



Universidad
de La Laguna



*Facultad de ciencias. Sección
de Biología*

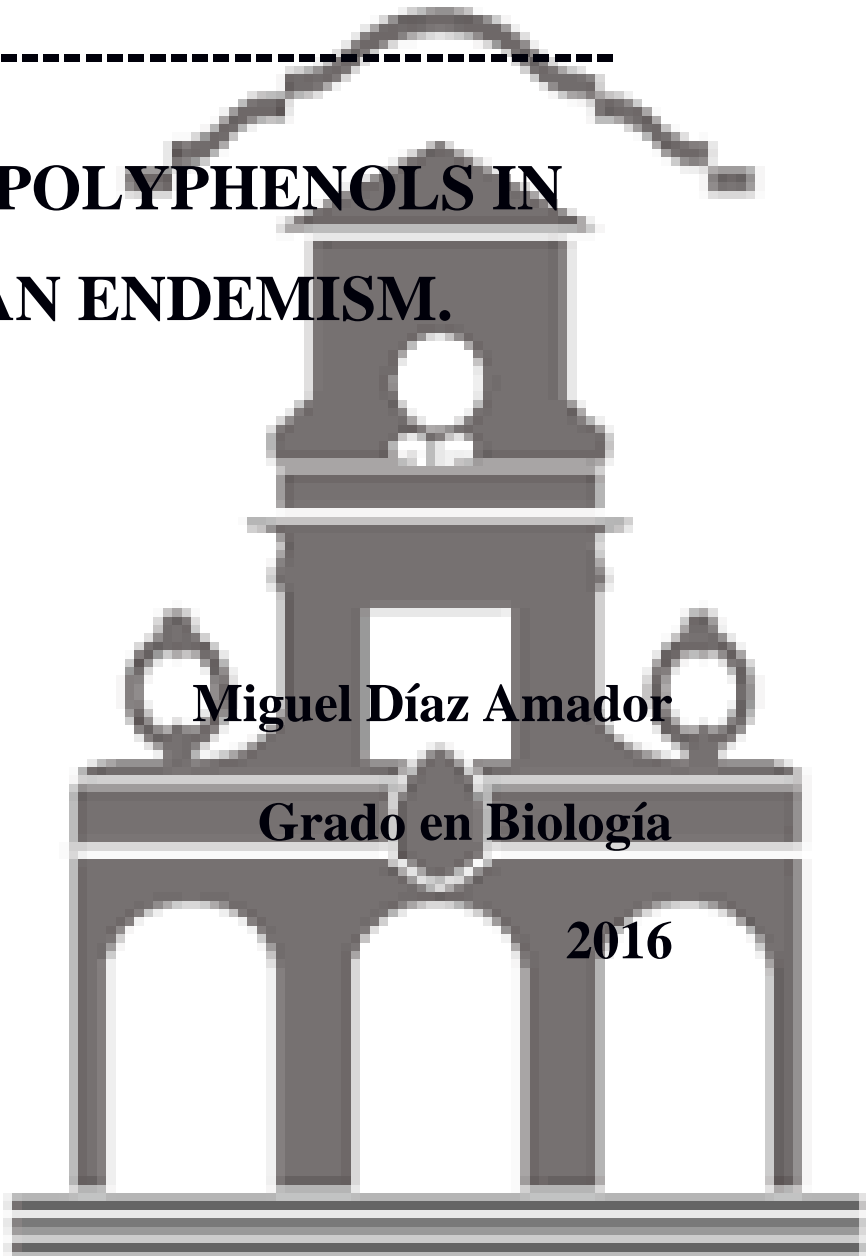
OBTENCIÓN DE POLIFENOLES EN ENDEMISMOS CANARIOS.

**OBTAINING POLYPHENOLS IN
CANARIAN ENDEMISM.**

Miguel Díaz Amador

Grado en Biología

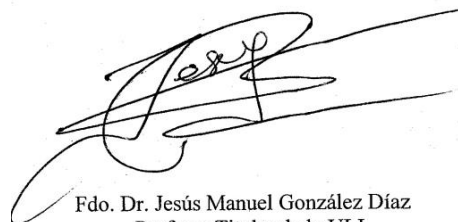
2016



**JESÚS MANUEL GONZÁLEZ DÍAZ, PROFESOR TITULAR DE QUÍMICA
ORGÁNICA, DE LA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA**

INFORMA: que el Trabajo Fin de Grado titulado “*Obtención de Polifenoles en Endemismos Canarios*”, ha sido realizado por **MIGUEL DÍAZ AMADOR**, bajo mi dirección, en los laboratorios del Instituto Universitario de Bio-Organica “Antonio González”, del Departamento de Química Orgánica de la Universidad de La Laguna, durante el curso 2014-2015, autorizando en esta fecha su presentación.

La Laguna, a 31 de Mayo de 2016



Fdo. Dr. Jesús Manuel González Díaz
Profesor Titular de la ULL

*Al Prof. Jesús G. Díaz, tutor de este trabajo, por su entrega,
paciencia y dedicación,
siempre con un “ponte las pilas Miguel” como emblema.*

*A mi madre y hermana, por su apoyo
incondicional cuando las ganas escaseaban.*

Índice

Resumen.....	1
Introducción.....	2
Características del género Hypericum.....	7
Objetivos.....	10
Sección experimental.....	11
Procedimientos experimentales generales.....	11
Materiales e instrumentación.....	11
Técnicas espectroscópicas: Infrarrojo.....	11
Técnicas espectroscópicas: Espectrometría de masas.....	14
Técnicas espectroscópicas: Resonancia Magnética Nuclear.....	16
Material vegetal.....	17
Aislamiento y purificación.....	18
Resultados y discusión.....	19
Actividad biológica.....	23
Galería de Espectros.....	28

RESUMEN

El género *Hypericum* es reconocido como fuente de numerosos compuestos orgánicos de interés para el hombre. En general, la importancia de dichos compuestos se debe a su potente actividad biológica. Un tipo de estos compuestos son las xantonas, un conjunto de polifenoles del que hemos aislado dos en el presente trabajo, a partir del endemismo canario *Hypericum coadunatum* L.; la 1,7-dihidroxanthona y la 2-hidroxyxanthona. Así mismo, se estudia el tipo de actividad biológica de las xantonas observando un amplio espectro de posibilidades, por ejemplo: anti-viral, anti-tumoral y anti-inflamatoria entre otras. En concreto, las xantonas aisladas por nosotros cumplen la función anti-inflamatoria e intervienen en el sistema inmunitario controlando la liberación de moléculas citotóxicas.

ABSTRACT

Hypericum is recognized as a source of a lot of organic compounds which have relevance for men. In general, the importance of these compounds is that they can perform some activity, being biologically active compounds. Xanthonas are one of these compounds, in this job two of them were isolated from Canary endemism *Hypericum coadunatum* L.: 1,7-dihydroxanthona and 2-hydroxyxanthona. Likewise, the kind of activity was also studied taking into account the broad spectrum of possibilities, for example: anti-viral, anti-tumoral and anti-inflammatory as the most relevant. Specifically, the xanthonas we isolate met the anti-inflammatory function and they are involved in the immune system controlling the release of cytotoxic molecules.

INTRODUCCIÓN

Históricamente, la Humanidad se ha sustentado en dos pilares fundamentales: la ciencia y la religión. Aunque no está constatado, ambos acompañan a la civilización desde tiempos inmemorables ya que la ciencia no estaba reconocida como tal y en gran parte de los episodios históricos de la humanidad, la religión enmascara o rechaza a la ciencia.

Ideologías aparte, la ciencia como cualquier otro hecho vinculado a la civilización ha sido objeto de diversos cambios tanto a nivel interno como en el desarrollo y la función que el hombre ha querido interpretar.

Dentro de la Ciencia, hablaremos de la Química y en concreto la Química Orgánica, una de las dos principales ramas de esta ciencia. Durante muchos años fue definida como la química del carbono o "la ciencia que estudia las estructuras, reacciones y síntesis de los compuestos del carbono". Y es que es esta rama la que trabaja con una corta selección de elementos de la tabla periódica, siendo fundamentales el carbono y el nitrógeno, así como azufre, fósforo y halógenos, estos últimos en menor medida. La otra gran rama de la química, la Química Inorgánica, trabaja con la totalidad de los elementos de la tabla periódica. Sin embargo, hoy en día ambas ramas se encuentran cordialmente relacionadas. No podemos olvidar a la biología ya que, desde un punto de vista molecular, se trata de química orgánica puesto que las biomoléculas no son más que compuestos orgánicos con función biológica activa. Es por ello que un *biólogo debe tener presente numerosos aspectos de la química, sobre todo en cuanto a las técnicas de obtención de estos compuestos.*

La finalidad que persigue la química orgánica es satisfacer las necesidades del hombre en cuanto a la obtención de compuestos naturales o sintéticos que cumplan una función particular. En general, se asocia mucho con la farmacología a fin de encontrar un fármaco que cure o alivie los síntomas de enfermedades y otras alteraciones que afecten al ser humano. Así mismo, está relacionada con la elucidación de estructuras moleculares e identificación de rutas sintéticas de compuestos que tenga interés social e industrial para de esta forma mejorar la calidad de vida de los humanos o bien optimizar los recursos en industria.

Ahora bien, para conocer verdaderamente una disciplina es necesario conocer sus orígenes y como se han desarrollado a lo largo de la historia. Si bien hoy en día la química orgánica se asocia casi que de manera automática con las plantas, está constatado que muchas culturas antiguas ya cultivaban plantas con fines determinados, enfocados a la obtención de compuestos activos útiles. Por ejemplo, se sabe que los egipcios cultivaban ricino, lino y cáñamo, con fines comerciales en el año 2300 a.C. Además, tenían un gran conocimiento de las plantas medicinales a las que se referían como: Ph-amakel (portador de seguridad). Años más tarde Galeno, farmacéutico griego, en su obra "Farmacopea Galénica" menciona una gran cantidad de enfermedades así como sus remedios utilizando plantas medicinales, de hecho, muchas de esas plantas se siguen utilizando actualmente.

Conforme se avanza en el tiempo, la variedad de utensilios y el grado de desarrollo de técnica fue en aumento, obteniéndose compuestos naturales con estructuras novedosas. Los primeros en ser identificados fueron drogas de

distintos tipos. El ejemplo más claro es el del opio, un narcótico descrito hace ya 5000 años utilizado también como fármaco al contener morfina. Fue la necesidad del hombre la que hizo que se empleara la química orgánica como herramienta de búsqueda de compuestos que combatan gran variedad de enfermedades.

Sin embargo, fue en el siglo XX cuando se produjeron los grandes avances y descubrimientos. Citamos aquí la Teoría electrónica del enlace, el desarrollo de la Mecánica Cuántica y el concepto de resonancia. El gran avance teórico de esta época fue seguido de un desarrollo en disciplinas afines que, en conjunto, mejoran el rendimiento de esta ciencia. Luego llegaron las Guerras y con ellas el avance de las químicas orgánicas industriales.

Hoy en día la química orgánica o bioquímica viaja hacia la obtención de compuestos *orgánicos activos, menos tóxicos y de actividad beneficiosa para el hombre*. Muchos de estos compuestos tienen origen natural, es decir, se obtienen a partir de tejido vegetal y pueden ser de varios tipos. Los *polifenoles* son un tipo de estos compuestos, de los más importantes en cuanto a propiedades biológicas ya que son los responsables de la actividad antioxidante que exhiben frutas, verduras y ciertas infusiones y bebidas naturales consumidas habitualmente por la población. Además, los polifenoles poseen actividad antiinflamatorias, antiagregantes plaquetarias, antibacterianas, estrogénica y moduladora de numerosas enzimas.

Desde el punto de vista químico, la estructura de estos compuestos, presentan uno o más grupos hidroxilos (-OH) unidos a un anillo aromático, lo que se conoce como un grupo fenólico. Es posible distinguir dos subtipos de

polifenoles, los flavonoides y los no-flavonoides. Los primeros presentan una estructura que consta de dos anillos aromáticos A y B, unidos entre sí por un anillo de γ -pirona.

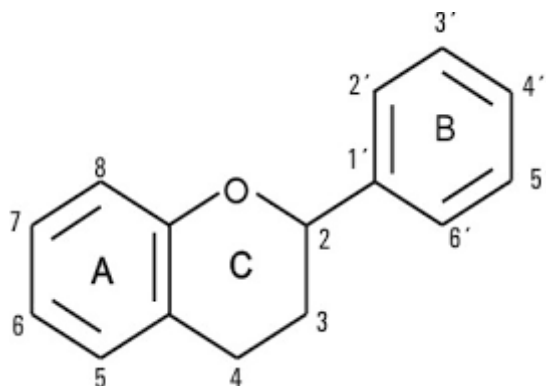


Ilustración 1. Estructura básica de los flavonoides donde se pueden observar los tres anillos fundamentales junto con la correcta numeración de sus átomos de carbono.

