

Química de los Flavonoides

Introducción

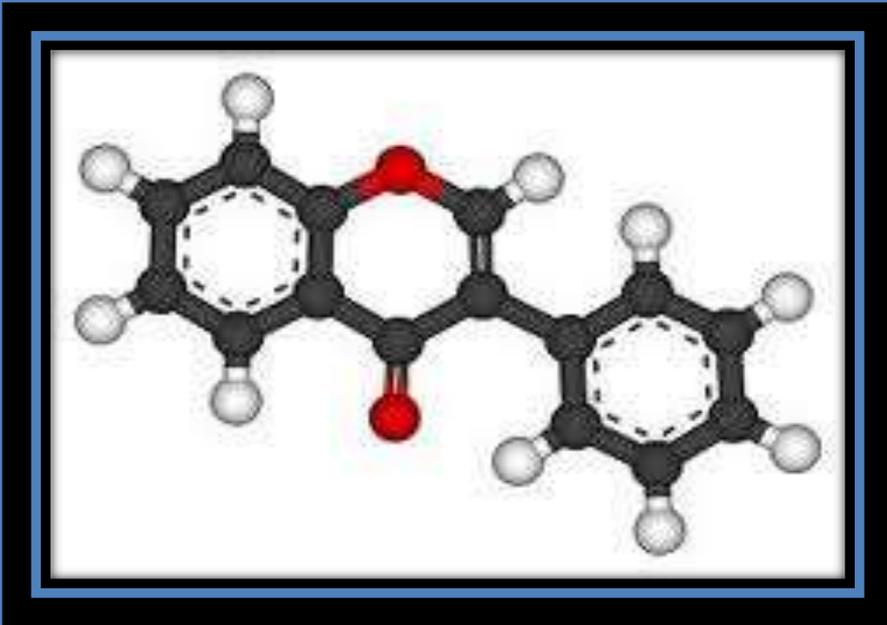
- Pigmentos naturales con una estructura carbonada C₃-C₆-C₃ o más, específicamente con un grupo fenilbenzopirano, dependiendo de la unión del grupo aromático con el núcleo benzopirano (cromano) serán, flavonoides 2-fenilbenzopirano, isoflavonoides 3-benzopirano, neoflavonoides 4-benzopirano



Botánica

Isoflavonas

- Distribución: Las Isoflavonas se hayan presentes mayoritariamente en la familia de las leguminosas (Fabaceae) , preferentemente en la subfamilia papilionideae, existen grandes revisiones de investigaciones sobre la presencia de Isoflavonas en esta subfamilia como la de Veitch (2007, 2009). Se encuentran presentes en los frutos de esta familia (Legumbre) y en las raíces o rizomas (mecanismo de fijacion de Nitrogeno)



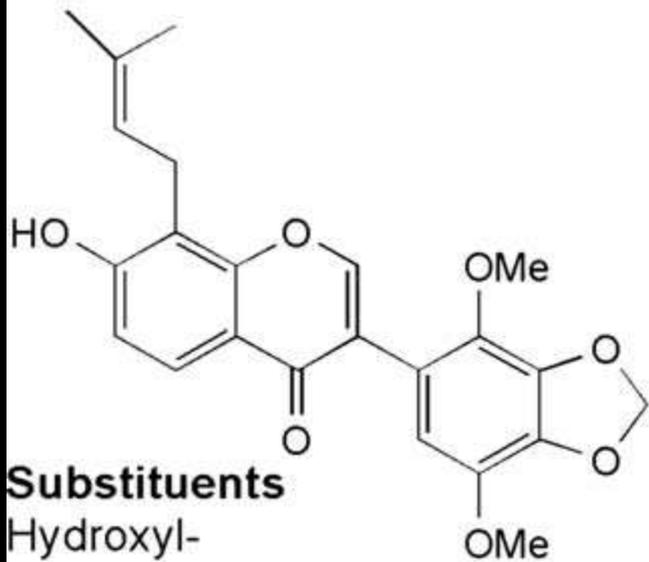
Química

Isoflavonas

- Características químicas resaltantes: Las isoflavonas difieren de sus respectivos flavonoides por la migración de un anillo aromático de C2 a C3. Mayores cambios en la estructura dependerán de su Hidroxilacion, metoxilacion, o metilendioxisustitucion, prenilacion y Glicosilacion.

