



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS  
QUÍMICAS

**Caracterización estructural de alcaloides de *Bocconia arborea* y sesquiterpenos de  
*Perezia* sp. Estructura de un nuevo cicloaducto derivado de la perezona.**

INFORME GENERAL DE ACTIVIDADES  
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS**

PRESENTA

QFB Fernando Rodríguez Ramos



**Ciencias  
Químicas**

Dr. E. Guillermo Delgado Lamas

2006

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por la beca otorgada (registro 201144).

Al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, lugar en donde se realizó este trabajo de investigación.

Al Dr. Guillermo Delgado Lamas, quien fungió como tutor.

## CONTENIDO

<b>RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>2</b>
<b>2. OBJETIVO GENERAL</b>	<b>5</b>
2.1 <i>Objetivo particular</i>	5
2.1.2 <i>Bocconia arborea</i>	5
2.1.3 <i>Perezia sp.</i>	5
<b>3. ESTUDIO QUÍMICO</b>	<b>6</b>
3.1 <i>Bocconia arborea</i>	6
3.1.1 Antecedentes	6
3.1.2 Parte experimental	6
3.1.3 Resultados y discusión	7
3.1.4 Conclusiones	8
3.2 <i>Perezia sp</i>	9
3.2.1 Antecedentes	9
3.2.2 Parte Experimental	10
3.2.3 Resultados y discusión	11
3.2.4 Conclusiones	21
<b>4. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS</b>	<b>22</b>

## RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue generar conocimiento sobre los metabolitos secundarios presentes en *Bocconia arborea* (Papaveraceae) y *Perezia* sp. (Compositae), especies vegetales usadas en la medicina tradicional de nuestro país.

Se llevó a cabo el estudio químico de los extractos metanólicos de las semillas, el tronco y las hojas de *Bocconia arborea* (conocida comúnmente como llora sangre). A partir de las semillas se aisló dihidroqueleritrina (**1**), 6-metoxidihidroquelerubina (**9**), 6,12-dimetoxidihidroqueleritrina (**10**), 6-metoxidihidroqueleritrina (**11**), 6-metoxidihidro-sanguinarina (**12**) y arnotianamida (**2**). Del tronco y de las hojas se aislaron y caracterizaron (**1**) y 6-acetonildihidroqueleritrina (**13**). La comparación de los perfiles cromatográficos de subfracciones permitió concluir que no existe diferencia significativa entre el contenido de metabolitos secundarios de los extractos metanólicos del tronco y de las hojas. La comparación de los resultados obtenidos con los estudios previos proporcionó evidencia de la constancia en el contenido químico de varias poblaciones de este vegetal.

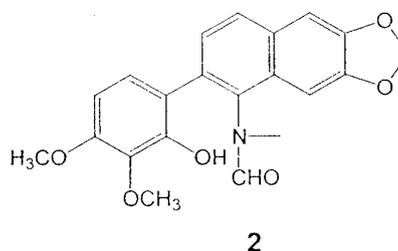
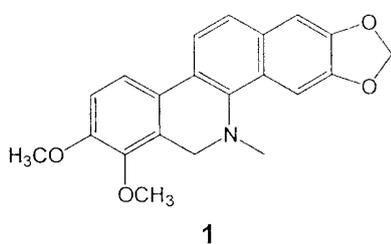
Con respecto al estudio químico de dos lotes (A y B) de raíz de pipitzahoac, como se conoce popularmente a *Perezia cuernavacana* y que se usa en la medicina tradicional, se logró el aislamiento, a partir de los extractos hexánicos, de los sesquiterpenos perezona (**6**),  $\alpha$ -pipitzol (**7**),  $\beta$ -pipitzol (**8**) en ambos lotes, y de una sustancia de estructura novedosa elucidada como el cicloaducto **14**, aislado del lote A. El aislamiento de los sesquiterpenos **6-8**, en los lotes A y B de raíz de pipitzahoac, permitió establecer que sus constituyentes químicos concuerdan con los informados previamente para *Perezia cuernavacana*, por lo que podemos concluir que esta es la identidad de la especie comercializada con fines terapéuticos. La estructura de **14** puede racionalizarse como derivada de la reacción de Diels-Alder entre metilciclopentadieno (**15**) y **6**. Con el fin de explorar las condiciones de obtención de **14**, se efectuó la reacción de cicloadición entre ciclopentadieno (**18**) y **6**. El resultado de la reacción fue la formación de los aductos **20** y **22** los cuales muestran una regio- y estereo- selectividad, además de que estructuralmente no son análogos al cicloaducto aislado **14**. Este resultado sugiere que el cicloaducto obtenido de la raíz de pipitzahoac es un producto natural.

## 1. INTRODUCCIÓN

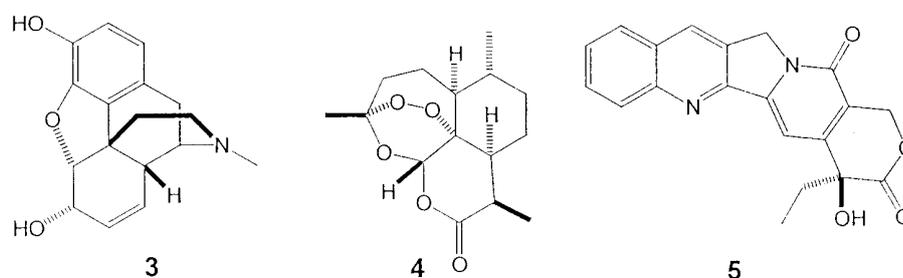
El análisis químico de las plantas ha dado como resultado el aislamiento de cientos de miles de sustancias químicas conocidas como metabolitos secundarios, los cuales constituyen una compleja red de moléculas orgánicas que permiten la comunicación entre los seres vivos, integran sus mecanismos de defensa, y son cruciales en la dinámica de los ecosistemas. Es pertinente mencionar que aún no se conoce el papel específico que desempeñan los metabolitos secundarios en la naturaleza, dada la complejidad y multiplicidad de sus funciones biológicas.

Actualmente, el estudio químico de las plantas es un área de investigación de gran dinamismo que permite determinar la estructura molecular, la reactividad química y la actividad biológica de los metabolitos secundarios. Adicionalmente, permite analizar sus implicaciones ecológicas, su significado taxonómico y su distribución en la naturaleza [1].

Así, recientemente se aislaron en nuestro laboratorio una serie de alcaloides benzofenantridínicos tales como la dihidroqueleritrina (**1**), a partir de la planta *Bocconia arborea* (Papaveraceae), lo cual sugería que existía una constancia en el tipo de metabolitos secundarios de este género [2]. Sin embargo, más recientemente se aisló arnotianamida (**2**), que tiene abierto el anillo B de benzofenantridina [3], proporcionando evidencia química de la cercanía taxonómica entre la familia Papaveraceae y Rutaceae, que es el grupo de plantas de donde anteriormente se había aislado **2** [4].