Dentro del reino vegetal podemos encontrar una gran variedad y cantidad de flavonoides, de hecho, hoy en día se conocen cerca de cinco mil. Los flavonoides son pigmentos de color amarillento, los cuales pueden ser clasificados en diferentes grupos, de los que destacan los flavonoles, las flavonas y las flavanas entre otros; cada uno de los cuales con características únicas. En cambio, los no-flavonoides son simplemente alcoholes monofenólicos, ácidos fenólicos simples y estilbenos¹.

¹ Flavonoides: Características químicas y aplicaciones; O. Cartaya e Ines Reynaldo, Cultivos Tropicales, vol. 22, núm. 2, 2001, pp. 5-14

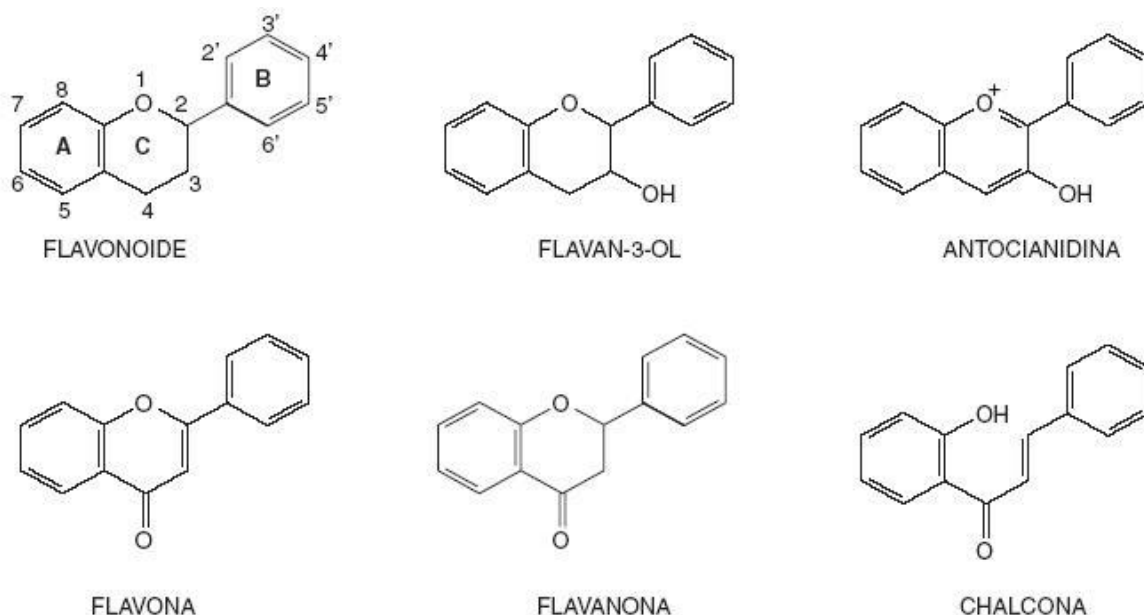


Ilustración 2. *Diferentes grupos de flavonoides.*

Un grupo de compuestos íntimamente relacionado con los flavonoides debido a su comportamiento cromatográfico y su coloración, amarilla, son las denominadas xantonas. Estos compuestos biológicamente activos están presentes fundamentalmente en dos familias de plantas superiores: Clusiaceae y Gentianaceae, aunque puede aparecer de forma esporádica en otras plantas. Químicamente hablando, son moléculas planas de seis carbonos conjugadas en un sistema de anillos de varios sustituyentes en ellos. El esqueleto de las xantonas consiste en dos anillos de benceno unidos por un grupo carbonilo y oxígeno. Cada anillo está fusionado de manera que no es posible su rotación. Este único esqueleto junto con el tipo y posición del sustituyente químico de fin en las propiedades específicas de las xantonas.

La importancia de las xantonas ha ido creciendo paulatinamente debido,

fundamentalmente, a sus propiedades farmacológicas y biológicas. Se atribuye a estas funciones anti-inflamatorias, la más común debido a la alta presencia de grupos hidroxilos; pero también hepatoprotectora, anti-tumoral y anti-oxidante entre otras^{2 3}.

Características del género *Hypericum*.

El género *Hypericum*, perteneciente a la familia Clusiaceae, está compuesto por unas 400 especies de distribución mundial, muy abundante en el hemisferio Norte y escaso en zonas tropicales y desérticas. Son especies herbáceas anuales o perennes de tamaño medio, o bien árboles y arbusto de tamaño considerable, sus flores son por lo general de color amarillo con tonalidades débiles a intensas.

² Naturally Occurring Xanthenes: Chemistry and Biology; J. S Negi, V. K Bisht, P. Singh. Review Article; Journal of Applied Chemistry Volume 2013, Article ID 621459, 9 pages.

³ Xanthenes as therapeutic agents: Chemistry and Pharmacology; Nougou Tchamo Diderot, Ngouela Silvere; Advances on photochemistry, Lead Molecules from Natural Products: Discovery and New Trends; page 273.



Ilustración 3. *Hypericum coadunatum* L

En las islas canarias el género *Hypericum* está representado por cinco especies principalmente: *H. grandifolium* Choisy conocida comúnmente como malfurado o corazoncillo; *H. reflexum* L. fil. cuyo nombre común puede ser la cruzadilla o la hierba cruz; *Hypericum canariense* L. de nombre común granadillo o flor de cruz; *H. perforatum* L. o hierba de San Juan y *H. coadunatum*. Siendo las dos primeras endemismos macaronésicos y las tres últimas endemismos canarios⁴.

La utilización como plantas ornamentales de especies de este género ha sido muy frecuente en muchas partes del mundo, aunque su uso en el tratamiento de numerosas enfermedades, tales como la depresión, es lo que ha llevado a un intenso estudio de especies de este género, destacando los llevados a cabo

⁴ Pedro Pérez de Paz, “Plantas medicinales o útiles en la flora canaria” F. Lemus LL 1999; pag 115

en el *H. perforatum* o hierba de San Juan⁵.

La mayor limitación a la hora de explotar un posible medicamento, obtenido de plantas medicinales, es nuestro completo desconocimiento de estos compuestos activos. *H. perforatum*, es la especie más estudiada de este género por su actividad farmacológica, utilizada desde la antigüedad en el tratamiento de la depresión moderada. Es la función farmacéutica la que ha despertado el interés de muchos investigadores que, a día de hoy, investigan este género para obtener nuevos compuestos de actividad biológica útil. Es el caso de la hyperina y la hyperforina, principios activos de *H. perforatum* y responsables de la actividad citada anteriormente. El primero, la hyperina, es un pigmento de color rojizo que actúa como indicador de tejido tumorales acumulándose en ellos; el segundo, la hyperforina es un combatiente, es decir, un compuesto antitumoral de actividad comparable al paclitaxel pero sin efectos tóxicos secundarios.

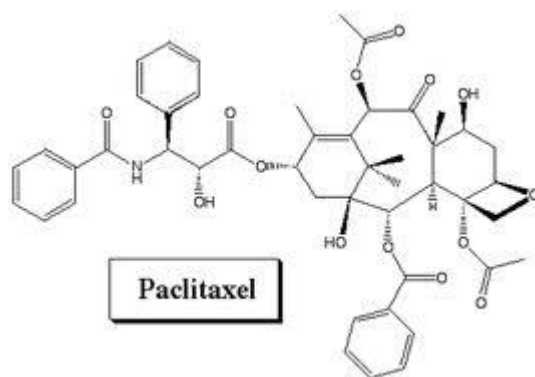


Ilustración 4 Estructura química del paclitaxel, un producto químico activo

⁵ Luisella Verotta, Furohypeforin, a Prenylated Phloroglucinol from St. John's Wort (*Hypericum perforatum*), J. Nat. Prod. 1999; 62,770-772

Sin embargo, se tiene constancia de que todas las especies de este género poseen, en mayor o menor medida, actividad biológica activa ya que son excelentes productoras de metabolitos secundarios tales como: ácido clorogénico y quercitina entre otros⁶.

OBJETIVOS

El reino vegetal, en su gran variedad y diversidad, es recurso importante de numerosos bienes para el ser humano. Como hemos desarrollado en el apartado introductorio, hay un aspecto en el que las plantas son especialmente influyentes para el hombre, y este es el ser proveedor de una gran cantidad de productos de actividad sanitaria o relacionada con alcanzar el bienestar humano.

- El objetivo del presente trabajo es el estudio fitoquímico del endemismo canario “*Hypericum coadunatum*”, para aislar e identificar los compuestos fenólicos de interés.
- Caracterizar los extractos obtenidos mediante técnicas cromatográficas para determinar la presencia de compuestos fenólicos.
- Aumentar las destrezas y habilidades en las técnicas de aislamiento y purificación y de compuestos activos introducidos en el periodo académico.

⁶ Phytochemical analysis and *in vitro* biological activity of three *Hypericum* species from the Canary Islands (*Hypericum reflexum*, *Hypericum canariense* and *Hypericum grandifolium*); Rosa M. Rabanal, Christian Zorzetto, Candelaria C. Sanchez; Fitoterapia 100 (2005) 95-109

SECCIÓN EXPERIMENTAL

Procedimientos experimentales generales

Los espectros de infrarrojo (IR) fueron recogidos en un espectro polarímetro Bruker TSP-55. Los espectros de ^1H y ^{13}C NMR fueron medidos usando espectrómetros Bruker Advance II 500 y Bruker Advance III 600. Las cromatografías en columna se realizaron sobre Sephadex LH-20 Pharmacia (ref. 17-0090-01), sílica gel (Merck 2300-400 mesh). Las separaciones por HPLC fueron llevadas a cabo por un sistema de bombeo JASCO Pu-980 equipado con un detector JASCO UV-975 y con una columna Waters Kromasil Si 5mm (10 x 250 mm). Los cromatogramas fueron visualizados bajo luz UV a 255 y 366 nm y posteriormente se rociaron con oleum seguido de calor. Todos los solventes fueron destilados antes de su uso en los diferentes experimentos.

Materiales e instrumentación

Técnicas espectroscópicas: Infrarrojo

En primer lugar, la espectroscopía de absorción infrarroja (IR) fue de las primeras técnicas de espectroscopía que encontró un uso extendido en el área del análisis de muestras. Recibe este nombre ya que emplea esta región del espectro electromagnético, dicha región puede dividirse a su vez en tres fragmentos: IR cercano (NIR: $12800\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$), IR medio ($4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$) e IR lejano ($400\text{-}10\text{ cm}^{-1}$); siendo el IR medio donde se dan la mayoría de las aplicaciones analíticas tradicionales.

Por lo que respecta al IR medio, existen espectro fotómetros comerciales desde 1940, aunque los avances más significativos en la técnica se produjeron con el desarrollo de instrumentos que incorporan el método de transformada de Fourier (FT-IR), que ha mejorado la calidad de los espectros y minimizado el tiempo requerido para la obtención de datos. Hoy en día, casi todos los instrumentos utilizados en espectroscopia de IR están equipados con el sistema de análisis que utilizan transformadas de Fourier de haz sencillo.



Ilustración 5. *Espectropolarímetro Bruker TSF-55.de La ULL*

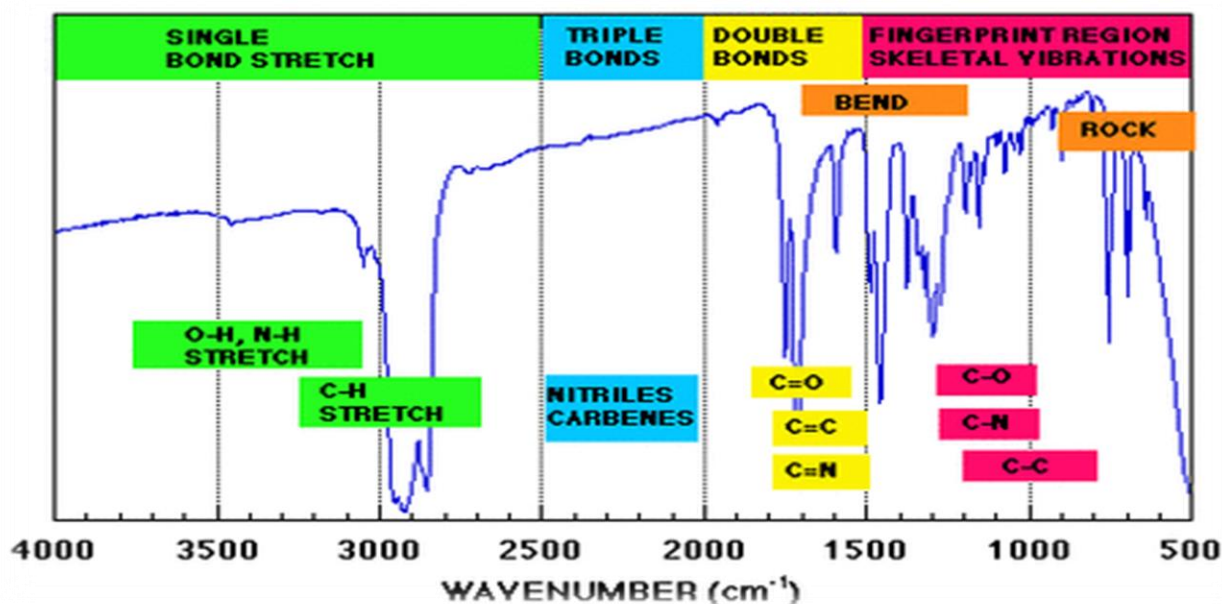
Una de las grandes ventajas de la espectroscopia de IR es su versatilidad, ya que permite estudiar prácticamente cualquier muestra con independencia del estado en que se encuentre: líquidos, disoluciones, pastas, polvos, fibras, películas, gases o superficies son algunos ejemplos.

