

00573

4  
2ej-

# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



## FTALIDOS DE LA FAMILIA UMBELLIFERAE

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS QUIMICAS  
(QUIMICA ORGANICA)

P R E S E N T A

Q.F.B. ROSA GPE. REZA GARDUÑO TREVIÑO



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## Contenido

	Página
1. Resumen	1
2. Introducción	4
3. Revisión de ftálidos	8
4. Derivatización de ftálidos diméricos. Corrección estructural de un ftálido dimérico de <i>Ligusticum wallichii</i>	20
5. Constituyentes adicionales del extracto hexánico de <i>Ligusticum porteri</i> .	39
6. Ensayos biológicos con <i>Artemia salina</i>	44
7. Conclusiones	47
8. Parte experimental	49
9. Espectros	59
10. Referencias	79

## RESUMEN

Los ftálidos son un grupo relativamente restringido de productos naturales que provienen de ciertos grupos de plantas de la familia *Umbelliferae* entre otras.

En total se han aislado hasta la fecha 45 ftálidos, nueve de los cuales son dímeros. En nuestro laboratorio se aislaron y caracterizaron dos de estos dímeros al estudiar el extracto clorofórmico de *Ligusticum porteri*. El estudio de dichos dímeros y de uno de sus productos de hidrogenación condujeron, respectivamente, a la propuesta de una representación tridimensional más adecuada para dichas estructuras ya que las empleadas anteriormente contenían cierta ambigüedad en cuanto a la orientación *exo* o *endo* de la molécula, y a la corrección estructural de un producto natural descrito por autores franceses.

Al analizar el extracto hexánico de *Ligusticum porteri* se encontraron  $\alpha$ -felandreno,  $\beta$ -felandreno,  $\alpha$ -terpineno, limoneno, p-cimeno y tres ftalidos, el 2-ligustílido, el E-ligustílido y el butilidenftalido.

## Summary

Phthalides are a small group of natural products which are mainly found in a certain group of plants in the Umbelliferae family. To date 45 phthalides have been isolated, including nine which are dimeric.

Two of these dimers, diligustilide (37) and riligustilide (40), were isolated and characterized previously in our laboratory from the chloroformic extract of *Ligusticum porteri*. <sup>1</sup>H NMR and UV spectral analysis of dimers 37 and 40, and the hydrogenation products of 37 allowed the structural reassignment of dihydrodiligustilide (44), previously proposed by French authors. Moreover, we propose a more accurate three-dimensional representation of these molecules, affording clarification of the current ambiguity between the *exo* and the *endo* orientations.

Analysis of the *n*-hexane extract of *Ligusticum porteri* allowed characterization of the following monoterpenes and phthalides:  $\alpha$ -phellandrene,  $\beta$ -phellandrene,  $\alpha$ -terpinene, limonene, *p*-cymene, *E*-ligustilide, *Z*-ligustilide and butylidenephthalide.

## INTRODUCCION

El descubrimiento de nuevas moléculas en la naturaleza continua siendo un campo de investigación fascinante que proporciona conocimientos amplios en diferentes ramas de la ciencia y representa un área clásica de investigación en química orgánica. Las contribuciones en este aspecto y los estudios sobre la función de estos productos en la naturaleza, han permitido esclarecer fenómenos biológicos complejos, como la interacción química entre los seres vivos. Por otro lado, los hallazgos en esta área han incidido de manera notable en la sociedad moderna, ya que ciertos productos farmacéuticos, componentes de insecticidas, compuestos saborizantes, etc. han sido investigados tomando como prototipo a las sustancias naturales puesto que, por lo general, éstas tienen actividades específicas, característica muy apreciada para evitar reacciones o procesos indeseables que dañen al ser humano y/o al medio ambiente que lo rodea.

De esta manera, en la búsqueda de compuestos cada vez más específicos, se ha vigorizado notablemente en las últimas décadas la investigación de las sustancias naturales, en especial las de origen marino, ya que estas presentan gran variedad estructural así como también actividades biológicas especializadas. Es interesante hacer mención que algunos de estos productos ya han sido comercializados.

En nuestro país existe una notable tradición en el uso de la flora endémica para diversos propósitos, y esta tradición explica que desde los inicios de la investigación química en México, se practique el estudio químico de la

vegetación.

El presente estudio recopila la información existente de un tipo de sustancias naturales denominadas ftálicos, circunscribiendo la descripción a su presencia en la familia de plantas *Umbelliferae*, y se analizan los resultados de ciertas transformaciones químicas de algunas sustancias de este tipo aisladas en nuestro laboratorio de la raíz de una planta perteneciente a este grupo, *Ligusticum porteri*.<sup>1</sup>

Este vegetal se localiza en la parte norte de la República Mexicana y en el suroeste de Estados Unidos, y ha sido objeto de estudios etnobotánicos por su importante uso medicinal e intensa comercialización en la región, lo que ha provocado la sobreexplotación de este recurso.<sup>2</sup>

En China, India, México y en el suroeste de Estados Unidos, los usos tradicionales de este vegetal y de ciertas plantas del mismo género incluyen actividad antibacteriana, insecticida, para el tratamiento de dolores asociados al reumatismo, y para padecimientos gastrointestinales. El té de la raíz de *chuchupate*, nombre que le dan los tarahumaras a *Ligusticum porteri*, es efectivo para aliviar dolores de cabeza y fiebres. El polvo de la misma se aplica tópicamente sobre las heridas para prevenir infecciones.<sup>2,3</sup>

Sorprendentemente, algunas investigaciones han demostrado que ciertos animales hacen uso análogo de este vegetal. Un ejemplo de ello son los estudios realizados sobre ciertos osos en Colorado, los cuales indican que estos animales mastican la raíz de *Ligusticum porteri* y la aplican

sobre sus patas y piel empleándola así como agente antiséptico.<sup>4,5</sup>

Por otro lado, a diferencia de otros metabolitos secundarios, los ftálidos han sido poco estudiados, tanto desde el punto de vista químico como farmacológico. Es por esto que el objetivo de éste trabajo es contribuir al conocimiento de la reactividad de tales compuestos.

## REVISION DE FTALIDOS

Se sabe que algunas especies de la familia Umbelliferae contienen ftálidos.<sup>14</sup> Sin embargo, estos metabolitos secundarios se han encontrado también en otras familias de plantas como son la Compositae, Gramineae, Leguminoseae, Oleaceae,<sup>14</sup> y últimamente en la Gentianaceae.<sup>14b</sup>

Algunos ftálidos son las sustancias responsables del sabor y olor característico de ciertas plantas comestibles de esta familia, como el apio, y tales sustancias se utilizan como odorizantes y saborizantes en la industria alimenticia.<sup>6,13</sup>

Las plantas que contienen ftálidos se han usado y aún se siguen utilizando ampliamente en la medicina tradicional en diversos países del mundo, principalmente en México,<sup>2,3</sup> China y Japón.<sup>22,29,32,33</sup>

Los usos populares de estas plantas son, entre otros, los siguientes: para la dispepsia y flatulencia,<sup>6</sup> como emenagogos y carminativos,<sup>9</sup> como sedantes y espasmolíticos,<sup>13</sup> para dolores de cabeza, fiebres y dolores asociados al reumatismo;<sup>2</sup> y para el tratamiento de desórdenes ginecológicos y obstétricos.<sup>33</sup>

En la tabla 1 se describe la información de la distribución de los ftálidos en las plantas de la familia Umbelliferae. Hasta ahora, de las especies que se han estudiado en esta familia sólo veintiuna de ellas contienen ftálidos (tabla 1) y pertenecen a alguno de los siguientes géneros: *Angelica*, *Apium*, *Bifora*, *Cnidium*, *Levisticum*, *Ligusticum*, *Neum* y *Petroselinum*.

ESPECIE	FTALIDOS
1. <i>Angelica acutiloba</i> Kitagawa	1,4; <sup>22</sup> 18,24,31,32,36, 37,41,42 <sup>33</sup>
2. <i>Angelica acutiloba</i> var. <i>sugiyamae</i>	1,3,4 <sup>14</sup>
3. <i>Angelica anomala</i> var. <i>chinensis</i>	1 <sup>14</sup>
4. <i>Angelica anomala</i> Lallement	ninguno <sup>14</sup>
5. <i>Angelica glauca</i> Edgew.	4,5,39 <sup>6</sup>
6. <i>Angelica sinensis</i>	1,4,23; <sup>14</sup> 43 <sup>34</sup>
7. <i>Angelica ternata</i>	4,20,34 <sup>14</sup>
8. <i>Apium graveolens</i>	2,3,6,7,11,14,15,21 <sup>7</sup> 1b; <sup>26</sup> 3,4,7,10,12,13 <sup>13</sup> 1,3,4,5,7,11,12,14 <sup>26</sup>
9. <i>Apium graveolens</i> var. <i>rapaceum</i>	1,1b,3,4,5,7,12,13 <sup>13</sup> 1,1b,3,4,7,11,12,14 <sup>26</sup>
10. <i>Bifora testiculata</i>	4,7,12 <sup>13</sup>
11. <i>Cnidium officinale</i> Makino	3,10; <sup>B</sup> 4; <sup>14</sup> 16; <sup>23</sup> 19; <sup>24</sup>
<i>Ligusticum officinale</i> Kitagawa	17,18,24,26,30,31,32, 33; <sup>23,24</sup> 10,12 <sup>27</sup>
12. <i>Conioselinum Kamschaticum</i>	1,4 <sup>14</sup>
13. <i>Levisticum officinale</i> Koch	4,38,39; <sup>10</sup> 4,5,7,22 <sup>16</sup>
14. <i>Ligusticum acutiloba</i> var. <i>sugiyamae</i>	1,4 <sup>14</sup>
15. <i>Ligusticum acutilobum</i> Sieb. et Zucc.	1,4 <sup>29</sup>
16. <i>Ligusticum nodiflorum</i> Vill.	1,4,5 <sup>D</sup>
<i>Trochiscanthes nodiflora</i> Koch	
17. <i>Ligusticum porteri</i>	4,37,40 <sup>11</sup>
18. <i>Ligusticum sinense</i>	4,10 <sup>14</sup>

Tabla 1

19. <i>Ligusticum wallichii</i>	4; <sup>14</sup> 25, 40, 44; <sup>18</sup> 32; <sup>20</sup> 37; <sup>21</sup> 27, 35; <sup>25</sup> 16, 31, 32 45 <sup>31</sup>
20. <i>Meum athamanticum</i>	4; <sup>14</sup> 7, 32, 37; <sup>17</sup> 16, 17, 18, 19, 24, 31, 32 <sup>19</sup>
21. <i>Petroselinum crispum</i> var. <i>tuberosum</i>	4, 7 <sup>13</sup>

Tabla 1 (continuación)

Es importante hacer notar que en todas estas especies se estudió el contenido de ftálidos en la parte subterránea de la planta, y en la mayoría de las ocasiones se estudiaron los extractos poco polares o hexánicos, pues se ha demostrado que en este tipo de vegetales, los disolventes no polares son capaces de extraer los principios activos mas efectivamente que los disolventes polares.<sup>29</sup>

A la fecha se han encontrado 46 ftálidos dentro de la familia de las Umbelíferas de los cuales nueve son dímeros. En el esquema 1 se muestran las estructuras de todos los ftálidos aislados hasta la fecha, y en la tabla 2 se indican los nombres de cada uno y su peso molecular.

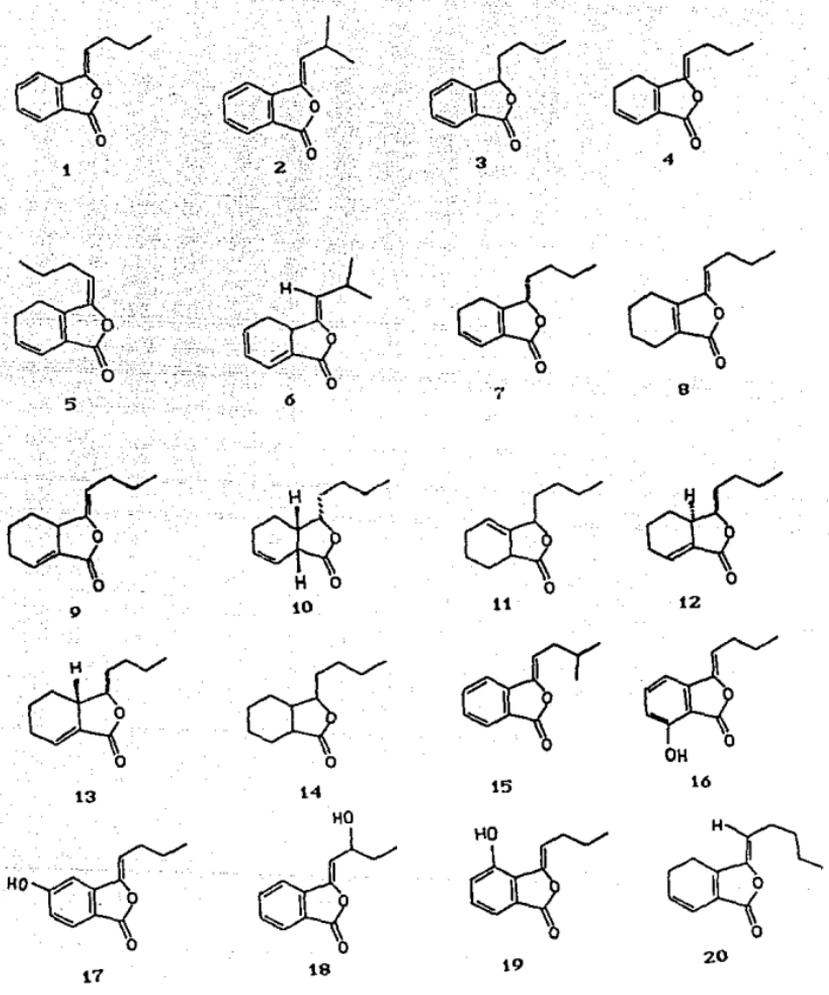
Antes se creía que los ftálidos aislados de umbelíferas no contenían substituyentes en el anillo A;<sup>14</sup> sin embargo, estudios posteriores han demostrado lo contrario, ya que se han encontrado varios ftálidos los cuales tienen epóxidos,<sup>18</sup> hidroxilos<sup>19, 23, 24, 31, 33</sup> u otros substituyentes en

dicho anillo.<sup>25</sup>

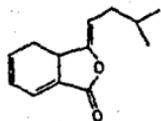
El ftálico aislado más frecuentemente de las plantas que contienen este tipo de sustancias es el Z-ligustílico (4).<sup>6-34</sup>

Debido a la abundancia del Z-ligustílico (4) en esta familia, éste se ha propuesto como precursor biogénico de otros ftálicos.<sup>17,18</sup> A su vez, se supone que la biogénesis de este tipo de metabolitos se lleva a cabo a través de la unión cabeza-cola de unidades de acetato.<sup>28,30</sup>

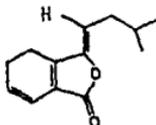
Como puede apreciarse en el esquema 1, hay algunos ftálicos con estructuras bastante similares, por lo que resulta difícil su purificación e identificación, y se han realizado estudios tendientes a optimizar su separación.<sup>15</sup> En cuanto a su identificación, existe una recopilación de los datos espectroscópicos (RMN<sup>1</sup>H y RMN <sup>13</sup>C) de algunos ftálicos,<sup>12</sup> sin embargo, tal revisión sólo incluye diez ftálicos del total aislados hasta la fecha.



