

# INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

---

- Estudio sintético y evaluación biológica de los compuestos oxidados del valenceno
- Análisis espectroscópico de los compuestos presentes en la raíz de cholla (*Opuntia sp*)

## T E S I S

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

QUE COMO UNO DE LOS REQUISITOS

PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS  
QUIMICOBIOLOGICAS**

PRESENTA

**Q. F. I. FANNY AZUCENA COLCHERO AMATECO**

MÉXICO, D. F.

ENERO 2009



## CONTENIDO

### *Estudio sintético y evaluación biológica de los compuestos oxidados del valenceno*

1.1	INTRODUCCIÓN-----	5
1.2	ANTECEDENTES-----	16
1.3	JUSTIFICACIÓN-----	20
1.4	OBJETIVOS-----	21
1.5	METODOLOGÍA GENERAL-----	22
1.6	RESULTADOS Y DISCUSIÓN-----	23
1.7	CONCLUSIONES-----	39
1.8	PARTE EXPERIMENTAL -----	40
1.9	REFERENCIAS-----	52
1.10	ESPECTROS-----	57

### *Análisis espectroscópico de los compuestos presentes en la raíz de cholla (Opuntia sp)*

2.1	INTRODUCCIÓN-----	95
2.2	ANTECEDENTES-----	100
2.3	JUSTIFICACIÓN-----	103
2.4	OBJETIVO-----	104
2.5	METODOLOGÍA GENERAL-----	105
2.6	RESULTADOS Y DISCUSIÓN-----	106
2.7	CONCLUSIONES-----	109
2.8	PARTE EXPERIMENTAL -----	110
2.9	REFERENCIAS-----	114
2.10	ESPECTROS-----	116

# CAPITULO 1

## Estudio sintético y evaluación biológica de los compuestos oxidados del valenceno

## 1.1 INTRODUCCIÓN

La denominación de pesticidas, o su equivalente plaguicidas, incluye una amplia variedad de productos muy diferentes en su composición y en sus propiedades a pesar de su utilización común.

Los plaguicidas son sustancias o ingredientes activos, así como las formulaciones o preparados que contienen uno o varios de ellos, destinados a cualquiera de los fines siguientes:<sup>1</sup>

- a. Combatir los agentes nocivos para los vegetales y productos vegetales o prevenir su acción.
- b. Favorecer o regular la producción vegetal, con excepción de los nutrientes y los destinados a la enmienda de suelos.
- c. Conservar los productos vegetales, incluida la protección de las maderas.
- d. Destruir los vegetales indeseables.
- e. Destruir parte de los vegetales o prevenir un crecimiento indeseable de los mismos.
- f. Hacer inofensivos, destruir o prevenir la acción de otros organismos nocivos o indeseables distintos de los que atacan a los vegetales.

Los pesticidas pueden clasificarse atendiendo a diversos aspectos.

Según el destino de su aplicación pueden considerarse:

- a. Pesticidas de uso fitosanitario o productos fitosanitarios: los destinados a su utilización en el ámbito de la sanidad vegetal o el control de vegetales.
- b. Pesticidas de uso ganadero: los destinados a su utilización en el entorno de los animales o en actividades relacionadas con su explotación.
- c. Pesticidas de uso en la industria alimentaria: los destinados a tratamientos de productos o dispositivos relacionados con la industria alimentaria.
- d. Pesticidas de uso ambiental: los destinados al saneamiento de locales u otros establecimientos públicos o privados.
- e. Pesticidas de uso en higiene personal: aquellos preparados útiles para la aplicación directa sobre el hombre.
- f. Pesticidas de uso doméstico: cualquier preparado destinado para aplicación por personas no especialmente calificadas en viviendas o locales habitados.

Atendiendo a su acción específica pueden efectuarse múltiples clasificaciones, siendo una de las más utilizadas la decimal, en la que se consideran:<sup>2</sup>

Tabla 1. Clasificación de Plaguicidas según el organismo blanco.

I.	Insecticidas
II.	Acaricidas
III.	Fungicidas
IV.	Nematocidas, desinfectantes y fumigantes en general
V.	Herbicidas
VI.	Fitorreguladores y productos afines
VII.	Molusquicidas, rodenticidas y varios
VIII.	Específicos post-cosecha y simientes
IX.	Protectores de maderas, fibras y derivados
X	Plaguicidas específicos varios

Desde el punto de vista de su constitución química, los pesticidas pueden clasificarse en diversos grupos, siendo los más importantes los siguientes:<sup>3</sup>

- Arsenicales.
- Carbamatos.
- Derivados de cumarina.
- Derivados de urea.
- Dinitrocompuestos.
- Organoclorados.
- Organofosforados.
- Organometálicos.
- Piretroides.
- Tiocarbamatos.
- Triazinas.

Algunos de estos grupos engloban varias estructuras diferenciadas, por lo que, en caso de interés, es posible efectuar una subdivisión de los mismos.

Atendiendo a su grado de peligrosidad para las personas, los pesticidas se clasifican de la siguiente forma:<sup>4</sup>

**En cuanto a su grado de toxicidad:**

- a. **De baja peligrosidad:** los que por inhalación, ingestión o penetración cutánea no entrañan riesgos apreciables.
- b. **Nocivos:** los que por inhalación, ingestión o penetración cutánea puedan entrañar riesgos de gravedad limitada.
- c. **Tóxicos:** los que por inhalación, ingestión o penetración cutánea puedan entrañar riesgos graves, agudos o crónicos, e incluso la muerte.
- d. **Muy tóxicos:** los que por inhalación, ingestión penetración cutánea puedan entrañar riesgos extremadamente graves, agudos o crónicos, e incluso la muerte.

Esta clasificación toxicológica de los plaguicidas se realiza atendiendo básicamente a su toxicidad aguda, expresada en DL50 (dosis letal al 50 por 100) por vía oral o dérmica en rata o en CL 50 (concentración letal al 50 por 100) por vía respiratoria en rata, fue establecida por Hodge y Sterner en 1949 y aún permanece vigente.

Los mecanismos de acción de los pesticidas sobre el organismo presentan entre sí grandes diferencias. Para algunos productos estos mecanismos son bien conocidos, incluso a nivel molecular, pero para otros son prácticamente desconocidos. Por otra parte, incluso dentro de una misma familia química pueden encontrarse compuestos desde escasamente peligrosos hasta muy tóxicos. Todo ello hace muy difícil establecer generalidades en lo concerniente a la toxicidad de los pesticidas.

Puede decirse que muchos compuestos organoclorados afectan al sistema nervioso central (depresión, narcosis), así como al hígado y al riñón. Se caracterizan también por acumularse en los tejidos grasos, de donde se eliminan de forma muy gradual. Los compuestos organofosforados y los carbamatos también afectan principalmente al sistema nervioso central, en este caso mediante un proceso de inhibición de la enzima colinesterasa. Los primeros actúan en forma irreversible, mientras que los segundos son inhibidores reversibles de esta enzima. Respecto a estos tres grupos de pesticidas, los más importantes, puede establecerse que su grado de toxicidad sigue el orden:

Organofosforados > Organoclorados > Carbamatos<sup>5</sup>

Los productos sintéticos destinados a controlar plagas y enfermedades en los vegetales han tenido un papel muy marcado en el incremento de la producción agrícola. Sin embargo, el uso continuo e indiscriminado de estas sustancias, no sólo ha causado enfermedades<sup>6</sup> y muertes por envenenamiento a corto y largo plazo, sino también ha afectado al medio ambiente, acumulándose por bioconcentración en los distintos eslabones de la cadena alimenticia, en el suelo y en el agua. Son responsables además de la resistencia<sup>7</sup> a insecticidas por parte de los insectos, sin que por ello se reste importancia a su capacidad en destrucción de parásitos,

predadores naturales y polinizadores, entre los otros tantos integrantes del ecosistema,<sup>8</sup> que han visto alterado su ciclo de vida a causa de estos productos.

El hombre depende del consumo directo de las plantas tanto vegetales, cultivos, cereales como de la obtención de sus productos.

En la naturaleza se ha observado que las plantas presentan ciertos mecanismos de defensa para su supervivencia y algunos estudios han demostrado que las plantas al estar sometidas bajo cierto estrés activan mecanismos para la formación de compuestos que les brindan protección,<sup>9</sup> estos son llamados metabolitos secundarios y tienen un papel de protección del medio ambiente así como de organismos que las rodean y que puedan dañarlas, los principales compuestos identificados se han clasificado de manera general como: alcaloides, terpenos, compuestos fenólicos, glicocidos cianogénicos, entre otros.<sup>10</sup>

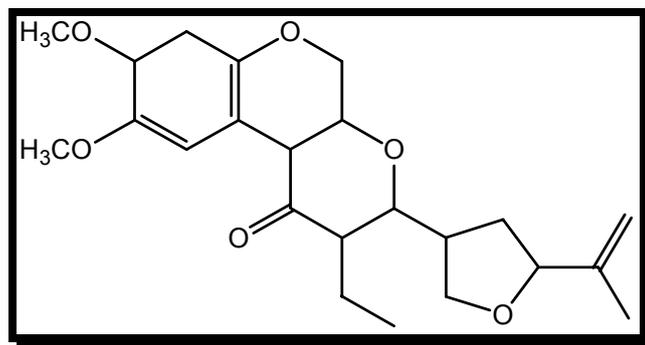
En los últimos años se ha retornado al uso de las plantas como fuente de pesticidas más seguros para el medio ambiente y la salud humana. Por lo que el empleo de insecticidas de origen natural, a partir de extractos naturales, es una alternativa muy importante para el control de insectos.

Muchas plantas son capaces de sintetizar metabolitos secundarios que poseen propiedades biológicas con importancia contra insectos plagas.<sup>11</sup> Para llevar a cabo la elección de plantas que contengan metabolitos secundarios capaces de ser utilizados como insecticidas naturales debe considerarse su fácil cultivo, así como, que contenga principios activos potentes con alta estabilidad química y de optima producción.

Los principales compuestos aislados de plantas usadas desde hace mucho tiempo para fines insecticidas son:

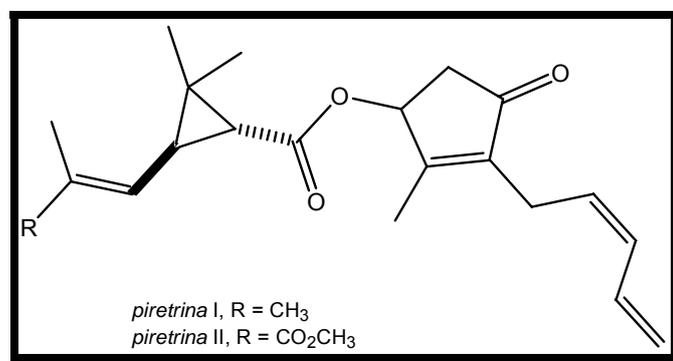
La rotenona<sup>12</sup> (extraída de *Derris elliptica* y *Lonchocarpus utilis*, Fam. Leguminosae) un flavonoide insecticida de contacto e ingestión, y repelente. Su modo de acción en insectos implica una inhibición del transporte de electrones a nivel de mitocondrias bloqueando la fosforilación del ADP a ATP.

Figura 1. Estructura de la rotenona



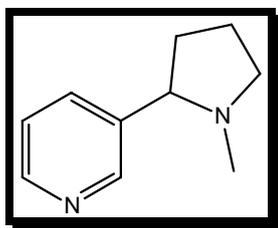
Las piretrinas<sup>13</sup> (obtenidas de las flores de *Chrysanthemum cinaerifolium*, Fam Compositae). Los componentes de esta planta con actividad insecticida reconocida son seis ésteres, formados por la combinación de los ácidos crisantémico y pirétrico y los alcoholes piretrolona, cinerolona y jasmolona.

Figura 2. Estructura general de las piretrinas



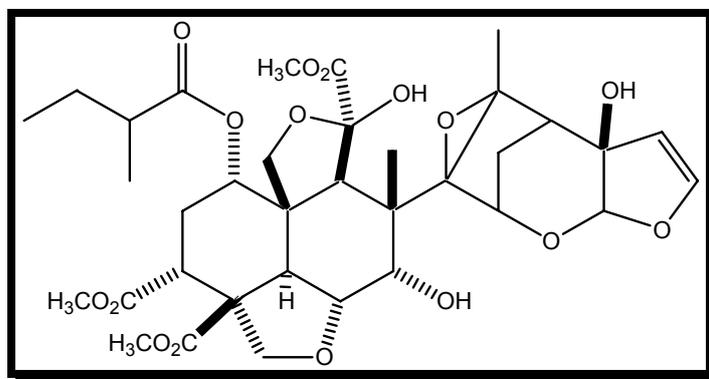
La *nicotina*<sup>14</sup> un alcaloide (derivado de *Nicotiana tabacum* Fam. Solanaceae). Sus propiedades insecticidas fueron reconocidas en la primera mitad del siglo XVI. Este compuesto no se encuentra en la planta en forma libre sino que formando maleatos y citratos. La nicotina es básicamente un insecticida de contacto no persistente.

Figura 3. Estructura de la *nicotina*



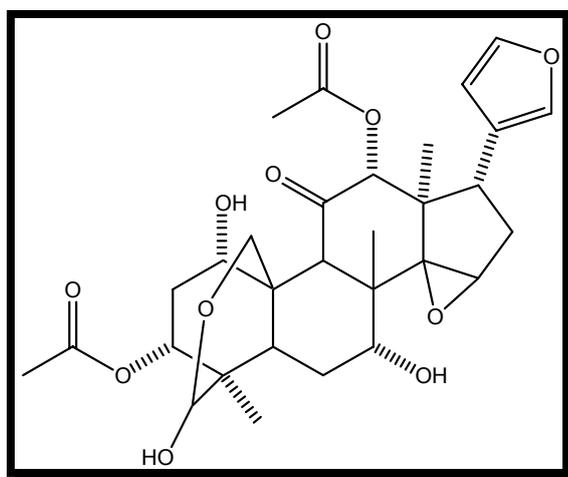
La *azadirachtina*<sup>15</sup> un tetraterpenoide (se obtiene del árbol *Azadirachta indica*), originario de la india. Este compuesto se encuentra en la corteza, hojas y frutos de este árbol pero la mayor concentración se ubica en la semilla.

Figura 4. Estructura de la *Azadirachtina*



En el caso de *Melia azedarach* (Fam. Meliaceae), sus frutos maduros y sus hojas amarillas son usados como insecticida de distintas especies de insectos que atacan diversos cultivos agronómicos.<sup>16</sup> El compuesto activo aislado es un limonoide y su actividad es antialimentaria.<sup>17, 18</sup>

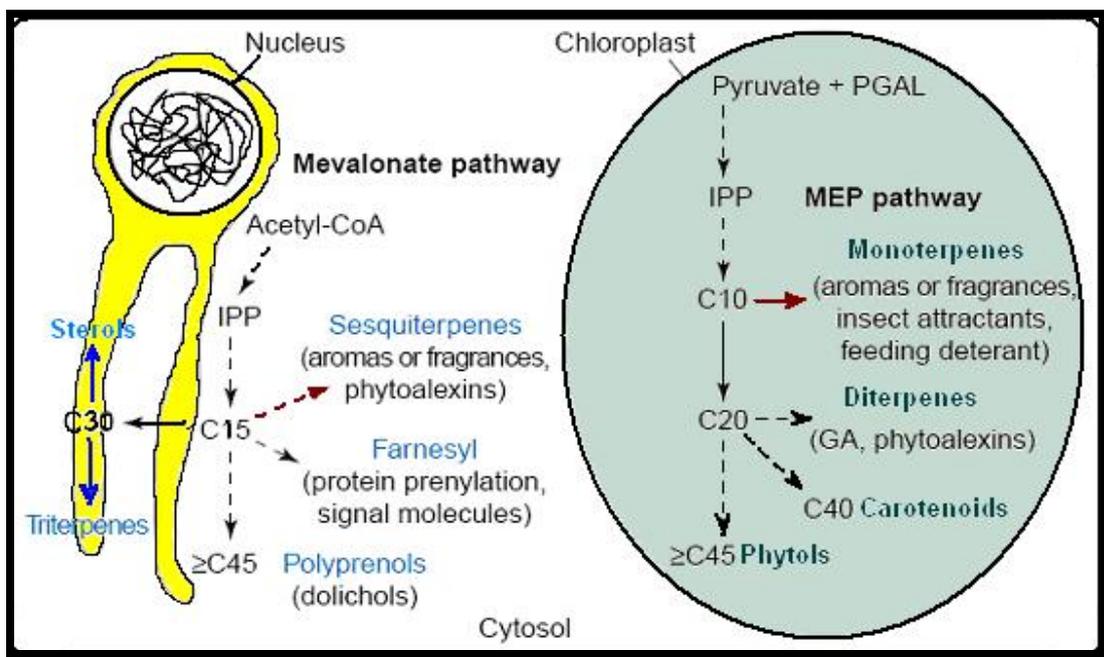
Figura 5. Estructura del Limonoide de *Melia azedarach*



Los aceites esenciales son una mezcla de compuestos volátiles de composición compleja,<sup>19,20</sup> contenidos en algunas plantas y que han tenido amplia y profunda influencia en la vida humana debido a su característico aroma y a su actividad biológica. En la mayoría de los casos los aceites esenciales se obtienen por destilación por arrastre de vapor, básicamente esos aceites contienen derivados alifáticos, aromáticos y compuestos terpenoides, de los cuales los principales constituyente son los monoterpenos y sesquiterpenos.<sup>21,22</sup>

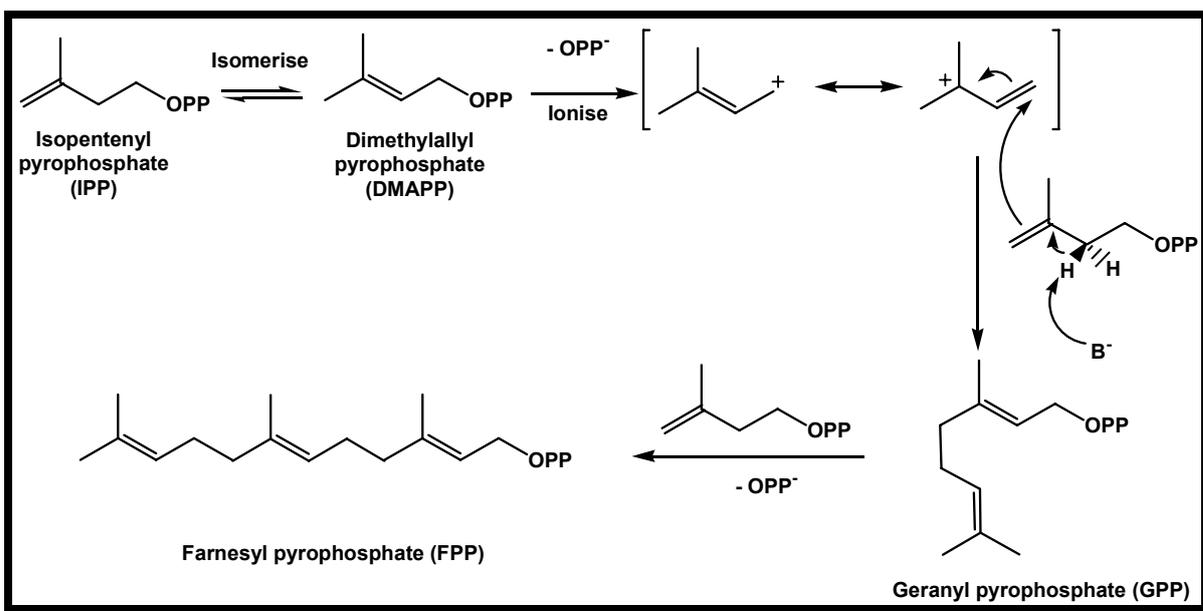
El grupo de los terpenos es uno de los grupos de mayor interés, los cuales dentro de la célula en general se sintetizan mediante las rutas del mevalonato y metileritrol fosfato.<sup>23</sup>

Esquema 1. Rutas de síntesis de mevalonato y metileritrol



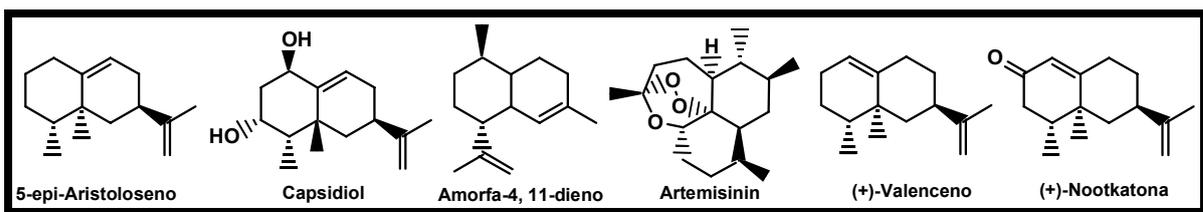
Como se ha observado a partir de unidades de isoprenos se obtienen terpenos más complejos como el farnesil pirofosfato (FPP):<sup>24</sup>

Esquema 2. Mecanismo de síntesis del farnesil pirofosfato



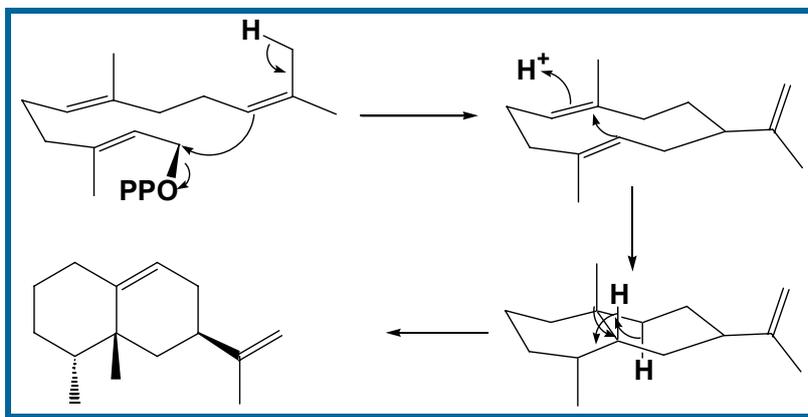
El FPP actúa como precursor de los sesquiterpenos la clase de compuestos terpenoides más grande y que son constituyentes de aceites esenciales en plantas los cuales presenta actividad biológica, como el capsidiol<sup>25-27</sup> que es un derivado del 5-*epi*-aristoloceno,<sup>28</sup> así como amorfa-4,11-dieno que es el precursor de un compuesto con gran actividad antimalaria el artemisinín, otro es el (+)-valenceno precursor de la nootkatona, el principal contribuyente del aroma de la toronja:<sup>23</sup>

Figura 6. Metabolitos secundarios obtenidos a partir de farnesil pirofosfato

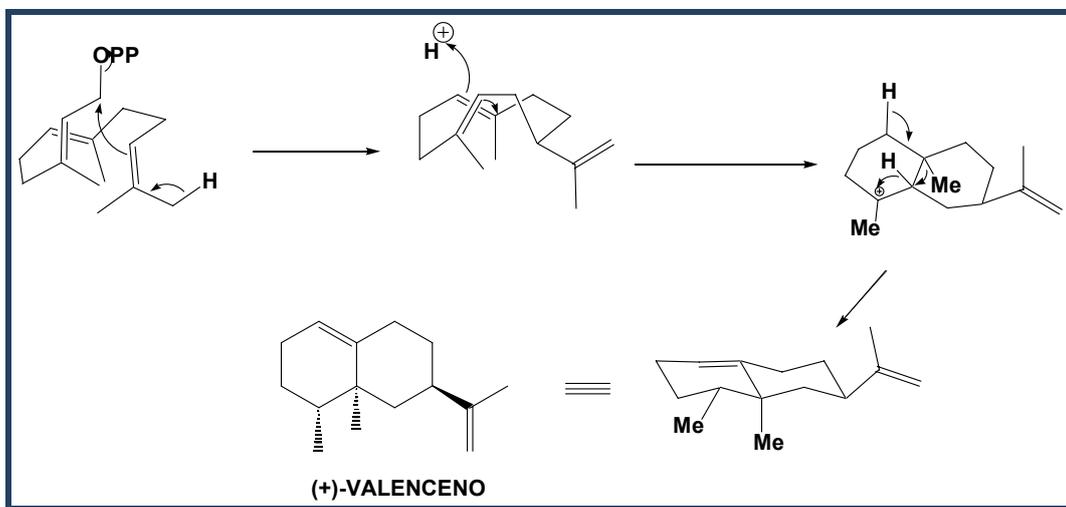


Para el valenceno, se propone una ruta de síntesis a partir del FPP semejante a la del capsidiol:<sup>24-29</sup>

Esquema 3. Ruta de síntesis del capsidiol



Esquema 4. Propuesta de síntesis del valenceno



El valenceno se ha encontrado en el aceite esencial de la cáscara de naranja, toronja, limón, clavo, mango, alcanfor; éste sufre dentro de la planta reacciones de oxidación enzimática<sup>30, 31</sup> a diferentes derivados oxidados y también se ha observado biotransformaciones mediadas por microorganismos.<sup>32-35</sup>

## 1.2 ANTECEDENTES

La importancia del valenceno radica en ser precursor de la nootkatona, que es el principal contribuyente del aroma de la toronja y otros alimentos cítricos,<sup>23,36</sup> Mozonas y Shaw reportaron en 1979 el alto porcentaje de valenceno (~1.5%) existente en el aceite esencial de cáscara de naranja, al cual se le dio un uso comercial ya que se utiliza en la industria alimenticia como saborizante<sup>37,38</sup> o aromatizante.<sup>39</sup>

Figura 6. Fotografía del cedro amarillo de Alaska



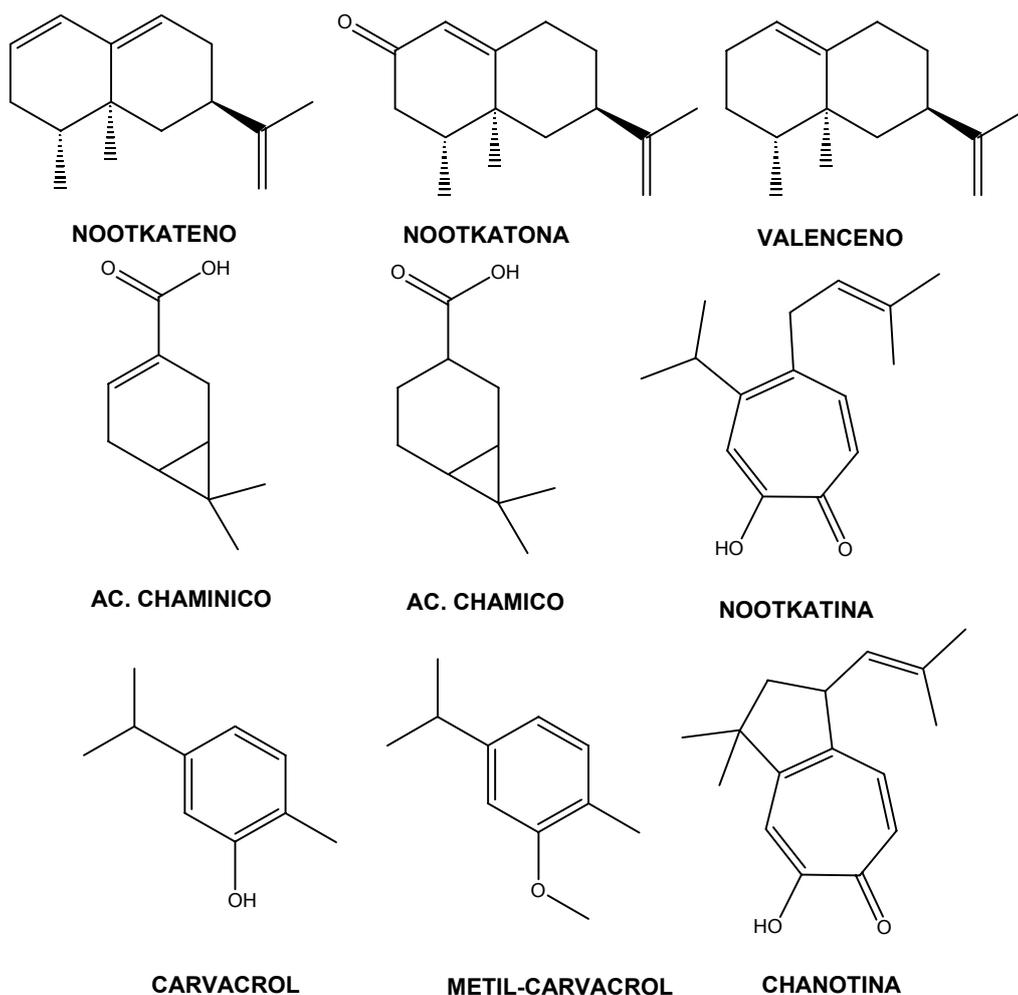
Durante mucho tiempo, se han llevado a cabo estudios de los compuestos presentes en los aceites esenciales provenientes del cedro amarillo de Alaska, los cuales fueron aislados por primera vez en 1926 por Clark y Lucas.<sup>40-42</sup> En donde se encontró que uno de los componentes principales era el valenceno. Este se obtuvo del duramen de este cedro,<sup>43,44</sup> así como en algunos otros cedros americanos, y recientemente, en algunas otras especies como de *Ocotea*,<sup>45</sup> *Baccharis spartioides*,<sup>46</sup> *Laurus novocanariensis*,<sup>47</sup> *Shiranihi mandarin Suppl. J.*,<sup>48</sup> *Olea europaea Cv.*<sup>49</sup> entre otras.<sup>50-52</sup>

Los compuestos oxidados derivados de valenceno han mostrado, además de sus propiedades en la industria alimenticia, propiedades antioxidantes y antimicrobianas,<sup>53-56</sup> otra propiedad encontrada, de gran importancia, es actividad insecticida contra larvas y mosquitos en pruebas realizadas con *Aedes aegypti*, *Xenophila cheopis* e *Ixodes scapularis*, dicha actividad ha sido discutida en términos de las rutas metabólicas que el valenceno toma dentro de la planta, de los compuestos oxidados de valenceno, la nootkatona y el 10-valencenaldehído han sido los derivados más efectivos contra dichas especies.<sup>57-59</sup>

El valenceno es degradado hacia metabolitos más polares que le confieren protección a la planta contra larvas e insectos que pudieran atacarlo. Dicha actividad protectora, en el caso del *cedro amarillo* de Alaska, lo hace una de las especies más longevas del mundo, ya que llegan a vivir más de 100 años.<sup>60,61</sup>

Dentro de los principales compuestos encontrados en el *cedro amarillo* de Alaska están el valenceno y la nootkatona entre otros:

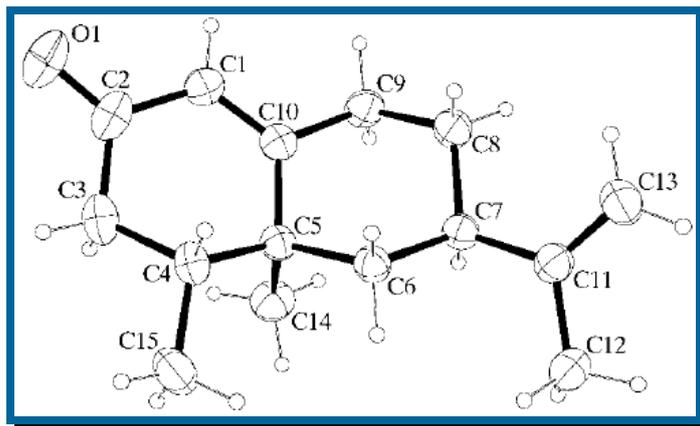
Figura 7. Metabolitos secundarios encontrados en el *cedro amarillo* de Alaska



Debido a la importancia comercial que tiene el valenceno, se han propuesto métodos para su síntesis,<sup>62,63</sup> así como para obtener a partir de él la nootkatona, con complejos de  $\text{CrO}_3\text{-(piridina)}_2$ <sup>64</sup> o  $\text{NaClO}_2$ .<sup>65</sup>

De la nootkatona se ha logrado determinar su configuración absoluta mediante Rayos-X a temperaturas muy bajas (150°K).<sup>66</sup>

Figura 8. Difracción de Rayos X de la Nootkatona



Sin embargo, no solo la Nootkatona ha sido estudiada, sino algunos otros compuestos derivados del valenceno que han mostrado actividad insecticida y algunos que aún están en estudio de su actividad.<sup>67</sup>

Se han planteado diferentes tipos de reacciones de oxidación del valenceno con la finalidad de determinar su reactividad así como los derivados que se pueden llegar a obtener a partir de este metabolito secundario.<sup>68</sup>

### 1.3 JUSTIFICACIÓN

El uso de pesticidas, para evitar la presencia de insectos que pueden ser vectores de enfermedades así como causa de daños en cosechas, entre otros, ha provocado daños al medio ambiente y resistencia en los insectos por su alta persistencia en el medio ambiente, como es el caso de los organoclorados (por ejemplo el DDT); en otros casos no son tan persistentes, pero su alta toxicidad no sólo para los insectos sino para animales incluyendo al ser humano como los organofosforados (parationes), los carbamatos que son poco persistentes tienen baja efectividad insecticidas.

Al observar que compuestos que existen en la naturaleza en plantas les brindan protección contra insectos sin causar daños a otras especies, se plantea probar su actividad biocida contra *Artemia salina* así como llevar a cabo reacciones de oxidación con la finalidad de potenciar su actividad, logrando obtener compuestos de origen natural que debido a su estructura sean eliminados del medio ambiente de manera natural y en poco tiempo, lo cual sería una ventaja ya que se evitaría que los insectos creen resistencia contra estos compuestos.

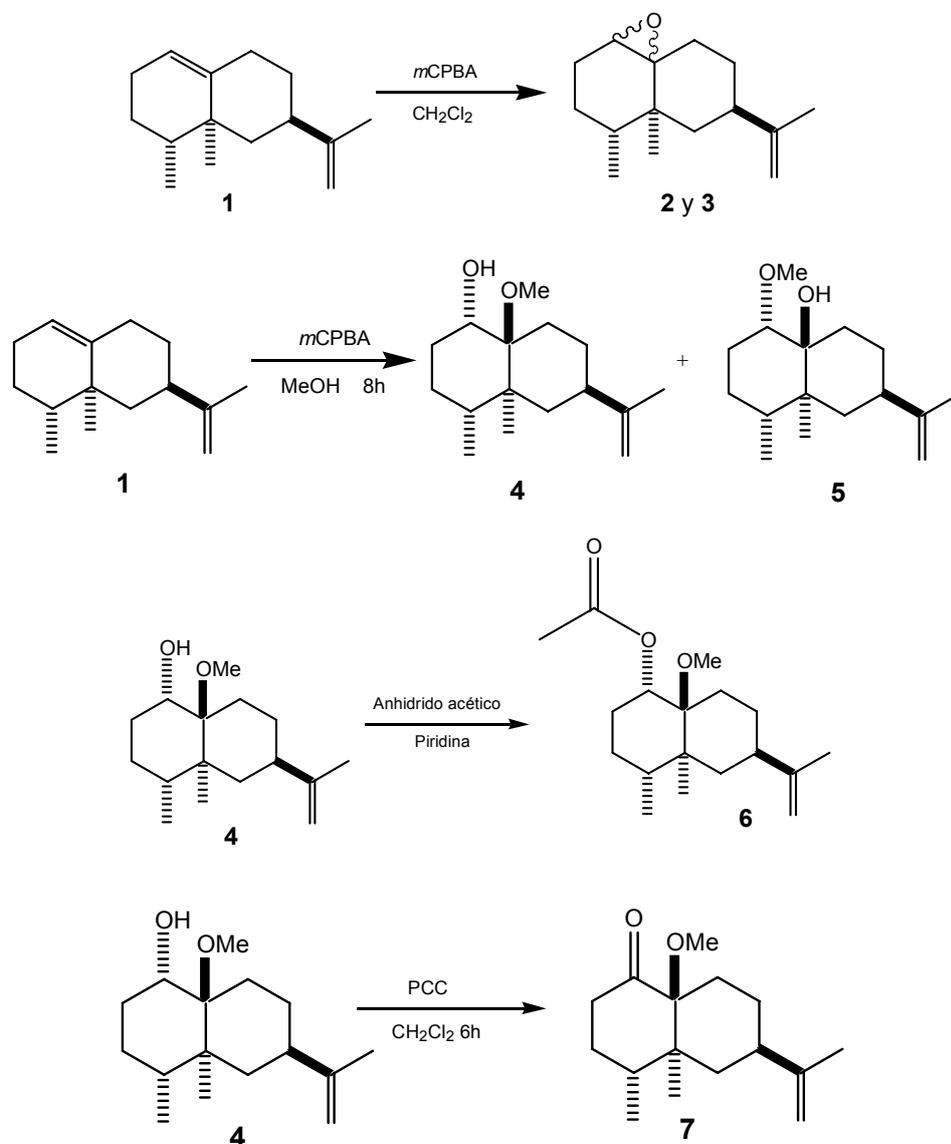
## 1.4 OBJETIVOS

- Sintetizar y caracterizar espectrométricamente los derivados oxidados del valenceno.
- Probar la actividad biológica (biocida) de los productos oxidados del valenceno en *Artemia salina*.

