



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA
ÁREA ACADÉMICA DE QUÍMICA
Licenciatura en Química

**Aislamiento y cuantificación de la
(+)-ivalina en el té de *Zaluzania triloba***

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO

PRESENTA:

ROSA INÉS ESCAMILLA BAÑOS

ASESOR: Dr. J. JESÚS MARTÍN TORRES VALENCIA

MINERAL DE LA REFORMA, HIDALGO 2010

El presente trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de Química Orgánica, Productos Naturales, del Área Académica de Química de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, bajo la dirección del Dr. J. Jesús Martín Torres Valencia, con recursos del proyecto CONACYT “Estudio químico Biodirigido de especies medicinales del estado de Hidalgo para la obtención de principios activos anticancerosos y antiinflamatorios” (ref. U2-80555).

Esta tesis de licenciatura generó una participación en un Congreso:

Eudesmanóloidas del té de *Zaluzania triloba*. Inés Escamilla Baños, Juan Antonio Gayosso de Lucio, Manuel González Ledesma y J. Martín Torres Valencia. Presentado en el 45° Congreso Mexicano de Química, 29° Congreso Nacional de Educación Química, del 18 al 22 de Septiembre de 2010 en la Riviera Maya, Quintana Roo. Bol. Soc. Quím. Mex. 2010,4, 139 c/117.

Ser excelente es comprender que la vida no es algo que se nos da hecha, si no que tenemos que producir las oportunidades para alcanzar el éxito, levantar los ojos de la tierra, elevar el espíritu y soñar con lograr lo imposible.

Agradecimientos

*Con respeto y gran admiración a mi asesor **Dr. J. Jesús Martín Torres Valencia** por brindarme su apoyo y tiempo para la realización de este trabajo. Por ser una gran persona y por su valiosa amistad, GRACIAS.*

*A todos ustedes que me brindaron su apoyo en todo momento y principalmente por su gran amistad "Muchas Gracias": **Laura Adriana, Luis Felipe, Alejandro y René.***

*A todos los miembros del jurado por sus acertados comentarios durante la revisión para la elaboración de este trabajo, a la **Dra. Maricruz Sánchez Zavala, Dra. Susana Rojas Lima, Dr. Juan Antonio Gayosso de Lucio, Dr. Tomás Eduardo Fernández Martínez y el Dr. José Roberto Villagómez Ibarra.***

Dr. Martín, mi más sincero agradecimiento por haber creído en mí, por brindarme el tiempo necesario para culminar con este trabajo, por ser uno de mis mejores amigos, por escucharme, por sus sabios consejos que me han servido para ser mejor persona tanto emocional como profesionalmente, por esas pláticas tan amenas, esos chistes, el café por las mañanas y sobre todo por ser un gran ser humano, se que siempre contaré con usted.

Dr. Juan, gracias por el tiempo y apoyo que me brindaste para la realización de este trabajo, aunque ha sido poco el tiempo que nos conocemos, fue suficiente para darme cuenta de que eres un gran ser humano y gran ejemplo a seguir.

Dedicatorias

A Dios por darme la fé, por permitirme cumplir con esta gran meta en mi vida.

*A las personas que más amo en la vida **A MIS PADRES** por estar en todo momento. A ti **PAPÁ** por tu gran esfuerzo para que saliera adelante y enseñarme a ser alguien en la vida, por tu paciencia y consejos que los agradezco enormemente. A ti **MAMÁ** por ser mi mejor amiga y nunca dejarme sola. Gracias por creer en mí.*

*A mis hermanos **Maritza** y **Roberto** por su apoyo y consejos, por estar siempre a mi lado y sobre todo por el gran amor que nos tenemos.*

*A mi hermosa sobrina **Valeria** por regalarme bellos momentos, travesuras y sobre todo por enseñarme a ver la vida de otra manera, por la gran experiencia de tener a alguien como tú.*

*A **Israel** por los gratos momentos, por brindarme todo su apoyo. Gracias por el tiempo que has estado a mi lado cuando más te necesité a pesar de los momentos difíciles que hemos pasado nunca me dejaste sola Te Amo.*

ÍNDICE

	Página
ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS	i
RESUMEN-ABSTRACT	1
1. INTRODUCCIÓN	
1.1. Productos naturales, metabolitos primarios y secundarios	2
1.2. La Herbolaria y el té	5
1.3. Lactonas sesquiterpénicas derivadas del eudesmano y guayano	9
2. ANTECEDENTES	
2.1. Especies de <i>Zaluzania</i>	14
2.2. Estudios químicos sobre especies de <i>Zaluzania</i> y compuestos aislados	15
3. OBJETIVOS	24
4. JUSTIFICACIÓN	25
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
5.1. Descripción de <i>Zaluzania triloba</i>	27
5.2. Estudio del extracto de acetato de etilo de la parte aérea de <i>Zaluzania triloba</i>	29
5.3. Decocción de la parte aérea	54
5.4. Maceración acuosa de la parte aérea	58
5.5. Cuantificación de la (+)-ivalina en el té de la parte aérea de <i>Z. triloba</i>	75
5.6. Esterificación de la (+)-ivalina con el ácido de Mosher (S)- (-)- α -metoxi- α -(trifluorometil)fenilacético	80
5.7. Estudio comparativo de las decocciones de la parte aérea de <i>Z. triloba</i> colectada en Mineral de la Reforma y en el Valle del Mezquital del estado de Hidalgo	96
6. CONCLUSIONES	101
7. PARTE EXPERIMENTAL	

7.1. General	103
7.2. Recolección e identificación de la planta	104
7.3. Obtención y separación del extracto de acetato de etilo de la parte aérea de <i>Zaluzania triloba</i>	104
7.4. Decocción de la parte aérea de <i>Zaluzania triloba</i> (Ort.) Pers.	106
7.5. Cuantificación de (+)-ivalina en el té de la parte aérea de <i>Zaluzania triloba</i>	107
7.6. Esterificación de la (+)-ivalina con el ácido de Mosher (S)-(-)- α -metoxi- α -(trifluorometil)fenilacético	108
7.7. Decocción de la parte aérea de <i>Zaluzania parthenioides</i>	109
8. REFERENCIAS	110
9. ANEXOS	114

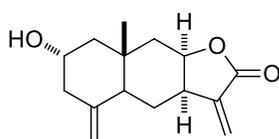
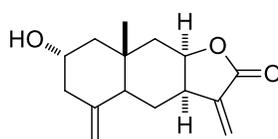
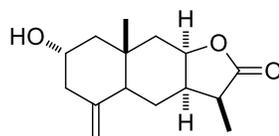
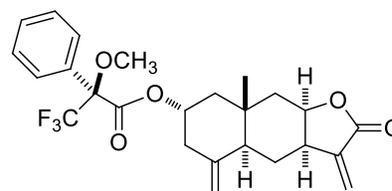
ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

$[\alpha]_D^{20}$	Rotación óptica
AcOEt	Acetato de etilo
APT	Attached proton test (experimento de carbonos unidos a protones)
CC	Cromatografía en columna
CCF	Cromatografía en capa fina
cm	Centímetros
COSY	Correlation spectroscopy (Espectroscopía de correlación)
δ	Desplazamiento químico
DCC	Diciclohexilcarbodiimida
d	Doble
ED	Dosis efectiva
g	Gramos
HMBC	Heteronuclear multiple bond correlation (correlación heteronuclear a distancia múltiple de enlaces)
HMQC	Heteronuclear multiple quantum coherence (correlación heteronuclear usando coherencia cuántica múltiple)
HPLC	High performance liquid chromatography (Cromatografía de líquidos de alta resolución)

Hz	Hertz
IR	Espectro de infrarrojo
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
kg	Kilogramo
L	Litro
MHz	Megahertz
µg	Microgramos
mL	Militros
mV	miliVoltios
°C	Grados Celsius
p.f.	Punto de fusión
ppm	Partes por millón
R _f	Factor de retención
RMN	Resonancia magnética nuclear
t	Señal triple
td	Señal triple de dobles
UV	Ultravioleta

RESUMEN

De las partes aéreas de *Zaluzania triloba* se obtuvieron (+)-ivalina (**1**), (+)-acetilivalina (**2**) y (+)-11 α ,13-dihidroivalina (**3**). Las sustancias se identificaron mediante espectroscopía de RMN en 1D y 2D y por comparación con datos descritos. La extracción acuosa (té) de planta seca (2.5 g) contiene aproximadamente 1.2% de la lactona sesquiterpénica **1**, por lo que cuando se ingiere tal cantidad de infusión (250 mL), una dosis terapéutica de alrededor de 30 mg del agente antileucémico (+)-ivalina (**1**) puede ser incorporada en el organismo. Adicionalmente se preparó el éster de Mosher de la (+)-ivalina (**4**) con la finalidad de complementar su caracterización.

