



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS  
QUÍMICAS

ESTUDIO FITOQUÍMICO DE *Wigandia urens*  
(HYDROPHYLLACEAE)

TESIS  
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

**Q.I. JUAN CAMILO VARGAS GALLEGO**

**TUTOR: Dr. LEOVIGILDO QUIJANO**  
INSTITUTO DE QUÍMICA

MÉXICO, D.F. MAYO DE 2014

Este trabajo se desarrolló en el laboratorio 2-6 del Instituto de Química de la UNAM bajo la asesoría del Doctor Leovigildo Quijano.

Este trabajo fue presentado en los siguientes eventos en la modalidad de cartel:

9<sup>na</sup> Reunión Internacional de Investigación de Productos Naturales Dra. Luisa Urania Román Marín realizada en Pachuca-Hidalgo entre el 29-31 de mayo de 2013.

QuimiUNAM realizado entre el 13-15 noviembre de 2013.

Simposio Interno del Instituto de Química realizado entre el 15-17 de enero de 2014.

## DEDICATORIA

*A mi madre Ofelia y mis hermanas Melisa y Vanessa las cuales han sido la luz en los momentos más difíciles y la guía para llevar un buen camino.*

*A la memoria de mis tias Aura y María Cristina las cuales me brindaron el amor de una madre.*

*A toda mi familia que siempre me acompaña desde la distancia.*

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Leovigildo Quijano por su asesoría y paciencia, por brindarme la oportunidad de trabajar junto a él, enseñarme el gusto por la investigación, además de todas sus enseñanzas a nivel académico y personal.

A los jurados Dra. Rachel Mata, Dr. Rogelio Pereda, Dr. Mariano Martínez, M. en C. Emma Maldonado y Dra. Yolanda Rios por sus correcciones, disposición y sugerencias en pro de mejorar la calidad del trabajo.

A la Q. Ma. De los Ángeles Peña, la M. en C. Elizabeth Huerta, el M. en C. Héctor Ríos, la Dra. Beatriz Quiroz y el Dr. Rubén Gaviño por la determinación de los espectros de RMN. Al Ing. Q. Luis Velasco y al Dr. Francisco Javier Pérez por al determinación de los espectros de masas. A la Q.F.B. Rocio Patiño por la determinación de los espectros de IR, Rotación óptica, UV y dicroísmo circular. Al M. en C. Antonio Nieto Camacho y la M. en C. Maria Teresa Ramírez Apan por los resultados de pruebas biológicas, por su asesoría y enseñanzas.

Al CONACYT por la beca otorgada con número de becario: 475926

Al Instituto de Química, al Posgrado en Ciencias químicas y a la UNAM, ya que me brindaron la oportunidad de realizar los estudios de posgrado y de compartir experiencias muy satisfactorias en mi proceso de formación.

A mi novia Catalina Frias por su apoyo incondicional durante este tiempo.

A mis amigos que están cerca y los que me acompañan en la distancia, con los que se han compartido gratos momentos.

Y a todo aquel que haya ayudado de alguna manera en la realización de este trabajo.

## CONTENIDO

|   |    |
|---|----|
| RESUMEN   | 1  |
| ABSTRACT  | 3  |
| INTRODUCCIÓN  | 4  |
| GENERALIDADES   | 5  |
| ○ Taxonomía, descripción botánica y distribución de <i>Wigandia urens</i> | 5  |
| ○ Antecedentes químicos de la familia Hydrophyllaceae                     | 8  |
| ○ Estructura y actividad biológica de compuestos fenólicos prenilados     | 9  |
| JUSTIFICACIÓN   | 14 |
| OBJETIVOS   | 15 |
| ○ Generales   | 15 |
| ○ Específicos   | 15 |
| PARTE EXPERIMENTAL  | 16 |
| ○ Materiales y métodos  | 16 |
| ○ Equipos utilizados  | 16 |
| ○ Preparación de los extractos  | 17 |
| ○ Aislamiento y purificación  | 18 |
| ○ Preparación de derivados  | 31 |
| ○ Pruebas biológicas  | 32 |
| ○ Compuestos aislados   | 34 |
| ○ Derivados obtenidos   | 36 |
| ○ Resumen datos espectroscópicos  | 37 |
| DISCUSIÓN DE RESULTADOS   | 39 |
| ○ Identificación espectroscópica  | 39 |
| ○ Pruebas biológicas  | 84 |
| CONCLUSIONES  | 88 |
| BIBLIOGRAFÍA  | 89 |
| ANEXOS  | 96 |

## LISTA DE CUADROS

|  |    |
|--|----|
| Cuadro 1. Sinonimia de <i>Wigandia urens</i> .   | 6  |
| Cuadro 2. Fracciones primarias obtenidas del extracto hexánico (Wu-Hx).                        | 18 |
| Cuadro 3. Fracciones secundarias obtenidas de la recromatografía de la fracción Wu-Hx-H.       | 19 |
| Cuadro 4. Fracciones secundarias obtenidas de la recromatografía de la fracción Wu-Hx-I.       | 20 |
| Cuadro 5. Fracciones terciarias obtenidas de la recromatografía de la fracción Wu-Hx-IB.       | 21 |
| Cuadro 6. Fracciones secundarias obtenidas de la recromatografía de la fracción Wu-Hx-J.       | 22 |
| Cuadro 7. Fracciones secundarias obtenidas de la recromatografía de la fracción Wu-Hx-K.       | 23 |
| Cuadro 8. Fracciones primarias obtenidas del extracto de diclorometanico (Wu-DCM).             | 24 |
| Cuadro 9. Fracciones secundarias obtenidas de la recromatografía de la fracción Wu-DCM-C.      | 25 |
| Cuadro 10. Fracciones secundarias obtenidas de la recromatografía de la fracción Wu-DCM-F.     | 26 |
| Cuadro 11. Fracciones secundarias obtenidas de la recromatografía de la fracción Wu-DCM-G.     | 27 |
| Cuadro 12. Fracciones primarias obtenidas del extracto acetónico (Wu-Ace).                     | 28 |
| Cuadro 13. Fracciones secundarias obtenidas de la recromatografía de la fracción Wu-Ace-F-AcO. | 29 |
| Cuadro 14. Fracciones primarias obtenidas del extracto metanolico (Wu-MeOH).                   | 30 |

## LISTA DE TABLAS

|   |    |
|---|----|
| Tabla 1. Datos espectroscópicos de RMN (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) para el compuesto <b>1</b> .   | 43 |
| Tabla 2. Datos comparativos de RMN <sup>1</sup> H en CDCl <sub>3</sub> entre el compuesto <b>1</b> y <b>1a</b> aislado de <i>P. ixodes</i> .  | 45 |
| Tabla 3. Datos espectroscópicos de RMN (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) del compuesto <b>2</b> .   | 49 |
| Tabla 4. Datos espectroscópicos de RMN en CDCl <sub>3</sub> para el desacetilwigandol ( <b>3</b> ).   | 54 |
| Tabla 5. Datos comparativos del desacetilwigandol aislado y el producto de reducción de la globiferina en acetona-d <sub>6</sub> .  | 55 |
| Tabla 6. Datos comparativos de RMN en CDCl <sub>3</sub> de la globiferina aislada de <i>W. urens</i> y el compuesto de <i>Cordia globifera</i> .  | 57 |
| Tabla 7. Datos de RMN <sup>1</sup> H en CDCl <sub>3</sub> de los benzociclododecadienos aislados de <i>W. urens</i> .   | 58 |
| Tabla 8. Datos comparativos de RMN <sup>13</sup> C de los benzociclododecadienos aislados.  | 59 |
| Tabla 9. Datos espectroscópicos de RMN a 400 MHz en CDCl <sub>3</sub> para el compuesto <b>4</b> y el compuesto aislado de <i>Cordia alliodora</i> .                                      | 62 |
| Tabla 10. Datos de RMN <sup>1</sup> H y RMN <sup>13</sup> C de la rhamnazina aislada de <i>W. urens</i> y la obtenida de <i>G. repens</i> en CDCl <sub>3</sub> y acetona-d <sub>6</sub> . | 66 |
| Tabla 11. Datos comparativos del compuesto ( <b>17</b> ) y el compuesto aislado de <i>I. warburgii</i> en D <sub>2</sub> O.   | 73 |
| Tabla 12. Datos comparativos de los peracetatos del compuesto aislado de <i>W. urens</i> y del compuesto de <i>I. warburgii</i> sintético en CDCl <sub>3</sub> .                          | 75 |
| Tabla 13. Datos espectroscópicos de RMN en D <sub>2</sub> O para <sup>1</sup> H (400 MHz) y <sup>13</sup> C (100 MHz) para el compuesto <b>17</b> .                                       | 76 |
| Tabla 14. Datos espectroscópicos de RMN en DMSO-d <sub>6</sub> para <sup>1</sup> H (400 MHz) y <sup>13</sup> C (100 MHz) para el compuesto <b>17</b> .                                    | 77 |
| Tabla 15. Datos espectroscópicos de RMN 400 MHz en CDCl <sub>3</sub> para las verapliquinonas A y B.  | 79 |

|  |    |
|--|----|
| Tabla 16. Datos espectroscópicos de RMN 400 MHz en C <sub>6</sub> D <sub>6</sub> para las verapliquinonas A y B. | 80 |
| Tabla 17. Tabla comparativa de los compuestos aislados de <i>W. urens</i> .                                      | 83 |
| Tabla 18. Evaluación preliminar de la actividad captadora del radical DPPH.                                      | 84 |
| Tabla 19. Valores de IC <sub>50</sub> de los tres compuestos evaluados y los estándares.                         | 85 |
| Tabla 20. Evaluación preliminar de la actividad inhibitoria de la proliferación celular.                         | 86 |
| Tabla 21. Evaluación preliminar de la actividad antiinflamatoria.  | 87 |



## LISTA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| Figura 1. <i>Wigandia urens</i> , ejemplar en el Campus UNAM   | 6  |
| Figura 2. Flores y tallos de <i>W. urens</i> .   | 7  |
| Figura 3. Tricomas presentes en tallos y hojas.  | 7  |
| Figura 4. Compuestos fenólicos prenilados aislados de especies de los géneros <i>Phacelia</i> y <i>Wigandia</i> .                  | 8  |
| Figura 5. Compuestos fenólicos prenilados aislados de especies del género <i>Nama</i> .  | 8  |
| Figura 6. Flavonoides aislados de especies de la familia Hydrophyllaceae.  | 9  |
| Figura 7. Prenilquinona ( <b>XXIV</b> ), prenilhidroquinona ( <b>XXV</b> ), y 6-hidroxi-2,2-dimetilcromeno ( <b>XXVI</b> ).        | 10 |
| Figura 8. Geranilhidroquinona ( <b>XXVII</b> ), geranilbenzoquinona ( <b>XXIX</b> ) y derivados con actividad citotóxica.          | 10 |
| Figura 9. Longitoronas y longitoroles de <i>Aplidium longithorax</i> .   | 11 |
| Figura 10. Derivados cíclicos de la geranilhidroquinona ( <b>XXVII</b> ) aislados del hongo <i>Tricholoma terreum</i> .            | 11 |
| Figura 11. Farnesilhidroquinona ( <b>XLIV</b> ) y derivados de la geranilhidroquinona ( <b>XXVII</b> ) con actividad antioxidante. | 12 |
| Figura 12. Flavidulol A ( <b>XLV</b> ) y sus derivados dihidro y tetrahidro.   | 12 |
| Figura 13. Globiferina ( <b>XLVIII</b> ) y sus derivados bioactivos.   | 13 |
| Figura 14. Wigandol ( <b>LI</b> ).   | 13 |
| Figura 15. Sorgoleona ( <b>LII</b> ).  | 13 |
| Figura 16. Esquema de extracción.  | 17 |
| Figura 17. Representación de los protones aromáticos del anillo tetrasustituido en el espectro de protón del compuesto <b>1</b> .  | 39 |
| Figura 18. Correlaciones observadas en el experimento COSY del geranilo.   | 40 |

|  |    |
|--|----|
| Figura 19. Efecto NOE observado entre el protón aromático H-6 y el metoxilo.   | 41 |
| Figura 20. Efectos NOE observados en el protón aromático H-2 y determinación de la configuración <i>E</i> del doble enlace 2' del compuesto <b>1</b> . | 41 |
| Figura 21. Correlaciones $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ observadas en el espectro HMBC del compuesto <b>1</b> .  | 42 |
| Figura 22. Fragmentos de masas del compuesto <b>1</b> .  | 44 |
| Figura 23. Isómero <b>1a</b> aislado de <i>Phacelia ixodes</i> .   | 44 |
| Figura 24. Patrón de sustitución del anillo aromático en el compuesto <b>2</b> .   | 46 |
| Figura 25. Correlaciones NOE observadas entre el anillo aromático y el doble enlace <i>Z</i> .   | 47 |
| Figura 26. Efectos NOE observados en la cadena prenilada y determinación de la configuración <i>E</i> del doble enlace C-6'.                           | 47 |
| Figura 27. Correlaciones HMBC entre los protones del doble enlace <i>cis</i> y los carbonos del anillo aromático.                                      | 48 |
| Figura 28. Correlaciones HMBC entre los protones a dos y tres enlaces con el carbono cuaternario base de oxígeno.                                      | 48 |
| Figura 29. Estructura compuesto ( <b>2</b> ).  | 48 |
| Figura 30. Fragmentos del espectro de masas por IE del compuesto ( <b>2</b> ).   | 50 |
| Figura 31. Correlaciones $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ en el experimento COSY del desacetilwigandol.   | 51 |
| Figura 32. Efecto NOE entre el metilo 15 y el protón vinílico H-7 que establece la configuración <i>Z</i> del doble enlace en C-6.                     | 52 |
| Figura 33. Correlaciones $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ (HMBC) observadas en el desacetilwigandol ( <b>3</b> ).  | 53 |
| Figura 34. Fragmentos del espectro de masas por IE del desacetilwigandol ( <b>3</b> ).   | 53 |
| Figura 35. Flavidulol A ( <b>7</b> ), wigandol ( <b>12</b> ) y globiferina ( <b>9</b> ).   | 56 |
| Figura 36. Compuesto aislado de <i>Cordia alliodora</i> .  | 60 |
| Figura 37. Fragmentos del espectro de masas por IE del compuesto ( <b>4</b> ).   | 61 |
| Figura 38. Correlaciones NOE observadas en acetona- $\text{d}_6$ para la rhamnazina.   | 63 |
| Figura 39. Intercambio de protón por deuterio en los grupos OH al adicionar $\text{D}_2\text{O}$ .   | 64 |

|  |    |
|--|----|
| Figura 40. Efecto NOE entre los protones aromáticos del anillo A y el metoxilo.  | 64 |
| Figura 41. Efecto NOE entre el protón H-2' del anillo B y el metoxilo.   | 65 |
| Figura 42. Correlaciones observadas en el experimento NOESY para la rhamnazina.  | 65 |
| Figura 43. Correlaciones $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ en el compuesto <b>17</b> .   | 68 |
| Figura 44. Efecto NOE y configuración Z de los dobles enlaces y entre el protón anomérico H-1' y H-5, H-6.                               | 68 |
| Figura 45. Efecto NOE observado en los protones H-3, H-4, H-5 de la aglicona.  | 68 |
| Figura 46. Correlaciones HMBC del protón H-7 y del protón anomérico H-1'.  | 69 |
| Figura 47. Correlaciones $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ en el experimento HMBC del compuesto ( <b>17</b> ) en DMSO- $\text{d}_6$ .       | 69 |
| Figura 48. Fragmentación IE del compuesto <b>17</b> .  | 69 |
| Figura 49. Disteroisómeros del litospermósido encontrados en la literatura.  | 70 |
| Figura 50. a) Dicroísmo circular compuesto aislado <b>17</b> b) Dicroísmo circular litospermósido.                                       | 71 |
| Figura 51. a) Dicroísmo circular del compuesto aislado <b>17</b> y b) dicroísmo circular reportado para la dasycarponina ( <b>17b</b> ). | 72 |
| Figura 52. a) Dicroísmo circular del compuesto aislado <b>17</b> y b) dicroísmo circular reportado para la riachina ( <b>17c</b> ).      | 72 |
| Figura 53. Efectos NOE observados en las verapliquionas A y B.   | 81 |
| Figura 54. Fragmentos de masas de las verapliquionas A y B   | 82 |
| Figura 55. Análisis comparativo por CCF de la sacarosa aislada y una referencia.   | 82 |

## ABREVIATURAS

|                      |   |
|----------------------|---|
| CCF                  | Cromatografía en capa fina                      |
| CCFp                 | Cromatografía en capa fina preparativa          |
| pf                   | Punto de fusión                                 |
| IE                   | Impacto electrónico                             |
| EMIE                 | Espectrometría de masas por impacto electrónico |
| EMFAB                | Espectrometría de masas por FAB                 |
| FAB                  | Bombardeo átomos rápidos                        |
| m/z                  | Relación masa-carga                             |
| IR                   | Infrarrojo                                      |
| UV                   | Ultravioleta                                    |
| RMN- <sup>1</sup> H  | Resonancia Magnética Nuclear de hidrógeno       |
| RMN- <sup>13</sup> C | Resonancia Magnética Nuclear de carbono 13      |
| <i>J</i>             | Constante de acoplamiento                       |
| m                    | Señal múltiple                                  |
| s                    | Señal simple                                    |
| d                    | Señal doble                                     |
| t                    | Señal triple                                    |
| q                    | Señal cuadruple                                 |
| sa                   | Señal simple ancha                              |
| da                   | Señal doble ancha                               |
| dt                   | Señal doble de triples                          |
| ta                   | Señal triple ancha                              |

|                               |                               |
|-------------------------------|-------------------------------|
| tq                            | Señal triple de cuartetos     |
| dd                            | Señal doble de dobles         |
| CDCl <sub>3</sub>             | Cloroformo deuterado          |
| DMSO-d <sub>6</sub>           | Dimetilsulfóxido deuterado    |
| D <sub>2</sub> O              | Agua deuterada                |
| C <sub>6</sub> D <sub>6</sub> | Benceno deuterado             |
| Ac <sub>2</sub> O             | Anhídrido acético             |
| py                            | Piridina                      |
| α <sub>D</sub>                | Rotación óptica               |
| μM                            | Micromolar                    |
| μl                            | Microlitros                   |
| Hz                            | Hertz                         |
| MHz                           | Megahertz                     |
| msnm                          | Metros sobre el nivel del mar |

## RESUMEN

*Wigandia urens* es un arbusto perteneciente a la familia *Hydrophyllaceae*, que crece dentro del campus de la UNAM en la reserva ecológica conocida como Pedregal de San Ángel. El género *Wigandia* cuenta con una sola especie en el territorio mexicano y se han hecho pocos estudios de su composición química.

Con el objeto de contribuir al conocimiento químico de la especie, en la presente investigación se realizó el estudio fitoquímico de las hojas de *W. urens* lográndose aislar 18 metabolitos por técnicas cromatográficas convencionales y cuya caracterización estructural se hizo mediante técnicas espectroscópicas principalmente de Resonancia Magnética Nuclear en una y dos dimensiones, así como Espectrometría de Masas.

De los compuestos aislados, dos de ellos son compuestos novedosos en la literatura, la 1-*O*-acetil-3-geranil-5-metoxi-hidroquinona (**1**) y la 2-[(1*Z*,6*E*)-3-hidroxi-3,7,11-trimetildodeca-1,6,10-trien-1-il]-hidroquinona (**2**). Los compuestos **1** y **2** son derivados de la geranilhidroquinona (**10**) y farnesilhidroquinona (**11**) respectivamente, las cuales fueron aisladas previamente de la misma especie.<sup>11,45</sup>

Así mismo, se aislaron seis compuestos descritos por primera vez en esta especie, el benzociclododecadieno **3**, el cual se nombró como desacetilwigandol, previamente obtenido como producto de reducción de la globiferina (**9**) aislada de *Cordia globífera*,<sup>47</sup> la 2-[(1*Z*)-3-hidroxi-3,7,-dimetilocta-1,6-dienil]-hidroquinona (**4**) aislada previamente de *Cordia alliodora*,<sup>50</sup> además de la verapliquinona B (**5**) (en mezcla con la verapliquinona A (**6**)) aislada de una especie no identificada de anémoma del género *Aplidium*,<sup>49</sup> la rhamnazina (**16**) un flavonol aislado de *Gutierrezia repens*,<sup>51</sup> el 5-*epi*-litospermósido (**17**) un cianoglicósido obtenido por primera vez en la familia *Hydrophyllaceae* y aislado con anterioridad de *Ilex warburgii*,<sup>68</sup> además de la sacarosa (**18**) un metabolito con amplia distribución.

También, se aislaron diez compuestos obtenidos con anterioridad en de esta especie: la verapliquinona A (**6**) (en mezcla **5** y **6**),<sup>12</sup> el flavidulol A (**7**),<sup>45</sup> la 1-*O*-metil-2-geranilhidroquinona (**8**),<sup>45</sup> la globiferina (**9**),<sup>12</sup> la geranilhidroquinona (**10**), y la farnesilhidroquinona (**11**) mencionadas anteriormente,<sup>45</sup> el wigandol (**12**)<sup>11,12,13,45</sup> y su producto cíclico (**13**),<sup>12</sup> la genkwanina (**14**) y la cirsimaritina (**15**).<sup>12,13</sup>

Además se prepararon ocho derivados (**19-26**) de los compuestos aislados.

Finalmente del estudio fitoquímico de los cuatro extractos (hexánico, diclorometánico, acetónico y metanólico) se evaluó la actividad antioxidante de 13 compuestos (aislados y derivados). Los resultados indicaron que tres de estos compuestos tienen actividad atrapadora del radical DPPH comparable con los estándares: el desacetilwigandol (**3**), la geranilhidroquinona (**10**) y la rhamnazina (**16**). En cuanto a la actividad inhibitoria de la proliferación celular se observó que varios de los compuestos evaluados presentan buena actividad a 50  $\mu\text{M}$  por lo que se requieren estudios más detallados para determinar la  $\text{IC}_{50}$  y determinar su potencial.

## ABSTRACT

*Wigandia urens* is a shrub belonging to the Hydrophyllaceae family, growing at UNAM campus in the ecological reserve known as Pedregal de San Angel. Genus *Wigandia* has a single species in the Mexican territory, and there are only very few studies of its chemical composition.

In order to contribute to the chemical knowledge of the species, the phytochemical study of the leaves of *W. urens* was carried out. Eighteen metabolites were isolated, by conventional chromatographic techniques. The structural characterization by Nuclear Magnetic Resonance in one and two dimensions and by mass spectrometry technique was achieved.

1-*O*-acetyl-3-geranyl-5-methoxy-hydroquinone (**1**) and 2-[(1*Z*,6*E*)-3-hydroxy-3,7,11-trimethyldodeca-1,6,10-trien-1-yl]-hydroquinone (**2**) are novel compounds derived from geranylhydroquinone (**10**) and farnesylhydroquinone (**11**) respectively, and previously isolated from the *W. urens*.<sup>11,45</sup>

Moreover, six isolated compounds have not been described before in the species; the benzocyclodecadiene which was named as desacetylwigandol (**3**) was previously obtained as a result of reduction of globiferin (**9**) isolated from *Cordia globifera*,<sup>47</sup> 2-[(1*Z*)-3-hydroxy-3,7-dimethylocta-1,6-dienyl]-hydroquinone (**4**) isolated before from *Cordia alliodora*,<sup>50</sup> verapliquinone B (**5**) (as a mixture with verapliquinone A (**6**)) isolated from an unidentified anemone species of the genus *Aplidium*,<sup>49</sup> rhamnazin (**16**) a flavonol isolated from *Gutierrezia repens*,<sup>51</sup> 5-*epi*-lithospermoside (**17**) a cyanoglycoside obtained for the first time in the Hydrophyllaceae family and previously isolated from *Ilex warburgii*,<sup>68</sup> in addition to, sucrose (**18**) a metabolite that is found throughout the plant kingdom.

Ten compounds obtained previously in this species were also isolated: verapliquinone A (**6**),<sup>12</sup> flavidulol A (**7**),<sup>45</sup> 1-*O*-methyl-2-geranylhydroquinone (**8**)<sup>45</sup> globiferin (**9**),<sup>12</sup> geranylhydroquinone (**10**), farnesylhydroquinone (**11**),<sup>45</sup> wigandol (**12**)<sup>11,12,13,45</sup> the cyclic product **13**,<sup>12</sup> genkwanin (**14**) and cirsimaritin (**15**).<sup>12,13</sup> Derivatives **19-26** of the isolated compounds were obtained.

Antioxidant activity of 13 isolated compounds and derivatives was tested, three of them shown scavenging activity against DPPH radical comparable to standards: desacetylwigandol (**3**), rhamnazin (**16**) and geranylhydroquinone (**10**). The inhibitory activity of cell proliferation was also tested. Preliminary results shown good activity at 50  $\mu$ M. So that detailed studies are required to determine the IC<sub>50</sub> and determine their potential.



## INTRODUCCIÓN

La investigación en productos naturales provenientes de diferentes fuentes como plantas, organismos marinos, hongos y microorganismos, va en crecimiento, ya que el aislamiento y la purificación de éstos como una fuente de medicamentos o fármacos son eventos cada vez más recurrentes.<sup>1-3</sup>

Dentro del reino vegetal, la familia Hydrophyllaceae agrupa más de 20 géneros distribuidos en los cinco continentes. Entre estos, *Phacelia* es el género con mayor número de especies y el más estudiado desde el punto de vista químico.<sup>7,22,23,48</sup> *Nama*, otro género de la familia, cuenta con menos especies y estudios químicos. En ambos casos, las quinonas e hidroquinonas preniladas son los metabolitos más comunes en ambos géneros.

El género *Wigandia* cuenta con una sola especie dentro de la República Mexicana, la cual se reconoce como *W. urens*. De ésta, también existen pocos estudios químicos<sup>11,12,45</sup> en los cuales se ha descrito el aislamiento y la identificación del mismo tipo de meroterpenos (compuestos fenólicos prenilados), así como derivados cíclicos de éstos conocidos como benzociclododecadienos.

Las quinonas e hidroquinonas preniladas han mostrado una gran diversidad de actividades biológicas entre las cuales se pueden mencionar la antioxidante y citotóxica contra diversos tipos de líneas cancerosas.<sup>25,27,28,35</sup>

Tomando en consideración lo anterior, se decidió realizar el estudio fitoquímico de *W. urens* contemplando la posibilidad de evaluar posteriormente el potencial de acción biológico de los metabolitos aislados.

## GENERALIDADES

### Taxonomía, descripción botánica y distribución de *Wigandia urens*

En México existe una amplia diversidad biológica en especies vegetales, entre las que se encuentran las de la familia Hydrophyllaceae con más de 20 géneros distribuidos en los cinco continentes. Esta familia está constituida principalmente por especies herbáceas, arbustos y árboles pequeños. En la República Mexicana la familia se encuentra representada por tres géneros: *Phacelia*, *Nama* y *Wigandia*.<sup>9</sup>

El género *Wigandia* está conformado por seis especies: *W. urens*, la cual ha sido descrita con diferentes sinonimias (Cuadro 1), *W. crispera*, *W. wurdackiana*, *W. reflexa*, y dos especies que se publicaron recientemente, *W. ecuadorensis*<sup>18</sup> y *W. brevistyla*<sup>19</sup> recolectadas en Ecuador y República Dominicana, respectivamente. Este género se encuentra comúnmente en zonas perturbadas, mientras que las especies de *Phacelia* y *Nama* crecen frecuentemente cerca de cuerpos de agua, en zonas de bosque tropical caducifolio y en pastizales.<sup>15</sup> El género *Wigandia* se distribuye desde Norteamérica hasta Argentina y en algunos lugares de Asia. Algunos autores plantean que en México está representado por una sola especie *Wigandia urens*,<sup>9,15</sup> mientras otros afirman que se trata de dos especies diferentes *W. urens* y *W. caracasana*, las cuales se diferencian en la presencia o ausencia de setas (tricomas).<sup>16,17</sup>

#### Clasificación taxonómica:

REINO: Plantae

FAMILIA: Hydrophyllaceae

PHYLUM: Magnoliophyta

GÉNERO: *Wigandia*

CLASE: Magnoliopsida

ESPECIE: *Wigandia urens*

ORDEN: Solanales

Cuadro 1. Sinonimias de *Wigandia urens*.

| <b>Nombre</b>                                | <b>Autor</b>  |
|--|---|
| <i>Hidrolea urens</i>                        | Hipólito Ruiz y José Pavón                              |
| <i>Wigandia caracasana</i>                   | Karl Kunth  |
| <i>W. macrophylla</i>                        | Diederich F. Schlechtendal, Ludolf Karl A. von Chamisso |
| <i>W. kunthii</i>                            | Jaques Denys Choisy                                     |
| <i>W. scorpioides</i>                        | J.D. Choisy   |
| <i>W. kunthii</i> var. <i>macrophylla</i>    | Diederich F. Schlechtendal, Ludolf Karl A. von Chamisso |
| <i>Ernstamra urens</i>                       | Carl Kuntze   |
| <i>W. peruviana</i>                          | William Miller  |
| <i>W. kunthii</i> var. <i>eukunthii</i>      | August Brand  |
| <i>W. caracasana</i> var. <i>macrophylla</i> | A. Brand  |
| <i>W. kunthii</i> var. <i>intermedia</i>     | A. Brand  |
| <i>W. caracasana</i> var. <i>calycina</i>    | A. Brand  |
| <i>W. kunthii</i> var. <i>viscosa</i>        | A. Brand  |
| <i>W. caracasana</i> var. <i>viscosa</i>     | James McBride   |
| <i>W. urens</i> var. <i>caracasana</i>       | Dorothy Gibson  |

*Wigandia urens* es una planta erecta que puede alcanzar hasta seis metros de altura llegando a ser arborescente, con tallos hispídos a cerdosos, muchas veces con tricomas glandulares y urticantes (Fig. 1). Sus hojas alternas pueden alcanzar hasta 50 cm de largo por 37 cm de ancho con láminas ovaladas, ápice por lo general agudo o en ocasiones redondeado u obtuso. Las flores dispuestas en cimas escorpioideas, con cinco sépalos, estambres con filamentos, estigmas clavados y corolas externas de color moradas, violáceas, azules o lila-blancuecinas (Fig. 2).<sup>9,15</sup>



Figura 1. *Wigandia urens*, ejemplar en el Campus UNAM.

Esta especie se encuentra en altitudes entre los 150 y 2200 msnm, florece y produce frutos en el periodo comprendido entre septiembre y mayo. La densidad de los tricomas depende de la cantidad de luz y agua a la que esté expuesta, se ha encontrado que aumenta en temporada de sequía y cuando está expuesta a la luz solar.<sup>15,20,21</sup> Estos tricomas son un mecanismo de defensa contra herbívoros y disipan el calor para evitar la pérdida de agua por transpiración (Fig. 3).<sup>20,21</sup>



Figura 2. Flores y tallos de *W. urens*.



Figura 3. Tricomas presentes en tallos y hojas.

En México se encuentra distribuida en los Estados de: Aguascalientes, Chiapas, Distrito Federal, Durango, Guerrero, Jalisco, Estado de México, Michoacán, Nayarit, Oaxaca, Querétaro, Puebla, San Luis Potosí, Sinaloa, Sonora, Tlaxcala y Veracruz. En la Ciudad de México crece abundantemente en la reserva ecológica del campus de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) en la zona conocida como el Pedregal de San Ángel.

Algunos nombres comunes con los que se conoce a *W. urens* son: ortiga de tierra caliente, tabaco cimarrón, tabaquillo, mala mujer, zigua y hoja de San Pablo, entre otros. Los usos comunes de la planta son: contra la sífilis, el reumatismo, los dolores musculares, la diabetes, las heridas, la inflamación, las úlceras y contra el insomnio.<sup>9,10,15,17</sup>

## Antecedentes químicos de la familia Hydrophyllaceae

Los compuestos característicos de varios géneros de esta familia son los fenólicos prenilados (Fig. 4).<sup>7,8</sup> Se ha documentado que varias especies del género *Phacelia* producen metabolitos de este tipo, los cuales causan dermatitis por contacto.<sup>22,23</sup> Del género *Nama* también se han aislado compuestos fenólicos prenilados (Fig. 5).<sup>24</sup>

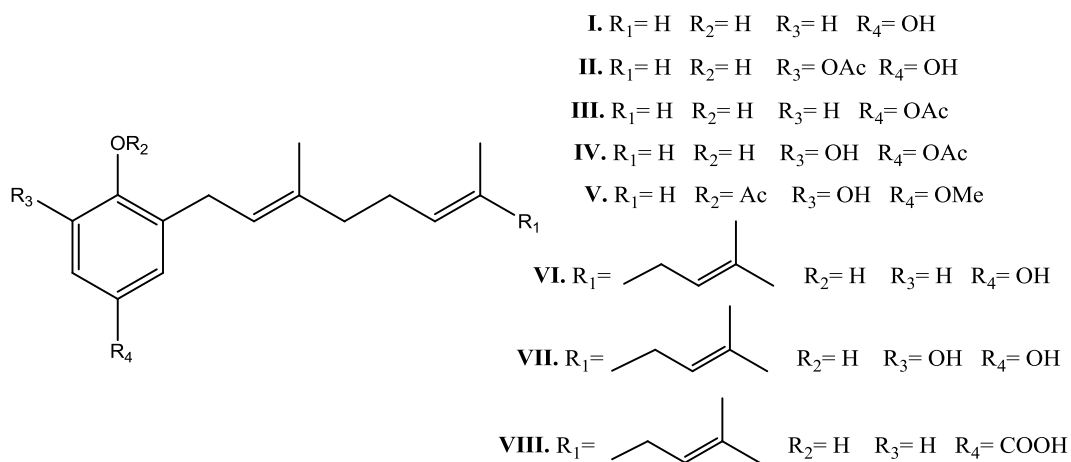


Figura 4. Compuestos fenólicos prenilados aislados de especies de los géneros *Phacelia* y *Wigandia*.

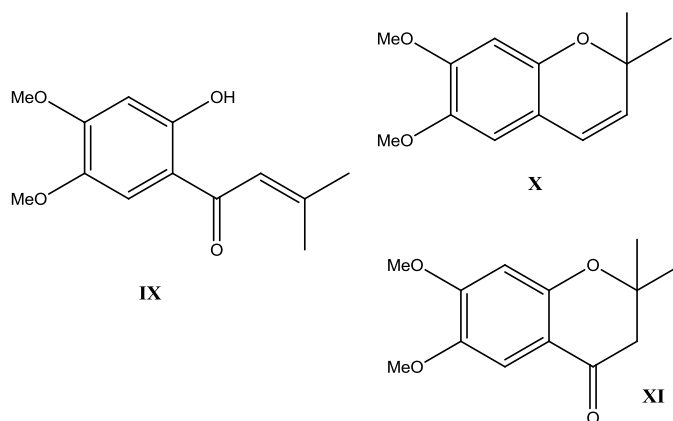


Figura 5. Compuestos fenólicos prenilados aislados de especies del género *Nama*.

Otro tipo de metabolitos presentes en especies de ésta familia son flavonoides (Fig. 6) de tipo flavona, flavanona, flavonol y antocianinas<sup>5,6,12,48</sup> También, se ha encontrado  $\beta$ -sitosterol.<sup>12</sup>

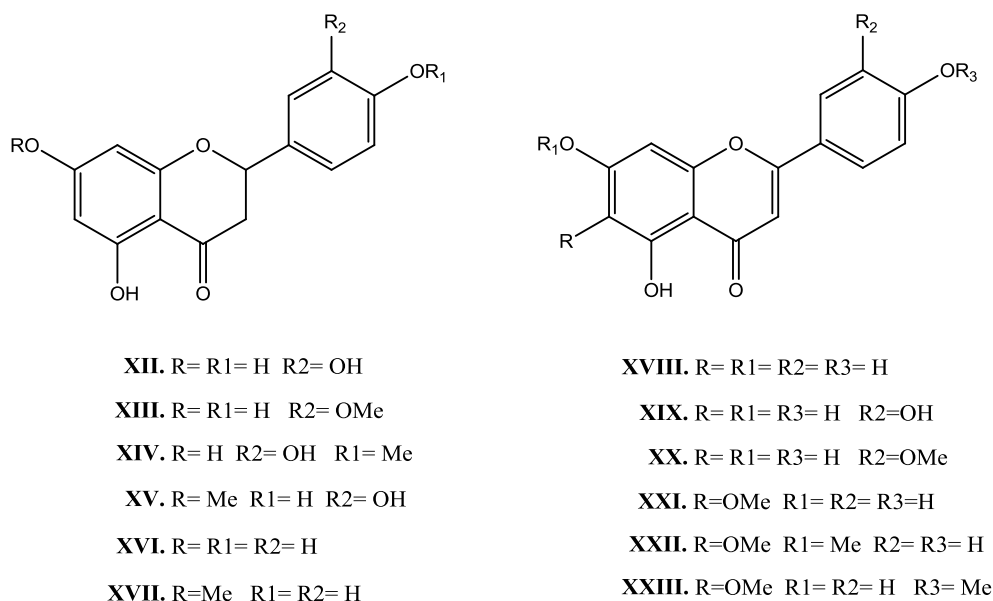


Figura 6. Flavonoides aislados de especies de la familia Hydrophyllaceae.

### Estructura y actividad biológica de compuestos fenólicos prenilados

Plantas de diferentes géneros y familias, organismos marinos y hongos son fuente de compuestos fenólicos prenilados con estructuras químicas relacionadas, pero con diferentes actividades biológicas. Se conoce que las quinonas e hidroquinonas preniladas o sus derivados, tienen actividad citotóxica contra ciertas células tumorales.<sup>25,26</sup>

Desde 1974, se tiene conocimiento de la actividad anticancerígena de compuestos fenólicos prenilados, por ejemplo, la geranilhidroquinona (**XXVII**) mostró citotoxicidad contra la leucemia en ratón.<sup>27</sup> En 1979 de *Aplidium sp.*, se aisló la prenilquinona (**XXIV**), la prenilhidroquinona (**XXV**) y el 6-hidroxi-2,2-dimetilcromeno (**XXVI**) (Fig. 7). **XXV** mostró actividad citotóxica contra la línea celular P388 en ratón en un ensayo *in vivo*, además de propiedades antimutagénicas al igual que el cromeno **XXVI** (Figura 7).<sup>28</sup> Posteriormente en 1998 se reportó la actividad citotóxica de la geranilhidroquinona (**XXVII**) y su derivado hidroxilado **XXVIII** (Fig. 8) contra cuatro líneas celulares. El mejor efecto de **XXVII** y **XXVIII** se observó contra el linfoma P-388, las IC<sub>50</sub> calculadas fueron 0.2 y 1.2 µg/ml respectivamente.<sup>25</sup> En un reporte más reciente (2012) se observó igualmente citotoxicidad de **XXVII** y la geranilbenzoquinona (**XXIX**) (Fig. 8) en las tres líneas celulares diferentes, PC-3 (cáncer de próstata), MCF-7 y MDA-MB-231 (cáncer de seno).<sup>29</sup>

También se ha reportado la actividad citotóxica de la 3-demetilubiquinona Q2 [2,3-dimetoxigeranilbenzoquinona] (**XXXI**) y de algunos derivados sintéticos que incluyen

quinonas e hidroquinonas preniladas, entre ellos la 6-metoxi-2-geranilbenzoquinona (**XXX**) (Fig. 8),<sup>30</sup> compuesto que ha sido aislado de *W. urens*. De manera adicional los compuestos **XXX** y **XXI**, obtenidos sintéticamente son actualmente productos patentados con actividad anticancerígena.<sup>31</sup>

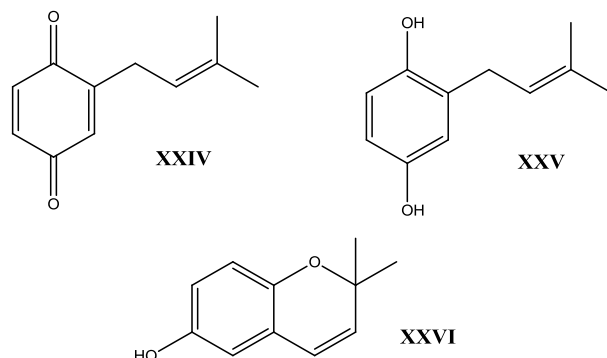


Figura 7. Prenilquinona (**XXIV**), prenilhidroquinona (**XXV**), y 6-hidroxi-2,2-dimetilcromeno (**XXVI**).

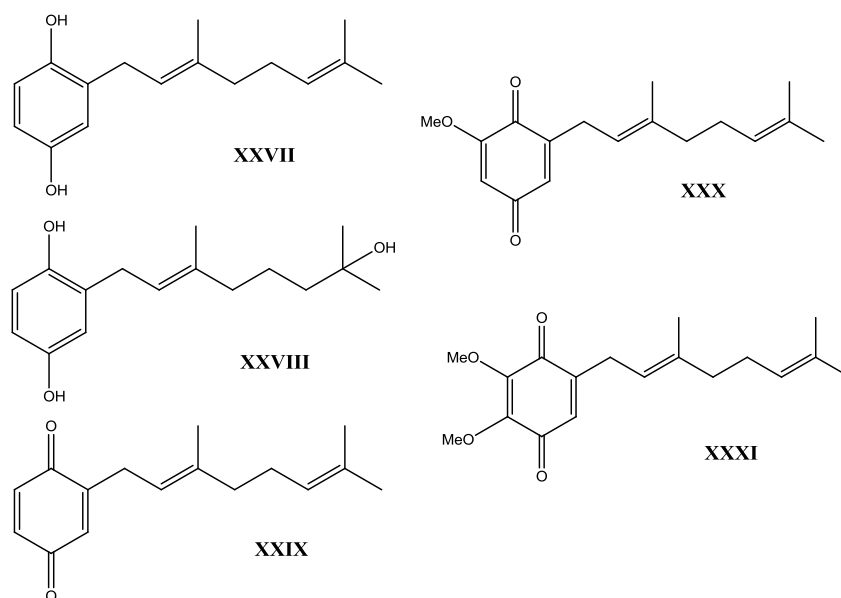


Figura 8. Geranilhidroquinona (**XXVII**), geranilbenzoquinona (**XXIX**) y derivados con actividad citotóxica.

Algunos de estos compuestos sufren procesos de ciclación de la cadena prenilada al anillo aromático y producen compuestos aromáticos con anillos de diferente tamaño, dependiendo de la cadena prenilada y del sitio donde se ciclen.

En 1997 y 1999 se publicó el aislamiento de derivados cíclicos de la farnesilhidroquinona (**XLIV**) y farnesilbenzoquinona de *Aplidium longithorax*, denominados longitoroles y longitoronas (**XXXII-XXXVII**) (Fig. 9).<sup>32-34</sup>

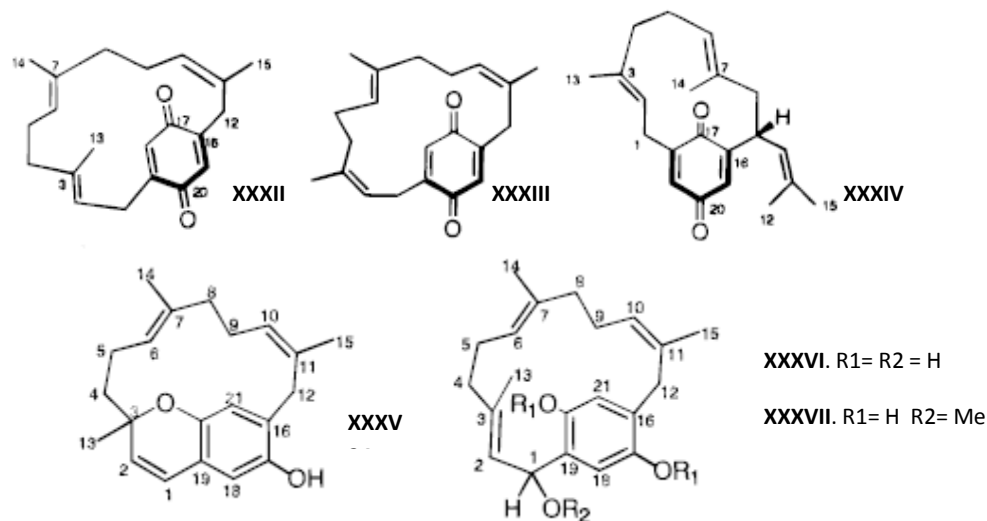


Figura 9. Longitoronas y longitoroles de *Aplidium longithorax*.

Recientemente (2013) se aislaron cuatro derivados cíclicos oxigenados de la geranilhidroquinona (**XXXVIII-XLI**) del hongo *Tricholoma terreum*, los cuales se evaluaron contra cinco diferentes tipos de líneas celulares derivadas de tumores humanos (células de cáncer de pulmón A-549, cáncer de mama MCF-7, cáncer de colon SW 480, leucemia HL 60, y carcinoma hepatocelular SMMC-7721). De los cuatro compuestos aislados (Fig. 10), tres presentan actividad citotóxica similar al cisplatino utilizado como referencia.<sup>35</sup>

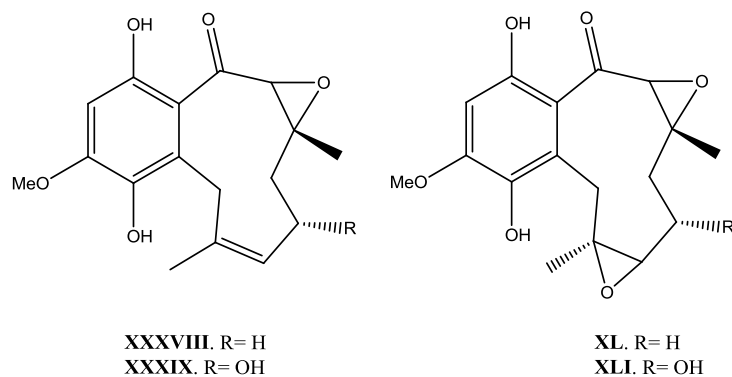


Figura 10. Derivados cíclicos de la geranilhidroquinona (**XXVII**) aislados del hongo *Tricholoma terreum*.



También se han hecho estudios sobre la actividad antioxidante de derivados fenólicos prenilados como **XXIV**, **XXVII**, **XLIV** y derivados de estos, que mostraron actividad antioxidante similar o mejor que las referencias usadas.<sup>36-41</sup>

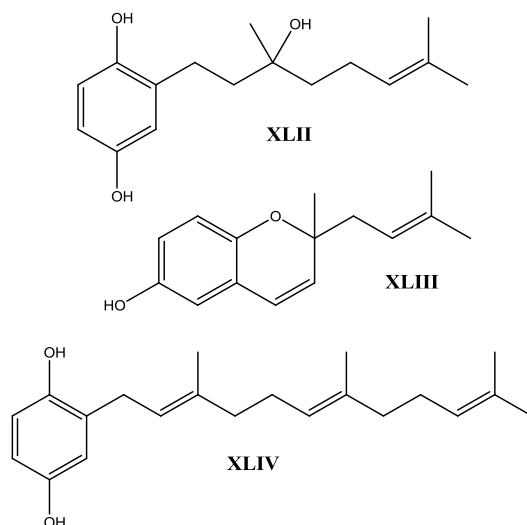


Figura 11. Farnesilhidroquinona (**XLIV**) y derivados de la geranilhidroquinona (**XXVII**) con actividad antioxidante.

En cuanto a la actividad antibacteriana y antiparasitaria se ha reportado la acción de este tipo de compuestos contra microorganismos como *Bacillus subtilis*,<sup>42</sup> *Trypanosoma cruzi*,<sup>43</sup> o contra parásitos causantes de enfermedades como la malaria<sup>40,43</sup> y leishmaniasis.<sup>43,44</sup>

Del hongo comestible *Lactarius flavidulus* se aisló el flavidulol A (**XLV**), un benzocyclodecadieno derivado de la geranilhidroquinona y sus derivados dihidro (**XLVI**) y tetrahidro (**XLVII**) (Fig. 12), los cuales mostraron actividad antibacteriana y supresora de las células T y B.<sup>46,82</sup>

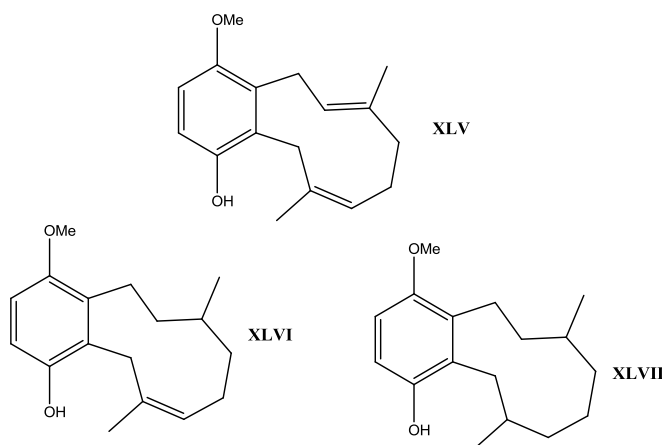


Figura 12. Flavidulol A (**XLV**) y sus derivados dihidro y tetrahidro.

La globiferina (**XLVIII**) y sus derivados cíclicos (**XLIX**, **L**) aislados de *Cordia globifera* mostraron actividad contra *Mycobacterium tuberculosis* y *Leishmania major* (Fig. 13).<sup>47</sup>

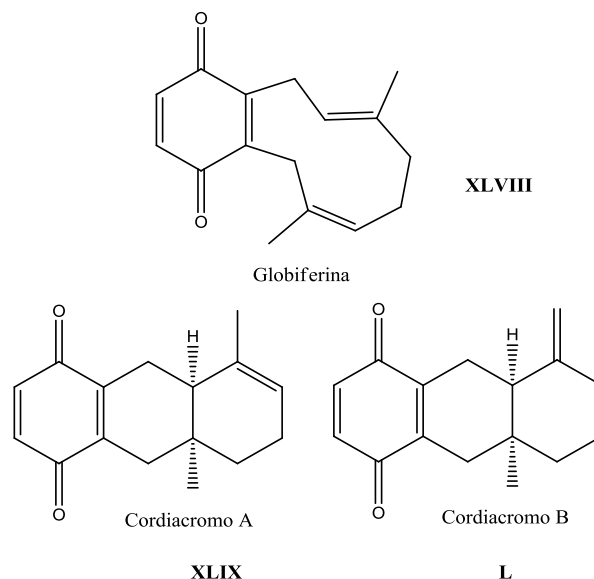


Figura 13. Globiferina (**XLVIII**) y sus derivados bioactivos.

Otro benzociclododecadieno denominado wigandol (**LI**), fue aislado de *W. kunthii* (Fig. 14).<sup>11</sup>

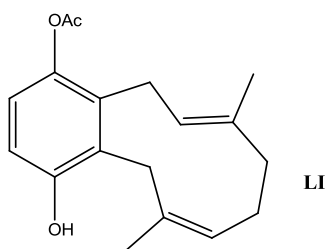


Figura 14. Wigandol (**LI**).

Otro compuesto con estructura quinoide y una cadena lipídica en vez de un grupo prenilo es la sorgoleona (**LII**) aislada del exudado de las raíces de *Sorgum bicolor* la cual presenta actividad alelopática<sup>81</sup> (Fig. 15).

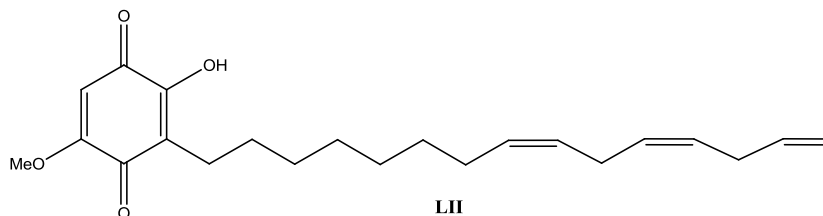


Figura 15. Sorgoleona (**LII**).

## JUSTIFICACIÓN

*Wigandia urens* es una planta arbustiva que crece abundantemente en el pedregal de San Ángel. Perteneció a la familia Hydrophyllaceae la cual cuenta con una sola especie en México.

Estudios previos de las partes aéreas<sup>11-13</sup> además de un reporte del estudio químico de los tallos,<sup>14</sup> describen el aislamiento de algunos compuestos fenólicos prenilados y derivados cíclicos (benzociclododecadienos). Tales compuestos presentan gran variedad de actividades biológicas entre las que se puede mencionar actividad antiparasitaria,<sup>46</sup> antileishmania,<sup>43,44,47</sup> citotóxica<sup>35</sup> y actividad antioxidante<sup>36-41</sup>, de estas dos últimas se observa que el potencial es similar o mayor que las referencias utilizadas.

Teniendo en cuenta que el cáncer es una de las enfermedades que más afecta a latinoamericana después de las enfermedades del corazón<sup>84</sup>, se hace importante encontrar compuestos que puedan contrarrestar esta enfermedad. Sabiendo que hay compuestos muy similares a los aislados de *W. urens* que ya han sido patentados con actividad anticancerígena<sup>31</sup> es conveniente realizar su estudio fitoquímico.

La actividad antioxidante está relacionada con la capacidad de estabilizar radicales libres en diversos medios como: degradación de alimentos, envejecimiento celular o enfermedades que se derivan de procesos oxidativos como problemas del corazón (ref), diabetes (ref) y alzheimer (ref). Por lo tanto es importante encontrar compuestos que permitan prevenir estos padecimientos y eviten el envejecimiento prematuro, además en la industria alimenticia para la conservación de productos que se consumen diariamente.

Considerando lo anterior en esta investigación se pretende aislar e identificar compuestos fenólicos prenilados de los extractos preparados y obtener derivados para evaluar su actividad antioxidante, mediante el método de la actividad captadora del radical DPPH, además de hacer una evaluación preliminar sobre su actividad citotóxica en varias líneas celulares y así poder valorar su potencial.

## OBJETIVOS

### Objetivo general

- Contribuir al conocimiento químico del género *Wigandia*, mediante el estudio químico de las hojas secas de *W. urens*.

### Objetivos específicos

- Aislar por técnicas cromatográficas convencionales los diferentes componentes obtenidos de las hojas secas de *W. urens*.
- Identificar por técnicas espectroscópicas como RMN en una y dos dimensiones y espectrometría de masas principalmente, los diferentes componentes de esta especie.
- Realizar pruebas de actividad inhibitoria de la proliferación y de actividad antioxidante de compuestos puros y derivados obtenidos por transformaciones químicas.

## PARTE EXPERIMENTAL

### Materiales y métodos

Para las diferentes separaciones por cromatografía en columna (CC), se utilizó gel de sílice malla 230-400 marca Macherey Nagel y Sephadex LH20 marca Pharmacia Biotech. Para cromatografía en capa fina analítica (CCFa) se utilizaron cromatofolios de gel de sílice de 0.20 mm y para cromatografía en capa fina preparativa (CCFp) placas de 20 x 20 cm y 0.25, 0.5, 1.0 o 2.0 mm de espesor (según el caso), con indicador de fluorescencia suministradas por Macherey Nagel.

La visualización de las placas se llevó a cabo con una lámpara de UV Espectroline modelo CX-20 a dos longitudes de onda (254 y 365 nm) y/o utilizando reveladores de sulfato cérico y óleum.

El material vegetal se recolectó el 14 de abril de 2008 en el Campus de la UNAM, el cual se identificó de acuerdo al voucher MEXU-235646, depositado en el Herbario Nacional (MEXU), México DF.

### Equipos utilizados

Para la determinación de los puntos de fusión sin corregir, se utilizó un equipo Fisher-Jhons. Las rotaciones ópticas se determinaron en un polarímetro Perkin-Elmer 343. Los espectros en el UV se determinaron en un equipo Shimadzu U160 y para el dicroísmo circular se utilizó un equipo Jasco 715.

La determinación de espectros en el IR se llevó a cabo en un espectrómetro FT-IR Bruker Tensor 27 los cuales se realizaron en pastilla de KBr o en solución de  $\text{CHCl}_3$ .

Los espectros de masas se realizaron en un espectrómetro Jeol, JMS AX-505 HA por impacto electrónico a 70 eV o FAB en la modalidad de iones positivos. Para los análisis de gases-masas se usó un equipo Agilent 6890N-Jeol JMS-GCMate II.

Los espectros de RMN se determinaron en equipos Varian Gemini versión 2000, JEOL Eclipse 300 y Bruker Avance III usando disolventes deuterados. Los desplazamientos químicos  $\delta$  son dados en ppm con referencia al TMS o el disolvente residual y las constantes de acoplamiento ( $J$ ) en Hz.

Se utilizó un lector de placas marca Bio-Tek modelo ELx-808 para medir las densidades ópticas en las pruebas biológicas.

## Preparación de los extractos

Se recolectaron hojas del espécimen en estudio, se limpiaron manualmente, se dejaron secar y se procedió a su molienda. Posteriormente el material en polvo (330 g) se empacó en una columna y se extrajo exhaustivamente por percolación utilizando disolventes en orden creciente de polaridad: hexano, diclorometano, acetona y metanol. Los extractos obtenidos con cada disolvente se concentraron a presión reducida y se analizaron por CCF.

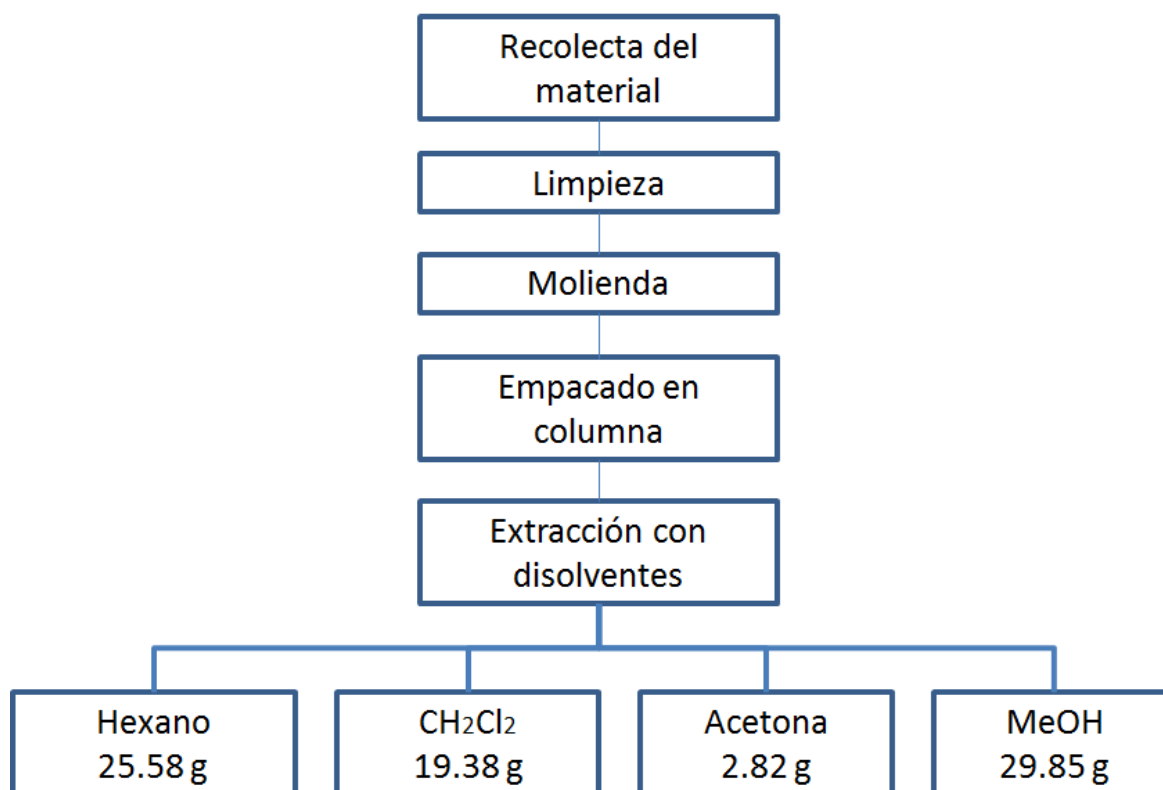


Figura 16. Esquema de extracción.

## Aislamiento y purificación

### Extracto hexánico (Wu-Hx)

El residuo del extracto hexánico (25.58 g), se sometió a cromatografía utilizando 250 g de gel de sílice como adsorbente y como eluyente mezclas de hexano y acetato de etilo de polaridad creciente. Se obtuvieron 71 fracciones, las cuales se reunieron de acuerdo con la similitud de sus componentes determinada por CCF, obteniéndose 15 fracciones primarias: Wu-Hx-(A-P) (Cuadro 2).

Cuadro 2. Fracciones primarias obtenidas del extracto hexánico (Wu-Hx).

| Fracción | Eluyente – Proporción | Fracciones reunidas | Clave   | Masa (g) |
|----------|-----------------------|---------------------|---------|----------|
| 1-12     | hexano 100 %          | 1-2                 | Wu-Hx-A | 0.5245   |
| 13-25    | hexano-AcOEt 95:5     | 3-10                | Wu-Hx-B | 0.0384   |
| 26-48    | hexano-AcOEt 9:1      | 11-14               | Wu-Hx-C | 0.0202   |
| 49-60    | hexano-AcOEt 8:2      | 15-16               | Wu-Hx-D | 2.7646   |
| 61-71    | hexano-AcOEt 6:4      | 17-21               | Wu-Hx-E | 2.4930   |
|          |                       | 22-25               | Wu-Hx-G | 1.0857   |
|          |                       | 26-31               | Wu-Hx-H | 3.3902   |
|          |                       | 32-38               | Wu-Hx-I | 3.3307   |
|          |                       | 39-49               | Wu-Hx-J | 0.6012   |
|          |                       | 50-53               | Wu-Hx-K | 0.5661   |
|          |                       | 54-56               | Wu-Hx-L | 0.6173   |
|          |                       | 57-63               | Wu-Hx-M | 1.1474   |
|          |                       | 64-69               | Wk-Hx-N | 0.9880   |
|          |                       | 70                  | Wu-Hx-O | 0.1643   |
|          |                       | 71                  | Wu-Hx-P | 2.7784   |

### **SEPARACION DE LOS CONSTITUYENTES DE LA FRACCION Wu-Hx-H**

La fracción primaria Wu-Hx-H se separó por cromatografía en columna (CC), utilizando 60 g de gel de sílice como adsorbente y como eluyentes, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y mezclas de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-acetona de polaridad creciente (Cuadro 3).

Cuadro 3. Fracciones secundarias obtenidas de la recromatografía de la fracción Wu-Hx-H.

| Fracción H | Eluyente-Proporción                             | Fracciones reunidas | Clave    | Masa (g) |
|------------|---|---------------------|----------|----------|
| 1-30       | CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 100 %           | 1-4                 | Wu-Hx-HA | 0.0575   |
| 31-38      | CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -acetona 98:0.2 | 5                   | Wu-Hx-HB | 0.0870   |
| 39-49      | CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -acetona 95:0.5 | 6                   | Wu-Hx-HC | 0.1212   |
| 50-52      | CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -acetona 95:5   | 7                   | Wu-Hx-HD | 0.1191   |
| 53-54      | CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -acetona 1:1    | 8                   | Wu-Hx-HE | 0.1138   |
| 55         | acetona 100%                                    | 9-13                | Wu-Hx-HF | 0.3914   |
| 56         | MeOH 100%                                       | 14-20               | Wu-Hx-HG | 0.5655   |
|            |   | 21-38               | Wu-Hx-HH | 0.3704   |
|            |   | 39-49               | Wu-Hx-HI | 0.1191   |
|            |   | 50-52               | Wu-Hx-HJ | 0.0336   |
|            |   | 53-55               | Wu-Hx-HK | 0.8335   |
|            |   | 56                  | Wu-Hx-HL | 0.0937   |

Las fracciones Wu-Hx-HA (57.5 mg), Wu-Hx-HB (87 mg) y Wu-Hx-HC (121.2 mg) se purificaron por CCF preparativa (CCFp) utilizando placas de gel de sílice de 20x20 cm y 0.25 o 1 mm de espesor. El proceso de elución se realizó con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-acetona 99:1 como eluyente; la placa se eluyó 2 veces (2X). De las fracciones Wu-Hx-HA y Wu-Hx-HB se obtuvieron cuatro fracciones (a-d) y de la fracción Wu-Hx-HC cinco fracciones (a-e). De Las fracciones Wu-Hx-HAc (7.7 mg), Wu-Hx-HBc (18.3 mg) y Wu-Hx-HCb (18.3 mg) se aisló la mezcla de los compuestos (*E*) y (*Z*)-2-geranil-6-metoxibenzoquinonas (verapliquinonas A y B) (**5**, **6**). Las fracciones Wu-Hx-HAb, Wu-Hx-HBb y Wu-Hx-HCa mostraron un perfil similar por CCF, por lo que se reunieron (19.6 mg) y se purificaron por CCF preparativa utilizando como eluyente CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 100%, obteniéndose tres fracciones (a-c). De estas, la fracción b (5.6 mg) se aisló la 1-*O*-acetil-3-geranil-5-metoxi-hidroquinona (**1**). Las fracciones Wu-Hx-HD (119.1 mg) y Wu-Hx-HE (113.3 mg) se purificaron de manera similar a las anteriores. De las fracciones Wu-Hx-HDa (27.3 mg) y Wu-Hx-HEa (39.8 mg) se aislaron cantidades adicionales de las verapliquinonas A (**6**) y B (**5**) como mezcla nuevamente. Mientras que de las fracciones Wu-Hx-HDc (33.5 mg) y Wu-Hx-HEb (13.6 mg), se aisló el wigandol (**12**).<sup>45</sup>



## SEPARACION DE LOS CONSTITUYENTES DE LA FRACCION Wu-Hx-I

La fracción primaria Wu-Hx-I se separó por cromatografía en columna utilizando 60 g de gel de sílice como adsorbente y como eluyente mezclas de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-acetona en orden creciente de polaridad (Cuadro 4).