Por otro lado, se reconoce que el análisis de las especies vegetales empleadas tradicionalmente con fines medicinales, puede proporcionar metabolitos secundarios bioactivos de aplicación terapéutica. Como ejemplo es pertinente citar al analgésico morfina (**3**), aislado en 1806 a partir de la planta *Papaver somniferum*, y que fue desarrollado comercialmente por la empresa Merck en 1826 [5]. La artemisinina (**4**) es una sustancia antimalárica que se aisló de *Artemisia annua*, una planta de uso etnomédico para el mismo propósito [1]. El agente anticancerígeno camptotecina (**5**) fue aislado de la planta con uso medicinal tradicional *Camptotheca acuminata* [6].

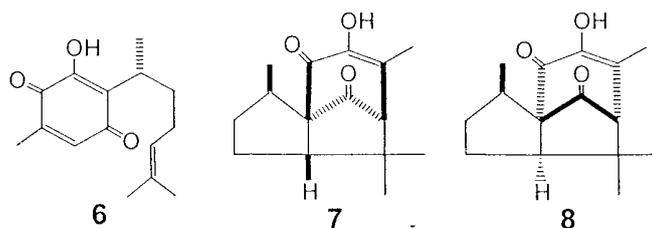


En México se comercializan numerosas plantas medicinales, pero es importante reconocer que no existe un control específico que determine la identidad y composición de las mismas. De ahí la importancia de definir los principios activos de las plantas de uso medicinal tradicional, y establecer los parámetros que definan la calidad y confiabilidad de las mismas.

Para ejemplificar lo anterior, podemos mencionar que uno de los primeros estudios químicos de plantas medicinales en nuestro país, se registra en 1857 con los trabajos del Dr. Leopoldo Río de la Loza, quien aisló perezona (**6**) de las raíces de *Perezia adnata* A. Gray, conocida como raíz de pipitzaohac [7]; esta planta es apreciada en la medicina tradicional por sus propiedades purgantes [8], y se comercializa con el mismo nombre común [9].

Estudios mas recientes informan la presencia de **6** y de  $\alpha$ - y  $\beta$ -pipitzoles (**7** y **8**), en especies de *Perezia* sp. [10-14] y *Acourtia* sp [15,16]; sin embargo, en cada una de ellas se han aislado otros sesquiterpenos estructuralmente novedosos relacionados con la perezona, que dan evidencia de la diferencia fitoquímica entre estos géneros y especies vegetales.

Una fuente importante de **6**, **7** y **8**, es *Perezia cuernavacana*, que a diferencia de las otras especies, se distingue por que estos sesquiterpenos son sus principales constituyentes químicos [10]; sin embargo, cuando se adquiere comercialmente pipitzahoac, no se conoce la identidad de la especie. Por lo anterior, es deseable llevar a cabo el estudio químico de muestras comerciales de pipitzahoac con el fin de establecer las variaciones en su contenido metabólico, en particular, de sus principios activos.



El conocer los constituyentes químicos de esta planta que tiene interés comercial, permitirá desarrollar métodos analíticos que cuantifiquen a los constituyentes químicos presentes en la raíz pipitzahoac, ponderar la identidad de la especie vegetal que se esta comercializando como *Perezia cuernavacana* y así proponer alternativas que permitan su conservación y eventualmente su cultivo como materia prima para la elaboración de fitomedicamentos.

## 2. OBJETIVO GENERAL

Generar conocimiento sobre los metabolitos secundarios presentes en *Bocconia arborea* y *Perezia* sp. (pipitzahoac), vegetales usados tradicionalmente con fines medicinales.

### 2.1 Objetivo particular

#### 2.1.2 *Bocconia arborea*

Realizar la extracción, el aislamiento y la caracterización de los metabolitos secundarios presentes en los extractos de las semillas, tronco y hojas de *Bocconia arborea*.

Tomando como base que en un estudio anterior se logró el aislamiento de arnotianamida (2) en el extracto metanólico de semillas de *Bocconia arborea* (Papaveraceae) [3] y no en una planta de la familia Rutacea [4], es necesario ponderar la presencia de este alcaloide en un nuevo lote de semillas, con el fin de comprobar la constancia en el contenido químico de esta parte del vegetal.

#### 2.1.3 *Perezia* sp.

Realizar el aislamiento y caracterización de los metabolitos secundarios presentes en el extracto hexánico de *Perezia* sp.

De acuerdo a los antecedentes del uso medicinal y comercialización de raíz de pipitzahoac, es necesario llevar cabo el análisis químico de las muestras vegetales conocidas como pipitzahoac, con el fin de establecer si contienen los metabolitos secundarios que contiene *Perezia cuemavacana*.

### 3. ESTUDIO QUÍMICO

A continuación se describen los resultados referentes al estudio químico de las dos especies vegetales. Estos se describen separadamente iniciando con *Bocconia arborea* y posteriormente con *Perezia* sp.

#### 3.1 *Bocconia arborea*

##### 3.1.1 Antecedentes

*Bocconia arborea* S. Watson, es una planta conocida como "llora sangre" en la región de Morelos [17]; actualmente se utiliza para el tratamiento de diversas afecciones digestivas [18], cutáneas y cancerosas [8,17,19]. Estudios anteriores han revelado la presencia de alcaloides benzofenantridínicos en el tronco, raíces [20], hojas [21,22] y semillas [3]. Estos alcaloides han mostrado actividad antimicrobiana [22], antioxidante [3,23] y citotóxica [19].

##### 3.1.2 Parte experimental

Se seleccionaron semillas (488 g), hojas (1.5 Kg) y tronco (5.7 Kg). El material vegetal se secó a temperatura ambiente, a la sombra, y posteriormente se molió. La obtención de los extractos se realizó por maceración, primeramente, con hexano durante 48 h, en dos ocasiones. Posteriormente, el residuo vegetal se extrajo con metanol. Los disolventes fueron eliminados a presión reducida obteniéndose los extractos metanólicos de semillas (103.6 g), tronco (160.6 g) y hojas (80.4 g).

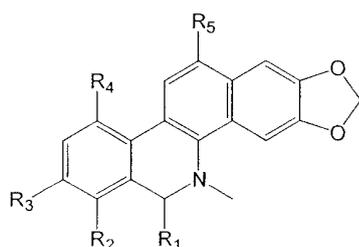
Cada uno de los extractos orgánicos fueron adsorbidos en la misma cantidad de gel de sílice 70-230 (1:1) y se aplicaron a una columna cromatográfica, empacada con SiO<sub>2</sub> para capa fina en proporción 5:1. La fase móvil inicial fue hexano al 100 % con aumento del gradiente de polaridad con CHCl<sub>3</sub>, hasta eluir con este último al 100 %. Posteriormente, se aumentó el gradiente de polaridad con MeOH hasta CHCl<sub>3</sub>/MeOH (9:1) de la mezcla eluyente (la cromatografía se llevó a cabo a presión reducida) [24]. Se colectaron eluatos

de 250 mL, los cuales se reunieron de acuerdo a su similitud cromatográfica, obteniéndose fracciones donde cada una de estas fueron resueltas a mezclas menos complejas por medio de cromatografía en columna. Posteriormente, algunos residuos sólidos fueron purificados mediante cristalizaciones disolviendo en  $\text{CHCl}_3$  y adicionando MeOH, lo cual permitió purificaciones eficientes. En otras ocasiones la purificación mediante cromatografía preparativa en placa, utilizando ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ , 90:10) resultó conveniente.

