



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

ESTUDIO DE LA REACTIVIDAD DE Z-LIGUSTÍLIDA. PREPARACIÓN DE
DERIVADOS Y EVALUACIÓN BIOLÓGICA.

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA
Q. JOSÉ LUIS GONZÁLEZ ÁVILA

TUTOR:
DR. EDUARDO GUILLERMO DELGADO LAMAS
INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM

MÉXICO, D.F. AGOSTO DE 2015



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.

JURADO

Dr. Alfonso Romo de Vivar Romo	Presidente
Dra. María Isabel Aguilar Laurents	Vocal
M. en C. Emma Maldonado Jiménez	Vocal
Dr. Eleuterio Burgueño Tapia	Vocal
Dr. Marcos Hernández Rodríguez	Secretario

Este trabajo se realizó en el Laboratorio 1-C del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la tutoría del Dr. Guillermo Delgado Lamas.

Parte de los resultados de esta investigación se presentaron en el congreso QUIMIUNAM 2015, celebrado del 22 al 24 de abril de 2015 en Ciudad Universitaria, D.F., México.

Q. José Luis González Ávila
Sustentante

Dr. E. Guillermo Delgado Lamas
Tutor

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada (número de becario 294731).

A la Coordinación y al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y al Instituto de Química, por poner a mi disposición sus recursos para la realización de este trabajo.

Al Dr. Guillermo Delgado Lamas, por la asesoría y el apoyo brindados durante la realización del trabajo experimental y la escritura de este documento.

A los miembros del jurado, los Doctores Alfonso Romo de Vivar Romo, María Isabel Aguilar Laurents, Eleuterio Burgueño Tapia, Marcos Hernández Rodríguez y la M. en C. Emma Maldonado Jiménez por sus oportunos y acertados comentarios para la mejora de este trabajo.

Al personal técnico del Instituto de Química, especialmente a las doctoras Beatriz Quiroz García y María Isabel Chávez Uribe, así como a la M. en C. Elizabeth Huerta Salazar y la Q. María de los Ángeles Peña González, del laboratorio de resonancia magnética nuclear; a la Q.F.B. María del Rocío Patiño Maya, del laboratorio de espectroscopía y polarimetría; al Dr. Francisco Javier Pérez Flores y al I. Q. Luis Velasco Ibarra, del laboratorio de espectrometría de masas; y a los M. en C. Antonio Nieto Camacho y María Teresa Ramírez Apán, del laboratorio de pruebas biológicas.

A mis compañeros del laboratorio 1C, especialmente a Eunice Ríos Vázquez, Fabiola Angélica López Huerta y Fernando Novillo, por su amistad, consejos y apoyo. También a la Dra. Alejandra León Cabrera por su amistad y los consejos brindados para la realización de este trabajo.

Finalmente, un agradecimiento personal a mi familia: a mi mamá, por su amor, apoyo e invaluable ejemplo; a mi hermana, por su compañía y cariño; y a mi tía, por su amor. Sin ustedes, no habría logrado culminar este trabajo

ÍNDICE

1. Introducción.....	13
2. Antecedentes.....	15
2.1 <i>Ligusticum porteri</i> y Z-ligustílida.....	15
2.1. Síntesis orientada a la diversidad.....	27
3. Justificación.....	29
4. Objetivos.....	30
5. Hipótesis.....	31
6. Resultados y discusión.....	32
6.1. Reducción de Z-ligustílida (1).....	32
6.10. Actividad biológica.....	59
6.2. Reacción de Alder-Rickert de sedanenólida (33).....	35
6.3. Reacción de Z-ligustílida (1) con PhNHNH ₂	37
6.4. Hidrólisis de Z-ligustílida (1).....	39
6.5. Reacción entre 36 y PhNHNH ₂	43
6.6. Reacción entre 36 y NH ₂ OH.....	45
6.7. Reacción de 36 con NH ₂ NH ₂	54
6.8. Hidrólisis de 2	55
6.9. Reacción de 42 con PhNHNH ₂	58
7. Conclusiones.....	62
8. Sección experimental.....	63
9. Referencias.....	75

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Metabolitos secundarios de <i>L. porteri</i>	16
Figura 2. Estructura de ftálida y numeración.	16
Figura 3. Dímeros lineales de 1	18
Figura 4. Cicloaductos de Diels-Alder de <i>Z</i> -ligustílida (1) y (a) anhídrido maleico; (b) acrilato de etilo; (c) ácido acrílico; (d) alcohol alílico; (e) ADDM; y, (f) propiolato de etilo.	23
Figura 5. Fotociclodímeros sintéticos de 1	24
Figura 6. Derivados de 1	27
Figura 7. Espectros RMN ¹ H apilados de (a) En la parte superior, el crudo de reacción entre 1 y PhNHNH ₂ ; (b) En medio, el compuesto 1 puro; y, (c) En la parte inferior, PhNHNH ₂ pura.	39
Figura 8. Espectros apilados de RMN ¹ H de 1 (inferior) y 36 (superior).....	42
Figura 9. Espectro de RMN ¹³ C de 36 (probablemente en equilibrio con 37).....	43
Figura 10. Estructura de 39	46
Figura 11. Espectro de masas de 39	47
Figura 12. Fragmentos de la estructura del producto menos polar entre 36 y NH ₂ OH.....	48
Figura 13. Estructura del compuesto 40	49
Figura 14. Reacción de 36 con NH ₂ NH ₂ ·2HCl.....	55

Figura 15. Compuestos evaluados.....	60
--------------------------------------	----

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1. Formación de ftálicas diméricas a través de reacciones de Diels-Alder de dos moléculas de Z-ligustílida (1).....	18
Esquema 2. Formación de 11	19
Esquema 3. Otros carbocationes en la formación de dímeros lineales.....	20
Esquema 4. Formación del dímero lineal 12	20
Esquema 5. Formación del dímero lineal 13	21
Esquema 6. Mecanismo de reacción para la formación de 14	22
Esquema 7. Reducción de 1 con LiAlH ₄	33
Esquema 8. Mecanismo de formación de 33	35
Esquema 9. Propuesta de reducción de 33	35
Esquema 10. Reacción entre 33 y ADDM.	36
Esquema 11. Mecanismo de reacción de Alder-Rickert entre 33 y ADDM.	37
Esquema 12. Hidrólisis de 1	40
Esquema 13. Equilibrio cetoéster-acetal.	42
Esquema 14. Reacción entre 36 y PhNHNH ₂	43
Esquema 15. Mecanismo de reacción para formación de 38	45
Esquema 16. Reacción entre 36 y NH ₂ OH.....	49

Esquema 17. Formación de la oxima 41 a partir del cetoácido 36 y $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$	50
Esquema 18. Mecanismo de reacción para la formación de 39	50
Esquema 19. Mecanismo de formación de 40	51
Esquema 20. Reacción entre 36 y $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ en presencia de Et_3N	52

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Condiciones de reacción y rendimiento para las reacciones de 1	33
Tabla 2. Condiciones ensayadas para llevar a cabo la reacción entre 1 y PhNHNH_2	38
Tabla 3. Condiciones de hidrólisis.	40
Tabla 4. Exploración de reacción entre 1 y $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$	45
Tabla 5. Resultados de evaluación antiinflamatoria en el modelo de inflamación auricular murina de los compuestos obtenidos en este trabajo.....	60
Tabla 6. Evaluación de actividad citotóxica de algunos compuestos preparados en este trabajo.	61

ÍNDICE DE ESPECTROS

Espectro 1. RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) de 1	i
Espectro 2. RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de 33	ii
Espectro 3. RMN ^{13}C (126 MHz, CDCl_3) de 33	iii
Espectro 4. RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de 34	iv

Espectro 5. RMN ^{13}C (126 MHz, CDCl_3) de 34 .	v
Espectro 6. RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de 35 .	vi
Espectro 7. RMN ^{13}C (126 MHz, CDCl_3) de 35 .	vii
Espectro 8. RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) de 36 .	viii
Espectro 9. RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de 36 .	ix
Espectro 10. RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de 38 .	x
Espectro 11. RMN ^{13}C (126 MHz, CDCl_3) de 38 .	xi
Espectro 12. RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de 39 .	xii
Espectro 13. RMN ^1H (126 MHz, CDCl_3) de 39 .	xiii
Espectro 14. RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de 40 .	xiv
Espectro 15. RMN ^1H (126 MHz, CDCl_3) de 40 .	xv
Espectro 16. RMN ^1H (126 MHz, CDCl_3) de 42 .	xvi
Espectro 17. RMN ^1H (126 MHz, CDCl_3) de 42 .	xvii

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS DE USO COMÚN

AcOEt- Acetato de etilo.

ADDM- Acetilendicarboxilato de dimetilo.

ADTR- Análisis directo en tiempo real.

c- Señal cuádruple.

°C- Grado Celsius.

c.c.f.- Cromatografía en capa fina.

CDCl₃- Cloroformo deuterado.

CD₃OD- Metanol deuterado.

CHCl₃- Cloroformo.

CH₂Cl₂- Cloruro de metileno.

COSY- Espectroscopia de Correlación (Correlation Spectroscopy).

d- Señal doble.

dd- Señal doble de dobles.

ddd- Señal doble de doble de dobles.

dt- Señal doble de triples.

δ- Desplazamiento químico.

DART- Análisis directo en tiempo real (Direct Analysis in Real Time)

DEPT- Aumento sin distorsión por transferencia de polarización (Distortionless

EM- Espectrometría de masas.

Enhancement by Polarization Transfer).

Et₂O- Éter etílico.

EtOH- Etanol.

HMBC- Correlación Heteronuclear de Múltiples Enlaces (Heteronuclear Multiple Bond Correlation).

Hz- Hertz.

Hex- Hexano.

h- Señal hepteto.

IES- Ionización con electrospray.

J- Constante de acoplamiento.

L- Litro.

LiAlH_4 - Hidruro de litio y aluminio (tetrahidroaluminato de litio).

m- Multiplete.

MeOH- Metanol.

Me_2CO - Acetona.

mL- Mililitro.

MHz- Megahertz.

NOESY- Espectroscopia de Efecto Nuclear Overhauser (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy).

p- Penteto (señal quintuple).

P_f - Punto de fusión.

Ppm- Partes por millón.

RMN- Resonancia Magnética Nuclear.

RMN ^1H - Resonancia Magnética Nuclear de hidrógeno.

RMN ^{13}C - Resonancia Magnética Nuclear de carbono 13.

s- Singulete.

sext- sexteto

THF- tetrahidrofurano.

TMS- Tetrametilsilano.

UV- Espectroscopia de ultravioleta.

1. INTRODUCCIÓN

Los productos naturales han sido empleados en el tratamiento de enfermedades a lo largo de la historia de la humanidad. El uso de la quinina, aislada de especies vegetales del género *Cinchona*, como antimalárico,¹ y del ácido acetilsalicílico, derivado semisintético del ácido salicílico, que se obtiene de la corteza de especies de *Salix* de uso tradicional para el tratamiento de fiebre,² son ejemplos de la relevancia de los usos etnomédicos en la terapéutica moderna, y la relevancia de los fitoquímicos y sus derivados en ese mismo campo.

A pesar de que la medicina tradicional puede ser una fuente fértil de desarrollo de fármacos modernos, el uso de esos compuestos (naturales y semisintéticos) implica un tránsito por diversas etapas, cada una de las cuales implica un reto científico que tiene que ser abordado de forma multidisciplinaria, comenzando por el uso etnomédico, continuando por su aislamiento y/o síntesis, la determinación de los mecanismos de acción y las pruebas clínicas y desarrollo.³ Por lo tanto, la química tiene importancia en el aislamiento y síntesis de estos compuestos.

México, con la vasta biodiversidad que ostenta, también tiene ejemplos importantes de remedios de origen vegetal en la medicina tradicional desde la época precolonial, y que en algunos casos se preservan hasta nuestros días. Los resultados de estudios científicos han correlacionado con ciertas aplicaciones etnomédicas en enfermedades importantes como la diabetes.⁴ Por lo anterior, resulta evidente la relevancia de continuar con los esfuerzos científicos en este sentido, en particular en química.

Aproximadamente 10% de las moléculas pequeñas empleadas como fármacos son compuestos de origen natural, y 29% derivados semisintéticos. Generalmente los productos naturales tienen una complejidad estructural mayor, que se refleja especialmente en la cantidad de ciclos y centros estereogénicos, en comparación con los compuestos sintéticos y en ocasiones es difícil la preparación sintética de los productos naturales.⁵

Estimaciones de la dimensión del espacio químico, aun delimitándolo (hay alrededor de 10^{60} moléculas con peso menor a 500 Da), proporcionan evidencia de la importancia de su exploración, por lo que la química puede ser llevada hacia esa parte desconocida, en respuesta a la presión que significa la necesidad de nuevos compuestos de bajo peso molecular como fármacos.⁶

En ese contexto, este trabajo se refiere a la preparación de derivados de una ftálide aislada de *Ligusticum porteri*, una planta usada en la medicina tradicional mexicana con actividad biológica diversa.⁷ Con ello se pretende aportar conocimiento sobre la reactividad del fitoquímico, a la par que se efectúa un ejercicio exploratorio del espacio químico en la búsqueda de compuestos con actividad antiinflamatoria y citotóxica.

2. ANTECEDENTES

2.1. *Ligusticum porteri* y Z-ligustílida

La planta *Ligusticum porteri* (Umbelliferae), conocida comúnmente como chuchupate u oshá, es empleada en la medicina tradicional del norte de México y sur de Estados Unidos, para el tratamiento de padecimientos como resfriados, dolor estomacal, dismenorrea, entre otros.⁸

A través de estudios químicos de *L. porteri*, se ha determinado que un grupo importante de los metabolitos que produce la planta son ftálicas, destacando Z-ligustílida (**1**), Z-butilidenftálica (**2**), las mezclas racémicas de toquinólida B (*rac*-**3**), diligustílida (*rac*-**4**) y riligustílida (*rac*-**5**), senquiunólida F (**6**), senquiunólida I (**7**) y otros compuestos, como isovainillina (**8**), ácido ferúlico (**9**), ferulato de coniferilo (**10**), entre otros (ver Figura 1).^{9,10}

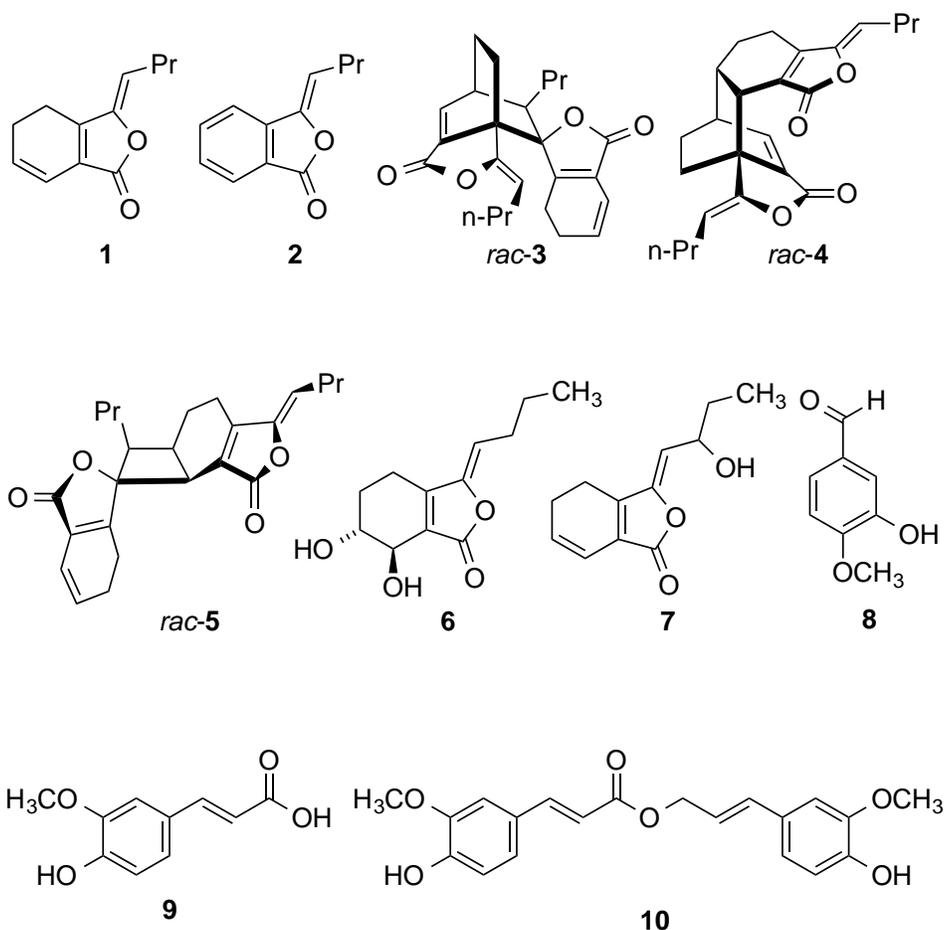


Figura 1. Metabolitos secundarios de *L. porteri*

Las ftálicas (Figura 2) son metabolitos secundarios comunes de las plantas de la familia Umbelliferae,¹¹ con la particularidad de que, proviniendo de estas fuentes, el carbociclo puede estar parcial o totalmente hidrogenado y no se encuentra sustituido, a diferencia del anillo furanoide, que se encuentra sustituido en la posición 3 por alquilos o alquilidenos.^{11b}

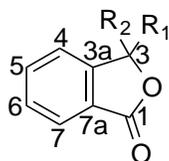


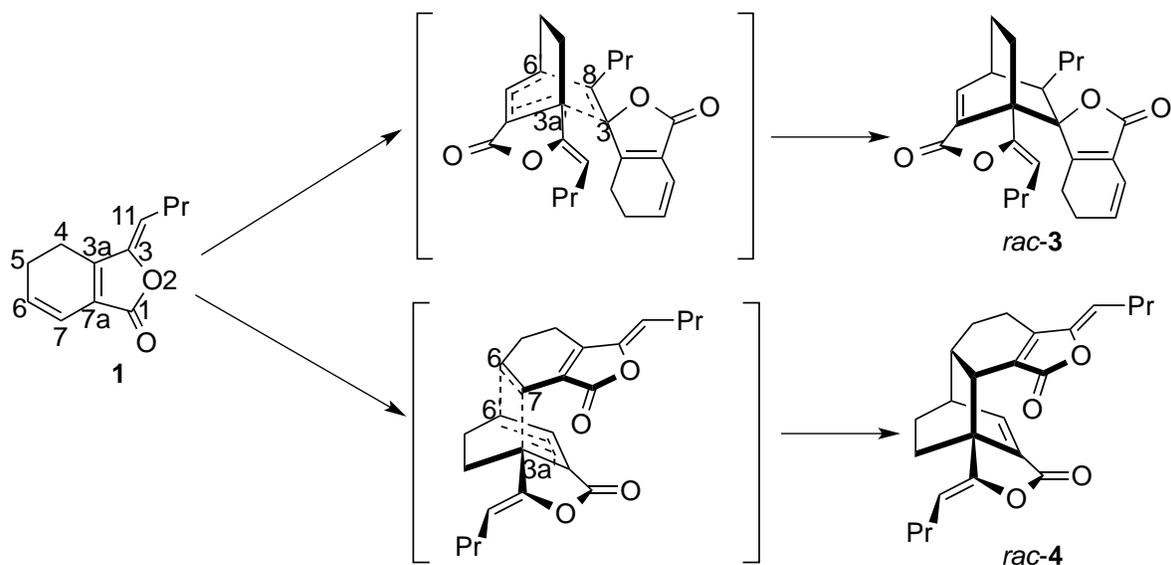
Figura 2. Estructura de ftálica y numeración

La ftálica *Z*-ligustílida (**1**) es notable por la abundancia relativa con que se encuentra en *L. porteri*,^{9a,10,12} además de la variedad de actividad biológica que posee, *verbi gratia*, sedante y espasmolítica,¹⁰ neuroprotectora,^{11d,13} moduladora de la resistencia de *Staphylococcus aureus* contra norfloxacina,¹⁴ antiinflamatoria,¹⁵ antinociceptiva,¹⁶ entre otras.^{11a,17}

Un aspecto notable en la estructura aparentemente simple de *Z*-ligustílida (**1**), es el ciclohexadieno homoanular (ver Figura 1), donde resulta evidente que el compuesto puede reaccionar con dienófilos en reacciones de Diels-Alder. De hecho, las ftálicas diméricas toquinólida B (*rac*-**3**) y diligustílida (*rac*-**4**) se pueden ver como productos de esta reacción entre dos moléculas de **1**, actuando como dienófilos la olefina C3-C8 y C6-C7, respectivamente, como se muestra en el Esquema 1.

El hecho de que las ftálicas **3**, **4** y **5** se hayan aislado como racematos ha sido objeto de controversia sobre su origen natural. Así, Lin *et al.*¹⁸ afirmaron que *rac*-**3** es un artefacto y no metabolito secundario de *Ligusticum chuangxiong*.

Sin embargo, hay gran cantidad de evidencias del origen natural de estos dos compuestos. Wakamatsu *et al.*¹⁹ prepararon *rac*-**3** y *rac*-**4** con rendimientos muy bajos, de hasta 26% y 3%, respectivamente, lo que aunado con otras observaciones, como la dificultad para prepararlos por medio de catálisis con ácidos de Lewis,²⁰ o por calentamiento con microondas,²¹ da evidencia de que estos productos son productos naturales, a pesar de que se encuentran como mezclas racémicas. Estas evidencias confirman el trabajo previo de Mitsuhashi y colaboradores,²² quienes observaron que las ftálicas diméricas no se forman a partir del calentamiento de **1** en benceno, tolueno ni xileno, ni almacenándolo por 6 meses a temperatura ambiente, además de que el contenido de los dímeros en los extractos frescos y añejados de *Angelica acutiloba* es constante. Por lo anterior concluyeron que estos son componentes originales de la planta.



Esquema 1. Formación de ftálicas diméricas a través de reacciones de Diels-Alder de dos moléculas de Z-ligustílida (**1**).

En el intento del grupo de Delgado para obtener los dímeros *rac-3* y *rac-4* a partir de **1**, por medio de catálisis con ácidos de Lewis, específicamente Et_2OBF_3 y SnCl_4 , se obtuvieron los dímeros **11-14** (Figura 3), unidos por un solo enlace carbono-carbono, en lugar de la formación del ciclohexadieno que se formaría por la reacción de Diels-Alder, lo que sugiere que se siguieron mecanismos iónicos para formar los compuestos.¹⁹

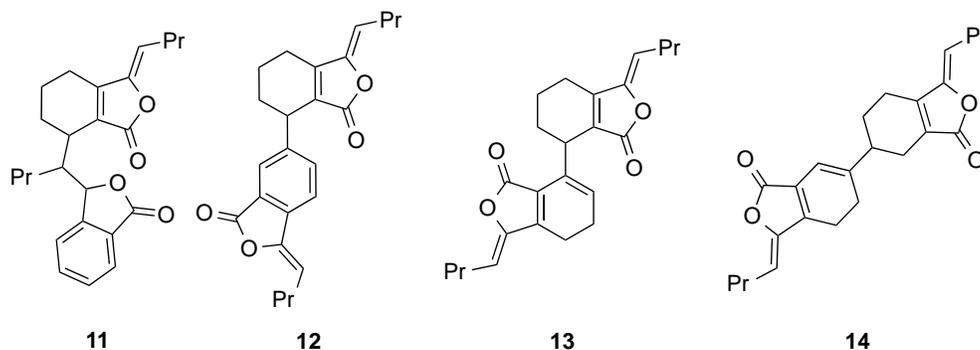
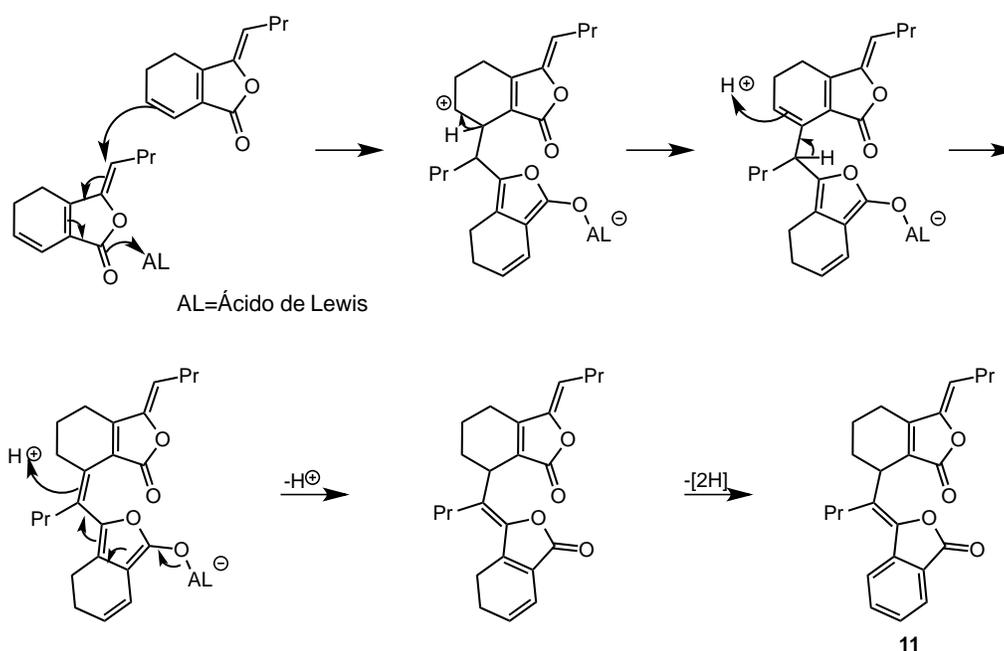


Figura 3. Dímeros lineales de **1**

Los autores racionalizan la observación anterior por medio de la formación de carbocationes al ocurrir la complejación del ácido de Lewis con el oxígeno del carbonilo o

los carbonos olefínicos, lo que en lugar de facilitar la reacción de Diels-Alder, lleva a mecanismos iónicos.

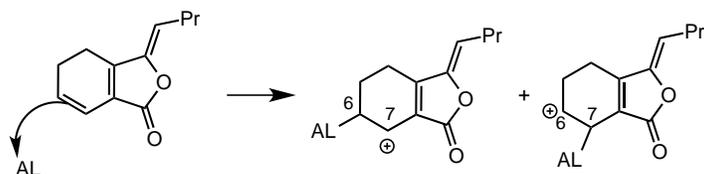
Como se muestra en el Esquema 2, se propone que el producto mayoritario se forma por un ataque nucleofílico de los electrones del doble enlace de la olefina C6-C7 al carbono C8 de otra molécula de **1**, en una adición conjugada 1,6, que es facilitada por la complejación del ácido de Lewis con el oxígeno. Isomerizaciones posteriores a través de reacciones de transferencia de hidrógeno llevan al ciclohexadieno que se deshidrogena para formar el producto observado, con rendimiento de 20%.



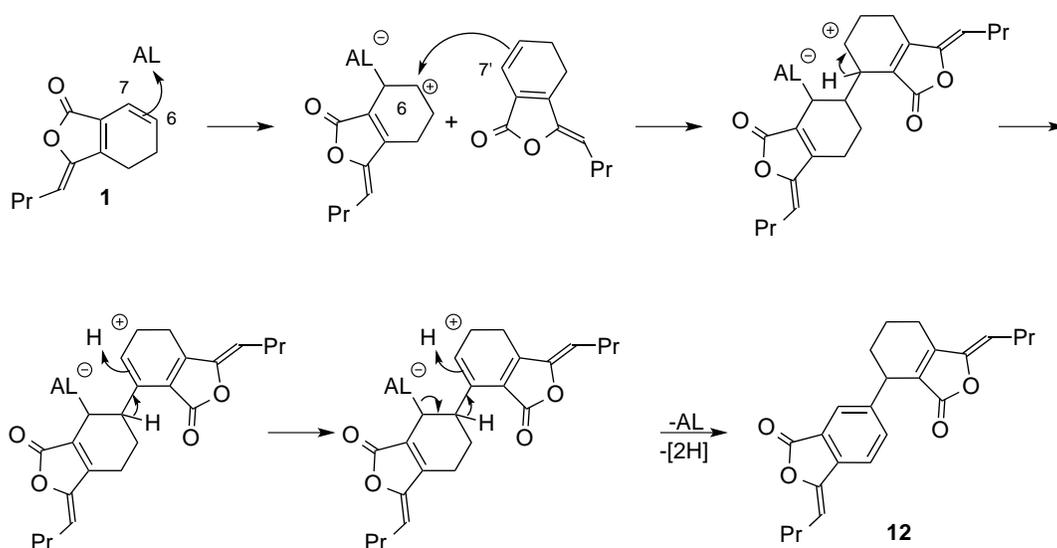
Esquema 2. Formación de **11**.

