

17
24.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA



EXAMEN ESPECIAL EN
QUIMICA

**DERIVATIZACION QUIMICA DEL Z-LIGUSTILIDO,
UN METABOLITO BIOACTIVO DE *Ligusticum porteri*.
PARA SU EVALUACION BIOLOGICA**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
Q U I M I C O
P R E S E N T A
RICARDO FIGUEROA GONZALEZ



MEXICO, D. F.,

1997.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

**Los resultados de esta tesis se presentaron en el
23rd International Symposium on Natural Products,
celebrado el 8 y 9 de Mayo de 1997
en Oaxtepec, Morelos., México.**

Este trabajo de investigación fue desarrollado con apoyo financiero del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), como parte del Proyecto 4794-N9406 bajo la supervisión del Dr. Guillermo Delgado Lamas.

DEDICATORIA

A DIOS

A mis padres:

Alicia González Arriaga y Víctor Figueroa Gutierrez.

A mis hermanos:

**Gloria, Gregorio, Aurora Maura, Alejandro,
Víctor Manuel y María del Socorro.**

A mis sobrinos:

Omar, Edgar, Gaby, Alejandro y Adrián.

A mis tíos y primos:

A Maripaz

A mis maestros:

Federico, Sergio, Toño Lee y Rafa.

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

A la Facultad e Instituto de Química.

Al laboratorio 1.

A Baden Powell y Napoleón Hill.

A México.

A mis todos mis compañeros y amigos de todos lados.

EL ZORRO MUTILADO. Fábula del místico árabe Sa'di:

Un hombre que paseaba por el bosque vio un zorro que había perdido sus patas, por lo que el hombre se preguntaba cómo podría sobrevivir. Entonces vio llegar a un tigre que llevaba una presa en su boca. El tigre ya se había hartado y dejó el resto de la carne para el zorro.

Al día siguiente Dios volvió a alimentar al zorro por medio del mismo tigre. El comenzó a maravillarse de la inmensa bondad de Dios y se dijo a sí mismo: "Voy también yo a quedarme en un rincón, confiando plenamente en el Señor, y éste me dara cuanto necesito".

Así lo hizo durante muchos días, pero no sucedía nada y el pobre hombre estaba casi a las puertas de la muerte cuando oyó una Voz que le decía "Oh tú, que te hallas en la senda del error, abre tus ojos a la Verdad". Sigue el ejemplo del tigre y deja ya de imitar al pobre zorro mutilado".

Por la calle vi a una niña aterida y tiritando de frío dentro de su ligero vestidito y con pocas perspectivas de conseguir una comida decente. Me encolericé y le dije a Dios "¿ Por qué permites estas cosas? ¿Por qué no haces nada para solucionarlo?". Durante un rato, Dios guardó silencio. Pero aquella noche, de improviso, me respondió: "Ciertamente que he hecho algo. Te he hecho a ti".

Anthony de Mello.

No les diga como hacerlo,
muéstreselos sin decir una sola palabra.
Si usted dice, verán sus labios moverse.
Si usted les muestra, querrán
hacerlo por si mismos.

Marie Montessori.

**Todo lo que la Mente es capaz de concebir y crear,
también es capaz de lograr.**

Napoleón Hill.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Guillermo Delgado Lamas, por todo el apoyo, paciencia, amistad, comprensión, confianza y excelente dirección en el transcurso de esta investigación. Además, por la minuciosa corrección del trabajo escrito y por el estímulo e interés que demuestra en la superación constante de cada uno de sus alumnos.

A la **M. en C. María Isabel Chávez** y **M. en C. Beatriz Quiroz**, por su paciencia, apoyo y ayuda en la obtención de los espectros de resonancia magnética nuclear, los cuales constituyen una parte fundamental de esta tesis.

A las **Químicas Rocío Patiño** y **Claudia C.** por la obtención de los experimentos de infrarrojo y UV. Al **M. en C. Javier Pérez** y al **I.Q. Luis Velasco** por la obtención de los espectros de masas.

Al personal de la Biblioteca "Jesus Romo Armería" y especialmente a **Lupita "Guerita"** y al **Sr. Alejandro** del taller de soplado de vidrio.

De una manera muy sincera y cálida a la **Q. María del Carmen Cruz López**, por su enorme paciencia, ayuda incondicional, comprensión, compañía, apoyo y por los sabios consejos que sólo ella puede dar. Sin su gran ayuda este trabajo hubiera sido mas aburrido.

A la **Bióloga Carmen Gutiérrez** y al **M. en C. Victor Navarro** por la acertada realización de los ensayos biológicos.

A la **Universidad Nacional Autónoma de México**, al **Instituto de Química**, especialmente al **laboratorio 1**. Por todos los grandes momentos en los que el tiempo se detenía tan sólo por el hecho de vernos jugar como enanos, y lo que falta.

AGRADECIMIENTOS

A DIOS, ya en todo instante me has guiado, ayudado y acompañado. Muchas gracias por darme la hermosa y bella oportunidad de cumplir con mi misión.

A mi Mamá,

Quien siempre me ha motivado a seguir adelante, con sus sabios consejos y quien siempre ha confiado en mí.

A mi Papá,

del Quien he recibido una gran lección de voluntad que no podré olvidar.
A los dos a quienes les agradezco infinitamente todo su apoyo inquebrantable, el cual siempre será mucho mayor al que un hijo puede esperar. Los quiero mucho.

A mis hermanos Aurora Maura, Alejandro, Víctor Manuel y María del Socorro por su apoyo incondicional, su grata compañía y por ser un gran ejemplo para mí, y a mis sobrinos Alejandro y Adrián, por brindarme su cariño y aprender de su compañía.

Quiero decirles que los quiero y aprecio mucho, más de lo que habitualmente demuestro.

A todos los maestros por compartir sus generosas, motivantes e inigualables, enseñanzas, además de ser un gran ejemplo para mí. Especialmente al M. en C. Sergio Saavedra Romero, I. Q. Antonio Lee Chong, Fis. Rafael Galicia, Dr. Federico Del Río, Q. María de Carmen Pérez, Dr. Juventino García, Dr. Francisco Mejía, M. en C. Salvador López, Dr. Rafael Moreno, M. en C. Gustavo Avila, Dr. Carlos Rius, M. en C. Manuel Méndez Sivalet y Dr. Jesús Hernández Trujillo. Quienes dejan una huella imborrable y trascendental por la confianza y esperanza que siembran en cada uno de sus alumnos.

A mis amigos Carlos A. P., Lissette P., Alejandra O., Alejandro G., Israel M., César G., Eduardo R., Iván G., Trinidad, Amulfo, Carlos V., Roberto P., Ramón, René, Juan P., Paty Meza, Noemí, Sandra, Enka R., Mónica H., Enka P., Ennque T., David, Perfecto, Javier, Blanca, Marco A., Ana, Edgardo V., Conchita, Marcos A., Mary P., María de la Luz, Gerardo B., Elizabeth A., y Armando M. por permitirme compartir tantos hermosos momentos.

A María de la Paz Orta Pérez, por compartir brillantes momentos, por su simpatía, sabiduría, comprensión y cariño.

A mis compañeros del laboratorio 1, quienes compartimos nuestras experiencias, alegrías y penas, y que sin embargo tratamos de luchar por lograr nuestras metas: Lili, Alicia, Fabiola, Enka, Paty, Claudia, Emma, Alberto, Elisa, Vero, Yola, Ber, Marco, Soco, Tavo, Baci, Vane, Alejandro y Anibal.

A mis compañeros de la Generación 92 y a la Comunidad "Trucha".

JURADO ASIGNADO

Presidente:	Prof.: Helio Flores Ramírez.
Vocal	Prof.: Angel Guzmán Sánchez.
Secretario	Prof.: Eduardo Guillermo Delgado Lamas.
1er. Suplente	Prof.: José Manuel Méndez Stivalet.
2do. Suplente	Prof.: Fernando León Cedeño.

Sitio donde se desarrolló el tema:

Laboratorio 1. Instituto de Química.
U.N.A.M.

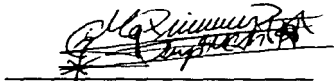
Asesor:

Dr. Eduardo Guillermo Delgado Lamas.

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Eduardo Guillermo Delgado Lamas", written over a horizontal line.

Sustentante:

Ricardo Figueroa González.

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Ricardo Figueroa González", written over a horizontal line. There is a small asterisk-like mark below the signature.

INDICE

	Pag.
1. Introducción	1
2. Antecedentes	3
3. Objetivos y Justificación	8
4. Discusión de Resultados	9
5. Ensayos Biológicos	51
6. Conclusiones	60
7. Parte Experimental	61
8. Espectros	79
9. Bibliografía	115

Lista de Espectros

Espectro. 1. RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) de la materia prima. Mezcla de 1 y 2.	79
Espectro. 2. RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) del Z-ligustilido 1.	80
Espectro. 3. RMN ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) del Z-ligustilido 1.	81
Espectro. 4. RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) del Butilidéntilido 2.	82
Espectro. 5. RMN ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) del Butilidéntilido 2.	83
Espectro. 6. RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) del producto crudo de la reacción. Mezcla de 1, 2 y 3. Pd/C 10%, AcOEt, 2 horas.	84
Espectro. 7. RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) del producto crudo de la reacción. Mezcla de 3 y 4. Pd/C 10%, AcOEt, 8 horas.	85
Espectro. 8. RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) del Butilftalido 4.	86
Espectro. 9. RMN ¹³ C (75 MHz, CDCl ₃) del Butilftalido 4.	87
Espectro. 10. RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) del 3(8),6(7)-tetrahidroligustilido 5	88
Espectro. 11. RMN ¹³ C (75 MHz, CDCl ₃) del 3(8),6(7)-tetrahidroligustilido 5.	89
Espectro. 12. RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) del producto crudo de la reacción. Mezcla de 4 y 5. PtO ₂ 10%, AcOEt, 4.5 horas.	90
Espectro. 13. RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) del producto crudo de la reacción. Mezcla de 4 y 5. Pd/C 10%, EtOH, 6 horas.	91
Espectro. 14. RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) del producto crudo de la reacción. Mezcla de 4, 5 y 6. PtO ₂ 10%, EtOH, 4.5 horas.	92
Espectro. 15. RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) del producto crudo de la reacción. Mezcla de 4, 5 y 6. PtO ₂ 10%, AcOEt, 28.5 horas.	93

Espectro 16	RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) del producto crudo de la reacción. Mezcla de 4 , 5 y 6 PtO ₂ 10%, EtOH, 28 horas	94
Espectro 17	RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) del Acido derivado del Z-Igustilido Compuesto 7	95
Espectro 18	RMN ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) del Acido derivado del Z-Igustilido Compuesto 7	96
Espectro 19	Experimento HMQC del Acido 7	97
Espectro 20	RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) del Acido derivado del Butilidenftálico Compuesto 8	98
Espectro 21	RMN ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) del Acido derivado del Butilidenftálico Compuesto 8	99
Espectro 22	Experimento HMQC del Acido 8	100
Espectro 23	RMN ¹ H (200 MHz, CDCl ₃) de la ftalazona derivada del Butilidenftálico Compuesto 9	101
Espectro 24	RMN ¹³ C (50 MHz, CDCl ₃) de la ftalazona derivada del Butilidenftálico Compuesto 9	102
Espectro 25	RMN ¹ H (200 MHz, CDCl ₃) de la ftalazona derivada del Z-Igustilido Compuesto 10	103
Espectro 26	RMN ¹³ C (50 MHz, CDCl ₃) de la ftalazona derivada del Z-Igustilido Compuesto 10	104
Espectro 27	RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) del 6,7-epoxiligustilido 11	105
Espectro 28	RMN ¹³ C (75 MHz, CDCl ₃) del 6,7-epoxiligustilido 11	106
Espectro 29	Experimento COSY del 6,7-epoxiligustilido 11	107
Espectro 30	Experimento HMQC del 6,7-epoxiligustilido 11	108
Espectro 31	RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) del <i>cis</i> -6,7-dihidroligustilido 12	109
Espectro 32	RMN ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) del <i>cis</i> -6,7-dihidroligustilido 12	110
Espectro 33	RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) del <i>trans</i> -6,7-dihidroligustilido 13	111
Espectro 34	RMN ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) del <i>trans</i> -6,7-dihidroligustilido 13	112
Espectro 35	Experimento COSY del <i>trans</i> -6,7-dihidroligustilido 13	113
Espectro 36	Experimento HMQC del <i>trans</i> -6,7-dihidroligustilido 13	114

Lista de Tablas

Tabla 1.0	Algunas especies que biosintetizan Z-Igustilido [1].	5
Tabla 2.0	Comparación de las señales de RMN ¹ H para 1 .	12
Tabla 3.0	Comparación de señales de RMN ¹³ C para 1 .	13
Tabla 4.0	Comparación de señales de RMN ¹ H para 2 .	13
Tabla 5.0	Comparación de señales de RMN ¹³ C para 2 .	14
Tabla 6.0	Hidrógenos de 1 , usados en el análisis de porcentaje de pureza de una muestra por RMN ¹ H.	15
Tabla 7.0	Hidrógenos de 2 , usados en el análisis de porcentaje de pureza de una muestra por RMN ¹ H.	15

Tabla 8.0	Comparación de las señales del compuesto 3, informadas en la literatura	17
Tabla 9.0	Comparación de los datos de RMN ¹ H obtenidos con los informados en la literatura para 4.	21
Tabla 10.0	Comparación de señales de RMN ¹³ C para 4	22
Tabla 11.0	Datos de RMN ¹ H y ¹³ C para 5, obtenidos de esta investigación	23
Tabla 12.0	Comparación de señales de RMN ¹ H para 6	27
Tabla 13.0	Resultados de los experimentos de hidrogenación y deshidrogenación catalítica	30
Tabla 14.0	Comparación de la asignación de las señales de los espectros de RMN ¹ H y ¹³ C de 7	35
Tabla 15.0	Asignación de señales de los espectros de RMN ¹ H y ¹³ C de 8	36
Tabla 16.0	Datos de las señales de los espectros de RMN ¹ H y ¹³ C para el compuesto 9	38
Tabla 17.0	Datos de espectroscopia de RMN ¹ H y ¹³ C para el compuesto 10	39
Tabla 18.0	Comparación de los métodos usados en la literatura para efectuar la reacción de epoxidación de algunos ftálicos con AMCPB	41
Tabla 19.0	Comparación de los desplazamientos químicos de RMN ¹ H de 11	43
Tabla 20.0	Señales de RMN ¹³ C de 11	44
Tabla 21.0	Comparación de las señales de RMN ¹ H para el <i>cis</i> -ligustidol 12	47
Tabla 22.0	Comparación de los datos de RMN ¹³ C para el <i>cis</i> -ligustidol 12	48
Tabla 23.0	Comparación de los datos de RMN ¹ H para el <i>trans</i> -ligustidol 13	49
Tabla 24.0	Comparación de los datos de RMN ¹³ C para el <i>trans</i> -ligustidol 13	49
Tabla 25.0	Propiedades farmacológicas de los extractos crudos y de los metabolitos secundarios aislados en algunas especies pertenecientes a la familia Umbelliferae	52
Tabla 26.0	Resultados de los ensayos biológicos de toxicidad, antimicrobianos y antifúngicos	55
Tabla 26.0	Resultados de los ensayos biológicos de toxicidad, antimicrobianos y antifúngicos (Continuación)	55
Tabla 27.0	Resultados de los ensayos biológicos de concentración mínima inhibitoria (CMI)	56
Tabla 27.0	Resultados de los ensayos biológicos de concentración mínima inhibitoria (CMI) (Continuación)	56

Abreviaturas

COSY	Correlated Spectroscopy.
EM	Espectrometría de Masas.
δ	Desplazamiento químico
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Correlation.
J	Constante de acoplamiento.

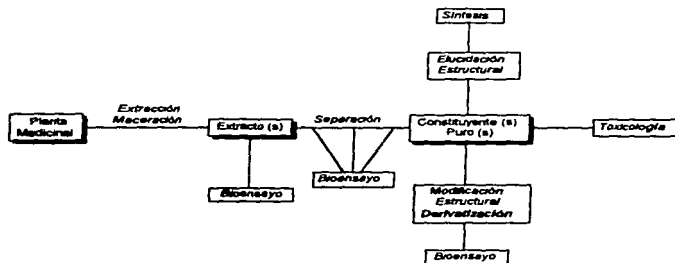
1. INTRODUCCION

El estudio de los fenómenos de la naturaleza es el objeto de las investigaciones científicas. Dentro de este amplio campo de estudio las plantas han sido un objeto de interés muy particular desde los tiempos iniciales de la existencia de la humanidad. Particularmente, en México, el uso de plantas para aliviar algunos dolores y en el tratamiento de algunas enfermedades ha sido ampliamente usado.

La investigación y estudio de las plantas con la intención de aislar los diferentes constituyentes químicos y la posterior elucidación estructural es una tarea difícil y laboriosa. Adicionalmente, es necesario evaluar el potencial farmacológico de los metabolitos secundarios mediante bioensayos preliminares, siendo estos de suma importancia, ya que con ellos se puede llegar a ponderar la eficiencia de tales constituyentes.

Por ello, es deseable realizar bioevaluaciones de los extractos de plantas y realizar el fraccionamiento y purificación de los constituyentes aplicando simultáneamente un bioensayo que permita dar seguimiento a la bioactividad. Este procedimiento permite la identificación de los constituyentes presumiblemente responsables de cierta actividad biológica.

En las últimas décadas se ha desarrollado esta metodología de investigación, acrecentándose las aportaciones y la vinculación entre la fitoquímica y la medicina. El esquema 1 está adaptado de la publicación de Hostettmann,¹ y muestra sucintamente la secuencia experimental que, entre otras opciones, puede seguirse para la obtención de sustancias bioactivas.

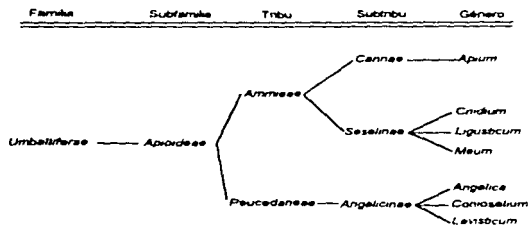


Esquema 1. Procedimiento para la obtención de sustancias bioactivas a partir de plantas.

Las investigaciones en esta área son de gran interés en el sector salud principalmente para las industrias farmacéuticas que, mediante derivatización química y bioensayos selectivos y específicos logran la obtención de compuestos apropiados para el tratamiento de alguna enfermedad. Si bien el proceso de lograr encontrar un nuevo fármaco es riguroso, largo y costoso, el beneficio social es invaluable.

2. ANTECEDENTES

El Z-ligustilido [1], es un metabolito secundario presente en algunas especies vegetales pertenecientes principalmente a la familia Umbelliferae. Esta familia se encuentra dividida en dos subfamilias, y la ubicación taxonómica del género *Ligusticum*, de donde se aisló el Z-ligustilido [1] empleado en el presente trabajo, se muestra en esquema 2. En base a las investigaciones fitoquímicas de algunas umbelíferas que datan desde el siglo pasado,^{7,8} ahora se sabe que este grupo de plantas se caracteriza por producir compuestos denominados ftálicos. Dichos compuestos se aíslan principalmente a partir de las raíces de este grupo de vegetales.



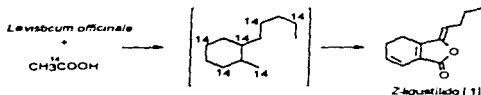
Esquema 2. Algunos géneros de Umbelliferae que contienen ftálicos.⁷

En general los ftálicos son un grupo de productos naturales análogos estructuralmente del anhídrido ftálico, de donde deriva su nombre. La biosíntesis de los ftálicos proviene del ácido acético^{7,8} (véase Esquema 3), por lo que se les denomina genéricamente acetogeninas o policétidos. Su distribución en la naturaleza es, comparativamente con otros productos naturales, tales como los terpenoides y polifenoles, relativamente restringida.

Como productos naturales, los ftálicos pueden dividirse, de acuerdo a sus características estructurales, como monómeros y dímeros. Los monómeros, a pesar de su aparente simplicidad estructural, han demostrado en ciertas transformaciones, una reactividad química característica.

Es interesante notar que numerosas plantas que poseen ftálicos son empleadas para diversos propósitos en la medicina tradicional de varios países del mundo, entre los que destacan China, Japón, México, Norteamérica, y algunos países de Europa, donde algunas especies son abundantes.

Los usos etnomédicos de las preparaciones que emplean plantas que poseen ftálicos son muy variados y se han reseñado repetidamente en la literatura. Particularmente en la República Mexicana, el té de las raíces de *Ligusticum porteri* es utilizado por los indios tarahumaras, quienes la conocen como "chuchupate", en el tratamiento de dolores gastrointestinales, de cabeza, fiebre, reumatismo e hinchazón.⁹⁻¹² Generalmente se presume que los ftálicos contenidos en estas plantas sean precisamente los metabolitos secundarios responsables de esta actividad.



Esquema 3. Ruta biosintética para el Z-ligustilido [1].^{7,8}

En los últimos años en nuestro laboratorio se ha investigado a esta planta medicinal¹³⁻¹⁷ y han sido numerosos los compuestos aislados e identificados, considerando principalmente en ftálicos monoméricos y diméricos, ácidos fenólicos y, recientemente, acil glucosil esteroleos.¹⁴

Entre los ftálicos aislados, el compuesto más abundante fue el Z-ligustilido [1]. Este metabolito secundario, a pesar de su aparente simplicidad estructural, ha demostrado en ciertas transformaciones una reactividad química característica por los grupos funcionales presentes, los cuales pueden describirse inclusivamente como: una γ -lactona- $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -insaturada, un dieno homoanular, un trieno conjugado, un éster de enol, un carbonilo $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -insaturado y un ciclohexadieno conjugado. El conjunto de estos grupos presentan en sí varias posibilidades de *situ*- y *regio*-diferenciación, por lo que la predicción de los productos de reacción no es, en ciertas ocasiones, obvia.

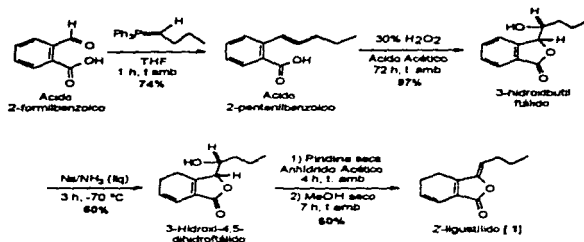
Como se mencionó anteriormente, Z-ligustilido [1] es un metabolito secundario aislado de varias especies vegetales. La tabla 1.0 muestra las especies vegetales informadas en la literatura que biosintetizan a esta substancia.

Tabla 1. Algunas especies que biosintetizan Z-ligustilido [1].*

Especie	Referencia
<i>Apium graveolens graveolens</i>	38
<i>Apium graveolens</i> L. var. <i>rapaceum</i> .	38, 42
<i>Apium graveolens</i> L. var. <i>dulce</i> .	20, 22, 27, 42
<i>Plucedium</i>	50
<i>Petroselinum crispum</i> var. <i>Tuberosum</i> .	38
<i>Bupleurum</i>	50
<i>Bifora testiculata</i> .	38
<i>Cnidium monnien</i>	50
<i>Cnidium officinale</i>	20, 22, 23, 24, 31,
	40, 41, 43, 47, 50, 55
<i>Ligusticum acutilobum</i>	20, 21, 22, 19
<i>Ligusticum acutiloba</i> var. <i>Sujiyame</i> .	19, 22
<i>Ligusticum chuaniqiong</i>	30,
<i>Ligusticum officinale</i>	41
<i>Ligusticum wallichii</i> Franch.	9, 26, 28, 34, 35,
<i>Ligusticum porteri</i>	16, 17, 57
<i>Meum athamanticum</i>	36,
<i>Angelica acutiloba</i>	45, 50, 51
<i>Angelica acutiloba</i>	25, 40, 41, 48, 51, 53
<i>Angelica dahurica</i>	50
<i>Angelica dohuzica</i>	30
<i>Angelica glauca</i>	33
<i>Angelica radix</i>	54
<i>Angelica sinensis</i>	30, 49, 51
<i>Angelica tenuissima</i>	44
<i>Angelica tohou</i>	50
<i>Archangelica officinalis</i>	30
<i>Levisticum acutilifolium</i>	30
<i>Levisticum chuaniqiong</i>	30
<i>Levisticum officinale</i>	8, 18, 22, 29,
	30, 32, 37, 39, 46.
<i>Levisticum joholense</i>	30
<i>Ligustici chuaniqiong</i> (rhizoma).	52
<i>Ligustici rhizoma</i>	56

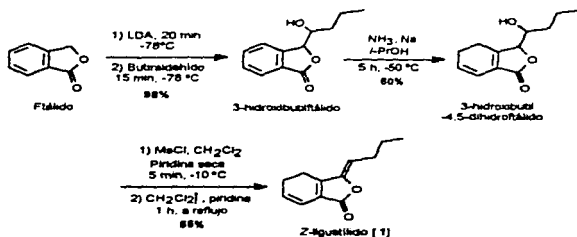
* Las referencias mostradas fueron ordenadas en secuencia cronológica.

Por otro lado, hasta el momento se han informado dos rutas sintéticas para el Z-ligustilido [1]. La primera de ellas,⁵⁶ consiste de 4 etapas; parte del ácido 2-formil benzoico, el cual reacciona con *n*-butiliditridenilfosforano, generado *in situ* a partir del bromuro de *n*-butilfenilfosfonio y *ter*-butóxido de potasio para generar el ácido 2-pentenilbenzoico como una mezcla de las isómeros *Z* y *E*. Esta mezcla se disuelve en ácido acético glacial y se trata con una solución al 30% de peróxido de hidrógeno, lo que genera al 3-hidroxibutilitáldido, como una mezcla de los isómeros *entreo*- y *treo*- en una proporción de 3:2. Después de una reducción de Birch, esta mezcla se deshidrata con anhídrido acético y piridina para generar el Z-ligustilido [1]. Esta ruta tiene 22% de rendimiento. Las condiciones de reacción así como los rendimientos parciales se muestran en el esquema 4.



Esquema 4. Ruta sintética para el Z-ligustilido [1].⁵⁴

La otra ruta de síntesis⁵⁷ parte del fthalido comercialmente disponible, e involucra 3 etapas, requiere tiempos de reacción cortos y disminuye la necesidad de purificación cromatográfica de los intermediarios. El alcohol fthalido de la primera etapa fue obtenido diastereoméricamente puro en cuatro horas y pudo ser usado en la próxima etapa sin purificar. La reducción de Birch y posterior deshidratación generó 1. El esquema 5 muestra esta ruta sintética.



Esquema 5. Segunda ruta sintética para el Z-ligustilido [1].⁵⁷

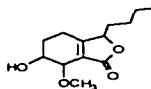
Es interesante mencionar que existen informes de pruebas biológicas aplicadas a los extractos de las plantas de la familia de las umbelíferas, principalmente sobre las empleadas en la medicina tradicional china y

japonesa,^{19,23,25} pero son relativamente pocos los informes disponibles en donde se prueban los compuestos en forma pura.^{43,47,57}

En la literatura podemos encontrar que Z-ligustilido [1] presenta una serie de propiedades farmacológicas interesantes. Presenta toxicidad (DL₅₀ 20 ppm) en el bioensayo con *Artemia salina*¹⁷ y se informa que tiene actividad antiespasmódica, antiasmática⁴⁸ y relajante del músculo liso.⁴⁵

Adicionalmente, algunos compuestos semejantes estructuralmente al Z-ligustilido [1], han mostrado propiedades sedantes en ratones.³⁸

Además, el compuesto 6-hidroxi-7-metoxidihidroligustilido, aislado del apio (*Apium graveolens*), fue recientemente patentado como una sustancia útil en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.⁵⁸



Esquema 6. Estructura del 6-hidroxi,7-metoxi 3(8)-dihidroligustilido, compuesto considerado de utilidad en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

3. OBJETIVOS Y JUSTIFICACION

Debido al uso que poseen en la medicina tradicional las plantas que contienen ftáldos en general, y Z-ligustilido [1] en particular, y al potencial farmacológico que poseen estas sustancias, se consideró conveniente la realización de estudios referentes a la reactividad química de Z-ligustilido [1], una sustancia representativa de las ftáldos, con los objetivos generales que son los siguientes:

- a) generación de conocimiento sobre la reactividad química de las sustancias orgánicas, y
- b) coadyuvar al establecimiento de las relaciones entre la estructura y la actividad biológica.

Por lo anterior, se establecieron los siguientes objetivos particulares:

1. Realizar el aislamiento del Z-ligustilido [1] (considerado como materia prima), a partir de una de sus fuentes naturales, que es la raíz de *Ligusticum porteri*.
2. Llevar a cabo diversas reacciones químicas con Z-ligustilido [1] que permitan la obtención de derivados, con el propósito de conocer la reactividad química de este producto natural.
3. Adicionalmente, realizar algunos ensayos biológicos preliminares (antimicrobianos, antifúngicos y toxicidad frente a *Artemia salina*) que permitan establecer la variación de bioactividad con respecto a la estructura molecular.

Comentarios acerca de la materia prima.

Desde su aislamiento, se observó que Z-ligustilido [1] posee una reactividad particular. Es lábil al contacto con oxígeno, luz y calor.¹⁹ Su transformación espontánea genera Z-3-butilidénftálico [2] (compuesto que ha sido informado como metabolito secundario),¹⁹⁻²³ y otros compuestos más polares no identificados. Debido a ello, se procuró manipular y almacenar 1, así como sus derivados con atmósfera inerte usando nitrógeno, aislados de la luz y mantenidos a 0°C, logrando evitar y reducir su descomposición. En la literatura se han informado algunas maneras de almacenar 1 con el fin de intentar reducir esta reactividad. Una de las técnicas indica que 1 almacenado en disolución de diclorometano, éter dietílico y metanol, aislado de la luz y a temperatura ambiente puede mantenerse sin presentar signos de aromatización o polimerización apreciable alrededor de 150 días.⁶⁰ Otro informe indica que si 1 se mantiene guardado en disolución con cloroformo, puede conservarse durante un año sin que se presenten compuestos de descomposición.⁵³

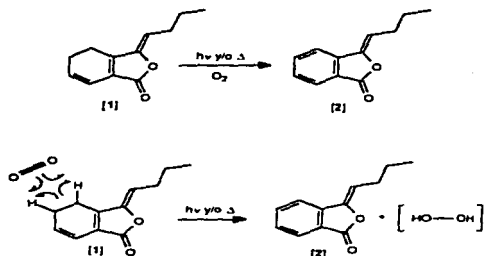
El Z-ligustilido [1] se obtuvo de las fracciones de menor polaridad de la cromatografía del extracto acetónico de las raíces de *Ligusticum porteri*, y fue purificado por cromatografía antes de usarlo como sustrato de reacción. Experimentalmente no se logró obtener al Z-ligustilido [1] totalmente puro, debido a que el compuesto 2, posee un Rf igual a 1, debido a su semejanza estructural. En la literatura se han informado algunos intentos de purificación de 1 mediante métodos tradicionales de cromatografía. Uno de ellos mediante cromatografía en columna abierta¹⁹ y otro por medio de cromatografía en capa fina.³⁰ En estos dos casos anteriores los resultados la purificación es parcial, pero actualmente, por medio de HPLC^{34,46} es posible separar 1 de 2.

La pureza de 1 fue obtenida mediante la interpretación del espectro de RMN ¹H de 300 MHz, (espectro 1) de una muestra de 1 recién cromatografiado. Después de este análisis, que se detalla mas adelante, se determinó que en la mezcla 1 se encontraba con 86.46% de pureza, correspondiendo el porcentaje restante (13.54%) a 2.

La conversión de 1 a 2 puede explicarse por una reacción de oxidación, presumiblemente mediante radicales libres, ya que este tipo de reacción es catalizada por la luz y el calor. Esta reacción se muestran en el esquema 7 y además se indica un plausible mecanismo.

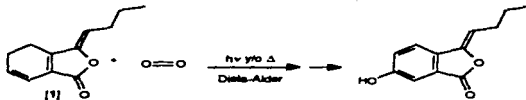
En la etapa 1 una molécula de oxígeno se acerca a 1 y logra un arreglo para efectuar la reacción de oxidación, los electrones generados vía radicales libres en la etapa 2 forman dos enlaces O-H a partir de la ruptura de dos enlaces C-H, en la etapa 3 se observa la formación del compuesto 2 que es más estable y la formación de un peróxido.

4. DISCUSION DE RESULTADOS

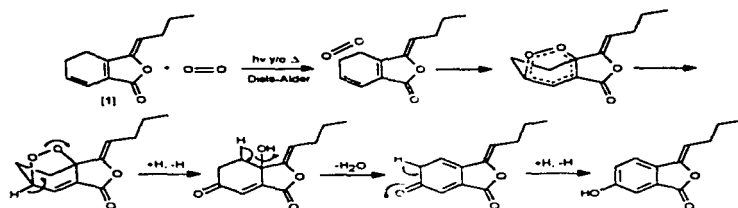


Esquema 7. Reacción de transformación espontánea de 1 a 2 vía radicales libres.

Por otro lado, para explicar la formación de compuestos de mayor polaridad a partir de Z-ligustilido, puede considerarse un mecanismo basado en la reacción de Diels-Alder, y una secuencia de transformaciones que producen al 6-hidroxi,3-butilidenfálido, que es una sustancia de mayor polaridad. En el esquema 8 se muestra la reacción, y en el esquema 9, el posible mecanismo.



Esquema 8. Reacción de Diels-Alder que genera al 6-hidroxi,3-butilidenfálido, compuesto de mayor polaridad.



