



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

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL  
DE COMPUESTOS POLARES DE LA ESPECIE VEGETAL**  
*Amaranthus hypochondriacus*

**PROYECTO DE INVESTIGACIÓN PARA OPTAR POR EL  
GRADO DE**

**MAESTRO EN CIENCIAS**

**PRESENTA  
Q. HÉCTOR VIEL JUARA**

**DR. JOSÉ FEDERICO DEL RIO PORTILLA  
INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM**

**CIUDAD DE MÉXICO, CD, MX, ENERO 2024**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## **UNAM –Dirección General de Bibliotecas**

### **Tesis Digitales**

### **Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS ©**

### **PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México y al Instituto de Química.

Al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas.

Al proyecto PAPIIT IN214722.

Al Consejo Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnología (CONAHCYT) No. CVU1180513

Al personal técnico del Instituto de Química.

Al Dr. José Rivera Chávez y sus estudiantes.

Al Dr. Rogelio Pereda Miranda y sus estudiantes.

A mis compañeros del Laboratorio BQ-1, en especial a Alan García Ladd, gracias por sus consejos, paciencia y compañerismo.

A mi asesor, Dr. Federico del Rio Portilla.

A mi amiga Evelyn García Ocegüera.

A mis papas y amigos en general.

## Abreviaturas

### **A:** *Amaranthus*

**HMBC:** Heteronuclear Múltiple Bond Correlation que en español significa Correlación Heteronuclear a Múltiples Enlaces.

**HPLC:** High Performance Liquid Chromatography que en español significa Cromatografía Líquida de Alta Eficacia.

**HPLC-DAD:** High Performance Liquid Chromatography Diode Array que en español significa Cromatografía Líquida de Alta Eficacia con Arreglo de Diodo.

**HPLC-DAD/ESI-MS-QTOF:** High Performance Liquid Chromatography Diode Array Electrospray Ionisation Mass Spectrometer Quadrupole Time-of-Flight que en español significa Cromatografía Líquida de Alta Eficacia con Arreglo de Diodo y Electronebulización acoplado a un Espectrómetro de Masa de Cuadrupolo y Tiempo de Vuelo.

**HSQC:** Heteronuclear Single Quantum Coherence que en español significa Coherencia Heteronuclear a Simple Quantum.

**RMN:** Resonancia Magnética Nuclear.

**TOCSY:** Total Correlation Spectroscopy que en español significa Espectroscopía de Correlación Total.

## Contenido

1. Introducción.....	6
2. Antecedentes .....	7
2.1 Descripción botánica y distribución geográfica en México.....	7
2.2 Componentes activos de <i>Amaranthus</i> spp. ....	8
2.3 Potencial antioxidante de <i>Amaranthus</i> spp. ....	10
3. Justificación.....	11
4. Objetivos .....	11
4.1 Objetivo General .....	11
4.2 Objetivos Específicos.....	11
5. Resultados y discusión.....	12
5.1 Cromatografía en columna abierta fase normal y reversa .....	12
5.2 Cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa y en fase normal .	13
5.3 Resonancia Magnética Nuclear de las fracciones 3.2 y 3.4 .....	14
5.4 Identificación del grupo enol en 3.2 y 3.4 mediante el revelado con Cl <sub>2</sub> /orto- toluidina.....	19
5.5 Espectrometría de Masa de los compuestos 3.2 y 3.4 mediante HPLC-DAD- ESI-MS-QTOF.....	21
5.6 Comparación de los desplazamientos químicos, las constantes de acoplamiento y la masa exacta de 3.2 y 3.4 con los datos reportados en la literatura.....	22
6. Conclusiones y Recomendaciones .....	24
7. Parte Experimental .....	25
7.1 Recolección y Maceración .....	25
7.2 Cromatografía Líquida en columna abierta .....	25
7.3 Cromatografía de Alta Eficiencia en fase reversa y normal.....	26
7.4 Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia acoplada a Masa.....	27
8. Referencias.....	27
9. Anexos .....	31

## 1. Introducción

La búsqueda de nuevos antioxidantes naturales es un área de investigación en crecimiento debido al amplio espectro de sus propiedades biológicas. Estas propiedades se asocian con la prevención de enfermedades crónicas. Una de las causas de estas enfermedades es el estrés oxidativo que se genera en las reacciones del metabolismo humano. En este contexto, llama la atención una marcada tendencia hacia la suplementación de productos alimenticios capaces de neutralizar parte del estrés oxidativo generado durante el metabolismo celular[1].

Con el propósito anterior se presentan estudios de alimentos con capacidad antioxidante, así como de las estructuras constituyentes responsables de dicha actividad.

El amaranto es un pseudocereal altamente nutritivo. Presenta un alto contenido de proteínas en relación a especies de cereales. Dentro de los beneficios que se le atribuyen a las semillas figuran: la disminución de los niveles de colesterol plasmático, la estimulación del sistema inmunológico, la actividad antitumoral, la reducción de los niveles de glucosa en sangre y el mejoramiento de la hipertensión [2]. En cuanto a la actividad antioxidante, el amaranto, así como otros pseudocereales, tiene una capacidad antioxidante comparable a la soya y el arroz [3].

El grano de amaranto se compone de proteínas (13–22%), lípidos (5–13%), fibra dietética (9–14%), vitaminas (ácido ascórbico, riboflavina, niacina), minerales y otros constituyentes, incluidas las betalainas [4-6]. Además, las proteínas del amaranto tienen una notable cantidad de lisina y metionina en relación con los cereales típicos [7]. Es rico en aminoácidos conocido por su capacidad antioxidante, tales como: derivados del azufre (cisteína y metionina), aromáticos (tirosina y triptófano), lisina, histidina, prolina, glicina, alanina y treonina [8]. Además, se recomienda como una fuente natural sustitutiva de escualeno (compuesto triterpénico poliinsaturado) [7].

Las deficiencias percibidas de vitaminas y minerales esenciales para la salud humana presentan una restricción significativa [9]. Hasta la fecha se han utilizado muchos antioxidantes sintéticos; sin embargo, las tendencias actuales de los consumidores se han desplazado hacia la ingestión de alimentos que contienen componentes naturales sin aditivos sintéticos [10]. Los datos publicados sobre hallazgos in vitro o in vivo revelaron que el género *Amaranthus* tiene propiedades terapéuticas y protectoras de la salud atribuidas principalmente a su potencial antioxidante [11].

## **2. Antecedentes**

### **2.1 Descripción botánica y distribución geográfica en México.**

El género *Amaranthus* pertenece al orden Caryophyllales, familia Amaranthaceae, subfamilia Amaranthoideae. Incluye hierbas anuales ramificadas con alrededor de 70 especies diferentes, 17 de las cuales son comestibles [11]. La mayoría de las especies de amaranto son nativas de América y sólo 15 especies se originan en Asia, África, Australia y Europa [12].

Las plantas de *Amaranthus* spp. están adaptadas para crecer bajo diferentes condiciones agroclimáticas y se reporta que son tolerantes al calor, la sequía y las plagas. Se pueden encontrar en zonas de clima subtropical, tropical y templado alrededor del mundo [11]. El cultivo muestra capacidad para cultivarse tanto como grano como frondoso en las zonas anteriores y en temporadas en las que otros cultivos no pueden florecer [13-15].

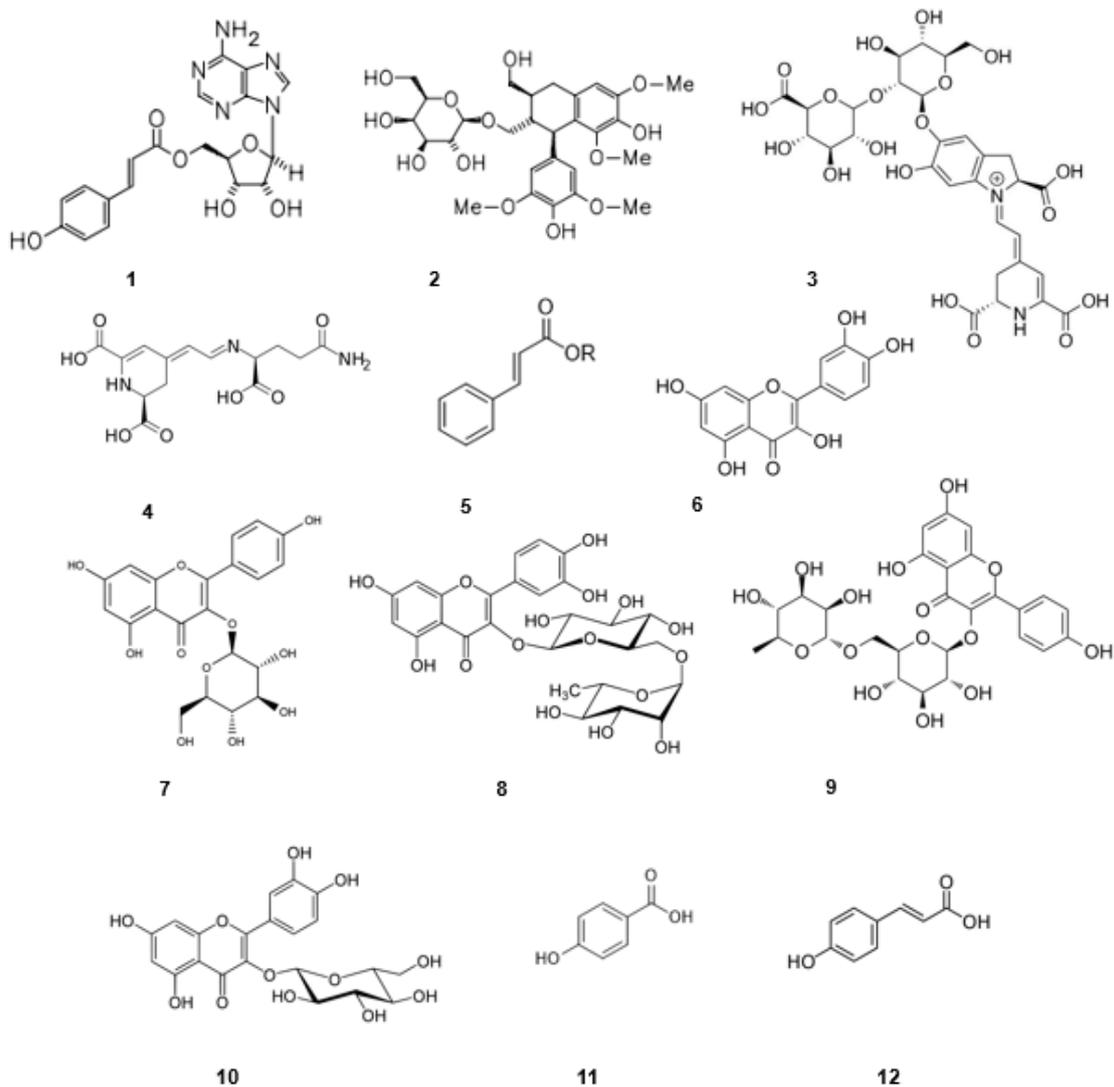
El género *Amaranthus* está distribuido a lo largo de México. *A. cruentus* y *A. hypochondriacus* se distribuyen en la parte centro sur del país, mientras que *A. powellii* está distribuido del centro al norte de México. *A. hypochondriacus* se distribuye principalmente en las regiones biogeográficas del Eje Volcánico Transmexicano y Sierra Madre del Sur en los estados de Puebla, México, Tlaxcala, Oaxaca y de la Ciudad de México [16].

