



Universidad
de La Laguna



*Facultad de ciencias. Sección
de Biología*

**OBTENCIÓN DE FLAVONOLES DE
PLANTAS SUPERIORES. ACTIVIDAD
BIOLÓGICA.**

**OBTAINING FLAVONOLS FROM
HIGHER PLANTS. BIOLOGICAL
ACTIVITY.**

David Fariña Flores

Grado en Biología

Julio de 2016



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

INFORMA: que el Trabajo de Fin de Grado titulado “*Obtención de Flavonoles de Plantas Superiores. Actividad Biológica.*”, ha sido realizado por **DAVID FARIÑA FLORES**, 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 2015-2016, autorizando en esta fecha su presentación.

La Laguna, a 4 de Julio de 2016



Fdo. Jesús Manuel González Díaz

RESUMEN.	4
ABREVIATURAS.	5
<i>Planta a estudio. Hypericum coadunatum Chr. Sm. ex Link</i>	6
OBJETIVOS.	9
SECCIÓN EXPERIMENTAL.	10
<i>Procedimientos experimentales generales</i>	10
<i>Técnicas espectroscópicas utilizadas</i>	10
<i>Material vegetal</i>	14
<i>Aislamiento y purificación</i>	14
<i>Cultivo de células leucémicas humanas HL-60 y ensayos de citotoxicidad</i>	16
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	17
ACTIVIDAD BIOLÓGICA.	18
<i>Inhibición de la iniciación</i>	20
<i>Inhibición de la proliferación</i>	21
<i>Inhibición de la fase invasiva</i>	22
<i>Efectos vasculares</i>	22
<i>Efecto anti arterioesclerótico</i>	23
<i>Efecto sobre la función plaquetaria.</i>	24
<i>Efectos cardiacos</i>	24
CONCLUSIÓN.	25
BIBLIOGRAFÍA.	26
<u>ANEXO: GALERÍA DE ESPECTROS</u>	28

RESUMEN.

El género *Hypericum* es una planta productora de numerosos metabolitos secundarios de interés para el ser humano. Dicho interés se debe fundamentalmente a la elevada actividad biológica de estos metabolitos secundarios. Uno de los compuesto que mayor interés merecen son los flavonoides, una gran familia de sustancias polifenolicas, de las que hemos aislado la *quercetina* y sus derivados acetilados *quercetina*, *3-acetil*, *quercetina*, *3',4'-diacetil*, *quercetina*, *3,3',4'-triacetil* y *quercetina*, *3,5,7,3',4'-pentaacetil*, a partir del estudio fitoquímico del endemismo canario *Hypericum coadunatum* Chr. Sm. ex Link. Asimismo, se estudiaron las posibles actividades biológicas de este compuesto. Dichas sustancias tienen efecto positivo en el sistema cardiovascular, actúan también como sustancias antitumorales, antiinflamatorias, antivíricas, y antibacteriales. Dichas propiedades vienen en gran medida por la capacidad antioxidante de estas sustancias. Para el aislamiento de estos compuestos se usaron técnicas como cromatografías en capa fina, cromatografías de exclusión molecular y cromatografías líquidas de alta precisión, así como técnicas espectrométricas como infrarrojo, resonancia magnética nuclear y espectrometría de masas. Además se calcularon los distintos puntos de fusión de los distintos compuestos.

Palabras clave: *Flavonoides, quercetina, anticarcinogénico, antioxidante,*

ABSTRACT.

The *Hypericum* genre is a plant producer of many secondary metabolites of interest for the human being. That interest comes from the high biological activity of these metabolites. One of the compounds that deserves major interest are the flavonoids, a big family of polyphenolic substances of that we have isolated the *quercetin* and its derivatives *quercetin*, *3-acetil*, *quercetin*, *3',4'-diacetil*, *quercetin*, *3,3',4'-triacetil* and *quercetin*, *3,5,7,3',4'-pentaacetil*, based on the study phytochemical of the canary endemism *Hypericum coadunatum* Chr. Sm. ex Link. In the same way, the possible biological activities of that compound were studied. These substances have positive impact on the cardiovascular system, and act like antitumor substances, anti-inflammatory, antiviral, and antibacterials. These properties come from the antioxidant capacity of these substances. For the isolation of these compounds there were used techniques like chromatographies on thin-layer, chromatographies of molecular exclusion and chromatography of high resolution liquids, as spectrometric techniques like infrared, nuclear magnetic resonance and spectrometric of masses. In addition, there were calculated the different points of merger of the different compounds.

Keys Word: *flavonoids, quercetin, antioxidants, anticarcinogenic.*

ABREVIATURAS.

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
APG	Angiosperm Phylogeny Group
ARN	Ácido ribonucleico
CC	Cromatografía en columna
CCF	Cromatografía en capa fina
CVDs	Afecciones cardiovasculares
d.C	Después de Cristo.
DMSO	Dimetilsulfóxido
GMPc	Guanosín monofosfato cíclico
HDL	Lipoproteína de alta densidad
HL-60	Human promyelocytic leukemia cells
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
Hz	Hertzios
IR	Infarrojo
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
MTT	Bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio
OD	Densidad óptica
PKC	Protein kinase C
PM	Peso Molecular
ppm	Partes por millón
PUFAs	Ácidos grasos poliinsaturados
Rf	Relación de frentes
RMN	Resonancia magnética nuclear
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SDS	Dodecilsulfato sódico
TMS	Tetrametilsilano
UV	Ultravioleta

INTRODUCCIÓN

Todas las células vegetales realizan una serie de procesos metabólicos comunes que desembocan en la formación de compuestos, tales como los azúcares, aminoácidos, nucleótidos, ácidos grasos y polímeros derivados de ellos. Estos resultan esenciales para la vida de la planta y el conjunto de procesos por los cuales se forman, recibe el nombre de metabolismo primario. Además de estos sucesos comunes, en las plantas también se dan una serie de procesos específicos de ciertos grupos taxonómicos. Estas rutas reciben el nombre de metabolismo secundario y sus productos se denominan metabolitos secundarios. La biosíntesis de estos compuestos suele estar restringida a fases específicas del desarrollo o a periodos de estrés causados por diversos factores, como la deficiencia de nutrientes, factores ambientales adversos, o el ataque de patógenos.

Desde el comienzo de la especie humana, las plantas han desempeñado un papel primordial en nuestra supervivencia. Ya no solo como fuente principal de alimento o de oxígeno, necesario para la vida de la mayoría de los seres vivos, sino también como importantes productoras de principios activos de los que los seres humanos nos hemos beneficiado desde épocas antiguas. El uso de las plantas con fines medicinales se remonta a culturas muy antiguas, como la sumeria o la china, y en muchos casos constituían el único medio para tratar las distintas afecciones que sufríamos. Mención especial merece Galeno de Pérgamo (129-200 d.C), uno de los más famosos médicos de la antigua cultura griega, quien recopiló en una serie de volúmenes información valiosa sobre muchas plantas y su uso a la hora de tratar diversas enfermedades, dando su nombre a todo un sistema de medicina. Más adelante, durante la Edad Media, podemos destacar los estudios realizados en el mundo islámico, los cuales influyeron notablemente en el uso de las plantas medicinales, creando las primeras boticas.

Ya en épocas modernas, el gran avance lo constituyó el farmacéutico alemán Sertümer, quien aisló el primer principio activo obtenido puro, la morfina, en 1805. Él, tras una serie de 57 experimentos, fue capaz de cristalizar un alcaloide de la resina secretada por *Papaver somniferum*. Este hecho revolucionó el mundo de la química moderna y abrió el camino para el aislamiento de una gran cantidad de productos naturales, como la quinina, la cafeína, la nicotina... y así, hasta llegar al gran número de

productos conocidos en la actualidad. Esto provocó un gran avance en la química y sobretodo en la química orgánica.

Por último, en el siglo XX se produjeron numerosos avances técnicos tales como el desarrollo de la mecánica cuántica, y de las distintas técnicas espectrométricas, entre las que se encuentra la resonancia magnética nuclear. Esto permitió la industrialización de la química y, con ello, un gran avance de la biología, puesto que ambas ciencias están profundamente interconectadas y relacionadas.

Actualmente, nos encontramos en un momento de búsqueda activa de nuevos compuestos bioactivos de origen natural, con un efecto beneficioso para nosotros y una aplicación potencial que no solo se centra en el campo de la salud, sino también en la industria y en el campo agroalimentario, destacando, por ejemplo, el uso de sustancias polifenolicas para evitar o retrasar la oxidación de ciertos compuestos presentes en los alimentos que, por su estructura química, resultan fácilmente degradables.

Desde el punto de vista químico, los fenoles se definen como sustancias que poseen un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilo, incluyendo sus derivados funcionales. Los fenoles se dividen en tres grupos fundamentales, polifenoles, ácidos fenólicos y flavonoides. En este trabajo nos centraremos fundamentalmente en este último grupo, los cuales, por su significativo efecto antioxidante, tienen una gran importancia hoy en día.

Los flavonoides fueron descubiertos en 1920 por Albert von Szent-Györgyi, un medico sueco que trabajo extensamente en el aislamiento de la vitamina C. Szent-Györgyi desarrolló un método para aislar la vitamina C, en forma cristalina, a partir de los pimientos rojos. Sin embargo, su descubrimiento de los flavonoides ocurrió casi de manera casual. Györgyi tenía por aquella época un amigo que sufría una grave diabetes hemorrágica, la cual se producía por un aumento en la fragilidad de la pared de los capilares. Györgyi recomendó a este amigo el consumo de pimientos rojos, excelente fuente de vitamina C. A pesar de que Györgyi ya había logrado aislar la vitamina C pura, esta aún no se encontraba en cantidades lo suficientemente altas como para que la enfermedad de su amigo se tratara con este compuesto exclusivamente. Como era de esperar para Györgyi, el tratamiento de su amigo resultó todo un éxito, sin embargo, la

sorpreza fue mayúscula cuando intentó emular, más adelante, este efecto terapéutico utilizando vitamina C aislada y no tuvo éxito. Por lo tanto Györgyi llegó a la conclusión de que debía haber otro compuesto responsable de la mejoría de su amigo. En experimentos posteriores él demostró que la sustancia responsable del efecto terapéutico era un compuesto de naturaleza polifenólica, la cual pertenecía a un gran grupo de colorantes vegetales amarillos, los cuales incluían las flavonas, los flavonoles y las flavononas. A partir de este punto, sus estudios se centraron en demostrar la actividad biológica de estos compuestos y dejaron claro que eran un grupo potencialmente prometedor con efectos terapéuticos sobre la salud. Denominó a los polifenoles como vitamina P estos estudios junto al de la vitamina C le llevaron a obtener el premio Nobel en 1937.

Muchos estudios han demostrado la importancia de las plantas como una fuente de antioxidantes (El Abed *et al.*, 2014). Una de estas sustancias, derivadas del metabolismo secundario, son los flavonoides. Estos son compuestos antioxidantes de tipo polifenólico, ampliamente distribuidos en la naturaleza, constituyendo fundamentalmente pigmentos de color amarillento, de los que se han detectado, aproximadamente, 4000 estructuras diferentes (Heim *et al.*, 2002), siendo los polifenoles más abundantes de la dieta (Scalbert & Williamson, 2000).

La mayoría de estos metabolitos secundarios derivan del acetyl-CoA, del ácido sikímico o del ácido mevalónico, sustancias precursoras de las tres rutas de biosíntesis fundamentales.

El sikimato, derivado de los carbohidratos, es el compuesto clave en la formación de compuestos aromáticos, tales como los compuestos fenólicos como los fenoles simples, los taninos, los ácidos fenólicos, los lignanos etc. El grupo acetado del acetyl-CoA da lugar por condensación a los poliactatos, los cuales, a su vez, originan ácidos grasos por reducción y antraquinonas por ciclación. El ácido mevalónico da lugar a terpenos y esteroides. Los flavonoides derivan de una biogénesis mixta, en su síntesis se combinan derivados del sikimato y del acetato. Esto incrementa la diversidad estructural de estos compuestos. Por otro lado, hay que tener en cuenta que los flavonoides muchas veces tienen unida una o varias unidades de azúcar, formando heterósidos.

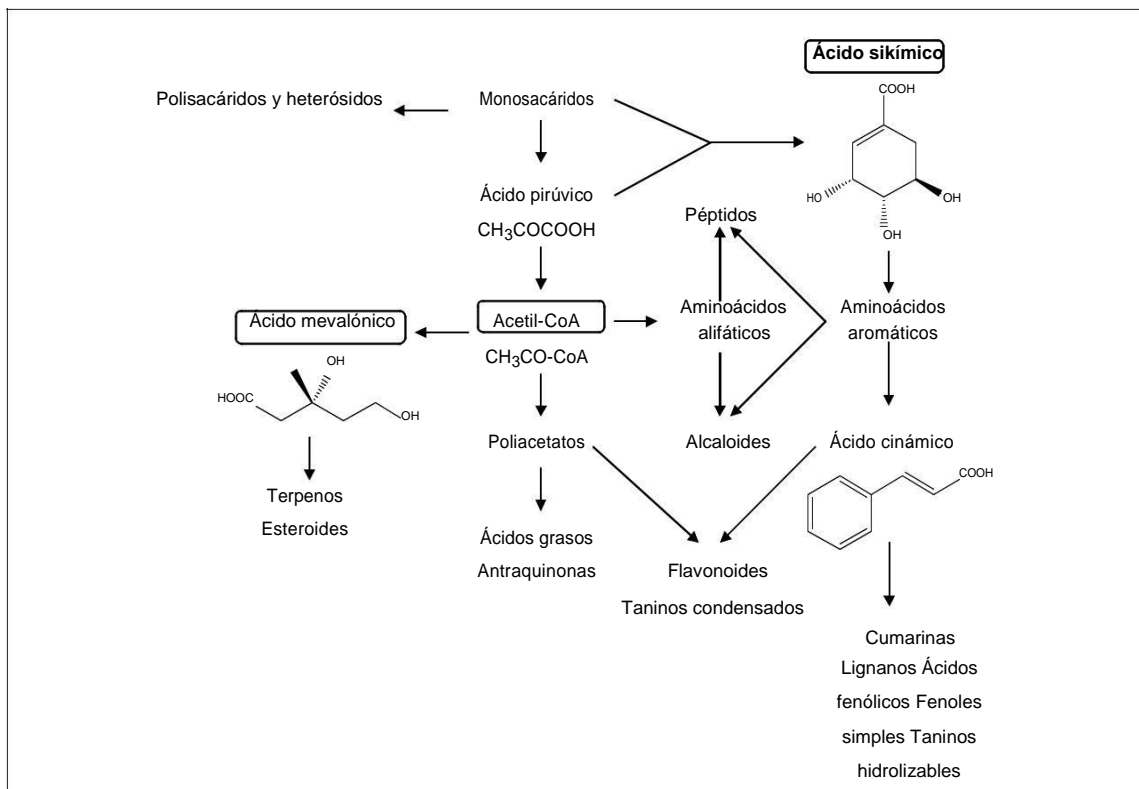


Figura 1. Principales rutas de biosíntesis de los metabolitos secundarios.