Cuadro 4. Fracciones secundarias obtenidas de la recromatografía de la fracción Wu-Hx-I.

| Fracción I | Eluyente-Proporción                           | Fracciones reunidas | Clave    | Masa (g) |
|------------|---|---------------------|----------|----------|
| 1-22       | CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 100 %         | 1-2                 | Wu-Hx-IA | 0.0035   |
| 23-31      | CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -acetona 98:2 | 3-10                | Wu-Hx-IB | 2.0224   |
| 32-35      | CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -acetona 95:5 | 11-13               | Wu-Hx-IC | 0.1247   |
| 36-44      | CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -acetona 9:1  | 14-18               | Wu-Hx-ID | 0.1192   |
| 45-53      | CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -acetona 7:3  | 19-24               | Wu-Hx-IE | 0.0979   |
| 54         | CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -acetona 1:1  | 25-36               | Wu-Hx-IF | 0.1989   |
| 55         | acetona 100%                                  | 37-47               | Wu-Hx-IG | 0.4385   |
| 56         | MeOH 100%                                     | 48-52               | Wu-Hx-IH | 0.2082   |
|            |   | 53-54               | Wu-Hx-II | 0.0593   |
|            |   | 55                  | Wu-Hx-IJ | 0.0384   |
|            |   | 56                  | Wu-Hx-IK | 0.0695   |

La fracción secundaria Wu-Hx-IB resultó ser la mayoritaria por lo que se decidió separarla nuevamente por cromatografía en columna utilizando 100 g de gel de sílice como adsorbente y como eluyentes mezclas de hexano-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-acetona en orden creciente de polaridad (Cuadro 5).

Cuadro 5. Fracciones terciarias obtenidas de la recromatografía de la fracción Wu-Hx-IB.

| Fracción IB | Eluyente-Proporción                           | Fracciones reunidas | Clave     | Masa (g) |
|-------------|---|---------------------|-----------|----------|
| 1-22        | hexano- CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 1:1   | 1-12                | Wu-Hx-IBA | 0.0180   |
| 23-53       | hexano- CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 1:3   | 13-28               | Wu-Hx-IBB | 0.0136   |
| 54-61       | CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 100 %         | 29-36               | Wu-Hx-IBC | 0.0494   |
| 62-68       | CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -acetona 95:5 | 37-39               | Wu-Hx-IBD | 0.0244   |
| 69-74       | CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -acetona 9:1  | 40-49               | Wu-Hx-IBE | 0.0564   |
| 75-77       | CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -acetona 7:3  | 50-53               | Wu-Hx-IBF | 0.0144   |
| 78          | acetona 100%                                  | 54-58               | Wu-Hx-IBG | 0.0308   |
| 79          | MeOH 100%                                     | 59-61               | Wu-Hx-IBH | 0.1033   |
|             |   | 62-63               | Wu-Hx-IBI | 0.1061   |
|             |   | 64-65               | Wu-Hx-IBJ | 0.0962   |
|             |   | 66                  | Wu-Hx-IBK | 0.0654   |
|             |   | 67-69               | Wu-Hx-IBL | 0.0356   |
|             |   | 70-71               | Wu-Hx-IBM | 0.2381   |
|             |   | 72                  | Wu-Hx-IBN | 0.0995   |
|             |   | 73-76               | Wu-Hx-IBO | 0.4794   |
|             |   | 77                  | Wu-Hx-IBP | 0.1487   |
|             |   | 78                  | Wu-Hx-IBQ | 0.3038   |
|             |   | 79                  | Wu-Hx-IBR | 0.1886   |

Las fracciones Wu-Hx-IBC (49.4 mg), Wu-Hx-IBD (24.4 mg) y Wu-Hx-IBE (56.4 mg) se purificaron por CCFp utilizando como eluyente CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-acetona (97:3). De las fracciones Wu-Hx-IBCb (5 mg) y Wu-Hx-IBDc (10.8 mg) se aisló la [(1Z,6E)-3-hidroxi-3,7,11-trimetildodeca-1,6,10-trien-1-il]-hidroquinona (**2**), [ $\alpha$ ]<sub>D</sub> -3.0 (c 0.1, CHCl<sub>3</sub>). De la fracción Wu-Hx-IBEd (15.5 mg) se obtuvo la 2-[(1Z)-3-hidroxi-3,7-dimetilocta-1,6-dienil]-hidroquinona (**4**) [ $\alpha$ ]<sub>D</sub> - 6.6 (c 0.2, CHCl<sub>3</sub>).<sup>50</sup> De las fracciones Wu-Hx-IBCa, Wu-Hx-IBDa y Wu-Hx-IBD se aislaron cantidades adicionales de una mezcla de las verapliquinonas A y B (**5, 6**).

## SEPARACION DE LOS CONSTITUYENTES DE LA FRACCION PRIMARIA Wu-Hx-J

La fracción primaria Wu-Hx-J se separó por cromatografía en columna utilizando 20 g de gel de sílice como adsorbente y como eluyente mezclas de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-acetona en orden creciente de polaridad (Cuadro 6).

Cuadro 6. Fracciones secundarias obtenidas de la recromatografía de la fracción Wu-Hx-J.

| Fracción J | Eluyente-Proporción                           | Fracciones reunidas | Clave    | Masa (mg) |
|------------|---|---------------------|----------|-----------|
| 1-9        | hexano- CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 1:1   | 1-12                | Wu-Hx-JA | 13.5      |
| 10-13      | hexano- CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 2:3   | 13-25               | Wu-Hx-JB | 8.4       |
| 14-18      | hexano- CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 3:7   | 26-33               | Wu-Hx-JC | 25        |
| 19-26      | hexano- CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 2:8   | 34-51               | Wu-Hx-JD | 45.1      |
| 27-42      | hexano- CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 1:9   | 52-61               | Wu-Hx-JE | 6.6       |
| 43-48      | hexano- CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 5:95  | 62-64               | Wu-Hx-JF | 6.0       |
| 49-59      | CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 100 %         | 65-70               | Wu-Hx-JG | 6.9       |
| 60-71      | CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -acetona 98:2 | 71-73               | Wu-Hx-JH | 33.7      |
| 72-75      | CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -acetona 95:5 | 74-77               | Wu-Hx-JI | 96.1      |
| 76-78      | CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -acetona 9:1  | 78-81               | Wu-Hx-JJ | 147.8     |
| 79-81      | CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -acetona 7:3  | 82-83               | Wu-Hx-JK | 98.1      |
| 82         | CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -acetona 1:1  |                     |          |           |
| 83         | acetona 100%                                  |                     |          |           |

La fracción Wu-Hx-JC (25 mg) se purificó por CCFp utilizando como eluyente CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-acetona 98:2 (2X). De la fracción Wu-Hx-JCf se obtuvieron 4.2 mg de la geranilhidroquinona (**10**) y de la fracción Wu-Hx-JCe (7 mg) después de purificarse nuevamente, 3.4 mg del compuesto **10**.

## SEPARACION DE LOS CONSTITUYENTES LA FRACCION PRIMARIA Wu-Hx-K

La fracción primaria Wu-Hx-K se separó por cromatografía en columna utilizando 15 g de gel de sílice como adsorbente y como eluyente mezclas de hexano-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y mezclas de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-acetona en orden creciente de polaridad (Cuadro 7).

Cuadro 7. Fracciones secundarias obtenidas de la recromatografía de la fracción Wu-Hx-K.

| Fracción K | Eluyente-Proporción                          | Fracciones reunidas | Clave     | Masa (mg) |
|------------|--|---------------------|-----------|-----------|
| 1-16       | hexano- CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 1:1  | 1-3                 | Wu-Hx-KA  | 6.7       |
| 17-24      | hexano- CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 2:8  | 4-8                 | Wu-Hx-KB  | 190       |
| 25-33      | CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 100 %        | 9-12                | Wu-Hx-KC  | 37.7      |
| 34-41      | CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -acetona 9:1 | 13-16               | Wu-Hx-KD  | 46.2      |
| 42-51      | CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -acetona 8:2 | 17-20               | Wu-Hx-KE  | 46.8      |
| 52-54      | CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -acetona 7:3 | 21-27               | Wu-Hx-KF  | 45.6      |
| 55-56      | CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -acetona 1:1 | 28-32               | Wku-Hx-KG | 26.1      |
| 57         | acetona 100%                                 | 33-35               | Wu- Hx-KH | 43.8      |
|            |  | 36-42               | Wu-Hx-KI  | 21.8      |
|            |  | 43-50               | Wu-Hx-KJ  | 18.1      |
|            |  | 51-54               | Wu-Hx-KK  | 13.3      |
|            |  | 55-57               | Wu-Hx-KL  | 18.7      |

De la fracción Wu-Hx-KB se obtuvo el flavonol rhamnazina (**16**) como un sólido insoluble en hexano-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (8 mg) con pf 203-208°C.<sup>51</sup>

#### **Extracto diclorometanico (Wu-DCM)**

Del residuo del extracto diclorometánico (19.38 g) se obtuvo el desacetilwigandol (**3**), como un sólido insoluble en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1.56 g), con un punto de fusión de 165-167°C. Las aguas madres se cromatografiaron en una columna de vidrio utilizando 200 g de gel de sílice como adsorbente y como eluyente mezclas de diclorometano-acetona de polaridad creciente. Se obtuvieron 79 fracciones, las cuales se reunieron de acuerdo con la similitud de sus componentes determinada por CCF, obteniéndose 16 fracciones primarias Wu-DCM (A-P) (Cuadro 8).

Cuadro 8. Fracciones primarias obtenidas del extracto diclorometánico (Wu-DCM).

| Fracción | Eluyente-Proporción                           | Fracciones reunidas | Clave    | Masa (g) |
|----------|---|---------------------|----------|----------|
| 1-41     | CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 100 %         | 1-2                 | Wu-DCM-A | 0.1156   |
| 42-58    | CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -acetona 95:5 | 3                   | Wu-DCM-B | 0.1974   |
| 59-63    | CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -acetona 9:1  | 4                   | Wu-DCM-C | 0.2849   |
| 64-71    | CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -acetona 7:3  | 5                   | Wu-DCM-D | 0.0883   |
| 72-74    | CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -acetona 1:1  | 6-7                 | Wu-DCM-E | 0.1571   |
| 75-77    | acetona 100 %                                 | 8-9                 | Wu-DCM-F | 0.2632   |
| 78-79    | MeOH 100 %                                    | 10-15               | Wu-DCM-G | 2.9303   |
|          |   | 16-21               | Wu-DCM-H | 0.6327   |
|          |   | 22-33               | Wu-DCM-I | 0.3480   |
|          |   | 34-43               | Wu-DCM-J | 0.1560   |
|          |   | 44-45               | Wu-DCM-K | 0.8116   |
|          |   | 46-47               | Wu-DCM-L | 0.6208   |
|          |   | 48-57               | Wu-DCM-M | 1.1571   |
|          |   | 58-64               | Wu-DCM-N | 0.9088   |
|          |   | 65-75               | Wu-DCM-O | 2.5520   |
|          |   | 76-79               | Wu-DCM-P | 1,2920   |

#### SEPARACION DE LOS CONSTITUYENTES DE LA FRACCION Wu-DCM-C

La fracción primaria Wu-DCM-C se separó por cromatografía en columna, utilizando 10 g de gel de sílice como adsorbente y mezclas de hexano-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-acetona como eluyentes (Cuadro 9).

Cuadro 9. Fracciones secundarias obtenidas de la recromatografía de la fracción Wu-DCM-C.

| Fracción C | Eluyente-Proporción                           | Fracciones reunidas | Clave     | Masa (mg) |
|------------|---|---------------------|-----------|-----------|
| 1-6        | hexano 100%                                   | 1-7                 | Wu-DCM-CA | 15.4      |
| 7-14       | hexano- CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 7:3   | 8                   | Wu-DCM-CB | 3.2       |
| 15-19      | hexano- CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 4:6   | 9-10                | Wu-DCM-CC | 21.2      |
| 20-23      | CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 100 %         | 11                  | Wu-DCM-CD | 5.3       |
| 24-25      | CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -acetona 95:5 | 12-13               | Wu-DCM-CE | 21.2      |
| 26         | CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -acetona 1:1  | 14-15               | Wu-DCM-CF | 83.2      |
|            |   | 16-18               | Wu-DCM-CG | 63.8      |
|            |   | 19-23               | Wu-DCM-CH | 4.4       |
|            |   | 24                  | Wu-DCM-CI | 9.2       |
|            |   | 25-26               | Wu-DCM-CJ | 26.2      |

Las fracciones Wu-DCM-CC (21.2 mg) y Wu-DCM-CE (21.2 mg) se purificaron por CCFp, empleando como eluyente CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. De la fracción Wu-DCM-CC se obtuvo dos fracciones (a-b) mientras que de la fracción Wu-DCM-CE se obtuvieron cuatro fracciones (a-d). De la fracción Wu-DCM-CCa (5.3 mg) se obtuvo la globiferina (**9**), mientras que de la fracción Wu-DCM-CEc (7.8 mg) se aisló el flavidulol A (**7**).

#### SEPARACION DE LOS CONSTITUYENTES DE LA FRACCION Wu-DCM-D

La fracción Wu-DCM-D se purificó por CCFp, empleando las mismas condiciones de la fracción anterior y de la fracción Wu-DCM-Dc (34.2 mg) se obtuvieron cantidades adicionales de flavidulol A (**7**). La fracción Wu-DCM-Dd se purificó por CCFp nuevamente bajo las mismas condiciones. De la fracción Wu-DCM-Ddb (4.2 mg) se aisló la 1-O-metil-2-geranilhidroquinona (**8**).

#### FRACCION Wu-DCM-E

La fracción Wu-DCM-E, se analizó espectroscópicamente por CCF identificándose como componentes mayoritarios la mezcla de las veraplíquonas A y B (**5, 6**).

## SEPARACION DE LOS CONSTITUYENTES DE LA FRACCION Wu-DCM-F

La fracción primaria Wu-DCM-F se separó por cromatografía en columna, utilizando 10 g de gel de sílice como adsorbente, y mezclas de hexano-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-acetona como eluyentes. (Cuadro 10).

Cuadro 10. Fracciones secundarias obtenidas de la recromatografía de la fracción Wu-DCM-F.

| Fracción F | Eluyente-Proporción                           | Fracciones reunidas | Clave     | Masa (mg) |
|------------|---|---------------------|-----------|-----------|
| 1-17       | hexano- CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 1:1   | 1-4                 | Wu-DCM-FA | 14        |
| 18-25      | hexano- CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 2:8   | 5-9                 | Wu-DCM-FB | 28.8      |
| 26-29      | CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 100 %         | 10-16               | Wu-DCM-FC | 58.9      |
| 30-33      | CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -acetona 98:2 | 17-19               | Wu-DCM-FD | 104       |
| 34-36      | CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -acetona 95:5 | 20-25               | Wu-DCM-FE | 75.1      |
| 37         | acetona 100                                   | 26-31               | Wu-DCM-FF | 24.6      |
|            |   | 32-34               | Wu-DCM-FG | 10.8      |
|            |   | 35-36               | Wu-DCM-FH | 15.3      |
|            |   | 37                  | Wu-DCM-FI | 18.7      |

La fracción Wu-DCM-FB (28.8 mg) se purificó por CCFp, empleando como eluyente CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-acetona (49:1). La fracción Wu-DCM-FBc (7.5 mg) consistía de la mezcla de los compuestos **2** y **4**.

Después de sucesivas CCF preparativas de la fracción Wu-DCM-FC (58.9 mg) se obtuvo la fracción Wu-DCM-FCCab (3 mg), de la cual se aislaron cantidades adicionales del compuesto **4** (2.0 mg) y de la fracción Wu-DCM-FCCc (13.8 mg) se obtuvo wigandol (**12**).

Las fracciones Wu-DCM-FD (104 mg) y Wu-DCM-FE (75.1 mg) se purificaron por CCFp utilizando CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-acetona (24:1) como eluyente. Las fracciones Wu-DCM-FDd y Wu-DCM-FEc se reunieron (5.4mg) y se obtuvo la farnesilhidroquinona (**11**).

De la purificación de la fracción Wu-DCM-FF (24.6 mg) por CCFp utilizando como mezcla de elución CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-acetona (97:3) se aisló el compuesto **13**.

## SEPARACION DE LOS CONSTITUYENTES DE LA FRACCION Wu-DCM-G

De la fracción primaria Wu-DCM-G se obtuvo un sólido insoluble en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (664.7 mg) el cual se separó por filtración y se identificó por comparación con una muestra auténtica (CCF) como el desacetilwigandol (**3**). Las aguas madres (2.26 g) se separaron por cromatografía en columna, utilizando 40 g de gel de sílice como adsorbente, y utilizando mezclas de hexano-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-acetona como eluyentes. (Cuadro 11).

Cuadro 11. Fracciones secundarias obtenidas de la recromatografía de la fracción Wu-DCM-G.

| Fracción G | Eluyente-Proporción                           | Fracciones reunidas | Clave     | Masa (mg) |
|------------|---|---------------------|-----------|-----------|
| 1-12       | hexano- CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 1:1   | 1-3                 | Wu-DCM-GA | 49.4      |
| 13-21      | hexano- CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 1:3   | 4-8                 | Wu-DCM-GB | 40        |
| 22-30      | CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 100 %         | 9-10                | Wu-DCM-GC | 11.4      |
| 31-35      | CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -acetona 95:5 | 11-13               | Wu-DCM-GD | 23.9      |
| 36-40      | CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -acetona 9:1  | 14-18               | Wu-DCM-GE | 91.1      |
| 41-42      | CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -acetona 7:3  | 19-21               | Wu-DCM-GF | 69.6      |
| 43         | acetona 100%                                  | 22-23               | Wu-DCM-GG | 100.9     |
|            |   | 24-25               | Wu-DCM-GH | 208       |
|            |   | 26                  | Wu-DCM-GI | 91.6      |
|            |   | 27-31               | Wu-DCM-GJ | 50.7      |
|            |   | 32-34               | Wu-DCM-GK | 316.6     |
|            |   | 35-39               | Wu-DCM-GL | 90.8      |
|            |   | 40-42               | Wu-DCM-GM | 48.8      |
|            |   | 43                  | Wu-DCM-GN | 94.9      |

La fracción Wu-DCM-GG (100.9 mg) se purificó por CCFp, empleando como eluyente CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-acetona 97:3. De la fracción Wu-DCM-GFa (44.3 mg) se aisló el wigandol (**12**), mientras que la fracción Wu-DCM-GFb (26.7 mg) se obtuvo una mezcla de la geranilhidroquinona (**10**) y el β-sitosterol.

La fracción Wu-DCM-GH (208 mg) se purificó de forma similar utilizando CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-acetona (49:1) (2X) como eluyente. De esta fracción se obtuvieron cantidades adicionales de geranilhidroquinona (**10**) (121.2 mg).



## FRACCIONES Wu-DCM-L y M

De la fracción Wu-DCM-L se obtuvo la genkwanina (**14**) (68.6 mg) como un sólido insoluble en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, mientras que de la fracción Wu-DCM-M de igual forma se obtuvieron 18.9 mg de cirsimarina (**15**).

## Extracto acetónico (Wu-Ace)

Del residuo del extracto de acetona se separó por filtración un sólido (485 mg). Una muestra de 115.2 mg de este sólido se purificó por CCFp utilizando como sistema de elución CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (7:3). De la fracción Wu-Ace-sólido c, (33.7 mg) se obtuvo el 5-*epi*-litospermósido (**17**) con p.f. 217-220°C y  $[\alpha]_D - 167$  (c 0.1, H<sub>2</sub>O).

A las aguas madres (2.82 g) se les realizó cromatografía en columna sobre 23 g de gel de sílice. Se obtuvieron 14 fracciones las cuales se reunieron de acuerdo a su similitud en CCF. (Cuadro 12).

Cuadro 12. Fracciones primarias obtenidas del extracto acetónico (Wu-Ace).

| Fracción | Eluyente-Proporción | Fracciones reunidas | Clave    | Masa (mg) |
|----------|---------------------|---------------------|----------|-----------|
| 1-6      | acetona 100 %       | 1                   | Wu-Ace-A | 1.5       |
| 7-14     | MeOH 100%           | 2                   | Wu-Ace-B | 13.6      |
|          |                     | 3                   | Wu-Ace-C | 28.4      |
|          |                     | 4                   | Wu-Ace-D | 499.7     |
|          |                     | 5                   | Wu-Ace-E | 123.4     |
|          |                     | 6-10                | Wu-Ace-F | 779.9     |
|          |                     | 11-14               | Wu-Ace-G | 170.5     |

La fracción primaria Wu-Ace-F se acetiló con Ac<sub>2</sub>O/piridina. El producto de acetilación se separó por cromatografía en columna utilizando 10 g de gel de sílice como adsorbente y como eluyente mezclas de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-acetona en orden creciente de polaridad. (Cuadro 13).

Cuadro 13. Fracciones secundarias obtenidas de la recromatografía de la fracción Wu-Ace-F-AcO.

| Fracción F- AcO | Eluyente-Proporción                           | Fracciones reunidas | Clave          | Masa (mg) |
|-----------------|---|---------------------|----------------|-----------|
| 1-4             | CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 100 %         | 1-5                 | Wu-Ace-F-AcO-A | 3.6       |
| 5-8             | CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -acetona 98:2 | 6-7                 | Wu-Ace-F-AcO-B | 44.8      |
| 9-14            | CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -acetona 95:5 | 8-9                 | Wu-Ace-F-AcO-C | 39.9      |
| 15-21           | CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -acetona 9:1  | 10-13               | Wu-Ace-F-AcO-D | 160.2     |
| 22-32           | CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -acetona 7:3  | 14-16               | Wu-Ace-F-AcO-E | 76        |
| 33-38           | CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -acetona 1:1  | 17-20               | Wu-Ace-F-AcO-F | 43.7      |
| 39-45           | acetona 100%                                  | 21-26               | Wu-Ace-F-AcO-G | 158.8     |
| 46              | MeOH 100%                                     | 27-36               | Wu-Ace-F-AcO-H | 33.2      |
|                 |   | 37-40               | Wu-Ace-F-AcO-I | 91        |
|                 |   | 41-45               | Wu-Ace-F-AcO-J | 86.9      |
|                 |   | 46                  | Wu-Ace-F-AcO-K | 49.1      |

La fracción Wu-Ace-F-AcO-B (44.8 mg) se purificó aplicando la CCFp sobre gel de sílice, empleando como eluyente hexano-AcOEt (1:1). De la fracción Wu-Ace-F-AcO-Bb se obtuvo el pentaacetato de glucosa (9.5 mg) la cual se comparó con una muestra auténtica.

La fracción Wu-Ace-F-AcO-D (160.2 mg) se purificó por CCF preparativa utilizando las mismas condiciones anteriores y de Wu-Ace-F-AcO-Db (16.7 mg) se aisló el peracetato del 5-*epi*-litospermósido (**24**) como componente mayoritario.

#### **Extracto metanólico (Wu-MeOH)**

Del residuo del extracto metanólico (29.85 g) se separó un sólido insoluble en MeOH por filtración (132.6 mg) constituido por compuestos pigmentados principalmente. De la parte soluble en metanol se tomaron 10.89 g y se separaron por cromatografía en columna sobre 150 g de sephadex LH-20. Se obtuvieron 60 fracciones, las cuales se reunieron de acuerdo a su similitud por CCF obteniéndose 17 fracciones MeOH (A-Q). (Cuadro 14)

Cuadro 14. Fracciones primarias obtenidas del extracto metanólico (Wu-MeOH).

| Fracción | Eluyente-Proporción | Fracciones reunidas | Clave     | Masa (g) |
|----------|---------------------|---------------------|-----------|----------|
| 1-60     | MeOH 100 %          | 1-7                 | Wu-MeOH-A | 0.0557   |
|          |                     | 8-12                | Wu-MeOH-B | 0.7445   |
|          |                     | 13                  | Wu-MeOH-C | 1.1665   |
|          |                     | 14-17               | Wu-MeOH-D | 2.4684   |
|          |                     | 18-25               | Wu-MeOH-E | 0.8327   |
|          |                     | 26-28               | Wu-MeOH-F | 0.2879   |
|          |                     | 29                  | Wu-MeOH-G | 0.1420   |
|          |                     | 30                  | Wu-MeOH-H | 0.1001   |
|          |                     | 31                  | Wu-MeOH-I | 0.1326   |
|          |                     | 32                  | Wu-MeOH-J | 0.024    |
|          |                     | 33                  | Wu-MeOH-K | 0.0498   |
|          |                     | 34-37               | Wu-MeOH-L | 0.2540   |
|          |                     | 38-44               | Wu-MeOH-M | 0.8919   |
|          |                     | 45-49               | Wu-MeOH-N | 0.5570   |
|          |                     | 50-55               | Wu-MeOH-O | 0.1893   |
|          |                     | 56-57               | Wu-MeOH-P | 0.0654   |
|          |                     | 58-60               | Wu-MeOH-Q | 0.0529   |

Antes de reunir las fracciones que conformarían la fracción Wu-MeOH-D se separaron sólidos insolubles en MeOH, los que se identificaron como el 5-*epi*-litospermósido (**17**) (60 mg) y mezclas de éste con sacarosa (**18**) (600 mg).

## Preparación de derivados

### Procesos de acetilación:

La preparación de derivados acetilados, se llevó a cabo de la manera convencional con pequeñas muestras (7 a 10 mg), utilizando anhídrido acético y piridina. En cada caso, se dio seguimiento a la reacción por CCF y al finalizar esta se eliminó el excedente de piridina y anhídrido acético mediante una corriente de nitrógeno. La mezcla de reacción en los casos que se requirió, se purificó por CCFp obteniéndose el derivado acetilado correspondiente. De este modo se obtuvieron los derivados monoacetilados de **2** y **4** (**19**) y (**20**) (5 y 2 mg respectivamente), además del diacetato del producto **1** (**22**) (2 mg), el diacetato del desacetilwigandol (**23**) (30 mg), el triacetato de la rhamnazina (**21**) (3.0 mg), el peracetato del 5-*epi*-litospermósido (**24**) (24.3 mg) y el diacetato de la geranilhidroquinona (**26**) (11 mg).

### Oxidación del desacetilwigandol (**3**) y obtención de la globiferina (**9**):

Una muestra de 50 mg de desacetilwigandol (**3**) se disolvió en acetona y se le adicionó MnO<sub>2</sub> (50 mg). Se dejó en agitación a temperatura ambiente. Se siguió la reacción por CCF y finalizada ésta, se filtró el producto y se eluyó a través de una columna de gel de sílice para eliminar el MnO<sub>2</sub> residual. Se concentró a presión reducida obteniéndose 42 mg del compuesto **9**.

### Oxidación de la geranilhidroquinona (**10**) y obtención de la geranilbenzoquinona (**25**):

Se siguió el mismo proceso descrito anteriormente utilizando 16 mg de geranilhidroquinona (**10**) para obtener 10.9 mg como geranilbenzoquinona (**25**).

## Pruebas biológicas:

### Actividad atrapadora del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH):

Se empleó la metodología descrita por Domínguez y colaboradores<sup>72</sup> con algunas modificaciones. El ensayo se realizó en placas de 96 pozos. Se colocaron 50 µL de la solución de cada compuesto y se adicionaron 150 µL de solución etanólica de DPPH 133.33 µM obteniendo concentraciones finales de cada compuesto en el rango 5.62 a 56.23 µM. La placa se incubó a 37°C durante 30 minutos en oscuridad y con agitación. Después se midió la absorbancia de cada pozo a 515 nm en un lector de microplacas. La muestra se ensayó por triplicado y los resultados se expresan como el promedio de los tres experimentos independientes más menos el error estándar de la media. Como estándar positivo se usó α-tocoferol, quercetina y BHT.

El porcentaje de reducción del DPPH se midió de la siguiente forma:

$$\frac{DO\ control - DO\ experimental}{DO\ control} \times 100\ %$$

Donde DO control= densidad óptica del DPPH transcurridos 30 minutos

DO experimental = densidad óptica del compuesto más DPPH transcurridos 30 minutos.

### Actividad inhibitoria de la proliferación:

Se siguió el procedimiento utilizado en el Instituto Nacional de Cáncer de Estados Unidos en un ensayo colorimétrico utilizando sulforrodamida B.<sup>83</sup>

Se mide la viabilidad de las células para preparar la población de células que se deposita en cada pozo. Se realizó el cultivo de los diferentes tipos de células tomando 100 µl de cada una en una placa de 96 pozos a 37° C en atmosfera de CO<sub>2</sub> al 5%. Posteriormente se prepararon los platos basal (células sin tratar) y experimental (células tratadas) tomando 100 µl adicionales del fármaco a ensayar o 100 µl más del cultivo celular (plato basal). Se fijan las proteínas con una solución de ácido tricloroacético (TCA) al 50% por 60 minutos a 4°C, se lava con agua por tres veces y se deja secar por 24 horas. Pasado este tiempo se le adiciona la sulforrodamida B (SRB) tiñendo las proteínas por 30 minutos, se lava con ácido acético para eliminar el exceso y se deja secar por 24 horas. Seguido a esto se disuelve con una solución Tris y se lee el valor de la densidad óptica a 515 nm.

El porcentaje de inhibición del crecimiento celular se midió de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Inhibición} = 100 - \left[ \frac{B}{A} \times 100 \right]$$

Donde A = células sin tratar

B = células más tratamiento

#### Actividad antiinflamatoria en el modelo inducido con TPA:

Se siguió el procedimiento establecido por De Young<sup>85</sup> con algunas modificaciones.<sup>86</sup> Se utilizaron ratones machos de la cepa cinvestav (25-30 g). Los animales (n = 3) se mantuvieron en cajas de acrílico a temperatura constante de 24°C con un fotoperiodo de 12 horas luz/12 horas oscuridad, con agua y alimento. Se anestecieron con pentobarbital sódico (35 mg/kg, IP) y se les aplicó 10 µl de una solución etanólica de TPA (0.25 mg/ml). Transcurridos 10 minutos en la misma oreja se aplicó 1 mg o µmol del compuesto disueltos en el vehículo (acetona-agua). En la oreja izquierda (testigo) se aplicó solamente 10 µl de etanol y 20 µl del vehículo en el que se disolvió el compuesto. Cuatro horas después de la aplicación del TPA los animales se sacrificaron con CO<sub>2</sub> y se tomó una muestra de 7 mm de diámetro de ambas orejas.

Las muestras de las dos orejas se pesaron y su diferencia representa el edema.

El porcentaje de inhibición se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{C - E}{C} \times 100$$

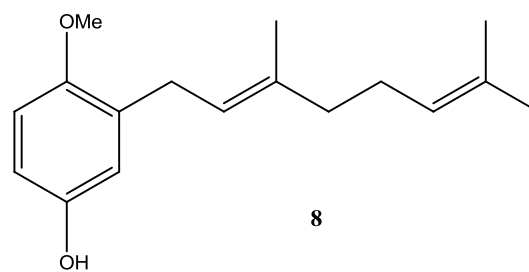
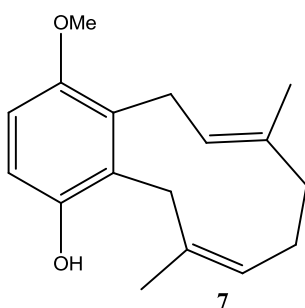
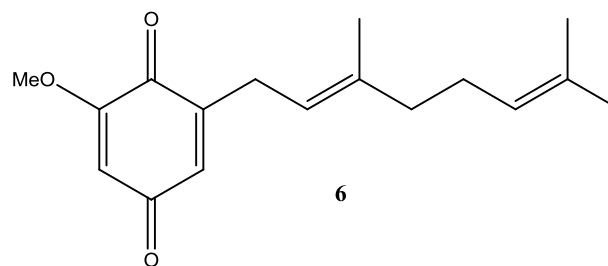
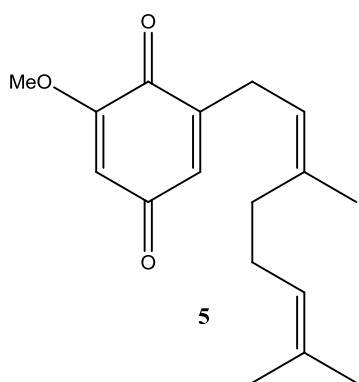
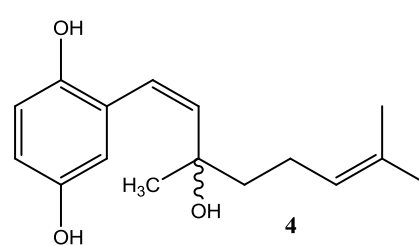
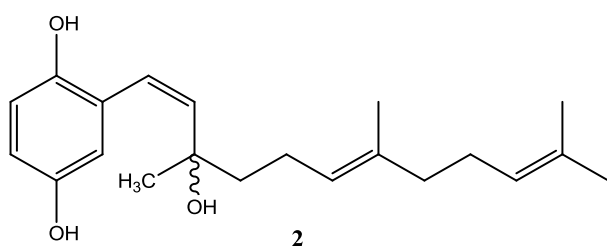
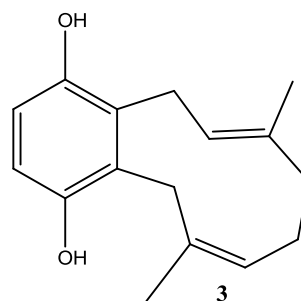
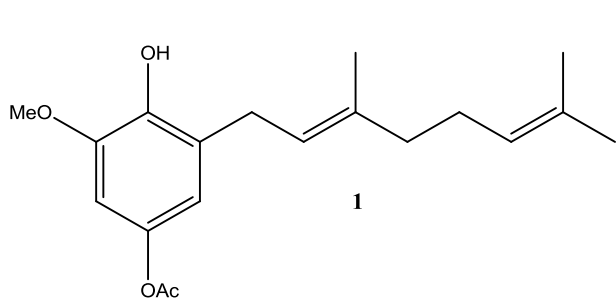
Donde:

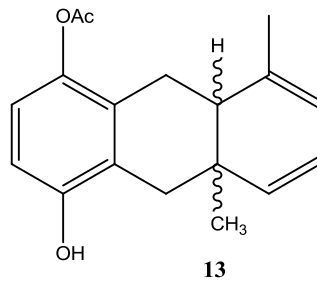
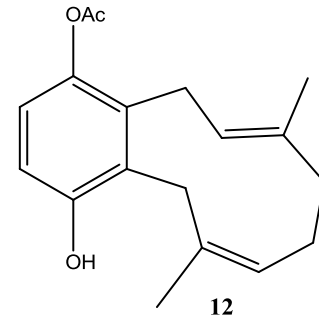
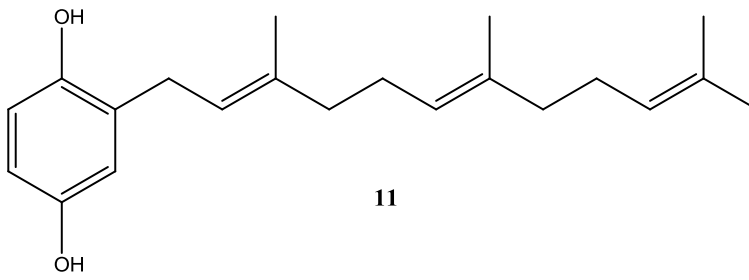
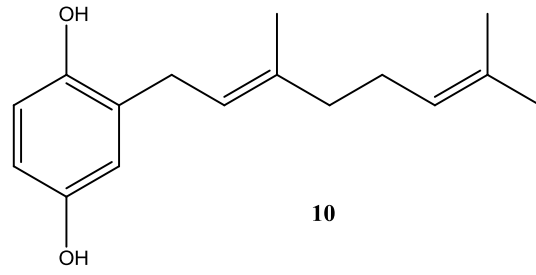
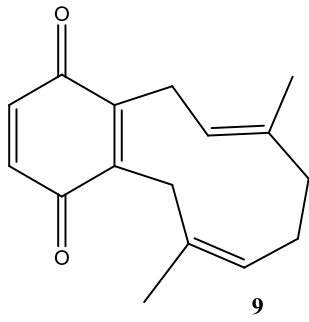
C= Edema del grupo tratado con TPA

E= Edema del grupo experimental (TPA + compuesto)

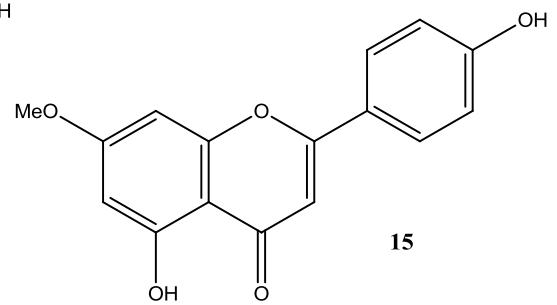
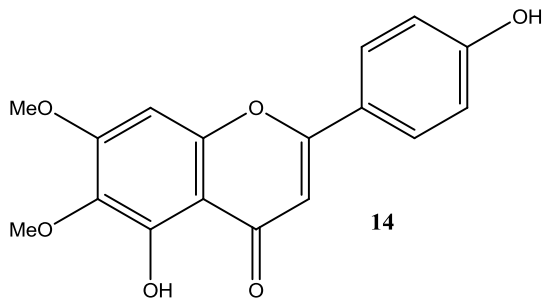
## Compuestos aislados

### Compuestos fenólicos prenilados

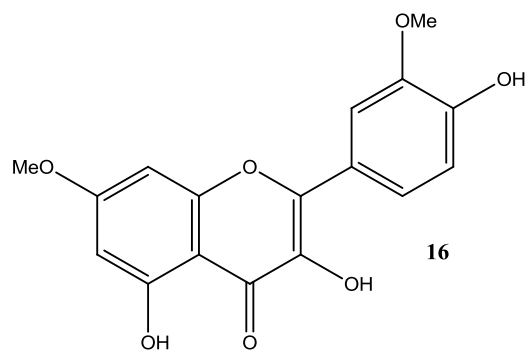




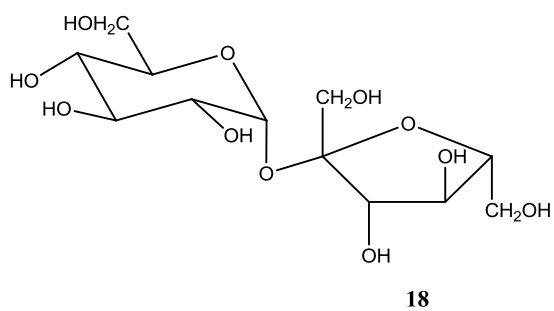
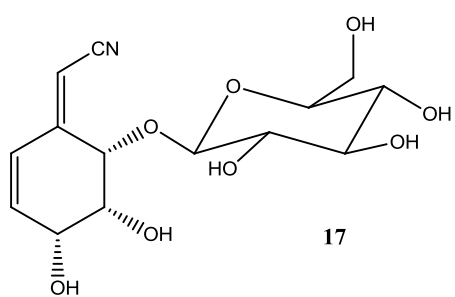
Flavonoides



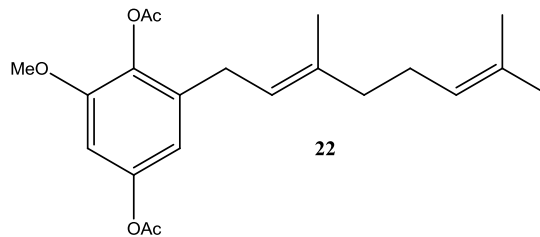
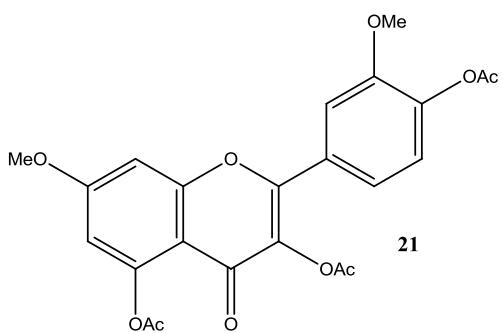
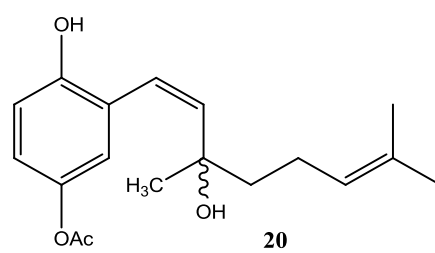
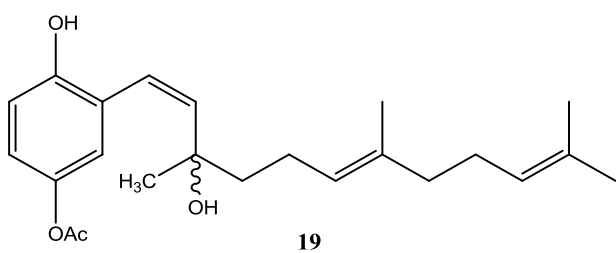


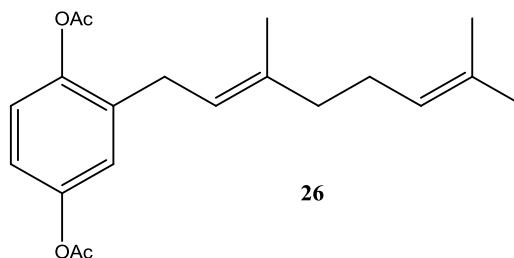
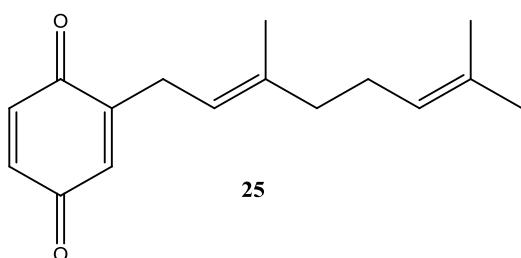
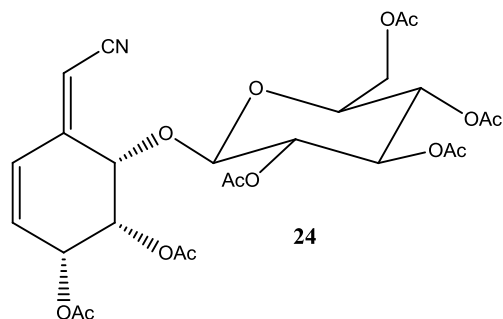
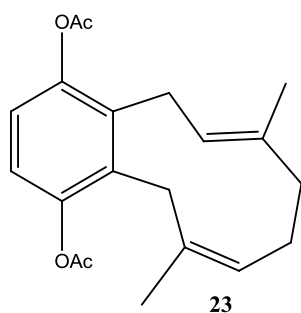


### Compuestos glicosilados



### Derivados obtenidos





## RESUMEN DATOS ESPECTROSCÓPICOS, DATOS ESPECTROMÉTRICOS Y PROPIEDADES FÍSICAS DE LOS COMPUESTOS AISLADOS.

A continuación se dan los datos para los compuestos descritos por primera vez en la especie, además de las verapliquinona A y de los benzociclododecadienos aislados. Los demás son compuestos reportados previamente en la especie de los cuales se conocen muy bien sus datos.

1-O-acetil-3-geranil-5-metoxi-hidroquinona (1): Aceite amarillo; IR (sol. CHCl<sub>3</sub>)  $\nu_{\max}$  3544, 3021, 2930, 1729, 1605, 1466, 1437, 1230, 1203, 928 cm<sup>-1</sup>; RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) y RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) (Tabla 1); EM-IE m/z 318 (36), 276 (97), 191 (84), 154 (93), 153 (78), 123 (61), 69 (100), 41 (72).

2-((1Z,6E)-3-hidroxi-3,7,11-trimetildodeca-1,6,10-trien-1-il)hidroquinona (2): Aceite amarillo;  $[\alpha]_D - 3$  (c 0.1, CHCl<sub>3</sub>); IR (sol. CHCl<sub>3</sub>)  $\nu_{\max}$  3599, 3339, 2929, 2856, 1650, 1604, 1115, 1075 cm<sup>-1</sup>; RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) y RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) (Tabla 2); EM-IE m/z 312 [M<sup>+</sup>-H<sub>2</sub>O] (5) 297 [M<sup>+</sup>-H<sub>2</sub>O- Me] (2), 260 (40), 161 (100).

Desacetilwigandol (3): Sólido blanco; p.f. 165-167°C; IR (KBr)  $\nu_{\max}$  3276, 2925, 1481, 1438, 1375 1286, 1226, 1182, 796, 745 cm<sup>-1</sup>; RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) y RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 125

MHz) (Tabla 4) ; RMN <sup>1</sup>H (acetona d-<sub>6</sub>, 500 MHz) y RMN <sup>13</sup>C (acetona d-<sub>6</sub>, 125 MHz) (Tabla 5); EM-IE m/z 244 [M<sup>+</sup>](90), 229 [M<sup>+</sup>- Me] (72), 136 (80), 69 (100).

2-((6E)-3-hidroxi-3,7,-dimetilocta-1,6-dienil)hidroquinona (4): Aceite amarillo; ; [α]<sub>D</sub> – 6.6 (c 0.2, CHCl<sub>3</sub>); IR (sol. CHCl<sub>3</sub>) ν<sub>max</sub> 3602, 3358, 3008, 2928, 1662, 1611, 1489, 1381, 1238, 1078; RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) y RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) (Tabla 9); EM-IE m/z 244 [M<sup>+</sup>-H<sub>2</sub>O] (48), 229, [M<sup>+</sup>-H<sub>2</sub>O- Me] (15), 161 (100), 69 (40).

Verapliquinona B (5): Acetite amarillo; IR (Sol. CHCl<sub>3</sub>) 2933, 2856, 1680, 1650, 1603, 1442, 1196, 1177, 1045 cm<sup>-1</sup>; RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400MHz y RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) (Tabla 15); RMN <sup>1</sup>H (C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>, 400MHz) y RMN <sup>13</sup>C (C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>, 100 MHz) (Tabla 16); EM-IE m/z 274 [M<sup>+</sup>] (8), 259 (1), 191 (100), 69 (2).

Verapliquinona A (6): Acetite amarillo; IR (Sol. CHCl<sub>3</sub>) 2933, 2856, 1680, 1650, 1603, 1442, 1196, 1177, 1045 cm<sup>-1</sup>; RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400MHz y RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) (Tabla 15); RMN <sup>1</sup>H (C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>, 400MHz) y RMN <sup>13</sup>C (C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>, 100 MHz) (Tabla 16); EM-IE m/z 274 [M<sup>+</sup>] (8), 259 (1), 191 (100), 69 (2).

Flavidulol A (7): Aceite amarillo-rojizo; IR (Sol. CHCl<sub>3</sub>) 3423, 2930, 2860, 1599, 1474, 1452,1258, 1239, 1076 cm<sup>-1</sup>; RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400MHz) y RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 100MHz) (Tablas 7 y 8); EMIE m/z 258 [M<sup>+</sup>] (100), 243 (22), 201 (13), 189 (22), 187 (18), 150 (27).

Wigandol (12): Cristales incoloros; p.f. 163-166°C; IR (KBr) 3473, 2934, 1741, 1435, 1374, 1244, 1204 cm<sup>-1</sup>; RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400MHz) y RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 100MHz) (Tablas 7 y 8); EMIE m/z 286 [M<sup>+</sup>] (10), 245 (52), 244 (100), 188 (50), 173 (44), 136 (43), 91(33), 43(38).

Rhamnazina (16): Sólido amarillo; p.f. 203-208°C; IR (sol. CHCl<sub>3</sub>) 3690, 3537, 2950, 1656, 1630, 1594, 1502 1225, 1219, 1160 cm<sup>-1</sup>; RMN <sup>1</sup>H (acetona d-<sub>6</sub>, 400 MHz), RMN <sup>13</sup>C (acetona d-<sub>6</sub>, 100 MHz) y RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) (Tabla 10); EM-IE m/z 330 [M<sup>+</sup>] (100).

5-*epi*-litospermósido (17): Agujas finas blancas; p.f. 217-220°C; ; [α]<sub>D</sub> – 167 (c 0.1, H<sub>2</sub>O); IR (KBr) 3429, 3262, 2221, 1442, 1408, 1222, 1118, 1056, 1040, 999 cm<sup>-1</sup>; UV (H<sub>2</sub>O) λ<sub>MAX</sub> (log ε) 259 (4.33), 221 (3.85); DC (2.4 x 10<sup>-5</sup>M, H<sub>2</sub>O) λ<sub>MAX</sub> (Δε) 223 (+13.2), 260 (-17.2); RMN <sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O, HDO: 4.78) y RMN <sup>13</sup>C (D<sub>2</sub>O) (Tabla 13); RMN <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub> +D<sub>2</sub>O) y RMN <sup>13</sup>C (DMSO-d<sub>6</sub>) (Tabla 14); EM- IE m/z 329 [M<sup>+</sup>] (2), 149 [M<sup>+</sup>- Glu] (80).

## DISCUSIÓN DE RESULTADOS

### Identificación espectroscópica

#### 1-O-acetil-3-geranil-5-metoxi-hidroquinona (1):

El compuesto **1** se obtuvo como un aceite amarillo cuyo peso molecular de 318 una fue determinado por espectrometría de masas por impacto electrónico (EMIE). De su espectro de IR se observan bandas de absorción en 3544 y 1729  $\text{cm}^{-1}$  que confirma la presencia de grupos hidroxilo y carbonilo en la estructura. (Espectro 8 anexos)

En el espectro de RMN- $^1\text{H}$  (Espectro 1 anexos) se observan señales de un sistema AB en la región de los protones aromáticos, como dos señales dobles en  $\delta$  6.47 y 6.50 con constantes de acoplamiento *meta* ( $J = 2.8$  Hz), correspondientes a 1H cada una. Lo anterior indicó la presencia de un anillo aromático 1, 3, 4, 5 tetra-sustituido (Fig. 17).

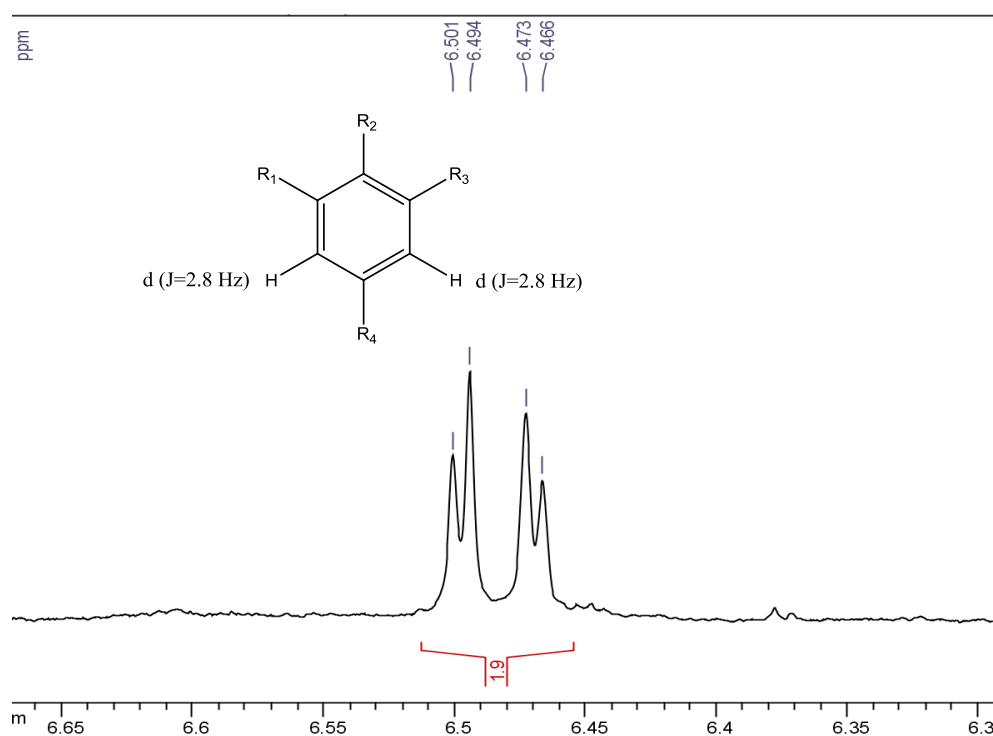


Figura 17. Representación de los protones aromáticos del anillo tetrasustituido en el espectro de protón del compuesto **1**.

Se observan además dos señales triples anchas, de dos protones vinílicos en  $\delta$  5.30 ( $J = 7.6$  Hz) y 5.10 ( $J = 6.8$  Hz); una señal doble en  $\delta$  3.35 ( $J = 7.2$  Hz) asignable a un metileno bencílico  $\alpha$  a un doble enlace; dos señales múltiples en  $\delta$  2.04 y 2.08 de metilenos alílicos y tres señales simples en  $\delta$  1.68, 1.69 y 1.60 correspondientes a metilos vinílicos. Las señales anteriores sugieren la presencia de un grupo geranilo en la molécula. Otras señales en el espectro, indicaron la presencia del hidrógeno de un OH fenólico ( $\delta$  5.55, intercambiable con  $D_2O$ ), un metoxilo aromático ( $\delta$  3.86) y un grupo acetato ( $\delta$  2.26), lo que está de acuerdo con el patrón de tetra-sustitución del anillo aromático.

En el experimento COSY (Espectro 4 anexos) se observan acoplamiento spin-spin entre el metilo vinílico, el protón vinílico y el metileno alílico de cada unidad prenílica del grupo geranilo en la estructura (Fig. 18).

En el espectro de RMN  $^{13}C$  (Espectro 2 anexos) se observan 19 señales, las cuales fueron asignadas a cuatro metinos, tres metilenos, cuatro metilos, y ocho carbonos cuaternarios, de acuerdo con los experimentos DEPT y HSQC.

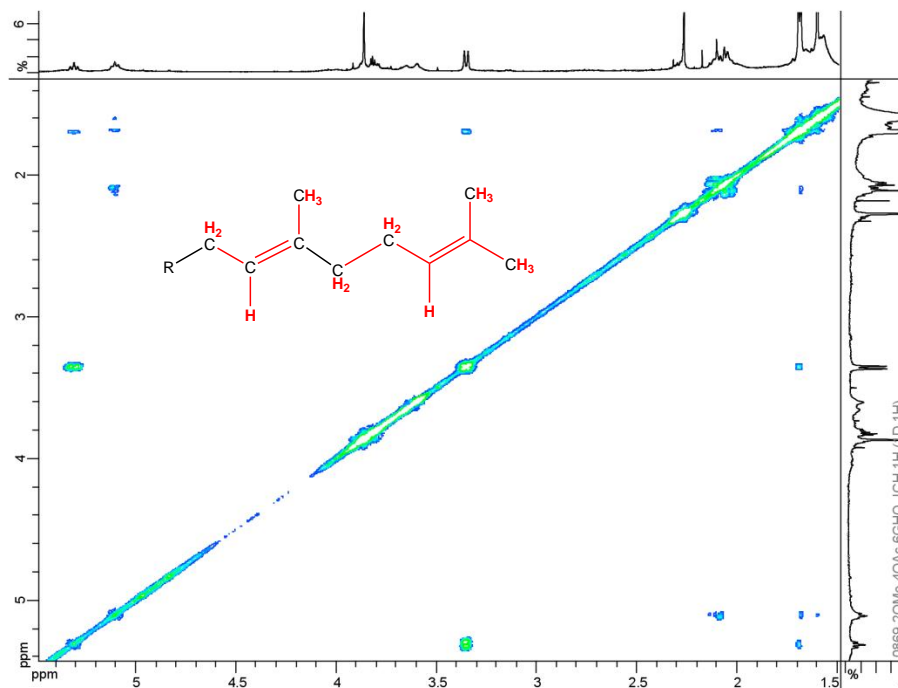


Figura 18. Correlaciones observadas en el experimento COSY del geranilo.

En el espectro NOESY (Espectro 5 anexos) se pueden observar correlaciones entre los protones del metoxilo en  $\delta$  3.86 ppm y el protón aromático en 6.50 ppm, así como entre el protón aromático en 6.47 ppm con los protones del metileno bencílico en 3.35 ppm, el

protón del metino vinílico en  $\delta$  5.30 y los protones del metilo del acetato en 2.26 ppm. Además se observa la correlación entre los protones en  $\delta$  5.30 y 2.06, lo que sugiere una configuración *E* del doble enlace 2' (Fig. 19 y 20).

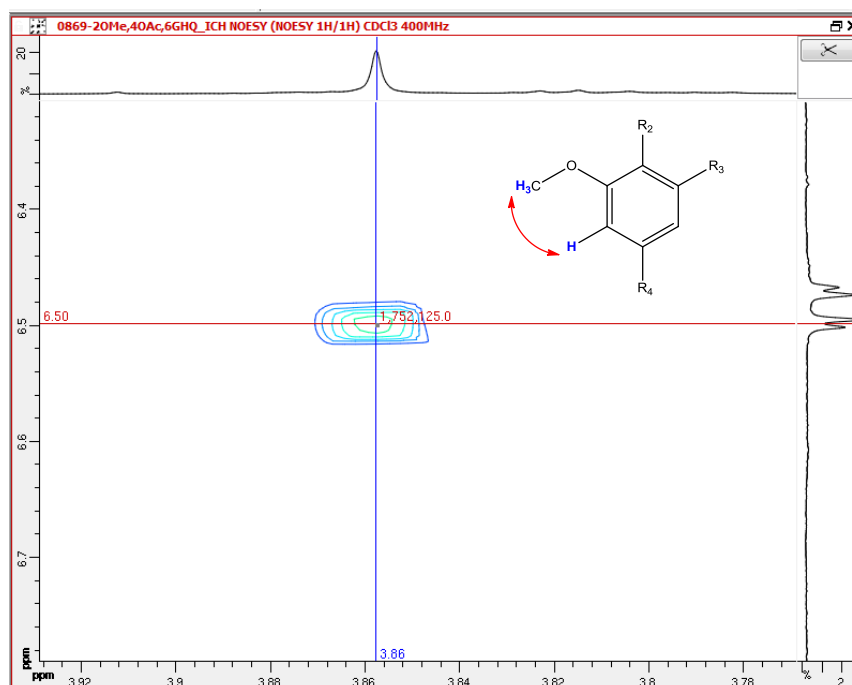


Figura 19. Efecto NOE observado entre el protón aromático H-6 y el metoxilo.

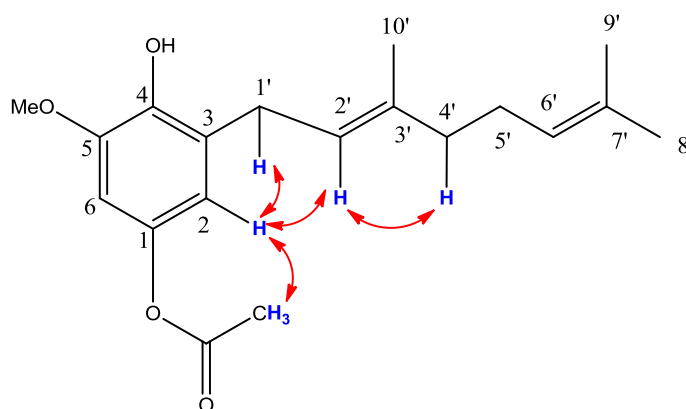
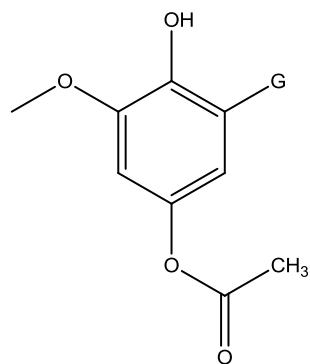
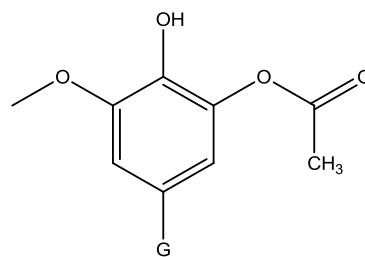


Figura 20. Efectos NOE observados en el protón aromático H-2 y determinación de la configuración *E* del doble enlace 2' del compuesto **1**.

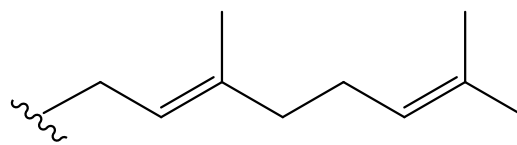
Teniendo en cuenta las correlaciones observadas en el experimento NOESY se pueden proponer dos estructuras probables:



Estructura parcial 1



Estructura parcial 2



Donde G es un grupo geranilo, **G** =

En el espectro HMBC (Espectro 7 anexos) se pueden observar las correlaciones  $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ , a dos y tres enlaces ( $^2J_{\text{C,H}}$ ,  $^3J_{\text{CH}}$ ), entre los protones del metileno bencílico H-1' con los carbonos C-2 y C-3 del anillo, lo que permitió su asignación y confirmar la estructura parcial **1** para el compuesto aislado (Fig. 21). A continuación se muestran otras correlaciones que permitieron establecer las posiciones relativas de los demás sustituyentes en el anillo.

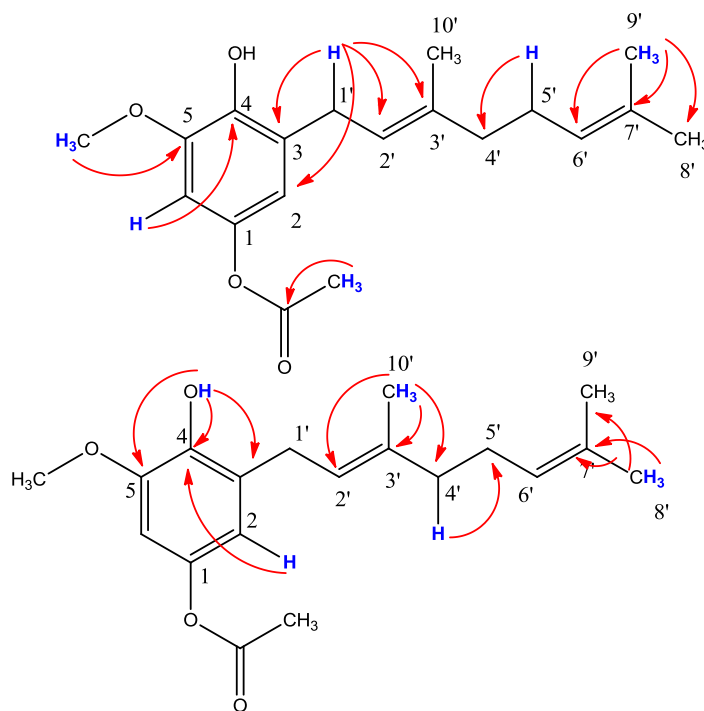
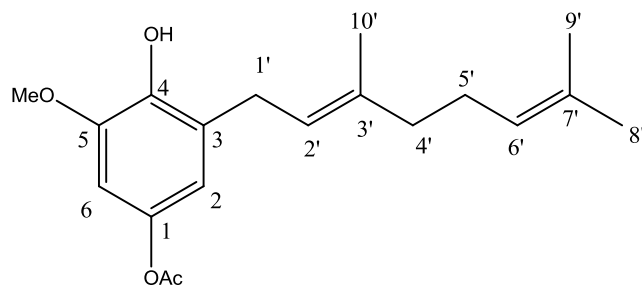


Figura 21. Correlaciones  $^1\text{H}-^{13}\text{C}$  observadas en el espectro HMBC del compuesto **1**.

Tabla 1. Datos espectroscópicos de RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) para el compuesto **1**.



| C/H | $\delta_c$               | $\delta_H$ , mult. <i>J</i> en Hz | NOESY <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H | HMBC <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C |
|-----|--------------------------|-----------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| 1   | 143.03 (C)               | -                                 | -                                    | -                                    |
| 2   | 114.03 (CH)              | 6.47 d (2.8)                      | H-1', H-2', H-12'                    | -                                    |
| 3   | 127.72 (C)               | -                                 | -                                    | -                                    |
| 4   | 141.04 (C)               | -                                 | -                                    | -                                    |
| 5   | 146.18 (C)               | -                                 | -                                    | -                                    |
| 6   | 102.64 (CH)              | 6.50 d (2.8)                      | H-11'                                | C-4                                  |
| 1'  | 27.69 (CH <sub>2</sub> ) | 3.35 d (7.6)                      | -                                    | C-2, C-3, C-4, C-2', C-3'            |
| 2'  | 121.39 (CH)              | 5.30 ta (7.6)                     | -                                    | -                                    |
| 3'  | 136.91 (C)               | -                                 | -                                    | -                                    |
| 4'  | 39.68 (CH <sub>2</sub> ) | 2.06 m                            | -                                    | C-5'                                 |
| 5'  | 25.56 (CH <sub>2</sub> ) | 2.10 m                            | -                                    | C-4'                                 |
| 6'  | 124.27 (CH)              | 5.10 ta (6.8)                     | H-8'                                 | -                                    |
| 7'  | 131.40 (C)               | -                                 | -                                    | -                                    |
| 8'  | 25.67 (CH <sub>3</sub> ) | 1.68 s                            | H-6'                                 | C-6', C-7', C-9'                     |
| 9'  | 17.69 (CH <sub>3</sub> ) | 1.60 s                            | -                                    | C-6', C-7', C-8'                     |
| 10' | 16.09 (CH <sub>3</sub> ) | 1.69 s                            | -                                    | C-2', C-3', C-4'                     |
| OMe | 56.12                    | 3.86 s                            | H-6                                  | C-5                                  |
| OAc | 21.09, 170.05            | 2.26 s                            | H-2                                  | C=O                                  |
| OH  | -                        | 5.55                              | -                                    | C-3, C-4, C-5                        |

En el espectro de masas (Espectro 9 anexos) se observa el ión molecular en una relación masa carga (*m/z*) de 318 uma, el cual corresponde para una fórmula molecular C<sub>19</sub>H<sub>26</sub>O<sub>4</sub>,



que está de acuerdo con la estructura propuesta. A continuación se muestran los fragmentos más significativos del compuesto **1** (Fig. 22).