## 1.5 METODOLOGÍA GENERAL

### a) METODOLOGÍA PARA LA SÍNTESIS DE DERIVADOS OXIDADOS DE VALENCENO.

1.- Preparar y caracterizar los derivados oxidados del valenceno de acuerdo a la siguiente metodología:



**b) BIOENSAYO DE TOXICIDAD EN *Artemia salina* PARA EVALUAR CL<sub>50</sub> DE DERIVADOS OXIDADOS DE VALENCENO**

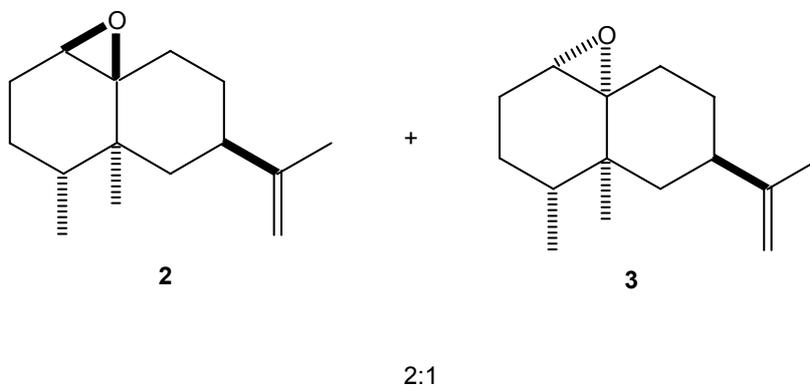
El bioensayo de toxicidad se llevo a cabo como lo plantea el protocolo por triplicado, empleando 30 individuos para cada concentración (10, 100 y 1000 ppm) con *Artemia salina* para determinar la CL50 de la actividad insecticida.

## 1.6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1.6.1 Síntesis de de los derivados del valenceno

#### a) Preparación y elucidación estructural de oxiranos **2** y **3**

La síntesis de los oxiranos **2** y **3** se llevó a cabo por la metodología señalada en la parte experimental. Al llevar a cabo la reacción de epoxidación del valenceno aparentemente solo se obtuvo un solo compuesto con un  $R_f$  de 0.82 (en hexano/AcOEt 8:2), el cual se logró purificar por cromatografía en columna; sin embargo, al analizarse por GC-MS se observaron 2 señales en el cromatograma con una proporción 2:1 y el patrón de fragmentación de ambas señales correspondieron a los oxiranos derivados del valenceno, con  $m/z = 220$ ; en el espectro de IR se observaron las señales características. Se obtuvieron los derivados **2** (trans) y **3** (cis), de acuerdo a su espectro de  $^1\text{H}$  RMN.



Un reporte señala la separación de dichos compuestos por medio de una simple destilación;<sup>68</sup> sin embargo, en nuestro caso, tal operación fue imposible de realizar por lo que se optó por usar un medio cromatográfico para este fin. Los isómeros no se pudieron obtener por separado, debido a que ambos compuestos tienen  $R_f$ 's semejantes.

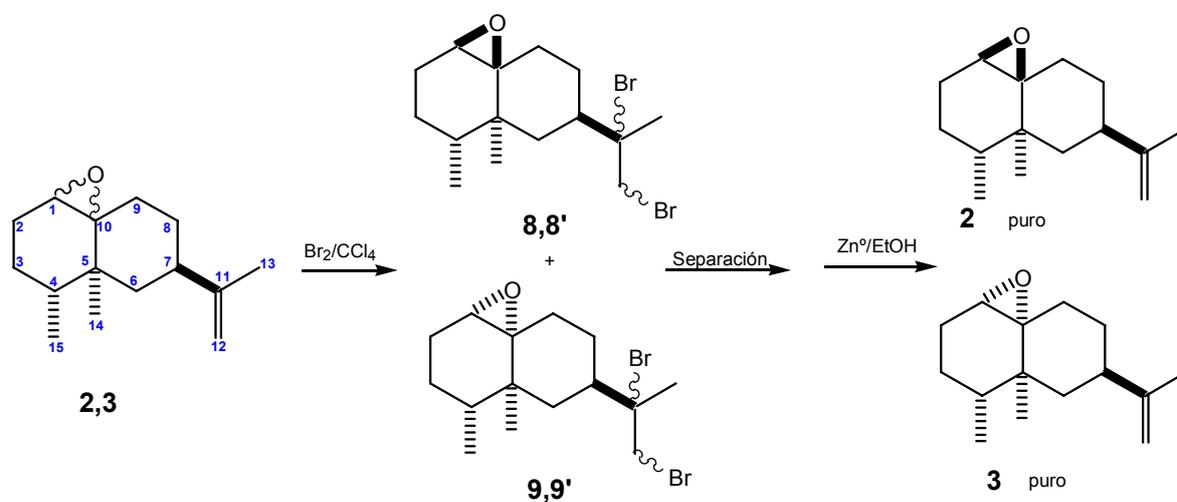
En una comunicación personal se nos informó acerca de la separación exitosa de alquenos diastereoméricos provenientes derivados de colesterol, la cual aprovecha la afinidad que tiene la sal de nitrato de plata para acomplejar, de manera selectiva, al alqueno menos impedido estéricamente.

Aplicando tal metodología para nuestros productos, se llevó a cabo dicho procedimiento, adsorbiendo  $\text{AgNO}_3$ , disuelta en acetonitrilo, en una placa de sílica gel preparativa de 20 x 20 cm con el fin de separar los dos oxiranos distereoisoméricos **2** y **3**.

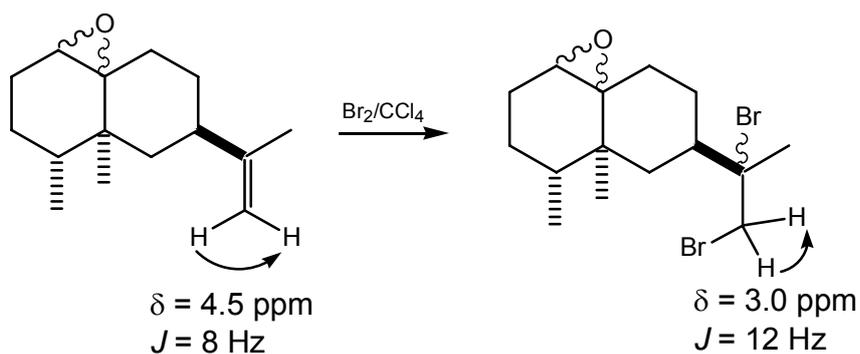
La mezcla de oxiranos **2** y **3** (100 mg) fueron eluidos a través de la placa de sílica gel usando hexano. Una vez que se observó la separación en la placa, se retiró cada parte de la sílica gel en donde se adsorbieron los oxiranos y se lavó cada fracción con hexano para quitar los residuos de acetonitrilo, obteniendo dos fracciones adsorbidas en la placa.

Los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  y de  $^{13}\text{C}$  de las fracciones obtenidas mostraron la apertura de ambos oxiranos así como la oxidación del correspondiente alcohol secundario; por lo cual, se desechó esta metodología para su purificación.

Siguiendo con el objetivo de separar la mezcla de oxiranos **2** y **3** para evaluar su actividad biocida de forma pura, se diseñó una estrategia que pudiera servir para separar los oxiranos, en esta se haría la halogenación del doble enlace con  $\text{Br}_2/\text{CCl}_4$ ; para aprovechar la diferencia de  $R_f$ 's de los nuevos compuestos. Una vez separados, se obtendría cada producto puro y cada uno de ellos se trataría con  $\text{Zn}^\circ$  para su deshalogenación, obteniendo cada oxirano por separado.



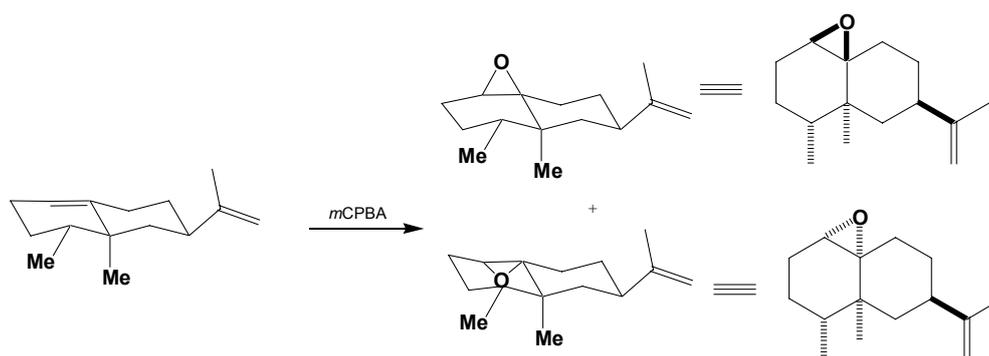
Se llevó a cabo la reacción de bromación obteniéndose una mezcla de reacción en donde se observó, en su espectro de RMN  $^1\text{H}$ , la desaparición de los protones vinílicos entre 4.5 y 4.6 ppm y observando la aparición de una señal doble de doble ( $J = 12 \text{ Hz}$ ) para el acoplamiento vecinal entre los dos protones diastereotópicos del metileno bromado terminal.



Desafortunadamente, los oxiranos diastereosoméricos dibromados también mostraron  $R_f$ 's muy parecidos, además de que disminuyó su liposolubilidad, eluyéndolos con hexano/AcOEt 9:1 en una columna de sílica gel sin poder obtenerlos por separado.

Con este resultado se decidió analizar la actividad biocida de éstos compuestos como mezcla.

El análisis espectrométrico de RMN-<sup>1</sup>H, señala que su conformación con respecto al valenceno no varía mucho, por lo cual se trataría de las siguientes conformaciones:

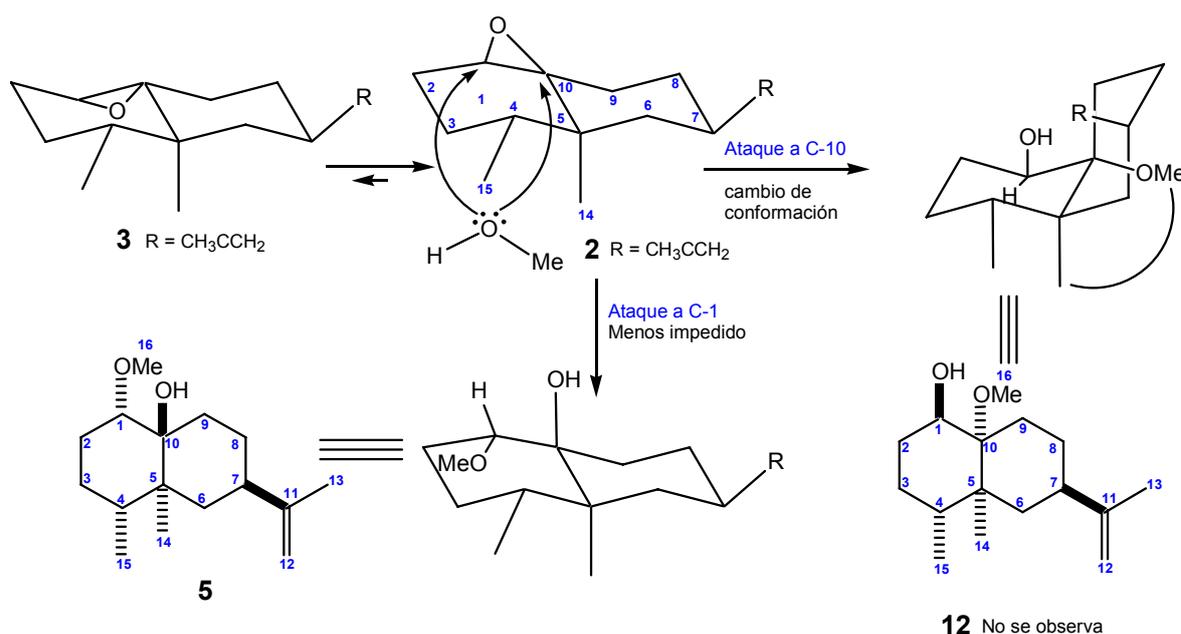


**a) Preparación de los alfa-hidroxiéteres a partir por epoxidación-solvólisis (metanol) directa y por epoxidación, separación (purificación) y apertura de oxiranos por separado.**

La preparación de los *alfa* hidroxiéteres se llevó a cabo por medio de la formación de los oxiranos *cis* y *trans* en un solo paso, colocando valenceno en presencia de ácido *meta*-cloroperbenzoico y usando metanol como disolvente para promover la apertura del epóxido formado. De esta reacción, se observó la formación de los productos **4** y **5**, los cuales se purificaron por columna ya que presentaron R<sub>f</sub>s diferentes, el compuesto **4** con un R<sub>f</sub> de 0.47 y el compuesto **5** con un R<sub>f</sub> de 0.68 (en hexano/AcOEt 8:2).

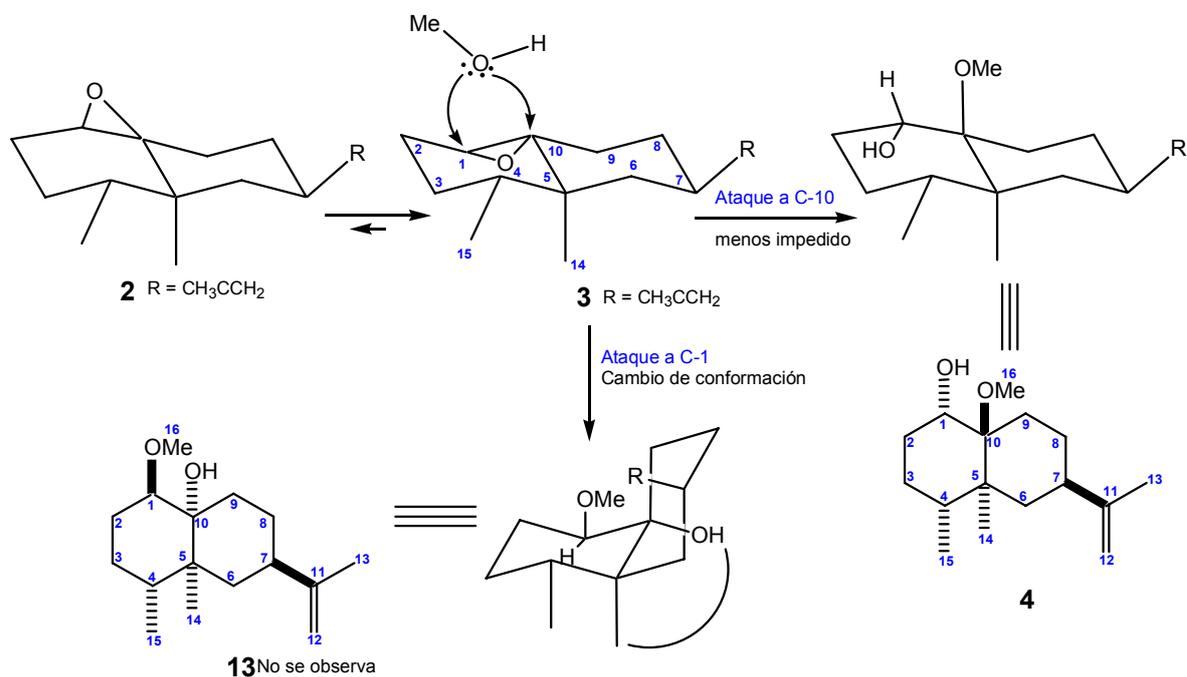
Un análisis de la apertura anular nos daría la posibilidad de obtener hasta 4 compuestos diastereosoméricos, productos del ataque del disolvente al epóxido *cis* o *trans*; sin embargo, solo se observó la aparición de dos productos.

Puede argumentarse que en la reacción existe la posibilidad de formación de un equilibrio entre los oxiranos **2** y **3** en donde el equilibrio se desplazaría al oxirano **2**, el cual es más estable dado que la interacción estérica con los metilos **14** y **15** es menor que la interacción estérica de los mismos metilos con el oxirano *cis*, del cual se derivarían dos *alfa* hidroxieéteres.



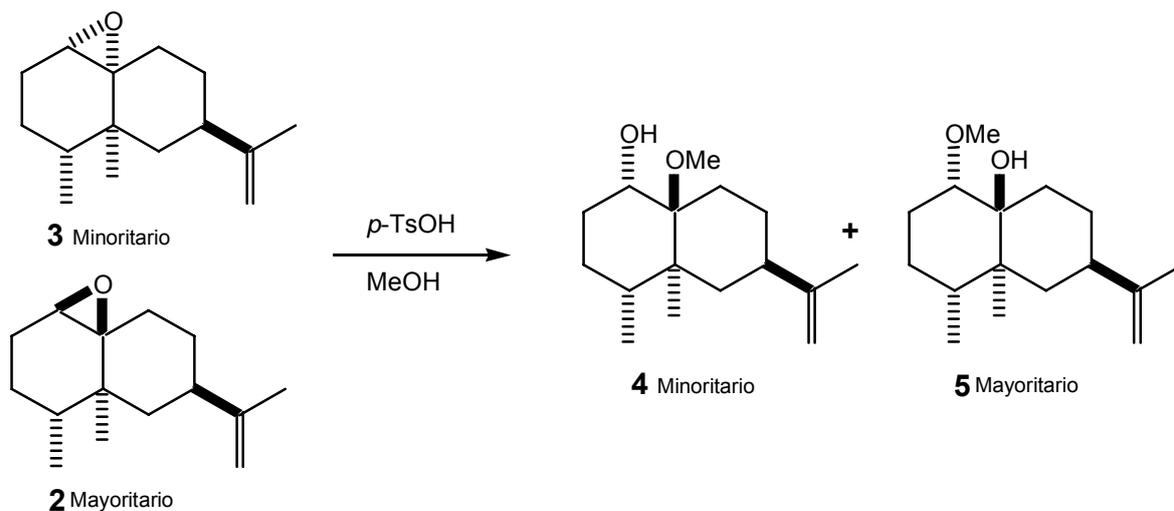
Sin embargo, esta hipótesis no explicaría la formación de del producto **4**, y dentro de de esta se plantearía la formación del producto **12** de apertura del oxirano, el cual no esta presente en la mezcla de reacción.

Por otro lado, si se plantea un argumento semejante, pero que en este caso que el equilibrio se desplazara al oxirano **3**, los productos serian dos nuevamente pero solo se explicaría la formación del compuesto **4** y del compuesto **13** que no corresponde a los que aparecen como productos de apertura del oxirano.

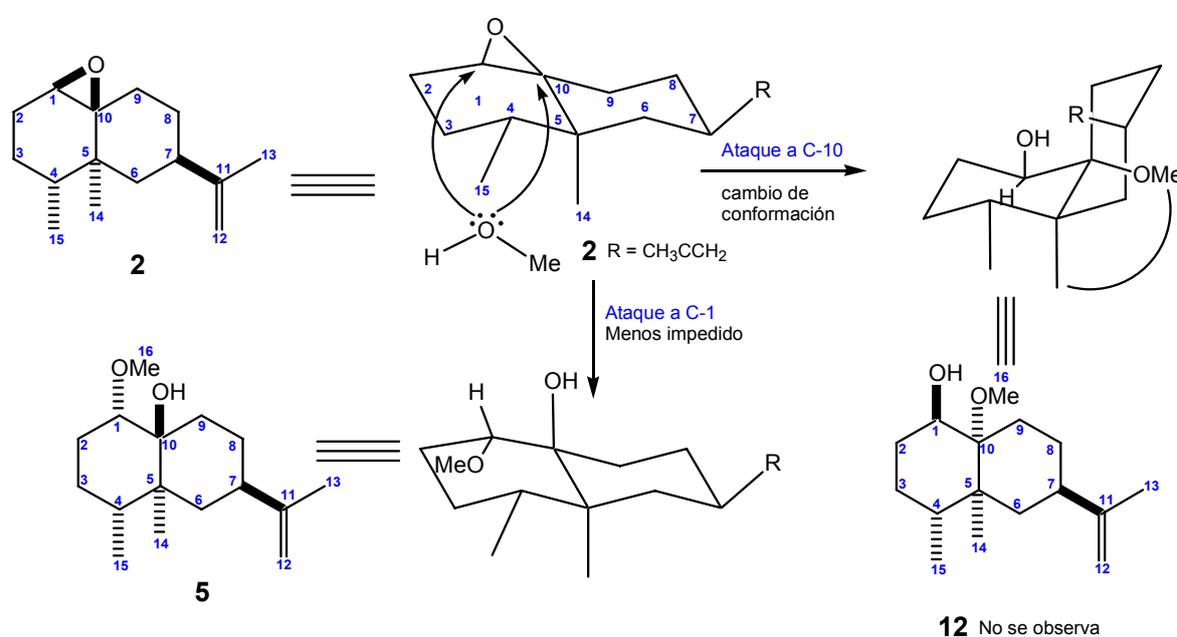


Para corroborar o desechar la idea de formación de uno de los dos oxiranos (**2**, **3**) se hizo reaccionar una cantidad equimolar en la misma reacción de los isómeros *cis* y *trans* con metanol y ácido *p*-toluensulfónico en cantidades catalíticas durante 2 h.

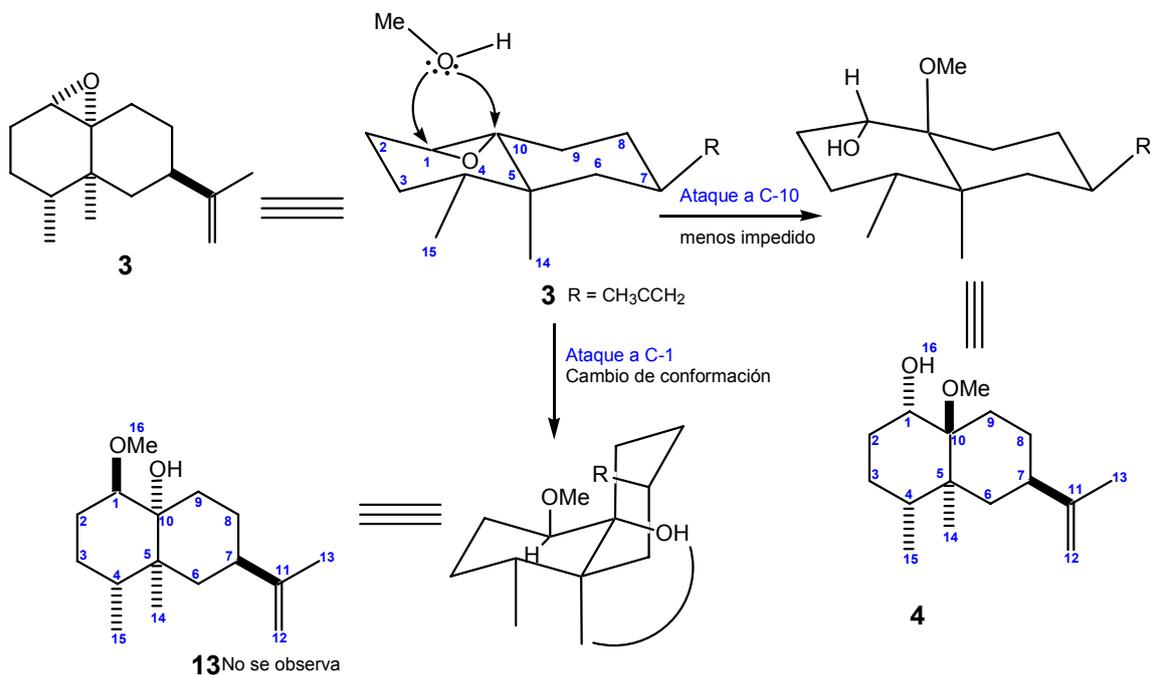
Al final de la reacción se produjeron los mismos *alfa*-hidroxiéteres **4** y **5**. No se observó la presencia de más productos provenientes de la apertura de la mezcla de oxiranos.



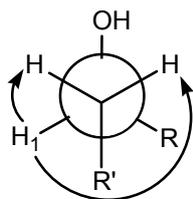
Por lo observado en la reacción, al utilizar la mezcla de los oxiranos, nos confirma que la apertura del oxirano podría ser selectiva, ya que el ataque nucleofílico del MeOH para la apertura del oxirano *beta* (**2**) se llevaría a cabo en el C-1 para obtener como producto el compuesto **5**, ya que no podría atacar al C-10 debido al impedimento estérico que existe con el metilo cabeza de puente.



En el caso del oxirano *alfa* (**3**) el metoxilo atacaría al C-10 para inducir la apertura del oxirano y formar el producto **4** ya que no podría atacar al C-1 debido a que el grupo OH que se formara sería *syn* al metilo cabeza de puente, el cual sería inestable.



Además de la inestabilidad que tendría la molécula por una posición *syn* de los grupos de los carbonos cabeza de puente, las señales del protón H-1 darían una señal doble de dobles con una proporción de 1:1:1:1 debido a su conformación en el espacio.



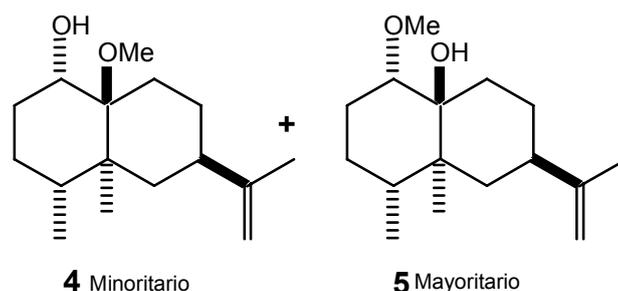
Una  $J$  pequeña  
y una  $J$  grande

Con el fin de poder analizar los compuestos **4** y **5** por medio de difracción de rayos X se efectuaron las reacciones de acetilación para poder cristalizar dichos derivados y someterlos al análisis de difracción de rayos X. La acetilación de los *alfa*-hidroxiéteres (**4** y **5**) se llevó a cabo usando anhídrido acético y piridina. Solamente se observó la acetilación de alcohol secundario **4**, no encontrándose la manera de acetilar, metilar ó proteger al alcohol terciario **5**. La reacción de desacetilación del

derivado acetilado **4** se llevó a cabo con metanol/NaOH, ya que no se observaron productos cristalizados que pudieran servir para un estudio de rayos X.

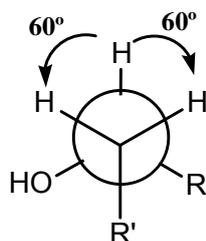
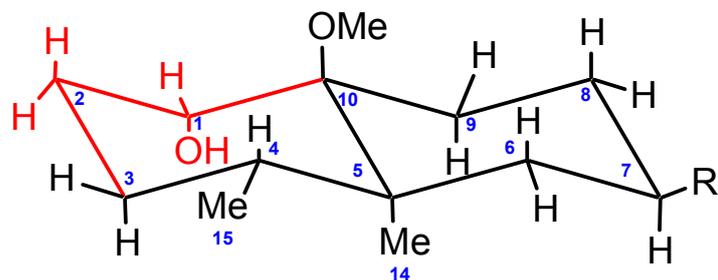
Posteriormente se analizaron por RMN de protón, concluyéndose que se trata de dos productos; en donde el grupo hidroxilo o el grupo metoxilo están en posición *trans* al metilo cabeza de puente.

La ubicación de estos grupos pudo hacerse a través de los espectros 2D RMN HSQC/HMBC, asignando las correspondientes señales de los protones a sus respectivos carbonos y ubicando las interacciones de los protones metoxílicos con los carbonos cabeza de puente.



En ambos compuestos, el espectro de protón mostró, entre otras señales, un acoplamiento a tres enlaces entre el protón base del metoxilo (o el protón base del hidroxilo H-1) de 2.6 Hz correspondiente a una señal doble de doble traslapada que se convierte a una señal triple con relación 1:2:1 en 2.96 ppm para el isómero **5** y en el caso del isómero **4** la señal aparece en 3.82 ppm como una señal simple.

En el compuesto **4**, solo pudo observarse si la disposición del H-1 se encontrara en posición axial con el grupo –OH o –OMe en posición ecuatorial, ya que de esta forma el H-1 se encuentra a aproximadamente a 60° con respecto a cada uno de los protones del carbono 2.

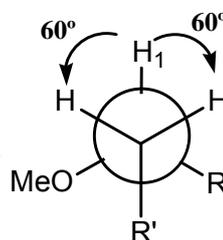
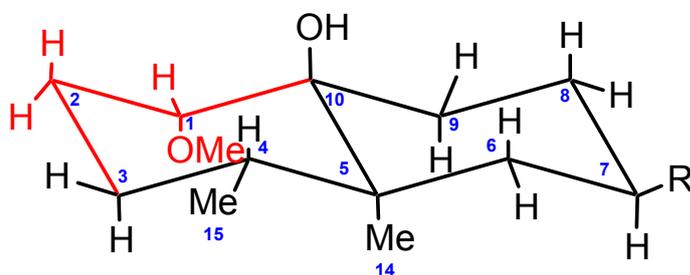


$$J = 0.9 \text{ Hz}$$

$$2 J \text{ iguales}$$

Para el producto **4** la señal aparentemente simple es una señal triple, solo que el ángulo diedro es aproximadamente de  $60^\circ$ , el cual corresponde a una constante de acoplamiento de 0.9 Hz; por lo cual, la señal triple se resuelve como una señal simple.

En el caso del compuesto **5** la señal doble de doble se observa como un triplete, esto nos indica su conformación espacial es diferente con respecto al compuesto **4**, ya que si su conformación fuera semejante la señal para el H-1 seria una señal aparentemente simple.

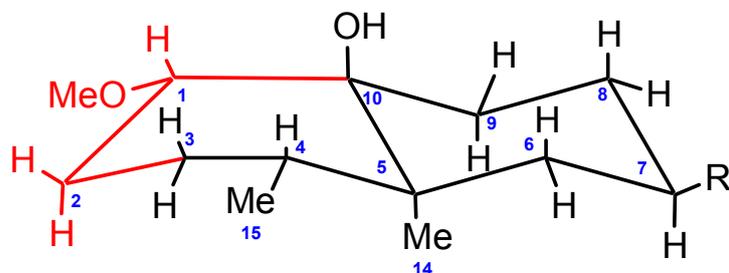


$$J = 0.9 \text{ Hz}$$

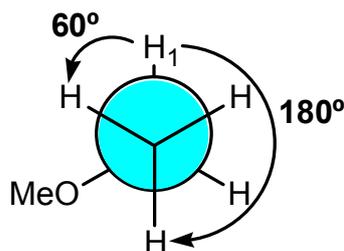
$$2 J \text{ iguales}$$

Compuesto **5** con una conformación semejante a la del compuesto **4**

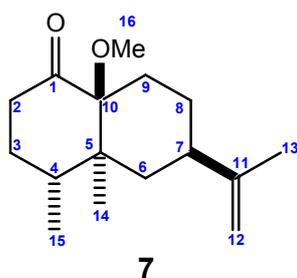
Sin embargo, se observa que la señal del H-1, para el compuesto **5**, corresponde a la siguiente conformación:



Esta conformación se respalda con la constante de acoplamiento ( $J = 3.5$  Hz) que se observa en el espectro de proton para H-1, esto quiere decir que los angulos diedros serian de  $60^\circ$  y de  $180^\circ$ .



La cetona **7** se obtuvo cuantitativamente al oxidar **4** con PCC/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . En el espectro de protón se observaron las señales separadas del metileno distereotópico *alfa* al carbonilo ( $\text{CH}_2 - 2$ ) como un doble de doble de dobles (ddd) ( $J = 8, 13$  y  $13$  Hz), correspondientes a  $\text{H}_{2\beta}$  en 2.72 ppm, y  $\text{H}_{2\alpha}$  como una señal más acoplada en 2.42 ppm. La cetona **7** se empleó en las pruebas de actividad biológica con *Artemia salina*.



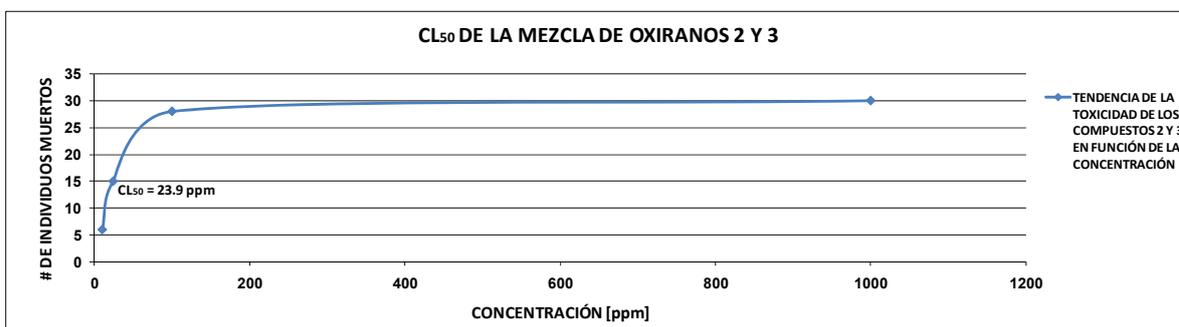
### 1.6.2 Determinación de la actividad biológica de los derivados oxidados del valenceno en *Artemia salina*<sup>70</sup>

Se llevo a cabo de manera exitosa el bioensayo, de los derivados oxidados del valenceno **2**, **3**, **4**, **5** y **7**, para determinar su actividad insecticida en *Artemia salina*. Se utilizo DMSO para disolver los compuestos posteriormente en agua, por lo cual se empleo un blanco con la proporción que se empleo en cada concentración (10, 100 y 1000 ppm), el experimento se llevó a cabo por triplicado.

Para determinar el nivel de bioactividad, se observó la variable dependiente decesos. El cálculo de  $CL_{50}$  se realizó por medio del programa de computación Finney Basic. En todos los experimentos se emplearon 30 nauplios vivos de aproximadamente 48 h de vida en un preparado de agua de mar.

