS y fragmentación de la sustancia H.

### J) Estructura de la sustancia I.

Esta sustancia ha sido aislada del extracto clorofórmico e identificada como la 5,4'-(OH)<sub>2</sub>-7-Ome-flavona o genkwanina, a partir de los siguientes datos analíticos:

- Comportamiento cromatográfico: tabla IV-7.
- Espectroscopía UV-visible: figura IV-34.
- Espectrometría de masas (EI-MS): figura IV-35.
- Espectroscopía <sup>1</sup>H-NMR: figura IV-33.

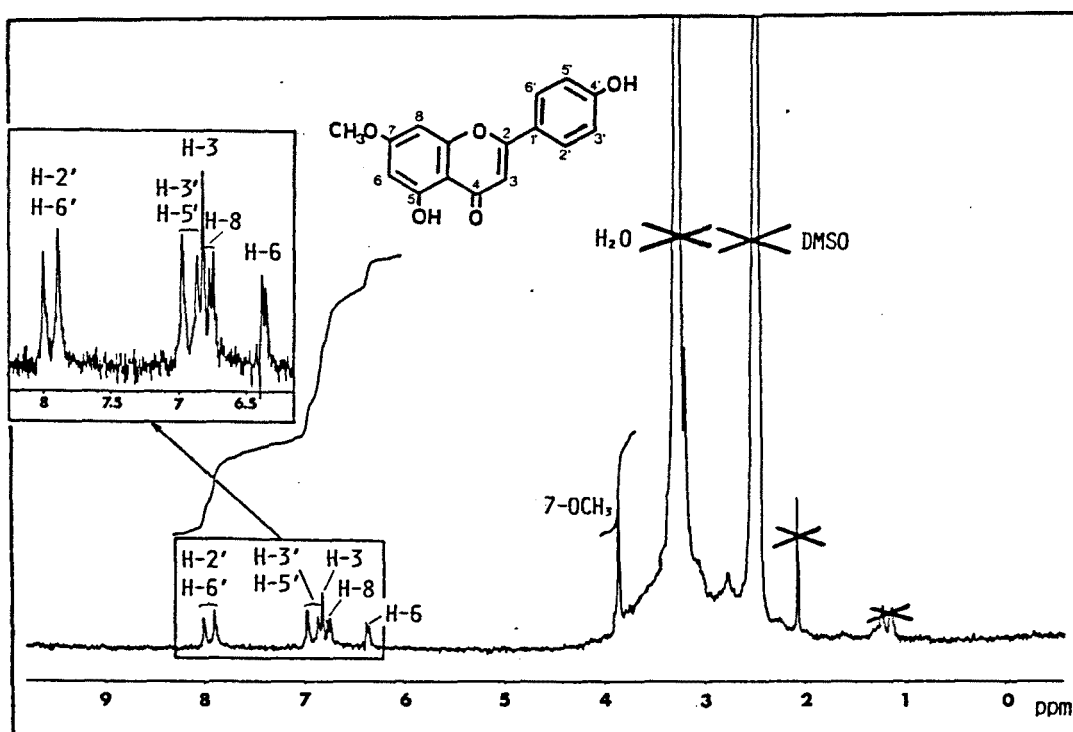
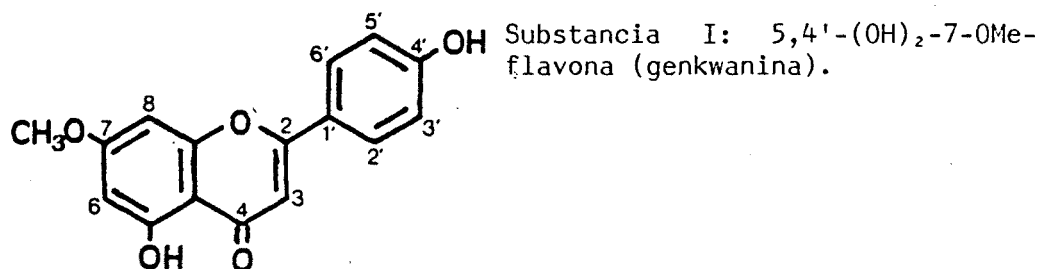
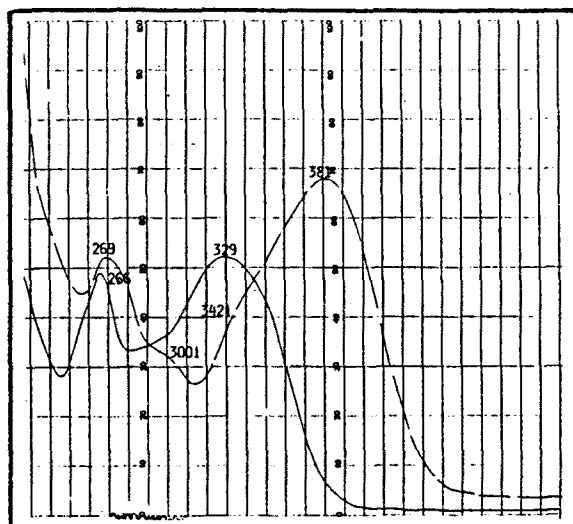
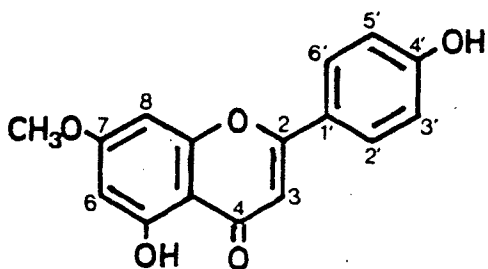
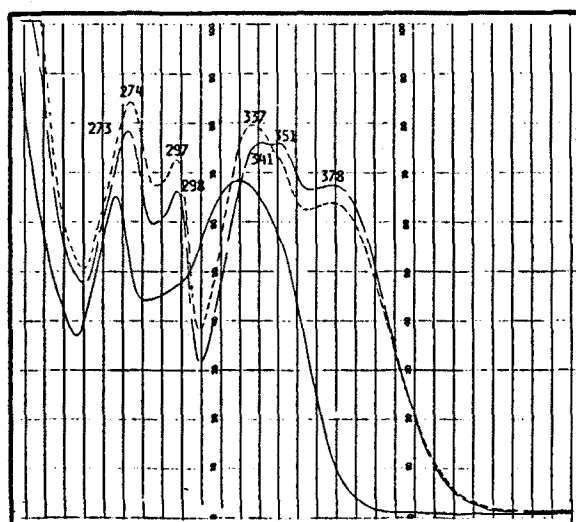