### 3.1.3 Resultados y discusión

A partir de las semillas se logró el aislamiento de dihidroqueleritrina (**1**, 0.0092 %), 6-metoxidihidroquelirubina (**9**, 0.0119 %), 6,12-dimetoxidihidroqueleritrina (**10**, 0.0502 %), 6-metoxidihidroqueleritrina (**11**, 0.0092 %), 6-metoxidihidrosanguinarina (**12**, 0.0067 %) y arnotianamida (**2**, 0.0041 %). Del tronco se aisló (**1**, 0.0023 %) y 6-acetonildihidroqueleritrina (**13**, 0.0003 %). De las hojas se obtuvo **1** (0.0028 %) y **13** (0.0008 %).

La caracterización de **1**, **2** y de **9-13** se efectuó mediante a la comparación de sus propiedades físicas y espectroscópicas con muestras auténticas aisladas en nuestro laboratorio [3,21,22].



- 9**  $R_1 R_4 = \text{OCH}_3$   $R_2 + R_3 = \text{OCH}_2\text{O}$ ,  $R_5 = \text{H}$   
**10**  $R_1 R_2 R_3 R_5 = \text{OCH}_3$ ,  $R_4 = \text{H}$   
**11**  $R_1 R_2 R_3 = \text{OCH}_3$ ,  $R_4 R_5 = \text{H}$   
**12**  $R_1 = \text{OCH}_3$ ,  $R_2 + R_3 = \text{OCH}_2\text{O}$ ,  $R_4 R_5 = \text{H}$   
**13**  $R_1 = \text{CH}_2\text{COCH}_3$ ,  $R_2 R_3 = \text{OCH}_3$ ,  $R_4 R_5 = \text{H}$

### 3.1.4 Conclusiones

En esta parte del trabajo de investigación se logró el reislamiento de los alcaloides mayoritarios presentes en *Bocconia arborea*, los cuales han sido descritos anteriormente por nuestro grupo de trabajo [3,21,22]. El reislamiento de **2** proporciona evidencia de la constancia de su presencia en *Bocconia arborea*, y constituye una evidencia química de la cercanía taxonómica entre Papaveracea y Rutaceae ya que **2** solo se había aislado de esta última familia.

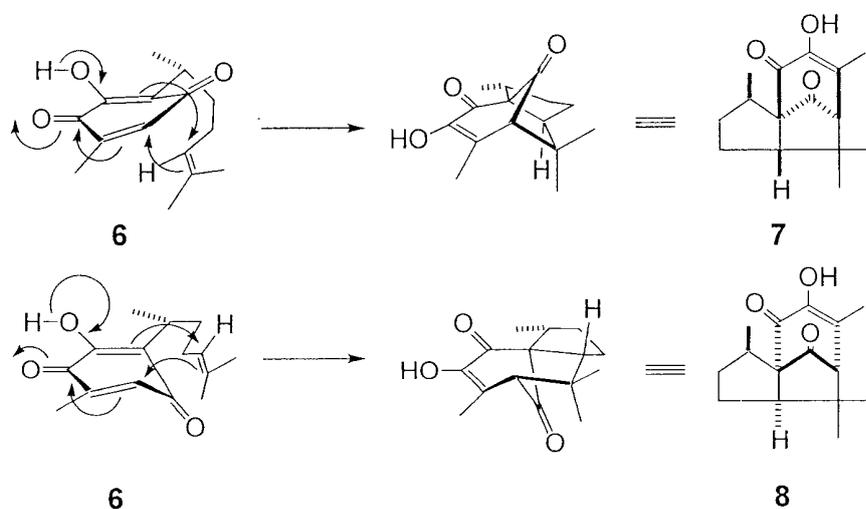
Mediante la comparación directa de los alcaloides aislados **1** y **13** y cromatografía en capa fina de subfracciones del tronco y las hojas, se llegó a la conclusión de que no existe diferencia significativa entre el contenido químico del tronco y las hojas siendo en las hojas en donde se pueden encontrar estos metabolitos en mayores cantidades.

El reislamiento de los alcaloides **1**, **2**, y **9-12**, mayoritarios en diferentes poblaciones de semillas, proporciona evidencia de la constancia en su contenido químico [3].

### 3.2 *Perezia* sp

#### 3.2.1 Antecedentes

*Perezia* es un género de la familia Compositae que comprende mas de 30 especies distribuidas desde la región de los andes en Sudamérica hasta el norte de América [16]. La información etnomédica disponible de piptzahoac (que es el nombre común con que se conoce a *Perezia adnata* aff. *cuernavacana*) [9] indica que el principal uso tradicional de la raíz es como purgante [8]. Varios productos naturales sesquiterpénicos han sido aislados del género *Perezia*, entre los que destaca la perezona (**6**) presente en las raíces de *P. cuernavacana*, cuya estructura fue determinada por Walls hace algunas décadas [10]. Cabe señalar que a partir de esta sustancia se han generado numerosas investigaciones sobre la reactividad química de sus principales derivados,  $\alpha$ - y  $\beta$ - pipitzoles (**7** y **8** respectivamente), que son sesquiterpenos isoméricos derivados de la cicloadición [ $\pi 4s + \sigma 2s$ ] intramolecular de **6**, la cual procede mediante catálisis ácida [25,26] (Esquema 1).



Esquema 1. Reacción intramolecular [ $\pi 4s + \sigma 2s$ ] de **6** para formar **7** y **8**

### 3.2.2 Parte Experimental

Se adquirieron dos lotes de raíz de pipitzahoac (A y B) en uno de los locales comerciales de plantas medicinales del pasaje catedral, de la Ciudad de México, obteniéndose los extractos hexánicos para posteriormente ser tratados por los métodos convencionales de cromatografía y recristalización como se indica a continuación. Una parte de estas muestras adquiridas están resguardadas en el laboratorio I-C del Instituto de Química para su autenticación botánica.

A partir de 3.7 Kg (lote A, adquirido en noviembre de 2004) y 1 Kg (lote B adquirido en febrero de 2006) de raíz de pipitzahoac (seco y molido), se obtuvieron los extractos hexánicos por maceración.