De modo similar, la formación de los dímeros **12-14** se explica porque la presencia del ácido de Lewis promueve la adición 1,2 de la olefina C6-C7 de **1** al doble enlace C6-C7 de otra molécula de *Z*-ligustilida, al cual se une el ácido de Lewis. Aunque los autores mencionan una baja nucleofilia y regioselección de este doble enlace, llama la atención que el segundo compuesto mayoritario corresponde al carbocatión alílico como intermediario, con carga formal en C7, más estable que el carbocatión secundario que se forma cuando el ácido de Lewis se une a este mismo carbono (ver Esquema 3), lo que

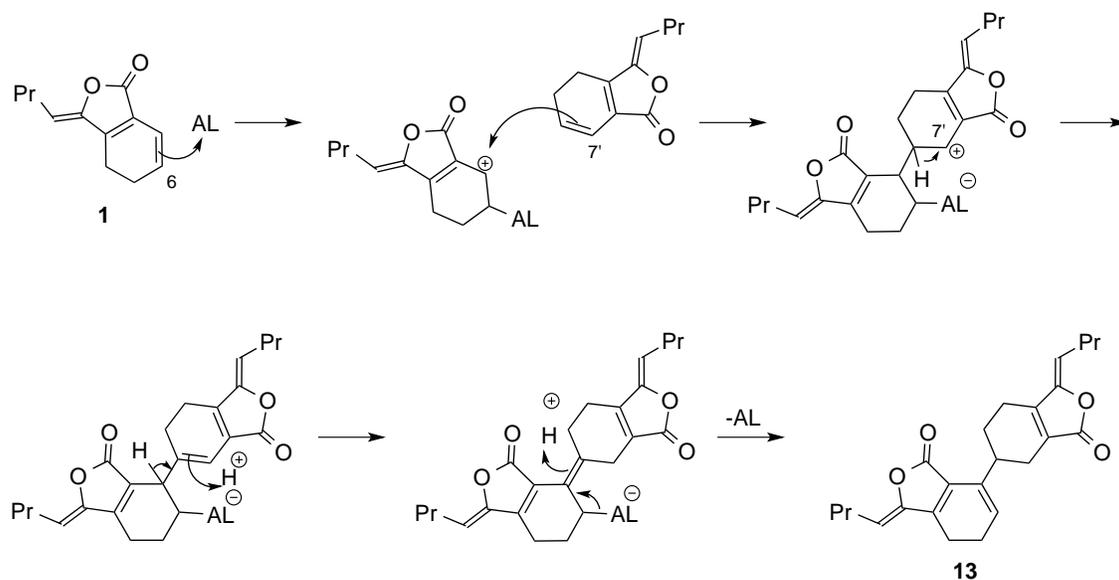
podría explicar el rendimiento más de 10 veces mayor en la formación de **14** (16%), en relación con **12** (1.4%) y **13** (1.2%), lo que parece indicar una leve regioselección en la coordinación del ácido de Lewis con la olefina.



Esquema 3. Otros carbocationes en la formación de dímeros lineales



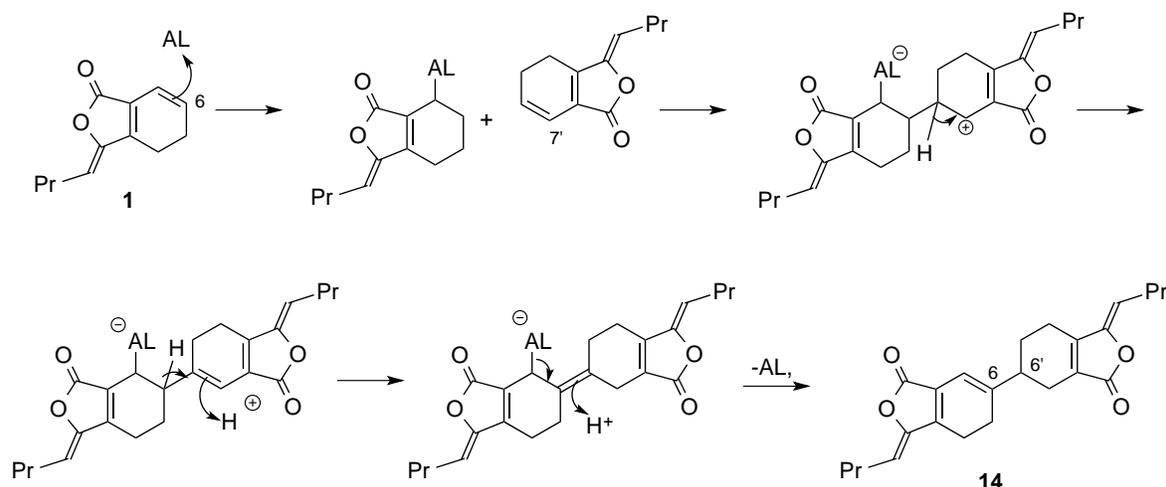
Esquema 4. Formación del dímero lineal **12**



Esquema 5. Formación del dímero lineal **13**

Para la formación de **12** y **13** (Esquemas 4 y 5), se coordina el ácido de Lewis con C7 de **1**. Posteriormente hay un ataque nucleofílico de la olefina C6-C7 de otra unidad de **1**, llevándose a cabo la unión del carbono C7 de la primera unidad con C7 o C6 de la segunda, para los intermediarios necesarios para **12** y **13**, respectivamente. Sucesivas reacciones de intercambio de protón, la descoordinación del ácido de Lewis y una aromatización en el caso de **12**, explican la formación de estos dímeros minoritarios.

Para que se forme **14** (Esquema 6), el ácido de Lewis se coordina con el carbono C7 de **1** lo que dejaría una carga formal sobre C6, que es atacado por el carbono C6 de la olefina C6-C7 de otra unidad de **1**; equilibraciones sucesivas explican la formación de **14**.



Esquema 6. Mecanismo de reacción para la formación de **14**

También se ha hecho reaccionar **1** con diferentes dienófilos. Por ejemplo, Mitsuhashi *et al.*²³ exploraron la reacción con anhídrido maleico para llevar a cabo la elucidación estructural de esta ftálica, con el fin de discernir si el dieno se encontraba conjugado o no obteniendo **15a** (Figura 4(a)).

Ese mismo compuesto (**15a**) y otros aductos de Diels-Alder fueron obtenidos a partir de **1** por Delgado y colaboradores (Ver Figura 4).²⁴ Sin embargo, en este trabajo notaron la formación de los isómeros *endo* y *exo* (**15a** y **15b**) en una proporción de 3:1. La reacción con acrilato de etilo también fue estereoselectiva, siendo predominante la formación de **16a** con respecto a **16b**; la regioselectividad se racionaliza por medio de cálculos teóricos, debido a que la unión de los carbonos C6 y C3a de **1** al carbono C3 y C2 del acrilato de etilo, respectivamente, no es favorable al considerar los coeficientes y las fases de los orbitales, por lo que la formación de los regioisómeros **16c** y **16d** es minoritaria.

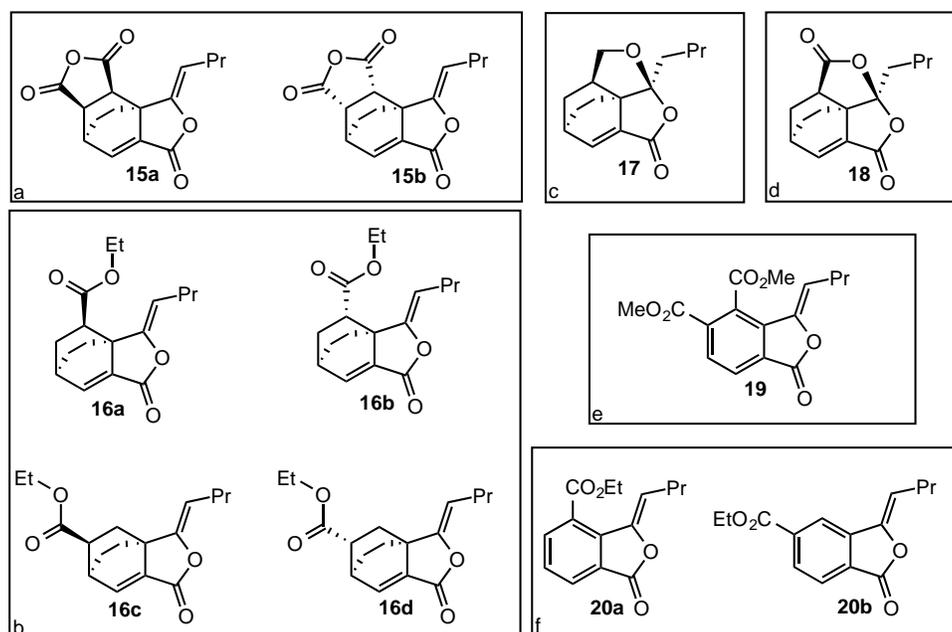


Figura 4. Cicloaductos de Diels-Alder de *Z*-ligustílida (**1**) y (a) anhídrido maleico; (b) acrilato de etilo; (c) alcohol alílico; (d) ácido acrílico; (e) ADDM; y, (f) propiolato de etilo

Por otro lado, la reacción de **1** con alcohol alílico procede solo en presencia de *p*-TsOH y es también regio- y estereoselectiva, puesto que sólo se observa el aducto **17**, lo que sugiere que primero ocurre la cicloadición, formándose mayoritariamente el producto *endo*, que continúa reaccionando en presencia del ácido mediante la adición del hidroxilo a la olefina C3-C8 proveniente de **1** por la cara *si* de C3, que es la única accesible. La reacción con ácido acrílico para la formación de **18** se puede explicar por un argumento similar.

Finalmente, en el mismo estudio se llevó a cabo la reacción entre **1** y acetilendicarboxilato de dimetilo (ADDM) o propiolato de etilo. En ambos casos ocurre una reacción de Alder-Rickert para formar los compuestos aromáticos **19**, **20a** y **20b**, análogos sustituidos de *Z*-butilidenftálida (**2**), siendo notable la regioselectividad para la formación de **20a** en el último caso.

La presencia de tres dobles enlaces carbono-carbono también ha llevado a la exploración de la reactividad de **1** por medio de cicloadiciones [$_{\pi}2_s + \pi 2_s$], permitidas en

condiciones fotoquímicas, teniendo en cuenta que riligustólida (**5**) es un dímero de este tipo, que efectivamente se obtuvo, además de los dímeros **21**, **22** y **23** (los dos últimos obtenidos también como producto natural de *A. sinensis*)²⁵. El producto **21** fue mayoritario lo que es explicado por medio de cálculos teóricos, en los que se encontró que las interacciones entre los orbitales moleculares (ocupados por un electrón) más alto y más bajo en energía (HSOMO y LSOMO, respectivamente, por sus siglas en inglés), son más favorables para el doble enlace C3-C8, considerando la reactividad por medio de cicloadición; y también por el análisis de carga de Mülliken, que sugiere la preferencia de ese mismo doble enlace considerando la reactividad dirigida por la carga.²⁶

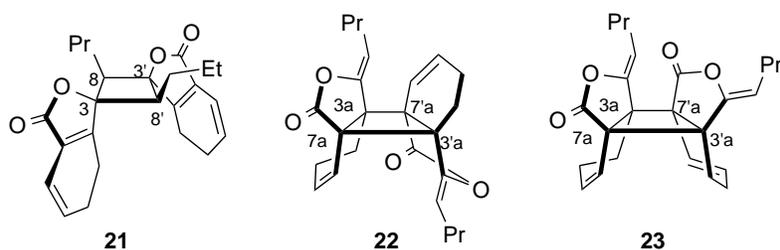


Figura 5. Fotociclodímeros sintéticos de **1**

Una característica de *Z*-ligustólida (**1**) es su inestabilidad, que ha sido ampliamente estudiada.

Pauli *et al.*²⁷ llevaron a cabo una evaluación de la pureza y estabilidad de *Z*-ligustólida aislada de *Angelica sinensis*, por medio de resonancia magnética nuclear cuantitativa (RMNc) y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM). Encontraron que **1** se descompone rápidamente al ser almacenada en CDCl₃, lo que difería del estudio de estabilidad en CHCl₃, atribuyendo la diferencia a la cantidad de fosgeno o ácido clorhídrico presente en el disolvente deuterado, que se descompone al ser expuesto a la luz. Los otros disolventes que se probaron fueron *n*-hexano, metanol, DMSO y una mezcla de hexano-acetato de etilo-agua-metanol (9:1:9:1), siendo este en el que aumenta la estabilidad de **1**. También llevaron a cabo la degradación forzada de **1**, encontrando tanto por RMNc como por CG-EM que el compuesto se transforma

sucesivamente a un epóxido, 4,5-dihidro-3-hidroxi-8-oxabutilftálida, butiraldehído y anhídrido ftálico.

Lin *et al.*¹⁸ observaron que Z-ligustílida (**1**) se transforma a las ftálicas diméricas diligustílida (*rac*-**3**) y riligustílida (*rac*-**5**) por acción de la luz y en los dioles *rac*-**6** y su epímero *rac-epi*-**6**, por acción del oxígeno del aire, concluyendo que estos compuestos son producto de la alteración postcosecha de los compuestos presentes en *L. chuangxiong*.

Hu y colaboradores establecieron que la descomposición de **1** es favorecida por factores como la temperatura, la luz y el oxígeno. Entre estos, la luz tiene un efecto más perceptible, así como el uso de disolventes miscibles en agua o el almacenamiento en agua. En cambio, cuando se agregan antioxidantes a Z-ligustílida (**1**) almacenada, su degradación es retrasada. Estas evidencias muestran que las reacciones de oxidación, hidrólisis y fotoquímicas tienen profunda influencia en la estabilidad de **1**.²⁸

Otra evidencia de la labilidad de Z-ligustílida es la que aportaron Lau y colaboradores, quienes analizaron la composición química de los extractos crudos de raíces de *Angelica sinensis* (RAS) y rizoma de *L. chuangxiong* (RC) por medio de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas de triple cuadrupolo (CG-EMTC), y compararon con los extractos de las mismas plantas después de tratamiento con vino. Para el análisis por CG-EMTC, se usaron como marcadores químicos Z-ligustílida (**1**), Z-butilidenftálida (**2**), ácido ferúlico (**10**), butilftálida (**24**), senquiunólida A (**25**). Se encontraron diferencias en el contenido de estos compuestos después del tratamiento con vino en la composición química de RAS y RC. En la primera, la cantidad de Z-ligustílida (**1**) y Z-butilidenftálida (**2**) disminuyeron; la proporción de ácido ferúlico (**10**) aumentó y no hubo variaciones significativas en el contenido de butilftálida (**24**) ni de senquiunólida A (**25**). Por otro lado, la composición química de RC después del tratamiento con vino también cambió: la cantidad de **10** aumentó en 20% en relación con el extracto crudo; la cantidad de **24** y **25** disminuyó y la de **1** y **2** permanecieron constantes. En este mismo estudio se estableció que es posible discernir entre los extractos de RAS y RC con base en el contenido de estos marcadores químicos. Además se mostró que la estabilidad de las

ftálidas podría depender del contenido de otros compuestos químicos, como se desprende del contraste en las variaciones químicas de ambos extractos antes y después del tratamiento con vino.²⁹

Xiao *et al.* también observaron que *Z*-ligustílida (**1**) al ser almacenada bajo la luz directa del sol a temperatura ambiente se transforma, primero en (3*Z*)-6,7-epoxiligustílida (*Z*-**26**), que se hidroliza para formar el diol *trans* (*rac*-**6**), y este a su vez se isomeriza al diol *cis*; o también ocurre que se isomeriza el doble enlace exocíclico para formar el epóxido *E* (*E*-**26**), que también se hidroliza para formar el diol *rac*-**27**.³⁰

Mitsuhashi y colaboradores reportaron la epoxidación con ácido *meta*-cloroperbenzoico (AMCPB) seguida de hidrólisis básica de ligustílida. Los productos fueron senquiunólida H (**25**) y senquiunólida I (**7**),³¹ así como la formación de senquiunólida L (**25**).³² Además, también prepararon diversos derivados con la finalidad de determinar la estructura de *Z*-ligustílida (**1**), sometiendo este compuesto a hidrogenación, de donde se obtuvo butilftálida (**24**), y las ftálidas di- y tetrahidroligustílida (**28** y **29**).²³ También obtuvieron un dialdehído por calentamiento de **1**.²²

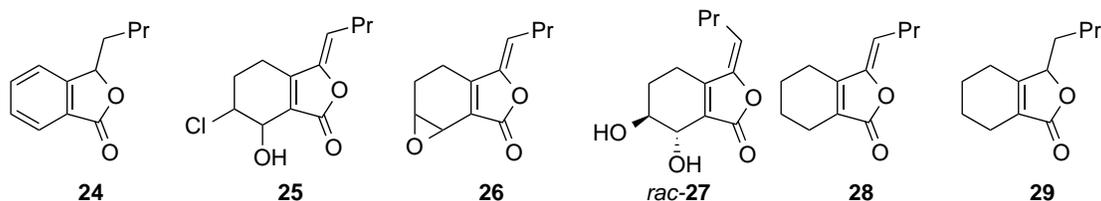


Figura 6. Derivados de **1**.

Beck y Stermitz hicieron reaccionar **1** con bencilamina y tioglicolato de metilo, obteniendo el producto **30**, derivado de la adición de bencilamina. El segundo nucleófilo dio una mezcla de productos: **31**, derivado de una adición conjugada 1,6; **32**, de una adición 1,2; y el producto **33** disustituido. Estos resultados están de acuerdo con la teoría de ácidos y bases duros y blandos, porque la bencilamina, como base más dura (con respecto al azufre), atacó al carbonilo de **1**, que es un ácido más duro que las olefinas (ácidos más blandos), sitios donde se unió el nucleófilo de azufre, que es una base más blanda.³³

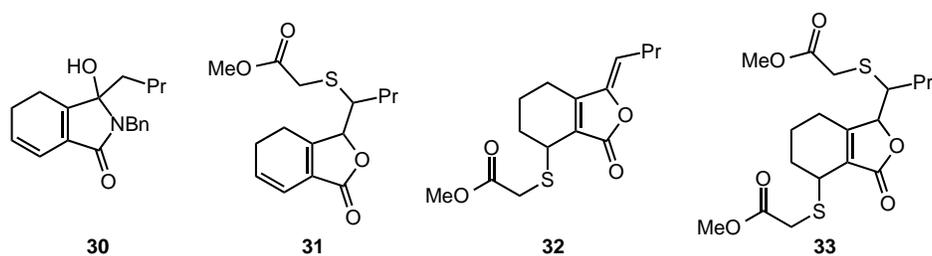


Figura 7. Derivados de **1**

2.1. Síntesis orientada a la diversidad

Los productos naturales han sido y siguen siendo una fuente de obtención de derivados semisintéticos que se emplean como fármacos. De las aprobaciones totales de la *Food and Drug Administration* (FDA) de nuevos fármacos de 2000 a 2010, el 50% está relacionado con productos naturales o sus derivados, que en muchas ocasiones poseen una mayor actividad. La química sintética es importante en la construcción de bibliotecas de estos derivados, mediante herramientas como la síntesis combinatoria a partir de esqueletos de productos naturales, o la síntesis de compuestos miméticos de estos.³⁴

No todos los compuestos son activos desde el punto de vista biológico. Por lo tanto, las síntesis que parten de productos naturales o se dirigen hacia estructuras privilegiadas tienen mayor potencial de tener determinada actividad biológica. También hay enfoques en los que las sustancias se prueban en una gran variedad de actividades biológicas, en las que intervienen diferentes mediadores, para probar la capacidad de interacción de los compuestos de bajo peso molecular con las biomacromoléculas involucradas.³⁵

La síntesis orientada a un objetivo está enfocada a la preparación de compuestos que pueden ser fármacos o candidatos a fármacos. El análisis retrosintético es la herramienta indispensable para este enfoque, cuya exploración se sirve también de la preparación de una biblioteca de compuestos con características estructurales similares, que tengan el potencial para enlazarse a una proteína previamente seleccionada como blanco.

Por el contrario, la síntesis orientada a la diversidad no está encaminada a la síntesis de un objetivo en específico, ni a la posible unión con una proteína en particular; en consecuencia, el análisis retrosintético no es aplicable, sino que se busca la síntesis de muchos compuestos complejos con diversas estructuras. Este tipo de síntesis se analiza de los reactivos hacia los productos, y si bien aun no hay un conjunto de principios que guíen su planeación, es útil el uso del análisis conformacional y de rutas sintéticas que incrementen la ramificación, para que permitan la unión de diferentes fragmentos útiles en el proceso de diversificación estructural.³⁶

La identificación de sustancias de bajo peso molecular con actividad biológica puede ser favorecida por la exploración de bibliotecas de compuestos funcionalmente diversos, en la medida en que de esa forma incrementa la posibilidad de identificar entidades químicas con las propiedades deseadas. Para ello es útil la preparación de compuestos con diversidad estructural, la cual tiene, esencialmente, cuatro componentes: (a) la diversidad de bloques constructores alrededor de un esqueleto; (b) la diversidad de grupos funcionales presentes; (c) la diversidad estereoquímica; y (e) la diversidad de esqueletos. A la diversidad estructural se debe añadir la complejidad estructural, que puede favorecer la interacción con macromoléculas de forma selectiva y específica.³⁷

Galloway *et al.*³⁷ definieron a la síntesis orientada a la diversidad como “la síntesis deliberada, simultánea y eficiente de más de un compuesto objetivo en un enfoque conducido por la diversidad”. Su objetivo es la generación de bibliotecas con alto grado de diversidad estructural que abarque gran parte del espacio químico, que puedan tener actividad incluso en aquellos procesos cuya modulación es considerada desafiante.

3. JUSTIFICACIÓN

Una gran variedad de productos naturales ha sido empleada exitosamente en el tratamiento de varias enfermedades, o como compuestos líder, en la síntesis total o semisíntesis de otros compuestos con actividad biológica mejorada en relación con los propios productos naturales.

La síntesis orientada a la diversidad es una herramienta útil con gran potencial para la obtención de sustancias con actividad biológica, incluso por mecanismos desconocidos o novedosos, en la medida que tiene como objetivo la exploración del espacio químico, a través de la síntesis de compuestos con estructuras diversificadas y novedosas que pueden interactuar con las biomacromoléculas involucradas en los procesos fisiológicos de los padecimientos.

La ftálica de origen natural *Z*-ligustílica (**1**) se obtiene con relativa abundancia de las raíces de *L. porteri*, teniendo una pluralidad de actividades biológicas notables.

Por otro lado, muchos productos naturales, incluyendo *Z*-ligustílica (**1**), tienen particularidades estructurales, funcionales y estereoquímicas, que implican dificultades en su preparación, y les confieren a aquellos una reactividad específica cuyo estudio permite seguir aportando conocimiento sobre la química de los compuestos orgánicos.

Dada la importancia de los agentes antiinflamatorios y citotóxicos, es conveniente explorar el espacio químico adyacente a *Z*-ligustílica (**1**) con el fin de obtener nuevos compuestos que puedan tener estas actividades, y paralelamente, aportar datos sobre esta sustancia en apariencia sencilla desde el punto de vista estructural.

4. OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo es la aportación de conocimiento científico sobre la reactividad de *Z*-ligustílida (**1**) y algunos derivados, logrando con sus transformaciones explorar compuestos estructuralmente muy diferentes, que pudieran ser bioactivos y, en la medida de lo posible, contribuir al establecimiento de relaciones estructura-actividad, a través de los siguientes objetivos particulares:

- Obtener derivados de *Z*-ligustílida (**1**) mediante reacciones de reducción, cicloadición, hidrólisis y adiciones nucleofílicas.
- Evaluar la actividad antiinflamatoria y citotóxica (líneas celulares) de los derivados de *Z*-ligustílida (**1**).
- Establecer relaciones de estructura-actividad con *Z*-ligustílida y sus derivados, en las actividades biológicas evaluadas.

•

5. HIPÓTESIS

Se ha demostrado que la ftálida de origen natural *Z*-ligustílida (**1**) posee una variedad importante de actividades biológicas, entre ellas las actividades antiinflamatoria y citotóxica. Es reconocido que frecuentemente los derivados semisintéticos muestren actividad mejorada o modulada; es decir, con menores efectos secundarios.

Así, la exploración del espacio químico, por medio de síntesis orientada a la diversidad, puede permitir el hallazgo de sustancias que actúen contra padecimientos conocidos por vías aún inexploradas.

En consecuencia, es posible obtener a partir de *Z*-ligustílida (**1**) compuestos con estructura diversificada que posean actividad antiinflamatoria mejorada en relación con la ftálida original, o que muestren actividad citotóxica en ciertas líneas celulares.

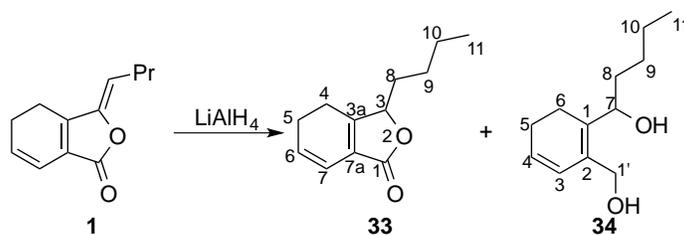
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este capítulo se exponen y discuten los resultados de la reactividad de *Z*-ligustílida (**1**) y de algunos de sus derivados. Se explica la reducción de ese compuesto y una transformación de uno de los productos de reducción a través de una reacción de Alder-Rickert. Igualmente se exponen las dificultades para llevar a cabo reacciones de **1** con diferentes nucleófilos, y la forma en que se logró allanarlas, para obtener los derivados. Finalmente, se dan a conocer los resultados de la actividad antiinflamatoria y citotóxica en las líneas celulares U251, PC-3, K562, HCT-15, MCF-7 y SKLU-1 de los compuestos obtenidos en la presente investigación.

6.1 Reducción de *Z*-ligustílida (**1**)

Con el objetivo de activar el homodieno de *Z*-ligustílida (**1**) y realizar más eficientemente la reacción de Alder-Rickert con diferentes dienófilos electrofílicos, se intentó la reducción del carbonilo y del doble enlace exocíclico. La reducción de **1** con LiAlH_4 se llevó a cabo a varias temperaturas y en presencia de Et_2O o THF (Tabla 1).

Por medio de las placas de c.c.f., se notó que la materia prima desapareció, y en su lugar había compuestos más polares. Uno de los compuestos que se generaron se caracterizó como sedanenólida (**33**), cuya identificación se hizo por comparación de sus datos espectroscópicos con los reportados previamente.³⁸ El otro compuesto generado fue **34**, que resultó muy lábil y hubo dificultad en su caracterización espectroscópica, por lo que su estructura se discute únicamente con base en la información obtenida a partir de los estudios de resonancia magnética nuclear, incluyendo los experimentos HSQC, HMBC y COSY.



Esquema 7. Reducción de **1** con LiAlH_4

Las condiciones en que se llevó a cabo la reacción de reducción de **1** se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Condiciones de reacción y rendimiento para las reacciones de **1**

Disolvente	T	t (min)	33	34
Et_2O	0 °C	30	39%	4%
Et_2O	t_{amb}	180	28%	no
THF	0 °C	30	44%	8%
THF	reflujo	90	42%	13%
THF	reflujo	300	c.c.f.	c.c.f

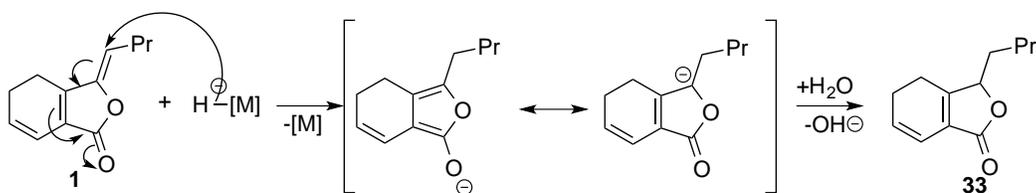
La anotación “no” significa que no se observó su formación; c.c.f indica que sí se obtuvo el compuesto, de acuerdo a lo observado en cromatografía en capa fina.

El aislamiento y caracterización de **34** fue difícil debido a que en el proceso de purificación por cromatografía en columna y en capa fina se transforma a otros productos; no obstante, el análisis de los datos de resonancia magnética nuclear permite postular la estructura indicada.

En el espectro de RMN ^{13}C de **34**, se encuentran doce señales, cuatro de ellas correspondientes a carbonos sp^2 , ubicadas en δ_{C} 137.6, 130.6, 127.3 y 127.2. De acuerdo con los experimentos DEPT 90 y 135, las primeras dos señales son de carbonos cuaternarios y las últimas dos son de metinos. En el espectro de RMN ^1H , los hidrógenos unidos a estos dos últimos carbonos generan las señales en δ_{H} 6.01 (dt, $J = 9.5$ Hz, 1.5 Hz) y 5.88 (dt, $J = 9.5$ Hz, 4.0 Hz), correlacionan entre sí en COSY, y son similares a las señales del ciclohexadieno de **1**, pero desplazadas hacia campo alto. La señal en δ_{H} 6.01 se

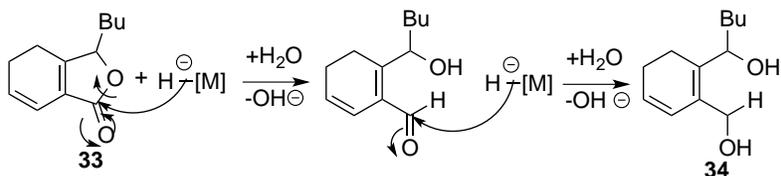
atribuye a H3 y la de δ_{H} 5.88, a H4, debido a que H3 se encuentra en el plano de desprotección de la olefina C1-C2. Además, la señal de H4 correlaciona en el espectro HMBC con la señal del carbono base de oxígeno en δ_{C} 61.1, C1'. Este último, de acuerdo con el experimento HSQC correlaciona con los hidrógenos diastereotópicos que dan lugar a las señales en δ_{H} 4.29 (d, $J = 12.0$ Hz) y 4.13 (d, $J = 12.0$ Hz); es decir, son los hidrógenos unidos a C1' (H1'a y H1'b). Bajo un argumento similar, por el desplazamiento químico propio de átomos de carbono de oximetino, o átomos de hidrógeno unidos a este tipo de carbonos y por su correlación en el experimento HSQC, se encuentra que C7 da origen a la señal en δ_{C} 70.6, y H7 general la señal ubicada en δ_{H} 4.63 (t, $J = 7.0$ Hz). En el experimento COSY, la señal de H7 tiene correlación con la de los hidrógenos que dan señales múltiples en δ_{H} 1.63-1.70 y 1.48-1.56, por lo que se asignan a los hidrógenos H8. Estas señales tienen correlación en el espectro HSQC con la señal en δ_{C} 35.0, que se asigna por eso a C8. Las señales en δ_{C} 28.3, 22.8 y 14.2, y sus correlativas en δ_{H} 1.32-1.36 y 1.18-1.25, 1.29-1.37 y 0.90 (t, $J = 7.0$ Hz), corresponden al resto de la cadena de alquílica (C9, C10 y C11). Las señales de los carbonos alifáticos del ciclohexadieno se encuentran en δ_{C} 22.9 y 21.8 (C6 y C5, respectivamente), y las señales en el espectro de RMN ^1H que les corresponden se encuentran entre δ_{H} 2.08-2.16 y 2.25-2.32, en la región de hidrógenos alílicos, en concordancia con la estructura propuesta.

