



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

PROGRAMA DE MAestrÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**“AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y MODIFICACIÓN QUÍMICA DE TERPENOS
CONSTITUYENTES DE *Verbesina persicifolia*”**

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Q. DAVID FABIAN LEÓN RAYO



TUTOR: Dr. Manuel Jiménez Estrada AÑO: 2012

H. Jurado

Presidente	M. en C. Baldomero Esquivel Rodríguez
Vocal	Dr. Ricardo Reyes Chilpa
Vocal	Dr. José Fausto Rivero Cruz
Vocal	Dra. Julia Cassani Hernández
Secretario	Dr. Alejandro Cordero Vargas

El presente trabajo de investigación fue realizado en el Laboratorio 2-10 del Departamento de Productos Naturales del Instituto de Química UNAM, bajo la asesoría del **Dr. Manuel Jiménez Estrada.**

A mis padres (Francisco y Lucelly) y mi hermana (Daniela)

Ustedes son el motor de mi vida y por ustedes: "soy lo que soy y seré lo que seré"

Gracias y amor infinito!!!

AGRADECIMIENTOS

- Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)**, por el apoyo brindado con la beca durante mis estudios de maestría. Becario número **255245**.
- Al **Instituto de Química UNAM**, por abrirme las puertas de sus instalaciones y poder realizar mi investigación.
- Al grupo de **técnicos académicos** del Instituto de Química, prestar de manera eficiente los servicios y análisis de espectroscopia, cromatografía y pruebas biológicas necesitados para realizar mi trabajo de tesis.
- Al **Honorable Jurado** asignado, que con sus valiosos aportes y correcciones enriquecieron el trabajo.
- A mi director de tesis el **Dr. Manuel Jiménez Estrada**, por todo su tiempo, apoyo y colaboración dedicados en estos años de estudio.
- A **Natalia Alzate Carvajal**, por su compañía, su amor y cariño incondicional han llenado mi estancia y vida de alegría.
- A la **M. en C. Eunice Ríos Vásquez** y familia, **Fabio Vengoechea** y **Sandra Ramírez**, por todo su apoyo y por recibirme y ayudarme en los primeros días de mi estancia.
- A toda mi **familia en Colombia**, tanto **León** como **Rayo** de quienes siempre tuve una palabra de amor, aliento y motivación.
- A los **compañeros** tanto actuales como ya titulados del **laboratorio 2-10**, por todos los momentos agradables durante mi estancia.
- A todos mis **amigos colombianos** que se encuentran en México, por hacer darle un ambiente familiar a la estancia y su ayuda cuando lo necesité. Y a mis **amigos en Colombia** y en otras partes del mundo con los que sé que puedo contar a pesar de la distancia.
- Al programa y personal del **Posgrado en Ciencias Químicas UNAM**, que siempre estuvieron dispuestos a colaborar.
- A la **Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)**, por abrir sus puertas y convertirse en mi nueva y amada *Alma Mater*.

TABLA DE CONTENIDO

Abreviaturas	8
RESUMEN INTRODUCTORIO	9
CAPÍTULO I. ANTECEDENTES Y MARCO TEÓRICO.....	10
1.1. Productos Naturales	11
1.1.1. Terpenos	11
1.1.2. Sesquiterpenos.....	14
1.2. Genero <i>Verbesina</i> y <i>Verbesina persicifolia</i>	15
1.2.1. <i>Verbesina persicifolia</i>	16
1.3. Propiedades Biológicas de Productos Naturales.....	18
1.3.1. Actividad Antioxidante.....	18
1.3.2. Actividad Antiinflamatoria	21
CAPÍTULO II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVOS.	23
2.1. Planteamiento del Problema	24
2.2. Justificación.....	24
2.3. Objetivos.....	24
2.3.1. Objetivo General	24
2.3.2. Objetivos Particulares.....	24
CAPÍTULO III. MATERIALES Y MÉTODOS.	26
3.1. Material Vegetal.....	27
3.2. Métodos Cromatográficos	27
3.3. Reactivos Utilizados en las Reacciones de Modificación Química.	27
3.4. Análisis Instrumentales y Espectroscópicos.....	28
3.5. Medidas y Pruebas de Actividad Biológica	29

3.5.1. Técnica para determinar el contenido de TBARS en cerebro de rata inducido con FeSO ₄ 10μM (microensayo)	29
3.5.2. Determinación de la Actividad Antioxidante (Reducción del Radical Libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo)	30
3.5.3. Determinación de Actividad Antiinflamatoria por el Método de Edema en la Oreja de Ratón Inducido con Acetato de 12- <i>O</i> -tetradecanoilforbol (TPA).....	31
CAPÍTULO IV. SECCIÓN EXPERIMENTAL Y RESULTADOS.	32
4.1. Extracción y Purificación de Compuestos	33
4.2. Reacciones de Modificación del Compuesto 1	37
4.2.1. Epoxidación	38
4.3. Reacciones de Modificación de la Mezcla de Compuestos 2 y 3	39
4.3.1. Acetilación.....	39
4.3.2. Oxidación	40
4.3.3. Epoxidación	42
4.3.4. Esterificación con Acido <i>p</i> -Bromobenzoico.....	43
4.3.5. Esterificación con Acido Cinámico.....	44
4.3.6. Reacción con Cloruro de Oxalilo.....	46
4.4. Actividad Biológica	48
4.4.1. Inhibición de la Peroxidación de Lípidos en Cerebro de Rata (TBARS).....	48
4.4.2. Actividad Reductora sobre el Radical DPPH.....	49
4.4.3. Actividad Antiinflamatoria en Modelo de Edema Inducido con TPA	51
CAPÍTULO V. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	52
5.1. Caracterización del Compuesto 1.....	53
5.2. Caracterización de los Epóxidos del Compuesto 1.....	59
5.2.1. Compuesto 1 - Epóxido 1	60
5.2.2. Compuesto 1 - Epóxido 2	63
5.3. Caracterización de Compuestos 2 y 3.....	67
5.4. Identificación de los Derivados Realizados a la Mezcla de Compuestos 2 y 3.....	69
5.4.1. Acetilación.....	70
5.4.2. Oxidación	71

5.4.3. Epoxidación	73
5.4.4. Esterificación con Acido <i>p</i> -Bromobenzoico.....	75
5.4.5. Esterificación con Acido Cinámico.....	77
5.4.6. Reacción con Cloruro de Oxalilo.....	79
5.5. Actividad Biológica	82
5.5.1. Actividad Antioxidante.....	82
5.5.2. Actividad Antiinflamatoria	84
CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	87
6.1. Conclusiones	88
6.2. Recomendaciones y Perspectivas	89
CAPÍTULO VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	90
CAPITULO VIII. ANEXOS	95
ANEXO I. Espectroscopia: “Compuesto 1”	96
ANEXO II. Espectroscopia: “Compuesto 1 - Epóxido 1”	98
ANEXO III. Espectroscopia: “Compuesto 1 - Epóxido 2”	99
ANEXO IV. Espectroscopia de los Compuestos 2 y 3.....	101
ANEXO V. Espectroscopia: “Mezcla Compuestos 2 y 3 - Acetilación”.....	103
ANEXO VI. Espectroscopia: “Mezcla Compuestos 2 y 3 - Oxidación”	107
ANEXO VII. Espectroscopia: “Mezcla Compuestos 2 y 3 - Epoxidación”	111
ANEXO VIII. Espectroscopia: “Mezcla Compuestos 2 y 3 - Éster Ac. <i>p</i> -Bromobenzoico”	115
ANEXO IX. Espectroscopia: “Mezcla Compuestos 2 y 3 - Esterificación Ac. Cinámico”	119
ANEXO X. Espectroscopia: “Mezcla Compuestos 2 y 3 - Reacción Cloruro de Oxalilo”	123

Abreviaturas

DPPH	2,2-Difenil-1-picrilhidrazilo
TBARS	Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico
TPA	Acetato de 12-O-tetradecanoilforbol
IPP	Difosfato de Isopentenilo
DMAPP	Difosfato de dimetilalilo
MVA	Ácido mevalónico
MEP	Fosfato de 2-metil-d-eritriol
TBA	Ácido tiobarbitúrico
DCC	N,N'-Diciclohexilcarbodiimida
DMAP	N,N-Dimetil-4-aminopiridina
m-CPBA	Ácido <i>meta</i> -cloroperbenzoico
¹H-RMN	Resonancia magnética nuclear protonica
¹³C-RMN	Resonancia magnética nuclear de carbono
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficiencia
CG-MS	Cromatografía de gases acoplada a detector de espectrometría de masas
IR	Espectrometría infrarrojo
MS-EI	Espectrometría de Masas - Impacto Electrónico

“AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y MODIFICACIÓN QUÍMICA DE TERPENOS CONSTITUYENTES DE *Verbesina persicifolia*”

RESUMEN INTRODUCTORIO

La investigación de la composición química, actividad biológica y aplicación de los productos naturales ha sido durante largo tiempo un campo de gran interés tanto para la comunidad científica como para la comunidad en general, que gusta de las alternativas naturales en el tratamiento de enfermedades, alimentos, cosméticos, entre otros campos.

Verbesina persicifolia (Familia *Asteraceae*) conocida tradicionalmente como Huichin, es una planta arbustiva de hojas ligeramente alargadas y pequeñas flores amarillas con formas similares a discos solares. En la medicina folklórica mexicana (Veracruz y Puebla principalmente), esta planta es usada tradicionalmente en el tratamiento de la diabetes, afecciones estomacales y dolor de huesos. En cuanto a su composición química, existen diversos reportes que indican presencia principalmente de compuestos sesquiterpénicos del tipo eudesmano.

En el presente trabajo se aislaron y caracterizaron 3 compuestos a partir del extracto hexánico de esta especie, el compuesto **1** fue identificado como un nuevo compuesto con la conformación poco frecuente tipo 10-desmetil-1-metileudesmano, del cual no se presentan reportes en la literatura. Los compuestos **2** y **3** fueron identificados como isómeros sesquiterpenos del tipo eudesmano con un grupo cinamato ubicado en la posición C-4, con reportes previos en especies del género *Verbesina*.

Luego haber separado e identificado los compuestos, se realizaron diversas modificaciones estructurales por medio de reacciones químicas, así mismo se evaluó la actividad antioxidante (TBARS y DPPH) y antiinflamatoria (edema en oreja de ratón inducido por TPA) de los derivados y las moléculas base (**1**, **2** y **3**), obteniendo información acerca de sus sitios activos para proponer nuevas modificaciones que podrían elevar la potencia biológica de estos compuestos.

CAPÍTULO I.

ANTECEDENTES Y MARCO TEÓRICO

1. ANTECEDENTES Y MARCO TEÓRICO

1.1. Productos Naturales

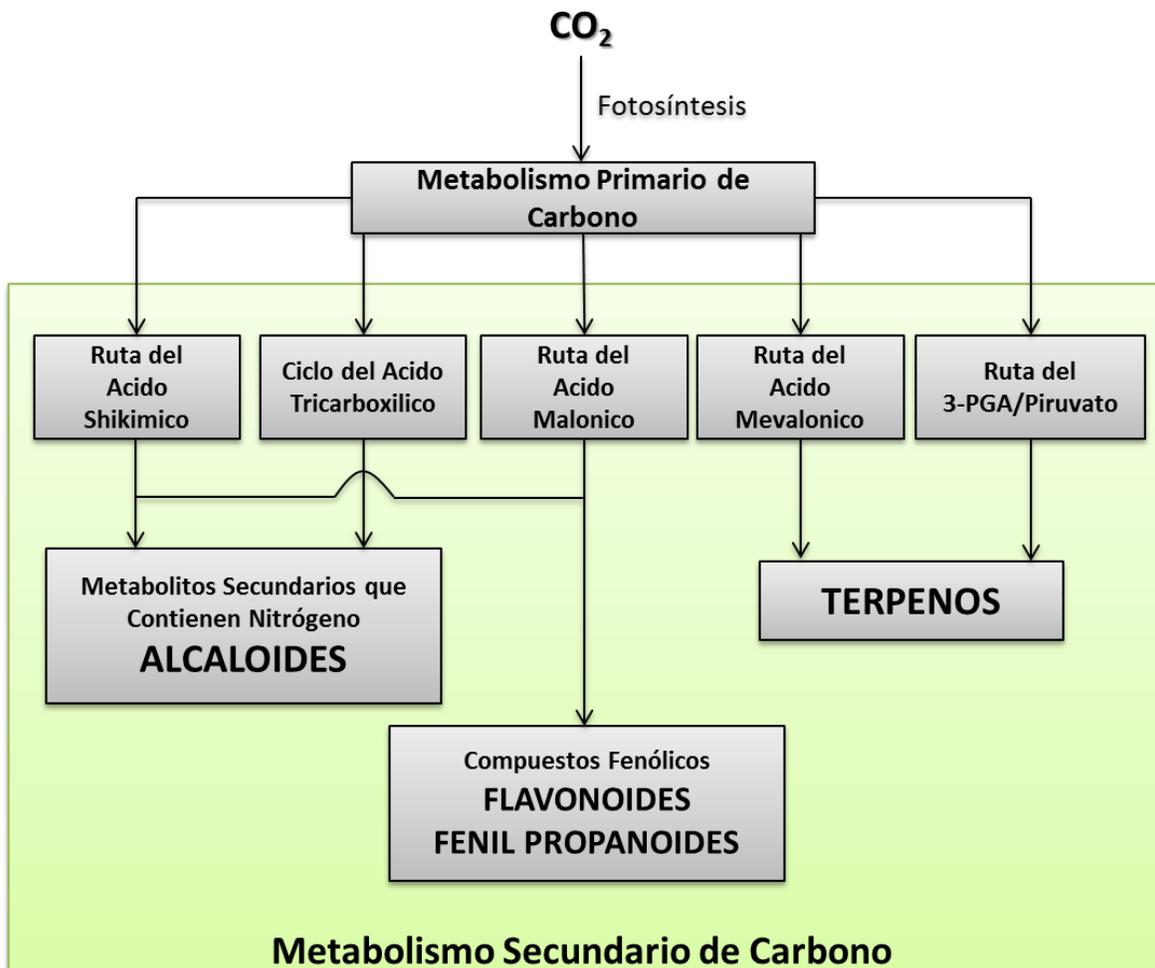
Desde tiempos remotos hasta la actualidad, la humanidad se ha beneficiado de las múltiples facultades de las plantas. En la antigüedad, se usaban las plantas, partes de ellas o sus extractos como medicinas; estos métodos fueron avanzando acorde a como la tecnología evolucionaba hasta obtener e identificar metabolitos activos puros, para el desarrollo posterior de su síntesis y producción en masa (1).

Los términos producto natural o metabolito secundario, son definidos como cualquier compuesto químico producto del metabolismo de un ser viviente y, que con el avance en su investigación se ha encontrado diversas funciones que dependen del entorno o ecosistema de la planta, animal o microorganismo que los produce; el aprovechamiento por el hombre de estos productos se ha plasmado en diversos sectores, principalmente en el campo farmacéutico y terapéutico; además cabe resaltar el campo de los alimentos y cosméticos (2). Con el paso del tiempo, en el campo farmacéutico, se considera que los productos naturales aún tienen un rol importante en el tratamiento y prevención de diversas enfermedades (3, 4), entre las que se destaca el cáncer (5, 6), la diabetes y enfermedades coronarias (7).

En la literatura se encuentran diversos reportes acerca de la amplia diversidad de estructuras químicas encontradas como productos de fuentes naturales (8, 9); con esto, diversos métodos de clasificación han surgido (tomando en cuenta sus grupos funcionales, entre otros), siendo el método más aceptado el que toma en cuenta su origen biosintético, como se muestra en el Esquema 1. A continuación se hará hincapié en la biosíntesis y aplicaciones de los compuestos terpénicos, en particular los sesquiterpenos del tipo eudesmano.

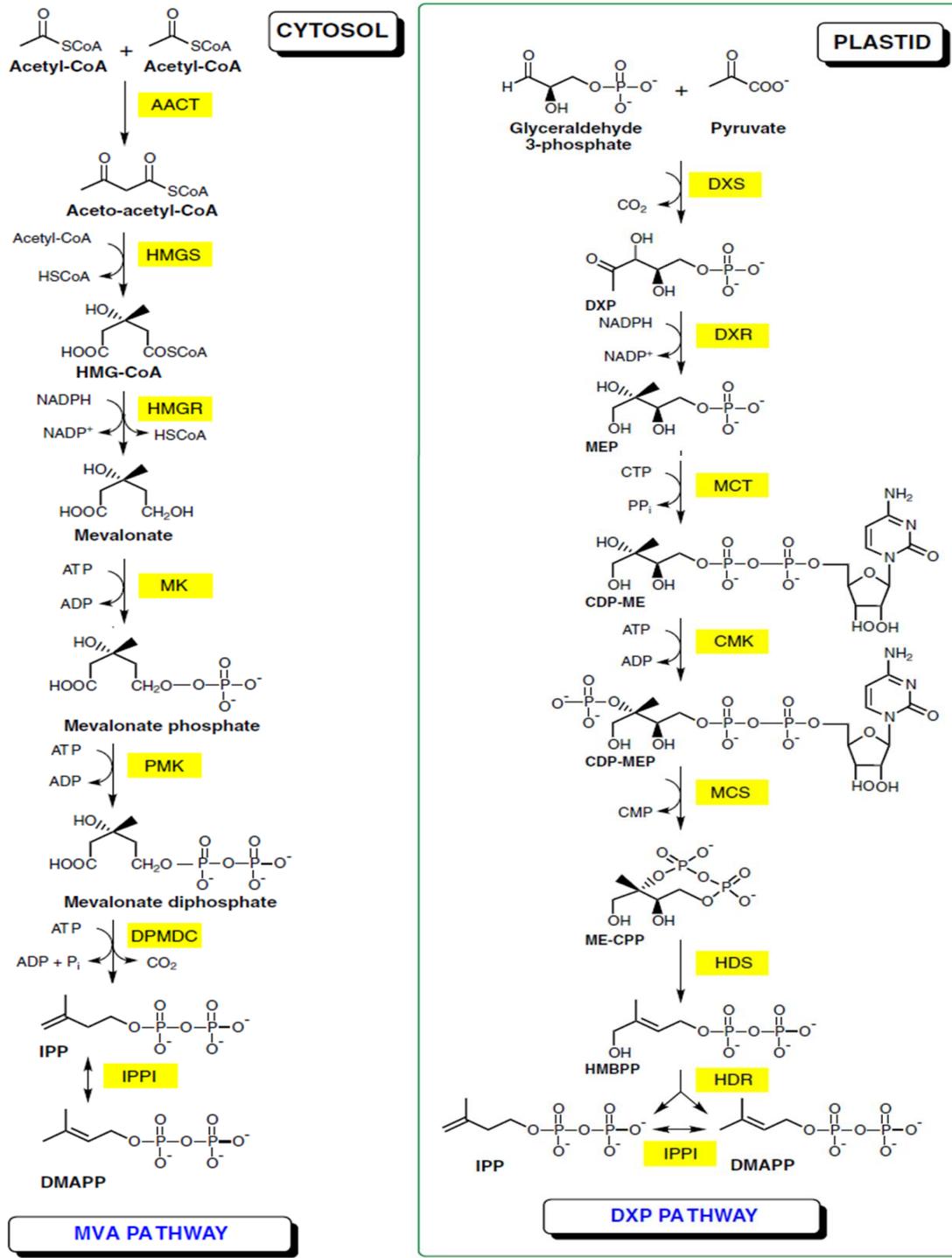
1.1.1. Terpenos

Los compuestos terpénicos son una amplia familia de productos naturales provenientes de las rutas del mevalonato y del metileritriol fosfato, con estructuras compuestas de unidades de isopreno en uniones generalmente del tipo cabeza-cola. El término “terpeno” es originario de la palabra traducida del inglés como “Turpentina” (“trementina” en español), también llamada “resina de árbol de pino”, que es el bálsamo viscoso de aroma agradable obtenido al cortar o cavar el tronco de algunas especies de árbol de pino (*Pinaceae*). La trementina contiene “ácidos de resina” y algunos hidrocarburos, los cuales fueron originalmente referidos como “terpenos” (10).



Esquema 1. Clasificación de los productos naturales con respecto a su biogénesis.

Para la síntesis *in vivo* de estos compuestos, el isopentenil difosfato (IPP) y el dimetilalil difosfato (DMAPP) son las sustancias bioquímicamente activas responsables de su formación. Se ha descubierto que éstos son sintetizados por dos rutas metabólicas (Esquema 2): en la primera, interviene el ácido mevalónico (MVA) formado por la condensación de tres moléculas de la acetil coenzima A, llevándose a cabo principalmente en el citosol a nivel celular; la segunda ruta es la del 2-C-metil-d-eritriol-4-fosfato (metileritriol fosfato, MEP) en la que interviene el ácido pirúvico formado en la glucólisis, que es realizada principalmente en los plástidos (11).



Esquema 2. Rutas metabólicas del IPP y DMAPP en la célula. Fuente: Bouvier *et al*, 2005 (11).

Los compuestos terpénicos son clasificados de acuerdo al número de unidades de isopreno unidas o número de carbonos en su estructura, como se muestra en la Figura 1 (12).

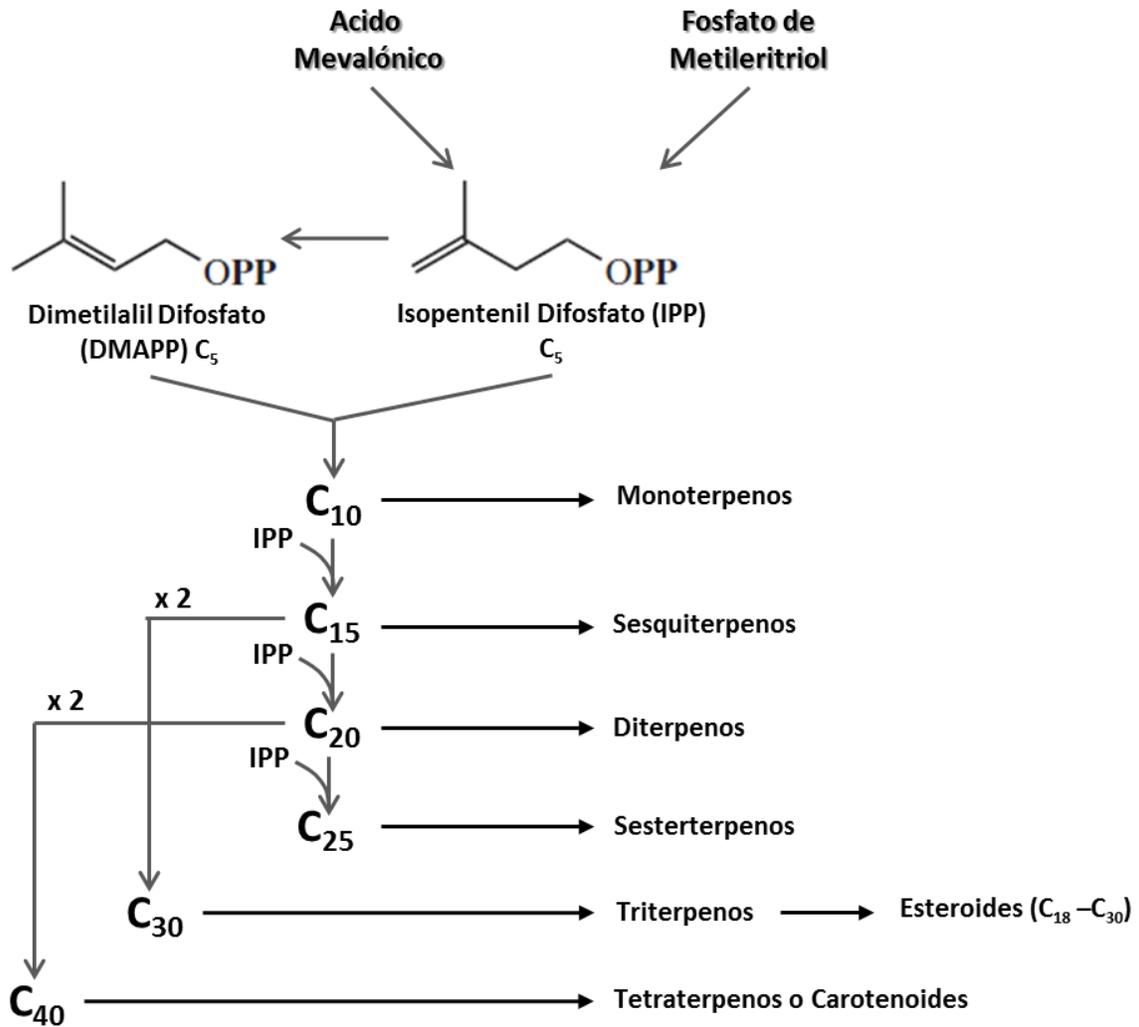


Figura 1. Clasificación de los compuestos terpénicos. Fuente: Dewick, 2009 (12).

1.1.2. Sesquiterpenos

Esta familia de compuestos proceden de la unión de tres unidades de IPP y DMAPP, las cuales son sintetizadas por la ruta del ácido mevalónico y conforman el pirofosfato de farnesilo, tras una serie de reacciones de anillación y transposición en su estructura se derivan los múltiples arreglos para este grupo de terpenos (Figura 2) (12, 13, 14).

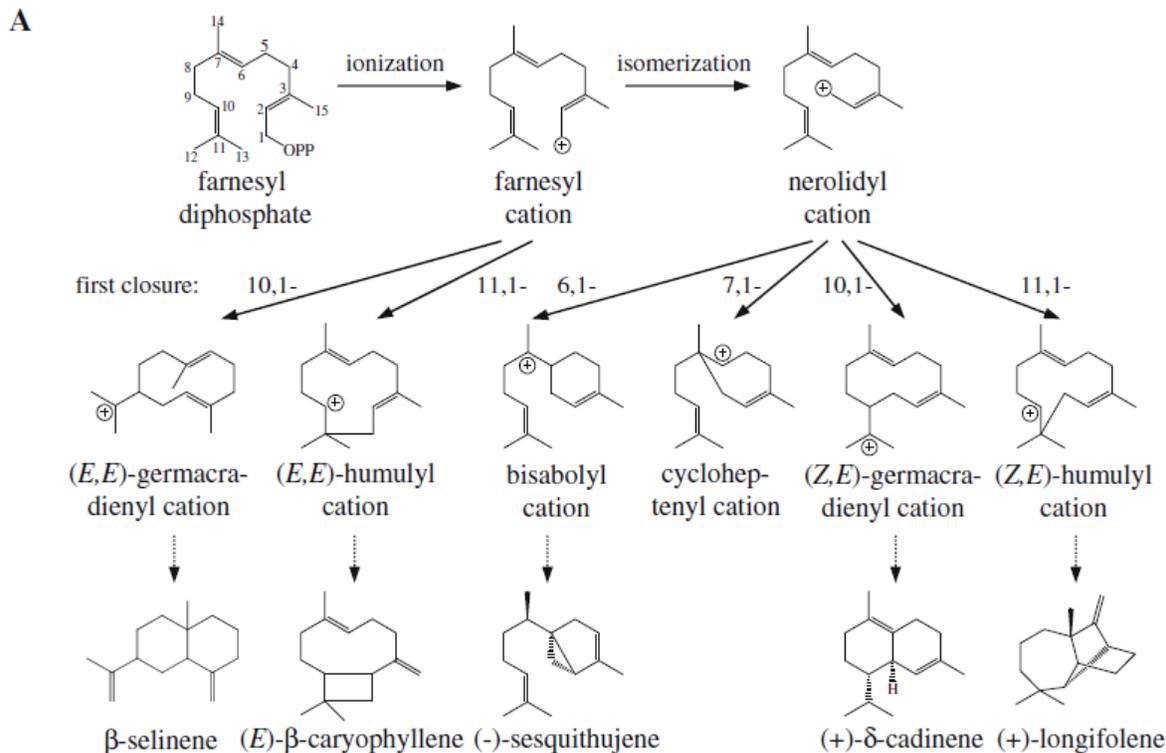


Figura 2. Reacciones de biosíntesis de los diferentes esqueletos de sesquiterpenos. Fuente: Degenhard, 2009 (14).

Los sesquiterpenos del tipo eudesmano, con su amplia variedad de grupos funcionales y propiedades biológicas, son de vital importancia para este trabajo de investigación, ya que su presencia ha sido reportada ampliamente para la familia *Asteraceae* (15), particularmente en el género *Verbesina* y en la planta *Verbesina persicifolia*. La biosíntesis de este grupo moléculas es generada por una serie de movimientos de electrones (transposiciones) catalizados de manera enzimática del farnesil difosfato pasando por el carbocatión germacranilo (12, 14).

1.2. Género *Verbesina* y *Verbesina persicifolia*

Verbesina es un género de plantas con flores perteneciente a la familia *Asteraceae*, se caracteriza por sus flores amarillas similares a discos solares. Su nombre es aludido a su semejanza con el follaje de la verbena.

Entre la composición química de este género se destaca ampliamente la presencia de sesquiterpenos del tipo eudesmano, de manera particular sus ésteres derivados del ácido cinámico; algunos reportes al respecto se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Algunos reportes de sesquiterpenos tipo eudesmano en el género *Verbesina*.

Planta	Compuestos ^a	Ref.
<i>V. glabrata</i> <i>V. luetzelburgii</i> <i>V. macrophylla</i> <i>V. cinérea</i> <i>V. boliviana</i> <i>V. pentantha</i> <i>V. semidecurrans</i>		(16)
<i>V. sordescens</i>		(17)
<i>V. oerstediana</i>		(18)
<i>V. oncophora</i> <i>V. linnheimeri</i>		(19)
<i>V. subcordata</i>		(20)
<i>V. turbacensis</i>		(21) (22)
<i>V. virginica</i>		(23)
	<p>Cinn = </p> <p>Cum = </p>	

^a Los grupos R para los compuestos son generalmente: hidroxilo (OH), carboxilo (COOH), acetato (COCH₃), entre otros

1.2.1. *Verbesina persicifolia*

Es una planta arbustiva, de hojas ligeramente alargadas que miden hasta 14 cm de largo; sus flores crecen en grupos formando cabezuelas que se crecen numerosas en la planta. Crece alrededor de

1.5 a 2 m de altura, y presenta un tallo liso color café. En la medicina tradicional e indígena mexicana la infusión de sus hojas ha sido usada como tratamiento para el dolor en los huesos, malestares estomacales, enfermedades hepáticas y diabetes (24, 25).



Figura 3. Fotografías de *V. persicifolia*. Fuente: Carlos Velazco (<http://www.flickr.com/people/aztekium>).

Los reportes realizados a la fecha sobre la composición química de *V. persicifolia* se citan a continuación:

- En 1982, Avila-Loria y colaboradores (26) reportan el aislamiento e identificación de tres sesquiterpenos del tipo eudesmano que se muestran en la Figura 4.

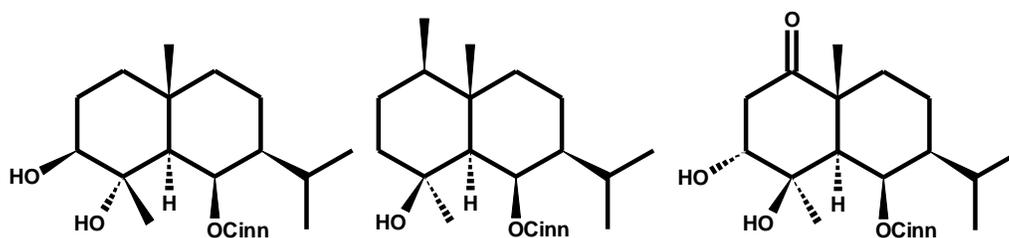


Figura 4. Sesquiterpenos eudesmánicos aislados de *V. persicifolia* por Avila-Loria, 1982 (26).

- En 1987, Jakupovic y colaboradores (20) reportan la presencia de α -pineno, γ -cadineno, aromadendreno, cariofileno, germacreno D, espatulenol, cubebol, oxido de cariofileno, 2-hidroxi- α -curcumeno, α -humuleno, tridecapentaineno y anhidrooplopanona; además de las lactonas sesquiterpénicas arbusculina B y α -ciclocotunolida; y los compuestos sesquiterpénicos del tipo eudesmano que se muestran en la Figura 5.

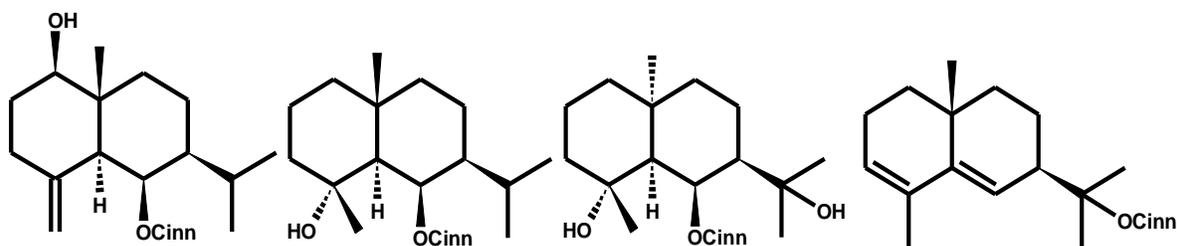


Figura 5. Sesquiterpenos eudesmánicos aislados de *V. persicifolia* por Jakupovic *et al*, 1987 (20).

- En 2007, Mejía-Flores (27) aísla e identifica el sesquiterpeno eudesmano mostrado en la Figura 6

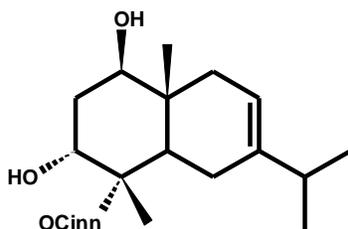


Figura 6. Sesquiterpeno tipo eudesmano aislado de *V. persicifolia* por Mejía-Flores, 2007 (27).

A nivel farmacológico, son pocos los estudios que se han realizado a los metabolitos encontrados en esta planta. En 1997 Pérez-Gutiérrez evaluó en ratones diabéticos y normoglucémicos la actividad hipoglucemiante del extracto hexánico, diclorometánico y metanólico de *V. persicifolia*, presentando actividad significativa, sobre todo en el caso del extracto metanólico (28); En 2010, Mejía-Flores (29) evaluó la actividad citotóxica, antiinflamatoria y genotóxica del compuesto mostrado en la Figura 6 y un derivado producto de su hidrogenación, usando óxido de platino como catalizador, la actividad del derivado aumentó el efecto citotóxico en algunas líneas celulares, pero ninguno mostró genotoxicidad en los ensayos realizados.

1.3. Propiedades Biológicas de Productos Naturales

Aunque el espectro de propiedades biológicas que han sido reportadas en productos naturales es muy amplio, en esta sección se pretenden dar a conocer de manera general, los conceptos y fundamentos de las metodologías para la medición de actividad biológica aplicados en este trabajo de investigación:

1.3.1. Actividad Antioxidante

En la naturaleza, los procesos oxidativos están asociados con una amplia variedad de reacciones metabólicas, en las cuales se destaca el envejecimiento celular (mejor conocido como estrés oxidativo), enfermedades cardiacas e incluso cáncer y procesos inflamatorios

En las células existen cuatro fuentes endógenas que parecen ser las principales productoras de grupos oxidantes: (a) la respiración normal anaerobia, en donde las mitocondrias consumen

oxígeno molecular, reduciéndolo en pasos secuenciales para producir agua. Inevitablemente en este proceso se forman subproductos como el anión-radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radical hidroxilo (OH^{\cdot}). (b) El ataque oxidativo de las células fagocíticas al destruir bacterias y/o virus, produciendo óxido nítrico (ON^{\cdot}), anión-radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogeno (H_2O_2) e hipoclorito (ClO^{\cdot}). (c) Los peroxisomas, los cuales son los organelos responsables de la degradación de ácidos grasos y otras moléculas, produciendo peróxido de hidrógeno (H_2O_2) como subproducto, el cual es degradado por catalasas. (d) Las enzimas "Citocromo P-450" en los animales constituyen un sistema de defensa primario contra los compuestos químicos tóxicos de plantas, la mayor fuente de toxinas dietarias.

Las fuentes exógenas más importantes que proveen gran carga oxidante a las células, acelerando así los procesos oxidativos son: (a) Las sales de hierro y cobre que promueven la generación de radicales oxidantes a partir de peróxidos (reacción de Fenton), aumentando el riesgo de enfermedades cardiacas y/o cáncer asociados a procesos oxidativos. (b) Los óxidos de nitrógeno (NO_x) en el humo de cigarrillo (cerca de 1000 ppm), causantes de la oxidación de macromoléculas y disminución del nivel de antioxidantes. (c) Los compuestos fenólicos, como los ácidos clorofénico y caféico que generan oxidantes por ciclación redox, que están contenidos en dietas a base de vegetales (30).

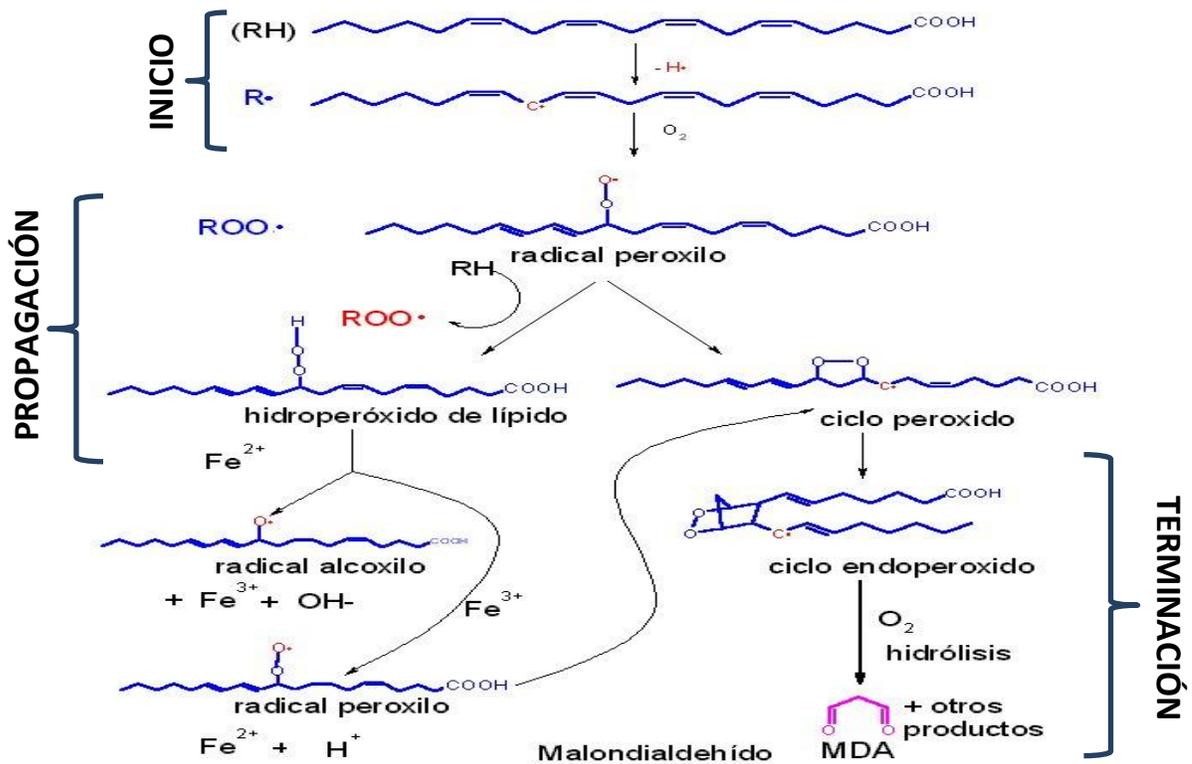
Un compuesto antioxidante es definido como cualquier sustancia que, cuando es aplicada en bajas concentraciones en un sustrato oxidable, disminuye significativamente o previene la oxidación de dicho sustrato (31). Este término ha sido aplicado a un amplio número de compuestos químicos en los campos de la nutrición y la farmacia, entre ellos se incluyen el β -caroteno, vitaminas E y C, y recientemente el selenio (32). En el cuerpo humano los radicales libres, en particular especies reactivas de oxígeno como el radical superóxido y el radical hidroxilo, entre otras, son producidos durante el metabolismo celular normal por oxidación. Los antioxidantes pueden ser sintetizados *in vivo* (enzimas antioxidantes) o tomados de la dieta (compuestos antioxidantes), con el fin de disminuir los efectos colaterales dañinos de dichas especies reactivas (33).

Los productos naturales juegan un papel importante como compuestos antioxidantes, destacando en particular los compuestos que presentan conjugación en sus estructuras como los derivados fenilpropanoides (coumarinas, flavonoides, entre otros) y algunos terpenos con grupos aromáticos como el carvacrol o el terpinoleno. Algunos aceites esenciales extraídos de plantas presentan actividad en la inhibición de la oxidación, siendo usados en la industria de la preservación de alimentos, aromaterapia y fragancias (34, 35, 36).

Existen diversas formas de medir la actividad antioxidante de un compuesto o grupo de compuestos, algunas metodologías se basan en métodos químicos colorimétricos o de fluorescencia para la identificación de productos intermediarios o finales del metabolismo, a continuación se describe el fundamento de las técnicas usadas en el presente trabajo de investigación:

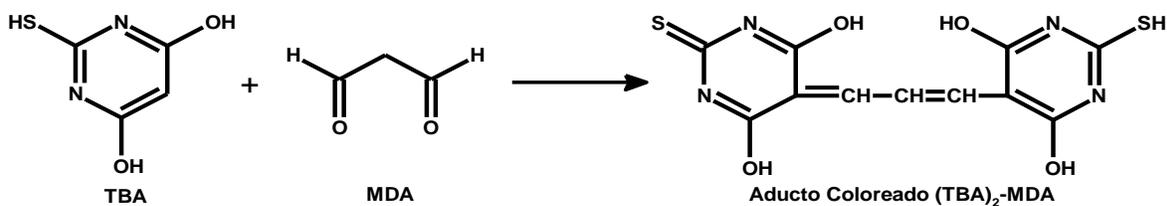
a) Inhibición de la Peroxidación de Lípidos

La peroxidación de lípidos es un proceso complejo tal como se muestra en el Esquema 3. En primera instancia (Fase de inicio), el compuesto insaturado reacciona con grupos oxidantes y oxígeno dimolecular mediante reacciones radicalarias formando el radical peroxilo que fácilmente propaga la reacción, provocando el rompimiento de las cadenas y la formación de alquenos, alcanos, cetonas y aldehídos de cadenas cortas, entre los que se destaca la presencia del malondialdehído (MDA) (37).



Esquema 3. Productos de la peroxidación de lípidos.

Existen diversas maneras de medir la peroxidación de lípidos y su inhibición. El ensayo por TBA (ácido tiobarbitúrico por sus siglas en inglés) o TBARS (sustancias reactivas al ácido tiobarbiturico), es uno de los métodos más antiguos y frecuentemente usado para medir el proceso de peroxidación; éste consiste en medir la cantidad de MDA y otras sustancias generadas por medio de su reacción con TBA (Esquema 4), formando un compuesto coloreado que en solución ácida absorbe luz a 532nm y presenta fluorescencia a 533nm (38).



Esquema 4. Generación del aducto coloreado entre TBA y MDA.

b) Capacidad Atrapadora del Radical DPPH

Otra manera de medir la capacidad total antioxidante de un compuesto es mediante su reacción con otras moléculas oxidantes o radicales libres que formen productos fácilmente detectables y medibles. En esta investigación se midió la actividad usando el radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH, Figura 7), el cual al ser reducido por la acción antioxidante (o atrapadora de radicales libres) del compuesto a probar, disminuye el valor de su absorbancia a 515nm (39).

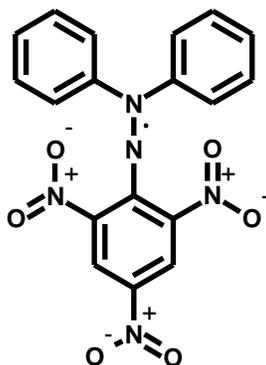


Figura 7. Estructura del Radical 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH).

1.3.2. Actividad Antiinflamatoria

Desde una visión general, la inflamación es una respuesta fisiológica-protectora al daño o destrucción de tejidos; es una compleja red de respuestas celulares coordinadas diseñadas para destruir, diluir o “amurallar” el estímulo nocivo y el tejido lastimado. La capacidad de desencadenar una reacción inflamatoria resulta esencial para la supervivencia, al estar en contacto el organismo vivo con patógenos ambientales y lesiones. Muchas teorías han sido presentadas con respecto a la iniciación de la respuesta inflamatoria. Primeramente, “la teoría humoral” argumenta que la respuesta inicial surge de la sangre y fluidos en los tejidos. La teoría alterna a la inflamación humoral, es la “teoría celular”, la cual soporta la idea que las células, que aparecen durante el proceso inflamatorio, son la principal protección del cuerpo contra infecciones microbianas (40, 41).

La inflamación es usualmente considerada el primer paso en el proceso curativo. Sin embargo, en algunas instancias el proceso antiinflamatorio llega a ser exagerado o prolongado, lo que resulta en posterior daño en el tejido. En estas situaciones, la inflamación se convierte en un cuadro clínico y requiere de tratamiento con compuestos o fármacos antiinflamatorios los cuales

interrumpen la respuesta inflamatoria del cuerpo. Estos compuestos inhiben la síntesis de prostaglandina por lo que los nociceptores (terminaciones nerviosas libres) no tienen que responder al dolor, estímulo irritante, y el edema en el tejido es resuelto (42).

La actividad biológica de los productos naturales ha sido reportada ampliamente en la literatura. En las plantas destacando a los alcaloides, fenilpropanoides, terpenoides y esteroides como los grupos con actividad significativa (43, 44). En sesquiterpenos, se han reportado mayoritariamente compuestos activos en el grupo de las lactonas de diversos esqueletos carbonados (45); para el tipo eudesmano se ha reportado compuestos que contienen grupos carboxilo en sus estructuras con altos valores de inhibición de la inflamación (46, 47).

Entender el comportamiento biológico de los compuestos con relación a sus estructuras y derivados es parte fundamental para su futura aplicación; esto remarca la importancia de este trabajo en el que se pretenden estudiar algunas de las características biológicas y estructuras de algunos terpenos tipo eudesmano, aislados de la planta mexicana *V. persicifolia*.

CAPÍTULO II.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVOS

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVOS

2.1. Planteamiento del Problema

Como se ha fundamentado en los antecedentes, se ha aislado e identificado una gran cantidad de compuestos sesquiterpénicos del género *Verbesina*, pero la investigación acerca de sus propiedades químicas y biológicas es poca, por lo que existe la necesidad de realizar estudios con el fin de ampliar el conocimiento en relación a estos campos. En este trabajo se propuso continuar con el estudio fitoquímico de la especie *V. persicifolia* con el fin de conocer y analizar la actividad biológica de algunos de sus compuestos en relación a su estructura.

2.2. Justificación

En la actualidad en los países desarrollados, los avances en la síntesis total de productos naturales con actividad biológica y la química combinatoria, han disminuido el valor de la investigación y el uso de los productos naturales como posibles fármacos en el tratamiento de enfermedades en seres humanos (48, 3). En Latinoamérica y otros países del mundo en desarrollo, la gran diversidad de recursos biológicos junto con su amplio conocimiento popular o etnofarmacológico, fortalece e incentiva la realización de trabajos investigativos con el fin de ampliar el conocimiento sobre la composición y el uso de los recursos naturales, en este caso particular las plantas.

La importancia de esta investigación se basa en buscar fuentes naturales, en este caso los compuestos terpénicos aislados *V. persicifolia*, para realizar estudios de relación estructura-actividad biológica, aprovechando el conocimiento de su acción farmacológica por medicina tradicional y fomentando el cultivo de estas plantas para su disposición.

2.3. Objetivos

2.3.1. Objetivo General

Estudiar la química y actividad biológica (antioxidante y antiinflamatoria) de compuestos terpénicos aislados de *V. persicifolia* y sus derivados, permitiendo aumentar el conocimiento científico sobre como se ve afectada la actividad de los compuestos con respecto a las modificaciones químicas estructurales realizadas.

2.3.2. Objetivos Particulares

- Extraer, purificar e identificar compuestos terpénicos en la planta.
- Evaluar la actividad biológica antioxidante y antiinflamatoria de los compuestos iniciales.

- Analizar los cambios en la actividad biológica por medio de la síntesis de derivados en los diferentes grupos funcionales de las moléculas.

CAPÍTULO III.

MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Material Vegetal

La recolección de las plantas fue realizada por la Licenciada en Biomedicina Ada Paulina Vázquez Candanedo en el municipio de Hueytamalco del Estado de Puebla, y fue identificada como *Verbesina persicifolia* DC con el folio número 975081, en el Herbario Nacional de México perteneciente al Instituto de Biología UNAM.

3.2. Métodos Cromatográficos

Los análisis de cromatografía en capa fina (CCF) fueron realizados usando placas de sílica gel 60 con indicador de fluorescencia a 254nm (Alugram® Sil-G/UV₂₅₄, Macherey-Nagel) de 0.20mm de espesor en soporte de aluminio.

La separación de compuestos por cromatografía preparativa en capa fina (CPCF), se realizaron usando placas de sílica gel 60 con indicador de fluorescencia a 254nm de 2.0mm de espesor en soporte de vidrio (CCM SIL G-200 UV254, Macherey-Nagel), generalmente cortadas de dimensiones 10 x 20cm.

La metodología de cromatografía de columna con vacío, se realizó usando gel de sílice de 200-400mesh (Macherey-Nagel), y columnas de vidrio con filtro de diferentes diámetros y dimensiones que fueron dispuestas a disposición de la cantidad de muestra a separar.

3.3. Reactivos Utilizados en las Reacciones de Modificación Química.

Todos los disolventes empleados (hexano, diclorometano, acetato de etilo, acetona) fueron destilados en columna vigreux previamente a su manejo.

Los reactivos usados para las diferentes reacciones se listan en orden alfabético a continuación:

- Ácido 4-bromobenzoico, 98%, Marca Aldrich-Chemistry
- Ácido *m*-cloroperbenzoico (*m*-CPBA), ≤77%, Marca Aldrich-Chemistry
- Ácido *trans*-cinámico, 97%, Marca Aldrich-Chemistry
- Anhídrido acético, 97% Para análisis, Marca Merck
- Cloruro de oxalilo, *Reagentplus*® ≥99%, Marca Aldrich-Chemistry
- Cloruro de tionilo, para síntesis, Marca Merck
- N,N'-Diciclohexilcarbodiimida (DCC), 99%, Marca Aldrich-Chemistry
- N,N-Dimetil-4-aminopiridina (DMAP), *Reagentplus*® 99%, Marca Aldrich-Chemistry
- Piridina anhidra, 99.8%, Marca Sigma-Aldrich

3.4. Análisis Instrumentales y Espectroscópicos

Todos los análisis fueron realizados en los laboratorios técnicos académicos de Espectrometría y Polarimetría, Espectrometría de Masas, Resonancia Magnética Nuclear y Cromatografía, pertenecientes al Instituto de Química UNAM. Los equipos y análisis usados se listan a continuación:

- Los análisis de infrarrojo fueron realizados en un equipo FT-IR Bruker Tensor 27, usando el método de dilución en CH₃Cl.
- La determinación de la rotación óptica se realizó en un polarímetro Perkin Elmer Modelo 343, usando lámpara de sodio y celdas de cuarzo.
- Los espectros de masas fueron obtenidos por el método de impacto electrónico usando un espectrómetro de masas Jeol JMS-AX505HA a 70 eV y una corriente de emisión de 100 μ Amp.
- Los análisis de resonancia magnética nuclear de los crudos de reacción se realizaron en un equipo de 200MHz (FT-NMR Varian Gemini 200) para experimentos de ¹H-RMN, y en un equipo de 300MHz (JEOL Eclipse 300) para experimentos de ¹H-RMN y ¹³C-RMN; los experimentos realizados a los compuestos y productos de reacción purificados (¹H, ¹³C, DEPT, COSY, NOESY, HSQC, HMBC) fueron tomados en los equipos Bruker Avance III de 400 MHz y Varian Unity Inova de 500 MHz; todos los experimentos fueron realizados usando CDCl₃ como disolvente y tetrametilsilano (TMS) como referencia interna.

Las abreviaciones usadas para la identificación de los picos y sistemas de multipletes fueron: singulete (s), singulete ancho (sa), doblete (d), doblete ancho (da), doble de dobles (dd), doble de triples (dt), doble de doble de dobles (ddd), doble de doble de doble de dobles (dddd).

- El análisis de cromatografía de gases acoplados a espectrometría de masas se realizó en un cromatógrafo Agilent Technologies 6890N, usando una columna Ultra-5 (Agilent), un flujo de helio (gas de arrastre) de 1mL/min, y un programa de temperatura que empezó a 30°C aumentando a 8°C/min hasta llegar a una temperatura final de 305°C; el detector acoplado fue un Espectrómetro de Masas Jeol JMS GCmate II.
- El análisis de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) se realizó en un cromatógrafo Hewlett-Packard Serie 1100, con un detector de arreglo de diodos, empleando una columna Synergy Max-RP, y un gradiente de disolventes así: inicial acetonitrilo/agua (40/60) por 20min y final acetonitrilo (100), todo a un flujo de 0.2mL/min.

3.5. Medidas y Pruebas de Actividad Biológica

Las pruebas de actividad biológica fueron realizadas en el Laboratorio de Pruebas Biológicas del Instituto de Química UNAM por el M. en C. Antonio Nieto Camacho, utilizando los protocolos que se describen a continuación:

3.5.1. Técnica para determinar el contenido de TBARS en cerebro de rata inducido con FeSO_4 10 μM (microensayo).

Disección y homogenizado del cerebro

- Anestesiarse a la rata con eter y sacrificar por dislocación cervical.
- Extraer el cerebro completo y colocarlo en solución salina 0.9 % fría (congelar a -70°C si no se va a trabajar inmediatamente).
- Lavar el cerebro con agua destilada para quitar restos de sangre.
- Pesar el cerebro y agregar 10 ml de solución amortiguadora de fosfatos (9.5 mM, pH= 7.4) por cada gramo de cerebro (10 ml/g).
- Homogenizar por 60 segundos.
- Centrifugar 10 min a 3000 rpm y recuperar el sobrenadante.

Cuantificación de proteínas por el método de Lowry y ajuste a la concentración deseada

- Tomar por duplicado 5 μL de sobrenadante y colocarlos en un pozo de la placa de 96.
- Agregar 20 μL de H_2O destilada.
- Agregar 150 μL de la siguiente mezcla, agitar muy bien e incubar 10 min a temperatura ambiente.

49 mL de Na_2CO_3 2 % en NaOH 0.1 N
0.5 mL de tartrato de Na/K 2 %
0.5 mL de CuSO_4 1 %

- Adicionar 25 μL de reactivo de Folin disuelto en agua (1:1). Mezclar bien, incubar 30 minutos a temperatura ambiente.
- Medir absorbancia a 540 nm y sustituir los valores en la fórmula para obtener el contenido de proteína en el homogenizado.

$$\text{proteína } \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}\right) = \left(\frac{A_{540\text{nm}} - 0.05012}{0.0028}\right) 40$$

- Ajustar el contenido de proteína a 2.666 mg/ml con solución amortiguadora de fosfatos (PBS, 9.5 mM, pH= 7.4).

$$V_2 = \frac{C_1 V_1}{C_2}$$

Inducción del estrés oxidativo con FeSO₄ 10 μM

- Trabajar todo en baño de hielo.
- Colocar por duplicado 375 μL de sobrenadante (2.666 mg prot/ml) en tubos Eppendorf de 1.5 ml.
- Agregar a todos los tubos 50 μL de EDTA 20 μM disuelto en PBS (concentración final 2 μM).
- Adicionar 25 μL de la muestra (20 veces más concentrada). Incubar 30 min a 37 °C con agitación.
- Agregar 50 μL de FeSO₄ 100 μM (concentración final 10 μM). Incubar 1 horas a 37 °C con agitación.
- Agregar 500 μL de reactivo TBA (Mezcla 1:1 de ácido tiobarbitúrico 0.5 % disuelto en NaOH 0.05 N y ácido tricloroacético al 30 %) e incubar 10 minutos en baño de hielo.
- Centrifugar 5 min a 12,000 rpm a temperatura ambiente. En esta técnica el botón es tan compacto que es difícil que se resuspenda.
- Incubar 30 minutos en baño de agua a 70-80 °C. Tapar y asegurar bien los tubos ya que en este paso se genera presión.
- Enfriar los tubos a temperatura ambiente y destaparlos para liberar la presión.
- Tomar por duplicado 200 μL de cada tubo y colocarlos en un pozo de la placa de 96 pozos.
- Medir absorbancia a 540 nm e interpolar los valores en la curva estándar para obtener la concentración de TBARS en solución.

$$TBARS (\mu M) = \frac{A_{540nm} + 0.00877}{0.07558}$$

3.5.2. Determinación de la Actividad Antioxidante (Reducción del Radical Libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo)

La actividad antioxidante de los compuestos puros, extractos o fracciones se realiza midiendo de manera indirecta la reducción del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) mediante una técnica espectrofotométrica.