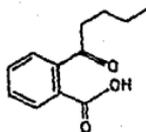
Esquema 1



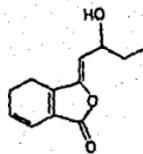
21



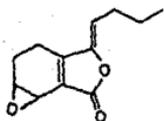
22



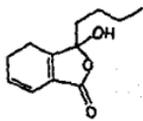
23



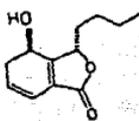
24



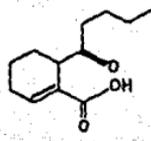
25



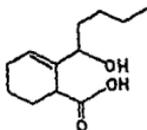
26



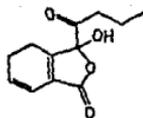
27



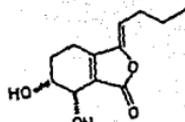
28



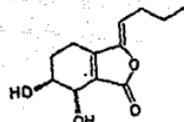
29



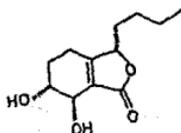
30



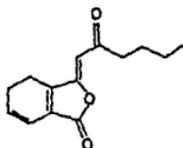
31



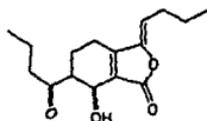
32



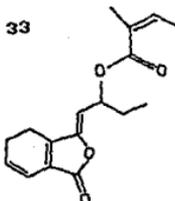
33



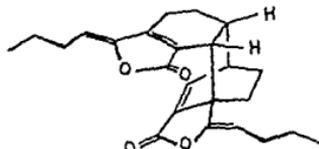
34



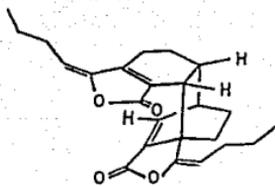
35



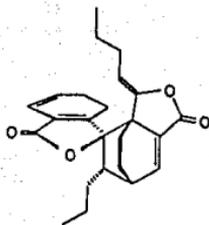
36



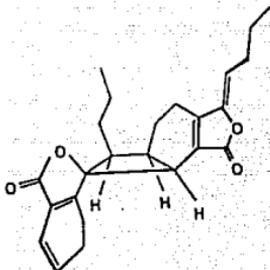
37



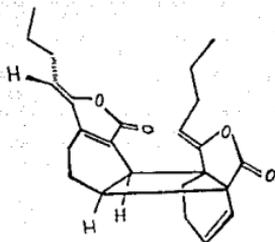
38



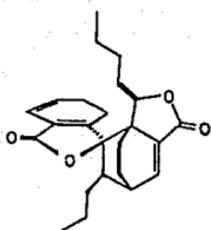
39



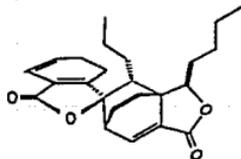
40



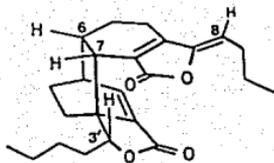
41



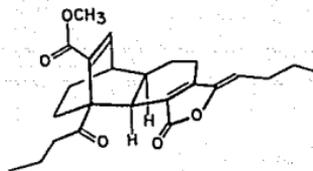
42



43



14



45

Tabla 2

No.	Nombre(s)	Fórmula	P.M.
1.	3-butilidenftálico (E y Z)	C <sub>12</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	188
2.	3-isobutilidenftálico	C <sub>12</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	188
3.	3-butilftálico	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>	190
4.	Z-ligustílico	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>	190
5.	E-ligustílico	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>	190
6.	3-isobutiliden-3a,4- -dihidroftálico	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>	190
7.	Sedanenólido	C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>	192
8.	Anhídrido sedanónico	C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>	192
9.	Anhídrido sedanónico	C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>	192
10.	Cnidilido	C <sub>12</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub>	194
11.	Sedanólido	C <sub>12</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub>	194
12.	Neocnidilido	C <sub>12</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub>	194
13.	cis-neocnidilido	C <sub>12</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub>	194
14.	3-butylhexahidroftálico	C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>	196
15.	3-isovalidenftálico	C <sub>13</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>	202
16.	7-hidroxi-3-butylidenftálico	C <sub>12</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub>	204
17.	5-hidroxi-3-butylidenftálico	C <sub>12</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub>	204
18.	9-hidroxi-3-butylidenftálico	C <sub>12</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub>	204
	Senkyunolide E		
19.	4-hidroxi-3-butylidenftálico	C <sub>12</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub>	204
20.	Ternino	C <sub>13</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>	204

Tabla 2 (Continuación)

21.	3-isovaliden-3a,4- -dihidroftálico	C <sub>13</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>	204
22.	Valideno-4,5-dihidroftálico	C <sub>13</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>	204
23.	Acido ligusticum	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> O <sub>3</sub>	206
24.	9-hidroxiligustilido Senkyunólido F	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> O <sub>3</sub>	206
25.	Z-6,7-epoxiligustilido	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> O <sub>3</sub>	206
26.	Senkyunólido G	C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> O <sub>3</sub>	208
27.	Senkyunólido K	C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> O <sub>3</sub>	208
28.	Acido sedanónico	C <sub>12</sub> H <sub>18</sub> O <sub>3</sub>	210
29.	Acido sedanólico	C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> O <sub>3</sub>	212
30.	Senkyunólido D	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> O <sub>4</sub>	222
31.	cis-6,7-dihidroxiligustilido	C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> O <sub>4</sub>	224
32.	trans-6,7- -dihidroxiligustilido	C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> O <sub>4</sub>	224
33.	Senkyunólido J	C <sub>12</sub> H <sub>18</sub> O <sub>4</sub>	226
34.	Ternitino	C <sub>14</sub> H <sub>16</sub> O <sub>3</sub>	232
35.	Senkyunólido M	C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub>	278
36.	Angeloylsenkyunólido F	C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> O <sub>4</sub>	288
37.	Levistólido A Diligustflido	C <sub>24</sub> H <sub>28</sub> O <sub>4</sub>	380
38.	Levistólido B	C <sub>24</sub> H <sub>28</sub> O <sub>4</sub>	380
39.	Angeólido	C <sub>24</sub> H <sub>28</sub> O <sub>4</sub>	380
40.	Riligustflido	C <sub>24</sub> H <sub>28</sub> O <sub>4</sub>	380

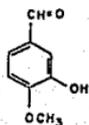
Tabla 2 (Continuación)

41. Tokinólido A	$C_{24}H_{28}O_4$	380
42. Tokinólido B	$C_{24}H_{28}O_4$	380
43. E-232	$C_{24}H_{28}O_4$	380
44. Dihidrodiligustflido	$C_{24}H_{30}O_4$	382
45. Wallichflido	$C_{25}H_{32}O_5$	412

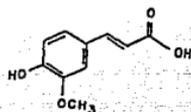
DERIVATIZACION DE FTALIDOS DIMERICOS.

CORRECCION ESTRUCTURAL DE UN FTALIDO DIMERICO DE  
*LIGUSTICUM WALLICHII*.

El análisis químico de las raíces de *Ligusticum porteri*, realizado recientemente en nuestro laboratorio,<sup>1</sup> permitió el aislamiento y determinación estructural de Z-ligustilido (4), riligustilido (40), Z-6.6',7.3a'-diligustilido (37), isovainillina (46) y ácido 4-hidroxi-3-metoxicinámico (47).<sup>5</sup>



46



47

El riligustilido (40) y el diligustilido (37) son ftálicos diméricos del Z-ligustilido (4), y una característica excepcional de ellos es que se encuentran en la naturaleza como mezclas racémicas.<sup>35</sup> El riligustilido (40) puede considerarse como el producto de la cicloadición  $[\pi 2_s + \pi 2_s]$ <sup>36</sup> del doble enlace C<sub>3</sub>,C<sub>8</sub> del Z-ligustilido con el doble enlace 6',7' del mismo monómero, como se muestra en la figura 1.

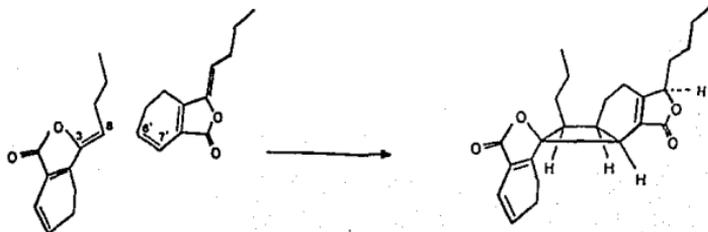


Figura 1

Por otro lado, el diligustilido (37) deriva de la cicloadición [ $\pi 4s + \pi 2s$ ] <sup>37</sup> de 2-ligustilido, donde el dieno lo integran los carbonos C3a, C7a, C7 y C6 del monómero, y el dienófilo, la olefina de los carbonos C6, C7. El estado de transición de la cicloadición que genera 37 se muestra en la figura 2.

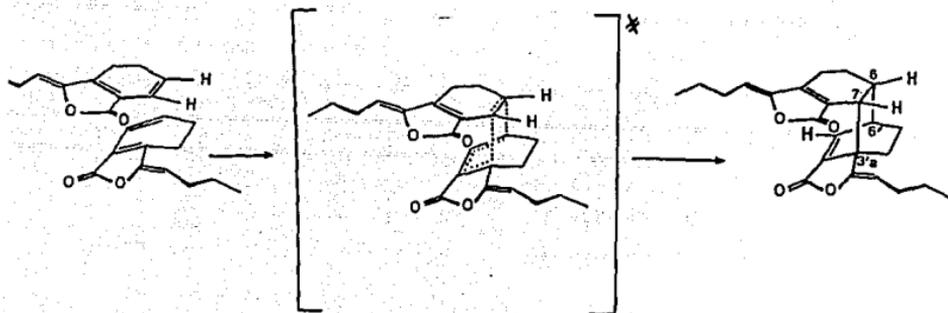


Figura 2

La peri-, regio- y estereo- selectividad en la formación de los aductos y la relativa estabilidad del monómero frente a diversas condiciones de reacción dan evidencia de la autenticidad de estas sustancias como productos naturales.

Son relativamente pocos los ftálicos diméricos que se han caracterizado, y todos ellos se han aislado de plantas de la familia *Umbelliferae*. Asimismo, su baja proporción con respecto a otros metabolitos secundarios presentes en las mismas fuentes naturales, ha impedido la realización de estudios de la reactividad química de tales sustancias.

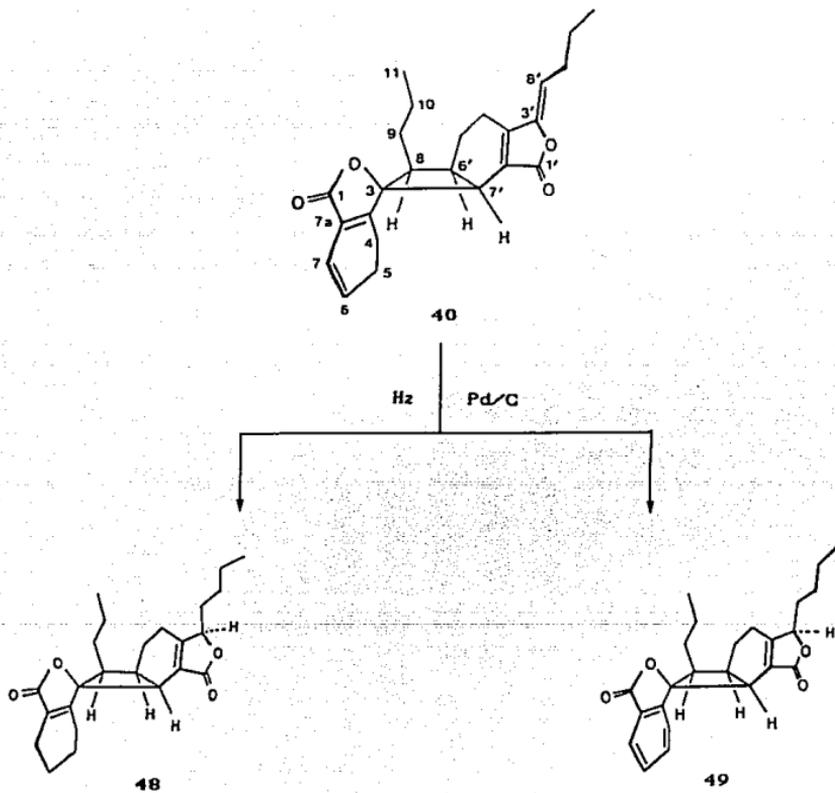
Dado el alto índice de insaturación de estas moléculas ( $\Omega=10$ ), se llevó a cabo la reducción en condiciones catalíticas de los ftálicos diméricos 40 y 37, con el objeto de evaluar detalladamente el comportamiento químico de las sustancias.

#### REDUCCION CATALITICA DE RILIGUSTILIDO (40)

La hidrogenación de una solución de 40 en acetato de etilo en 10% Pd-C durante 24 horas generó una mezcla de productos, que fueron caracterizados como 48 y 49, como se indica en el esquema 2. El compuesto 48 es el producto mayoritario, y corresponde al tetrahidroderivado del riligustilido (40), en el cual, como es de esperarse, se saturan los dobles enlaces C6, C7 y C3', C8' de 40, los cuales no están conjugados con los carbonilos, y por lo tanto son más susceptibles a la reducción catalítica debido a que poseen mayor densidad electrónica.<sup>37</sup>

La saturación del doble enlace C3', C8' del riligustilido (40) genera un centro quiral en C3'. La configuración de tal carbono se establece al analizar el estado de transición de la hidrogenación, el cual se muestra en la figura 3. Es evidente que la cara *si* de C3' (del enantiómero indicado) se encuentra en la parte convexa de la molécula, por lo que el hidrógeno se adiciona por esa dirección, generando el centro con quiralidad R. La

transformación de 40 a 48 es una reacción estereoselectiva, en particular es una reacción diastereocara diferenciadora.<sup>38</sup>



Esquema 2

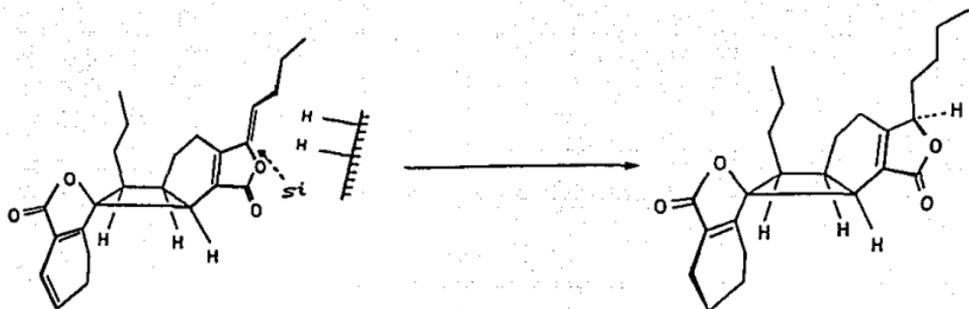
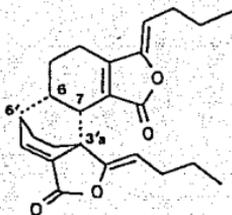