La formación de **33** en mayor proporción parece indicar que el mecanismo de la reducción de **1** (Esquema 8) procede mediante un ataque del hidruro al carbono C8 de este compuesto, que después de una tautomería ceto-enólica se convierte en la forma cetónica, esto es, en el anión de sedanenólida (**33**). La observación de que en THF al aumentar el tiempo y temperatura de reacción disminuye el rendimiento de **33**, y que al calentar a reflujo por 5 h en este disolvente el compuesto **1** en presencia de LiAlH_4 , da lugar a una mezcla compleja, sugiere que **33** se forma primero y posteriormente se transforma en otros compuestos de reducción, entre ellos **34**, y posiblemente también productos secundarios de condensación; además una vez terminada la reacción, el producto **33** continúa transformándose, por ejemplo, a butilftálida (**24**).



Esquema 8. Mecanismo de formación de **33**

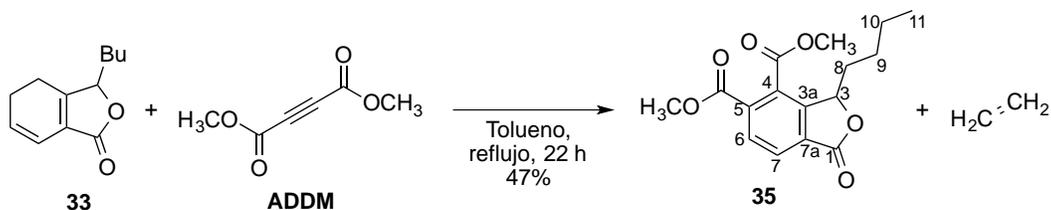
Aún más, es probable que la formación de **34** podría tener lugar en el momento en que se comienza a llevar a cabo la desactivación del exceso de LiAlH_4 , porque el intermediario que se forma no es electrofílico y consecuentemente no puede ser atacado por otro hidruro, para lo cual habría mayor densidad de carga negativa, que difícilmente podría ser estabilizada. Esto explicaría el bajo rendimiento en la formación de **34**, porque como se sugiere en el Esquema 9, cuando entra en contacto un poco de agua en la mezcla de reacción, ocurre la protonación del enolato para formar sedanenólida, que reacciona con el exceso aun existente de LiAlH_4 , reduciéndose la lactona. Es interesante que este otro compuesto mayoritario posee aún el ciclohexadieno conjugado, debido a que la reducción mediante adición conjugada 1,4 de hidruro en el carbono C3a, tendría mayor impedimento estérico para llevarse a cabo, en relación con la adición 1,6 que se sugiere se lleva a cabo inicialmente. Por lo tanto, aunque seguramente esa adición podría ocurrir en alguna etapa de la reacción, seguro lo haría en mucho menor proporción, por la razón expuesta, como se puede deducir de la observación de los productos formados en mayor proporción.



Esquema 9. Propuesta de reducción de **33**

6.2. Reacción de Alder-Rickert de sedanenólida (**33**)

El compuesto **33** se calentó a reflujo por 22 h en tolueno con acetilendicarboxilato de dimetilo (ADDM), con el objetivo de obtener **35**.

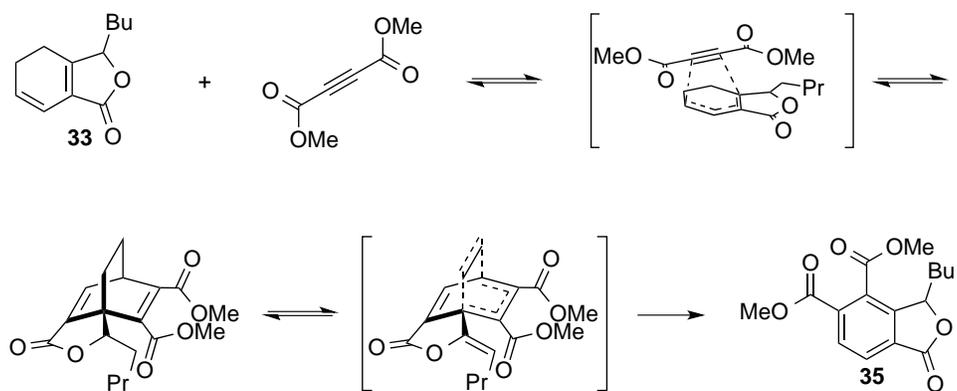


Esquema 10. Reacción entre **33** y ADDM

Efectivamente, la reacción dio lugar a un producto que en el espectro de RMN ^1H mostró dos señales dobles (δ_{H} 8.02 (H7) y 7.95 (H6)) en la región aromática, con típico acoplamiento *orto* de 8.0 Hz. Hay dos señales simples en δ_{H} 3.95 y 3.95 que por su desplazamiento químico e integración se atribuyen a las generadas por los hidrógenos de los metoxilos provenientes de ADDM. También hay una señal en δ_{H} 5.75 (dd) que se atribuye a H3, que se acopla a tres enlaces con dos hidrógenos diastereotópicos ($^3J = 8.0, 3.0$ Hz). De acuerdo con las interacciones observadas en HSQC, a los hidrógenos H7 y H6 están enlazados con los carbonos que dan lugar a las señales en δ_{C} 127.74 (C7) y 130.32 (C6). Las otras señales de carbonos aromáticos son cuaternarias y se encuentran en δ_{C} 148.6, 135.8, 129.6 y 127.8. En el espectro de RMN ^{13}C hay tres señales de grupo carbonilo, en δ_{C} 168.5, 166.3 y 166.1, que se pueden atribuir, la primera, a la lactona que proviene de **33**, y las otras dos al diéster proveniente de ADDM. También hay dos señales muy cercanas tanto en RMN ^{13}C (δ_{C} 53.1 y 53.0) que se atribuyen a los metoxilos provenientes también de ADDM. Hay una señal de carbono de oximetino (δ_{C} 81.56) que, debido a que se encuentra desplazada hacia campo bajo, concuerda con un carbono bencílico unido a oxígeno (C3), y que muestra correlación en el experimento HSQC con la señal de H3.

El rendimiento de la reacción fue de 47% y se observó que aproximadamente 15 al 20% de materia prima queda sin reaccionar, cantidad que fue recuperada, aun cuando se aumentó la cantidad de ADDM (de 4 a 8 equivalentes).

La formación de **35** se explica por medio de una reacción de Alder-Rickert, en la que un ciclohexadieno reacciona con un acetileno, en la especie ADDM, para formar un compuesto biciclo[2,2,2]-octadieno por medio de una reacción de Diels-Alder, el cual sufre una retro Diels-Alder, liberando etileno y un compuesto aromático, como se ilustra en el Esquema 11.



Esquema 11. Mecanismo de reacción de Alder-Rickert entre **33** y ADDM

En las condiciones en que se llevó a cabo la reacción, no se logró obtener el “intermediario” de Diels-Alder, debido, probablemente, a la baja estabilidad de éste, que que fácilmente forma de nuevo las materias primas, o bien libera etileno y el producto **35**. Este, debido a que es aromático, es más estable y no vuelve a reaccionar para formar el cicloaducto de Diels-Alder. Por ese motivo la última flecha del mecanismo indica un solo sentido, demostrando la irreversibilidad del paso. Es probable, por lo tanto que si se aumentara el tiempo de reacción, habría mayor acumulación de producto; sin embargo, esta hipótesis no se comprobó.

6.3. Reacción de *Z*-ligustílida (**1**) con PhNHNH₂

Se llevó a cabo la exploración de la reacción entre *Z*-ligustílida (**1**) y fenilhidrazina de varias formas. En todos los casos se obtuvieron mezclas complejas coloridas, en los que se veía en gran medida la presencia de **1** sin reaccionar. Se asumió que las mezclas se debían principalmente a productos de descomposición de fenilhidrazina, por lo que se intentó llevar a cabo la reacción en atmósfera de nitrógeno. De ese modo se

logró reducir la complejidad de las mezclas; no obstante, también quedaba gran cantidad de **1** sin reaccionar. Los intentos que se llevaron a cabo para que procediera la reacción se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Condiciones ensayadas para llevar a cabo la reacción entre **1** y PhNHNH₂

Intento	1 (mmol)	PhNHNH ₂ (mmol)	Condiciones	Observaciones
1	0.45	0.46	EtOH, reflujo, 3h	Mezcla compleja
2	0.29	0.29	EtOH, MW, 145 °C, 10 min	Mezcla muy compleja
2a	0.29	+0.29	EtOH, MW, 108 °C, 3 h	Mezcla muy compleja
3	0.29	0.44	EtOH, reflujo, 24 h, N ₂	n.r. (c.c.f.)
4	1.02	1.07	EtOH, reflujo, 24 h, N ₂ , AcOH _{cat}	n.r. (RMN)

Notas: (a) La abreviatura n.r. significa que no hay reacción. (b) El intento 2a, que indica +0.29 en la columna de PhNHNH₂, indica que a la mezcla del intento 2 se adicionaron 0.29 mmol de ese reactivo y se volvió a hacer reaccionar la mezcla.

Por medio del análisis del espectro RMN ¹H del crudo de reacción del intento 4 (Figura 8), se corroboró que quedaba aun gran cantidad de **1** sin reaccionar. También se notó que aunque en c.c.f. la mezcla de reacción era menos compleja en comparación con los intentos en que no se llevó a cabo la reacción en atmósfera de N₂, comenzaba a haber descomposición, aparentemente de PhNHNH₂ (debido a los cambios que se observaron en las señales de RMN ¹H en la región de hidrógenos aromáticos). En el espectro de RMN ¹H del crudo de reacción hay una señal adicional en δ_H 7.04. Además, las señales del reactivo se notan más anchas y complejas. Esto puede deberse a la descomposición térmica de la fenil hidrazina, o bien, a su oxidación con oxígeno remanente.

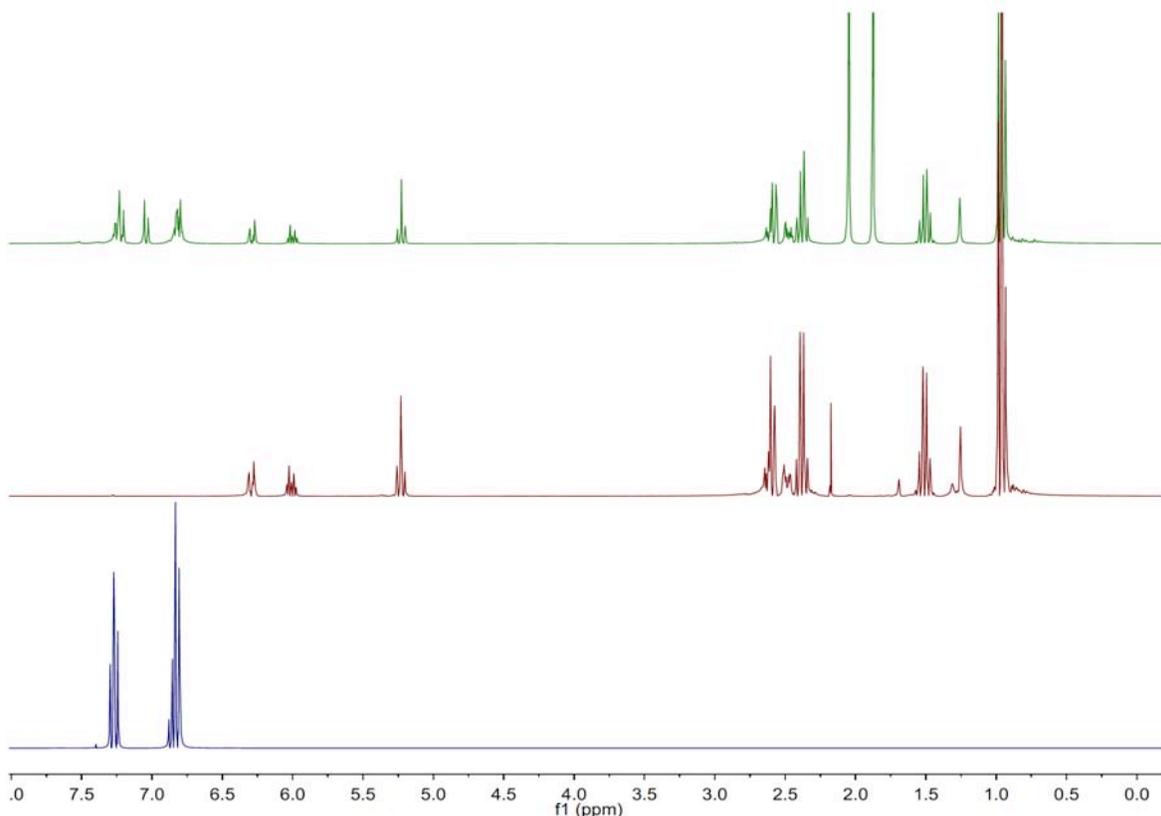


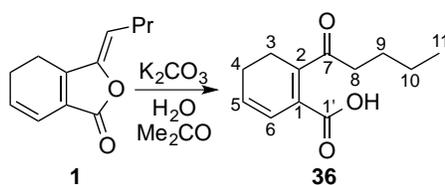
Figura 8. Espectros RMN ^1H apilados de (a) En la parte superior, el crudo de reacción entre **1** y PhNHNH_2 ; (b) En medio, el compuesto **1** puro; y, (c) En la parte inferior, PhNHNH_2 pura

Las observaciones anteriores llevaron a la conclusión de la poca reactividad de *Z*-ligustólida (**1**) frente a fenilhidrazina.

Esto puede deberse a que aunque fenilhidrazina es un compuesto nucleofílico, el compuesto **1** no es lo suficientemente electrofílico para reaccionar. Para corroborar esta hipótesis, se consideró pertinente la hidrólisis de la lactona para obtener el cetoácido correspondiente. En principio, el carbonilo de la cetona debería ser más electrofílico que el carbonilo de **1**, y en consecuencia la reacción entre el cetoácido y el nucleófilo debería proceder. Lo aquí planteado se discute en los apartados que siguen.

6.4. Hidrólisis de *Z*-ligustólida (**1**)

La hidrólisis de *Z*-ligustílida (**1**) (Esquema 12) se llevó a cabo con calentamiento por microondas en medio básico (K_2CO_3). El mejor rendimiento (78%) se obtuvo al calentar el compuesto disuelto en acetona y una disolución acuosa de la base al 10%, a 140 °C por 6 min. Variaciones de la concentración de la base y de **1** tienen efecto importante en el rendimiento de la reacción. Como se nota en la Tabla 3, el intento 2, en el que la concentración de **1** y la de la base son altas, el rendimiento es menor; cuando la concentración de **1** es muy baja, el rendimiento también es bajo (intento 3). Las condiciones óptimas son cuando las concentraciones de ambos compuestos son moderadas. Esto se nota al comparar los intentos 1 y 5, en el que las concentraciones de **1** son iguales, pero cuando la concentración de K_2CO_3 cambia de 20% a 10%, el rendimiento sube de 51% a 78%.



Esquema 12. Hidrólisis de **1**

Tabla 3. Condiciones de hidrólisis

Intento	% m / V K_2CO_3	C_1 (mmol/mL) ^a	Rendimiento
1	20	0.4	51%
2	20	1.1	22%
3	10	0.1	41%
4	10	0.3	60%
5	10	0.4	78%

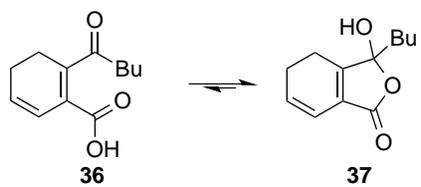
a. indica la concentración de *Z*-ligustílida (**1**)

Los resultados expuestos resultan lógicos tomando en consideración que se forman dos fases, y que por lo tanto al incrementar las repulsiones hidrofóbicas, con concentraciones muy altas de los reactivos, estos entran menos en contacto debido a la inmiscibilidad de las fases. Por otro lado, cuando las concentraciones son adecuadas, ambas fases entran en contacto y por ende los reactivos también, y procede mejor la reacción. Cuando es muy baja la concentración de los reactivos el rendimiento es bajo, debido a que se trata de reacciones en equilibrio, que se encuentra desplazado hacia la formación de los reactivos, dada su baja concentración.

Comparando la reactividad de **1** con respecto a la hidrólisis y a la adición de PhNHNH₂, resulta evidente la eficiencia de la primera transformación, ya que en esta reacción el nucleófilo es el ion hidroxilo, que al poseer carga formal negativa, aumenta su carácter nucleofílico.

De la observación del espectro de RMN ¹H del producto, queda clara la transformación de **1**, puesto que desaparece la señal triple del hidrógeno vinílico (H8) centrada en δ_H 5.21, y las señales de los hidrógenos vinílicos del producto se encuentran ligeramente desplazadas a campo alto en relación con las de **1**: la señal de H7 de **1** se desplazó de δ_H 6.29 a 6.01 (H-6 en **36**); la de H6, de δ_H 6.15 (H6 en **1**) a 5.96 (H5 en **36**).

En RMN ¹³C no se observa la señal típica de un carbonilo de cetona. Esto se atribuye a que el cetoácido **36** se encuentra en equilibrio con su forma hemicetálica (γ -hidroxi- γ -lactona) **37**, observándose las señales de este último compuesto. El equilibrio está desplazado hacia la formación de **37** y por lo tanto, son éstas las señales de este compuesto las que se observan. Esto explica también la separación de las señales de los hidrógenos de los metilenos α - y β - al carbono hemicetálico, que es un centro estereogénico que causa que los hidrógenos vecinos sean diastereotópicos. Esta observación se refuerza con la hidrólisis de **2**, que se discutirá posteriormente.



Esquema 13. Equilibrio cetoéster-hemicetal

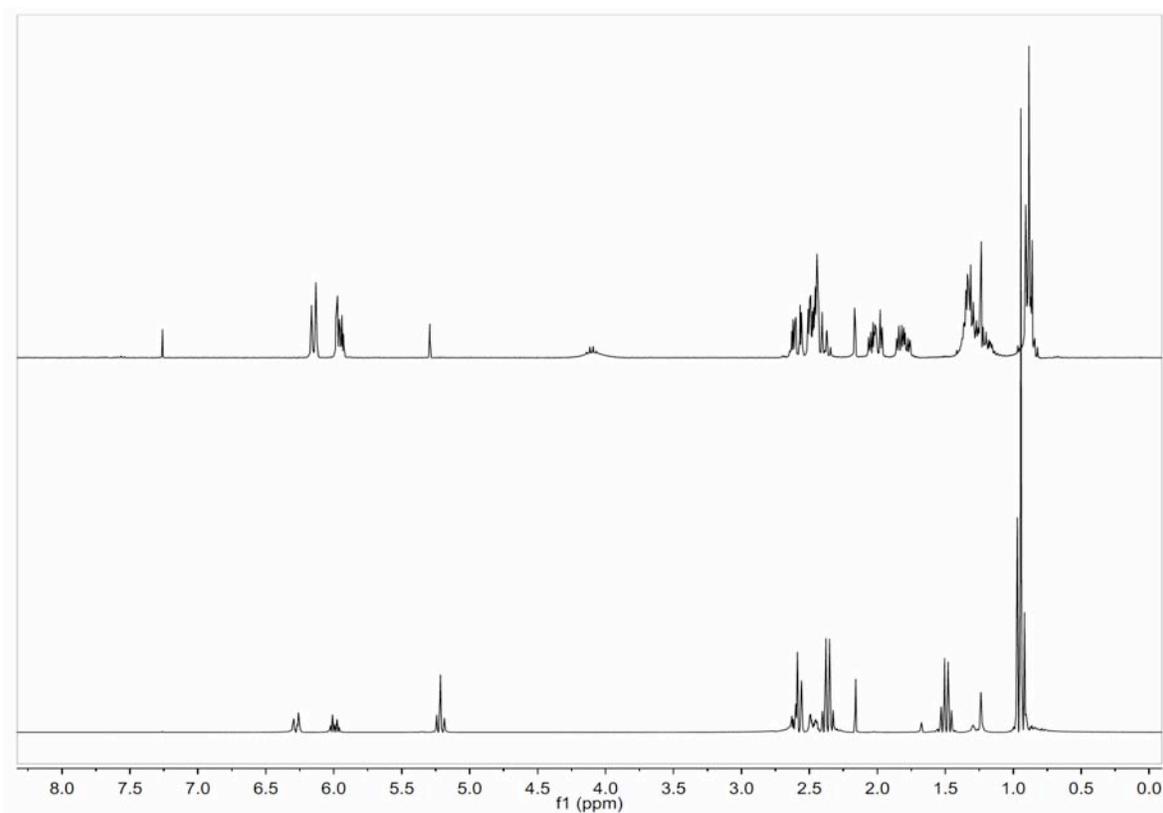


Figura 9. Espectros apilados de RMN ^1H de **1** (inferior) y **37** (superior).

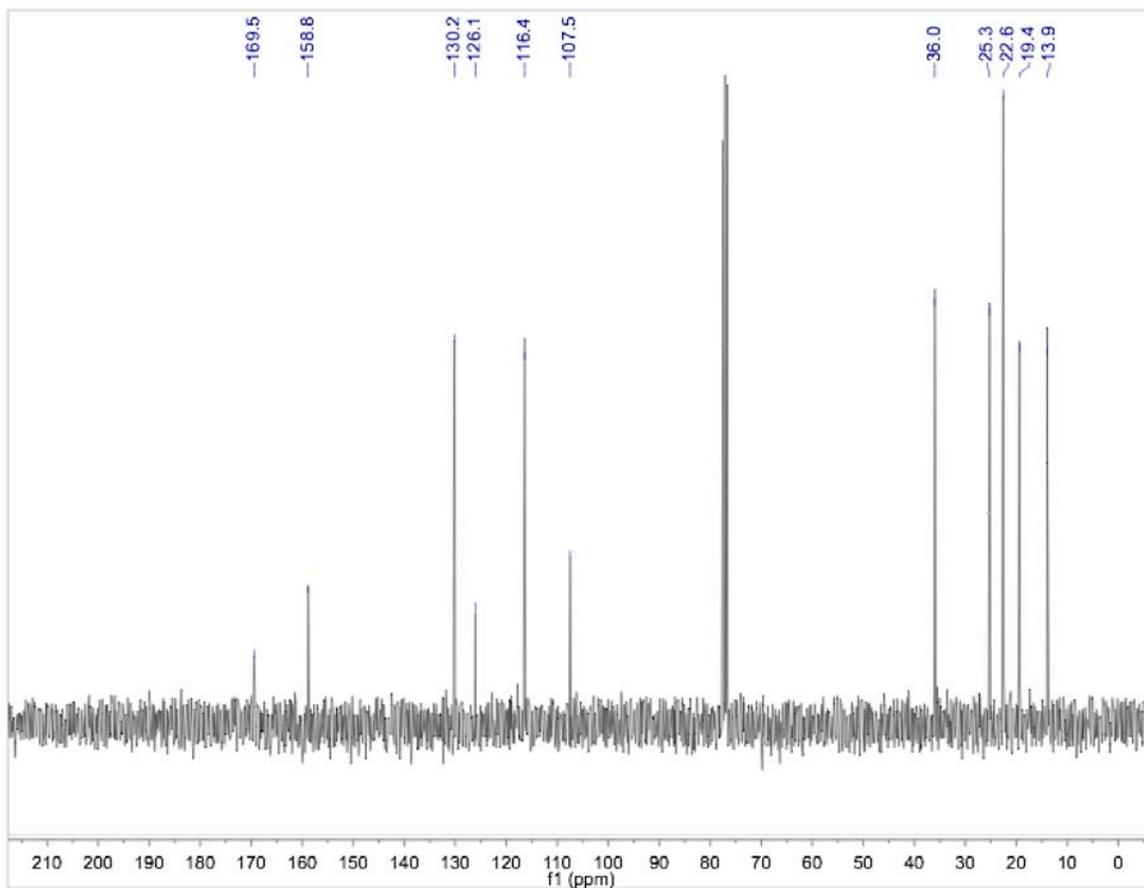
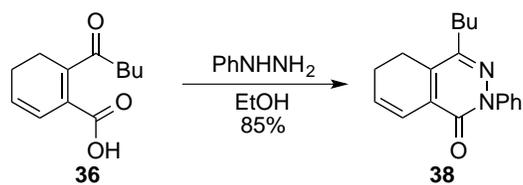


Figura 10. Espectro de RMN ^{13}C de **37**

6.5. Reacción entre **36** y PhNHNH_2

La mezcla del cetoácido **36** y fenilhidrazina se calentó a reflujo en EtOH por 1.5 h, observándose que hubo transformación a un producto de condensación, como se muestra en el Esquema 14.



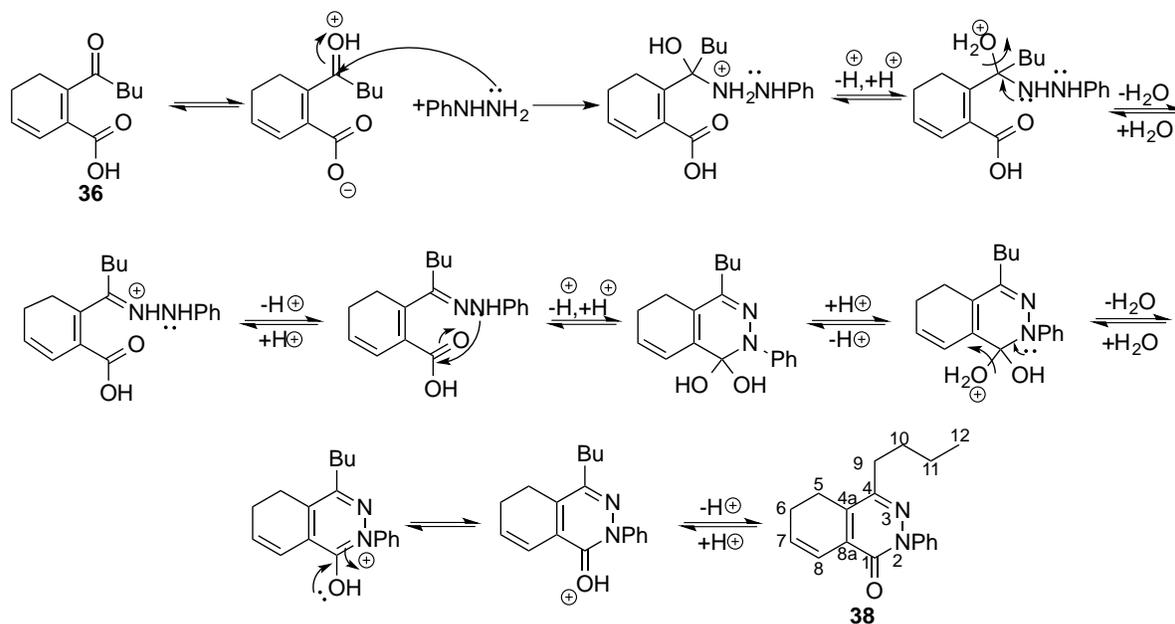
Esquema 14. Reacción entre **36** y PhNHNH_2

La reacción se llevó a cabo en atmósfera de nitrógeno porque, como se describió en líneas anteriores, la fenilhidrazina se oxida fácilmente. En estas condiciones, la reacción tuvo un rendimiento de 85%.

De ese modo se comprobó que el cetoácido **36** es más electrofílico que la ftálica **1**, como se había previsto, por lo que la reacción procede para formar la fenilftalazona **38**, con buen rendimiento y como producto único aislado, porque solo se recuperó materia prima y ese producto.

La formación del producto **36** se comprobó por medio de espectroscopia y espectrometría de masas. En el espectro de RMN ^1H se observan las señales del sistema vinílico desplazado hacia campo bajo, en δ_{H} 6.91 (td, $J = 9.5, 2.0$ Hz, H8) y 6.30 (td, $J = 9.5, 4.5$ Hz, H7). Las señales del fenilo proveniente del nucleófilo se observan como señales propias de un sistema AA'BB'C, esto es, dos multipletes (δ_{H} 7.63-7.59 y 7.47-7.43) y una señal triple de triples en δ_{H} 7.35 ($J = 7.4, 1.2$ Hz), correspondiente a H4'. La señal del grupo carbonilo se localiza en δ_{C} 157.9, y la del carbono de la imina se observa en δ_{C} 147.8. Las señales del primer metileno de la cadena de butilo está desplazado a campo bajo debido a su vecindad con la imina, en δ_{C} 32.2 y δ_{H} 2.66.

La reacción tiene esa regioselectividad en virtud de que el átomo de nitrógeno más nucleofílico de PhNHNH_2 es el terminal: la conjugación con el sistema aromático del átomo de nitrógeno interno disminuye la disponibilidad de su par de electrones para proceder con la adición nucleofílica. Además, el sitio al que se une este átomo es el carbonilo de cetona, más electrofílico que el carboxilo del ácido, dando lugar a una imina. En el Esquema 15 se ilustra que ese es el primer ataque que ocurre y determina la selectividad. Es probable que el segundo ataque, que ocurre del átomo de nitrógeno menos nucleofílico al átomo de carbono menos electrofílico, se encuentre facilitado debido a la cercanía de ambos en la hidrazona intermediaria, que tampoco se pudo aislar, por lo que la reacción procede con buen rendimiento para formar el segundo ciclo de seis átomos.



Esquema 15. Mecanismo de reacción para formación de **38**

6.6. Reacción entre **36** e NH_2OH

Se intentó llevar a cabo la reacción entre *Z*-ligustilida (**1**) y $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ directamente, en ausencia de cualquier otro reactivo, pero no ocurrió ningún cambio. Al aumentar el tiempo de reacción tampoco se observó cambio alguno. Al calentar con microondas, si bien en apariencia hubo cambio en el color de la disolución, en cromatografía no se veía un cambio claro aún después de agregar base.

Tabla 4. Exploración de reacción entre **1** y $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$

Intento	1 (mmol)	$\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$	Condiciones	Observaciones
1	0.48	0.48 mmol	EtOH, reflujo, 3h	n.r. (c.c.f.)
2	0.75	0.74 mmol	EtOH, reflujo, 24 h	n.r. (c.c.f.)
3	0.75	0.74 mmol	EtOH, MW, 140 °C, 10 min	Mezcla amarilla; n.r. (c.c.f.)
4	0.63	0.65 mmol	EtOH, MW, 140 °C, 10 min, 0.75 mmol K_2CO_3	Mezcla compleja

Nota: n.r. indica que no se observó que procediera la reacción.

