

2011/02

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE LOS FTALIDOS DE *Ligusticum porteri* C & R (UMBELLIFERAE)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A

ROSA GUADALUPE REZA GARDUÑO TREVIÑO

MEXICO, D. F.

1987



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CONTENIDO

I.	INTRODUCCION	2
II.	ANTECEDENTES	7
III.	DISCUSION DE RESULTADOS	19
IV.	RESUMEN Y CONCLUSIONES	53
V.	PARTE EXPERIMENTAL	56
VI.	ESPECTROS	71
	IR (CHCl ₃) <u>Z</u> -ligustilido	72
	IR (CHCl ₃) (<u>Z</u> , <u>Z'</u>)-rel-(6 <u>R</u> ,7 <u>R</u>)-6.6',7.3'a-diligustilido	73
	IR (CHCl ₃) <u>Z</u> -rel-(8 <u>S</u> ,6' <u>R</u> ,7' <u>S</u>)-8.6', 3.7'-diligustilido	74
	RMN ¹ H (CDCl ₃) <u>Z</u> -ligustilido	75
	RMN ¹ H (CDCl ₃) (<u>Z</u> , <u>Z'</u>)-rel-(6 <u>R</u> ,7 <u>R</u>)-6.6',7.3'a-diligustilido	76
	RMN ¹ H (CDCl ₃) (<u>Z</u> , <u>Z'</u>)-rel-(3 <u>R</u> ,6 <u>R</u> ,7 <u>R</u> ,7'a <u>S</u>)-3,8,7',7'a-tetra- hidro-6.6',7.3'a-diligustilido	77
	RMN ¹ H (CDCl ₃) (<u>Z</u> , <u>Z'</u>)-rel-(3 <u>R</u> ,6 <u>R</u> ,7 <u>R</u>)-3,8-dihidro-6.6',7.3'a- diligustilido	78
	RMN ¹ H (CDCl ₃) <u>Z</u> -rel-(8 <u>S</u> ,6' <u>R</u> ,7' <u>S</u>)-8.6',3.7'-diligustilido	79
	RMN ¹ H (CDCl ₃) <u>Z</u> -rel-(8 <u>S</u> ,6' <u>R</u> ,7' <u>S</u>)-6,7,3',8'-tetrahydro- 8.6',3.7'-diligustilido	80
	RMN ¹ H (CDCl ₃) <u>Z</u> -4,5-dehidro-3',8'-dihidro-8.6',3.7'- diligustilido	81
	RMN ¹³ C (CDCl ₃) (<u>Z</u> , <u>Z'</u>)-rel-(6 <u>R</u> ,7 <u>R</u>)-6.6',7.3'a-diligustilido	82
	RMN ¹³ C (CDCl ₃) <u>Z</u> -rel-(8 <u>S</u> ,6' <u>R</u> ,7' <u>S</u>)8.6',3.7'-diligustilido	83
VII.	BIBLIOGRAFIA	85

I. INTRODUCCION

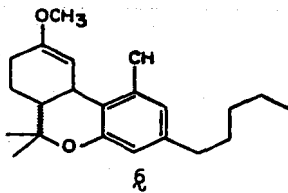
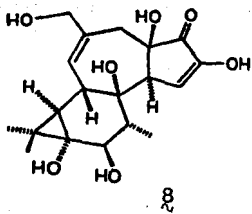
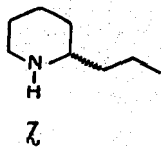
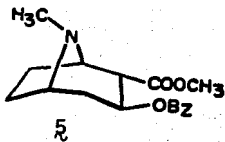
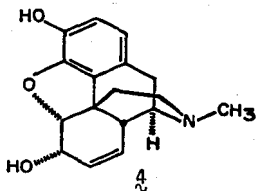
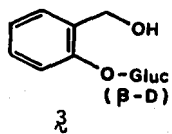
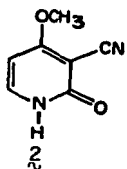
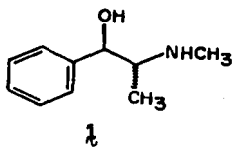
INTRODUCCION

Los reinos vegetal y animal han representado desde siempre los recursos naturales decisivos para la supervivencia del ser humano, principalmente con fines alimenticios y terapéuticos. El aprovechamiento de estos recursos naturales se encuentra enmarcado por el endemismo, la disponibilidad práctica de los mismos y la filosofía de las diferentes culturas en el mundo, las cuales han generado conocimientos para tal objetivo.

En particular ciertas plantas o productos obtenidos de ellas han sido usadas por miles de años y su estudio, cultivo y recolección ha sido una práctica común en diversas civilizaciones. Muchos de estos productos naturales son aún usados en nuestros días y generalmente para propósitos similares. Como ejemplos se puede mencionar a la efedrina (1), constituyente de *Ephedra sp.* que se utiliza para aliviar padecimientos respiratorios, la ricinina (2) es el principio activo del aceite de ricino, el cual se usa como purgante. La salicina (3) es el producto natural análogo a la aspirina y se encuentra principalmente en la corteza de los sauces.

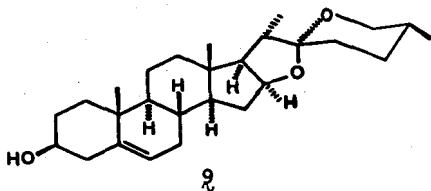
La morfina (4), la cocaína (5) y el tetrahidrocanabino1 (6) son los principios activos de plantas que se han usado a través de los tiempos en rituales como narcóticos y alucinógenos.¹

Por otro lado, también existen sustancias naturales que po-



seen alta toxicidad para el ser humano, o bien son venenos, como son la coniina (ζ) (cicuta, constituyente de ciertos abetos) y el forbol (η) y sus derivados, que son metabolitos secundarios comunes en ciertas especies de plantas de la familia Euphorbiaceae.²

Aún recientemente, es notable la contribución de las sustancias naturales de origen vegetal a la obtención de fármacos modernos. Basta mencionar a la diosgenina (θ), que se obtiene del tubérculo de especies de *Dioscorea* (la cual era relativamente abundante en nuestro país), y es materia prima para la obtención de sustancias esteroidales.³ Este hallazgo permitió el florecimiento de la industria de los esteroides y es indudable el impacto de tales productos farmacéuticos en la sociedad moderna.



Así, las sustancias naturales de origen vegetal, siguen representando en la actualidad una fuente de agentes terapéuticos de utilidad práctica, por lo que se requiere su investigación.

En particular, México cuenta con una amplia tradición en el uso de plantas medicinales, y este conocimiento empírico constituye un

punto de partida idóneo para la búsqueda de nuevas sustancias con actividad farmacológica, ya que este grupo de plantas ha sido poco estudiado en nuestro país tanto desde los puntos de vista biológico y farmacológico, como fitoquímico.^{4,5}

El objetivo del presente trabajo es contribuir al conocimiento de los constituyentes químicos de la flora medicinal de nuestro país, mediante la extracción, el aislamiento y la elucidación de la estructura molecular de los metabolitos secundarios de la raíz de *Ligusticum porteri* C. & R. (nombres comunes: wasia, chuchupaste), la cual es usada por los tarahumaras para la preparación de infusiones y ungüentos para los padecimientos gastrointestinales, dolores de cabeza, fiebres y para aliviar los dolores asociados al reumatismo.^{6,7}

II. ANTECEDENTES

ANTECEDENTES

La planta que es objeto del presente estudio, *Ligusticum porteri* pertenece a la familia Umbelliferae, de la que se conocen aproximadamente tres mil especies, agrupadas en cerca de 300 géneros. Este grupo de plantas se divide en tres subfamilias: *Hydrocotyloideae*, *Saniculoideae* y *Apioideae*, las cuales comprenden dos, dos y ocho tribus respectivamente,⁸ como se indica en el esquema 1.

<u>FAMILIA</u>	<u>SUBFAMILIA</u>	<u>TRIBU</u>
Umbelliferae	<i>Hydrocotyloideae</i>	<i>Hydrocotyleae</i> <i>Mulineae</i>
	<i>Saniculoideae</i>	<i>Saniculeae</i> <i>Lagoecieae</i>
	<i>Apioideae</i>	<i>Echinophoreae</i> <i>Scandiceae</i> <i>Coriandreae</i> <i>Smyrnieae</i> <i>Apiiae (Anmieae)</i> <i>Peucedaneae</i> <i>Laserpitieae</i> <i>Dauceae</i>

ESQUEMA 1

En esta familia se han encontrado como metabolitos secundarios un gran número de cumarinas, flavonoides y compuestos acetilénicos,

y en menor número lactonas sesquiterpénicas y ftalidos.^{8,9,10}

Debido a que en *L. porteri* se encontraron ftalidos como constituyentes principales, se describirán a continuación las características principales de este tipo de sustancias y su distribución en la naturaleza. También se menciona la biogénesis y la actividad farmacológica de los mismos.

Los ftalidos tienen la estructura general indicada en la figura 1, en la cual el anillo A puede estar parcial o totalmente saturado, y con la presencia de sustituyentes. En el anillo lactónico se pueden presentar dos posibilidades; una en la que $R_1=H$ y $R_2=alquilo$ y otra en la que R_1 y R_2 representen un grupo alquilideno.

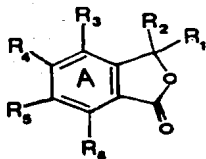


Figura 1. Fórmula estructural de un ftalido

La mayoría de los ftalidos se oxidan rápidamente por la influencia del aire y tienden fácilmente a formar polímeros, además como estas sustancias tienen diferencias estructurales muy pequeñas resulta difícil separar una mezcla de las mismas.¹¹

Todas las especies de la familia Umbelliferae, de las cuales se han encontrado ftalidos hasta ahora, pertenecen a las tribus *Ammieae* o *Peucedaneae* de la subfamilia *Apioideae* (ver esquema 1) y a siete géneros principalmente, indicados en el esquema 2.^{11,12}

FAMILIA	SUBFAMILIA	TRIBU	SUBTRIBU	GENERO
		<i>Ammieae</i>	<i>Carinae</i> <i>Seselinae</i>	<i>Apium</i> <i>Cnidium</i> <i>Ligusticum</i> <i>Meum</i>
Umbelliferae	<i>Apioideae</i>	<i>Peucedaneae</i>	<i>Angelicinae</i>	<i>Angelica</i> <i>Conioselinum</i> <i>Levisticum</i>

ESQUEMA 2

Existe en la literatura una revisión sobre la distribución de los ftalidos en la familia Umbelliferae la cual fue publicada en 1979.¹¹ En esta revisión se describe la composición química de quince especies de este grupo de plantas de las cuales se aislaron 22 ftalidos diferentes. A continuación se reseñan estos resultados y los que se han publicado posteriormente a esta revisión.

En la tabla 1 se indican los ftalidos reportados hasta ahora en las especies de la familia Umbelliferae.¹¹⁻²¹ Sus nombres y fórmulas estructurales se encuentran en la tabla 2 y en el esquema 3, respectivamente.

ESPECIEFTALIDO

<i>Angelica acutiloba</i> ²⁷	12
<i>Angelica acutiloba</i> var. <i>sugiyamae</i> ^{27,36}	11,12,23
<i>Angelica anomala</i> Laliement ¹¹	- - - -
<i>Angelica anomala</i> var. <i>chinensis</i> ¹¹	11
<i>Angelica glauca</i> Edgew. ¹³	23,43
<i>Angelica sinensis</i> Diels ¹¹	11,22,23
<i>Angelica ternata</i> Regel et Schmalh. ¹¹	23,30,31
<i>Apium graveolens</i> L. ^{11,12}	10,12,13,16,17,18,19,20,21,24, 25,26,27,28
<i>Cnidium officinale</i> Makino ^{11,18,39}	11,12,14,15,17,23,24,27,32-40
<i>Conioselinum kamtschaticum</i> Rupr. ¹¹	11,23
<i>Levisticum officinale</i> Koch ^{11,17,19}	11,12,13,23,28,42,43,44
<i>Ligusticum acutilobum</i> Sieb. et Zucc. ^{11,36}	11,12,22,23,29
<i>Ligusticum acutiloba</i> var. <i>sugiyamae</i> Hikino ¹¹	11,23
<i>Ligusticum sinense</i> ¹¹	14,23
<i>Ligusticum wallichii</i> Franch. ^{11,15,16,20}	11,12,17,23,24,29,32,38,39, 41,42
<i>Meum athamanticum</i> ^{11,14,21}	11,12,17,23,32,33,35,38,39,42, 45

Tabla 1

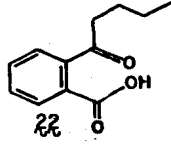
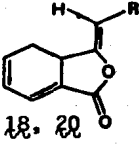
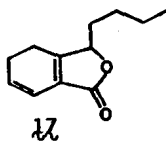
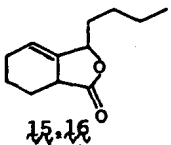
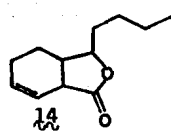
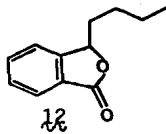
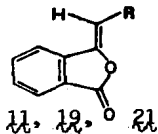
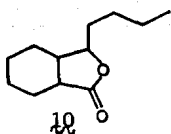
FTALIDO	R	NOMBRE (S)
10		3-butylhexahidroftalido ³⁸
11	n-propil	3-butylidenftalido=ligusticum lactona ^{12,19}
12		3-butylftalido ¹²
13		3-butyltetrahidroftalido ¹¹
14		cnidilido=cnidium lactona* ^{12,39}
15		cnidium lactona* ¹¹
16		sedanolido* ¹¹
17		3-butyl-4,5-dihidroftalido=sedanenolido=senkyunolido ^{12,14,19,38}
18	isopropil	3-isobutiliden-3 _a ,4-dihidroftalido ¹¹
19	isopropil	3-isobutilidenftalido ¹¹
20	isobutil	3-isovaliden-3 _a ,4-dihidroftalido ¹¹
21	isobutil	3-isovalidenftalido ¹¹
22		ácido ligusticum=ácido n-valerofenon-o-carboxílico ¹¹
23	n-propil	ligustilido ^{11,12,13,17,19,36,40}
24		neocnidilido ^{12,39}
25		sedanolido*=isocnidium lactona ¹¹
26		ácido sedanólico ¹¹
27		ácido sedanónico ³⁸
28		anhídrido sedanónico* ¹¹
29		anhídrido sedanónico* ¹¹
30	n-butil	ternino ¹¹
31	n-valeril	ternitino ¹¹
32		7-hidroxi-3-butylidenftalido ^{18,20,21}
33		5-hidroxi-3-butylidenftalido ^{18,21}
34		3-hidroxi-3-butyl-8-oxo-4,5-dihidroftalido ¹⁸
35		9-hidroxi-3-butylidenftalido ¹⁸
36		9-hidroxi ligustilido ^{18,21}
37		3-hidroxi-3-butyl-4,5-dihidroftalido ^{18,20}

Tabla 2

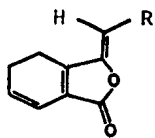
Tabla 2 (continuación)

FTALIDO	R	NOMBRE (S)
38		cis-6,7-dihidroiligustilido ^{20,21}
39		trans-6,7-dihidroiligustilido=ligustilido= (Z)-rel-(6S,7S)-6,7-dihidroiligustilido ^{14,16,21}
40		trans-6,7-dihidroxi-3-butil-4,5-dihidroftalido ¹⁸
41		wallichilido ²⁰
42		(Z,Z')-rel-(6S,7S)-6.6',7.3a'-diligustilido= Levistolido A ^{14,15,17}
43		angeolido ^{13,17}
44		Levistólido B ¹⁷
45		4-hidroxi-3-butilidenftalido ²¹

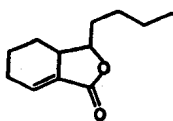
*=mismo nombre utilizado para diferentes compuestos.