Esquema 9. Formación del Z-6-hidroxi-3-butilidenoftálico

En la primera etapa el oxígeno actúa como dienófilo, por efecto de la luz y/o calor se forma un enlace de tipo peróxido formando un ciclo de 6 átomos que contiene 2 átomos de oxígeno, este compuesto es inestable y puede sufrir una ruptura que genera un grupo hidroxilo y un carbonilo α,β insaturado, posteriormente ocurre una eliminación generando un dieno el cual genera a través del equilibrio tautomérico, al compuesto aromatzado que es más estable.

Interpretación del espectro de RMN ¹H de la materia prima.

La información espectroscópica de RMN ¹H de las señales correspondientes a cada hidrógeno del Z-ligustilido [1] generada en nuestro laboratorio¹⁵ y la informada en la literatura para butilidengftáldo [2],³⁶ permite, por comparación, la asignación de cada una de las señales. En las tablas 2-5 O se muestran las señales observadas de los espectros de RMN de ¹H y ¹³C (Espectros 2-5) para cada uno de dichos compuestos

Tabla 2.0 Comparación de señales de RMN ¹H para 1.*

Hidrógeno	Z-ligustilido 1 ^a	Z-ligustilido 1 ^b	Z-ligustilido 1 ^c	Z-ligustilido 1 ^d
4	2.60, td (1.0, 10.0.)	2.57, m	2.62, * (14)	2.65-2.45, m
5	2.49-2.44, m	2.43, m	2.52-2.45, m	2.65-2.45, m
6	6.01, dt (10.0, 4.5.)	5.97, dt (4.1, 9.5)	6.02, * (2.0, 4.0, 10.0)	6.00, dt (4.2, 9.7)
7	6.29, dt (9.5, 4.5)	6.25, dt (1.8, 9.5)	6.26, * (2.0, 10.0)	6.28, dt (1.8, 9.7)
8	5.22, t (8.0)	5.20, t (8.0)	5.25, * (8.0)	5.24, t (8.0)
9	2.39, c (7.5)	2.43, td (7.3, 8.0)	2.33, * *	3.28, dd (7.7, 15.4)
10	1.51, c (7.5)	1.48, qt (7.3, 7.3)	1.51, * (7.0)	1.52, c (7.0)
11	0.96, t (7.5)	0.92, t (7.3)	0.96, * (7.0)	0.95, t (7.0)

* Datos obtenidos en la presente investigación. RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz, espectro 2.)

^a Datos obtenidos en la referencia 35. RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz).

^b Datos obtenidos en la referencia 39. RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz).

^c Datos obtenidos en la referencia 15. RMN ¹H (CDCl₃, 200 MHz).

^d En la tabla se indican los parámetros en el siguiente orden: δ , multiplicidad, (J).

* Esto se emplean para todas las tablas siguientes.

^e Dato no indicado.

En las tablas 2.0 y 3.0, se puede observar que prácticamente los datos obtenidos en esta investigación con respecto a los datos informados en la literatura para 1 son muy semejantes. Sin embargo, en el caso de ¹³C, los datos de la columna 3 para los C-4 y C-5, están cambiados.

Para confirmar la asignación de los señales de 1, se efectuaron experimentos en dos dimensiones (COSY y HMQC), corroborando las asignaciones realizadas.

Tabla 3.0 Comparación de señales de RMN ¹³C para 1.*

Carbono	Z-igustillido 1 ^a	Z-igustillido 1 ^b	Z-igustillido 1 ^c	Z-igustillido 1 ^d
1	167.61, s	167.6, s	167.1	167.6, s
3	148.64, s	149.0, s	147.6	149.0, s
3a	147.04, s	147.2, s	148.6	147.2, s
4	18.53, d	18.6, t	22.5	18.6, t
5	22.42, d	22.6, t	18.0	22.6, t
6	129.86, d	130.0, d	129.7	130.0, d
7	117.18, d	117.4, d	117.2	117.4, d
7a	124.06, s	124.3, s	123.9	124.3, d
8	112.81, d	112.7, d	112.4	112.7, d
9	28.12, t	28.2, t	27.7	28.2, t
10	22.42, t	22.5, t	21.9	22.5, t
11	13.74, q	13.8, q	13.3	13.8, q

- *. Datos obtenidos en la presente investigación. RMN ¹³C (CDCl₃, 125 MHz, espectro 3).
- b. Datos obtenidos en la referencia 35. RMN ¹³C (CDCl₃, 100.61 MHz)
- c. Datos obtenidos en la referencia 39. RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz).
- d. Datos obtenidos en la referencia 15. RMN ¹³C (CDCl₃, 50 MHz).
- . En la tabla se indican los siguientes parámetros: δ, multiplicidad.
Esto se aplica a todas las tablas siguientes.

Tabla 4.0 Comparación de señales de RMN ¹H para 2.

Hidrógeno	Butilidentifilido 2 ^a	Butilidentifilido 2 ^b	Butilidentifilido 2 ^c
4	7.64, ddd (8.0,6.5,1.0)	7.4-8.0	7.70
5	7.67, ddd (8.0,1.0,1.0)	7.4-8.0	7.70
6	7.51, ddd (1.5,1.5,7.0)	7.4-8.0	7.70
7	7.89, ddd (7.0,1.0,1.0)	7.4-8.0	7.70
8	5.64, t (8.0)	5.60	5.58, t (7.5)
9	2.48, c (8.0)	2.42, (8.0)	2.44, m (8.4)
10	1.56, sextup (7.5)	1.58, (8.0)	1.54, m (7.5)
11	0.99, t (7.5)	1.0, (6.0)	0.96, t (6.6)

- *. Datos obtenidos en la presente investigación. RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz, espectro 4).
- b. Datos obtenidos en la referencia 39. RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz).
- c. Datos obtenidos en la referencia 32. RMN ¹H (CDCl₃, 100 MHz).

Tabla 5.0 Comparación de señales de RMN ¹³C para 2.

Carbono	Butiliden- Ráido 2 ^a	Butiliden- Ráido 2 ^b	Butiliden- Ráido 2 ^c
1	167.22, s	167.1, s	167.1, s
3	139.62, s	139.8, s	139.8, s
3a	145.60, s	145.8, s	145.7, s
4	119.62, d	119.6, d	119.6, d
5	134.19, d	134.2, d	134.2, d
6	129.32, d	129.3, d	129.3, d
7	125.27, d	125.2, d	125.2, d
7a	124.51, s	124.7, s	124.7, s
8	109.43, d	109.4, d	109.4, d
9	27.77, t	27.8, t	27.8, t
10	22.51, t	22.6, t	22.5, t
11	13.77, c	13.8, q	13.8, q

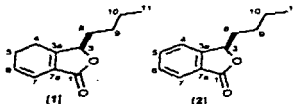
^a. Datos obtenidos en la presente investigación. RMN ¹³C (CDCl₃, 125 MHz, espectro 5).

^b. Datos obtenidos en la referencia 32. RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz).

^c. Datos obtenidos en la referencia 39. RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz).

En las asignaciones de las señales de los hidrógenos para 2 en RMN ¹H, se observa que, los parámetros de δ y multiplicidad para los hidrógenos del anillo aromático, no habían sido aún reportados. En esta investigación, dichos parámetros fueron obtenidos. Por otro lado, las asignaciones de las señales de ¹³C obtenidas en este trabajo son prácticamente iguales a las informadas en la literatura.

Por otra parte, y continuando con el análisis de la mezcla de 1 + 2, los hidrógenos que se utilizan para hacer el análisis en el caso de 1 son el hidrógeno del enlace exocíclico en 3(8), y los hidrógenos del doble enlace endocíclico de las posiciones 6 y 7 y, por otro lado, en el caso de 2 el hidrógeno del doble enlace exocíclico en las 3(8) y los 4 hidrógenos del anillo aromático. Se puede observar que en ambas estructuras existe un hidrógeno en la posición 8, sin embargo, el desplazamiento químico es distinto. Lo anterior se puede observar en las estructuras mostradas en el esquema 10 para 1 y 2, en donde el ambiente químico es distinto.



Esquema 10. Estructuras del Z-ligustilido [1] y del Z-butilidéntalido [2].

El análisis de las señales del espectro 1 a partir de campo bajo hacia campo alto se observa un grupo de señales que presentan desplazamiento

químico (δ) entre δ 8.0 y 7.4, son generadas por los 4 hidrógenos del anillo aromático de 2, que tienen una integración de 0.50 (1H) y 1.54 (3H). Una señal que presenta un doblete tripleteado δ 6.4 se asigna a hidrógeno 7 de 1 tiene una integración de 3.11 (1H). En δ 6.0 se observa un quintuplete asignado a un hidrógeno en 6 de 1, y tiene una integración de 3.47 (1H). Adicionalmente, en δ 5.64, hay un triplete el cual se asigna al hidrógeno de la posición 8 de 2, que integra para 0.61 (1H). Finalmente en δ 5.22 se observa un triplete generado por hidrógeno 8 de 1. Las señales generadas a mas alto campo no se consideran ya que corresponden a los hidrógenos de la cadena alquílica de ambos compuestos.

En base a estos datos el cálculo del porcentaje de 1 y 2 se obtiene como sigue. Inicialmente se calcula el promedio de la integración de un hidrógeno de 1. Esto se muestra en la tabla 6.

Tabla 6.0. Hidrógenos de 1, usados en el análisis de porcentaje de pureza de una muestra por RMN ^1H

Hidrógeno	δ [ppm]	Integración
6	6.0	3.47. (1H)
7	6.4	3.11. (1H)
8	5.216	3.58. (1H)
Suma =		10.16 (3H)
Promedio de 1H =		3.386 (1H)

Para el compuesto [2], los datos se muestran en la tabla 7.0.

Tabla 7.0. Hidrógenos de 2, usados en el análisis de porcentaje de pureza de una muestra por RMN ^1H

Hidrógeno	δ [ppm]	Integración
7	7.892	0.50. (1H)
5, 4 y 6	7.678-7.478	1.54. (3H)
8	5.642	0.61. (1H)
Suma =		2.65 (5H)
Promedio de 1H =		0.53 (1H)

después, los valores de promedio de un hidrógeno de cada compuesto son sumados, esta suma representará el 100% de la muestra analizada, esto es:

$$3.386 (1\text{H}) \text{ de [1]} + 0.53 (1\text{H}) \text{ de [2]} = 3.916.$$

así para saber el porcentaje de [1] en la muestra analizada obtenemos el valor de la relación:

$$\frac{\text{promedio de (1H) para el compuesto [1]}}{\text{suma de los promedios de (1H) de [1] y [2]}} \times 100$$

substituyendo valores tenemos:

$$\frac{3.386}{3.916} \times 100 = 86.465$$

este es el porcentaje obtenido para [1]. Finalmente para obtener el porcentaje correspondiente a [2], se obtiene por diferencia del total y el valor obtenido para 2 es:

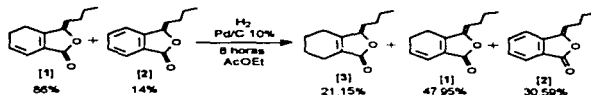
$$100 - 86.465 = 13.534$$

Por lo tanto, el porcentaje de pureza del Z-ligustilido [1], obtenido experimentalmente fue de 86.46 %, correspondiendo el porcentaje restante al Z-butildirifalido [2] (13.54%). Así, la materia prima que se empleó para la realización de las reacciones, consistió en 1 y 2 en las proporciones indicadas.

4.1 Reacciones de hidrogenación catalítica.

Reacción de hidrogenación con Pd al 10% en AcOEt por 2 horas.

Quando la mezcla de 1 + 2 (86:14) se mezcló con 10 mg de catalizador (Pd/C) previamente activado y puestos a reaccionar durante 2 horas, se logra observar por medio del análisis de *ccl* que la materia prima no se ha consumido totalmente, y un compuesto de mayor polaridad. El análisis del espectro de RMN ¹H de 300 MHz de una muestra del crudo de la reacción (Espectro 6), se logran observar las señales para los compuestos 1 y 2, y además una señal adicional. Esta señal es un triplete en δ 5.11 que corresponde al hidrógeno de la posición 8 del compuesto obtenido de la hidrogenación de 1, el cual es el 6,7-dihidroligustilido [3]. Este compuesto, ha sido informado como metabolito secundario y se han informado sus datos espectroscópicos de RMN ¹H, los cuales se muestran en la tabla 8.0. En esta tabla, se observan las señales de todos los hidrógenos, excepto el de la posición 5, ya que esta se superpone con las señales de los hidrógenos de 1 y 2. Sin embargo, esta señal es la utilizada para hacer el análisis de porcentaje de cada uno de los compuestos de la mezcla de reacción. En el esquema 11 se muestran los resultados obtenidos de esta reacción.



Esquema 11. Reacción de hidrogenación con Pd al 10% en AcOEt 2 horas.

Tabla 6.0 Comparación de señales del compuesto 3.
Informadas en la literatura.

Hidrógeno	6,7-dihidro- ligustilido 3 ^a	6,7-dihidro- ligustilido 3 ^b	6,7-dihidro- ligustilido 3 ^c
4	+	-	2.35, m
5	+	-	1.75, *
6	+	1.4-2.3, *	1.26-1.53, *
7	+	5.11, t	2.35, m
8	5.11, t	5.11, *	5.11, t
9	+	2.34, *	1.75, *
10	+	1.23, *	1.26-1.53, *
11	+	0.88, * (18.0)	0.94, t (7.0)

- ^a Datos obtenidos en la presente investigación. RMN¹H (CDCl₃, 300 MHz, espectro 6).
^b Datos obtenidos en la referencia 39. RMN¹H (CDCl₃, 300 MHz).
^c Datos obtenidos en la referencia 82. RMN¹H (CDCl₃, 80 MHz).
 +. El desplazamiento de estos hidrógenos se superponen con los de 1 y 2.
 *. Dato no informado.

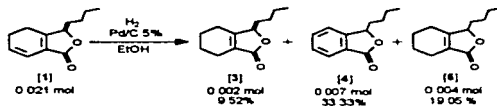
Se puede observar que si bien 1 no es transformado totalmente, se forma como producto al Z-6,7-dihidroligustilido [3], hay además un ligero aumento del compuesto 2. Esto indica que hay competencia entre la hidrogenación y la deshidrogenación. Esto hace suponer que en el seno de la reacción el catalizador posiblemente esta deshidrogenando la posición 4(5) de 1, y al mismo tiempo, está hidrogenando la posición 6(7) de 1. Es importante hacer notar que al parecer la hidrogenación y la deshidrogenación se efectúan con la misma velocidad, aunque comparando los porcentajes de la formación de 2 y 3 mostrados en el esquema 11, estos son un tanto favorables para el producto de hidrogenación, siendo estos del 21%. Si bien el rendimiento del producto de aromatización es 30%, hay que tomar en consideración que existe un poco de este compuesto en la materia prima (14%), de forma que lo que realmente se produce a partir de 1 es un 17%.

Además, en cuanto a la reactividad de 1 con respecto a la posibilidad de hidrogenación de las dobles ligaduras en 6(7) y 3(8), se observa que el doble enlace 6(7) es más reactivo que el 3(8). Esto se justifica ya que en el doble enlace 6(7) existe un menor impedimento estérico, por lo que el catalizador puede interactuar favorablemente.

Este resultado es semejante al obtenido por Mitsuhashi²¹ al hidrogenar [1], y obtener como productos de reacción a los compuestos Z-6(7)-dihidroligustilido [3], butilfálido [4] y 3(8),6(7)-tetrahidroligustilido [5]. Si bien las condiciones de reacción son distintas, es importante notar que no se indica el tiempo de reacción

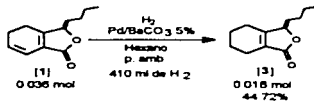
ni tampoco la cantidad de hidrógeno consumido. Esta reacción se detalla en esquema 12.

En esta reacción la cantidad de **4** generada representa la mitad del rendimiento, por lo que la materia prima debió de estar acompañada de **2**, aunque no se menciona. Se observa además la obtención **5**, esto es importante, ya que se puede confirmar su formación a partir de **3**, lo que confirma la reactividad de las dobles ligaduras de **1**.



Esquema 12. Reacción de hidrogenación realizada por Mitsuhashi.²¹

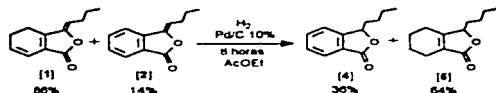
En otro informe del mismo autor,⁸ se indica la obtención de **3** empleando Pd/BaCO₃ al 5%, como único producto, siendo estas las condiciones óptimas para su preparación. Lo anterior se muestra en el esquema 13.



Esquema 13. Obtención de **4** informada por Mitsuhashi.⁸

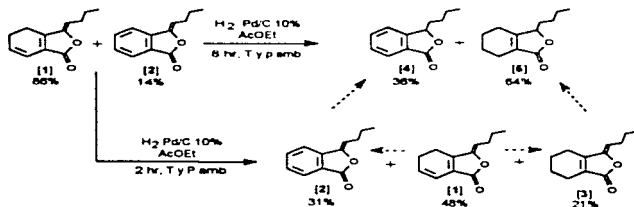
Reacción de hidrogenación con Pd/C al 10 % en AcOEt por 8 horas.

La hidrogenación de una disolución de **1** + **2** en AcOEt con 10 mg de catalizador Pd/C al 10% generó una mezcla de 2 compuestos de mayor polaridad. Uno de ellos, el cual es el de menor polaridad, el butilftárido [**4**], fue identificado por comparación de las señales de RMN ¹H obtenidas con las informadas en la literatura (Tablas 9.0-10.0). El otro compuesto, fue identificado como el 3(8),6(7)-tetrahidroglustilido [**5**], compuesto del cual no se tiene información espectroscópica, por lo que la asignación de las señales se efectúa por primera ocasión. Esta discusión se presenta posteriormente. En el esquema 14 se muestra la reacción efectuada así como los porcentajes de **4** y **5** obtenidos a partir del análisis del espectro de RMN ¹H de una muestra del producto crudo de la reacción (Espectro 7).



Esquema 14. Reacción de hidrogenación catalítica con Pd/C al 10% en AcOEt 8 horas.

En esta reacción se observa que 4 se obtiene en un porcentaje mucho menor comparado con 5. Posiblemente en este caso se observa que la velocidad de la reacción de hidrogenación es mucho más rápida que la de deshidrogenación. Es interesante notar que cuando se consume la materia prima [1] el catalizador busca otros sitios reactivos, estos pueden ser los dobles enlaces de las posiciones 3(B) de 2, que se genera en el seno de la reacción a partir de 1 y de 3, cuando este se ha producido a partir de 1. Lo anterior se esquematiza en el esquema 15.



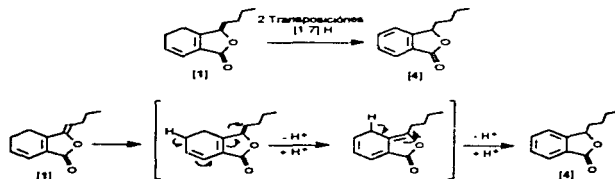
Esquema 15. Posibles rutas de obtención de los compuestos 4 y 5.

El esquema 15 indica que 8 horas de hidrogenación con paladio son suficientes para hidrogenar a la materia prima puesto que esta se ha consumido totalmente. Además se confirma que, efectivamente, la doble ligadura de la posición 6(7) de 1 es mas reactiva que la 3(B) y ésta a su vez, es mas reactiva que la doble ligadura de la posición 3a(7a).

Adicionalmente, es pertinente hacer algunas observaciones referentes a la formación de los productos obtenidos. Para el caso del compuesto [4], puede decirse que su precursor sea el compuesto [2], ya que puede hidrogenarse en la posición 3(B); además, 2 pudo al mismo tiempo generarse al deshidrogenarse la

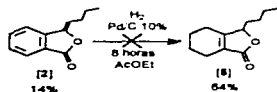
posición 4(5) de [1], como anteriormente se había discutido. Es decir, que durante el transcurso de la reacción además del 14 % de 2 ya presente, 1 genera el 25% restante para completar el 43% final.

Es interesante hacer notar que la aparición de una cantidad mayor de [5] que la esperada puede deberse a otra causa. En esas condiciones puede producirse por una secuencia de reacciones sigmatrópicas, o bien por protonaciones y desprotonaciones consecutivas de 1 para formar 4. Esta reacción y el presumible mecanismo se muestra en el esquema 16.



Esquema 16. Reacciones sigmatrópicas y/o transferencias protónicas que generan el compuesto 4 a partir de 1.

Por otro lado, la formación de 5 en una cantidad mayor también puede originarse por la posible hidrogenación parcial del compuesto aromático al no haber ya dobles ligaduras que hidrogenar. Aunque existe la posibilidad de reducción del doble enlace 3a(7a), esta es un poco difícil debido al impedimento estérico (Esquema 17).



Esquema 17. Ruta en la que se considera improbable la obtención de 5 a partir de 2, debido a las condiciones de reacción.

Con respecto al tetrahidroligustilido [5], se puede observar que es originado a partir de la formación del compuesto [3], (el cual es un intermediario), por la hidrogenación de la doble ligadura en la posición 3(8).

Discusión de la información espectroscópica de los compuestos 4 y 5.

En la tabla 9.0 se indican los datos obtenidos de RMN ¹H (espectro 8) en este trabajo para 4 los cuales son comparados con los informados en la literatura.

Tabla 9.0 Comparación de los datos de RMN ¹H obtenidos con los informados en la literatura para 4.

Hidrógeno	Butilálido 4 ^a	Butilálido 4 ^b	Butilálido 4 ^c
3	5.48, dd (4.1, 7.8)	-	5.48, dd (4.5, 8.1)
4	7.44, dd (0.9, 1.5, 7.5)	7.46, *	7.44, dd (0.8, 7.5)
5	7.67, ddd (1.5, 7.8, 1.5)	7.65, *	7.67, ddd (8.0) (1.5, 7.8, 7.8)
6	7.52, dd (0.9, 7.5, 7.5, 0)	7.52, *	7.53, dd (7.5, 7.5)
7	7.9, d (7.8)	7.9, *	7.90, d (7.5)
8a	2.11-1.99, m	2.3, *	1.78, m (*)
8b	1.83-1.71, m		
9	1.58-1.34, m	1.41, *	2.04, m (*)
10	1.58-1.34, m	1.23, *	1.37, M (*)
11	0.89, t (11.6)	0.90, *	0.91, T (7.2)

^a. Datos obtenidos en la presente investigación. RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz, espectro 8).

^b. Datos obtenidos en la referencia 39. RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz).

^c. Datos obtenidos en la referencia 15. RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz).

* Dato no informado.

En la tabla anterior se puede observar que en la literatura se informa que los H en la posición 8, son equivalentes, sin embargo, en el espectro obtenido muestra claramente dos grupos de señales con δ de 2.11-1.99, y 1.83-1.71, ambas señales integran para un hidrógeno. Conocer la multiplicidad de cada una de las señales es difícil, ya que la molécula presenta libre giro en el enlace C(3)-C(8).

Por otra parte, en tabla 10.0 se puede observar que los datos de RMN ¹³C (espectro 9) obtenidos en esta investigación con los mostrados en la literatura son prácticamente iguales.

Tabla 10.0 Comparación de señales de RMN ¹³C para 4

Carbono	Butilalido 4 ^a	Butilalido 4 ^b	Butilalido 4 ^c
1	170 61, s	170 2	170 66, s
3	81 40, d	81 1	81 43, d
3a	150 12, s	149 7	150 10, s
4	121 68, d	121 51	121 67, d
5	133 87, d	133 6	129 00, d
6	128 98, d	128 6	125 70, d
7	125 69, d	125 0	133 90, d
7a	126 21, s	125 6	136 51, s
8	34 44, t	34 0	34 42, d
9	26 87, t	26 5	26 87, d
10	22 41, t	22 0	22 41, t
11	13 82, q	13 4	13 85, c

- Datos obtenidos en la presente investigación. RMN ¹³C (CDCl₃, 125 MHz, espectro 9).
- Datos obtenidos en la referencia 39. RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz).
- Datos obtenidos en la referencia 15. RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz).

Por otro lado para el compuesto 5, no se tienen informes acerca de los datos de RMN ¹H, por lo que estos fueron asignados en el presente trabajo.

El espectro de RMN ¹H (espectro 10) muestra una señal en δ 4.80-4.77 que integra para un hidrógeno, este tipo de señales corresponden a hidrogenos que tienen un grupo electrotractor o a un átomo electronegativo, estos provocan que la señal se desplace a campo bajo, por lo que esta señal corresponde al hidrógeno en C(3). En cuanto a la multiplicidad de esta señal, no es homogénea, ya que, como en el caso del compuesto 4, en la posición 3, la cadena alifática presenta libre giro, adoptando varios conformeros.

Continuando con el análisis, en δ 2.52-2.19 se observa un sextuplete, que integra para cuatro hidrógenos. Esta señal puede ser generada por 4 hidrógenos que sean equivalentes magnéticamente. En la molécula, existen dos pares de hidrógenos de ambiente magnético similar. Un par de estos, son los metilenos en 5 y 6, mientras que el otro par, son los metilenos de 4 y 7. Considerando a los hidrógenos vecinales, los protones en 5 y 6, presentarían una mayor multiplicidad, ya que, cada uno puede interactuar con 4 hidrógenos, por lo que este par se descarta. El par de hidrógenos en 4 y 7, solo tienen dos hidrógenos vecinos, por lo que se esperaría una señal más sencilla, si cada uno de estos metilenos presenta un triplete, la señal observada, si estas no se transponen, se observaría un sextuplete, que es la señal que se observa, por lo tanto en δ mencionado al inicio corresponde a los metilenos de 4 y 7. Un argumento adicional para apoyar esta asignación es que la doble ligadura vecina a estos metilenos desplace la señal a campo bajo.

En δ 1.9-1.6 se observan dos señales, las cuales, se superponen parcialmente. Estas señales integran para seis hidrógenos. La señal a campo

bajo, que no presenta una multiplicidad homogénea, integra para 2 hidrógenos. Esta multiplicidad puede ser presentada por el metileno en 8, además de que, presenta un trazo semejante al presentado por el mismo metileno en el compuesto 4. La señal a campo alto presenta un quintuplete e integra para 4 hidrógenos. La forma de la señal es parecida a la de los metilenos en 4 y 7, por lo que, en base a lo ya discutido anteriormente, se dedujo que, esta señal corresponde a los metilenos en 5 y 6

En δ 1.55-1.3 aparecen dos señales superpuestas parcialmente como el caso anterior. La señal a campo bajo, presenta un quintuplete homogéneo, característico de un metileno con dos metilenos vecinos, por lo que dicha señal es asignada al metileno en 9, el cual, se espera que presente esa multiplicidad. La señal a campo bajo presenta un sextuplete, el cual integra para dos hidrógenos, por lo que esta señal se debe a un metileno que tiene un metilo y un metileno vecinos, por tanto, corresponde al metileno en 10. Finalmente, la señal en δ 0.95, que integra para 3 hidrógenos corresponde al metilo. Por otro lado, en el espectro 11, se muestran las señales de RMN ^{13}C , que fueron asignadas por analogía con estructuras semejantes.

Tabla 11.0 Datos de RMN ^1H * y ^{13}C ** para 5, obtenidos en esta investigación

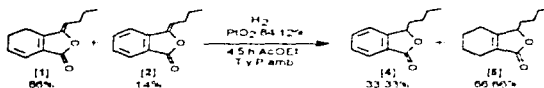
Posición	3(8),6(7)-tetra hidroiquitilido δ ^1H	3(8),6(7)-tetra hidroiquitilido δ ^{13}C
1		173.68, s
3	4.78, m	88.87, d
3a		163.60, s
4	2.22, sextup (7.8, 7.8)	23.16, d
5	1.79-1.67, quintup	21.60, t
6	1.79-1.67, quintup	21.60, t
7	2.22, sextup (7.8, 7.8)	19.84, t
7a		126.75, s
8	1.81, m	32.00, t
9	1.52-1.47, quintup	26.57, t
10	1.38, ddd (3.6, 3.6, 13.5)	22.43, t
11	0.91, t (6.9)	13.82, q

* (300 MHz, CDCl_3 , espectro 10).

** (75 MHz, CDCl_3 , espectro 11).

Reacción de hidrogenación con PtO_2 al 84.12% en AcOEt por 4.5 horas

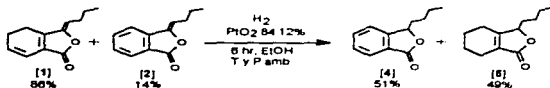
Cuando una cantidad de la mezcla de 1 + 2 es disuelta en AcOEt y se mezcla con PtO_2 durante 4.5 horas observa por medio de ccf la desaparición total de la materia prima y la formación de 2 productos de mayor polaridad, los cuales fueron identificados como 4 y 5. Mediante el análisis del espectro de RMN 1H de 200 MHz de una muestra del crudo de la reacción indica una porcentaje de 33.3% de 4 y 66.6% de 5 (Espectro 12). Es interesante notar que el resultado con respecto a las proporciones de los productos obtenidos es casi el mismo al que se obtuvo cuando se utilizó paladio, solo que con platino se reduce el tiempo de reacción. Cabe aclarar que el platino posee mayor capacidad catalítica. Este resultado se ilustra en el esquema 18.



Esquema 18. Reacción de hidrogenación catalítica con PtO_2 al 84.12% en AcOEt 4.5 horas

Reacción de hidrogenación con Pd/C al 10% en EtOH 6 por horas

En esta reacción se trata de observar el efecto del disolvente en la proporción de los productos de reacción. Cuando la mezcla de 1 + 2, fue puesta a reaccionar con Pd/C durante 6 horas en etanol, se puede observar que es transformado totalmente, y además se observa la aparición de dos productos de reacción, que fueron los mismos que se han obtenido en las reacciones anteriores, los compuestos [4] y [5]. El análisis del espectro de RMN 1H indica una relación de 1:1. (Espectro 13). Este resultado es interesante ya que un medio de mayor polaridad favoreció la velocidad de la reacción de deshidrogenación con respecto a la hidrogenación, resultado contrario al observado en reacciones anteriores. El esquema 19 muestra las proporciones obtenidas de [4] y [5] para esta reacción.



Esquema 19. Reacción de hidrogenación catalítica con PtO_2 al 84.12% en etanol 6 horas.

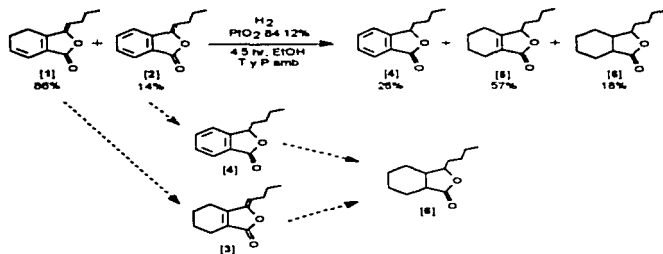
Reacción de hidrogenación con PtO₂ al 84.12% en EtOH por 4.5 horas.

En esta reacción se trata de observar el efecto del disolvente y el efecto del catalizador. Cuando se disuelve la mezcla de 1 + 2 en etanol y se mezcla con PtO₂ durante 4.5 horas la materia prima se consume. Por medio del análisis de ccf aparecen tres compuestos de mayor polaridad. El análisis del espectro de RMN ¹H de 300 MHz (espectro 14), de una muestra del crudo de la reacción muestra un grupo de señales que no se había observado anteriormente, estas señales aparecen en campo bajo, (δ 4.2) otras a campo alto entre un δ 2.5 y 3.0. Estas señales, fueron comparadas con las informadas en la literatura para el compuesto 3(8),6(7),3a(7a)-hexahidroligustilido [6]. Este compuesto ha sido informado en la literatura como metabolito secundario⁶² y, obtenido por medio de síntesis por relevo,^{63,64} a partir del butilftálico y del sedanenólido mediante hidrogenación catalítica. La comparación de las señales observadas por RMN ¹H, (cuya discusión se detalla en el final de la discusión de esta reacción), se muestra en la tabla 12.0. Este resultado indica que por medio de condiciones suaves de temperatura y presión es posible efectuar la hidrogenación del doble enlace C(3a)-C(7a) de 1.

En efecto, la polaridad del disolvente favorece la velocidad de la reacción de hidrogenación, que en los casos anteriores competía con la reacción de deshidrogenación. Esto se manifiesta al comparar los porcentajes de 4. Como se observó en los casos anteriores, dicho compuesto se había presentado en un mayor porcentaje, entre el 33 y 51% y, en esta reacción se redujo a 25.55%. Esta reacción ilustra el efecto el disolvente sobre el sustrato y el catalizador.

Por otro lado, la disminución de 4 y la aparición de 6 se pueden deber a la hidrogenación precisamente de 4. Es decir, del anillo aromático presente en este compuesto, por lo que ahora se puede comentar que hay competencia entre dos grupos funcionales que son el anillo aromático y el doble enlace 3a(7a) de 5. En la literatura se ha informado la obtención de 6 a partir de 4, sin embargo, no se menciona el tiempo de reacción.⁶⁵

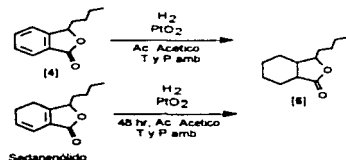
Lo anterior permite proponer rutas para la obtención de estos compuestos a partir de [1], los cuales se muestran en el esquema 20.



Esquema 20. Reacción de hidrogenación con PtO_2 en $EtOH$ 4.5 horas. En la parte inferior del diagrama se muestran los presuntos precursores del hexahidrogustilido [6]. Obsérvese que 6 presenta tres centros estereogénicos.

Discusión acerca de la asignación de señales de RMN 1H de 6.

Las señales de RMN 1H , para el compuesto 6, se muestran en la tabla 12.0. En la literatura se ha informado el aislamiento de este compuesto como metabolito secundario, y además, ha sido obtenido como producto de síntesis por relevo, a partir butilfáltido [4], y del sedanenólido, como se muestra en el esquema 21.



