

23
249



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE LOS
CONSTITUYENTES QUIMICOS DEL EXTRACTO
METANOLICO DE LA RAIZ DE LIGUSTICUM PORTERI

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

Q U I M I C A

P R E S E N T A

LILIANA HERNANDEZ VAZQUEZ

MEXICO, D. F.

1996

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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 esta 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.

Jurado asignado

Presidente	Prof: Elvira Santos Santos
Vocal	Prof: Gustavo García de la Mora.
Secretario	Prof: Eduardo Guillermo Delgado Lamas
1er. Suplente	Prof: Consuelo García Manrique
2do. Suplente	Prof: Ernestina Cervera Flores.

Sitio donde se desarrollo el tema:

Instituto de Química de la UNAM.

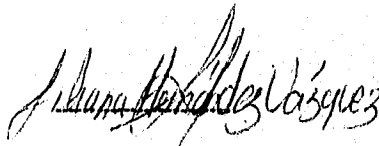
Asesor:

Dr. Eduardo Guillermo Delgado Lamas



Sustentante:

Liliana Hernández Vázquez.



Esta tesis fué desarrollada en el Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Guillermo Delgado Lamas, como parte de un proyecto de investigación financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (4794-N9406).

DEDICATORIA

A mis padres
con todo mi cariño y admiración.

A mis hermanos.

A mis sobrinos.

¿Qué es lo que quieres de mí?
Házmelo pronto saber,
pues en mi alma hay un lugar
que solo Tú puedes llenar.
Voy por caminos sin comprender
a donde quiero llegar,
soy como el viento en el ancho mar,
buscando donde aplacar.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Guillermo Delgado Lamas, por la asesoría brindada en la elaboración de éste trabajo, y por el apoyo e interés que manifiesta en la superación de sus alumnos.

A la M.en C María Isabel Chávez por la realización de los experimentos de resonancia magnética nuclear de alta frecuencia. A la M. en C. Beatriz Quiroz, por la obtención de los espectros de resonancia magnética nuclear; Q. Rocío Patiño, por la obtención de los espectros de infrarojo, I..Q Luis Velasco y M. en C. Javier Pérez Flores, por el registro de los espectros de masas.

A Yola, Carmen, Marce y Vero por la asesoría brindada, y por su apoyo.

A mis compañeros del laboratorio 1.

Al personal de la biblioteca Jesús Romo Armería.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, por el apoyo y la confianza que me brindan, gracias a los cuales hoy es posible la culminación de esta meta.

A ti mamá, tengo que agradecerte todos los momentos que me has regalado; gracias por tu cariño, por ser mi mejor compañera y por enseñarme que cada meta culminada, solo es el inicio de la próxima.

A ti, papá, gracias por quererme y por exigirme siempre más.

Marce, te doy gracias por tu cariño, tu apoyo y por ser mi mejor ejemplo a seguir.

A ti, Manuel, por ser lo más hermoso que Dios me brindó.

A ti, Blanca te agradezco tu cariño.

A mis sobrinitos Ale y Alejandro, les doy gracias por permitirme amarlos.

A Vero y Gaby les doy gracias por enseñarme lo grande y maravillosa que es la amistad.

Gracias a los profesores que tal vez aún sin saberlo, dejaron una huella muy importante en mi vida: Irma Flores y Fidel Sánchez.

Al profesor Mario A. Maldonado, por su amistad y apoyo.

A mis compañeros de la generación 92.

A ustedes Maira, Nora y José Luis gracias por brindarme su compañía y por regalarme lo más maravilloso del mundo, su amistad.

A Gaby, Mary, Alicia, Leli, Alma y Ricardo, por todos los momentos hermosos que compartimos.

Índice

Resumen.	1
Introducción.	2
Objetivos.	4
Antecedentes.	3
Resultados y Discusión	8
Desarrollo Experimental.	39
Conclusiones	52
Espectros	
Espectro 1. IR (CHCl₃) del derivado de glicerol (9)	55
Espectro 2. RMN¹H (CDCl₃, 300 MHz) del derivado del glicerol (9)	56
Espectro 3. IR (CHCl₃) de toquinólido B (10)	57
Espectro 4. RMN¹H (CHCl₃, 300 MHz) del toquinólido B (10).5	58
Espectro 5. IR (CHCl₃) del diligustilido (13)	59
Espectro 6. RMN¹H (CDCl₃, 300 MHz) del diligustilido (13)	60
Espectro 7. IR (CHCl₃) del ácido 4-hidroxi-3-metoxi-cinámico. (15)	61
Espectro 8. RMN¹H (CDCl₃, 300 MHz) del ácido 4-hidroxi-3-metoxi-cinámico (15)	62
Espectro 9. IR (CHCl₃) del senkyunólido I (22).	
Espectro 10. RMN¹³C (CDCl₃, 75 MHz) del senkyunólido I (22)	63
Espectro 11. DEPT (CDCl₃, 75 MHz) del senkyunólido I (22)	64
Espectro 13. IR (CDCl₃) de tetraacetil β-D-glucopiranosido de β-sitosterilo (25)	65
Espectro 14. RMN¹H (CDCl₃, 300 MHz) de tetraacetil β-D-glucopiranosido de β-sitosterilo (25)	66
Espectro 16. RMN¹³C (CDCl₃, 75 MHz) de tetraacetil β-D-glucopiranosido de β-sitosterilo (25)	67
Espectro 17. IR (CHCl₃) de la mezcla de acil-glucosil-esteroles (27+28)	68
Espectro 18. RMN¹H (CDCl₃, 300 MHz) de la mezcla de acil-glucosil-esteroles (27+28)	69

Espectro 19. IR (CHCl ₃) del derivado acetilado de la mezcla de acil-glucosil-esteres (29+30)	70
Espectro 20. RMN ¹ H (CDCl ₃ , 500 MHz) del derivado acetilado de la mezcla de acil-glucosil-esteres (29+30)	71
Espectro 21. RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 125 MHz) del derivado acetilado de la mezcla de acil-glucosil-esteres (29+30).	72
Espectro 23. RMN ¹ H (MeOD, 200 MHz) de β-D fructopiranosido de α-D glucopiranosilo (31)	73
Espectro 24. RMN ¹ H (CDCl ₃ , 300 MHz) de octa-acetil β-D fructopiranosido de α-glucoglucopiranosido (32)	74

Bibliografía.	75
---------------	----

Índice de figuras

Figura 1. Estructura General de un Ftálico	4
Figura 2. Datos Espectroscópicos del Z-ligustilido (6)	10
Figura 3. Fragmentos Estructurales de Toquinólido B (10)	11
Figura 4. Datos Espectroscópicos Selectos de Toquinólido B (10)	12
Figura 5. Orientación Espacial de Z-ligustilido (6) en la Reacción de Cicloadición para la Obtención de Toquinólido B.	13
Figura 6. Fragmentos Estructurales del Dilugustilido (13)	16
Figura 7. Posibilidades Estructurales del Derivado del Acido-Cinámico	19
Figura 8. Estructura Parcial del Glicol Ftálico.	21
Figura 9. Posibilidades Estructurales del Glicol Ftálico	22
Figura 10. Reaccion de Obtención de 22 y 23 a partir de Z-ligustilido (6)	23
Figura 11. Proyección Conformacional de 22 Deducida por las Constantes de Acoplamiento H-5 y H-6, H-5' y H-6, H-6 y H-7.	23
Figura 12. Correlaciones Observadas en el Espectro COSY H-H de 25.	26
Figura 13. Correlaciones Observadas en el Espectro HMBC de 29+30	34

Índice de Tablas.

Tabla 1. Datos de RMN¹H para el Toquinólido (10) y Angeólido (12).	15
Tabla 2. Datos de RMN¹H para Diligustólido (13).	18
Tabla 3. Datos de RMN¹H para el Acido 4-hidroxi-3-metoxi-cinámico.	20
Tabla 4. Datos de RMN¹H para los Glicoles Ftálidos (22 y 23).	25
Tabla 5. Datos de RMN¹H para los compuestos 25 y 26	29
Tabla 6. Datos de RMN¹³C para los compuestos 25 y 26	29
Tabla 7. RMN¹H de los Compuestos 25 y 27	31
Tabla 8. Datos de Elución de la Columna Principal	37
Tabla 9. Datos de Elución para la Obtención de Senkyunólido I (22).	
Tabla 10. CL₅₀ en el ensayo de <i>Artemia salina</i>.	

RESUMEN

En el presente trabajo se realizó el aislamiento y caracterización de los constituyentes químicos del extracto metanólico de la raíz de la planta medicinal *Ligusticum porteri*, con el objetivo de contribuir al conocimiento químico de esta especie por medio de la utilización de diversos métodos cromatográficos y técnicas espectroscópicas, espectrométricas y en algunos casos por medio de la formación de derivados. Este análisis permitió la obtención y caracterización de los siguientes compuestos: un derivado de glicerol (9), toquinólido B (10), diligustilido (13), ácido 4-hidroxi-3-metoxi-cinámico (15), senkyunólido I (22), una mezcla de acil-glucosil-esteroles (27+28), β -D-glucopiranosido de β -sitosterilo (25), y β -D-fructopiranosido de α -D-glucopiranosilo (31).

Adicionalmente se realizaron bioensayos preliminares a los compuestos obtenidos para evaluar su posible actividad biológica, en particular, ensayos de toxicidad frente a *Artemia salina*, de fitotoxicidad, (empleando el bioensayo de gota en hojas de *Tagetes erecta*) y de actividad antimicrobiana. De estos ensayos se encontró que toquinólido B (10) es tóxico para *Artemia salina*. Las demás sustancias son inocuas en los bioensayos empleados.

INTRODUCCIÓN

En México como en diferentes lugares del mundo se utilizan un gran número de especies vegetales con fines diversos. Este hecho ha motivado que numerosos grupos de investigación realicen estudios sobre la flora útil, con el fin de generar conocimientos tendientes al aprovechamiento racional de este recurso natural renovable, que es la vegetación. El uso de ciertas plantas en la medicina tradicional de nuestro país se sustenta en el conocimiento acumulado de las culturas antiguas de México, y sugiere que estas contienen sustancias bioactivas, por lo que es necesario el estudio químico de este grupo de plantas.

En particular, la planta *Ligusticum porteri* Coult & Rose (nombre Tarahumara: wasia, nombre común: chuchupate) perteneciente a la familia de Umbelliferae (subfamilia Apiceae), es apreciada en México por su uso medicinal no sólo por los Tarahumaras, sino por diversos grupos étnicos de nuestro país y del sur de Estados Unidos.¹ Es notable que numerosas especies del mismo género son usadas con fines medicinales en países como China y Japón. Los usos de estas plantas son amplios y diversos.²

Ligusticum porteri se utiliza en la preparación de una infusión de la raíz, que se administra para el tratamiento de dolores de cabeza, y problemas gastrointestinales. En forma de ungüentos se aplica en las articulaciones para aliviar dolores asociados a reumatismo. Adicionalmente, se ha observado que algunos osos de norteamérica mastican la raíz de este vegetal y el emplaste que se forma lo aplican en la piel, presumiblemente con fines antisépticos.³

Estos datos indican la posibilidad de que esta especie vegetal biosintetice metabolitos secundarios bioactivos, lo que se hace necesario su estudio químico minucioso. Previamente se han analizado los extractos hexánico y clorofórmico de las raíces,^{4, 5, 6} en el presente trabajo se realizará el estudio del extracto metanólico de este vegetal con el fin de contribuir al conocimiento químico de la flora medicinal de nuestro país.

OBJETIVOS

Objetivo general:

Realizar estudios tendientes a generar conocimiento químico sobre la flora medicinal de nuestro país, con el fin de coadyuvar a su uso racional.

Objetivos particulares:

(a) Realizar el aislamiento y la caracterización química de los metabolitos presentes en el extracto metanólico de la raíz de *Ligusticum porteri*, mediante la utilización de diversos métodos cromatográficos, espectroscópicos y químicos.

(b) Realizar algunos bioensayos preliminares que permitan la evaluación del potencial biológico de las sustancias caracterizadas.

ANTECEDENTES.

Ligusticum porteri es una planta distribuida en el norte de México y sur de Estados Unidos, donde es altamente apreciada y comercializada como planta medicinal. Esta especie ha sido objeto de estudios previos en nuestro grupo de investigación con el fin de obtener aquellos metabolitos responsables de sus múltiples usos en la medicina tradicional de nuestro país y contribuir al conocimiento de la flora útil.^{4,5,6}

Los estudios previos se enfocaron específicamente a la obtención de los metabolitos secundarios presentes en los extractos hexánico y clorofórmico de las raíces de este material, encontrándose como metabolitos principales ftálicos en el extracto clorofórmico⁴ y monoterpenos en el hexánico.⁸

Los ftálicos se caracterizan por presentar la estructura general que se indica en la figura 1, en la cual el anillo A puede estar total o parcialmente saturado, y poseer o no sustituyentes. En el anillo lactónico se pueden presentar dos posibilidades: una en la que $R_1=H$ y $R_2=alquilo$ y otra en que se presente una cadena insaturada como sustituyente.

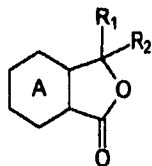
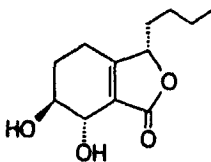


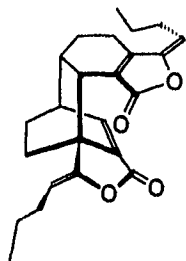
Figura 1. Estructura General de un Ftálico

La revisión de la literatura química sobre la distribución de los ftálicos en la naturaleza indica que estos son metabolitos comunes para la familia Umbelliferae y, específicamente, para las plantas que pertenecen a las tribus *Ammieae* o *Peucedaneae* de la subfamilia *Apioidae*. Una recopilación bibliográfica publicada incluye alrededor de medio

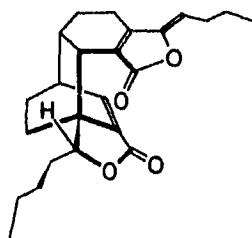
centenar de ftálidos en la naturaleza.⁴ Recientemente se han informado los constituyentes de *Ligusticum chuangxiang* que son el ftálico monomérico senkyunólido N (1) y dos de naturaleza dimérica los cuales fueron nombrados como senkyunólido O (2) y (3*R*)-3', 8'-dihidro-diligustflido (senkyunólido P).



(1) senkyunólido N

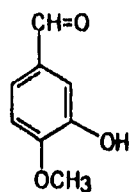


(2) Senkyunólido O

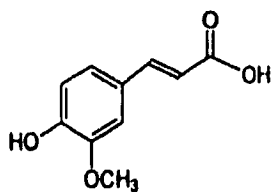


(3) Senkyunólido P

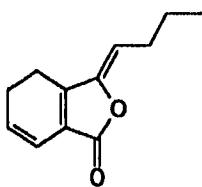
En el estudio previo realizado al extracto clorofórmico de *Ligusticum porteri* se caracterizaron los metabolitos secundarios que se describen a continuación: vainillina (4), ácido ferúlico (5), Z-ligustflido (6), diligustflido (7) y riligustflido (8).⁴ Los compuestos 7 y 8 son derivados diméricos de Z-ligustflido, por lo que se ha propuesto que su biosíntesis presumiblemente involucra una reacción de cicloadición entre dos moléculas de este compuesto.



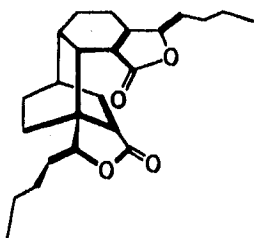
4



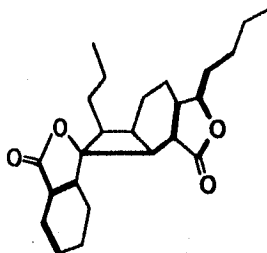
5



6



7



8

Los compuestos diméricos aislados de *L. porteri* se presentan como mezclas racémicas, y en general, todas los metabolitos diméricos de ligustilido para esta familia presentan la misma característica. La posibilidad de que estas sustancias diméricas racémicas sean artefactos ha sido minimizada debido a que estudios recientes sobre la reactividad de Z ligustilido (6) y algunos dímeros han demostrado la dificultad de llevar a cabo las reacciones de cicloadición.²²

algunos dímeros han demostrado la dificultad de llevar a cabo las reacciones de cicloadición.²²

Es importante mencionar que se han realizado algunos estudios sobre la actividad farmacológica de los extractos de algunas especies pertenecientes a este grupo de plantas. Por ejemplo: extractos de *Ligusticum acutilobum* poseen acción sedativa y producen estupor en el sistema nervioso en ratones. Se observa asimismo relajación por la subsecuente inyección de extractos de este material vegetal en perros. La inyección intravenosa promueve la hipnosis e irritación.⁶

De los metabolitos aislados hasta el momento se ha logrado determinar que el Z-ligustilido (6) posee propiedades hipnóticas, los compuestos *trans*- y *cis*-E-3-butyliden-4, 5, 6, 7-tetrahidro-6, 7-dihidroxi-1(3H)-isobenzofuranona aislados de *Polygonum multiflorum* son inhibidores de Ca^{2+} ATPasa^{10a} y que el 6-hidroxi-7-metoxi-dihroligustilido, un derivado de los metabolitos del *Apium graveolens* (apio), ha sido patentado recientemente para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.^{10b y c}

La reseña descrita pone en relieve la importancia biológica y potencial de desarrollo farmacológico de los flálidos, con lo cual se justifica el estudio detallado de las fuentes naturales de estas sustancias. Por otro lado, debido al amplio uso de las raíces de *Ligusticum porteri* en preparaciones medicinales y condimentos, los cuales son ingeridos por quienes emplean la planta, es deseable la adquisición del mayor conocimiento posible sobre los constituyentes químicos presentes en este material vegetal. El presente estudio contribuye a tal objetivo.

RESULTADOS Y DISCUSION .

Del extracto metanólico de la raíz de *Ligusticum porteri* se aislaron ocho sustancias: un derivado del glicerol (9), un ácido cinámico (16), tres ftálicos (11, 14, 23), una mezcla de acil-glucosil-esteres (27+28), β -D-glucopiranosido de β -sitosterilo (25) y β -D-fructopiranosido de α -D-glucopiranosilo (31). La discusión de la determinación estructural de los constituyentes aislados se llevará a cabo en orden de elución de las sustancias de la columna cromatográfica en la que se aplicó el residuo metanólico.

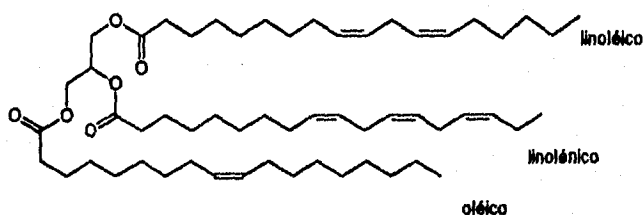
Elucidación estructural del derivado del glicerol (9).

De las fracciones de menor polaridad se aisló un aceite amarillo cromatográficamente homogéneo. Los datos que se deducen de su espectro de IR (CHCl_3 , espectro 1) indican la presencia de carbonilo (1746 cm^{-1}) e insaturaciones (3009 cm^{-1}).

En el espectro de RMN^1H (CDCl_3 , 300 MHz, espectro 2) se observa una señal múltiple (δ 5.35) asignable a hidrógenos vinílicos, que integra para doce hidrógenos, lo que indica que el compuesto presenta enlaces carbono-carbono mono, di- o tri-sustituídos. En δ 2.80 se observa una señal múltiple que integra para seis hidrógenos, que por su desplazamiento químico corresponde a protones doblemente alílicos, y otro multiplete (δ 3.30) que integra para doce hidrógenos, correspondiente a hidrógenos alílicos. Los datos descritos anteriormente permiten deducir la presencia de un trieno homo conjugado, un dieno homo conjugado y una doble ligadura aislada, por lo que los dobles enlaces están disustituídos. Adicionalmente se observa un triplete dobleteado (δ 2.31) que integra para seis hidrógenos, que por su desplazamiento químico corresponde a protones metilénicos unidos a un grupo electroattractor, que de acuerdo al espectro de IR (CHCl_3 , espectro 1) debe ser un grupo carbonilo de ester. Este fragmento estructural se confirma con las señales encontradas en el espectro de RMN^1H en δ 4.11 a 4.30, que indican la presencia de

hidrógenos geminales a oxígeno, y que representan la parte donde el oxígeno se une a la cadena carbonada.

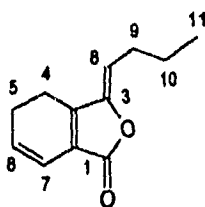
Las propiedades espectroscópicas descritas anteriormente permiten establecer que esta sustancia es un derivado esterificado del glicerol. El número de átomos de carbono saturados de los residuos ácidos se deducen por la integración de la señal δ 1.20 a 1.40 en el espectro de RMN¹H (CDCl₃, 300 MHz, espectro 2), que indica la presencia de aproximadamente 60 hidrógenos. El número de hidrógenos y el tipo de insaturaciones permiten suponer la presencia de residuos del ácido linolénico, linoléico y oléico. Se propone la estructura promedio (9), para este compuesto dada la frecuencia de estos ácidos en la naturaleza. Es importante mencionar que la ubicación de las cadenas lipídicas en el glicerol no pueden ser determinada con los datos obtenidos, y aunque solo se observa una mancha homogénea por medio de CCF para este compuesto, muy probablemente se tenga una mezcla de ésteres, ya que en el espectro de RMN¹H (300 MHz, CDCl₃, espectro 2) las integraciones no son exactas. Las fracciones cromatográficas subsecuentes, a pesar de mostrar una mancha homogénea por cromatografía analítica, están constituidas por glicéridos con diferentes grados de insaturación, de acuerdo al análisis por RMN¹H. Los espectros muestran prácticamente las mismas señales, pero con diferentes integraciones. No se realizó la separación y caracterización de cada sustituyente de estas mezclas debido a que estas sustancias son comunes en la flora. Es importante mencionar que a mayor número de dobles enlaces, aumenta la labilidad de la sustancia, presumiblemente por oxidaciones espontáneas.



Elucidación estructural de toquinólido B (10).

Elucidación estructural de toquinólido B (10)

El siguiente compuesto aislado es un sólido cristalino, el cual presenta en su espectro de IR (CHCl_3 , espectro 3) señales correspondientes a metilos y metilenos (2935 y 2962 cm^{-1}), en 1755 cm^{-1} una absorción correspondiente a carbonilo, y en 1662 cm^{-1} absorción atribuible a dobles ligaduras. Estos datos son característicos de γ -lactona- α,β insaturada y son análogos a las propiedades espectroscópicas del Z-ligustilido (6) que es un producto natural presente en el extracto clorofórmico de las raíces de *Ligusticum porteri*.^{4,8} Para fines comparativos, en la figura 2 se muestran ciertos datos espectroscópicos relevantes del Z-ligustilido (6) informados en la literatura.⁴



(6)

UV (metanol) λ_{max} 322 (ϵ 14678) 273 (ϵ 15238).

IR (CHCl_3) ν_{max} cm^{-1} 2963, 2934, 2873, 1669 1758.

RMN^1H (CDCl_3 , 200 MHz): δ , asignación: 6.28 (dt, J 9.0, 1.0 Hz, H-7), 6.00 (dt, J 9.7, 4.2 Hz, H-6), 5.29 (t, J 8.0 Hz, H-8), 2.65-2.45 (4H, m, H-4), 2.28 (2H, dd, J 15.4, 7.7, Hz, H-9), 1.52 (2H, c, J 7.0 Hz, H-10) 0.96 (3H, t, J 7.2 Hz, H-11).