Ante los resultados de los intentos mencionados, se decidió llevar a cabo la reacción con **36** en lugar de **1**, calentando con microondas a 140 °C, por 16 min en EtOH, lo que resultó en una mezcla de dos productos.

El producto más polar muestra en los espectros de RMN ^1H y ^{13}C señales esencialmente iguales, aunque con diferente desplazamiento químico, deduciéndose por lo tanto que la conectividad carbono-carbono y carbono-hidrógeno se mantiene como en **36**. El carbono C4 da una señal en RMN ^{13}C en δ_{C} 157.0, adecuado para el carbono enlazado a nitrógeno de una aciloxima. Esta señal tiene correlación en el espectro HMBC con los hidrógenos cuyas señales se encuentran en δ_{H} 2.63-2.55 (H9, señal traslapada con la de otros dos núcleos, por la integración) y 1.61 (q, $J = 7.5$ Hz, H10), confirmando de ese modo su asignación como C4. Las señales en RMN ^1H correspondientes a los hidrógenos vinílicos del compuesto se encuentran desplazadas a campo bajo, en δ_{H} 6.65 (dt, $J = 9.5$, 2.0 Hz, H8) y 6.35 (dt, $J = 9.5$, 4.0 Hz, H7) La observación en el espectro de masas del pico base en m/z 206.0985 (M+1) y 411.1785 (2M+1), confirman que se formó el segundo ciclo. También se puede notar la pérdida de los fragmentos C_2H_5 y C_4H_9 , en m/z 178.1013 y 150.0369. Con base en esta información se confirma la benzoxazolona **39** como estructura para este producto de reacción.

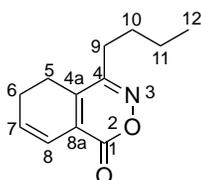


Figura 11. Estructura y numeración de **39**

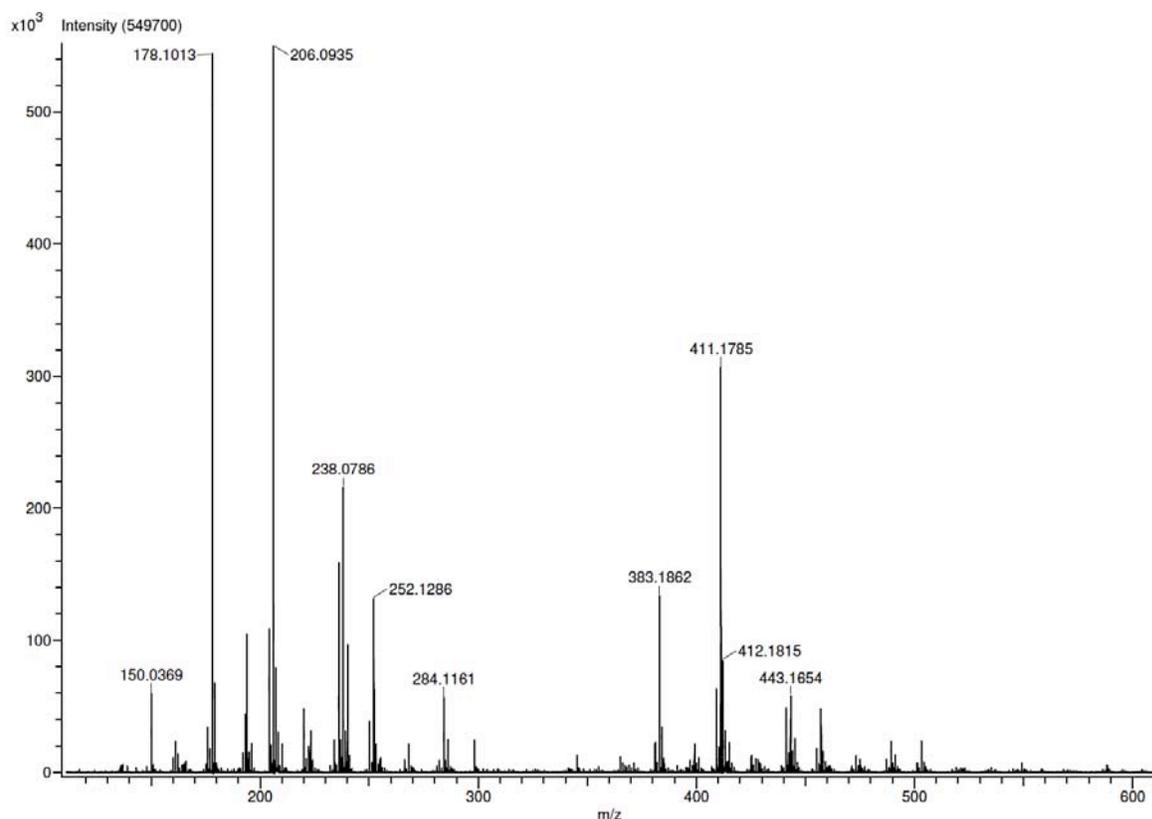


Figura 12. Espectro de masas de **39**.

En el espectro de RMN ^{13}C del producto de menor polaridad de esta reacción, se observaron catorce señales de carbono, esto es, dos átomos de carbono adicionales al producto **39**. En RMN ^1H , se observan las señales típicas del ciclohexadieno de este compuesto: las señales de dos hidrógenos vinílicos, uno en δ_{H} 6.20 (dt, $^3J = 10.0$ Hz, $^4J = 1.5$ Hz), deduciéndose que es el hidrógeno interno del dieno (H6) y otro en 6.11 (m, H5), ligeramente desplazadas hacia campo bajo en relación con **36** y hacia campo alto en relación con **1**; también se observó una señal múltiple alrededor de δ_{H} 2.53 que integra para cuatro hidrógenos. De acuerdo con las interacciones que se encuentran en el espectro HSQC, estos hidrógenos se encuentran enlazados a los carbonos cuyas señales están desplazadas a δ_{C} 116.7 (C6), 132.0 (C5), 23.1 (C4) y 20.7 (C3). En el espectro HMBC se observan correlaciones entre las señales de H6 y las señales de carbono cuaternarias ubicadas en δ_{C} 112.0 (C1), 132.0 (C2) y 159.4 (C7), (en el experimento HMBC tienen correlación con el hidrógeno vinílico H6, y el multiplete de los hidrógenos alílicos). Así se completa el fragmento A que se muestra en la Figura 13.

Hay dos metilos, uno de los cuales (C5', δ_H 0.95 y δ_C 14.2) se encuentra enlazado a un metileno (C4', δ_C 23.5) y este, a su vez, con otro metileno (C3', δ_C 26.2). Las señales correspondientes a los hidrógenos de ambos metilenos se enciman alrededor de δ_H 1.36. El metileno C3' también se acopla, de acuerdo con lo observado en los espectros HMBC y COSY, con el metileno con señal de carbono en δ_C 36.8 (C2') y cuyos hidrógenos (H2'a y H2'b) originan las señales doble de doble de dobles en δ_H 2.04 ($^2J = 14.0$, $^3J = 11.5$, 4.5 Hz) y 1.84 ($^2J = 14.0$, $^3J = 11.0$, 5.0 Hz). La no equivalencia magnética puede atribuirse a la rigidez generada por la posible formación de puentes de hidrógeno intramolecular. Las señales de ambos hidrógenos H2' (δ_H 2.04 y 1.84) tienen correlación en HMBC con la señal de grupo carbonilo en δ_C 170.5 (C1').

El otro metilo mostró señales en los espectros de RMN 1H y ^{13}C en δ_H 1.23 (t, $^3J = 7.0$ Hz) y δ_C 15.5 (C9) De acuerdo a lo observado en los espectros de RMN 1H y COSY, los hidrógenos de ese metilo se acoplan con dos átomos de hidrógeno que dan señales dobles de cuadruples, en δ_H 3.47 y 3.38 ($^2J = 9.0$, $^3J = 7.0$, 7.0, 7.0 Hz), enlazados al carbono base de oxígeno desplazado a δ_C 60.1 (C8). El fragmento C es, como se indica en la Figura 13, un etoxilo.

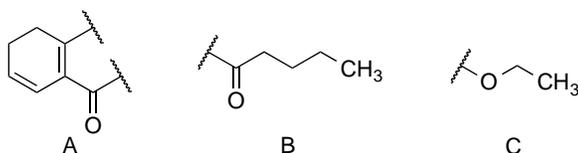


Figura 13. Fragmentos A, B y C de la estructura del producto menos polar entre **36** y NH_2OH

Sabiendo que uno de los compuestos que reaccionó fue NH_2OH , y considerando que el átomo de carbono cuya señal se desplaza a δ_C 170.46, dentro de la región de carbonilos de amida, se concluye que la estructura del compuesto es la que se muestra en la Figura 14.

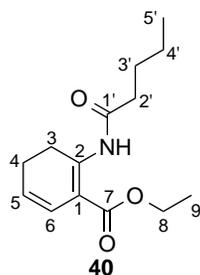
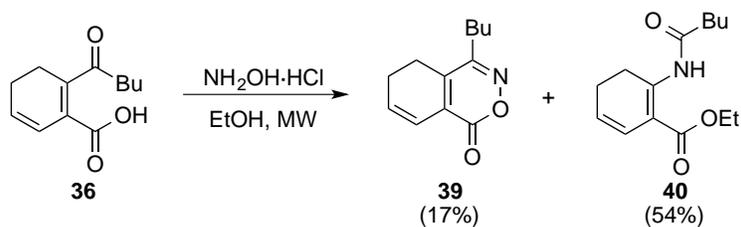


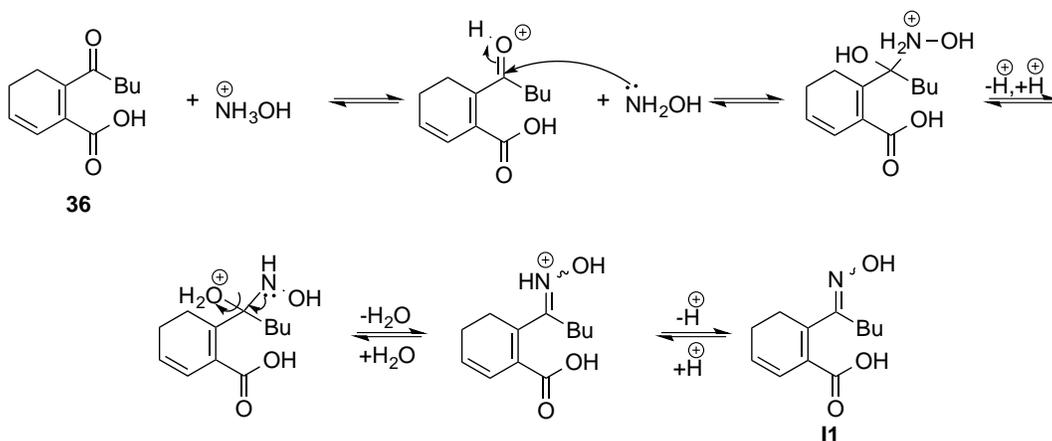
Figura 14. Estructura del compuesto **40**

Con la estructura de ambos compuestos determinada, se puede establecer que el rendimiento global de la reacción fue de 71%, como se muestra en el Esquema 16.



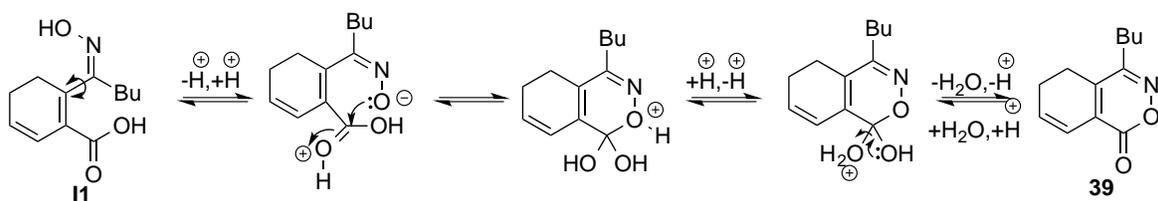
Esquema 16. Reacción entre **36** y NH_2OH

Para la formación de ambos compuestos, es necesario primero la formación de la oxima **II**, como se muestra en el Esquema 17. Se propone que la reacción es catalizada por el protón proveniente del clorhidrato de hidroxilamina. Esto deja libre al par de electrones del átomo de nitrógeno (más nucleofílico que el de oxígeno) para atacar al carbonilo de la cetona (más electrofílico que el del ácido). La oxima **II** no se pudo aislar ni caracterizar en las condiciones en que se llevó a cabo la reacción. Este intermediario común continúa reaccionando para dar lugar a los compuestos **39** y **40**, como se explica más adelante.



Esquema 17. Formación de la oxima **II** a partir del cetoácido **36** y $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$

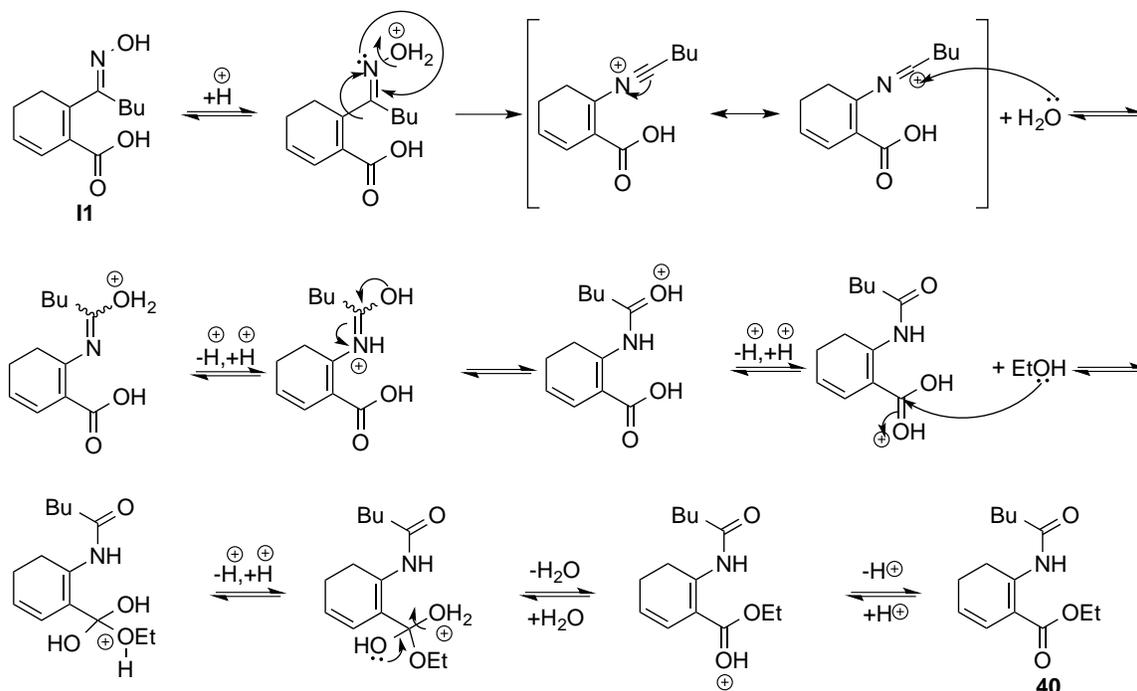
El mecanismo de reacción mediante el cual la oxima **II** se transforma en **39** se muestra en el Esquema 18. Se parte del isómero *Z*-**II** (intuitivamente se nota que el isómero *E* no podría reaccionar para formar **39**), en el cual el hidroxilo de la oxima ataca al carbono del carboxilo, paso que puede estar catalizado por la presencia de HCl en el medio, que protona el oxígeno sp^2 de ese grupo. Una vez formado el enlace carbono-oxígeno, ocurre una serie de reacciones de transferencia de protones y finalmente la eliminación de agua para que se forme **39**.



Esquema 18. Mecanismo de reacción para la formación de **39**

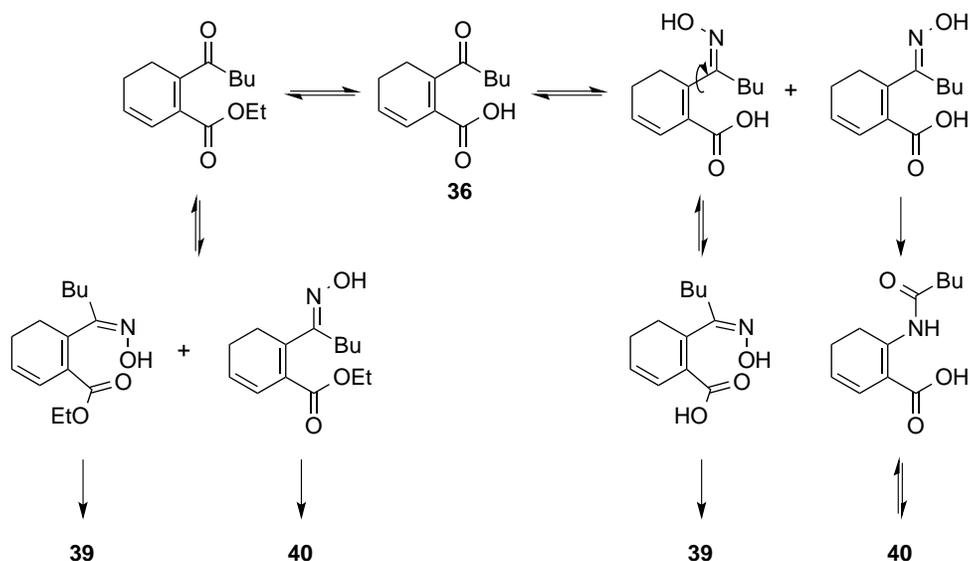
Por otra parte, para que se lleve a cabo la formación de **40**, también es notoria la importancia del medio ácido, puesto que un análisis de la transformación revela que se trata de una reacción de Beckmann. Esta reacción, típica de oximas en medio ácido, procede por la protonación del hidroxilo de la oxima, que promueve la migración del butilo al nitrógeno y la eliminación de agua. El carbocatión es estabilizado por agua para formar el iminon protonado, el cual se desprotona y se tautomeriza a la amida. La presencia del éster etílico

40 se explica mediante el mecanismo de adición – eliminación promovida por ácido. Este mecanismo se ilustra en el Esquema 19.



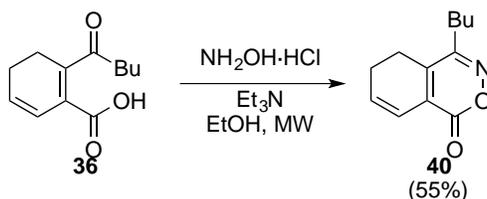
Esquema 19. Mecanismo de formación de **40**

Como se mencionó, la formación de **40** se explicó como una reacción de Beckmann seguida de una esterificación; sin embargo, un panorama más completo de lo que podría estar ocurriendo en el seno de la reacción se ilustra en el Esquema 20. En este se puede notar que la esterificación **36** y la adición de NH_2OH al mismo puede ser simultánea. El cetoéster que se forma a partir de **36** también puede ser atacado por NH_2OH . Del ataque de ese nucleófilo al cetoácido y al cetoéster resultan cuatro compuestos (los isómeros *E* y *Z* de las oximas). Los isómeros *Z* de ambas oximas tienen la geometría adecuada para la ciclación, por lo que ambos dan lugar a **39**. En cambio, los isómeros *E* tienen la geometría adecuada para que se de la migración del fragmento de ciclohexadienilo (que se encuentra *trans* al hidroxilo).



Esquema 20. Competencia de reacciones de **36** con NH_2OH en EtOH

En virtud de que la presencia de HCl disminuyó el rendimiento en la formación de la bezoxazolona **39**, se decidió llevar a cabo la reacción en presencia de Et_3N , inhibiendo así la reacción de Beckmann. El resultado fue el previsto, logrando que únicamente se formara **39**.



Esquema 21. Reacción entre **36** y $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ en presencia de Et_3N .

Una observación experimental sobre estos compuestos es que ambos son especialmente sensibles a la aromatización.

La afirmación anterior se hace evidente con los espectros de RMN ^1H de ambos productos. Se tomaron los espectros de las muestras de ambos productos recién purificados y posteriormente se repurificaron y se tomaron nuevamente los espectros después de algunos días.

En la Figura 15, se muestran los espectros de RMN ^1H correspondientes a **39**. En ambos espectros hay cuatro señales de hidrógenos aromáticos, en δ_{H} 8.40, 7.94, 7.85 y 7.74 que corresponden al compuesto aromático que corresponde; sin embargo, en el espectro inferior son más notorias estas señales. Igualmente, las señales de hidrógenos alifáticos cercanas a las de **39** son más evidentes en el espectro de la muestra cuyo espectro se tomó después de días de haberla purificado. De acuerdo con la relación de áreas bajo la curva de las señales de **39** y del compuesto aromatizado en RMN ^1H , la proporción de 25:1, en la muestra recién purificada, cambia a 8:1, en la muestra analizada después de días de haber sido purificada.

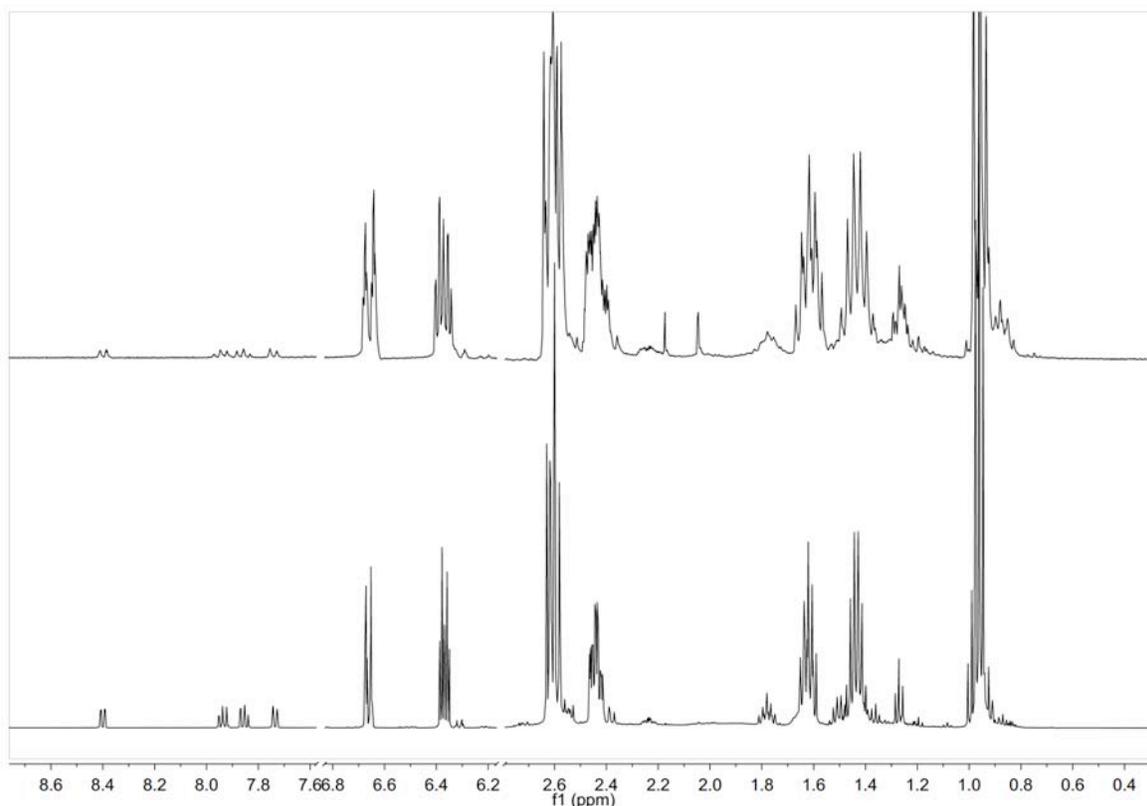


Figura 15. Espectros de RMN ^1H de **39** de una muestra recién purificada (superior) y de una muestra después de varios días de haberla purificado.

En el caso del compuesto **40**, la transformación es aún más evidente, puesto que las señales de compuestos aromáticos (δ_{H} 7.88, 7.71, 7.58 y 7.48) en el compuesto recién purificado son casi imperceptibles. También aparecen señales de hidrógeno unido a base de oxígeno cercanas a las que produce el compuesto **40**. Igualmente se nota la complicación de

las señales a campo alto, debido a la aparición de señales que se traslapaban parcialmente con las que origina **40**. En este caso la proporción de **40** con respecto al compuesto aromatizado es inicialmente de 9:1 y posteriormente 3:1, de acuerdo con la integración del área bajo la curva de las señales de cada uno de los compuestos en los espectros de RMN ^1H .

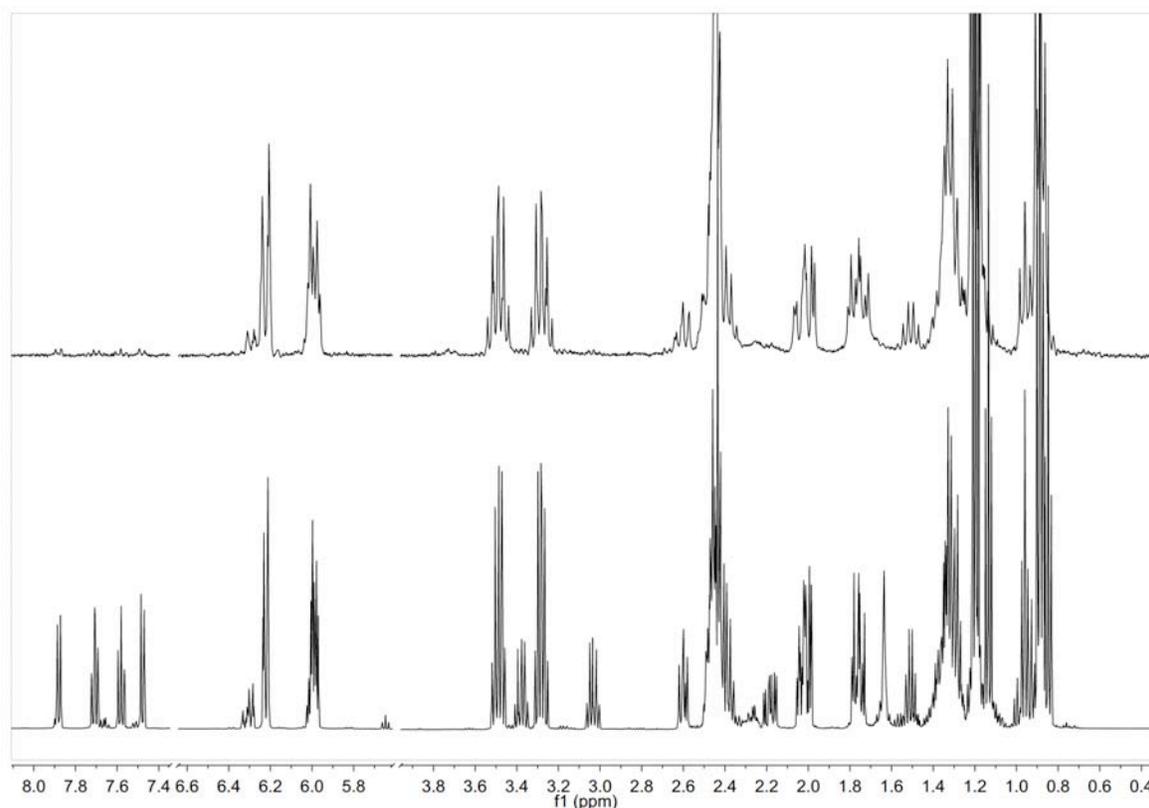


Figura 16. Espectros de RMN ^1H de **39** de una muestra recién purificada (superior) y de una muestra después de varios días de haberla purificado.

6.7. Reacción de **36** con NH_2NH_2

La reacción del cetoácido **36** con el dihidrocloruro de hidrazina empleando etanol como disolvente generó una transformación parcial de la materia prima a *Z*-ligustílida (**1**), debido a que la adición intramolecular del ácido a la cetona protonada procede más eficientemente que la adición de la hidrazina (cuya nucleofilia se encuentra disminuida por la presencia de ácido).

Por lo anterior, la reacción se efectuó con el dihidrocloruro de hidrazina en presencia de Et₃N, calentando en MeOH con microondas a 120 °C por 4 min, y la reacción condujo a **41** en un rendimiento de 70 %.

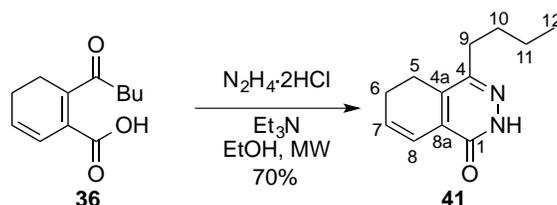
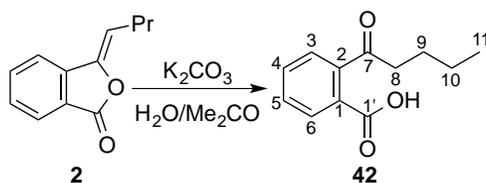


Figura 17. Reacción de **36** con NH₂NH₂·2HCl y Et₃N

La estructura se confirmó por medio de RMN. De acuerdo con el análisis de los espectros RMN ¹³C y DEPT, hay seis señales de carbono sp², cuatro de ellas cuaternarias y dos más de metino. Las dos señales más desplazadas hacia campo bajo se encuentran en δ_C 161.10 y 150.49, correspondientes al grupo carbonilo (C1) y al carbono de la imina (C4). El carbono del metino ubicado en δ_C 120.52 está enlazado al hidrógeno que se observa en δ_H 6.71, y este se acopla con el hidrógeno que resuena en δ_H 6.34 (y está unido al carbono que se localiza en δ_C 134.8). Hay dos señales de carbono sp³ en δ_C 23.0 (C5) y 22.6 (C6) que tienen correlación en el espectro HSQC con los hidrógenos alílicos cuyas señales son multipletes centrados en δ_H 2.71 (H5) y 2.41 (H6), respectivamente. Con estas señales se integra el ciclohexadieno, que se encuentra unido por los carbonos de uno de los dobles enlaces a los carbonos de la imina y carbonilo mencionados anteriormente. El primer metileno de la cadena de butilo produce la señal en δ_C 32.7 (C9) y está enlazado con los hidrógenos del multiplete δ_H 2.64 (H9), desplazamiento químico que confirma su vecindad al doble enlace C-N. Finalmente, hay otros dos metilenos (δ_C 31.0, δ_H 1.60 y δ_C 23.4, δ_H 1.42, respectivamente) y un metilo (δ_C 14.29, δ_H 0.96), con lo que se completa la estructura de **41**.