Esquema 21. Obtención de 6 a partir de butilfáltido [4], y sedanenólido. Cabe mencionar que en ambos casos se utiliza ácido acético glacial y exceso de catalizador. No se informan rendimientos.

Tabla 12.0 Comparación de señales de RMN ¹H para 6.

Posición	3(8),6(7),3a(7a)-hexahidro ligustilido 6 ^a	3(8),6(7),3a(7a)-hexahidro ligustilido 6 ^b
3	4.24, dddd (3.38, 5.56, 8.1)	4.12, m W _{1/2} = 10
3a	2.62, dddd (4.13, 8.25, 7.8)	
7a	2.99, dd (12.0, 12.0)	2.61, m W _{1/2} = 12

a. Datos obtenidos en esta investigación. RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz, espectros, 14, 15 y 16)
 b. Datos obtenidos en la referencia 62 RMN ¹H (CDCl₃, 60 MHz).

La comparación de las señales indica que existen algunas variaciones. Es importante comentar que la reacción de hidrogenación aparentemente no es estereoselectiva y debido a esto, se considera que en la mezcla de reacción hay varios estereoisómeros, los cuales no pueden ser diferenciados totalmente por RMN.

La asignación de señales se realizó por medio de su multiplicidad, y las constantes de acoplamiento que se indican, son el promedio de las observadas. Si bien, la multiplicidad no es muy clara, se han hecho varias suposiciones. Para la señal en δ 4.24, que corresponde al H-3, tiene vecinos a 3H, por lo que se generaría un ddd (8 señales). Si, en el último desdoblamiento de señales, estas se juntaran, daría lugar a un quintuplete. Este tipo de señal es la que experimentalmente se observa.

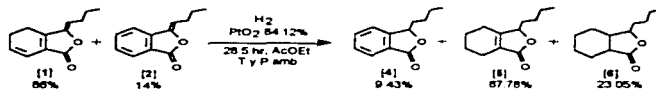
Para el hidrógeno H-7a (δ 2.99), se puede observar que tiene a 3 hidrógenos vecinos. Como hipótesis, las multiplicidades que se pueden proponer serían, un triplete que se dobletea y un doble de doble. En el último caso, si las señales se superponen se podría generar un triplete, este comportamiento es el observado, por lo que esta señal se asigna a este hidrógeno. Por otro lado, la señal en δ 2.62 se observa como triplete y se asigna a 3a. Finalmente, no es posible la asignación de los hidrógenos adicionales ya que hay notable superposición de señales.

Reacción de hidrogenación con PtO₂ al 84.12% en AcOEt por 28.5 horas.

Después del resultado obtenido en la reacción anterior, se intentó evaluar el efecto del disolvente a tiempos de reacción largos y usando platino como catalizador.

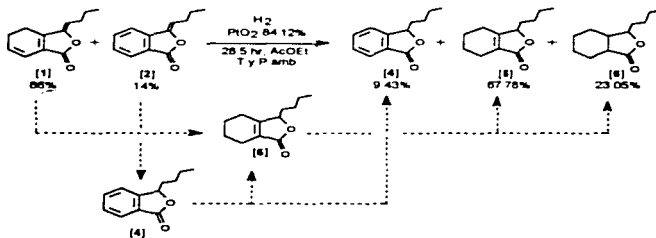
Una disolución de la mezcla 1 + 2 en AcOEt fue mezclada con PtO₂ durante 28.5 horas. El análisis de ccf indica la presencia de tres compuestos, como se esperaba. El análisis del espectro de RMN ¹H de 300 MHz (espectro 15)

del crudo de la reacción indica que la mezcla se constituía de 3 compuestos, que fueron identificados como 4, 5 y 6, con los porcentajes que se muestran en el esquema 22.



Esquema 22. Reacción de hidrogenación catalítica con PtO_2 al 84.12% en AcOEt 28.5 horas.

En este esquema puede observarse la reducción parcial del anillo aromático, y la poca reactividad de la doble ligadura 3a(7a) del compuesto [5]. El precursor de [6] puede ser [4], pero teniendo al compuesto [5] como intermediario. Esto se puede observar en el esquema 23.

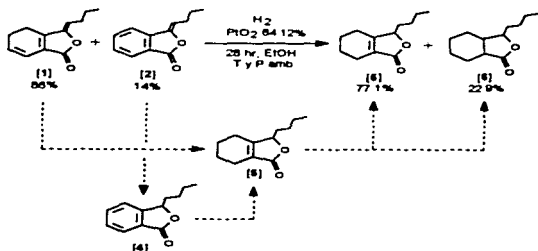


Esquema 23. Rutas propuestas para la formación de [6] a partir de [4] y [5]. Nótese que [5] puede considerarse intermediario en la reacción.

Reacción de hidrogenación con PtO_2 al 84.12% en EtOH por 28 horas.







De la experiencia de las reacciones anteriores se conoce que es posible obtener el hexahidrido [6], sólo que para poder comparar el efecto de los disolventes en los productos de la reacción se efectuó una prueba al hacer reaccionar la mezcla de 1 + 2 en etanol con PtO_2 durante el mismo tiempo de reacción. El análisis de *ccf* indica que había una mezcla de dos productos de reacción, observándose por comparación con muestras de anteriores reacciones que se trataban de los compuestos 5 y 6. Este resultado puede confirmar lo

anteriormente descrito, el compuesto **4** es más susceptible a la hidrogenación que el compuesto **5**, ya que mediante el análisis del espectro de RMN ^1H de 300 MHz (espectro 16), de una muestra del producto crudo indicó que el compuesto **4** había desaparecido totalmente, y que el compuesto **5** aumentaba en proporción aunque sin aumentar la cantidad de **6**. Esto confirma la etapa de la transformación de **4** a **6** es la etapa lenta de la reducción y al parecer se requieren tiempos de reacción mayores para que **5** pueda transformarse totalmente en **6**. Posiblemente se requiera adicionalmente presión para optimizar la reducción total. Los porcentajes de los compuestos **5** y **6** se muestran en el esquema 24.



Esquema 24. Transformación de [1] hasta el derivado [5] que su vez genera [6].

Tabla 13.0 Resultados de los experimentos de hidrogenación y deshidrogenación catalítica.

Experim.	Catalizador	Disolvente	Tiempo (h)	Productos obtenidos %					
									
				[1]	[2]	[3]	[4]	[5]	[6]
1				86	14				
2	Pd/C	AcOEt	2	47.93		21.15	30.59		
3	Pd/C	AcOEt	8				35.84	64.01	
4	Pd/C	AcOEt	8 (reflujo)		100				
5	Pd/C	EtOH	6				50.96	49.03	
6	Pd/C	EtOH	6 (reflujo)		100				
7	PtO ₂	AcOEt	4.5				33.33	66.66	1
8	PtO ₂	AcOEt	28.5				9.43	67.78	23.05
9	PtO ₂	EtOH	4.5				25.55	56.58	17.86
10	PtO ₂	EtOH	4.5 (reflujo)		46.26*		15.97*		
11	PtO ₂	EtOH	28					77.10	22.90

Nota. Los datos presentados en la tabla fueron obtenidos de acuerdo al análisis de las señales para cada uno de los compuestos. La metodología de este análisis de las mezclas fue la misma que se realizó a la materia prima.

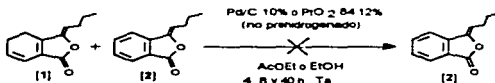
* Resultado obtenido experimentalmente.

4.2 Reacciones de deshidrogenación catalítica

Intentos de reacciones de deshidrogenación catalítica de 1 a temperatura ambiente.

Para evaluar la posibilidad de aromatización de **1**, y cuantificar la cantidad de **2** en presencia de catalizador no prehidrogenado, se llevaron a cabo algunos ensayos experimentales. Se efectuaron 4 reacciones a temperatura ambiente variando el disolvente (AcOEt y EtOH), el catalizador (Pd/C y PtO₂) y, el tiempo de reacción.

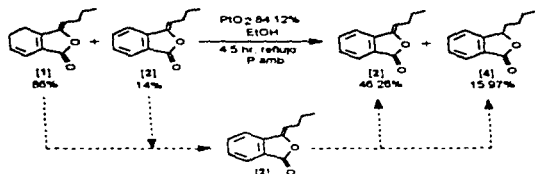
Los resultados demostraron que no hubo transformación significativa de **1** a **2**, ya que por medio del análisis de RMN ¹H de las espectros en cada una de las condiciones efectuadas, se mantiene el mismo porcentaje inicial. Lo anterior se muestra en el esquema 25.



Esquema 25. Intentos de reacciones de deshidrogenación

Reacción de deshidrogenación catalítica con PtO₂ al 84.12 % en EtOH a reflujo.

Al observar los resultados de las reacciones de deshidrogenación a temperatura ambiente se planteó que el catalizador posiblemente necesitaría un energía de activación para efectuar la deshidrogenación. Cuando se mezcló **1** + **2** en EtOH con PtO₂ y puestos a reflujo durante 4.5 horas, se transformó totalmente la materia prima, observándose una mezcla de varias sustancias. El producto crudo obtenido fue separado por cromatografía en columna, del cual se aislaron dos compuestos. Estos fueron el Z-butilidenoalído **2** y el butilidenoalído **4**. Este resultado indica que, aún sin hidrógeno, el catalizador hidrogena la posición 3(8) de **1** y **2**, y que posteriormente se deshidrogena. Es interesante notar que bajo condiciones de deshidrogenación el catalizador puede hidrogenar la molécula, por lo que es evidente que existen la competencia entre la reacción de hidrogenación y la de deshidrogenación. Sin embargo, se obtiene favorablemente el producto deseado según las condiciones de reacción. Lo anterior se puede observar en el esquema 26.

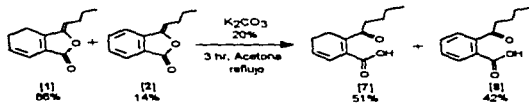


Esquema 26. Formación de los productos de deshidrogenación catalítica. En este caso también se presenta la competencia entre las reacciones de deshidrogenación y la hidrogenación catalítica. Se muestra además la ruta posible que puede seguir [1] para transformarse en [2] y este último para generar [4].

4.3 Reacción de hidrólisis básica de 1 con K_2CO_3 al 10%.

En la literatura se han informado algunas técnicas de apertura de la lactona de varios ftálicos por medio de una reacción de hidrólisis básica.^{19,20} Casi todas fueron efectuadas con dos álcalis fuertes, (hidróxido de sodio e hidróxido de potasio), los tiempos de reacción varían entre 1 a 3 horas y se observa que los rendimientos en general son altos. En nuestro laboratorio se ha efectuado la reacción de hidrólisis básica de 1 en un estudio previo.¹⁵ Este indica que cuando una disolución de 1 en acetona se mezcla con una disolución de K_2CO_3 al 10% y a reflujo durante 1 hora se realiza la hidrólisis de 1.

Debido a lo anterior la reacción con el fin de optimizar el rendimiento se efectuó la reacción elevando la concentración del K_2CO_3 a 20%, y el tiempo de reacción a 3 horas, esperando con ello la transformación total de 1. Esta reacción se detalla en el esquema siguiente.



Esquema 27. Reacción de hidrólisis básica para el Z-ligustilido [1].

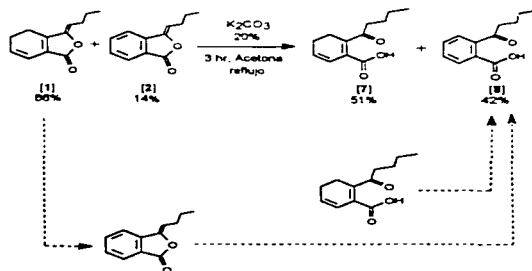
Después de este tiempo se logra observar 2 productos de reacción de mayor polaridad y materia prima remanente. El crudo de reacción obtenido fue

separado por ccv, obteniendo en las fracciones iniciales casi el 50% de materia prima. En fracciones intermedias se logra obtener el compuesto de menor polaridad 7, este revela una mancha amarilla con sulfato cérico en ccf.

En las fracciones finales se logra separar al compuesto de mayor polaridad 8, el cual esta recién revelado con sulfato cérico en ccf presenta una mancha rosa intensa, que se vuelve café conforme transcurre el tiempo. El comportamiento presentado por este compuesto se asemeja al presentado por 2, por lo que, inicialmente se puede deducir que se trata del derivado obtenido de la hidrólisis de 2. Esto fue posteriormente confirmado por los datos de RMN de ^1H .

Por anterior, el compuesto de menor polaridad se identifica como el ácido derivado del Z-ligustilido [1]. Cabe mencionar que este compuesto al contacto con luz y calor se transforma espontáneamente al compuesto aromático 8.

Por otra parte, aunque se observa que la materia prima no se consume totalmente, los rendimientos experimentales muestran como en casos anteriores, que durante el transcurso de la reacción hay transformación espontánea de 1 a 2 y posiblemente de 7 a 8. En ambos casos se puede decir que la transformación de 1 a 2 y posteriormente la hidrólisis de este para formar 8, es presumiblemente menos probable, ya que se observa que la labilidad de 7 es mayor que la que presenta 1, por lo que es mas probable la transformación espontánea de 7 a 8. Lo anterior se muestra en el esquema 28.



Esquema 28. Ruta de formación de 8 a partir de 2 y 7.

Con el tiempo de reacción de 3 horas se esperaba que la hidrólisis fuera total, ya que en principio, la reacción de hidrólisis es favorecida. Si bien la base

utilizada es mas suave que las que se han utilizado en la literatura, esta fue elegida precisamente para reducir la transformación de 1 a 2 al emplear condiciones suaves de reacción.

Si bien en las condiciones de reacción empleadas se obtiene el producto deseado con un buen rendimiento, estas necesitan ser mas estudiadas con el fin de optimizar la reacción.

Experimentalmente se observa que la agitación es un factor importante, ya que cuando se mezcla la disolución de carbonato con la disolución de 1 en acetona, aparecen dos fases que no son miscibles, por lo que la interacción entre estas se reduce si la agitación es muy lenta. Adicionalmente en la literatura no hay informes acerca de que los compuestos 7 y 8 hayan sido aislados como metabolitos secundarios. De acuerdo con lo anterior, únicamente se tiene la información espectroscópica para 7.

Asignación de señales de RMN ^1H y ^{13}C para el compuesto 7.

La asignación de las señales del espectro de RMN ^1H (espectro 17.) de compuesto 7 fue realizada por comparación con el estudio previo efectuado en este laboratorio. Esto se muestra en la tabla 14.0. En dicha tabla se puede observar que hay hidrógenos que aunque pertenecen al mismo carbono, no son equivalentes, estos se aprecia en el experimento HMQC (espectro 19), al observarse desplazamientos químicos distintos esto es ocasionado por la diferencia en el ambiente químico y a la posición espacial de las moléculas. Es importante decir que este comportamiento no se observa en 1.

Tabla 14.0 Comparación de la asignación de señales de los espectros de RMN ¹H y ¹³C de 7.

Posición	Acido 7 ^a ¹ H	Acido 7 ^b ¹ H	Acido 7 ^a ¹³ C	Acido 7 ^b ¹³ C
1			169.50, s	169.50, s
3			158.93, s	201.00, s
3a			125.87, s	158.81, s
4a	2.64-2.58, m	2.50 m W _{1/2} = 9.7 Hz	19.29, t	25.10, t
4b	2.49-2.39, m	2.50 m W _{1/2} = 9.7 Hz		
5	2.50-2.44, m	2.50 m W _{1/2} = 9.7 Hz	22.41, t	22.45, t
6	5.96, ddd (4.0, 4.0, 9.5)	5.97 dt (9.7, 2.8)	130.01, d	130.16, d
7	6.14, ddd (2.0, 4.0, 9.5)	6.16 dt (9.7, 0.8)	116.24, d	116.32, d
7a			107.61, s	126.00, s
8a	2.03, ddd (4.0, 12.0, 12.5)	1.95, m W _{1/2} = 37.2 Hz	35.83, t	35.90, t
8b	1.81, ddd (4.0, 11.0, 14.0)	1.95, m W _{1/2} = 37.2 Hz		
9a	1.36-1.29, m	1.32, m W _{1/2} = 23.0 Hz	25.10, t	22.45, t
9b	1.24-1.16, m	1.32, m W _{1/2} = 23.0 Hz		
10	1.36-1.29, m	1.32, m W _{1/2} = 23.0 Hz	22.41, t	19.33, t
11	0.89, t (6.5)	0.90, t (6.4)	13.74, q	13.80, q

a. Datos obtenidos en la presente investigación. Se indica δ [ppm], multiplicidad y J [Hz].
 RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz), Espectro 17; RMN ¹³C (CDCl₃, 125 MHz), Espectro 18.
 b. Datos obtenidos de la referencia 15: RMN ¹H (CDCl₃, 200 MHz); RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz).

Por otro lado, en la tabla 15.0 se indica la información de RMN ¹H (espectro 20) y ¹³C (espectro 21) compuesto 8. Como en el compuesto anterior, se observa que hay hidrógenos que están en el mismo carbono y que, sin embargo, difieren en su desplazamiento químico. Esto se puede observar en el experimento HMQC (espectro 22) de este compuesto.

En cuanto a la asignación de las señales de los hidrógenos del anillo aromático, se puede observar que presentan el mismo comportamiento que los asignados para 2 y 4.

Tabla 15.0. Asignación de señales de los espectros de RMN ^1H * y ^{13}C ** de 8.

Posición	Acido 8 ¹ ^1H	Acido 8 ⁶ ^{13}C
1		168.75, s
3		132.80, s
3a		148.96, s
4	7.55, d (7.5)	122.27, d
5	7.70, dd (8.0, 8.0, 0.7)	134.58, d
6	7.56, dd (7.5)	130.47, d
7	7.81, d (7.5)	126.19, d
7a		129.55, s
8a	2.20, ddd (5.0, 12.0, 14.0)	38.52, t
8b	2.07, ddd (5.0, 12.0, 14.0)	
9a	1.42-1.33, m	25.36, t
9b	1.17-1.10, m	
10	1.31, q (7.5)	22.41, t
11	0.853, t (7.5)	13.72, q

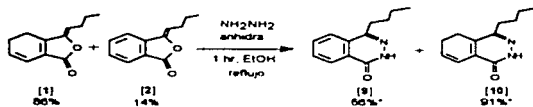
* (500 MHz, CDCl_3 , espectro 20)

** (125 MHz, CDCl_3 , espectro 21)

4.4 Reacción de 1 con hidrazina anhidra. Obtención de ftalazonas.

Esta reacción se encuentra informada para el establecimiento de la estructura del Z-ligustilido [1],²⁰ o de otros ftálidos.^{9,23} Este tipo de reacciones, hace décadas eran muy utilizadas precisamente para ayudar a la identificación de compuestos, ya que generalmente se obtienen derivados sólidos.

En nuestro laboratorio esta reacción se ha efectuado obteniendo buenos rendimientos.¹⁵ Cuando una disolución de etanol de la mezcla 1 + 2, mezclada con hidrazina anhidra se somete durante 1 hora a reflujo, es posible observar por medio de ccf la transformación total de la materia prima y la obtención de dos productos de reacción de mayor polaridad. En el esquema 29 se muestra esta reacción.



Esquema 29 Reacción de 1 con hidrazina anhidra para obtener las ftalazonas
* El porcentaje indica el rendimiento experimental

La separación por cromatografía en columna abierta del crudo de la reacción permite aislar al compuesto de menor polaridad que en ccf revela con lámpara de UV una mancha negra y no revela con sulfato cérico amoniacal.

El compuesto de mayor polaridad muestra en ccf al ser revelado con lámpara UV λ 254 y 365 nm una fluorescencia morada intensa muy parecida a la que muestra la materia prima, esta similitud en el comportamiento permitió deducir que se trataba de la ftalazona derivada del Z-ligustilido [1]. Este hecho fue confirmado por el análisis del espectro de RMN

Esta reacción es favorecida en condiciones anhidras, ya que en el mecanismo de reacción una de las etapas implica la formación de agua. Esta reacción es prácticamente cuantitativa, y el rendimiento obtenido es el más alto de todas las reacciones efectuadas sobre 1. El compuesto obtenido 10 es estable cuando es expuesto a luz y calor, y no muestra transformación espontánea al derivado aromático 9.

Asignación de señales para el compuesto 9.

Las señales de RMN ^1H (espectro 23) de 9, por ser un compuesto aromático, siguen el mismo comportamiento presentado por los compuestos 4 y 8. Las señales observadas a alto campo, son atribuidas a la cadena de butilo. En δ 2.95 aparece un triplete que integra para 2 hidrógenos, esta señal es presentada por los carbonos del metileno en 8, ya que tiene a dos hidrógenos vecinos, y demás, la integración es adecuada para este carbono. En δ 1.77 aparece un quinteto que integra para 2 hidrógenos; esta multiplicidad sería esperada para el metileno de la posición 9 por tener acoplamiento con 4 hidrógenos vecinos. Además, se logra observar, en δ 1.48 a un sexteto que integra para 2 hidrógenos, esta multiplicidad sería esperada para el metileno en 10, el cual esta acoplado a 5 hidrógenos. Finalmente, la señal en δ 0.99 corresponde al triplete del metilo. La señales de RMN ^1H y ^{13}C para 9, se muestran en la tabla 16.0

Tabla 16.0 Datos de las señales de los espectros de RMN ^1H y ^{13}C ** para el compuesto 9.

Posición	Ftalezaza 9 ^1H	Ftalezaza 9 ^{13}C
1		160.38, s
3	10.33, s	147.90, s
3a		133.41, s
4	7.93, dd (1.2, 3.5)	124.80, d
5	7.85, dd (1.5, 3.3)	133.41, d
6	7.78, ddd (3.0, 4.5, 7.8)	131.27, d
7	8.48, dd (1.2, 1.2, 7.8)	127.10, d
7a		129.47, s
8	2.95, t (7.8, 7.8)	31.82, t
9	1.77, quintuplete (7.8)	30.00, t
10	1.48, sext (7.8)	22.54, t
11	0.99, t (7.8)	13.86, q

* (200 MHz, CDCl_3 , espectro 23.)

** (75 MHz, CDCl_3 , espectro 24.)

Asignación de señales para el compuesto 10.

La comparación de los datos de 10 con los de 9, en particular los correspondientes a los metilenos endocíclicos y los correspondientes a la cadena alquílica, permitieron la asignación de las señales. Además, los datos obtenidos de las señales de 10 pueden ser comparadas con las obtenidas en un estudio previo.¹⁷ Estas señales y la comparación de estas se muestran en la tabla 17.0.

Tabla 17.0 Datos de espectroscopía de RMN de ^1H y ^{13}C para el compuesto 10.

Posición	Ftaleza de 1° , ^1H	Ftaleza de 1° , ^1H	Ftaleza de 1° , ^{13}C	Ftaleza de 1° , ^{13}C
1			158.56, s	159.62, s
2	11.25, s	11.67, sa		
3			148.55, s	148.55, s
3a			136.01, s	136.01, s
4	2.64, td (2.1, 2.1, 9.8)	2.70-2.55, m	29.81, t	29.86, t
5	2.43-2.35, m 6.28, ddd	2.70-2.55, m 6.28, dt	21.99, t	132.78, d
6	(4.2, 4.2, 5.7)	(9.7, 4.4)		
7	6.83, ddd (2.1, 2.1, 9.6)	6.83, dt (9.7, 1.9)	120.305, d	120.27, d
7a			131.80, s	131.67, s
8	2.59, t (8.1)	1.67-1.25, m	31.96, t	31.99, t
9	1.59, quintu (7.5)	2.39, m	22.38, t	22.40, t
10	1.40, sextup (6.9)	1.67-1.25, m	21.737, t	21.75, t
11	0.975, t (6.9)	0.95, t (7.0)	13.83, q	13.88, q

^a Datos obtenidos de la presente investigación RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3 , espectro 25.), RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , espectro 26).

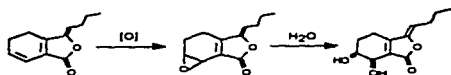
^b Datos obtenidos de la referencia 15. RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3), RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3).

En la tabla anterior, se pueden observar algunas variaciones. En esta investigación se logra una mejor separación de las señales y la multiplicidad, por lo que se logra asignar dichas absorciones.

4.5 Reacción de epoxidación de 1 con AMCPB .

La reacción de 1 con ácido *meta*-cloroperbenzoico (AMCPB) ha sido informada repetidamente en la literatura,^{41,64,65,67} sin embargo, en la mayoría de los procedimientos descritos, no se lleva a cabo el aislamiento del epóxido. El objetivo de dichas técnicas es la formación del epóxido, el cual sirve como intermediario para la obtención de la mezcla de dioles *cis*- y *trans*-. Esta última reacción se discutirá mas adelante.

El producto de la reacción de epoxidación de 1, el compuesto Z-6,7-epoxilugustilido se ha informado que ha sido aislado la planta *Ligusticum wallichii*.⁶⁸ En este informe se detallan algunas de sus propiedades espectroscópicas y además se muestra la obtención de 11 a través de transformaciones de 1, esto se muestra en el esquema 30.




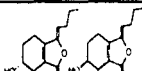

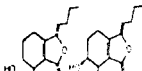



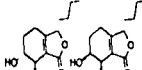

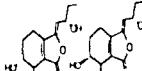
Esquema 30. Biosíntesis del diol a partir del 1.⁹⁹

Debido a lo anterior, se decidió realizar el aislamiento y caracterización del epóxido para comprobar para comprobar la información espectroscópica disponible.

Por otro lado, para la elección de las condiciones de reacción más adecuadas para efectuar esta reacción, se realizó una revisión en la literatura, encontrando varias técnicas. Estas se muestran en la tabla 18.0.

En esta tabla se detallan la relación estequiométrica entre el varios ftálicos (substrato), que presentan una doble ligadura en la posición 6(7), y el AMCPB, distintas condiciones de reacción empleadas. Se indican además, los rendimientos totales.

Tabla 18.0 Comparación de los métodos usados en la literatura para efectuar la reacción de epoxidación de algunos fármacos con AMCPB.

Sustrato	Cantidad de Sustrato [mg] (mmol)	Cantidad de AMCPB [mg] (mmol)	Rel. esteq S/cir AMCPB	Condiciones de Reacción. T [°C], t [min], vol CH ₂ Cl ₂ [ml]	Condiciones de Apertura del Epóxido.	Productos obtenidos	Rendimientos mg, (mmol), %
 PM: 190 ^a	1001 (4.3730)	915.4 (5.3220)	1:1.2	reflujo, 90, 10	Acetona-Agua (1:1, 10 ml), 0.3 ml de H ₂ SO ₄ al 10 %, agitación, 0°C, 1.5 h		(<i>trans</i> -) 88.2, (0.3848), 31.7 (<i>cis</i> -) 12.0, (0.0535), 4.41 ^a
 PM: 190 ^b	200 (1.0526)	100 (0.5813)	2:1	reflujo, 2, 5	THF-Agua (6:1, 7 ml), 1 gota de HClO ₄ al 78% (reacción rápida)		(<i>trans</i> -) 22, (0.0982), 9.33 (<i>cis</i> -) 132.0, (0.5897), 56.020 ^b
 PM: 190 ^c	100 (0.5263)	100 (0.5813)	1:1	60, 2, 2	THF (1.5 ml), 0.15 ml de HCl conc. (reacción rápida)		(<i>cis</i> -) 81.3, (0.3358), 63.80 ^c
 PM: 192 ^d	111.5 (0.5868)	219.3 (1.2750)	1:2	ta, 60, 2.5	Dioxano-Agua (2:1, 1.5 ml), 0.15 ml de H ₂ SO ₄ [3M], agitación, 0°C, 30 min		(<i>trans</i> -) 22.9, (0.124), 21.13 (<i>cis</i> -) 38, (0.1681), 28.64 ^d
 PM: 206 ^e	72.2 (0.3504)	190.8 (1.1090)	1:3	ta, 30, 1.5	Dioxano-Agua (5:2, 1.6 ml), 0.25 ml de H ₂ SO ₄ [3M], agitación, 0°C, 1h		(<i>trans</i> -) 3.7, (0.0154), 4.39 (<i>cis</i> -) 3.9, (0.0162), 4.62 ^e

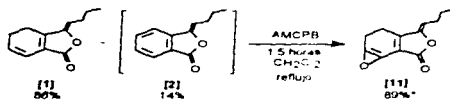
^a Condiciones obtenidos en la presente investigación. ^b Datos obtenidos de la referencia 64. ^c Datos obtenidos de la referencia 41.

^d Datos obtenidos de la referencia 65. ^e Datos obtenidos de la referencia 67.

Es interesante remarcar las diferencias en las condiciones de reacción informadas. Con respecto a la relación estequiométrica entre **1** y el AMCPB, se observa que no hay uniformidad. Por un lado, se puede pensar que con un exceso de **1**, (Renglón 2), la reacción es más selectiva, y que se favorecería la epoxidación del doble enlace 6(7). Por el contrario, un exceso de AMCPB tendría menos selectividad ya que al epoxidar totalmente la doble ligadura en 6(7) se efectuaría la oxidación de la posición 3(8). Por otra parte, los tiempos de reacción, en general, son cortos.

Cuando se efectuaron experimentos con las condiciones de reacción informadas para **1**, los resultados no fueron repetitivos. Principalmente, porque en los tiempos de reacción descritos, la materia prima no reacciona completamente. Debido a lo anterior, esta reacción se efectuó con algunas variaciones, principalmente cambiando los tiempos de reacción y la relación estequiométrica.

Cuando una cantidad equivalente de la mezcla de **1** + **2** y de AMCPB son disueltos en CH_2Cl_2 y puestos a reflujo durante 3 horas, se puede observar mediante el análisis de ccf la obtención de un producto de reacción de mayor polaridad y materia prima remanente. Esta reacción se muestra en el esquema 31.



Esquema 31 Obtención de **11** a partir de **1**.
* El porcentaje indicado es el rendimiento a partir de **1**.

Mediante la separación por ccv del producto crudo de la reacción se logra obtener en las fracciones iniciales materia prima remanente (66% de transformación). En posteriores fracciones se obtiene el compuesto de mayor polaridad. Este compuesto presenta una transformación espontánea si se pone en contacto con el aire y luz. Entre los productos de la transformación de **11** se pueden identificar a una mezcla de dioles. La transformación de **11** se trató de reducir mediante la eliminación del ácido meta cloro perbenzóico remanente, por filtración sobre alúmina.

Cabe indicar que en esta reacción se trató de favorecer la epoxidación de **1** en el doble enlace 6(7) y disminuir la de la posición 3(8), tanto de **1** como de **2**, es por ello que se mantuvo la reacción durante un tiempo corto y se utilizó una relación estequiométrica de 1:1.2.

Comparación de los datos informados en la literatura para el epóxido.

Los hidrógenos correspondientes a las posiciones geminales a oxígeno, es decir, en las posiciones 6 y 7 muestran gran diferencia con los informados en la literatura y los obtenidos por nuestro laboratorio. Se esperaría que los δ observados fueran semejantes con el compuesto aislado de la planta. En la tabla 19.0, se muestran los δ químicos de las señales de RMN ^1H , (espectro 27) para el epóxido derivado del Z-ligustilido 1. Adicionalmente, en la tabla 20.0 se muestra la asignación de las señales de RMN ^{13}C (espectro 28) para dicho compuesto.

Observando los valores de la tabla, se puede observar que varios datos son distintos, principalmente, las señales que se asignan a los hidrógenos vecinos a la base de oxígeno del epóxido. Esto conduce a discutir las señales de estos dichos hidrógenos en 4, 5, 6 y 7. Las señales restantes, son similares con las informadas, por lo que, no se discutirán.

Tabla 19.0 Comparación de los desplazamientos químicos de RMN ^1H de 11.

Hidrógeno	Z-6,7-epoxi- ligustilido 11 ^a	Z-6,7-epoxi- ligustilido 11 ^b
4a	2.49, ddd (2.4, 2.4, 7.5)	2.59, m
4b	1.79, dddd (1.8, 6.3, 10.5, 12.9)	2.59, m
5a	2.54, ddd (1.5, 2.4, 6.3)	2.14, m
5b	2.36-2.26, m	2.06, m.
6	3.73, ddd (1.2, 2.1, 5.1)	4.33, m (5.5, 3.5, 2.5)
7	3.78, d (3.9)	4.61, m (2.5)
8	5.31, t (7.8)	5.36, t (8.0)
9	2.37, q (7.5, 7.5)	2.36, m (8.0, 7.5)
10	1.50, sextup (7.3)	1.58, m (7.5, 7.5)
11	0.950, t (7.5)	0.96, t (7.5)

^a Datos obtenidos en la presente investigación. RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz, espectro 27.).

^b Datos obtenidos de la referencia 66. RMN ^1H (CDCl_3 , 250 MHz).

Tabla 20.0 Señales de RMN ¹³C de 11

Carbono	2,6,7-epoxi- ligustilido 11*
1	167.95, s
3	148.08, s
3a	152.45, s
4	16.81, t
5	20.35, t
6	54.61, d
7	43.20, d
7a	123.75, s
8	114.22, d
9	28.16, t
10	22.28, t
11	13.73, c

* (CDCl₃, 75 MHz, espectro 28)

La asignación de las señales para los hidrógenos 6 y 7, se realizó a partir de la información obtenida del experimento COSY (espectro 29). Comenzando el análisis con H-7, este tendría un acoplamiento sólo con H-6, y este, a su vez presentaría acoplamiento con H-5. En el espectro se observa una señal en δ 3.78 que correlaciona con una señal en δ 3.73, si bien este acoplamiento es casi imperceptible, es muy útil, ya que, esta última señal tiene otra correlación. De lo anterior, se puede deducir que, la señal a campo bajo con δ 3.78 se trata del H-7, que está acoplado con el H-6 (δ 3.73). El segundo acoplamiento que presenta esta señal se ubica en δ 2.54, por lo que esta señal corresponde a los hidrógenos de la posición 5. Junto con esta señal, hay unas señales vecinas las cuales integran para 2 y para 3 hidrógenos.