EMIE (70 eV) m/z (% rel): 190 (M^+ , 27.9), 161 (46.3), 159 (51), 148 (36), 106 (36), 105 (58.2), 78 (40), 77(51)

Figura 2. Datos espectroscópicos del Z-ligustilido (6)

En el espectro de RMN^1H (CDCl_3 , 300 MHz, espectro 4) del compuesto aislado se observan dos tripletes: uno en δ 0.81 (J 7.2 Hz) y otro en δ 0.88 (J 7.2 Hz) correspondientes a los metilos de dos fragmentos etilo ($-\text{CH}_2\text{CH}_3$, figura 3A). En δ 4.65 se observa una señal con multiplicidad doble de doble (J 8.7, 6.6 Hz) que integra para un hidrógeno, y sugiere la presencia de un protón olefinico, vecino a un metileno. La ausencia de acoplamientos con otros hidrógenos vinílicos sugiere que se trata de una doble ligadura trisustituida. Estos datos son congruentes con la presencia de una cadena butilidénica (C(8)-C(9)-C(10)-C(11)) similar

a la que existe en el Z-ligustilido (6) (figura 3B). Una señal doblete tripleteado en δ 5.92 (J 4.0, 9.3 Hz) y una segunda señal doblete tripleteado en δ 6.17 (J 2.1, 9.3 Hz) que integran para un hidrógeno cada una, permiten definir un sistema vinílico disustituido análogo al que presenta el Z-ligustilido (figura 3C).

Adicionalmente, se presenta una señal doble en δ 7.52 que corresponde a un protón vinílico, que de acuerdo a su desplazamiento químico es influenciado por un grupo electrotractor, por lo que se propone que se trate del hidrógeno olefínico β al carbonilo de una lactona α,β -insaturada. La multiplicidad de esta señal sugiere que se encuentre unido a un metino, por lo que se deduce un doble enlace trisustituido (figura 3D). Los datos espectroscópicos descritos permiten establecer los fragmentos estructurales mostrados en la figura 3.

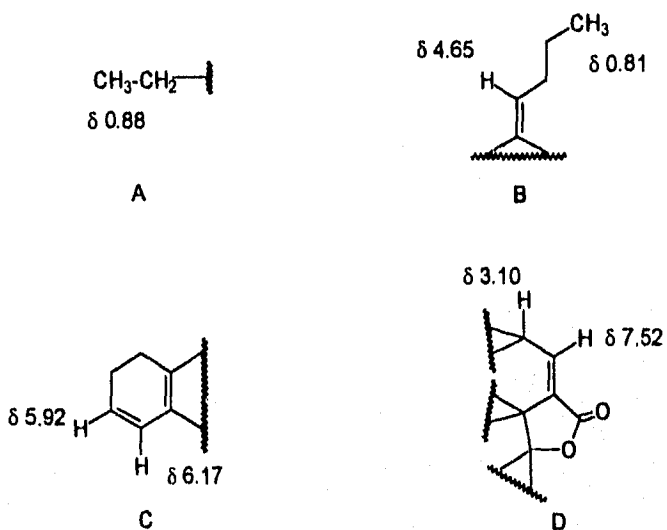
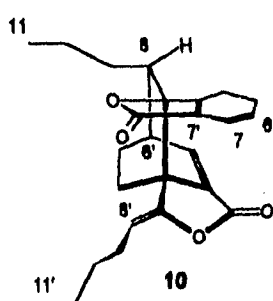


Figura 3. Fragmentos Estructurales de Toquinólido B (10).

La integración de las señales bajo la curva para este compuesto suman 28 hidrógenos, justo el doble del total de hidrógenos presentes en el Z-ligustilido (6). Esta observación, junto con los datos antes descritos y la evidencia previa de la presencia de derivados diméricos del Z-ligustilido (6)^{4, 6} en este material vegetal, permiten suponer que este compuesto se trate de uno de ellos.

Con los datos físicos y espectroscópicos obtenidos, se realizó la búsqueda bibliográfica de posibles compuestos con características similares, encontrándose que estos corresponden al toquinólido B (10), aislado por vez primera de *Angelica acutiloba*,¹¹ y posteriormente aislado de *Ligusticum chuangxiang*.⁷ En la figura 4 se muestran algunos datos físicos y espectroscópicos selectos de 10.



p.f: 120-122 °C.

$[\alpha]_D^{25} 0^\circ$

UV(ethanol) λ max 280 (ϵ 6100)

IR(KBr) ν max cm^{-1} 1786, 1756, 1700, 1662

EM (% rel): 380 (M^+ , 3), 191 (71), 190 (100)
161(41), 148 (89), 105 (22).

Figura 4. Datos Espectroscópicos Selectos de Toquinólido B (10).

Los argumentos descritos en la literatura que sustentan la estructura del toquinólido B (10) se describen a continuación:

a) El patrón de fragmentación en EM muestra un ión molecular m/z 380 y prácticamente no hay fragmentos que se registren en el intervalo de m/z 380 a m/z 190. Posteriormente la fragmentación de este compuesto corresponde a la presentada por el Z-ligustilido (m/z 161 y 148). Lo anterior proporciona la evidencia de un dímero derivado de una cicloadición de Z-ligustilido (6).

b) Su espectro de IR presenta absorciones en 1786, 1756 cm^{-1} y 1700, y 1662 cm^{-1} (ver figura 3) absorciones correspondientes a dos carbonilos de γ -lactona enólica y carbonilo de lactona α , β -insaturada, respectivamente.

c) La absorción máxima en UV (λ 280 nm) corresponde a una lactona α , β , γ , δ -insaturada.

d) La presencia de señales para una sola cadena butilidénica permite suponer que un sistema butilidénico actúe como dienófilo y el ciclohexadieno actúe como dieno en una cicloadición $4\pi+2\pi$ (Diels-Alder, figura 5). Esta unión se confirma por la señal doble δ 7.52 correspondiente al hidrógeno de un sistema vinílico trisustituido conjugado con un carbonilo de lactona.

e) La configuración de los dobles enlaces trisubstituidos de las cadenas se establece por medio del desplazamiento químico del hidrógeno olefínico de la cadena butilidénica por comparación con las informadas para el angeólido (11),¹² el cual es un derivado dimérico natural de *E*-ligustilido (12). El angeólido (11) presenta señales en δ 5.38 (dd, J 9.5, 7.0 Hz, H-8) y δ 2.82 (m, H-8) y el toquinólido B (10) en δ 4.62 (d, J 8.8, 6.8 Hz) y δ 1.66 (m) respectivamente, con lo que se concluye que el toquinólido B (10) presenta una geometría *Z* en la cadena butilidénica. La estructura fue confirmada por medio del análisis cristalográfico por rayos X por Naito y colaboradores.⁷

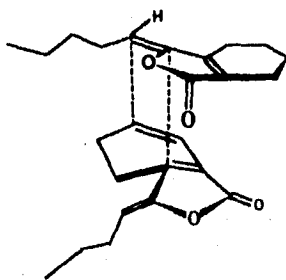
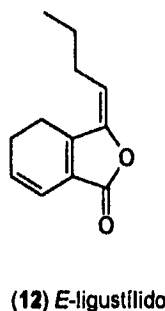
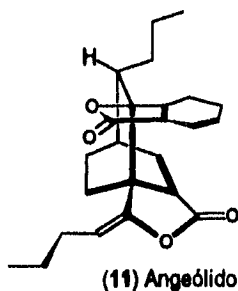


Figura 5. Orientación de *Z*-ligustilido (6) en la Reacción de Cicloadición para la Obtención de Toquinólido B (10).

En la tabla I se comparan los datos obtenidos para el compuesto aislado en el presente trabajo con los informados en la literatura para el toquinólido B (10) y el angeólido (11), que es un diastereoisómero de 10 (es el dímero 4+2 derivado de E-ligustilido).

Es manifiesta una similitud notable entre los datos obtenidos para el compuesto aislado de *L. porteri* y los informados en la literatura para el toquinólido B (10). Las diferencias que se observan pueden explicarse de la siguiente manera: 1) En el espectro de IR del compuesto obtenido solo se observa una banda ancha centrada en 1755 cm^{-1} correspondiente a una lactona y en los datos informados en la literatura se observan dos ($1786, 1756$) correspondientes a dos grupos carbonilo, esta diferencia es atribuida a que en el presente trabajo se obtuvo el espectro de IR en CHCl_3 y los datos informados se obtuvieron en KBr.



2) Las señales para los hidrógenos H-8 y H-6' son observadas en el espectro de RMN^1H (espectro 4) como multipletes en comparación a las informadas que son observadas como un ddd, un dddd, y un ddd. Esta diferencia se debe a que el espectro obtenido en el presente trabajo fué obtenido a 300 MHz y en la referencia se obtuvo a 500 MHz.

El análisis comparativo de los datos (punto de fusión, infrarrojo, rotación óptica) permitió concluir que toquinólido B (10) es constituyente de *Ligusticum porteri*.

Tabla 1. Datos RMN¹H para el Toquinólido B (10) y Angeólido (11).

Hidrógeno	Toquinólido B (10) ^a	Toquinólido B(10) ^b	Angeólido (11) ^c
4	2.03-2.21 (m)	2.03-2.21 (m)	
5	2.26-2.32 (m)	2.25-2.31 (m)	
6	5.92 (dt) (9.6, 4.2)	5.92 (dt) (9.3, 3.9)	5.99 (dt) (9.5, 3.0)
7	6.17 (dt) (9.6, 2.1)	6.17 (dt) (9.3, 2.1)	6.19 (dt) (9.5, 1.0)
8	1.67 (dddd) (9.2, 5.3, 1.9, 1.7)	1.64-1.69(m)	2.82 (m)
9	1.24-1.38 (m) 1.43-1.51 (m)	1.24-1.32 (m) 1.41-1.52 (m)	
10	1.09-1.2 (m) 1.24-1.38 (m)	1.09-1.21 (m) 1.24-1.37 (m)	
11	0.88 (t) (7.1)	0.88 (t) (7.2)	0.88 (t) (7.2)
4'	1.24-1.38 (m) 2.47-2.53 (m)		
5'	1.24-1.38 (m) 2.03-2.21 (m)	1.24-1.36 (m) 2.04-2.4 (m)	
6'	3.10 (ddd) (6.7, 2.9, 2.2, 1.9)	3.10 (m)	3.20 (dq) (6.5, 2.5)
7'	7.51 (d) (6.7)	7.52 (d) (6.6)	7.49 (d) (6.5)
8'	4.62 (dd) (8.7, 6.8)	4.65 (dd) (8.7, 6.6)	5.38 (dd) (9.5, 7.0)
9'	1.98 (ddt) (14.2, 6.8, 7.6) 2.03-2.21 (m)	1.91-2.04 (m) 2.04-2.4 (m)	
10'	1.24-1.38 (m)	1.24-1.33 (m)	
11'	0.82 (t) (7.4)	0.82 (t) (7.2)	0.85 (t) (7.0)

a. Datos obtenidos de la referencia 7. RMN¹H (CDCl₃, 500 MHz).

b. Datos obtenidos en la presente investigación RMN¹H (CDCl₃, 300 MHz, espectro 4).

c. Datos obtenidos de la referencia 12. RMN¹H (CDCl₃, 400 MHz).

Elucidación estructural de diligustilido (13).

El siguiente compuesto aislado es otro sólido cristalino el cual presenta en su espectro de IR (CHCl_3 , espectro 5) señales correspondientes a metilos y metilenos (2962 y 2935 cm^{-1}), una banda de absorción ancha en 1759 cm^{-1} correspondiente a carbonilo, en 1664 y 1631 cm^{-1} bandas correspondientes a insaturaciones. Los datos descritos son congruentes a los presentados para una γ -lactona α,β -insaturada, análoga a la presentada por el Z-ligustilido (figura 2)

Su espectro de RMN^1H (CDCl_3 , espectro 6) presenta tripletes en δ 0.92 (6H, J 7.5 Hz) correspondiente a los hidrógenos de dos metilos unidos a metilenos ($-\text{CH}_2\text{CH}_3$). Se observan dos señales con multiplicidad de tripletes uno en δ 5.00 (J 7.5 Hz, H-8') y el otro en 5.07 (J 8.1, H-8) correspondientes a los hidrógenos olefinicos de dos dobles enlaces trisustituídos, vecinal a metino (figura 6A y 6B). Estas señales son semejantes a las presentada por el Z-ligustilido δ 5.20 (t, J 8.0, H-8, figura 1). Un doblete en 7.35 correspondiente a un protón olefinico de una lactona α,β -insaturada (figura 6C). Los datos antes descritos permiten deducir los fragmentos estructurales que se representan en la figura 6

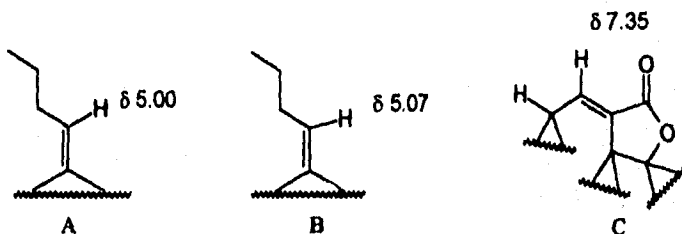


Figura 6. Fragmentos Estructurales de Diligustilido (13).

La integración bajo la curva del espectro de RMN¹H (CDCl₃, espectro 6) para este compuesto corresponde a un total de 28 hidrógenos, precisamente el doble de la presentada para el Z-ligustilido (6) e igual a la presentada por el toquinólido B (10). Por lo que se sugiere que se trate de un dímero de Z-ligustilido (6). En el espectro de RMN¹H de este compuesto no se observan las señales característica de un doble enlace disustituido similares a las presentes en el Z-ligustilido (figura 1) y en el espectro de RMN¹H (CDCl₃, 300 MHz, espectro 4) del toquinólido (figura 3), por lo que la conjunción de los datos antes descritos, permiten suponer que en la cicloadición para la formación del dímero, la doble ligadura disustituida de una molécula de Z-ligustilido actúa como dienófilo y el sistema vinílico del ciclo de seis como dieno.

La comparación de datos físicos y espectroscópicos (tabla 2) de este compuesto con los informados en la literatura permitió identificar a este compuesto como diligustilido (13), el cual fue aislado por primera vez de *Ligusticum wallichii*¹³ y fue confirmado por comparación directa con una muestra original previamente obtenida por nuestro grupo de investigación, del análisis del extracto clorofórmico de la especie vegetal en estudio.

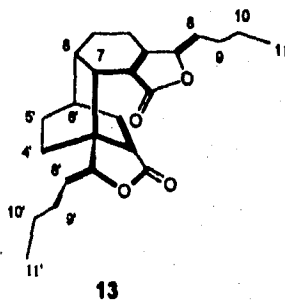


Tabla 2. Datos de RMN¹H para Diligustilido (13).

Hidrógeno	Diligustilido(13) ^a	Diligustilido(13) ^b	Diligustilido(13) ^c
6	2.55 (m)	2.52 (m)	2.56 (ddd) (9.0, 6.5, 2.5)
7	3.23 (d) (8.7)	3.25 (d) (9.0)	3.27 (d) (9.0)
8	5.00 (t) (7.5)	4.97 (t) (8.0)	5.00 (t) (7.5)
11	0.92 (t) (7.5)	0.97 (t) (7.0)	0.92 (t) (7.0)
6'	2.99 (dddd)	2.98 (ddd) (6.5, 2.5, 2.5)	
7'	7.35 (d) (6.6)	7.31 (d) (6.5)	7.36 (d) (6.5)
8'	5.07 (t) (8.1)	5.05 (t) (8.0)	5.08 (t) (8.0)
11'	0.92 (t) (7.5)	0.97 (t) (7.0)	0.92 (t) (7.0)

a Datos obtenidos en el presente trabajo

b Datos obtenidos en la referencia 4. RMN¹H (CDCl₃, 80 MHz)

c. Datos obtenidos en la referencia 13. RMN¹H (CDCl₃, 250 MHz)

Elucidación estructural de ácido 4-hidroxi-3-metoxi-cinámico (15).

El siguiente compuesto aislado fue un sólido cuyo espectro de IR (KBr, espectro 7) indica la presencia de hidroxilo (3438 cm⁻¹), carbonilo (1691 cm⁻¹), el cual debe corresponder a un ácido carboxílico por una banda ancha de 2594 a 3016 cm⁻¹. Además de bandas de absorción que pueden ser atribuidas a insaturaciones (1600 y 1666 cm⁻¹).

El espectro de RMN¹H (CDCl₃, 300 MHz, espectro 8) de este compuesto presenta un singulete δ 3.90 que integra para tres hidrógenos, que por desplazamiento químico corresponde a un grupo metoxilo. Se observan dos señales con multiplicidad de dobletes una en δ 6.26 (J 15.9 Hz) y otra en δ 7.61 (J 15.9 Hz), cada una de las cuales integra para un hidrógeno. Las constantes de acoplamiento de estas señales indican que se trata de un sistema vinílico en disposición *trans* y el desplazamiento químico de esta señal permite suponer que

esta doble ligadura se encuentra conjugada al grupo carbonilo. Adicionalmente pueden identificarse las señales para un sistema ABX bencenoide con constantes de acoplamiento *orto* (J 8.1 Hz) y *meta* (J 1.8 Hz). Los sustituyentes en el anillo, pueden ser un metoxilo, un hidroxilo y una olefina conjugada con un ácido carboxílico. Con estos datos se pueden proponer seis posibles estructuras, las cuales se muestran en la figura 7.

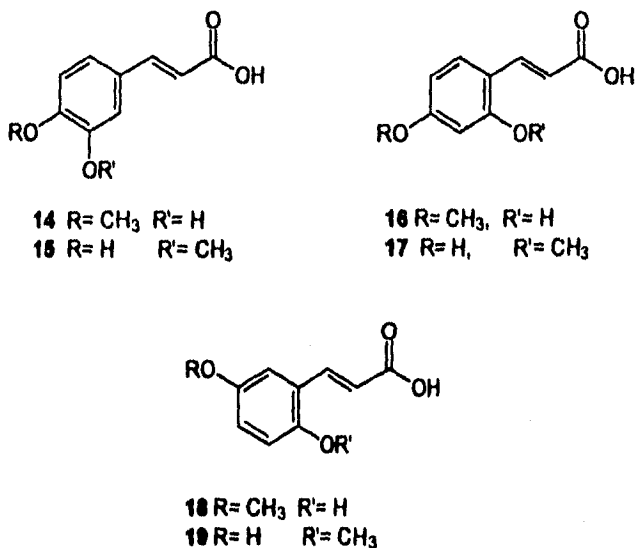


Figura 7. Posibilidades Estructurales del Derivado del Acido Cinámico.

De estas seis estructuras las de mayor probabilidad, por razones biogénicas,¹⁴ son la **14** y **15**, de las cuales fue posible identificar que el compuesto presenta la estructura **15** (ácido 4-hidroxi-3-metoxi-cinámico), por comparación de los datos obtenidos con los informados en la literatura. Esta sustancia había sido aislada previamente de este material vegetal,⁴ y la comparación directa con una muestra auténtica confirmó su identidad.

Tabla 3. Datos de RMN¹H para el Acido 4-Hidroxi-3-Metoxi-Cinámico(15).

Hidrógeno	(15) ^a	(15) ^b	(15) ^c
a	3.90 (s)	3.92 (s)	3.89 (s)
b	6.26 (d) (15.9)	6.25 (d)	6.30 (d)
c	6.89 (d) (8.1)		6.85
d	7.00 (d) (1.8)		7.09
e	7.04 (dd) (8.1, 1.8)		7.17
f	7.58 (d) (13.9)	7.67 (d)	7.58 (d)

a Datos obtenidos en el presente trabajo. RMN¹H (CDCl₃, 300 MHz, espectro 8)

b Datos obtenidos en la referencia 4. RMN¹H (CDCl₃, 80 MHz)

c Datos obtenidos en la referencia 15.

Determinación estructural de *trans*-6, 7-dihidroxi-ligustilido(senkyunólido 1, 22).

De fracciones de mayor polaridad se aisló un semisólido amarillo, el cual presenta en su espectro de IR (espectro 9) absorciones características de vibraciones de hidroxilo (3413 cm⁻¹), y bandas correspondientes a metilos y metilenos (2960 y 2933cm⁻¹). Una banda de absorción característica de carbonilo de γ -lactona (1751 cm⁻¹), señales en 1678 y 1638 cm⁻¹ que sugieren la presencia de insaturaciones, lo que permite suponer que se trate de una lactona α,β -insaturada. Estos datos son congruentes para un ftárido de estructura similar al Z-ligustilido (6) aislado previamente de este material vegetal^{4,5} y cuyas características espectroscópicas se muestran en la figura 2.

El espectro de RMN¹³C (CDCl₃, 75 MHz, espectro 10) totalmente desacoplado de este compuesto indica, la presencia de doce carbonos, uno de carbonilo (δ 169.00), cuatro carbonos sp² (δ 114.21, 125.68, 148.01, 153.30) correspondientes a dos sistemas vinílicos. En forma adicional, mediante el experimento DEPT (CDCl₃, 75 MHz espectro 11) para este compuesto, fué posible establecer la presencia de un metilo (δ 13.50), cuatro metilenos que

por desplazamiento químico corresponden a carbonos sp^3 (δ 18.77, 22.16, 26.16 y 28.00), dos metinos sp^3 (δ 71.40 y 67.06), y uno sp^2 (δ 114.21) y por último se observan tres carbonos cuaternarios (126.68, 148.01, 153.30).

Con los datos antes mencionados es posible establecer la fórmula molecular $C_{17}H_{16}O_4$, que implica cinco grados de insaturación, dos de los cuales son explicados por la presencia de dos dobles ligaduras ($-C=C-$), dos más por una lactona, y una debida muy probablemente a un ciclohexano, lo que permite establecer el esqueleto estructural de un ftálico. Los oxígenos se explican por la presencia de dos alcoholes, para los cuales es necesario establecer su ubicación (figura 8).

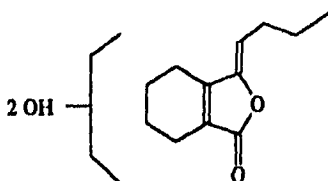


Figura 8. Estructura Parcial del Glicol Ftálico.

El espectro de RMN^1H ($CDCl_3$, 300 MHz, espectro 12), para este compuesto presenta señales características para una cadena butilidénica: en δ 0.94 (3H, J 7.17 Hz, H11) correspondiente (CH_3-CH_2), en un sexteto δ 1.50 (2H, J 7.4 Hz, H-10, $CH_3-CH_2-CH_2$), un cuarteto δ 2.33 (2H, J 7.45 Hz, H-9, CH_2-CH_2-CH) y un triplete δ 5.29 (J 7.60 Hz, H-8, $CH_2-CH=CH$).

Se observa en el mismo espectro una señal ddd en δ 3.95 (J 5.7, 8.7, 3.0, H-6) y un doblete en δ 4.45 (J 5.7 Hz, H-7) cuyos desplazamientos químicos corresponden a hidrógenos geminales a oxígeno. De acuerdo a la constantes de acoplamiento en común de estas señales los hidrógenos son vecinales, lo que implica la presencia de un glicol. Otras señales observables son dos multipletes en δ 1.84 a 1.90 y δ 2.00 a 2.00, los cuales integran para dos hidrógenos que por su desplazamiento químico podría tratarse de protones alílicos y un multiplete más en δ 2.40 a 2.50 que integra para dos hidrógenos correspondientes a

metileno. El análisis anterior permite plantear dos hipótesis estructurales, las cuales se presentan en la figura 9.