6.8. Hidrólisis de 2

Se hidrolizó el compuesto **2**, en las mismas condiciones que el compuesto **1**. Se comprobó su formación por medio de RMN.



Esquema 22. Hidrólisis de **2**

De una observación de los espectros en la Figura 18, se nota que después de 25 min de adquisición en el espectro de RMN ^{13}C del producto, se observan doce señales del producto; sin embargo, después de más adquisiciones (10 h), aparecen más señales de intensidad menor. Se nota que algunas de ellas corresponden a las doce señales de **37**. Determinando el área bajo la curva de las señales aromáticas del producto de hidrólisis de **2**, y las de los hidrógenos vinílicos de **37**, espectro de RMN ^1H de esta mezcla, se llega a la conclusión de que estos compuestos se encuentran en relación 9:1. El análisis de los espectros de RMN ^1H y ^{13}C (ambos) llevan a la conclusión de que en disolución se encuentran los productos **37**, **42** y **43**, en relación 7:10:65, respectivamente.

Como se mencionó en el párrafo que precede, en el espectro de RMN ^{13}C que se adquirió por 25 min se observan señales correspondientes a **43**. La señal de carbono cuaternario en δ_{C} 168.8 corresponde al carbono carbonílico (C1); la señal en δ_{C} 107.9 se atribuye a C3. Hay seis señales más de carbonos sp^2 en δ_{C} 149.0, 126.9 (ambas de carbono cuaternario), 134.8, 130.7 125.6, y 122.4 (de metino), que conforman el anillo aromático. Adicionalmente, hay cuatro señales de carbono que conforman la cadena de butilo, ubicadas en δ_{C} 38.7 (C8), 25.5 (C9), 22.6 (C10) y 13.9 (C11). Por medio del experimento HSQC, se determina que las señales de los hidrógenos enlazados a estos átomos de carbono que se localizan en δ_{H} 2.27-2.01 (m, H8a y H8b), 1.44-1.34 (m, H9a), 1.39-1.24 (H10) 1.21-1.10 (H9b), y 0.86 (t, $J = 8.0$ Hz, H11). Esta información es suficiente para confirmar la formación de **43**.

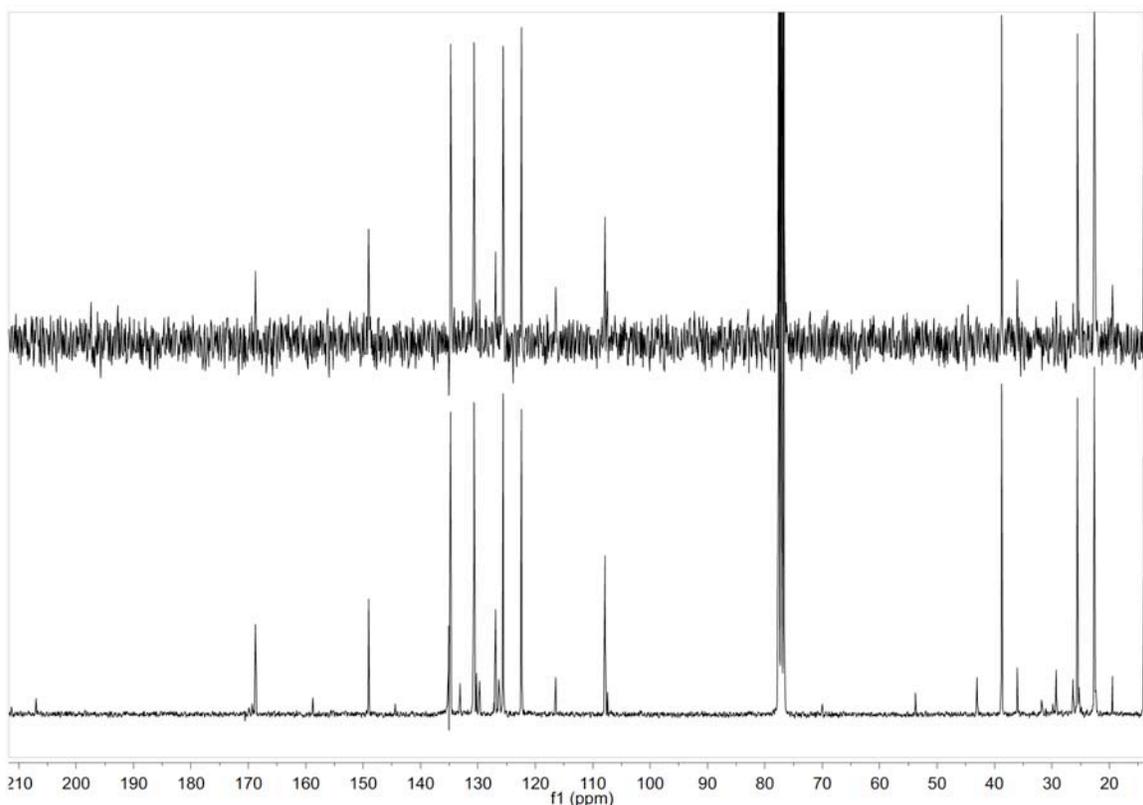


Figura 18. Comparación de los espectros de RMN ^{13}C del producto de hidrólisis de **2** después de 25 min (superior) y 10 h (inferior) de adquisición

Las señales restantes en el espectro de RMN ^{13}C (adquirido durante 10 h), se asignan razonablemente al compuesto **42**, la forma de cetoácido de **43**. Las señales en δ_{C} 207.0 y 169.9 corresponden a los grupos carbonilo de cetona y de ácido, C7 y C1', respectivamente. Las señales en δ_{C} 158.8, 144.4, 133.1, 130.9, 130.2 y 129.7 corresponden al anillo de benceno *o*-disustituido. Hay cuatro señales más de carbonos alifáticos correspondientes a la cadena de butilo, en δ_{C} 43.0, 29.2, 22.4 y 14.0. Estas asignaciones se pueden observar en Figura 19.

De esta manera se nota que en el caso del cetoácido **42**, también se encuentra en equilibrio con su forma de hemiacetal **43**, desplazado hacia esta última, tal como ocurre con el cetoácido **36**.

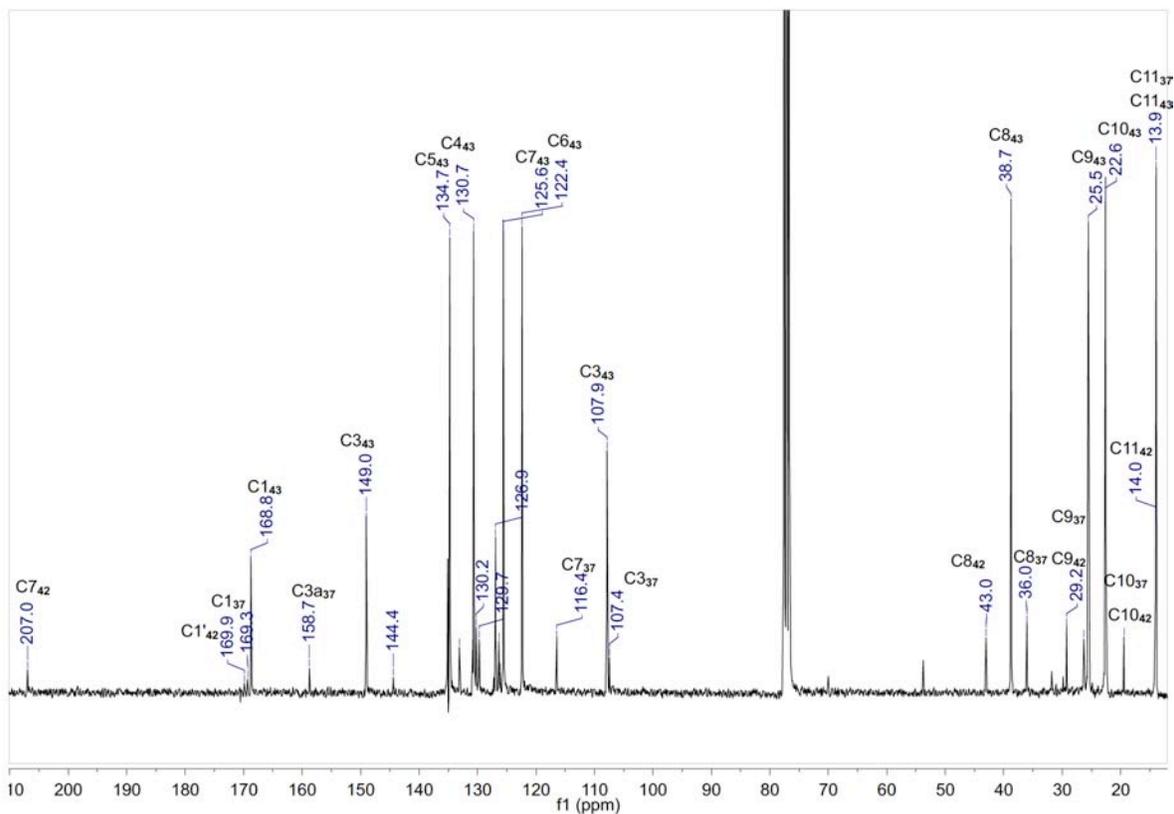


Figura 19. Asignación de las señales en el espectro de RMN ^{13}C de la mezcla de **37**, **42** y **43**

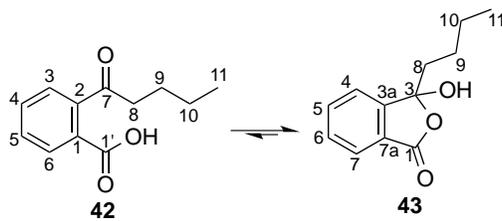


Figura 20. Equilibrio entre **42** y **43**

6.9. Reacción de **42** con PhNHNH_2

Se llevó a cabo la reacción entre el cetoácido **42** con PhNHNH_2 , por calentamiento a reflujo en EtOH por 2h, obteniéndose el producto que se muestra en la Figura 21.

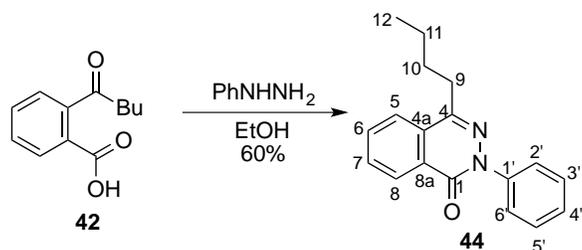


Figura 21. Reacción entre **42** y PhNHNH₂

En el espectro de RMN ¹³C del producto, hay dieciséis señales. Dos de ellas, en la región de carbonos sp², del doble de intensidad que las otras, por lo que corresponde al compuesto **44**. La señal de carbono cuaternario en δ_c 160.8 corresponde al grupo carbonilo (C1). Esta señal correlaciona en el espectro de HMBC con la señal en δ_c 8.43 (H8), que tiene correlación con la señal de carbono δ_c 128.2 (C8) en el experimento HSQC. Esta señal correlaciona en el espectro COSY con la señal en δ_H 7.95 (ddd, $J = 8.0, 7.0, 1.5$ Hz, H7), que corresponde al hidrógeno enlazado al carbono cuya señal se encuentra en δ_c 135.0 (C7). Bajo argumentos similares se asignan la señales de metinos en δ_c 126.4 y 133.0 a C5 y C6; y las señales en δ_H 8.02 (ddd, $J = 8.0, 1.5, 0.5$ Hz) y 7.86 (ddd, $J = 8.0, 7.0, 1.5$ Hz) a H5 y H6, respectivamente. En RMN ¹H, hay, de campo bajo a campo alto, señales en δ_H 3.03 (m, H9), 1.78 (m, H10), 1.49 (sext, $J = 7.0$ Hz, H11) y 0.98 (t, $J = 7.0$ Hz, H12), que correlacionan en el espectro HMBC con las señales de carbono en δ_c 32.7 (C9), 31.2 (C10), 23.5 (C11) y 14.2 (C12), correspondientes a la cadena de butilo. Las señales de H5, H9 y H10 tienen correlación con la señal en δ_c 149.6 (C4) en el experimento HMBC. En el mismo experimento se observa las correlaciones entre las señales de H5, H8 y H9 con la que se ubica en δ_c 130.5 (C4a). La presencia en el producto del fenilo proveniente de PhNHNH₂, se confirmó por las señales múltiples que originan en el espectro RMN ¹H, en δ_H 7.64-7.58 (H2' y H6'), 7.54-7.46 (H3' y H5') y 1.44-7.36 (H4'), que en el experimento HSQC tienen correlación con las señales de carbono en δ_c 129.7 (C2' y C6'), 127.1 (C3' y C5') y 128.8 (C4'). La señal correspondiente a H2' y H6' correlaciona con la que se ubica en δ_c 143.4 (C1') en el espectro HMBC.

6.10. Actividad biológica

La pertinencia de llevar a cabo la evaluación antiinflamatoria de los productos obtenidos es evidente al considerar que algunos dímeros naturales de **1** poseen esta propiedad, y un derivado semisintético mostró la mejor actividad.³⁹

La actividad antiinflamatoria de los productos naturales **1** y **2** y de los compuestos semisintéticos preparados fue evaluada por el modelo de inflamación auricular murina (Tabla 5).⁴⁰ También se evaluó la actividad citotóxica en las líneas celulares U251, PC-3, K562, HCT-15, MCF-7 y SKLU-1.⁴¹ En la Figura 22, se muestran las estructuras de los compuestos evaluados; en las Tabla 5 y 6 se resumen los resultados obtenidos.

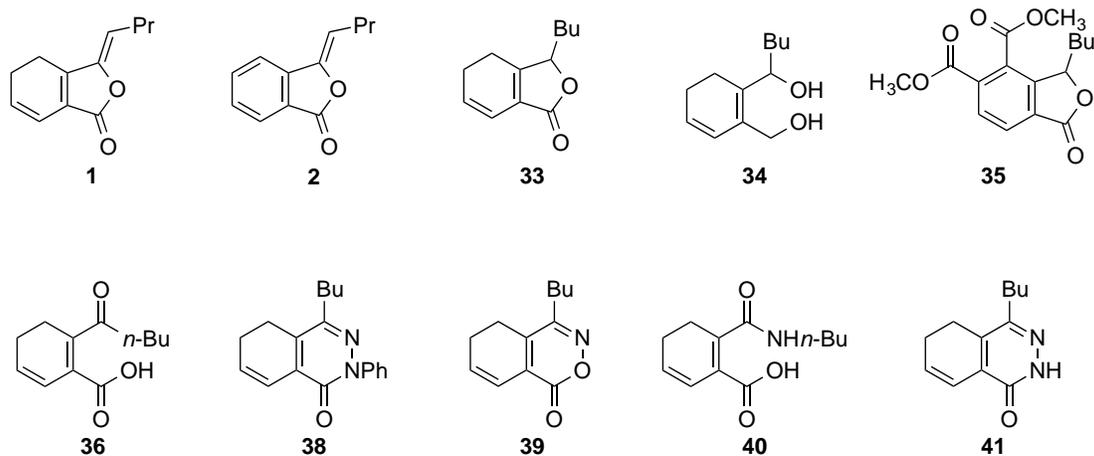


Figura 22. Compuestos evaluados

Tabla 5. Resultados de evaluación antiinflamatoria en el modelo de inflamación auricular murina de los compuestos obtenidos en este trabajo

Muestra	Dosis ($\mu\text{mol/oreja}$)	Edema (mg)	Inhibición (%)
Control (CHCl_3)	-	17.83 \pm 1.33	-
1	1	15.13 \pm 0.71	15.14
33	1	14.60 \pm 0.12	18.13
35	1	14.10 \pm 0.75*	20.93*
38	1	14.13 \pm 0.84	20.75
41	1	16.53 \pm 0.69	7.29

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

Tabla 6. Evaluación de actividad inhibitoria de la proliferación celular de algunos compuestos preparados en este trabajo

Compuesto	% de inhibición de la proliferación celular en líneas cancerígenas humanas					
	U251	PC-3	K562	HCT-15	MCF-7	SKLU-1
1	22.28	19.07	52.81	35.04	22.67	11.54
35	2.82	13.3	NC	14.0	24.32	18.37
36	6.21	NC	3.90	7.53	NC	NC
38	36.85	39.25	73.63	60.84	37.69	20.84
41	6.17	7.97	22.54	NC	7.36	NC

Como se puede observar, ninguno de los compuestos tiene actividad antiinflamatoria importante, y en cuanto a la actividad citotóxica, únicamente **38** inhibe las líneas celulares K256 y HCT-15, en 73.63 y 60.84%, respectivamente, y **1**, la primera de las líneas mencionadas en 52.81%.

Los resultados no permiten definir relaciones de estructura reactividad, puesto que no hay una tendencia entre el cambio del heterociclo y cambio en las actividades biológicas de los derivados.

No obstante, se ilustra la conveniencia de la síntesis orientada a la diversidad, puesto que de un portafolio de compuestos en los que la mayoría posee una leve actividad (citotóxica), existe un compuesto (**38**) que sí tiene mayor actividad con respecto al producto natural del que proviene, lo que pone de relieve que eficiencia práctica de este enfoque sintético, al considerar que evaluando en diversas actividades biológicas compuestos que se encuentren en regiones no muy cercanas del espacio químico, se pueden descubrir compuestos que tengan actividad biológica potenciada, aunque, como en este trabajo, se parta de compuestos que no posean tal actividad.

7. CONCLUSIONES

En este trabajo se hicieron aportes sobre el conocimiento de la reactividad química de los productos naturales *Z*-ligustílica (**1**) y *Z*-butilidenftálica (**2**). Se notó que la reducción mediante hidruro de litio y aluminio del primero tiene características peculiares, debido a la presencia del carbonilo $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -insaturado, lo cual impide que se comporte típicamente ante esta reducción, para dar la reducción total al diol. También se estableció que ese compuesto es poco reactivo frente a nucleófilos como PhNHNH₂ y NH₂OH, pero reacciona con el ion hidroxilo. El cetoácido resultante es más reactivo con este tipo de compuestos, puesto que proceden las reacciones para obtener los heterociclos correspondientes. Las reacciones de *Z*-butilidenftálica pueden considerarse con mayor predictibilidad con respecto a las de *Z*-ligustílica.

Los productos naturales **1** y **2** así como los derivados obtenidos permitieron integrar un portafolio que guardan relativa semejanza estructural y que permiten ampliar el espacio químico conocido.

Por otro lado, la exploración de la actividad biológica (ampliación del espacio biológico) del portafolio, permitió reconocer la presencia de un compuesto activo (**38**) contra la línea celular K256 (leucemia), aunque debido al número reducido de sustancias, no resulta posible proponer relaciones entre la estructura molecular y la actividad biológica. De cualquier manera, es importante reconocer que la síntesis orientada a la diversidad estructural constituye una metodología adicional para la búsqueda de compuestos con actividad biológica de interés práctico, como la terapéutica y la agronomía, entre otras áreas.

8. SECCIÓN EXPERIMENTAL

Las reacciones de Z-ligustílida (**1**) y del cetoácido **36** se llevaron a cabo con el compuesto recién purificado y preparado, respectivamente. Se emplearon disolventes de grado analítico y los reactivos (Sigma-Aldrich) se emplearon del envase. El secado de THF se realizó reflujiéndolo en LiAlH_4 por una noche y destilando; posteriormente, se redestiló después de refluir en hilo de sodio y adquirir una coloración morada con benzofenona. Se almacenó con hilo de sodio. El tolueno se secó por agitación con CaH_2 y posterior destilación de CaH_2 . Para las reacciones con fenilhidrazina, al disolvente (EtOH) se le burbujeó previamente N_2 (30 min) para eliminar el aire disuelto. Se empleó un reactor de microondas Anton Par Monowave 300, con pulsos de potencia variable, con viales de vidrio de borosilicato (10 mL o 30 mL). La temperatura se determinó con el termómetro externo de infrarrojo.

A menos que se indique de otra forma, la purificación por cromatografía en columna abierta se llevó a cabo con gel de sílice malla 230-400 y fue monitoreada por cromatografía en capa fina (cromatofolios Merck 60 F₂₅₄ de 0.2mm de espesor), visualizando con lámpara de ultravioleta y con revelador de sulfato cérico de amonio. Cuando fue necesario, se emplearon cromatoplasmas preparativas de gel de sílice (Merck 60 F₂₅₄ 2mm 20 x 20 cm) para la purificación de los compuestos.

Los espectros de RMN se adquirieron en equipos Varian Inova a 500 MHz, Bruker Avance III a 400 MHz, Jeol Eclipse a 300 MHz, y se reportan los desplazamientos químicos en ppm, referenciando con TMS o el disolvente; los espectros de UV, en un equipo Shimadzu UV160U; y los espectros de IR, en un equipo FT-IR Bruker Tensor 750. La espectrometría de masas se llevó a cabo en un equipo Jeol AccuTOF JMS-T100LC. Los puntos de fusión fueron tomados con un aparato Fisher-Johns, y no están corregidos.

La actividad antiinflamatoria se determinó basándose en el protocolo de inflamación auricular murina aguda inducida por 13-acetato de 12-*O*-tetradecanoilforbol,⁴⁰ usando

ratones machos (cepa CD-1) de 25-30 g, con disolventes (etanol) Baker y reactivos Aldrich. La actividad inhibitoria de la proliferación celular se llevó a cabo mediante el método de sulforrodamina B.⁴¹

Purificación de *Z*-ligustílida (**1**)

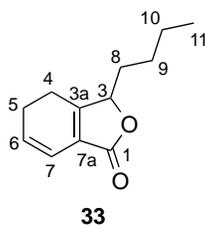
Se adsorbió parte del aceite (2 g) proveniente de un fraccionamiento primario de *L. porteri* que contiene *Z*-ligustílida (**1**), *Z*-butilidenftálida (**2**) y algunas impurezas, en gel de sílice (4.0 g). El aceite se aplicó en una columna (5 cm de diámetro) empacada con una suspensión de gel de sílice (70 g) en una mezcla de Hex-AcOEt (98.5:1.5). Se eluyó la columna con este mismo sistema de disolventes. Se colectaron fracciones de 120 mL. Se obtuvo el compuesto **2** (201.6 mg, R_f : 0.53, Hex-AcOEt 4:1) en las fracciones 6-8 y **1** (739.8 mg, R_f : 0.51, Hex-AcOEt 4:1) en las fracciones 9-15.

Una parte del compuesto **1** (160 mg) obtenido de la columna se sometió a una repurificación por medio de cromatografía en capa fina preparativa fijada en vidrio, adsorbiendo 160 mg en una placa, que se eluyó con Hex-AcOEt (85:15). La franja correspondiente a **1** se desprendió del vidrio (mediante un raspado cuidadoso de la placa) y la gel de sílice se extrajo al agitar con 100 mL de AcOEt-Me₂CO 1:1. Se evaporó el disolvente y se obtuvo una mezcla (116 mg) de los compuestos **1** y **2** en proporción 98:2. Los compuestos se identificaron por comparación con muestras auténticas obtenidas previamente en el laboratorio. Debido a la labilidad de **1** a la luz y al contacto con el aire, esta sustancia debe almacenarse en recipientes de color ámbar, en atmósfera de nitrógeno y a baja temperatura (4 °C).

Reducción de *Z*-ligustílida (**1**)

En un matraz bajo atmósfera de N₂, se agregó una disolución de **1** (116.3 mg, 0.61 mmol en 2 mL de THF) a 1.3 mL de una disolución 2.0 M de LiAlH₄ (2.6 mmol) en THF diluida en 5 mL más de ese disolvente a 0 °C. La mezcla se agitó bajo reflujo por 90 min.

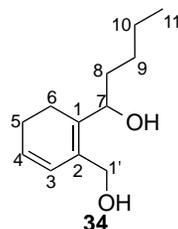
Pasado ese tiempo, se desactivó el exceso de LiAlH_4 con agua (0.1 mL), luego se adicionó una disolución de NaOH 10% (0.1 mL) y finalmente agua (2 mL). La mezcla resultante se extrajo con AcOEt (5 x 10 mL), se reunieron las fracciones orgánicas, y esta fase se filtró sobre celita, se secó con Na_2SO_4 anh. y se evaporó el disolvente. El residuo (141.4 mg), se purificó por cromatografía en columna abierta eluyendo con un gradiente de Hex- AcOEt (4:1 a 3:2), obteniéndose sedanenólida (**33**) (Lit.³⁸) (aceite amarillo, 49.8 mg, 42%, R_f : 0.38, Hex- AcOEt 7:3) y **34** (aceite incoloro, 15.7 mg, 13%, R_f : 0.26 (Hex- AcOEt 1:1).



Sedanenólida (**33**) (Lit.³⁸)

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 6.20 (dt, $J = 10.0, 2.0$ Hz, 1H, H7), 5.93 – 5.88 (m, 1H, H6), 4.92 (dd, $J = 8.0, 4.0$ Hz, 1H, H3), 2.52 – 2.40 (m, 4H, H4, H5), 1.88 (dddd, $J = 14.0, 9.0, 7.0, 4.0$ Hz, 1H, H8a), 1.53 (td, $J = 14.5, 8.0$ Hz, 1H, H8b), 1.44 – 1.30 (m, 4H, H9, H10), 0.90 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H, H11).

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 171.2 (C1), 161.3 (C3a), 128.3 (C6), 124.5 (C7a), 116.9 (C7), 82.5 (C3), 31.9 (C8), 26.7 (C9), 22.4 (C10), 22.3 (C5), 20.8 (C4), 13.8 (C11).



1-(1-hidroxibutil)-2-hidroximetil-ciclohexa-1,3-dieno (**34**)

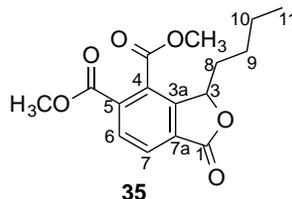
Nota: La alta labilidad de este compuesto se mencionó en la página 29.

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 6.01 (dt, $J = 9.5, 1.6$ Hz, 1H, H3), 5.88 (dt, $J = 9.5, 4.0$ Hz, 1H, H4), 4.63 (t, $J = 7.0$ Hz, 1H, H7), 4.29 (d, $J = 12.0$ Hz, 1H, H1'a), 4.13 (d, $J = 12.0$ Hz, 1H, H1'b), 2.32 – 2.22 (m, 1H, H3a), 2.18 – 2.09 (m, 3H, H3b, H4), 1.48-1.70 (m, 2H, H8) 1.36-1.18 (m, 4H, H9, H10), 0.90 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, H11).

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ 137.6 (C1), 130.6 (C2), 127.3 (C3), 127.2 (C4), 70.6 (C7), 61.1 (C1'), 35.0 (C8), 28.3 (C9), 22.9 (C5), 22.8 (C10), 21.8 (C6), 14.2 (C11).

Preparación de 3-butil-1-oxo-1,3-dihidroisobenzofurano-4,5-dicarboxilato de dimetilo (**35**)

A una disolución de **33** (88.4 mg, 0.46 mmol) en tolueno (10 mL), se añadió ADDM (0.44 mL, 3.59 mmol). La mezcla se calentó a reflujo por 22 h. Posteriormente se evaporó el disolvente y se purificó por cromatografía en columna abierta con Hex-AcOEt (4:1). Se obtuvo **35** (66.6 mg, 0.218 mmol, 47%) como un aceite amarillo. R_f : 0.44 (Hex-AcOEt 3:2) y **33** (25.4 mg, 0.12 mmol, 26%).



UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ): 289.5 (3.8), 207.0 (4.8), 269.5 (3.6) nm.

IR (KBr) ν_{max} : 2955, 2865, 1769, 1726, 1604, 1466, 1435, 1378, 1341, 1279, 1238, 1195, 1147, 1074, 1000, 962, 923, 858, 826, 788, 751, 695, 605, 412 cm^{-1} .

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 8.02 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H7), 7.95 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H6), 5.75 (dd, $J = 8.0, 3.0$ Hz, 1H, H3), 3.95 (s, 3H, H2'), 3.95 (s, 3H, H2''), 2.06 (dddd, $J =$

14.5, 10.0, 5.5, 3.0 Hz, 1H, H8a), 1.62 (dddd, $J = 14.5, 10.0, 8.0, 4.5$ Hz, 1H, H8b), 1.44 – 1.21 (m, 4H, H9, H10), 0.87 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H, H11).

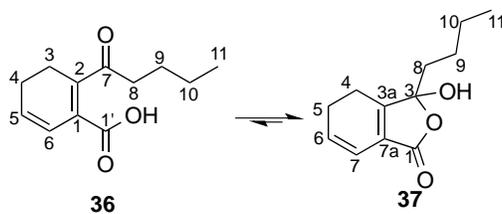
RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ 168.54 (C1), 166.31 (C1'), 166.08 (C1''), 148.55 (C3a), 135.79 (C5), 130.32 (C6), 129.63 (C4), 127.84 (C7a), 127.74 (C7), 81.56 (C3), 53.10 (C2'), 52.95 (C2''), 33.22 (C8), 26.63 (C9), 22.15 (C10), 13.67 (C11).

EM (ADTR) m/z 308, 307 $[\text{M} + \text{H}]^+$

EMAR-IES m/z 307.11707 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{O}_6$: 307.11816)

Hidrólisis de Z-ligustílida (obtención de **36**)

A un vial de 30 mL con una disolución de Z-ligustílida (**1**) (412.9 mg, 2.173 mmol) en acetona (6 mL) se le añadió una disolución acuosa de $\text{K}_2\text{CO}_3 \cdot 1.5\text{H}_2\text{O}$ 10% (6 mL), y se calentó por 6 min a 140 °C en el reactor de microondas. Se añadieron 15 mL de HCl 10%, y se extrajo con CH_2Cl_2 (5 x 8 mL). Las fases orgánicas se reunieron y se extrajo con una disolución saturada de NaCl (25 mL), luego se filtró a través de Na_2SO_4 anh. Se evaporó el disolvente y se obtuvo un residuo líquido de color café (490.2 mg), que se adsorbió en gel de sílice (1.0 g), aplicado sobre una columna previamente empacada con una suspensión de 25.0 g de gel de sílice en Hex-AcOEt 4:1, sistema con el que se eluyó la columna. Se obtuvo el compuesto **36** el cual se encuentra en equilibrio con **37** (352.6 mg, 1.695 mmol; 78%) como un aceite amarillo pálido. R_f : 0.40 (Hex-AcOEt 3:2).