Adicionalmente, esta señal, en el experimento HMQC (espectro 30) tiene una correlación vecina, esto indica que los hidrógenos del carbono 5 no son equivalentes y en el espectro de RMN ¹H presentan distinto δ . Esta señal vecina, correlaciona con una señal en δ 2.37. De esta forma, a los hidrógenos de la posición 5, se les asignan las señales de δ 2.54 (5a) y δ 2.37 (5b).

Por otra parte, queda por asignar a los hidrógenos de la posición 4. Estos hidrógenos sólo deberán presentar acoplamiento con los hidrógenos en posición 5. En el experimento COSY, las señales que correlacionan con los H-5a e H-5b están en δ 2.49 y δ 1.79. Además, en el experimento HMQC se puede observar que estos hidrógenos no son equivalentes. La separación entre estas señales es notable. Por tanto, se asigna a las señales anteriormente indicadas como H-4a y H-4b, respectivamente.

Las asignaciones de las señales múltiples en δ 2.56-2.48 y δ 2.40-2.29, queda como sigue; la primera señal, la cual integra para dos hidrógenos, corresponde a H-5a y H-4a, y, la segunda señal corresponde a H-5b y a dos

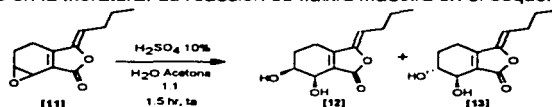
hidrógenos de H-9 que son equivalentes. Estos hidrógenos pueden ser observados en el experimento COSY ya que correlacionan con los hidrógenos 8 y 10.

De lo anterior, se puede comentar que los datos informados para **11** por Kaouadji,⁶⁶ no corresponden a dicha molécula. Adicionalmente, en este informe, se indican datos de EM. Los datos de EM muestran que se obtiene el ión molecular en 206, sin embargo, el patrón de fragmentación informado es distinto al obtenido, por lo que posiblemente, cuando Kaouadji logró aislar al compuesto, este muy posiblemente ya se había descompuesto, como es frecuente en este tipo de sustancias.

4.7 Reacción de Hidrólisis de 6,7-Epoxi-Z-ligustilido [11].

Como anteriormente se indicó, existen varios informes sobre la hidrólisis del epóxido.^{64,66,67} De las técnicas descritas se eligió la hidrólisis con ácido sulfúrico, ya que permite obtener un mejor rendimiento, aunque, como se puede observar, presentan resultados distintos. Esto posiblemente, a que este tipo de compuestos presentan cierta volatilidad aunque tengan un mayor peso molecular. Esto fue observado experimentalmente, ya que cuando estos eran secado a alto vacío, el peso se reducía hasta 50 %.

Cuando una cantidad de **11** es disuelta en acetona y se mezcla con una disolución de ácido sulfúrico al 10%, manteniendo agitación constante durante una hora es posible observar por medio de ccf la obtención de una mezcla de dos productos de mayor polaridad con un Rf muy cercano. En esta mezcla se logra observar que el compuesto de menor polaridad se encuentra en una menor proporción con respecto al de mayor polaridad. Debido a la similitud en cuanto a la estructura de estos compuestos, el crudo de reacción fue separado mediante la técnica de cpp (cromatografía en placa preparativa). El compuesto de menor polaridad fue identificado como el producto el isómero *cis*-ligustidiol [**12**], de acuerdo a la comparación de las señales del espectro de RMN ¹H (espectro 31) con las informadas en la literatura, y el compuesto de mayor polaridad y de mayor proporción fue identificado como el *trans*-ligustidiol [**13**], igualmente, por comparación de las señales del espectro de RMN ¹H (espectro 33), con las informadas en la literatura. La reacción se ilustra muestra en el esquema 32.



Esquema 32. Hidrólisis ácida de **11**.

Se han observado proporciones variables de isómeros *cis-trans*. En algunos casos se favorece la formación del glicol *trans*-, con respecto al glicol *cis*-.^{14,34,36} También, existen informes acerca de que esta proporción es favorable al isómero *cis*-.^{35,64}

Es importante comentar que en la literatura se ha discutido el aumento de la presencia de glicoles de Z-ligustilido [1]^{40,41} en preparaciones comerciales de *Ligusticum* de China y Japón. Se piensa que se favorece la formación de estos compuestos conforme transcurre un mayor tiempo de almacenamiento de las preparaciones que contienen extractos de la planta. Posiblemente los dioles provengan a partir de una serie de transformaciones espontáneas a partir del Z-ligustilido 1,⁶⁶ en las que el epóxido anteriormente mencionado, puede ser un intermediario. Esta observación fue comprobada cuando una muestra de preparaciones recién hechas fueron analizadas, encontrando en algunos casos muy poca cantidad de los glicoles y, en algunas no se logró identificarlos.⁶⁴

Si bien han sido numerosos los compuestos de este tipo que se han informado como metabolitos secundarios, entre los cuales se encuentran compuestos hidroxilados en distintas posiciones del anillo, e incluso de la cadena alquílica, posiblemente sus posibles precursores sean los compuestos Z-ligustilido [1] y el Z-butilidéntalido [2], entre otros.

Comparación de los datos informados en la literatura para los dioles.

La asignación de las señales del espectro de RMN ¹H, para el *cis*-ligustidiol, se efectuó por comparación de las señales informadas en la literatura. Estos datos se muestran en la tabla 21.0.

Tabla 21 0 Comparación de las señales de RMN ¹H para el *cis*-ligustidiol 12.

Hidrógeno	<i>cis</i> -ligustidiol 12 ^a	<i>cis</i> -ligustidiol 12 ^b	<i>cis</i> -ligustidiol 12 ^c	<i>cis</i> -ligustidiol 12 ^d
4a	2.66, dddd (1.2, 3.8, 4.5, 11.4)	2.58, dddd (18.4, 5.9, 5.4, 1.1)	2.86, dddd (18.2, 7.5, 5.5, 1.8)	2.82-2.69 (m)
4b	2.44-2.37, dddd (1.2, 3.8, 4.5, 11.1)	2.50, dddd (18.4, 8.1, 5.5, 1.9)	2.41, sa d (18.2, 8.0, 5.5)	2.36-2.42 (m)
5a	2.18-2.12, m	2.58, dddd (13.5, 9.8, 1.5, 9)	2.15, dddd (14.7, 5.5, 5.5, 5)	1.79-1.85 (m)
5b	1.84-1.78, m	2.12, dddd (13.5, 5.4, 5.3, 1)	1.81, dddd (14.7, 5.6, 0.2, 5)	2.10-2.17(m)
6	4.08, ddd (1.2, 2.1, 4.5)	3.95, ddd (9.8, 5.9, 3.1)	4.09, ddd (7.5, 3.5, 2.5)	4.06, ddd (7.9, 3.9, 2.5)
7	4.62, d (2.7)	4.5, ddd (5.9, 1.9, 1.1)	4.62, m d (3.5)	4.81 d (3.9)
8	5.31, t (4.8)	5.29, t (7.3)	5.31, t (8)	5.31, t (7.9)
9	2.36, t (7.0)	2.36, td (7.3, 7.3)	2.37, dt (8.7, 5)	2.36, dt (7.9, 7.4)
10	1.50, sextup (7.5)	1.50, c (7.3, 7.3)	1.50, sextup (7.5, 7.5)	1.50, tq (7.4, 7.4)
11	0.95, t (7.5)	0.95, t (7.3)	0.95, t (7.5)	0.95, t (7.4)

a. Datos obtenidos en la presente investigación. RMN ¹H, 500 MHz, CDCl₃, Espectro 31.

b. Datos obtenidos de la referencia 35. RMN ¹H, 400 MHz, CDCl₃.

c. Datos obtenidos de la referencia 68. RMN ¹H, 300 MHz, CDCl₃.

d. Datos obtenidos de la referencia 65. RMN ¹H, 500 MHz, CDCl₃.

Los datos obtenidos concuerdan con los informados en la referencia 65. En lo que respecta a los datos de RMN ¹³C, estos muestran, como en el caso anterior, estar de acuerdo con las asignaciones, estos, se muestran en la tabla 22.0.

Con respecto al *trans*-ligustidiol 13, los datos de RMN ¹H (espectro 33 y 34) se muestran en la tabla 23.0. Se puede observar que hay algunas variaciones en la asignación de los hidrógenos de las posiciones 4 y 5. Como se informa, estos no son equivalentes. Los experimentos de COSY (espectro 35) y HMQC (espectro 36), permitieron la asignación inambigua de estas señales. Observando el espectro de RMN ¹H para 13, hay cuatro señales múltiples, que se localizan en δ 2.56-2.58, 2.31, 2.13-2.06, 1.92-1.85. La primera señal integra para dos hidrógenos. Estas señales en el experimento COSY, presentan un acoplamiento con la tercera y cuarta señal, además, no presenta acoplamiento con la señal asignada al hidrógeno 6, y en el experimento HMQC presenta una señal amplia, por lo que se puede concluir que esta señal corresponde al metileno en posición 4, la cual presenta los acoplamientos con los hidrógenos en la posición 5, siendo las señales de estos hidrógenos las que tiene δ 2.13-2.06 y 1.92-1.85, que integran para un hidrógeno cada una y además, presentan un acoplamiento con el hidrógeno 6, en el experimento COSY y, por medio del HMQC se observa que

dichos hidrógenos pertenecen al mismo carbono. Por último, la señal con δ 2.31, la cual integra para dos hidrógenos y que podría confundirse con los metilenos en 4 y 5, 2 presenta como un quintuplete y corresponde al metileno en C-9.

Tabla 22.0 Comparación de datos de RMN ^{13}C para el *cis*-ligustidiol 12.

Carbono	<i>cis</i> -ligustidiol 12 ^a	<i>cis</i> -ligustidiol 12 ^b	<i>cis</i> -ligustidiol 12 ^c	<i>cis</i> -ligustidiol 12 ^d
1	169.30, s	169.2, s	169.2, s	169.4, s
3	148.26, s	148.5, s	148.3, s	153.4, s
3a	153.16, s	153.0, s	153.0, s	148.2, s
4	18.20, t	19.1, t	18.1, t	18.5, t
5	25.73, t	26.7, t	25.8, t	25.6, t
6	63.70, d	71.9, d	67.0/63.8, d	67.5, d
7	67.11, d	68.0, d	67.0/63.8, d	63.3, d
7a	125.27, s	126.3, s	125.2, s	125.5, s
8	114.43, d	114.1, d	114.3, d	114.5, d
9	28.09, t	28.2, t	28.1, t	28.1, t
10	22.26, t	22.4, t	22.3, t	22.3, t
11	13.75, c	13.7, q	13.8, t	13.8, c

a. Datos obtenidos en esta investigación. RMN ^{13}C , 125 MHz, CDCl_3 , Espectro 32.

b. Datos obtenidos de la referencia 35. RMN ^{13}C , 100.61 MHz, CDCl_3 .

c. Datos obtenidos de la referencia 68. RMN ^{13}C , 75 MHz, CDCl_3 .

d. Datos obtenidos de la referencia 65. RMN ^{13}C , 125 MHz, CDCl_3 .

Tabla 23.0 Comparación de las señales de RMN ¹H para el *trans*-ligustidol 13.

Hidrógeno	<i>trans</i> - ligustidol 13 ^a	<i>trans</i> - ligustidol 13 ^b	<i>trans</i> - ligustidol 13 ^c	<i>trans</i> - ligustidol 13 ^d
4a	2.56-2.48.	2.53-2.60(m) 2.45-2.52 (m)	2.38 dddd (18.4.5.4.5.4.1.1)	2.54 m
4b	2.56-2.48, m	2.53-2.60(m) 2.45-2.52 (m)	2.85 dddd (18.4.7.6.5.7.1.4)	2.54 m
5a	2.13-2.06, ddd (5.0.8.5.10.0)	1.85-1.93 (m) 2.07-2.12 (m)	1.81 dddd (13.8.7.6.6.2.2.4)	2.12 ddd (13.5.5.5.3.5)
5b	1.92-1.85, ddd (5.7.8.2.23.0)	1.85-1.93 (m) 2.07-2.12 (m)	2.14 dddd (13.8.7.6.6.2.2.4)	1.89 m
6	4.00, ddd (3.3.6.3.9.8)	3.96 ddd (9.2.5.8.3.3)	4.07 ddd (7.6.3.5.2.4)	3.94, ddd (10.6.5.3.5)
7	4.37, d (5.1)	4.49 d (5.8)	4.61 ddd (3.5.1.9.1.1)	4.49, sa, d (6.5)
8	5.28, t (8.0)	5.28 t (7.9)	5.31 t (7.7)	5.28 t (8)
9	2.31, quintup (7.2)	2.35 dt (7.9.7.4)	2.36 td (7.7.7.7)	2.36 dt (8.7.5)
10	1.50, sextup (7.8)	1.49 tq (7.4.7.4)	1.50 qt (7.7.7.7)	1.5 tq (7.5.7.5)
11	0.94, t (7.2)	0.95 t (7.5)	0.95 t (7.7)	0.95 t (7.5)

- a. Datos obtenidos en la presente investigación. RMN ¹H, 500 MHz, CDCl₃, Espectro 33
 b. Datos obtenidos de la referencia 65. RMN ¹H, 500 MHz, CDCl₃
 c. Datos obtenidos de la referencia 35. RMN ¹H, 400 MHz, CDCl₃
 d. Datos obtenidos de la referencia 68. RMN ¹H, 300 MHz, CDCl₃

Tabla 24.0 Comparación de datos de RMN ¹³C para el *trans*-ligustidol, 13.

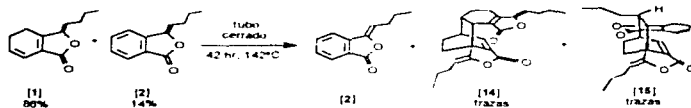
Carbono	<i>trans</i> -ligustidol 13 ^a	<i>trans</i> -ligustidol 13 ^b	<i>trans</i> -ligustidol 13 ^c
1	169.07, s	169.1, s	168.6, s
3	148.07, s	152.9, s	152.2, s
3a	152.82, s	148.1, s	148.0, s
4	19.15, t	19.1, t	19.4, t
5	26.66, t	26.6, t	26.9, t
6	67.92, d	71.8, d	72.0/68.5, d
7	71.78	67.9, d	72.0/68.5, d
7a	125.93, s	126.0, s	125.9, s
8	114.29, d	114.3, d	114.3, d
9	28.07, t	28.1, t	28.1, t
10	22.23, t	22.3, t	22.3, t
11	13.72, c	13.8, q	13.7, t

- a. Datos obtenidos en esta investigación. RMN ¹³C, 125 MHz, CDCl₃, Espectro 34.
 b. Datos obtenidos de la referencia 65. RMN ¹³C, 75 MHz, CDCl₃
 c. Datos obtenidos de la referencia 68. RMN ¹³C, 125 MHz, CDCl₃

De acuerdo a lo anteriormente descrito, se puede comentar que los hidrógenos en la posición 4 son isócronos (resuenan en el mismo desplazamiento químico, es decir, son magnéticamente equivalentes), y que los hidrógenos en la posición 5 no lo son, permitiendo con estos experimentos corregir algunas de las asignaciones informadas previamente. En la tabla 24.0, se muestran las señales de RMN ^{13}C que presenta el *trans*-ligustidol, 13

4.8 Reacción de Diels-Alder.

En la literatura se pueden encontrar varios intentos por formar los dímeros a partir del *Z*-ligustilido [1], mediante reacciones de cicloadición $[4\pi+2\pi]$, con resultados infructuosos. En intentos realizados en nuestro laboratorio¹⁵ se obtuvieron otros tipos de dímeros, sin embargo no se logran obtener los aductos de Diels-Alder aislados de las especies vegetales. Hasta el momento no se tienen informes en la literatura acerca de la obtención por medio de síntesis de este tipo de compuestos.



Esquema 33 Reacción de Diels-Alder de 1

El tratamiento térmico de 1 bajo atmósfera inerte y tubo sellado en un cañón a una temperatura entre 145-155°C durante 45 horas permite la obtención de una mezcla de compuestos de diversas polaridades (esquema 33). El análisis comparativo por medio de ccv del crudo de reacción con muestras auténticas de diligustilido [14] y toquinólido B [15], indica que hay una cierta cantidad de cada uno de estos compuestos, siendo el diligustilido [14], el dímero más abundante. Esta observación condujo a analizar una muestra del crudo de la reacción por RMN ^1H de 500 MHz. En dicho espectro se lograron identificar las señales correspondientes al diligustilido con un porcentaje de aproximadamente el 22%. La cromatografía en ccv del crudo de reacción permitió la separación de butilidenfálido [2], trazas de *Z*-ligustilido [1], trazas de toquinólido B [15], diligustilido y otra mezcla de compuestos de mayor polaridad que continua en estudio. Los resultados obtenidos de esta reacción indican por primera ocasión la obtención por medio de síntesis de relevo de algunos dímeros de 1. La discusión de esta reacción no se tratará en esta ocasión, ya que hasta el momento, la investigación continúa.

5. ENSAYOS BIOLOGICOS

Antecedentes de actividad biológica de las especies vegetales y de los productos obtenidos.

Ciertas especies vegetales pertenecientes a la familia *Umbelliferae*, han sido desde hace mucho tiempo apreciadas en la medicina tradicional en varias partes del mundo. En los últimos años, los extractos crudos y constituyentes químicos de estas plantas (fálidos) han generado un interés particular, ya que muchos de ellos han mostrado actividad farmacológica importante, y se ha considerado que pueden ser prototipos farmacéuticos

En el norte de nuestro país y sur de Estados Unidos, se encuentra la planta *Ligusticum porteri* la cual es muy apreciada por los Tarahumaras, quienes la han empleado para el tratamiento de diversos padecimientos. En China y Japón, la planta *Ligusticum chuangxiong* ha sido empleada para el alivio de varias enfermedades, y ha sido comercializada en forma de extracto crudo. En Europa, las especies vegetales *Ligusticum wallichii* y *Levisticum officinale* las cuales se localizan en Francia y Alemania, respectivamente, también se han utilizados en la medicina tradicional. En la tabla 250, se han recopilado algunos usos, propiedades farmacológicas y utilidad como auxiliar en tratamiento de padecimientos, de las especies vegetales y de los constituyentes químicos aislados en este tipo de plantas. Cabe mencionar que son pocos los informes de actividad farmacológica de los compuestos puros, encontrándose mayor número de informes con respecto a los extractos crudos

Tabla 25 0 Propiedades farmacológicas de los extractos crudos y de metabolitos secundarios aislados en algunas especies pertenecientes a la familia Umbelliferae

Planta Medicinal (Nombre Científico)	Usos y Propiedades farmacológicas.
<i>Ligusticum porteri</i>	Insecticida y antiparasitante, usado tópicamente por osos salvajes. Se indica la DL ₅₀ para 1, 20 10 ppm ¹¹
<i>Ligusticum acutilobum</i>	El extracto muestra propiedades sedantes en el sistema nervioso central. En ratones, produce estupor y respiración espasmódica. El extracto produce relajación y actividad antipirética cuando se inyecta subcutánea en perros. La inyección intravenosa promueve hipnosis, ataxia e irritación. Además, baja la presión sanguínea, la temperatura corporal, disminuye los latidos y la respiración ¹²
<i>Ligusticum wallichii</i>	Presenta actividad espasmolítica. Extractos de la planta muestran una actividad semejante en el intestino de cerdo. La actividad es seis veces mayor con respecto a los extractos de <i>C. officinale</i> . Ambos extractos muestran actividad antihistaminica comparada a las características de la atropina. El extracto crudo, presenta efectos analgésicos y haemodinámicos. Se prescribe junto con otros medicamentos en el tratamiento de la angina pectoris. El extracto en agua caliente incrementa el flujo de sangre en la vena coronaria ¹³ . Alquilalidos volátiles no polares han mostrado actividad antifúngica y actividad relajante del músculo liso ¹⁵
<i>Apium graveolens</i>	El aceite volátil de las semillas, muestra una actividad tranquilizante y anticonvulsiva, después de la aplicación de una inyección intraperitoneal en ratas y ratones ¹⁴ . El extracto crudo es usado como diurético, y en el tratamiento de la gota, el reumatismo, la bronquitis y el calarrio. Una actividad hipotensiva y su efecto diurético fue observado, después de una inyección intravenosa de un extracto acuoso de la planta en conejos y ratas. Los compuestos volátiles de los frutos de <i>Apium graveolens</i> exhiben una actividad tranquilizante y anticonvulsiva, después de una inyección intraperitoneal en ratas y ratones. Los máximos de actividad fueron mostrados de una fracción del aceite constituida de alcoholes sesquiterpénicos y ftálicos. La planta ha sido también usada en tumores, especialmente de pulmón ¹⁶
<i>Cnidium officinale</i>	Los extractos presentan actividad sedante. El extracto de éter dietílico, presenta un efecto sinérgico en ratones tratados con hexobarbitalo de sodio. Después de un pretratamiento con el extracto, no se incrementó la actividad locomotora la cual fue medida después de una aplicación oral de metilamfetamina, pero resultando una disminución de la actividad ¹⁷ . El extracto acuoso muestra un fuerte efecto hipotensivo y diurético cuando es probado en la inyección intravenosa en ratones y conejos ¹ . El extracto crudo se usa para el tratamiento de la menstruación irregular, anemia, dolor de cabeza, hipertensión, bronquitis crónica, asma, reumatismo. Los extractos etanólico y acuoso dan pronunciados efectos de contracción del músculo liso del útero y la tráquea ¹⁸
<i>Angelica sinensis</i>	El extracto de etéreo de la planta, muestra actividad espasmolítica, analgésica, sedante, y disminución de la temperatura corporal. Los extractos etanólico y cloroalcohólico, tienen actividad semejante al extracto etéreo, sin embargo, este último tiene un efecto ligeramente mayor ¹⁹

<i>Levisticum officinale</i>	Actividad estrogénica fue probada para extracto acuoso de las raíces, en ratas hembra por medio de una inyección subcutánea. La actividad fue comparada al benzoato de estradiol. ⁷ Presenta propiedades diuréticas. El té es usado en el tratamiento de malestares de la vesícula y renales. ⁴⁶
<i>Ligusticum chuangxiang</i>	El extracto crudo usado en el tratamiento del dolor de cabeza, anemia, resfriado e irregularidad de la menstruación. ^{66,68}
<i>Angelica acutiloba</i>	Extracto crudo que se usa en el tratamiento de enfermedades de la mujer y se cree que tiene propiedades sedantes. ¹⁵
<i>Angelica glauca</i>	Extracto crudo es usado como estimulante por su buen olor. Usado en el contra la flatulencia y en el tratamiento de la dispepsia. ¹¹
<i>Ligusticum acutilobum</i>	El extracto crudo presenta actividad anticolinérgica en intestino de rata. Se compara la actividad con respecto a sulfato de atropina. Además se prueban extractos crudos obtenidos con disolventes de distinta polaridad concluyendo que los extractos obtenidos de disolventes poco polares extraen más eficientemente los principios activos que los obtenidos por disolventes polares. ⁷
<i>Apium graveolens</i> L var <i>rapaceum</i>	El extracto crudo presenta propiedades diuréticas. Además, el polvo de las raíces, se comen como complemento de ensaladas y cocida u horneada como un vegetal. ⁴⁸
<i>Bifora testiculata</i>	Usado como sabonzante natural. ⁴⁸
<i>Petroselinum crispum</i> var. <i>Tuberosum</i>	El extracto crudo se usa como diurético, en desórdenes menstruales y es estimulante uterino. Espasmolítico. Los frutos poseen actividad estrogénica. Complemento en salsas y ensaladas. ⁴⁸
<i>Angelicae radix</i>	El extracto es usado como un remedio homeostático para enfermedades de la mujer. Se informa desde el punto de vista clínico la evaluación de agregación anti-plaquetas. ¹¹
Z-ligustilido [1] y Butilidénfálico [2]	Compuestos aislados de <i>Cnidium officinale</i> . Presentan actividad anticolinérgica. Butilidénfálico [4] no presenta este tipo de actividad. ¹¹ Han sido implicados como los principios activos responsables de la actividad antiasmáticos y efectos espasmódicos de <i>Angelica sinensis</i> . ⁴⁶
Z-ligustilido [1], butilidénfálico [2] y senkiunólido	Estos compuestos aislados de <i>Cnidium Rhizome</i> son usados en el tratamiento de la Arteriosclerosis. ¹¹
Derivado del Z-ligustilido [1]	Compuesto aislado <i>Angelica acutiloba</i> es útil como tranquilizante del sistema nervioso central. ⁴⁶
Z-ligustilido [1], butilidénfálico [2] y neocinólido	Muestran penetración en la piel. También se probaron los extractos de éter y metanólico. ¹¹
Z-ligustilido [1], Butilidénfálico [2] y butilidénfálico [4]	Estos compuestos aislados de <i>L. wallichii</i> , muestran contracción en útero de rata no preñada. Butilidénfálico, presenta actividad antiespasmódica no específica tiene un potencia menor con respecto a la papaverina. El mecanismo de acción es distinto al de la papaverina. ^{21,24}

Bioensayos preliminares efectuados a los derivados obtenidos (Bionensayo de toxicidad contra *Artemia salina*, antimicrobianos y antifúngicos)

Debido a la amplia utilidad de las umbelíferas en varias partes del mundo, (como se mencionó anteriormente), los informes, tratan de ponderar, la actividad farmacológica que se les atribuye. Adicionalmente, los esfuerzos están enfocados a encontrar las interrelaciones entre dichos efectos y los constituyentes químicos. Determinar una presumible acción farmacológica y adaptarle un modelo de estudio, es un problema difícil, ya que dicho modelo, debe estar relacionado con el uso de la planta.¹⁹ Relacionado con lo anterior, conocer algunas de las propiedades farmacológicas básicas es de fundamental importancia ya que con estos estudios, se pueden proponer nuevos modelos de estudio y conocer el mecanismo de acción. Los bioensayos preliminares efectuados son los que estaban disponibles. Se espera, que los compuestos sintetizados sean probados en bioensayos más específicos, como por ejemplo el de Alzheimer.

El bioensayo de toxicidad frente *Artemia salina*⁶⁰ representa una alternativa para la detección de compuestos con posible actividad biológica y provee información preliminar para realizar pruebas 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. 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. Z-ligustilido es tóxico a *Artemia salina* (DL₅₀ 20 1) de acuerdo a los resultados de nuestro laboratorio.^{13,17}

También se ha evaluado su actividad frente a microorganismos gram negativos, gram positivos (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Sacharomyces cervisiae* y *Klebsellia pneumoniae*), mostrando una actividad débil.²⁷

Resultados de los bioensayos efectuados

En la tabla 26 0 se muestran los resultados obtenidos los ensayos biológicos contra *Artemia salina*, antimicrobianos y antifúngicos en los que, se indica la dosis letal media (DL₅₀) y la inhibición del crecimiento. Un resultado positivo (+) indica inhibición apreciable del crecimiento. Cuando no hay inhibición apreciable se considera un resultado negativo (-). Un resultado intermedio se indica con (+/-). Adicionalmente, en la tabla 27 0 se muestran las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI)

Tabla 26 0 Resultados de los ensayos biológicos de toxicidad, antimicrobianos y antifúngicos











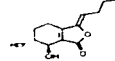
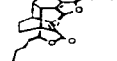
Bioensayo contra	Compuesto					
	 [1]	 [2]	 [4]	 [5]	 [7]	 [8]
A. s.*	10 3	12 5	3 7	20	>100	157
E. c.**	9	10	-	-	8	7
S. s.**	12	+/-	+/-	8	11	-
M. s.**	10	12	11	14	8	8
T. v.***	-	-	9	8	-	-
A. n.***	-	-	9	13	-	-

Tabla 26 0 Resultados de los ensayos biológicos de toxicidad, antimicrobianos y antifúngicos (Continuación)

Bioensayo contra	Compuesto					
	 [9]	 [10]	 [11]	 [12]	 [13]	 [14]
A. s.*	>100	67	20	>50	>100	67
E. c.**	-	-	10	12	+/-	-
S. s.**	-	-	13	10	+/-	-
M. s.**	-	-	10	9	+/-	-
T. v.***	-	-	-	-	-	-
A. n.***	-	-	-	-	-	-

*Bioensayo de toxicidad (A s.) *Artemia salina* [DL₅₀]; (ppm)

**Bioensayo antibacteriano (E c.) *Escherichia coli*, (S. a.) *Staphylococcus aureus* y (M. s.) *Mycobacterium smegmatis*. Cantidad probada 500 µg/disco de 5 mm. (µg/ml)

***Bioensayo antifúngico: (T. V.) *Trichoderma viride*, (A. N.) *Aspergillus niger*. Cantidad probada 500 µg/disco de 5 mm. (µg/ml)

En los dos últimos casos la prueba resulta positiva (+) si hay inhibición en el crecimiento y negativa en el caso opuesto.

Tabla 27.0 Resultados de los ensayos biológicos de concentración mínima inhibitoria (CMI).













Micro-organismo	Compuesto					
	 [1]	 [2]	 [4]	 [5]	 [7]	 [8]
C.a.	>50	400	200	>400	>400	>400
E.c.	>400	>400	>400	>400	400	>400
P.m.	>400	400	ND	ND	>400	>400
S.a.	200	200	200	>400	200	400
S.f.	>400	400	>400	>400	400	>400
S.s.	>400	>400	>400	>400	400	>400

Tabla 27.0 Resultados de los ensayos biológicos de concentración mínima inhibitoria (CMI).
(Continuación)

Micro-organismo	Compuesto					
	 [9]	 [10]	 [11]	 [12]	 [13]	 [14]
C.a.	400	>400	25	ND	>400	ND
E.c.	>400	>400	400	ND	>400	ND
P.m.	ND	ND	200	ND	>400	ND
S.a.	200	>400	100	ND	>400	ND
S.f.	200	>400	200	ND	200	ND
S.s.	>400	>400	400	ND	>400	ND

Bioensayo de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) 0.62-400 µg/ml
(C.a.) *Candida albicans*, (E.c.) *Escherichia coli*, (P.m.) *Proteus mirabilis*, (S.a.) *Staphylococcus aureus*; (S.f.) *Streptococcus faecalis*; (S.s.) *Shigella sonnei*. ND. No determinado

Discusión de Resultados. Relaciones entre la estructura y la actividad farmacológica.

En cuanto a la toxicidad frente a *Artemia salina* de los compuestos probados, el butilftárido [4], el Z-ligustilido [1], el butilidenftárido [2] y el Z-6,7-epoxiligustilido [11], mostraron ser los compuestos de mayor toxicidad. Por una parte, los compuestos 2 y 4 son estables, debido al anillo aromático. Cuando se compara el compuesto ftárido (misma estructura de 4, pero sin el butilo), se observa que no presenta toxicidad, y esto, muestra la importancia de la cadena alquílica para la actividad. Para 2 y 4, se observa que la cadena saturada

incrementa la actividad, ya que el valor de 4 es mayor que el de 2. Una tendencia similar se observa para 1, donde el valor de DL_{50} es mayor con respecto a 2, y se observa que si el anillo está parcialmente saturado, el valor de actividad aumenta.

Pero, por otro lado, el compuesto 11 presenta toxicidad presumiblemente por la reactividad del epóxido. Este es un compuesto lábil, en condiciones normales, y debido a esta labilidad, puede favorecerse la incidencia en algún sitio de acción.

Frente a *Eschenchia coli*, el Z-ligustilido [1], el Z-butilidenftáldo [2] y sus respectivos ácidos, [7] y [8], mostraron los mayores valores, 2 fue el mayor de todos aunque por una diferencia pequeña. Esto sugiere que la presencia de estas sustancias en la planta, puede ser la responsable de la actividad antiséptica.

La apertura de la γ -lactona provoca una disminución de la toxicidad frente a *Artemia salina*, por lo que se puede suponer que este sistema sea una parte importante para la actividad. Por otro lado, el sistema aromático en los compuestos 2 y 8, vuelve a mostrar un efecto importante en la bioactividad.

Además de que la presencia de un grupo carbonilo en 7 y 8, permite a la molécula, tener más sitios reactivos y posiblemente coadyuve a incrementar la bioactividad. Adicionalmente, el compuesto 12 muestra mayor actividad frente a *E. coli* con respecto al isómero *trans*- [13]; lo cual refleja la importancia del establecimiento de las relaciones entre la estructura y la bioactividad.

En el caso del microorganismo *Staphylococcus aureus*, los compuestos 1, 7 y 10, presentan los valores más sobresalientes. Posiblemente, sea un caso semejante al observado para *E. coli* para 1 y 7. Para estos compuestos, se remarca la importancia del sistema dieno homoanular y la cadena alquílica. Por otro lado, en el caso del epóxido, la propia inestabilidad favorece un incremento en su actividad. Sin embargo, puede plantearse la pregunta, si este compuesto es el que realmente presenta la actividad o algún compuesto de transformación o posiblemente, los productos derivados de la apertura del oxirano se complementen y favorezcan la actividad. El valor de la toxicidad en el caso del diol *cis*-, es semejante al de 11, y puede ser complementado por la actividad intermedia del otro isómero.

Para el microorganismo *Mycobacterium smegmatis*, los compuestos 1, 2, 4 y 5, son los más activos. Las partes estructurales que tienen en común son la presencia de un anillo, con distintos grados de insaturación, la lactona y la cadena alquílica. Al parecer el efecto del anillo de seis miembros es importante, ya que los compuestos con mayor actividad son el compuesto 2, el cual tiene el anillo totalmente insaturado y el compuesto 5 que posee su anillo parcialmente saturado.