El extracto del lote A se concentró a sequedad dejando un residuo aceitoso (36 g) que contenía materia sólida. Este material se disolvió en AcOEt y posteriormente se indujo la precipitación agregando hexano, el sólido se filtró y se lavó con hexano frío obteniéndose aproximadamente 5 g de un residuo cristalino mezclado con un aceite anaranjado. Estos cristales fueron purificados mediante cromatografía en columna empacada con SiO<sub>2</sub> malla 230-400 (5 cm diámetro x 25 cm de altura) eluida con mezcla (hexano/AcOEt (95:5)). Se reunieron las fracciones pertinentes de acuerdo a su similitud en contenido químico de acuerdo al análisis por cromatografía en capa fina. Las fracciones menos polares fueron purificadas mediante cromatografía relámpago (5 cm diámetro x 45 cm de altura) empacada con sílica gel (malla 230-400), eluida con una mezcla de disolventes (hexano/AcOEt (97:3)).

El Lote B se concentró a sequedad obteniéndose un residuo cristalino anaranjado el cual se disolvió en AcOEt posteriormente se indujo la precipitación agregando hexano, el residuo cristalino 7.5 g, se recristalizó de hexano/AcOEt. Las aguas madres se concentraron a sequedad obteniéndose un residuo aceitoso con materia sólida el cual se trató de la misma forma que el lote A.

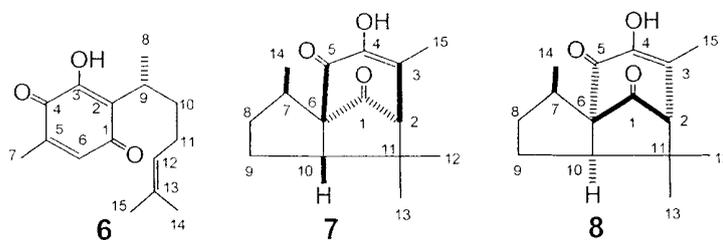
### 3.2.3 Resultados y discusión

Lote A. Se logró el aislamiento de **6** (0.001 %), cristales anaranjados, pf. 104-105 °C, Rf 0.5 (hexano/CHCl<sub>2</sub> (97:3)). **7** (0.0729 %), cristales incoloros, pf. 135 °C, Rf 0.4 (hexano/AcOEt (97:3)); EM (IE, *m/z*) 248, C<sub>15</sub>H<sub>20</sub>O<sub>3</sub>; IR (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)  $\nu_{\max}$  3444, 1754, 1675 y 1640 cm<sup>-1</sup>; [ $\alpha$ ]<sub>D</sub> +178 (c 0.185, CHCl<sub>3</sub>); UV (CHCl<sub>3</sub>)  $\lambda_{\max}$  244, 280 ( $\epsilon$  7943) nm; DC (c 0.0023, CHCl<sub>3</sub>) [ $\theta$ ]<sub>240</sub> -21.58, [ $\theta$ ]<sub>310</sub> +26.78. **8** (0.0056 %) cristales incoloros, pf. 105 °C, Rf 0.34 (hexano/AcOEt (97:3)); EM (IE, *m/z*) 248, C<sub>15</sub>H<sub>20</sub>O<sub>3</sub>; IR (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)  $\nu_{\max}$  3444, 1754, 1675 y 1641 cm<sup>-1</sup>; [ $\alpha$ ]<sub>D</sub> -67 (c 0.165, CHCl<sub>3</sub>), UV (CHCl<sub>3</sub>)  $\lambda_{\max}$  247, 281 ( $\epsilon$  7943) nm; DC (c 0.0023, CHCl<sub>3</sub>) [ $\theta$ ]<sub>242</sub> +11.58, [ $\theta$ ]<sub>280</sub> -9.09, [ $\theta$ ]<sub>296</sub> +0.88, [ $\theta$ ]<sub>316</sub> -17.26. Así como una sustancia caracterizada como un cicloaducto (**14**, 0.0051 %) del cual no existen informes acerca de su aislamiento y caracterización en ninguna especie vegetal. Lote B, se logró el aislamiento de **6** (0.79 %), **7** (0.004 %), **8** (0.003 %).

La elucidación estructural de **6-8**, se llevó a cabo mediante el análisis de los espectros de RMN <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C en una y dos dimensiones. Las asignaciones RMN <sup>1</sup>H de **7** y **8** corresponden con las informadas por Bohlmann [16], y las asignaciones de los datos de RMN <sup>13</sup>C de los pipitzoles corresponden con las informadas por Joseph-Nathan [27]. La RMN <sup>1</sup>H de **6** corresponde con la informada por Walls [10]. Los datos espectroscópicos de **6-8** se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Datos de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) y  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ );  $\delta$  (ppm).

Asignación	6		7		8	
	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$
C1	-	187.3	-	203.9	-	203.7
C2	-	124.6	2.83 s	69.0	2.75 s	68.8
C3	-	150.9	-	127.3		129.2
C4	-	184.3	-	144.6		144.6
C5	-	140.5	-	194.0	-	193.7
C6	6.48 c	135.8	-	75.0		76.1
C7	2.06 d	14.6	2.40 m	34.8	2.56 m	35.0
C8	1.20 d	18.2	1.65 m; 1.90 m	38.2	1.38 m; 1.86 m	35.2
C9	3.05 ddd	29.3	1.50 m; 1.76 m	26.0	1.77 m; 1.60 m	24.6
C10	1.78 m; 1.57 m	34.1	2.11 t	57.5	1.99 dd	55.4
C11	1.87 m; 1.61 m	26.6	-	37.3	-	37.4
C12	5.08 tt	124.4	1.02 s	26.4	1.05 s	26.5
C13	-	131.4	1.07 s	25.5	1.07 s	24.1
C14	1.64 s	25.6	1.38 d	14.8	1.33 d	13.4
C15	1.53 s	17.5	2.05 s	17.8	2.06 s	17.9
OH	6.96	-	6.09	-	6.01	-



De las fracciones menos polares del extracto hexánico de la raíz de pipitzaohac se obtuvo **14** (189 mg) como sólido cristalino en forma de agujas, pf. 114-115°C, el cual al revelar su cromatoplaquea con sulfato cérico amoniacal presenta una coloración café oscura similar a la que presenta con la lámpara UV<sub>254</sub>, no se observa a UV<sub>365</sub>; su Rf es de 0.41 en mezcla de disolventes (hexano/AcOEt (97:3)); su fórmula molecular C<sub>21</sub>H<sub>28</sub>O<sub>3</sub> fue confirmada con base en el ion molecular [M<sup>+</sup>] en m/z: 328 observado en EM (IE). El índice de deficiencia de hidrógeno indica que la molécula tiene 8 grados de insaturación producto de tres enlaces  $\pi$ , dos grupos carbonilo y tres ciclos. Los datos de RMN <sup>13</sup>C y la información derivada de la modalidad DEPT sugieren que esta estructura posee el esqueleto básico de la perezona (**6**). La absorción en 3439 cm<sup>-1</sup> en IR indica la presencia del hidroxilo, la señal en 1753 cm<sup>-1</sup> se asigna al carbonilo de la ciclopentanona y en 1675 cm<sup>-1</sup> y 1635 cm<sup>-1</sup> se observa la banda característica del enol  $\alpha$  a la cetona de un anillo de seis miembros similar a los pipitzoles. Otros datos obtenidos son:  $[\alpha]_D -73.33$  (c 0.06, CHCl<sub>3</sub>); el espectro de UV (CHCl<sub>3</sub>) muestra un máximo en  $\lambda_{max}$  283 ( $\epsilon$  5011) nm; y los datos de dicroísmo circular (c 0.0044, CHCl<sub>3</sub>)  $[\theta]_{280} -73.89$ ,  $[\theta]_{312} +22.25$ .