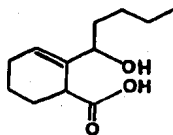
ESQUEMA 3



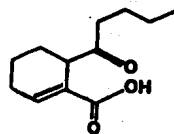
23, 30, 31



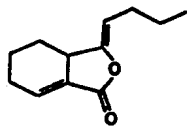
24, 25



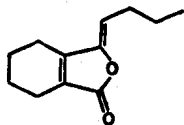
26,



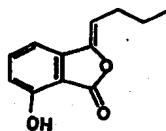
27



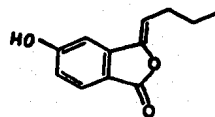
28



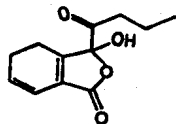
29



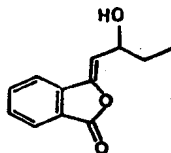
30



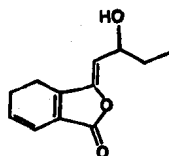
31



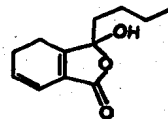
34



35

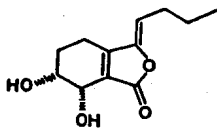


36

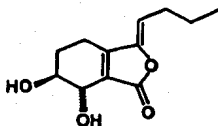


37

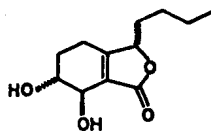
ESQUEMA 3 (continuación)



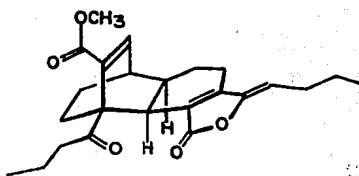
38



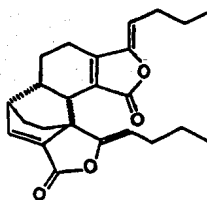
39



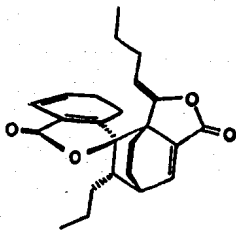
40



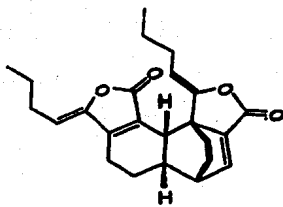
41



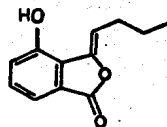
42



43



44



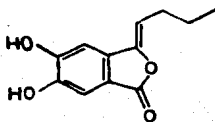
45

ESQUEMA 3 (continuación)

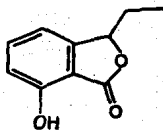
También se han encontrado compuestos derivados del esqueleto del ftalido en otras familias como *Compositae*, *Gramineae*, *Leguminosae* y *Oleaceae*. En ciertos hongos también se encuentran este tipo de metabolitos. En estas familias el anillo A es siempre aromático y en todos los casos se encuentra unido a este anillo, por lo menos, un grupo que contiene oxígeno.²²⁻³⁴

Como ejemplos se pueden citar los siguientes:

En *Peltogyne pubescens* y *Peltogyne venosa* (*Leguminosae*) se ha encontrado el 5,6-dihidroxitfalido (46), en la familia *Oleaceae* se encontró el 3-etil-7-hidroxitfalido (47).



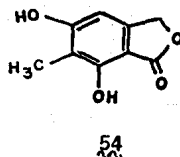
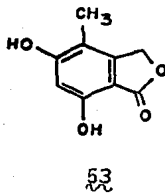
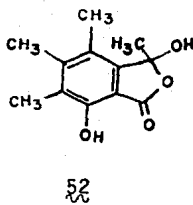
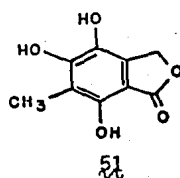
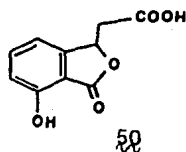
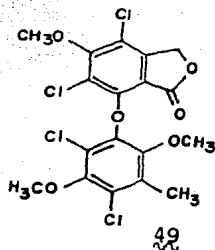
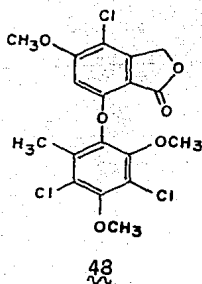
46



47

En hongos y líquenes se han encontrado varios ftalidos como productos metabólicos, los cuales tienen como sustituyentes hidroxilos metoxilos o cloruros; a continuación se mencionan algunos ejemplos:

ESPECIE	FTALIDO
<i>Buellia canescens</i> ²⁸	buellolido (48) y canesolido (49)
<i>Alternaria kikuchiana</i> ²⁹	ácido iso-ochracinico (50)
<i>Aspergillus terreus</i> ³⁰	6-metil-4,5,7-trihidroxiftalido (51)
<i>Sclerotinia libertiana</i> ³¹	sclerolido (52)
<i>Aspergillus flavus</i> ³²	5,7-dihidroxi-4-metilftalido (53)
<i>Alectorina nigricans</i> ³³	5,7-dihidroxi-6-metilftalido (54)



En cuanto a la biogénesis de los ftalidos, hasta ahora sólo se ha estudiado la del ligustílido (23)

En base a los estudios hechos con *Levisticum officinale* (Koch) se concluye que una de las posibles rutas biogenéticas del ligustílido es a través de la unión cabeza-cola de unidades de acetato,³⁵ la cual se muestra en la figura 2.

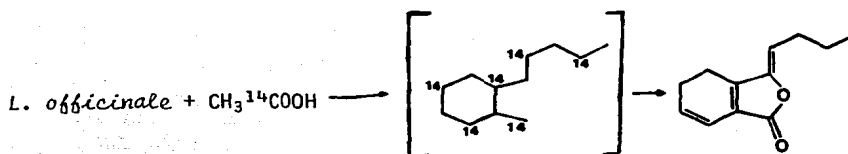


Figura 2. Posible biosíntesis del ligustílido

Otros autores^{14,21} sugieren que otros ftalidos encontrados en Umbelliferae se forman a partir del z-ligustílido, el ftalido más acumulado en esta familia de plantas.

Muchas umbelíferas que contienen ftalidos se han utilizado en la medicina popular como antiespasmódicos, sedantes, diuréticos y anti-reumáticos.¹¹ Sin embargo todavía no está completamente claro que tanto los ftalidos son responsables de la actividad farmacológica atribuida a las plantas que los contienen, aunque se ha encontrado que algunos ftalidos tienen actividad anticolinérgica y sedante.^{11,36}

III. DISCUSION DE RESULTADOS

DISCUSION DE RESULTADOS

Del extracto clorofórmico de la raíz de *Ligusticum porteri* (Coult & Rose) se aislaron cinco sustancias: isovainillina, ácido 4-hidroxi-3-metoxicinámico y tres ftalidos, dos de ellos de naturaleza dimérica.

Las estructuras de estas sustancias se establecieron por métodos espectroscópicos, espectrométricos, químicos y por comparación con los datos reportados en la literatura. La determinación de estas estructuras se discute a continuación.

ELUCIDACION DE LA ESTRUCTURA MOLECULAR DE LA ISOVAINILLINA

De las fracciones más polares se aisló un sólido con olor característico de peso molecular 152, de acuerdo a la espectrometría de masas. Su espectro en el infrarrojo indica la presencia de un hidroxilo (3526 cm^{-1}), de un carbonilo aldehídico ($2849, 2826, 2735$ y 1689 cm^{-1}), y la intensidad y el número de bandas en la región de 1600 a 1450 cm^{-1} sugieren la presencia de un núcleo aromático. Por otro lado, el área bajo la curva del espectro de RMN ^1H , indica la presencia de ocho protones, tres de los cuales corresponden a un grupo metoxilo ($\delta 3.95, 3\text{H}, \underline{s}$), por lo que se deduce la existencia de tres oxígenos en la molécula y por lo tanto, integrando estos datos, se establece la fórmula molecular $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_3$. Esta fórmula sugiere la presencia de un anillo bencenoide que en conjunción con la funcionalidad descrita (aldehído, oxhidrilo y

metoxilo), indica que éste se encuentra trisustituído. El patrón de sustitución se deduce por el análisis de los desplazamientos químicos y la multiplicidad de los protones bencénicos en RMN ^1H , como se describe a continuación.

La presencia de una sustitución asimétrica es evidente por el reconocimiento de un sistema ABM. La parte M se observa como un doblete en δ 7.01 ($J_{AM} = 9$ Hz) y la parte AB se manifiesta como un doblete de doblete centrado en δ 7.42 ($J_{AM} = 9$ Hz, $J_{AB} = 1.5$ Hz) y como un doblete en 7.40 ppm ($J_{AB} = 1.5$ Hz), como se indica en la figura 3.

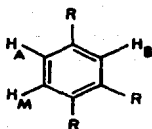


Figura 3

Existen seis posibilidades de ubicación de los sustituyentes consistentes con esta patrón de sustitución. Sin embargo la ausencia de la banda correspondiente a un hidroxilo quelatado en el espectro de IR (banda ancha en $2500-3000\text{ cm}^{-1}$) indica la no vecindad del mismo con el aldehído, y consideraciones biogenéticas hacen presuponer que el grupo aldehído se encuentra aislado. Por lo tanto, quedan dos posibilidades isoméricas que corresponden a la vainillina (55) y a la isovainillina (56). (Figura 4).

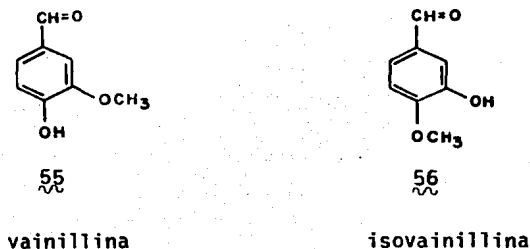


Figura 4

Estas posibilidades isoméricas se discriminan por comparación con los datos físicos y espectroscópicos encontrados en la literatura y se concluye que el compuesto es la isovainillina (56).

DETERMINACION ESTRUCTURAL DEL ACIDO 4-HIDROXI-3-METOXICINAMICO

Se aisló otra substancia de las fracciones más polares cuyo espectro de IR muestra la presencia de un hidroxilo (3533 cm^{-1}), de un ácido carboxílico (2962 , 2929 y 2855 cm^{-1} y 1685 cm^{-1} para el carbonilo) y las bandas en la región de 1631 a 1465 cm^{-1} sugieren la presencia de un núcleo aromático. El espectro de masas indica que el peso molecular es de 194. El análisis del espectro de RMN ^1H confirma la presencia de protones aromáticos por su desplazamiento alrededor de 7 ppm; en el mismo se ve un sistema AB que indica la presencia de dos protones vinílicos en posición trans ($J = 16\text{ Hz}$) y que por su desplazamiento (7.67 y 6.25 ppm) a campo bajo y por su multiplicidad se deduce que están vecinos al grupo ácido. En 3.92 ppm se observa un singlete que

integra para tres protones. Esto sugiere la presencia de un metoxilo. Por otra parte, el trazo bajo la curva de este espectro indica la presencia de ocho protones, además de los protones del ácido y del hidroxilo fenólico (que no se observan en este espectro) con lo cual se obtiene un total de diez protones. En base a los datos anteriores se puede establecer un fórmula molecular $C_{10}H_{10}O_4$ que es congruente con el peso molecular de 194. Esta última, los grupos funcionales indicados en el espectro de IR y el análisis del espectro de RMN^1H permiten establecer una estructura correspondiente a un ácido cinámico con un sustituyente metoxilo y un hidroxilo fenólico.

La multiplicidad de los protones bencénicos no está bien resuelta; sin embargo se observa cierta similitud con la de la isovainilina, ésto en conjunción con razones biogénéticas permite establecer un patrón de sustitución el cual nos conduce a dos posibles estructuras (Figura 5).

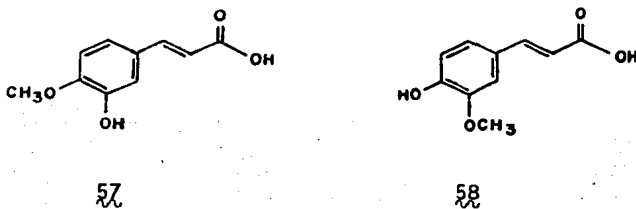


Figura 5

Estas estructuras (57 y 58) se discriminan por comparación con los datos físicos y espectroscópicos encontrados en la literatura

y se concluye que el compuesto aislado es el ácido 4-hidroxi-3-metoxi-cinámico (58).

DETERMINACION DE LA ESTRUCTURA MOLECULAR DEL LIGUSTILIDO

En las fracciones menos polares se encontró una substancia aceitosa que al revelarse con luz ultravioleta presenta fluorescencia azul.

El espectro de masas de este compuesto indica que tiene un peso molecular de 190 y su espectro de infrarrojo muestra la presencia de un carbonilo de γ -lactona (1758 cm^{-1}), de dobles enlaces (1400 cm^{-1}), de metilos y de metilenos (2873 , 2934 y 2963 cm^{-1}), de lo cual se deduce que la molécula posee al menos dos oxígenos. En el espectro de RMN^1H se observa un triplete en 0.96 ppm que integra para tres protones, esto indica que se trata de un metilo unido a un metileno (figura 6); también se observa en $\delta\ 5.20$ un triplete que integra para un protón, que por su desplazamiento se deduce que se trata de un protón vinílico y por su multiplicidad que está unido a un metileno (figura 7).



Figura 6

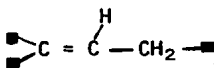


Figura 7

En 5.97 y 6.28 ppm se observan cuatro tripletes (dos dt) con

$J = 9, 3.5 \text{ Hz}$ y $J = 9, 1 \text{ Hz}$, respectivamente, que integran para un protón cada señal, lo cual sugiere la presencia de un sistema ABX_2 ya que estas señales corresponderían a la parte AB del mismo.

Los fragmentos deducidos son consistentes con la estructura general de un ftalido y esto está de acuerdo con el área total bajo la curva del espectro de RMN^1H que indica la presencia de catorce protones, que en conjunción con los dos oxígenos antes asignados, permite deducir que el compuesto tiene como fórmula molecular $C_{12}H_{14}O_2$ (PM=190) la cual indica seis grados de insaturación, tres de los cuales corresponden a la estructura general del ftalido y tres corresponden a tres dobles enlaces. Con el espectro de RMN^1H únicamente se explican dos dobles enlaces, y debido a la ausencia de protones vinílicos adicionales, se concluye que el tercer doble enlace se encuentra tetrasustituído. Esto se apoya con la presencia de una banda en 1669 cm^{-1} del espectro de IR la cual corresponde a dobles enlaces tri- y tetra-sustituídos.

Hasta este punto se pueden establecer dos posibles estructuras que se indican en la figura 8 (omitiendo la estereoquímica del doble enlace de la cadena lateral).

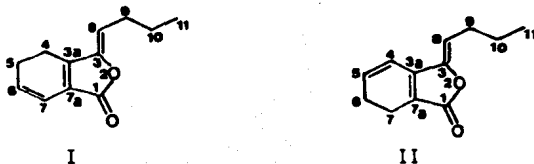
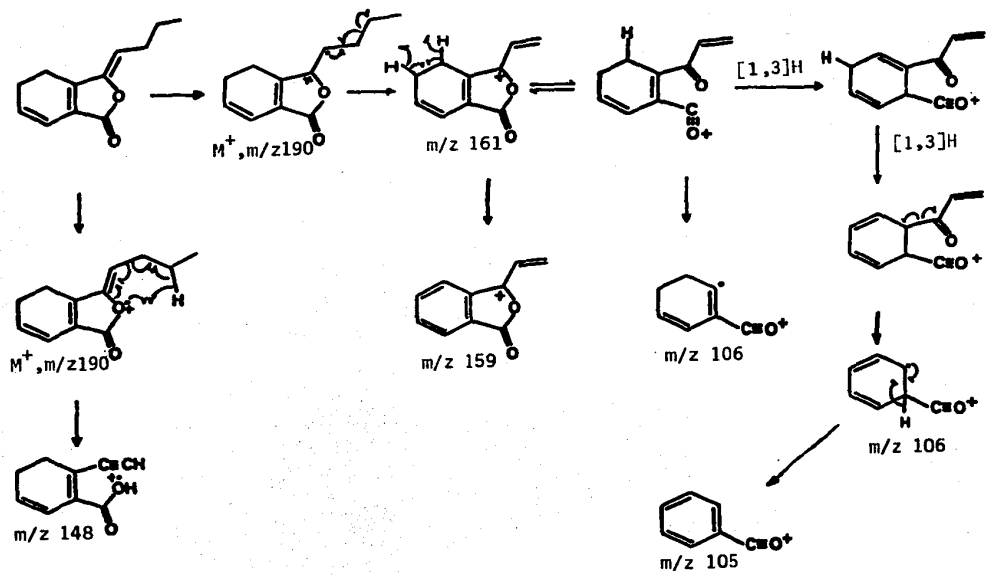


Figura 8

Como en el espectro de RMN^1H las señales correspondientes a los protones vinílicos del anillo A se localizan en 6.28 y 5.97 ppm se infiere que éstos se encuentran cerca de un grupo electronegativo ya que están desplazados a campos más bajos respecto a protones vinílicos que no tienen vecinos a grupos electroatrayentes, por lo tanto, se descarta la estructura II (figura 8), asignándose para el compuesto aislado la estructura I. Esta estructura es consistente con los principales iones observados en el espectro de masas y cuya fragmentación se muestra en el esquema 4. La pérdida del radical etilo del ion molecular produce el fragmento m/z 161 el cual se puede aromatizar por pérdida de dos radicales hidrógeno para producir el ion m/z 159. El ion m/z 161 puede sufrir dos transposiciones [1,3] de hidrógeno con una subsecuente pérdida de propenona (-55 uma) para formar el ion m/z 106, el cual se aromatiza mediante pérdida de radical hidrógeno para formar el ion m/z 105. Por otro lado, a partir del ion molecular, mediante la transferencia [1,5] de hidrógeno y subsecuente pérdida de propeno se forma el ion radical m/z 148.