Como en otros procesos de absorción de radiación electromagnética, la interacción de la radiación infrarroja con la materia provoca en ésta alguna alteración. En el caso que nos ocupa, esta alteración guarda relación con cambios en el estado vibracional (espectroscopia vibracional) de las

moléculas. El espectro vibracional de una molécula se considera una propiedad física única y por tanto característica de dicha molécula. Así, entre otras aplicaciones, el espectro IR se puede usar como “huella dactilar” en la identificación de muestras desconocidas mediante la comparación con espectros de referencia.

Como primera aproximación, un espectro de IR se obtiene al pasar radiación a través de una muestra y determinar que fracción de esta radiación incidente ha sido absorbida. La energía particular a la que aparece cada pico en un espectro guarda relación con la frecuencia de vibración de una parte de la molécula.

Ilustración 6. Espectrograma de IR absorciones características de los diferentes grupos funcionales.



La espectroscopía de IR junto a la espectrometría de masas y la resonancia magnética nuclear, las cuales se comentan a continuación, forman la base del análisis cualitativo contemporáneo centrado en la identificación de la

estructura molecular de compuestos y mezclas desconocidas.

Técnicas espectroscópicas: Espectrometría de masas

Por su parte, la espectrometría de masas es una poderosa técnica microanalítica usada para identificar compuestos desconocidos, para cuantificar compuestos conocidos, y para elucidar la estructura y propiedades químicas de moléculas orgánicas. La detección de compuestos puede ser llevada a cabo con cantidades de muestra realmente pequeñas y obtener información acerca de: la composición elemental de las muestras (espectrometría de masas atómico); de la composición de las moléculas inorgánicas, orgánicas y biológicas; de la composición cualitativa y cuantitativa de mezclas complejas y de la estructura y composición de superficies sólidas.



Ilustración 7. Espectrómetro de masas.

Brevemente, el funcionamiento en esencia es transferir alguna forma de energía a las moléculas para analizar la ionización. En la técnica clásica de impacto electrónico (EI siglas en inglés de “electronionization”), algunas de

las moléculas ionizadas se dividen en una variedad de fragmentos ionizados, el patrón de fragmentación resultante, así como los iones residuales constituyen el espectro de masas. En principio, el espectro de masas de cada compuesto es único y puede ser usado como su “huella química” para así caracterizar la muestra analizada.

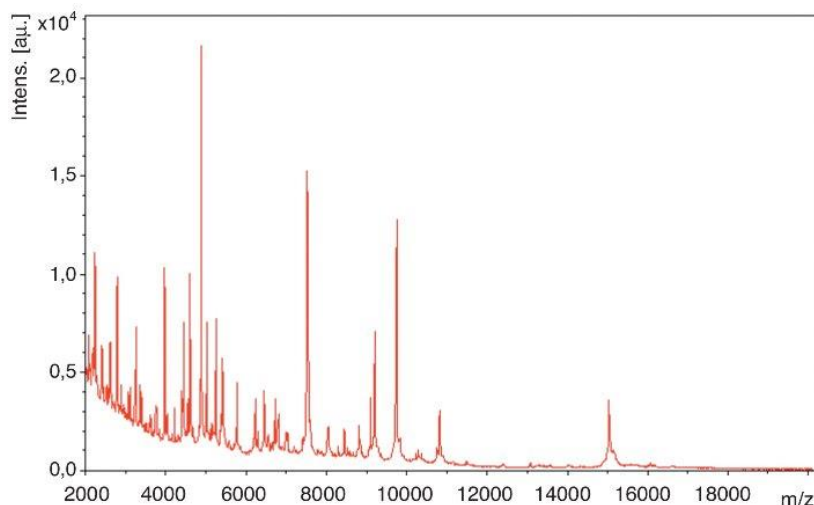


Ilustración 8. *Espectrógrama de masas.*

Actualmente, esta técnica continúa teniendo los mismos fundamentos que en su origen. Como mencionamos anteriormente, esta técnica se fundamenta en la separación de partículas moleculares o átomos por su diferente masa, estando el proceso formado por cuatro etapas: ionización de la muestra, aceleración de los iones por un campo eléctrico, dispersión de los iones según su relación masa/carga y por último, la detección de los iones y producción de la correspondiente señal eléctrica.

Técnicas espectroscópicas: Resonancia Magnética Nuclear

Por último, la resonancia magnética nuclear (RMN) es un método espectral basado en las propiedades magnéticas de los núcleos y, en su aplicación más común, en las propiedades del núcleo de hidrógeno. Ahora bien, si solo implicase los núcleos no tendría interés para los químicos. Afortunadamente, los electrones producen modificaciones débiles, aunque observables, siendo estas las que darán lugar a los desplazamientos químicos y a las constantes de acoplamiento, permitiendo así el estudio detallado de la estructura electrónica de las moléculas, razón del éxito de la RMN en química orgánica. Un espectrómetro de RMN consiste esencialmente en un imán, un emisor de radiofrecuencia y un detector de radiofrecuencia.



Ilustración 9. *Espectrómetro de RMN de la ULL*

Cuando una muestra que contiene núcleos dotados de ciertas propiedades magnéticas, por ejemplo protones, es colocada entre los dos polos de un imán y sometida al campo de radiofrecuencia (rf) del emisor, es capaz de absorber

energía, lo que se llama entrar en resonancia. Dado que solo cuenta la relación ν/B_0 , no se hacen variar simultáneamente los dos campos, el magnético y el eléctrico, sino que se fija uno y se hace variar progresivamente el otro, lo que se conoce como barrido. Se hablará pues de barrido de campo o barrido de frecuencia. Cada vez que la relación frecuencia/campo sea la adecuada, el receptor registra una señal.

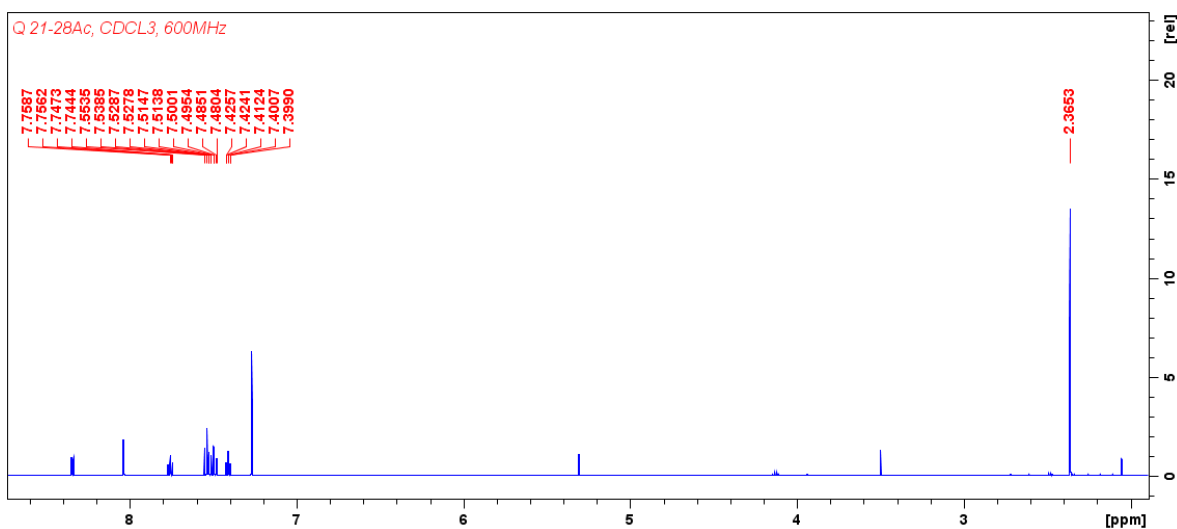


Ilustración 10. Espectro de ^1H -RMN

Material vegetal

Las partes aéreas de *Hypericum coadunatum* Sm. Ex. Link Bunch. fueron recolectadas en Julio de 2009, en Tejeda, Las Palmas de Gran Canaria e identificadas por el Prof. Pedro Pérez de Paz, Departamento de Botánica, Facultad de Farmacia, Universidad de La Laguna donde quedan especies almacenadas bajo la referencia que se cita a continuación: TFC: 49.191.

Aislamiento y purificación

En este trabajo, se parte de las fracciones Q21-28, P21-25 y K24-28, obtenidas de un estudio previo de *Hypericum coadunatum* disponibles en el laboratorio con el fin de identificar y cuantificar los compuestos fenólicos activos biológicamente.

En primer lugar, se realizaron una serie de cromatografías en placa fina de la fracción Q21-28 para así asegurar la presencia de compuestos, y las sucesivas para encontrar un solvente que separe bien los compuestos de cara a la siguiente fase: la HPLC. El solvente empleado en la HPLC fue hexano-acetato de etilo (7:3), observándose en la pantalla un pico de absorción de UV, mayoritario al resto, con T_R de 18.7 minutos. Una vez finalizada la HPLC de este compuesto se concentra el resultado en un vial para proceder a determinar la cantidad de producto puro que tenemos, en esta ocasión: 65 mg. Llegado este punto se prepara una muestra para llevarla a resonancia magnética nuclear para realizar el espectro del H. Por otra parte, se observó que el producto cristalizaba en acetato de etilo y se realizó el punto de fusión tras dicha cristalización.

El siguiente paso fue la acetilación del restante de Q21-28, para ello se disolvió en 1ml de piridina y se añadió 2ml de anhídrido acético dejando la mezcla en agitación dos días. Al cabo, se extrae de forma usual con un disolvente que no sea miscible con H_2O , en este caso acetato de etilo. Entre 5-10ml de HCl para la eliminación de la piridina ya que el Cl reacciona con esta y forma el cloruro de piridina que es soluble en agua. Se elimina la fracción acuosa y se añade nuevamente una pequeña cantidad de HCl. En contra, en la

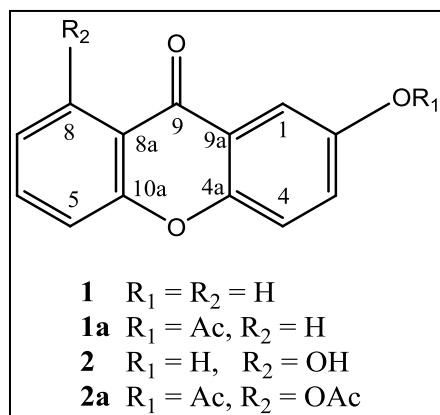
fase del acetato de etilo el exceso de ácido se neutraliza con disolución saturada de bicarbonato sódico, interesa agitar de manera manual abriendo el recipiente para liberar los gases formados en la reacción. Por último, se secó con sulfato sódico, se filtró el resultado y se concentró para su posterior estudio.

La fracción P21-25 resultó ser exactamente el mismo producto que Q21-28 por lo que se añaden 25 mg al total de producto.