Por otra parte, al comparar el compuesto 2 con 4, la hidrogenación del doble enlace 3(8) en el caso de este último provoca que la bioactividad sea ligeramente menor

Para los compuestos 7 y 8, se observa que la apertura de la lactona disminuye ligeramente la bioactividad dejando sólo el anillo el cual está parcial y totalmente insaturado

Los compuestos 4 y 5 fueron los únicos que presentaron actividad antifúngica apreciable frente a *Trichoderma viride* y *Aspergillus niger*. Se vuelve a remarcar la importancia del anillo de seis miembros con diferentes grados de insaturación, la lactona y la cadena alquílica presente en este tipo de compuestos

Adicionalmente, las ftalazonas obtenidas 9 y 10 muestran poca actividad antimicrobiana, por lo que la incorporación de nitrógeno a esta estructura no resultó en un mejor actividad

6. CONCLUSIONES

La integración de los resultados obtenidos y la experiencia y conocimientos acumulados durante la realización del presente proyecto permitieron la obtención de numerosas conclusiones, entre las cuales podemos resaltar las siguientes.

a. La doble ligadura en la posición 6(7) del Z-ligustilido [1], mostró ser la más reactiva con respecto a la 3(8) y a la 3a(7a). Esta *situ-* selectividad fue observada en las reacciones de hidrogenación catalítica y de epoxidación.

b. La ligadura 3a-(7a) mostró menos reactividad incluso comparada con el anillo aromático.

c. El aislamiento y análisis estructural de 6,(7)-epoxi-Z-ligustilido [11] permitió corregir una serie de asignaciones de RMN y de EM.

d. La labilidad relativa de los derivados obtenidos fue muy variada. En el caso del compuesto 7, se observó un incremento en la transformación espontánea del sistema dieno homoanular hacia el compuesto 8, cuando fue expuesto a la luz, calor y/o oxígeno. Este comportamiento no se observa para los compuestos 4 y 5, los cuales son estables. Sin embargo, en los compuestos 2, 8, 11, 12 y 13, se observa que se transforman lentamente a compuestos de mayor polaridad. Un caso sobresaliente, es el compuesto 10, que presenta descomposición después de mucho tiempo. Este compuesto mostró ser el derivado más estable con sistema dieno homoanular.

e. Es viable la obtención de dímeros mediante reacciones de cicloadición de Diels-Alder, empleando Z-ligustilido [1] como dieno y dienófilo. Si bien los rendimientos son bajos, es posible la realización de experimentación adicional para determinar las condiciones óptimas para la obtención de los cicloadductos.

f. Los resultados obtenidos y su interpretación permitieron tener un mejor conocimiento de la reactividad química de Z-ligustilido [1], y conocer las condiciones experimentales apropiadas para la manipulación de los derivados.

g. En cuanto a las pruebas biológicas se mostró un incremento en la capacidad de inhibición para cierto tipo de organismos, de los compuestos sintetizados con respecto a la materia prima [1]. Algunos derivados como el *cis*-ligustidiol [12], presentaron un incremento en la actividad en los bioensayos efectuados con respecto a la materia prima, y algunos de ellos tuvieron un actividad antifúngica apreciable.

h. Es posible especular, de acuerdo a los resultados, que el estereoisómero *cis*-[12] del diol sea más activo con respecto al *trans*-[13]. Es interesante mencionar que el 6-metoxi-7-hidroxi-3(8)-dihidroligustilido (presumiblemente *cis*-) es el compuesto informado como útil en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

i. De acuerdo a la toxicidad frente a *Artemia salina* entre los compuesto de mayor toxicidad, se obtuvo al butiltálido [4]

j. Puede atribuirse un efecto biológico complementario y/o sinérgico en las mezclas de compuestos. Es por ello, que en los extractos crudos, donde estos compuestos están mezclados, presentan actividades notables

k. Es deseable la obtención de un mayor número de derivados de Z-ligustilido [1] y la realización otras bioevaluaciones con el fin de ponderar con mayor cercanía el potencial farmacológico de este grupo de sustancias.

7. PARTE EXPERIMENTAL

7.0 Materiales y Equipos

El análisis en cromatografía en capa fina se efectuó en cromatofolios marca Macherey-Nagel Duren, tipo Alugram SiIG/UV

Se emplearon como reveladores una lámpara de rayos UV Spectronile, modelo EX-20 (λ de 254 nm y 365 nm) y una solución de Sulfato Cérico Amoniacal $((\text{NH}_4)_2\text{Ce}(\text{SO}_4)_4)$ al 1% en ácido sulfúrico [2N]

Para el empacado de las columnas se empleó sílice gel (SiO_2), marca Merck, 60 GF (para placa) y sílice (SiO_2) grado 70-230

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear de ^1H y ^{13}C , se obtuvieron en un espectrómetro analítico Varian, modelo Unity 300 a 300 MHz y un espectrómetro analítico marca Varian, modelo Unity plus 500 a 500 MHz, usando como disolvente CDCl_3 y CD_3COCD_3 (según sea el caso) y en ambos equipos se utilizó tetrametilsilano (TMS) como estándar interno

Los espectros de UV se obtuvieron en un espectrómetro marca Shimadzu, modelo UV 160U.

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

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fischer-Johns.

Los espectros de Espectroscopía de Masas se obtuvieron en un espectrómetro marca JEOL, modelo JMS-Ax505 HA, a 70 eV y una Corriente de Ionización de 100 $\mu\text{Amperes}$

7.1 Extracción y aislamiento de la materia prima.

Las raíces secas y finamente molidas de *Ligusticum porteri* (10 Kg) se maceraron consecutivamente con acetona y metanol (3 veces con cada disolvente).

1.06 Kg. de residuo acetónico fue adsorbido con 762.4 g de SiO_2 grado 70-230, posteriormente fue dividido en dos partes iguales. Cada una de estas fue fraccionada simultáneamente mediante cromatografía en columna a vacío (ccv)^{70,71} empleando 806.1 g de SiO_2 para placa como soporte en cada una de ellas. La elución de las columnas se inició con hexano, aumentando gradualmente la polaridad con acetato de etilo hasta una proporción 1:1, el volumen de cada fracción fue de 1.6 litros y se recolectaron 89 fracciones. Adicionalmente se realizó un lavado de la columna con acetona.

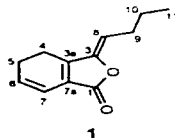
El Z-ligustilido [1] materia prima y metabolito secundario empleado en las derivatizaciones químicas, fue monitoreado por ccf (cromatografía en capa fina) y se identificó en las primeras 11 fracciones debido a la fluorescencia morada que presenta en lámpara de UV ($\lambda=254$ nm). Dichas fracciones fueron reunidas exceptuando la primera de ellas.

Para llevar a cabo cada una de las reacciones fue necesario purificar la materia prima ya que el análisis por medio de cromatografía en capa fina (ccf) indica que en las fracciones 2-9 de la cromatografía en columna inicial lo contienen, además de que dicho compuesto se encuentra mezclado con otros compuestos menos polares, identificándose entre estos al compuesto que es producto de la deshidrogenación espontánea de 1 que es el Z-butilidenftárido [2].

La purificación de la materia prima se llevo a cabo mediante la técnica de cromatografía en columna a vacío utilizando SiO_2 grado IIC como soporte y efectuando la elución con hexano.

El análisis posterior del espectro de RMN ^1H de una muestra purificada condujo a deducir que 1 se encontraba con una pureza del 86%, correspondiendo el porcentaje, es decir, el 14% a 2. Esta mezcla fue la que sometió a las diversas condiciones de reacción para la obtención de los derivados. El rendimiento estimado de Z-ligustilido [1], a partir del material vegetal fue de 2.573 %.

Datos físicos y espectroscópicos del Z-ligustilido [1].



Aceite amarillo oscuro, olor penetrante
Rf = 0.34 (hexano-acetato de etilo 9:1)
PM. 190.24 g/mol. (Calc. para $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{O}_2$)

IR (CHCl_3) ν_{max} [cm^{-1}]: 2963.12, 2935.26, 2873.90, 1755.56, 1668.20, 1462.40, 1273.60, 1056.27, 1015.40, 968.20

UV (MeOH) λ_{max} nm (c): 205.5 (11150.50), 272 (7887.88), 321.0 (6582.83).

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3 , espectro 2, tabla 2.0), se indica (δ , multiplicidad, J): 6.29 (1H, td, J = 4.5, 9.5 Hz, H-7), 6.01 (1H, dt, J = 4.5, 10 Hz, H-6), 5.22 (1H, t, J =

8.0, Hz, H-8), 2.60 (1H, td, J= 1.0, 10.0 Hz, H-4), 2.49-2.44 (2H, m, H-5), 2.39 (2H, cuadruplete, J=7.5 Hz, H-9), 1.51 (2H, cuadruplete, J=7.5 Hz, H-10), 0.96 (3H, t, J= 7.5 Hz, H-11).

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3 , espectro 3, tabla 3.0), se indica (δ , multiplicidad): 167.61 (s, C-1), 148.64 (s, C-3), 147.04 (s, C-3a), 129.86 (d, C-6), 117.18 (d, C-7), 124.06, s (C-7a), 112.81 (d, C-8), 28.12 (t, C-9), 22.42 (d, C-5), 22.42 (t, C-10), 18.53 (d, C-4), 13.74 (q, C-11)

7.2 Reacciones de hidrogenación catalítica.

Reacción de hidrogenación con Pd/C al 10% en AcOEt por 2 horas.

El catalizador Pd/C al 10% (10 mg), fue suspendido en acetato de etilo (6 ml) y se prehidrogenó a temperatura ambiente y con agitación constante durante 3 horas. Al cabo de ese tiempo se adicionó **1** (150 mg, 0.66 mmol), disuelto en acetato de etilo (5 ml). La reacción se mantuvo durante 2 horas. Después de ese tiempo se logra observar por medio del análisis de ccf la disminución en la cantidad de materia prima y trazas de otro compuesto de mayor polaridad.

La eliminación del catalizador por filtración sobre celita y sílice, y la posterior eliminación del disolvente por concentración a presión reducida permite obtener un residuo aceitoso amarillo. El análisis del espectro de RMN ^1H (espectro 6) del producto estable los siguientes rendimientos: 21.15% de **3**, 30.59% de **2** y 47.93% de materia prima.

Reacción de hidrogenación con Pd/C al 10% en AcOEt por 8 horas.

El catalizador Pd/C al 10% (10 mg) suspendido en acetato de etilo (5 ml) se prehidrogenó a temperatura ambiente y con agitación constante durante 2 horas. Después de este tiempo se adiciona **1** (100.3 mg, 0.53 mmol). La reacción se mantuvo durante 8 horas. Al cabo de ese tiempo por medio del análisis de ccf se observa la desaparición total de la materia prima y dos productos de mayor polaridad.

Posteriormente se elimina el catalizador por filtración sobre celita y sílice, y se elimina el disolvente por concentración a presión reducida permitiendo obtener un residuo crudo de color amarillo-verdoso claro con olor característico (99.4 mg). Una muestra del crudo de la reacción fue analizada por RMN ^1H (espectro 7). El residuo restante fue resuelto mediante cromatografía en capa preparativa de 2 mm de espesor utilizando como eluyente una mezcla de hexano-acetato de etilo 98:2. Esto permitió la obtención de los compuestos **4** y **5**.

Reacción de hidrogenación con PtO₂ al 84 12% en AcOEt 4.5 por horas

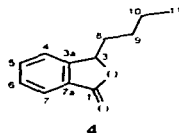
El catalizador PtO₂ al 84 12% (10 mg) suspendido en acetato de etilo (5 ml) a temperatura ambiente y con agitación constante se prehidrogenó durante 2.5 h. Después de ese tiempo se agregó 1 (100.4 mg, 0.53 mmol), disuelto en acetato de etilo (5 ml). La reacción se mantuvo durante 4.5 horas. Después de ese tiempo se observan la desaparición total de la materia prima y dos productos de reacción. La separación del catalizador mediante filtración sobre celita y sílice, y la posterior eliminación del disolvente por concentración a presión reducida permite la obtención de un residuo aceitoso color verde claro con olor característico. El análisis del espectro de RMN ¹H (espectro 12.) del crudo de reacción establece una proporción de 57% de 4 y 43% de 5.

Reacción de hidrogenación catalítica con Pd/C 10% en EtOH 6 por horas

El catalizador Pd/C al 10% (100 mg) fue suspendido en etanol (10 ml) y temperatura ambiente y con agitación constante se prehidrogenó durante 2 horas. Después de ese tiempo se adicionó 1 (99.0 mg, 3.93 mmol). La reacción se mantiene 6 horas. Al cabo de este tiempo la separación del catalizador mediante filtración con celita y sílice, y la posterior eliminación del disolvente por concentración a presión reducida permite la obtención de un residuo aceitoso color verde claro con olor característico. (882.4 mg).

Una parte del crudo fue analizada por RMN ¹H de 300 MHz, (espectro 13). El residuo restante fue adsorbido con igual cantidad de SiO₂ 70-230 y separado por medio de cromatografía en columna abierta con técnica de flash^{22,23} (cca), empleando 73.0 g de SiO₂ 70-230 como soporte, una columna de vidrio (3.3 cm de diámetro), y eluyendo con una mezcla de hexano-AcOEt (98/2). Se colectan fracciones de 250 ml. Siguiendo el criterio de ccf para reunir fracciones, se observó que en las fracciones 22-38, contienen al butilftáldido [4], (275.0 mg, 36.96% de rendimiento total) y en las fracciones 46-69 se observa que contienen 3(8),6(7)-tetrahidroigustilido [5] (295 mg, 38.78% de rendimiento).

Datos físicos y espectroscópicos del Butilftáldido [4].



Aceite transparente, olor agradable
Rf = 0.276 (hexano-acetato de etilo 9.1)
PM. 190.24 g/mol. (Calc para C₁₂H₁₄O₂)

IR (CHCl₃) ν_{max} [cm⁻¹] 2963.30, 2936.40, 2866.60, 1758.10, 1523.50, 1471.50, 1424.90, 1347.90, 1287.0, 1070.30, 987.90, 930.50

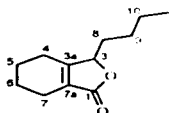
UV (Hexano) λ_{max} nm (ϵ) 278.5 (1577.67), 271.5 (1425.0), 224.0 (9092.86).

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃, espectro 8, tabla 9.0) 7.9 (1H, d, J=7.8 Hz, H-7), 7.67 (1H, ddd, J=7.8, 7.8, 1.5 Hz, H-5), 7.52 (1H, dd, J=7.5, 7.5, 0.9 Hz, H-6), 7.44 (1H, dd, J=7.5, 1.5, 0.9 Hz, H-4), 5.48 (1H, dd, J=7.8, 4.1 Hz, H-3), 2.11-1.99 (1H, m, H-8a), 1.83-1.71 (1H, m, H-8b), 1.58-1.34 (4H, m, H-9 e H-10), 0.89 (2H, t, J=11.6 Hz, H-11).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃, espectro 9, tabla 10.0) 170.61 (s, C-1), 150.12 (s, C-3a), 133.87 (d, C-5), 128.98 (d, C-6), 126.21 (s, C-7a), 125.69 (d, C-7), 121.68 (d, C-4), 81.40 (d, C-3), 34.44 (t, C-8), 26.87 (t, C-9), 22.41 (t, C-10), 13.82 (q, C-11).

EM (IE, 70 eV) 190 (M⁺) (20), 172 (3), 172 (3.4), 148 (7), 134 (28), 133 (100), 115 (3), 105 (53), 77 (26), 76 (7), 51 (9), 50 (3), 41 (3), 39 (3)

**Datos físicos y espectroscópicos del
3(8),6(7)-tetrahidroiligustilido [5].**



5

Aceite translúcido, ligeramente verde-claro, olor agradable.
Rf = 0.212 (hexano-acetato de etilo 88.12)

PM. 194.27 g/mol. (Calc para C₁₂H₁₈O₂)

IR (CHCl₃) ν_{max} [cm⁻¹] 2960.00, 2934.00, 2870.90, 1744.70, 1682.1, 1601.90, 1523.90, 1476.70, 1422.0, 1334.0, 1068.0, 1040.70, 935.10

UV (MeOH) λ_{max} nm (ϵ) 219.0 (19256.06)

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , espectro 10, Tabla 11 0) 4.78 (1H, m, H-3), 2.22 (4H, sextuplete, $J=7.8$, 7.8 Hz, H-4, H-7), 1.86-1.81 (2H, m, H-8), 1.79-1.67 (4H, quintup, H-5 e H-6), 1.52-1.47 (4H, quintup, H-9), 1.38 (2H, ddd, $J=3.6$, 3.6, 13.5 Hz, H-10), 0.91 (3H, t, $J=6.9$ Hz, H-11)

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , espectro 11, Tabla 11 0) 173.68 (s, C-1), 163.60 (s, C-3a), 126.75 (s, C-7a), 88.87 (d, C-3), 32.0 (t, C-8), 26.57 (t, C-9), 23.16 (d, C-4), 22.43 (t, C-10), 21.6 (t, C-5 y C-6), 19.84 (t, C-7), 13.82 (c, C-11)

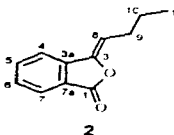
EM (IE, 70 eV): 195 [M^+], 194 [M^+] (30), 165 (8), 138 (8), 137 (33), 110 (13), 109 (100), 81 (43), 79 (18), 41 (10), 39 (4)

7.3 Reacciones de deshidrogenación catalítica

Reacción de deshidrogenación catalítica

Al catalizador PbO_2 al 82.14% (41.2 mg) suspendido en etanol (10 ml), se le adiciona 1 (415.7 mg, 1.816 mmol). Esta mezcla, con agitación constante y a reflujo, se mantiene durante 4.5 horas. Al cabo de ese tiempo se logra observar por medio de ccf la transformación total de la materia prima. Este residuo fue separado del catalizador mediante filtración en pipeta Pasteur empacada con SiO_2 grado de tlc y celita. Al filtrado obtenido se le evapora el disolvente, mediante rotavapor y presión reducida, obteniendo un residuo aceitoso (397 mg). Este crudo fue adsorbido en SiO_2 70-230 y separado mediante cromatografía en columna abierta empleando SiO_2 70-230 como soporte (36.0 g), una columna de vidrio (1.7 cm de diámetro), eluyendo inicialmente con hexano y aumentando gradualmente la polaridad del sistema de elución con acetato de etilo. Se colectaron fracciones de 100 ml. Por medio de ccf, se observa que en las fracciones 21-25 se lograron obtener 2 (159.6 mg, 0.85 mmol, 46.26% de rendimiento). En las fracciones 39-48 se obtiene 4 (55.1 mg, 0.29 mmol, 15.97% de rendimiento).

Datos físicos y espectroscópicos del Z-Butilidenftálico [2].



Aceite translúcido, olor penetrante. Estable

Rf= 0.34 (hexano-acetato de etilo 9:1)

PM. 188.22 g/mol (Calc. para $C_{12}H_{12}O_2$)

IR ($CHCl_3$) ν_{max} . [cm^{-1}] 2965.1, 2933.60, 2872.70, 1776.02, 1687.30, 1613.50, 1474.50, 1341.70, 1275.0, 1074.13, 1002.30, 925.50

UV (MeOH) λ_{max} , nm (ϵ): 311.5 (7868.9), 260.5 (23037.12), 235.5 (23500.0), 210.5 (20580.30)

RMN 1H (500 MHz, $CDCl_3$, espectro 4, tabla 4-0): 7.89 (1H, ddd, J= 1.0, 1.0, 7.0 Hz, H-7), 7.67 (1H, ddd, J=1.0, 1.0, 7.0 Hz, H-5), 7.64 (1H, ddd, 1.0, 1.0, 7.0 Hz, H-4), 7.51 (1H, ddd, 1.0, 6.5, 8.0 Hz, H-6), 5.64 (1H, t, 8.0 Hz, H-8), 2.46 (2H, cuadruplete, J= 8.0 Hz, H-9), 1.56 (2H, sextuplete, J=7.5 Hz, H-10), 0.99 (3H, t, J= 7.5, H-11)

RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$, espectro 5, tabla 5-0): 167.22 (s, C-1), 145.8 (s, C-3a), 139.62 (s, C-3), 134.19 (d, C-5), 129.32 (d, C-6), 125.27 (d, C-7), 124.51 (s, C-7a), 119.62 (d, C-4), 109.43 (d, C-8), 27.77 (t, C-9), 22.51 (t, C-10), 13.77 (q, C-11).

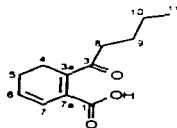
7.4 Reacción de hidrólisis básica con K_2CO_3 al 20%.

Una disolución de **1** (503.6 mg, 2.20 mmol) en acetona (10 ml), fue mezclada con una disolución de K_2CO_3 al 20% (10 ml). Esta mezcla, se calienta en baño maría durante 3 horas a reflujo y con agitación constante. Al transcurrir este tiempo de reacción se separan las fases, y la fase orgánica se concentra, obteniendo un residuo aceitoso amarillo al cual se le agrega una disolución de HCl al 10% (5 ml). Posteriormente se efectúa una extracción con CH_2Cl_2 (4x10ml), las fases orgánicas son reunidas y se realiza un lavado con una disolución saturada de NaCl de (2x25ml). La fase orgánica resultante es secada con Na_2SO_4 anhidro. Después se evapora el disolvente con rotavapor por destilación a presión reducida, obteniendo un crudo aceitoso (660.9 mg).

Este crudo fue adsorbido con SiO_2 30-70 y sometido a una separación por ccv, usando SiO_2 para placa como soporte (6 g), una columna de vidrio (22 mm de diámetro), y empleando como eluyente una mezcla de hexano-AcOEt (98:2), al cual se le fue incrementando gradualmente la polaridad. Las fracciones se colectaron de 25 ml. En base al criterio de ccv, se reunieron las siguientes fracciones 1-6, 17-28, 29-37 y 38-49. El primer lote de fracciones contiene materia prima que no reaccionó (239.4 mg, 1.05 mmol); el segundo lote, el cual contiene a **7** (69.1 mg, 0.332 mmol); el tercer lote de fracciones que contiene una mezcla de **7** y **8** (162 mg), y finalmente, el cuarto lote de fracciones contiene a **8** (59.9 mg, 0.29 mmol).

Posteriormente se realizó una recromatografía de las fracciones 29-37, adsorbiendo el residuo acetoso (162.0 mg) en igual cantidad de SiO₂, 70-230, y se separaron por ccv empleando una columna de vidrio (2.2 cm de diámetro), empacada con SiO₂ para placa (6.0 g), y eluyéndose con una mezcla de hexano-AcOEt (98:2) colectando fracciones de 100 ml. Por medio de ccf en las fracciones 4-5 se recolectó **7** (57.3 mg, 0.28 mmol) y en las fracciones 6-10 se obtuvo **8** (60.5 mg, 0.29 mmol). Los rendimientos totales para cada uno de estos compuestos son los siguientes para **7** (126.4 mg, 0.61 mmol, 50.68% de rendimiento), y para **8** (120.4 mg, 0.58 mmol, 48.23 %).

Datos físicos y espectroscópicos del ácido derivado del Z-ligustilido, [7].



7

Aceite amarillo claro transparente. Inestable en condiciones normales.

R_f = 0.276 (hexano-acetato de etilo 8:2)

PM, 208.25 g/mol (Calc para C₁₂H₁₄O₂)

IR (CHCl₃) ν_{max} [cm⁻¹] 3584.40, 3389.40, 2951.50, 2936.80, 2871.70, 1763.60, 1669.80, 1355.30, 1275.6, 1061.3, 944.0, 903.50

UV (MeOH) λ_{max} nm (ε) 204.5 (1643.20), 282.0 (426.40).

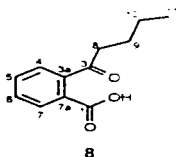
RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃ espectro 17., tabla 14.0) 6.14 (1H, ddd, J = 2.0, 4.0, 9.5 Hz, H-7), 5.96 (1H, ddd, J = 4.0, 4.0, 9.5 Hz, H-6), 2.64-2.58 (1H, m, H-4a), 2.50-2.44 (2H, m, H-5), 2.49-2.39 (1H, m, H-4b), 2.03 (1H, ddd, J = 4.0, 12.0, 12.5 Hz, H-8a), 1.81 (1H, ddd, J = 4.0, 11.0, 14.0 Hz, H-8b), 1.36-1.29 (3H, m, H-10, H-9a), 1.24-1.16 (1H, m, H-9b), 0.892 (3H, t, J = 6.5, H-11)

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃ espectro 18., tabla 15.0) 169.56 (s, C-1), 158.93 (s, C-3), 130.01 (s, C-6), 125.87 (s, C-3a), 116.24 (d, C-7), 107.61 (s, C-7a), 35.83 (t, C-8), 25.10 (t, C-9), 22.41 (t, C-5), 22.41 (t, C-10), 19.29 (t, C-4), 13.737 (q, C-11).

EM (IE, 70 eV): 210 [M⁺+2] (4.77), 209 [M⁺+1] (34.09), 208 [M⁺] (11.63), 192 (6.47), 191 (41.59), 190 (5.45), 189 (4.29), 180 (20.45), 153 (8.66), 92 (9.20), 91 (10.57), 80 (6.48), 79 (74.86), 78 (22.5), 77 (64.09), 67 (12.41), 65 (13.63), 57

(10 43). 55 (16 57) 53 (8 86). 52 (10 09) 51 (17 04) 49 (5 79). 43 (9 20). 41 (23 52). 39 (17 05)

Datos físicos y espectroscópicos del ácido derivado del Z-Butilidenftáldo, [8].



Aceite amarillo claro

R_f = 0,276 (hexano-acetato de etilo 8 2)

PM. 206,24 g/mol (Calc para C₁₇H₁₄O₃)

IR (CHCl₃) ν_{max} [cm⁻¹] 3695 40, 3593 20, 2951 94, 2934 22, 2875 70, 1762 21, 1712 98, 1604 70, 1467 80, 1381 0, 1363 0 60, 1262 78, 1134 10, 1087 80, 1042 08, 945 10, 908 40, 852 50

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃, espectro 20, tabla 15 0) 7 81 (1H, d, J=7 5, Hz, H-7), 7 70 (1H, ddd, J= 8 0, 8 0, 7 5 Hz, H-5), 7 56 (1H, d, J=7 5 Hz, H-6), 7 55 (1H, d, J=7 5 Hz, H-4), 2 20 (1H, ddd, J=5 0, 12 0, 14 0 Hz, H-8a), 2 073 (1H, ddd, J= 5 0, 12 0, 14 0 Hz, H-8b), 1 42-1 33 (1H, m, H-9a), 1 305 (2H, cuadruplete, J= 7 5 Hz, H-10), 1 17-1 10 (1H, m, H-9b), 0 853 (3H, t, J= 7 5 Hz, H-11).

RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃, espectro 21, tabla 15 0) 168 75 (s, C-1), 148 96 (s, C-3a), 134 58 (d, C-5), 132 80 (s, C-3), 130 47 (d, C-6), 129 55 (s, C-7a), 126 19 (d, C-7), 122 27 (d, C-4), 38 52 (t, C-8), 25 36 (t, C-9), 22 41 (t, C-10), 13 72 (q, C-11).

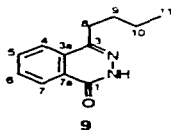
7.5 Reacción de 1 con hidrazina anhidra.

Una disolución de **1** (463 8 mg, 2 026 mmol), en etanol (530 5 mg, 12 05 mmol), se mezcla con hidrazina anhidra (441 mg, mmol). Esta mezcla se pone a reflujo durante 1 hora. La evaporación del disolvente a vacío permite obtener un residuo amarillo cristalino (500 5 mg). El análisis de ccf indica la desaparición total de materia prima y dos compuestos de mayor polaridad. El compuesto de mayor polaridad presenta una fluorescencia morada en lámpara de UV ($\lambda = 254$ nm) y siendo mas notable en $\lambda = 365$ nm). El producto crudo fue recristalizado por

par de disolventes de acetona-hexano obteniendo un sólido blanco cristalino (488.0 mg).

La mezcla recristalizada fue adsorbida en igual cantidad de sílice 70.230 y separada por cca usando SiO₂ grado 70-230 (35 g) una columna de de vidrio (17 mm de diámetro), eluyendo con una mezcla de hexano-AcOEt (8.2), y colectando fracciones de 75 ml. Por medio del análisis por ccf, en las fracciones 7-18 se colectó un sólido blanco cristalino, **9** (47.2 mg 0.231 mmol, 65.71% de rendimiento) y en las fracciones 25-31 se colectó un sólido blanco cristalino, **10**, (390 mg, 1.912 mmol, 90.95% de rendimiento).

Datos espectroscópicos de la ftalazona derivada del Z-Butilidéntalido [9]



Sólido blanco amorfo

Pf. 154-157 °C.

PM. 202.25 g/mol. (Calc. para C₁₂H₁₄N₂O).

IR (CHCl₃) ν_{max} [cm⁻¹]: 3403.70, 3180.00, 3080.60, 2960.40, 2934.40, 2874.90, 2865.0, 1665.90, 1613.90, 1599.0, 1555.70, 1486.20, 1461.40, 1380.90, 1343.70, 1182.1, 1154.3, 1022.8

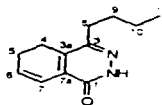
UV (EtOH) λ_{max} nm (ϵ): 324.0 (6497.67), 234.5 (7086.83), 207.0 (14830).

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃, espectro 23., tabla 16.0): 10.33 (1H, s, H-2), 8.48 (1H, dd, J=1.2, 1.2, 7.8 Hz, H-7), 7.85 (1H, dd, J=1.5, 3.3 Hz, H-5), 7.3 (1H, dd, J=1.2, 3.5 Hz, H-4), 7.78 (1H, ddd, J=3.0, 4.5, 7.8 Hz, H-6), 2.95 (2H, t, J=7.8, 7.8 Hz, H-8), 1.77 (2H, quintuplete, J=7.8 Hz, H-9), 1.48 (2H, sextuplete, J=7.8 Hz, H-10), 0.99 (3H, t, J=7.8 Hz, H-11).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃, espectro 24.): 160.38 (s, C-1), 147.90 (s, C-3a), 133.41 (d, C-5), 131.27 (d, C-6), 129.47 (s, C-7a), 128.10 (s, C-3), 127.10 (d, C-7), 124.80 (d, C-4), 31.82 (t, C-8), 30.00 (t, C-9), 22.54 (t, C-10), 13.86 (q, C-11).

EM (IE, 70 eV): 203 [M⁺+1] (7.16), 202 [M⁺] (36.73), 201 [M⁺-1] (7.16), 187 (10), 174 (9.55), 173 (21.43), 161 (32.25), 160 (100), 159 (10.90), 131 (9.54), 130 (16.33), 115 (10.0), 104 (6.46), 103 (17.69), 102 (21.13), 77 (7.84), 76 (4.98).

**Datos físicos y espectroscópicos de la
ftalazona derivada del Z-ligustilido. [10].**



10

Sólido blanco cristalino
Pf. 130-135 °C
PM. 204.27 g/mol. (Calc para C₁₂H₁₆N₂O)

IR (CHCl₃) ν_{max} [cm⁻¹] 3392.90, 2962.70, 2933.50, 2875.0, 2863.10, 2833.80,
1657.50, 1620.50, 1620.30, 1580.40, 1532.0, 1468.30, 1383.20, 1343.30,
1319.40, 1174.60, 1109.50, 1078.90, 928.80, 888.90

UV (EtOH) λ_{max} nm (ϵ): 285 (7140.0), 254.5 (8345.45), 246.5 (7974.55), 208.0
(41449.10).

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃, espectro 25, tabla 17 0) 11.25 (1H, s, H-2), 6.83 (1H,
ddd, J= 2.1, 2.1, 9.6 Hz, H-7), 6.28 (1H, ddd, J= 4.2, 4.2, 5.7 Hz, H-6), 2.64 (2H,
td, J= 1.2, 9.6 Hz, H-4), 2.59 (2H, t, J= 8.1 Hz, H-8), 2.43-2.35 (2H, m, H-5), 1.59
(2H, quintup, J= 7.5 Hz, H-10), 0.96 (3H, t, J= 6.9 Hz, H-11)

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃, espectro 26, tabla 17 0) 158.56 (s, C-1), 148.55 (s, C-
3), 136.00 (s, C-3a), 132.80 (d, C-6), 131.80 (s, C-7a), 120.31 (d, C-7), 31.96 (t,
C-8), 29.81 (t, C-4), 22.39 (t, C-9), 21.99 (t, C-5), 21.74 (t, C-10), 13.83 (q, C-11).

EM (IE, 70 eV): 205 [M⁺+1] (5.79), 204 [M⁺] (39.20), 203 [M⁻-1] (30.00), 186 (4.97),
175 (9.375), 162 (80.96), 161 (84.20), 160 (6.13), 130 (4.09), 105 (3.41), 104
(4.57), 103 (5.96), 91 (3.24), 78 (3.40), 77 (6.82), 43 (2.89), 41 (2.39), 39 (1.77).

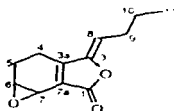
7.6 Reacción de epoxidación

Una disolución de **1** (1.0010 g, 4.37 mmol), en CH₂Cl₂ (10 ml), se mezcla con ácido *m*-cloroperbenzoico (AMCPB, 915.4 mg, 5.32 mmol) disueltos en CH₂Cl₂ (5 ml), y posteriormente, se calienta a reflujo y con agitación vigorosa durante 1.5 horas. Al cabo de ese tiempo el producto crudo se transvasa a un embudo de separación y se efectúa un lavado con una disolución de Na₂S₂O₃ al 10% (2x15 ml). Se observa que al mezclar el crudo con la disolución anterior

aparece una turbidez. Después, a la fase orgánica resultante, se le efectúa un lavado con una disolución saturada de Na_2HCO_3 (2X15ml). Posteriormente, la fase orgánica se lava con disolución saturada de NaCl (1x30ml), y la fase orgánica es secada con Na_2SO_4 anhidro y se le evapora el disolvente a vacío, obteniendo un residuo amarillo (1079.0 mg). De acuerdo con el análisis por ccf, se observa un nuevo compuesto de mayor polaridad y materia prima que no ha reaccionado.