La estructura I mostrada en la figura 8 corresponde al Ligustilido (23) el cual existe en sus dos formas isoméricas en la naturaleza. La discriminación entre ambas está basada en el desplazamiento químico del protón olefínico de la cadena lateral: en el isómero E se encuentra desprotegido por la vecindad con el oxígeno etéreo de la lactona (δ 5.73) mientras que en el isómero Z este protón resuena a mayor campo (δ 5.23). El desplazamiento químico observado para el Ligustilido de *L. porteri* es δ 5.20 lo cual establece la configuración Z.



ESQUEMA 4

ELUCIDACION ESTRUCTURAL DE (Z,Z')-rel-(6R,7R)-6,6',7.3a' DILIGUSTILIDO

Esta sustancia se aisló como un sólido cristalino cuyo espectro de infrarrojo indica la presencia de metilos y metilenos (2960 y 2872 cm^{-1}), de dobles enlaces (3015 cm^{-1}) y de carbonilo de γ -lactona (1767 cm^{-1}).

Su espectro de RMN^{13}C con desacoplamiento total muestra la presencia de 24 átomos de carbono. La naturaleza funcional y el grado de hidrogenación de estos átomos se establece por su desplazamiento químico y por su multiplicidad mostrada en el espectro de desacoplamiento parcial. De lo anterior se establece la presencia de dos carbonilos, cuatro dobles enlaces: uno tetrasustituido y tres trisustituidos, un carbono cuaternario, tres metinos, ocho metilenos y dos metilos. Por lo tanto, la molécula posee 24 átomos de carbono, 28 de hidrógeno y 2 oxígenos carbonílicos, que considerando la presencia de la γ -lactona que es manifiesta por IR, se establece la naturaleza lactónica de un grupo carbonilo.

Esta sustancia muestra en EM un ion molecular de 380 y la integración de esta dato con los parámetros analizados de IR y RMN^{13}C establece la fórmula molecular $\text{C}_{24}\text{H}_{28}\text{O}_4$, y, por lo tanto, la molécula posee once grados de insaturación.

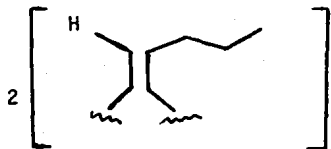
Es notable que la fórmula molecular deducida sea precisamente el doble de la correspondiente a un ftalido con seis grados de insaturación ($\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{O}_2$), y sugiere la naturaleza dimérica del producto natu-

ral. Esta observación es apoyada por el análisis del espectro de masas el cual no presenta fragmentación significativa entre m/z 380 y m/z 192, y el pico base se encuentra precisamente en m/z 190 que presumiblemente es el ion molecular del monómero.

La comparación de los fragmentos más abundantes de este compuesto coinciden con los del ligustilido previamente descrito en este trabajo (Esquema 4), lo que sugiere que esta substancia es la unidad del producto natural.

El espectro de RMN^1H presenta dos tripletes ($J=8$ Hz) en 4.97 y 5.05 ppm similares a los del protón (vinílico de la cadena lateral) H-8 del ligustilido, y corresponde cada señal a un protón olefínico. El otro carbón del doble enlace es cuaternario, esto se apoya con las señales en el espectro de RMN^{13}C de los carbonos vinílicos que portan el hidrógeno (108.41 \underline{d} y 111.70 \underline{d}) y de los carbonos cuaternarios (148.22 \underline{s} y 150.71 \underline{s}). La multiplicidad de las señales en el espectro de RMN^1H permite deducir la vecindad del protón vinílico a un metileno. Por otro lado también se observa otro triplete en δ 0.9 (7 Hz), que integra para seis protones, similar al triplete del metilo de la cadena lateral del ligustilido, esto sugiere que se trata de dos metilos cada uno unido a un metileno.

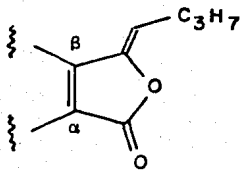
Si se integran los datos de RMN^1H y RMN^{13}C hasta ahora analizados se puede escribir la fórmula parcial III.



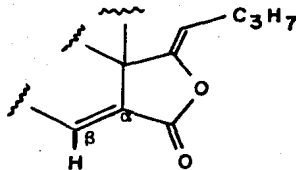
III

Esta estructura correspondería a las dos cadenas laterales del ftálico.

Tomando en consideración que los espectros de IR y RMN¹³C indican la presencia de una γ -lactona α,β -insaturada y un segundo grupo carbonilo (1767 cm^{-1} , 168.30 $\underline{\text{s}}$ y 164.69 $\underline{\text{s}}$), y debido a la ausencia de funciones hidroxilo o eter, el cuarto oxígeno debe formar parte de un segundo grupo lactónico α,β -insaturado, por lo que se infieren las dos fórmulas parciales posibles IV y V, tomando en consideración el desplazamiento a campo alto de H-8 en RMN¹H (δ 4.97 y 5.05), de acuerdo a los argumentos indicados para el ligustilido.



IV



V

Existen tres posibilidades de combinar estas estructuras parciales en la molécula del dímero, éstas son: 1) que el producto natural contenga dos unidades de IV, 2) que contenga dos unidades de V y 3) que contenga una unidad de IV y una de V. La estructura parcial IV se comprueba con las señales en RMN¹³C para los carbonos del doble enlace tetrasustituído (154.98 s para C_β y 134.32 s para C_α) cuyas asignaciones se establecen por comparación con moléculas análogas. La fórmula parcial V se confirma por un lado, por las señales de los carbonos α y β en el espectro de RMN¹³C (126.67 s y 141.96 d, respectivamente), también asignadas por comparación, y por otro lado con la señal del protón β en el espectro de RMN¹H (7.31 ppm, d, 6.5 Hz). Estas asignaciones se muestran en la figura 9.

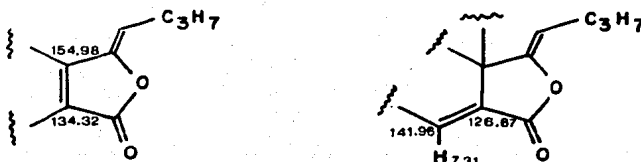


Figura 9

Por lo tanto, se concluye que tanto la estructura IV como la V están presentes en la molécula del dímero.

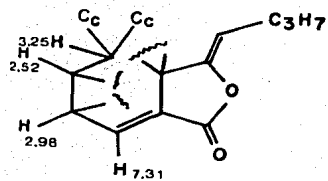
Continuando el análisis del espectro de RMN¹H se observan cuatro metinos (δ 7.31, d, 6.5 Hz; δ 3.25, d, 9 Hz; δ 2.52, m y δ 2.98,

dddd, 6.5, 2.5, 2.5 y 2.5 Hz). De la multiplicidad y desplazamiento químico mostrados por las señales en este espectro, se deduce que dos de ellos están unidos a un carbono cuaternario y a un metino, ya que se manifiestan como dobletes y en particular uno de éstos es de naturaleza olefínica y es precisamente el protón β al carbonilo lactónico. Experimentos de doble resonancia realizados en los espectros simplificados con diferentes concentraciones de reactivo de desplazamiento (figura 10) permiten establecer estas asignaciones. Estos experimentos a doble resonancia se describirán a continuación transcritos al espectro original.

1) Al irradiar el doblete centrado en 7.31 ppm (6.5 Hz, protón β), el dddd (6.5, 2.5, 2.5 y 2.5 Hz) centrado en 2.98 ppm se simplifica a un ddd ($J = 2.5, 2.5$ y 2.5 Hz). Por lo que se concluye que estos protones son vecinos.

2) Al irradiar la señal centrada en 2.52 ppm m, se simplifican las señales que se encuentran en δ 3.25 d, 9 Hz y en δ 2.98. El doblete en δ 3.25 se simplifica a singulete y la señal centrada en 2.98 ppm se simplifica a ddd (2.5, 2.5 y 2.5 Hz). Con estos resultados se deduce que el protón en δ 3.25 es vecino a dos carbonos cuaternarios y al metino cuya señal se centra en 2.52 ppm. A su vez, éste último es vecino al protón centrado en 2.98 ppm.

Con la integración de la información proporcionada por estos experimentos, el espectro de RMN^{13}C y el de infrarrojo se puede establecer la fórmula parcial VI.



VI Cc=carbono cuaternario

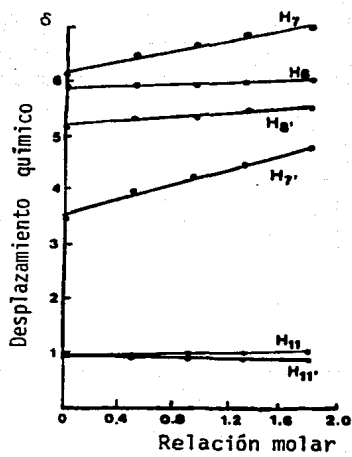
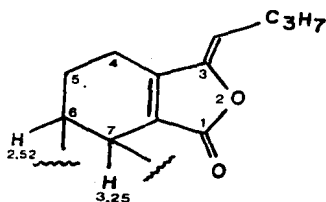
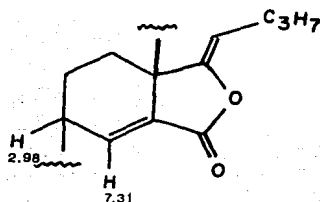


Figura 10

Como el producto natural es un dímero del ligustilido en el cual desaparecen las señales correspondientes a los protones vinflicos en las posiciones 6 y 7, se deduce que la dimerización afecta estas posiciones. Reuniendo toda la información proporcionada por el análisis espectral hecho hasta ahora, se tienen las estructuras parciales VII y VIII.

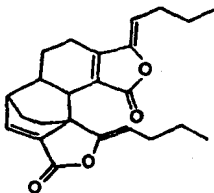


VII



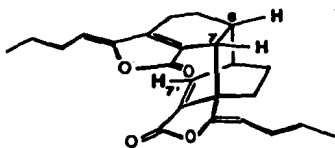
VIII

Si se unen estas estructuras parciales se obtiene un compuesto dimérico del tipo 4+2 en donde la regioquímica se deduce de los experimentos de doble resonancia descritos anteriormente. Por lo tanto se establece la fórmula estructural IX.



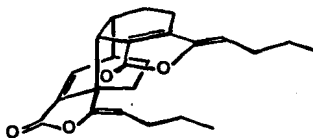
IX

Existen dos posibilidades estereoquímicas para esta molécula las cuales se denominan con el descriptor *endo* y *exo* y corresponden a las estructuras 59 y 60 respectivamente.



endo

59



exo

60

Con el conocimiento previo de que la reacción de Diels-Alder procede *in vitro* mediante un estado de transición con estereoquímica *endo*, el cual se muestra en la figura 11, se podría presuponer que la estereoquímica mostrada en 59 corresponde al producto natural. Sin embargo este argumento no es válido ya que los productos naturales se forman *in vivo* mediante catálisis enzimática.

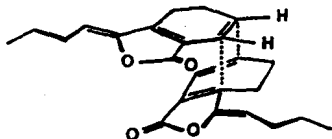


Figura 11

Para distinguir entre los diastereoisómeros α y β se llevó a cabo un experimento con reactivo de desplazamiento, empleando $\text{Eu}(\text{fod})_3$ y se analizaron los cambios en el desplazamiento químico de ciertos protones, inducidos por este reactivo, los cuales se muestran en la figura 10. La similitud en los cambios de desplazamiento químico observados para H-6 y H-7 indica que estos protones se encuentran orientados hacia el mismo lado, de acuerdo con los modelos *exo* (figura 12) y *endo* (figura 13). Por otro lado, se observa un notable desplazamiento del protón vinílico H-7', lo cual sugiere un complejamiento del metal con el carbonilo de la γ -lactona fusionada con el biciclo [2.2.2] (figura 13).

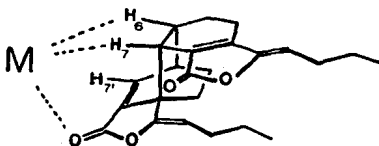


Figura 12

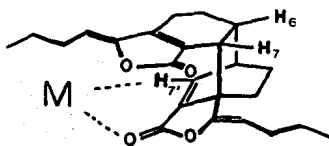


Figura 13

Debido a que H-7' sufre mayor desprotección que H-6 y H-7 al adicionar reactivo de desplazamiento, se puede suponer que el primer protón está opuesto a los dos últimos, y sugiere que el modelo *endo* es el que corresponde a la molécula. Sin embargo, la argumentación descrita no puede considerarse como definitiva para establecer la estereoquímica

de la molécula, ya que el análisis de los modelos Dreiding indica que el metal puede complejarse con el sustrato en varias direcciones. Por lo anterior, y para establecer inambiguamente la estereoquímica de la molécula, se procedió a realizar un estudio cristalográfico por rayos X, de un sólido especialmente preparado para tal fin. Los detalles del estudio cristalográfico se describen en la parte experimental y la figura 63 representa el dibujo computarizado del modelo final.

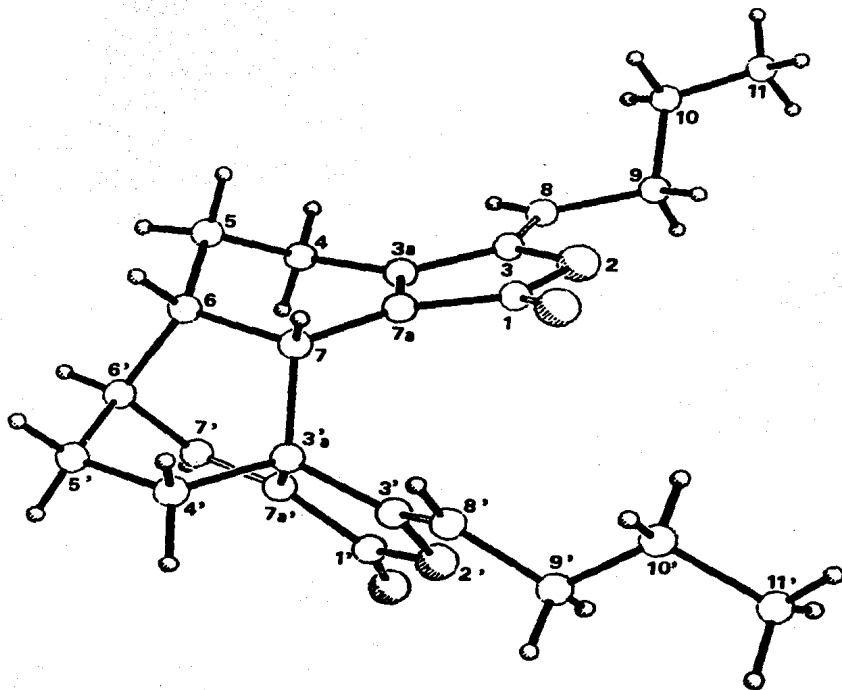
Se hace así evidente la estructura de un aducto de Diels-Alder del Z-ligustilido con estereoquímica *endo* (formula 59), el cual se debe formar por el estado de transición mostrado en la figura 11.

La hidrogenación catalítica de este producto natural produce una mezcla de dos sustancias las cuales fueron separadas por métodos cromatográficos. Estas corresponden al 3,8,-dihidro- (61) y 3,8,7,7'a-tetrahidroderivados (62) de acuerdo a los iones moleculares observados en 382 y 384 respectivamente, y a las evidencias que se describen a continuación.

El espectro de RMN¹H de 61 sólo muestra el triplete del protón vinílico H-8' el cual resuena en δ 4.96. Por otro lado, se observa una señal compleja centrada en δ 4.54 que corresponde al protón geminal de la γ -lactona α,β -insaturada. Se establece que se hidrogena el doble enlace 3,8 preferentemente al 3',8' por las siguientes evidencias:

a) La desaparición de la señal del protón olefínico a campo bajo que corresponde a H-8 el cual se encuentra en posición δ en el sistema de dienona conjugada.