Los flavonoides son compuestos naturales de bajo peso molecular (PM), los cuales comparten un esqueleto común de difenilpiranos (C6-C3-C6), constituidos por dos anillos aromáticos (A y B) ligados por una cadena alifática de tres carbonos, la cual se puede combinar con un oxígeno y dos carbonos del anillo A, para formar un tercer anillo, denominado anillo C, de tipo pirano, o en menor medida de tipo furano.

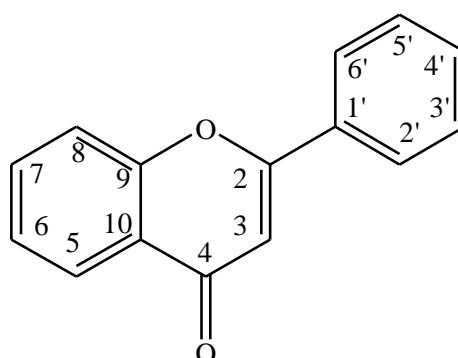


Figura 2. Estructura básica de los flavonoides con la numeración correcta de sus átomos de carbono.

En las plantas, los flavonoides, tienen multitud de funciones incluidas la señalización, la atracción de polinizadores, la protección de la luz UV y de los

fitopatógenos (Koes *et al.*, 2005). Se ubican, principalmente, en la parte exterior de los vegetales, flores y hojas, con excepciones, como la de los tubérculos de cebolla, que contienen elevadas concentraciones de quercetina 4'-D-glucósidos (Martínez *et al.*, 2002). Estos compuestos se pueden clasificar en flavonas, flavonoles, isoflavonas, flavanonas, flavanoles y antocianidinas.

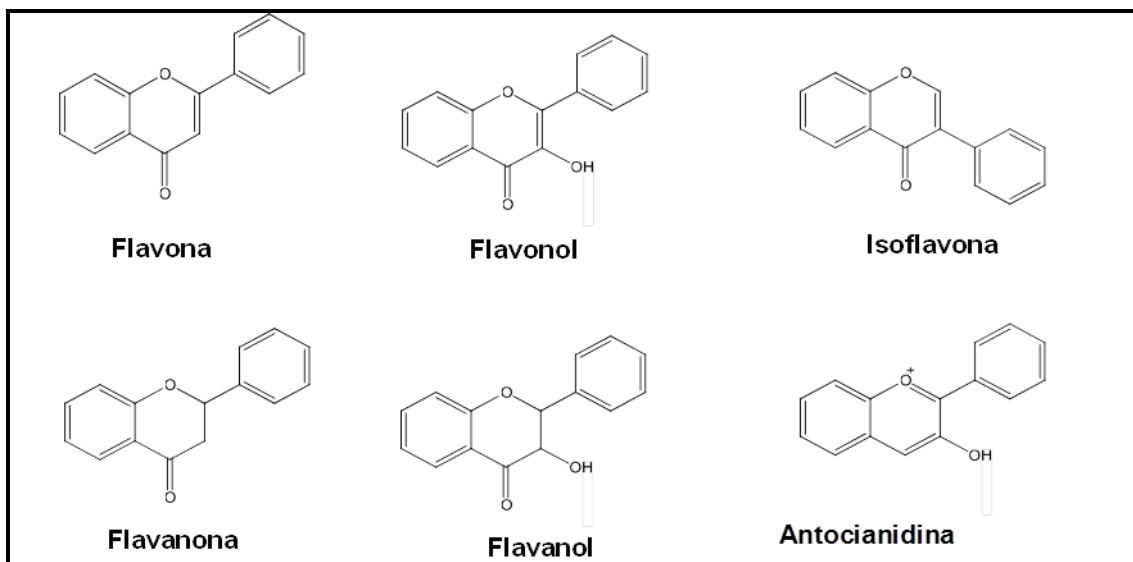


Figura 3. Estructuras de tipos de flavonoides.

Los flavonoides presentan un gran impacto en la salud de los humanos, con propiedades antiinflamatorias, analgésicas, antimicrobianas, antioxidantes, antitrombóticas, como protectores gástricos y hepáticos, cardiotónicos y anticancerígenas. Considerables evidencias epidemiológicas han indicado que una dieta rica en flavonoides está directamente relacionada con un descenso en enfermedades crónicas, tales como las afecciones cardiovasculares (CVDs), la diabetes tipo II, las enfermedades neurodegenerativas y posiblemente el cáncer (Del Río *et al.*, 2013), ya que actúan como potentes antioxidantes. Esto se debe a que los compuestos fenólicos, especialmente los flavonoides, tienen un poder significativo frente a los radicales libres y frente a las especies reactivas de oxígeno (ROS) (Cevallos-Casals *et al.*, 2006).

Por otro lado, los flavonoides no solo tienen importancia para la salud humana cuando son consumidos directamente en la dieta. Se pueden utilizar como conservantes de diversos alimentos tales como los productos derivados de la pesca (Iglesias, 2009), los cuales por su gran contenido en ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) tienen un

impacto beneficioso para la salud reduciendo el nivel de triglicéridos y del colesterol asociado a las lipoproteínas de baja densidad (LDL) (Parthasarathy *et al.*, 1988). También, se han utilizado sustancias pertenecientes al grupo de los flavonoides como plaguicidas, destacando el uso de rotenoides.

Por todo esto, resulta obvia la necesidad de efectuar una búsqueda intensiva de nuevos flavonoides, así como de derivados de los ya descubiertos, puesto que son sustancias de gran utilidad e importancia, sea tanto en el campo de la salud humana, o en el de la industria agroalimentaria.

Planta a estudio. *Hypericum coadunatum* Chr. Sm. ex Link

El género *Hypericum* pertenece a la familia Hypericaceae, según la nueva clasificación botánica dada por APG III (Angiosperm Phylogeny Group, 2009)" Actualmente, está representado por aproximadamente 400 especies, de las cuales encontramos 5 en canarias, siendo muchas de ellas endémicas de las islas. Concretamente, nos encontramos poblaciones de: *Hypericum canariense* L., denominado comúnmente Granadillo y representado en las islas de Gran Canaria, Tenerife, La Palma, La Gomera y el Hierro; *Hypericum grandifolium* Choisy, designado usualmente Malfurada y presente en todas las islas. *Hypericum glandulosum* Aiton, conocido comúnmente por el nombre de Malfurada de monte. *Hypericum reflexum* L. fil. llamado Cruzadilla y presente en las islas de Tenerife, La Gomera y Gran Canaria. Y por último, *Hypericum coadunatum* Chr. Sm. ex Link presente únicamente en la isla de Gran Canaria y con poblaciones muy escasas. (Bramwell & Bramwell, 1994). Se denomina comúnmente como Cruzadilla de naciente (Machado & Morera, 2005). Además, destacan las poblaciones introducidas de *Hypericum perforatum* L, planta denominada Hierba de San Juan y utilizada con fines ornamentales.

Tanto *H. glandulosum* como *H. grandifolium* constituyen endemismos macaronésicos. El resto de las especies son endémicas de las islas, siendo *H. coadunatum* un raro endemismo insular de la isla de Gran Canaria, con poblaciones muy raras en riscos húmedos y paredes de la región central por encima de San Mateo (1.200m) en las zonas este y oeste de la isla. Sobre todo, crece en áreas de "almagres" por ser zonas más húmedas en suelos de la asociación Litosol y Umbrept. En su hábitat

convive, frecuentemente, con plantas, tales como *Adiantum capillus-veneris*, *Pteridium aquilinum*, la invasora *Ageratina adenophora*, *Salix canariensis*, *Hedera helix* subsp. *canariensis* y otras especies del género *Hypericum*, como *H. grandifolium* o *H. reflexum*.

La planta tiene un biotipo nanofanerófito, de tipo arbustivo. Presenta tallos suberectos o procumbentes. Hojas ovadas, con ápice obtuso, sésiles, perfoliadas en la base. Opuestas y decusadas, vellosas en el envés y márgenes glandulares. Inflorescencia de tipo cimoso y densa. Flores de un color amarillo pálido y de un pequeño tamaño, aproximadamente, 1cm de ancho. Fruto en cápsula la cual puede ser a veces carnosa. Semillas muy pequeñas y en mucha cantidad, de un color marrón, las cuales se dispersan por el viento.

Es una planta monoica, alógama y florece entre agosto y septiembre. La polinización es de tipo entomófilo y muy comúnmente cantarofila (polinizada por escarabajos).



Imagen 1. *H. coadunatum* mostrando la inflorescencia

Desde hace mucho tiempo, las plantas del género *Hypericum* se han utilizado con fines medicinales, por ejemplo, en la medicina tradicional europea, el aceite obtenido de la maceración de esta especie se ha utilizado en el tratamiento tópico contra las quemaduras, por su efecto analgésico, cicatrizante y antibacteriano. Hoy en día, destaca el uso de estas plantas en el tratamiento contra la depresión (Muller, 2004). También, se han encontrado evidencias que demuestran el uso potencial de estas plantas en el tratamiento antiinflamatorio y antitumoral. Concretamente destaca el uso la

hypericina (1) y la hyperforina (2), principios activos de *H. perforatum*. El primero, la hypericina, es un pigmento de color rojizo que actúa como indicador de tejido tumorales acumulándose en ellos; el segundo, la hyperforina es un compuesto antitumoral, responsable de la mayor parte de la actividad nombrada anteriormente, este compuesto está formado por un esqueleto de floroglucinol con sustituciones de cadenas lipofílicas de isopreno.

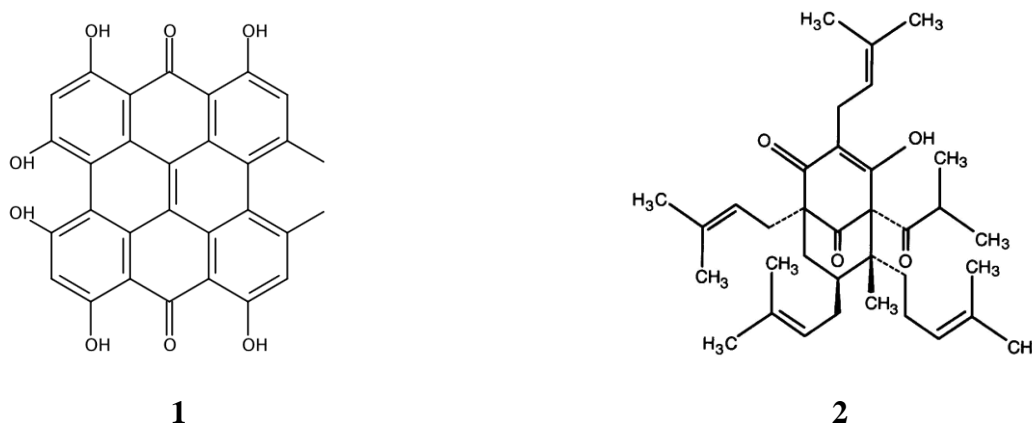


Figura 4. Estructura química de la hypericina (1) e hyperforina (2).

Se ha encontrado que la hyperforina tiene una actividad antitumoral comparable a la del paclitaxel, aunque sin presentar muchos de los efectos tóxicos secundarios de este. El paclitaxel es un alcaloide vegetal que se utiliza fundamentalmente en el tratamiento de varios tipos de cáncer, tales como el cáncer de mama, de ovario, de pulmón, de próstata o de piel, siendo uno de los quimioterápicos que se utilizan comúnmente. Sin embargo, este compuesto presenta numerosos efectos secundarios como un descenso en la cantidad de células sanguíneas, la caída del cabello, artralgias y mialgias, náuseas y vómitos, neuropatía periférica, entre otros.

Aunque la mayoría de los estudios sobre las plantas del género *Hypericum*, y en especial sobre *H. perforatum*, se basen en la actividad de la hyperforina y, en menor medida de la hypericina, se ha visto que las especies de este género son importantes productoras de otros tipos de metabolitos secundarios, como el ácido clorogénico y diversos flavonoides tales como la quercetina (Rabanal *et al*, 2005).

La quercetina es un flavonoide ampliamente distribuido en diversas frutas y verduras siendo conocida su gran actividad antioxidante y su acción terapéutica frente a diversas patologías. (Martinez-Flórez *et al*, 2002).



Imagen 2: Las cebollas es uno de los vegetales que posee la mayor concentración de quercetina

OBJETIVOS.

1. El objetivo principal de este trabajo es el estudio fitoquímico de la planta *H. coadunatum*.
2. Se busca aislar e identificar compuestos flavonoides que puedan resultar de interés por su actividad biológica.
3. Además, se caracterizaran los compuestos obtenidos mediante diversas técnicas cromatográficas y espectroscópicas.
4. También, se evaluará la posible actividad biológica de los compuestos aislados en *H. coadunatum*.
5. Todo esto permitirá el aumento en las destrezas y habilidades, así como el conocimiento de las técnicas necesarias para aislar y caracterizar los compuestos activos de los organismos vegetales.