Se toman por triplicado 50 μL de la solución problema a diferentes concentraciones (ppm, μg/ml o μM) y se depositan en una microplaca de 96 pozos, posteriormente se agregan 150 μL de una solución etanólica de DPPH 133.33 μM (concentración final 100 μM). La mezcla se protege de la luz y se agita durante 30 minutos a 37 °C, posteriormente se lee su absorbancia a 515 nm en lector de microplacas (Biotek ELx808). La actividad sobre el DPPH se expresa como porcentaje de reducción y se calcula con la fórmula:

$$\% \text{ de reducción} = (C - E / C) 100$$

En donde:

C= DO del control (DPPH 100 μ M)

E= DO del experimental (mezcla DPPH 100 μ M + compuesto problema)

3.5.3. Determinación de Actividad Antiinflamatoria por el Método de Edema en la Oreja de Ratón Inducido con Acetato de 12-O-tetradecanoilforbol (TPA)

El ensayo de edema inducido con acetato de 12-O-tetradecanoilforbol (TPA) se realizó empleando ratones macho de la cepa CD1 (25-30 g). Los animales (n= 5) se colocaron en cajas de acrílico transparente a temperatura constante de 24 °C, con un fotoperiodo de 12 horas luz/oscuridad y con agua y alimento *ad libitum*. Bajo anestesia general con pentobarbital sódico (31.5 mg/kg, IP), en la oreja derecha se aplicaron 10 μ l de una solución atenuada de TPA (0.25 mg/ml). Diez minutos después, en la misma oreja se aplica 1 μ mol del compuesto disueltos en 20 μ l del vehículo (metanol, etanol, acetona, diclorometano, acetato de etilo o mezcla de disolventes). La oreja izquierda (control) recibe solamente 10 μ L de etanol y 20 μ L del vehículo del compuesto. Cuatro horas después a la aplicación del TPA, los animales se sacrificaron con CO₂ para tomar una muestra de 7 mm de diámetro de ambas orejas. El incremento del peso de la muestra derecha con respecto a la izquierda representa el edema. La inhibición del edema se calcula con formula:

$$\% \text{ de Inhibición} = [(C-E) / C] 100$$

En donde

C= Edema del grupo control (tratado con TPA)

E= Edema del grupo experimental (TPA mas el compuesto)

Los resultados obtenidos se sometieron a un análisis de varianza de una vía (ANOVA), seguida de una prueba de Dunnett de comparación múltiple para aislar los grupos con diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0.05$).

CAPÍTULO IV.

SECCIÓN EXPERIMENTAL Y RESULTADOS

4. SECCIÓN EXPERIMENTAL Y RESULTADOS

4.1. Extracción y Purificación de Compuestos

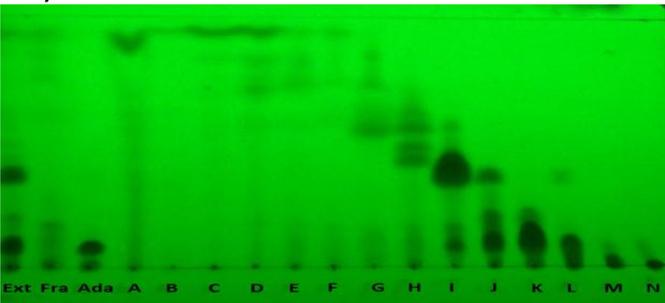
Para este trabajo se utilizó el extracto hexánico obtenido por el método de maceración de la hojas de *V. persicifolia*, usando 3 Kg de hojas frescas con un volumen aproximado de 5 L de hexano durante 24 horas, repitiendo la extracción con nuevo hexano dos veces, obteniendo al final un total de 60 g (2% rendimiento) de extracto hexánico concentrado.

El fraccionamiento del extracto hexánico (40 g) concentrado se realizó por cromatografía de columna con vacío usando gel de sílice como fase estacionaria, en una relación 1:3 (Sílice-Muestra), haciendo un gradiente ascendente de polaridad de eluyentes, recolectando fracciones y reuniéndolas de acuerdo a su similitud en cromatoplaaca en 14 fracciones codificadas de la A a la N (Esquema 5). En donde por su rendimiento y por presentar una sola mancha en la cromatoplaaca, se eligieron las fracciones **F** e **I**, como objetivos en la búsqueda de compuestos terpénicos de la planta y se procedió con su respectiva purificación.

a)

Fracción	Peso (g)	Rendimiento (%)
A	6.74	16.85
B	0.75	1.87
C	1.01	2.52
D	0.93	2.32
E	1.99	4.97
F	3.63	9.07
G	6.79	16.97
H	0.95	2.37
I	3.68	9.20
J	2.25	5.62
K	3.74	9.35
L	0.82	2.05
M	1.35	3.37
N	0.72	1.80

b)



c)



Ext Fra Ada A B C D E F G H I J K L M N

Esquema 5. Resultados columna cromatográfica del extracto hexánico de *V. persicifolia*: **a)** Rendimientos del fraccionamiento. **b)** Cromatoplaaca (Hex:AE 75:25) Rev. UV 240 nm. **c)** Cromatoplaaca (Hex:AE 75:25) Rev. Sulfato Cerico.

La fracción **F** (3.63 g) fue nuevamente adsorbida en gel de sílice para su purificación por cromatografía de columna, para al final obtener un total de 528 mg ($\approx 1\%$ Rendimiento en extracto) de una sola mancha en la cromatoplaque, la cual por análisis de cromatografía de gases/espectrometría de masas (Figura 8) fue confirmado como un compuesto mayoritario con m/z 222, el cual fue enviado a análisis espectroscópicos de resonancia magnética nuclear, infrarrojo, masas y rotación óptica. Identificando el **Compuesto 1** como (-)-(1 β , 7 α , 10 β)-(10 \rightarrow 1)*abeo*-eudesm-4,5-en-11-ol (Figura 9) no reportado en la literatura.

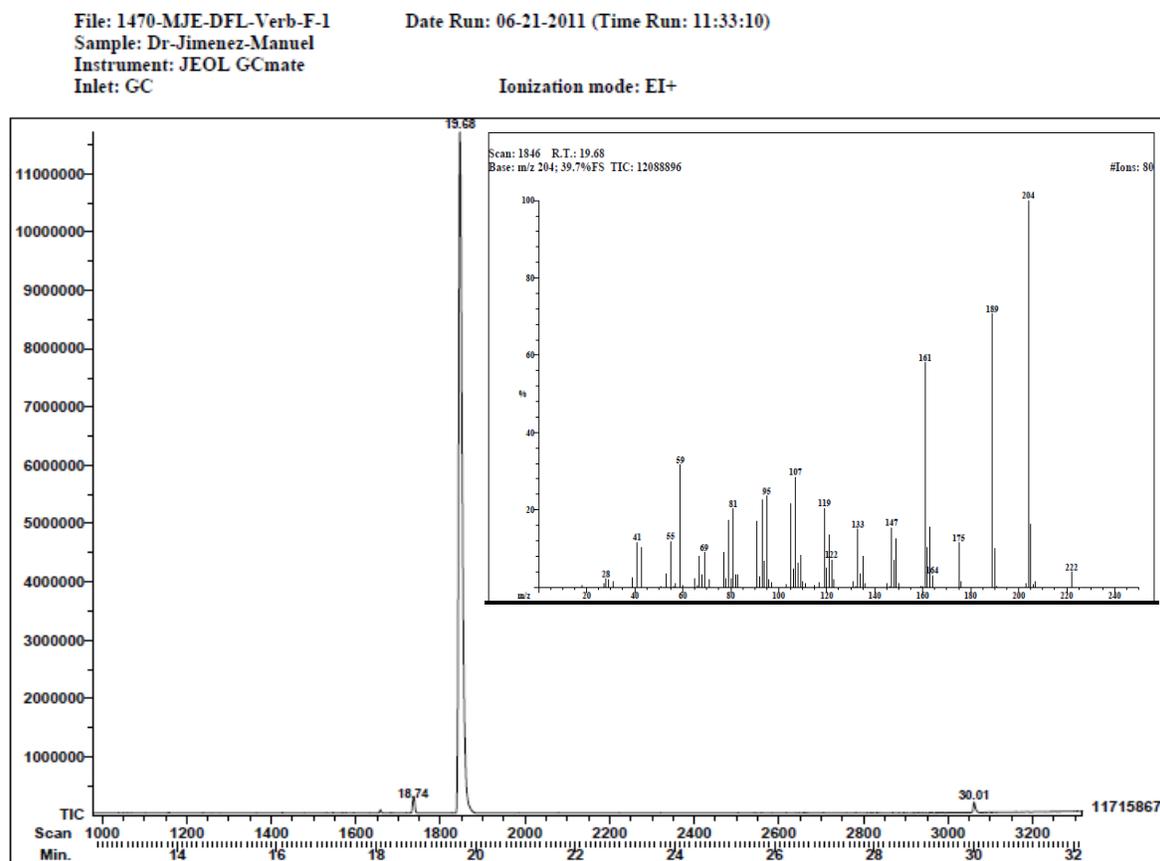


Figura 8. Cromatograma (CG/MS) y espectro de masas de fracción F purificada.

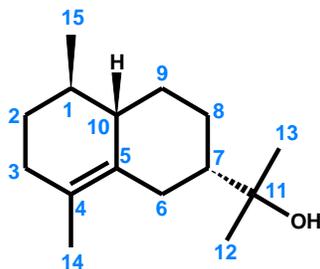


Figura 9. Estructura y numeración del Compuesto 1: (-)-(1 β , 7 α , 10 β)-(10 \rightarrow 1)*abeo*-eudesm-4,5-en-11-ol.

Los datos físicos y espectroscópicos obtenidos del Compuesto **1** se muestran a continuación, sus espectros se encuentran en el Anexo I, y su elucidación estructural es descrita en el Capítulo V, Sección 5.1.:

- Compuesto 1** (Rf: 0.72 Hex:AcOEt 70:30): Aceite Verde-Amarillo, C₁₅H₂₆O; $[\alpha]_D^{25}$ -18.72 (c 12.5, CH₂Cl₂); IR (CHCl₃) ν_{\max} 3453.42, 3008.53, 2967.89, 2929.06, 2864.68, 1724.27, 1633.82, 1461.26, 1374.68, 1235.46 cm⁻¹; ¹H RMN (CDCl₃, 400MHz) δ 2.63 - 2.56 (2.59, dd, J = 13.2, 2.0 Hz, H-6b), 2.22 - 2.16 (2.19, m, H-3), 2.18 - 2.10 (2.15, m, H-10), 2.05 - 1.98 (2.01, m, H-9b), 1.70 - 1.64 (1.67 m, H-6a), 1.68 - 1.63 (1.65, m, H-8b), 1.63 (dt, J = 1.9, 1.0 Hz, H-14), 1.55 - 1.50 (1.53, m, H-2), 1.55 - 1.48 (1.52, m, H-8a), 1.50 - 1.43 (1.46, m, H-7), 1.35 - 1.25 (1.30, m, H-9a), 1.30 - 1.23 (1.26, m, H-1), 1.19 (s, H-12, H-13), 0.92 (d, J = 6.7, H-15); ¹³C RMN (CDCl₃, 101MHz) δ 138.92 (C-5), 131.21 (C-4), 73.99 (C-11), 57.89 (C-10), 48.66 (C-7), 39.31 (C-1), 36.69 (C-3), 32.72 (C-2), 30.01 (C-9), 27.41 (C-13), 27.36 (C-8), 26.47 (C-6), 26.22 (C-12), 22.48 (C-15), 13.97 (C-14); MS-EI m/z 222 [M]⁺, 204 [M - H₂O]⁺, 189 [M - CH₅O]⁺, 175 [M - C₂H₇O]⁺, 161 [M - C₃H₉O]⁺, 147 [M - C₄H₁₁O]⁺, 133 [M - C₅H₁₃O]⁺, 119 [M - C₆H₁₅O]⁺.

La fracción I (3.68 g) fue al igual que F purificada por columna cromatográfica en gel de sílice, obteniendo 1270 mg (2.5% Rendimiento en extracto) de una mancha en cromatopla, la cual fue enviada a análisis de resonancia magnética nuclear, infrarrojo y masas, donde en el espectro de ¹H-RMN (Figura 10) se observa que la mancha corresponde a una mezcla de dos compuestos con grupos cinamato sustituyentes en proporción molar 57:43, calculado en relación a las integrales de los dobletes a 6.369 y 6.301 respectivamente.

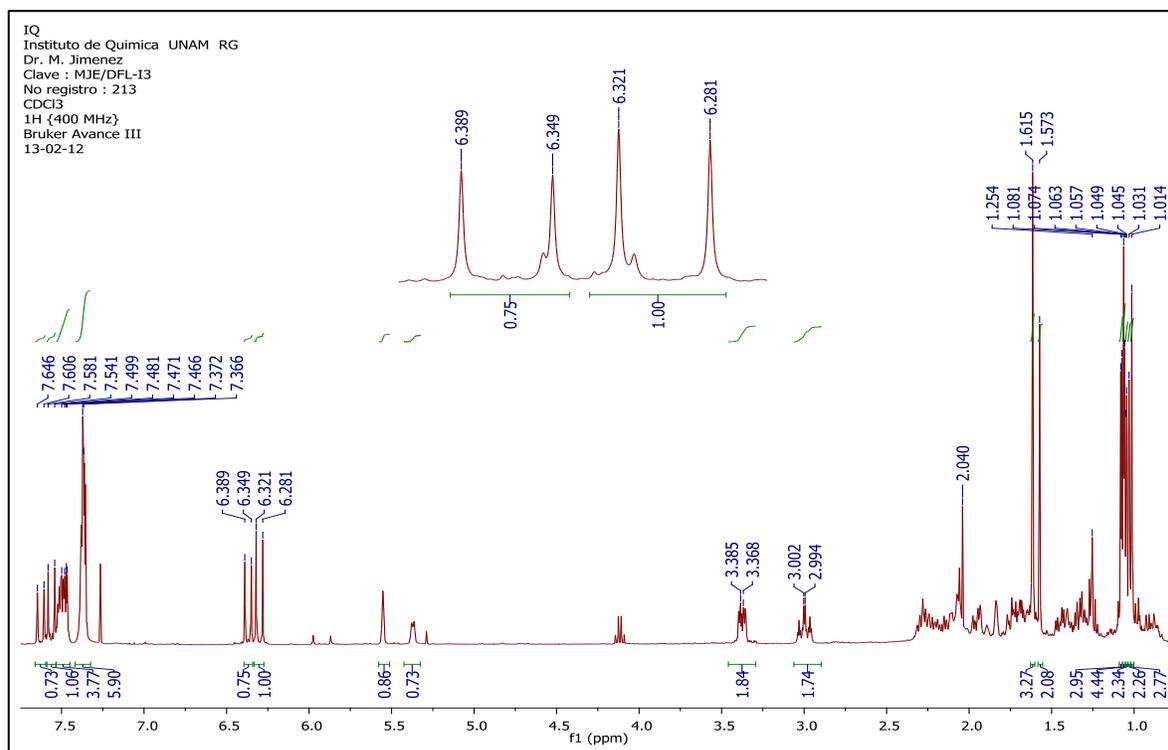


Figura 10. Espectro ¹H-RMN de la Fracción I purificada.

Para confirmar que se trataba de una mezcla, esta fue enviada a un análisis de HPLC (Figura 11), observándose en el cromatograma la presencia de dos compuestos.

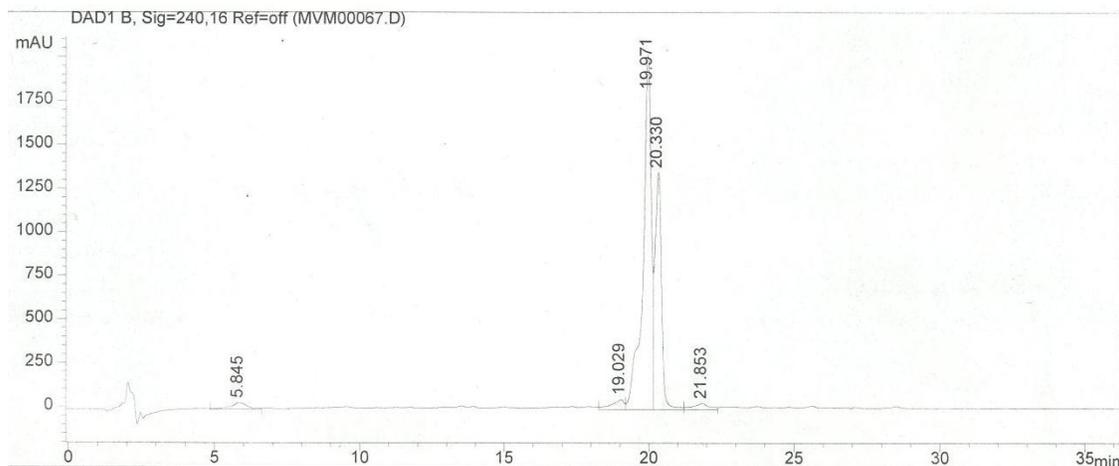


Figura 11. Cromatograma (HPLC) de la fracción I purificada.

La separación de los compuestos fue realizada por cromatografía en placa preparativa aplicando en una placa de 10 x 20 cm (distancia de recorrido 18.5 cm), 50 mg de la fracción purificada disueltos en diclorometano, usando una mezcla de hexano - acetato de etilo (70:30) como eluyente, observando una mancha visible de color verde seguida de una mancha observada bajo la lámpara ultravioleta (254 nm) la cuales fueron separadas, obteniendo al final 15mg y 10mg de los compuestos separados, los cuales fueron enviados a análisis de resonancia magnética nuclear, infrarrojo, masas y rotación óptica. Identificándolos como **Compuesto 2** (+)-4 β -Cinamoiloxi-1 β -Hidroxiudesm-6,7-eno y su isómero **Compuesto 3** (+)-4 β -Cinamoiloxi-1 β -Hidroxiudesm-7,8-eno (Figura 12).

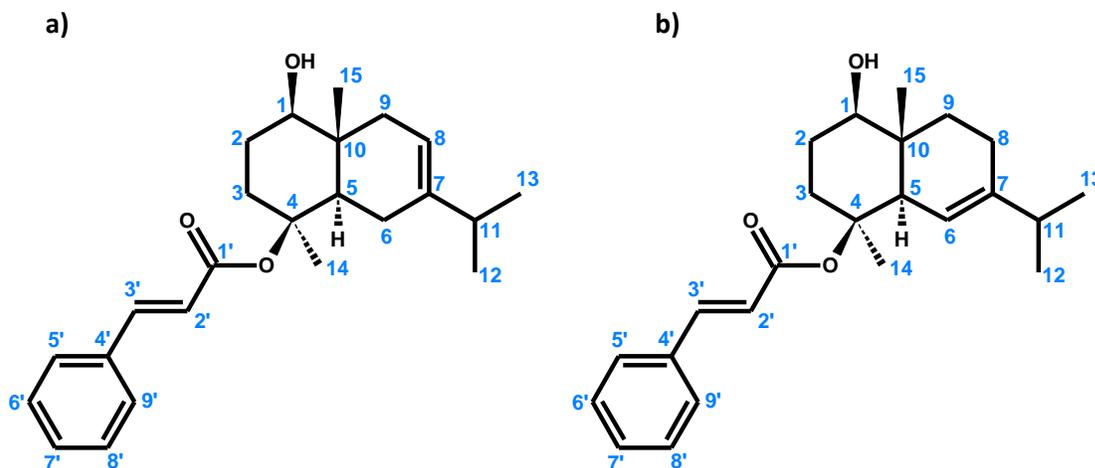


Figura 12. Estructuras y numeración de: **a)** Compuesto 2: (+)-4 β -Cinamoiloxi-1 β -Hidroxiudesm-6,7-eno.
b) Compuesto 3: (+)-4 β -Cinamoiloxi-1 β -Hidroxiudesm-7,8-eno.

Los datos físicos y espectroscópicos obtenidos de los compuestos **2** y **3** se muestran a continuación, la elucidación de las estructuras se muestra en el Capítulo V, Sección 5.3 y sus respectivos espectros se encuentran en el Anexo IV:

- Compuesto 2** (Rf: 0.42 Hex:AcOEt 70:30): Aceite Amarillo Pálido; $[\alpha]_D^{25} +1.08$ (c 5.7, CH₂Cl₂); **IR (CHCl₃)** ν_{\max} 3526.22, 3397.78, 3011.79, 2960.51, 2932.75, 2871.67, 1702.77, 1636.74, 1450.48, 1314.72, 1182.35, 1160.94, 980.69 cm⁻¹; **¹H RMN (CDCl₃, 500MHz)** δ 7.59 - 7.53 (7.56, d, *J* = 16.0 Hz, H-3'), 7.53 - 7.43 (7.49, m, H-5', H-9'), 7.42 - 7.32 (7.37, d, *J* = 4.1 Hz, H-6' - H-8'), 6.34 - 6.27 (6.30, d, *J* = 16.1 Hz, H-2'), 5.60 - 5.51 (5.56, sa, H-6), 3.43 - 3.31 (3.38, dd, *J* = 11.3, 4.4 Hz, H-1), 3.04 - 2.93 (2.99, dt, *J* = 15.0, 3.0 Hz, H-3a), 2.37 - 2.28 (2.32, dt, *J* = 23.0, 7.5 Hz, H-11), 2.15 - 2.07 (2.11, m, H-8a), 2.05 - 1.99 (2.04, d, *J* = 8.7 Hz, H-8b), 1.99 - 1.96 (1.97, d, *J* = 5.9 Hz, H-9a), 1.87 - 1.79 (1.81, m, H-5), 1.81 - 1.68 (1.74, m, H-2), 1.62 (s, H-14), 1.50 - 1.38 (1.43, ddd, *J* = 17.0, 13.8, 4.5 Hz, H-3b), 1.37 - 1.31 (1.33, dd, *J* = 11.6, 7.1 Hz, H-9b), 1.09 - 1.06 (1.07, dd, *J* = 6.8, 3.1 Hz, C¹²H₃, H-13), 1.02 (s, H-15); **¹³C RMN (CDCl₃, 125MHz)** δ 166.20 (C-1'), 144.10 (C-7), 144.05 (C-3'), 134.74 (C-4'), 130.21 (C-7'), 128.98 (C-6', C-8'), 128.11 (C-5', C-9'), 120.24 (C-2'), 116.39 (C-6), 82.02 (C-4), 78.36 (C-1), 52.21 (C-5), 38.53 (C-10), 35.72 (C-9), 35.28 (C-11), 33.74 (C-3), 27.16 (C-2), 24.60 (C-14), 22.86 (C-8), 21.91 (C-12), 21.77 (C-13), 12.36 (C-15); **MS-EI** m/z 367 [M - H]⁺, 236 [M - C₉H₈O]⁺, 220 [M - C₉H₈O₂]⁺, 203 [M - C₉H₈O₃]⁺, 147 [M - C₁₅H₂₄O]⁺, 131 [M - C₁₅H₂₅O₂]⁺.
- Compuesto 3** (Rf: 0.46 Hex:AcOEt 70:30): Aceite Verde; $[\alpha]_D^{25} +14.57$ (c 3.5, CH₂Cl₂); **IR (CHCl₃)** ν_{\max} 3528.67, 3014.61, 2932.33, 2871.84, 1702.77, 1636.83, 1450.41, 1315.40, 1176.64, 1025.58, 979.76 cm⁻¹; **¹H RMN (CDCl₃, 500MHz)** δ 7.69 - 7.58 (7.63, d, *J* = 16.0 Hz, H-3'), 7.57 - 7.46 (7.52, m, H-5', H-9'), 7.44 - 7.33 (7.38, d, *J* = 3.7 Hz, H-6' - H-8'), 6.42 - 6.33 (6.37, d, *J* = 16.0 Hz, H-2'), 5.41 - 5.35 (5.38, d, *J* = 5.1 Hz, H-8), 3.46 - 3.31 (3.38, dd, *J* = 10.8, 4.8 Hz, H-1), 3.09 - 2.97 (3.02, dt, *J* = 9.0, 1.8 Hz, H-3a), 2.35 - 2.28 (2.32, dd, *J* = 22.6, 9.6 Hz, H-6a), 2.31 - 2.23 (2.26, m, H-11), 2.22 - 2.10 (2.19, m, H-9a), 2.14 - 2.10 (2.12, m, H-6b), 1.96 - 1.87 (1.90, m, H-9b), 1.70 - 1.63 (1.66, m, H-2), 1.58 (s, H-14), 1.47 - 1.42 (1.44, dd, *J* = 14.0, 9.4 Hz, H-3b), 1.40 - 1.30 (1.35, ddd, *J* = 18.2, 14.8, 4.9 Hz, H-5), 1.06 (d, *J* = 7.0 Hz, H-12, H-13), 1.03 (s, H-15); **¹³C RMN (CDCl₃, 125MHz)** δ 166.06 (C-1'), 144.21 (C-3'), 142.15 (C-7), 134.66 (C-4'), 130.30 (C-7'), 129.01 (C-6', C-8'), 128.18 (C-5', C-9'), 120.07 (C-2'), 116.01 (C-8), 82.64 (C-4), 79.84 (C-1), 49.18 (C-5), 41.20 (C-9), 38.08 (C-10), 35.06 (C-11), 33.60 (C-3), 26.98 (C-2), 24.92 (C-14), 23.38 (C-6), 21.93 (C-12), 21.44 (C-13), 12.50 (C-15); **MS-EI** m/z 367 [M - H]⁺, 220 [M - C₉H₈O₂]⁺, 187 [M - C₁₀H₁₃O]⁺, 131 [M - C₁₅H₂₅O₂]⁺.

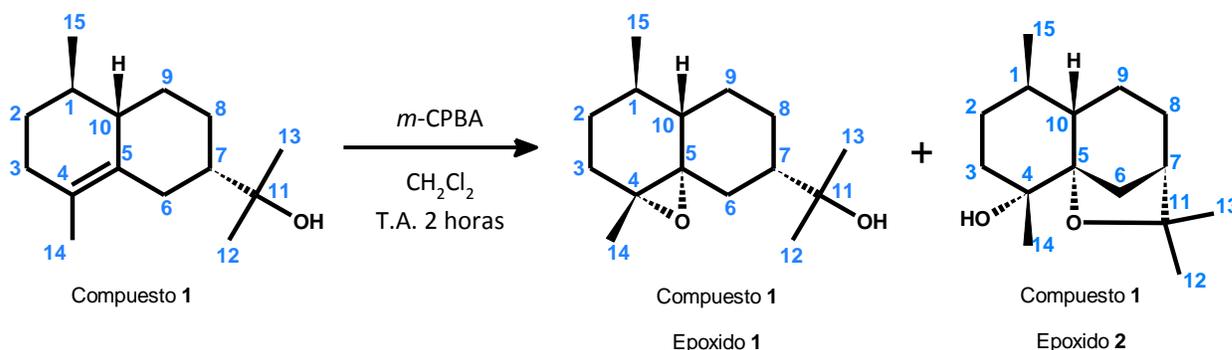
4.2. Reacciones de Modificación del Compuesto 1

La limitación estérica que provocan los grupos metílicos sobre el grupo hidroxilo en C-11, que impidió la realización modificaciones químicas sobre este grupo funcional, como acetilaciones y otras esterificaciones, es por esto que se decidió solo realizar la modificación sobre la doble ligadura.

4.2.1. Epoxidación

A 104 mg (1 mmol) de compuesto **1** disueltos en 15 mL de CH₂Cl₂ se agregaron 124 mg (1.5 mmol) de ácido *m*-cloroperbenzoico (*m*-CPBA por sus siglas en inglés), procediendo la reacción por dos horas a temperatura ambiente; posteriormente se lavó con soluciones acuosas de NaHSO₃ 10%, NaHCO₃ 10%, salmuera y agua hasta la obtener pH neutro en la fase acuosa; la fase orgánica fue separada y secada con Na₂SO₄ anhidro y concentrada obteniendo 109.9 mg de crudo de reacción el cual por análisis de cromatografía en capa fina se observó la presencia de dos compuestos de Rf 0.18 y 0.36 (Hex:AcOEt 70:30).

La purificación de los productos de reacción se realizó aplicando el crudo de reacción en una placa de cromatografía preparativa de 20 x 10 cm y una mezcla de hexano - acetato de etilo (60:40) como fase móvil, obteniendo dos productos de reacción identificados como Epóxido **1** (32 mg, 28.7% rendimiento) y Epóxido **2** (45 mg, 40.3% rendimiento) con las estructuras presentadas en el Esquema 6.



Esquema 6. Reacción de epoxidación del compuesto **1**.

Los datos físicos y espectroscópicos obtenidos de los compuestos obtenidos se muestran a continuación:

- **Compuesto 1 - Epóxido 1** (Rf: 0.33 Hex:AcOEt 70:30): Aceite Amarillo; IR (CHCl₃) ν_{\max} 3450.82, 2962.90, 2931.47, 1724.40, 1603.11, 1463.47, 1380.65, 1234.58, 859.56 cm⁻¹; ¹H RMN (CDCl₃, 400MHz) δ 2.00 - 1.90 (1.95, ddd, *J* = 13.8, 10.4, 0.8 Hz, H-6a), 1.85 - 1.78 (1.82, ddt, *J* = 13.3, 8.3, 1.2 Hz, H-3a), 1.78 - 1.69 (1.75, m, H-10), 1.68 - 1.63 (1.65, m, H-6b), 1.68 - 1.61 (1.64, ddd, *J* = 8.9, 6.8, 3.5 Hz, H-8a), 1.68 - 1.53 (1.60, m, H-7), 1.65 - 1.58 (1.62, m, H-3b), 1.64 - 1.52 (1.58, m, H-2), 1.54 - 1.46 (1.49, m, H-9a), 1.50 - 1.44 (1.47, m, H-8b), 1.43 (s, H-14), 1.40 - 1.32 (1.36, m, H-9b), 1.30 - 1.18 (1.24, m, H-1), 1.17 (s, H-13), 1.14 (s, H-12), 0.94 (d, *J* = 6.7 Hz, H-15); ¹³C RMN (CDCl₃, 101MHz) δ 73.76 (C-11), 73.16 (C-5), 69.29 (C-4), 52.53 (C-10), 44.48 (C-7), 33.63 (C-2), 33.38 (C-1), 31.75 (C-3), 29.54 (C-6), 27.85 (C-13), 27.47 (C-8), 25.59 (C-12), 24.85 (C-9), 23.47 (C-15), 16.31 (C-14); MS-EI m/z 238 [M]⁺, 221 [M - OH]⁺, 205 [M - CH₅O]⁺, 179 [M - C₃H₇O]⁺, 163 [M - C₄H₁₁O]⁺, 147 [M - C₄H₁₁O₂]⁺.

El espectro infrarrojo para este compuesto se encuentra en el Anexo II.

- Compuesto 1 - Epóxido 2** (Rf: 0.65 Hex:AcOEt 70:30): Aceite Amarillo-Verde; **IR (CHCl₃) v_{max}** 3547.81, 2957.03, 2929.54, 1726.97, 1602.84, 1458.73, 1360.15, 1234.65, 1151.92, 884.31 cm⁻¹; **¹H RMN (CDCl₃, 400MHz) δ** 2.64 - 2.56 (2.61, ddd, *J* = 12.7, 7.0, 1.6 Hz, H-6a), 2.03 - 1.98 (2.01, dt, *J* = 6.9, 3.5 Hz, H-7), 1.90 - 1.82 (1.86, ddd, *J* = 8.7, 7.2, 4.0 Hz, H-9a), 1.88 - 1.82 (1.85, m, H-8a), 1.76 - 1.67 (1.72, ddd, *J* = 14.6, 10.4, 4.0 Hz, H-2a), 1.66 - 1.60 (1.62, m, H-6b), 1.62 - 1.55 (1.59, m, H-3), 1.47 - 1.36 (1.44, m, H-1), 1.47 - 1.41 (1.43, m, H-10), 1.45 - 1.39 (1.42, m, H-2b), 1.45 - 1.35 (1.40, m, H-9b), 1.32 (s, H-14), 1.31 (s, H-13), 1.17 (s, H-12), 1.13 - 1.02 (1.07, m, H-8b), 0.87 (d, *J* = 6.1 Hz, H-15); **¹³C RMN (CDCl₃, 101MHz) δ** 93.19 (C-5), 81.73 (C-11), 79.00 (C-4), 52.11 (C-10), 45.62 (C-7), 39.69 (C-1), 34.91 (C-3), 33.61 (C-2), 31.48 (C-6), 31.20 (C-12), 30.78 (C-9), 24.87 (C-8, C-14), 23.12 (C-13), 22.62 (C-15); **MS-EI m/z** 238 [M]⁺, 223 [M - CH₃]⁺, 205 [M - CH₅O]⁺, 162 [M - CH₁₂O]⁺.

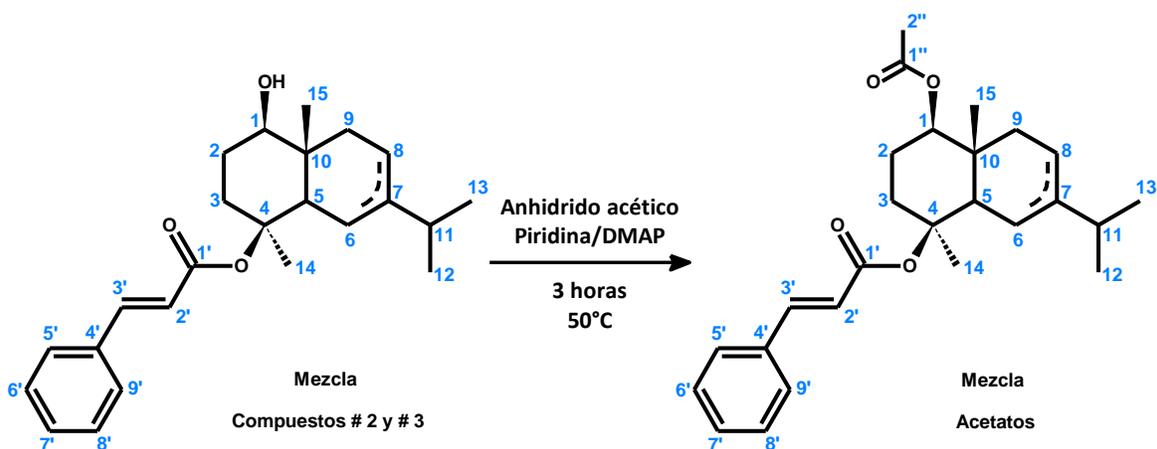
El espectro infrarrojo para este compuesto se encuentra en el Anexo III.

4.3. Reacciones de Modificación de la Mezcla de Compuestos 2 y 3

La complejidad en la separación y los bajos rendimientos obtenidos luego de la purificación de los compuestos 2 y 3 dificultó que se realizaran las modificaciones a los compuestos puros, por lo que se decidió que las modificaciones siguientes fueran realizadas a la mezcla de estos compuestos:

4.3.1. Acetilación

Esta reacción procedió de acuerdo al Esquema 7:



Esquema 7. Procedimiento de acetilación de la mezcla de compuestos 2 y 3.

A 107 mg (1 mmol) de la mezcla de compuestos, se agregó 1 mL de anhídrido acético, 3 mL de piridina y 15 mg de N,N-Dimetil-4-aminopiridina (DMAP); procediendo la reacción en agitación constante por 3 horas a 50°C, luego del tiempo de reacción se añadió agua y acetato de etilo para su extracción; la fase separada de acetato de etilo fue lavada con soluciones acuosas de HCl 10%, NaHCO₃ 10%, salmuera y agua hasta la obtención de pH neutro en la fase acuosa; la fase orgánica se separó y secó con Na₂SO₄ anhidro, obteniéndose 111 mg de crudo de reacción concentrado en

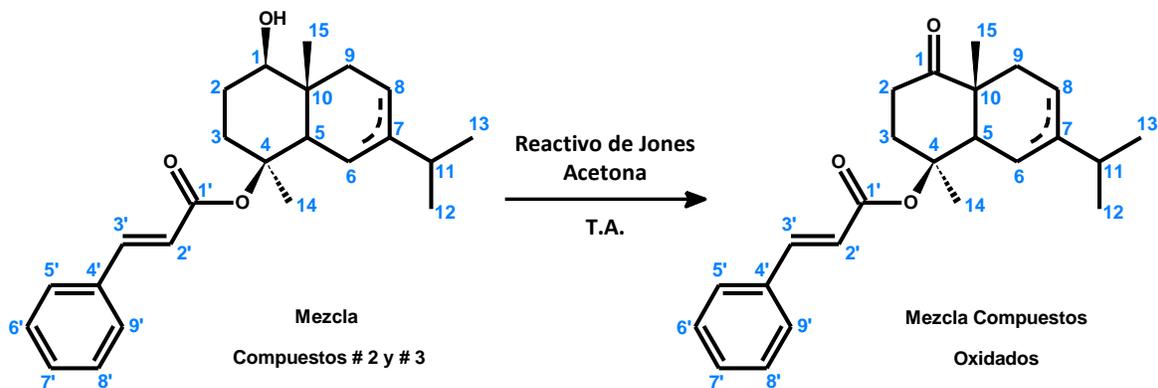
rotavapor, el cual fue aplicado a una placa de cromatografía preparativa de 20 x 10 cm y eluida en una mezcla de hexano - acetato de etilo (60:40), separando 71.2 mg (59.8% rendimiento de reacción) de producto purificado el cual presentó los siguientes datos físicos y espectroscópicos:

- **Mezcla Compuestos 2 y 3 - Acetilación** (Rf: 0.78 Hex:AcOEt 70:30): Aceite Amarillo, $C_{26}H_{34}O_4$; IR ($CHCl_3$) ν_{max} 2959.96, 2929.83, 1721.42, 1704.10, 1637.08, 1255.02, 1194.06, 1139.53 cm^{-1} ; 1H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.67 - 7.54 (7.60, dd, $J = 26.5, 16.0$ Hz, H-3'), 7.54 - 7.46 (7.50, ddd, $J = 13.4, 6.6, 2.8$ Hz, H-5', H-9'), 7.41 - 7.34 (7.37, m, H-6' - H-8'), 6.42 - 6.27 (6.34, dd, $J = 28.3, 16.0$ Hz, H-2'), 5.55 (sa, $\#_2H-6$), 5.32 (sa, $\#_3H-8$), 4.68 - 4.57 (4.63, dt, $J = 9.6, 4.9$ Hz, H-1), 3.10 - 2.92 (3.02, ddt, $J = 14.8, 11.8, 3.1$ Hz, H-3a), 2.34 - 2.26 (2.29, m, $\#_3H-8a$), 2.33 - 2.14 (2.24, m, H-11), 2.16 - 2.06 (2.09, m, $\#_2H-8a$), 2.05 (s, H-2''), 1.96 - 1.88 (1.92, da, $J = 14.6$ Hz, $\#_2H-5$), 1.92 - 1.85 (1.88, m, $\#_3H-9a$), 1.84 - 1.70 (1.76, m, H-2), 1.72 - 1.65 (1.67, m, $\#_2H-9a$), 1.63 (s, $\#_2H-14$), 1.59 (s, $\#_3H-14$), 1.58 - 1.38 (1.47, dddd, $J = 16.0, 10.9, 7.5, 4.2$ Hz, H-3b), 1.46 - 1.35 (1.40, m, $\#_3H-5$), 1.36 - 1.23 (1.29, m, $\#_2H-9b$), 1.07 (dd, $J = 6.9, 2.4$ Hz, H-12, H-13), 1.04 (d, $J = 1.0$ Hz, H-15); ^{13}C RMN (101 MHz, $CDCl_3$) δ 171.14 - 171.01 (C-1''), 166.13 - 165.98 (C-1'), 144.27 ($\#_3C-3'$), 144.10 ($\#_2C-7, \#_2C-3'$), 142.05 ($\#_3C-7$), 134.70 - 134.61 (C-4'), 130.31 - 130.23 (C-7'), 128.99 - 128.98 (C-6', C-8'), 128.16 - 128.10 (C-5', C-9'), 120.15 - 119.96 (C-2'), 116.00 ($\#_2C-6$), 115.74 ($\#_3C-8$), 82.33 - 81.75 (C-4), 81.10 - 79.87 (C-1), 52.35 ($\#_2C-5$), 49.34 ($\#_3C-5$), 40.83 ($\#_3C-9$), 37.45 - 37.03 (C-10), 35.63 ($\#_2C-9$), 35.20 - 34.99 (C-11), 33.43 - 33.29 (C-3), 24.79 - 24.50 (C-14), 23.60 - 23.44 (C-2), 23.20 ($\#_3C-6$), 22.75 ($\#_2C-8$), 21.88 - 21.86 (C-12), 21.72 - 21.40 (C-13), 21.35 (C-2''), 13.60 - 13.41 (C-15); MS-EI m/z 410 $[M]^{+*}$, 351 $[M - C_2H_3O_2]^+$, 262 $[M - C_9H_7O_2]^+$, 219 $[M - C_{11}H_{11}O_3]^+$, 202 $[M - C_{11}H_{12}O_4]^+$, 187 $[M - C_{12}H_{15}O_4]^+$, 159 $[M - C_{14}H_{19}O_4]^+$, 131 $[M - C_{17}H_{27}O_3]^+$.

La relación molar de la mezcla calculada por medio de las integrales en el espectro de 1H -RMN para las señales a 6.308 (Compuesto # 2, doblete, C^2H) y 6.379 (Compuesto # 3, doblete, C^2H), es de 55:45 (#2:#3). En la Sección 5.4 se muestra el análisis espectroscópico de las estructuras; espectros realizados al producto de reacción se encuentran en el Anexo V, y el análisis de sus asignaciones en el Capítulo V, Sección 5.4.1.

4.3.2. Oxidación

Esta reacción procedió de acuerdo al Esquema 8:



Esquema 8. Procedimiento de oxidación de la mezcla de compuestos # 2 y # 3.

Se tomaron 100 mg (1 mmol) de la mezcla de compuestos y se disolvieron en 10 mL de acetona, posteriormente se agregó (gota a gota) el reactivo de Jones ($\text{CrO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$) hasta un total de 5 gotas donde la solución viró a color verde/azul intenso que indicó el final de la oxidación. Se agregó agua y acetato de etilo, la fase de acetato de etilo fue extraída y lavada en repetidas ocasiones con agua hasta pH neutro en la fase acuosa; La fase orgánica se separó y secó con Na_2SO_4 y posteriormente se rota evaporó obteniendo 92 mg de crudo de reacción.

La reacción fue purificada en placa de cromatografía preparativa de 20 x 10 cm usando un sistema de hexano - acetato de etilo (70:30) como eluyente, separando un total de 70 mg (70.3% rendimiento de reacción) de la mezcla de compuestos oxidados, que presentaron los datos físicos y espectroscópicos a continuación:

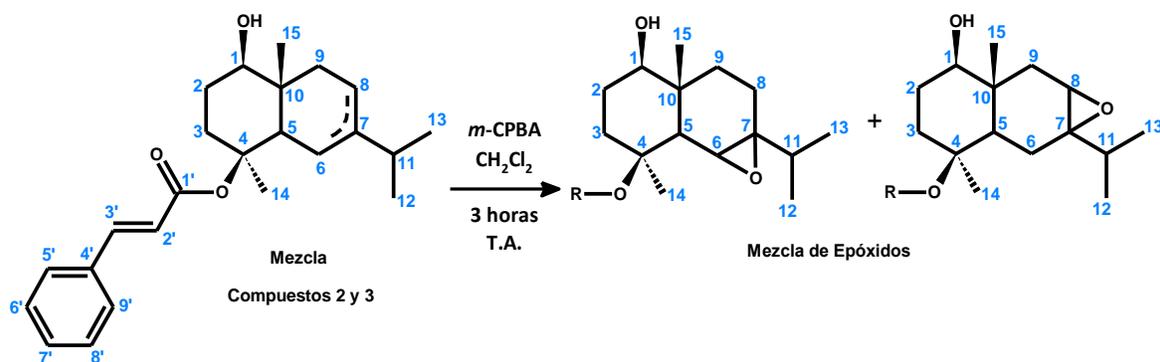
- Mezcla Compuestos 2 y 3 - Oxidación** (Rf: 0.75 Hex:AcOEt 70:30): Aceite Amarillo Pálido; **IR** (CHCl_3) ν_{max} 3030.40, 2963.15, 2930.73, 1705.49, 1636.56, 1232.98, 1201.34, 1174.72 cm^{-1} ; **^1H RMN (400 MHz, CDCl_3)** δ 7.73 - 7.57 (7.65, dd, $J = 34.7, 16.0$ Hz, H-3'), 7.57 - 7.46 (7.51, m, H-5', H-9'), 7.43 - 7.35 (7.39, m, H-6' - H-8'), 6.46 - 6.32 (6.39, dd, $J = 35.8, 16.0$ Hz, H-2'), 5.58 (dda, $J = 1.7, 0.8$ Hz, $\#_3\text{H-8}$), 5.38 (da, $J = 5.8$ Hz, $\#_2\text{H-6}$), 3.32 - 3.24 (3.27, ddd, $J = 14.7, 5.3, 3.1$ Hz, H-3a), 2.83 - 2.72 (2.78, m, H-3b), 2.50 - 2.38 (2.35, m, $\#_3\text{H-6a}$), 2.35 - 2.30 (2.32, m, $\#_2\text{H-5}$), 2.30 - 2.19 (2.24, m, H-11), 2.20 - 2.09 (2.15, m, $\#_2\text{H-8a}$), 2.06 - 1.95 (2.00, m, $\#_2\text{H-9a}$), 1.99 - 1.89 (1.93, m, H-2a), 1.85 - 1.79 (1.82, m, $\#_3\text{H-6b}$), 1.80 - 1.73 (1.77, m, $\#_3\text{H-9a}$), 1.77 - 1.72 (1.73, m, $\#_3\text{H-5}$), 1.74 - 1.64 (1.69, ss, H-14), 1.60 - 1.47 (1.53, m, H-2b), 1.29 - 1.22 (1.26, m, H-15), 1.11 - 1.01 (1.08, ddd, $J = 8.3, 6.9, 1.8$ Hz, H-12, H-13); **^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3)** δ 215.53 - 215.22 (C-1), 166.14 - 166.09 (C-1'), 144.95 (C-3'), 144.67 ($\#_2\text{C-7}$), 144.59 (C-3'), 141.57 ($\#_3\text{C-7}$), 134.48 - 134.37 (C-4'), 130.53 - 130.42 (C-7'), 129.04 - 129.03 (C-6', C-8'), 128.23 - 128.13 (C-5', C-9'), 119.70 - 119.31 (C-2'), 116.16 ($\#_2\text{C-6}$), 115.56 ($\#_3\text{C-8}$), 81.83 - 81.29 (C-4), 52.14 - 50.89 (C-5), 46.44 - 46.17 (C-10), 35.85 - 35.13 (C-9), 35.10 - 34.92 (C-11), 34.49 - 34.31 (C-3), 31.09 - 31.03 (C-2), 24.14 - 24.08 (C-14), 23.89 ($\#_3\text{C-6}$), 22.93 ($\#_2\text{C-8}$), 21.89 (C-12), 21.78 - 21.37 (C-13), 19.29 - 18.16 (C-15); **MS-EI** m/z 366 $[\text{M}]^+$, 219 $[\text{M} - \text{C}_9\text{H}_7\text{O}_2]^+$, 203 $[\text{M} - \text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{O}_2]^+$, 131 $[\text{M} - \text{C}_{15}\text{H}_{23}\text{O}_2]^+$.

La relación molar de la mezcla calculada por medio de las integrales en el espectro de ^1H -RMN para las señales a 6.346 ppm (Compuesto 2, doblete, C^2H) y 6.435 ppm (Compuesto 3, doblete,

C²H) es de 42:58 (**2:3**). Los espectros para el producto purificado se encuentran en el Anexo VI, y su interpretación y asignación en la Sección 5.4.2, Capítulo V.

4.3.3. Epoxidación

Al igual que para el compuesto **1**, esta reacción siguió el procedimiento como se muestra en el Esquema 9:



Esquema 9. Procedimiento de epoxidación de la mezcla de compuestos **2** y **3**.

A 100 mg (1 mmol) de la mezcla de compuestos disueltos en 15 mL de CH₂Cl₂ se agregaron 200 mg (4.2 mmol) de *m*-CPBA, procediendo la reacción por dos horas a temperatura ambiente; posteriormente la fase orgánica fue lavada con soluciones acuosas de NaHSO₃ 10%, NaHCO₃ 10%, salmuera y agua hasta la obtener pH neutro en la fase acuosa; la fase orgánica fue separada y secada con Na₂SO₄ anhidro y concentrada obteniendo 98.7 mg de crudo de reacción.

La purificación de los productos de reacción se realizó aplicando el crudo de reacción en una placa de cromatografía preparativa de 20 x 10 cm y una mezcla de hexano - acetato de etilo (25:75) como fase móvil, obteniendo un total de 52 mg (49.5% rendimiento) de la mezcla de epóxidos que presentó los siguientes datos espectroscópicos:

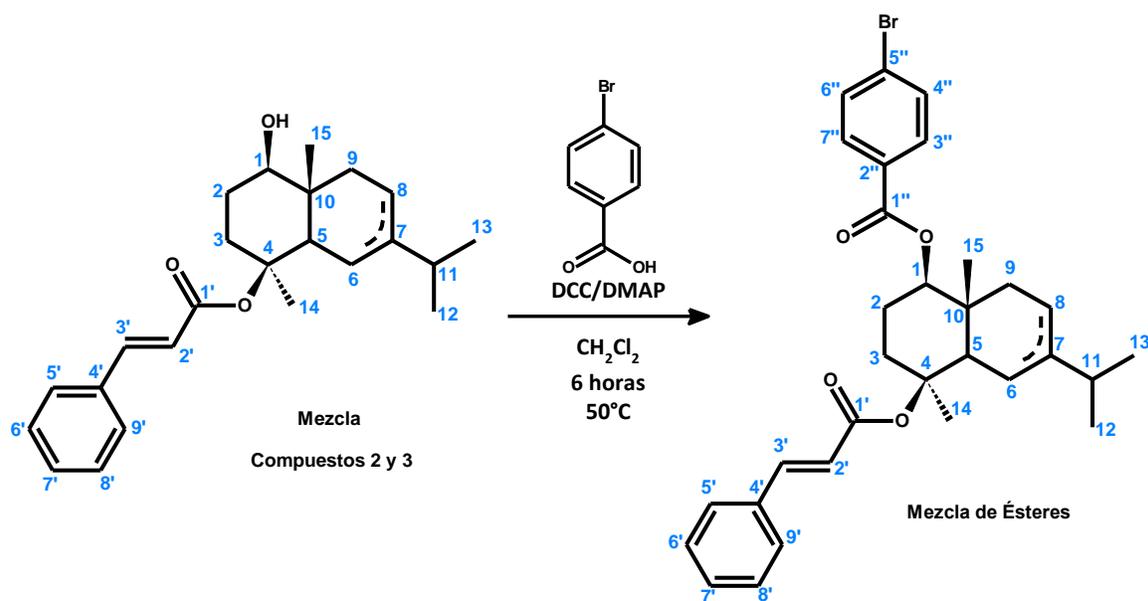
- Mezcla Compuestos 2 y 3 - Epoxidación** (Rf: 0.18 Hex:AcOEt 70:30): Aceite Amarillo Palido, C₂₄H₃₀O₃; ; IR (CHCl₃) ν_{max} 3609.76, 3500.62, 2963.60, 2940.11, 2875.72, 1703.54, 1637.03, 1450.23, 1313.21, 1179.69, 1024.18, 979.45 cm⁻¹; ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 7.73 - 7.59 (7.65, dd, *J* = 37.7, 16.0 Hz, H-3'), 7.56 - 7.49 (7.52, m, H-5', H-9'), 7.42 - 7.36 (7.39, m, H-6' - H-8'), 6.47 - 6.32 (6.39, dd, *J* = 42.2, 16.0 Hz, H-2'), 5.46 (sa, #₂H-6), 3.31 - 3.25 (3.27, m, H-1), 3.02 - 2.99 (3.01, da, *J* = 6.1 Hz, #₃H-8), 3.02 - 2.96 (2.99, m, #₃H-3a), 2.16 - 2.09 (2.13, m, #₃H-9a), 2.08 - 1.97 (2.02, m, #₃H-6), 1.95 - 1.85 (1.90, dt, *J* = 24.1, 5.3 Hz, H-2a), 1.87 - 1.81 (1.84, dt, *J* = 15.6, 5.0 Hz, #₂H-8a), 1.79 - 1.73 (1.76, m, #₂H-9a), 1.77 - 1.71 (1.74, m, #₂H-11), 1.71 - 1.64 (1.67, m, #₂H-5), 1.67 - 1.61 (1.65, m, #₂H-3a), 1.62 - 1.56 (1.59, m, #₃H-11), 1.59 - 1.56 (1.57, m, #₃H-9b), 1.55 (s, #₃H-14), 1.57 - 1.52 (1.51, m, #₂H-3b), 1.55 - 1.47 (1.50, m, #₂H-9b), 1.43 (s, #₂H-14), 1.40 - 1.34 (1.37, m, #₃H-3b), 1.33 (s, #₂H-15), 1.31 - 1.23 (1.27, m, #₃H-5), 1.10 - 1.06 (1.07, dd, *J* = 6.9, 2.5 Hz, #₃H-12, #₃H-13), 1.05 (s, #₃H-15), 0.94 - 0.89 (0.91, dd, *J* = 6.0, 6.0 Hz, #₂H-12, #₂H-13); ¹³C RMN (126 MHz, CDCl₃) δ 166.74 - 165.76 (C-1'), 145.50 - 144.32 (C-3'), 134.53 - 134.41 (C-4'), 130.54 - 130.38 (C-7'), 129.03 - 128.99

(C-6', C-8'), 128.33 - 128.14 (C-5', C-9'), 119.86 - 118.52 (C-2'), 83.03 (#3C-4), 80.47 - 79.50 (C-1), 74.25 (#2C-7), 72.53 (#2C-6), 72.12 (#2C-4), 64.35 (#3C-7), 56.55 (#3C-8), 46.98 - 45.11 (C-5), 41.19 (#2C-3), 40.40 (#3C-9), 38.89 - 37.33 (C-10), 35.25 (#3C-11), 34.39 (#2C-9) - 33.50 (#3C-3), 32.69 (#2C-11), 29.88 (#2C-14), 27.76 (#2C-8), 26.89 - 26.83 (C-2), 24.81 (#3C-14), 20.32 (#3C-6), 18.60 - 18.02 (#3C-12, #3C-13), 16.37 - 16.11 (#2C-12, #2C-13), 13.31 - 13.26 (C-15); **MS-EI** m/z 384 [M + 1]⁺, 367 [M - OH]⁺, 236 [M - C₉H₈O₂]⁺, 219 [M - C₉H₉O₃]⁺, 175 [M - C₁₂H₁₇O₃]⁺, 136 [M - C₁₅H₂₀O₃]⁺, 131 [M - C₁₅H₂₅O₃]⁺.

La relación molar de la mezcla calculada por medio de las integrales en el espectro de ¹H-RMN para las señales a 6.346 (Compuesto **2**, doblete, C^{2'}H) y 6.430 (Compuesto **3**, doblete, C^{2'}H) es de 50:50 (**2:3**). Los espectros del producto purificado se encuentran en el Anexo VII, y su análisis se encuentra consignado en la Sección 5.4.3, Capítulo V.

4.3.4. Esterificación con Acido *p*-Bromobenzoico

Esta reacción se efectuó como se muestra en el Esquema 10:



Esquema 10. Procedimiento de esterificación con ácido *p*-bromobenzoico de la mezcla de compuestos **2** y **3**.

Para llevar a cabo esta reacción se disolvieron 100 mg (1 mmol) de la mezcla de compuestos en 15 mL de CH₂Cl₂, a esta mezcla se agregó 300 mg (2 mmol) de ácido *p*-bromobenzoico, 300 mg (5.3 mmol) de N,N'-diclohexilcarbodiimida (DCC) y 50 mg (1.5 mmol) de N,N-dimetil-4-aminopiridina (DMAP) y se sometió a calentamiento a reflujo a 50°C y agitación constante por 6 horas, observándose la formación de precipitado color blanco descrito en la bibliografía (49) como N,N'-diclohexilurea, el balón de reacción fue enfriado en baño de hielo para promover la precipitación de la urea y luego esta fue filtrada por gravedad y el residuo filtrado fue lavado con solución acuosa de NaHCO₃ 10%, salmuera y agua hasta obtener pH neutro en la fase acuosa.