Isoflavonas

A Isoflavone aglycones

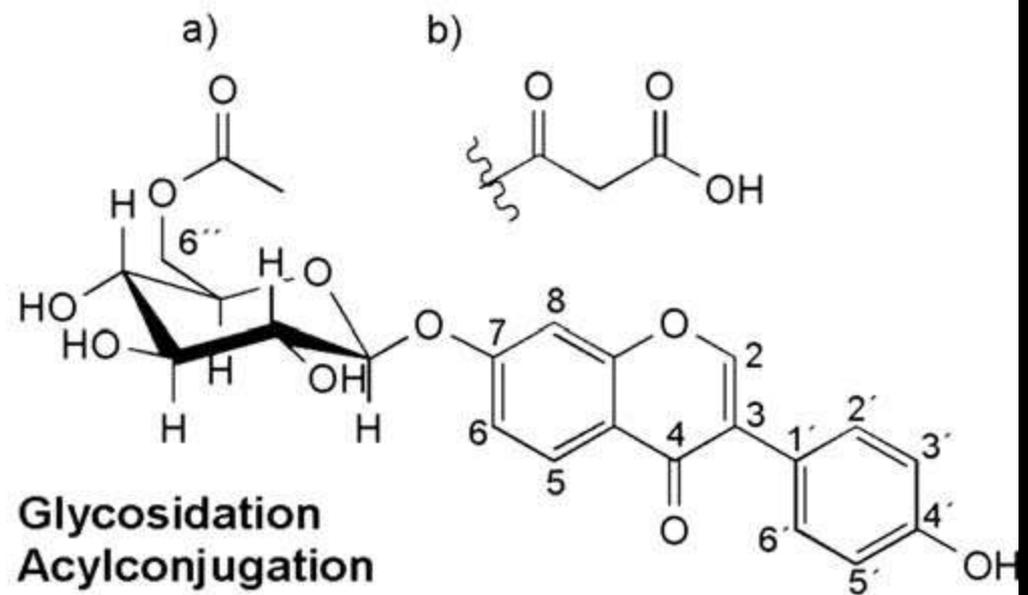


Substituents

Hydroxyl-
Methoxy-
Methylenedioxy-
Prenyl-

Preferrugone

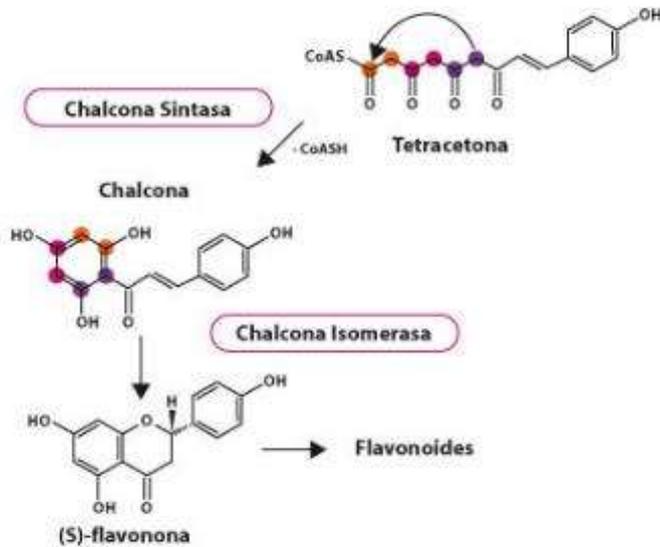
B Isoflavone glycosides



Glycosidation Acylconjugation

a) Genistein-7-O-(6''-acetyl) glucoside
b) Genistein-7-O-(6''-malonyl) glucoside

Síntesis de flavonoides

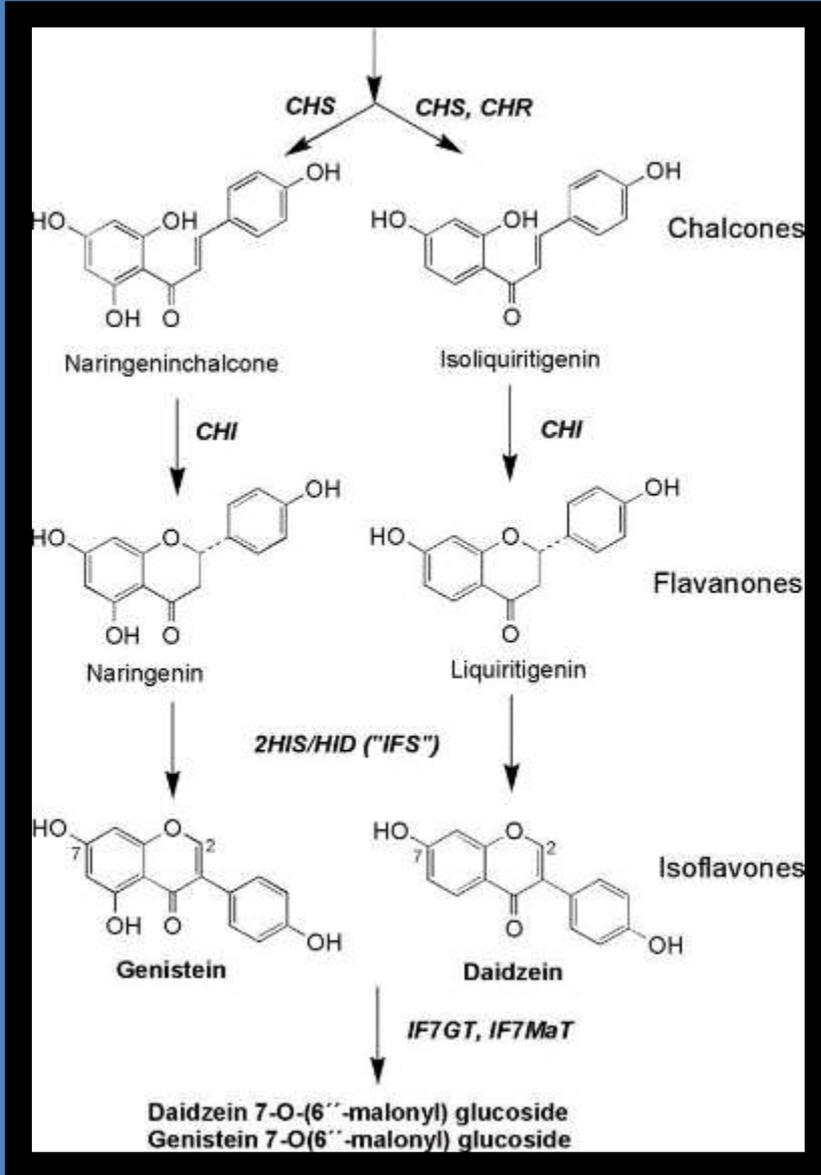


3Dciencia.com

Biosíntesis

Biosíntesis

Las Isoflavonas proceden de la ruta de los Fenilpropanoides, pero el paso crucial para convertirse en Isoflavonas esta en la conversión de la respectiva flavanona en una Isoflavona, la enzima que realiza este proceso es la 2-hidroxiisoflavanona sintetasa (2HIS) luego se produce una deshidratación mediante la 2-hidroxiisoflavona deshidrasa convirtiéndola en una Isoflavona (todas estas enzimas ya han sido caracterizadas convenientemente)



Biosíntesis

- Regulación:
- La vía del ácido shikímico es dependiente de la luz.
- La acción de la fenilalanina amonioliasa, que inicia la vía biosintética de los flavonoides, es fundamental para la vida de las plantas y por ello está estrictamente regulada. Entre otros factores, la fenilalanina amonioliasa es activada por la luz, y depende además de la concentración de diferentes hormonas vegetales. La actividad de la fenilalanina amonioliasa suele aumentar cuando a los vegetales se les somete a situaciones de estrés, como puede ser la falta de agua ("estrés hídrico"), infecciones fúngicas o bacterianas, radiaciones UV, y el frío (por esto último las plantas sometidas a bajas temperaturas suelen presentar coloraciones rojizas en tallos y hojas, y cuando los inviernos son muy fríos, las flores desarrollan colores muy intensos en la primavera siguiente).
- Hay isozimas dedicadas a la producción de flavonoides diferentes en respuesta a señales ambientales diferentes

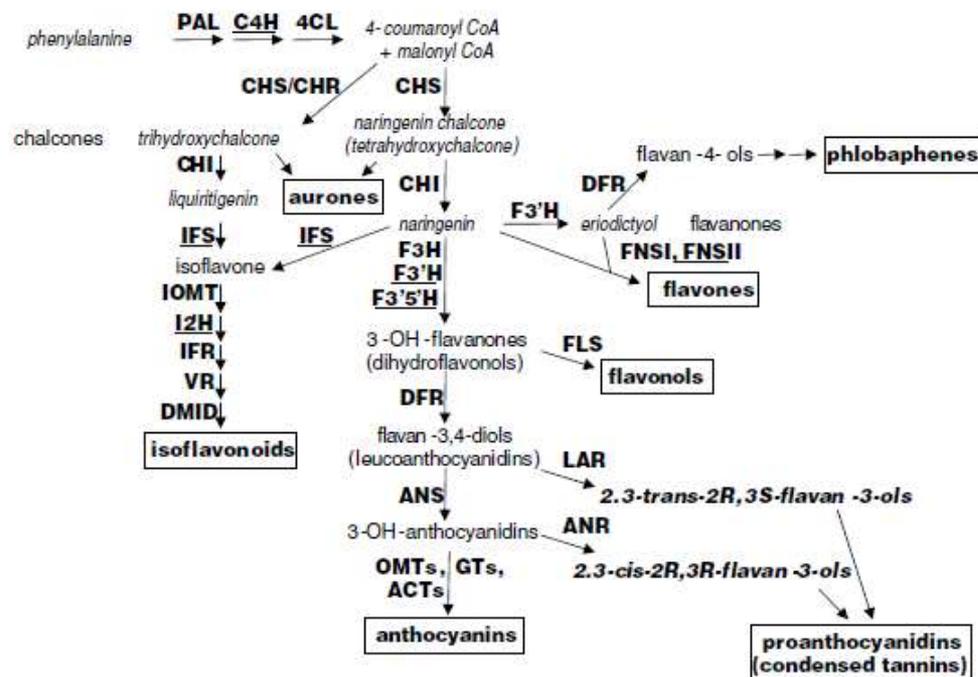


Figure 3.1 Schematic of the flavonoid pathway showing the enzymatic steps leading to the major classes of end products, flavonols, anthocyanins, proanthocyanidins, phlobaphenes, aurones, flavones, and isoflavonoids, which are identified with boxes. Names of the major classes of intermediates are given, with names of specific compounds in italics. Enzymes are indicated with standard abbreviations in bold; names of cytochrome P450 monooxygenases that may function as membrane anchors for other flavonoid enzymes are underlined. Abbreviations: ACTs, acetyl transferases; ANR, anthocyanidin reductase; ANS, anthocyanidin synthase (also known as leucoanthocyanidin dioxygenase); C4H, cinnamate-4-hydroxylase; CHI, chalcone isomerase; CHR, chalcone reductase; CHS, chalcone synthase; 4CL, 4-coumaroyl:CoA-ligase; DFR, dihydroflavonol 4-reductase; DMID, 7,2'-dihydroxy, 4'-methoxyisoflavanol dehydratase; F3'H, flavanone 3-hydroxylase; FNSI and FNSII, flavone synthase I and II; F3'5'H, flavonoid 3' and 3'5' hydroxylase; IOMT, isoflavone O-methyltransferase; IFR, isoflavone reductase; I2'H, isoflavone 2'-hydroxylase; IFS, isoflavone synthase; LAR, leucoanthocyanidin reductase; OMTs, O-methyltransferase; PAL, phenylalanine ammonia-lyase; GTs, glucosyl transferases; VR, vestitone reductase.



Fitoquímica

SECUENCIA DE INVESTIGACION

OBTENCION DEL MATERIAL

- Colectar planta completa, flor y fruto.
- Por duplicado.
- Anotar nombre vernáculo y científico.
- Hábitat, tamaño, aspecto y color de los órganos recogidos
- Clima, altitud, abundancia o escasez de la especie.
- Una foto.

IDENTIFICACION

- Por un botánico de experiencia
- Buen manejo de literatura
- Guardar muestra herborizada

DESECACION

- Para eliminar H₂O y evitar alteración.
- Hacerle gradualmente-- cambios de lugares.
- **Aire libre**, en el sol sobre papel que se cambia diariamente.
- **Estufa**: temperatura controlada+ aire forzado

PROCESO DE INVESTIGACION FITOQUIMICA



Aislamiento

- Existen muchas vías de aislar y separar una isoflavonas, lo más importante es reconocer el material del cual se está extrayendo (material vegetal, muestra biológica, Alimento), la presencia de carbohidratos y compuestos lipofílicos, afectará el desarrollo del método.

Aislamiento

- SPE: (Solid Phase Extraction): Para poder evitar la mayor cantidad de interrupciones en la matriz, como medio de purificación podemos utilizar cartuchos de SPE C1; eluyendo el extracto en el cartucho y luego pasando a través del mismo MeOH con pequeñas concentraciones de Acido acético.

Aislamiento

- Partiendo de una muestra vegetal: La utilización de Material Seco, podría hacer decrecer la presencia de Isoflavonas, de preferencia utilizar material fresco. Flavonoides altamente acilados suelen ser lábiles a temperaturas muy altas y frecuentemente son degradados durante el proceso de secado.