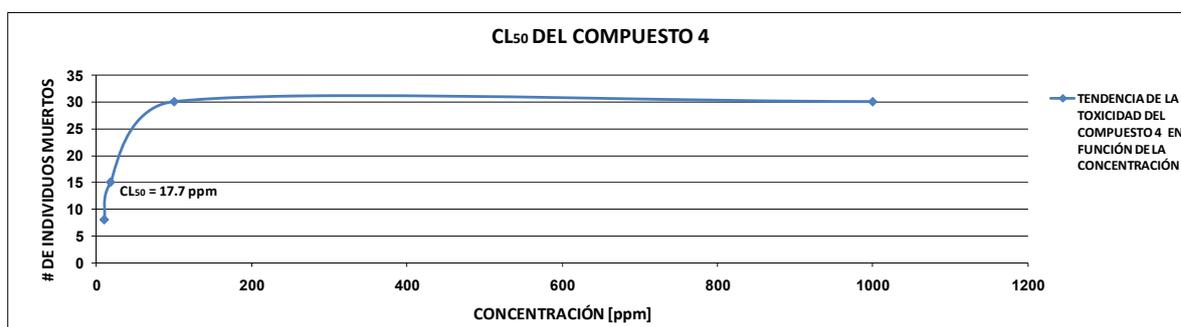
Compuesto **2** y **3**. De la concentración de 1000 ppm murieron 30 de 30 nauplios, de 100 ppm murieron 28 de 30 nauplios y de 10 ppm murieron 6 de 30 nauplios. En la Gráfica 1 se observa que la  $CL_{50} = 23.9$  ppm, lo cual nos indica que esta mezcla de oxiranos presenta actividad insecticida.

Gráfica 1.  $CL_{50}$  de los compuestos **2** y **3**



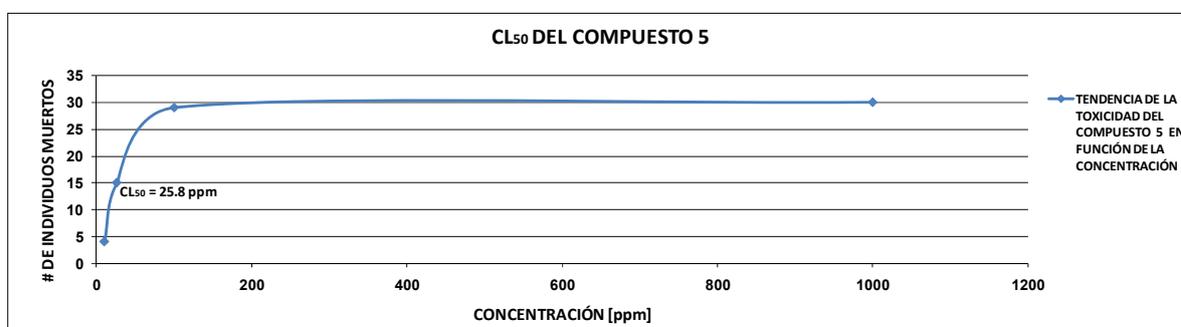
Compuesto 4. De la concentración de 1000 ppm murieron 30 de 30 nauplios, de 100 ppm murieron 30 de 30 nauplios y de 10 ppm murieron 8 de 30 nauplios. En la Gráfica 1 se observa que la  $CL_{50} = 17.7$  ppm, lo cual nos indica que el compuesto 4 presenta actividad insecticida.

Gráfica 2.  $CL_{50}$  del compuesto 4



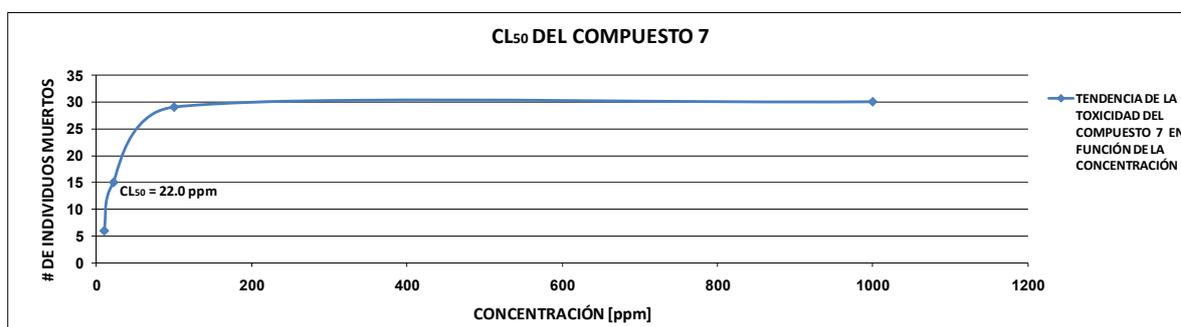
Compuesto 5. De la concentración de 1000 ppm murieron 30 de 30 nauplios, de 100 ppm murieron 29 de 30 nauplios y de 10 ppm murieron 4 de 30 nauplios. En la Gráfica 1 se observa que la  $CL_{50} = 25.8$  ppm, lo cual nos indica que el compuesto 5 presenta actividad insecticida.

Gráfica 3.  $CL_{50}$  del compuesto 5



Compuesto 7. De la concentración de 1000 ppm murieron 30 de 30 nauplios, de 100 ppm murieron 29 de 30 nauplios y de 10 ppm murieron 6 de 30 nauplios. En la Gráfica 1 se observa que la  $CL_{50} = 22.0$  ppm, lo cual nos indica que el compuesto 7 presenta actividad insecticida.

Gráfica 4.  $CL_{50}$  del compuesto 7



Se plantea que un compuesto tiene actividad biológica, en este caso insecticida, si su  $CL_{50}$  es menor a 1000 ppm; al llevar a cabo el bioensayo se determinó la  $CL_{50}$  de los compuestos probados y se observó que todos presentan actividad biológica ya que sus  $CL_{50}$  son menores a 1000 ppm.

Al probar estos compuestos, debido a que no eran solubles en agua, se utilizó DMSO como codisolvente, por lo que se preparó un blanco con las mismas cantidades de DMSO que las que se emplearon en cada concentración (1000, 100 y 10 ppm) probada, se utilizaron también 30 nauplios vivos de 48 h para cada blanco, en donde se observó que el DMSO no presentó ningún efecto tóxico sobre los nauplios, ya que después de las 24 h de exposición requeridas se observó que todos estaban vivos en las tres concentraciones.

Tabla 2. Resultados ( $LC_{50}$ ) calculada de los bioensayos con *A. salina*. El estándar positivo empleado, fue *Ocimum basilicum*<sup>69</sup> el cual tiene un  $LC_{50}$  de 6.3 ppm.

Compuesto	$LC_{50}$ (ppm) en <i>Artemia salina</i> .
Mezcla <b>2 y 3</b>	23.9 ppm
<b>4</b>	17.7 ppm
<b>5</b>	25.8 ppm
<b>7</b>	22.0 ppm
<i>Ocimum basilicum</i> <sup>69</sup>	6.3 ppm
Blanco DMSO	inactivo

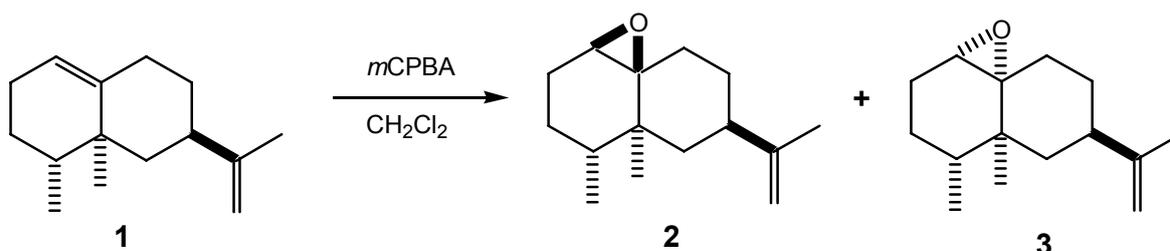
## 1.7 CONCLUSIONES

- Se llevó a cabo la síntesis de los compuestos oxidados derivados del valenceno **2**, **3**, **4**, **5**, **6** y **7** así como la asignación espectroscópica de cada uno ellos.
- Se planteo una hipótesis que explica la razón del por qué solo se obtienen los *alfa*-hidroxieteros **4** y **5** a partir de los oxiranos **2** y **3** sin la presencia de los otros diateroisómeros **12** y **13**.
- Se determinó la actividad biológica de los compuestos **2**, **3**, **4**, **5** y **7**; de los compuestos **2** y **3** se determinó su actividad biológica como mezcla. Se comprobó que todos tienen actividad biológica, siendo el más activo el compuesto **4**.
- Los compuestos probados presentaron actividad biológica (insecticida) en *Artemia salina*; sin embargo, fue menor que la de *Ocimum basilicum* que contiene estragol (1-alil-4-metoxibenceno) un producto activo de origen natural utilizado como testigo positivo.

## 1.8 PARTE EXPERIMENTAL

### 1.8.1 SÍNTESIS DE LOS DERIVADOS OXIDADOS DEL VALENCENO

#### FORMACIÓN DE OXIRANOS



En un matraz de fondo redondo de 250 mL se colocaron 5 g (24.5 mmol, 1 eq.) de Valenceno, en 50 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y 8.4 g (48.68 mmol, 1.93 eq.) de *m*CPBA. La mezcla de reacción se colocó en agitación a temperatura ambiente por 12 horas.

La adición del *m*CPBA fue gradual, primero se colocaron 1.18 eq, después de 4 h, mediante cromatografía en capa fina (CCF) y revelador  $\text{K}_2\text{MnO}_4$  se observó la presencia de un solo producto con un  $R_f$  de 0.82 (en hexano/ $\text{AcOEt}$  8:2) y también se observó que ya no avanzaba la reacción, pero que aun había valenceno sin reaccionar. Se adicionaron 0.5 equivalentes más y después de 2 horas se observó que disminuyó la cantidad de valenceno presente, posteriormente se adicionaron 2.5 equivalentes más, sin embargo 2 horas después se observó que ya no se consumieron los remanentes de valenceno, se dejó otras 4 horas pero ya no se observó cambios en la reacción y esta se detuvo.

La mezcla de reacción se neutralizó con 120 mL (3 de 40mL) de una solución de  $\text{NaOH}$  al 5%, se desechó la fase acuosa y solo se conservó la fase orgánica, posteriormente se eliminaron los residuos de humedad con  $\text{CaCl}_2$  anhidro, se filtró y se eliminó el  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  a presión reducida.

La mezcla de reacción se separó mediante cromatografía en columna, (50 g de sílica gel, hexano/AcOEt 95:5, 9:1 y 8:2) obteniéndose un rendimiento de 4.68 g (87%) de la mezcla de oxiranos **2** y **3**.

IR (pastilla de KBr):  $\nu$  máx. 3081, 2932.8, 1729.9, 1644.4, 1453.7, 1379.9, 1237.3, 1125.5, 957.2, 886.6, 741.7  $\text{cm}^{-1}$ .

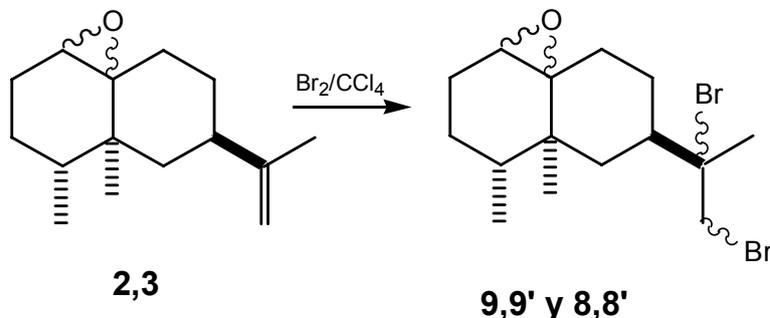
RMN- $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  0.65 (d, 3H, H-15), 0.93 (s, 3H, H-14), 1.17 (m, 2H, H-9), 1.71 (s, 3H, H-13), 1.78 (m, 2H, H-8), 2.23 (m, 1H, H-7), 2.93 (d, 1H, H-1, oxirano **2**), 3.03 (t, 1H, H-1, oxirano **3**), 4.64-4.67 (m, 1H, H-12b), 4.67-4.70 (m, 1H, H-12a).

RMN- $^{13}\text{C}$  (75.4 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  40.90 (C-1, oxirano **2**), 41.42 (C-6), 60.31 (C-1, oxirano **3**), 63.89 (C-10), 105.50 (C-12), 149.60 (C-11).

EM (70 eV): oxirano **2** m/z 220 ( $\text{M}^+$ , 2), 204 (70), 188 (14), 162 (33); oxirano **3** m/z 220 ( $\text{M}^+$ , 2), 204 (100), 162 (25).

EMAR (EI+): oxirano **2** 220.0492; oxirano **3** 220.0485.

## BROMACIÓN DE LA MEZCLA DE OXIRANOS



En un matraz de fondo redondo de 100 mL se colocaron 0.5 g (2.25 mmol) de la mezcla de oxiranos, 5 mL de una solución de  $\text{CCl}_4$  y  $\text{Br}_2$ . La mezcla de reacción se colocó en agitación a temperatura ambiente por 2 horas. Mediante cromatografía en capa fina (CCF) y revelador  $\text{K}_2\text{MnO}_4$ , se observó la presencia de un producto mayoritario con un  $R_f$  de 0.72 (en hexano/ $\text{AcOEt}$  8:2), debido a que ya no avanzaba la reacción esta se detuvo.

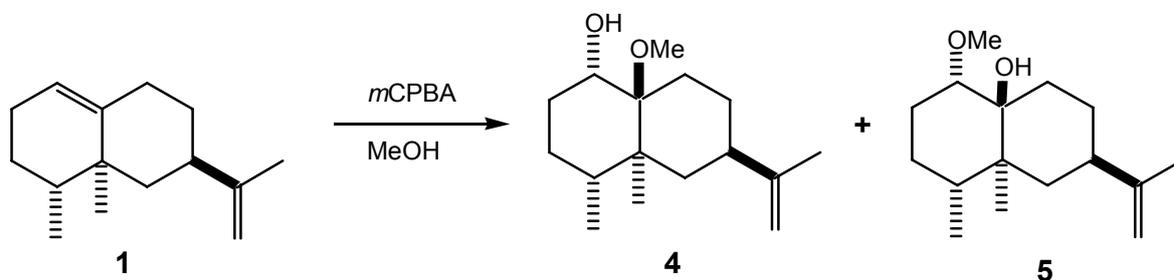
La mezcla de reacción se neutralizó con 10 mL de una solución saturada de  $\text{NaHSO}_3$ , se desechó la fase acuosa y solo se conservó la fase orgánica, posteriormente se eliminaron los residuos de humedad con  $\text{CaCl}_2$  anhidro, se filtró y se eliminó el  $\text{CCl}_4$  a presión reducida.

La mezcla de reacción se separó mediante cromatografía en columna, sílica gel como fase estacionaria y hexano: acetato de etilo 9:1 como fase móvil, se hizo un análisis mediante RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ .

RMN- $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  0.65 (d, 3H, H-15), 0.93 (s, 3H, H-14), 1.17 (m, 2H, H-9), 1.71 (s, 3H, H-13), 1.78 (m, 2H, H-8), 2.23 (m, 1H, H-7), 2.93 (d, 1H, H-1, oxirano **2**), 3.03 (t, 1H, H-1, oxirano **3**), 4.64-4.67 (m, 1H, H-12b), 4.67-4.70 (m, 1H, H-12a).

RMN- $^{13}\text{C}$  (75.4 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  40.90 (C-1, oxirano **2**), 41.42 (C-6), 60.31 (C-1, oxirano **3**), 63.89 (C-10), 105.50 (C-12), 149.60 (C-11).

## FORMACIÓN DE $\alpha$ -HIDROXIETERES



En un matraz de fondo redondo de 250 mL se colocaron 5 g (24.5 mmol, 1 eq.) de valenceno, en 50 mL de MeOH y 8.4g (48.68 mmol, 1.93 eq.) de *m*CPBA. La mezcla de reacción se colocó en agitación a temperatura ambiente por 14 h.

La adición del *m*CPBA fue gradual, primero se colocaron 1.18 eq, después de 2 h, mediante cromatografía en capa fina (CCF) y revelador  $K_2MnO_4$ , se observó la formación de la mezcla de oxiranos y de otros dos compuestos más, sin embargo se seguía observando valenceno sin reaccionar y ya que no avanzaba la reacción se adicionaron 0.5 equivalentes más y después de 2 h se observó que disminuyó la cantidad de valenceno presente, posteriormente se adicionaron 2.5 equivalentes más; sin embargo, 2 horas después se observó que ya no se consumieron los remanentes de valenceno, pero después se observó que desapareció casi completamente la mancha que correspondía a la mezcla de oxiranos, se dejó otras 2 h pero ya no se observó cambios en la reacción y se detuvo.

La mezcla de reacción se neutralizó con 120 mL (3 de 40mL) de una solución de NaOH al 5%, se desechó la fase acuosa y solo se conservó la fase orgánica, posteriormente se eliminaron los residuos de humedad con  $CaCl_2$  anhidro, se filtró la mezcla de reacción en  $CH_2Cl_2$  se le adicionó sílica gel y se evaporó el  $CH_2Cl_2$  a presión reducida.

La mezcla de reacción se separó mediante cromatografía en columna (45 g de sílica gel y hexano/AcOEt 95:5, 9:1 y 8:2). Se logró separar los dos productos formados,

del producto **4** se obtuvieron 1.24 g (23%) con un Rf de 0.47 (en hexano/AcOEt 8:2); y del **5** 2.43 g (45%) con un Rf de 0.68 (en hexano/AcOEt 8:2).

**(4R-5S-7R)-7-isopropenil-10-metoxi-4,5-dimetil-decahidronaft-1-ol (4):**

IR (película, CHCl<sub>3</sub>):  $\nu$  máx. 3463, 3081, 2933, 1644, 1075 cm<sup>-1</sup>.

RMN-<sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  0.73 (d,  $J$  = 4.5 Hz, 3H, H-15), 1.09 (s, 3H, H-14), 1.21 (m, 1H, H-6a), 1.26 (m, 2H, H-3), 1.39 (qd  $J$  = 11, 4.3 Hz, 2H, H-9a), 1.52 (m, 1H, H-2a), 1.55 (m, 1H, H-9b), 1.62 (m, 1H, H-6b), 1.65 (m, 1H, H-8a), 1.72 (s, 3H, H-13), 1.96 (m, 1H, H-2b), 1.98 (m, 1H, H-8b), 1.99 (m, 1H, H-4), 2.22 (tt,  $J$  = 8, 16 Hz, 1H, H-7), 3.12 (s, 3H, H-16), 3.86 (s, 1H, H-1), 4.68 (s, 1H, H-12b), 4.70 (s, 1H, H-12a).

RMN-<sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  15.1 (C-15), 16.5 (C-14), 20.7 (C-13), 24.1 (C-8), 25.2 (C-3), 25.9 (C-9), 29.1 (C-2), 33.9 (C-4), 38.3 (C-6), 39.6 (C-7), 40.3 (C-5), 47.7 (16), 70.0 (C-1), 76.8 (C-10), 108.2 (C-12), 151.1 (C-11).

EM (70 eV):  $m/z$  252 (M<sup>+</sup>, 10), 234 (58), 202 (96), 98 (100)

EMAR (EI+): Calculado para C<sub>16</sub>H<sub>28</sub>O<sub>2</sub>: 252.20893. Encontrado: 252.20943

**(4R-5S-7R)-7-isopropenil-1-metoxi-4,5-dimetil-decahidronaft-10-ol (5):**

IR (película, CHCl<sub>3</sub>):  $\nu$  máx. 3478, 3081, 2928, 1643, 1110 cm<sup>-1</sup>.

RMN-<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  0.73 (d,  $J$  = 8 Hz, 3H, H-15), 1.08 (s, 3H, H-14), 1.19 (m, 1H, H-8b), 1.19 (m, 1H, H-3b), 1.34 (m, 1H, H-6b), 1.34 (m, 1H, H-3a), 1.46 (qd,  $J$  = 4, 9 Hz, 1H, H-9b), 1.58 (m, 1H, H-6a), 1.58 (m, 1H, H-9a), 1.69 (s, 3H, H-13), 1.75 (m, 1H, H-2b), 1.75 (m, 1H, H-4), 1.86 (tdd,  $J$  = 3, 5, 14 Hz, 2H, H-2a), 2.25 (m, 1H, H-7), 2.25 (m, 1H, H-8a), 2.94 (s, 1H, H-1), 3.29 (s, 3H, H-16), 4.64 (s, 1H, H-12b), 4.67 (s, 1H, H-12a).

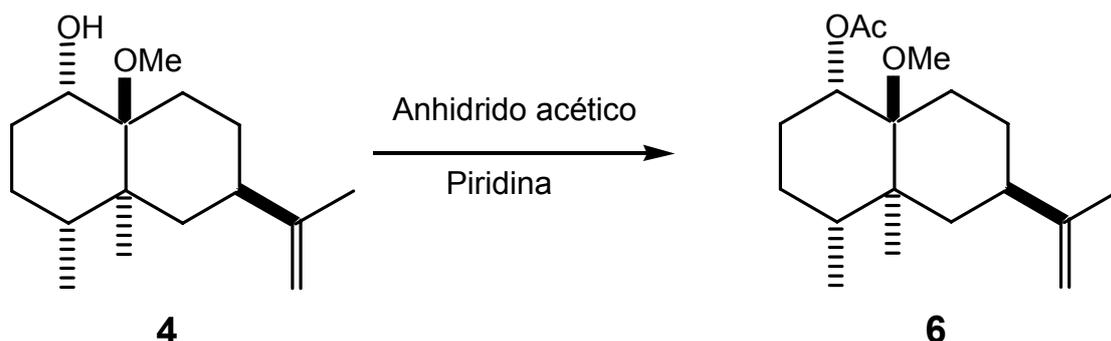
RMN-<sup>13</sup>C (75.4 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  15.4 (C-15), 15.5 (C-14), 21.1 (C-13), 24.0 (C-2), 26 (C-3), 26.0 (C-9), 31.9 (C-8), 35.4 (C-4), 38.6 (C-6), 39.6 (C-7), 39.7 (C-5), 57.8 (C-16), 74.3 (C-10), 85.6 (C-1), 108.6 (C-12), 151.0 (C-11).

EM (70 eV):  $m/z$  252 (M<sup>+</sup>, 35), 220 (100), 202 (56), 187 (20), 165 (50).

EMAR (EI+): Calculado para C<sub>16</sub>H<sub>28</sub>O<sub>2</sub>: 252.20893. Encontrado: 252.20823

## ACETILACIÓN DE $\alpha$ -HIDROXIETERES

### Acetilación del compuesto **4**



En un matraz de fondo redondo de 100 mL se colocaron 1 g (3.96 mmol, 1 eq.) del compuesto **4**, en 10 mL de piridina y 0.6 g (5.94 mmol, 1.5 eq.) de anhídrido acético. La mezcla de reacción se colocó en agitación a temperatura ambiente por 6 horas.

Mediante cromatografía en capa fina (CCF) y revelador  $K_2MnO_4$  en las primeras 4 horas observó la formación de un nuevo producto, pero aun había materia prima, por lo que se dejó otras 2 horas bajo las mismas condiciones, transcurrido este tiempo ya no se observó materia prima, la reacción se detuvo.

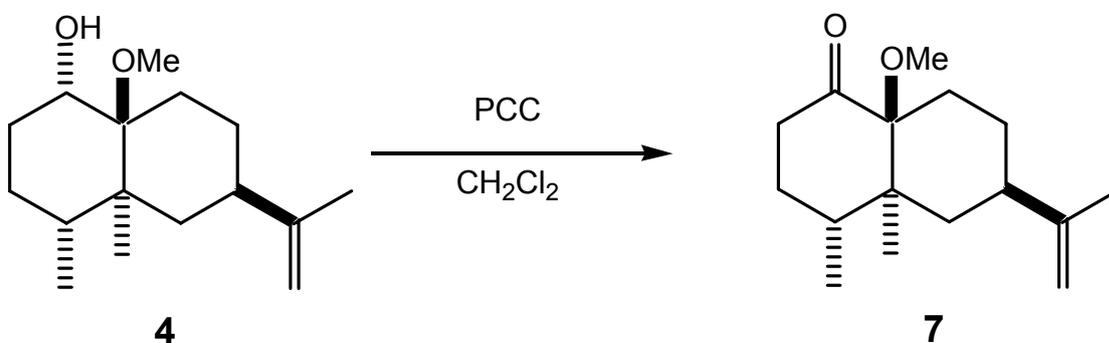
Se evapora la piridina de la mezcla de reacción a presión reducida, se le agrega 10 mL de  $CH_2Cl_2$ , se neutraliza con 30 mL (3 de 10 mL) de una solución de NaOH al 5%, se desechó la fase acuosa y solo se conservó la fase orgánica, posteriormente se eliminaron los residuos de humedad con  $CaCl_2$  anhidro, se filtró la mezcla de reacción en  $CH_2Cl_2$  se le adicionó sílica gel y se evaporó el  $CH_2Cl_2$  a presión reducida.

La mezcla de reacción se separó mediante cromatografía en columna (35 g de sílica gel y hexano / AcOEt 9:1) se logro purificar y se obtuvieron 0.97 g (97%) del compuesto **6**. Finalmente se llevo a cabo el análisis de este producto (**6**) mediante RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  para determinar la presencia del grupo acetilo.

RMN- $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  0.73(d,  $J = 8\text{Hz}$ , 3H, H-15), 1.08 (s, 3H, H-14), 1.40( dd,  $J = 6, 12\text{Hz}$ , 2H, H-6), 1.60 (m, 2H, H-3), 1.71 (s, 3H, H-13), 1.78 (m, 2H, H-8), 1.88 (tt,  $J = 8, 16\text{Hz}$ , 1H, H-7), 1.90 (m, 2H, H-2), 2.00 (m, 1H, H-4), 2.01 (s, 3H, H-18), 2.1 (m, 2H, H-9), 3.11 (s, 3H, H-16), 3.82 (s, 1H, H-1), 4.68 (s, 1H, H12b), 4.70 (s, 1H, H-12a).

RMN- $^{13}\text{C}$  (75.4 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  15.4 (15), 16.8 (14), 20.6 (C-18) 21.0 (13), 24.4 (C-3), 25.4 (C-8), 26.1 (C-6), 29.4 (C-2), 34.1 (C-4), 38.5 (C-9), 39.8 (C-7), 40.4 (C-5), 48.0 (16), 70.3 (C-1), 77.7 (C-10), 108.4 (C-12), 151.0 (C-11), 170.3 (C-17).

#### Oxidación del compuesto 4



En un matraz de fondo redondo de 100 mL se colocaron 0.7 g (2.78 mmol, 1 eq.) del compuesto **4**, en 20 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y 0.6 g (2.78 mmol, 1 eq.) de PCC. La mezcla de reacción se colocó en agitación a temperatura ambiente por 6 horas. Mediante cromatografía en capa fina (CCF) y revelador K<sub>2</sub>MnO<sub>4</sub> en las primeras 3 horas observó la formación de un nuevo producto, pero aun había materia prima, por lo que se dejó otras 2 horas bajo las mismas condiciones, transcurrido este tiempo ya no se observó avance de la reacción, se dejó 1 hora y la reacción se detuvo.

La mezcla de reacción se neutralizó con 60 mL (3 de 20 mL) de una solución de NaOH al 5%, se desechó la fase acuosa y solo se conservó la fase orgánica, posteriormente se eliminaron los residuos de humedad con CaCl<sub>2</sub> anhidro, se filtró la mezcla de reacción en, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> se evaporó el CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> a presión reducida.

La mezcla de reacción se separó mediante cromatografía en columna, sílica gel como fase estacionaria y hexano: acetato de etilo 9:1 como fase móvil, se logró purificar el producto **7** en un 93%. Posteriormente se hizo un análisis mediante RMN de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C.

IR (película, CHCl<sub>3</sub>):  $\nu$  máx. 3415, 3082, 2935, 1715, 1644, cm<sup>-1</sup>.

RMN-<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  0.73 (s, 3H, H-14), 0.78 (d, 3H, H-15), 1.58 (m, 1H, H-3b), 1.26 (m, 1H, H-8b), 1.32 (m, 1H, H-9b), 1.72 (s, 3H, H-13), 1.79 (m, 1H, H-8a), 1.79 (m, 1H, H-3a), 1.84 (m, 1H, H-9a), 1.85 (m, 1H, H-6b), 1.88 (m, 1H, H-6a), 2.15 (m, 1H, H-7), 2.15 (m, 1H, H-2b), 2.50 (m, 1H, H-4), 2.79 (m, 1H, H-2a), 3.06 (s, 3H, H-16), 4.65 (s, 1H, H-12a), 4.69 (s, 1H, H-12b).

RMN-<sup>13</sup>C (75.4 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  13.0 (C-14), 14.0 (C-15), 20.2 (C-6), 20.6 (C-13), 24.8 (C-8), 31.0 (C-3), 32.8 (C-4), 36.6 (C-9), 37.9 (C-2), 39.1 (C-7), 44.2 (C-5), 50.3 (C-10), 83.5 (C-16), 108.6 (C-12), 149.9 (C-11), 214.7 (C-1).

EM (70 eV):

EMAR (EI+): Calculado para C<sub>16</sub>H<sub>28</sub>O<sub>2</sub>: 252.20893. Encontrado: 252.20943

## 1.8.2 BIOENSAYO DE TOXICIDAD EN *Artemia salina* PARA EVALUAR CL<sub>50</sub> DE LOS DERIVADOS OXIDADOS DE VALENCENO<sup>70</sup>

### Día 1

- Se preparó agua de mar según las instrucciones del envase (3.8 g de sal de mar comercial en 100 mL de agua destilada). Se filtró.
- Se colocaron aproximadamente 50 mg de huevos de *Artemia salina* en un matraz erlenmeyer con 350 mL de agua de mar. Se colocaron en un lugar con luz (artificial o natural). Se les colocó una bomba de aire con burbujeo lento.

### Día 2

- Se transfirió la mayor cantidad de nauplios vivos a un matraz erlenmeyer con agua de mar fresca.
- Se pesaron 20 mg de la muestra.

### Día 3

- Se disuolvieron 20 mg de la muestra en 2 mL del disolvente, de la siguiente forma: las muestras polares se disolvieron en 2 mL de agua destilada y las muestras no polares, se disolvieron en 0.5 mL de DMSO y 1.5 mL de agua destilada (lo que hizo un total de 2 mL).

A partir de esta solución, se prepararon diluciones de 1000, 100 y 10 ppm, transfiriendo a cada vial 500, 50 y 5  $\mu$ L de las muestras disueltas a cada vial respectivamente. Fueron tres viales por cada concentración (nueve viales en total por muestra). Se hizo un control por muestra. Como las muestras fueron no polares se les agregó al control 50  $\mu$ L de DMSO.

- Los nauplios están listos para el ensayo.

A cada vial se le agregaron 20 nauplios (se utilizaron 30 nauplios en total por dilución) y la dilución del extracto requerida. Después se agregó agua de mar hasta completar 5 mL por vial. A cada vial se le agregó además, una gota de

suspensión de levadura (3 mg de levadura seca es disuelta en 5 mL de agua de mar) como alimento.

Nota:

Los nauplios se utilizaron entre 48 y 72 h después de que se inició la incubación; si embargo, luego de 72 h se descartaron.

#### Día 4

- Después de 24 h, se contó y anotó el número de sobrevivientes en cada dilución.

## 1.9 REFERENCIAS

1. D. Córdoba, Toxicología, Edit. Manual Moderno, 4ª Ed., México D. F., **2001**, 107-227
2. W. Ashworth, The encyclopedia of environmental studies, Edit. Facts On File. Inc., U. S. A., **1991**, 291-292
3. B.O.E., 24 enero 1984, Real Decreto 30 noviembre 1983, núm. 3349/83 (Presidencia)
4. F. de la Jara, Manual de Toxicología y tratamiento de las intoxicaciones con plaguicidas, Edit. Asociación mexicana de la industria de plaguicidas y fertilizantes, A. C., 4ª Ed., México D. F., **1985**, 1-35
5. O.M.S., Interim Document 9. Copenhagen 1982
6. D. Waterhouse, W. J. Carman, D. Schottenfeld, G. Gridley, S. MacLean, *Cancer*, **1996**, 77, 763-770.
7. D. Bourguet, A Genissel., M. Raymond, *J. Econ. Entomol.* **2000**, 93, 1588-1595.
8. K. Freemark, C. Boutin, *Agriculture, Ecosystems and Environment* **1995**, 52, 67-91.
9. M. Siragusa, F. De Pasquale, L. Abbate, N. Tusa, C. De Pasquale, G. Alonzo, *Scientia Horticulturae*, **2006**, 109, 54-59
10. X. A. Domínguez, Ed. Limusa. México. **1973**
11. C. L. Céspedes, J. S. Calderón, L. Lina, E. Aranda, *J. Agric. Food Chem.*, **2000**, 48, 1903-1908.
12. hA. Sae-Yun, C. Ovatlarnporn, A. Itharat, R. Wiwattanapatpee, *Journal of Chromatography*, **2006**, 1125, 2, 172-176
13. I. Nosec, A. Cristescu, A. Enescu, V. Tacu, I. Giurca, G. Cristodorescu, *Revista de igiena, bacteriologie, virusologie, parazitologie, epidemiologie, pneumoftiziologie. Bacteriologia, virusologia, parazitologia, epidemiologia*, **1978**, 23, 3, 183-188
14. M. Fischer, T. Jefferies, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1996**, 44, 5, 1258-1264.