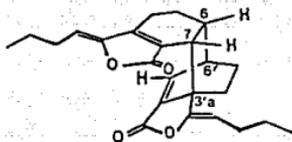
Figura 3

El producto minoritario de la reacción es el dihidro-dehidro-derivado (49), en el cual se satura el doble enlace C3', C8' del riligustílido (40) con un curso estereoquímico análogo a la transformación recién descrita, y se deshidrogenan los carbonos C4 y C5, generándose el sistema bencenoide. La competencia entre la reacción de reducción (para generar 48) y la aromatización (para formar 49) es una reacción ampliamente documentada,<sup>39</sup>obteniéndose generalmente mezclas de productos. En este caso particular puede concluirse que la presencia de la espiro lactona en el riligustílido (40) le confiere un alto grado de congestión estérica a la molécula. Precisamente los hidrógenos en C4 y C5 del riligustílido (40) se encuentran en la parte cóncava de ésta, por lo que la deshidrogenación debe ser favorecida

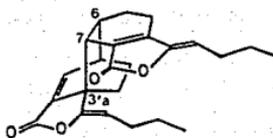




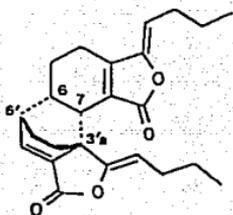
52



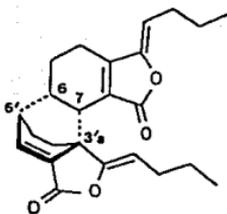
endo 37



exo 56



54

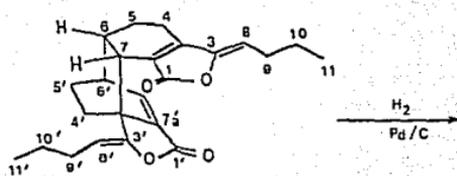


53

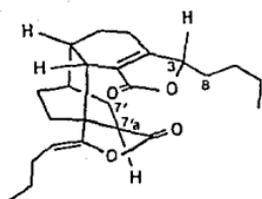
utilizaron repetidamente la fórmula 52 para esta molécula, que fue informada desde 1982 como constituyente de *Ligusticum wallichii*.<sup>21</sup> Sin embargo, la fórmula empleada (52) no indica claramente la configuración en 6' y 3'a, generando ambigüedad con respecto a la orientación *exo*- o *endo*- de la substancia. Tales posibilidades estereoquímicas deben representarse con las fórmulas 53 y 54, respectivamente. La identidad de esta substancia con el levistólido A (37), aislado por Höfle y colaboradores de *Levisticum officinale*,<sup>10</sup> quien utilizó la fórmula 54, sugiere la orientación *endo* del aducto de Diels-Alder. Para evitar representaciones estructurales ambiguas, es importante utilizar fórmulas que indiquen clara y concisamente la expresión estereoquímica de las substancias. En este caso particular, las fórmulas 37 o 54 para el estereoisómero *endo* y 53 o 56 para el *exo*.

Es nuestra recomendación el uso de las fórmulas 37 y 56 para estas substancias, ya que indican sin ninguna ambigüedad la arquitectura molecular. Tales representaciones se continuarán utilizando en el presente trabajo.

La hidrogenación catalítica del producto natural 37 aislado de *Ligusticum porteri*, produjo una mezcla de dos substancias, 57 y 58, en proporción 3:1, y son el 3,8,7',7a'-tetrahidro y el 3,8-dihidroderivado, respectivamente (esquema 4).

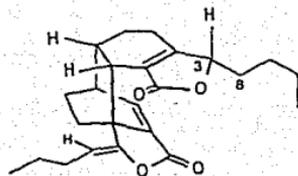


37



57

+



58

Esquema 4

El producto mayoritario, es el tetrahidroderivado (57), en el cual se hidrogenó el doble enlace C7, C7'a, que está conjugado con el carbonilo. El análisis del curso estereoquímico de la reducción de los dobles enlaces C3, C8 y C7, C7'a indica que la cara *re* de C3 y la cara *si* de C7'a son las más accesibles y por lo tanto los centros quirales que se generan poseen la configuración 3S y 7a'R. Figura 4.

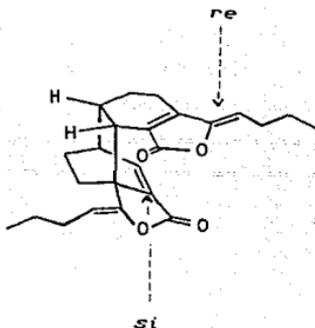


Figura 4

Es interesante notar que el doble enlace C3', C8' del diligustíflido (37) no se reduce, debido seguramente a que las dos diastereocaras de la olefina están impedidas al acceso del agente hidrogenante.

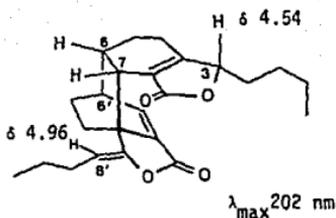
El producto minoritario de esta transformación es el dihidroderivado (58), un sólido cristalino en el cual sólo se reduce el doble enlace C3, C8 de 37.

## CORRECCION DE UN FTALIDO DIMERICO DE *Ligusticum wallichii*

La estructura 58, sin especificar la configuración en C3, fué asignada por autores franceses a Z-3'.8'-dihidro-6.6',7.3'a-diligustflido (44), un ftárido dimérico de *Ligusticum wallichii*, obtenido como aceite.<sup>18</sup>

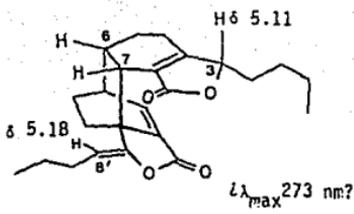
Además de las diferencias de los estados físicos de ambas sustancias (el 3,8-dihidroderivado obtenido por reducción catalítica de 37 es un sólido cristalino, mientras que la sustancia de *L. wallichii* es un producto aceitoso), las cuales pudieran eventualmente atribuirse a la presencia de impurezas en el producto natural que impiden su cristalización. Sin embargo, la comparación de los datos espectroscópicos indicó valores disímiles, lo cual permitió concluir que ambas sustancias son diferentes.

En particular, los desplazamientos químicos de H-3 ( $\delta$  5.11) y H-8' ( $\delta$  5.18) informados para la supuesta estructura 58 por Kaouadji,<sup>18</sup> están a campo bajo con respecto a las asignaciones de los hidrógenos análogos del producto de reacción (H-3:  $\delta$  4.54; H-8'  $\delta$  4.96, figura 5). Por otro lado, la  $\lambda_{max}$  informada para la sustancia de *L. wallichii*, 273 nm, la cual se debe a una dienona conjugada, no es consistente con la fórmula 58, por lo que se concluye que la estructura propuesta para el producto natural de *L. wallichii* por los investigadores franceses, no es correcta.



Dihidroderivado del aducto  
4+2, como producto de reac-  
ción. (L. porteri).

58



Dihidroderivado del aducto  
4+2, reportado como producto  
natural\* (L. wallichi).

58

Figura 5

El análisis de los datos publicados para el ftálico dimérico natural permite deducir que el constituyente de *L. wallichi* es *rel*-(3'R)-2-3',8'-dihidro-6.6',7.3a'-diligustfílido (44), ya que ésta estructura está de acuerdo con las siguientes evidencias:

(a) la presencia de una dienoa  $\alpha,\beta,\gamma,\delta$  insaturada, y evidenciada por la absorción en UV a  $\lambda_{\max} 273 \text{ nm}$ ,

(b) la señal en  $\delta 5.18$  pertenece a H-8, y está de acuerdo con el hidrógeno  $\delta$  de la dienoa conjugada (figura 6).

(c) la señal en  $\delta 5.11$  se asigna a H-3', y la configuración en C-3 en el enantiómero mostrado en la figura

6 es R, ya que H-3' se encuentra desplazado a campo bajo (aprox. 0.40 ppm) por la desprotección que ejerce sobre él el carbonilo en C-1, y

(d) el desplazamiento diamagnético de H-7 de 58 ( $\delta$  3.02) con respecto al H-7 del diligustírido (37,  $\delta$  3.27) es consistente con la saturación del doble enlace C3'-C8'. Este análisis permite concluir que la estructura del producto natural aislado por los autores franceses de *L. wallichii*, debe corregirse a la estructura 44.

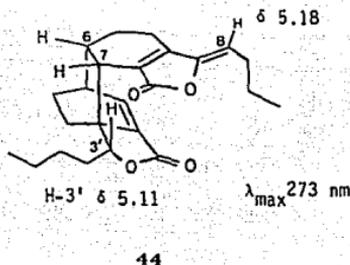


Figura 6

#### REACCIONES ADICIONALES DE LOS FTALIDOS DIMERICOS 37 Y 40.

Se realizaron algunos ensayos de reducción de los aductos 40 y 37, con hidruros metálicos. Al tratar el aducto [4+2] con  $\text{NaBH}_4$  o  $\text{LiBH}_4$  no hay modificación de la materia prima. Por otro lado, la reacción de solvólisis del aducto [4+2] (37) con metóxido de sodio en metanol, produce una

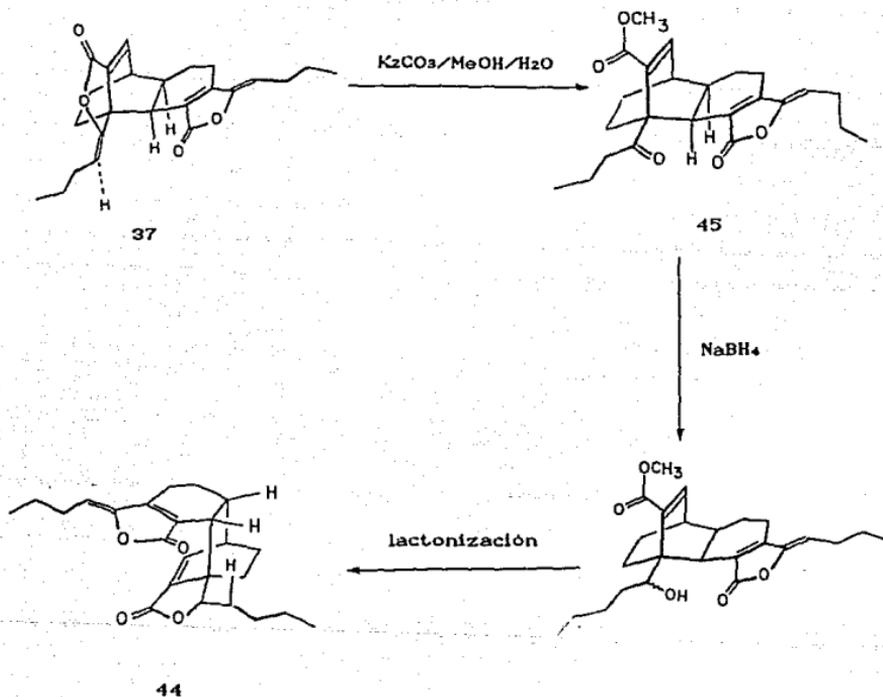
mezcla de tres productos que se transforman con el tiempo y al contacto con sílice. La no disponibilidad de la materia prima en cantidades adecuadas para la realización de las reacciones a nivel preparativo (aprox. 100 mg), impidió la continuación de los ensayos.

Al hacerse la corrección estructural del dihidroderivado del aducto [4+2] (44), se consideró la conveniencia de realizar la correlación química para obtener directamente el producto natural de *Ligusticum wallichii* 44, a partir del diligustilido (37). Esta correlación involucra como intermediario al wallichilido (45), que también es un metabolito secundario de *L. wallichii*. La secuencia de transformaciones que conducirían eventualmente a la correlación química se ilustran en el esquema 5.

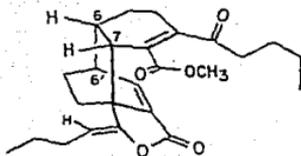
El primer paso consistiría en la apertura selectiva de la lactona fusionada al biciclo, para obtener eventualmente el wallichilido (45), el cual se sometería a reducción con  $\text{NaBH}_4$ , produciéndose la mezcla de alcoholes epiméricos correspondiente. Uno de los epímeros generaría, al lactonizarse, el producto 44, completándose la correlación propuesta.

Los intentos de apertura selectiva de la lactona más tensionada fueron infructuosos, ya que no se obtuvo el monoéster 45. Estos resultados sugieren que el carbonilo de la lactona fusionada al biciclo debe estar muy impedido al ataque del agente nucleofílico, por lo que se obtiene el

producto alterno 59.



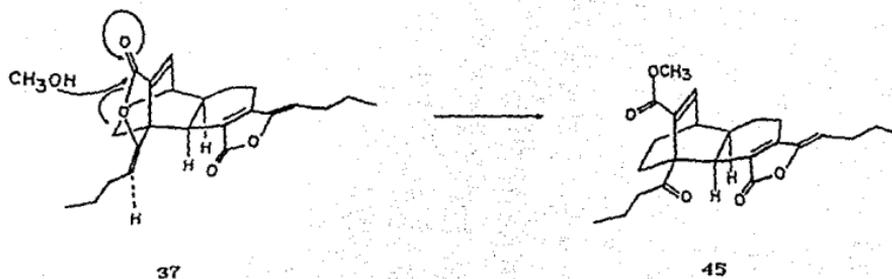
Esquema 5



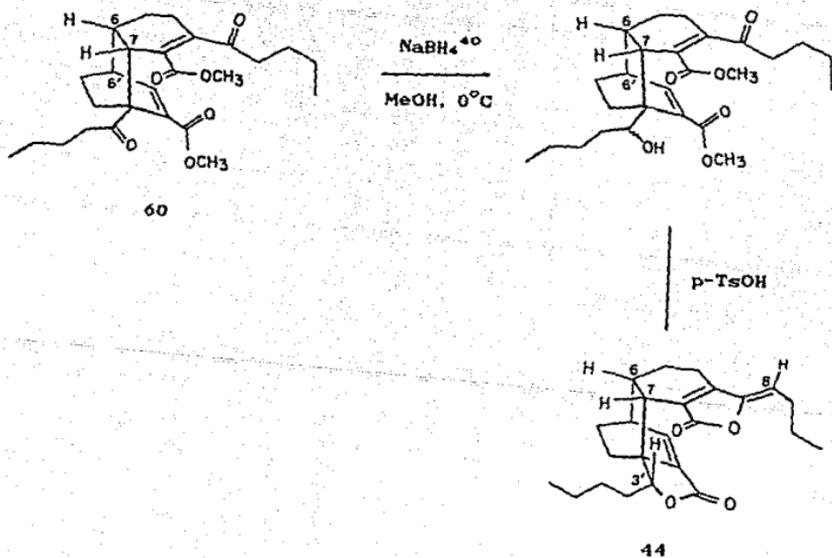
59

Por otro lado, el análisis estructural del wallichilido (45) sugiere que esta substancia pudiera ser un artefacto generado durante el aislamiento de la misma, en la cual se adiciona metanol al diligustilido (37, Esquema 6), ya que durante este proceso se utilizó metanol como eluyente en la cromatografía de líquidos de alta resolución.<sup>31</sup> Sin embargo, la situ-selectividad observada en la reacción de hidrólisis arriba mencionada no apoya esta suposición. El espectro de RMN <sup>1</sup>H de 45 fue proporcionado por el Dr. Fukuyama de los Laboratorios de Química de Productos Naturales en Otsuka Pharmaceutical, Japón. (Espectro 15).

Al obtener los resultados anteriores se modificó el plan de trabajo para obtener 44, el cual se ilustra en el esquema 7.