El residuo obtenido es adsorbido en la misma cantidad de SiO_2 70-230 y es separado por ccv usando SiO_2 para placa como soporte (10 g), una columna de vidrio (26 mm de diámetro), eluyendo con una mezcla hexano-AcOEt (9:1), colectándose fracciones de 50 ml. De la anterior ccv en las fracciones iniciales, se logra recuperar 1, (0.3431 mg, 1.498 mmol). En fracciones posteriores, se obtiene un compuesto aceitoso translúcido, 11 (0.53 mg, 2.56 mmol, 89.01 % de rendimiento). Este compuesto fue disuelto en un poco de acetona y es filtrado en un pipeta Pasteur empacada con alúmina (2 cm de alto) con el fin de eliminar las trazas de ácido remanente de la reacción. Se logra observar que presenta descomposición en condiciones normales por lo que es guardado bajo atmósfera de nitrógeno y mantenido en refrigeración.

Datos físicos y espectroscópicos del 6,7-epoxiligustilido, [11].



11

Aceite verde claro, translúcido, olor desagradable y penetrante. Descompone en condiciones normales.
 $R_f = 0.369$ (hexano-acetato de etilo 8:2)

PM: 206.24 g/mol. (Calc. para $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{O}_3$).

IR (CHCl_3) ν_{max} [cm^{-1}]: 2964.50, 2933.50, 2876.0, 1768.50, 1675.50, 1634.90, 1045.70, 1018.10, 959.50, 889.40

UV (EtOH) λ_{max} nm (ϵ): 203.0 (59072.50), 276.0 (98951.15)

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , espectro 27, tabla 19.0): 5.31 (1H, t, $J = 7.8$ Hz, H-8), 3.78 (1H, d, $J = 3.9$ Hz, H-7), 3.73 (1H, ddd, $J = 1.2, 2.1, 5.1$ Hz, H-6), 2.54 (1H, ddd, $J = 1.5, 2.4, 6.3$ Hz, H-5a), 2.49 (1H, ddd, $J = 2.4, 2.4, 7.5$ Hz, H-4a), 2.37 (2H,

cuadruplete, J= 7.5 Hz, H-9; 2.36-2.26 (1H, m, H-5b), 1.79 (1H, dddd, J= 1.8, 6.3, 10.5, 12.9 Hz, H-4b), 1.50 (2H, sextuplete, J= 7.3 Hz, H-10), 0.95 (3H, t, J= 7.5 Hz, H-11)

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3), espectro 28 (tabla 20.0), 167.95 (s, C-1), 152.45 (s, C-3a), 148.08 (s, C-3), 123.75 (s, C-7a), 114.22 (d, C-8), 54.61 (d, C-6), 43.26 (d, C-7), 28.16 (t, C-9), 22.28 (t, C-10), 20.35 (t, C-5), 16.81 (t, C-4), 13.73 (c, C-11)

EM (IE, 70 eV) 207 ($[\text{M}^+ + 1]$, 15.68), 206 ($[\text{M}^+]$, 100), 178 (20.11), 177 (71.59), 164 (5.45), 164 (24.20), 163 (25.23), 151 (20.11), 150 (25.0), 149 (20.11), 136 (16.70), 135 (19.77), 133 (6.13), 123 (6.61), 122 (17.73), 121 (19.77), 108 (5.11), 107 (10.22), 105 (5.11), 103 (6.13), 95 (9.34), 94 (12.27), 93 (8.86), 91 (11.59), 83 (6.61), 79 (13.63), 77 (13.16), 69 (6.2), 67 (6.0), 65 (12.27), 65 (11.11), 55 (47.04), 52 (6.61), 44 (6.61), 41 (9.20), 39 (12.27)

7.7 Reacción de hidrólisis ácida del epóxido

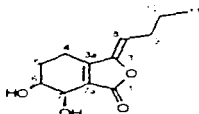
A una mezcla de acetona agua 1:1 (10 ml), se le adiciona **11** (250.0 mg, 1.124 mmol), posteriormente el matraz de reacción se coloca en un baño de hielo y con agitación constante se agregan 0.3 ml de una disolución de H_2SO_4 al 10 %, esta mezcla se mantiene durante 1.5 horas. Al cabo de ese tiempo se elimina la agitación observándose 2 fases: la fase orgánica es separada y se concentra a vacío. El producto crudo es disuelto en CH_2Cl_2 (10 ml) se transvasa a un embudo de separación y se lleva a cabo un lavado con una disolución saturada de Na_2HCO_3 (2x15ml). A la fase orgánica resultante se le efectúa un lavado con disolución saturada de NaCl (2x15ml) y finalmente se efectúa un lavado con agua (2x25ml). La fase orgánica obtenida se seca con Na_2SO_4 anhidro y se concentra a presión reducida. De esta manera se logran obtener un residuo amarillo (220.0 mg). El análisis por medio de ccf indica una mezcla de dos compuestos de mayor polaridad donde, el más polar de ellos, es mayoritario.

Esta mezcla de reacción se disuelve en un poco de acetona y es aplicada para su separación en una cromatografía en placa preparativa analítica de 20X20 cm y de 0.25 mm de espesor base de aluminio (3 placas). Eluyéndose con una mezcla de CH_2Cl_2 :MeOH 96:4 (x4). Posteriormente, se raspa la sílice donde se monitorea cada compuesto (usando la lámpara de UV como revelador), y se extrae con acetona (8x50 ml). Los filtrados de cada compuesto son reunidos, y se les evapora el disolvente con rotavapor por medio de destilación a presión reducida. Los residuos obtenidos son disueltos en acetona, y filtrados en una pipeta Pasteur empacada con alúmina (2 cm de alto). Después, ambos filtrados son secados con Na_2SO_4 anhidro y se concentran en rotavapor.

En ambos casos se obtiene un residuo aceitoso. El compuesto de menor polaridad, se caracterizó como el cis-ligustidol [12] (12 mg, 0.0535 mmol, 4.41 %

de rendimiento) y el de mayor polaridad se identificó como el *trans*-ligustidol [13] (86.2 mg, 0.3848 mmol, 31.71% de rendimiento).

**Datos físicos y espectroscópicos
del *cis*-6,7-ligustidol, [12].**



12

Aceite amarillo, opaco

R_f = 0.469 (diclorometano-metanol 9:1)

PM: 224.25 g/mol (Calc. para C₁₂H₁₆O₄)

IR (CHCl₃) ν_{max} [cm⁻¹]: 3431.935, 2961.674, 2931.362, 2871.7, 1737.296, 1638.414, 1606.301, 1461.20, 1380.00, 1325.08, 1088.203, 1043.693

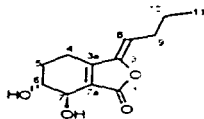
UV (MeOH) λ_{max} , nm (...): 204.5 (2298.28), 273.0 (1420.19)

RMN ¹H (300 MHz, CD₂COCD₃): 5.41 (1H, t, J = 7.6 Hz, H-8), 4.41 (1H, s, H-7), 3.73 (1H, s, H-6), 2.62 (2H, t, J = 3.9, 5.7 Hz, H-5a), 2.49 (1H, ddd, J = 0.9, 6.3, 9.0 Hz, H-5b), 2.25 (1H, quintuplete, J = 2.1 Hz, H-4a), 1.83 (1H, quintuplete, J = 2.1 Hz, H-4b), 2.29 (2H, quintuplete, J = 7.5 Hz, H-9), 1.49 (2H, sextuplete, J = 7.3 Hz, H-10), 0.93 (3H, t, J = 7.3 Hz, H-11)

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃, espectro 31, tabla 21.0): 5.31 (1H, t, J = 4.8 Hz, H-8), 4.62 (1H, d, J = 2.7 Hz, H-7), 4.08 (1H, ddd, J = 1.2, 2.1, 4.5 Hz, H-6), 2.66 (1H, m, H-4a), 2.44-2.37 (1H, dddd, 1.2, 3.6, 4.5, 11.1 Hz, H-4b), 2.36 (2H, t, J = 7.0 Hz, H-9), 2.18-2.12 (1H, m, H-5a), 1.84-1.78 (1H, m, H-5b), 1.51 (2H, sextuplete, J = 7.5 Hz, H-10), 0.96 (3H, t, J = 7.5 Hz, H-11)

RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃, espectro 32, tabla 22.0): 169.30 (s, C-1), 153.16 (s, C-3a), 148.26 (s, C-3), 125.27 (s, C-7a), 114.43 (d, C-8), 67.11 (d, C-7), 63.70 (d, C-6), 28.09 (t, C-9), 25.73 (t, C-5), 22.26 (t, C-10), 18.20 (t, C-4), 13.75 (q, C-11)

**Datos físicos y espectroscópicos
del *trans*-6,7-ligustidiol, [13].**



[13]

Aceite amarillo, opaco.

Rf = 0.454 (diclorometano-metanol 9/1)

PM. 224.25 g/mol. (Calc para C₁₂H₁₆O₄)

IR (CHCl₃) ν_{max} [cm⁻¹]: 3593.2, 3467.9, 2967.9, 2964.5, 2935.5, 2875.7, 1755.3, 1678.0, 1641.30, 1604.7, 1458.10, 1381.0, 1327.0, 1155.3, 1083.9, 1039.6, 1022.2, 968.2, 918.1

UV (MeOH) λ_{max} nm (ε): 204.0 (4288.0), 274.0 (5835.2)

RMN ¹H (300 MHz, CD₂COCD₂) 5.41 (1H, t, J = 7.935 Hz, H-8), 4.37 (1H, d, J = 5.1 Hz, H-7), 4.00 (1H, t, J = 4.35, H-6), 2.55-2.48 (2H, m, H-4a e H-5a), 2.08-1.82 (2H, m, H-4b e H-5b), 2.31 (2H, quintuplete, J = 7.2 Hz, H-9), 1.50 (2H, sextuplete, J = 7.8 Hz, H-10), 0.94 (3H, t, J = 7.2 Hz, H-11)

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃, espectro 33, tabla 23.0) 5.28 (1H, t, J = 8 Hz, H-8), 4.37 (1H, d, J = 6 Hz, H-7), 4.00 (1H, ddd, J = 3.3, 6.3, 9.8 Hz, H-6), 2.56-2.48 (2H, m, H-4), 2.35 (2H, cuádruplete, J = 7.5 Hz, H-9), 2.13-2.06 (1H, ddd, J = 5.0, 8.5, 10.0 Hz, H-5a), 1.89 (1H, ddd, J = 5.7, 8.2, 23 Hz, H-5b), 1.50 (2H, sextup, J = 7.5 Hz, H-10), 0.94 (t, J = 7.5 Hz, H-11)

RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃, espectro 34, tabla 24.0) 169.07 (s, C-1), 152.82 (s, C-3a), 148.07 (s, C-3), 125.93 (s, C-7a), 114.29 (d, C-8), 71.78 (d, C-7), 67.92 (d, C-6), 28.07 (t, C-9), 26.66 (t, C-5), 22.23 (t, C-10), 19.16 (t, C-4), 13.72 (c, C-11)

7.7 Reacción de Diels-Alder.

1 (1.0365 g, 4.527 mmol) fue colocado en un tubo largo de vidrio de 2 mm de espesor y 1 cm de diámetro, al cual se le pone atmósfera de nitrógeno y posteriormente se sella con soplete, y se coloca en uno de los orificios de un cañón para reacciones a alta temperatura, manteniéndose a 142°C durante 42 horas. Cuando transcurre la reacción, se logra observar el cambio de la materia

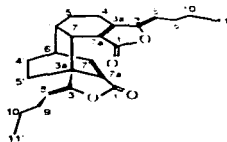
prima de un color amarillo a una coloración ambar y al finalizar la reacción presenta una coloración roja translúcida. Además, el residuo se va haciendo más viscoso. Transvasando este crudo con acetona y posterior evaporación, resulta un residuo aceitoso (937.6 mg).

En el análisis por ccf del producto crudo se observan trazas de materia prima, Z-butilidéntalido [2], y una mezcla de varios compuestos más polares. Por comparación con muestras originales se observa que hay se toquinólido B [15] (trazas), y, diligustilido [14].

El análisis del espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de una muestra del producto crudo se establece que diligustilido [14] está en 22 %.

El crudo de reacción fue adsorbido en SiO_2 70-230 y separado por cc usando una columna de vidrio (2.5 cm de diámetro) empacada con SiO_2 para placa como soporte (10 g) y eluyendo con la mezcla hexano-AcOEt (9:1) y colectándose fracciones de 100 ml. Por medio del análisis de ccf, se observa por comparación con muestras originales que en las fracciones 1-4, hay una mezcla de compuestos poco polares, entre otros se identifica al Z-butilidéntalido [2], toquinólido B [15], y diligustilido [14] (190.4 mg). En las fracciones 5-18 se colectó diligustilido [14] (105.4 mg, 0.2774 mmol, 6.16 % rendimiento parcial experimental). El análisis de las fracciones subsecuentes se logra observar compuestos de mayor polaridad. El estudio de dichas fracciones no se incluye en este trabajo ya que hasta el momento continúa en investigación.

Datos físicos y espectroscópicos del Diligustilido [14]



14

Agujas blancas cristalinas

P.f. 123.-125 °C.

PM. 380.48 g/mol. (Calc. para $\text{C}_{24}\text{H}_{28}\text{O}_4$)

R_f = 0.43 (hexano-acetato de etilo 7:3)

IR (CHCl_3) ν_{max} : 3015, 2960, 2872, 1790, 1767, 1710, 1667, 1620 cm^{-1} .

UV (EtOH) λ_{max} (ϵ): 273 (24208), 228 (12252)

RMN¹H (200 MHz, CDCl₃): 7.37 (1H, d, J=6.6 Hz, H-7'), 5.08 (1H, t, J=7.8 Hz, H-8), 5.00 (1H, t, J=7.8 Hz, H-8'), 3.26 (1H, ddd, J=4.5, 2.0, 2.0 Hz, H-6'), 2.56 (1H, dd, J=7.3, 8.0 Hz, H-6), 2.28 (2H, dd, J=14.0, 7.0 Hz, H-9), 2.17 (2H, dd, J=14.0, 7.0 Hz, H-9'), 2.1-1.95 (3H, m, H-4, H-4'), 1.95-1.80 (3H, m, H-5, H-4'), 1.60-1.20 (2H, m, H-5'), 1.45 (2H, c, J=7.0 Hz, H-10), 1.44 (2H, c, J=7.0 Hz, H-10'), 0.93 (3H, t, J=7.0 Hz, H-11), 0.92 (3H, t, J=7.0 Hz, H-11')

RMN¹³C (50 MHz, CDCl₃): 168.12 (s, C-1), 164.63 (s, C-1'), 154.88 (s, C-3a), 150.37 (s, C-3'), 147.80 (s, C-3), 142.09 (d, C-7'), 133.80 (s, C-7'a), 126.27 (s, C-7a), 11.80 (d, C-8), 108.16 (d, C-8'), 47.34 (s, C-3'a), 41.30 (d, C-7, C-6'), 38.01 (d, C-6), 30.74 (t, C-4'), 13.76 (q, C-11), 13.62 (q, C-11')

EM (IE, 70 eV): 380 [M⁺] (22), 191 (100), 161 (37), 148 (97), 55 (30).

7.8 Parte Experimental. Ensayos Biológicos.

Bioensayo de letalidad frente *Artemia salina*⁶⁹

Material

1. Huevecillos de *Artemia salina*
2. Sal de mar.
3. Pecera pequeña.
4. Bomba aireadora.
5. Lámpara.
6. Jeringas de 5 μ l, 10 μ l, 100 μ l.
7. Viales limpios (9 por muestra).
8. Termostato.

Procedimiento

1. Se prepara agua de mar de acuerdo a las instrucciones de la caja, (aproximadamente 38 g de sal por litro de agua).
2. Se vacía el agua de mar en una pecera pequeña y se adicionan los huevecillos de *Artemia salina*. Después, se coloca la luz de la lámpara encima de la pecera y a 28 °C de temperatura.
3. Estas condiciones de temperatura y luz se mantienen durante dos días para permitir la maduración de los huevecillos.
4. Se preparan los viales para el análisis de cada compuesto. (Se analiza inicialmente 1000, 100 y 10 μ g/ml, (en caso de tener poca muestra, las concentraciones de trabajo serán 50, 25 y 12.5 μ g/ml). Se preparan 3 viales

- para cada concentración, resultando un total de nueve viales por compuesto a probar.
5. Se pesan 20 mg de muestra y se mezclan con 2 ml de disolvente (generalmente acetona pura) (20 mg por 2 ml) De esta disolución se transfieren 500 y 5 μ l a viales correspondientes a 1000, 100 y 10 mg/ml, respectivamente
 6. Posteriormente se evapora el disolvente con nitrógeno y después, los viales son secados a alto vacío aproximadamente 30 minutos. Los compuestos volátiles pueden evaporarse durante 12 horas
 7. Después de dos días (cuando la larva de *Artemia salina* ha emergido), se adicionan 5 ml de agua salada a cada vial y se agregan 10 individuos por vial (30 *Artemias* por dilución). Después de 24 horas se cuentan y registra el número de microorganismos sobrevivientes.
 8. Los datos obtenidos se analizan con el programa Finney de cómputo para determinar el valor de dosis letal media (LD₅₀) y el intervalo de confianza de 95%.

Bioensayos antimicrobianos y antifúngicos

Material

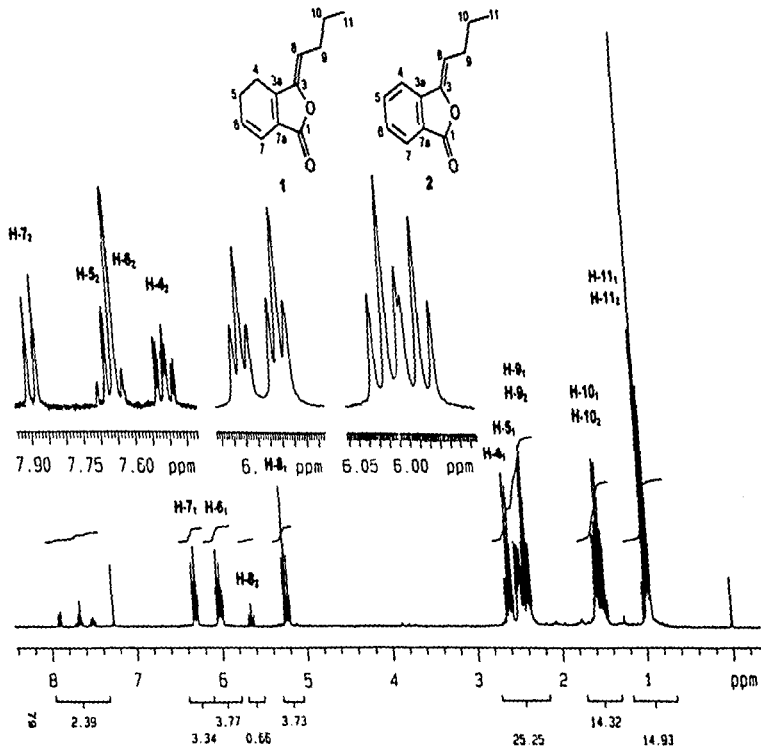
1. Cajas petri
2. Agar No. 1 para antibióticos
3. Papel filtro
4. Jeringas de 5 μ l, 10 μ l, 100 μ l

Procedimiento

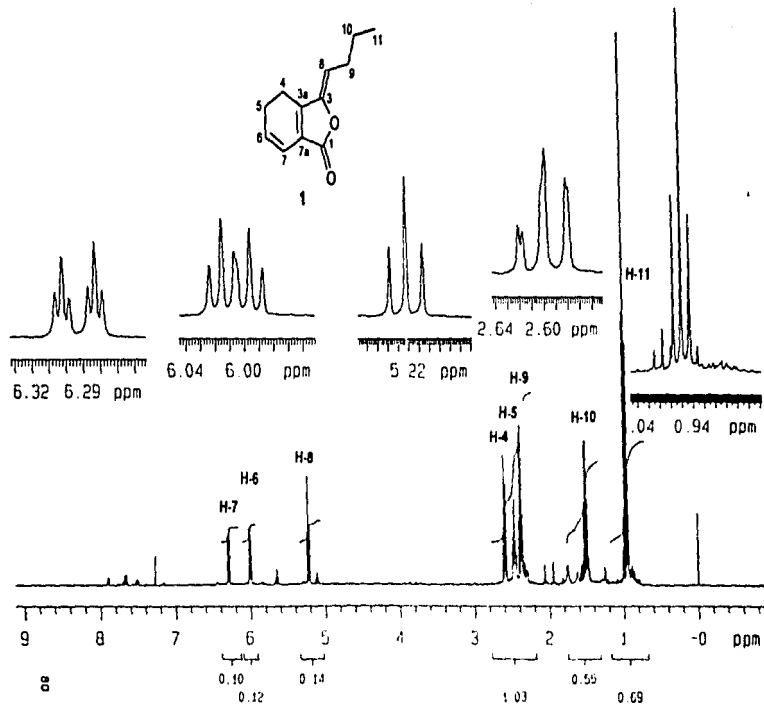
1. Se preparan los medios de cultivo en cajas petri estériles, adicionando a cada caja la cantidad suficiente de agar No. 1 para antibióticos (previamente preparado, esterilizado y caliente)
2. Se pesa y se disuelve el compuesto a probar (en el disolvente en el que sea soluble, generalmente acetona) para tener una concentración de 1 mg/ml.
3. Se cortan los discos de papel filtro (5 mm de diámetro) se marcan con lápiz y después se le adicionan 500 mg (a cada disco) de la disolución preparada en el paso 2. Se evapora el disolvente a temperatura ambiente
4. Posteriormente, los discos se colocan sobre la superficie de medio y poco después se siembra el microorganismo. Todo bajo condiciones estériles. Se colocan además un disco control que haya sido empapado sólo con disolvente.
5. Posteriormente las cajas son incubadas a 37°C durante 24 horas.
6. Si aparece un halo de inhibición (resultado positivo), este se mide (mm).

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

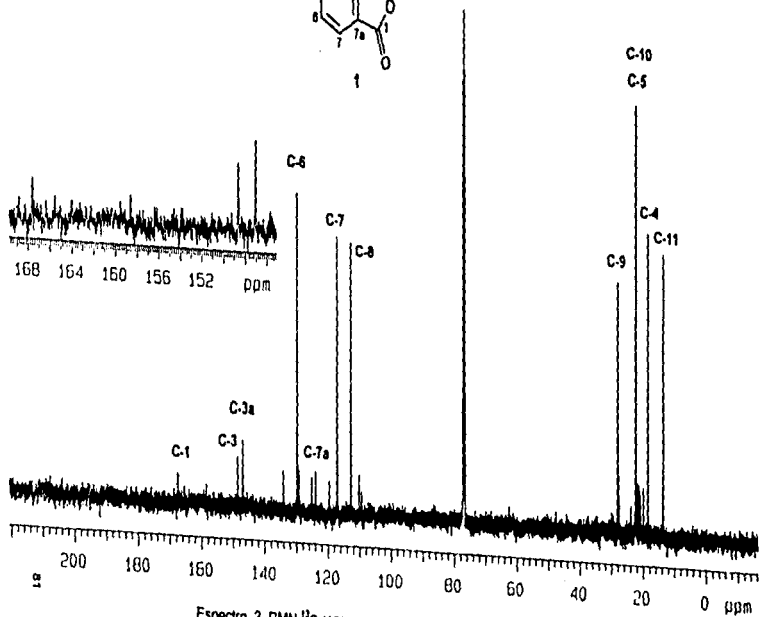
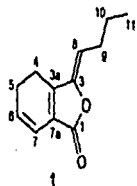
8. ESPECTROS



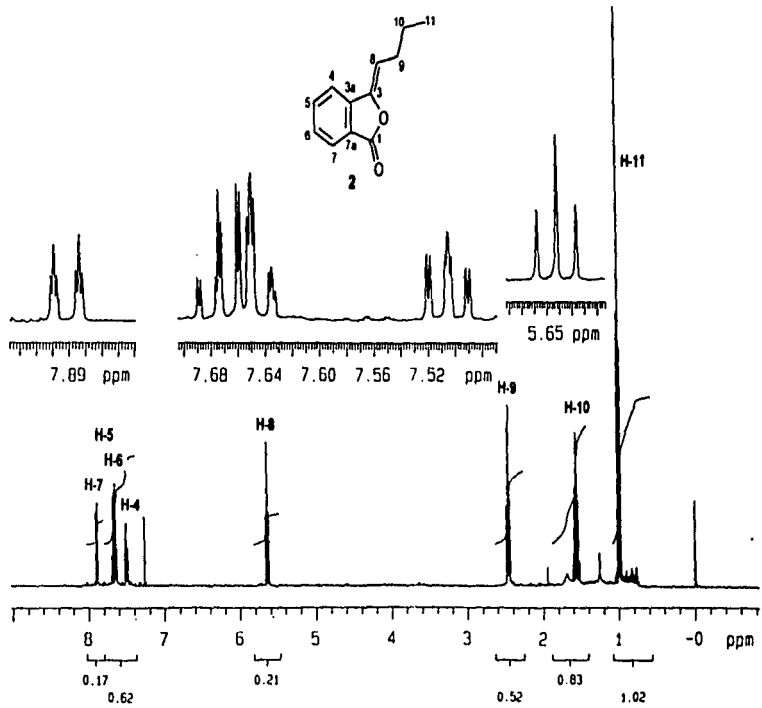
Espectro 1. RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) de la materia prima Mezcla de 1 y 2



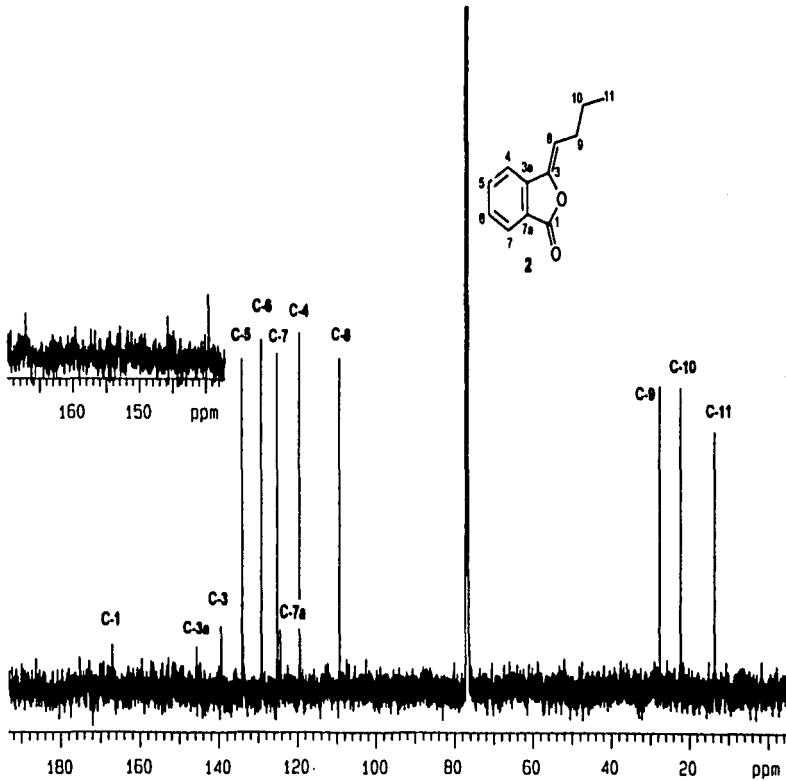
Espectro 2 RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) del Z-ligustilido 1.



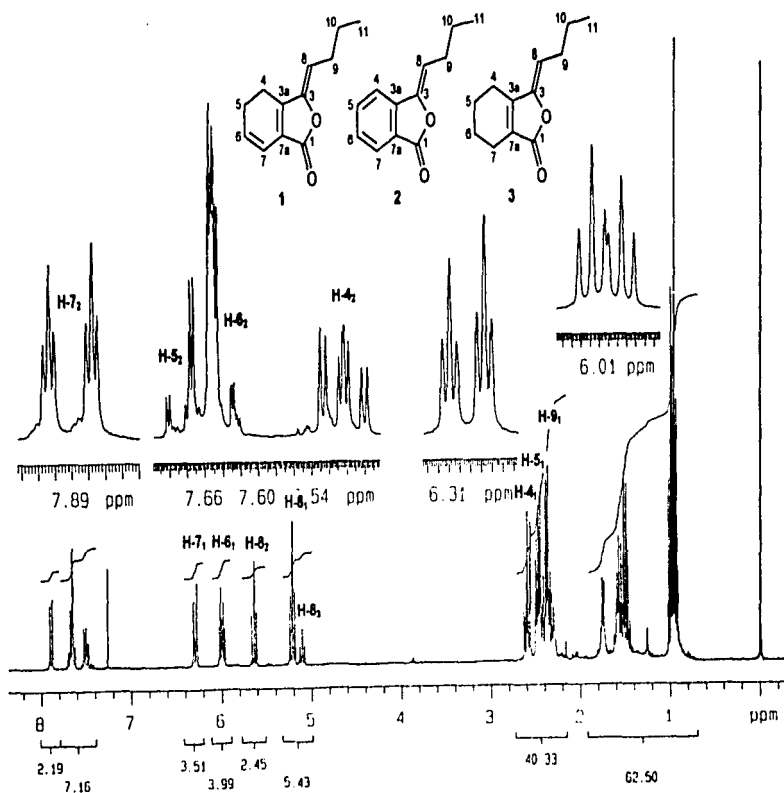
Espectro 3. RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) del Z-igustilido 1.



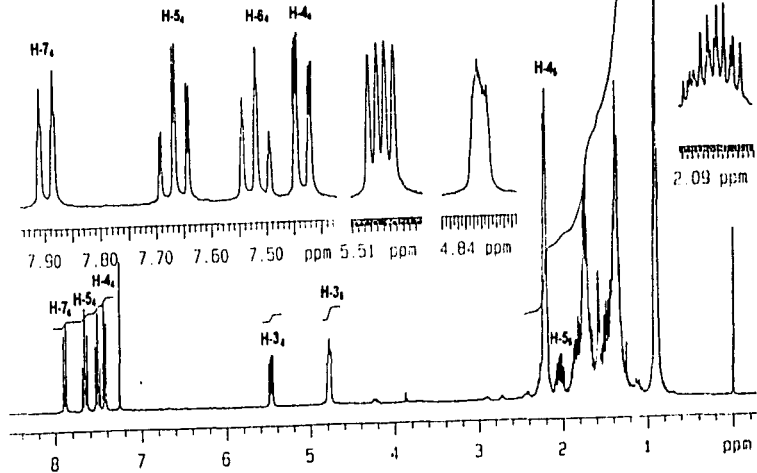
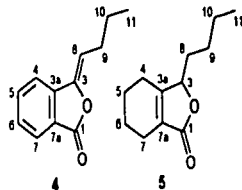
Espectro 4. RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) del Butilidenoalido 2.



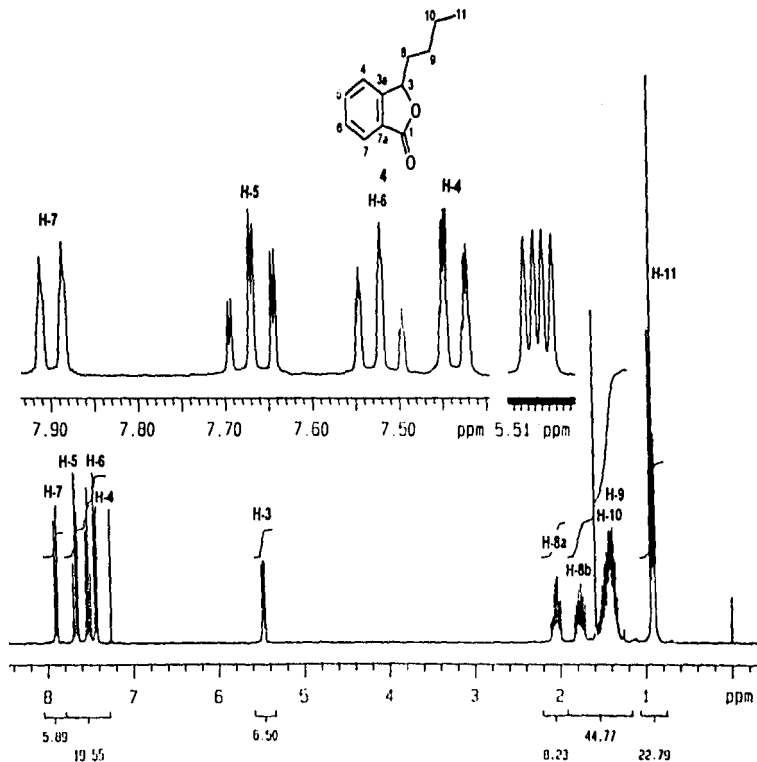
Spectro. 5. RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) del Butilidenalido 2.