(+)-ivalina (**1**)(+)-acetilivalina (**2**)(+)-11 α ,13-dihidroivalina (**3**)éster de Mosher de la (+)-ivalina (**4**)

ABSTRACT

The aerial parts of *Zaluzania triloba* afforded (+)-ivalin (**1**), (+)-acetyl ivalin (**2**), and (+)-11 α ,13-dihydroivalin (**3**). The substances were identified by 1D and 2D NMR spectroscopy in comparison with published data. The water infusion (tea) preparation from air-dried plant material (2.5 g) contains ca. 1.2% of the sesquiterpene lactone **1**, envisaging that when such infussion is ingested (250 mL), a therapeutic dose around 30 mg of the antileucemic agent (+)-ivalin (**1**) may be incorporated into the organism. In addition, Mosher's ester (**4**) from (+)-ivalin was prepared in order to complement its characterization.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Productos naturales, metabolitos primarios y secundarios

Los productos naturales son sustancias que se encuentran en la naturaleza y que podemos aislar y procesar. Su estructura puede ser de naturaleza orgánica, inorgánica, o una combinación de ambas. Generalmente, llamamos productos naturales a las sustancias que obtenemos de fuentes medicinales o nutrimentales. También denominamos como productos naturales a los compuestos que obtenemos de organismos vivos tales como bacterias, hongos, algas, animales y vegetales. Dichos organismos generan dos tipos principales de compuestos conocidos como metabolitos primarios y metabolitos secundarios, los cuales se distinguen por la función que desempeñan dentro del organismo que los produce; si tienen función vital (nacer, crecer, reproducirse, etc.) se clasifican como primarios, mientras que si no es así, son considerados como secundarios. De estos últimos, en la mayoría de las veces se desconoce la función que desempeñan en el organismo. Usualmente, a los metabolitos secundarios se les denomina como productos naturales. Tales compuestos, a diferencia de los metabolitos primarios que son casi universales en los organismos, son de una distribución limitada en la naturaleza y característicos de una familia o género, e inclusive de una especie. Ejemplos de metabolitos primarios son las proteínas, los ácidos nucleicos, los polisacáridos y las grasas, mientras que

los terpenos, los alcaloides y los policétidos son considerados como metabolitos secundarios

Frecuentemente, los metabolitos secundarios son los que más despiertan el interés de químicos, biólogos y farmacólogos, ya que poseen estructuras variadas, desde simples hasta muy complejas, y actividades biológicas importantes y específicas. En general, los compuestos responsables de los aromas, los colores y los principios activos de una especie son metabolitos secundarios.

En la mayoría de las ocasiones el estudio sobre productos naturales se ha enfocado hacia los extractos y sustancias de plantas terrestres que tienen un uso terapéutico, siendo este tipo de análisis los que generan la mayor parte de los compuestos biológicamente activos (Dewick, 2009). Es así que los productos naturales y la medicina han estado estrechamente relacionados a través del uso de la Medicina Tradicional, cuyos estudios químicos, farmacológicos y clínicos han sido base de la mayoría de los medicamentos que conocemos. Por ejemplo, la cocaína (**5**), aislada del árbol de coca (*Erythroxylum coca*), sirvió de modelo para la síntesis de medicamentos que contienen principios activos como la benzocaína (**6**), la lidocaína (**7**) y la procaína (**8**) (Figura 1), empleados actualmente como anestésicos locales. De tal manera que la investigación sobre productos naturales ha permitido contar con sustancias altamente promisorias para la cura de diversas enfermedades, como por ejemplo la artritis, algunos tipos de cáncer e infecciones causadas por hongos, bacterias y virus (Cortez et al., 2004).

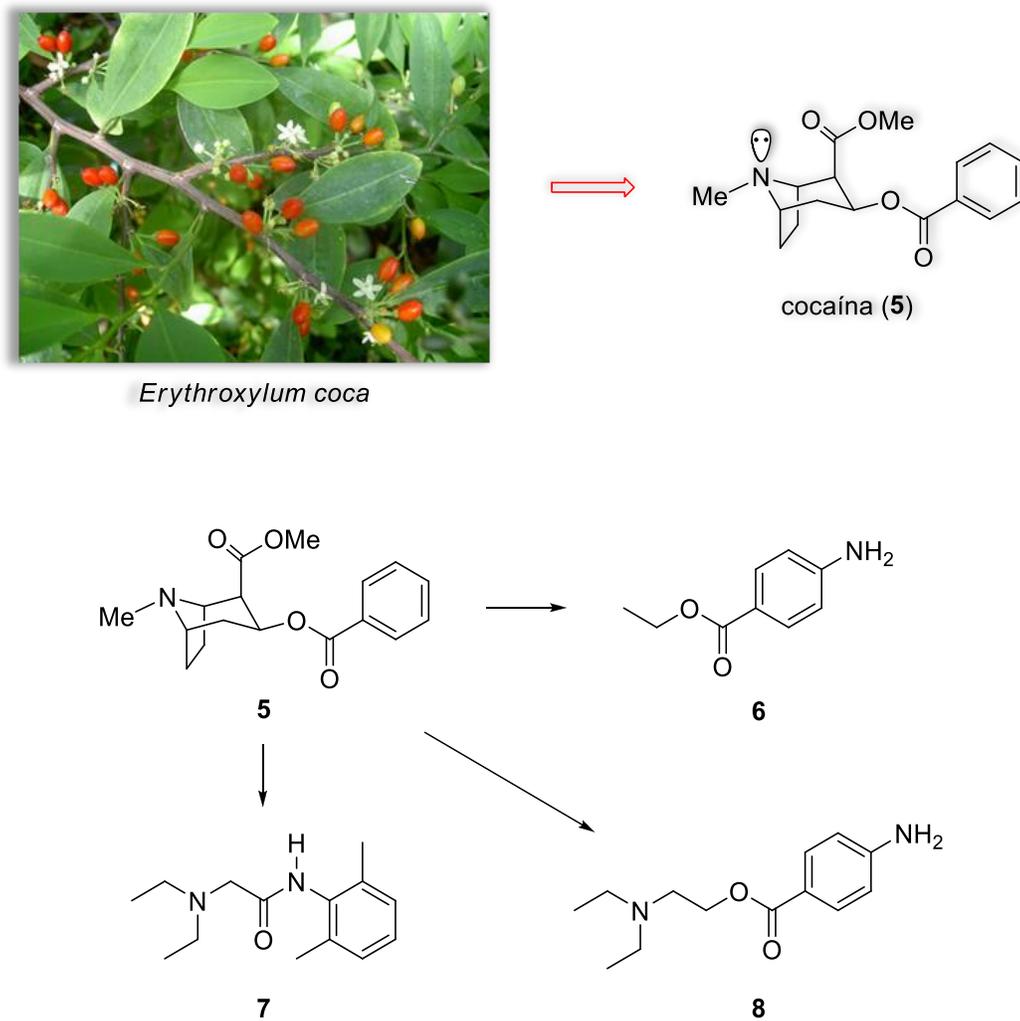


Figura 1. Imagen del árbol *Erythroxylum coca*, estructuras de la cocaína (5) y los anestésicos locales benzocaína (6), lidocaína (7) y procaína (8).

1.2. La Herbolaria y el té

La herbolaria estudia las propiedades curativas de plantas y hierbas medicinales que nos provee la naturaleza. Es una forma de medicina alternativa que desde hace siglos se ha practicado. Desde sus inicios tanto las comunidades primitivas como los egipcios, griegos y romanos en su necesidad de curar sus dolores, padecimientos y enfermedades, tuvieron en la herbolaria el vehículo adecuado



para cuidar su salud y tener una mejor calidad de vida, herencia que después se vio enriquecida de manera clave por la contribución del Lejano Oriente y sobre todo por la gran tradición herbolaria del Nuevo Mundo, en especial México.

Dependiendo de la planta y del tratamiento, toda la especie o parte de ella es utilizada para el remedio. En medicina tradicional, pueden utilizarse hierbas frescas, en forma de infusión, o se pueden secar, cortar y pulverizar para su uso.

Generalmente, el empleo de las especies medicinales es a manera de *té*, aunque también se usan en forma de cataplasmas, “pomadas”, y en forma de aromas (aromaterapia). Como es bien conocido, en el mercado se venden varias plantas

medicinales y es común encontrar en las tiendas y supermercados diversas marcas de té que se usan para varios padecimientos, principalmente como tranquilizantes, antiinflamatorios, antipiréticos o simplemente por su olor agradable y sabor (Tabla 1). El éxito de estos productos naturales es debido a que efectivamente contienen principios activos que ayudan en los padecimientos para los que son empleados, aparte de que son económicos y fáciles de usar (Lozoya-Legorreta, 1994).

Tabla 1. Té comerciales y sus propiedades medicinales.

Té (especie)	Propiedades atribuidas
7 Azhates: naranjo (<i>Citrus aurantium</i>), rosas (<i>Rosa spp.</i>), tila (<i>Tilia mexicana</i>), sauco mexicano (<i>Sambucus mexicana</i>), manzanilla (<i>Matricaria chamomilla</i>), romero (<i>Rosmarinus officinalis</i>), toronjil (<i>Melissa officinalis</i>).	Cada una de ellas con beneficios específicos y de efecto profundamente tranquilizante ya que, no sólo se destina al sistema nervioso, sino también al circulatorio (presión), a la piel, a descansar los sentidos y al sistema digestivo.
Anís (<i>Pimpinella anisum</i>)	Evita trastornos digestivos, cólicos y gases estomacales.
Canela (<i>Cinnamomun zeylanicum</i>)	Actúa como un suave astringente, ayuda a las molestias de la diarrea.
Hierbabuena (<i>Menta viridis</i>)	Refuerza el estómago, es útil en la preparación de comidas, calma cólicos estomacales, trastornos de la digestión, cáncer de estómago; elimina parásitos intestinales, la ronquera y el reumatismo.
Jamaica (<i>Hibiscus sabdariffa</i>)	Favorece de buena manera el proceso digestivo, es ligeramente laxante, es diurética,

	antiparasitaria y puede llegar a ser muy bueno para tratar el colesterol.
Limón (<i>Citrus aurantifolium</i>)	Combate la hinchazón intestinal, favorece la digestión estomacal, descongiona el hígado y es un desintoxicante natural.
Manzanilla (<i>Matricaria chamomilla</i>)	Estimula el apetito, la secreción de jugo gástrico, favorece la digestión, combate los gases intestinales, facilita y favorece la menstruación, alivia la conjuntivitis. Actúa contra enfermedades nerviosas, fiebres, calambres, inflamaciones, reumatismo e insomnio.
Naranja (<i>Citrus aurantium</i>)	Sirve como calmante de los nervios.
Negro (<i>Camellia sinensis</i>)	Ayuda a despejar la mente y activa el organismo.
Rojo (<i>Camellia sinensis</i>)	Reduce el nivel de grasas y elimina el colesterol del organismo.
Tila (<i>Ternstroemia sylvatica</i>)	Ataques de histerismo y los cólicos nefríticos.
Verde (<i>Camellia sinensis</i>)	Prolonga la juventud ya que tiene gran cantidad de antioxidantes.