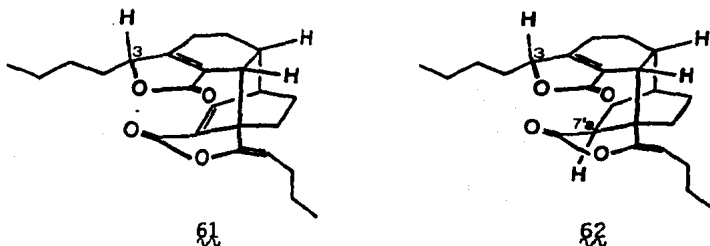
DIBUJO COMPUTARIZADO DE
(Z,Z')-rel-(6R,7R)-6.6',7.3'a-diligustflido
(representaci3n enantiom3rica)



b) La desaparición en UV de la absorción característica del sistema carbonílico $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -insaturado ($\lambda_{\text{m\acute{a}x}} = 273 \text{ nm}$).

c) El notable congestionamiento estérico del doble enlace 3; 8' impide la saturación del mismo, de acuerdo al análisis con los modelos Dreiding.

El mismo análisis con estereomodelos permite establecer la configuración R en el centro quiral formado (C-3) ya que la cara si en C-3 es la accesible al agente reductor.



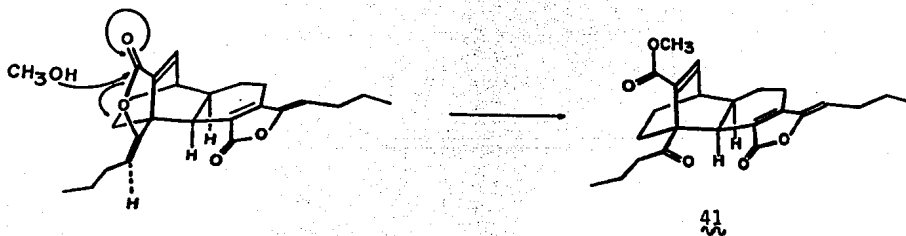
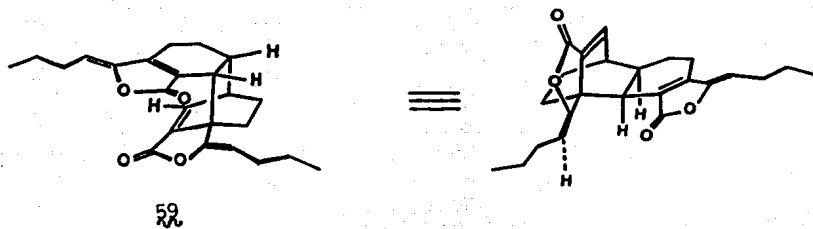
Por otro lado, la estructura 62 del tatrahidroderivado se basa, además de los argumentos indicados para 61 , en la desaparición del protón vinílico β al carbonilo lactónico de la materia prima, en la permanencia de la señal del protón vinílico H-8' ($\delta 4.68$) y en las dos absorciones intensas en el IR en 1792 y 1753 cm^{-1} correspondientes a γ -lactona con oxígeno etéreo enólico y γ -lactona α,β -insaturada, respectivamente.

Las configuraciones R en C-3 y S en C-7'a se establecen de acuerdo al descongestionamiento de las caras C-3 $\delta\acute{\iota}$ y C-7'a $\eta\epsilon$ de la materia prima que producen la estereoselección observada.

Existen reportados en la literatura tres aductos de Diels-Alder del ligustilido, reportados como constituyentes de *Levisticum officinale*¹⁷, los cuales son el angeolido $\underline{43}$, levistolido B $\underline{44}$ y levistolido A $\underline{42}$, éste último aislado casi simultáneamente por Kaouadji y colaboradores, de *Ligusticum wallichii* y al cual denominaron $\underline{Z,Z}'$ -diligustilido. Esta estructura coincide en todos sus datos espectroscópicos con la molécula aislada de *L. porteri*, a pesar de la diferencia en los estados físicos, ya que los autores la reportan como aceite y en este caso se obtuvo como sólido. La comparación directa de ambas muestras realizada amablemente por el profesor Kaouadji confirmó la identidad de las mismas. Sin embargo Kaouadji reporta esta substancia como $\underline{Z,Z}'$ -rel-(6S,7S)-6.6',7.3'a diligustilido que correspondería precisamente a la estructura *exo* ($\underline{60}$) lo cual es incorrecto, ya que el análisis por rayos X confirmó que se trata del estereoisómero *endo*.

Por lo tanto, la estructura propuesta para el producto natural de *Ligusticum wallichii*¹⁵ y *Levisticum officinale* (levistolido A, $\underline{42}$)¹⁷ debe corregirse a ($\underline{Z,Z}'$)-rel-(6R,7R)-6.6',7.3'a diligustilido ($\underline{59}$), el cual también es constituyente de *Ligusticum porteri*.

Por otro lado, es importante señalar que la estructura $\underline{41}$ se ha reportado como producto natural de *Ligusticum wallichii* por Fukuyama y colaboradores²⁰. Es probable que esta molécula sea un artefacto, ya que se formaría precisamente por la apertura con metanol de la γ -lactona fusionada con el biciclo 2.2.2. de ($\underline{Z,Z}$)-(6R,7R)-6.6',7.3'a diligustilido ($\underline{59}$), como se muestra en el esquema 5. Esta posibilidad está basada,



ESQUEMA 5

además de las analogías estructurales, en que se empleó metanol (en la cromatografía de líquidos de alta presión), en el proceso de aislamiento de 41.

Se realizaron algunos ensayos experimentales de metanólisis de 59. La materia prima se modifica, sin embargo, de la mezcla de reacción no se obtuvo el producto 41. Es necesario reproducir las condiciones de la cromatografía de líquidos de alta presión para concluir si en realidad en esas condiciones se produce la metanólisis de 59.

DETERMINACION DE LA ESTRUCTURA MOLECULAR DE Z-8.6',3.7'-DILIGUSTILIDO

Esta sustancia se aisló como un producto cristalino cuyos parámetros espectroscópicos mostraron notable similitud con los del (Z,Z')-rel-(6R,7R)-6.6',7.3'a diligustilido 59 analizados previamente. Estas semejanzas se enlistan a continuación:

- a) La presencia de un ion molecular en m/z 380 y la ausencia de fragmentos significativos entre m/z 380 y m/z 192.
- b) La presencia de γ -lactona α,β -insaturada, manifiesta por la absorción en 1755 y 1676 cm^{-1} .
- c) La existencia de dos cromóforos es manifiesta por las absorciones en $\lambda_{\text{máx}}$ 213 y 283 nm. Esta última atribuible a una enona $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -insaturada y la primera corresponde a la enona conjugada.
- d) El espectro de RMN¹³C desacoplado totalmente indica la presencia de 24 átomos de carbono cuyos desplazamientos químicos muestran, en

términos generales, cierta similitud con los de 59. El grado de hidrogenación de los átomos de carbono, establecido por la multiplicidad de las señales en el espectro de RMN^{13}C parcialmente desacoplado, es igual al de 59.

e) El espectro de RMN^1H indica la presencia de un doble enlace disustituído vecinalmente siendo uno de los sustituyentes un metileno y el otro un carbón tetrasustituído (δ 6.15, 1H, dt, $J= 9$ y 3 Hz; y δ 5.88, 1H, dt, $J= 9$ y 4 Hz). Y un protón vinflico de un enlace trisustituído, el cual está vecino a un metileno (δ 5.19, t, 8 Hz) y por su desplazamiento químico corresponde a la estereoquímica Z de la cadena lateral del ftalido como se describió anteriormente.

Las similitudes enumeradas hacen evidente que esta substancia es un dímero de un ftalido y presumiblemente el monómero sea el ligustilido debido a la coincidencia de los fragmentos principales que se señalan en el esquema 4.

Por lo que se concluye que esta substancia es un estereoisómero de 59.

Las evidencias descritas permiten establecer las fórmulas parciales mostradas en las figuras 14 y 15, donde se indican las asignaciones de RMN^{13}C (figura 14), de RMN^1H y UV (figura 15).

Faltan por acomodar en estas estructuras parciales un n-propilo, dos metilenos vecinales y dos metinos que se indican en la figura 16, que son manifiestos por los argumentos señalados.

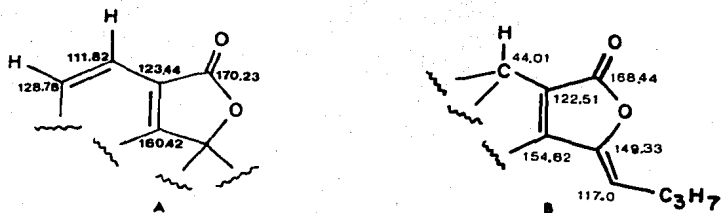
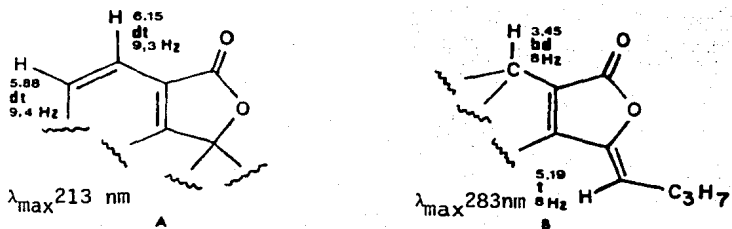
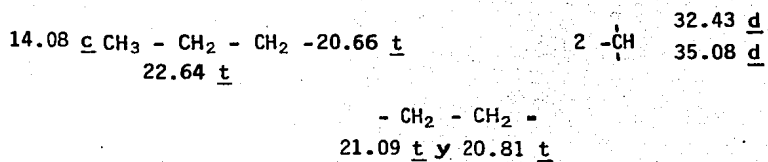
Figura 14. Asignaciones de RMN^{13}C Figura 15. Asignaciones de RMN^1H y UV

Figura 16

La expansión de las fórmulas mostradas en las figuras 14 A y 15 A se establece por la presencia del singulete en 91.97 ppm que indica la naturaleza cuaternaria del carbono unido al oxígeno. La integración a este fragmento del radical n-propilo, para completar el esqueleto del ftalido, requiere la incorporación de un metino, por lo que se definen los fragmentos mostrados en la figura 17; es decir, para unir los fragmentos principales de la figura 17 A y 17 B se requiere ahora la integración de un metino y de dos metilenos vecinales.

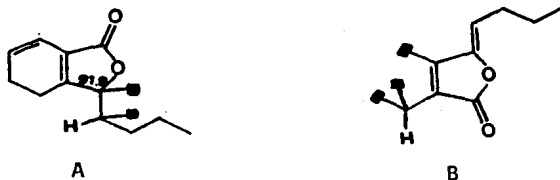


Figura 17

El metino se podría colocar en las posiciones 4 o 6 correspondiendo el fragmento $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ a los carbonos 5,6 y 4,5 respectivamente, como se muestra en la figura 18.

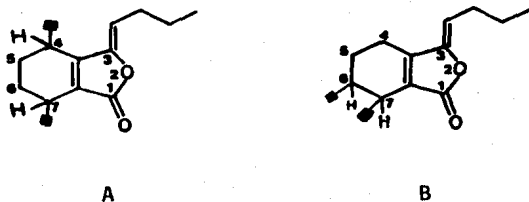


Figura 18

El protón unido al carbono 7 se manifiesta como un doblete (δ 3.45; bd, 8 Hz), lo cual solo es consistente con la fórmula parcial de la figura 18 B y permite eliminar la fórmula parcial indicada en 18 A, ya que en ésta última este protón se manifestaría como una señal compleja.

Tomando en consideración que esta substancia es un aducto 2+2 del Z-ligustilido, la *regio* y *estereo* diferenciación en su formación, y omitiendo las posibilidades enantioméricas, existen cuatro formas posibles de combinar las fórmulas parciales 17 A y 18 B. Estas fórmulas se muestran en la figura 19, en la que se muestran los estados de transición de la dimerización del Z-ligustilido.

Los experimentos con reactivo de desplazamiento permiten establecer la regioquímica de esta cicloadición 2+2, como se describe a continuación. Al analizar los cambios experimentados en el desplazamiento químico de ciertos protones del producto natural, al adicionar reactivo de desplazamiento (mostrados en la figura 20), se observa que los protones H-7, H-7' y H-8' tienen comportamiento similar frente a este reactivo, lo cual es indicativo de que estos protones se encuentran orientados hacia el mismo lado y esto permite concluir que el C-3 se une al C-7' y el C-8 al C-6' con lo cual se descartan las estructuras moleculares B y D mostradas en la figura 19, ya que en éstas los protones H-7 y H-7' se encuentran de lados opuestos y por lo tanto su comportamiento frente al reactivo de desplazamiento sería diferente y no similar como es el caso.

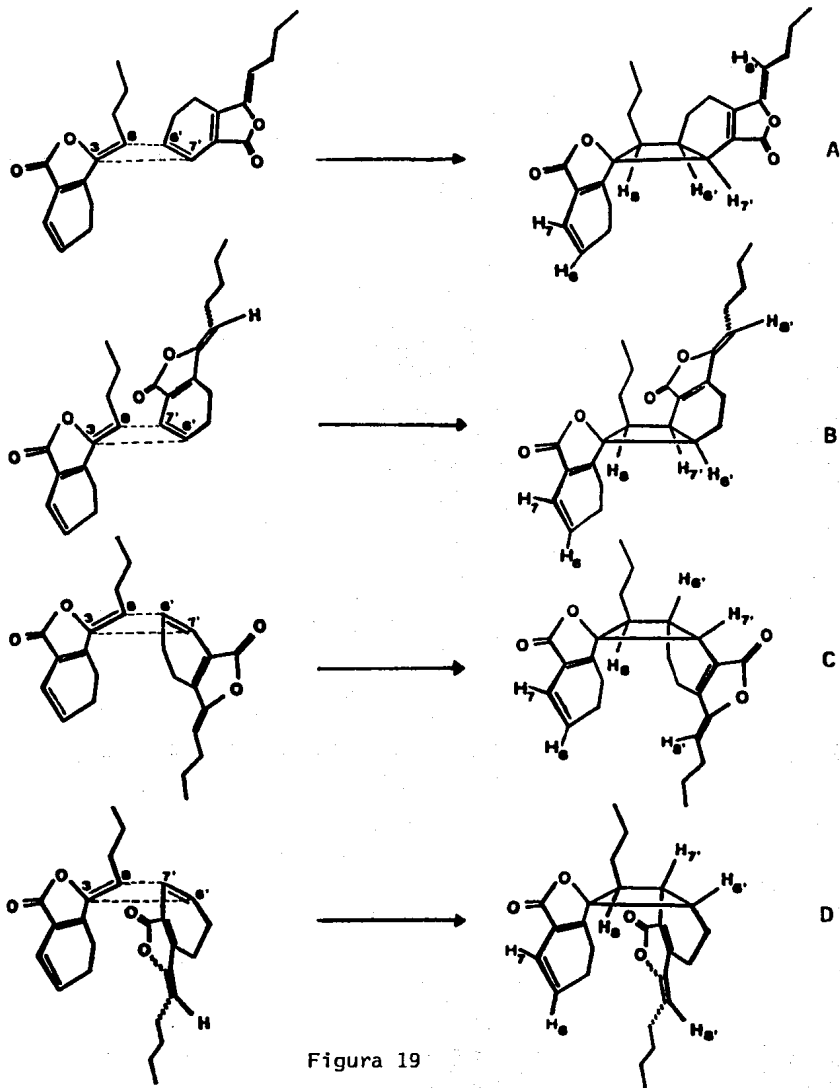


Figura 19

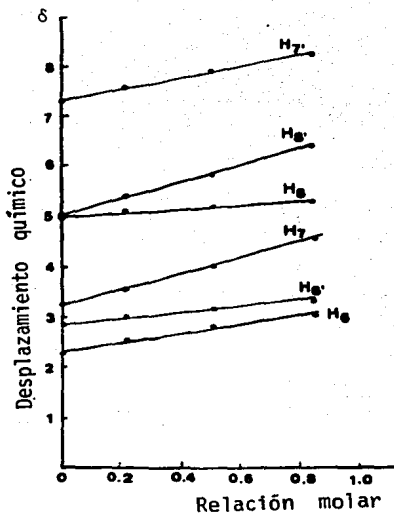
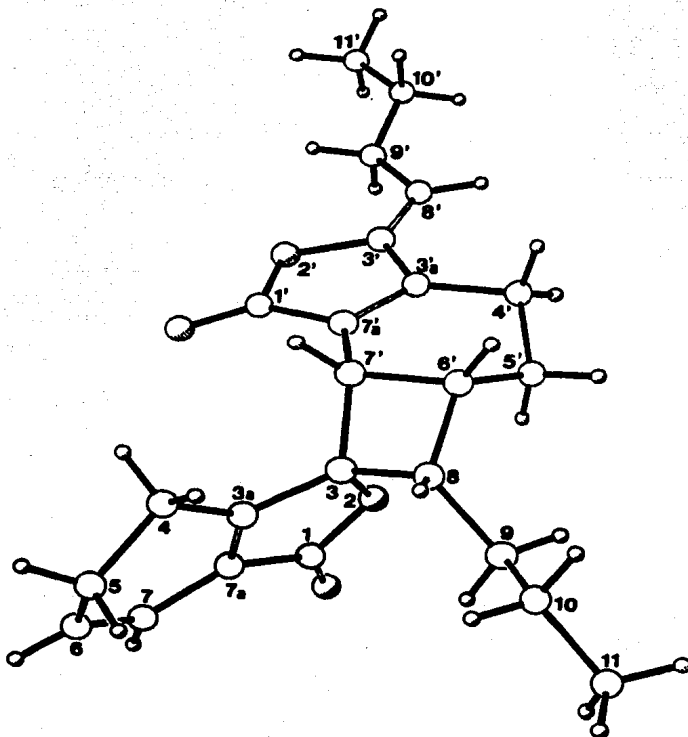