Aislamiento

- Si estamos buscando agliconas en el material vegetal, podemos realizar un lavado con solventes no polares como el caso de cloruro de Metileno, éter di etílico, acetato de etilo. (aunque se encuentra raramente bajo la forma de agliconas)
- Normalmente la extracción podemos realizarla bajo un equipo soxhlet a 60 C durante 2 horas y comprobar la presencia de Agliconas en dicho extracto.
- Luego podemos proceder a realizar una extracción con mezclas de MeOH: H₂O, la eficiencia de la extracción puede mejorar con sonificación del material vegetal

Aislamiento

- Los flavonoides en el material vegetal se encuentran siempre conjugados con o-glic o c-glic, raramente se encuentra bajo la forma de aglicona.
- Para casos practico de aislamiento sera necesario separar estos glucósidos del esqueleto de los flavonoides, para esto se propone una hidrolizar acida.

Aislamiento

Sistemas Cromatográficos para la extracción: existen varios sistemas para la extracción de las Isoflavonas mediante columnas Cromatográficas.

Fases estacionarias: Poliamida, Sephadex LH20, C18 RP

Fases Móviles: Migración y mixturas de compuestos Polares a Hidrófobicos

Solventes de desarrollo

- Hexano
- Tetracloruro de carbono
- Benceno
- Diclorometano
- Cloroformo
- Eter dietilico
- Acetato de etilo
- Acetona
- Isopropanol
- Etanol
- Metanol
- Agua

Serie eluotropa

El poder eluyente aumenta con la Polaridad del disolvente



Aumenta el poder eluyente

Polaridad creciente



Extracción de Flavonoides

Maceración lixiviación

Filtración

Separación por resina
AMBERLITE XAD2

Recuperar en MeOH

Rotaevaporar a 40C

Disolver en Agua

Aglicona

Someter a Hidrólisis acida a
60C

Glicosidos

Extraer en BuOH y
redisolver en MeOH



Caracterización

- Son moléculas difíciles de caracterizar, normalmente se determinan bajo el brillo en presencia de fluorescencia, de color azul intenso, que cambia a Marrón intenso en presencia de vapores de amoniacó.

<i>Visible colour</i>	<i>Colour in UV light</i>		<i>Indication</i>
	<i>alone</i>	<i>with ammonia</i>	
Orange Red Mauve	dull orange, red or mauve	blue	anthocyanidin 3-glycosides
Bright yellow	fluorescent yellow cerise or pink	blue	most anthocyanidin 3,5-diglycosides
	dark brown or black	dark brown or black	6-hydroxylated flavonols and flavones; some chalcone glycosides
Very pale yellow		dark red or bright orange	most chalcones
	bright yellow or yellow-green	bright orange or red	aurones
	dark brown	bright yellow or yellow brown	most flavonol glycosides
None		vivid yellow-green	most flavone glycosides
	dark mauve	dark brown	biflavonyls and unusually substituted flavones
	faint blue	faint brown	most isoflavones and flavanonols
	dark mauve	intense blue	5-desoxyisoflavones and 7,8-dihydroxyflavanones
		pale yellow or yellow-green	flavanones and flavanonol 7-glycosides

Características espectrales de las Isoflavonas

<i>Principal máxima (nm)</i>	<i>Subsidiary máxima (nm) (with relative intensities)</i>	<i>Indication</i>
475–560	ca. 275 (55%)	anthocyanins
390–430	240–270 (32%)	aurones
365–390	240–260 (30%)	chalcones
350–390	ca. 300 (40%)	flavonols
250–270		
330–350	absent	flavones and biflavonyls
250–270		
275–290	310–330 (30%)	flavanones and flavanonols
ca. 225		
255–265	310–330 (25%)	isoflavones

Espectroscopia UV

Table VI-1. *Band II in the UV spectra of isoflavones differing in their A-ring oxidation pattern*

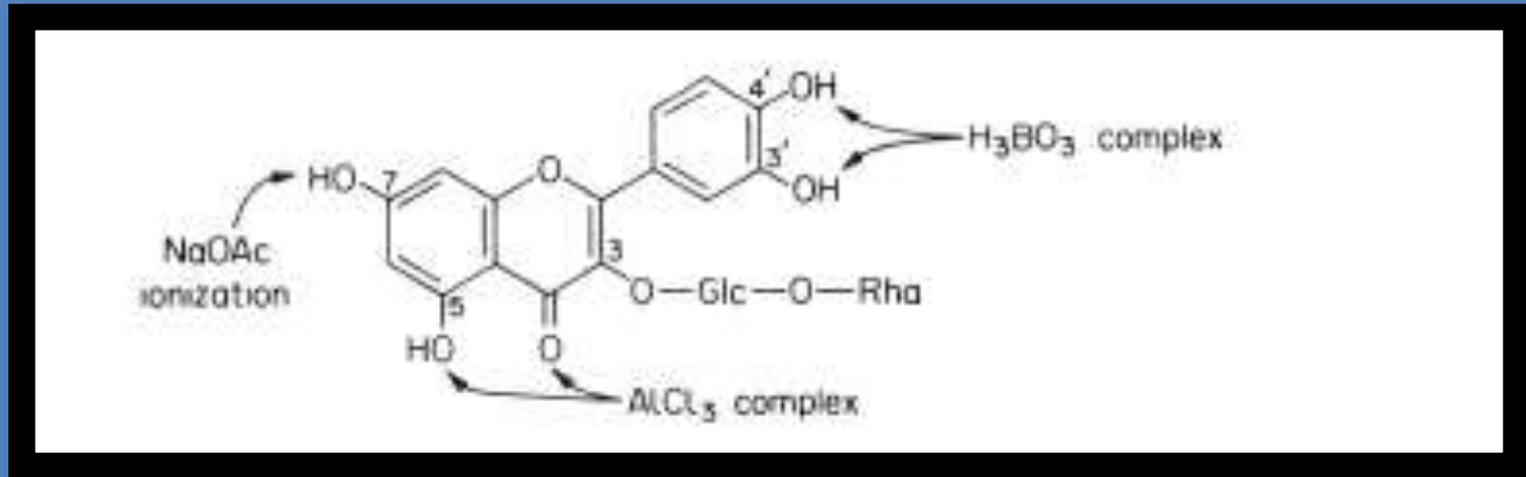
Spectrum No.	Isoflavone	Oxidation pattern		Band II (nm)
		A-ring	B-ring	
108	Daidzein	7	4'	249
113	Genistein	5,7	4'	261
129	6-Hydroxygenistein	5,6,7	4'	270

La banda II de absorción de las Isoflavonas normalmente ocurre en la región de 245-270 nm y generalmente no es afectada por el incremento de la Hidroxilación del anillo B, pero si es desplazada bato crómicamente por Hidroxilación del anillo A

Características de las espectroscópicas:

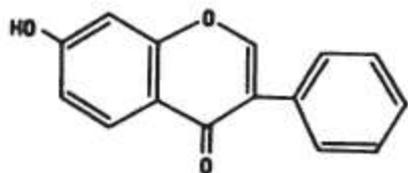
- Isoflavonas Polioxigenadas, que tengan la banda II de absorción, entre 265 y 270 generalmente son trioxigenadas en el anillo A.
- La metilación o Glicosilación de 7 o 4'-OH tiene un pequeño o muy pequeño efecto sobre el espectro UV, Mientras que una sustitución en el 5-OH causa un ligero desplazamiento Hipsocromico.

Espectroscopia uv



Reactivos de Desplazamiento

7-HYDROXYISOFLAVONE



CHROMATOGRAPHIC DATA

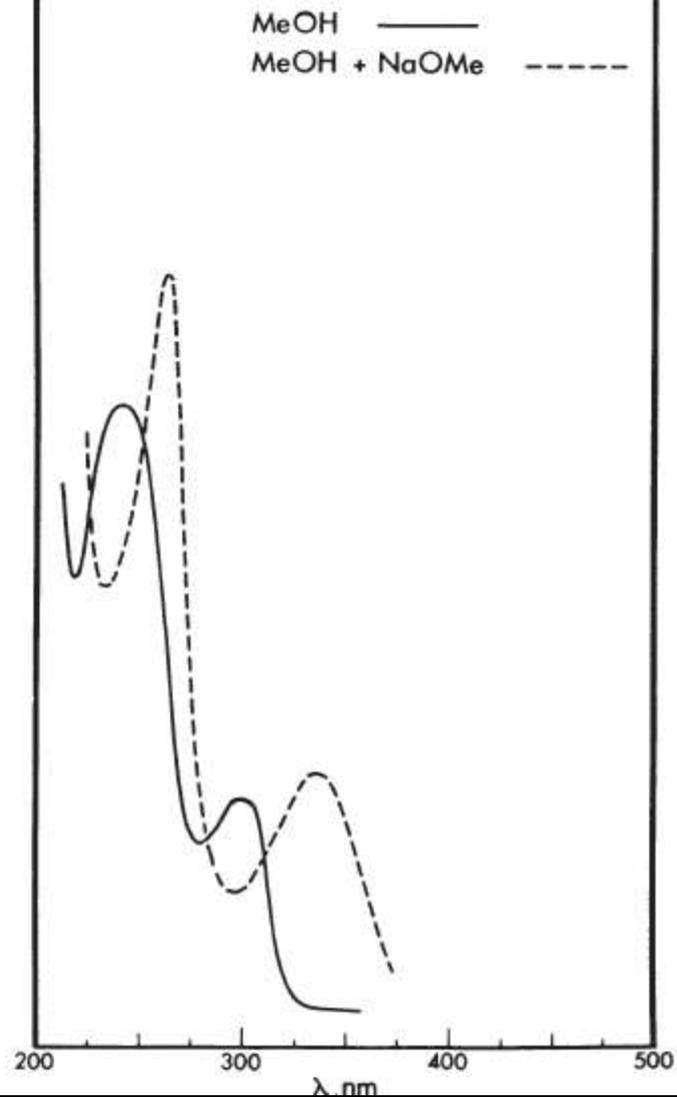
Spot Appearance: (UV) invisible
(UV/NH₃) fluorescent light blue