(Martínez, 1979).

En el trabajo presente se llevó a cabo el estudio químico del extracto de acetato de etilo (AcOEt) de la parte aérea de *Zaluzania triloba* (Ort.) Pers. (Figura 2), la cual es una especie que se usa en medicina tradicional como antiinflamatorio, para el dolor de estómago y para curar heridas agusanadas de animales (Villavicencio, 2009). El uso de la planta es a manera de decocción.

El estudio químico condujo a la obtención y caracterización de sus componentes mayoritarios, entre ellos la sustancia conocida como (+)-ivalina (**1**) (Figura 2), cuyos

estudios biológicos han demostrado que posee actividad antileucémica importante. (Topçu et al., 1993) Debido a lo anterior, se decidió cuantificar el compuesto **1** en la extracción acuosa (infusión) de la parte aérea de la especie.



Zaluzania triloba

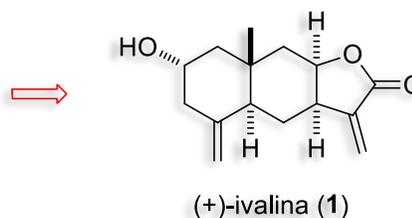


Figura 2. Imagen de *Zaluzania triloba* y estructura de la (+)-ivalina (**1**).

El compuesto **1**, pertenece a una clase particular de terpenos denominados lactonas sesquiterpénicas tipo eudesmanólida. Para mejor comprensión de estos conceptos se describe el siguiente tema.

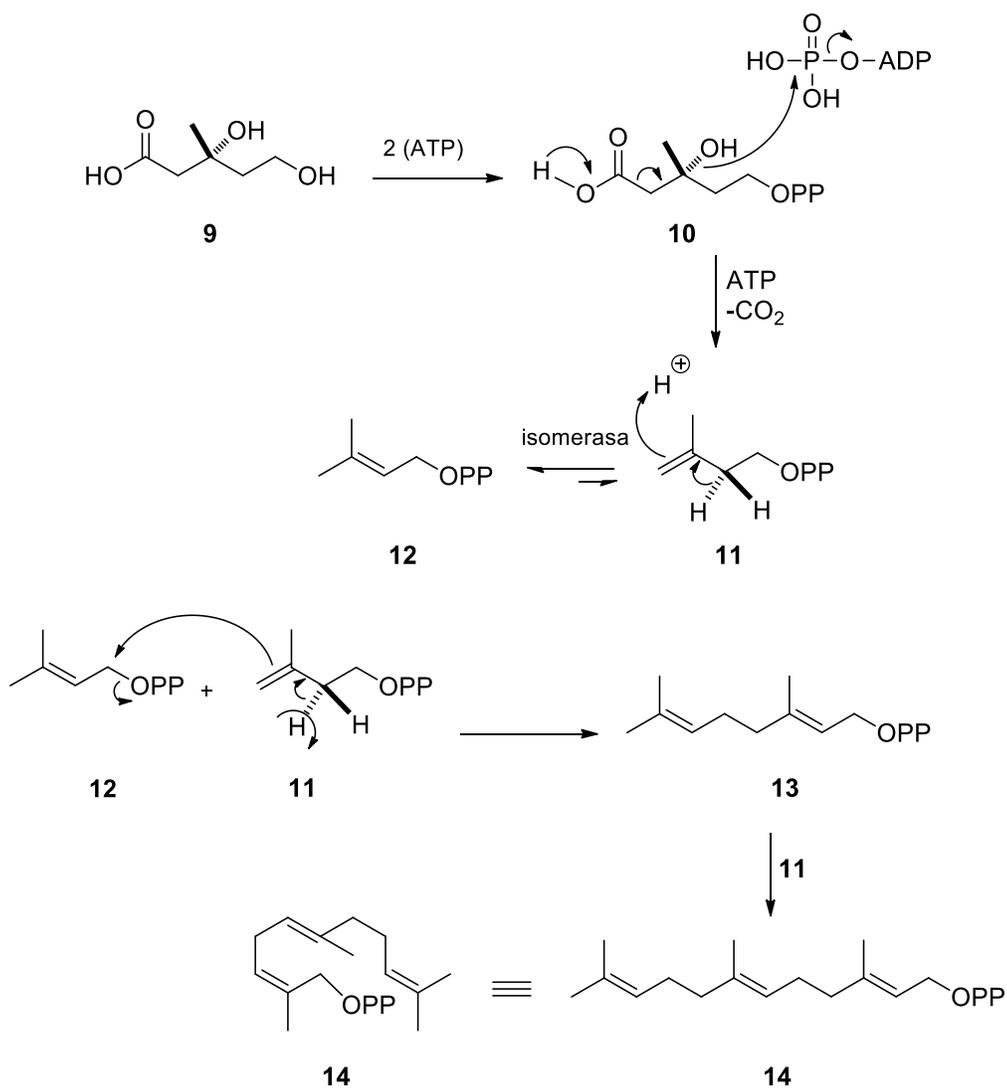
1.3. Lactonas sesquiterpénicas derivadas del eudesmano y guayano

Como se mencionó antes, los metabolitos secundarios (productos naturales) están representados por 3 grandes familias de compuestos: los **terpenos**, los **alcaloides** y los **policétidos**. Los terpenos son sustancias que se generan en los organismos mediante la ruta biosintética del ácido mevalónico (**9**). Este metabolito mediante una fosforilación del OH primario da lugar al intermediario **10**, el cual posteriormente por descarboxilación y pérdida de OH conduce al difosfato de isopentenilo (**11**). **11** puede convertirse en el difosfato de dimetilalilo (**12**) mediante la acción de una enzima denominada isomerasa (Esquema 1). Los difosfatos de isopentenilo (**11**) y dimetilalilo (**12**) representan unidades de cinco átomos de carbono denominadas isoprénicas y son los que participan en la formación de terpenos (Dewick, 2009). Dependiendo del número de unidades isoprénicas que contenga el metabolito resulta su nombre, como se describe en la Tabla 2.

Tabla 2. Clasificación de terpenos.

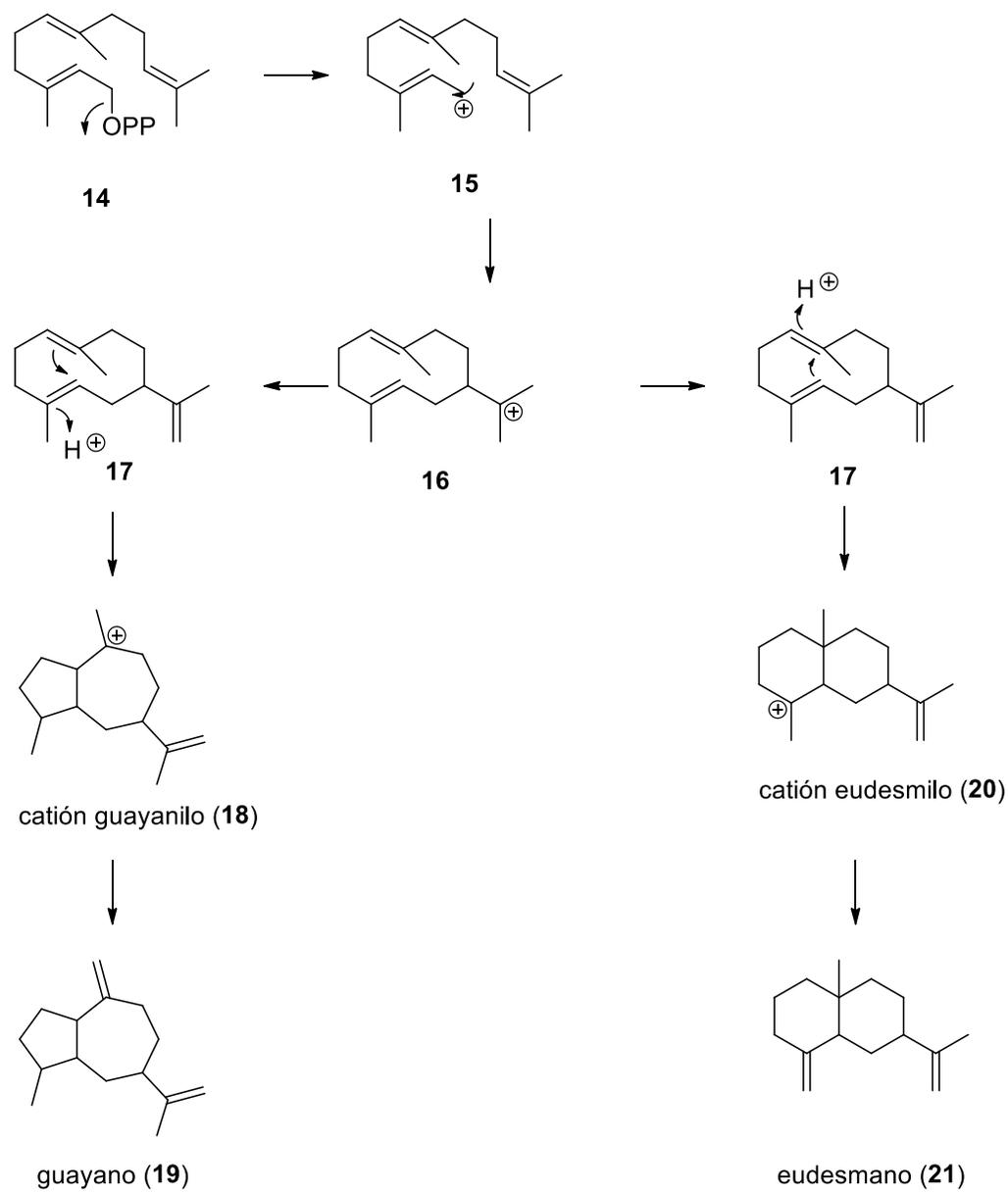
Nombre	Unidades isoprénicas	Átomos de carbono
Hemiterpenos	1	5
Monoterpenos	2	10
Sesquiterpenos	3	15
Diterpenos	4	20
Sesterterpenos	5	25
Triterpenoides	6	30
Tetraterpenos	8	40

Cuando **11** y **12** se combinan resulta una estructura de 10 carbonos denominada difosfato de geranilo (**13**) (Esquema 1), el cual es el precursor de los monoterpenos. A su vez, si una segunda molécula de **11** se adiciona al difosfato de geranilo (**13**), da lugar al difosfato de farnesilo (**14**), considerado como el precursor de los sesquiterpenos.