Figura 20

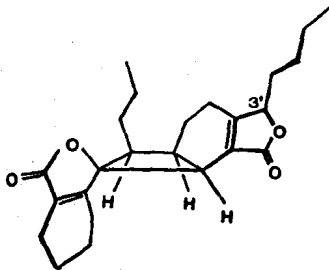
La hidrogenación catalítica del producto natural permitió la obtención de dos sustancias, las cuales se describirán posteriormente, ya que los cambios observados en la espectroscopía de los productos de hidrogenación no permitió la discriminación entre las estructuras A y C de la figura 19. Afortunadamente el sólido obtenido por recristalizaciones sucesivas presentó las características apropiadas para un análisis cristalográfico de rayos X. Los detalles de este análisis se describen en la parte experimental y la figura 64 es el dibujo generado por la computadora de la estructura final. Este análisis establece claramente la

DIBUJO COMPUTARIZADO DE
Z- 8.6°, 3.7'- DILIGUSTILIDO



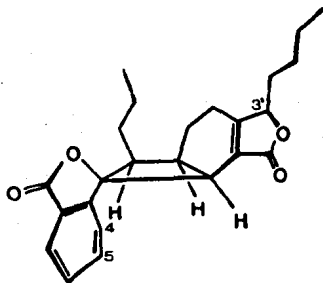
estructura 64 del producto natural el cual corresponde a un dímero 2+2 del ligustilido con la *regio* y *estereo* química mostradas en el estado de transición para la figura 19 A.

Por otro lado, las dos sustancias que produce la reducción catalítica del dímero 2+2 (64) fueron resueltas por cromatografía en capa fina. El producto de menor polaridad corresponde al 6,7,3',8'-tetrahidroderivado 65 que posee 4 una adicionales con respecto a la materia prima y en cuyo espectro de RMN^1H no se observan señales correspondientes a protones vinílicos y hay una mayor complejidad en las señales comprendidas entre 1.30 y 2.10 ppm. En este mismo espectro se observa una señal compleja en δ 4.85 correspondiente al metino base de la lactona y el doblete amplio centrado en 3.33 ppm correspondiente a H-7'. La configuración del centro quiral generado en C-3' se establece en base a la accesibilidad de la cara *si* en este centro en la materia prima, por lo tanto el producto posee la configuración 3'R indicada en la fórmula 65 .



65

El producto de hidrogenación de mayor polaridad tiene un peso molecular idéntico al de la materia prima (380); sin embargo las propiedades físicas y espectroscópicas indican una diferencia estructural entre ambas. En particular el espectro de RMN^1H no muestra la presencia de protones vinílicos, sino que se observan señales complejas en la región comprendida de 7.35 a 7.85 ppm que indican la presencia de protones aromáticos. Por otro lado se observa una señal compleja centrada en 4.83 ppm que corresponde al protón geminal al oxígeno etéreo de la lactona. Por lo tanto este análisis espectroscópico permite concluir que la materia prima sufrió un proceso de hidrogenación y deshidrogenación simultánea para producir la molécula 66 en la cual se hidrogenó la posición 3', 8' y se aromató el ciclohexadieno conjugado de la materia prima. La configuración R del centro quiral generado C-3' se establece mediante los argumentos empleados para determinar la estereoquímica del tetrahidroderivado.



La ausencia de actividad óptica en los dos dímeros 59 y 64 merece un comentario adicional, ya que esto indica su presencia como productos racémicos. Esta característica podría hacer suponer que se trata de artefactos formados a partir del ligustilido, y en particular esta suposición ha sido propuesta para la existencia de algunas mezclas racémicas de sustancias similares al ligustilido.¹⁸

Sin embargo, existen evidencias que indican que estos compuestos son formados por sistemas enzimáticos, las cuales se mencionan a continuación:

a) Existe una *estereo-* y *regio-*diferenciación excepcional en la formación de los aductos a partir del monómero, lo cual solo es consistente en términos generales por biosíntesis.

b) El monómero (*Z*-ligustilido 23) bajo las condiciones en las cuales se mantuvo el extracto o se realizó la separación no produce cantidades detectables de aductos.

c) Algunos ensayos experimentales de obtención del aducto en condiciones térmicas han sido infructuosos.

d) Existen reportadas en la literatura mezclas racémicas de productos naturales; es decir, el sistema enzimático forma los dos enantiómeros.

IV. RESUMEN Y CONCLUSIONES

RESUMEN Y CONCLUSIONES

De los extractos orgánicos de la raíz de *L. porteri* (washia, chuchupaste) la cual tiene uso medicinal entre los tarahumaras, se obtuvieron mediante métodos cromatográficos cinco metabolitos secundarios cuyas estructuras fueron determinadas por métodos químicos, espectroscópicos, espectrométricos y cristalográficos. Tales sustancias son: isovainillina (56), ácido 4-hidroxi-3-metoxicinámico (58), Z-ligustilido (23), (Z,Z')-rel- (6R,7R)-6.6',7.3'a diligustilido (59) y Z-8.6',3.7'-diligustilido (64).

La sustancia 59 ha sido aislada previamente de otros rizomas de umbelíferas. Sin embargo, el estudio estructural de esta sustancia permitió la corrección de la estereoquímica propuesta previamente (de *exo* a *endo*). Por otro lado, se plantea la posibilidad de que el wallichilido (fórmula 41) reportado como producto natural²⁰, sea en realidad un artefacto, ya que esta sustancia es el producto de apertura de la γ -lactona fusionada con el biciclo [2.2.2] de 59 con metanol.

Algunas sustancias de esta raíz mostraron extrema labilidad por lo que se requirió una extrema manipulación experimental de las mismas. Sin embargo se detectó la presencia de sustancias adicionales minoritarias que no fueron caracterizadas en esta ocasión, por lo que una reinvestigación química de esta especie deberá tomar en consideración la alta labilidad de las sustancias presentes.

Este es el primer estudio de *Ligusticum porteri* y constituye

una contribución al conocimiento de los metabolitos secundarios de la flora medicinal de nuestro país.

V. PARTE EXPERIMENTAL

PARTE EXPERIMENTAL

Se recolectó la raíz de *Ligusticum porteri* C & R (Umbelliferae) en la sierra de Chihuahua y se dejó secar a temperatura ambiente. La muestra botánica se encuentra depositada en el Herbario Nacional, Instituto de Biología de la U.N.A.M., Robert Bye & E. Linares 14148.

2.6 kg de raíz seca y fragmentada de *L. porteri* se maceraron durante 14 días, a temperatura ambiente, con hexano. Repetida la operación se evapora el disolvente obteniéndose 256.58 g de extracto.

La planta libre de hexano se deja macerar nuevamente bajo las mismas condiciones, utilizando como disolvente cloroformo. El peso del extracto clorofórmico, después de evaporar el disolvente, fue de 127.35 g.

Se prepara el extracto etanólico en la misma forma que los dos anteriores, obteniéndose 126.38 g de residuo. Los extractos obtenidos se mantienen a 0°C, protegidos de la luz y en atmósfera inerte.

Los tres extractos se compararon por cromatografía analítica, utilizando como eluyente una mezcla de hexano-acetato de etilo 7:3 y como reveladores luz ultravioleta y sulfato cérico amoniacal. Se observa que las manchas más homogéneas se encuentran en el extracto clorofórmico, por lo cual se decidió iniciar el estudio fitoquímico por la separación de los constituyentes de este residuo.

Con el objeto de conocer el tipo de compuestos presentes, se efectuó un análisis preliminar. En este estudio se fraccionaron 10.9291 g del extracto clorofórmico en una columna de vidrio empacada con 300 g de sílica gel, utilizando como eluyente inicial una mezcla de hexano-acetato de etilo (95:5), aumentándose gradualmente la polaridad del mismo hasta acetato de etilo 100%.

De esta separación cromatográfica inicial se lograron aislar dos sustancias, que de acuerdo a su análisis espectroscópico y espectrométrico, corresponden a los ftalidos ligustilido $\frac{23}{\mu}$ y a la molécula dimérica $\frac{59}{\mu}$.

Los datos físicos, espectroscópicos, espectrométricos y el rendimiento total de estas sustancias y de los demás productos aislados y de reacción, se describen más adelante.

En este análisis preliminar, se observó la alta labilidad de las moléculas minoritarias, ya que la mayor parte de éstas se transforman al contacto con el aire y presumiblemente en presencia de luz y calor. Tomando en consideración estas observaciones se procedió a una manipulación experimental extremadamente cuidadosa, protegiendo las fracciones orgánicas de la luz y manteniéndolas en atmósfera de argón. La eliminación del disolvente se llevó a cabo a presión reducida y los espectros fueron corridos recién aislados los productos.

Con el objeto de aislar y caracterizar los constituyentes minoritarios de este extracto, se procedió a fraccionar una mayor cantidad del mismo.

Se fraccionaron 80.76 g del extracto clorofórmico en una columna de vidrio empacada con 2430 g de sílica gel empleando como eluyente inicial hexano, colectándose fracciones de 500 ml, los cuales se concentran con rotaevaporador. Se aumentó gradualmente la polaridad del eluyente hasta acetato de etilo 100%, y posteriormente la columna se lavó por elución con acetona. Las fracciones eluidas se compararon por cromatografía analítica utilizando como reveladores luz ultravioleta y sulfato cérico amoniacal. Se reunieron las fracciones eluidas tomando como criterios el Rf, el color y la homogeneidad de las manchas.

Las fracciones 1-31 fueron reunidas y sólo mostraban una señal en RMN¹H en δ 1.25, por lo que se desecharon, ya que carecen de interés en cuanto a metabolitos secundarios característicos se refiere.

Las fracciones 32 a 35, eluidas con hexano-acetato de etilo (9:1), fueron reunidas, obteniéndose 23.0599 g de residuo. Este se adsorbió en sílica gel y se aplicó a una columna cromatográfica empacada con 700 g de sílice, suspendida en hexano.

Las fracciones iniciales eluidas de esta cromatografía estaban constituidas por varias sustancias, de entre las cuales se observa la presencia constante de una sustancia que muestra fluorescencia azul muy intensa al exponer la cromatoplaaca analítica a la luz ultravioleta. Tomando en consideración este criterio de detección, se reunieron algunas fracciones (eluidas con hexano-acetato de etilo 8:2), obteniéndose 9.4996 g de residuo. Este residuo fue analizado exhaustivamente por cromatografía en capa fina utilizando varios eluyentes, con el objeto

de lograr una separación óptima de la sustancia que absorbe en el ultravioleta, encontrándose que una mezcla de hexano-acetona (4:1), permite una mejor resolución de la mezcla. Se aplicaron 200 mg de residuo a una cromatoplaça preparativa, utilizando este eluyente, obteniéndose 53.4 mg de un aceite amarillo, que fue identificado como Z-ligustilido (23). Los datos espectroscópicos, características físicas y rendimiento con respecto a la planta seca, así como los parámetros de los demás compuestos aislados se indican al concluir la descripción del aislamiento de los productos naturales, como se indicó anteriormente.

De las fracciones sucesivas de esta recromatografía, las cuales se eluyeron con hexano-acetato de etilo 9:1, se obtuvieron 8 mg de un aceite amarillo, el cual presumiblemente es un isómero de cnidilido (14). Sin embargo, la extrema labilidad de esta sustancia no permitió su caracterización completa. Las fracciones de mayor polaridad de esta recromatografía fueron reunidas obteniéndose 6.072 g de residuo. Este se aplicó a una columna de cromatografía empacada con sílica (180 g) suspendida en hexano, y utilizando un gradiente de hexano-acetato de etilo como fase móvil. Sin embargo, los eluatos obtenidos estaban constituidos por mezclas complejas de sustancias de acuerdo a su análisis por cromatografía analítica. Se intentó la resolución de algunas de estas mezclas mediante cromatoplaças preparativas, a pesar de esto no se logró la purificación de alguna sustancia, debido presumiblemente a su extrema labilidad. Es necesario considerar estas observaciones en futuros análisis de este espécimen.

Las fracciones 71 a 81 de la cromatografía inicial, eluidas con hexano:acetato de etilo (9:1) fueron reunidas y almacenadas a baja temperatura (0-5°C), protegidas de la luz y en atmósfera inerte como se mencionó previamente, y se continuó con la cromatografía inicial. Al cabo de aproximadamente tres semanas en estas condiciones se observó un sólido en el seno del residuo el cual fue separado por filtración. Recristalizaciones sucesivas de metanol de este material permitieron la obtención de la muestra analítica del (Z)-rel-(8S,6'R,7'S)-8.6',3.7'-diligustilido (64).

La cristalización fraccionada de las aguas madres reunidas permitió la obtención del (Z,Z')-rel-(6R,7R)-6.6',7.3'a-diligustilido (59). La mayor proporción de esta sustancia se obtuvo de las fracciones 82 a 86, eluidas con hexano:AcOEt (9:1), como se describe a continuación. Al dejar almacenadas estas fracciones bajo las condiciones utilizadas en los residuos orgánicos de este análisis, se formó un sólido cristalino el cual fue separado por filtración. Recristalizaciones sucesivas de metanol permitieron la purificación de 59.

Las fracciones 167-205, de mayor polaridad de la cromatografía inicial, eluidas en acetato de etilo 100% fueron reunidas obteniéndose 9.68 g de residuo. Este se adsorbió en 10 g de sílice y se aplicó a una columna de cromatografía empacada con 300 g de sílice suspendida en hexano-acetato de etilo (9:1). Se colectan fracciones de 100 ml. Algunas fracciones menos polares de esta recromatografía fueron reunidas (0.55 g) y se recromatografiaron en sílica gel utilizando hexano:aceta-

to de etilo (9:1) como eluyente constante. Con este procedimiento se obtuvieron 40 mg de un sólido de olor característico cuyas constantes físicas y espectroscópicas corresponden a la isovainillina (56). De los eluatos de mayor polaridad de la recromatografía de las fracciones 167-205 de la cromatografía inicial, se logró la obtención de 32 mg de un sólido identificado como ácido 4-hidroxi-3-metoxicinámico (58).

REDUCCION CATALITICA DE (Z)-rel-(8S,6'R,7'S)-8.6',3.7'-diligustilido.

Se agregaron 183 mg de (64) repartido en dos lotes. En cada lote se suspenden aproximadamente 10 mg de catalizador (Pd/C) en 5 ml de acetato de etilo y se mantienen bajo atmósfera de hidrógeno a temperatura ambiente y con agitación continua durante una hora. Transcurrido ese tiempo se adicionan aproximadamente 90 mg de 64 disueltos en 5 ml de acetato de etilo. Se dejó reaccionar con agitación continua en atmósfera de hidrógeno y a temperatura ambiente, durante 3 horas, al final de las cuales se observó por cromatografía en capa fina que había dos productos.

Estos productos se separaron por cromatografía en capa fina utilizando como eluyente una mezcla de hexano-acetona 7:3, desarrollando dos veces la placa. El producto de mayor movilidad en este sistema corresponde al (3'R)-rel-6,7,3',8'-tetrahydro-Z-8.6',3.7'-diligustilido (65) y se obtienen 60 mg. El producto de menor movilidad corresponde a (3'R)-4,5-dehidro-3',8'-dihidro-Z-8.6',3.7'-diligustilido (66). Se obtuvieron 25 mg de este último.