El segundo producto aislado, viene de la fracción K24-28 en esta ocasión no se comenzó con la HPLC sino que se acetiló siguiendo el proceso mencionado anteriormente para luego llevar a cabo una cromatografía en columna y gel de sílice. Para realizar la columna se resuspendió la columna en benceno y se preparó un diluyente de benceno-acetato de etilo en proporciones 9:1. De las distintas fracciones que salieron de dicha columna, la número 11 se cristalizó en acetato de etilo ya que no es muy soluble en dicho líquido. A continuación se realizaron el pesado y el punto de fusión.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La cromatografía en columna del gel de sílice del extracto diclorometánico del *Hypericum coadunatum*, combinada con la cromatografía en columna semipreparativa de alta presión HPLC, nos permitió el aislamiento de dos xanthonas **1** y **2**. La elucidación estructural de las referidas sustancias se basó en los siguientes datos:



La xanthona **1**, se aísla como un polvo de color amarillo de punto de fusión 235-238°C (EtOAc-Hexanos). Esta sustancia da positiva la reacción del $FeCl_3$, característica de fenoles y presenta una fórmula molecular $C_{13}H_8O_3$, determinada por espectrometría de masas de alta resolución HREIMS, que muestra el pico del ion molecular a m/z 212.0482 $[M]^+$ (100%). La fórmula molecular de **1** nos indica la presencia de 10 grados de insaturación en la molécula. El espectro UV, muestra bandas de absorción a λ_{max} (MeOH): 235 (log ϵ 3.98), 299 (log ϵ 3.12) y 362 (log ϵ 3.18) nm, características de xantonas⁷. El espectro de ^{13}C -RMN, muestra 13 señales en la región aromática incluyendo una señal para un carbono carbonílico a δ_C 181.7 ppm. El espectro de 1H -RMN, muestra un doble doblete a relativamente bajo campo δ_H 8.35 indicativo de un protón *peri* a un grupo carbonilo en C-8, típico de un anillo xanthónico no sustituido⁸. Los valores de las constantes de acoplamiento para

⁷ Las xantonas suelen mostrar tres o cuatro bandas de absorción en el UV a longitudes de onda de: 225-245, 245-270, 300-345 y 335-410 nm. "Síntesis de xantonas polioxigenadas de *Hypericum ericoides* y *Centaureum linarifolium*. Estudio espectroscópico. "Tesis Doctoral, Universidad de Valencia, enero de 1988. Pag. 35

⁸ D. Barrachlongh, H. D. Locksley, F. Scheinmann, M.T. Magalhaes, and O.R. Gottlieb, J. Chem. Soc., **B**, 603 (1970)

H-8 ($J = 8.0$ y 1.6 Hz), nos indican la presencia de un protón en C-7 y C-6, observables a $\delta_{\text{H}} 7.37$ (1H, td, $J = 7.6$ y 1.0 Hz) y a $\delta_{\text{H}} 7.75$ (1H, td $J = 7.7$ y 1.6 Hz), respectivamente. El protón H-5 aparece a $\delta_{\text{H}} 7.50$ ppm como un doblete ancho de constante de acoplamiento 8.5 Hz. Asimismo se observan las señales de tres protones aromáticos típicos de un sistema ABC, con resonancias a $\delta_{\text{H}} 7.75$ (1H, d, $J = 3.0$ Hz), $\delta_{\text{H}} 7.46$ (1H, d, $J = 8.95$ Hz) y a $\delta_{\text{H}} 7.32$ (1H, dd, $J = 8.95$ y 3.0 Hz). La correlación observada en el experimento HMBC (Heteronuclear Multiple-Bond Correlation) entre la señal del protón H-1 a $\delta_{\text{H}} 7.75$ y el carbono carbonílico a $\delta_{\text{C}} 181$, nos permitió localizar el grupo hidroxilo en la posición C-2 del núcleo xanthonico. El tratamiento de **1** con anhídrido acético y piridina rindió el monoacetato **1a** como un sólido cristalino de color blanco y punto de fusión de 222 - 223°C . Su fórmula molecular $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_4$ y espectro de ^1H -RMN donde aparece el típico singulete a $\delta_{\text{H}} 2.36$ (3H, s) concuerdan con la incorporación de un grupo acetilo al alcohol **1**.

Los datos físicos y espectroscópicos discutidos anteriormente coinciden perfectamente con los dados en la bibliografía para la 2-hidroxixanthona, aislada con anterioridad del *Hypericum canariensis*.

Así mismo, la xanthona **2**, se aisló como un sólido cristalino en forma de agujas amarillas de punto de fusión 235 - 236°C (hexano-EtOAc), da positiva la reacción para fenoles con FeCl_3 , y presenta una fórmula molecular de $\text{C}^{13}\text{H}^8\text{O}^4$, determinada por HREIMS, donde se observa el ion molecular a (m/z 228.0433 $[\text{M}]^+$, 43%) que requiere 10 grados de insaturación. El espectro UV,

muestra bandas de absorción a λ_{\max} (MeOH): 234 (log ϵ 4.47), 259 (log ϵ 4.5), 286 (log ϵ 3.8) y 386 (log ϵ 3.86) nm, valores característicos de un núcleo xanthonónico. El espectro de ^1H -RMN, muestra la señal de un OH quelatado a δ_{H} 12.69 ppm, que nos indica que un grupo hidroxilo está localizado en C-1 o C-8. De igual manera, este espectro muestra las señales de 3 protones aromáticos en un sistema de spin ABD con resonancias a δ_{H} 6.74 (1H, brd, $J=8.3$ Hz, H-7) δ_{H} 7.66 (1H, t, $J=8.3$ Hz, H-6) y a δ_{H} 6.96 (1H, d, $J=9.0$ Hz, H-4). La correlación observada en el experimento HMBC entre la señal del protón H-1 y el carbono carbonílico a δ_{C} 182.9, nos permitió localizar el segundo de los grupos hidroxilo en la posición C-2 del núcleo xanthonónico. La acetilación de **2** da lugar a la formación del derivado diacetilado 2a. El espectro de ^1H -RMN, muestra las típicas señales de dos grupos acetilo a δ_{H} 2.48 y 2.3 ppm (cada uno 3H, s).

Los datos físicos y espectroscópicos discutidos coinciden perfectamente con los datos en la bibliografía para la 2,8-dihidroixanthona, ó 1,7-dihidroixanthona aislada con anterioridad del *Hypericum canariense*⁹.

⁹ M. Luz Cardona, José R. Pedro, Eliseo Seoane y Rosa Vidal, Journal of Natural Products, Vol. 48, Nº 3, pp 467-469, (1985).

ACTIVIDAD BIOLÓGICA

En trabajos como este, donde lo que se busca es la obtención y purificación de compuestos, se hace casi obligatorio averiguar si nuestros productos poseen o no actividad biológica activa. Las xantonas, protagonistas de este trabajo, son compuestos con numerosas actividades biológicas las cuales se recogen en la bibliografía desde hace décadas.

Estos pigmentos de origen fenólico destacan sobre todo por sus numerosas propiedades antioxidantes siendo, de hecho, uno de los antioxidantes más potentes que se encuentran en la naturaleza. Dicha actividad recae en las propiedades REDOX (reducción-oxidación) de los grupos hidroxilos de los anillos fenólicos y de la relación estructural entre las diferentes partes de la estructura química. Los grupos hidroxilos fenólicos poseen una excelente propiedad de quelación del hierro y otros metales de transición. Es por eso que desempeñan un papel muy importante en la protección frente a los fenómenos oxidativos, y tienen efectos terapéuticos en un elevado número de patologías.

Así mismo, se sabe que tienen un efecto notable en la salud cardiovascular puesto que previenen el endurecimiento de las arterias (arterosclerosis), al mismo tiempo que protegen al músculo cardíaco. A parte de ello, se conocen otras actividades de las que destacan como antibióticos naturales, antiviruses y anti-inflamatorios al igual que ayudan a combatir infecciones y por tanto a fortalecer el sistema inmunitario.

Sin embargo, cuando uno se plantea cómo puede beneficiarse de semejantes

actividades, irremediablemente se le vienen a la cabeza los medicamentos con la ingesta de pastillas o bien mediante inyecciones ya que gran parte, sino todas, las actividades que antes se describen son del ámbito de la salud. Pues bien hoy en día se sabe que muchas frutas y verduras contienen cantidades óptimas de estos productos, por lo que basta con introducirlas en la dieta.

Las referencias más actuales sobre la importante actividad de las xantonas recaen sobre plantas del género *Garcinia*. Los investigadores han estudiado la especie *Garcinia buchananii* para descubrir tres nuevas xantonas a las que han denominado: isomaniflavona, 1,4-dimethoxyjacareubin y garcinisisona-G. La importancia de estos descubrimientos es que su actividad antioxidante es mucho más eficiente, *in vitro*, que la que presentan el ácido ascórbico y la quercitina¹⁰.



Ilustración 11. Imagen de *Garcinia buchananii*. Se aprecian las hojas y el fruto.

¹⁰ Timo D. Stark, Mathias Salger, Oliver Frank et. Al; Antioxidative Compounds from *Garcinia buchananii*; Journal of Natural Products

Dentro de este género, otra especie de gran importancia es la *Garcinia cowa*. Teerayu y colaboradores, estudiando el fruto de esta planta han encontrado un gran número de xantonas de las que destacan un grupo de cinco, nuevas para la ciencia, denominadas “garciniacowonas” A-E. En esta ocasión, las xantonas fueron estudiadas a fin de cuantificar la actividad antimicrobial *in vitro*. El resultados de esta investigación fue satisfactorio puesto que reveló que actúan como fuertes inhibidores de la enzima α -glucosidasa, responsable del catabolismo del glucógeno y por tanto como restricción de fuente de carbono para las bacterias¹¹.



Ilustración 12. Frutos de la especie *Garcinia cowa*.

Por otra parte, el Departamento de Agricultura de Estados Unidos divulga, desde septiembre del 2015, un nuevo grupo de compuestos llamados “fitonutrientes” donde se encuentran las xantonas junto con los flavonoides y

¹¹ Bioactive Prenylated Xanthonas from the Young Fruit and Flowers of *Garcinia cowa*. Teerayut Sriyatep, Ittipon Siridechakorn et. al.; Journal of Natural Products

otros compuestos bioquímicos obtenidos de plantas. La utilidad de este grupo recae fundamentalmente en que son muy beneficiosos para la salud humana, en concreto, las xantonas influyen sobre todo por su potencial medicinal. Y en este aspecto destaca una fruta sobre el resto el mangostán, obtenida de la planta *Garcinia mangostana*, hasta el punto de que, desde 2007, se ha convertido en el tercer recurso botánico más vendido en Estados Unidos. Se trata del recurso natural que posee mayor cantidad de xantonas, conteniendo más de treinta. La facilidad que presenta el mangostán es que todas estas xantonas se encuentran, en su mayoría, en el pericarpio por lo que es muy sencillo hacerse con ellas. Su función en el cuerpo es remover los radicales libres, siendo algunas de las más importantes: α -mangostin, γ -mangostin, mangostene B, Garcinone E, etc.

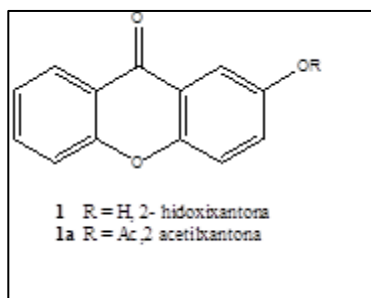
Recapitulando sabemos que las xantonas poseen un amplio espectro de actividades biológicas que van desde la antiinflamatoria, hasta la antitumoral pasando por antiviral y antimicrobiana. También somos conscientes de que podemos disfrutar de estos beneficios incluyendo en nuestra dieta diaria extractos de plantas o bien el mangostán. Ahora bien, concretemos un poco más sobre los productos obtenidos en este trabajo.

En un proyecto llevado a cabo en el Departamento de Investigación Médica del Hospital General de Taiwan, se estudió la actividad biológica de un gran número de xantonas, en las que se encuentra la 1,7-dihidroxyxanthona, *principio activo obtenido por nosotros en el presente estudio*. Dicho proyecto reveló la fuerte actividad antioxidante, anti-bacteriana y anti-inflamatoria, todas ellas típicas de las xantonas. Sin embargo, se observó como algo

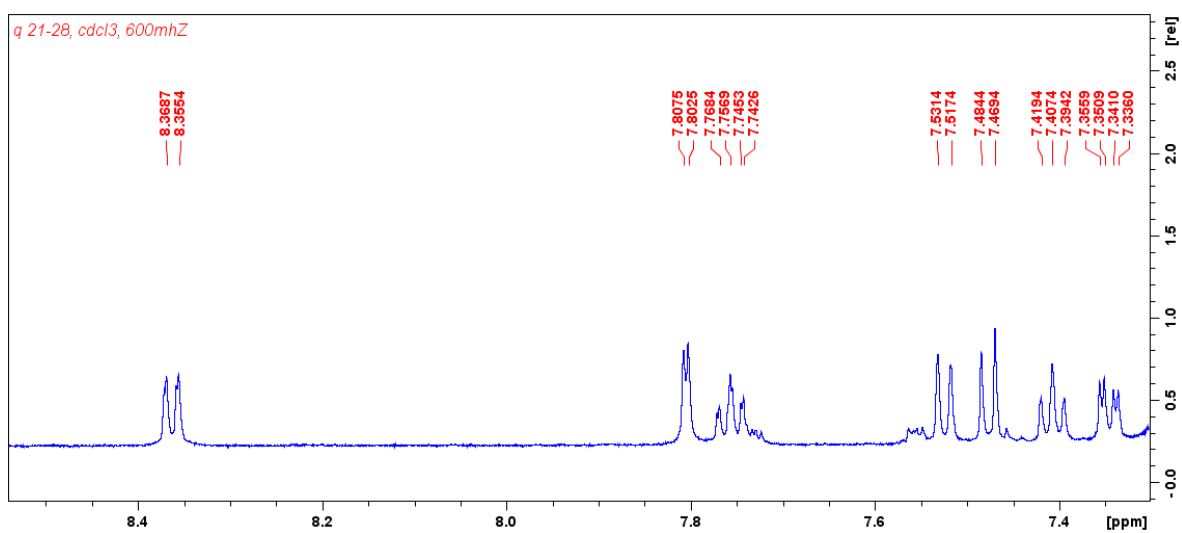
novedoso, que posee actividad inhibitoria sobre mastocitos y neutrófilos induciendo la liberación de histamina y β -glucuronidasa en ratas. Igualmente, en este proyecto se estudió la xantona identificada como 2-hidroxyxanthona, *también obtenida en el presente trabajo*, la cual posee actividad relacionada con la inhibición de la actividad de mastocitos, así como en la degranulación de neutrófilos¹², por lo que interviene en el proceso de respuesta frente a una invasión microbiana ya que el proceso de degranulación consiste en la liberación de moléculas citotóxicas responsables de la eliminación de las bacterias.