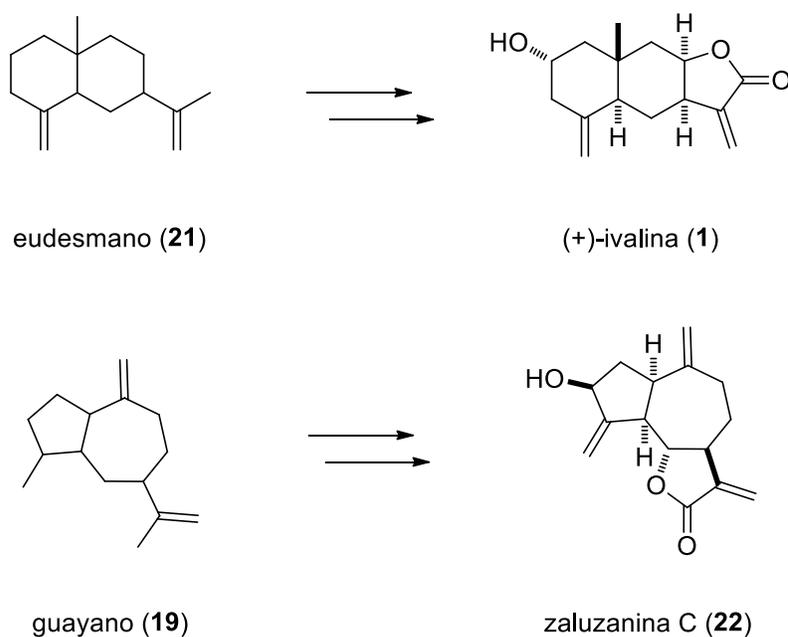
Esquema 1. Biosíntesis de terpenos a partir del ácido mevalónico (**9**).

La pérdida del grupo fosfato en **14**, genera el catión farnesilo (**15**) que puede conducir al catión germacrilo (**16**) de la manera como se muestra en el Esquema 2. Posteriormente, la salida de un protón produce el germacrano (**17**). Este último, mediante una serie de reacciones en las que se involucran reordenamientos de Wagner-Meerwein, puede conducir por un lado al catión guayanilo (**18**), que por pérdida de un protón genera el guayano (**19**), o por otro lado al catión eudesmilo (**20**), el cual también mediante la salida de un protón da lugar al eudesmano (**21**) (Dewick, 2009).



Esquema 2. Biosíntesis de los esqueletos hidrocarbonados del guayano (**19**) y eudesmano (**21**).

Generalmente, estos esqueletos carbocíclicos son funcionalizados en varias posiciones por oxígenos, formando alcoholes, cetonas o ácidos carboxílicos. En varias ocasiones se aíslan en forma de lactonas, en cuyo caso el nombre de los compuestos toma la terminación “ólida”. Por ejemplo, la (+)-ivalina (**1**) es una eudesmanólida, mientras que la zaluzanina C (**22**) es una guayanólida (Romo de Vivar et al., 1967) (Esquema 3). Ambas son denominadas también como lactonas sesquiterpénicas (Dewick, 2009).



Esquema 3. Los esqueletos de eudesmano y guayano conducen a eudesmanólidas y guayanólidas, respectivamente.

2. ANTECEDENTES

2.1. Especies de *Zaluzania*

El género *Zaluzania* (Compositae) comprende alrededor de 32 especies (Tabla 3), de las cuales 11 son endémicas en México y 5 crecen en el estado de Hidalgo (Plantsystematics, 2010; Yabuta et al., 1978; Pérez-Escandón et al., 2003).

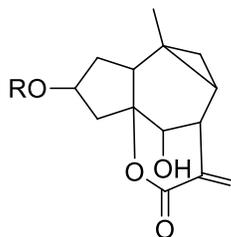
Tabla 3. Especies conocidas de *Zaluzania* (Compositae).

Especie	Especie
<i>Z. angusta</i> Benth. & Hook. F.	<i>Z. montagnaefolia</i> A. Gray
<i>Z. anthemidifolia</i> B.L. Roob. & Greenm	<i>Z. myriophylla</i> Sch. Bip.
<i>Z. asperrima</i> Sch. Bip.	<i>Z. nonesis</i> Hieron. ex Sod.
<i>Z. augusta</i> Sch. Bip. *	<i>Z. oppositifolia</i> Sch. Bip.
<i>Z. cinerascens</i> Sch. Bip.	<i>Z. parthenioides</i> (DC.) Rzedowski* ⁺
<i>Z. coulteri</i> Hemsl.*	<i>Z. pinnatilobata</i> Sch. Bip.
<i>Z. delgadoana</i> B. L. Turner	<i>Z. pringlei</i> Greenm.
<i>Z. discoidea</i> A. Gray	<i>Z. quitensis</i> Hieron
<i>Z. eminens</i> Hort. Ex F. T. Hubbard	<i>Z. resinosa</i> S. Watson
<i>Z. ensifolia</i> Sch. Bip.	<i>Z. robinsonii</i> W. M. Sharp.* ⁺
<i>Z. globosa</i> Sch. Bip.	<i>Z. sodiroi</i> Hieron
<i>Z. grayana</i> B. L. Rob. & Greenm	<i>Z. squarrosa</i> Sch. Bip.
<i>Z. grayiana</i> B. L. Rob. & Greenm	<i>Z. subcordata</i> W. M. Sharp.
<i>Z. indica</i> Reinw. Ex Blume	<i>Z. triloba</i> (Ort.) Pers.* ⁺
<i>Z. megacephala</i> Sch. Bip.*	<i>Z. trilobata</i> Hoffmgg.
<i>Z. mollissima</i> A. Gray	

*Especies presentes en el estado de Hidalgo. ⁺*Z. triloba*, *Z. parthenioides* y *Z. robinsonii* han sido consideradas como sinónimos. (Plantsystematics, 2010).

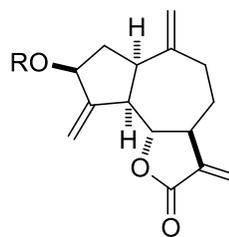
2.2. Estudios químicos sobre especies de *Zaluzania* y compuestos aislados

Se han llevado a cabo estudios químicos sobre algunas de estas especies, evidenciando que las lactonas sesquiterpénicas, denominadas zaluzaninas, son características de este género (Yabuta et al., 1978). Una de las primeras especies estudiadas fue *Z. augusta*, de cuya parte aérea se aislaron en cantidades importantes dos guayanólidas denominadas zaluzanina A (**23**) y zaluzanina B (**24**) (Romo et al., 1967). Posteriormente, de la misma especie se obtuvieron las zaluzaninas C (**22**) y D (**25**), así como la (+)-ivalina (**1**). Estas lactonas también se describieron como componentes de *Z. triloba* (Romo de Vivar et al., 1967) (Figura 3).



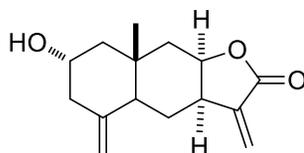
R=H, zaluzanina A (**23**)

R=Ac, zaluzanina B (**24**)



R=H, zaluzanina C (**22**)

R=Ac, zaluzanina D (**25**)



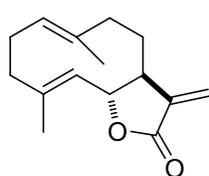
ivalina (**1**)

Figura 3. Metabolitos aislados de *Z. augusta*.

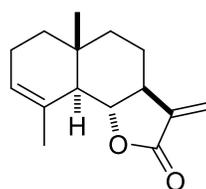
Posteriormente, se describió un estudio para la identificación de lactonas sesquiterpénicas en *Z. triloba*, *Z. parthenioides*, *Z. pringlei* y *Z. montagnaefolia* (Tabla 4). Los estudios establecieron la presencia de las zaluzaninas A (**23**), B (**24**), C (**22**) y D (**25**) en *Z. augusta* y *Z. triloba*, mientras que las lactonas **22** y **25**, así como la (+)-ivalina (**1**) también se encontraron en *Z. parthenioides* y *Z. robinsonii*. Otras lactonas aisladas de *Z. montagnaefolia* fueron la custunólida (**26**) y la α -ciclocustunólida (**27**), y en *Z. pringlei* se identificó a la epitulipinólida (**28**) (Yabuta et al., 1978) (Figura 4).

Tabla 4. Lactonas sesquiterpénicas de especies de *Zaluzania*.