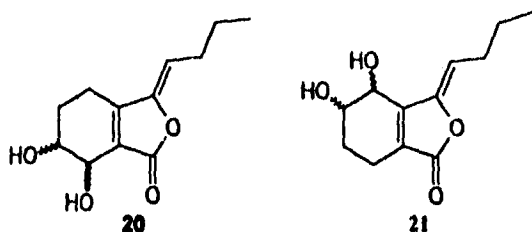


Figura 9. Posibilidades Estructurales del Glicol Ftálico

Para discernir entre las posibilidades estructurales se realizó una búsqueda bibliográfica de compuestos análogos. Se informa en la literatura que al tratar *Z*-ligustilido con AMCPB en CH_2Cl_2 y posterior tratamiento ácido, es posible obtener al glicol del *Z*-ligustilido, el cual posee la fórmula estructural 20. En la figura 10 se describe la reacción para la formación del glicol.¹³ En esta reacción es notable la formación de los dos isómeros (*cis* y *trans*), siendo este último el de mayor proporción, ya que la apertura de epóxidos se realiza por medio de mecanismo $\text{S}_{\text{N}}2$ (para formar 22), 23 puede formarse por una reacción $\text{S}_{\text{N}}1$. Ambos productos (22 y 23) han sido identificados como constituyentes de *Cnidium officinale*.¹⁶

La orientación espacial de los hidroxilos para el producto natural de *L. porteri* se obtuvo mediante el análisis de las constantes de acoplamiento entre H-5, H-6 y H-7. Las constantes de acoplamiento observadas se muestran en la figura 11 y el espectro 12, donde la interacción H(6)-H(7) corresponde a una disposición pseudo *trans* diaxial, y permite identificar a este compuesto como *trans*-6,7-dihidroxi-ligustilido (senkyunólido I, 22).

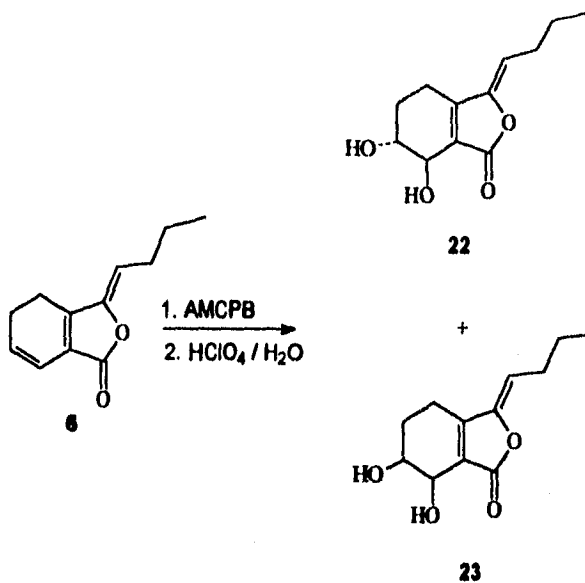


Figura 10. Reacción de Obtención de **22** y **23** a Partir de Z-ligustilido (**6**).

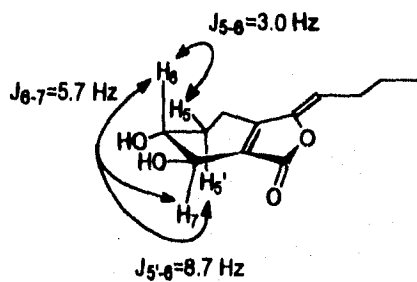
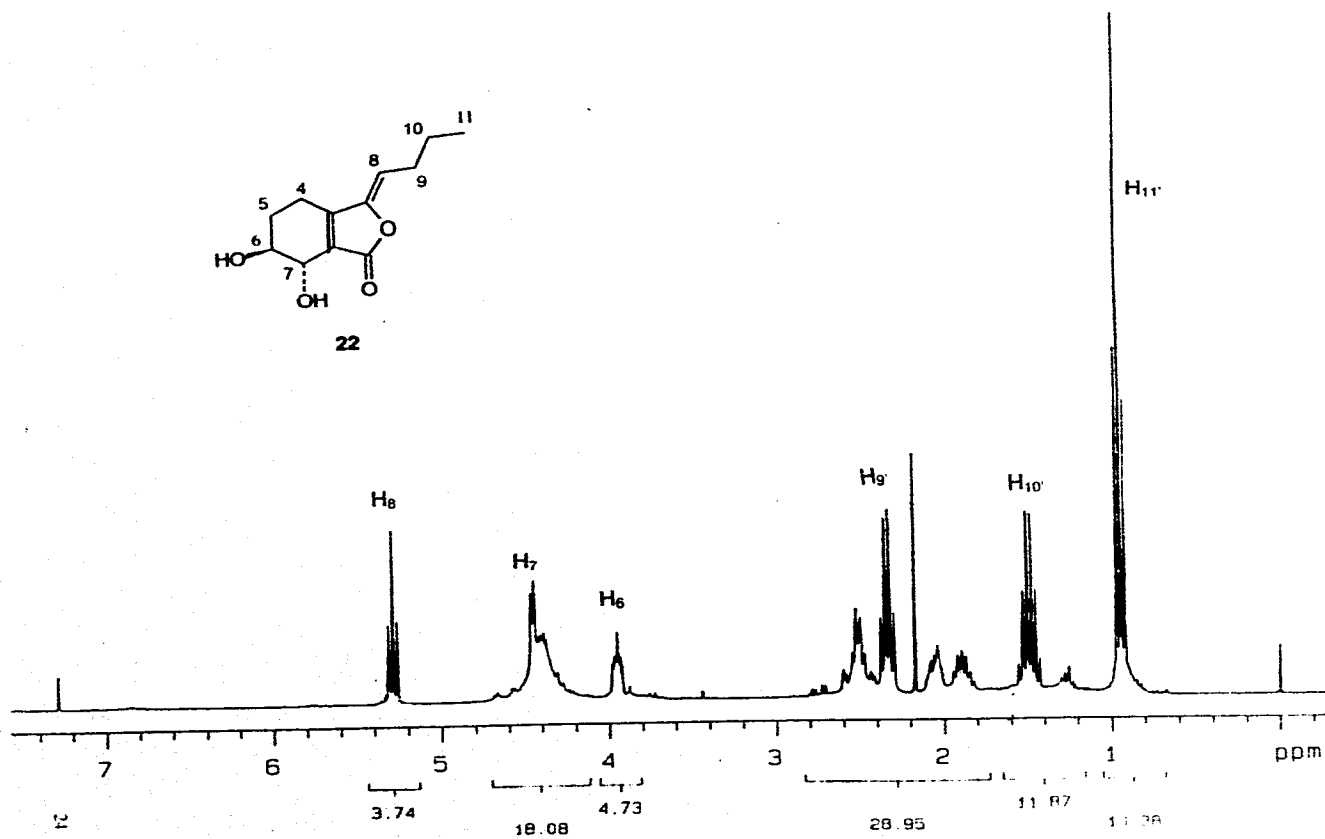
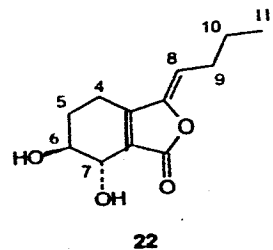


Figura 11. Proyección Conformacional de **22** Deducida por las Constantes de Acoplamiento H-5 y H-6, H-5' y H-6, H-6 y H-7.



Espectro 12 RMN¹H (CDCl₃, 300 MHz) del senkyunólido I (22)

La confirmación de esta estructura se llevó a cabo por la comparación de los datos obtenidos con los informados en la literatura tabla 4.

Tabla 4. Datos de RMN¹H para los Glicol Ftálidos (22, 23)

Hidrógeno	senkyunólido I (22) ^a	senkyunólido I (22) ^b	senkyunólido H (22) ^b
6	3.95 (ddd) (5.7, 8.7, 3.0)	3.95 (ddd) (9.9, 6.4, 3.4)	4.05 (ddd) (7.8, 3.9, 2.4)
7	4.45 (d) (5.7)	4.50 (d) (6.4)	4.62 (d) (3.9)
8	5.29 (t) (7.60)	5.29 (t) (7.8)	5.31 (t) (7.8)
9		2.36 (dt) (7.8, 7.3)	2.36 (dt) (7.8, 7.3)
10		1.50 (s) (7.3)	1.50 (s) (7.3)
11		0.95 (t) (7.3)	0.95 (t) (7.3)

a. Datos obtenidos en la presente investigación RMN¹H (CDCl₃, 300 MHz, espectro 12)

b. Datos obtenidos en la referencia 16

Se llevará a cabo primeramente la elucidación estructural del compuesto (25) para facilitar la discusión de la mezcla de compuestos (27+28).

Elucidación estructural de tetraacetil β-D-glucopiranosido de β-sitosterilo (25).

De las fracciones de mayor polaridad se obtuvo un sólido blanco (24), cuyas características de solubilidad sugieren que la estructura de este compuesto este constituida por un fragmento lipofóbico y otro lipofílico, por lo cual se obtuvo el derivado acetilado del producto natural (24) para facilitar su manejo e identificación.

El producto acetilado (25) es un sólido soluble en cloroformo y presenta en su espectro de IR (CHCl₃, espectro 13) señales en 2958 y 2869 cm⁻¹ correspondientes a metilos y metilenos, y una señal en 1755 cm⁻¹ que indica la presencia carbonilo.

De acuerdo a su espectro de RMN¹H (CDCl₃, 300 MHz, espectro 14) se estableció la presencia de un fragmento de β-D glucopiranosido acetilado como parte de la estructura de este compuesto por las siguientes señales: δ 4.59 (1H, d, J 8.1 Hz), δ 4.95 (dd, J 8.0, 9.5 Hz), δ 5.20 (1H, t, J 9.5, 9.9), δ 5.07 (1H, t, J 9.5, 9.9 Hz), δ 3.67 (dd, J 8.8, 2.4, 4.8 Hz), δ 4.25 (1H, dd, J 12, 4.8 Hz), δ 4.11 (1H, dd, J 2.7, 12 Hz). Además se observan cuatro singuletes en δ 2.07, 2.04, 2.01, 2.00 las cuales integran cada uno para tres hidrógenos correspondientes a metilos de acetato.

Mediante un experimento COSY H-H (CDCl₃, 300 MHz, espectro 15), se obtuvo la correlación de los hidrógenos de este fragmento, ya que se observa un doblete en δ 4.59 (1H, J 8.1 Hz) que corresponde a H-1'. Este correlaciona con una señal con multiplicidad de doble de doble (δ 4.95, J 8.0, 9.5 Hz) que se asignó a H-2'. Esta señal se encuentra acoplada con un triplete en δ 5.20 con (1H, J 9.5, 9.9) que pertenece a H-3'. Este triplete presenta correlación con una señal con multiplicidad de triplete 5.07 dd (1H, J 9.5, 9.9 Hz) que fué asignado a H-4'. Esta correlaciona a su vez, con la señal con multiplicidad de doble de doble de doble en δ 3.67 (J 8.8, 2.4, 4.8 Hz) que corresponde a H-5'. Por último, la señal doble de doble se encuentra acoplada con dos señales: una en δ 4.25 que presenta multiplicidad de doble de doble y (1H, J 12, 4.8 Hz), y la otra en δ 4.11 (1H, J 2.7, 12 Hz) que pertenecen a los hidrógenos H-6'. En la figura 12 y el espectro 15 se presentan estas correlaciones.

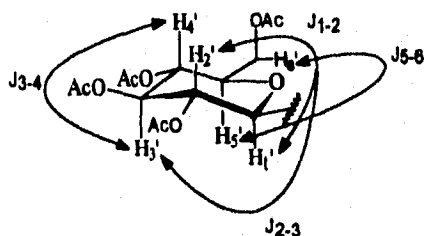
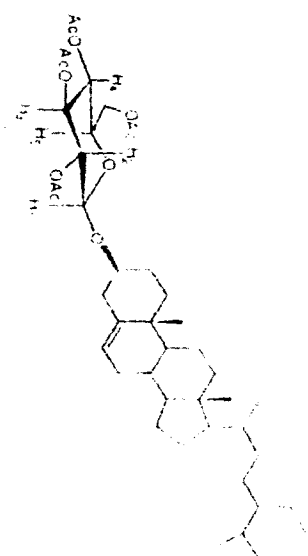
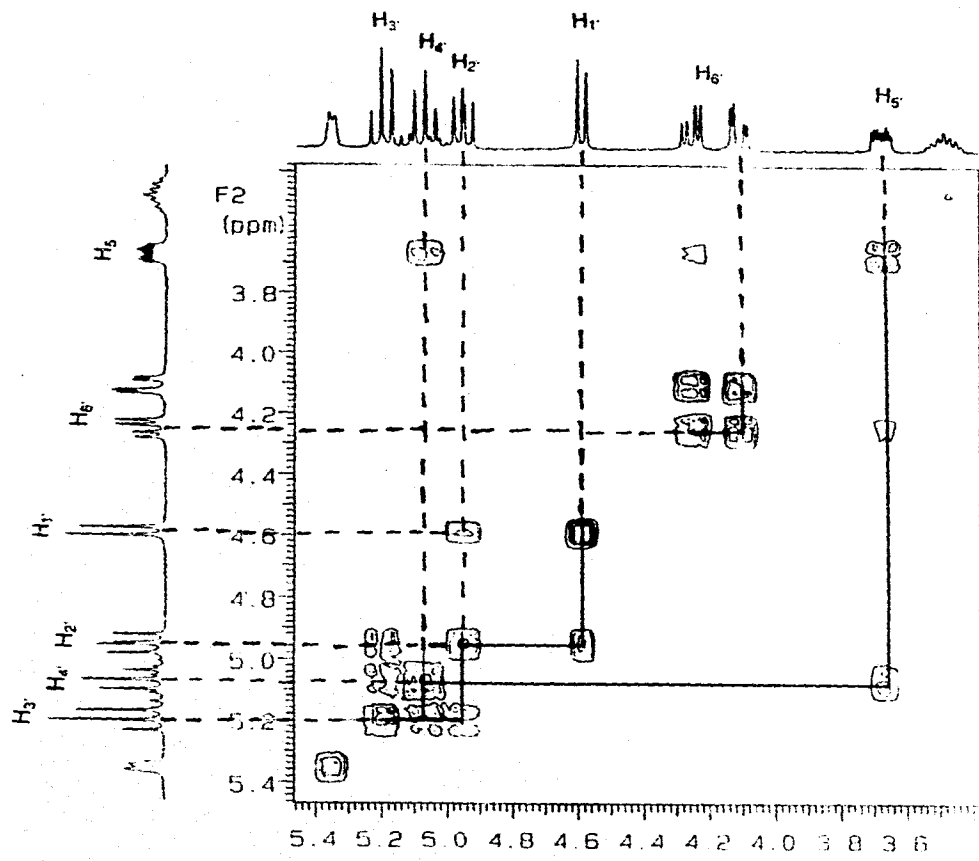


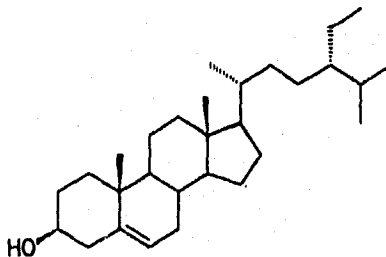
Figura 12. Correlaciones Observadas en el Espectro COSY H-H de 25.



Espectro 15.COSY H-H (CDCl₃, 300 MHz) de tetraacetil β-D-glucopiranosido de β-sitosterol (25).

Adicionalmente se observan señales que corresponden al fragmento no polar de la molécula (espectro 14): un doblete δ 5.35 que integra para un hidrógeno debido a un protón vinílico unido a metino. La ausencia de acoplamiento con otros hidrógenos olefinicos sugiere una doble ligadura trisustituida. Se observa también un doble de doble de doble δ 3.48 (J 4.8, 10.5, 15.9 Hz), que puede ser atribuido a un hidrógeno geminal a oxígeno, esta señal correlaciona con una señal de doble de doble de doble en δ 2.20, donde resuenan los hidrógenos alílicos. Se observan a campo alto las señales características de los metilenos de un esteroide: 0.67 (s), 0.81 (d, J 6.6), 0.83 (d, J 6.6), 0.92 (d, J 6.6).

En el espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , espectro 16) se observan cuatro señales en δ 170.60, 170.30, 169.30, 169.20, las cuales pueden ser atribuidas a los carbonos carbonílicos. En δ 140.30 y 122.10 se observan señales correspondientes a carbonos sp^2 , y se tienen también señales a alto campo de carbonos sp^3 . Para facilitar la determinación del tipo y número de carbonos que posee esta molécula se llevó a cabo un experimento DEPT con el cual se lograron identificar catorce metinos, doce metilenos diez metilos, tres carbonos cuaternarios y cuatro carbonos de carbonilo. Lo anterior implica un total de 43 carbonos de los cuales 14 son del azúcar acetilada (seis de la glucosa + ocho de cuatro acetatos) y 29 carbonos correspondientes a la parte no polar de la estructura con la que se forma el enlace glucosídico. El número de carbonos localizados para la parte no polar de permite confirmar que se trate de un esteroide según lo sugería el espectro de RMN ^1H (espectro 14). Dada la frecuencia de β -sitosterol (26) en productos naturales se procedió a la identificación de (25), por la comparación de los datos espectroscópicos del compuesto en estudio con los reportados para el β sitosterol (26, tabla 5 y 6).



26

Tabla 5. Datos de RMN¹H para los Compuestos 25 y 26.

Hidrogeno	25 ^a	26 ^b
3	3.48 (m)	3.52 (m)
6	5.36 (m)	5.35 (m)
18	0.67 (s)	0.69 (s)
19		1.01 (s)
21	0.92 (d) (6.6)	0.92 (d) (6.4)
26	0.86 (d) (6.6)	0.83 (d) (6.8)
27	0.81 (d) (6.6)	0.81 (d) (6.9)
29		0.85 (t) (7.8)

a Datos obtenidos en la presente investigación RMN¹H (CDCl₃, 300 MHz).

b Datos informados en la referencia 17.

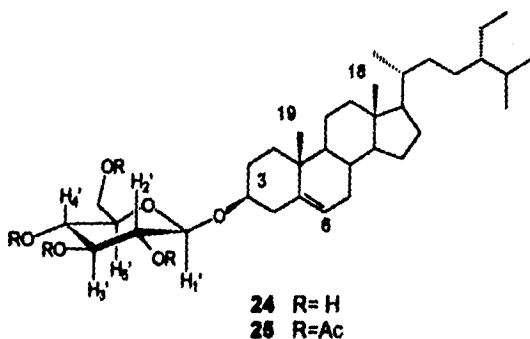
Tabla 6. Datos de RMN¹³C para los compuesto 25 y 26.

Carbono	25 ^a	26 ^b	Carbono	25 ^a	26 ^b	Carbono	25 ^a	26 ^b
1	37.33	37.20	11	21.09	21.05	21	18.68	18.77
2	31.63	31.88	12	39.79	39.75	22	33.95	33.94
3	71.73	71.71	13	42.37	42.33	23	26.10	26.09
4	42.20	42.33	14	56.75	56.76	24	45.82	45.84
5	140.71	140.35	15	24.15	24.28	25	29.15	29.15
6	121.63	122.00	16	28.25	28.22	26	19.77	19.79
7	31.96	31.88	17	56.02	56.05	27	19.21	19.33
8	31.81	31.88	18	11.84	11.84	28	23.13	23.08
9	51.13	51.22	19	19.46	19.33	29	11.04	11.82
10	36.43	36.70	20	36.07	36.12			

a Datos informados en la referencia 17.

b Datos obtenidos en la presente investigación RMN¹³C (CDCl₃, 75 MHz).

La mayor diferencia observada entre los datos informados para el β -sitosterol (26) y la parte no polar del derivado acetilado del compuesto aislado (25) se presenta en el desplazamiento químico de H-3, lo cual se explica porque con el oxígeno geminal a este hidrógeno se forma el enlace glucosídico. La integración de ambos fragmentos permite la identificación de este compuesto como el derivado peracetilado de β -D-glucopiranosido de β -sitosterol (25). La comparación directa con una muestra auténtica confirmó esta identidad, por lo que 24 es el producto natural de *L. porteri*.



Elucidación estructural de la Mezcla de Acil-Glucosil-Esteroles (27+28)

El siguiente compuesto aislado es un sólido amorfo (cromatográficamente homogéneo), el cual presenta en su espectro de IR (CHCl_3 , espectro 17) una banda intensa en 3450 cm^{-1} que sugiere la presencia de grupos hidroxilo, además bandas características de metilos y metilenos en 2931 y 2856 cm^{-1} , una banda en 1731 cm^{-1} correspondiente a carbonilo. El espectro de RMN^1H (CDCl_3 , 300 MHz, espectro 18) para este compuesto presenta un multiplete en δ 5.35 que indica la presencia hidrógenos vinílicos y se observan multipletes de δ 4.20 a 4.30 y δ 3.30 a 3.60 que pueden ser de hidrógenos geminales a oxígeno. Se decidió obtener y analizar el derivado peracetilado de este compuesto (o mezcla de compuestos), para facilitar su identificación estructural.

En el espectro de IR (CHCl_3 , espectro 19) del derivado acetilado (29+30), no se observan las señales atribuibles a hidroxilo, con lo que se confirma que se obtuvo el derivado peracetilado del producto natural. Se identificó la presencia de metilos y metilenos (2931 y 2856 cm^{-1}), y una señal (1755 cm^{-1}) correspondiente a los carbonilos.

El espectro de RMN^1H (CDCl_3 , espectro 20) de este compuesto presenta gran similitud con el obtenido para tetraacetil- β -D-glucopiranosido de β -sitosterol (25) por lo que sugiere que posean estructuras similares (Tabla 7.)