SECCIÓN EXPERIMENTAL.

Procedimientos experimentales generales.

Los espectros obtenidos por resonancia magnética nuclear de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN fueron medidos usando un espectrómetro Bruker Advance II 500 y Bruker Advance III 600. Los desplazamientos químicos (δ) se expresan en partes por millón (ppm) y las constantes de acoplamiento (J) en hertzios (Hz). Como patrón interno se utilizó tetrametilsilano (TMS). Los espectros de infrarrojo (IR) fueron recogidos en un espectro polarímetro Bruker TSF-55. Las cromatografías en columna (CC) de exclusión molecular se realizaron sobre Sephadex LH-20 Pharmacia (ref. 17-0090-01), sílica gel (Merck 2300-400 mesh). Las cromatografías en capa fina (CCF) se realizaron utilizando cromatofolios de sílica gel de la casa Macherey-Nagel, tipo SIL G-60 de 0.20 mm de espesor. Los cromatogramas fueron visualizados bajo luz UV a 255 y 366 nm. Estos se revelaron rociando óleum (80% ácido acético/4% ácido sulfúrico/16% agua) y exponiéndolos a continuación a calor. La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) fueron realizadas 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).

Técnicas espectroscópicas utilizadas.

La espectrometría de absorción infrarroja junto a la espectrometría de masas y a la resonancia magnética nuclear constituye la base para el análisis cualitativo centrado en la identificación de la estructura molecular de un compuesto problema, estas técnicas se describirán brevemente a continuación:

Espectrometría de absorción infrarroja (IR)

Esta técnica utiliza la región del espectro electromagnético que comprende las longitudes de onda desde los 12800 cm^{-1} hasta los 10 cm^{-1} . A su vez, el IR lo podemos dividir en 3 zonas fundamentales: el IR cercano ($12800\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$), el IR medio ($4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$) y el IR lejano ($400\text{-}10\text{ cm}^{-1}$). La mayoría de las aplicaciones analíticas de esta técnica se dan en el IR medio.

La espectrometría infrarroja implica el análisis de los modos vibracionales y rotaciones de torsión y flexión de los átomos de una molécula. En la interacción con la radiación infrarroja, parte de la radiación incidente es absorbida a longitudes de onda específica; la multiplicidad de vibraciones que ocurren simultáneamente produce un espectro de absorción muy complejo que es característico solamente de los grupos funcionales que están presentes en la molécula y de la configuración global de esta.

El espectro infrarrojo de un compuesto es básicamente la superposición de bandas de absorción de sus grupos funcionales específicos. Para el análisis cualitativo, uno de los mejores aspectos del espectro de infrarrojos es que la absorción en regiones específicas de frecuencia puede correlacionarse con movimientos específicos de estiramiento o de flexión y, en algunos casos, con la relación de estos grupos y el resto de la molécula. Cuando se interpreta el espectro, es posible establecer que grupos funcionales están presentes en el material y cuales están ausentes. Esto permite utilizar el IR como una huella dactilar y compararlo con una base de datos con espectros puros de referencia permitiendo la identificación de la estructura molecular.

Antes de desarrollar el IR se puede obtener mucha información del compuesto o de la mezcla, la cual permitirá su posterior identificación. Esta información podría ser el estado físico, apariencia, solubilidad y punto de fusión. Una vez obtenido el IR, generalmente, se estudia primero la región de estiramiento del hidrógeno, para determinar si la muestra es alifática, aromática, o ambas opciones. A posterior, se hace un examen de la región de frecuencias de grupo para tratar de establecer los grupos funcionales que se encuentran presentes.

En muchas ocasiones, la interpretación del IR no basta para identificar completamente la muestra problema, pero es posible deducir que tipo de compuesto se halla presente. Una vez alcanzado este punto, como se ha dicho en anterioridad, se compara el IR obtenido con una serie de IRs de referencia hasta encontrar un espectro correspondiente.

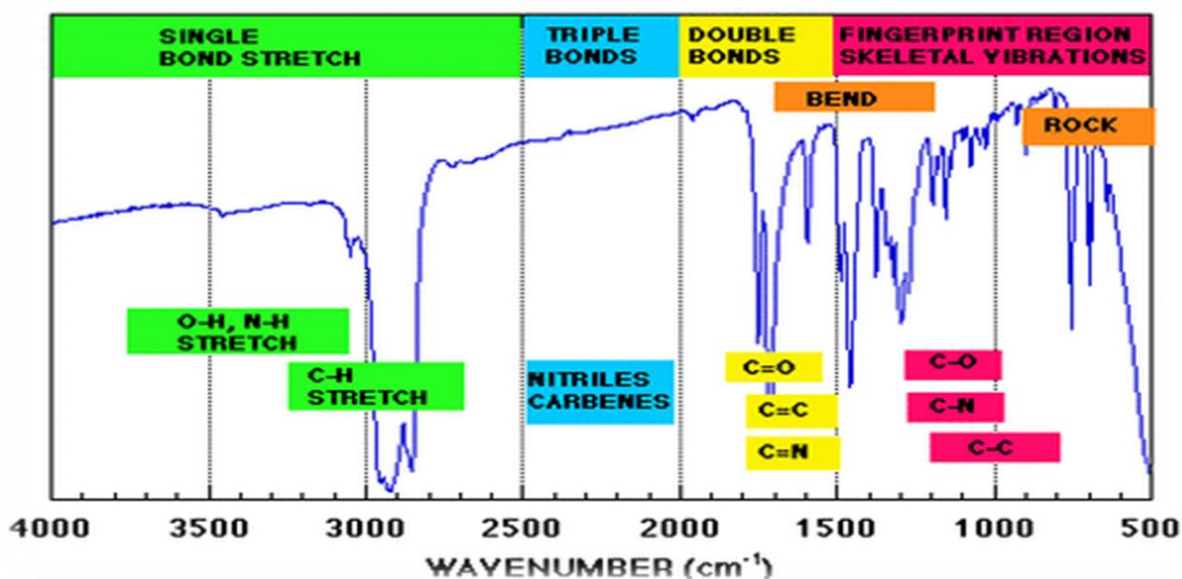


Figura 5. Espectro de IR con las absorciones características de diferentes grupos funcionales.

Existen diversos fotómetros comerciales, aunque, actualmente, los más útiles en la identificación de compuestos son los que incorporan un espectrómetro de infrarrojos de transformada de Fourier (FIR). Estos permiten mejorar la calidad de los espectros así como disminuir el tiempo necesario para obtener los datos. En la actualidad, la ULL cuenta con un espectropolarímetro Bruker TSF-55 y es en este donde se han desarrollado los IRs de este trabajo.

Espectrometría de masas.

Esta técnica es uno de los medios analíticos más generalizado para obtener información cualitativa y cuantitativa acerca de la composición atómica y molecular de compuestos tanto orgánicos como inorgánicos. Un espectrómetro de masas es un equipo que produce partículas cargadas eléctricamente procedentes de la muestra original. Además, este aparato es capaz de separarlos de acuerdo con su relación de carga y masa. El espectro de masas es un registro de los números relativos de los diferentes

iones que resulta ser característico para cada tipo de compuesto, incluyendo los isómeros. En muchos casos, junto a la información obtenida mediante IR y resonancia magnética nuclear permite la elucidación estructural de los compuestos químicos.

La ventaja de esta técnica sobre otras se encuentran en su sensibilidad y en su especificidad para la identificación de compuestos desconocidos o para confirmar la presencia de un compuesto determinado en una mezcla. Esta mayor sensibilidad, viene dada por la acción del sistema analizador así como un filtro de carga/masa el cual reduce las interferencias de fondo, así como la sensibilidad de los detectores multiplicadores de electrones que utiliza. La excelente especificidad de la técnica se debe a los patrones de fragmentación característicos, los cuales aportan información acerca del peso y de la estructura molecular.

Resonancia magnética nuclear

Esta técnica se basa en la absorción característica de energía por núcleos que giran dentro de un potente campo magnético, después de irradiarlos con otro campo secundario más débil y perpendicular al primero, permitiendo identificar así las configuraciones atómicas en las moléculas. Los núcleos de algunos isótopos poseen un movimiento intrínseco de giro alrededor de su eje. El giro propio (o espín) de estas partículas genera un momento magnético a lo largo del eje del espín. Si tal núcleo se coloca en un campo magnético externo, sus movimientos se podrían alinear a favor o en contra de dicho campo. La aplicación más común de la resonancia magnética nuclear (RMN), está basada en las propiedades de los núcleos de hidrogeno. Estos además sufrirán modificaciones débiles y observadas debido al flujo de electrones en la molécula lo que permitirá responder preguntas tales como ¿qué núcleo tenemos?, ¿cuál es su posición en la molécula?, ¿existen más núcleos iguales?, ¿dónde están y por qué están rodeados?, etc. En consecuencia, en la investigación dentro de la química orgánica, la RMN es la técnica empleada con mayor asiduidad para identificar y caracterizar moléculas.

Un Espectrómetro de RMN consta básicamente de un emisor y un detector de radiofrecuencia y de un imán. La muestra a estudio se coloca entre los dos polos de dicho imán y es sometida a un campo de radiofrecuencia por el emisor. En este

momento, la muestra absorberá energía, tanto magnética como eléctrica. Cuando la relación entre el campo magnético y el eléctrico sea el adecuado se emitirá un pulso y el receptor registrará una señal.

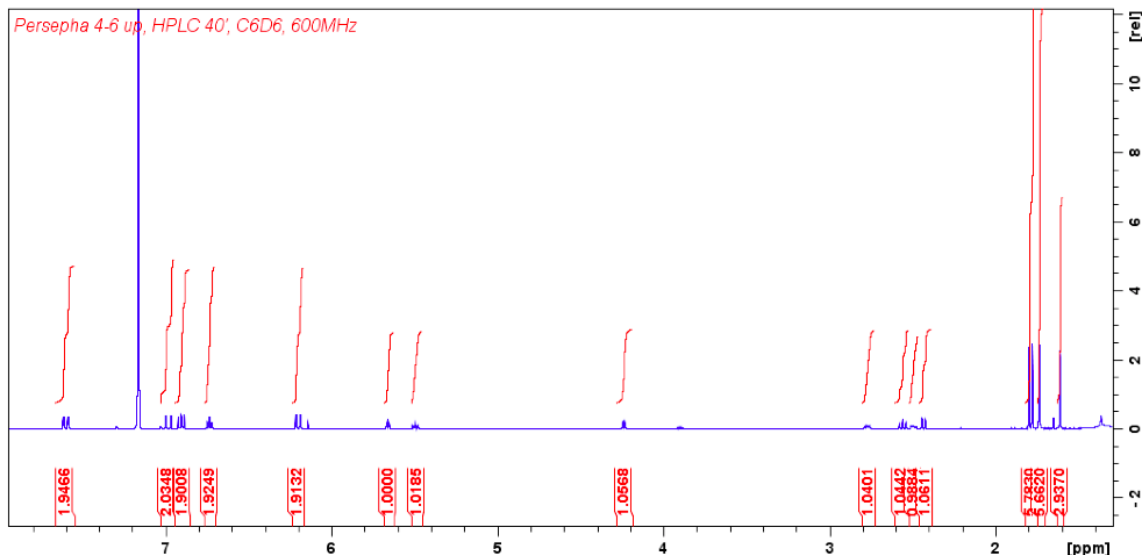


Figura 6: Ejemplo de espectro de ^1H -RMN.

Material vegetal

El material vegetal fue recogido e identificado en julio de 2009 por el profesor Pedro L. Pérez de Paz perteneciente al departamento de Botánica de La Universidad de La Laguna. Se recolectaron 10 kg de material fresco constituido por sumidades y tallos floridos o próximos a florecer en la localidad de La Culata de Tejeda en Gran Canaria, concretamente en los acantilados sobre la carretera que discurre por esta zona, a una altura de 1.550 m y con unas coordenadas UTM: 441544-3094925. Una parte de este material se almacenó bajo la referencia TFC: 49.191.

Aislamiento y purificación

En este trabajo, se parte de las fracciones HyCs 16-21 (3,25g) obtenidas de la cromatografía en Sephadex LH-20 del extracto butanólico del *H. 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 objeto de estudio, para así asegurar la presencia de compuestos fenólicos, y las sucesivas para encontrar un disolvente que separe bien los compuestos. Observamos que el disolvente adecuado para la elución de la capa fina era una mezcla de acetato de etilo/acetona/agua en las proporciones de 7: 2.5: 0.5, respectivamente. Esta cromatografía reveló la presencia de dos compuestos mayoritarios de color anaranjado cuando se revela con *óleum*, con Rf de 0.79 y 0.25. La purificación posterior por precipitación, a través de una mezcla de metanol/acetato de etilo, nos permitió aislar el producto menos dipolar con un grado de pureza tal que nos permitió el estudio posterior, mediante las diferentes técnicas espectroscópicas. Esta sustancia fue identificada como la quercetina **1**

El siguiente paso fue la acetilación de una alícuota del producto precipitado 200 mg, a fin de confirmar la estructura inicialmente propuesta. Para ello, se disolvió el sólido en 2 ml de piridina y se añadió 4 ml de anhídrido acético dejando la mezcla en agitación y en la oscuridad durante 12 horas. Al cabo de este tiempo, se extrae de forma usual con un disolvente que no sea miscible con H₂O. En este caso utilizamos acetato de etilo. A continuación, se lava la fase orgánica con porciones de disolución acuosa de ácido clorhídrico al 5%, entre 10 y 15 ml cada vez, para la eliminación de la piridina ya que el HCl reacciona con ésta y forma el cloruro de piridinio que es soluble en agua. Se elimina la fracción acuosa y la fase orgánica se lava con solución saturada de bicarbonato sódico para eliminar el exceso de ácido, interesa agitar de manera manual abriendo el embudo de decantación para liberar los gases formados CO₂, en la reacción de neutralización. Por último, se secó con sulfato sódico anhidro, se filtró el resultado y se concentró a vacío para su posterior estudio. La cromatografía en capa fina del residuo acetilado 125 mg, muestra la presencia de al menos 4 derivados acetilados, por lo que se purificaron por cromatografía de media presión en columna de gel de sílice (35-70 mesh, Art 7748), usando como eluyente, mezclas de hexanos acetato de etilo de polaridad creciente, se recolectaron un total de 45 fracciones de 50 ml cada una. La fracción n° 8, eluída con hexanos/acetato de etilo al 30%, rinde 25 mg del flavonol totalmente acetilado **1d**, en la fracción n° 11, se obtiene el triacetato de quercetina **1c** (6.7 mg). Las fracciones 14-20, eluídas con hexano acetato de etilo al 50%, resultaron ser una mezcla compleja que se purificó posteriormente por cromatografía en capa fina preparativa de gel de sílice usando hexano/acetato de etilo al 45% y dando tres recorridos. Se extrajeron dos bandas con metanol, la superior resulto ser el diacetato de

la quercetina **1b** (35mg) y la inferior se identificó como la 3-acetilquercetina **1a** (17 mg).