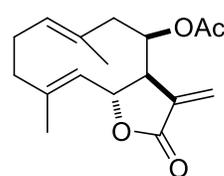
Lactonas sesquiterpénicas							
Especie	22	23	24	25	26	27	28
<i>Z. triloba</i> (Ort.) Pers.	+		+	+			
<i>Z. parthenioides</i> = <i>Z. triloba</i>	+		+	+			
<i>Z. augusta</i> Sch. Bip.		+	+				
<i>Z. montagnifolia</i> A. Gray		+	+		+	+	
<i>Z. pringlei</i> Greenm.							+



custunolida (**26**)



α -ciclocustunólida (**27**)

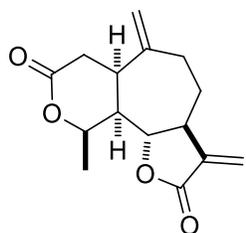


epitulipinólida (**28**)

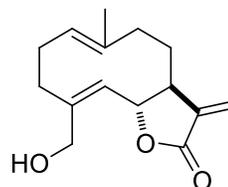
Figura 4. Lactonas sesquiterpénicas aisladas de especies de *Zaluzania*.

La zaluzanina C (**22**) no es exclusiva de especies de *Zaluzania*, también se ha encontrado en la especie *Cynara sibthorpiana* (Abdallah et al., 1984). Esta lactona posee propiedad citotóxica importante, específicamente contra la leucemia linfocítica P-388 (Yabuta et al., 1978; Abdallah et al., 1984).

De *Z. grayana* se aisló **22**, la zaluzanina E (**29**) y la 15-hidroxi-[8-desoxisalonitenólida] (**30**) (Figura 5), siendo la lactona **22** el compuesto mayoritario (Spring et al., 1995).



zaluzanina E (**29**)

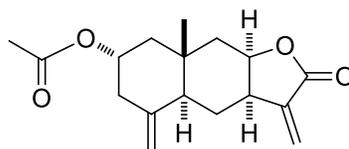


15-hidroxi-[8-desoxisalonitenólida] (**30**)

Figura 5. Compuestos aislados de *Z. grayana*

La (+)-ivalina (**1**) se aisló y caracterizó por vez primera en las especies *Iva microcephala* Nutt e *Iva imbricata* Walt. Del extracto de CHCl₃ de hojas y flores de *I. microcephala* Nutt, se obtuvo **1** en un 1.9% de rendimiento, mientras que de *I. imbricata* Walt. se obtuvo en 0.7% (Herz y Högenauer, 1962). Debido al aislamiento de **1** tanto en *Z. triloba* como en *I. imbricata* e *I. microcephala* se evidenció la existencia de una relación estrecha entre estos géneros (Romo de Vivar et al., 1967).

Por otro lado, de *Inula royleana* DC. (sin. *Inula racemosa* Hook. F.) se aislaron varias lactonas sesquiterpénicas, principalmente eudesmanólicas, entre éstas la (+)-ivalina (**1**) y la (+)-acetilivalina (**2**), este último descrito como producto natural por vez primera (Figura 6) (Bohlmann et al., 1978).



(+)-acetilivalina (**2**)

Figura 6. Estructura de la (+)-acetilivalina (**2**).

Así mismo, del estudio de las partes aéreas de *Inula graveolens* se aisló por vez primera la (+)-11 α ,13-dihidroivalina (**3**) además de cuatro lactonas sesquiterpénicas conocidas, entre ellas nuevamente la lactona **1** (Topçu et al., 1993). En dicho trabajo también se evaluó la actividad biológica de estas sustancias, las cuales mostraron buena actividad citotóxica y antibacteriana.

Por otro lado, de *Carpesium macrocephalum* Franc. et. Savat (Compositae), especie que ha tenido uso en la medicina tradicional china por sus componentes hemostáticos y antipiréticos, también se aisló la (+)-ivalina (**1**) y la (+)-11 α ,13-dihidroivalina (**3**), ambas en poco rendimiento (Yang et al., 2002; Yang et al., 2003).

La (+)-ivalina (**1**), así como su acetato (**2**) también se han obtenido de especies de *Arnica*, plantas utilizadas ampliamente en medicina tradicional como antiinflamatorios y antipiréticos. Tal es el caso de *A. chamissonis* ssp. y de *A. longifolia*, de cuyas flores se caracterizaron a **1** y **2**, respectivamente, junto con otras lactonas sesquiterpénicas (Willuhn et al., 1985 y 1998). El compuesto **1** se describió como primera eudesmanólida en este género.

La estructura y configuración absoluta de **1** son conocidas, y se determinó mediante RMN de ^1H (Willuhn et al., 1985), ^{13}C (Topçu et al., 1993) y difracción de rayos-X (Herz y Högenauer, 1962; Coetzer et al., 1982).

Como se mencionó anteriormente en la sección de Introducción, la (+)-ivalina (**1**) es una lactona sesquiterpénica que ha presentado actividad antileucémica (Tomioka et al., 1984). Se ha demostrado que ejerce una actividad importante contra células tumorales P-388, KB-3 y KB-V1 con ED_{50} de 0.14, 0.18 y 1.3 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. La (+)-acetilivalina (**2**), que ha sido preparada de la (+)-ivalina, tiene casi la misma actividad. No así la (+)-11 α ,13-dihidroivalina (**3**) que resultó inactiva para estas células (Topçu et al., 1993). También la lactona **1** ha sido probada contra *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* mostrando que tiene actividad moderada contra estos microorganismos (Yang et al., 2002).

Algunas reacciones químicas se han llevado a cabo sobre la lactona **1**. Así, su hidrogenación parcial usando paladio sobre carbono condujo a la (+)-11 α ,13-dihidroivalina (**3**), mientras que la hidrogenación en ácido acético permitió obtener la tetrahidroivalina (**31**) (Figura 7) (Herz y Högenauer, 1962).

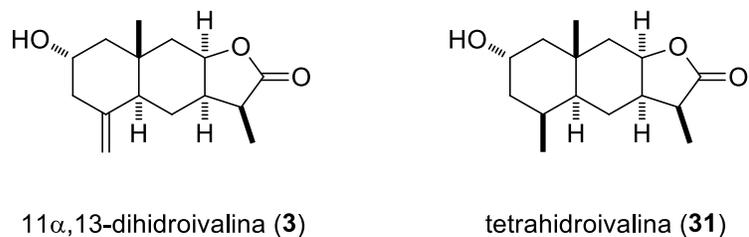
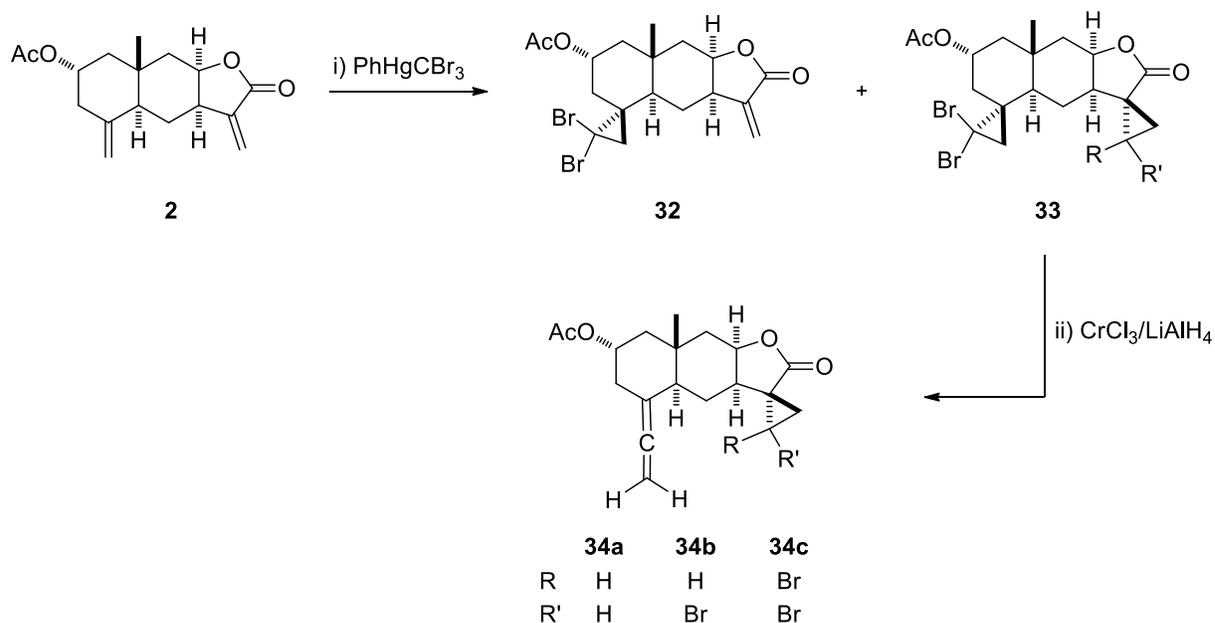


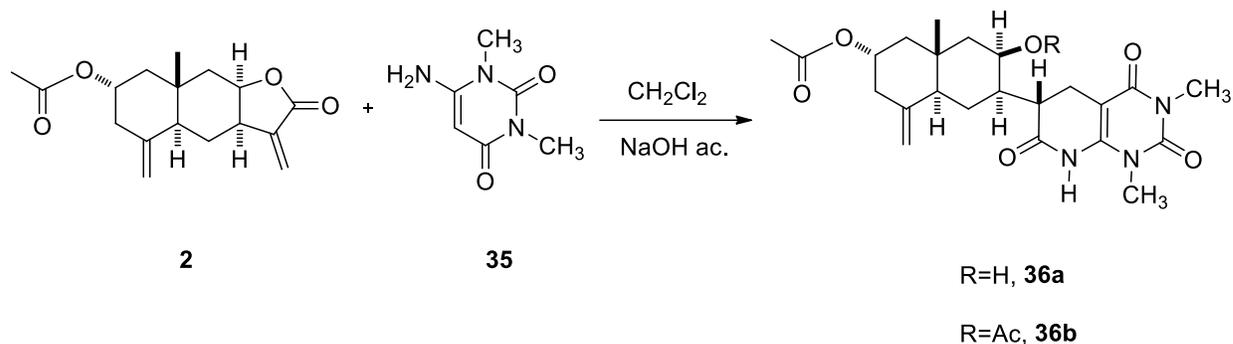
Figura 7. Compuestos obtenidos a partir de **1**.