Ácido 2-valeril-3,4-dihidrobenzoico (**36**) [3-hidroxi-sedanenólida (**37**)]

UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ): 283.5 (3.4), 204.5 (3.9), 248.0 (3.0) nm.

IR (KBr, película) ν_{max} : 3584, 3389, 2962, 2937, 2872, 1764, 1670, 1355, 1276, 1061, 944, 904 nm.

Nota: La asignación en RMN se hace con base en el compuesto **36**, pero se debe tener en consideración que se observa **37**, como se discutió en las páginas 36 y 37.

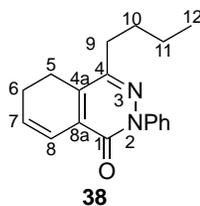
RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 6.15 (dt, $J = 10.0, 2.0$ Hz, 1.7 Hz, 1H, H6), 6.00 – 5.92 (m, 1H, H5), 2.65 – 2.29 (m, 4H, H3, H4), 2.08 – 1.92 (m, 1H, H8a), 1.88 – 1.72 (m, 1H, H8b), 1.39 – 1.16 (m, 4H, H9, H10), 0.88 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H, H11).

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ 169.5 (C1'), 158.9 (C2), 130.2 (C1), 126.1 (C5), 116.4 (C6), 107.5 (C7), 36.0 (C8), 25.3 (C9), 22.6 (C4, C10), 19.4 (C3), 13.94 (C11).

EM (ADTR) m/z 209 [M + H]⁺

Obtención de 4-butil-2-fenil-5,6-dihidroftalazin-1(2H)-ona (**38**)

A una disolución del cetoácido **36** (180.6 mg, 0.8682 mmol) en EtOH (2.5 mL) se añadió fenilhidrazina (142.9 mg, 1.3231 mmol). La mezcla se calentó a reflujo durante 1.5 h. Transcurrido ese tiempo, se evaporó el disolvente y el crudo (287.3 mg) se adsorbió en gel de sílice (576.6 mg). Se empacó una columna de 2.6 cm de diámetro con una suspensión de gel de sílice (15 g) en Hex-AcOEt (85:15) y se eluyó con la mezcla de ambos disolventes en la misma proporción, obteniéndose **38** (207 mg, 0.793 mmol, 85%) como un sólido ligeramente amarillo. R_f : 0.49 (Hex-AcOEt 3:2); P_f : 65 – 69 °C.



4-butil-2-fenil-5,6-dihidroftalazin-1(2H)-ona (**38**)

UV (MeOH) λ_{\max} (log ϵ): 336.5 (3.8), 205.0 (4.4), 267.5 (3.2) nm.

IR (KBr) ν_{\max} : 2934, 2861, 1651, 1619, 1580, 1486, 1457, 1430, 1394, 1367, 1310, 1283, 1233, 1159, 1136, 1077, 1027, 966, 935, 886, 860, 839, 805, 788, 767, 736, 694, 655, 614, 558, 509, 476, 418 nm.

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 7.63 – 7.59 (m, 2H, H2', H6'), 7.47 – 7.43 (m, 2H, H3', H6'), 7.35 (tt, $J = 7.5, 1.0$ Hz, 1H, H4'), 6.91 (td, $J = 9.5, 2.0$ Hz, 1H, H8), 6.30 (dt, $J = 9.5, 4.5$ Hz, 1H, H7), 2.72 – 2.61 (m, 4H, H5, H9), 2.41 (dddd, $J = 9.5, 9.5, 4.5, 2.0$ Hz, 2H, H6), 1.63 (p, $J = 7.5$ Hz, 2H, H10), 1.43 (sext, $J = 7.5$ Hz, 2H, H11), 0.95 (t, $J = 7.5$ Hz, 3H, H12).

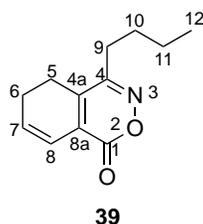
RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ 157.9 (C1), 147.8 (C4), 142.1 (C1'), 134.6 (C4a), 132.6 (C7), 132.3 (C8a), 128.6 (C3'), 127.7 (C4'), 125.5 (C2'), 121.0 (C8), 32.2 (C9), 30.1 (C10), 22.5 (C11), 22.0 (C5), 21.8 (C6), 13.8 (C12).

EM (ADTR) m/z 281 [M + H]⁺

EMAR-IES m/z 281.16470 [M + H]⁺ (calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}$: 281.16359)

Obtención de 4-butil-5,6-dihidro-1H-benzo[d][1,2]oxazin-1-ona (**39**)

A una disolución de **36** (96.5 mg, 0.46 mmol) y Et₃N (80.5 mg, 0.80 mmol) en EtOH (2 mL) se adicionó NH₂OH·HCl (36.2 mg, 0.52 mmol). La mezcla se calentó con microondas a 120 °C por 4 min. Se evaporó el disolvente y el residuo se purificó por cromatografía en columna abierta con Hex-AcOEt (4:1). Se obtuvo un aceite amarillo que se caracterizó como **39** (52.2 mg, 0.25 mmol, 55%), R_f: 0.53 (Hex-AcOEt 3:2) y **36** (18.4 mg, 0.09 mmol, 19%).



4-butil-5,6-dihidro-1*H*-benzo[*d*][1,2]oxazin-1-ona (**39**)

UV (MeOH) λ_{max} (log ε): 323.0 (3.8), 205.0 (4.1), 258.5 (3.3) nm

IR (película) ν_{max}: 3053, 2959, 2934, 2872, 1724, 1636, 1591, 1528, 1464, 1436, 1378, 1341, 1279, 1250, 1174, 1103, 1022, 939, 911, 883, 728, 697 nm.

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 6.65 (dt, *J* = 10.0, 2.0 Hz, 1H, H8), 6.35 (dt, *J* = 10.0, 4.5 Hz, 1H, H7), 2.63 – 2.51 (m, 4H, H5, H9), 2.47 – 2.37 (m, 2H, H6), 1.61 (p, *J* = 7.5 Hz, 2H, H10), 1.42 (s, *J* = 7.5 Hz, 3H, H11), 0.95 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H, H12).

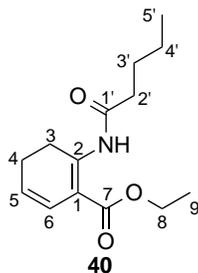
RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ 163.3 (C1), 157.0 (C4), 135.2 (C4a), 133.8 (C7), 127.3 (C8a), 119.6 (C8), 30.7 (C9), 29.2 (C10), 22.4 (C11), 13.8 (C12).

EM (ADTR) *m/z* 411 [2M+H]⁺, 206 [M + H]⁺, 178, 150.

EMAR-IES *m/z* 206.11806 [M + H]⁺ (calculado para C₁₂H₁₇N₂O: 206.11810).

Obtención de 2-(butilcarbamoil)ciclohexa-1,5-dieno-1-carboxilato de etilo (**40**)

Una mezcla del cetoácido **36** (71.6 mg, 0.34 mmol) y $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ (24.2 mg, 0.35 mmol) en EtOH (2 mL) se calentó en el reactor de microondas a 140 °C por 16 min. Se evaporó el disolvente y el crudo se purificó por cromatografía en columna abierta con Hex-AcOEt (9:1). Se obtuvo el aceite incoloro **39** (46.4 mg, 0.18 mmol, 54%) R_f : 0.49 (Hex-AcOEt 4:1) y el aceite amarillo **40** (12.0 mg, 0.06 mmol, 17%) R_f : 0.53 (Hex-AcOEt 3:2) y **36** (7.9 mg, 0.04 mmol, 11%).



2-(butilcarbamoil)ciclohexa-1,5-dieno-1-carboxilato de etilo (**40**)

UV (MeOH) λ_{max} ($\log \epsilon$): 283.5 (3.7), 204.5 (3.9), 245.5 (3.1) nm.

IR (KBr) ν_{max} : 3049, 2958, 2934, 2874, 1766, 1669, 1464, 1438, 1381, 1316, 1274, 1212, 1178, 1134, 1110, 1054, 1008, 941, 891, 862, 731, 702 nm.

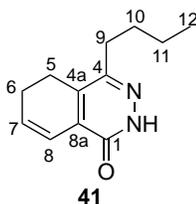
RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) δ 6.20 (dt, $J = 10.0, 1.5$ Hz, 1H, H6), 6.14 – 6.08 (m, 1H, H5), 3.47 (dq, $J = 9.0, 7.0$ Hz, 1H, H8a), 3.38 (dq, $J = 9.0, 7.0$ Hz, 1H, H8b), 2.54 – 2.50 (m, 4H, H3, H4), 2.04 (ddd, $J = 14.0, 11.5, 4.5$ Hz, 1H, H2'a), 1.84 (ddd, $J = 14.0, 11.0, 5.0$ Hz, 1H, H2'b), 1.43 – 1.27 (m, 4H, H3' y H4'), 1.23 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H, H9), 0.95 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H, H5').

RMN ^{13}C (126 MHz, CD_3OD) δ 170.5 (C8), 159.4 (C7), 132.0 (C5), 128.9 (C1), 116.7 (C6), 112.0 (C2), 60.2 (C1'), 36.8 (C1''), 26.2 (C2''), 23.6 (C3''), 23.1 (C4), 20.7 (C3), 15.5 (C2'), 14.2 (C4').

EM (ADTR) m/z 252 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 253.

Obtención de 4-butyl-5,6-dihydroftalazin-1(2H)-ona (**41**)

Una mezcla de 98.1 mg (0.47 mmol) de cetoácido **36**, 75.3 mg de $\text{N}_2\text{H}_4 \cdot 2\text{HCl}$ y 156.0 mg (1.54 mmol) de Et_3N en 2 mL de EtOH se calentó con microondas por 4 min a 120 °C. Se evaporó el disolvente y el producto crudo (250.1 mg) se adsorbió en 370 mg de gel de sílice que se aplicó en una columna de 2.6 cm de diámetro empacada con 12.5 g de sílice en Hex-AcOEt 3:2, eluyente que se empleó en la columna. Se obtuvieron 66.0 mg (0.3235 mmol, 70 %) de un sólido blanco (**41**). R_f : 0.43 (Hex-AcOEt 1:1), P_f : 136-138 °C y **36** (9.1 mg, 0.04 mmol, 9 %)



UV (MeOH) λ_{max} ($\log \epsilon$): 322.5 (3.6), 321 (3.7), 205.5 (4.1), 263.5 (3.1), 225 (3.7) nm

IR (KBr) ν_{max} : 3127, 3055, 3007, 2956, 2928, 2864, 2829, 1645, 1613, 1581, 1533, 1458, 1434, 1392, 1372, 1350, 1294, 1239, 1209, 1181, 1107, 1078, 1017, 988, 929, 883, 777, 730, 705, 665, 598, 567, 533, 489, 462, 419 cm^{-1} .

RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) δ 6.71 (dt, $J = 10.0, 2.0$ Hz, 1H, H8), 6.34 (dt, $J = 10.0, 4.5$ Hz, 1H, H7), 2.73 – 2.67 (m, 2H, H5), 2.66 – 2.61 (m, 2H, H9), 2.45 – 2.35 (m, 2H, H6),

1.61 (p, $J = 7.5$ Hz, 1H, H10), 1.42 (sext, $J = 7.5$ Hz, 2H, H11), 0.96 (t, $J = 7.5$ Hz, 3H, H12).

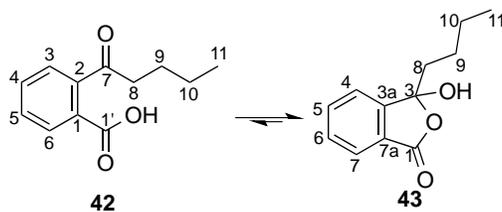
^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD) δ 161.1 (C1), 150.5 (C4), 138.4 (C8a), 134.8 (C7), 132.4 (C4a), 120.5 (C8), 32.7 (C9), 31.0 (C10), 23.4 (C11), 23.0 (C5), 22.6 (C6), 14.2 (C12).

EM (ADTR) m/z 409 $[2\text{M}+\text{H}]^+$, 205 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 206.

EMAR-IES m/z 205.13410 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (calculado para $\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}$: 205.13409).

Hidrólisis de Z-butilidenftálida (obtención de **42**)

A un vial de 10 mL con una disolución de **2** (201.8 mg, 1.073 mmol) en acetona (2.5 mL) se le añadió una disolución acuosa de $\text{K}_2\text{CO}_3 \cdot 1.5\text{H}_2\text{O}$ 10% (2.5 mL), y se calentó por 7 min a 140 °C en el reactor de microondas. Se añadieron 10 mL de HCl 10%, y se extrajo con CH_2Cl_2 (5 x 8 mL). Las fases orgánicas se reunieron y se extrajo con una disolución saturada de NaCl (25 mL), luego se filtró a través de Na_2SO_4 anh. Se evaporó el disolvente y se obtuvo un residuo líquido de color café (185.5 mg), que se adsorbió en gel de sílice. Este se aplicó sobre una columna previamente empacada con una suspensión de 9.4 g de gel de sílice en Hex-AcOEt 4:1, sistema con el que se eluyó la columna. Se obtuvo el compuesto **42**, el cual se encuentra en equilibrio con **43** (149.1 mg, 0.724 mmol; 68%) como un aceite amarillo pálido. R_f : 0.36 (Hex-AcOEt 3:2).



Ácido 2-valerilbenzoico (**42**)

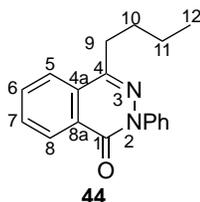
Nota: La asignación en RMN se hace con base en el compuesto **42**, pero se debe tener en consideración que se observa **43**, como se discutió en las páginas 53 y 54.

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 7.82 (dt, $J = 7.7, 1.0$ Hz, 1H, H6), 7.77 – 7.65 (m, 1H, H4), 7.57 (m, 2H, H3, H5), 2.31 – 1.94 (m, 2H, H8), 1.46 – 1.04 (m, 4H, H9, H10), 0.86 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, H11).

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ 168.8 (C1'), 149.1 (C3a), 134.8 (C4), 130.7 (C3), 125.6 (C6), 122.4 (C5), 107.9 (C7), 38.7 (C8), 25.54 (C9), 22.59 (C10), 13.95 (C11).

Obtención de 4-butil-2-fenil-ftalazin-1(2H)-ona (**44**)

A una disolución del cetoácido **42** (149.1 mg, 0.724 mmol) en EtOH (2 mL) se añadió fenilhidrazina (140.1 mg, 1.296 mmol). La mezcla se calentó a reflujo durante 2 h. Transcurrido ese tiempo, se evaporó el disolvente y el crudo (216.0 mg) se adsorbió en gel de sílice (408.0 mg). Se empacó una columna de 2.4 cm de diámetro con una suspensión de gel de sílice (10 g) en Hex-AcOEt (4:1) y se eluyó con la mezcla de ambos disolventes en la misma proporción, obteniéndose **44** (207 mg, 0.793 mmol, 85%) como un aceite amarillo. R_f : 0.50 (Hex-AcOEt 7:3).



4-butil-2-fenil-ftalazin-1(2H)-ona (**44**)

UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ): 296.2 (4.0), 212.6 (4.7), 273.0 (3.9) nm.

IR (KBr) ν_{\max} : 3051, 2961, 2935, 2898, 2868, 1658, 1589, 1491, 1461, 1451, 1429, 1382, 1338, 1236, 1167, 1131, 1067, 1028, 998, 964, 902, 866, 831, 789, 750, 725, 683, 641, 613, 587, 533, 512, 487, 466, 422. nm.

RMN ^1H (300 MHz, CD_3OD) δ 8.43 (ddd, $J = 8.0, 1.5, 1.0$ Hz, 1H, H8), 8.02 (ddd, $J = 8.0, 1.5, 1.0$ Hz, 1H, H5), 7.95 (ddd, $J = 8.0, 7.0, 1.5$ Hz, 1H, H7), 7.86 (ddd, $J = 8.0, 7.0, 1.5$ Hz, 1H, H6), 7.64 – 7.58 (m, 2H, H2', H6'), 7.54 – 7.46 (m, 2H, H3', H5'), 7.44 – 7.36 (m, 1H, H4'), 3.03 (m, 2H, H8), 1.87 – 1.65 (m, 4H, H9), 1.49 (sext, $J = 7.0$ Hz, 2H, H10), 0.98 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H, H11).

RMN ^{13}C (75 MHz, CD_3OD) δ 160.8 (C1), 149.6 (C4), 143.4 (C1'), 135.0 (C7), 133.0 (C6), 130.5 (C4a), 129.7 (C3', C5'), 129.3 (C8a), 128.8 (C4'), 128.2 (C8), 127.1 (C2', C6'), 126.4 (C5), 32.7 (C9), 31.2 (C10), 23.5 (C11), 14.2 (C12).

EM (ADTR) m/z 279 [M + H]⁺

EMAR-IES m/z 479.14962 [M + H]⁺ (calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}$: 279.14974)

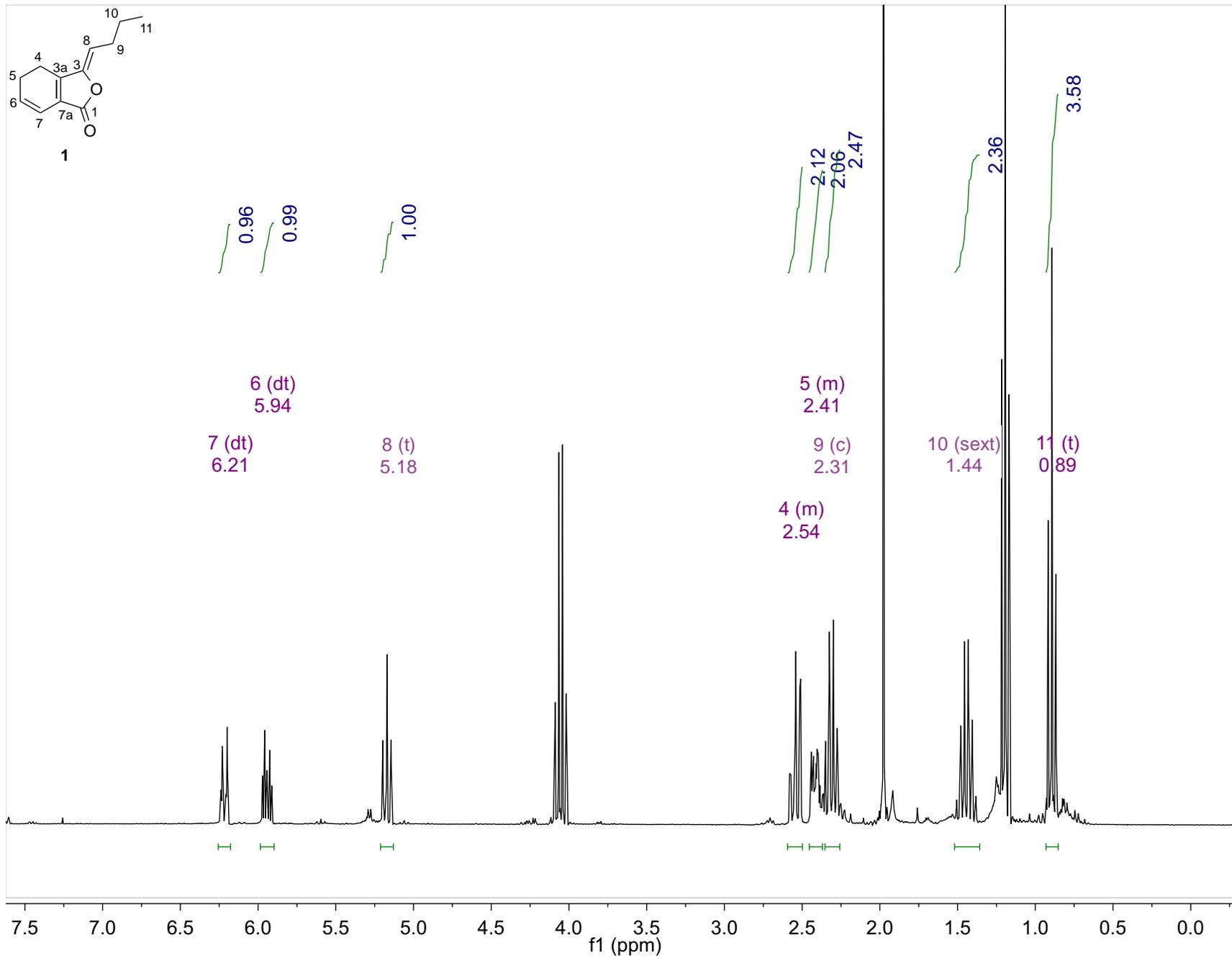
9.0 REFERENCIAS

1. Greenwood, D. *J. Antimicrob. Chemother.* **1992**, *30*, 417-427.
2. (a) Levesque, H.; Lafont, O. *Rev. Méd. Interne* **2000**, *21 Suppl. 1*, 8-18. (b) Madhi, J. G.; Mahdi, A. J.; Mahdi, A. J.; Bowen, I. D. *Cell Prolif.* **2006**, *39*, 147-155.
3. Corson, T. W.; Crews, C. M. *Cell* **2007**, *130*, 769-774.
4. Heinrich, M.; Frei H., B.; Leonti, M. *J. Nat. Prod.* **2014**, *77*, 678-689.
5. Bade, R.; Chan, H.-F.; Reynisson, J. *Eur. J. Pharmacol.* **2010**, *45*, 5646-5652.

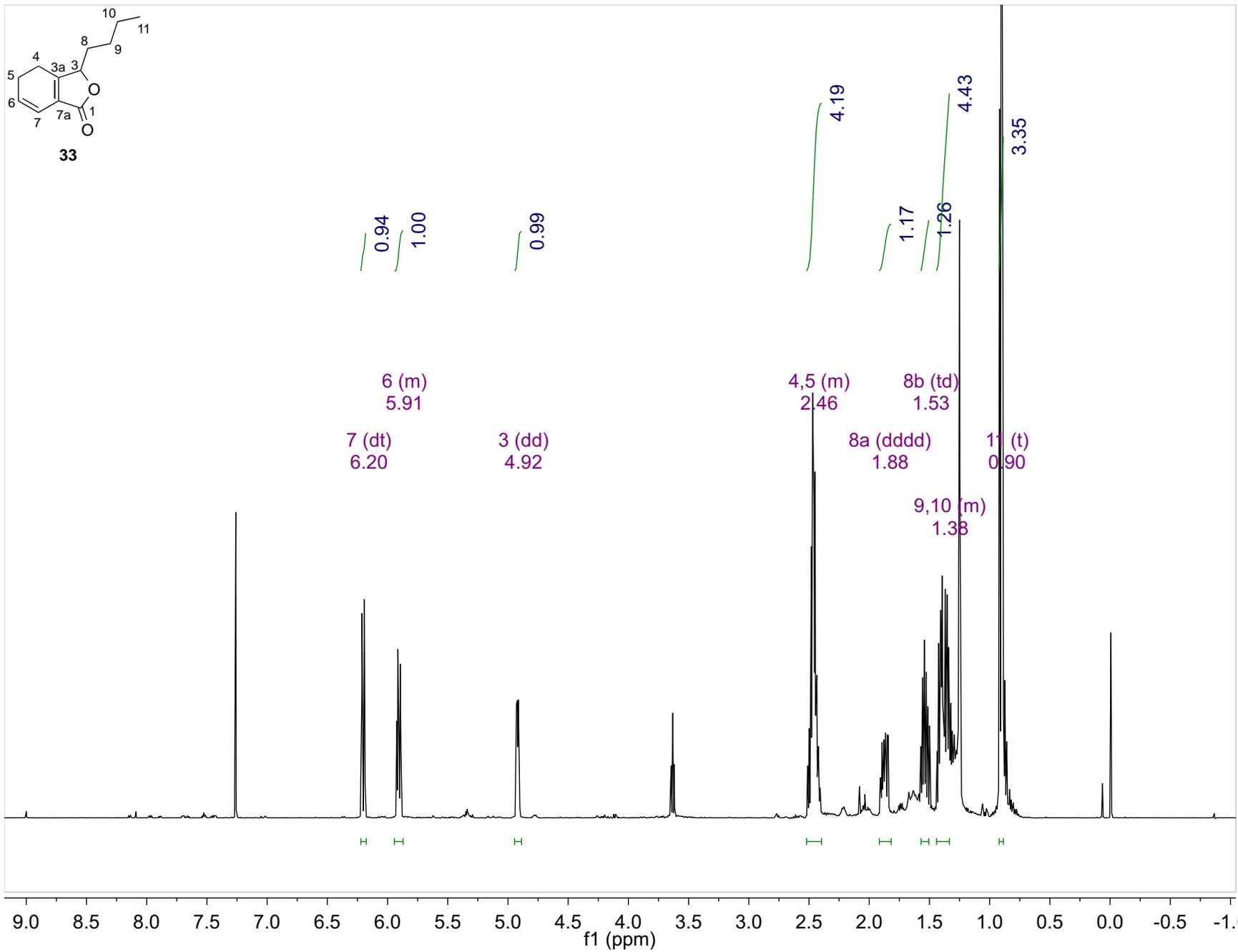
-
6. Reymond, J.-L.; Van Deursen, R.; Blum, L. C.; Rudiggkeit, L. *Med. Chem. Commun.* **2010**, *1*, 30-38.
7. Bye, R. A. *Econ. Bot.* **1986**, *40*, 103-124.
8. (a) Appelt, G. D. *J. Ethnopharmacol.* **1985**, *13*, 51-55. (b) Bye, R. A. *Econ. Bot.* **1986**, *40*, 103-124. (c) Bye, R. A.; Linares, E. *J. Ethnobiol.* **1986**, *6*, 289-306. (d) Linares, E.; Bye, R. A. *J. Ethnopharmacol.* **1987**, *19*, 153-198.
9. (a) Delgado, G.; Reza-Garduño, R. G.; Ríos, M. Y.; del Río, F. *Planta Med.* **1992**, *58*, 570-571. (b) Delgado, G.; Reza-Garduño, R. G.; Toscano, R. A.; Bye, R. A., Linares *Heterocycles* **1988**, *27*, 1305-1312.
10. León, A.; Toscano, R. A.; Tortoriello, J.; Delgado, G. *Nat. Prod. Res.* **2011**, *25*, 1234-1242.
11. (a) Beck, J. J.; Stermitz, S.-C. *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 891-900.; (b) Gijbels, M. J. M.; Schiffer, J. J. C.; Svendsen, B. *Riv. Ital. EPPOS* **1979**, *LXI*, 335-331. (c) Pushan, W.; Xuanliang, G.; Yixiong, W.; Fukuyama, Y.; Miura, i.; Sugawara, M. *Phytochemistry* **1984**, *23*, 2033-2038. (d) Or, T. C. T.; Yang, C. L. H.; Law, A. H. Y.; Li, J. C. B.; Lau, A. S. Y. *Neuropharmacology* **2011**, *60*, 823-831. (e) Zschocke, S.; Liu, J.-H.; Stuppner, H.; Bauer, R. *Phytochem. Anal.* **2008**, *9*, 283-290.
12. León, A.; Chávez, M. I.; Delgado, G. *Magn. Reson. Chem.* **2011**, *49*, 469-476.
13. (a) Feng, Z.; Lu, Y.; Wu, X.; Zhao, P.; Li, J.; Peng, B.; Qian, Z.; Zhu, L. *J. Ethnopharmacol.* **2012**, *144*, 313-321. (b) Wang, J.; Du, J.-R.; Wang. Y.; Kuang, X.; Wang, C.-Y. *Acta Pharm. Sin.* **2010**, *31*, 791-797.
14. Cégiéla-Carlio, P.; Bessièrre J.-M.; David, B.; Mariotte A.-M.; Gibbons, S.; Dijoux-Franca, M.-G. *Flavour Fragr. J.* **2005**, *20*, 671-675.

-
15. Del-Ángel, M.; Nieto, A.; Ramírez-Apán, T.; Delgado, G. *Eur. J. Pharmacol.* **2015**, *752*, 40-48.
16. Juárez-Reyes, K.; Ángeles-López, G. E.; Rivero-Cruz, I.; Bye, R.; Mata, R. *Pharm. Biol.* **2014**, *52*, 14-20.
17. Lin, G.; Chan, S. S.-K.; Chung, H.-S.; Li, S.-L. *Stud. Nat. Prod. Chem.* **2005**, *32*, 611-669.
18. Li, S. L.; Yan, R.; Tam, Y. K.; Lin, G. *Chem. Pharm. Bull.* **2007**, *55*, 140-144.
19. Ogawa, Y.; Mori, Y.; Maruno, M.; Wakamatsu, T. *Heterocycles* **1997**, *45*, 1869-1872.
20. Ríos, M.Y.; Delgado, G. *Rev. Soc. Quím. Mex.* **1999**, *43*, 127-132.
21. González Ávila, J. L., Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Distrito Federal, Junio 2012.
22. Tsuchida, T.; Kobayashi, M.; Kaneko, K.; Mitsunashi, H. *Chem. Pharm. Bull.* **1987**, *35*, 4460-4464.
23. Mitsunashi, H.; Nagai, U. *Tetrahedron* **1963**, *19*, 1277-1283.
24. Lager, E.; Sundin, A.; Toscano, R. A.; Delgado, G.; Sterner, O. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 4215-4218.
25. Li, W.; Wu, Y.; Liu, X.; Yan, C.; Liu, D.; Pan, Y.; Yang, G.; Yin, F.; Weng, Z.; Zhao, D.; Chen, Z.; Cai, B. *Molecules* **2013**, *18*, 520-534.
26. Quiroz-García, B.; Figueroa, R.; Cogordán, J. A.; Delgado, G. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 3003-3006.
27. Schinkovitz, A.; Pro, S. M.; Main, M.; Chen, S.-N.; Jaki, B. U.; Lankin, D. C.; Pauli, G. *F. J. Nat. Prod.* **2008**, *71*, 1604-1611.