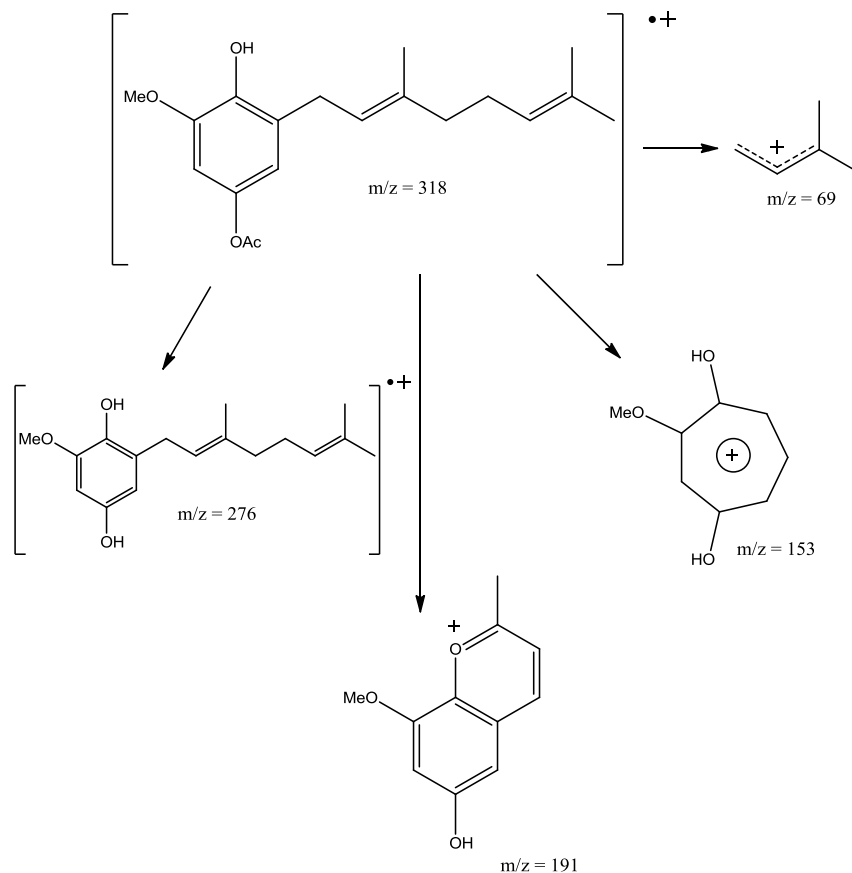


Figura 22. Fragmentos de masas del compuesto **1**.

La revisión de la literatura mostró la existencia del isómero **1a** aislado de *Phacelia ixodes*,<sup>22</sup> del que sólo se describen sus desplazamientos de protón.

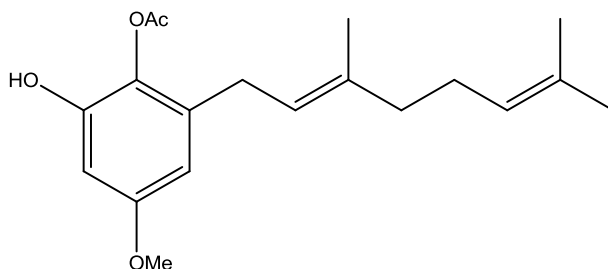


Figura 23. Isómero **1a** aislado de *Phacelia ixodes*.

La comparación de los datos de RMN <sup>1</sup>H de ambos compuestos (Tabla 2) mostró ligeras diferencias en el desplazamiento de varias señales que sugieren que se trata de

compuestos diferentes. De acuerdo con lo anterior, el compuesto **1** es un compuesto no descrito en la literatura.

Tabla 2. Datos comparativos de RMN  $^1\text{H}$  en  $\text{CDCl}_3$  entre el compuesto **1** y **1a** aislado de *P. ixodes*.

| No. | $\delta_{\text{H}}$ , mult. <i>J</i> en Hz<br>400 MHz<br>Compuesto <b>1</b> . | $\delta_{\text{H}}$ , mult. <i>J</i> en Hz<br>90 MHz<br>Compuesto <b>1a</b> de<br><i>Phacelia ixodes</i> | $\Delta ^1\text{H}$<br>( $^1\text{H}$ compuesto <b>1</b> -<br>$^1\text{H}$ compuesto<br>reportado) |
|-----|---|--|--|
| 1   | -   | -  | -  |
| 2   | 6.47 d (2.8)  | 6.31 s   | <b>0.16</b>  |
| 3   | -   | -  | -  |
| 4   | -   | -  | -  |
| 5   | -   | -  | -  |
| 6   | 6.50 d (2.8)  | 6.31 s   | <b>0.19</b>  |
| 1'  | 3.34 d (7.6)  | 3.17 d (8.0)   | <b>0.17</b>  |
| 2'  | 5.30 ta (7.6)   | 5.21 t (8.0)   | <b>0.09</b>  |
| 3'  | -   | -  | -  |
| 4'  | 2.06 m  | 2.06 m   | -  |
| 5'  | 2.10 m  |  | -  |
| 6'  | 5.10 ta (6.8)   | 5.09 m   | 0.01   |
| 7'  | -   | -  | -  |
| 8'  | 1.68 s  | 1.68 s   | 0  |
| 9'  | 1.60 s  | 1.60 s   | 0  |
| 10' | 1.69 s  | 1.68 s   | 0.01   |
| OMe | 3.86 s  | 3.71 s   | <b>0.15</b>  |
| OAc | 2.26 s  | 2.28   | - 0.02   |
| OH  | 5.55  | 5.40   | <b>0.15</b>  |

2-[(1Z,6E)-3-hidroxi-3,7,11-trimetildodeca-1,6,10-trien-1-il]-hidroquinona (**2**):

El compuesto **2** se obtuvo como un aceite de color amarillo ópticamente activo,  $[\alpha]_{\text{D}} -3.0$  (c 0.1,  $\text{CHCl}_3$ ). El espectro en el Infrarrojo mostró bandas características para grupos

hidroxilo en  $3599$  y  $3339\text{ cm}^{-1}$ , para metilos y metilenos en  $2929$  y  $2856\text{ cm}^{-1}$ , dobles enlaces en  $1650$  y  $1604\text{ cm}^{-1}$  y enlaces C–O en  $1115$  y  $1075\text{ cm}^{-1}$  (Espectro 17 anexos).

En el espectro de RMN- $^1\text{H}$  (Espectro 10 anexos) se observan tres señales en la región de los protones aromáticos con desplazamientos  $\delta$  6.64 d ( $J = 8.8\text{ Hz}$ ), 6.48 d ( $J = 2.8\text{ Hz}$ ) y 6.57 dd ( $J = 8.4, 2.8\text{ Hz}$ ), las cuales por su multiplicidad y constantes de acoplamiento indican la presencia de un anillo aromático trisustituido 1, 2, 4 (Fig. 24).

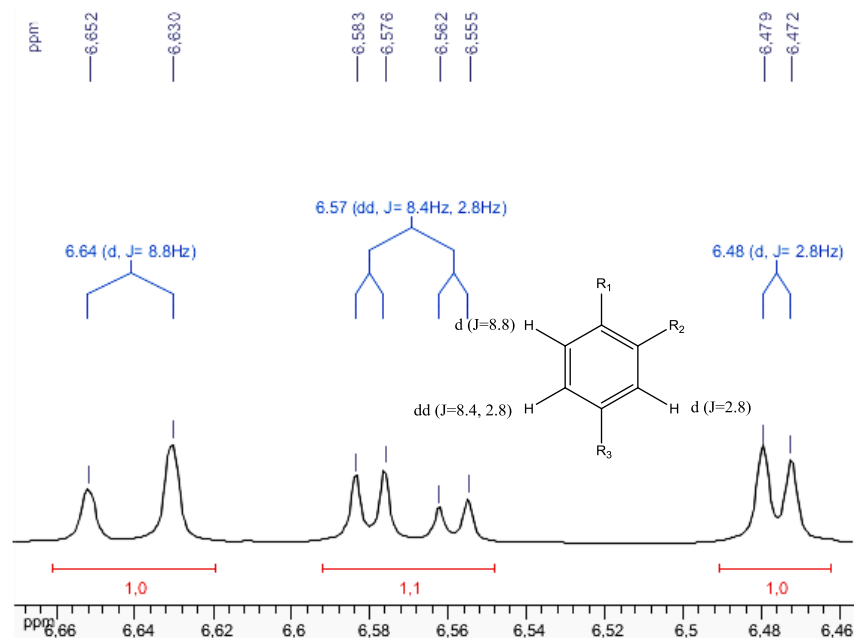


Figura 24. Patrón de sustitución del anillo aromático en el compuesto **2**.

En la región de los protones vinílicos, se observan dos señales dobles características de un sistema AX en  $\delta$  6.27 y 5.60 ( $J = 10.0\text{ Hz}$ ), las cuales debido a sus desplazamientos químicos y constantes de acoplamiento indican la presencia de un doble enlace con configuración *cis*. Se observan además señales asignables a otros dos protones vinílicos en  $\delta$  5.10 (m) y 5.08 (m). Señales múltiples en  $\delta$  2.10, 2.04, 1.96, 1.72 y 1.64 sugieren la presencia de grupos metileno alílicos y tres señales simples en  $\delta$  1.67, 1.59 y 1.57 indican la presencia de igual número de metilos vinílicos. Finalmente, una señal simple en  $\delta$  1.36 correspondiente a un metilo terciario, que por su desplazamiento químico, es probable se encuentre enlazado a un carbono que soporta una función oxigenada.

El espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Espectro 11 anexos) mostró 21 señales, las cuales fueron asignadas a siete metinos, cuatro metilenos, cuatro metilos, y seis carbonos cuaternarios, de acuerdo con los experimentos DEPT. De estos últimos, un carbono alifático ( $\delta$  77.10) y

otros dos aromáticos ( $\delta$  147.02 y 149.19), pueden ser asignados de acuerdo con sus desplazamientos a carbonos que soportan funciones oxigenadas.

Los datos anteriores de RMN  $^1\text{H}$  y de  $^{13}\text{C}$ , sugieren que el compuesto **2** debe ser una hidroquinona monosustituida, derivada de la farnesilhidroquinona con un doble enlace disustituido *cis* y un carbono cuaternario que soporta un alcohol y un metilo, en la cadena lateral.

En el experimento NOESY (Espectro 14 anexos) se observa una correlación entre el protón del anillo aromático con acoplamiento *meta* y un protón del doble enlace disustituido, lo que sugiere que el doble enlace se encuentra  $\alpha$  al anillo. La interacción entre los dos protones del doble enlace corrobora la estereoquímica del doble enlace *cis* (*Z*) (Fig. 25).

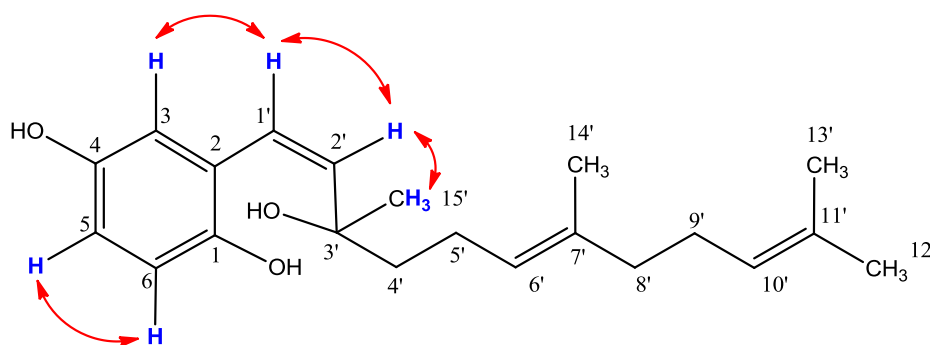


Figura 25. Correlaciones NOE observadas entre el anillo aromático y el doble enlace *Z*.

Además, se observa la interacción entre el protón del doble enlace H-6' con los protones del metileno H-8' que está de acuerdo con la presencia del segundo doble enlace *E* en C-6' (Fig. 26).

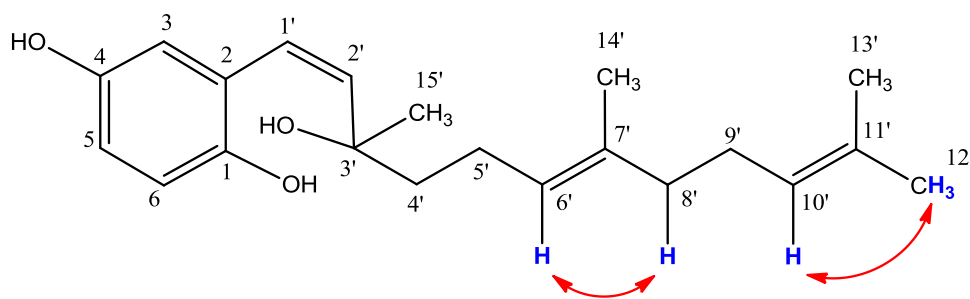


Figura 26. Efectos NOE observados en la cadena prenilada y determinación de la configuración *E* del doble enlace C-6'.

Los acoplamientos a dos y tres enlaces ( $^2J$ ,  $^3J$ ), observados en el experimento HMBC (Espectro 16 anexos), confirman la posición del doble enlace disustituido. En el espectro

se observan las correlaciones entre el protón en  $\delta$  6.27 (H-1') con los carbonos C-1, C-2 y C-3 del anillo aromático y del protón en 5.60 ppm con C-2. (Fig. 27)

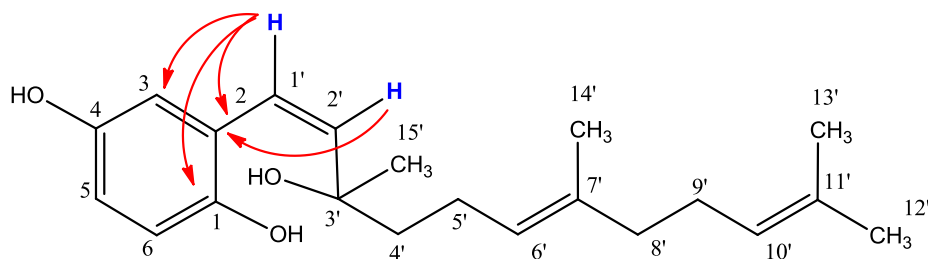


Figura 27. Correlaciones HMBC entre los protones del doble enlace *cis* y los carbonos del anillo aromático.

También se observan interacciones entre los protones del doble enlace *cis* y el carbono cuaternario en 77.1 ppm y de este con los metilenos 4' y 5', además de las interacciones de los protones del grupo metilo en  $\delta$  1.36 con el carbono cuaternario, un carbono  $sp^2$  (C-2') y un metileno (C-4'). (Fig. 28)

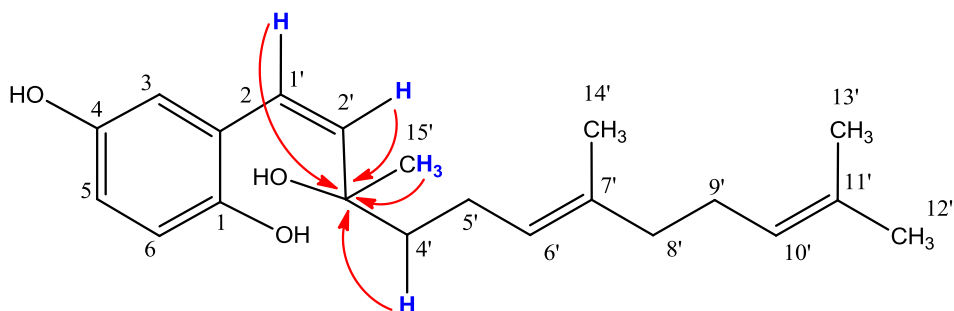


Figura 28. Correlaciones HMBC entre los protones a dos y tres enlaces con el carbono cuaternario base de oxígeno.

Estas correlaciones fueron clave para establecer la conexión entre el doble enlace *cis* en la cadena prenilada, el anillo aromático y el carbono cuaternario base de oxígeno. Los datos de RMN permiten establecer que el compuesto aislado debe ser un derivado de la farnesilhidroquinona con la cadena lateral modificada, cuya estructura se estableció como: 2-[(1Z,6E)-3-hidroxi-3,7,11-trimetildodeca-1,6,10-trien-1-il]-hidroquinona (**2**).

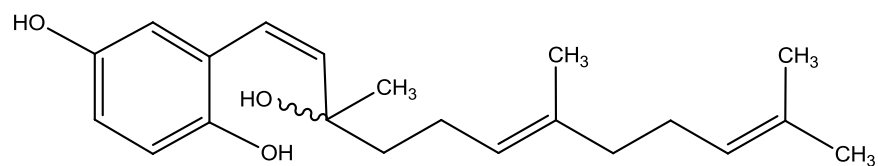
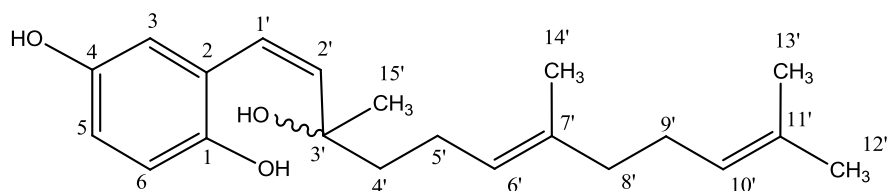


Figura 29. Estructura compuesto (**2**).

La revisión en la literatura indicó que el compuesto **2**, es un compuesto nuevo.

Tabla 3. Datos espectroscópicos de RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) del compuesto **2**.



| C/H | $\delta_c$               | $\delta_H$ , mult. (J en Hz) | COSY <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H | HMBC <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C |
|-----|--------------------------|------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|
| 1   | 147.02 (C)               | -                            | -                                   | -                                    |
| 2   | 121.96 (C)               | -                            | -                                   | -                                    |
| 3   | 112.83 (CH)              | 6.48 d (2.8)                 | H-5                                 | C-1, C-4, C-5, C-1'                  |
| 4   | 149.19 (C)               | -                            | -                                   | -                                    |
| 5   | 115.37 (CH)              | 6.57 dd (8.8, 2.8)           | H-6, H-3                            | C-1, C-3, C-4                        |
| 6   | 116.68 (CH)              | 6.64 d (8.8)                 | H-5                                 | C-1, C-2, C-4                        |
| 1'  | 122.57 (CH)              | 6.27 d (10.0)                | H-2'                                | C-1, C-2, C-3, C-3'                  |
| 2'  | 130.97 (CH)              | 5.60 d (10.0)                | H-1'                                | C-2, C-3', C-4', C-15'               |
| 3'  | 77.10 (C)                | -                            | -                                   | -                                    |
| 4'  | 40.88 (CH <sub>2</sub> ) | 1.72 m, 1.64 m               | H-5'                                |                                      |
| 5'  | 22.60 (CH <sub>2</sub> ) | 2.10 m                       | H-4', H-6'                          | C-4', C-6', C-7'                     |
| 6'  | 123.97 (CH)              | 5.10 m                       | H-5', H-14'                         | C-4', C-5', C-8', C-14'              |
| 7'  | 135.29 (C)               | -                            | -                                   | -                                    |
| 8'  | 39.66 (CH <sub>2</sub> ) | 1.96 m                       | H-9'                                | C-6', C-7', C-9', C-10',             |
| 9'  | 26.67 (CH <sub>2</sub> ) | 2.04 m                       | H-8', H-10'                         | C-7', C-8', C-10', C-11'             |
| 10' | 124.32 (CH)              | 5.08 m                       | H-9'                                | C-12' C-13'                          |
| 11' | 131.32 (C)               | -                            | -                                   | -                                    |
| 12' | 25.67 (CH <sub>3</sub> ) | 1.67 s                       | -                                   | C-10', C-11', C-13'                  |
| 13' | 17.66 (CH <sub>3</sub> ) | 1.59 s                       | -                                   | C-10', C-11', C-12'                  |
| 14' | 15.94 (CH <sub>3</sub> ) | 1.57 s                       | H6'                                 | C-6', C-7', C-8'                     |
| 15' | 26.01 (CH <sub>3</sub> ) | 1.37 s                       | -                                   | C-2', C-3', C-4'                     |

En el espectro de masas determinado por IE (Espectro 18 anexos), no se observó el ión molecular de 330 uma, sin embargo se observa el ión de  $m/z$  312 debido a la pérdida de

una molécula de agua, característico de los alcoholes terciarios. A continuación se muestran los fragmentos más significativos.

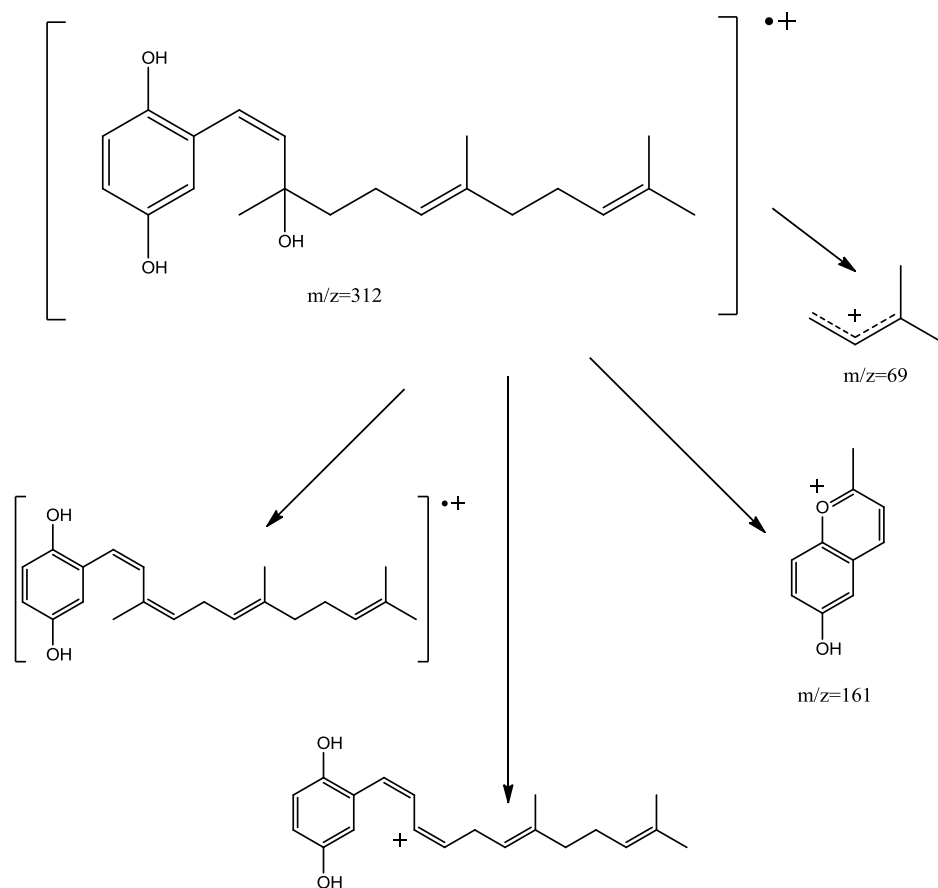


Figura 30. Fragmentos del espectro de masas por IE del compuesto (2).

La acetilación del compuesto **2** en  $\text{Ac}_2\text{O}/\text{py}$  tras una hora de reacción permitió obtener el producto monoacetilado **19**, lo que se confirmó por su espectro de masas donde se observa un ión ( $\text{M}-\text{H}_2\text{O}$ ) de 42 unidades de masas mayor ( $m/z$  354) que el del compuesto **2** (Espectro 83 anexos). En los espectros de RMN  $^1\text{H}$  (Espectro 81 anexos) se observa una señal simple en 2.26 ppm que integra para tres protones y de RMN  $^{13}\text{C}$  (Espectro 82 anexos) las señales de los carbonos en  $\delta$  21.07 y 169.85 del grupo metilo y carbonilo respectivamente.

La asignación de su posición relativa del acetato, se realizó mediante análisis de los datos de RMN  $^1\text{H}$ , en el cual se observa desplazamiento a campo bajo de las señales de los protones 3 y 5 (+0.23 y +0.22 ppm, respectivamente) vecinos a la posición 4 del anillo, mientras que el protón de la posición 6 del anillo sufre un ligero desplazamiento de +0.09 ppm. Esto indica que el grupo acetato está en la posición 4 del anillo y ejerce un efecto de desprotección sobre las posiciones 3 y 5.

### Desacetilwigandol (3):

El compuesto **3** fue aislado como un sólido de color blanco insoluble en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y soluble en acetona con punto de fusión 165-167 °C, cuyo peso molecular de 244 una determinado por EMIE, está de acuerdo para una fórmula molecular  $\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{O}_2$ .

El espectro IR (Espectro 31 anexos) muestra bandas de absorción características de grupos hidroxilo en  $3275\text{ cm}^{-1}$ , además las bandas de absorción en  $1180$  y  $1220\text{ cm}^{-1}$  para enlaces C-O.

En el espectro de RMN- $^1\text{H}$  (Espectro 19 anexos) se observan dos señales dobles de un sistema AB, en  $\delta$  6.54 y 6.52 con constantes de acoplamiento  $J = 8.0\text{ Hz}$ , las cuales indican la presencia de un anillo aromático tetrasustituido. Además una señal doble ancha y una señal triple ancha en  $\delta$  5.27 y 5.11 respectivamente asignables a protones vinílicos, señales múltiples en  $\delta$  1.77, 2.01 y 2.15 se asignaron a metilenos alílicos y dos señales simples anchas en  $\delta$  1.60 y 1.69 se deben a dos metilos vinílicos. Se observa una señal simple en 3.30 y señales en 3.31 dd ( $J = 16.5, 12.0\text{ Hz}$ ) y 3.76 da ( $J = 16.5\text{ Hz}$ ). También una señal ancha en 4.44 ppm correspondiente a OH de grupos fenólicos

El espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Espectro 20 anexos) presenta 16 señales, correspondientes a dos metilos, cuatro metilenos, cuatro metinos y seis carbonos cuaternarios, de acuerdo con los experimentos DEPT (Espectro 21 anexos) y HSQC (Espectro 24 anexos).

En el experimento COSY (Espectro 22 anexos) se observan correlaciones entre los metilos vinílicos, los protones vinílicos, los metilenos alílicos y los metilenos bencílicos. Los acoplamientos observados sugieren la presencia de una cadena prenilada derivada de un grupo geranilo. (Fig. 31)

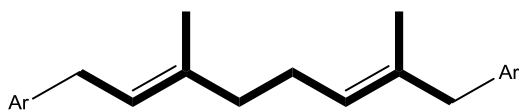


Figura 31. Correlaciones  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  en el experimento COSY del desacetilwigandol.

Sin embargo solo se observan dos de los tres metilos vinílicos de la cadena de un geranilo. Estos datos, así como el patrón de sustitución del anillo aromático sugieren que el grupo geranilo se encuentra formando un ciclo mediante la unión de uno de los metilos terminales con el anillo aromático, dando origen a un benzociclododecadieno similar al wigandol (**12**) aislado anteriormente de la misma especie.<sup>11-13,45</sup>

Los datos anteriores permitieron identificar el compuesto como el desacetilwigandol (**3**), el cual no ha sido aislado anteriormente de una fuente natural.



En el experimento NOESY (Espectro 23 anexos) se observa la correlación entre el protón vinílico H-7 y los protones del metilo H-15, mientras que en el otro doble enlace no se observa correlación con el grupo metilo pero si con el metileno H-9, permitiendo establecer la configuración de los dobles enlaces (*Z*)-C-6 y (*E*)-C-10, misma configuración establecida en el wigandol (**12**) y los otros benzocyclodecadienos aislados.

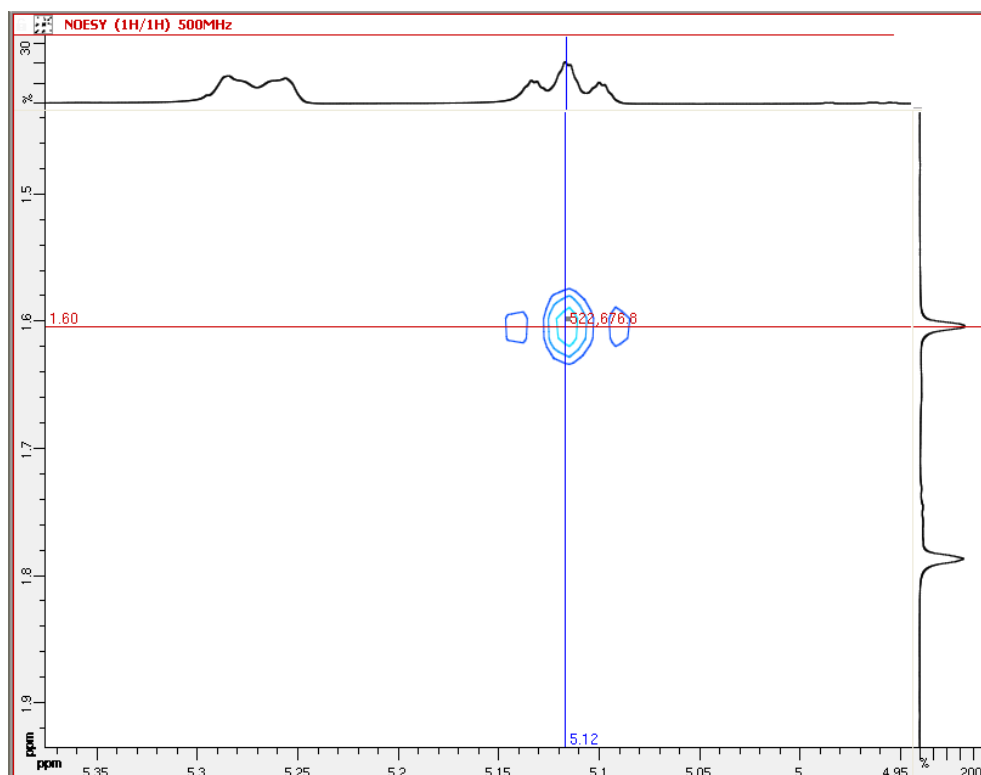


Figura 32. Efecto NOE entre el metilo 15 y el protón vinílico H-7 que establece la configuración *Z* del doble enlace en C-6.

La asignación de los carbonos protonados se estableció por medio del experimento HSQC, mientras que los carbonos cuaternarios se establecieron a través del experimento HMBC (Espectro 25 anexos), permitiendo así la asignación completa de las señales de RMN en la estructura. A continuación se muestran las correlaciones observadas en el experimento HMBC. (Fig. 33)

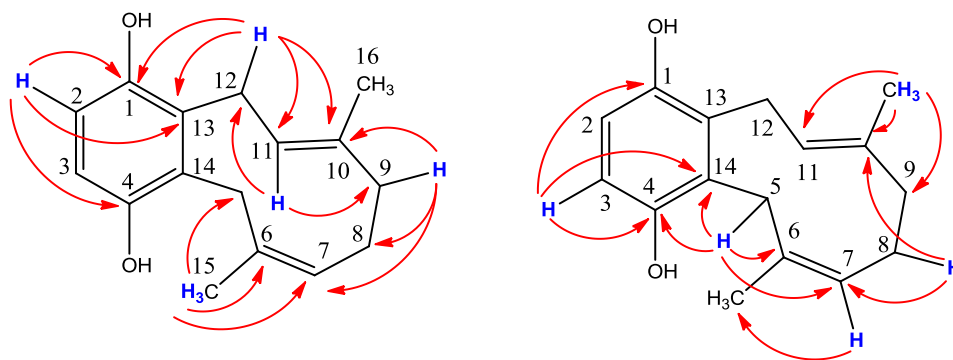


Figura 33. Correlaciones  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (HMBC) observadas en el desacetilwiganol (**3**).

Recientemente de *Cordia globifera*<sup>47</sup> se aisló la quinona denominada globiferina (**9**), la cual al ser tratada con  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  dio como producto de reducción la hidroquinona, cuya estructura corresponde al desacetilwiganol (**3**). La comparación de los datos espectroscópicos del compuesto aislado de *W. urens* y del compuesto obtenido por reducción de la globiferina (**9**) indican que se trata del mismo compuesto (Tabla 19) (Espectros 26 y 27 anexos). Sin embargo, varios desplazamientos químicos en RMN  $^{13}\text{C}$  publicados para el producto de reducción de la globiferina (**9**), se encuentran erróneamente intercambiados. Este es el primer reporte del desacetilwiganol como producto natural.

A continuación se muestran los fragmentos más significativos:

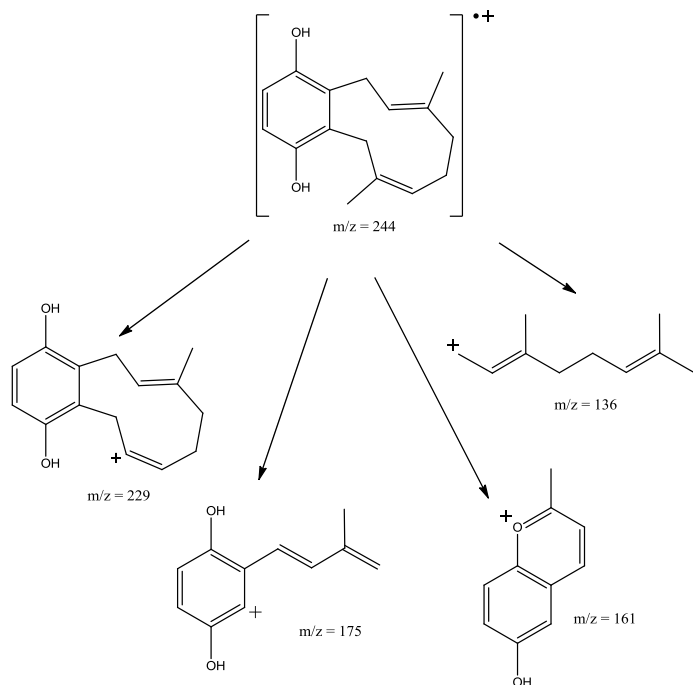
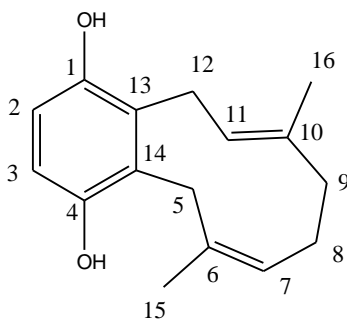


Figura 34. Fragmentos del espectro de masas por IE del desacetilwiganol (**3**).

Tabla 4. Datos espectroscópicos de RMN en CDCl<sub>3</sub> para el desacetilwigandol (**3**).



| C/H | $\delta_c$               | $\delta_H$ , mult. <i>J</i> en Hz | COSY $^1H-^1H$     | HMBC $^1H-^{13}C$           |
|-----|--------------------------|-----------------------------------|--------------------|-----------------------------|
|     | 125 MHz                  |                                   |                    |                             |
| 1   | 143.65 (C)               | -                                 | -                  | -                           |
| 2   | 109.05 (CH)              | 6.54 d (8.0)                      | H-3                | C-1, C-4, C-13              |
| 3   | 109.32 (CH)              | 6.52 d (8.0)                      | H-2                | C-1, C-4, C-14              |
| 4   | 144.93 (C)               | -                                 | -                  | -                           |
| 5   | 24.38 (CH <sub>2</sub> ) | 3.30 s                            | H-7, H-15          | C-4, C-6, C-7, C-14, C-15   |
| 6   | 135.25 (C)               | -                                 | -                  | -                           |
| 7   | 117.99 (CH)              | 5.11 ta (8.5)                     | H-5, H-8, H-15     | C-5, C-8, C-15              |
| 8   | 24.73 (CH <sub>2</sub> ) | 2.01 m                            | H-7, H-9a, H-9b    | C-6, C-7, C-9, C-10         |
| 9   | 34.35 (CH <sub>2</sub> ) | 2.15 m                            | H-8                | C-7, C-8, C-10, C-11        |
|     |                          | 1.76m                             | H-8                |                             |
| 10  | 127.27 (C)               | -                                 | -                  | -                           |
| 11  | 119.27 (CH)              | 5.27 da (12.0)                    | H-16, H-12a, H-12b | C-9, C-12, C-13, C-16       |
| 12  | 23.40 (CH <sub>2</sub> ) | 3.31 dd (12.0, 16.5)              | H-11, H-12b        | C-1, C-10, C-11, C-13, C-14 |
|     |                          | 3.76 da (16.5)                    | H-11, H-12a, H-16  |                             |
| 13  | 122.39 (C)               | -                                 | -                  | -                           |
| 14  | 123.46 (C)               | -                                 | -                  | -                           |
| 15  | 18.33 (CH <sub>3</sub> ) | 1.60 s                            | H-5, H-7           | C-5, C-6, C-7               |
| 16  | 12.92 (CH <sub>3</sub> ) | 1.79 s                            | H-11, H-12a, H-12b | C-9, C-10, C-11             |
| OH  | -                        | 4.43, 4.45                        | -                  | -                           |

Tabla 5. Datos comparativos del desacetilwigandol aislado y el producto de reducción de la globiferina en acetona-d<sub>6</sub>.

| C/H | Desacetilwigandol aislado |                                       | Producto de reducción de la globiferina |                                       |
|-----|---------------------------|---------------------------------------|---|---------------------------------------|
|     | $\delta_c$<br>125 MHz     | $\delta_H$ , mult. J en Hz<br>500 MHz | $\delta_c$<br>125 MHz                   | $\delta_H$ , mult. J en Hz<br>500 MHz |
| 1   | 149.18                    | -                                     | <b>150.3</b>                            | -                                     |
| 2   | 113.49                    | 6.59 d (8.5)                          | <b>113.6</b>                            | 6.59 d (8.6)                          |
| 3   | 113.74                    | 6.57 d (8.5)                          | <b>113.4</b>                            | 6.57 d (8.7)                          |
| 4   | 150.39                    | -                                     | <b>149.1</b>                            | -                                     |
| 5   | 28.84                     | 3.20 d (14.0)                         | 28.7                                    | 3.20 d (13.8)                         |
|     |                           | 3.42 da (14.0)                        |   | 3.42 d (13.8)                         |
| 6   | 141.26                    | -                                     | <b>130.9</b>                            | -                                     |
| 7   | 121.90                    | 5.06 ta (8.5)                         | 121.8                                   | 5.06 dd (7.2, 8.4)                    |
| 8   | 25.44                     | 1.99 m                                | 25.3                                    | 1.96 m                                |
| 9   | 39.26                     | 1.70 t (12.0)                         | 39.1                                    | 1.70 t (11.9)                         |
|     |                           | 2.13 dd (12.0, 6)                     |   | 2.13 dd (5.2, 11.6)                   |
| 10  | 130.97                    | -                                     | <b>141.1</b>                            | -                                     |
| 11  | 125.26                    | 5.23 da (12.0)                        | 125.1                                   | 5.23 dd (13.8, 1.8)                   |
| 12  | 27.97                     | 3.19 dd (17, 12.0)                    | 27.8                                    | 3.21 dd (13.8, 16.7)                  |
|     |                           | 3.87 da (17.0)                        |   | 3.87d (16.7)                          |
| 13  | 126.58                    | -                                     | <b>127.6</b>                            | -                                     |
| 14  | 127.75                    | -                                     | <b>126.5</b>                            | -                                     |
| 15  | 22.85                     | 1.59 s                                | <b>17.0</b>                             | 1.59 s                                |
| 16  | 17.09                     | 1.78 s                                | <b>22.7</b>                             | 1.79 s                                |
| OH  | -                         | 7.64 sa                               | -                                       | 7.61, 7.63                            |

### Flavidulol A (7) Wigandol (12) y Globiferina (9)

Los benzociclododecadienos son compuestos que pueden considerarse como derivados cíclicos de la geranilhidroquinona, de los cuales solo son conocidos tres: el wigandol (12), el flavidulol A (7) y la globiferina (9), los cuales fueron aislados de *W. urens*,<sup>11-13,45</sup> siendo el desacetilwigandol (3) el cuarto compuesto de este tipo que se aísla de esta especie y de una fuente natural. El flavidulol A (7) ha sido aislado también de *Lactarius flavidulus*,<sup>46</sup> una especie de hongo comestible en Japón, mientras que la globiferina (9) fue obtenida de *Cordia globifera*.<sup>47</sup> En un trabajo previo, la globiferina (9), se aisló de *W. kunthii* (Sinónimo *W. urens*) y nombrada inicialmente wigandiona<sup>12</sup> (resultados no publicados).

En el presente trabajo, el flavidulol A (7) se aisló del extracto de diclorometano, mientras que el wigandol (12) se aisló del extracto de hexano y diclorometano. El primero se obtuvo como un aceite de color rojizo y el segundo como un sólido cristalino. Estos dos compuestos habían sido aislados e identificados en un trabajo previo de *W. urens*.<sup>45</sup> (Espectros 49-50 y 53-54 anexos)

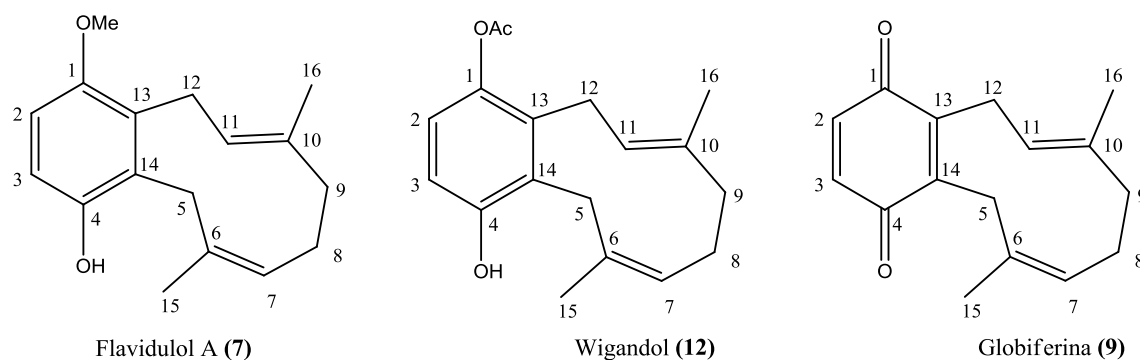


Figura 35. Flavidulol A (7), wigandol (12) y globiferina (9).

La globiferina (9) (Fig. 35), se aisló del extracto de diclorometano como un aceite rojo, el cual absorbe fuertemente en el UV. Este compuesto fue aislado e identificado de *W. urens* en dos trabajos previos<sup>12,13</sup> y posteriormente de *Cordia globifera*.<sup>47</sup> A continuación se presenta una tabla con los datos comparativos entre el compuesto aislado y el compuesto reportado de *Cordia*. (Espectros 51-52 anexos)

Tabla 6. Datos comparativos de RMN en CDCl<sub>3</sub> de la globiferina aislada de *W. urens* y el compuesto de *Cordia globifera*.

| C/H | Compuesto aislado        |  | Compuesto de <i>Cordia globifera</i> |  |
|-----|--------------------------|--|--------------------------------------|--|
|     | $\delta_C$<br>75 MHz     | $\delta_H$ , mult. <i>J</i> en Hz<br>300 MHz | $\delta_C$<br>125 MHz                | $\delta_H$ , mult. <i>J</i> en Hz<br>500 MHz |
| 1   | 188.19 (C)               | -  | 188.2 (C)                            | -  |
| 2   | 136.49 (CH)              | 6.78 d (9.9)                                 | 136.5 (CH)                           | 6.80 (9.9)                                   |
| 3   | 136.10 (CH)              | 6.74 d (9.9)                                 | 136.2 (CH)                           | 6.76 (9.9)                                   |
| 4   | 187.93 (C)               | -  | 187.9 (C)                            | -  |
| 5   | 27.25 (CH <sub>2</sub> ) | 2.90- 3.40m                                  | 27.3 (CH <sub>2</sub> )              | 2.99 señal ancha                             |
|     |                          |  |                                      | 3.32 señal ancha                             |
| 6   | 137.77 (C)               | -  | 137.8 (C)                            |  |
| 7   | 122.77 (CH)              | 5.10 q (8.1)                                 | 122.8 (CH)                           | 5.13 dd (8.3, 8.3)                           |
| 8   | 24.44 (CH <sub>2</sub> ) | 2.01- 2.06 m                                 | 24.5 (CH <sub>2</sub> )              | 2.02 señal ancha                             |
| 9   | 38.08 (CH <sub>2</sub> ) | 2.01- 2.06 m                                 | 38.2 (CH <sub>2</sub> )              | 2.18 señal ancha                             |
|     |                          |  |                                      | 1.74 señal ancha                             |
| 10  | 132.95 (C)               | -  | 133.0 (C)                            |  |
| 11  | 121.08 (CH)              | 5.10 q (8.1)                                 | 121.2 (CH)                           | 5.09 dd (9.5, 7.3)                           |
| 12  | 27.63 (CH <sub>2</sub> ) | 2.90-3.40m                                   | 27.7 (CH <sub>2</sub> )              | 3.13 señal ancha                             |
|     |                          |  |                                      | 3.64 señal ancha                             |
| 13  | 144.17 (C)               | -  | 144.2 (C)                            | -  |
| 14  | 143.28 (C)               | -  | 143.3 (C)                            | -  |
| 15  | 23.43 (CH <sub>3</sub> ) | 1.46 s                                       | 23.5 (CH <sub>3</sub> )              | 1.49 s                                       |
| 16  | 16.88 (CH <sub>3</sub> ) | 1.73 s                                       | 16.9 (CH <sub>3</sub> )              | 1.74 s                                       |

En este trabajo, la globiferina (**9**) fue obtenida también como producto de oxidación del desacetilwigandol con MnO<sub>2</sub>. Los datos de ambos productos fueron idénticos al compuesto natural.

A continuación se muestran dos tablas resumen de los datos de RMN de los 4 benzociclododecadienos aislados de *W. urens* donde se observan las similitudes y diferencias entre ellos.

Tabla 7. Datos de RMN  $^1\text{H}$  en  $\text{CDCl}_3$  de los benzociclododecadienos aislados de *W. urens*.

| H   | $\delta_{\text{H}}$ , mult. <i>J</i> en Hz<br>Desacetilwigandol<br>500 MHz | $\delta_{\text{H}}$ , mult. <i>J</i> en Hz<br>Flavidulol A<br>400 MHz | $\delta_{\text{H}}$ , mult. <i>J</i> en Hz<br>Wigandol<br>400 MHz | $\delta_{\text{H}}$ , mult. <i>J</i> en Hz<br>Globiferina<br>300 MHz |
|-----|--|---|---|--|
| 1   | -  | -   | -   | -  |
| 2   | 6.54 d (8.0)   | 6.65 d (8.7)  | 6.69 d (8.5)  | 6.79 d (9.9)   |
| 3   | 6.52 d (8.0)   | 6.60 d (8.7)  | 6.52 d (8.5)  | 6.74 d (9.9)   |
| 5   | 3.30 s   | 3.30 s  | 3.23 da (14.4)  | 3.20 m   |
|     |  |   | 3.30 da (14.4)  |  |
| 7   | 5.11 ta (8.5)  | 5.11 t (8.3)  | 5.10 ta (8.4)   | 5.10 q (8.1)   |
| 8   | 2.01 m   | 2.0 m   | 1.99 m  | 2.01 m   |
| 9   | 2.15 m   | 2.15 m  | 2.14m   | 2.01 m   |
|     | 1.76m  | 1.73 m  | 1.73 m  |  |
| 11  | 5.27 da (12.0)   | 5.26 da (12.0)  | 5.20 da (12.0)  | 5.10 q (8.1)   |
| 12  | 3.31 dd (16.5, 12.0)   | 3.23 dd (17.0, 11.7)  | 3.29 da (16.4)  | 3.20 m   |
|     | 3.76 da (16.5)   | 3.91 da (17.0)  | 3.41 da (16.4)  |  |
| 15  | 1.60 s   | 1.61 s  | 1.57 s  | 1.46 s   |
| 16  | 1.79 s   | 1.78 s  | 1.77 s  | 1.72 s   |
| OH  | 4.43, 4.45   | 4.41 s  | 5.12 s  | -  |
| OAc | -  | -   | 2.30 s  | -  |
| OMe | -  | 3.77 s  | -   | -  |

Tabla 8. Datos comparativos de RMN  $^{13}\text{C}$  de los benzociclododecadienos aislados.

| H                  | $\delta_{\text{C}}$ 125 MHz<br>Desacetilwigandol | $\delta_{\text{C}}$ 100 MHz<br>Flavidulol A | $\delta_{\text{C}}$ 100 MHz<br>Wigandol | $\delta_{\text{C}}$ 75 MHz<br>Globiferina |
|--------------------|--|---|---|---|
| 1                  | 143.65 (C)                                       | 152.13 (C)                                  | 142.85 (C)                              | 188.19 (C)                                |
| 2                  | 109.05 (CH)                                      | 109.46 (CH)                                 | 119.98 (CH)                             | 136.49 (CH)                               |
| 3                  | 109.32 (CH)                                      | 112.52 (CH)                                 | 113.53 (CH)                             | 136.10 (CH)                               |
| 4                  | 144.93 (C)                                       | 148.90 (C)                                  | 153.01 (C)                              | 187.93 (C)                                |
| 5                  | 24.38 (CH <sub>2</sub> )                         | 28.35 (CH <sub>2</sub> )                    | 28.39 (CH <sub>2</sub> )                | 27.25 (CH <sub>2</sub> )                  |
| 6                  | 135.25 (C)                                       | 139.32 (C)                                  | 139.26 (C)                              | 137.77 (C)                                |
| 7                  | 117.99 (CH)                                      | 123.92 (CH)                                 | 121.97 (CH)                             | 122.77 (CH)                               |
| 8                  | 24.73 (CH <sub>2</sub> )                         | 24.78 (CH <sub>2</sub> )                    | 24.73 (CH <sub>2</sub> )                | 24.44 (CH <sub>2</sub> )                  |
| 9                  | 34.35 (CH <sub>2</sub> )                         | 38.44 (CH <sub>2</sub> )                    | 38.34 (CH <sub>2</sub> )                | 38.08 (CH <sub>2</sub> )                  |
| 10                 | 127.27 (C)                                       | 131.36 (C)                                  | 131.93 (C)                              | 132.95 (C)                                |
| 11                 | 119.27 (CH)                                      | 124.13 (CH)                                 | 122.52 (CH)                             | 121.08 (CH)                               |
| 12                 | 23.40 (CH <sub>2</sub> )                         | 27.21 (CH <sub>2</sub> )                    | 27.80 (CH <sub>2</sub> )                | 27.63 (CH <sub>2</sub> )                  |
| 13                 | 122.39 (C)                                       | 128.93 (C)                                  | 131.67 (C)                              | 144.17 (C)                                |
| 14                 | 123.46 (C)                                       | 127.51 (C)                                  | 127.42 (C)                              | 143.28 (C)                                |
| 15                 | 18.33 (CH <sub>3</sub> )                         | 22.43 (CH <sub>3</sub> )                    | 22.36 (CH <sub>3</sub> )                | 23.43 (CH <sub>3</sub> )                  |
| 16                 | 12.92 (CH <sub>3</sub> )                         | 16.93 (CH <sub>3</sub> )                    | 17.00 (CH <sub>3</sub> )                | 16.88 (CH <sub>3</sub> )                  |
| CH <sub>3</sub> CO | -  | 20.86, 170.45                               | -                                       | -   |
| OMe                | -  | -   | 56.43                                   | -   |



#### 2-[(1Z)-3-hidroxi-3,7,-dimetilocta-1,6-dienil]-hidroquinona (4):

El compuesto **4** se obtuvo como un aceite amarillo [ $\alpha$ ]<sub>D</sub>- 6.6 (c 0.2, CHCl<sub>3</sub>). En el espectro de IR (Espectro 36 anexos) se observan bandas de absorción características de grupos OH en 3602 y 3358 cm<sup>-1</sup>, grupos metilo, metileno y metino entre 3008 y 2908 cm<sup>-1</sup>, para dobles enlaces en 1662 y 1488 cm<sup>-1</sup> y finalmente la banda en 1238 cm<sup>-1</sup> característica de enlaces C-O.

El espectro de RMN <sup>1</sup>H (Espectro 33 anexos) fue muy similar al del compuesto **2**. En él se observan señales en la región de los protones aromáticos que de acuerdo a la multiplicidad y constantes de acoplamiento indican la presencia de un anillo aromático 1, 2, 4 trisustituido, con señales en  $\delta$  6.64 d ( $J = 8.4$  Hz), 6.57 dd ( $J = 8.4, 2.8$  Hz) y 6.48 d ( $J = 2.8$  Hz). Además se observan dos señales dobles de un sistema AB en la región de los protones vinílicos  $\delta$  6.27 y 5.59 con constantes de acoplamiento de 10.0 Hz asignables a un doble enlace disustituido  $\alpha$  al anillo aromático, como en el compuesto **2**. Una señal triple ancha que integra para un protón en 5.08 ppm, además de señales correspondientes a dos metilenos en  $\delta$  1.71 y 2.10, dos metilos vinílicos en 1.57 y 1.66 ppm y un metilo en 1.36 ppm. Los datos anteriores, sugieren que el compuesto **4**, corresponde a un derivado de la geranilhidroquinona, similar al compuesto **2**.

El espectro de RMN <sup>13</sup>C (Espectro 34 anexos) confirmó lo anterior, ya que en él se observan 16 señales correspondientes a seis metinos, dos metilenos, tres metilos y cinco carbonos cuaternarios (uno de ellos un carbono sp<sup>3</sup> base de oxígeno), de acuerdo con los experimentos DEPT. Los datos espectroscópicos permitieron identificar al compuesto **4** como la 2-[(1Z)-3-hidroxi-3,7,-dimetilocta-1,6-dienil]-hidroquinona, o 2-(1Z)-(3-hidroxi-3,7-dimetilocta-1,6-dienil)-1,4-bencenodiol obtenido previamente de *Cordia alliodora*.<sup>50</sup>

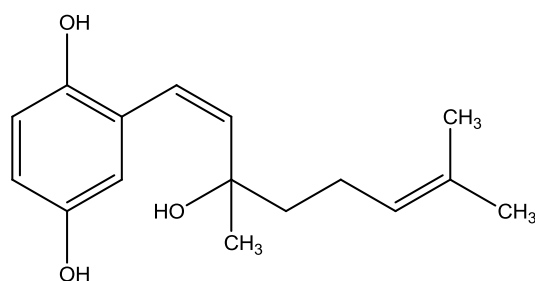


Figura 36. Compuesto aislado de *Cordia alliodora*.

La comparación de los datos de RMN <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C del compuesto aislado, y los del compuesto reportado de *Cordia*, muestran que se trata del mismo compuesto. (Tabla 9)

El espectro de masas (Espectro 37 anexos) muestra un pico correspondiente a la pérdida de agua, en  $m/z$  244 ( $M^+ - 18$ ) debido a la presencia del alcohol terciario al igual que en el compuesto **2**. A continuación se muestran los fragmentos más significativos.

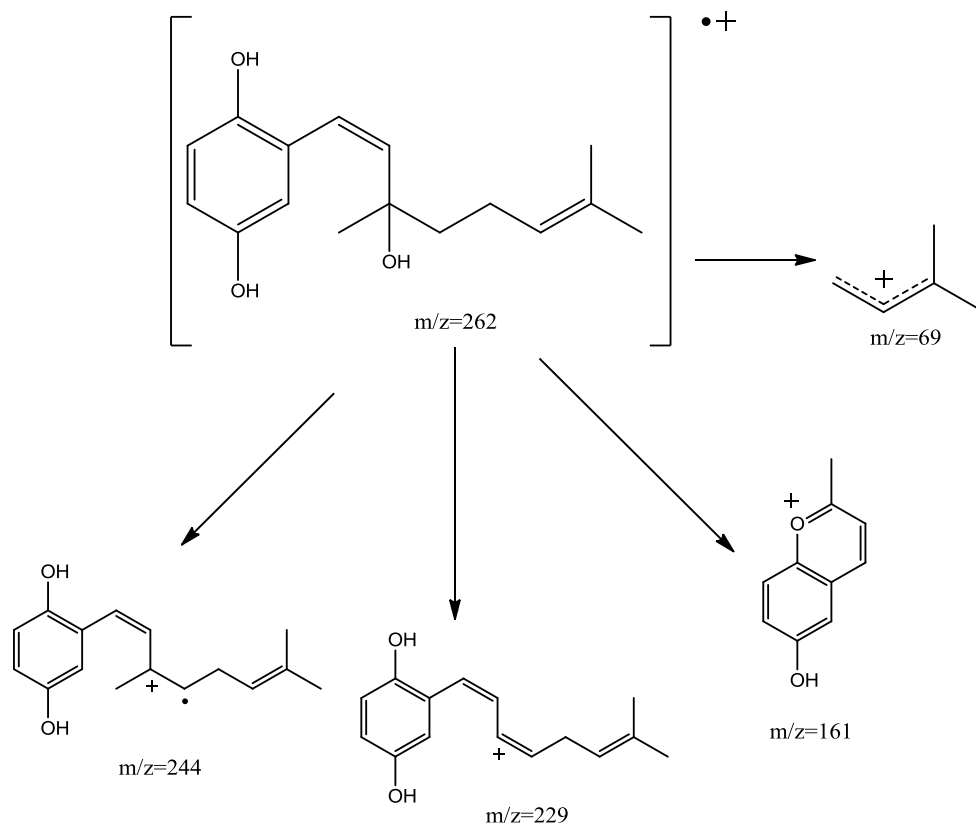
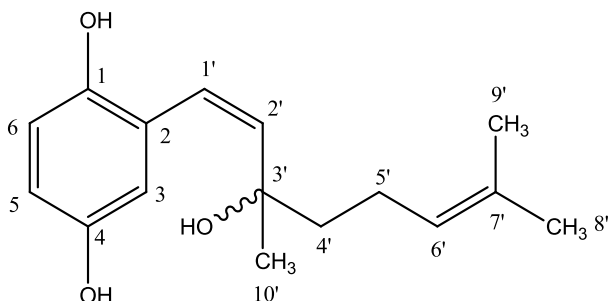


Figura 37. Fragmentos del espectro de masas por IE del compuesto (**4**).

Tabla 9. Datos espectroscópicos de RMN a 400 MHz en CDCl<sub>3</sub> para el compuesto **4** y el compuesto aislado de *Cordia alliodora*.



| C/H | Compuesto aislado        |  | Compuesto de <i>Cordia alliodora</i> |  |
|-----|--------------------------|--|--------------------------------------|--|
|     | $\delta_C$<br>100MHz     | $\delta_H$ , mult. <i>J</i> en Hz<br>400 MHz | $\delta_C$<br>125 MHz                | $\delta_H$ , mult. <i>J</i> en Hz<br>500 MHz |
| 1   | 146.96 (C)               | -  | 147.0 (C)                            | -  |
| 2   | 121.96 (C)               | -  | 122.0 (C)                            | -  |
| 3   | 112.84 (CH)              | 6.48 d (2.8)                                 | 112.8 (CH)                           | 6.48 d (3.1)                                 |
| 4   | 149.22 (C)               | -  | 149.2 (C)                            | -  |
| 5   | 115.39 (CH)              | 6.57 dd (8.4, 2.8)                           | 115.4 (CH)                           | 6.57 dd (8.7, 3.1)                           |
| 6   | 116.68 (CH)              | 6.64 d (8.4)                                 | 116.7 (CH)                           | 6.64 d (8.7)                                 |
| 1'  | 122.58 (CH)              | 6.27 d (10.0)                                | 122.6 (CH)                           | 6.27 d (9.8)                                 |
| 2'  | 130.94 (CH)              | 5.59 d (10.0)                                | 131.0 (CH)                           | 5.59 d (9.8)                                 |
| 3'  | 78.09 (C)                | -  | 78.1 (C)                             | -  |
| 4'  | 40.86 (CH <sub>2</sub> ) | 1.71 m                                       | 40.9 (CH <sub>2</sub> )              | 1.71 m                                       |
| 5'  | 22.70 (CH <sub>2</sub> ) | 2.10 m                                       | 22.7 (CH <sub>2</sub> )              | 2.10 m                                       |
| 6'  | 124.11 (CH)              | 5.08 ta (7.2)                                | 124.1 (CH)                           | 5.09 m                                       |
| 7'  | 131.67 (C)               | -  | 131.7 (C)                            | -  |
| 8'  | 25.64 (CH <sub>3</sub> ) | 1.66 s                                       | 25.6 (CH <sub>3</sub> )              | 1.66 s                                       |
| 9'  | 17.60 (CH <sub>3</sub> ) | 1.57 s                                       | 17.6 (CH <sub>3</sub> )              | 1.57 s                                       |
| 10' | 25.98 (CH <sub>3</sub> ) | 1.36 s                                       | 26.0 (CH <sub>3</sub> )              | 1.36 s                                       |

Rhamnazina (3',7-dimetoxi-4',5-dihidroxi-flavonol) (16):

La rhamnazina (**16**) se aisló como un sólido amarillo insoluble en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, y soluble en acetona con pf 203-208°C. El espectro IR (Espectro 62 anexos) muestra bandas de absorción características para grupos hidroxilo en 3690 y 3537 cm<sup>-1</sup>, así como una banda en 1656 cm<sup>-1</sup> debida a grupos carbonilo y bandas en 1219 y 1224 cm<sup>-1</sup> a enlaces C-O. El espectro de masas por impacto electrónico mostró un ión molecular de *m/z* 330 que está de acuerdo para una fórmula molecular C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>O<sub>7</sub>.

En el espectro de RMN <sup>1</sup>H (Espectro 59 anexos) en acetona-d<sub>6</sub> se observan en la región de los protones aromáticos, dos sistemas de acoplamiento spin-spin. Un sistema AB en δ 6.33 y 6.72 con acoplamiento meta entre los protones con *J* = 2.4 Hz, y un sistema ABX con señales dobles en 7.02 (*J* = 8.4 Hz), 7.91 (*J* = 2.0 Hz) y una señal doble de dobles en δ 7.85 (*J* = 8.4, 2.0 Hz). Los datos anteriores sugieren la presencia de un flavonoide sustituido en las posiciones 5, 7 del anillo A y 3', 4' del anillo B. Se observan además dos señales simples en δ 3.93 y 3.94 que integran para tres protones cada una, las cuales son asignables a dos grupos metoxilo.

En el espectro de RMN <sup>13</sup>C (Espectro 60 anexos) se observan 16 señales, para cinco metinos, diez carbonos cuaternarios, además de una señal de mayor intensidad asignable a dos grupos metoxilo.

De acuerdo con los datos de masas y de RMN <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C, el compuesto **16** debe ser un flavonol dimetoxilado. En el espectro NOESY, determinado en acetona-d<sub>6</sub>, no se pudo establecer la posición relativa de los dos metoxilos, ya que presentan desplazamientos químicos muy similares en el espectro de protón. (Fig. 38).

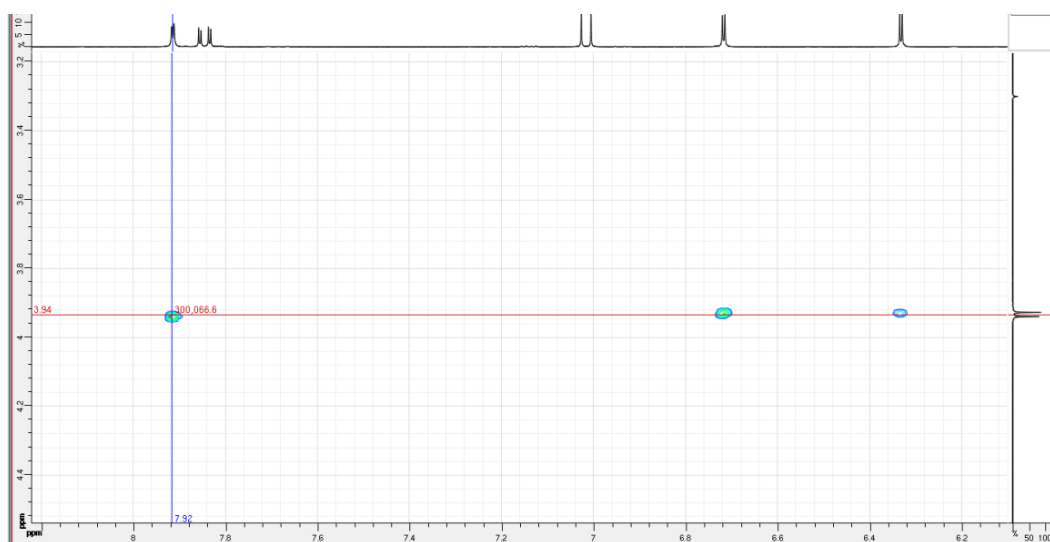


Figura 38. Correlaciones NOE observadas en acetona-d<sub>6</sub> para la rhamnazina.

En el espectro determinado en  $\text{CDCl}_3$  (Espectro 55 anexos), las señales de los grupos metoxilo se resuelven mejor, observándose en 3.89 y 4.00 ppm. El experimento NOESY determinado en  $\text{CDCl}_3$  (Espectro 58 anexos), permitió asignar las posiciones relativas de los grupos hidroxilo (intercambiables con  $\text{D}_2\text{O}$ , Fig. 39) y metoxilo en el núcleo flavonoide.