## 2.2 Componentes activos de *Amaranthus* spp.

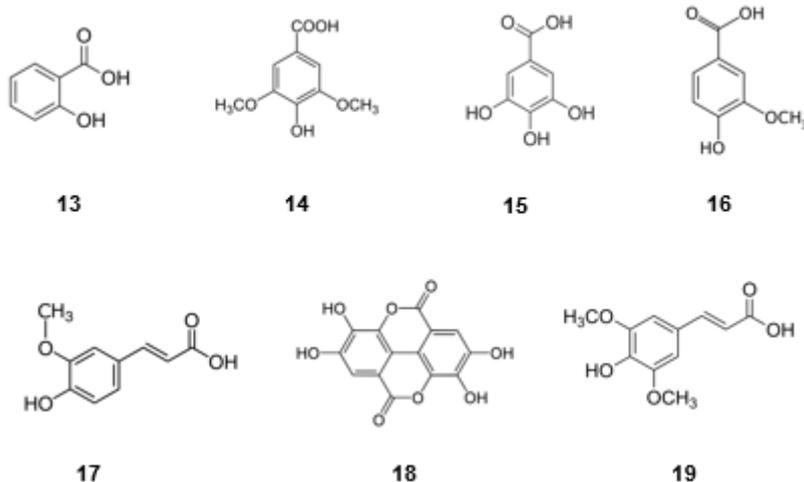
Los extractos de todas las partes de la planta de *Amaranthus* parecen tener beneficios medicinales; de ahí el objetivo de que en estudios recientes se hayan identificado los componentes terapéuticos de las diferentes biopartes. La alta actividad antioxidante de la mayoría de las especies de *Amaranthus* spp., junto con sus actividades antiinflamatorias, ha llamado el interés en investigar su potencial nutricional y clínico como alimento funcional [11].

El análisis fitoquímico de partes aéreas de diversas especies de *Amaranthus* spp. ha mostrado la presencia de constituyentes activos como alcaloides, flavonoides, glucósidos, ácidos fenólicos, esteroides, saponinas, aminoácidos, vitaminas, minerales, terpenoides, lípidos, betaínas, taninos catéquicos y carotenoides [4-6]. También están documentados el amarantósido **1**, un glucósido de lignano; amaricina, una cumaroil adenosina **2** [17], betalaínas como las betacianinas (amarantina **3**), betaxantina **4**; hidroxicinamatos **5**, quercetina **6** y glucósidos de caempferol **7** como flavonoides y ácidos fenólicos [18].

Los extractos de hojas, flores, tallos y semillas de plantas amaranto obtenidos secuencialmente con acetona y metanol/agua permitieron la obtención de rutina **8**, nicotiflorina **9**, isoquercitrina **10**, ácidos 4-hidroxibenzoico **11** y *p*-cumárico **12** como componentes principales [19].



Estudios específicos sobre los metabolitos secundarios de las hojas las especies *A. tricolor* y *A. hypochondriacus* revelaron un alto contenido de betacianinas y betaxantinas, mientras que la isoquercetina y la rutina fueron los flavonoides más abundantes; los ácidos fenólicos más comunes fueron el salicílico **13**, siríngico **14**, gálico **15**, vanílico **16**, ferúlico **17**, *p*-cumárico **12**, elágico **18** y sinápico **19** [20].



### 2.3 Potencial antioxidante de *Amaranthus* spp.

Los antioxidantes desempeñan un papel esencial en los productos alimentarios y farmacéuticos debido a su función defensiva contra las especies reactivas de oxígeno, producido durante las reacciones metabólicas en todos los organismos vivos.

Las especies reactivas de oxígeno constituyen radicales libres y los antioxidantes reducen el efecto de ellos. La especies antioxidantes son estructuras conjugadas que pueden variar desde aromáticas con grupos –OH libres como la mayoría de polifenoles y flavonoides, polienos como el escualeno hasta enoles como es caso del ácido ascórbico o vitamina c. Los hidrógenos activos fenólico y enólico en los casos correspondientes desempeñan un papel crucial en la captura de radicales libres [21]. Se ha demostrado la influencia de los radicales libres en el cáncer y los trastornos degenerativos [22].

El potencial antioxidante del amaranto se ha atribuido a la presencia de niveles apreciables de compuestos fenólicos, flavonoides, fitoesteroles y escualeno [23]. Se demostró que los extractos de las hojas y flores de *Amaranthus*, poseen la mayor actividad antioxidante en comparación con otras partes; y la rutina como el principal capturador de radicales libres [19].

Además de los compuestos anteriores se encontraron péptidos bioactivos e hidrolizados de proteínas con actividad antioxidante. En este orden fue determinada la secuencia de tres péptidos de *A. hypochondriacus* con alta actividad antioxidante contra dipeptil-peptidasa IV y angiotensina [24].

### 3. Justificación

En el escenario actual de salud se ha producido un incremento en el uso de productos naturales para el tratamiento de enfermedades crónicas en favor de productos sintéticos. Estudios recientes revelan que el uso de antioxidantes previene muchas de estas dolencias las cuales están relacionadas con el estrés oxidativo celular. El *Amaranthus hypochondriacus*, es una planta ampliamente distribuida en México empleada en una variedad de alimentos. Ha sido reportado un gran potencial antioxidante de esta planta. Los compuestos principales que han sido atribuido a esta actividad son de naturaleza fenólica y flavonoides con estructuras variadas. No obstante, es pertinente continuar con el estudio de esta especie para identificar sustancias adicionales con diferente naturaleza química a las ya descritas. La búsqueda de nuevos compuestos naturales con actividad antioxidante es requerida debido a los problemas de seguridad y toxicidad de algunos antioxidantes sintéticos.

### 4. Objetivos

#### 4.1 Objetivo General

Obtención de compuestos nuevos con potencial actividad antioxidante de *A. hypochondriacus* para ampliar el conocimiento referente a los constituyentes de la especie.

#### 4.2 Objetivos Específicos

- Aislar la fracción hidrosoluble del material vegetal, con el propósito de obtener compuestos polares.
- Purificar los compuestos polares de la fracción hidrosoluble, mediante cromatografía de columna abierta en fase normal seguida de HPLC en fase reversa y fase normal con la finalidad de obtener compuestos de diferente naturaleza química a los ya descritos.
- Caracterizar los compuestos aislados mediante RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  monodimensional, las técnicas bidimensionales heteronucleares (HSQC

y HMBC) y homonucleares (TOCSY) de RMN y Espectrometría de Masas, con la finalidad de obtener la estructura química de los compuestos.

## 5. Resultados y discusión

### 5.1 Cromatografía en columna abierta fase normal y reversa

Tomando como referencia el potencial antioxidante reportado en la literatura de la porción hidrosoluble y los pocos reportes de compuestos identificados del macerado metanólico-acuoso se decidió estudiar dicha fracción. Tras el fraccionamiento cromatográfico inicial en columna abierta en fase normal se pudieron identificar 3 fracciones en el intervalo de gradiente 5:95-15:85 metanol/diclorometano. La primera fracción de Rf 0.85(1) eluye al 5% de metanol impurificada con la segunda fracción. La segunda fracción de Rf 0.80(2) eluye al 10% de metanol, mientras que la tercera fracción de Rf 0.65(3) eluye al 15% de metanol en diclorometano y coeluye junto con la fracción 2. (Figura 1).

De estos valores de Rf (Figura 1) se deduce que a pesar de que las fracciones primarias 1 y 2 son lo suficientemente solubles tanto en agua como en metanol e insolubles en disolventes poco polares como el acetato de etilo, presentan grupos funcionales polares de menor adsorción sobre la fase estacionaria polar en relación a 3. Por tanto, la fracción primaria 3 debe presentar compuestos de naturaleza química diferentes.

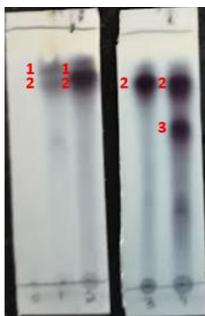


Figura 1. Cromatografía de Capa Delgada (TLC) resultado de la elución de los fracciones primarias 1, 2 y 3.

Como resultado de la extracción en fase sólida en fase reversa de las fracciones primarias: 3 eluyó en 100% de agua, mientras que 1 y 2 lo hicieron cuando se

disminuyó la polaridad del eluyente desde agua 100% hasta agua-acetonitrilo 85:15. Este resultado está en acuerdo de que 3 es mucho más polar que 1 y 2, por tanto, no se distribuye en la fase estacionaria apolar.

## 5.2 Cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa y en fase normal

A continuación, se muestra el cromatograma de una corrida en fase reversa de una muestra que contenía las fracciones primarias 2 y 3 (Figura 2). A partir de lo antes expuesto en relación a la polaridad de las fracciones se intuye que 3 eluye a los 5 min y que 2 a los 18.5 min corroborándose así que son compuestos polares de diferente naturaleza química. La fracción primaria 3 a penas se distribuyó en la columna eluyendo muy próximo al tiempo muerto.

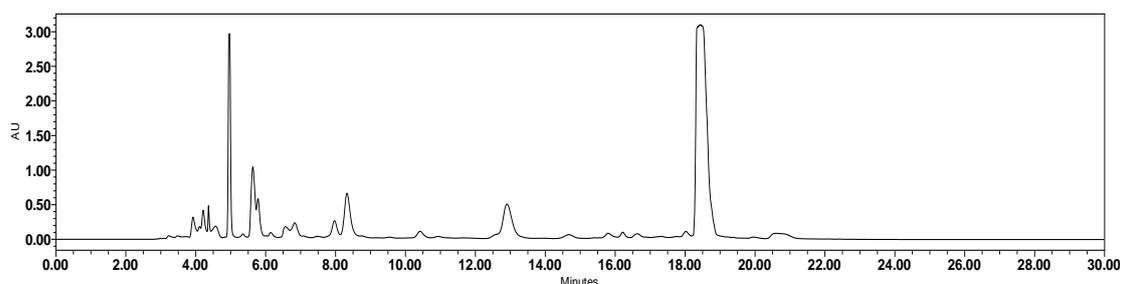


Figura 2. Cromatograma en fase reversa en columna C18 de una muestra que contiene las fracciones 2 y 3.

Luego teniendo en consideración la no retención de 3 en fase reversa se procedió a tratarla en fase normal. Se pudo separar en cuatro fracciones secundarias cuyos cromatogramas superpuestos se muestran en la Figura 3, en los siguientes tiempos de corrida: 5.5, 8, 10 y 12 min.

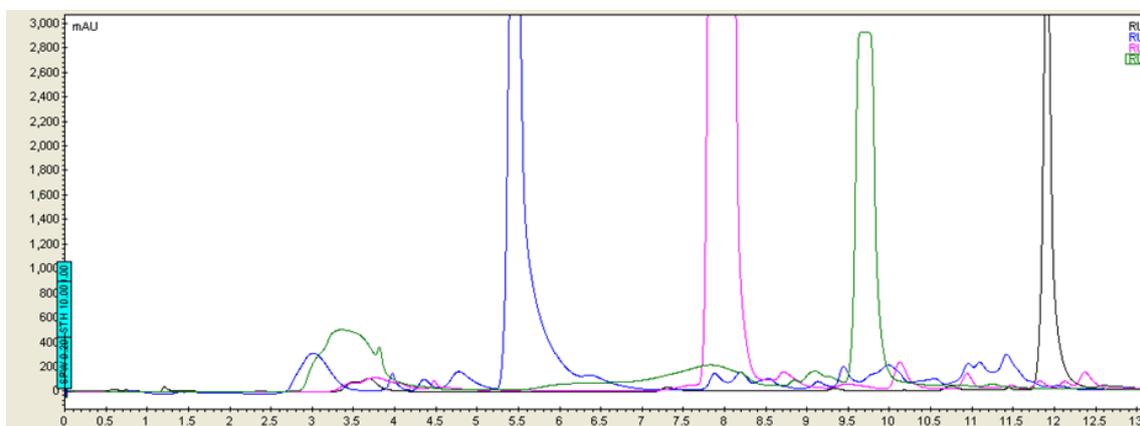


Figura 3. Cromatogramas superpuestos de las subfracciones aisladas de la fracción 3 en columna NH<sub>2</sub>.