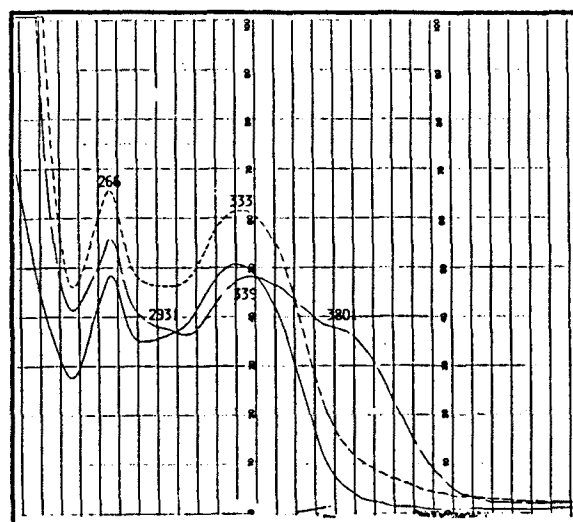
FIGURA IV-34: Espectros UV-visible de la sustancia I.



————— MeOH      - - - - - NaOMe



————— MeOH      - - - - - AlCl<sub>3</sub>,  
 . . . . . AlCl<sub>3</sub>, + HCl



————— MeOH      - - - - - NaOAc  
 - - - - - NaOAc + H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>,

Datos espectrales:  $\lambda$  en nm, i = inflexión.

MeOH:	266	329			
NaOMe:	269	300i	342i	381	
AlCl <sub>3</sub> :	273	298	341	351	378
AlCl <sub>3</sub> , + HCl:	274	297	337	378	
NaOAc:	266	293i	339	380i	
NaOAc + H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> :	266	333			

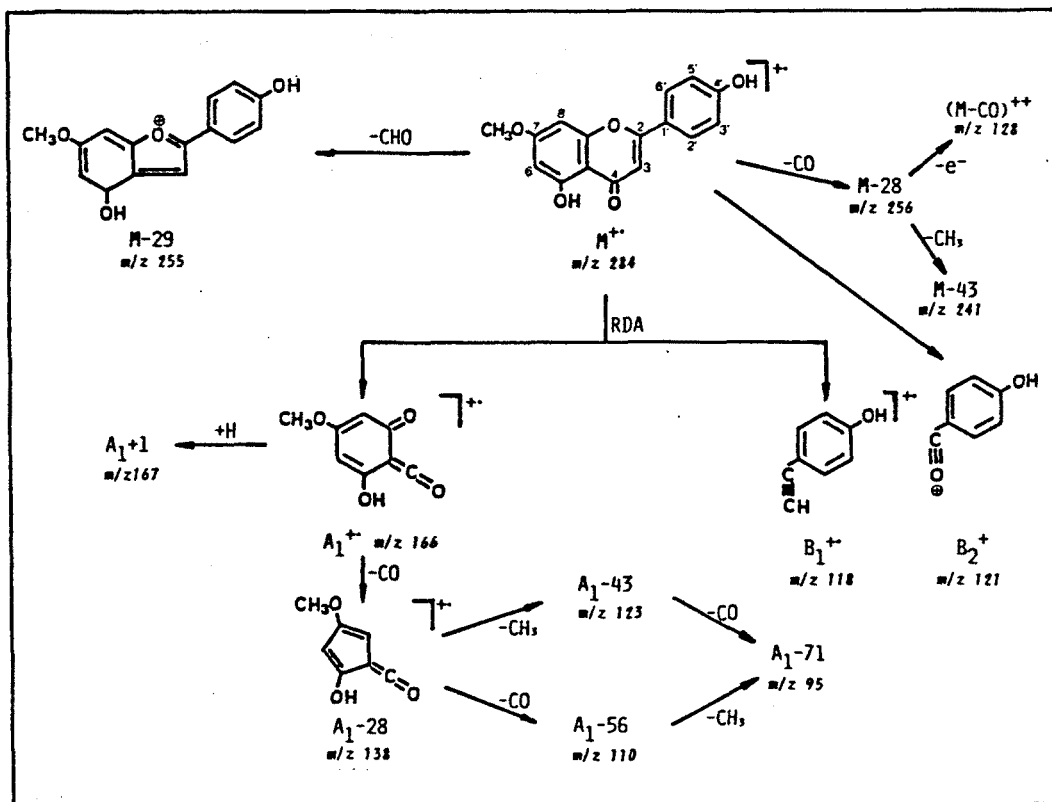
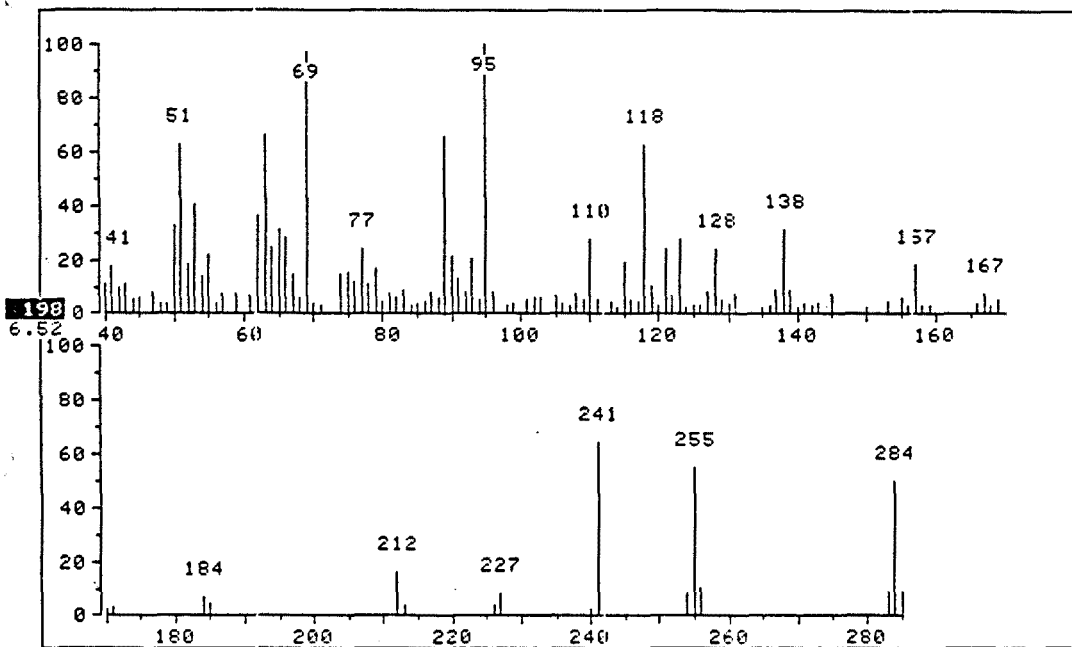


FIGURA IV-35: Espectro EI-MS y fragmentación de la sustancia I.