Esquema 6



Esquema 7

Inicialmente se efectuó la metanólisis del diligustólido (37) obteniéndose el diester 60. Este último se somete a reducción selectiva de cetonas en presencia de enonas.<sup>40</sup> Al efectuarse la reducción a  $-78^{\circ}\text{C}$  y a  $0^{\circ}\text{C}$  con  $\text{NaBH}_4$  se recupera la materia prima, por lo que se procedió a efectuar la reducción a temperatura ambiente. En estas condiciones se obtuvieron dos productos menos polares que la materia prima. Esta mezcla no logró separarse debido a la poca cantidad de material y a la similitud de los Rf de los constituyentes de la misma. Además el producto esperado debería ser presumiblemente más polar que la materia prima.

Al efectuar la reacción de reducción de 60 con  $\text{LiBH}_4$  a temperatura ambiente se obtuvieron cuatro productos de reacción adicionales a la materia prima, de los cuales solo uno es más polar que el reactante. Por las mismas razones anteriores, esta mezcla de reacción no se logró resolver en sus componentes.

Dada la no disponibilidad de los productos naturales apropiados, ni del material vegetal para su eventual aislamiento, no fué posible la realización de ensayos adicionales para efectuar la correlación química.

CONSTITUYENTES ADICIONALES DE  
*LIGUSTICUM PORTERI*

Los rizomas de las plantas del género *Ligusticum* son conocidos en todo el mundo por su uso medicinal y olor característico. Precisamente este olor peculiar es atribuido a los ftálidos presentes en el vegetal. Tales sustancias se descomponen fácilmente al contacto con el aire y con la temperatura, y esto provoca ligeros cambios en el olor de los residuos orgánicos que las contienen.

Se ha reportado en la literatura que las sustancias responsables de este aroma provocan estornudos, hemorragias nasales y trastornos auditivos.<sup>22</sup> El autor del presente trabajo experimentó ligera somnolencia durante la obtención de los extractos y en las etapas iniciales del fraccionamiento, por lo que fue necesario adoptar las medidas pertinentes para la manipulación de los residuos orgánicos con este olor característico.

La separación de las mezclas de ftálidos siempre ha presentado y aún presenta una dificultad experimental extrema debido a su similitud, por lo que los estudios estructurales han omitido en ciertas ocasiones los aspectos estereoquímicos. Recientemente se ha utilizado la metodología de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas para la identificación de estas sustancias. Sin embargo, esta técnica presenta severas limitaciones para caracterizar sustancias novedosas y discriminar estructuras estereoisoméricas.

Esta metodología se empleó en el presente trabajo para el análisis de una fracción del extracto hexánico de la raíz

de *L. porteri* obtenida mediante un fraccionamiento previo por cromatografía líquido-sólido. La figura 7 muestra el cromatograma obtenido en las condiciones que se describen en la parte experimental y los resultados se muestran en la tabla 3.

El contenido de esta fracción puede dividirse en dos tipos de sustancias que son los monoterpenos, que presentan tiempos de retención cortos, y los ftálicos, que poseen mayor tiempo de retención. Las proporciones relativas del primer grupo de sustancias acumulan presumiblemente 42.4% mientras que los ftálicos suman 57.4%, aproximadamente. Tal proporción es similar a la encontrada previamente en las fracciones de baja polaridad de los extractos de especies de *Cnidium*<sup>15</sup> y *Levisticum*,<sup>16</sup> en la que los ftálicos representan la mayor proporción de los elementos constitutivos de este residuo.

Es interesante notar que algunos compuestos terpénicos presentes ( $\alpha$ -pineno, limoneno,  $\beta$ -felandreno,  $\alpha$ -terpineno y p-cimeno) han sido detectados en especies comestibles de *Umbelliferae* tales como el apio y el nabo,<sup>26</sup> siendo el limoneno un compuesto relativamente abundante en estas especies.

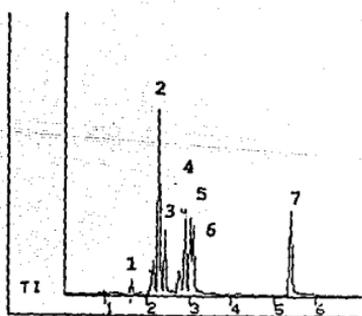
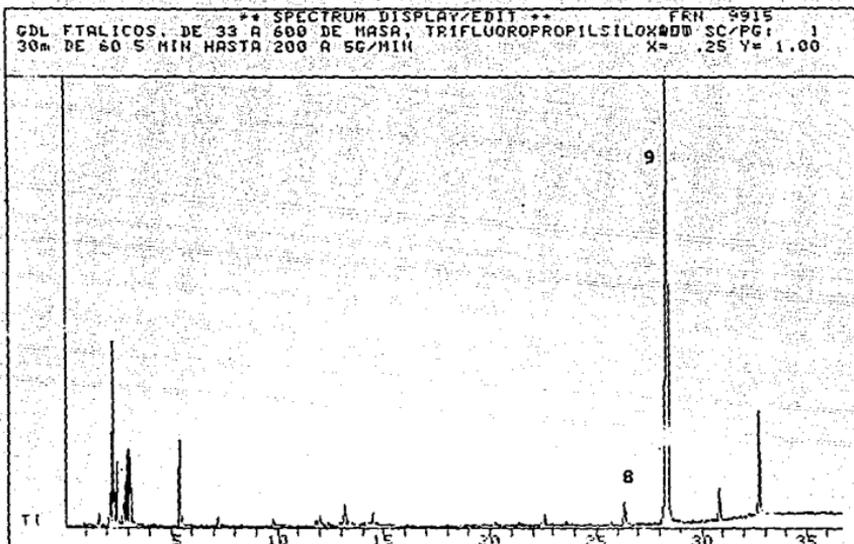
No todos los ftálicos presentes pudieron resolverse en las condiciones de operación instrumental empleadas, las cuales se describen en la parte experimental, sin embargo, el espectro de masas obtenido de esta fracción permite concluir que E- y Z-ligustilido están presentes como constituyentes mayoritarios y deben ser los responsables del intenso olor

característico. Los ftálidos también están presentes en las plantas comestibles arriba mencionadas pero en una proporción relativa significativamente menor.<sup>26</sup>

Cabe señalar que el análisis realizado por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas corresponde a las primeras fracciones de la cromatografía líquido-sólido del extracto hexánico, por lo que presumiblemente este residuo se encuentra enriquecido en monoterpenos, con respecto a este extracto, ya que estos metabolitos tienen un tiempo de retención menor. Así, las proporciones de monoterpenos con respecto a los ftálidos en el total del extracto hexánico, debe ser menor.

Tabla 3

Compuesto	Rt (min)	% Relativo
$\alpha$ -pineno	1.7	0.74
$\alpha$ -felandreno	2.3	12.56
limoneno	2.4	6.23
$\beta$ -felandreno	2.9	6.54
$\alpha$ -terpineno	3.0	6.45
p-cimeno	3.1	3.26
desconocido	5.4	7.74
butilidenftálido	26.4	6.10
E-ligustílido	28	} 42.28
Z-ligustílido	28.3	
desconocido	32.7	7.39



1.  $\alpha$ -pineno
2.  $\alpha$ -felandreno
3. limoneno
4.  $\beta$ -felandreno
5.  $\alpha$ -terpineno
6. p-cimeno
7. desconocido
8. butilidencalido
9. E- y Z-ligustilido

Figura 7

## ENSAYOS BIOLÓGICOS

Debido al frecuente uso popular medicinal que poseen diversas preparaciones de la raíz de *L. porteri*, no sólo en humanos, sino también en animales, como se describió en la introducción del presente trabajo, se consideró pertinente realizar una prueba biológica exploratoria preliminar con algunos de las sustancias características de este vegetal, que son los ftálicos.

Hace algunos años se describió un método simple para efectuar bioensayos preliminares de productos naturales.<sup>41</sup> Este método consiste en determinar la toxicidad de una sustancia o extracto hacia el crustáceo *Artemia salina*. El procedimiento determina valores de concentración letal media (LC<sub>50</sub>) en µg/ml o ppm de compuestos activos y extractos en un medio acuoso salino que contiene las larvas del camarón. Los resultados obtenidos se ilustran en las tablas 4 y 5 para el Z-ligustilido (4) y para el diligustilido (37) respectivamente. Como puede apreciarse el Z-ligustilido resultó ser muy tóxico teniendo una LC<sub>50</sub> de 20.1 ppm mientras que su derivado [4+2] (37) no tiene toxicidad alguna contra *Artemia salina* (LC<sub>50</sub> > 1000 ppm).

En este bioensayo, las sustancias que poseen una concentración letal media menores a 1000 ppm se consideran como tóxicas.

Los resultados obtenidos sugieren que el Z-ligustilido puede ser el responsable de la actividad antiséptica de las preparaciones de esta planta, y no los dímeros. Sin embargo, es claro que son necesarios bioensayos adicionales que

permitan la evaluación farmacológica de estas sustancias.

Tabla 4

Resultados del bioensayo de Z-ligustilido con *Artemia salina*

Concentración (ppm)	1000	100	10
Sobrevivientes	0/10	0/10	6/10
	0/10	0/10	8/10
	0/10	0/10	8/10
Muertos	30/30	30/30	8/30
% mortalidad	100	100	26.66
LC <sub>50</sub> = 20.1 ppm			

Tabla 5

Resultados del bioensayo del diligustilido con *Artemia salina*

Concentración (ppm)	1000	100	10
Sobrevivientes	10/10	10/10	10/10
	10/10	10/10	10/10
	10/10	10/10	10/10
Muertos	0/30	0/30	0/30
% mortalidad	0	0	0
LC <sub>50</sub> > 1000 ppm			

## CONCLUSIONES

La revisión de la literatura química sobre los ftálicos indica que este tipo de productos naturales son de distribución restringida en la naturaleza y que han sido poco estudiados desde el punto de vista químico. Al efectuar algunas transformaciones químicas en los ftálicos diméricos aislados de *Ligusticum porteri*, se observó que el comportamiento químico de estas sustancias, frente a los reactivos probados, es altamente sensible a los factores estéricos, y la predicción de la estereoquímica de los productos puede realizarse utilizando este tipo de argumentos.

Por otro lado, las plantas que biosintetizan ftálicos presentan gran variedad de usos en la medicina tradicional; y es probable que la actividad farmacológica de *Ligusticum porteri* se deba al Z-ligustílico, y no a los dímeros presentes, debido al hecho de que resultó ser muy tóxico de acuerdo al bioensayo con *Artemia salina*. Sin embargo, es necesario efectuar pruebas biológicas adicionales las cuales permitan evaluar la acción farmacológica de los ftálicos diméricos presentes en este vegetal.

El análisis estructural de uno de los productos de hidrogenación del diligustílico permitió la corrección estructural de un producto natural aislado de *Ligusticum wallichii*.

El estudio por CG-EM de las fracciones de menor polaridad de los extractos orgánicos de *L. porteri*, permitió la caracterización de sesquiterpenos y ftálicos adicionales.

## PARTE EXPERIMENTAL

Los puntos de fusión fueron determinados en un aparato Fischer-Jones. Los espectros de IR fueron obtenidos en solución de  $\text{CHCl}_3$ . Los espectros de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  fueron determinados a 80 ó 300 MHz y a 75 MHz, respectivamente, en solución de  $\text{CHCl}_3$ , utilizando como referencia interna al TMS. Los espectros de masas fueron obtenidos en un espectrómetro Hitachi Perkin-Elmer RMU 6D de doble foco, utilizando la técnica de impacto electrónico y un potencial de ionización de 70 eV.

Las sustancias naturales utilizadas para las reacciones fueron obtenidas previamente como se describe en la referencia 1.

Hydrogenación de (Z)-rel-(8S,6'R,7'S)-8.6',3.7'-diligustíflido.  
(riligustíflido,40).

Diez mg de Pd/C al 10% suspendidos en 5ml de acetato de etilo se prehidrogenaron a temperatura ambiente y con agitación continua durante 1h. Al cabo de este tiempo se adicionan 85 mg de 40 disueltos en 5 ml de acetato de etilo. La reacción se mantuvo por 3.5 horas. Al cabo de este tiempo se consumió la materia prima y se observan dos productos de reacción.

La eliminación del catalizador por filtración sobre celita y la eliminación del disolvente por concentración a presión reducida permitió la obtención de un residuo aceitoso, el cual fué resuelto en sus componentes por medio de una cromatografía preparativa, utilizando como mezcla

eluyente hexano-acetona 7:3 y desarrollando dos veces la placa. El producto de menor polaridad es el tetrahidroderivado (48), del cual se obtienen 35 mg.

Estado físico: aceite incoloro

IR (CHCl<sub>3</sub>): 3028, 3014, 2959, 2935, 2868, 1746, 1673, 1072, 1039, 940 cm<sup>-1</sup> (Espectro 3).

RMN <sup>1</sup>H (80 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 4.85 (H-3', 1H, m), 3.33 (H-7', 1H, d, 6Hz), 2.84 (H-, 1H, t, 7Hz). (Espectro 4).

EMIE (70 eV) m/z (% int. rel.): 384 (M<sup>+</sup>, 0.6), 193 (79.7), 192 (100), 163 (18), 150 (16).

El producto de mayor polaridad corresponde al dehidro-dihidro derivado (49). Se obtuvieron 14 mg.

Estado físico: aceite incoloro

IR (CHCl<sub>3</sub>): 3031, 3016, 2960, 2933, 2873, 1757, 1085, 953 cm<sup>-1</sup> (Espectro 5).

RMN <sup>1</sup>H (80 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.85-7.35 (4H, señal compleja, hidrógenos aromáticos), 4.83 (H-3', 1H, m), 3.56 (H-7', 1H, d, 9Hz). (Espectro 6).

EMIE (70 eV) m/z (int. rel.): 380 (M<sup>+</sup>, 17), 193 (100), 188 (35), 159 (42), 146 (24).

#### Reducción catalítica de

(Z,Z')-rel-(6R,7R)-6.6',7.3'a-diligustíldo. (37).

Se disolvieron 100 mg de 37 en 10 ml de acetato de etilo y se hace reaccionar con atmósfera de hidrógeno empleando Pd/C como catalizador. Después de 24 hrs. se filtra sobre

celita y se concentra. Se obtuvieron dos productos. Uno de ellos cristalizó de etanol y es el tetrahidroderivado de 37, se obtuvieron 25 mg.

Estado físico: cristales.

Punto de fusión: 110-113°C

IR (CHCl<sub>3</sub>) cm<sup>-1</sup>: 2957, 2932, 2872, 1792, 1753, 1712, 1666, 1463, 1174, 1061, 1022, 1000, 980.000, 980.

(Espectro 9).

RMN <sup>1</sup>H (80 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 4.68 ppm (H-8', 1H, t, 8Hz), 2.86 ppm (H-7, 1H, d, 10 Hz). (Espectro 10).

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

El producto más polar se obtuvo después de purificarlo tres veces por cromatografía en capa fina en la que se empleó como eluyente una mezcla de hexano-acetona en proporciones 7:3, 7:3 y 8:2. Se obtuvieron 8 mg de éste, y corresponde al dihidroderivado.

Estado físico: cristalino.

Punto de fusión: 104-106°C

IR (CHCl<sub>3</sub>) cm<sup>-1</sup>: 2959, 2933, 2872, 1754, 1710, 1666. (Espectro 11).