Las fracciones mayoritarias fueron las que eluyeron a los 8 y 12 min, y fueron llamadas fracción 3.2 y 3.4, debido a que resultaron ser la segunda y la cuarta fracción obtenida a partir de la fracción primaria 3.

### 5.3 Resonancia Magnética Nuclear de las fracciones 3.2 y 3.4

En el espectro de RMN <sup>1</sup>H del compuesto 3.2 se observa una señal notablemente desprotegida y otras dos relativamente desprotegidas a 8.00, 5.90 y 5.69 ppm. En principio se pensaba que se trataba de un compuesto aromático sustituido con un grupo acetilo (-OCOCH<sub>3</sub>) y al menos dos hidroxilos meta-sustituídos. De esta forma se presenta un protón más desprotegido en posición -para u -orto al acetilo y otros protones más protegidos en las relativas posiciones -orto y -para a los grupos hidroxilos que justificaran la observación anterior. No obstante, la ausencia de multiplicidad de las señales característica de ese tipo de sistema aromático descartó dicha posibilidad.

Lo anterior condujo a un dieno conjugado enólico, lo cual resultó controversial puesto que en general, en la naturaleza muy pocos enoles son relativamente estables como es el caso del ácido ascórbico [25], debido a que la mayoría se encuentran en su forma -ceto.

Por otra parte, el análisis de las señales a campo medio y alto llevó a pensar que el dieno conjugado estaba sustituido por un monosacárido en su forma cerrada como glucósido; sin embargo, llamó la atención la ausencia del desplazamiento químico característico del protón anomérico. Esto último llevó a concluir que se trataba de un alditol o alcoholes de azúcares.

La señal a campo bajo de desplazamiento químico 8.00 ppm (1H, d, J=8.0 Hz, H-4) es resultado de la desprotección de un hidrógeno de alqueno que se encuentra geminal a un grupo -OR. Por otra parte, las dos señales dobles a campo medio de 5.90 ppm (1H, d, J= 4.8 Hz, H-5) y 5.69 (1H, d, J= 8.2 Hz, H-3) son resultado del inductivo -I que ejercen los heteroátomos unidos directamente de los grupos -OR y -NH<sub>2</sub> [26], para la primera señal; y la segunda señal es característica de protones de alquenos (Figura 4 y 6). Por el valor de la constante

de acoplamiento  $J_{H3-H4} = 8.0$  Hz se pueden intuir que H-3 y H-4 son vecinales y se encuentran en geometría *-cis* [27].

A campo medio también aparecen tres señales base de oxígeno: dos triplicadas desprotegidas a 4.18 (1H, t,  $J = 5.11$  Hz, H-6) y 4,15 ppm (1H, t,  $J = 4.76$  Hz, H-7) y un multiplete a 4.00 (1H, m, H-8) (Figura 4 y 6). A juzgar por las constantes de acoplamiento se puede intuir que las dos primeras señales están acoplando entre ellas y por tanto se encuentran a tres enlaces de distancia.

A campo alto se observan dos señales dobles de dobles a 3.84 ppm (1H, dd,  $J = 12.38$  Hz, 3.02 Hz H9a) y 3.73 ppm (1H, dd,  $J = 12.32$  Hz, 2.93 Hz H9b) correspondientes a dos hidrógenos no equivalentes, pero con iguales conectividades: la multiplicidad de la señal junto a los valores de las  $J$  revela que existe acoplamiento geminal entre ellos y vecinal con un tercer protón; por tanto, son protones diasterotópicos (Figura 4 y 6).

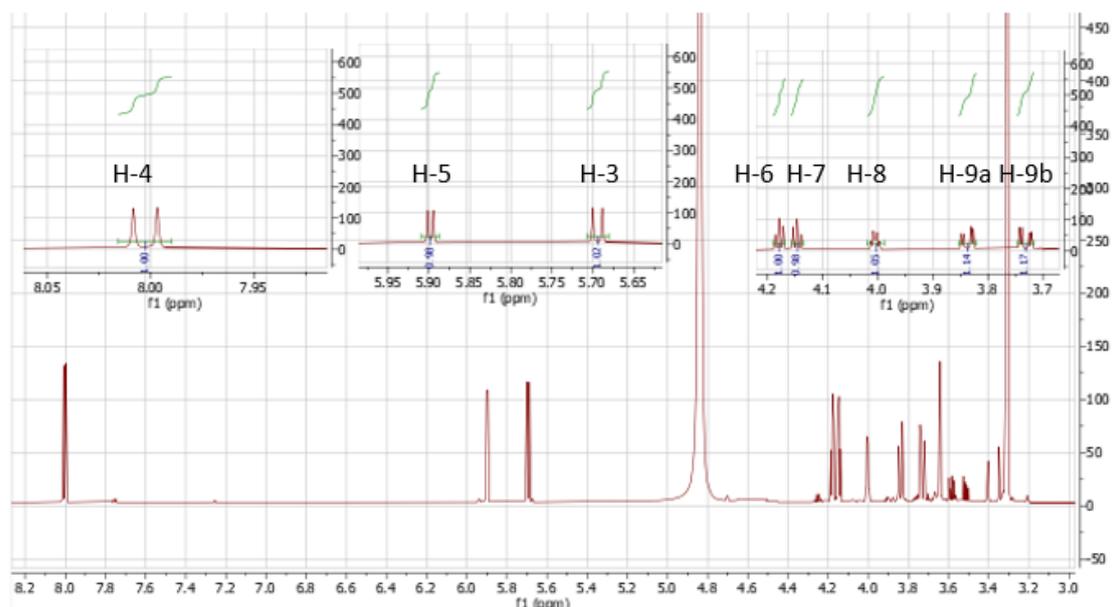


Figura 4. Espectro RMN  $^1H$  (700 MHz, MeOD)  $\delta$  8.00, 5.90, 5.69, 4.18, 4.15, 4.00, 3.84, 3.73.

El espectro de RMN  $^{13}C$  del compuesto 3.2 mostró 9 átomos de carbonos, de los cuales 4 son  $C_{sp2}$  de alqueno unidos directamente a grupos -OH y -OR y 5 son alifáticos base de O teniendo en cuenta la zona donde aparecen. A partir del espectro HSQC editado  $^1H-^{13}C$  (Anexos: Figura 15) se deduce la multiplicidad de cada uno de los carbonos; así las señales en 166.57(C-1) y 152.53(C-2) ppm corresponde a  $C_{sp2}$  completamente sustituidos base de oxígeno debido a la

ausencia de señal de correlación y su desprotección, los carbonos 142.72(C-4) y 102.65(C-3) ppm a  $C_{sp^2}H$ , el C-4 está más desprotegido ya que es vinílico y base de oxígeno a diferencia del C-3 que solo es vinílico y a su vez en lugar de sentir el efecto  $-I$  se protege por el efecto mesomérico positivo del O (+M). Por otra parte, las señales en 90.74(C-5), 86.37(C-8), 75.73(C-6), 71.3(C-7) ppm corresponden a  $C_{sp^3}H$  base de oxígeno y en 62.28(C-9) a  $C_{sp^3}H_2$  base de oxígeno. Consecuentemente, 5 carbonos saturados base de oxígeno indicaron que el fragmento  $-CHOHCHOHCHOHCH_2OH$  estaba en el compuesto 3.2 (Figura 5 y 6).

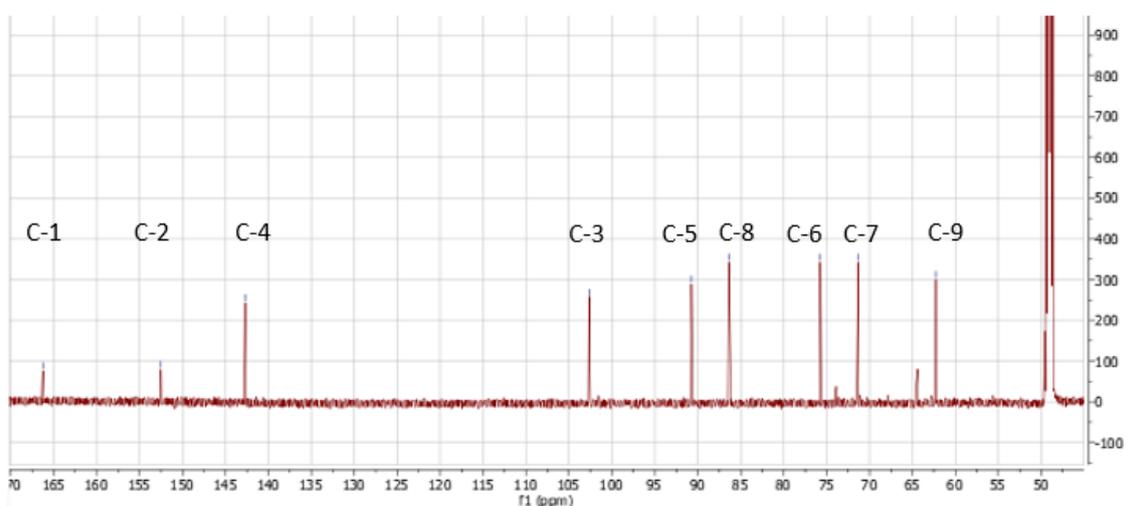


Figura 5. Espectro RMN  $^{13}C$  (176 MHz, MeOD)  $\delta$  166.27, 152.53, 142.72, 102.65, 90.74, 86.37, 75.73, 71.31, 62.28.

La conectividad del compuesto 3.2 se determinó a través de las correlaciones del experimento HMBC de H-3/C-4; H-4/C-3, C-5, C-1, C-2; H-5/C-4, C-6, C-2; H-7/C-5, C-8, C-9; H-9/C-7, C-8 (Figura 6 y Anexos: Figura 16). Además, mediante el experimento TOCSY se determinaron dos sistemas de espines, uno correspondiente a la parte insaturada H-3/H-4 y otro a la parte alifática de la molécula H-5/H-6/H-7/H-8/H-9a/H-9b (Anexos: Figura 17).

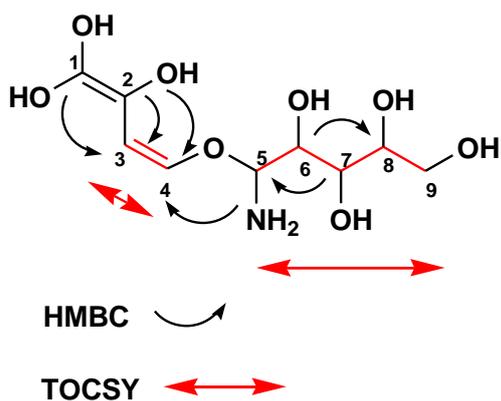


Figura 6. Estructura del compuesto 3.2, y las correlaciones correspondientes a los experimentos HMBC y TOCSY.

El espectro de RMN  $^1\text{H}$  del compuesto 3.4 se observan dos señales notablemente desprotegidas a 8.31 y 8.19 ppm, lo cual pudiera ser indicativo de la presencia de protones aromáticos sustituidos en posición –orto o –para con un grupo acetilo ( $-\text{OCOCH}_3$ ). También se observa una señal alrededor de 6 ppm que pudiera indicar un protón aromático disustituido en –orto y –para con grupos hidroxilos. No obstante, la ausencia de multiplicidad característica descartó el sistema aromático.

