

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE QUIMICA



TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

MODIFICACION ESTRUCTURAL DE HESPERIDINA Y NARINGINA Y  
EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA SOBRE LA ENZIMA  
GLUCOSA-6-FOSFATASA

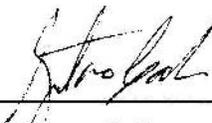
Trabajo Especial de Grado presentado ante la  
Ilustre Universidad Central de Venezuela, por la  
Br. Ynés M. Rojas C., para optar al título de  
Licenciada en Química, mención Geoquímica.

Tutores: Dra. María Rodríguez  
Dr. Freddy González

Caracas, Octubre del 2016.

Los abajo firmantes designados por la Universidad Central de Venezuela, como integrantes del jurado examinador del Trabajo Especial de Grado titulado: Modificación estructural de Hesperidina y Naringina y Evaluación de la actividad biológica sobre la enzima glucosa-6-fosfatasa. Presentado por Br. Ynés María Rojas Castellanos, C.I. 7.996.702, certificamos que este trabajo cumple con los requisitos exigidos por nuestra Magna Casa de Estudios para optar por el título de Licenciado en Química.

  
Dra. María Rodríguez  
(Tutor)

  
Dr. Gustavo Cabrera  
(Jurado)

  
Dr. Jaime Charris  
(Jurado)

---

## AGRADECIMIENTOS

A Dios primeramente, por la culminación de esta meta que iniciará otras.

Mi familia que apoyo esta aventura, papá esto también te pertenece y mami disfrútalo en el cielo. Gracias por entender a la científica del hogar.

La estructura académica que representa mi Alma Mater, “la casa que vence las sombras”, la Universidad Central de Venezuela y todo el profesorado de la Facultad de Ciencias y la Escuela de Química, por haber formado parte importante en mi vida, especialmente al Prof. Masahisa Hasegawa, por aceptarme y trabajar en este proyecto, el cual me permitió conocer a los Profesores María Rodríguez, Gustavo Cabrera, Jaime Charris, Freddy Mujica que lo mejoraron y brindaron su amistad. Gracias por la excelencia educativa y calidad humana.

Los compañeros de faena en Productos Naturales, Profesores Diana Pachón, Jairo Bermúdez, Manuel Fermín, Reine Mendoza, Luis De Freitas, los tesisistas Sofía, Neydimar, Yuari, Ricardo, al grupo de Síntesis Orgánica, Daniela, Iván y Lourdes, gracias por su amistad, apoyo y correcciones realizadas a este proyecto.

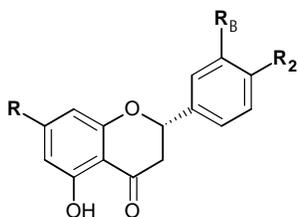
A los amigos y compañeros que están en otras faenas, con los cuales estudie y fraternice están en mi corazón, gracias por sus buenos deseos en la culminación de esta Tesis.

Gracias les quiero y aprecio un montón ;

## Resumen

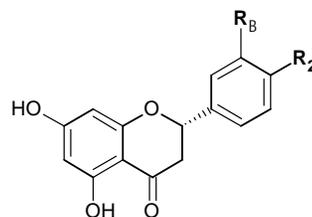
Los flavonoides son compuestos de origen natural a los cuales se les atribuyen numerosos beneficios en el tratamiento de diferentes tipos de enfermedades que aquejan al ser humano, entre ellas destaca la Diabetes Mellitus, esta dolencia crónica aparece cuando el páncreas no produce insulina suficiente o cuando no es utilizada eficazmente por el organismo. Su descontrol con el tiempo daña gravemente órganos y sistemas. Esta enfermedad puede ser estudiada a través de la inhibición de la enzima glucosa-6-fosfatasa. En el presente trabajo se realizó la modificación estructural de las flavanonas glicosídicas hesperidina (1) y naringina (2), mediante reacciones químicas tales como hidrólisis ácida y básica, hidrogenación catalítica y bromación, obteniéndose las agliconas hesperetina (3)  $Pf_{exp}$  226-228°C y naringenina (4)  $Pf_{exp}$  244-249°C por hidrólisis ácida. La chalcona de naringina (5)  $Pf_{exp}$  180-182°C por hidrólisis básica y la floracetofenona 4'-neohesperidósido (6)  $Pf_{exp}$  160-164°C, la cual es un producto de degradación de (5) en medio básico. Mientras que, las flavonas glicosídicas de naringina (7)  $Pf_{exp}$  188-192°C y hesperidina (8)  $Pf_{exp}$  270-273°C y la flavona de hesperetina (9)  $Pf_{exp}$  238-240°C fueron obtenidas por tratamiento del producto acetilado de (1 y 2) con *N*-bromosuccinimida en presencia de peróxido de benzoilo.

## Contenidos



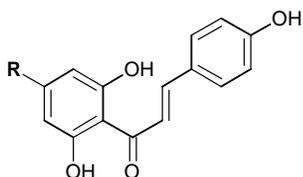
Hesperidina (1) R: 7-*O*-ramnosilglucosa; R<sub>1</sub>: OH; R<sub>2</sub>: O-CH<sub>3</sub>

Naringina (2) R: 7-*O*-ramnosilglucosa, R<sub>1</sub>: H; R<sub>2</sub>: OH

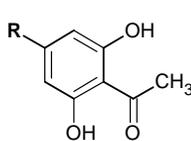


Hesperetina (3) R<sub>1</sub>: OH; R<sub>2</sub>: O-CH<sub>3</sub>

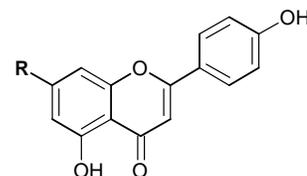
Naringenina (4) R<sub>1</sub>: H; R<sub>2</sub>: OH



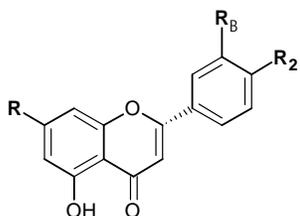
Chalcona de Naringina (5)



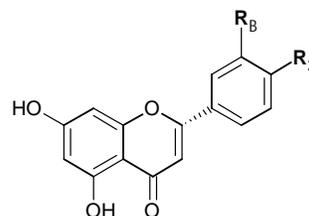
Floracetofenona-4'-*S*-neohesperidosido (6)



Flavona de Naringina (7)



Flavona de Hesperidina (8)



Flavona de Hesperetina (9)

Adicionalmente, se determinó el efecto de los compuestos sintéticos **(3-7)** sobre el sistema enzimático glucosa-6-fosfatasa empleando floricina como control positivo. Los compuestos **3-7** presentaron mayor porcentaje de inhibición del sistema enzimático G-6-Pasa que sus materiales de partida **1** y **2**, siendo el compuesto **6** el más activo con un IC<sub>50</sub> (144,17 ± 7,03) μM. Hesperidina y naringina presentaron valores de IC<sub>50</sub> > 300 μM. Los productos sintetizados **3-7** presentaron un porcentaje de pureza 93% determinado por HPLC y fueron caracterizados por métodos espectroscópicos UV, RMN-<sup>1</sup>H, RMN-<sup>13</sup>C y DEPT-135.

Palabras claves: Diabetes mellitus, Flavonoides, Glucosa-6-fosfatasa, Hesperidina, Naringina.



**Índice**

Resumen .....	iii
Abreviaturas .....	ix
Listas de espectros.....	xii
Lista de esquemas.....	xiii
Lista de figuras .....	xiii
Lista de tablas.....	xvi
Introducción .....	1
1 Diabetes Mellitus.....	3
1.1 Diabetes Tipo 1 (insulino dependiente).....	4
1.2 Diabetes Tipo 2 (no insulino dependiente).....	4
1.3 La Diabetes Gestacional.....	4
1.4 Regulación hormonal de la glicemia.....	5
1.5 Insulina .....	5
1.6 Glucágon .....	5
1.7 La Glucogenólisis.....	7
1.8 La Gluconeogénesis.....	8
1.9 Glucosa-6-fosfatasa: (E.C.3.1.3.9).....	8
2 Los Flavonoides .....	9
2.1 Chalconas.....	13
2.2 Flavonas.....	14
2.3 Flavanonas.....	14
2.4 Flavonoles.....	15
2.5 Flavanonoles (Dihidroflavonoles).....	16
2.6 Antocianinas .....	16
2.7 Auronas.....	17
2.8 Isoflavanoides.....	18
2.9 Neoflavonoides .....	18

3	Hesperidina y Naringina.....	19
3.1	Antecedentes. ....	21
4	Justificación .....	24
5	Objetivos.....	25
5.1	Objetivos Generales.....	25
5.2	Objetivos Específicos .....	25
6	Metodología Experimental .....	27
6.1	Solventes y reactivos.....	27
	Métodos cromatográficos. ....	27
6.2	Reactivos para ensayos biológicos.....	28
6.3	Instrumentación.....	29
6.4	Bioensayos sobre la enzima Glucosa-6-fosfatasa. ....	30
6.4.1	Obtención de microsomas hepáticos.....	31
6.4.2	Determinación de la actividad sobre la Glucosa-6-Pasa.....	32
6.4.3	Determinación de Proteínas. ....	34
7	Procedimientos para la síntesis de los derivados de los flavonoides hesperidina y naringina. ....	35
7.1	Derivados de la Hesperidina y Naringina.....	36
7.1.1	Procedimiento para la Hidrólisis Ácida de Hesperidina y Naringina (obtención de la Aglicona). <sup>1,1</sup> .....	36
7.1.2	Procedimiento para la Hidrólisis Básica de Hesperidina y Naringina (obtención de la Chalcona) <sup>1, 1</sup> .....	36
7.1.3	Procedimiento para la obtención de la Dihydrochalcona de Hesperidina y Naringina <sup>[42],[43]</sup> , [44] .....	37
7.1.4	Procedimiento para la obtención de la Flavona de Hesperidina y Naringina. <sup>[44], 1, 1</sup> .....	37
7.1.5	Procedimiento para la obtención de la Aurona y Flavonol de Hesperidina y Naringina. ....	38
8	Resultados Sintéticos: Discusión. ....	39

8.1 Determinación de la pureza de hesperidina comercial: (2S)-7-[ -ramnopiranosil (1 6)- -D-glucopiranosiloxi]-2,3-dihidro-5-hidroxi-2-(3-hidroxi-4-metoxifenil)-4H-1-benzopirano-4-ona.....	42
8.2 Determinación de la pureza de naringina comercial:4',5,7-trihidroxiflavanona-7-ramnoglucósido. ....	43
8.3 Hidrólisis Ácida de Hesperidina: Obtención de Hesperetina, (Hp): 3',5,7– trihidroxi -4'-metoxiflavanona.....	44
8.4 Hidrólisis Ácida de Naringina: Obtención de naringenina, (Ng): 4',5,7- trihidroxiflavanona.....	49
8.5 Síntesis de las Chalconas de Hesperidina (CH-H): 3, 2',6'-trihidroxi-4-metoxi-4'-(O <sub>6</sub> - -L-ramnopiranosil- -D-glucopiranosiloxi)-trans-chalcona y Hesperetina (CH-Hp): (E)-3-(3-hidroxi-4-metoxifenil)-1-(2,4,6-trihidroxifenil) propen-2-en-1-one.....	55
8.6 Síntesis de la Chalcona de naringina (CH-N): 4'-ramnoglucosil-2',6',4-trihidroxichalcona. ....	58
8.7 Síntesis de la Floracetofenona 4'- -neohesperidosido (Fa4n): 4-acetil-3, 5-dihidroxi-fenil-(O <sub>2</sub> - -L-ramnopiranosil- -D-glucopiranosido). ....	67
8.8 Síntesis de la Flavona de Hesperidina (F-H): 5, 7, 3'-trihidroxi-4'-metoxi-flavona-7-rutinosido (Diosmina).....	73
8.9 Síntesis de la Flavona de Naringina (F-N): 7-[[2-O- (6-deoxi- -L-mannopiranosil)- -D-glucopiranosil]oxi]-5-hidroxi-2-(4-hidroxifenil)-4H-benzopirano-4-ona.....	83
8.10 Síntesis de la Aurona y Flavonol de Hesperidina y Naringina. ....	87
9 Resultados Biológicos: Discusión.....	89
10 Conclusiones .....	91

## Abreviaturas

Siglas	Significado
Abs	Absorbancia.
ACN	Acetonitrilo.
AcOEt	Acetato de etilo.
AcOH	Ácido acético.
ATP	Adenosin trifosfato.
C	Grados centígrados.
CC	Cromatografía en columna.
CCF	Cromatografía de capa fina.
CHCl <sub>3</sub>	Cloroformo.
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Diclorometano.
(CH <sub>3</sub> CO) <sub>2</sub>	Anhídrido acético.
CH <sub>3</sub> COCH <sub>3</sub>	Acetona.
(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH	Alcohol Isoamilico.
(C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CO) <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de benzoilo.
C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> N	Piridina.
CH-H	Chalcona de Hesperidina
CH-Hp	Chalcona de Hesperetina
CH-N	Chalcona de Naringina
cm	Centímetros.
<i>d</i>	Doblete.
<i>dd</i>	Doblete de doblete.
<i>dt</i>	Doblete de triplete.
DEPT	Correlación heteronuclear H-C, por sus siglas en inglés, Distortionless Enhancement by Polarization Transfer.
DHC	Dihidrochalcona
DM	Diabetes mellitus.
DMSO	Dimetilsulfóxido.
DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub>	Dimetilsulfóxido deuterado.
EtOH	Etanol.
g	Gramos.
G	Glucosa.
Gli	Glicósido
Glu	Glucopiranososa.
GLUT2	Proteína que transporta glucosa-T2, por sus siglas en inglés, Glucose transport-T2.
GLUT4	Proteína que transporta glucosa-T4 desde la sangre al interior de la célula, por sus siglas en inglés, Glucose transport-T4.
G-6-P	Glucosa-6-fosfato.
G-6-Pasa	Enzima Glucosa-6-Fosfatasa.
h	Horas.
Hex	1-hexano.
HCl	Ácido clorhídrico
HCO <sub>2</sub> H	Ácido fórmico.
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Ácido sulfúrico.
+H	Con histonas.
-H	Sin histonas.
H	Hesperidina
Hp	Hesperetina
IC <sub>50</sub>	Concentración inhibitoria para la mitad de población estudiada, por sus siglas en inglés, Inhibitory Concentration.
IR	Infrarrojo.

## Contenidos

Siglas	Significado
HEPES	Ácido [ <i>N</i> -(2-hidroxietyl)-piperazin- <i>N</i> -2(2-etyl)]-sulfónico, por sus siglas en inglés, 4-(2-hydroxyethyl)-piperazineethanesulfonic Acid.
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno, agua oxigenada.
HPLC	Cromatografía líquida de alto rendimiento, por sus siglas en inglés, High-Performace Liquid Chromatography.
Hz	Hertz.
<i>J</i>	Constante de acoplamiento medida en Hz.
<i>m</i>	Multiplete.
M	Molar.
MeOH	Metanol.
mg	Miligramos.
MHz	Megahertz.
min	Minutos.
mL	Mililitros.
mL/min	Mililitros por minutos.
mM	Milimolar.
N	Naringina
NA	No-asignado.
NaHCO <sub>3</sub>	Bicarbonato de sodio.
NaOH	Hidróxido de sodio.
NBS	N-bromosuccinamida
ND	No-determinado.
Ng	Naringenina
nm	Nanometro.
Pd-C	Paladio sobre carbono activado
P <sub>eb</sub>	Punto de ebullición.
P <sub>fexp</sub>	Punto de fusión experimental.
Pi	Fosfato inorgánico.
PPi	Pirofosfato inorgánico.
ppm	Partes por millón.
RE	Retículo endoplasmático.
Rf	Factor de retención.
RMN- <sup>13</sup> C	Resonancia magnética nuclear del isótopo de carbono-trece.
RMN- <sup>1</sup> H	Resonancia magnética nuclear del isótopo de hidrógeno-uno.
s	Singlete.
SDS	Dodecil sulfato de sodio, por sus siglas en inglés, Dodecyl Sulfate, Sodium salt.
SeO <sub>2</sub>	Oxido de selenio (II)
SGLT1	Co-tran Co-transportador de Na <sup>+</sup> -glucosa, por sus siglas en inglés, Sodium Glucose Transport-1.
SP	Proteína estabilizadora, por sus siglas en inglés, Stability Protein.
SUC	Sub-unidad catalítica del sistema enzimático G-6-Pasa.
T	Temperatura.
t	Tiempo.
<i>t</i>	Triplete.
T1	Transportador de G-6-P hacia el lumen del RE.
T2	Transportador de G fuera del lumen del RE.
T3	Transportador de Pi fuera del lumen del RE.
UV	Ultravioleta.
UV-Vis.	Detector de ultravioleta en el visible.
α	- En términos biológicos: Células que secretan glucagón. - En términos químicos: Disposición espacial de un enlace químico.
β	- En términos biológicos: Células que secretan insulina. - En términos químicos: Disposición espacial de un enlace químico.
μ	Micro.

<b>Siglas</b>	<b>Significado</b>
$\lambda$	Longitud de onda.
%	Porcentaje.

**Listas de espectros**

N°	Título del espectro	Pág.
1	RMN- <sup>1</sup> H del compuesto Hp (hesperetina)	101
2	Ampliación entre 7.0 – 2.0 ppm del RMN- <sup>1</sup> H del compuesto Hp (hesperetina)	102
3	RMN- <sup>13</sup> C del compuesto Hp (hesperetina)	103
4	DEPT- 135 del compuesto Hp (hesperetina)	104
5	RMN- <sup>1</sup> H del compuesto Ng (naringenina)	105
6	Ampliación entre 7.0 – 2.0 ppm del RMN- <sup>1</sup> H del compuesto Ng (naringenina)	106
7	RMN- <sup>13</sup> C del compuesto Ng (naringenina)	107
8	DEPT- 135 del compuesto Ng (naringenina)	108
9	IR del compuesto Ch-N (chalcona de naringina)	109
10	RMN- <sup>1</sup> H del compuesto Ch-N (chalcona de naringina)	110
11	Ampliación entre 7.8 – 4.4 ppm del RMN- <sup>1</sup> H del compuesto Ch-N (chalcona de naringina)	111
12	RMN- <sup>13</sup> C del compuesto Ch-N (chalcona de naringina)	112
13	DEPT- 135 del compuesto Ch-N (chalcona de naringina)	113
14	RMN- <sup>1</sup> H del compuesto Fa-4n (floracetofenona-4- -neohesperidosido)	114
15	Integración del RMN- <sup>1</sup> H del compuesto Fa-4n (floracetofenona-4- -neohesperidosido)	115
16	Ampliación entre 6.2 – 4.3 ppm del RMN- <sup>1</sup> H del compuesto Fa-4n (floracetofenona-4- -neohesperidosido)	116
17	RMN- <sup>13</sup> C del compuesto Fa-4n (floracetofenona-4- -neohesperidosido)	117
18	DEPT- 135 del compuesto Fa-4n (floracetofenona-4- -neohesperidosido)	118
19	RMN- <sup>1</sup> H de la Flavona de Hesperetina (Diosmetina)	119
20	Ampliación entre 8.0 – 6.2 ppm RMN- <sup>1</sup> H de la Flavona de Hesperetina (Diosmetina).	120
21	RMN- <sup>13</sup> C de la Flavona de Hesperetina (Diosmetina)	121
22	RMN- <sup>1</sup> H de la Flavona de Hesperidina (Diosmina) entre 12.5 -9.1 ppm	122
23	RMN- <sup>1</sup> H de la Flavona de Hesperidina (Diosmina) entre 9.9 – 6.1 ppm	123
24	RMN- <sup>1</sup> H de la Flavona de Hesperidina (Diosmina) entre 5.7 – 2.0 ppm	124
25	RMN- <sup>13</sup> C de la Flavona de Hesperidina (Diosmina)	125
26	DEPT-135 de la Flavona de Hesperidina (Diosmina)	126
27	RMN- <sup>1</sup> H del compuesto F-N (flavona de naringina)	127
28	Ampliación entre 6.2 – 4.3 ppm del RMN- <sup>1</sup> H del compuesto F-N (flavona de naringina)	128

## Lista de esquemas

N°	Título de esquema	Pág.
1	Procedimiento para la obtención de los microsomas	31
2	Ensayo general de inhibición sobre la enzima G-6-Pasa	33
3	Procedimiento para la determinación de proteínas.	34
4	Modificación estructural propuesta para los flavonoides hesperidina y naringina.	35
5	Síntesis de la naringina: i) a) $H_2SO_4$ /etilenglicolmonoetil éter, 6h a T 80-90 °C o b) $H_2SO_4$ /EtOH 6h a T 90°C; ii) $NaOH_{(ac, 20\%)}$ , 6h a $T_{amb}$ ; iii) $H_2/Pd_{10\%}$ -C/MeOH, 6h, 40 psi a $T_{amb}$ ; iv) a) Piridina y anhídrido acético, 6 horas a $T_{amb}$ ; v) NBS, $CHCl_3$ , peróxido de benzoilo, 4h, T 60°C; vi) $H_2O_2_{(ac, 15\%)}/NaOH_{(ac, 16\%)}/MeOH$	40
6	Síntesis de la hesperidina: i) a) $H_2SO_4$ /etilenglicolmonoetil éter, 6h a T 80-90 °C o b) $H_2SO_4$ /EtOH 6h a T 90°C; ii) $NaOH_{(ac, 20\%)}$ , 24h a $T_{amb}$ ; iv) a) Piridina y anhídrido acético, 4 días a $T_{amb}$ ; a) NBS, $CHCl_3$ , peróxido de benzoilo, 10h, T 60°C; iv) b) Piridina, anhídrido acético, 6 h, T 95-100°C; b) $SeO_2$ , alcohol <i>iso</i> -amílico, 24 h, 110 °C; vi) $H_2O_2_{(ac, 15\%)}/NaOH_{(ac, 16\%)}/MeOH$	41
7	Formación de chalcona vía carbanión.	55
8	Separación de la muestra Flavona de hesperidina F-H (NBS).	78

## Lista de figuras

N°	Título de figura	Pág.
1	Degradación de los alimentos	3
2	Mecanismo de regulación de la glucosa en el organismo	7
3	Relación estructura-función del sistema Glucosa-6-Fosfatasa	8
4	Estructura básica de los flavanoides	9
5	Biosíntesis de Flavonoides	11
6	Estructura genérica de las chalconas y dihidrochalconas	13
7	Estructura general de las flavonas	14
8	Estructura general de las flavanonas	15
9	Estructura general de los flavonoles	15
10	Estructura general de los flavanonoles	16
11	Estructura de las antocianinas.	17
12	Estructura genérica de las auronas	18
13	Estructura de los Isoflavonoides	18
14	Estructura de los Neoflavonoides	19
15	Estructura de la Hesperidina	19

N°	Título de figura	Pág.
16	Estructura de la Naringina	20
17	Determinación del porcentaje de pureza de hesperidina comercial, usada como material de partida: a) cromatograma HPLC de la hesperidina utilizando el Sistema de elución, detección a 280 nm; b) espectro de UV en eluente del Sistema	42
18	Determinación del porcentaje de pureza de naringina comercial, usada como material de partida: a) cromatograma HPLC de la naringina utilizando Sistema de elución, detección a 280 nm; b) espectro de UV en eluente del Sistema.	43
19	Determinación del porcentaje de pureza para hesperetina: a) cromatograma HPLC de la hesperetina utilizando Sistema de elución, detección a 280 nm; b) espectro de UV en eluente del Sistema.	44
20	Cromatografía de capa fina realizada a los productos de las hidrólisis ácidas de hesperidina 3 – 6. Sistema de desarrollo AN-2 (AcOEt-MeOH-H <sub>2</sub> O (100:13,5:10; v/v/v)); sistema de detección: a) Iodo, I <sub>2</sub> ; b) 254 nm.	46
21	Cromatografía de capa fina realizada a los productos de las hidrólisis ácidas de Hesperidina 3 – 7, utilizando el sistema de solvente AN-6 (Hex-AcOEt-HCOOH (75:25:1; v/v/v)) y como sistema de detección a) Iodo I <sub>2</sub> ; b) 254 nm.	46
22	Determinación del porcentaje de pureza para naringenina: a) cromatograma HPLC de la naringenina utilizando Sistema de elución, detección a 280 nm; b) espectro de UV en eluente del Sistema.	49
23	Cromatografía de capa fina realizada a los productos de las hidrólisis ácidas de naringina 1 – 3. Sistema de desarrollo; AN-6 (Hex-AcOEt- HCOOH (75:25:1; v/v/v)); sistema de detección: a) visible; b) 254 nm; c) AS, 365 nm sin calor; d) AS, 365nm con calor, visible.	51
24	Cromatografía de capa fina realizada a los productos de la hidrólisis ácida de naringina 1 – 3. Sistema de desarrollo AN-2 (AcOEt-MeOH-H <sub>2</sub> O (100:13,5:10; v/v/v)); sistema de detección: a) visible; b) 254 nm; c) AS, 365 nm sin calor; d) AS, 365nm con calor, visible	51
25	Cromatografía de capa fina realizada a los productos de la hidrólisis ácida de naringina, aguas madres y patrón. Sistema de desarrollo AN-2 (AcOEt-MeOH-H <sub>2</sub> O (100:13,5:10; v/v/v)); sistema de detección: a) visible; b) 254 nm; c) 365 nm; d) AS, 365 nm sin calor; e) AS, visible.	52
26	Espectro UV (MeOH) de naringenina (-----) y naringina ( ).	54
27	Espectros UV de las soluciones de chalcona de hesperidina (CH-H) y chalcona de hesperetina (CH-Hp) en MeOH (a) antes, (b) después de neutralizar.	57
28	Determinación del porcentaje de pureza para la chalcona de naringina (CH-N). a) cromatograma HPLC de la CH-N utilizando Sistema de elución, detección a 280 nm; b) espectro de UV en eluente del Sistema	58
29	Cromatografía de capa fina realizada a las muestras de naringina (N), chalcona de naringina (CH-N) y chalcona de naringina patrón (CH-Np), utilizando el sistema de solvente AN2: AcOEt-MeOH-H <sub>2</sub> O (100:13,5:10; v/v/v) y como sistema de detección a) visible; b) 365 nm; c) 254 nm d) revelado AS, visible con calor.	59
30	Cromatografía de capa fina realizada a las muestras de naringina (N) y chalcona de naringina (CH-N), utilizando el sistema de solvente L-1:AcOEt-AcOH-HCO <sub>2</sub> H-H <sub>2</sub> O (100:10:10:10; v/v/v/v) y como sistema de detección a) visible; b) 365 nm; c) 254 nm d) revelado com AS, visible con calor.	60
31	Espectro UV de la solución de chalcona de narinigina (CH-N) (después de	60

<b>N°</b>	<b>Título de figura</b>	<b>Pág.</b>
	neutralizar y/o acidificar) y naringina (N) en MeOH.	
32	Espectro UV y cromatograma HPLC comparativo a : 280 nm (en rojo) y : 360 nm (en negro) de la muestra chalcona de naringina (CH-N) en equilibrio con naringina (N).	66
33	Determinación del porcentaje de pureza para la floracetofenona 4'- -neohesperidosido (Fa4n). a) cromatograma HPLC de la Fa4n utilizando Sistema de elución, detección a 280 nm; b) espectro de UV en eluyente del Sistema	67
34	Cromatografía de capa fina realizada a las muestras de naringina (N), floracetofenona 4'- -neohesperidosido (Fa4n) y chalcona de naringina (CH-N), utilizando el sistema de solvente AN2: AcOEt-MeOH-H <sub>2</sub> O (100:13,5:10; v/v/v) y como sistema de detección a) visible; b) 365 nm; c) 254 nm d) AS, 365 nm con calor.	69
35	Cromatografía de capa fina realizada a las muestras de naringina (N), floracetofenona 4'- -neohesperidosido (Fa4n) y chalcona de naringina (CH-N), utilizando el sistema de solvente L-1: AcOEt -AcOH-HCO <sub>2</sub> H-H <sub>2</sub> O (100:10:10:10; v/v/v/v) y como sistema de detección a) visible; b) 365 nm; c) 254 nm d) AS, 365 nm con calor.	69
36	Espectros U.V de floracetofenona 4'- -neohesperidosido (Fa4n) y chalcona de naringina (CH-N) en eluyente del sistema HPLC.	70
37	Determinación del porcentaje de pureza para la flavona de hesperidina (F-H)-. a) cromatograma HPLC de la flavona de hesperidina (F-H) utilizando Sistema de elución, detección a 330 nm; b) espectro de UV en eluyente del Sistema.	74
38	Cromatografía de capa fina (NBS) realizada a las muestras de hesperidina (H), hesperidina acetilada (H-Acet) y flavona de hesperidina (F-H), utilizando el sistema de solvente AN2: AcOEt-MeOH-H <sub>2</sub> O (100:13,5:10; v/v/v) y como sistema de detección a) visible; b) 365 nm; c) 254 nm d) AS, 365 nm con calor.	75
39	Cromatografía de capa fina (SeO <sub>2</sub> ) realizada a las muestras de hesperidina (H), hesperidina acetilada (H-Acet) y flavona de hesperidina (F-H), utilizando el sistema de solvente AN2: AcOEt-MeOH-H <sub>2</sub> O (100:13,5:10; v/v/v) y como sistema de detección a) visible; b) 365 nm; c) 254 nm d) AS, 365 nm con calor.	76
40	Cromatografía de capa fina realizada a las muestras de hesperetina (Hp) y flavona de hesperidina (F-H), utilizando el sistema de solvente AN2: AcOEt-MeOH-H <sub>2</sub> O (100:13,5:10; v/v/v) y como sistema de detección a) visible; b) 365 nm; c) 254 nm d) AS, 365 nm con calor.	77
41	Espectro U.V de la flavona de hesperidina (F-H) en eluyente	78
42	Cromatografía de capa fina realizada a las fracciones solubles 1 y 2 (Fs1 y Fs2) y residuo 2 (R2), utilizando el sistema de solvente AN2: AcOEt-MeOH-H <sub>2</sub> O (100:13,5:10; v/v/v) y como sistema de detección a) 254 nm, b) 365 nm; c) I <sub>2</sub> , visible, d) 254 nm	79
43	Determinación del porcentaje de pureza para la flavona de naringina (F-N). a) cromatograma HPLC de la F-N utilizando Sistema de elución, detección a 330 nm; b) espectro de UV en eluyente del Sistema.	83
44	Cromatografía de capa fina realizada a las muestras de naringina (N), naringina acetilada (N-aceti) y flavona de naringina (F-N), utilizando el sistema de solvente AN2: AcOEt-MeOH-H <sub>2</sub> O (100:13,5:10; v/v/v) y como sistema de detección a) visible; b) 365 nm; c) 254 nm d) AS, 365 nm con calor.	84
45	Espectro U.V de la flavona de naringina (F-N) y naringina (N) en eluyente.	85

**Lista de tablas**

N°	Título de tabla	Pág.
1	Substitución de las antocianinas $\lambda_{\text{máx.}}$ (nm).	17
2	Propiedad relativa de la amargura de algunos compuestos	21
3	Sabor y dulzura relativa de neohesperidosidas DHC y Sacarina.	22
4	Porcentaje de inhibición de hesperidina, naringina y sus derivados sobre la G-6-Pasa.	23
5	Preparación de los sustratos.	32
6	Parámetros de la hidrólisis ácida de hesperidina, porcentaje de rendimiento y punto de fusión experimental.	45
7	Desplazamientos químicos para la hesperetina (Hp) (270 MHz, DMSO- $d_6$ ).	47
8	Parámetros de la hidrólisis ácida de naringina, rendimiento y punto de fusión experimental.	50
9	Desplazamientos químicos para la naringenina (N) (270 MHz, DMSO- $d_6$ ).	54
10	Desplazamientos químicos de protones y carbono para la naringenina (N) (270 MHz, DMSO- $d_6$ ). Constante de acoplamiento en paréntesis (J en Hz).	64
11	Desplazamientos químicos de protones y carbono para la floracetofenona-4- -neohesperidosido (Fa4n) (270 MHz, DMSO- $d_6$ ). Constante de acoplamiento en paréntesis (J en Hz).	72
12	Desplazamientos químicos de $^1\text{H}$ y $^{13}\text{C}$ para la flavona de hesperidina (FH) (diosmina) (270 MHz, DMSO- $d_6$ ) y diosmetina (270 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ).	82
13	Desplazamientos químicos de protones para la flavona de naringina (F-N) (270 MHz, DMSO- $d_6$ ). Constante de acoplamiento en paréntesis (J en Hz).	86
14	Inhibición de la G-6-Pasa y determinación del $\text{IC}_{50}$ de los compuestos sintetizados.	89

---

## Introducción

Tradicionalmente las plantas han sido la fuente natural para el ser humano en el tratamiento de enfermedades, proporcionando beneficios, tales como: pocos efectos secundarios, aceptada tolerancia, economía y uso tradicional. En países como China, el uso de la medicina tradicional para el tratamiento de enfermedades, tiene características de un sistema médico, por la popularidad y tradición en su utilización.<sup>[1]</sup> Igualmente en Venezuela y otros países de América, es común el uso de plantas para el tratamiento de enfermedades como medio alternativo a la medicina general.<sup>[2, 3]</sup> Para la industria farmacéutica, estos saberes populares, representan una información importante para el desarrollo de drogas en determinadas dolencias. En el caso de la diabetes, por ejemplo, el descubrimiento de la metformina (droga antihiper glucemiante) provino de la medicina tradicional china mediante el empleo de la planta *Galega officinalis*.<sup>[1]</sup> En este contexto la obtención de los principales componentes de los extractos activos de la plantas, como lo son los flavonoides, triterpenos y alcaloides han demostrado que poseen aplicaciones terapéuticas.<sup>[4]</sup>

Los flavonoides son compuestos fenólicos constituyentes de la parte no-energética de la dieta humana. Se han identificado más de 4.000 flavonoides diferentes. Como características generales de estos compuestos debemos señalar su solubilidad en agua y etanol, su carácter fenólico y su intensa absorción en la región ultravioleta y visible debido a la presencia de sistemas aromáticos conjugados. Se encuentran en las flores, hojas, semillas y frutas de todos los vegetales y en bebidas como vino y cerveza.<sup>[5]</sup>

Los flavonoides reciben una considerable atención en la literatura, específicamente por su importancia biológica y fisiológica.<sup>[6]</sup> Tienen un efecto en la salud del ser humano y animal, debido a su papel en la dieta que se atribuye a sus propiedades antioxidantes o su acción estrogénica,<sup>[7]</sup> y una amplia gama de actividad

antimicrobiana y farmacológica,<sup>[8,9]</sup> asimismo, son utilizados para el tratamiento de afecciones cardiacas y diabetes.<sup>[10]</sup>

La Diabetes Mellitus es una enfermedad crónica caracterizada por hiperglucemia causada por la insuficiente acción de la insulina.<sup>[11]</sup> La diabetes tiene dos (02) variantes: tipo 1 (déficit parcial o total de insulina) y tipo 2 (resistencia de los tejidos a la actividad reguladora de la insulina). La medicación usada para tratarla se basa en la estimulación de producción de insulina (sulfonilureas), la disminución de la producción de glucosa (biguanidinas), la inhibición de la absorción intestinal de los carbohidratos (acarbosa), entre otras drogas.<sup>[1]</sup> La Organización Mundial de la Salud (OMS) calcula que esta enfermedad será la séptima causa de muerte en el 2030, siendo alrededor de 592 millones de personas (10 % de adultos), que la padecerán.<sup>[12]</sup>

En 1963, Horowitz y Gentili<sup>[13]</sup> encontraron que al realizar modificaciones en sitios específicos en las flavanonas glicosiladas de frutas cítricas (hesperidina y naringina), el producto puede ser amargo, semi amargo, dulce o insípido. Si combinamos el efecto farmacológico de los flavonoides, con el sabor dulce, estaríamos en la ruta de un edulcorante con actividad terapéutica, específicamente en el tratamiento de la diabetes.

El interés de este Trabajo se centra en estudiar la actividad antihyperglucemiante de los derivados de hesperidina y naringina sobre el sistema glucosa-6-fosfatasa (G-6-Pasa), la cual cataliza los pasos finales de la gluconeogénesis y glucogenólisis, por conversión de glucosa-6-fosfato (G-6-P) a glucosa y fosfato,<sup>[14]</sup> contribuyendo a la hiperglucemia, por lo tanto su inhibición disminuiría su actividad, constituyendo un enfoque potencial para el tratamiento de la Diabetes.

## 1 Diabetes Mellitus.

Al ingerir los alimentos constituidos por carbohidratos, grasas o lípidos y proteínas, se convierten mediante la digestión en sustancias útiles, moléculas más sencillas (glucosa, ácidos grasos y aminoácidos) para el cuerpo humano, siendo absorbidos y metabolizados para la producción de energía y componentes esenciales para el funcionamiento del organismo (1<sup>era</sup> Ley de la Termodinámica-Conservación de la energía). La glucosa, es el combustible esencial que utilizan las células para proveer de energía al organismo, esto se realiza mediante la interrelación e integración de procesos bioquímicos de síntesis y degradación de los polisacáridos almacenados <sup>[14]</sup> (Figura 1).

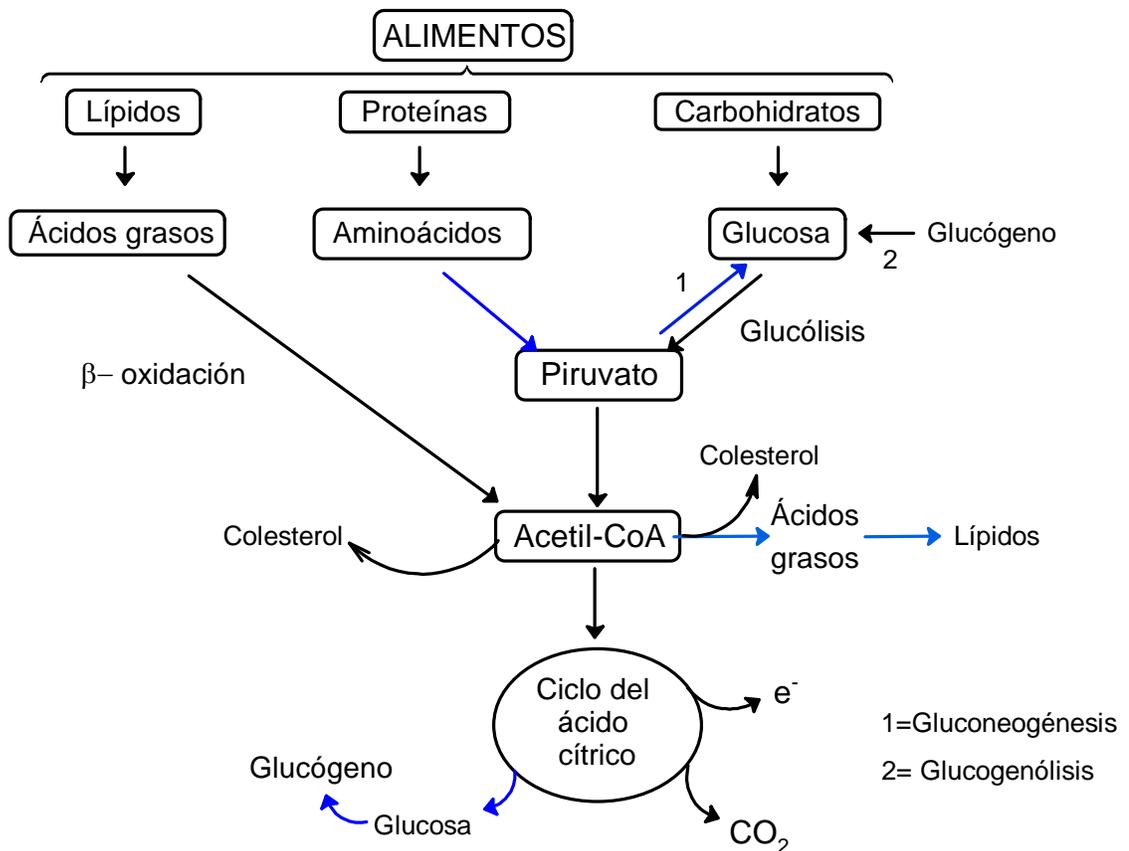


Figura. 1 Degradación de los alimentos. <sup>[14]</sup>

La Diabetes es una enfermedad crónica que incapacita al organismo a utilizar los alimentos adecuadamente, debido a la falta total o parcial de una hormona llamada Insulina, secretada por las células de los islotes de Langerhans del páncreas. Cuando no existe insulina o cuando esta no es producida en forma efectiva, la glucosa se acumula en sangre aumentando los niveles de azúcar, esto es la diabetes.<sup>[15]</sup>

Existen tres tipos de diabetes (Diabetes tipo 1, Diabetes tipo 2, y Diabetes Gestacional) y el tratamiento dependerá del tipo de Diabetes.

### 1.1 Diabetes Tipo 1 (insulino dependiente).

En este tipo de diabetes el páncreas no produce insulina o produce muy poco. Debido a que la insulina es necesaria para poder vivir, las personas, con diabetes tipo 1 deben inyectarse insulina todos los días para poder metabolizar los alimentos que consumen (enfermedad autoinmune).<sup>[15]</sup>

### 1.2 Diabetes Tipo 2 (no insulino dependiente).

En este tipo de diabetes a diferencia de la anterior, el páncreas produce insulina, pero por alguna razón, el organismo no es capaz de usarla adecuadamente, por lo que a pesar de que existe insulina en cantidades adecuadas, los niveles de glucosa en la sangre no son normales (resistencia a la insulina). La diabetes tipo 2, es conocida también como "Diabetes de adultos", ya que generalmente ocurre en personas mayores de 40 años.<sup>[15]</sup>

### 1.3 La Diabetes Gestacional.

La Diabetes Gestacional es la que aparece en mujeres durante el embarazo, y generalmente desaparece después del parto. Los cambios hormonales durante el embarazo, hacen que en algunos casos el páncreas no sea capaz de producir suficiente insulina.<sup>[15]</sup>

#### 1.4 Regulación hormonal de la glicemia.

La glicemia está definida como la concentración de glucosa presente en la sangre. El nivel normal, con un ayuno de al menos 8 (ocho) horas, es de 70 - 110 mg/dL. Por encima de 125 mg/dL es considerado Diabetes.<sup>[16]</sup> Estas concentraciones dependen de la alimentación (carbohidratos) presentes en los alimentos, ya que la glucosa es utilizada como fuente de energía por todos los tejidos. Luego de la ingesta de los alimentos, éstos llegan al intestino delgado en donde sufren lo que se denomina absorción intestinal. Para ello, los nutrientes deben ser digeridos utilizando enzimas, las cuales hidrolizan a los nutrientes (grasas, hidratos de carbono y proteínas) y los transforman en moléculas más simples capaces de ser absorbidos por el epitelio intestinal. El sistema portal drena la mucosa intestinal y vierte la sangre directamente en el hígado, éste es el primer tejido comprometido en el control de la glicemia.<sup>[17]</sup> Los niveles de glucosa en sangre son controlados por las hormonas insulina y glucágon.

#### 1.5 Insulina

La insulina es una hormona polipeptídica, segregada por las células de los islotes de Langerhans del páncreas.<sup>[14]</sup> Sus efectos principales son:

- aumenta el transporte de glucosa al interior celular produciendo una disminución de los valores de glucosa en sangre,
- aumenta la actividad de algunas enzimas tales como la glucógeno sintasa, aumentando la gluconeogénesis, a su vez disminuye la glucogenólisis.

#### 1.6 Glucágon

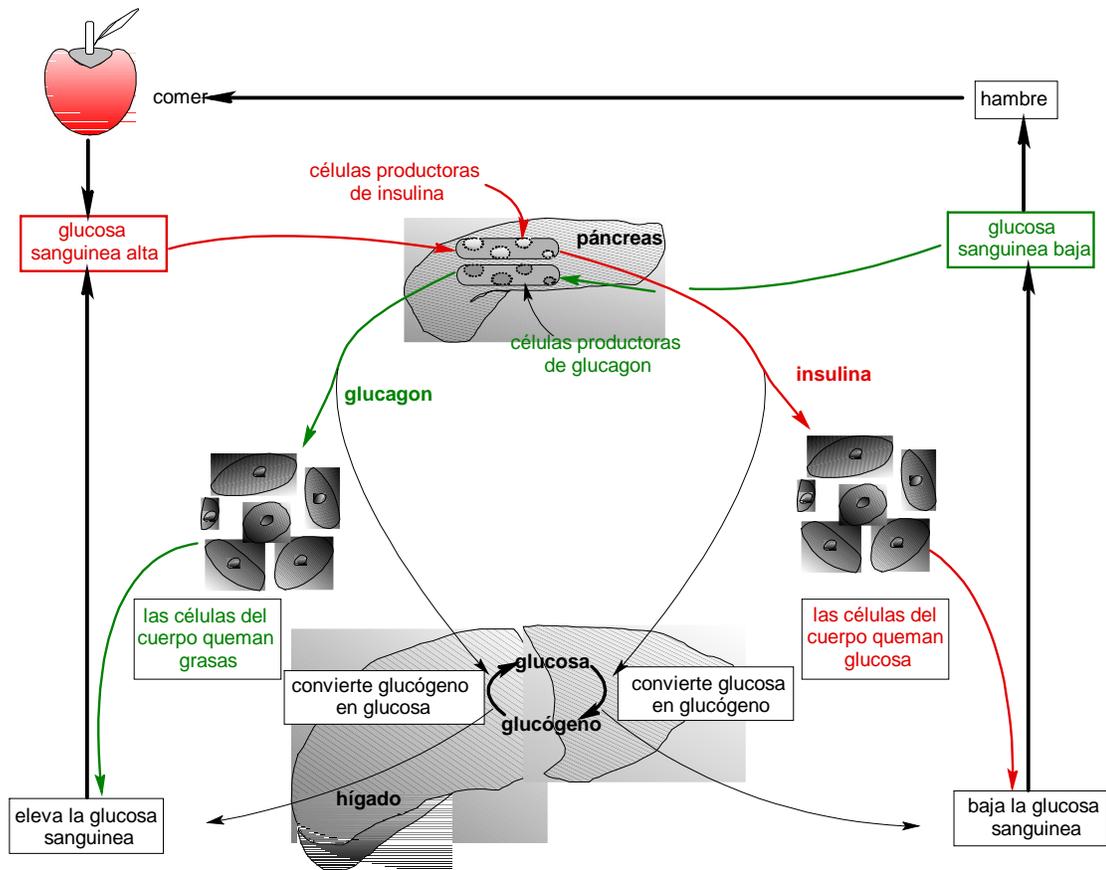
Es una hormona polipeptídica, segregada por las células de los islotes de Langerhans del páncreas. Su efecto principal es:

- promueve la glucogenólisis y la gluconeogénesis a partir de aminoácidos en el hígado, ya que estos dos procesos generan un aumento de los niveles de glucosa disponible para el organismo.

Cuando la glucosa aumenta, por ejemplo tras la ingestión, el hígado capta glucosa y la almacena en forma de glucógeno (gluconeogénesis), esta acción es regulada por la liberación de insulina por las células de los islotes endocrinos pancreáticos.<sup>[15]</sup>

Cuando la glicemia disminuye, como ocurre en el ayuno, se estimula la producción de glucágon, el cual estimula la glucogenólisis, el hígado libera glucosa a la sangre en beneficio del cerebro y otros tejidos. Esta glucosa proviene de la hidrólisis del glucógeno o de la gluconeogénesis.<sup>[18]</sup>

La glucosa se almacena en los animales en forma de glucógeno, este se encuentra mayormente en las células de los músculos y el hígado. El glucógeno es un polisacárido simple (más de 30.000 residuos de glucosa), su almacenamiento provee al organismo de energía en tiempos de necesidad (ayuno o situaciones de huida o lucha)<sup>[15]</sup> (Figura 2).