R_f Values: 0.90 (TBA), 0.38 (HOAc)

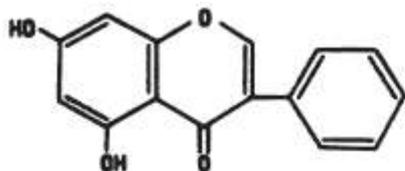
UV SPECTRAL DATA (λ_{max} , nm)

MeOH	242, 299, 305sh
NaOMe	264, 336
AlCl ₃	243, 299, 305sh
AlCl ₃ /HCl	243, 299, 305sh
NaOAc	263, 311sh, 336
NaOAc/H ₃ BO ₃	252sh, 301

(Proc. I)



5,7-DIHYDROXYISOFLAVONE



CHROMATOGRAPHIC DATA

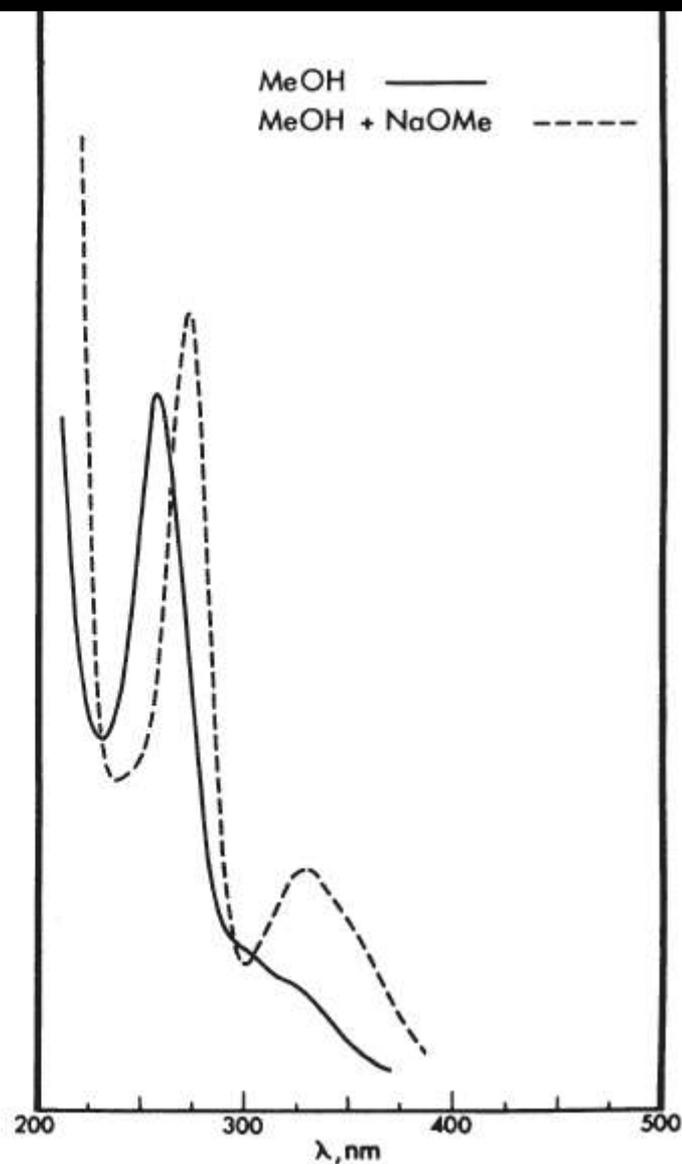
Spot Appearance: (UV) deep purple
(UV/NH₃) deep purple

R_f Values: 0.93 (TBA), 0.33 (HOAc)

UV SPECTRAL DATA (λ_{max}, nm)

MeOH	259, 303sh, 315sh
NaOMe	274, 329
AlCl ₃	272, 311, 367
AlCl ₃ /HCl	273, 313sh, 367
NaOAc	273, 327
NaOAc/H ₃ BO ₃	260, 317sh

(Proc. I)



Técnicas Espectrométricas

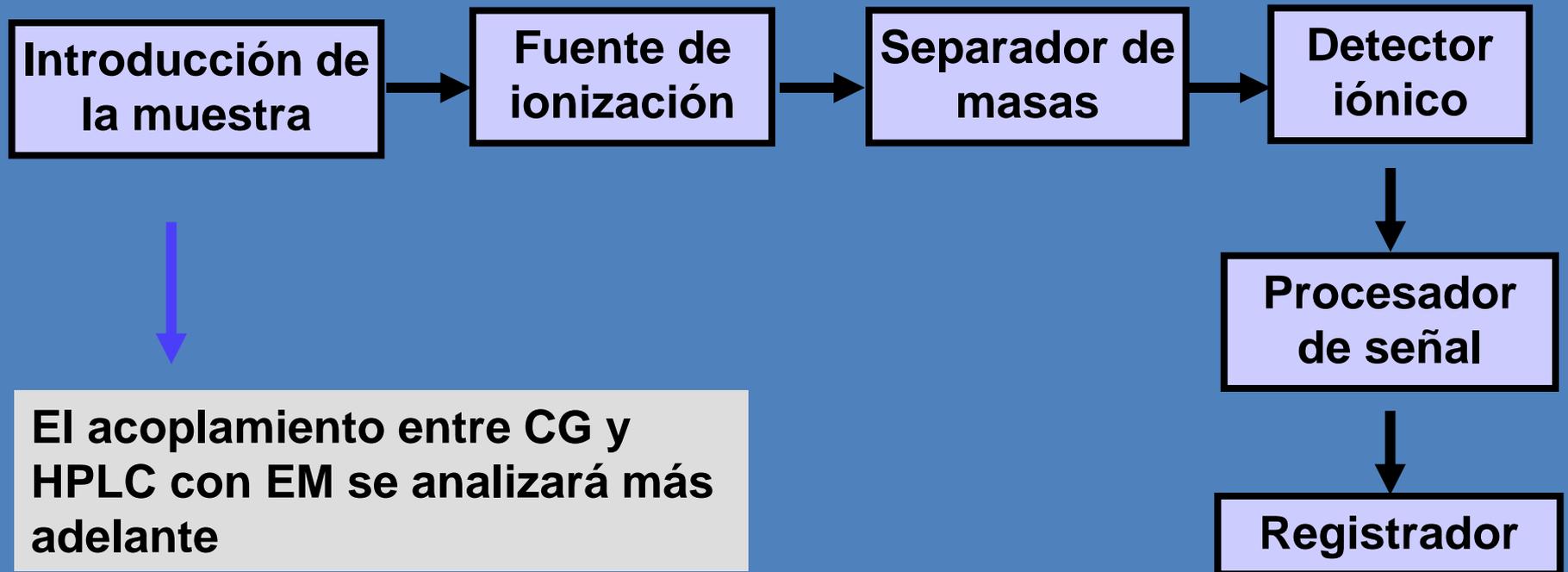
- Los tipos de análisis mas importantes para el trabajo con flavonoides, son los relacionados con la Espectrometría de MS, MS/MS y la RMN 1H y RMN 13C.
- El trabajo con IR no ayuda en gran manera, debido a la cantidad de señales iguales, que se solaparían.