En el espectro de RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) se observa una señal doble en  $\delta$  1.24 ppm (3H) que corresponde al metilo secundario C7' de la cadena característica de la perezona (**6**); en  $\delta$  5.16 se observa una señal múltiple para el hidrógeno vinílico de la cadena C4'; en  $\delta$  1.62 y  $\delta$  1.67 resuenan dos señales simples de los metilos (C6' y C8') unidos al carbono (C5') de doble enlace al final de la cadena; en  $\delta$  1.40 y  $\delta$  1.58 se manifiestan los hidrógenos geminales del metileno C2', vecino al C1' cuyo metino resuena en  $\delta$  1.90 y que está unido al metilo secundario C7'.

En la modalidad COSY del espectro de RMN  $^1\text{H}$ , se pueden observar las correlaciones entre los hidrógenos de la cadena y del tricyclo (Figura 1); La figura 2 muestra algunas correlaciones selectas a dos y tres enlaces de distancia, observadas en la modalidad HMBC de los espectros de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ .

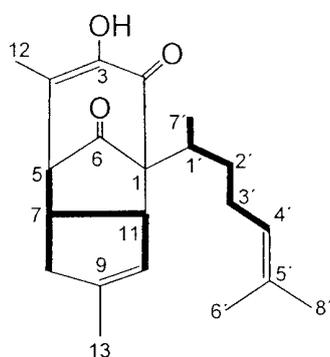


Figura 1.  $^1\text{H} - ^1\text{H}$  COSY

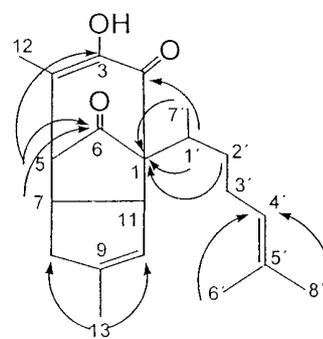


Figura 2. Correlaciones HMBC

Asimismo, se pudo constatar el sitio de unión de la cadena al tricyclo por el experimento HMBC (Figura 2) ya que los hidrógenos de los carbonos  $\text{C}7'$ ,  $\text{C}1'$  y  $\text{C}2'$  correlacionan con el carbono cuaternario  $\text{C}1$  que a su vez correlaciona con los hidrógenos en  $\text{C}7$ ,  $\text{C}11$  y  $\text{C}5$ ; el carbonilo  $\text{C}6$  correlaciona con el hidrógeno en  $\text{C}5$ ,  $\text{C}11$  y  $\text{C}7$ , pero el carbonilo  $\text{C}2$  solo se correlaciona con  $\text{C}11$  lo que hace suponer que el arreglo estructural de los carbonilos, el grupo hidroxilo y el metilo  $\text{C}12$  tienen un arreglo similar al del pipitzol, con la diferencia de que esta estructura posee un ciclo conectado en los carbonos  $\text{C}7$  y  $\text{C}11$ , y no en  $\text{C}1$  y  $\text{C}11$ , ya que  $\text{C}1$  está ocupado por la cadena. Lo que confirma la conexión en  $\text{C}7$  y  $\text{C}11$ , de un ciclo de cinco miembros cuyos hidrógenos correlacionan en el espectro COSY (Figura 1). La estructura se confirmó por difracción de rayos X (Figura 3). La asignación de RMN de **14** se muestra en la tabla 2.

Tabla 2. RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) y  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm) de **14**

Asignación	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	Asignación	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$
1	-	71.2	12	2.05 s	18.2
2	-	193.7	13	1.62 s	16.2
3	-	147.5	1'	1.90 m	33.8
4	-	127.2	2'	1.4 m; 1.58 m	33.1
5	3.17 d	57.2	3'	2.04 m; 2.14 m	26.7
6	-	202.9	4'	5.16 m	124.6
7	3.07 m	3.2	5'	-	131.3
8	1.99 m; 2.45 m	38.8	6'	1.62 s	17.6
9	-	145.3	7'	1.24 d	15.2
10	5.08 t	123.3	8'	1.67 s	25.6
11	3.41 m	52.9	OH	6.03	-