**Figura 2.** Mecanismo de regulación de la glucosa en el organismo. [15]

### 1.7 La Glucogenólisis.

La glucogenólisis consiste en la degradación intracelular del glucógeno a unidades monoméricas de glucosa, las enzimas que se requieren son similares en el músculo y en el hígado, pero la vía tiene diferentes rutas en estos dos sitios.

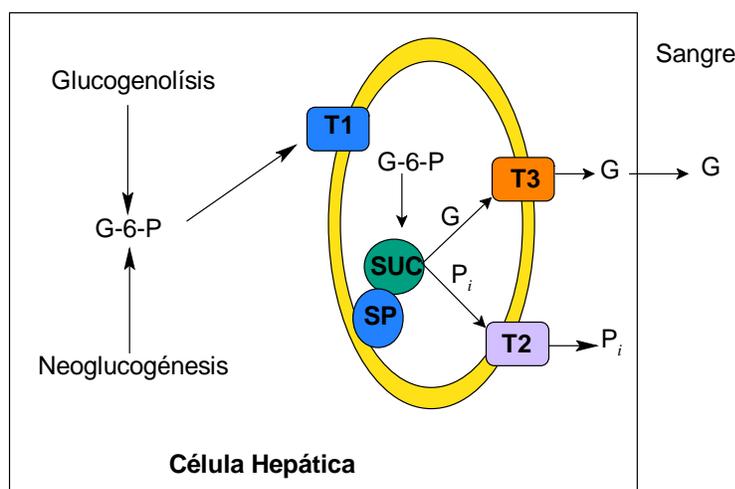
En el tejido muscular, la degradación del glucógeno lleva a la formación de glucosa 6-fosfato (G-6-P) que se metaboliza por la vía de la glucólisis. En el hígado, el producto final de la glucogenólisis es la glucosa, que es llevada al torrente sanguíneo y tomada por las células (cerebro, células rojas de la sangre y los adipocitos). [15]

### 1.8 La Gluconeogénesis.

Es la formación de glúcidos o carbohidratos a partir de precursores no glucídicos, de los cuales los más importantes son: piruvato, lactato y alanina. Este proceso permite proveer de glucosa a los tejidos, cuando el glucógeno almacenado por el hígado disminuye (ayuno). La enzima final necesaria para la gluconeogénesis es la glucosa-6-fosfatasa. <sup>[15]</sup>

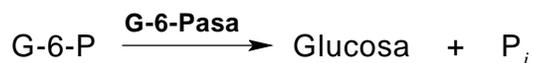
### 1.9 Glucosa-6-fosfatasa: (E.C.3.1.3.9).

La glucosa-6-fosfatasa (G-6-Pasa) es una enzima multifuncional embebida dentro de la membrana del retículo endoplasmático. Burchell y Waddel, en 1991, describen a la G-6-Pasa como un sistema multicomponente, formado por 5 polipéptidos: la subunidad catalítica (SUC), una proteína estabilizadora (PE) y tres proteínas transportadoras: T1 que transporta G-6-P hacia el lumen del retículo endoplasmático, T2 y T3 las cuales transportan, hacia el citosol, los productos de hidrólisis fosfato inorgánico (Pi) y glucosa (G) respectivamente, <sup>[19]</sup> (Figura 3).



**Figura 3.** Relación estructura-función del sistema Glucosa-6-Fosfatasa. <sup>[19]</sup>

Esta enzima cataliza la reacción final de la gluconeogénesis, así como la glucogenólisis, procesos que tienen en común la formación de glucosa y fosfato inorgánico a partir de glucosa-6-fosfato.

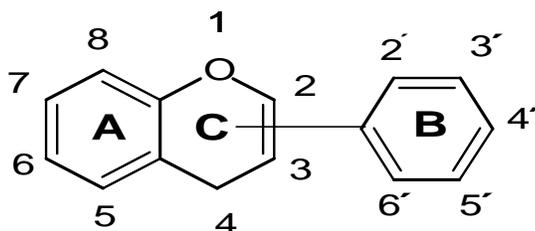


Las alteraciones en este sistema (G-6-Pasa) tan delicadamente complejo, produciría una complicación en el metabolismo de la glucosa, originando una dolencia con características de epidemia, como lo es la Diabetes.

Estudios realizados por McComarck y col. (2001) proponen a la enzima G-6-Pasa y sus transportadores T1, T2 y T3, como posibles blancos terapéuticos para fármacos que reduzcan la hiperglucemia del paciente diabético.<sup>[20]</sup>

## 2 Los Flavonoides

Todos los flavonoides son difenilpropanos polifenólicos que presentan una amplia distribución en el reino vegetal, encontrándose frecuentemente en forma de glicósidos, siendo las estructuras benzo- $\gamma$ -pirano las más comunes, (Figura 4).<sup>[21]</sup>



**Figura 4.** Estructura básica de los flavonoides.

En la Figura 4, podemos ver que la estructura básica más común de los flavonoides, está constituida por tres anillos, denominados A, B y C. Para enumerar

el sistema se usa números ordinarios (del 1 al 8) para los anillos A y C y números primos (desde el 1' al 6') para el anillo B.

La proporción de oxigenación varía y puede estar como hidroxilo (-OH), metoxi (-OCH<sub>3</sub>), metilendioxi (-OCH<sub>2</sub>O-) ó formando glicósidos de: glucosa, ramnosa, xilosa, galactosa y/o arabinosa, entre otros, aunque pueden encontrarse también, como agliconas. La hidroxilación en los anillos aromáticos es muy frecuente en las posiciones 7 y 4', frecuente en 5 y 3', a veces en 8 y 5' y escasa en 6 y 2'.<sup>[22]</sup>

Los flavonoides son producidos por una ruta biosintética mixta<sup>[23]</sup> que comprende la glicólisis de la glucosa para producir malonil coenzima A (vía acetato-malonato) y cumaroil coenzima A (vía shikimato) donde la enzima fenilalanina amonio liasa es la primera enzima clave en la biosíntesis de los fenilpropanoides.<sup>[24]</sup> es decir, el anillo A de los flavonoides proviene de la cadena del policétido vía acetato-malonato, el anillo B es obtenido a través del ácido shikímico, y los tres átomos de carbono que unen a los anillos A y B provienen del fenilpropano a través del ácido corísmico, es por ello que a los flavonoides se le conocen como unidades C<sub>15</sub>, representados como C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, Figura 5.<sup>[25]</sup>

La acción de la enzima chalcona sintasa sobre el policético (precursor flavonoidal) origina los primeros flavonoides denominados chalconas y son considerados como el precursor<sup>[4]</sup> de una amplia variedad de núcleos flavonoidales, Figura 5. Las chalconas son cicladas, a través de la enzima chalcona isomerasa, para obtener las flavanonas, éstas son flavonoides del tipo benzo- $\gamma$ -pirano y representan a la mayoría de los flavonoides con un tercer anillo denominado anillo C, cuyo grado de oxidación clasifica a los flavonoides en: Flavonas, Flavanonas, Flavonoles, Flavanonoles (Dihidroflavonoles), Antocianinas y antocianidinas, Auronas, Isoflavonas y Neoflavonoides (surgen de una modificación de la estructura base).

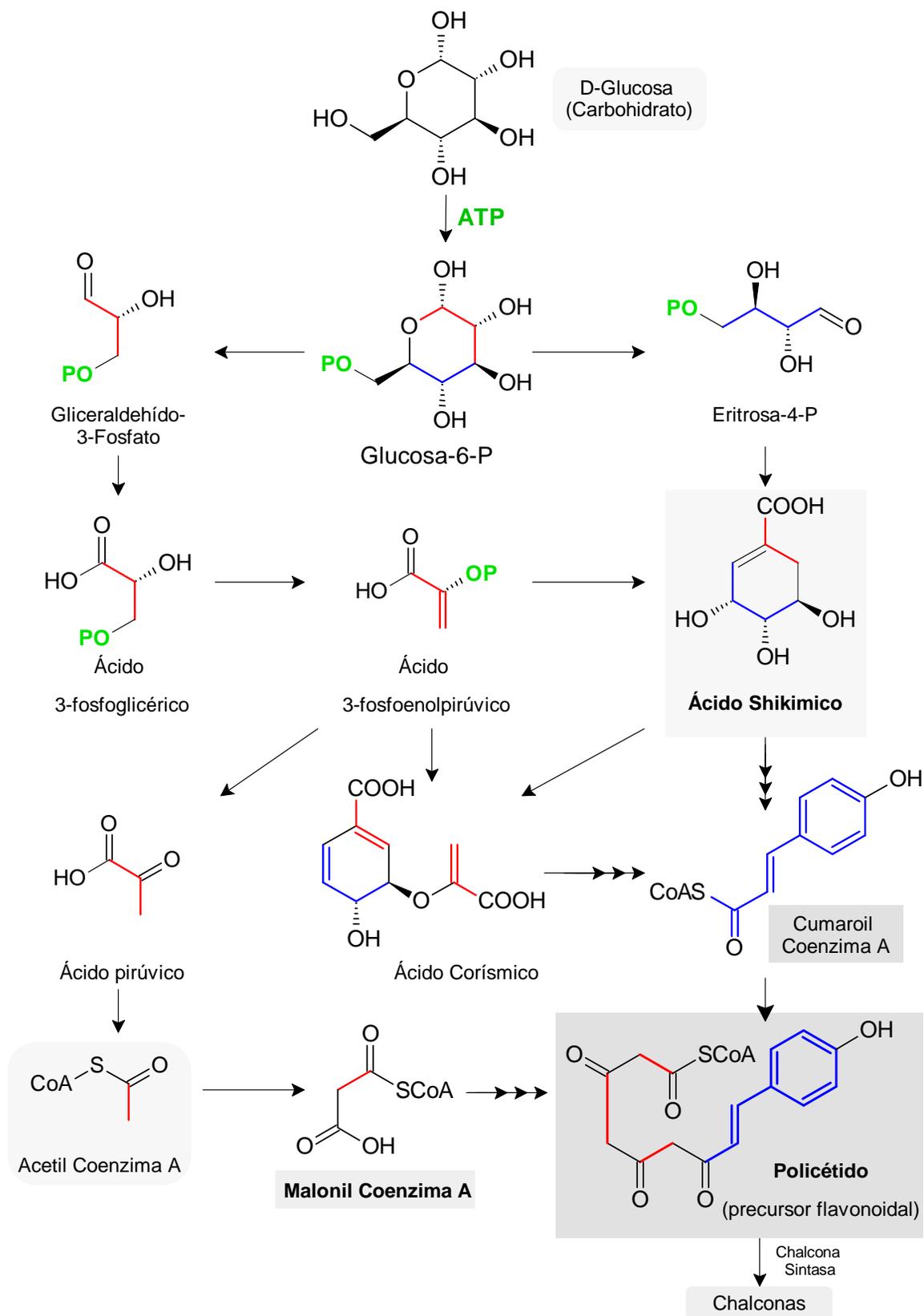


Figura 5. Biosíntesis de Flavonoides.<sup>[4]</sup>

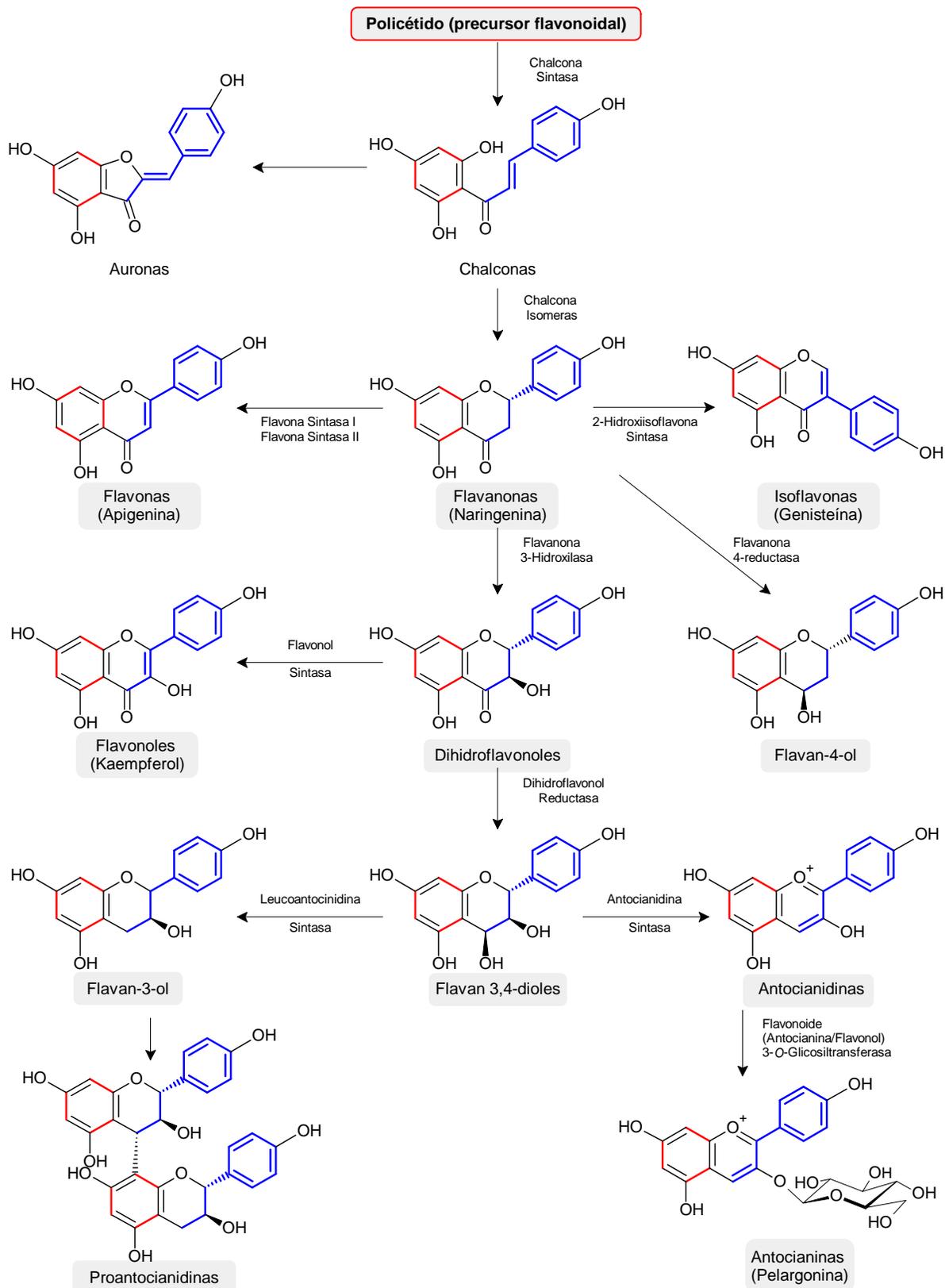
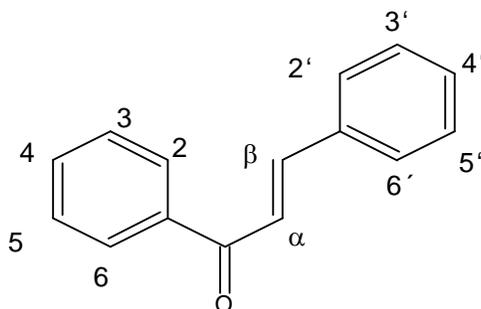


Figura 5 (continuación). Biosíntesis de los Flavonoides.<sup>[4]</sup>

Los flavonoides constituyen un grupo de sustancias químicas, con una actividad farmacéutica interesante relacionada en muchos casos a su actividad antioxidante, así como su baja toxicidad. Se ha demostrado que pueden inhibir la peroxidación lipídica, poseen efectos antimutagénicos, tienen capacidad de inhibir diversas enzimas (ej. la catecol O-metil transferasa, la histidina decarboxilasa, las fosfodiesterasas, entre otras). Además ejercen otras acciones, tales como: diurética, antiespasmódica, antidiabética, antitumoral, antimicrobiana, antiulcerosa gástrica, antiinflamatoria, entre otras.<sup>1</sup>

## 2.1 Chalconas.

Las chalconas están caracterizadas por su disposición en la estructura  $C_6(A)-CO-CH=CH-C_6(B)$ , donde tres carbonos alifáticos no participan en la formación de un anillo heterocíclico, siendo esta característica que los hace diferentes a otros tipos de flavonoides, (Figura 6).<sup>1</sup>

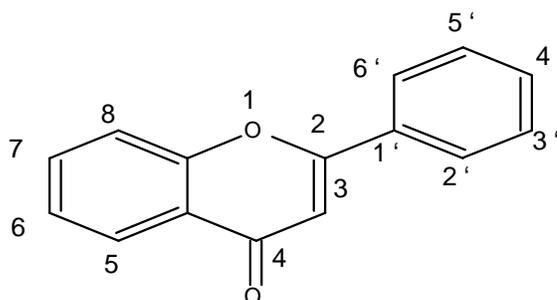


**Figura 6.** Estructura genérica de las chalconas y dihidrochalconas.

Los sustituyentes alquílicos frecuentemente reportados en núcleos del tipo chalcona son: metilo e isoprenilo, donde éste último puede formar ciclopiranos y/o ciclofuranos. Las dihidrochalconas son aún más escasas en la naturaleza, respecto de las chalconas, y se presentan también como derivados O- y C-prenilados y O-glicósidos en el anillo A.<sup>[22]</sup>

## 2.2 Flavonas.

Las flavonas presentan aromaticidad en el anillo C, poseen un grupo carbonilo en posición 4 y una insaturación entre las posiciones 2 y 3 del anillo C, (Figura 7). Tienen una distribución mucho más amplia que sus dihidroderivados (flavanonas) y su diversidad estructural está frecuentemente asociada a los sustituyentes glicosídicos y/o alquílicos.<sup>[22]</sup>

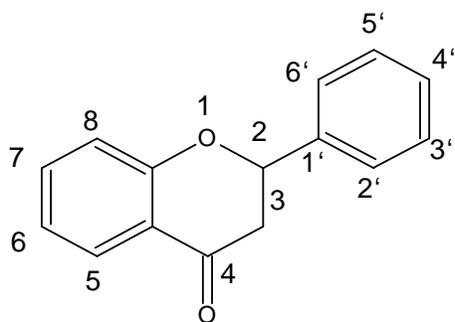


**Figura 7.** Estructura general de las flavonas

## 2.3 Flavanonas.

Las flavanonas, al igual que las flavonas y flavonoles son los flavonoides presentes en los cítricos. Se diferencian de las primeras, por no presentar insaturación en la posición 2 y 3 del anillo C y de los segundos, por la falta de grupo hidroxilo en la posición 3 del anillo C, (Figura 8).<sup>[22]</sup> Aunque las flavonas y los flavonoles se han encontrado en bajas concentraciones, han mostrado ser potentes antioxidantes, contribuyendo a la acción anticancerígena y cardioprotectora, entre otras. Estos compuestos tienen aplicación en la estabilización de los alimentos debido a su habilidad de protegerlos contra la peroxidación.<sup>[26]</sup>

En la mayoría del reino vegetal las flavanonas se encuentran en pequeñas cantidades. Sin embargo, son mayoritarias en los cítricos, presentándose como glucósidos, algunos de ellos responsables del sabor amargo de los cítricos y sus derivados.<sup>[1]</sup>

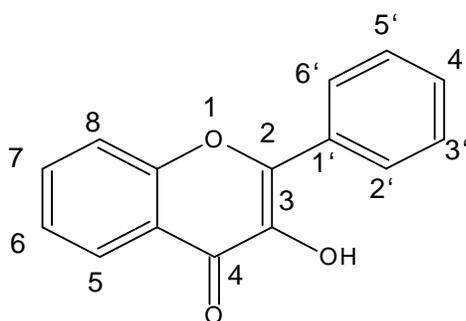


**Figura 8.** Estructura general de las flavanonas.

## 2.4 Flavonoles.

La sustitución del grupo hidroxilo en el carbono 3 del anillo C de las flavonas genera los flavonoles (Figura 9). En este grupo de polifenoles, algunos miembros destacan por su actividad anti-inflamatoria, antioxidante y antimicrobiana.<sup>[1]</sup>

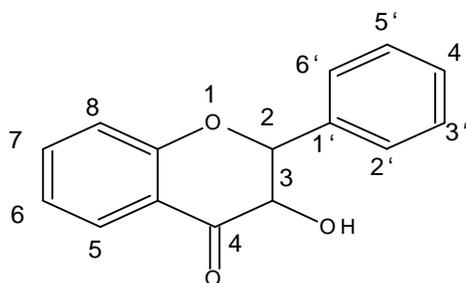
Estos compuestos se encuentran más frecuentemente en la naturaleza en comparación con otros flavonoides.<sup>[23]</sup>



**Figura 9.** Estructura general de los flavonoles.

## 2.5 Flavanonoles (Dihidroflavonoles).

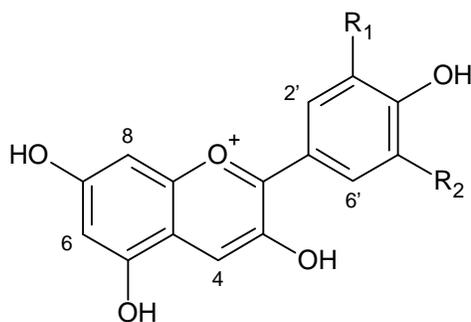
Los flavanonoles también son conocidos como 3-hidroxiflavanonas o dihidroflavonoles, (Figura 10).<sup>[22]</sup> Son menos frecuentes en la naturaleza que los flavonoles.<sup>[23]</sup>



**Figura 10.** Estructura general de los flavanonoles.

## 2.6 Antocianinas

Las antocianinas son derivados glicosilados de las antocianidinas en las cuales la cianidina ( $R_1=OH$ ,  $R_2=H$ ) y delphinidina ( $R_1=OH$ ,  $R_2=OH$ ) son más frecuentes.<sup>[27]</sup> Se diferencian del resto de los flavonoides por la ausencia del grupo carbonilo en la posición 4 y las insaturaciones en los carbonos 2 y 3 del anillo C, Figura 11. Se caracterizan por ser pigmentos coloridos (azul, púrpura, rojos de las flores), son altamente inestables en comparación a sus derivados glicosilados (antocianinas). Al igual que otros flavonoides, exhiben actividad antiinflamatoria, antitumoral y un fuerte potencial antioxidante.<sup>[23]</sup>



**Figura 11.** Estructura de las antocianinas.

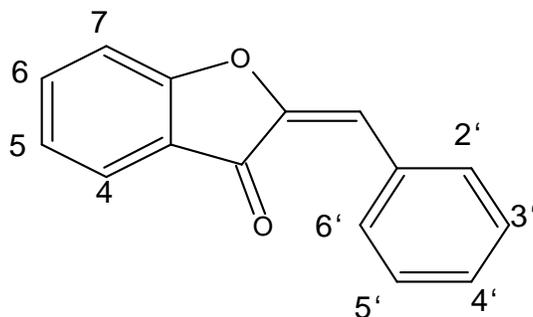
El color de las antocianinas depende del número y orientación de los grupos hidroxilos y metoxilos presentes en la molécula (Tabla 1), incrementos en la hidroxilación producen desplazamientos hacia tonalidades azules mientras que incrementos en las metoxilaciones producen coloraciones rojas. [27]

**Tabla 1.** Substitución de las antocianidinas máx. (nm).

Aglicona	Substitución		} máx (nm)	espectro visible
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>		
Pelargonidina	H	H	494	(naranja)
Cianidina	OH	H	506	(naranja-rojo)
Delfinidina	OH	OH	508	(azul-rojo)
Peonidina	OCH <sub>3</sub>	H	506	(naranja-rojo)
Petunidina	OCH <sub>3</sub>	OH	508	(azul-rojo)
Malvidina	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	510	(azul-rojo)

## 2.7 Auronas.

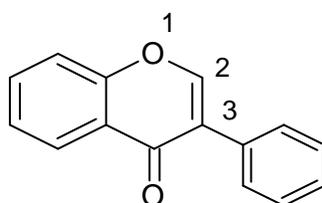
Se forman probablemente, a partir de las chalconas por ciclación oxidativa con el C-2. Son los pigmentos amarillos dorados que existen en ciertas flores, Figura 12. [22]



**Figura 12.** Estructura genérica de las auronas.

## 2.8 Isoflavonoides

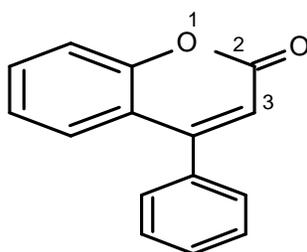
Los isoflavonoides son aquellos en los cuales, el anillo B se une al C-3 en lugar del C-2, por lo que el esqueleto cambia (Figura 13). Junto con algunos flavonoides, estilbenos y lignanos, ciertos isoflavonoides forman parte del grupo de fitoestrógenos, compuestos de origen vegetal con actividad estrogénica. Diversos efectos farmacológicos de los isoflavonoides han sido explorados por su potencial uso como inmunomoduladores. [28]



**Figura 13.** Estructura de los Isoflavonoides

## 2.9 Neoflavonoides

Los neoflavonoides se forman por la migración del anillo bencénico B al C-4 y el grupo carbonilo al C-2, Figura 14. Poseen una menor capacidad antioxidante con respecto al resto de los flavonoides. [22]



**Figura 14.** Estructura de los Neoflavonoides

### 3 Hesperidina y Naringina.

La hesperidina es una flavanona glicosilada conformada estructuralmente por la flavanona (2S)-hesperetina y rutinósido (ramnosilglucósido). También se designa como (2S)-7-[[6-O-(6-desoxi- $\alpha$ -L-manopiranosil)- $\beta$ -D-glucopiranosil]oxi]-2,3-dihidro-5-hidroxi-2-(3-hidroxi-4-metoxifenil)-4H-1-benzopiran-4-ona, Figura 15.<sup>[29]</sup>

Este flavanoide se encuentra principalmente en frutas cítricas tales como el limón y las naranjas. La hesperidina y la hesperetina reducen la permeabilidad capilar y son antiinflamatorios.<sup>[30]</sup>

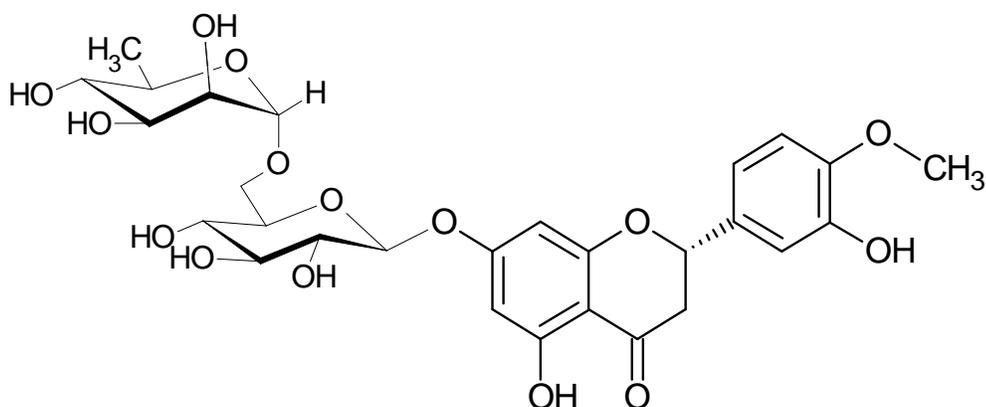
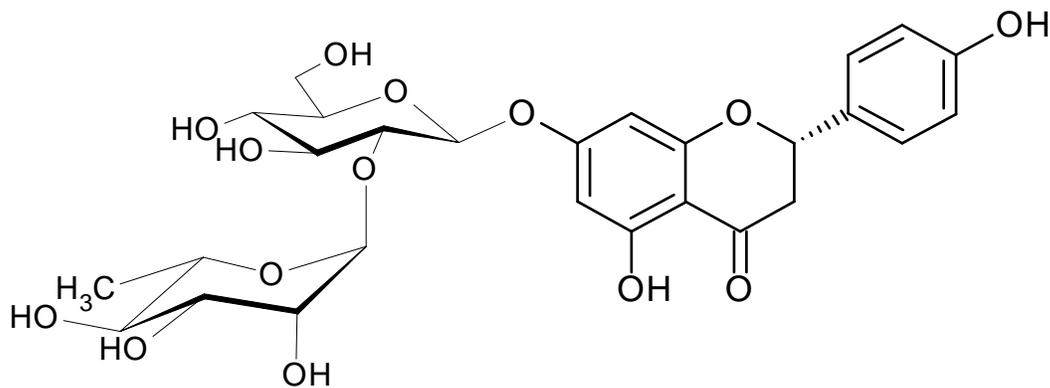


Figura 15. Estructura de la Hesperidina

La Naringina (4',5,7-trihidroxi-flavanona 7-ramnoglucosida) es una flavanona glicosilada (Figura 16) que se extrae de la cáscara de algunos citrus (*Citrus paradisi*, *Citrus aurantium*) y es la principal responsable de su sabor amargo. También está presente en la pulpa de los frutos, hojas, flores y semillas de la planta.<sup>[31]</sup>

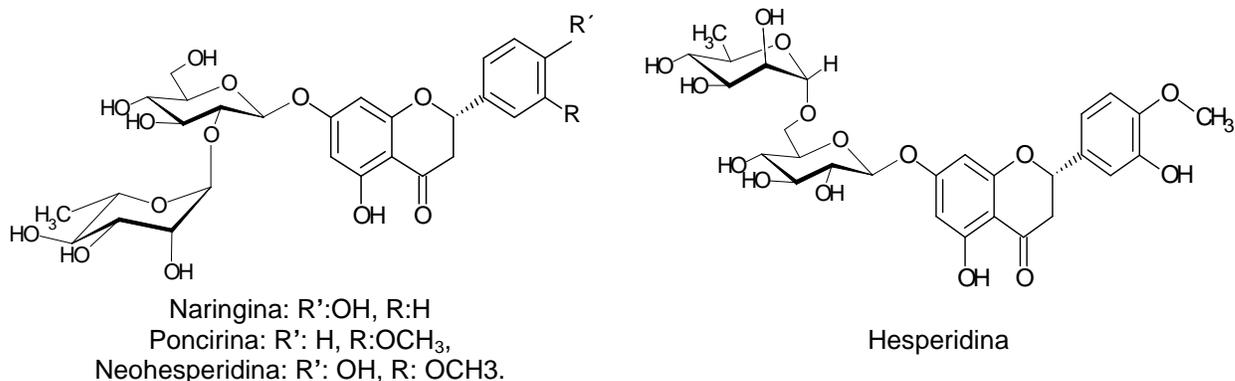
Usada en perfumería y para dar sabor a golosinas, bebidas y productos de panadería, actualmente, su estudio sigue vigente por su propiedad antioxidante como estabilizante de aceites y como derivado dihidrochalcona correspondiente, la cual por su importante capacidad endulzante y su aplicación potencial como edulcorante. [30]



**Figura 16.** Estructura de la Naringina.

### 3.1 Antecedentes.

**Horowitz y Gentili (1963)**, [32] estudiaron el alto contenido de flavanonas glicosiladas (naringina, poncirina, neohesperidina y hesperidina) presentes en los cítricos, principalmente en la piel de las frutas. La naringina y poncirina son muy amargas (toronja), mientras que la neohesperidina es un poco amarga (naranja). La hesperidina, presente en los cítricos (limón y naranjas dulces), no es amarga. La fracción glicosilada de las flavanonas, están conformadas por la ramnosa y glucosa, respectivamente. Estos disacáridos presentan dos formas isoméricas, rutinosa o neohesperidosido. Estos investigadores concluyeron que las flavanonas cítricas que contienen neohesperidósido son amargas, mientras las que contienen la fracción rutinosa son insípidas (Tabla 2). [32]



**Tabla 2.** Propiedad relativa de la amargura de algunos compuestos.\*[32]

Flavanona	Concentración (M)	Relación
Floracetofenona 4'-neohesperidósido	$1 \times 10^{-3}$	1
Neohesperidina	$5 \times 10^{-4}$	2
Naringina	$5 \times 10^{-5}$	20
Poncirina	$5 \times 10^{-5}$	20

\* Hesperidina no fue amarga a  $2 \times 10^{-2}$  M

**Horowitz y Gentili (1969)**,<sup>[13]</sup> continuaron sus investigaciones respecto a la fracción glicosilada presente en las flavanonas y su relación con el sabor amargo o insípido de las frutas cítricas, realizando modificaciones en sitios específicos de las flavanonas neohesperidosidas obteniendo productos que presentaban sabores amargo, dulce amargo, dulce o insípido. Estas modificaciones fueron:

- Remoción de grandes fragmentos de la molécula (una o ambas azúcares o del anillo B)
- Conversión de la flavanona en otros tipos de flavanoides y
- Cambios en los grupos sustituyentes.

Particularmente interesante fue en la obtención de la dihidrochalcona neohesperidósida, la cual mostro una intensa dulzura (Tabla 3). En experimentos con animales de laboratorio (ratas), mostro baja o ninguna toxicidad, siendo interesante su estudio como edulcorante.

**Tabla 3.** Sabor y dulzura relativa de neohesperidósidas DHC y Sacarina sódica.<sup>[13]</sup>

Compuesto	Sabor	Concentración (M)	Dulzura relativa	
			Molar	Peso
Naringina DHC	Dulce	$2 \times 10^{-4}$	1	0.4
Neohesperidina DHC	Dulce	$1 \times 10^{-5}$	20	7
Neoeriocitrina DHC	Parcialmente dulce	...	...	...
Poncirina DHC	Parcialmente amarga	...	...	...
Sacarina sódica	Dulce	$2 \times 10^{-4}$	1	1

**Cedeño (2008)**,<sup>[33]</sup> realizó la modificación estructural de los flavonoides naringina y hesperidina, obteniendo los productos hesperetin-7-glucosa, flavona y chalcona de la hesperidina y chalcona, aurona y flavona de naringina, respectivamente. Estos productos fueron evaluados por su actividad biológica sobre la enzima G-6-Pasa, donde la chalcona (*cis*), aurona y flavona de naringina y la hesperetin-7-glucosa, mostraron un mayor porcentaje de inhibición, indicando un efecto mayor sobre el transportador T1 que sobre la subunidad catalítica (Tabla 4).

**Tabla 4.** Porcentaje de inhibición de hesperidina, naringina y sus derivados sobre la G-6-Pasa.<sup>[33]</sup>

Compuesto	% Inhibición en microsomas	
	(%)	
	Intactos (-H)	Rotos (+H)
Hesperidina	19.9	32.6
Naringina	18.2	18
Hesperetin-7-glucosa	51.8	27.8
Hesperidin <i>trans</i> -chalcona	4.2	24.2
Naringina <i>trans</i> -chalcona	14.3	5.6
Hesperidina flavona	33.6	31.5
Naringina flavona	56.4	35.4
Naringina <i>cis</i> -chalcona	79.3	48.9
Naringina aurona	60.2	36.9

#### **4 Justificación**

Tomando en cuenta la actividad antihiper glucemiante de los flavonoides, en especial de la floricina y el sabor dulce de las dihidrochalconas, se planteó el estudio de los derivados de hesperidina y naringina sobre el sistema glucosa-6-fosfatasa (G-6-Pasa), esta enzima cataliza los pasos finales de la gluconeogénesis y glucogenólisis, por conversión de glucosa-6-fosfato (G-6-P) a glucosa, contribuyendo al aumento de ésta en la sangre del individuo (hiperglicemia), por lo tanto su inhibición disminuiría su actividad, constituyendo un enfoque potencial para el tratamiento de la diabetes.

## 5 Objetivos

### 5.1 Objetivos Generales

- Sintetizar derivados de los flavonoides hesperidina y naringina con posible propiedad hipoglucemiante.

### 5.2 Objetivos Específicos

- Obtener mediante hidrólisis ácida la aglicona de las flavanonas de hesperidina y naringina.
- Obtener mediante la hidrólisis básica la chalcona de las flavanonas de hesperidina y naringina.
- Obtener mediante la bromación y deshidrobromación la flavona partiendo de la flavanonas hesperidina y naringina.
- Obtener mediante la hidrogenación catalítica la floracetofenona ramnoglucósida (producto de degradación) de la chalcona de naringina.
- Caracterizar e identificar los compuestos sintetizados mediante métodos espectroscópicos de RMN-<sup>1</sup>H, RMN-<sup>13</sup>C y DEPT-135
- Determinar la actividad biológica de los compuestos sintetizados mediante bioensayos sobre la enzima glucosa-6-fosfatasa (G-6-Pasa).



---

## 6 Metodología Experimental

### 6.1 Solventes y reactivos.

#### **Solventes**

Acetato de etilo  
Acetona  
Acetonitrilo P.A.  
Ácido acético P.A.  
Ácido clorhídrico P.A.  
Ácido fórmico P.A.  
Ácido sulfúrico P.A.  
Alcohol Isoamílico  
Anhídrido Acético P.A.  
Agua destilada  
Butanol P.A.  
Cloroformo P.A  
Diclorometano (P.A y destilado)  
Dimetilsulfóxido P.A.  
Etanol  
Etilenglicol-monoetiléter  
Hexano P.A.  
Metanol (P.A. y destilado).  
Piridina P.A  
Tolueno (P.A. y destilado)

#### **Reactivos**

Anisaldehído.  
Hesperidina aprox. 80%  
Hidróxido de potasio.  
Hidróxido de sodio.  
Naringina 95% HPLC  
N-bromosuccinamida  
Óxido de Selenio (II)  
Paladio 10% sobre carbono activo  
Peróxido de Benzoilo  
Sílica gel.  
Sulfato cérico  
Peróxido de Hidrógeno 10%  
Yodo.  
Resina de intercambio iónico Dowex 50W  
Dimetilsulfóxido deuterado  
Metanol deuterado

#### Métodos cromatográficos.

Se utilizaron placas analíticas de sílica gel 60; 0,25 mm con indicador de fluorescencia UV<sub>254</sub>. Los sistemas de desarrollo empleados requirieron las siguientes mezclas:

**AN-2:** AcOEt-MeOH-H<sub>2</sub>O (100:13,5:10; v/v/v)

**AN-6:** Hexano-AcOEt-HCO<sub>2</sub>H (75:25:1; v/v/v)

**L-1:** AcOEt-AcOH-HCO<sub>2</sub>H-H<sub>2</sub>O (100:10:10:10; v/v/v/v)

Empleando como reveladores anisaldehído en ácido sulfúrico (AS) y vapores de yodo, I<sub>2(s)</sub>.

Para la preparación del revelador (AS), se mezclan 0,5 mL de anisaldehído con 10 mL de ácido acético glacial, a continuación se agregan 85 mL metanol y 5 mL de ácido sulfúrico concentrado, todo en ese orden.

La placa de TLC es rociada con este revelador, luego es calentada a 100 °C por uno o dos minutos y evaluada en el visible o UV-365 nm.

## 6.2 Reactivos para ensayos biológicos.

Ácido ascórbico	Glucosa-6-fosfato
Ácido sulfúrico	HEPES
Albumina bovina	Heptamolibdato de amonio
Carbonato de sodio	Hidróxido de sodio
Cloruro de sodio	Histona II-A.
Cloruro de magnesio	Kit para la determinación enzimática de glucosa (Glucosa oxidasa, Peroxidasa, Antipirina y Fenol).
Dimetilsulfóxido	Sacarosa
Dodecilsulfato de sodio	Sulfato Cúprico
EDTA.	Tartrato de sodio y potasio
Floricina	
Folin Ciocalteus	
Fosfato diácido de potasio	

### 6.3 Instrumentación.

- ✓ Balanza Denver Instrumental Company, modelo AA-200
- ✓ Cava Ultra-low regulable
- ✓ Centrífuga Survall Instruments (Duport). Modelo RC5C. Rotor SS34.
- ✓ Equipo infrarrojo, modelo Espectrómetro IR 200
- ✓ Fusiómetro de marca SYBRON-Thermolyne, modelo MP-12615
- ✓ Equipo de resonancia magnética nuclear, marca JEOL, modelo Eclipse 270: campo de aplicación 270 MHz para  $^1\text{H}$  y 67,5 MHz para  $^{13}\text{C}$ .
- ✓ Cromatografo HPLC-Dionex, modelo UltiMate<sup>R</sup>3000
- ✓ Espectrómetro de absorción molecular (UV), marca THERMO electrón, modelo Nicolet evolution 300
- ✓ Espectrofotómetro Pharmacia, modelo Novaspec II
- ✓ Lámpara de Xenón de UV; marca UVP, modelo UVGL-25, = 254 y 365nm
- ✓ pHmetro
- ✓ Rotavapor modelo RE 200 de marca Yamato con baño de agua modelo BM 100
- ✓ Ultracentrífuga Beckman; modelo L5-75B; rotor 30 de titanio

#### 6.4 Bioensayos sobre la enzima Glucosa-6-fosfatasa.

La enzima glucosa-6-fosfatasa (G-6-Pasa) cataliza el paso final de los procesos de la gluconeogénesis y glucogenólisis, produciendo glucosa y fosfato inorgánico (Pi), al torrente sanguíneo a partir de la glucosa-6-fosfato (G-6-P).

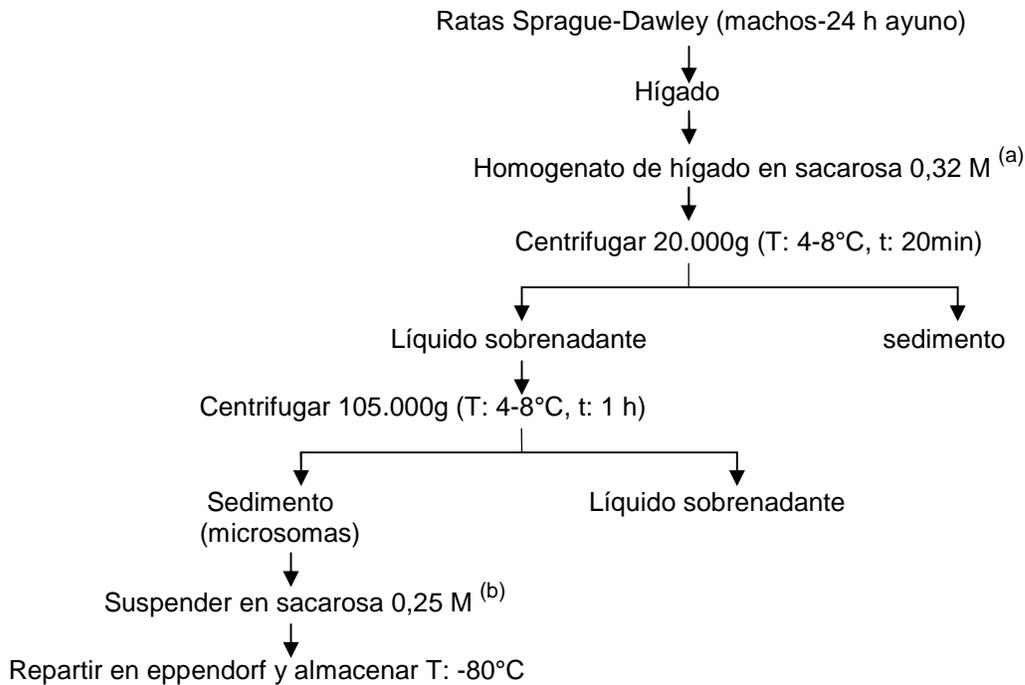


El seguimiento de la reacción se realiza mediante la desaparición del sustrato G-6-P o la formación de los productos (glucosa o Pi). Siendo el fosfato inorgánico (Pi) utilizado en este trabajo el cual, en medio ácido y heptamolibdato de amonio  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ , forman un complejo azul, con absorbancia a 820 nm.<sup>[34]</sup>

Para determinar el sitio de acción del inhibidor sobre la enzima (transportadores o subunidad catalítica), se utilizan tanto microsomas intactos como rotos; los primeros son vesículas en las cuales la membrana limitante actúa como una barrera de permeabilidad selectiva, mientras que los segundos carecen de esta selectividad y el sustrato tiene libre acceso a la subunidad catalítica. Los microsomas rotos se obtienen por la incorporación de histonas, que son proteínas básicas que rompen la integridad de las estructuras microsomales, Figura 3.

#### 6.4.1 Obtención de microsomas hepáticos.

Para la preparación de los microsomas, fuente de la enzima (G-6-Pasa), se basó en el procedimiento descrito por Marcucci *et al.*, (1983) <sup>[35]</sup> el cual se describe en el siguiente esquema:



**(a)** Sacarosa 0,32 M; MgCl<sub>2</sub> 3 mM

**(b)** Sacarosa 0,25 M; HEPES 5 mM; MgCl<sub>2</sub> 1 mM pH: 6,5

**Esquema 1.** Procedimiento para la obtención de los microsomas. <sup>[35]</sup>

#### 6.4.2 Determinación de la actividad sobre la Glucosa-6-Pasa.

Se utilizó como sustrato G-6-P 5 mM, tanto con histonas (+H) como sin ellas (-H). En la Tabla 5, se muestran los reactivos y cantidades necesarias para su preparación.

**Tabla 5.** Preparación de los sustratos.

Sustrato	G-6-P	EDTA	HEPES	H <sub>2</sub> O (μL)	Histonas (μL)	Vt (mL)
	100 mM (μL) pH 6,5	0,1 M (μL) pH 6,5	1 M (μL) pH 6,5			
-H	250	100	80	1570	-	2
+H	250	100	80	1370	200	2

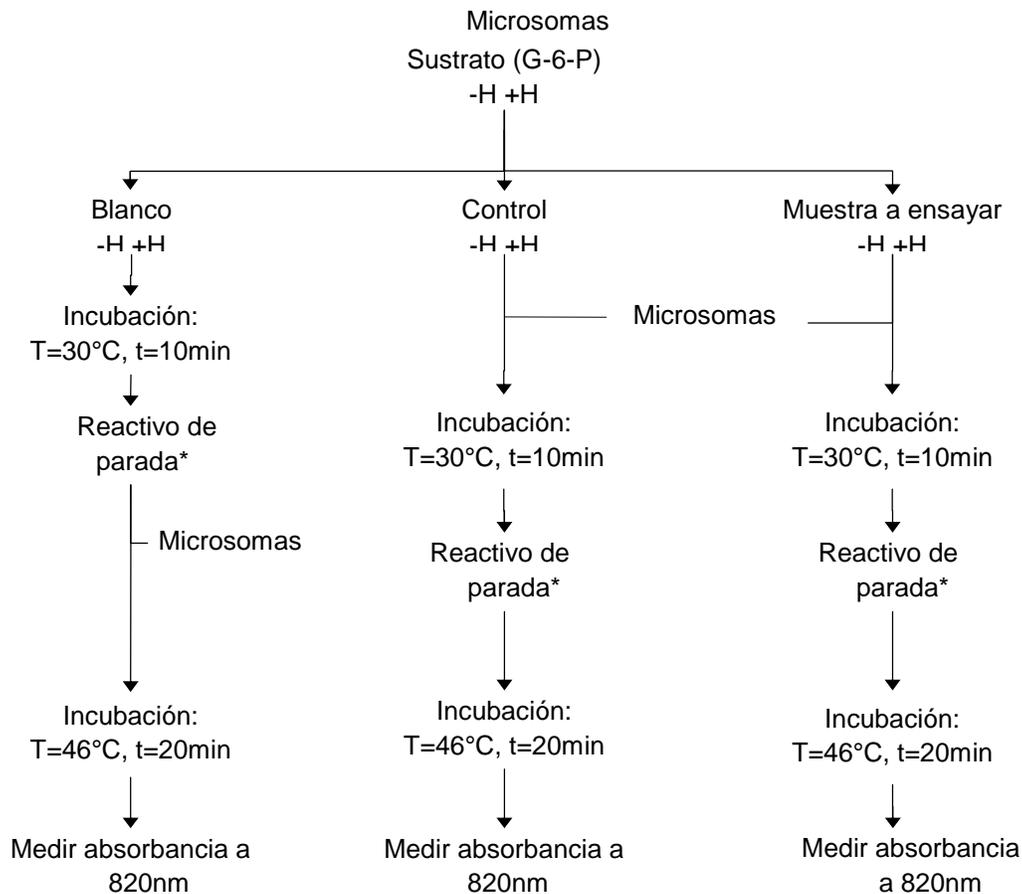
Para determinar la actividad de los extractos y compuestos purificados sobre la enzima G-6-Pasa se empleó la metodología descrita por Burchell *et al.*,<sup>[34]</sup> Esquema 2. A continuación se describe brevemente la metodología seguida para el ensayo de G-6-Pasa:

- a) Se utilizaron cuatro tubos de ensayo para cada compuesto a ensayar (blanco y triplicados), tanto con histonas (+H) como sin ellas (-H).
- b) Para los ensayos control se colocó en cada tubo 40 μL de sustrato más 40 μL de agua (o del solvente en que fue disuelto el compuesto a ensayar). Para los ensayos con la fracción o el compuesto a analizar, se añadió 40 μL de la solución problema o del compuesto a probar a la concentración deseada en lugar de agua.
- c) Los microsomas fueron diluidos hasta una concentración final de 1 mg de proteína/mL, en sacarosa (0,25 M); HEPES (5 mM); MgCl<sub>2</sub> (1 mM) y pH =6,5.
- d) Se colocaron los tubos en un baño de temperatura controlada a 30°C.
- e) Se adicionaron 20 μL de los microsomas a los triplicados y se incubó por 10 min, manteniendo la T (30 °C).
- f) La reacción se detuvo, tubo por tubo, en el orden e intervalo de tiempo en que se colocaron los microsomas, añadiendo 0,9 mL del reactivo de parada,

incluyendo a los blancos. Por último, se añadió 20 µL de los microsomas a los blancos.