REDUCCION CATALITICA DE (Z,Z')-rel-(6R,7R)-6.6',7.3'a-DILIGUSTILIDO (59).

Se efectuó la hidrogenación catalítica de 91 mg de 59 disuelto en 10 ml de acetato de etilo y se hace reaccionar con atmósfera de hidrógeno, en presencia de Pd/C como catalizador (previamente hidrogenado). Se deja la reacción durante 24 horas al final de las cuales se filtra sobre celita y se concentra. En esta reacción se obtuvieron dos productos. Uno de ellos logró cristalizarse de etanol y corresponde a (Z,Z')-rel-(3R,6R,7R,7'aS)-3,8,7'-7'a-tetrahidro-6.6',7.3'a-diligustilido (62), obteniéndose 22 mg del mismo.

Como el producto más polar de esta reducción no se logró purificar en esta ocasión, se procedió a la reducción de un nuevo lote de 59 bajo las mismas condiciones. La mezcla de productos se logró separar por cromatografía en capa fina desarrollando la placa en tres ocasiones, con mezcla de hexano-acetona 7:3, 7:3 y 8:2, respectivamente. Mediante este procedimiento se lograron obtener 7 mg de (Z,Z')-rel-(3R,6R,7R)-3,8-dihidro-6.6',7.3'a-diligustilido 61.

ANALISIS CRISTALOGRAFICO DE (Z)-rel-(8S,6'R,7'S)-8.6',3.7'-DILIGUSTILIDO (64).

Los cristales de 64 los cuales tienen la forma apropiada para su análisis de rayos-X, se lograron obtener por recristalización lenta de etanol.

Para este análisis se usó un cristal de dimensiones aproximadas 0.28 x 0.22 x 0.44 mm. Los cristales de 64 son monoclinicos con

grupo espacial P2 1/c con $a=6.097 \text{ \AA}$ (3), $b=12.753 \text{ \AA}$ (7) y $c=27.285 \text{ \AA}$ (12), $\mu=0.75 \text{ cm}^{-1}$, $F(000)=815.91$, $Z=4$ ($C_{24}H_{28}O_4$).

Los datos fueron obtenidos en un difractómetro Nicolet R3m (radiación monocromada $CuK\alpha$). Un total de 3725 reflexiones independientes fueron medidas para un ángulo de $3 < 2\theta < 50$ de las cuales se consideraron observadas 2001. $U=0.051 \text{ \AA}^2$.

La estructura se resolvió por métodos directos.³⁷ En el refinamiento final fueron usados parámetros térmicos anisotrópicos para los átomos diferentes de hidrógeno y un factor térmico isotrópico fijo para los átomos de hidrógeno. Los índices de discrepancia finales son $R=0.0882$ y $R_w=0.0988$ para las 2001 reflexiones observadas. La red cristalina es centrosimétrica, debido a la presencia de los dos enantiómeros.

ANALISIS CRISTALOGRAFICO DE (Z,Z')-rel-(6R,7R)-6.6',7.3'a-DILIGUSTILIDO (59).

Los cristales usados para el análisis cristalográfico de 59 fueron obtenidos por cristalización lenta de etanol. Los cristales fueron monoclinicos, del grupo espacial P2 1/n y las dimensiones del cristal fueron $0.4 \times 0.4 \times 0.4 \text{ mm}$, $\mu=0.77 \text{ cm}^{-1}$, con $a=9.308$ (4) \AA , $b=8.356$ (2) \AA , $c=26.378$ (13) \AA , $\rho_{\text{calc.}} 1.23 \text{ gcm}^{-3}$ para $Z=4$ ($C_{24}H_{28}O_4$). Los datos fueron medidos en un difractómetro Nicolet R3m (radiación $K\alpha$, monocromada Cu, scan W, discriminación pulso altura). Fueron tomadas un total de 3592 reflexiones independientes para $3 < 2\theta < 50$, para las cuales 2257 se consideraron observadas $|F| > 3\sigma|F|$. La estructura fue resuelta por métodos directos y refinada por el método de mínimos cuadrados. En el refina

miento final, los parámetros térmicos anisotrópicos fueron usados para los átomos diferentes de hidrógeno y los factores de temperatura isotrópicos fueron usados para los átomos de hidrógeno. Los átomos de hidrógeno no fueron incluidos en los cálculos del factor estructural.

Los índices de la discrepancia final son $R=0.0886$ y $R_w=0.0998$ para las reflexiones observadas. La red cristalina es centrosimétrica, lo cual indica la presencia de los dos enantiómeros.

CARACTERISTICAS FISICAS, ESPECTROSCOPICAS Y ESPECTROMETRICAS DE LOS
COMPUESTOS AISLADOS Y DERIVADOS OBTENIDOS.

ISOVAINILLINA (56)

pf. 69-74 °C

IR (CHCl₃) cm⁻¹: 3526, 1689, 1596, 1510, 1465, 1435, 1402, 1381, 1291,
1268, 1178, 1151, 1121, 1032, 870, 820.

RMN ¹H (80 MHz, CDCl₃): 9.78 ppm (H-1, 1H, s), 7.42 ppm (H-7, 1H, dd,
9, 1.5 Hz), 7.40 ppm (H-3, 1H, d, 1.5 Hz), 7.01
ppm (H-6, 1H, d, 9 Hz), 3.95 ppm (OCH₃, 3H, s).

Rendimiento (A partir del peso seco de la raíz): 0.0024%.

ACIDO 4-HIDROXI-3-METOXI-TRANS-CINAMICO (58)

pf. 154-158 °C

IR (CHCl₃) cm⁻¹: 3533, 2962, 2929, 2855, 1685, 1514, 1268.

RMN ¹H (80 MHz, CDCl₃): 7.67 ppm (HC=CHCO, 1H, d, 16 Hz), 6.25 ppm
(HC=CHCO, 1H, d, 16 Hz), 3.92 ppm (OCH₃, 3H, s).

EMIE (70 eV) m/z (%rel.): 194(M⁺, 100), 179(21.2), 133(22.2), 51(14.4).

Rendimiento (A partir del peso seco de la raíz): 0.0022%.

LIGUSTILIDO (23)

IR (CHCl₃) cm⁻¹,
(Espectro 1): 2963, 2934, 2873, 1758, 1669, 1461, 1305, 1274,
1056, 1013, 965.

RMN ¹H (80 MHz, CDCl₃)
(Espectro 4): 6.28 ppm (H-7, 1H, dt, 9, 1 Hz), 5.97 ppm (H-6,
1H, dt, 9, 3.5 Hz), 5.20 ppm (H-8, 1H, t, 8 Hz),
0.96 ppm (H-11, 3H, t, 7 Hz).

EMIE (70 eV) m/z (%rel): 190(M⁺, 27.9), 161(46.3), 159(31), 148(36),
106(36), 105(58.2), 78(40), 77(51.6), 55 (100),
51(44), 50(30), 39(39).

UV (Metanol): λ_{max} 322 nm (ε 14678), λ_{max} 273 nm (ε 15238),
λ_{max} 209 nm (ε 20995).

Rendimiento (A partir del peso seco de la raíz): 0.3076%.

(Z,Z')-rel-(6R,7R)-6.6',7.3a' DILIGUSTILIDO (52)

pf. 123 °C

IR (CHCl₃) cm⁻¹,
(Espectro 2): 3015, 2960, 2872, 1767, 1710, 1667.

RMN ¹H (80 MHz, CDCl₃)
(Espectro 5): 7.31 ppm (H-7', 1H, d, 6.5 Hz), 5.05 ppm (H-8
1H, t, 8 Hz), 4.97 ppm (H-8', 1H, t, 8 Hz),
3.25 ppm (H-7, 1H, d, 9 Hz), 2.98 ppm (H-6',
1H, dddd, 6.5, 2.5, 2.5, 2.5 Hz), 0.90 ppm (H-

11, H-11', 6H, t, 7 Hz), 2.52 ppm (H-6, 1H, m).

EMIE (70 eV) m/z (%rel.): 380(M⁺, 22), 191(95), 190(100), 161(37),
148(97), 55(30).

UV (Etanol): $\lambda_{\text{m\AA x}}$ 273 nm (ϵ 24208), $\lambda_{\text{m\AA x}}$ 228 nm (ϵ 12252).

RMN¹³C (20 MHz, CDC1₃)
(Espectro 11): 168.30 ppm (s, C-1), 164.69 ppm (s, C-1'),
154.98 ppm (s, C-3a), 150.71 ppm (s, C-3'),
148.22 ppm (s, C-3), 141.96 ppm (d, C-7'),
134.22 ppm (s, C-7'a), 126.67 ppm (s, C-7a),
111.70 ppm (d, C-8), 108.41 ppm (d, C-8'),
47.69 ppm (s, C-3'a), 41.69 ppm (d, C-7),
41.69 ppm (d, C-6'), 38.45 ppm (d, C-6),
31.13 ppm (t, C-4'), 28.95 ppm (t, C-5),
28.03 ppm (t, C-9)*, 27.54 ppm (t, C-9')*,
25.87 ppm (t, C-5'), 22.34 ppm (t, C-10)*,
22.30 ppm (t, C-10')*, 13.92 ppm (c, C-11)*,
13.77 ppm (c, C-11')*.

* Estas asignaciones pueden cambiar.

Rendimiento (A partir del peso seco de la raíz): 0.0366%.

(Z, Z')-rel-(3R, 6R, 7R, 7a'S)-3, 8, 7', 7'a-TETRAHIDRO-6.6', 7.3'a-DILIGUSTI-
LIDO (62)

pf. 110-113 °C

IR (CHCl₃) cm⁻¹: 2957, 2932, 2872, 1792, 1753, 1712, 1666, 1463,

1174, 1061, 1022, 1000, 980.

RMN ^1H (80 MHz, CDCl_3)
(Espectro 6): 4.68 ppm (H-8, 1H, t, 8 Hz), 2.86 ppm (H-7, 1H,
d, 10 Hz).

EMIE (70 eV) m/z (%rel.): 384(M^+ , 100), 356(37), 327(38), 189(32),
187(31), 163(81.4), 107(47), 105(32), 91(61),
83(42), 79(66), 77(46), 55(79.7), 41(42).

(Z,Z')-rel-(3R,6R,7R)-3,8-DIHIIDRO-6,6;7,3'-DILIGUSTILIDO (61)

pf. 104-106 °C

IR (CHCl_3) cm^{-1} : 2959, 2933, 2872, 1754, 1710, 1666.

RMN ^1H (80 MHz, CDCl_3)
(Espectro 7): 7.29 ppm (H-7', 1H, d, 7 Hz), 4.96 ppm (H-8',
1H, t, 8 Hz), 4.54 ppm (H-3, 1H, $\text{W}\frac{1}{2}$ 12 Hz),
3.18 ppm (H-7, 1H, d, 9 Hz), 2.96 ppm (H-6',
1H, ddd, 6.5, 2.5, 2.5 Hz).

EMIE (70 eV) m/z (%rel.): 382(M^+ , 2.9), 193 (51.1), 190 (100), 161
(45), 148 (53.9), 107 (25), 105 (28), 91 (25)
79 (24), 77 (20), 55 (51.1), 41 (28).

Z-8.6',3.7'-DILIGUSTILIDO (64)

pf. 138-141°C

IR (CHCl₃) cm⁻¹
(Espectro 3): 2962, 2933, 2873, 1755, 1676, 1461, 1303, 1064,
940.

RMN¹H (80 MHz, CDCl₃)
(Espectro 8): 6.15 ppm (H-7, 1H, dt, 9,3 Hz), 5.88 ppm (H-6,
1H, dt, 9,4 Hz), 5.19 ppm (H-8', 1H, t, 8 Hz),
3.45 ppm (H-7', 1H, bd, 8 Hz), 0.96 ppm (H-11,
H-11', 6H, t, 8 Hz).

EMIE (70 eV) m/z (%rel.): 380 (M⁺, 2.9), 191 (54), 190 (96.8), 161
(70), 148 (100), 106 (32), 105 (60), 91 (33),
78 (50), 77 (50), 55 (86).

UV (etanol): λ_{máx} 283 nm (ε 20328), λ_{máx} 213 nm (ε 8861).

RMN¹³C (20 MHz, CDCl₃)
(Espectro 12): 170.23 ppm (s, C-1), 168.44 ppm (s, C-1'),
160.42 ppm (s, C-3a), 154.62 ppm (s, C-3'a),
149.33 ppm (s, C-3'), 128.78 ppm (d, C-6),
123.44 ppm (s, C-7a)*, 122.51 ppm (s, C-7'a)*,
117.00 ppm (d, C-8'), 111.82 ppm (d, C-7),
91.97 ppm (s, C-3), 44.01 ppm (d, C-7'),
35.08 ppm (d, C-8)*, 32.43 ppm (d, C-6)*,
28.01 ppm (t, C-9'), 26.34 ppm (t, C-5'),
22.64 ppm (t, C-10), 22.40 ppm (t, C-10'),
21.09 ppm (t, C-4), 20.81 ppm (t, C-5),
20.66 ppm (t, C-9), 20.09 ppm (t, C-4'),
14.08 ppm (c, C-11)*, 13.81 ppm (c, C-11')*.

* Estas asignaciones pueden cambiar.

Rendimiento (A partir del peso seco de la raíz): 0.0303%.

(Z)-rel-(8S,6'R,7'S)-6,7,3',8'-TETRAHIDRO-8.6',3.7'-DILIGUSTILIDO (65).

IR (CHCl₃) cm⁻¹: 3028, 3014, 2959, 2935, 2868, 1746, 1673, 1072, 1039, 940.

RMN ¹H (80 MHz, CDCl₃),
(Espectro 9): 4.85 ppm (H-8, 1H, m), 3.33 ppm (H-7', 1H, d, 6 Hz), 2.84 ppm (H-3', 1H, t, 7 Hz).

EMIE (70 eV) m/z (%rel.): 384 (M⁺, 0.6), 193 (79.7), 192 (100), 163 (18), 150 (15.5).

(Z)-4,5-DEHIDRO-3',8'-DIHIDRO-8.6',3.7'-DILIGUSTILIDO (66).

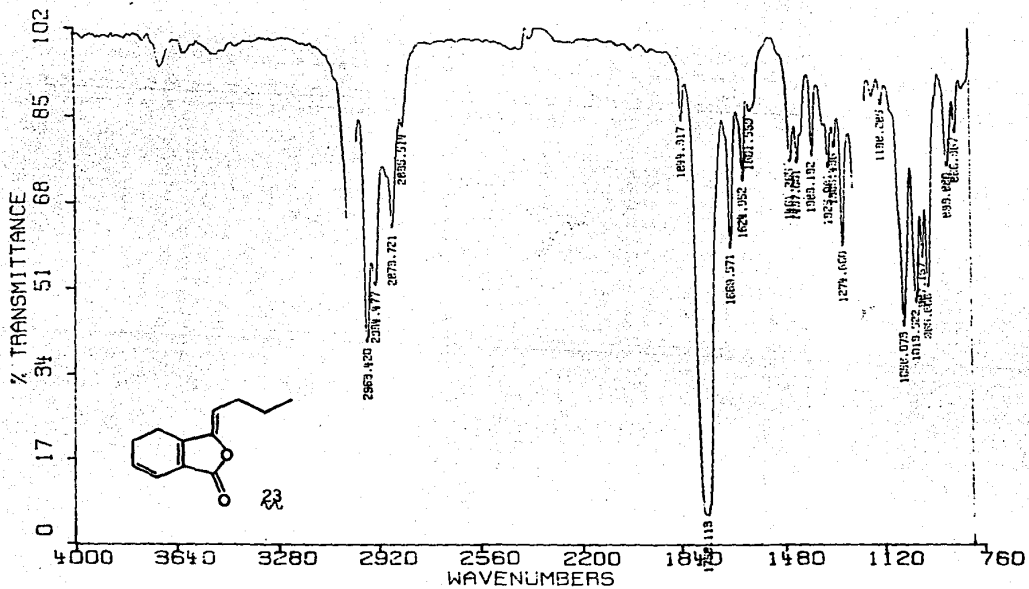
IR (CHCl₃) cm⁻¹: 3031, 3016, 2960, 2933, 2873, 1757, 1085, 953.

RMN ¹H (80 MHz, CDCl₃),
(Espectro 10): 7.85 a 7.35 ppm (señal compleja, protones aromáticos), 4.83 ppm (H-3', 1H, señal compleja), 3.56 ppm (H-7', 1H, d, 9 Hz).