Cultivo de células leucémicas humanas HL-60 y ensayos de citotoxicidad

Las células HL-60 se obtuvieron de la colección alemana de cultivos celulares (DSMZ) y se cultivaron en medio RPMI 1640 suplementado con 10% (v/v) de suero bovino fetal (FBS) inactivado por calor y antibiótico (100 unidades /ml de penicilina y 100 µg/ml estreptomina) en una atmósfera humidificada (37 °C y 5% CO₂) y a una densidad no superior a 0.5 x 10⁶ células/ml. A las células se les cambió el medio de cultivo tres veces por semana y se dividieron aproximadamente cada 24 horas.

Evaluación de la citotoxicidad.

Se realizó, mediante el ensayo de la reducción metabólica del bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio (MTT) por la actividad deshidrogenasa mitocondrial.

Las células se cultivaron en placas de 96 pocitos, por triplicado, a una densidad de 1x10⁴ células/pocito en 0,2 ml de medio de cultivo y en presencia de diferentes concentraciones de los compuestos a ensayar. Después de 72 h, las placas se centrifugaron (500 g, 10 min) a temperatura ambiente y el medio se eliminó por aspiración. A cada pocito se le añadió 100 µl de MTT (0,5 mg/ml en medio de cultivo con antibiótico) y las placas se incubaron durante 4 h a 37°C. La reacción se paró añadiendo 100 µl de SDS (20%) con HCl 0,02 M e incubando la mezcla hasta la mañana siguiente. La cuantificación de la conversión del MTT (amarillo) en su forma reducida (púrpura) por la deshidrogenasa mitocondrial, se determinó a 570 nm en un lector de microplacas (modelo 680 Bio-Rad), utilizando como blancos pocitos sin medio

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La elucidación estructural de las referidas sustancias se basó en los siguientes datos:

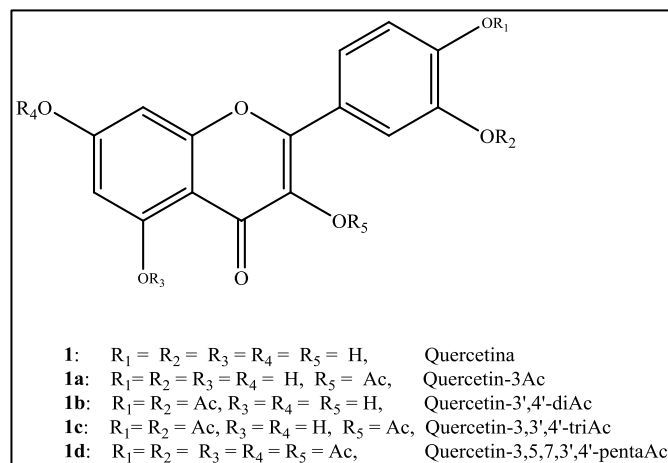


Figura 7 flavonoides estudiados

La quercetina **1**, se aísla como un polvo de color amarillo de punto de fusión 273-281°C (MeOH/EtOAc). Esta sustancia da positiva la reacción del FeCl₃, característica de fenoles y presenta una fórmula molecular C₁₅H₁₀O₇, determinada por espectrometría de masas de alta resolución HREIMS, que muestra el pico del ion molecular a m/z 302.0429 [M]⁺ (100%). La fórmula molecular de **1** nos indica la presencia de 11 grados de insaturación en la molécula. El espectro de ¹³C-RMN, muestra 15 señales en la región aromática incluyendo una señal para un carbono carbonílico a δ_C 177.7 ppm. El espectro de ¹H-RMN, muestra resonancias de dos protones acoplados en *meta* a δ_H 6.75 y 6.79 ppm (cada uno 1H, d, J = 1.9 Hz), correlacionados con los carbonos δ_C 99.7 y 94.7 ppm, respectivamente, en el espectro de HSQC, característicos de los protones H-6 y H-8 del anillo A para un flavonoide hidroxilado en las posiciones C-5 y C-7. El anillo B fue caracterizado como un anillo bencénico 1,3,4-trisustituido (δ_H 8.64 1H, d, J = 2.1 Hz, δ_C 117.1, δ_H 8.14 1H, dd, J = 8.5 y 2.1 Hz, δ_C 121.5 y a δ_H 7.42 1H, d J = 8.5 Hz, δ_C 117.1) así se pudo identificar al compuesto **1** como 3,5,7,3',4'-pentahidroxiflavona (quercetina).

Los derivados acetilados presentan unos espectros de ¹H-RMN prácticamente idénticos a los de la quercetina, diferenciándose por la incorporación de uno, dos, tres o cinco grupos acetilo en los compuestos **1a**, **1b**, **1c** y **1d**, respectivamente. Las señales de dichos grupos aparecen como singulestes de intensidad tres hidrógenos en la zona del

espectro a $\delta_H \cong 2.5$ ppm. La determinación exacta de la posición de los grupos acetilo en los distintos derivados, se hizo en base a las correlaciones observadas en el experimento HMBC, entre los protones del grupo acetilo y los carbonos sobre los que estaban ubicados.

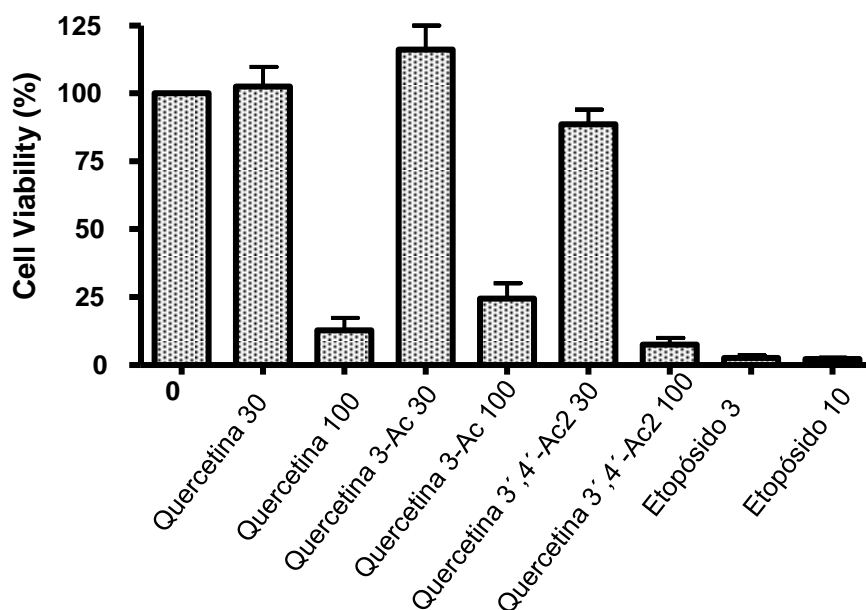
ACTIVIDAD BIOLÓGICA.

El siguiente paso lógico, una vez aislado y caracterizado un producto natural, es la evaluación de su actividad biológica para elucidar su posible uso útil para el ser humano. Los flavonoides son compuestos que han sido estudiados ampliamente en busca de sus posibles aplicaciones en la salud humana. Estos compuestos desempeñan un amplio espectro de actividades biológicas y destacan por su potente efecto como agentes antitumorales.

La actividad biológica de los compuestos aislados y de semi-síntesis obtenidos en este trabajo fue evaluada en líneas celulares leucémicas humanas HL-60, por el profesor Francisco Estévez y colaboradores, perteneciente al Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. A continuación, se añade una tabla y una gráfica del efecto en la viabilidad celular de los distintos compuestos aislados en función de distintas concentraciones μ molar.

Muestras		OD ₅₆₂			Viability (%)			AVER	DESV
1	HL60 72h	0,728	0,728	0,728	100,0	100,0	100,0	100,0	0,0
2	Quercetina 30	0,793	0,756	0,690	108,9	103,8	94,8	102,5	7,2
3	Quercetina 100	0,080	0,130	0,069	11,0	17,9	9,5	12,8	4,5
4	Q 3-Ac 30	0,776	0,856	0,904	106,6	117,6	124,2	116,1	8,9
5	Q 3-Ac 100	0,210	0,131	0,191	28,8	18,0	26,2	24,4	5,7
6	Q 3',4'Ac2 30	0,690	0,626	0,618	94,8	86,0	84,9	88,6	5,4
7	Q 3',4'Ac2 100	0,035	0,071	0,055	4,8	9,8	7,6	7,4	2,5
8	Etopósido 3	0,027	0,013	0,016	3,7	1,8	2,2	2,6	1,0
9	Etopósido 10	0,013	0,016	0,020	1,8	2,2	2,7	2,2	0,5

Figura 8. Efecto de los compuestos aislados en células tumorales humanas HL-60



Gráfica 1. Efecto de los compuestos aislados en células tumorales HL-60

Como se observa claramente, el compuesto más citotóxico frente a las células HL-60 fue el 3',4'-diacetato de quercetina **1b** en la concentración de 100 μ molar. La quercetina triacetilada **1c** y pentaacetilada **1d** no fueron solubles en DMSO, por lo que no se pudo medir su actividad biológica.

Dentro de la extensa bibliografía disponible sobre esta clase de compuestos, podemos destacar la exhaustiva revisión hecha por Middlenton y colaboradores en *Pharmacological Reviews* en el año 2000. También podemos señalar los estudios hechos por Álvarez y colaboradores, Universidad de Santiago de Compostela, donde analizan la actividad de los flavonoides en la lucha contra el cáncer y, además, su acción cardiovascular y sanguínea. Estos dos campos son aquellos donde los flavonoides han demostrado tener una potencialidad de uso más amplia, aunque también hay estudios que avalan las acciones antivirales, antibacterianas, antialérgicas y hepatoprotectoras de los flavonoides como los desarrollados por Evans y colaboradores en el año 1998.

Los estudios elaborados sobre la carcinogénesis dividen este proceso en cuatro etapas fundamentales: Iniciación, promoción, progresión e invasión. Los flavonoides antitumorales pueden intervenir en cualquiera de las cuatro etapas nombradas o en

varias de ellas mediante distintos mecanismos. Los procesos de actuación más importantes se describen a continuación.

Inhibición de la iniciación

Algunos flavonoides inhiben el paso del agente precursor a mutágeno durante la elaboración de los propios alimentos. Otros, dificultan la absorción del promotor tumoral, sobre todo en el tubo digestivo.

Sin embargo, el efecto más interesante de los flavonoides en este sentido es su capacidad para modular las enzimas metabólicas hepáticas, concretamente las enzimas del citocromo P450, las cuales constituyen la primera línea de defensa frente a moléculas exógenas con efectos carcinógenos. El patrón de actividad de los flavonoides sobre las enzimas metabólicas, parece variar en función del tejido estudiado e, incluso, en función de la vía de administración de los polifenoles. Mientras que *in vitro* las catequinas del té inhiben las P450 monooxigenasas, *in vivo*, tanto el té negro como el verde inducen en la rata algunas de las isoenzimas del sistema P450 de tipo antioxidante. (Álvarez *et al*, 2003)

Los flavonoides, también, pueden actuar capturando el mutágeno o interponiéndose entre este y su diana de actuación. Este proceso estará influenciado tanto por la estructura química del flavonoide, así como por la polaridad del mutágeno. La quercetina es un compuesto que destaca en este aspecto, habiendo sido demostrado su efecto *in vivo*. (Álvarez *et al*, 2003).

Las propiedades antioxidantes de estos compuestos son consideradas herramientas importantes a la hora de evitar la iniciación de la carcinogénesis. Las ROS son compuestos que pueden resultar mutágeno ya que son capaces de oxidar el ADN, de activar mutágenos, de promover la producción de promotores tumorales o de intervenir en procesos inflamatorios, comúnmente relacionados con la carcinogénesis (Middlenton *et al*, 2000).

Inhibición de la proliferación

Esta etapa se caracteriza por la alteración de la regulación de la proliferación y diferenciación celular. Los flavonoides pueden actuar como agentes citoestáticos, lo que permite su utilización ya no como agentes preventivos, sino como sustancias activas en la lucha contra el cáncer.

Uno de los posibles efectos de estos compuestos polifenólicos es que pueden influir actuando sobre las señales de transducción que regular el crecimiento, proliferación y diferenciación celular. Concretamente pueden inhibir la actividad de las quinasas, enzimas claves en la ruta del ácido araquidónico e interaccionar con los receptores con receptores estrogénicos. La quercetina es uno de los flavonoides que más se ha estudiado para este aspecto, llegando incluso a realizar estudios clínicos de fase I (estudios donde participan ya seres humanos después de pasar las fases de experimentación *in vitro* y con en animales).

Otros flavonoides pueden actuar aumentando las uniones tipo *gap* en las células. Estas uniones permiten el paso de moléculas entre membranas, como los fármacos citotóxicos utilizados en la quimioterapia, y en los procesos carcinógenos se reduce tanto su número como su tamaño.