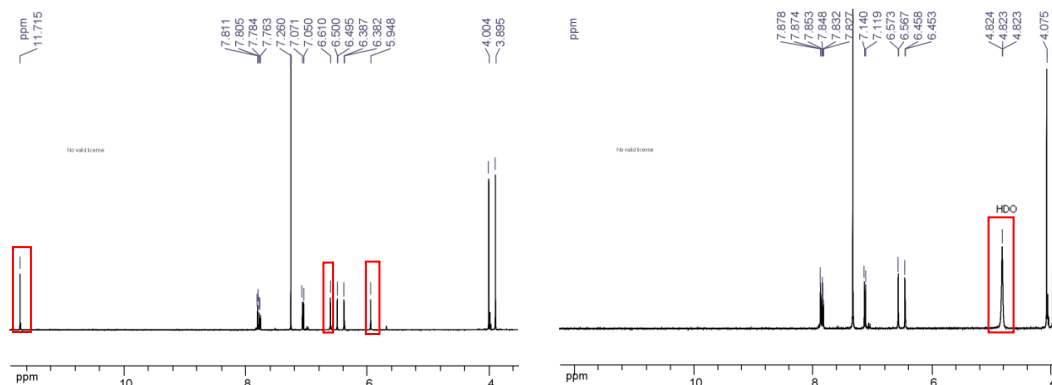


Figura 39. Intercambio de protón por deuterio en los grupos OH al adicionar  $\text{D}_2\text{O}$ .

En el espectro se observa la correlación del metoxilo en  $\delta$  3.89 con los dos hidrógenos del anillo A, lo que indica que este metoxilo debe encontrarse en la posición 7. (Fig. 40)



Figura 40. Efecto NOE entre los protones aromáticos del anillo A y el metoxilo.

Por otra parte la señal del metoxilo en  $\delta$  4.00 mostró correlación con la señal del protón aromático con acoplamiento meta ( $\text{H}-2'$ ), lo que significa que el segundo metoxilo debe encontrarse en  $\text{C}-3'$ . (Fig. 41)

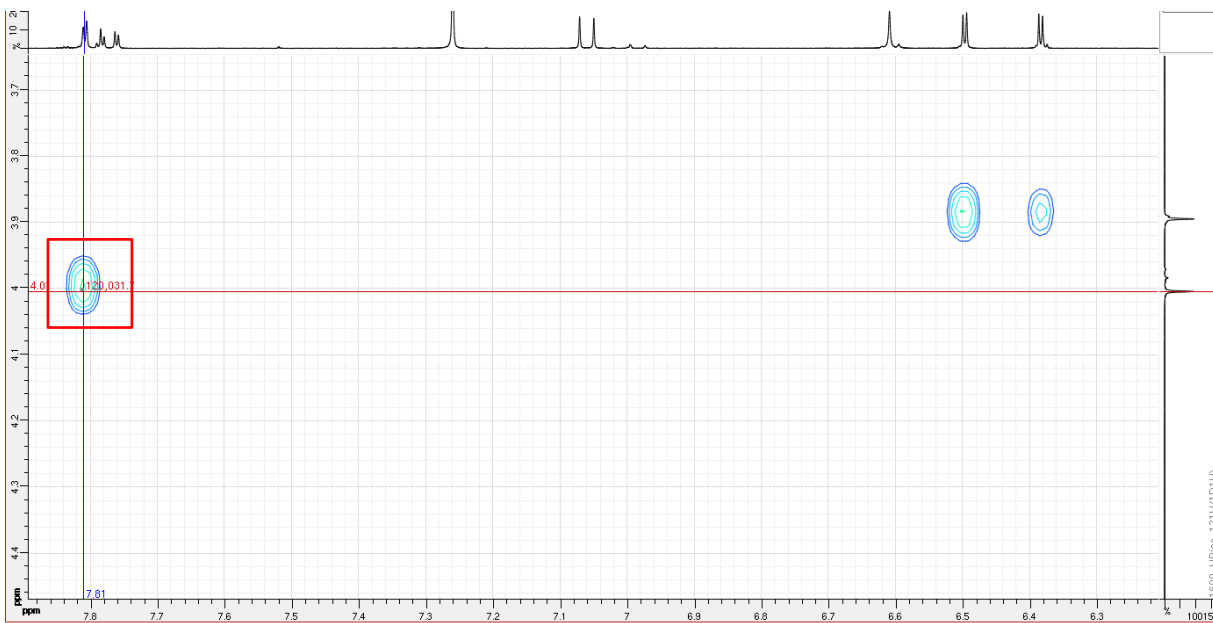


Figura 41. Efecto NOE entre el protón H-2' del anillo B y el metoxilo.

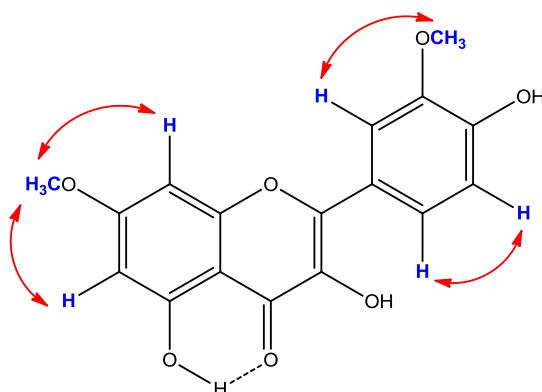


Figura 42. Correlaciones observadas en el experimento NOESY para la rhamnazina.

Los datos de masas, de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ , así como los datos obtenidos en el experimento NOESY permitieron proponer la estructura del flavonoide aislado como el 3',7-dimetoxi-4',5-dihidroxyflavonol (rhamnazina) (**16**).

La comparación de los datos de RMN obtenidos, con los descritos en  $\text{CDCl}_3$  y acetona- $\text{d}_6$  para la rhamnazina aislada de *Gutierrezia repens*<sup>51</sup> están de acuerdo con la estructura propuesta. (Tabla 10).

Tabla 10. Datos de RMN  $^1\text{H}$  y RMN  $^{13}\text{C}$  de la rhamnazina aislada de *W. urens* y la obtenida de *G. repens* en  $\text{CDCl}_3$  y acetona- $\text{d}_6$ .

| C/H    | Rhamnazina asilada<br>acetona- $\text{d}_6$ ,<br>400 MHz |                                  | Rhamnazina de G.<br>Repens, acetona- $\text{d}_6$<br>400 MHz |                                  | Rhamnazina<br>aislada<br>$\text{CDCl}_3$ 400 MHz | Rhamnazina<br>de G. Repens<br>$\text{CDCl}_3$ 200 MHz |
|--------|--|----------------------------------|--|----------------------------------|--|---|
|        | $^{13}\text{C}$  | $\delta_{\text{H}}$ , m. J en Hz | $^{13}\text{C}$  | $\delta_{\text{H}}$ , m. J en Hz | $\delta_{\text{H}}$                              | $\delta_{\text{H}}$                                   |
| 2      | 147.1  | -                                | 146.5  | -                                | -  | -   |
| 3      | 137.0  | -                                | 135.3  | -                                | -  | -   |
| 4      | 176.6  | -                                | 175.0  | -                                | -  | -   |
| 5      | 161.7  | -                                | 161.1  | -                                | -  | -   |
| 6      | 98.42  | 6.33 d (2.4)                     | 97.4   | 6.33 d (2.0)                     | 6.38 d (2.0)                                     | 6.36 d (2.2)  |
| 7      | 166.7  | -                                | 165.8  | -                                | -  | -   |
| 8      | 92.98  | 6.72 d (2.4)                     | 92.0   | 6.80 d (2.0)                     | 6.50 d (2.0)                                     | 6.48 d (2.2)  |
| 9      | 157.8  | -                                | 156.9  | -                                | -  | -   |
| 10     | 104.8  | -                                | 103.9  | -                                | -  | -   |
| 1'     | 122.9  | -                                | 121.9  | -                                | -  | -   |
| 2'     | 112.2  | 7.91 d (2.0)                     | 111.2  | 7.90 d (2.2)                     | 7.81 d (2.4)                                     | 7.7-7.8 m   |
| 3'     | 148.3  | -                                | 147.5  | -                                | -  | -   |
| 4'     | 149.8  | -                                | 148.9  | -                                | -  | -   |
| 5'     | 116.1  | 7.02 d (8.4)                     | 116.0  | 7.02 d (8.5)                     | 7.06 d (8.4)                                     | 7.02 d (8.8)  |
| 6'     | 123.6  | 7.85 dd (8.4, 2.0)               | 122.6  | 7.86 dd (8.5, 2.2)               | 7.77 dd (8.4, 2.4)                               | 7.7-7.8 m   |
| 7-OMe  | 55.54  | 3.93 s                           | 55.6   | 3.94 s                           | 4.00   | 3.97 s  |
| 3'-Ome | 55.54  | 3.94 s                           | 55.5   | 3.95 s                           | 3.89   | 3.86 s  |
| 3-OH   | -  | -                                | -  | -                                | 6.61   | -   |
| 5-OH   | -  | 12.12                            | -  | 12.14                            | 11.72  | 12.62   |
| 4'-OH  | -  | -                                | -  | -                                | 5.95   | -   |

(2Z)-2-[(4R,5R,6S)-6-(β-D-glucopiranosiloxi)-4,5-dihidroxi-2-ciclohexen-1-iliden]-  
acetonitrilo (5-*epi*-litospermósido) (**17**):

El 5-*epi*-litospermósido (**17**) se aisló como agujas muy finas blancas con punto de fusión 217-220°C y una rotación óptica  $[\alpha]_D -167$  (c 0.1, H<sub>2</sub>O). En el espectro IR (Espectro 79 anexos) se observan bandas de absorción en 3340 y 3350 cm<sup>-1</sup> debidas a la presencia de los grupos OH en la molécula y una banda muy característica en 2221 cm<sup>-1</sup> para triples enlaces. Además de las bandas en 1039 y 1055 cm<sup>-1</sup> debidas a enlaces C-O.

En el espectro de masas por IE se observa un ion molecular de m/z 329, el cual sugiere la presencia de un nitrógeno en la estructura y una formula molecular C<sub>14</sub>H<sub>19</sub>O<sub>8</sub>N.

En el espectro de RMN <sup>1</sup>H en D<sub>2</sub>O (Espectro 64 anexos) se observan dos señales dobles de dobles en δ 6.36 (*J* = 10.0, 1.6 Hz) y 6.06 (*J* = 10.0, 2.0 Hz) correspondientes a un doble enlace *cis*, además de una señal simple ancha asignable a otro protón vinílico en 5.65 ppm. Se observan además una señal triple en δ 4.98 (*J* = 2.4 Hz) y dos señales simples anchas en 4.52 y 4.30 ppm, que por sus desplazamientos químicos deben corresponder a tres metinos que soportan funciones oxigenadas. La presencia de una señal doble en δ 4.74 (*J* = 7.6 Hz), así como las señales correspondientes a la parte AB de un sistema ABX en 3.92 (*J* = 12.4, 1.6 Hz) y 3.75 (*J* = 12.4, 5.6 Hz) y dos señales complejas en 3.52-3.56 y 3.43-3.47 ppm que integran para dos protones cada una, están de acuerdo con la presencia de un glicósido.

En el espectro de RMN <sup>13</sup>C (Espectro 65 anexos) se observan 14 señales asignables a once metinos (ocho de ellos bases oxigenadas y tres vinílicos), además de un metileno también base de una función oxigenada y dos carbonos cuaternarios, de acuerdo con los experimentos DEPT y HSQC. La presencia de un carbono cuaternario en 118.73 ppm, aunada a la absorción en el IR a 2220 cm<sup>-1</sup>, son indicativas de la presencia de un grupo nitrilo (C≡N). Los datos anteriores sugieren que el compuesto aislado, es un cianoglucosido de tipo litospermósido (**17a**) (Fig 49.)

El experimento COSY (Espectros 67 y 75 anexos) permitió establecer la conectividad entre los protones vinílicos H-2, H-3 y H-7, así como la conectividad con los protones H-4, H-5 y H-6, de los metinos que soportan las funciones oxigenadas de la aglicona y entre los protones del residuo glucosídico. (Fig. 43)



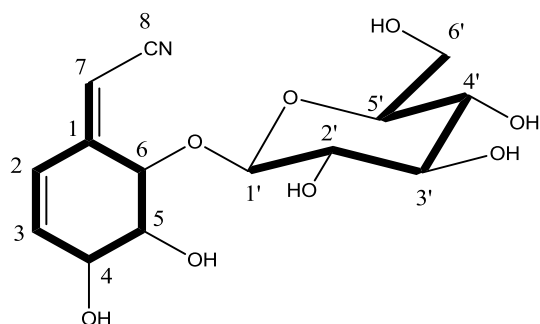


Figura 43. Correlaciones  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  en el compuesto **17**.

En el experimento NOESY (Espectro 68 y 76 anexos) se observa la correlación entre los protones vinílicos, centrados en  $\delta$  6.36, y 6.06 y entre el protón vinílico en  $\delta$  5.65 con el protón en  $\delta$  6.36 estableciendo la geometría Z del segundo doble enlace (Fig. 44). También se observa la correlación entre los protones base de oxígeno H-4, H-5 y H-6 sugiriendo que los tres protones tienen la misma orientación (Fig. 45).

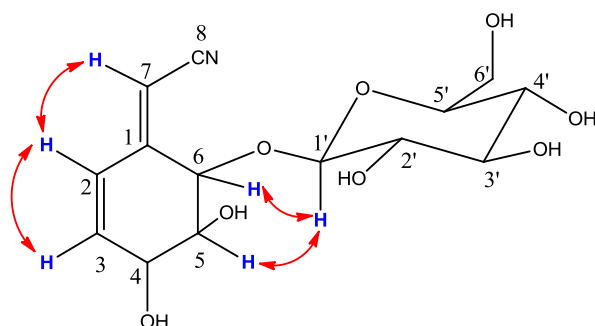


Figura 44. Efecto NOE y configuración Z de los dobles enlaces y entre el protón anomérico H-1' y H-5, H-6.

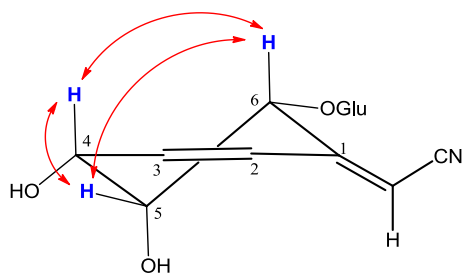


Figura 45. Efecto NOE observado en los protones H-3, H-4, H-5 de la aglicona.

La posición relativa de la unión glucosídica se comprobó tanto en el experimento NOESY como en el experimento HMBC. En el primero se observaron correlaciones NOE entre el protón anomérico (H-1') y los protones H-6 y H-5 de la aglicona (Fig. 44), mientras que en el HMBC (Espectros 78 anexos) se observan acoplamiento a larga distancia entre el

protón anomérico H-1' y el carbono C-6 de la aglicona, corroborando la posición de la unión glucosídica en este carbono. También, se observan los acoplamientos entre el protón H-7 y los carbonos C-2, C-6, así como con el carbono del grupo nitrilo (C-8) (Fig. 46).

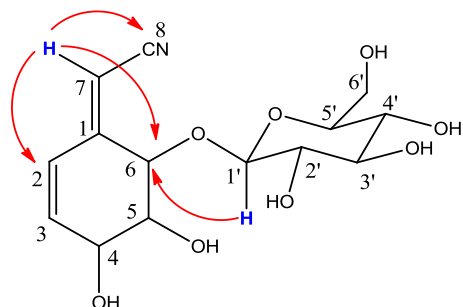


Figura 46. Correlaciones HMBC del protón H-7 y del protón anomérico H-1'.

A continuación se muestran otras correlaciones observadas en el espectro HMBC, que permitieron esclarecer la estructura del cianoglucósido **17**.

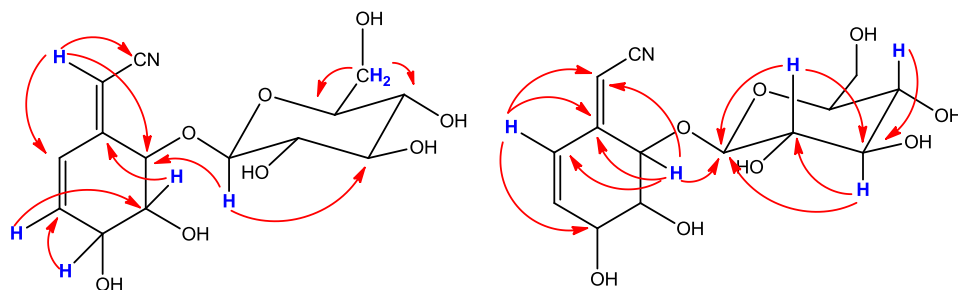


Figura 47. Correlaciones  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  en el experimento HMBC del compuesto (**17**) en  $\text{DMSO-d}_6$ .

En el espectro de masas por IE se observa el ion molecular en una relación  $m/z$  329 con muy baja intensidad, mientras que el ion en  $m/z$  149 generado por la pérdida de glucosa ilustra la fragmentación más significativa de la molécula:

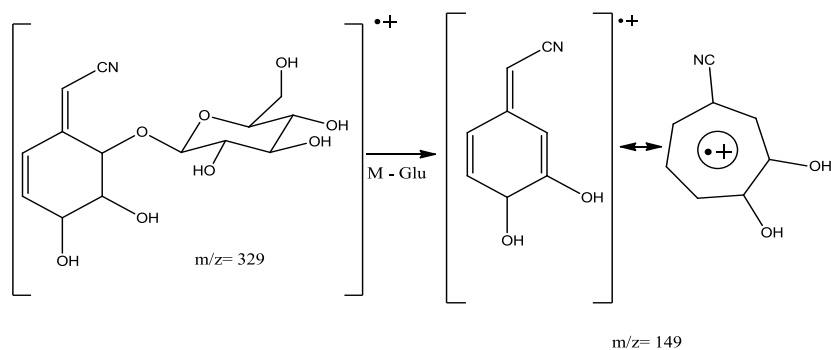


Figura 48. Fragmentación IE del compuesto **17**.

De acuerdo al número de centros estereogénicos presentes en la aglicona (3) se tendrían ocho diastereoisómeros posibles. La revisión bibliográfica reveló datos para cuatro de ellos existentes: litospermósido<sup>52,55,57-66,69</sup> (griffonina)<sup>56</sup>, dasycarponina<sup>57</sup>, riachina<sup>67</sup> y el 5-*epi*-litospermósido<sup>65,68,70</sup>. A continuación se muestran las estructuras de los diastereoisómeros conocidos.

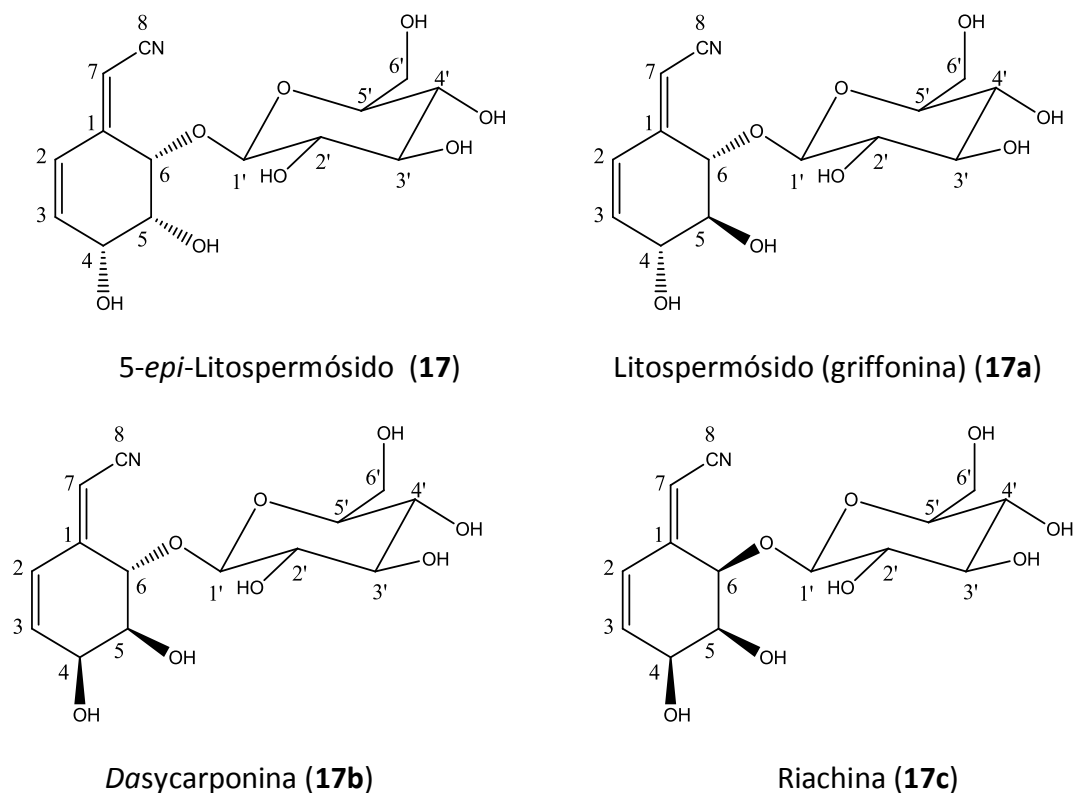


Figura 49. Diastereoisómeros del litospermósido encontrados en la literatura.

El litospermósido: (2Z)-2-[(4R,5S,6S)-6-(β-D-glucopiranosiloxi)-4,5-dihidroxi-2-ciclohexen-1-iliden]-acetonitrilo (**17a**) (Fig. 49), es un cianoglicósido que fue aislado primeramente en 1977 de *Lithospermum officinale* y *L. purpureum-caeruleum*. Su estructura establecida como 6-O-β-D-glucopiranosil-1-cianometilen-4,5-dihydroxy-2-ciclohexeno y su configuración absoluta como (4R,5S,6S) en 1979. Posteriormente, ha sido aislado de diferentes especies de las familias Boraginaceae,<sup>52,55</sup> Fabaceae,<sup>61,66</sup> Leguminosae<sup>58,64</sup> Ochnaceae,<sup>63</sup> Ranunculaceae<sup>57,60,62,65</sup> y Rosaceae.<sup>59</sup> Tiene un punto de fusión reportado de 278°-279 °C y una rotación óptica [α]<sub>D</sub>-138 (c 0.5, H<sub>2</sub>O)

La griffonina, fue aislada de *Griffonia simplicifolia* (Caesalpinaceae)<sup>56</sup> y su estructura identificada posteriormente como litospermósido (**17a**) en 1979.

La comparación de los datos de RMN <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C reportados en la literatura tanto en D<sub>2</sub>O como en DMSO-d<sub>6</sub> para el litospermósido, con los del producto aislado de *W. urens*,

mostró diferencias significativas principalmente en los desplazamientos de H-4, H-5 y H-6 (Tablas 1-3 anexos). Entre estos, los valores de las constantes de acoplamiento reportadas para el litospermósido  $^3J_{4,5} = 9.0$  Hz y  $^3J_{5,6} = 8.0$  Hz que indican una orientación axial-axial entre estas posiciones. Por lo tanto el ángulo diedro formado entre los protones H-4 y H-5 y entre H-5 y H-6 debe ser de  $180^\circ$ , esto sugiere que no debe haber correlación NOE entre estos pares de protones, como se muestra en la figura 46. Por el contrario el compuesto aislado (**17**) presenta una  $^3J_{5,6} = 2.4$  Hz indicando una orientación axial-ecuatorial que difiere a lo reportado en el litospermósido. Sin embargo el espectro de dicroísmo circular del compuesto aislado **17** y el litospermósido (Fig. 51), son similares sugiriendo que son diastereoisómeros.

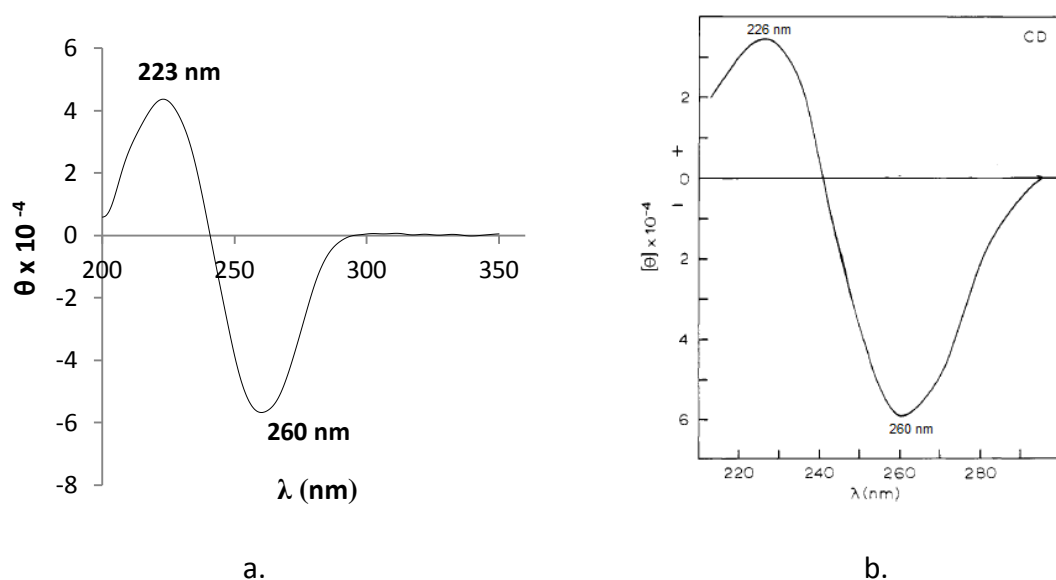


Figura 50. a) Dicroísmo circular compuesto aislado **17** b) Dicroísmo circular litospermósido.

La dasycarponina: (2Z)-2-[(4S,5S,6S)-6-( $\beta$ -D-glucopiranosiloxi)-4,5-dihidroxi-2-ciclohexen-1-iliden]-acetonitrilo (**17b**) (Fig. 49), aislada de *T. dasycarpum*<sup>57</sup> en 1979 e identificada como el 4-*epi*-litospermósido; también muestra varias diferencias significativas en los datos de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  (Tabla2 anexos) y en el valor de rotación óptica  $[\alpha]_D -11$  (c 0.6,  $\text{H}_2\text{O}$ ) En el espectro de dicroísmo circular se observan valores de absorción inversos al compuesto aislado de *W. urens*, lo que sugiere que son diastereoisómeros (Fig. 51).

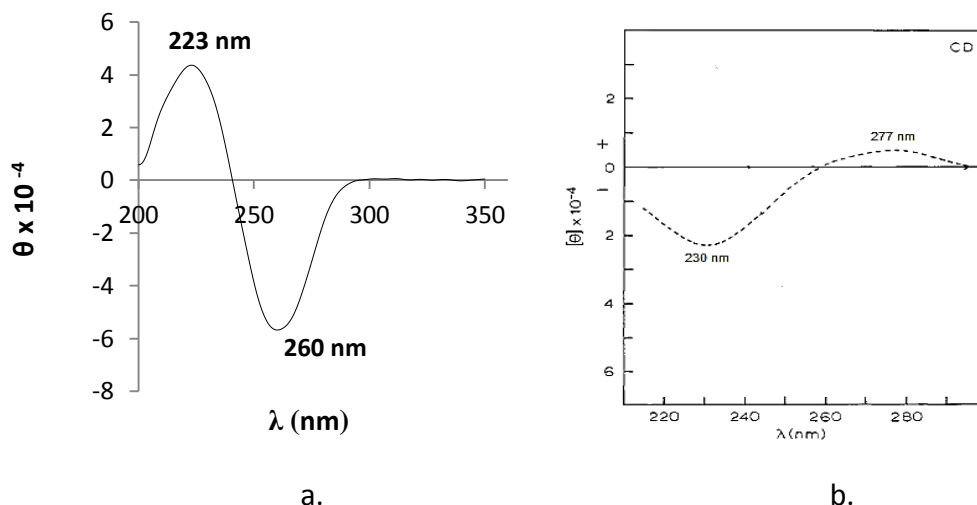


Figura 51. a) Dicroísmo circular del compuesto aislado **17** y b) dicroísmo circular reportado para la dasycarponina (**17b**).

La riachina: (2Z)-2-[(4S,5S,6R)-6-(β-D-glucopiranosilo)-4,5-dihidroxi-2-ciclohexen-1-iliden]-acetonitrilo (**17c**), es otro cianoglicosido aislado recientemente de *Bauhinia pentandra*,<sup>67</sup> (Fig. 49). Tiene un pf reportado, 221-223°C similar al compuesto aislado de *W. urens* (217-220 °C) y una rotación óptica  $[\alpha]_D +29$  (MeOH). Los datos de RMN  $^1\text{H}$  y RMN  $^{13}\text{C}$  también son muy similares a los del compuesto aislado, mientras que el valor de la rotación óptica es de signo contrario (compuesto aislado  $[\alpha]_D -167$  (c 0.1, H<sub>2</sub>O)). En el espectro de dicroísmo circular de la riachina se observan valores de absorción inversos al compuesto aislado **17**. Lo anterior sugiere que la riachina y el compuesto aislado de *W. urens* son diastereoisómeros (Fig. 52).

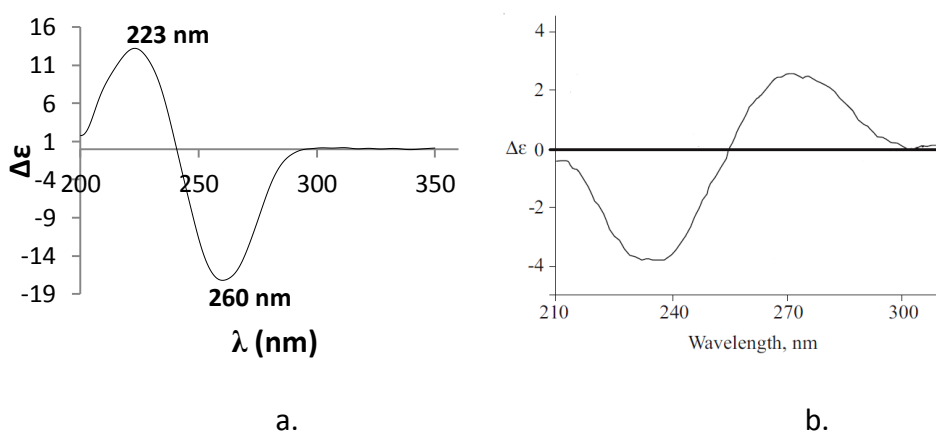


Figura 52. a) Dicroísmo circular del compuesto aislado **17** y b) dicroísmo circular reportado para la riachina (**17c**).

El cianoglicósido (2Z)-2-[(4R,5R,6S)-6-(β-D-glucopiranosiloxi)-4,5-dihidroxi-2-ciclohexen-1-iliden]-acetonitrilo (**17**), fue aislado en 1983 de *Ilex warburgii*<sup>68</sup> y en 2006 de *Semiaquilegia adoxoides*.<sup>65</sup> Su estructura fue establecida como (Z)-6α-(β-D-glucosyloxy)-4α,5α-dihydroxy-2-cyclohexene-Δ<sup>1,α</sup>-acetonitrilo (**17**), la cual corresponde al diastereoisomero 4R,5R,6S de la riachina (**17c**). Sus datos de RMN, así como el punto de fusión (221-223°C) son muy similares a los reportados para la riachina, mientras que la rotación óptica [α]<sub>D</sub> -247 (MeOH), es de signo contrario aunque de mayor valor absoluto.

Los valores de las constantes de acoplamiento entre los protones H-4, H-5 y H-6, <sup>3</sup>J<sub>4,5</sub> = 3.0 Hz y <sup>3</sup>J<sub>5,6</sub> = 3.0 Hz reportadas para el producto de *I. warburgii* coinciden con el valor obtenido del producto aislado **17** <sup>3</sup>J<sub>5,6</sub> = 2.4 Hz indicando una configuración axial-ecuatorial entre estas posiciones como se observa en la figura 46.

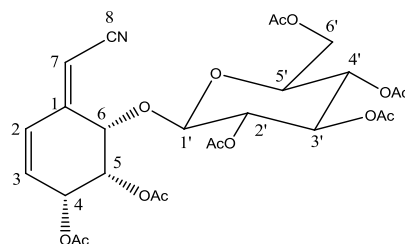
Tabla 11. Datos comparativos del compuesto (**17**) y el compuesto aislado de *I. warburgii* en D<sub>2</sub>O.

| Compuesto aislado de <i>W. urens</i><br>p.f. 217-220°C<br>[α] <sub>D</sub> = -167 (H <sub>2</sub> O)<br>400 MHz (D <sub>2</sub> O, ref. HDO 4.78) |                     |                   | Cianoglicósido de <i>Ilex warburgii</i> <sup>68</sup><br>(natural)<br>p.f. = 221.223°C<br>[α] <sub>D</sub> = -247 (MeOH)<br>RMN (D <sub>2</sub> O) |                  |                   |                   | Cianoglicósido de <i>Ilex warburgii</i> <sup>70</sup><br>(sintético)<br>(producto no cristalizado)<br>[α] <sub>D</sub> = -223 (MeOH)<br>400 MHz (D <sub>2</sub> O, ref. HDO: 4.79) |                  |                   |                   |
|---|---------------------|-------------------|--|------------------|-------------------|-------------------|--|------------------|-------------------|-------------------|
| No  | δ <sup>1</sup> H    | δ <sup>13</sup> C | δ <sup>1</sup> H   | Δ <sup>1</sup> H | δ <sup>13</sup> C | Δ <sup>13</sup> C | δ <sup>1</sup> H   | Δ <sup>1</sup> H | δ <sup>13</sup> C | Δ <sup>13</sup> C |
| 1   | -                   | 155.57            | -  | -                | 154.9             | 0.67              | -  | -                | 155.48            | 0.09              |
| 2   | 6.36 dd (10.0, 1.6) | 128.22            | 6.37 dd (10, 2)  | -0.01            | 126.2             | 2.02              | 6.36   | 0.00             | 128.13            | 0.09              |
| 3   | 6.06 dd (10.0, 2.0) | 137.03            | 6.06 dd (10, 2)  | 0.00             | 138.1             | -1.07             | 6.07   | -0.01            | 136.92            | 0.11              |
| 4   | 4.52 m              | 68.39             | 4.50 m   | 0.02             | 68.3              | 0.09              | 4.50-4.54  | 0.00             | 68.30             | 0.09              |
| 5   | 4.30 sa             | 70.09             | 4.30 t (3)   | 0.00             | 69.1              | 0.99              | 4.29-4.33  | -0.01            | 70.00             | 0.09              |
| 6   | 4.98 t (2.4)        | 76.71             | 4.95 t (3)   | 0.03             | 76.4              | 0.31              | 4.97-5.01  | -0.01            | 76.69             | 0.02              |
| 7   | 5.65 sa             | 97.85             | 5.66 sa  | -0.01            | 96.3              | 1.55              | 5.66   | -0.01            | 97.74             | 0.11              |
| CN  | -                   | 118.73            | -  | -                | 117.1             | 1.63              | -  | -                | 118.63            | 0.10              |
| 1'  | 4.74 d (7.6)        | 101.17            | 4.95   | <b>-0.21</b>     | 100.6             | 0.57              | 4.75   | -0.01            | 101.04            | 0.13              |
| 2'  | 3.43-3.47 m         | 73.51             | -  | -                | 73.0              | 0.51              | 3.44-3.46  | 0.01             | 73.40             | 0.11              |
| 3'  |                     | 76.98             | -  | -                | 76.9              | 0.08              |  |                  | 76.90             | 0.08              |
| 4'  | 3.52-3.56 m         | 76.60             | -  | -                | 75.8              | 0.80              | 3.51-3.57  | 0.01             | 76.50             | 0.10              |
| 5'  |                     | 70.49             | -  | -                | 70.2              | 0.29              |  |                  | 70.38             | 0.11              |
| 6'a   | 3.92 dd (12.4, 16)  | 61.58             | -  | -                | 61.3              | 0.28              | 3.92   | 0.00             | 61.46             | 0.12              |
| 6'b   | 3.75 dd (12.4 5.6)  |                   | -  | -                |                   |                   | 3.75   | 0.00             |                   |                   |

De acuerdo con los datos anteriores, tanto el punto de fusión como la rotación óptica y los datos de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  del compuesto aislado de *W. urens*, también son muy similares a los del (Z)-6 $\alpha$ -( $\beta$ -D-glucosiloxi)-4 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -dihidroxi-2-ciclohexen- $\Delta^{1,\alpha}$ -acetonitrilo (**17**) aislado de *Ilex warburgii* y *Semiaquilegia adoxoides*,<sup>65,68</sup> lo cual permite suponer que ambos compuestos son iguales (Tabla 25) y por lo tanto la estructura del compuesto aislado de *W. urens* debe corresponder al (2Z)-2-[(4R,5R,6S)-6-( $\beta$ -D-glucopiranosiloxi)-4,5-dihidroxi-2-ciclohexen-1-iliden]-acetonitrilo (5-*epi*-litospermósido) (**17**).

Por otra parte, la comparación de los datos de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  reportados para los peracetatos del compuesto aislado de *I. warburgii* (tanto natural como sintético) con los del peracetato del compuesto obtenido de *W. urens* **24** (Espectros 84 y 85 anexos), comprobaron la identidad de estos ya que resultaron ser iguales, mientras que los datos del peracetato del litospermósido resultaron diferentes sobre todo en las posiciones 4 y 5 de la aglicona (Tabla 12).

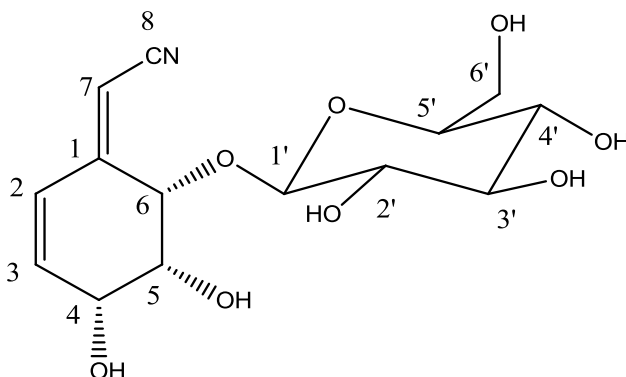
Tabla 12. Datos comparativos de los peracetatos del compuesto aislado de *W. urens* y del compuesto de *I. warburgii* sintético en CDCl<sub>3</sub>.



|                    | Peracetato del compuesto <b>17</b><br>(400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) [ $\alpha$ ] <sub>D</sub> = -53 (CHCl <sub>3</sub> ). |                 | Peracetato del 5-epi-lithospermósido sintético. <sup>70</sup><br>400 MHz, CDCl <sub>3</sub> [ $\alpha$ ] <sub>D</sub> = -84 (CHCl <sub>3</sub> ). |                         |                 |                          |
|--------------------|---|-----------------|---|-------------------------|-----------------|--------------------------|
|                    | <sup>1</sup> H  | <sup>13</sup> C | <sup>1</sup> H  | $\Delta$ <sup>1</sup> H | <sup>13</sup> C | $\Delta$ <sup>13</sup> C |
| 1                  | -   | 151.02          | -   |                         | 151.17          | -0.15                    |
| 2                  | 6.35 da (9.6)   | 129.21          | 6.33 d (9.8)  | 0.02                    | 129.38          | -0.17                    |
| 3                  | 5.99 dd (9.6, 3.6)  | 131.32          | 5.98 da (9.8)   | 0.01                    | 131.49          | -0.17                    |
| 4                  | 5.63 dt (3.6, 1.2)  | 65.88           | 5.62-5.64 sa  | 0.00                    | 66.03           | -0.15                    |
| 5                  | 5.39 sa   | 67.97           | 5.33-5.38 m   | 0.03                    | 68.14           | -0.17                    |
| 6                  | 4.80 m  | 74.51           | 4.79-4.81 sa  | 0.00                    | 74.90           | -0.39                    |
| 7                  | 5.45 s  | 100.44          | 5.44 sa   | 0.01                    | 100.63          | -0.19                    |
| CN                 | -   | 115.76          | -   | -                       | 115.93          | -0.17                    |
| 1'                 | 4.83 d (7.6)  | 100.46          | 4.85 d (7.5)  | 0.02                    | 100.92          | -0.46                    |
| 2'                 | 5.20 m  | 70.78           | 5.13-5.25 m   | -                       | 70.95           | -0.17                    |
| 3'                 | 5.23 m  | 72.80           |   | -                       | 72.97           | -0.17                    |
| 4'                 | 5.14 m  | 68.01           |   | -                       | 68.18           | -0.17                    |
| 5'                 | 3.76 m  | 72.16           | 3.73-3.78 m   | -                       | 72.33           | -0.17                    |
| 6'a                | 4.35 dd (12.4, 2.4)   | 61.34           | 4.34 dd (12.3, 2.2)   | 0.01                    | 61.51           | -0.17                    |
| 6'b                | 4.10 dd (12.4, 4.4)   |                 | 4.10 dd (12.3, 4.5)   | 0.00                    |                 |                          |
| CH <sub>3</sub> CO | 2.10  | 20.78           | 2.09  | 0.01                    | 20.95           | -0.17                    |
|                    | 2.09  | 20.64           | 2.08  | 0.01                    | 20.81           | -0.17                    |
|                    | 2.07  | 20.57(x2)       | 2.06  | 0.01                    | 20.74           | -0.17                    |
|                    | 2.04  | 20.55(x2)       | -   | -                       | 20.71           | -0.16                    |
|                    | 2.03  |                 | 2.02  | 0.01                    |                 |                          |
|                    | 2.00  |                 | 1.99 (x2)   | 0.01                    |                 |                          |
| C=O                | -   | 170.61          | -   | -                       | 170.81          | -0.20                    |
|                    |   | 170.45          |   |                         | 170.65          | -0.20                    |
|                    |   | 170.18          |   |                         | 170.38          | -0.20                    |
|                    |   | 169.85          |   |                         | 170.05          | -0.20                    |
|                    |   | 169.29          |   |                         | 169.49          | -0.20                    |
|                    |   | 168.82          |   |                         | 169.02          | -0.20                    |



Tabla 13. Datos espectroscópicos de RMN en D<sub>2</sub>O para <sup>1</sup>H (400 MHz) y <sup>13</sup>C (100 MHz) para el compuesto **17**.



| C/H | $\delta_c$<br>100 MHz    | $\delta_H$ , mult. <i>J</i> en Hz<br>400 MHz | COSY <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H | HMBC <sup>1</sup> H - <sup>13</sup> C |
|-----|--------------------------|--|-------------------------------------|---------------------------------------|
| 1   | 155.57 (C)               | -  | -                                   | -                                     |
| 2   | 128.22 (CH)              | 6.36 dd (10.0, 1.6)                          | H-3, H-4                            | C-1                                   |
| 3   | 137.03 (CH)              | 6.06 dd (10.0, 2.0)                          | H-2, H-4                            | C-1                                   |
| 4   | 68.39 (CH)               | 4.52 sa                                      | H-2, H-3, H-5                       | C-2, C-3                              |
| 5   | 70.09 (CH)               | 4.30 sa                                      | H-4, H-6                            | -                                     |
| 6   | 76.71 (CH)               | 4.98 t (2.4)                                 | H-5, H-7                            | C-1, C-1', C-7                        |
| 7   | 97.85 (CH)               | 5.65 sa                                      | H-6                                 | C-1, C-2, C-6, C-8                    |
| 8   | 118.73 (CN)              | -  | -                                   | -                                     |
| 1'  | 101.17 (CH)              | 4.74 d (7.6)                                 | H-2'                                | -                                     |
| 2'  | 73.51 (CH)               | 3.43-3.47 m                                  | -                                   | -                                     |
| 3'  | 76.98 (CH)               |  | -                                   | -                                     |
| 4'  | 76.60 (CH)               |  | 3.52-3.56 m                         | -                                     |
| 5'  | 70.49 (CH)               | -  |                                     | -                                     |
| 6'a | 61.58 (CH <sub>2</sub> ) | 3.92 dd (12.4, 1.6)                          | H-5                                 | -                                     |
| 6'b |                          | 3.75 dd (12.4, 5.6)                          | H-5                                 | -                                     |

Tabla 14. Datos espectroscópicos de RMN en DMSO-d<sub>6</sub> para <sup>1</sup>H (400 MHz) y <sup>13</sup>C (100 MHz) para el compuesto **17**.

| C/H | δ <sub>c</sub><br>100 MHz | δ <sub>H</sub> , mult. J en Hz<br>400 MHz<br>(DMSO-d <sub>6</sub> + D <sub>2</sub> O) | COSY <sup>1</sup> H - <sup>1</sup> H | HMBC <sup>1</sup> H - <sup>13</sup> C |
|-----|---------------------------|---|--------------------------------------|---------------------------------------|
| 1   | 155.15 (C)                | -   | -                                    | -                                     |
| 2   | 126.26 (CH)               | 6.19 dd (10.0, 2.0)   | H-3, H-4                             | C-1, C-4, C-6, C-7                    |
| 3   | 138.26 (CH)               | 5.90 dd (10.0, 2.4)   | H-2, H-4                             | C-1, C-5                              |
| 4   | 67.56 (CH)                | 4.26 sa   | H-2, H-3, H-5                        | C-6                                   |
| 5   | 69.26 (CH)                | 4.02 sa   | H-4, H-6                             | C-1                                   |
| 6   | 75.79 (CH)                | 4.70 t (2.0)  | H-5, H-7                             | C-1, C-1', C-2, C-7                   |
| 7   | 96.23 (CH)                | 5.60 sa   | H-6                                  | C-1, C-2, C-6, C-8                    |
| 8   | 117.29 (CN)               | -   | -                                    | -                                     |
| 1'  | 100.45 (CH)               | 4.45 d (7.2)  | H-2'                                 | C-3', C-6                             |
| 2'  | 72.91 (CH)                | 3.24 dd (8.8, 7.2)  | H-1', H-3'                           | C-1'                                  |
| 3'  | 76.38 (CH)                | 3.19 t (8.8)  | H-2', H-4'                           | C-1', C-2',                           |
| 4'  | 70.19 (CH)                | 3.03 dd (8.8, 8.4)  | H-3', H-5'                           | C-3', C-5'                            |
| 5'  | 77.06 (CH)                | 3.14 m  | H-4'', H-6'a, H-6'b                  | C-3', C-6'                            |
| 6'a | 61.37 (CH <sub>2</sub> )  | 3.68 dd (11.6, 2.0)   | H-5, H-6'b                           | C-4'                                  |
| 6'b |                           | 3.40 dd (11.6, 6.4)   | H-5, H-6'a                           | C-4', C-5'                            |

#### Verapliquinonas A y B:

Se obtuvo un aceite de color amarillo, en cuyo espectro IR se observan bandas de absorción en 1680, 1650 cm<sup>-1</sup>, características de grupos carbonilo y en 1628, 1456 y 1442 cm<sup>-1</sup>, de dobles enlaces de una quinona. (Espectro 47 anexos).

En el espectro de masas por IE se observa un ion molecular de m/z 274 (M<sup>+</sup>) el cual corresponde a un compuesto de fórmula molecular de C<sub>17</sub>H<sub>22</sub>O<sub>3</sub> (Espectro 48 anexos).

En el espectro de RMN <sup>1</sup>H en CDCl<sub>3</sub> (Espectro 38 anexos) se observan un cuarteto en δ 6.44 (J = 2.0 Hz) compuesto y una señal doble en δ 5.86 (J = 2.4 Hz), dos señales triples anchas en 5.14 (J = 7.2 Hz) y 5.07 (J = 6.8 Hz) correspondientes a protones vinílicos, una señal simple en 3.81 de un metoxilo. Se observa además una señal doble en δ 3.13 (J = 7.2 Hz) asignable a un metileno bencílico, señales múltiples en 2.06 y 2.08 ppm asignables a

metilenos alílicos y tres señales simples anchas en  $\delta$  1.69, 1.62 y 1.60 asignables a metilos vinílicos. Estas seis señales junto con las señales triples de los vinílicos en  $\delta$  5.14 y 5.07 sugieren la presencia de un grupo geranilo. Los datos anteriores están de acuerdo para la 2-geranil-6-metoxibenzoquinona (Verapliquinona A) (**6**), aislada anteriormente de la misma especie.<sup>12</sup> Sin embargo, en el espectro se observan además señales extras como son un cuarteto en  $\delta$  6.46 ( $J = 2.0$  Hz) y tres señales simples anchas en 1.75, 1.65 y 1.59. Lo anterior indica la presencia de otro compuesto muy similar, cuya diferencia se encuentra en la geometría del doble enlace en 2', que corresponde con la (*Z*)-2-geranil-6-metoxibenzoquinona (verapliquinona B) (**5**).

En el espectro de RMN <sup>13</sup>C en CDCl<sub>3</sub> (Espectro 39 anexos) se observan varias señales duplicadas debido a la presencia de los isómeros *Z* y *E*. Se puede observar para cada compuesto 17 señales asignables a cuatro metilos, tres metilenos, cuatro metinos y seis carbonos cuaternarios.

La mezcla de las *E* y *Z*-2-geranil-6-metoxibenzoquinonas verapliquinonas A y B respectivamente (**6**, **5**), fue aislada por primera vez de una especie no identificada de un tunicado del género *Aplidium*.<sup>49</sup> La comparación con los datos espectroscópicos publicados tanto en CDCl<sub>3</sub> como en C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>, confirmaron la identificación de éstas como los compuestos aislados de *W. urens*. (Tablas 15 y 16)

La integración del área bajo la curva para los protones H-3, indica que la proporción de los isómeros *E*:*Z*, en la mezcla es de 2:1.

En el experimento NOESY en C<sub>6</sub>D<sub>6</sub> (Fig. 53) (Espectro 44 anexos) se observan correlaciones entre los protones del metilo en  $\delta$  1.60 del compuesto minoritario y el protón vinílico H-2' de la cadena del geranilo de acuerdo con la configuración *Z* en la verapliquinona B (**5**) mientras que en la verapliquinona A (**6**) se observa correlación entre el protón H-2 y H-4 indicando la configuración *E* de esta última. También se observa la correlación entre los protones del metilo terminal H-8' con el protón vinílico H-6' en 5.14 y 5.11 ppm en ambos compuestos.

Tabla 15. Datos espectroscópicos de RMN 400 MHz en CDCl<sub>3</sub> para las verapliquinonas A y B.

| C/H | Compuesto mayoritario    |  | Compuesto minoritario    |                                       | Verapliquinona A         |                                       | Verapliquinona B         |                                       |
|-----|--------------------------|--|--------------------------|---------------------------------------|--------------------------|---------------------------------------|--------------------------|---------------------------------------|
|     | $\delta_C$<br>100 MHz    | $\delta_H$ , mult. J en<br>Hz, 400 MHz | $\delta_C$<br>100 MHz    | $\delta_H$ , mult. J en Hz<br>400 MHz | $\delta_C$<br>75 MHz     | $\delta_H$ , mult. J en Hz<br>300 MHz | $\delta_C$<br>75 MHz     | $\delta_H$ , mult. J en Hz<br>300 MHz |
| 1   | 182.18 (C)               | -                                      | 182.13 (C)               | -                                     | 182.20 (C)               | -                                     | 182.20 (C)               | -                                     |
| 2   | 146.45 (C)               | -                                      | 146.74 (C)               | -                                     | 146.47 (C)               | -                                     | 146.47 (C)               | -                                     |
| 3   | 132.80 (CH)              | 6.44 q (2.4)                           | 132.94 (CH)              | 6.46 q (2.4)                          | 132.71 (CH)              | 6.43 dt (2.8, 2.2)                    | 132.85 (CH)              | 6.48 dt (2.8, 2.2)                    |
| 4   | 187.71 (C)               | -                                      | 187.69 (C)               | -                                     | 187.70 (C)               | -                                     | 187.70 (C)               | -                                     |
| 5   | 107.15 (CH)              | 5.86 d (2.4)                           | 107.11 (CH)              | 5.86 (2.4)                            | 107.17 (CH)              | 5.86 d (2.8)                          | 107.17 (CH)              | 5.86 d (2.8)                          |
| 6   | 158.88 (C)               | -                                      | 158.88 (C)               | -                                     | 158.90 (C)               | -                                     | 158.90 (C)               | -                                     |
| 1'  | 27.13 (CH <sub>2</sub> ) | 3.13 d (7.2)                           | 26.93 (CH <sub>2</sub> ) | 3.13 d (7.2)                          | 27.13 (CH <sub>2</sub> ) | 3.12 d (7.8)                          | 26.96 (CH <sub>2</sub> ) | 3.12 d (7.8)                          |
| 2'  | 117.72 (CH)              | 5.14 tq (7.2, 1.2)                     | 118.44 (CH)              | 5.14 tq (7.2, 1.2)                    | 117.75 (CH)              | 5.13 tq (7.6, 1.2)                    | 118.46 (CH)              | 5.13 tq (7.6, 1.2)                    |
| 3'  | 140.05 (C)               | -                                      | 140.05 (C)               | -                                     | 140.07 (C)               | -                                     | 140.07 (C)               | -                                     |
| 4'  | 39.62 (CH <sub>2</sub> ) | 2.06 m                                 | 31.86 (CH <sub>2</sub> ) | 2.04 m                                | 39.63 (CH <sub>2</sub> ) | 2.03 m                                | 31.87 (CH <sub>2</sub> ) | 2.03 m                                |
| 5'  | 26.43 (CH <sub>2</sub> ) | 2.05 m                                 | 26.34 (CH <sub>2</sub> ) | 2.10 m                                | 26.43 (CH <sub>2</sub> ) | 2.03 m                                | 26.34 (CH <sub>2</sub> ) | 2.07 m                                |
| 6'  | 123.87 (CH)              | 5.07 t (6.8)                           | 123.73 (CH)              | 5.07 t (6.8)                          | 123.85 (CH)              | 5.08 ta (7.2)                         | 123.85 (CH)              | 5.08 ta (7.2)                         |
| 7'  | 131.83 (C)               | -                                      | 132.03 (C)               | -                                     | 131.83 (C)               | -                                     | 131.83 (C)               | -                                     |
| 8'  | 25.68 (CH <sub>3</sub> ) | 1.69 d (0.8)                           | 25.70 (CH <sub>3</sub> ) | 1.65 sa                               | 25.69 (CH <sub>3</sub> ) | 1.67 d (1.2)                          | 25.69 (CH <sub>3</sub> ) | 1.64 d (1.6)                          |
| 9'  | 16.09 (CH <sub>3</sub> ) | 1.60 sa                                | 17.64 (CH <sub>3</sub> ) | 1.59 sa                               | 17.71 (CH <sub>3</sub> ) | 1.58 sa                               | 16.10 (CH <sub>3</sub> ) | 1.57 sa                               |
| 10' | 17.69 (CH <sub>3</sub> ) | 1.62 d (0.8)                           | 23.44 (CH <sub>3</sub> ) | 1.75 q (1.2)                          | 16.10 (CH <sub>3</sub> ) | 1.60 d (1.2)                          | 23.50 (CH <sub>3</sub> ) | 1.74 q (1.5)                          |
| OMe | 56.27                    | 3.81 s                                 | 56.27                    | 3.81 s                                | 56.27                    | 3.80 s                                | 56.27                    | 3.80 s                                |

Tabla 16. Datos espectroscópicos de RMN 400 MHz en C<sub>6</sub>D<sub>6</sub> para las verapliquinonas A y B

| C/H | Compuesto mayoritario    |  | Compuesto minoritario    |  | Verapliquinona A         |                                       | Verapliquinona B         |                                       |
|-----|--------------------------|--|--------------------------|--|--------------------------|---------------------------------------|--------------------------|---------------------------------------|
|     | $\delta_c$<br>100 MHz    | $\delta_H$ , mult. J en<br>Hz, 400 MHz | $\delta_c$<br>100 MHz    | $\delta_H$ , mult. J en<br>Hz, 400 MHz | $\delta_c$<br>75 MHz     | $\delta_H$ , mult. J en Hz<br>300 MHz | $\delta_c$<br>75 MHz     | $\delta_H$ , mult. J en Hz<br>300 MHz |
| 1   | 181.96 (C)               | -                                      | 181.92 (C)               | -                                      | 187.10 (C)               | -                                     | 187.10 (C)               | -                                     |
| 2   | 146.55 (C)               | -                                      | 146.81 (C)               | -                                      | 146.18 (C)               | -                                     | 146.18 (C)               | -                                     |
| 3   | 133.06 (CH)              | 6.36 q (2.4)                           | 133.21 (CH)              | 6.39 q (2.0)                           | 132.71 (CH)              | 6.36 dt (2.4, 2.2)                    | 132.71 (CH)              | 6.40 dt (2.4, 2.2)                    |
| 4   | 187.50 (C)               | -                                      | 187.47 (C)               | -                                      | 187.10 (C)               | -                                     | 187.10 (C)               | -                                     |
| 5   | 107.50 (CH)              | 5.43 d (2.4)                           | 107.50 (CH)              | 5.44 d (2.4)                           | 107.11 (CH)              | 5.42 d(2.4)                           | 107.11 (CH)              | 5.44 d(2.4)                           |
| 6   | 159.29 (C)               | -                                      | 159.29 (C)               | -                                      | 158.91 (C)               | -                                     | 158.91 (C)               | -                                     |
| 1'  | 27.80 (CH <sub>2</sub> ) | 2.97 d (7.2)                           | 27.67 (CH <sub>2</sub> ) | 3.02 (7.2)                             | 27.43 (CH <sub>2</sub> ) | 2.97 da (7.3)                         | 27.43 (CH <sub>2</sub> ) | 3.02 da (7.3)                         |
| 2'  | 119.26 (CH)              | 5.05 tq (7.2, 1.2)                     | 119.97 (CH)              | 5.02 m                                 | 118.88 (CH)              | 5.04 tq (7.3, 1.1)                    | 119.70 (CH)              | 5.04 tq (7.3, 1.1)                    |
| 3'  | 139.77 (C)               | -                                      | 139.75 (C)               | -                                      | 139.40 (C)               | -                                     | 139.40 (C)               | -                                     |
| 4'  | 40.26 (CH <sub>2</sub> ) | 1.98 m                                 | 32.38 (CH <sub>2</sub> ) | 1.98 m                                 | 39.89 (CH <sub>2</sub> ) | 1.98 ta (7.4)                         | 32.05 (CH <sub>2</sub> ) | 1.98 ta (7.4)                         |
| 5'  | 27.10 (CH <sub>2</sub> ) | 2.07 m                                 | 27.06 (CH <sub>2</sub> ) | 2.07 m                                 | 26.73 (CH <sub>2</sub> ) | 2.07 q (7.4)                          | 26.64 (CH <sub>2</sub> ) | 2.07 q (7.4)                          |
| 6'  | 124.88 (CH)              | 5.14 t (7.2)                           | 124.74 (CH)              | 5.11 t (7.2)                           | 124.51 (CH)              | 5.13 ta (7.4)                         | 124.51 (CH)              | 5.13 ta (7.4)                         |
| 7'  | 132.04 (C)               | -                                      | 132.16 (C)               | -                                      | 131.60 (C)               | -                                     | 131.60 (C)               | -                                     |
| 8'  | 26.23 (CH <sub>3</sub> ) | 1.74 sa                                | 26.20 (CH <sub>3</sub> ) | 1.65 sa                                | 25.86 (CH <sub>3</sub> ) | 1.74 da (1.1)                         | 25.86 (CH <sub>3</sub> ) | 1.65 da (1.4)                         |
| 9'  | 18.10 (CH <sub>3</sub> ) | 1.54 sa                                | 18.03 (CH <sub>3</sub> ) | 1.53 sa                                | 17.72 (CH <sub>3</sub> ) | 1.54 sa                               | 15.89 (CH <sub>3</sub> ) | 1.52 sa                               |
| 10' | 16.27 (CH <sub>3</sub> ) | 1.43 sa                                | 23.75 (CH <sub>3</sub> ) | 1.60 d (1.2)                           | 15.89 (CH <sub>3</sub> ) | 1.42 da (1.1)                         | 23.40 (CH <sub>3</sub> ) | 1.59 q (1.5)                          |
| OMe | 55.45                    | 2.82 s                                 | 55.45                    | 2.82 s                                 | 55.03                    | 2.80 s                                | 55.03                    | 2.80 s                                |

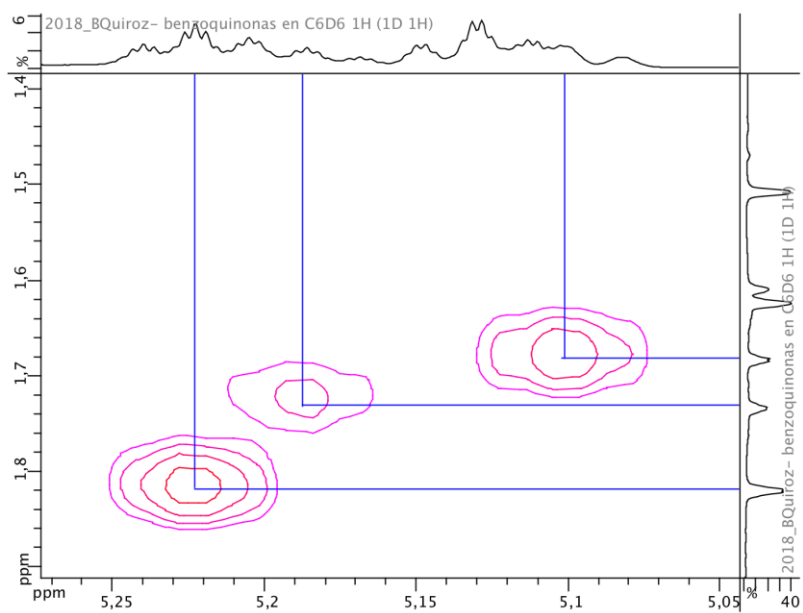
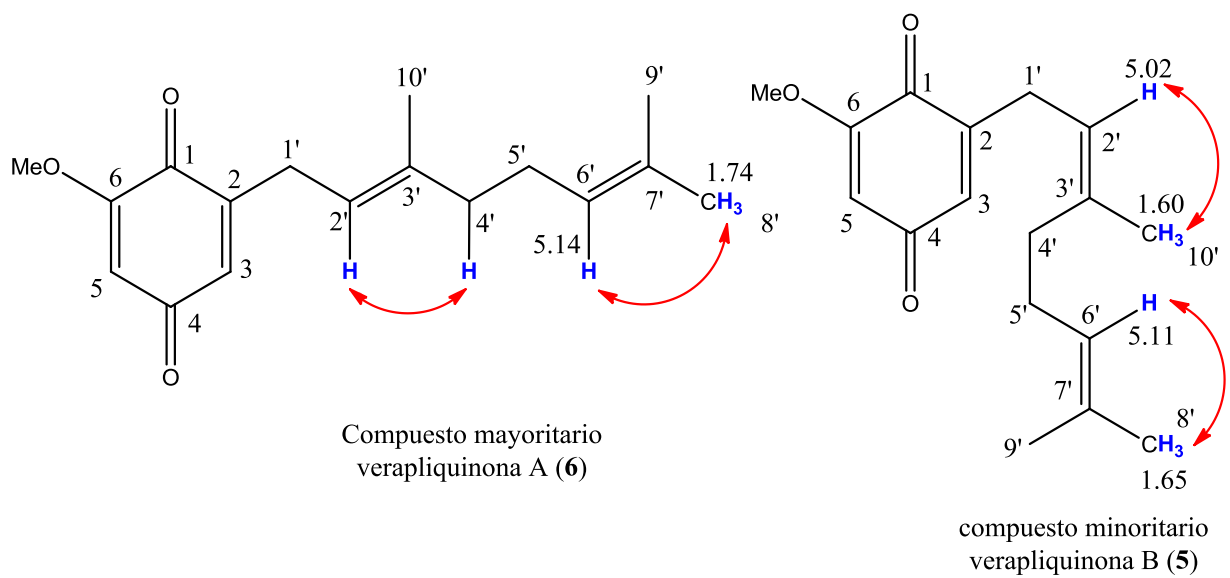


Figura 53. Efectos NOE observados en las verapliquinonas A y B.