Tabla 7. RMN^1H de los compuestos 25 y 29+30

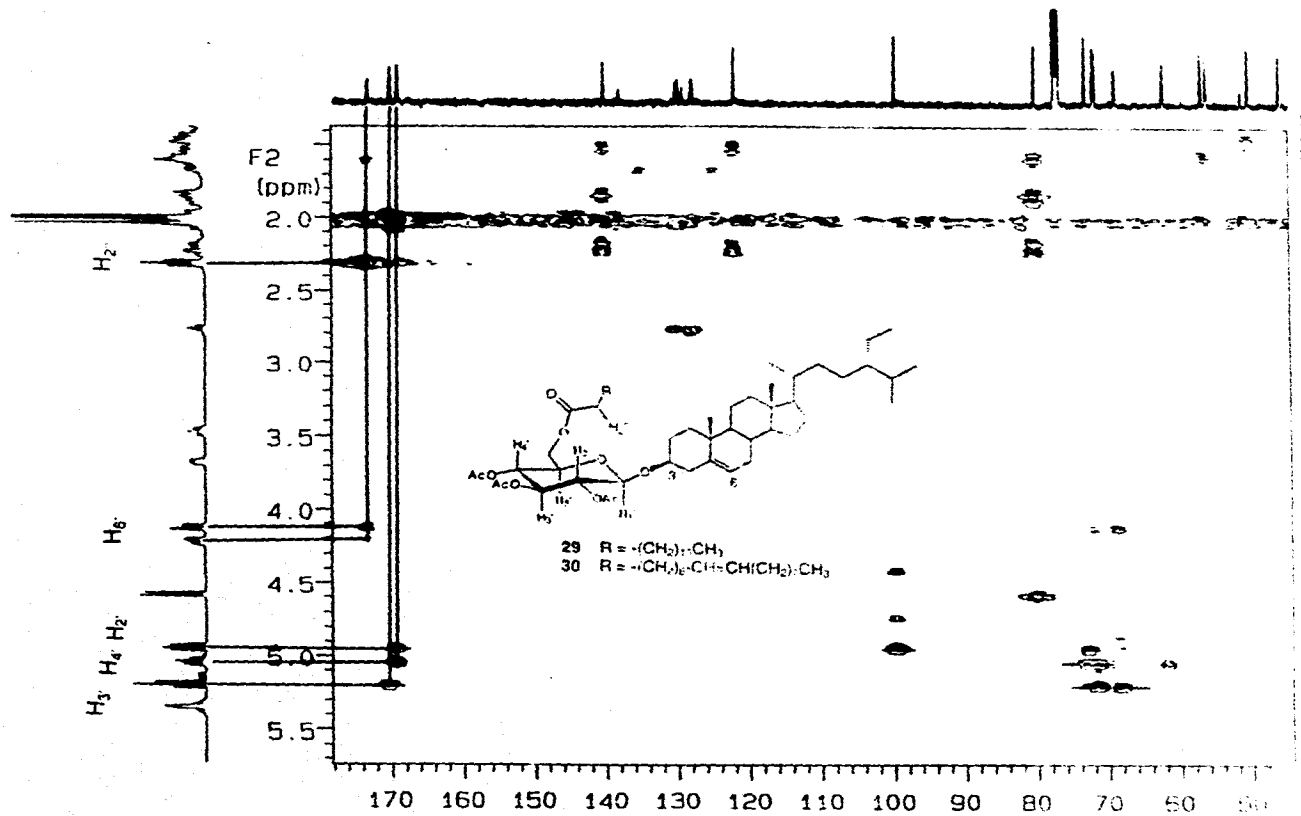
Hidrógeno	25	29+30
3	3.48 m	3.49
6	5.36 m	5.35 m
1'	4.58 d (8.0)	4.59 d (8.1)
2'	4.95 dd (7.8, 9.3)	4.94 dd (8.0, 9.5)
3'	5.20 (dd) (9.6, 9.3)	5.20 (t) (9.5)
4'	5.07 (dd) (9.3, 9.9)	5.04 (dt) (9.5,)
5'	3.67 (ddd) (2.4, 4.8, 9.9)	3.68 ddd (2.5, 5.0, 9.5)
6'	4.11 dd (2.5, 12) 4.25 dd (4.6, 12)	4.12 dd (3.0, 12) (4.22 ddd) (3.0, 5.0, 12.0)

Adicionalmente, en el espectro de RMN^1H (espectro 20) para este compuesto (29+30) solo se observan tres señales para metilos de acetato, en contraste con las cuatro señales que presenta el espectro de RMN^1H (espectro 14) del compuesto 25. Los datos descritos anteriormente y la evidencia en el espectro de IR (espectro 19) de una banda de absorción en 1731 cm^{-1} característica de carbonilo permite suponer que uno de los grupos hidroxilo del azúcar del producto natural se encuentre esterificado. Este grupo ester podría consistir en un ácido graso, ya que se localiza en el espectro de RMN^1H (espectro 20), un triplete δ 2.31 (J 4.5 Hz) que corresponde a un metileno α - al grupo carbonilo, y una señal

ancha en δ 1.30 que corresponde a los hidrógenos de una cadena alifática. La longitud de esta cadena se obtuvo por la integración del área bajo la curva para esta señal, calculándose que corresponde aproximadamente a un éster C18. Se observa además la señal característica para hidrógenos metilénicos doblemente alilílicos en δ 2.80. Sin embargo la integración observada para esta señal solo suma para un protón, lo que lleva a suponer que esta muestra este constituida por una mezcla de dos sustancias (29+30), que tiene el mismo comportamiento cromatográfico en CCF. La integración de la señal en δ 2.80 hace deducir que la estructura que incorpora un dieno homoconjugado en el éster (linoleilo) constituye un 50% de la mezcla. El 50% remanente se debe al éster completamente saturado, ya que en la zona de δ 4.80 a 5.50 se observan seis hidrógenos, de los cuales tres pertenecen al azúcar, y tres a hidrógenos vinílicos. La suma de los hidrogenos vinílicos para 29+30 es de seis, por lo que cada constituyente esta en proporción 1:1.

A continuación se determinará la ubicación del residuo lipídico en la glucopiranosas. De acuerdo a la tabla 7 se puede observar que la mayor diferencia entre los compuestos 25 y 29+30 se encuentra en el desplazamiento de los hidrógenos H-4' y H-6', por lo que presumiblemente la cadena lipídica podría estar esterificada en alguno de los oxígeno que se encuentran unidos a los C-4' y C-6'. De acuerdo a este razonamiento se buscaron compuestos análogos en la literatura que permitieran deducir la posición de la cadena lipídica, encontrándose una sustancia análoga esterificada en C-6', la cual fue aislada del extracto metanólico de *Typha latifolia* que presenta señales en δ 5.06 (dd, J 9.5) para H-4' y en δ 4.24 (dd, J 12.1, 5.3,) y 4.12 (dd, J 12, 2.2 Hz) para H-6' en comparación a las obtenidas para el compuesto en estudio δ 5.04 (dt, 9.5) y 4.11 (dd J 2.5, 12) y 4.25 (dd 4.6, 12)

Dada la diferencia mínima en los desplazamientos químicos y con el fin de establecer inambiguamente la ubicación del éster lipídico, se realizó el experimento HMBC para este compuesto, con el cual se establecieron las asignaciones de los carbonilos por su correlación con los hidrógenos a dos y tres enlaces σ (figura 13 y espectro 22). En el espectro HMBC (CDCl_3 , 125 MHz, espectro 22) se observan cuatro señales de grupos carbonilo δ 169.00, 170.00, 185.00 acopladas con los hidrógeno H-2', H-3', H-4' respectivamente, la señal δ 173 corresponde al carbonilo del ácido graso que fue identificado por su correlación con H-2'' y con el H-6'.



Espectro 22 HMBC (CDCl₃, 125 MHz) del derivado acetilado de la mezcla de acil-glucosil-esteroides (29+30).

corresponde al carbono del ácido graso que fue identificado por su correlación con H₂ en el H₁.

productos naturales 27 y 28. El análisis por espectrometría de masas con el cual sera posible determinar el largo de la cadena lipídica esta actualmente en proceso.

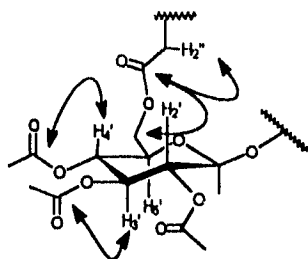
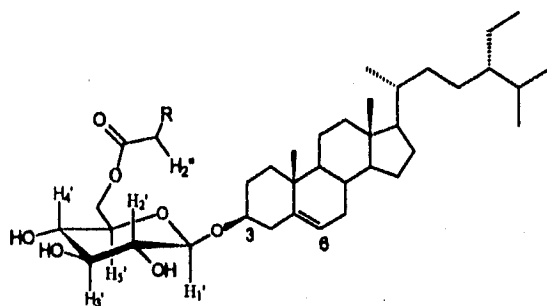
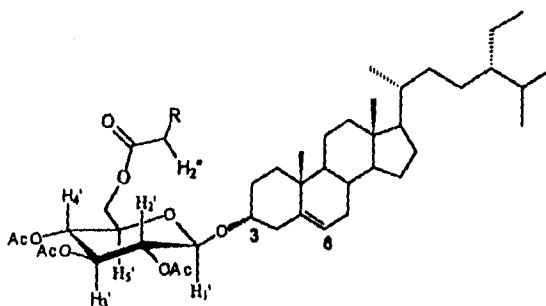


Figura 13. Correlaciones Observadas en el Espectro HMBC



27 R= $-(\text{CH}_2)_{15}-\text{CH}_3$

28 R= $-(\text{CH}_2)_6-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_7-\text{CH}_3$



29 R= $-(\text{CH}_2)_{15}-\text{CH}_3$

30 R= $-(\text{CH}_2)_6-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_7-\text{CH}_3$

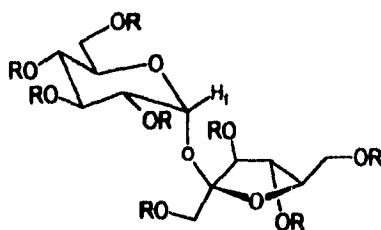
Elucidación estructural de β -D-fructopiranosido de α -D-glucopiranosilo (31).

El último compuesto obtenido es un sólido cristalino, el cual presenta en su espectro de RMN¹H (MeOD, 200 MHz, espectro 23), un doblete en δ 5.41 que integra para un hidrógeno cuyo desplazamiento químico y multiplicidad sugiere la presencia del hidrógeno anomérico de un azúcar, señales múltiples de δ 3.2 a 4.2 correspondientes a hidrógenos geminales a oxígeno cuya área bajo la curva integra para catorce hidrógenos. Se decidió obtener el derivado acetilado de este compuesto para facilitar su determinación estructural.

El espectro de RMN¹H (CDCl₃, 300 MHz, espectro 24) para el derivado acetilado, presenta siete singuletes en δ 2.17, 2.12, 2.11, 2.09, 2.05, 2.04, 2.01 cuya integración del área bajo la curva corresponde a 24 hidrógenos correspondientes a ocho metilos de acetato, lo que implica un total de ocho hidroxilos en el producto natural.

Se observa una señal con multiplicidad de doblete en δ 5.68 (1H, J 3.66) la cual sugiere que corresponda a hidrógeno anomérico de un azúcar en posición ecuatorial, y fue asignado como H-1. El doble de doble en δ 4.88 (1H, J 3.66, 10.30) fue asignado a H-2, un doble de doble en δ 5.44 (1H, 9.6, 10.3, H-3) la constante en común (J 10.3) de estos doblete de dobles sugiere un ángulo diedro mayor a 90°. Un triplete en δ 5.07 (1H, J 10.0) fue asignado

perteneciente a H-4. Se observan también un triplete en δ 5.37 (1H, J 6.0) y doblete δ 5.45 (1H, J 6.9). Además se observan señales múltiples de δ 4.08 a 4.34 cuya área bajo la curva integra para ocho hidrógenos. Los datos espectroscópicos antes descritos pudieron identificar a este compuesto como octaacetil β -D-fructopiranosido de α -D-glucopiranosido (32). La comparación directa con una muestra auténtica permitió confirmar la identidad de esta sustancia por lo tanto 31 es el producto natural.



31 R=H
32 R=Ac

Bioensayos preliminares.

Se realizaron pruebas de toxicidad para *Artemia salina*, antimicrobianas y de fitotoxicidad como bioensayos preliminares para los compuestos aislados.

Toxicidad para *Artemia salina*.

El bioensayo de Toxicidad para *Artemia salina*¹⁸ representa una buena alternativa para detectar compuestos con posible actividad biológica, y provee una buena información preliminar para realizar pruebas específicas posteriores. Es muy utilizado para realizar fraccionamiento dirigidos de extractos crudos debido a que la técnica que se emplea es sencilla y produce resultados rápidos y reproducibles. Aunque si bien no se ha logrado

comprobar que la toxicidad para *Artemia salina* correlacione con actividad citotóxica o antimicrobiana, un resultado positivo puede ser indicativo de estas propiedades.

Por estas razones se llevó a cabo este bioensayo para los compuestos caracterizados de este material vegetal según la técnica que se describe en la sección experimental. Los resultados de CL_{50} , fueron obtenidos mediante el trazo del gráfico log C contra el porcentaje de mortalidad. En la tabla 8 se muestran los valores de CL_{50} para *Artemia salina* de cada uno de los compuestos aislados.

Tabla 8. CL_{50} para *Artemia salina*.

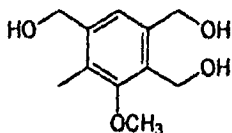
substancia	CL_{50}
toquinólido B	517
diligustilido	>1000
ácido 4-hidroxi-3-metoxicinámico	177
glucosil esterol	>1000

Fitotoxicidad (Bioensayo de gota).

Debido a la importancia de la obtención de sustancias con actividad herbicida que puedan ser utilizadas como modelos sintéticos para la producción de nuevos herbicidas se hace necesaria la evaluación de los constituyentes de *L. porteri*. Por lo cual se llevó a cabo el bioensayo de gota como prueba para la identificación de una posible actividad fitotóxica de los compuestos aislados. Este bioensayo se considera que la producción de necrosis o clorosis en la especie vegetal como resultado positivo.

Los resultados obtenidos para toquinólido B (10), diligustilido (13), trans-6, 7-dihidroxi-ligustilido (senkyunólido I, 22) en este bioensayo utilizando hojas de *Tagetes erecta*, son negativos, y para ácido 4-hidroxi-3-metoxi-cinámico (15) se produce cierto daño pero que no es comparable al observado algunas fitotoxinas por ejemplo zinniol (33) el cual es una fitotoxina activa comúnmente producida por hongos pertenecientes al género

*Alternaria*²³ y que fué utilizada en el presente trabajo como referencia de un resultado positivo.



33

Pruebas antimicrobianas

Adicionalmente se realizó la evaluación antimicrobiana de toquinólí B (10), ácido ferúlico (15) y diligustilido (13) para *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris* y *Candida albicans*, encontrándose que la concentración mínima inhibitoria (C.M.I) es mayor a 0.4. Esto indica que los compuestos evaluados no presentan propiedades antimicrobianas. En esta evaluación se emplearon como referencia positiva gentamicina y nistatina.²⁰

Se mencionó en la introducción del presente trabajo que algunos osos mastican la raíz de *L. portell* y el emplaste lo aplican en su piel, presumiblemente con fines antisépticos. Los resultados de las pruebas antimicrobianas no estan de acuerdo con esta presunción. Es probable que este hecho obedezca a otros efectos, tal vez de naturaleza sedante, sobre el animal.

Materiales y Equipos

El análisis en cromatografía en capa fina se llevó a cabo en cromatofolios Alugram SilG/UV, Macherey-Nagel Duren y se empleo como revelador una lampara de UV Spectronile Modelo ex-20 a 365, 254 nm y una solución de sulfato cérico amónico al 1% en ácido sulfúrico 2N.

Se empleo silica gel MercK malla 70-230 y 60 GF para las columnas cromatográficas

Los espectros de RMN¹ H se obtuvieron con un espectrómetro analítico Varian XR-300 a 300 MHz y un instrumento Varian 500 MHz para ciertos experimentos, usando como disolvente CDCl₃ y MeOD segun el caso, y como referencia tetrametilsilano (TMS).

Los espectros de IR se obtuvieron en un espectrómetro Perkin-Elmer 283-B.

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fischer-Johns y no se encuentran corregidos.

Para el ensayo de toxicidad de Artemia salina

Pecera

Lámpara

Un regulador de temperatura (Visitherm).

Agua de mar artificial (Instant Ocean).

Huevecillos de *Artemia salina*.

Para el ensayo de fitotoxicidad.

5 cajas petri de 10 cm de diámetro.

Una placa preparativa de silica gel de 5 mm de espesor.

Hojas de *Tagetes erecta*.

DESARROLLO EXPERIMENTAL.

El material vegetal en estudio fué proporcionado e identificado por el Dr. Robert Bye del Instituto de Biología de la UNAM. El material fué adquirido como material de investigación en el mercado de Sonora de la Ciudad de México. Cinco kilogramos de raíces de *L. porteri* se dejaron secar a temperatura ambiente, fueron molidas y posteriormente extraídas con hexano mediante tres maceraciones sucesivas, empleando 5 litros de disolvente en cada una y dejando en contacto con el disolvente por 48 hrs. El disolvente fue evaporado a presión reducida y el residuo vegetal fue sometido a maceración con acetona y metanol, siguiendo el procedimiento antes descrito. Se obtuvieron 262, 292 y 190 g de extracto hexánico, acetónico y metanólico respectivamente. (Diagrama 1)

En forma particular en el presente trabajo se realizó el estudio del extracto metanólico para lo cual este se fraccionó en mezclas menos complejas, mediante el uso de cromatografía en columna.

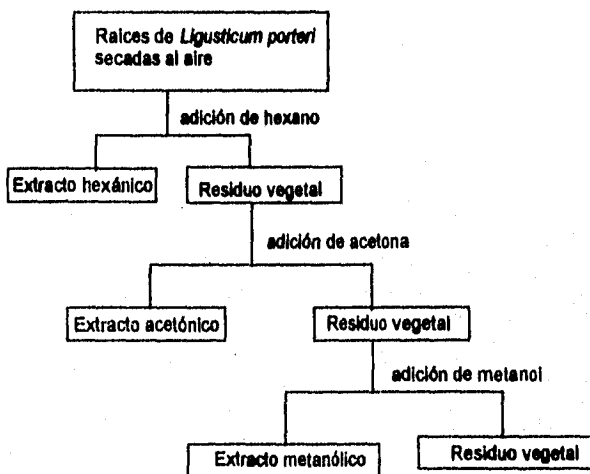


Diagrama 1

Fraccionamiento del extracto metanólico de la raíz de *Ligusticum porteri*.

El extracto metanólico (190 g) fué adsorbido en sílica gel 70-230 en relación 1:1 y fué aplicado a una columna empacada con sílica gel Merck 60 GF en relación 1:5. Esta columna se realizó por medio de elución al vacío usando mezclas de disolventes con incremento de polaridad. (Diagrama 2)²¹

Se obtuvieron 137 fracciones de 500 ml, las cuales se evaporaron a presión reducida y fueron reunidas de acuerdo a su análisis de cromatografía en capa fina como se muestra en la tabla 9.

Tabla 9. Datos de Elución de la Columna Principal.

Eluyente	Fracción	Fracción final	Compuesto aislado
Hexano-acetato de etilo 85-15	1 y 2	A	Derivado de Glicerol
Hexano-acetato de etilo 85-15	3 a 5	B	Toquinólido B
Hexano-acetato de etilo 85-15	6 a 9	C	Diligustilido
Hexano-acetato de etilo 60-40	20 a 22	D	*
Hexano-acetato de etilo 60-40	23-33	E	Ácido ferúlico
Hexano-acetato de etilo 60-40	34-42	F	Senkyunólido I
Hexano-acetato de etilo 40-60	43-47	G	Acilglucosil esterol
Hexano-acetato de etilo 40-60	48-58	H	*
Cloroformo	59-71	I	*
Cloroformo-metanol 90-10	72-86	J	Glucosil esterol
Cloroformo-metanol 75-25	87-96	K	*
Cloroformo-metanol 50-50	97-137	L	Sacarosa

Procedimiento de Extracción y Aislamiento de los Constituyentes del Vegetal

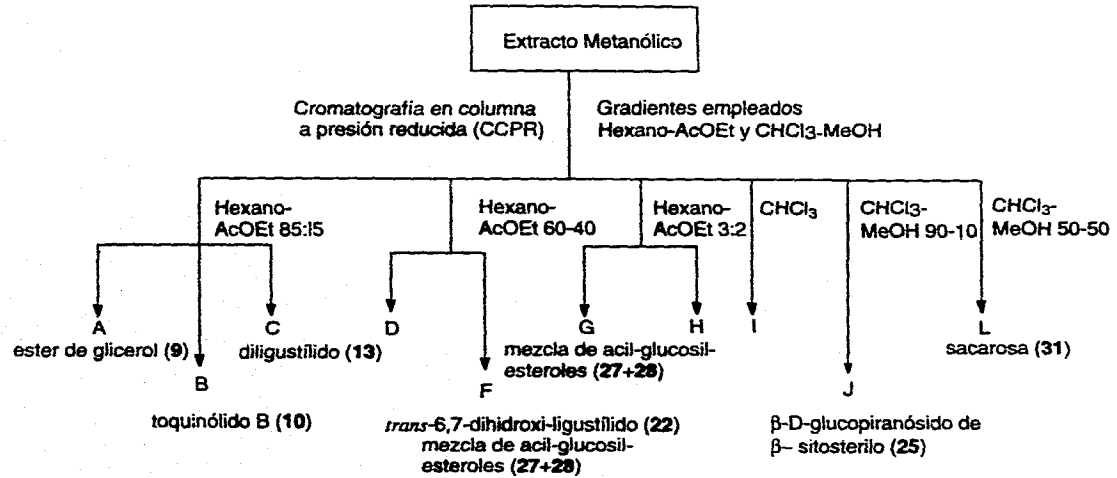


Diagrama 2

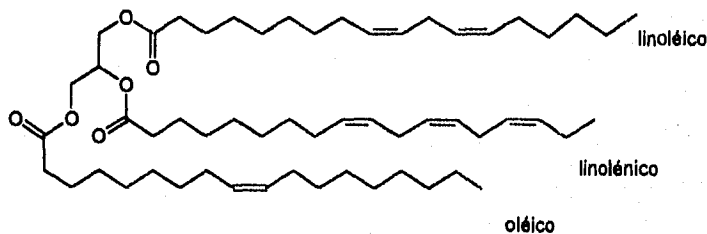
Aislamiento del Derivado de Glicerol (9)

La fracción A presenta una gran complejidad al ser analizada por medio de cromatografía en capa fina (CCF) por lo que se tomaron 2 g y se resolvieron en sus componentes principales por medio de cromatografía en columna a presión normal (CC). Este extracto fue adsorbido en sílica gel 70-230 en relación 1:1 y empacado en una columna cromatográfica de 2.5 cm de diámetro y 25 cm de altura empacada con sílica 60 GF, usando como eluyentes mezclas de hexano-acetato de etilo. Se obtuvieron 92 fracciones de 40 ml aproximadamente, se les evaporó el disolvente y se analizaron por CCF, reuniéndose en tres grupos (a, b, c). Las fracciones a y c no fueron analizadas porque presentaban poca homogeneidad en esta técnica. La fracción b (50 mg) presenta una mancha homogénea, por lo cual se aplicó este extracto en una placa preparativa y fue eluida dos veces con una mezcla de hexano-acetato de etilo (86-14). Obteniéndose 20 mg de (9), cuyas características se mencionan a continuación:

Aceite amarillo.

IR ν_{max} cm^{-1} ($CHCl_3$, espectro 1) 3009, 1746.

RMN¹H (300MHz, $CDCl_3$, espectro 2): δ , asignaciones: 5.35 (12H, m, $CH=CH$), 4.11 a 4.30 (H, m, $H-COO$), 2.80 (6H, $C=C-CH_2-C=C$), (12H, m, $C=C-CH$), 1.25 (60 H, s, CH_2).



9

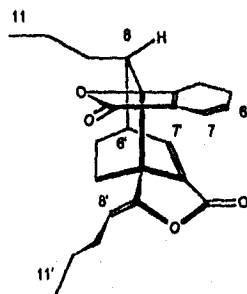
Aislamiento de Toquinólido B (10).

La fracción B (5.1 g) fué resuelta en sus componentes por medio de cromatografía en columna a presión reducida (CCPR), para lo cual el extracto se adsorbió en 5 g de sílica gel 70-230 y aplicada a una columna cromatográfica de 4 cm de diámetro y 5 cm de altura empacada con sílica gel 60 GF.

Se eluyó la columna con mezclas de hexano-acetato de etilo por medio de vacío. Las fracciones de menor polaridad se reunieron y en estas se formaron cristales, los cuales fueron lavados con hexano-acetato de etilo 96-4 y filtrados al vacío. Estos cristales (400 mg) fueron recristalizados de acetona y fueron identificados como toquinólido B (10). Sus datos físicos y espectroscópicos son:

IR ν_{max} cm^{-1} ($CHCl_3$, espectro 3) 2962, 2935, 1755, 1705 y 1662 cm^{-1} .

RMN¹H ($CDCl_3$, 300MHz, espectro 4): δ , asignaciones: 0.81 (3H, t, J 7.2Hz, H-11); 0.88 (3H, t, J 7.2 Hz, H-11'); 3.11(1H, m, H-6'); 4.65 (1H, dd, J 8.7, 6.6 Hz, H-8'); 5.92 (1H, dt, J 3.9, 9.3 Hz, H-6); 6.17 (1H, dt, J 2.1, 9.3 Hz, H-7); 7.52 (1H, d, J 6.0 Hz, H-7').