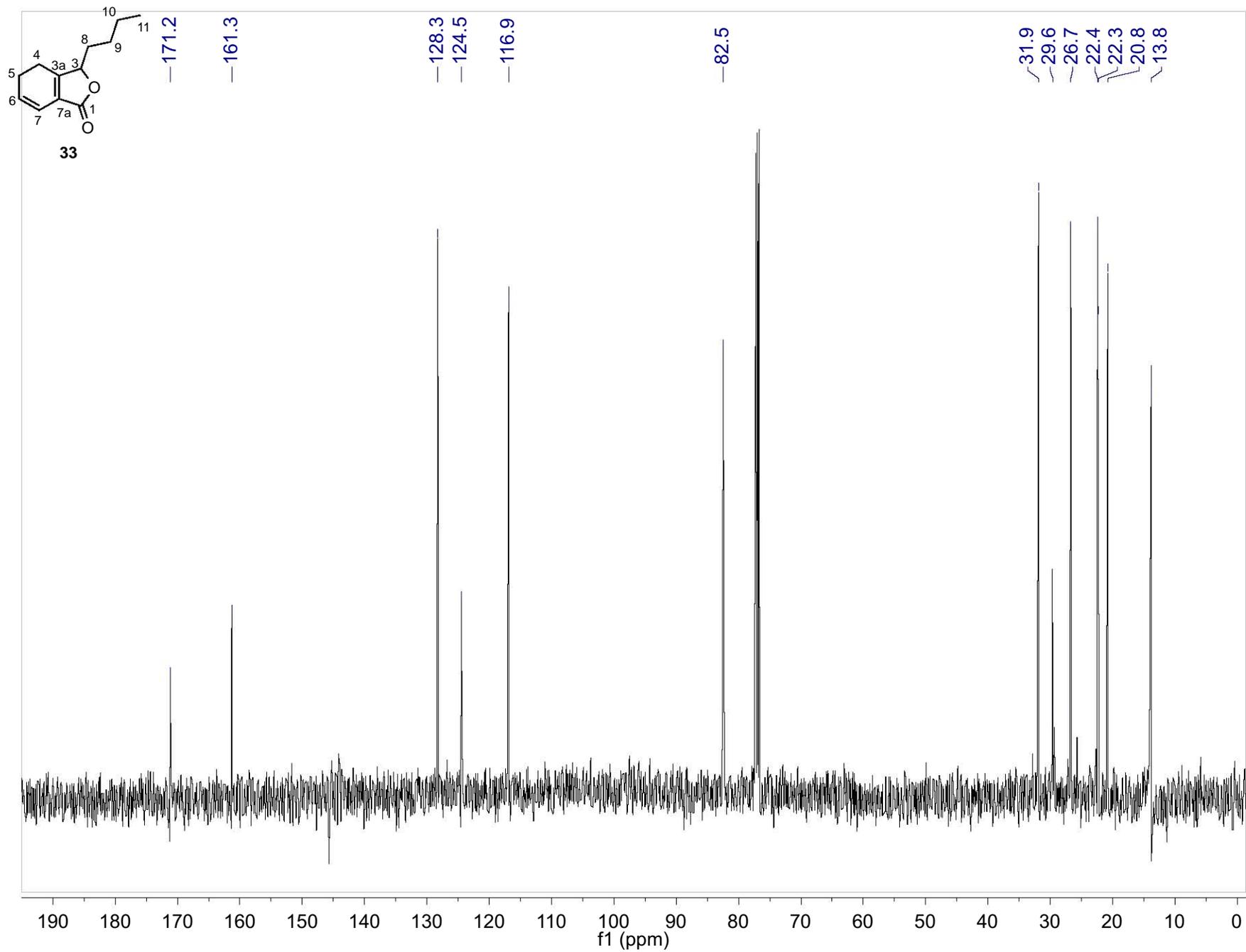
-
28. Cui, F.; Feng, L.; Hu, J. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2006**, *32*, 747-755.
29. Zhan, J. Y.; Zhang, W. L.; Zheng, K. Y.; Zhu, K. Y.; Chen, J.; Chan, P. H.; Dong, T. T.; Choi, R. C.; Lam, H.; Tsim, K. W.; Lau, D. T. *Chin. Med. (London, U. K.)* **2013**, *8*, 12-19.
30. Zuo, A. H.; Cheng, M. C.; Zhuo, R. J.; Wang, L.; Xiao, H. B. *Acta Pharm. Sin.* **2013**, *48*, 911-916.
31. Kobayashi, M.; Fujita, M.; Mitsunashi, H. *Chem. Pharm. Bull.* **1987**, *35*, 1427-1433.
32. Kobayashi, M.; Mitsunashi, H. *Chem Pharm Bull* **1987**, *35*, 4789-4792.
33. Beck, J. J.; Stermitz, F. R. *J. Nat. Prod.* **1995**, *58*, 1047-1055.
34. Newman, D. J.; Cragg, G. M. *J. Nat. Prod.* **2012**, *75*, 311-335.
35. Tan, S. D. *Nat. Chem. Biol.* **2005**, *2*, 74-84.
36. Schreiber, S. L. *Science* **2000**, *287*, 1964-1969.
37. Galloway, W. R. J. D.; Isidro-Llobet, A.; Spring, D. R. *Nat. Commun.* **2010**, *1*, 1-13.
38. Oguro, D.; Watanabe, H. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2011**, *75*, 1502-1505.
39. Del-Ángel, M.; Nieto, A.; Ramírez-Apan, T.; Delgado, G. *Eur. J. Pharmacol.* **2015**, *752*, 40-48.
40. Gábor, M. *Methods Mol. Biol.* **2003**, *225*, 129-137.
41. Monks, A.; Scudiero, D.; Skehan, P.; Shoemaker, R.; Paul, K.; Hose, C.; Langley J.; Cronise, P.; Vaigro-Wolff, A.; Gray-Goddrich, A.; Campbell, H.; Mayo, J.; Boyd, M. *J. Natl. Cancer Inst.* **1991**, *83*, 757-766.



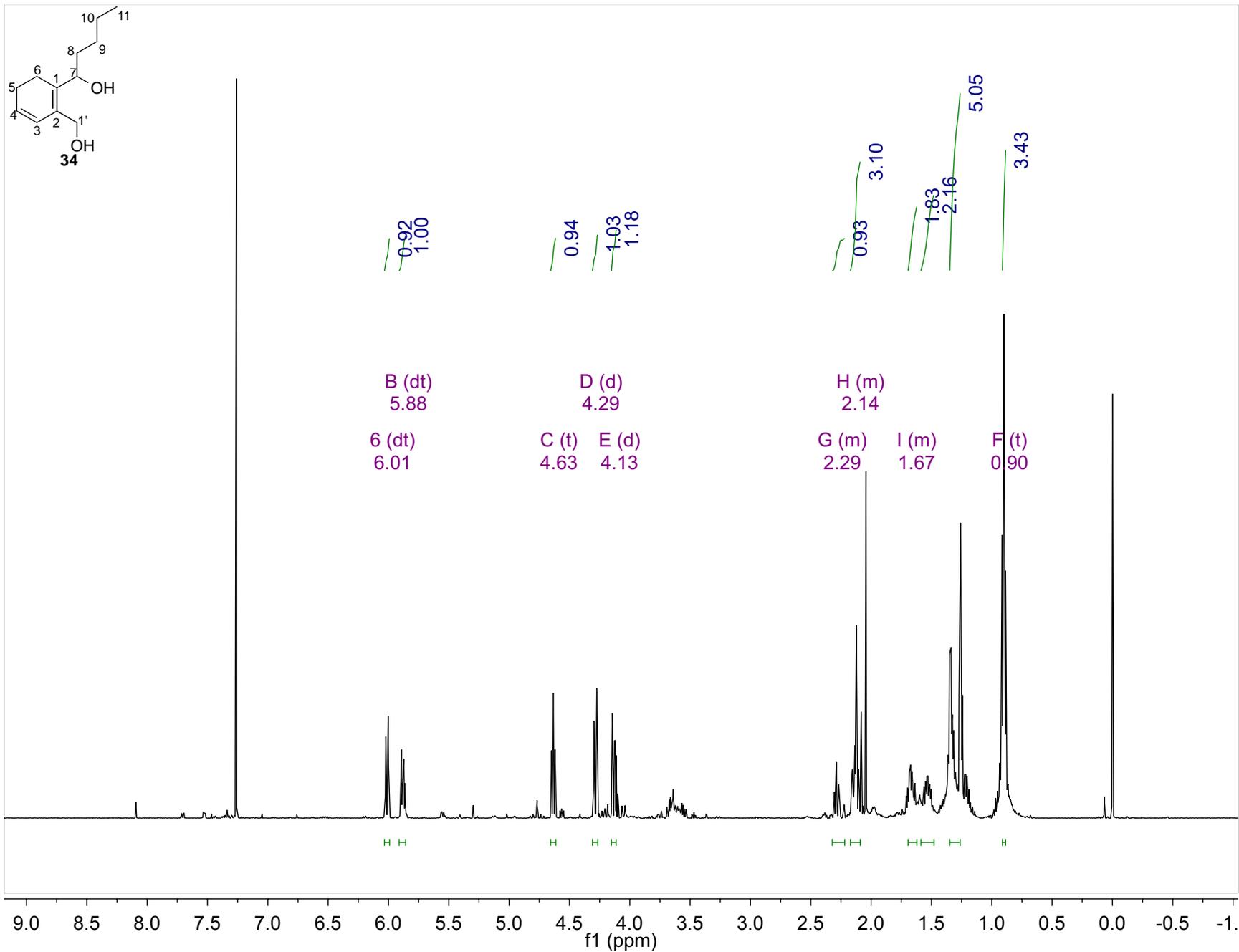
Espectro 1. RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) de **1**.



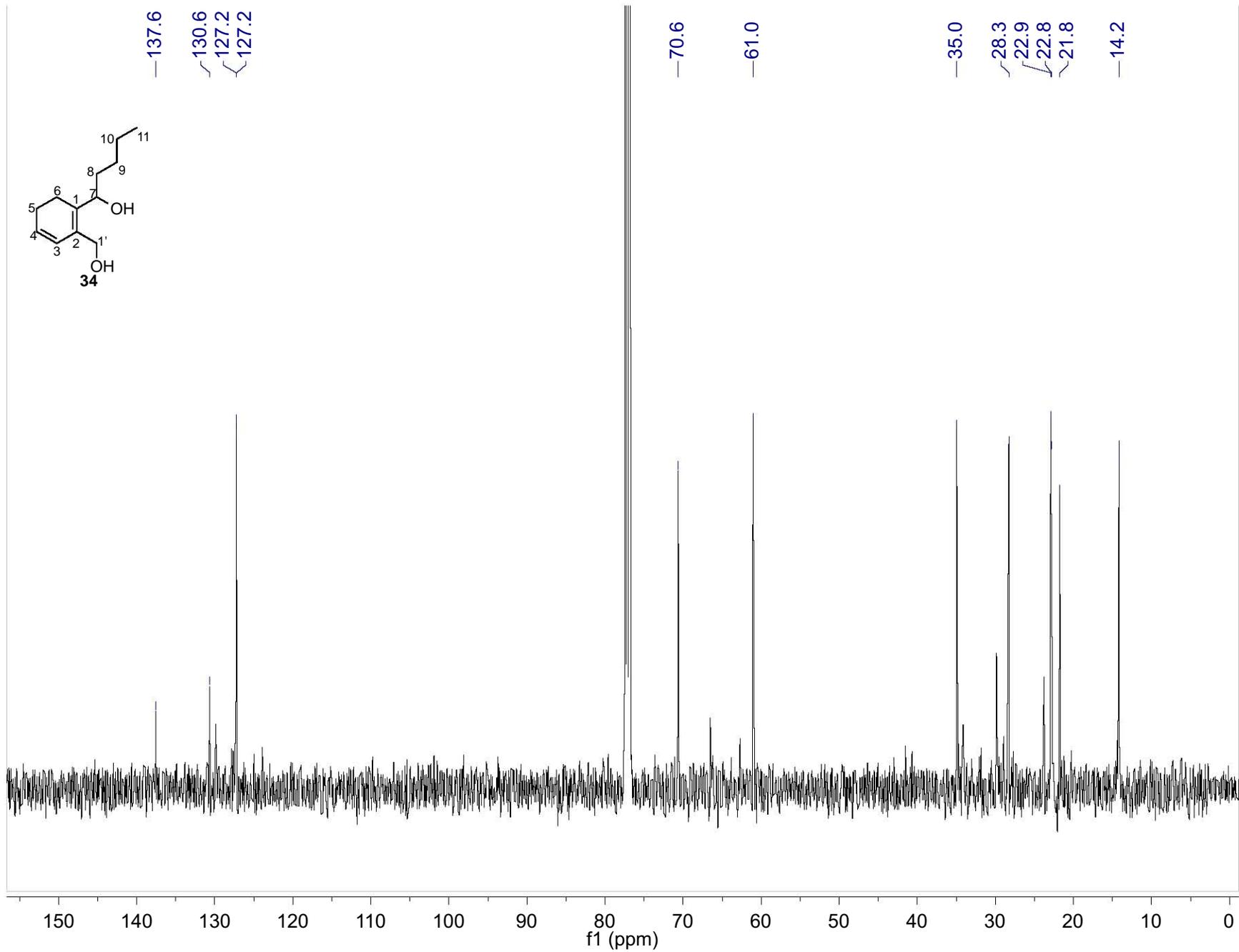
Espectro 2. RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de **33**.



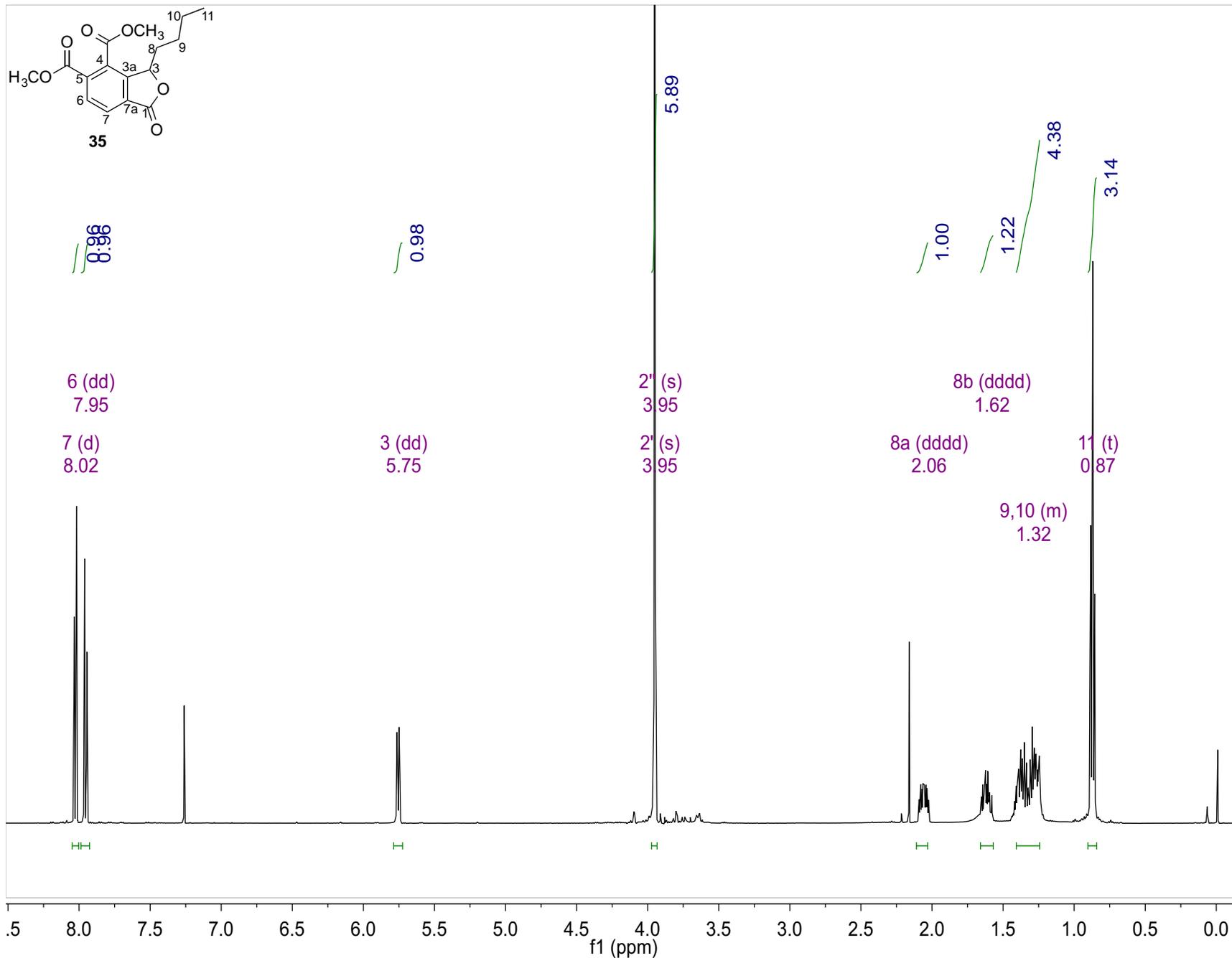
Espectro 3. RMN ^{13}C (126 MHz, CDCl_3) de **33**.



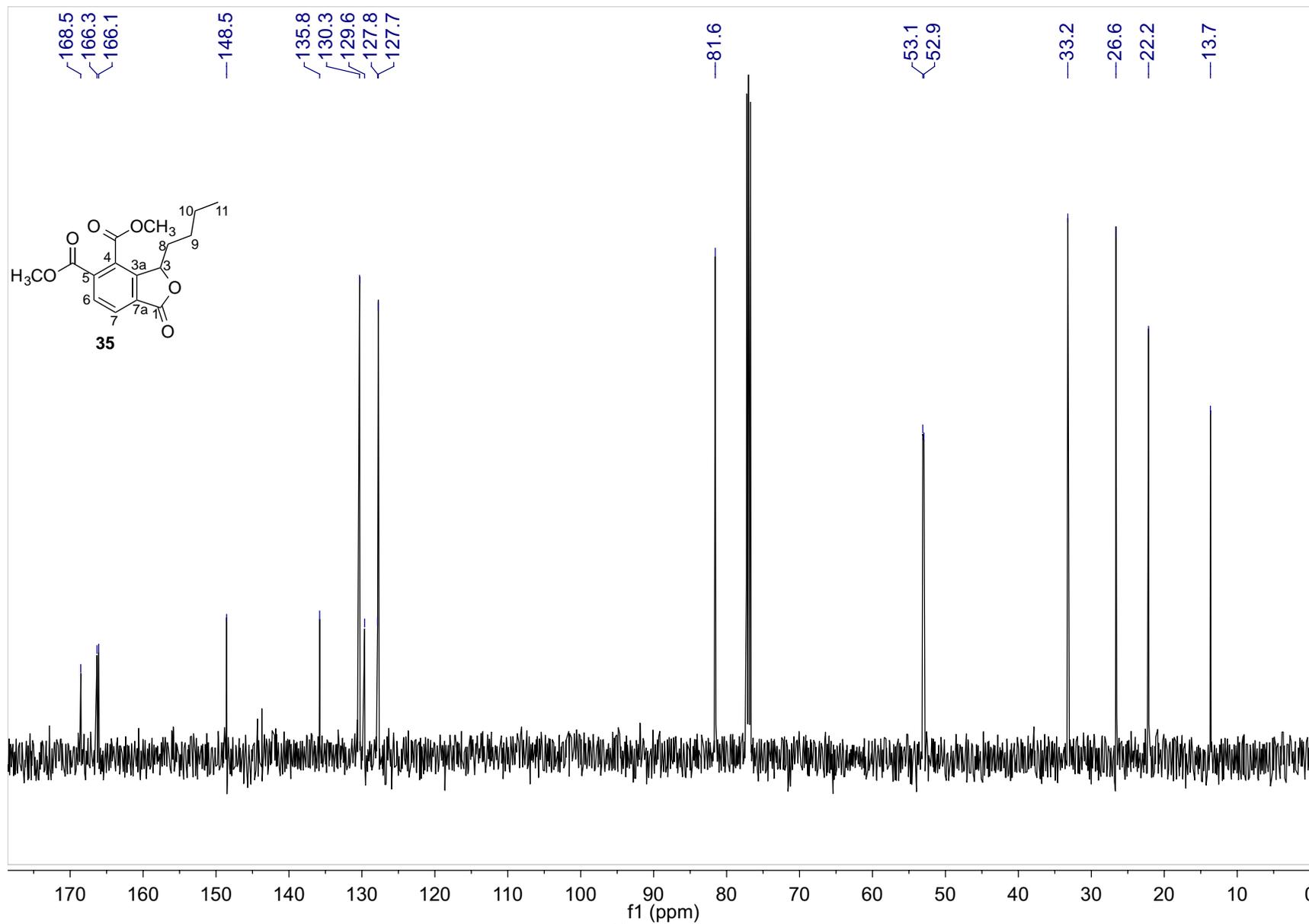
Espectro 4. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) de 34.



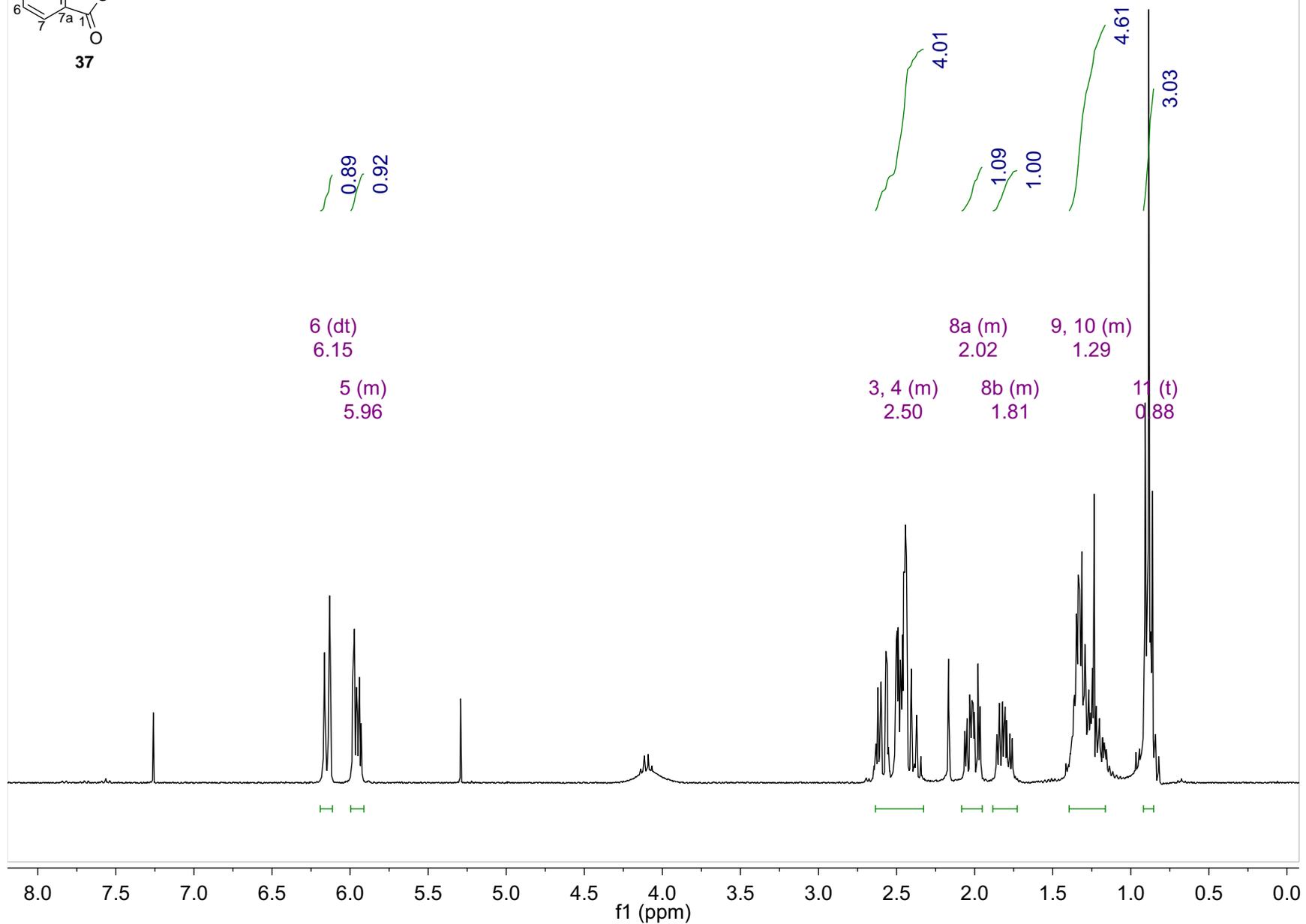
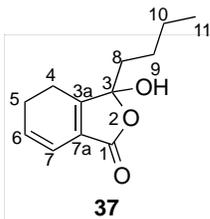
Espectro 5. RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de **34**.



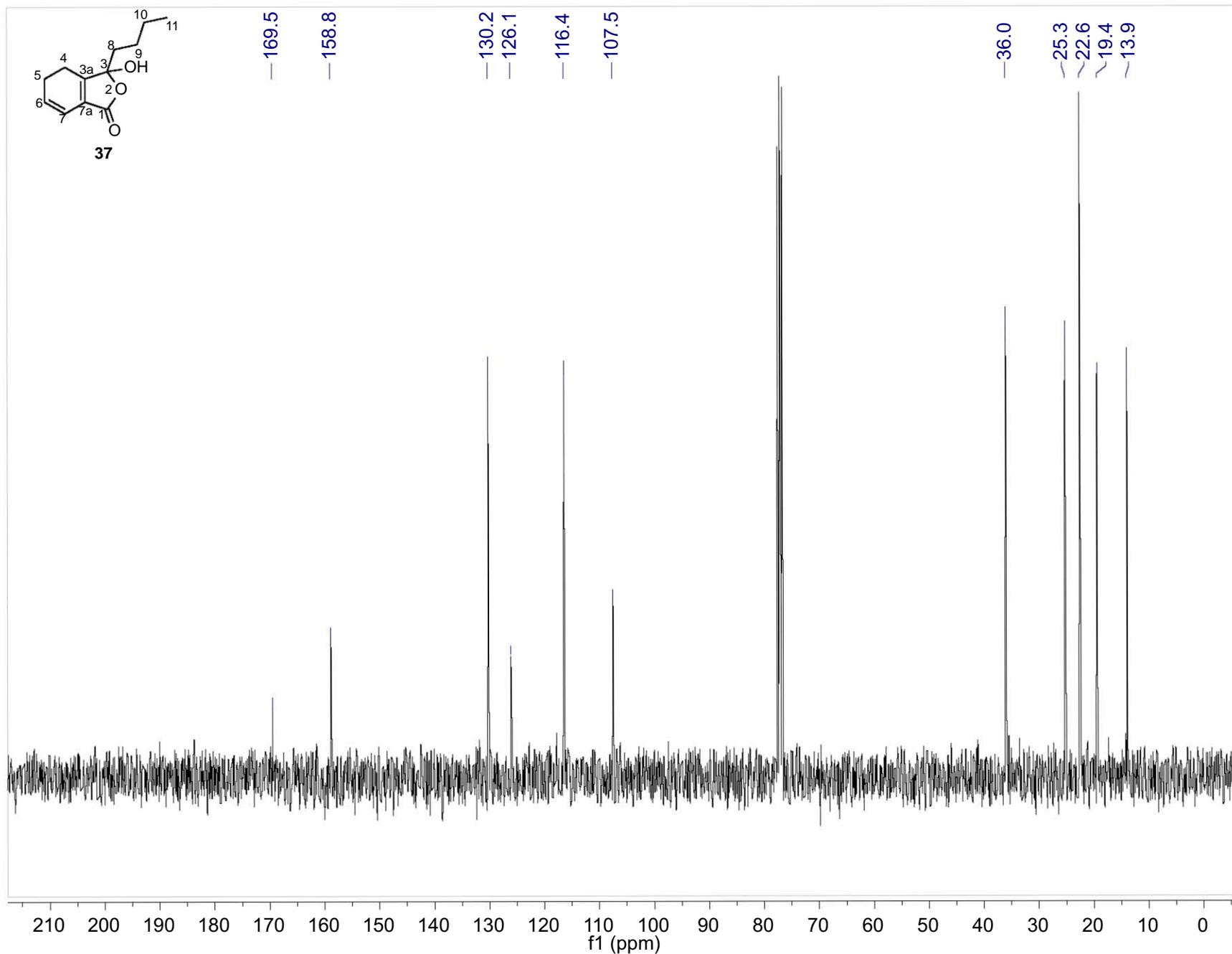
Espectro 6. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) de **35**.