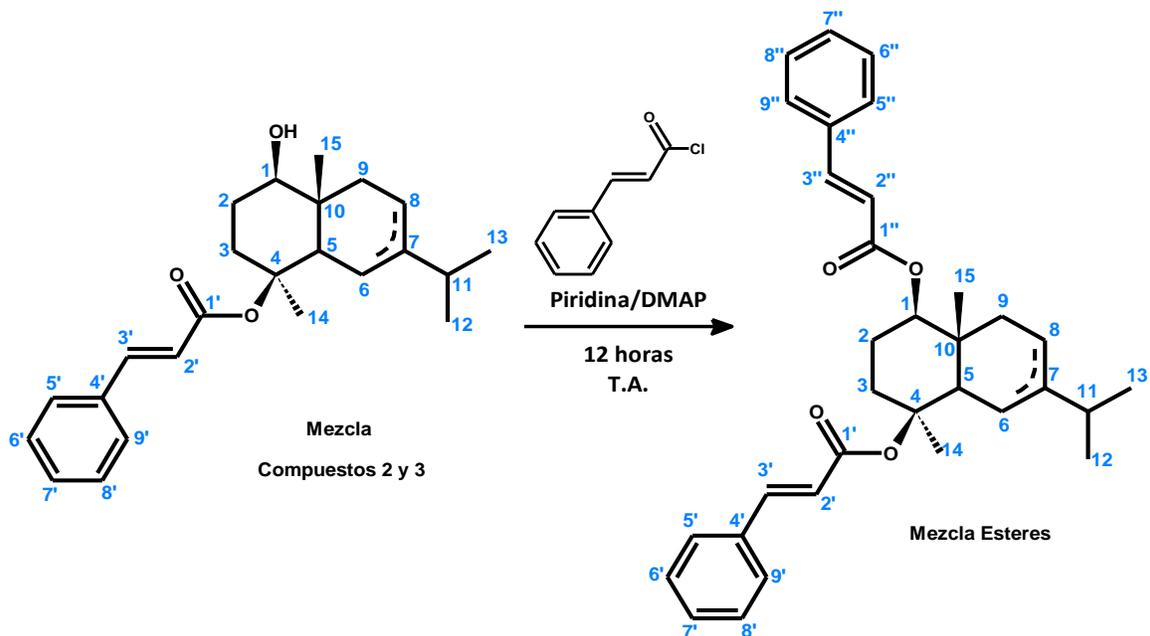
La fase orgánica separada se secó con Na₂SO₄ y se concentró cuidadosamente sumergiendo en repetidas ocasiones el balón en baño de hielo para promover la formación de nuevos cristales de urea que fueron retirados por filtración, para así obtener al final 60 mg de crudo de reacción libre de urea, el cual fue aplicado a una placa de cromatografía preparativa de 20 x 10cm y eluida con una mezcla de hexano - acetato de etilo (60:40), separando 31 mg (21.3% rendimiento) del compuesto esterificado de interés con los siguientes datos físicos y espectroscópicos:

- Mezcla Compuestos 2 y 3 - Esterificación Ac. p-Bromobenzoico** (Rf: 0.86 Hex:AcOEt 70:30): Aceite Amarillo Pálido, C₃₁H₃₅BrO₄; ; **IR (CHCl₃) v_{max}** 3017.30, 2959.94, 2929.49, 1707.21, 1636.97, 1591.26, 1273.82, 1116.41, 1013.70, 982.01 cm⁻¹; **¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ** 7.92 - 7.86 (7.89, m, H-4'', H-6''), 7.69 - 7.58 (7.62, m, H-3'), 7.59 - 7.55 (7.57, m, H-3'', H-7''), 7.54 - 7.48 (7.51, ddd, J = 13.3, 5.9, 3.8 Hz, H-5', H-9'), 7.42 - 7.36 (7.38, m, H-6' - H-8'), 6.44 - 6.31 (6.37, dd, J = 28.4, 16.0 Hz, H-2'), 5.58 (sa, #₂H-6), 5.31 (sa, #₃H-8), 4.92 - 4.84 (4.88, m, H-1), 3.18 - 3.01 (3.08, ddt, J = 15.4, 12.4, 3.4 Hz, H-3a), 2.37 - 2.18 (2.26, m, H-11), 2.24 - 2.17 (2.20, dd, J = 16.0, 8.0 Hz, #₃H-6a), 2.08 - 2.01 (2.05, m, #₂H-5), 2.06 - 1.98 (2.02, m, #₂H-8b), 2.00 - 1.95 (1.96, d, J = 9.8 Hz, #₃H-9a), 1.85 - 1.76 (1.81, m, H-2), 1.71 - 1.68 (1.69, m, #₂H-9a), 1.66 - 1.62 (s, H-14), 1.60 - 1.53 (1.57, ddd, J = 11.8, 8.6, 4.0 Hz, H-3b), 1.58 - 1.49 (1.54, m, #₃H-5), 1.40 - 1.37 (1.38, m, #₂H-9b), 1.25 - 1.22 (s, H-15), 1.10 - 1.04 (1.07, m, H-12, H-13); **¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃) δ** 166.14 - 165.99 (C-1'), 165.71 - 165.61 (C-1''), 144.39 (#₂C-7, #₂C-3'), 144.21 (#₃C-3'), 142.14 (#₃C-7), 134.68 - 134.59 (C-4'), 131.83 (C-3'', C-7''), 131.23 (C-4'', C-6''), 130.38 - 130.30 (C-7'), 129.71 (C-2''), 129.03 - 129.02 (C-6', C-8'), 128.20 - 128.13 (C-5', C-9'), 128.09 (C-5''), 120.11 - 119.91 (C-2'), 115.93 (#₂C-6), 115.67 (#₃C-8), 82.29 - 82.08 (C-4), 81.72 - 80.79 (C-1), 52.38 (#₂C-5), 49.38 (#₃C-5), 41.02 (#₃C-9), 37.87 - 37.44 (C-10), 35.83 (#₂C-9), 35.22 - 34.99 (C-11), 33.44 - 33.30 (C-3), 24.79 - 24.50 (C-14), 23.69 - 23.52 (C-2), 23.25 (#₃C-6), 22.76 (#₂C-8), 21.89 - 21.87 (C-12), 21.73 - 21.44 (C-13), 13.99 - 13.79 (C-15); **MS-EI m/z** 550 [M-H]⁺, 402 [M - C₉H₉O₂]⁺, 351 [M - C₇H₄BrO₂]⁺, 202 [M - C₁₆H₁₃BrO₄]⁺, 184 [M - C₂₄H₃₁O₃]⁺, 159 [M - C₁₉H₂₀BrO₄]⁺, 131 [M - C₂₂H₂₈BrO₃]⁺.

La relación molar de la mezcla calculada por medio de las integrales en el espectro de ¹H-RMN para las señales a 6.335 (Compuesto **2**, doblete, C²H) y 6.406 (Compuesto **3**, doblete, C²H) es de 53:47 (**2:3**). Los espectros tomados al producto de reacción purificado se encuentran en el Anexo VIII con los que realizó su análisis y asignación como se encuentra en la Sección 5.4.4, Capítulo V.

4.3.5. Esterificación con Acido Cinámico

En primera instancia se realizaron pruebas para esterificar la mezcla de compuestos de la misma forma que para con el ácido p-bromobenzoico usando DCC/DMAP como catalizadores pero esta no generó la mezcla de esteres esperada; es por esto que se realizó un nuevo procedimiento de esterificación como se muestra en el Esquema 11:



Esquema 11. Procedimiento de esterificación con ácido cinámico de la mezcla de compuestos **2** y **3**.

El primer paso para llevar a cabo la reacción fue la preparación *in situ* del cloruro de cinamoilo, para esto se pesaron 200 mg (2.48 mmol) de ácido *trans*-cinámico y se agregaron 5 mL de cloruro de tionilo (SOCl_2), calentando esta mezcla de reacción a 50°C en agitación constante por 3 horas; pasado el tiempo, se eliminó el exceso de cloruro de tionilo con ayuda de una bomba de alto vacío, obteniendo un sólido amorfo blanco correspondiente al cloruro de ácido esperado.

Por otra parte, 200 mg (1 mmol) de la mezcla de compuestos y 15 mg (0.22 mmol) de N,N-dimetil-4-aminopiridina (DMAP), fueron disueltos en 10 mL de piridina y mezclados con el cloruro de cinamoilo recién formado y se llevó a cabo la reacción en agitación constante a temperatura ambiente por 12 horas. Transcurrido el tiempo de reacción, se agregó agua y acetato de etilo esperando la formación de fases y extrayendo tres veces la fase de acetato de etilo, la cual fue lavada con soluciones acuosas de HCl 10%, NaHCO_3 10%, salmuera y agua hasta obtener pH neutro en la fase acuosa; la fase orgánica lavada se separó, secó con Na_2SO_4 y concentró en rotavapor obteniendo 187 mg de crudo de reacción.

La reacción fue purificada por cromatografía de columna con vacío absorbiendo el crudo de reacción en 1 g de gel de sílice para 5 g de gel de sílice de recorrido, usando hexano – acetato de etilo (95:5) como eluyente obteniendo al final 83 mg (30.6% rendimiento) del compuesto esterificado y 97mg de la mezcla inicial de compuestos.

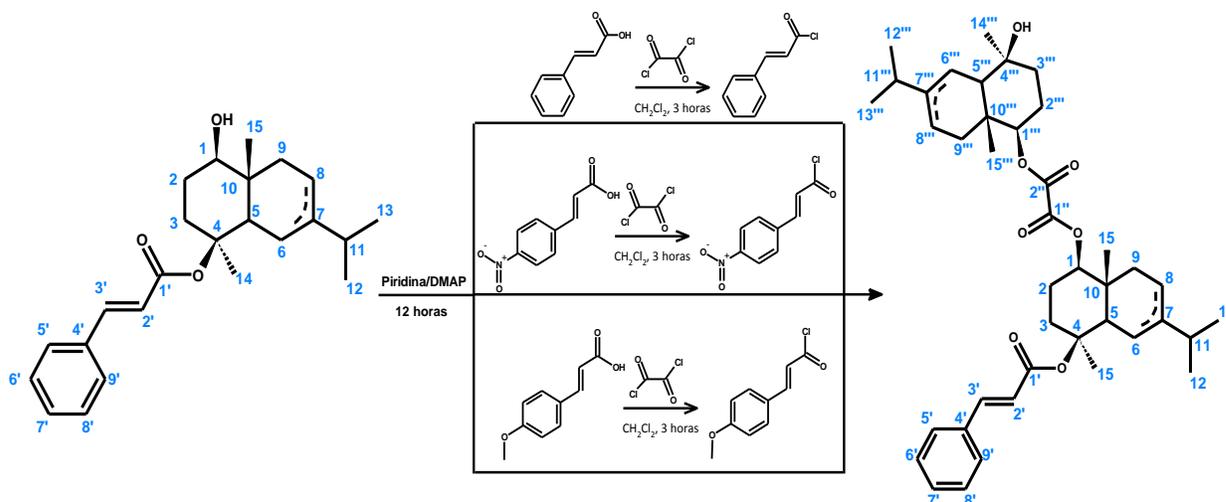
Los datos físicos y espectroscópicos para el compuesto esterificado con ácido cinámico se muestran a continuación:

- Mezcla Compuestos 2 y 3 - Esterificación Ac. Cinámico** (Rf: 0.82 Hex:AcOEt 70:30): Aceite , $C_{31}H_{35}BrO_4$; ; **IR** ($CHCl_3$) ν_{max} 3030.41, 2961.14, 2930.23, 2873.29, 1703.26, 1637.53, 1312.15, 1182.39, 1167.25, 979.65 cm^{-1} ; **1H RMN (400 MHz, $CDCl_3$)** δ 7.73 - 7.56 (7.64, m, H-3', H-3''), 7.56 - 7.46 (7.51, dd, $J = 9.1, 7.0$ Hz, H-5', H-9', H-5'', H-9''), 7.43 - 7.33 (7.38, m, H-6' - H-8', H-6'' - H-8''), 6.49 - 6.39 (6.42, m, H-2''), 6.44 - 6.30 (6.38, m, H-2'), 5.57 (sa, $\#_2H-6$), 5.33 (sa, $\#_3H-8$), 4.83 - 4.74 (4.79, m, H-1), 3.13 - 2.99 (3.06, td, $J = 12.1, 2.8$ Hz, H-3a), 2.35 - 2.18 (2.26, m, H-11), 2.18 - 2.13 (2.15, d, $J = 8.4$ Hz, $\#_3H-6b$), 2.06 - 1.98 (2.02, dd, $J = 21.4, 6.5$ Hz, $\#_2H-8b$), 2.02 - 1.97 (1.99, dd, $J = 6.9, 5.2$ Hz, $\#_2H-5$), 2.01 - 1.93 (1.96, m, $\#_3H-9a$), 1.79 - 1.69 (1.74, ddd, $J = 19.4, 11.3, 5.5$ Hz, H-2), 1.72 - 1.67 (1.69, m, $\#_2H-9a$), 1.65 - 1.61 (s, H-14), 1.52 - 1.44 (1.48, m, $\#_3H-5$), 1.56 - 1.39 (1.47, m, H-3b), 1.38 - 1.26 (1.32, m, $\#_2H-9b$), 1.19 - 1.17 (s, H-15), 1.11 - 1.02 (1.06, m, H-12, H-13); **^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$)** δ 166.94 - 166.81 (C-1''), 166.15 - 165.99 (C-1'), 144.69 ($\#_2C-7, C-3'$), 144.33 - 144.28 (C-3''), 144.12 (C-3'), 142.01 ($\#_3C-7$), 134.63(C-4'), 134.60 (C-4', C-4''), 134.55 (C-4''), 130.34 (C-7', C-7''), 130.32 (C-7''), 130.23 (C-7'), 128.99 (C-6', C-8', C-6'', C-8''), 128.19 (C-5', C-5'', C-9''), 128.12 (C-9'), 120.19 - 119.99 (C-2'), 118.69 (C-2''), 116.01 ($\#_2C-6$), 115.83 ($\#_3C-8$), 82.38 - 81.80 (C-4), 81.14 - 79.88 (C-1), 52.39 ($\#_2C-5$), 49.39 ($\#_3C-5$), 40.90 ($\#_3C-9$), 37.73 - 37.31 (C-10), 35.69 ($\#_2C-9$), 35.22 - 35.00 (C-11), 33.50 - 33.34 (C-3), 24.81 - 24.52 (C-14), 23.73 - 23.56 (C-2), 23.23 ($\#_3C-6$), 22.79 ($\#_2C-8$), 21.89 - 21.87 (C-12), 21.73 - 21.41 (C-13), 13.80 - 13.59 (C-15); **MS-EI** m/z 498 [M-H] $^{+}$, 351 [M - $C_9H_7O_2$] $^{+}$, 203 [M - $C_{18}H_{15}O_4$] $^{+}$, 159 [M - $C_{21}H_{23}O_4$] $^{+}$, 131 [M - $C_{24}H_{31}O_3$] $^{+}$.

La relación molar de la mezcla calculada por medio de las integrales en el espectro de 1H -RMN para las señales a 5.57 (Compuesto **2**, singulete, C^6H) y 5.33 (Compuesto **3**, singulete, C^8H) es de 33:67 (**2:3**). Los espectros del producto purificado se encuentran en el Anexo IX y su análisis y asignación se encuentran en la Sección 5.4.5, Capítulo V.

4.3.6. Reacción con Cloruro de Oxalilo

En el proceso de producir nuevos ésteres de la mezcla de compuestos **2** y **3** con ácidos derivados del cinámico como el ácido 4-nitrocínámico y 4-metoxicínámico, usando cloruro de oxalilo como precursor para la formación *in situ* de los cloruros de ácido respectivos, para posteriormente su reacción con la mezcla de compuestos en piridina/DMAP, se encontró que todas las reacciones llegaban a un producto con Rf en TLC iguales (Rf = 0.8, Hex:AcOEt 70:30) e iguales señales en su espectroscopia, que al ser analizada se encontró la formación de una especie de compuesto dimerizado por un grupo 1,2-dicarbonilo entre la mezcla de compuestos con uno de los grupos cinamato hidrolizado, causado por un exceso de cloruro en la esterificación, como se muestra en el Esquema 12.



Esquema 12. Procedimiento para la reacción de la mezcla de compuestos **2** y **3** con cloruro de oxalilo.

Todas las reacciones fueron realizadas usando para la formación de los cloruros de ácido 200 mg en cada caso de ácido cinámico (4.9 mmol), ácido 4-nitrocínámico (3.8 mmol) y ácido 4-metoxicínámico (4.1 mmol), a los cuales se agregaron 2 mL de cloruro de oxalilo, procediendo esta reacción a temperatura ambiente por tres horas y posteriormente se evaporó el cloruro usando vacío hasta obtener pequeñas cantidades de líquido. Luego de la formación del cloruro de acilo respectivo, 100 mg (1 mmol) de la mezcla de compuestos y 15 mg (0.22 mmol) de DMAP fueron disueltos en 10 mL de piridina y agregados junto con el cloruro, para así proceder la reacción por 12 horas a temperatura ambiente en agitación constante.

Transcurrido el tiempo de reacción, se agregó agua y acetato de etilo esperando la formación de fases y extrayendo tres veces la fase de acetato de etilo, la cual fue lavada con soluciones acuosas de HCl 10%, NaHCO₃ 10%, salmuera y agua hasta obtener pH neutro en la fase acuosa; la fase orgánica lavada se separó, secó con Na₂SO₄ y concentró en rotavapor obteniendo 97 mg (con ácido cinámico), 105 mg (con ácido 4-nitrocínámico) y 90 mg (con ácido 4-metoxicínámico) de crudo de reacción.

Los crudos de reacción fueron absorbidos en 1 g de gel de sílice para ser purificados por cromatografía de columna con vacío con 5 g de gel de sílice de recorrido, usando hexano – acetato de etilo (95:5) como eluyente obteniendo al final 51.6 mg (28.3% rendimiento, con ácido cinámico) 58.7 mg (32.2% rendimiento, con ácido 4-nitrocínámico) y 67.5mg (37.0% rendimiento, con ácido 4-metoxicínámico) del compuesto con los siguientes datos físicos y espectroscópicos:

- **Mezcla Compuestos 2 y 3 – Reacción Cloruro de Oxalilo** (Rf: 0.80 Hex:AcOEt 70:30): Aceite, C₃₁H₃₅BrO₄; ; **IR (CHCl₃)** ν_{\max} 3498.80, 2962.13, 2928.88, 2872.42, 1759.52, 1735.16, 1702.92, 1636.78, 1449.31, 1315.03, 1185.47, 1137.95, 978.10 cm⁻¹; **¹H RMN (400 MHz, CDCl₃)** δ 7.67 - 7.53 (7.60, dd, *J* = 27.1, 16.0 Hz, H-3'), 7.54 - 7.45 (7.50, m, H-5', H-9'), 7.41 - 7.35 (7.38, td, *J* = 4.8, 3.2 Hz, H-6' - H-8'), 6.41 - 6.27 (6.34, dd, *J* = 28.7, 16.0 Hz, H-2'), 5.54 (sa, #₂H-6', #₂H-6'''), 5.31 (da, *J* = 3.8 Hz, #₃H-8, #₃H-8'''), 4.80 - 4.73 (4.76, dt, *J* = 10.7,

4.1 Hz, H-1, H-1'''), 3.14 - 3.01 (3.08, m, H-3a, H-3a'''), 2.34 - 2.16 (2.24, m, H-11, H-11'''), 2.17 - 2.12 (2.14, m, #₃H-6a, #₃H-6a'''), 2.12 - 1.98 (2.04, m, #₂H-8, #₂H-8'''), 1.98 - 1.91 (1.95, m, #₂H-5, #₂H-5'''), 1.98 - 1.88 (1.93, m, #₃H-9a, #₃H-9a'''), 1.86 - 1.74 (1.79, m, #₃H-6b, #₃H-6b'''), 1.85 - 1.67 (1.76, m, H-2, H-2'''), 1.75 - 1.67 (1.72, m, #₃H-9b, #₃H-9b'''), 1.63 - 1.60 (ss, H-14, H-14'''), 1.52 - 1.40 (1.46, m, H-3b, H-3b'''), 1.49 - 1.40 (1.44, m, #₃H-5, #₃H-5'''), 1.40 - 1.28 (1.34, m, #₂H-9b, #₂H-9b'''), 1.16 - 1.13 (s, H-15, H-15'''), 1.08 - 1.02 (1.05, m, H-12, H-13, H-12''', H-13'''); ¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃) δ 166.08 - 165.92 (C-1'), 158.26 - 158.22 (C-1''), 158.12 - 158.08 (C-2''), 144.44 (#₂C-7, C-3', #₂C-7'''), 144.24 (C-3'), 142.04 (#₃C-7, #₃C-7'''), 134.64 - 134.54 (C-4'), 130.38 - 130.30 (C-7'), 129.02 - 129.00 (C-6', C-8'), 128.18 - 128.12 (C-5', C-9'), 120.03 - 119.82 (C-2'), 115.68 (#₂C-6, #₂C-6'''), 115.56 (#₃C-8, #₃C-8'''), 84.41 - 83.17 (C-1, C-1'''), 81.99 - 81.43 (C-4, C-4'''), 52.24 (#₂C-5), 49.30 (#₃C-5), 40.76 (#₃C-9, #₃C-9'''), 37.66 - 37.27 (C-10, C-10'''), 35.58 (#₂C-9, #₂C-9'''), 35.19 - 34.99 (C-11, C-11'''), 33.33 - 33.19 (C-3, C-3'''), 24.75 - 24.45 (C-14, C-14'''), 23.28 (C-2, C-2'''), 23.10 (C-2, C-2''', #₃C-6, #₃C-6'''), 22.72 (#₂C-8, #₂C-8'''), 21.84 (C-12, C-12'''), 21.72 - 21.34 (C-13, C-13'''), 13.54 - 13.50 (C-15), 13.35 - 13.31 (C-15'''); MS-EI m/z 498 [M-H]⁺, 351 [M - C₉H₇O₂]⁺, 203 [M - C₁₈H₁₅O₄]⁺, 159 [M - C₂₁H₂₃O₄]⁺, 131 [M - C₂₄H₃₁O₃]⁺.

La relación molar de la mezcla calculada por medio de las integrales en el espectro de ¹H-RMN para las señales a 6.304 (Compuesto **2**, doblete, C²H) y 6.375 (Compuesto **3**, doblete, C²H) es de 58:42 (**2:3**). Los espectros obtenidos del producto purificado se encuentran en el Anexo X y su interpretación y asignación se encuentra detallada en la Sección 5.4.6, Capítulo V.

4.4. Actividad Biológica

Debido a que no se encontraron evidencias reportadas para estos compuestos y sus derivados, se decidió realizar análisis primarios para:

- Actividad Antioxidante: usando las metodologías de inhibición de la peroxidación de lípidos en cerebro de rata (TBARS) y actividad reductora sobre el radical difenilpicrilhidrazilo (DPPH).
- Actividad Antiinflamatoria: usando la metodología del modelo de edema en oreja de ratón inducido con TPA.

Los resultados obtenidos se muestran en los ítems a continuación:

4.4.1. Inhibición de la Peroxidación de Lípidos en Cerebro de Rata (TBARS)

La información obtenida en los experimentos se muestra en la tabla 2:

Tabla 2. Resultados del ensayo de TBARS para **1** y la mezcla de compuestos **2 y 3** y sus respectivos derivados.

Muestra	Concentración (μM)	TBARS ($\frac{\text{nmol}}{\text{mg prot}}$)	Inhibición (%)
Compuesto 1 ^a	1	7.998	8.30
	10	7.585	13.04
	100	0.546	93.74
Compuesto 1 - Epóxido 1 ^b	1	6.533	9.65
	10	5.928	18.02
	100	6.288	13.04
Compuesto 1 - Epóxido 2 ^b	1	7.267	0.00
	10	6.983	3.43
	100	6.695	7.41
Mezcla de Compuestos (M.C.) 2 y 3 ^a	1	8.409	3.60
	10	8.084	7.32
	100	7.198	17.48
M.C. 2 y 3 - Acetilación ^b	1	6.748	6.68
	10	6.328	12.49
	100	6.017	16.79
M.C. 2 y 3 - Oxidación ^c	1	8.607	0.00
	10	8.379	1.86
	100	7.873	7.79
M.C. 2 y 3 - Epoxidación ^c	1	8.660	0.00
	10	8.230	3.60
	100	8.303	2.75
M.C. 2 y 3 - Est. Ac. <i>p</i> -bromobenzoico ^b	1	7.099	1.83
	10	7.549	0.00
	100	6.973	3.57
M.C. 2 y 3 - Est. Ac. cinámico ^c	1	8.528	0.12
	10	8.332	2.40
	100	8.332	2.40
M.C. 2 y 3 - Reacción Cloruro Oxalilo ^c	1	8.875	0.00
	10	8.822	0.00
	100	8.686	0.00
Hidroxitolueno Butilado (BHT)	1	8.045	5.77
	10	1.069	87.48
	100	0.321	96.24

^a Muestras realizadas con blanco = 0.331 $\frac{\text{nmol TBARS}}{\text{mg prot}}$ y control (FeSO_4 + Vehículo) = 8.723 $\frac{\text{nmol TBARS}}{\text{mg prot}}$.

^b Muestras realizadas con blanco = 0.272 $\frac{\text{nmol TBARS}}{\text{mg prot}}$ y control (FeSO_4 + Vehículo) = 7.231 $\frac{\text{nmol TBARS}}{\text{mg prot}}$.

^c Muestras realizadas con blanco = 0.321 $\frac{\text{nmol TBARS}}{\text{mg prot}}$ y control (FeSO_4 + Vehículo) = 8.538 $\frac{\text{nmol TBARS}}{\text{mg prot}}$.

4.4.2. Actividad Reductora sobre el Radical DPPH

Debido a la baja actividad obtenida en los ensayos por TBARS, se decidió agregar la concentración de 1000 μM para tener un mayor espectro de información para este experimento; la información obtenida en los experimentos se muestra en la tabla 3:

Tabla 3. Resultados del ensayo DPPH para **1** y la mezcla de compuestos **2 y 3** y sus respectivos derivados.

Muestra	Concentración (μM)	Absorbancia (515nm)	Reducción de DPPH (%)
DPPH	-	0,753	-
Compuesto 1	1	0.735	2.35
	10	0.734	2.48
	100	0.738	1.90
	1000	0.708	5.93
Compuesto 1 - Epóxido 2	1	0.742	1.37
	10	0.736	2.17
	100	0.726	3.50
	1000	0.625	11.31
Mezcla de Compuestos (M.C.) 2 y 3	1	0.736	0.00
	10	0.734	0.00
	100	0.788	0.00
	1000	0.702	3.79
M.C. 2 y 3 - Acetilación	1	0.737	0.00
	10	0.739	0.00
	100	0.735	0.00
	1000	0.652	10.73
M.C. 2 y 3 - Oxidación	1	0.727	3.37
	10	0.732	2.79
	100	0.732	2.79
	1000	0.706	6.20
M.C. 2 y 3 - Epoxidación	1	0.728	3.23
	10	0.727	3.37
	100	0.735	2.35
	1000	0.705	6.33
M.C. 2 y 3 - Est. Ac. <i>p</i> -bromobenzoico	1	0.747	0.00
	10	0.728	0.23
	100	0.720	1.42
	1000	0.662	9.32
M.C. 2 y 3 - Est. Ac. cinámico	1	0.728	3.23
	10	0.721	4.21
	100	0.722	4.07
	1000	0.686	8.81
M.C. 2 y 3 - Reacción Cloruro Oxalilo	1	0.746	0.93
	10	0.738	1.95
	100	0.730	2.97
	1000	0.717	4.69
Hidroxitolueno Butilado (BHT)	1	0.730	0.05
	10	0.688	5.71
	100	0.435	40.41
	1000	0.113	84.57
Tocoferol	1	0.735	0.00
	10	0.669	8.40
	100	0.120	83.61
	1000	0.090	86.89

4.4.3. Actividad Antiinflamatoria en Modelo de Edema Inducido con TPA

Luego de realizados los ensayos los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4:

Tabla 4. Resultados obtenidos para la reducción de inflamación inducida con TPA para **1** y la mezcla de compuestos **2** y **3** y sus respectivos derivados (dosis = $1 \mu\text{mol}/\text{oreja}$).

Muestra	Edema (mg)	Inhibición (%)
Compuesto 1 ^a	15.07 ± 0.29	3.62
Compuesto 1 - Epóxido 1 ^b	15.83 ± 0.46	-4.80
Compuesto 1 - Epóxido 2 ^b	15.20 ± 1.01	-0.66
M.C. 2 y 3 ^a	10.27 ± 0.42 *	34.33 *
M.C. 2 y 3 - Acetilación ^b	12.60 ± 0.98	16.56
M.C. 2 y 3 - Oxidación ^b	14.43 ± 0.93	4.47
M.C. 2 y 3 - Epoxidación ^b	9.58 ± 1.56 **	36.59 **
M.C. 2 y 3 - Est. Ac. <i>p</i> -bromobenzoico ^b	11.53 ± 0.40 *	23.68 *
M.C. 2 y 3 - Est. Ac. cinámico ^b	8.85 ± 0.77 **	41.39 **
M.C. 2 y 3 – Reacción Cloruro Oxalilo ^b	8.55 ± 0.33 **	43.38 **
Indometacina	1.99 ± 0.68 **	83.73 **

^a Resultados obtenidos con un edema control de 15.63mg ± 0.41

^b Resultados obtenidos con un edema control de 15.01mg ± 1.36

Los datos representan el promedio de cuatro animales ± el error estándar de la media ($x \pm \text{EEM}$). Los resultados se analizaron mediante una prueba t de student y los valores de $p \leq 0.05$ (*) y $p \leq 0.01$ (**) se consideraron como diferencia significativa con respecto al control.

CAPÍTULO V.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

5.1. Caracterización del Compuesto 1

El compuesto **1**, obtenido en una cantidad considerable (528 mg de 40 g de extracto hexánico), fue identificado como un nuevo compuesto sesquiterpénico, no descrito para ninguna fuente natural, del tipo 10-desmetil-1-metileudesmano, este tipo de esqueleto carbonado solo ha sido descrito para *Ocotea corymbosa* (50) y para el hongo endófito *Nodulisporium sp.* del cedro *Juniperus cedre* (51), pero sus estructuras difieren en la ubicación de grupos funcionales (Figura 13).

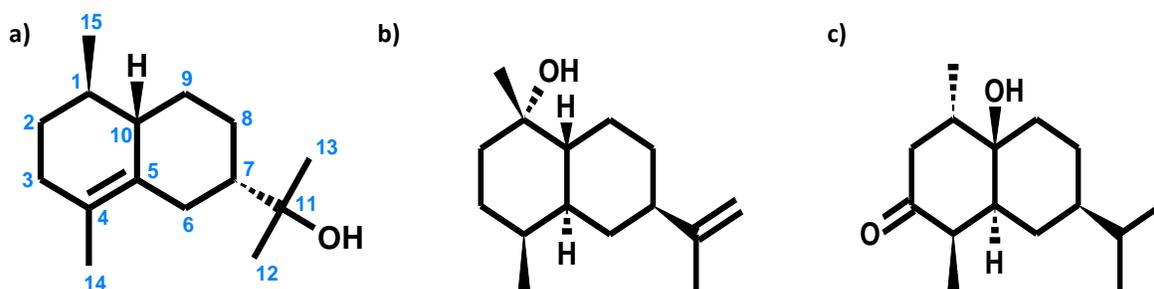


Figura 13. Comparación del compuesto **1** con otros compuestos 10-desmetil-1-metileudesmanos reportados: **a)** Compuesto **1** extraído de *V. persicifolia* **b)** Extraído de *O. corymbosa* y *Nodulisporium sp.* **c)** Extraído de *O. corymbosa*.

La caracterización de este compuesto empezó al analizar su espectro de masas (Figura 14), encontrando un pico para el ion molecular a $222\ m/z$, seguido del pico base a $204\ m/z$ $[M - 18]^+$ que representa la pérdida de un grupo OH como H_2O en la molécula, a lo que prosigue la pérdida de un grupo metilo para $189\ m/z$ $[M - 18 - 15]^+$ y subsecuentes pérdidas de grupos metileno $175\ m/z$ $[M - 18 - 15 - 14]^+$, $161\ m/z$ $[M - 18 - 15 - 14 - 14]^+$ debidas probablemente a la contracción de los anillos alifáticos en la molécula; seguidas así de nuevas pérdidas de grupos metileno y metilo.

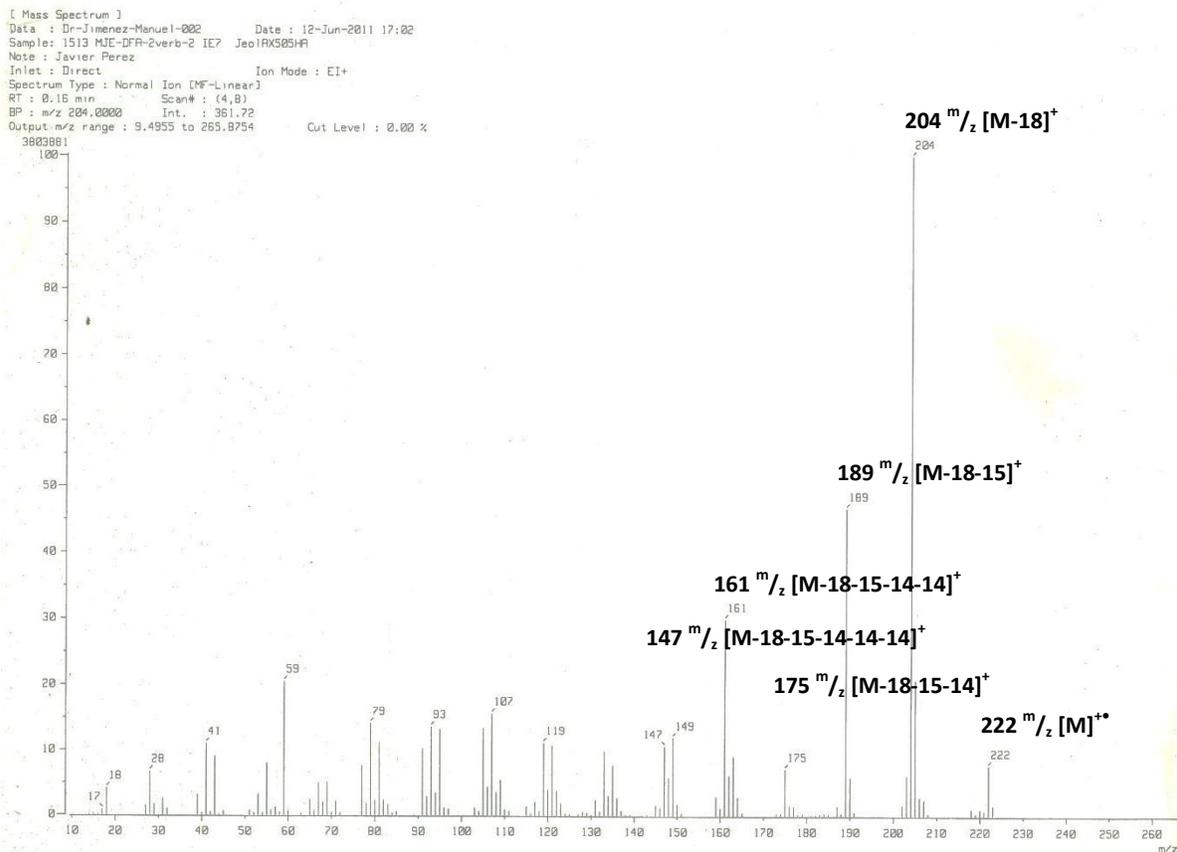


Figura 14. Espectro de masas del compuesto 1.

En el análisis del espectro infrarrojo (Figura 15) debido a la poca diversidad de grupos funcionales en la molécula solo se puede observar característicamente las absorciones a 3553.42 cm^{-1} debida al estiramiento de grupos OH y a 1633.82 cm^{-1} debida al estiramiento de C=C tetrasustituido.

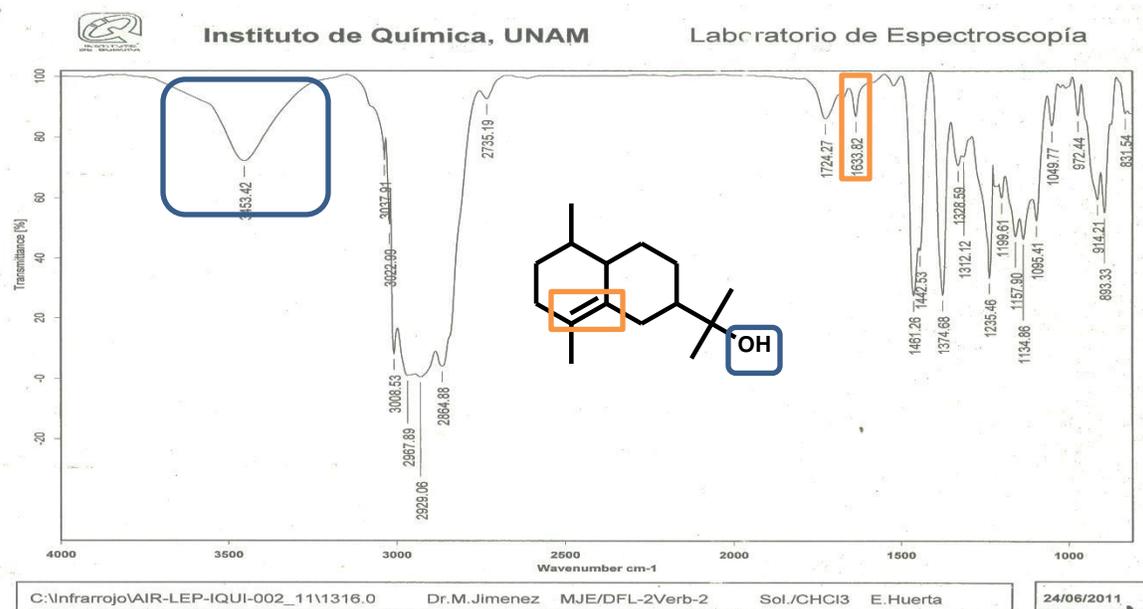


Figura 15. Espectro infrarrojo del compuesto 1.

En el análisis al espectro ^1H -RMN (Figura 16), se observan señales de protones alílicos entre 2.61 y 1.95 ppm; se encuentran además de forma característica diversos sistemas para los grupos metilos que se encuentran en la molécula: sistema doble de triples (dt, $J = 1.9, 1.0$ Hz) para un metilo de tipo vinilo a 1.63 ppm; singlete intenso que integra para 6 protones (dos grupos metilos) en 1.19 ppm y un doblete intenso (d, $J = 6.7$ Hz) a 0.92 ppm que indicó que este metilo estaba enlazado a un carbono tipo metino y no a uno cuaternario, siendo esta la primera evidencia de una posición alterna de uno de los grupos metilo en el esqueleto eudesmano.

UNAM. Instituto de Química (H. Rios)
 Dr-M-Jimenez
 Clave: MJE/DFL-2Verb-2
 No. Registro: 1458
 Experimento: RMN-1H
 Solvente: CDCl_3
 BrukerAvance400MHz (H)
 Junio-23-2011

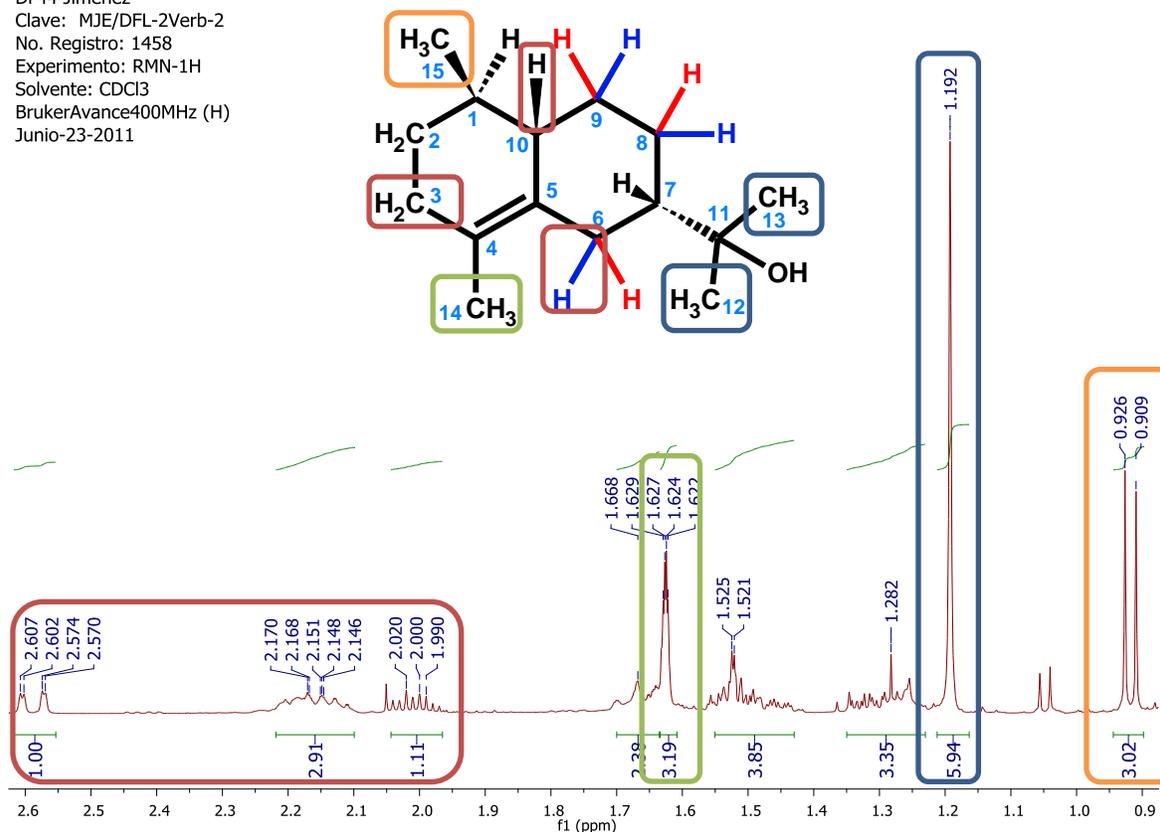


Figura 16. Espectro ^1H -RMN y algunas asignaciones del compuesto 1.

En el análisis al espectro de ^{13}C -RMN (Figura 17) y ^{13}C -DEPT (Figura 18, espectro ampliado entre 60 y 12.5 ppm), se denotan las señales 138.92 y 131.21 ppm para carbonos con hibridación sp^2 cuaternarios, la señal a 73.99 ppm para un carbono sp^3 cuaternario unido a heteroátomo (oxígeno en este caso); tres carbonos sp^3 tipo metino (CH) a 57.84, 48.66 y 39.31 ppm; cinco carbonos sp^3 tipo metileno (CH_2) a 36.69, 32.72, 30.01, 27.36 y 26.47 ppm; y cuatro carbonos sp^3 tipo metilo (CH_3) a 27.41, 26.22, 22.48 y 13.97 ppm. La suma de todos los carbonos e hidrógenos tomando en cuenta que el carbono cuaternario en 73.99 ppm se encuentra enlazado a un grupo OH cuya evidencia ya había sido confirmada en los análisis de infrarrojo y espectrometría de masas, genera la fórmula molecular $\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{O}$ con su peso molecular 222 UMA que corrobora el pico para el ion molecular en el espectro de masas (Figura 14).

UNAM. Instituto de Quimica (H. Rios)
 Dr-M-Jimenez
 Clave: MJE/DFL-2Verb-2
 No. Registro: 1458
 Experimento: RMN-13C
 Solvente: CDCL3
 BrukerAvance-100.62MHz (H)
 Junio-23-2011

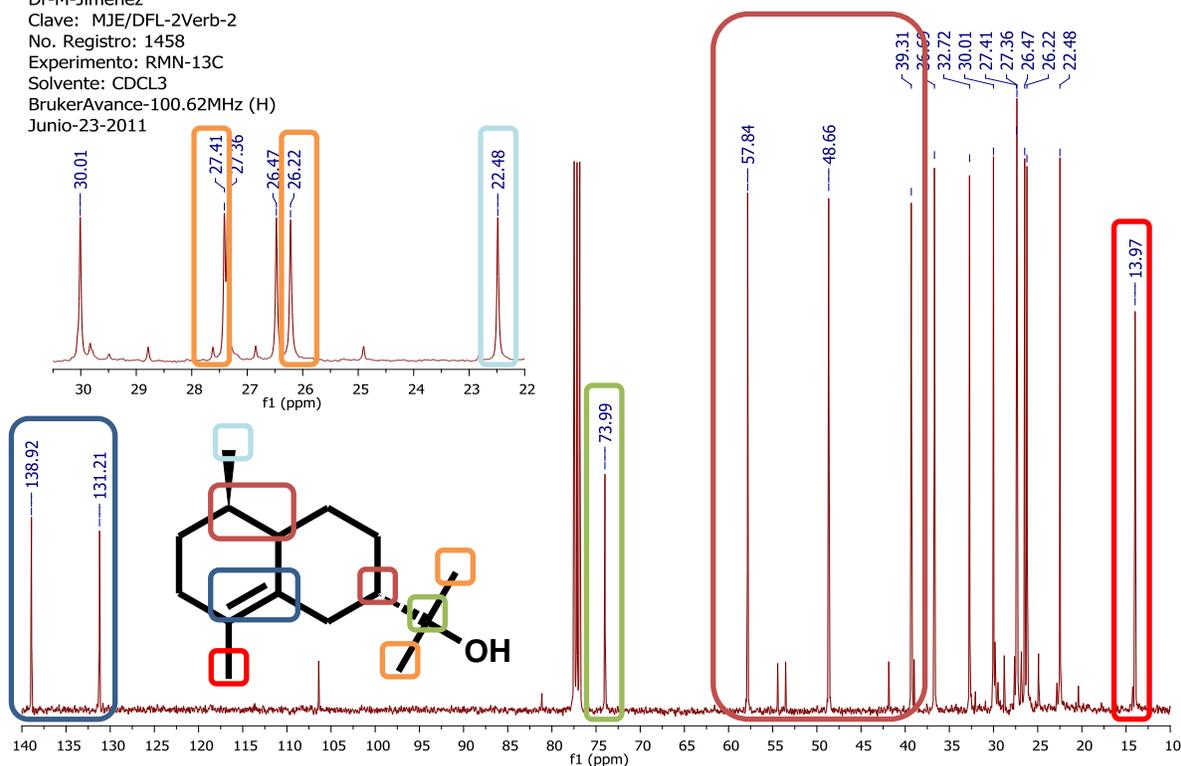
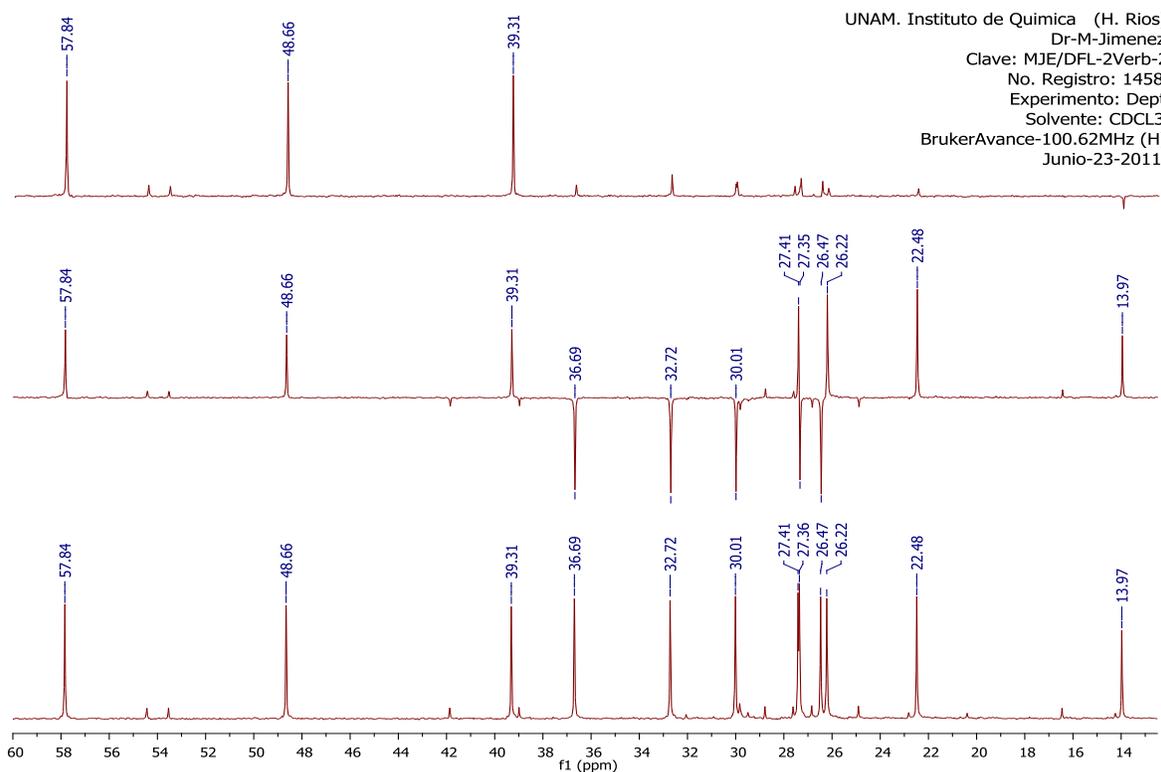


Figura 17. Espectro ^{13}C -RMN y algunas asignaciones para el compuesto 1.



UNAM. Instituto de Quimica (H. Rios)
 Dr-M-Jimenez
 Clave: MJE/DFL-2Verb-2
 No. Registro: 1458
 Experimento: Dept
 Solvente: CDCL3
 BrukerAvance-100.62MHz (H)
 Junio-23-2011

Figura 18. Espectro ^{13}C -DEPT para el compuesto 1.

El experimento de resonancia magnética bidimensional HSQC (Anexo I) realizado al compuesto, ayudo a confirmar las asignaciones de la molécula de acuerdo a como se muestra en la Tabla 5:

Tabla 5. Asignaciones RMN para el compuesto **1**.

# C	^{13}C (ppm) [DEPT] ^{a,c}	^1H (ppm) ^{b,c}
1	39.31 [CH]	1.30 - 1.23 (1.26, m)
2	32.72 [CH ₂]	1.55 - 1.50 (1.53, m)
3	36.69 [CH ₂]	2.22 - 2.16 (2.19, m)
4	131.21 [C]	
5	138.92 [C]	
6	26.47 [CH ₂]	1.70 - 1.64 (1.67 m, H^a) 2.63 - 2.56 (2.59, dd, $J = 13.2, 2.0$ Hz, H^b)
7	48.66 [CH]	1.50 - 1.43 (1.46, m)
8	27.36 [CH ₂]	1.55 - 1.48 (1.52, m, H^a) 1.68 - 1.63 (1.65, m, H^b)
9	30.01 [CH ₂]	1.35 - 1.25 (1.30, m, H^a) 2.05 - 1.98 (2.01, m, H^b)
10	57.89 [CH]	2.18 - 2.10 (2.15, m)
11	73.99 [C]	
12	26.22 [CH ₃]	1.19 (s)
13	27.41 [CH ₃]	1.19 (s)
14	13.97 [CH ₃]	1.63 (dt, $J = 1.9, 1.0$ Hz)
15	22.48 [CH ₃]	0.92 (d, $J = 6.7$)

^a ^{13}C RMN (101 MHz, CDCl₃).

^b ^1H RMN (400 MHz, CDCl₃).

^c Las asignaciones de carbono e hidrógeno fueron confirmadas con el experimento de HSQC (400 MHz, CDCl₃).

Las correlaciones encontradas en el espectro del experimento heteronuclear HMBC (por sus siglas en inglés, Anexo I), confirmó las asignaciones realizadas. En la Figura 19 se observan graficadas las correlaciones más importantes para la molécula y en la Tabla 16 en el anexo I se encuentran consignadas todas las asignaciones encontradas en el espectro.

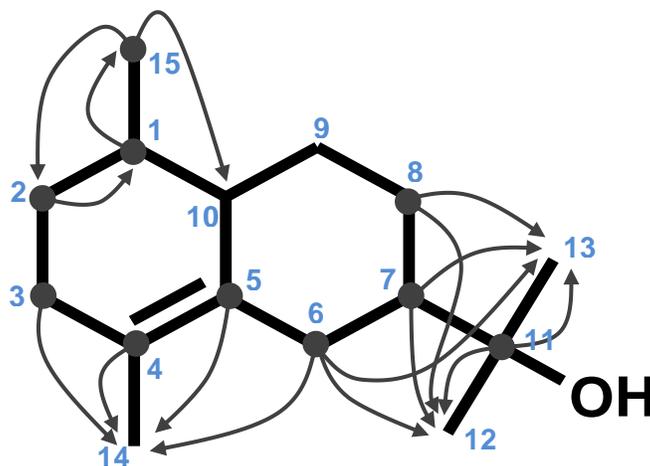


Figura 19. Correlaciones importantes en el espectro de HMBC para el compuesto **1**.

La esteoquímica del compuesto se determinó tomando en los parámetros espectroscópicos a continuación:

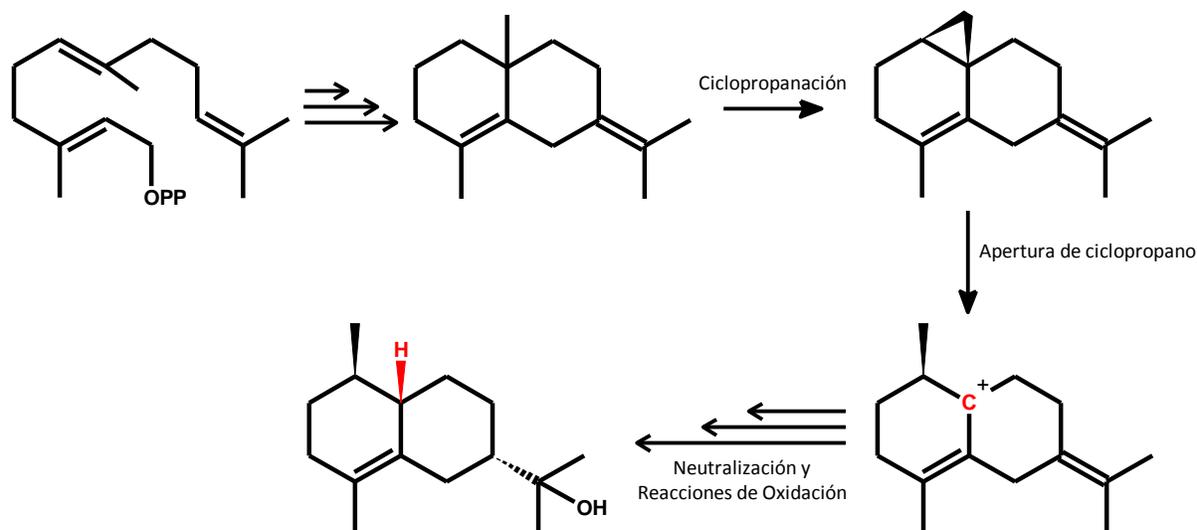
- La constante de acoplamiento $J = 13.2$ Hz en las señales correspondientes a los protones de C-6 indica, en concordancia con lo reportado por Raharivelomana *et al.* (52), que el hidrógeno en C-7 se encuentra en posición pseudo-ecuatorial a los protones en C-6, posicionando el grupo isopropanoil en posición α .
- De acuerdo a las tablas para desplazamientos químicos en anillos alifáticos (53), el desplazamiento de 39.91 ppm para C-1 indica que el grupo metilo sustituyente se encuentra en posición ecuatorial; y los desplazamientos de 27.36 (C-8), 30.01 (C-9) y 57.89 (C-10) indican que la posición del hidrógeno en C-10 es β .

Tomando en cuenta lo dicho anteriormente se propone la estereoquímica mostrada en la Figura 20, para ser nombrada como (-)-(1 β , 7 α , 10 β)-(10 \rightarrow 1)*abeo*-Eudesm-4,5-en-11-ol.



Figura 20. Estructuras y estereoquímica del compuesto 1: (-)-(1 β , 7 α , 10 β)-(10 \rightarrow 1)*abeo*-Eudesm-4,5-en-11-ol.

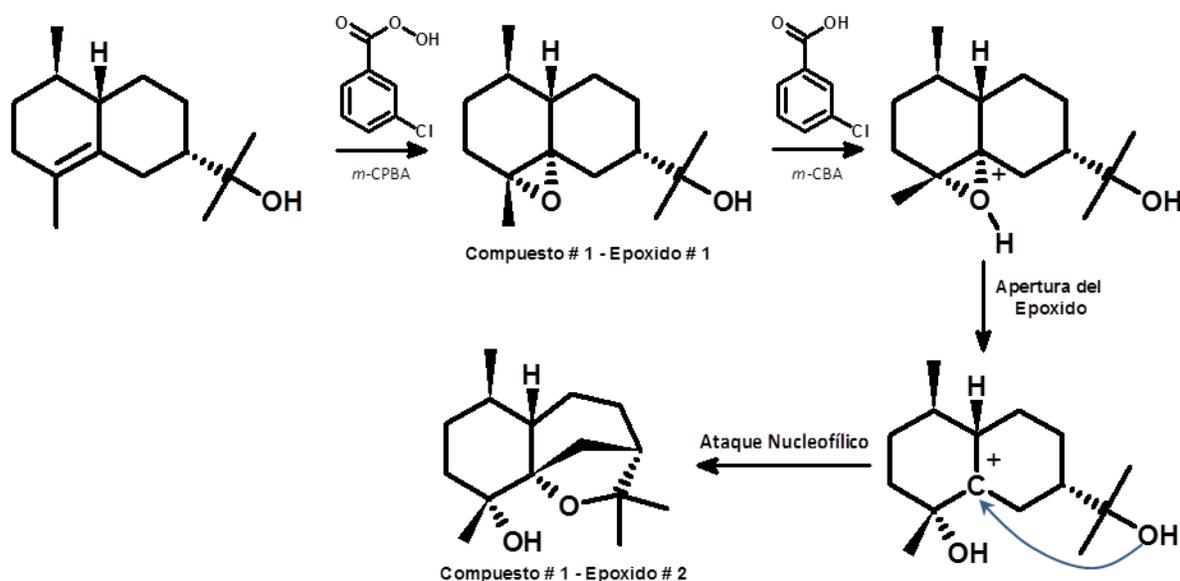
Una vez establecida la estructura del compuesto se propuso un arreglo del esqueleto eudesmánico para la biogénesis de estos compuestos (Esquema 13), en el cual el grupo metilo en C-10 migra al realizarse una ciclopropanación entre C-1, C-10 y C-15, probablemente por un mecanismo similar a la biogénesis de triterpenos como el cicloartenol (12), abriendo el ciclo generando la reubicación del grupo metilo y posteriormente neutralizando el carbocatión formado en C-10 con grupos donadores de hidruro en las células (NADH o NADPH), y por último una fase de adición y oxidación de posiciones específicas que dan lugar a los grupos funcionales encontrados para esta conformación (50; 51).