- g) Se incubaron por 20 min., en un baño de temperatura controlada a 46 °C.
- h) Se determinó la absorbancia a una longitud de onda de 820 nm.
- i) La actividad enzimática se expresó en µmoles de Pi/min./mg de proteína.

Para determinar la cantidad de fosfato liberado en la reacción se realizó una curva de calibración con un rango de concentración de 0 a 75 nmol de Pi tomando alícuotas correspondientes de una solución madre de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1 mM en un volumen final de 100 µL.



-H: sin histonas;+H: con histonas

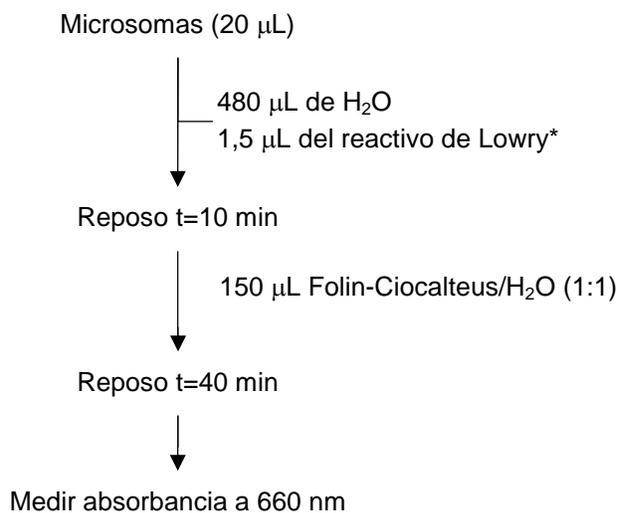
\*Reactivo de parada:  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$  0,42% en  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,5M: SDS 5%: Acido Ascórbico 10% en una proporción de 6:2:1.

**Esquema 2.** Ensayo general de inhibición sobre la enzima G-6-Pasa.<sup>[34]</sup>

### 6.4.3 Determinación de Proteínas.

La cantidad de proteínas se determinó siguiendo el procedimiento de Lowry *et al.*,<sup>[36]</sup> modificado por Markwell *et al.*,<sup>[37]</sup> que combina la reacción de Biuret basada en la unión de los enlaces peptídicos de las proteínas con los iones de cobre en medio alcalino y la reducción del reactivo de Folin-Ciocalteus por los residuos de tirosina y triptófano de las proteínas, esta reacción intensifica el color del complejo cobre-proteína.<sup>[38]</sup>

En la determinación de la concentración de proteínas presentes en cada ensayo se elaboró una curva de calibración con un rango de concentración entre 25 y 100 µg/mL en un volumen final de 500 µL. La cantidad de proteínas se estimó en base a una curva de calibración usando albúmina como proteína patrón de acuerdo con el Esquema 3.



\*Reactivo de Lowry: A+B (100:1)

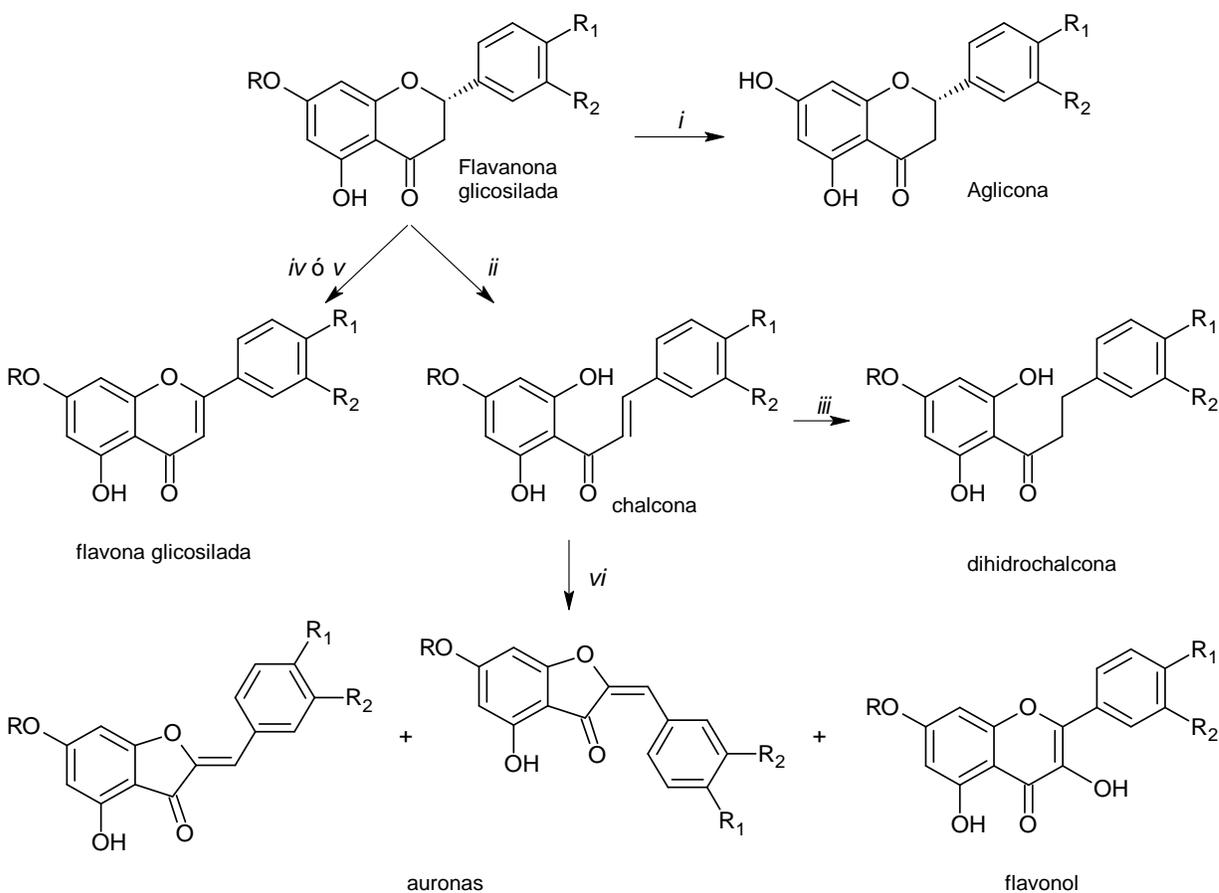
A = Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2%, NaOH 0,4%, KNaC<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>6</sub> 0,16%, SDS 1%.

B = CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 4%.

**Esquema 3.** Procedimiento para la determinación de proteínas. <sup>[37]</sup>

## 7 Procedimientos para la síntesis de los derivados de los flavonoides hesperidina y naringina.

El siguiente esquema de reacciones químicas, fue utilizado para la preparación y obtención de los derivados de los flavonoides hesperidina y naringina, respectivamente.



R=ramnosil (1-2)glucósido  $R_1=H$   $R_2=OH$ , naringina

R=ramnosil (1-6)glucósido  $R_1=OH$   $R_2=OMe$ , hesperidina

**Esquema 4.** Modificación estructural propuesta para los flavonoides hesperidina y naringina.

i) a)  $H_2SO_4$ /etilenglicolmonoetil éter, 6h (T: 80-90 °C) ó b)  $H_2SO_4$ /EtOH 6h, T: 90°C; ii)  $NaOH_{(ac, 20\%)}$ , 6h a  $T_{amb}$ ; iii)  $H_2/Pd_{10\%-C}/MeOH$ , 6h, 40 psi a  $T_{amb}$ ; iv) a) Piridina y anhídrido acético, 4 días a  $T_{amb}$ ; b) NBS,  $CHCl_3$ , peróxido de benzoilo, 4h, T 60°C; v) a) Piridina, anhídrido acético, 6 h, (T: 95-100°C); b)  $SeO_2$ , alcohol *iso*-amílico, 24 h, 110 °C; vi)  $H_2O_2_{(ac, 15\%)}/NaOH_{(ac, 16\%)}/MeOH$ .

## 7.1 Derivados de la Hesperidina y Naringina.

### 7.1.1 Procedimiento para la Hidrólisis Ácida de Hesperidina y Naringina (obtención de la Aglicona).<sup>[39],[40],[41]</sup>

Un equivalente de la flavanona glicosilada (H ó N), se disolvió en 20 mL solvente (Etilenglicol monoetil éter (EtEG) y/o Etanol (EtOH)). Seguidamente, se agregó ácido sulfúrico concentrado ( $H_2SO_{4(C)}$ , 1-5 mL) y la mezcla de reacción se mantuvo en agitación constante por 6 horas a una temperatura (T) entre 80-90 °C. Posteriormente, se agregó agua destilada al medio de reacción para precipitar la aglicona correspondiente. El producto se filtró por succión y se recristalizó de EtOH y se almacenó en un desecador. Con ambos sustratos, el porcentaje de rendimiento fue similar, reproducible y satisfactorio: hesperetina (Hp) (75-83 %) y naringenina (Ng) 75-85 %.

### 7.1.2 Procedimiento para la Hidrólisis Básica de Hesperidina y Naringina (obtención de la Chalcona)<sup>[42], [43], [44]</sup>

Se disolvió un equivalente de la flavanona glicosilada (H ó N) en una solución acuosa de hidróxido de sodio ( $NaOH_{(ac, 20\%)}$ , 20 mL) y se mantuvo en agitación constante a temperatura ambiente ( $T_{amb}$ ) durante 6 horas. Luego, se enfrió la solución (0 °C) y se neutralizó con ácido clorhídrico concentrado ( $HCl_{(C)}$ , frío). Seguidamente, la solución neutra fue enfriada para precipitar la chalcona correspondiente. El precipitado fue filtrado por succión en frío y lavado con agua fría. Posteriormente, el precipitado fue recristalizado de agua y almacenado en desecador.

### 7.1.3 Procedimiento para la obtención de la Dihidrochalcona de Hesperidina y Naringina<sup>[42],[43],[44]</sup>

Se disolvió en EtOH (25 mL) un equivalente (1 eq) de la chalcona de hesperidina (CH-H) o naringina (CH-N) y se adicionó el catalizador paladio sobre carbón activado (Pd<sub>10%</sub>/C, 0.1eq), esta solución fue tratada con H<sub>2(g)</sub> a una presión de 40-50 psi a T<sub>amb</sub> durante 2 h. El proceso de hidrogenación catalítica fue repetido tres veces, con lo cual el tiempo total de hidrogenación fue de 6 h. Transcurrido el tiempo, la solución se filtró a través de celita 545 y lavado con EtOH. Posteriormente, el filtrado fue acidificado con HCl<sub>(C)</sub> (pH 3) y finalmente fue enfriada a 0 °C durante 24 h. El precipitado fue filtrado por succión en frío recristalizado de agua y almacenado en desecador.

### 7.1.4 Procedimiento para la obtención de la Flavona de Hesperidina y Naringina. [44], [45], [46]

Se ensayaron dos procedimientos, los cuales son descritos a continuación:

a) Se hizo reaccionar un equivalente (1 eq) de la flavanona glicosilada (H ó N) con anhídrido acético (152 eq) en presencia de piridina (36 eq) a T<sub>amb</sub> durante 4 días mediante agitación constante. Luego, se adicionó agua destilada al medio de reacción para precipitar el producto acetilado, el cual fue filtrado y lavado con agua. El producto acetilado y seco fue disuelto en cloroformo (15-20 mL) y se agregó peróxido de benzoilo (0.1 eq). Seguidamente y mediante agitación continua se adicionó *N*-Bromosuccinamida (1,5 eq) disuelta en cloroformo (15 a 20 mL). El medio de reacción se mantuvo a 60 °C durante 4 horas. Posteriormente, se dejó evaporar el solvente a temperatura ambiente y el residuo viscoso resultante fue disuelto en EtOH (30 mL) y basificado con NaOH<sub>(ac, 15%)</sub> (11 mL). La solución alcalina fue calentada cerca de la ebullición durante 5 minutos, enfriada y neutralizada con H<sub>2</sub>SO<sub>4(C)</sub> (pH 6-7). Seguidamente, se adicionó EtOH para favorecer la precipitación de sales inorgánicas, las cuales fueron eliminadas por

centrifugación. El producto de reacción fue obtenido a partir de la solución hidroetanólica.

b) Las flavanonas hesperidina y naringina (1 eq) fueron acetiladas individualmente por tratamiento de las mismas con anhídrido acético (152 eq) y piridina (36 eq) durante 6 horas a T (95-100 °C). Seguidamente, la mezcla de reacción fue llevada a T<sub>amb</sub> y se adicionó agua destilada helada para precipitar el producto acetilado el cual fue filtrado por succión, lavado con agua destilada y recrystalizado de benceno-hexano. El producto acetilado fue disuelto en 131 mL de alcohol *iso*-amilico y se adiciono dióxido de selenio (10 eq). La mezcla de reacción se calentó a temperatura de reflujo (120 °C) durante 24 horas. Posteriormente, se filtró la solución para retirar el metal formado (selenio) y se evaporó el solvente. Luego, se añadió una solución acuosa de NaOH<sub>(ac, 15%)</sub> (113 mL) y se calentó la mezcla a 100 °C durante 10 minutos. La solución se enfrió y se adicionó 20 mL de HCl<sub>(C)</sub>, se filtro la solución y se trató con 250 mL de acetato de etilo. Seguidamente, se acidificó la solución acuosa con HCl<sub>(C)</sub> (pH= 3) y se filtró el precipitado correspondiente a flavona de hesperidina (FH) o naringina (FN), también conocidas como diosmina y rhoifolin respectivamente.

#### 7.1.5 Procedimiento para la obtención de la Aurona y Flavonol de Hesperidina y Naringina.<sup>[47]</sup>

Se agregó 5,3 mL de una solución fría de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (ac,15%) sobre una solución fría que contiene un equivalente de chalcona (CH-H ó CH-N). La mezcla de reacción se mantuvo a 0 °C durante 12 horas. El precipitado formado, aurona de la chalcona, fue filtrado, lavado con metanol y recrystalizado de acetona. La solución metanólica fue utilizada para obtener el flavonol de las chalconas correspondientes. En el caso del flavonol la solución metanólica anteriormente descrita fue evaporada a T<sub>amb</sub> y el residuo fue recrystalizado de MeOH y secado.

---

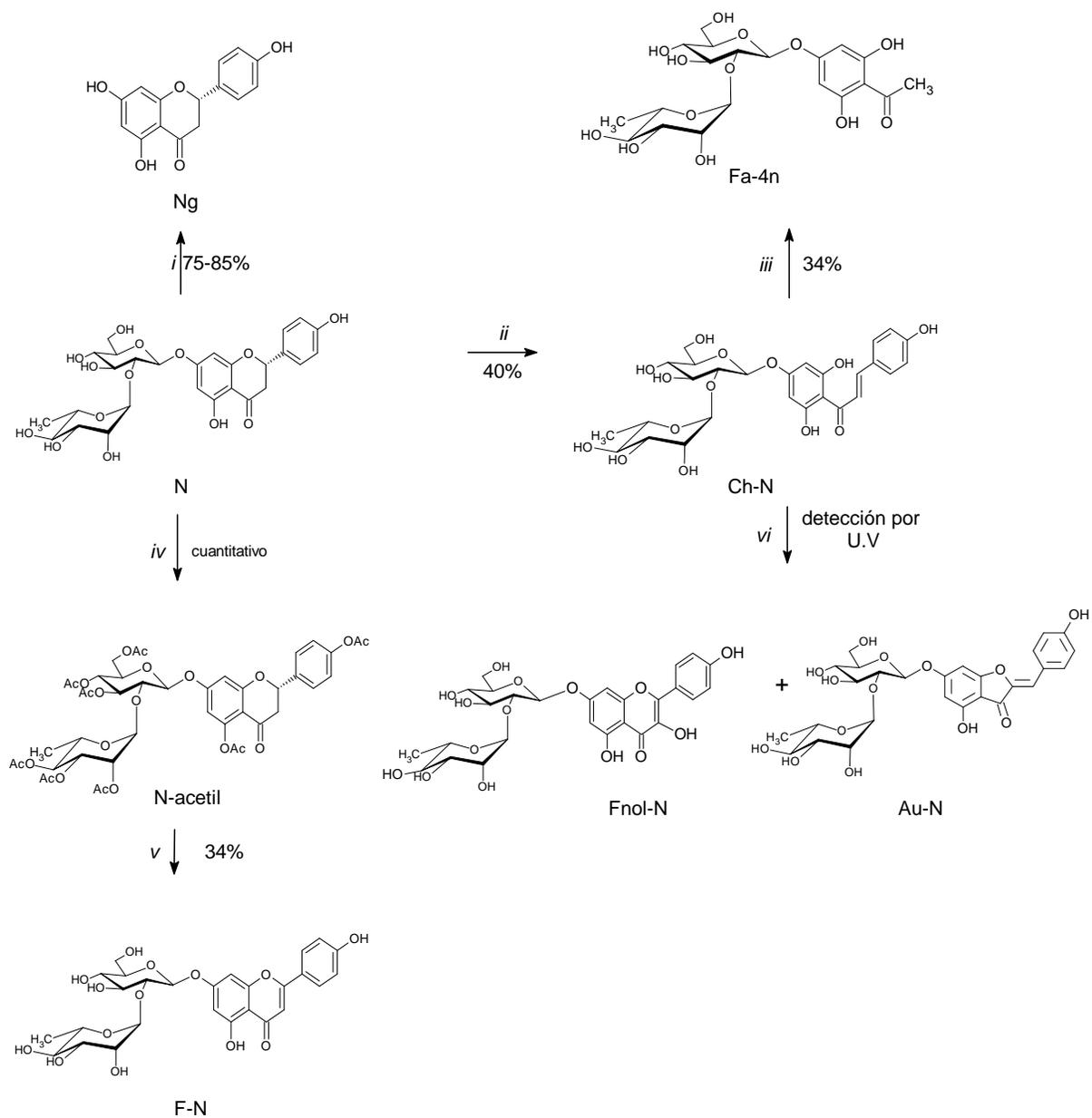
## 8 Resultados Sintéticos: Discusión.

En la presente investigación, los productos sintetizados son presentados con las enumeraciones relacionadas a sus datos espectroscópicos. Adicionalmente, se muestran las siglas con las cuales son identificados, la fórmula molecular condensada, el peso molecular asociado a la misma, el punto de fusión experimental, el porcentaje de rendimiento obtenido, el porcentaje de pureza determinado por HPLC y el número de registro CAS (por sus siglas en inglés, “*Chemical Abstracts Service*”).

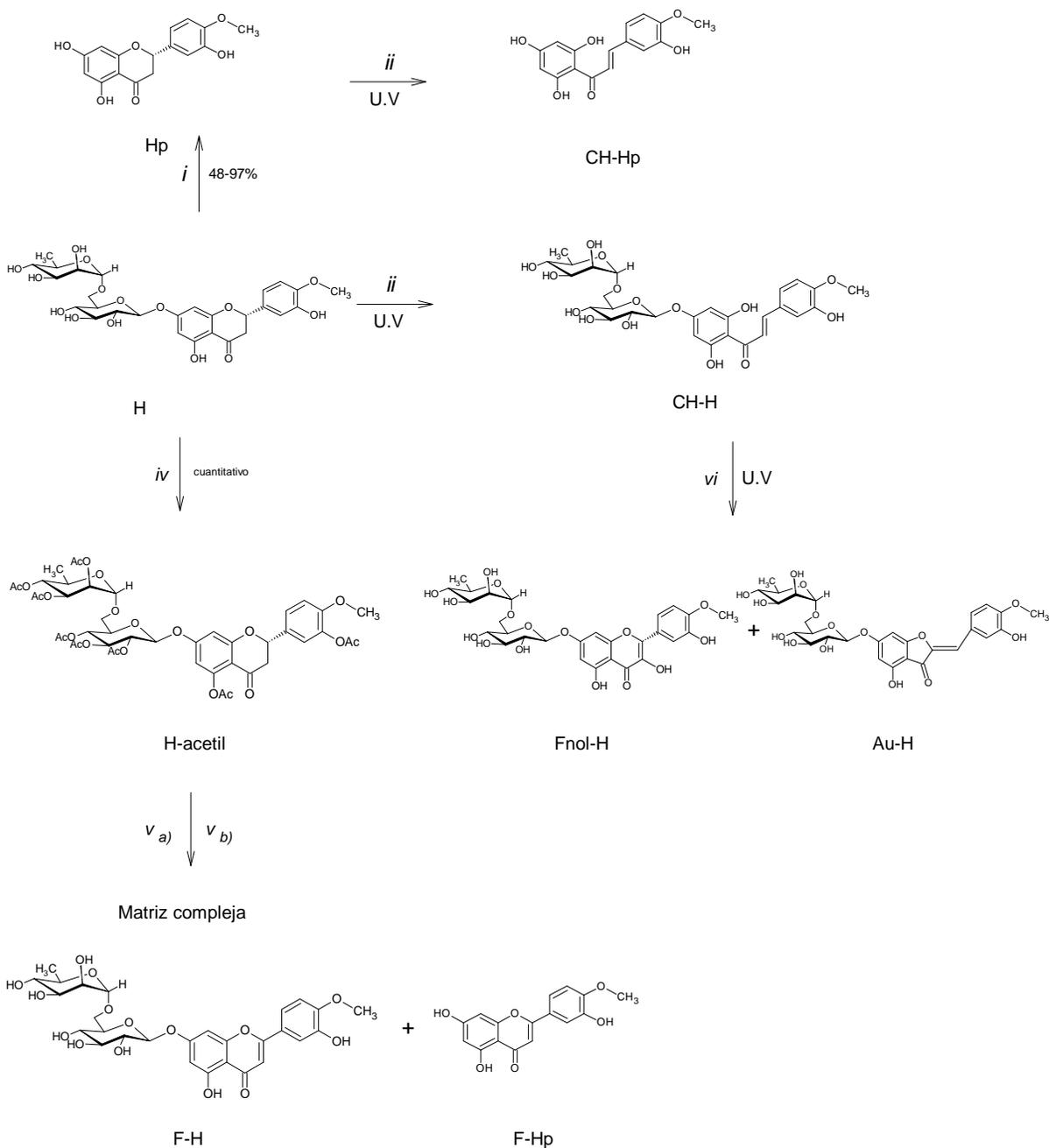
El progreso de las reacciones fué monitoreado mediante la técnica de cromatografía de capa fina (CCF) comparando el material de partida con el crudo de reacción y en algunos casos utilizando patrones del producto deseado. Para ello se utilizó como sistema de desarrollo las mezclas de solventes AcOEt-MeOH-H<sub>2</sub>O; 100:13.5:10; v/v/v (AN-2), Hex-AcOEt-HCO<sub>2</sub>H; 75:25:1; v/v/v (AN-6) y AcOEt-AcOH-HCO<sub>2</sub>H-H<sub>2</sub>O; 100:10:10:10; v/v/v/v (L-1). La detección de los productos fue realizada con lámparas de UV a 254 y 365 nm, y los agentes de coloración anisaldehído en ácido sulfúrico (AS) y/o vapores de yodo (I<sub>2</sub>).

Los cromatogramas de HPLC fueron obtenidos empleando software Chromeleon<sup>R</sup>6.80 en un equipo Dionex UltiMate<sup>R</sup>3000, utilizando como sistema de elución: Columna Acclaim 120 C18 (2,1x100 mm; 3 μm); flujo: 0,450 mLmin<sup>-1</sup>; solvente A: H<sub>2</sub>O-AcOH<sub>glacial</sub> (991,7:8,3; v/v); solvente B: ACN-AcOH<sub>glacial</sub> (992:8; v/v); gradiente lineal: 0-5,3 min 88%A, 5,3-10 min 79,5%A, 10-21,3 56%A, 21,3-22 min 0%A; detección: 280 nm; espectro UV: 200-800 nm.

A continuación se presenta un resumen, donde se observa los porcentajes de rendimientos obtenidos, para las modificaciones estructurales de hesperidina y naringina, a las cuales se les determinó el porcentaje de pureza por HPLC (Esquema 5 y Esquema 6).

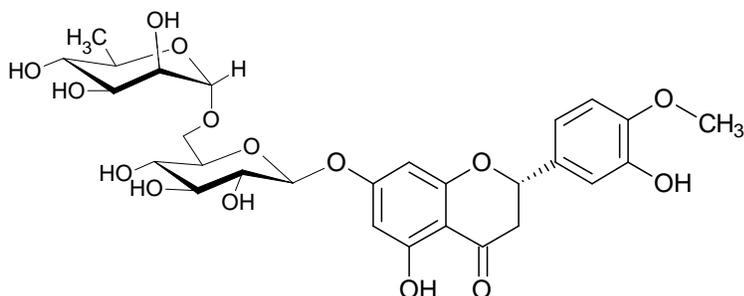


**Esquema 5.** Modificación estructural de naringina: i) a)  $\text{H}_2\text{SO}_4$ /etilenglicolmonoetil éter, 6h a T 80-90 °C ó b)  $\text{H}_2\text{SO}_4$ /EtOH 6h a T 90°C; ii)  $\text{NaOH}_{(\text{ac}, 20\%)}$ , 6h a  $T_{\text{amb}}$ ; iii)  $\text{H}_2$ / $\text{Pd}_{10\%}\text{-C}$ /MeOH, 6h, 40 psi a  $T_{\text{amb}}$ ; iv) a) Piridina y anhídrido acético, 6 horas a  $T_{\text{amb}}$ ; v) NBS,  $\text{CHCl}_3$ , peróxido de benzoilo, 4h, T 60°C; vi)  $\text{H}_2\text{O}_2$  (ac, 15%)/ $\text{NaOH}_{(\text{ac}, 16\%)}$ /MeOH.



**Esquema 6.** Modificación estructural de hesperidina: i) a)  $\text{H}_2\text{SO}_4$ /etilenglicolmonoetil éter, 6h a T 80-90 °C o b)  $\text{H}_2\text{SO}_4$ /EtOH 6h a T 90°C; ii)  $\text{NaOH}_{(\text{ac}, 20\%)}$ , 24h a  $T_{\text{amb}}$ ; iv) a) Piridina y anhídrido acético, 4 días a  $T_{\text{amb}}$ ; a) NBS,  $\text{CHCl}_3$ , peróxido de benzoilo, 10h, T 60°C; iv) b) Piridina, anhídrido acético, 6 h, T 95-100°C; b)  $\text{SeO}_2$ , alcohol *iso*-amílico, 24 h, 110 °C; vi)  $\text{H}_2\text{O}_2_{(\text{ac}, 15\%)}/\text{NaOH}_{(\text{ac}, 16\%)}/\text{MeOH}$ .

8.1 Determinación de la pureza de hesperidina comercial: (2S)-7-[ $\alpha$ -D-glucopiranosiloxi]-2,3-dihidro-5-hidroxi-2-(3-hidroxi-4-metoxifenil)-4H-1-benzopirano-4-ona.



**H**

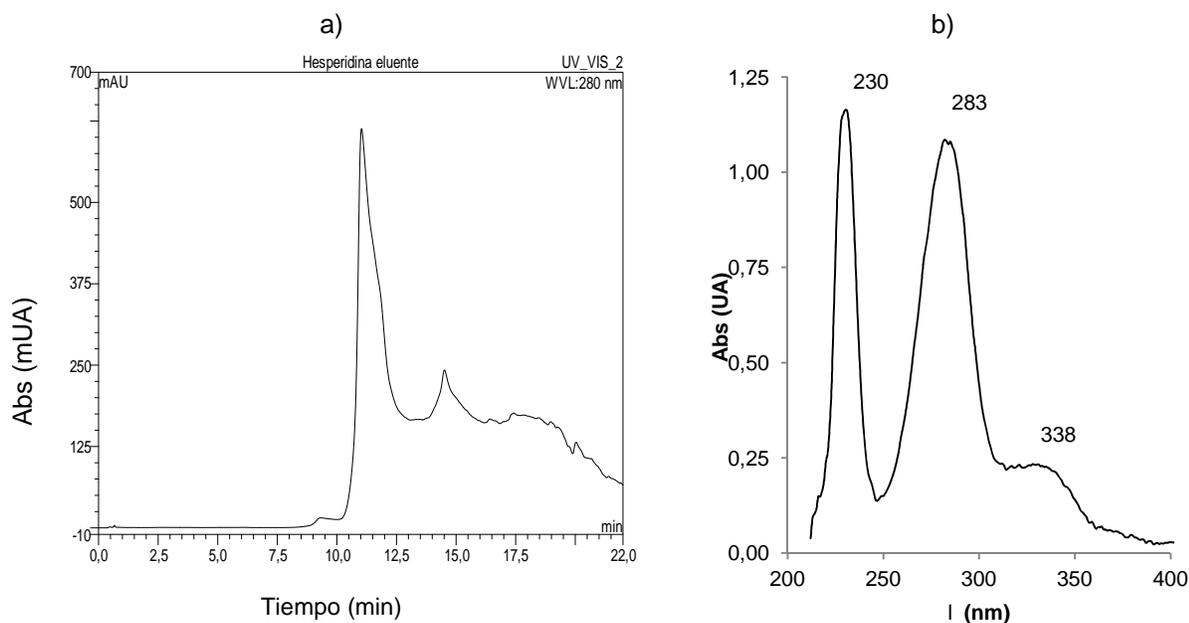
$C_{28}H_{34}O_{15}$ : 610,56 g/mol

$Pf_{exp}$ : 250-256°C

% Pureza: >84 %

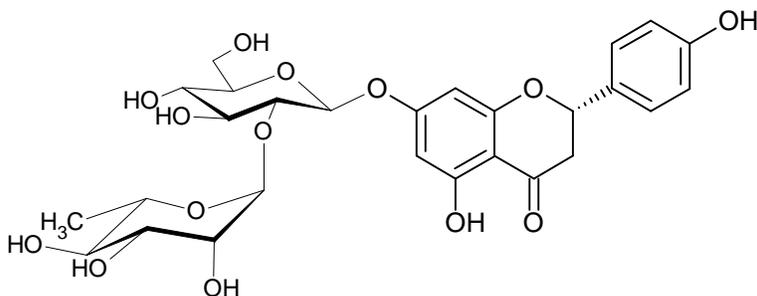
[CAS]: 520-26-3

En las modificaciones realizadas sobre el flavonoide hesperidina (H) se utilizó una muestra comercial de Sigma Aldrich, aprox., 80%, H5254-100g, la cual presentó un porcentaje de pureza experimental >80 %, determinado por HPLC. Figura 17.



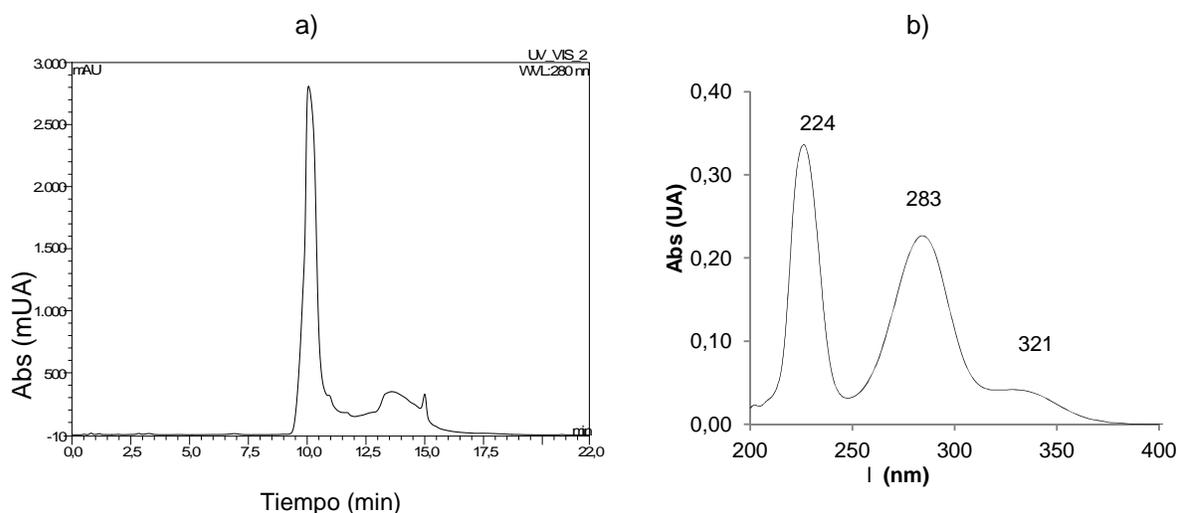
**Figura 17** Determinación del porcentaje de pureza de hesperidina comercial, usada como material de partida: a) cromatograma HPLC de la hesperidina utilizando el Sistema de elución, detección a 280 nm; b) espectro de UV en eluyente del Sistema.

## 8.2 Determinación de la pureza de naringina comercial: 4',5,7- trihidroxiflavanona-7-ramnoglucósido.



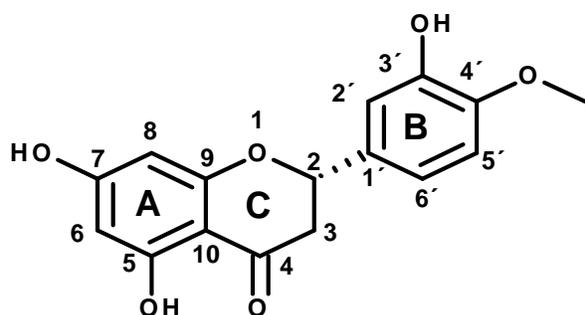
**N**  
 $C_{27}H_{32}O_{14}$ : 580,53 g/mol  
 $Pf_{exp}$ : 164-166°C  
% Pureza: >93 %  
[CAS]: 10236-47-2

En las modificaciones realizadas sobre el flavonoide naringina (N) se utilizó una muestra comercial de Sigma Aldrich 95% HPLC, 71162-100g, la cual presentó un porcentaje de pureza experimental >93 %, determinado por HPLC, Figura 18.



**Figura 18** Determinación del porcentaje de pureza de naringina comercial, usada como material de partida: a) cromatograma HPLC de la naringina utilizando Sistema de elución, detección a 280 nm; b) espectro de UV en eluente del Sistema.

### 8.3 Hidrólisis Ácida de Hesperidina: Obtención de Hesperetina, (Hp): 3',5,7-trihidroxi -4'-metoxiflavanona.



#### Hp

$C_{16}H_{14}O_6$ : 302.28 g/mol

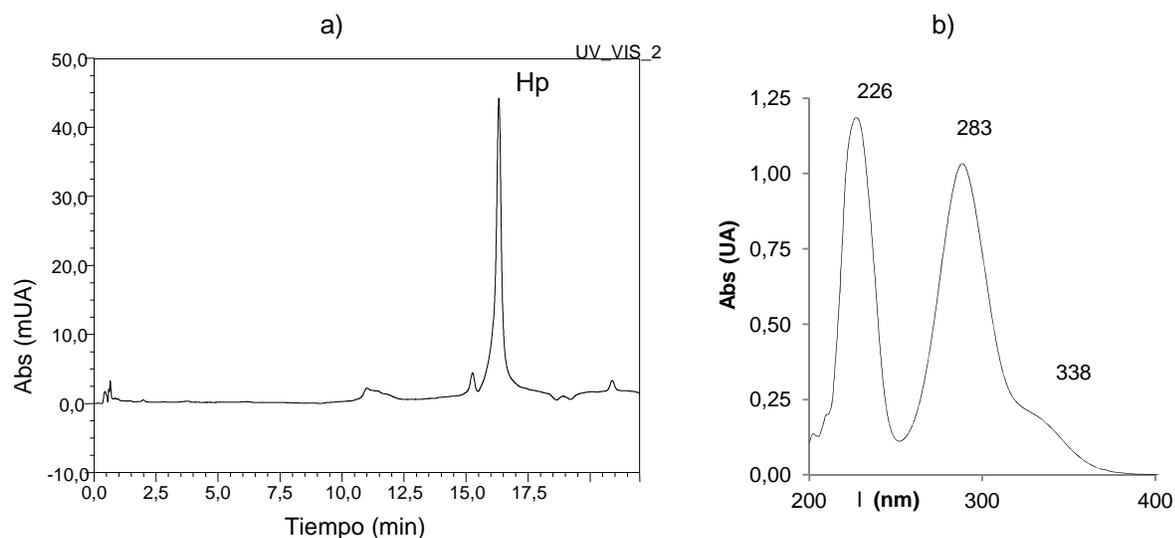
$Pf_{exp}$ : 228-230 °C

Rend.: 48-97 %

% Pureza: >93 %

[CAS]: 520-33-2

Según el procedimiento descrito,<sup>[39]</sup> la hidrólisis ácida de hesperidina a 90 °C, produce hesperetina, con un rendimiento promedio de 36 % con  $Pf_{rep}$  (224-226) °C. Sin embargo, las modificaciones respecto al solvente, tiempo de reacción y cantidad de ácido, produjo mejores porcentajes de rendimiento entre 48-97 %, (Tabla 6), cuyo porcentaje de pureza experimental >93 %, fue determinado por HPLC, Figura 19.



**Figura 19.** Determinación del porcentaje de pureza para hesperetina: a) cromatograma HPLC de la hesperetina utilizando Sistema de elución, detección a 280 nm; b) espectro de UV en eluyente del Sistema.

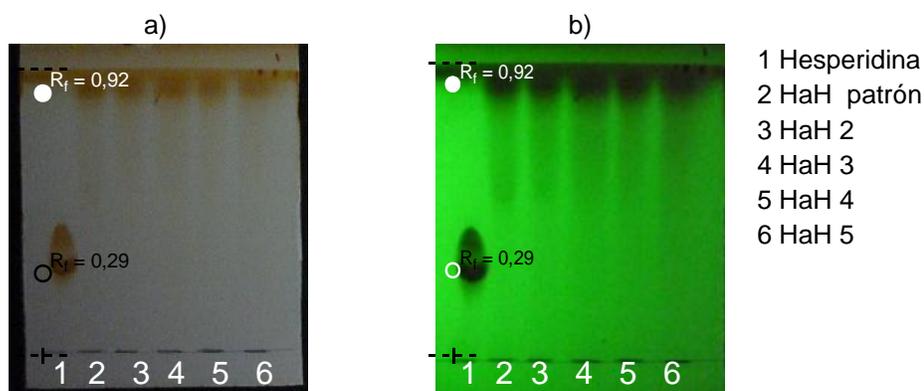
**Tabla 6.** Parámetros de la hidrólisis ácida de hesperidina, porcentaje de rendimiento y punto de fusión experimental.

Réplica	Hesperidina (mg)	Solvente (20 mL)	H <sub>2</sub> SO <sub>4(c)</sub> (mL)	t (h)	H <sub>p</sub> <sub>exp</sub> (mg)	% Rend. (%)	Pf <sub>exp</sub> (°C)
1	1000	EtEG	1	5	239	48	225-227
2	1001	EtEG	1	7	359	73	223-228
3	1000	EtOH	1	6	482	97	223-226
4	1055	EtOH	1	13	461	88	228-230
5	1000	EtOH	1	12	621	--- <sup>a</sup>	224-225
6	1001	EtOH	5	12	575	--- <sup>a</sup>	222-225

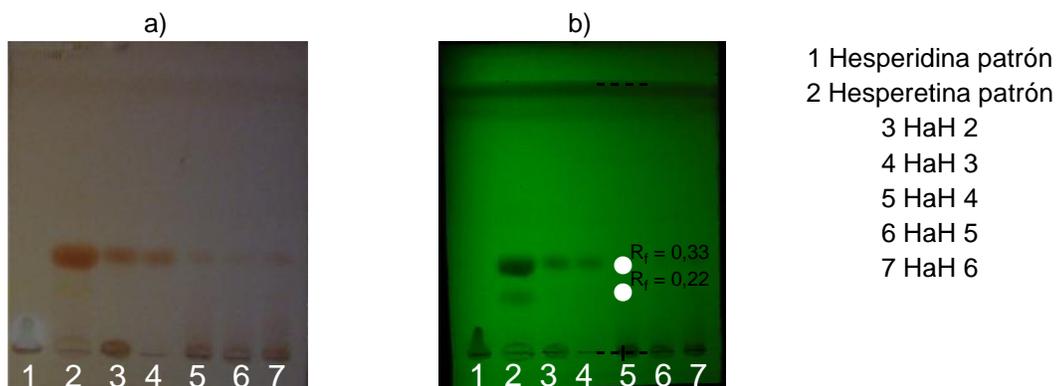
a) producto húmedo.

La hidrólisis ácida es un método empleado para remover total o parcialmente los glicósidos presentes en la estructura del flavanoide poliglicosilado con el fin de obtener la aglicona. Debido a la baja solubilidad de la hesperidina en agua y solventes orgánicos, se realizaron diversas modificaciones a los métodos reportados en relación a: solvente, pH, temperatura y tiempo de reacción. Al utilizar EtEG-H<sub>2</sub>SO<sub>4(c)</sub> (20:1; v/v) como solvente, el rendimiento de la reacción aumenta al incrementar el tiempo de reacción de 5 a 7 h a temperatura de reflujo, lo cual no es observado al utilizar EtOH-H<sub>2</sub>SO<sub>4(c)</sub> (20:1, ó 20:5; v/v). Sin embargo, Al utilizar EtOH-H<sub>2</sub>SO<sub>4(c)</sub> (20:1; v/v) a temperatura de reflujo durante 6 h, se obtuvo un porcentaje de rendimiento de 97 %, similar al rendimiento reportado (99 %) para la obtención de hesperetina empleando MeOH-H<sub>2</sub>SO<sub>4(c)</sub> (20:1; v/v) a temperatura de reflujo durante 7½ h.<sup>[41]</sup>

La hesperetina se obtuvo como un sólido de color beige claro soluble en: MeOH, AcOEt, acetona, EtOH y parcialmente soluble en: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O; e insoluble en hexano, Pf<sub>exp</sub> 228-230 °C. El progreso de la reacción fue monitoreado por CCF con los sistemas AN-2 (Figura 20) y AN-6 (Figura 21), donde se observó la formación del producto deseado con valores de R<sub>f</sub> de 0,92 y 0,33 respectivamente. Para ello, se empleó la hesperidina, como material de partida y un patrón de hesperetina previamente obtenida en el Laboratorio.<sup>[33]</sup>



**Figura 20.** Cromatografía de capa fina realizada a los productos de las hidrólisis ácidas de hesperidina 3 – 6. Sistema de desarrollo AN-2 (AcOEt-MeOH-H<sub>2</sub>O (100:13,5:10; v/v/v)); sistema de detección: a) lodo, I<sub>2</sub>; b) 254 nm.



**Figura 21.** Cromatografía de capa fina realizada a los productos de las hidrólisis ácidas de Hesperidina 3 – 7, utilizando el sistema de solvente AN-6 (Hex-AcOEt- HCOOH (75:25:1; v/v/v)) y como sistema de detección a) lodo I<sub>2</sub>; b) 254 nm.

En las CCF de los productos de hidrólisis ácida de hesperidina (HaH), obtenidos en las diferentes réplicas reportadas en la Tabla 6, se observó la ausencia de material de partida de  $R_f$  0,29 en AN-2 (Figura 20) y la aparición de una mancha en común con el patrón de hesperetina de  $R_f$  0,33 en AN-6 (Figura 21). La identidad inequívoca del producto de reacción (hesperetina) fue establecida por RMN-<sup>1</sup>H y RMN-<sup>13</sup>C, respectivamente.

En la caracterización del producto de hidrólisis ácida de hesperidina (H) a hesperetina (Hp) se analizaron los datos espectroscópicos en DMSO- $d_6$  de RMN- $^1\text{H}$  (Espectros 1 y 2), RMN- $^{13}\text{C}$  (Espectro 3) y DEPT-135 (Espectro 4). En el espectro de RMN- $^1\text{H}$  (Espectro 1) se observan tres singletes centrados en 12,13; 10,85 y 9,14 ppm asignados a los grupos hidroxilo fenólicos en C-5, C-7 y C-3' respectivamente, los cuales han sido previamente reportados para un patrón estándar de hesperetina en DMSO- $d_6$ .<sup>[48]</sup> Con lo cual se confirma que el proceso de hidrólisis y purificación fue exitoso. En la tabla 7, se puede observar la asignación de las señales detectadas en RMN- $^1\text{H}$ , RMN- $^{13}\text{C}$  y DEPT-135 para la muestra hesperetina (**Hp**) y son comparables a los datos reportados para hesperetina semisintética o natural en Acetona- $d_6$ <sup>[49]</sup> y DMSO- $d_6$ <sup>[50], [51] [52]</sup> (Tablas A1 y A2 en Anexo).

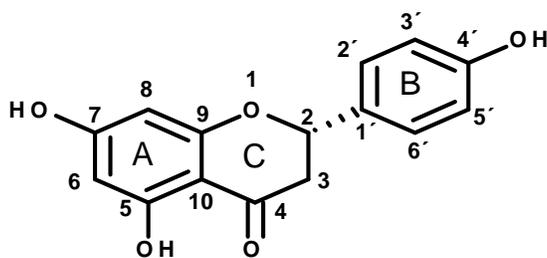
**Tabla 7.** Desplazamientos químicos de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  para la hesperetina (Hp) (270 MHz, DMSO- $d_6$ ).