Adicionalmente, el compuesto **1** y otros productos naturales de esta clase de terpenos han sido objeto de considerable investigación, principalmente como modelos para la síntesis de compuestos biológicamente activos, como los derivados alénicos que desempeñan un papel biológico importante en varios productos farmacéuticos como hipotensores, antiinflamatorios y agentes hipnóticos. Por ejemplo, las reacciones de la (+)-acetilivalina (**2**) con los reactivos de Seyferth (i) e Himaya (ii) condujeron a la obtención de los derivados alénicos **34a-c** (Esquema 3) (Díaz et al., 1998).



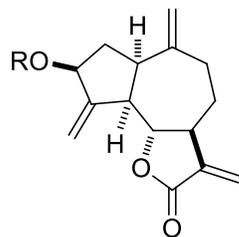
Esquema 3. Derivados alénicos obtenidos a partir de reacciones de **2** con los reactivos de Seyferth (i) e Himaya (ii).

De igual manera, la lactona **2** se empleó en la síntesis con 6-amino-1,3-dimetil-2,4-pirimidindiona (**35**) para la obtención de los derivados pirimidínicos **36 a-b** (Esquema 4), los cuales se prepararon con la finalidad de contar con agentes potencialmente antivirales (Díaz et al., 1997a; 1998b).



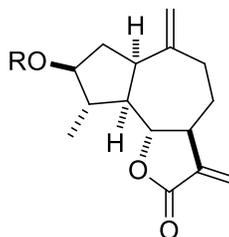
Esquema 4. Derivados pirimidínicos a partir de la acetilivalina (**2**).

En nuestro grupo de investigación, en el año 2005, se llevó a cabo el estudio químico del extracto AcOEt de la parte aérea de *Z. triloba*, colectada en el Valle del Mezquital en el Estado de Hidalgo, resultando en el aislamiento y caracterización de las lactonas sesquiterpénicas denominadas zaluzaninas C (**22**), D (**25**), así como en la identificación tentativa de las zaluzaninas F (**37**) y G (**38**) (Figura 8), las cuales se aislaron como componentes minoritarios (Téllez-Reyes, 2005).



R = H, zaluzanina C (**22**)

R = Ac, zaluzanina D (**25**)



R = H, zaluzanina F (**37**)

R = Ac, zaluzanina G (**38**)

Figura 8. Metabolitos aislados de *Z. triloba* colectada en el Valle del Mezquital.

Con la finalidad de complementar el estudio de *Z. triloba*, teniendo como principal objetivo el aislamiento y la caracterización completa de las lactonas **37** y **38**, en este trabajo se hizo una colecta de la especie en el municipio de Mineral de la Reforma, Hidalgo, en el 2008, y se procedió a su estudio químico cuyos resultados fueron inesperados y se describen en la parte de Resultados y Discusión.

3. OBJETIVOS

- Llevar a cabo el estudio químico de *Zaluzania triloba* (Ort.) Pers. enfocado en el aislamiento y caracterización de sus metabolitos secundarios mediante técnicas cromatográficas y métodos espectroscópicos.
- Explorar la composición química de la decocción de la parte aérea de *Z. triloba* debido al empleo que ha tenido en medicina tradicional, y correlacionar la estructura y posible actividad biológica de los metabolitos identificados con el uso medicinal de la especie.
- Identificar y cuantificar el compuesto (+)-ivalina en el té de la parte aérea de *Z. triloba* mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), con la finalidad de conocer si esta preparación contiene dicha sustancia, ya que es conocido que posee actividad antileucémica.
- Contribuir al conocimiento de productos naturales con actividad biológica que pudieran ser útiles en el tratamiento del cáncer y la inflamación.

4. JUSTIFICACIÓN

Hoy en día la investigación de los productos naturales nos brinda la posibilidad de obtener sustancias promisorias para el tratamiento de diversas enfermedades como las crónico-degenerativas, entre ellas el cáncer y la diabetes, así como enfermedades causadas por bacterias, parásitos y virus. Una estrategia para la búsqueda de principios activos ha sido el estudio de plantas que se emplean en la medicina tradicional, dado que casi siempre se ha encontrado correlación entre la estructura y actividad biológica de las sustancias aisladas con el uso medicinal de las especies. Los metabolitos encontrados en estos organismos siempre han despertado el interés de químicos, biólogos y farmacólogos ya que poseen estructuras químicas muy variadas simples o complejas así como actividades biológicas específicas. Varios de estos metabolitos han sido objeto de investigación considerable, principalmente como modelos para la síntesis de compuestos biológicamente activos.

En nuestro grupo de trabajo se está desarrollando un proyecto de investigación enfocado al estudio químico de especies medicinales del estado de Hidalgo para el aislamiento y caracterización de principios activos con actividad antiinflamatoria y anticancerosa. En este contexto se planteó el estudio químico *Zaluzania triloba*, una planta que crece abundantemente en varios municipios del estado de Hidalgo y que

se utiliza tradicionalmente en forma de té para el dolor de estómago, la inflamación y heridas. En las especies del género *Zaluzania* se han encontrado lactonas sesquiterpénicas que han mostrado actividad antitumoral, antileucémica, antimicrobiana y antiinflamatoria, por lo que se espera que el estudio químico de esta planta contribuya al conocimiento de productos naturales con posible aplicación farmacológica.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Descripción de *Zaluzania triloba*

Zaluzania triloba (Ort.) Pers. (Compositae) (Figura 9) es una planta que crece abundantemente en varios municipios del estado de Hidalgo donde se le conoce vulgarmente como “hediondilla”, se emplea en medicina tradicional para aliviar el dolor de estómago y las heridas, además es administrada en forma de infusión (Pérez-Escandón et al., 2003).



Figura 9. Imagen de *Zaluzania triloba*.

Z. triloba es un arbusto de 1 m de alto con tallos cilíndricos, ramificados y estriados con pelos largos y erectos, sus hojas son alternas pecioladas, más o menos triangulares, haz verde oscuro y envés verde claro con pelos rígidos. Sus cabezuelas poco numerosas, ubicadas en la punta de los tallos, están soportadas en pedúnculos de hasta 6 cm de largo. La cabezuela amarilla, aunque tiene aspecto de una flor, es una inflorescencia formada por pequeñas flores (Figura 10). Es aromática al estrujarse. Su hábitat preferentemente se encuentra cerca de habitaciones humanas, en lugares perturbados y también suelen crecer en zonas desérticas y ocasionalmente en cultivos (Conabio, 2010). Es abundante en los Municipios de Actopan, El Arenal, Atotonilco, Epazoyucan, Mineral de la Reforma, Pachuca, San Agustín Tlaxiaca, Singuilucan, Tepeapulco, Tolcayuca, Villa de Tezontepec, Zapotlán, Zempoala, y florece de junio a noviembre (Villavicencio-Nieto y Pérez-Escandón, 2006).



Figura 10. Imágenes de la parte aérea de *Zaluzania triloba*.

5.2. Estudio del extracto acetato de etilo de la parte aérea de *Zaluzania triloba*

La parte aérea seca y molida de *Z. triloba* (0.5 kg) se extrajo con AcOEt por medio de reflujo de 6 h, seguido de filtrado y concentrado en el rotavapor para obtener el correspondiente extracto (26.5 g, 5.3%), el cual se sometió a separación mediante cromatografía en columna (CC), usando gel de sílice y mezclas de hexano-AcOEt (3:1, 2:1, 1:1 y 1:2) y AcOEt-acetona (5:1) como eluyente. Se colectaron cinco fracciones gruesas que se etiquetaron como A, B, C, D y E y se analizaron mediante cromatografía en capa fina (CCF) y RMN de ^1H con la finalidad de observar su composición y similitud. En la fracción A se observaron principalmente ácidos grasos, en la fracción B se apreciaron señales características de lactonas sesquiterpénicas, mientras que en las demás fracciones se observaron restos de este tipo de lactonas y ácidos grasos. La purificación de la fracción B mediante sucesivas cromatografías en columna condujo a la obtención de dos compuestos, cuyo análisis preliminar por RMN de ^1H mostraron ser del tipo lactonas sesquiterpénicas. Las sustancias se etiquetaron inicialmente como compuesto **A** y compuesto **B**, siendo **A** el metabolito mayoritario.

Otro lote del extracto de AcOEt (3 g) se sometió a separación mediante CC utilizando como eluyente CHCl_3 -acetona (2:1). El procedimiento se realizó 3 veces para obtener el compuesto **A** en mezcla con sustancias grasas (1.75 g, 19.4%), posteriormente se purificó por CC usando gel de sílice y como eluyente hexano-AcOEt (1:1), lo cual

permitió obtener la sustancia **A** (332 mg, 3.68%) en forma de cristales amorfos con p.f. 125–127 °C.

La caracterización de las dos sustancias se llevó a cabo mediante sus datos físicos y espectroscópicos, así como por comparación con datos descritos en la literatura de compuestos afines. Esto nos permitió llegar a la conclusión de que el compuesto **A** se trataba de la (+)-ivalina (**1**), mientras que el compuesto **B** resultó ser el acetato (**2**) de esta misma molécula (Figura 11). Ambas sustancias son lactonas sesquiterpénicas conocidas y sus datos espectroscópicos resultaron iguales a los descritos (Willuhn et al., 1985; Topçu et al., 1993). La sustancia **1** presentó $[\alpha]_D^{20} = +134$ (c 1.0, CHCl₃), mientras que **2** mostró $[\alpha]_D^{20} = +122$ (c 0.7, CHCl₃). En seguida se describe el proceso de análisis por RMN que condujo a su caracterización.