(10)

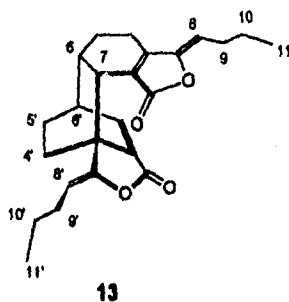
Aislamiento de Diligustilido (13).

En la fracción C se formó un sólido cristalino, el cual se lavó con hexano-acetato de etilo 95-5 y se filtró al vacío. Se recrystalizó de acetona y se identificó como diligustilido (13)¹³ (1203 mg) sus datos físicos y espectroscópicos son:

p.f: 123 °C

IR ν_{max} cm^{-1} (CHCl₃, espectro 5) 2962, 2935, 1759, 1710, 1661, 1631.

RMN¹H (CDCl₃, 300 MHz, espectro 6): δ , asignaciones: 0.92 (6H, t, J 7.5 Hz, H11 y H11'); 2.55 (1H, m, H-6); 2.99 (1H, dddd, H-6'), d 3.23 (1H, J 8.7 Hz, H-7), 5.00 (1H, t, J 7.5 Hz, H-8'); 5.07 (1H, t, J 8.1 Hz, H-8); 7.35 (1H, d, J 6.0 Hz, H-7').

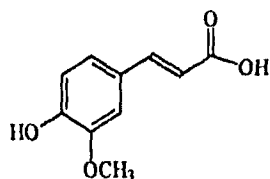


Aislamiento de Acido 4-Hidroxi-3-Metoxi-Cinámico (15).

La fracción E (7.1174 g) fue resuelta en sus componentes cromatográficos por medio de CCPR, para lo cual se adsorbió en 9 g de sílica gel 70-230 y se aplicó a una columna de 5 cm de altura y 4 cm de diámetro empacada con sílica gel para placa. Se eluyó con mezclas de hexano-acetona. De las fracciones de menor polaridad se obtuvo un sólido amarillo (739 mg), el cual fue recrystalizado de acetona. Se identificó con ácido 4-hidroxi-3-metoxi-cinámico(15)⁴ y sus datos físicos y espectroscópicos son los siguientes:

IR ν_{max} cm^{-1} (KBr, espectro 7) 3438, 2594 a 3016, 1691, 1660, 1600.

RMN¹H (300 MHz, CDCl₃, espectro 8): δ , asignación: 3.91 (3H, s, -OCH₃); 6.26 (1H, d, 15.9 Hz,); 6.89 (1H, d, J 8.1 Hz); 7.00 (1H, d, J 1.8 Hz); 7.04 (1H, dd, J 8.1, 1.8 Hz); 7.61 (1H, d, 15.9 Hz,).



15

Aislamiento de Senkyunólido I (22).

La fracción F (1 g) fué resuelta en sus componentes principales por medio de CCPR para lo cual este extracto fué adsorbido en 1g de silica gel 70-230 y aplicada a una columna de 5 cm de diámetro y de 4 cm de altura empacada con silica gel 60 GF. Esta columna fué eluida con mezclas de hexano-acetato de etilo con incrementos de polaridad obteniéndose 15 fracciones, las cuales fueron reunidas de acuerdo a su análisis por CCF (tabla 2)

Tabla 9. Datos de elución para la obtención de senkyunólido I (22).

Fraciones	Compuesto aislado
1 a 3	*
4 a 11	senkyunólido I (23)
11 a 15	acilglucosil esterol

Las fracciones 4-11 (800 mg) de esta columna presentan una mancha homogénea bajo el análisis de CCF, que revela al UV 254 nm por lo cual fueron purificadas por medio de la técnica CCPR, obteniéndose un semisólido amarillento (200 mg), el cual fué identificado como Senkyunólido I(22)¹⁶ sus datos espectroscopicos son:

IR ν_{max} (CHCl₃, espectro 9): 3416, 2960, 2875, 1751, 1678, 1618 cm⁻¹.

RMN¹H (CDCl₃, 300 MHz, espectro 12): δ, asignación: 5.29 (1H, d, J 7.60, H-8); 4.45 (1H, d, J 5.7, H-7); 3.97 (1H, ddd, J 3.0, 5.7, 8.7); 2.33 (2H, c, J 7.45, H-9); 0.94 (3H, t, J 7.17, H-11).

RMN¹³C (CDCl₃, 75 MHz, espectro 6), asignación: 169.23 (C-1); 114.21 (C-3); 114.21 (C-8); 71.40 (C-7); 67.06 (C-6); 28.00 (C-5); 26.16 (C-4); 22.16 (C-9); 18.77 (C-10); 13.67 (C-11).

Aislamiento de la Mezcla de Acil-Glucosil-Esteroles (27+28).

La fracción G (3.5 g) fue resuelta en sus componentes cromatográficos por medio de la técnica de CCPR usando como eluyente hexano-acetato de etilo. Las fracciones de mayor polaridad fueron reunidas y recromatografiadas obteniéndose un aceite viscoso (200 mg), el cual fue identificado como mezcla de acil-glucosil-esteroles. Los datos experimentales de los productos natural se presentan a continuación,

IR ν_{max} cm⁻¹ (CHCl₃, espectro 17): 3450, 2931, 2856 y 1731.

RMN¹H (CDCl₃, 500 MHz, espectro 18): δ, asignación: 5.35 (m, H-6); 3.30-3.60 (m), 4.20 a 4.30 (m)

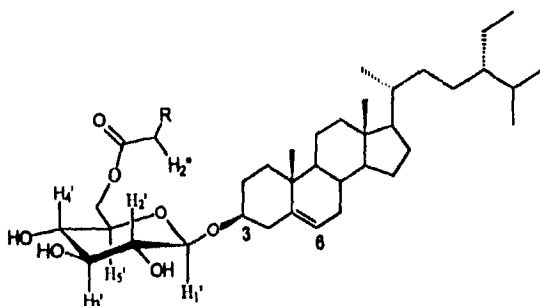
Obtencion del Derivado Peracetilado de la Mezcla de Acil-Glucosil-Esteroles (27+28).

El procedimiento que se siguió para la obtencion del derivado peracetilado de la mezcla de acil-glucosil-esteroles se describe a continuación: 100mg de la mezcla de acil-glucosil-esterol se colocaron en un matraz bola de 25 ml, se le añadió 1 ml de piridina y 1 ml de anhídrido acético. Esta mezcla se dejó a temperatura ambiente bajo agitación constante y se monitoreo por medio de CCF. Al término de la reacción se añadieron 2 g de hielo y se dejó la mezcla de reacción en agitación constante una hora más. Esta mezcla se extrajo con acetato de etilo 5 veces, los extractos orgánicos se reunieron y lavaron primero con ácido clorhídrico al 10 %, después con bicarbonato de sodio al 10% y finalmente se lavó con una solución saturada de NaCl. Se evapora el disolvente a presión reducida obteniéndose 98 mg

de un sólido blanco el cual fué caracterizado como el derivado acetilado de la mezcla de acil-glucosil-esteres (29+30) y cuyos datos espectroscopicos son los siguientes:

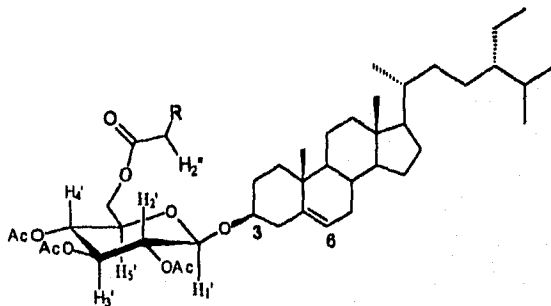
IR ν_{\max} cm^{-1} (CHCl_3 , espectro 19) 2931, 2856, 1755.

RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz, espectro 20): δ , asignación: 5.35 (1H, m, H-6); 5.04 (1H, dt, J 9.5, H-4'); 4.94 (1H, dd, J 8.0, 9.5, H-2'); 4.59 (1H, d, J 8.1, H-1'); 4.22 (1H, ddd, J 3.0, 5.0, 12.0 H-6'); 4.12 (1H, dd, J 3.0, 12.0 H-6'); 3.68 (1H, ddd, J 2.5, 5.0, 9.5 H-5'); 3.49 (1H, m H-3).



27 R= $-(\text{CH}_2)_{15}-\text{CH}_3$

28 R= $-(\text{CH}_2)_8-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_7-\text{CH}_3$



27 R= $-(\text{CH}_2)_{15}-\text{CH}_3$

28 R= $-(\text{CH}_2)_8-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_7-\text{CH}_3$

Obtención del derivado Peracetilado de β -D-Glucopiranosido de β -Sitosterilo (25).

La fracción J fue resuelta en sus componentes por medio de CCPR. En las fracciones de mayor polaridad se observa la formación de un sólido (200 mg) cuyas características de solubilidad permiten suponer que se trate de un compuesto que posea una parte polar y otra no polar. Se decidió realizar una reacción de acetilación de este compuesto para facilitar su identificación estructural y su mejor manejo, para lo cual se siguió la técnica antes descrita.

Este fue identificado como el derivado peracetilado de β -D-glucopiranosido de β sitoesterilo (25):

p.f. >270 °C

IR ν máx cm^{-1} (CHCl_3 , espectro 13) 2958, 2869 y 1755.

RMN^1H (CDCl_3 , 300 MHz, espectro 14): δ , asignación: 5.36 (1H, m, H-6); 3.48 (1H, m, H-3); 0.92 (s, H-21), 0.86 (d, J 6.6, H-26); 0.81 (d, J 6.6, H-27); 0.06(s, H-18).

RMN^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz, espectro 16) δ , asignación: 140.35 (C-5), 122.00 (C-6); 71.71 (C-3); 56.76 (C-14); 56.05 (C-17); 51.22 (C-9) 45.84 (C-24); 42.33(C-13); 39.75(C-12); 37.20(C-1); 33.94(C-22); 31.88(C-2) 28.22 (C-16); 26.09 (C-23); 23.08 (C-28); 24.28 (C-18); 21.05 (C-11); 19.79(C-26); 19.33 (C-19); 18.77 (C-21); 18.77 (C-21); 11.84 (C-18) 11.82 (C-29).

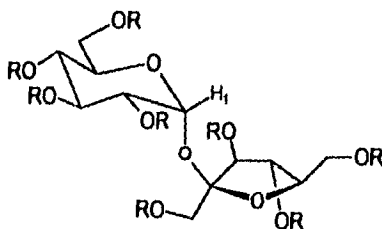
Aislamiento de β -D Fructopiranosido de α -D Glucopiranosilo (31).

En la fracción L se observa la formación de un sólido el cual fue recrystalizado de metanol e identificado como β -D fructopiranosido de α -D glucopiranosilo (31), por medio del análisis de los datos espectroscópicos obtenidos a su derivado peracetilado (32).

A continuación se presentan los datos espectroscopicos del compuesto (32):

Aceite amarillo

RMN¹H (CDCl₃, 300 MHz, espectro 24); 5.68 (1H, d J 3.66, H-1); 5.37 (1H, t, J 6.0); 5.44 (1H, dd, J 9.6, 10.30, H-3); 5.45 (1H, d, J 6.9); 5.07 (1H, t, J 10, H-4); 4.88 (1H, dd, J 3.66, H-2); 4.08-4.34 (8H, m); 2.17 (s), 2.12(s), 2.11 (s), 2.09 (s), 2.05 (s), 2.01 (s).



31 R=H

32 R=Ac

Pruebas Biológicas.

Ensayo de *Artemia salina*.¹⁸

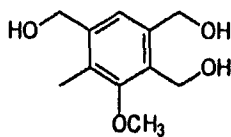
Se pesaron 20 mg de cada uno de los compuestos evaluados y se disolvieron en 2ml de acetona.

De esta solución se tomaron 500, 50 y 5 µl (10, 100, 1000 ppm) y añadieron en tres viales, haciendo 3 repeticiones de cada concentración se dejó evaporar el solvente durante toda la noche. Se añadieron 5ml de agua salada y 10 *Artemias* a cada uno de los viales. Después de 24 hrs se contó el número de artemias muertas y vivas.

Ensayo de Fitotoxicidad (Bioensayo de gota).¹⁹

El material vegetal (hojas de *Tagetes erecta*) fué raspado suavemente con ayuda de un pincel corto en el envés foliar para remover la cutícula. La hoja fué colocada en una caja petri de 10 cm de diámetro conteniendo dos hojas de papel filtro humedecidas con 5 ml de agua destilada. Sobre cada punto se aplicaron 20 µl de agua destilada. Por otra parte la muestra fué disuelta al 1% en un disolvente orgánico y 5 µl de esta solución fueron

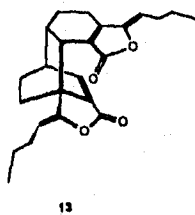
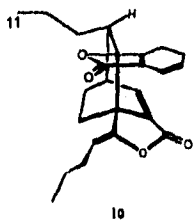
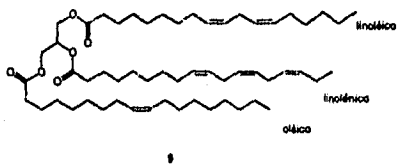
adsorbidos en gel de sílice (0.5 cm). El disolvente se dejó evaporar y el adsorbente impregnado fué adicionado a la gota de agua aplicada anteriormente. Como control se utilizó gel de sílice impregnada con el disolvente utilizado. Se realiza la lectura de este bioensayo cada 24 hrs por tres días, una prueba positiva produce necrosis en el vegetal. La referencia utilizada como prueba positiva fué zinniol (33), el cual es una fitotoxina comunmente producida por el genero *Alternaria*.¹⁹

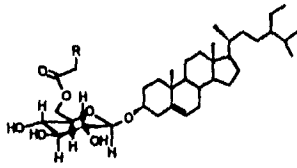
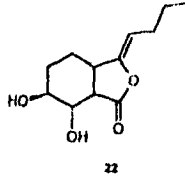
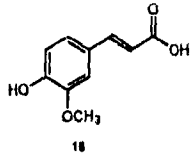


33

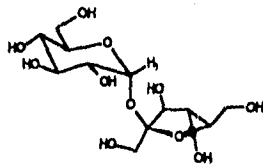
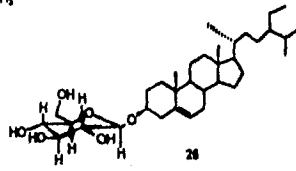
CONCLUSIONES.

Del extracto metanólico de la raíz de *Ligusticum porteri* se aislaron y caracterizaron los metabolitos siguientes: un derivado de glicerol (9), toquinólido B (10) y diligustilido (13), ácido ferúlico (15), trans-6,7-dihidroxi-ligustilido (senkyunólido I, 22), β -D glucopiranosido de β -sitosterilo (25), una mezcla de acil-glucosil-esteroles (27+28), y β -D-fructopiranosido de α -D-glucopiranosilo (31).



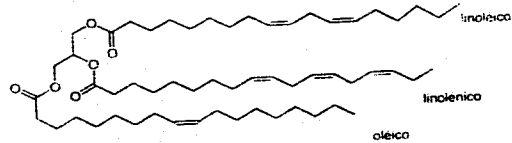


27 R = (CH₂)₁₁CH₃
 28 R = (CH₂)₇CH(CH₃)₂CH₃

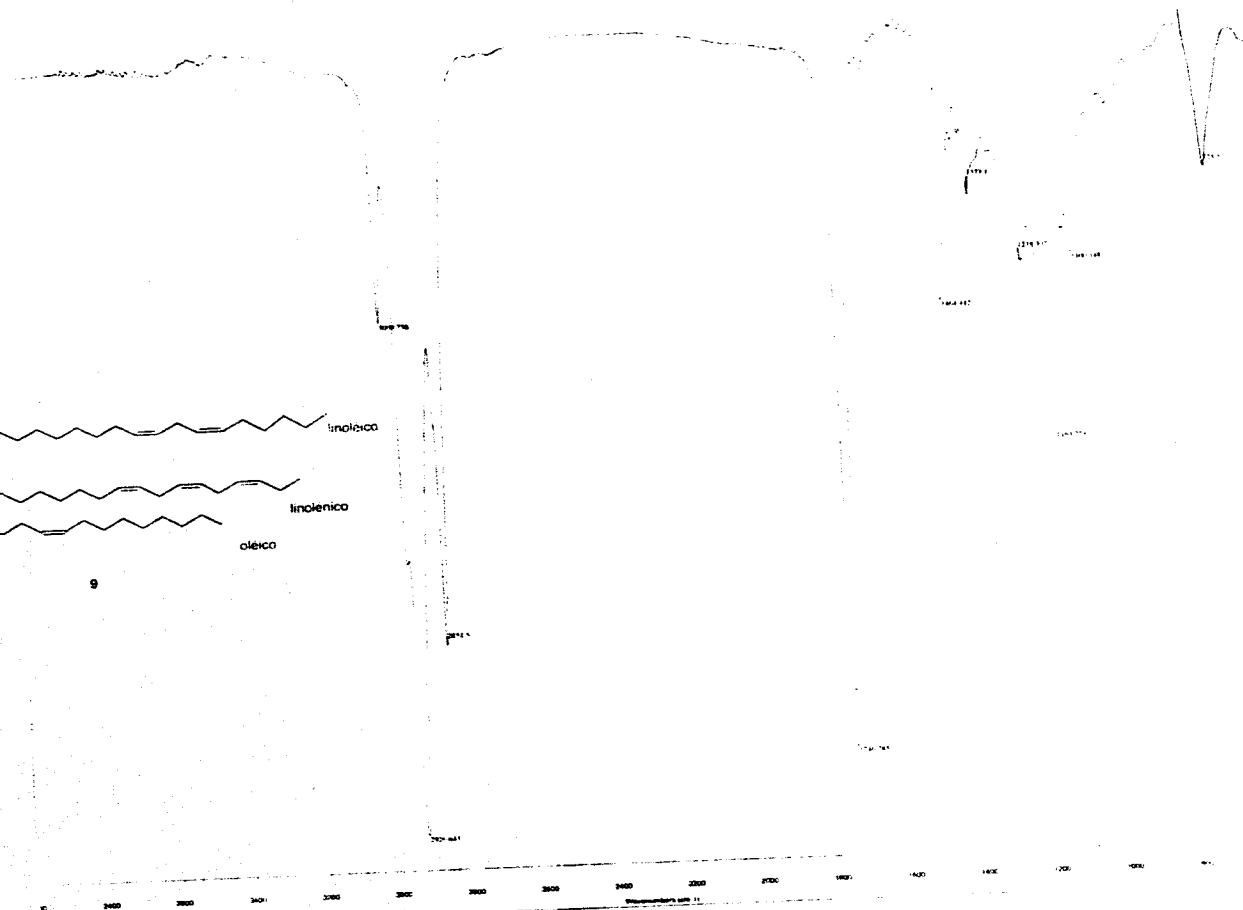


De acuerdo a estos resultados se puede concluir que el extracto metanólico de esta especie vegetal esta constituido principalmente por azúcares, derivados de esteroleos y frálidos. Se ha informado que estos últimos son compuestos bioactivos por lo que son responsable de las propiedades medicinales atribuidas a esta planta, aunque los esteroleos y azúcares podrían ser coadyuvantes para la actividad biológica registrada para las preparaciones medicinales que emplean este vegetal.

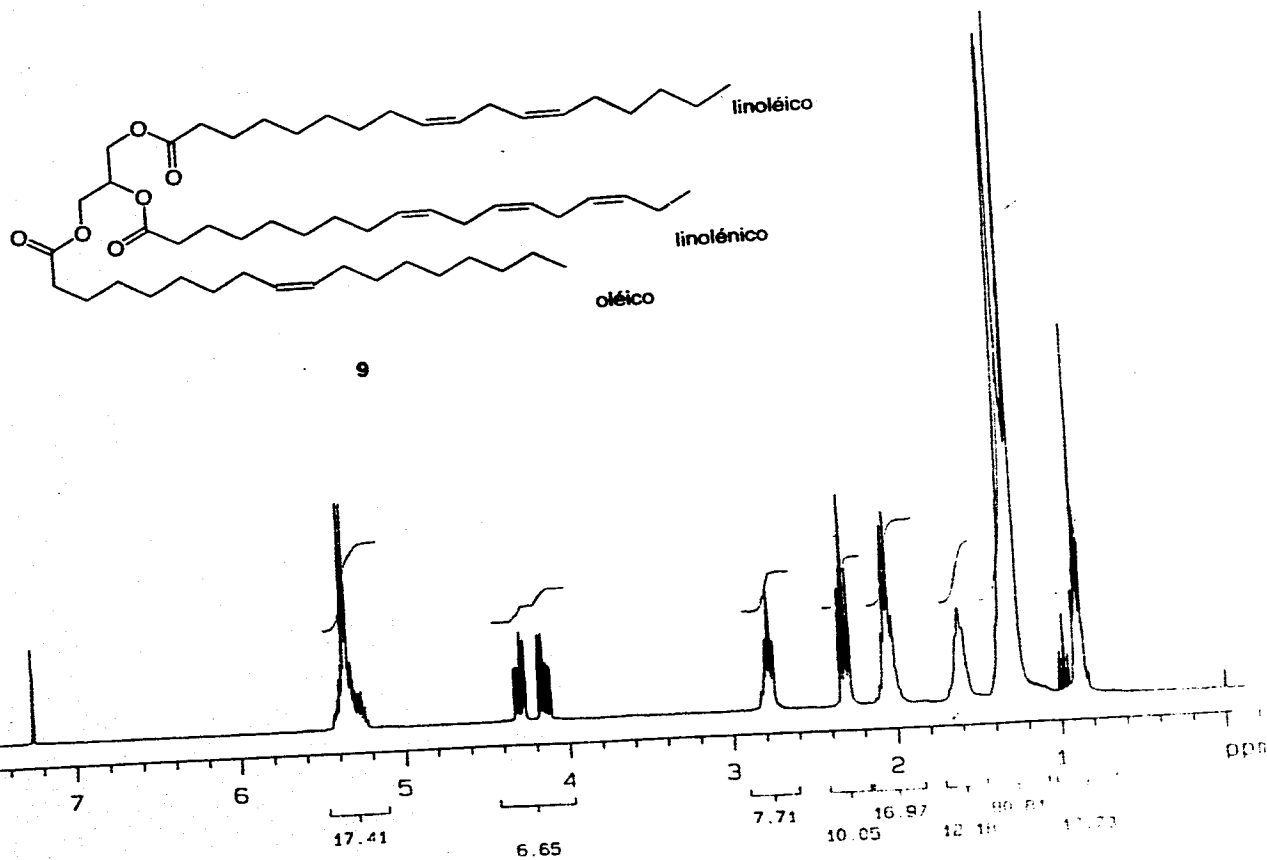
Los resultados obtenidos para los bioensayos preliminares en pruebas de toxicidad a *Artemia salina*, fitotoxicidad y antimicrobianas que se realizaron a toquinólido B (10), diligustilido (13), ácido 4-hidroxi-3-metoxi-cinámico (15) y trans-6,7-dihidroxi-ligustilido (senkyunólido I, 22) permitieron concluir que: el toquinólido B (10) presenta actividad en el bioensayo de *Artemia salina* por lo que es conveniente su posterior evaluación en pruebas de citotoxicidad. El que no se haya encontrado fitotoxicidad de las sustancias ensayadas frente a *Tagetes erecta* puede explicarse debido a que las sustancias de *L. porteri* se encuentran en la raíz, y no se esperaría que fueran tóxicas a partes aéreas de otra planta. La inactividad de las sustancias aisladas del extracto metánolico de *L. porteri* como agentes antimicrobianos permite descartar la utilidad de ciertas preparaciones con características presumiblemente antisépticas.