RMN <sup>1</sup>H (80 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 7.29 ppm (H-7', 1H, d, 7 Hz), 4.96 ppm (H-8', 1H, t, 8 Hz), 4.54 ppm (H-3, 1H, W 1/2 12 Hz), 3.18 ppm (H-7, 1H, d, 9 Hz), 2.96 ppm (H-6', 1H, ddd, 6.5, 2.5, 2.5 Hz). (Espectro 12).

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

Ensayos de reacción con hidruros metálicos de (37) y (40).

A una solución de 8 mg de 37 o 40, (en corridas diferentes), disueltos en 4 ml de metanol anhidro, a 0°C, se le adicionaron 1.6 mg de NaBH<sub>4</sub>. Tales condiciones se mantienen por tres horas. Al término de este tiempo no se observa modificación de la materia prima. Después se adicionan 1.7 mg adicionales de NaBH<sub>4</sub> (en total 3.3 mg) y se somete a reflujo por una hora. La ejecución del procedimiento usual para aislar el producto de reacción, permitió la recuperación de casi la totalidad de la materia prima.

Se realizaron los ensayos análogos utilizando como agente reductor LiBH<sub>4</sub> en metanol con los mismos substratos 37 y 40 en las mismas proporciones con respecto al reactivo, con los mismos tiempos y condiciones de reacción. Tampoco se observa modificación de la materia prima.

#### Metanólisis del diligustólido (37)

##### a) Hidrólisis selectiva con K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

A 29.8 mg de 37 se le agregaron 10 ml de una solución de carbonato de potasio al 5% en metanol acuoso al 70% a temp. amb. Después de 15 min se agrega HCl al 10%. Se extrae con

acetato de etilo varias veces, se reúnen las fases orgánicas, se secan con sulfato de sodio anhidro y se evapora el disolvente. Al desarrollar una cromatografía en placa fina, se observó la presencia de un solo producto y de materia prima sin reaccionar. Para separar la mezcla de reacción se eluye una columna de cromatografía empleando como eluyente una mezcla de hexano-acetona 9:1. En las fracciones menos polares se recuperó la materia prima, y en las más polares se obtuvo el producto de reacción (59) cuyo punto de fusión es 152-158°C. Como se obtuvo muy poca cantidad del producto de hidrólisis, fue necesario efectuar la reacción varias veces para poder obtener la cantidad necesaria para efectuar los análisis espectroscópicos correspondientes.

IR ( $\text{CHCl}_3$ )  $\text{cm}^{-1}$ : 2940, 2870, 1712, 1630, 1430, 1360, 1270, 1080.

RMN  $^1\text{H}$  (80 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 7.3 ppm (H-7, 1H, d, 7 Hz), 4.79 ppm (H-8', 1H, t, 8 Hz), 3.59 ppm ( $\text{OCH}_3$ , 3H, s). (Espectro 13).

EMIE (70 eV) m/z (% rel.): 412( $\text{M}^+$ , 18), 394(41), 369(29), 355(20), 337(20), 324(25), 323(89.7), 191(70), 165(88.7), 105(73), 91(58), 77.2(100), 57.2(88.7), 43(69).

b) Metanólisis del diligustilido (37) para formar el diéster.

Se disuelve sodio metálico en metanol absoluto y se mezcla con 102.8 mg de 37 previamente disuelto en metanol absoluto. Se deja reaccionar con agitación continua a

temperatura ambiente durante 4 hrs, tiempo en el cual se completa la reacción. Se concluye la reacción mediante la adición de agua y se agrega ácido clorhídrico al 10% hasta neutralización. Posteriormente se evapora el metanol, se extrae la fase acuosa con acetato de etilo varias veces, se reúnen los extractos orgánicos, se lavan con salmuera, se secan con sulfato de sodio anhidro y se evapora el disolvente. Se obtiene el diéster del diligustilido (60), que es el producto esperado, mezclado con materia prima (37). La mezcla de reacción se separa por cromatografía en columna empleando hexano-acetona como eluyente en proporción 4:1. La columna se monta en sílica gel-celita, desactivando la sílice previamente mediante la adición de agua. Se obtuvieron 75.8 mg del diéster 60, el cual presenta un componente adicional (Espectro 14) que presumiblemente es el ácido en C-7a'.

Ensayos de reducción con hidruros metálicos  
del diéster del diligustilido (60).

a) Reducción de 60 con  $\text{NaBH}_4$  a  $-78^\circ\text{C}$ .

La solución de 60 (38.8 mg) en 50% de metanol en dicloro metano (5 ml) se enfría en un baño de hielo seco-acetona y se agregan 42.4 mg de  $\text{NaBH}_4$ . Después de agitar durante una hora, se adiciona 1 ml de acetona y se deja que la reacción alcance la temperatura ambiente. Se diluye la mezcla con diclorometano, se lava con hidróxido de sodio 1M, se seca sobre sulfato de sodio anhidro y se concentra. Se recupera la

materia prima sin reaccionar.

b) Reducción de 60 con  $\text{NaBH}_4$  a  $0^\circ\text{C}$

Se disuelven 18.1 mg de 60 en metanol absoluto, se agregan 19.9 mg de borohidruro de sodio y se deja reaccionar con agitación continua a  $0^\circ\text{C}$  durante una hora. Esta vez tampoco hay reacción.

c) Se efectúa el mismo procedimiento efectuado en (b) pero a temperatura ambiente. Se obtiene una mezcla de dos productos menos polares que la materia prima la cual no se separó debido a la poca cantidad que se obtuvo. Así pues se manda la mezcla a IR y RMN  $^1\text{H}$

d) Reducción de 60 con  $\text{LiBH}_4$

Se disuelven 10 mg de la materia prima en 5 ml de metanol absoluto, se agrega un exceso del agente reductor y se mantiene con agitación continua y a temperatura ambiente durante 24 hrs. ya que a las 12 hrs. no hay reacción aparente. Después de trabajar la reacción de la manera usual se obtienen 8.5 mg de mezcla en la que por lo menos hay cuatro productos de los cuales sólo uno de ellos es más polar que la materia prima. Dentro de la mezcla de reacción también se observó la presencia de materia prima.

Constituyentes del extracto hexánico de *Ligusticum porteri*.

El extracto hexánico de la raíz de *Ligusticum porteri* se adsorbió en sílica gel 60. El peso del extracto fue de

256.58g. Una vez adsorbido el extracto, se separó por cromatografía en columna empleando 1 Kg de sílica gel como fase estacionaria. Se comenzó a eluir la columna con hexano 100% y se fué aumentando la polaridad del eluyente gradualmente con mezclas de hexano:acetato de etilo. En las fracciones menos polares, un residuo amarillo aceitoso, se observa por cromatografía en capa fina que contiene al Z-ligustílido y probablemente otros ftálidos de bajo peso molecular y algunos terpenos por lo que este aceite se sometió a al análisis combinado de cromatografía de gases acoplado con espectrometría de masas. Este método se describe a continuación:

Para identificar los constituyentes del aceite aislado del extracto hexánico de *L. porteri* se utilizó un cromatógrafo de gases Hewlett Packard modelo 5840A acoplado a un espectrómetro de masas modelo 5985-HP. Se empleó una columna capilar de trifluoropropil-siloxano (RSL-400) de 30 m por 0.32 mm, un flujo de 1.5 ml/min con un split ajustado 1/100 con un programa de temperatura de 60 a 200°C con un calentamiento de 5°C/min; la temperatura del inyector, de la cámara de ionización y de la interfase fue de 230°C; el voltaje de ionización fue de 70eV y los espectros de masas se adquirieron de 33 a 600 uma cada 0.3 s.

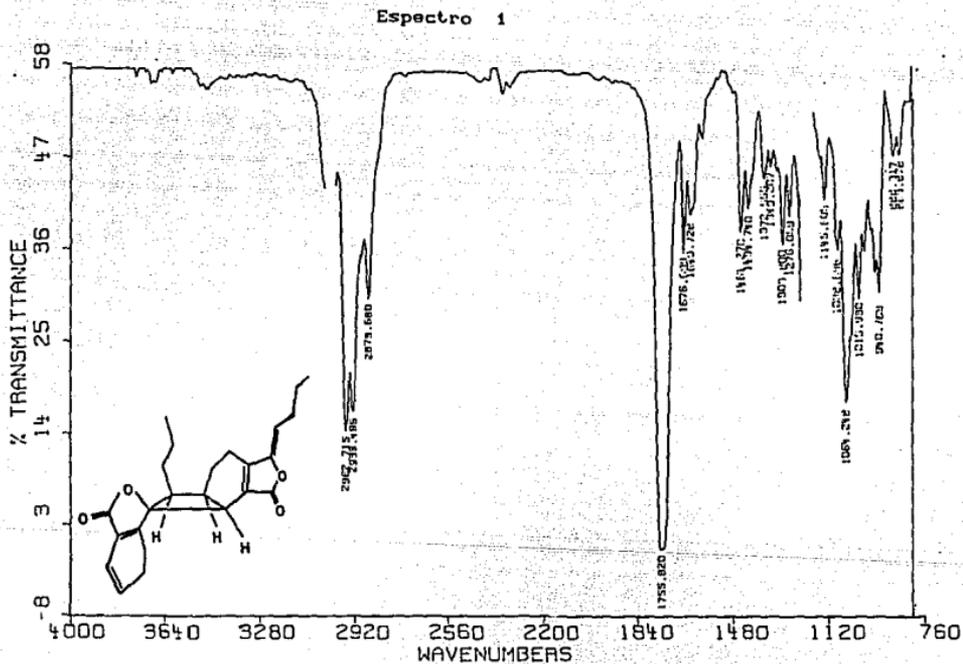
Según el catálogo de Alltech<sup>12</sup> la columna empleada es una de las más adecuadas para separar monoterpenos. El programa de temperaturas que se utilizó son aquellas

condiciones a las cuales se tiene la información, anteriormente recabada, para poder efectuar comparaciones con los tiempos de retención de compuestos ya estudiados.

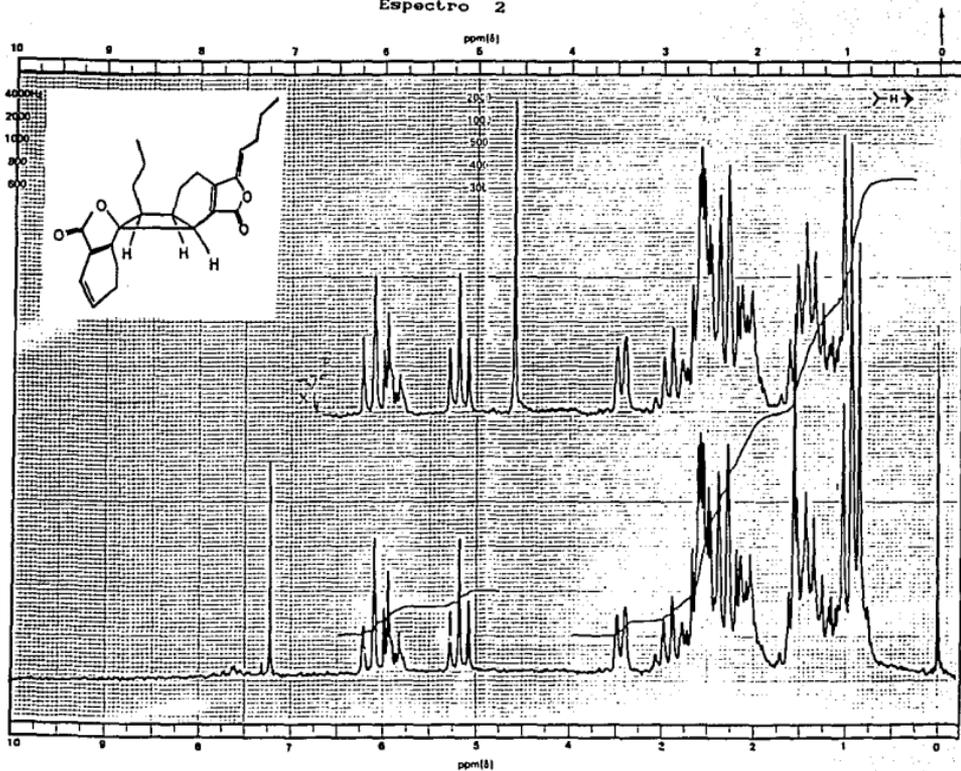
Este programa de temperaturas permite separar monoterpenos poco retenidos y en forma relativamente rápida compuestos más retenidos.

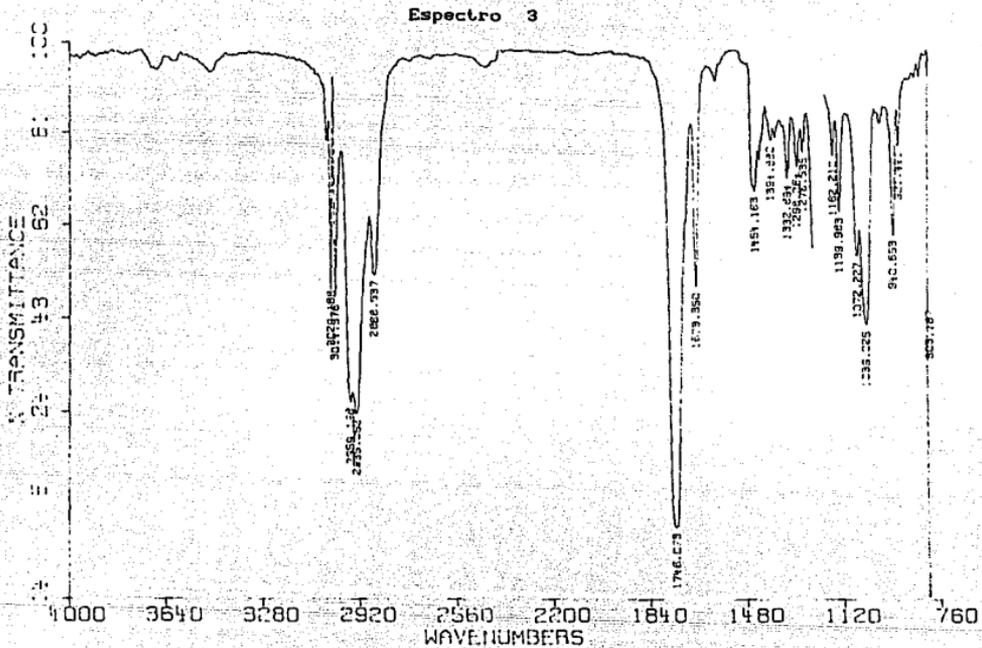
Todos los espectros de masas obtenidos se cotejaron con el archivo de espectros de masas de compuestos del National Bureau of Standards (NBS), provisto por el software del sistema, para encontrar aquellos compuestos con espectros de masas con un alto índice de similitud. Estos resultados y la confrontación con espectros en la literatura<sup>43,44</sup> permitieron caracterizar la mayoría de los monoterpenos de mayor proporción en la muestra. Los ftálidos se caracterizaron con los resultados obtenidos previamente.<sup>16</sup>