K) Estructura de la sustancia J.

El compuesto J ha sido aislado del extracto clorofórmico. A partir de sus datos analíticos analíticos se ha identificado como la 5,3',4'-(OH)<sub>3</sub>-6,7,8-(OMe)<sub>3</sub>-flavona o sideritoflavona:

- Comportamiento cromatográfico: tabla IV-7.
- Espectroscopía UV-visible: figura IV-37.
- Espectrometría de masas (EI-MS): figura IV-38.
- Espectroscopía <sup>1</sup>H-NMR: figura IV-36.

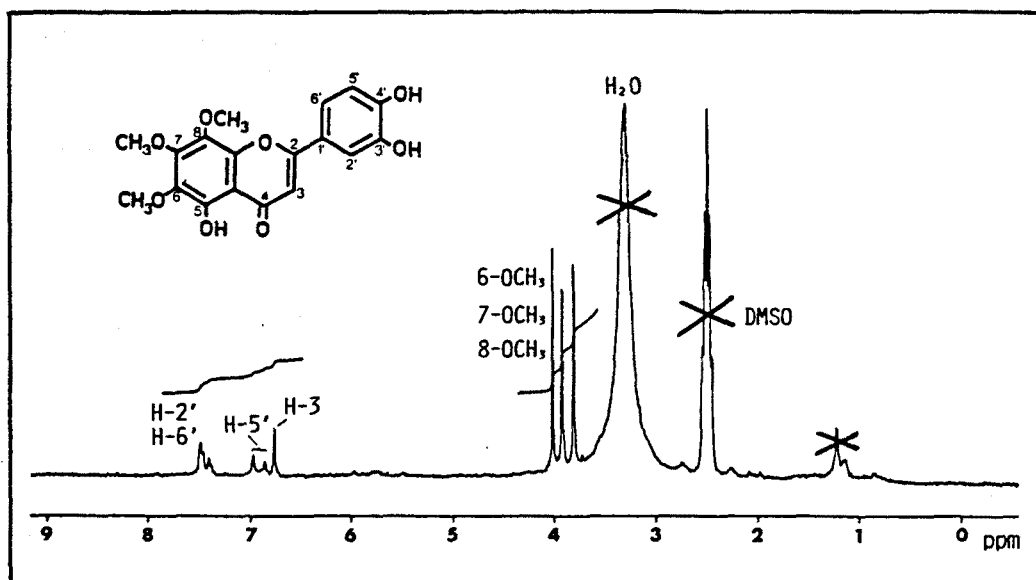
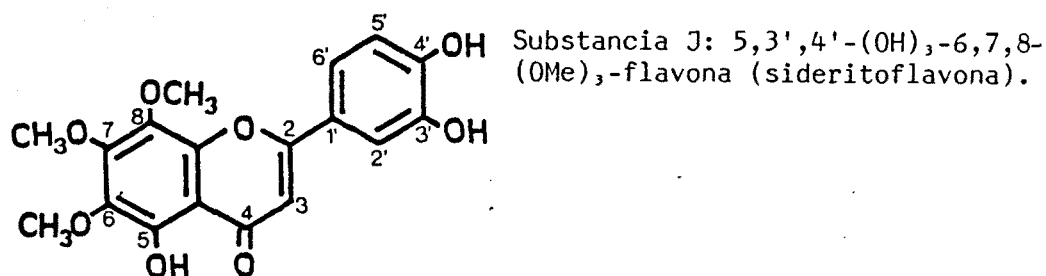
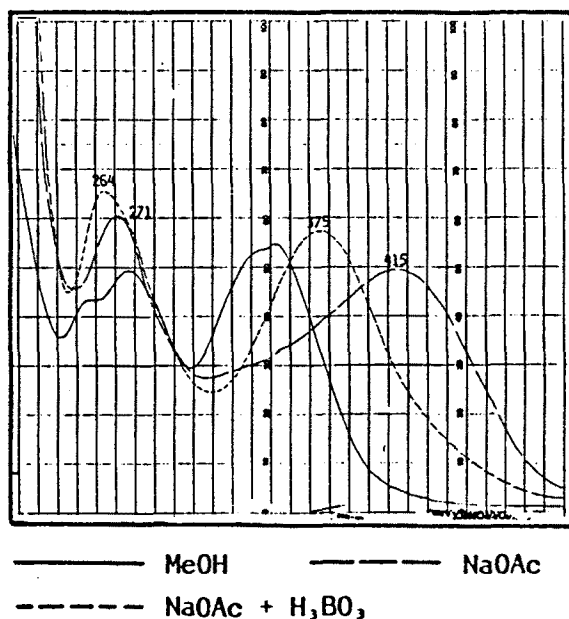
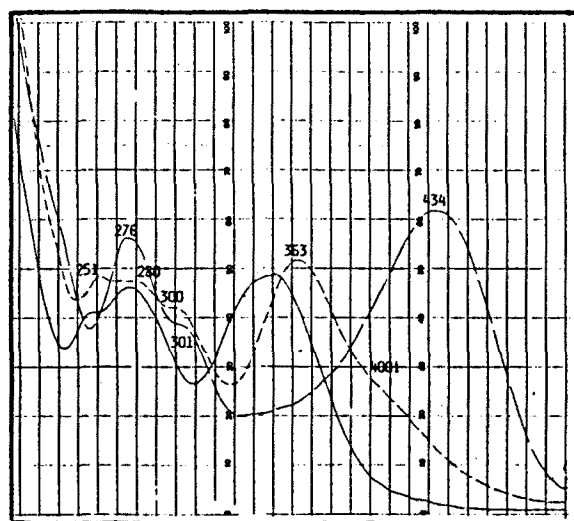
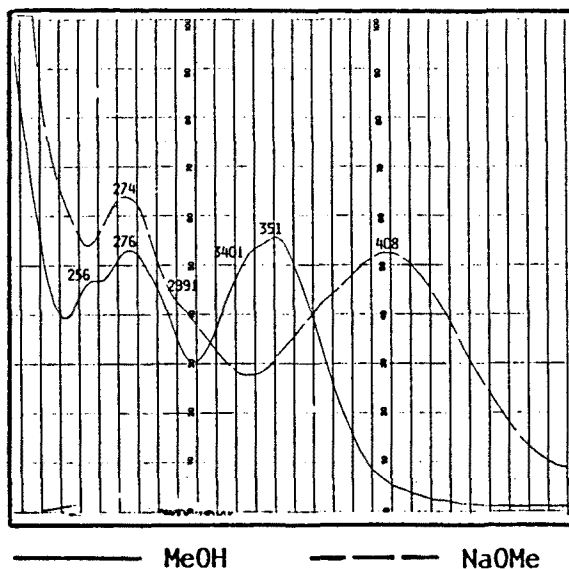
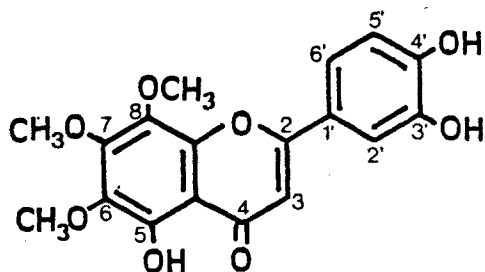