¹² Synthesis and Anti-inflammatory Effects of Xanthone Derivatives. Chun-Nan Lin, Mei-Ing Chung et. al.; J. Pharm. Pharmacol. 1996, 48: 532-538

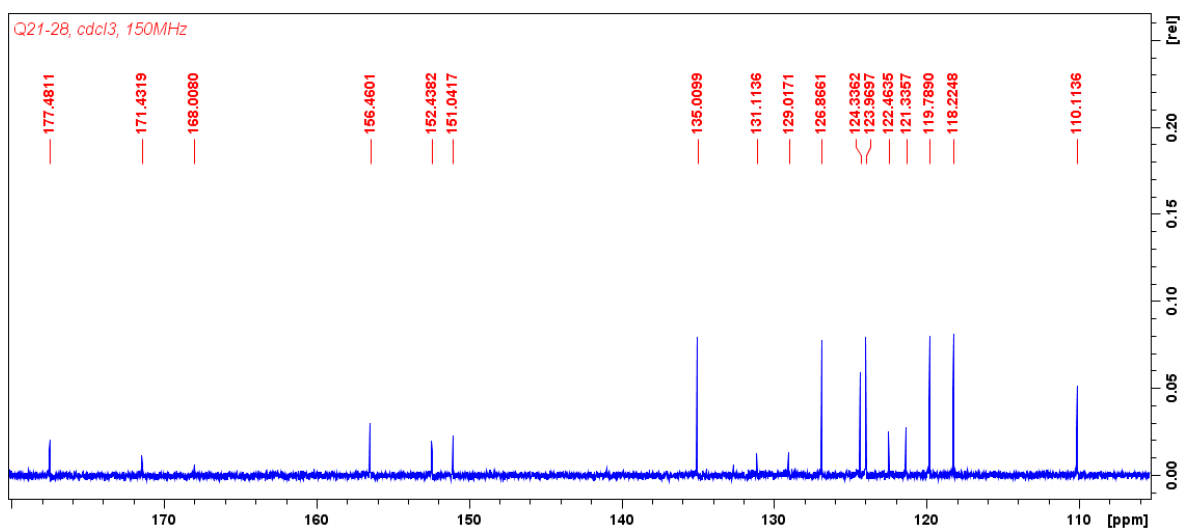
GALERIA DE ESPECTROS



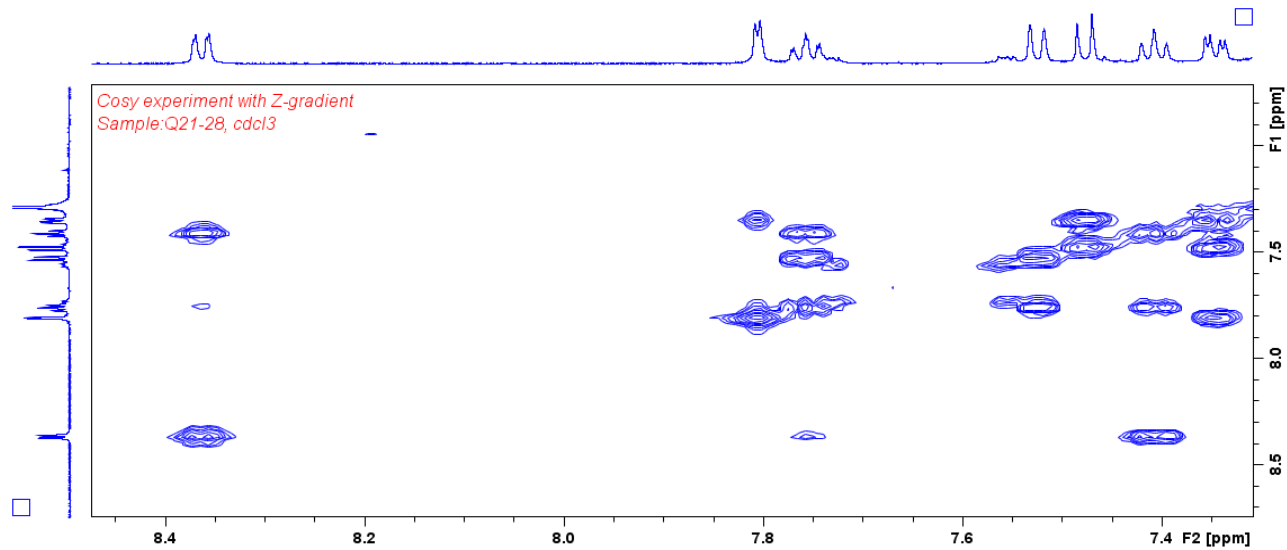
¹H-RMN de **1**



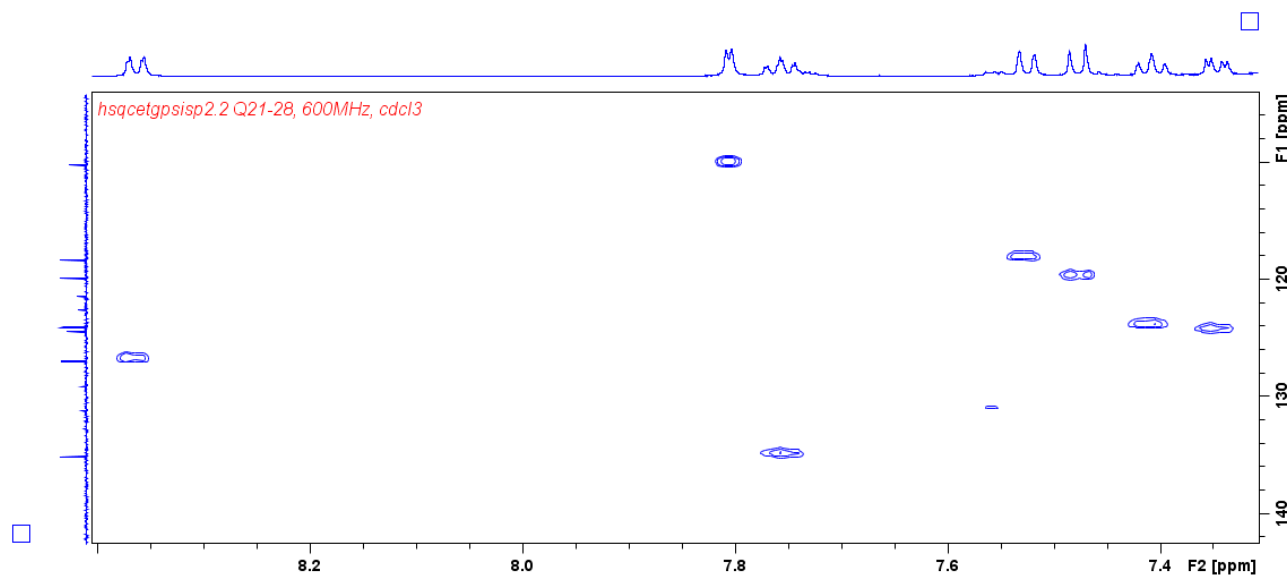
¹³C-RMN de **1**



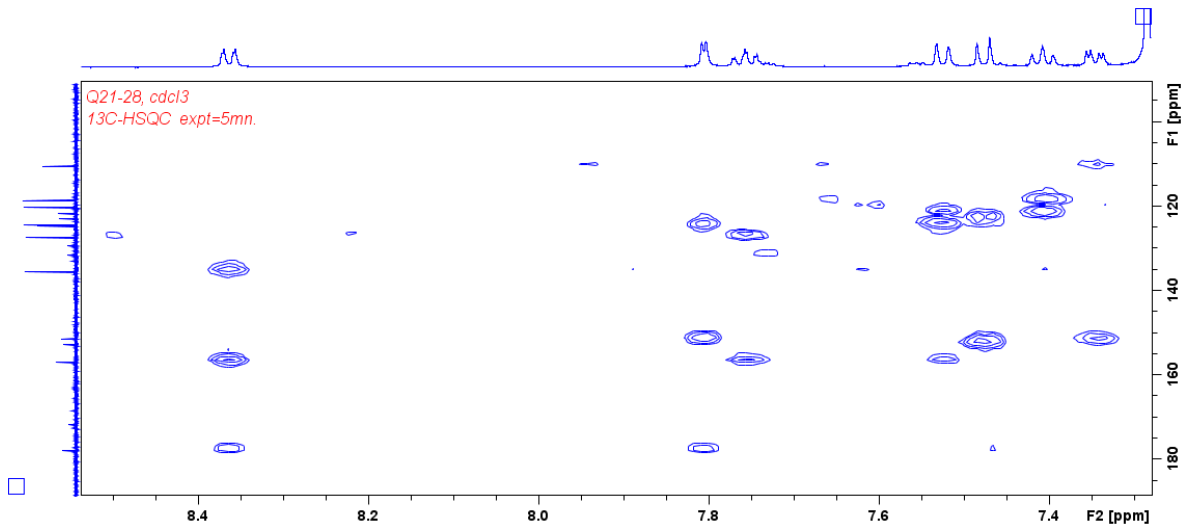
COSY de 1