H/C	$\nu_H$ (ppm)	multp; Int	J (Hz)	$\nu_C$ (ppm)	DEPT-135
2	5,42	dd; 1H	12,1/2,7	78,77	CH
3 <sub>ec</sub>	3,19	dd; 1H	17,1/12,3	42,62 <sup>a</sup>	CH <sub>2</sub>
3 <sub>ax</sub>	2,73	dd; 1H	17,2/3,1		
4				196,64	C
5	12,13	s; 1H		164,05	C
6	5,89	d; 1H	1,7	96,42	CH
7	10,85	s; 1H		167,22	C
8	5,89	d; 1H	1,7	95,59	CH
9				163,36	C
10				102,42	C
1'				131,80	C
2'	6,91	s; 1H		114,66	CH
3'	9,14	s; 1H		147,11	C
4'				148,51	C
5'	6,96	d; 1H	8,2	112,77	CH
6'	6,86	d; 1H	8,2	118,22	CH
4'-OMe	3,77	s; 3H		56,34	CH <sub>3</sub>

a) Señal con fase negativa ( ) en el espectro DEPT-135 (Espectro 4).

En el espectro de RMN-<sup>13</sup>C (Espectro 3) se observan 16 señales, asignadas por DEPT-135 (Espectro 4) como: ocho carbonos cuaternarios, seis metinos uno de ellos alifático, un metileno y un metilo tipo metoxi. En el espectro de UV (Figura 19) se observa la presencia de tres máximos de absorción en 226, 283 y 338 nm, los cuales son característicos para núcleos flavonoidales del tipo flavanona. Dicho núcleo flavonoidal presenta constantes de acoplamiento características (12-17 Hz) para el patrón de sustitución del anillo C, éstas fueron observadas en el espectro de RMN-<sup>1</sup>H (Espectro 2) para los dobletes de dobletes centrados en 5,42 (*dd*; 12,1/2,7 Hz; 1H; H-2), 3,19 (*dd*; 17,1/12,3 Hz; 1H; H-3<sub>ec</sub>) y 2,73 (*dd*; 17,2/3,1 Hz; 1H; H-3<sub>ax</sub>). Las señales de H-6 y H-8 pertenecientes al anillo A se observan como un doblete de acoplamiento *meta* en 5,89 ppm (*d*; 1,7 Hz; 2H; H-6, H-8). A 3,76 ppm se observa un singlete asociado a un grupo metoxi (-OCH<sub>3</sub>) presente en el anillo B. Basados en estos datos se confirmó la identidad de hesperetina.

#### 8.4 Hidrólisis Ácida de Naringina: Obtención de naringenina, (Ng): 4',5,7-trihidroxiflavanona.



#### Ng

$C_{15}H_{12}O_5$ : 272.25 g/mol

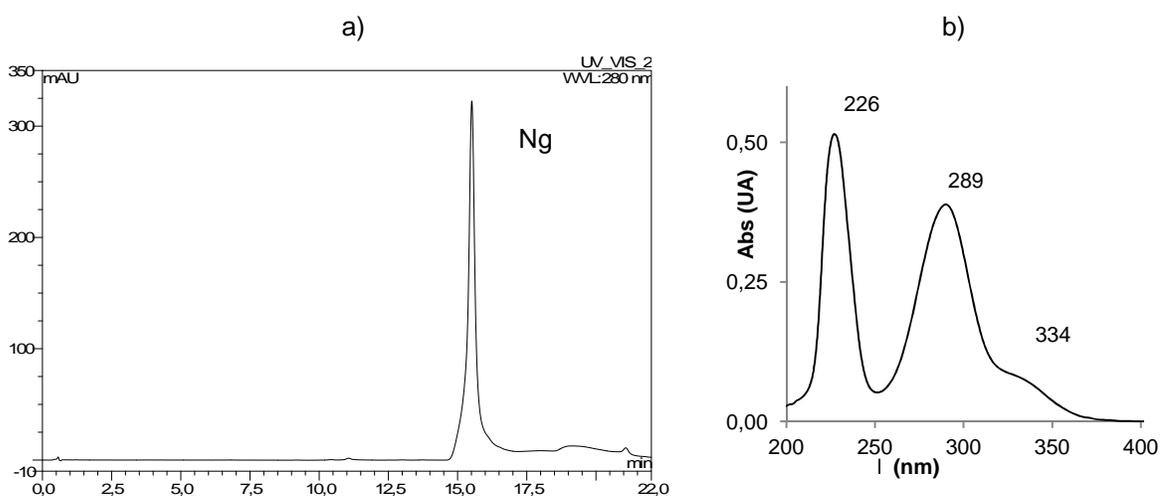
$Pf_{exp}$ : 246-249 °C

Rend.: 76-86 %

% Pureza: >93 %

CAS: 480-41-1

Según el procedimiento descrito,<sup>[39]</sup> la hidrólisis ácida de naringina a 90 °C, produce naringenina, con un rendimiento promedio de 88 %.<sup>[53]</sup> Se realizó el procedimiento de hidrólisis de manera similar al utilizado con hesperidina, para ello se utilizó EtOH (20 mL),  $H_2SO_{4(c)}$  (1 mL, 10 eq) durante 4-5 horas, entre 80-90 °C. El crudo de reacción fue recristalizado en EtOH- $H_2O$ . El procedimiento fue realizado con diversas condiciones de reacción y se obtuvo el producto deseado con porcentajes de rendimiento entre (77-86) %, (Tabla 8), cuyo porcentaje de pureza de 93 % fue determinado por HPLC, (Figura 22).



**Figura 22.** Determinación del porcentaje de pureza para naringenina: a) cromatograma HPLC de la naringenina utilizando Sistema de elución, detección a 280 nm; b) espectro de UV en eluente del Sistema.

## Resultados Sintéticos-Discusión

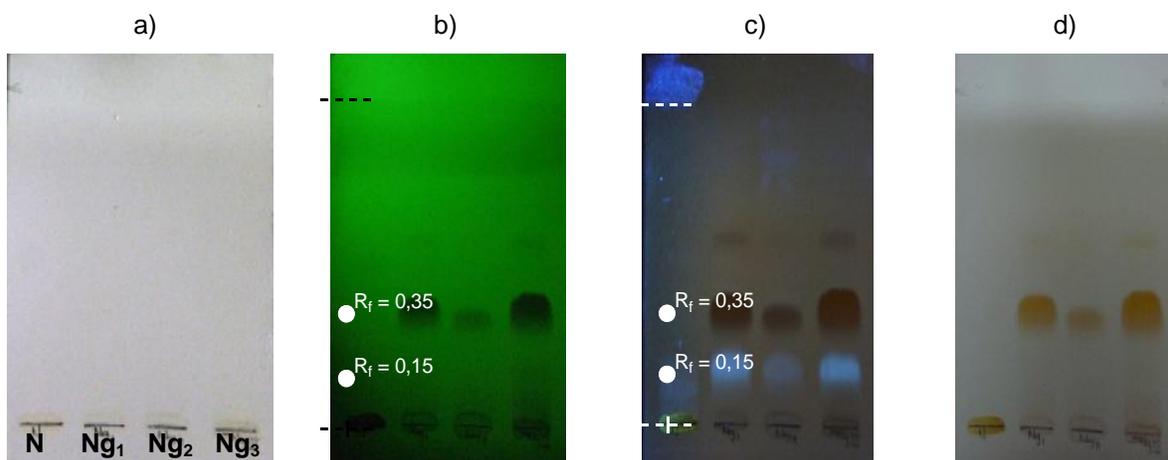
**Tabla 8.** Parámetros de la hidrólisis ácida de naringina, rendimiento y punto de fusión experimental.

Réplica	Naringina (mg)	EtOH (mL)	H <sub>2</sub> SO <sub>4(c)</sub> (mL)	t (h)	Ng <sub>exp</sub> (mg)	% Rend. (%)	Pf <sub>exp</sub> (°C)
1	1003	20	1	6	485	---- <sup>a</sup>	240-246
2	720	14,5	1	5	291	86	245-250
3	2025	40	2	4	728	77	246-249

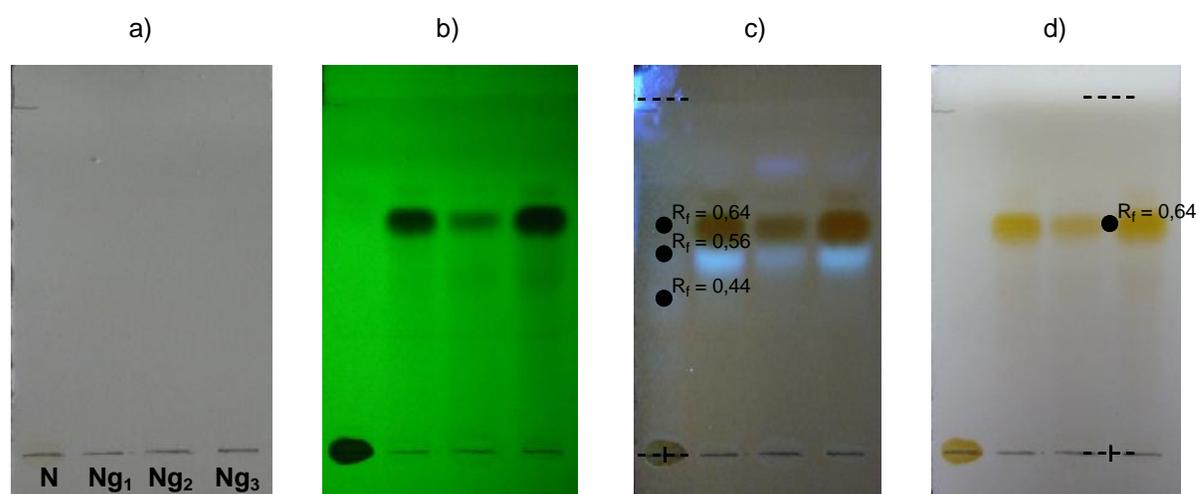
a) producto húmedo.

La solubilidad de la naringina (N) en medio acuoso es mayor que la hesperidina (H) lo cual beneficia la obtención de la aglicona naringenina (Ng) mediante la hidrólisis ácida.<sup>[53]</sup> La naringenina (Ng) se obtuvo como un sólido de color amarillo claro, soluble en: MeOH, EtOH, DMSO, Et<sub>2</sub>O, acetona; e insoluble en: H<sub>2</sub>O. El progreso de la reacción fue monitoreado por CCF con los sistemas AN-6 (Figura 23) y AN-2 (Figura 24), donde se observó la formación del producto deseado con valores de R<sub>f</sub> de 0,35 y 0,64 respectivamente. Para ello, se empleó un patrón de naringenina (NgP) previamente obtenida en el Laboratorio.<sup>[33]</sup>

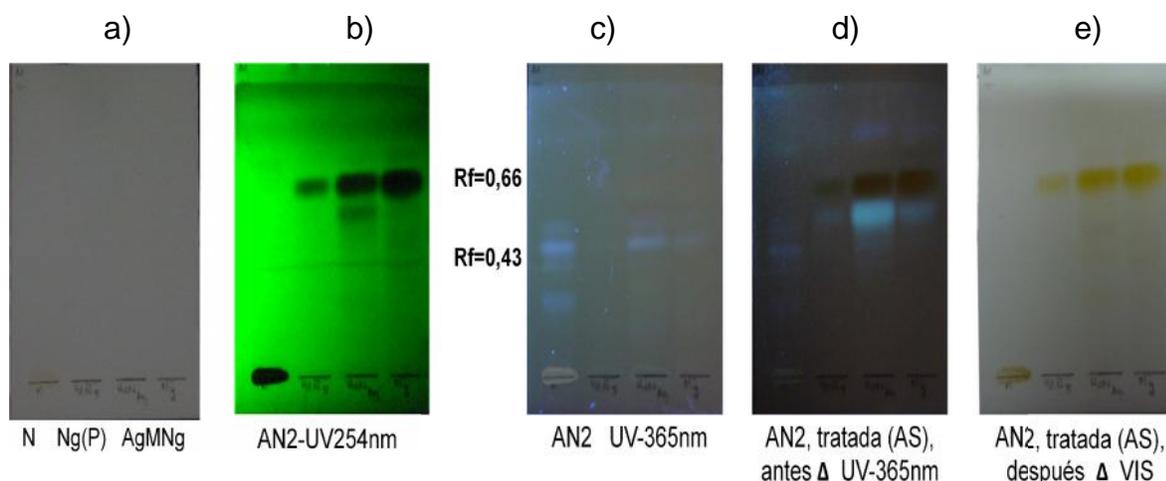
En las CCF de los productos de hidrólisis ácida de naringina, obtenidos en las diferentes réplicas reportadas en la Tabla 8, se observó la ausencia de material de partida en AN-6 (Figura 23) y en AN-2 (Figura 24) y la aparición de una mancha en común con el patrón de naringenina con R<sub>f</sub> de 0,66 (Figura 25). La identidad inequívoca del producto de reacción (naringenina) fue establecida por RMN-<sup>1</sup>H y RMN-<sup>13</sup>C, respectivamente.



**Figura 23.** Cromatografía de capa fina realizada a los productos de las hidrólisis ácidas de naringina 1 – 3. Sistema de desarrollo; AN-6 (Hex-AcOEt- HCOOH (75:25:1; v/v/v)); sistema de detección: a) visible; b) 254 nm; c) AS, 365 nm sin calor; d) AS, 365nm con calor, visible.



**Figura 24.** Cromatografía de capa fina realizada a los productos de la hidrólisis ácida de naringina 1 – 3. Sistema de desarrollo AN-2 (AcOEt-MeOH-H<sub>2</sub>O (100:13,5:10; v/v/v)); sistema de detección: a) visible; b) 254 nm; c) AS, 365 nm sin calor; d) AS, 365nm con calor, visible.



**Figura 25.** Cromatografía de capa fina realizada a los productos de la hidrólisis ácida de naringina, aguas madres y patrón. Sistema de desarrollo AN-2 (AcOEt-MeOH-H<sub>2</sub>O (100:13,5:10; v/v/v)); sistema de detección: a) visible; b) 254 nm; c) 365 nm; d) AS, 365 nm sin calor; e) AS, visible.

El producto de la hidrólisis ácida de naringina fue disuelto en DMSO-*d*<sub>6</sub>, y se analizó por RMN-<sup>1</sup>H (Espectros 5 y 6), RMN-<sup>13</sup>C (Espectro 7) y DEPT-135 (Espectro 8). En RMN-<sup>1</sup>H (Espectro 5) se observan tres señales centradas en 12,14; 10,76 y 9,59 ppm, al igual que en la hesperetina, y fueron asignadas a los grupos hidroxilo fenólicos en C-5, C-7 y C-4' respectivamente, las cuales han sido previamente reportados para un patrón estándar de naringenina en DMSO-*d*<sub>6</sub>. Con lo cual se confirma que el proceso de hidrólisis y purificación fue exitoso. El singlete en 12,14 ppm (s, 1H, C<sub>5</sub>-OH), es característico del hidroxilo en la posición C-5 del anillo A en núcleos flavonoidales, debido al puente de hidrógeno intramolecular con el carbonilo en C-4 del anillo C. En la zona de aromáticos (Espectros 5 y 6) se observan un par de dobletes, que integra para dos protones cada uno, característicos de un patrón de sustitución 1,4- (*para*), el primero centrado en 7,31 ppm, con constante de acoplamiento  $J = 7,9$  Hz asociados a los protones H-2' y H-6', y el segundo centrado en 6,79 ppm con constante de acoplamiento  $J = 8,4$  Hz asignados a los protones H-3' y H-5', correspondientes al anillo B del flavonoide. La señal centrada en 5,89 ppm observada como un singlete que integra para dos protones, pertenece a los protones H-6 y H-8 del anillo aromático A. Continuando con las señales, se muestra un doblete de doblete a 5,43 ppm con una constante de acoplamiento  $J$ : 12,1 y 1,7

Hz correspondiente al protón H-2 del anillo C. También se observa dos dobletes de dobletes en 3,25 ppm (*dd*,  $J = 16,9$  y  $13,1$  Hz) y en 2,71 ppm (*dd*,  $J = 16,8$  y  $2,2$  Hz), atribuidos a los protones alifáticos H-3<sub>ec</sub> y H-3<sub>ax</sub> del metileno C-3, respectivamente.<sup>[48]</sup>

En el espectro de UV (Figura 22) se observa la presencia de tres máximos de absorción en 226, 289 y 334 nm, el cual es característico para núcleos flavonoidales del tipo flavanona y es comparable al espectro de UV de un patrón comercial de la flavanona glicosilada naringina (N), (  $\lambda_{\text{máx}}$ : 224, 283 y 321 nm), la cual fue utilizada como material de partida en la obtención de naringenina (Ng), (  $\lambda_{\text{máx}}$ : 226, 289 y 334 nm), Figura 26.

El espectro de RMN-<sup>13</sup>C (Espectro 7), se observan 15 señales, asignadas por DEPT-135 (Espectro 8) como: siete carbonos cuaternarios, siete metinos uno de ellos alifático y un metileno. En el RMN-<sup>13</sup>C (Espectro 7) se observa una señal en 196,81 ppm correspondiente al carbonilo C-4 presente en el anillo C; las señales en 167,22; 164,08; 158, 29 y 163,50 ppm se corresponden a los átomos de carbono aromáticos sustituidos con átomos de oxígeno enlazados a grupos hidroxilo asignados a C-7, C-5, C-9 y C-4' respectivamente, distribuidos en los anillos A y B de la flavanona. Igualmente se observan señales características de carbonos aromáticos 1,4-disustituidos en; 129,47 ppm (C-1'), 128,85 ppm (C-2' y C-6'), 115,78 ppm (C-3' y C-5'), lo cual justifica la presencia del anillo B de la flavanona. Otros desplazamientos químicos interesantes son mostrados en el espectro DEPT-135 (Espectro 8), en 78,9 ppm y 42,6 ppm que corresponden a los carbonos C-2 y C-3, siendo este último el metileno (CH<sub>2</sub>), presente en el anillo C.

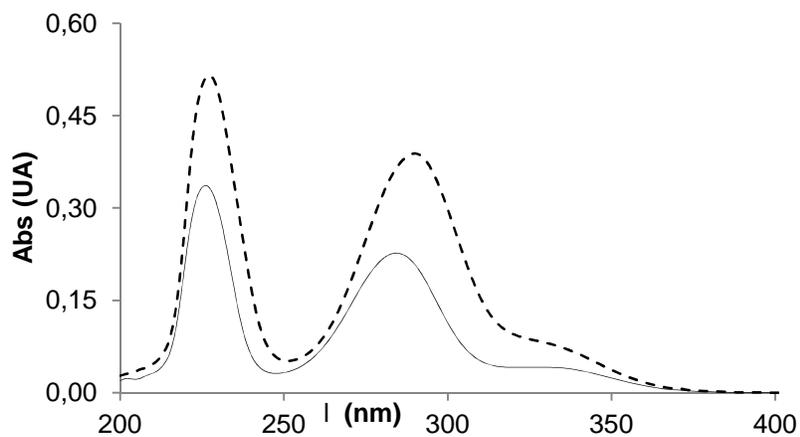
En la Tabla 9, se puede observar la asignación de las señales detectadas en RMN-<sup>1</sup>H, RMN-<sup>13</sup>C y DEPT-135 para la muestra naringenina (Ng) y son comparables a los datos reportados para naringenina semisintética o natural en Acetona-*d*<sub>6</sub><sup>[49][54]</sup> y DMSO-*d*<sub>6</sub><sup>[48],[54], [55], [56], [57]</sup> (Tablas A4 y A5 en Anexo).

## Resultados Sintéticos-Discusión

**Tabla 9.** Desplazamientos químicos para la naringenina, (Ng) (270 MHz, DMSO- $d_6$ ).

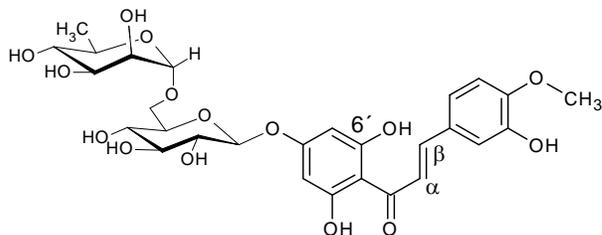
H/C	$\nu_H$ (ppm)	multp; Int	J (Hz)	$\nu_C$ (ppm)	DEPT-135
2	5,43	<i>dd</i> ; 1H	12,1/1,7	78,98	CH
3 <sub>ec</sub>	3,25	<i>dd</i> ; 1H	16,9/13	42,56 <sup>a</sup>	CH <sub>2</sub>
3 <sub>ax</sub>	2,68	<i>dd</i> ; 1H	16,8/2,2		
4				196,81	C
5	12,14	<i>s</i> ; 1H		164,08	C
6	5,89	<i>s</i> ; 1H		96,41	CH
7	10,76	<i>Sanchoi</i> ; 1H		167,22	C
8	5,89	<i>s</i> ; 1H		95,57	CH
9				163,50	C
10				102,40	C
1'				129,47	C
2'	7,31	<i>d</i> ; 1H	7,9	128,79	CH
3'	6,79	<i>d</i> ; 1H	8,4	115,78	C
4'	9,59	<i>Sanchoi</i> ; 1H		158,29	C
5'	6,79	<i>d</i> ; 1H	8,4	115,78	CH
6'	7,31	<i>d</i> ; 1H	7,9	128,79	CH

a) Señal con fase negativa ( ) en el espectro DEPT-135 (Espectro 8).

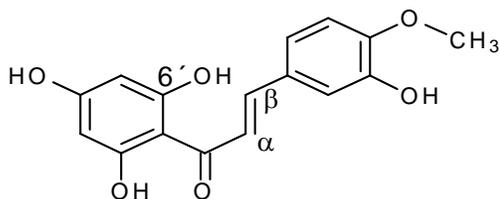


**Figura 26.** Espectro UV (MeOH) de naringenina (-----) y naringina ( ).

8.5 Síntesis de las Chalconas de Hesperidina (CH-H): 3, 2',6'-trihidroxi-4-metoxi-4'-(O<sub>6</sub>- -L-ramnopiranosil- -D-glucopiranosiloxi)-trans-chalcona y Hesperetina (CH-Hp): (E)-3-(3-hidroxi-4-metoxifenil)-1-(2,4,6-trihidroxifenil) propen-2-en-1-one.

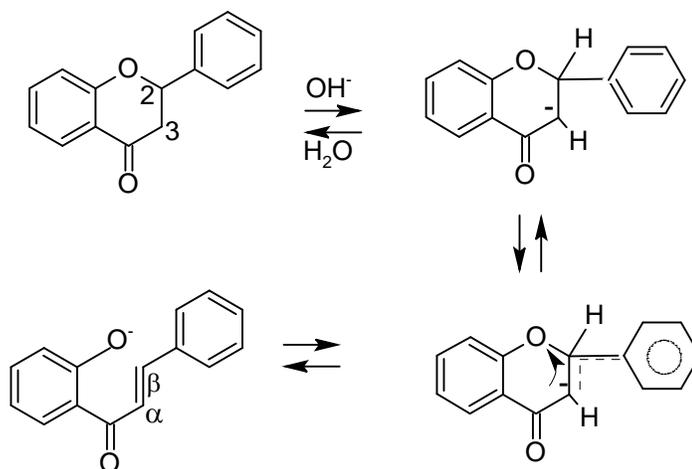


**CH-H**  
C<sub>28</sub> H<sub>34</sub> O<sub>15</sub>: 610,57 g/mol



**CH-Hp**  
C<sub>16</sub> H<sub>14</sub> O<sub>6</sub>: 302,28 g/mol

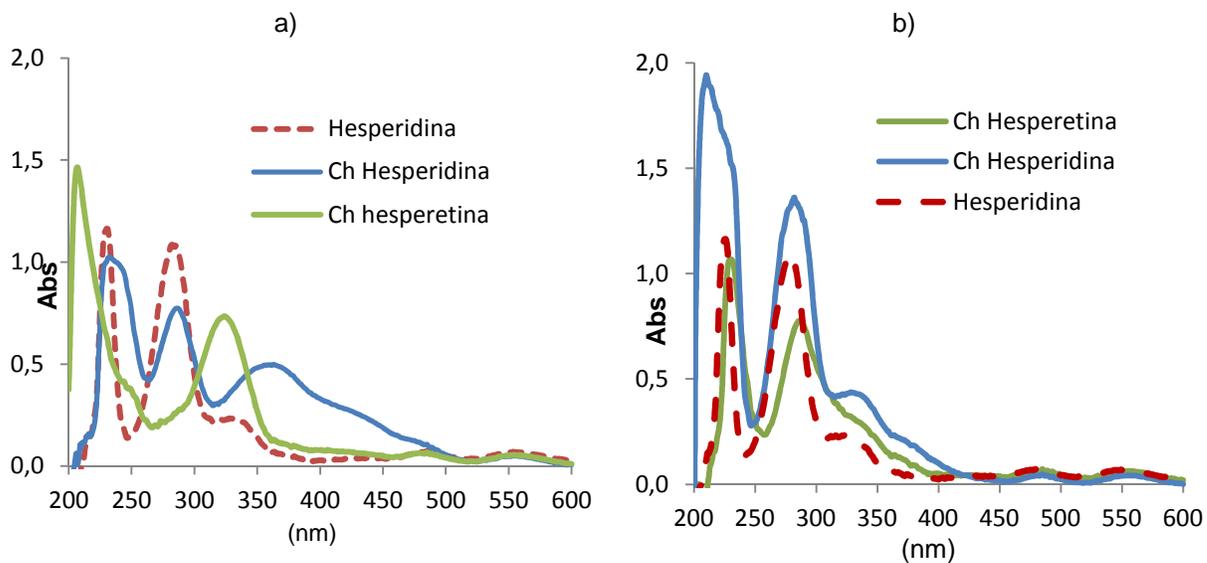
La hidrólisis básica en los flavanoides permite la apertura del anillo central (heterocíclico), el cual es particularmente frágil en las flavanonas, originando varios grupos estructurales.<sup>[22]</sup> El carácter carbaniónico de carbonos a un grupo carbonilo hace que presenten un comportamiento como nucleófilo, el medio básico fuerte facilita la ionización del enlace C –H y forma el carbanión, estabilizado por conjugación a través del enolato.<sup>[58]</sup>



**Esquema 7.** Formación de chalcona via carbanión. <sup>[59]</sup>.

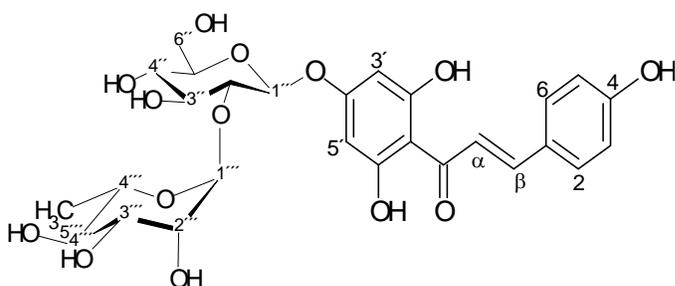
La reacción de hidrólisis básica para la obtención de la respectiva chalcona de la hesperidina (Ch-H) y hesperetina (Ch-Hp) respectivamente, se llevo a cabo siguiendo el procedimiento previamente descrito (pág. 36). Así, mediante agitación constante a temperatura ambiente se uso hesperidina (1 eq, 1 g, 1,3 mmol), NaOH (20 %, 76 eq, 99,02 mmol, 20 mL); con hesperetina (1 eq, 1 g, 3,3 mmol) se utilizó NaOH (20 %, 30 eq, 99,02 mmol, 20 mL). Luego de 6h, cada mezcla fue enfriada a 0° C (12 h de refrigeración), la mezcla de Ch-H se dividió y una parte se neutralizo con HCl<sub>(c)</sub> y otra con resina de intercambio iónico Dowex 50W, la mezcla de CH-Hp se neutralizó con HCl<sub>(c)</sub> solamente, dejándose enfriar nuevamente a 0°C por 24 h cada mezcla. Los precipitados obtenidos fueron filtrados por succión y lavados con agua fría, recristalizados de agua caliente y secados en un desecador. Las reacciones fueron monitoreadas por UV, evidenciando la formación en solución de la chalcona (antes de neutralizar), en CH-H 281 y 362 nm en MeOH y en CH-Hp 254 y 324 nm en el mismo solvente (Figura 27), valores que indican la presencia de una cetona - insaturada, después de neutralizar cada solución, presentaron máximos en 280 nm, en las flavanonas evidenciando la ausencia del sistema enona conjugado (chalcona).

En literatura consultada reporta la existencia del equilibrio de la flavanona y chalcona,<sup>[60]</sup> esta reacción es reversible y es desplazado hacia la flavanona por la existencia de un grupo OH en el C-5 de la flavanona o su equivalente C-6' en la chalcona<sup>[22]</sup>. Por lo anterior no se aislaron los productos CH-H y CH-Hp, solo se evidenciaron en solución. Es importante señalar que la obtención de la chalcona de hesperidina, es reportada en literatura <sup>[42], [43],-[44]</sup> bajo las condiciones anteriormente citadas, pero al neutralizar la solución para precipitar la chalcona, se obtenía la flavanona hesperidina o hesperetina.



**Figura 27.** Espectros UV de las soluciones de chalcona de hesperidina (CH-H) y chalcona de hesperetina (CH-Hp) en MeOH (a) antes, (b) después de neutralizar.

## 8.6 Síntesis de la Chalcona de naringina (CH-N): 4'-ramnoglucosil-2',6',4-trihidroxichalcona.

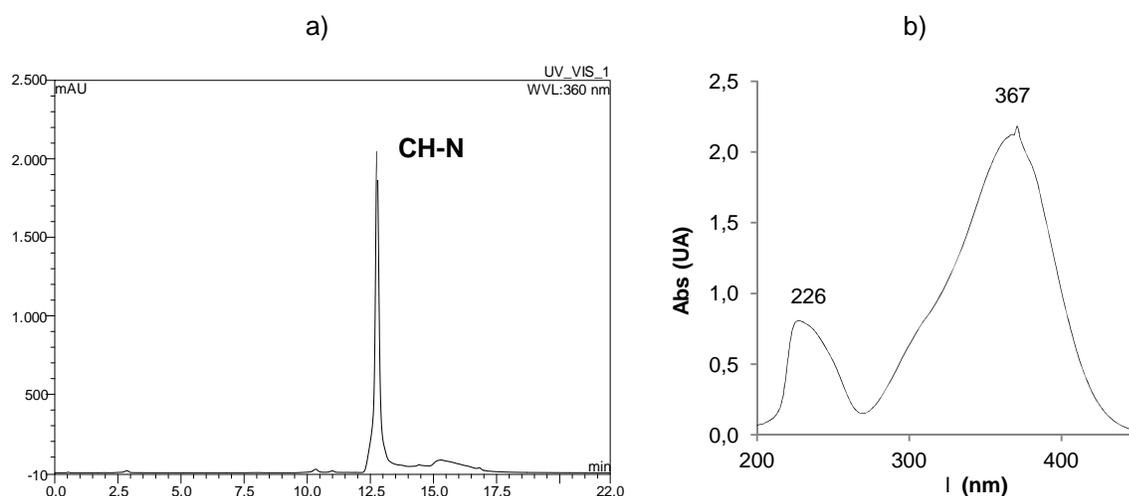
**CH-N**C<sub>27</sub> H<sub>32</sub> O<sub>14</sub>: 580,53 g/molP<sub>f,exp</sub>: 180-182°C

Rend: 40 %

% Pureza: &gt;84 %

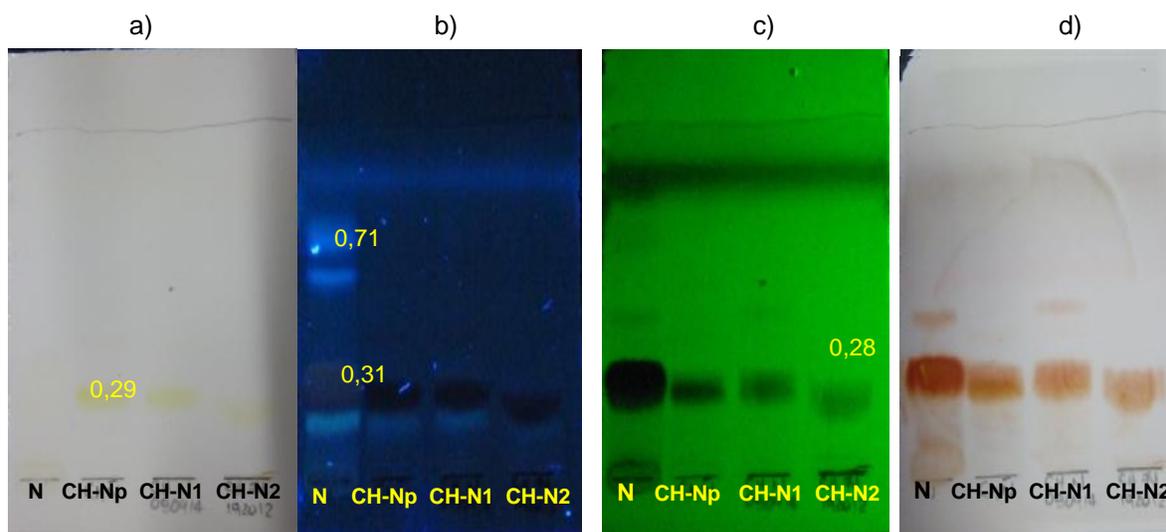
CAS: 50376-43-7

Esta reacción se llevo a cabo siguiendo el procedimiento descrito previamente (pág.36). Así, mediante agitación constante a T<sub>amb</sub> se mezcló N (1 eq, 1 g, 1,7 mmol) y NaOH (ac, 20%, 58 eq, 99,02 mmol, 20 mL) después de 6h, la mezcla fue enfriada a 0° C (12 h de refrigeración), y posteriormente fue neutralizada con HCl<sub>(c)</sub>, dejándose enfriar nuevamente a 0°C por 24 h, obteniendo un precipitado, de color amarillo claro, fue filtrado por succión, lavado con agua fría, recristalizado en agua (402,1 mg; 40%) y secado en un desecador. El sólido cristalizado presentó un P<sub>f,exp</sub> 180-182 °C (H<sub>2</sub>O), (P<sub>f,rep</sub>: 201-202 °C; H<sub>2</sub>O)<sup>[44]</sup> es inestable en solución de pH ácido, neutro<sup>[60]</sup> o básico y mostró un porcentaje de pureza > 84 % determinado por HPLC, Figura 28.

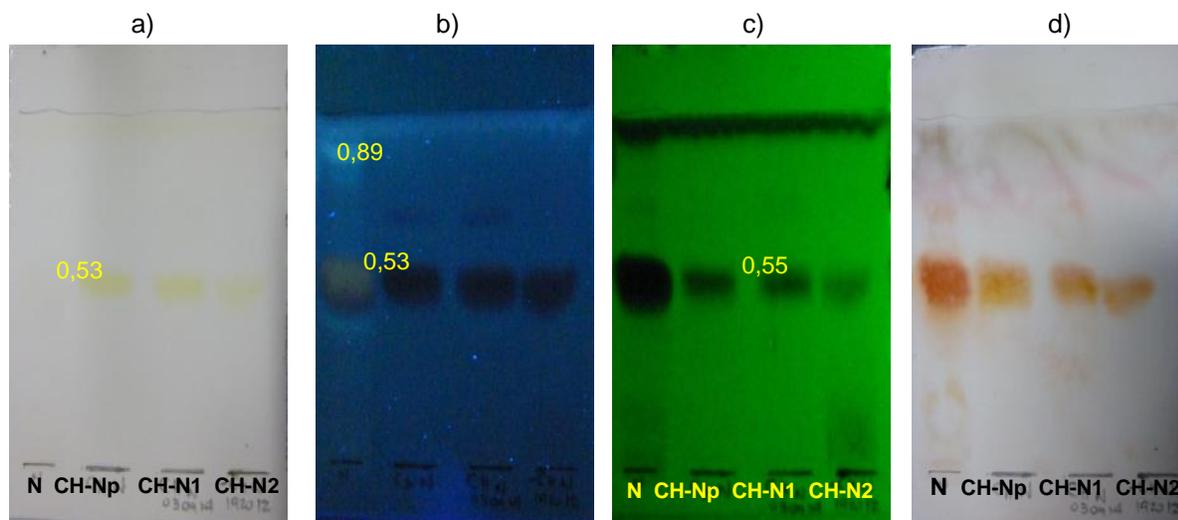


**Figura 28.** Determinación del porcentaje de pureza para la chalcona de naringina (CH-N). a) cromatograma HPLC de la CH-N utilizando Sistema de elución, detección a 280 nm; b) espectro de UV en eluente del Sistema.

El producto de reacción, chalcona de naringina (CH-N), fue un sólido amarillo soluble en EtOH, MeOH, AcOEt. Al ser desarrollado en CCF las muestras CH-N, N y patrón de CH-N (CH-N<sub>p</sub>), en el sistema de solventes AN-2 (Figura 29) y L-1 (Figura 30) con el fin de evaluar la pureza del precipitado obtenido CH-N. Las CCF fueron reveladas con el agente de coloración AS y se observan que presentan manchas de color amarillo-marrón en el visible y de color azul a 365 nm, los valores de R<sub>f</sub> obtenidos comparativamente para las muestras (CH-N1 y CH-N2), patrón (CH-N<sub>p</sub>) y material de partida (N), son poco diferenciables entre sí: R<sub>f</sub><sub>AN-2</sub>: N 0,31; 0,71; CH-N 0,28 (Figura 29) y R<sub>f</sub><sub>L-1</sub>: N 0,53; 0,89; CH-N 0,55, Figura 30.

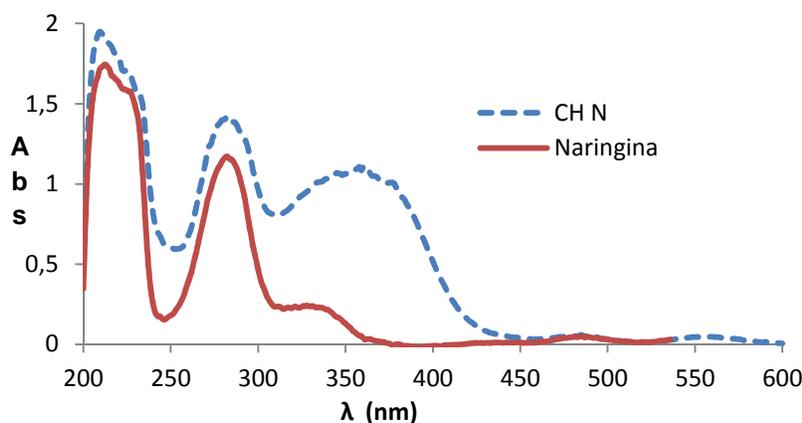


**Figura 29.** Cromatografía de capa fina realizada a las muestras de naringina (N), chalcona de naringina (CH-N) y chalcona de naringina patrón (CH-N<sub>p</sub>), utilizando el sistema de solvente AN2: AcOEt-MeOH-H<sub>2</sub>O (100:13,5:10; v/v/v) y como sistema de detección a) visible; b) 365 nm; c) 254 nm d) revelado AS, visible con calor.



**Figura 30.** Cromatografía de capa fina realizada a las muestras de naringina (N) y chalcona de naringina (CH-N), utilizando el sistema de solvente L-1:AcOEt-AcOH-HCO<sub>2</sub>H-H<sub>2</sub>O (100:10:10:10; v/v/v/v) y como sistema de detección a) visible; b) 365 nm; c) 254 nm d) revelado con AS, visible con calor.

Las muestras CH-N1 y CH-N2 fueron monitoreadas por UV en solución antes y después de neutralizar, observándose tanto en la solución como en el precipitado la presencia de la chalcona, con un máximo de absorción en la región de 300 a 400 nm (Banda I) y 220 a 270 nm (Banda II), en las muestras se evidenció CH-N UV-Vis (MeOH): 211, 283 y 356 nm, comparándose con el material de partida N, UV-Vis (MeOH): 212, 284 y 333 (sh) nm. (Figura 31).



**Figura 31.** Espectro UV de la solución de chalcona de naringina (CH-N) (después de neutralizar y/o acidificar) y naringina (N) en MeOH.

La muestra CH-N fue analizada por espectrometría IR (Espectro 9), presentando una banda ancha de absorción en  $3370\text{ cm}^{-1}$ , asignada a enlaces OH característica de alcoholes y fenoles (intervalo normal  $3650\text{--}3200\text{ cm}^{-1}$ ), presente en los anillos A, B y grupo glicosídico. Adicionalmente, se observa una banda intensa a  $1069\text{ cm}^{-1}$  asignada a enlaces C–O, característica de alcoholes CH-OH (intervalo normal  $1125\text{--}1000\text{ cm}^{-1}$ ), asociados al grupo glicosilado del anillo A de la CH-N; otra banda de absorción intensa a  $1626\text{ cm}^{-1}$  asociada a enlaces C=O (intervalo normal  $1775\text{--}1650\text{ cm}^{-1}$ ), esta banda presenta un subintervalo de cetonas conjugadas, insaturadas a enlaces C=C (intervalo normal  $1650\text{--}1600\text{ cm}^{-1}$ ), observada en la estructura de la CH-N. La banda de absorción débil en  $823\text{ cm}^{-1}$  (intervalo normal  $860\text{--}780\text{ cm}^{-1}$ ) determina el tipo de sustitución *para* en anillos aromáticos, observada en el anillo B de la CH-N.

La muestra CH-N es inestable en solución de pH ácido, neutro<sup>[60]</sup> o básico, donde el equilibrio de isomerización de chalcona (CH-N) a flavanona (N) es rápido ( $t < 150\text{ min.}$ ), lo cual fue evidenciado en los espectros de RMN tomado en DMSO- $d_6$  para la muestra CH-N, para la cual se observan los desplazamientos, mayoritarios, asociados a N en lugar de CH-N. Sin embargo, en el espectro de RMN- $^1\text{H}$  (Espectro 11) se observan dos dobletes centrados en 7,94 (15,4 Hz) y 7,55 (8,1 Hz) asociados a enlaces olefínicos *trans*- y *cis*-chalcona respectivamente. Adicionalmente, en el espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  (Espectro 13) se observan las señales en 130,08 y 116,61 ppm atribuibles a los metinos del anillo 1,4-disustituido de la chalcona. Así, en el espectro de RMN- $^1\text{H}$  (Espectros 10 y 11), tomado en DMSO- $d_6$ , la CH-N muestra las siguientes señales, un desplazamiento químico de 12,06 ppm asociado a un grupo OH formando puente de hidrógeno con un carbonilo y otra señal a 9,67 ppm correspondiente a protones hidroxí fenólicos asignados a OH-5 y OH-4' respectivamente. Se observan par de dobletes que integran para dos protones, con desplazamientos químicos en 7,33 y 6,81 ppm cuyas constantes de acoplamiento son iguales a 8,4 Hz, lo cual es característico en anillos aromáticos con patrón de sustitución *-para* (1,4-) Dos singletes centrados en 6,11 y 6,09 ppm que integran para un protón cada uno, están asociados a H-8 y H-6 en N respectivamente. En

5,54 ppm se observa inicialmente un triplete de doblete con constantes de acoplamiento de 9,6 y 2,5 Hz, sin embargo, esta asignación corresponde a dos dobletes de dobletes, solapados entre sí, centrados en 5,52 y 5,49 ppm con constantes de acoplamiento 9,6 y 2,5 Hz y están asociados a los protones H-2 de los diastereoisómeros de naringina 2*S* y 2*R* respectivamente, previamente reportados en la literatura.<sup>[48]</sup> Esta observación confirma la reversibilidad racémica de la reacción de chalcona a flavanona de naringina en solución. A continuación se observan señales asociadas a la parte glicosídica de la muestra CH-N, donde resaltan par de dobletes, el primero a 5,17 ppm y constante de acoplamiento 4,2 Hz; y la segunda señal a 5,16 ppm y constante de acoplamiento 5,9 Hz asociados a los protones anoméricos de la glucosa en la mezcla racémica de naringina 2*S* y 2*R*, mientras que para la ramnosa se observa un multiplete centrado en 5,10 ppm asociado a los protones anoméricos de la ramnosa en la mezcla racémica de 2*S* y 2*R* de naringina presente en la muestra denominada CH-N. En 1,15 ppm, se observa un doblete con constante de acoplamiento de 6,5 Hz, asociado a los protones metílicos de la ramnosa en la muestra.

Al comparar las señales en el espectro de RMN-<sup>13</sup>C (Espectro 12), observamos una señal con desplazamiento de 197,80 ppm correspondiente al grupo carbonilo. También desplazamientos desde 165 a 95 ppm que corresponden a carbonos de sistemas aromáticos y otros enlazados a un hidroxilo. La fracción glicosídica de la estructura aparece en el rango de 79,37 ppm hasta 68,84 ppm. La señal con desplazamiento 18,57 ppm esta asignada al CH<sub>3</sub> (ramnosa). En el DEPT-135 (Espectro 13) se observan dos señales de fases negativas con desplazamientos de 61,02 y 42,66 ppm características los metilenos de la glucosa y del carbono C-3 de la flavanona.

Las señales mayoritarias en los espectros RMN-<sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C del compuesto CH-N, indican que la estructura elucidada se corresponde a una mezcla racémica del material de partida naringina y difiere de la estructura de la chalcona (CH-N). Sin embargo las señales minoritarias confirman la presencia de la chalcona de

naringina y por ende el equilibrio flavanona-chalcona. En la Tabla 10, se muestra las señales de RMN- $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  asignadas tanto para la mezcla racémica de naringina como la mezcla *cis*- y *trans*-chalcona de naringina.

## Resultados Sintéticos-Discusión

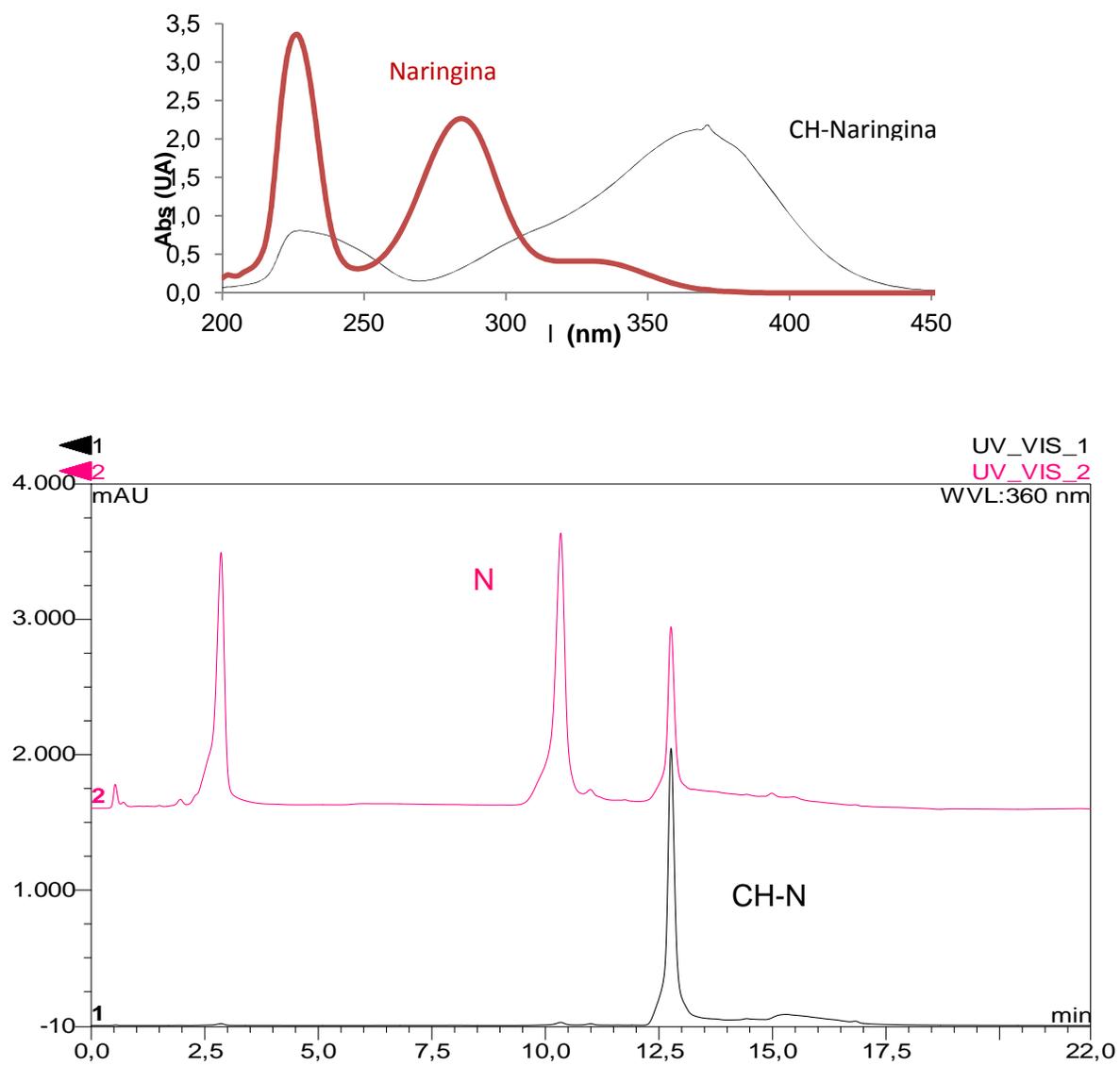
Tabla 10. Desplazamientos químicos de protones y carbono para la Naringina (270 MHz, DMSO- $d_6$ ). Constante de acoplamiento en paréntesis (J en Hz).