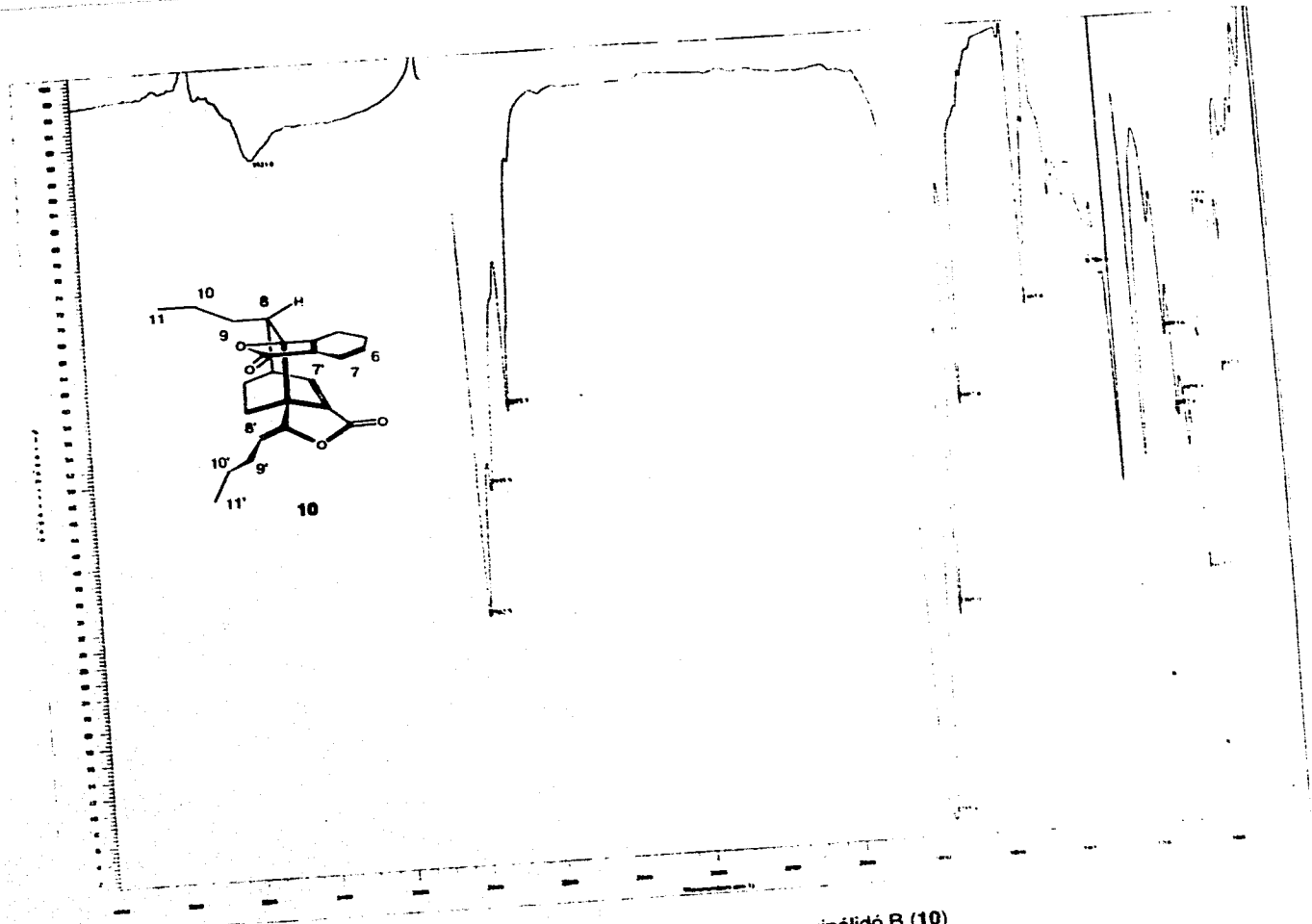
9



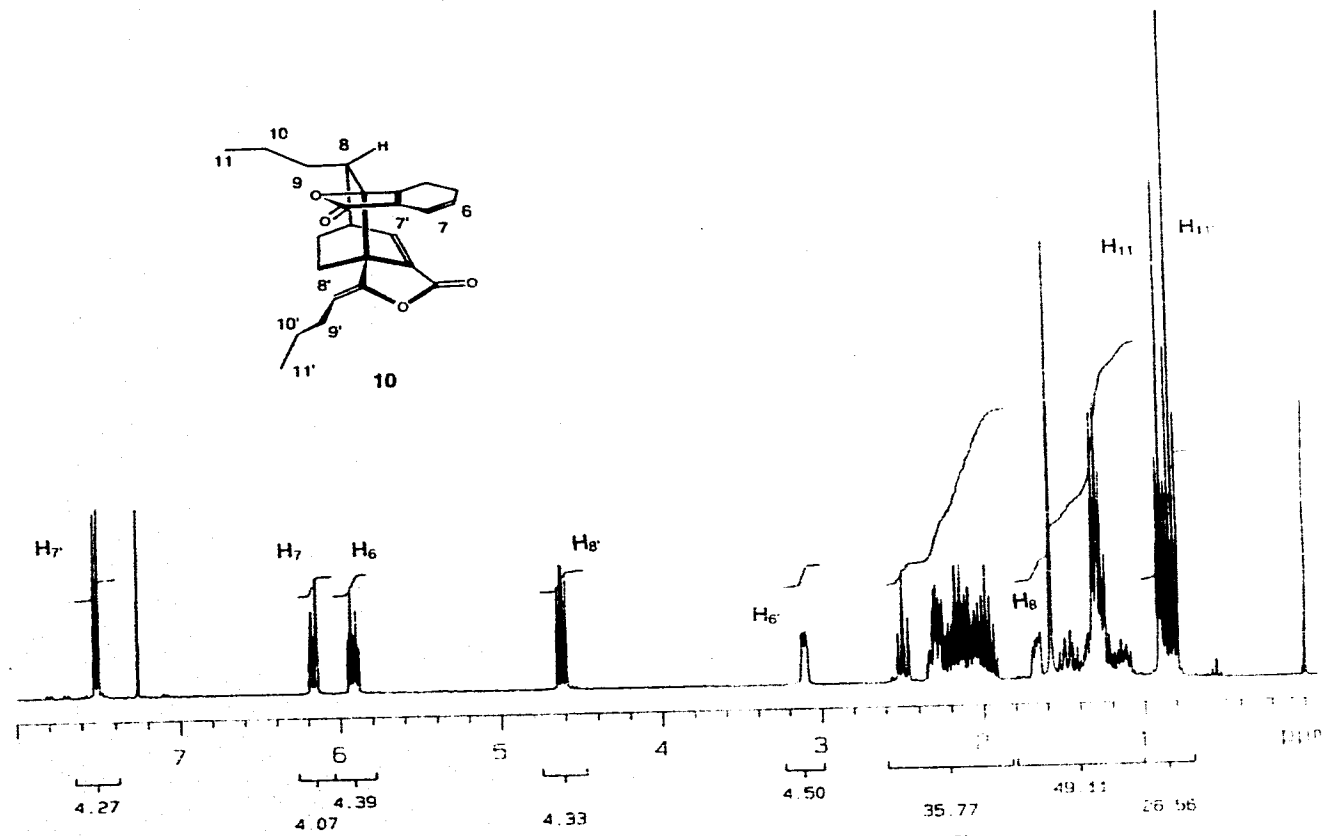
Espectro 1. IR (CHCl₃) del derivado de glicerol (9).



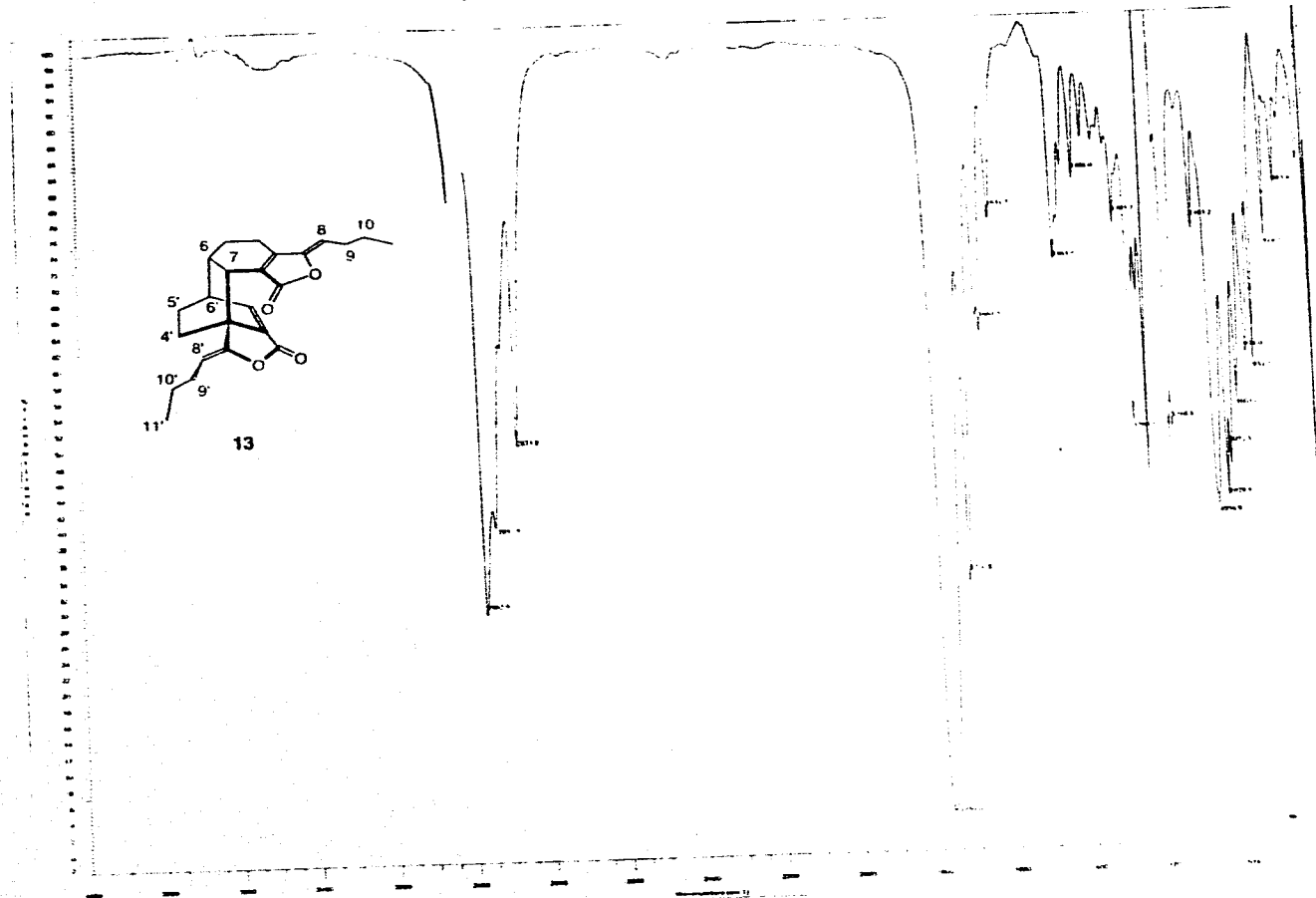
Espectro 2. RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) del derivado del glicerol (9)



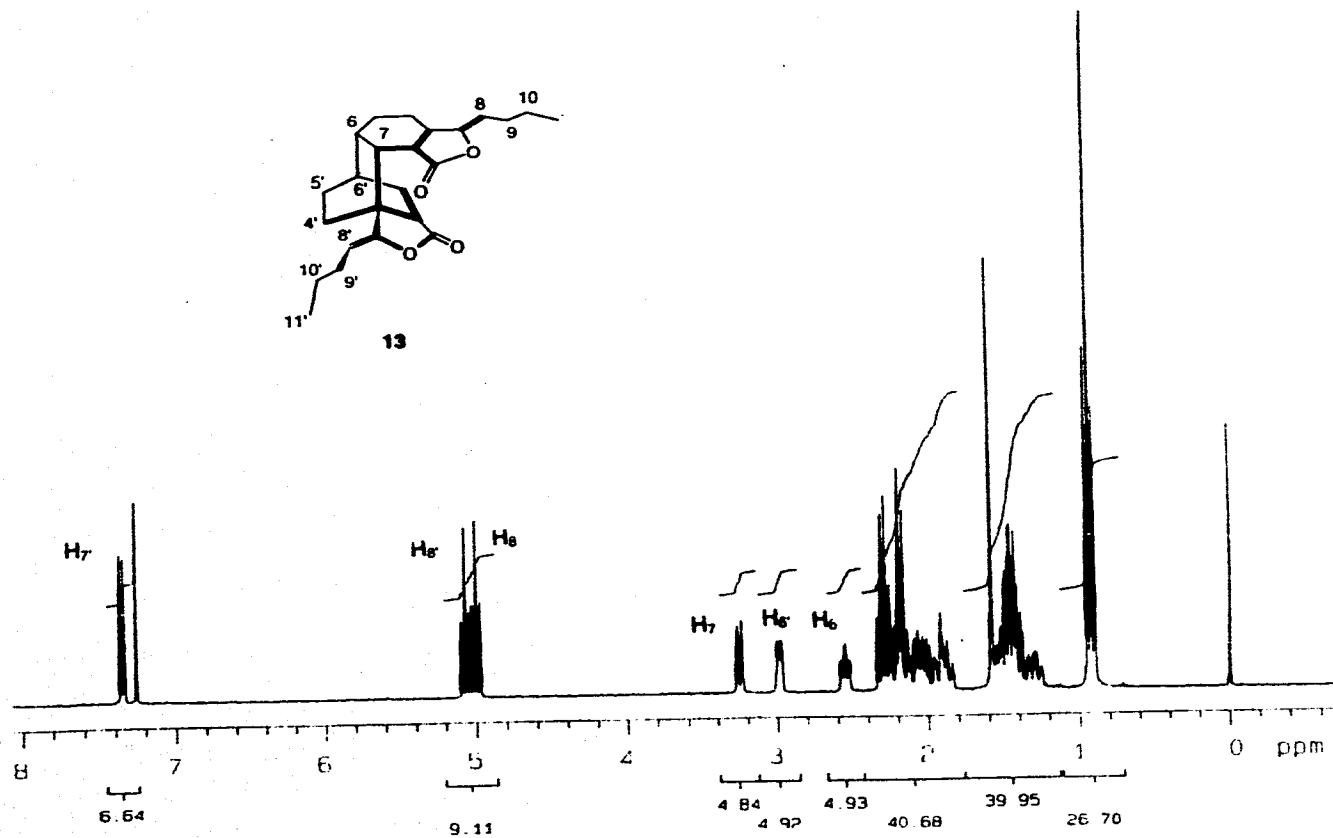
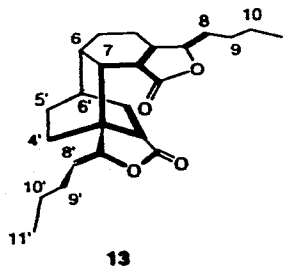
Espectro 3. IR (CHCl_3) de toquinólido B (10)



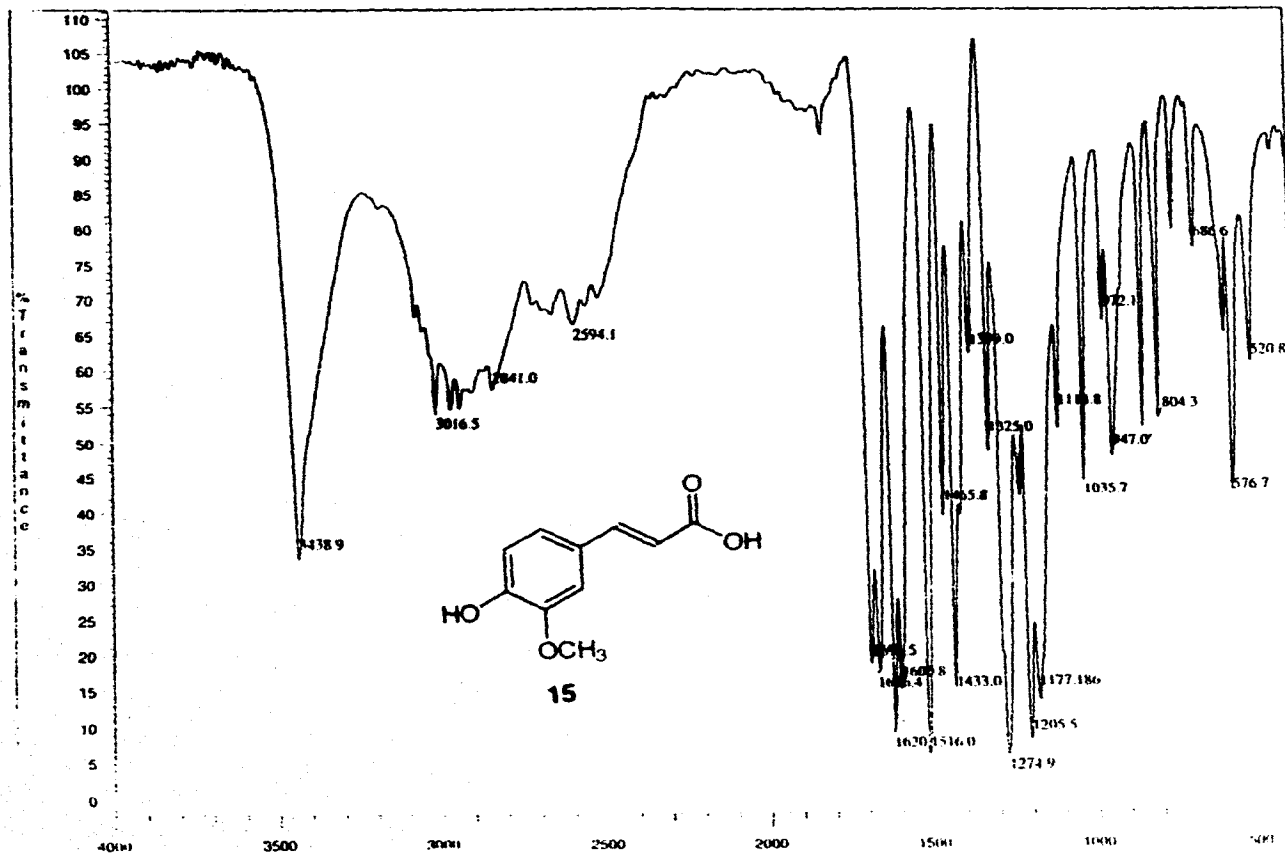
Espectro 4. RMN¹H (CHCl₃, 300 MHz) del toquinólido B (10).



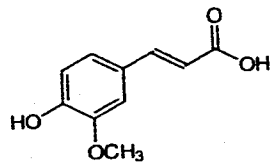
Espectro 5. IR (CHCl_3) del diigustilido (13)



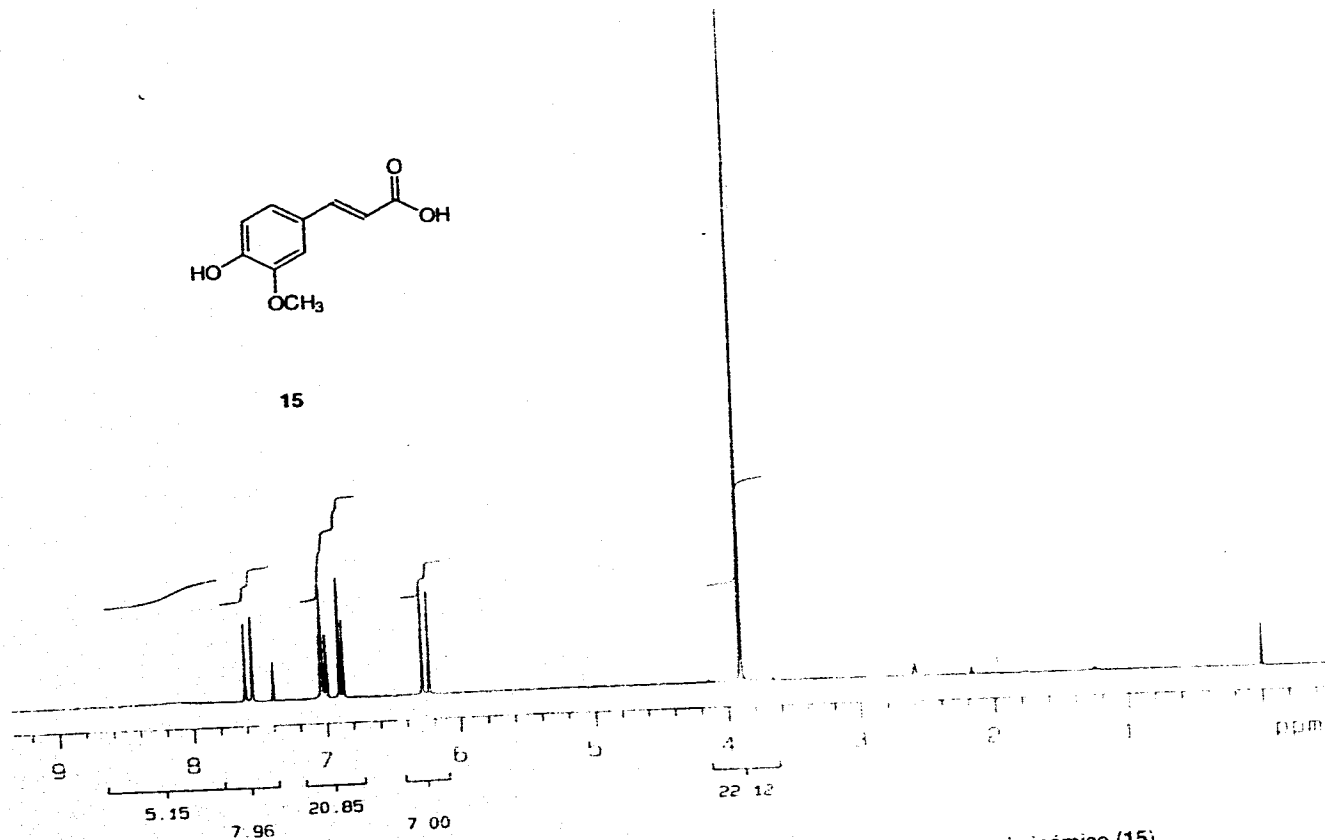
Espectro 6. RMNH¹H (CDCl₃, 300 MHz) del diligustilido (13)



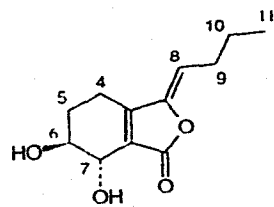
Espectro 7 IR (CHCl₃) del ácido 4-hidroxi-3-metoxi-cinámico. (15)