FIGURA IV-36: Espectro <sup>1</sup>H-NMR (80 MHz, d-DMSO) de la sustancia J.

FIGURA IV-37: Espectros UV-visible de la sustancia J.



Datos espectrales:  $\lambda$  en nm, i = inflexión.

MeOH:	256	276	340i	351
NaOMe:	274	299i	408	
AlCl <sub>3</sub> :	276	301	434	
AlCl <sub>3</sub> + HCl:	251	280	300	363 400i
NaOAc:	271	415		
NaOAc + H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> :	264	375		

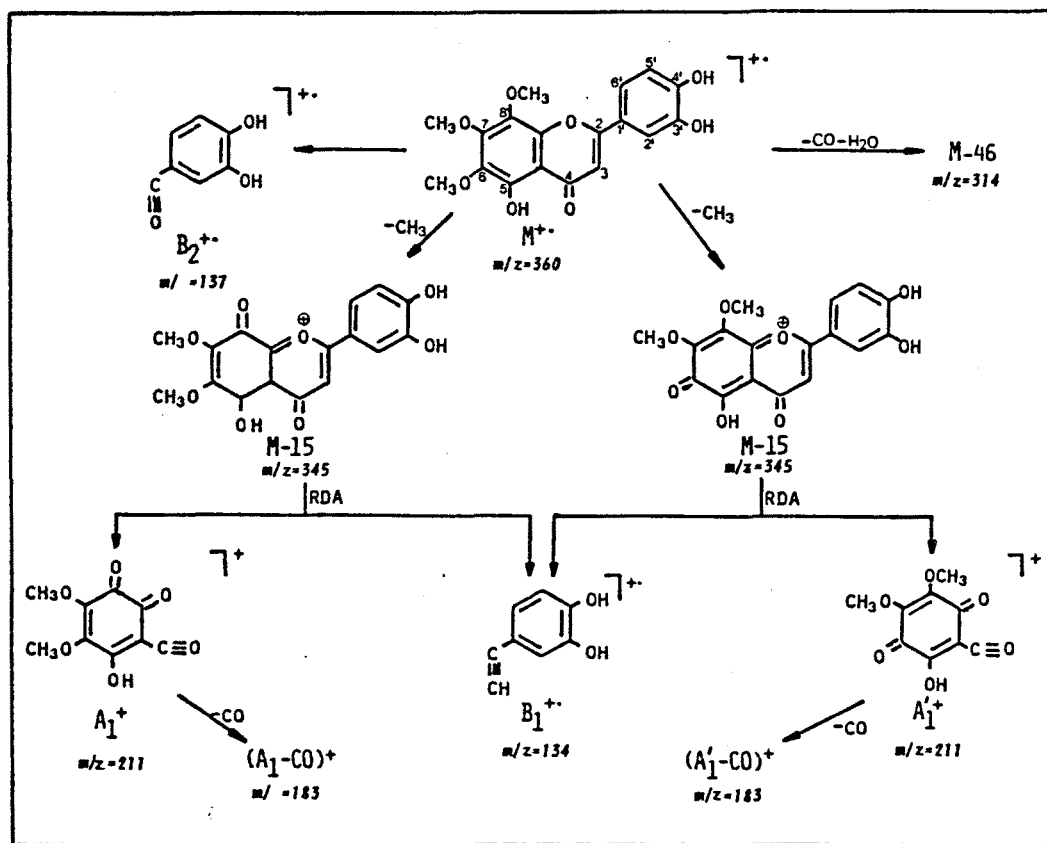
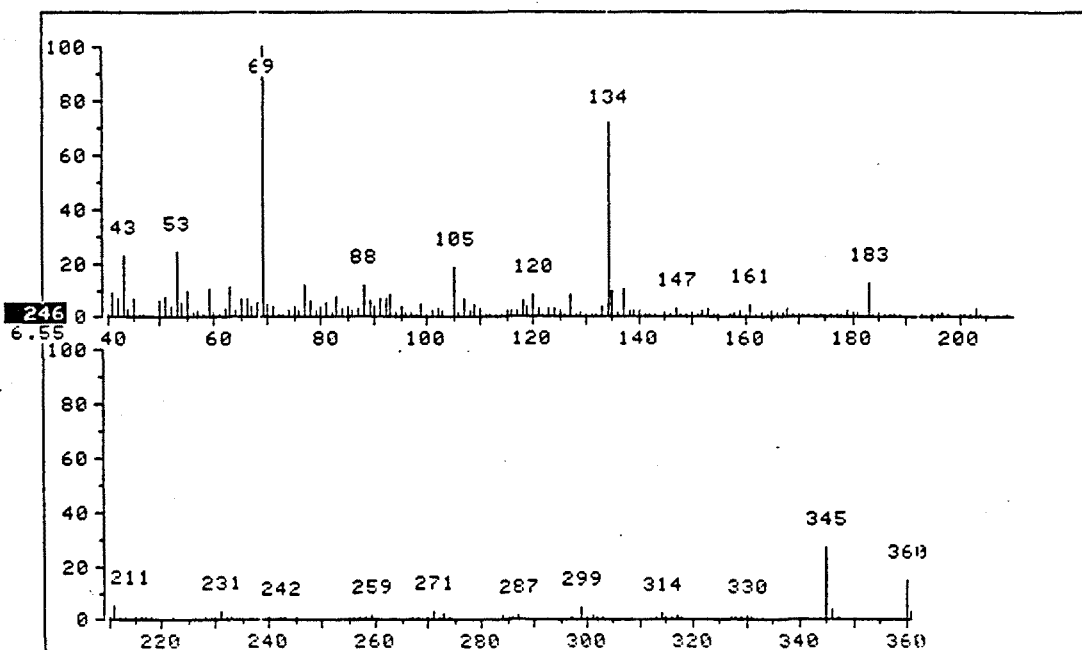


FIGURA IV-38 : Espectro EI-MS y fragmentación de la sustancia J.