Señales Mayoritarias (Naringina, N)						
H/C	Isómero 2S		Isómero 2R		$\delta_c$ (ppm)	DEPT
	$\delta_H$ (ppm)	Multp; J (Hz)	$\delta_H$ (ppm)	Multp; J (Hz)		
2	5,52	dd; 9,6/2,5	5,49	dd; 9,6/2,5	79,35	CH
3	3,40 <sub>ecuat</sub> 2,70 <sub>axial</sub>	<i>m</i> ; <i>m</i>	3,43 <sub>axial</sub> 2,75 <sub>ecuat</sub>	<i>m</i> ; <i>m</i>	42,69 <sup>a</sup>	CH <sub>2</sub>
4					197,80	C
5					165,47	C
6	6,11	<i>s</i>			96,91	CH
7					165,47	C
8	6,09	<i>s</i>			95,68	CH
9					163,43	C
10					100,96	C
1'					129,13	C
2'	7,33	<i>d</i> ; 8,4			128,91	CH
3'	6,81	<i>d</i> ; 8,4			115,81	CH
4'					158,40	C
5'	6,81	<i>d</i> ; 8,4			115,81	CH
6'	7,33	<i>d</i> ; 8,4			128,91	CH
1''	5,17	<i>d</i> ; 5,2	5,16	5,9	97,98	CH
2''					77,71	CH
3''					79,37	CH
4''					70,18	CH
5''					77,45	CH
6''	3,67 3,40(s)				61,02 <sup>a</sup>	CH <sub>2</sub>
1'''	5,10	<i>m</i>	5,10	<i>m</i>	98,13	CH
2'''					71,07	CH
3'''					76,81	CH
4'''					72,42	CH
5'''					68,84	CH
6'''	1,15	<i>d</i> ; 6,2			18,59	CH <sub>3</sub>
Señales Minoritarias (Chalcona de naringina, CH-N)						
	$\delta_H$ (ppm)	Multp; J (Hz)				
$\alpha$	7,95	<i>d</i> ; 15,4				
$\beta$	7,69	<i>d</i> ; 15,9				
1''					101,18 <sup>b</sup>	CH
1'''					97,19 <sup>b</sup>	CH
3',5'					95,26 <sup>b</sup>	CH
2,6	7,55	<i>d</i> ; 8,1			131,08 <sup>b</sup>	CH
3,5					116,61 <sup>b</sup>	CH

a) Señal con fase negativa ( ) en el espectro DEPT 135° (Espectro 13), desplazamiento químico reportado en DMSO- $d_6$  39,7 ppm (RMN-<sup>13</sup>C) y 2,5ppm (RMN-<sup>1</sup>H). b) asignadas a través del espectro DEPT-135 (Espectro 13).

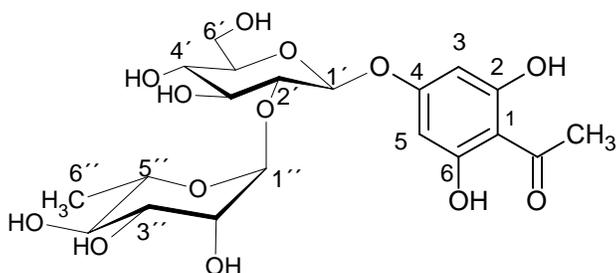
La muestra CH-N tratada por HPLC, evidenció la interconversión de la muestra CH-N a la muestra de partida N, varios estudios revelan <sup>[61]</sup> que el sistema se desplaza a la formación de chalcona (apertura de anillo C) si el medio es básico, cambiando a la flavanona (formación de ciclo) si es ácido. El eluyente usado para tratar la muestra CH-N por HPLC fue la mezcla: solvente A: H<sub>2</sub>O-AcOH<sub>glacial</sub> (991,7:8,3; v/v) y solvente B: ACN-AcOH<sub>glacial</sub> (992:8; v/v), un medio ácido para este sistema, por lo cual está presente la mezcla racémica del material de partida N (>12%), pero se observa en el cromatograma la especie CH-N (>84%), el procedimiento entre la preparación de la muestra CH-N, su dilución en una mezcla de ACN-AcOH y posterior estudio por HPLC fue alrededor de 30 min, tiempo que permitió evidenciar el inicio del equilibrio  $CH-N \rightleftharpoons N$ , (Figura 32), en donde el pico a 10,5 min del cromatograma, pertenece a la flavanona naringina (N) a una longitud de onda de 280 nm y el pico situado a 12,5 min pertenece a la chalcona de naringina (CH-N), a 360 nm, donde está su máximo.

## Resultados Sintéticos-Discusión



**Figura 32.** Espectro UV y cromatograma HPLC comparativo a : 280 nm (en rojo) y : 360 nm (en negro) de la muestra chalcona de naringina (CH-N) en equilibrio con naringina (N).

8.7 Síntesis de la Floracetofenona 4'-neohesperidosido (Fa4n): 4-acetil-3, 5-dihidroxi-fenil-(O2'-L-ramnopiranosil-D-glucopiranosido).



**Fa4n**

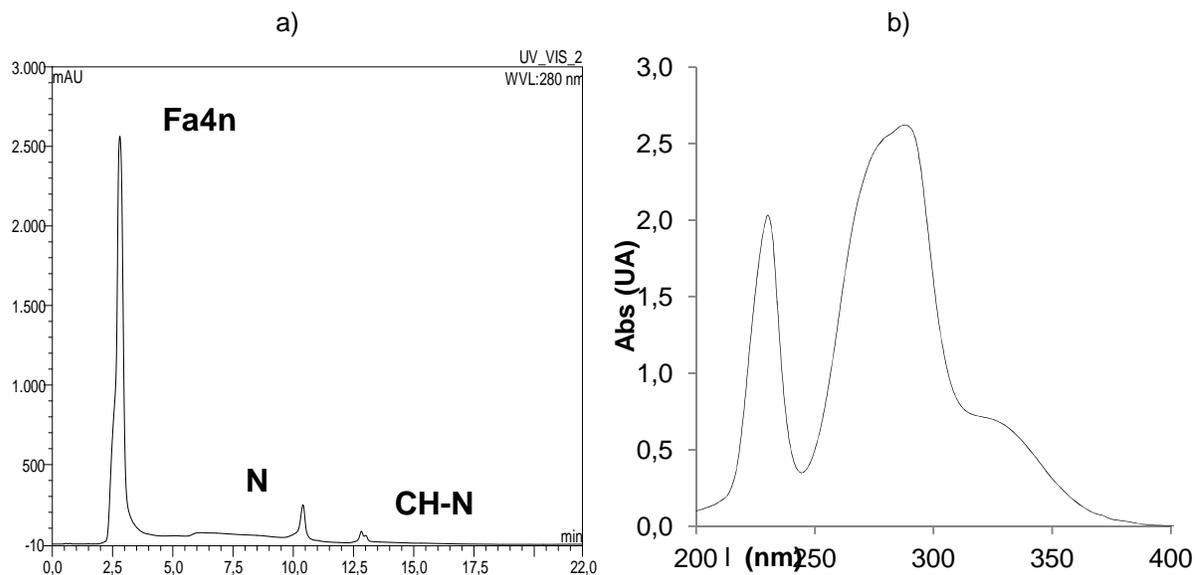
$C_{20}H_{28}O_{13}$ : 476,43 g/mol

$Pf_{exp}$ : 160-164°C

Rend: 34 %

CAS: 23643-71-2

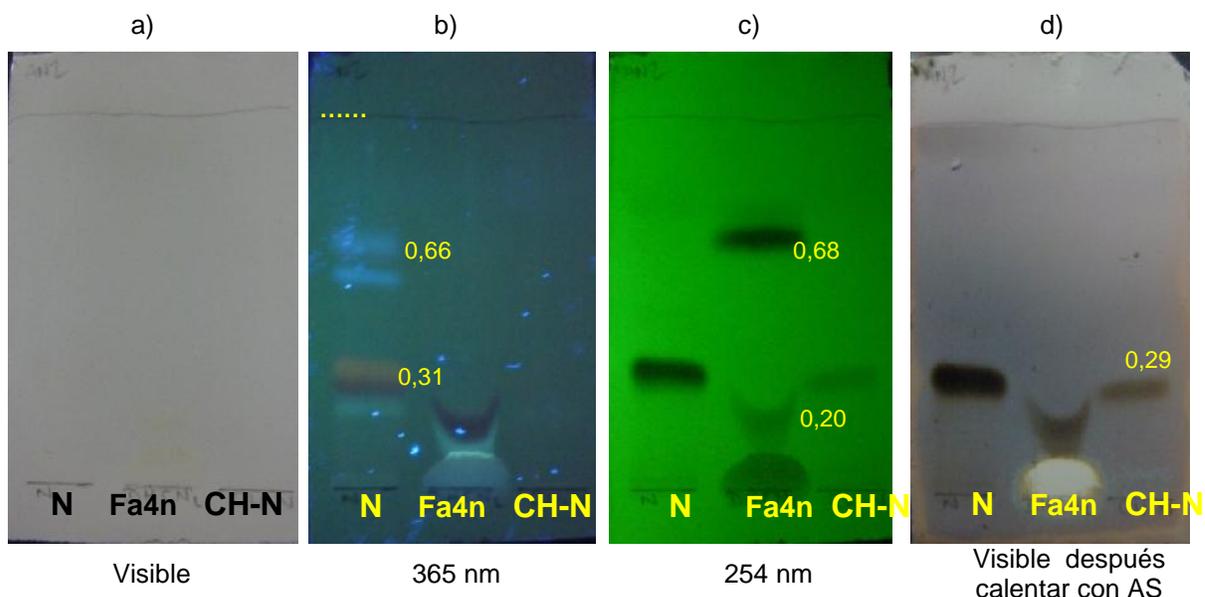
Siguiendo el procedimiento descrito previamente (pág. 37) para la obtención de la dihidrochalcona de naringina (DCH-N) partiendo de la chalcona de naringina (CH-N), se realizó la síntesis de la floracetofenona 4'-neohesperidosido (**Fa4n**) como un producto de degradación, sólido de color beige claro (168,7mg, 34 %),  $Pf_{exp}$  160-164°C ( $Pf_{rep}$  164-166°C) [43], soluble en  $CH_2Cl_2$ , EtOH, AcOEt,  $H_2O$ , poco soluble en MeOH e insoluble en Hex y  $CHCl_3$ . La muestra Fa4n fue evaluada por HPLC, determinando un porcentaje de pureza > 90%, (Figura 33). Se observa en el cromatograma la presencia del equilibrio chalcona-flavanona, además del producto de degradación Fa4n.



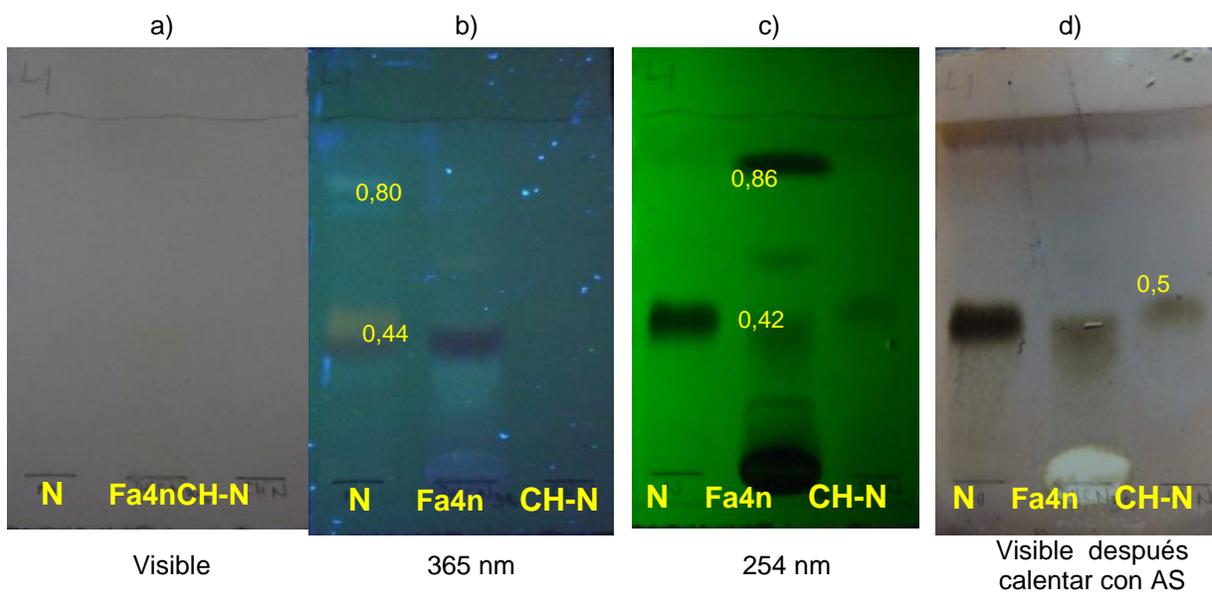
**Figura 33.** Determinación del porcentaje de pureza para la floracetofenona 4'-neohesperidosido (Fa4n). a) cromatograma HPLC de la Fa4n utilizando Sistema de elución, detección a 280 nm; b) espectro de UV en eluente del Sistema.

La hidrogenación catalítica como proceso reductivo, es una reacción que permite la saturación de un doble o triple enlace mediante el uso de un catalizador y condiciones de reacción adecuadas (disolvente, presión y temperatura) incluyendo el compuesto mismo. En casos donde la concentración con álcali es mayor de 30% y calor, se favorece la fragmentación de los anillos A y B y los carbonos C-2 y C-3 [22] La alta presión atmosférica aplicada y agitación continua favorecieron la reacción retro Claisen-Schmidt, lo cual produjo la fragmentación de la chalcona de naringina para la obtención del producto de degradación cetónico, identificado como floracetofenona 4'-neohesperidosido (**Fa4n**).

La CCF aplicada a la muestra obtenida floracetofenona 4'-neohesperidosido (Fa4n) frente a la naringina (N) y chalcona de naringina (CH-N), en el sistema de solventes AN-2 (AcOEt-MeOH-H<sub>2</sub>O ; 100:13,5:10; v/v/v) (Figura 34) y L-1: (AcOEt-AcOH-HCO<sub>2</sub>H-H<sub>2</sub>O; 100:10:10:10; v/v/v/v), (Figura 35), revela manchas de color amarillo a marrón en el visible y naranja y azul a 365 nm asociadas a un esqueleto flavonoidal, al ser rociadas con AS y calentar se intensificó la coloración anterior (marrón oscuro), para las muestras de N y CH-N, los valores de R<sub>f</sub> de las muestras son diferenciables (R<sub>f</sub><sub>AN-2</sub>: 0,31 ; 0,66 N; 0,29 CH-N y 0,20 ; 0,68 Fa4n, (Figura 34) y R<sub>f</sub><sub>L-1</sub>: 0,44 ; 0,80 N; 0,50 CH-N y 0,42 ; 0,86 Fa4n, (Figura 35).

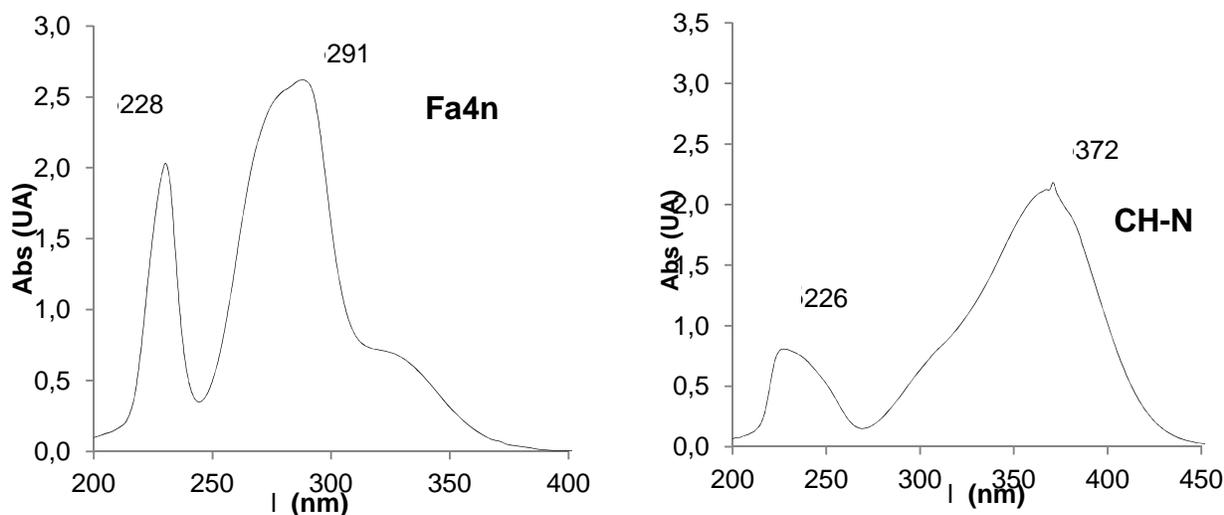


**Figura 34.** Cromatografía de capa fina realizada a las muestras de naringina (N), floracetofenona 4'-neohesperidosido (Fa4n) y chalcona de naringina (CH-N), utilizando el sistema de solvente AN2: AcOEt-MeOH-H<sub>2</sub>O (100:13,5:10; v/v/v) y como sistema de detección a) visible; b) 365 nm; c) 254 nm d) AS, 365 nm con calor.



**Figura 35.** Cromatografía de capa fina realizada a las muestras de naringina (N), floracetofenona 4'-neohesperidosido (Fa4n) y chalcona de naringina (CH-N), utilizando el sistema de solvente L-1: AcOEt -AcOH-HCO<sub>2</sub>H-H<sub>2</sub>O (100:10:10:10; v/v/v/v) y como sistema de detección a) visible; b) 365 nm; c) 254 nm d) AS, 365 nm con calor.

En el espectro de UV-Vis la muestra floracetofenona 4'-neohesperidosido (Fa4n) evidencia dos bandas de absorción a 228 y 291 nm, lo cual es característico de compuestos aromáticos y son diferentes a las observadas en el material de partida chalcona de naringina (CH-N) a 226 y 372 nm, esta última asociada a la banda I de un flavonoide tipo chalcona (300-400nm) (Figura 36).



**Figura 36.** Espectros U.V de floracetofenona 4'-neohesperidosido (Fa4n) y chalcona de naringina (CH-N) en eluente del sistema HPLC.

En el espectro de RMN-<sup>1</sup>H (Espectros 14 - 16) tomado a la muestra (Fa-4n) en DMSO-<sub>d6</sub> se observa un singlete con desplazamiento a 5,98 ppm que integra para dos protones, es atribuida a los protones H-3 y H-5 del sistema aromático, con un ambiente químico igual. Otras señales van desde un rango de 5 ppm hasta 3 ppm, que representan la parte glicosídica de la estructura, en el espectro 16-integrado, la señal a 1,16 ppm y constante de 5,7 Hz, el cual integra a 3 protones es observada como un doblete que sugiere la presencia de ramnosa, conjuntamente con la señal del protón anomérico a 4,76 ppm y constante de 7,7 Hz, a 5,05 ppm se observa un doblete que integra a dos protones y constante de acoplamiento de 10,6 Hz, que corresponde al protón anomérico de la glucosa. A 2,57 ppm se observa un singlete asociado a un metilo unido a un grupo carbonilo, se reporta un valor de 2,55 ppm para alcanos monosustituidos. El espectro de

RMN-<sup>13</sup>C (Espectro 17) de la muestra Fa4n se observa una señal con desplazamiento 204,05 ppm atribuida al grupo carbonilo, seguida de otras señales a 164,38 ppm y 163,50 ppm asignadas a los carbonos C-4, C-2 y C-6 del anillo aromático por la influencia del oxígeno (grupo OH y O-R), los carbonos C-3 y C-5 presentan señal a 97,87 ppm en consecuencia de los efectos del grupo hidroxilo en las posiciones orto y para respectivamente y el sustituyente O-R en posiciones orto.

La señal para el carbono C-1 se ubica en 106,25 ppm por el efecto *orto*- y *para*- de los sustituyentes OH y O-R. El grupo de señales desde 77,67 hasta 60,91 ppm se atribuye a la parte glicosídica de la estructura, destacándose en DEPT-135 (Espectro 18) las señales a 60,91 ppm y 18,16 ppm, pertenecientes a los carbonos metilénico de la glucosa y metilo de la ramnosa. El metilo unido al carbonilo se observa a 33,13 ppm.

La información espectroscópica RMN-<sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C del compuesto floracetofenona-4'- -neohesperidosido (Fa4n) se asignaron según la tabla 11.

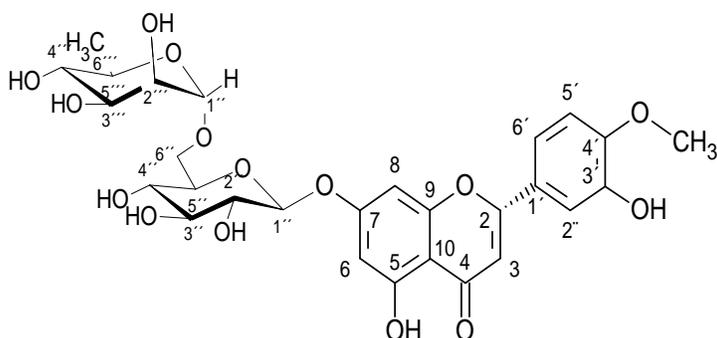
## Resultados Sintéticos-Discusión

**Tabla 11.** Desplazamientos químicos de protones y carbonos para la floracetofenona-4'- -neohesperidosido **Fa4n** (270 MHz, DMSO- $d_6$ ). Constante de acoplamiento en paréntesis (J en Hz).

H/C	$\delta_H$ (ppm)	J (Hz)	$\delta_C$ (ppm)	DEPT
1			106,23	C
2			163,50	C
3	5,98 (s) (H)	-	97,87	CH
4			164,38	C
5	5,98 (s) (H)	-	97,87	CH
6			163,50	C
CO			204,05	C
CH <sub>3</sub>	2,57 (s) (3H)	-	33,13	CH <sub>3</sub>
1'	5,38	4,9	100,19	CH
2'	4,07	-	77,67	CH
3'	3,34	4,2	77,35	CH
4'	3,67	12,9	71,12	CH
5'	5,05 (d)	10,6	77,35	CH
6'	4,55 (d)	5,7	60,91 <sup>a</sup>	CH <sub>2</sub>
1''	5,19 (d)	5,9	100,19	CH
2''	3,44	5,2	72,40	CH
3''	3,38	10,9	70,79	CH
4''	3,38	10,9	72,40	CH
5''	4,73 (d)	4,2	68,75	CH
6''	1,16(d)(3H)	5,7	18,16	CH <sub>3</sub>

a) Señal con fase negativa ( ) en el espectro DEPT 135° (espectro 18), desplazamiento químico reportado en DMSO- $d_6$  39,7 ppm (RMN-<sup>13</sup>C) y 2,5ppm (RMN-<sup>1</sup>H).

8.8 Síntesis de la Flavona de Hesperidina (F-H): 5, 7, 3'-trihidroxi-4'-metoxi-flavona-7-rutinosido (Diosmina).



**F-H**

C<sub>27</sub>H<sub>30</sub>O<sub>14</sub>: 608,54 g/mol

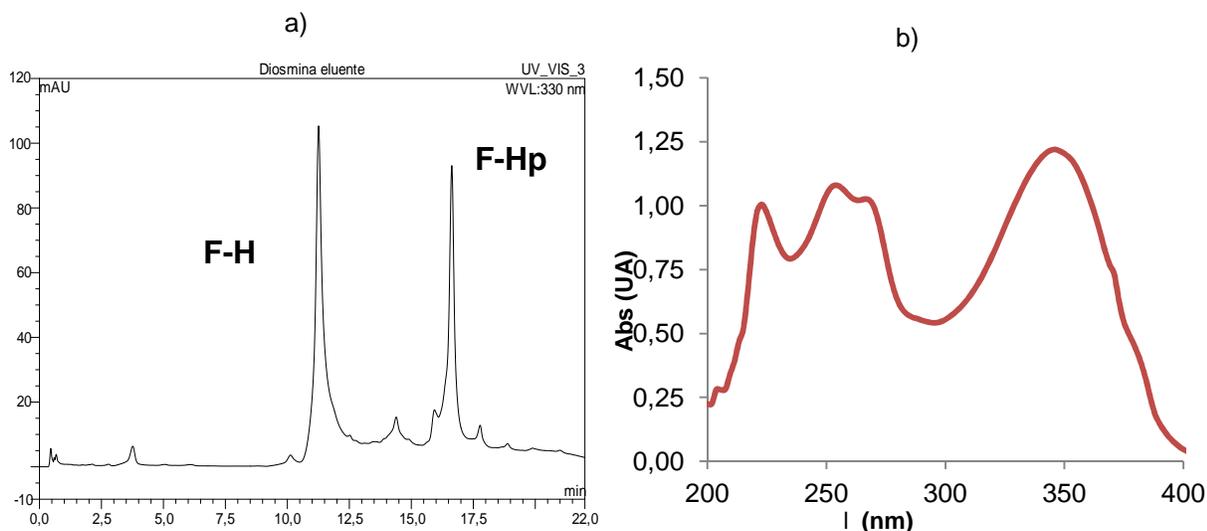
Pf<sub>exp</sub>: 248-256 °C

%Pureza: 51,54

Rend: 38,5%

CAS: 520-27-4

De acuerdo al procedimiento descrito previamente (pág. 37), la hesperidina acetilada (2,199 g; 2,3 mmol; 1eq), se disolvió en CHCl<sub>3</sub>, se agregó NBS (0,6664 g; 3,7 mmol; 1,6 eq), (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CO)<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,1009 g; 0,4 mmol; 0,2 eq) y se mantuvo a temperatura de reflujo (60°C) por 10 horas. El residuo viscoso obtenido se disolvió en EtOH y se basificó con una solución acuosa de NaOH al 15%, la cual fue calentada a ebullición por 5 minutos y neutralizada con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>(c). El precipitado obtenido fue lavado con una mezcla H<sub>2</sub>O-EtOH (1:1, v/v), obteniéndose 544,6 mg (38%), Pf<sub>exp</sub> 248-256 °C, (Pf<sub>rep</sub>: 272-280 °C) [45]. Se purificó la muestra por cromatografía en columna, usando mezclas de polaridad ascendente de Acetona-MeOH (100:0; v/v) (0:100; v/v), obteniéndose 161,8 mg de una mezcla, cuyo análisis por HPLC (Figura 37) mostró que contiene a la flavona de hesperidina (F-H) en 51 % y su aglicona (flavona de hesperetina/ F-Hp) en un 35 %, las cuales son conocidas como diosmina y diosmetina respectivamente.

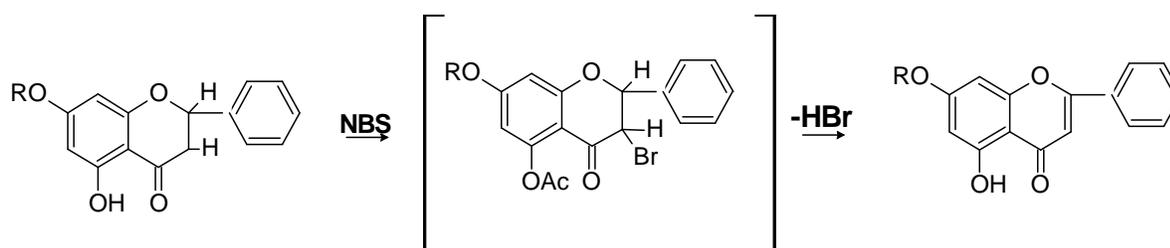


**Figura 37.** Determinación del porcentaje de pureza para la flavona de hesperidina (F-H)-. a) cromatograma HPLC de la flavona de hesperidina (F-H) utilizando Sistema de elución, detección a 330 nm; b) espectro de UV en eluente del Sistema.

Las etapas esenciales para la obtención de la flavona comprenden:

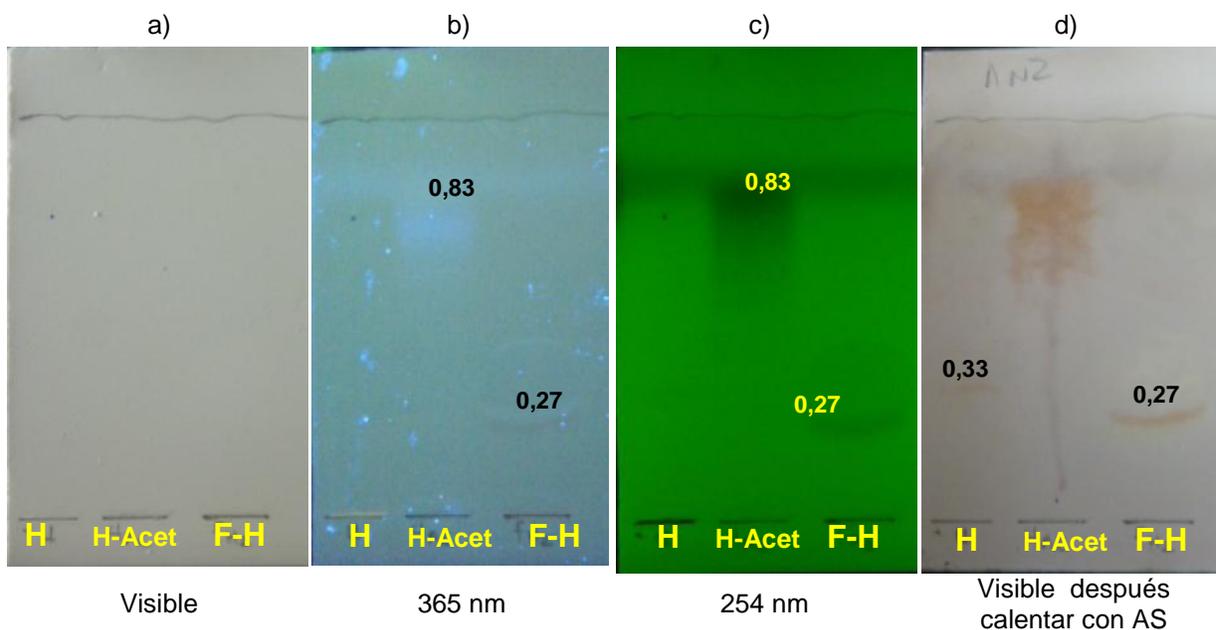
1. La acetilación de la flavanona mediante el tratamiento con anhídrido acético y piridina en reflujo, con el fin de proteger los grupos OH.
2. La oxidación de la flavanona acetilada mediante:
  - a) N-bromosuccinimida (NBS) y peróxido de benzoilo
  - b) Oxido de selenio ( $\text{SeO}_2$ ) en alcohol isoamilico.
3. La hidrólisis básica del producto oxidado con el fin de eliminar los grupos acetilo y restablecer los grupos OH.<sup>[46]</sup>

La utilización de NBS y peróxido de benzoilo es con el fin de realizar una halogenación selectiva, introduciendo el bromo en el C-3 de flavanona glicosilada, para luego eliminar el HBr mediante una base fuerte, formando un alqueno.<sup>[45]</sup>



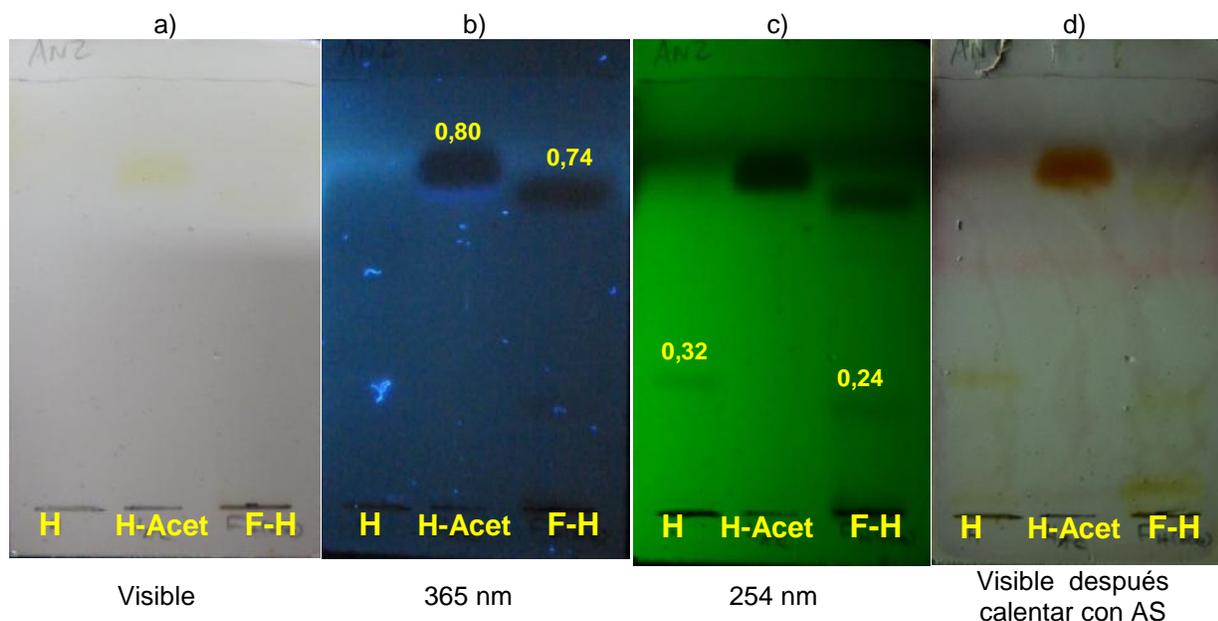
La oxidación de la flavanona acetilada mediante el uso de  $\text{SeO}_2$ , promueve la deshidrogenación del carbono al grupo carbonilo presente en el anillo C de la estructura. [58]

La CCF aplicada a la muestra obtenida flavona de hesperidina (F-H) frente al material de partida hesperidina (H) y la hesperidina acetilada (H acetilada), en el sistema de solvente AN-2 (AcOEt-MeOH- $\text{H}_2\text{O}$  (100:13,5:10; v/v/v)) revela manchas de color amarillo a marrón en el visible y naranja y azul a 365 nm asociadas a un esqueleto flavonoidal, al ser rociadas con AS y calentar se intensificó la coloración anterior (marrón oscuro), para las muestras, los valores de  $R_f$  de las muestras son diferenciables ( $R_{f\text{AN-2}}$ : 0,33 H; 0,83 H-acet; 0,27 F-H) (Figura 38).



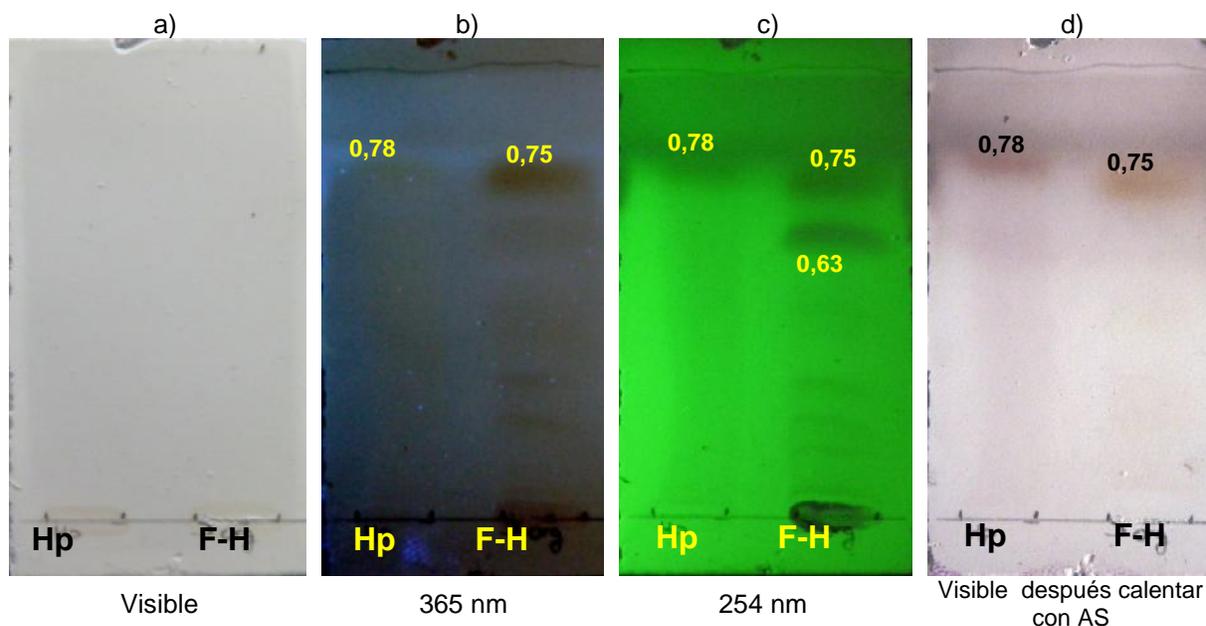
**Figura 38.** Cromatografía de capa fina (NBS) realizada a las muestras de hesperidina (H), hesperidina acetilada (H-Acet) y flavona de hesperidina (F-H), utilizando el sistema de solvente AN2: AcOEt-MeOH- $\text{H}_2\text{O}$  (100:13,5:10; v/v/v) y como sistema de detección a) visible; b) 365 nm; c) 254 nm d) AS, 365 nm con calor.

Al emplear el segundo procedimiento utilizando  $\text{SeO}_2$  (10 eq) y alcohol isoamilico (pág. 38), el precipitado obtenido fue lavado con una mezcla  $\text{H}_2\text{O}$ -EtOH (1:1; v/v), obteniéndose 968,7 mg (21%). La CCF aplicada a la muestra obtenida flavona de hesperidina (F-H) frente a la hesperidina (H) y hesperidina acetilada (H acetil), en el sistema de solventes AN-2 ( $\text{AcOEt}$ - $\text{MeOH}$ - $\text{H}_2\text{O}$ ; 100:13,5:10; v/v/v), revela manchas de color amarillo a marrón en el visible y naranja y azul a 365 nm asociadas a un esqueleto flavonoidal, al ser rociadas con AS y calentar, se intensificó la coloración anterior (marrón oscuro), los valores de  $R_f$  de las muestras son diferenciables ( $R_{f\text{AN-2}}$ : 0,32 H; 0,80 H-acet; 0,74 ; 0,24 F-H) (Figura 39), observándose dos manchas para la muestra F-H (0,74 ; 0,24), la de menor  $R_f$  con valor similar a la hesperidina (0,32), la otra mancha de la muestra un  $R_f$  cercano a la hesperidina acetilada (0,80), presentando menos polaridad con respecto a las primeras.



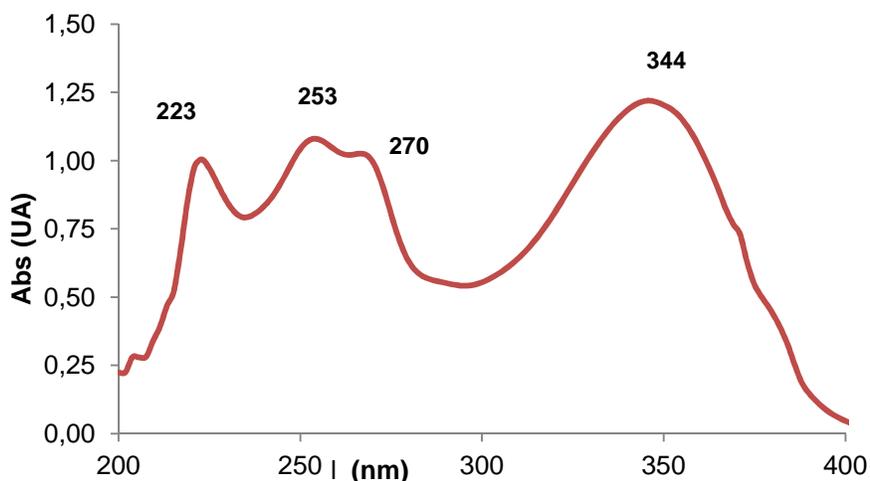
**Figura 39.** Cromatografía de capa fina ( $\text{SeO}_2$ ) realizada a las muestras de hesperidina (H), hesperidina acetilada (H-Acet) y flavona de hesperidina (F-H), utilizando el sistema de solvente AN2:  $\text{AcOEt}$ - $\text{MeOH}$ - $\text{H}_2\text{O}$  (100:13,5:10; v/v/v) y como sistema de detección a) visible; b) 365 nm; c) 254 nm d) AS, 365 nm con calor.

Se realizó un CCF con la hesperetina (Hp) obtenida y la muestra flavona de hesperidina (F-H) en (SeO<sub>2</sub>), se observa que ambas presentan un valor similar de Rf 0,78 Hp y 0,75; 0,63 F-H, revelando que presentan polaridades similares y aún continúa con impurezas (Figura 40).



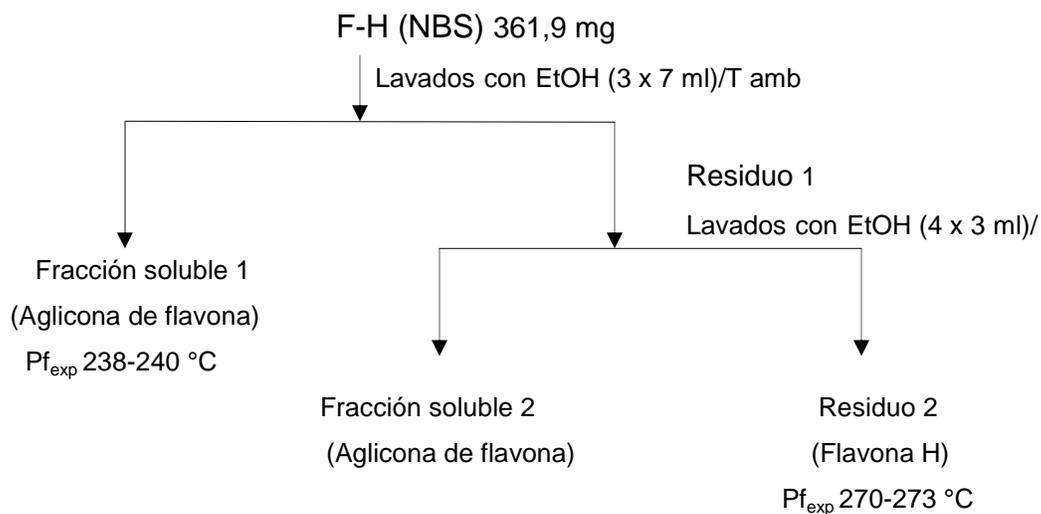
**Figura 40.** Cromatografía de capa fina realizada a las muestras de hesperetina (Hp) y flavona de hesperidina (F-H), utilizando el sistema de solvente AN2: AcOEt-MeOH-H<sub>2</sub>O (100:13,5:10; v/v/v) y como sistema de detección a) visible; b) 365 nm; c) 254 nm d) AS, 365 nm con calor.

El espectro UV de flavona de hesperidina (F-H) muestra dos bandas de absorción a 253, 270 nm (banda II) y en 344 nm (banda I), estas son características para las flavonas. Los picos observados en la banda II, son indicativos de aumento de la oxigenación en el anillo B de la flavona, originando uno o dos picos, designados como II a y II b, siendo el de mayor longitud de onda el pico II a, este último puede observarse como un pico menor (“shoulder”) entre 250 – 275 nm <sup>[62]</sup> (Figura 41).



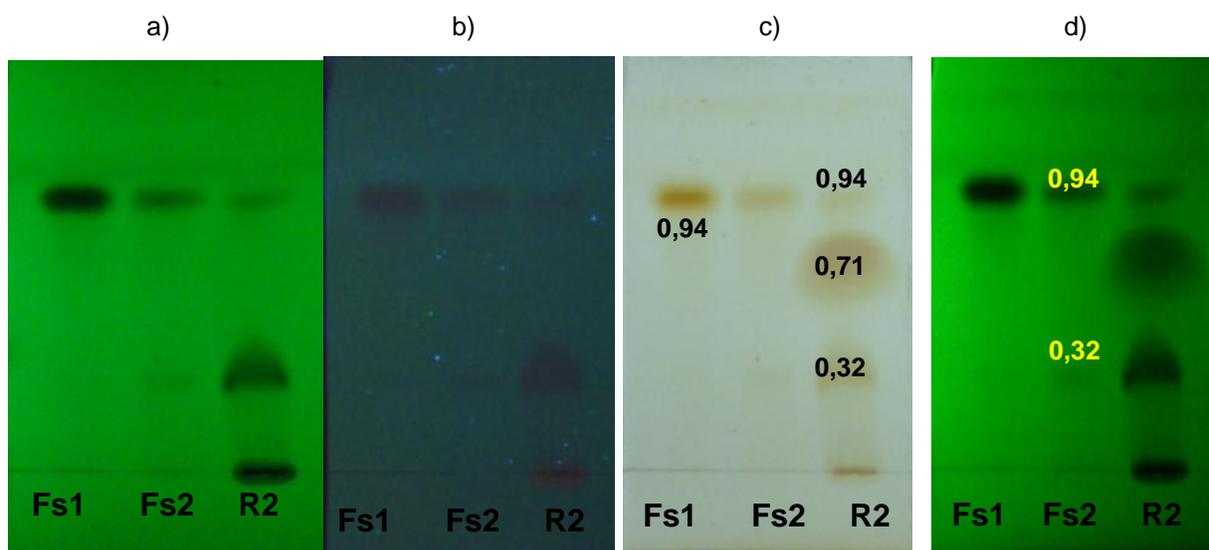
**Figura 41.** Espectro U.V de la flavona de hesperidina (F-H) en eluente.

La muestra flavona de hesperidina (F-H) obtenida por el primer procedimiento (NBS) se aplicó el esquema de separación (esquema 8), en donde las fracciones solubles se hallaron la aglicona (flavona de hesperetina), y el residuo 2 se halló la flavona de hesperidina aún con impurezas.