Esquema 13. Propuesta de biogénesis de compuestos 10-desmetil-1-metileudesmanos.

5.2. Caracterización de los Epóxidos del Compuesto 1

Como confirmación de la estructura del compuesto **1**, se encontró para su epoxidación la formación de dos productos, el primero de ellos es el producto esperado para la epoxidación de **1** y el producto adicional es una subsecuente reacción en la que el grupo OH en C-11 realiza un ataque nucleofílico tipo S_N1 sobre el C-5, posiblemente causado por la catálisis ácida provocada por el ácido *m*-clorobenzoico (*m*-CBA) subproducto de la reacción de epoxidación, protonando el epóxido y propiciando su apertura. El mecanismo propuesto para esta reacción se muestra en el Esquema 14.



Esquema 14. Mecanismo de reacción propuesto para la formación del "Compuesto 1 - Epóxido 2".

El análisis del mecanismo de reacción permitió suponer la estereoquímica de los productos tomando en cuenta el producto de partida, ya que la reacción se ve favorecida, además de la protonación del epóxido por el *m*-CBA, a la cercanía del grupo hidroxilo en C-11 a la cara anti (de menor impedimento estérico) del epóxido, propiciando el ataque nucleofílico anti y así la apertura del epóxido obteniendo la estereoquímica propuesta para ambos epóxidos.

5.2.1. Compuesto 1 - Epóxido 1

Para la identificación del "Compuesto 1 - Epóxido 1", se encontró el ion molecular de $238\ m/z$ esperado en el análisis de espectrometría de masas (Figura 21), seguido de fraccionamientos similares a los encontrados para **1**.

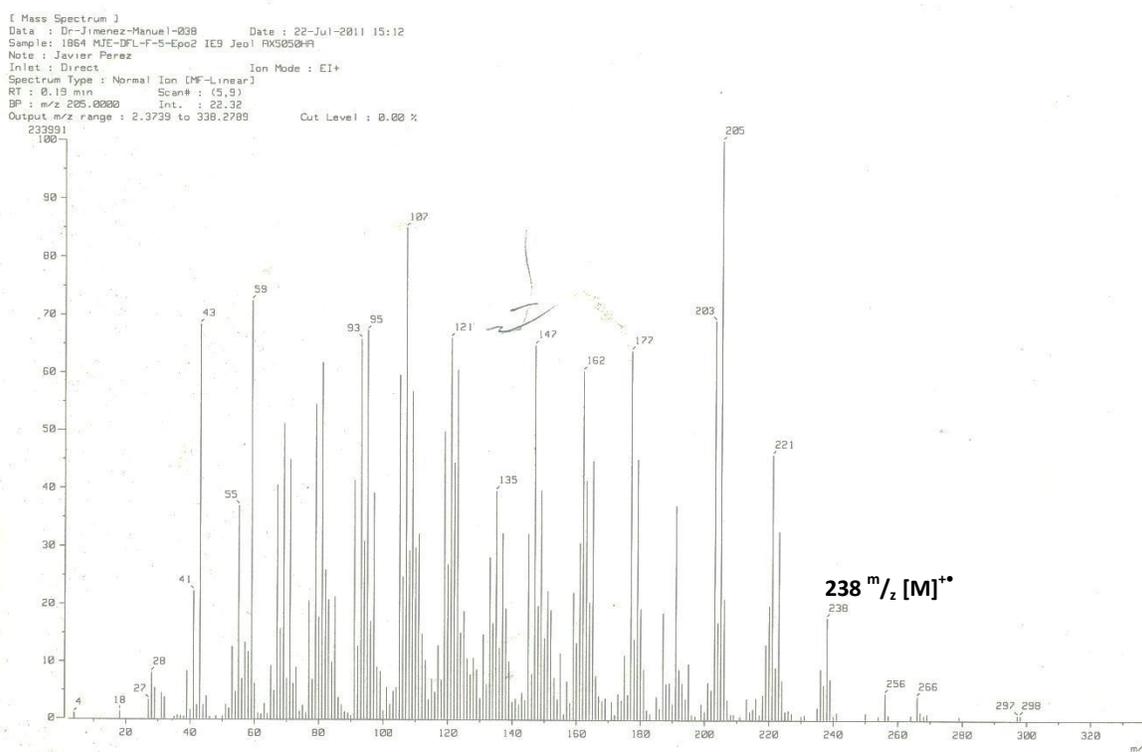


Figura 21. Espectro de masas: "Compuesto 1 - Epóxido 1".

En el espectro de ^1H -RMN para el epóxido **1** (Figura 22), se puede observar el desplazamiento a campo más alto de los protones antes vinílicos; las señales para los grupos metílicos (C-12 y C-13) que en el compuesto uno se observan como un singulete de alta intensidad para ambos grupos metilos, en el epóxido **1** se ven separadas como dos singuletes a 1.17 y 1.14 ppm; las señal para el grupo metilo (C-14) se ve desplazada a 1.43 ppm como un singulete intenso a causa del cambio de funcionalidad de doble ligadura a epóxido; y el grupo metilo (C-15) conserva su multiplicidad de doblete que confirma la posición y conformación de la estructura.

Instituto de Química UNAM RG
 Dr. M. Jimenez
 Clave : MJE/DFL-FS-Epo-1
 No registro : 2531
 CDCl₃
 1H {400 MHz}
 Bruker Avance III
 14-10-11

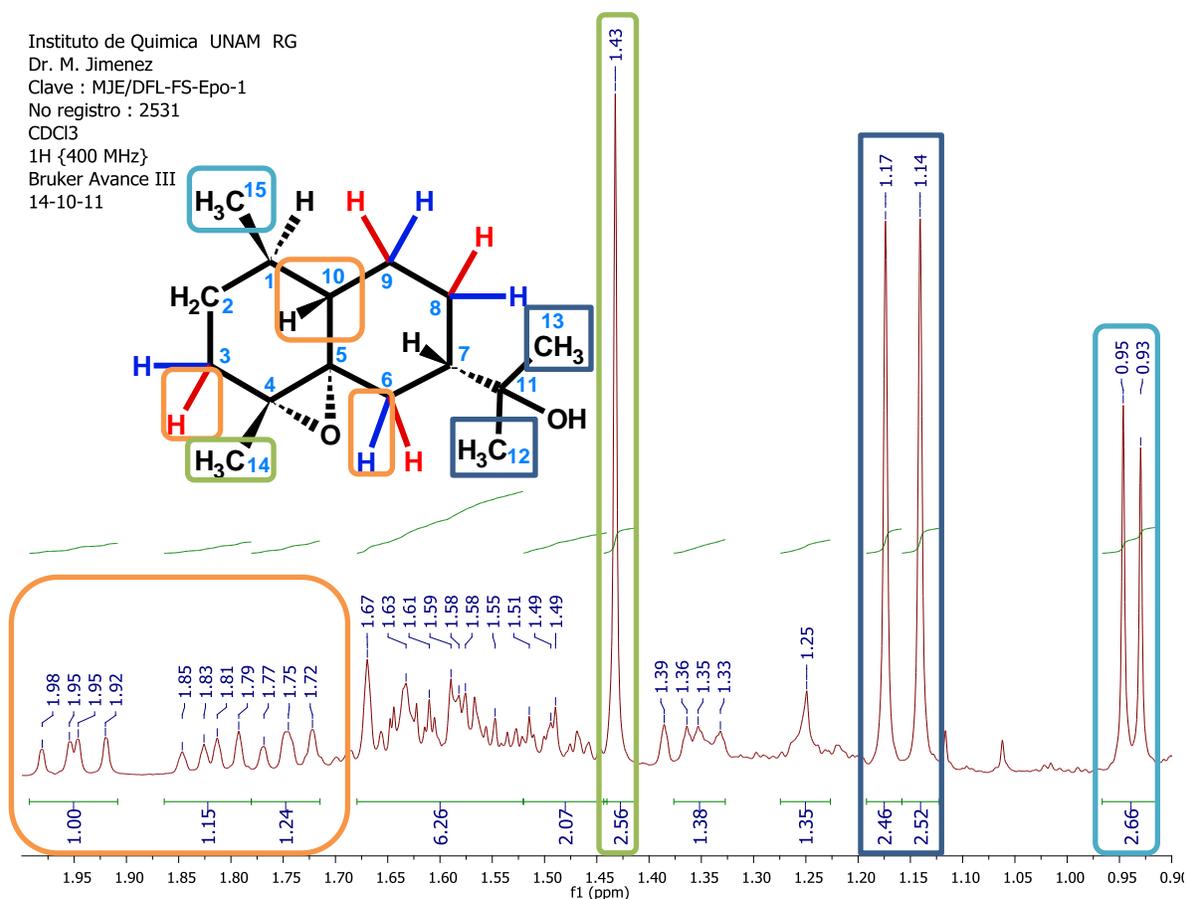


Figura 22. Espectro ¹H-RMN: "Compuesto 1 - Epóxido 1".

El espectro de ¹³C-RMN para el epóxido # 1 (Figura 23), muestra de manera importante el desplazamiento de los carbonos cuaternarios a campo alto por la formación del epóxido; con el experimento ¹³C-DEPT (Figura 24) se asignó el número de protones obteniendo 3 carbonos cuaternarios, 3 carbonos tipo metino (CH), 5 carbonos tipo metileno (CH₂) y 4 carbonos tipo metilo (CH₃), confirmando el número de insaturaciones y fórmula C₁₅H₂₆O₂ (238 UMA).

Teniendo en cuenta los análisis anteriores, se realizaron las asignaciones respectivas para hidrógenos y carbonos (Tabla 6) de la molécula, las cuales fueron confirmadas con ayuda del experimento HSQC cuyo espectro se encuentra en el Anexo II. La estereoquímica de la molécula se asignó teniendo en cuenta el desplazamiento químico para C-14 (16.31 ppm) que indica posición pseudo-axial de este grupo metilo.

Instituto de Quimica UNAM RG
Dr. M. Jimenez
Clave : MJE/DFL-FS-Epo-1
No registro : 2531
CDCl3
13C {100 MHz}
Bruker Avance III
14-10-11

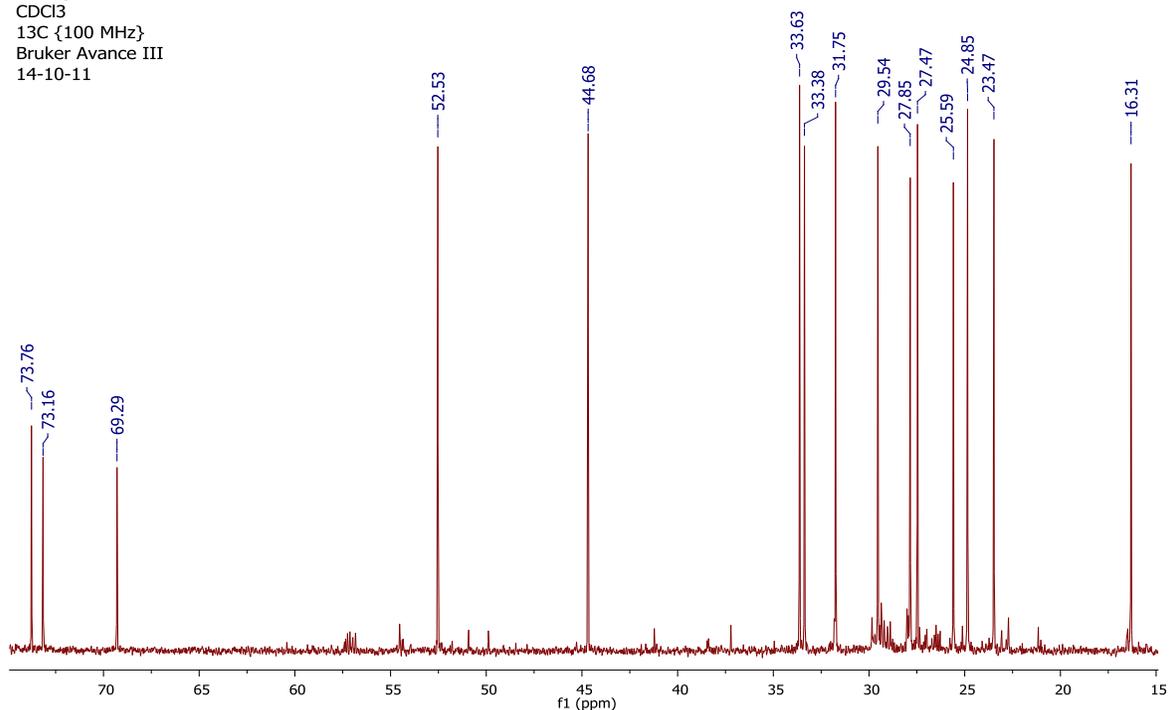
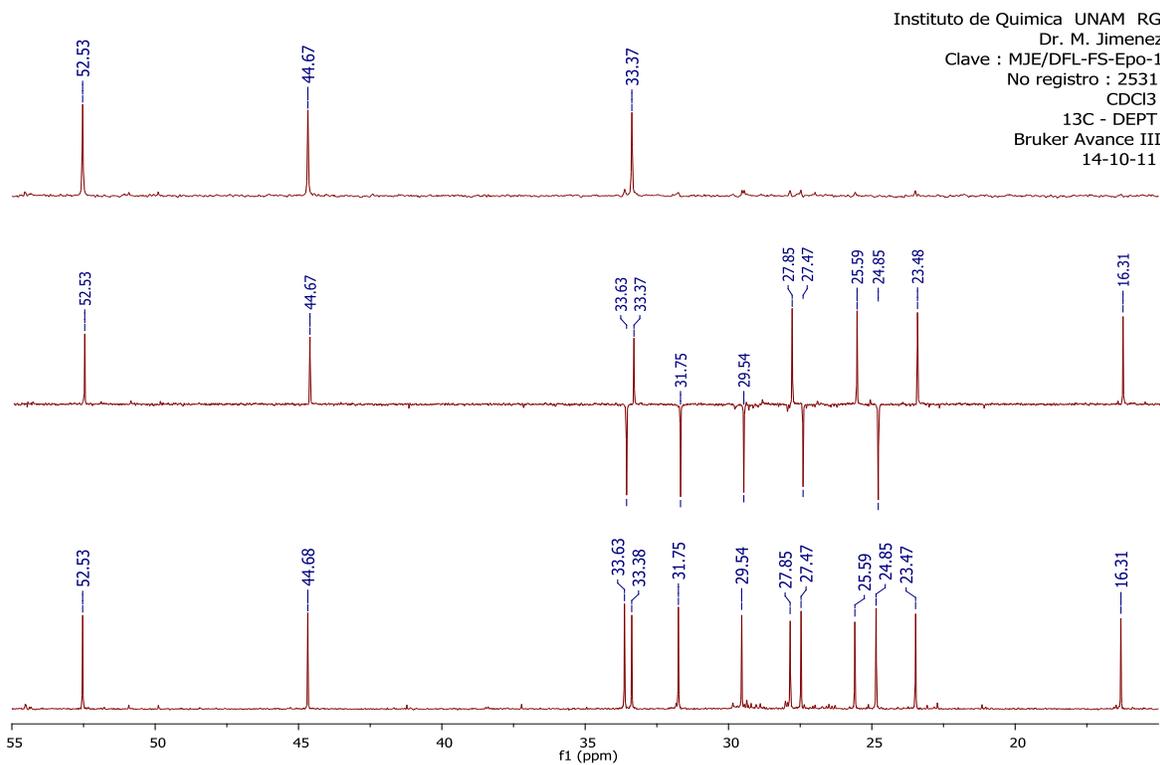


Figura 23. Espectro ^{13}C -RMN: "Compuesto 1- Epóxido 1".



Instituto de Quimica UNAM RG
Dr. M. Jimenez
Clave : MJE/DFL-FS-Epo-1
No registro : 2531
CDCl3
13C - DEPT
Bruker Avance III
14-10-11

Figura 24. Espectro ^{13}C -DEPT: "Compuesto 1 - Epóxido 1".

Tabla 6. Asignaciones RMN para el "Compuesto 1 - Epóxido 1".

# C	¹³ C (ppm) [DEPT] ^{a,c}	¹ H (ppm) ^{b,c}
1	33.38 [CH]	1.30 - 1.18 (1.24, m)
2	33.63 [CH ₂]	1.64 - 1.52 (1.58, m)
3	31.75 [CH ₂]	1.85 - 1.78 (1.82, ddt, J = 13.3, 8.3, 1.2 Hz, H ^a) 1.65 - 1.58 (1.62, m, H ^b)
4	69.29 [C]	
5	73.16 [C]	
6	29.54 [CH ₂]	2.00 - 1.90 (1.95, ddd, J = 13.8, 10.4, 0.8 Hz, H ^a) 1.68 - 1.63 (1.65, m, H ^b)
7	44.68 [CH]	1.68 - 1.53 (1.60, m)
8	27.47 [CH ₂]	1.68 - 1.61 (1.64, ddd, J = 8.9, 6.8, 3.5 Hz, H ^a) 1.50 - 1.44 (1.47, m, H ^b)
9	24.85 [CH ₂]	1.54 - 1.46 (1.49, m, H ^a) 1.40 - 1.32 (1.36, m, H ^b)
10	52.53 [CH]	1.78 - 1.69 (1.75, m)
11	73.76 [C]	
12	25.59 [CH ₃]	1.14 (s)
13	27.85 [CH ₃]	1.17 (s)
14	16.31 [CH ₃]	1.43 (s)
15	23.47 [CH ₃]	0.94 (d, J = 6.7 Hz)

^a ¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃).

^b ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃).

^c Las asignaciones de carbono e hidrógeno fueron confirmadas con el experimento de HSQC (400 MHz, CDCl₃).

5.2.2. Compuesto 1 - Epóxido 2

Luego del análisis espectroscópico se identificó el compuesto como 10-desmetil-4 α -hidroxi-1 β -metildihidroagarofurano derivado semi-sintético del producto natural aislado **1**. Para su identificación, de manera inicial se observó el pico para su ion molecular 238 ^{m/z} en su espectro de masas (Figura 25), observando que se trataba de un isómero del epóxido **1**.

En el espectro ¹H-RMN (Figura 26), se observó característicamente la separación marcada en los desplazamientos de los metilos C-12 (1.31 ppm) y C-13 (1.19ppm) debida a la pérdida del libre giro del grupo isopropilo, pasando a ser parte del sistema rígido bicíclico heterocíclico formado en la reacción; se observó además que se conservaba la configuración del metilo C-15 unido a CH, por el doblete a 0,87 ppm; para el grupo metilo C-14 no se observó ningún cambio característico en su señal (singulete, 1.32 ppm).

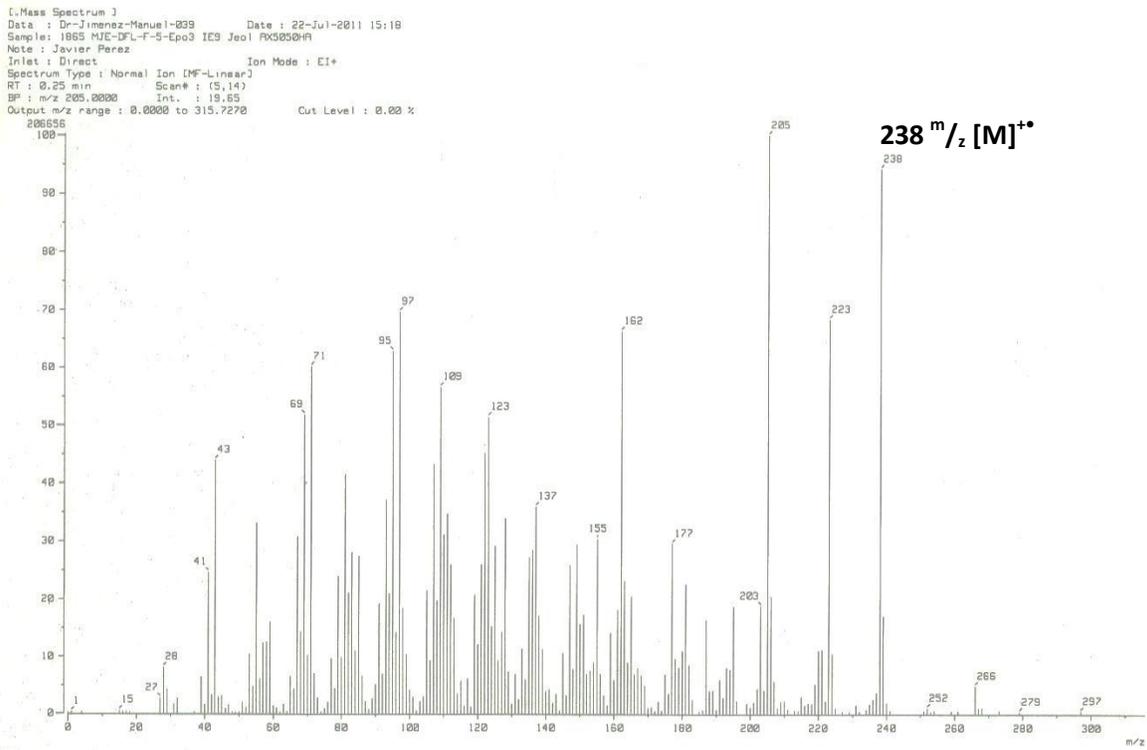


Figura 25. Espectro de masas: "Compuesto 1 - Epóxido 2".

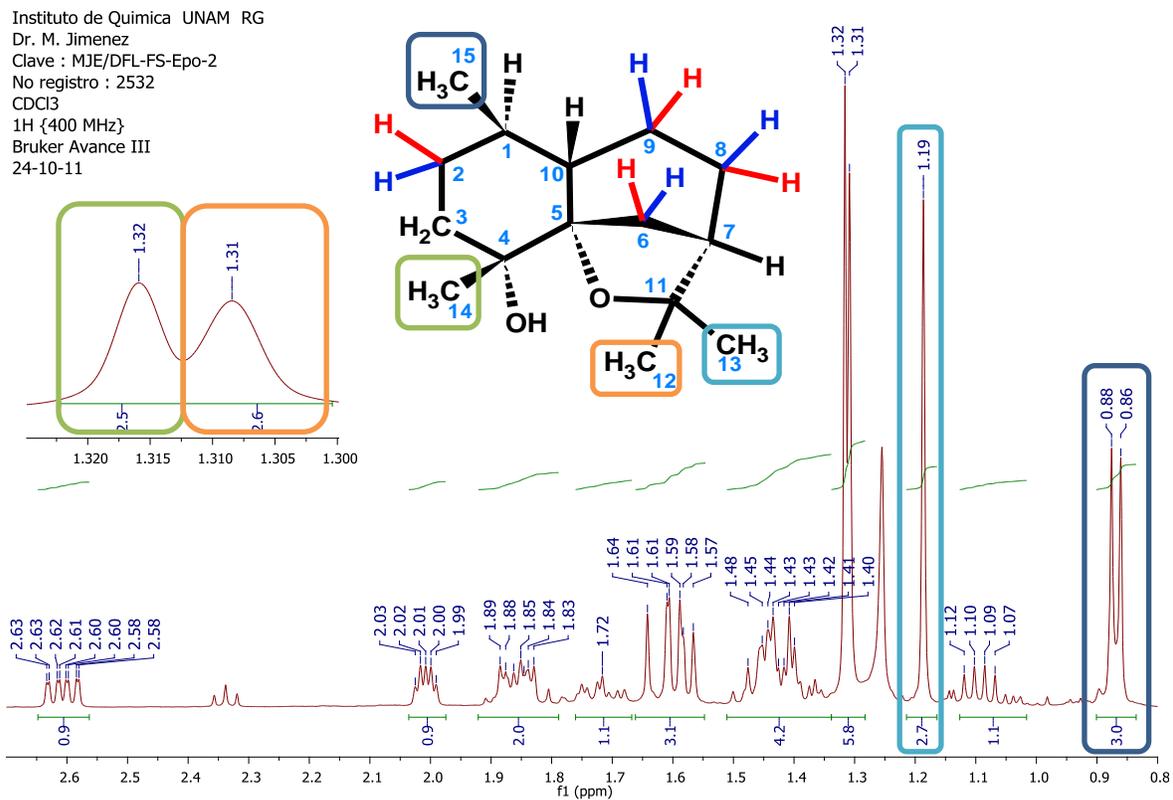


Figura 26. Espectro ¹H-RMN: "Compuesto 1 - Epóxido 2".

El análisis y asignación para el espectro ^{13}C -RMN (Figura 27), debió ser complementado con el análisis del experimento bidimensional HMBC (Figura 28), en el cual se encontraron las correlaciones que llevaron a la propuesta de la estructura bicíclica.

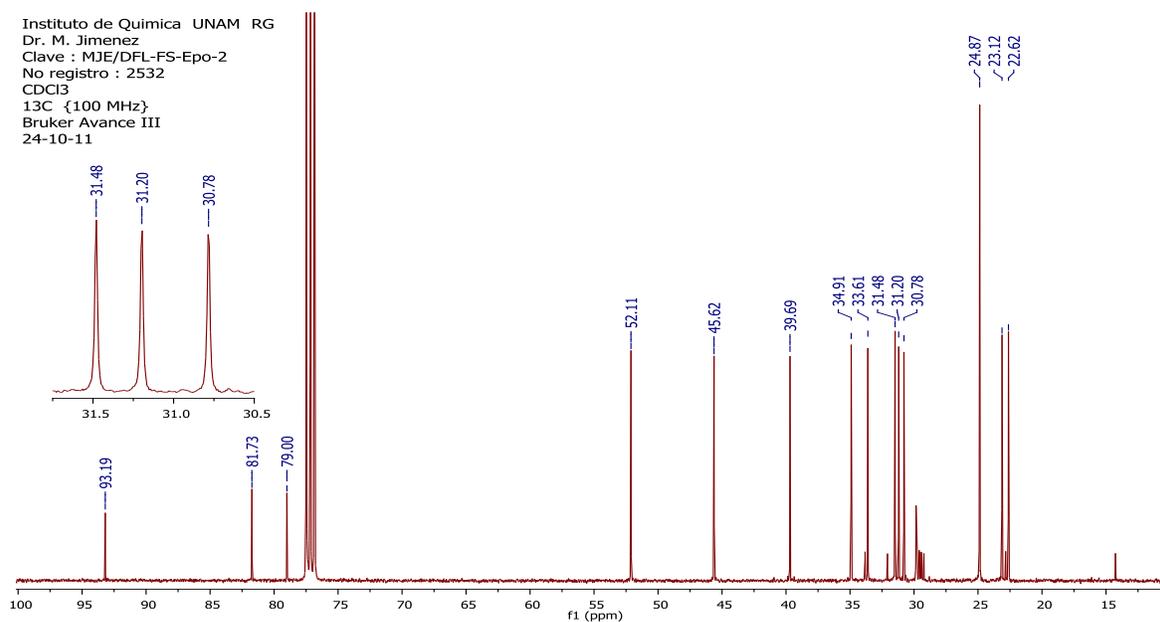


Figura 27. Espectro ^{13}C -RMN: "Compuesto 1 - Epóxido 2".

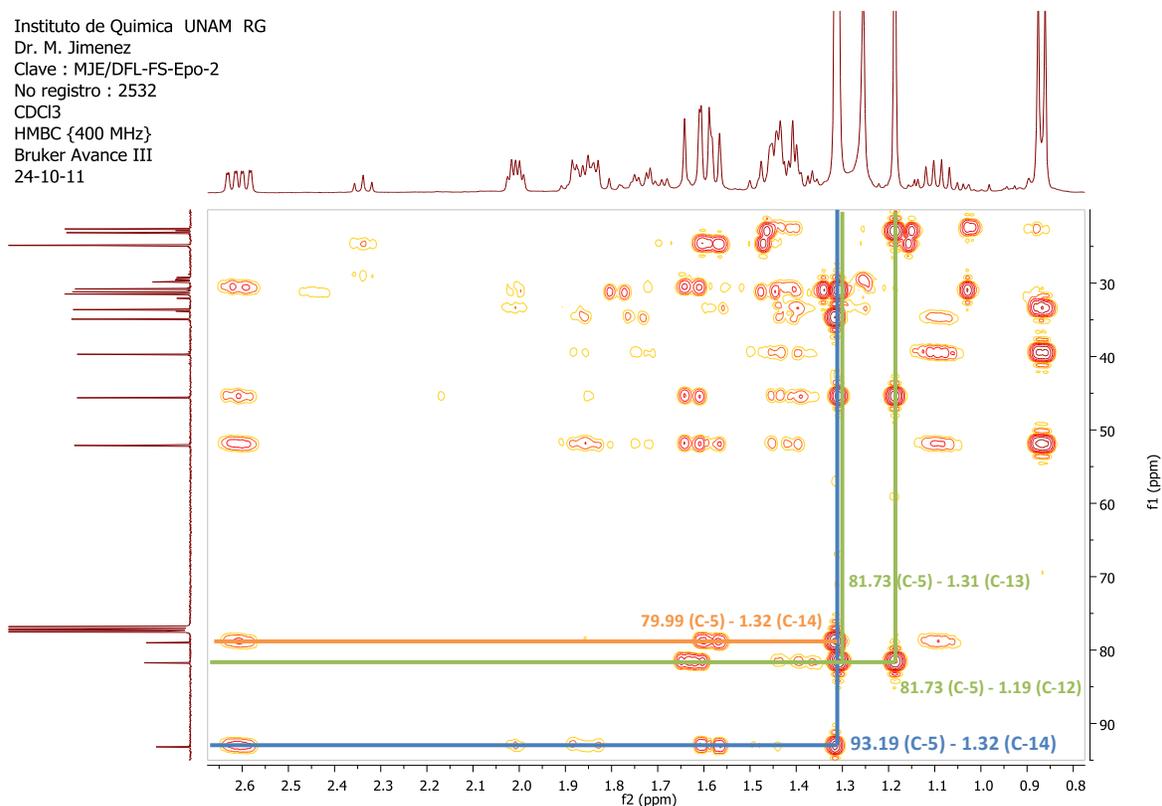


Figura 28. Espectro HMBC: "Compuesto 1 - Epóxido 2".

En la Figura 29 se muestra en la estructura del compuesto las correlaciones marcadas en la Figura 28, además de otras correlaciones importantes que ayudaron a la determinación de la estructura.

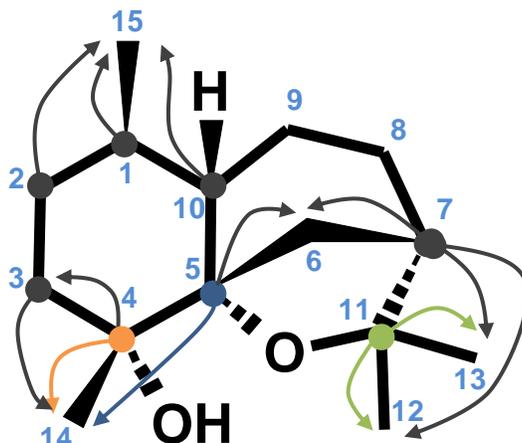


Figura 29. Correlaciones importantes de HMBC para el "Compuesto 1 - Epóxido 2".

Finalmente se realizaron las asignaciones para la molécula, tomando en cuenta los experimentos ^{13}C -DEPT y HSQC cuyos espectros se encuentran en el Anexo III. Las asignaciones se muestran a continuación en la Tabla 7. La estereoquímica del grupo metilo C-14 fue determinada tomando en cuenta su desplazamiento de 24.87 ppm que corresponde a la posición axial de este grupo; además, la constantes de acoplamiento en C-6 ($J = 14.6, 10.4$ Hz) al igual que en # 1 indican que se mantiene la posición pseudo-ecuatorial y por tanto la estereoquímica del protón en C-7.

Tabla 7. Asignaciones RMN para el "Compuesto 1 - Epóxido 2".

# C	^{13}C (ppm) [DEPT] ^{a,c}	^1H (ppm) ^{b,c}
1	39.69 [CH]	1.47 - 1.36 (1.44, m)
2	33.61 [CH ₂]	1.76 - 1.67 (1.72, ddd, $J = 14.6, 10.4, 4.0$ Hz, H ^a) 1.45 - 1.39 (1.42, m, H ^b)
3	34.91 [CH ₂]	1.62 - 1.55 (1.59, m)
4	79.00 [C]	
5	93.19 [C]	
6	31.48 [CH ₂]	2.64 - 2.56 (2.61, ddd, $J = 12.7, 7.0, 1.6$ Hz, H ^a) 1.66 - 1.60 (1.62, m, H ^b)
7	45.62 [CH]	2.03 - 1.98 (2.01, dt, $J = 6.9, 3.5$ Hz)
8	24.87 [CH ₂]	1.88 - 1.82 (1.85, m, H ^a) 1.13 - 1.02 (1.07, m, H ^b)
9	30.78 [CH ₂]	1.90 - 1.82 (1.86, ddd, $J = 8.7, 7.2, 4.0$ Hz, H ^a) 1.45 - 1.35 (1.40, m, H ^b)
10	52.11 [CH]	1.47 - 1.41 (1.43, m)
11	81.73 [C]	
12	31.20 [CH ₃]	1.17 (s)
13	23.12 [CH ₃]	1.31 (s)
14	24.87 [CH ₃]	1.32 (s)
15	22.62 [CH ₃]	0.87 (d, $J = 6.1$ Hz)

^a ^{13}C RMN (101 MHz, CDCl₃).

^b ^1H RMN (400 MHz, CDCl₃).

^c Las asignaciones de carbono e hidrógeno fueron confirmadas con el experimento de HSQC (400 MHz, CDCl₃).

5.3. Caracterización de Compuestos 2 y 3

En el género *Verbesina*, el compuesto **2** ha sido reportado para *V. persicifolia* (20) y *V. oerstediana* (18) y el compuesto **3** reportado para *V. oerstediana* (18) y *V. oncophora* (19); en otro género de la familia *Asteraceae*, **2** y **3** fueron reportados para *Brintonia discoidea* (54). Las asignaciones de estos compuestos se realizaron en comparación a los reportes como se muestra en la Tabla 8.

Tabla 8. Comparación de las asignaciones obtenidas y las asignaciones reportadas para el Compuesto **2** y **3**.

# C	Asignaciones Obtenidas ^a				Asignaciones Reportadas ^c			
	Compuesto 2		Compuesto 3		Compuesto 2		Compuesto 3	
	¹ H-RMN	¹³ C-RMN	¹ H-RMN	¹³ C-RMN	¹ H-RMN (18)	¹³ C-RMN (54)	¹ H-RMN (18)	¹³ C-RMN (54)
1	3.38 (dd)	78.36 [CH]	3.38 (dd)	79.84 [CH]	3.38 (dd)	78.2 [CH]	3.38 (dd)	79.5 [CH]
2	1.74 (m)	27.16 [CH ₂]	1.66 (m)	26.28 [CH ₂]	1.68 (da) 1.74 (dddd)	27.0 [CH ₂]	1.65 (m)	26.7 [CH ₂]
3	2.99 (dt) 1.43 (ddd)	33.74 [CH ₂]	1.44 (dd) 3.02 (dt)	33.60 [CH ₂]	2.99 (ddd) 1.45 (ddd)	33.6 [CH ₂]	1.43 (m) 3.02 (ddd)	33.4 [CH ₂]
4		82.02 [C]		82.64 [C]		81.9 [C]		82.4 [C]
5	1.81 (sa)	52.21 [CH]	1.35 (ddd)	49.18 [CH]	1.85 (sa)	52.0 [CH]	1.34 (dd)	52.0 [CH]
6	5.56 (sa)	116.39 [CH]	2.12 (m) 2.32 (dd)	23.38 [CH ₂]	5.55 (sa)	116.2 [CH]	2.09 (dda) 2.28 (dda)	23.2 [CH ₂]
7		144.10 [C]		142.15 [CH]		143.7 [C]		141.8 [C]
8	2.11 (m) 2.04 (da)	22.86 [CH ₂]	5.38 (da)	116.01 [CH]	2.07 (m)	22.7 [CH ₂]	5.37 (da)	115.8 [CH]
9	1.33 (dd) 1.97 (d)	35.72 [CH ₂]	1.90 (m) 2.19 (m)	41.20 [CH ₂]	1.31 (ddda) 1.95 (ddd)	35.5 [CH ₂]	1.92 (da) 2.16 (dda)	41.0 [CH ₂]
10		38.53 [C]		38.08 [C]		38.3 [C]		37.9 [C]
11	2.32 (dt)	35.28 [CH]	2.26 (m)	35.06 [CH]	2.24 (qq)	35.1 [CH]	2.24 (m)	34.8 [CH]
12	1.07 (dd)	21.91 [CH ₃]	1.06 (d)	21.93 [CH ₃]	1.07 (d)	21.7 [CH ₃]	1.94 (d)	21.7 [CH ₃]
13	1.07 (dd)	21.77 [CH ₃]	1.06 (d)	21.44 [CH ₃]	1.07 (d)	21.6 [CH ₃]	1.05 (d)	21.2 [CH ₃]
14	1.62 (s)	24.60 [CH ₃]	1.58 (s)	24.92 [CH ₃]	1.62 (s)	24.4 [CH ₃]	1.58 (s)	24.7 [CH ₃]
15	1.02 (s)	12.33 [CH ₃]	1.03 (s)	12.50 [CH ₃]	1.01 (s)	12.2 [CH ₃]	1.02 (s)	12.3 [CH ₃]
1'		166.20 [C]		166.06 [C]		166.0 [C]		165.9 [C]
2'	6.30 (d)	120.24 [CH]	6.37 (d)	120.07 [CH]	6.30 (d)	120.1 [CH]	6.37 (d)	119.8 [CH]
3'	7.56 (d)	144.05 [CH]	7.63 (d)	144.21 [CH]	7.56 (d)	143.9 [CH]	7.62 (d)	144.0 [CH]
4'		134.74 [C]		134.66 [C]		134.6 [C]		134.4 [C]
5' - 9'	7.49 (m)	128.11 [CH]	7.52 (m)	128.18 [CH]	7.50 (m)	128.8 [CH]	7.51 (m)	128.8 [CH]
6' - 8'	7.37 (m)	128.98 [CH]	7.38 (m)	129.01 [CH]	7.37 (m)	127.9 [CH]	7.38 (m)	127.9 [CH]
7'	7.37 (m)	130.21 [CH]	7.38 (m)	130.30 [CH]	7.37 (m)	130.0 [CH]	7.38 (m)	130.0 [CH]

^a ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃); ¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃); Las asignaciones de carbono e hidrógeno fueron confirmadas con el experimento de HSQC (400 MHz, CDCl₃).

^b ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃); ¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃).

Los valores para las asignaciones con sus respectivas constantes de acoplamiento se muestran en la Tabla 9. La confirmación de la estereoquímica fue igual para ambos compuestos, ya que sus desplazamientos químicos, constantes de acoplamiento y correlaciones eran cercanos y semejantes. La señal de protón en C-1 (3.38 ppm, dd, $J = 11.3, 4.4$ Hz para **2** y 3.38, dd, $J = 10.8, 4.8$ Hz, para **3**) indica la posición axial del hidrogeno por su $J = 10.8$ Hz (Ax-Ax); la correlación espacial encontrada entre los protones de C-1 (3.38 ppm **2** y 3.38 **3**) y C-5 (1.81 ppm **2**, 1.35 ppm **3**) en el espectro NOESY (Figura 30) muestra que ambos protones se encuentran en la misma posición; al no encontrar NOE entre las señales de protón para C-1 y el metilo en C-15, se confirma estereoquímica contraria del protón en C-1 y el grupo metilo C-15 ubicando así al grupo hidroxilo

en posición ecuatorial o β . La correlación entre los metilos C-15 y los protones metileno del grupo cinamato, confirman que el grupo cinamato se encuentra en posición axial o β .

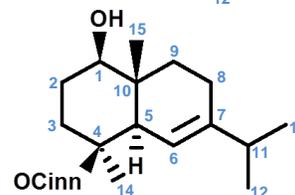
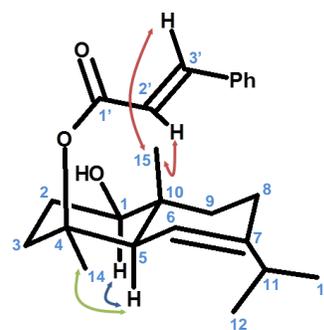
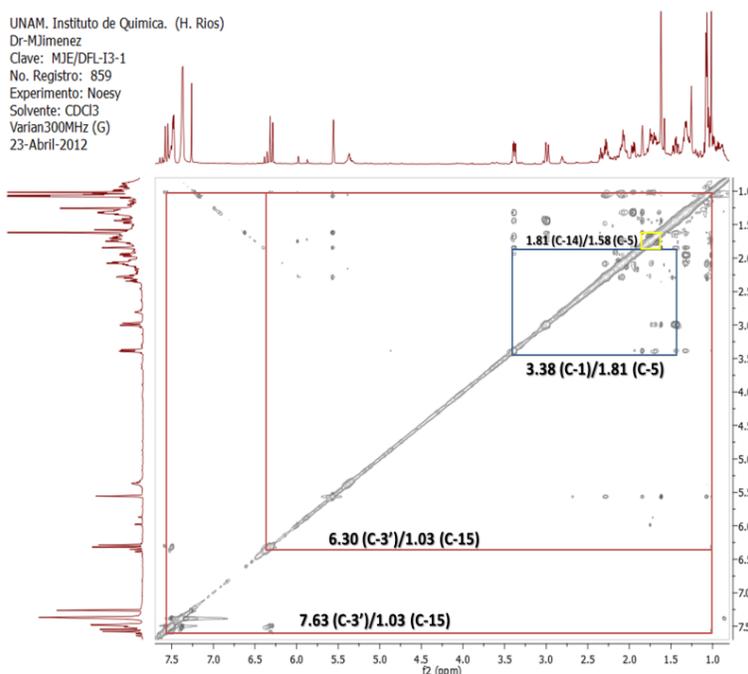
Tabla 9. Asignaciones RMN para los compuestos **2** y **3**.

# C	Compuesto 2		Compuesto 3	
	¹³ C (ppm) [DEPT] ¹	¹ H (ppm) ²	¹³ C (ppm) [DEPT] ¹	¹ H (ppm) ²
1	78.36 [CH]	3.43 - 3.31 (3.38, dd, <i>J</i> = 11.3, 4.4 Hz)	79.84 [CH]	3.46 - 3.31 (3.38, dd, <i>J</i> = 10.8, 4.8 Hz)
2	27.16 [CH ₂]	1.81 - 1.68 (1.74, m)	26.98 [CH ₂]	1.70 - 1.63 (1.66, m)
3	33.74 [CH ₂]	3.04 - 2.93 (2.99, dt, <i>J</i> = 15.0, 3.0 Hz) 1.50 - 1.38 (1.43, ddd, <i>J</i> = 17.0, 13.8, 4.5 Hz)	33.60 [CH ₂]	3.09 - 2.97 (3.02, dt, <i>J</i> = 9.0, 1.8 Hz) 1.47 - 1.42 (1.44, dd, <i>J</i> = 14.0, 9.4 Hz)
4	82.02 [C]		82.64 [C]	
5	52.21 [CH]	1.87 - 1.79 (1.81, m)	49.18 [CH]	1.40 - 1.30 (1.35, ddd, <i>J</i> = 18.2, 14.8, 4.9 Hz)
6	116.39 [CH]	5.60 - 5.51 (5.56, s)	23.38 [CH ₂]	2.35 - 2.28 (2.32, dd, <i>J</i> = 22.6, 9.6 Hz) 2.14 - 2.10 (2.12, m)
7	144.10 [C]		142.15 [C]	
8	22.86 [CH ₂]	2.15 - 2.07 (2.11, m) 2.05 - 1.99 (2.04, d, <i>J</i> = 8.7 Hz)	116.01 [CH]	5.41 - 5.35 (5.38, d, <i>J</i> = 5.1 Hz)
9	35.72 [CH ₂]	1.99 - 1.96 (1.97, d, <i>J</i> = 5.9 Hz) 1.37 - 1.31 (1.33, dd, <i>J</i> = 11.6, 7.1 Hz)	41.20 [CH ₂]	2.22 - 2.10 (2.19, m) 1.96 - 1.87 (1.90, m)
10	38.53 [C]		38.08 [C]	
11	35.28 [CH]	2.37 - 2.28 (2.32, dt, <i>J</i> = 23.0, 7.5 Hz)	35.06 [CH]	2.31 - 2.23 (2.26, m)
12	21.91 [CH ₃]	1.09 - 1.06 (1.07, dd, <i>J</i> = 6.8, 3.1 Hz)	21.93 [CH ₃]	1.06 (d)
13	21.77 [CH ₃]	1.09 - 1.06 (1.07, dd, <i>J</i> = 6.8, 3.1 Hz)	21.44 [CH ₃]	1.06 (d)
14	24.60 [CH ₃]	1.62 (s)	24.92 [CH ₃]	1.58 (s)
15	12.36 [CH ₃]	1.02 (s)	12.50 [CH ₃]	1.03 (s)
1'	166.20 [C]		166.06 [C]	
2'	120.24 [CH]	6.34 - 6.27 (6.30, d, <i>J</i> = 16.1 Hz)	120.07 [CH]	6.42 - 6.33 (6.37, d, <i>J</i> = 16.0 Hz)
3'	144.05 [CH]	7.59 - 7.53 (7.56, d, <i>J</i> = 16.0 Hz)	144.21 [CH]	7.69 - 7.58 (7.63, d, <i>J</i> = 16.0 Hz)
4'	134.74 [C]		134.66 [C]	
5' - 9'	128.11 [CH]	7.53 - 7.43 (7.49, m)	128.18 [CH]	7.57 - 7.46 (7.52, m)
6' - 8'	128.98 [CH]	7.42 - 7.32 (7.37, m)	129.01 [CH]	7.44 - 7.33 (7.38, m)
7'	130.21 [CH]	7.42 - 7.32 (7.37, m)	130.30 [CH]	7.44 - 7.33 (7.38, m)

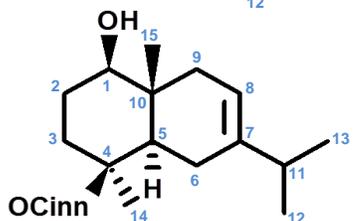
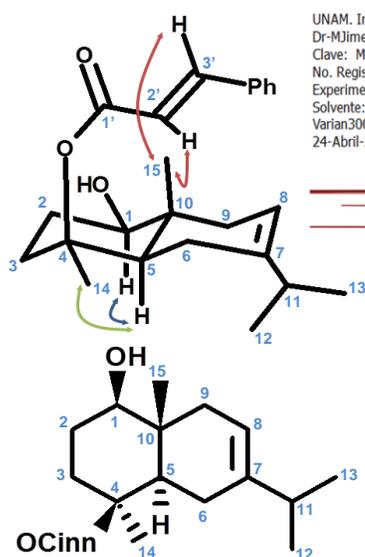
¹¹³C RMN y ¹³C DEPT, 101MHz, CDCl₃.

²¹H RMN y HSQC, 400MHz, CDCl₃.

UNAM. Instituto de Química. (H. Rios)
 Dr-MJimenez
 Clave: MJE/DFL-13-1
 No. Registro: 859
 Experimento: Noesy
 Solvente: CDCl3
 Varian300MHz (G)
 23-Abril-2012



Compuesto 2



Compuesto 3

UNAM. Instituto de Química. (H. Rios)
 Dr-MJimenez
 Clave: MJE/DFL-13-2
 No. Registro: 860
 Experimento: Noesy
 Solvente: CDCl3
 Varian300MHz (G)
 24-Abril-2012

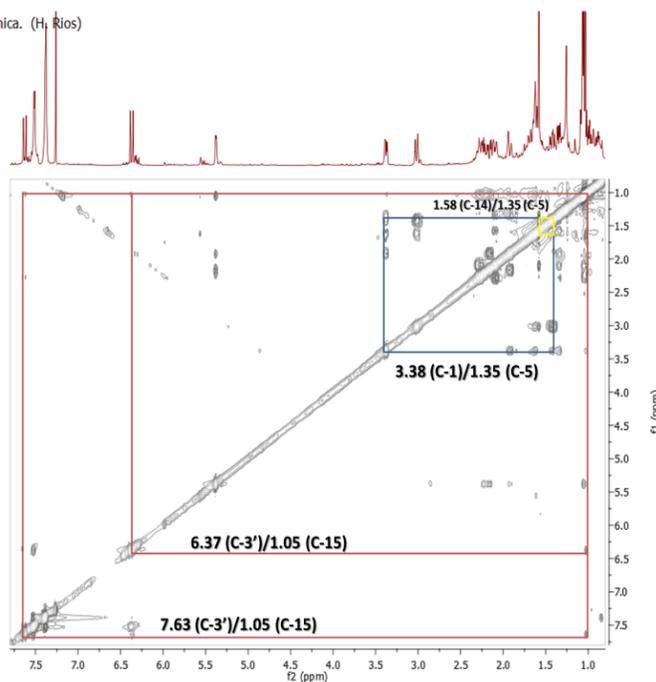


Figura 30. Espectros NOESY y correlaciones importantes para: a) Compuesto 2. b) Compuesto 3.

5.4. Identificación de los Derivados Realizados a la Mezcla de Compuestos 2 y 3.

La evidencia espectroscópica para la formación de los productos de las reacciones de modificación es mostrada a continuación:

5.4.1. Acetilación

La acetilación de la mezcla se confirmó observando el ion molecular $410 \text{ }^m/z$ en el espectro de masas para el producto de reacción, el cual corresponde a la suma del peso molecular de estructura de los compuestos **# 2** y **# 3** (368 UMA), más el grupo acetilo adicionado (+ 42 UMA). Además de dos señales en su espectro infrarrojo representativas de grupos carbonilo éster a 1721.42 y 1704.10 cm^{-1} .

Para realizar las asignaciones de la mezcla de compuestos (Tabla 10), en su espectro ^1H -RMN, un pico intenso a 2.05 ppm indicó la presencia del grupo metilo de acetato ($\text{O}=\text{C}-\text{CH}_3$), y la señal para C-1 a 4.63 ppm, la formación de un éster unido a un grupo CH; las señales para carbonos sp^2 a 171.14 y 171.01 ppm en el espectro de ^{13}C -RMN, son atribuidas a los grupos carbonilo del grupo acetato para cada una de las moléculas de mezcla, además de la señal a 21.35 ppm que de acuerdo al espectro HSQC pertenece al carbono metílico del grupo acetato.

Tabla 10. Asignaciones RMN: "Mezcla Compuestos **2** y **3** - Acetilación".

# C	# Compuesto ¹	¹³ C (ppm) ²	DEPT ²	¹ H (ppm) ³
1		81.10 - 79.87	[CH]	4.68 - 4.57 (4.63, dt, $J = 9.6, 4.9 \text{ Hz}$)
2		23.60 - 23.44	[CH ₂]	1.84 - 1.70 (1.76, m)
3		33.43 - 33.29	[CH ₂]	3.10-2.92 (3.02, ddt, $J = 14.8, 11.8, 3.1 \text{ Hz}$, H ^a) 1.58-1.38 (1.47, dddd, $J = 16.0, 10.9, 7.5, 4.2 \text{ Hz}$, H ^b)
4		82.33 - 81.75	[C]	
5	2	52.35	[CH]	1.96 - 1.88 (1.92, da, $J = 14.6 \text{ Hz}$)
	3	49.34	[CH]	1.46 - 1.35 (1.40, m)
6	2	116.00	[CH]	5.55 (sa)
	3	23.20	[CH ₂]	2.34 - 2.26 (2.29, m, H ^a)
7		144.10 - 142.05	[C]	
8	2	22.75	[CH ₂]	2.16 - 2.06 (2.09, m, H ^a)
	3	115.74	[CH]	5.32 (sa)
9	2	35.63	[CH ₂]	1.72 - 1.65 (1.67, m, H ^a) 1.36 - 1.23 (1.29, m, H ^b)
	3	40.83	[CH ₂]	1.92 - 1.85 (1.88, m, H ^a)
10		37.45 - 37.03	[C]	
11		35.20 - 34.99	[CH]	2.33 - 2.14 (2.24, m)
12		21.88 - 21.86,	[CH ₃]	1.07 (dd, $J = 6.9, 2.4 \text{ Hz}$)
13		21.72 - 21.40	[CH ₃]	1.07 (dd, $J = 6.9, 2.4 \text{ Hz}$)
14		24.79 - 24.50	[CH ₃]	1.63 (s) - 1.59 (s)
15		13.60 - 13.41	[CH ₃]	1.04 (d, $J = 1.0 \text{ Hz}$)
1'		166.13 - 165.98	[C]	
2'		120.15 - 119.96	[CH]	6.42 - 6.27 (6.34, dd, $J = 28.3, 16.0 \text{ Hz}$)
3'		144.27 - 144.10	[CH]	7.67 - 7.54 (7.60, dd, $J = 26.5, 16.0 \text{ Hz}$)
4'		134.70 - 134.61	[C]	
5' - 9'		128.16 - 128.10	[CH]	7.54 - 7.46 (7.50, ddd, $J = 13.4, 6.6, 2.8 \text{ Hz}$)
6' - 8'		128.99 - 128.98	[CH]	7.41 - 7.34 (7.37, m)
7'		130.31 - 130.23	[CH]	7.41 - 7.34 (7.37, m)
1''		171.14 - 171.01	[C]	
2''		21.35	[CH ₃]	2.05 (s)

¹ El número de compuesto se indica en el caso donde la asignación de hidrógeno y carbono difieren.

² ^{13}C RMN y ^{13}C DEPT, 101MHz, CDCl₃.

³ ^1H RMN y HSQC, 400MHz, CDCl₃.

La posición del grupo acetato fue confirmada por medio del experimento HMBC, En la Figura 31 se observa de manera ampliada la correlación entre el grupo carbonilo del acetato (171.14 y 171.01 ppm) y el hidrógeno en C-1 (4.63 ppm), que confirma que la acetilación fue efectuada en la posición C-1 en la mezcla de moléculas.

Instituto de Química UNAM RG
 Dr. M. Jimenez
 Clave : MJE/DFL-I3-Acet
 No Registro : 504
 HMBC (400 MHz)
 CDCl₃
 Bruker Avance III
 14-03-12

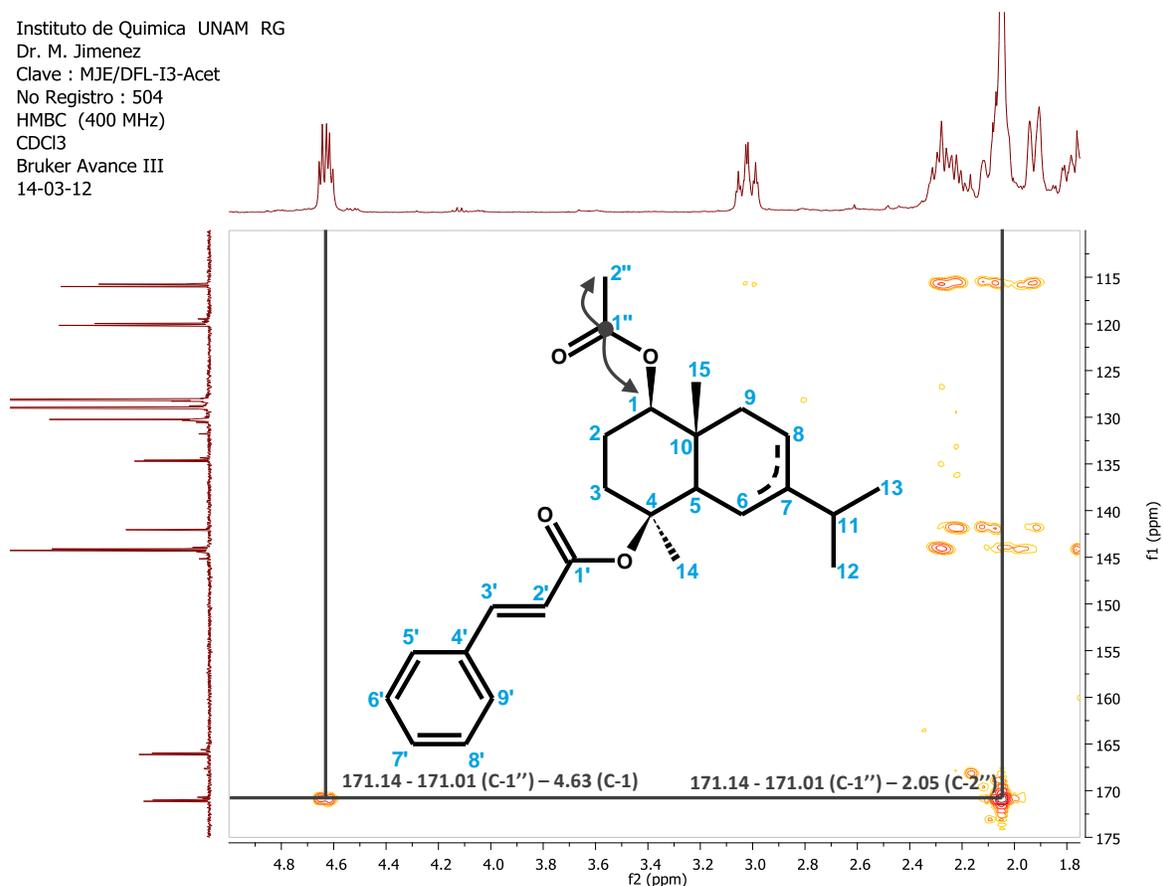


Figura 31. Espectro HMBC ampliado: "Mezcla Compuestos 2 y 3 - Acetilación".