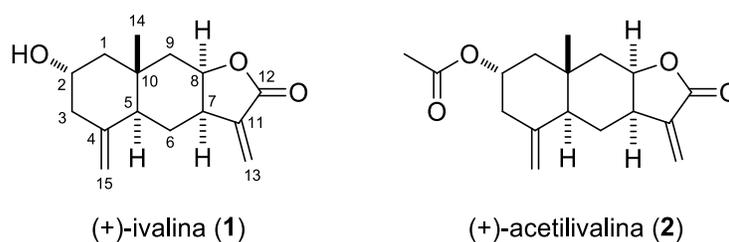


Figura 11. Estructuras de la (+)-ivalina (**1**) y la (+)-acetilivalina (**2**).

El espectro de RMN de ¹H de **1** (Figuras 12 y 13, Tabla 5) mostró entre sus señales más significativas dos dobles ($J = 1.0$ Hz) en 6.14 y 5.60 ppm características de un metileno exocíclico conjugado a un grupo carbonilo de lactona y que fueron asignados a los protones H-13 y H-13', en 4.90 y 4.55 ppm se apreciaron dos señales dobles anchas ($J = 1.3$ Hz) para otro metileno exocíclico que fueron

asignadas a H-15 y H-15', una señal triple de dobles en 4.51 ppm ($J = 5.0, 1.5$ Hz) correspondiente al protón H-8 base de la lactona, y una señal triple de triples ($J = 11.0, 4.7$ Hz) en 3.83 ppm típica de un protón base de OH que fue asignada a H-2. A frecuencias bajas, en 0.84 ppm, se observó una señal característica de un metilo terciario (simple) que integró para 3 protones, y que se asignó al CH₃-14. La ampliación de este espectro se muestra en la Figura 13 donde se puede observar con mayor claridad el desplazamiento y la multiplicidad de las señales que fueron asignadas al resto de los protones del compuesto **1**. Para la asignación completa de sus señales en el espectro de protón también se hizo uso del experimento de correlación homonuclear ¹H-¹H, COSY, que se muestra en la Figura 14. En este espectro se pudo observar la mayoría de los acoplamientos entre los protones vecinos y geminales de la molécula, por ejemplo el que mostraron entre sí los protones del doble enlace exocíclico H-13 y H-13', y el acoplamiento de estos hidrógenos con H-7, lo cual confirmó su asignación en el espectro de ¹H. En la Figura 15 se muestra una ampliación del espectro COSY de esta misma sustancia en el cual se observó la correlación de H-8 base de la lactona con las señales en 3.02 y 1.55 ppm, las cuales fueron asignadas a H-7 y H-9 α , respectivamente. Asimismo, se observó de manera clara la correlación H-2 base de OH con los protones de los metilenos en C-1 y C-3, así como el acoplamiento de H-7 con los protones H-6 α y H-6 β . El resto de las correlaciones se resaltan con los recuadros marcados en la figura.

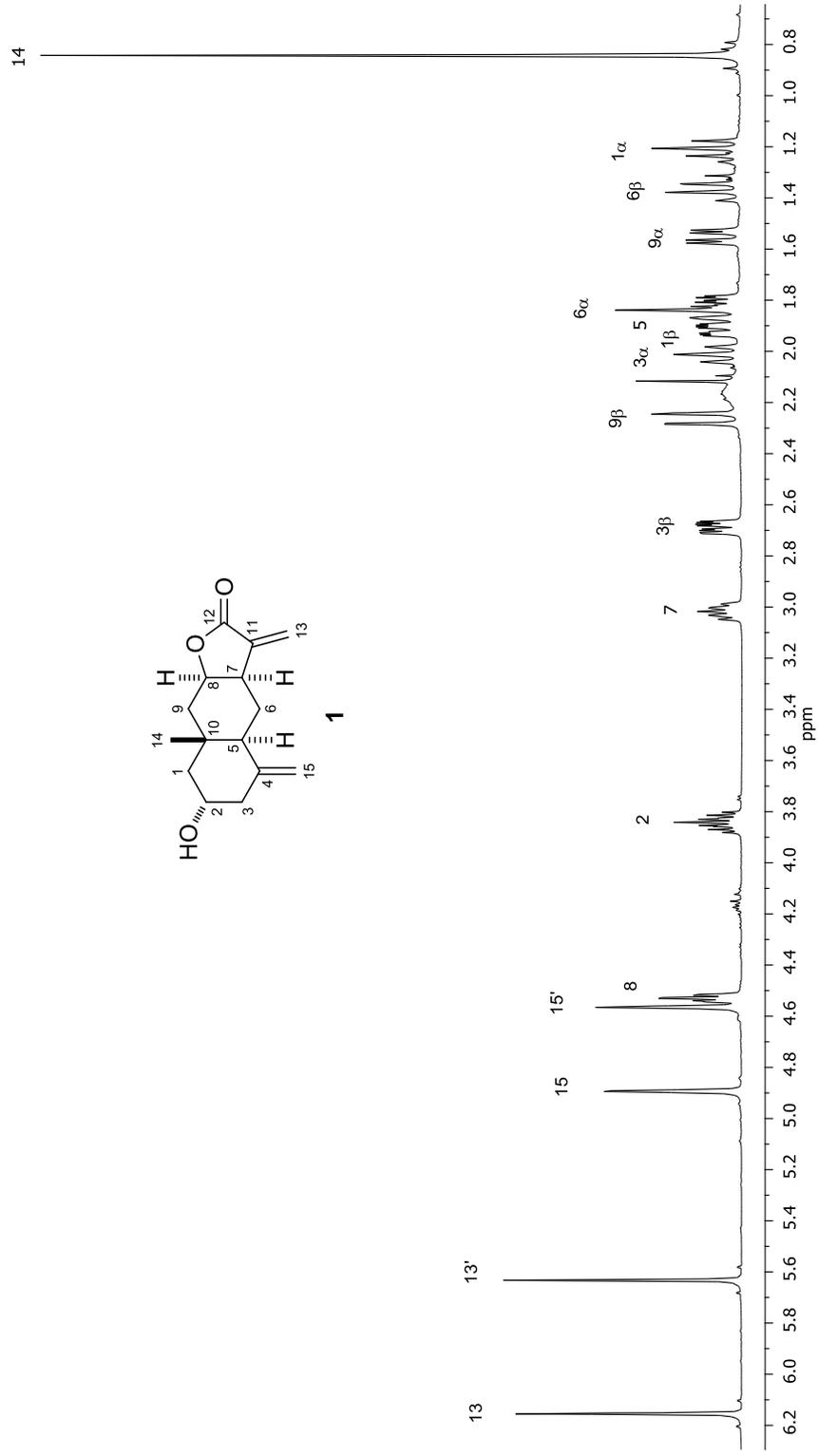


Figura 12. Espectro de RMN de ¹H (400 MHz) de la (+)-ivalina (1) en CDCl₃.

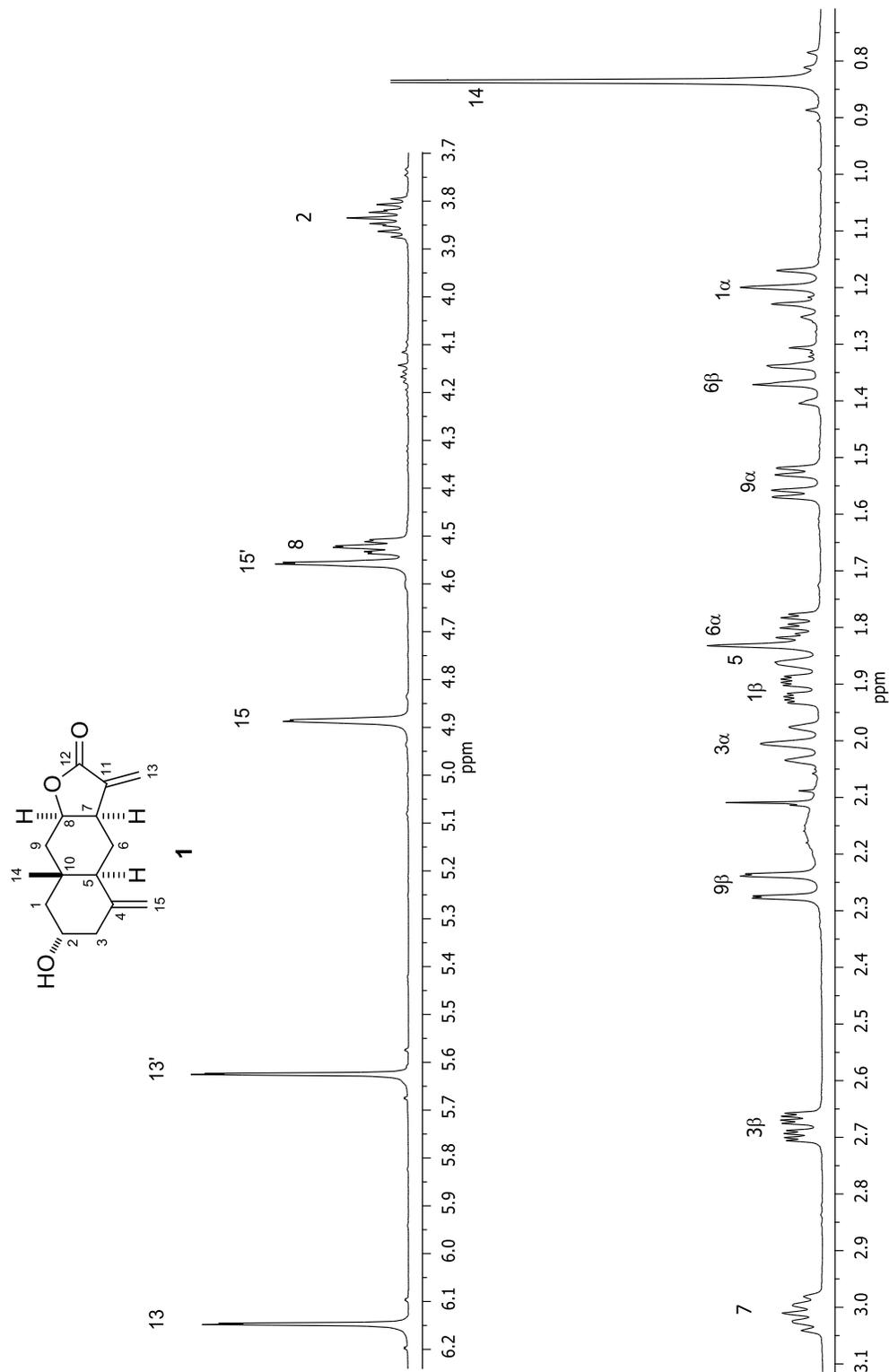


Figura 13. Ampliaciones del espectro de RMN de ¹H (400 MHz) de la (+)-ivalina (1) en CDCl₃.