**Esquema 8.** Separación de la muestra flavona de hesperidina F-H (NBS).

En el análisis por CCF, para las fracciones solubles (Fs) 1 y 2 y el residuo (R) 2, se observan, que la Fs1 presenta una mancha con Rf: 0,94, en cambio la Fs2 presenta una mancha con Rf: 0,94 y una ligera impureza con Rf: 0,32 aproximado y el R2 muestra tres manchas cada una con Rf: 0,94; 0,71 y 0,32. (Figura 42). Para realizar la espectrometría RMN-<sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C se toman la Fs1 (Aglicona de flavona) y el R2 (Flavona H).



**Figura 42.** Cromatografía de capa fina realizada a las fracciones solubles 1 y 2 y residuo 2, utilizando el sistema de solvente AN2: AcOEt-MeOH-H<sub>2</sub>O (100:13,5:10; v/v/v) y como sistema de detección a) 254 nm, b) 365 nm; c) I<sub>2</sub>, visible, d) 254 nm.

La fracción de la flavona de hesperetina (diosmetina) evaluada por RMN-<sup>1</sup>H fue analizada en CD<sub>3</sub>OD (Espectros 19 y 20), observándose las siguientes señales en la región aromática, un doblete de doblete en 7,51 ppm con una constante de acoplamiento (J= 8,0; 2,0 Hz), que integra para un protón asignado al H-6', seguidamente en 7,39 ppm se observa un doblete con constante de acoplamiento de J= 2,2 Hz, asociado a un protón H-2', en 7,09 ppm se muestra un doblete (J= 8,4Hz) asignado al protón H-5'. De acuerdo con los datos reportados en la literatura, los singletes centrados en 6,58; 6,44 y 6,20 ppm corresponden a los protones H-3, H-8 y H-6, respectivamente, en la flavona de hesperetina (diosmetina).<sup>[63]</sup> En 3,94

ppm se observa un singlete asociado al grupo metoxi (4'-OMe) del anillo B de la flavona.

El uso de RMN-<sup>13</sup>C (Espectro 21) mostro las señales a 118,71; 112,66; 111,45; 103,23; 98,95 y 93,79 ppm características de carbonos en sistemas aromáticos y asignados a los C-6', C-5', C-2', C-3, C-6 y C-8 respectivamente, reportados en literatura [64]. También se observa la señal del grupo metoxi del anillo B de la flavona a 55,20 ppm.

La segunda fracción (residuo 2) de la flavona glicosilada (diosmina) se disolvió en DMSO-*d*<sub>6</sub> y analizó con espectrometría RMN-<sup>1</sup>H (Espectros 22 - 25), el Espectro 22 se observan los siguientes desplazamientos químicos, a 12,03 ppm característica del OH (C-5) en núcleos flavonoidales, el cual forma puente de hidrógeno intramolecular con el carbonilo en C-4, un singlete a 9,47 ppm asignado a un protón hidroxifenólico presente en C-3'. El Espectro 23, muestra señales en la región aromática, observándose a 7,59 ppm un doblete de dobletes con constante de acoplamiento J= 8,6 y 1,6 Hz, asignado a un protón H-6', a 7,45 ppm un doblete con constante J= 1,6 Hz asociado al protón H-2', a 7,15 ppm un doblete con constante J= 8,9 Hz asignado al protón H-5', todos pertenecientes al anillo B de la flavona. A 6,83 ppm un singlete asignado al protón H-3 ubicado en el anillo C de la flavona. Los desplazamientos químicos a 6,77 y 6,46 ppm vistas como dobletes e igual constante de acoplamiento J= 1,6 Hz, asociados a los protones H-8 y H-6, respectivamente, pertenecientes al anillo A de la flavona. En el Espectro 24, se detectan las señales del protón anomérico de la glucosa a 5,09 ppm como un doblete con constante acoplamiento J= 7,0 Hz, y el protón anomérico de la ramnosa a 4,54 ppm como un doblete muy fino. En 3,85 ppm se observa un singlete asociado a los protones (3H) del grupo metoxi (O-Me-4'), el resto de señales pertenecen a protones glicosídicos de la flavona de hesperedina. El Espectro 25 se observa la señal a 1,06 ppm, de un doblete perteneciente a los protones (3H) de la ramnosa.

La espectrometría de RMN-<sup>13</sup>C (Espectro 25) aplicada a la muestra reveló las siguientes señales a 182,50 ppm característica de un grupo carbonilo en C-4, en la región de aromáticos con un sustituyente, las señales observadas a 164,80; 163,56; 161,80; 157,55; 151,93 y 147,41 ppm fueron asignados a los carbonos C-2, C-7, C-5, C-9, C-4' y C-3', respectivamente. Continuando con las señales a 123,54; 119,52; 113,78; 112,93; 106,07; 104,45; 101,12; 100,59; 100,22 y 95,42 ppm, asociados a los carbonos C-1', C-6', C-2', C-5', C-10, C-3, C-1', C-6, C-1, C-8. Estos presentan el efecto *orto* y *para* de los sustituyentes. La fracción glicosídica de la muestra se observa en los desplazamientos a 76,86; 76,20; 73,69; 72,64; 71,33; 70,91; 70,17; 68,91; 66,66; 56,38 y 18,36 ppm, asignadas a C-3'', C-5'', C-2'', C-4''', C-4'', C-2''', C-3''', C-5''', C-6'', C-4' (O-Me) y C-6''' (ramnosa). En el Espectro 26 (DEPT-135), se observan las señales de la fracción glicosídicas y la perteneciente al carbono metilénico de la glucosa (CH<sub>2</sub>).

En la tabla 12, se puede observar la asignación de las señales detectadas en RMN-<sup>1</sup>H y RMN-<sup>13</sup>C para la muestra flavona de hesperidina (**F-H**) (diosmina) y correspondiente aglicona (flavona de hesperetina **F-Hp**- diosmetina).

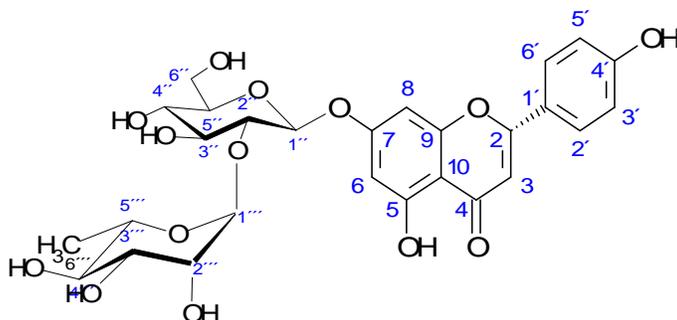
Resultados Sintéticos-Discusión

**Tabla 12.** Desplazamientos químicos de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  para la flavona de hesperidina **FH** (diosmina) (270 MHz, DMSO- $d_6$ ) y flavona de hesperetina **F-Hp** (diosmetina) (270 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).

<i>H/C</i>	<i>Flavona de hesperidina (Diosmina)</i>				<i>Flavona de hesperetina (Diosmetina)</i>			
	$u_{\text{H}}$ (ppm)	$J$ (Hz)	$u_{\text{C}}$ (ppm)	<i>DEPT</i>	$u_{\text{H}}$ (ppm)	$J$ (Hz)	$u_{\text{C}}$ (ppm)	<i>DEPT</i>
<b>2</b>			164,80	C			112,63	
<b>3</b>	6,83 (s) (H)	-	104,45	CH	6,58 (s) (H)	-	103,19	CH
<b>4</b>			182,50	C			-	
<b>5</b>			161,80	C			161,91	
<b>6</b>	6,46 (d) (H)	1,6	100,59	CH	6,20 (d) (H)	1,9	98,94	CH
<b>7</b>			163,56	C			164,97	
<b>8</b>	6,77 (d) (H)	1,6	95,42	CH	6,42 (d) (H)	1,9	93,78	CH
<b>9</b>			157,55	C			158,15	
<b>10</b>			106,07	C			103,55	
<b>1'</b>			123,54	C			123,79	
<b>2'</b>	7,45 (d) (H)	1,6	113,78	CH	7,39(d) (H)	2,2	112,63	CH
<b>3'</b>			147,41	C			146,95	
<b>4'</b>			151,93	C			151,32	
<b>5'</b>	7,15 (d) (H)	-	112,93	CH	7,07(d) (H)	8,4	111,44	CH
<b>6'</b>	7,59 (dd) (H)	8,6/1,6	119,52	CH	7,49(d) (H)	8,6/2,2	118,69	CH
<b>4'-OMe</b>	3,82 (s) (3H)	-	56,38	$\text{CH}_3$	3,97 (s) (3H)	-	55,19	$\text{CH}_3$
<b>1''</b>	5,09 (d) (H)	7,0	100,22	CH			-	
<b>2''</b>			73,69	CH			-	
<b>3''</b>			76,86	CH			-	
<b>4''</b>			71,33	CH			-	
<b>5''</b>			76,20	CH			-	
<b>6''</b>			66,66 <sup>a</sup>	$\text{CH}_2$			-	
<b>1'''</b>	4,54 (d) (H)		101,12	CH			-	
<b>2'''</b>			70,91	CH			-	
<b>3'''</b>			70,17	CH			-	
<b>4'''</b>			72,64	CH			-	
<b>5'''</b>			68,91	CH			-	
<b>6'''</b>	1,06 (s) (3H)	-	18,38	$\text{CH}_3$			-	

a) Señal con fase negativa ( ) en el espectro DEPT 135° (Espectro 26), desplazamiento químico reportado en DMSO- $d_6$  39,7 ppm (RMN- $^{13}\text{C}$ ) y 2,5 ppm (RMN- $^1\text{H}$ ); desplazamiento químico reportado en  $\text{CD}_3\text{OD}$  49 ppm (RMN- $^{13}\text{C}$ ) y 4,8; 3,1 ppm (RMN- $^1\text{H}$ ).

8.9 Síntesis de la Flavona de Naringina (F-N): 7-[[2-O- (6-deoxi- -L-mannopiranosil)- -D-glucopiranosil]oxi]-5-hidroxi-2-(4-hidroxifenil)-4H-benzopirano-4-ona.



**F-N**

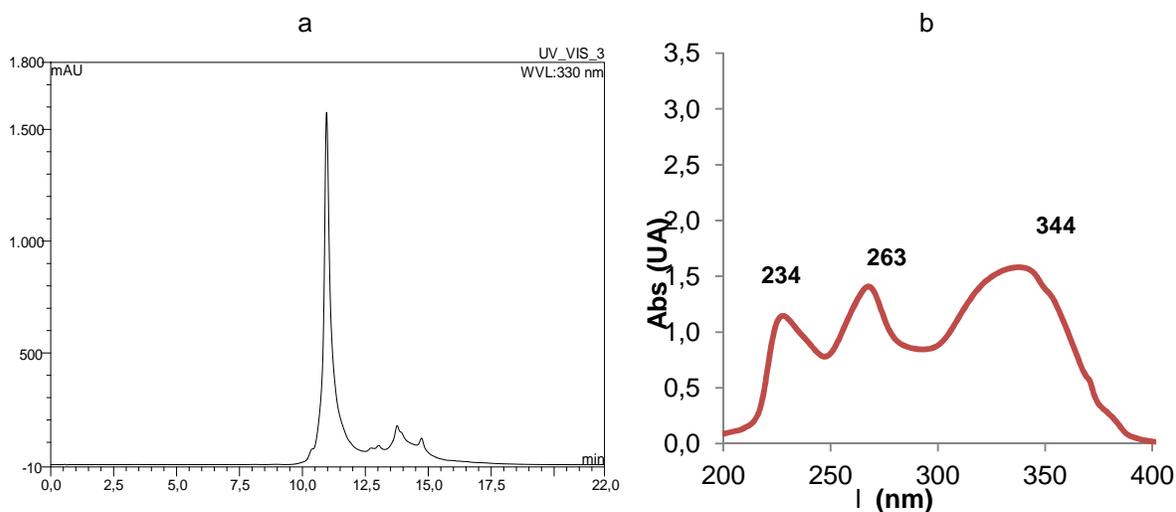
$C_{27}H_{30}O_{14}$ : 578,52 g/mol

$Pf_{exp}$ : 188-192 °C

Rend: 34 %

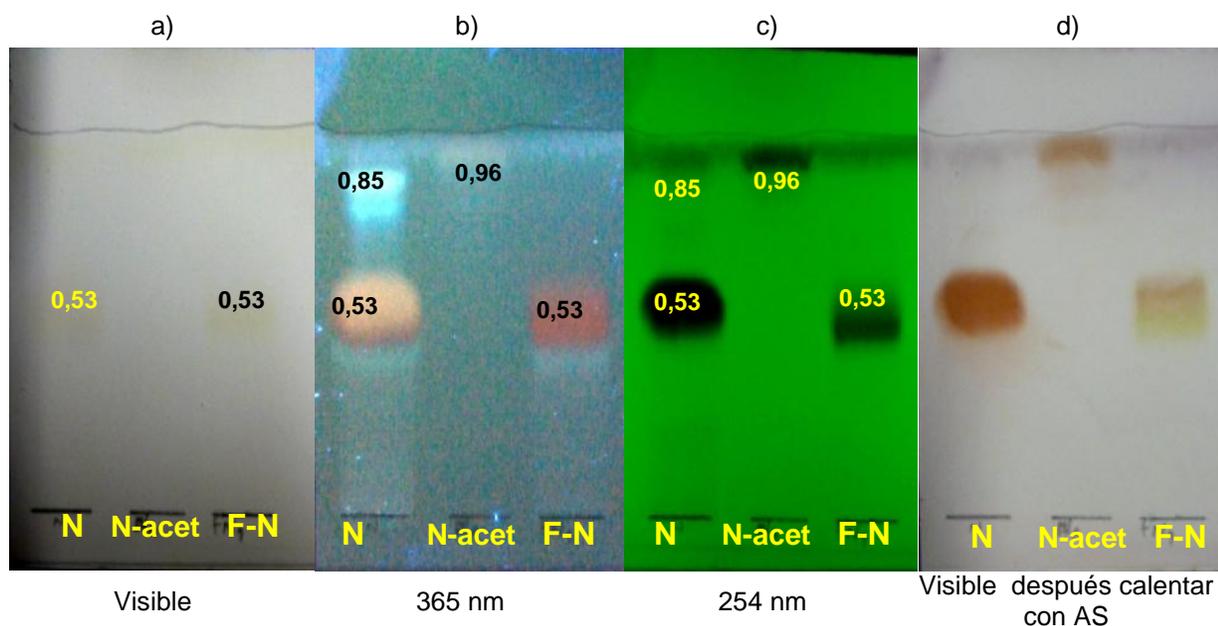
CAS: 17306-46-6

De acuerdo al procedimiento descrito (págs. 37 y 38), se utilizó naringina acetilada (2,5 mmol; 1eq), la cual se disolvió en  $CHCl_3$ , se agregó NBS (0,6345g; 3,6 mmol; 1,4 eq),  $C_6H_5CO)_2O_2$  (0,0631g; 0,26 mmol; 0,1 eq), a temperatura de reflujo (60°C) por 4 horas, el residuo viscoso fue disuelto en EtOH y basificado con una solución acuosa de NaOH al 15%, la cual fue calentada a ebullición por 5 minutos y neutralizada con  $H_2SO_{4(C)}$ , el precipitado obtenido fue lavado con una mezcla  $H_2O$ -EtOH (1:1, v/v), obteniéndose 499,2 mg (34%),  $Pf_{exp}$  188-192°C, ( $Pf_{rep}$  198-200 °C)<sup>[45] [46]</sup>. La muestra F-N fue evaluada por HPLC, obteniendo un porcentaje de pureza > 91% (Figura 43).



**Figura 43.** Determinación del porcentaje de pureza para la flavona de naringina (F-N). a) cromatograma HPLC de la F-N utilizando Sistema de elución, detección a 330 nm; b) espectro de UV en eluyente del Sistema.

La CCF aplicada a la muestra obtenida flavona de naringina (F-N) frente al material de partida flavanona naringina (N) y la naringina acetilada (N acetilada), en el sistema de solvente AN-2 (AcOEt-MeOH-H<sub>2</sub>O ; 100:13,5:10; v/v/v) revela manchas de color amarillo a marrón en el visible y naranja y azul a 365 nm asociadas a un esqueleto flavonoidal. A 254 nm se observa que el producto obtenido (F-N) está sin restos de material precursor (N y N acetilada), al ser rociadas con AS y calentar se intensifico la coloración anterior (marrón oscuro), para las muestras, los valores de R<sub>f</sub> de las muestras son diferenciables (R<sub>f</sub><sub>AN-2</sub>: 0,53 N; 0,85 (impureza de N); 0,96 N-acet; 0,53 F-N) (Figura 44).

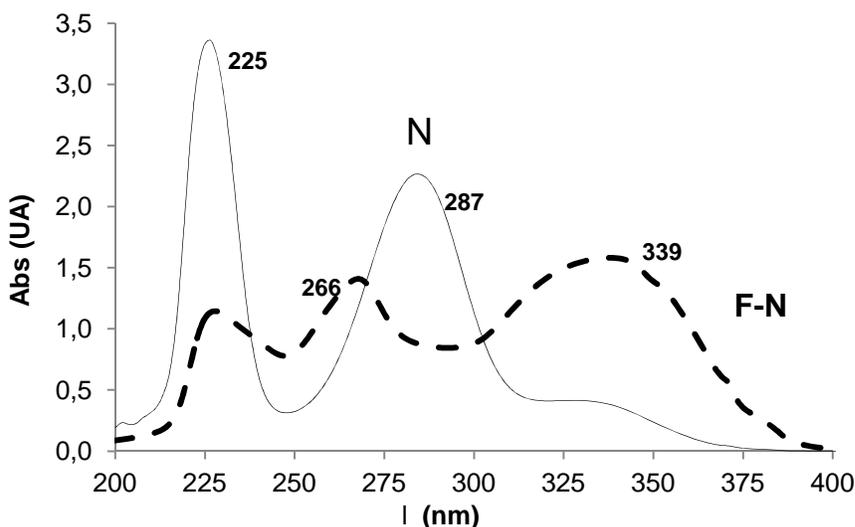


**Figura 44.** Cromatografía de capa fina realizada a las muestras de naringina (N), naringina acetilada (N-aceti) y flavona de naringina (F-N), utilizando el sistema de solvente AN2: AcOEt-MeOH-H<sub>2</sub>O (100:13,5:10; v/v/v) y como sistema de detección a) visible; b) 365 nm; c) 254 nm d) AS, 365 nm con calor.

Al observar la CCF se observa que las manchas de naringina (N) y flavona de naringina (F-N) tienen un R<sub>f</sub> similar, esto sugiere que ambas comparten una estructura común y la diferencia es el doble enlace de los C<sub>2</sub> y C<sub>3</sub> del anillo C del flavonoide.

El espectro UV de flavona de naringina (F-N) evidencia, dos bandas de absorción a 224, 266 nm (banda II) y otra en 339 nm (banda I), características para las flavonas. La primera es debida al anillo A y la segunda asociada al anillo B en conjugación con el anillo C.

La falta de picos en la banda II, es indicativo de una o ninguna oxigenación en el anillo B de la flavona, a diferencia de la flavona de hesperidina (F-H), la cual presenta en el anillo B, las posiciones C3' y C4' con grupos -OH y -OMe respectivamente, mientras que la flavona de naringina presenta en C4' un grupo -OH<sup>[58]</sup> (Figura 45).



**Figura 45.** Espectro U.V de la flavona de naringina F-N (- - -) y la naringina N ( ) en eluente.

La muestra flavona de naringina (F-N) fue analizada por RMN-<sup>1</sup>H (Espectros 27 y 28), tomado en DMSO-*d*<sub>6</sub>, observándose las siguientes señales: dos dobletes centrados en 7,93 y 6,94 ppm (zona de aromáticos), que integran para dos protones cada uno, los cuales están en posición *orto*- entre sí, cuyas constantes de acoplamiento fueron de J= 8,7 Hz, los cuales fueron asignados a los protones H-2', H-6', H-3' y H-5' del anillo B. Asimismo, se observan dos dobletes con desplazamientos químicos centrados en 6,81 y 6,78 ppm, asignados a los protones

H-8 (anillo A) y H-3 (anillo C) de la estructura F-N; el singlete centrado en 6,35 ppm corresponde al protón H-6 (anillo A), el cual debería mostrarse como un doblete, con una constante de acoplamiento *meta* (1 a 3 Hz) en relación al H-8. Otra señal importante es la correspondiente a la ramnosa (CH<sub>3</sub>-6'''), la cual se observa a 1,20 ppm, con multiplicidad de doblete y constante de acoplamiento de 6,2 Hz. El resto de las señales desde 4,5 ppm hasta 3,1 ppm, pertenece a fracción glicosídica de la estructura F-N, siendo la señal con desplazamiento 6,08 ppm, para el protón anomérico de la glucosa H.1''.

La información espectroscópica RMN-<sup>1</sup>H del compuesto flavona de naringina (F-N) se asignaron según la tabla 13.

**Tabla 13.** Desplazamientos químicos de protones para la flavona de naringina **F-N** (270 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>). Constante de acoplamiento en paréntesis (J en Hz).

H	$\delta$ (ppm)	J (Hz)
3	6,78 (H,d)	-
6	6,35 (H, d)	-
8	6,81 (H, d)	-
1'		
2'	7,93 (2H,d)	8,7
3'	6,94 (2H,d)	8,7
5'	6,94 (2H,d)	8,7
6'	7,93 (2H,d)	8,7
1''	6,08 (H, d)	4,2
2''	3,33	-
3''	3,21	6,0
4''	3,19	-
5''	nd	-
6''	3,64 (H, s)	-
1'''	5,18(H, d)	7,0
2'''	3,19	6,0
3'''	nd	-
4'''	nd	-
5'''	5,11 (H, d)	-
6'''	1,20 (3H,d)	6,2

Desplazamiento químico reportado en DMSO-*d*<sub>6</sub> 39,7 ppm (RMN-<sup>13</sup>C) y 2,5 ppm (RMN-<sup>1</sup>H).

#### 8.10 Síntesis de la Auroa y Flavonol de Hesperidina y Naringina.

De acuerdo al procedimiento descrito (pág 34), para la obtención de flavonol, se disolvió chalcona de naringina y hesperidina (CH-N/H) (1eq) en una mezcla fría de NaOH 16% y MeOH (40mL), luego se agregó a una solución acuosa de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 15 % (5.3 mL) y se enfrió a 0°C durante 12 horas. Se repitió tres veces (03) cada reacción pero no se observó la formación de ningún precipitado.



## 9 Resultados Biológicos: Discusión.

Se evaluó el efecto inhibitorio de los compuestos sintetizados, sobre la enzima glucosa-6-fosfatasa (**G-6-Pasa**). La determinación del IC<sub>50</sub>, se realizó con los compuestos que presentaron un efecto inhibitorio mayor sobre la enzima **G-6-Pasa** que el control positivo Floricina <sup>[65]</sup> en microsomas intactos, este efecto es indicativo que la interacción es sobre los transportadores (T) del sistema G-6-Pasa sin ser afectada la subunidad catalítica (SUC) (Tabla. 14).

**Tabla 14.** Inhibición de la G-6-Pasa y determinación del IC<sub>50</sub> de los compuestos sintetizados.

Muestra	Microsomas intactos						Microsomas rotos				
	Act <sup>a</sup>	DE <sup>b</sup>	SEM <sup>c</sup>	p <sup>d</sup>	% Inh (%) <sup>e</sup>	IC <sub>50</sub> (-m) <sup>f</sup>	Act <sup>a</sup>	DE <sup>b</sup>	SEM <sup>c</sup>	p <sup>d</sup>	% Inh (%) <sup>e</sup>
<b>Control</b>	4,92	1,28	0,64	-	-	-	6,60	0,76	0,38	-	-
<b>H (1)</b>	2,80	0,86	0,43	0,033	43	302 ± 45 <sup>g</sup>	4,93	0,60	0,30	0,014	25
<b>N (2)</b>	3,49	0,47	0,23	0,082	29	inactivo	5,34	1,27	0,64	0,141	19
<b>Hp (3)</b>	2,08	0,96	0,48	0,012	58	280 ± 13 <sup>g</sup>	4,89	1,54	0,77	0,094	26
<b>Ng (4)</b>	2,39	0,54	0,27	0,011	51	233 ± 8 <sup>g</sup>	4,50	1,03	0,52	0,017	32
<b>CH-N (5)</b>	2,81	1,09	0,54	0,046	43	209 ± 35 <sup>g</sup>	5,37	1,81	0,90	0,057	19
<b>Fa-4N (6)</b>	2,71	0,94	0,47	0,032	45	144 ± 4 <sup>g</sup>	5,19	1,21	0,61	0,097	21
<b>FN (7)</b>	2,60	1,02	0,51	0,030	47	189 ± 27 <sup>g</sup>	5,25	1,15	0,58	0,099	20
<b>Floricina</b>						466 ± 19 <sup>h</sup>					

Los ensayos sobre la G-6-Pasa fueron realizados usando G-6-P (5 mM) como sustrato en microsomas intactos (sin histonas) y rotos (con histonas) en ausencia (control) o presencia de los compuestos sintetizados (1-7; 200 μM) o floricina (50 μM). Las medidas fueron determinadas por triplicado. a) La actividad es expresada en μmolesPO<sub>4</sub><sup>3-</sup>/h/mg proteína. b) Desviación estándar de la actividad. c) Desviación estándar media de la actividad. d) significancia estadística. e) Porcentaje de inhibición obtenido por comparación respecto del control. f) El IC<sub>50</sub> fue calculado con el software ED50v1.0 (Vargas 2000) usando los ensayos sobre la G-6-Pasa en microsomas intactos con G-6-P (1 mM) en presencia de concentraciones crecientes de los compuestos sintetizados. g) Desviación estándar de la media del IC<sub>50</sub>. h) Estrada y col., 2005.

El posible efecto sobre la glucosa-6-fosfatasa, puede evaluarse sobre alguno de sus componentes (transportadores T1, T2 y T3) en microsomas intactos o sobre la subunidad catalítica (SUC) en microsomas rotos.

Los resultados de la inhibición de la enzima G-6-Pasa, por los compuestos obtenidos en las síntesis realizadas en los microsomas intactos como rotos, indica que estos poseen una actividad sobre el sistema G-6-Pasa, específicamente sobre el transportador T1, el cual permite el traslado de la G-6-P hacia el retículo endoplasmático del sistema G-6-Pasa sin afectar la subunidad catalítica. También se observa en la Tabla 14, que el material de partida de las síntesis realizadas, hesperidina y naringina, presentan menor porcentaje de inhibición en los microsomas intactos, que los productos de la síntesis, revelando que las transformaciones químicas efectuadas incrementaron la inhibición.

El efecto de modificar el anillo C (chalcona y flavona), permitiendo mayor interacción (conjugación) con los anillos A y B, incrementa el porcentaje de inhibición en los microsomas intactos en relación al material de partida.

Los productos de las síntesis de la flavanona naringina, presentaron mayor efecto sobre el  $IC_{50}$ , que el material de partida, el cual fue inactivo. Este efecto, fue menor para la flavanona de la hesperidina. Un resultado interesante es el obtenido con las agliconas de las flavanonas que muestran, el mayor efecto sobre el  $IC_{50}$  y sobre el porcentaje de inhibición en microsomas intactos y rotos, en comparación con sus productos de partida y otros productos obtenidos.

---

## 10 Conclusiones

- Se obtuvo la chalcona de naringina ( $Pf_{exp}$  180-182°C, Rend: 40,2 %), la flavona de naringina ( $Pf_{exp}$  188-192°C, Rend 34 %) y la naringenina ( $Pf_{exp}$  244-249°C, Rend: 76-86 %) partiendo de la naringina.
- Se obtuvo la hesperetina ( $Pf_{exp}$  226-228°C, Rend: 48-97 %) partiendo de la hesperidina.
- Se obtuvo el producto de degradación floracetofenona 4'-neohesperidosido ( $Pf_{exp}$  160-164°C, Rend: 34 %) partiendo de la chalcona de naringina.
- Se obtuvo la flavona de hesperidina ( $Pf_{exp}$  270-273°C, Rend: 38,5 %) y la flavona de hesperetina ( $Pf_{exp}$  238-240 °C).
- Todos los productos obtenidos de las síntesis realizadas presentaron actividad biológica sobre el transportador T1 en los microsomas intactos.
- Las transformaciones químicas realizadas a las flavanonas de hesperidina y naringina aumentaron el porcentaje de inhibición en los microsomas intactos en comparación con el material de partida.
- Las modificaciones realizadas en el anillo C de la flavanona naringina, incrementan en un 43 % para la chalcona y un 47% para la flavona, el porcentaje de inhibición en los microsomas intactos en relación al material de partida la naringina con un 29%.
- El  $IC_{50}$  obtenido para la naringenina (Ng) es de 233  $\mu$ M, la chalcona de naringina (CH-N) de 209  $\mu$ M, la floracetofenona-4'-neohesperidosido (Fa-4n) con 144  $\mu$ M y la flavona de naringina (F-N) con un 189  $\mu$ M, es mayor que el material de partida naringina (inactivo).
- Las agliconas de flavanonas (Hp y Ng) presentan mayor  $IC_{50}$  (280  $\mu$ M y 233  $\mu$ M) que el resto de productos obtenidos.

## 11 Recomendaciones

- Realizar la hidrogenación catalítica sobre la chalcona de naringina y hesperidina para la obtención de las dihidrochalconas respectivas.
- Realizar la oxidación de las flavanonas hesperidina y naringina para la obtención de isoflavonas.
- Evaluar la actividad inhibitoria sobre el sistema glucosa-6-fosfatasa de los productos sintéticos obtenidos de las reacciones de reducción y oxidación.
- Evaluar la inhibición de la absorción intestinal de la glucosa de los productos obtenidos.

---

## 12 Bibliografía

---

- [1] Li. W.L, Zheng. H.C, Bukuru.J, De Kimpe. N. **(2004)**. “*Natural medicines used in the traditional Chinese medical system for therapy of diabetes mellitus*”. J. Ethnopharmacol 92:1-21.
- [2] Rodríguez M, Hasegawa M, González-Mújica F, Motta N, Castillo A, Castillo J, Zea E, Mora K, Sousa L, González A, Camejo D. **(2008)**. “*Antidiabetic and antiradical activities of plants from Venezuelan Amazon*”. Rev. Bras Farmacogn 18 (3): 331-338.
- [3] Andrade-Cetto A, Heinrich M. **(2005)**. “*Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes*”. J. Ethnopharmacol 99: 325-348.
- [4] Drago M.E. **(2007)**. “*Flavonoides recombinantes de relevancia farmacéutica*”. Rev. Mex Cienc Farmac. 38 (4): 42-47.
- [5] Martínez, F.J., González, J.M., Tuñón, M.J. **(2002)**: “*Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes*”. Nutr. Hosp., 17: 271-278
- [6] C.A. Rice-Evans, N. J. Miller, G. Papanga, *Trends Plants Sci.* 2 **(1997)** 152.
- [7] R.J. Miksicek, *Mol. Pharmacol.* 44 **(1993)** 37.
- [8] E. Wollenweber, in: V. Cody, E. Middleton Jr., J.B. Harbone, A. Beretz. (Eds.), **(1988)**, “*Plant Flavonoids in Biology and Medicine II*”. Biochemical, Celular and Medicinal properties, Liss, New York, NY, USA, p. 45.
- [9] M. Weidenborner, H.C. Jha, *Mycol.* **(1994)** Res. 98 1376.
- [10] Aherne SA y O'Brien NM. **(2002)**: “*Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism*”. Nutrition, 18:75-81. Pag 3.
- [11] Saltiel,A.R., Kahn, R. **(2001)**.“*Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism*”. Nature, 414, 799-806.
- [12] [WWW.WHO.Int/mediacentre/factsheet/fs312/en/Diabetes.Fact sheet Nr 312](http://WWW.WHO.Int/mediacentre/factsheet/fs312/en/Diabetes.Fact_sheet_Nr_312). consultada 01/06/2015.
- [13] R.M.Horowitz and B. Gentili **(1969)**. “*Taste and Structure in Phenolic Glycosides*”. J. Agr. Food Chem. 17, 696.

- [14] Nelson, D. L. and Cox, M. M. (**Abril 2004**). "*Lehninger Principles of Biochemistry*". 4da Edición. Capítulo 15.
- [15] World Health Organization, Department of Noncommunicable Disease Surveillance. (**1999**). "*Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications*". Geneva: WHO; Disponible en PDF. accedido en julio 2014.
- [16] Tu salud; (**2012**). "*Diabetes*". Editorial Cadena Capriles.
- [17] Brandan, N y Aguirre, V. (**2002**). "*Interrelaciones Metabólicas*". Cátedra de Bioquímica. Fac. de Medicina. UNNE.
- [18] Garibay M. (**2005**). "*Metabolismo de la Glucosa*" Fisiología, Centro Médico Nacional de México. (disponible en: <http://201.116.18.153/laciencia/biologia/fisiologia/be3.htm>).
- [19] Burchel, A and Waddel ID. (**1991**). "*The molecular basis of the hepatic microsomal glucose-6-phosphatase*". *Biochim. Biophys. Acta*, 1092, 129-130.
- [20] McCormack, J.G., Westergard, N., Kristiansen, M., Brand, C.L and Lau J. (**2001**). "*Pharmacological approaches to inhibit endogenous glucose production as a means of anti-diabetic therapy*". *Current Pharmaceutical Design*, 7, 1451-1474.
- [21] Havsteen B: Flavonoids. (**1983**). "*A class of natural products of high pharmacological potency*". *Biochem Pharmacol*, 32:1141-1148. Pág., 4.
- [22] Marcano, D y Hasegawa M. (**2002**). "*Fitoquímica Orgánica*". Universidad Central de Venezuela. Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico. 2<sup>da</sup> edición. Caracas, Cap. 3.
- [23] Dewick P. (**2002**). *Medicinal Natural Products. A Biosynthetic Approach*. Second Edition. Cap. 4
- [24] MacDonald M., y D'Cucha G. (**2007**). A modern view of phenylalanine ammonia lyase. *Biochem. Cell Biol.* 85(3): 273-282.
- [25] Gros E., et al., (**1985**) *Introducción al estudio de los Productos Naturales*. Monografía N°30, Secretaría General de la OEA, Pág., 69

- 
- [26] Cartaya, O. y Reynaldo, I. **(2002)**. “*Reseña Bibliográfica. Flavonoides: Características Químicas y Aplicaciones*”. Cultivos Tropicales, 22, 5-14.
- [27] Durst R, Wrolstad Re. **(2001)**. “*Separation and Characterization of Anthocyanins by HPLC*”. In: Handbook of Food Analytical Chemistry. New Jersey: John Wiley & Sons; p. 33-45.
- [28] Soriano E. **(2003)**. “*Los metabolitos de las plantas y las células cancerosas I. Los flavonoides*”. REB 22 (4): 191-197.
- [29] Garg, A., Garg, S. Zaneveld, L J., Singla, A. K. **(2001)**. “*Chemistry and pharmacology of the citrus bioflavonoid hesperidin*”. Phytother. Res., 15, 655-669.
- [30] Dr. García., M, et al. **(2002)**. “*Plantas cítricas en el tratamiento de enfermedades vasculares*”. Rev. Cubana Angiol y Cir Vasc., 3(2):39-46.
- [31] Castillo, J.; Benavente, O.; Río J.A, del. **(1992)**. “*Naringin and Neohesperidin levels during development of leaves, flowers buds, and fruits of Citrus aurantium*”. Plant Physiology, 99, 67-73.
- [32] Horowitz, R. M., Gentili,B., **(1963b)**. “*Flavanoids of Citrus VI. The structure of neohesperidose*”.Tetrahedron 19, 773.-782.
- [33] Cedeño, G. **(2007)**. “*Modificación estructural de hesperidina (flavonoide) y estudio de su actividad biológica sobre la enzima glucosa-6-fosfatasa*”. TEG, Esc. Química, Fac. Ciencias, UCV.
- [34] Burchell, A., Hume, R., and Burchell, B **(1988)**. “*A new microtechnique for the analysis of the human hepatic microsomal glucose-6-phosphatase system*”. Clin. Chem. Acta 173, 183-192
- [35] Marcucci O., González-Mujica F. y Pérez-Ayuso E., **(1983)**, “*Alterations of Liver nuclear envelopes accompanying thioacetamide administration in rats*”, Acta Cient. Venezolana, 34(2), 109-117.
- [36] Lowry O., Rosebrough H., Farr A. y Randall R., **(1951)**, “*Protein measurement with the folin phenol reagent*”, J. Biol. Chem., 193(1), 209-220.
- [37] Markwell M., Hass S., Bieber L. y Tolbert N., **(1978)**, “*A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein sample*”, Analytical Biochemistry, 87(1), 206-210.

- [38] William B., Wilson K. (1981), *“Principios y técnicas de Bioquímica”* Editorial Omega, Barcelona.
- [39] Arthur, H.R., Hui, W.H. y Ma, C.N., (1956), *“An examination of the Rutaceae of Hong Kong. Part I. Flavanoid Glycosides from Zanthoxylum species and the Occurrence of optically active hesperetin”*. J.Chem.Soc.pp.632-635.
- [40] Grohmann, K., Manthey, J. and Cameron, R. (2000). *“Acid-catalyzed hydrolysis of hesperidin at elevated temperatures”*. Carbohydrate Research, 328, 141-146.
- [41] Seitz, T. and Wingard, R. (1978). *“An Improved Conversion of Hesperidin into Hesperetin Including Purity Determination by Gradient-Elution, High-Pressure Liquid Chromatography”*. J. Agric. Food Chem., 26, 1978.
- [42] Horowitz, R. M., y Gentilli B., U.S. **Patent 3.087.821**. (Abril 30, 1963a).
- [43] Krbeček, L., Inglett, G., Holik. M., Dowling, B, Wagner, R y Riter R., (1968), *“Dihydrochalcones. Synthesis of potential sweetening agents”*. J. Agr. Food. Chem. 16, 108-112.
- [44] Linke, H.A.B y Eveleigh, D.E. (1975). *“Facile synthesis of the chalcones and dihydrochalcones from naringin, neohesperidin and hesperidin”*. Naturorsch, 30b, 606-608.
- [45] Lorette, N. B., Gage, T y Wender, H. S. (1951). *“The use of N-bromosuccinimide and Pyridinium bromide perbromide in the conversion of flavanones into flavones”*. J. Org. Chem., 16, 930-933.
- [46] Voigtlander. D. H., **Patente 0459076**. (Mayo 24, 1977).
- [47] Geissman. T.A. y Fukushima. D. (1948). *“Flavonones and related compounds V. The oxidation of 2'-hydroxychalcones with alkaline hydrogen peroxide”*. J. Am.Chem Soc, May, 70 (5), 1686-9.
- [48] Maltese F., Erkelens C., van der Kooy, F., Choi Y. H., y Verpoorte R. (2009). *“Identification of Natural Epimeric Flavanone Glycosides by NMR Spectroscopy”*. Food Chemistry, 116, 575-579. (espectros disponibles en: <http://www.wangfei.ac.cn/nmrspectra/7/1/28>, consultada el 04-07-2016)

---

[49] Yaipakdee P. y Robertson L., (2001), "*Enzymatic halogenation of flavanones and flavones*", *Phytochemistry*, 57, 341-347.

[50] Erenler R., Sen O., Aksi H., Demirtas I., Yaglioglu A., Elmastas M. y Telci İ., (2016), "*Isolation and identification of chemical constituents from *Origanum majorana* and investigation of antiproliferative and antioxidant activities*", doi: 10.1002/jsfa.7155.

[51] Elabbar F., Habel A., Bozkeha N. y Awina T., (2014), "*Isolation and identification of some compounds from *Cyclamen rohlfsianum* (Primulaceae) from Libya*", *Scientific Reviews & Chemical Communications*, 4(1), 1-10.

[52] Wagner H., Chari V. y Sonnenbichler J., (1976), "*<sup>13</sup>C-NMR spektren natürlich vorkommender flavonoide*", *Tet. Letters*, 21, 1799-1802.

[53] Pulley, H y Von Loesecke, M. (1939). "*Preparation of rhamnose from naringin*". *J. Am. Chem. Soc.*, 61,175.

[54] LemosDaSilva L., Faqueti L., Reginatto F., Conceição dos Santos A., Barison A. y Biavatti M., (2015), "*Phytochemical analysis of *Vernonanthura tweedieana* and a validated UPLC-PDA method for the quantification of eriodictyol*", *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 25, 375-381.

[55] Türkkkan B., Özyürek M., Bener M., Güçlü K. y Apak R., (2012), "*Synthesis, characterization and antioxidant capacity of naringin-oxime*", *Spectroschimica Acta Part A*, 85, 235-240.

[56] Kiriakou E., Primikyri A., Charisiadis P., Katsoura M., Gerothanassis I., Stamatis H. y Tzakos A., (2012), "*Unexpected enzyme-catalyzed regioselective acylation of flavonoid aglycones and rapid product screening*", *Organic & Biomolecular Chemistry*, 10, 1739-1742.

[57] Jain R. y Mittal M., (2012), "*Naringenin, a flavonone from the stem of *Nyctanthes arbortritis* Linn.*" *Inter. J. Biol. Pharm. Allied Sciences*, 1(7), 964-972.

[58] Marcano D y Cortés L. (1982). "*Química Orgánica*". Editorial Reverté Venezolana, S.A.

[59] Cizak A and Mielczarek C. (1992), "*Practical and theoretical aspects of flavanone-chalcone isomerisations*". *J. Chem.Soc. Perkin Trans.* 1603-1607.

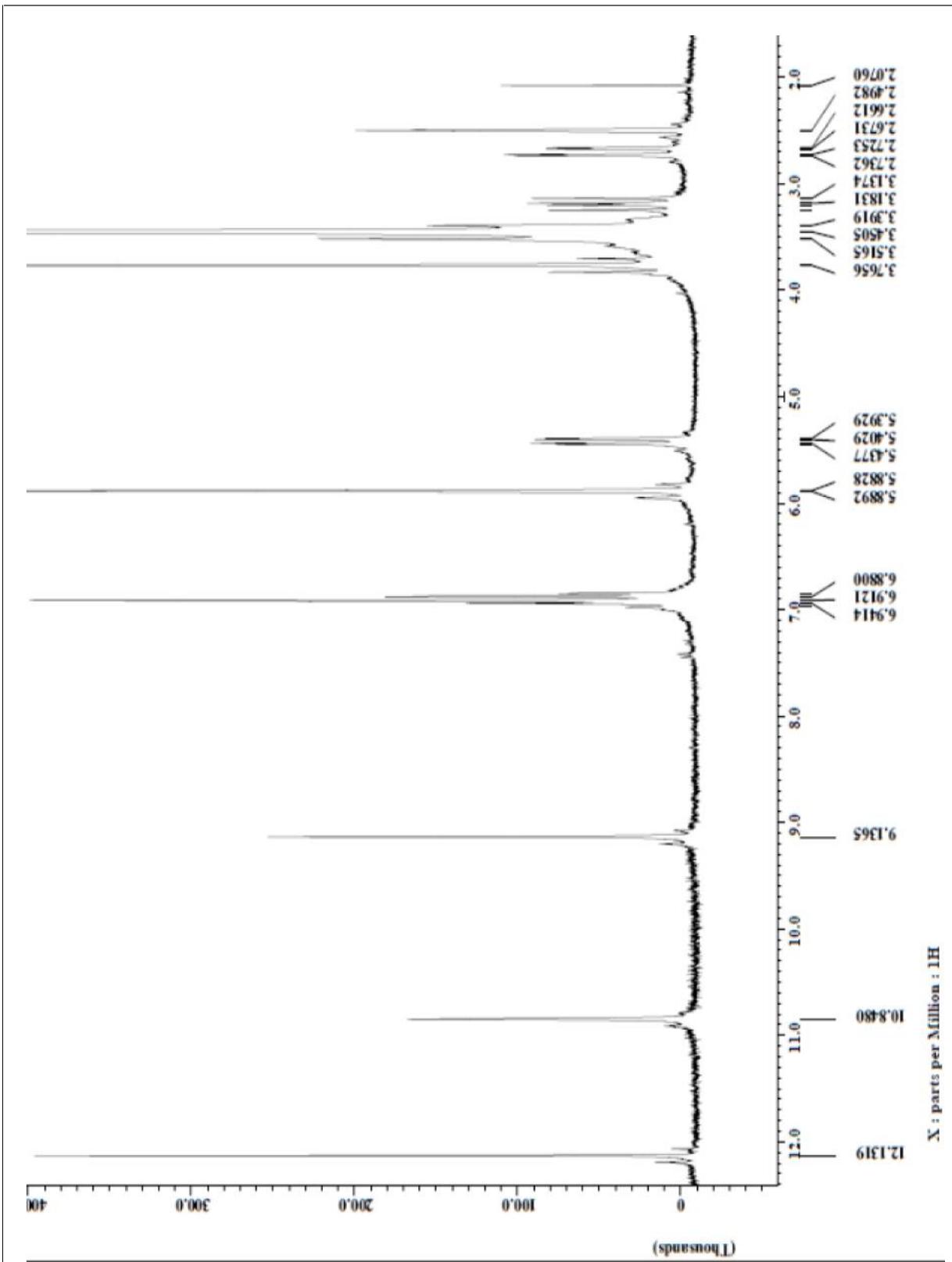
- [60] Montenegro, M., Nazareno, M y Borsarelli C. **(2007)**. “*Kinetic study of the photosensitized oxygenation of the flavanone naringin and its chalcone*”. J. Photochem and Photobio A: Chemistry 186. 47-56.
- [61] González, E., Nazareno, M y Borsarelli C. **(2002)**. “*Enthalpy- entropy compensation effect in the chalcone formation from, naringin in water-ethanol mixtures*”. J. Chem. Soc., Perkin Trans 2. 2052-2056.
- [62] Mabry, T.J., Markham, K.R y Thomas, M.B., **(1970)**. “*The Systematic Identification of Flavanoids*”, Springer-Verlag. New York.
- [63] Aissaoui M, León F, Brouard I, Benayache F y Benayache S. **(2014)**, “*Secondary metabolites from Crotalaria saharae (Fabaceae)*”, Der Pharmacia Lettre., 6 (1): 186-189.
- [64] Park Y, Moon B, Yang H, Lee Y, Lee E y Lim Y., **(2007)**, “*Spectral assignments and reference data: Complete assignments of NMR data of 13 hydroxymethoxyflavones*”, Magn. Reson. Chem. 45: 1072-1075.
- [65] Estrada O., Hasegawa M., González-Mujica F., Motta N., Perdomo E., Solórzano A., Méndez J., Méndez B. y Zea E. **(2006)**, “*Evaluation of Flavonoids from Bauhinia megalandra Leaves as Inhibitor of Glucose-6-Phosphatase System*”, Phytother. Res., 19(10), 859-863.