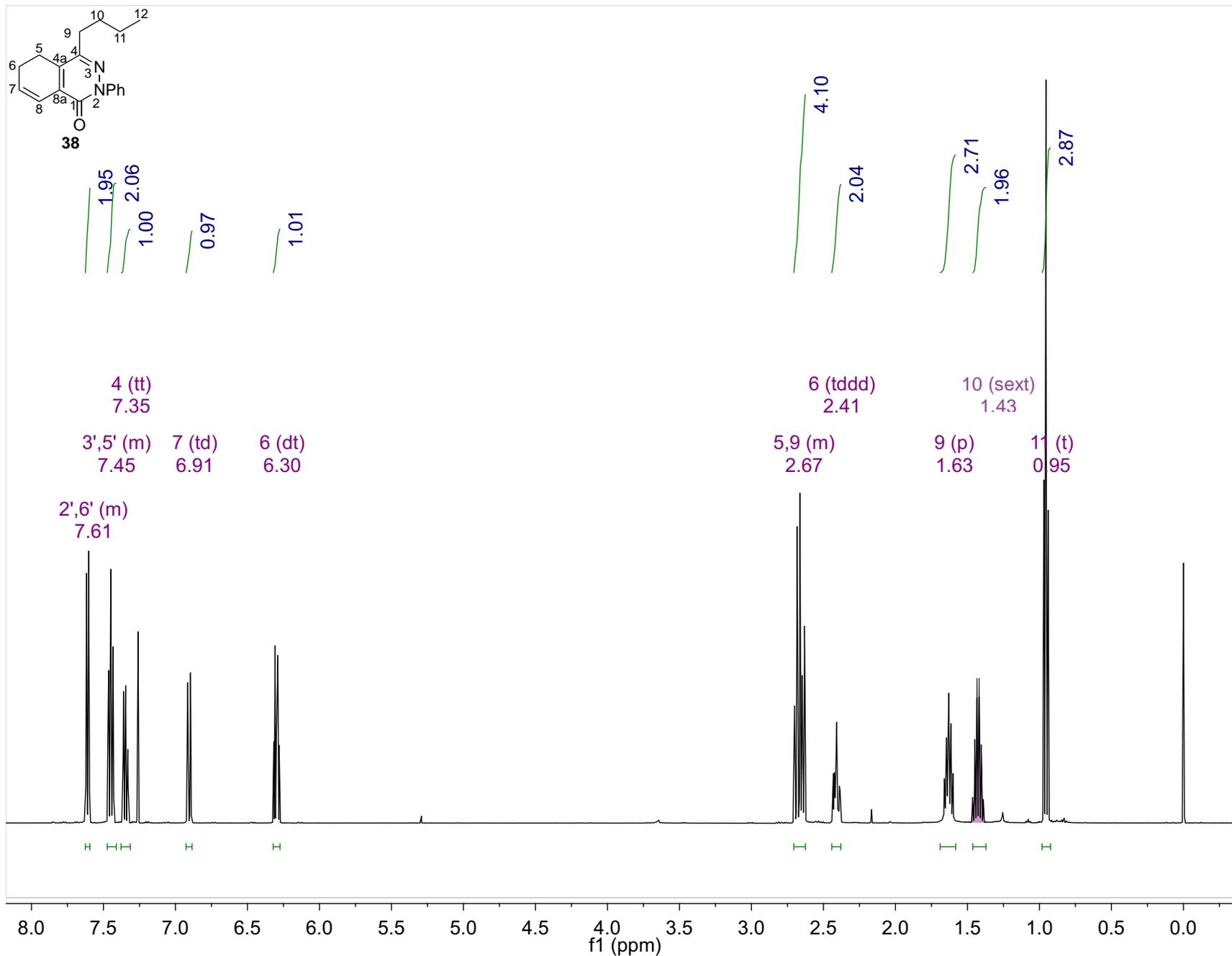
Espectro 7. RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de **35**.



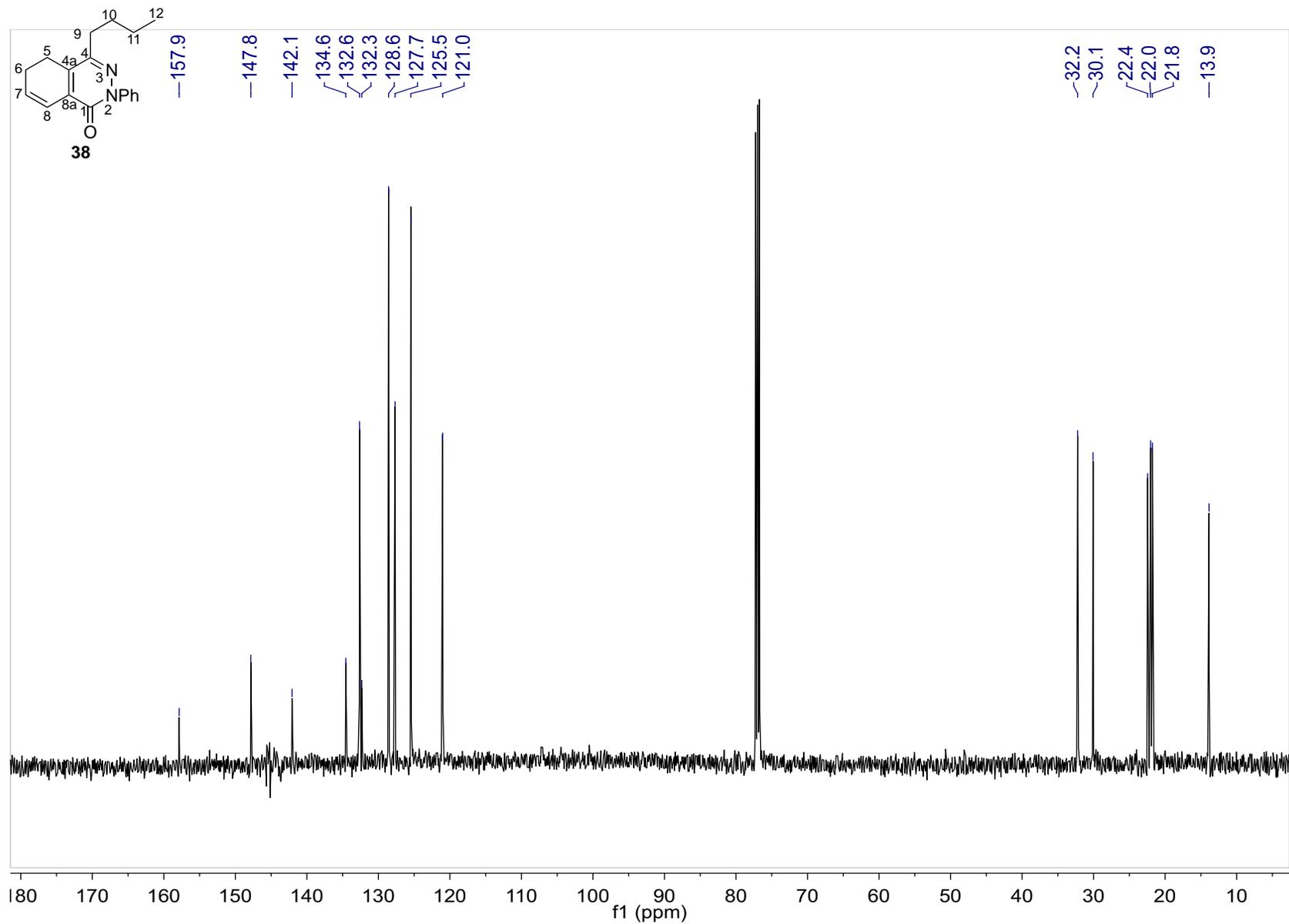
Espectro 8 RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) de 36.



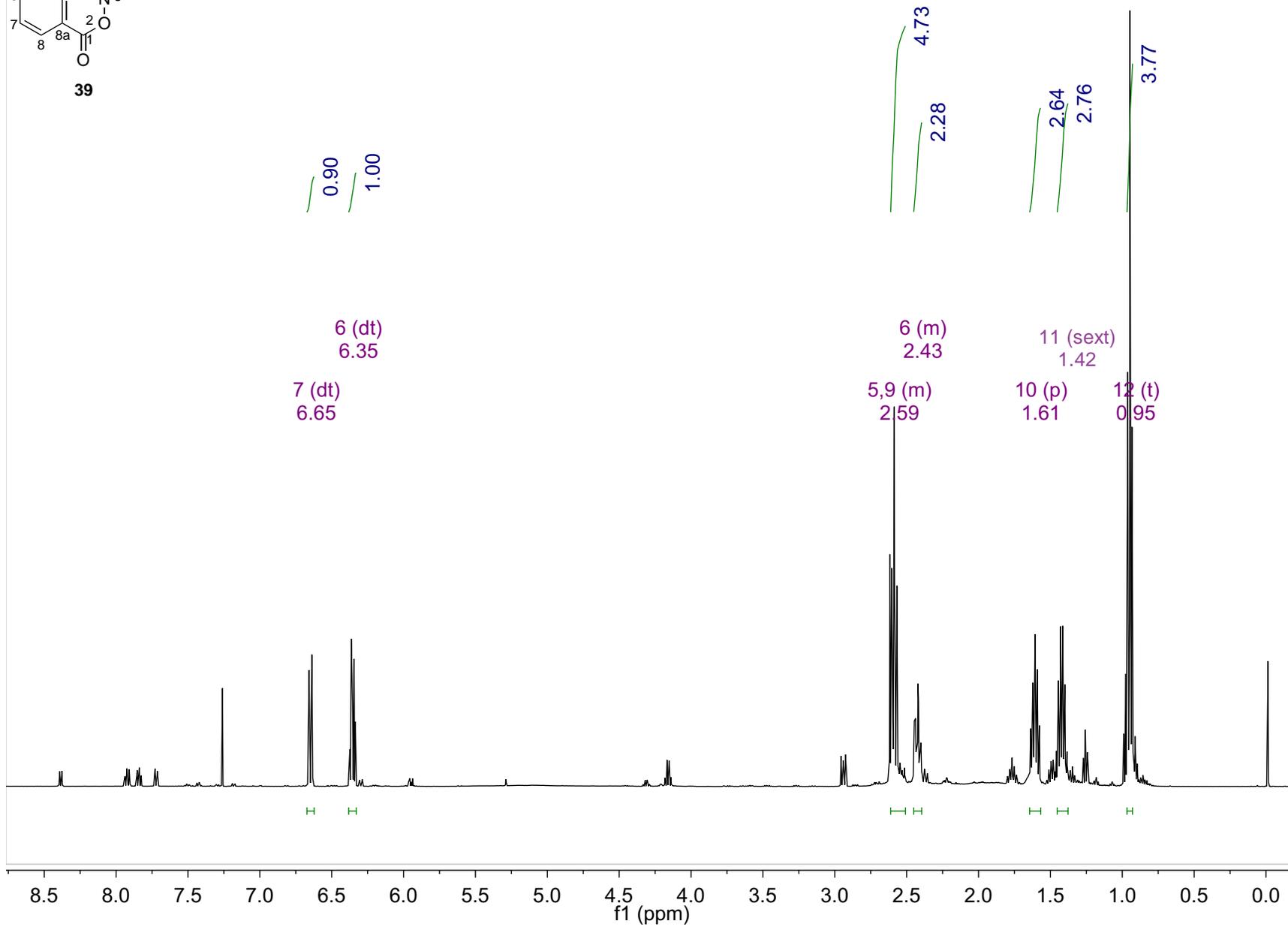
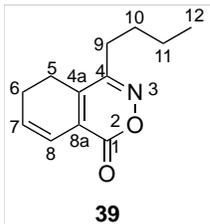
Espectro 9. RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de 37.



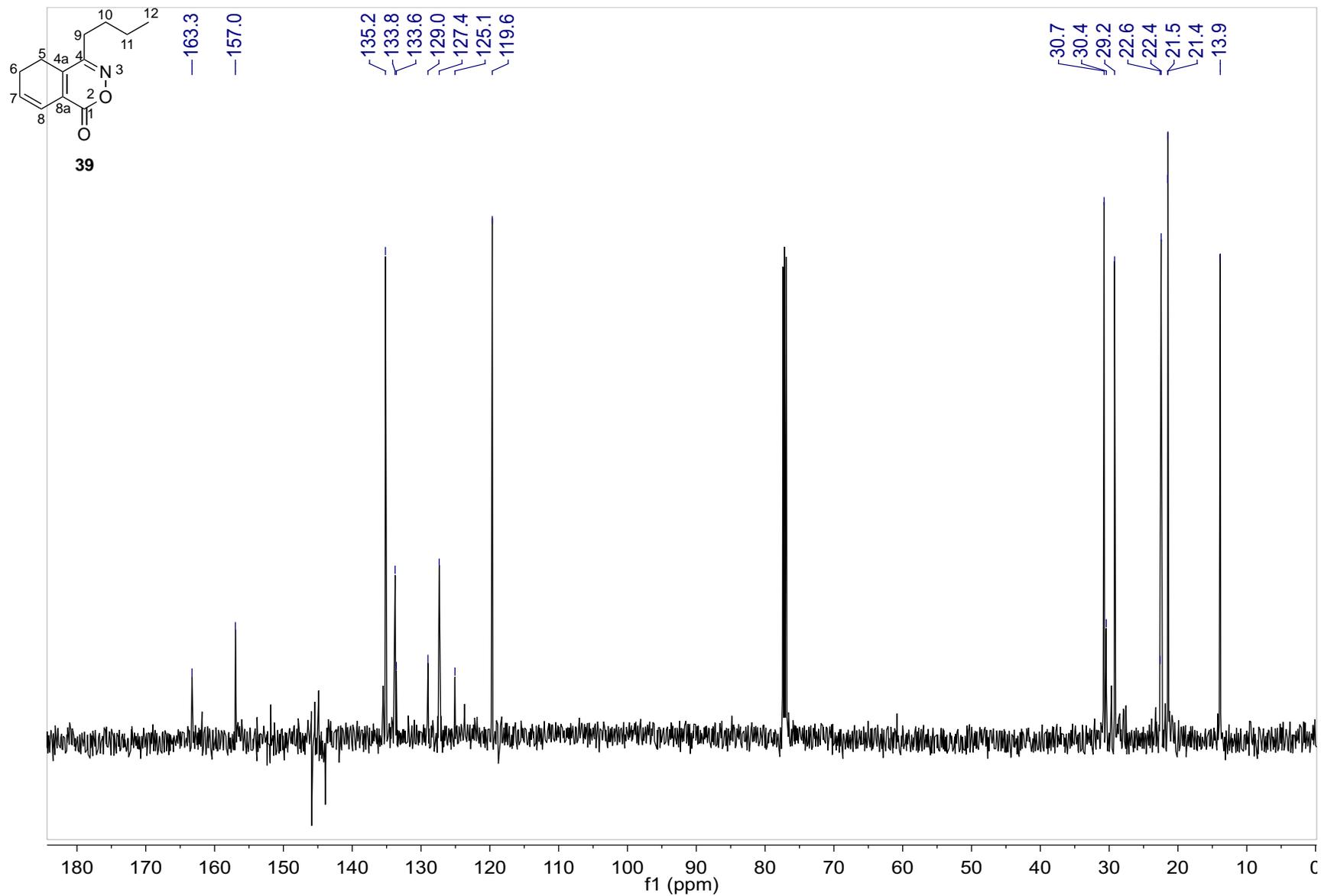
Espectro 10. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) de **38.**



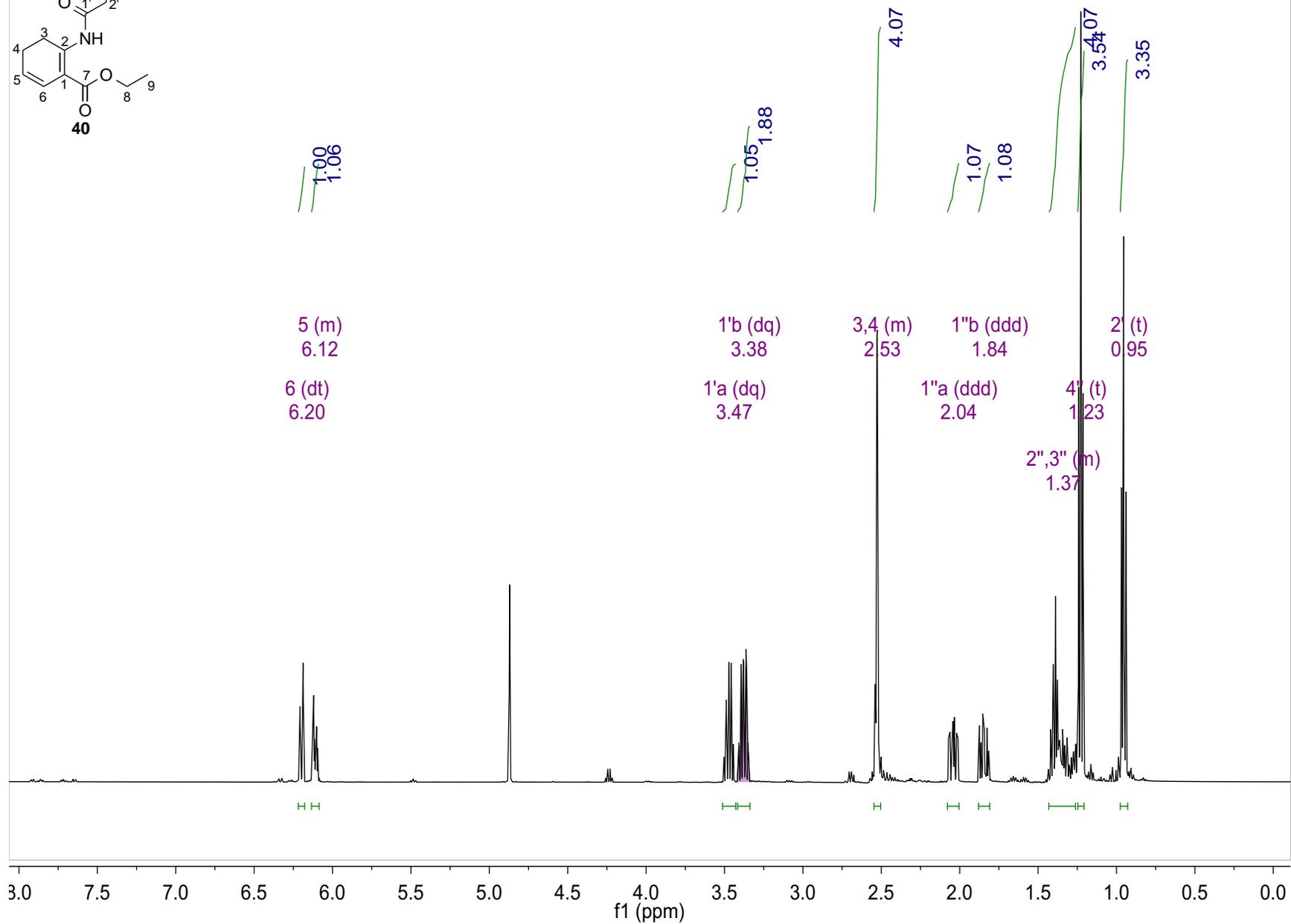
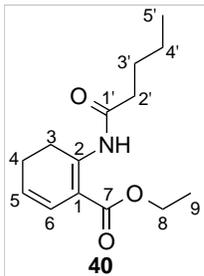
Espectro 11. RMN ¹³C (126 MHz, CDCl₃) de **38**.



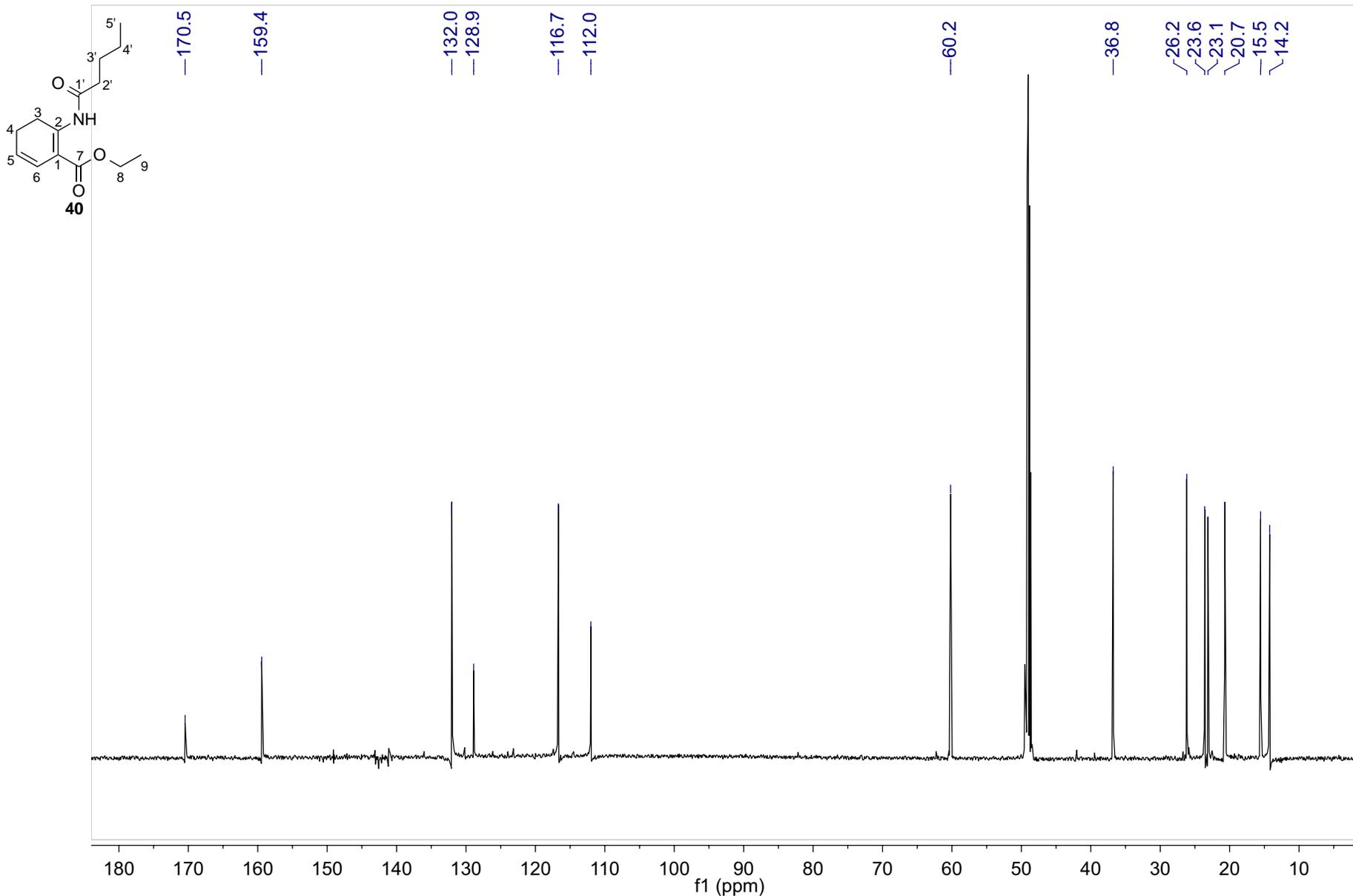
Espectro 12. RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de **39**.



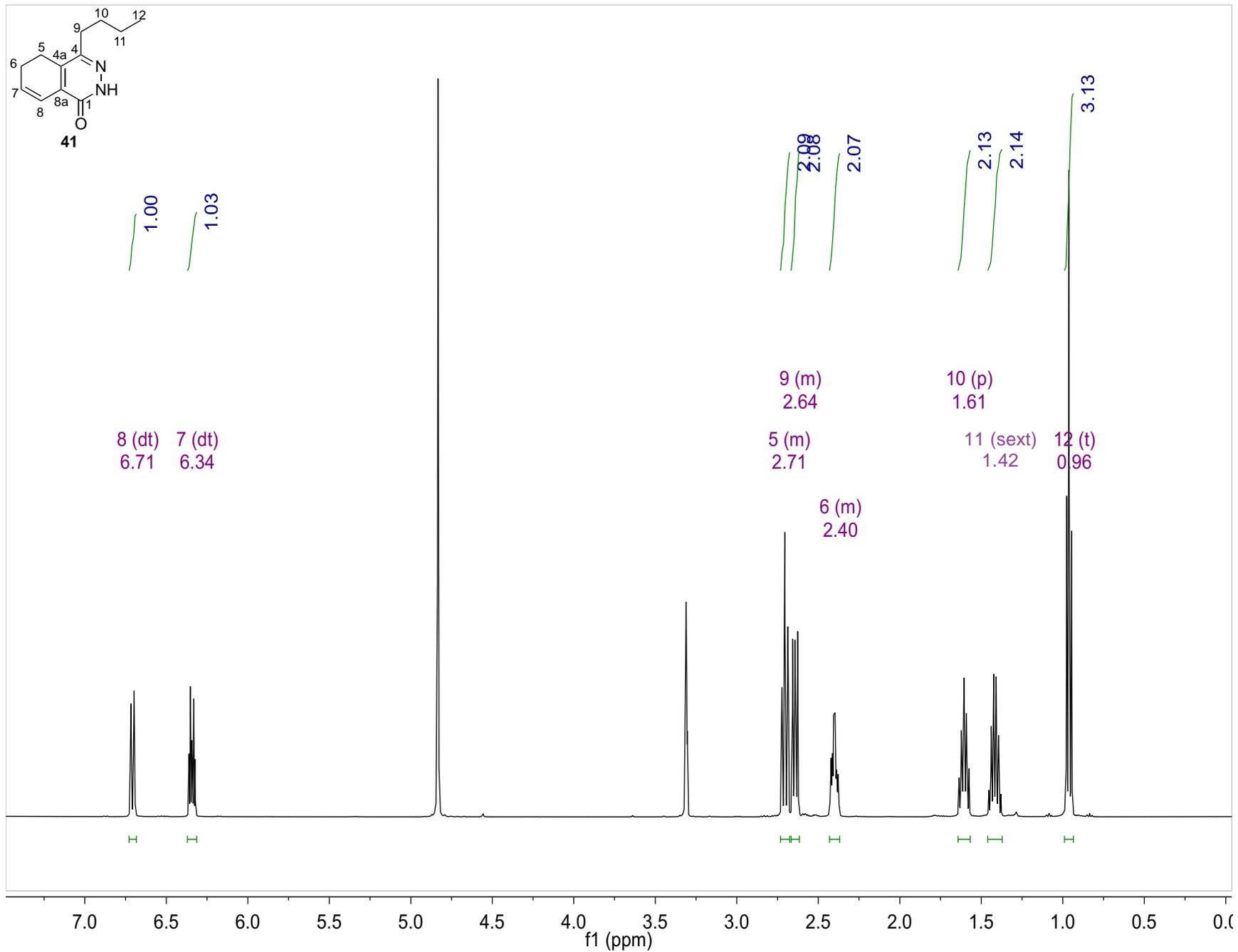
Espectro 13. RMN ^{13}C (126 MHz, CDCl_3) de **39**.



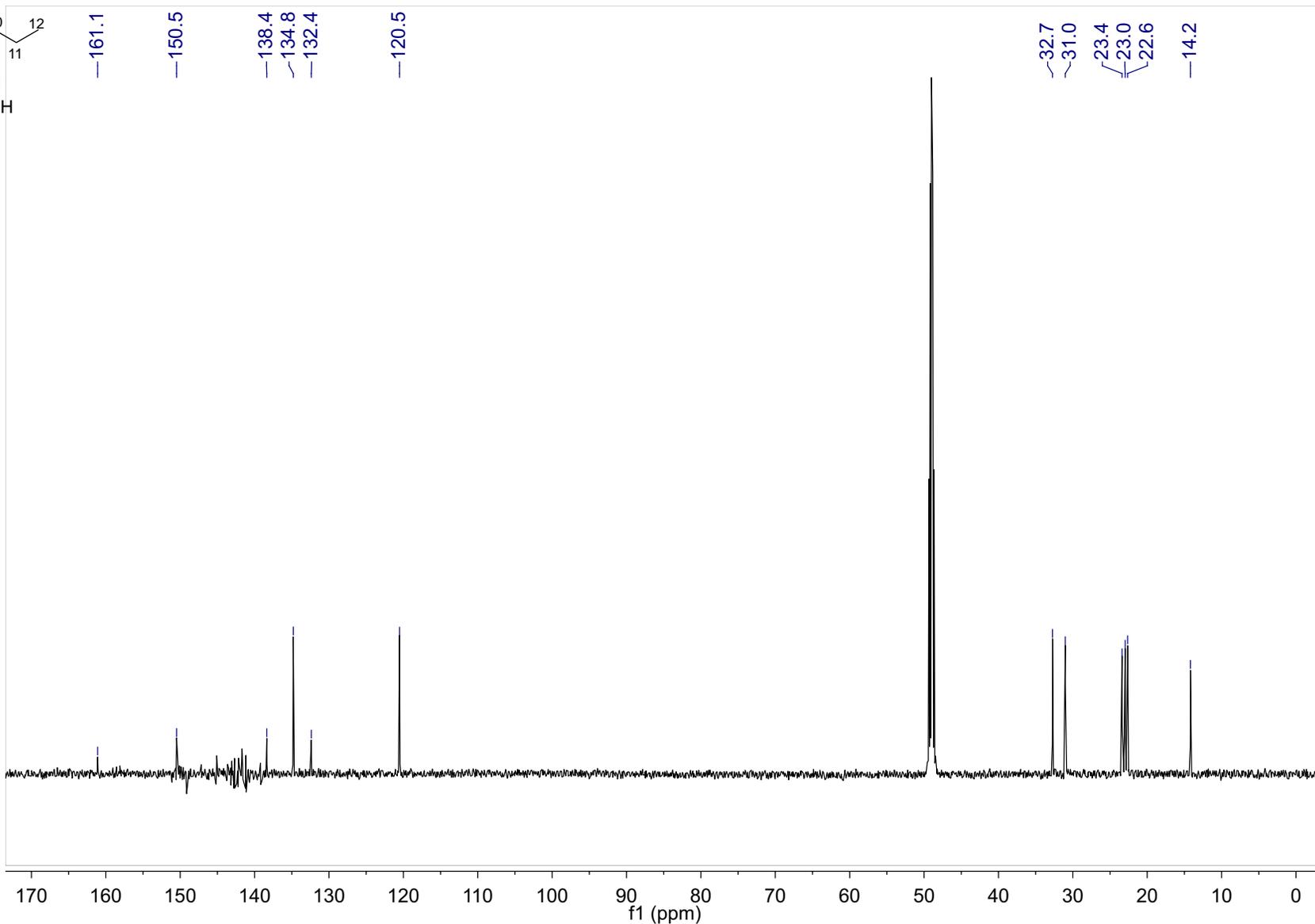
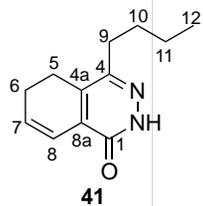
Espectro 14. RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de **40**.



Espectro 15. RMN ¹³C (125 MHz, CD₃OD) de **40**.



Espectro 16. RMN ¹H (500 MHz, CD₃OD) de **41**.



Espectro 17. RMN ¹³C (125 MHz, CD₃OD) de **41**.