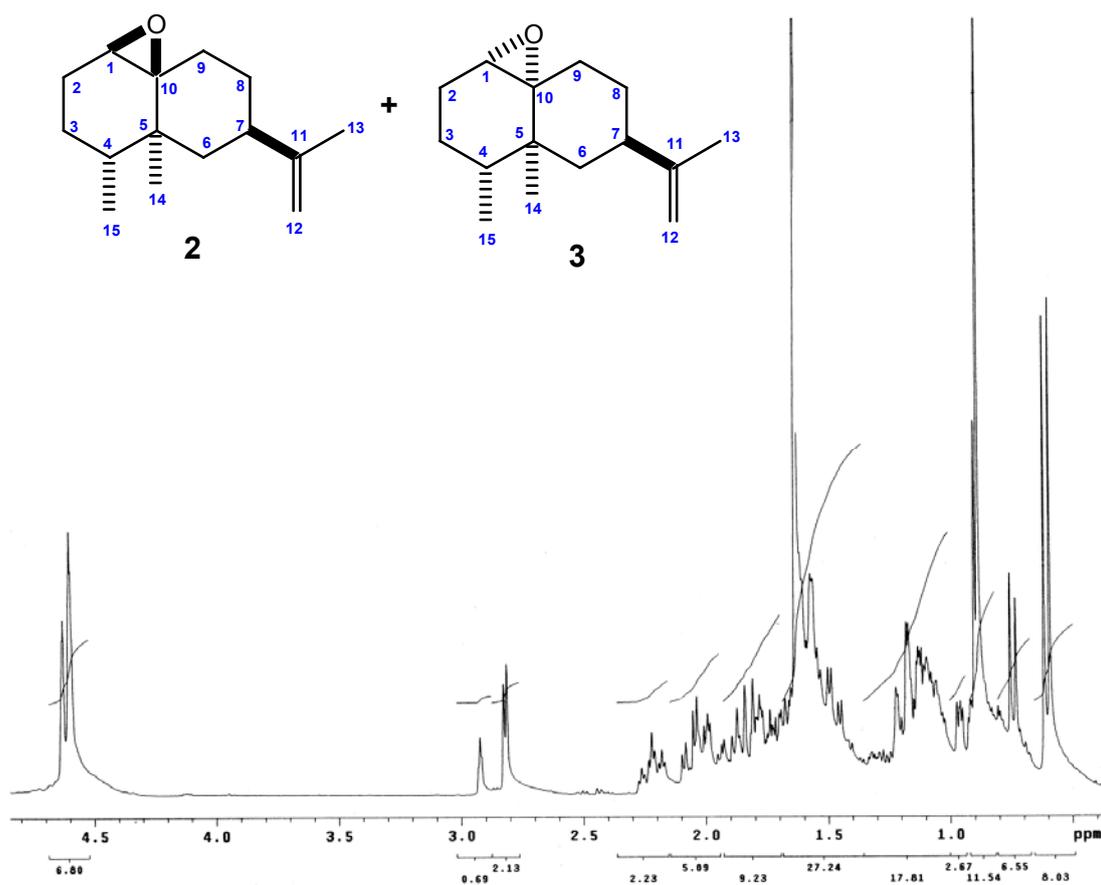
15. G. Silva, A. Lagunes, J. C. Rodríguez, D. Rodríguez, *Revista Manejo Integrado de Plagas (CATIE)*, **2002** (en prensa).
16. G. Valladares, M.T. Defagó, S.M. Palacios, M.C. Carpinella, *J. Econ. Entomol.* **1997**, *90*, 747-750.
17. M. C. Carpinella, C. Ferrayoli, G. Valladares, M. Defago, S. M. Palacios, *Biosci. Biotechnol. Biochem*, **2002**, *66*, 1731-1736.
18. M. C. Carpinella, M. T. Defago, G. Valladares, S. M. Palacios, *J. Agric. Food Chem.*, **2003**, *51*, 369-374
19. I. A. Ogunwande, E. Essien, A. O. Ogunbinu, G. Flamini, P. L. Cioni, *J. Essent. Oil Res.*, **2007**, *19*, 545–547
20. C. W. Coggins, Jr., R. W. Scora, L. N. Lewis, J. C. F. Knapp, *J. Agr. Food Chem.* **1969**, Vol. 17, No. 4, 807-809,
21. J.T.Sime, P.S.J. Cheetman, M.L. Gradley, N.E. Banister, *PCT. Int. Appl.*, **1996**, 30
22. W. N. Setter, R. A. Cole, W. A. Haber, *Biochemical Systematics and Ecology*, **2007**, *35*, 877-886
23. Joe Chappell, *TRENDS in Plant Science* **2004**, Vol.9 No.6, 266-269
24. L. Wong, R.J. Sowden, S. Yasmin, N. H. Rees, S. G. Bell, *Org. Biomol. Chem.*, **2005**, *3*, 57–64
25. L. Ralston, S. T. Kwon, M. Schoenbeck, J. Ralston, D. J. Schenk, R. M. Coates J. Chappell, *Arch. Biochem. Biophys.*, **2001**, *393*, 222–235.
26. J. P. Noel, P. E. O'Maille, J. Chappell, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **2006**, *448*, 73–82
27. R. K. Allemann, M. J. Calvert, P. R. Ashton, *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, *124*, 11636-11641
28. L. Mondillo, M.L. Crupi, R. Costa, P. Dugo, G. Dugo, *Food Chemistry*, **2007**, *105*, 771–783
29. R. M. Coates, Y. Zhao, D. J. Schenk, S. Takahashi, J. Chappell, *J. Org. Chem.*, **2004**, *69*, 7428-7435

30. S. Takahashi, Yun-Soo Yeo, Y. Zhao, P. E. O'Maille, B. T. Greenhagen, J. P. Noel, R. M. Coates, J. Chappell, *J. Biol. Chem.*, **2007**, Vol. 282, No. 43, 31744–31754,
31. J. Bohlmann, J. Lücker, P. Bowen, *Phytochemistry*, **2004**, 65, 2649–2659
32. R. Kaspera, U. Krings, T. Nanzad, R. G. Berger, *Appl Microbiol Biotechnol*, **2005**, 67, 477–483
33. Y. Asakawa, M. Furusawa, T. Hashimoto, Y. Noma, *Chem. Pharm. Bull.*, **2006**, 54(6), 861-868
34. Y. Asakawa, M. Furusawa, T. Hashimoto, Y. Noma, *Chem. Pharm. Bull.*, **2005**, 53(11) 1423-1429
35. H. H. Jelenä, *J. Agric. Food Chem.* **2002**, 50, 6569-6574
36. S. Selli, A. Canbas, V. Varlet, H. Kelebek, C. Prost, T. Serot, *J. Agric. Food Chem.* **2008**, 56, 227–234
37. A. G. J. Voragen, R. W. G. van Willige, J. P. H. Linssen, A. Legger- Huysman, *Food Additives and Contaminants*, **2003**, Vol. 20, No. 1, 84–91
38. J. H. Tatum, P. E. Shaw, R. E. Berry, *J. Agr. Food Chem.*, **1967**, 15, No. 5, 773-775,
39. Y. Asakawa, M. Furusawa, T. Hashimoto, Y. Noma, *Chem. Pharm. Bull.*, **2005**, 53(11), 1513—1514 R.H.
40. Clarck, C.C. Lucas, *Trans. Roy. Soc. Can.*, **1926**, Sec. III20, 423-428
41. G.B. Barton. *Wood and fiber*, **1976**, Fall V. 8, 3
42. A.S. Harris. *Fs-24[publicación desconocida]: U.S Department of Agriculture, Forest Service.* **1984**, 6
43. E.L. Little, Jr. *U.S. Department of Agriculture Miscellaneous Publication* No. 1146
44. W.D. Brush. *American Forests*, **1950**, 28-29
45. S. Takaku, W. A. Haber, W. N. Setzer, *Biochemical Systematics and Ecology*, **2007**, 35, 525-532
46. J. A. Zygadlo, M. M. Oliva, M. P. Zunino, M. L. López, Y. A. Soria, F. N. Ybarra, L. Sabini, M. S. Demo, F. Biurrun, *J. Essent. Oil Res.*, **2007**, 19, 509–513

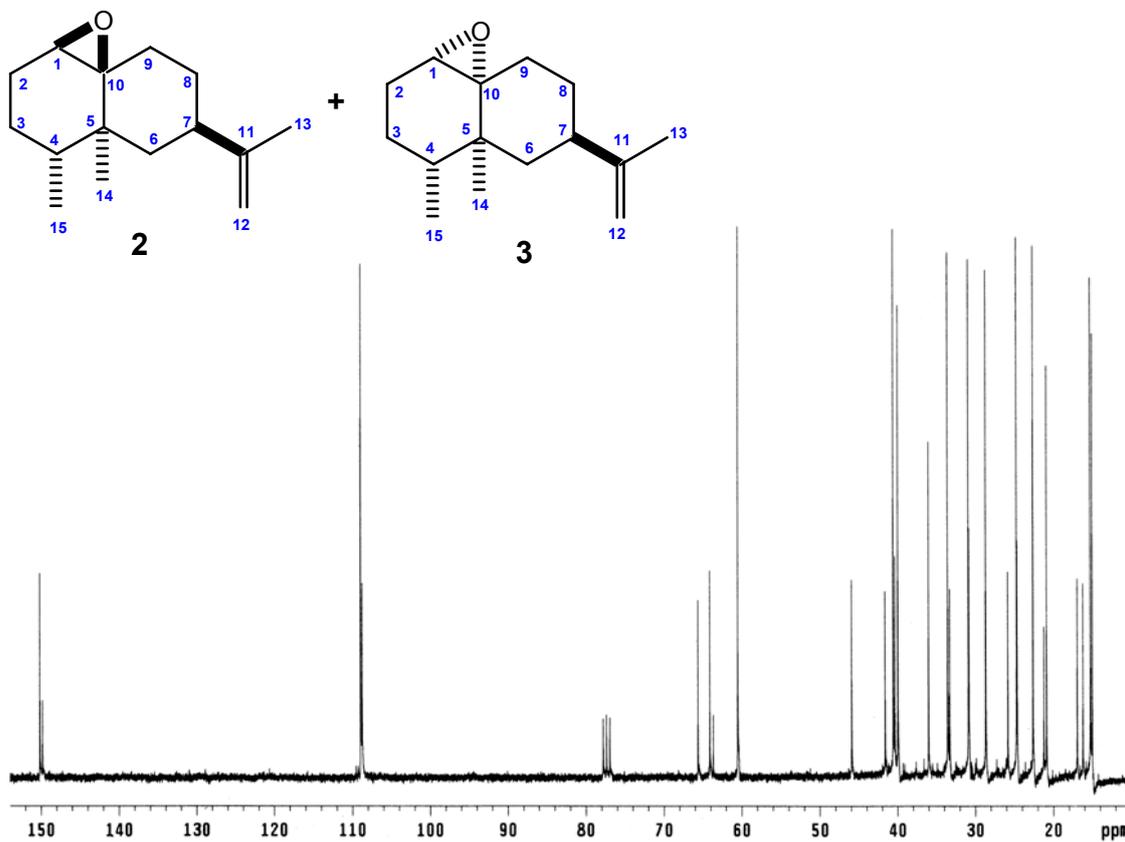
47. A. Gonzalez-Coloma, J. M. Rodilla, M. T. Tinoco, J. C. Morais, C. Gimenez, R. Cabrera, D. M. Benito, L. Castillo, *Biochemical Systematics and Ecology*, **2008**, 36, 167-176
48. T. Shibamoto, K. Umamo, Y. Hagi, *J. Agric. Food Chem.*, **2002**, 50, 5355-5359
49. G. Flamini, P. L. Cioni, I. Morelli, *J. Agric. Food Chem.*, **2003**, 51, 1382-1386
50. X. Fenandez, C. Castel, L. Lizzani-Cuvelier, C. Perichet, S. Lavoine, *J. Agric. Food Chem.*, **2006**, 54, 8848-8854
51. I. Chinou, K. Vagionas, O. Ngassapa, D. Runyoro, K. Graikou, O. Gortzi, *Food Chemistry*, **2007**, 105, 1711-1717
52. M. Miyazawa, Y. Nakamura, Y. Ishikawa, *J. Agric. Food Chem.*, **2000**, 48, 369-3641,
53. D. K. Manter, R. G. Kelsey, J. J. Karchesy, *J Chem Ecol*, **2007**, 33, 2133-2147
54. B. Tepe, M. Kelen, *Bioresource Technology*, **2008**, 99, 4096-4104
55. R. Y. Peng, Ming-Ching Cheng, Li-Yun Lin, Tung-Hsi Yu, *J. Agric. Food Chem.*, **2008**, 30, 20
56. D. E. Cane, B. Felicetti, *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, 126, 7212-7221
57. N. A. Panella, M. C. Dolan, J. J. Karchesy, Y. Xiong, J. Peralta-Cruz, M. Khasawneh, J. A. Montenieri, G. O. Maupin, *Journal of Medical Entomology*, **2005**, 42, 3, 352-358
58. G. Dietrich, M. C. Dolan, J. Paralta-Cruz, J. Schmidt, J. Piesman, R. J. Eisen, J. J. Karchesy, *J. Med. Entomol.* **2006**, 43, 5, 957-961
59. B.N. Meyer, N.R. Ferrigni, J.E. Putman, L.B. Jacobsen, D.E. Nicholls, J.L. McLaughlin, *Planta Med.*, **1982**, 45, 31-34
60. R.C. De Groot, B. Woodward, P.E. Hennon, *Forest Products Journal*, **2000**, 50, 1
61. J.T. Sime. *Spec. Publ. R. Soc. Chem.*, **1997**, 90-194
62. G. Majetich, M. Behnke, K. Hull, *J. Org. Chem.*, **1985**, 50, 3615-3618
63. R. Coate, J. Shaw, *J. Chern Org.*, **1970**, 35, 8
64. W. Daubenm, I. Orber, D. Fullerton, *J. Org. Chem.*, **1969**, 94, 11
65. J. A. R. Salvador, S. M. Silvestre, *Tetrahedron*, **2007**, 63, 2439-2445

66. F. R. Fronczek, A. M. Sauer, B. C. R. Zhu, W. E. Crowe, G. Henderson, R. A. Lainea, *Acta Cryst.*, **2003**, C59, o254-o256
67. A.-L. Pérez-Castorena, A. Arciniegas, S. L. Guzmán, J. L. Villaseñor, A. Romo de Vivar, *J. Nat. Prod.*, **2006**, 69, 1471-1475
68. G. W. Shaffer, E. H. Eschinasi, K. L. Purzycki, A. B. Doerr, *J. Org. Chem.*, **1975**, 40, 15, 2181-2185
69. S. Iliev, G. Papanov, P. Malakov, P. Khristeva, K. Tomova, *Nauchni Trudove - Plovdivski Universitet Paisii Khilendarski*, **1983**, 21, 3, 105-112
70. (a) H. S. Ubaldo, Evaluación biológica de los extractos de la raíz de *Pentalinon andrieuxii* Mull. Arg. (Apocynaceae) en *Artemia salina* Leach. Tesis de Licenciatura (Químico Farmacéutico Biólogo)-UVM, Escuela de Químico Farmacéutico Biólogo, México, **2004**. (b) M. Z. Gabriela, Síntesis de tiocarbamidas N, N`-disustituidas y prueba de toxicidad en *Artemia salina*, Tesis de Licenciatura (Químico Farmacéutico Biólogo)-UNAM, Facultad de Química, México, **1998**

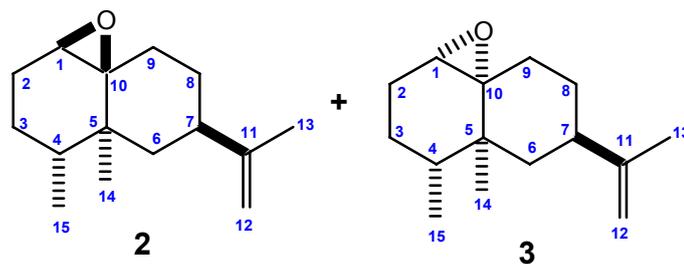
## 1.10 ESPECTROS



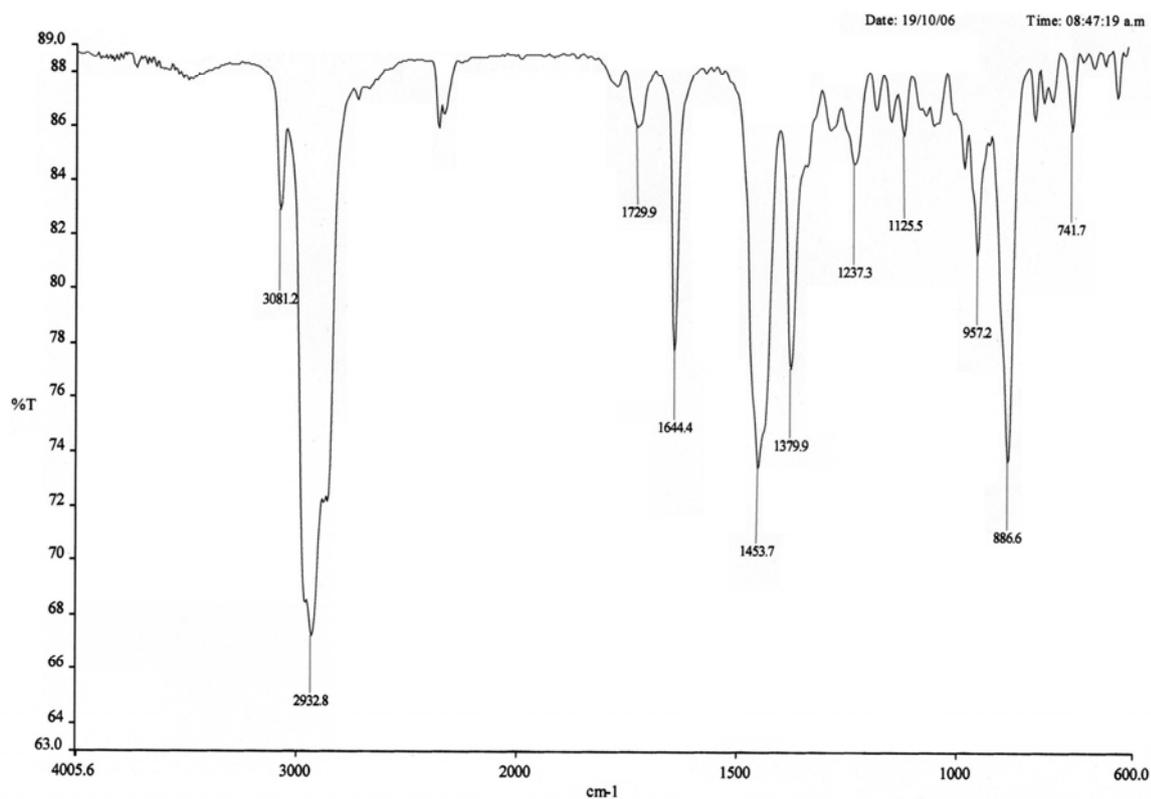
Espectro 1 de RMN  $^1\text{H}$  de la mezcla de 2 y 3



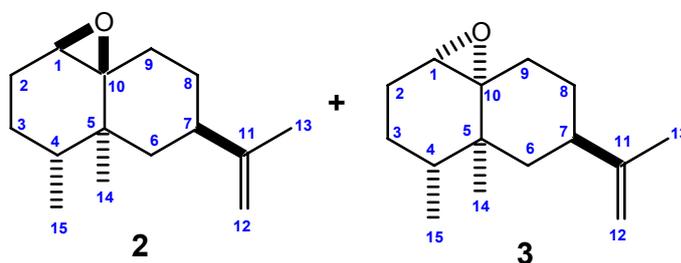
Espectro 2 de RMN  $^{13}\text{C}$  de la mezcla de 2 y 3



*Central de Instrumentación de Espectroscopía, ENCB-IPN.*

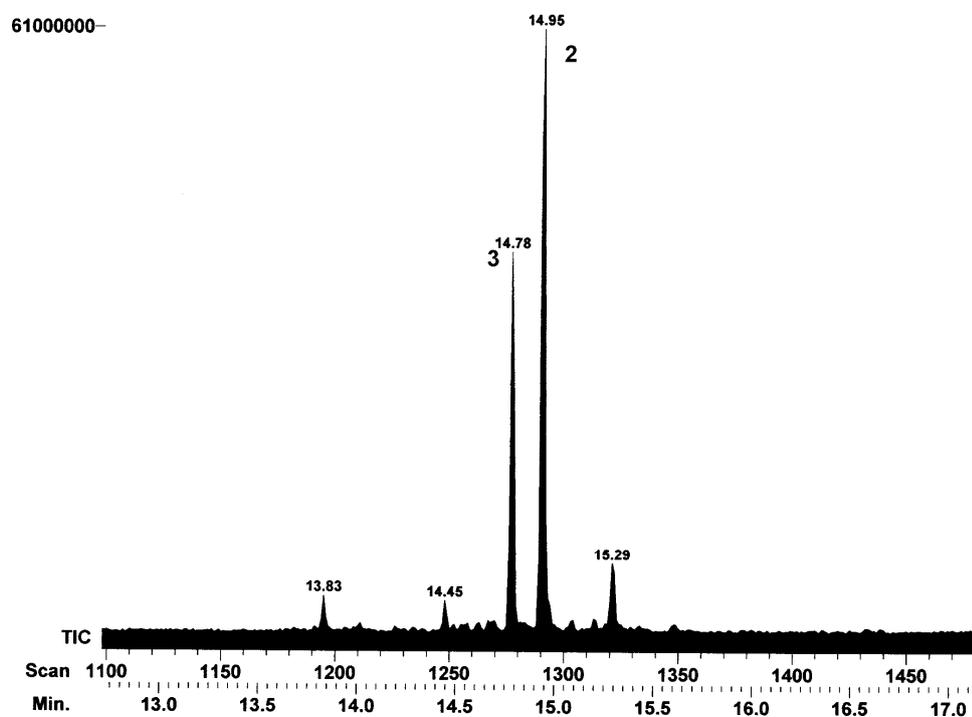


Espectro 3 de IR de la mezcla de **2** y **3**



Sample: Javier Peralta, #3 EI GC  
 Instrument: JEOL MSRoute

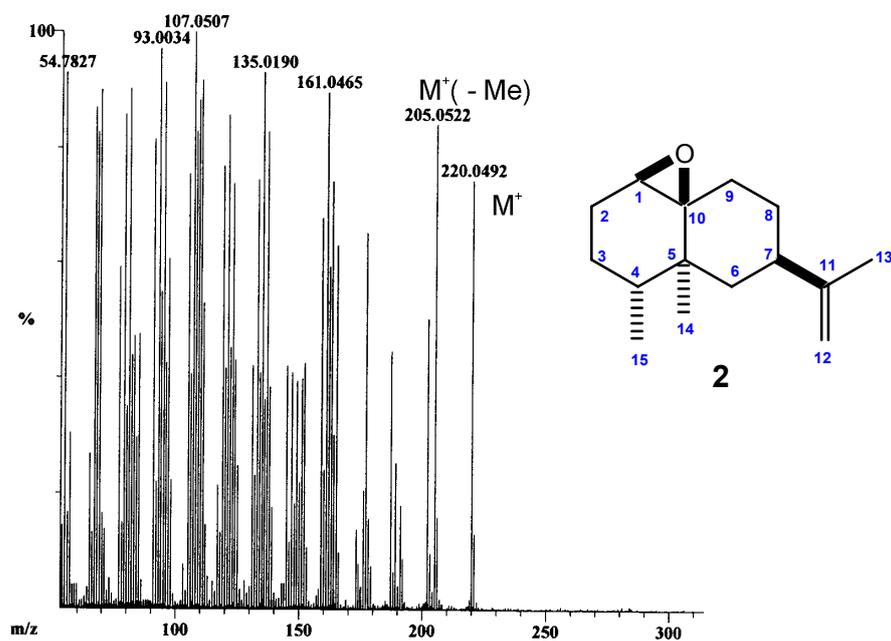
Ionization mode: EI+



Cromatograma 1 de GC-MS de la mezcla de 2 y 3

Scan: 1289-1293  
Base: m/z 107; 56.4%FS TIC: 27609677

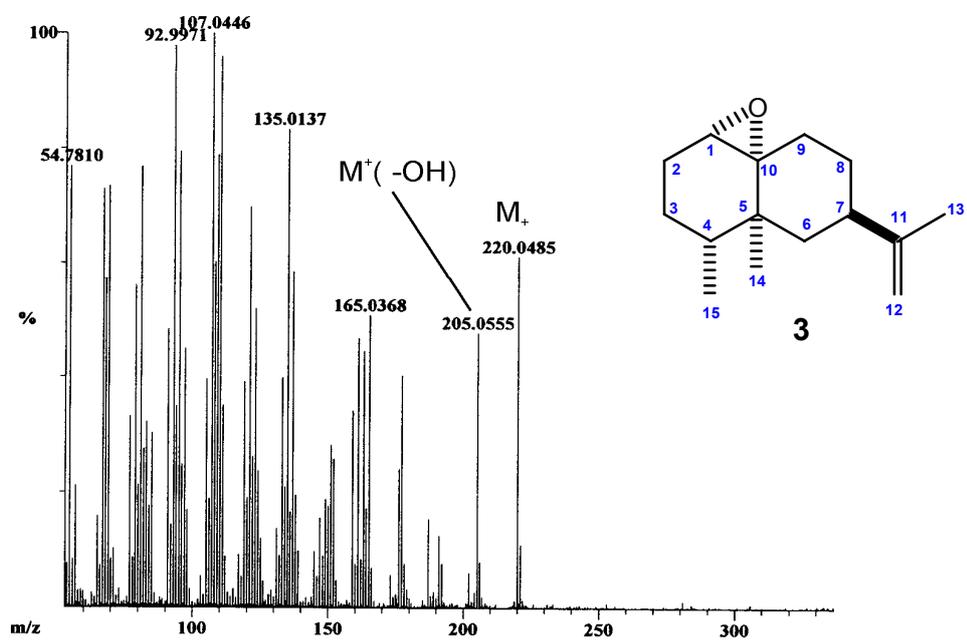
R.T.: 14.95



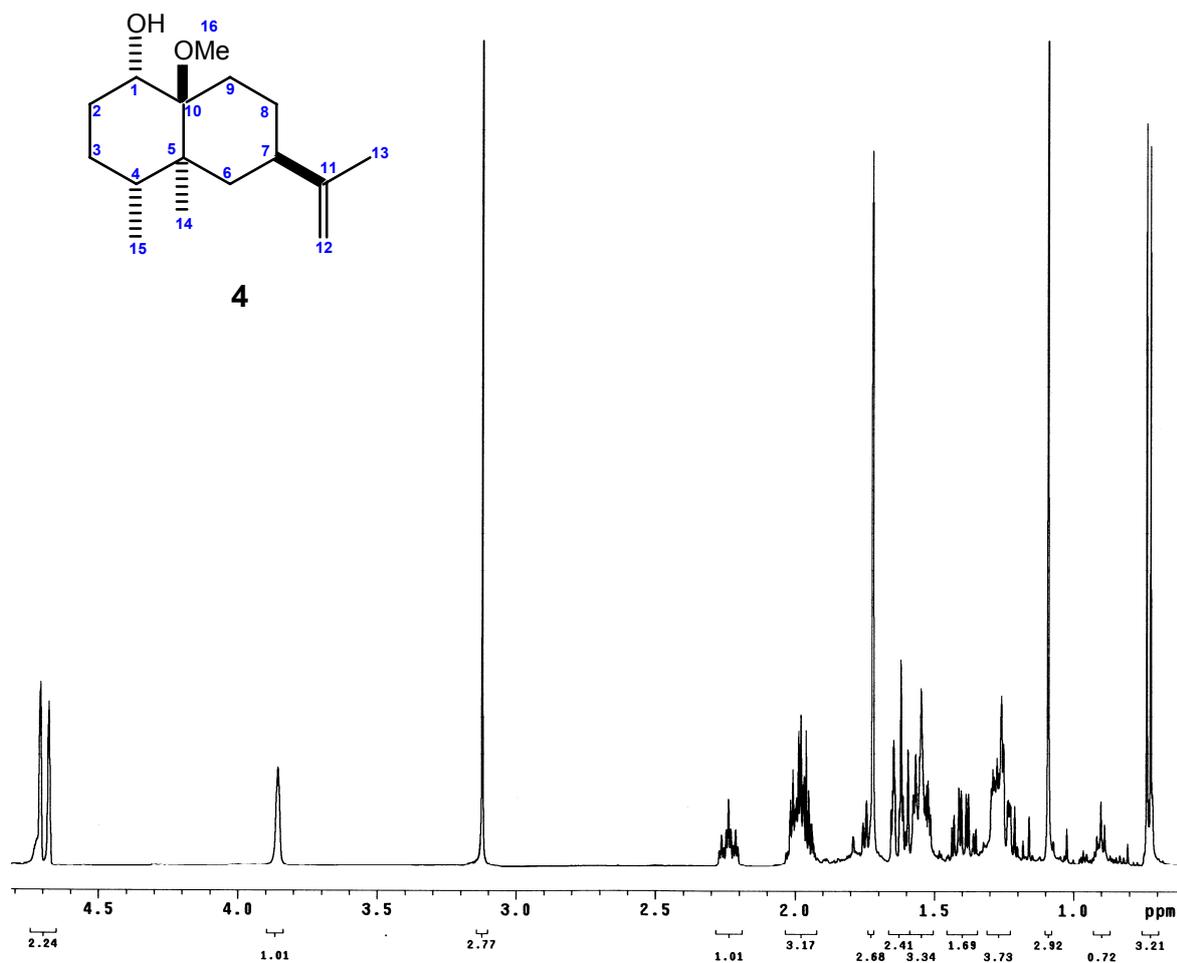
Espectro 4 de Masas de alta resolución de 2

Scan: 1276-1279  
Base: m/z 107; 62.3%FS TIC: 20343068

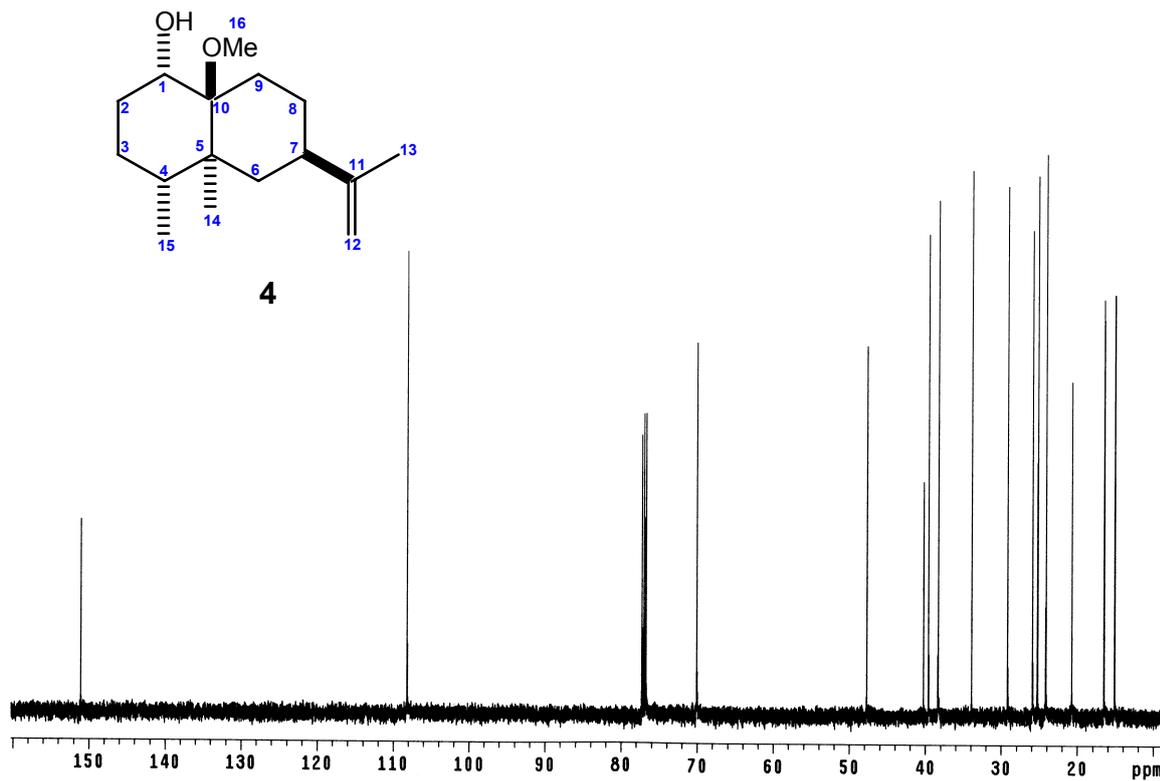
R.T.: 14.79



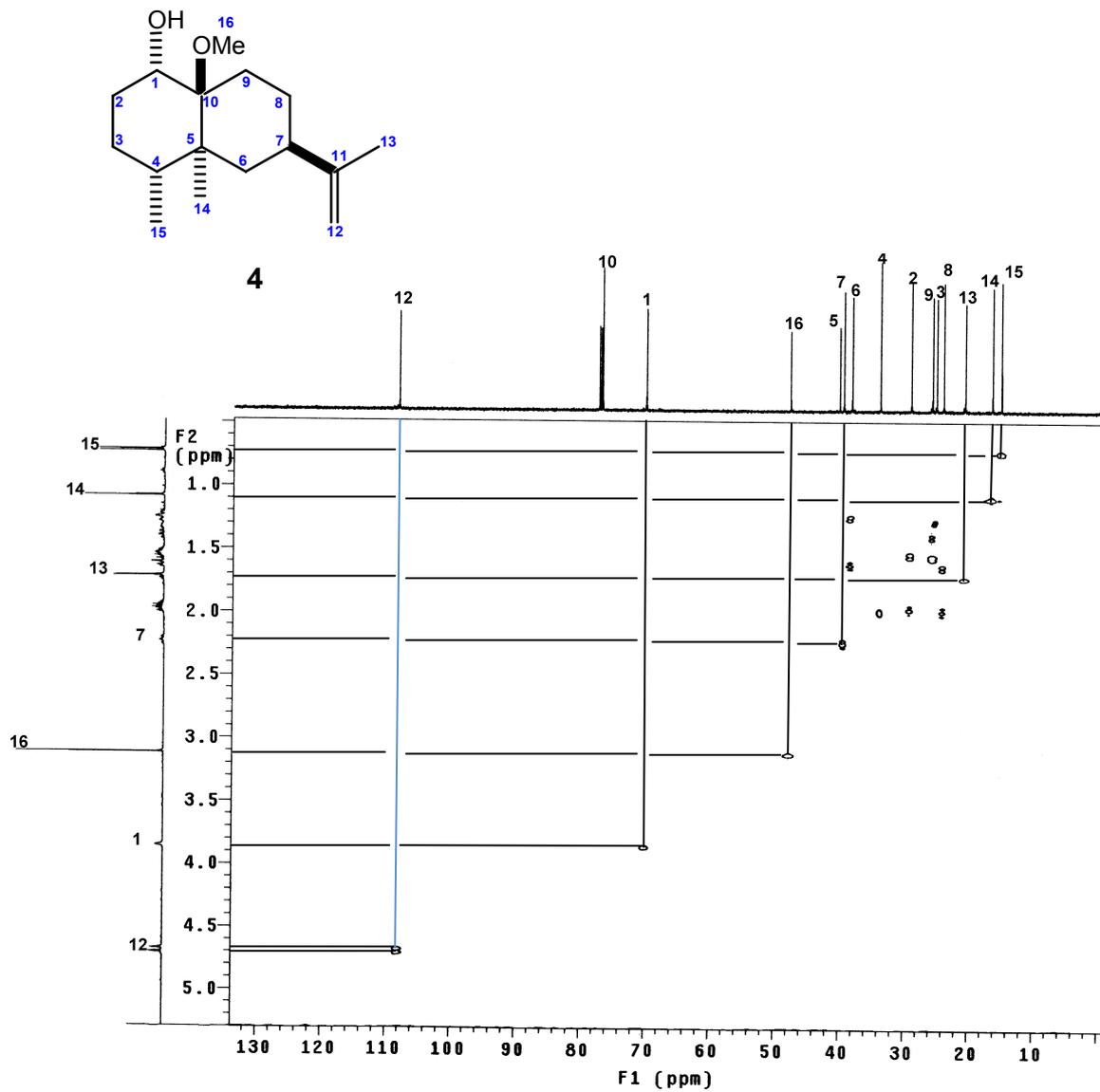
Espectro 5 de Masas de alta resolución de 3