Los flavonoides también son capaces de inhibir la actividad de la tirosina en los receptores de factores de crecimiento epidérmico. Las mutaciones que afectan a estos receptores están relacionadas fundamentalmente con el cáncer, sobre todo con el cáncer de próstata. También se han descrito propiedades citoestáticas por mecanismos no tóxicos en las células normales para los flavonoides , impidiendo la síntesis de ADN, del ARN y de las proteínas de las células tumorales.

Por último, hay estudios que demuestran la inducción de la apoptosis en células tumorales por mediación de los flavonoides.

Inhibición de la fase invasiva.

Se ha demostrado la influencia de distintos flavonoides en esta fase al evitar la formación de nuevos capilares sanguíneos en los tumores, proceso necesario para asegurar su supervivencia. En este campo destacan el estudio de Fotsis *et al*, 1997 donde demuestra la acción inhibitoria de los flavonoides en la activación y proliferación de los mastocitos. Estas células secretan agentes de neovascularización y en los procesos cancerosos se observa su migración hacia los tumores, causada por la producción de distintos péptidos por las células cancerígenas.

El segundo de los grandes efectos de los flavonoides en la salud humana es sobre el sistema cardiovascular. Las actividades biológicas descritas para estos compuestos los convierten en sustancias de interés, por su efecto frente al daño oxidante de las LDL y como protectores del endotelio vascular. Además, pueden desempeñar un papel importante en la regulación de la agregación plaquetaria y en la contractibilidad del musculo liso vascular.

Efectos vasculares

Existen varios flavonoides con acción relajante sobre el musculo liso vascular. La acción vasodilatadora es mayormente independiente del endotelio. Sobre este aspecto, podemos destacar los trabajos de Duarte *et al*, 1993. Estos trabajos arrojan luz sobre la relación estructural de los flavonoides con su actividad biológica. Ellos demostraron que la presencia de un grupo carbonilo en la posición 4 y un doble enlace entre C2-C3 son requisitos indispensables para el efecto vasodilatador. Asimismo, el patrón de hidroxilación del anillo B determina el potencial de acción de estos compuestos. Observaron que la ausencia, o la metilación, del grupo hidroxilo en la posición 3' reducía drásticamente el efecto relajante de estas sustancias. Por otro lado, una doble hidroxilación en el anillo B favorece la acción vasodilatadora.

Su acción es debida a su efecto sobre la proteína quinasa C (PKC) y la regulación de la entrada de calcio en la célula. La actividades de algunas quinasas están estrechamente interconectadas con la función contráctil de las células musculares y los

flavonoides son capaces de actuar modificando la actividad de estas enzimas, fundamentalmente inhibiéndolas. Los flavonoles como la quercetina y algunas flavonas son los inhibidores más potentes (Ferriola *et al*, 1989). Por ejemplo, la quinasa que actúa sobre la cadena ligera de la miosina es fuertemente inhibida por el kaempferol, un flavonoide con una estructura muy similar a la quercetina.

Los flavonoides también pueden bloquear los canales de calcio dependientes del voltaje, lo que inhibe la respuesta celular a la liberación de calcio intracelular. Algunos flavonoides son capaces también de inhibir la actividad de las enzimas responsables de la degradación de GMPc y AMPc, por lo que estos nucleótidos incrementan su concentración, lo que puede influir en la acción relajante de estos compuestos.

Efecto anti arterioesclerótico

Comúnmente se ha considerado como factor de riesgo en las enfermedades coronarias el aumento sanguíneo de la LDL, especialmente de la LDL oxidada. Según Álvarez *et al*, 2003, *“Los mecanismos que probablemente tienen lugar se engloban en la denominada «hipótesis oxidativa de la aterogénesis», según la cual, el ateroma lo forman células espumosas, originadas en el subendotelio vascular a partir de macrófagos que han captado de manera descontrolada LDL, previamente oxidadas. Estas lipoproteínas resultan citotóxicas para el endotelio y son, además, quimiotácticas para los macrófagos y los monocitos y promueven la presencia de éstos en la lámina íntima de los vasos sanguíneos.”* Se ha encontrado que algunos flavonoides son capaces de inhibir, en ínfimas concentraciones, la oxidación de las LDL y su captación por los macrófagos. Esto se debe fundamentalmente a su efecto antioxidante frente a las ROS y a su actividad quelante de iones como el Fe^{2+} y Cu^{2+} . Igualmente, son capaces de activar los mecanismos antioxidantes mediados por el tocoferol y los carotenoides.

Los flavonoides son capaces de inhibir, por tanto, la oxidación de las LDL, pero también, son capaces de producir un bloqueo en los daños celulares provocados por las LDL oxidadas. En esta actividad destaca la quercetina, siendo capaz de actuar de las dos maneras al mismo tiempo, con un efecto sinérgico en la prevención de la arterioesclerosis

Efecto sobre la función plaquetaria.

Otro de los efectos que los flavonoides tienen en el sistema cardiovascular es inhibir la agregación plaquetaria, por lo que podrían tener un efecto antitrombótico importante. Esto se debe fundamentalmente a la capacidad que tiene algunos flavonoides para unirse a la membrana citoplasmática de las plaquetas que forman un trombo, siendo capaces de dispersar dicho trombo y preservar a las células endoteliales del daño oxidante. Aparte de las propiedades antioxidantes, pueden estar implicados otros efectos, como el bloqueo de la ruta del ácido araquidónico, por inhibición de la ciclooxigenasa y/o la lipoxigenasa, o el impedimento de la formación de tromboxano.

También, en este aspecto, influye la capacidad de los flavonoides para aumentar la concentración intracelular del AMPc por los mecanismos descritos anteriormente. La acción de la quercetina sobre este aspecto está escasamente estudiada, lo que podría abrir nuevas líneas de investigación interesantes en un futuro.

Efectos cardiacos.

Los flavonoides, especialmente la quercetina, han demostrado tener un efecto positivo en la recuperación de la actividad contráctil del miocardio, después de un proceso isquémico. Este mecanismo parece estar influenciado sobre el efecto de los flavonoides sobre el citocromo P450. Además la quercetina provoca un descenso en la relación de la xantina deshidrogenasa y la xantina oxidasa típico de los procesos isquémicos, este descenso en la relación entre estas dos enzimas provoca la creación de radicales superóxido, con los efectos oxidantes perjudiciales asociados.

En resumen, los flavonoides influyen en las afecciones del sistema cardiovascular de las siguientes maneras:

1. Disminuyendo la oxidación de las LDL y aumentando la concentración de las HDL.
2. Reduciendo la liberación de mediadores a partir de mastocitos cardiacos.
3. Disminuyendo la inflamación cardiovascular, inhibiendo la agregación plaquetaria y reduciendo los daños derivados de la formación de trombos.
4. Aumentando la vasodilatación.

CONCLUSIÓN.

1. Desde el punto de vista químico podemos concluir que frente a las condiciones de acetilación usuales, las posiciones C-3, C-3' y C-4', son más activas que C-5 y C-7.
2. Los ensayos de citotoxicidad llevados a cabo con células tumorales humanas HL-60 muestran que la actividad antitumoral se incrementa al acetilar las posiciones en C-3, compuestos **1a** y C-3' y C-4' compuesto **1b**.

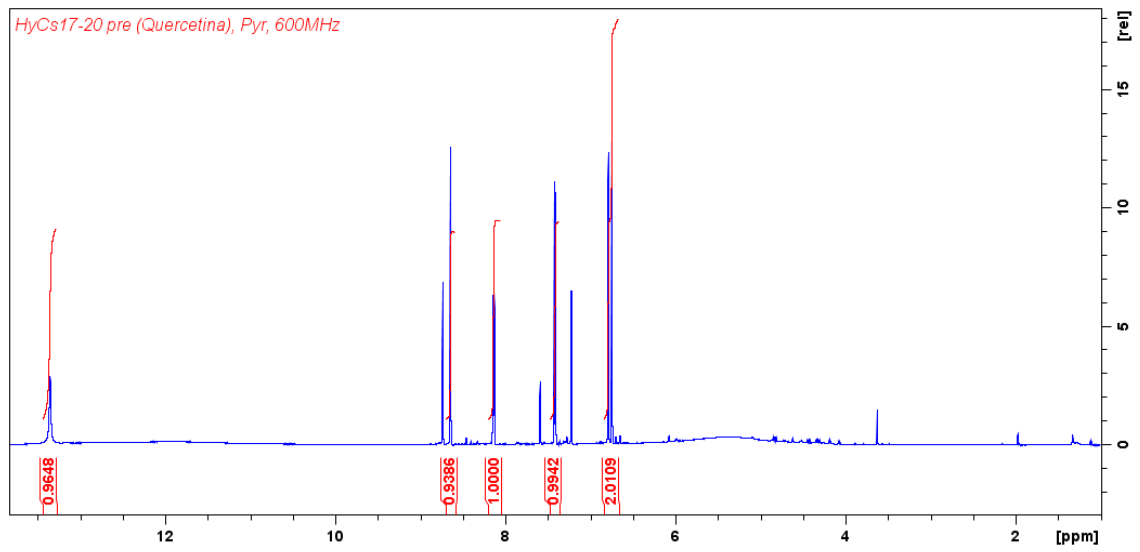
BIBLIOGRAFÍA.

- [1] Álvarez, E., Orallo, F. 2003. Actividad biológica de los flavonoides (I). Acción frente al cancer. *Offarm: farmacia y sociedad*. 22: 102-110.
- [2] Álvarez E., Orallo, F. 2003. Actividad biológica de los flavonoides (II). Acción cardiovascular y sanguínea. *Offarm: farmacia y sociedad*. 22: 130-140.
- [3] Angiosperm Phylogeny Group, 2009. "An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III". *Botanical Journal of the Linnean Society* 161 (2): 105–121.
- [3] Bramwell, D., & Z. Bramwell, 2001. Flores Silvestres de las Islas Canarias. *Editorial Rueda, Alcorcón (Madrid)*. 437 pp.
- [4] Cevallos-Casals, B. A., Byrne, D., Okie, W. R., & Cisneros-Zevallos, L. 2006. Selecting new peach and plum genotypes rich in phenolic compounds and enhanced functional properties. *Food Chemistry*, 96, 273–280.
- [5] D. Del Rio, A. Rodriguez-Mateos, J.P.E. Spencer. 2013, Dietary (poly)phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases, *Antioxid. Redox Signaling* 18 1818–1892.
- [6] Duarte J, Perez VF, Utrilla P, Jimenez J, Tamargo J, Zarzuelo A. 1993. Vasodilatory effects of flavonoids in rat aortic smooth muscle. Structure-activity relationships. *Gen Pharmacol* 24: 857-62.
- [7] El Abed, N., Kaabi, B., Smaali, M. I., Chabbouh, M., Habibi, K., Mejri, M., ... Ben Hadj Ahmed, S. 2014. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of thymus capitata essential oil with its preservative effect against *Listeria monocytogenes* inoculated in minced beef meat. *Journal of Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 13, 130.
- [8] Ferriola P. C., Cody V. and Middleton E. Jr. 1989 Protein kinase C inhibition by flavonoids. Kinetic mechanisms and structure-activity relationships. *Biochem. Pharmacol.* 38, 1617-1624.
- [9] Fotsis T, Pepper MS, Aktas E. 1997. Flavonoids, dietary-derived inhibitors of cell proliferation and in vitro angiogenesis. *Cancer Res* 57:2916-21.
- [10] Gómez, R. 2006. Aislamiento de la morfina . 200 años de un descubrimiento fundamental para la química moderna. *Historia de la química* 102(2), 45–53.
- [11] Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., & Bobilya, D. J. 2002. Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J. Nutr. Biochem*, 13(10), 572-584.
- [12] Iglesias, J., 2009, Diseño de ingredientes antioxidantes de origen natural y su aplicación en la estabilización de productos derivados de la pesca. Doctorado en Química. Universidad de Santiago de Compostela. España.
- [13] Koes, R., Verweij, W. and Quattrocchio, F. 2005 Flavonoids: a colorful model for the regulation and evolution of biochemical pathways. *Trends Plant Sci* 10, 236-242.
- [14] Luisella Verotta, 1999. Furohypeforin, a Prenylated Phloroglucinol from St. John's Wort (*Hypericum perforatum*), *J. Nat. Prod.* 62,770-772
- [15] Martínez-Flórez, S., González-Gallego, J., Culebras, JM., Tuñón, MJ. 2002, Flavonoids: Properties and antioxidant action. *Nutr. Hosp.*, 17(6), 271-278.