## ESPECTROS

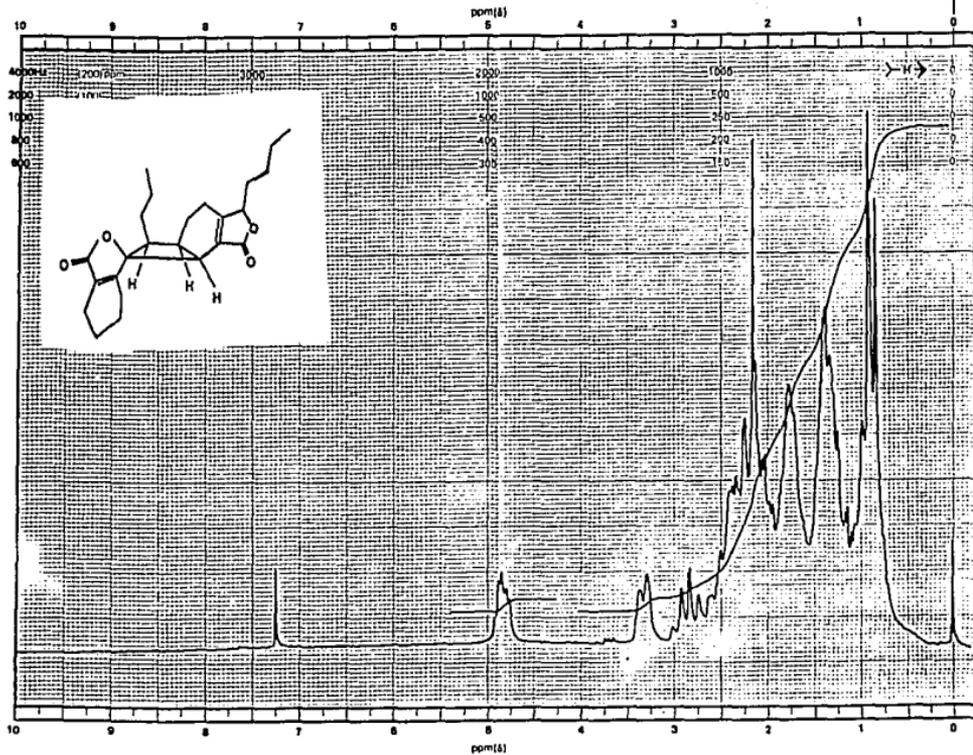


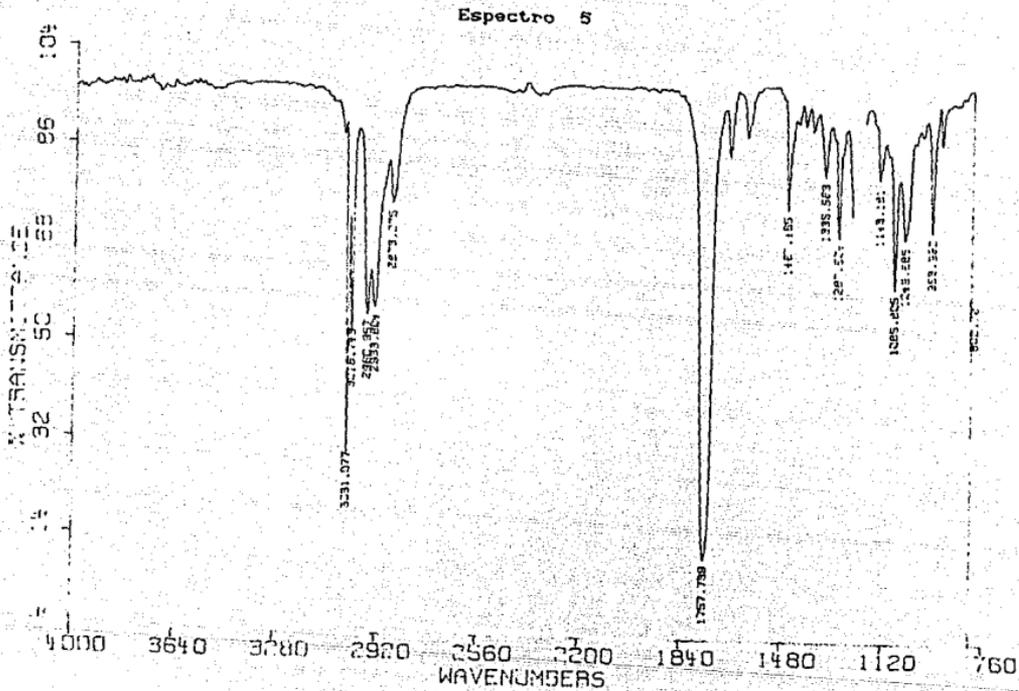
Espectro 2



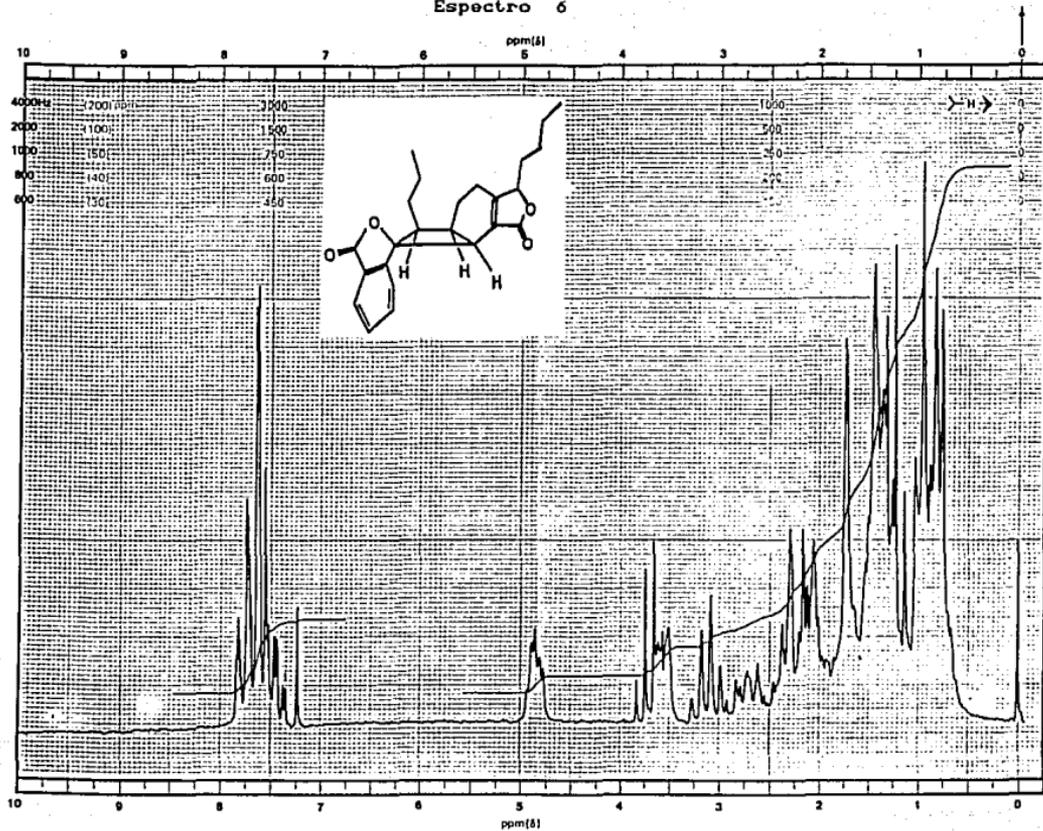


Espectro 4

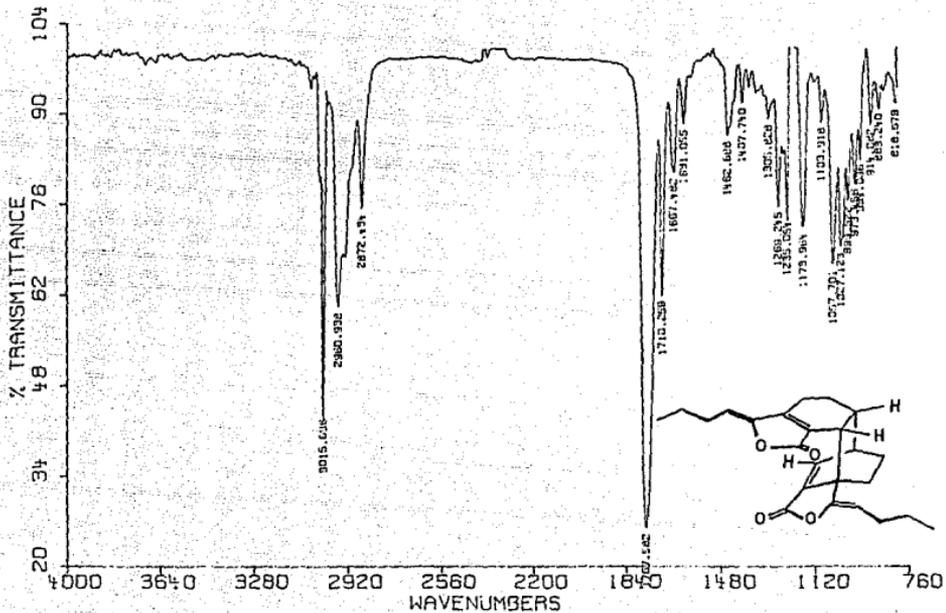




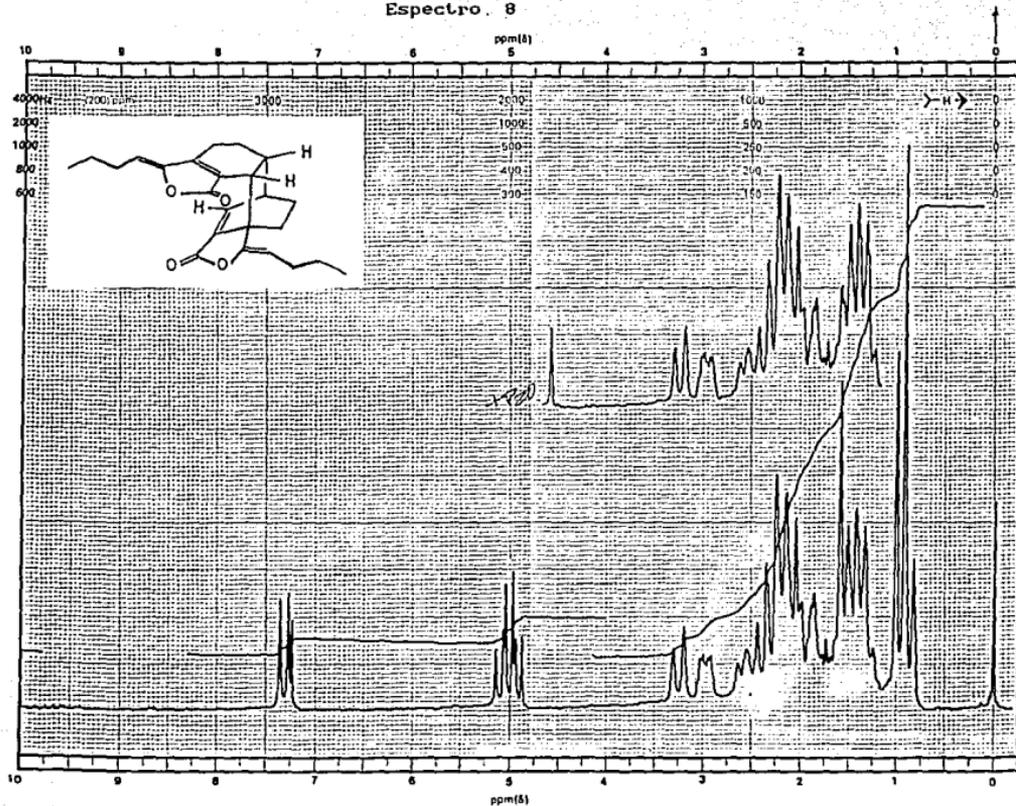
Espectro 6



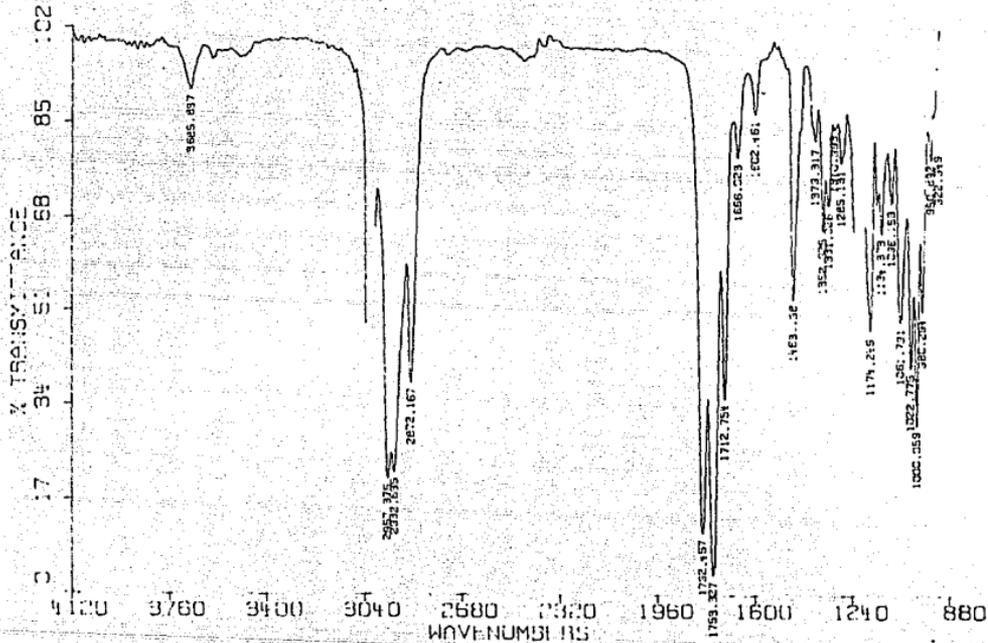
## Spectro 7



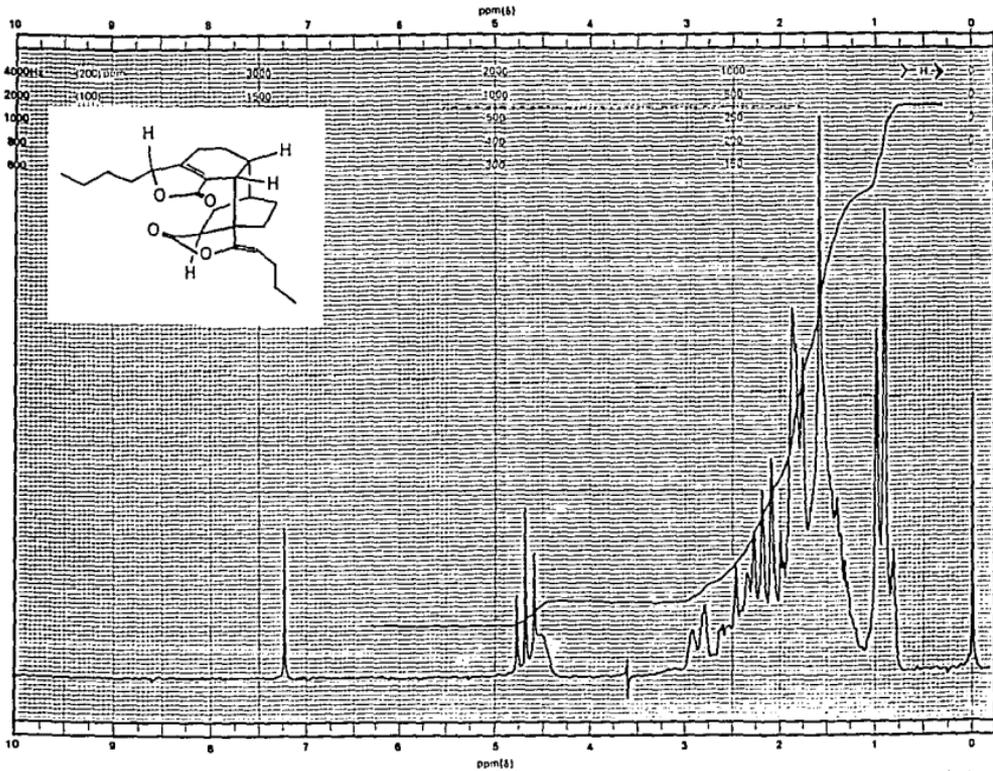
Espectro. 8



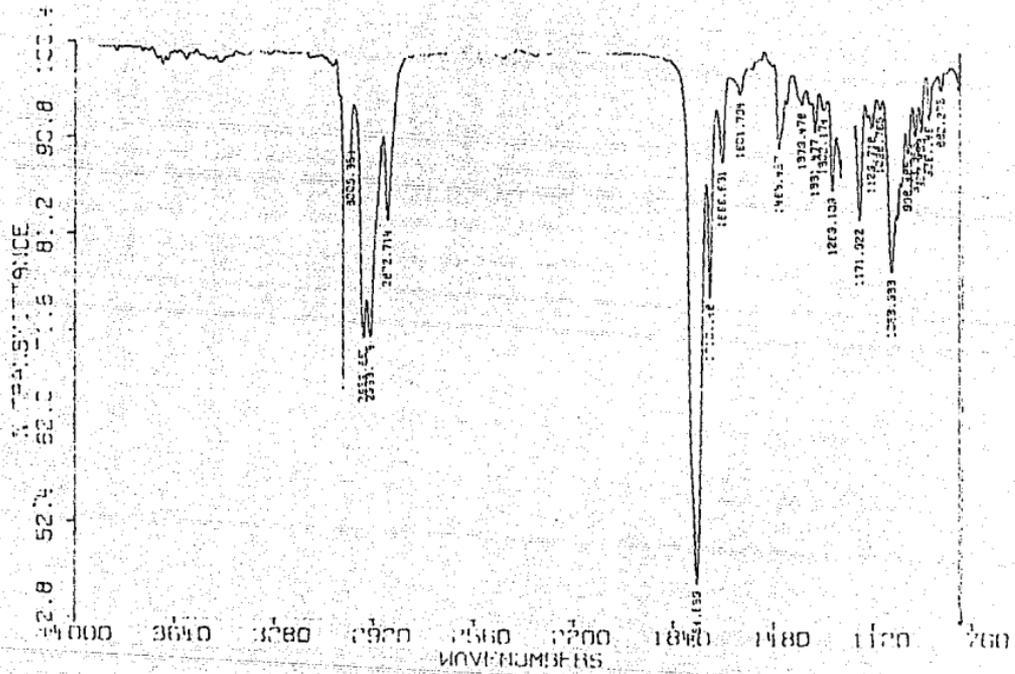
## Espectro 9



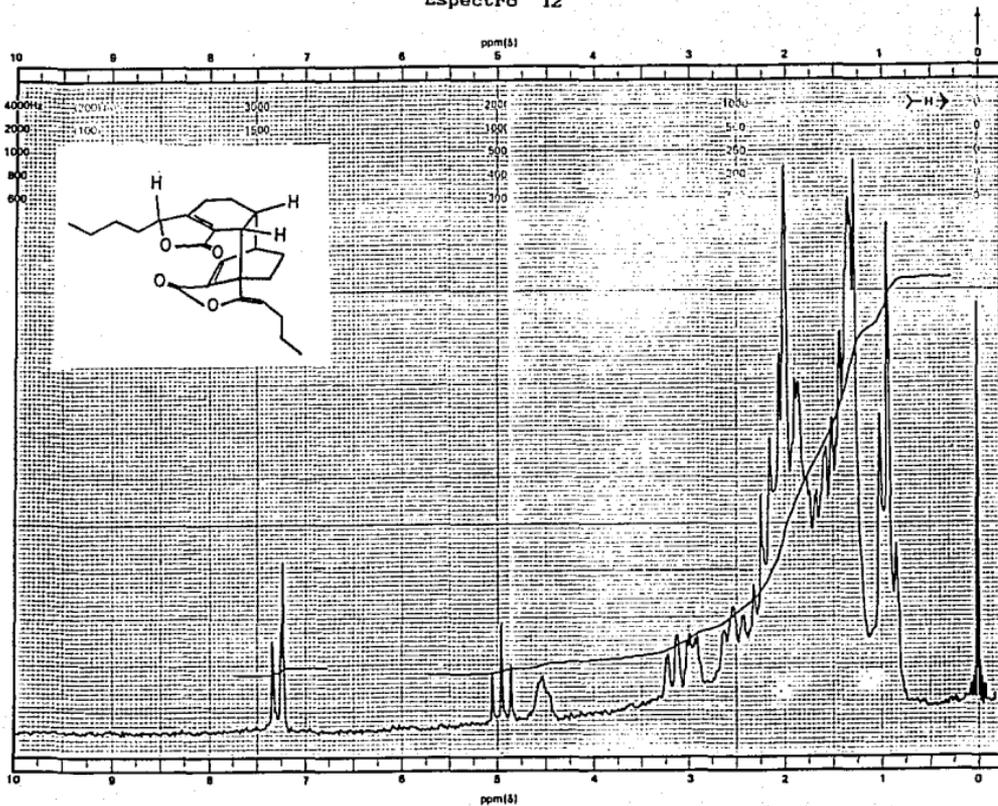
Espectro 10



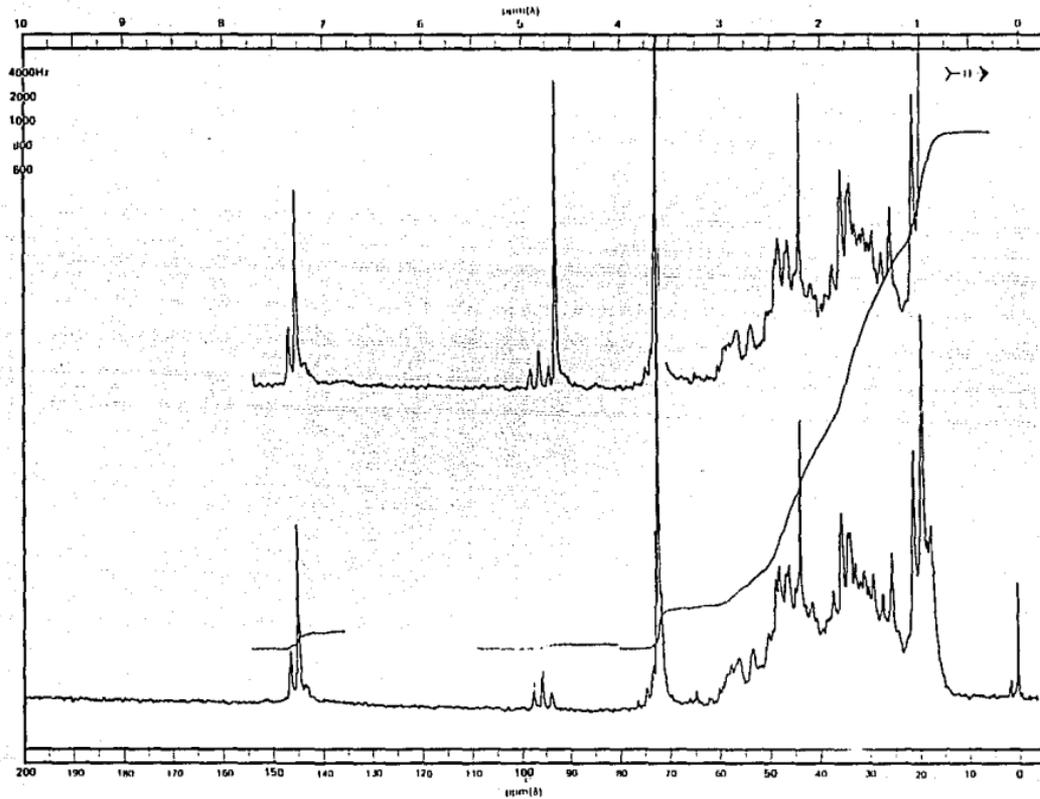
### Espectro 11



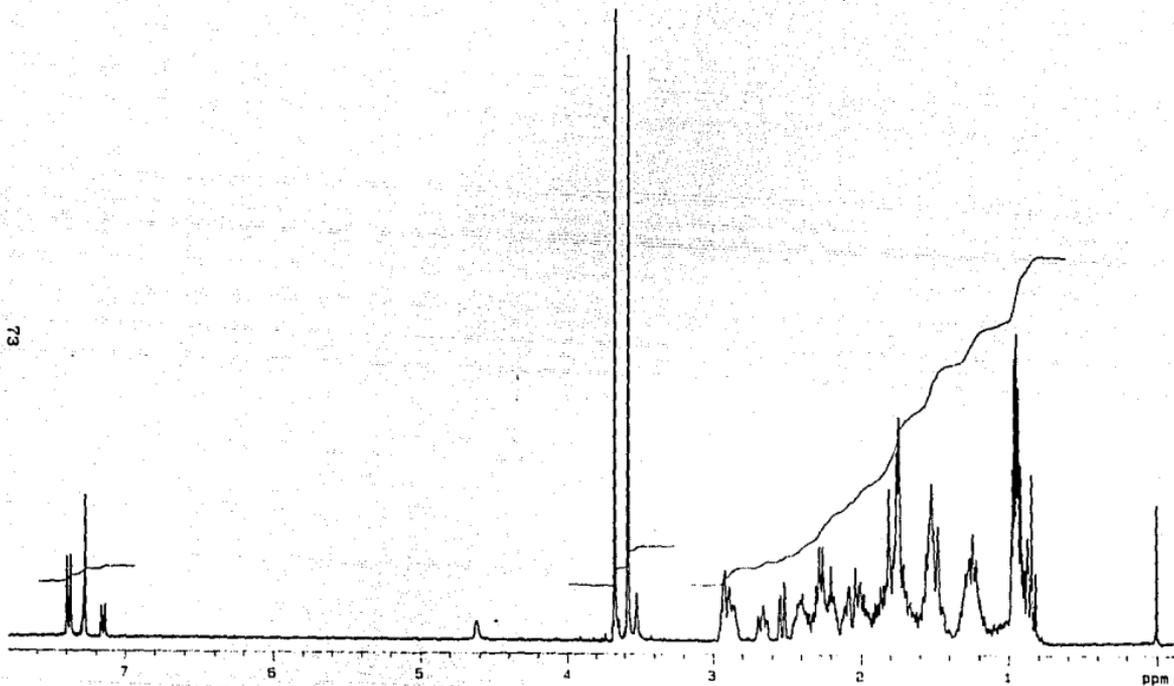
Espectro 12



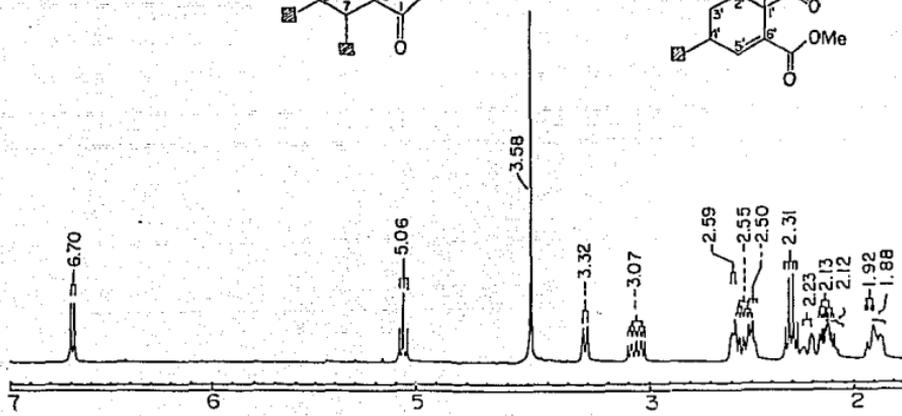