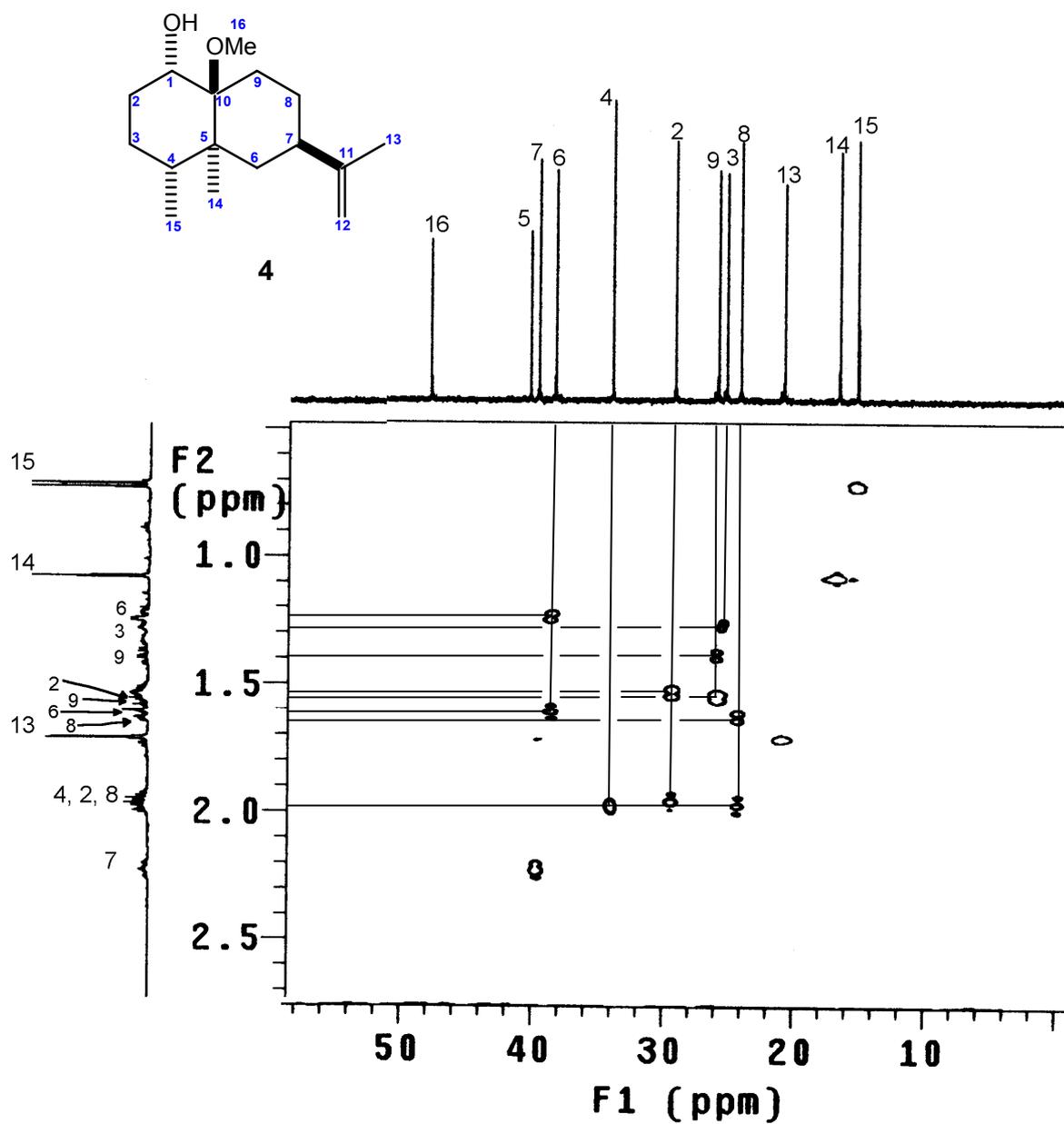
Espectro 6 de RMN  $^1\text{H}$  de **4**



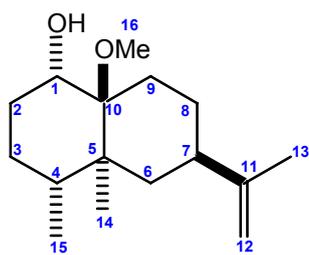
Espectro 7 de RMN  $^{13}\text{C}$  de **4**



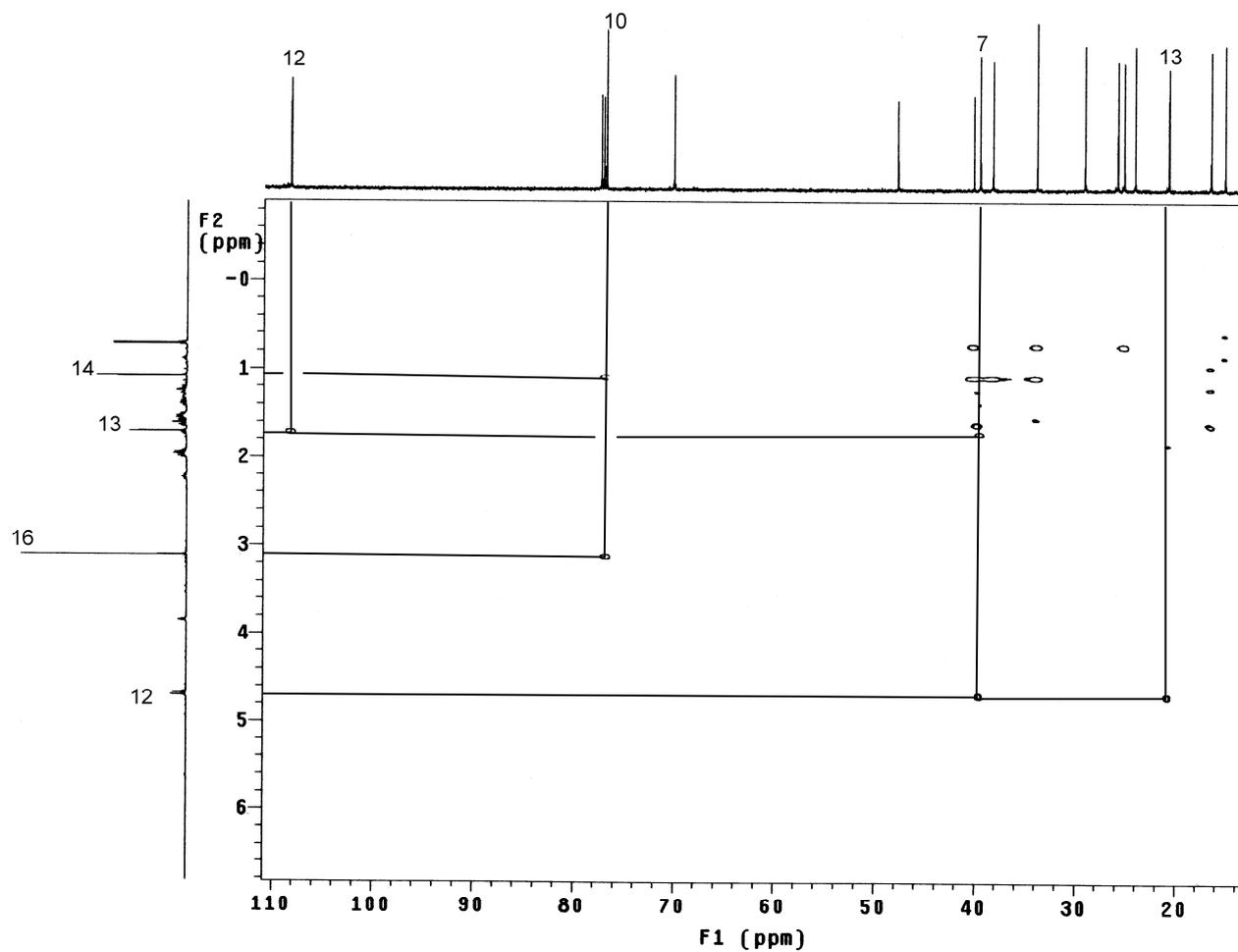
Espectro 8 Experimento bidimensional (HSQC) de **4**



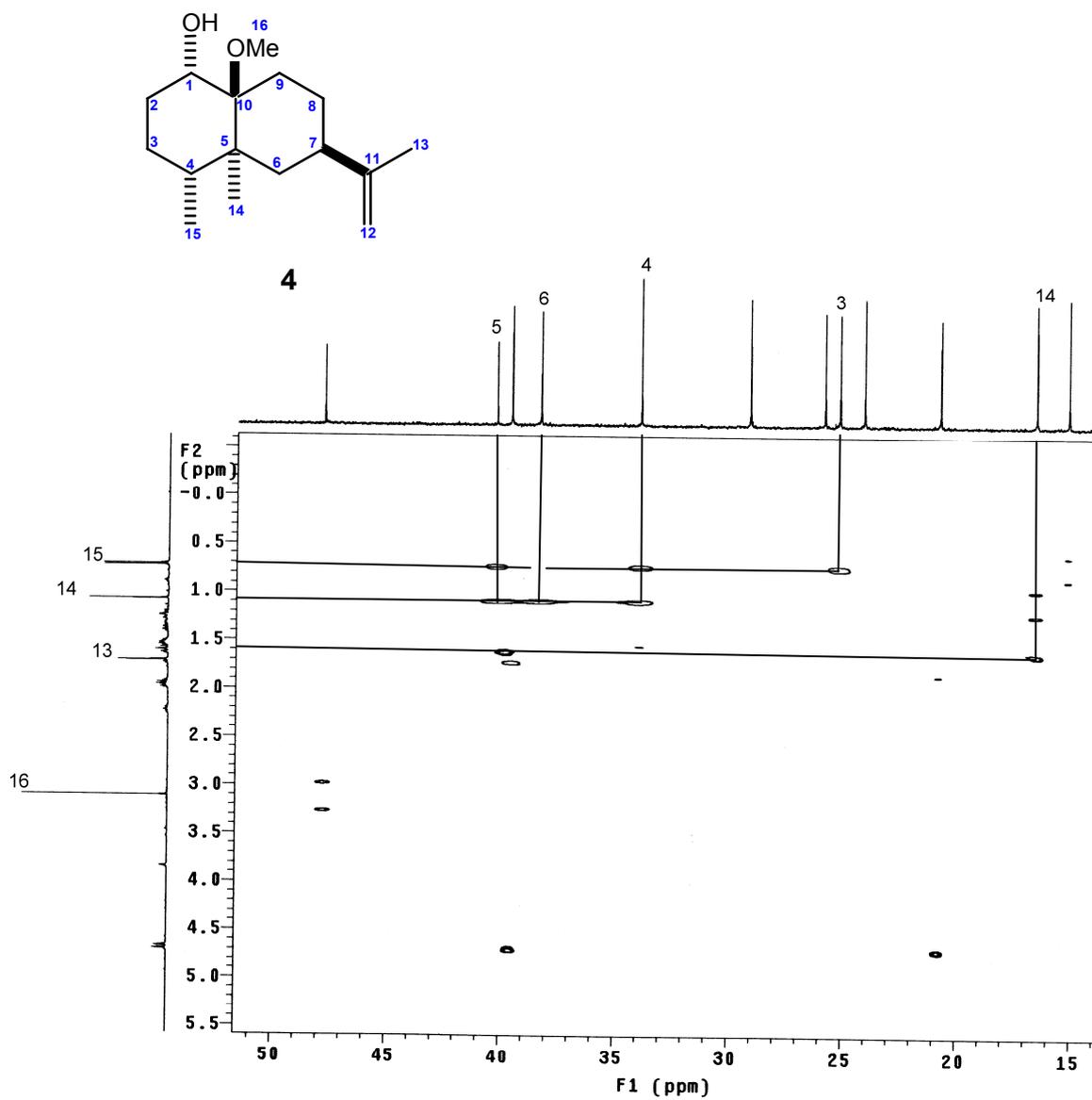
Espectro 9 Expansión del experimento bidimensional (HSQC) de 4



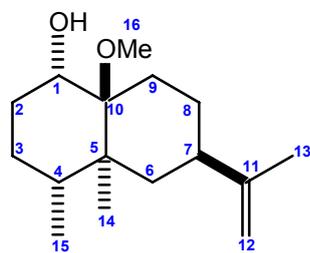
**4**



Espectro 10 Experimento bidimensional (HMBC) de 4

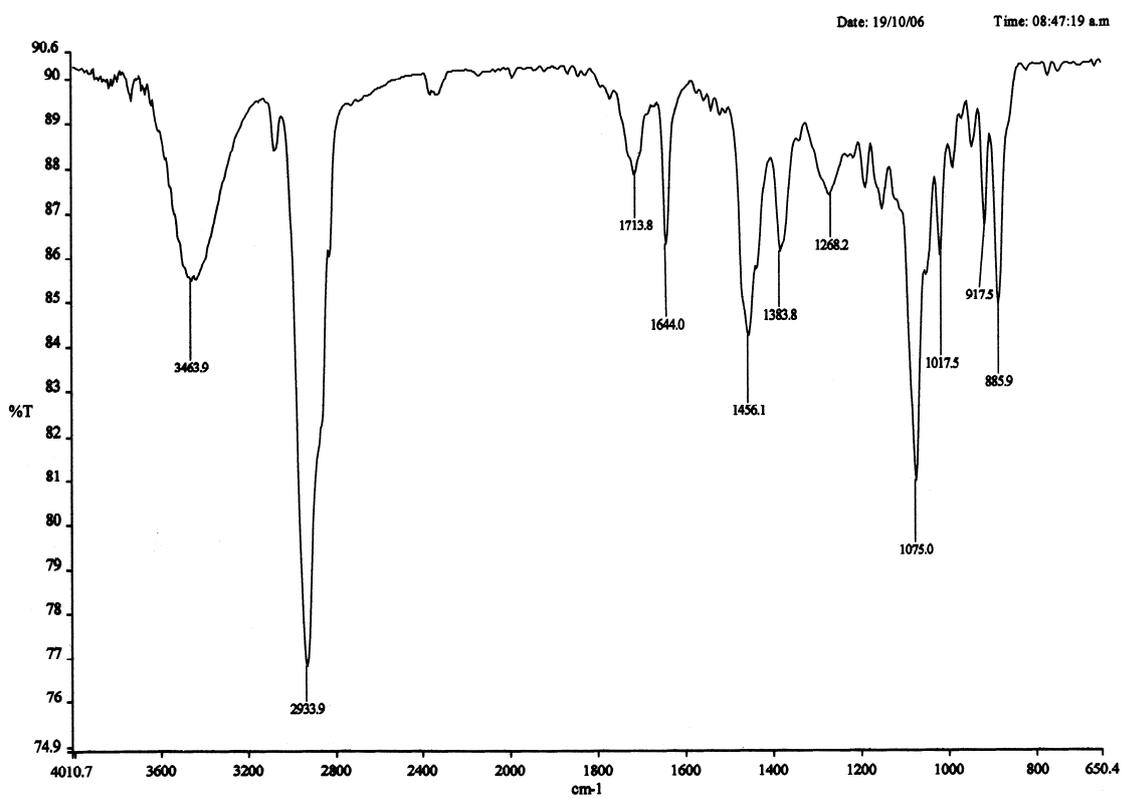


Espectro 11 Expansión del experimento bidimensional (HMBC) de **4**

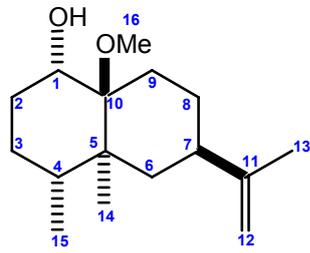


4

*Central de Instrumentación de Espectroscopía, ENCB-IPN.*



Espectro 12 de IR de 4

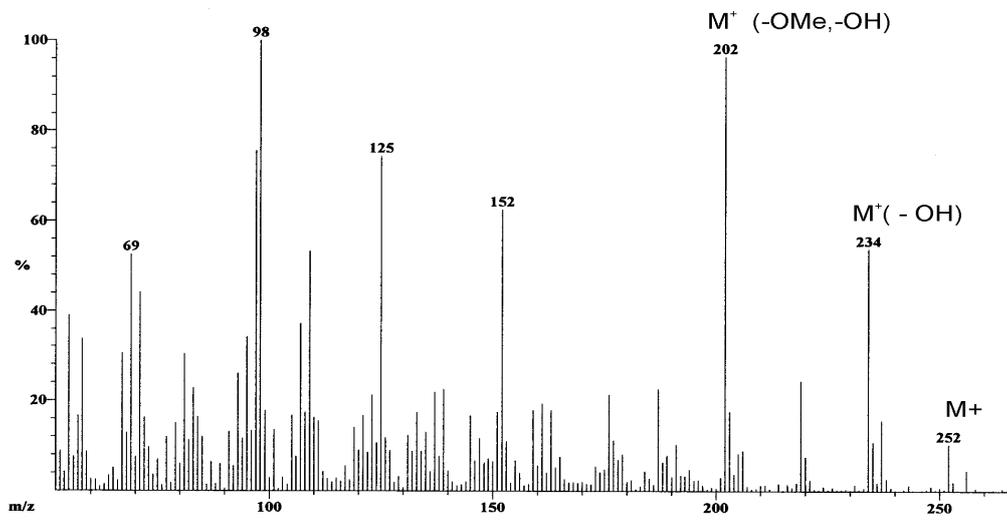


4

R.T.: 2.28

Scan: 114

Base: m/z 98; 34.8%FS TIC: 7663840



Espectro 13 de Masas de 4

Instrument: JEOL MSRoute

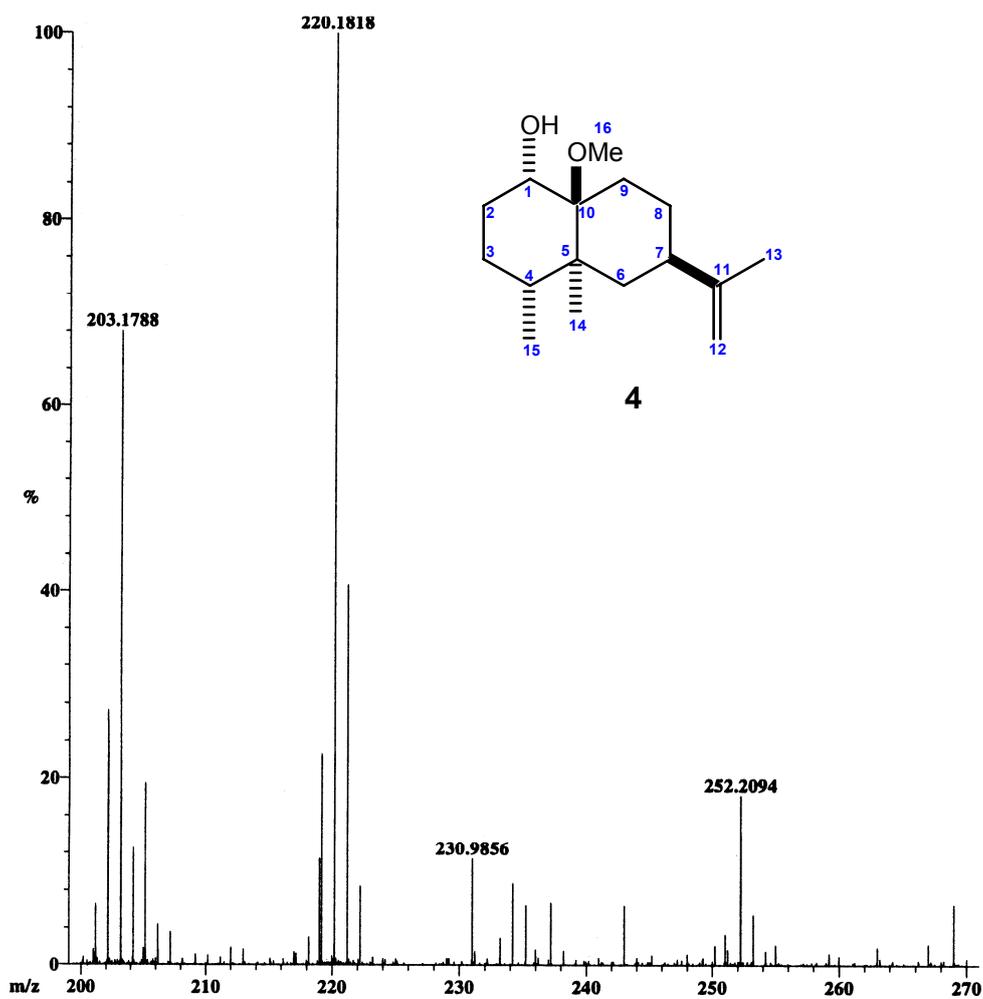
Ionization mode: CI+

Scan: 72-76

R.T.: 1.49

#Ions: 2200

Base: m/z 220; 7.1% FS TIC: 583066

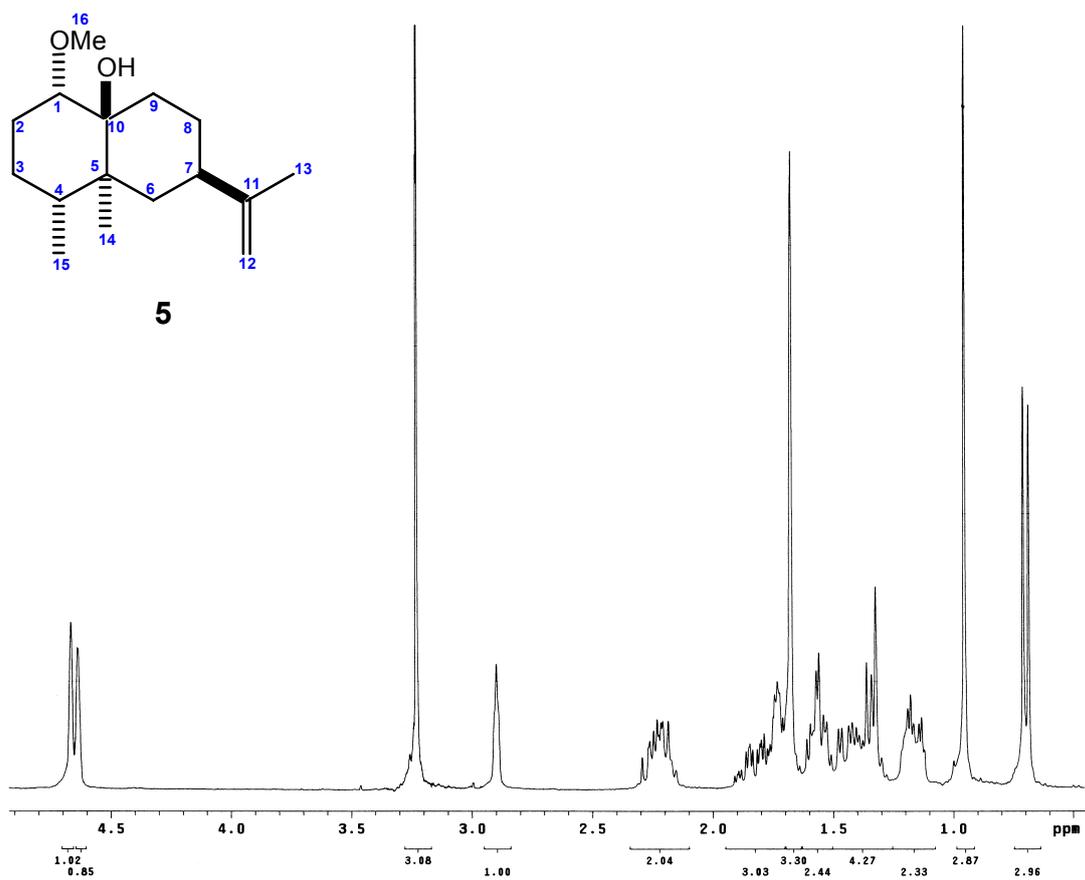


Selected Isotopes : H<sub>0-50</sub> C<sub>0-20</sub> N<sub>0-1</sub> O<sub>0-5</sub> Br<sub>0-1</sub>

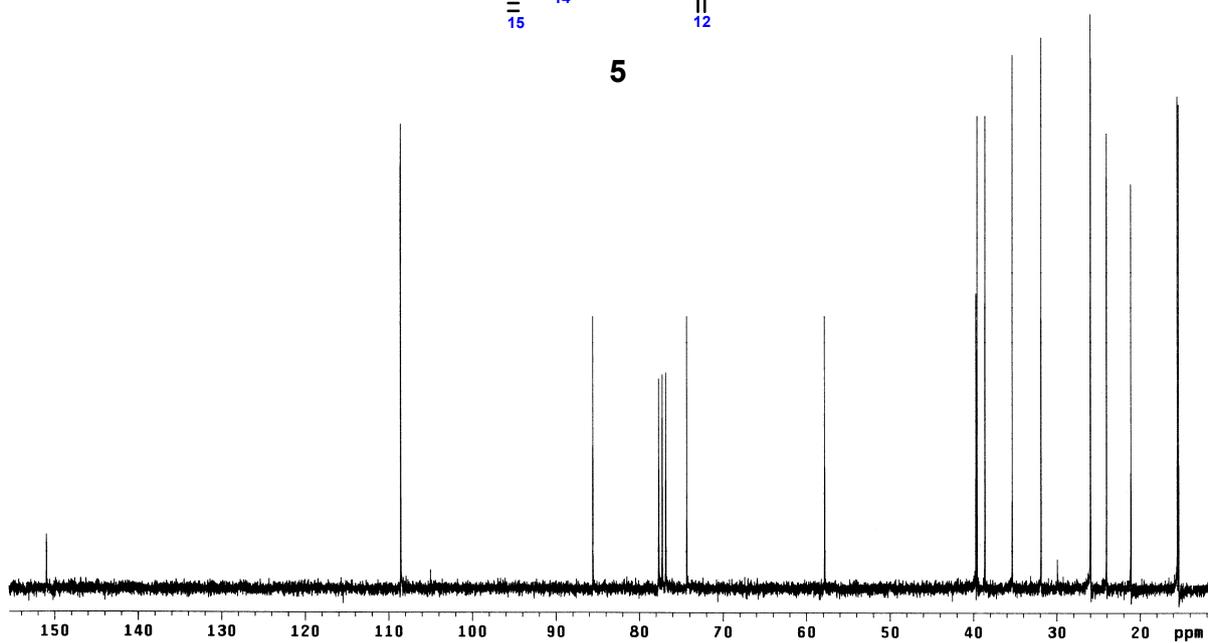
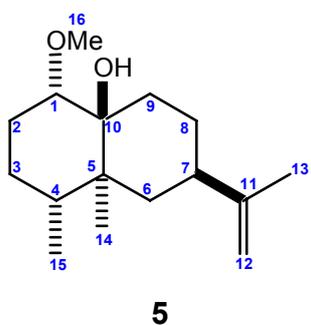
Error Limit : 100 ppm

<u>Measured Mass</u>	<u>% Base</u>	<u>Formula</u>	<u>Calculated Mass</u>	<u>Error</u>
252.20943	18.2%	C <sub>16</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>	252.20893	2.0

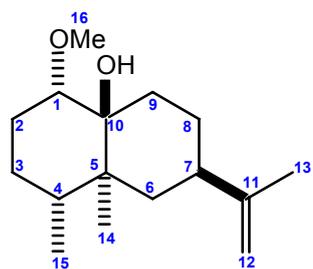
Spectro 14 de Masas de alta resolución de 4



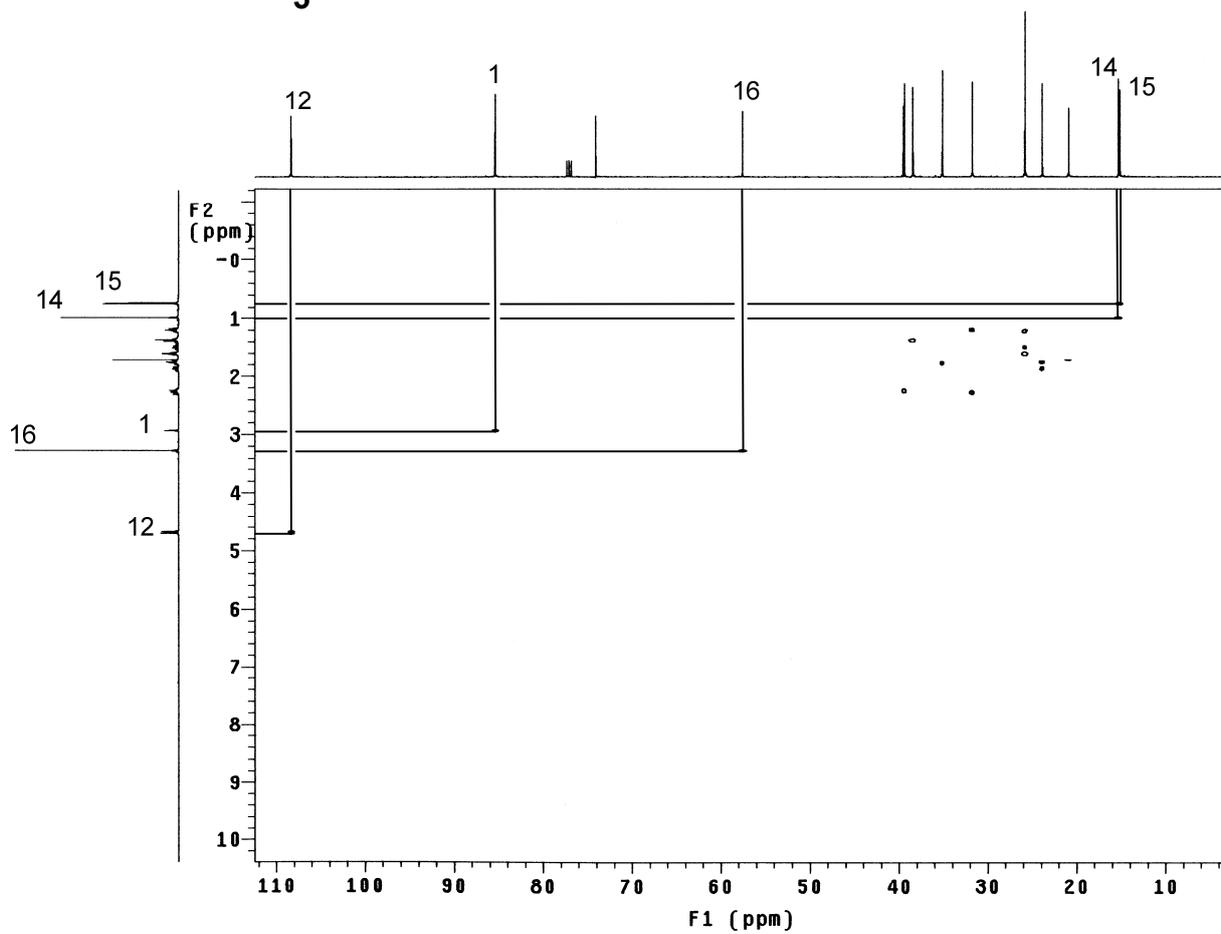
Espectro 15 de RMN <sup>1</sup>H de **5**



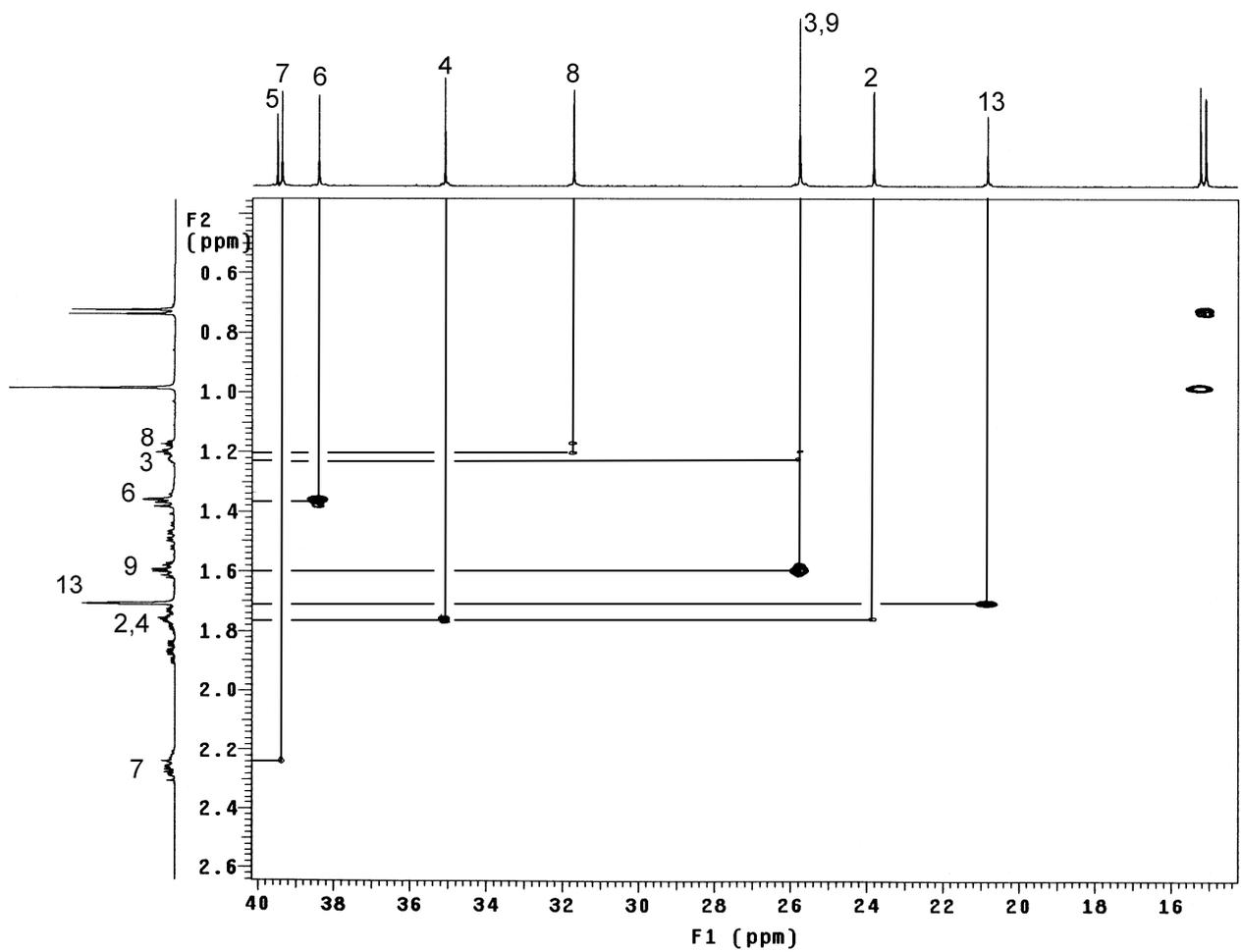
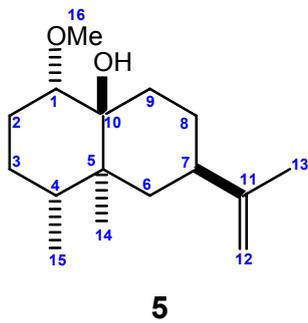
Espectro 16 de RMN <sup>13</sup>C de **5**