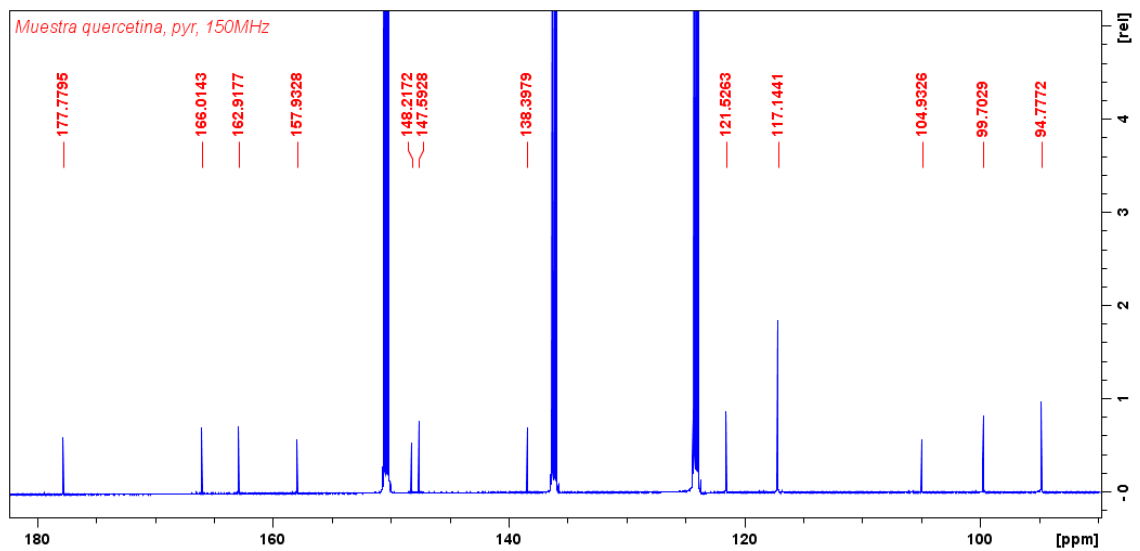
- [16] Middleton E, Jr., Kandaswami C, Theoharides TC. 2000. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev*; 52 : 673-751.
- [17] Machado, A. Morera, M. (coord.), 2005. Nombres Comunes de las Plantas y los Animales de Canarias. *Academia Canaria de la Lengua*. Islas Canarias. 305pp.
- [18] Middleton E, Jr., Kandaswami C, Theoharides TC. 2000. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev*; 52: 673-751.
- [19] MORENO, J.C. (coord.), 2008. Lista Roja 2008 de la flora vascular española. *Dirección General de Medio Natural y Política Forestal (Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino, y Sociedad Española de Biología de la Conservación de Plantas)*. Madrid. 86 pp.
- [20] Müller, W. Yoshitake, T. Lizuka, R. Weikop, P. Ögren, S. Kehr, J. 2004. Hypericum perforatum L (St John's wort) preferentially increases extracellular dopamine levels in the rat prefrontal cortex. *Br J Pharmacol*. 142(3): 414-418.
- [21] Oomah, B. D., & Mazza, G. 2000. Functional foods. In *The wiley encyclopedia of science & technology* (2nd ed., pp. 1176-1182). NewYork.
- [22] Parthasarathy, S., Quinn, M. T., & Steinberg, D. (1988). Is oxidized low density lipoprotein involved in the recruitment and retention of monocyte/macrophages in the artery wall during the initiation of atherosclerosis? *Basic Life Sci*, 49, 375-380.
- [23] PÉREZ DE PAZ, P.L., & C.E. HERNÁNDEZ PADRÓN, 1999. Plantas medicinales o útiles de la Flora canaria. *Ed. F. Lemus*. La Laguna. 386 pp.
- [24] Rosa M. Rabanal, Christian Zorzetto, Candelaria C. Sanchez; 2005. Fitoterapia Phytochemical analysis and *in vitro* biological activity of three *Hypericum* species from the Canary Islands (*Hypericum reflexum*, *Hypericum canariense* and *Hypericum grandifolium* 95-109
- [25] Scalbert, A. and Williamson, G. 2000 Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J Nutr* 130, 2073S-2085S.
- A). <http://www.chemocare.com/es/chemotherapy/drug-info/paclitaxel.aspx> (Consultada el 1/6/2016)
- B). http://www.magrama.gob.es/es/biodiversidad/temas/inventarios-nacionales/696_tcm7149481.pdf (Consultada el 20/6/2016)
- C.) http://www.pesticideinfo.org/Detail_Chemical.jsp?Rec_Id=PC35133 (Consultada 1/4/2016)
- D.) <https://www.aecc.es/SOBREELCANCER/ELCANCER/Paginas/Origendelaenfermedad.aspx> (consultada 25/6/2016)