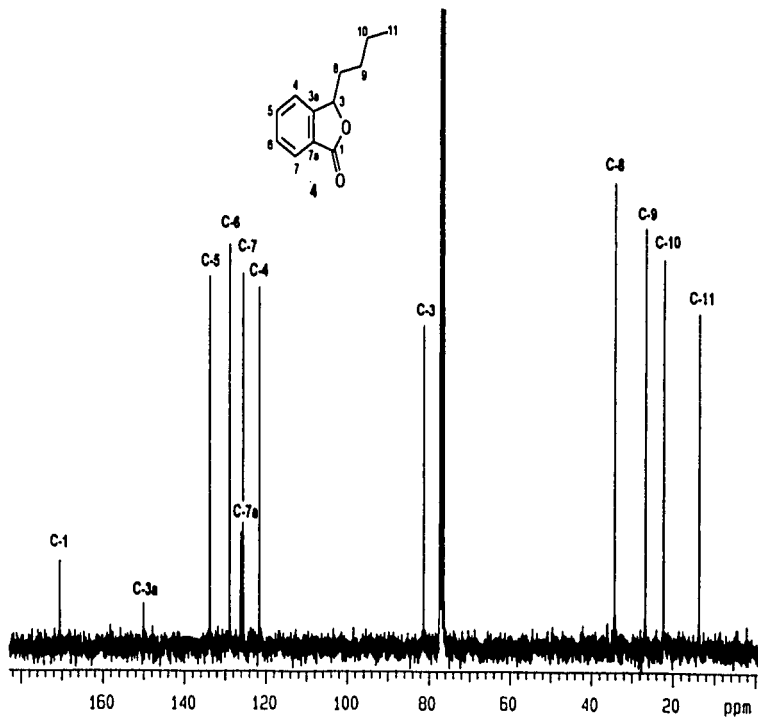
Espectro ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) del producto crudo de la reacción. Mezcla de 1, 2 y 3. Pd/C 10%, AcOEt, 2 horas.



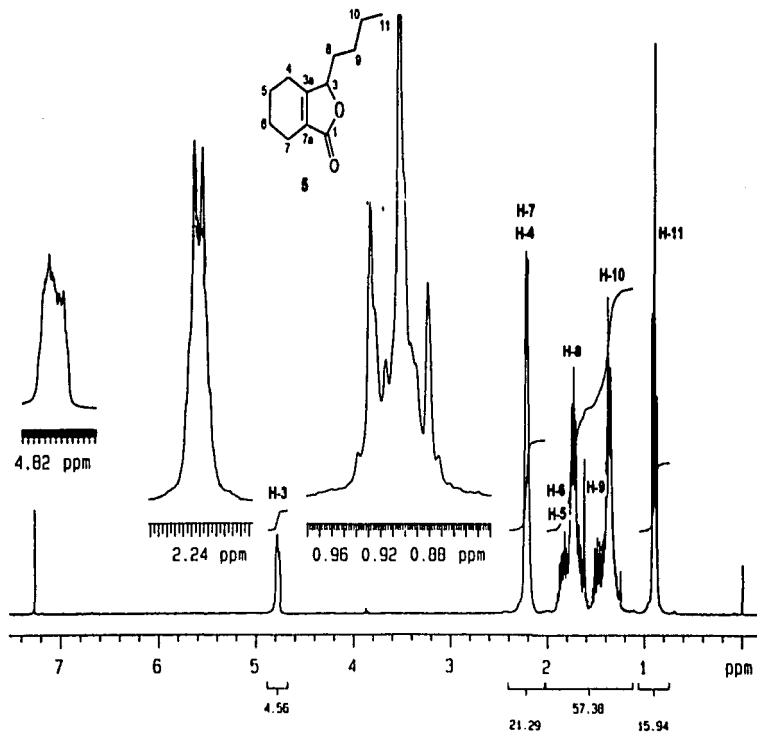
Espectro: 7 RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) del producto crudo de la reacción Mezcla de 4 y 5. Pd/C 10%, AcOEt, 8 horas.



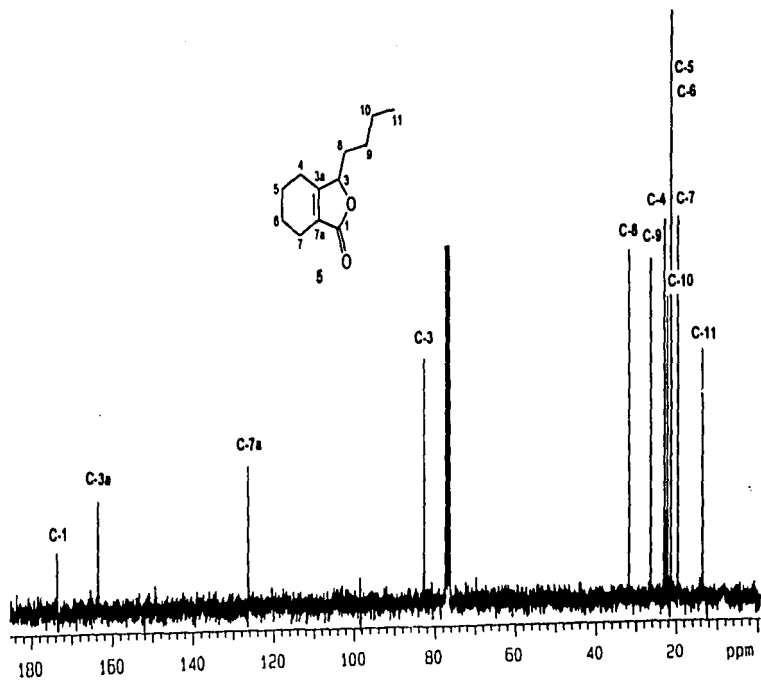
Espectro. 8 RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) del Butilfátido 4



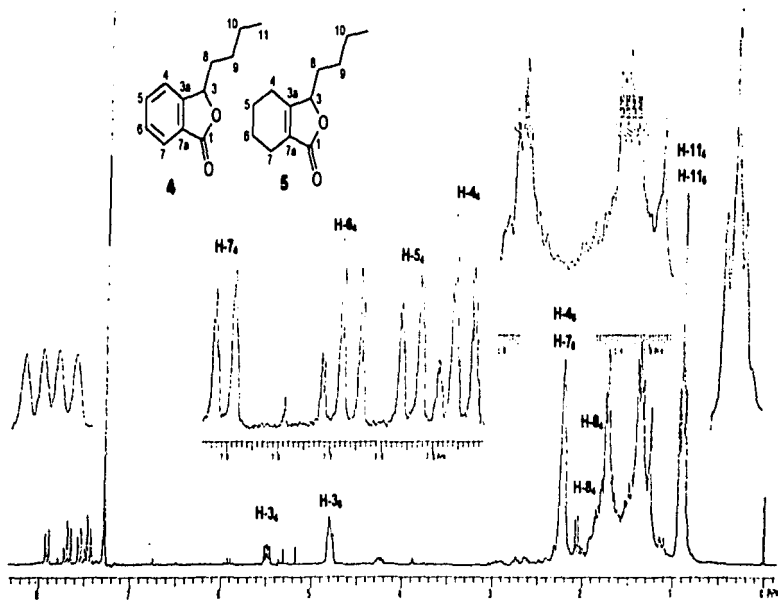
Spectro 9 RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) del Butilmaleído 4.



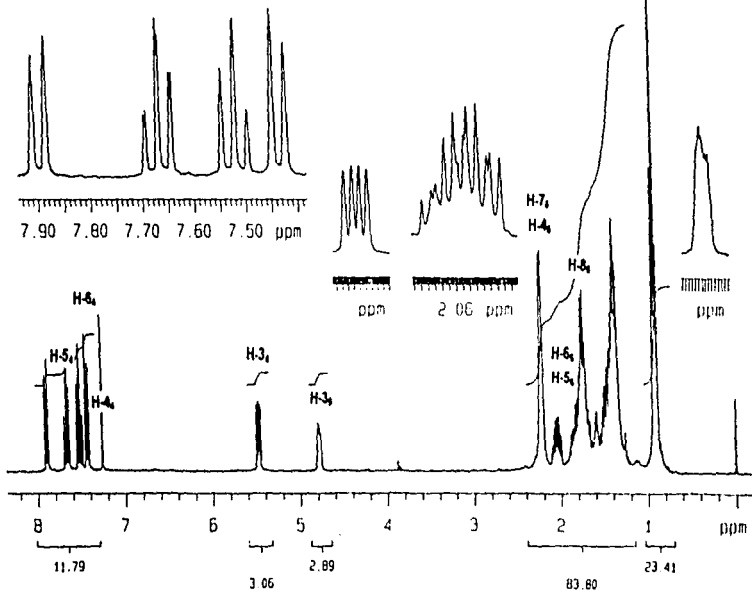
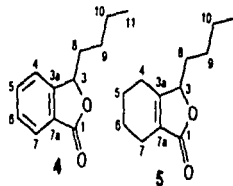
Espectro. 10. RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) del 3(8),6(7)-tetrahydroigustilido **5**.



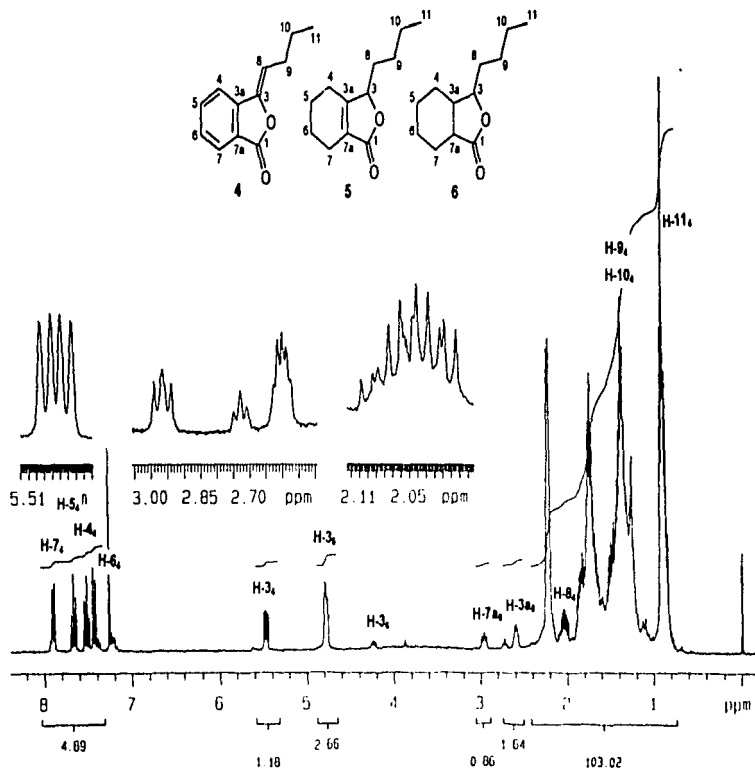
Espectro. 11. RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) del 3(8),5(7)-tetrahydrogustilido 5.



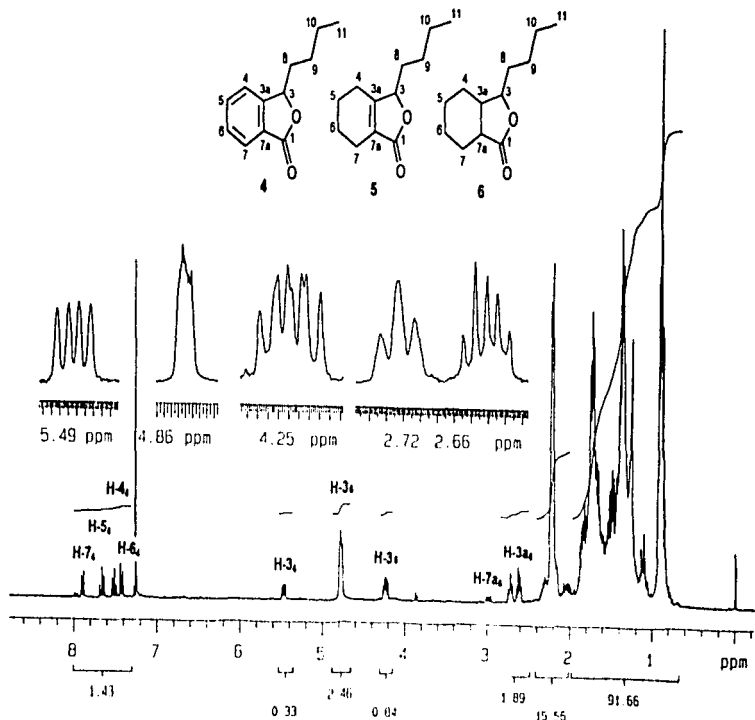
Espectro 12. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) del producto crudo de la reacción.
 Mezcla de 4 y 5. PIO_2 10%, AcOEt, 4.5 horas.



Espectro 13 RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) del producto crudo de la reacción
Mezcla de 4 y 5 Pd/C 10%, EtOH, 6 horas

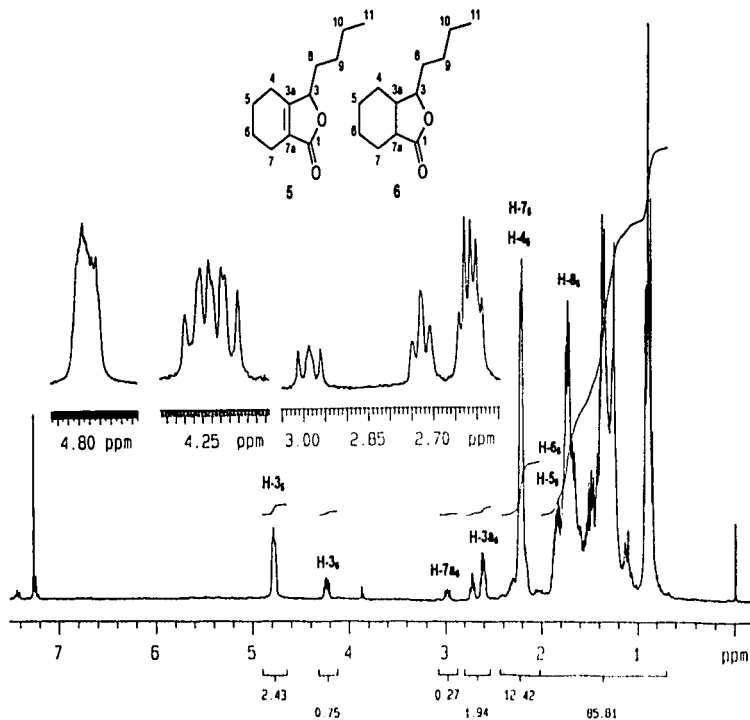


Espectro. 14 RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) del producto crudo de la reacción
 Mezcla de 4, 5 y 6 PbO , 10%, EtOH, 4.5 horas

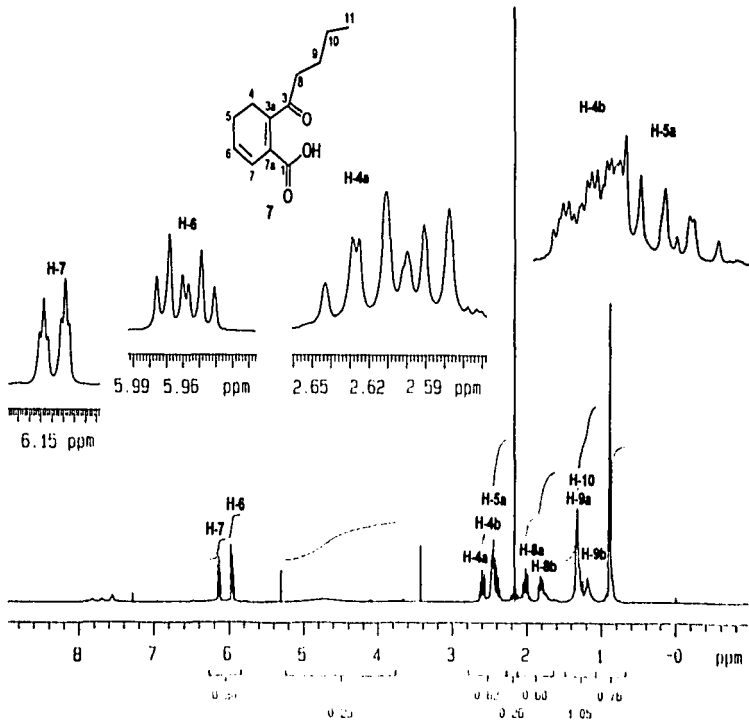


Espectro 15. RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) del producto crudo de la reacción Mezcla de 4, 5 y 6. PIO; 10%, AcOEt, 28 5 horas.

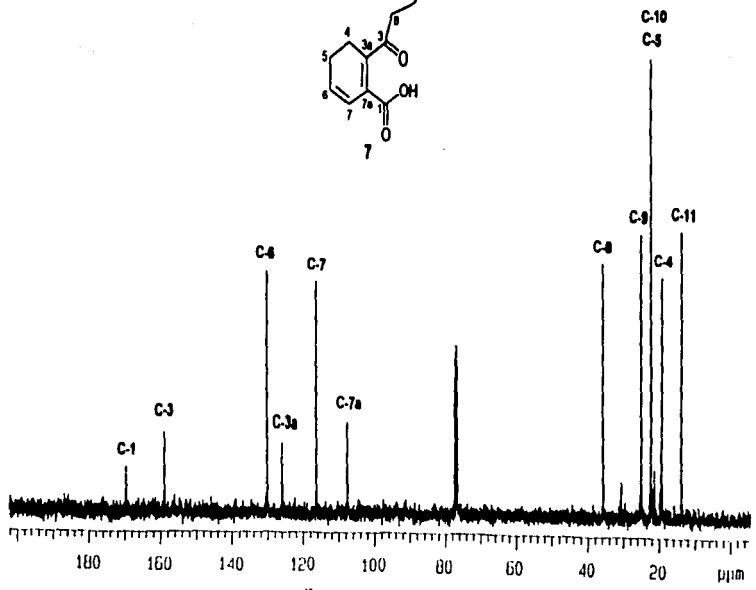
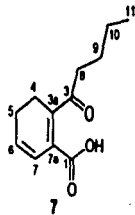
Documento de Propiedad Intelectual de la Universidad de Chile. No se permite su reproducción, distribución o uso sin el consentimiento expreso de la Universidad de Chile.



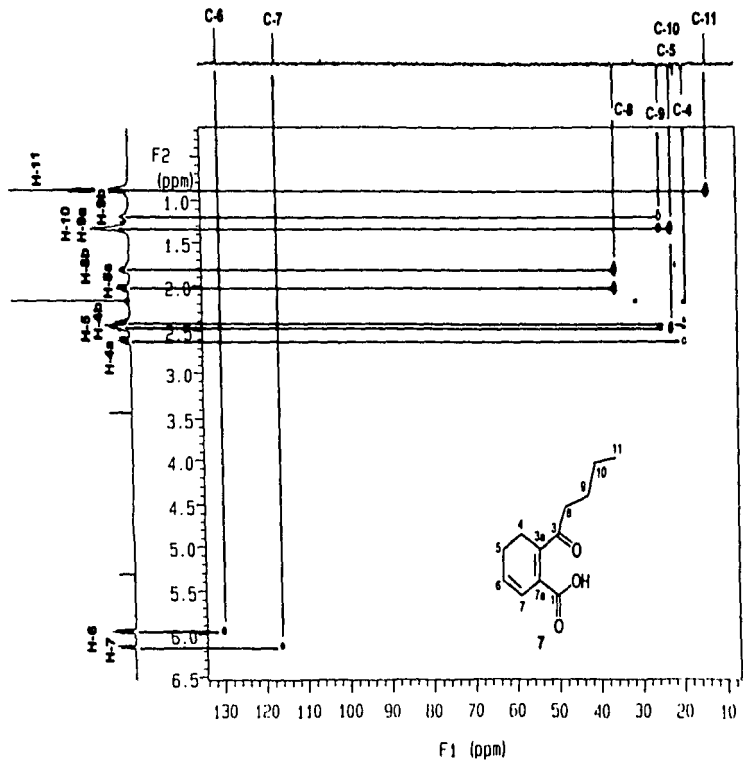
Espectro 16 RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) del producto crudo de la reacción
Mezcla de 4, 5 y 6. PtO_2 10%, EtOH, 28 horas.



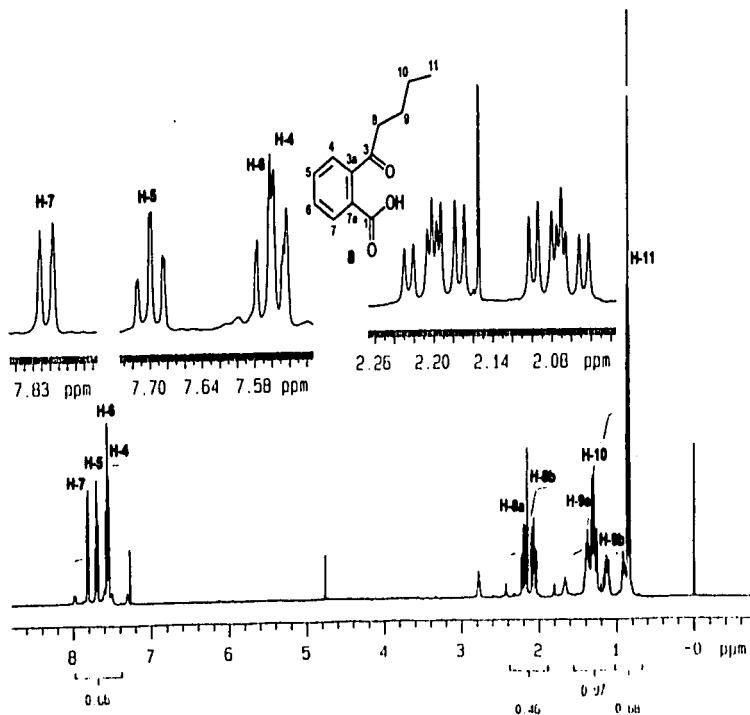
Espectro ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) del Acido derivado del Z-Igustilido
Compuesto 7.



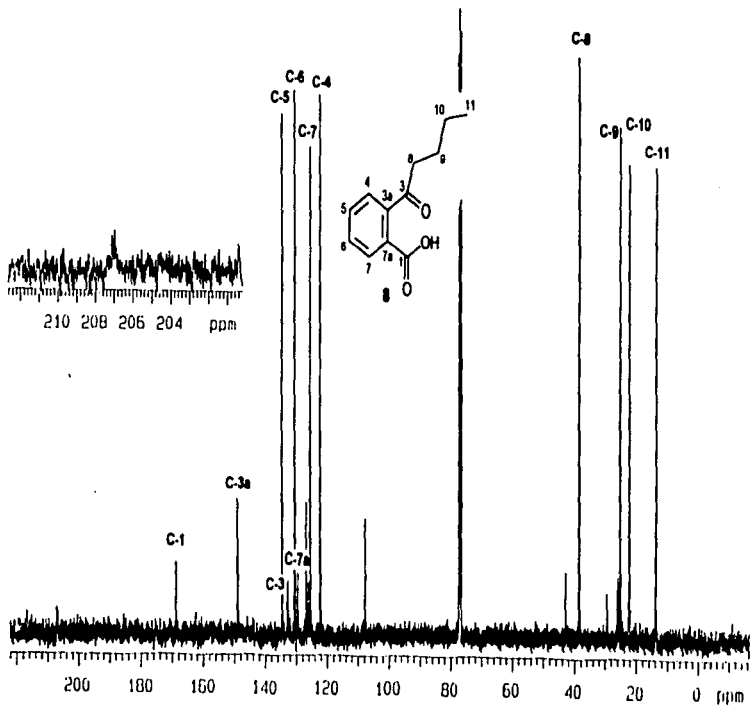
Espectro. 18 RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) del Acido derivado del Z-Igustido
Compuesto 7.



Espectro. 19. Experimento HMQC del Acido 7.

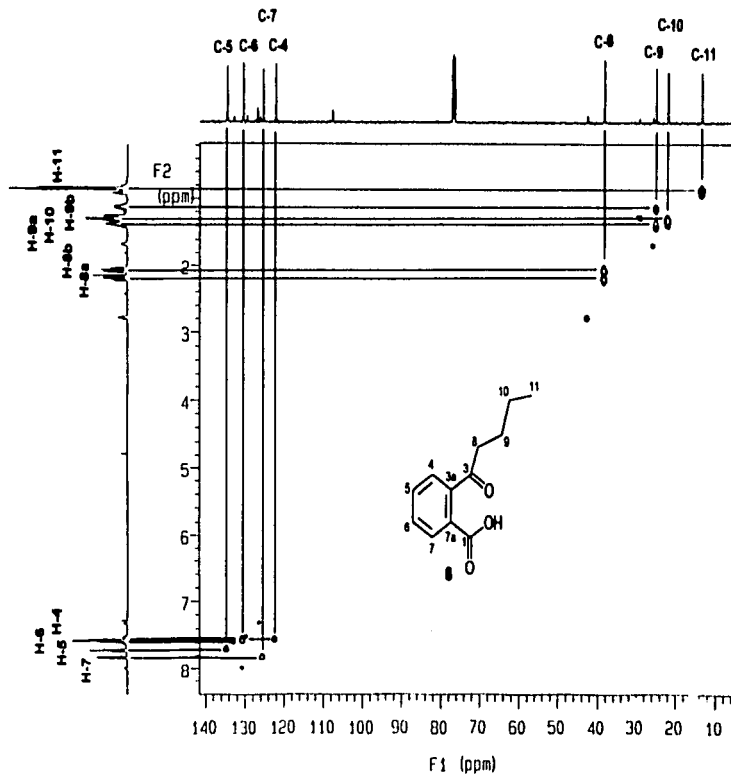


Espectro. 20. RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) del Acido derivado del Butilidénido.
Compuesto 8.

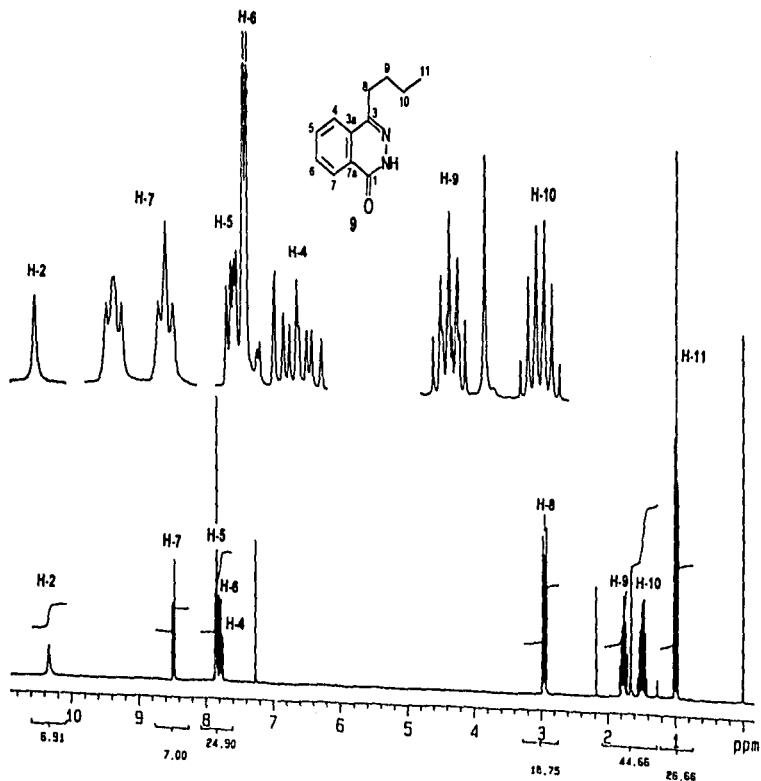


g

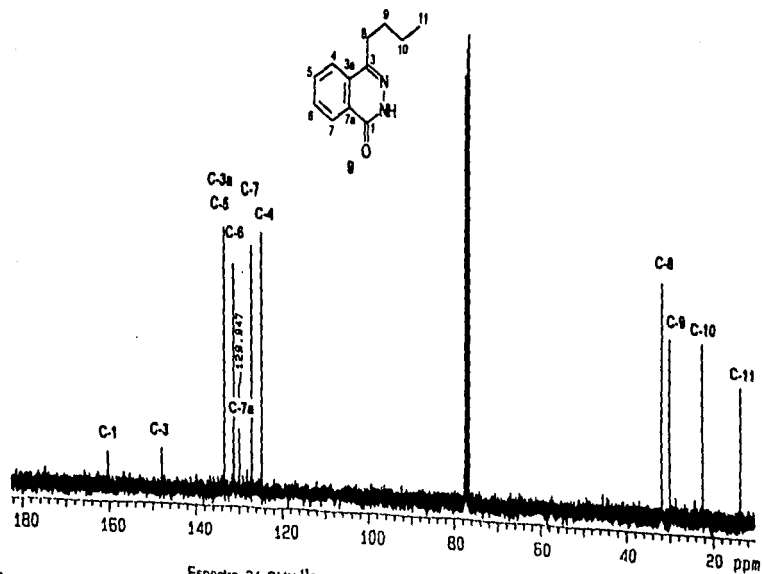
Espectro. 21. RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) del Acido derivado del Butilidantido.
Compuesto 8.



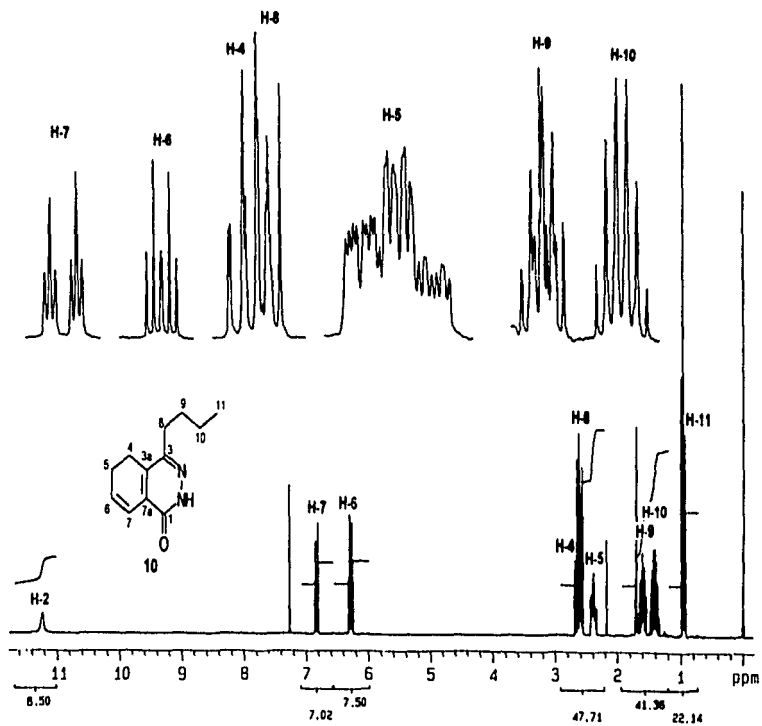
Spectro. 22. Experimento HMQC del Acido 8.



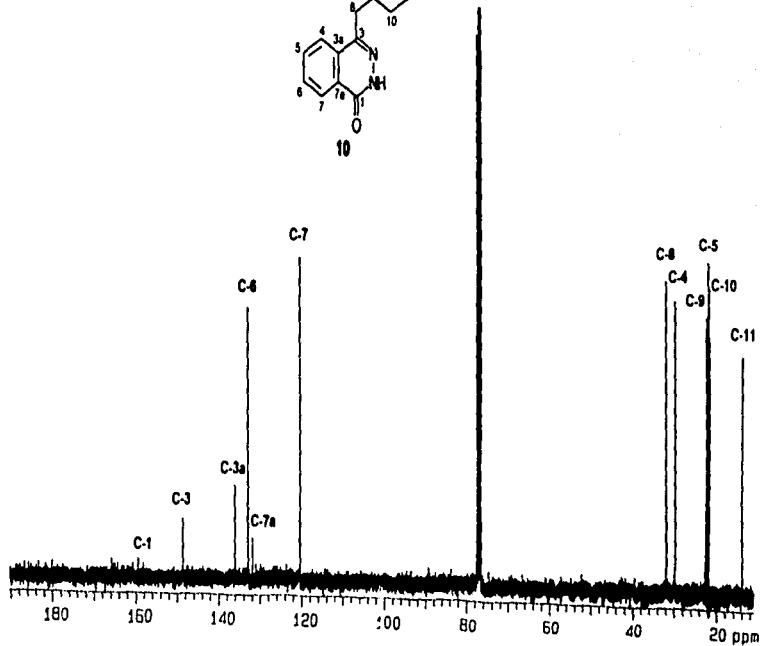
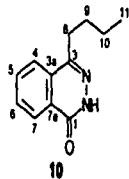
Spectro 23 RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) de la flutazona derivada del Butilidenoálido. Compuesto 9



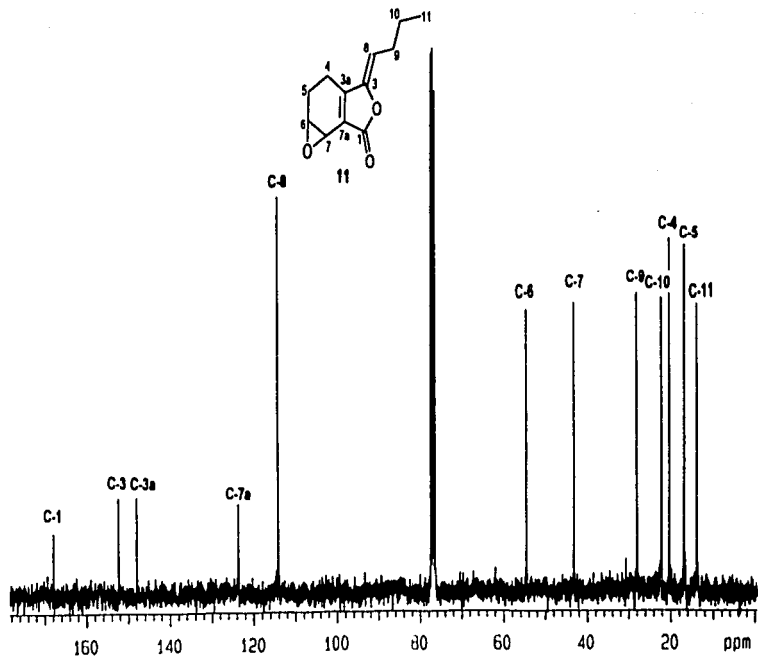
Spectro. 24. RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) de la ftalazona derivada del Butilfenitilido. Compuesto 9.