---

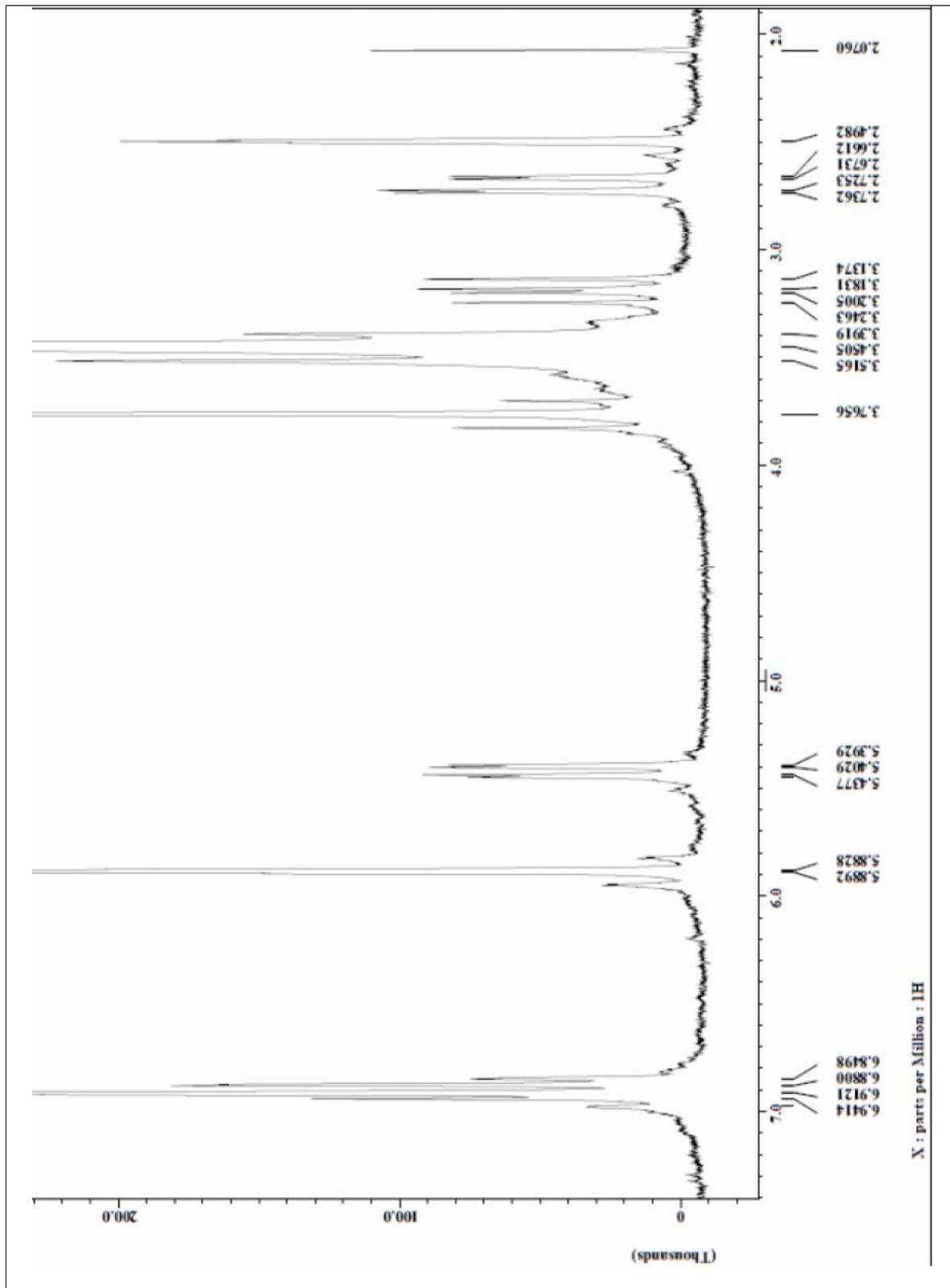
## ESPECTROS



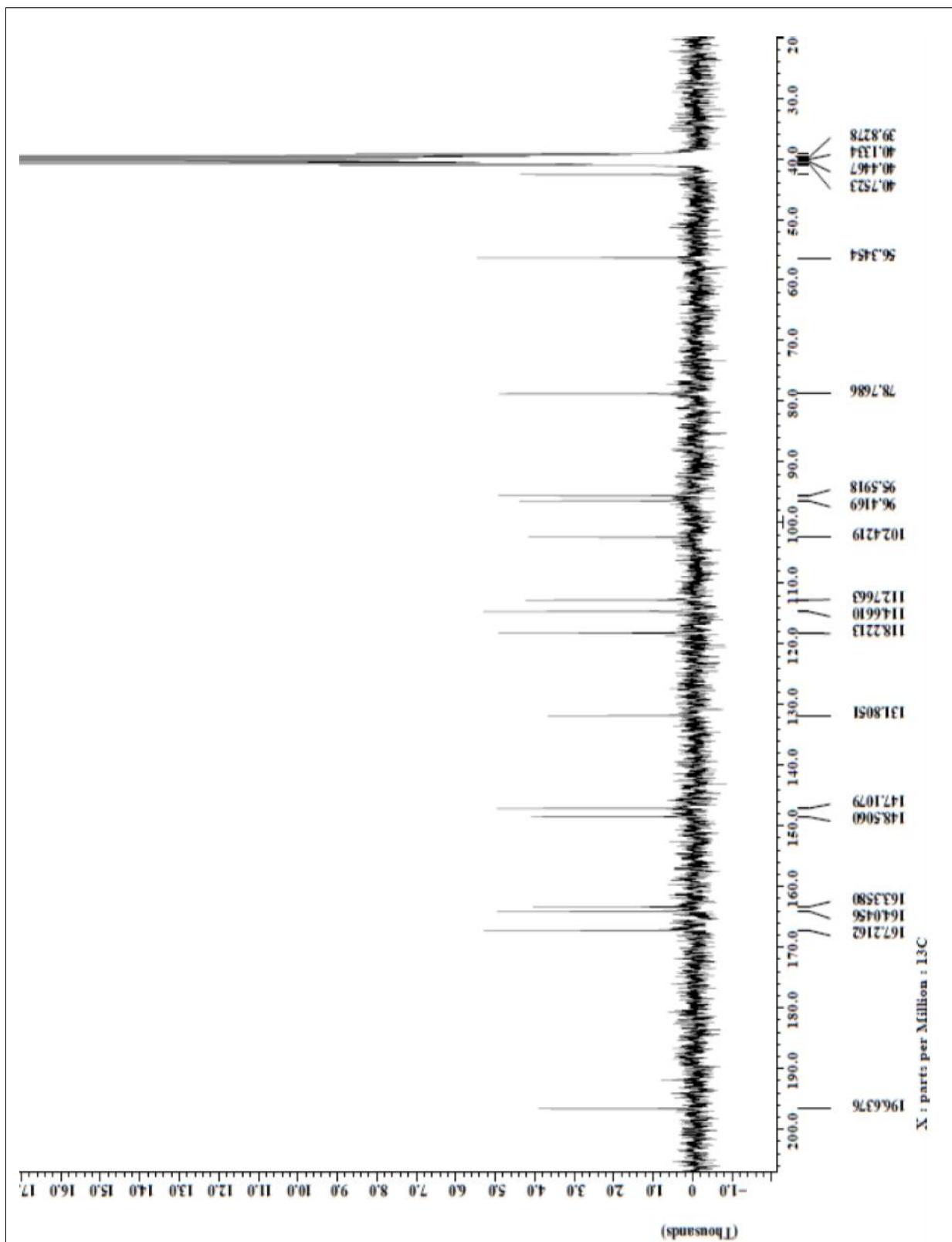
Espectro 1. RMN-<sup>1</sup>H de la Hesperetina (Hp).



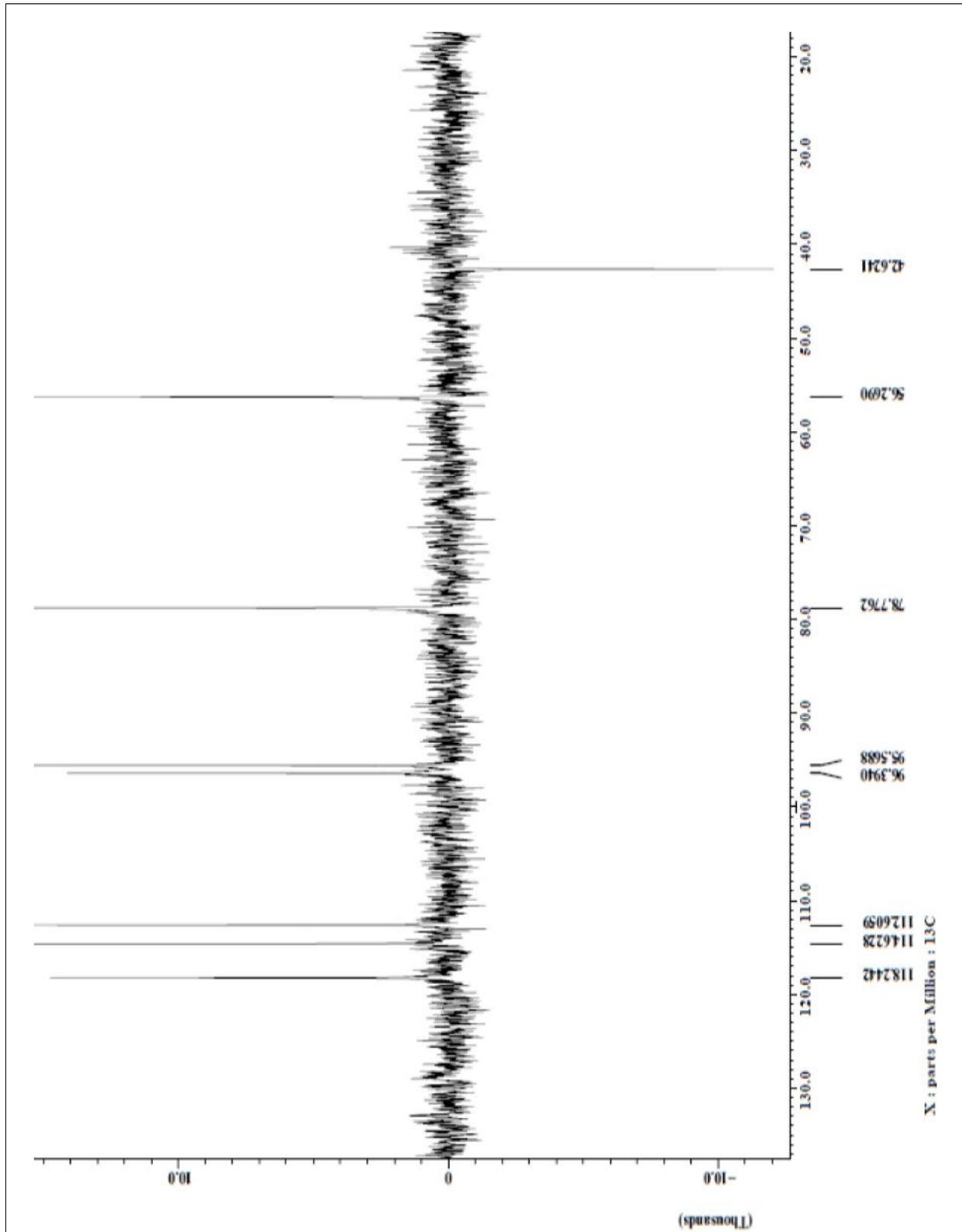
Espectro 2. RMN-<sup>1</sup>H de la Hesperetina (Hp). Ampliación



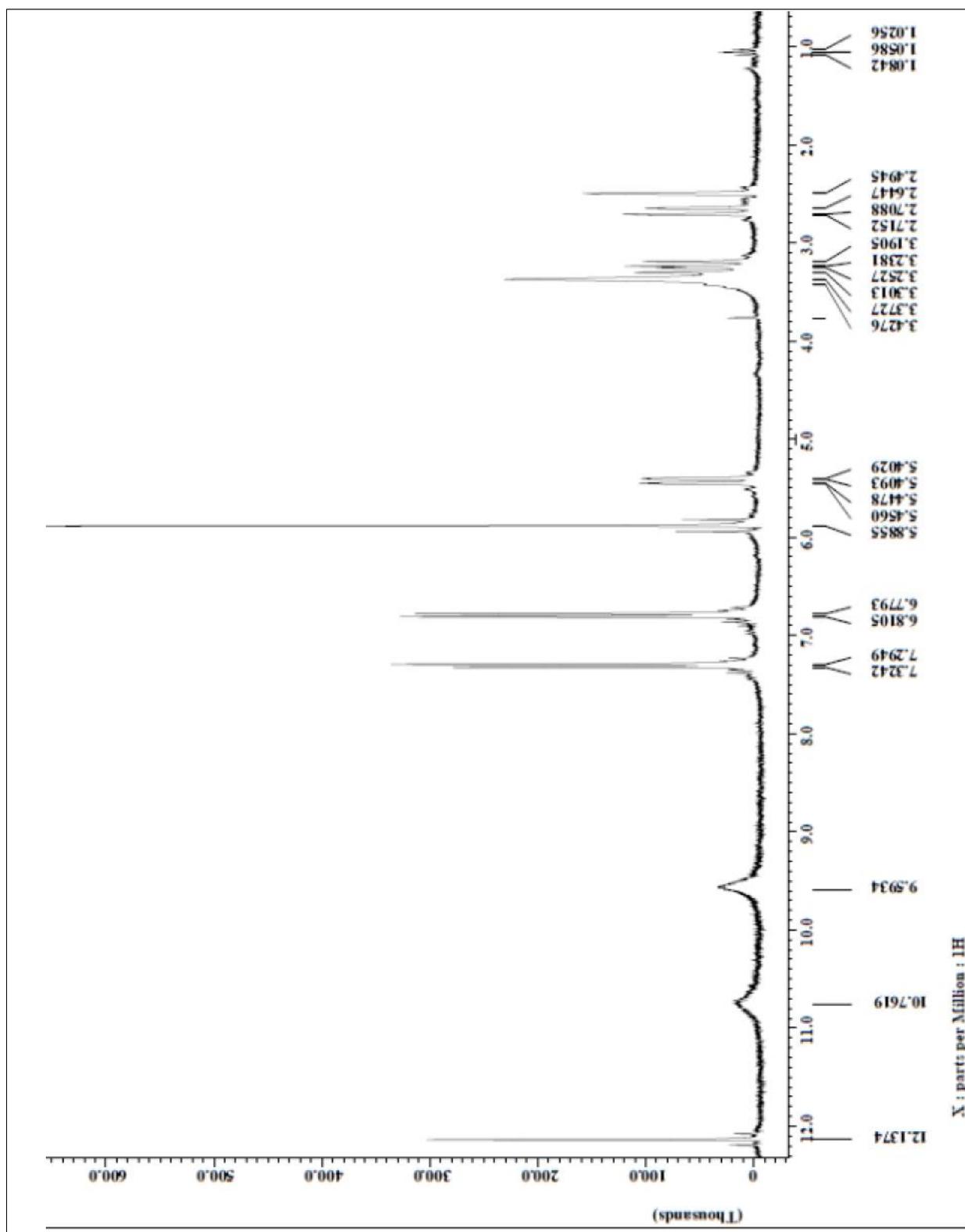
Espectro 3. RMN-<sup>13</sup>C de la Hesperetina (Hp).



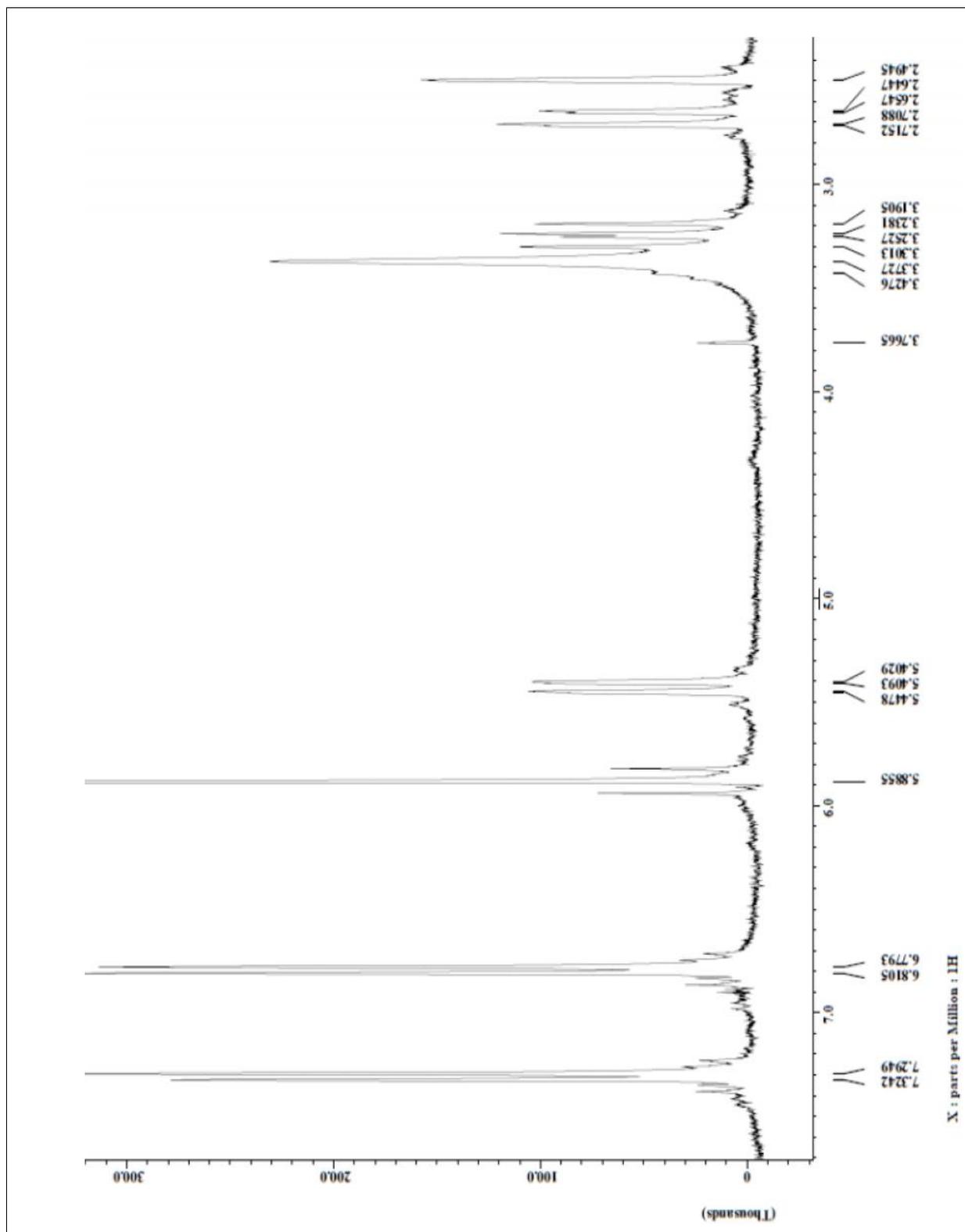
Espectro 4. RMN-<sup>13</sup>C-DEPT-135 de la Hesperetina (Hp).



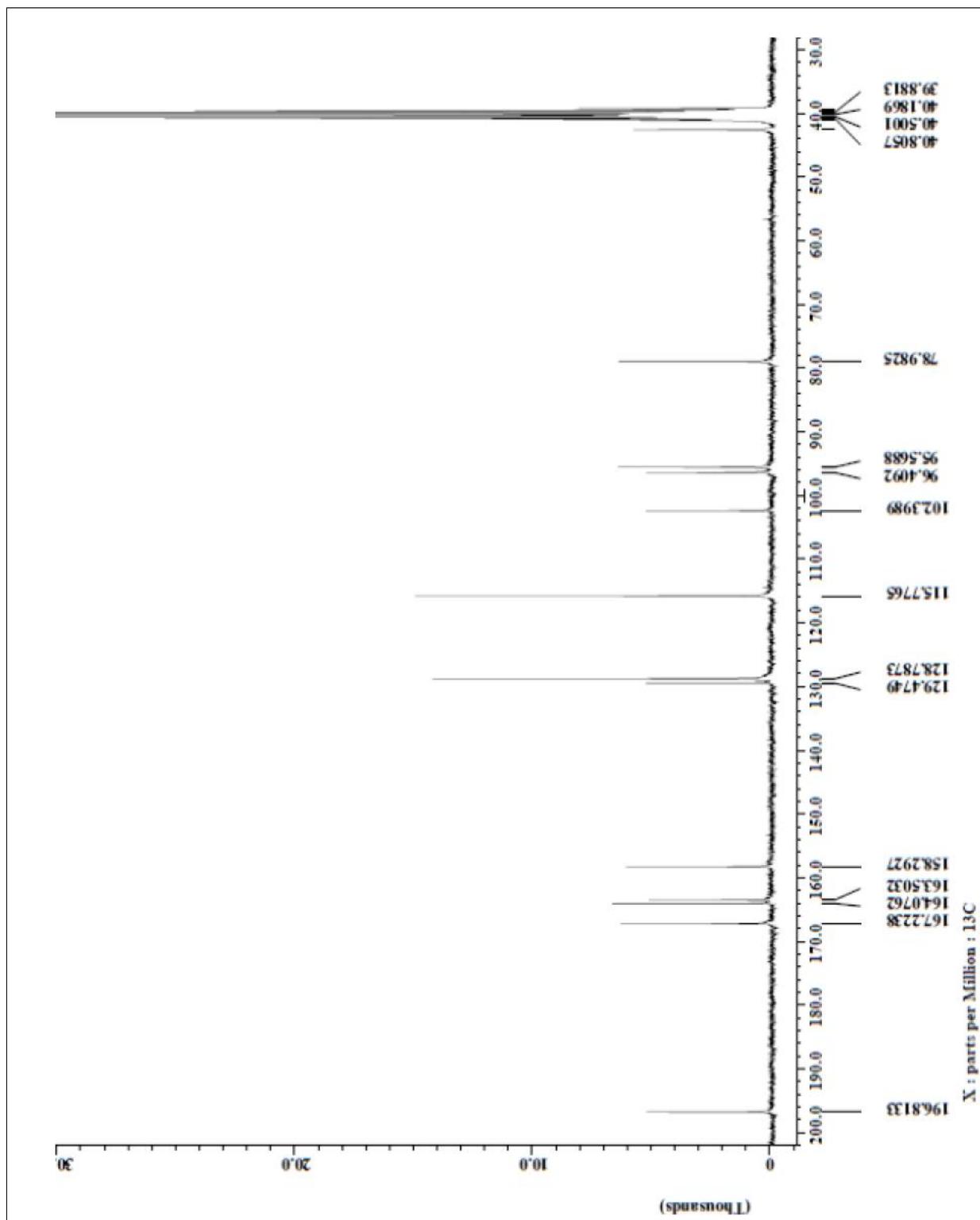
Espectro 5. RMN-<sup>1</sup>H de la Naringenina (Ng).



Espectro 6. RMN-<sup>1</sup>H de la Naringenina (Ng). Ampliación.

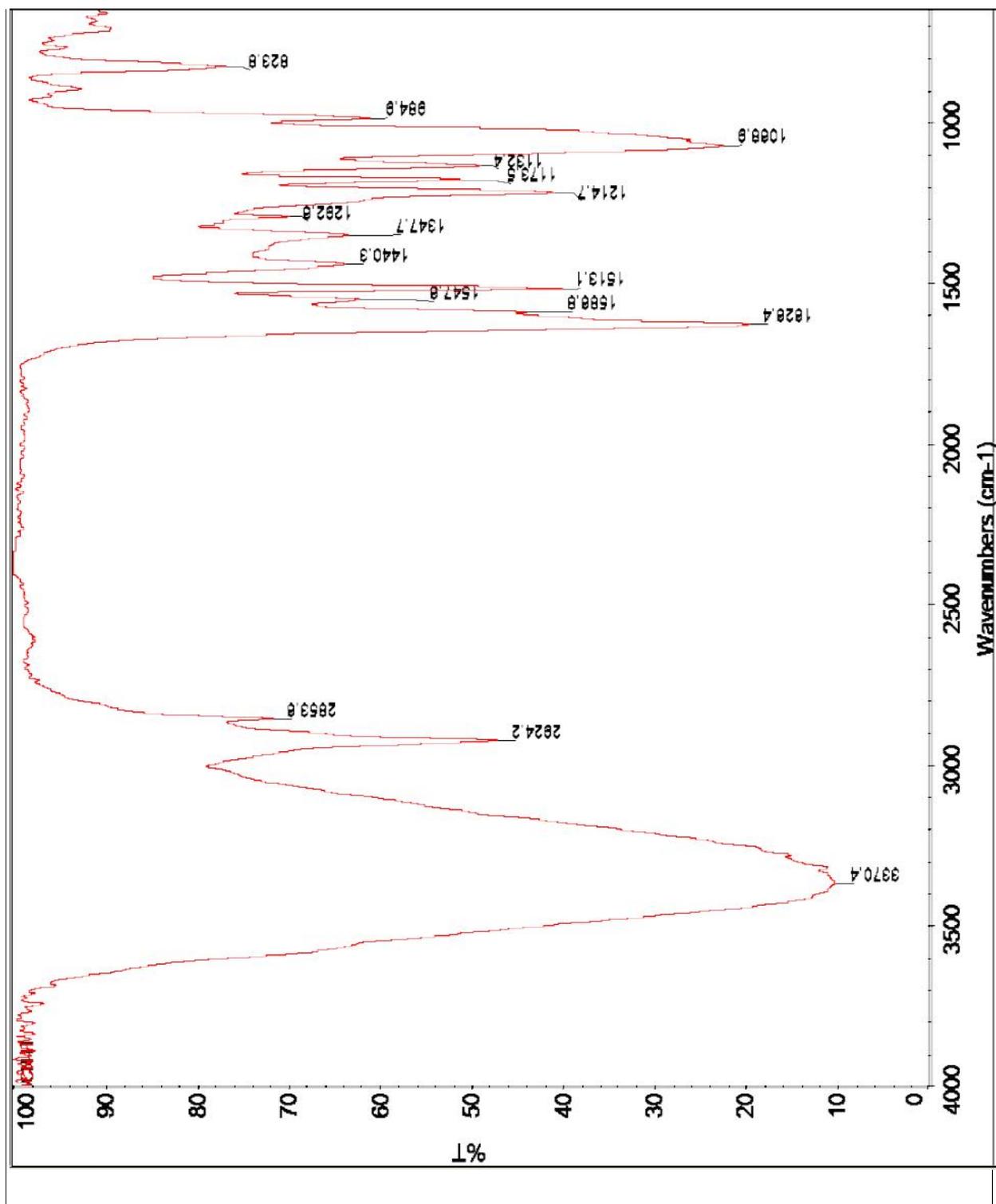


Espectro 7. RMN-<sup>13</sup>C de la Naringenina (Ng).

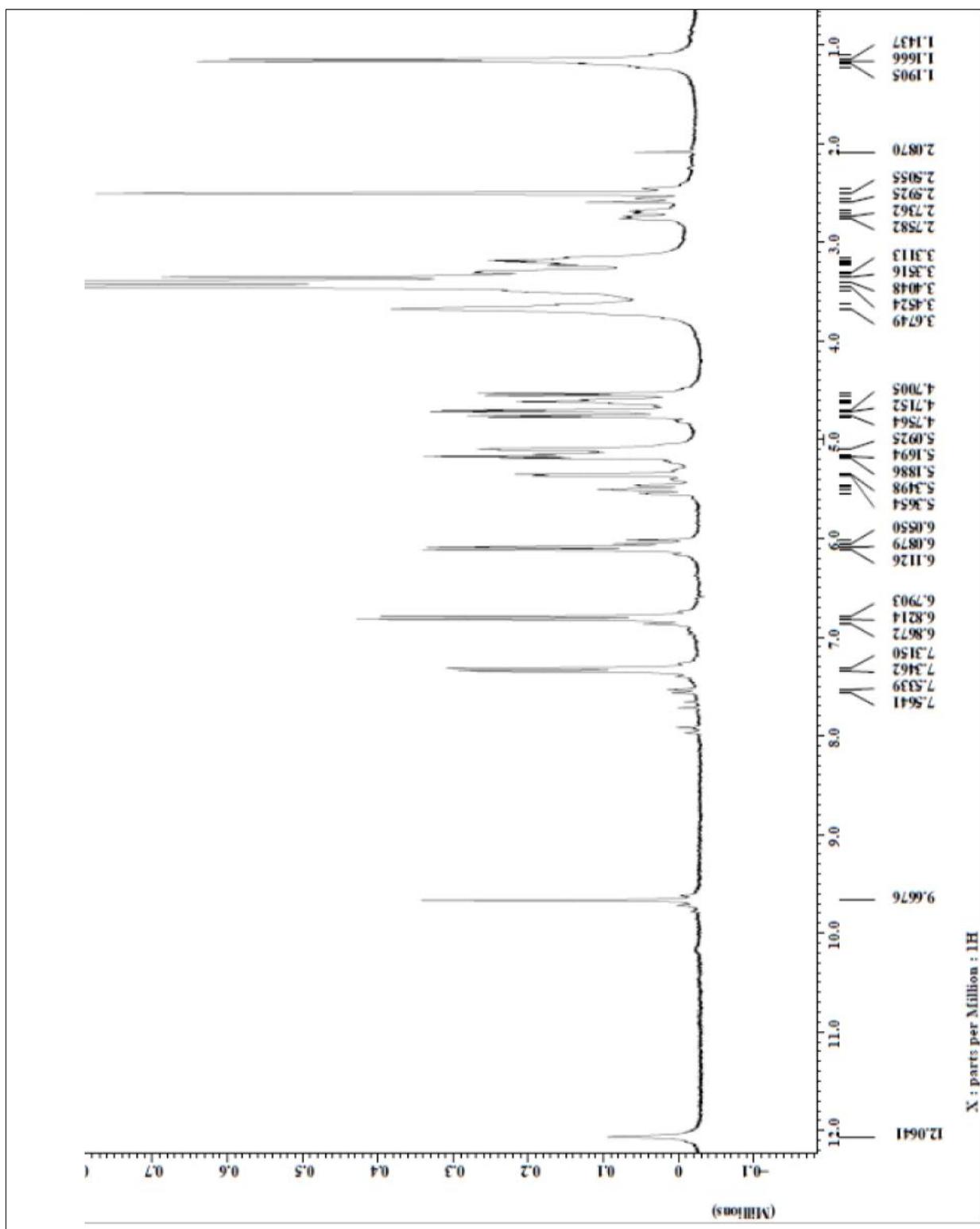




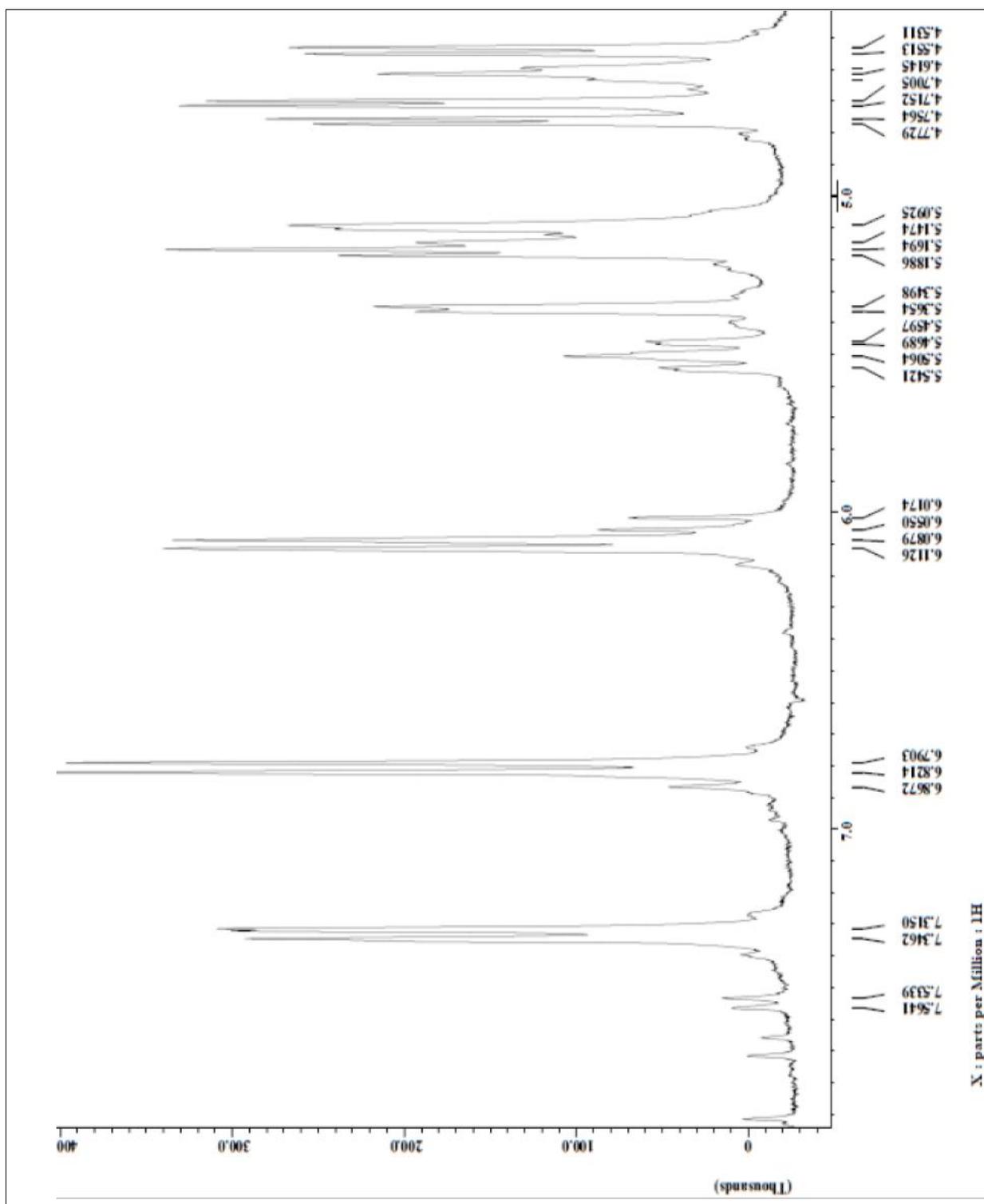
Espectro 9. IR de la Chalcona de naringina (CH-N).



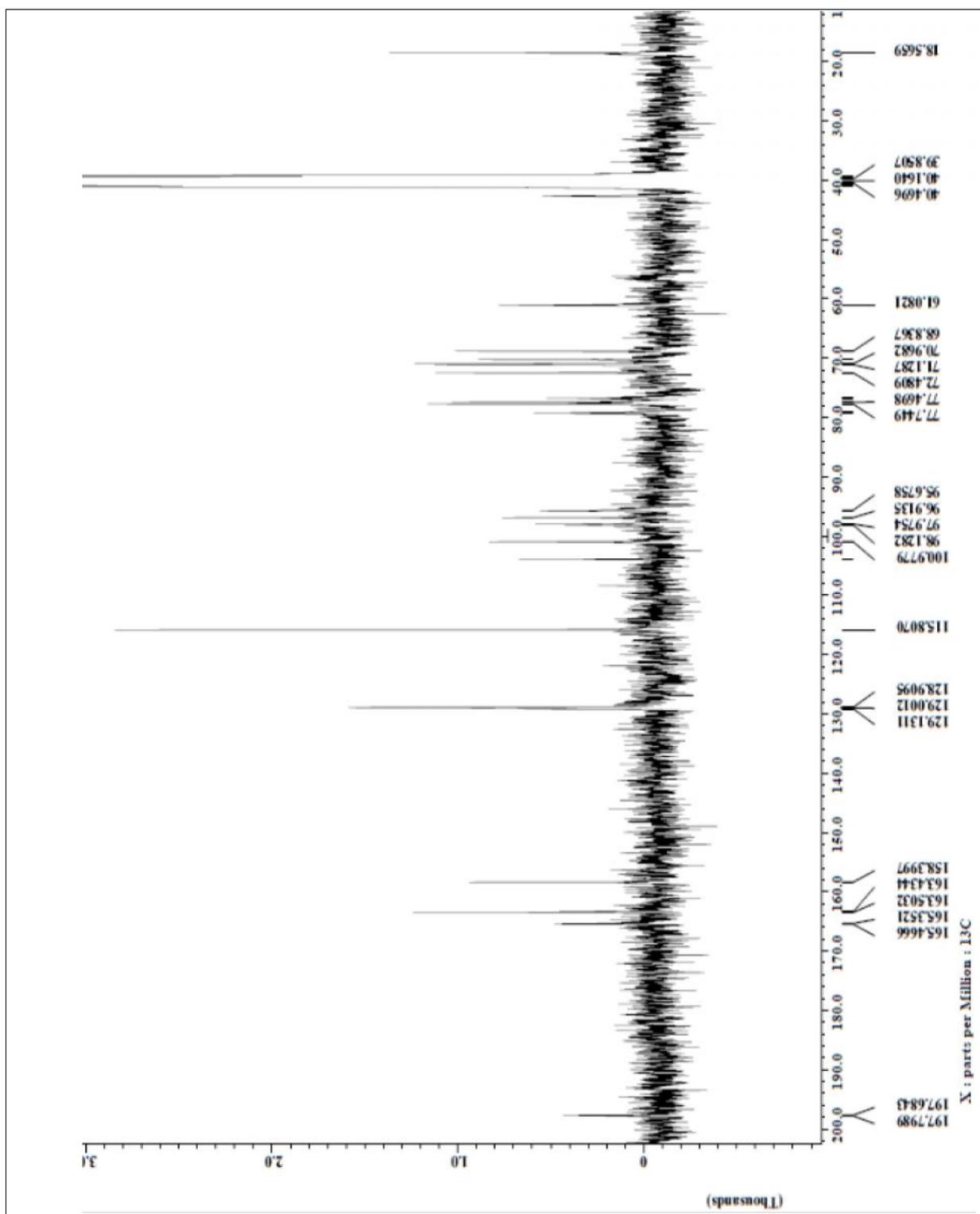
Espectro 10. RMN-<sup>1</sup>H de la Chalcona de naringina (CH-N).



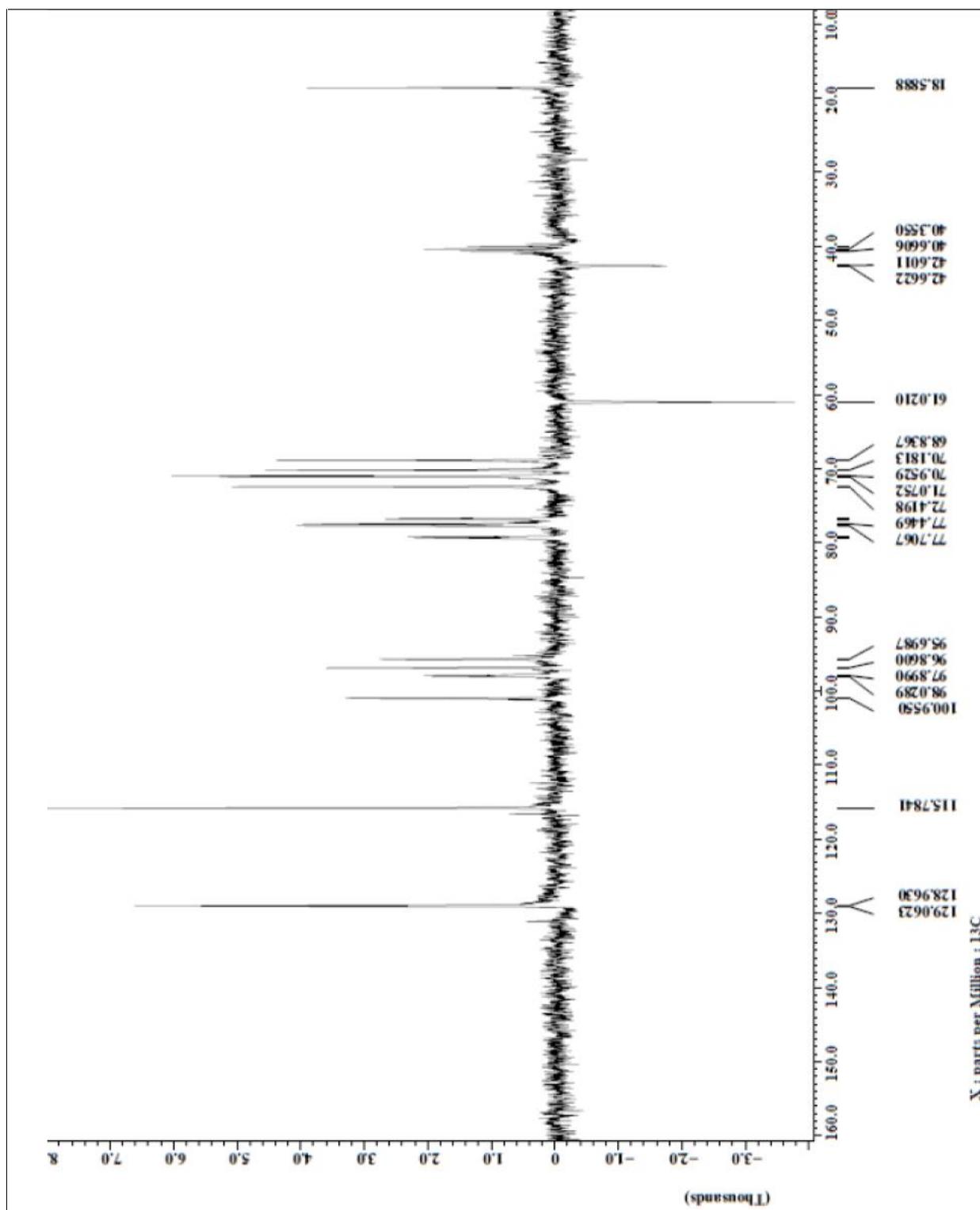
Espectro 11. RMN-<sup>1</sup>H de la Chalcona de naringina (CH-N). Ampliación.



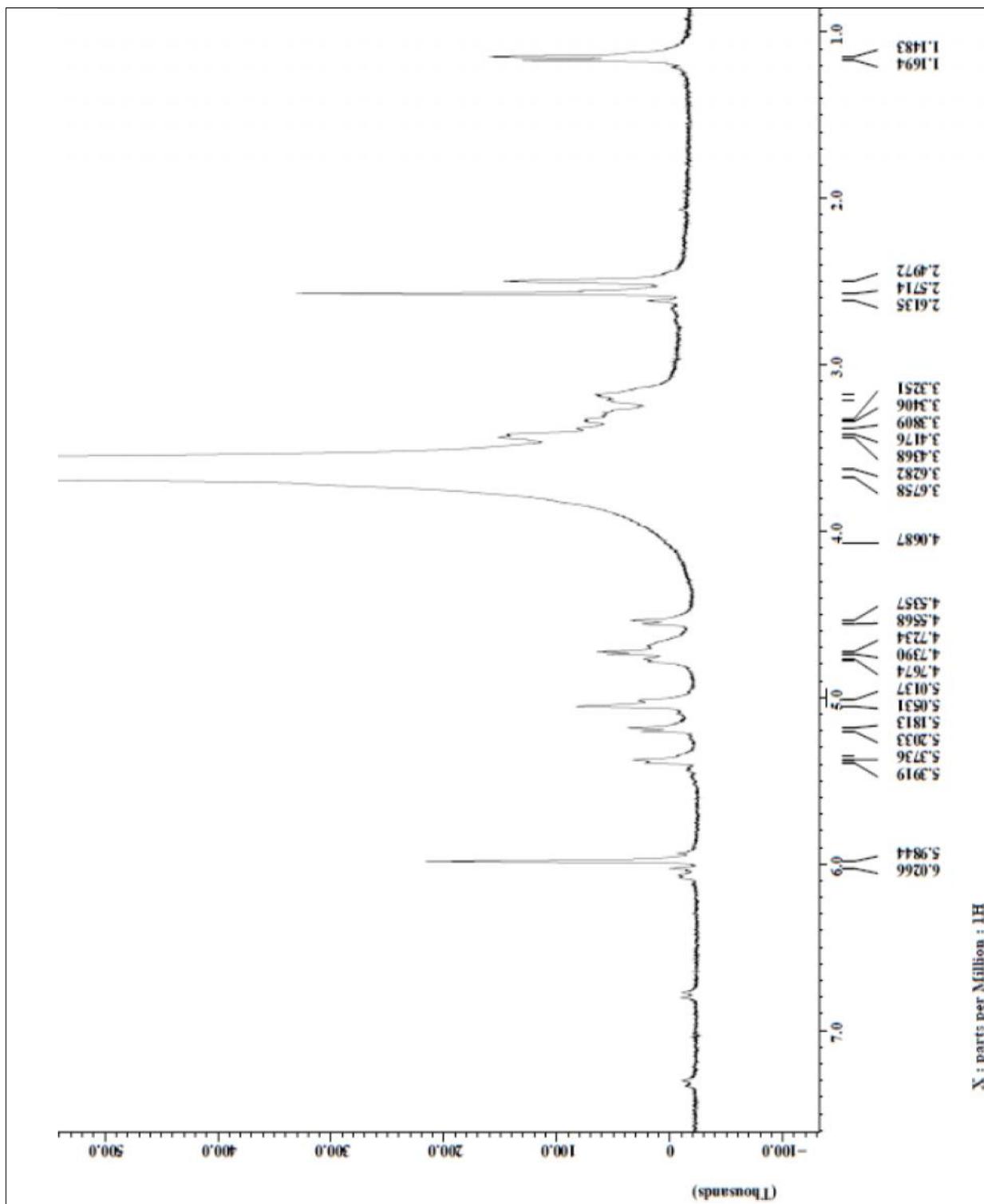
Espectro 12 RMN-<sup>13</sup>C de la Chalcona de naringina (CH-N).



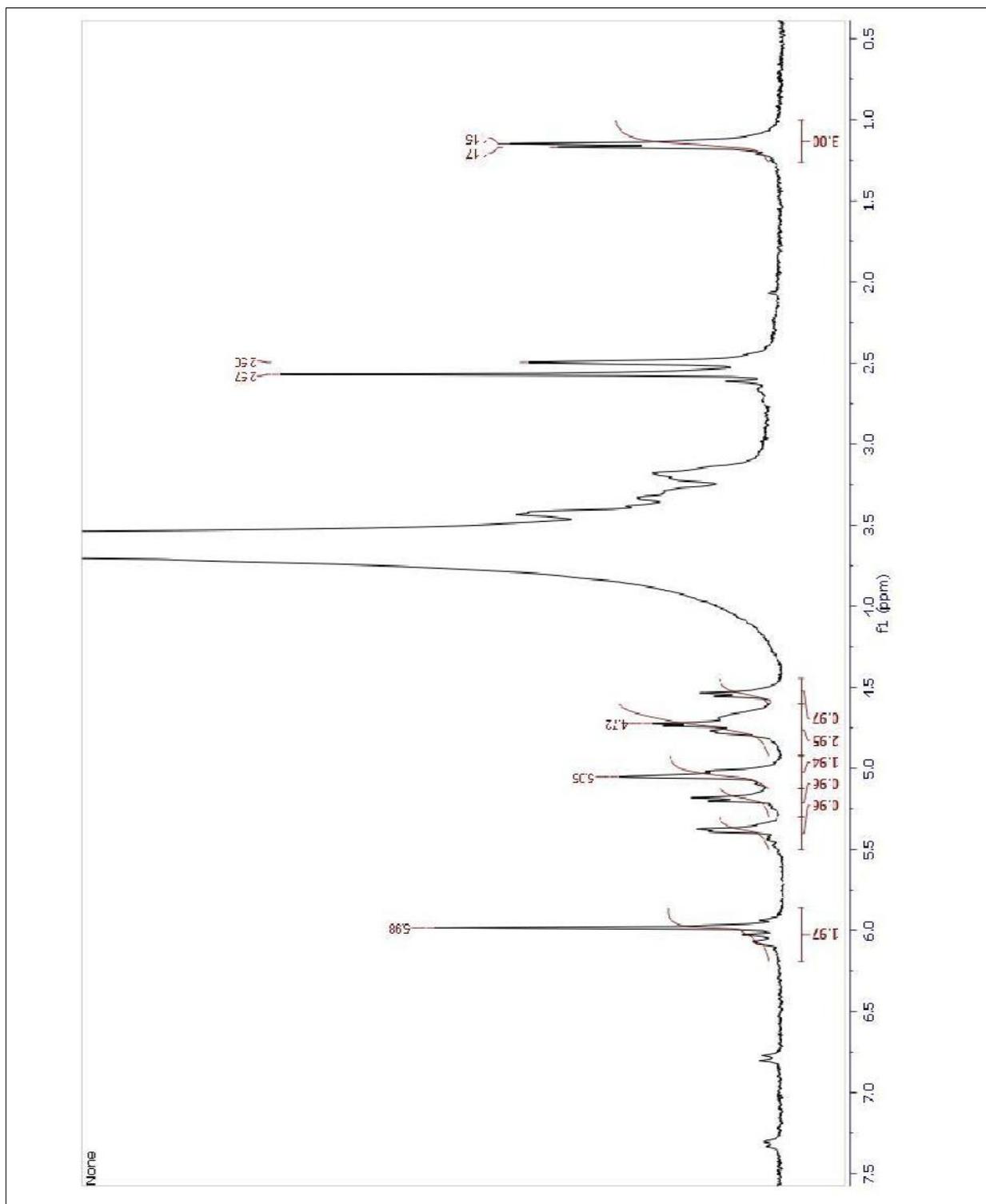
Espectro 13. RMN-<sup>13</sup>C-DEPT-135 de la Chalcona de naringina (CH-N).