ANEXO: GALERÍA DE ESPECTROS

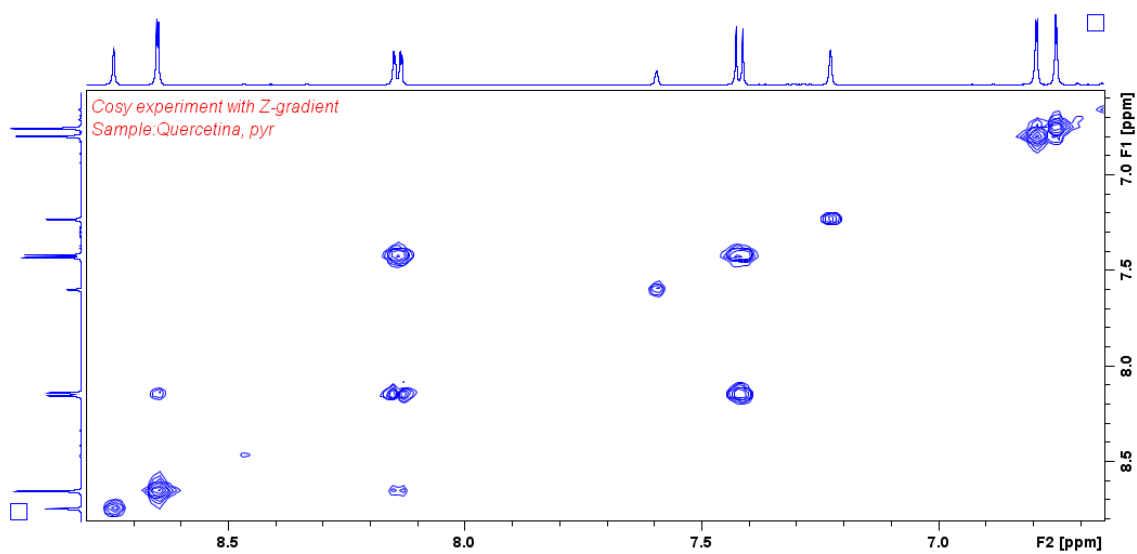
^1H -RMN de **1**



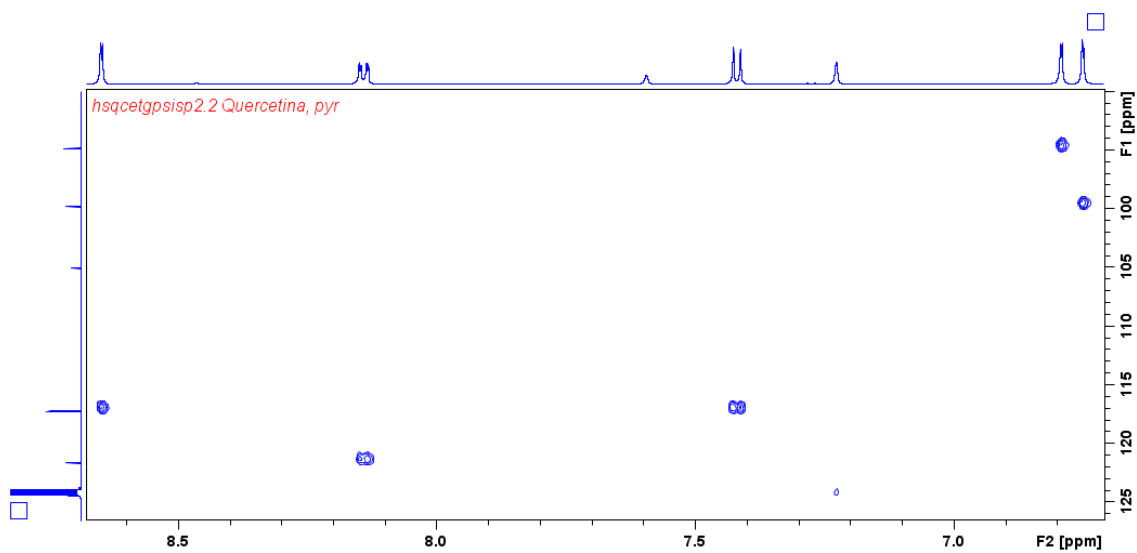
^{13}C -RMN de **1**



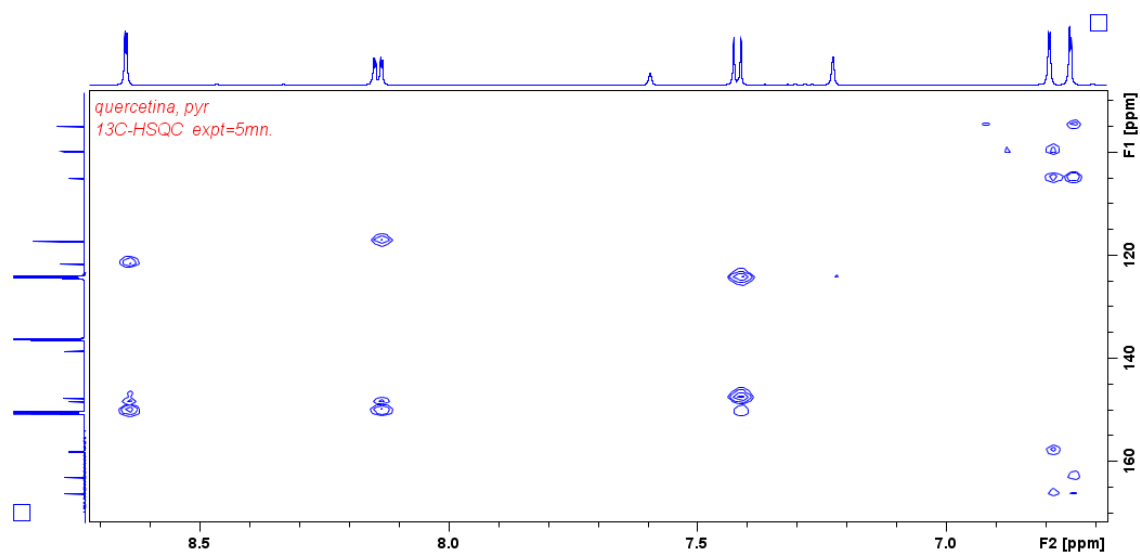
COSY de 1



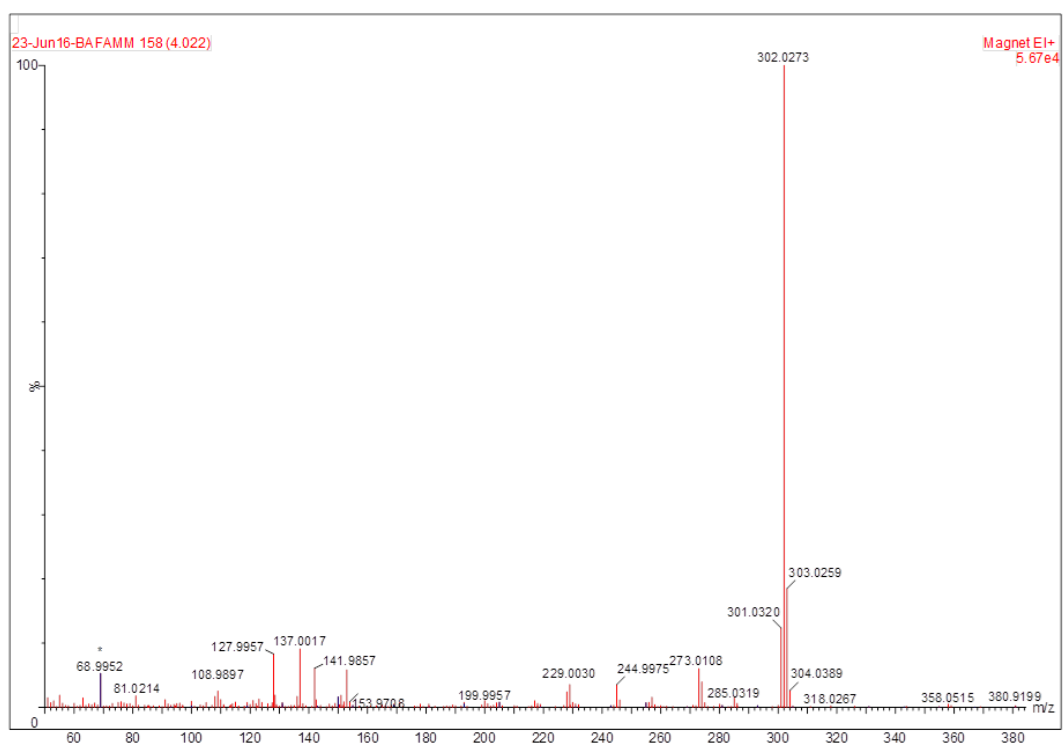
HSQC de 1



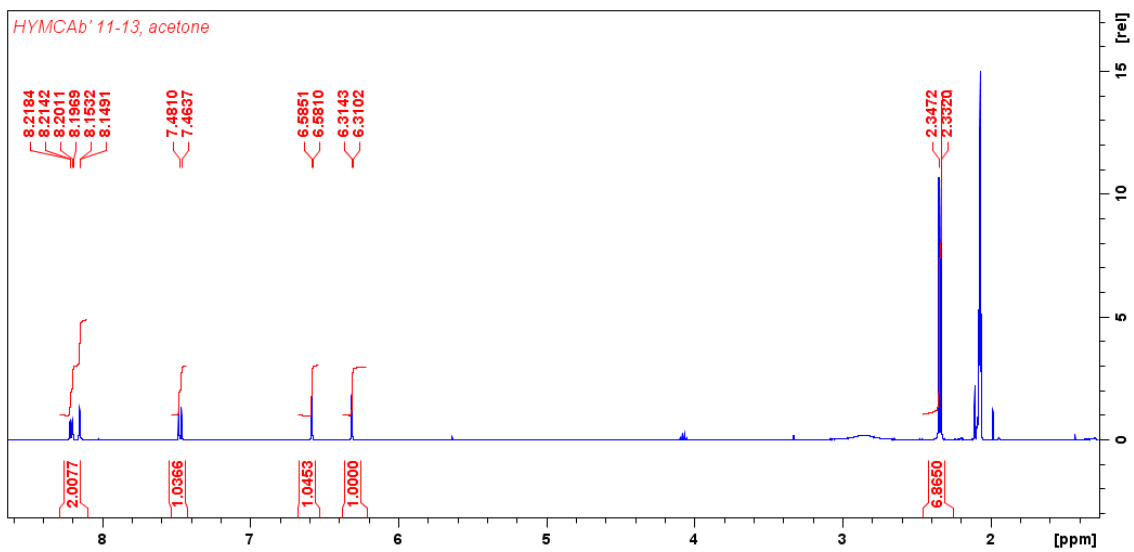
HMBC de 1



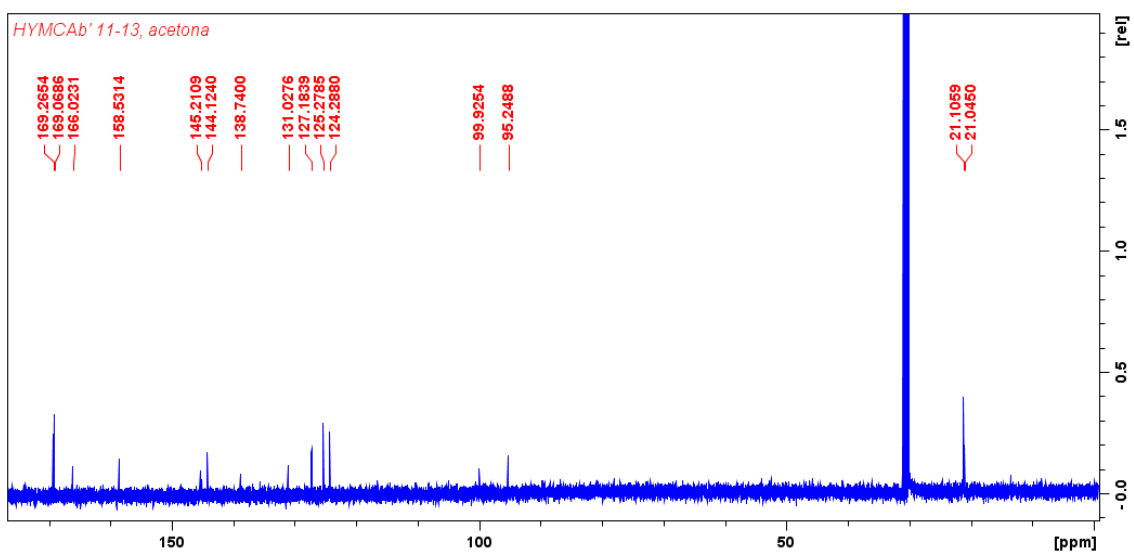
Espectro de masas de 1



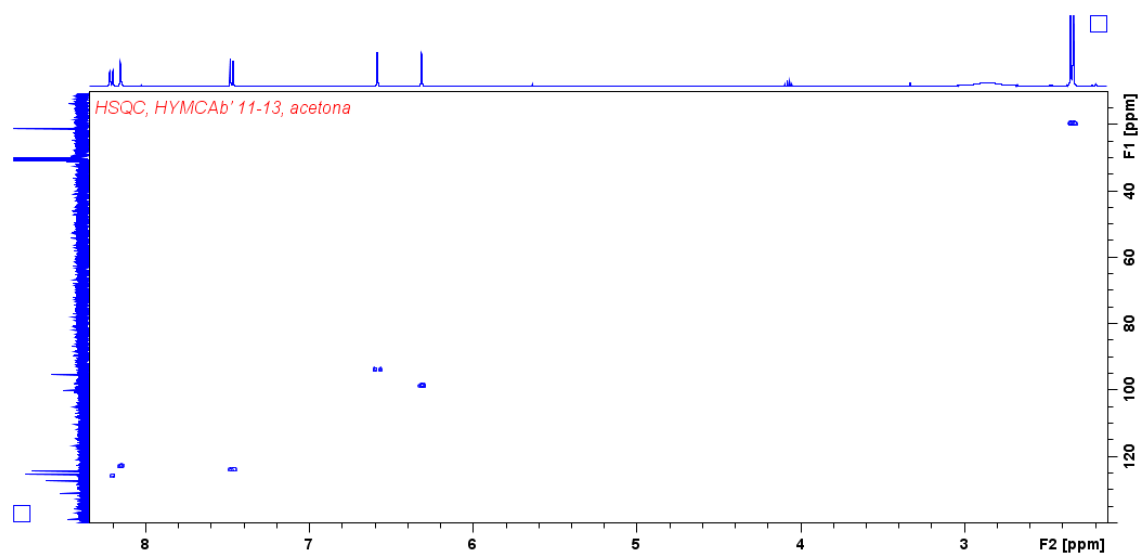
¹H-RMN de **1b**



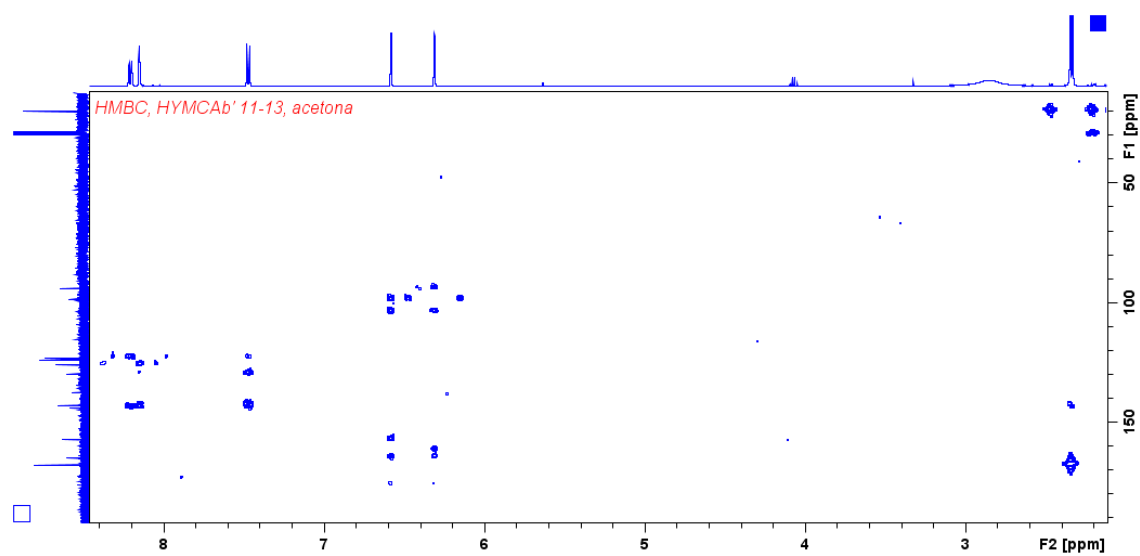
¹³C-RMN de **1b**.



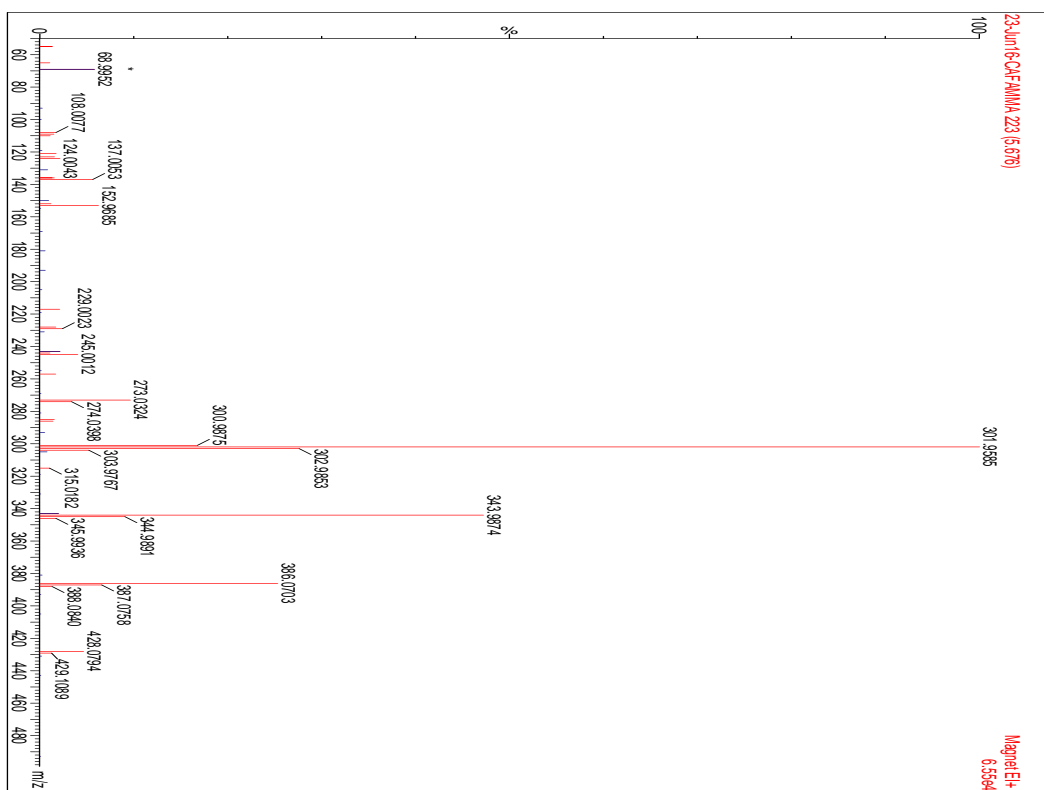
HSQC de **1b**



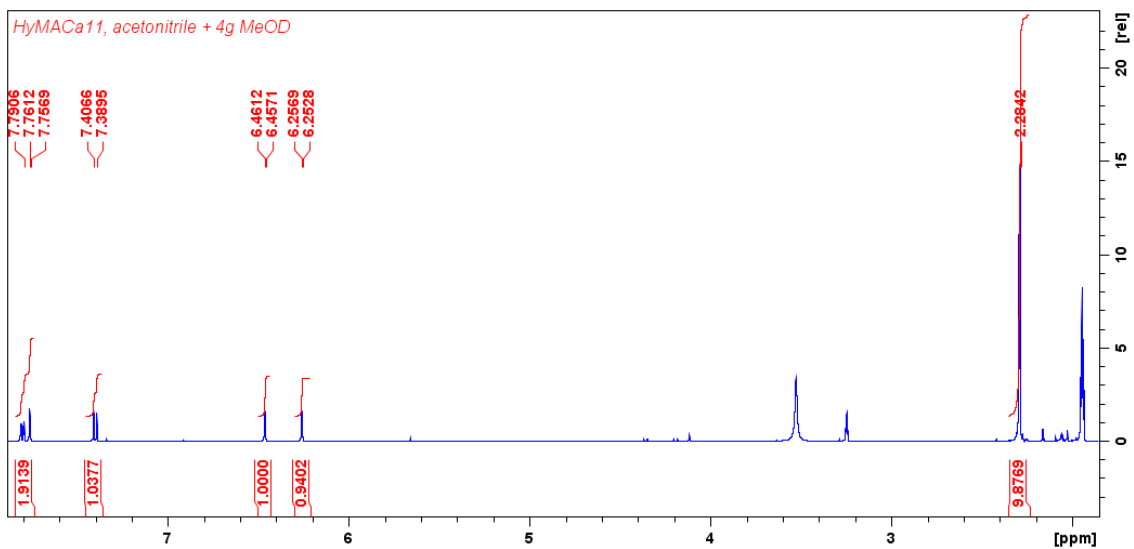
HMBC de **1b**



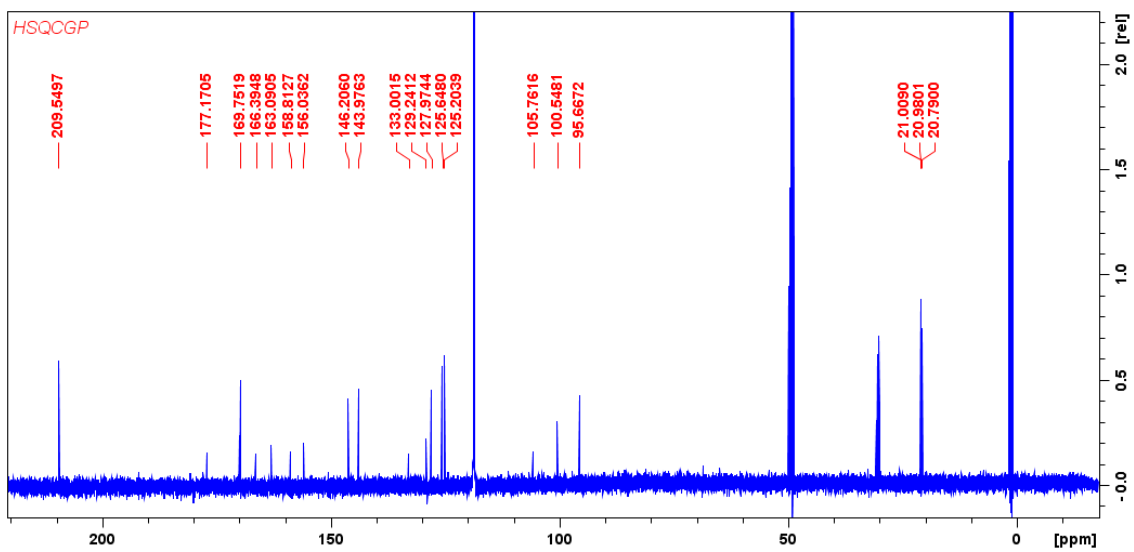
Espectro de masas de **1b**.



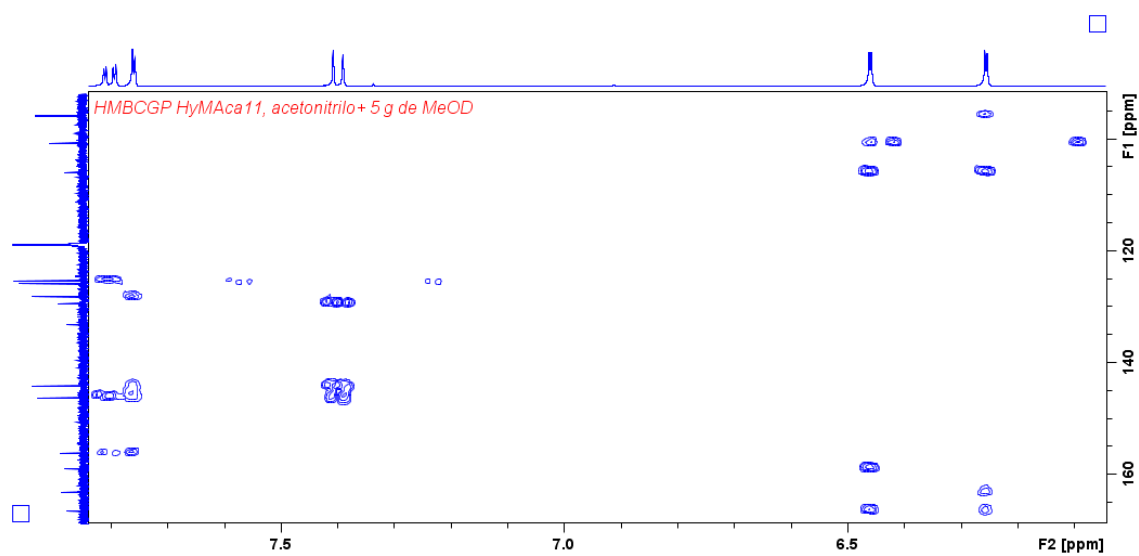
^1H -RMN de **1c**.