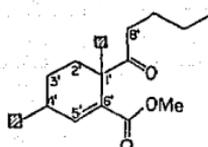
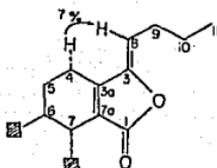
Espectro 13



Espectro 14



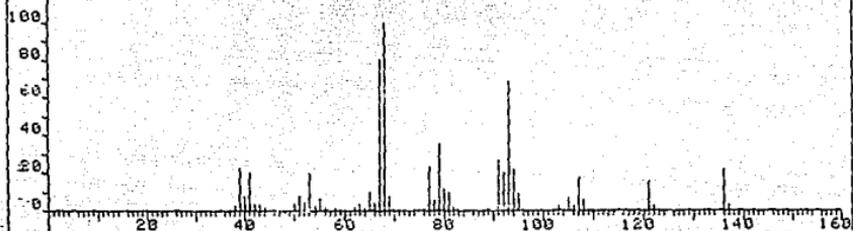
Espectro 15



74

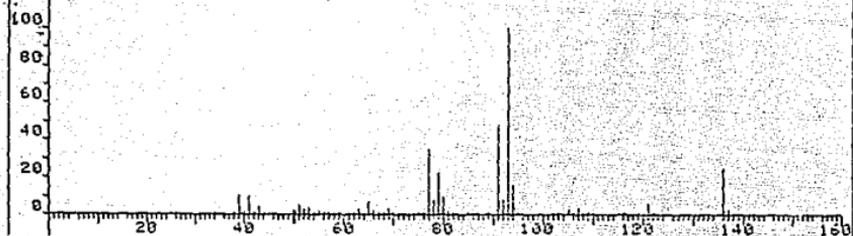
Limoneno

FRN 9915	SPECTRUM 60	RETENTION TIME 2.4
LARGST 4: 68.1, 100.0	67.1, 80.5	93.1, 68.4 79.1, 35.3
LAST 4: 121.2, 15.5	122.2, 2.1	136.2, 22.4 137.1, 2.9
PAGE 1 Y = 1.00		



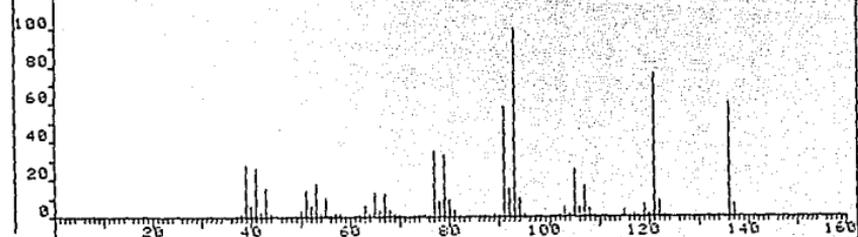
$\beta$ -felandreno

FRN 9915	SPECTRUM 72	RETENTION TIME 2.9
LARGST 4: 93.1, 100.0	81.1, 47.9	77.1, 34.6 136.2, 24.2
LAST 4: 121.2, 5.6	122.2, .9	136.2, 24.2 137.2, 2.4
PAGE 1 Y = 1.00		