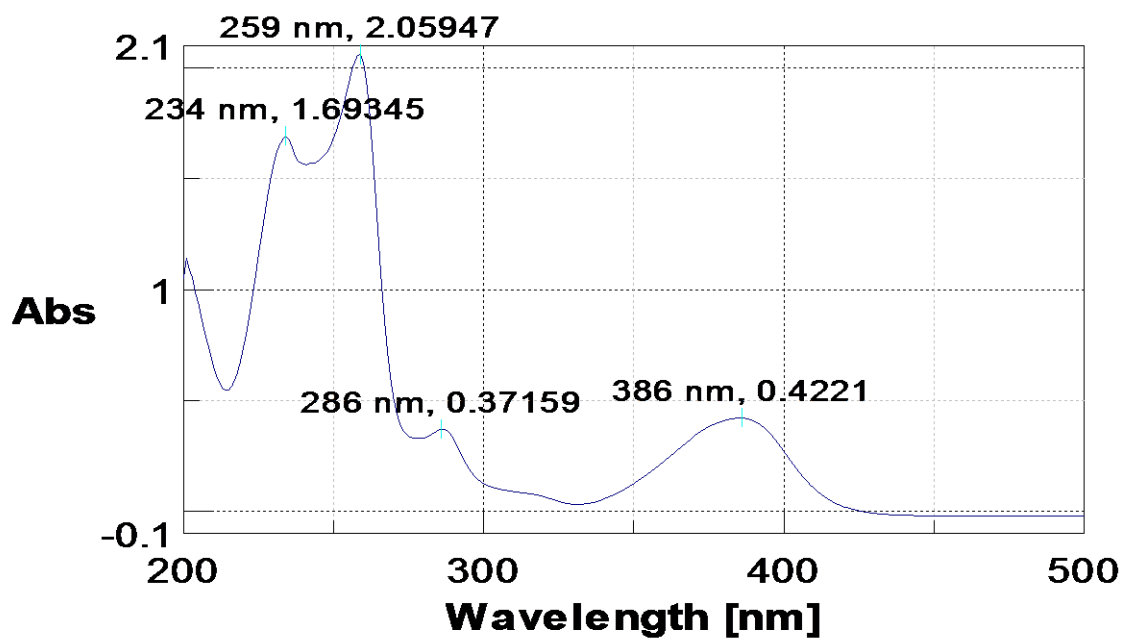
HSQC de 1



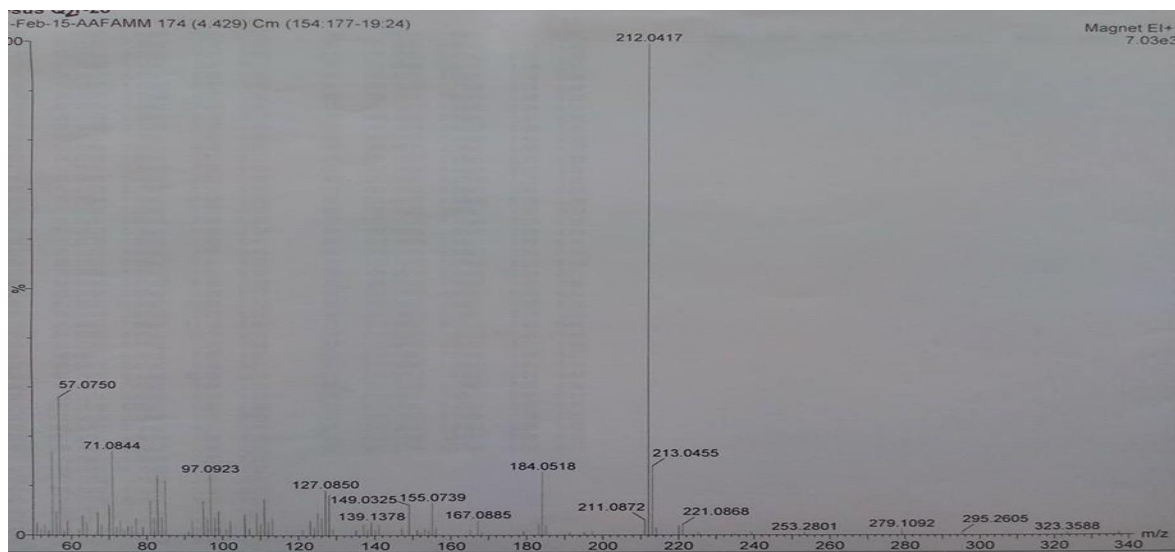
HMBC de 1



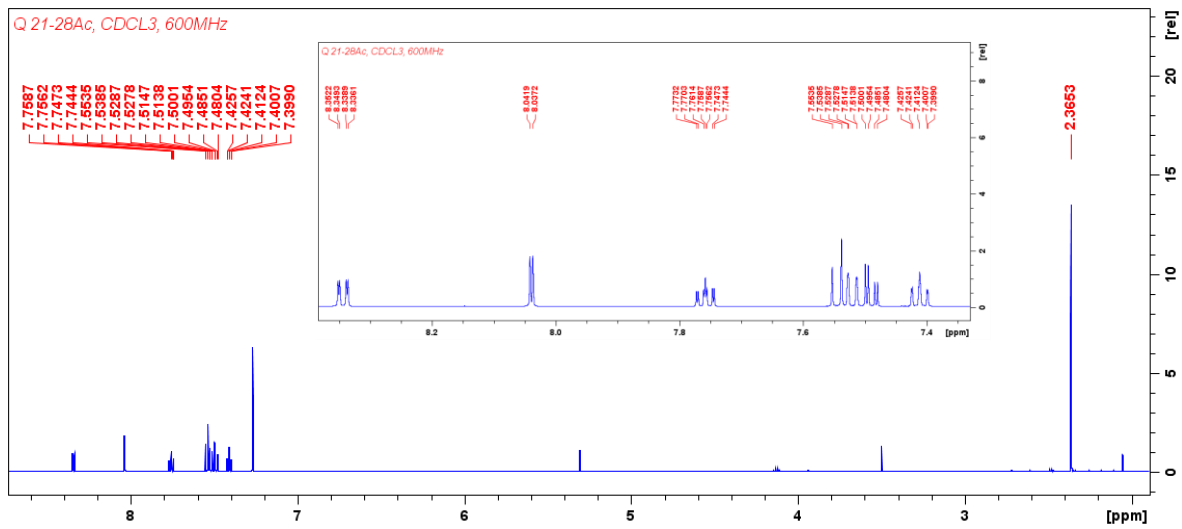
Espectro de UV de 1



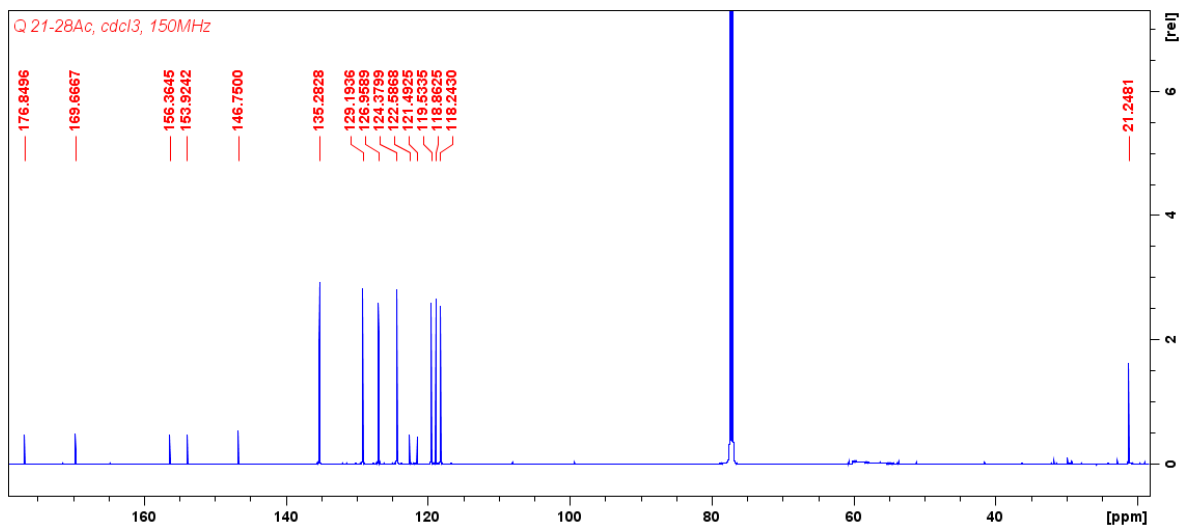
Espectro de masas de 1



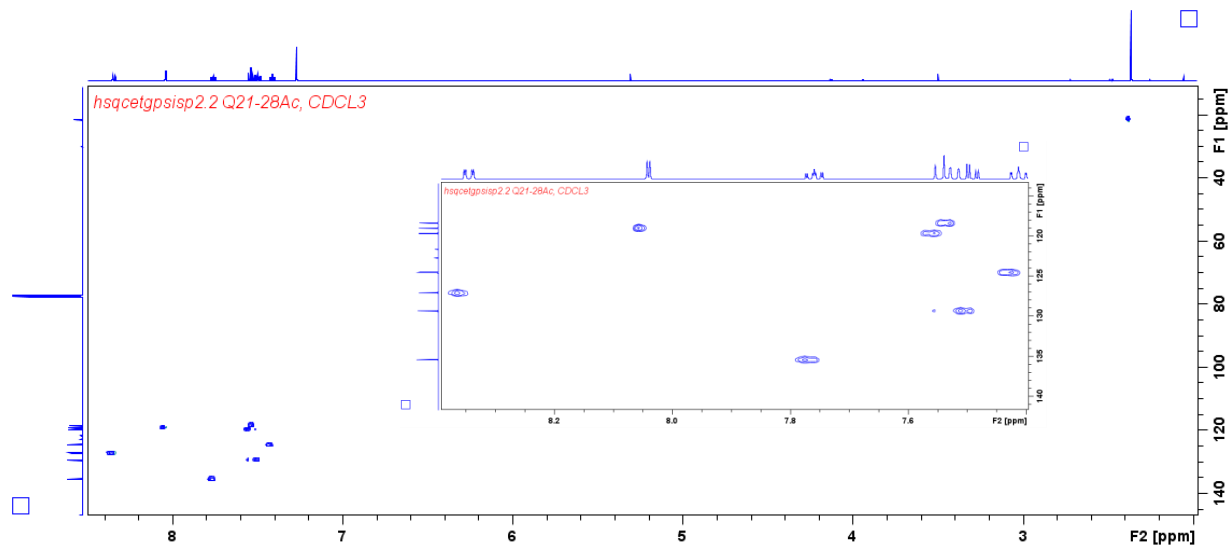
¹H-RMN de 1a



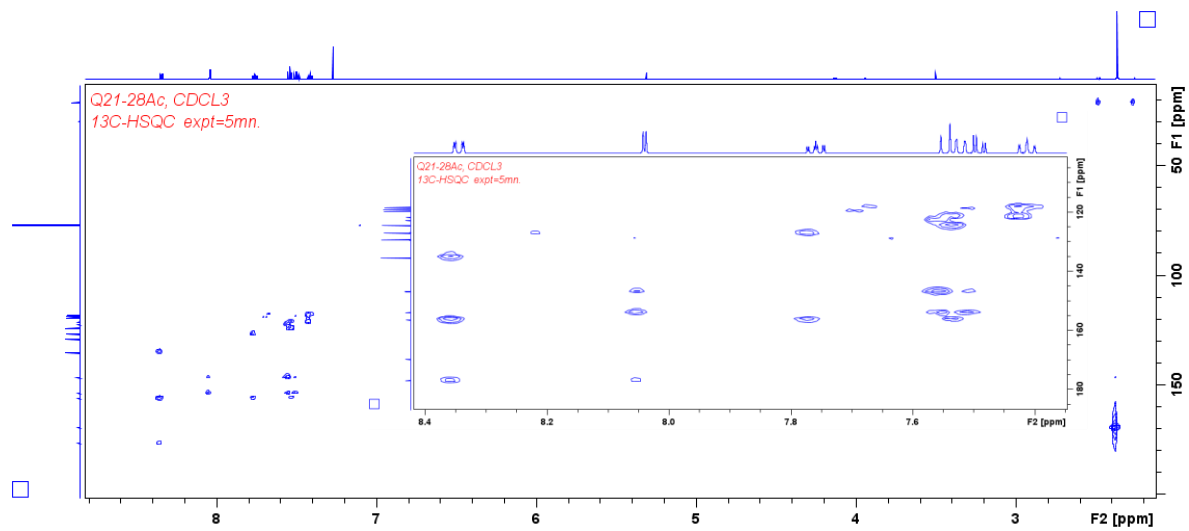
¹³C-RMN de 1a



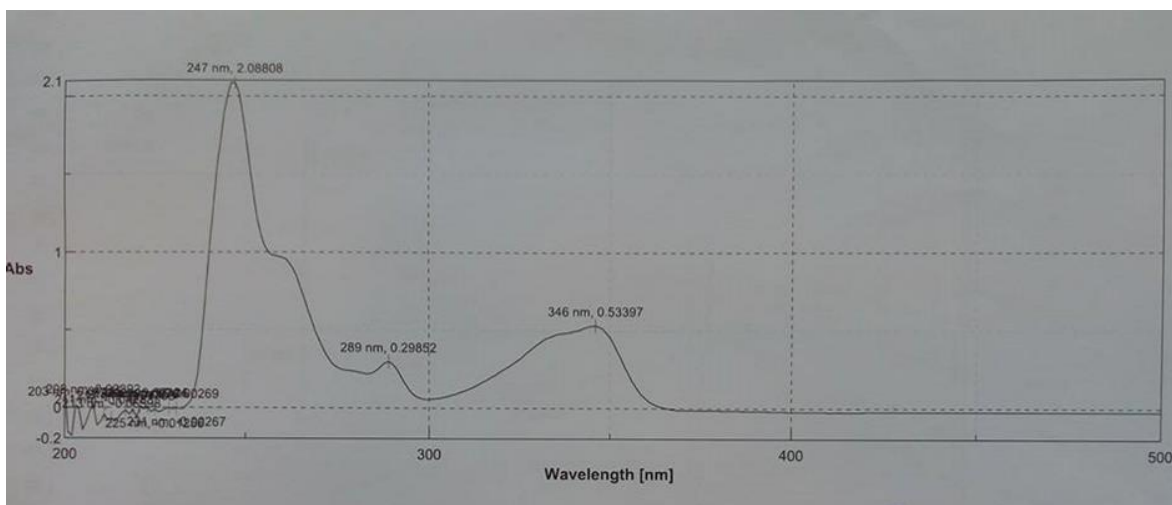
HSQC de 1a