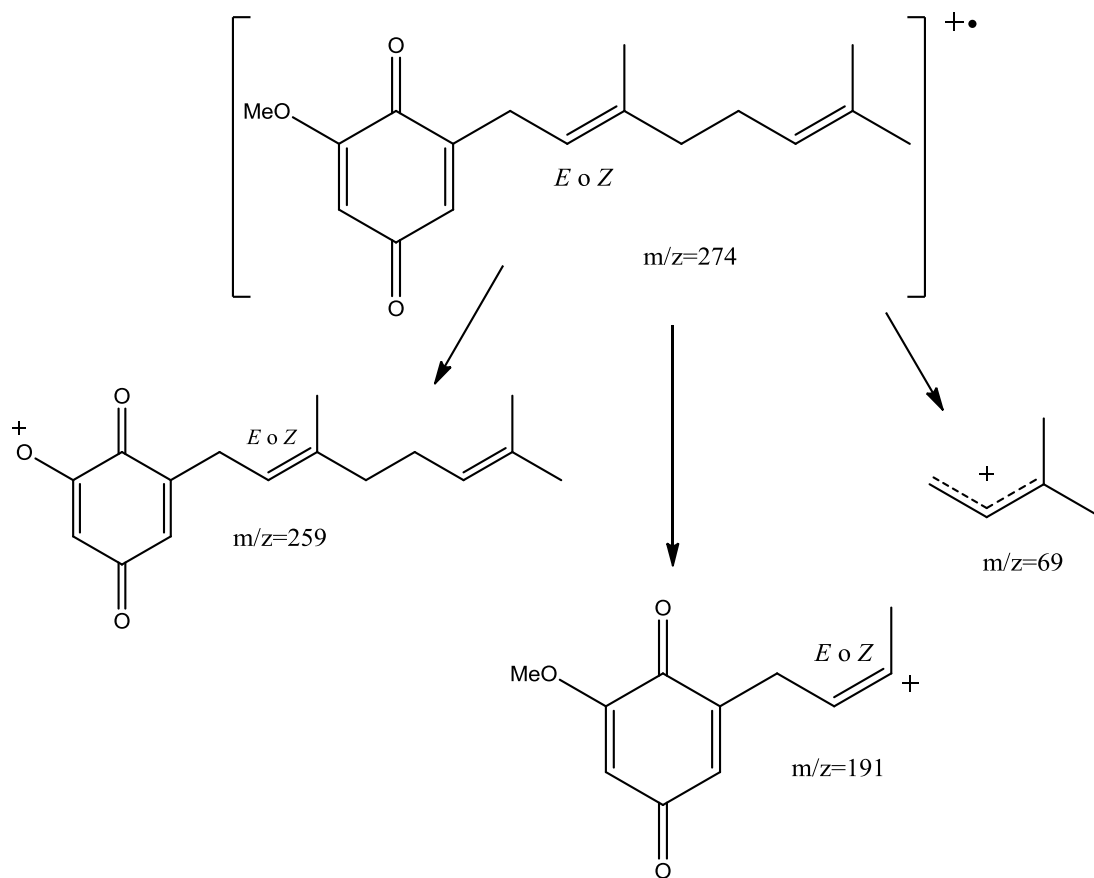


Figura 54. Fragmentos de masas de las verapliquinonas A y B

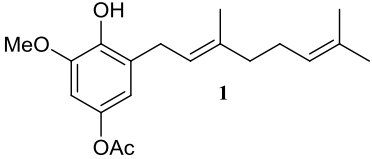
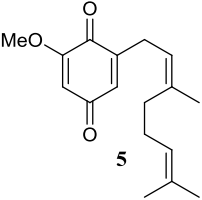
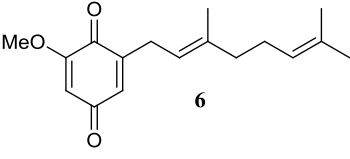
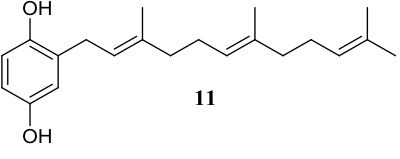
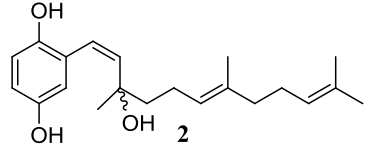
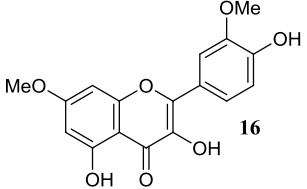
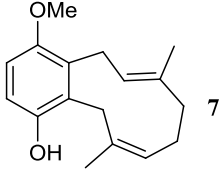
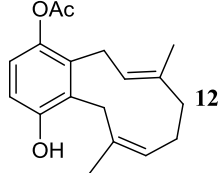
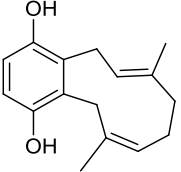
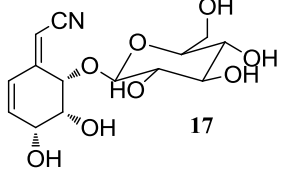
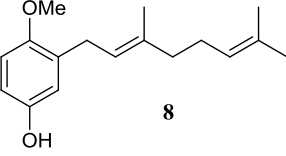
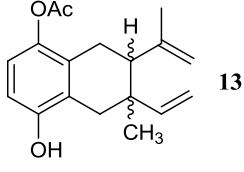
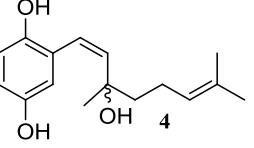
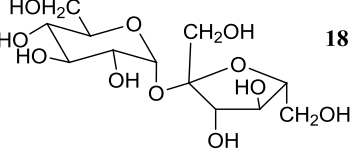
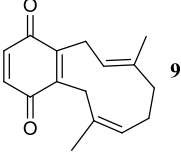
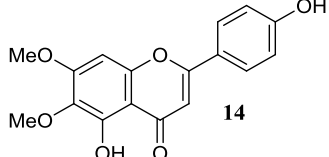
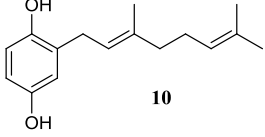
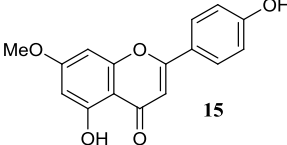
**Sacarosa (18):**

De la fracción Wu-MeOH-C y D se obtuvo un sólido que cristalizó de forma espontánea en metanol, con punto de fusión (178-180°C). El análisis del espectro de RMN  $^1\text{H}$  y la comparación por CCF con una muestra auténtica de sacarosa, confirmó que se trata del mismo compuesto (Fig. 55).



Figura 55. Análisis comparativo por CCF de la sacarosa aislada y una referencia.

Tabla 17. Tabla resumen de los compuestos aislados de *W. urens*.

| Compuestos reportados por primera vez de <i>W. urens</i>                                    |  | Compuestos reportados previamente de <i>W. urens</i>  |   |
|---|--|---|---|
|  <p>1</p>  |  <p>5</p>   |  <p>6</p>    |  <p>11</p>   |
|  <p>2</p>  |  <p>16</p>  |  <p>7</p>    |  <p>12</p>   |
|  <p>3</p>  |  <p>17</p>  |  <p>8</p>    |  <p>13</p>   |
|  <p>4</p> |  <p>18</p> |  <p>9</p>   |  <p>14</p>  |
|   |  |  <p>10</p> |  <p>15</p> |



## Pruebas biológicas:

### Prueba de actividad captadora del radical DPPH:

La evaluación preliminar de los compuestos mostró los siguientes resultados:

Tabla 18. Evaluación preliminar de la actividad captadora del radical DPPH.

| Muestra                                     | Concentración ( $\mu\text{M}$ ) | D.O. 515 nm | % de reducción del DPPH |
|---|---------------------------------|-------------|-------------------------|
| DPPH  | 50                              | 0.685       | -                       |
| AGMB (ácido 3-geranil-4-metoxibenzoico)     | 50                              | 0.644       | 5.94                    |
| Rhamnazina ( <b>16</b> )                    | 50                              | 0.381       | <b>44.38</b>            |
| Compuesto <b>1</b>                          | 50                              | 0.636       | 7.20                    |
| Compuesto <b>22</b>                         | 50                              | 0.675       | 1.41                    |
| Wigandiona ( <b>9</b> )                     | 50                              | 0.628       | 8.32                    |
| Geranilbenzoquinona ( <b>25</b> )           | 50                              | 0.555       | 18.93                   |
| Wigandol ( <b>12</b> )                      | 50                              | 0.664       | 3.11                    |
| Desacetilwigandol ( <b>3</b> )              | 50                              | 0.107       | <b>84.38</b>            |
| Compuesto ( <b>23</b> )                     | 50                              | 0.685       | 0.05                    |
| Geranilhidroquinona ( <b>10</b> )           | 50                              | 0.157       | <b>77.13</b>            |
| Compuesto ( <b>26</b> )                     | 50                              | 0.677       | 1.12                    |
| 5- <i>epi</i> -litospermosido ( <b>17</b> ) | 50                              | 0.672       | 1.90                    |
| Compuesto <b>24</b>                         | 50                              | 0.668       | 2.43                    |

De acuerdo a lo anterior, se observa que los compuestos desacetilwigandol (**3**), geranilhidroquinona (**10**) y rhamnazina (**16**) muestran actividad significativa a la concentración utilizada. Por lo tanto, se decidió evaluarlos a diferentes concentraciones para obtener los valores de  $\text{IC}_{50}$  de estos tres compuestos.

Condiciones experimentales: Temperatura:  $37 \pm 2$  °C; tiempo de incubación:  $30 \pm 2$  min; concentración DPPH:  $100 \mu\text{M}$

Los valores representan el promedio de tres experimentos independientes ( $n=4$ )  $\pm$  error estándar de la media. Los datos se sometieron un análisis de varianza (ANOVA) seguida de una prueba de Dunnett para aislar grupos con diferencia significativa. Los valores de  $p \leq 0.05$  (\*) y  $p \leq 0.01$  (\*\*) se consideraron como diferencia significativa con respecto al control.

Tabla 19. Valores de IC<sub>50</sub> de los tres compuestos evaluados y los estándares.

| Muestra                            | Concentración (μM) | A <sub>515nm</sub> | % de reducción del DPPH | IC 50 (μM)   |
|------------------------------------|--------------------|--------------------|-------------------------|--------------|
| Rhamnazina (16)<br>(n=3)           | Control            | 0.88 ± 0.03        | -                       | 58.11 ± 3.49 |
|                                    | 17.78              | 0.75 ± 0.04        | 14.77 ± 3.36            |              |
|                                    | 31.62              | 0.65 ± 0.05 *      | 26.09 ± 4.91            |              |
|                                    | 56.23              | 0.46 ± 0.04 *      | 47.70 ± 5.71            |              |
|                                    | 100.00             | 0.14 ± 0.04 *      | 84.07 ± 7.60            |              |
|                                    | 177.83             | 0.06 ± 0.01 *      | 92.54 ± 0.36            |              |
| Desacetilwigandol (3)<br>(n=3)     | Control            | 0.88 ± 0.04        | -                       | 38.58 ± 1.99 |
|                                    | 5.62               | 0.84 ± 0.03        | 4.64 ± 3.21             |              |
|                                    | 10.00              | 0.76 ± 0.04        | 13.34 ± 1.74            |              |
|                                    | 17.78              | 0.68 ± 0.04 *      | 22.77 ± 2.49            |              |
|                                    | 31.62              | 0.53 ± 0.03 *      | 40.32 ± 3.44            |              |
|                                    | 56.23              | 0.24 ± 0.04 *      | 73.48 ± 6.56            |              |
| Geranilhidroquinona (10)<br>(n=3)  | Control            | 0.88 ± 0.03        | -                       | 37.22 ± 3.44 |
|                                    | 5.62               | 0.80 ± 0.04        | 8.73 ± 4.41             |              |
|                                    | 10.00              | 0.75 ± 0.06        | 14.43 ± 6.66            |              |
|                                    | 17.78              | 0.68 ± 0.06 *      | 23.21 ± 7.42            |              |
|                                    | 31.62              | 0.51 ± 0.06 *      | 42.47 ± 7.74            |              |
|                                    | 56.23              | 0.27 ± 0.04 *      | 69.50 ± 5.71            |              |
| α-Tocoferol (n=4)                  | Control            | 0.741 ± 0.018      | -                       | 31.74 ± 1.04 |
|                                    | 13.34              | 0.609 ± 0.026 **   | 17.96 ± 1.74            |              |
|                                    | 17.78              | 0.553 ± 0.027 **   | 25.51 ± 2.02            |              |
|                                    | 23.71              | 0.488 ± 0.020 **   | 34.31 ± 1.80            |              |
|                                    | 31.62              | 0.400 ± 0.019 **   | 46.13 ± 1.98            |              |
|                                    | 42.17              | 0.284 ± 0.017 **   | 61.65 ± 2.19            |              |
|                                    | 56.23              | 0.135 ± 0.009 **   | 81.76 ± 1.11            |              |
|                                    | 74.13              | 0.106 ± 0.007 **   | 85.79 ± 0.63            |              |
|                                    | 100.00             | 0.106 ± 0.007 **   | 85.78 ± 0.58            |              |
| Quercetina (n=4)                   | Control            | 0.741 ± 0.018      | -                       | 10.89 ± 0.47 |
|                                    | 2.37               | 0.665 ± 0.017 *    | 10.37 ± 0.32            |              |
|                                    | 3.16               | 0.642 ± 0.018 **   | 13.46 ± 0.49            |              |
|                                    | 4.22               | 0.603 ± 0.019 **   | 18.80 ± 0.69            |              |
|                                    | 5.62               | 0.559 ± 0.018 **   | 24.70 ± 0.92            |              |
|                                    | 7.50               | 0.509 ± 0.016 **   | 31.42 ± 1.07            |              |
|                                    | 10.00              | 0.419 ± 0.014 **   | 43.49 ± 1.54            |              |
|                                    | 13.34              | 0.313 ± 0.018 **   | 57.75 ± 2.28            |              |
|                                    | 17.78              | 0.181 ± 0.024 **   | 75.55 ± 3.26            |              |
|                                    | 23.71              | 0.107 ± 0.003 **   | 85.53 ± 0.28            |              |
| BHT (Butilhidroxitolueno)<br>(n=3) | Control            | 0.737 ± 0.022      | -                       | 74.91 ± 5.76 |
|                                    | 10.00              | 0.664 ± 0.034      | 10.57 ± 1.72            |              |
|                                    | 31.62              | 0.511 ± 0.029 **   | 31.16 ± 2.16            |              |
|                                    | 100.00             | 0.327 ± 0.026 **   | 55.78 ± 4.06            |              |
|                                    | 316.23             | 0.134 ± 0.014 **   | 81.99 ± 1.34            |              |
|                                    | 1000.00            | 0.123 ± 0.026 **   | 83.58 ± 2.99            |              |

Como se puede observar los tres compuestos evaluados desacetilwigandol (**3**), geranilhidroquinona (**10**) y rhamnazina (**16**) presentan actividad captadora de radicales DPPH comparable con los estándares utilizados  $\alpha$ -tocoferol y BHT. Se observa además que al cambiar o reemplazar los grupos hidroxilo los cuales pueden donar un radical H $\cdot$  y reducir el DPPH la actividad disminuye significativamente como en el caso del diacetato de la geranilhidroquinona y del diacetato del desacetilwigandol. De acuerdo a esto, se puede explicar el hecho que los tres compuestos que conservan los OH fenólicos libres presenten actividad.<sup>73</sup>

Actividad inhibitoria de la proliferación celular:

La evaluación preliminar sobre 6 líneas celulares mostró los siguientes resultados:

U251= glía de sistema nervioso central, PC-3= próstata, K562= leucemia, HCT-15= colon, MCF-7= mama, SKLU= pulmón, NC= No citotóxico.

Tabla 20. Evaluación preliminar de la actividad inhibitoria de la proliferación celular.

| Muestra                                     | % de inhibición del crecimiento por la línea celular |       |       |        |       |        |
|---|--|-------|-------|--------|-------|--------|
|   | U251   | PC-3  | K562  | HCT-15 | MCF-7 | SKLU-1 |
| AGMB (ácido 3-geranil-4-metoxibenzoico)     | 20.13  | 14.48 | 30.65 | 10.84  | NC    | 15.79  |
| Rhamnazina ( <b>16</b> )                    | 72.96  | 65.23 | 100   | 79.09  | 79.43 | 75.29  |
| Compuesto <b>1</b>                          | 25.47  | 45.53 | 85.49 | 18.18  | 23.07 | 31.83  |
| Compuesto <b>22</b>                         | 100  | 100   | 100   | 100    | 100   | 100    |
| Wigandona ( <b>9</b> )                      | 50.2   | 98.56 | 100   | 100    | 81.14 | 100    |
| Geranilbenzoquinona ( <b>25</b> )           | 90.07  | 77.4  | 100   | 45.29  | 46.86 | 78.23  |
| Wigandol ( <b>12</b> )                      | 100  | 100   | 100   | 100    | 100   | 100    |
| Desacetilwigandol ( <b>3</b> )              | 80.23  | 100   | 100   | 82.23  | 73.67 | 100    |
| Compuesto ( <b>23</b> )                     | 48.17  | 95.4  | 100   | 41.49  | 51.40 | 68.29  |
| Geranilhidroquinona ( <b>10</b> )           | 100  | 100   | 100   | 100    | 96.88 | 100    |
| Compuesto ( <b>26</b> )                     | 100  | 100   | 100   | 100    | 90.24 | 100    |
| 5- <i>epi</i> -litospermosido ( <b>17</b> ) | 11   | 10.3  | 31.2  | 19.97  | 24.55 | 7.389  |
| Compuesto <b>24</b>                         | 0.94   | NC    | 39.17 | 20.05  | 10.95 | 7.104  |

Se observa que a excepción del AGMB, el 5-*epi*-lithospermosido y su derivado acetilado **24** los demás compuestos presentan actividad citotóxica al menos sobre una línea celular a la concentración evaluada. Sin embargo, se necesitarían valores de IC<sub>50</sub> para corroborar esta actividad de acuerdo a las curvas de dosis-respuesta a concentraciones más bajas y adicional a esto la evaluación sobre líneas celulares no cancerosas para observar la selectividad, lo cual se realizará en análisis posteriores.

Actividad antiinflamatoria en el modelo inducido con TPA:

Se llevo a cabo la evaluación preliminar de la actividad antiinflamatoria en el modelo de inflamación de oreja inducido con TPA mostrando los siguientes resultados:

Tabla 21. Evaluación preliminar de la actividad antiinflamatoria.

| <b>Muestra</b>                               | <b>Dosis<br/>(<math>\mu</math>mol/oreja)</b> | <b>Edema<br/>(mg)</b> | <b>Inhibición<br/>(%)</b> |
|--|--|-----------------------|---------------------------|
| Control                                      | -  | 15.40 $\pm$ 0.43      | -                         |
| 5- <i>epi</i> -lithospermosido ( <b>17</b> ) | 1  | 13.67 $\pm$ 0.73      | 11.26                     |
| Indometacina <sup>a</sup>                    | 1  | 2.88 $\pm$ 0.73**     | 78.76**                   |

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

<sup>a</sup> control etanol:acetona 1:1= 14.75  $\pm$ 1.13 mg

De acuerdo a los resultados anteriores se observa que a pesar de que el compuesto tiene actividad antiinflamatoria es muy leve por lo que se decidió no continuar con análisis más detallados.

## CONCLUSIONES

- De los extractos de *W. urens* se aislaron 18 compuestos dos de ellos (**1** y **2**) son productos no reportados en la literatura. Otros seis (**3-5**, **16-18**), son compuestos descritos por primera vez en *W. urens*: tres derivados de la geranilhidroquinona: el desacetilwigandol (**3**) y los derivados **4** y **5**, además de un derivado de la quercetina (rhamnazina) (**16**), un cianoglicósido (5-*epi*-litospermósido) (**17**) y sacarosa (**18**). Además de 10 compuestos reportados previamente de la misma especie.
- De acuerdo a las correlaciones obtenidas en el experimento NOESY se pudo establecer la configuración *Z* y *E* de los dobles enlaces  $\Delta^6$  y  $\Delta^{10}$ , en los benzocyclodecadienos aislados.
- Se obtuvieron seis derivados acetilados (**19-24**), además de los productos de oxidación del desacetilwigandol (**3**) (globiferina (**9**)) y la geranilhidroquinona (**10**) (geranilbenzoquinona (**25**)) que ayudaron a confirmar las estructuras propuestas de los productos naturales aislados.
- Se obtuvo el desacetilwigandol (**3**) un benzocyclodecadieno reportado por primera vez como producto natural, y del cual se realizó la corrección en la asignación de las señales de RMN  $^{13}\text{C}$  reportadas en la literatura en acetona- $d_6$ .
- La diversidad estructural de los metabolitos aislados de *Wigandia urens*, está de acuerdo con el tipo de compuestos aislados de otros géneros pertenecientes a la familia Hydrophyllaceae.
- Los resultados de la evaluación de la actividad antioxidante de 13 compuestos (aislados y derivados), de los cuales tres de ellos mostraron poseer actividad atrapadora del radical DPPH comparable con los estándares utilizados: el desacetilwigandol (**3**), la rhamnazina (**16**) y la geranilhidroquinona (**10**).
- En cuanto a la actividad inhibitoria de la proliferación celular se observó que varios de los compuestos evaluados presentan buena actividad a 50  $\mu\text{M}$  por lo que se requieren estudios más detallados para determinar la  $\text{IC}_{50}$  y determinar su potencial.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Franz B., Wube A., Schmid M. Natural product isolation – how to get from biological material to pure compounds. *Natural Products Reports* 2013, 30, 525-545.
2. Linh T. Ngo, Joseph I. Okogun, William R. Folk. 21st Century natural product research and drug development and traditional medicines. *Natural Products Reports* 2013, 30, 584-592.
3. Kingston D. Modern Natural Products Drug Discovery and Its Relevance to Biodiversity Conservation. *Journal of Natural Products* 2011, 74, 496-511.
4. Seger C., Sturm S., Stuppner H. Mass spectrometry and NMR spectroscopy: modern high-end detectors for high resolution separation techniques – state of the art in natural product HPLC-MS, HPLC-NMR, and CE-MS hyphenations. *Natural Products Reports* 2013, 30, 970-987.
5. Ley. J., Krammer G., Reinders G., Gatfield I., Bertram H. J. Evaluation of Bitter Masking Flavanones from Herba Santa (*Eriodictyon californicum* (H. & A.) Torr., Hydrophyllaceae). *Journal of the Agricultural and Food Chemistry* 2005, 53, 6061-6066
6. Bacon J., Hannan G., Fang N., Mabry T. Chemosystematics of the Hydrophyllaceae: Flavonoids of Three Species of *Eriodictyon*. *Biochemical Systematics and Ecology* 1986, 14, 591-595.
7. Reynolds G. W., Rodriguez E. Dermatotoxic phenolics from glandular trichomes of *Phacelia campanularia* and *P. pedicellata*. *Phytochemistry* 1986, 25, 1617-1619.
8. Reynolds G. W., Gafner F., Rodriguez E. Contact allergens of an urban shrub *Wigandia caracasana*. *Contact Dermatitis* 1989, 21, 65-68.
9. Rzedowski, G. C. de, Rzedowski J. y colaboradores. Flora fanerogámica del Valle de México. 2a. ed., 1a reimp., Instituto de Ecología, A.C. y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Pátzcuaro Michoacán. 2005. p. 601.
10. Zavala-Sanchez M., Pérez C., Arias L., Pérez S. Anti-inflammatory activity of *Wigandia urens* and *Acalypha alopecuroides*. *African Journal of Biotechnology* 2009, 8, 5901-5905.
11. Gómez F., Quijano L., Calderón J. S., and Rios T. Terpenoids isolated from *Wigandia kunthii*. *Phytochemistry* 1980, 19, 2202-2203.
12. García G. Estudio fitoquímico de *Wigandia kunthii* (Hydrophyllaceae). Determinación de la estereoquímica y conformación del wigandol y wigandiona. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F. 1992.
13. Cruz L. E. Estudio fitoquímico de *Wigandia kunthii* y análisis de los productos de hidrólisis del wigandol. Tesis de Licenciatura. Universidad Veracruzana. Orizaba. México. 1997.

14. Cao S., Rossant C., Ng S., Buss A., Butler M. Phenolic derivatives from *Wigandia urens* with weak activity against the chemokine receptor CCR5. *Phytochemistry* 2003, 64, 987-990.
15. Pérez S. La familia Hydrophyllaceae en el estado de Guerrero, México. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). 2007.
16. Davidse G., Sánchez M., Knapp S. Cabrera F. Rubiaceae a Verbenaceae. Hydrophyllaceae. *Flora mesoamericana* 2011, 4, 1-10.
17. Nash Dorothy. Hydrophyllaceae. *Flora de Veracruz* (5) 1-37. 1979.
18. Cornejo X. *Wigandia ecuadorensis* (Hydrophyllaceae), una nueva especie del bosque muy seco tropical al occidente de Ecuador. *Novon: A Journal for Botanical Nomenclature* 2006, 16, 324-327.
19. Cornejo X. *Wigandia brebistyla*: una nueva Hydrophyllaceae de la República Dominicana. *Anales del Jardín Botánico de Madrid* 2007, 64, 63-67.
20. Cano Z., Oyama K. *Wigandia urens* (Hydrophyllaceae): un mosaico de recursos para sus insectos herbívoros. *Acta botánica mexicana* 1994, 28, 29-39.
21. Pérez L., Cano Z., Oyama K. Variation in leaf trichomes of *Wigandia urens*: environmental factors and physiological consequences. *Tree Physiology* 2000, 20, 629-632.
22. Reynolds G., Rodriguez E. Prenylated Phenols that Cause Contact Dermatitis from Trichomes of *Phacelia ixodes*. *Planta Medica* 1981, 43, 187-193.
23. Reynolds G. W., Epstein W., Rodriguez E. Unusual contact allergens from plants in the family Hydrophyllaceae. *Contact Dermatitis* 1986, 14, 39-44.
24. Roitman J., Wollenweber E.  $\beta$ ,  $\beta$ -dimethacrylophenones and a chromanone from *Nama hispidum* and *Nama jhonstonii*. *Phytochemistry* 1993, 33, 936-938.
25. Rueda A., Zubía E., Ortega M., Salvá J. A new cytotoxic prenylhydroquinone from a Mediterranean Tunicate of the Genus *Aplydium*. *Natural Product Letters* 1998, 11, 127-130
26. Scheuer P., Higa T., Rzepecki L. M., Targett N., Uemura D., Waite J. H., Ward J. *Bioorganic Marine Chemistry*. Vol. 4. Edit. Springer-Verlag. Alemania. 1991.
27. Fenical W. 1976. Webber H.H., Ruggieri G.D. Food- drugs the sea proceedings. Marine technology Society. Washington D.C. 1974. p. 388.
28. Howard B., Clarkson K. Simple prenylated hydroquinone derivatives from the marine urochordate *Aplidium californicum*. Natural anticancer and antimutagenic agents. *Tetrahedron Letters* 1979, 46, 4449-4452.
29. Baeza E., Catalán K., Peña-Cortés H., Espinoza L. Synthesis of geranylhydroquinone derivatives with potential cytotoxic activity. *Química Nova* 2012, 35, 523-526.

30. Fedorov S., Randchenko O. Shubina L., Balaneva N., Bode A., Stonik V., Dong Z. Evaluation of Cancer-Preventive Activity and Structure–Activity Relationships of 3-Demethylubiquinone Q2, Isolated from the Ascidian *Aplidium glabrum*, and its Synthetic Analogs. *Pharmaceutical Research* 2006, 23, 70-81.
31. Fedorov S., Randchenko O. Shubina L., Bode A., Stonik V., Dong Z. Therapeutics Quinones. World Intellectual Property Organization. PCT/US2005/033956. Patente de invención. WO 2006034392 A2.
32. Davis R. A., Carroll A., Quinn R. Longithorols C-E. Three New Macrocyclic Sesquiterpene Hydroquinone metabolites from the Australian Ascidian, *Aplidium longithorax*. *Journal of Natural Products* 1999, 62, 1405-1409.
33. Davis R. A., Carroll A., Quinn R. Longithorols J and K., Two New Cyclofarnesyl Quinone Derived metabolites from the Australian Ascidian *Aplidium longithorax*. *Journal of Natural Products* 1999, 62 158-160.
34. Fu X., Hossain M.B, Schmitz F. J., van der Helm D. Longithorones, Unique Prenylated Para- and Metacyclophane Type Quinones from the Tunicate *Aplidium longithorax*. *Journal of Organic Chemistry* 1997, 62, 3810-3819.
35. Yin X., Feng T., Li Z. H. Dong Z. J., Li Y., Liu J. K. Highly Oxygenated Meroterpenoids from fruiting Bodies of the Mushroom *Tricholoma terreum*. *Journal of Natural Products* 2013, 76, 1365–1368.
36. Sato A., Shindo T., Kasanuki N., Hasegawa K. Antioxidant Metabolites from the Tunicate *Amaroucium multiplicatum*. *Journal of Natural Products* 1989, 52, 975–981.
37. Aknin M., Dayan T., Rudi A., Kashman Y., Gaydou E. Hydroquinone Antioxidants from the Indian Ocean Tunicate *Aplidium savignyi*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1999, 47, 4175-4177.
38. Masuoka C., Ono M., Ito Y., Nohara T. Antioxidative Constituents from the Aerial Part of *Piper elongatum* VAHL. *Food Science and Technology International Tokyo* 1997 3, 285-289.
39. Yamaguchi L., Lago, J., Tanizaki T., Di Mascio P., Kato M. 2006. Antioxidant activity of prenylated hydroquinone and benzoic acid derivatives from *Piper crassinervium*. *Phytochemistry* 2006, 67 1838–1843.
40. Sáez A., Rojano B., Blair S., Segura C., Figadere B., Seon B., Grellier P., Sáez J. Antimalarials and antioxidants compounds from *Piper tricuspe* (Piperaceae). *Pharmacologyonline* 2008, 1, 1-8.
41. Cotelle N., Moreau S., Bernier J. L., Catteau J. P., Hénichart J.P. Antioxidant properties of natural hydroquinones from the marine colonial tunicate *Aplidium californicum*. *Free Radical Biology & Medicine* 1991, 11, 63-68.



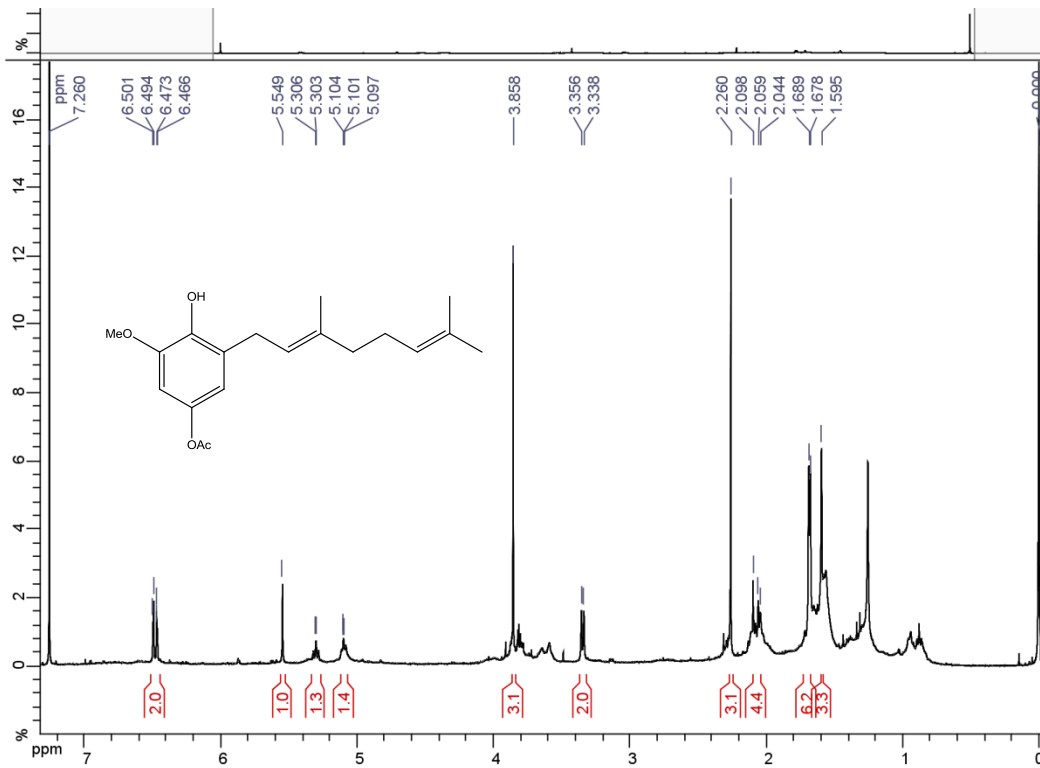
42. De Rosa S., De Giulio A., Iodice C. Biological effects of prenylated hydroquinones: structure-activity relationship studies in antimicrobial, brine shrimp, and fish lethality assays. *Journal of Natural Products* 1994, 57, 1711-1716.
43. Florez N., Jiménez I., Giménez A., Ruiz G., Gutierrez D., Bourdy G., Bazzocchi I. Antiparasitic activity of prenylated benzoic acid derivatives from Piper species. *Phytochemistry* 2009, 70, 621-627.
44. Mori K., Kawano M., Fuchino H., Ooi T., Satake M., Agatsuma Y., Kusumi T., Sekita S. Antileishmanial Compounds from *Cordia fragrantissima* Collected in Burma (Myanmar). *Journal of Natural Products* 2008, 71, 18-21.
45. Vargas Gallego Juan Camilo. Aislamiento e identificación de metabolitos secundarios presentes en hojas de *Wigandia urens* HYDROPHYLLACEAE. Tesis de Licenciatura. Instituto de Química-Universidad Tecnológica de Pereira. México D.F. 2011.
46. Takahashi A., Kusano G., Ohta T., Nozoe S. The Constituents of *Lactarius flavidulus*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 1988, 36, 2366-2370.
47. Dettrakul S., Surerum S., Rajviroongit S., Kittakoop P. Biomimetic Transformation and Biological Activities of Globiferin, a Terpenoid Benzoquinone from *Cordia globifera*. *Journal of Natural Products* 2009, 72, 861-865.
48. Mori M., Kondo T., Toki K., Yoshida K. Structure of antocyanin from the blue petals of *Phacelia campanularia* and its blue flower color development. *Phytochemistry* 2006, 67, 622-629.
49. Guella G., Mancini I., Pietra F. Verapiliquinones: novel diprenylquinones from an *Aplidium* sp. (Ascidiacea) of Ile-Verte waters, Brittany. *Helvetica Chimica Acta* 1987, 70, 621-626.
50. Ioset J.R., Marston A., Gupta M., Hostettmann K. Antifungal and Larvicidal compound from the root bark of *Cordia alliodora*. *Journal of Natural Products* 2000, 63, 424-426.
51. Alarcón S. R., Ábalos M., Colloca C. B., Pacciaroni A., Sosa V. E. Flavonoids from *Gutierrezia repens* (Asteraceae). *The journal of the Argentine Chemical Society* 2007, 95, 20-24.
52. Sosa A., Winternitz F., Wylde R., Pavia A. Structure of a cyanoglucoside of *Litospermum purpureo-caeruleum*. *Phytochemistry* 1977, 16, 707-709.
53. Simpol L., Otsuka H., Ohtani K., Kasai R., Yamasaki K. Nitrile glycosides and rosmarinic acid, the histamine inhibitor from *Ehretia philipensis*. *Phytochemistry* 1994, 36, 91-95
54. Seigler D., Pauli G. F., Fröhlich R., Wegelius E., Nahrstedt A., Glander K. E., Ebinger J. E. Cyanogenic glycosides and menisdaurin from *Guazuma ulmifolia*, *Ostrya*

- virginiana*, *Tiquilia plicata*, and *Tiquilia canescens*. *Phytochemistry* 2005, 66, 1567-1580.
55. Kumar N., Srinivas S., Kumar K., K Sastry. Rare cyano glucosides from *Coldenia procumbens* Linn. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* 2013, 5, 1394-1397.
  56. Dwuma-Badu D., Watson W. H., Gopalakrishna E. M., Okarter T. U., Knapp J. E., Schiff P. L. Jr., Slatkin D. J. Griffonin and Griffonilide, Novel Constituents of *Griffonia simplicifolia*. *Lloydia* 1976, 39, 385-390.
  57. Wu J., Fairchild E., Beal J., Tomimatsu T., Doskotch R. Lithospermoside and dasycarponin cyanoglucosides from *Thalictrum*. *Journal of Natural Products* 1979, 42, 500-511.
  58. Plouvier Victor. Présence de lithospermosido dans le *Cercis siliquastrum*. *Phytochemistry* 1978, 17, 1010
  59. Ito H., Miyake M., Nishitani E., Mori K., Hatano T., Okuda T., Konoshima T., Takasaki M., Kozuka M., Mukainada T., Tokuda H., Nishino H., Yoshida T. Anti-tumor promoting activity of polyphenols from *Cowania mexicana* and *Coleogyne ramosissima*. *Cancer Letters* 1999, 143, 5-13.
  60. Han Q.B. Jiang B., Mei S.X., Ding G., Sun H.D. Xie J.X., Liu Y.Z. Constituents from the roots of *Semiaquilegia adoxoides*. *Fitoterapia* 2001, 72, 86-88
  61. Fort D. M. Susan S. D. J., Nelson T. Lithospermoside from *Bauhinia fassoglensis* (Fabaceae). *Biochemical Systematics and Ecology* 2001, 29, 439-441.
  62. Erdemgil F. Z., Baser K. H. C., Akbay P., Sticher O., Çalis I. Thalictroside, a new phenolic compound from *Thalictrum orientale*. *Z. Naturforsch* 2003, 58c, 632-636.
  63. Tih A. E., Ghogonu R. T., Sondengam B. L., Caux C., Bodo B. Constituents of *Lophira alata* leaves. *Biochemical Systematics and Ecology* 2003. 31, 549-551.
  64. Li Y., Zhang D. M., Yu S. S. A new stilbene from *Cercis chinensis* Bunge. *Journal of Integrative Plant Biology* 2005, 47, 1021-1024.
  65. Niu F., Cui Z., Chang H. T., Jiang Y., Chen F. K., Tu P. F. Constituents from the roots of *Semiaquilegia adoxoides*. *Chinese Journal of chemistry* 2006, 24, 1788-1791.
  66. Mazimba O., Majinda R. R. T., Modibedi C., Masesane I. B., Cencič A., Chingwaru W. *Tylosema esculentum* extractives and their bioactivity. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 2011, 19, 5225-5230.
  67. Silva T., Lins A., Sarmiento-Filha M., Ramos C., Agra M., Camara C. Riachin, a new cyanoglucoside from *Bauhinia pentandra* and its antioxidant activity. *Chemistry of Natural Compounds* 2013, 49, 685-690.
  68. Ueda K., Yasutomi K., Mori I. Structure of a new cyanoglucoside from *Ilex warburgii* Loens. *Chemistry Letters* 1983, 12, 149-150.

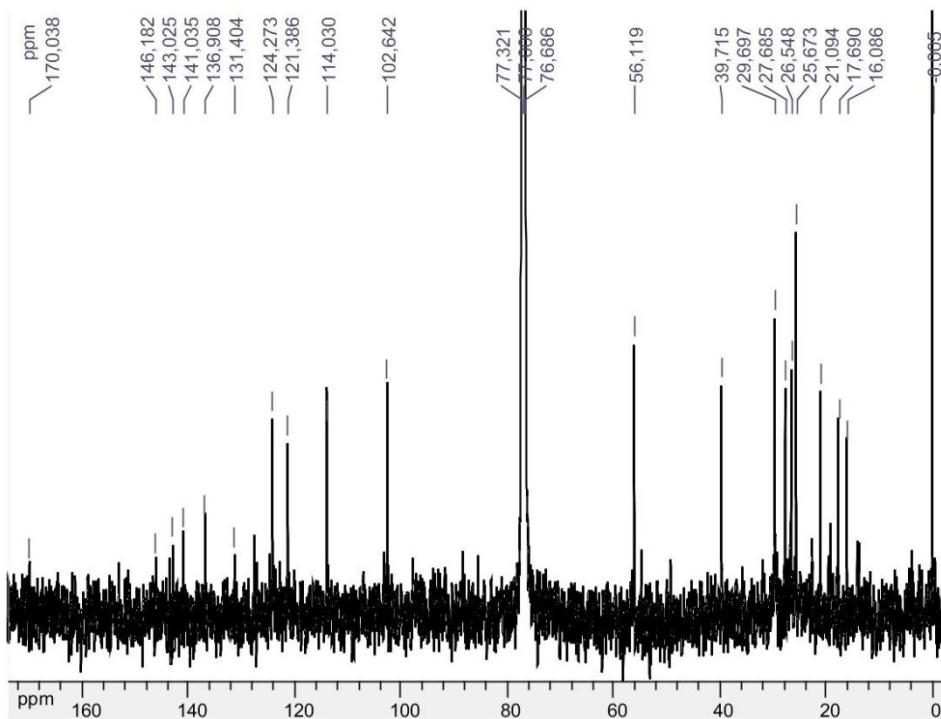
69. Josien-Lefebvre D., Le Drian C. Total synthesis of (-)-lithospermoside. *Helvetica Chimica Acta* 2003, 86, 661-672.
70. Josien-Lefebvre D., Le Drian C. Total synthesis of (2Z)-[(4R,5R,6S)-6-( $\beta$ -D-Glucopiranosiloxi)-4,5-dihidroxiciclohexen-2-en-1-ilideno]etanonitrilo. *Helvetica Chimica Acta* 2007, 90, 19-30.
71. Chen C. C., Che, Y. P., Hsu H. Y. Bauhinin, a new nitrile glucoside from *Bauhinia championii*. *Journal of natural products* 1985, 48, 933-937.
72. Domínguez M., Nieto A., Marín J. C., Keck A. S., Jeffery E., Céspedes C. L. Antioxidant activities of extracts from *Barkleyanthus salicifolius* (Asteraceae) and *Penstemon gentianoides* (Scrophulariaceae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2005, 53, 5889-5895.
73. Heim K. E., Tagliaferro A. R., Bobilya D. J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry* 2002, 13, 572-584.
74. Fleming F. F. Nitrile-containing natural products. *Natural Product Reports* 1999, 16, 597-606
75. Yamasaki K. Non-cyanogenic cyanoglucosides. *Studies in Plant Science* 1999, 6, 335-345.
76. Valiente-Banuet A., Garcia E. Una lista florística actualizada para la reserva del Pedregal de San Angel, México D.F. *Acta Botánica Mexicana* 1990, 9, 13-30.
77. Cano-Santana Z., Oyama K. Variation in leaf trichomes and nutrients of *Wigandia urens* (Hydrophyllaceae) and its implication for herbivory. *Oecologia* 1992, 92, 405-409.
78. Cano-Santana Z., Oyama K. Ámbito de hospederos de tres especies de insectos herbívoros de *Wigandia urens* (Hydrophyllaceae). *Southwestern Entomologist* 1994, 19, 167-172.
79. Castillo-López J. L., Cano-Santana., Oyama K. Preferencias y supervivencia de *Lophoceramica pyrrha*, un noctúrido gregario constructor de refugios, en dos plantas hospederas. *Duggesiana* 2010, 17, 229-236.
80. Cano Z., Oyama K. *Wigandia urens* (Hydrophyllaceae): un mosaico de recursos para sus insectos herbívoros. *Acta Botánica Mexicana* 1994, 28, 29-39.
81. Dayan F. E., Rimando A. M., Pan Z., Baerson S. R., Gimsing A. L., Duke S. O. Sorgoleone. *Phytopchemistry* 2010, 71, 1032-1039.
82. Fujimoto H., Nakayama Y., Yamazaki M. Identification of immunosuppressive components of a mushroom, *Lactarius flavidulus*. *Chemical Pharmaceutical Bulletin* 1993, 41, 654-658

83. Skehan P., Storeng R., Scudiero D., Monks A., McMahon J., Vistica D., Warren J. T., Bokesch H., Kenney S., Boyd M. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *Journal of the National Cancer Institute* 1990, 82, 1107-1112
84. Organización Panamericana de la Salud. *Cáncer en las Américas. Perfiles de país*, 2013. Washington, D.C.: 2013.
85. Silverstein R., Webster F., Kiemle D. *Spectrometric identification of organic compounds*. Edit: Jhon Wiley and Sons. Séptima edición. New Jersey. Estados Unidos. 2005.
86. Nathan P. J., Diaz E. *Elementos de resonancia magnética nuclear de hidrógeno*. Grupo editorial iberoamericana. México D.F. México. 1993
87. Mann J. *Secondary metabolism*. Edit: Oxford University Press. Segunda edición. New York. Estados Unidos. 1987.
88. Dewick Paul. *Medicinal Natural Products a biosynthetic approach*. Edit: Jhon wiley and sons. Tercera edición. Inglaterra. 2009.

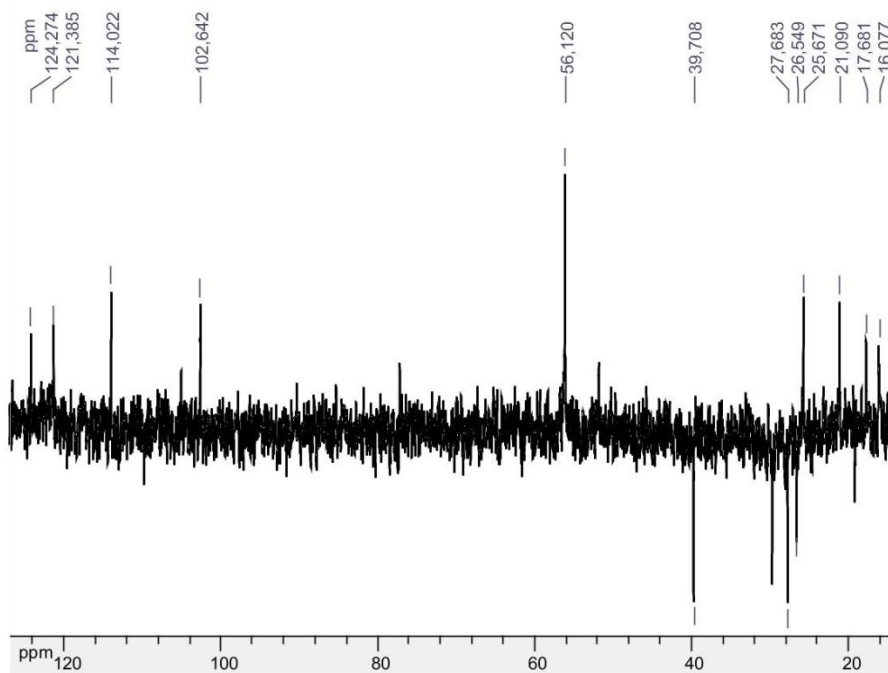
# ANEXOS



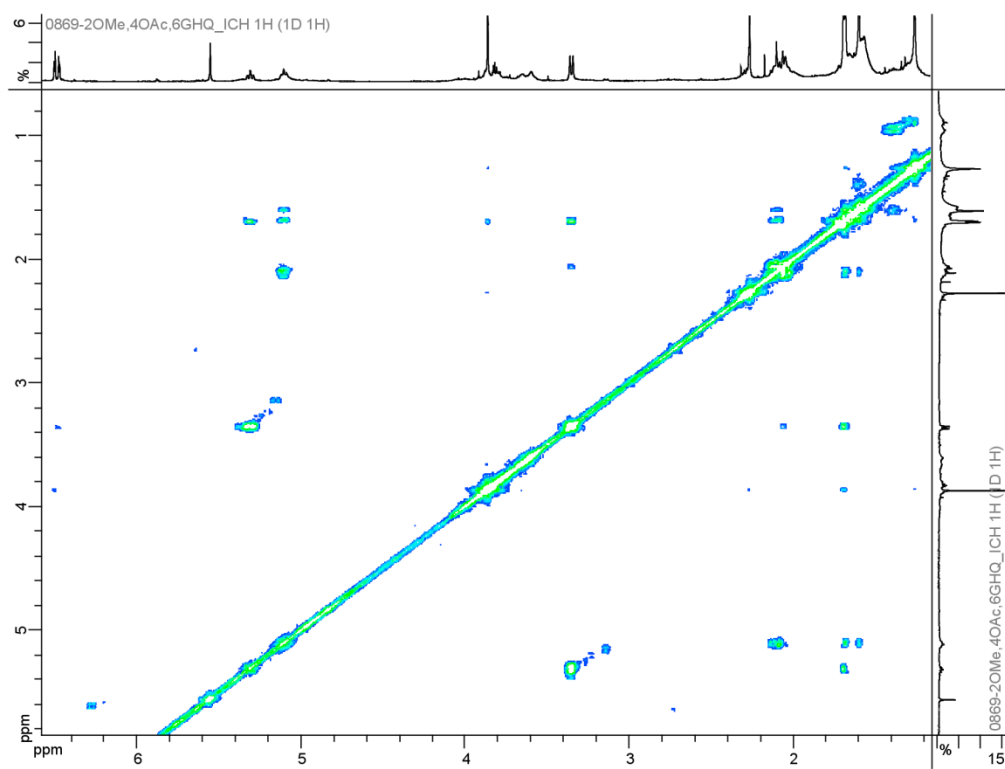
Espectro 1. RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) para el compuesto (**1**).



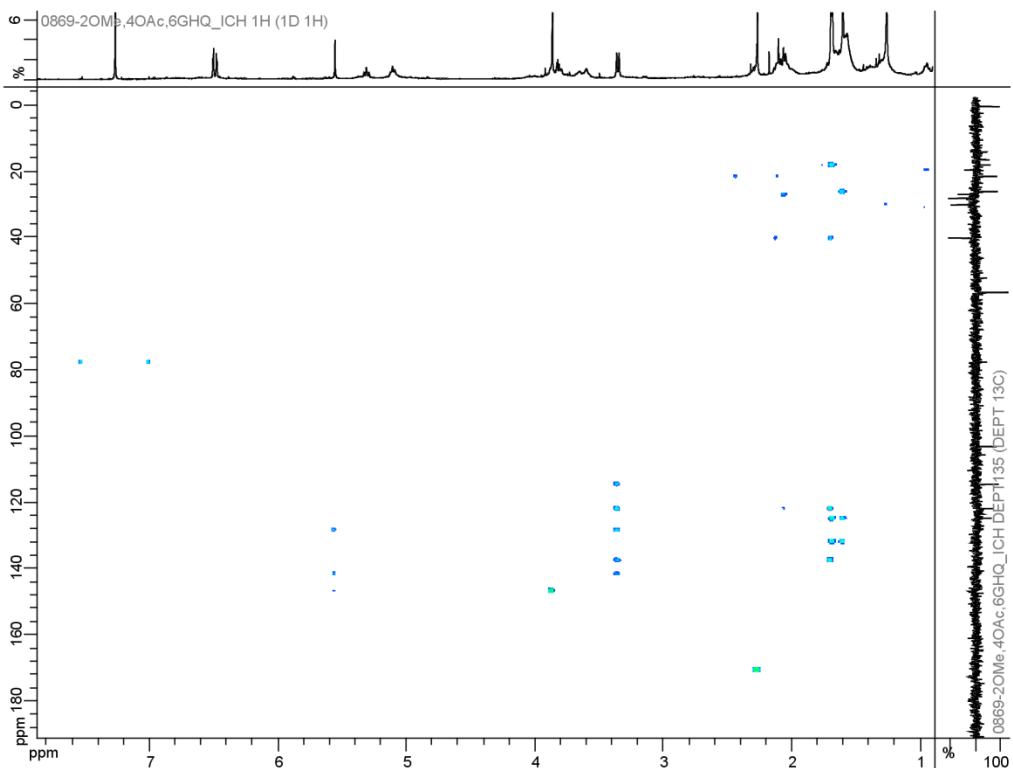
Espectro 2. RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) para el compuesto (**1**).



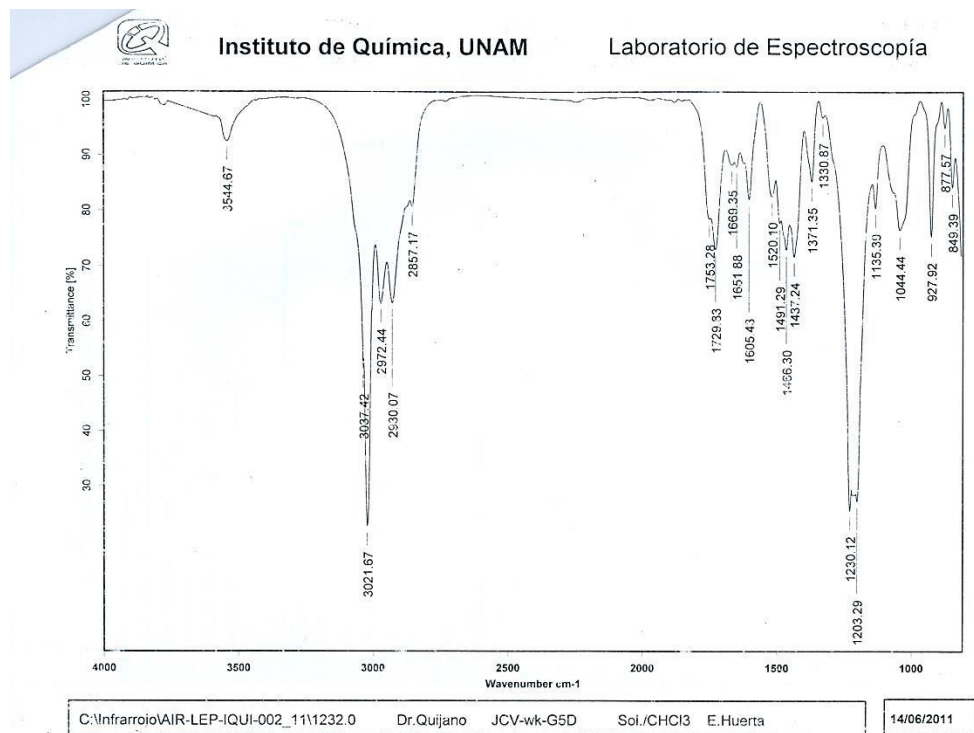
Espectro 3. Experimento DEPT 135 para el compuesto (1).



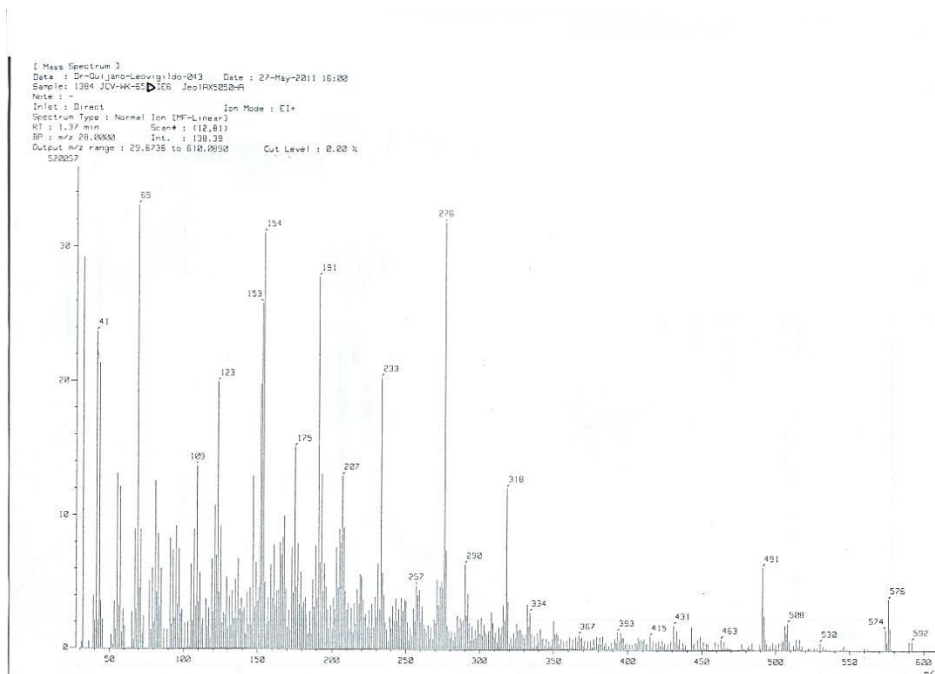
Espectro 4. Experimento COSY para el compuesto (1).



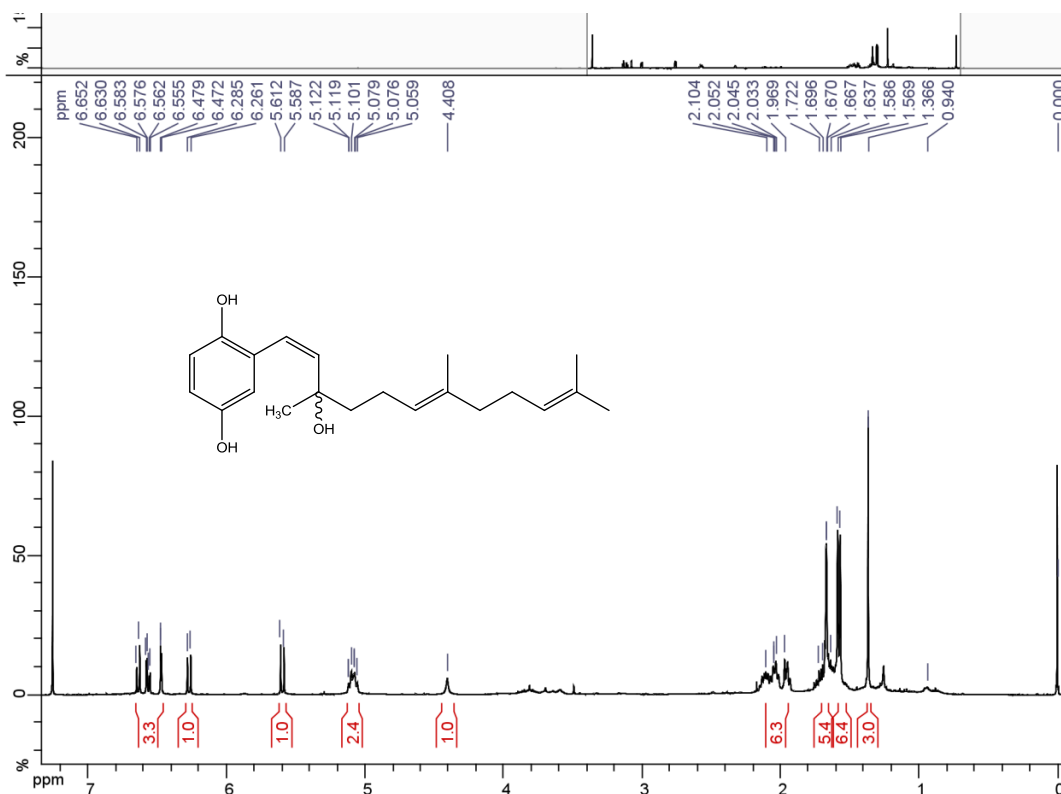
Espectro 7. Experimento HMBC para el compuesto (1).



Espectro 8. Espectro IR para el compuesto (1).

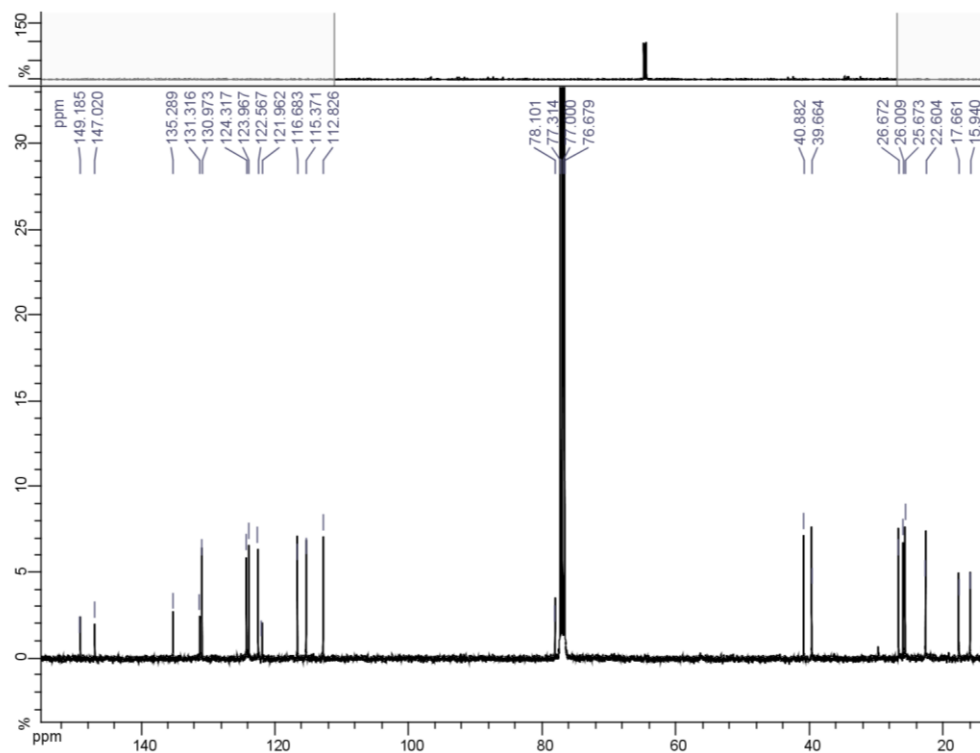


Espectro 9. Espectro de masas por I.E. para el compuesto (1).

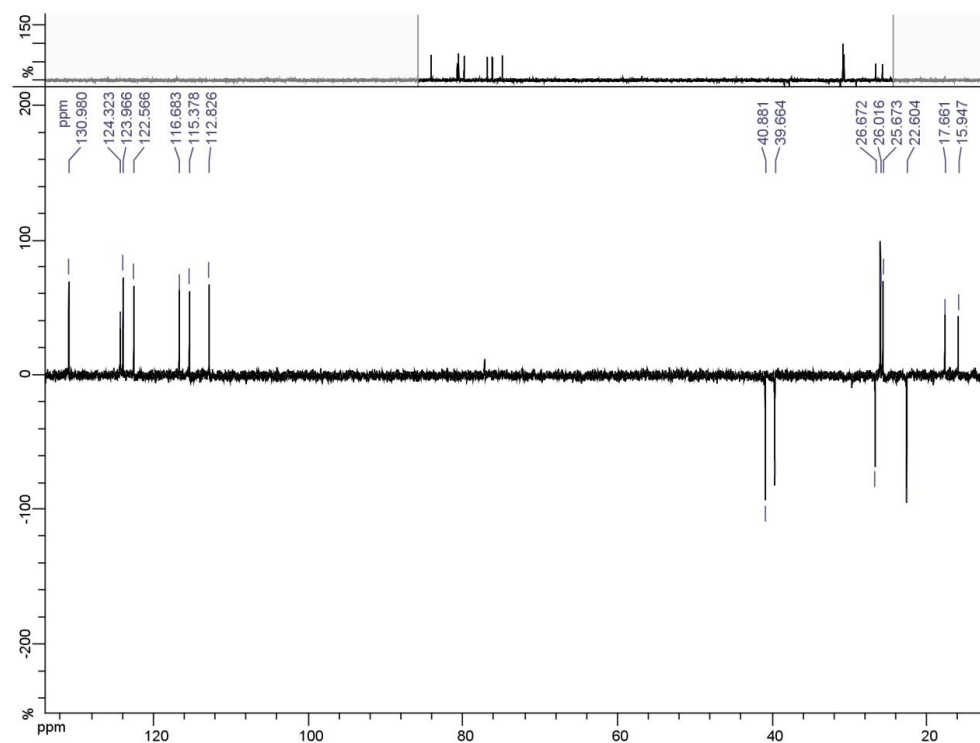


Espectro 10. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) para el compuesto (2).

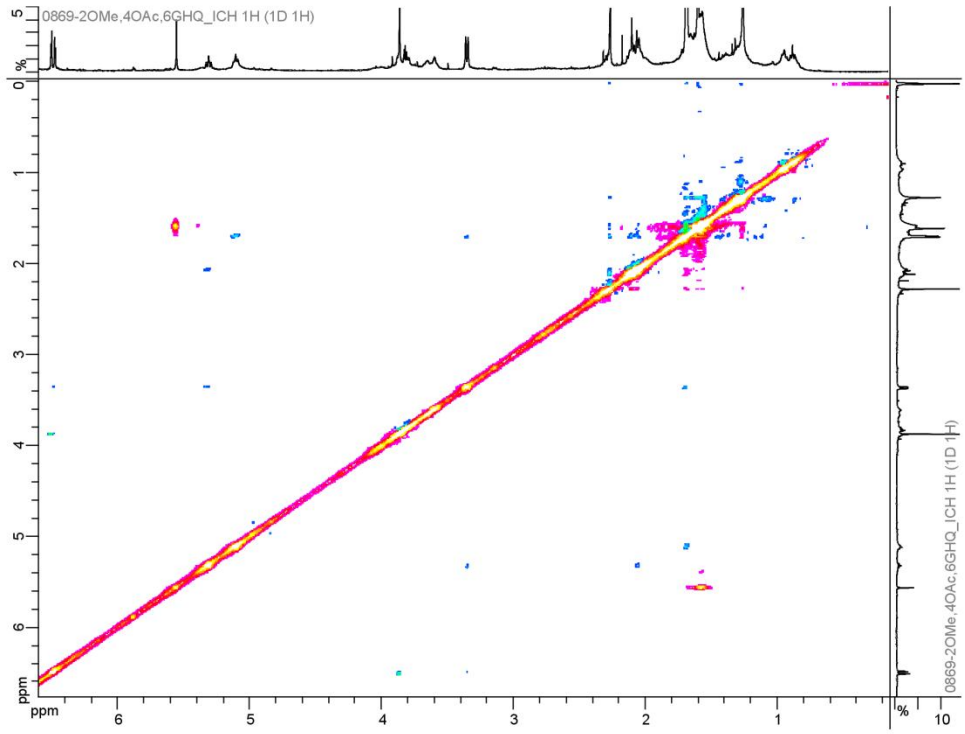




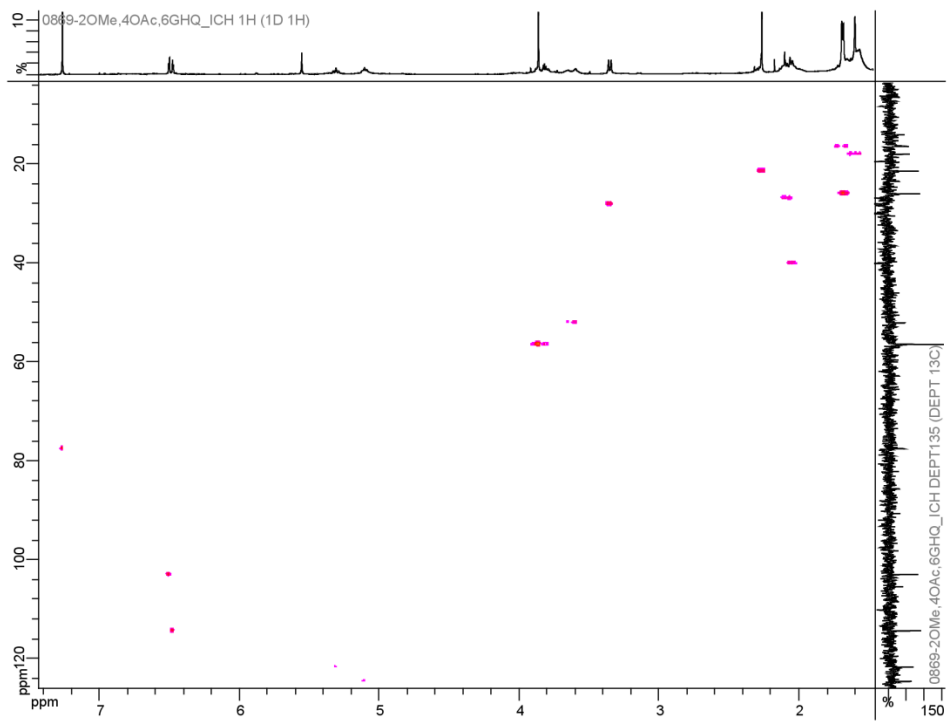
Espectro 11. RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) para el compuesto (2).