$\alpha$ -terpineno

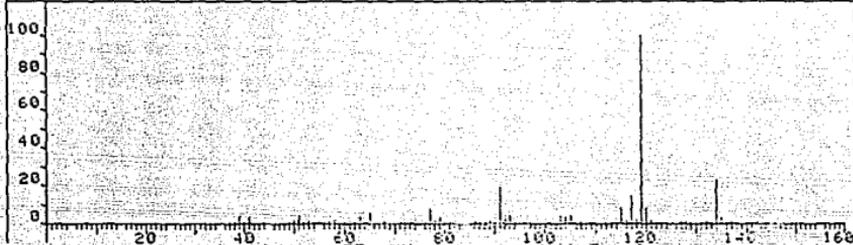
FRN 9915	SPECTRUM 75	RETENTION TIME 3.0
LARGST 4: 93.1, 100.0	121.2, 75.5	136.2, 60.7 91.1, 53.2
LAST 4: 134.1, .8	135.1, 1.1	136.2, 60.7 137.2, 5.8
PAGE 1 Y = 1.00		



**p-cimeno**

FRN 9915	SPECTRUM 77	RETENTION TIME 3.1
LARGST 4: 119.2, 100.0	134.1, 23.7	91.1, 13.9 117.1, 14.7
LAST 4: 134.1, 23.7	135.1, 2.9	126.2, 1.1 127.1, .3

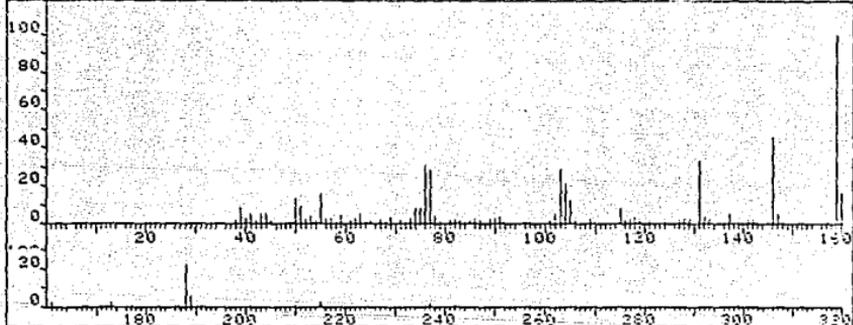
PAGE 1 Y = 1.00



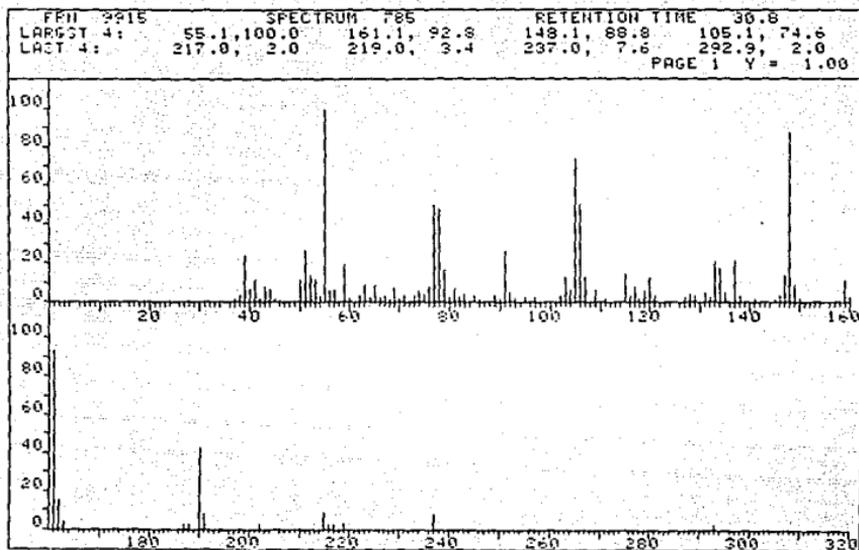
**butilidestalde**

FRN 9915	SPECTRUM 271	RETENTION TIME 25.4
LARGST 4: 159.1, 100.0	144.0, 43.5	131.1, 33.5 141.1, 13.4
LAST 4: 188.1, 22.1	189.1, 6.1	215.0, 3.1 227.0, 1.4

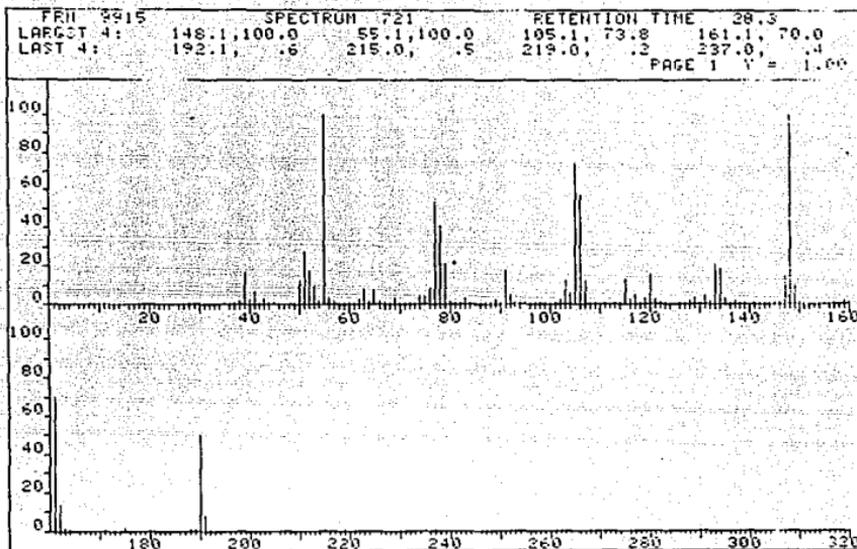
PAGE 1 Y = 1.00



*E*-ligustilide



Z-ligustilide



## REFERENCIAS

1. El primer estudio fitoquímico de esta planta se realizó en nuestro laboratorio: Reza Garduño Treviño, Rosa G. Aislamiento y Caracterización de los Ftálicos de *Ligusticum porteri* C & R (Umbelliferae), Tesis UNAM (1987).
2. Bye, R. A. Jr. Medicinal Plants of the Sierra Madre: Comparative Study of Tarahumara and Mexican Market Plants. *Economic Botany*, 40 (1), 103-124 (1986).
3. Bye, R. A. and Linares, E. A study of four medicinal plant complexes of México and adjacent United States. *Journal of Ethnopharmacology*, 19, 153-183 (1987).87).
4. Merewood A. Plants of the Apes. *Wildlife Conservation*, 54 March/April, (1991).
5. Cowen R. Medicine on the Wildside, Animals may rely on a natural pharmacy. *Science News*, 138(18), 280-282 (1990).
6. Banerjee, S. K.; Gupta, B. D.; Sheldrick, William S. and Höfle, G. Angeolide, a Novel Lactone from *Angelica glauca*. *Liebigs Ann. Chem.*, 699 (1982).
7. Bjeldanes, L. F. and Kim, I. Phthalide Components of Celery Essential Oil. *J. Org. Chem.*, 42, 2333 (1977).
8. Bohrmann, H.; Stahl, E. and Mitsuhashi, H. Studies of the Constituents of Umbelliferae Plants XIII. Chromatographic Studies on the Constituents of *Cnidium officinale* Makino. *Chem. Pharm. Bull*, 15, 1606-1608 (1967).
9. Bos, R.; Fischer, F. C. and Gijbels, M. J. M. Volatile

- Components of *Trochiscanthes nodiflora*. *Planta Medica*, 55,212 (1989).
10. Cichy, M.; Wray, V. and Höfle, G. Neue Inhaltsstoffe von *Levisticum officinale* Koch (Liebstöckel). *Liebigs Ann. Chem.*, 397-400 (1984).
  11. 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  $\underline{Z}$ -6.6'-7.3a'-Diligustilide. *Heterocycles*, 27, 1305 (1988).
  12. Fischer, F. C: and Gijbels, M. J. M. cis- and trans-Neocnidilide;  $^1\text{H}$ - and  $^{13}\text{C}$ -NMR Data of Some Phthalides. *Planta Medica*, 77 (1987).87).
  13. Gijbels, M. J. M.; Fischer, F. C.; Scheffer, J. J. C. Baerheim Svendsen, A. Phthalides in Roots of *Apium graveolens*, *Apium graveolens* var. *rapaceum*, *Bifora testiculata* and *Petroselinum crispum* var. *tuberosum*. *Fitoterapia*, LVI (1), 17 (1985).
  14. Gijbels, M. J. M.; Scheffer, J. J. C. and Baerheim S. A., Phthalides in Umbelliferae. *Rivista Italiana E.P.P.O.S. LXI*, 335 (1979).
  - 14b. Mpondo Mpondo, E.; García, J. and Chulia, A. J. New Phthalides from *Gentiana pedicellata*. *Planta Medica*, 297 (1987).
- Chulia, A. J.; García, J. and Mariotte, A. M. Nouveau Glycoside de Phthalide Chez *Gentiana pedicellata*. *J. Nat. Prod.*, 49, 514 (1986).

- García, J.; Mpondo Mpondo, E.; Chulia, A. J. and Mariotte, A. M. 3-(3-hydroxypropyl)-phthalide from *Gentiana pedicellata*. *Planta Medica*, 55, 405 (1989).
- García, J.; Mpondo Mpondo, E.; Chulia, A. J.; Kaouadji, M. and Cartier, G. Two Phthalide Glucosides from *Gentiana pyrenaica*. *Phytochemistry*, 28, 1759 (1989).
15. Gijbels, M. J. M.; Scheffer, J. J. C. and Baerheim Svendsen, A. Analysis of Phthalides from Umbelliferae by Combined Liquid-Solid and Gas-Liquid Chromatography. *Chromatographia*, 14, 452 (1981).
  16. Gijbels, M. J.M.; Scheffer, J. J. C. and Baerheim Svendsen, A. Phthalides in the Essential Oil from Roots of *Levisticum officinale*. *Planta Medica*, 44, 207 (1982).
  17. Kaouadji, M.; Mariotte, A. and Reutenauer, H., Phthalide Derivatives from *Meum athamanticum* Jacq. *Z. Naturforsch*, 39c, 872 (1984).84).
  18. Kaouadji, M.; De Pachtere, F.; Pouget, C.; Chulia, A. J. and Lavaitte, S. Three Additional Phthalide Derivatives, an epoxymonomer and two dimers, from *Ligusticum wallichii* rhizomes. *J. Nat. Prod.*, 49, 872 (1986).
  19. Kaouadji, Mourad and Pouget, Corinne. Additional Phthalide Derivatives from *Meum athamanticum*. *J. Nat. Prod.*, 49, 184 (1986).
  20. Kaouadji, M.; Puech-Baronnat, M. et Mariotte, A.,  $\alpha$ -ligustilidiol, Nouveau Phthalide hydroxyle Isole de *Ligusticum wallichii* Franch. *Tetrahedron Lett.*, 24, 4675 (1983).

21. Kaouadji, M.; Reutenauer, H.; Chulia, A. J. et Marsura A., (Z, Z')Diligustilide, Nouveau Phthalide Dimere Isole de *Ligusticum wallichii* Franch. *Tetrahedron Lett.*, 24, 4677 (1983).
22. Kariyone, T. and Ryohei K., Atlas of Medicinal Plants. pp. 1971. Osaka, Japan. Takeda Chemical Industries, Ltd.
23. Kobayashi, M.; Fujita, M. and Mitsuhashi, H., Components of *Cnidium officinale* Makino: Occurrence of pregnenolone, coniferyl ferulate, and hydroxyphthalides. *Chem. Pharm. Bull.*, 32, 3770 (1984).
24. Kobayashi, M.; Fujita, M. and Mitsuhashi, H., Studies on the Constituents of Umbelliferae Plants XV. Constituents of *Cnidium officinale*: Occurrence of Pregnenolone, Coniferylferulate and Hydroxyphthalides *Chem. Pharm. Bull.*, 35, 1427 (1987).87).87).
25. Kobayashi, M. and Mitsuhashi, H. Studies on the Constituents of Umbelliferae Plants XVII. Structure of Three New Ligustilide Derivatives from *Ligusticum wallichii*. *Chem. Pharm. Bull.*, 35, 4789 (1987).
26. MacLeod, G. and Ames, J. M. Volatile Components of Celery and Celeriac. *Phytochemistry*, 28, 1817 (1989).
27. Mitsuhashi, H. and Muramatsu, T. Studies on the Constituents of Umbelliferae Plants IX. Structure of cnidilide and neocnidilide. *Tetrahedron*, 20, 1971-1982 (1964).
28. Mitsuhashi, H. and Nagai, U. Studies on the Constituents

- of Umbelliferae Plants VII. *Tetrahedron*, 19, 1277 (1963).
29. Mitsuhashi, H.; Nagai, U. Muramatsu, T. and Tashiro, H. Studies on the Constituents of Umbelliferae Plants II. Isolation of the Active Principles of *Ligusticum* Root. *Chem. and Pharm.*, 8, 243 (1960).60).
30. Mitsuhashi, H. and Nomura, M. Studies on the Constituents of Umbelliferae Plants XII. Biogenesis of 3-Butylphthalide. *Chem. Pharm. Bull.*, 14, 777-778 (1966).
31. Pushan, W.; Xuanliang, G.; Yixion, W.; Fukuyama, Y.; Miura, I. and Sugagwara, M. Phthalides from the Rhizome of *Ligusticum wallichii*. *Phytochemistry*, 23, 2033 (1984).
32. Sheu, S. J.; Ho, Y. S.; Chen, Y. P. and Hsu, H. Y. Analysis and Processing of Chinese Herbal Drugs; VI. The Study of *Angelica radix*. *Planta Medica*, 377 (1987).
33. Tsuchida, T.; Kobayashi, M.; Kaneko, K. and Mitsuhashi, H. Studies on the Constituents of Umbelliferae Plants XVI. Isolation and Structure of Three New Ligustilide Derivatives from *Angelica acutiloba*. *Chem. Pharm. Bull.*, 35, 4460. (1987).
34. Hon, P.; Lee, Ch.; Choang, T. F.; Chui, K. and Wong, H. N. C., A ligustilide dimer from *Angelica sinensis*. *Phytochemistry*, 29, 1189 (1990).
35. Jung, D. J.; Porzel, A. and Huneck, S. Gigasol and other Coumarins from *Angelica gigas*. *Phytochemistry*, 30, 710

- (1991).
36. Fleming, I. *Frontier Orbitals and Organic Chemical Reactions*. London: J. Wiley, 1976.
  37. House, H. O. *Modern Synthetic Reactions*. 2ed. Menlo Park, W. A. Benjamin, 1972.
  38. Izumi, Y. and Tai, A. *Stereo-differentiating Reactions: The Nature of Asymmetric Reactions*. New York: Academic Press, 1977.
  39. Carruthers, W. *Some Modern Methods of Organic Synthesis*. 3<sup>rd</sup>ed. Cambridge University, 1986.
  40. Ward, D. E.; Rhee, Ch. K. and Zoghaib. A General Method for the Selective Reduction of Ketones in the Presence of Enones. *Tetrahedron Lett.*, 29, 517 (1988).
  41. Meyer, B. N.; Ferrigni, N. R.; Putnam, J. E.; Jacobsen, L. B.; Nichols, D. E. and McLaughlin, J. L. Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. *Planta Medica*, 31 (1982).
  42. Alltech Associates Inc. Catalog 70, 86 (1985).
  43. Masada, Y. *Analysis of Essential Oils by Gas Chromatography and Mass Spectrometry*. New York, John Wiley and Sons Inc., 1976.
  44. Cornu, A. and Massot, Q. M. *Compilation of Mass Spectral Data*. 2nd. Ed. vol 1 and 2, London, Hyden, 1975.