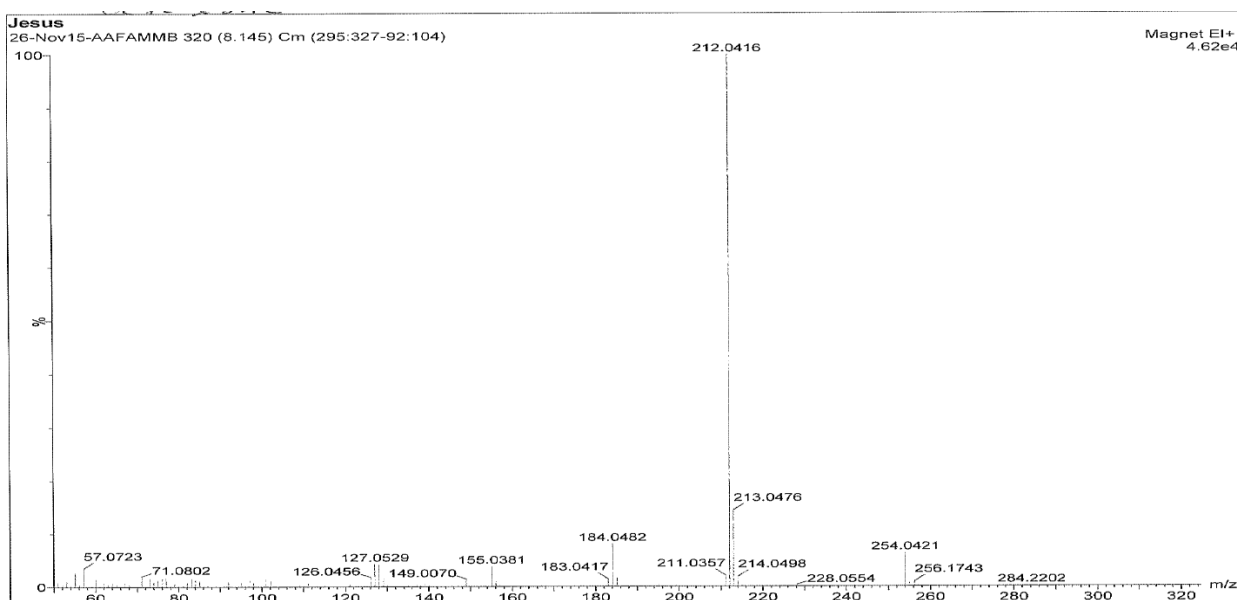
HMBC de 1a

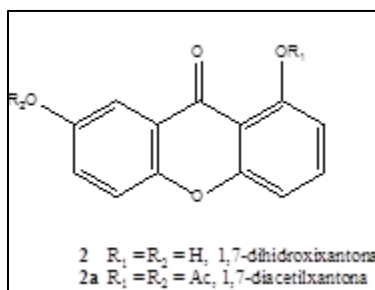


Espectro de UV de 1a

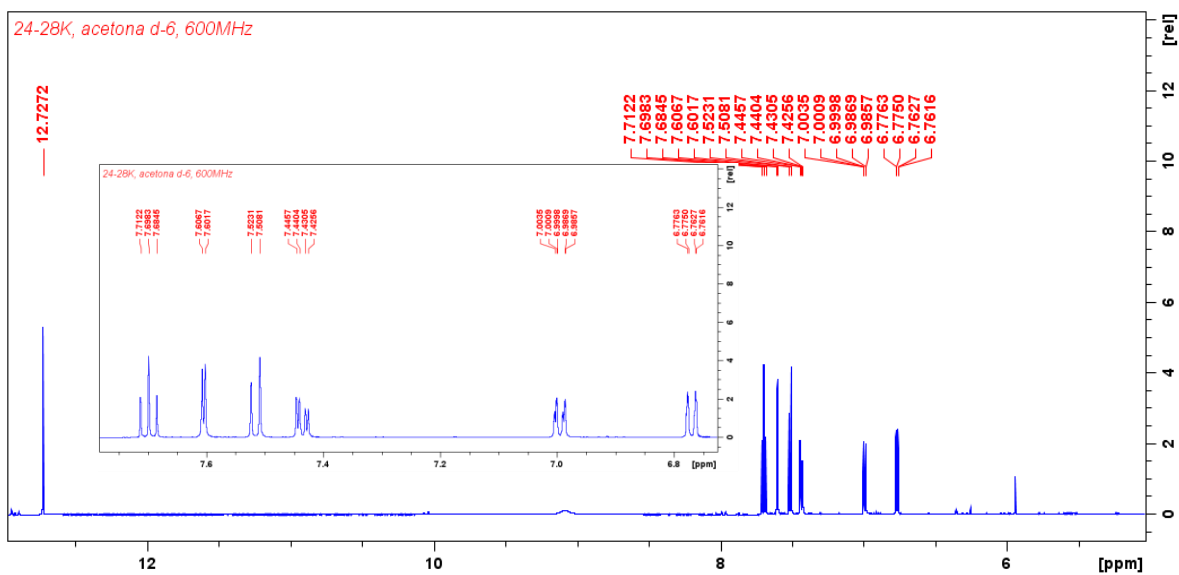


Espectro de masas de 1a

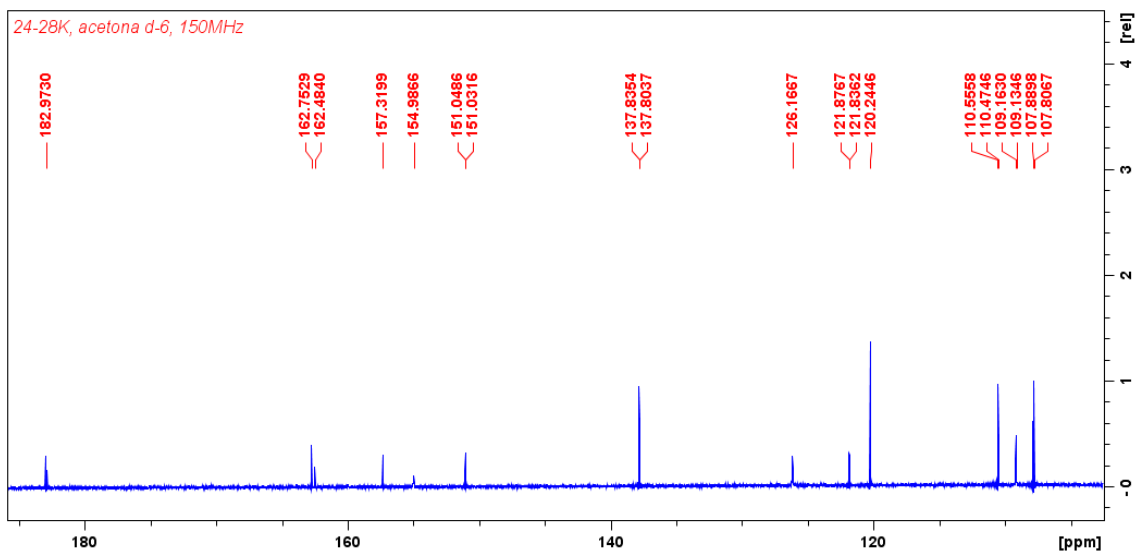




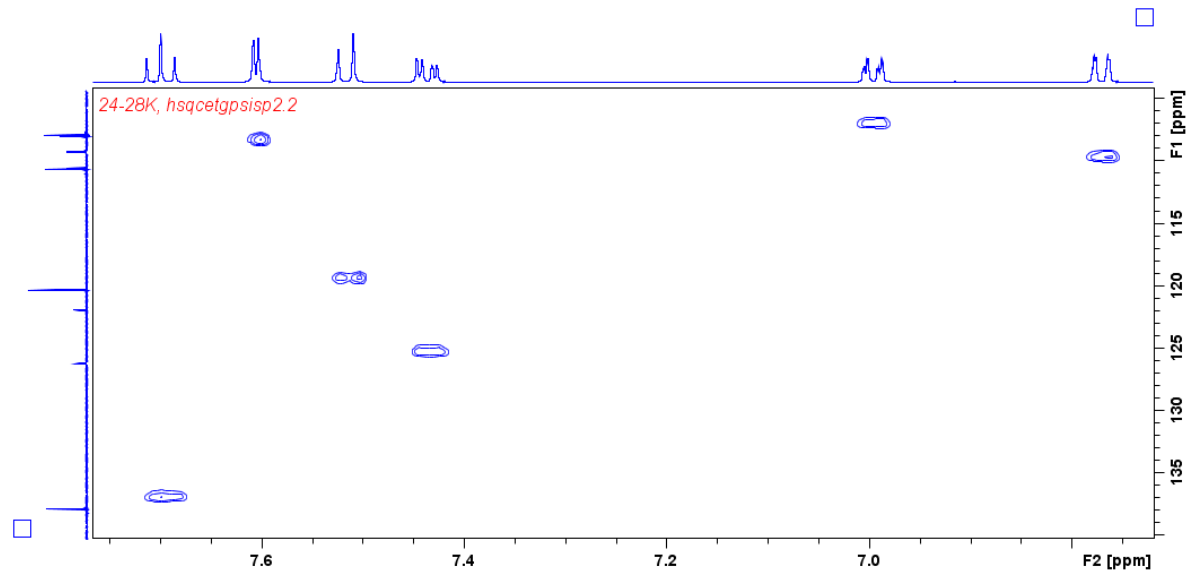
¹H-RMN de 2



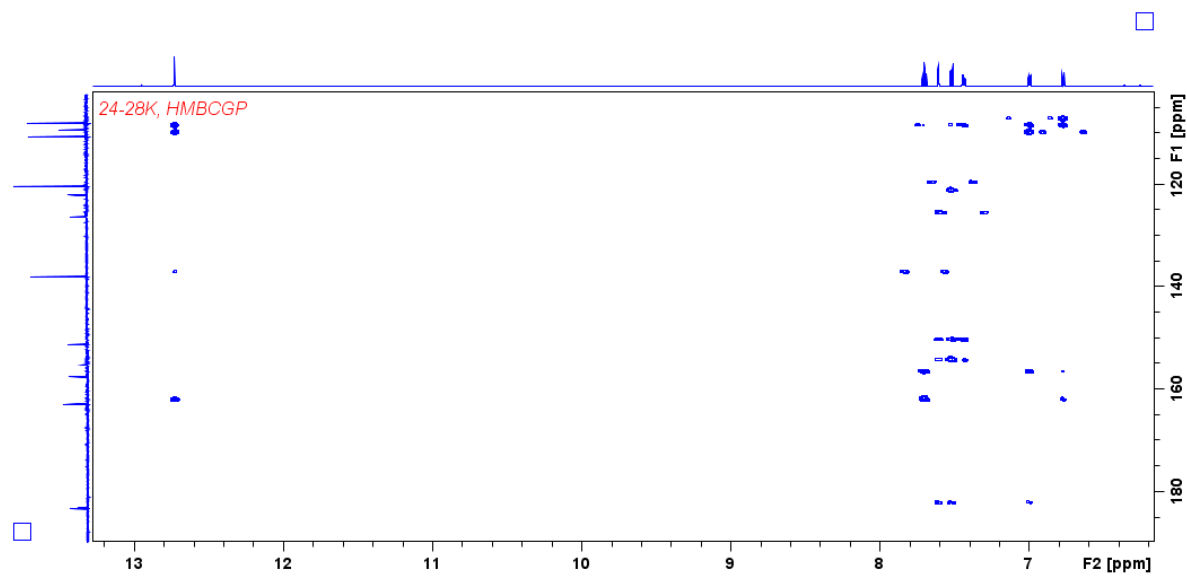
¹³C-RMN de 2



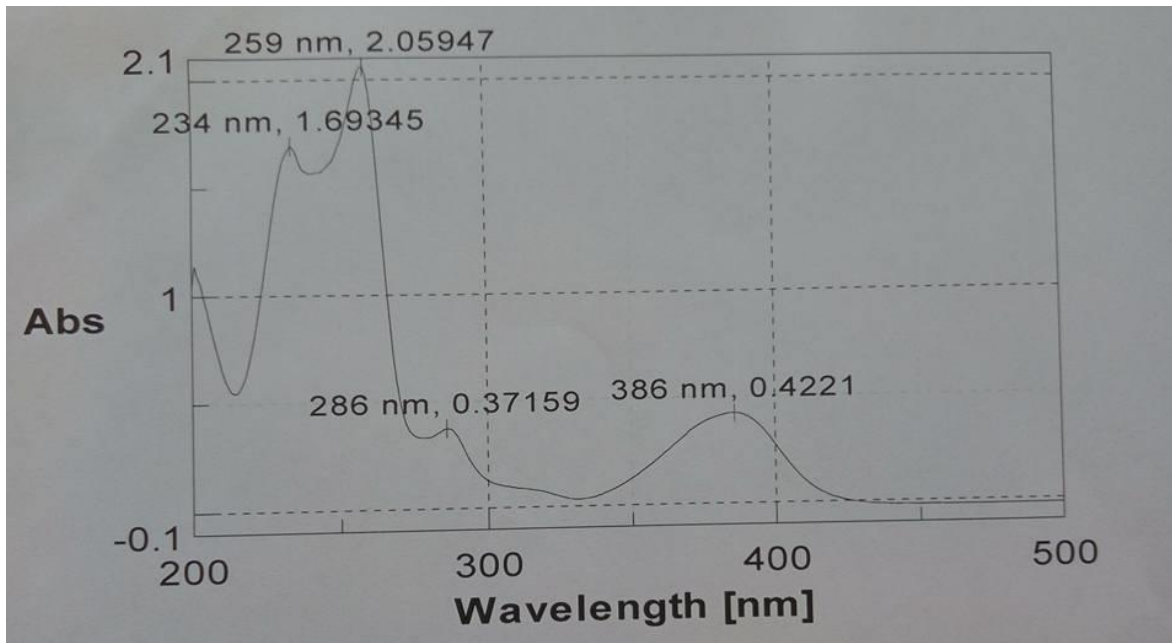
HSQC de 2