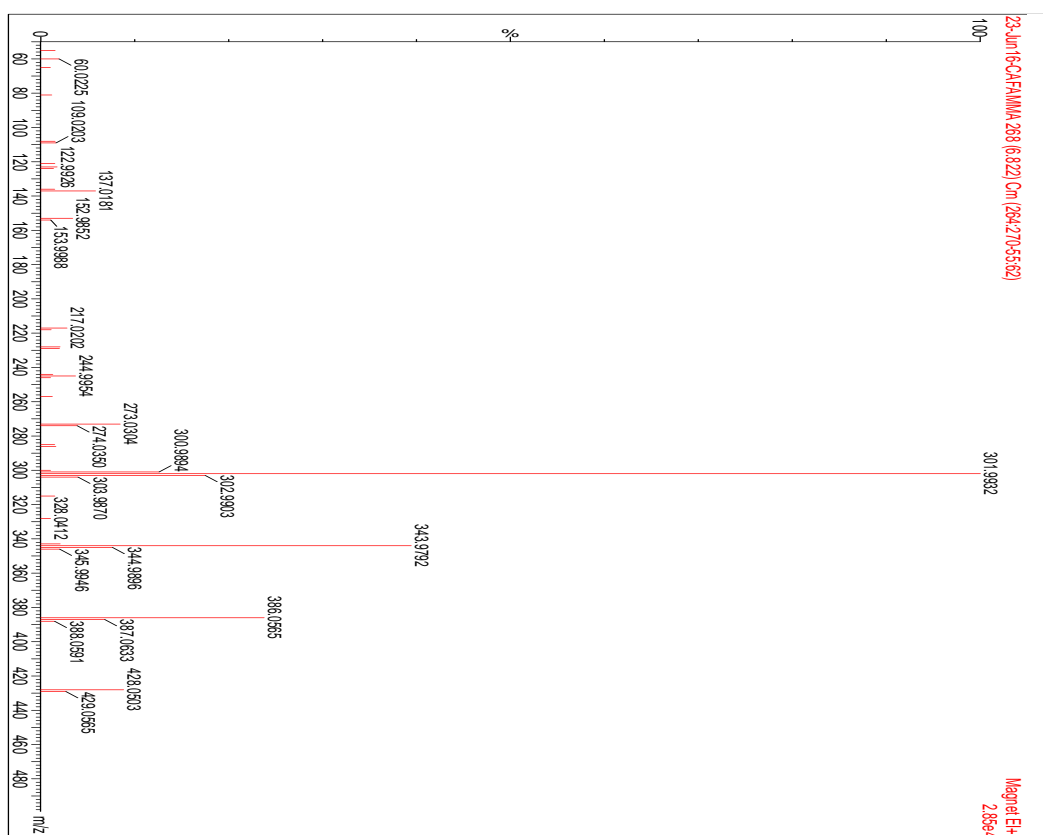
^{13}C -RMN de **1c**



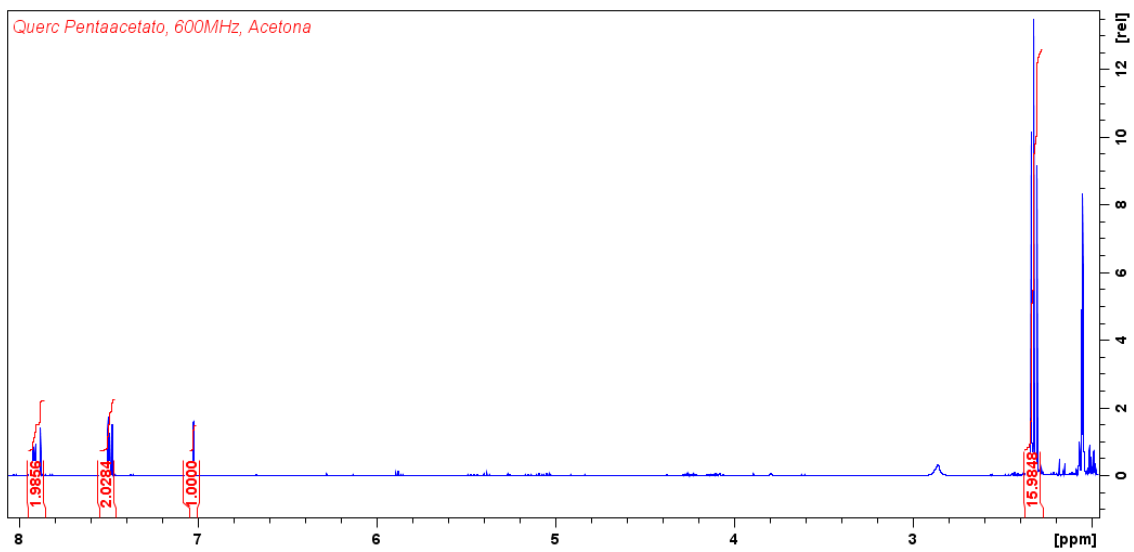
HMBC de 1c.



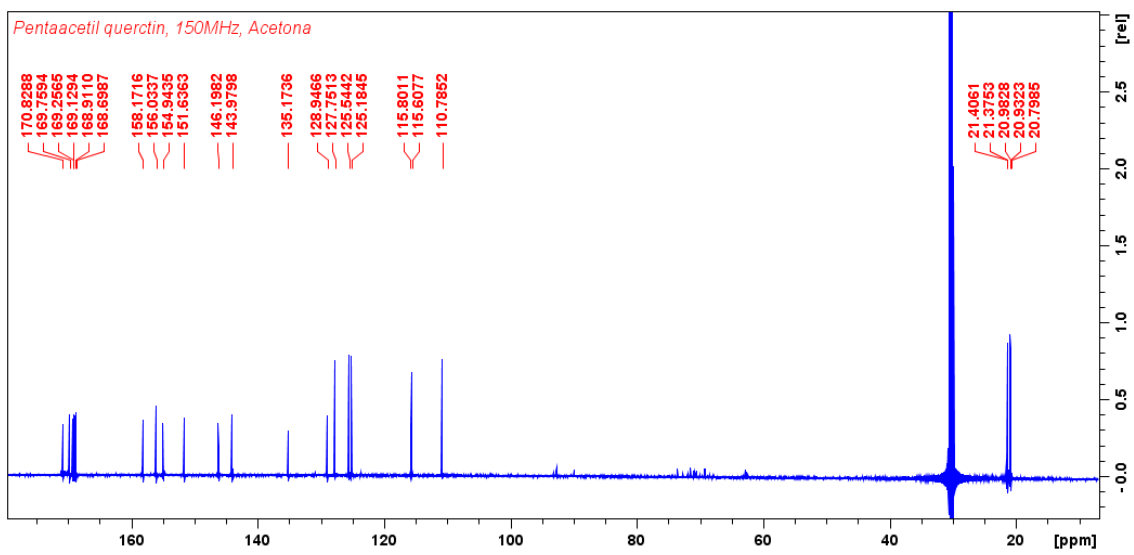
Espectro de masas de 1c



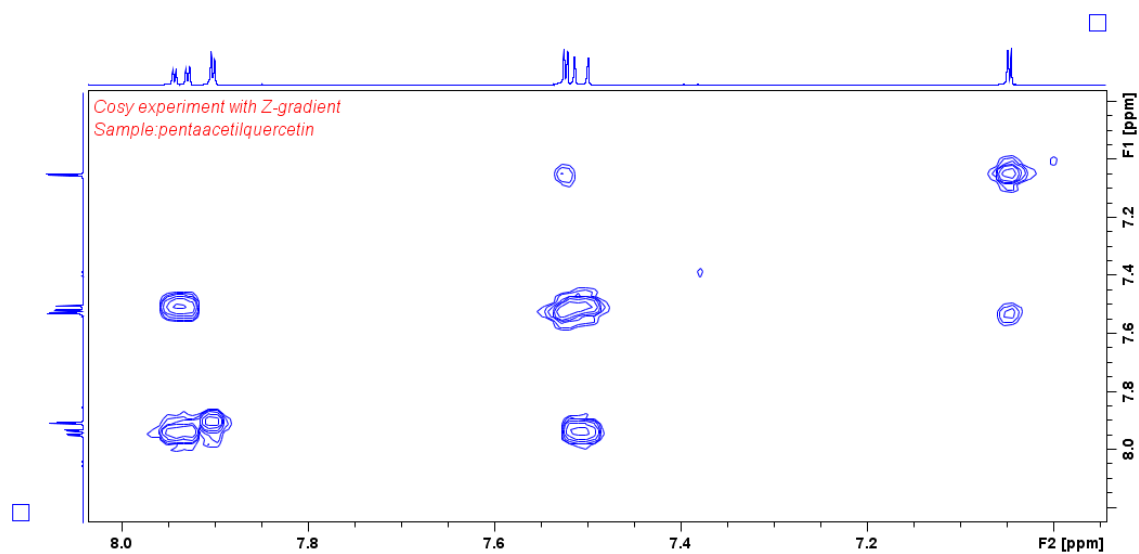
¹H-RMN de **1d**.



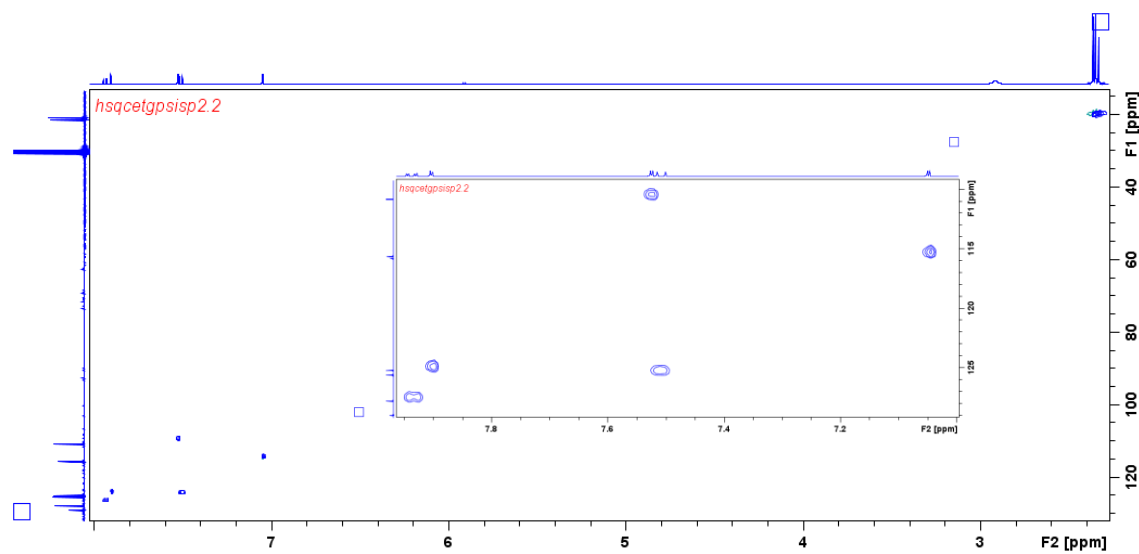
¹³C-RMN de **1d**.



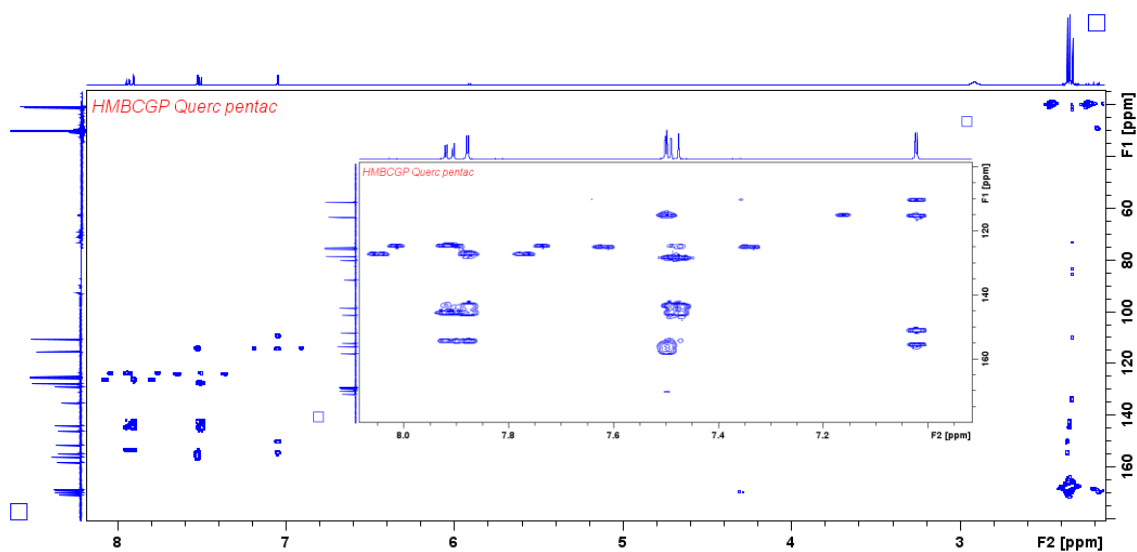
COSY de **1d**.



HSQC de **1d**.



HMBC de **1d**.



Espectro de masas **1d**.