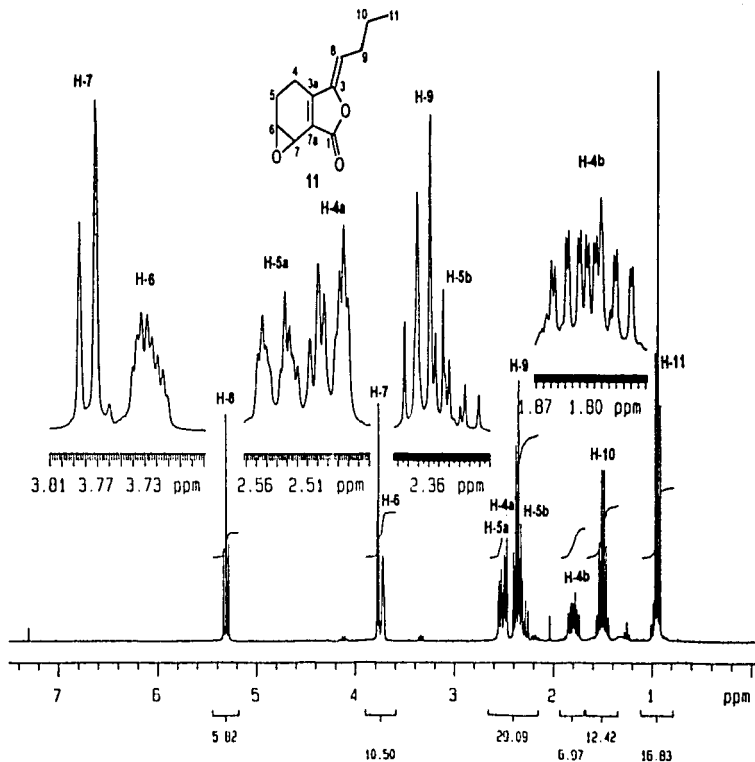
Espectro 25 RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) de la falazona derivada del Z-igustilido
 Compuesto 10.



Espectro 26. RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) de la ftalazona derivada del Z-ligustilido
Compuesto 10.

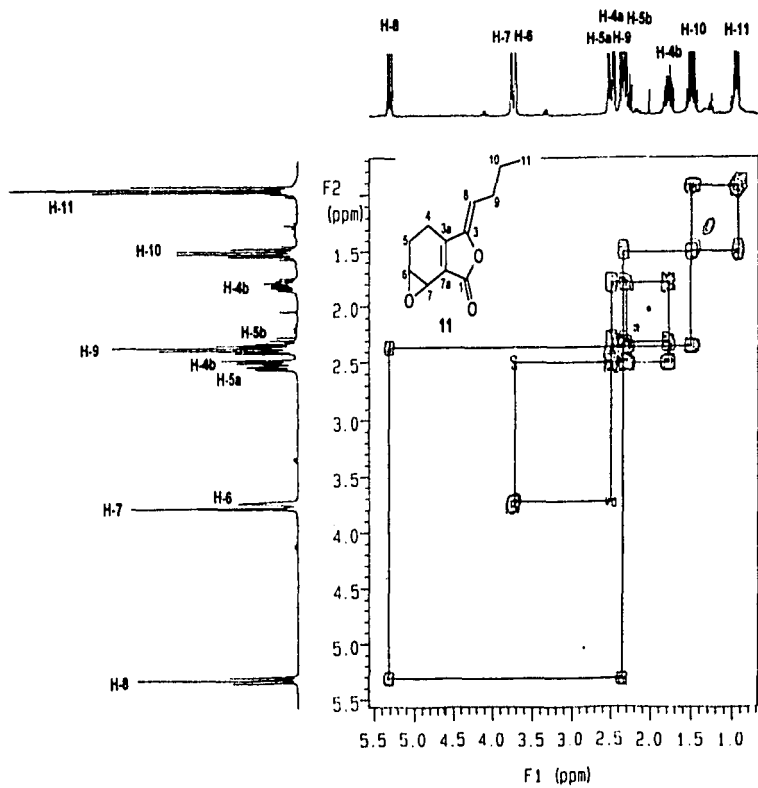


Espectro 28 RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) del 6,7-epoxigustilido 11.

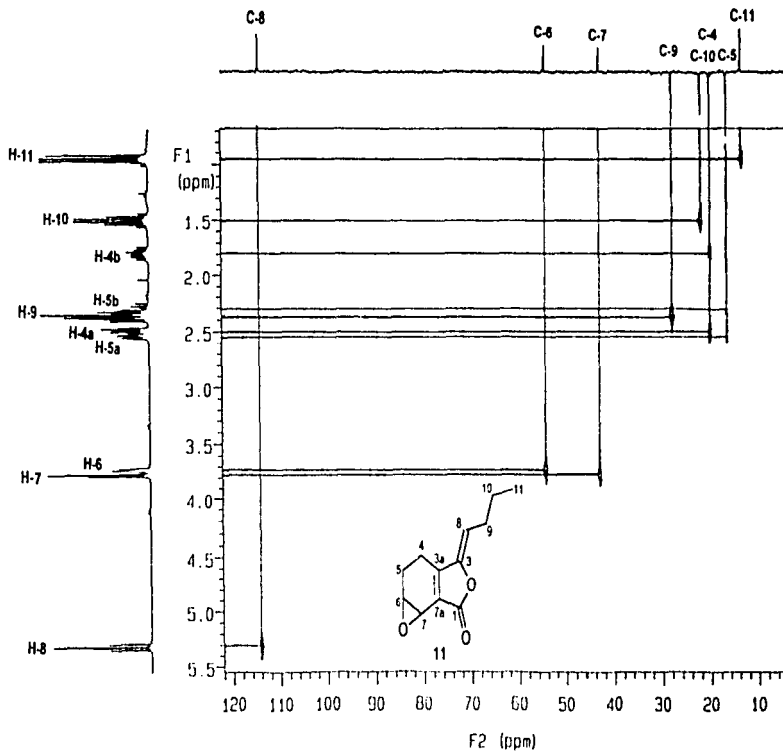


901

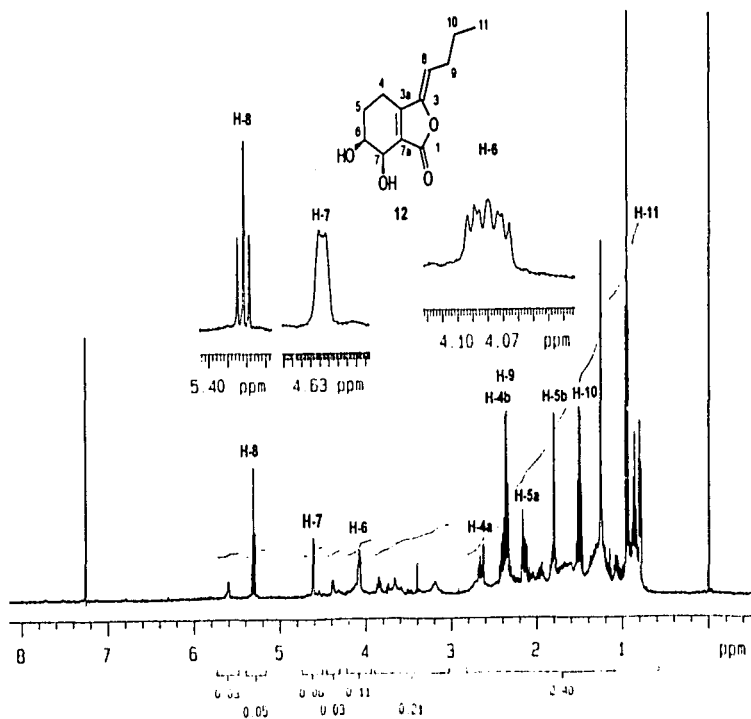
Espectro 27. RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) del 6,7-epoxigustilido 11.



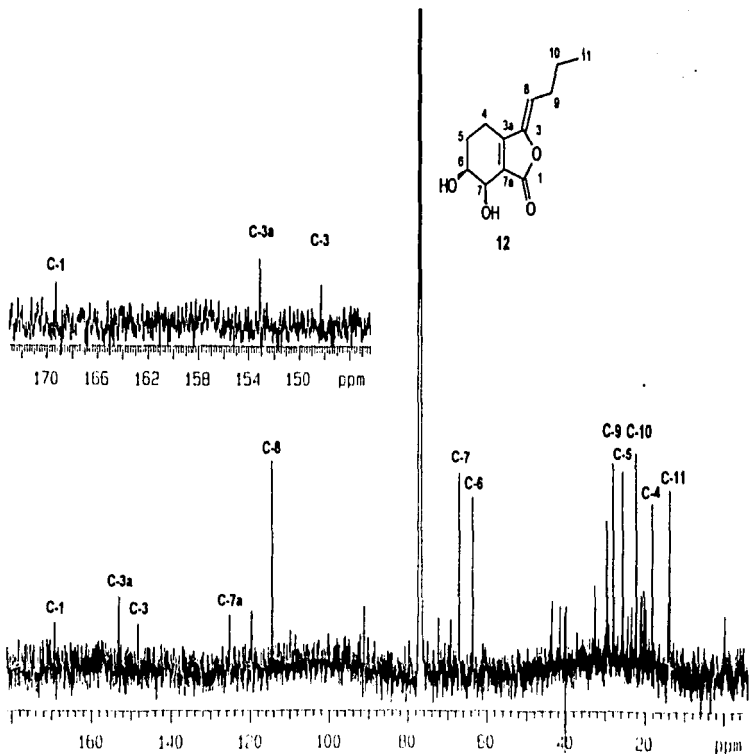
Espectro 29 Experimento COSY del 6,7-epoxystigilido 11.



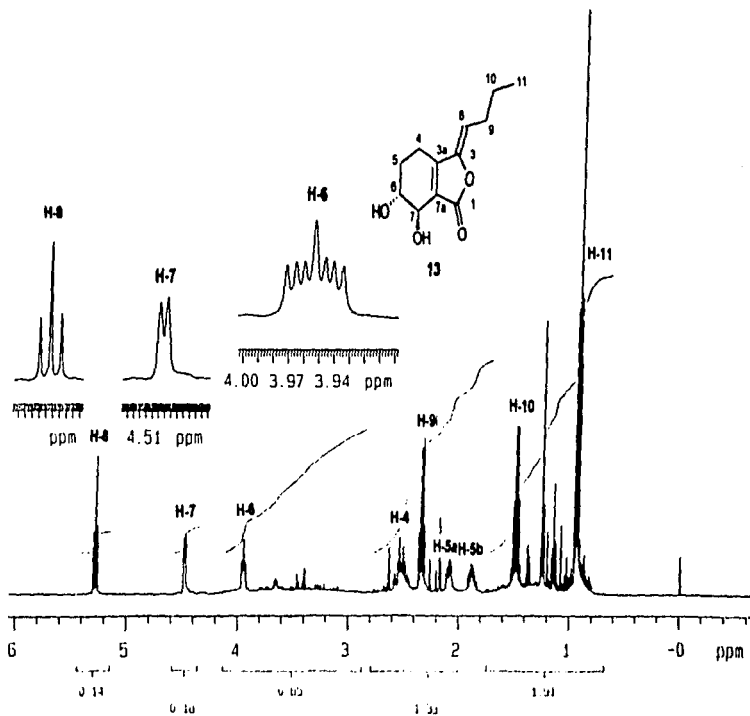
Espectro. 30 Experimento HMOC del 6,7-epoxilgulitido 11.



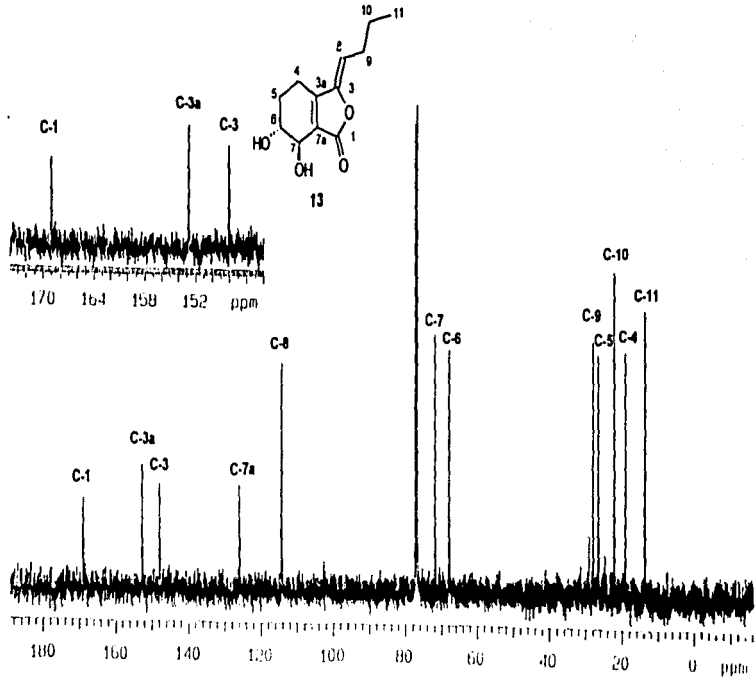
Espectro. 31. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) del Cis-6,7-dihidroguistilido 12



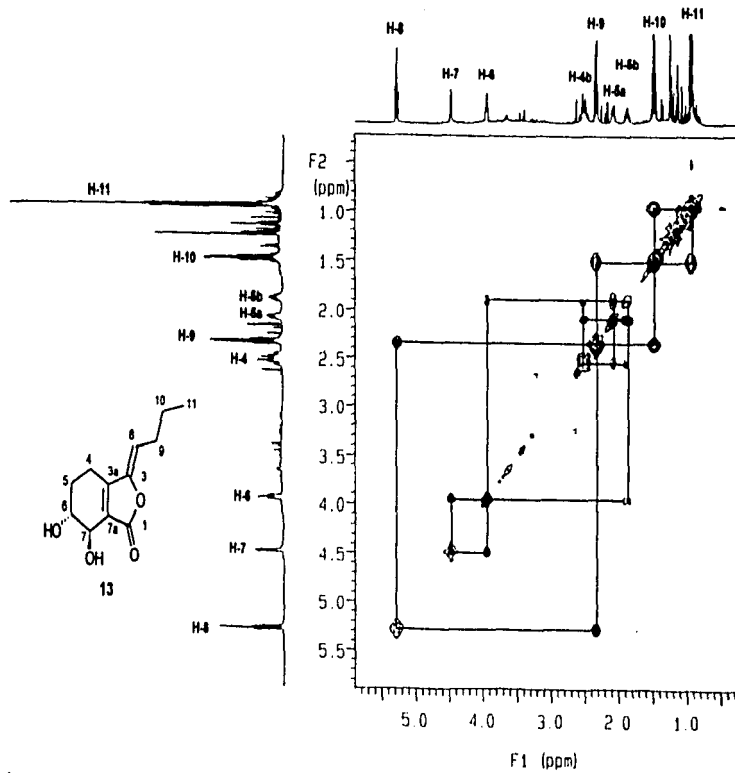
Espectro 32. RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) del Cis-6,7-dihidrogustiido 12

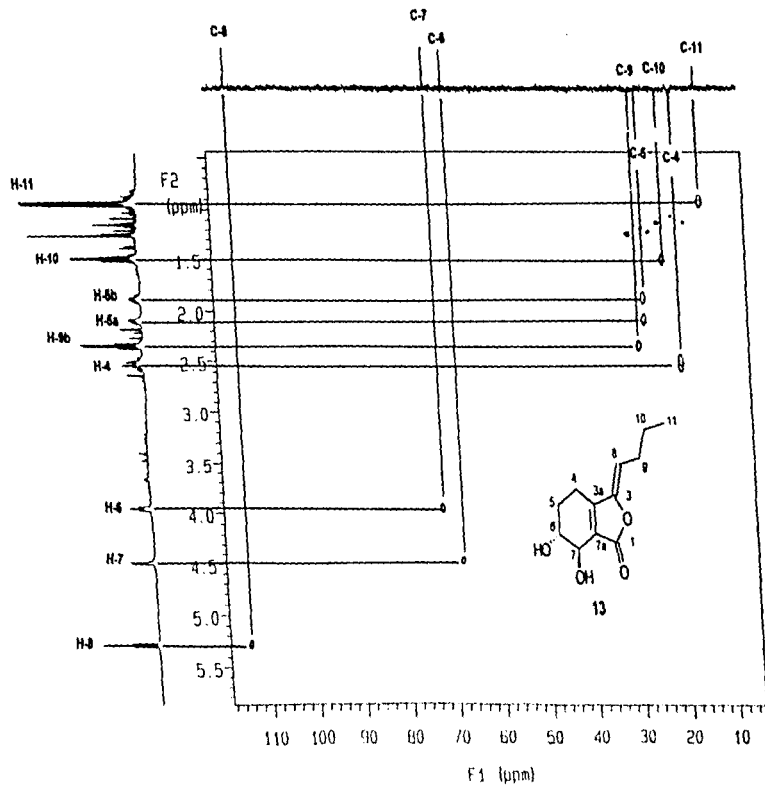


Espectro 33 RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) del *Trans*-6,7-dihidroglustilido **13**



Espectro 34 RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) del *Trans*-6,7-dihydrologustilido 13

Espectro 35 Experimento COSY del *Trans*-6,7-dihidrogestilido **13**



Espectro 36. Experimento HMQC del Trans-6,7-dihidroguistilido 13.

9. BIBLIOGRAFIA

1. Hostettman, K., and Hamburger M.; Bioactivity in Plants: The Link Between Phytochemistry and Medicine. *Phytochemistry*. **1991**, *30*, 3864-3874.
2. Ciamician, G., und Silber, P.; Ueber die hochsiedenden Bestandtheile des Sellerieöls. *Ber. Dtsch. Chem. Ges* **1897**, *30*, 492-501
3. Ciamician, G., und Silber, P.; Ueber die Spaltungsproducte der Sedanonsaure. *Ber. Dtsch. Chem Ges* **1897**, *30*, 501-505
4. Ciamician, G., und Silber, P.; Ueber die Constitution der riechenden Bestandtheile des Sellerieöls. *Ber. Dtsch. Chem. Ges* **1897**, *30*, 1419-1424
5. Ciamician, G., und Silber, P.; Ueber die Sedanonsaure. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1897**, *30*, 1424-1427
6. Ciamician, G., und Silber, P.; Ueber die Sedanolsaure und das Sedanolid. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1897**, *30*, 1427-1433
7. Gijbels, M. J. M., Scheffer, J. J. C., and Svendsen B.; Phtalides in Umbelliferae. *Riv. Ital. E. P. P. O. S* **1979**, *61*, 335-341
8. Mitsuhashi, H., and Nomura, M.; Studies on the Constituents of Umbelliferae Plants. XII. Biogenesis of 3-Butylphthalide. *Chem. Pharm. Bull.* **1966**, *14*, 777-778.
9. Appelt, G. D.; Pharmacological Aspects of Selected Herbs Employed in Hispanic Folk Medicine in the San Luis Valley of Colorado, USA: I. *Ligusticum poteri* (Osha) and *Matricaria chamomilla* (Manzanilla). *J. Ethnopharmacol.* **1985**, *13*, 51-55
10. Bye, R. A.; Medicinal Plants of the Sierra Madre: Comparative Study of Tarahumara and Mexican Market Plants. *Economic Botany*. **1986**, *40*, 103-124.
11. Bye, R. A., and Linares, E.; Ethnobotanical Notes from the Valley of San Luis, Colorado. *J. Ethnobiol.* **1986**, *6*, 289-306
12. Linares, E., and Bye, R. A.; A Study of four Medicinal Plants Complexes of Mexico and Adjacent United States. *J. Ethnopharmacol.* **1987**, *19*, 153-198.
13. Reza-Garduño Treviño, Rosa Guadalupe. Ftálidos de la Familia Umbelliferae. Tesis de Maestría, Universidad Nacional Autónoma de México. **1991**.
14. Hernández, V., Liliana. Aislamiento y Caracterización de los Constituyentes Químicos del Extracto Metanólico de la Raíz de *Ligusticum porteri*. Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México. **1996**.

15. Rios, G., Yolanda. Aproximaciones Sintéticas y Correlaciones Químicas de Cicloaductos Naturales Diméricos del Z-ligustilido. Tesis Doctoral. Universidad Nacional Autónoma de México. 1996.
16. Delgado, G., Reza-Garduño, R. G., Toscano, R. A., Bye, R., and Linares, E.; Secondary Metabolites from the Roots of *Ligusticum porteri* (Umbelliferae): X-Ray Structure of Z-6,6'-7,3'-Diilgustilide. *Heterocycles*, 1988, 27, 1305-1310
17. Delgado, G., Reza-Garduño, R. G., Rios, M. Y., and Del Rio, F. Phthalides and Monoterpenes of the Hexane Extract of the Roots of *Ligusticum porteri*. *Planta Med.* 1992, 58, 570-571.
18. Naves, Y.R.; Etudes sur les matières végétales volatiles XXIV Composition de l'huile essentielle et du résinoïde de livèche (*Levisticum officinale Koch*). *Helv. Chim. Acta.* 1943, 26, 1281-1295
19. Mitsushashi, H., Nagai, U., Muramatsu, T., and Tashiro, H.; Studies on the Constituents of Umbelliferae Plants II. Isolation of the Active Principles of *Ligusticum Root*. *Chem. & Pharm. Bull.* 1960, 8, 243-245.
20. Mitsushashi, H., Nagai, U., and Muramatsu, T., Studies on the Constituents of Umbelliferae Plants. III. Structure of Ligustilide. *Chem. Pharm. Bull.* 1961, 9, 115-119.
21. Mitsushashi, H., and Nagai, U., Studies on the Constituents of Umbelliferae Plants-VII. Structure of Ligustilide. *Tetrahedron.* 1963, 19, 1277-1283
22. Mitsushashi, H., Muramatsu, T., Ukon, N., and Ueno, K.; Studies on the Constituents of Umbelliferae Plants. VIII. Distribution of Alkylphthalides in Umbelliferae. *Plants Chem. Pharm. Bull.* 1963, 11, 1317-1319
23. Mitsushashi, H., and Muramatsu, T.; Studies on the Constituents of Umbelliferae Plants. IX. Structure of Cnidilide and Neocnidilide. *Tetrahedron.* 1964, 20, 1971-1982.
24. Bohmann, H., Stahl, E., and Mitsushashi, H.; Studies of the Constituents of Umbelliferae Plants. XIII. Chromatographic Studies on the Constituents of *Cnidium officinale* (Makino). *Chem. Pharm. Bull.* 1967, 15, 1606-1608
25. Tatsuo, K. and Koiso, R.; *Angelica acutiloba* Kitagawa. En: Atlas of Medicinal Plants. Takeda Chemical Industries, Ltd., 1971, Osaka, Japón.

26. Wun, Ko., Sing, L., Ching, Yeh., and Yao, W. Alkylphthalides isolated from *Ligusticum wallichii* Franch and their in vitro inhibitory effect on rat uterine contraction induced by prostaglandin $F_{2\alpha}$. *T'ai-wan Y Hsueh Hui Tsa Chih.* **1977**, *76*, 669-677. **Chem. Abstr.** **88:130721p.**
27. Fehr, D.: Study on aroma of the substances of celer (*Apium graveolens L.*) *Pharmazie* **1979**, *34*, 658-662 **Chem. Abstr.** **92:213657f.**
28. Ko, W.: A newly isolated antispasmodic-butylidenephthalide *Jpn. J. Pharmacol.* **1980**, *30*, 85-91. **Chem. Abstr.** **92:208863r.**
29. Fehr, D.: Essential oil of *Levisticum officinale* L. Studies on essential oil from fruit, leaves, stems and roots. *Planta Medica.* **1980**, *34-40.* **Chem. Abstr.** **94:127131q.**
30. Lu, R., He, L., Fang, H. and Zhang, X. Thin layer chromatography and densitometry of ligustilide in Umbelliferae plants *Yao Hsueh Hsue Pao* **1980**, *6*, 371-374 **Chem. Abstr.** **94:71576u.**
31. Gijbels, M. J. M., Scheffer, J. J. C., and Svendsen A. B.: Analysis of Phthalides from Umbelliferae by Combined Liquid-Solid and Gas-Liquid Chromatography *Chromatographia.* **1981**, *14*, 452-454.
32. Gijbels, M. J. M., Scheffer, J. J. C., and Svendsen A. B. Phthalides in the Essential Oil from Roots of *Levisticum officinale* *Planta Med* **1982**, *44*, 207-211.
33. Banerjee, S. K., Gupta, B. D., Sheldrick, W. S., and Hofle, G.; Angeolide, a Novel Lactone from *Angelica glauca*. *Liebigs Ann. Chem.* **1982**, 699-707.
34. Kaouadji M., Puech-Baronnat, M. and Mariotte, A.-M.; (Z)-Ligustilidol, Nouveau Phthalide Hydroxyle Isolé de *Ligusticum wallichii* Franch *Tetrahedron Lett.* **1983**, *24*, 4675-4676.
35. Pushan, W., Xuanliang, G., Yixiong, W., Fukuyama, Y., Miura, Y., and Sugawara, M.; Phthalides from the Rhizome of *Ligusticum wallichii*. *Phytochemistry.* **1984**, *23*, 2033-2038.
36. Kaouadji, M., Mariotte, A., and Reutenauer, H.; Phthalide Derivatives from *Meum athamanticum* Jacq. *Z. Naturforsch.* **1984**, *39C*, 872-876
37. Cichy, M., Wray, V., and Hofle, G.; Neue Inhaltsstoffe von *Levisticum officinale* Koch. (Liebstöckel). *Liebigs Ann. Chem.* **1984**, 397-400.

38. Gijbels, M. J. M., Fischer, F. C., Scheffer, J. J. C., and Svendsen A. B.: Phthalides in Roots of *Apium graveolens*, *A. graveolens* var. *rapaceum*, *Bifora testiculata* and *Petroselinum cnspum* var. *tuberosum* *Fitoterapia* **1985**, *56*, 17-23.
39. Fischer, F. C., and Gijbels, M. J. M. *cis*- and *trans*-Neocnidilide. ¹H- and ¹³C-NMR Data of Some Phthalides *Planta Med* **1987**, *49*, 77-80
40. Tsuchida, T., Kobayashi, M., Kaneko, K., and Mitsuhashi, H. Studies on the Constituents of Umbelliferae Plants XVI Isolation and Structures of Three New Ligustilide Derivatives from *Angelica acutiloba* *Chem Pharm Bull* **1987**, *35*, 4460-4464
41. Kobayashi, M., and Mitsuhashi, H. Studies on the Constituents of Umbelliferae Plants XVII Structures of Three New Ligustilide Derivatives from *Ligusticum wallichii* *Chem Pharm Bull* **1987**, *35*, 4789-4792
42. MacLeod, G., and Ames, J. M. Volatile Components of Celery and Celeriac *Phytochemistry* **1989**, *28*, 1817-1824
43. Ozaki, Y., Sekita, S., and Harada, M.: Centrally Acting Muscle Relaxant Effect of Phthalides (ligustilide, cnidilide and senkyunolide) Obtained from *Cnidium officinale* *Makino Yakugaku Zasshi* **1989**, *109*, 402-405 *Chem. Abstr.* **111:90319y**
44. Kim, S., and Chi, J. Studies on Essentials Oils of Plants of *Angelica* Species in Korea (II) Essential Oils of the Root of *Angelica tenuissima* *Saengyak Hakhoechi* **1989**, *20*, 13-20. *Chem. Abstr.* **111:140298p**
45. Noro, Y., Hisata, Y., Okuda, K., Kawamura, T., Ishikura, Y., Sakai, E., and Tanaka, T.: *Shoyakugaku Zasshi* **1989**, *43*, 83-85 *Chem. Abstr.* **111:120700**
46. Segebrecht, S., and Schilder, H., Ligustilide Guiding Component for Preparations of *Levisticum* roots *Planta Med* **1989**, *55*, 572-573
47. Kimura, M., Harada, M., Sekida, S., and Yuda, M., Pharmaceuticals Containing Butylidenphthalide, Senkyunolide, or Ligustilide for Treatment of Arteriosclerosis *Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 01,207,233* [89,207,233]. *Chem. Abstr.* **111:239574n.**
48. Kobayashi, M., Kaneko, H., Tsuchida, T., and Mihashi, H., Isolation of Ligustilide Compounds as Central Nervous System Tranquilizers. *Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 01,254,671* [89,254,671]. *Chem. Abstr.* **112:223247t.**

49. Hon, M., Lee, M., Tai, C., Chui, K., and Wong, H.; A Ligustilide dimer from *Angelica sinensis*. *Phytochemistry*. **1990**, *29*, 1189-1191
50. Takano, K., Yasuda, Y., Takahashi, N., Hamano, T.; Soke, T. and Akiyama, K.; Analysis of Essential Oils in Various Species of *Angelica* Root by Capillary Gas Chromatography. *Kenkyu Nenpo - Tokyo - tontsu Eisen Kenkyusho* **1990**, *41*, 62-
51. Shimizu, M., Matsuzawa, T., Suzuki, S., Yoshizaki, M., and Morita, N.; Evaluation of *Angelica Radix* (Touki) by the Inhibitory Effect on Platelet Aggregation. *Chem. Pharm. Bull* **1991**, *38*, 2046-2048
52. Namba, T., Sekiya, K., Kadota, S., Hattori, M. and Koizumi, T.; Studies on the Baths with Crude Drug the Effects of *Senkyu* Extracts as Skin Penetration Enhancer. *Yakugaku Zasshi* **1992**, *112*, 638-644 **Chem. Abstr.** **118:87496t**
53. Kanamori, H., and Sakamoto, Y.; Evaluation of *Angelicae Radix* And Purification Method and Stability of ligustilide. *Hiroshima-ken Eisen Kenkyu Hokoku*. **1992**, *39*, 23-26 **Chem. Abstr.** **119:34294q**
54. Kikuchi, H., Lay, T., and Tanabe, M. High-performance liquid chromatographic separation and quantitative determination of ligustilide in the *Angelica* plant using fluorimetric detection. *Acta Chromatogr.* **1992**, *1*, 23-33
55. Shin, S., and Park, B.; The Production of Essential Oils by Tissue Culture of *Cnidium officinale*. *Yakhak Hoechi*. **1994**, *38*, 179-183. **Chem. Abstr.** **122:235312e**.
56. Mo, Ch., and Shei, S.; A Comparative study on Processed *Ligusticum Rhizoma*. *Chin. Pharm. J. (Taipei)*. **1994**, *46*, 155-164 **Chem. Abstr.** **121:286699y**
57. Beck, J. J., and Stermitz, F. R.; 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.* **1996**, *58*, 1047-1055.
58. Li, S., Wang, Z., Fang, X., and Li, Y.; Synthesis of (Z)-Ligustilide. *Synth. Commun.* **1993**, *23*, 2909-2913.
59. 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**.
60. Höfle, G.; Comunicación personal.

61. Li, S., Wang, Z., Fang, X., Yang, Y., and Li, Y.; Total Synthesis of 6,7-dihydroligustigustilide. *Synth. Commun.* **1993**, *23*, 2051-2054.
62. Bjeldanes, L., and Kim, I., Phthalide Components of Celery Essential Oil. *J. Org. Chem.* **1977**, *42*, 2333-2335
63. Barton, D H R. and De Vries, J.; X The Constitution of Sedanolide. *J. Chem. Soc.* **1963**, *19*, 1916-1919.
64. Kobayashi, M., Fujita, M., and Mitsunashi, H.; Studies on the Constituents of Umbelliferae Plants. XV. Constituents of *Cnidium officinale*: Occurrence of Pregnenolone, Conifenylferulate and Hydroxyphthalides. *Chem. Pharm. Bull.* **1987**, *35*, 1427-1433.
65. Naito, T., Katsuhara, T., Niitsu, K., Ikeya, Y., Okada, M., and Mitsunashi, H.; Two Phthalides from *Ligusticum chuangxiong*. *Phytochemistry*. **1992**, *31*, 639-642.
66. Kaouadji, M., De Pachtere, F., Pouget, C., Chulia, A. J., and Lavaitte, S.; Three Additional Derivatives, An Epoximonomer and Two Dimers, from *Ligusticum wallichii* Rhizomes. *J. Nat. Prod.* **1986**, *49*, 872-877.
67. Naito, T., Ikeya, Y., Okada, M., Mitsunashi, H., and Maruno, M.; Two Phthalides from *Ligusticum chuangxiong*. *Phytochemistry*. **1996**, *41*, 233-236.
68. Kaouadji, M., and Pouget, C.; Additional Phthalides Derivatives from *Meum athamanticum*. *J. Nat. Prod.* **1986**, *49*, 184-185.
69. McLaughlin, J., Nichols, D., Jacobsen, L., Putnma, J.E., Ferrigni, N.R., and Meyer, B.N. Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. *Planta Medica*. **1982**, *45*, 31-34.
70. Pelletier, S., Chokshi, H., and Desai, H., Separation of Diterpenoid Alkaloid mixtures using Vacuum Liquid Chromatography. *J. Nat. Prod.* **1986**, *49*, 892-900.
71. Coll, J., and Bowden, B.; The Application of Vacuum Liquid Chromatography to the separation of Terpene Mixtures. *J. Nat. Prod.* **1986**, *49*, 934-936.
72. Still, C., Kahn, M., and Mitra, A.; Rapid Chromatographic Technique for Preparative Separations with Moderate Resolution. *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 2923-2925.
73. Yau, E., and Coward, J., Filtering-Column Chromatography, a fast, convenient chromatographic method. *Aldrichimica Acta*. **1988**, *21*, 106-107.