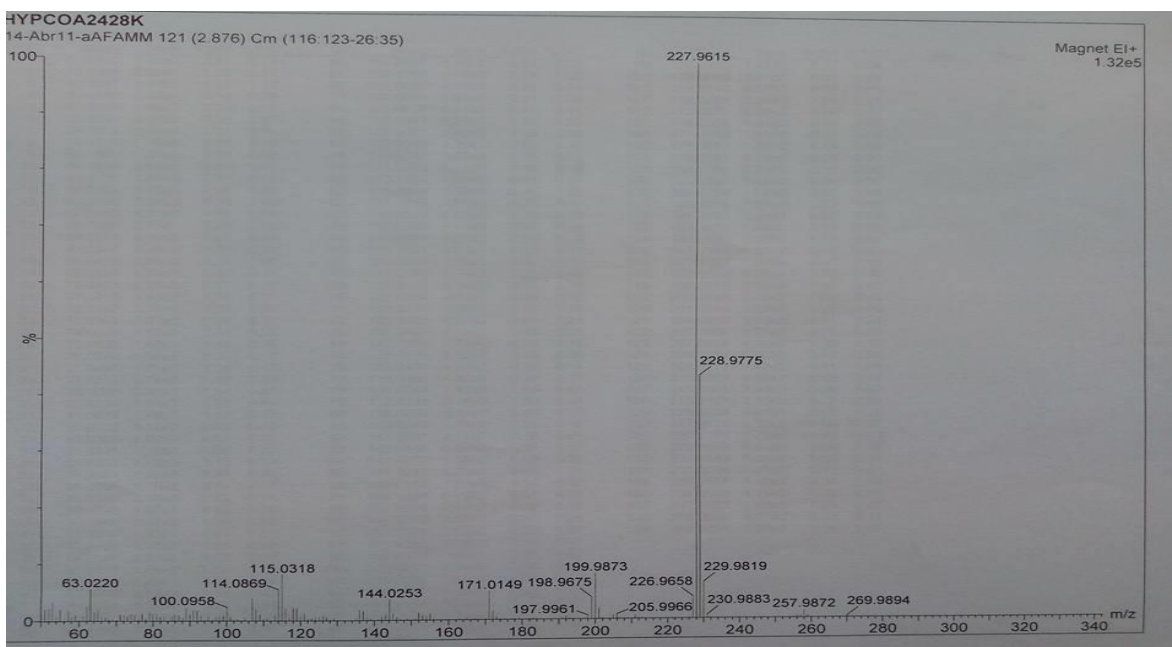
HMBC de 2



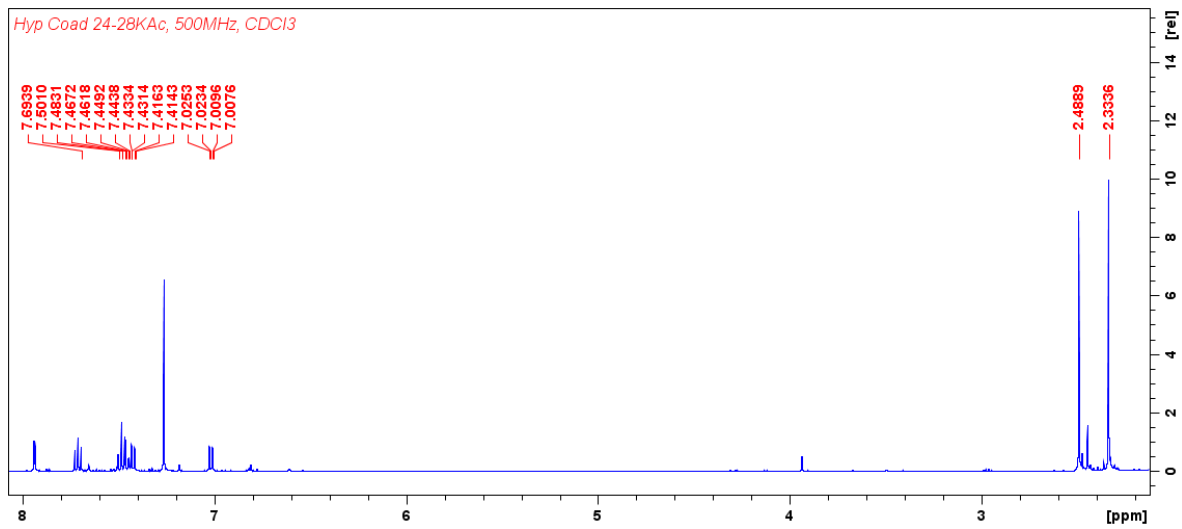
Espectro de UV de 2



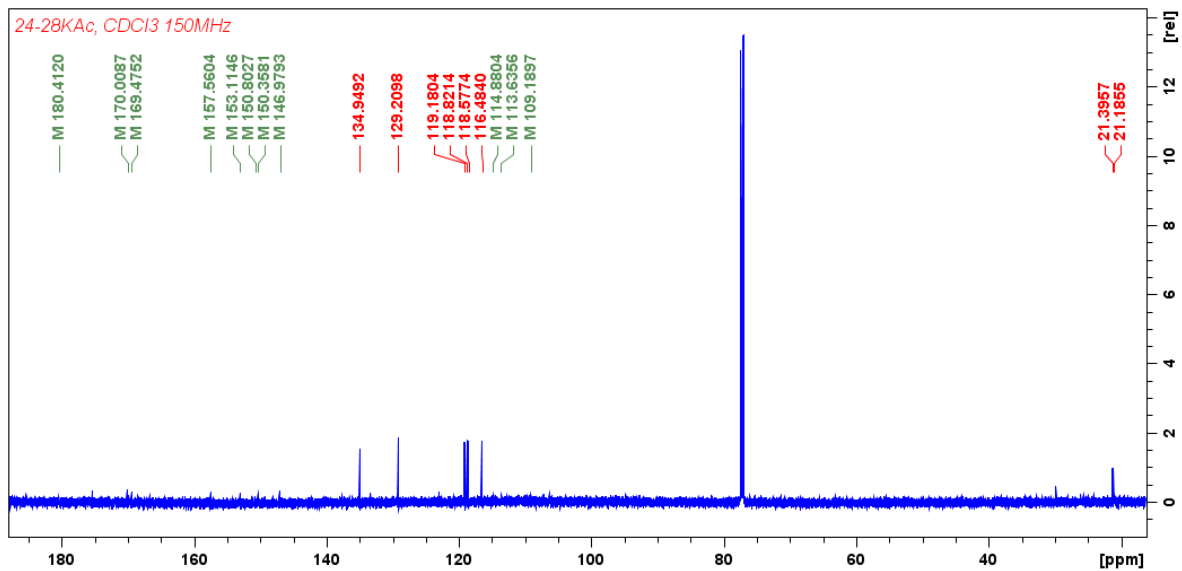
Espectro de masas de 2



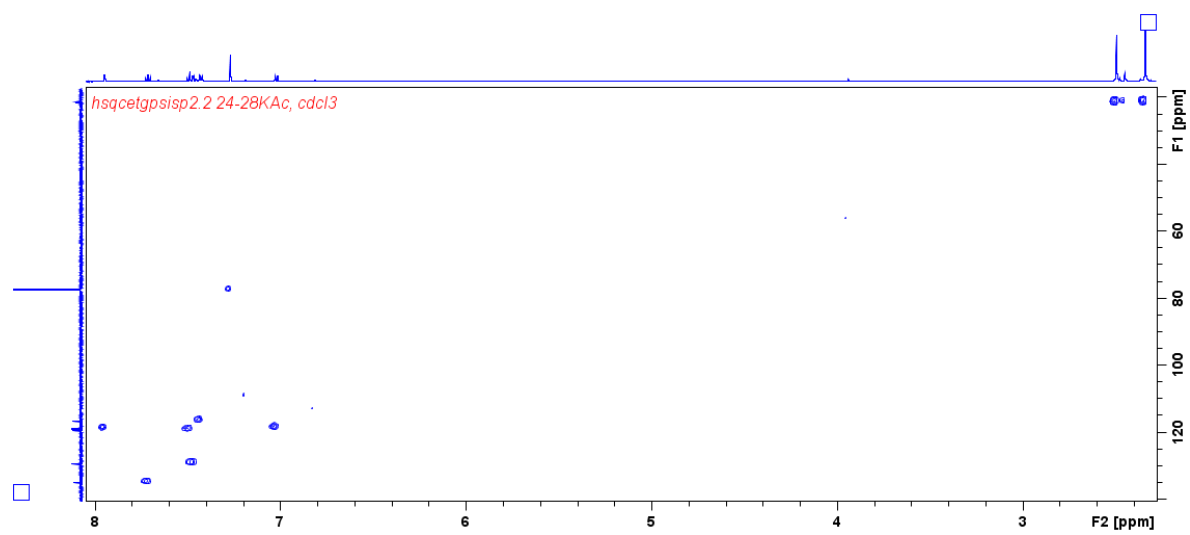
¹H-RMN de 2a



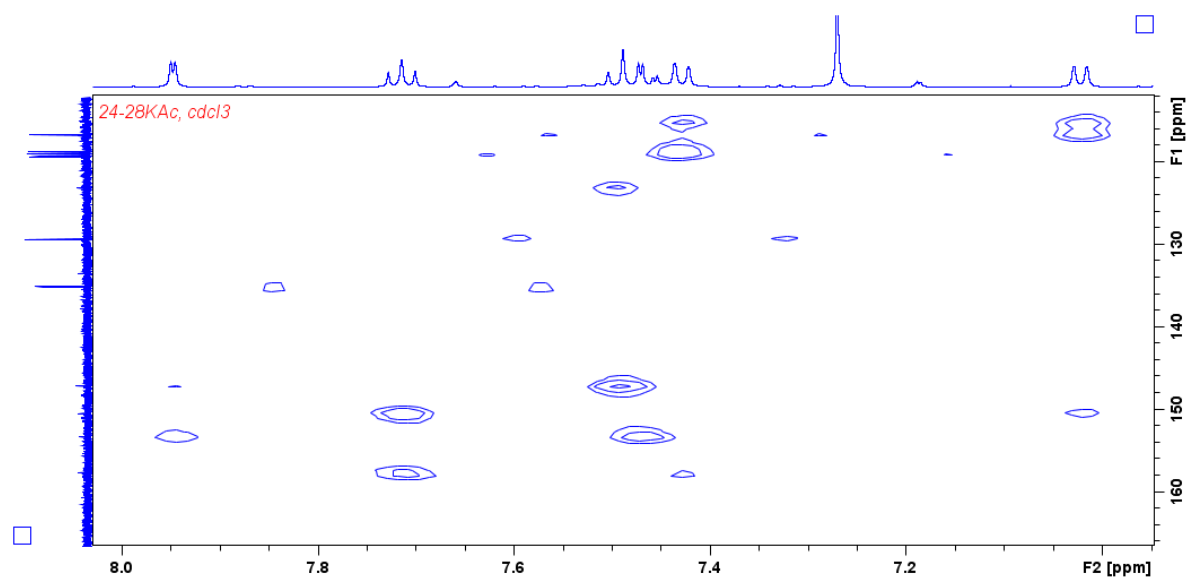
¹³C-RMN de 2a



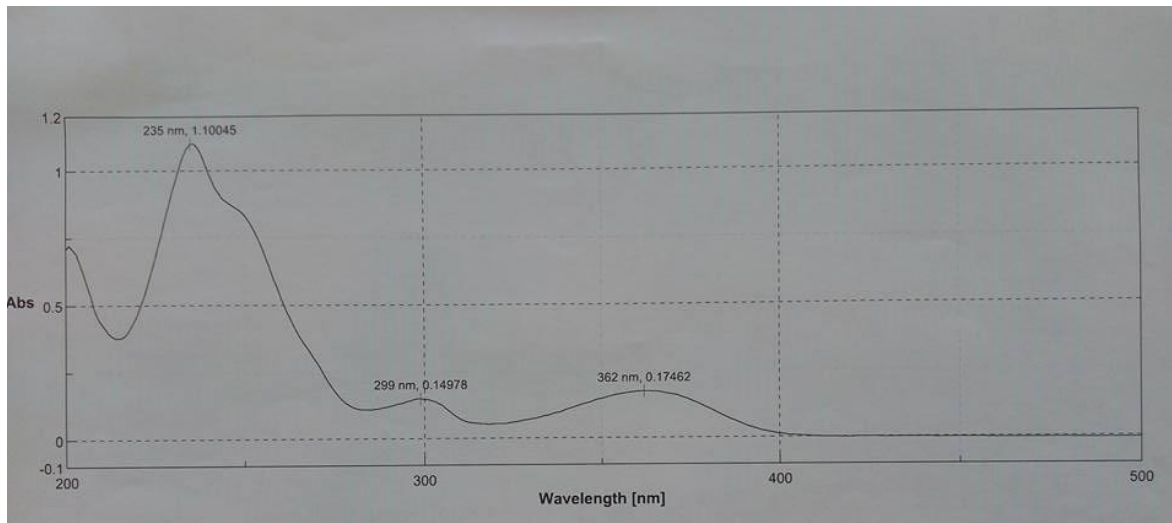
HSQC de 2a



HMBC de 2a



Espectro de UV de 2a



Espectro de masas de 2a