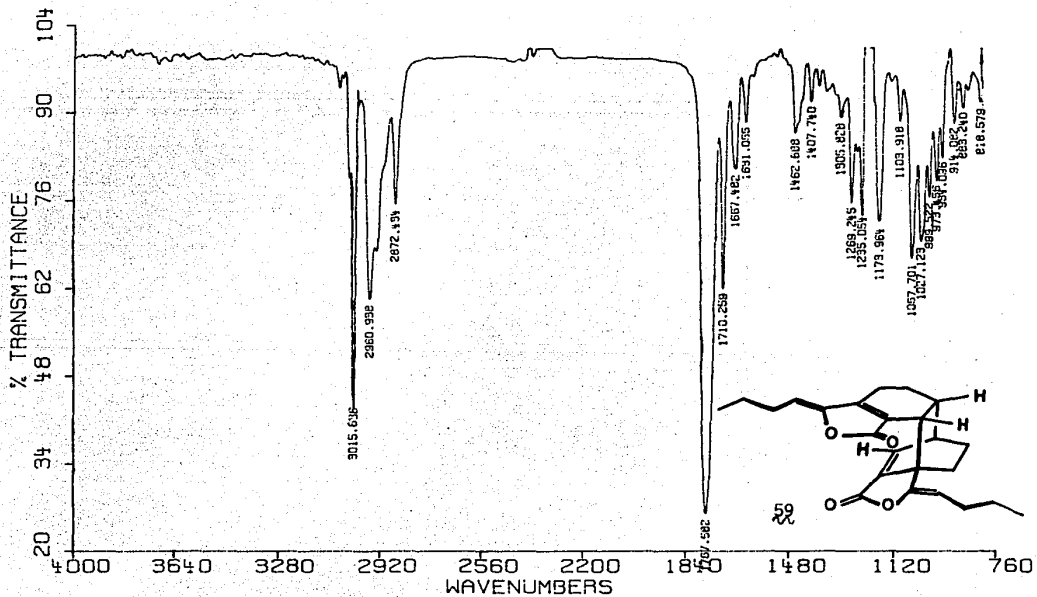
EMIE (70 eV) m/z (%rel.): 380 (M⁺, 17), 193 (100), 188 (35.3), 159 (42.5), 146 (24.2).