5.4.2. Oxidación

Formación del grupo carbonilo debido a la oxidación de la mezcla, se observó en un inicio en su espectro de masas al encontrar su ion molecular $366 \text{ }^m/z$ debido a la pérdida de dos hidrógenos por la oxidación del grupo hidroxilo.

Para realizar las asignaciones en sus espectros RMN (Tabla 11), Las señales en 215 ppm en el espectro ¹³C-RMN indicaron la presencia de un grupo cetónico cíclico en la estructura, cuyas correlaciones en el experimento HMBC (Figura 32), afirman la ubicación del grupo carbonilo en la posición C-1.

Tabla 11. Asignaciones RMN: "Mezcla Compuestos 2 y 3 - Oxidación".

# C	# Compuesto ¹	¹³ C (ppm) ²	DEPT ²	¹ H (ppm) ³
1		215.53 - 215.22	[C]	
2		31.09 - 31.03	[CH ₂]	1.99 - 1.89 (1.93, m, H ^a) 1.60 - 1.47 (1.53, m, H ^b)
3		34.49 - 34.31	[CH ₂]	3.32 - 3.24 (3.27, ddd, J = 14.7, 5.3, 3.1 Hz, H ^a) 2.83 - 2.72 (2.78, m, H ^b)
4		81.83 - 81.29	[C]	
5	2 3	52.14 50.89	[CH] [CH]	2.35 - 2.30 (2.32, m) 1.77 - 1.72 (1.73, m)
6	2 3	116.16 23.89	[CH] [CH ₂]	5.38 (da, J = 5.8 Hz) 2.50 - 2.38 (2.35, m, H ^a) 1.85 - 1.79 (1.82, m, H ^b)
7		144.67 - 141.57	[C]	
8	2 3	22.93 115.56	[CH]	2.20 - 2.09 (2.15, m, H ^a) 5.58 (dda, J = 1.7, 0.8 Hz)
9	2 3	35.85 35.13	[CH ₂] [CH ₂]	2.06 - 1.95 (2.00, m, H ^a) 1.80 - 1.73 (1.77, m, H ^a)
10		46.44 - 46.17	[C]	
11		35.10 - 34.92	[CH]	2.30 - 2.19 (2.24, m)
12		21.89	[CH ₃]	1.11 - 1.01 (1.08, ddd, J = 8.3, 6.9, 1.8 Hz)
13		21.78 - 21.37	[CH ₃]	1.11 - 1.01 (1.08, ddd, J = 8.3, 6.9, 1.8 Hz)
14		24.14 - 24.08	[CH ₃]	1.74 (s) - 1.64 (s)
15		19.29 - 18.16	[CH ₃]	1.29 - 1.22 (1.26, m)
1'		166.14 - 166.09	[C]	
2'		119.70 - 119.31	[CH]	6.46 - 6.32 (6.39, dd, J = 35.8, 16.0 Hz)
3'		144.95 - 144.59	[CH]	7.73 - 7.57 (7.65, dd, J = 34.7, 16.0 Hz)
4'		134.48 - 134.37	[C]	
5' - 9'		128.23 - 128.13	[CH]	7.57 - 7.46 (7.51, m)
6' - 8'		129.04 - 129.03	[CH]	7.43 - 7.35 (7.39, m)
7'		130.53 - 130.42	[CH]	7.43 - 7.35 (7.39, m)

¹El número de compuesto se indica en el caso donde la asignación de hidrógeno y carbono difieren.

²¹³C RMN y ¹³C DEPT, 101MHz, CDCl₃.

³¹H RMN y HSQC, 400MHz, CDCl₃.

DrJimenez
INSTITUTO DE QUIMICA, UNAM/ E. Huerta
Dr. M. Jimenez
Clave: MJE/DFL-13-Ox
Disolvente: CDCl3
HMBC
Bruker Avance III 400 MHz (H)
09-05-12
No. de Registro: 925

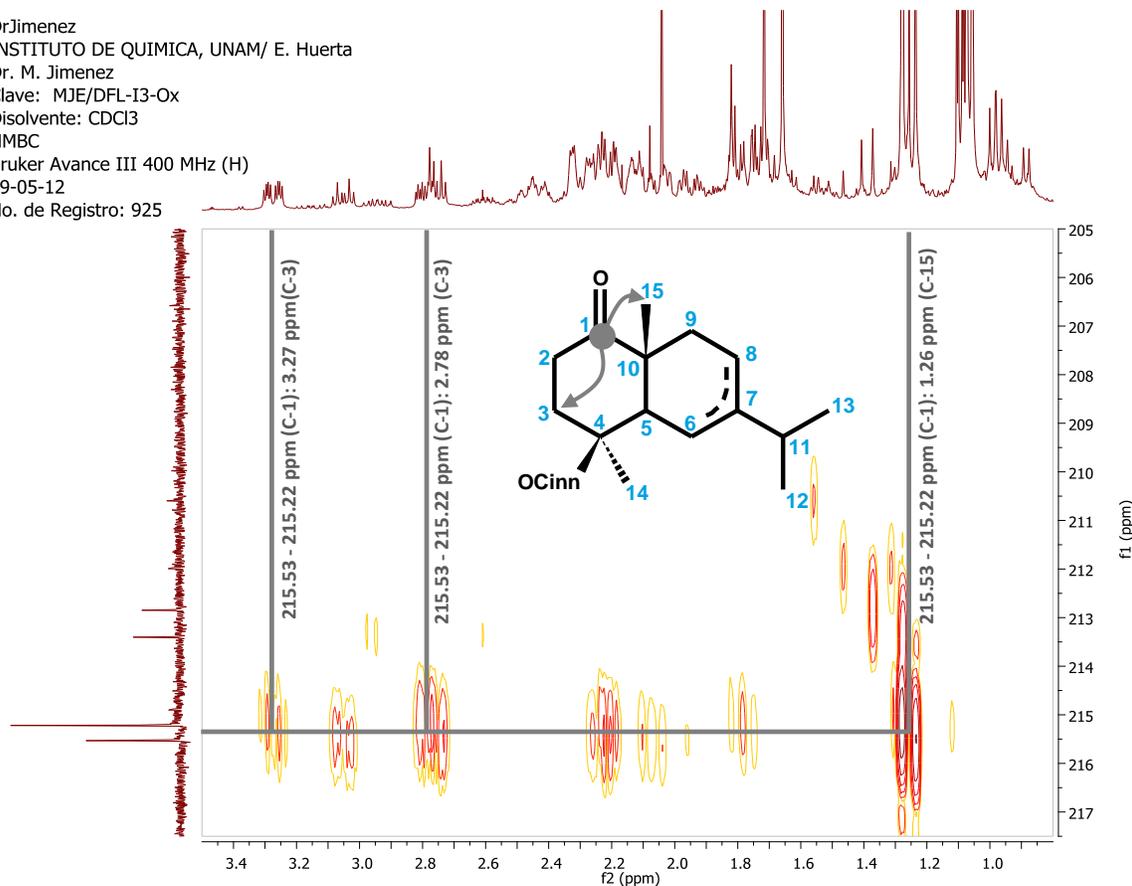
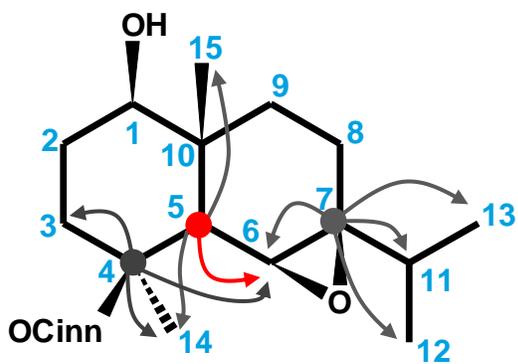


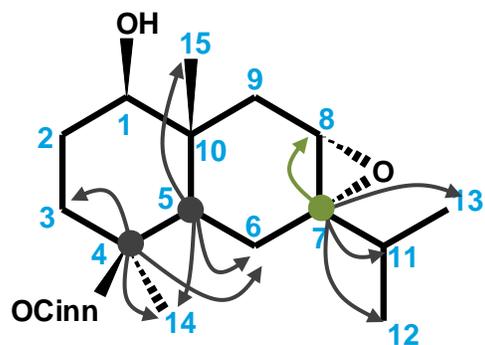
Figura 32. Espectro HMBC ampliado: "Mezcla Compuestos 2 y 3 - Acetilación".

5.4.3. Epoxidación

Esta al igual que en las reacciones anteriores fue confirmada al hallar el ion molecular de 386 m/z debido a la suma de un oxígeno por la epoxidación de la doble ligadura en el núcleo eudesmano. Las asignaciones de sus espectros RMN, fueron realizadas con la ayuda del experimento HMBC, el cual permitió conocer las ubicaciones de los átomos de carbono en la mezcla en relación a sus átomos vecinos, tomando en cuenta las señales de los carbonos C-4 (72.12 ppm # 2, 83.03 ppm # 3), C-5 (46.98 ppm # 2, 45.11 ppm # 3) y C-7 (74.25 ppm # 2, 64.35 ppm # 3), en particular buscando la correlación de estos carbonos con los protones C-H del grupo epóxido para # 2 (5.45 ppm) y # 3 (3.01 ppm), y los grupos metilo de la molécula (Figura 33).



Epóxido del compuesto 2.



Epóxido del compuesto 3.

UNAM. Instituto de Química. (H. Rios)
 Dr-MJimenez
 Clave: MJE/DFL-I3-EPO
 No. Registro: 1061
 Experimento: HMBC
 Solvente: CDCl3
 Varian300MHz (G)
 16-Mayo-2012

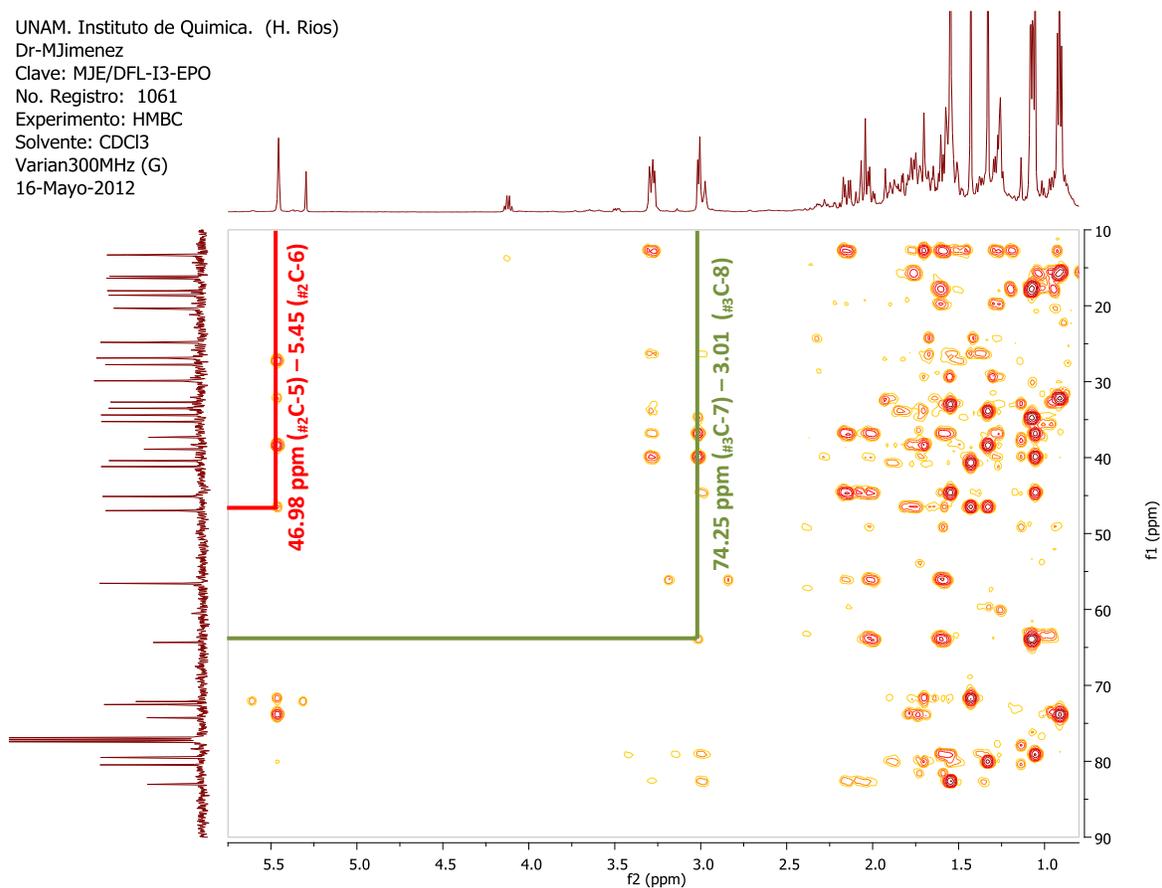


Figura 33. Correlaciones espectro HMBC (Ampliado) de "Mezcla Compuestos 2 y 3 - Epoxidación".

Luego de realizadas y ubicadas las diferentes correlaciones, se realizaron las asignaciones de las señales como se muestra en la Tabla 12.

Tabla 12. Asignaciones RMN: “Mezcla Compuestos 2 y 3 - Epoxidación”.

# C	# Compuesto ¹	¹³ C (ppm) ²	DEPT ²	¹ H (ppm) ³
1		80.47 - 79.50	[CH]	3.31 - 3.25 (3.27, m)
2		26.89 - 26.83	[CH ₂]	1.95 - 1.85 (1.90, dt, J = 24.1, 5.3 Hz, H ^a) 1.71 - 1.64 (1.67, m, H ^b)
3		41.19 33.50	[CH ₂] [CH ₂]	1.67 - 1.61 (1.65, m, H ^a) 1.57 - 1.52 (1.51, m, H ^b) 3.02 - 2.96 (2.99, m, H ^a) 1.40 - 1.34 (1.37, m, H ^a)
4		72.12 - 83.03	[C]	
5	# 2 # 3	46.98 45.11	[CH] [CH]	1.71 - 1.64 (1.67, m)
6	# 2 # 3	72.53 20.32	[CH] [CH ₂]	5.46 (sa) 2.08 - 1.97 (2.02, m)
7		74.25 - 64.35	[C]	
8	# 2 # 3	27.76 56.55	[CH ₂] [CH]	1.87 - 1.81 (1.84, dt, J = 15.6, 5.0 Hz, H ^a) 1.67 - 1.61 (1.65, dd, J = 13.4, 9.5 Hz, H ^b) 3.02 - 2.99 (3.01, da, J = 6.1 Hz)
9	# 2 # 3	34.39 40.40	[CH ₂] [CH ₂]	1.79 - 1.73 (1.76, m, H ^a) 1.55 - 1.47 (1.50, m, H ^b) 2.16 - 2.09 (2.13, m, H ^a) 1.59 - 1.56 (1.57, m, H ^b)
10		38.89 - 37.33	[C]	
11	# 2 # 3	32.69 35.25	[CH]	1.77 - 1.71 (1.74, m) 1.62 - 1.56 (1.59, m)
12	# 2 # 3	16.37 18.60	[CH ₃]	0.94 - 0.89 (0.91, dd, J = 6.0, 6.0 Hz) 1.10 - 1.06 (1.07, dd, J = 6.9, 2.5 Hz)
13	# 2 # 3	16.11 18.02	[CH ₃]	0.94 - 0.89 (0.91, dd, J = 6.0, 6.0 Hz) 1.10 - 1.06 (1.07, dd, J = 6.9, 2.5 Hz)
14	# 2 # 3	29.88 24.81	[CH ₃]	1.43 (s) 1.55 (s)
15	# 2 # 3	13.26 13.31	[CH ₃]	1.33 (s) 1.05 (s)
1'		166.74 - 165.76	[C]	
2'		119.86 - 118.52	[CH]	6.47 - 6.32 (6.39, dd, J = 42.2, 16.0 Hz)
3'		145.50 - 144.32	[CH]	7.73 - 7.59 (7.65, dd, J = 37.7, 16.0 Hz)
4'		134.53 - 134.41	[C]	
5' - 9'		128.33 - 128.14	[CH]	7.56 - 7.49 (7.52, m)
6' - 8'		129.03 - 128.99	[CH]	7.42 - 7.36 (7.39, m)
7'		130.54 - 130.38	[CH]	7.42 - 7.36 (7.39, m)

¹ El número de compuesto se indica en el caso donde la asignación de hidrógeno y carbono difieren.

² ¹³C RMN y ¹³C DEPT, 101MHz, CDCl₃.

³ ¹H RMN y HSQC, 400MHz, CDCl₃.

5.4.4. Esterificación con Acido *p*-Bromobenzoico

Esta reacción se realizó con la finalidad de obtener un derivado cristalino, pero no se obtuvieron los cristales esperados. El pico para el ion molecular 550 ^{m/z} junto con el pico 552 ^{m/z} (Bromo isotópico), confirman la formación del éster esperado.

En el análisis de su espectro ¹H-RMN, se encontró un sistema de señales tipo AA'-BB' en la zona de los aromáticos a 7.87 y 7.57 ppm perteneciente al grupo anillo aromático del grupo *p*-

bromobenzoato, adicional a los sistemas debidos al grupo cinamato en la molécula y la señal a 4.88 ppm indica la formación de un éster; las señales para carbonos sp^2 a 165.71 y 165.61 ppm en el espectro de ^{13}C -RMN, son atribuidas a los grupos carbonilo del grupo *p*-bromobenzoato para cada una de las moléculas de mezcla; las asignaciones (Tabla 13) fueron determinadas con ayuda del experimento HSQC y en comparación con las señales de compuestos **2** y **3**.

Tabla 13. Asignaciones RMN: “Mezcla Compuestos **2** y **3** - Esterificación Ac. *p*-Bromobenzoico”.

# C	# Compuesto ¹	¹³ C (ppm) ²	DEPT ²	¹ H (ppm) ³
1		81.72 - 80.79	[CH]	4.92 - 4.84 (4.88, m)
2		23.69 - 23.52	[CH ₂]	1.85 - 1.76 (1.81, m)
3		33.44 - 33.30	[CH ₂]	3.18 - 3.01 (3.08, ddt, <i>J</i> = 15.4, 12.4, 3.4 Hz, H ^a) 1.60 - 1.53 (1.57, ddd, <i>J</i> = 11.8, 8.6, 4.0 Hz, H ^b)
4		82.29 - 82.08	[C]	
5	2	52.38	[CH]	2.08 - 2.01 (2.05, m)
	3	49.38	[CH]	1.58 - 1.49 (1.54, m)
6	2	115.93	[CH]	5.58 (sa)
	3	23.25	[CH ₂]	2.24 - 2-17 (2.20, dd, <i>J</i> = 16.0, 8.0 Hz, H ^a)
7		144.39 - 142.14	[C]	
8	2	22.76	[CH]	2.06 - 1.98 (2.02, m, H ^b)
	3	115.67		5.31 (sa)
9	2	35.83	[CH ₂]	1.71 - 1.68 (1.69, m, H ^a)
	3	41.02	[CH ₂]	1.40 - 1.37 (1.38, m, H ^b) 2.00 - 1.95 (1.96, d, <i>J</i> = 9.8 Hz, H ^a)
10		37.87 - 37.44	[C]	
11		35.22 - 34.99	[CH]	2.37 - 2.18 (2.26, m)
12		21.89 - 21.87	[CH ₃]	1.10 - 1.04 (1.07, m)
13		21.73 - 21.44	[CH ₃]	1.10 - 1.04 (1.07, m)
14		24.79 - 24.50	[CH ₃]	1.66 (s) - 1.62 (s)
15		13.99 - 13.79	[CH ₃]	1.25 (s) - 1.22 (s)
1'		166.14 - 165.99	[C]	
2'		120.11 - 119.91	[CH]	6.44 - 6.31 (6.37, dd, <i>J</i> = 28.4, 16.0 Hz)
3'		144.39 - 144.21	[CH]	7.69 - 7.58 (7.62, m)
4'		134.68 - 134.59	[C]	
5' - 9'		128.20 - 128.13	[CH]	7.54 - 7.48 (7.51, ddd, <i>J</i> = 13.3, 5.9, 3.8 Hz)
6' - 8'		129.02 - 129.03	[CH]	7.42 - 7.36 (7.38, m)
7'		130.38 - 130.30	[CH]	7.42 - 7.36 (7.38, m)
1''		165.71 - 165.61	[C]	
2''		129.71	[C]	
3'' - 7''		131.83	[CH]	7.59 - 7.55 (7.57, m)
4'' - 6''		131.23	[CH]	7.92 - 7.86 (7.89, m)
5''		128.09	[C]	

¹ El número de compuesto se indica en el caso donde la asignación de hidrógeno y carbono difieren.

² ^{13}C RMN y ^{13}C DEPT, 101MHz, CDCl₃.

³ 1H RMN y HSQC, 400MHz, CDCl₃.

La posición del grupo *p*-bromobenzoato fue determinada por medio del experimento HMBC, donde en la Figura 34 se observa de manera ampliada la correlación entre el grupo carbonilo del sustituyente (165.71 y 165.61 ppm) y el hidrogeno en C-1 (4.88 ppm).

Instituto de Quimica UNAM RG
 Dr. M. Jimenez
 Clave : MJE/DFL-13-pBr3
 No registro : 215
 CDCl3
 HMBC {400 MHz}
 Bruker Avance III
 14-02-12

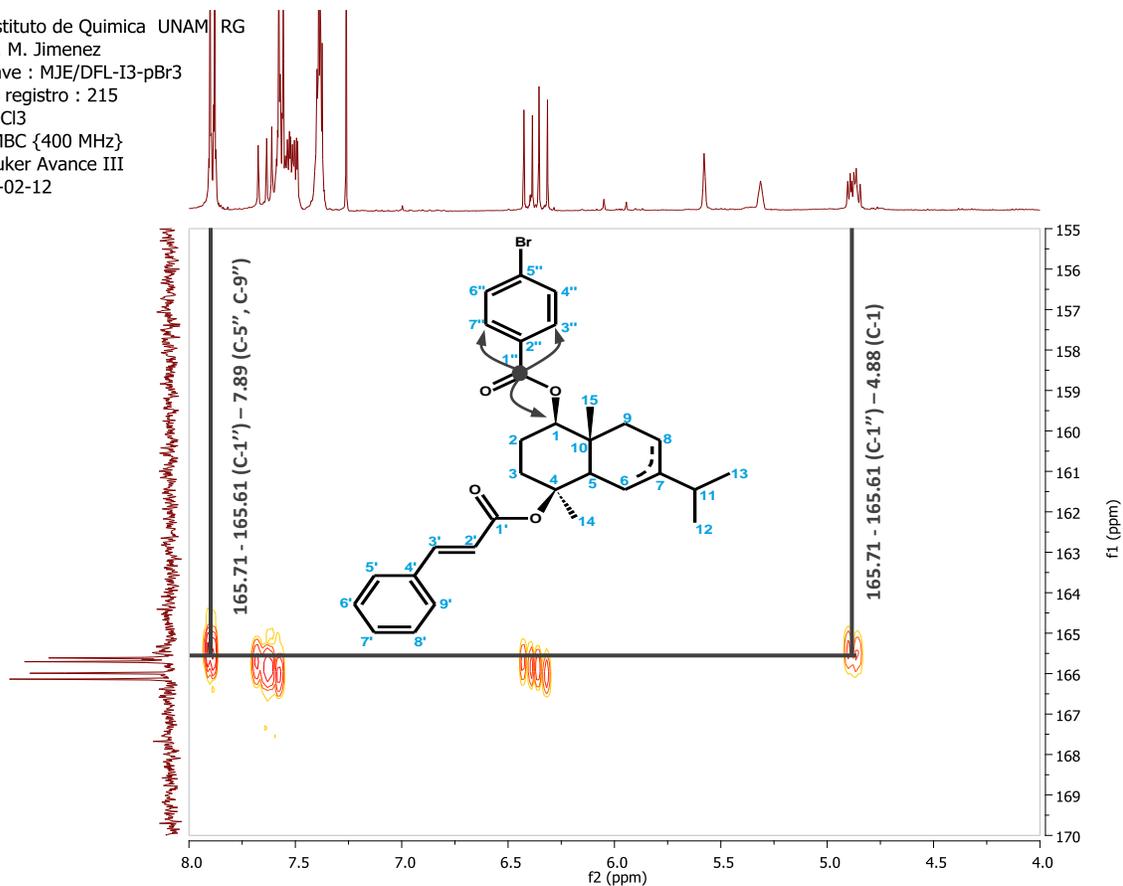


Figura 34. Espectro HMBC ampliado: "Mezcla Compuestos **2** y **3** - Esterificación Ac. *p*-Bromobenzoico".

5.4.5. Esterificación con Acido Cinámico

El pico para el ion molecular 498 m/z , confirma la adición de un nuevo grupo cinamato (+ 131 UMA) en la mezcla de compuestos.

Debido a la similitud de sus señales, las asignaciones y la confirmación de su estructura se hizo tomando en cuenta las nuevas señales para grupos carbonilo en ^{13}C -RMN a 166.94 y 166.81 ppm que presentan correlación particular en HMBC (Figura 35) con el protón a 4.79 ppm para la posición C-1; con esto en consideración las demás asignaciones (Tabla 14) fueron realizadas con ayuda del experimento HSQC, comparando además con las señales para la mezcla de moléculas inicial.

Tabla 14. Asignaciones RMN: “Mezcla Compuestos 2 y 3 - Esterificación Ac. Cinámico”.

# C	# Compuesto ¹	¹³ C (ppm) ²	DEPT ²	¹ H (ppm) ³
1		81.14 - 79.88	[CH]	4.83 - 4.74 (4.79, m)
2		23.73 - 23.56	[CH ₂]	1.79 - 1.69 (1.74, ddd, J = 19.4, 11.3, 5.5 Hz)
3		33.50 - 33.34	[CH ₂]	3.13 - 2.99 (3.06, td, J = 12.1, 2.8 Hz, H ^a) 1.56 - 1.39 (1.47, m, H ^b)
4		82.38 - 81.80	[C]	
5	2	52.39	[CH]	2.02 - 1.97 (1.99, dd, J = 6.9, 5.2 Hz)
	3	49.39	[CH]	1.52 - 1.44 (1.48, m)
6	2	116.01	[CH]	5.57 (sa)
	3	23.23	[CH ₂]	2.18 - 2.13 (2.15, d, J = 8.4 Hz, H ^b)
7		144.69, 142.01	[C]	
8	2	22.79	[CH]	2.06 - 1.98 (2.02, dd, J = 21.4, 6.5 Hz, H ^b)
	3	115.83		5.33 (sa)
9	2	35.69	[CH ₂]	1.72 - 1.67 (1.69, m, H ^a) 1.38 - 1.26 (1.32, m, H ^b)
	3	40.90	[CH ₂]	2.01 - 1.93 (1.96, m, H ^a)
10		37.73 - 37.31	[C]	
11		35.22 - 35.00	[CH]	2.35 - 2.18 (2.26, m)
12		21.89 - 21.87	[CH ₃]	
13		21.73 - 21.41	[CH ₃]	
14		24.81 - 24.52	[CH ₃]	1.65 - 1.61 (ss)
15		13.80 - 13.59	[CH ₃]	1.19 - 1.17 (ss)
1'		166.15 - 165.99	[C]	
2'		120.19 - 119.99	[CH]	6.44 - 6.30 (6.38, m)
3'		144.69 - 144.12	[CH]	7.73 - 7.56 (7.64, m)
4'		134.63 - 134.60	[C]	
5' - 9'		128.19 - 128.12	[CH]	7.56 - 7.46 (7.51, dd, J = 9.1, 7.0 Hz)
6' - 8'		128.99	[CH]	7.43 - 7.33 (7.38, m)
7'		130.34 - 130.23	[CH]	7.43 - 7.33 (7.38, m)
1''		166.94 - 166.81	[C]	
2''		118.69	[CH]	6.49 - 6.39 (6.42, m)
3''		144.33 - 144.28	[CH]	7.73 - 7.56 (7.64, m)
4''		134.60 - 134.55	[C]	
5'' - 9''		128.19	[CH]	7.56 - 7.46 (7.51, dd, J = 9.1, 7.0 Hz)
6'' - 8''		128.99	[CH]	7.43 - 7.33 (7.38, m)
7''		130.34 - 130.32	[CH]	7.43 - 7.33 (7.38, m)

¹ El número de compuesto se indica en el caso donde la asignación de hidrógeno y carbono difieren.

² ¹³C RMN y ¹³C DEPT, 101MHz, CDCl₃.

³ ¹H RMN y HSQC, 400MHz, CDCl₃.

Instituto de Química UNAM RG
 Dr. M. Jimenez
 Clave : MJE/DFL-13-SO-Cin
 No Registro : 926
 HMBC (400 MHz)
 CDCl₃
 Bruker Avance III
 26-04-12

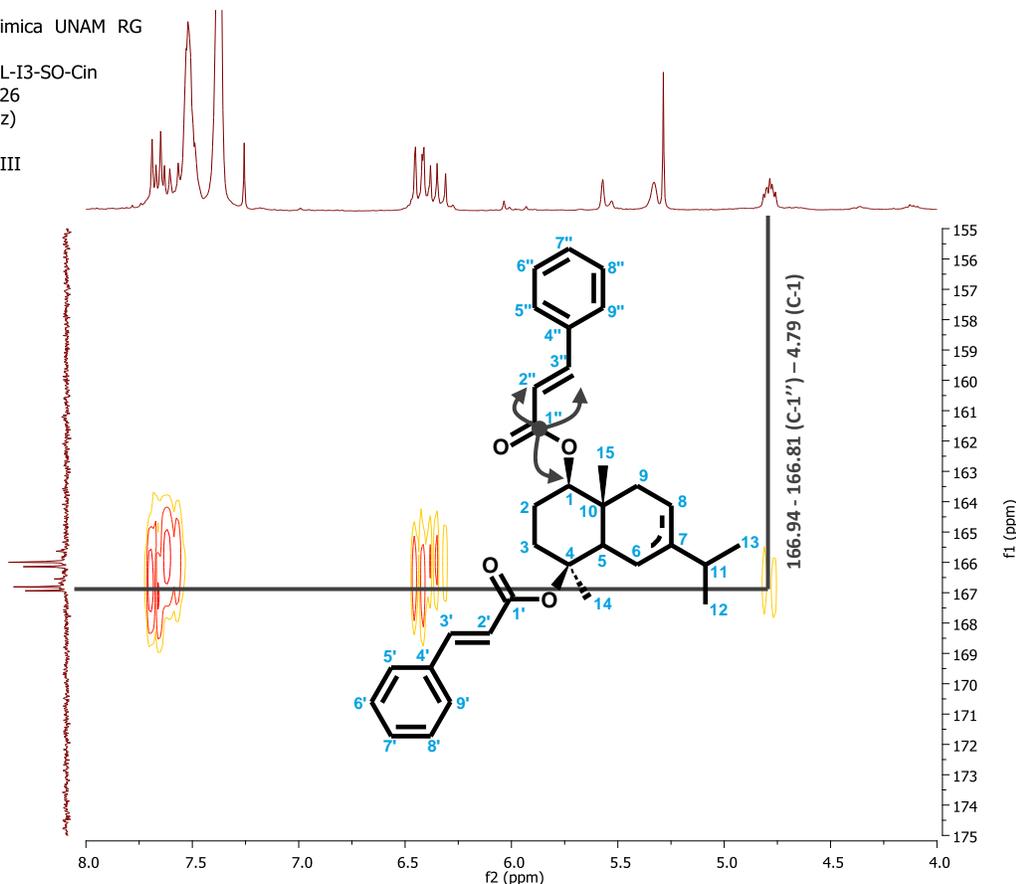


Figura 35. Espectro HMBC ampliado: "Mezcla Compuestos **2** y **3** - Esterificación Ac. Cinámico".

5.4.6. Reacción con Cloruro de Oxalilo

Al igual que en la esterificación de la mezcla con ácido cinámico, el espectro ¹H-RMN, sólo muestra la señal a 4.76 ppm que indicó la esterificación del grupo OH en posición C-1; como evidencia de la unión del grupo 1,2-dicarbonilo se encontraron las señales en ¹³C-RMN, para estos en 158.26 – 152.22 ppm (C-1'') y 158.12 – 158.08 ppm (C-2''), que con ayuda del experimento HMBC se confirmó que se encontraban enlazados con las posiciones C-1 y C-1''' en la molécula, como se muestra en la (Figura 36). Las asignaciones realizadas se encuentran en la Tabla 15.

La estructura fue finalmente confirmada con el análisis de la fragmentación de la molécula en el espectrómetro de masas teniendo en cuenta su espectro, en el cual no se logra observar el pico para ion molecular (660 ^{m/z}), sin embargo se encuentra claramente el ion 642 ^{m/z}, que representa la pérdida de agua en C-4'''; se proponen además otros fragmentos como se muestra en el Esquema 15 que confirman la dimerización de las moléculas.

Tabla 15. Asignaciones RMN: “Mezcla Compuestos 2 y 3 - Reacción Cloruro de Oxalilo”.

# C	# Compuesto ¹	¹³ C (ppm) ²	DEPT ²	¹ H (ppm) ³
1 - 1'''		84.41 - 83.17	[CH]	4.80 - 4.73 (4.76, dt, J = 10.7, 4.1 Hz)
2 - 2'''		23.28 - 23.10	[CH ₂]	1.85 - 1.67 (1.76, m)
3 - 3'''		33.33 - 33.19	[CH ₂]	3.14 - 3.01 (3.08, m, H ^a) 1.52 - 1.40 (1.46, m, H ^b)
4 - 4'''		81.99 - 81.43	[C]	
5 - 5'''	2	52.24	[CH]	1.98 - 1.91 (1.95, m)
	3	49.30	[CH]	1.49 - 1.40 (1.44, m)
6 - 6'''	2	115.68	[CH]	5.54 (sa)
	3	23.10	[CH ₂]	2.17 - 2.12 (2.14, m, H ^a) 1.86 - 1.74 (1.79, m, H ^b)
7 - 7'''		144.44 - 142.04	[C]	
8 - 8'''	2	22.72	[CH ₂]	2.12 - 1.98 (2.04, m, H ^a)
	3	115.56	[CH]	5.31 (da, J = 3.8 Hz)
9 - 9'''	2	35.58	[CH ₂]	1.98 - 1.88 (1.93, m, H ^a) 1.40 - 1.28 (1.34, m, H ^b)
	3	40.76	[CH ₂]	1.75 - 1.67 (1.72, m, H ^b)
10 - 10'''		37.66 - 37.27	[C]	
11 - 11'''		35.19 - 34.99	[CH]	2.34 - 2.16 (2.24, m)
12 - 12'''		21.84	[CH ₃]	1.08 - 1.02 (1.05, m)
13 - 13'''		21.72 - 21.34	[CH ₃]	1.08 - 1.02 (1.05, m)
14 - 14'''		24.75 - 24.45	[CH ₃]	1.63 - 1.60 (ss)
15		13.54 - 13.50	[CH ₃]	1.16 - 1.13 (ss)
1'		166.08 - 165.92	[C]	
2'		120.03 - 119.82	[CH]	6.41 - 6.27 (6.34, dd, J = 28.7, 16.0 Hz)
3'		144.44 - 144.24	[CH]	7.67 - 7.53 (7.60, dd, J = 27.1, 16.0 Hz)
4'		134.64 - 134.54	[C]	
5' - 9'		128.18 - 128.12	[CH]	7.54 - 7.45 (7.50, m)
6' - 8'		129.02 - 129.00	[CH]	7.41 - 7.35 (7.38, td, J = 4.8, 3.2 Hz)
7'		130.38 - 130.30	[CH]	7.41 - 7.35 (7.38, td, J = 4.8, 3.2 Hz)
1''		158.26 - 158.22	[C]	
2''		158.12 - 158.08	[C]	
15'''		13.35 - 13.31	[CH ₃]	1.16 - 1.13 (ss)

¹El número de compuesto se indica en el caso donde la asignación de hidrógeno y carbono difieren.

²¹³C RMN y ¹³C DEPT, 101MHz, CDCl₃.

³¹H RMN y HSQC, 400MHz, CDCl₃.

Instituto de Química UNAM RG
 Dr. M. Jimenez
 Clave : MJE/DFL-13-NO2Cin
 No Registro : 505
 HMBC (400 MHz)
 CDCl3
 Bruker Avance III
 15-03-12

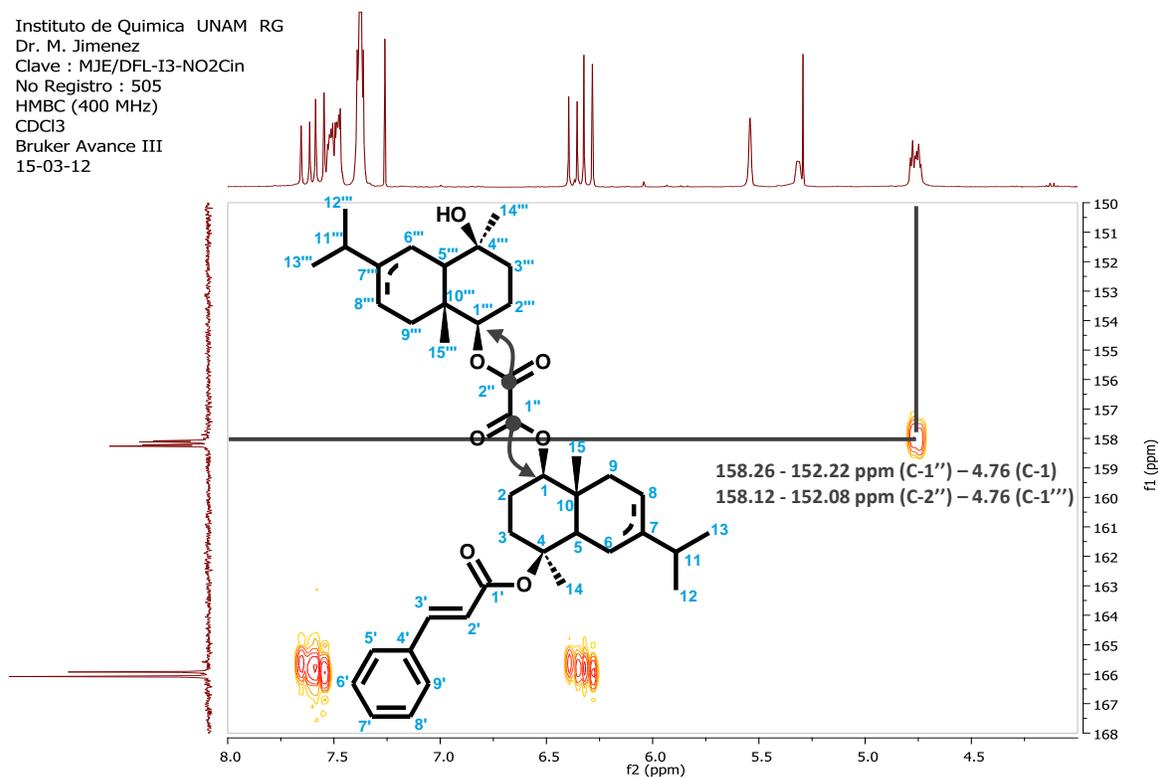
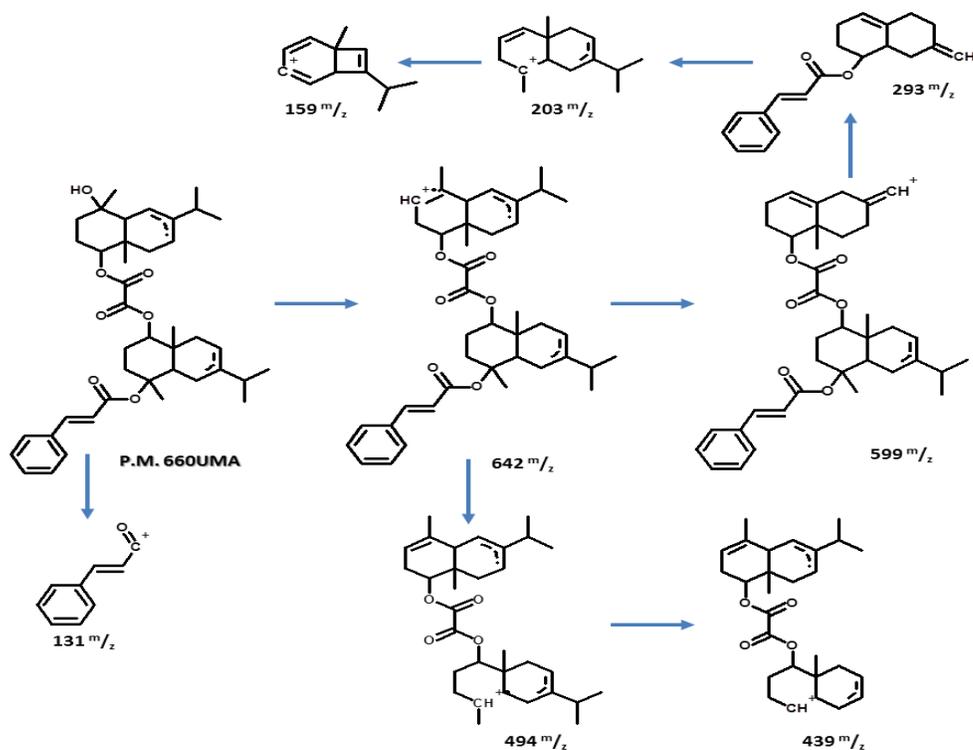


Figura 36. Espectro HMBC ampliado: "Mezcla Compuestos 2 y 3 - Reacción Cloruro de Oxalilo".



Esquema 15. Fraccionamiento propuesto por espectroscopia de masas para la "Mezcla Compuestos 2 y 3 - Reacción Cloruro de Oxalilo".

5.5. Actividad Biológica

Una vez obtenidos e identificados los derivados de los compuestos aislados de *V. persicifolia*, se procedió a realizar el análisis de sus propiedades biológicas como antioxidante y antiinflamatorio como se muestra a continuación:

5.5.1. Actividad Antioxidante

La actividad para prevenir y/o evitar la oxidación de sustratos en los compuestos obtenidos y sus derivados, mostró de manera general que la actividad radica en la doble ligadura en el esqueleto eudesmánico, ya que esta se ve disminuida debido al intercambio de grupo funcional por grupos epóxido o por impedimento estérico sobre la misma. El análisis y discusión de los resultados obtenidos para las diferentes pruebas realizadas se muestran a continuación:

Actividad Inhibitoria de la Peroxidación Lipídica

En los compuestos evaluados, la inhibición de la peroxidación solo fue elevada, a nivel del control positivo (BHT) para el compuesto **1** (93% a una dosis de 100 μ M), sin embargo, al realizar la epoxidación de su doble ligadura su actividad se pierde rotundamente para los dos productos de esta reacción, como se muestra en la Figura 37, esto indicó que la doble ligadura de este compuesto tiene la capacidad de inhibir la propagación de la peroxidación, posiblemente al atrapar los radicales por adición de estos mismos a su estructura.

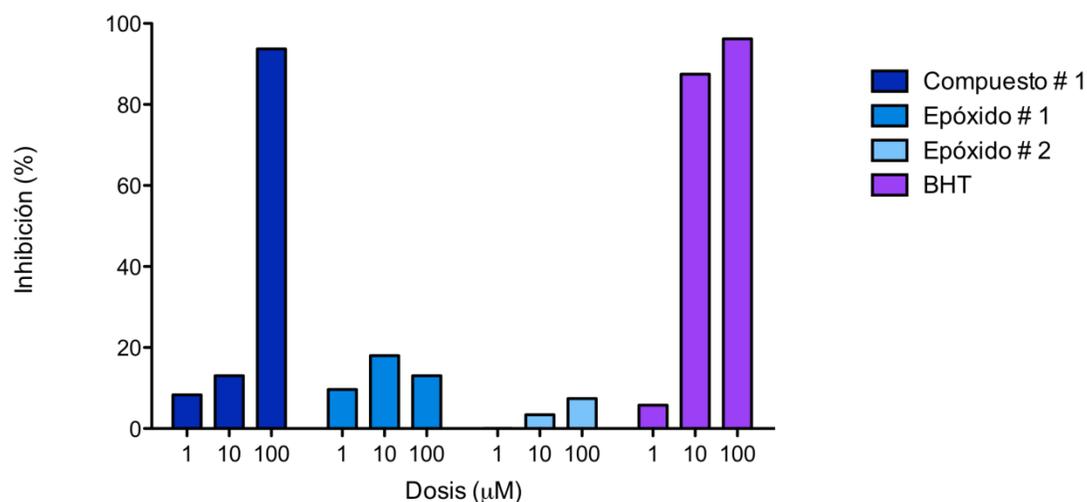


Figura 37. Inhibición de la peroxidación lipídica (dosis: 1, 10 y 100 μ M), para el compuesto **1** y sus Derivados.

La Mezcla de Compuestos **2** y **3** y su grupo de derivados no presentaron actividad significativa para la inhibición de la peroxidación (Figura 38), aunque estos compuestos presenten dobles ligaduras en el esqueleto eudesmano (al igual que **1**), es posible que la presencia del grupo cinamato impida, por razones estéricas o de repulsiones electrónicas, su reacción con los productos de la

peroxidación, esto como perspectiva a la investigación, se podría comprobar realizando la hidrólisis del grupo cinamato y probando la actividad de los compuestos con el grupo OH libre.

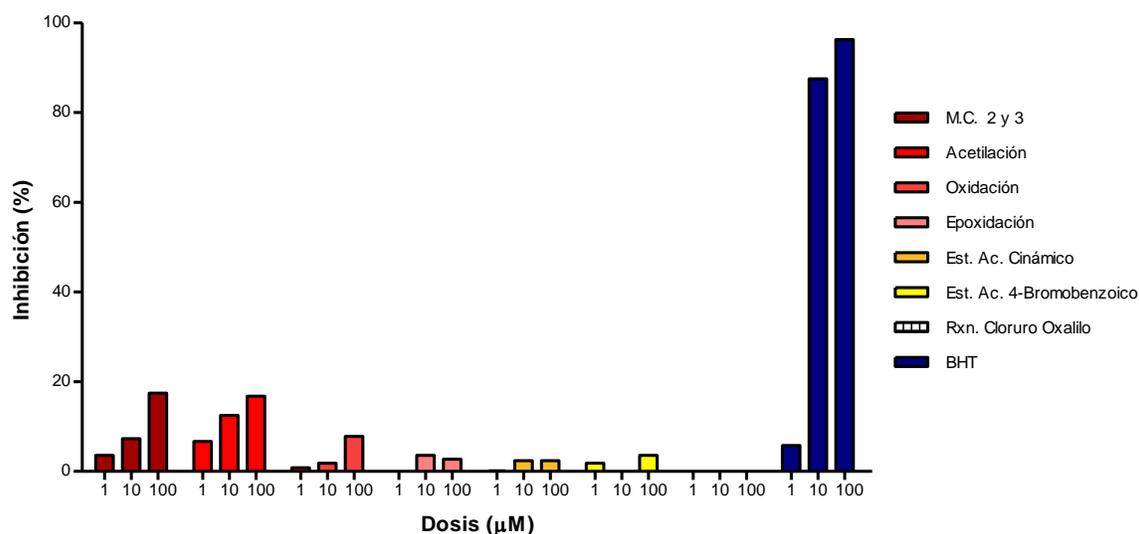


Figura 38. Inhibición de la peroxidación lipídica (dosis: 1, 10 y 100μM), para la mezcla de compuestos **2** y **3**, y sus derivados.

Actividad Reductora sobre el Radical DPPH

A diferencia del ensayo TBARS, ninguno de los compuestos y derivados fue activo en el ensayo usando el radical DPPH (Figura 39), la razón del resultado radica en la diferencia de mediciones en ambas pruebas, el ensayo de TBARS como se ha indicado antes mide la actividad inhibitoria de la peroxidación de lípidos en la cual se forman radicales altamente reactivos sobre átomos de carbono y oxígeno, mientras que la estructura del radical DPPH le confiere una alta estabilidad, dificultando su reducción con sustratos impedidos en condiciones suaves de reacción (55), como es el caso del compuesto **1**.

Para los extractos acuosos de la planta *V. encelioides* (56) se encontró por medio del ensayo con DPPH que su actividad era baja; ningún reporte adicional fue encontrado para la actividad antioxidante en el género *Verbesina* o para compuestos sesquiterpénicos, aportando información al número de reportes para actividad antioxidante de compuestos sesquiterpénicos eudesmano en el género.

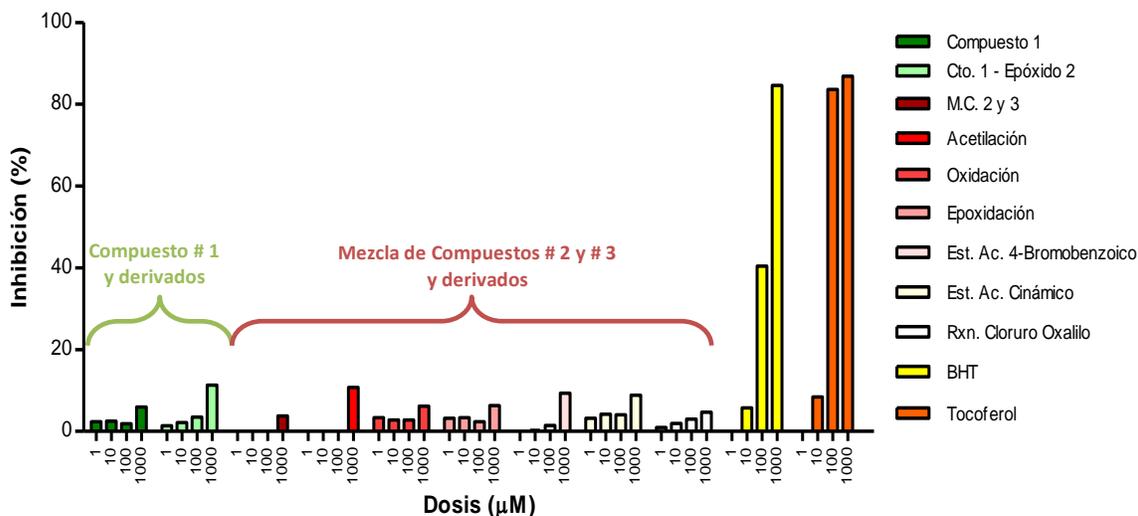


Figura 39. Actividad reductora sobre el radical DPPH (dosis: 1, 10, 100 y 1000 µM), para **1** y la mezcla de compuestos **2 y 3** y sus respectivos derivados.

5.5.2. Actividad Antiinflamatoria

El Compuesto **1** y sus derivados presentaron baja actividad en el ensayo con TPA; la actividad del extracto hexánico de *V. persicifolia* fue reportada por Mejía-Flores en 2007 (27), la cual en comparación indica que este compuesto no es representativo para la actividad en el extracto. Por otra parte, en estudios previos se ha encontrado (46; 47) que la actividad antiinflamatoria en estructuras similares a **1** que presentan grupos carboxilo (COOH) en su estructura, muestran actividades mayores, siendo una interesante perspectiva para futuros trabajos la modificación de esta clase de compuestos con el fin de obtener esta funcionalidad y observar los cambios en su actividad.

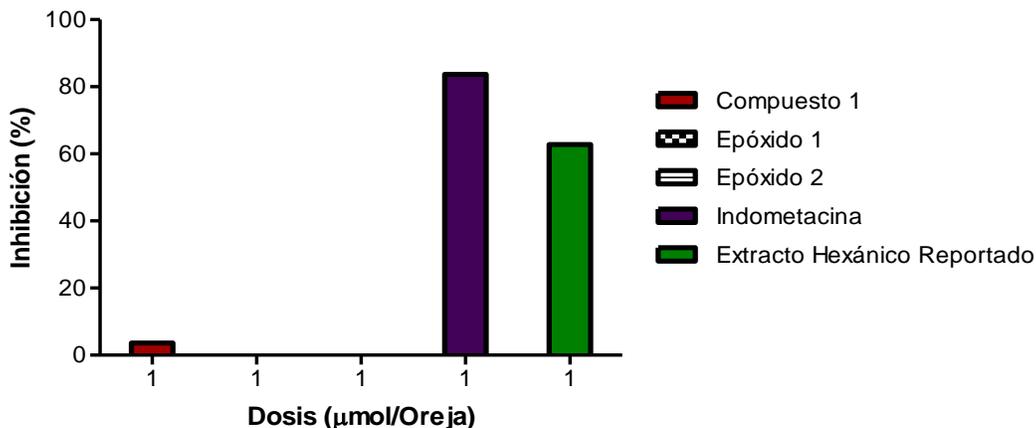


Figura 40. Actividad antiinflamatoria en modelo de edema inducido con TPA del compuesto **1** y sus derivados.

La mezcla de compuestos **2** y **3**, presentó 34% disminución de la inflamación, lo que comparado con el 63% presentado por el extracto hexánico ya reportado (27), permite deducir que esta mezcla de compuestos contribuye significativamente a la actividad antiinflamatoria de la planta.

La actividad biológica de la mezcla se alteró al realizar las modificaciones en su estructura (Figura 41), realizando las siguientes observaciones:

- La actividad de las moléculas se vio aumentada cuando el grupo OH en posición C-1 de las moléculas fue esterificado con ácido cinámico y para la formación del dímero con puente dicarbonílico; para el caso del ácido cinámico, se ha reportado que este ácido y sus ésteres poseen actividad antiinflamatoria (57; 58), lo que hace suponer que este grupo tiene efecto en la actividad. En el caso del dímero, para este aumento se plantea una sinergia entre ambos núcleos eudesmánicos además del grupo cinamato que aún se encuentra en la estructura.
- Los productos de la reacción epoxidación no presentaron cambios drásticos en la inhibición de la inflamación, lo que podría indicar que la doble ligadura en el esqueleto eudesmano de estos compuestos no afecta su actividad antiinflamatoria.
- La acetilación y p-bromobenzoilación de la mezcla de compuestos disminuyeron su actividad, lo que da un indicio que el grupo OH en posición C-1 juega un papel importante en su actividad, siendo esta actividad selectiva a la clase de sustituyente en dicha posición.
- La oxidación del grupo OH (C-1) genera una pérdida rotunda de la actividad, lo que confirma que el oxígeno con hibridación sp^2 en esta posición es parte fundamental para su actividad antiinflamatoria.

Con esto se determinó que el grupo hidroxilo en C-1 en sinergia con el grupo cinamato en C-4, son fuente de la actividad antiinflamatoria de este compuesto, y que la esterificación de la posición C-1 con ácidos de actividad inflamatoria reconocida podrían aumentar su actividad.

Mejía-Flores en 2007 (27), reportó la actividad antiinflamatoria del sesquiterpeno eudesmano mostrado en la Figura 6, cuya diferencia con los compuestos aislados en este trabajo radica en el grupo hidroxilo adicional en C-3, este aumento en su actividad concuerda con lo ya dicho para la actividad antiinflamatoria de los compuestos **2** y **3**, además de los reportes en sesquiterpenos eudesmano (15), que indican que el patrón de oxigenación de estos compuestos es parte vital de su actividad biológica, en este caso antiinflamatoria.

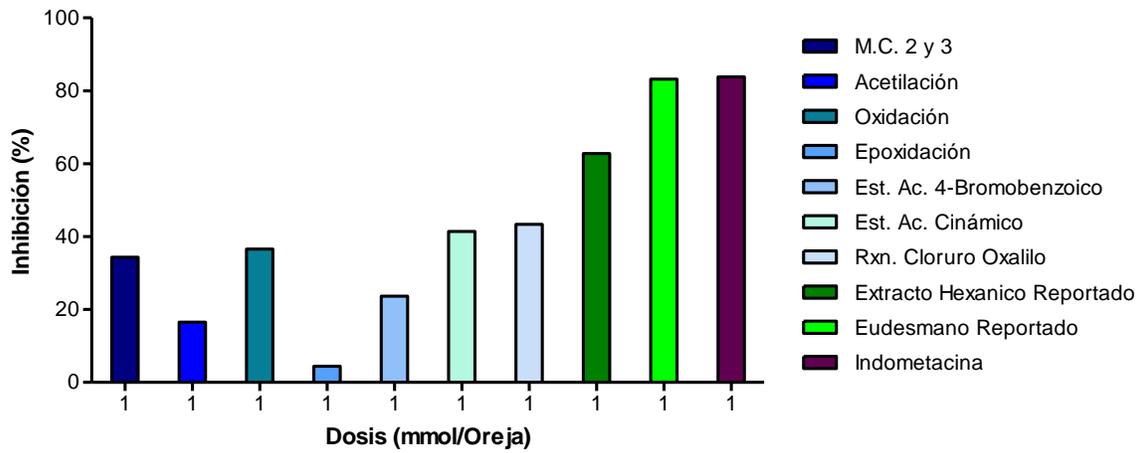


Figura 41. Actividad antiinflamatoria en modelo de edema inducido con TPA de la mezcla de compuestos **2** y **3**, y sus derivados.