Espectrometría de masas

Es una técnica instrumental sofisticada que separa y detecta iones en fase gaseosa. Se basa en ionizar moléculas gaseosas convirtiéndolas en iones (generalmente cationes), que se separan al ser acelerados por un analizador de masa: **la separación se basa en la distinta relación m/z de los iones.**

ESPECTRÓMETRO DE MASAS

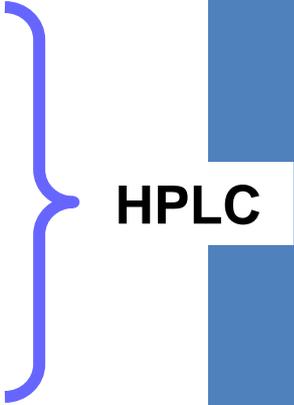
Componentes del instrumento



El acoplamiento entre CG y HPLC con EM se analizará más adelante

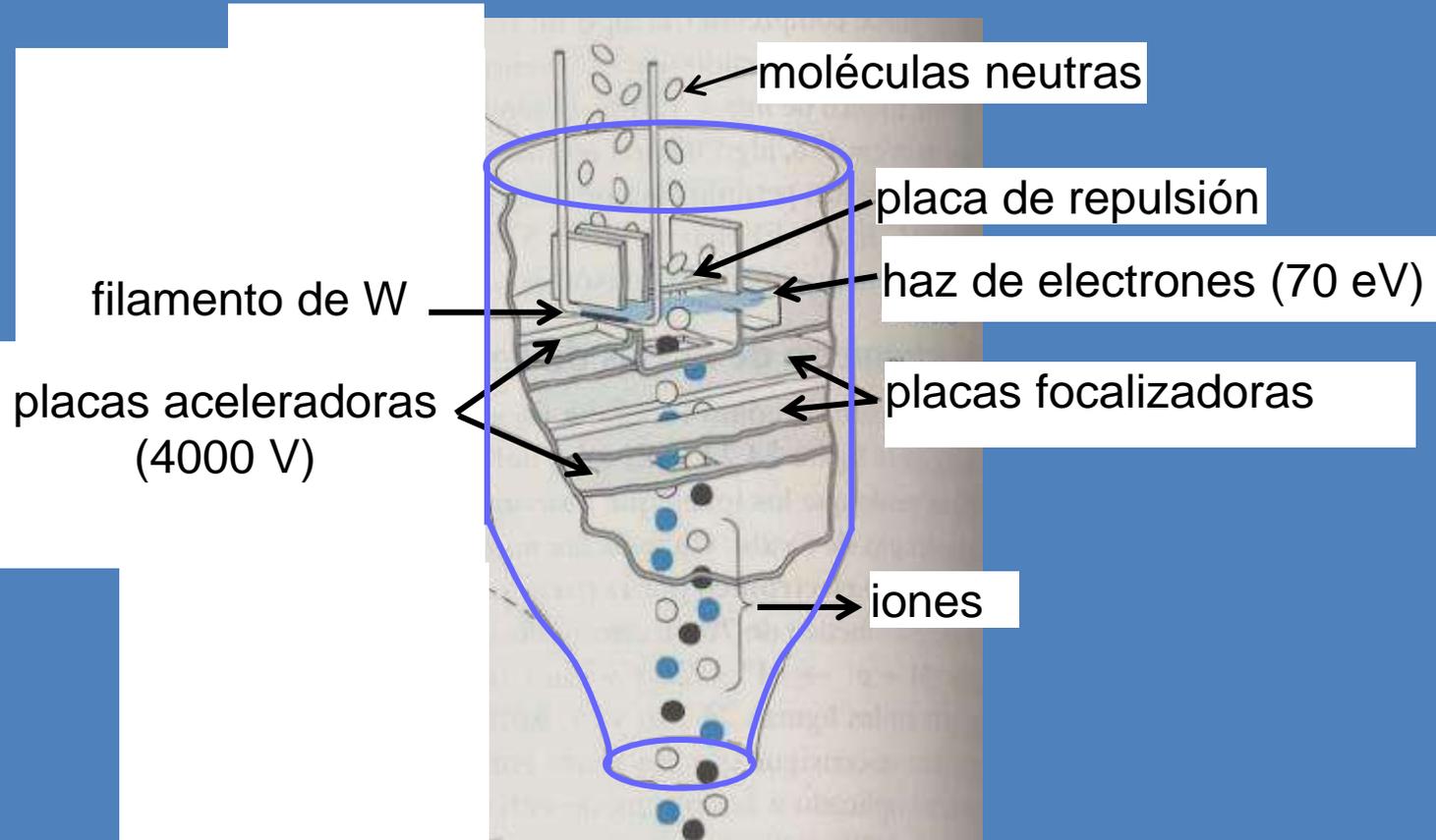
Fuentes de ionización

- ❖ **Ionización por impacto electrónico**
- ❖ **Ionización química**
- ❖ **Fuente de bombardeo con átomos rápidos**
- ❖ **Desorción con láser**
- ❖ **Ionización a presión atmosférica:**
 - Electronebulización asistida con un gas: electrospray
 - Ionización química a presión atmosférica
 - Fotoionización a presión atmosférica



HPLC

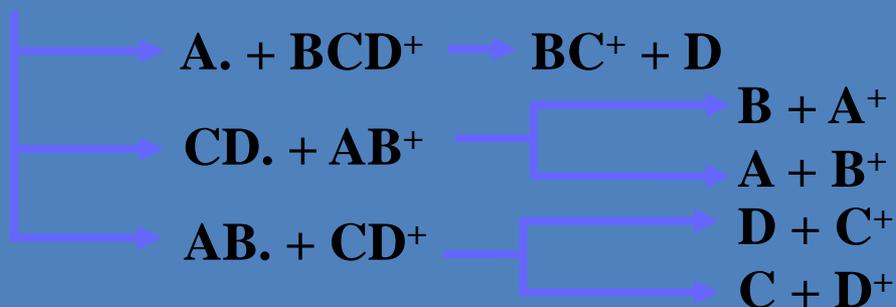
Ionización por impacto electrónico



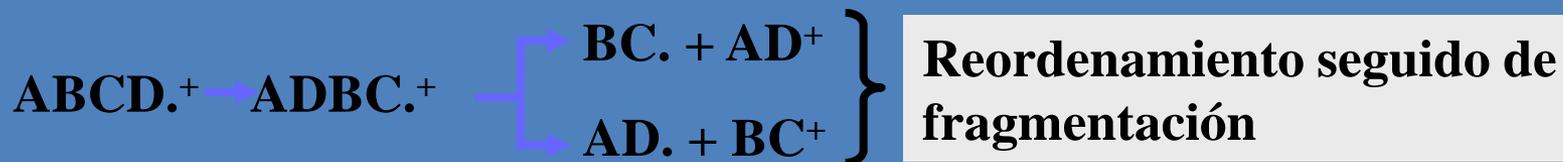
ion molecular

Fragmentación del ion molecular

Molécula hipotética ABCD (A, B, C y D = átomos)

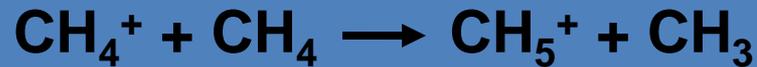


Fragmentación del ion molecular



Ionización química

Gas reactivo \longrightarrow metano, isobutano, amoníaco (cámara de ionización de “alta” presión a 10 torr)



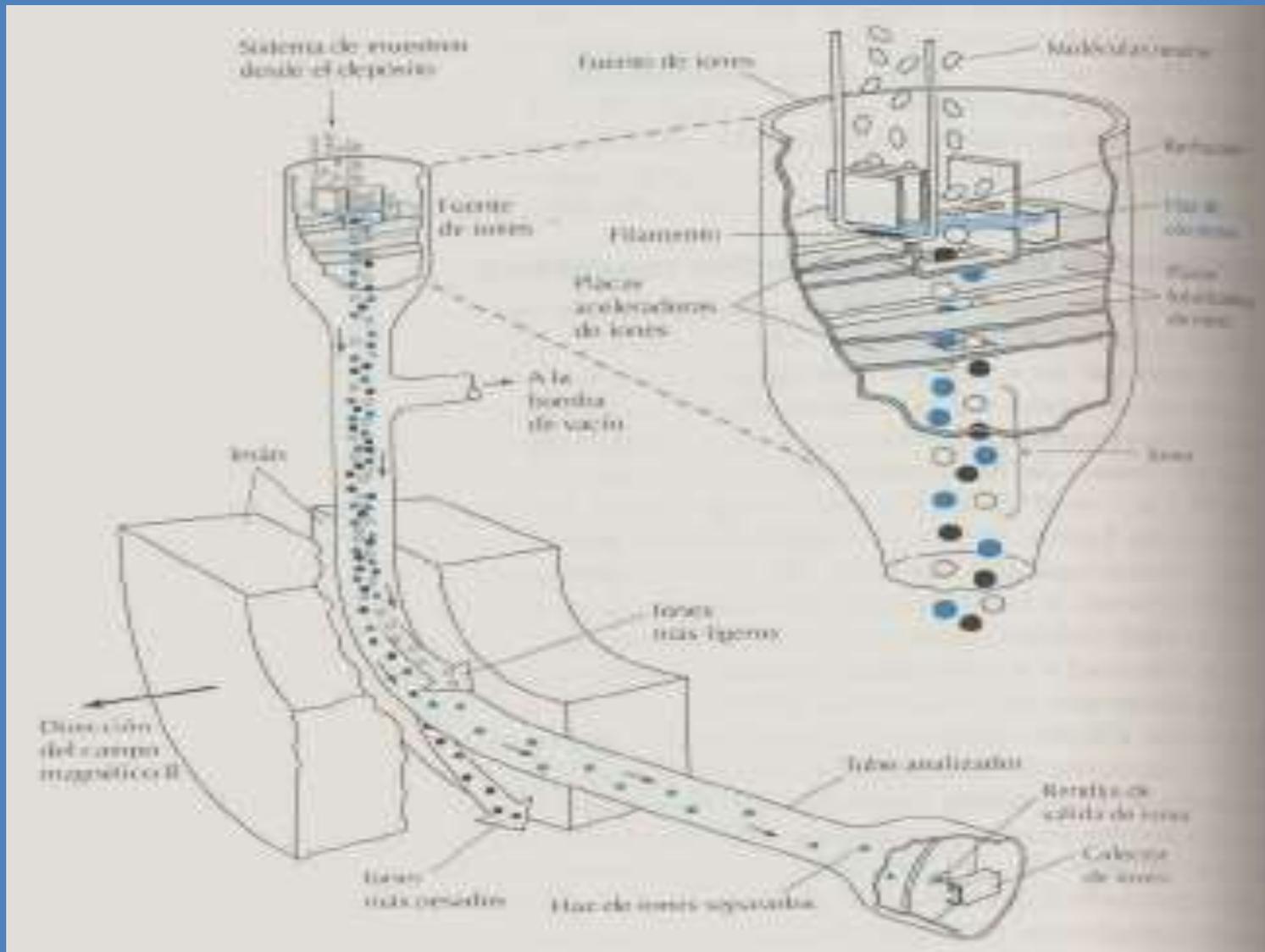
Transferencia protónica entre molécula reactiva y analito