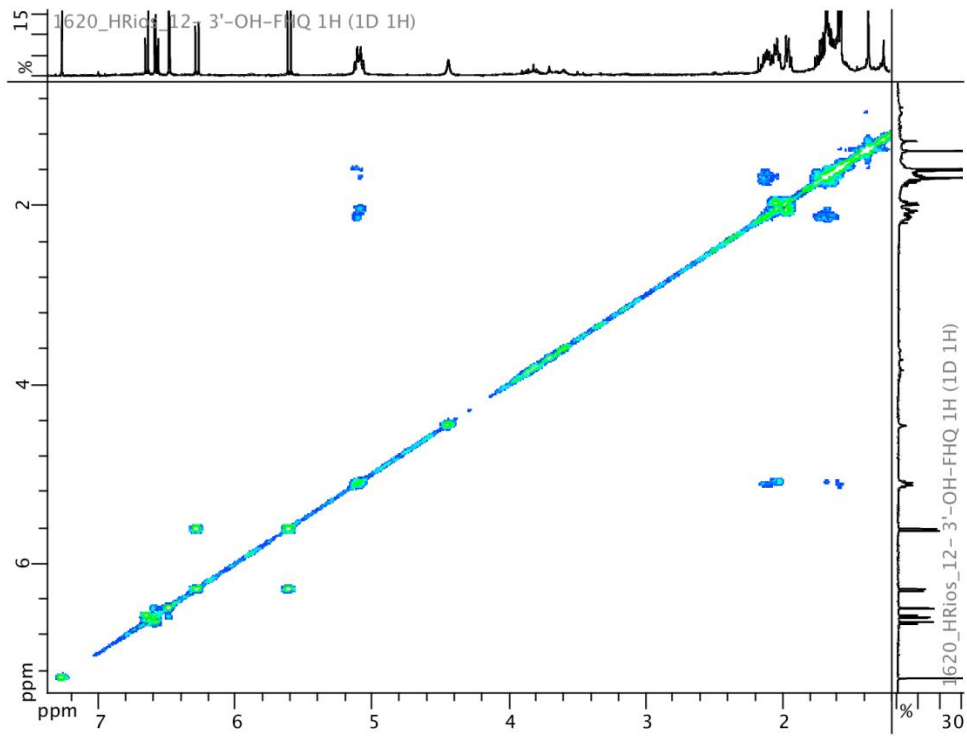
Espectro 12. Experimento DEPT 135 para el compuesto (2).



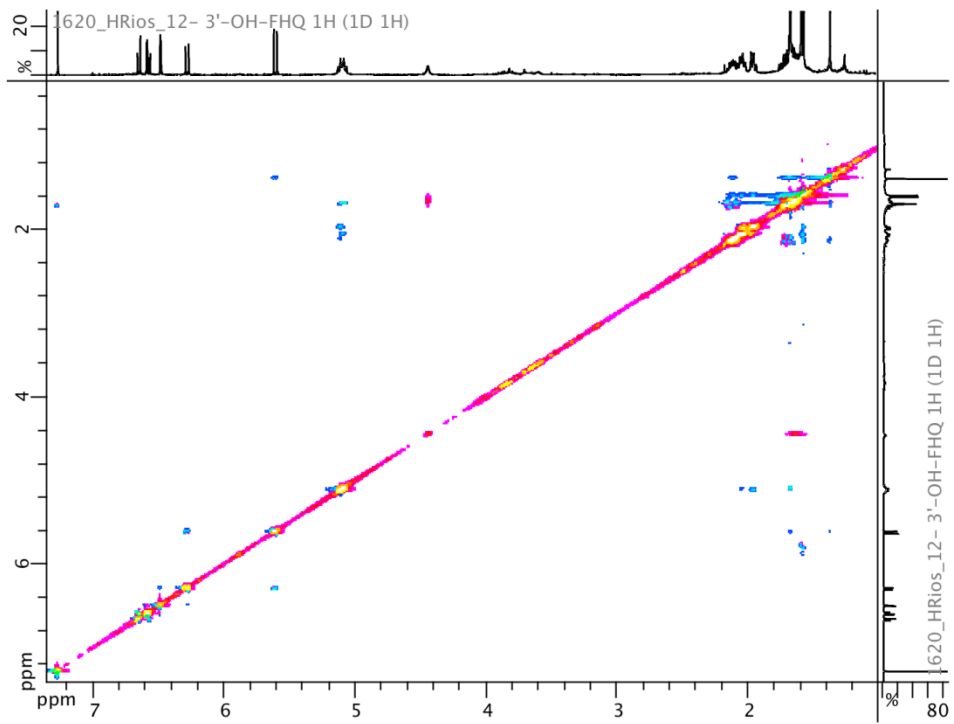
Espectro 5. Experimento NOESY para el compuesto (1).



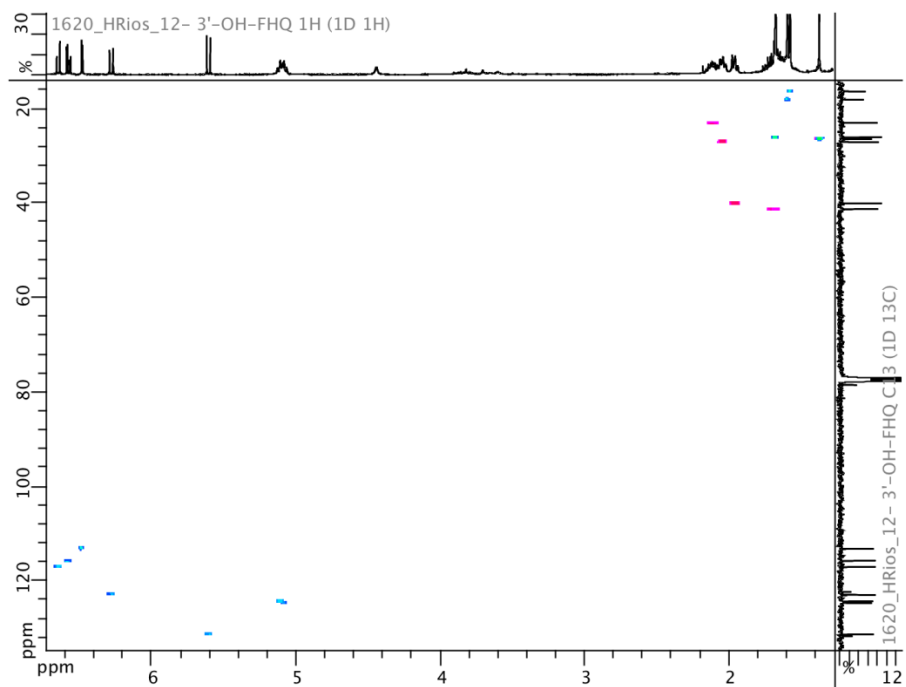
Espectro 6. Experimento HSQC para el compuesto (1).



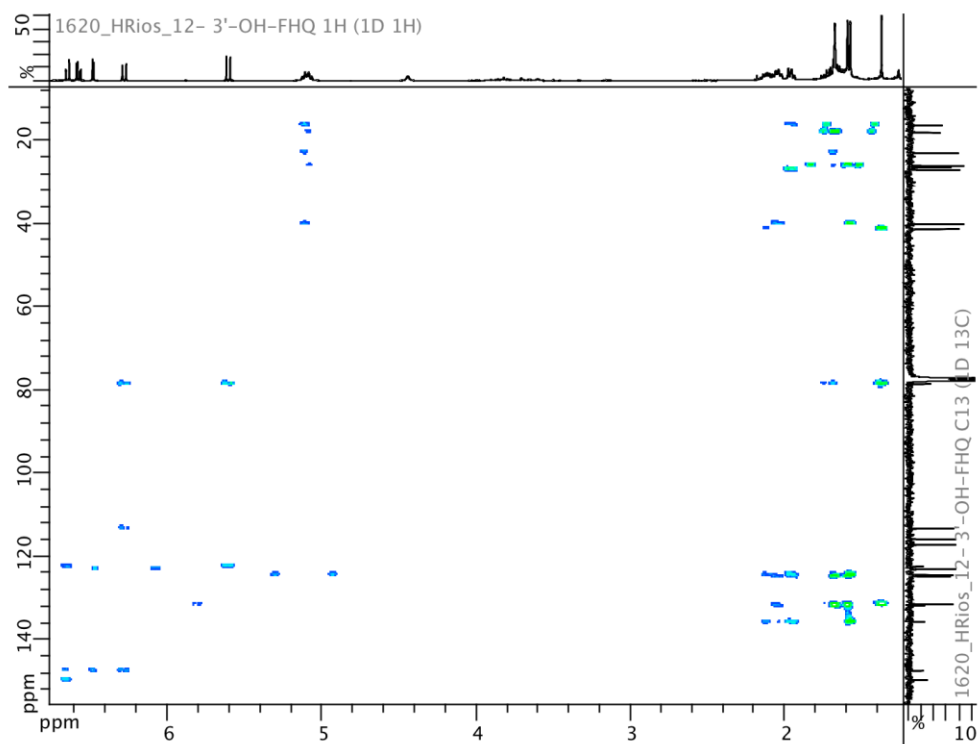
Espectro 13. Experimento COSY para el compuesto (2).



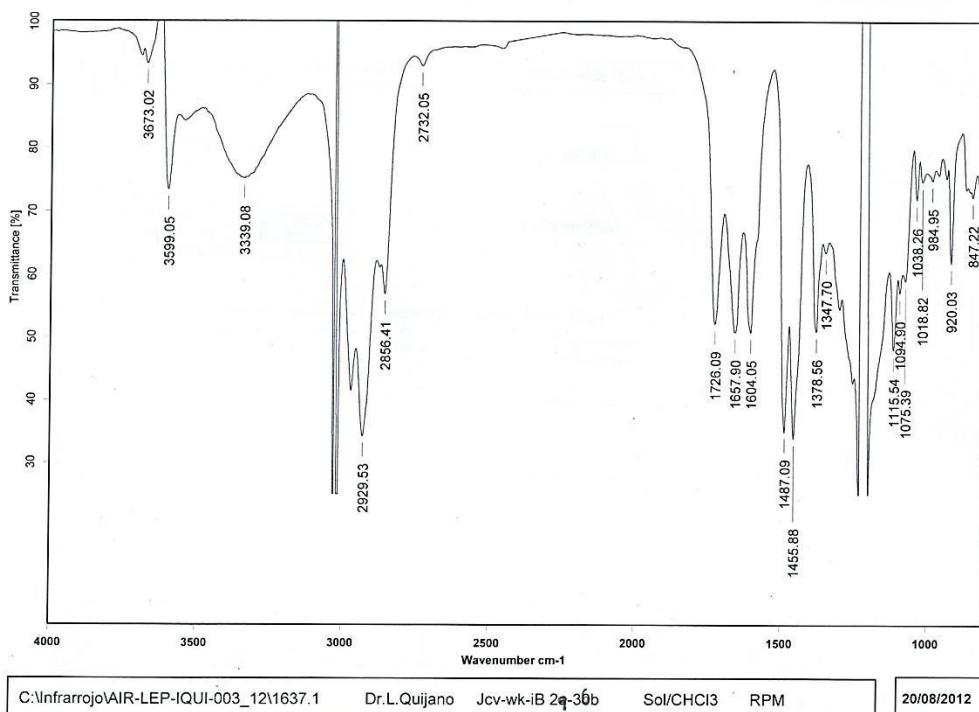
Espectro 14. Experimento NOESY para el compuesto (2).



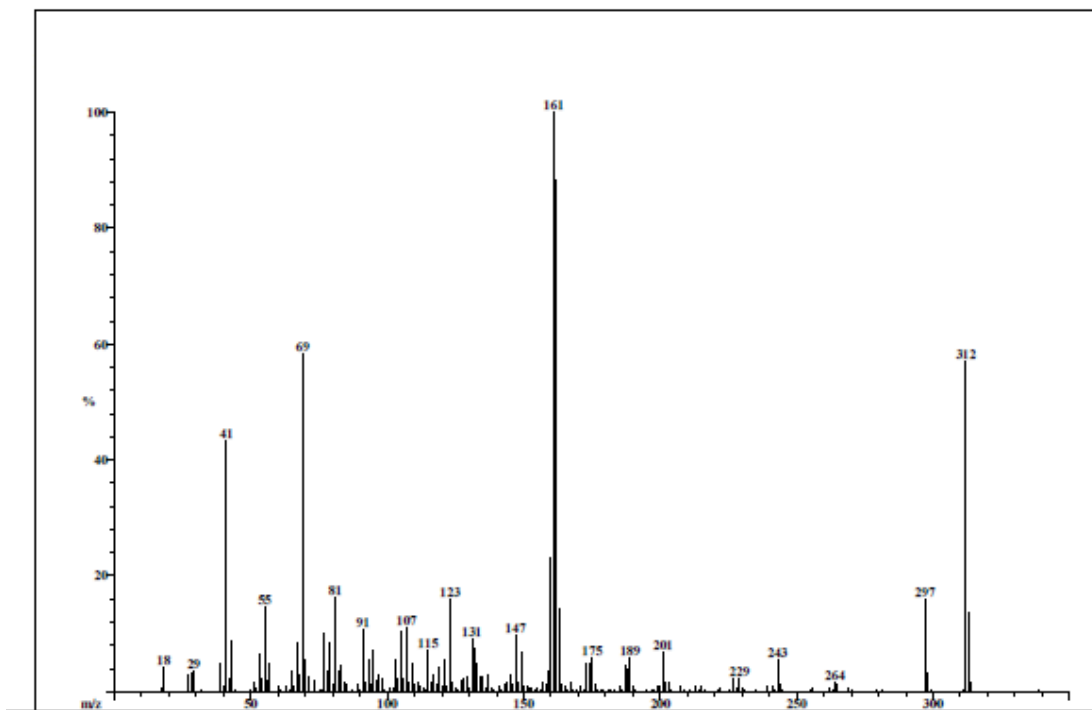
Espectro 15. Experimento HSQC para el compuesto (2).



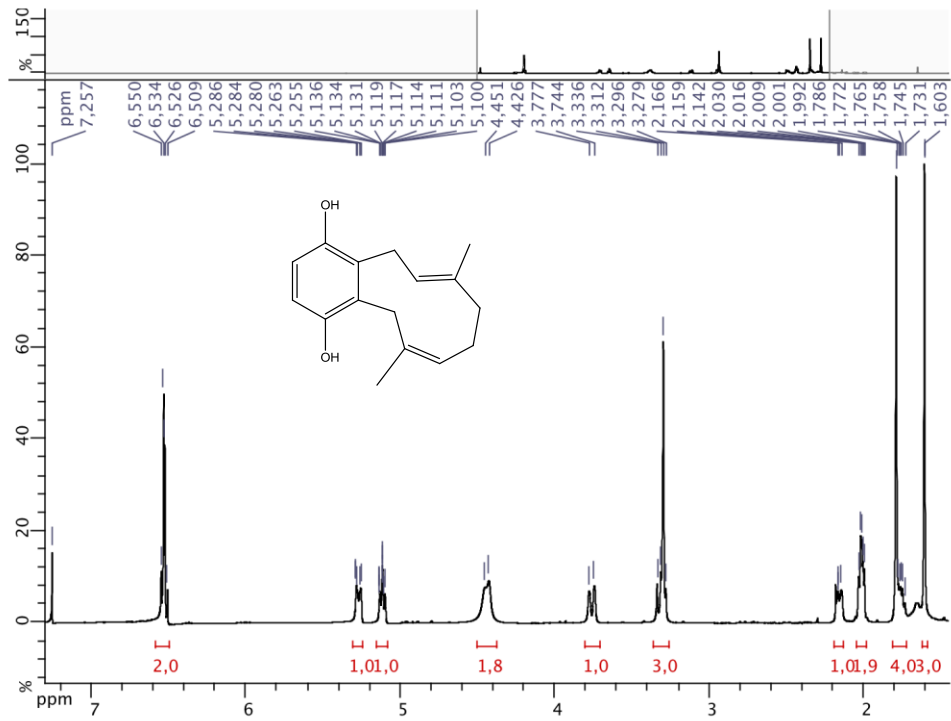
Espectro 16. Experimento HMBC para el compuesto (2).



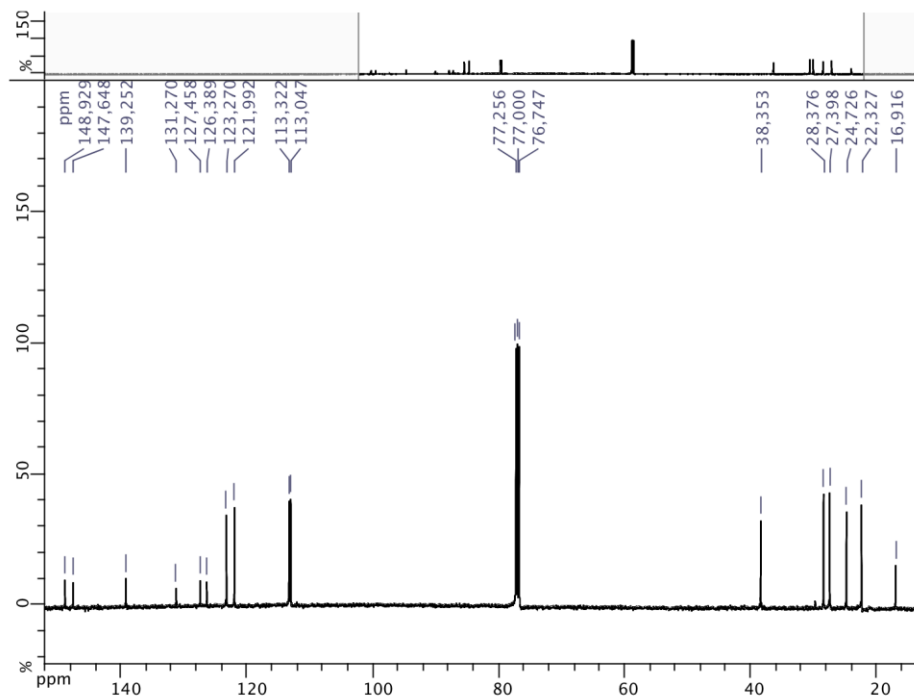
Espectro 17. Espectro IR para el compuesto (2).



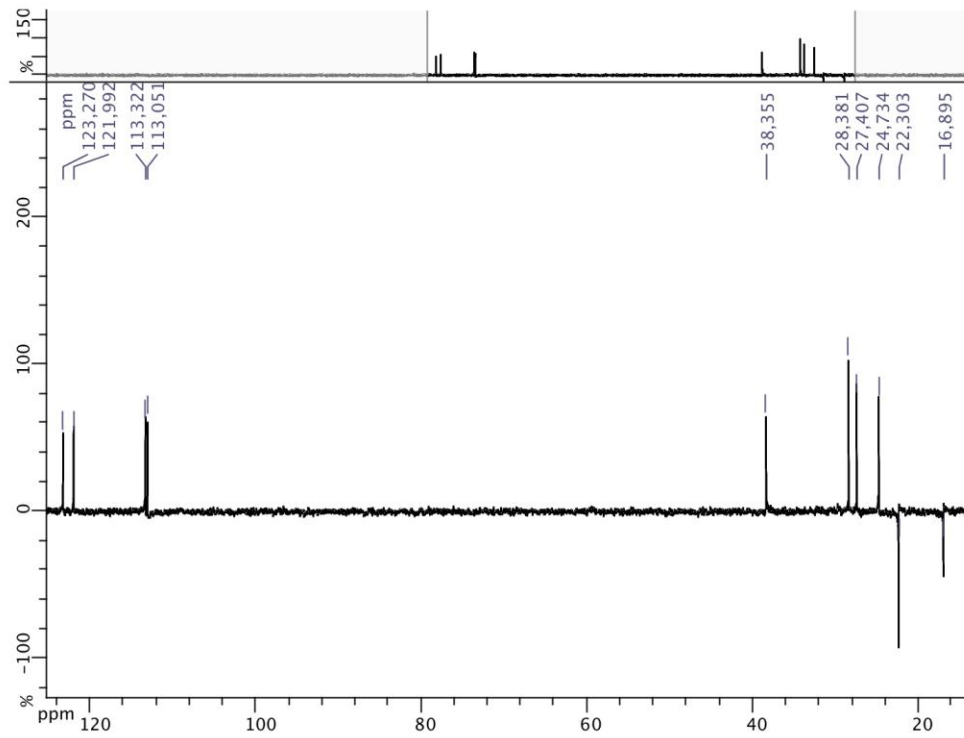
Espectro 18. Espectro de masas por I.E. para el compuesto (2).



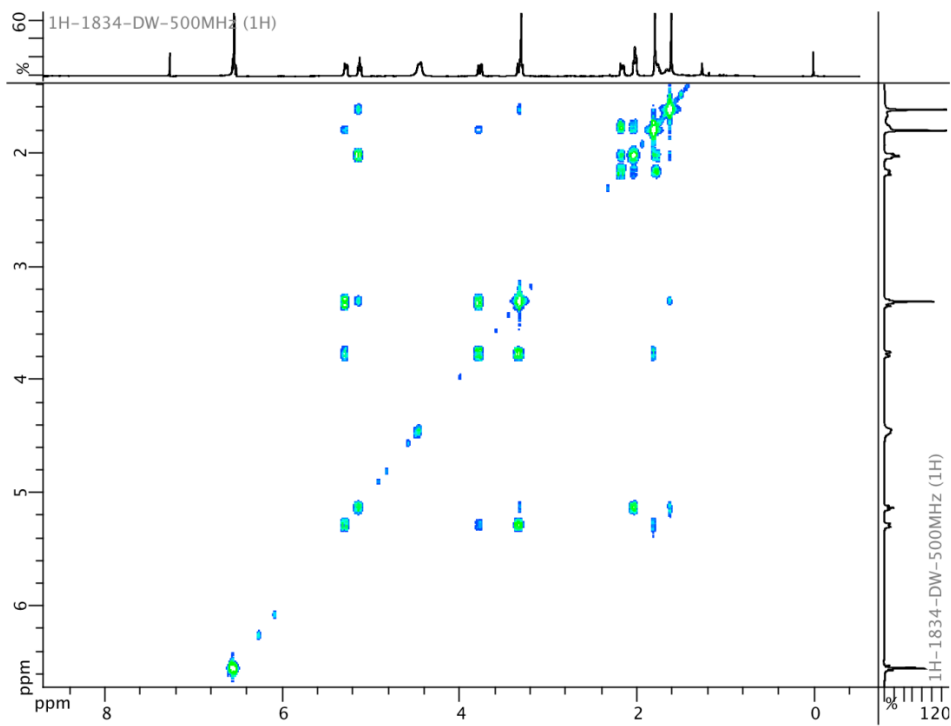
Espectro 19. RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) para el desacetilwiganol (**3**).



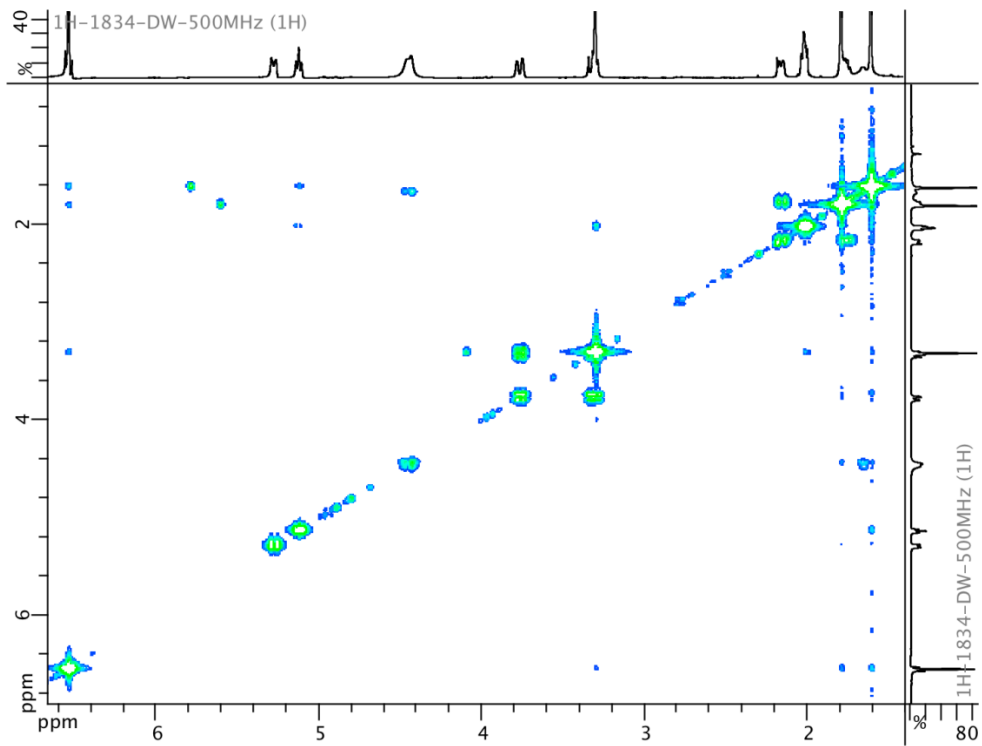
Espectro 20. RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) para el desacetilwiganol (**3**).



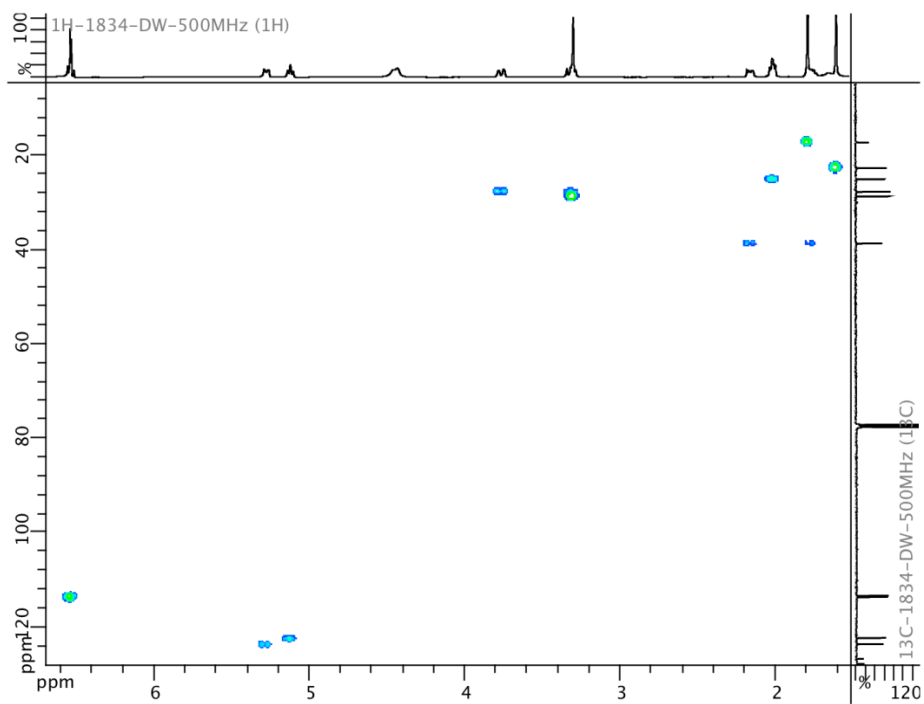
Espectro 21. Experimento DEPT 135 en  $\text{CDCl}_3$  para el desacetilwiganol (**3**).



Espectro 22. Experimento COSY en  $\text{CDCl}_3$  para el desacetilwiganol (**3**).

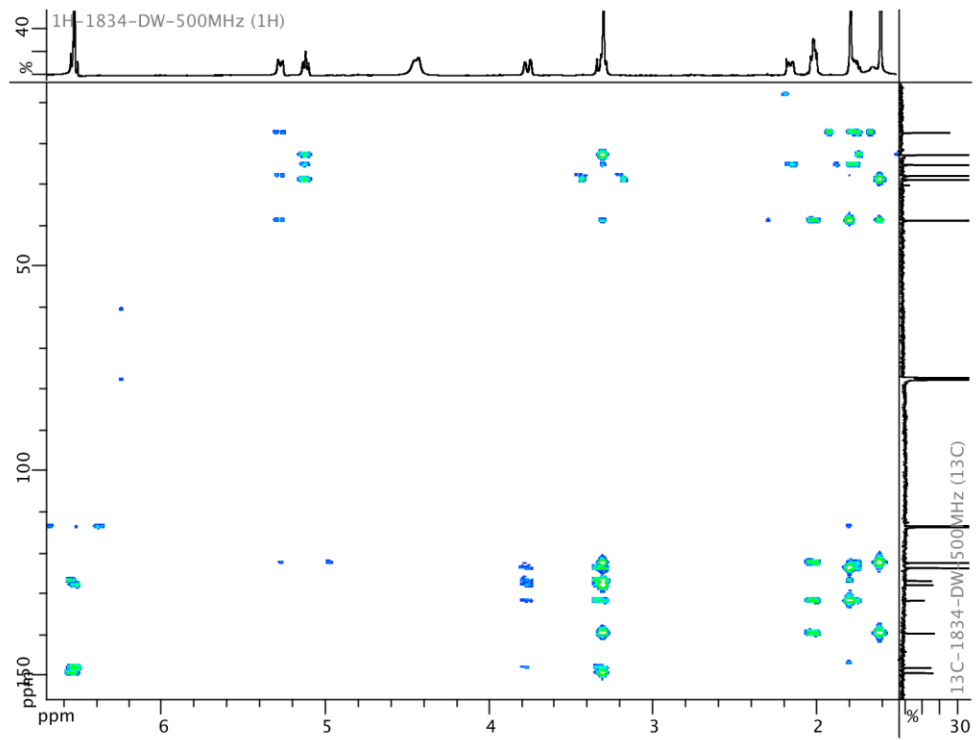


Espectro 23. Experimento NOESY en  $\text{CDCl}_3$  para el desacetilwigandol (**3**).

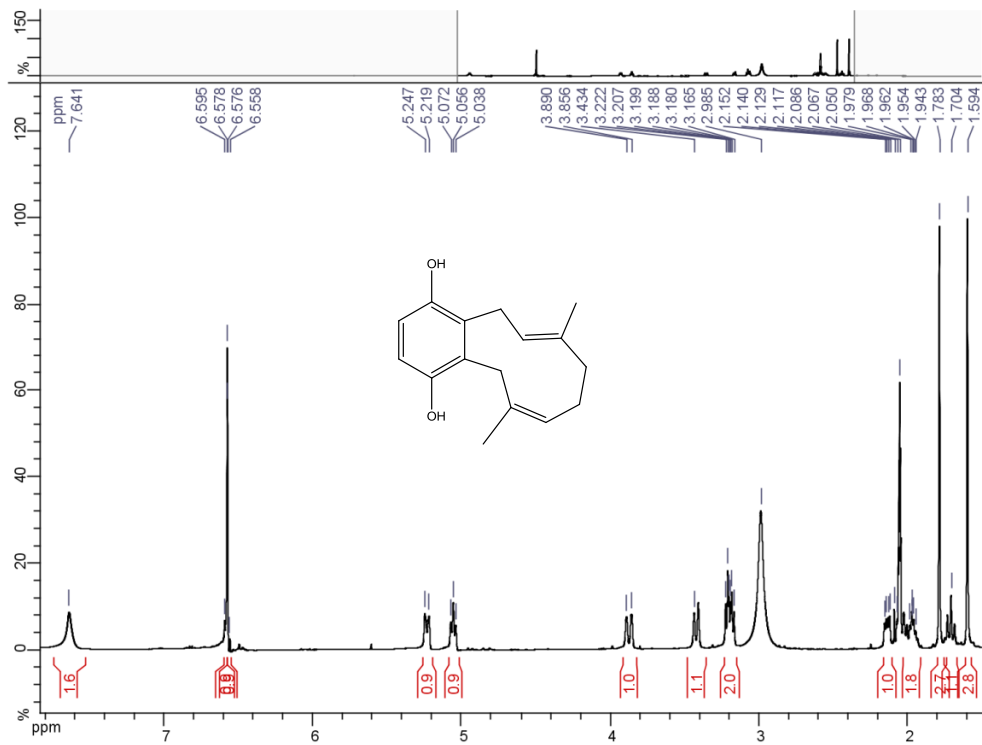


Espectro 24. Experimento HSQC en  $\text{CDCl}_3$  para el desacetilwigandol (**3**)

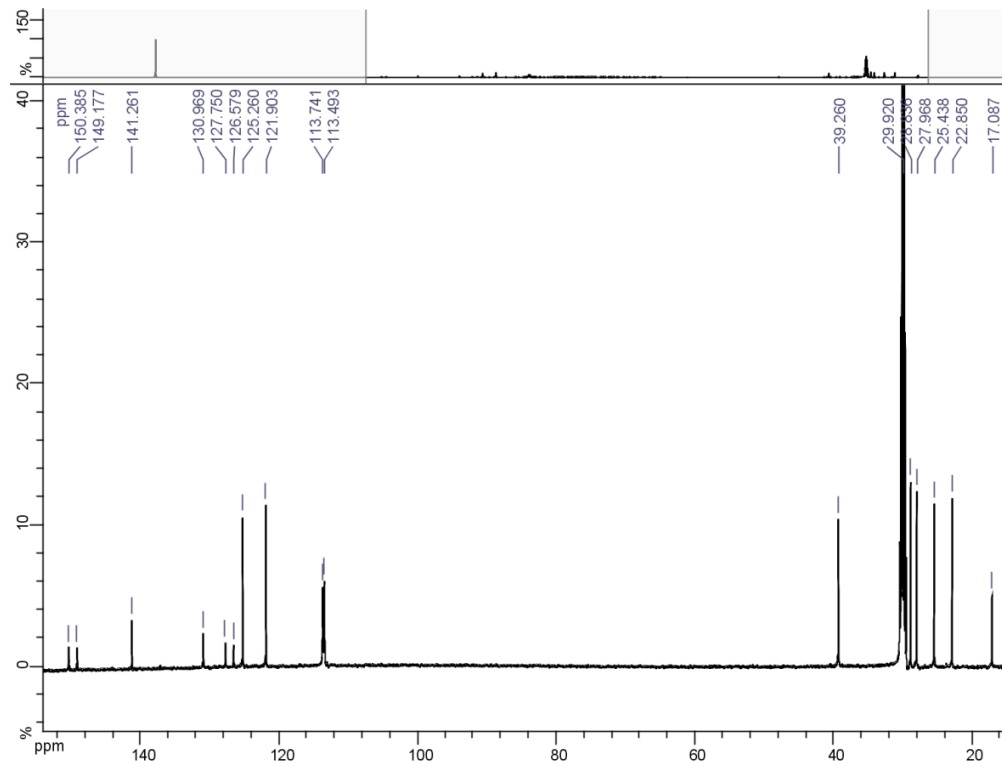




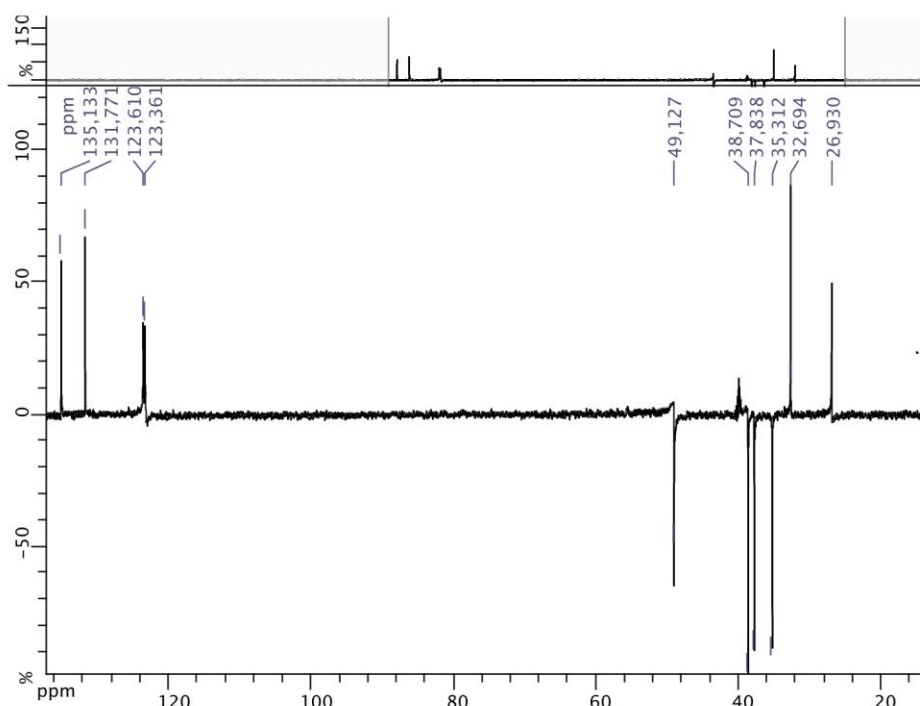
Espectro 25. Experimento HMBC en  $\text{CDCl}_3$  para el desacetilwigandol (**3**)



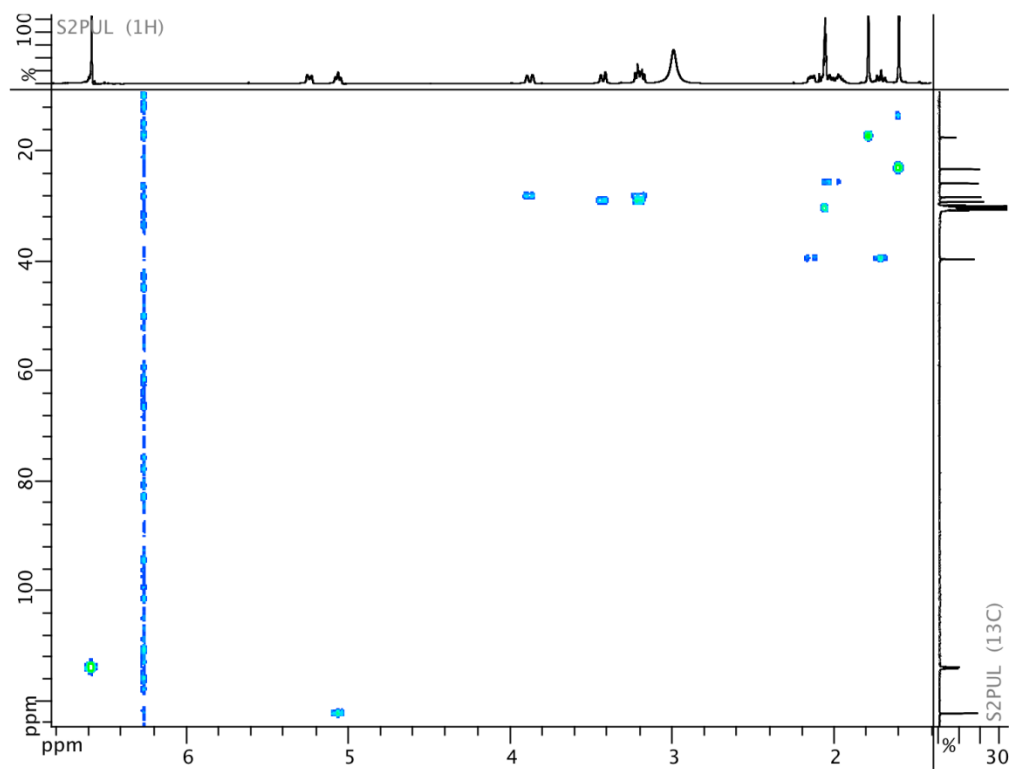
Espectro 26. RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz, acetona- $\text{d}_6$ ) para el desacetilwigandol (**3**).



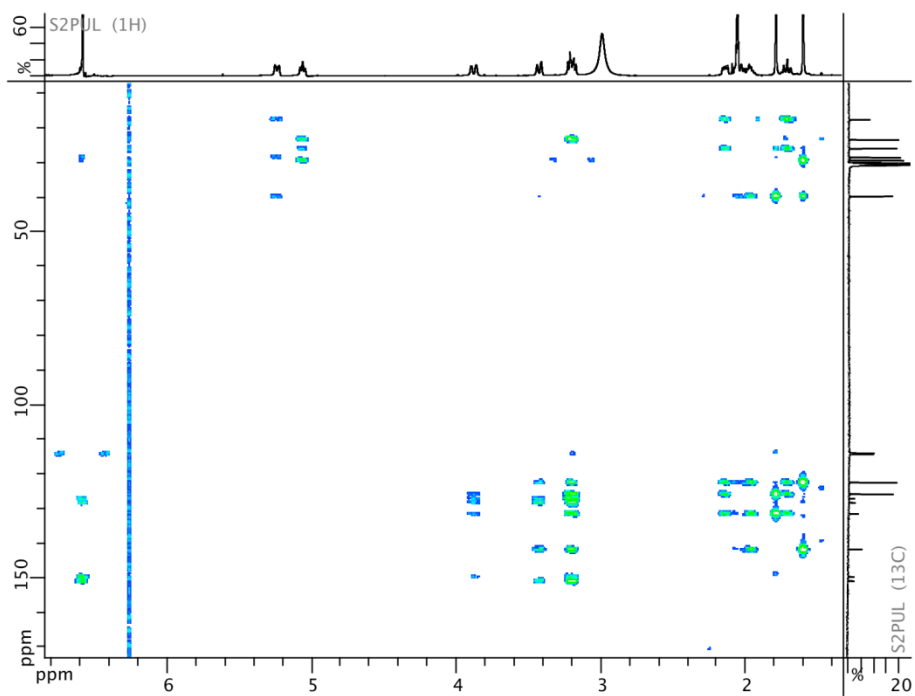
Espectro 27. RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz, acetona- $\text{d}_6$ ) para el desacetilwígandol (**3**).



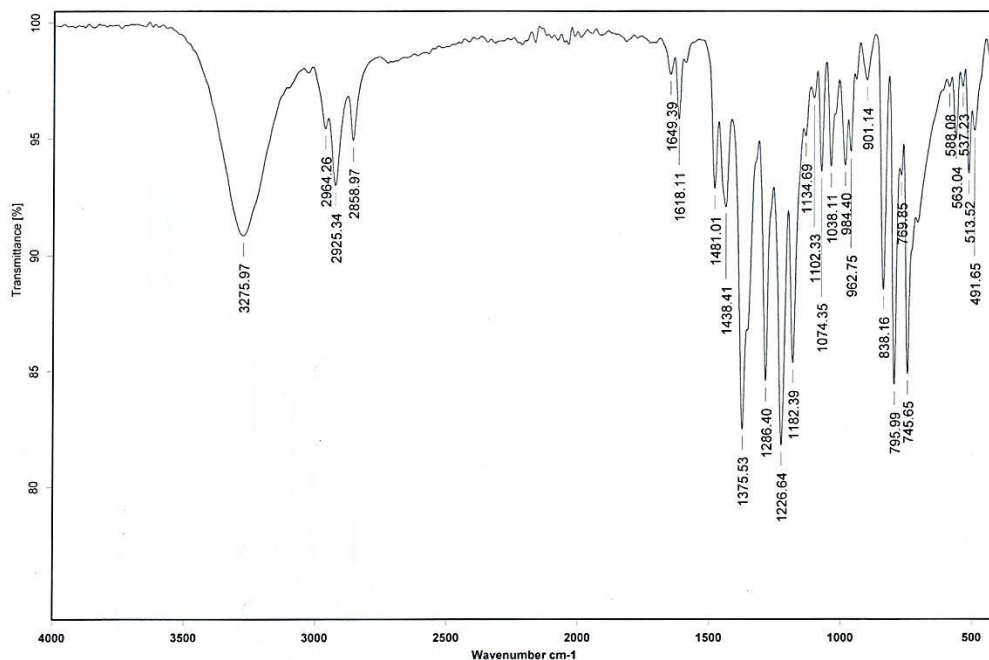
Espectro 28. Experimento DEPT 135 en acetona- $\text{d}_6$  para el desacetilwígandol (**3**).



Espectro 29. Experimento HSQC en acetona-d<sub>6</sub> para el desacetilwigandol (3).



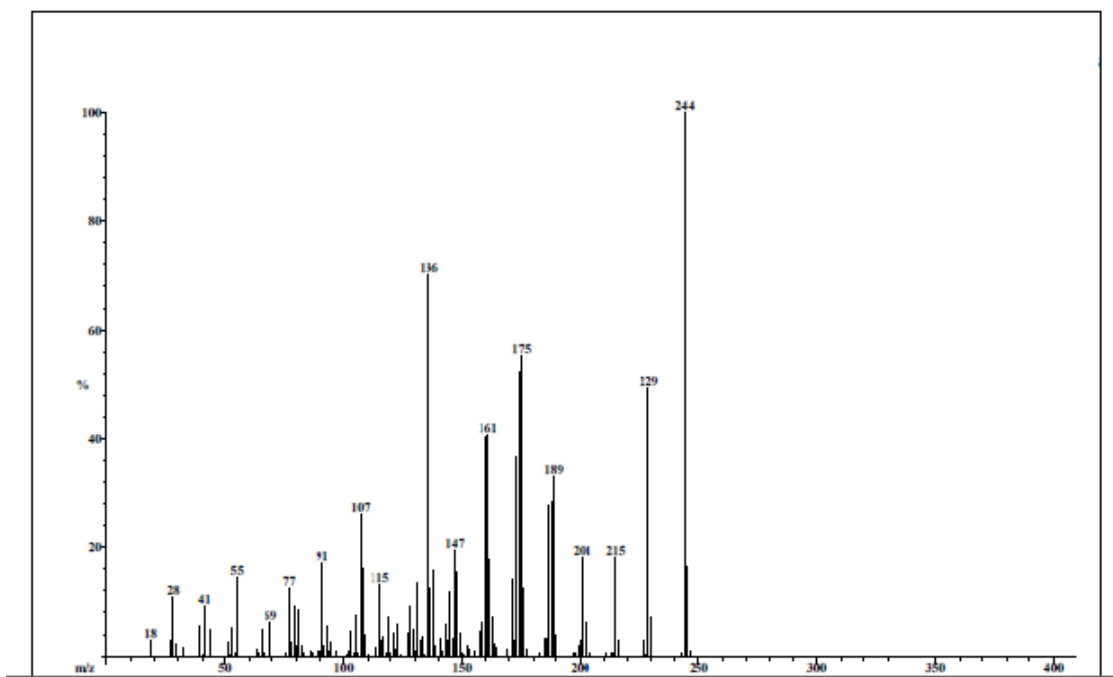
Espectro 30. Experimento HMBC en acetona-d<sub>6</sub> para el desacetilwigandol (3).



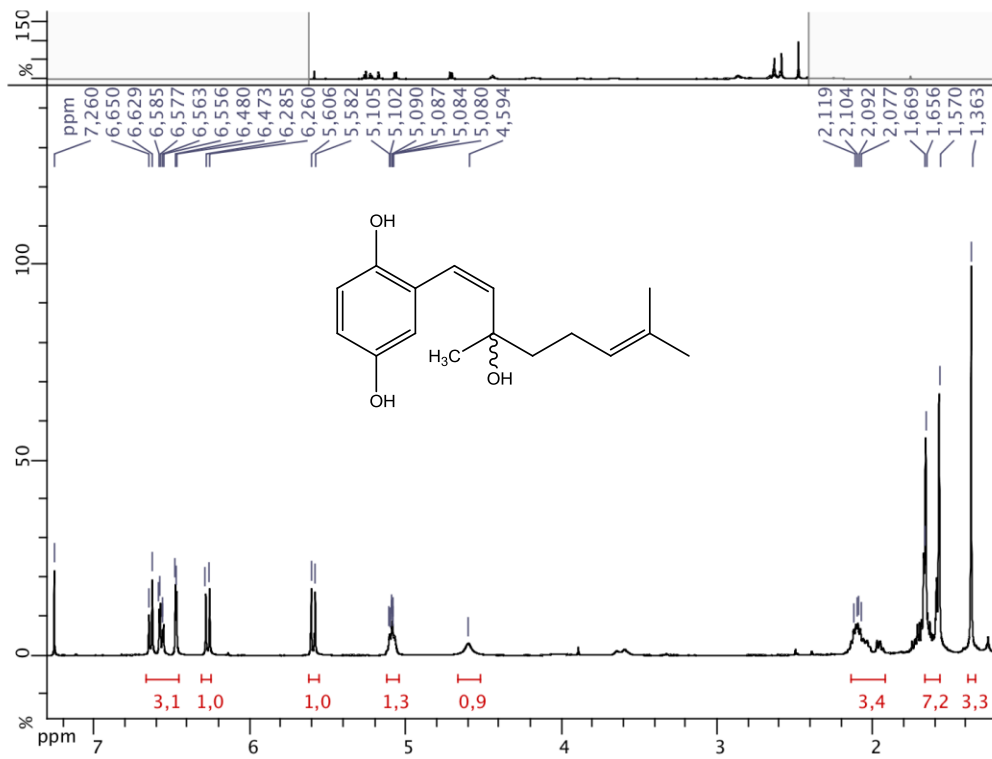
Dr.L.Quijano DW KBr/Pastilla RPM

02/12/2013

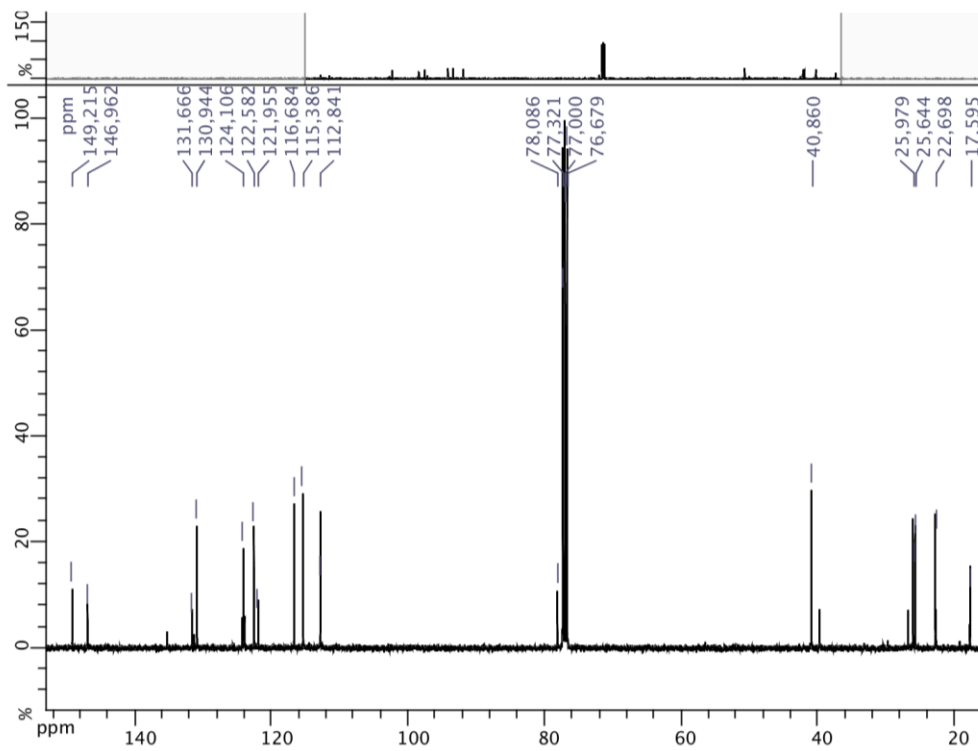
Espectro 31. Espectro IR para el desacetilwiganol (3).



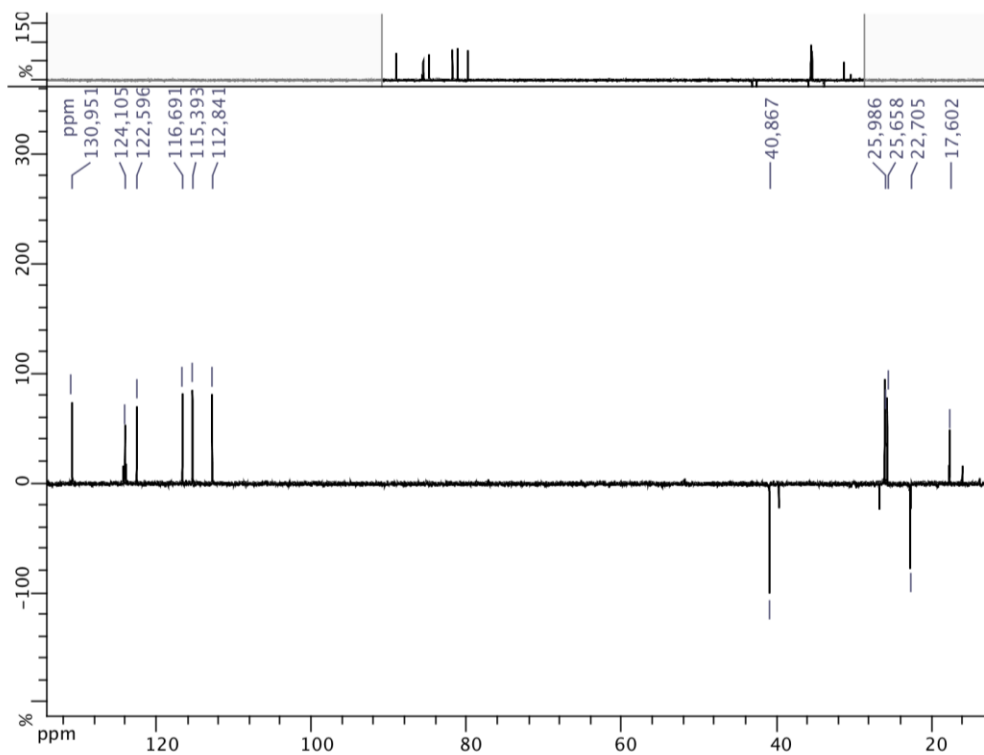
Espectro 32. Espectro de masas por I.E. para el desacetilwiganol (3)



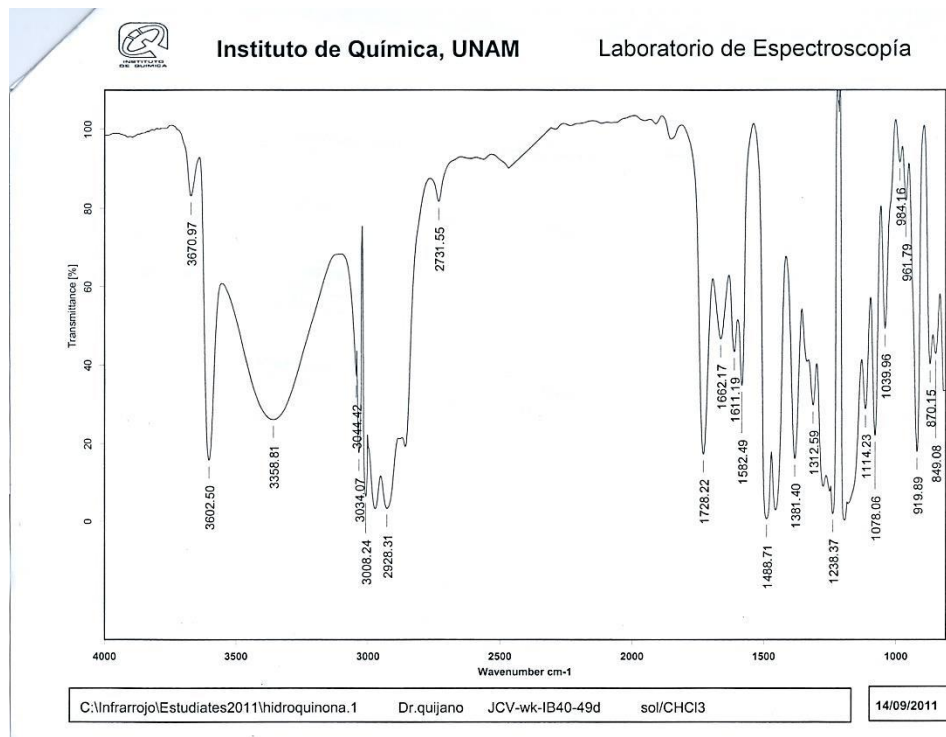
Espectro 33. RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) para el compuesto (4).



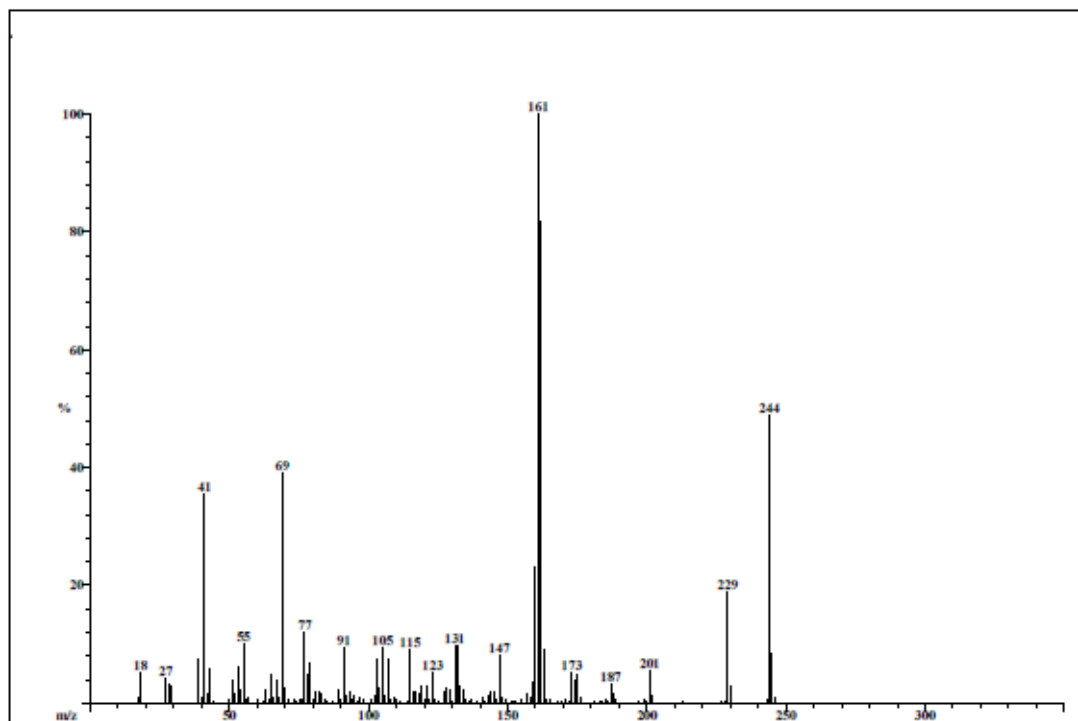
Espectro 34. RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) para el compuesto (4).



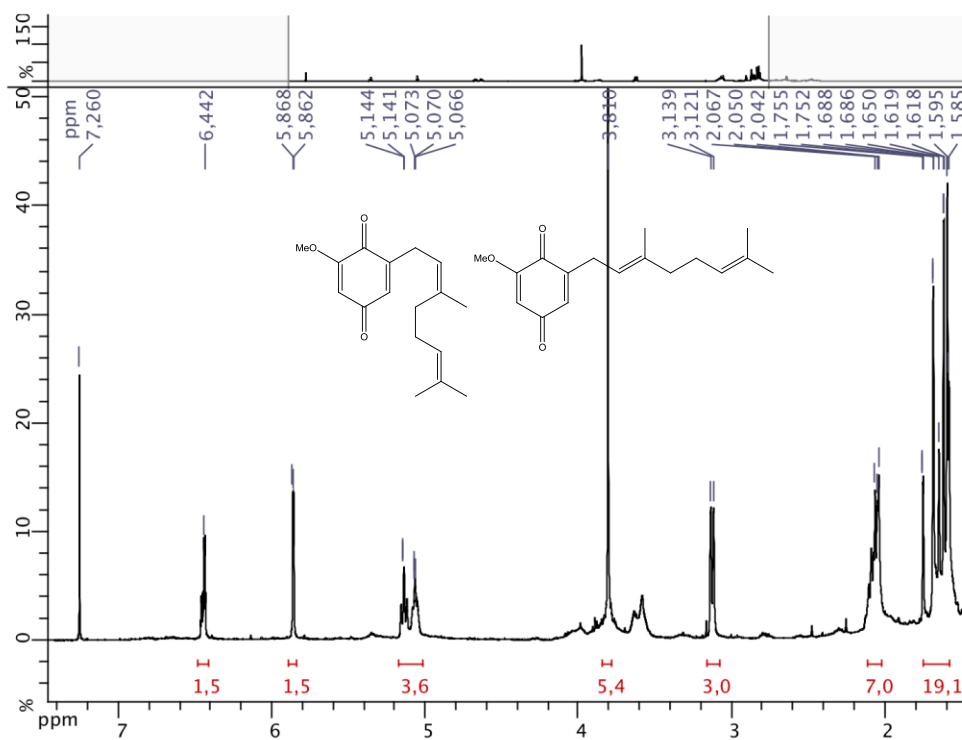
Espectro 35. Experimento DEPT 135 para el compuesto (4).



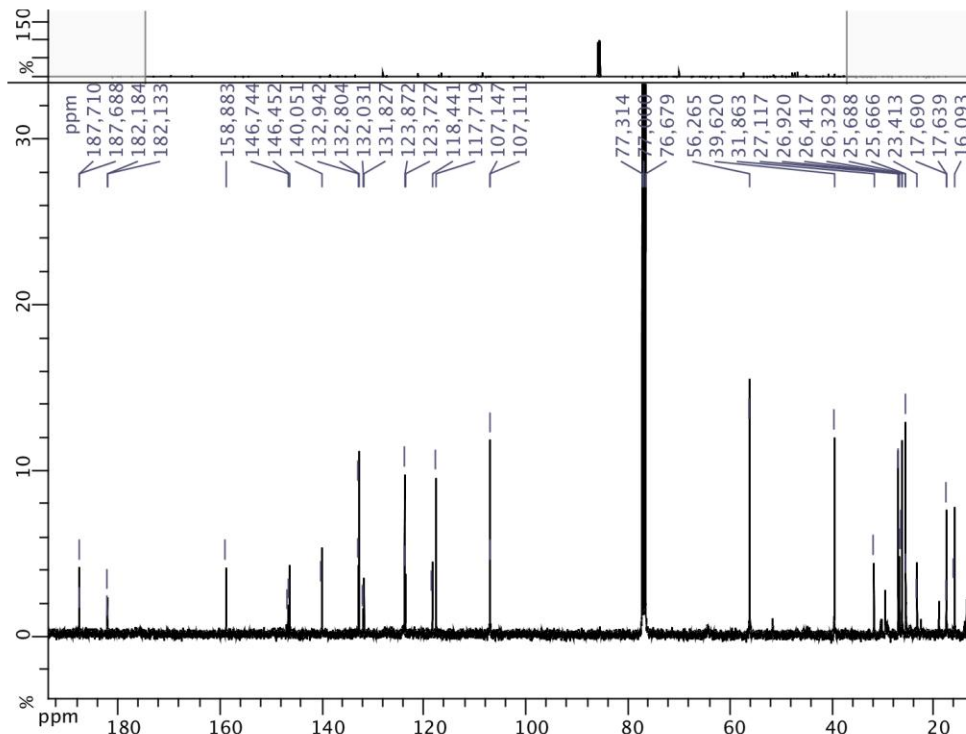
Espectro 36. Espectro IR para el compuesto (4).



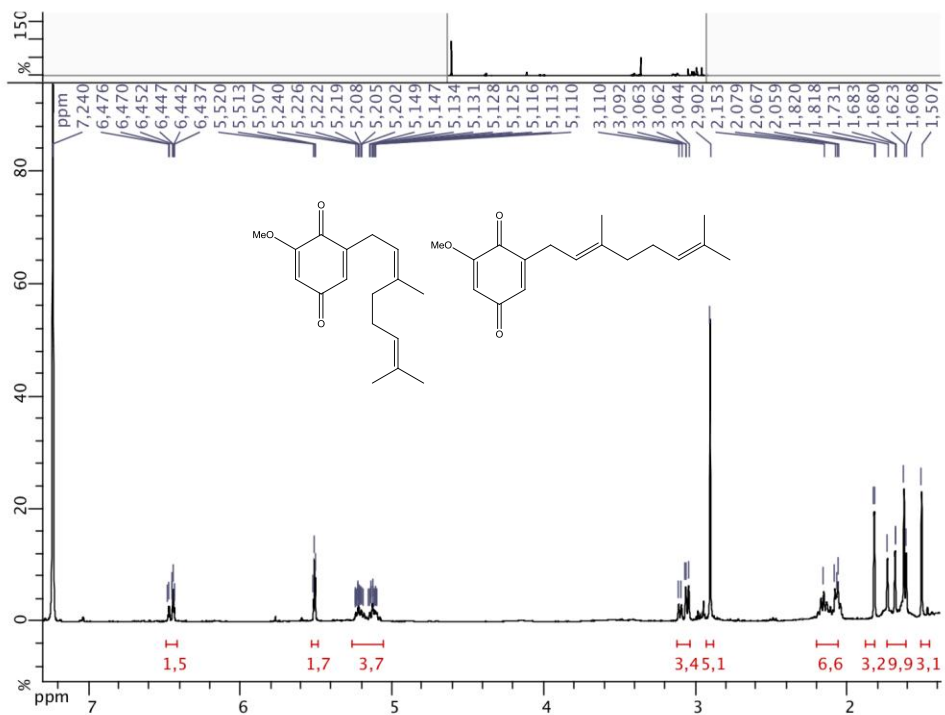
Espectro 37. Espectro de masas por I.E. para el compuesto (4).