CAPÍTULO VI.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

6.1. Conclusiones

Se separó, purificó e identificó el nuevo compuesto $(-)-(1\beta, 7\alpha, 10\beta)-(10\rightarrow 1)abeo-eudesm-4,5-en-11-ol$ (**1**) con 1% de rendimiento en el extracto hexánico de las hojas de *V. persicifolia*, el cual presenta una transposición 10-desmetil-1-metil en su esqueleto eudesmano poco usual en este tipo de estructuras, proponiéndose que su biosíntesis desde el núcleo eudesmano es generada por el intercambio del grupo metilo en C-10 por medio de una reacción de ciclopropanación y su posterior apertura dando lugar a la migración del grupo metilo en C-1.

Se aisló e identificó el compuesto $(+)-4\beta$ -Cinamoiloxi- 1β -Hidroxi eudesm-6,7-eno (**2**) y su isómero $(+)-4\beta$ -Cinamoiloxi- 1β -Hidroxi eudesm-7,8-eno (**3**), encontrando reportes para **2** en *V. persicifolia* y otras especies del género; **3** ha sido reportado en otras especies del género, pero no se encontraron registros en la planta.

Para el compuesto **1**, se obtuvieron dos productos derivados de su reacción de epoxidación, uno de los cuales fue formado por un ataque nucleofílico previo a la epoxidación normal de la molécula, produciendo un derivado del tipo 1-metil-10-desmetildihidroagarofurano.

A causa de la complejidad en su separación, se realizaron las reacciones de derivatización para la mezcla de compuestos **2** y **3**, obteniendo e identificando los productos para las reacciones de acetilación, epoxidación, oxidación, esterificación con ácido *p*-bromobenzoico, esterificación con ácido cinámico y una reacción de dimerización no esperada del compuesto eudesmanico con cloruro de oxalilo.

El compuesto **1**, presentó una alta inhibición de la peroxidación de lípidos (93% a $100\mu\text{M}$), la cual se vio rotundamente disminuida al realizar la reacción de epoxidación, proponiendo que la actividad inhibidora de la peroxidación se encuentra en la doble ligadura en posición C-4; la actividad en el ensayo de DPPH para este compuesto y sus derivados fue baja, lo cual es debido a la estabilidad y reactividad de este radical en comparación con los radicales formados con el método de TBARS; Por último este compuesto y sus derivados resultaron ser inactivos en las pruebas antiinflamatorias.

La mezcla de compuestos **2** y **3** y sus derivados, no mostraron actividad en los ensayos de actividad antioxidante por TBARS y DPPH. Por otro lado, esta mezcla presentó 34% de inhibición de la inflamación, valor que fue alterado al realizar el análisis en sus derivados, que al ser analizados se concluyó que el grupo hidroxilo en la posición C-1 y el grupo cinamato en la molécula son los sitios clave de los que depende su actividad.

Aunque fueron pocos los compuestos obtenidos con valores significativos de actividad biológica, este estudio proporciona información importante acerca de sus grupos funcionales, estructuras y su actividad, además de plantear nuevas propuestas de modificación que podrían llegar a generar compuestos biológicamente más efectivos.

6.2. Recomendaciones y Perspectivas

De acuerdo a los resultados de esta investigación se recomienda realizar nuevos productos derivados de estas estructuras de acuerdo a las recomendaciones y referencias presentadas en el trabajo. Además, realizar nuevas pruebas de actividad biológica, sugiriendo la actividad citotóxica, antimicrobiana, entre otras, con el fin de aumentar el rango de conocimiento de las mismas.

CAPÍTULO VII.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Tyler, V. E. Phytomedicines: Back to the Future. *J. Nat. Prod.* **1999**. *62*, 1589-1592.
2. Mann, J. *Secondary Metabolism*, 2^a Ed.; Oxford University Press: USA, 1987.
3. Newman, D. J.; Cragg, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*(3), 461-477.
4. Beutler, J. A. **2009**. 9.11. Natural Products as a Foundation for Drug Discovery. 9, 2009, *Curr. Protoc. Pharm.* *46*, 9.11.1-9.11.21.
5. Reddy, L.; Odhav, B.; Bhoola, K. D. Natural Products for Cancer Prevention: a Global Perspective. *Pharm. and Therap.* **2003**, *99*(1), 1-13.
6. Mukherjee, A. K. *et al.* Advances in Cancer Therapy with Plant Based Natural Products. *Curr. Med. Chem.* **2001**. *8*(12), 1467-1486.
7. Wang, H. X.; Ng, T. B. Natural Products with Hypoglycemic, Hypotensive, Hypocholesterolemic, Antiatherosclerotic and Antithrombotic Activities. *Life Sci.* **1999**. *65*(25), 2663-2677.
8. Roderick, W. R. Structural Variety of Natural Products. *J. Chem. Ed.* **1962**. *39*(1), 3-11.
9. Croteau, R.; Kutchan, T. M.; Lewis, N. G. 24. Natural Products (Secondary Metabolites). En *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*; B. Buchanan, W. Gruissem y R. Jones. Ed.; American Society of Plant Physiologist: Maryland, USA, 2000; 1250-1318.
10. Breitmaier, E., Ed. *Terpenes. Flavors, Fragrances, Pharmaca, Pheromones*; Wiley VCH: Weinheim, Germany, 2006.
11. Bouvier, F.; Rahier, A.; Camara, B. Biogenesis, molecular regulation and function of plant isoprenoids. *Prog. Lipid Res.* **2005**. *44*(6), 357-429.
12. Paul M. Dewick. *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*. 3^a Ed.; Jonh Wiley & Sons Ltd, United Kingdom, 2009, pp 187-246.
13. Fraga, B. M. Natural Sesquiterpenoids. *Nat. Prod. Rep.* **2009**. *26*, 1125-1155.
14. . Degenhard, J.; Köllner, T. G.; Gershenzon, J. Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants. *Phytochemistry*. **2009**. *70*, 1621-1637.
15. Wu, Q. X.; Shi, Y. P.; Jia, Z. J.. Eudesmane sesquiterpenoids for the *Asteraceae* Family. *Nat. Prod. Rep.* **2006**. *23*, 699-734.

16. Bohlmann, F. *et al.* Eudesmane Derivatives from *Verbesina* Species. *Phytochemistry*. **1980**. *19*, 2391-2397.
17. Bohlmann, F. *et al.* Two New Eudesmane Cinnamates from *Verbesina sordescens*. *Phytochemistry*. **1982**. *21*(7), 1663-1664.
18. Castro, V.; Jakupovic, J.; Bohlmann, F. New Oplodiol Derivatives from *Verbesina oerstediana*. *Rev. Latinoamer. Quím.* **1984**. *15*(3), 111-114.
19. Domínguez, X.A. *et al.* Constituents from *Verbesina oncophora*, *V. lindheimeri*. *Rev. Latinoamer. Quím.* **1987**. *18*(3), 113.
20. Jacupovic, J. *et al.* Further Eudesmane Derivatives From *Verbesina* Species. *Planta Med.* **1987**. *53*(1), 39-42.
21. Amaro-Luis, J. M. Eudesmane Derivatives from *Verbesina turbacensis*. *J. Braz. Chem. Soc.* **2002**. *13*(3), 352-357.
22. Bruno-Colmenares, J. *et al.* Absolute Configuration of Two Eudesmane Derivatives from *Verbesina turbacensis* H.B.K. *J. Chem. Crystallogr.* **2010**. *40*(2), 110-115.
23. Xu, W. H. *et al.* Two New Eudesmane Derivatives from *Verbesina Virgata*. *Chin. Chem. Lett.* **2010**. *21*, 693-695.
24. Instituto Nacional Indigenista. *Flora Medicinal Indigena de México*. Tomo II; México D.F., 1994; pp 900.
25. Instituto Nacional Indigenista. *Atlas de las Plantas de la Medicina Tracional Mexicana*. Tomo II; México D.F., 1994; pp 832.
26. Avila-Loria, M.; Ortega, A. Estudio Químico de la Planta *Verbesina persicifolia*. Tesis Licenciatura. UNAM, Ciudad de México, 1982.
27. Mejía-Flores, M.; García-Argáez, A. N. Aislamiento de un Nuevo Eudesmano Citotóxico de las Partes Aereas de *Verbesina persicifolia* DC. Tesis Licenciatura. UNAM, Ciudad de México, 2007.
28. Pérez-Gutiérrez, R. M. Actividad Hipoglucemiante de *Salpianthus arenarius*, *Acrocomia mexicana*, *Agarista mexicana* y *Verbesina persicifolia*. Tesis Doctoral. UAM, Ciudad de México, 1997.
29. Mejía-Flores, M.; Martínez-Vázquez, M. Evaluación genotóxica de extractos y compuestos obtenidos de *Verbesina persicifolia* DC. Tesis Maestría. UNAM, Ciudad de México, 2010.
30. Ames, B. N. Foreword. En *Natural Antioxidants in Human Health and Disease*; Balz F. Ed.; Academic Press, INC.: California, USA, 1994; pp xix - xxv.

31. Halliwell B.; Gutteridge M. C. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 4^a Ed.; Oxford University Press: New York, 2007; pp 80.
32. Garewal, H. S. *Antioxidants and Disease Prevention*; CRC Press: USA, 1997, pp. 1-2.
33. Inserra, P. F.; Ardestani, S. K.; Watson, R. R. 3. Antioxidants and Immune Function. En *Antioxidants and Disease Prevention*; Harinder, S. G. Ed.; CRC Press: USA, 1997, pp 19-22.
34. Pereira-Nunes, X. Biological Oxidations and Antioxidant Activity of Natural Products. En *Phytochemicals as Nutraceuticals - Global Approaches to their Role in Nutrition and Health*; Venketeshwer R.; InTech: Rijeka, Croatia, 2012.
35. Rice-Evans, C. A.; Miller, N. J.; Paganga, G. Structure-Antioxidant Activity Relationships of Flavonoids and Phenolic Acids. *Free Rad. Bio. Med.* **1996**. 20(7), 933-956.
36. Ng, T. B.; Liu, F.; Wang, Z. T. Antioxidative Activity of Natural Products from Plants. *Life Sci.* **2000**. 66(8), 709-723.
37. Dotan, Y.; Lichtenberg, D.; Pinchuk, I. Lipid Peroxidation cannot be used as a Universal Criterion of Oxidative Stress. *Prog. Lipid Res.* **2004**. 43, 200-227.
38. Measurement of Reactive Species. En *Free Radicals in Boilogy and Medicine*. 4^a Ed.; Halliwell B. y Gutteridge M.C.; Oxford University Press: New York, 2007; pp 326-329.
39. Brand-Williams, W.; Cuvieeler, M.E.; Berset, C. Use of a Free Radical Method to Evualuate Antioxidant Activity. *LWT - Food Sci. Technol.* **1995**. 28, 25-30.
40. Bodamyali, T. *et al.* 1. Introduction. En *Free Radicals and Inflammation*; Winyard, P.G.; Blake, D.R. y Evans, C.H.; Birkhäuser Verlag: Basel, Switzerland, 1999; pp 1-2.
41. Burke, A., Smyth, E.; FitzGerald, G. A. Agentes Analgésicos-Antipiréticos; Farmacoterapia de la Gota. En *Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica*; Goodman & Gilligan; McGraw-Hill Interamericana: 2006; 671-685.
42. Nonopioid Analgesics, Nonsteroidal Antiinflammatories, and Antigout Drugs. En *Pharmacology: An Introduction*. 6^a Ed.; Hitner, H. y Nagle, B.; McGraw-Hill: 2012, 20, págs. 293-294.
43. Yuan, G. *et al.* Natural products and anti-inflammatory activity. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* **2006**. 15(2), 143-152.
44. Gautam, G.; Jachak, S. M. Recent developments in anti-inflammatory natural products. *Med. Res. Rev.* **2009**, 29(5), 767-820.
45. Hall, I. H. *et al.* Anti-inflammatory activity of sesquiterpene lactones and related compounds. *J. Pharm. Sci.* **1979**. 68(5), 537-542.

46. Hernández, V. *et al.* Anti-inflammatory profile of dehydrocostic acid, a novel sesquiterpene acid with a pharmacophoric conjugated diene. 2005, *Eur. J. Pharm. Sci.* **2005**. 26, 162-169.
47. Muhamad, A. New Eudesmane Derivatives and Other Sesquiterpenes from the Epigeal Parts of *Dittrichia graveolens*. *Chem. Pharm. Bull.* **2008**. 56(11), 1535-1545.
48. McChesneya, J. D.; Venkataramana, S. K.; Henria, J. T. Plant natural products: Back to the future or into extinction?. *Phytochemistry*. **2007**. 68(14), 2015–2022.
49. Neises, B.; Steglich, W. Simple Method for the Esterification of Carboxylic Acids. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1978**. 17(7), 522-524.
50. Pereira-Chavez, J.; Gottlieb, O. R.; Yoshida, M. 10-Desmethyl-1-Methyl-Eudesmanes from *Ocotea corymbosa*. *Phytochemistry*. **1995**. 39(4), 849-852.
51. Dai, J. *et al.* Metabolites from the Endophytic Fungus *Nodulisporium sp.* from *Juniperus cedre*. *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 3498-3506.
52. Raharivelomanana, P. *et al.* Eudesmane Sesquiterpenes from *Laggera alata*. *Phytochemistry*. **1998**. 47(6), 1085-1088.
53. Pretsch, E.; Bühlmann, P.; Bärderstschler, M. *Structure Determination of Organic Compounds . Tables of Spectral Data*. 4^a Ed.; Springer: Berlin, 2008; 87-92.
54. Lu, T.; Vargas, D.; Fischer, N. H. Sesquiterpenes from *Brintonia discoidea*. *Phytochemistry*. **1993**. 34(3), 737-742.
55. Fossey, J.; Lefort, D.; Sorba, J. *Free Radicals in Organic Chemistry*; John Wiley & Sons: Paris, 1995; pp 31-72.
56. Jain, S. C.; Singh, R.; Jain, R. Antimicrobial and Antioxidant Potentials of *Verbesina encelioides* (Cav.) Benth. and Hook. Fil ex Gray. *Res. J. Med. Plant.* **2008**. 2(2), 61-65.
57. Godoy, M.E. *et al.* Antiinflammatory activity of Cinnamic Acid Esters. *Molecules*. **2000**. 5, 5-6.
58. Sharma, P. Cinnamic acid derivatives: A new chapter of various pharmacological activities. *J. Chem. Pharm. Res.* **2001**. 3(2), 403-423.

CAPITULO VIII.

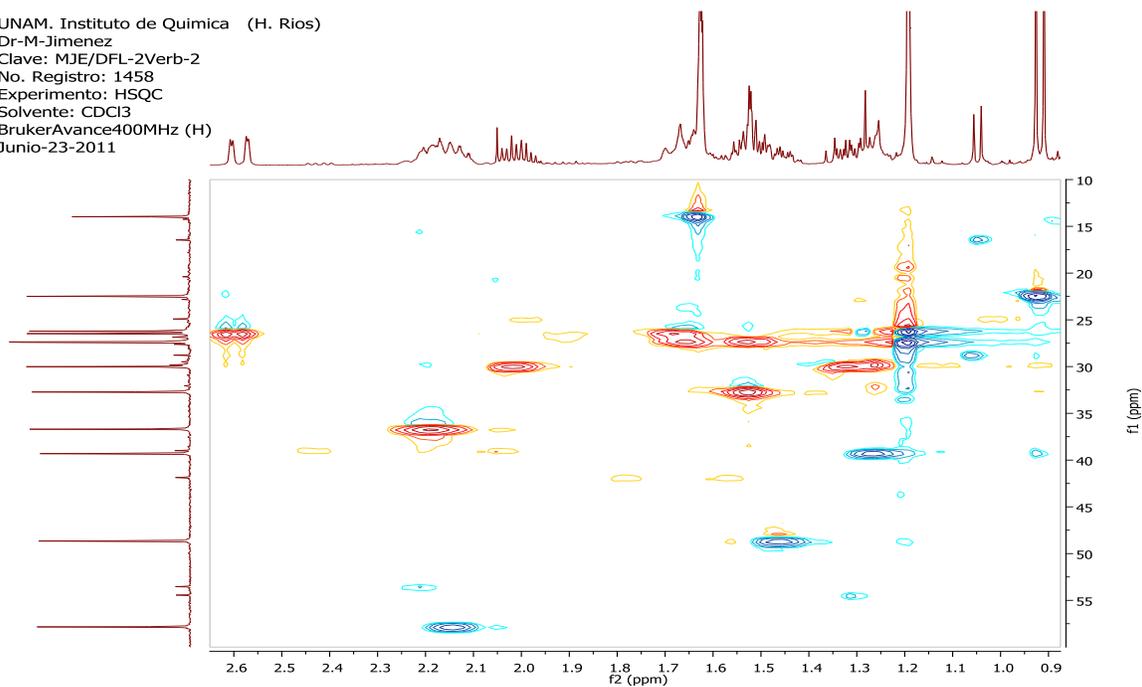
ANEXOS

ANEXO I.

Espectroscopia: "Compuesto 1".

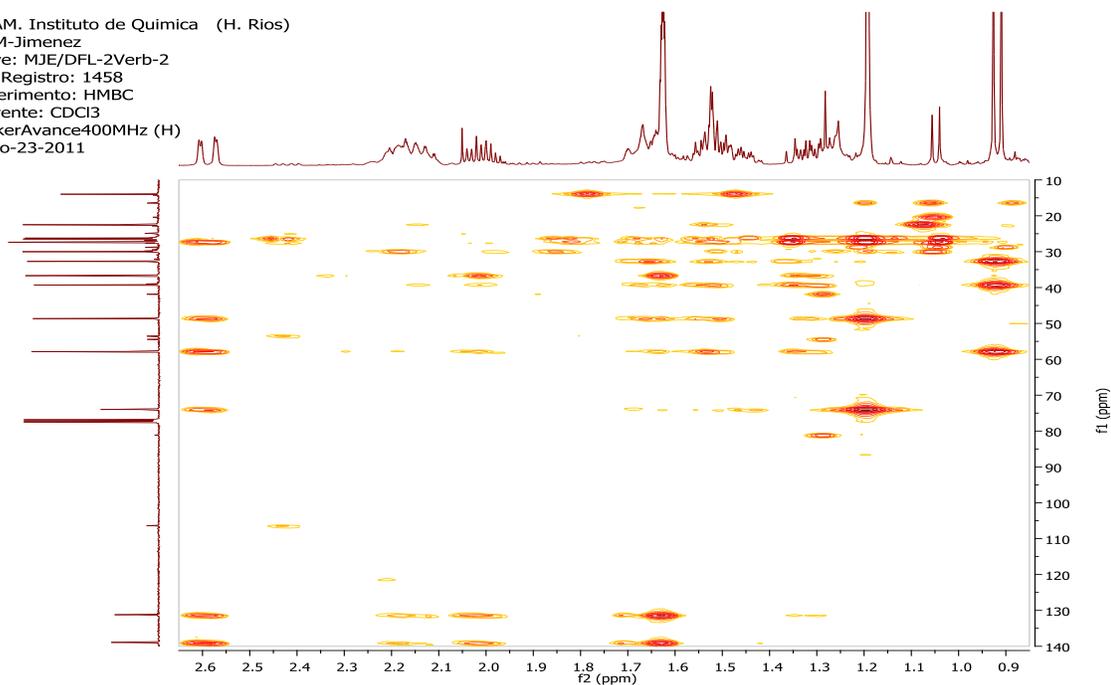
1. Espectro HSQC

UNAM. Instituto de Quimica (H. Rios)
Dr-M-Jimenez
Clave: MJE/DFL-2Verb-2
No. Registro: 1458
Experimento: HSQC
Solvente: CDCl3
BrukerAvance400MHz (H)
Junio-23-2011



2. Espectro HMBC

UNAM. Instituto de Quimica (H. Rios)
Dr-M-Jimenez
Clave: MJE/DFL-2Verb-2
No. Registro: 1458
Experimento: HMBC
Solvente: CDCl3
BrukerAvance400MHz (H)
Junio-23-2011



3. Tabla de Correlaciones del Experimento HMBC

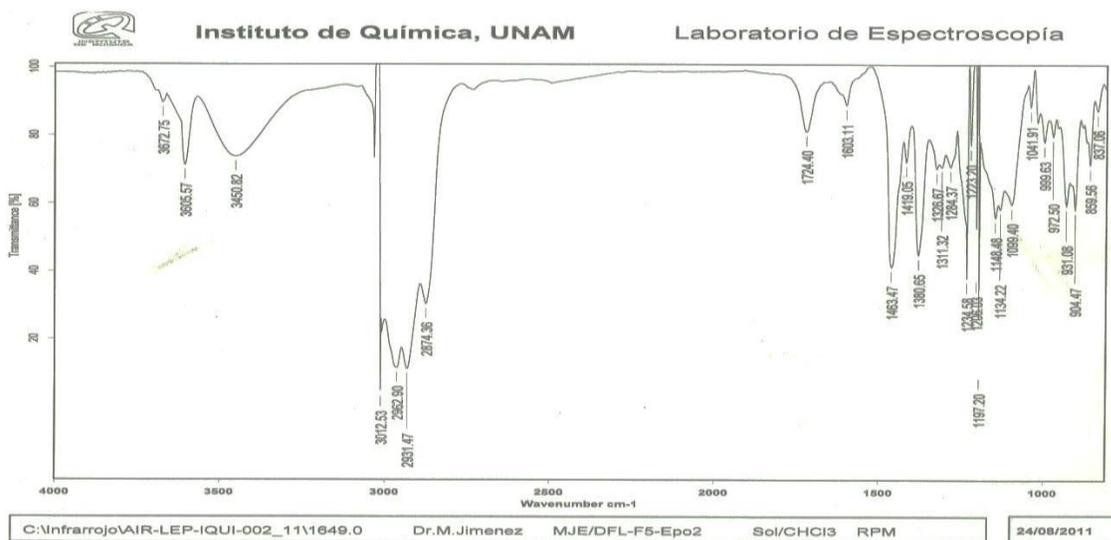
Tabla 16. Correlaciones en el espectro HMBC para el Compuesto # 1.

# C	¹³ C (ppm)	HMBC		# C	¹³ C (ppm)	HMBC	
		Señal	Intensidad			Señal	Intensidad
1	39.31	2.22 - 2.16 (C ³ H ₂) 2.05 - 1.98 (C ⁹ H ^b) 1.70 - 1.64 (C ⁶ H ^a , C ⁸ H ^b) 1.55 - 1.43 (C ⁸ H ^a , C ⁷ H, C ² H ₂) 1.35 - 1.25 (C ⁹ H ^a) 0.92 (C ¹⁵ H ₃)	Débil Débil Débil Débil Débil Alta	8	27.36	2.63 - 2.56 (C ⁶ H ^b) 1.55 - 1.43 (C ⁶ H ^a , C ⁷ H) 1.35 - 1.25 (C ⁹ H ^a) 1.19 (C ¹² H ₃ , C ¹³ H ₃)	Media Media Alta Alta
2	32.72	1.30 - 1.23 (C ¹ H) 0.92 (C ¹⁵ H ₃)	Débil Alta	9	30.01	2.22 - 2.16 (C ³ H ₂) 2.05 - 1.98 (C ⁹ H ^b) 1.55 - 1.43 (C ⁶ H ^a , C ⁷ H) 1.35 - 1.25 (C ⁹ H ^a)	Media Débil Débil Débil
3	36.69	2.05 - 1.98 (C ⁹ H ^b) 1.63 (C ¹⁴ H ₃) 1.35 - 1.25 (C ⁹ H ^a)	Media Alta Débil	10	57.89	2.63 - 2.56 (C ⁶ H ^b) 2.22 - 2.16 (C ³ H ₂) 2.05 - 1.98 (C ⁹ H ^b) 1.70 - 1.60 (C ⁶ H ^a , C ⁸ H ^b , C ¹⁴ H ₃) 1.55 - 1.43 (C ⁶ H ^a , C ⁷ H, C ² H ₂) 1.35 - 1.25 (C ⁹ H ^a) 0.92 (C ¹⁵ H ₃)	Media Débil Débil Débil Débil Débil Alta
4	131.21	2.63 - 2.56 (C ⁶ H ^b) 2.22 - 2.10 (C ³ H ₂ , C ¹⁰ H) 2.05 - 1.98 (C ⁹ H ^b) 1.70 - 1.64 (C ⁶ H ^a) 1.63 (C ¹⁴ H ₃) 1.35 - 1.25 (C ⁹ H ^a)	Media Débil Débil Débil Alta Débil	11	73.99	2.63 - 2.56 (C ⁶ H ^b) 1.70 - 1.64 (C ⁶ H ^a , C ⁸ H ^b) 1.55 - 1.43 (C ⁶ H ^a , C ⁷ H) 1.19 (C ¹² H ₃ , C ¹³ H ₃)	Media Débil Débil Alta
5	138.92	2.63 - 2.56 (C ⁶ H ^b) 2.22 - 2.10 (C ³ H ₂ , C ¹⁰ H) 2.05 - 1.98 (C ⁹ H ^b) 1.70 - 1.64 (C ⁶ H ^a) 1.63 (C ¹⁴ H ₃) 1.50 - 1.43 (C ⁷ H)	Media Débil Media Débil Alta Debil	12	26.22	1.71 - 1.64 (C ⁶ H ^a , C ⁸ H ^b) 1.55 - 1.48 (C ⁶ H ^a) 1.50 - 1.43 (C ⁷ H) 1.19 (C ¹³ H ₃)	Débil Débil Media Alta
6	26.47	2.63 - 2.56 (C ⁶ H ^b) 1.70 - 1.64 (C ⁶ H ^a , C ⁸ H ^b) 1.55 - 1.43 (C ⁸ H ^a , C ⁷ H) 1.35 - 1.25 (C ⁹ H ^a) 1.19 (C ¹² H ₃ , C ¹³ H ₃)	Débil Media Media Alta Alta	13	27.41	1.71 - 1.64 (C ⁶ H ^a , C ⁸ H ^b) 1.55 - 1.48 (C ⁶ H ^a) 1.50 - 1.43 (C ⁷ H) 1.19 (C ¹² H ₃)	Débil Débil Media Alta
7	48.66	2.63 - 2.56 (C ⁶ H ^b) 1.70 - 1.64 (C ⁶ H ^a , C ⁸ H ^b) 1.55 - 1.43 (C ⁸ H ^a , C ⁷ H) 1.35 - 1.25 (C ⁹ H ^a) 1.19 (C ¹² H ₃ , C ¹³ H ₃)	Débil Débil Débil Débil Alta	14	13.97	1.50 - 1.43 (C ⁷ H)	Alta
				15	22.48	2.18 - 2.10 (C ¹⁰ H) 1.55 - 1.50 (C ² H ₂)	Débil Media

ANEXO II.

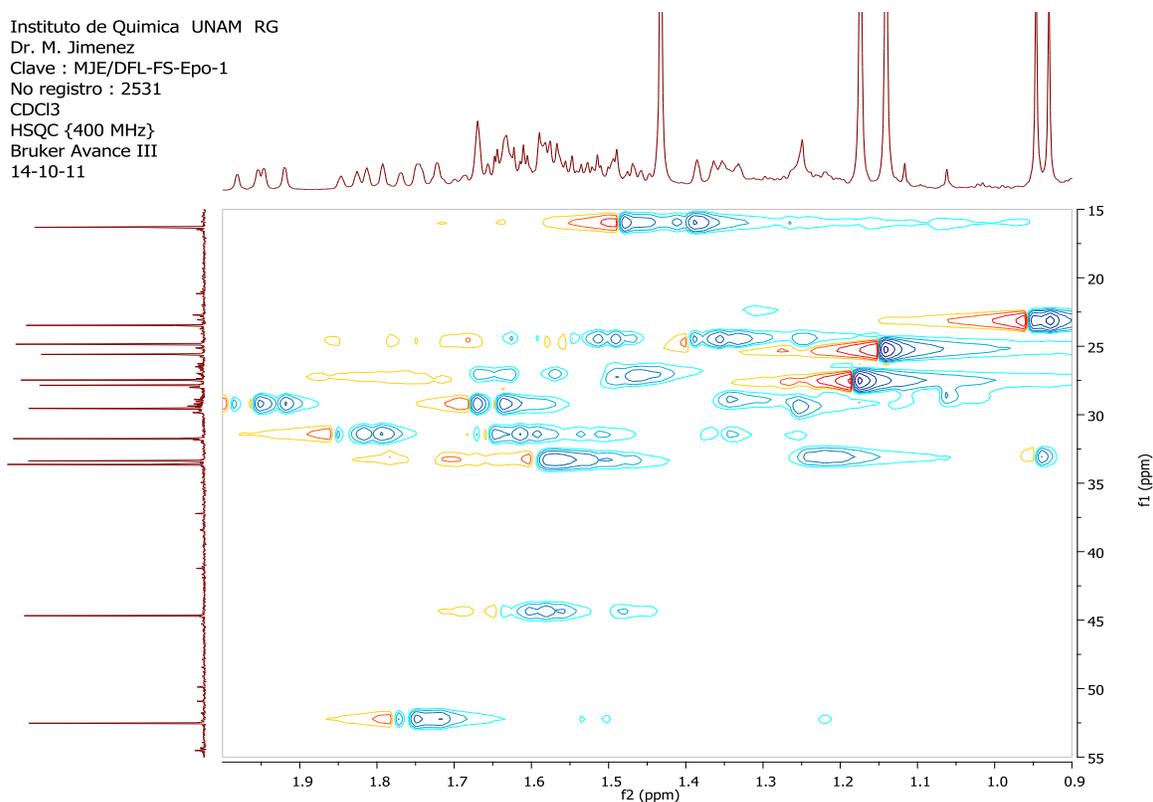
Espectroscopia: "Compuesto 1 - Epóxido 1".

1. Espectro Infrarrojo



2. Espectro HSQC

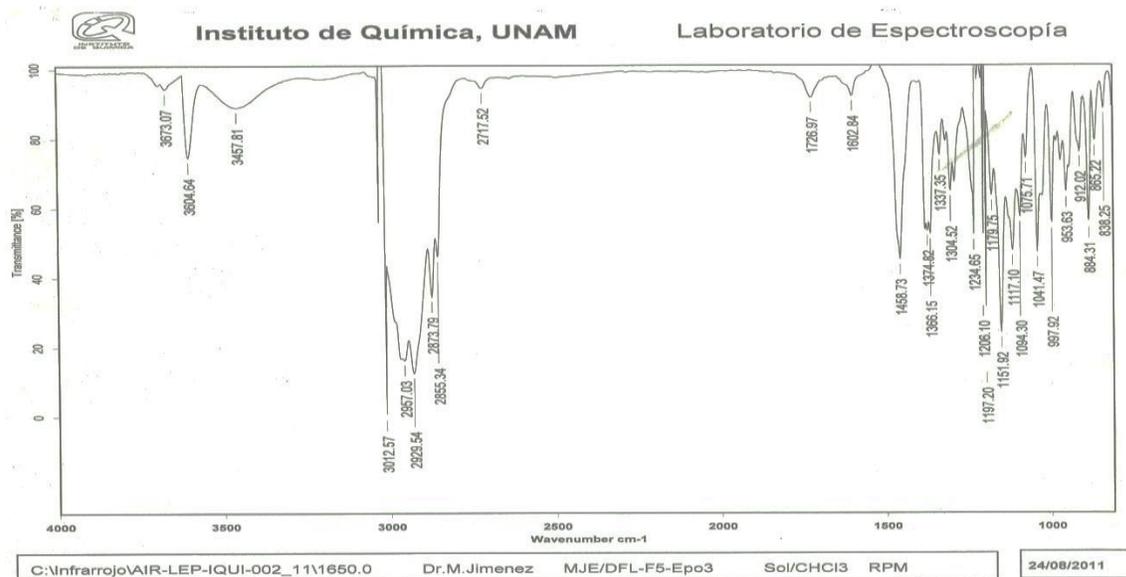
Instituto de Química UNAM RG
Dr. M. Jimenez
Clave : MJE/DFL-FS-Epo-1
No registro : 2531
CDCl₃
HSQC {400 MHz}
Bruker Avance III
14-10-11



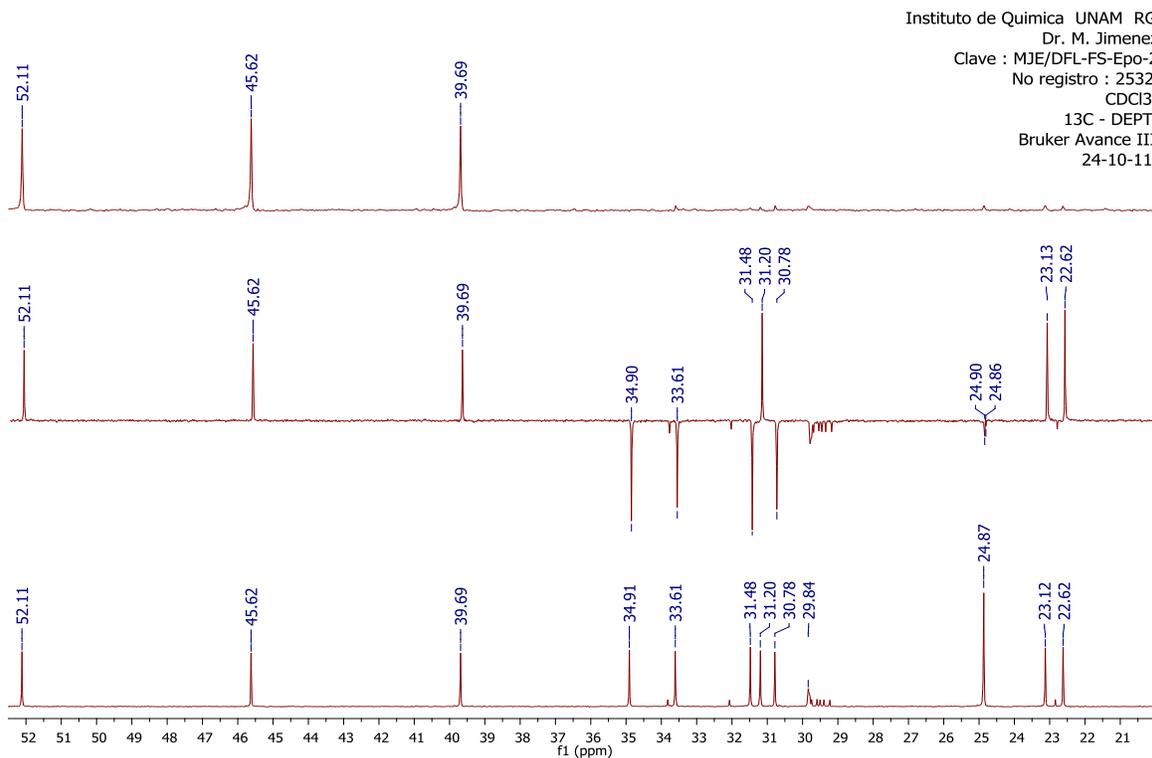
ANEXO III.

Espectroscopia: "Compuesto 1 - Epóxido 2".

1. Espectro Infrarrojo

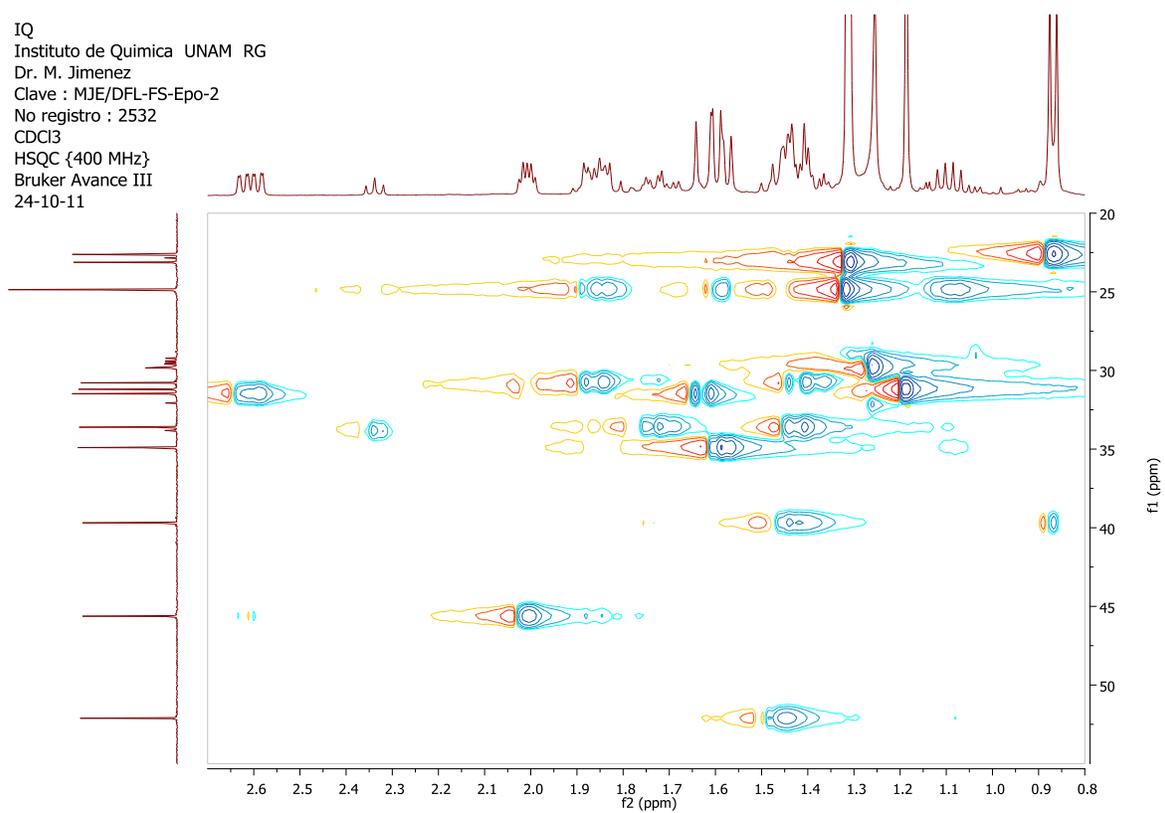


2. Espectro ¹³C-DEPT



3. Espectro HSQC

IQ
Instituto de Química UNAM RG
Dr. M. Jimenez
Clave : MJE/DFL-FS-Epo-2
No registro : 2532
CDCl₃
HSQC {400 MHz}
Bruker Avance III
24-10-11

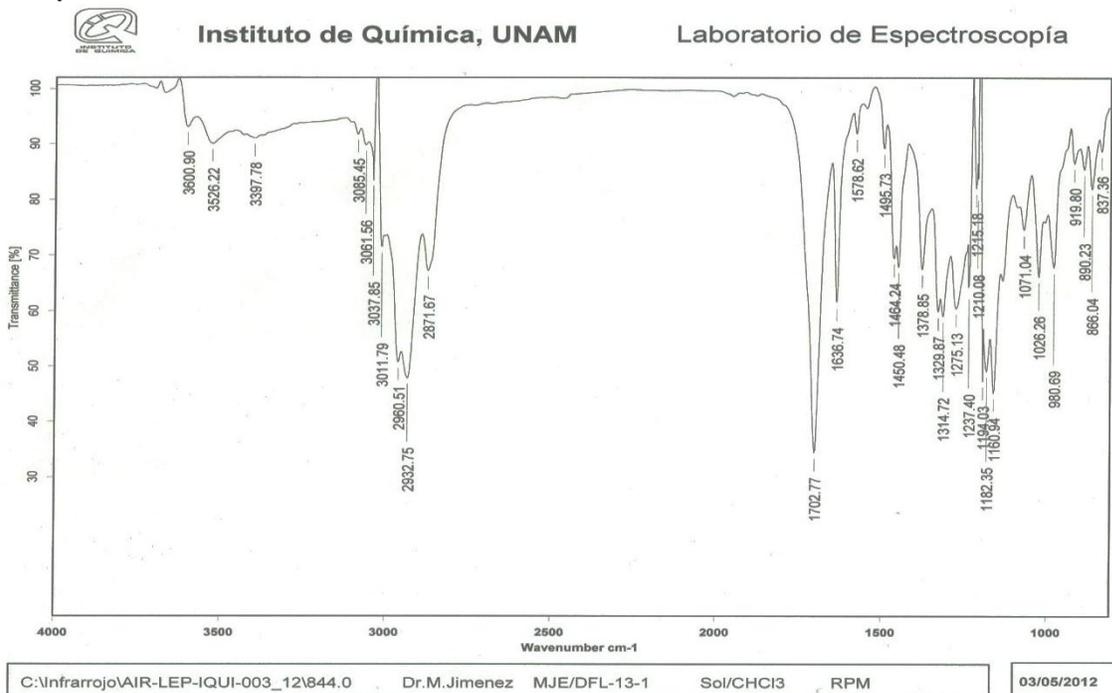


ANEXO IV.

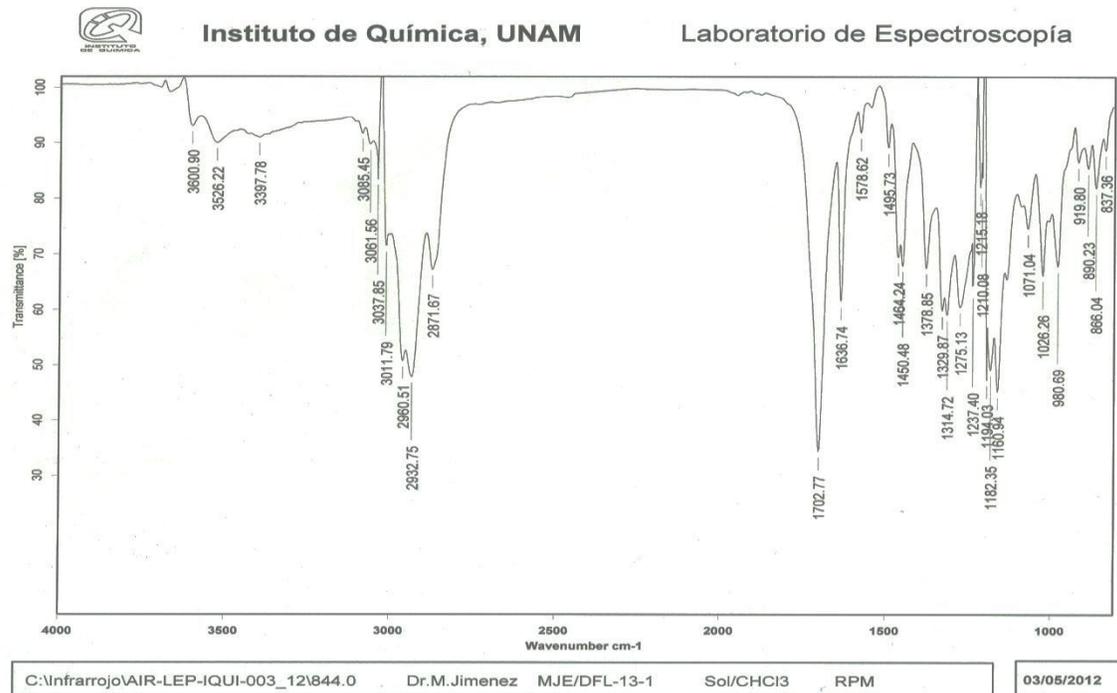
Espectroscopia de los Compuestos 2 y 3

1. Espectros Infrarrojo

Compuesto # 2



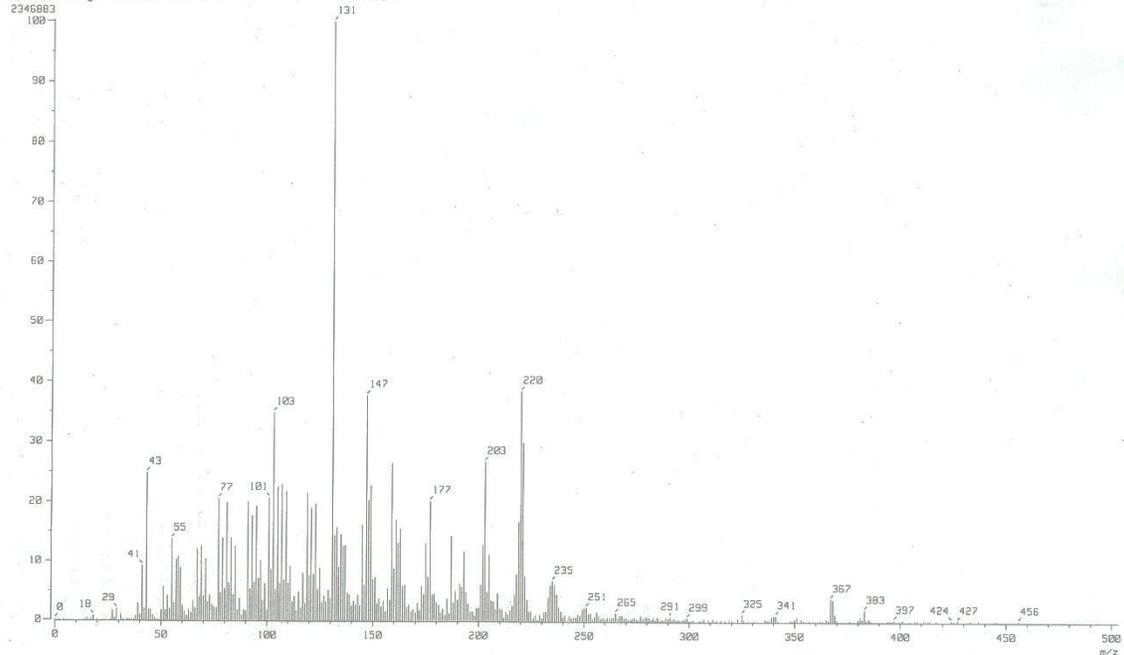
Compuesto # 3



2. Espectros de Masas

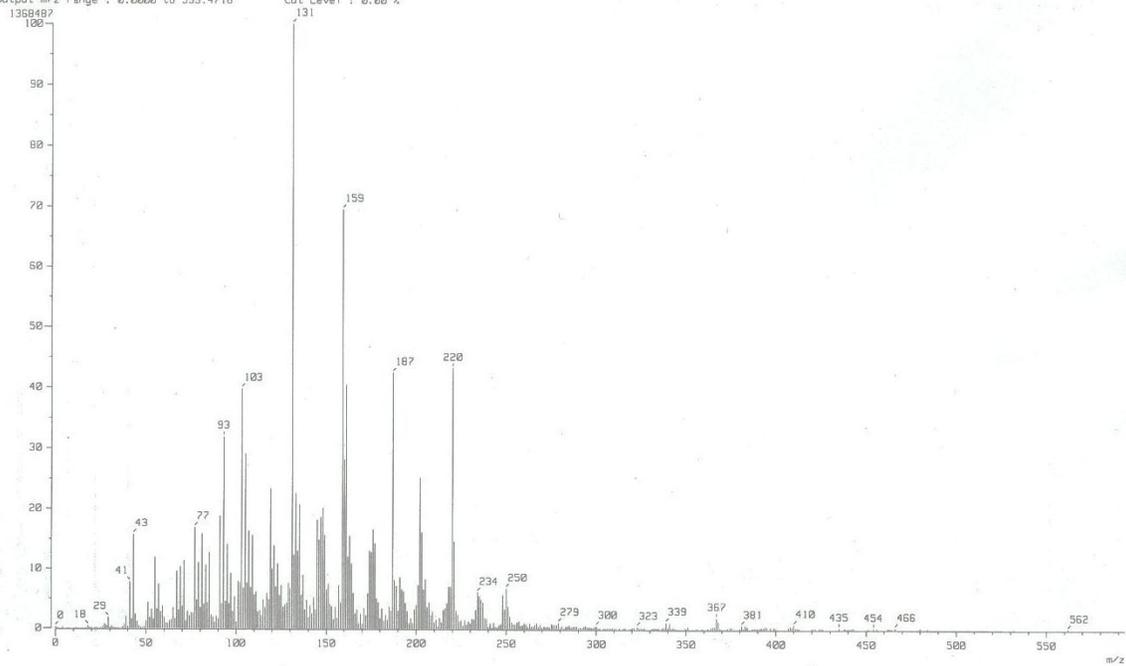
Compuesto # 2

[Mass Spectrum]
Data : Dr-Jimenez-Manuel-060 Date : 02-May-2012 12:46
Sample: 1029 MJE-DPL-13-1 IE20 Jeol FX505HR
Note : Javier Perez
Inlet : Direct Ion Mode : EI+
Spectrum Type : Normal Ion [MF-Linear]
RT : 0.49 min Scan# : (4,20)
BP : m/z 131.0000 Int. : 223.17
Output m/z range : 0.0000 to 503.2641
Cut Level : 0.00 %



Compuesto # 3

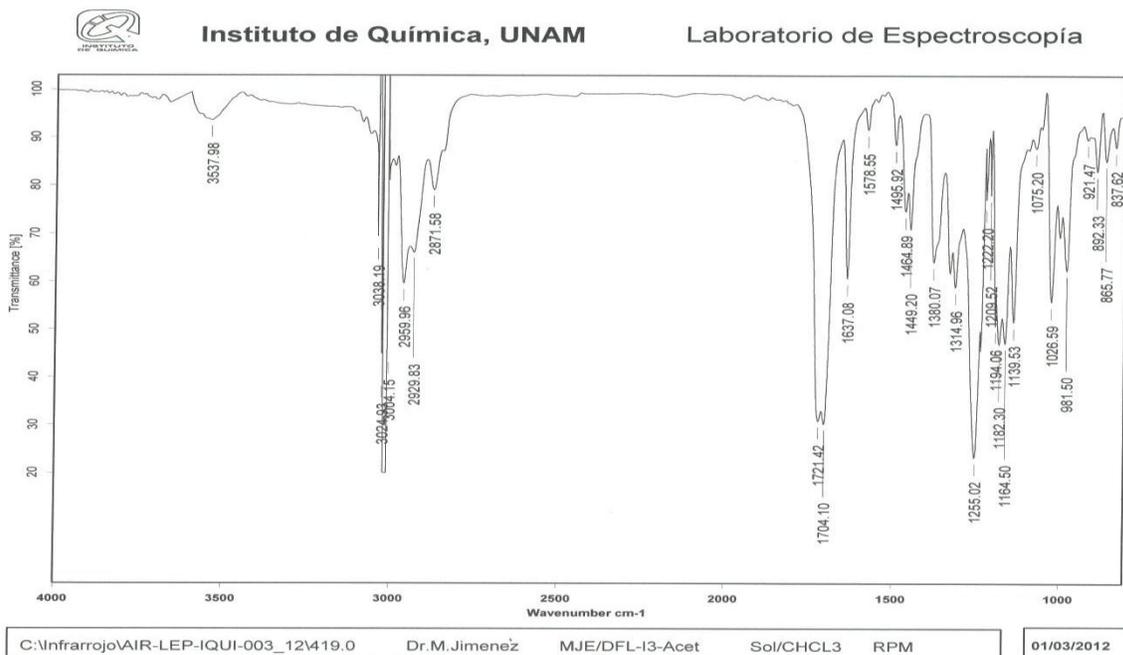
[Mass Spectrum]
Data : Dr-Jimenez-Manuel-061 Date : 02-May-2012 12:55
Sample: 1030 MJE-DPL-13-2 IE20 Jeol FX505HR
Note : Javier Perez
Inlet : Direct Ion Mode : EI+
Spectrum Type : Normal Ion [MF-Linear]
RT : 0.80 min Scan# : (7,32)
BP : m/z 131.0000 Int. : 130.51
Output m/z range : 0.0000 to 593.4718
Cut Level : 0.00 %



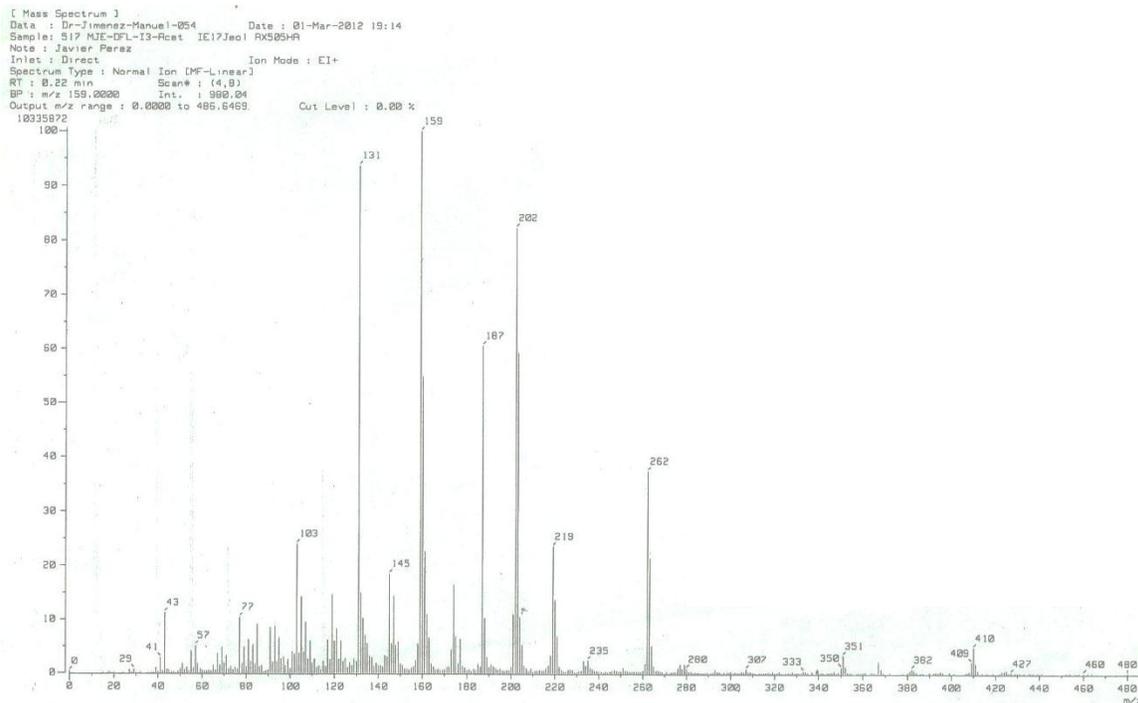
ANEXO V.

Espectroscopia: "Mezcla Compuestos 2 y 3 - Acetilación".