VI. ESPECTROS

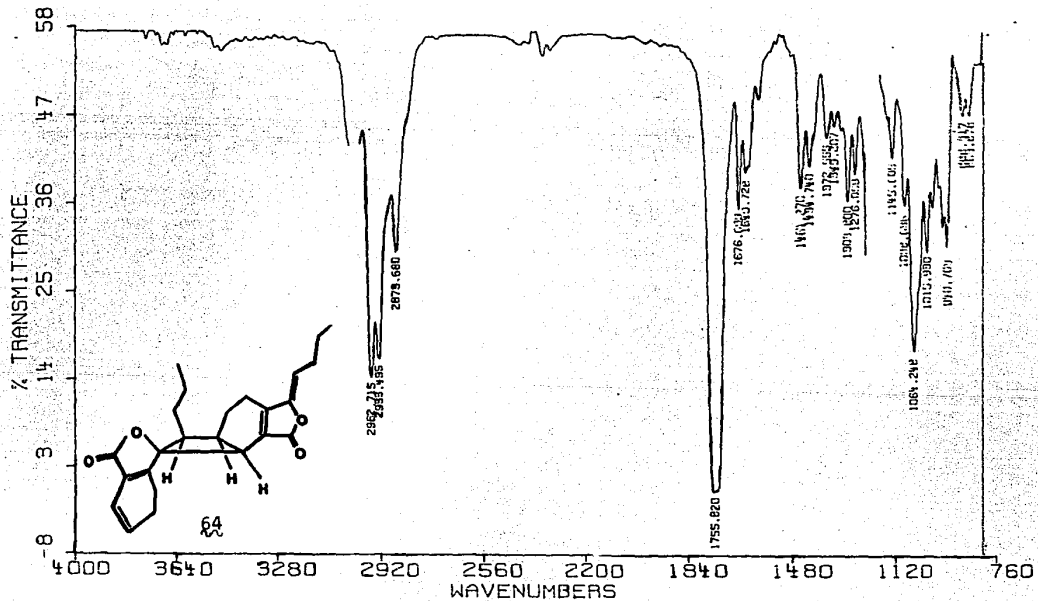
ESPECTRO 1



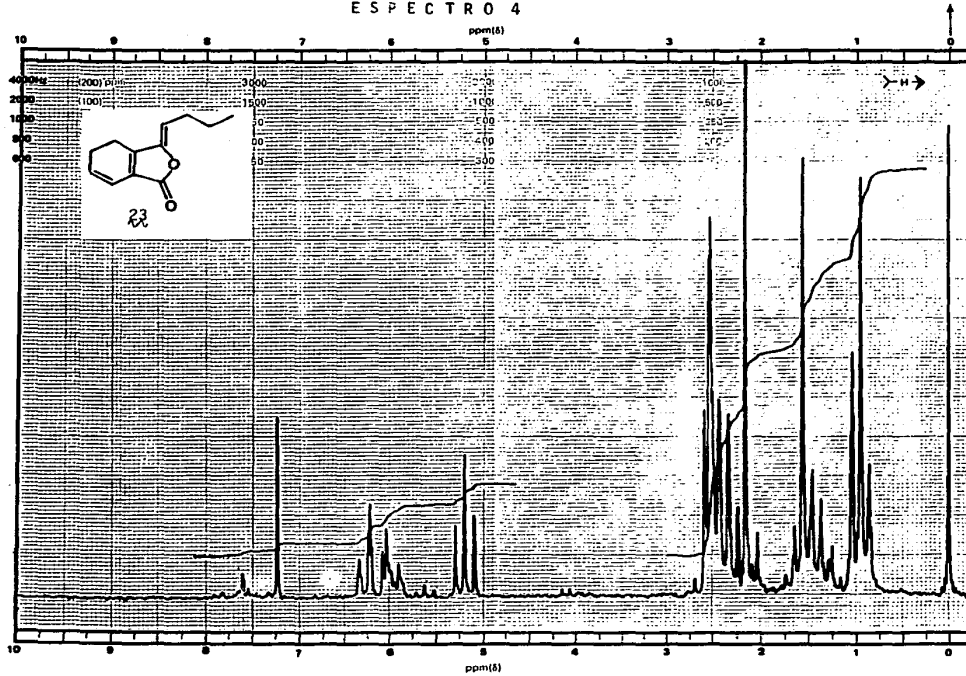
ESPECTRO 2



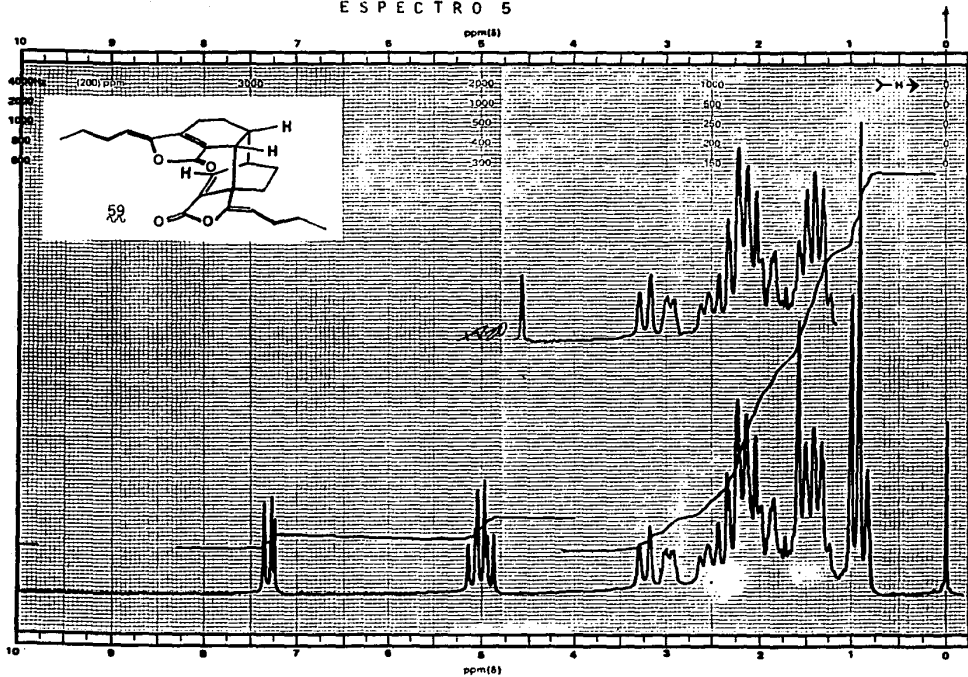
ESPECTRO 3



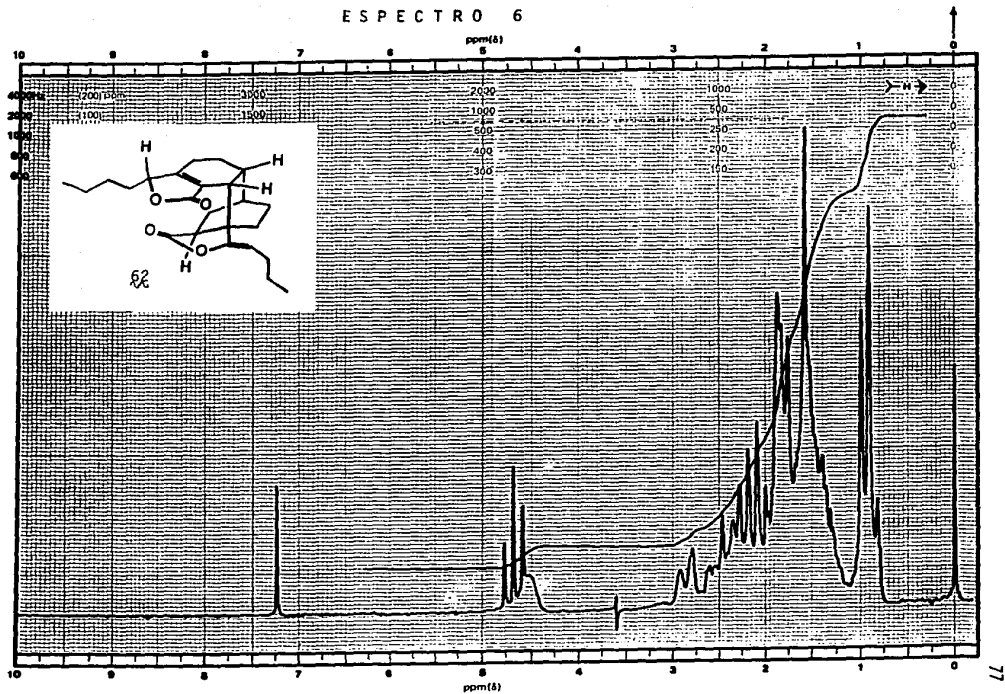
ESPECTRO 4



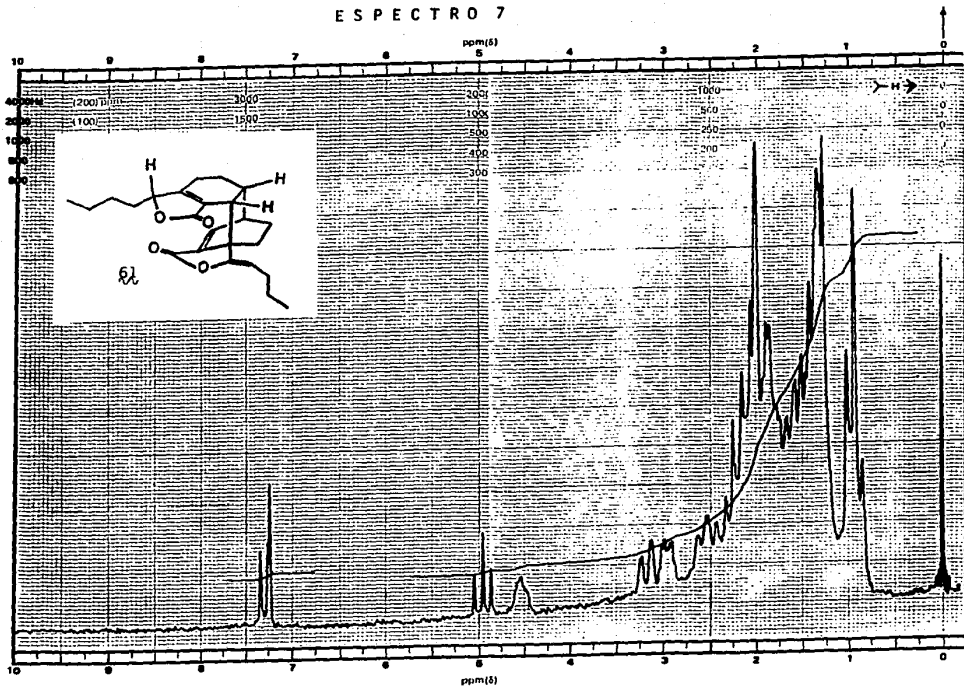
ESPECTRO 5



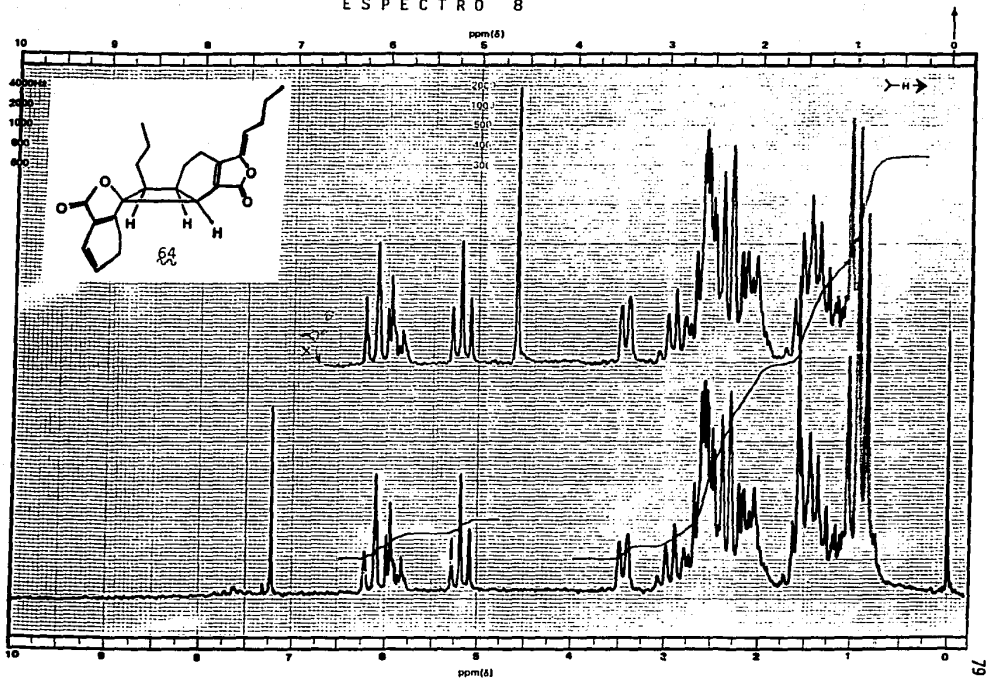
ESPECTRO 6



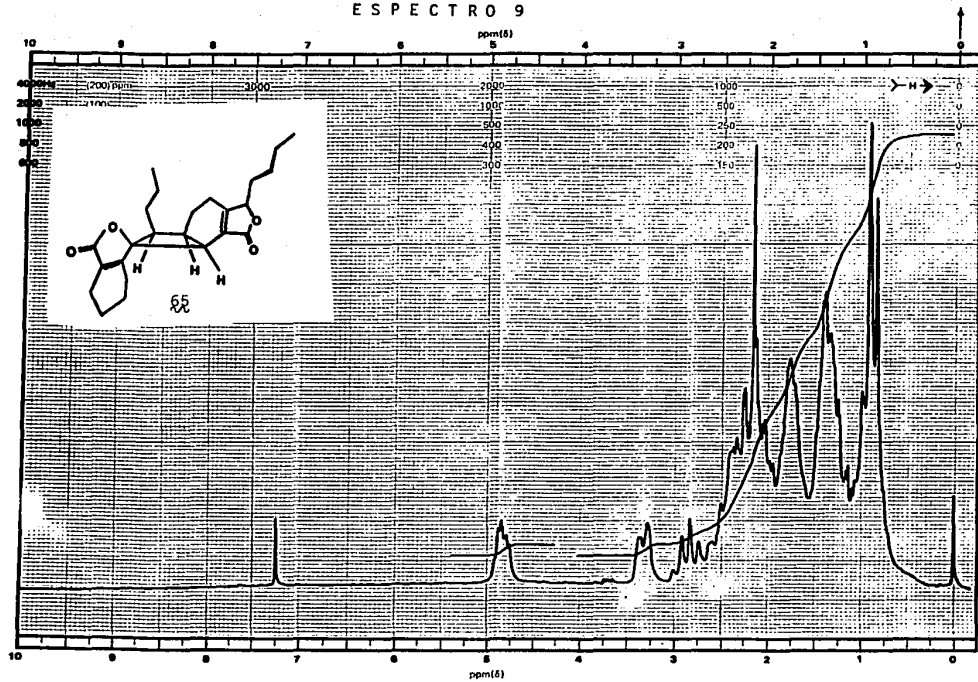
ESPECTRO 7



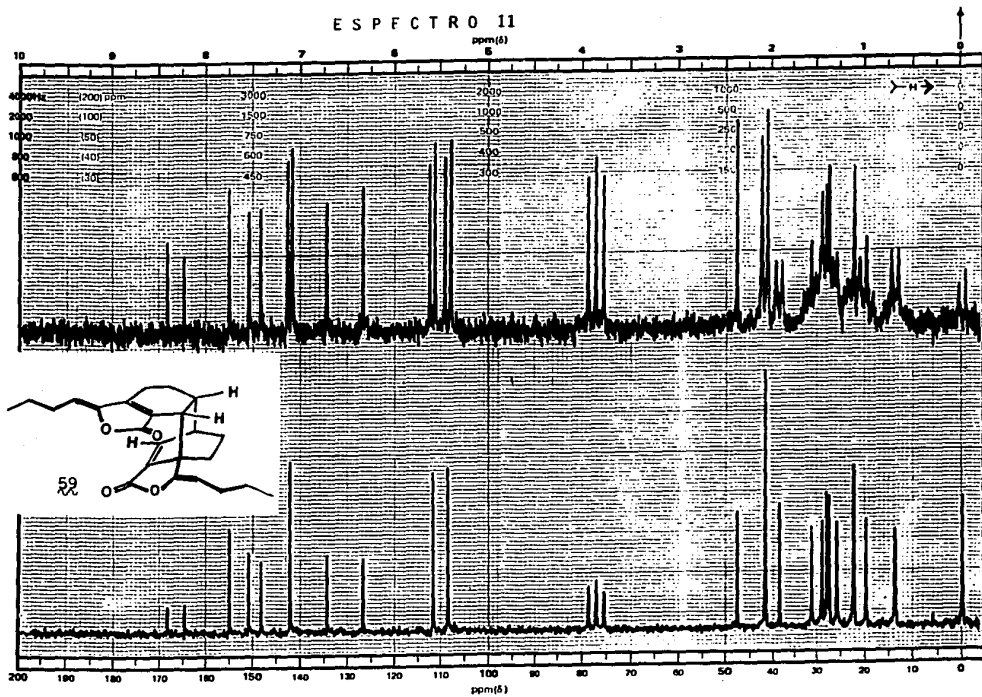
ESPECTRO 8



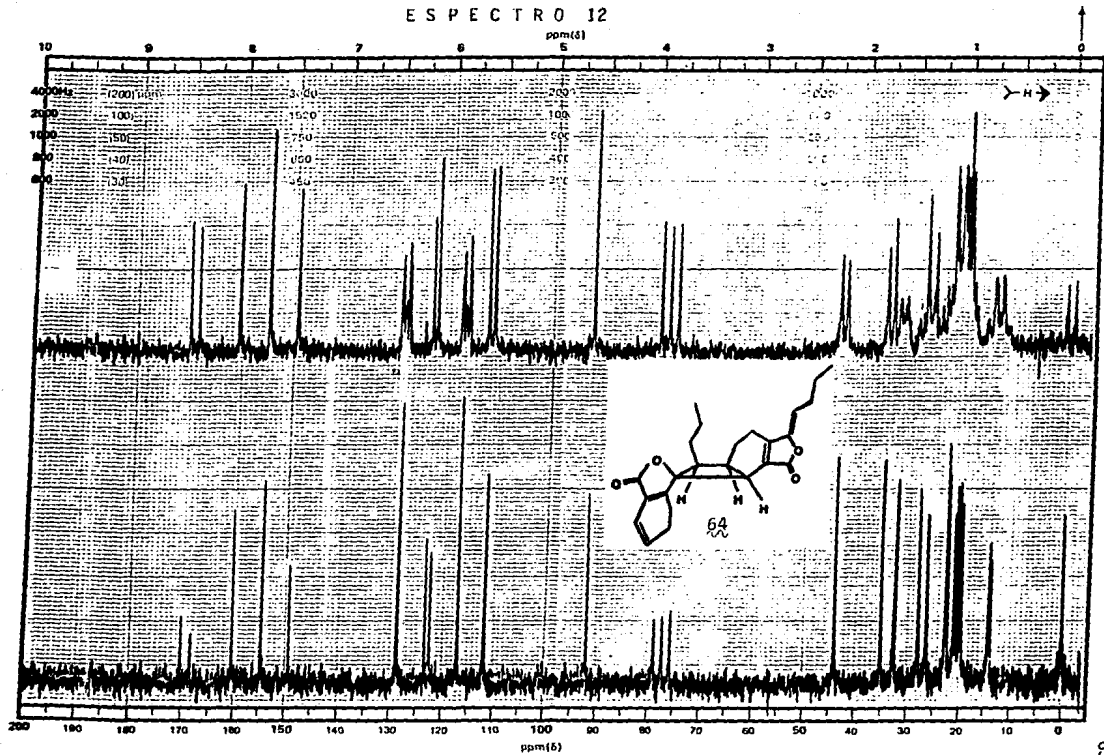
ESPECTRO 9



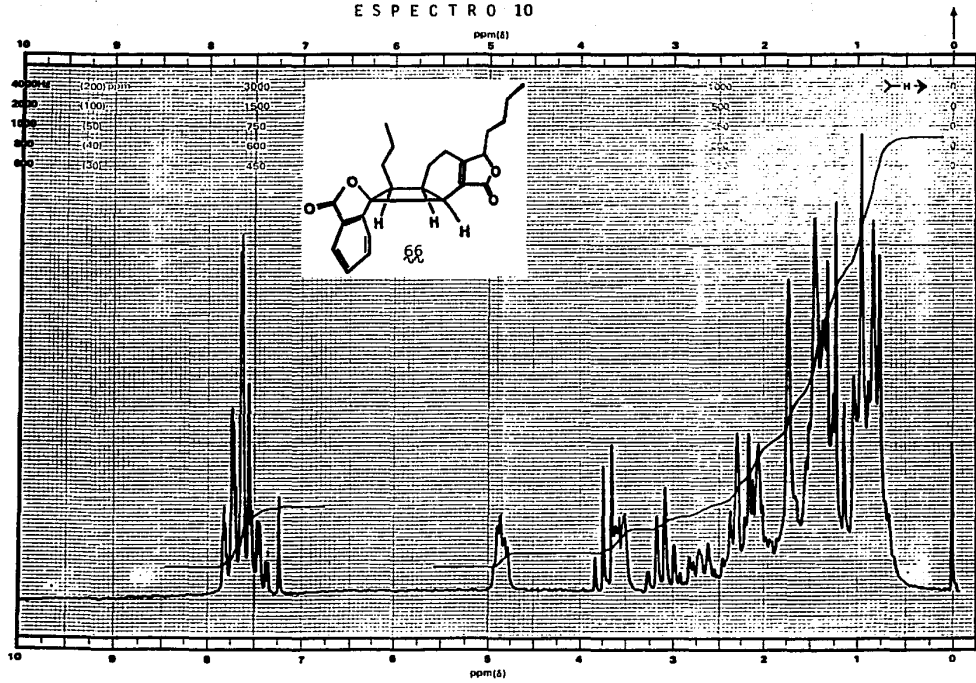
ESPCTRO 11



ESPECTRO 12



ESPECTRO 10



VII. BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

1. Mann, J., Secondary Metabolism. Oxford University Press. 1980.
2. Evans, F. J. and Taylor, S. E., Pro-Inflammatory Tumour-Promoting and Anti-Tumour Diterpenes of the Plant Families Euphorbiaceae and Thymelaeaceae. *Prog. Chem. Org. Nat. Prod.* 44, 1 (1985).
3. Allinger, N. L., Cava, M. P., De Jongh, D. C., Johnson, C. R. and Stevens, C. L., Organic Chemistry, 2nd. Ed., Worth Publishers, 1980.
4. Lozoya, X., Flora Medicinal de México. Plantas Indígenas. Publicación del IMSS. México, 1982.
5. Rzedowsky, J., La Vegetación de México. Editorial Limusa. México 1978.
6. Bye, R. A., Medicinal Plants of the Sierra Madre. *Economic Botany* 40, 103 (1986).
7. Bye, R. A., Medicinal Plants of the Tarahumara Indians of Chihuahua. *San Diego Museum Papers* (Edited by Tyson, R. A. and Elerick, D. V.) No. 19 (1985).
8. Harborne, J. B., Heywood, V. H. and Crowden, R. K., Chemosystematics of the Umbelliferae. A General Survey. *Phytochemistry* 8, 1963 (1969).
9. González, A. G., Breton, J. I., Galindo, A. y Rodríguez, L. F., Lactonas Sesquiterpénicas en Umbelíferas. *Rev. R. Acad. Ciencias Exactas, Físicas y Naturales (Madrid)* 69, 647 (1976).
10. Hegnauer, R., Chemotaxonomie der Pflanzen. Birkhauser Verlag, Basel und Stuttgart, Vol. 6 (1973).
11. Gijbels, M. J. M., Scheffer, J. J. C., and Baerheim Svendsen, A.,

- Phthalides in Umbelliferae. *Revista Italiana EPPoS* 51, 335 (1979).
12. Gijbels, M. J. M., Fischer, F. C., Scheffer, J. J. C. and Baerheim Svendsen, A. Phthalides in Roots of *Apium graveolens*, *Apium graveolens* var. *rapaceum*, *Bifora testiculata* and *Petroselinum crispum* var. *tuberosum*. *Fitoterapia* 56, 17 (1985).
 13. Banerjee, S. K., Gupta, B. D., Sheldrick, W. S. and Höfle, G., Angeolide, A Novel Lactone from *Angelica glauca*. *Liebigs Ann. Chem.* 699 (1982).
 14. Kaouadji, M., Mariotte, A. M., and Reutenauer, H., Phthalide Derivatives from *Meum athamanticum*. *Z. Naturforsch.* 39c, 872 (1984).
 15. Kaouadji, M., Reutenauer, H., Chulia, A. J., and Marsura, A. Z,Z'-Diligustilide, Nouveau Phthalide Dimere Isole de *Ligusticum wallichii* Franch. *Tetrahedron Lett.* 4677 (1983).
 16. Kaouadji, M., Puech-Baronnat, M., and Mariotte, A. M. (Z)-Ligustilidiol, Nouveau Phthalide Hydroxyle Isole de *Ligusticum wallichii* Franch. *Tetrahedron Lett.* 4675 (1983).
 17. Cichy, M., Wray, V. und Höfle, G., Neue Inhaltsstoffe von *Levisticum officinale* Koch (Liebstöckel). *Liebigs Ann. Chem.* 397 (1984).
 18. Kobayashi, M., Fujita, M., and Mitsuhashi, H., Components of *Cnidium officinale* Makino. Occurrence of Pregnenolone, Coniferyl Ferulate, and HydroxyPhthalides. *Chem. Pharm. Bull.* 32, 3770 (1984).
 19. Gijbels, M. J. M., Scheffer, J. J. C., and Baerheim Svendsen, A. Phthalides in the Essential Oil from Roots of *Levisticum officinale*. *Planta Medica* 44, 207 (1982).

20. Pushan, W., Xuanliang, G., Yixiong, W., Fukuyama, Y., Miura, I., and Sugawara, M., Phthalides from the Rhizome of *Ligusticum wallichii*, *Phytochemistry* 23, 2033 (1984).
21. Kaouadji, M. and Pouget, C., Additional Phthalide Derivatives from *Meum athamanticum*. *J. Nat. Prod.* 49, 184 (1986).
22. Vrkoč, J., Ubik, K., and Sedmera, P., Phenolic Extractives from the Achenes of *Helichrysum aenacium*. *Phytochemistry* 12, 2062 (1973).
23. Vrkoč, J., Buděsinsky, M., Dolejš, L., and Vasičková, S., Arenophthalide A: A New Phthalide Glycoside from *Helichrysum aenacium*. *Phytochemistry* 14, 1845 (1975).
24. De Alvarenga, M. A., Braz Filho, R., Gottlieb, O. R., De Dias, J. P., Magalhaes, A. F., Magalhaes, E. G., Magalhaes, G. C., Magalhaes, M. T., Maia, J. G. S., Marques, R., Marsaioli, A. J., Mesquita, A. A. L., De Moraes, A. A., De Oliveira, A. B., De Oliveira, G. G., Pedreira, G., Pereira, S. A., Pinho, S. L. V., Santana, A. E. G., and Santos, C. C., Dihydroisocoumarins and Phthalide from Wood Samples Infested by Fungi. *Phytochemistry* 17, 511 (1978).
25. Malan, E. and Roux, D. G., (+)-2,3-trans-Pubescin, The First Catechin Analogue of Peltogynoids from *Peltogyne pubescens* and *P. venosa*. *Phytochemistry* 13, 1575 (1974).
26. Kameoka, H., Miyazawa, M. and Haze, K. 3-Ethyl-7-hydroxyphthalide from *Forsythia japonica*. *Phytochemistry* 14, 1676 (1975).
27. Bowen, L., Clifford, K. H., and Phillips, G. T., Biosynthesis of Myco-

- phenolic Acid. The Synthesis of 6-Farnesyl-5,7-dihydroxy-4-methyl-phthalide in a Cell-free Preparation from *Penicillium brevicompactum*, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 949 (1977).
28. Sala, T. and Sargent, M.V., New Metabolites of Lichen *Buellia ceneszens*: Novel Phthalides Catabolites of Depsidones. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 1041 (1978).
29. Knight, D. W. and Portas, C. D., A Total Synthesis of (+)-Isoochra_cnic Acid, A Hydroxy Phthalide from *Alternaria kikuchiana*. *Tetrahedron Lett.* 4543 (1977).
30. Naito, S. and Kaneko, Y., Two New Phenolic Reductones from *Aspergillus terreus*. *Tetrahedron Lett.* 4675 (1969).
31. Tokoroyama, T. and Kubota, T., The Structure and Synthesis of Sclerolide. *Tetrahedron* 26, 1085 (1970).
32. Grove, J. F., New Metabolic Products of *Aspergillus flavus*. Asperflavin, Anhydroasperflavin, and 5,7-Dihydroxy-4-Methyl-Phthalide. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, 2406 (1972).
33. Solberg, Y., Studies on the Chemistry of Lichens. XI. Chemical Investigations of Five Norwegian *Alectoria* species. *Acta. Chem. Scand. Ser. B.* 29, 145 (1975).
34. Canonica, L., Kroszczyński, W., Ranzi, B. M., Rindone, B., and Scolastico, C., *J. Chem. Soc. D*, 1357 (1970).
35. Mitsuhashi, H. and Nomura, M., Studies on the Constituents of Umbelliferae Plants. XII. Biogenesis of 3-Butylphthalide. *Chem. Pharm. Bull.* 14, 777 (1966).
36. Mitsuhashi, H., Nagai, U., Muramatsu, T., and Tashiro, H., Studies

- on the Constituents of Umbelliferae Plants. II. Isolation of the Active Principles of *Ligusticum* Root. *Chem. Pharm. Bull.* 8, 243 (1960).
37. Sheldrick, G. M., SHELXT Revision 3. An Integrated System for Solving, Refining and Displaying Structures from Diffraction Data. University of Göttingen. Federal Republic of Germany. (1981).
38. Bjeldanes, L. F. and Kim, I., Phthalide Components of Celery Essential Oil. *J. Org. Chem.* 42, 2333 (1977).
39. Mitsuhashi, H. and Muramatsu, T., Studies on the Constituents of Umbelliferae Plants. IX. Structure of Cnidilide and Neocnidilide. *Tetrahedron* 20, 1971 (1964).
40. Mitsuhashi, H. and Nagai, U., Studies on the Constituents of Umbelliferae Plants. VII. Structure of Ligustilide 2. *Tetrahedron* 19, 1277 (1963).