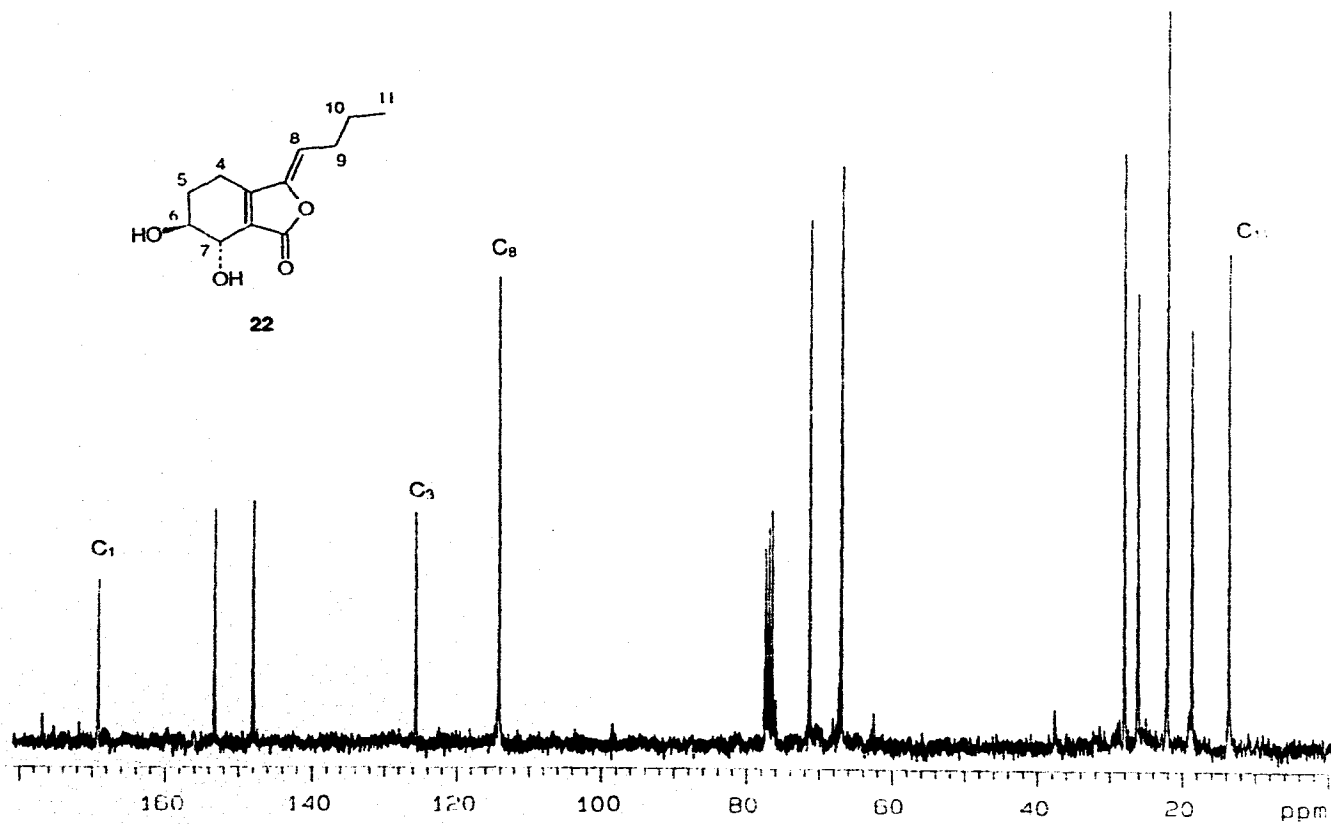
15



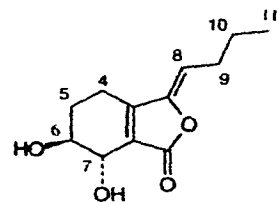
Espectro 8 RMN¹H (CDCl₃, 300 MHz) del ácido 4-hidroxi-3-metoxi-cinámico (15)



22

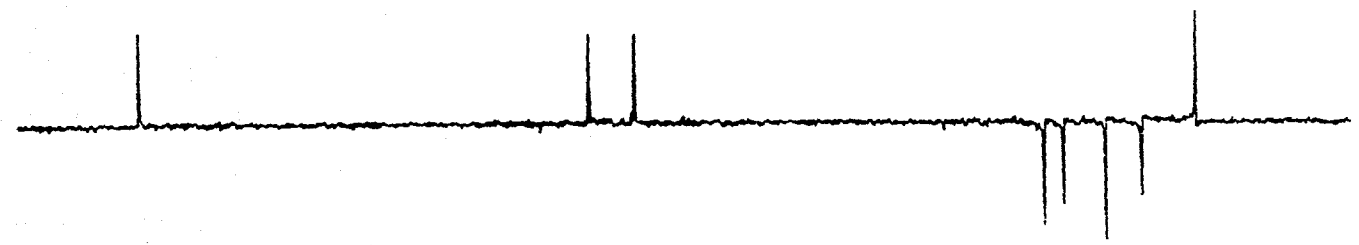


Espectro 10 RMN¹³C (CDCl₃, 75 MHz) del senkyunólido I (22)

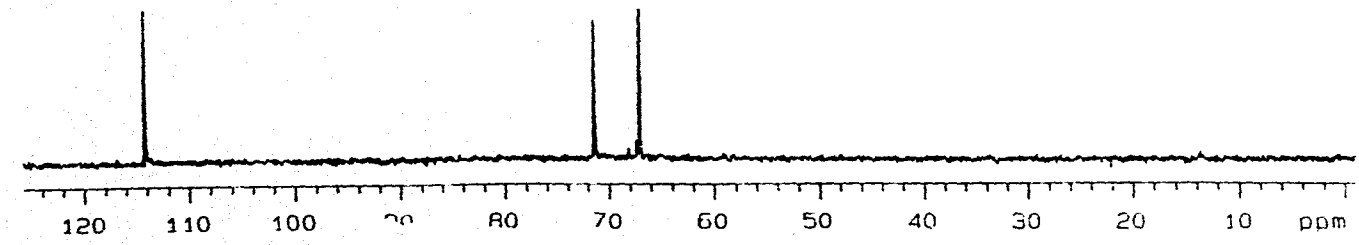


22

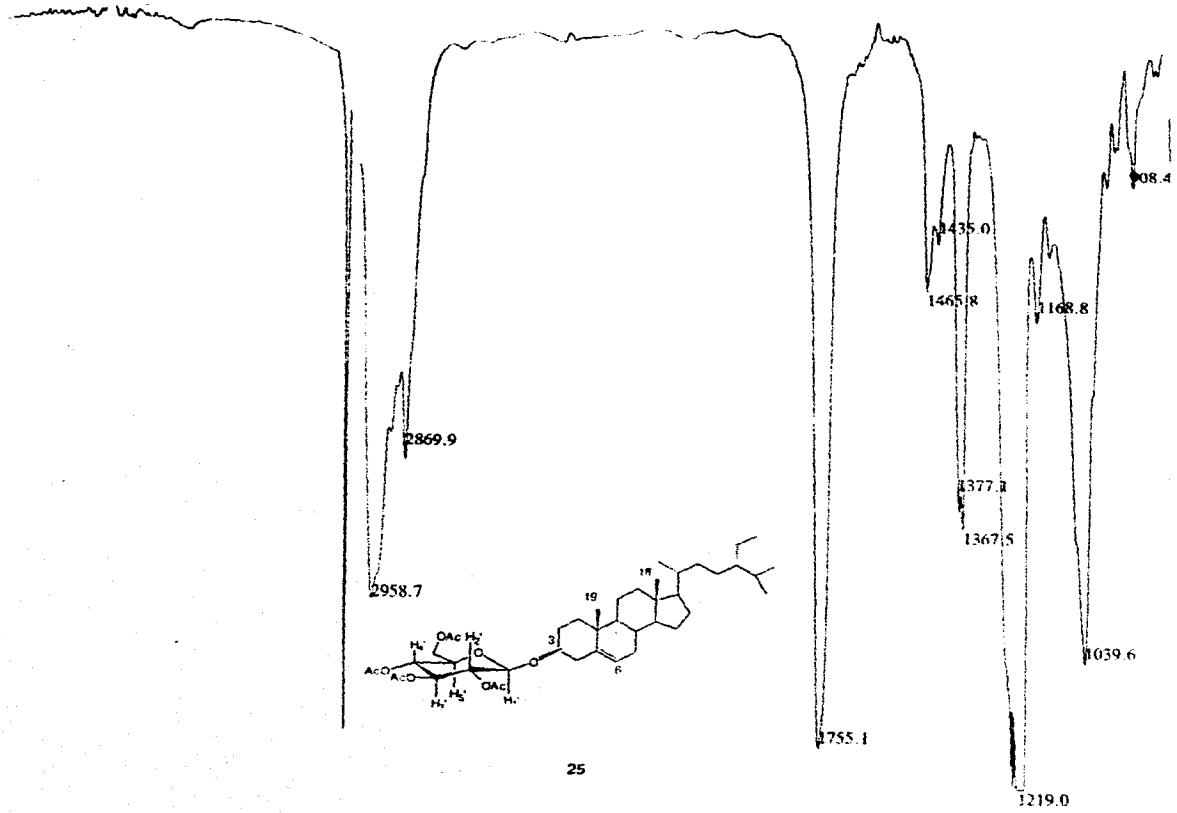
CH3 y CH arriba; CH2 abajo



CH unicamente

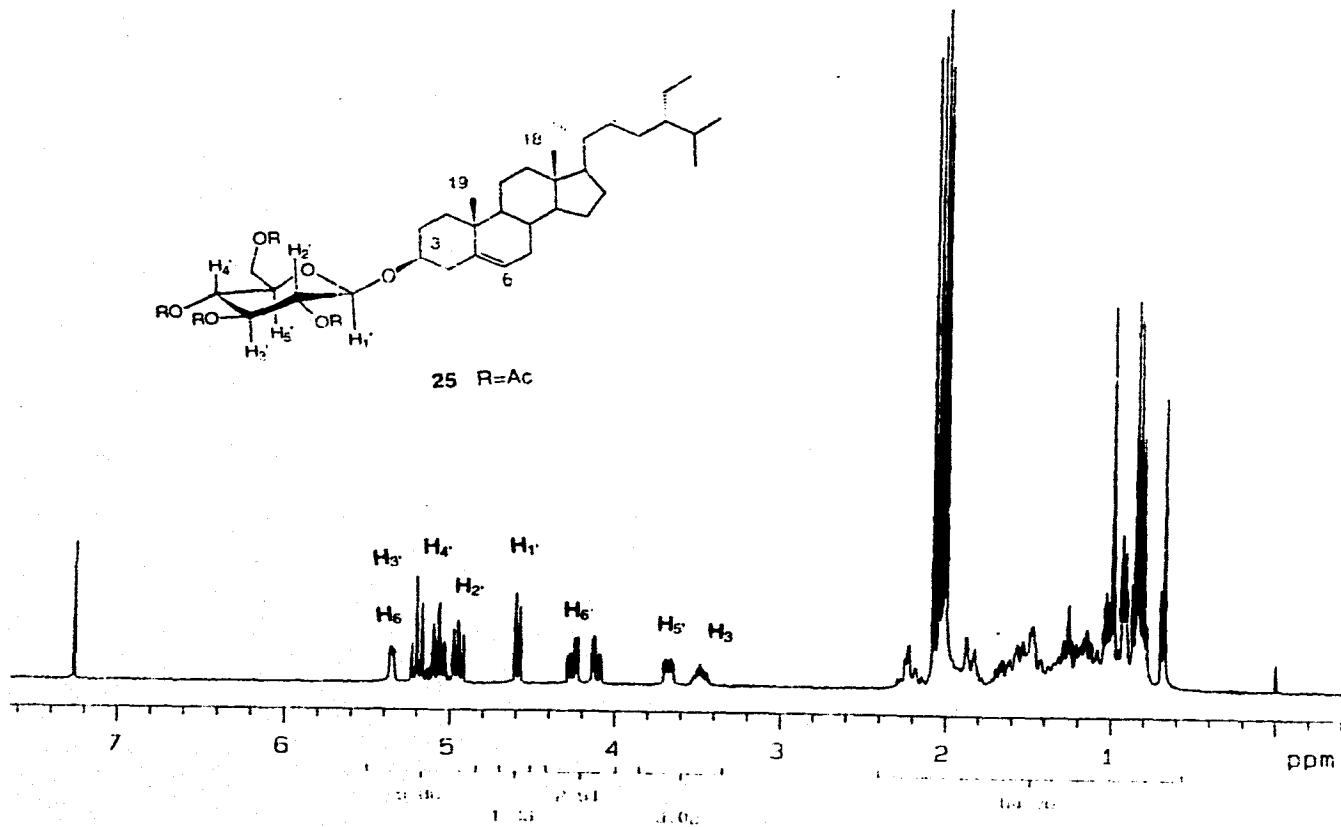
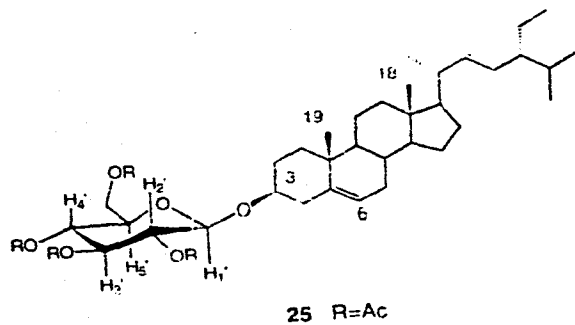


Espectro 11 DEPT (CDCl₃, 75 MHz) del senkyunólido I (22)

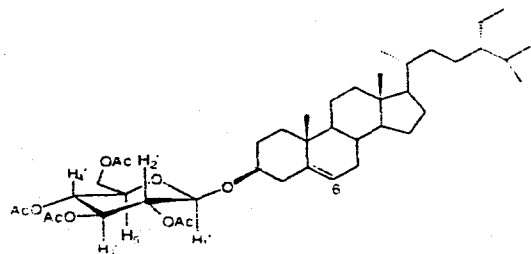


3

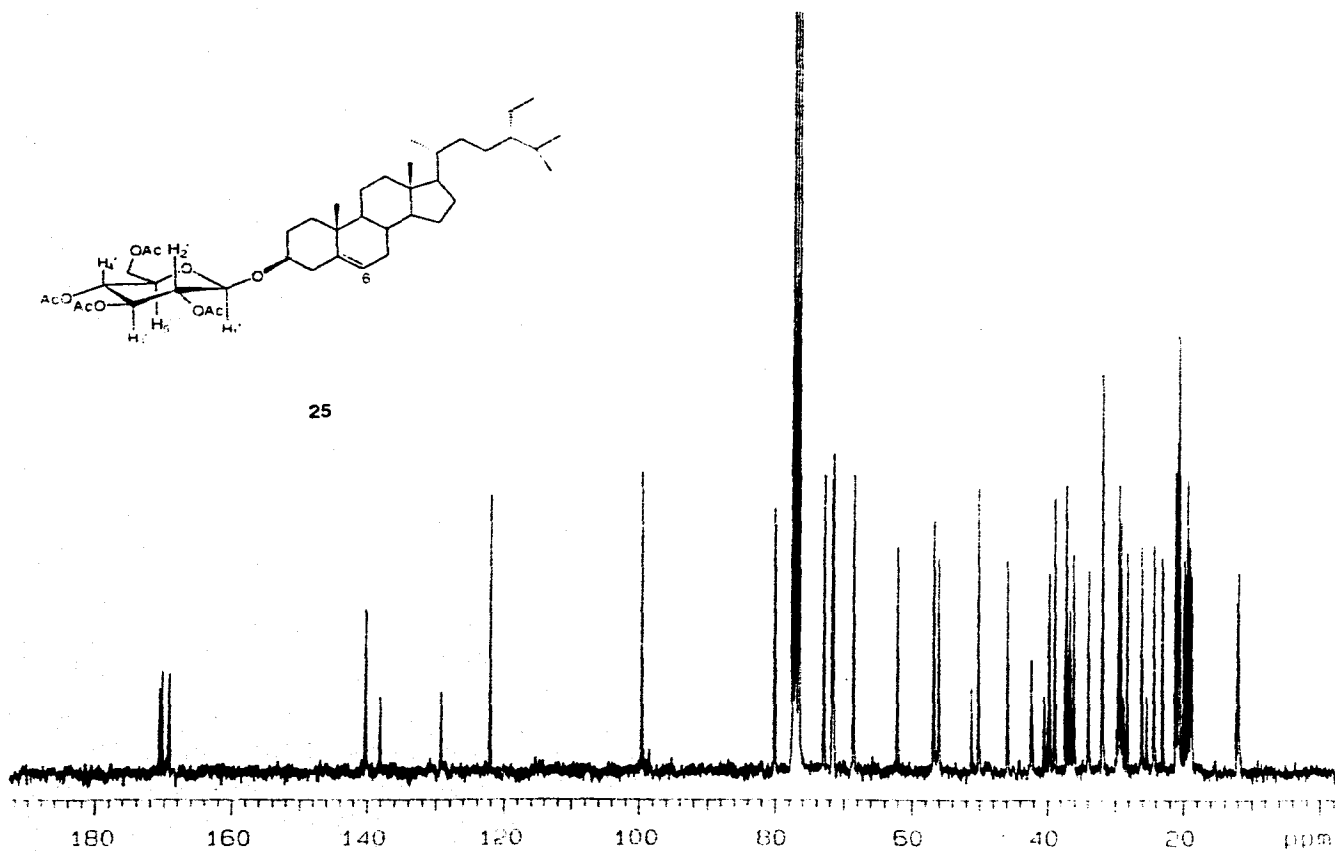
Espectro 13 IR (CDCl₃) de tetraacetil β-D-glucopiranosido de β-sitosterol(25)



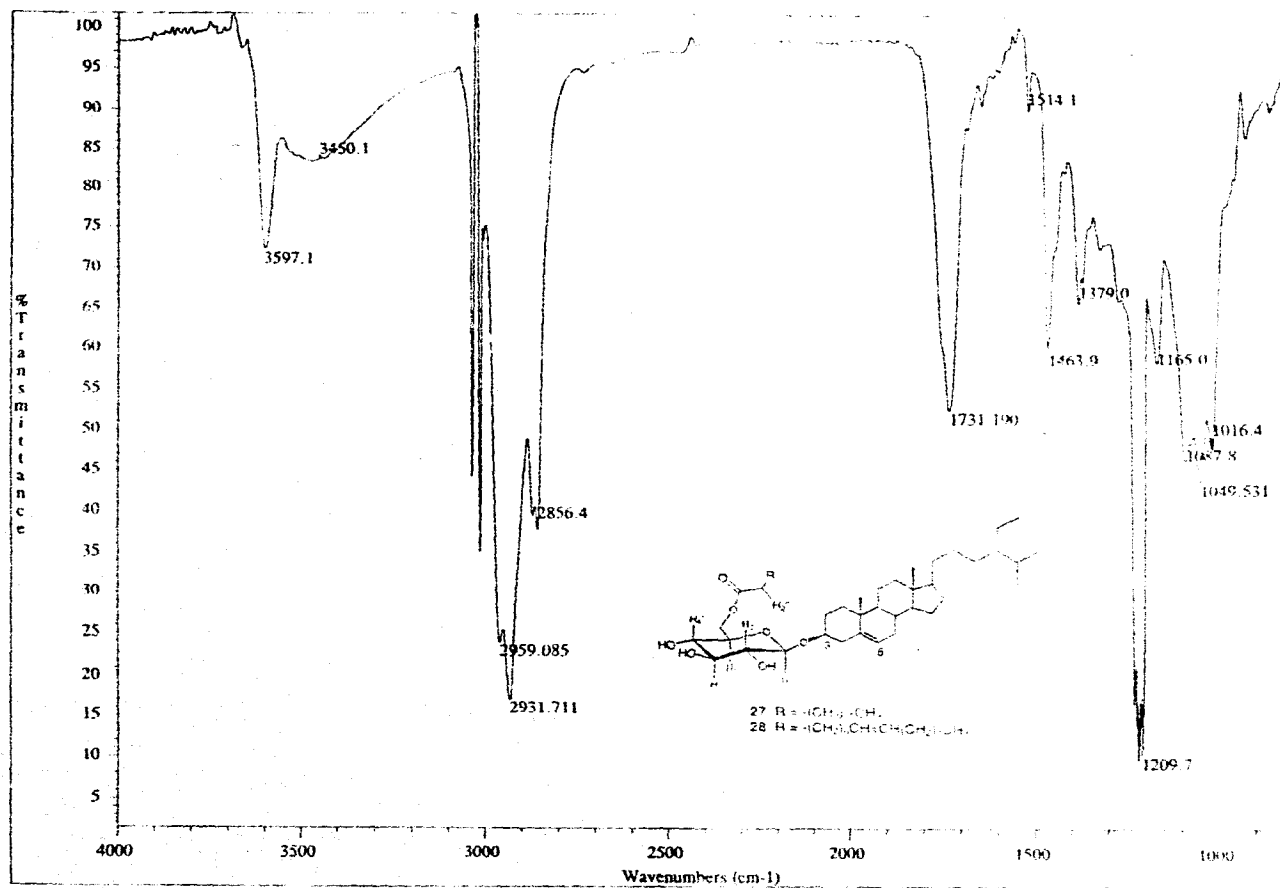
Espectro 14 RMN¹H (CDCl₃, 300 MHz) de tetracetil β-D-glucopiranosido de β-sitosterol (25)



25

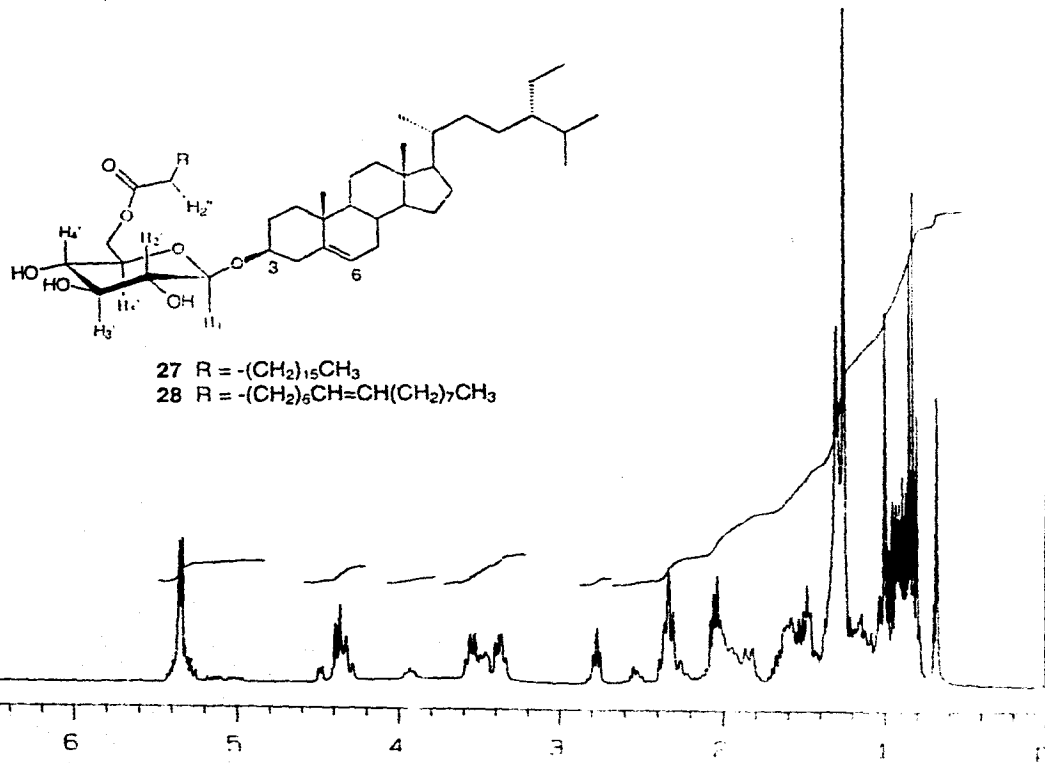


Espectro 16 RMN¹³C (CDCl₃, 75 MHz) de tetraacetil β-D-glucopiranosido de β-sitosterol (25)

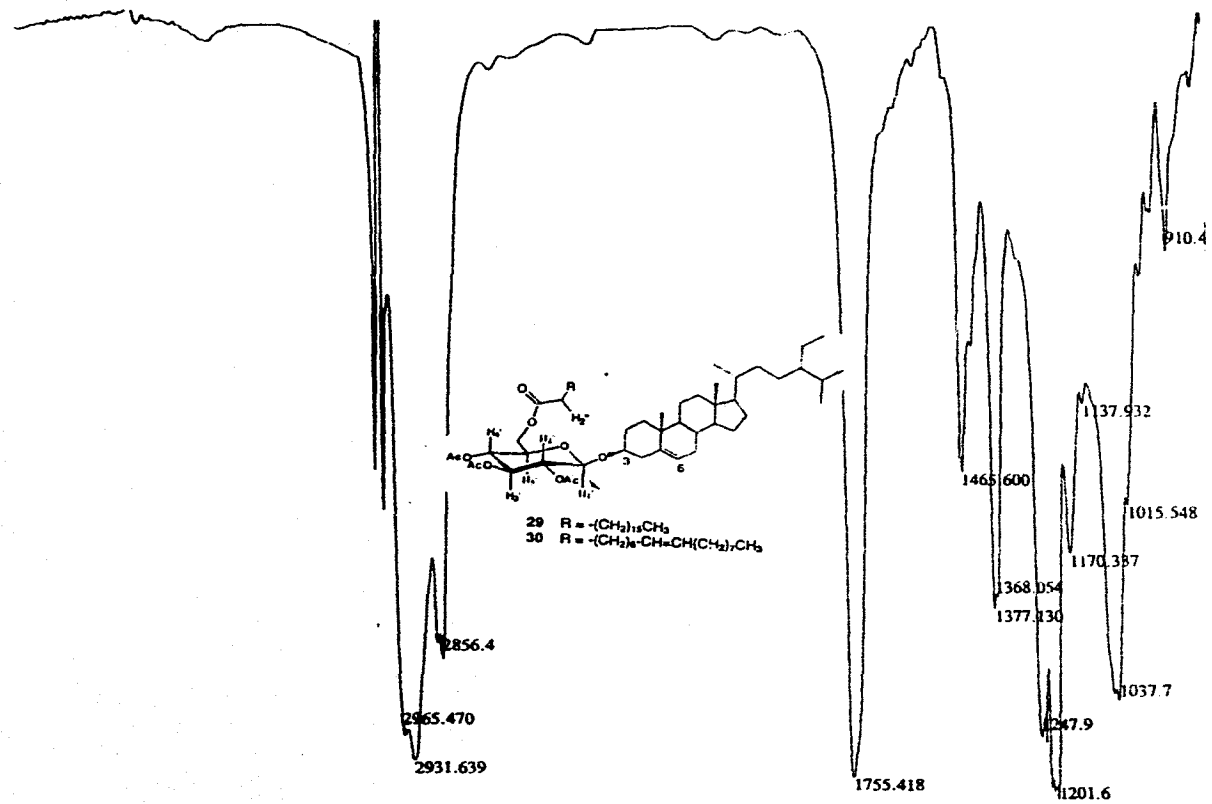


Espectro 17. IR (CHCl₃) de la mezcla de acil-glucosil-esteres (27+28).