1. Espectro Infrarrojo

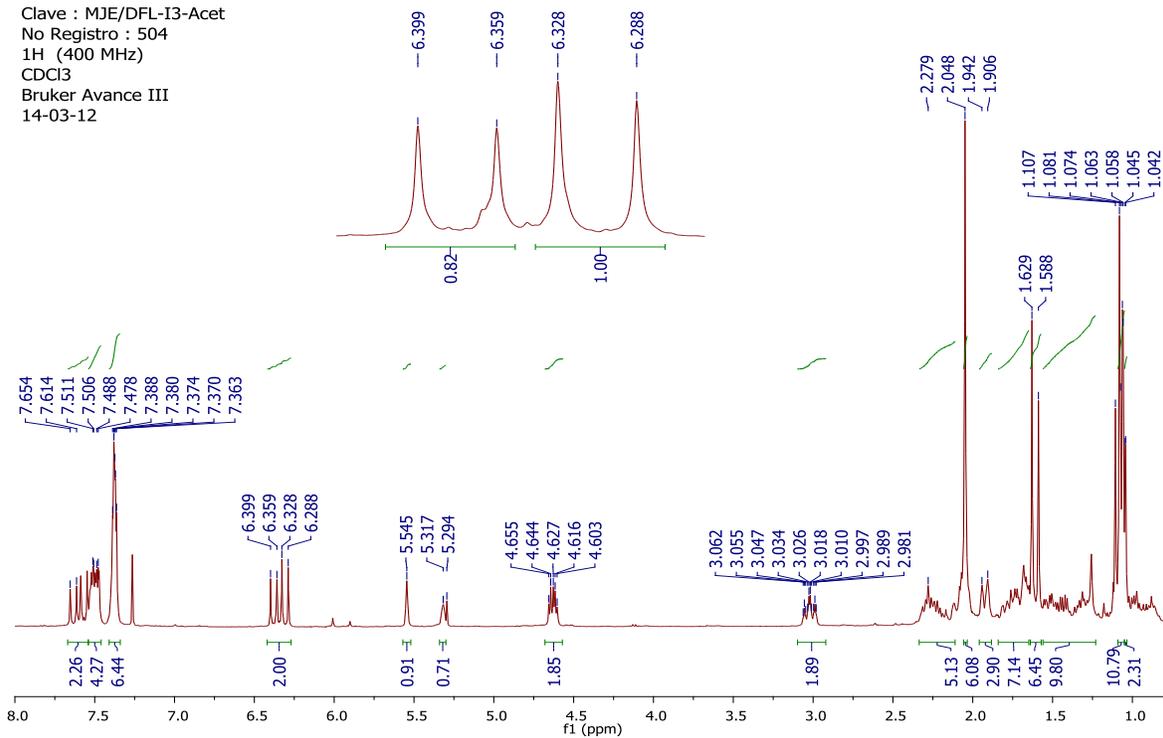


2. Espectro de Masas



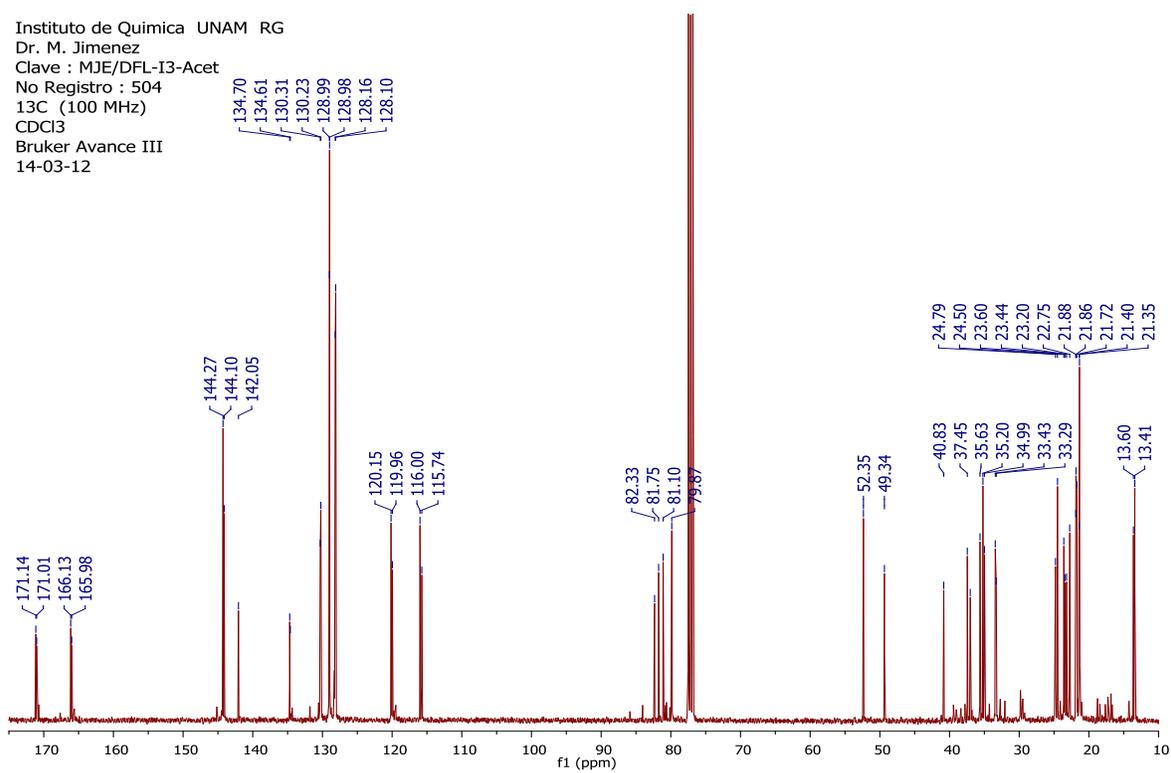
3. Espectro ^1H -RMN

Instituto de Quimica UNAM RG
Dr. M. Jimenez
Clave : MJE/DFL-I3-Acet
No Registro : 504
 ^1H (400 MHz)
 CDCl_3
Bruker Avance III
14-03-12



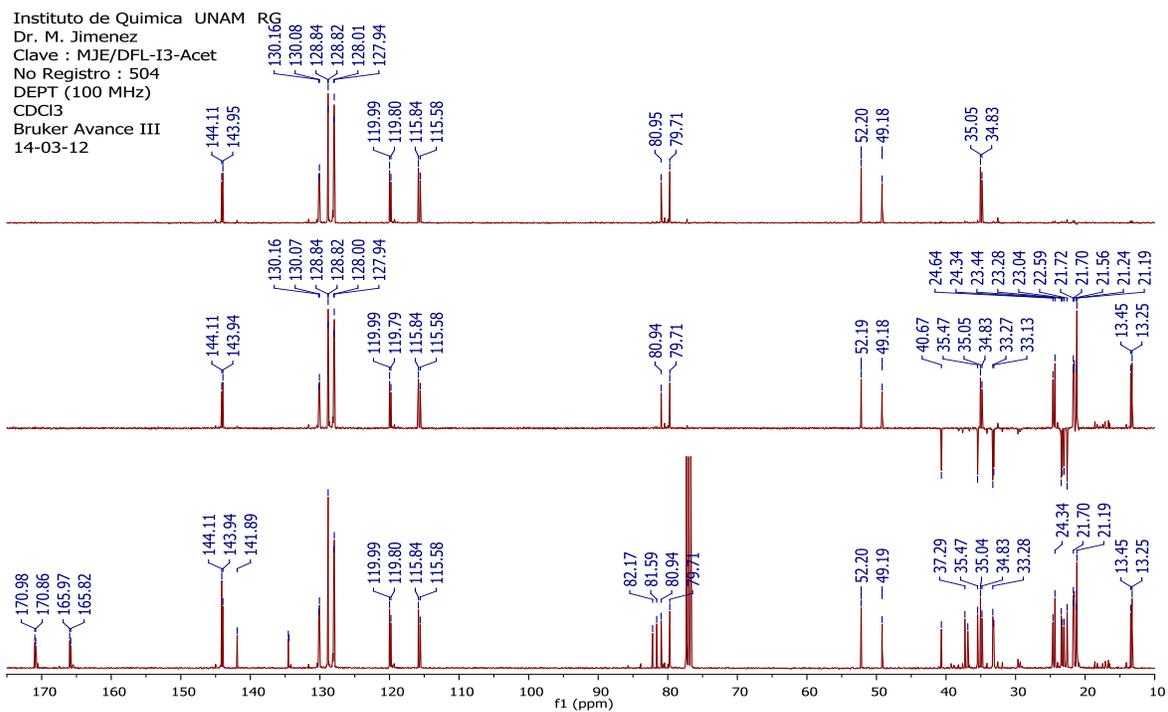
4. Espectro ^{13}C -RMN

Instituto de Quimica UNAM RG
Dr. M. Jimenez
Clave : MJE/DFL-I3-Acet
No Registro : 504
 ^{13}C (100 MHz)
 CDCl_3
Bruker Avance III
14-03-12



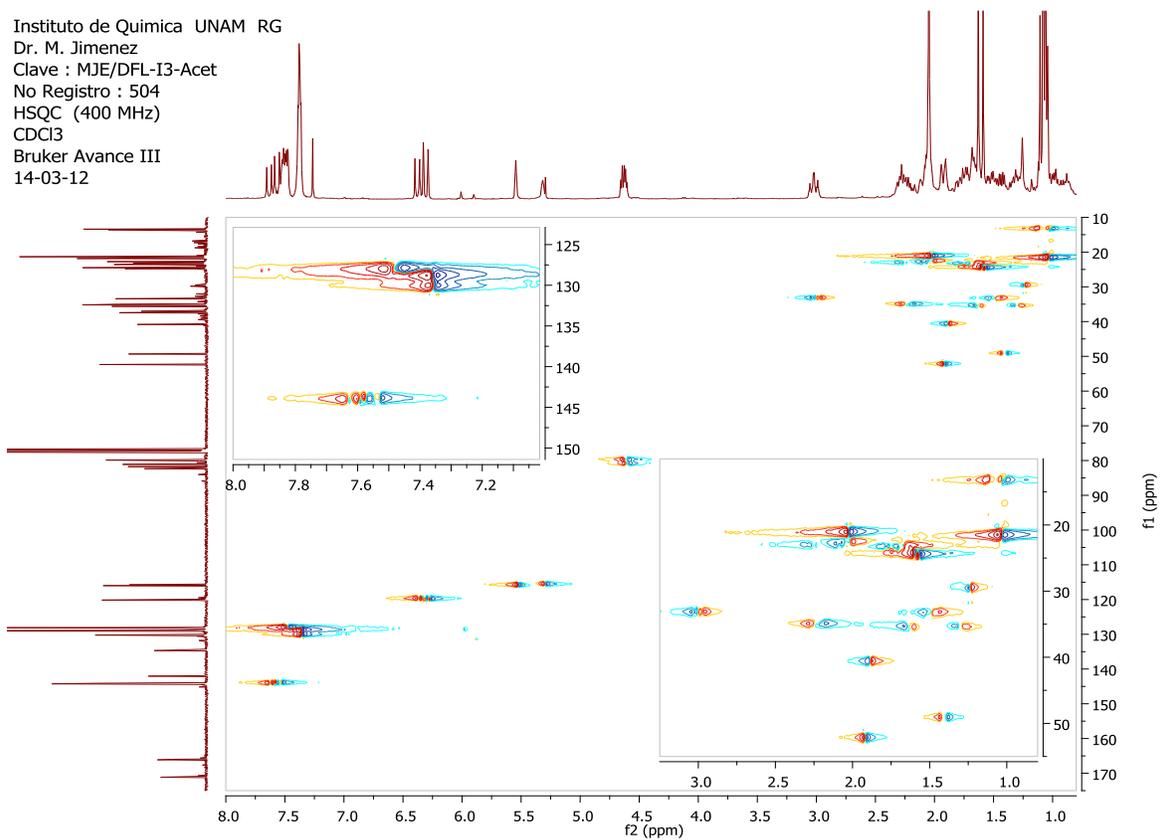
5. Espectro ^{13}C -DEPT

Instituto de Quimica UNAM RG
 Dr. M. Jimenez
 Clave : MJE/DFL-I3-Acet
 No Registro : 504
 DEPT (100 MHz)
 CDCl₃
 Bruker Avance III
 14-03-12



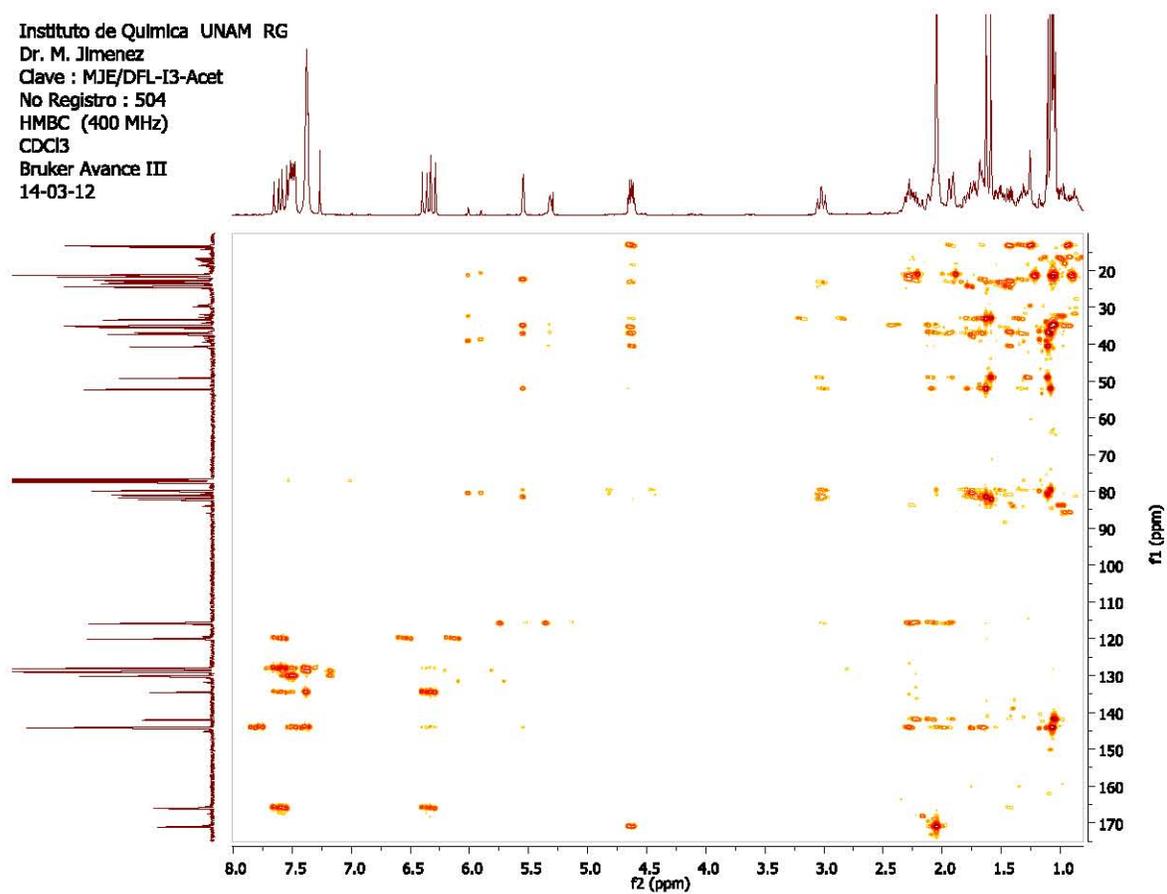
6. Espectro HSQC

Instituto de Quimica UNAM RG
 Dr. M. Jimenez
 Clave : MJE/DFL-I3-Acet
 No Registro : 504
 HSQC (400 MHz)
 CDCl₃
 Bruker Avance III
 14-03-12



7. Espectro HMBC

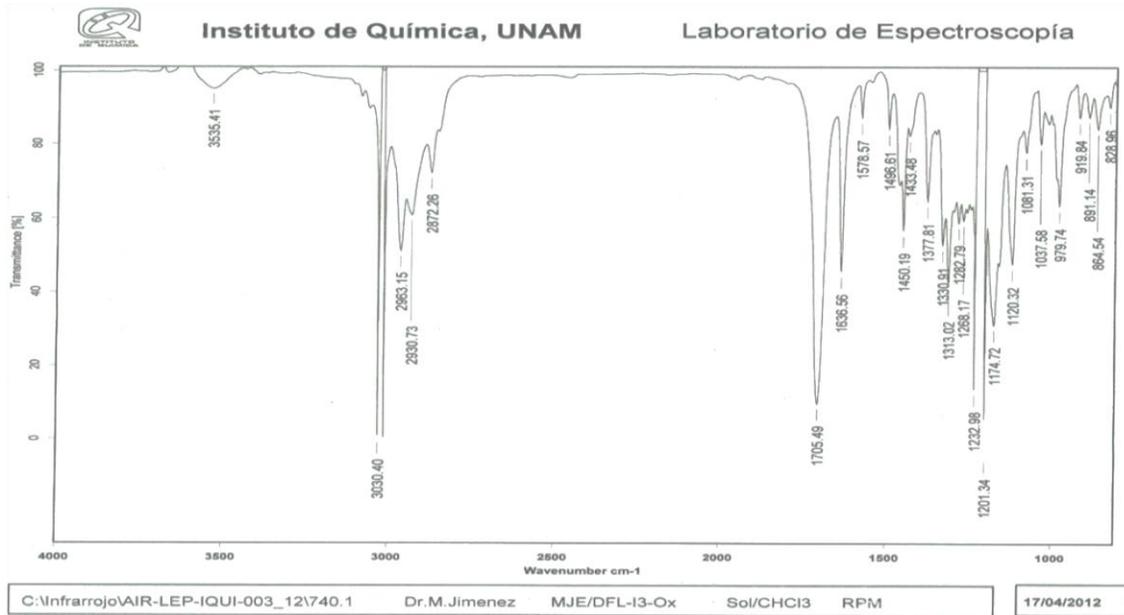
Instituto de Química UNAM RG
Dr. M. Jimenez
Clave : MJE/DFL-I3-Acet
No Registro : 504
HMBC (400 MHz)
CDCl₃
Bruker Avance III
14-03-12



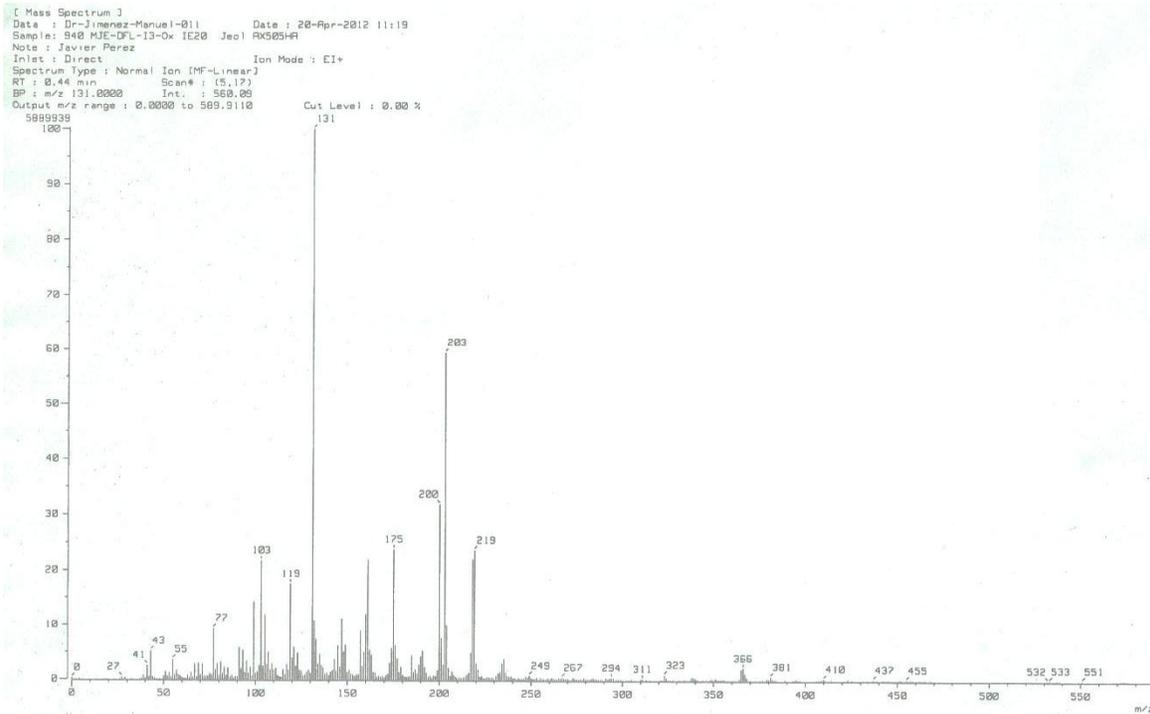
ANEXO VI.

Espectroscopia: "Mezcla Compuestos 2 y 3 - Oxidación".

1. Espectro Infrarrojo

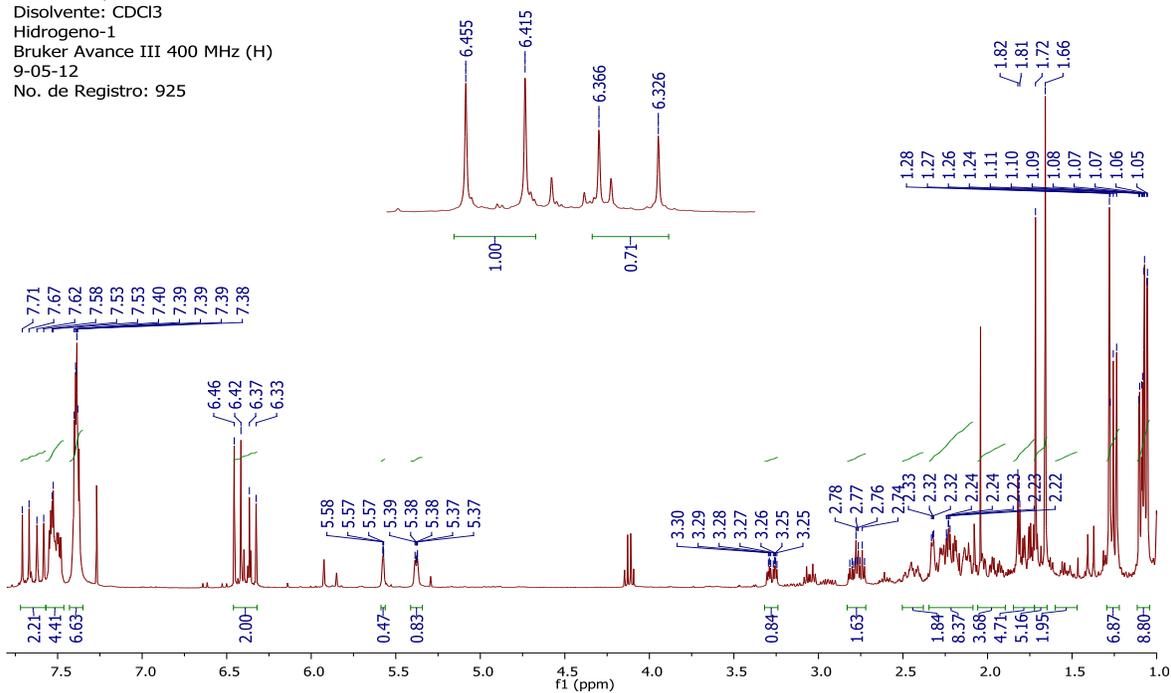


2. Espectro de Masas



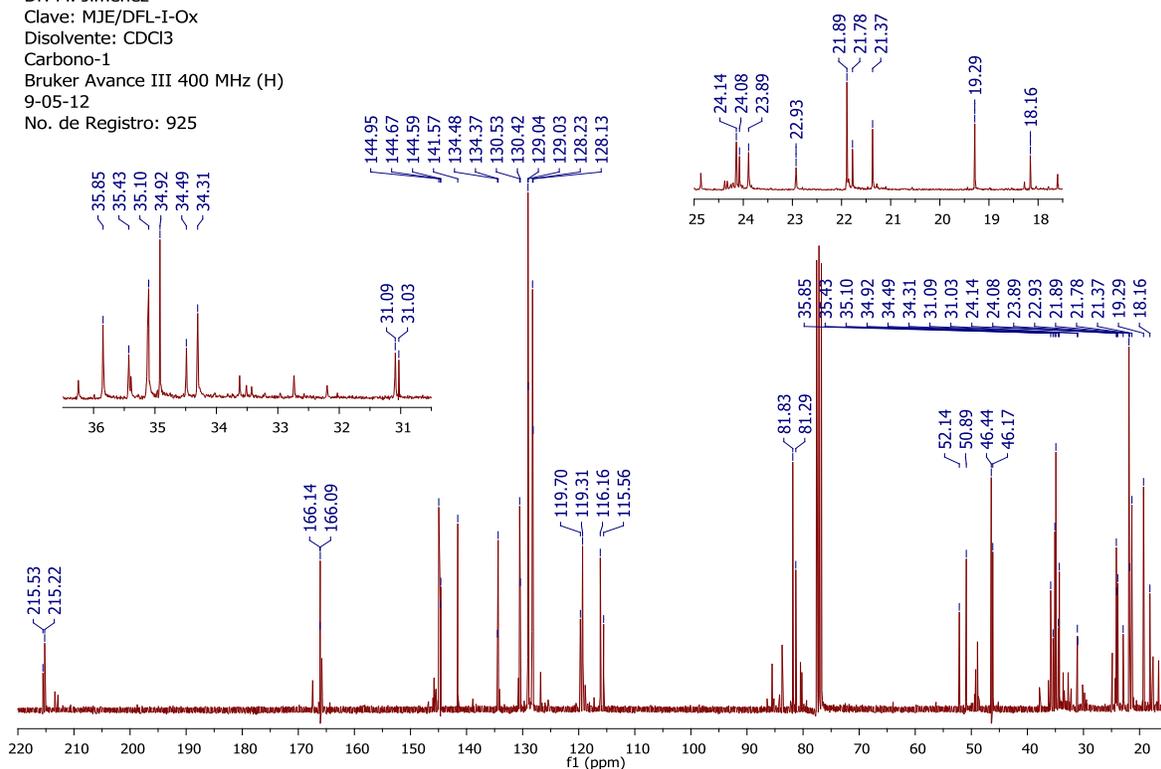
3. Espectro ¹H-RMN

INSTITUTO DE QUIMICA, UNAM/ E. Huerta
 Dr. M. Jimenez
 Clave: MJE/DFL-I-Ox
 Disolvente: CDCl₃
 Hidrogeno-1
 Bruker Avance III 400 MHz (H)
 9-05-12
 No. de Registro: 925

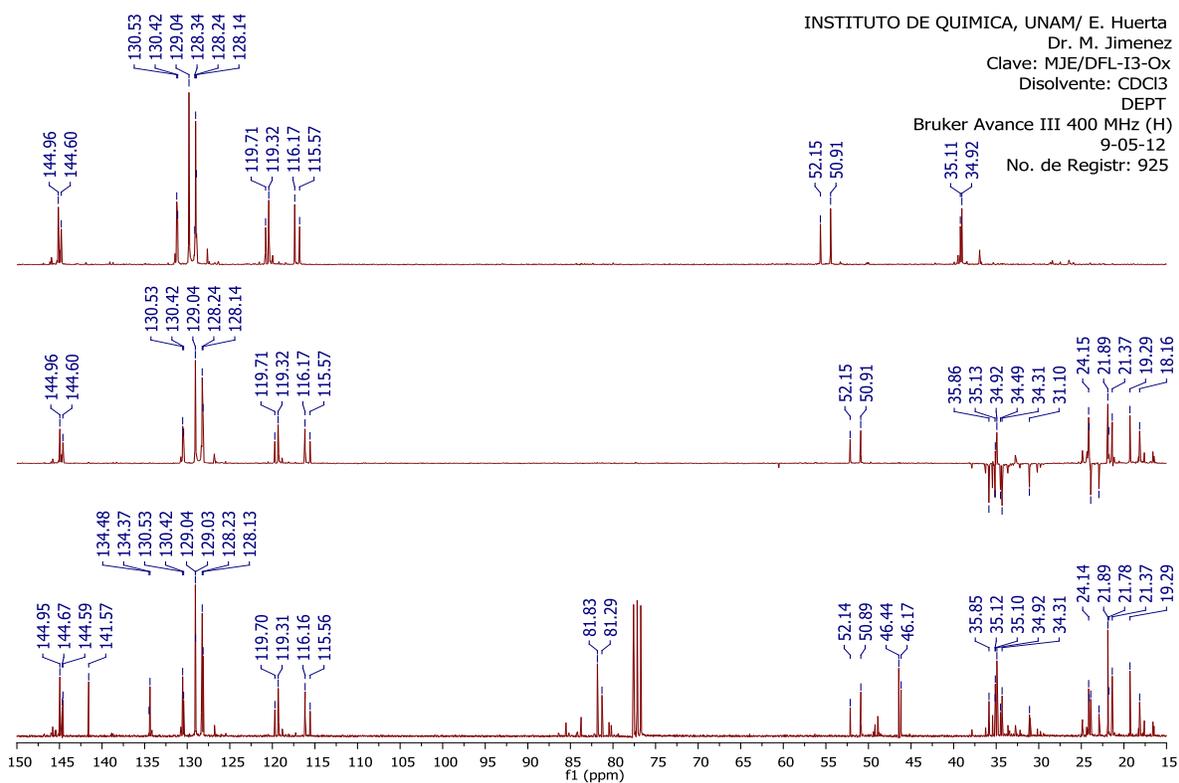


4. Espectro ¹³C-RMN

INSTITUTO DE QUIMICA, UNAM/ E. Huerta
 Dr. M. Jimenez
 Clave: MJE/DFL-I-Ox
 Disolvente: CDCl₃
 Carbono-1
 Bruker Avance III 400 MHz (H)
 9-05-12
 No. de Registro: 925

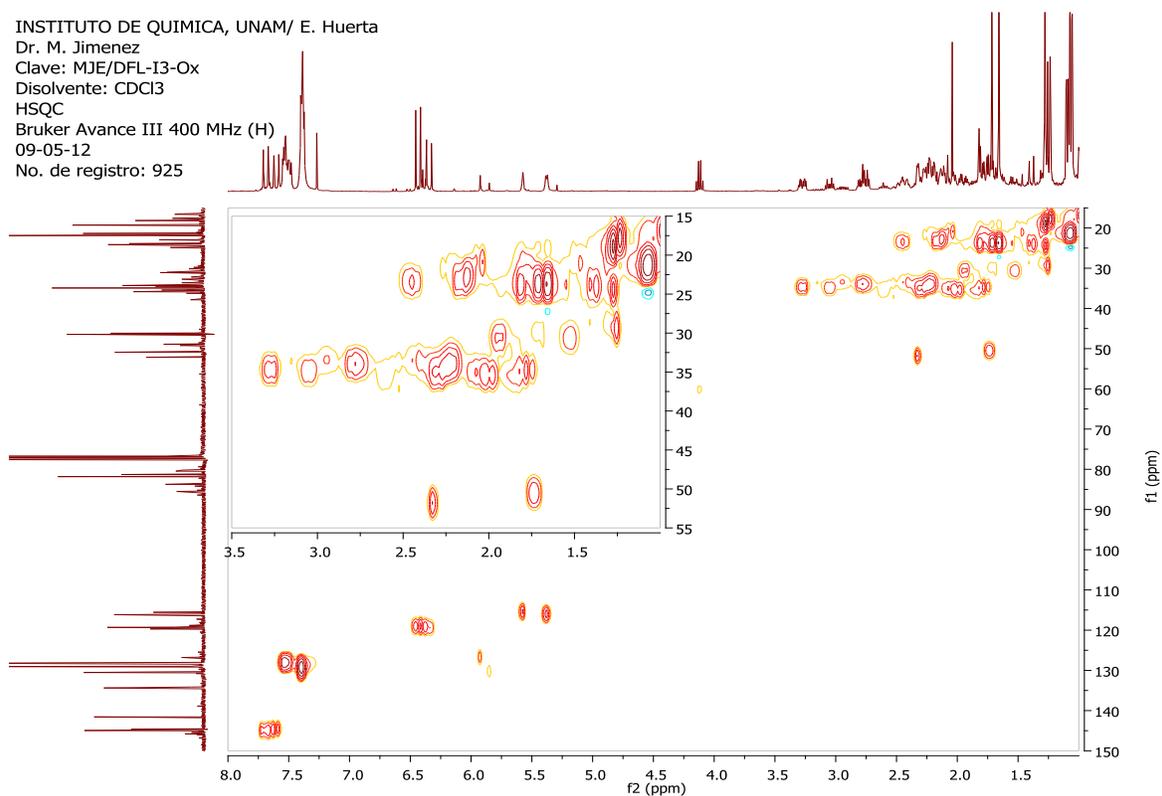


5. Espectro ^{13}C -DEPT



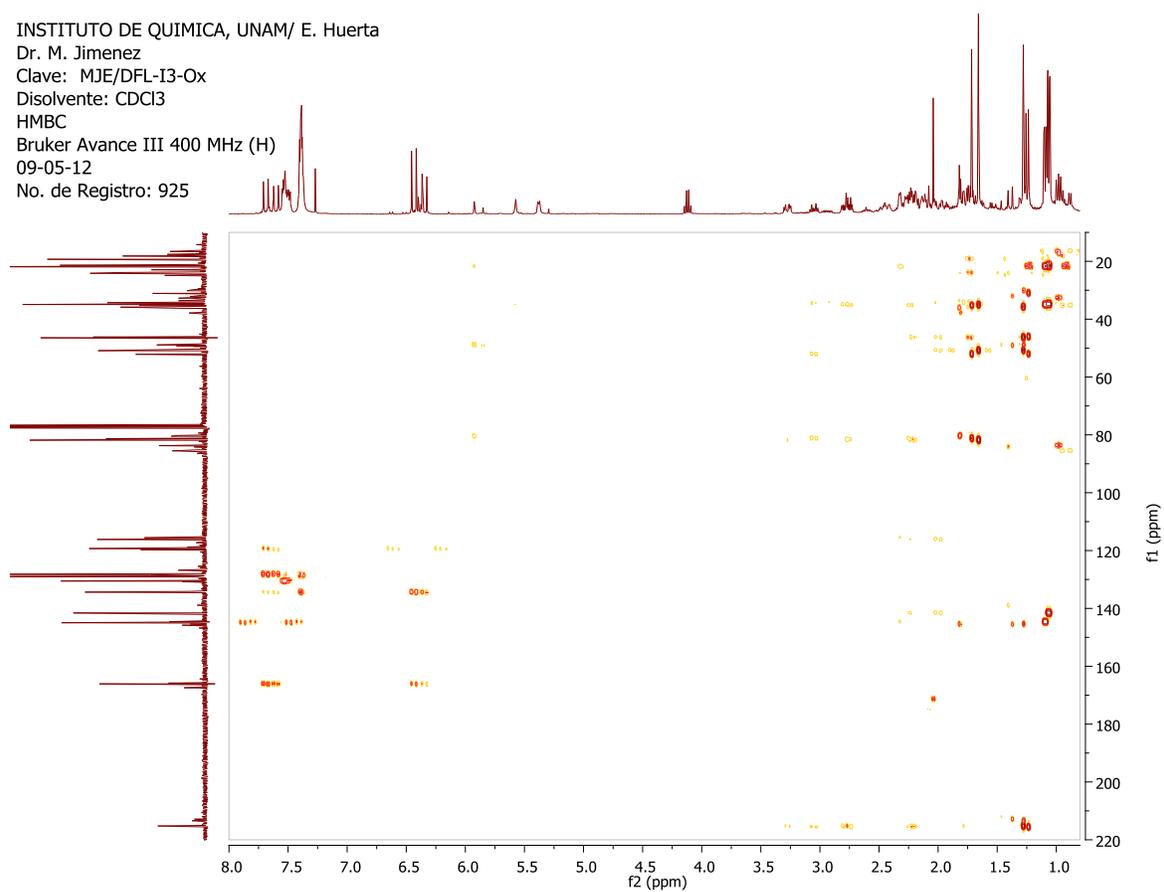
6. Espectro HSQC

INSTITUTO DE QUIMICA, UNAM/ E. Huerta
 Dr. M. Jimenez
 Clave: MJE/DFL-I3-Ox
 Disolvente: CDCl_3
 HSQC
 Bruker Avance III 400 MHz (H)
 09-05-12
 No. de registro: 925



7. Espectro HMBC

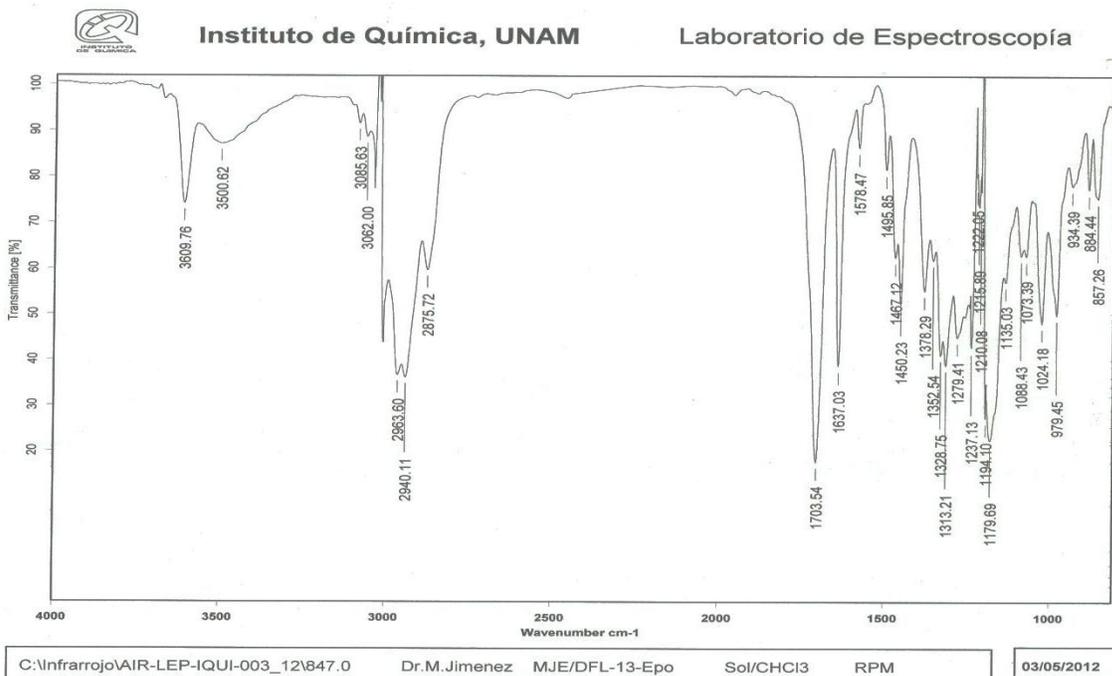
INSTITUTO DE QUIMICA, UNAM/ E. Huerta
Dr. M. Jimenez
Clave: MJE/DFL-I3-Ox
Disolvente: CDCl₃
HMBC
Bruker Avance III 400 MHz (H)
09-05-12
No. de Registro: 925



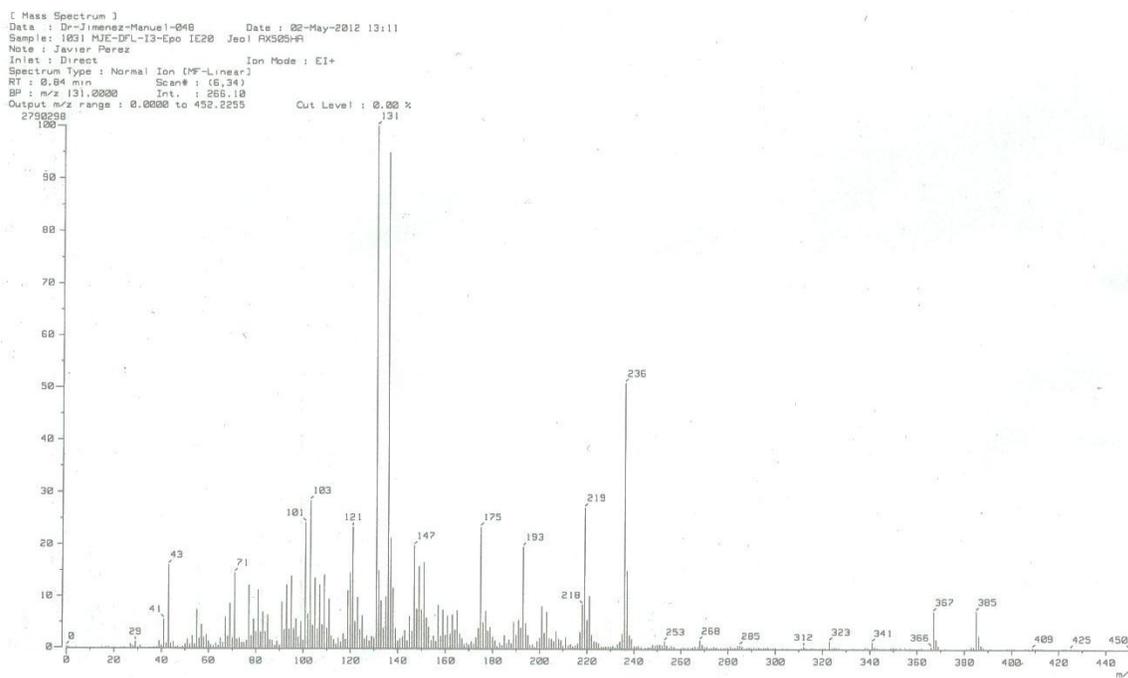
ANEXO VII.

Espectroscopia: "Mezcla Compuestos 2 y 3 - Epoxidación".

1. Espectro Infrarrojo

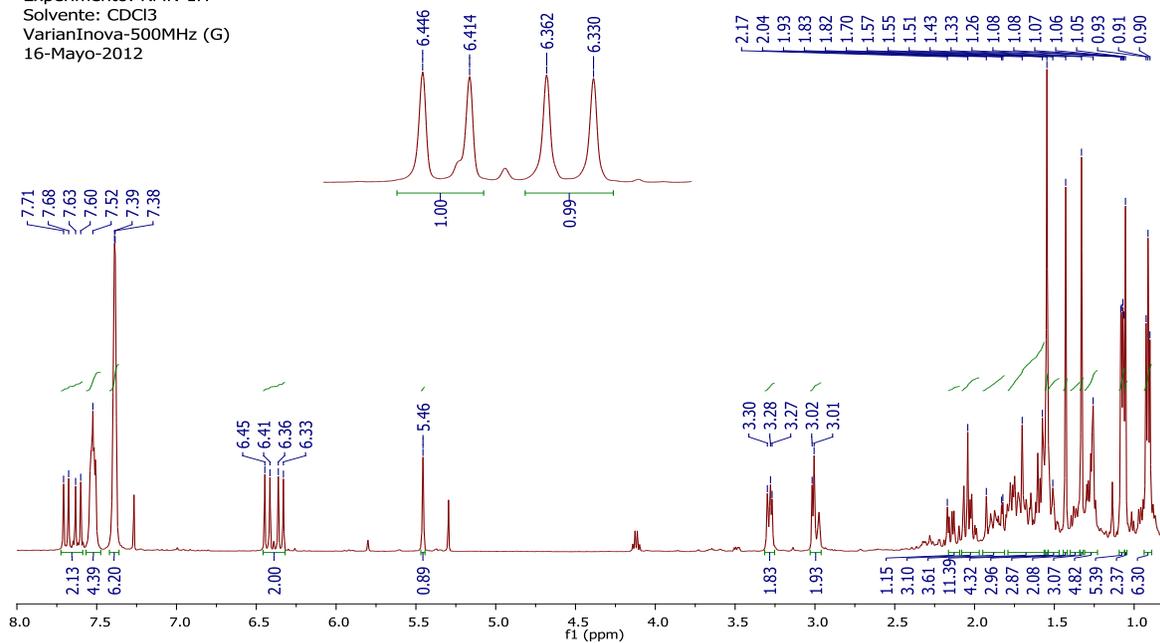


2. Espectro de Masas



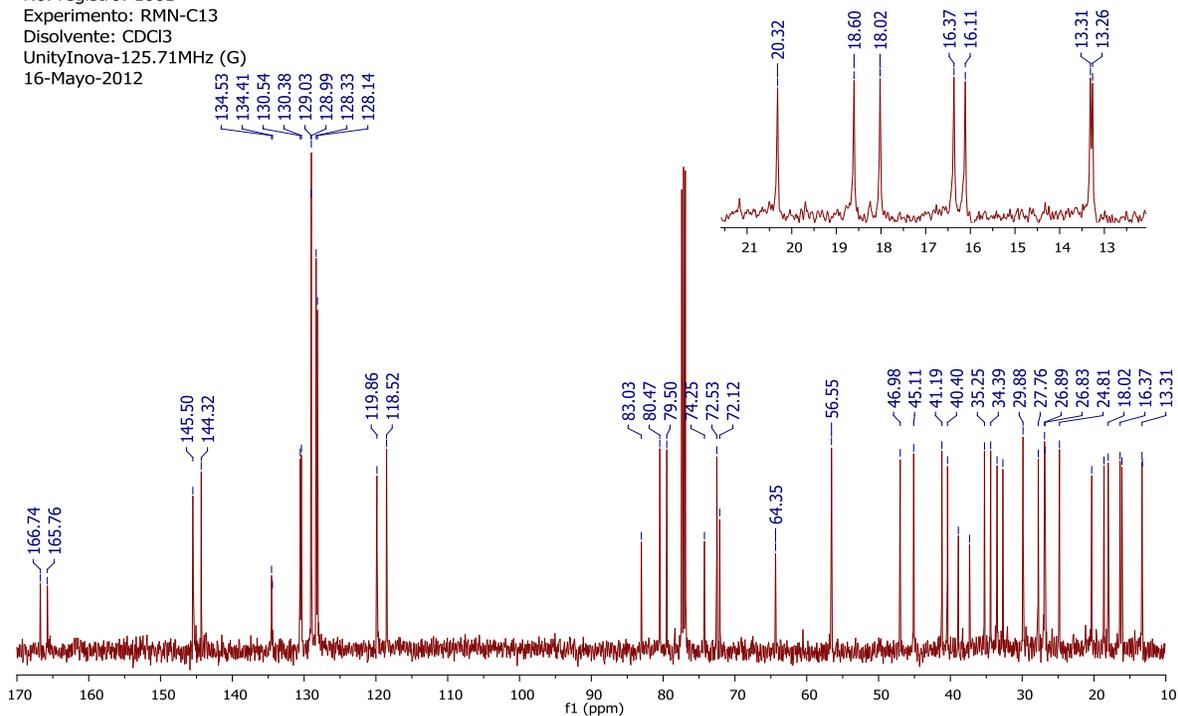
3. Espectro ^1H -RMN

UNAM. Instituto de Quimica. (H. Rios)
Dr-MJimenez
Clave: MJE/DFL-I3-EPO
No. Registro: 1061
Experimento: RMN-1H
Solvente: CDCl₃
VarianInova-500MHz (G)
16-Mayo-2012



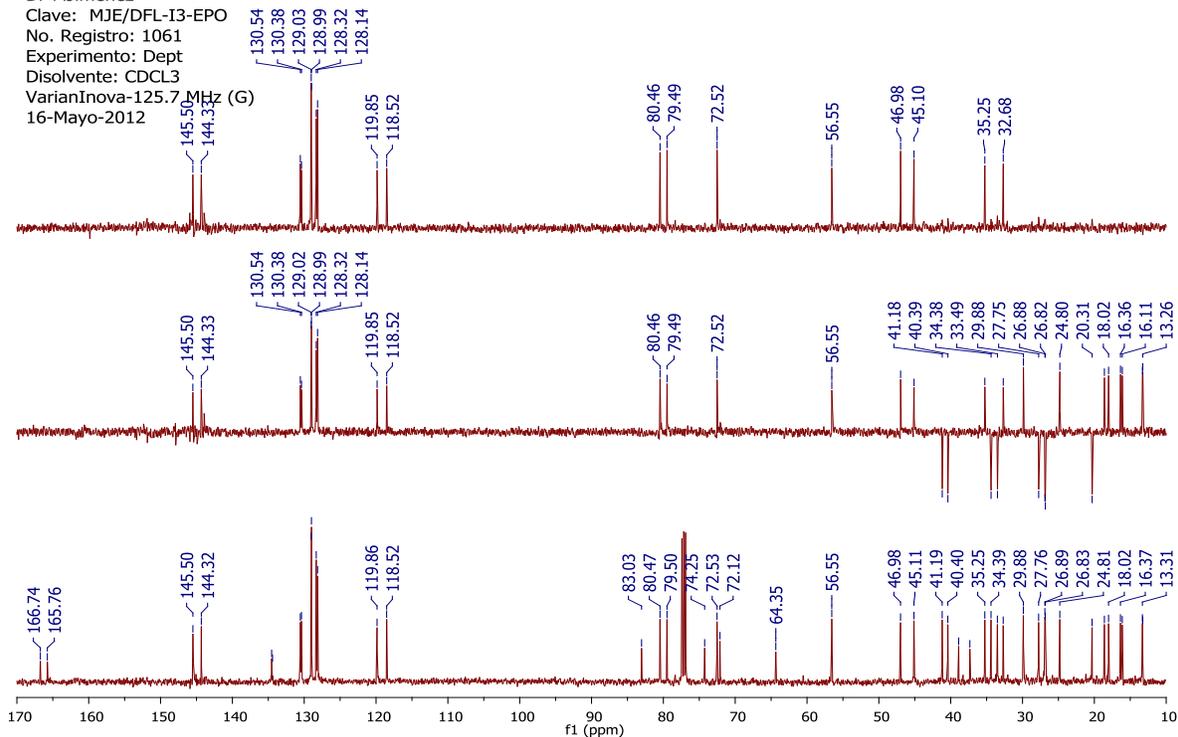
4. Espectro ^{13}C -RMN

UNAM. Instituto de Quimica (H. Rios)
Dr-MJimenez
Clave: MJE/DFL-I3-EPO
No. registro: 1061
Experimento: RMN-C13
Disolvente: CDCl₃
UnityInova-125.71MHz (G)
16-Mayo-2012



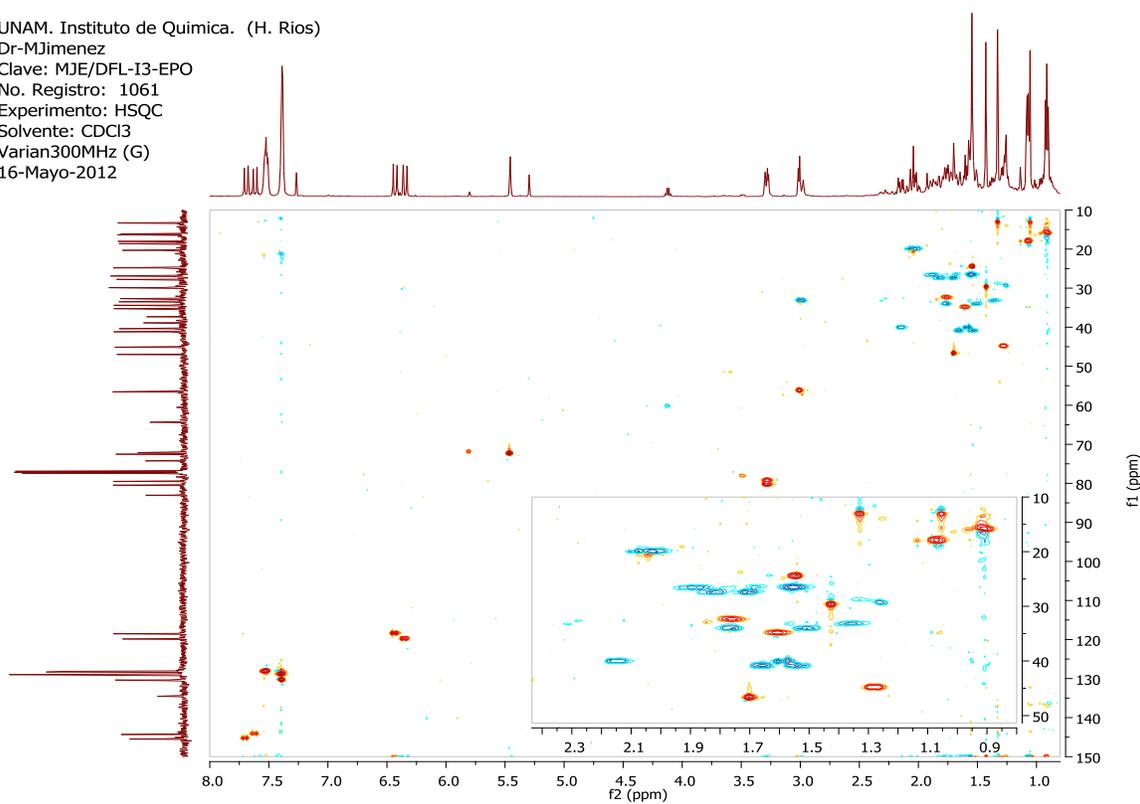
5. Espectro ^{13}C -DEPT

UNAM. Instituto de Quimica. (H. Rios)
 Dr-MJimenez
 Clave: MJE/DFL-I3-EPO
 No. Registro: 1061
 Experimento: Dept
 Disolvente: CDCL3
 VarianInova-125.7MHz (G)
 16-Mayo-2012



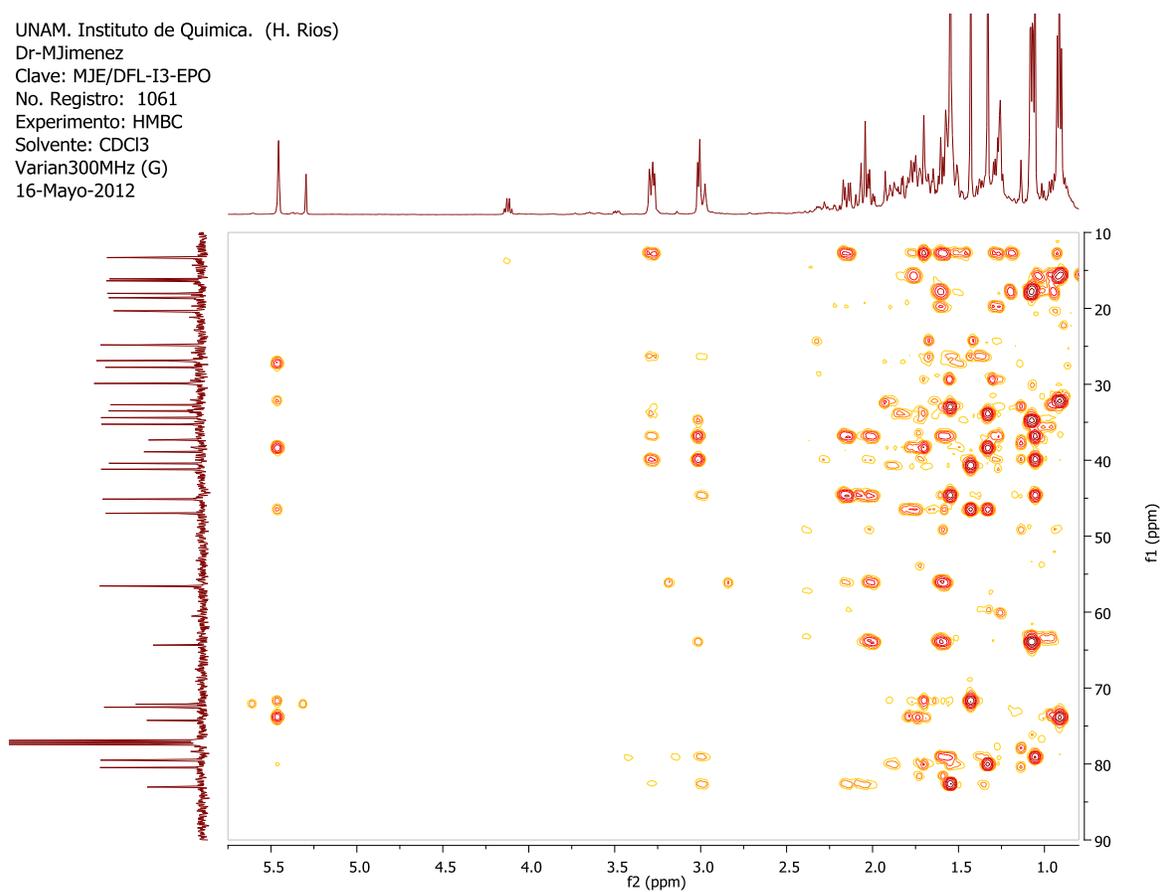
6. Espectro HSQC

UNAM. Instituto de Quimica. (H. Rios)
 Dr-MJimenez
 Clave: MJE/DFL-I3-EPO
 No. Registro: 1061
 Experimento: HSQC
 Solvente: CDCL3
 Varian300MHz (G)
 16-Mayo-2012



7. Espectro HMBC

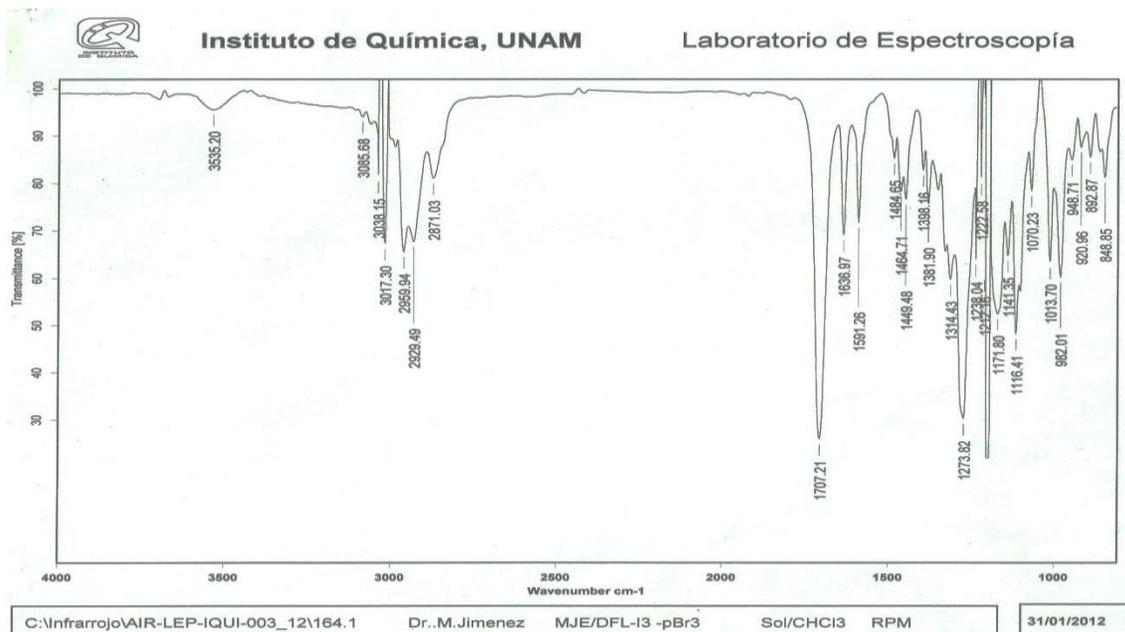
UNAM. Instituto de Quimica. (H. Rios)
Dr-MJimenez
Clave: MJE/DFL-I3-EPO
No. Registro: 1061
Experimento: HMBC
Solvente: CDCl3
Varian300MHz (G)
16-Mayo-2012



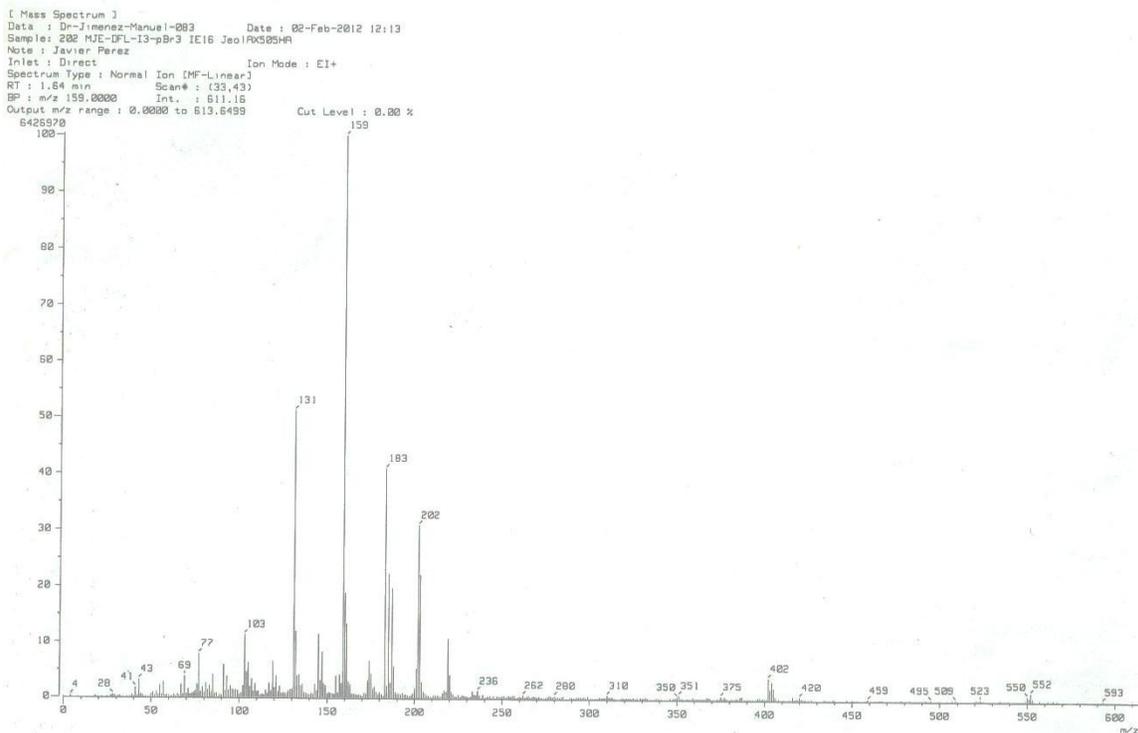
ANEXO VIII.