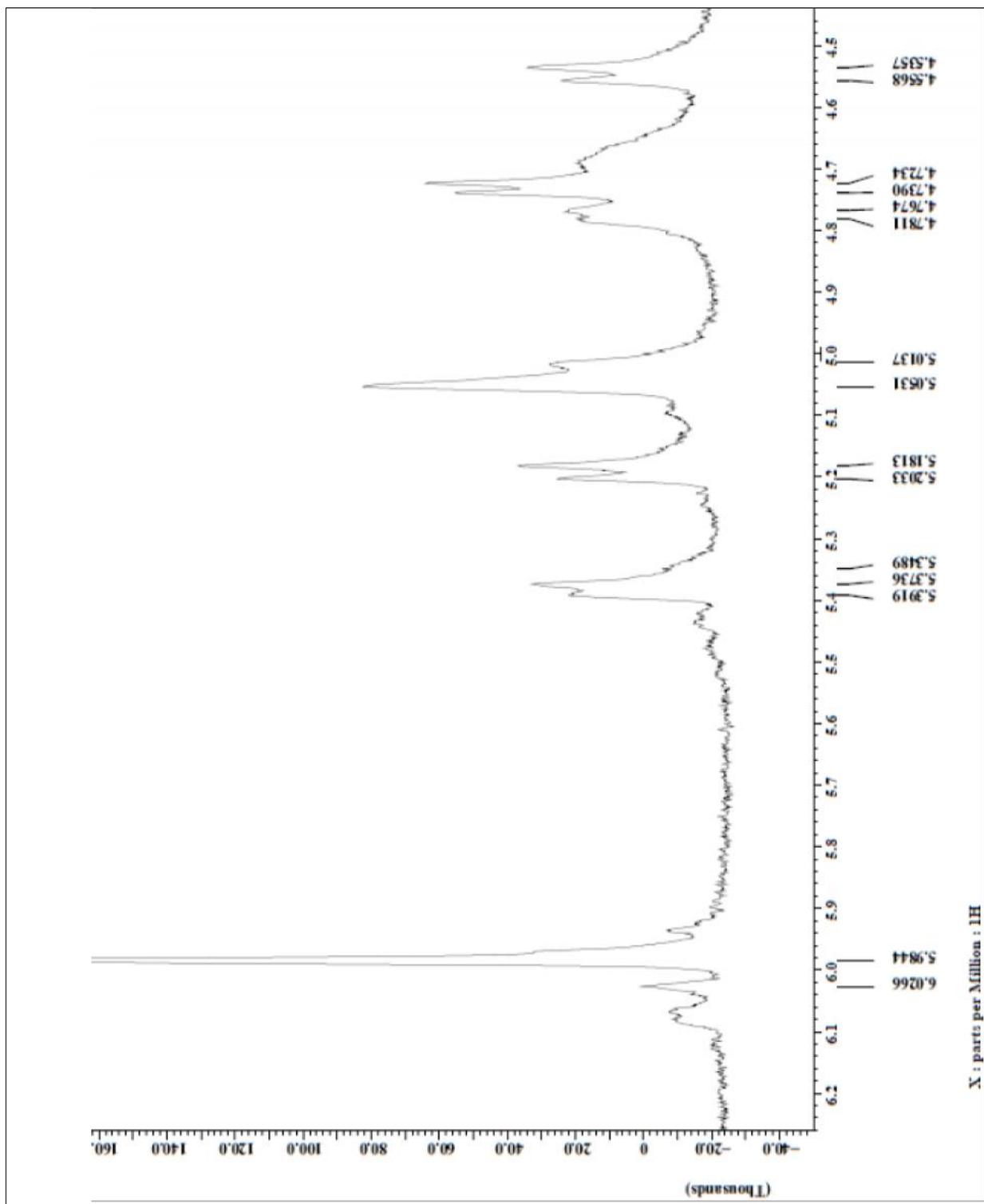
Espectro 14. RMN-<sup>1</sup>H de la Floracetofenona-4'-neohesperidosido (Fa4n).



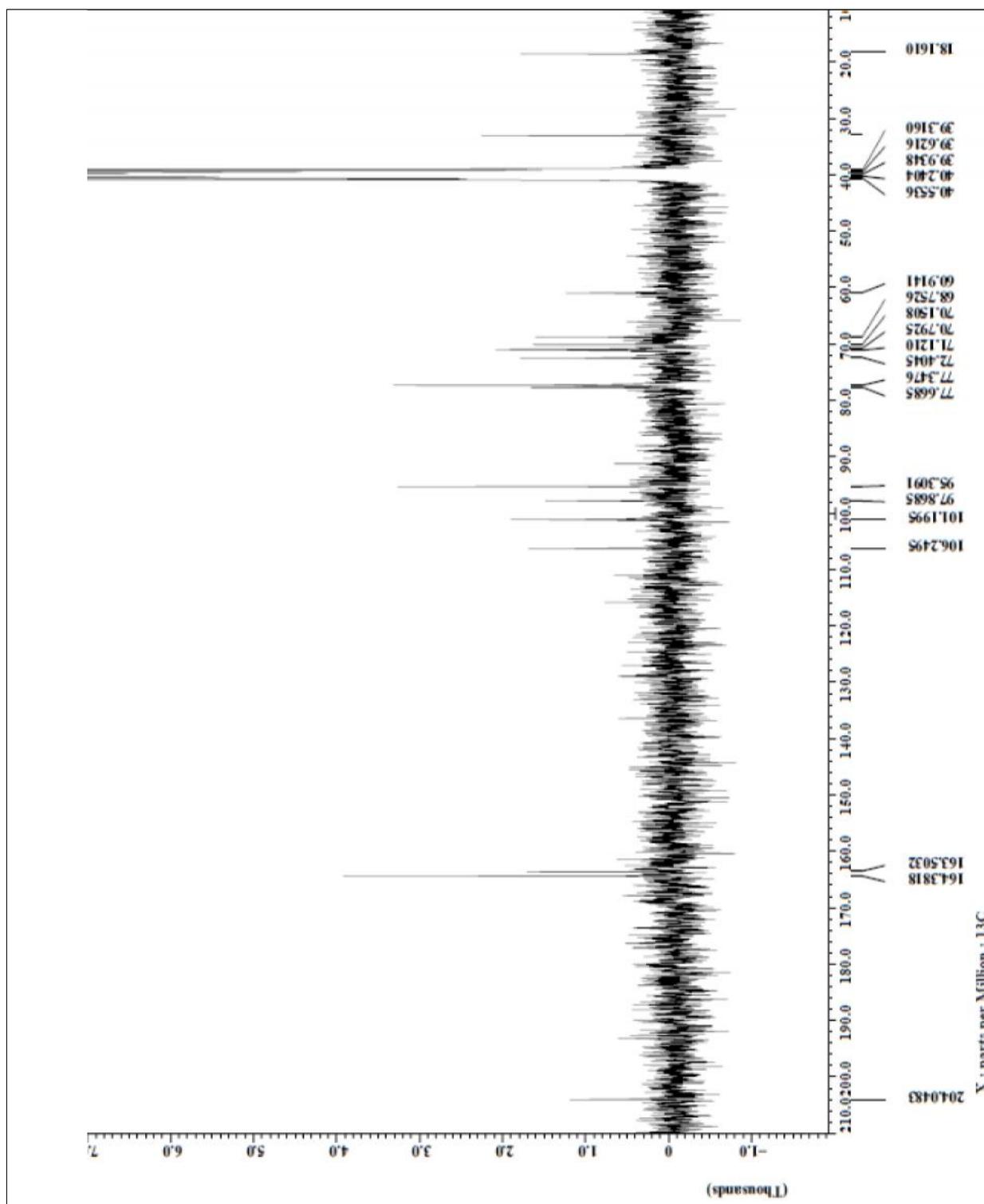
Espectro 15. RMN-<sup>1</sup>H de la Floracetofenona-4'-neohesperidosido (Fa4n) (integración).



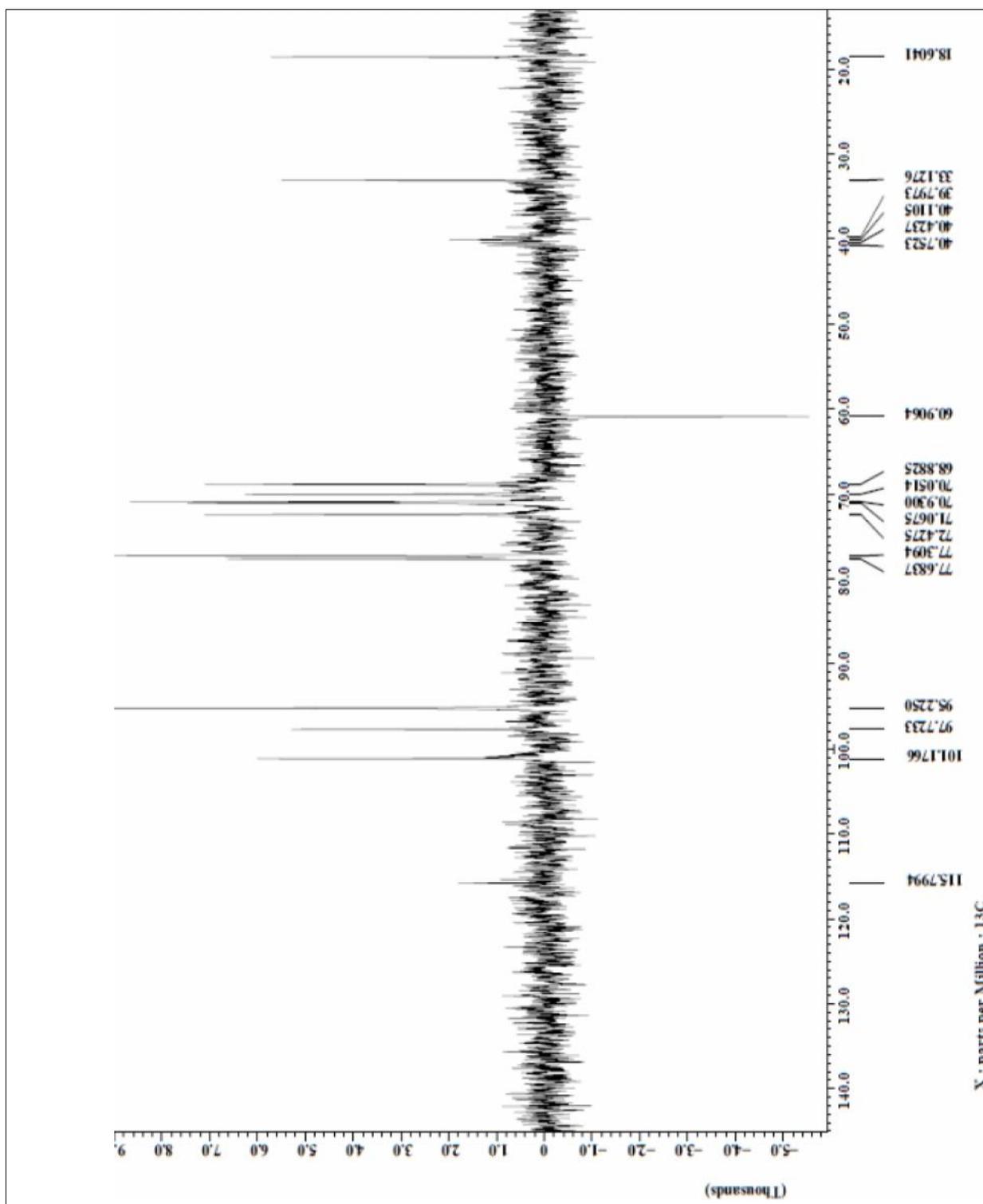
Espectro 16. RMN-<sup>1</sup>H de la Floracetofenona-4'-neohesperidosido (Fa4n). (Ampliación).



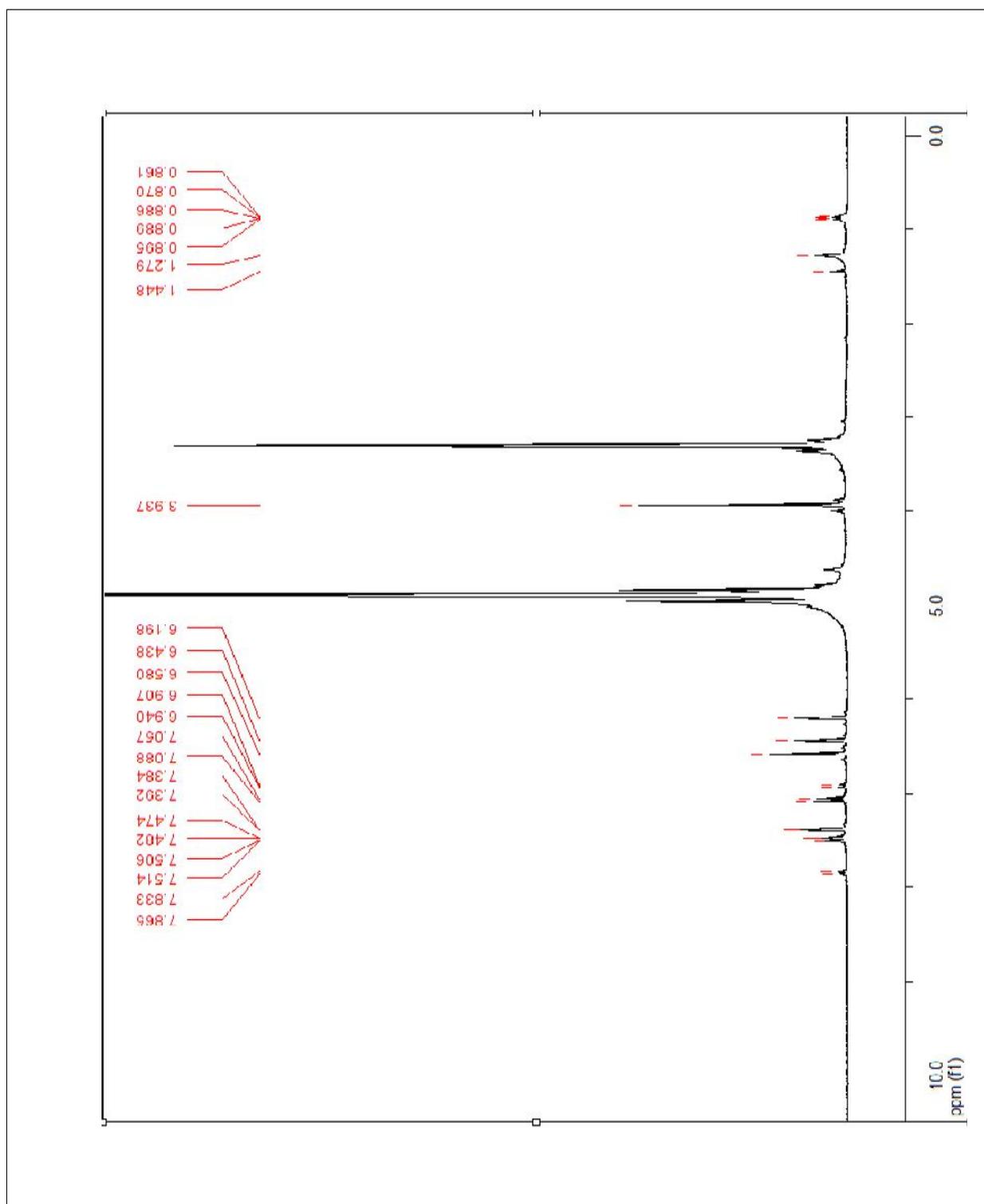
Espectro 17. RMN-<sup>13</sup>C de la Floracetofenona-4'-neohesperidoso (Fa4n).



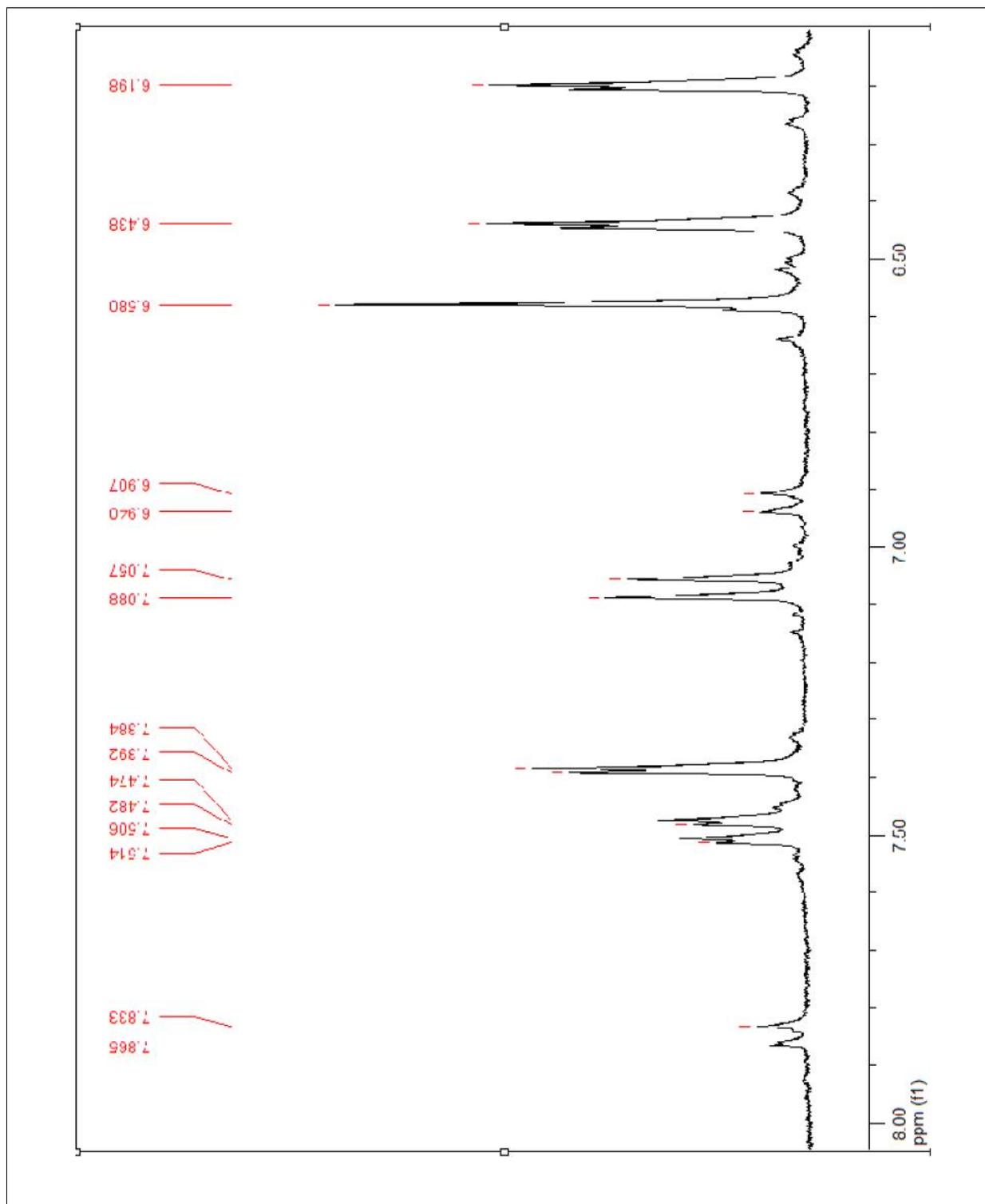
Espectro 18. RMN-<sup>13</sup>C-DEPT-135 de la Floracetofenona-4'-neohesperidosido (Fa4n).



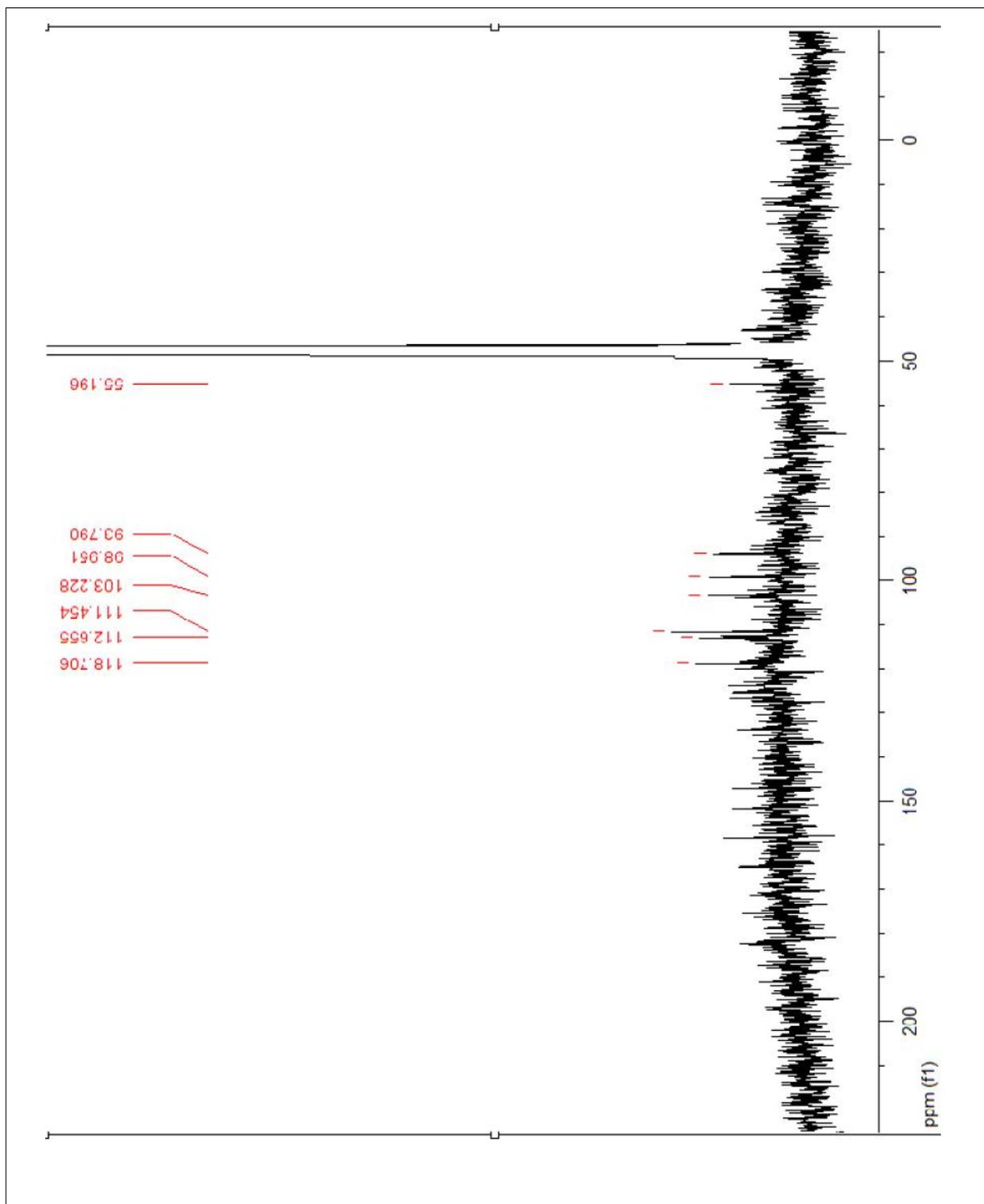
Espectro 19. RMN-<sup>1</sup>H de la Flavona de Hesperetina (Diosmetina) (F-Hp).



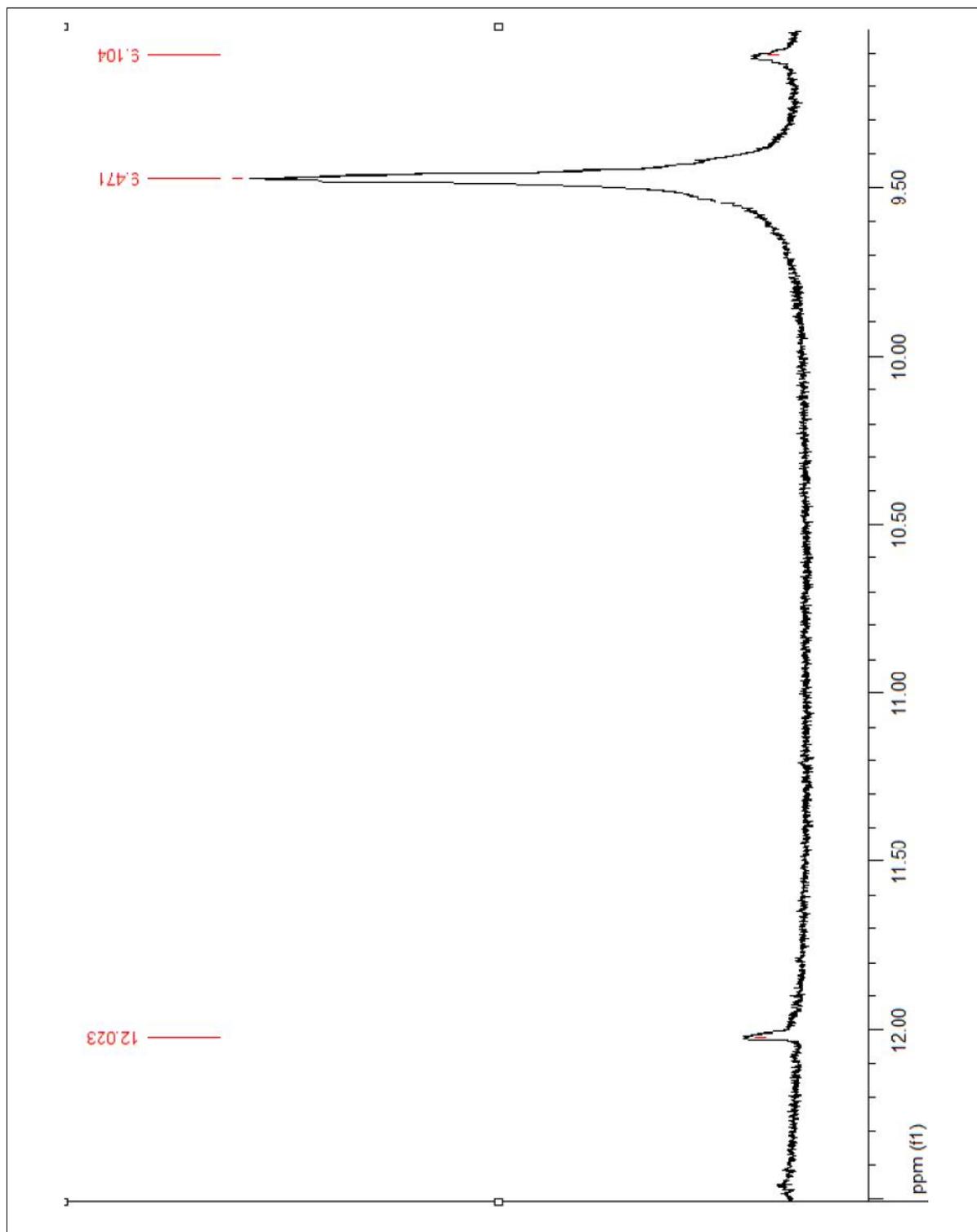
Espectro 20. RMN-<sup>1</sup>H de la Flavona de Hesperetina (Diosmetina) (F-Hp).



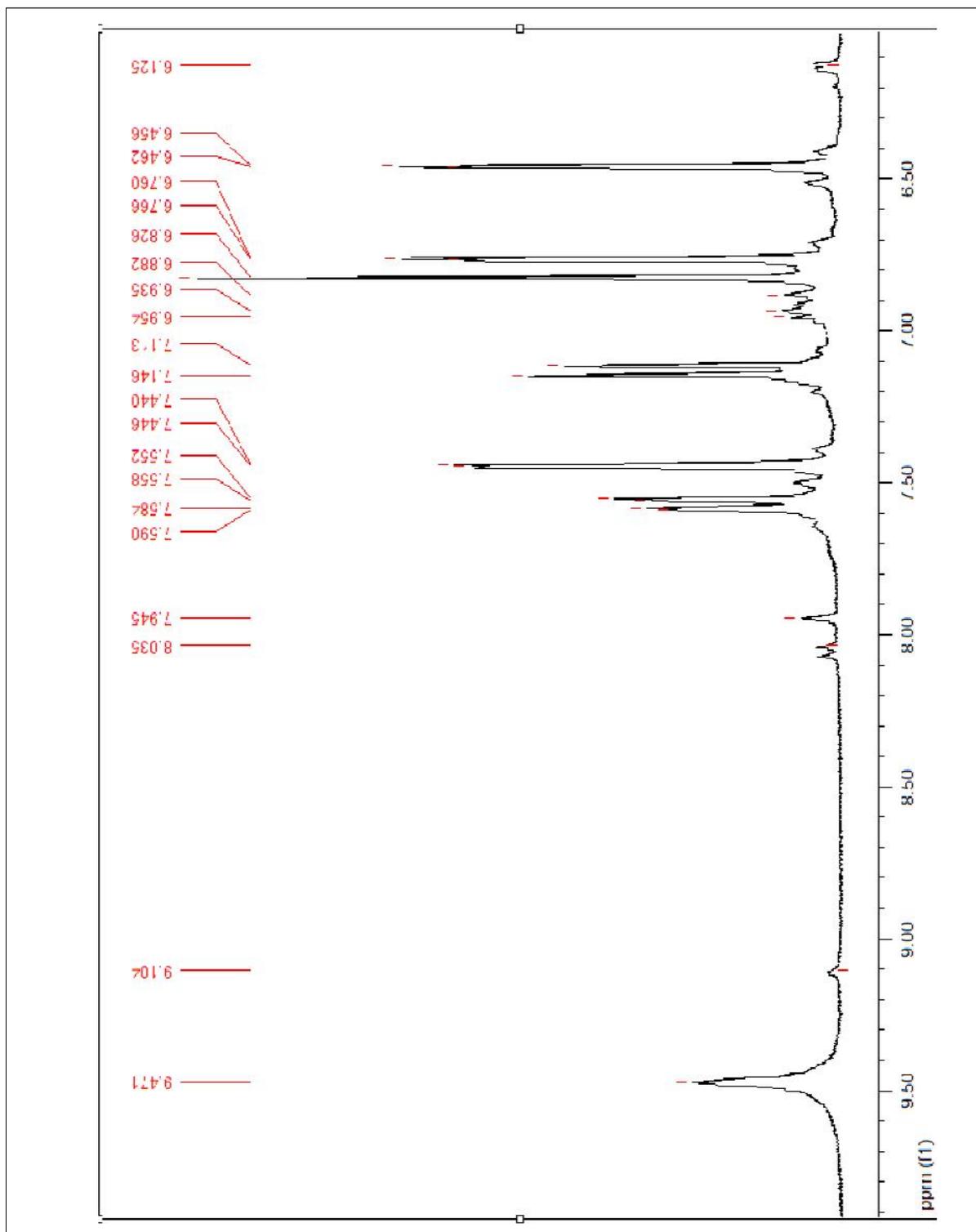
Espectro 21. RMN-<sup>13</sup>C de la Flavona de Hesperetina (Diosmetina) (F-Hp).



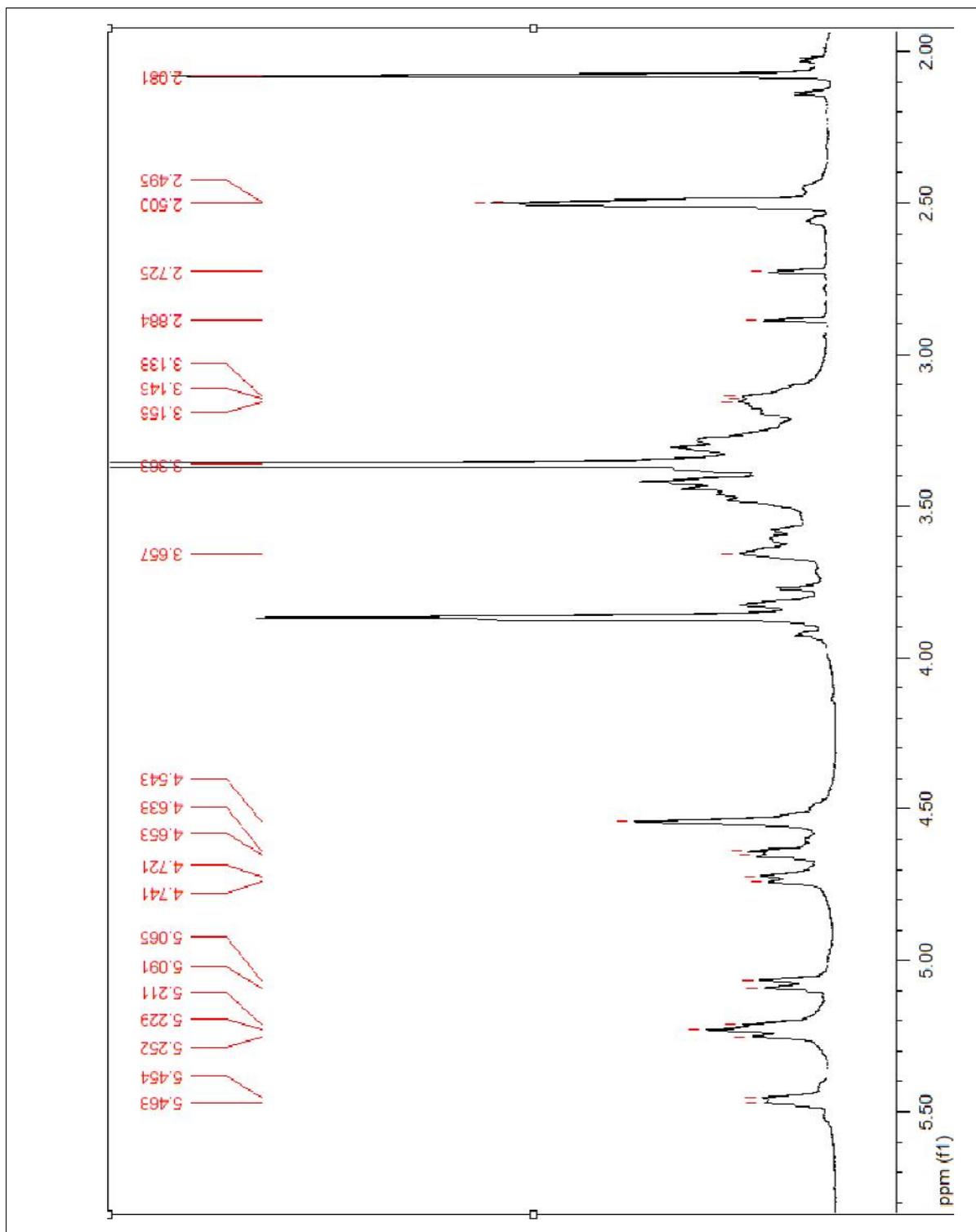
Espectro 22. RMN-<sup>1</sup>H de la Flavona de Hesperidina (Diosmina) (F-H).



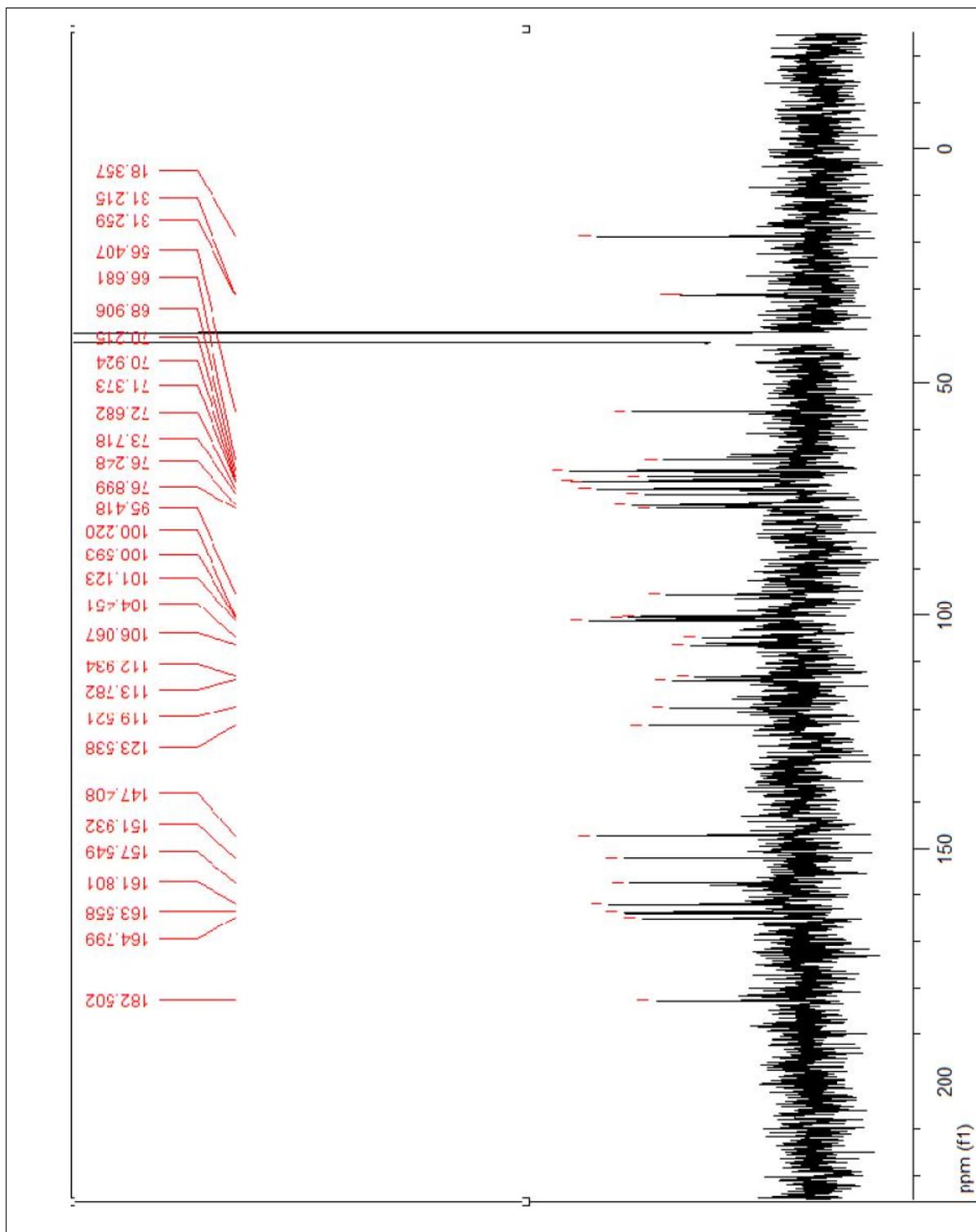
Espectro 23. RMN-<sup>1</sup>H de la Flavona de Hesperidina (Diosmina) (F-H).



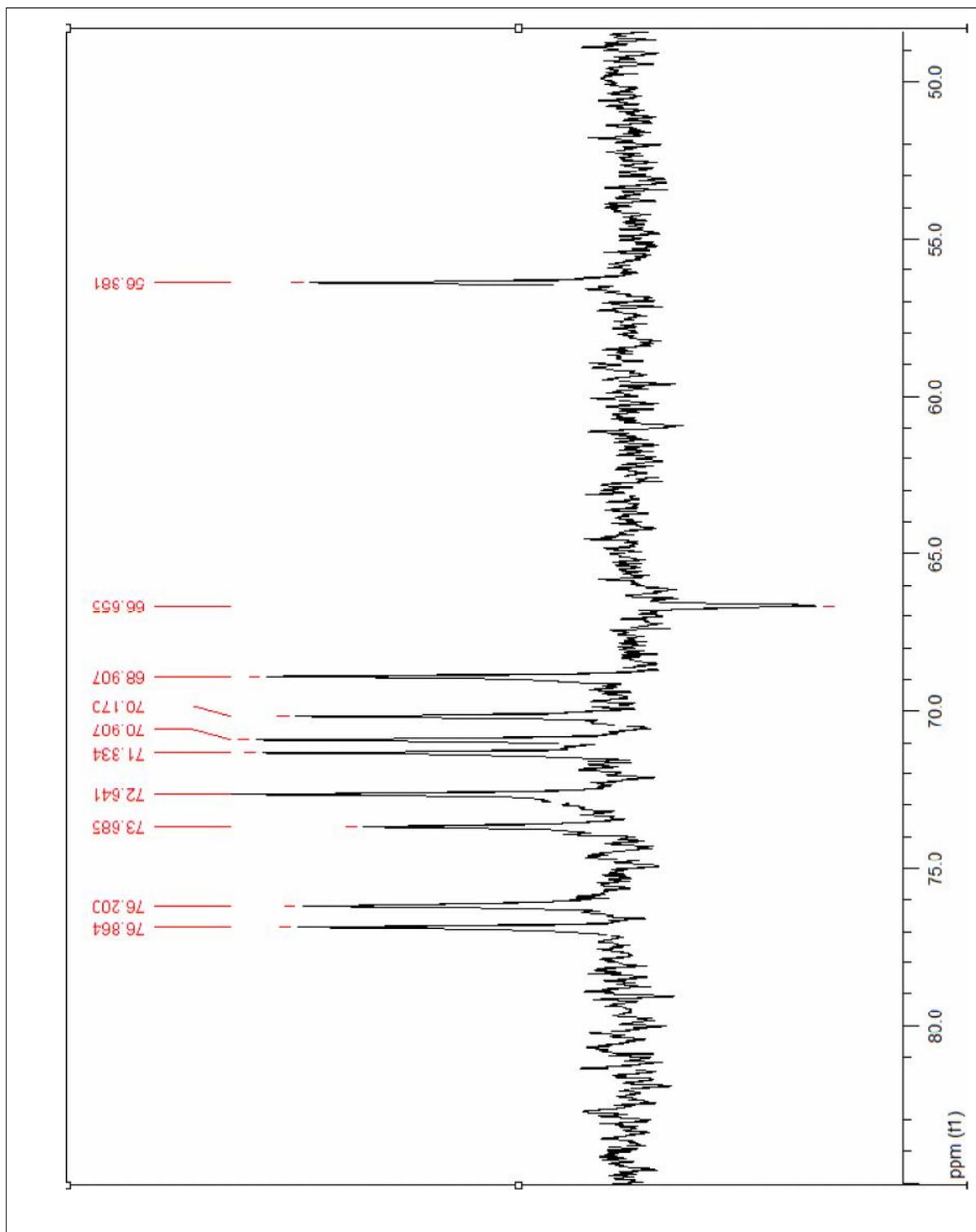
Espectro 24. RMN-<sup>1</sup>H de la Flavona de Hesperidina (Diosmina) (F-H).



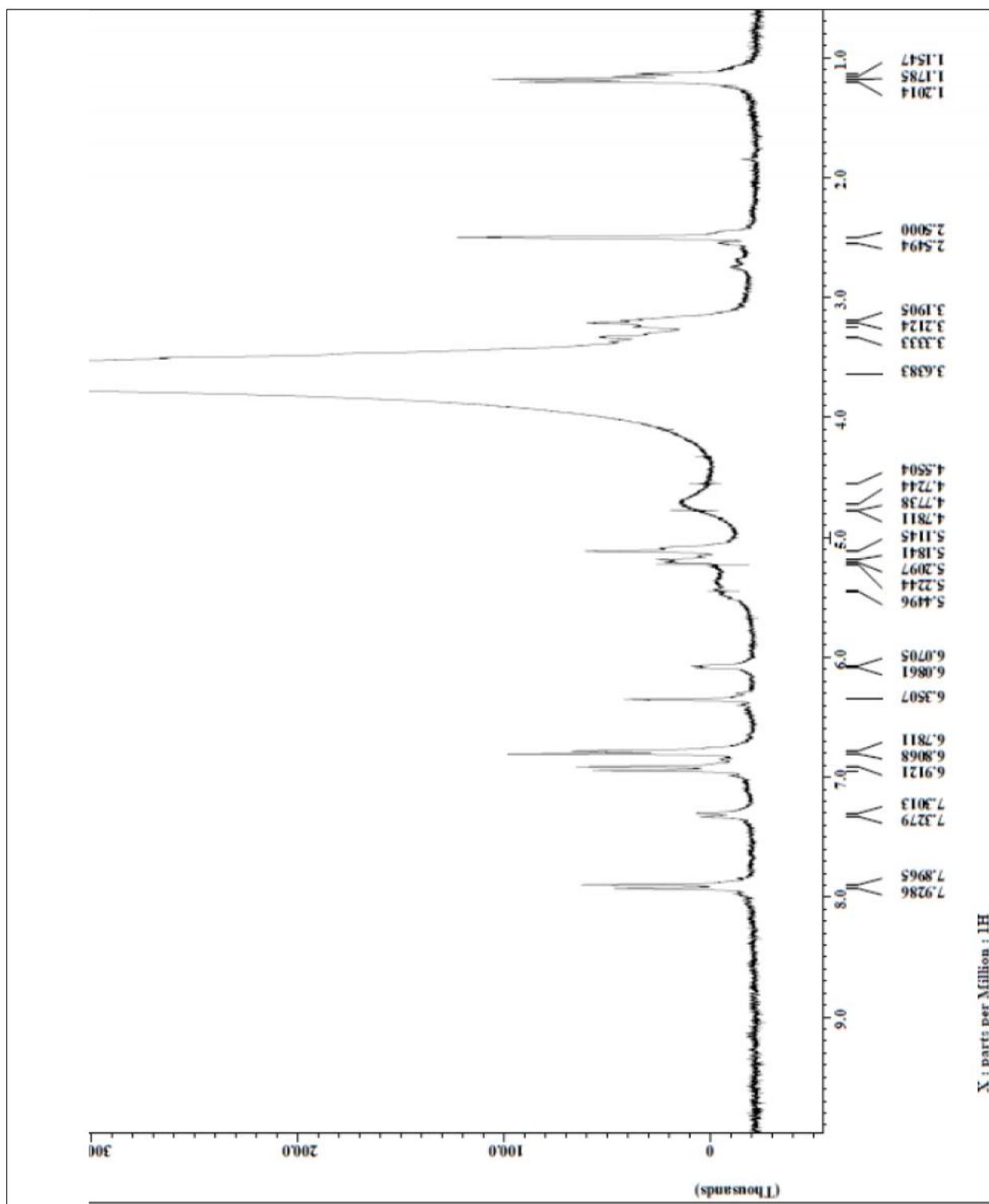
Espectro 25. RMN-<sup>13</sup>C de la Flavona de Hesperidina (Diosmina) (F-H).



Espectro 26. RMN-<sup>13</sup>C-DEPT-135 de la Flavona de Hesperidina (Diosmina) (F-H).



Espectro 27. RMN-<sup>1</sup>H de la Flavona de naringina (F-N).



Espectro 28. RMN-<sup>1</sup>H de la Flavona de naringina (F-N). (Ampliación).