Por tanto, teniendo en cuenta lo anterior, así como las similitudes con el compuesto 3.2; se asumió que se trataba de un dieno conjugado enólico.

Por otra parte, el análisis de las señales a campo medio y alto condujo a pensar que el dieno conjugado era un sustituyente O-glicosídico de un monosacárido; como el caso anterior, tras la ausencia del desplazamiento químico característico del protón anomérico, concluimos que se trataba de otro alditol o alcoholes de azúcares.

Las señales de singuletes de desplazamiento químico 8.31 ppm (1H, s, H-4) y 8.19 ppm (1H, s, H-1) a campo bajo, fueron atribuidas a dos hidrógenos de alqueno que se encuentran geminales a grupos  $-\text{OH}$  y  $-\text{OR}$ , respectivamente con fuerte efecto  $-\text{I}$ , lo cual provoca que se desplacen a campo bajo.

Por otra parte, en la zona de campo medio aparece una señal doble a 5.97 ppm (1H, d,  $J = 6.4$  Hz, H-5) que se trata del hidrógeno del CH unido directamente a los grupos  $-\text{OR}$  y  $-\text{NH}_2$  [26], el cual se encuentra desprotegido debido al doble efecto  $-\text{I}$  que ejercen ambos grupos.

Además, en esta misma zona aparecen tres señales: una triplicada más desprotegida a 4.74 ppm (1H, t,  $J = 6.2$  Hz, H-6), dos multipletes menos desprotegidos a 4.33 ppm (1H, m, H-7) y a 4.17 ppm (1H, m, H-8). En campo alto se observan dos señales dobles de dobles a 3.89 ppm (1H, dd,  $J = 12.5$  Hz, 2.6 Hz H9a) y 3.75 ppm (1H, dd,  $J = 12.5$  Hz, 2.6 Hz H9b) correspondientes a dos hidrógenos diasterotópicos (Figura 7 y 9). Por las constantes de acoplamiento se intuye que H-5/H-6, H-8/H-9a y H-8/H-9b se encuentra a tres enlaces de distancias y H-9a/H-9b a dos enlaces de distancia.

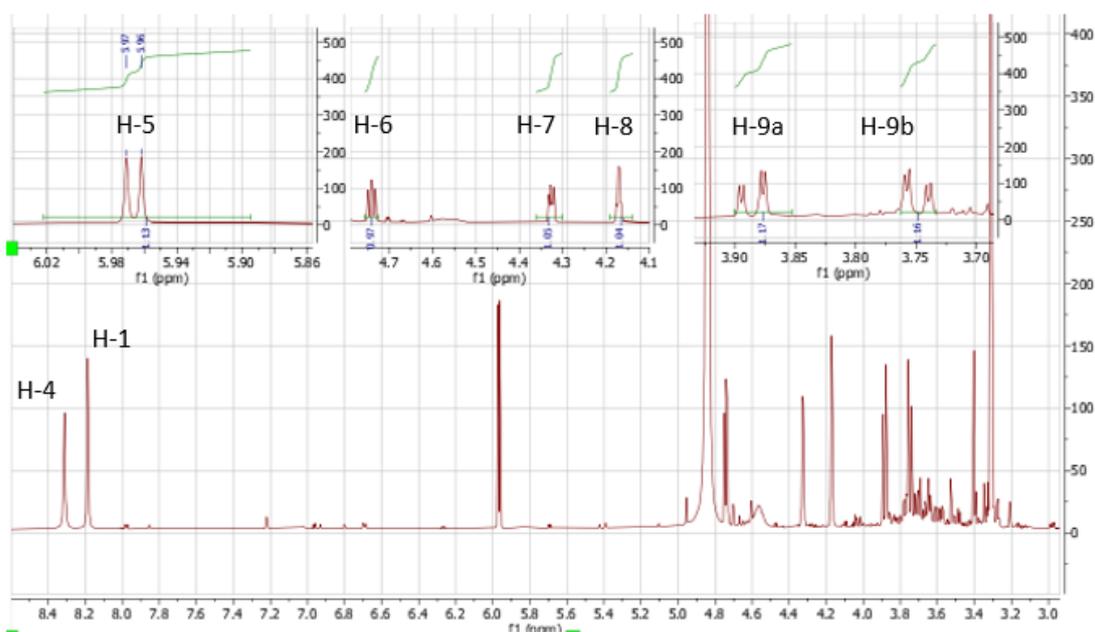


Figura 7. Espectro RMN  $^1\text{H}$  (700 MHz, MeOD)  $\delta$  8.31, 8.19, 5.97, 4.74, 4.33, 4.17, 3.84, 3.75.

El espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  del compuesto 3.4 mostró 9 átomos de carbonos, de los cuales 4 son  $\text{Csp}^2$  de alqueno unidos directamente a grupos -OH y -OR y 5 son alifáticos base de O teniendo en cuenta la zona donde aparecen. A partir del espectro HSQC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (Anexos: Figura 18) se deduce la multiplicidad de cada uno de los carbonos así, las señales en 157.61(C-2) y 150.06(C-3) ppm corresponde a  $\text{Csp}^2$  completamente sustituidos base de oxígeno debido a la ausencia de señal de correlación y su desprotección. Los carbonos que muestran desplazamiento químico en 153.51(C-1) y 142.04(C-4) ppm a  $\text{Csp}^2\text{H}$  base de oxígeno y por otra parte las señales en 91.27(C-5), 88.18(C-8), 75.47(C-6), 72.66(C-7) ppm a  $\text{Csp}^3\text{H}$  base de oxígeno y en 63.47(C-9) a  $\text{Csp}^3\text{H}_2$  base de oxígeno. Consecuentemente, 5 carbonos saturados indicaron que el fragmento -CHOHCHOHCHOHCH<sub>2</sub>OH estaba en el compuesto 3.4 (Figura 8 y 9).

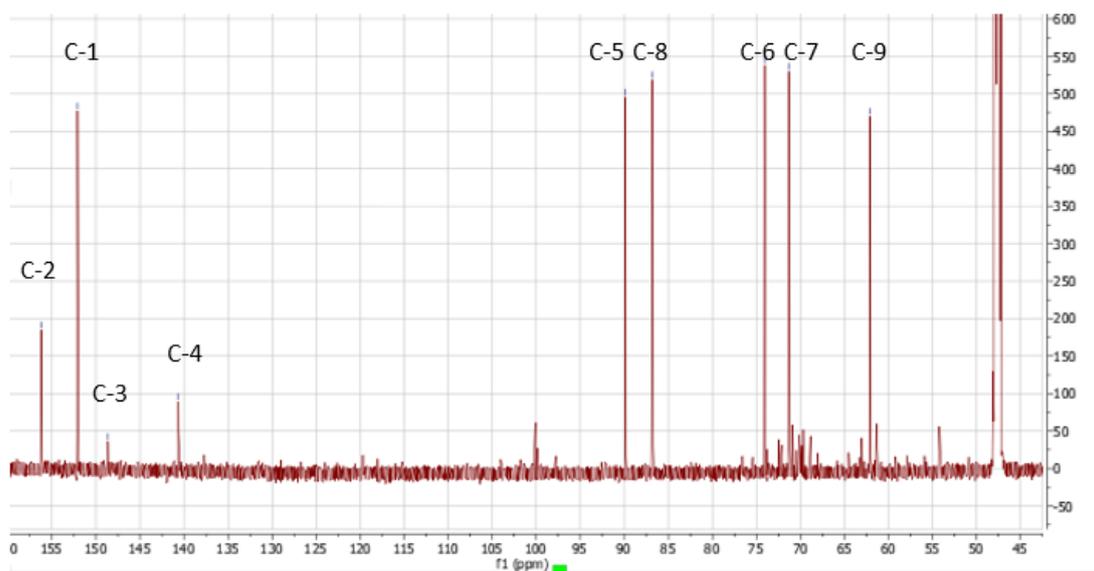


Figura 8. Espectro RMN  $^{13}\text{C}$  (176 MHz, MeOD)  $\delta$  157.61, 153.51, 150.06, 142.04, 91.27, 88.18, 75.47, 72.66, 63.47.

La conectividad del compuesto 3.4 fueron determinadas a través de las correlaciones del experimento HMBC de H-1/C-2, C-3; H-4/C-3; H-5/C-4, C-3, C-6; H-6/C-5; H-7/C-5; H-9a/C-7, C-8 (Figura 9 y Anexos: Figura 19). Además, mediante el experimento TOCSY se determinó un único sistema de espín, el correspondiente a la parte alifática de la molécula H-5/H-6/H-7/H-8/H-9a/H-9b (Anexos: Figura 20).

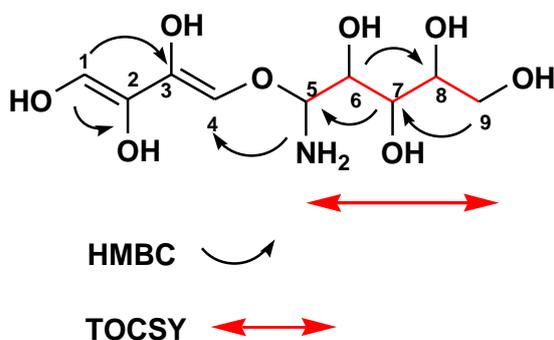


Figura 9 Estructura del compuesto 3.4, y las correlaciones correspondientes a los experimentos HMBC y TOCSY.

#### 5.4 Identificación del grupo enol en 3.2 y 3.4 mediante el revelado con $\text{Cl}_2$ /orto-toluidina.

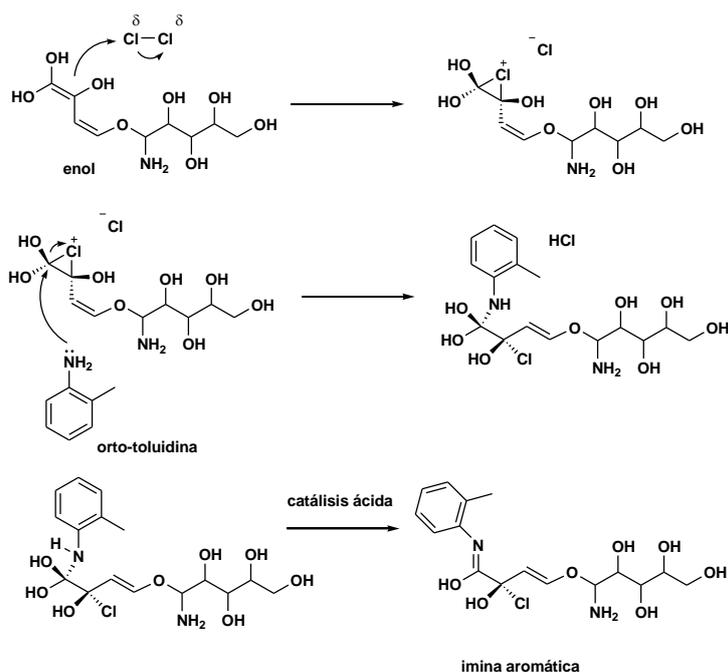
En principio se esperaba encontrar compuestos de naturaleza peptídica, puesto que el ensayo  $\text{Cl}_2$ /orto-toluidina ha sido reportado en el reconocimiento de

compuestos de naturaleza peptídica [28]. En su lugar se identificaron enoles, y en relación con ello se propuso el siguiente mecanismo de reacción tomando como base que se muestran unas manchas azules en las cromatoplasacas.