Espectroscopia: "Mezcla Compuestos 2 y 3 - Esterificación Ac. *p*-Bromobenzoico".

1. Espectro Infrarrojo

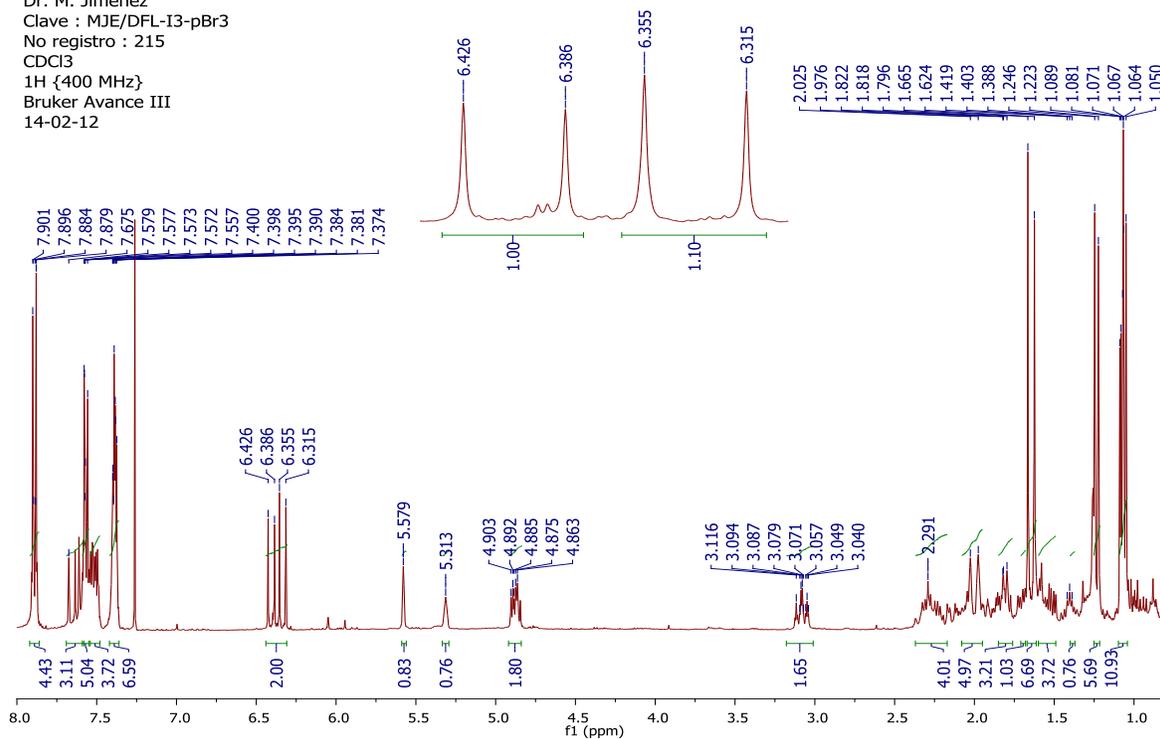


2. Espectro de Masas



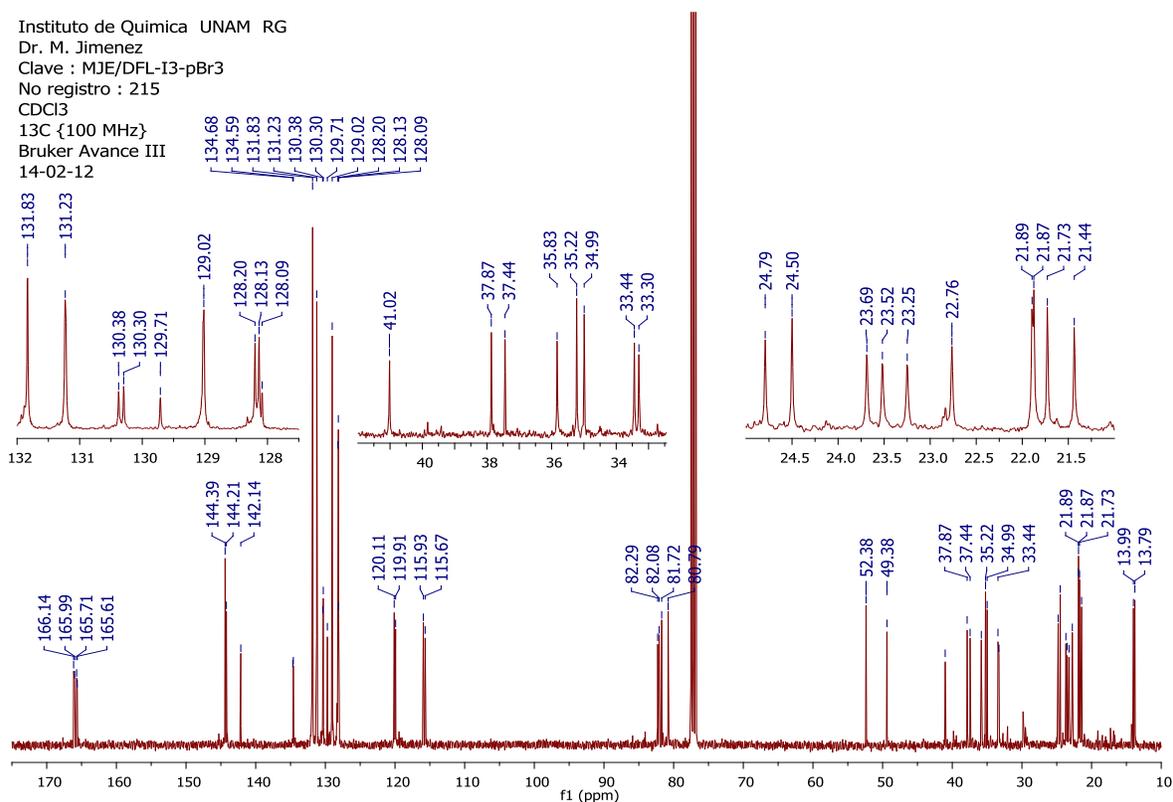
3. Espectro ^1H -RMN

Instituto de Química UNAM RG
 Dr. M. Jimenez
 Clave : MJE/DFL-13-pBr3
 No registro : 215
 CDCl₃
 1H {400 MHz}
 Bruker Avance III
 14-02-12



4. Espectro ^{13}C -RMN

Instituto de Química UNAM RG
 Dr. M. Jimenez
 Clave : MJE/DFL-13-pBr3
 No registro : 215
 CDCl₃
 13C {100 MHz}
 Bruker Avance III
 14-02-12



5. Espectro ^{13}C -DEPT

Instituto de Química UNAM RG

Dr. M. Jimenez

Clave : MJE/DFL-13-pBr3

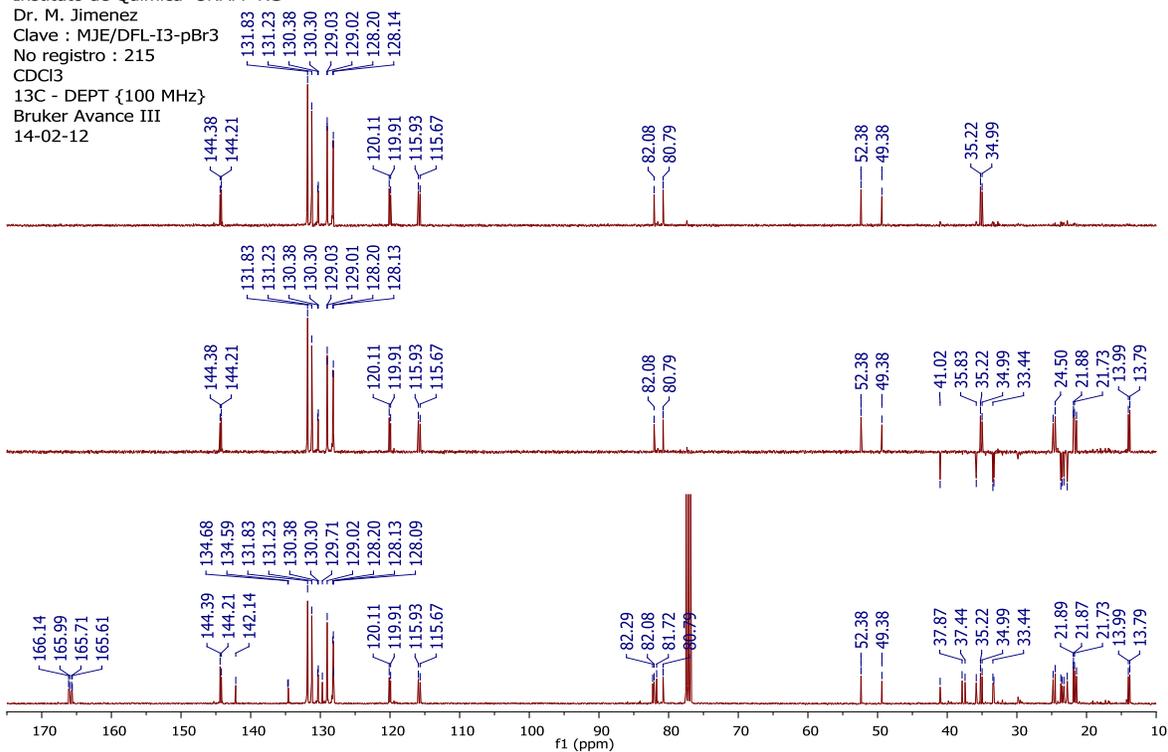
No registro : 215

CDCl_3

^{13}C - DEPT {100 MHz}

Bruker Avance III

14-02-12



6. Espectro HSQC

Instituto de Química UNAM RG

Dr. M. Jimenez

Clave : MJE/DFL-13-pBr3

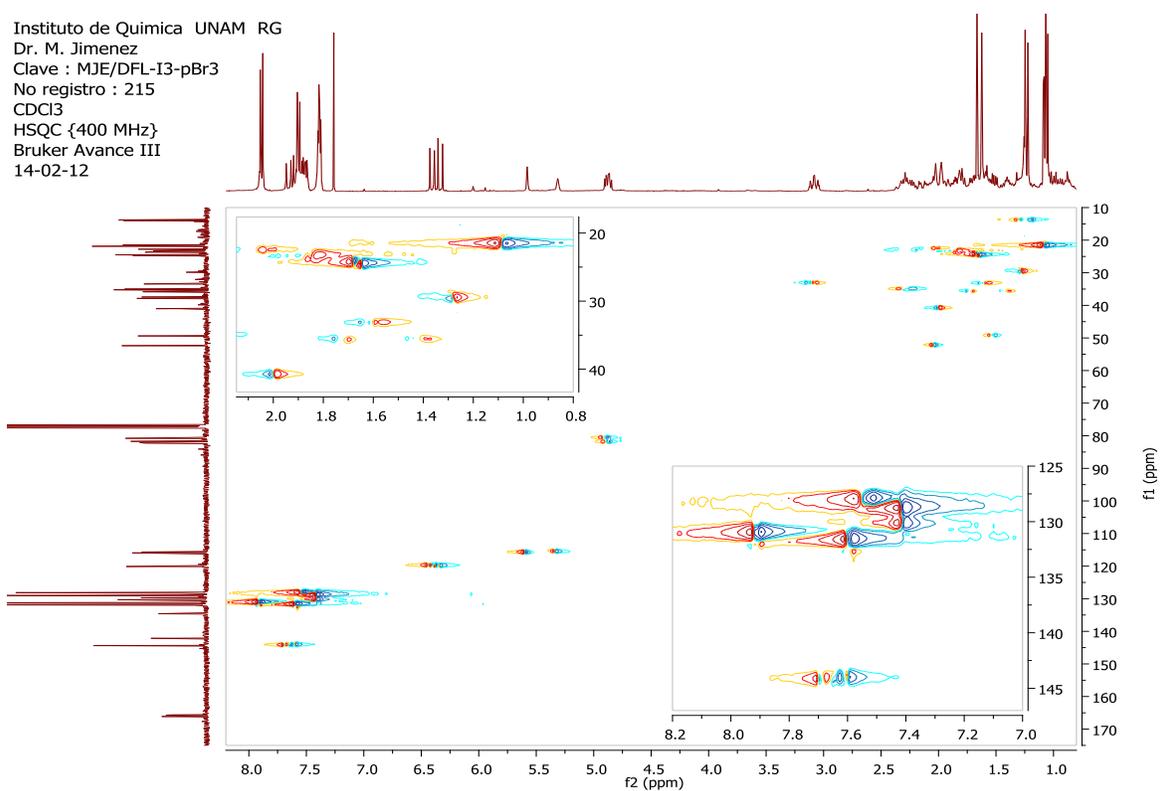
No registro : 215

CDCl_3

HSQC {400 MHz}

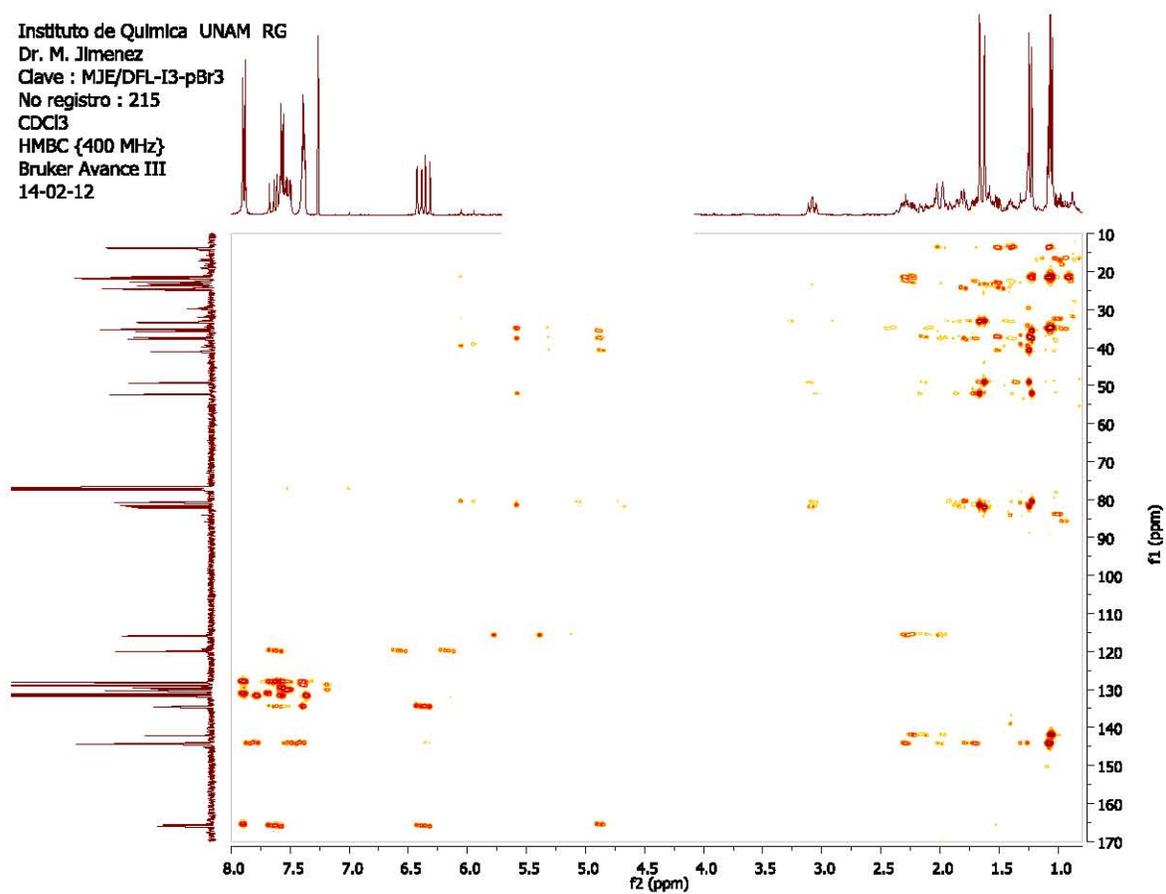
Bruker Avance III

14-02-12



7. Espectro HMBC

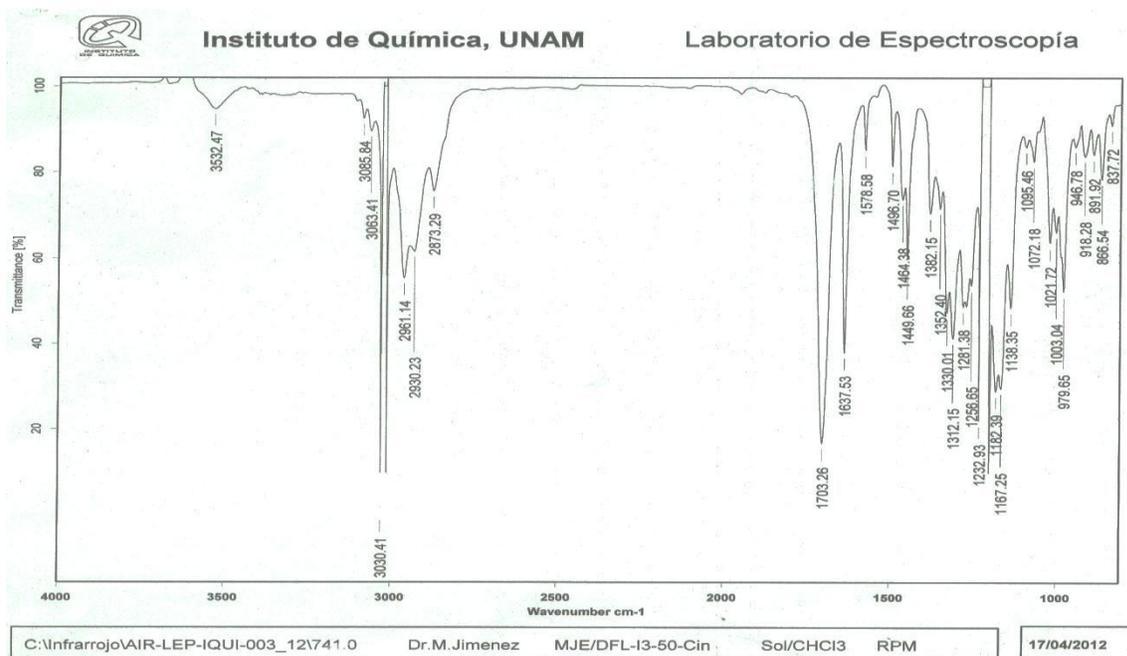
Instituto de Química UNAM RG
Dr. M. Jimenez
Clave : MJE/DFL-I3-pBr3
No registro : 215
CDCl₃
HMBC {400 MHz}
Bruker Avance III
14-02-12



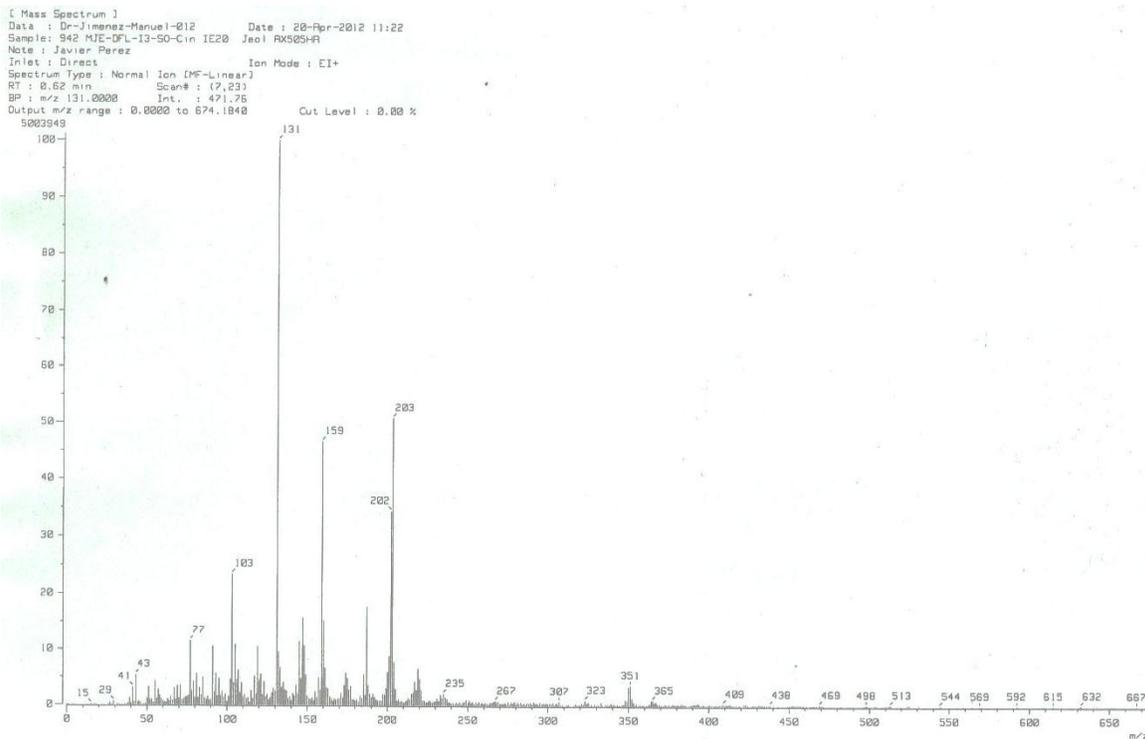
ANEXO IX.

Espectroscopia: “Mezcla Compuestos 2 y 3 - Esterificación Ac. Cinámico”.

1. Espectro Infrarrojo

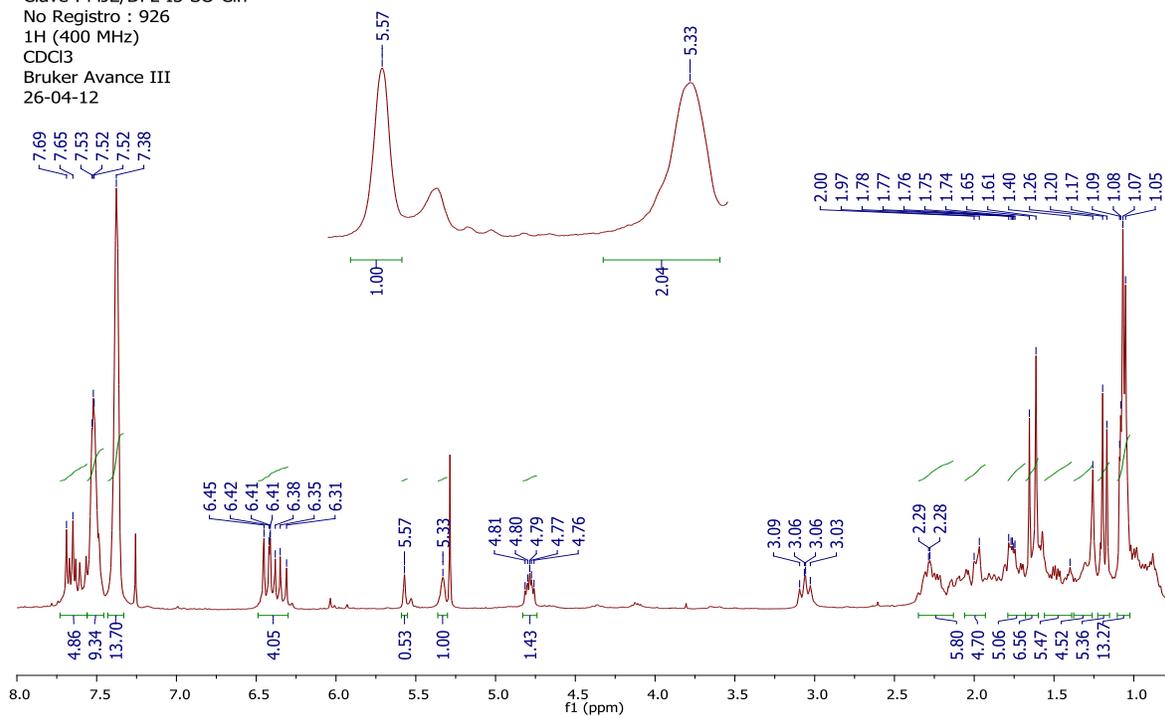


2. Espectro de Masas



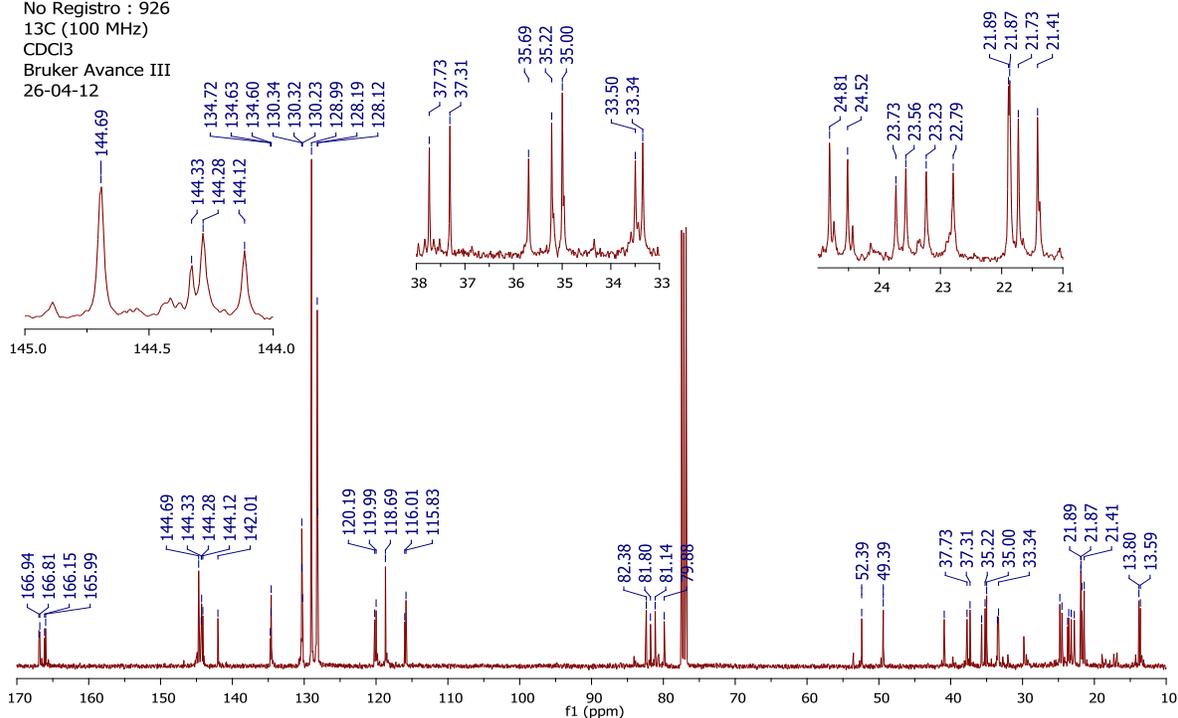
3. Espectro ^1H -RMN

Instituto de Química UNAM RG
Dr. M. Jimenez
Clave : MJE/DFL-13-SO-Cin
No Registro : 926
 ^1H (400 MHz)
CDCl₃
Bruker Avance III
26-04-12



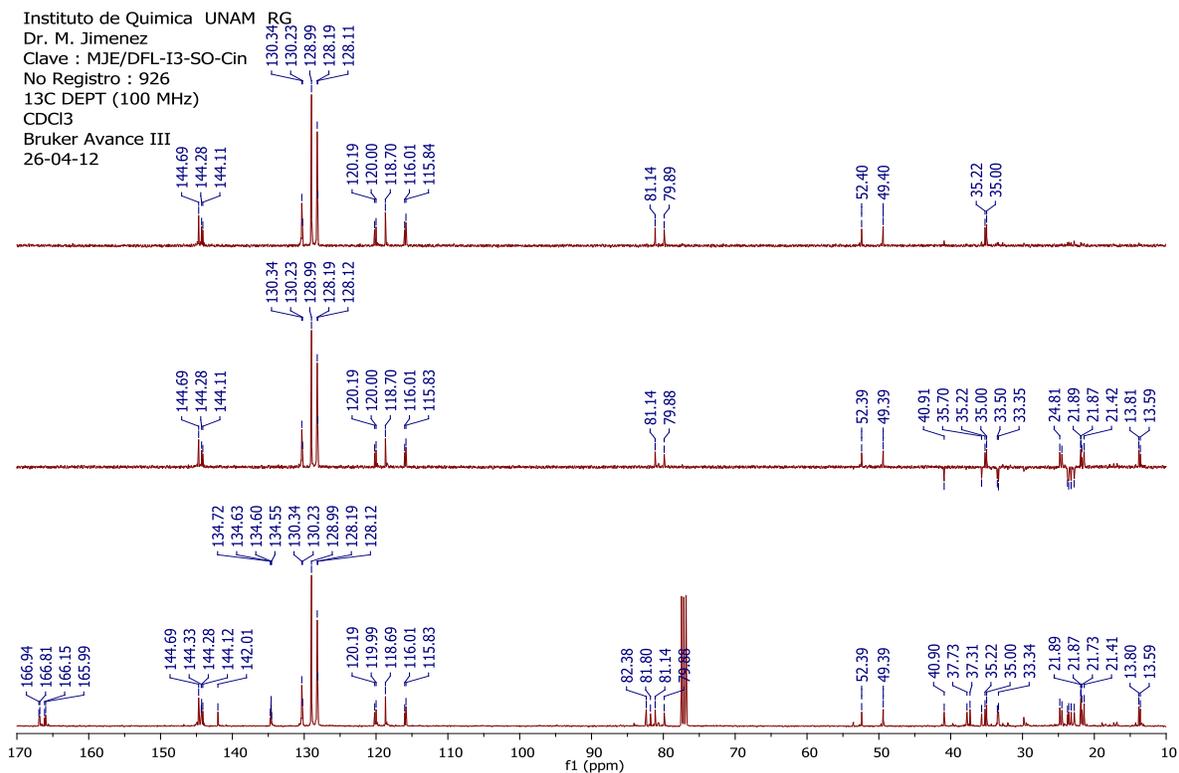
4. Espectro ^{13}C -RMN

Instituto de Química UNAM RG
Dr. M. Jimenez
Clave : MJE/DFL-13-SO-Cin
No Registro : 926
 ^{13}C (100 MHz)
CDCl₃
Bruker Avance III
26-04-12



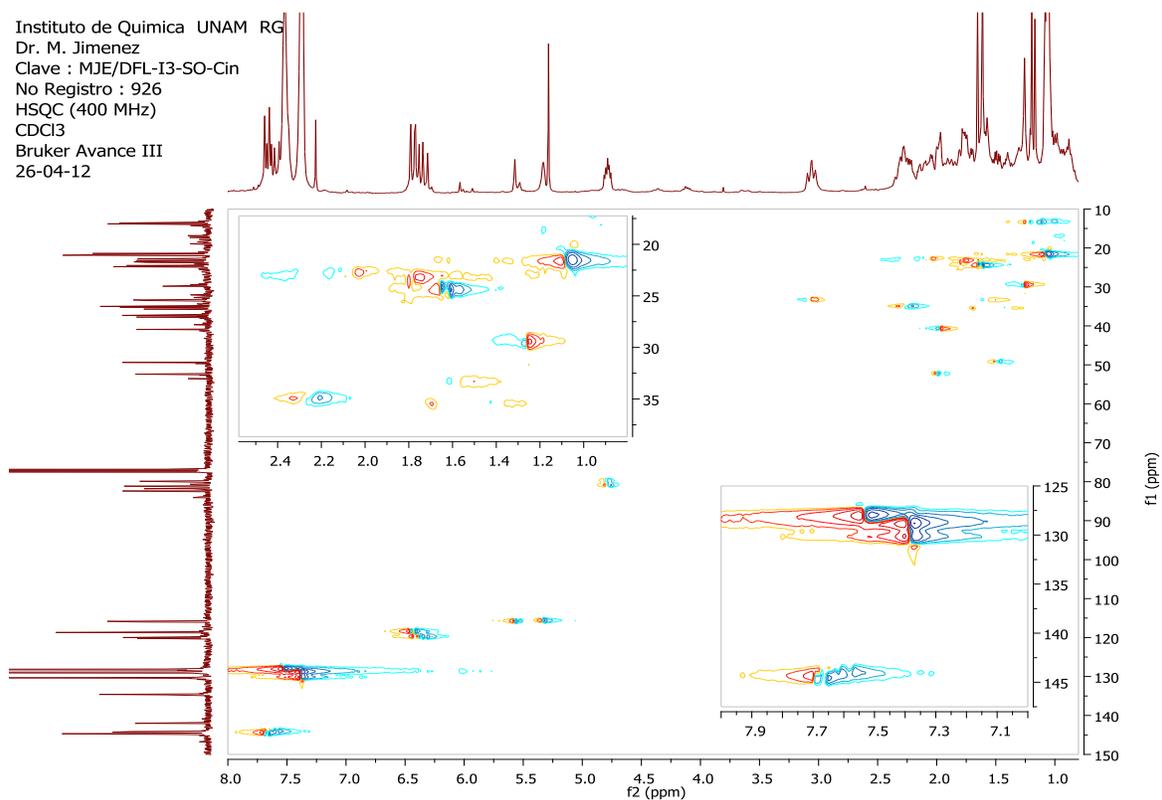
5. Espectro ^{13}C -DEPT

Instituto de Quimica UNAM RG
 Dr. M. Jimenez
 Clave : MJE/DFL-I3-SO-Cin
 No Registro : 926
 ^{13}C DEPT (100 MHz)
 CDCl₃
 Bruker Avance III
 26-04-12



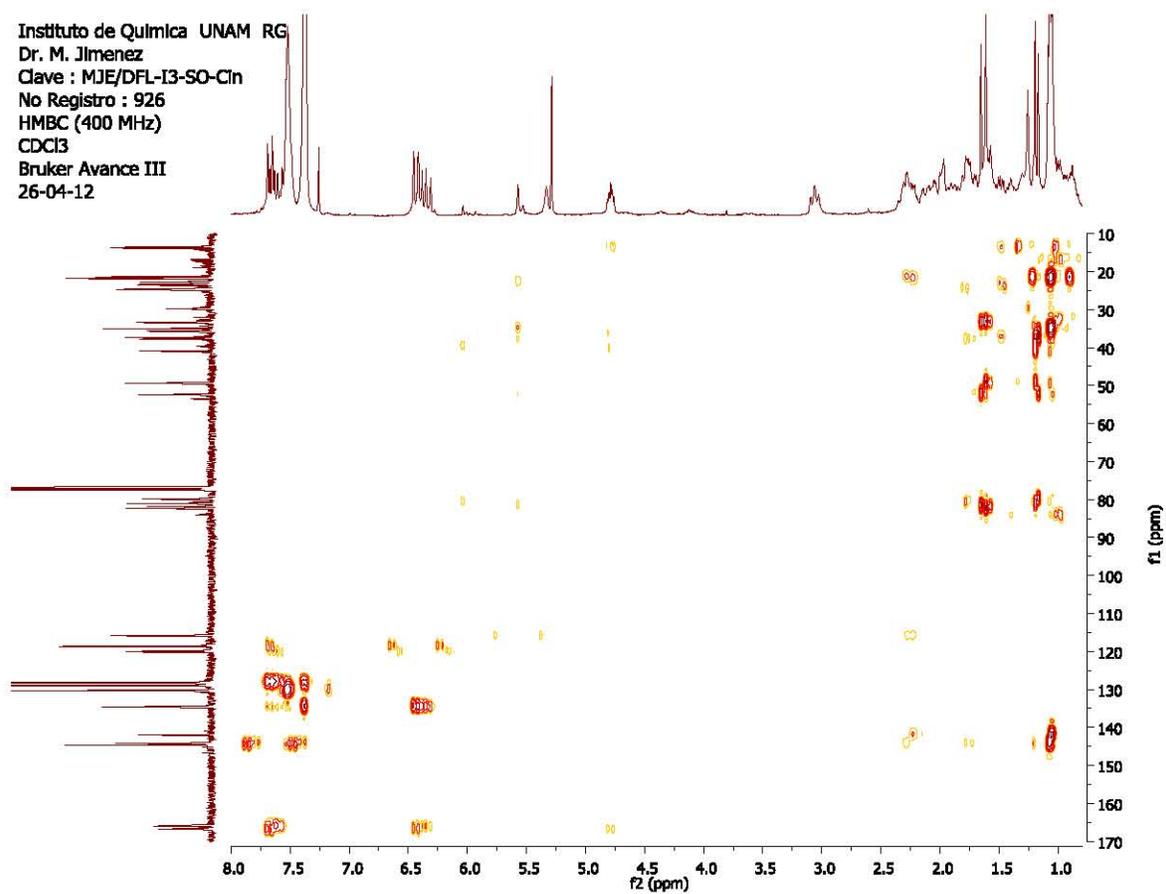
6. Espectro HSQC

Instituto de Quimica UNAM RG
 Dr. M. Jimenez
 Clave : MJE/DFL-I3-SO-Cin
 No Registro : 926
 HSQC (400 MHz)
 CDCl₃
 Bruker Avance III
 26-04-12



7. Espectro HMBC

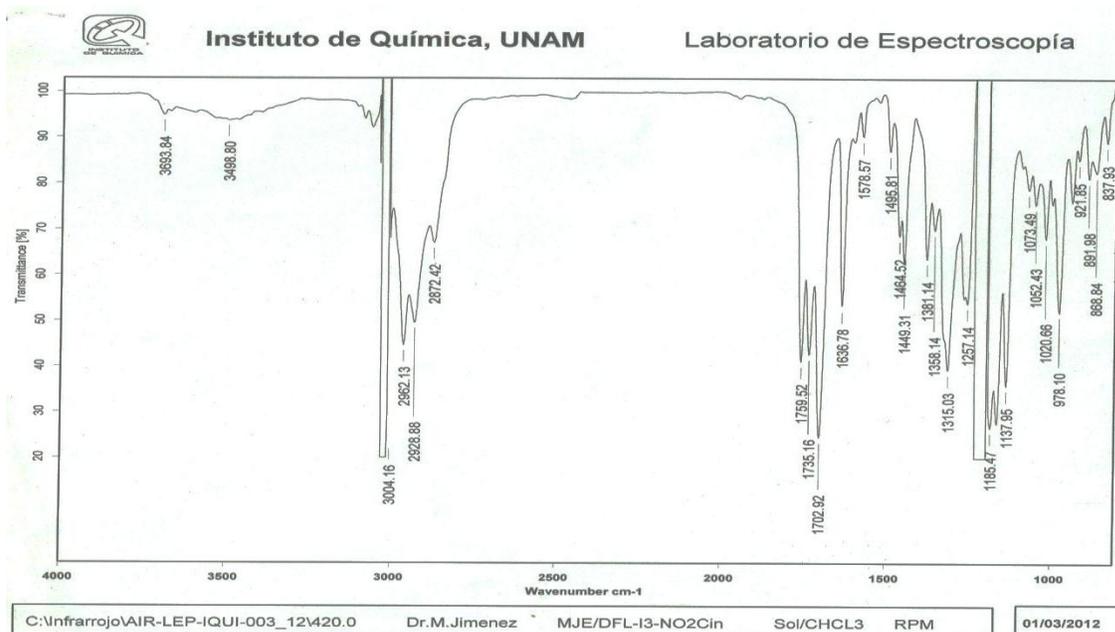
Instituto de Química UNAM RG
Dr. M. Jimenez
Clave : MJE/DFL-I3-SO-Clh
No Registro : 926
HMBC (400 MHz)
CDCl₃
Bruker Avance III
26-04-12



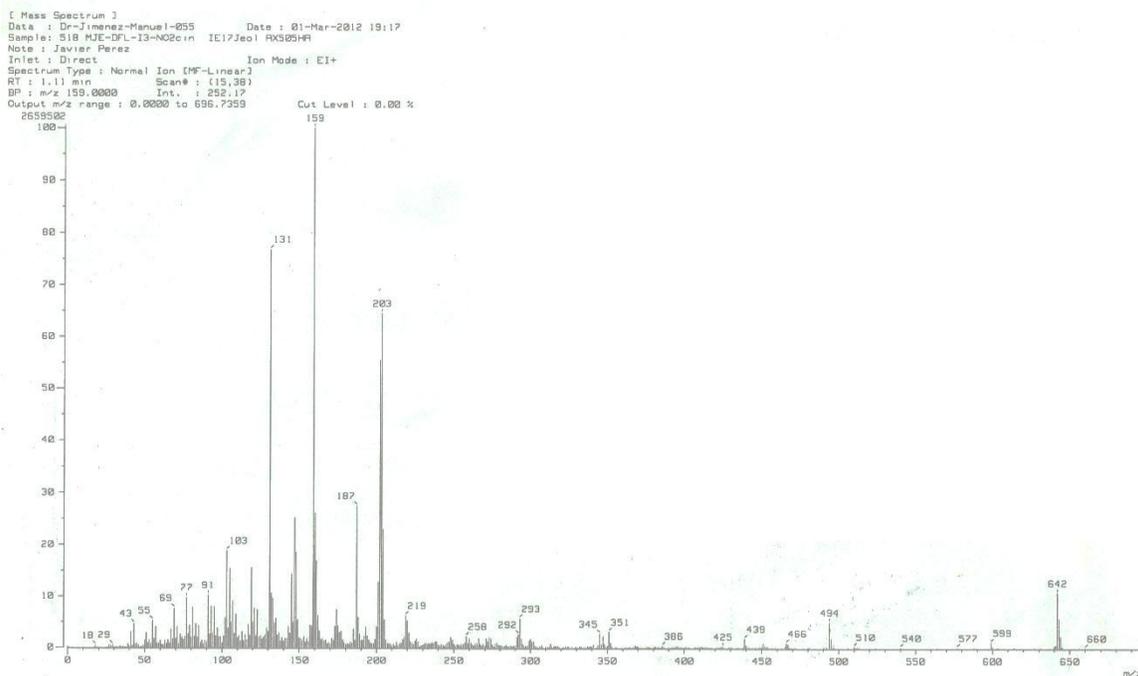
ANEXO X.

Espectroscopia: "Mezcla Compuestos 2 y 3 - Reacción Cloruro de Oxalilo".

1. Espectro Infrarrojo

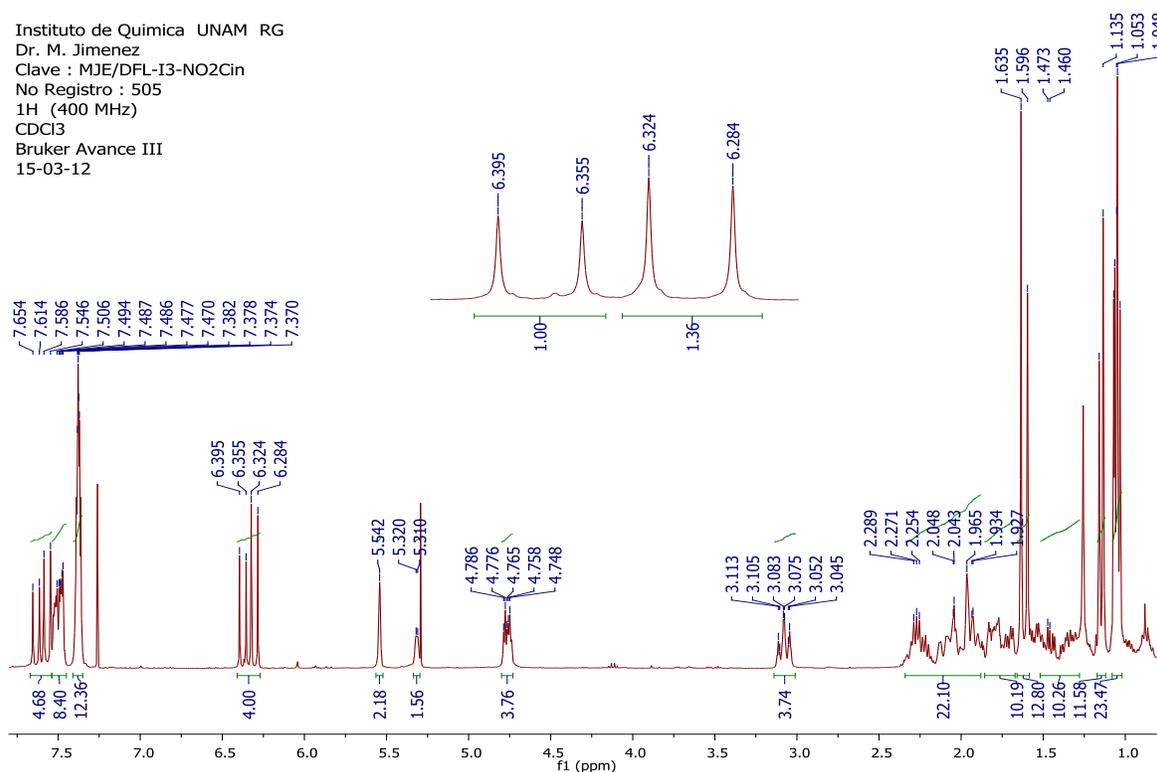


2. Espectro de Masas



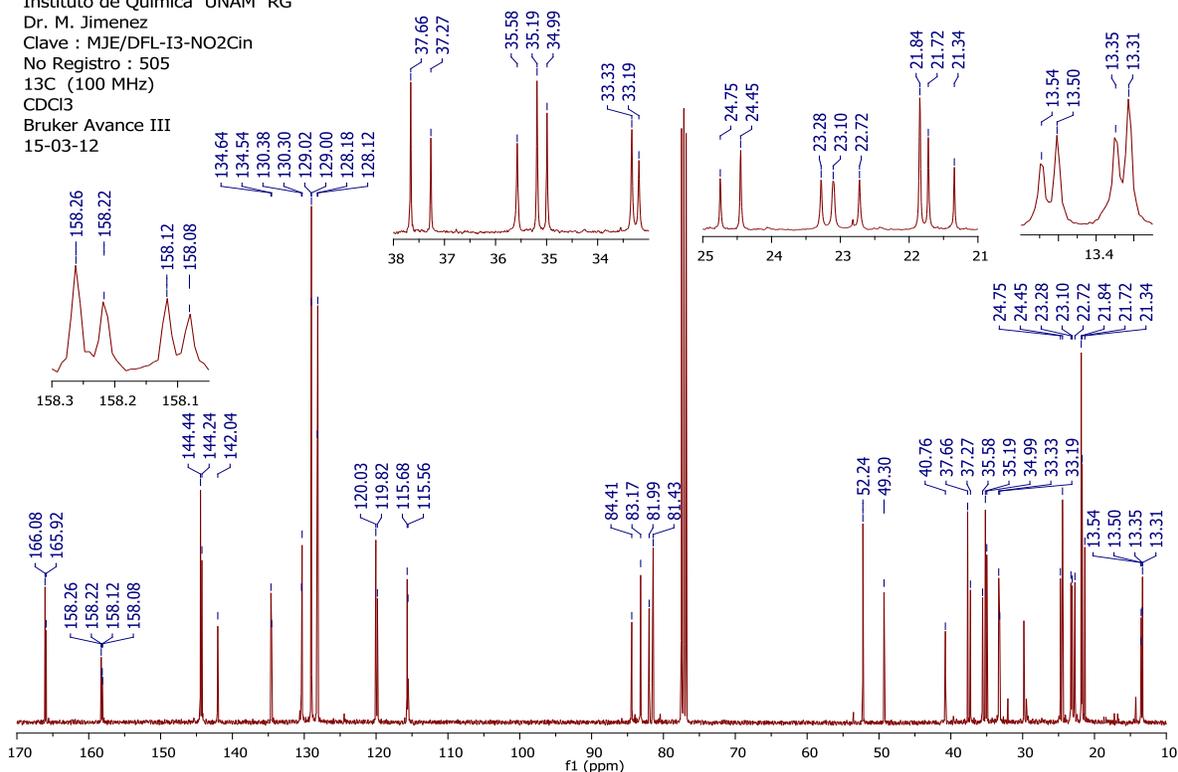
3. Espectro ¹H-RMN

Instituto de Química UNAM RG
 Dr. M. Jimenez
 Clave : MJE/DFL-I3-NO2Cin
 No Registro : 505
 1H (400 MHz)
 CDCl₃
 Bruker Avance III
 15-03-12



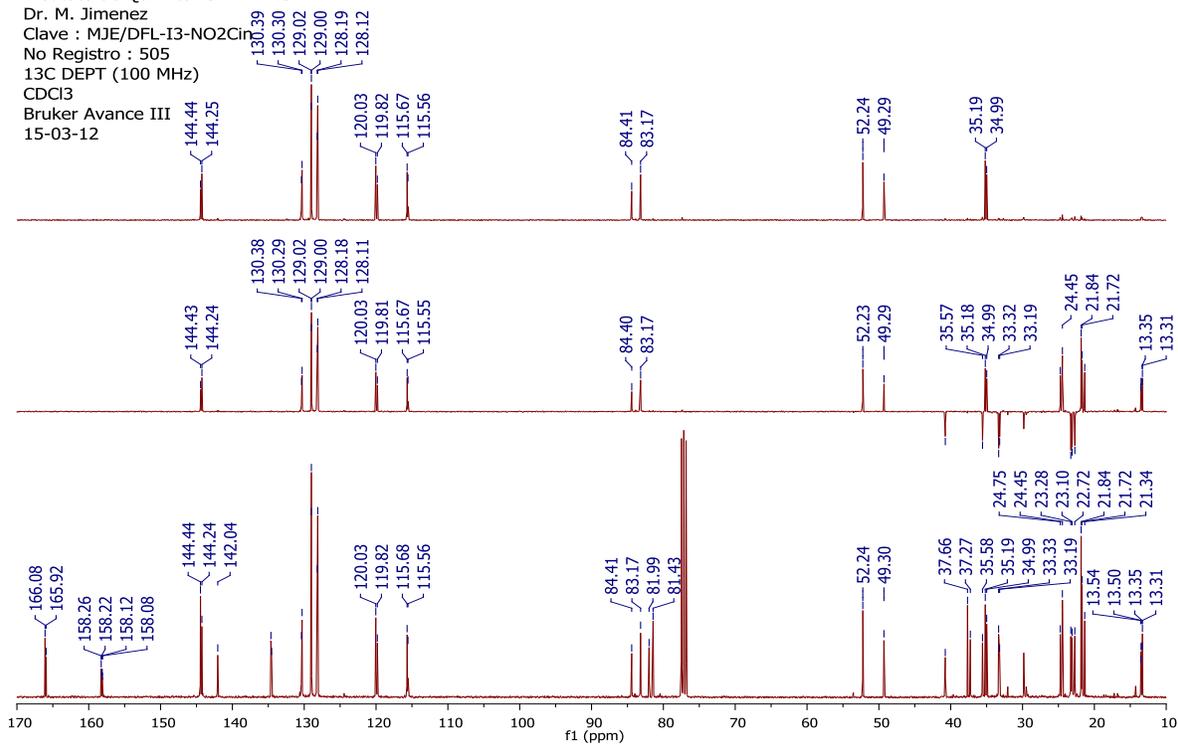
4. Espectro ¹³C-RMN

Instituto de Química UNAM RG
 Dr. M. Jimenez
 Clave : MJE/DFL-I3-NO2Cin
 No Registro : 505
 13C (100 MHz)
 CDCl₃
 Bruker Avance III
 15-03-12



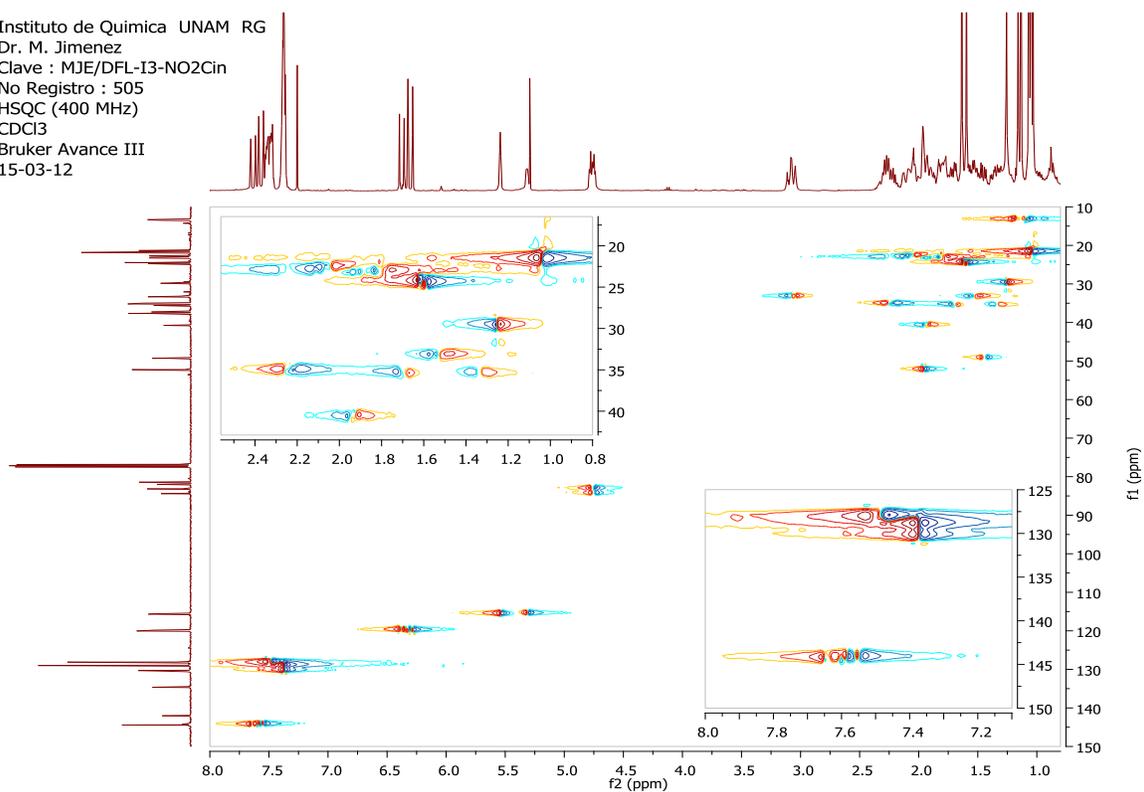
5. Espectro ¹³C-DEPT

Instituto de Quimica UNAM RG
 Dr. M. Jimenez
 Clave : MJE/DFL-I3-NO2Cin
 No Registro : 505
 13C DEPT (100 MHz)
 CDCl3
 Bruker Avance III
 15-03-12



6. Espectro HSQC

Instituto de Quimica UNAM RG
 Dr. M. Jimenez
 Clave : MJE/DFL-I3-NO2Cin
 No Registro : 505
 HSQC (400 MHz)
 CDCl3
 Bruker Avance III
 15-03-12



7. Espectro HMBC

Instituto de Química UNAM RG
Dr. M. Jimenez
Clave : MJE/DFL-I3-NO2Cln
No Registro : 505
HMBC (400 MHz)
CDCl₃
Bruker Avance III
15-03-12