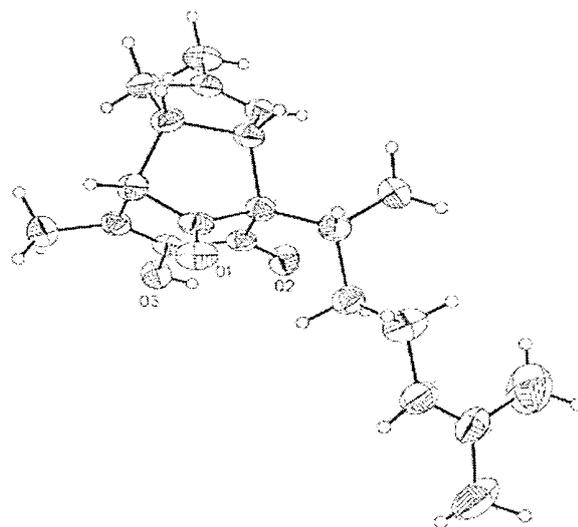
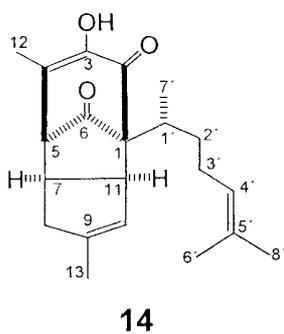
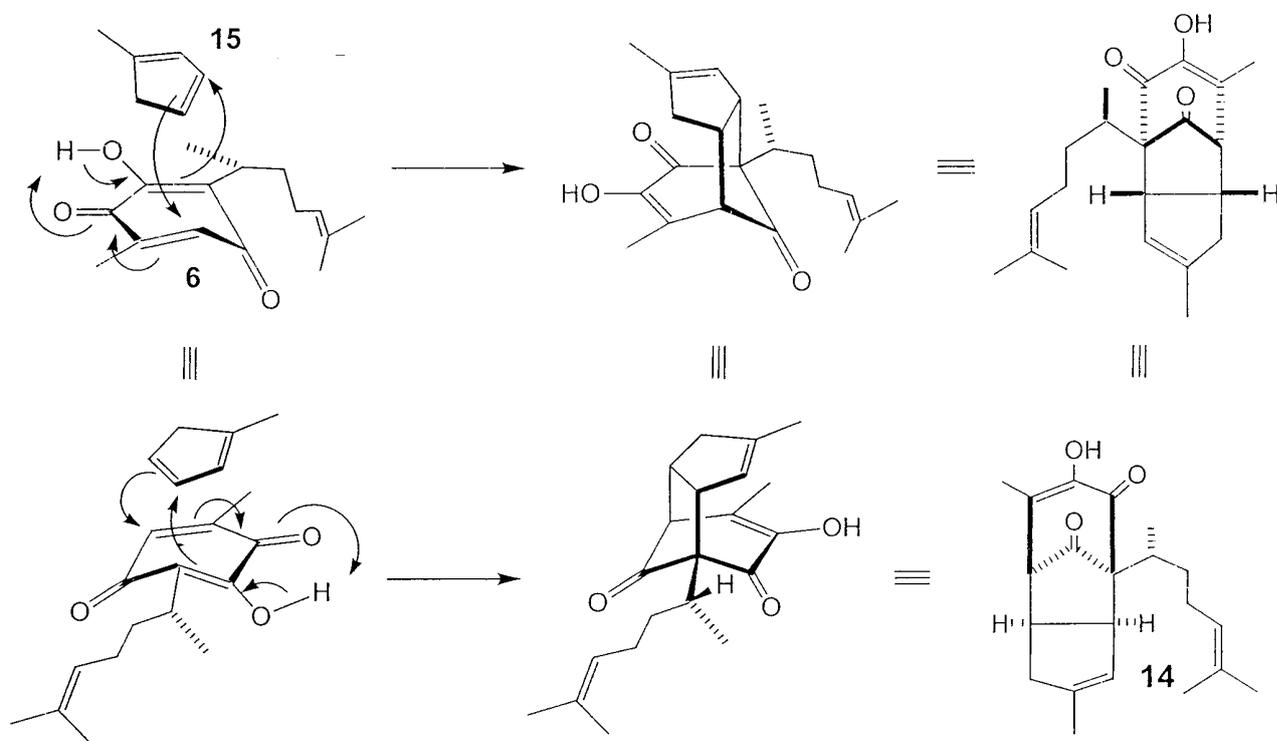
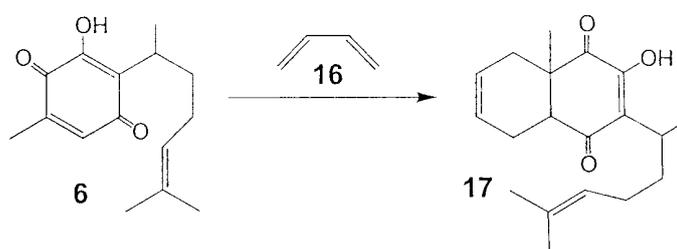


Figura 3. Estructura molecular de **14**



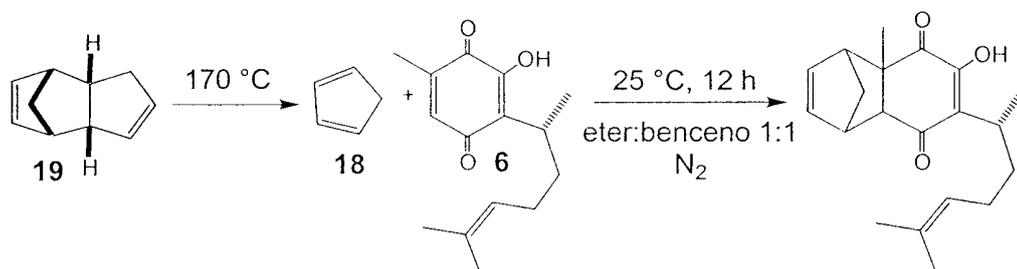
Esquema 2. Propuesta mecanística para la formación de **14** mediante la cicloadición regio- y estereo- diferenciada de **15** y **6**.

Anteriormente se realizó la reacción de Diels-Alder con **6** y butadieno (**16**), y como producto se obtuvo el aducto **17**, que dió evidencia de la posición de los sustituyentes (hidroxilo, metilo y de la cadena), en el anillo de quinona (**6**) el cual se comporta como dienófilo, como se observa en el esquema 3 [9]. Tomando como base estos antecedentes se considero pertinente llevar a cabo un experimento de cicloadición adicional que ponderara a **14** como producto natural.



Esquema 3. Formación del cicloaducto **17** derivado de la reacción de Diels-Alder entre Perezona (**6**) y 1,3-butadieno (**16**)

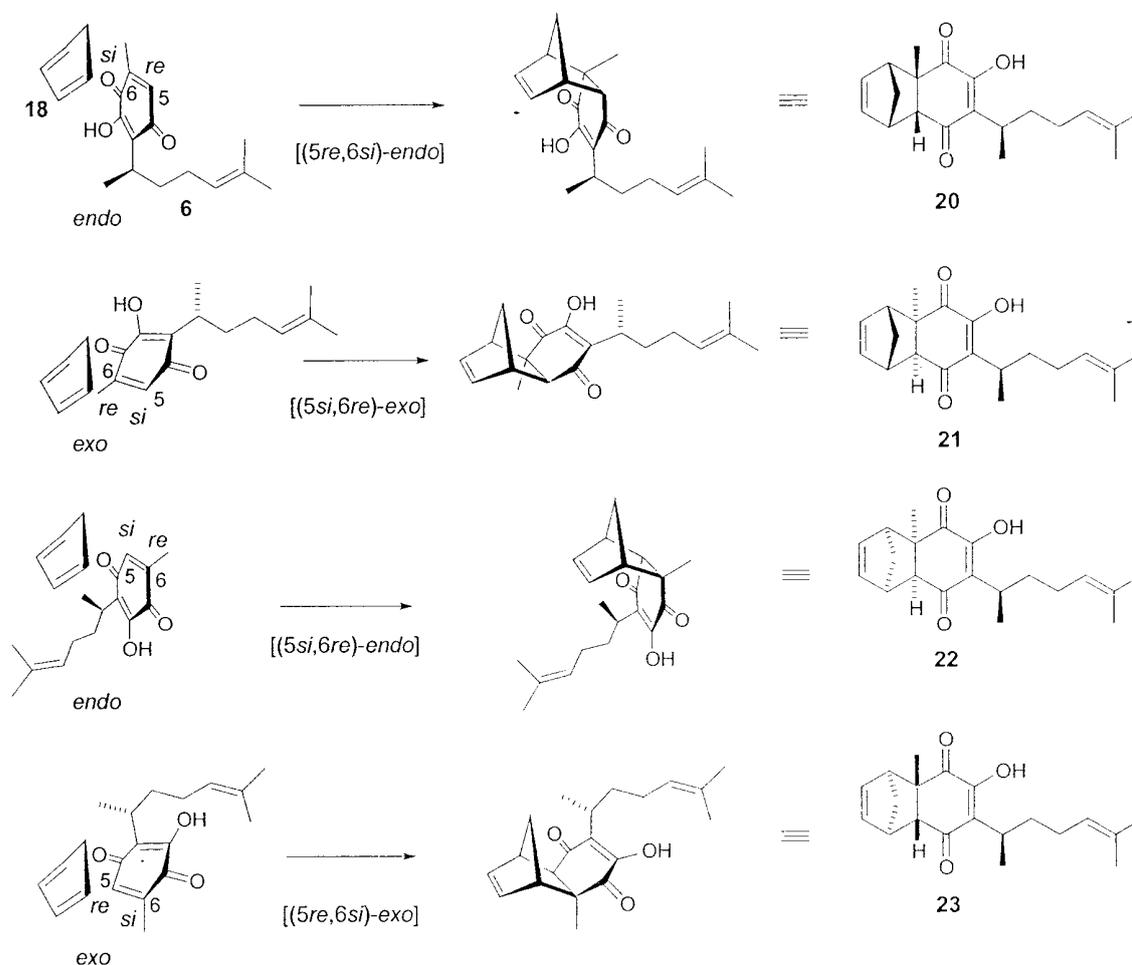
Debido a la indisponibilidad de **15** (o su forma dimérica) se llevó a cabo la experimentación con **18** (obtenido a partir de **19**) [30]. Se tomaron 10 mL de dicitopentadieno (**19**) en un matraz bola de 250 mL conectado a un sistema de destilación simple, el cual se calentó a 170 °C en atmósfera inerte de nitrógeno, para realizar la retro Diels-Alder y obtener **18**, el cual destila a 48 °C y se recibe en un baño de hielo para evitar la dimerización de **18** a **19**, esquema 4.