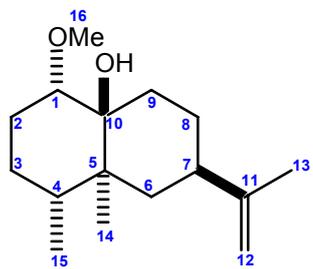
**5**



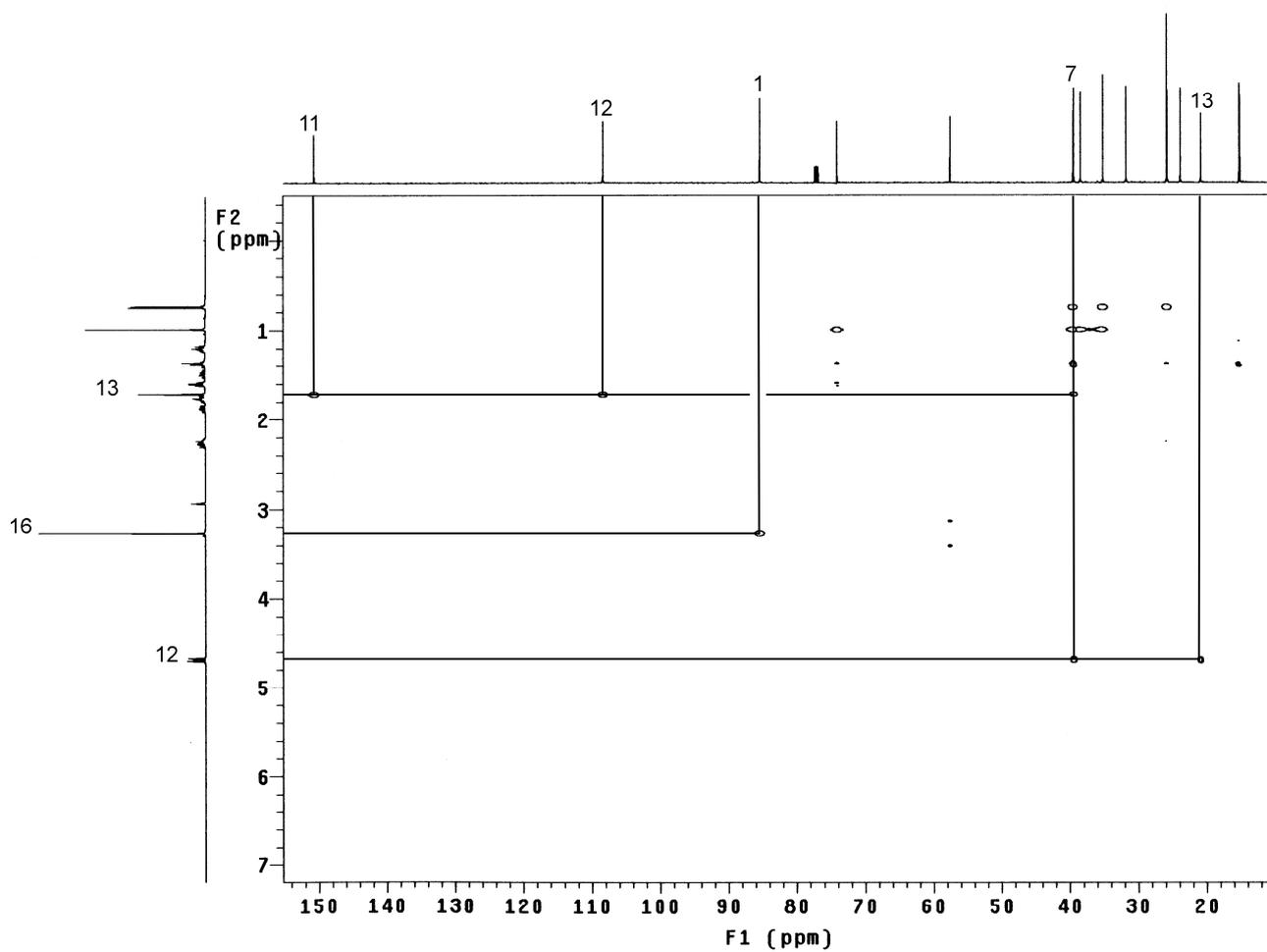
Espectro 17 Experimento bidimensional (HSQC) de **5**



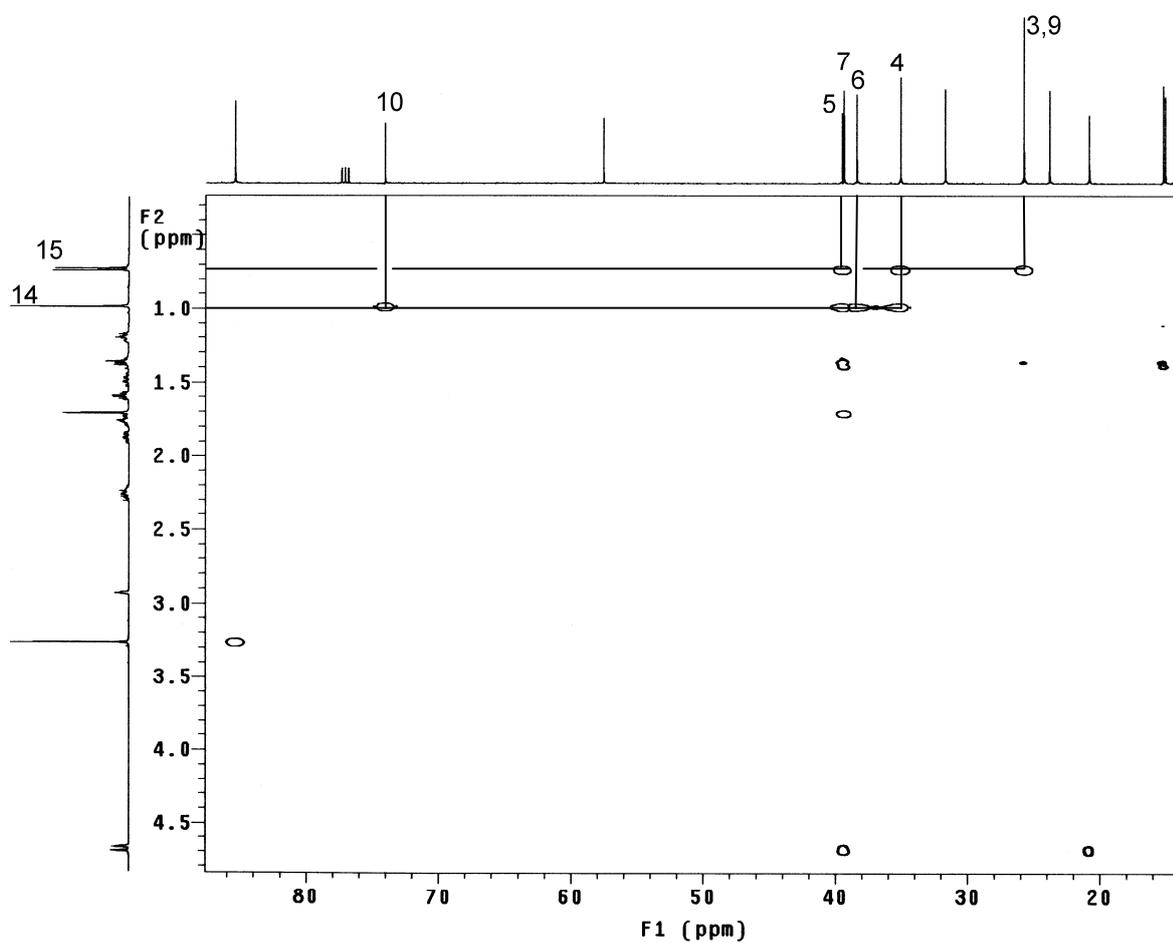
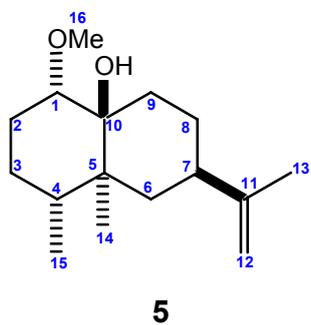
Spectro 18 Expansión del experimento bidimensional (HSQC) de **5**



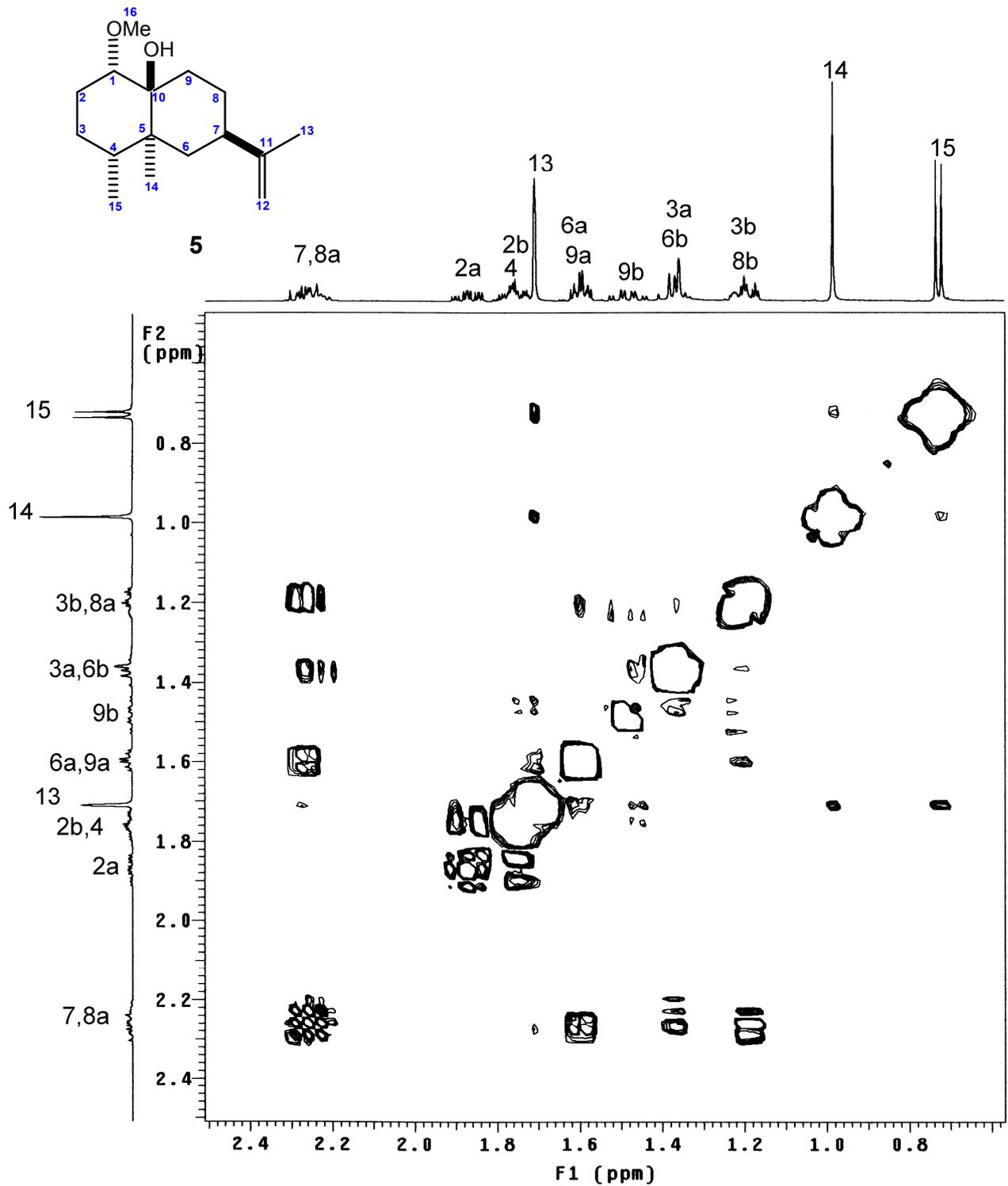
**5**



Espectro 19 Experimento bidimensional (HMBC) de **5**



Espectro 20 Expansión del experimento bidimensional (HMBC) de **5**

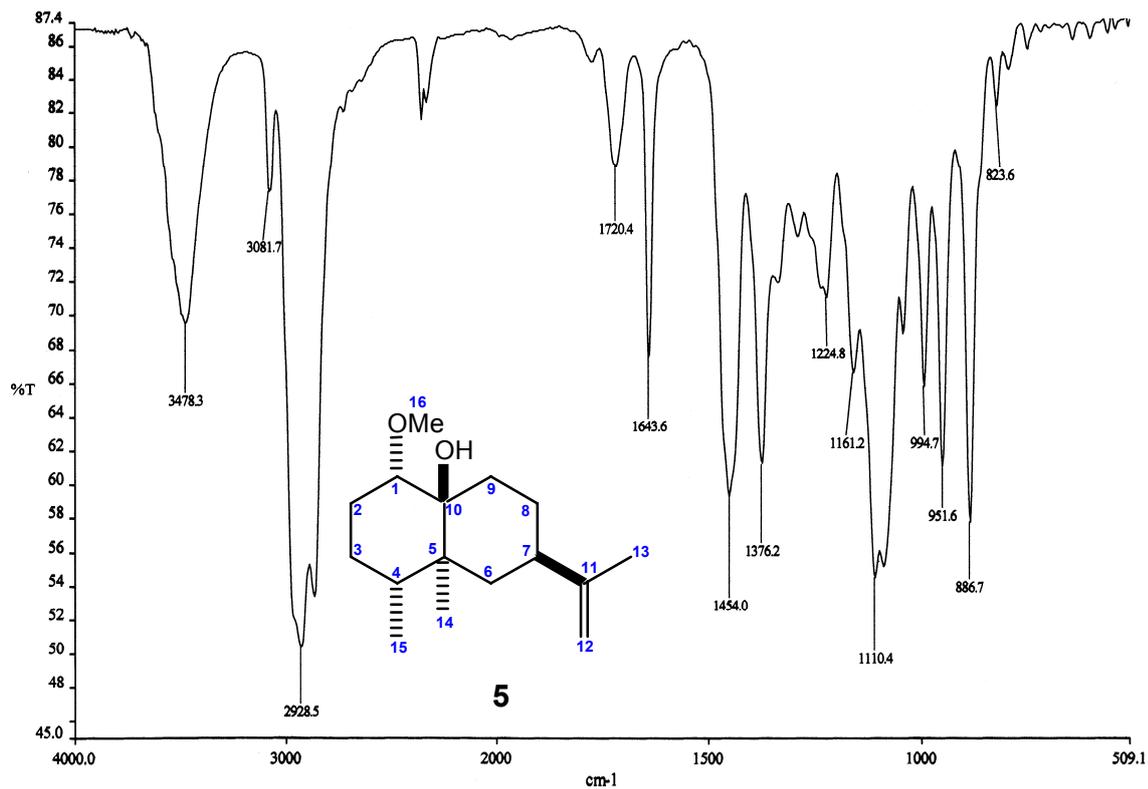


Espectro 21 Experimento bidimensional (COSY) de **5**

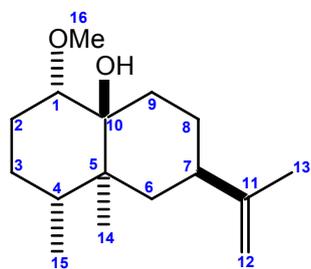
Central de Instrumentación de Espectroscopía, ENCB-IPN.

Date: 19/10/06

Time: 08:47:19 a.m



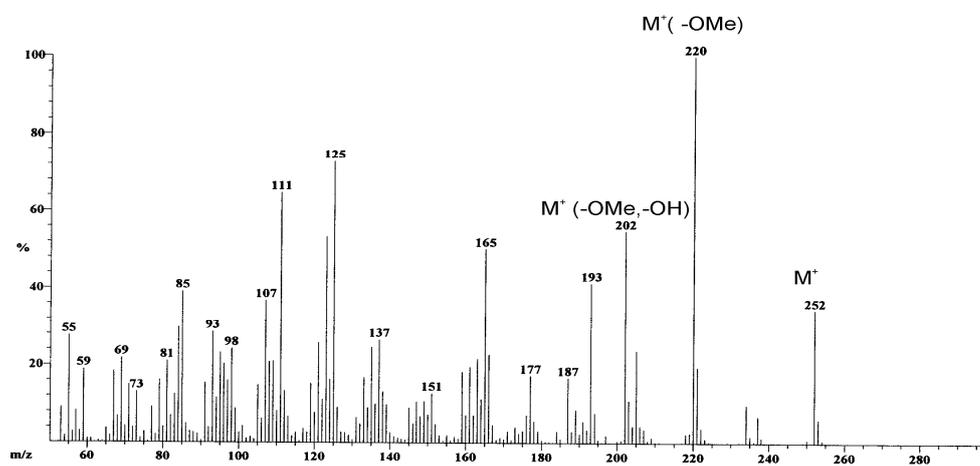
Espectro 22 de IR de 5



**5**

Date | 07-13-2006 (Time Run: 11:33:39)

Ionization mode: EI+



Espectro 23 de Masas de 5

Instrument: JEOL MSRoute

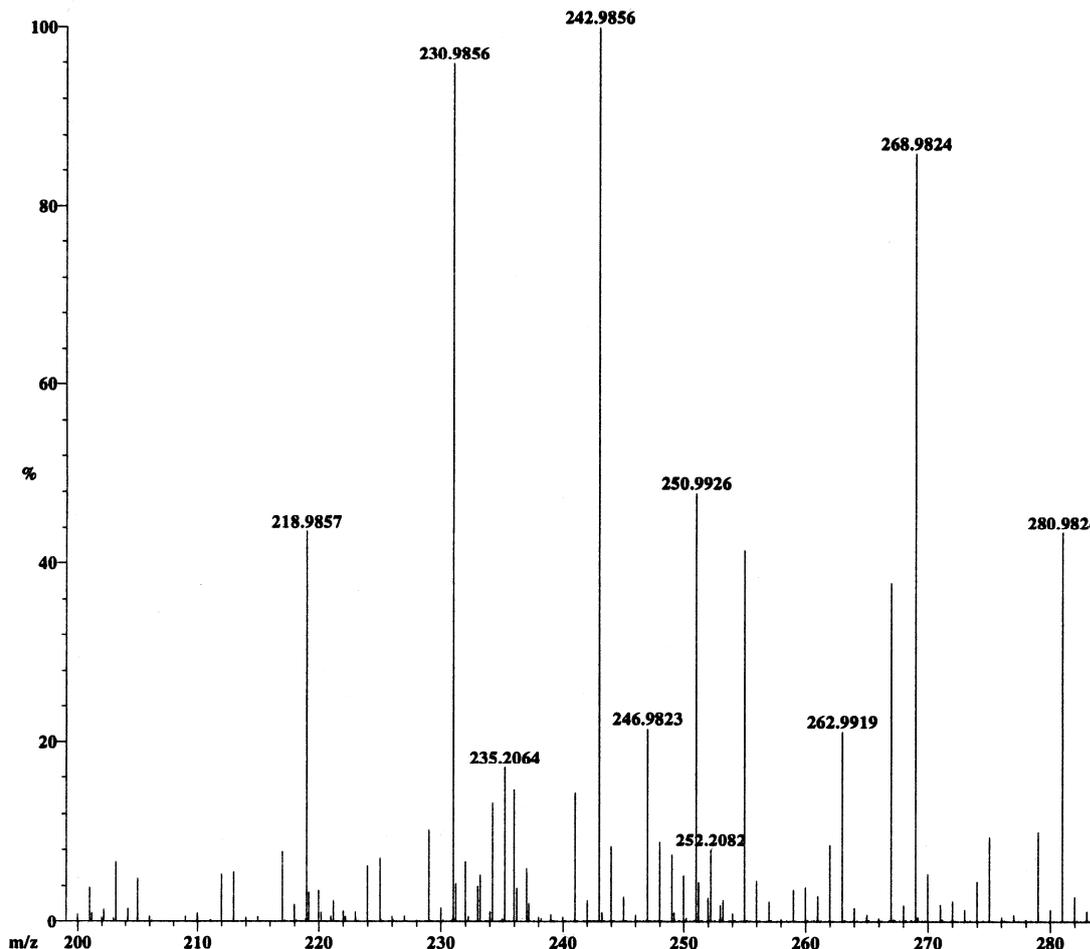
Ionization mode: CI+

Scan: 39-46

R.T.: .85

#Ions: 2607

Base: m/z 243; 12.4%FS TIC: 1315050

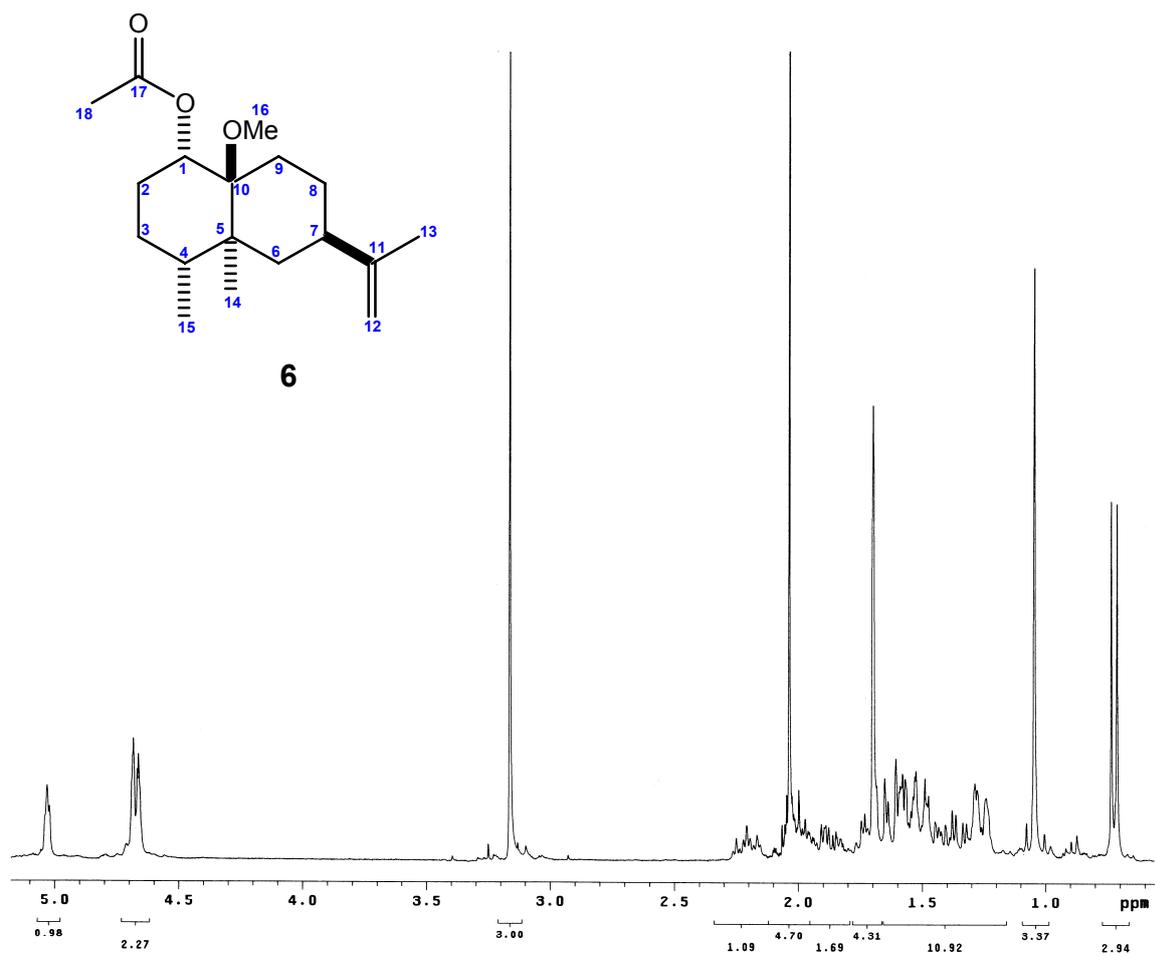


Selected Isotopes : H<sub>0-50</sub> C<sub>0-20</sub> N<sub>0-1</sub> O<sub>0-5</sub> Br<sub>0-1</sub>

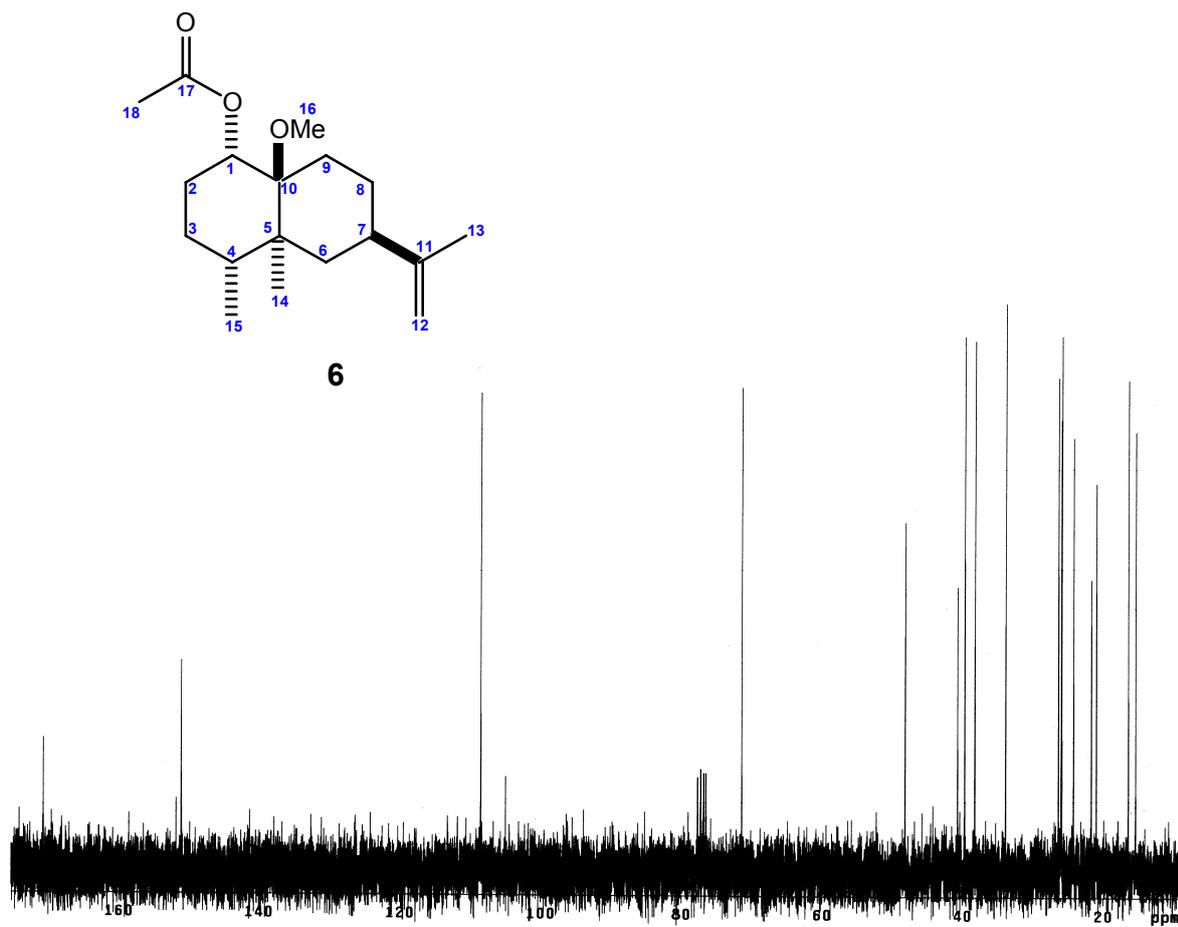
Error Limit : 100 ppm

<u>Measured Mass</u>	<u>% Base</u>	<u>Formula</u>	<u>Calculated Mass</u>	<u>Error</u>
252.20823	8.1%	C <sub>16</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>	252.20893	-2.8

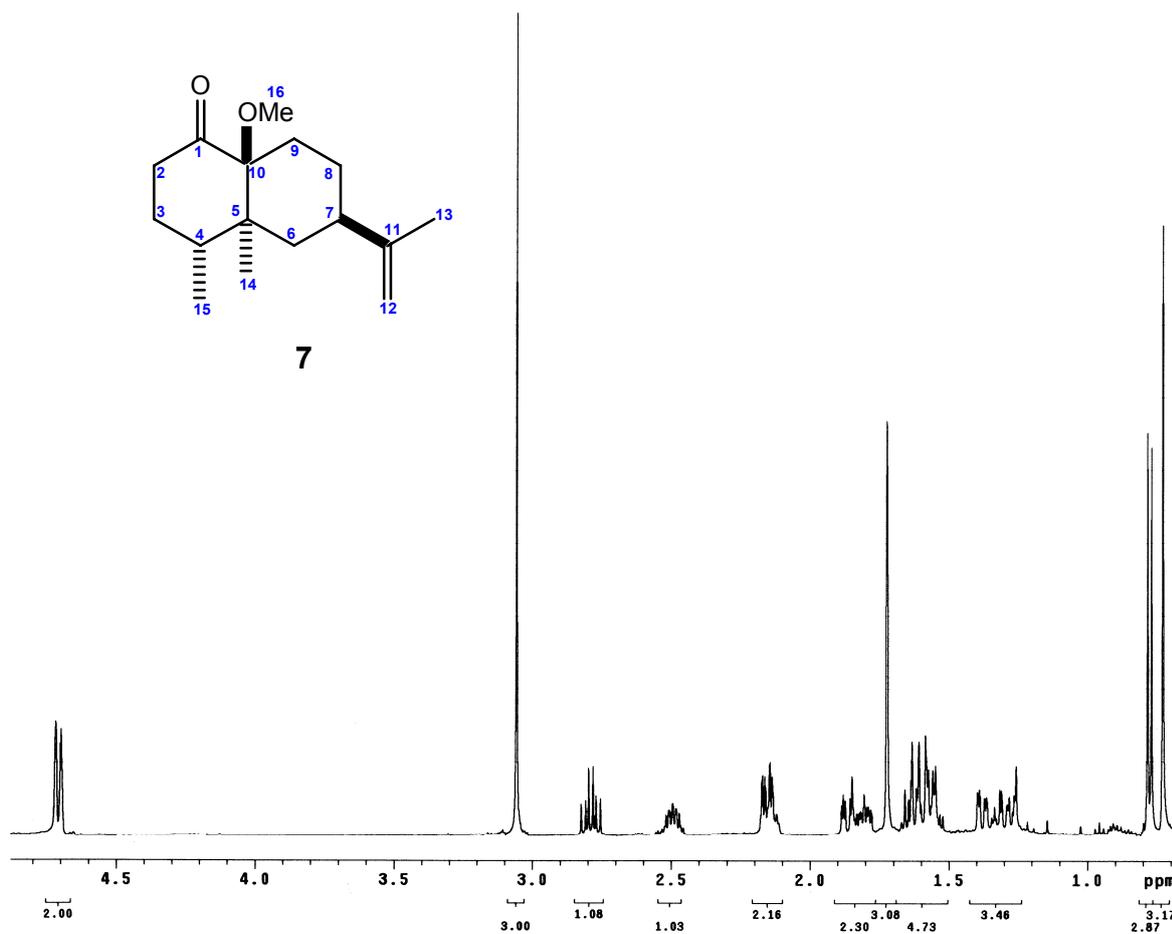
Espectro 24 de Masas de alta resolución de 5



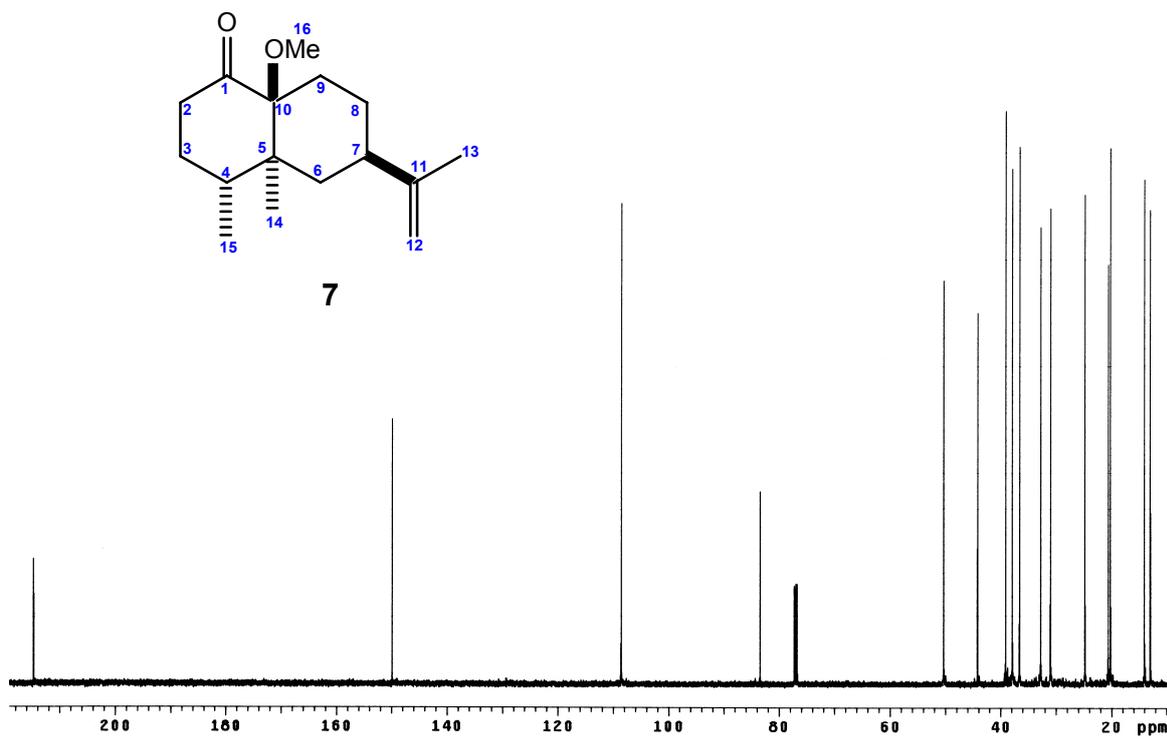
Espectro 25 de RMN  $^1\text{H}$  de **6**



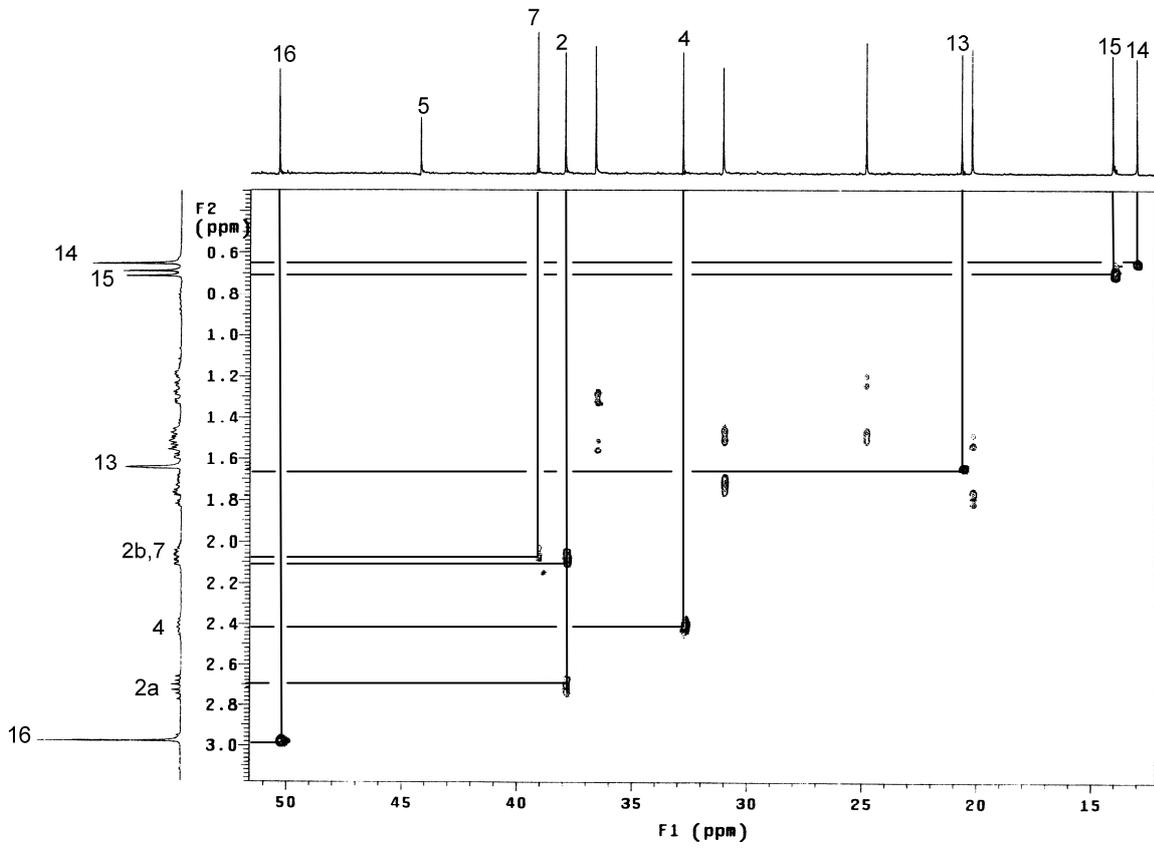
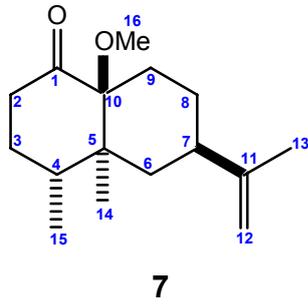
Espectro 26 de RMN  $^{13}\text{C}$  de **6**