En el primer paso se produce la adición de cloro y formación del ion cloronium, experimentalmente ocurre cuando se pone en contacto el producto en atmósfera de cloro. Una vez que se esparce orto-toluidina a la muestra ya clorada toma lugar el segundo paso que constituye el ataque nucleofílico del grupo  $-NH_2$ , para luego producirse la deshidratación y subsecuente formación de la imina o base de Schiff aromática. Este paso está asistido por la formación de un producto más estable debido a la extensión de la conjugación, de ahí que ocurra a temperatura ambiente [29]

La conjugación del producto resultante no es suficiente para que se obtenga un máximo alrededor de 580-595 nm con una absorptividad molar del orden de una transición  $\pi-\pi^*$ . A medida que el número de dobles enlaces conjugados aumenta, la banda menos energética se desplaza batocrómicamente, pudiendo presentar coloración el compuesto al comenzar a absorber selectivamente radiación en la región visible.

Por tanto, se espera una segunda condensación seguido de un paso de deshidratación, lo cual da una  $\alpha$ -diimina aromática  $\alpha, \beta$ -insaturada (Figura 10).



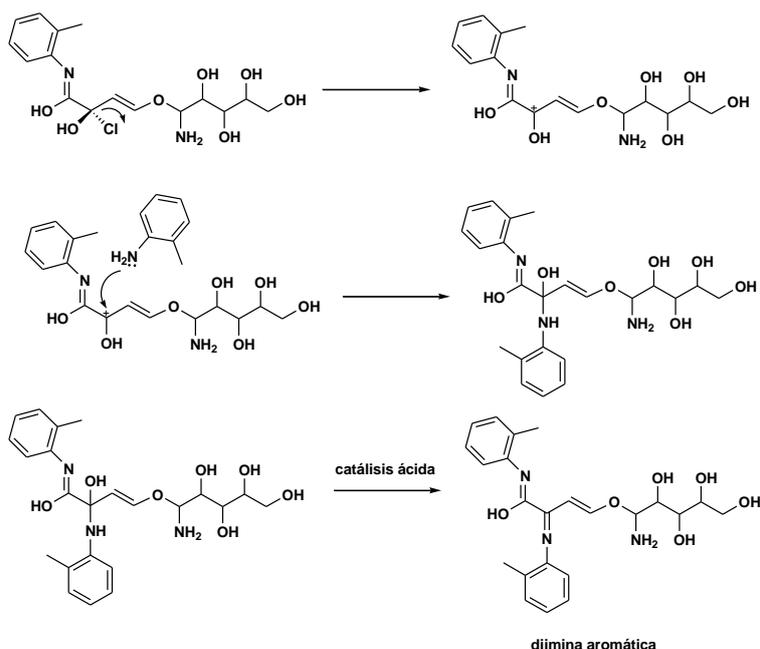


Figura 10. Mecanismo propuesto en este trabajo que explica la formación de la diimina aromática derivada de los enoles 3.2 y 3.4 mediante el ensayo  $\text{Cl}_2$ /orto-toluidina.

### 5.5 Espectrometría de Masa de los compuestos 3.2 y 3.4 mediante HPLC-DAD-ESI-MS-QTOF.

Los compuestos 3.2 y 3.4 a penas se retuvieron en la columna C-18 del experimento HPLC-DAD-ESI-MS-QTOF con tiempos de elución a penas a los 0.8 min de corrida. En la Figura 11 se muestra el perfil de 3.2.

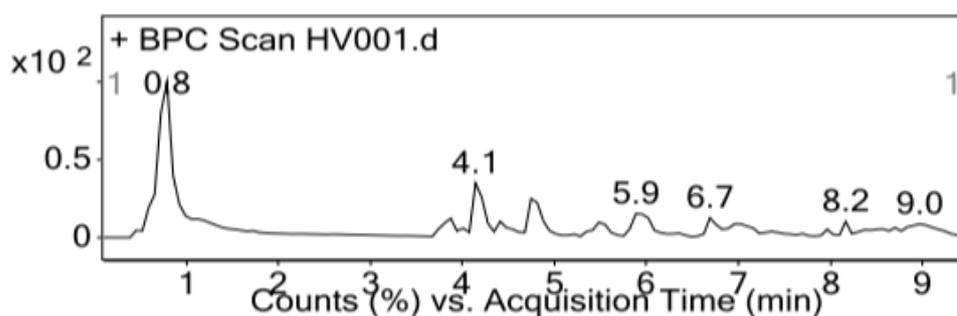


Figura 11. Perfil cromatográfico de compuesto 3.2 en HPLC-DAD-ESI-MS-QTOF.

El barrido MS-QTOF obtenido de seleccionar el intervalo de tiempo de elución de 3.2, mostró una señal correspondiente al ion  $[M + H]$  a  $m/z$  268.10505. La masa par de este ion fue indicio de la presencia de un número impar de nitrógenos. Debido a que el voltaje de fragmentación utilizado era relativamente débil no se observan los iones fragmentos del correspondiente ion cuasimolecular (Figura 12).

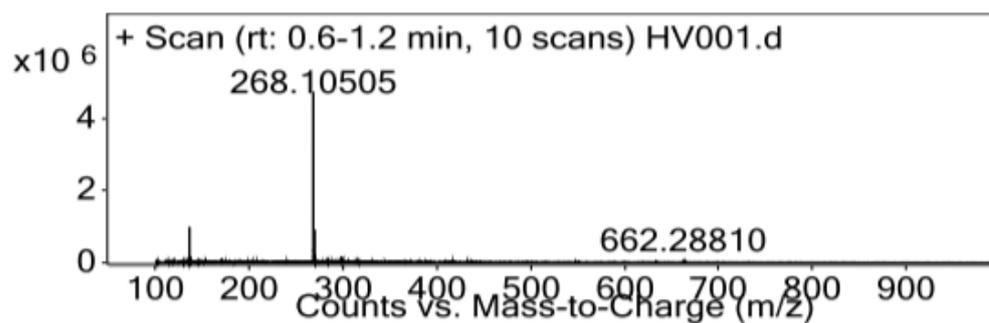


Figura 12. Barrido de masa correspondiente al intervalo de tiempo de elución de 3.4.

Un barrido similar MS-QTOF obtenido de seleccionar el intervalo de tiempo de elución de 3.2 condujo al ion  $[M + H]$  a  $m/z$  para 3.2 a 268.0939.

### 5.6 Comparación de los desplazamientos químicos, las constantes de acoplamiento y la masa exacta de 3.2 y 3.4 con los datos reportados en la literatura.

El compuesto 3.4 presentó las mismas señales con desplazamiento químico que (Z,Z)-5-amino-5-(1,2,3-trihidroxi)buta-1,3-dieniloxi)pentano-6,7,8,9-tetraol [30], lo cual corroboró el isómero geométrico representado hasta este punto para 3.4, (1Z,3Z) (Anexos: Tabla 1 y 2). Por otra parte, la identidad de la configuración absoluta relacionada con los centros estereogénicos puede ser determinada modelando los diferentes espectros de dicroísmo circular de cada uno de los diastereoisómeros correspondientes. Para ello, las estructuras tienen que ser establecidas mediante mecánica molecular, métodos semiempíricos o abinitios. La configuración absoluta se establece de comparar los diferentes espectros de dicroísmo circular modelados con el experimental.

La masa del ion  $[M+H]$  reportada para (Z, Z)-5-amino-5-(1, 2,3-trihidroxi)buta-1,3-dieniloxi)pentano-6,7,8,9-tetraol es 268.1041, lo que conduce a un error en relación a la masa exacta de 3.4 de 38 ppm, confirmándose la fórmula molecular  $C_9H_{17}O_8N$ .

(Z,Z)-5-amino-5-(1,2,3-trihidroxi)buta-1,3-dieniloxi)pentano-6,7,8,9-tetraol mostró en publicaciones previas actividad antioxidante frente al 2,2-difenil-1-picrilhidracil [27], un radical libre que muestra capacidad aceptora de hidrógenos en presencia de antioxidantes. La capacidad de reducir radicales libres de una sustancia implica la estabilización de su radical correspondiente, en este caso a través de

los enlaces conjugados y los oxígenos, luego se espera que 3.4 tenga actividad antioxidante.

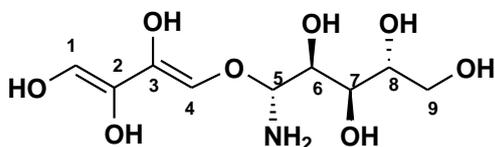


Figura 13. (Z,Z)-5-amino-5-(1,2,3-trihidroxi)buta-1,3-dieniloxi)pentano-6,7,8,9-tetraol aislado de *Murraya koeniggi* por Qin-Ge Ma. y colaboradores [30].

El compuesto 3.2 presentó señales y constantes de acoplamiento parecidas al (Z)-5-amino-5-(1,1,2-trihidroxi)buta-1,3-dieniloxi)pentano-6,7,8,9-tetraol reportado por Siebatcheu et. al [27]; pero no coincidían debido a que los datos se encontraban en DMSO-d<sub>6</sub>. El espectro de RMN <sup>1</sup>H de 3.4 en DMSO-d<sub>6</sub> (Anexos: Figura 21) coincide con los desplazamientos químicos y las J reportadas. En relación al isómero geométrico de los dos posibles se comprueba el mostrado hasta ahora, 3Z, debido a la coincidencia de la J H-3/H-4 de 3.2 con el reporte de la literatura (Tabla 3).

La masa del ion [M+H] reportado para (Z)-5-amino-5-(1,1,2-trihidroxi)buta-1,3-dieniloxi)pentano-6,7,8,9-tetraol [M+H] fue de 268.1040, lo que condujo a un error en relación a la masa exacta de 3.2 de 3.91 ppm, confirmándose la fórmula molecular C<sub>9</sub>H<sub>17</sub>O<sub>8</sub>N.

El (Z)-5-amino-5-(1,1,2-trihidroxi)buta-1,3-dieniloxi)pentano-6,7,8,9-tetraol fue aislado del hongo *Trichoderma erinaceum*, y mostró actividad antimicrobiana inhibiendo significativamente el crecimiento de *Pythium ultimum*.

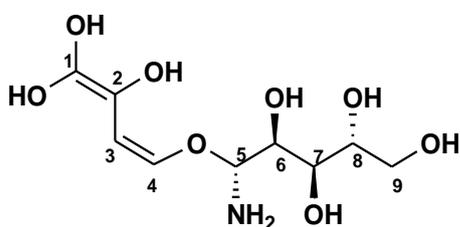


Figura 14. (Z)-5-amino-5-(1,1,2-trihidroxi)buta-1,3-dieniloxi)pentano-6,7,8,9-tetraol aislado de un hongo endofítico llamado *Trichoderma erinaceum* por Siebatcheu E.C y colaboradores [27].

## 6. Conclusiones y Recomendaciones

El aislamiento de la fracción hidrosoluble mediante macerados sucesivos con incremento de la polaridad proporcionó tres fracciones primarias con naturaleza química diferentes.

El estudio mediante HPLC en fase reversa y fase normal de la fracción más polar permitió la obtención de dos enoles no reportados en *Amaranthus*: (Z)-5-amino-5-(1,1,2-trihidroxibuta-1,3-dieniloxy)pentano-6,7,8,9-tetraol y (Z,Z)-5-amino-5-(1,2,3-trihidroxibuta-1,3-dieniloxy)pentano-6,7,8,9-tetraol que potencialmente tienen actividad antioxidante.

La estructura química y las conectividades de estos compuestos de *A. hypochondriacus* se pudo determinar mediante las técnicas de RMN y Espectrometría de Masas.

Se recomienda corroborar la configuración absoluta de los centros estereogénicos mediante dicroísmo circular y experimentos de RMN que muestren cercanía espacial, así como probar la actividad antioxidante frente a radicales libres típicos del metabolismo celular.