Separador de masas

- ❖ **Espectrómetro de masas de sector magnético**
- ❖ **Espectrómetro de masas de cuadrupolo**
- ❖ **Espectrómetro de masas de tiempo de vuelo**
- ❖ **Espectrómetro de masas de trampa iónica**

Espectrómetro de masas de sector magnético



¿cómo se separan los iones de distinta masa?

$$E_{\text{cinética}} = \frac{1}{2} mv^2 = zV$$

$$\implies v = (2zV/m)^{1/2}$$

m : masa

v : velocidad de la partícula

m : masa

z : carga

V : diferencia de potencial

$$\left. \begin{array}{l} F_M = Bzv \\ F_C = mv^2/r \end{array} \right\} \begin{array}{l} mv^2/r = Bzv \\ v = Bzr/m \end{array}$$

F_M : fuerza centrípeta

F_C : fuerza centrífuga

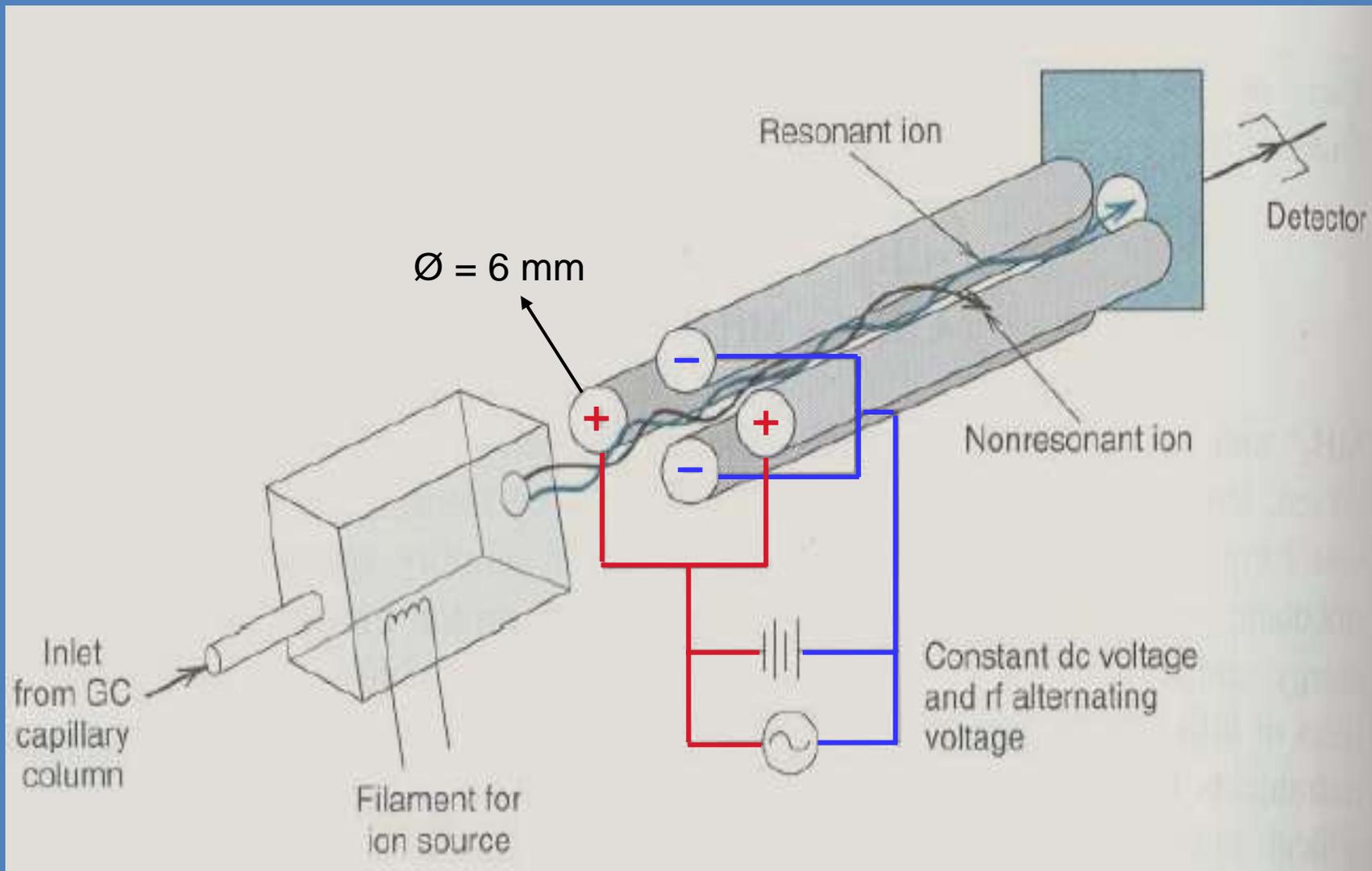
B : campo magnético

r : radio de curvatura

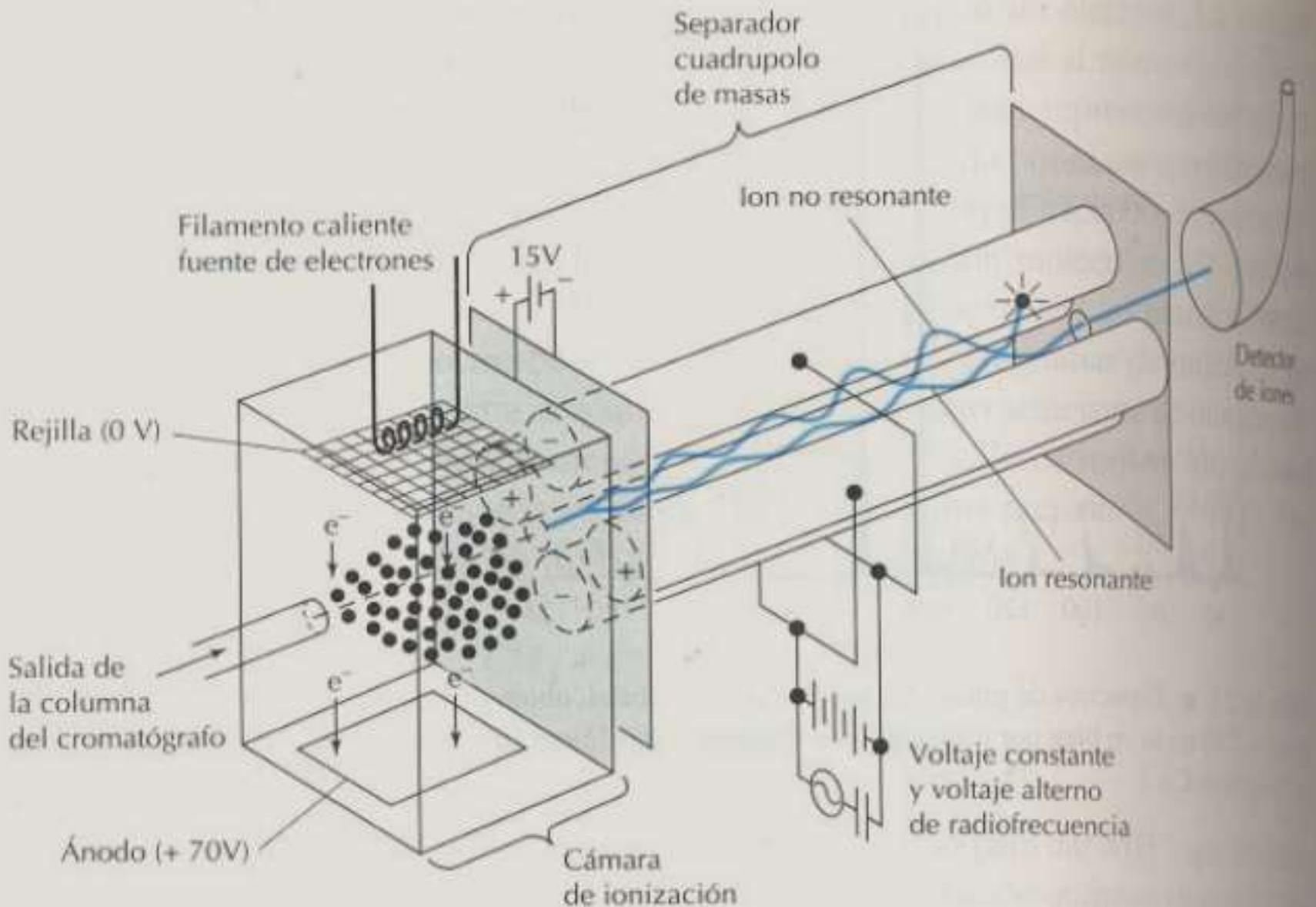
$$Bzr/m = (2zV/m)^{1/2}$$

$$m/z = B^2 r^2 / 2V$$

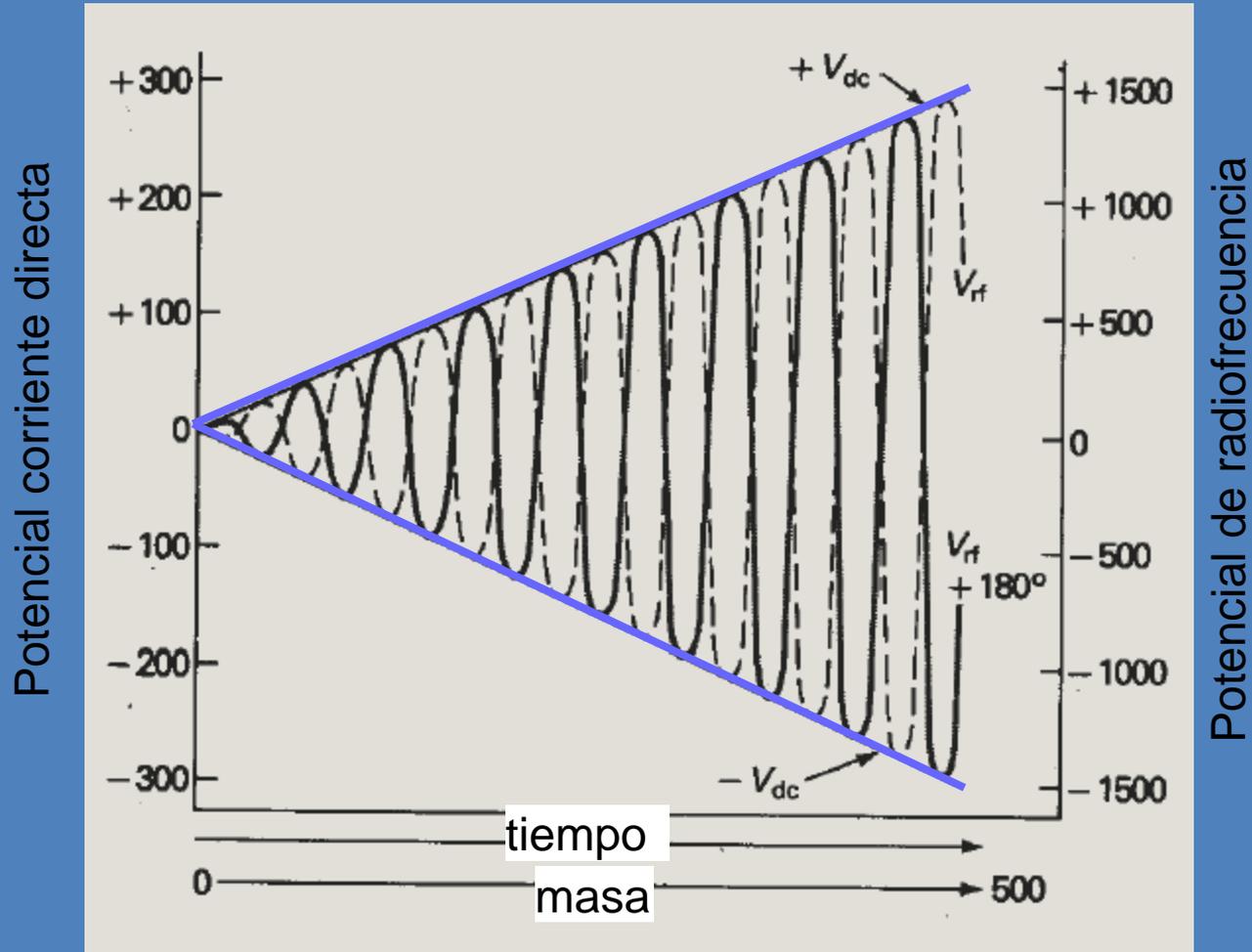
Espectrómetro de masas de cuadrupolo



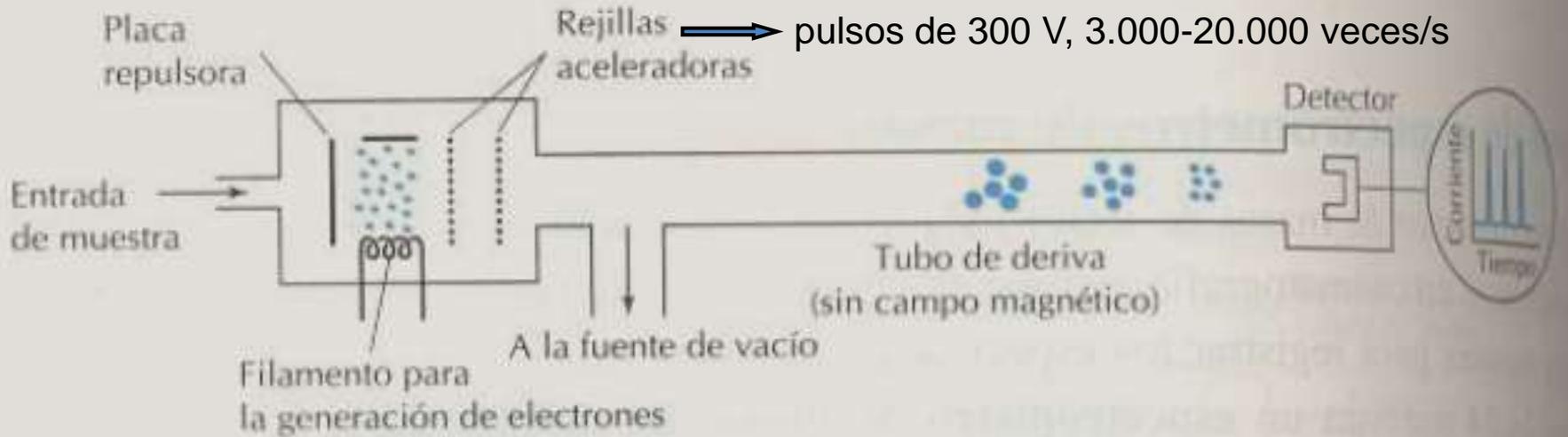
Espectrómetro de masas de cuadrupolo



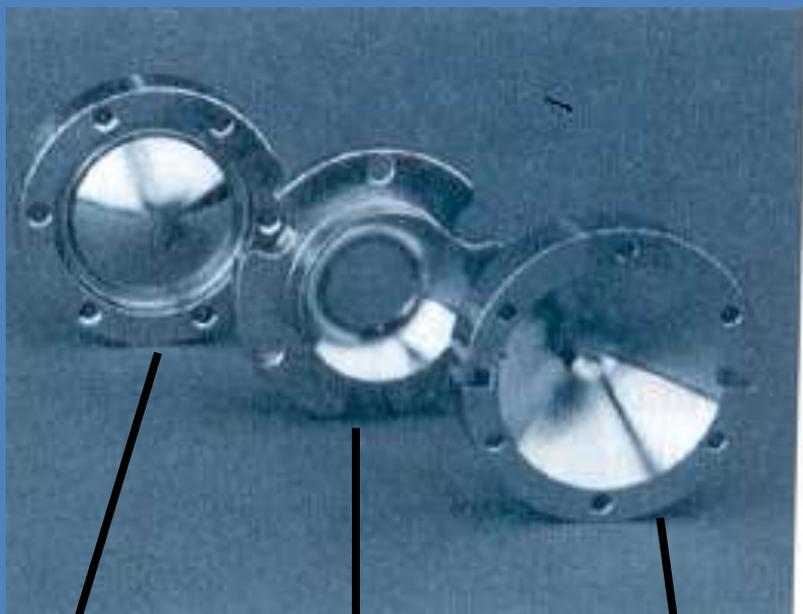
Relación de voltajes durante un barrido de masa con un analizador cuadrupolo



EM de tiempo de vuelo (TOF: time of flight)