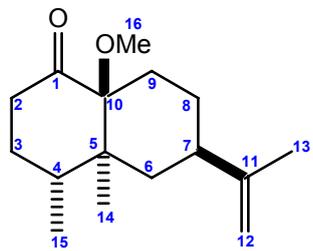
Espectro 27 de RMN  $^1\text{H}$  de 7



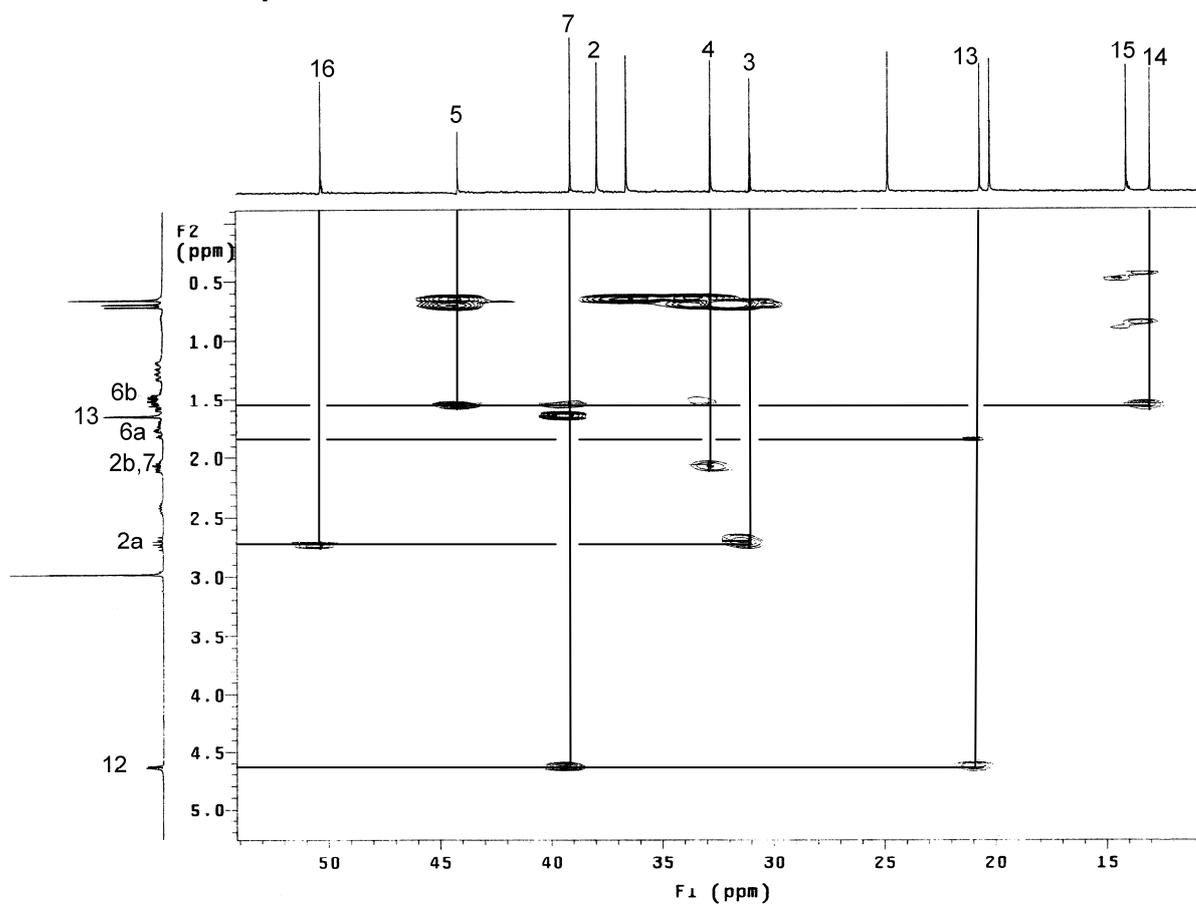
Espectro 28 de RMN  $^{13}\text{C}$  de 7



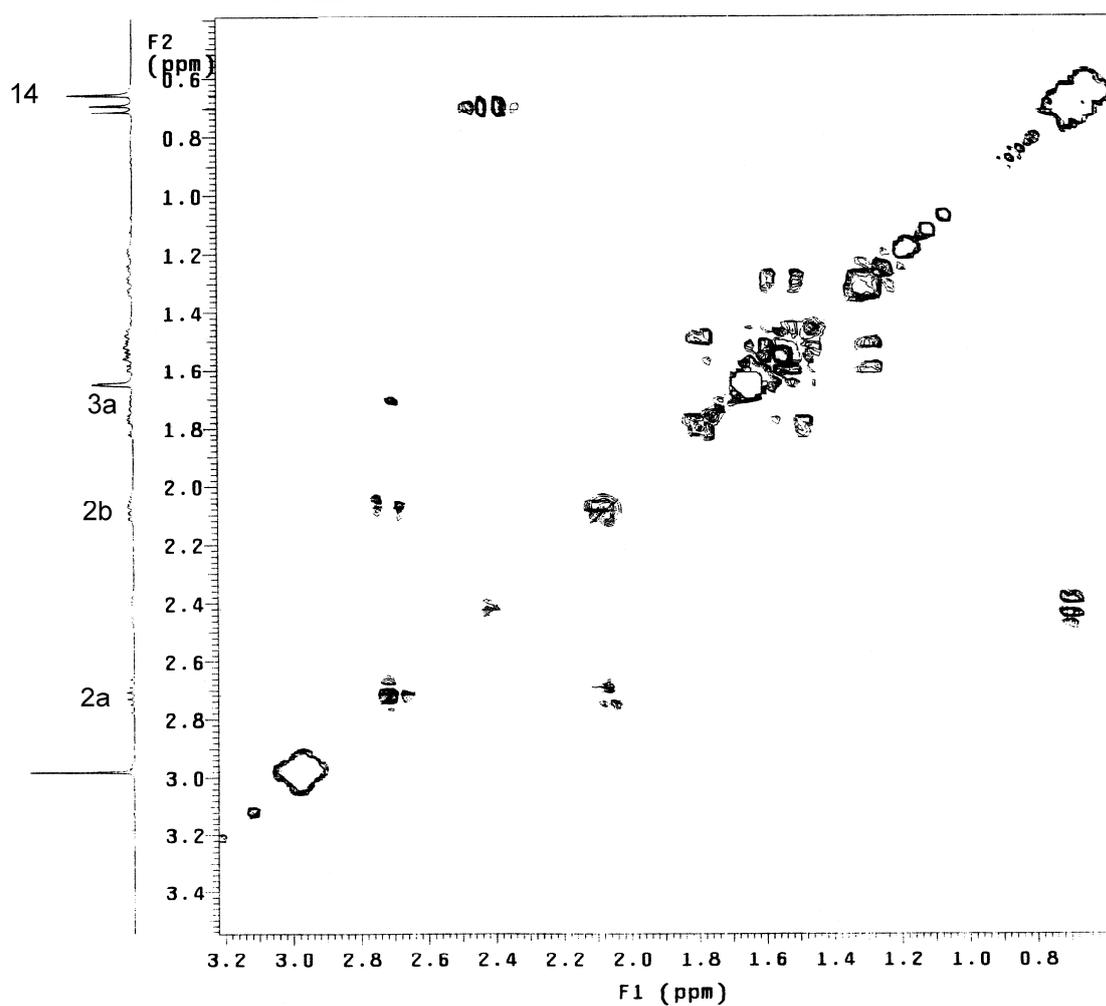
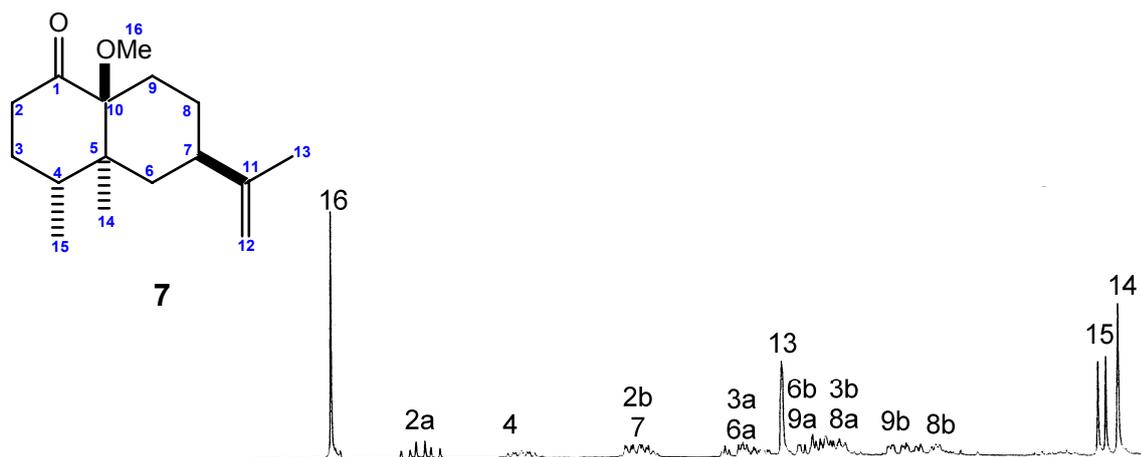
Espectro 29 Experimento bidimensional (HSQC) de 7



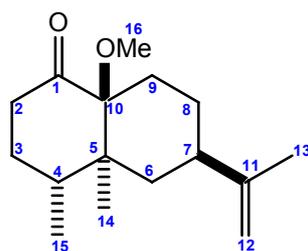
7



Espectro 30 Experimento bidimensional (HMBC) de 7

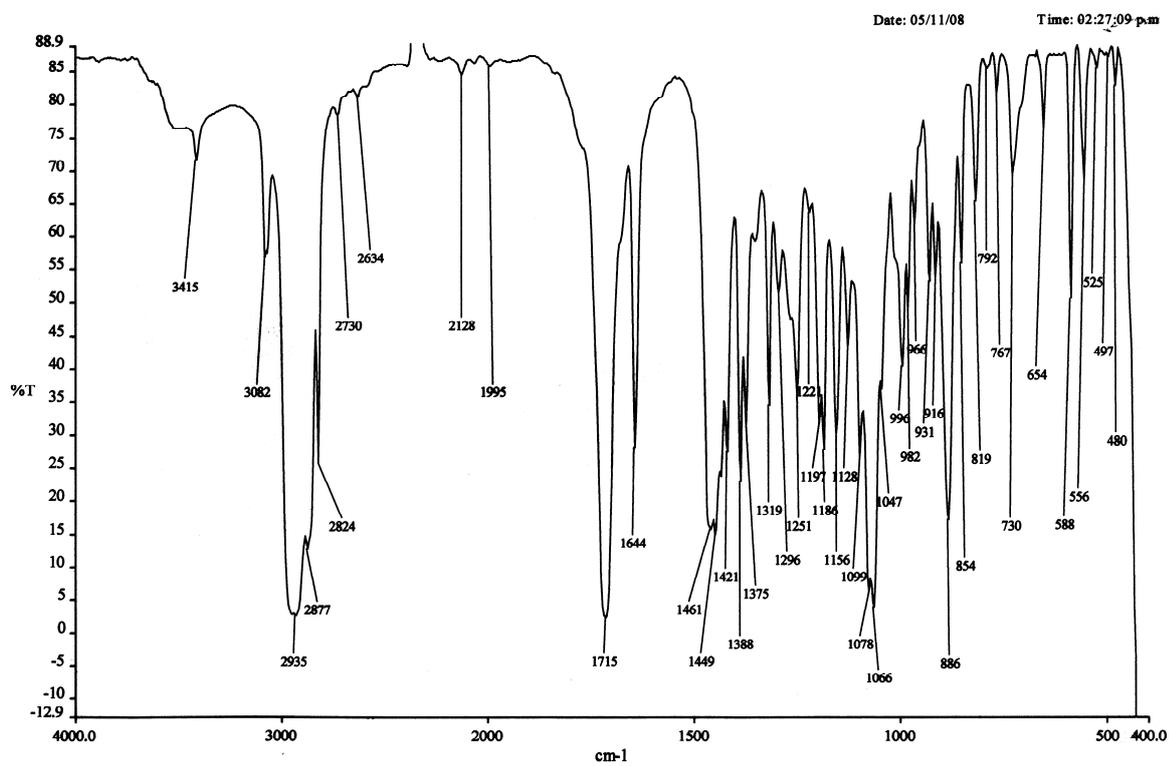


Espectro 31 Experimento bidimensional (COSY) de 7



7

*Central de Instrumentación de Espectroscopía, ENCB-IPN.*



Espectro 32 de IR de 7

Instrument: JEOL MSRoute

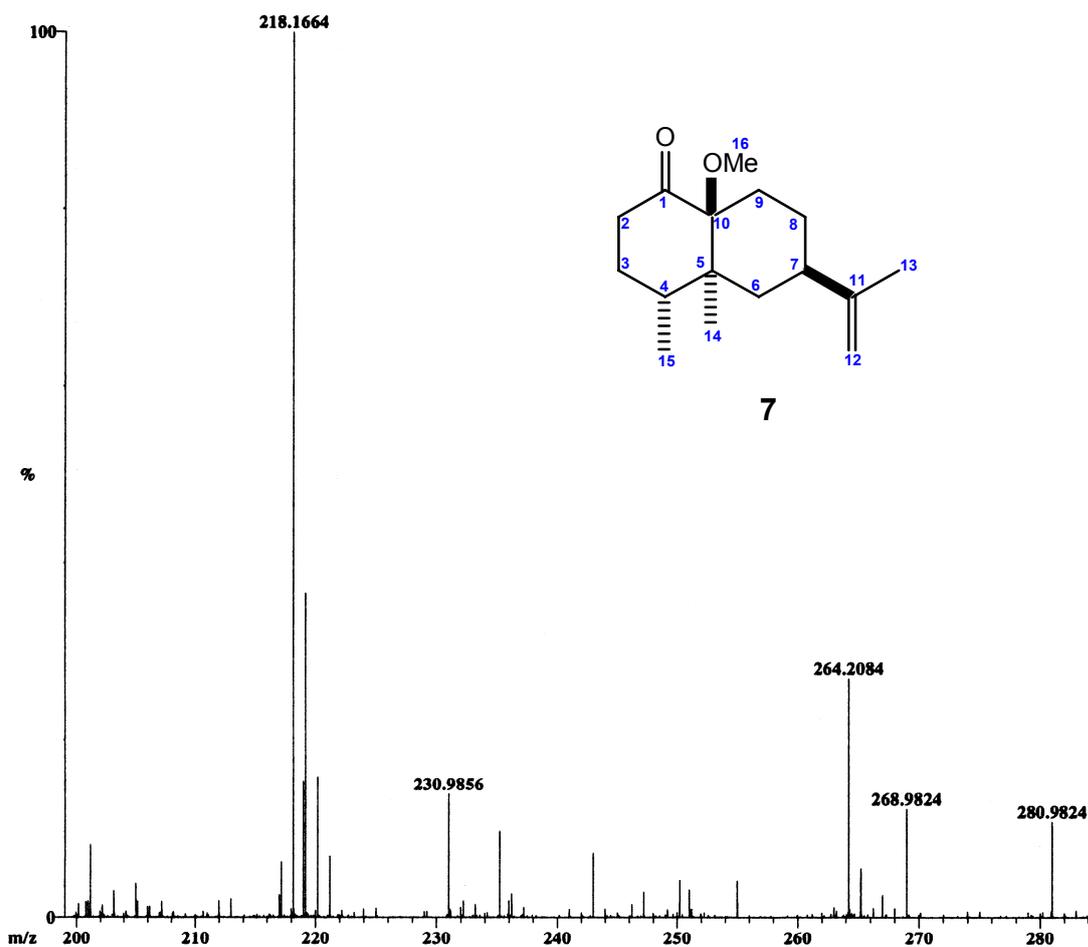
Ionization mode: CI+

Scan: 54-60

R.T.: 1.14

Base: m/z 218; 5.5% FS TIC: 344848

#Ions: 2561

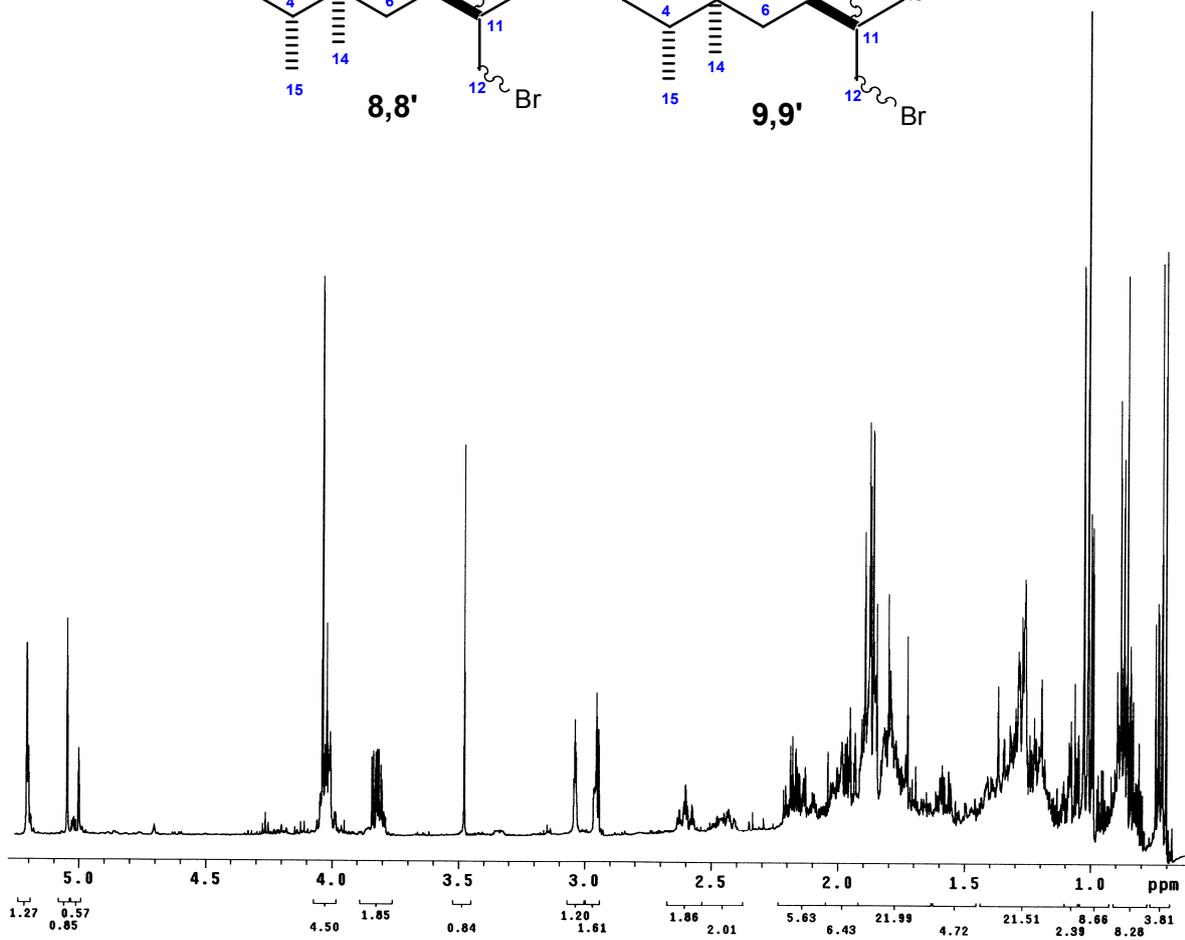
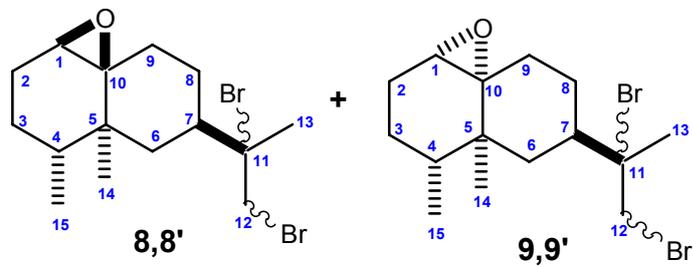


Selected Isotopes : H<sub>0-30</sub>C<sub>0-20</sub>O<sub>0-2</sub>

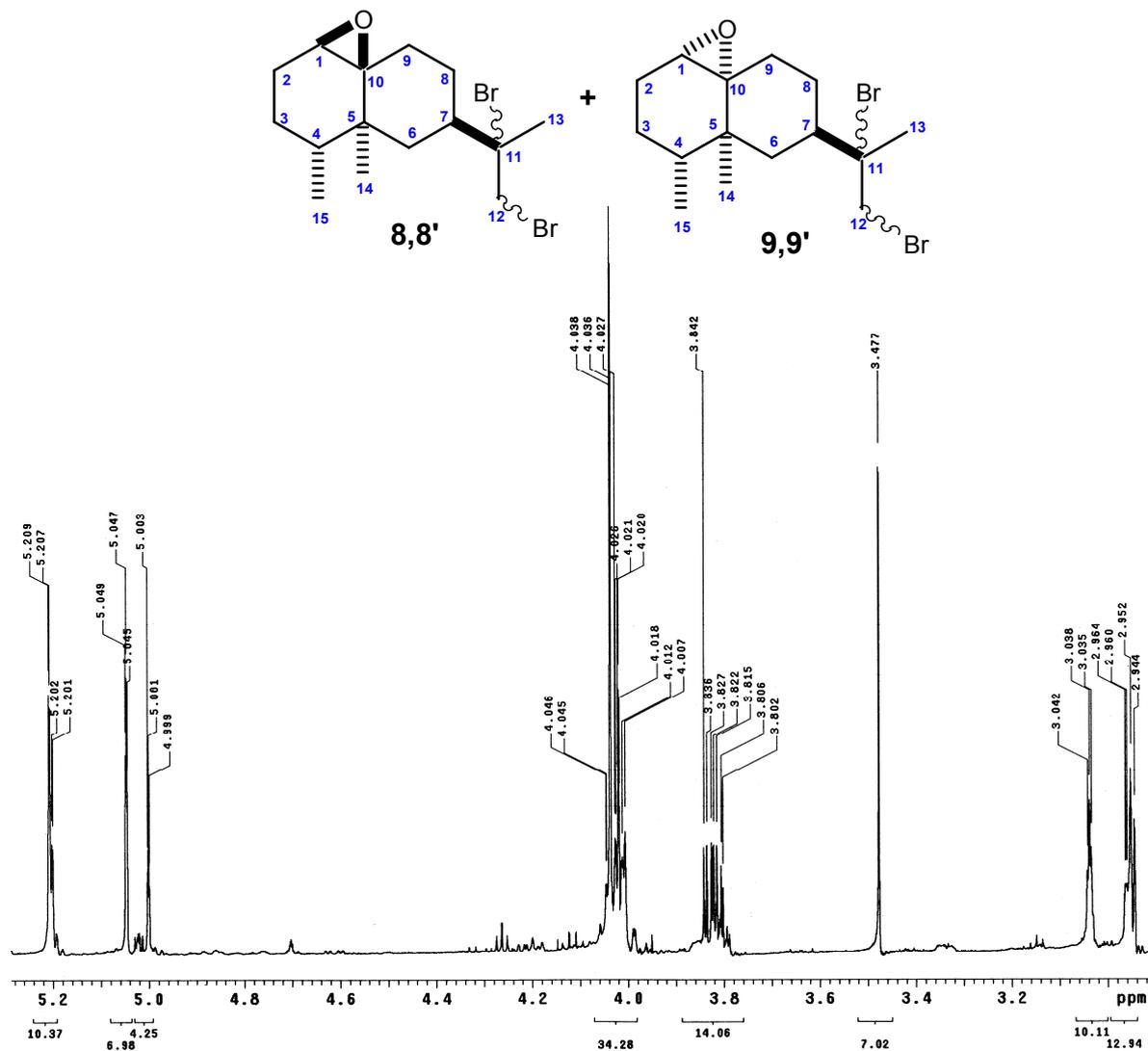
Error Limit : 100 ppm

<u>Measured Mass</u>	<u>% Base</u>	<u>Formula</u>	<u>Calculated Mass</u>	<u>Error</u>
264.20844	27.0%	C <sub>17</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>	264.20893	-1.9

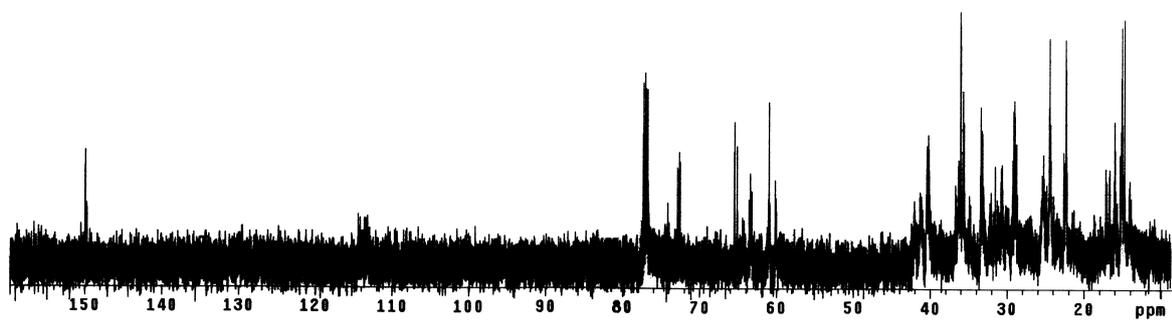
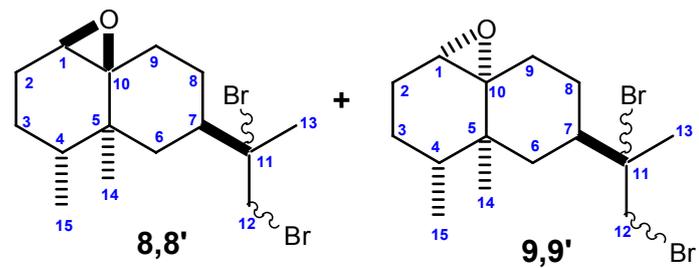
Espectro 33 de Masas de alta resolución de 7



Espectro 34 de RMN  $^1\text{H}$  la mezcla de 8-8' y 9-9'



Espectro 35 de RMN  $^1\text{H}$  de la mezcla de **8-8'** y **9-9'** (ampliación)



Espectro 36 de RMN  $^{13}\text{C}$  de la mezcla de 8-8' y 9-9'

# **CAPITULO 2**

## **Análisis espectroscópico de los compuestos presentes en la raíz de cholla (Opuntia sp)**

## 2.1 INTRODUCCIÓN

Las plantas medicinales han sido utilizadas a lo largo de la historia por el hombre con la finalidad de aliviar diversas molestias. Todos los pueblos primitivos han adquirido información sobre las propiedades medicinales de gran número de plantas propias de su ambiente. Estos conocimientos, generalmente los han acumulado determinados individuos, sacerdotes, hechiceros, curanderos, etc., quienes los han transmitido, de generación en generación, a determinados aprendices y a sus descendientes. En ocasiones, historiadores, viajeros o curanderos, han dejado útiles descripciones de plantas medicinales y su utilidad.

Así, en la Biblia están descritas unas 200 plantas medicinales y sus aplicaciones. El papiro de Ebers, escrito hace aproximadamente unos 3500 años, contiene descripciones de enfermedades e indicaciones para tratarlas con plantas entre las que se ha identificado la *Scilla marítima*, empleada con el mismo fin que, 100 años después, la empleaba Hipócrates, quien además, conocía los usos de ajenojo, cicuta, beleño, ruibarbo y manzanilla.

Figura 9. Papiro de Ebers



En el año 372 a. de C., Teofrasto, discípulo de Aristóteles, escribió 10 libros *sobre la historia de las plantas* y otros ochos *sobre las causas de las plantas*; donde menciona los usos de la canela, el cornezuelo de centeno, el apio y el helecho macho. En el año 77 a. de C., Dióscorides escribió su *De materia médica* en la que menciona todas las plantas y medicinas conocidas por los griegos. Esta fue considerada, durante quince siglos, la obra cumbre en Botánica y Farmacia.

Plinio el viejo, naturalista latino (23 - 79 d. de C.), escribió 47 volúmenes sobre *Historia Natural*, en los que nombra, entre más de mil, varias plantas medicinales aún en uso: anís, alheña, casia, helecho macho.

Galeno (131 – 200 d. de C.), farmacéutico y médico griego. Escribió veinte libros sobre medicina y farmacia, indicando empleo y aún adulteraciones de las plantas medicinales. En obras posteriores se recopilan estas informaciones y, unidas a otros conocimientos, forman la farmacia europea. En China, India y Japón se ha encontrado abundante información escrita sobre la flora medicinal. La mayor parte de los conocimientos africanos sobre plantas medicinales, continúa transmitiéndose verbalmente entre unos cuantos elegidos; lo mismo ocurre con los conocimientos de muchas tribus de América.

Si se logra difundir esta información y estudiarla científicamente, la humanidad obtendrá sorprendentes e importantes sustancias que, de lo contrario, permanecerán ignoradas por muy largo tiempo, pues la civilización tiende a romper la cadena de la tradición verbal que ha preservado esta información.

Los conocimientos sobre las plantas medicinales de América, fueron transmitidos por los aborígenes a los misioneros y viajeros españoles, quienes los inmortalizaron en diversas obras como las de: Gonzalo Fernández de Oviedo, *De la natural historia de las Indias e Islas y tierra firme del mar océano* publicada en 1535. En estas obras aparece la descripción de muchas plantas medicinales, entre ellas el achiote, guaco,

tabaco y cacao. José de Acosta publica en 1590 su *Historia natural y moral de las indias*.

Uno de los legados más importantes de México al mundo es el *Códice Badiano* (conocido también como *Códice De la Cruz-Badiano*, o por su título en latín *Libellus de medicinalibus indorum herbis*, *Libro de las hierbas medicinales de los indios*) es un escrito sobre la herbolaria mexicana, escrito originalmente en náhuatl por el xochimilca Martín de la Cruz, alumno del Colegio de la Santa Cruz de Tlatelolco, hacia 1552. El original en náhuatl ha desaparecido.

Posteriormente fue traducido al latín por Juan Badiano, también xochimilca y estudiante del Colegio de la Santa Cruz. Otro nombre con que se conoce este códice es '*Barberini*', debido a que Francesco Barberini lo poseía durante los primeros años del siglo XVII. El libro sobre herbolaria medicinal mexicana de Martín de la Cruz es un importante legado para botánica y la medicina tradicionales.

Todavía en años recientes, su estudio permitió al grupo del doctor José Luis Mateos, en el Instituto Mexicano del Seguro Social, encontrar el principio activo del *cihuapahltli* o zoapatle. De la Cruz cita que este vegetal se empleaba para facilitar el parto. Las investigaciones ratificaron que el zoapatle contiene un poderoso ocitósico (provoca la contracción del útero). Toda la sabiduría contenida en este libro fue heredada por los químicos orgánicos mexicanos de este siglo, que han sobresalido en el terreno internacional con sus investigaciones sobre productos naturales.

Figura 10. Una página del *Códice Badiano*



Fray Bernardino de Sahagún, escribió a fines del siglo XVI su Historia de las cosas de Nueva España, en las que menciona muchas de las plantas empleadas con fines medicinales por los aztecas y zapotecas.

Como ya se ha mencionado existe una gran variedad de plantas medicinales en México. Las cactáceas son plantas americanas, numerosísimas en México, que se extienden por todo el resto del nuevo mundo. Producen arabana y galactana, con las cuales forman abundante mucilago; diversos ácidos orgánicos y sales de los mismos, sobre todo malato y oxalato cálcicos; diversos azúcares; glucósidos saponínicos del ácido cereínico; y, sobre todo, algunos alcaloides, como los del peyote (*Lophophora Williamsii*), de efectos embriagadores, capaces de acallar el hambre y la sed, y de producir gran euforia.

La familia de las cactáceas está compuesta por unas 1500 especies de plantas carnosas suculentas, de figura de melón, o de cirio o con el tallo segmentado en plantas superpuestas, por lo regular sin hojas o con hojas muy pequeñas, y, en cambio, con numerosas espinas un ejemplo de esta familia es la *Opuntia microdasys*. Las flores suelen ser grandes y muy hermosas, con las hojas que las forman soldadas en una especie de tubo o trompetilla más o menos prolongado; por fuera de él están los numerosos sépalos del cáliz, verdosos y dispuestos en torno a dicho tubo; siguen a ellos los pétalos, vistosos, llamativos, también numerosos y ordenados de manera parecida. Arrancando del interior del tubo floral, nacen innumerables estambres, que se asoman a lo alto de la flor y constituyen otro adorno floral. Estas flores surgen del extremo del fruto en ciernes, con un solo estilo y con una sola cavidad, que se transforma en una especie de baya, por lo común con una sola cavidad y numerosas semillas adheridas a las paredes del fruto.<sup>15</sup>

Figura 11. *Opuntia microdasys*



## 2.2 ANTECEDENTES

Dentro del género *Opuntia* existen un gran número de especies con diferentes actividades, como la *Opuntia leptocaulis*, de la cual se ha caracterizado un metabolito antineoplásico<sup>1</sup> mediante técnicas de RMN, espectrometría de masas y rayos X.

Figura 12. *Opuntia leptocaulis*



Otra variedad, *Opuntia ficus-indica mucilage* produce actividad reversiva en alteraciones de la mucosa gástrica en ratas,<sup>2</sup> además de otras actividades, como hipoglucemiante<sup>3</sup>.

Figura 13. *Opuntia ficus-indica mucilage*



Se han llevado a cabo diferentes estudios con diferentes especies de *Opuntia* como *dillenii*,<sup>4</sup> *imbricata*,<sup>16</sup> *polyacantha*,<sup>17</sup> etc.<sup>5-10</sup>

La clasificación de la *Opuntia* de nuestro interés es la siguiente:

Nombre científico: *Opuntia imbricata*

Familia: Cactáceas

Genero: *Opuntia*

Grupo: *Cylindropuntia*

Especie: *imbricata*

Figura 14. *Opuntia imbricata*.