## **7. Parte Experimental**

### **7.1 Recolección y Maceración**

Las semillas de *Amaranthus hypochondriacus* fueron recolectadas en el pueblo de Santiago Tulyehualco, Xochimilco, Ciudad de México. No fue corroborada la especie mediante estudios de material genético; no obstante fue atribuida la especie debido a estudios taxonómicos previos en el área de recolección.

Las semillas pulverizadas fueron sometida a maceraciones sucesivas con hexano, acetato de etilo, diclorometano y metanol/agua 60:40, con el objetivo de separar la fracción liposoluble de la fracción hidrosoluble. La mezcla hidroalcohólica fue secada por rotoevaporación a vacío. El producto seco se redisolvió en pequeños volúmenes de metanol, luego fue centrifugado y filtrado.

### **7.2 Cromatografía Líquida en columna abierta**

El extracto seco fue adsorbido sobre sílica gel malla 240-400 (relación 1:1 respecto al peso del extracto seco), y después pasó por una columna de vidrio de 5 cm de diámetro, empacada con gel de sílice malla 240-400 (450 g). Se eluyó primero con diclorometano y posterior con mezclas diclorometano-metanol desde una proporción 5:95 hasta 30:70 y finalmente metanol. Se colectaron 40 fracciones de 250 mL, las cuales se reunieron en forma de 3 fracciones primarias de acuerdo con su perfil en cromatografía de capa fina con sílica como fase estacionaria.

Para dar seguimiento a la cromatografía en columna, se usaron cromatofolios de gel de sílice 60 F254 soportadas en aluminio (marca Merck), las cuales se eluyeron con fase móvil diclorometano/metanol/agua, en relación 5:4:1 y se observaron bajo luz UV ( $\lambda = 254$  y  $365$  nm) y se revelaron con  $\text{Cl}_2$ /orto-toluidina.

La orto-toluidina se encuentra al 1% en disolución acuosa de ácido acético pH 3-4 y KI al 0.5%.

Ensayo de Cl<sub>2</sub>/orto-toluidina: Una vez secas las cromatoplasmas eluidas con la fase móvil se ponen en atmósfera de Cl<sub>2</sub> durante 5 min. Finalmente son reveladas las cromatoplasmas cloradas a temperatura ambiente con la orto-toluidina.

Las fracciones obtenidas se purificaron mediante retención hidrofóbica por extracción en fase sólida a través de Strata C18. Para ello, una vez que la muestra es retenida sobre el material adsorbente, se eluyó primero con agua, y posteriormente con mezclas agua-acetonitrilo disminuyendo la polaridad desde 5:95 hasta 50:50, para finalmente eluir con acetonitrilo. De igual forma se siguió mediante cromatografía de capa fina para distinguir las fracciones donde estaban los compuestos de interés.

### **7.3 Cromatografía de Alta Eficiencia en fase reversa y normal.**

La cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa fue llevada a cabo en un módulo con bomba Waters 2535 y un detector de arreglo de fotodiodo Waters 2998, empleando una columna semipreparativa Symmetry C18, 5 µm de tamaño de partícula y dimensiones 7.8 x 100 mm. Esta técnica fue operada a un flujo de 4.6 mL/min. Durante 8 min fue eluido con agua-acetonitrilo 95:5(v/v), luego un gradiente durante 3 min hasta alcanzar una proporción 90:10. En lo siguiente se mantuvo la mezcla en la relación anterior durante 2 min hasta regresar finalmente a las condiciones iniciales de 95:5. El tiempo de corrida fue de 20 min.

La cromatografía líquida de alta eficiencia en fase normal fue llevada a cabo en un cromatógrafo Varian ProStar a una longitud de onda de 250 nm, empleando una columna analítica µBondapak Amino(NH<sub>2</sub>), 10 µm de tamaño de partícula y dimensiones 3.9 x 300 mm. Esta técnica fue operada a un flujo de 1.1 mL/min con un gradiente. Durante 12 min fue eluido con acetonitrilo hasta alcanzar una proporción acetonitrilo-agua 70:30(v/v), luego un gradiente durante 2 min hasta alcanzar una proporción 10:90. En lo siguiente se mantuvo la mezcla en la relación anterior durante 4 min hasta alcanzar las condiciones iniciales de acetonitrilo. El tiempo de corrida fue de 20 min.

#### **7.4 Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia acoplada a Masa.**

La cromatografía líquida de alta eficiencia se llevó a cabo con un detector de arreglo de fotodiodos (HPLC-DAD, por sus siglas en inglés) con longitudes de onda de detección 220, 250 y 320nm y un espectrómetro de masas de cuadrupolo acoplado a uno de tiempo de vuelo empleando como fuente de ionización electrospray (ESI-MS-QTOF, por sus siglas en inglés). El espectrómetro fue operado en modo positivo con un poder resolutivo de masa de 2500 a m/z 100 con una velocidad de barrido de 1 Hz bajo los siguientes parámetros: temperatura del gas 275°C , flujo del gas nebulizador 7 L/min y voltaje del capilar 4.5 kV. El voltaje fragmentador entre el analizador de cuadrupolo y el de tiempo de vuelo fue de 150 V. El Ar sirvió como gas de colisión y N<sub>2</sub> como gas envolvente. HPLC-DAD/ESI-MS-QTOF fue operado con una columna C18 en modo isocrático con una mezcla agua-acetonitrilo 85:15(v/v) acetonitrilo durante 9.5 min a un flujo de 0.4 mL/min.

Los experimentos de RMN se registraron en un espectrómetro Bruker Avance III a 700 MHz (<sup>1</sup>H) y 175 MHz (<sup>13</sup>C) usando las secuencias de pulsos estándares para los experimentos y referenciado a las señales residuales de los solventes empleados.

#### **8. Referencias**

1. Cardoso SM, Fassio A. (2020). "The Antioxidant Capacities of Natural Products". *Molecules* ,25(23):5676. [https://doi:10.3390/molecules25235676](https://doi.org/10.3390/molecules25235676).
2. Caselato-Sousa VM, Amaya-Farfán J. (2012) "State of knowledge on amaranth grain: a comprehensive review". *Journal Food Science*,77(4):93-104. [https://doi:10.1111/j.1750-3841.2012.02645.x](https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2012.02645.x).
3. Gorinstein, S., et al. (2007). "The total polyphenols and the antioxidant potentials of some selected cereals and pseudocereals". *European Food Research and Technology*, 225:321–328. <https://doi.org/10.1007/s00217-006-0417-7>

3. Segura-Nieto, M., et al. (2018). "Biochemistry of amaranth proteins." *Amaranth biology, chemistry, and technology*. CRC Press,75-106.
4. Montoya-Rodríguez, A., et al. (2015). "Identification of Bioactive Peptide Sequences from Amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) Seed Proteins and Their Potential Role in the Prevention of Chronic Diseases." *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 14(2):139-158. [https://doi:10.1111/1541-4337.12125](https://doi.org/10.1111/1541-4337.12125).
5. Karamać, M., et al. (2019). "Antioxidant Activity and Phenolic Composition of Amaranth (*Amaranthus caudatus*) during Plant Growth." *Antioxidants (Basel)*, 8(6):173. [https://doi:10.3390/antiox8060173](https://doi.org/10.3390/antiox8060173).
6. Miguel, M. (2018). "Betalains in Some Species of the Amaranthaceae Family: A Review." *Antioxidants (Basel)*,7(4):53. [https://doi:10.3390/antiox7040053](https://doi.org/10.3390/antiox7040053).
7. Chivenge, P., et al. (2015). "The Potential Role of Neglected and Underutilised Crop Species as Future Crops under Water Scarce Conditions in Sub-Saharan Africa." *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 12(6): 5685–5711. [https://doi:10.3390/ijerph120605685](https://doi.org/10.3390/ijerph120605685)
8. Tiengo, A., et al. (2009). "Characterization and ACE-inhibitory activity of amaranth proteins". *Journal Food Science*, 74(5):121-126. [https://doi:10.1111/j.1750-3841.2009.01145.x](https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01145.x).
9. Haddad, L., et al. (2016). "Food Systems and Diets: Facing the Challenges of the 21st Century". *Global Panel on Agriculture and Food Systems for Nutrition*: London, UK.
10. Tkaczewska, J. (2020). "Peptides and protein hydrolysates as food preservatives and bioactive components of edible films and coatings—A review". *Trends in Food Science & Technology*, 106: 298–311.
11. Peter, K., & Gandhi, P. (2017). "Rediscovering the therapeutic potential of *Amaranthus* species: A review." *Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences*, 4(3):196-205. <https://doi.org/10.1016/j.ejbas.2017.05.00>.
12. Martinez-Lopez, A., et al. (2019). "Nutraceutical value of kiwicha (*Amaranthus caudatus* L.)." *Journal of Functional Foods*, 65:1037-35.

13. Grundy, M. M. L. and colaboradores (2022). "Cell wall of feeds and their impact on protein digestibility: An in vitro method applied for pig nutrition." *Animal Feed Science and Technology*, 293:1154-67. <http://10.1016/j.anifeedsci.2022.115467>.
14. Ebert, A.W., Wu, T. and Wang, S. (2011). "International Cooperators' Guide: Vegetable Amaranth (*Amaranthus L.*) ". AVRDC Publication No. 11-754. Asian Vegetable Research and Development Center, Shanhua.
15. Grobelnik Mlakar, S., et al. (2009). "Rheological Properties of Dough Made from Grain Amaranth-Cereal Composite Flours Based on Wheat and Spelt." *Czech Journal of Food Sciences*, 27: 309-319. <http://10.17221/61/2009-CJFS>.
16. Espitia-Rangel, E., et al. (2010). "Distribución geográfica de las especies cultivadas de *Amaranthus* y de sus parientes silvestres en México." *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 1(3): 427-437.
17. Santiago, P., et al. (2014). "Functional Attributes of Amaranth." *Austin Journal of Nutrition and Food Sciences*, 2(1):1010.
18. Santra, D. K. & R. Schoenlechner (2017). "Amaranth Part 2—Sustainability, Processing, and Applications of Amaranth". *Sustainable Protein Sources*, 257-264. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802778-3.00016-0>.
19. Calderon de la Barca, A., et al. (2010). "Gluten-Free Breads and Cookies of Raw and Popped Amaranth Flours with Attractive Technological and Nutritional Qualities." *Plant foods for human nutrition (Dordrecht, Netherlands)*, 65: 241-246.
20. Mlakar, S. G., et al. (2010). "GRAIN AMARANTH AS AN ALTERNATIVE AND PERSPECTIVE CROP IN TEMPERATE CLIMATE". *Agricultural and Food Sciences, Environmental Science*.
21. Feng, J.-Y., & Liu, Z.-Q. (2009). "Phenolic and Enolic Hydroxyl Groups in Curcumin: Which Plays the Major Role in Scavenging Radicals". *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(22):11041-46. <https://doi.org/10.1021/jf902244g>.

22. Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C. (2008). Free radicals, antioxidants in disease and health. *Int J Biomed Sci* 4(2):89-96. PMID: 23675073; PMCID: PMC3614697.
23. Park, S.-J., et al. (2020). "A Review of Recent Studies on the Antioxidant Activities of a Third-Millennium Food: *Amaranthus* spp." *Antioxidants (Basel)*,9(12):1236. <https://doi.org/10.3390/antiox9121236>.
24. Montoya-Rodríguez, A., et al. (2015). "Identification of Bioactive Peptide Sequences from Amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) Seed Proteins and Their Potential Role in the Prevention of Chronic Diseases." *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 14(2):139-158. [http://doi:10.1111/1541-4337.12125](http://doi.org/10.1111/1541-4337.12125).
25. José Luis Silencio Barrita & María del Socorro Santiago Sánchez. (2013). "Antioxidant Role of Ascorbic Acid and His Protective Effects on Chronic Diseases". *Oxidative Stress and Chronic Degenerative Diseases - A Role for Antioxidants*. <https://doi.org/10.5772/52181>.
26. Honda, T., et al. (2002). Synthesis and anti-influenza virus activity of 4-guanidino-7-substituted Neu5Ac2en derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 12(15):1921-4.
27. Siebatcheu, E., et al. (2022). "Secondary metabolites from an endophytic fungus *Trichoderma erinaceum* with antimicrobial activity towards *Pythium ultimum*." *Natural Product Research*, 37(4):657-662. [http://doi:10.1080/14786419.2022.2075360](http://doi.org/10.1080/14786419.2022.2075360).
28. Reyes, A., et al. (1975). "Partial purification and identification of a reversible decapacitation factor from rabbit seminal plasma". *Fertil Steril*, 26(2):148-57. PMID: 47814.
29. Brahmachari, G. (2021). Chapter 1—Green synthetic approaches for biologically relevant heterocycles: Green catalytic systems and solvents—An overview. En G. Brahmachari (Ed.), *Green Synthetic Approaches for Biologically Relevant Heterocycles (Second Edition)* (Second Edition, pp. 1-9). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820792-5.00001-9>

30. Ma, Q.-G., et al. (2016). "Alkenes with antioxidative activities from *Murraya koenigii* (L.) Spreng." *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 26(3): 799-803.