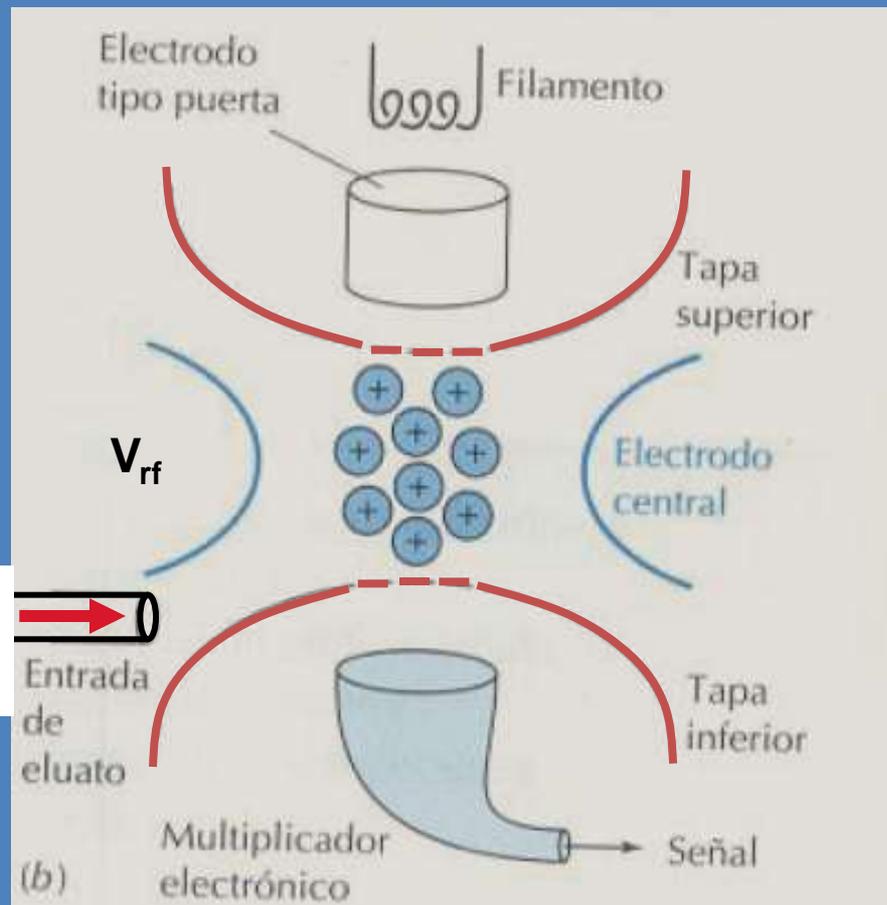
Espectrómetro de masas de trampa iónica



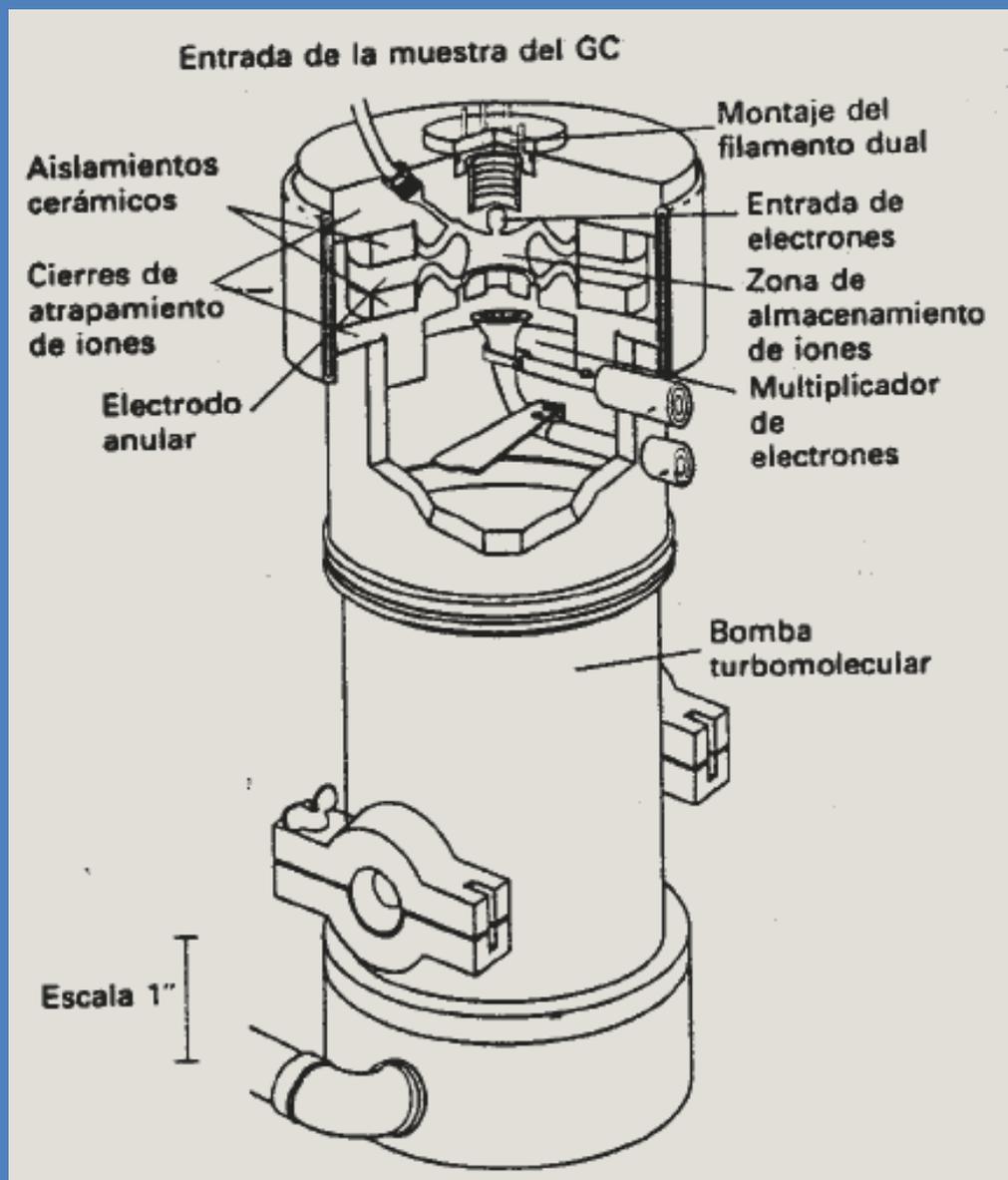
tapa

electrodo anular central

tapa



Esquema detector de trampa iónica (ITP)



Espectros de masas

Dependen de:

Energía de ionización de la molécula

Grupos funcionales de la molécula

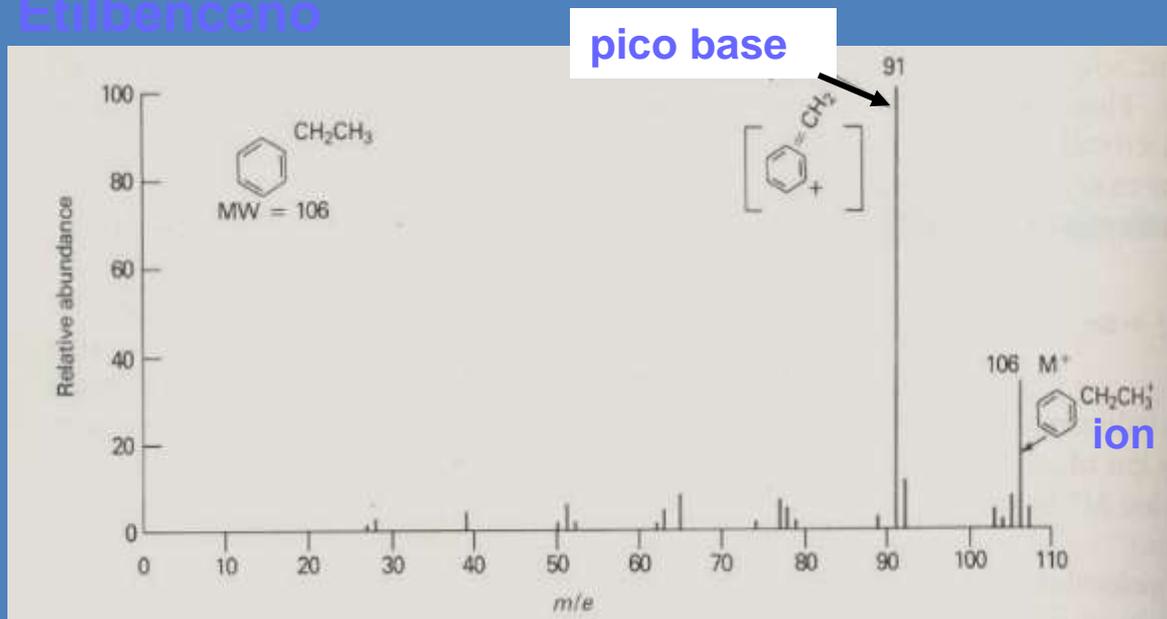
Método de ionización

Presión y temperatura de trabajo

Diseño instrumental

Espectros de masas obtenidos por impacto electrónico

Etilbenceno



En este ejemplo el pico base se forma por pérdida de CH₃

M⁺ → fragmento de mayor masa

- molécula con número par de N → **M⁺ con masa par**
- molécula con número impar de N → **M⁺ con masa impar**

Átomos y grupos frecuentemente desplazados

4 H → M-4	F → M-19
CH ₃ → M-15	HF → M-20
NH ₃ → M-17	C ₂ H ₂ → M-26
H ₂ O → M-18	