### L) Estructura de la sustancia K.

La sustancia K ha sido aislada tanto del extracto clorofórmico como del etéreo e identificada como la 5,7,4'-(OH)<sub>3</sub>-flavona o apigenina, en base a sus datos analíticos:

- Comportamiento cromatográfico: tabla IV-7.
- Espectroscopía UV-visible: figura IV-40.
- Espectrometría de masas (EI-MS): figura IV-41.
- Espectroscopía <sup>1</sup>H-NMR: figura IV-39.

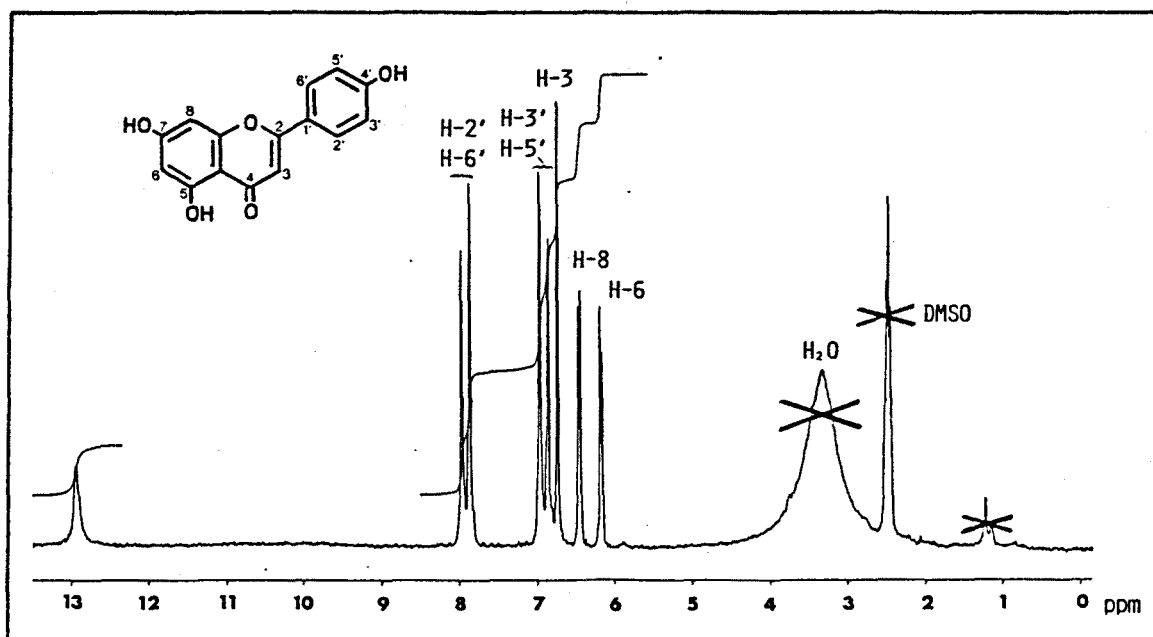
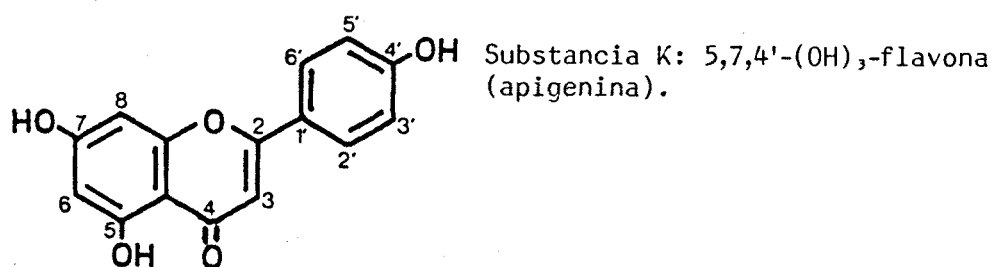
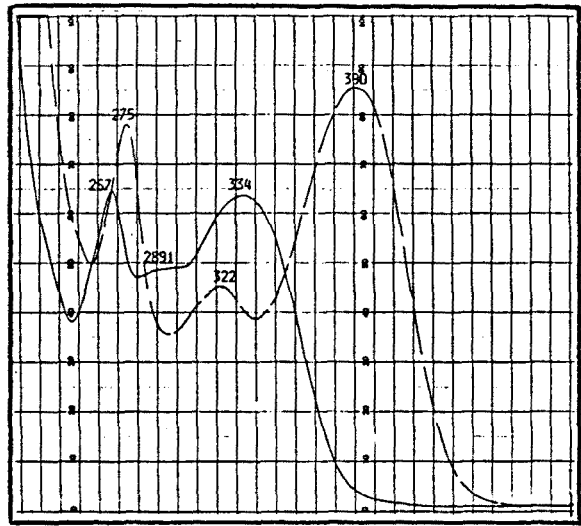
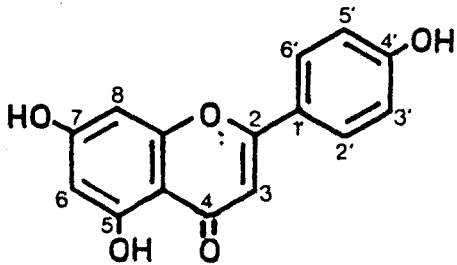
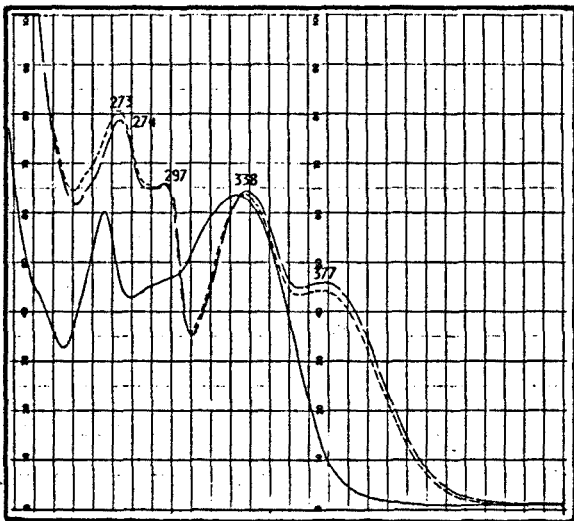


FIGURA IV-39: Espectro <sup>1</sup>H-NMR (80 MHz; d-DMSO) de la sustancia K.