Espectro 38. RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) para las verapliquinonas B (5) y A (6).

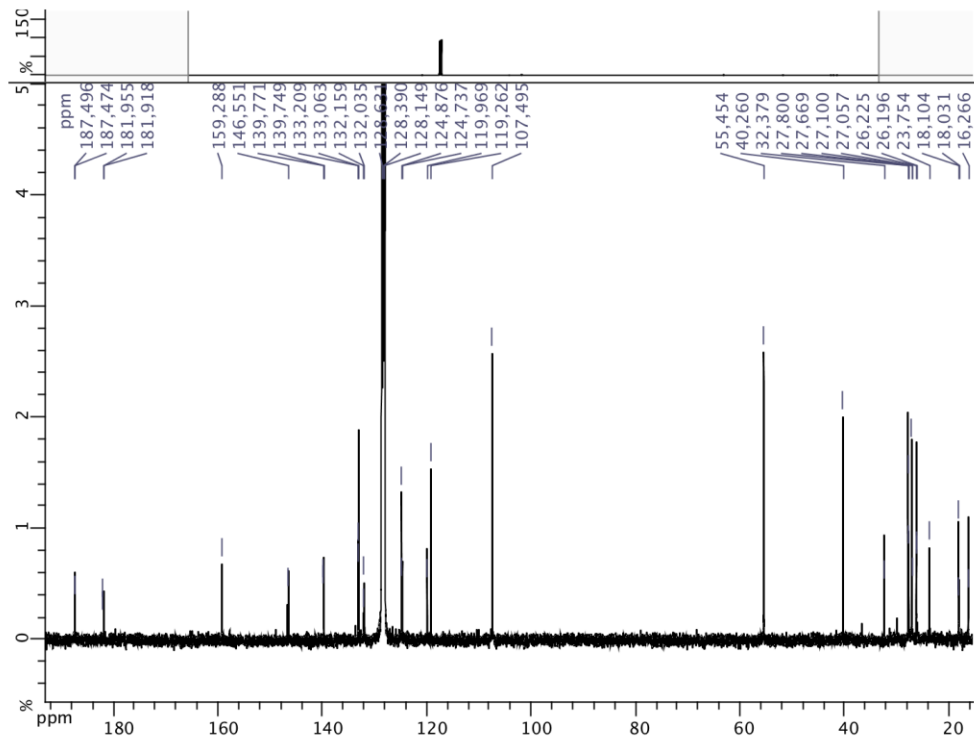


Espectro 39. RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) para las verapiquinonas B (5) y A (6).

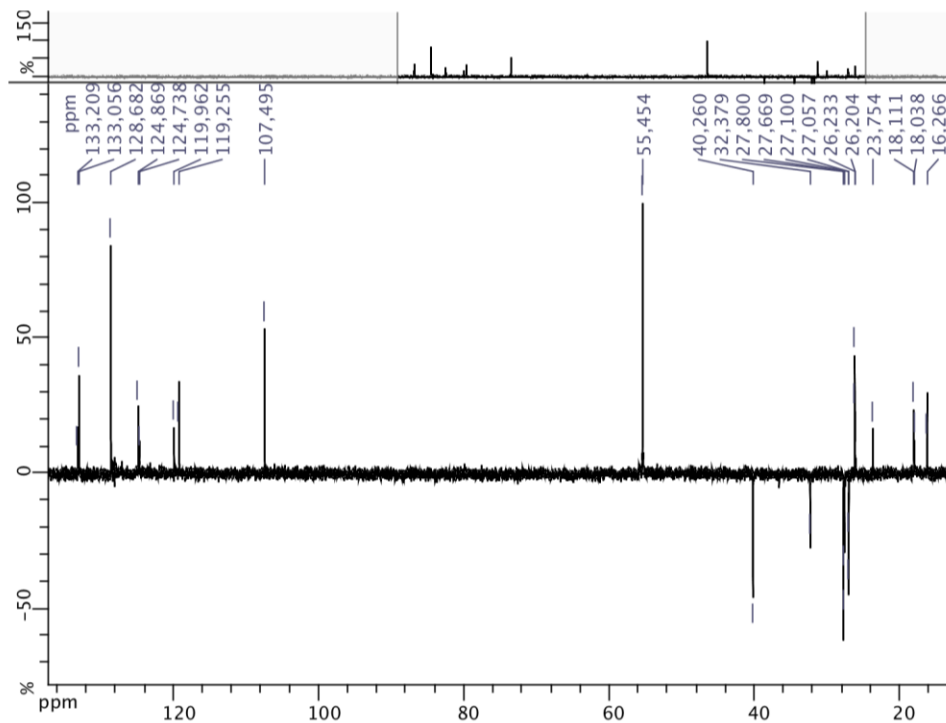


Espectro 40. RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$ ) para las verapiquinonas B (5) y A (6).

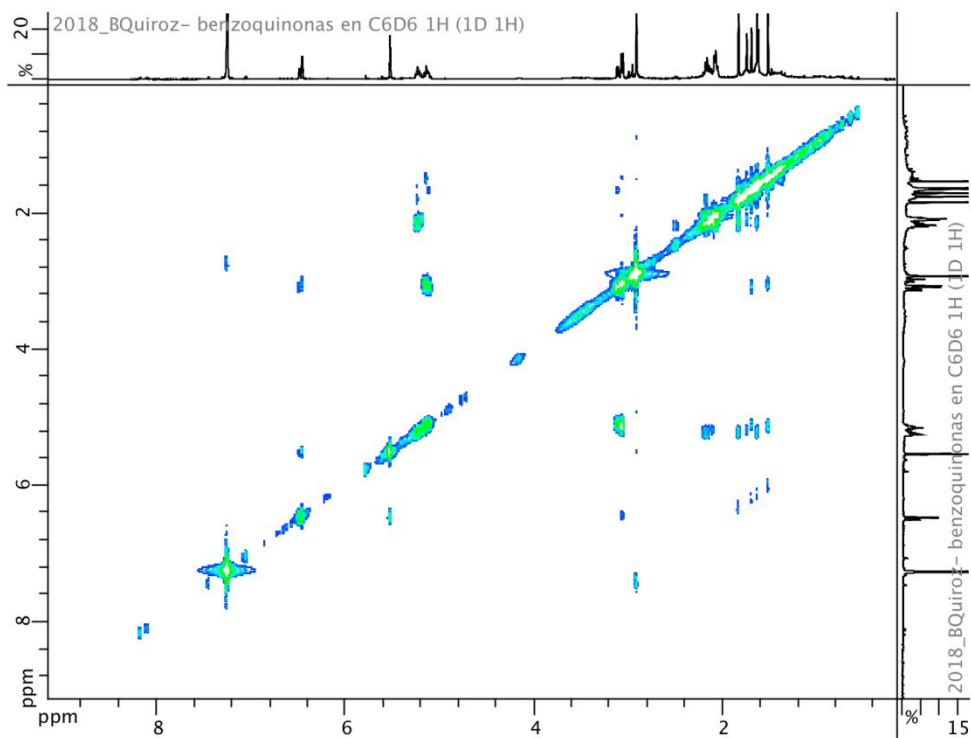




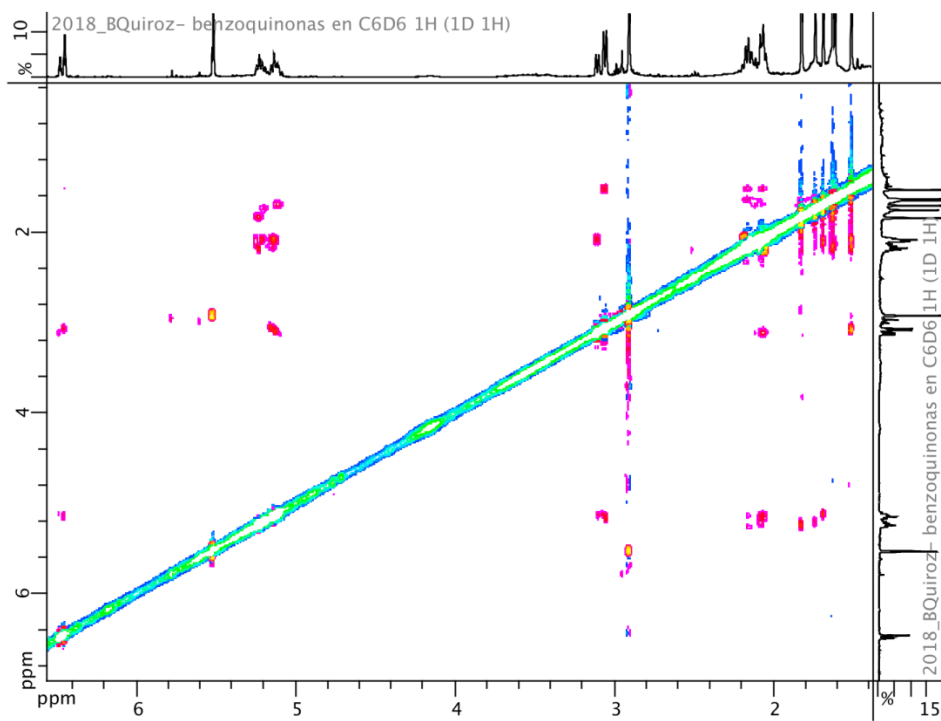
Espectro 41. RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$ ) para las veraplikinonas B (**5**) y A (**6**).



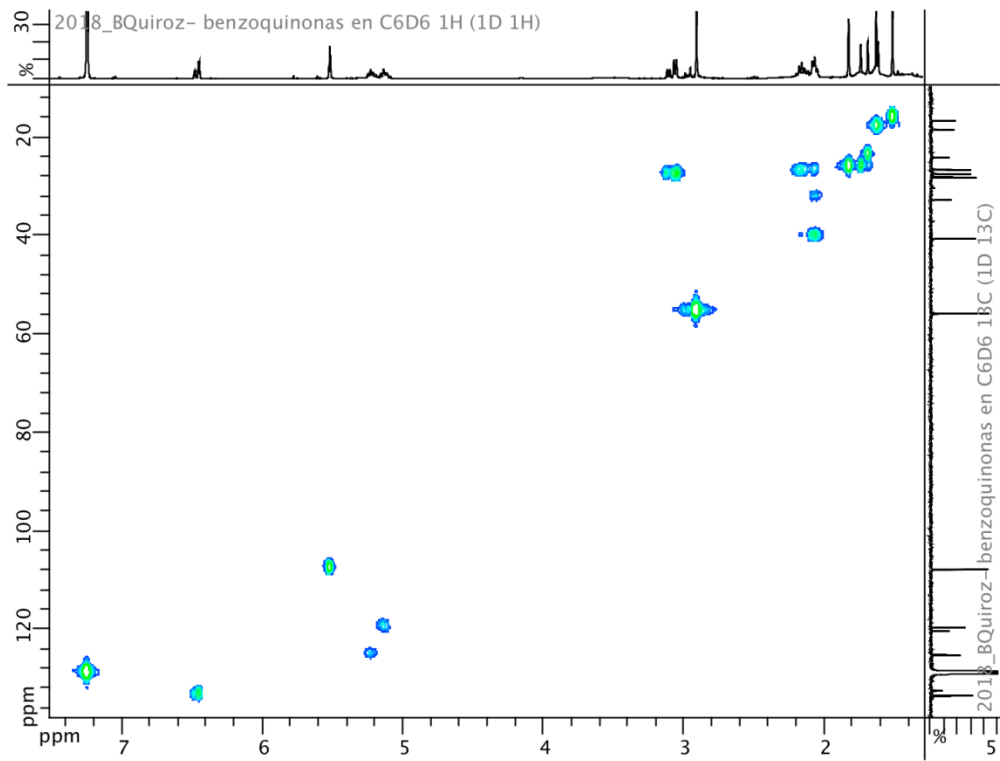
Espectro 42. Experimento DEPT 135 en  $\text{C}_6\text{D}_6$  para las veraplikinonas B (**5**) y A (**6**).



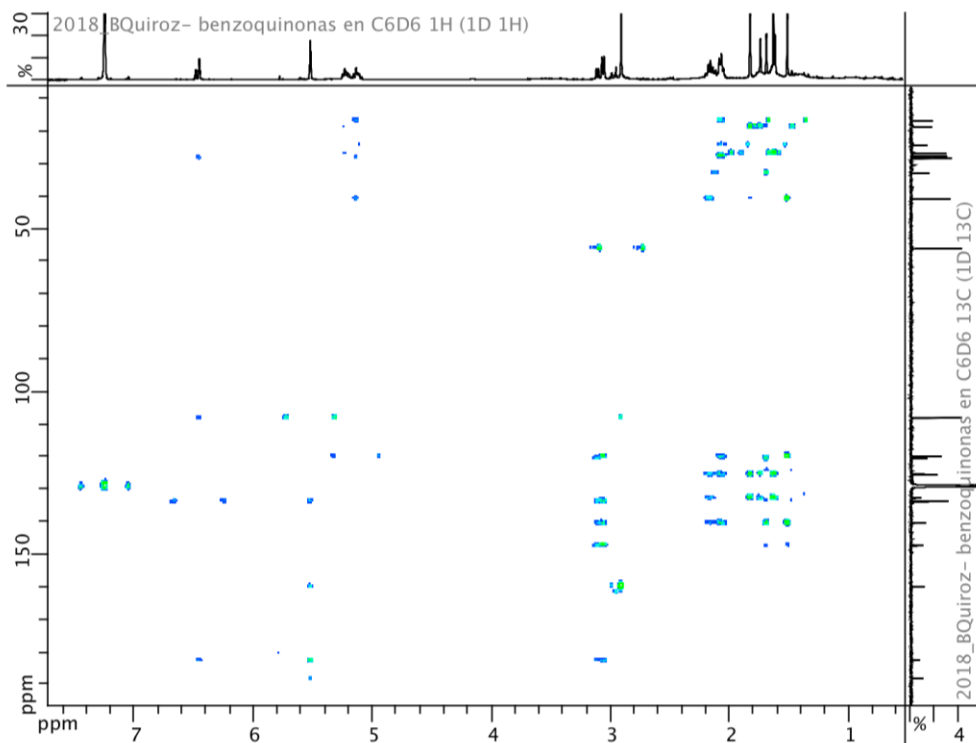
Espectro 43. Experimento COSY en  $C_6D_6$  para las veraplikinonas B (5) y A (6).



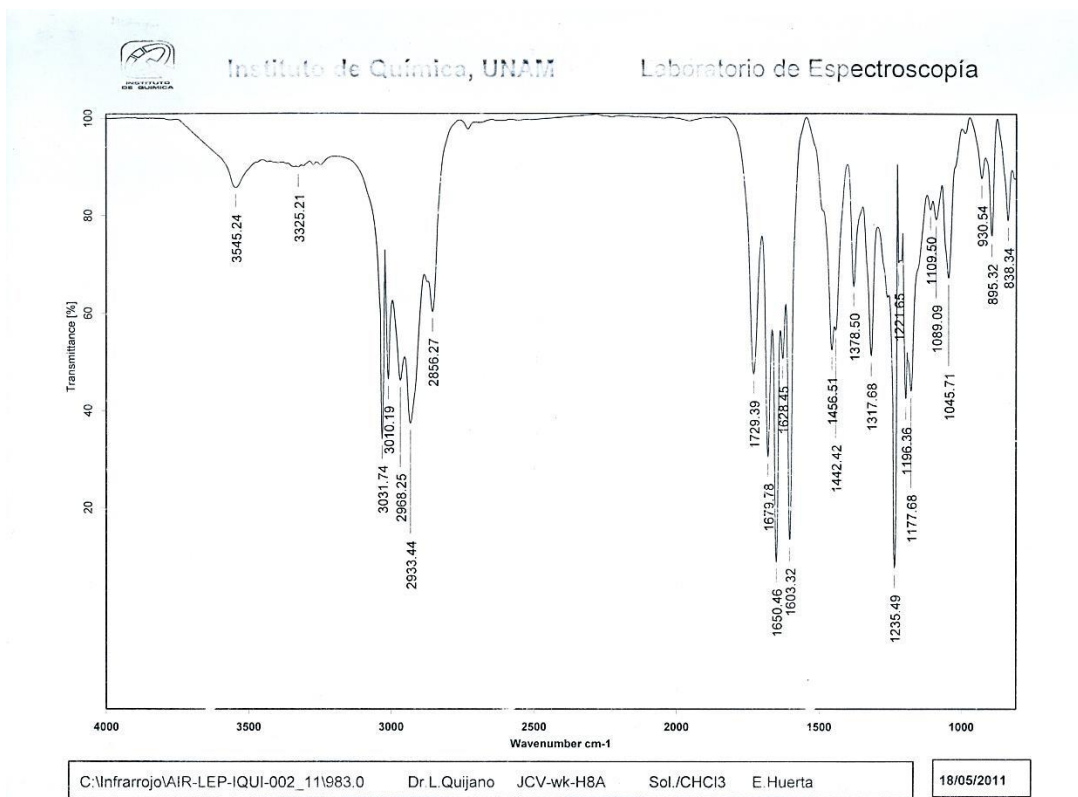
Espectro 44. Experimento NOESY en  $C_6D_6$  para las veraplikinonas B (5) y A (6).



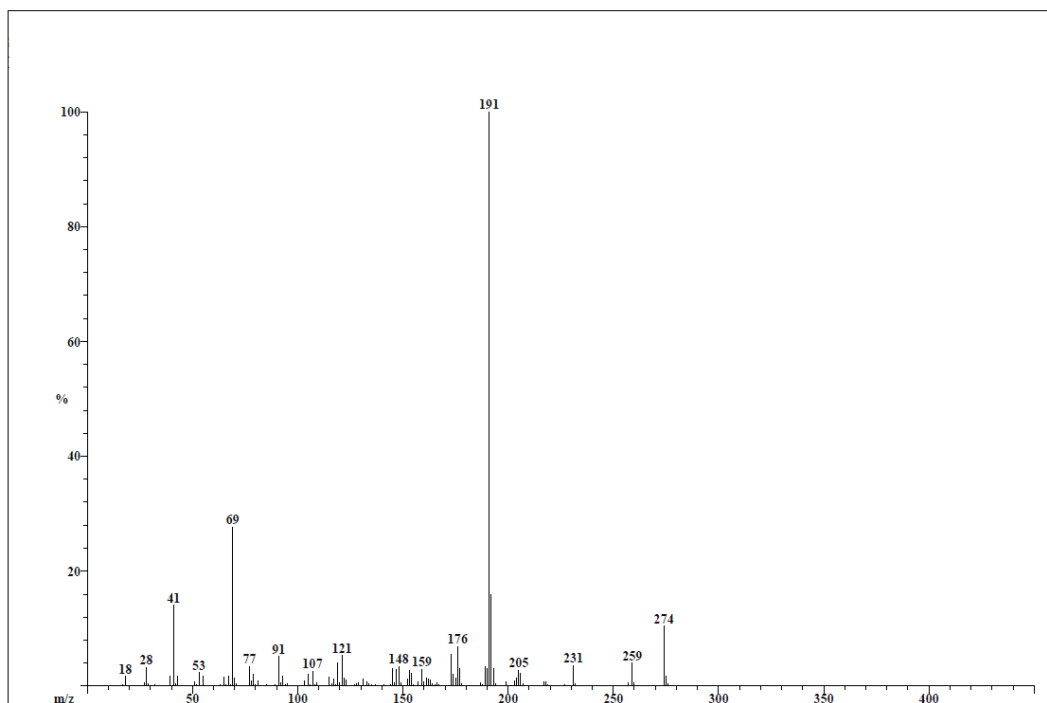
Espectro 45. Experimento HSQC en  $C_6D_6$  para las veraplikinonas B (5) y A (6).



Espectro 46. Experimento HMBC en  $C_6D_6$  para las veraplikinonas B (5) y A (6).

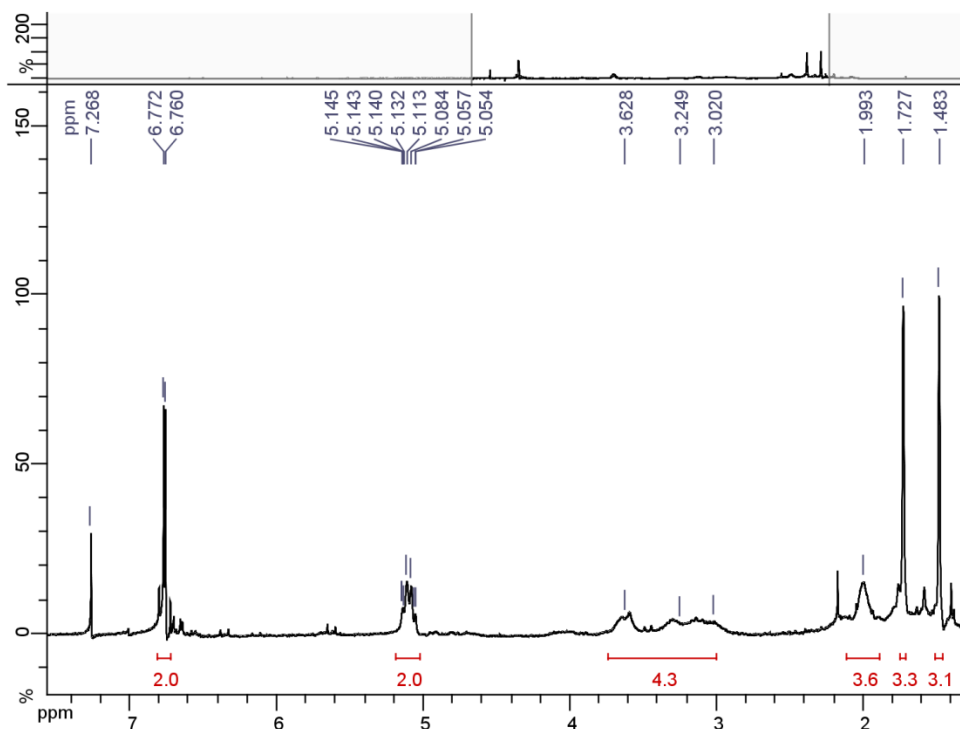


Espectro 47. Espectro IR para las verapliquinas B (5) y A (6).

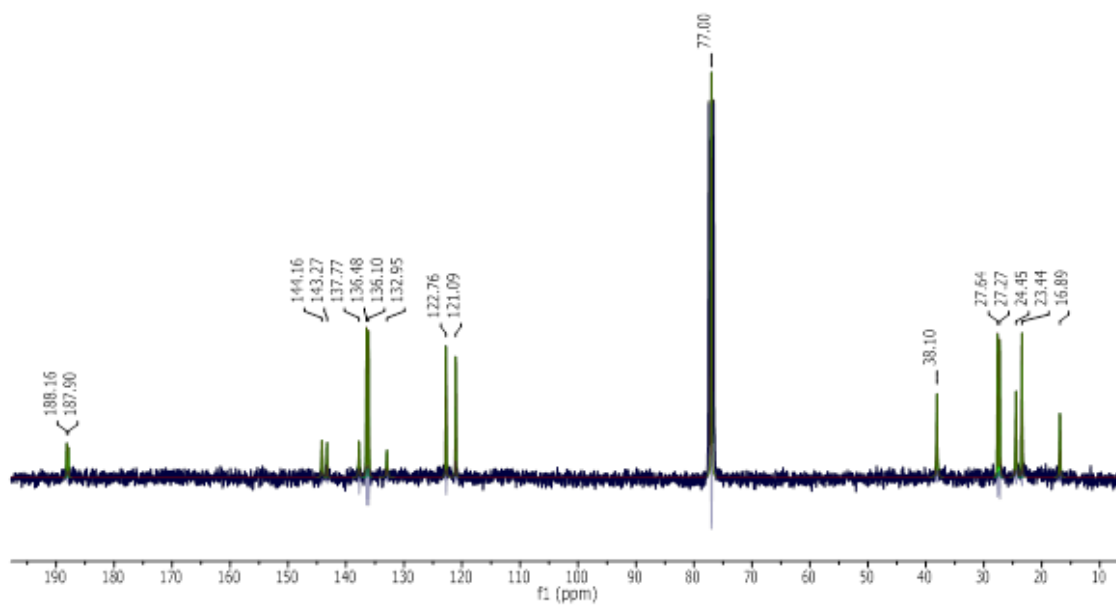


Espectro 48. Espectro de masas por I.E. para las verapliquinas B (5) y A (6).

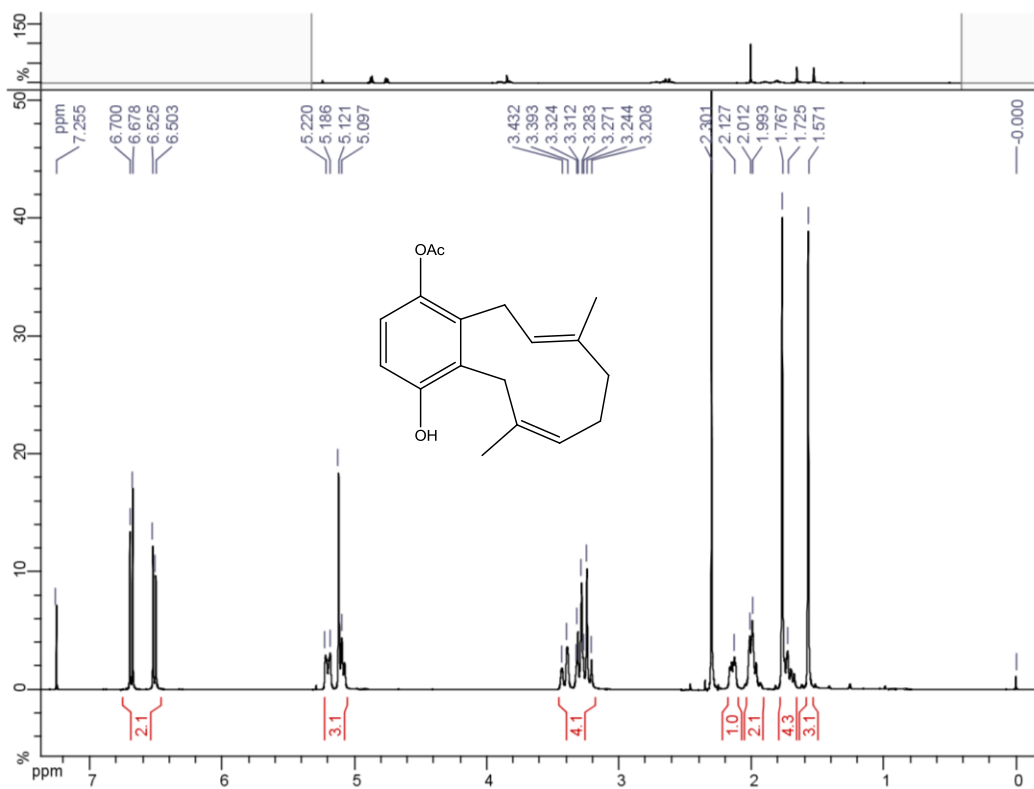




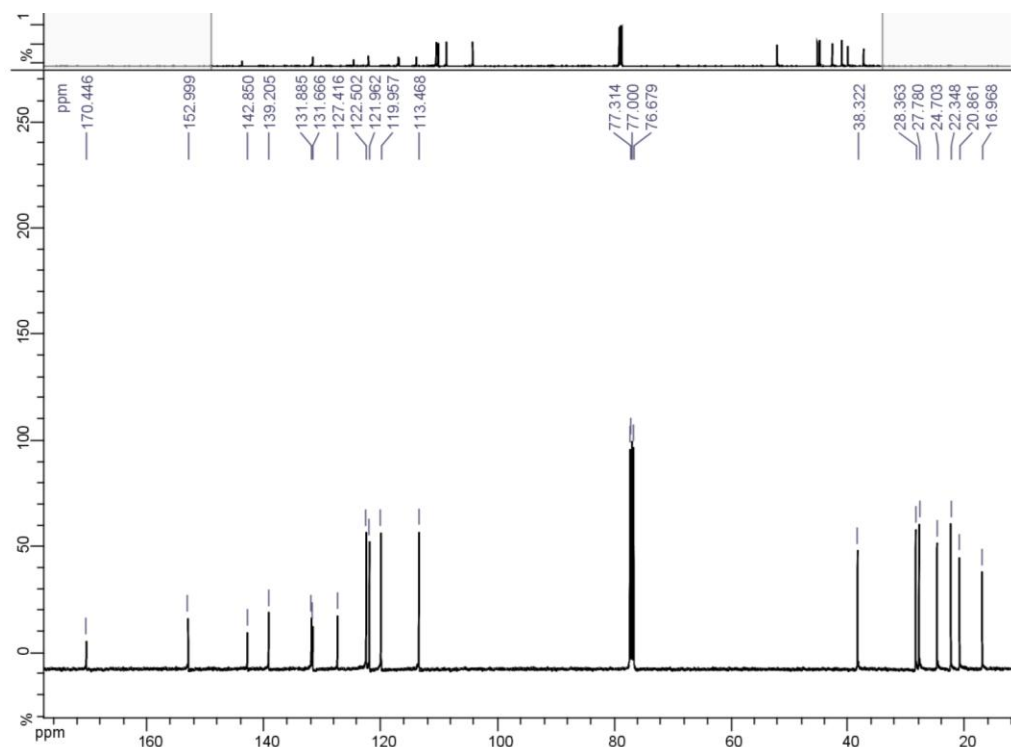
Espectro 51. RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) para la globiferina (**9**).



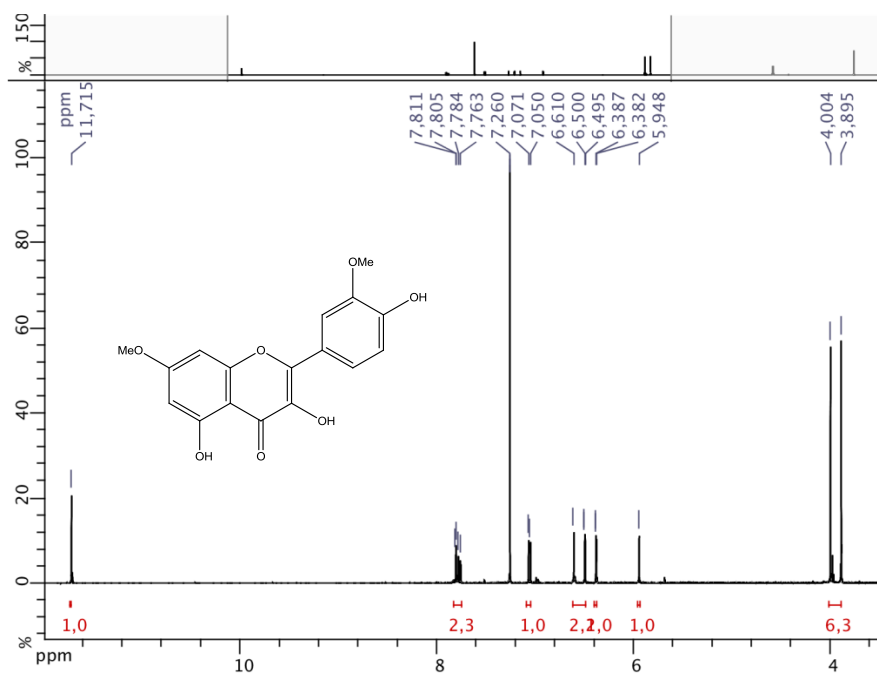
Espectro 52. RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) para la globiferina (**9**).



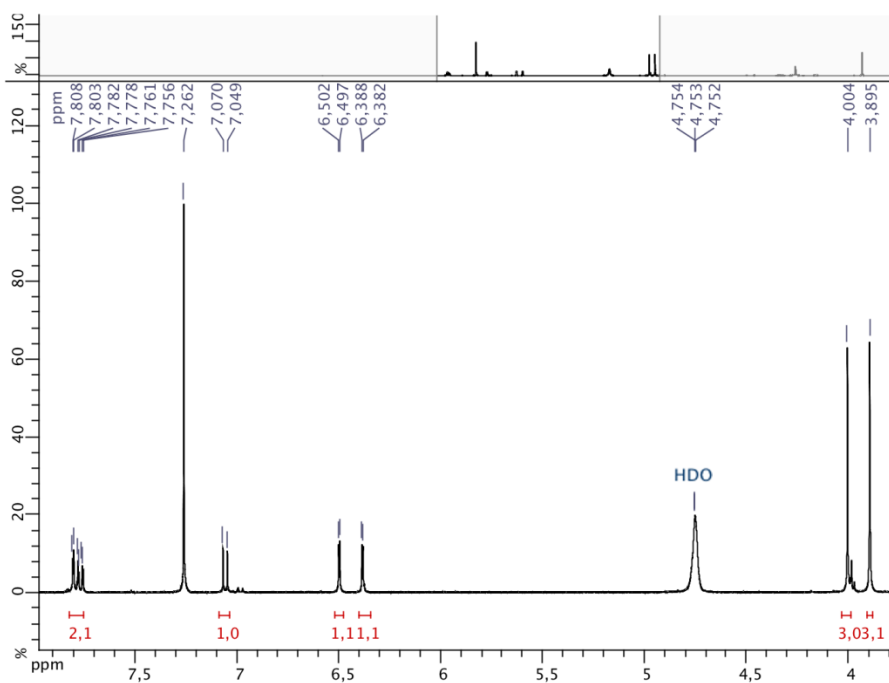
Espectro 53. RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) para el wigandol (**12**).



Espectro 54. RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) para el wigandol (**12**).

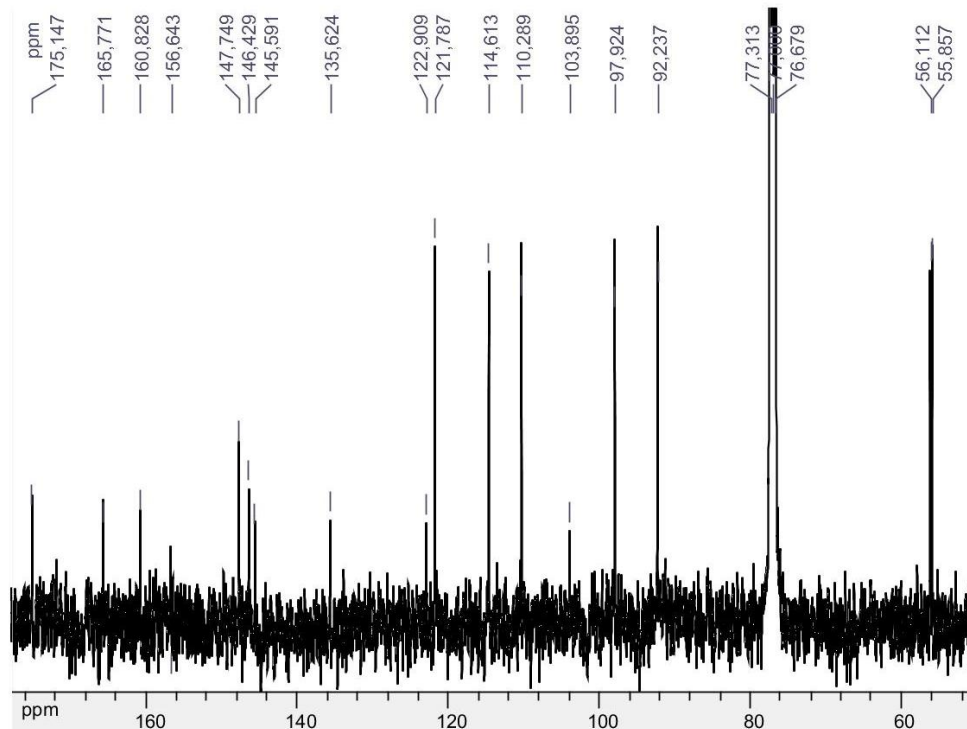


Espectro 55. RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) para la rhamnazina (**16**).

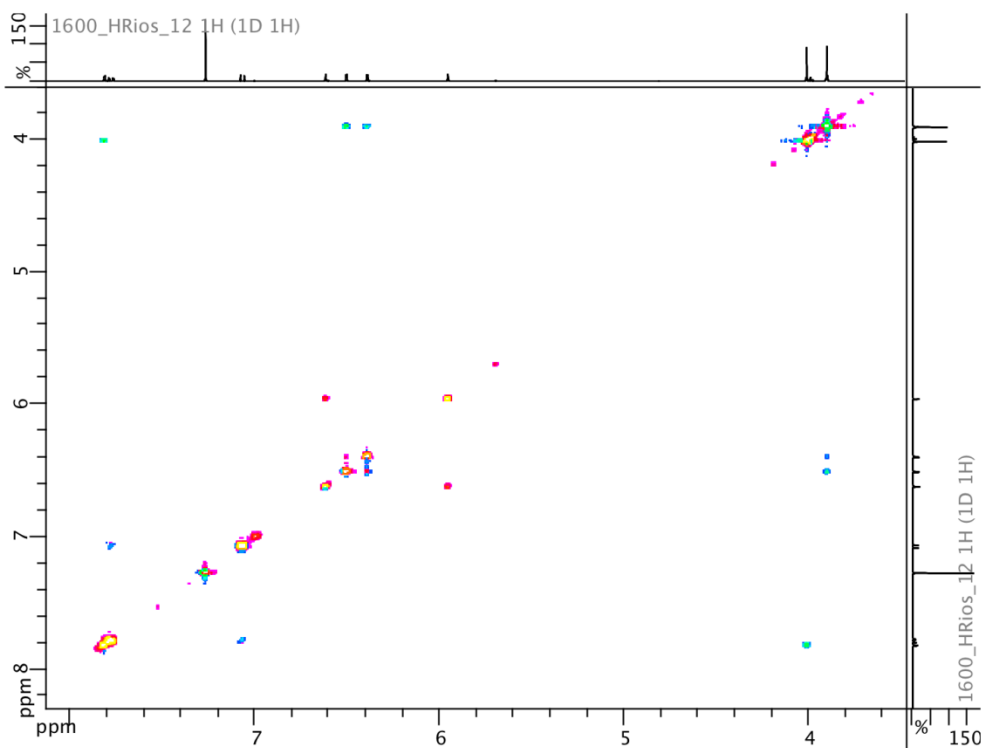


Espectro 56. RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3 + \text{D}_2\text{O}$ ) para la rhamnazina (**16**).

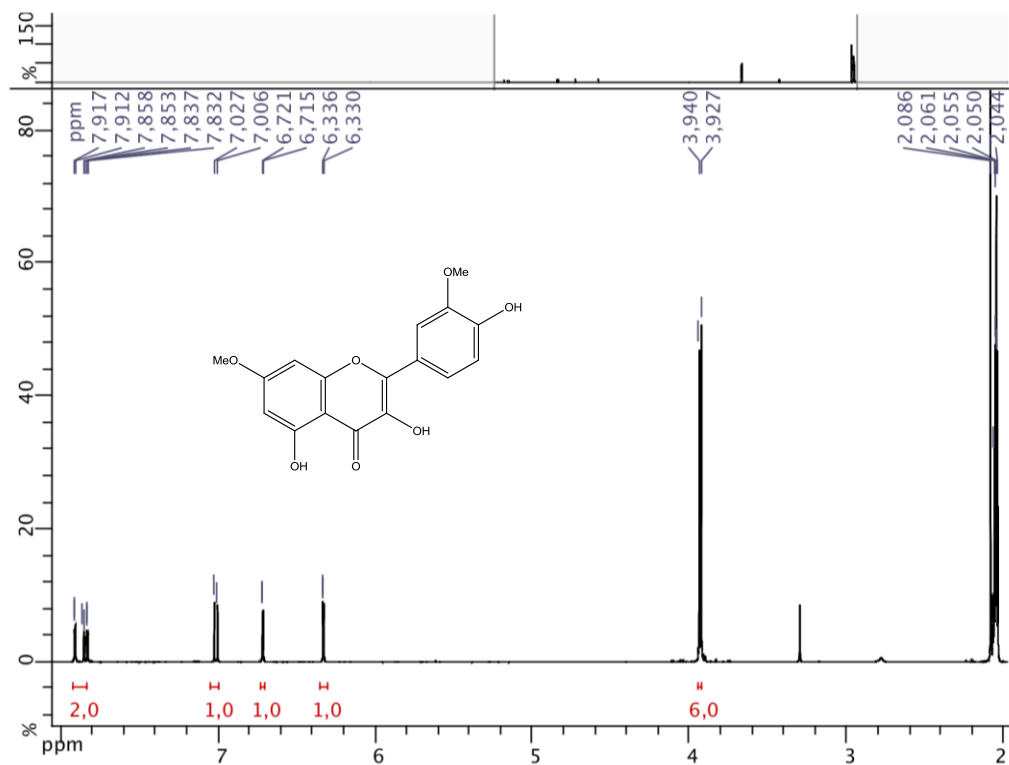




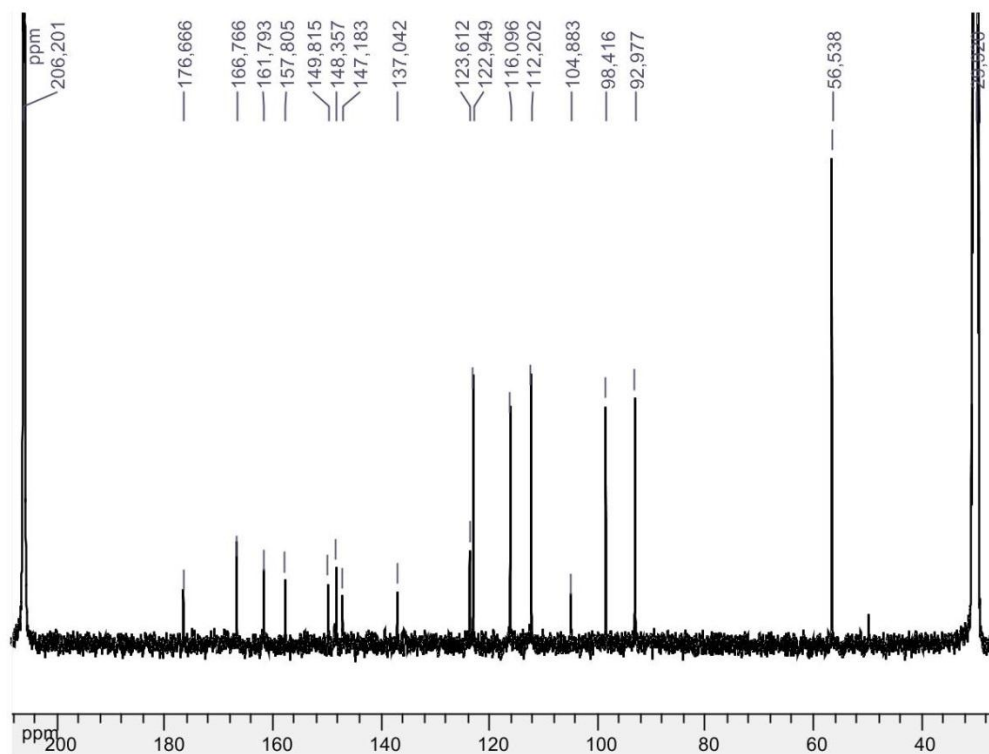
Espectro 57. RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) para la rhamnazina (**16**).



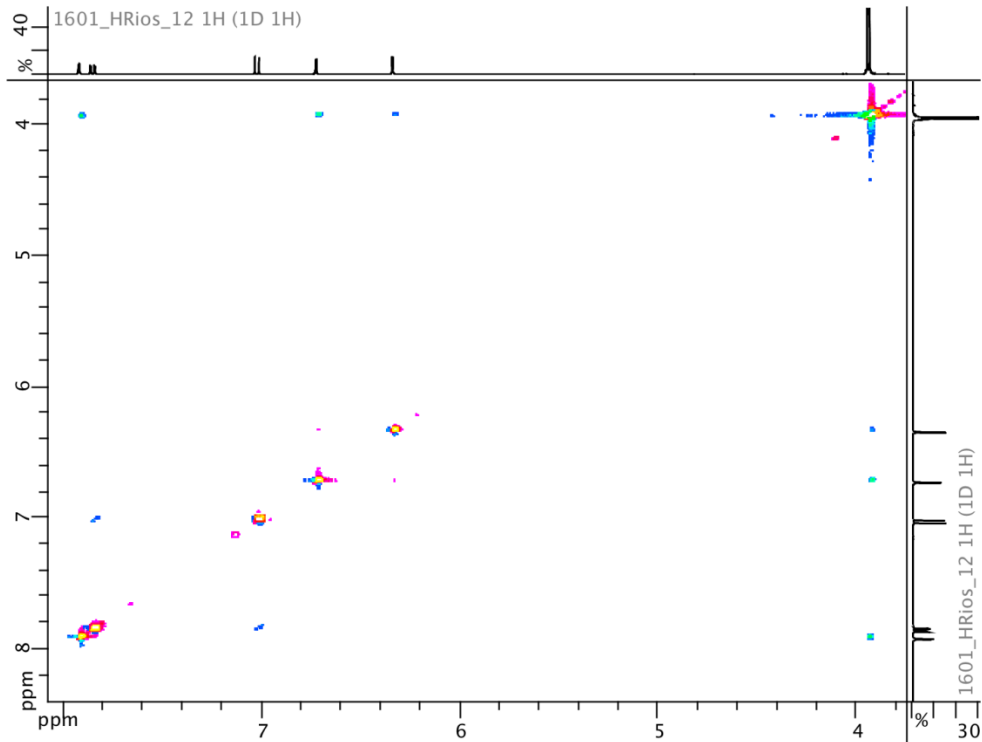
Espectro 58. Experimento NOESY  $\text{CDCl}_3$  para la rhamnazina (**16**).



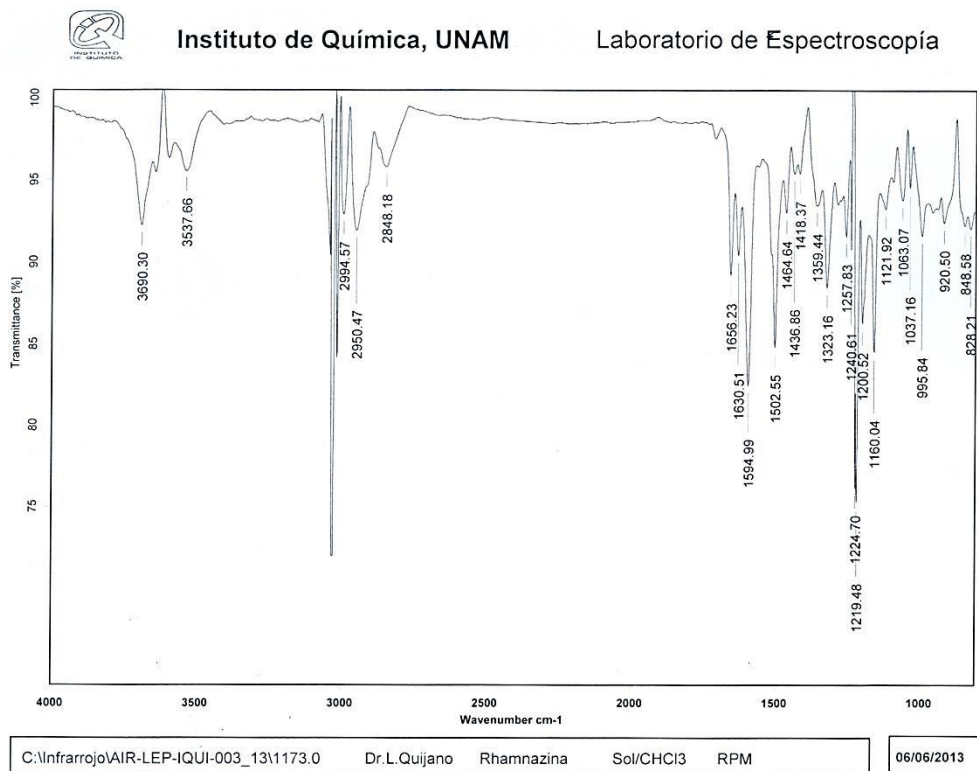
Espectro 59. RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, acetona- $\text{d}_6$ ) para la rhamnazina (**16**).



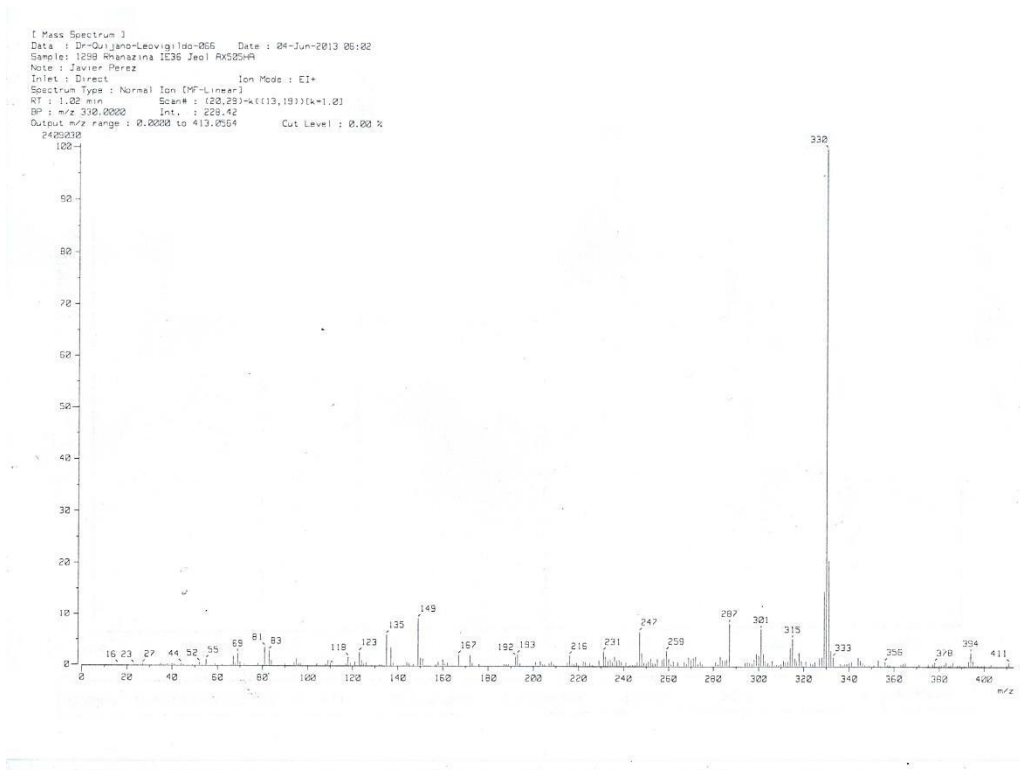
Espectro 60. RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz, acetona- $\text{d}_6$ ) para la rhamnazina (**16**).



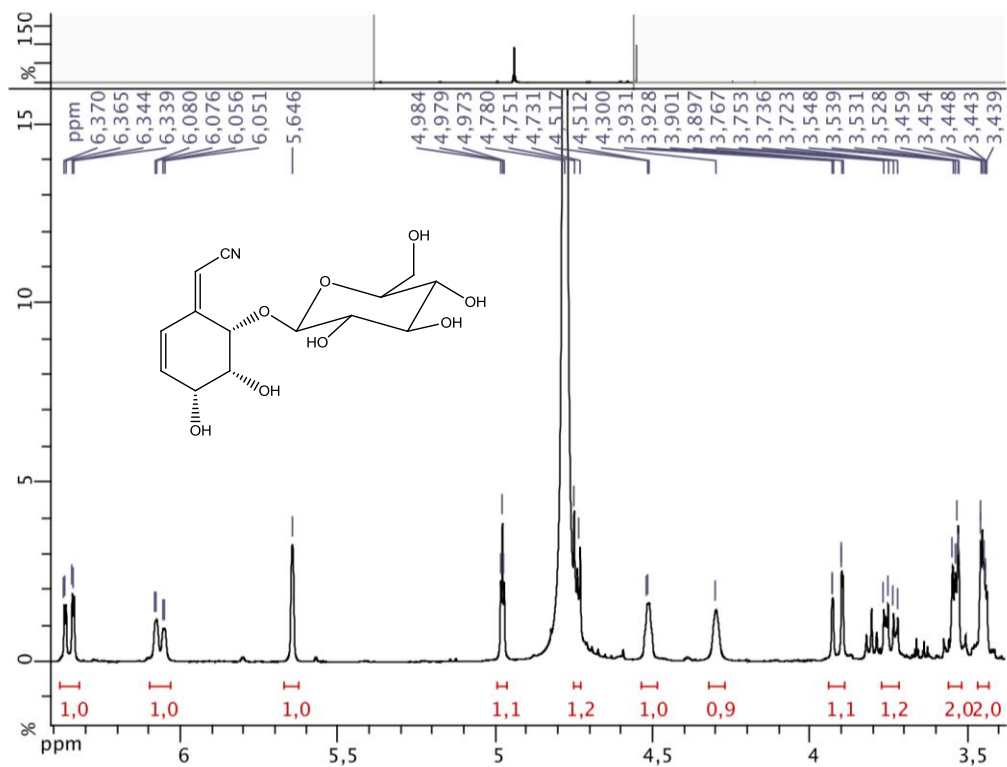
Espectro 61. Experimento NOESY acetona-d<sub>6</sub> para la rhamnazina (16).



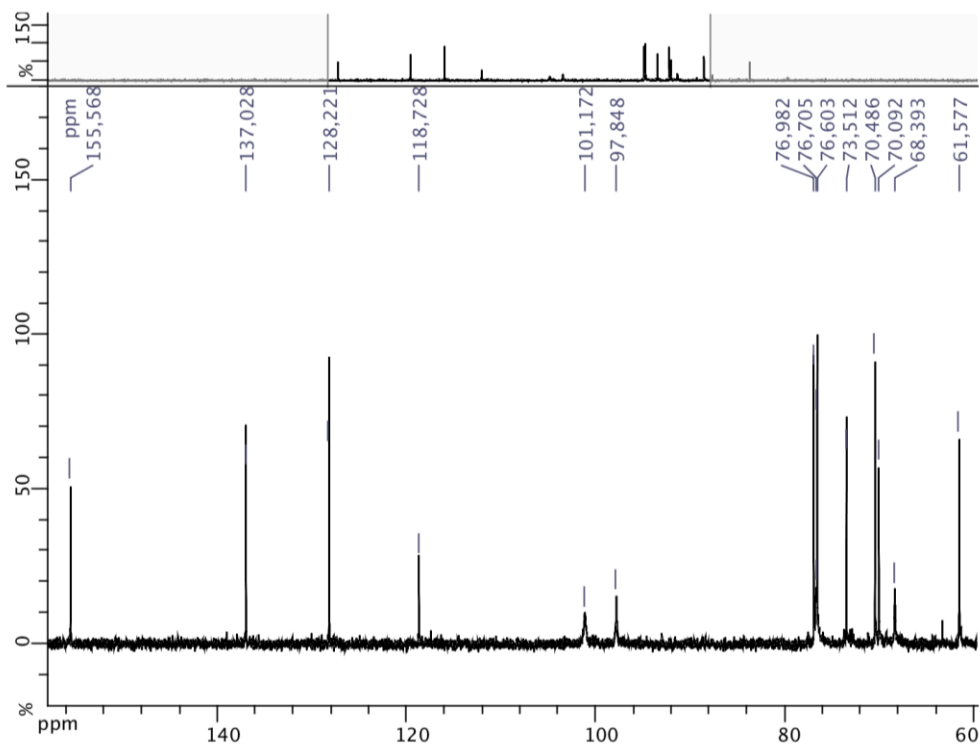
Espectro 62. Espectro IR para la rhamnazina (16).



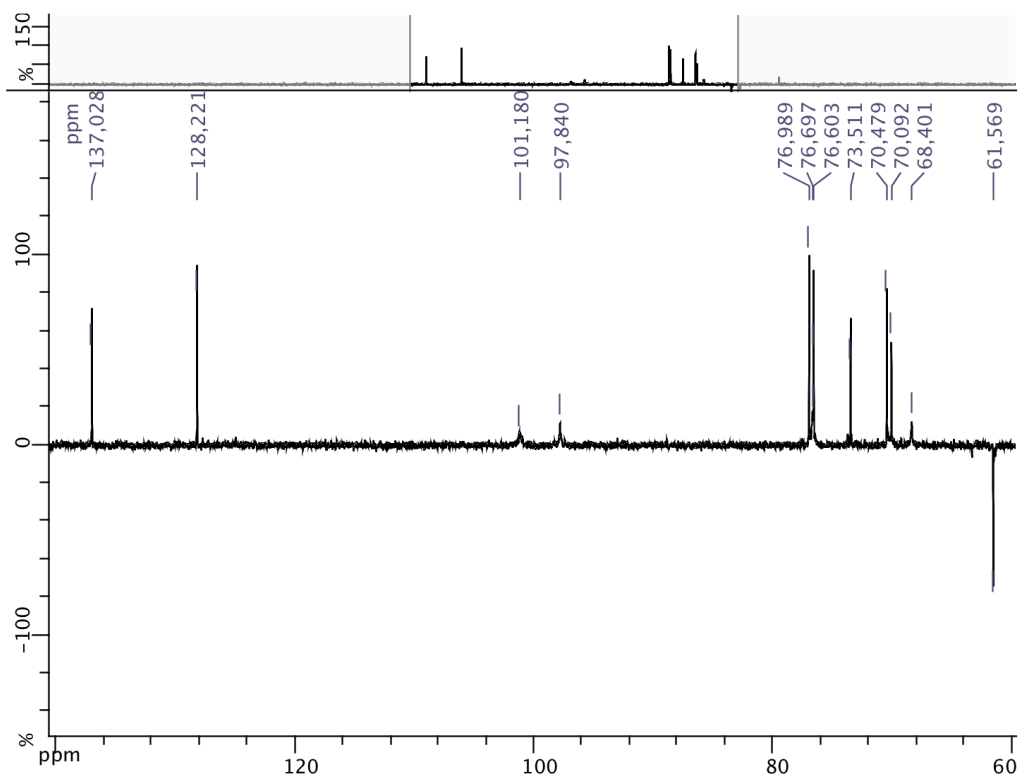
Espectro 63. Espectro de masas por I.E. para la rhamnazina (16).



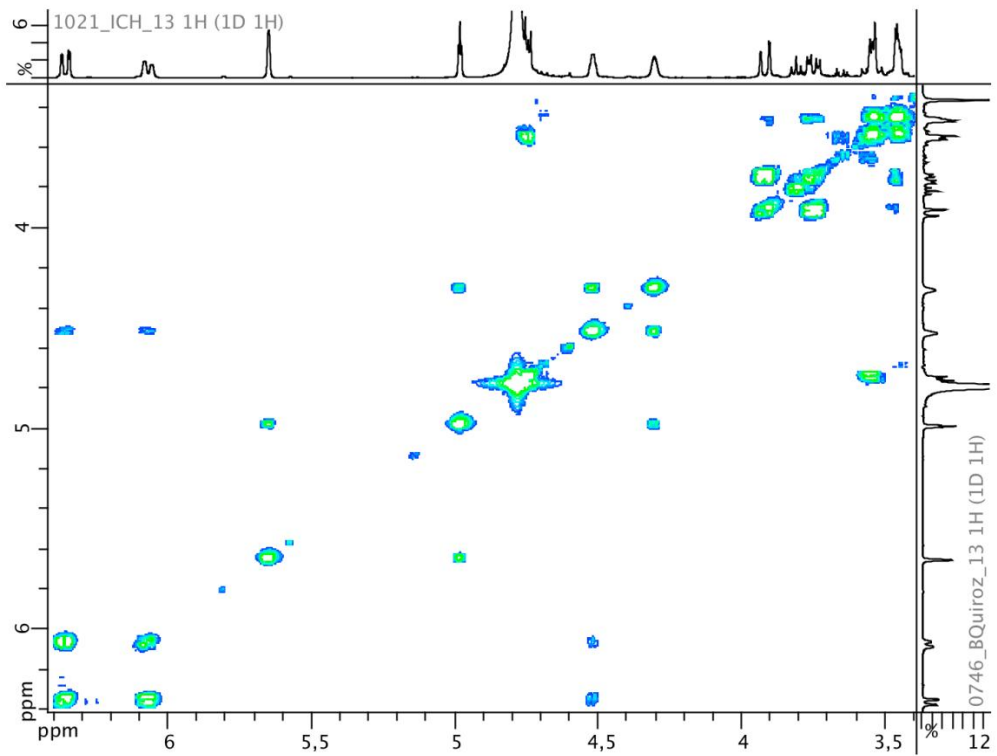
Espectro 64. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, D<sub>2</sub>O) para el compuesto (17).



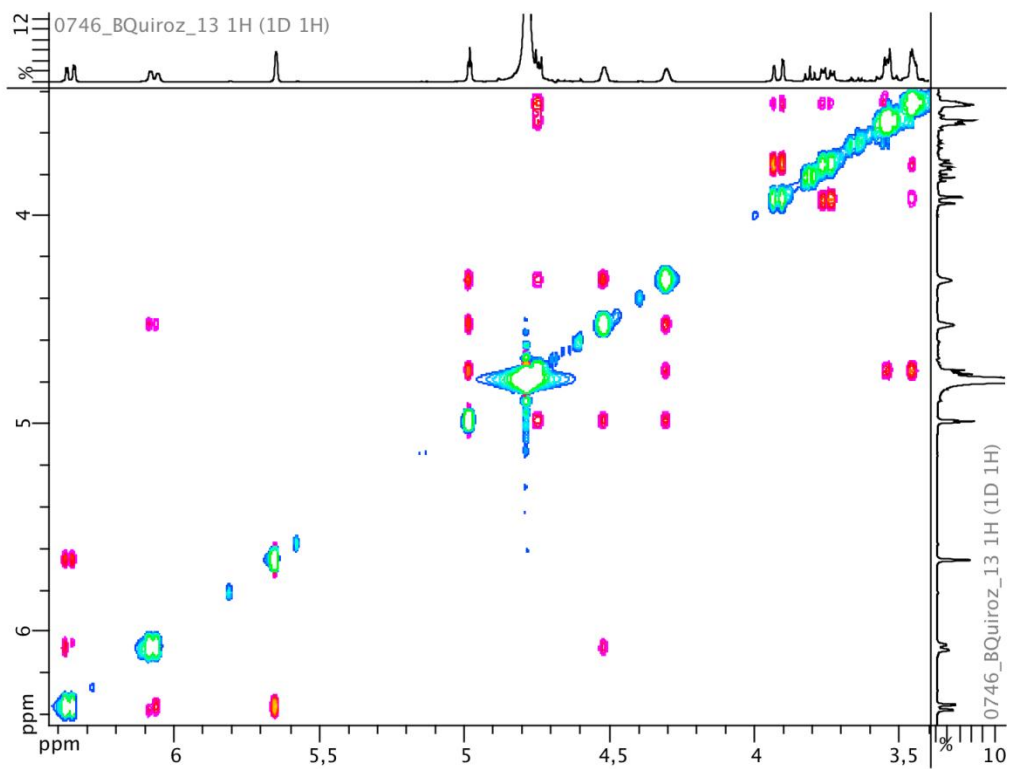
Espectro 65. RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, D<sub>2</sub>O) para el compuesto (17).



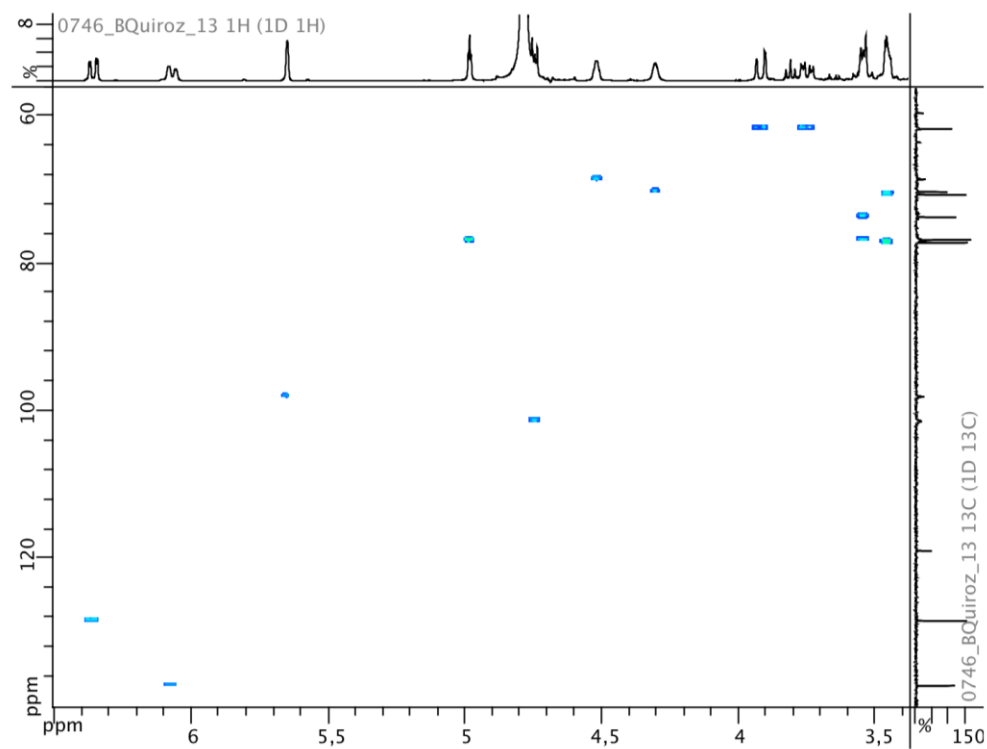
Espectro 66. Experimento DEPT 135 en D<sub>2</sub>O para el compuesto (17).