Esquema 4. Condiciones de reacción para la reacción de Diels-Alder entre **6** y **18**

Posteriormente, se disolvió **6** (0.272 g) en una mezcla de éter anhidro y benceno (1:1) y se puso a reaccionar con **18** a temperatura ambiente, en atmósfera inerte de nitrógeno; la reacción se siguió por ccf y en 12 h, **6** se consumió completamente.

El resultado de la reacción fue la formación de una mezcla de distereoisómeros observados en el espectro de RMN  $^1\text{H}$  Tabla 3. La separación cromatográfica de los diastereoisómeros no se logró por los métodos convencionales utilizados en el presente proyecto. Se puede racionalizar la cicloadición entre **18** y **6**, como una reacción regio y estereo selectiva, ya que el curso estereoquímico de la reacción sugiere la formación de cuatro diastereoisómeros (**20-23**), como se muestra en el esquema 5.



Esquema 5. Curso estereoquímico de la reacción de Diels-Alder, ilustrada para la reacción entre **18** y **6**, para la formación de **20-23**, como posibles productos.

El espectro de RMN  $^1\text{H}$  de la mezcla, muestra señales dobles,  $\delta$  7.29 ppm un singulete del hidroxilo enólico, en  $\delta$  5.9 ppm y  $\delta$  6.03 se observan dos señales doble de doble que corresponden a los hidrógenos vinílicos del anillo del aducto, en  $\delta$  5.07 observa un cuarteto que corresponde al hidrógeno vinílico de la cadena lateral de la perezona, y en  $\delta$  1.2 ppm se observa un singulete del metilo cuaternario.

Tabla 3. Datos de RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) y  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de la mezcla de diastereoisómeros.

Asignación	$\delta$ $^1\text{H}$ (ppm)	$\delta$ $^{13}\text{C}$ (ppm)	Asignación	$\delta$ $^1\text{H}$ (ppm)	$\delta$ $^{13}\text{C}$ (ppm)
C1	-	199.6 + 0.02	C12	1.14; 1.12	17.5 + 0.2
2	-	131.3	C13	3.06	29.6
C3	-	155.1 + 0.1	C14	1.7; 1.5	46.8
C4	-	197.5 + 0.06	C15	1.6; 1.5	33.7
C5	-	50.7 + 0.03	C16	5.06	124.4
C6	3.07	54.4	C17	-	132.4 + 0.05
C7	6.04	136	C18	1.6	26.01
C8	5.6	135	C19	1.5	25.6
C9	3.41	49.4	C20	1.2	29.9
C10	2.84	57.4	OH	7.3	-
C11	1.7	26.6			

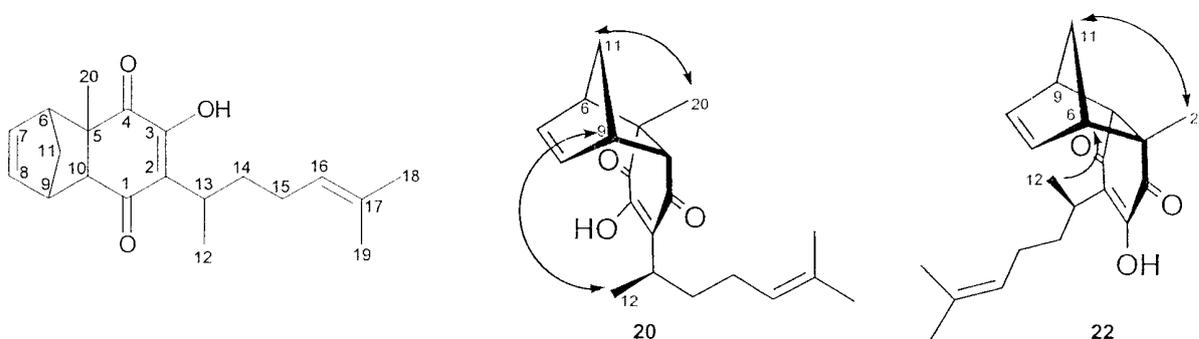


Figura 4. Correlaciones NOESY de 20 y 22

De acuerdo a las correlaciones en el espectro NOESY, se observa que la cicloadición *endo*, es la favorecida en las condiciones de reacción antes descritas, ya que para la forma *exo* debería observarse la correlación del hidrógeno del hidroxilo con el hidrógeno en C11. Sin embargo, ésta no se observa.

#### 3.2.4 Conclusiones

El aislamiento de los sesquiterpenos **6-8**, en los lotes A y B de raíz de pipitzahoac, permitió establecer que sus constituyentes químicos, concuerdan con los informados previamente para *Perezia cuernavacana* [10, 26], por lo que podemos concluir que esta es la identidad de la especie comercializada con fines terapéuticos.

La diferencia en los rendimientos de las sustancias aisladas de un lote y otro, pondera la variabilidad en la cantidad de sesquiterpenos que se pueden aislar de *Perezia cuernavacana* [26], esto origina una variable que se debe tomar en consideración para futuros estudios a esta especie vegetal, y sugiere llevar a cabo un estudio comparativo de *Perezia cuernavacana* colectada en diferentes épocas de año para obtener los mejores rendimientos de los sesquiterpenos para su evaluación biológica y ponderar el uso medicinal que se atribuye al vegetal.

El resultado de la reacción de Diels-Alder entre **6** y **18** fue la formación de los aductos (**20** y **22**), que estructuralmente no son análogos al cicloaducto **14**. Este resultado proporciona evidencia de que bajo las condiciones de la reacción de Diels-Alder que se obtuvieron en este trabajo, no es posible realizar una cicloadición regio- y estereo- selectiva como la que originó la formación de **14**, así se concluye que **14** es un producto natural.