## 9. Anexos

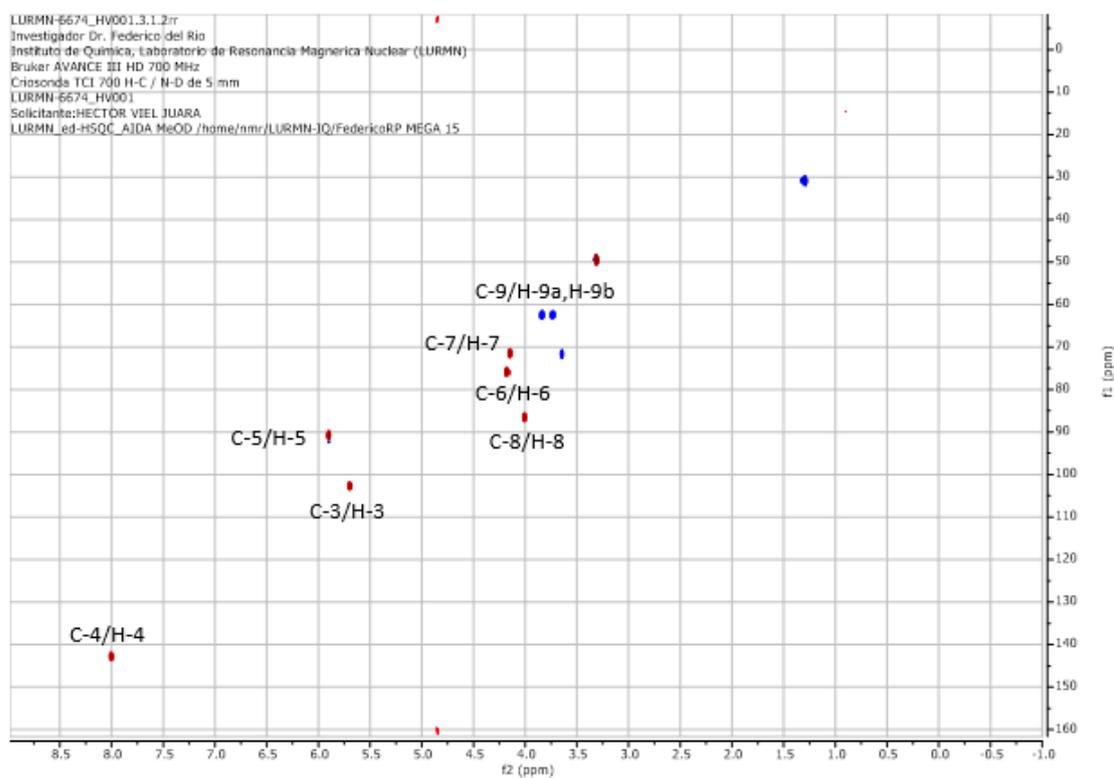


Figura 15. HSQC 3.2

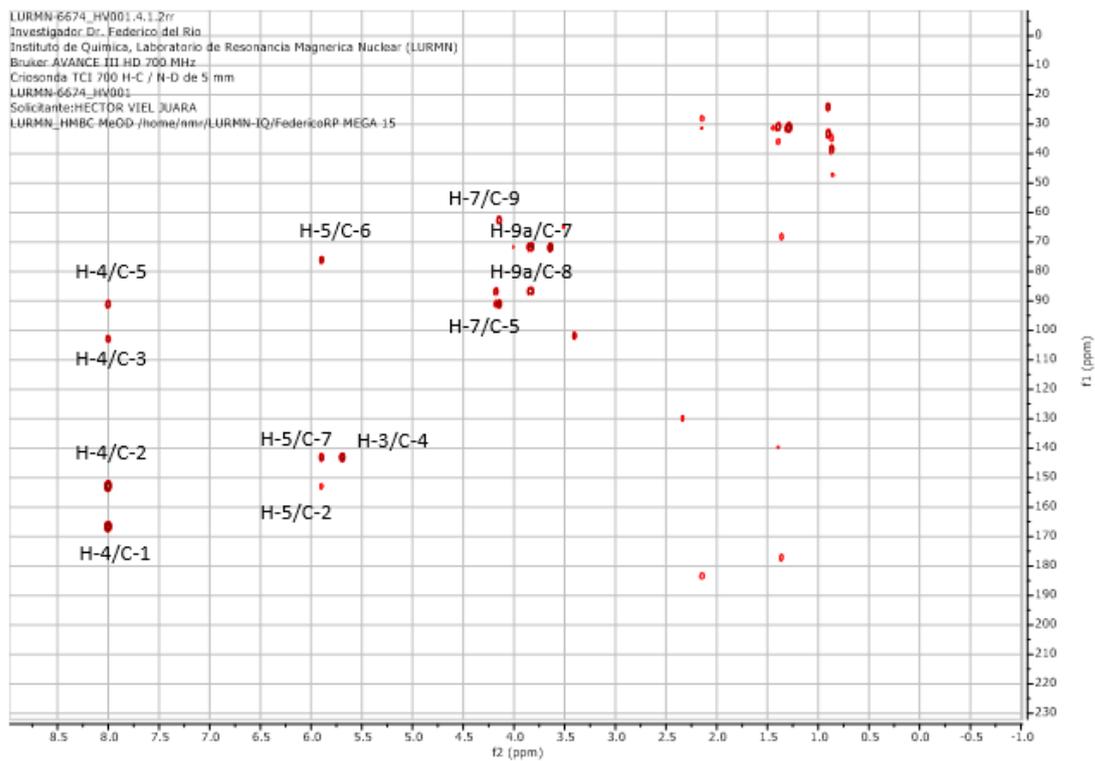


Figura 16. HMBC 3.2

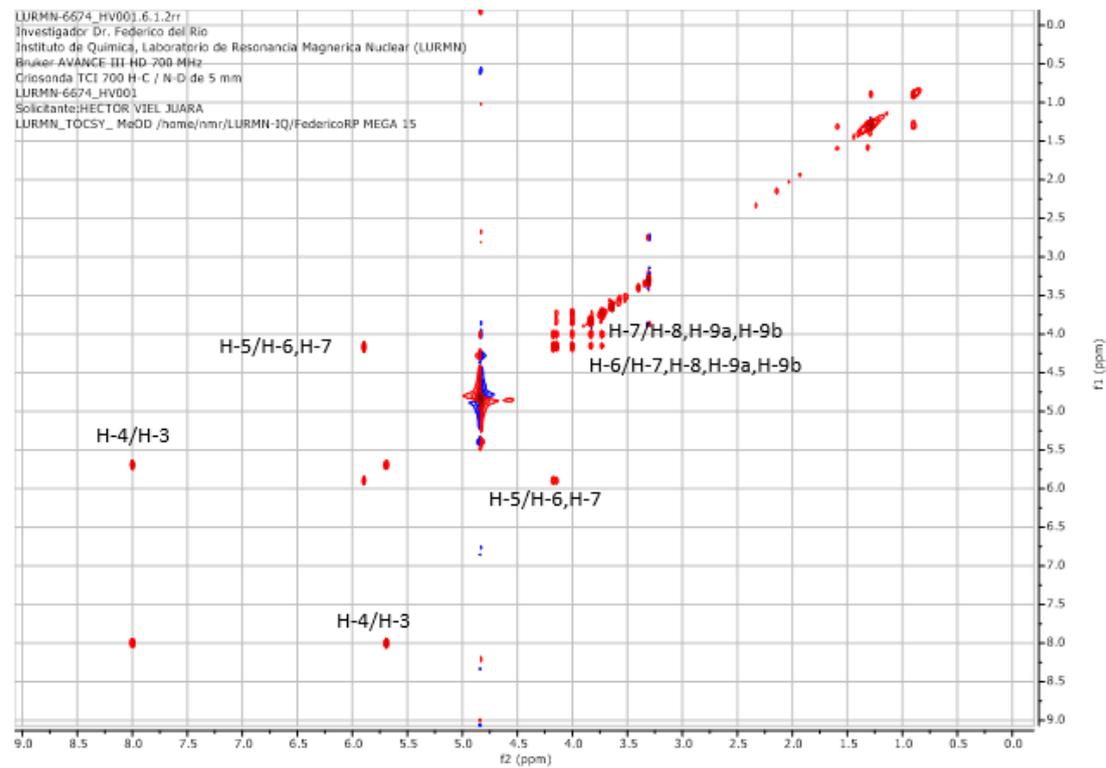


Figura 17. TOCSY 3.2

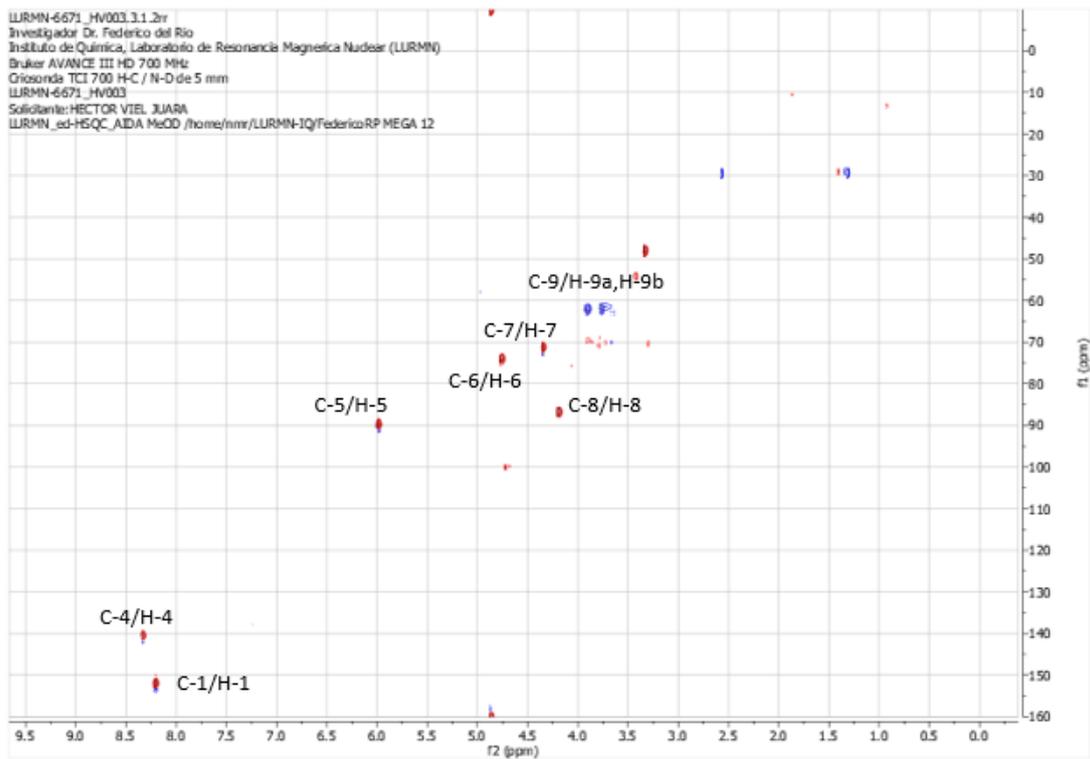


Figura 18. HSQC 3.4

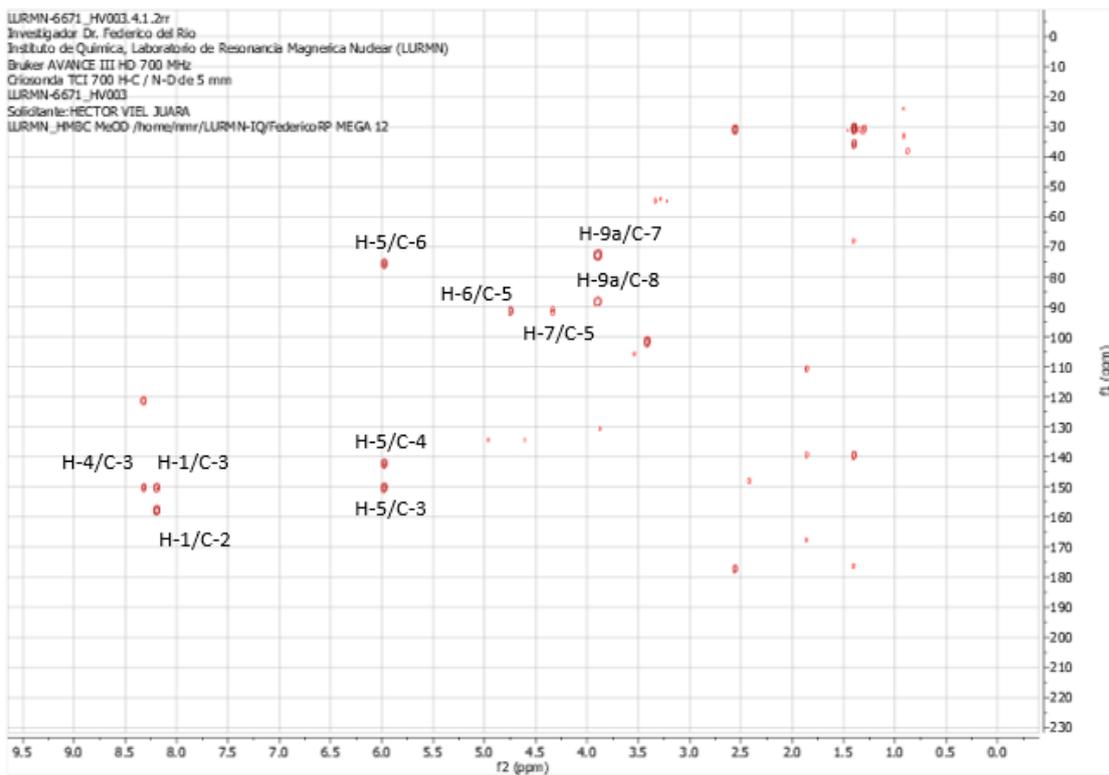


Figura 19. HMBC 3.4

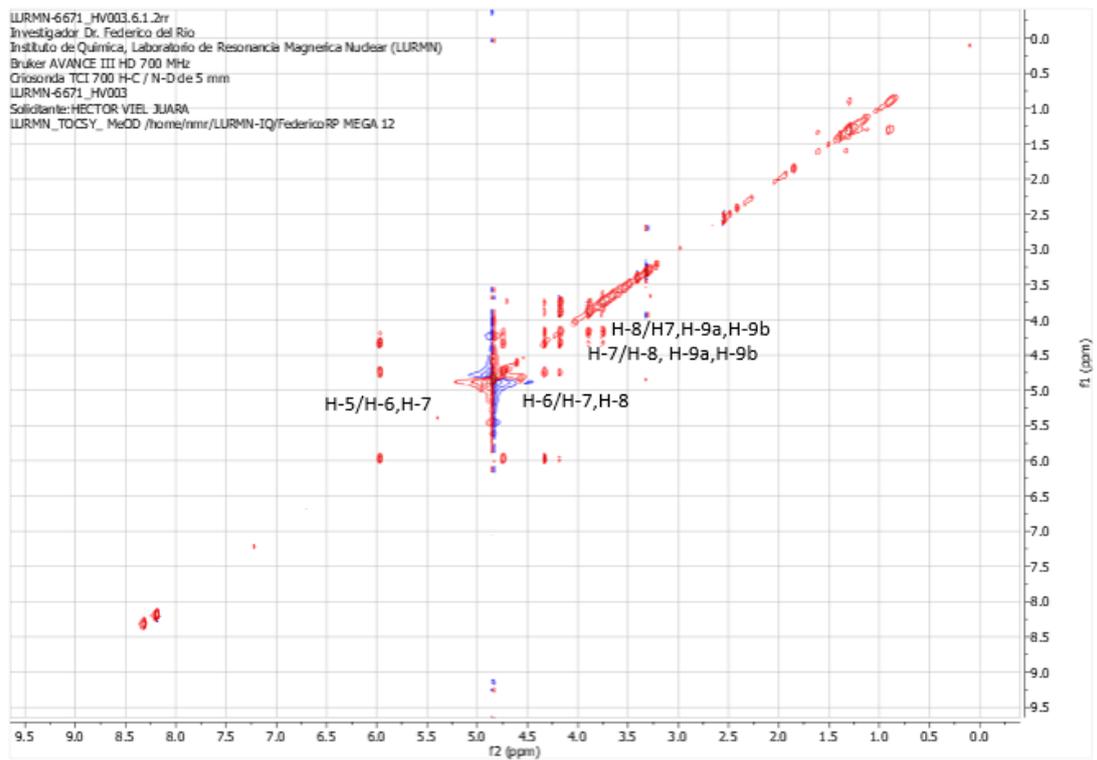


Figura 20. TOCSY 3.4

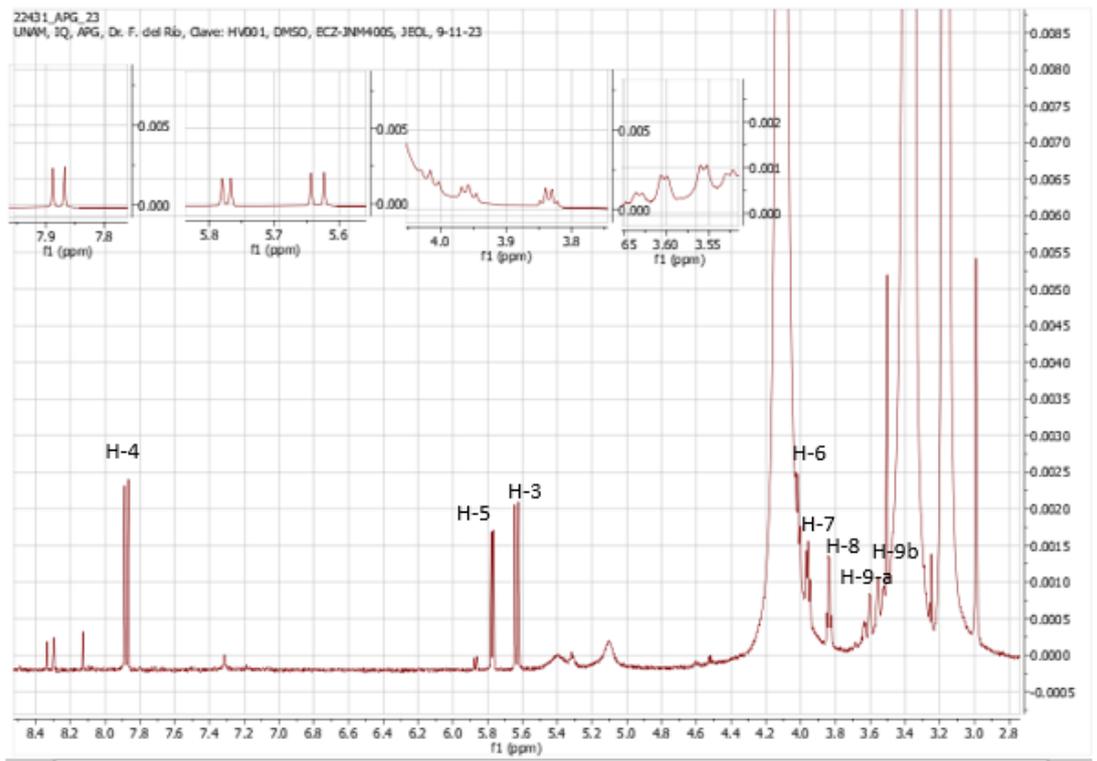


Figura 21. RMN 1H 3.2 400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub> δ 7.88, 5.77, 5.63, 4.02, 3.96, 3.84, 3.62, 3.54.

3.4				
H asignado	$\delta$ <sup>1</sup> H observado (700MHz MeOD)	$\delta$ <sup>1</sup> H reportado (300 MHz MeOD)	J observado Hz (700MHz MeOD)	J reportado Hz (300 MHz MeOD)
4	8,31	8,32		
1	8,19	8,19		
5	5,97	5,97	6,40	6,30
6	4,74	4,75	6,17	6,00
7	4,33	4,34	-	-
8	4,17	4,17	-	-
9a	3,89	3,89	12,47;2,52	12,60;2,70
9b	3,75	3,77	12,47;2,52	12,60;2,70

Tabla 1. Comparación de los datos de desplazamiento químico <sup>1</sup>H de 3.4 con el compuesto aislado de *Murraya koeniggi* por Qin-Ge Ma. y colaboradores [30].

3.4		
C asignado	$\delta$ <sup>13</sup> C observado (175MHz MeOD)	J reportado Hz (125MHz MeOD)
2	157,61	157,60
3	150,06	150,00
1	153,51	153,50
4	142,04	142,00
5	91,27	91,30
8	88,18	88,20
6	75,47	75,50
7	72,66	72,70
9	63,47	63,50

Tabla 2. Comparación de los datos de desplazamiento químico <sup>13</sup>C de 3.4 con el compuesto aislado de *Murraya koeniggi* por Qin-Ge Ma. y colaboradores [30].

3.2				
H asignado	$\delta$ <sup>1</sup> H observado (400MHz DMSO)	$\delta$ <sup>1</sup> H reportado (600 MHz DMSO)	J observado Hz (400MHz DMSO)	J observado Hz (600MHz DMSO)
4	7,88	7,89	8,13	8,00
5	5,77	5,78	5,36	5,50
3	5,63	5,64	7,99	8,00
6	4,02	4,02	-	-
7	3,96	3,96	-	-
8	3,84	3,84	-	-
9a	3,62	3,62	-	-
9b	3,54	3,54	-	-

Tabla 3. Comparación de los datos de desplazamiento químico <sup>1</sup>H de 3.2 con el compuesto aislado de un hongo endofítico llamado *Trichoderma erinaceum* por Siebatcheu E.C y colaboradore [27].