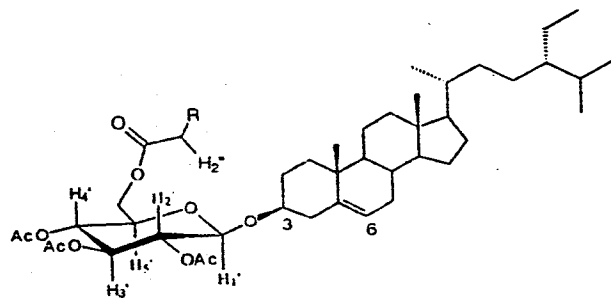
ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA



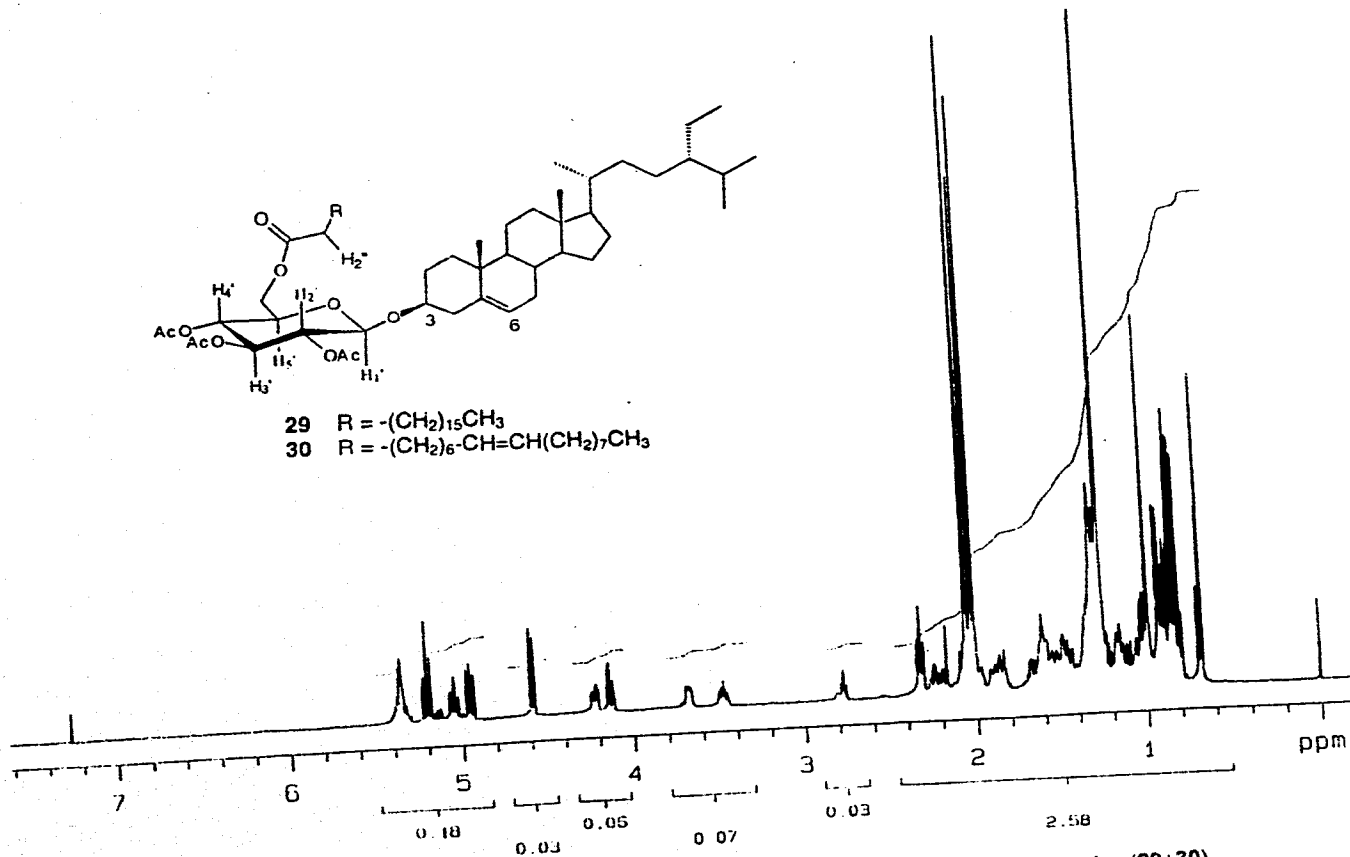
Espectro 18 RMN¹H (CDCl₃, 300 MHz) de la mezcla de acil-glucosil-esteroides (27+28).



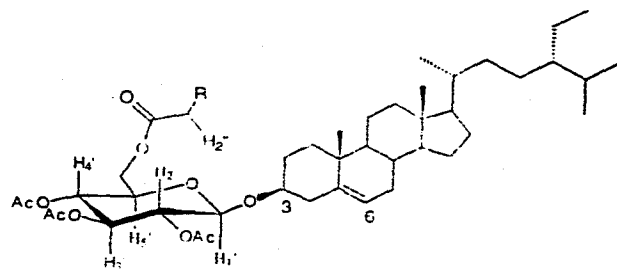
Espectro 19. IR del derivado acetilado de la mezcla de acil-glucosil esteroides (29+30)



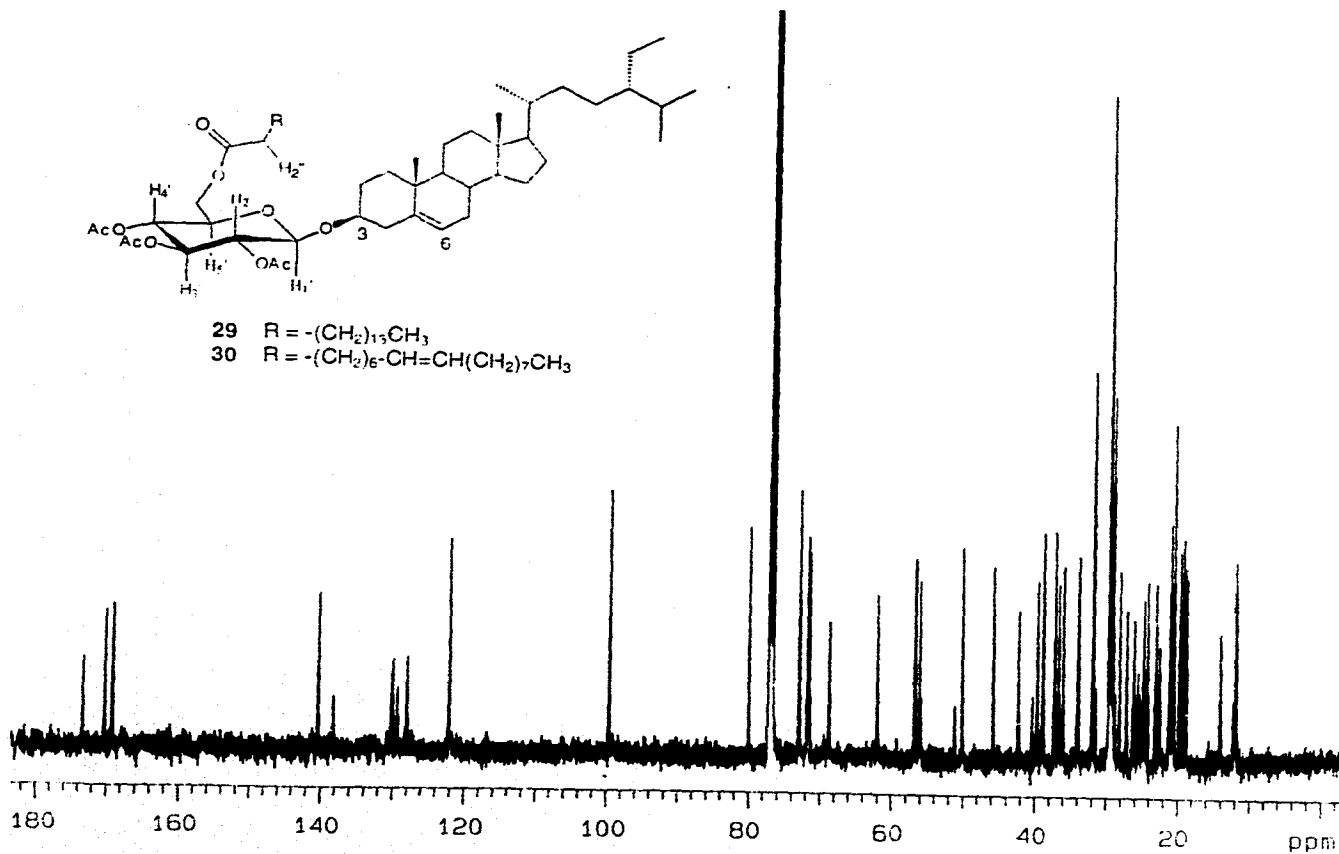
- 29 R = $-(\text{CH}_2)_{15}\text{CH}_3$
 30 R = $-(\text{CH}_2)_6\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$



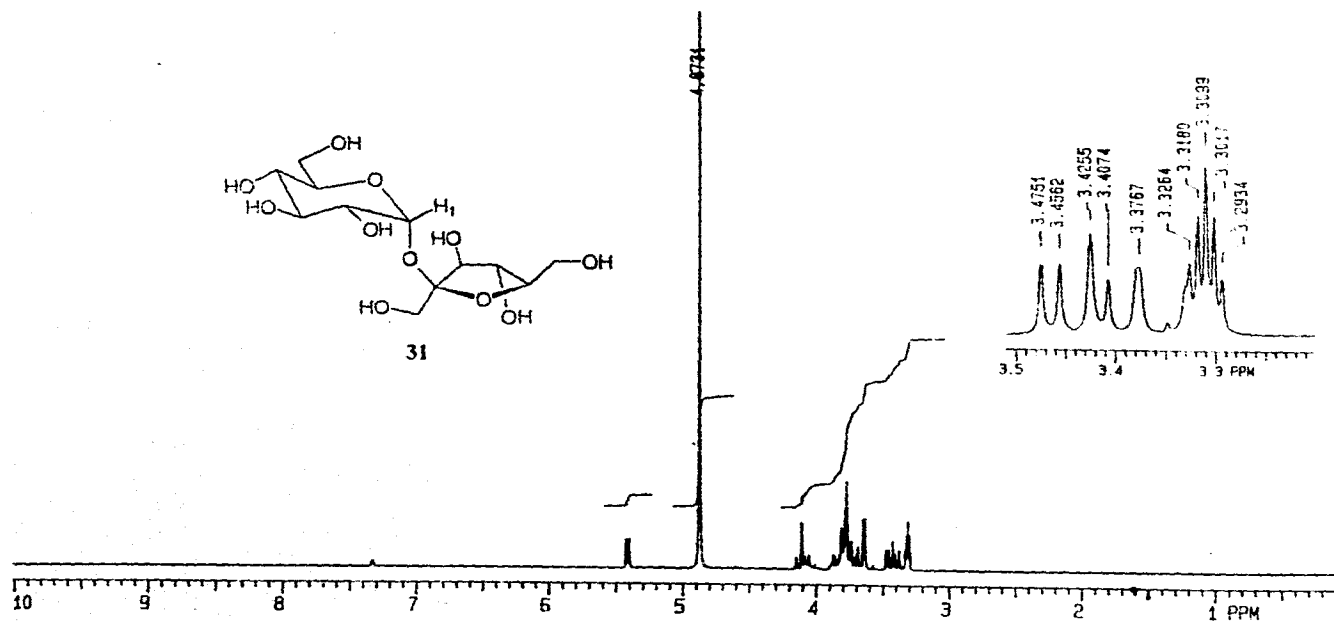
Espectro 20. RMN¹H del derivado acetilado de la mezcla de acil-glucosil esteroides (29+30)



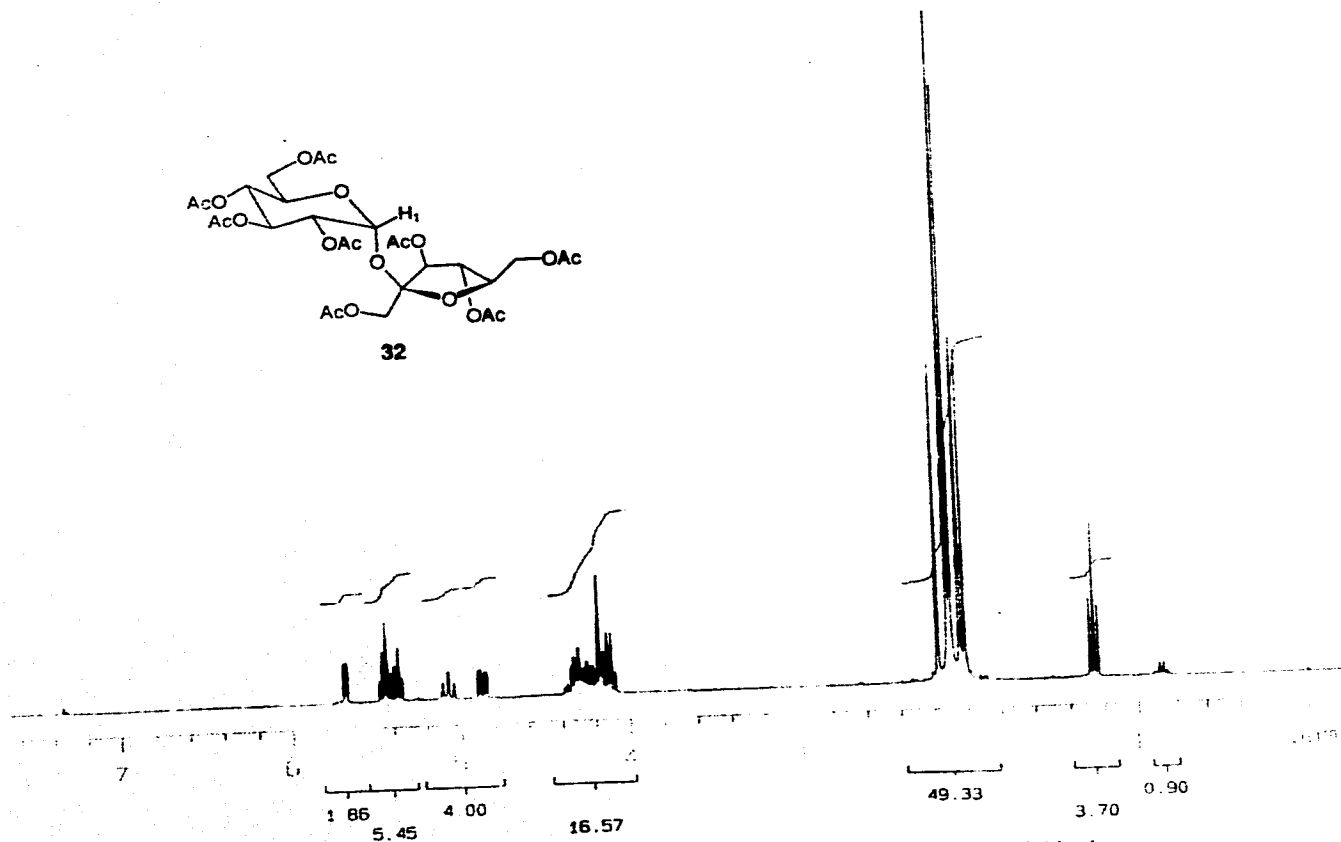
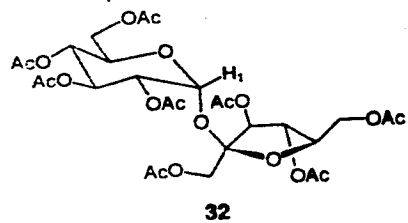
- 29 R = $-(\text{CH}_2)_{13}\text{CH}_3$
 30 R = $-(\text{CH}_2)_6-\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$



Espectro 21. RMN¹³C (CDCl₃, 125 MHz) del derivado acetilado de la mezcla de acil-glucosil-esteroides (29+30).



Espectro ^1H RMN (MeOD, 200 MHz) de β -D fructopiranosido de α -L glucopiranosá (31).



Espectro 24 RMN¹H (CDCl₃, 300 MHz) de octaacetil de β-D fructopiranosido de α-D glucopiranosá (32).

BIBLIOGRAFIA

1. Bye, R. A. Medicinal Plants of the Sierra Madre: Comparative Study of Tarahumara and Mexican Market Plants. *Econ. Bot.* 40, 103 (1986).
2. Pushan, W., Xuanliang, G., Fukuyama, Y., Miura, I., and Sugawara, M. Phthalides from the Rhizome of *Ligusticum wallichii*. *Phytochemistry* 23, 2033 (1984).
3. Cowen, K. Medicine on the Wild Side. *Science News* 138, 280 (1990).
4. Reza-Garduño, R., Aislamiento y Caracterización de los ftálicos de *Ligusticum porteri* C & R (Umbelliferae). Tesis, UNAM. (1987)
5. Delgado, G., Reza-Garduño, R., Rios, M. Y., del Río, F. Phthalides and Monoterpenes of the Hexane Extract of the Roots of *Ligusticum porteri*. *Planta Med.* 58, 570 (1992).
6. Delgado, G., Reza-Garduño, R., Toscano, R., Bye, R. and Linares, E. Secondary Metabolites from the Roots of *Ligusticum porteri* (Umbelliferae). X-Ray Structure de Z-6', 7.3a -Diligustilide. *Heterocycles* 27, 1305 (1988).
7. Naito, T., Kotsuhara, T., Niitsu, K., Keya, Y., Okada, M., and Mitsahashi, L., Phthalide Dimeres from *Ligusticum chuangxiang* Hort. *Heterocycles* 32, 2433 (1991).
8. Delgado, G. Natural Products from Some Medicinal Plants. Bioactivity and Chemical Reactivity. *Rev. Latinoamer. Quim.* 24, 37 (1996).
9. Gijbels, M. J. M., Sheffer, J. J. C. and Svendsen, A. B. Phthalides in Umbelliferae *Revista Italiana E.P.P.O.S* 61 335 (1979).
10. a) Grech, J., N., Basil, Q., Roufogalis, B., and Duke, C., Novel Ca²⁺-ATPase Inhibitors from the Dried Roots Tubers the *Polygonum multiflorum*. *J. Nat. Prod.* 57, 1682 (1994). b) Murahashi, M., Harada, K., Hirogami, K., Novel Phthalide Derivative as NGF enhancer from *Apium graveolens*. Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 04, 334, 378 [92, 334, 378], Chem. Abstr. 118:240924c. c) Beck, J., J. and Stermitz, F. Addition of Methyl Thioglycolate and Benzylamine to (Z)-Ligustilide, a Bioactive Unsaturated Lactone Constituent of Several Herbal Medicines. An Improved Synthesis of (Z)-Ligustilide. *J. Nat. Prod.* 58, 1047 (1995).
11. Tsuchida, T., Kobayashi, M., Kaneko, K. and Mitsuhashi, H. Studies on the Constituents of Umbelliferae Plants. XVI Isolation and Structure of Three New Ligustilide Derivates from *Angelica acutiloba*. *Chem. Pharm. Bull.* 35, 4460 (1987).

12. Banerjee, S.K., Gupta, B.D., Sheldrick, W., and Hofle, G. Lactonic Constituents of *Angelica glauca*. *Liebigs Ann. Chem.* 699 (1982).
13. Kauadji, M., Reutenauer, H., Chua, J., Marsura, A. (Z, Z') Diligustilide, Nouveau Phtalide Dimere Isole *Ligusticum Wallichii* Franch. *Tetrahedron Lett.* 24, 4677 (1983).
14. Manito, P. Biosynthesis of Natural Products. John Wiley & Sons (1981).
15. Standard NRM Spectra, Sadler Research Laboratories U.S.A 26 16885.
16. Kobayashi, M., Fujita, M. and Mitsuhashi, H. Studies on the Constituents of Umbelliferae Planta XV. Constituents of *Cnidium officinale*: Occurrence of Pregnenolone, Coniferyl Ferulate and Hydroxy Phtalides. *Chem. Pharm. Bull.* 35, 1427 (1987).
17. Greca, D., Manaco, P. and Previtera, L. Stigmasterols from *Typha Latifolia*. *J. Nat. Prod.* 53, 1430 (1990)
18. Colegate, S., and Molyneux, R. Bioactive Natural Products. Detection Isolation and Structural Determination, CRC Press, USA (1993).
19. Gamboa, M., M. Metabolitos Fitotóxicos Producidos por *Alternaria* (Ell y Mart) Jones y Grout. Tesis de Maestria. Universidad Autónoma de Yucatán (1993).
20. Villarreal, M. L., Alvarez, L., Alonso, D., Navarro, V., Gacia, P. and Delgado, G. Cytotoxic and antimicrobial screening of select terpenoids from *Asteraceae* species. *J. of Ethnopharm.* 42, 25 (1994).
21. Coll, J., C. and Bowden, B., F The Application of Vacuum Liquid Chromatography to the Separation of Terpene Mixtures. *J. Nat. Prod.* 49, 934 (1986).
22. Ríos, M.Y. Aproximaciones Sintéticas y Correlaciones Químicas de Cicloaductos Naturales Diméricos Derivados de Z-Ligustilido. Tesis Doctoral. UNAM (1996).