#### 4. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1) Espinosa-García, F. J.; Delgado, G. Relationship Between Ecology of Plant Defense and the Prospection of Secondary Metabolites with Potential Medicinal or Agricultural Application. *Rev. Latinoamer. Quím.* **1998**, *26/1*, 13-28.
- 2) Krane, B. D.; Fagbule, M. O.; Shamma, M.; The Benzophenanthridine Alkaloids. *J. Nat. Prod.* **1984**, *47*, 1-43.
- 3) Rodríguez, F.; Delgado, G. Alcaloides Antioxidantes a partir de las Semillas de *Bocconia arborea*. *Rev. Soc. Quím. Méx. Núm. Esp. 4*, **2005**, *49*, 173.
- 4) Ishii, H.; Tsutomu, I.; Chen, I. S. Arnottianamide and Isoarnottianamide: The structural Establishment due to Chemical Conversion from the known Benzo[c]phenanthridine Alkaloids by the Novel Baeyer-Viliger like Oxidation of an Immonium Group. *Tetrahedron Lett.* **1976**, *15*, 1203-1206.
- 5) Manske, R. H. F.; Homes, H. L. The Alkaloids. The Morphine Alkaloids. Vol. II. Academic Press Inc. Pub. **1966**, 3-37.
- 6) Wall, M. E.; Wani, M. C.; Cook, C. E.; Keith, H. P.; McPhail, A. T.; Sim, G. A. Plant Antitumor Agents. I. The Isolation and Structure of Camptothecin, a Novel Alkaloidal Leukemia and Tumor Inhibitor from *Camptotheca acuminata*. *J. Am. Chem. Soc.* **1966**; *88*(16); 3888-3890.
- 7) Joseph Nathan, P. La química de la perezona como homenaje al doctor Leopoldo Río de la Loza en el centenario de su fallecimiento. *Rev. Soc. Quím. Méx.* **1974**, *18*, 226-241.
- 8) Díaz, J. L. Uso de las Plantas Medicinales de México. *Monografías Científicas del IMPELAM*. IMSS. **1976**. México.
- 9) Díaz, J. L. Índice y Sinonimia de las Plantas Medicinales de México. *Monografías Científicas del IMPELAM*. IMSS. **1976**. México.
- 10) Walls, F.; Salmón M.; Padilla J.; Joseph-Nathan P.; Romo J. La Estructura de la Perezona. *Bol. Inst. Quím. Univ. Nac. Autón. Méx.* **1965**, *17*, 3-15.
- 11) Walls, F.; Padilla J.; Joseph-Nathan P.; Giral, F.; Escobar, M.; Romo, J. Studies in Perezona derivatives: Structures of the pipitzols and Perezinona. *Tetrahedron* **1966**, *22*, 2387-2399.
- 12) Joseph-Nathan, P.; Gonzáles, Ma. P.; Rodríguez, V. M. Terpenoids of *Perezia hebeclada*. *Phytochemistry* **1972**, *11*, 1803-1808.

- 13) Joseph-Nathan, P.; Hernández, J. D.; Román, L. U.; García, E. G.; Mendoza, V.; Mendoza, S. Coumarin and terpenoids from *Perezia alamani* var. *oolepis*. *Phytochemistry* **1982**, *21*, 1129-1132.
- 14) Joseph-Nathan, P.; Hernández, J. D.; Román, L. U.; García, E. G.; Mendoza, V. Sesquiterpenes from *Perezia carpholepis*. *Phytochemistry* **1982**, *21*, 669-672.
- 15) Bohlmann, F.; Zdero, C.; King, R. M.; Robinson H. Neue perezon-derivate aus *Acourtia thurberi*. *Phytochemistry* **1979**, *18*, 1894-1895.
- 16) Zdero, C.; Bohlmann, F.; Sánchez, H.; Domínguez, X. A. Isocedrene Derivatives and Other Constituents from *Acourtia nana*. *Phytochemistry* **1991**, *30*, 2695-2697.
- 17) Baytelman, B. Acerca de Plantas y Curanderos. Instituto Nacional de Antropología e Historia. México, D. F. **1983**.
- 18) Martínez, M. Las Plantas Medicinales de México. Ed. Botas. 3ª. edición. México, D.F. **1945**, 165-172.
- 19) Kenneth, W. B. Chemistry and Biochemistry of Organic Natural Products. Harwood academic publishers. Amsterdam The Netherlands. **1998**, 343-364.
- 20) Manske, R. H. F. The Alkaloids of Papaveraceous Plants. XXXVIII. *Bocconia arborea* Wats. *Can. J. Res.* **1943**, *21*, 140-143.
- 21) Julián, A.; Delgado, G. (±)-Bocconarborines A and B, Novel 1,3-bis-Benzo[c]phenanthridinyl Acetone Alkaloids from *Bocconia arborea*. *Rev. Soc. Quím. Méx.* **2001**, *45*, 189-194.
- 22) Navarro, V.; Delgado, G. Two Antimicrobial Alkaloids from *Bocconia arborea*. *J. Ethnopharmacol.* **1999**, *66*, 223-226.
- 23) Narváez-Mastache, J. M.; Rodríguez, F.; Delgado, G. *Rev. Soc. Quím. Méx.* Núm. Esp. 2, **2005**, *49*, 52.
- 24) Pelletier, S. W.; Chokshi, H. P.; Desai, H. K. Separation of Diterpenoid Alkaloid Mixtures Using Vacuum Liquid Chromatography. *J. Nat. Prod.* **1986**, *49*, 892-900.
- 25) Delgado, G. Química de la Flora Mexicana. Edición de la Universidad Nacional Autónoma de México y la Sociedad Química de México. México, D.F. **2006**, 20-30.
- 26) Walls, F.; Padilla, J.; Joseph-Nathan, P.; Escobar, M.; Romo, J. Studies in Perezone Derivatives structures of the Pipitzols and Perezinone. *Tetrahedron* **1966**, *22*, 2387-2399

- 27) Joseph-Nathan, P.; Gutiérrez, A.; Hernández, J. D.; Román, L. U.; Santillán, R. L. <sup>13</sup>C-NMR Studies of Cedranolides. *J. Nat. Prod.* **1986**, *49*, 79-89.
- 28) Joseph-Nathan, P.; Román, L. U.; Hernández, J. D.; Taira, Z.; Watson, H. The Stereochemistry of Pipitzols and Perezols. *Tetrahedron* **1980**, *36*, 731-4.
- 29) Padilla, J.; Romo, J.; Walls, F.; Crabbé, P. Propiedades Ópticas de unos Derivados de la Serie de la Perezona y de los Pipitzoles. *Rev. Soc. Quím. Méx.* **1967**, *11*, 7-22.
- 30) Moffett, R. B. Cyclopentadiene and 3-chlorocyclopentene. *Organic Syntheses, Coll.* **1963**, *4*, 238.