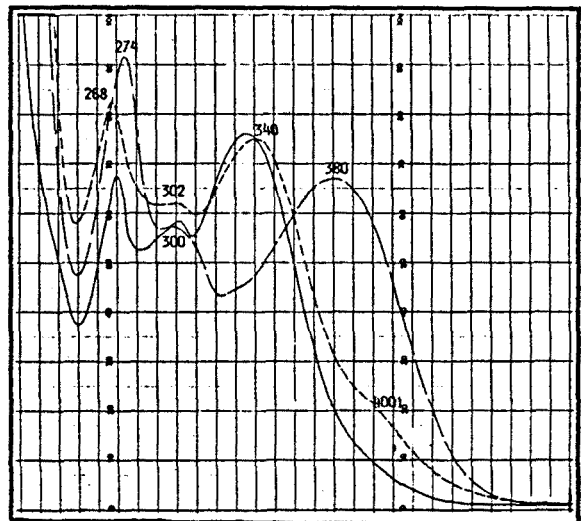
FIGURA IV-40: Espectros UV-visible de la sustancia K.



———— MeOH      - - - - NaOMe



———— MeOH      - - - - AlCl<sub>3</sub>,  
 ····· AlCl<sub>3</sub> + HCl



———— MeOH      ····· NaOAc  
 ····· NaOAc + H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>

Datos espectrales:  $\lambda$  en nm, i = inflexión.

MeOH:	267	289i	334	
NaOMe:	275	322	390	
AlCl <sub>3</sub> :	274	297	338	377
AlCl <sub>3</sub> + HCl:	273	296	338	377
NaOAc:	274	300	380	
NaOAc + H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> :	268	302	340	400i

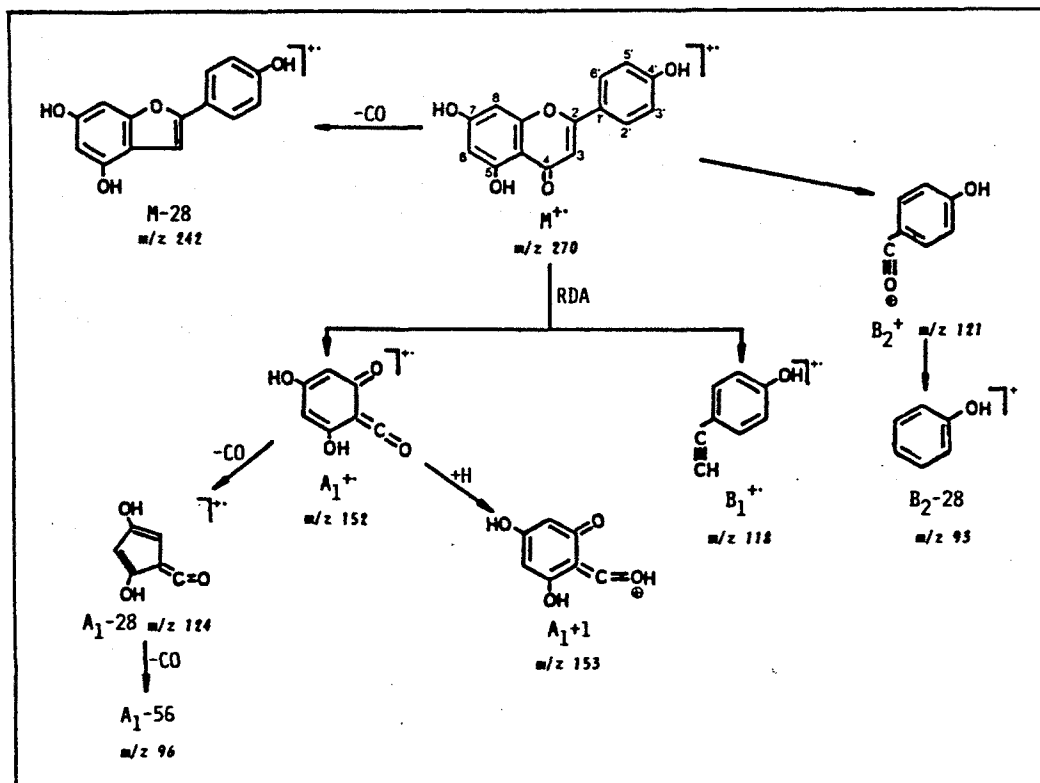
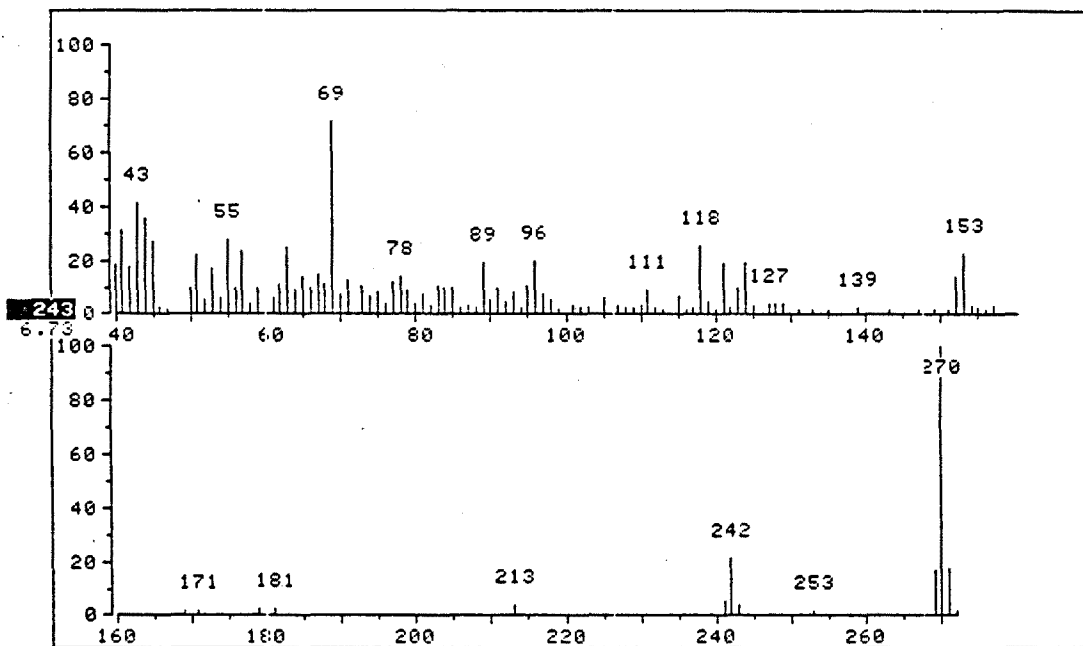