Se han llevado a cabo pocos estudios de *Opuntia imbricata* a la cual se le conoce con el nombre común “árbol de cholla”. Generalmente la parte aérea de esta planta es utilizada como forraje para el ganado, sin embargo en medicina tradicional la raíz se utiliza para aliviar malestares estomacales, fiebre, gripe hepatitis, diabetes, diarrea, mal de orín, etc.; generalmente se utiliza la raíz en una decocción.<sup>11</sup> Recientemente se han hecho investigaciones con los extractos de la raíz y ha presentado esta actividad antimicrobiana como se observa en la siguiente tabla.<sup>12</sup>

Tabla 3. Actividad antimicrobiana del extracto metanólico de *Opuntia sp.*

NOMBRE LOCAL	NOMBRE DE LA FAMILIA NOMBRE DE LA PLANTA	PARTE EMPLEADA	USO MEDICINAL	ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA			
				A	B	C	D
Pitallita, viejitos	CACTACEAE Mamiallaria dioica K. Brandegee (E-225)	Parte aérea	Dolor o dolor de oídos, cistitis, uretritis, presión arterial y encías inflamadas	-	-	-	-
Ceribe	CACTACEAE Opuntia bigelovii Engelm (E-239)	Parte aérea	Fiebre y dolor de estomago	-	-	-	-
Cholla	CACTACEAE Opuntia cholla weber (E-240)	Raíz	Problemas de estómago, fiebre, hepatitis, diabetes, diarrea, después del parto, cistitis, uretritis, sarampión, vómitos, presión arterial y para estimular el apetito.	-	+	-	-
Pitalla agria	CACTACEAE Stenocereus gummosus (Engelm) Gibson y Acvak (E-172)	Parte aérea Fruto	Mordedura de serpiente venenosa, presión arterial, parásitos y para controlar colesterol	-	+	-	-
Pitalla dulce	CACTACEAE Stenocereus thurberi (E-267)	Parte aérea Flores	Picadura de abeja ", lophon" o escorpaena sp., mordedura de serpientes, heridas, presión arterial, úlceras y cáncer	-	-	-	-

A. *S. aureus*

B. *B. subtilis*

C. *S. fecalis*

D. *E. coli*

## 2.3 JUSTIFICACION

El uso de plantas medicinales a lo largo de la historia del hombre ha sido de gran importancia, ya sea en actos rituales como para aliviar malestares. El conocimiento empírico del uso de estas se ha transmitido de manera oral de generación en generación, lo cual ha ocasionado la pérdida o deformación de este conocimiento, hasta nuestros días; sin embargo, se ha logrado recuperar parte de este conocimiento e indagar de manera que se ha logrado aislar e identificar principios activos, de algunas plantas medicinales de uso popular, que han demostrado tener efecto terapéutico sobre las personas.

Este trabajo se basa en la información adquirida acerca del uso de la raíz de *opuntia imbricata*, en la medicina tradicional así como estudios que comprueban su actividad antimicrobiana. Por lo cual se plantea hacer un análisis fitoquímico preliminar para determinar de manera general el tipo de compuestos presentes en la raíz de *opuntia imbricata*, así como llevar a cabo su separación mediante cromatografía en columna para su posterior elucidación para finalmente determinar si existe la presencia de algún compuesto de interés.

## 2.4 OBJETIVO

- Aislar, identificar y elucidar los diferentes metabolitos presentes en la raíz de *Opuntia cholla* (*Opuntia imbricata*).

## 2.5 METODOLOGÍA GENERAL

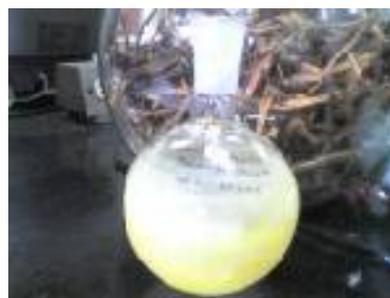
- Hacer maceraciones con metanol para extraer los metabolitos no polares que contenga la raíz de *Opuntia cholla* (*Opuntia imbricata*).
- Llevar a cabo un análisis fitoquímico preliminar, para determinar los componentes del macerado metanólico: Alcaloides, Esteroides, Saponinas, Flavonoides, Taninos, Antraquinonas, Glicósidos Cardiotónicos, Lactonas Sesquiterpénicas y Cumarinas.<sup>13, 14</sup>
- Separar los componentes de los extractos mediante cromatografía en columna.
- Caracterizar los metabolitos de los extractos mediante espectroscopia de IR, espectrometría de masas, espectrometría de RMN de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C.

## 2.6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

- ▶ Se obtuvieron los concentrados de las maceraciones con hexano y metanol de la raíz de *Opuntia cholla* (*Opuntia* sp).



**Extracto metanólico**



**Extracto Hexánico**

- ▶ Del extracto metanólico se determinaron, mediante pruebas fitoquímicas, la presencia de Alcaloides, Flavonoides, Glucósidos cianogenéticos, Azúcares reductores, Cumarinas, Saponinas, Taninos, Quinonas, Glucósidos Cardicos y Lactonas Sesquiterpénicas.<sup>13, 14</sup>

<b>ALCALOIDES</b>	
Reactivo de Dragendorff	(+) pp. Naranja
Reactivo de Mayer	(-)
Ácido Silicotúngstico	(+) pp. Amarillento
Reactivo Wagner	(-)
<b>FLAVONOIDES</b>	
Auronas o Chalconas	(-)
Flavonas	(+) pp. Amarillo rojo
Flavonoles	(-)
Flavononas	(-)
Antocianinas	(-)
Xantonas	(+) pp. Amarillo rojo
Flavonoles	(-)
<b>GLUCOSIDOS CIANOGENÉTICOS</b>	
Picrato de sodio	(-)

<b>AZÚCARES REDUCTORES</b>	
Reactivo de Fehling	(-)
Reactivo de Benedict	(-)
<b>SAPONINAS</b>	
Estabilidad de espuma	(-)
Reacción de Liebermann Buchard	(-)
Reacción de Rosenthaler	(-)
<b>TANINOS</b>	
Reactivo de gelatina	(-)
FeCl <sub>3</sub> al 11%	(+) Derivado de catecol, compuesto fenólico
<b>QUINONAS</b>	
Antraquinonas	(-)
<b>CUMARINAS</b>	
Reacción de Erlich	(+) Coloración Naranja
Reacción con NH <sub>4</sub> OH	(+) Fluorescencia azul-violeta
<b>GLUCOSIDOS CARDIACOS</b>	
Reactivo de Baljet	(+) Coloración Naranja-rojo oscuro
Reactivo Kedde	(-)
<b>SESQUITERPENLACTONAS</b>	
Reacción con Fe(OH) <sub>3</sub>	(-)

- ▶ El macerado metanólico se separó por cromatografía en columna y se obtuvieron 10 fracciones de las cuales se analizaron 2, las cuales parecían tener un solo componente mayoritario, la fracción 1 y 5.
- ▶ Se colectaron 10 fracciones de 20 mL y se llevo a cabo el análisis de las fracciones 1 y 5 debido a que presentaban un componente mayoritario en Cromatografía en capa fina, y las demás fracciones presentaban varios compuestos muy diluidos.

### **Análisis de los extractos**

- ▶ De la fracción 1 podemos observar en el espectro de RMN H<sup>1</sup> señales para protones alifáticos entre 0 y 2.5 ppm., protones base de oxígeno entre 2.8 y 3.7ppm., protones vinílicos 3.9 y 5 ppm., y protones aromáticos entre 7 y 8 ppm. En el caso del espectro de RMN <sup>13</sup>C se confirman los carbonos

carbonílicos entre 170 y 180 ppm, carbonos aromáticos entre 120 y 140 ppm y los carbonos alifáticos entre 10-40 ppm.

- ▶ En la fracción 5 se pueden observar en el espectro de RMN  $H^1$  señales para protones alifáticos entre 0 y 2.5 ppm., protones base de oxígeno 2.6 y 3.0 ppm., protones vinílicos entre 3.5 y 5.0 ppm., y protones aromáticos entre 6.5 y 8.2 ppm en una mayor proporción en comparación a la fracción 1. En el espectro de RMN  $^{13}C$  se observan del mismo modo señales para carbonos alifáticos entre 0 y 45 ppm., base de oxígeno 50 y 75 ppm., y aromáticos entre 120 y 140 ppm.
- ▶ El análisis a priori de estas dos fracciones evidencio la presencia, en la fracción 1, de compuestos hidrocarbonatos de tipo esférico. En la fracción 5 se puede notar la presencia de derivados aromáticos asociados a un azúcar, lo cual es evidente por la señal de carbono ubicada entre 61 y 73 ppm.
- ▶ El espectro IR de la fracción 1 denotó la presencia de cadenas hidrocarbonadas con absorción en 2855 y 2926  $cm^{-1}$ .
- ▶ En la fracción 5 el espectro IR confirmo la presencia de derivados aromáticos (absorción =C-H aromáticos) con la señal ubicada en 1900  $cm^{-1}$ , además de la absorción del estiramiento O-H ubicada en 3350  $cm^{-1}$ .

## 2.7 CONCLUSIONES

- Dentro del análisis fitoquímico que se llevo a cabo se identificó la presencia de compuestos de interés como fueron: alcaloides, flavonoides, taninos cumarinas y glucosidos cardiacos.
- El análisis de las dos fracciones mayoritarias del extracto metanólico de Opuntia choya ha revelado la presencia de compuestos esteroidales en la fracción 1 y derivados aromáticos asociados a azucares en la fracción 5.

## 2.8 PARTE EXPERIMENTAL

### 2.8.1 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO METANÓLICO

- Se trabajó con la raíz de *Opuntia umbricata*, la cual se secó a temperatura ambiente.
- Después, de que se logró secar al máximo, se fragmentó y se pesaron aproximadamente 1 Kg de esta.
- Se colocó en un matraz bola de vidrio, de aproximadamente 5 L de volumen, y se le agregaron 4 L de metanol.
- Se tapó y se dejó reposar por 30 días. Posteriormente se filtro el macerado y se evaporó el metanol a presión reducida, en un rotavapor.
- Se obtuvieron aproximadamente 5 g de un residuo semisólido, se tomó una muestra de este y se preparó una muestra para RMN de  $^1\text{H}$ .

### 2.8.2 ANÁLISIS FITOQUÍMICO

El análisis fitoquímico se llevo a cabo empleando el extracto metanólico y siguiendo el protocolo:

#### ALCALOIDES

Se tomaron 5 mL del extracto metanólico y se le adicionaron 10 mL de HCl al 10%, se calentó a ebullición por 5 minutos, se enfrió y se filtro. Este filtrado claro, transparente (no incoloro) se coloco en tubos de ensaye. Uno de los tubos sirvió como testigo negativo para comparar los cambios que se observaban en los tubos donde se realizaron las reacciones. Cada tubo contenía aproximadamente 1 mL del extracto.

Tubo 1. Se le adicionó una gota de reactivo Dragendorff y se formó un precipitado naranja indico presencia de alcaloides.

Tubo 2. Se le adicionó una gota de reactivo de ácido silicotúgstico y se formó un precipitado blanco amarillento indicativo de presencia de alcaloides.

#### FLAVONOIDES

A 0.5 mL del extracto metanólico se le adicionaron 1.5 mL de metanol y se dividió en 3 tubos, de los cuales sirvió como testigo negativo.

Tubo 1. Reacción de Shinoda. Se le adicionaron dos gotas de HCl concentrado, como no se observo cambio se adiciona un trocito de magnesio metálico y se observo un precipitado naranja que indicó la presencia de flavonas.

Tubo 2. Se adicionaron tres gotas de NaOH al 10% y se observó a aparición de un precipitado naranja que indicó la presencia de xantonas y flavonas.

#### TANINOS

A un mL del extracto se le adicionaron 2 mL de agua más tres gotas de NaCl al 2 %, se calentó a ebullición por 1 min, se enfrió y se filtró. El filtrado se colocó en tubos de ensaye uno sirvió como testigo negativo.

Tubo 1. Se le adicionó una gota de  $\text{FeCl}_3$  al 1%, en donde se observo una coloración verde que indicó la presencia de compuestos derivados del catecol, posteriormente se le adicionó 1 gota de  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  al 1 %, se observó una coloración azul que indicó la presencia de compuestos fenólicos.

#### CUMARINAS

Reacción de Erlich. 0.5 mL del extracto metanólico se colocaron en una capsula de porcelana, se concentró y se añadió dos gotas del reactivo de Erlich y una gota de

HCl concentrado, se presento una coloración naranja que nos indicó la presencia de cumarinas.

Reacción con  $\text{NH}_4\text{OH}$ . Se concentró otra porción del extracto y se le adicionaron 0.5 mL de etanol más dos gotas de  $\text{NH}_4\text{OH}$  concentrado, presentándose una fluorescencia azul-violeta indicativa de cumarinas.

## GLUCÓSIDOS CARDIACOS

Se transfirió a una capsula de porcelana 2 mL del extracto y se concentró hasta la tercera parte de su volumen original y se colocó en una placa muesca. Se le adicionó tres gotas del reactivo de Baljet, se formó una coloración naranja-rojiza indicativa de glucósidos.

### 2.8.2 SEPARACIÓN DE LOS COMPONENTES DEL EXTRACTO METANÓLICO

- Se procedió a eliminar las trazas de humedad en el semisólido agregándole acetona para arrastrar los residuos de agua, posteriormente también se empleó una bomba de alto vacío.
- Después de que se determinó que estaba libre de humedad, el residuo semisólido, se disolvió aproximadamente un gramo de este en 10 mL de metanol, grado HPLC.
- Posteriormente se le agregó 5 g de sílica gel, para que se adsorbiera, y se eliminó el metanol a presión reducida.
- Se preparó una columna con 60 g de sílica gel, de 30 cm de longitud y 2.5 cm de diámetro interno, siendo la primer fase móvil cloruro de metileno.
- Ya que se tenía la sílica seca con el residuo adsorbido se humectó con cloruro de metileno para posteriormente agregarla a la columna.

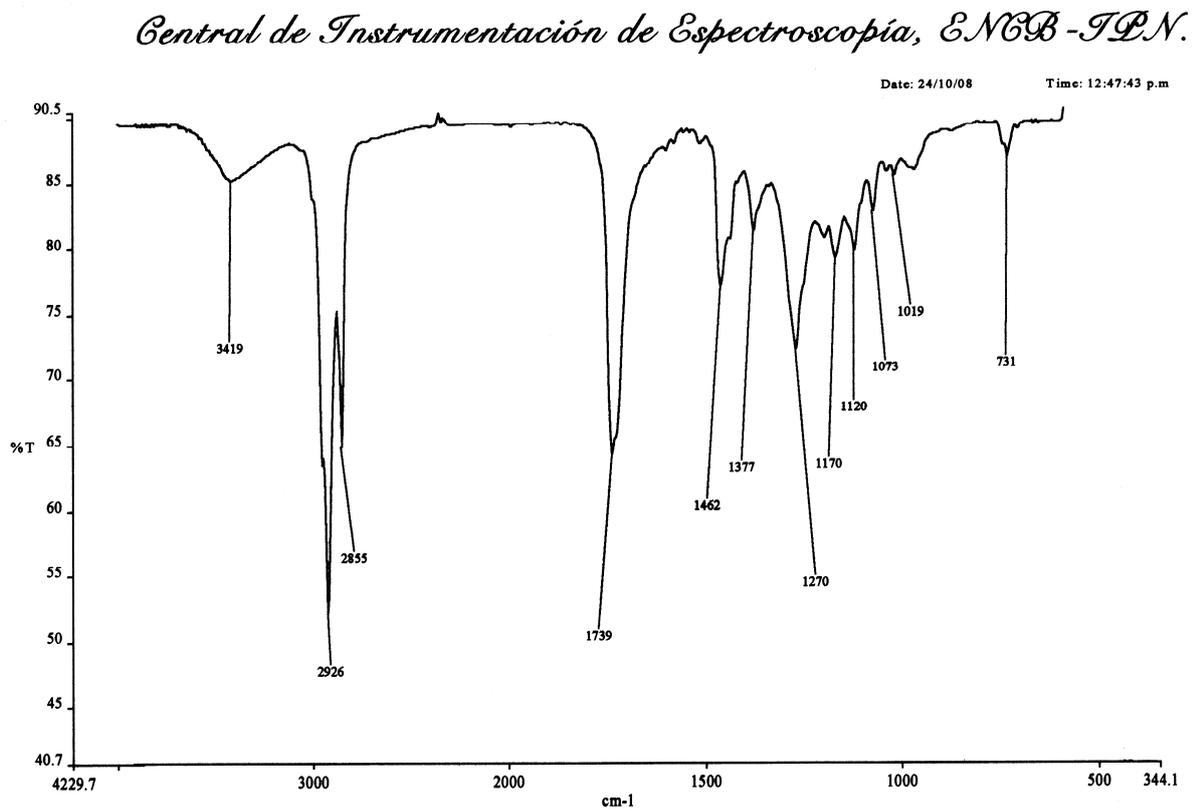
- Las fases móviles que se emplearon fueron: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 200 mL, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> / AcoEt 9:1 (100 mL), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> / AcoEt 8:2 (150 mL), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> / AcoEt 7:3 (100 mL), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> / AcoEt 1:1 (200 mL), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> / AcoEt 3:7 (200 mL), AcoEt (300 mL).
- Se obtuvieron 40 fracciones y se analizaron de las cuales se hizo el análisis espectroscópico y espectrométrico.

## 2.9 REFERENCIAS

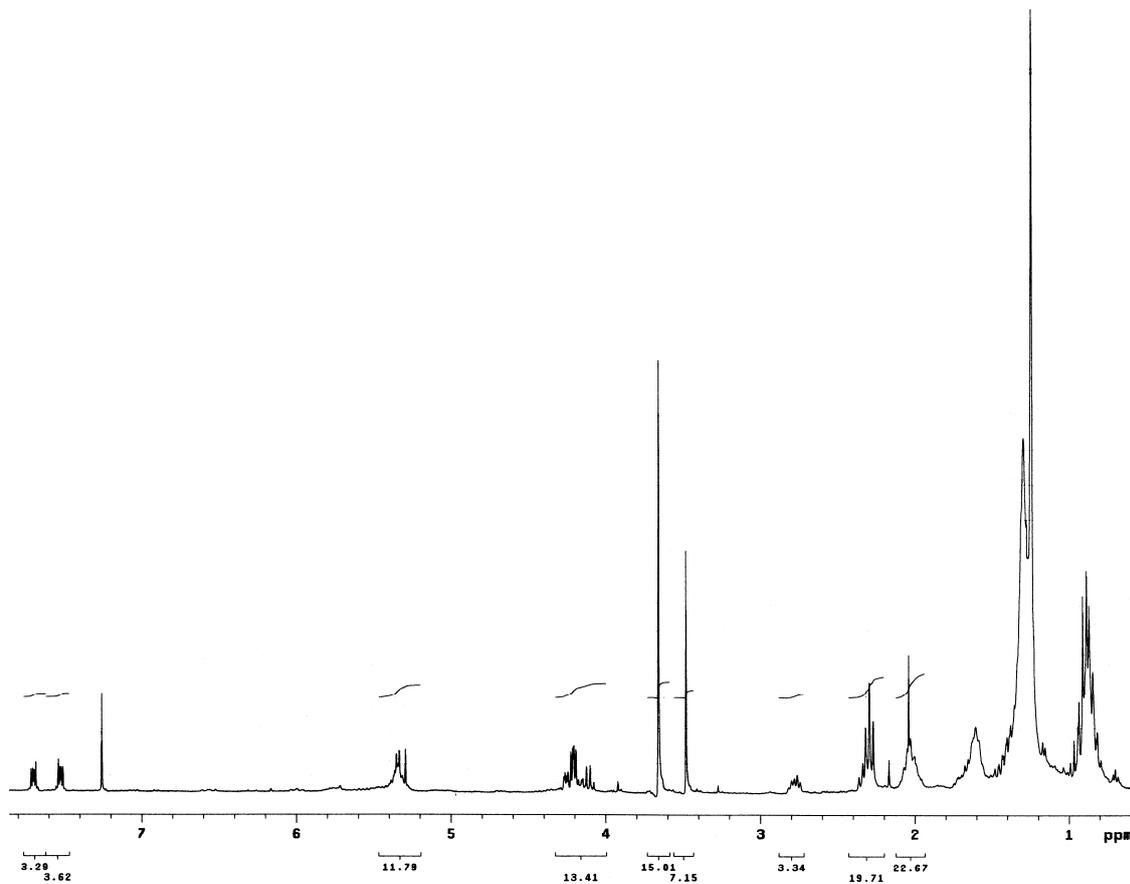
1. E. M. K. Wijeratne, T. J. Turbyville, A. Fritz, L. Whitesell, A. A. L. Gunatilaka, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2006**, 14 (23), 7917-7923
2. R. Vazquez-Ramirez , M. Olguin-Martinez , C. Kubli-Garfias , R. Hernandez-Munoz, *World Journal of Gastroenterology*, **2006**, 12 (27), 4318-4324
3. P. S. Oh, K. T. Lim, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. **2006**, 29 (7), 1391-6
4. Ahmed MS, El Tanbouly ND, Islam WT, Sleem AA, El Senousy AS, *Phytotherapy Research*, **2005**,19 (9), 807-809
5. R. Saleem, M. Ahmad, A. Azmat, S. I. Ahmad, Z. Faizi, L. Abidi, S. Faizi, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, **2005**, 28 (10), 1844-1851
6. Ennouri M, Fetoui H, Bourret E, Zeghal N, Attia H, *Bioresource Technology*. **2006**, 97(12), 1382-1386
7. F. C. Stintzing, K. M. Herbach , M. R. Mosshammer , R. Carle , W. Yi , S. Sellappan , C. C Akoh , R. Bunch , P. Felker, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2005**, 53 (2), 442-451
8. D. Faldmo, M. Stephan, S. T. Boyd, D. M. Scott, *Oficial Journal of the American Academy of Physician Assistants*, **2004**, 17 (11), 35-36
9. L. Tesoriere, D. Butera, A. M. Pintaudi, M. Allegra, M. A. Livrea, *The American Journal Clinical Nutrition*, **2004**, 80 (2), 391-395
- 10.V. Aires, S. Adote, A. Hichami, K. Moutairou, E. S. Boustani, N. A. Khan, *Molecular and Cellular Biochemistry*, **2004**, 260 (1-2), 103-110
- 11.R. Encarnación-Dimayuga, G. Contreras, *Rev. Méd. IMSS (Méx.)*, **1992**, 30, 297-306
- 12.R. Encarnación-Dimayuga, M. Virgen, N. Ochoa, *Pharmaceutical Biology*, **1998**, 36 (1), 33-43.
- 13.O. Lock, 2ª Ed., Perú Pontificia Universidad Católica del Perú Fondo editorial, **1994**
- 14.Wagner, H. S. Bladt, E.M. Zgainski, Germany: Springer-Verlag, **1984**
- 15.P. F. Quer, *Plantas medicinales*, Edit. Labor, S. A., 6ª Ed., **1980**, 161-165

16. J. A. M. Chavez, N. Balagurusamy, J. Rodriguez-Martinez, Engineering in Life Sciences, 2008, 8 (4), 425-430.
17. I. A. Schepetkin, G. Xie, N. K. Liliya, K. A. Robyn, A. J. Mark, Q. T. Mark, International Immunopharmacology, 2008, 8 (10), 1455-1466
18. X. A. Domínguez, Métodos de investigación fitoquímica, Edit. Limusa S. A., México D. F., **1973**

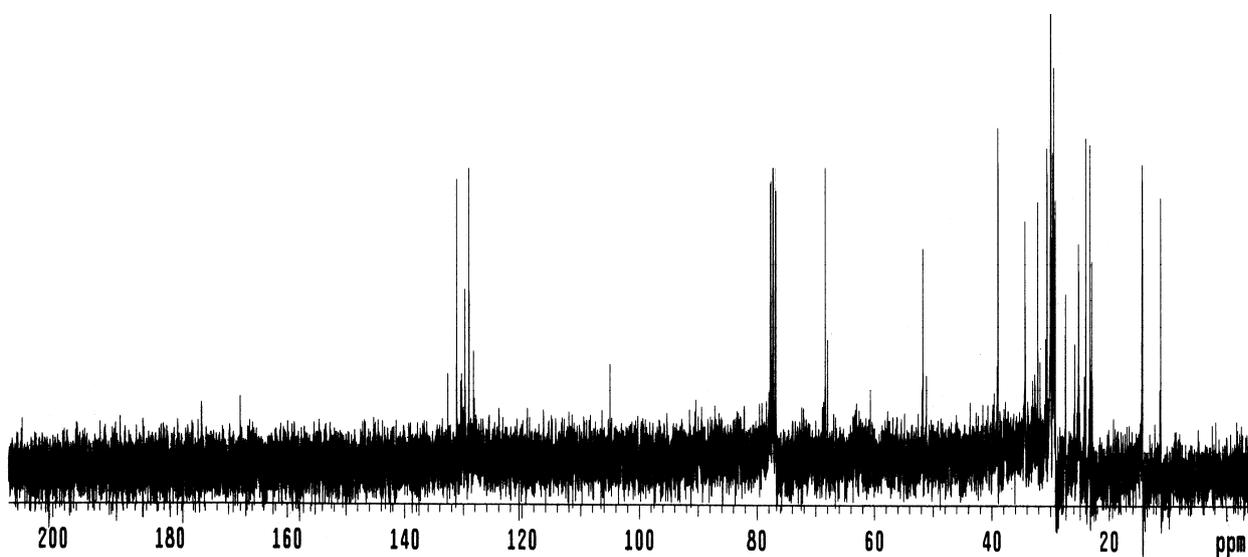
## 2.10 ESPECTROS



Espectro 37 de IR- Fracción 1

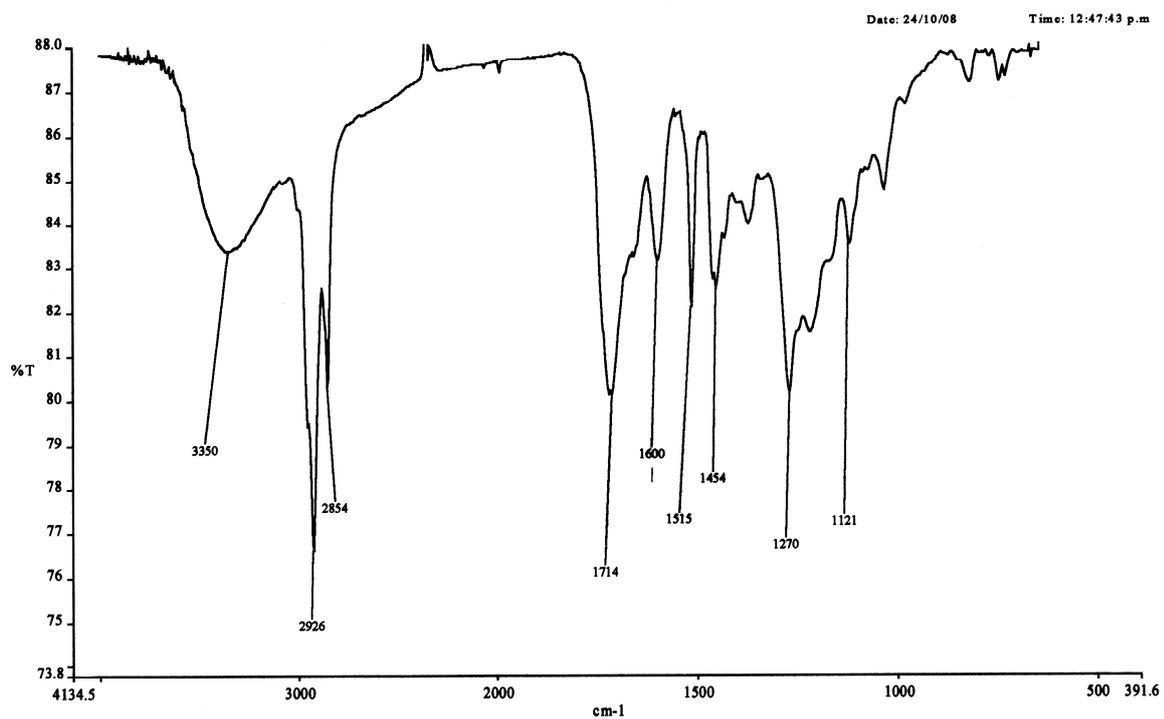


Espectro 38 de RMN H<sup>1</sup>- Fracción 1

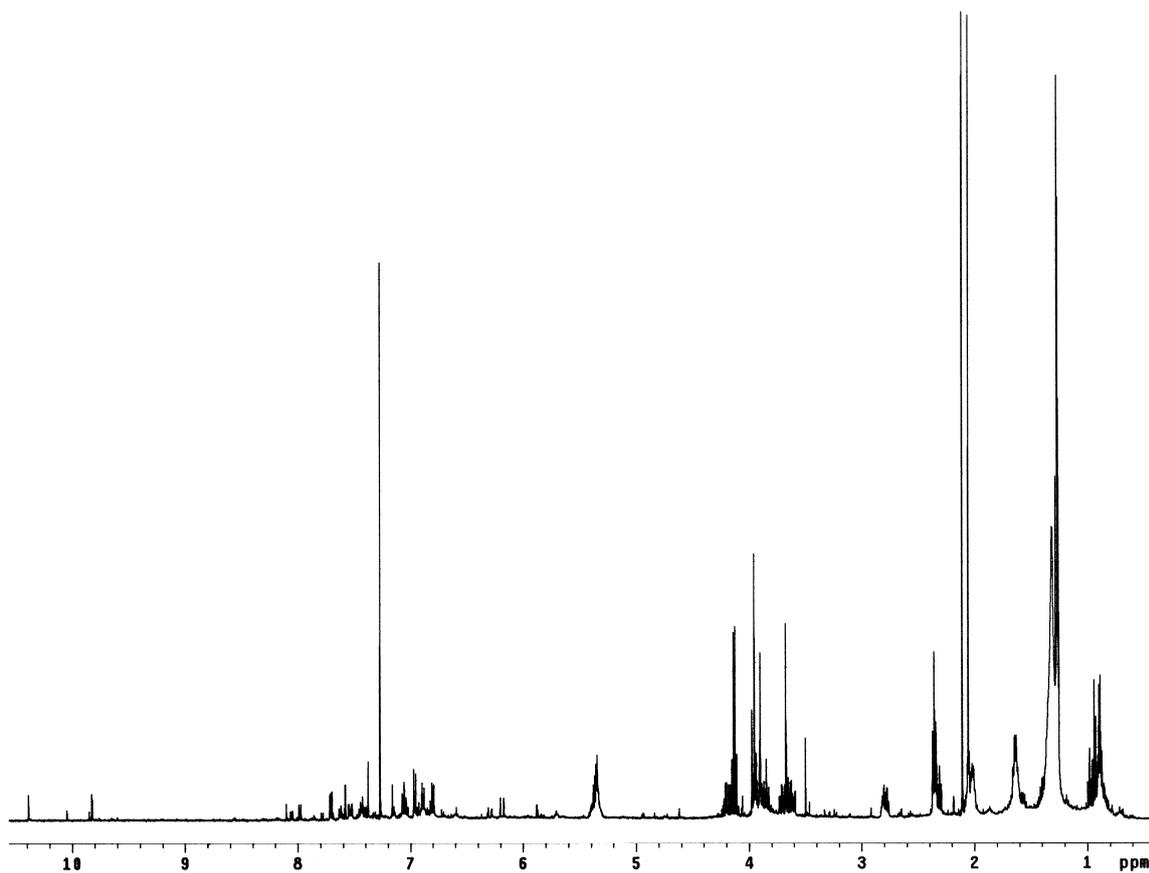


Espectro 39 de RMN  $^{13}\text{C}$ - Fracción 1

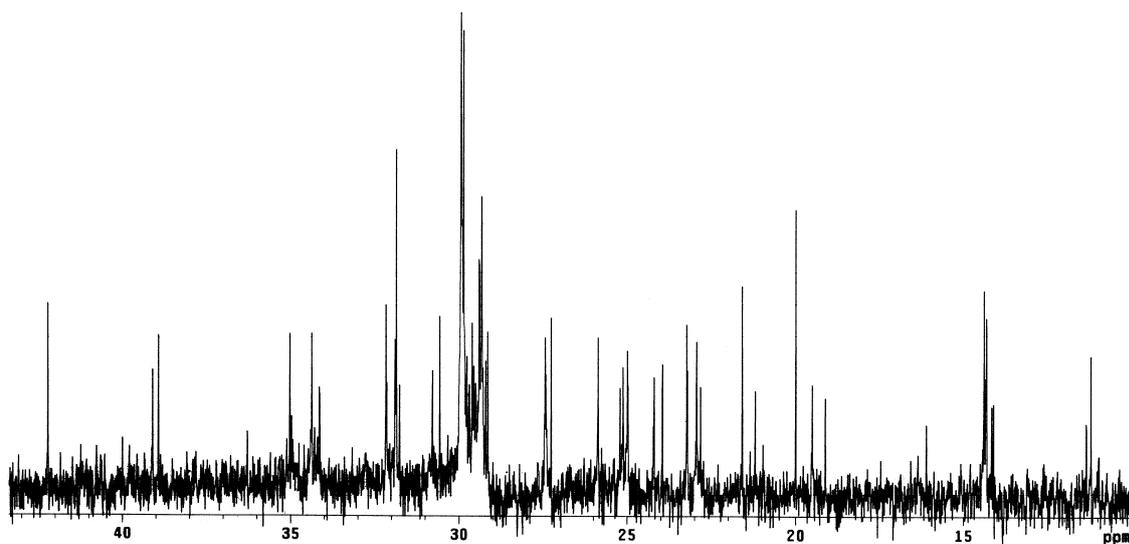
*Central de Instrumentación de Espectroscopía, ENCB-IPN.*



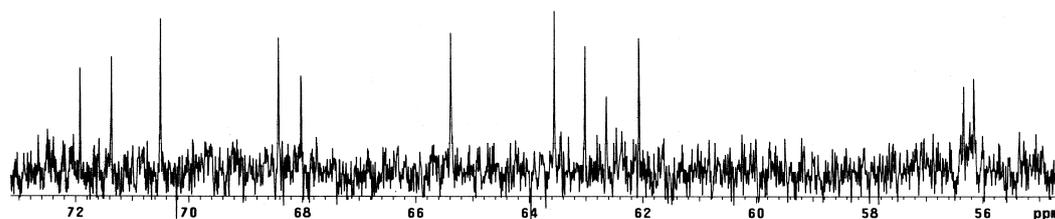
Espectro 40 de IR- Fracción 5



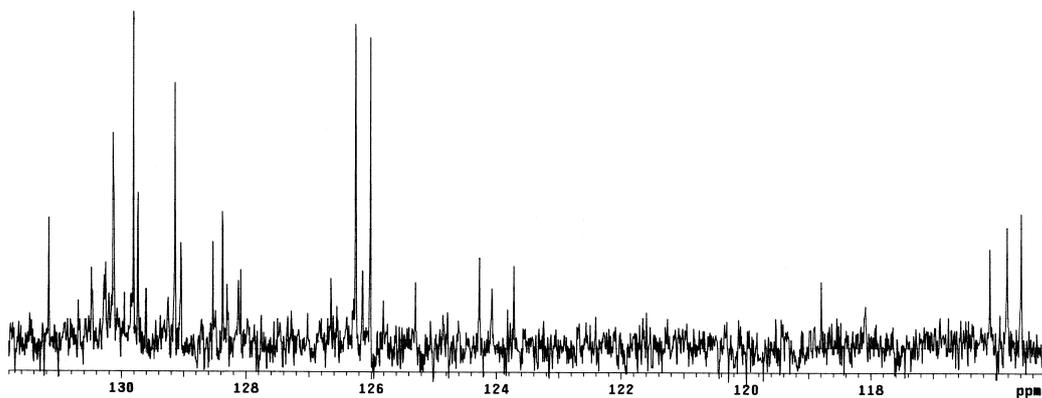
Espectro 41 de RMN <sup>1</sup>H- Fracción 5



Espectro 42 de RMN  $^{13}\text{C}$ - Fracción 5, Zona de alifáticos



Espectro 42' de RMN  $^{13}\text{C}$ - Fracción 5, Zona de bases de oxígeno



Espectro 42'' de RMN  $^{13}\text{C}$ - Fracción 5, Zona de aromáticos