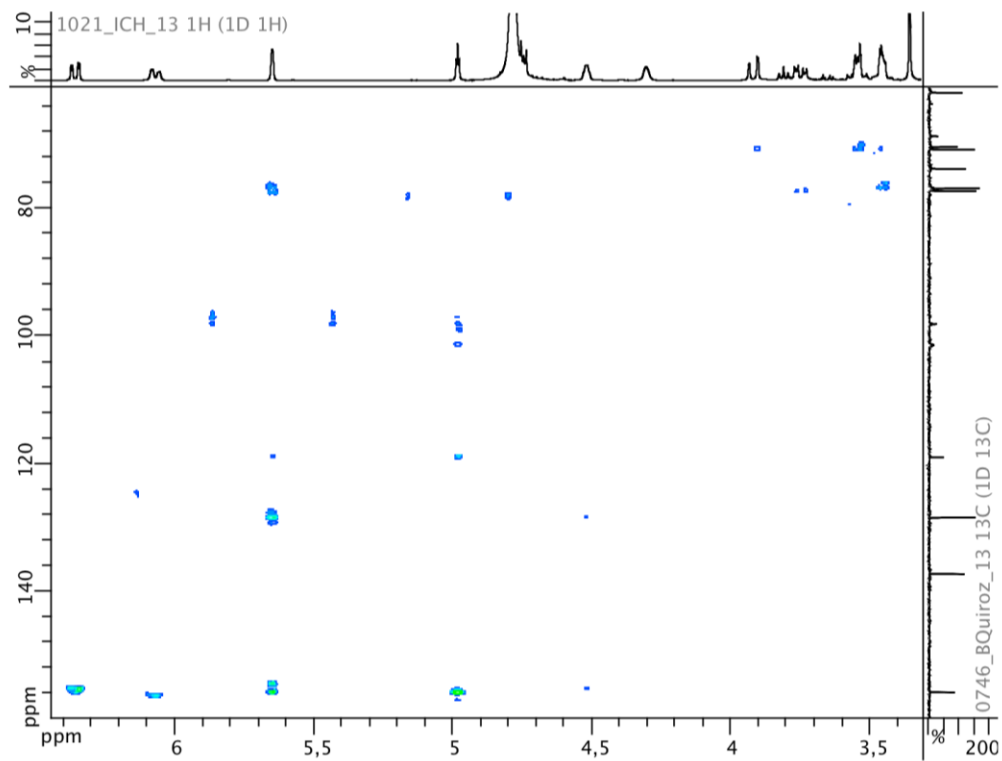
Espectro 67. Experimento COSY en D<sub>2</sub>O para el compuesto (17).



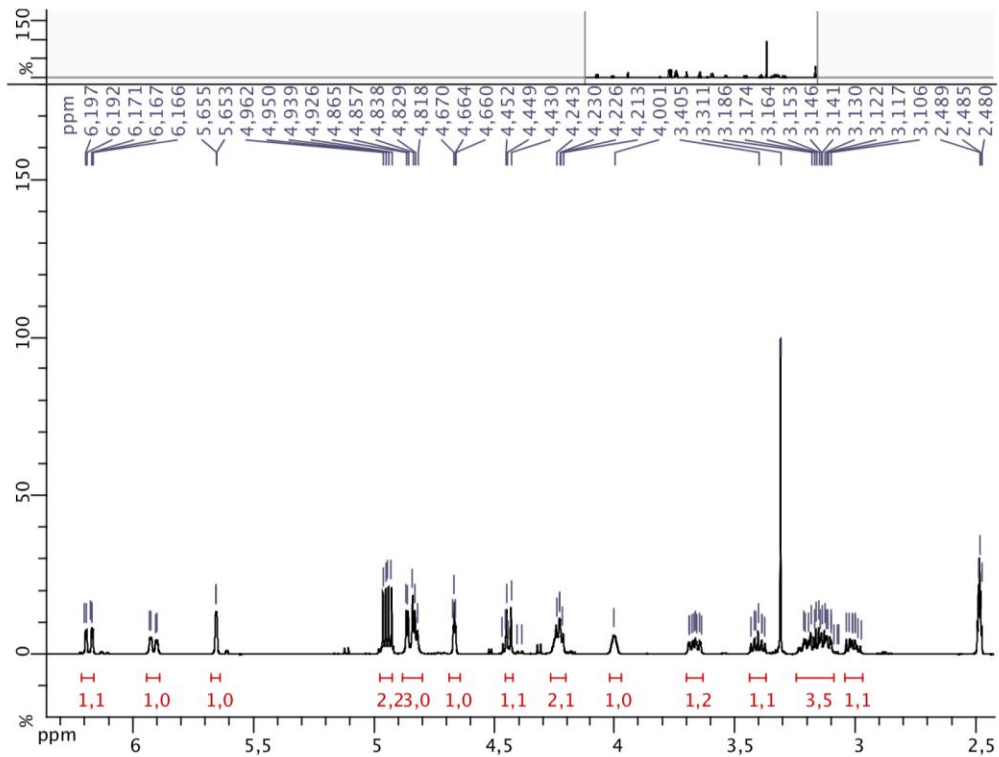
Espectro 68. Experimento NOESY en D<sub>2</sub>O para el compuesto (17).



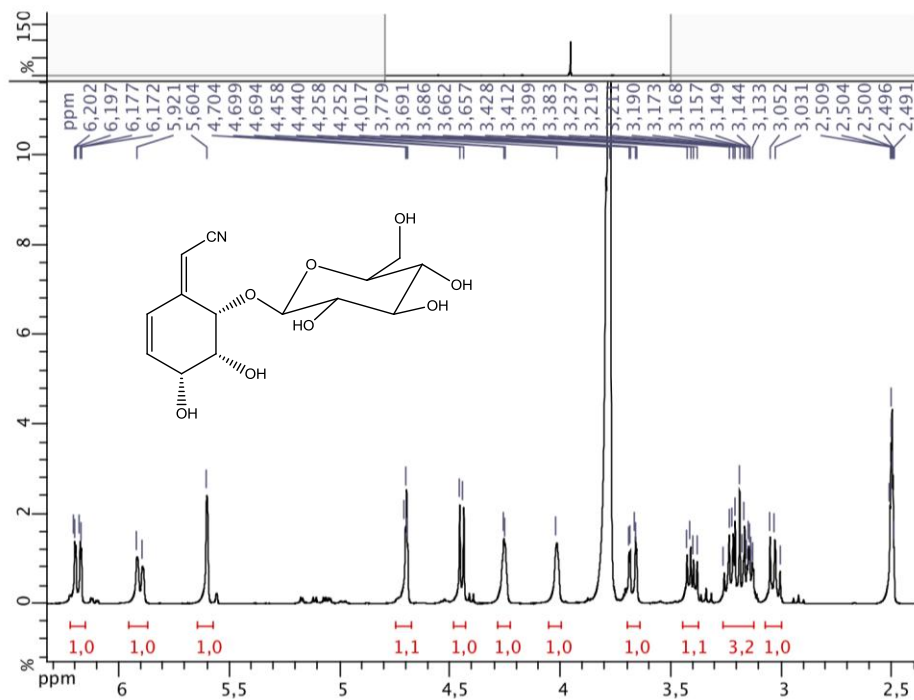
Espectro 69. Experimento HSQC en D<sub>2</sub>O para el compuesto (17).



Espectro 70. Experimento HMBC en D<sub>2</sub>O para el compuesto (17).

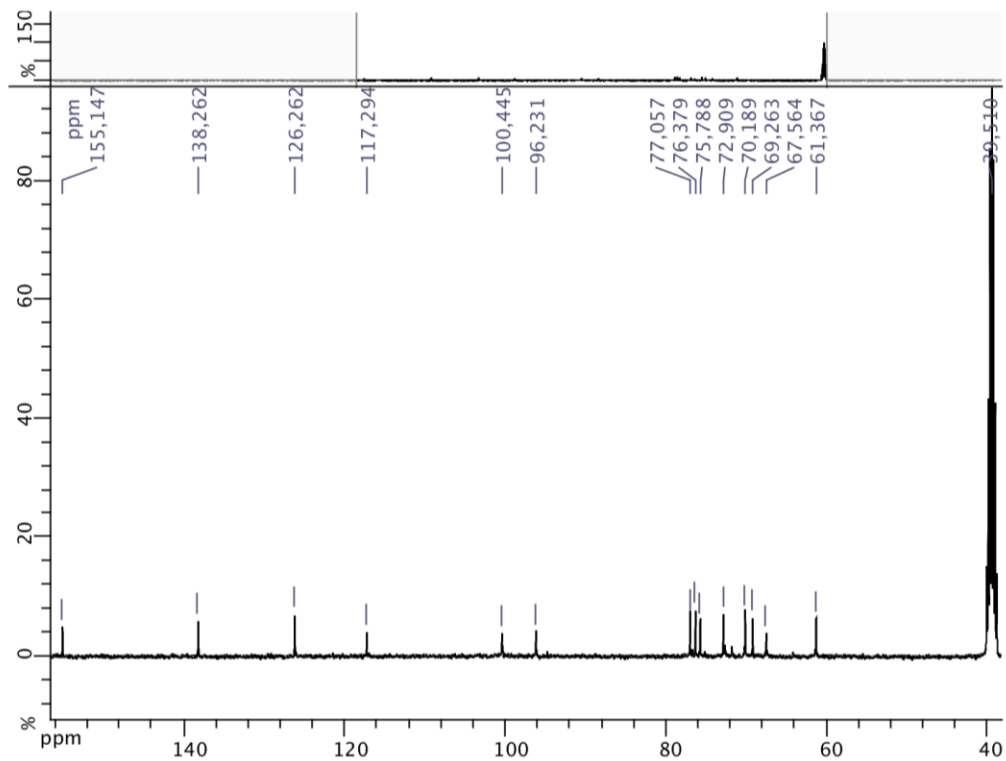


Espectro 71. RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, DMSO- $\text{d}_6$ ) para el compuesto (17).

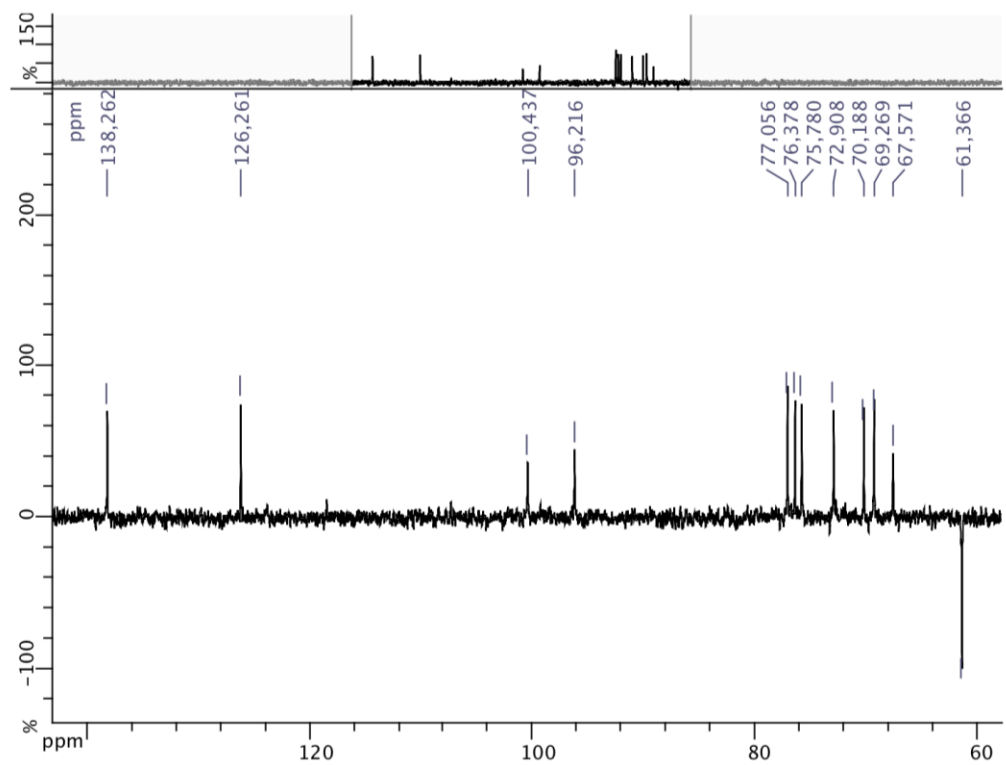


Espectro 72. RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, DMSO- $\text{d}_6 + \text{D}_2\text{O}$ ) para el compuesto (17).

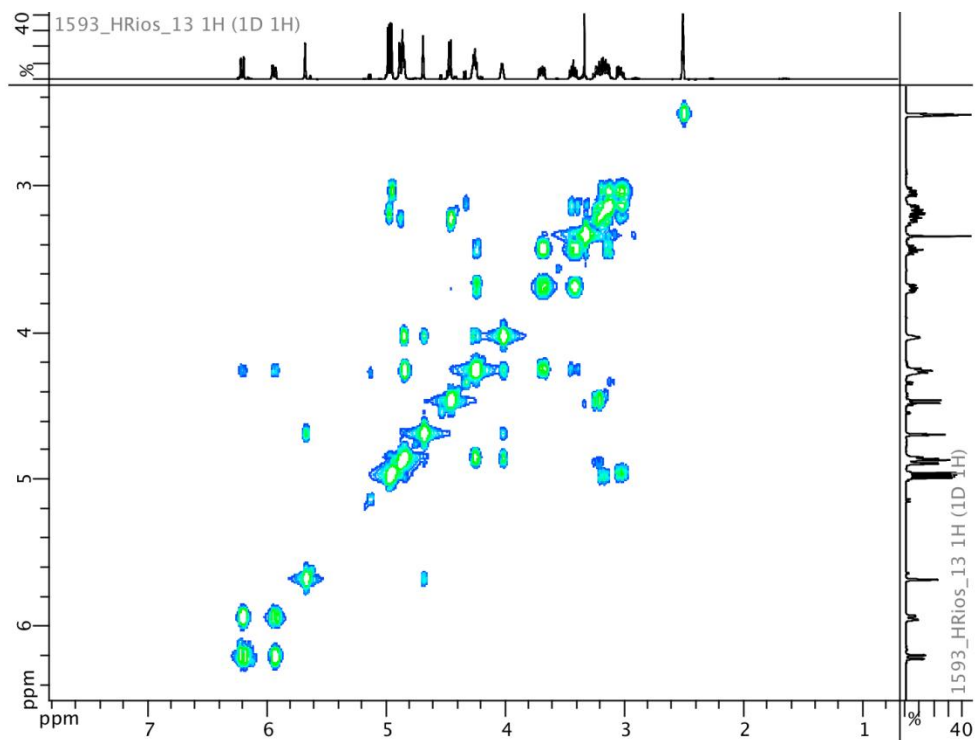




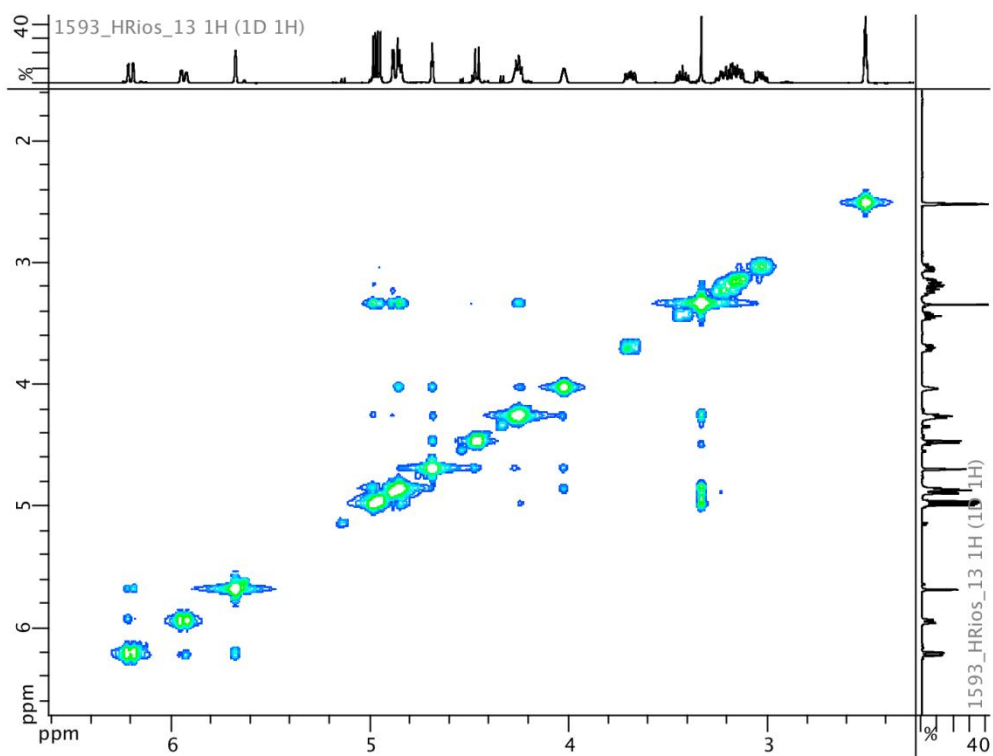
Espectro 73. RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz, DMSO- $\text{d}_6$ ) para el compuesto (17).



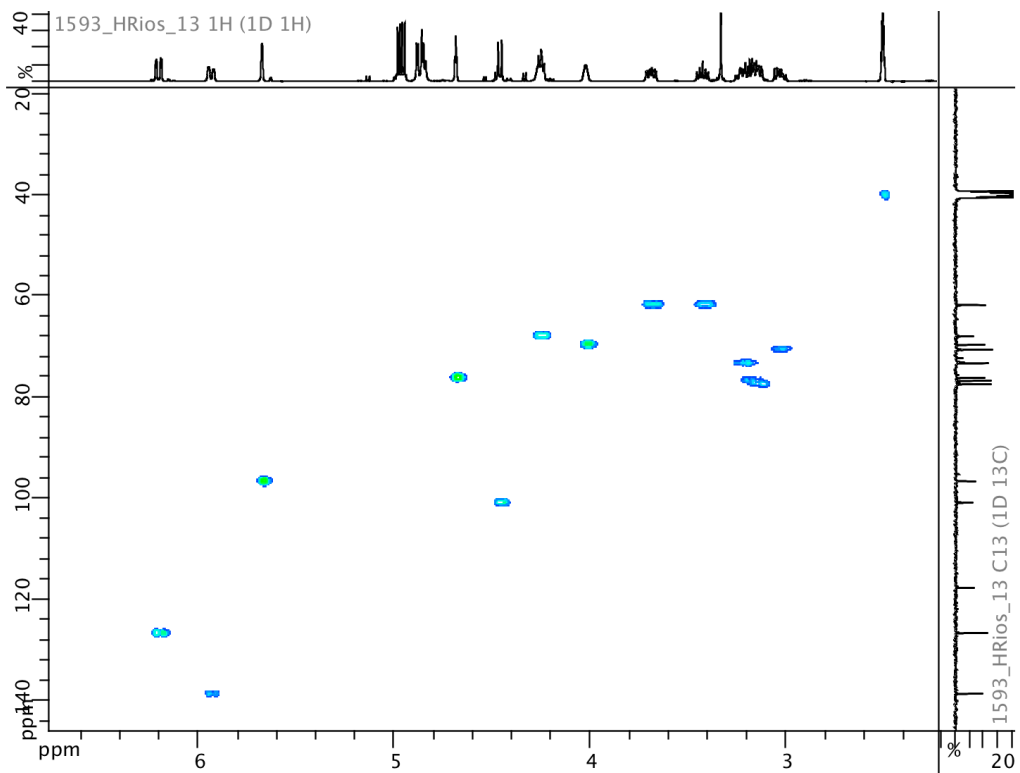
Espectro 74. Experimento DEPT 135 en DMSO- $\text{d}_6$  para el compuesto (17).



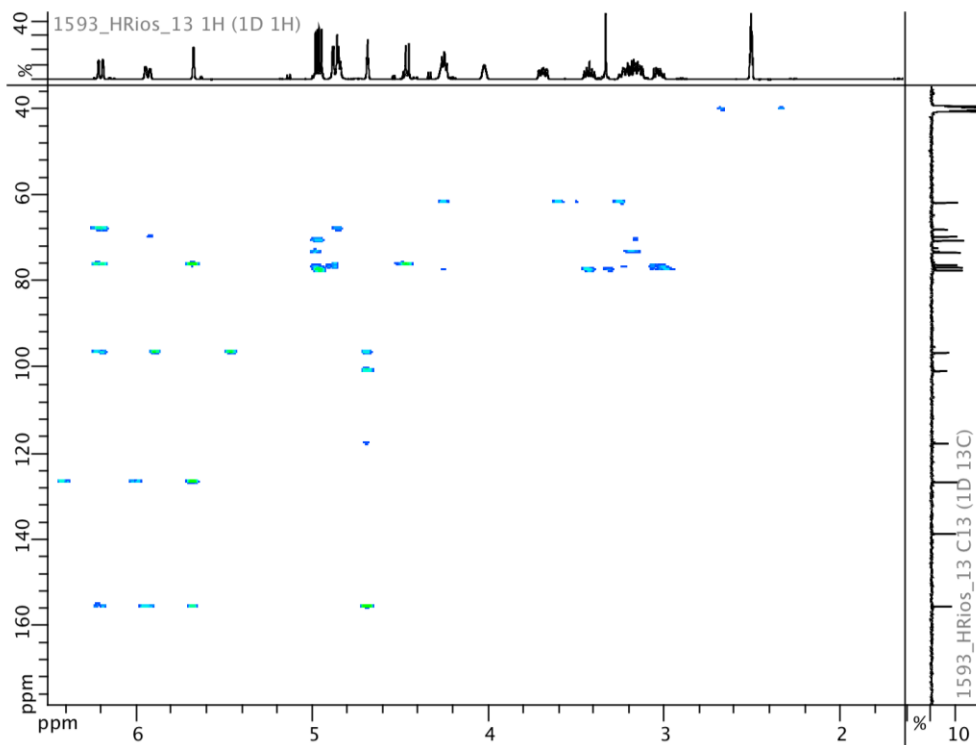
Espectro 75. Experimento COSY en DMSO-d<sub>6</sub> para el compuesto (17).



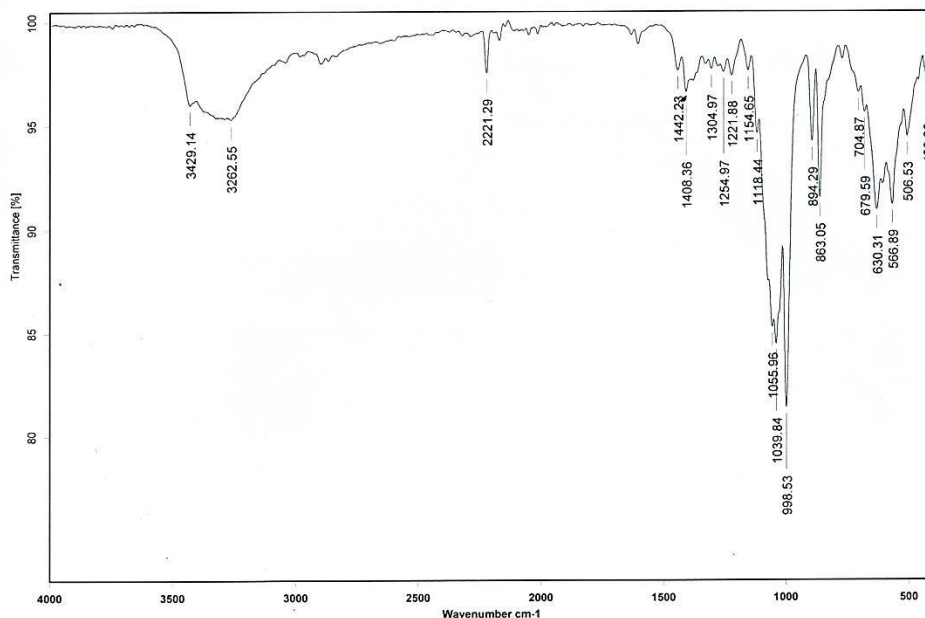
Espectro 76. Experimento NOESY en DMSO-d<sub>6</sub> para el compuesto (17).



Espectro 77. Experimento HSQC en DMSO-d<sub>6</sub> para el compuesto (17).

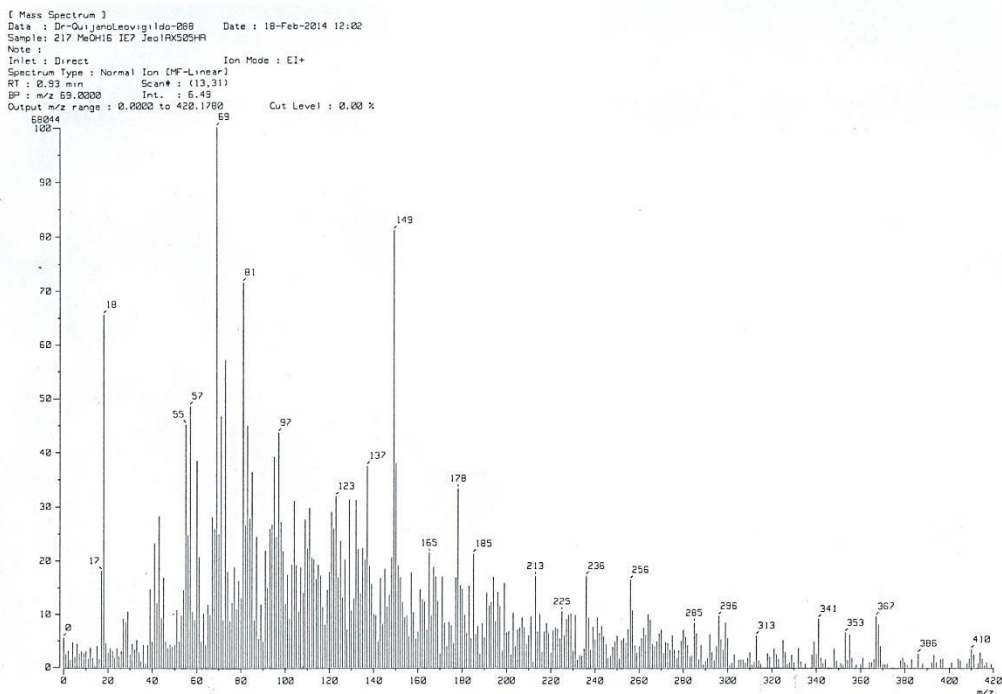


Espectro 78. Experimento HMBC en DMSO-d<sub>6</sub> para el compuesto (17).

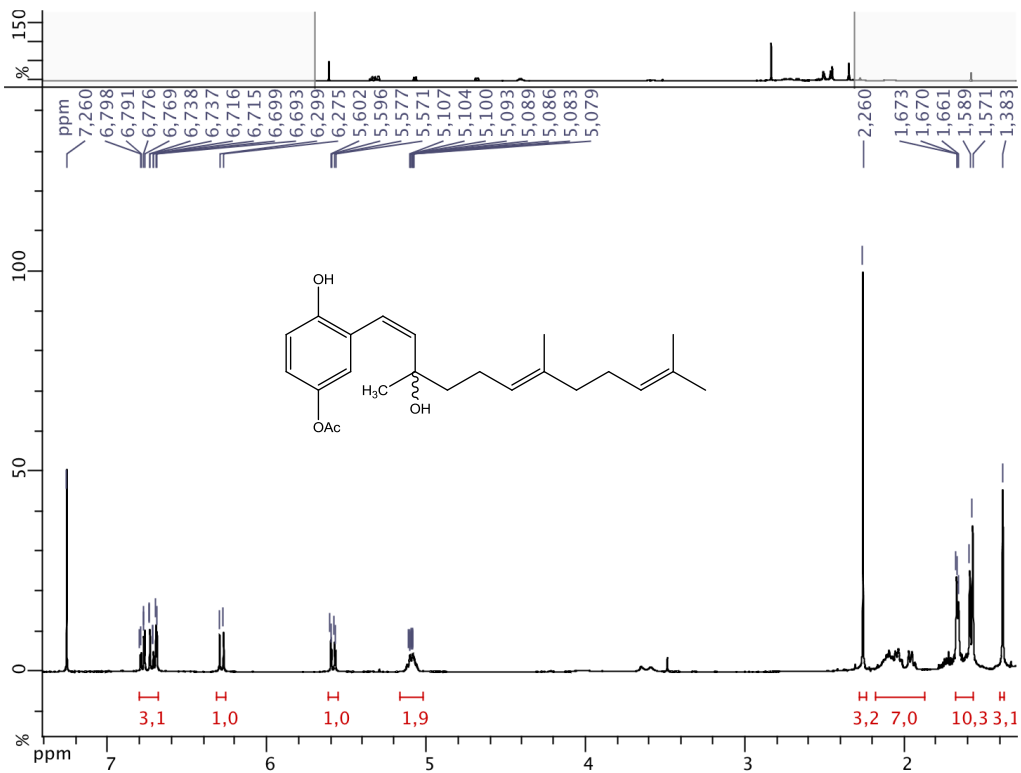


Dr.L.Quijano Solido MeOH16 KBr/Pastilla RPM 30/09/2013

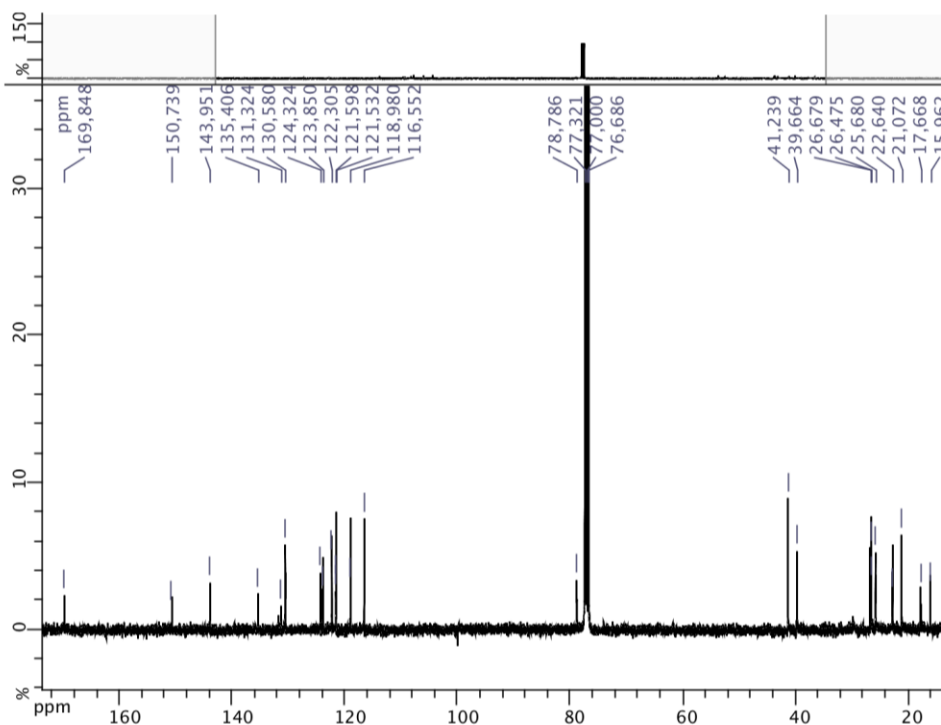
Espectro 79. Espectro IR para el compuesto (17).



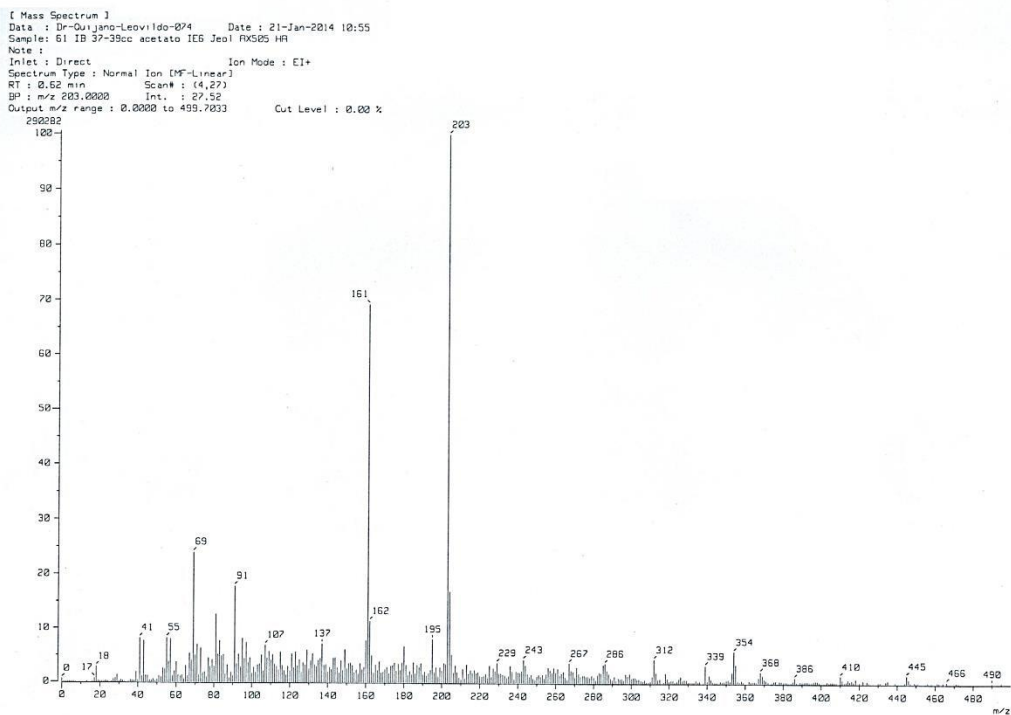
Espectro 80. Espectro de masas por I.E. para el compuesto (17).



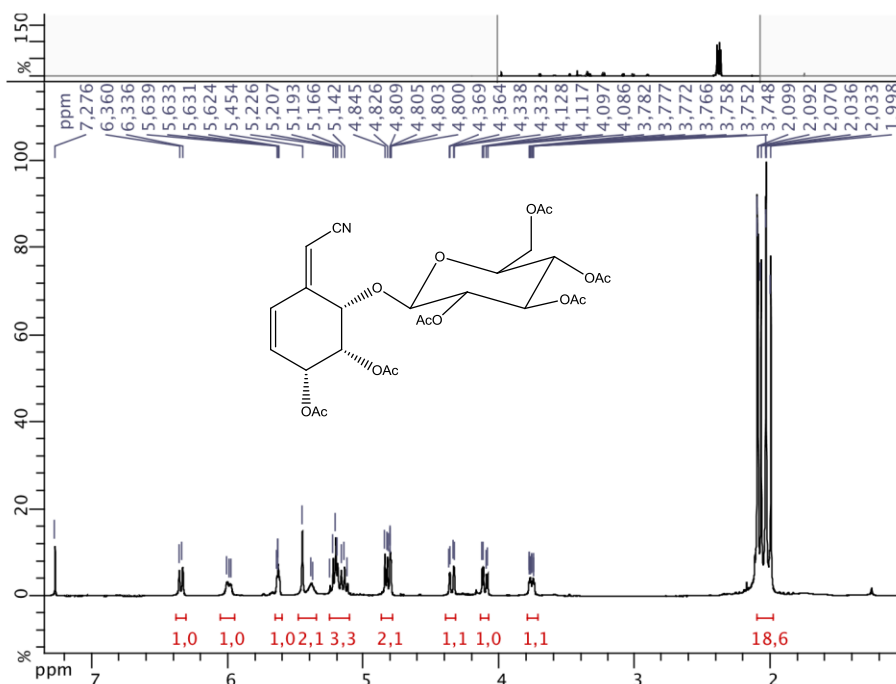
Espectro 81. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) para el compuesto **(19)**.



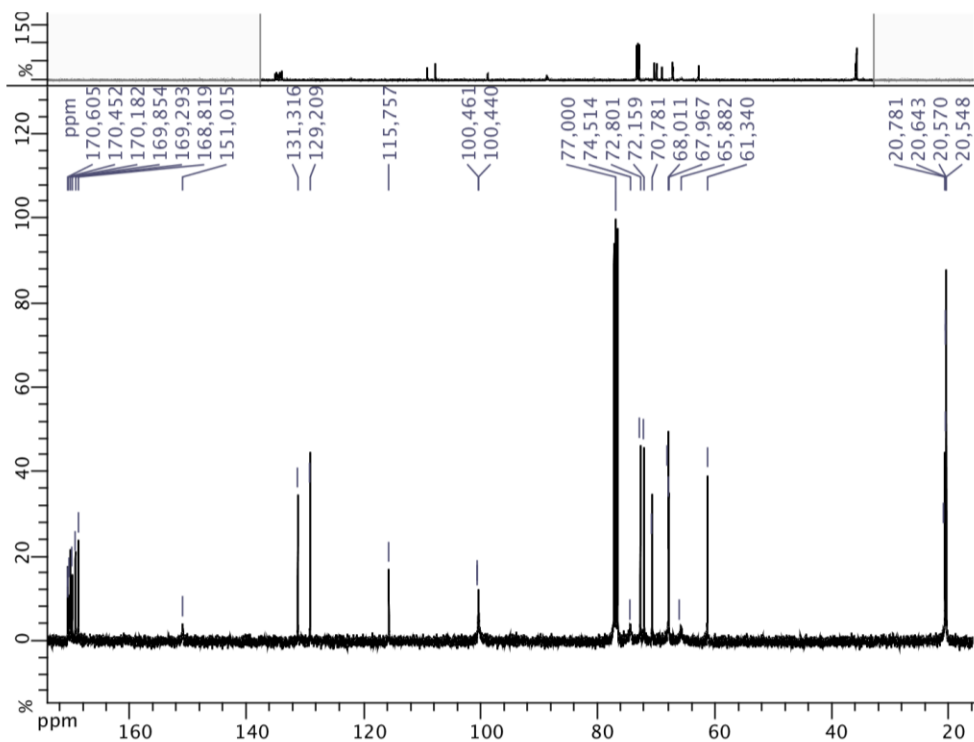
Espectro 82. RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) para el compuesto **(19)**.



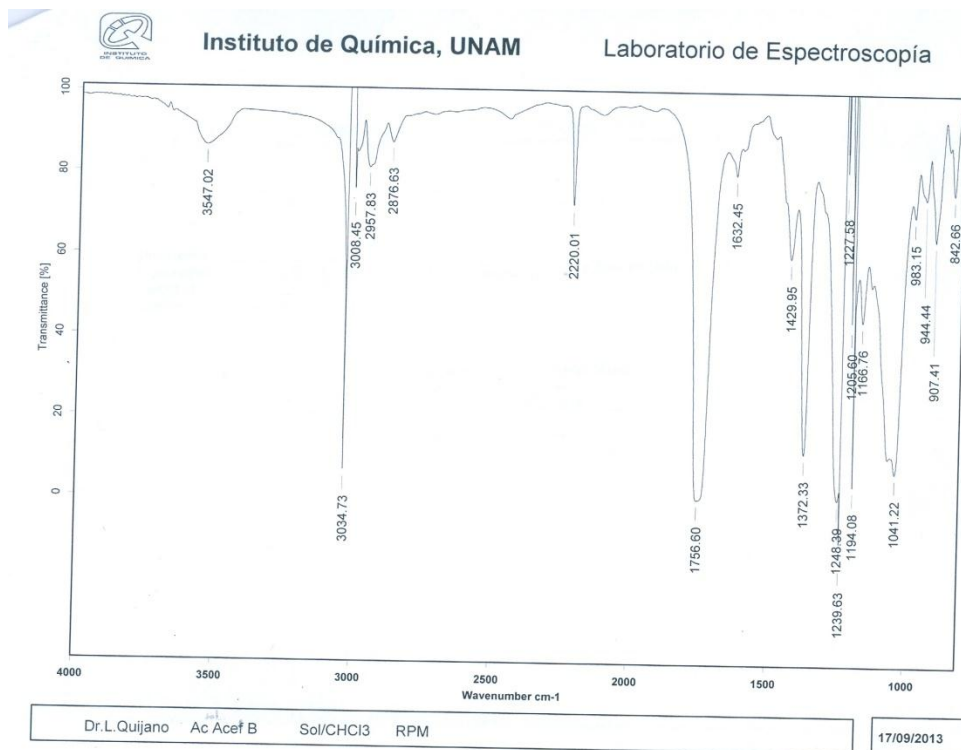
Espectro 83. Espectro de masas por I.E. para el compuesto (19).



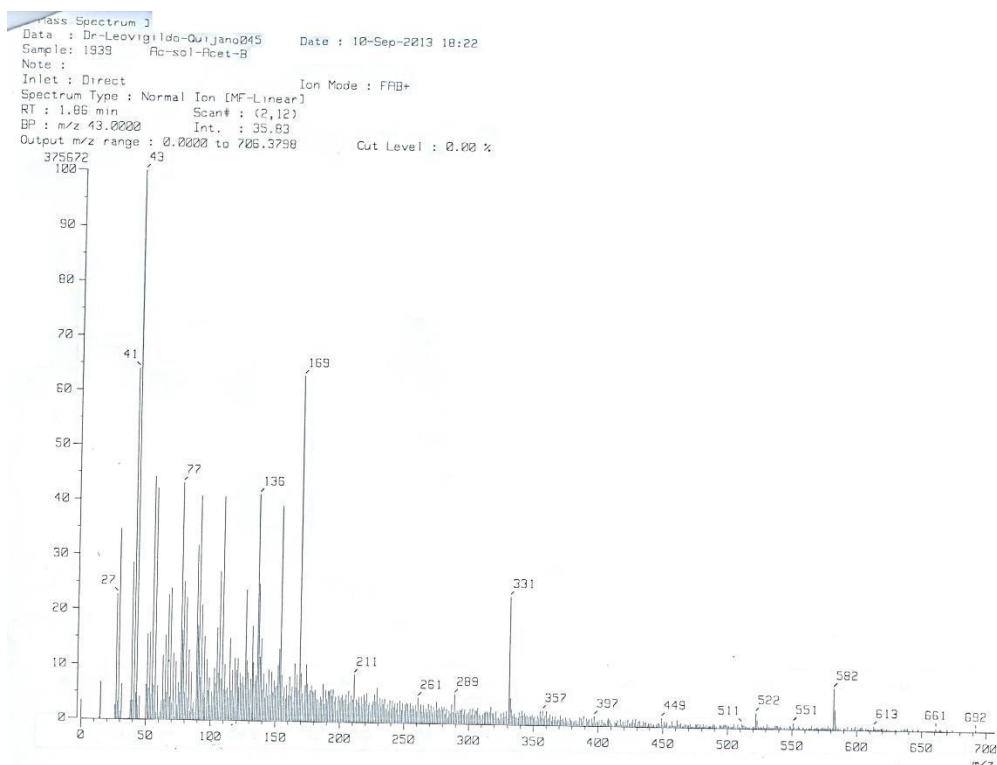
Espectro 84. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) para el compuesto (24).



Espectro 85. RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) para el compuesto (24).



Espectro 86. Espectro IR para el compuesto (24).



Espectro 87. Espectro de masas por I.E. para el compuesto (24).

Tabla 1. Datos comparativos del compuesto 17, riachina y litospermósido en DMSO-d<sub>6</sub>.

| Compuesto aislado<br>DMSO, 400 MHz<br>p.f = 217-220°C<br>[α] <sub>D</sub> = -167 (H <sub>2</sub> O) |                  |                   | Riachina de <i>Bauhinia pentandra</i> <sup>67</sup><br>DMSO, 500 MHz<br>p.f. = 221-223°C<br>[α] <sub>D</sub> = +29 (H <sub>2</sub> O) |                  |                   |                   | Litospermósido de <i>Cercis chinensis</i> <sup>64</sup><br>DMSO, 500 MHz<br>[α] <sub>D</sub> = -137 (DMSO-d <sub>6</sub> ) |                  |                   |                   |
|---|------------------|-------------------|---|------------------|-------------------|-------------------|--|------------------|-------------------|-------------------|
| No  | δ <sup>1</sup> H | δ <sup>13</sup> C | δ <sup>1</sup> H  | Δ <sup>1</sup> H | δ <sup>13</sup> C | Δ <sup>13</sup> C | δ <sup>1</sup> H   | Δ <sup>1</sup> H | δ <sup>13</sup> C | Δ <sup>13</sup> C |
| 1   | -                | 155.15            | -   | -                | 154.14            | 1.0               | -  | -                | 155.3             | -0.1              |
| 2   | 6.20             | 126.26            | 6.17  | 0.03             | 125.09            | 1.17              | 6.21   | -0.01            | 125.9             | -0.6              |
| 3   | 5.93             | 138.26            | 5.90  | 0.03             | 139.52            | -1.26             | 6.01   | -0.08            | 138.1             | 0.2               |
| 4   | 4.24             | 67.56             | 4.43 s  | <b>0.19</b>      | 65.29             | <b>2.27</b>       | 4.02   | <b>0.22</b>      | 69.8              | <b>-2.2</b>       |
| 5   | 4.02             | 69.26             | 4.03 s  | 0.01             | 68.62             | 0.64              | 3.67   | <b>0.35</b>      | 73.5              | <b>4.2</b>        |
| 6   | 4.68             | 75.79             | 4.54  | <b>0.14</b>      | 76.62             | 0.83              | 4.55   | <b>0.13</b>      | 75.3              | 0.5               |
| 7   | 5.67             | 96.23             | 5.69 s  | -0.02            | 98.66             | <b>-2.43</b>      | 5.68   | -0.01            | 96.8              | -0.5              |
| CN  | -                | 117.29            | -   |                  | 117.63            | -0.34             | -  | -                | 117.1             | 0.2               |
| 1'  | 4.46             | 100.45            | 4.37  | 0.09             | 103.08            | <b>-2.63</b>      | 3.16   | <b>-0.14</b>     | 102.3             | <b>-1.8</b>       |
| 2'  | 3.24             | 72.91             | 2.88 m  | <b>0.36</b>      | 73.34             | -0.43             |  | 0.08             | 73.0              | 0.1               |
| 3'  | 3.17             | 76.38             | 3.12 m  | 0.05             | 76.82             | -0.44             |  | 0.01             | 76.5              | -0.1              |
| 4'  | 3.02             | 70.19             | 3.07 m  | -0.05            | 69.97             | 0.22              |  | 0.00             | 70.1              | 0.1               |
| 5'  | 3.13             | 77.06             | 3.14 m  | 0.01             | 76.73             | 0.33              |  | -0.03            | 76.9              | 0.2               |
| 6'a   | 3.42             | 61.37             | 3.47 m  | -0.05            | 61.24             | 0.13              | 3.42   | 0.00             | 61.5              | -0.1              |
| 6'b   | 3.68             |                   | 3.63 m  | 0.05             |                   |                   | 3.67   | 0.01             |                   |                   |



Tabla 2. Datos comparativos de dasycarponina, griffonina y el compuesto aislado **17**.

| Compuesto aislado de <i>W. urens</i><br>D <sub>2</sub> O, 400 MHz<br>p.f 217-220 °C<br>[α] <sub>D</sub> = -167 (H <sub>2</sub> O) |                  |                   | Dasycarponina de <i>T. dasycarpum</i> <sup>57</sup><br>D <sub>2</sub> O, 90 MHz<br>p.f 253-255°C<br>[α] <sub>D</sub> = -11 (H <sub>2</sub> O) |                  |                   |                   | Griffonina<br><i>G. simplicifolia</i> <sup>56</sup><br>D <sub>2</sub> O, 250 MHz<br>p.f 263-265°<br>[α] <sub>D</sub> = -149 (H <sub>2</sub> O) |                  |
|---|------------------|-------------------|---|------------------|-------------------|-------------------|--|------------------|
| No  | δ <sup>1</sup> H | δ <sup>13</sup> C | δ <sup>1</sup> H  | Δ <sup>1</sup> H | δ <sup>13</sup> C | Δ <sup>13</sup> C | δ <sup>1</sup> H   | Δ <sup>1</sup> H |
| 1   | -                | 155.57            | -   | -                | 155.4             | 0.17              | -  | -                |
| 2   | 6.36             | 128.22            | 6.35  | 0.01             | 128.5             | -0.28             | 6.05   | <b>0.06 Inv.</b> |
| 3   | 6.06             | 137.03            | 6.05  | 0.01             | 139.8             | <b>-2.77</b>      | 6.30   | <b>0.01 Inv.</b> |
| 4   | 4.52             | 68.39             | 4.28  | <b>0.24</b>      | 68.1              | 0.29              | 4.25   | <b>0.27</b>      |
| 5   | 4.30             | 70.09             | 3.1-4.0   | -                | 79.4              | <b>-9.31</b>      | 3.95   | <b>0.35</b>      |
| 6   | 4.98             | 76.71             | γ<br>4.6-5.0  | -                | 72.0              | <b>4.71</b>       | 4.80   | <b>0.18</b>      |
| 7   | 5.65             | 97.85             | 5.70  | -0.05            | 102.5             | <b>-4.65</b>      | 5.57   | 0.08             |
| CN  | -                | 118.73            | -   | -                | 120.1             | <b>-1.27</b>      | -  | -                |
| 1'  | 4.74             | 101.17            | 3.1-4.0   | -                | 105.3             | <b>-4.13</b>      | 4.11   | -                |
| 2'  | 3.43             | 73.51             | γ   | -                | 75.6              | -2.09             | 3.82   | -                |
| 3'  | -<br>3.47        | 76.98             | 4.6-5.0   | -                | 78.6              | -1.62             | 3.45-3.8   | -                |
| 4'  | 3.52             | 76.60             |   | -                | 71.3              | <b>5.30</b>       |  | -                |
| 5'  | -<br>3.56        | 70.49             |   | -                | 78.3              | <b>-7.81</b>      |  | -                |
| 6'a   | 3.92             | 61.58             |   | -                | 63.2              | -1.62             |  | -                |
| 6'b   | 3.75             |                   |   | -                |                   |                   |  | -                |

Tabla 3. Datos comparativos del compuesto **17** y el litospermósido en D<sub>2</sub>O.

| Compuesto aislado<br>p.f 217-220°C<br>[α] <sub>D</sub> = -167 (H <sub>2</sub> O) |                  |                   | Litospermósido de<br><i>L. purpureo</i> <sup>52</sup><br>D <sub>2</sub> O,(100 o 250 MHz)<br>p.f. : 278-279°C<br>[α] <sub>D</sub> = -156 (H <sub>2</sub> O) |                  |                   |                   | Litospermósido de<br><i>T. rugosum</i> <sup>57</sup><br>p.f. =272-274°C<br>D <sub>2</sub> O, 90 MHz<br>[α] <sub>D</sub> = -138 (H <sub>2</sub> O) |                  |                   |                   | Litospermósido sintético <sup>69</sup><br>400 MHz D <sub>2</sub> O (ref. HDO: 4.79)<br>p.f. = 271°C<br>[α] <sub>D</sub> = -148 (H <sub>2</sub> O) |                  |                   |                   |
|--|------------------|-------------------|---|------------------|-------------------|-------------------|---|------------------|-------------------|-------------------|---|------------------|-------------------|-------------------|
| No   | δ <sup>1</sup> H | δ <sup>13</sup> C | δ <sup>1</sup> H  | Δ <sup>1</sup> H | δ <sup>13</sup> C | Δ <sup>13</sup> C | δ <sup>1</sup> H  | Δ <sup>1</sup> H | δ <sup>13</sup> C | Δ <sup>13</sup> C | δ <sup>1</sup> H  | Δ <sup>1</sup> H | δ <sup>13</sup> C | Δ <sup>13</sup> C |
| 1  | -                | 155.57            | -   | -                | 155.9             | 0.33              | -   | -                | 157.6             | -2.03             | -   | -                | 157.60            | -2.03             |
| 2  | 6.36             | 128.22            | 6.37  | -0.01            | 127.3             | 0.92              | 6.33  | 0.03             | 129.2             | -0.98             | 6.38  | -0.02            | 129.28            | -1.06             |
| 3  | 6.06             | 137.03            | 6.12  | -0.06            | 136.6             | 0.43              | 6.12  | -0.06            | 138.7             | -1.67             | 6.16  | <b>-0.10</b>     | 138.43            | -1.40             |
| 4  | 4.52             | 68.39             | 4.30  | <b>0.22</b>      |                   |                   | 4.28  | <b>0.24</b>      | 76.2              | <b>-7.81</b>      | 4.33  | <b>0.19</b>      | 72.21             | <b>3.82</b>       |
| 5  | 4.30             | 70.09             | 3.96  | <b>0.34</b>      |                   |                   | 3.3-  | -                | 78.5              | <b>-8.41</b>      | 3.99  | <b>0.31</b>      | 76.19             | <b>-6.10</b>      |
| 6  | 4.98             | 76.71             | 4.86  | <b>0.12</b>      |                   |                   | 4.1<br>y<br>4.7-<br>4.9   | -                | 72.3              | <b>4.41</b>       | 4.89  | 0.09             | 78.05             | -1.34             |
| 7  | 5.65             | 97.85             | 5.63  | 0.02             | 97.4              | <b>3.45</b>       | 5.61  | 0.04             | 99.4              | -1.5              | 5.67  | -0.02            | 99.40             | -1.55             |
| CN   | -                | 118.73            | -   | -                | 118               | 0.73              | -   | -                | 120.1             | -1.37             | -   | -                | 119.99            | -1.26             |
| 1'   | 4.74             | 101.17            | -   | -                | -                 | -                 | 3.3-  | -                | 104.9             | -3.73             | 4.92  | <b>-0.18</b>     | 104.83            | <b>3.66</b>       |
| 2'   | 3.43-            | 73.51             | -   | -                | -                 | -                 | 4.1   | -                | 75.3              | 0.21              | 3.4-  | -                | 75.05             | -1.54             |
| 3'   | 3.47             | 76.98             | -   | -                | -                 | -                 |   | -                | 78.4              | -1.42             | 3.6m  | -                | 78.40             | -1.42             |
| 4'   | 3.52-            | 76.60             | -   | -                | -                 | -                 |   | -                | 72.3              | <b>4.3</b>        |   | -                | 78.15             | -1.55             |
| 5'   | 3.56             | 70.49             | -   | -                | -                 | -                 |   | -                | 78.3              | <b>7.81</b>       |   | -                | 71.97             | -1.48             |
| 6'a  | 3.92             | 61.58             | -   | -                | -                 | -                 |   | -                | 63.5              |                   | 3.95  | 0.03             | 63.13             | -1.55             |
| 6'b  | 3.74             |                   | -   | -                | -                 | -                 |   | -                |                   |                   | 3.77  | 0.03             |                   |                   |

Tabla 4. Datos comparativos del compuesto **17** y el compuesto aislado de *S. adoxoides* e *I. warburgii* en D<sub>2</sub>O.

| Compuesto aislado<br>D <sub>2</sub> O, 400 MHz<br>p.f. 217-220°C<br>[α] <sub>D</sub> = -167 (H <sub>2</sub> O)<br>(ref. HDO: 4.78) |                  |                   | Cianoglicósido de<br><i>Semiaquilegia adoxoides</i> <sup>65</sup><br>D <sub>2</sub> O, 300 MHz<br>p.f. = 222°C<br>[α] <sub>D</sub> = -241 (MeOH) |                  |                   |                         | Cianoglicósido de <i>Ilex warburgii</i> <sup>68</sup><br>D <sub>2</sub> O<br>p.f. = 221.223°C<br>[α] <sub>D</sub> = -247 (MeOH) |                  |                   |                   | Producto sintético <i>Ilex warburgii</i> <sup>70</sup><br>D <sub>2</sub> O, 400 MHz<br>(producto aceitoso)<br>[α] <sub>D</sub> = -223 (MeOH)<br>(ref. HDO: 4.79) |                  |                   |                   |
|--|------------------|-------------------|--|------------------|-------------------|-------------------------|---|------------------|-------------------|-------------------|--|------------------|-------------------|-------------------|
| No   | δ <sup>1</sup> H | δ <sup>13</sup> C | δ <sup>1</sup> H   | Δ <sup>1</sup> H | δ <sup>13</sup> C | Δ <sup>13</sup> C       | δ <sup>1</sup> H  | Δ <sup>1</sup> H | δ <sup>13</sup> C | Δ <sup>13</sup> C | δ <sup>1</sup> H   | Δ <sup>1</sup> H | δ <sup>13</sup> C | Δ <sup>13</sup> C |
| 1  | -                | 155.57            | -  | -                | 157.3             | -1.73                   | -   | -                | 154.9             | 0.67              | -  | -                | 155.48            | 0.09              |
| 2  | 6.36             | 128.22            | 6.21   | 0.15             | 130.0             | -1.78                   | 6.37  | -0.01            | 126.2             | <b>2.02</b>       | 6.36   | 0.00             | 128.13            | 0.09              |
| 3  | 6.06             | 137.03            | 5.90   | 0.16             | 138.8             | -1.77                   | 6.06  | 0.00             | 138.1             | <b>-1.07</b>      | 6.07   | -0.01            | 136.92            | 0.11              |
| 4  | 4.52             | 68.39             | <b>4.14</b>  | <b>Inv. 0.16</b> | 71.2              | <b>Inv. 5<br/>-1.81</b> | 4.50  | -0.01            | 68.3              | 0.09              | 4.50-4.54  | 4.52<br>-0.02    | 68.30             | 0.09              |
| 5  | 4.30             | 70.09             | <b>4.35</b>  | <b>Inv. 0.16</b> | 70.2              | <b>Inv. 4<br/>-1.11</b> | 4.30  | 0.00             | 69.1              | 0.99              | 4.29-4.33  | 4.31<br>-0.01    | 70.00             | 0.09              |
| 6  | 4.98             | 76.71             | 4.73   | 0.25             | 78.3              | -1.59                   | 4.95  | 0.03             | 76.4              | 0.31              | 4.97-5.01  | 4.99<br>-0.01    | 76.69             | 0.02              |
| 7  | 5.65             | 97.85             | 5.48   | 0.16             | 99.6              | -1.75                   | 5.66  | -0.02            | 96.3              | <b>1.55</b>       | 5.66   | -0.01            | 97.74             | 0.11              |
| CN   | -                | 118.73            | -  | -                | 120.5             | -1.77                   |   |                  | 117.1             | <b>1.63</b>       | -  | -                | 118.63            | 0.10              |
| 1'   | 4.74             | 101.17            | 4.82   | -0.08            | 102.9             | -1.73                   |   |                  | 100.6             | 0.57              | 4.75   | -0.01            | 101.04            | 0.13              |
| 2'   | 3.43-<br>3.47    | 73.51             | <b>3.36</b>  |                  | <b>72.2</b>       | -                       |   |                  | 73.0              | 0.51              | 3.44-3.46  | 0.01             | 73.40             | 0.11              |
| 3'   |                  | 76.98             | <b>3.29</b>  |                  | <b>78.7</b>       | -                       |   |                  | 76.9              | 0.08              |  |                  | 76.90             | 0.08              |
| 4'   | 3.52-<br>3.56    | 76.60             | <b>3.31</b>  |                  | <b>71.1</b>       | -                       |   |                  | 75.8              | 0.80              | 3.51-3.57  | 0.01             | 76.50             | 0.10              |
| 5'   |                  | 70.49             | <b>3.39</b>  |                  | <b>75.2</b>       | -                       |   |                  | 70.2              | 0.29              |  |                  | 70.38             | 0.11              |
| 6'a  | 3.92             | 61.58             | 3.74   | 0.17             | 63.3              | -1.72                   |   |                  | 61.3              | 0.28              | 3.92   | 0.00             | 61.46             | 0.12              |
| 6'b  | 3.75             |                   | -  | -                |                   |                         | 3.75  | 0.00             |                   |                   |  |                  |                   |                   |

Tabla 5. Datos comparativos del compuesto **24** y los peracetatos del litospermósido, y el compuesto de *I. warburgii* en CDCl<sub>3</sub>.

| No                 | Peracetato del compuesto aislado<br>400 MHz, [α] <sub>D</sub> = -53 (CHCl <sub>3</sub> ). |                 | 5-epi-litospermósido peracetato sintético. <sup>70</sup> 400 MHz,<br>CDCl <sub>3</sub> [α] <sub>D</sub> = -84 (CHCl <sub>3</sub> ). |                  |                 |                   | Litospermósido peracetato sintético <sup>69</sup><br>400 MHz, CDCl <sub>3</sub> , [α] <sub>D</sub> = -100 (CHCl <sub>3</sub> ). |                  |                 |                   |
|--------------------|---|-----------------|---|------------------|-----------------|-------------------|---|------------------|-----------------|-------------------|
|                    | <sup>1</sup> H  | <sup>13</sup> C | <sup>1</sup> H  | Δ <sup>1</sup> H | <sup>13</sup> C | Δ <sup>13</sup> C | <sup>1</sup> H  | Δ <sup>1</sup> H | <sup>13</sup> C | Δ <sup>13</sup> C |
| 1                  | -   | 151.02          | -   |                  | 151.17          | -0.15             | -   | -                | 150.76          | 0.26              |
| 2                  | 6.35 da (9.6)   | 129.21          | 6.33 d (9.8)  | 0.02             | 129.38          | -0.17             | 6.30 da (10)  | 0.05             | 128.77          | 0.44              |
| 3                  | 5.99 dd (9.6, 3.2)  | 131.32          | 5.98 da (9.8)   | 0.01             | 131.49          | -0.17             | 5.98 dd (10, 3.6)   | 0.01             | 131.35          | 0.03              |
| 4                  | 5.63 t (4)  | 65.88           | 5.62-5.64 sa  | 0.00             | 66.03           | -0.15             | <b>5.42- 5.46 m</b>   | -                | 68.97           | <b>-3.09</b>      |
| 5                  | 5.39 sa   | 67.97           | 5.33-5.38 m   | 0.03             | 68.14           | -0.17             | <b>5.26 dd (7.9, 5.8)</b>   | <b>0.13</b>      | 71.67           | <b>-3.70</b>      |
| 6                  | 4.80 m  | 74.51           | 4.79-4.81 sa  | 0.00             | 74.90           | -0.39             | 4.70 dd (7.9 1.3)   | <b>0.10</b>      | 73.99           | 0.52              |
| 7                  | 5.45 s  | 100.44          | 5.44 sa   | 0.01             | 100.63          | -0.19             | 5.42-5.46 m   |                  | 100.33          | 0.11              |
| CN                 | -   | 115.76          | -   | -                | 115.93          | -0.17             | -   | -                | 115.68          | 0.08              |
| 1'                 | 4.83 d (7.6)  | 100.46          | 4.85 d (7.5)  | 0.02             | 100.92          | -0.46             | 4.87 d (7.6)  | -0.04            | 101.88          | <b>-1.42</b>      |
| 2'                 | 5.20 m  | 70.78           | 5.13-5.25 m   | -                | 70.95           | -0.17             | 5.14-5.25 m   | -                | 70.66           | 0.12              |
| 3'                 | 5.23 m  | 72.80           |   | -                | 72.97           | -0.17             |   | -                | 72.77           | 0.03              |
| 4'                 | 5.14 m  | 68.01           |   | -                | 68.18           | -0.17             |   | -                | 68.15           | -0.14             |
| 5'                 | 3.76 m  | 72.16           | 3.73-3.78 m   | -                | 72.33           | -0.17             | 3.74 ddd (7.1, 3.4, 2.4)  | 0.02             | 72.19           | -0.03             |
| 6'a                | 4.35 dd (12.4, 2.4)   | 61.34           | 4.34 dd (12.3, 2.2)   | 0.01             | 61.51           | -0.17             | 4.36 dd (12.3 2.4)  | 0.01             | 61.32           | 0.02              |
| 6'b                | 4.10 dd (12.4, 4.4)   |                 | 4.10 dd (12.3, 4.5)   | 0.00             |                 |                   | 4.11 dd (12.3, 3.4)   | 0.01             |                 |                   |
| CH <sub>3</sub> CO | 2.10  | 20.78           | 2.09  | 0.01             | 20.95           | -0.17             | 2.11  | -0.01            | 20.88           | 0.10              |
|                    | 2.09  | 20.64           | 2.08  | 0.01             | 20.81           | -0.17             | 2.10  | -0.01            | 20.85           | -0.21             |
|                    | 2.07  | 20.57(x2)       | 2.06  | 0.01             | 20.74           | -0.17             | 2.09  | -0.02            | 20.74           | -0.17             |
|                    | 2.04  | 20.55(x2)       | -   | -                | 20.71           | -0.16             | 2.05  | -0.01            | 20.62           | -0.05             |
|                    | 2.03  |                 | 2.02  | 0.01             |                 |                   | 2.03  | 0.00             | 20.61           | -0.06             |
|                    | 2.00  |                 | 1.99 (6 AcO)  | 0.01             |                 |                   | 2.00  | 0.00             | 20.48           | 0.07              |
|                    |   |                 |   |                  |                 |                   |   |                  |                 |                   |
| C=O                | -   | 170.61          | -   | -                | 170.81          | -0.20             | -   | -                | 174.15          | <b>-3.54</b>      |
|                    |   | 170.45          |   |                  | 170.65          | -0.20             |   |                  | 170.72          | -0.27             |
|                    |   | 170.18          |   |                  | 170.38          | -0.20             |   |                  | 170.40          | -0.22             |
|                    |   | 169.85          |   |                  | 170.05          | -0.20             |   |                  | 169.3116        | 0.54              |
|                    |   | 169.29          |   |                  | 169.49          | -0.20             |   |                  | 9.22            | 0.07              |
|                    |   | 168.82          |   |                  | 169.02          | -0.20             |   |                  | 169.05          | 0.23              |
|                    |   |                 |   |                  |                 |                   |   |                  |                 |                   |