FIGURA IV-41: Espectro EI-MS y fragmentación de la substancia K.

## LL) Estructura de la sustancia L.

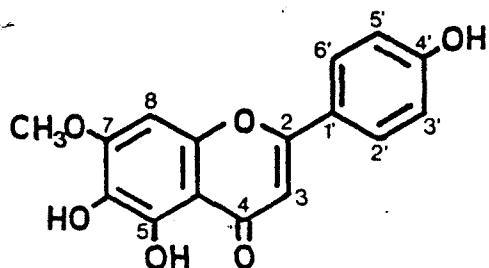
Esta sustancia ha sido aislada del extracto clorofórmico en cantidad inferior al milígramo, por lo que no ha sido posible registrar su espectro de  $^1\text{H-NMR}$ .

Datos analíticos:

- Comportamiento cromatográfico: tabla IV-7.
- Espectroscopía UV-visible: figura IV-42.
- Espectrometría de masas (EI-MS): figura IV-43.

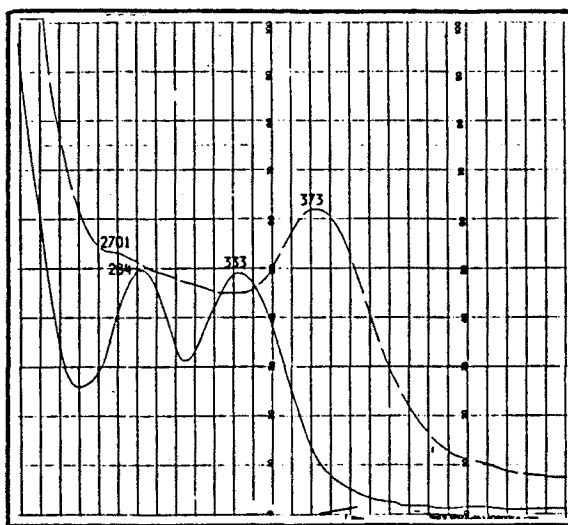
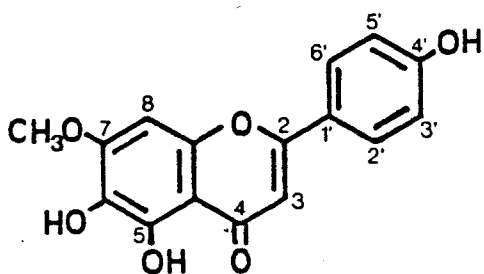
El comportamiento cromatográfico de la sustancia L es el de una flavona hidroxilada, relativamente polar, substituida en 6 y/u 8. Su espectro UV-visible corresponde al de una 5-OH-flavona 6-hidroxilada ( $\Delta\lambda\text{I}$  en  $\text{AlCl}_3+\text{HCl}$  respecto al MeOH de 25 nm, banda I no desdoblada en  $\text{AlCl}_3+\text{HCl}$ , y  $\lambda\text{II}$  en MeOH entre 283 y 286 nm), monosubstituida en B (banda II no desdoblada en el espectro metanólico) por un hidroxilo libre en 4' ( $\Delta\lambda\text{I}$  en NaOMe respecto al MeOH de 40 nm) y con un 7-OR (ausencia de  $\Delta\lambda\text{II}$  en NaOAc respecto al MeOH e  $\Delta\lambda\text{I}$  en NaOAc/MeOH  $>$   $\Delta\lambda\text{I}$  en NaOMe/MeOH).

La fórmula molecular de L,  $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_6$ , correspondiente a un peso molecular de 300 ( $\text{M}^+$  en EI-MS), es la de una trihidroximetoxiflavona. El anillo B posee un solo hidroxilo libre en 4' ( $\text{B}_1^+$ ,  $(\text{B}_1+\text{H})^+$ ,  $\text{B}_2^+$  y  $(\text{B}_2-\text{CO})^+$  a  $m/z$  118, 119, 121 y 93, respectivamente) y por tanto el anillo A debe contener dos hidroxilos (en 5 y 6) y un metoxilo, que se encuentra en la posición 7, dada la inexistencia del ión M-15 característico de flavonas 6- y/u 8-metoxiladas. La sustancia L resulta ser, por lo tanto, la 5,6,4'-(OH) $_3$ -7-OMe-flavona o sorbifolina.

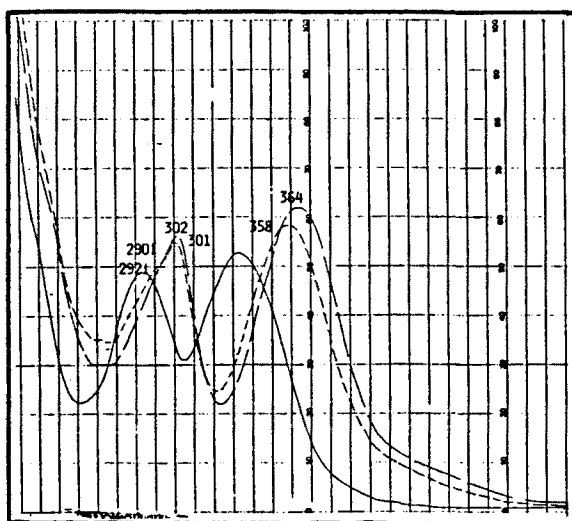


Sustancia L: 5,6,4'-(OH) $_3$ -7-OMe-flavona (sorbifolina).

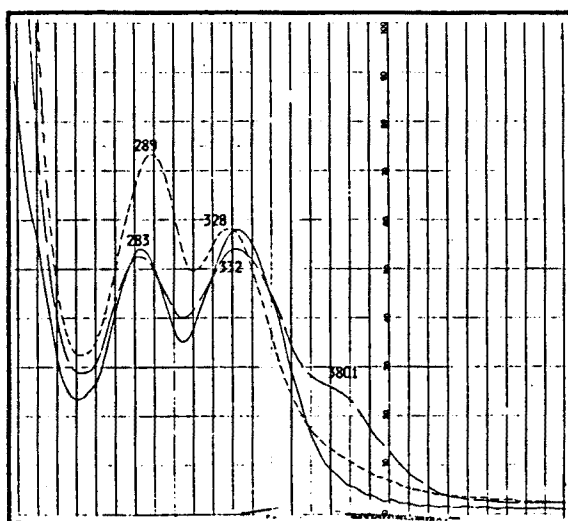
FIGURA IV-42: Espectros UV-visible de la sustancia L.



———— MeOH      - - - - NaOMe



———— MeOH      - - - - AlCl<sub>3</sub>,  
 - - - - AlCl<sub>3</sub>, + HCl



———— MeOH      - - - - NaOAc  
 - - - - NaOAc + H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>

Datos espectrales:  $\lambda$  en nm, i = inflexión.

MeOH:	284	333	
NaOMe:	270i	373	
AlCl <sub>3</sub> :	292i	302	364
AlCl <sub>3</sub> , + HCl:	290i	301	358
NaOAc:	283	332	380i
NaOAc + H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> :	289	328	



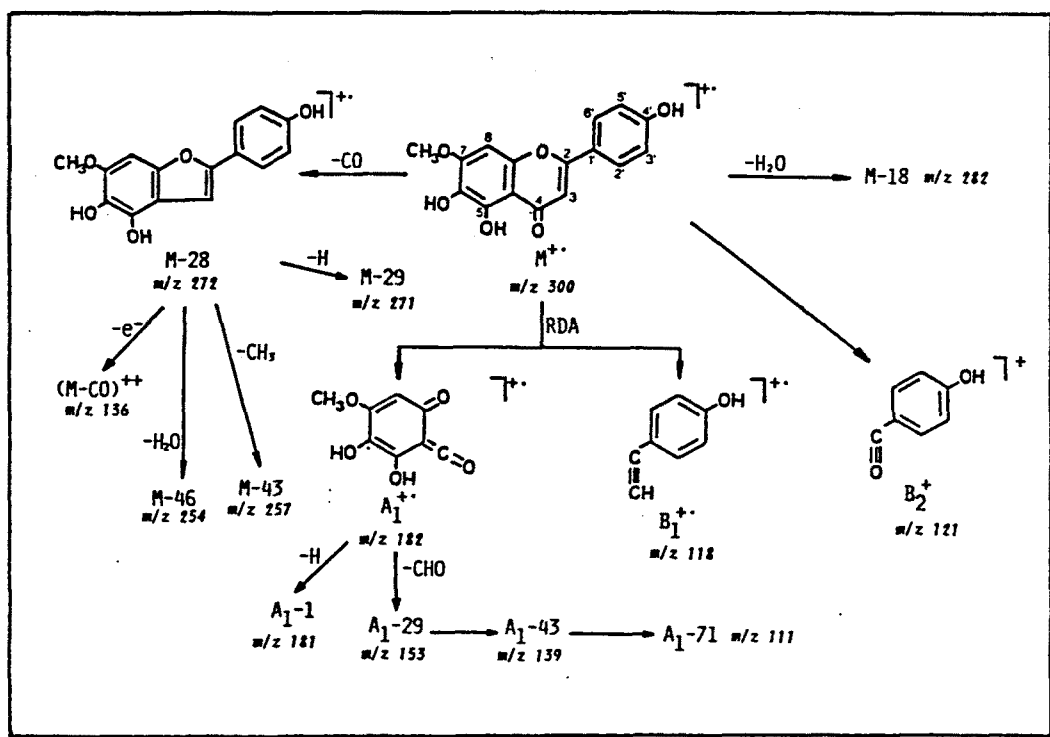
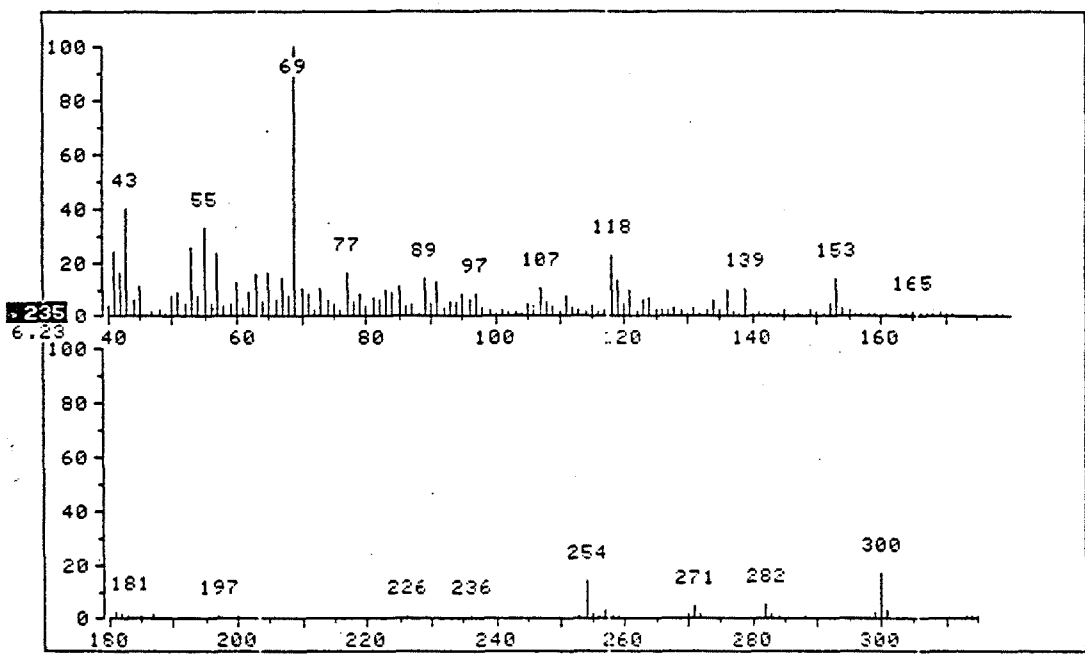


FIGURA IV-43: Espectro EI-MS y fragmentación de la sustancia L.