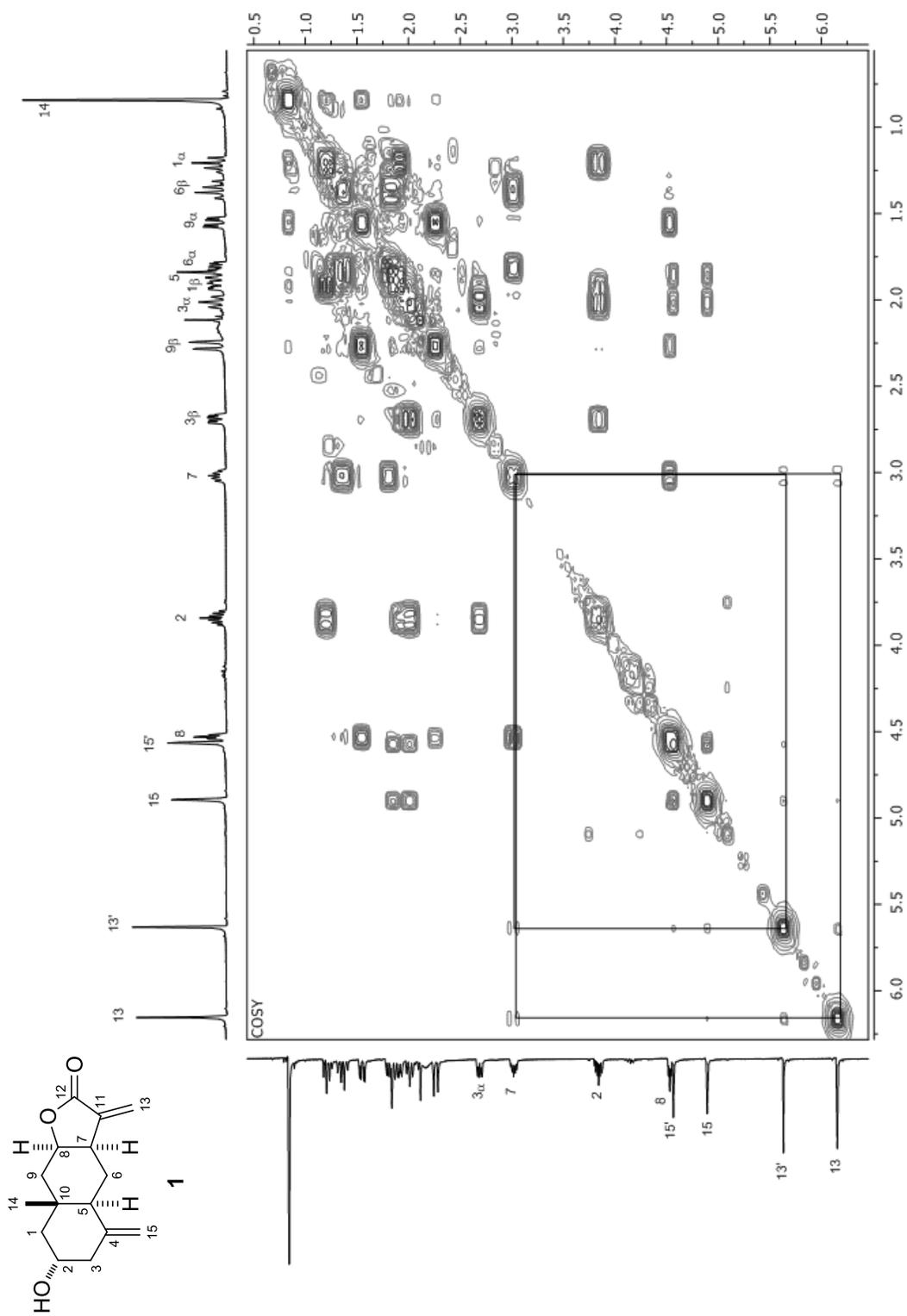


Figura 14. Espectro COSY (400 MHz) de la (+)-ivalina (1) en $CDCl_3$.

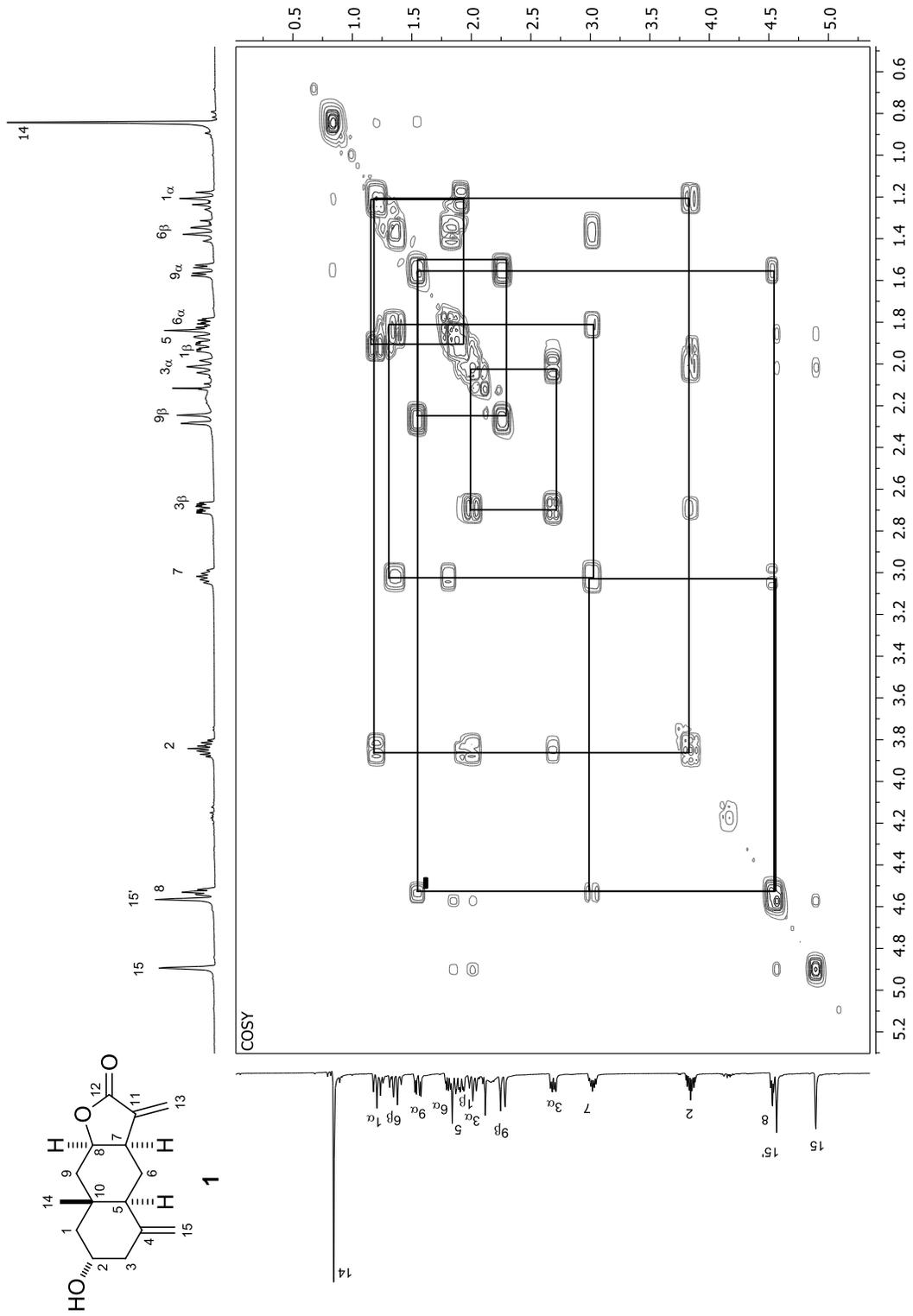


Figura 15. Ampliación del espectro COSY (400 MHz) de la (+)-ivalina (1) en CDCl₃.

En el espectro de ^{13}C (Figura 16, Tabla 6) se observaron 15 señales, entre ellas la de 170.57 ppm característica de un carbonilo de éster, 4 señales típicas de carbonos de enlaces dobles entre 150 y 110 ppm, 2 señales de carbonos base de oxígeno en 76.64 y 66.91 ppm y 8 señales más en la zona de carbonos sp^3 , entre 53 y 18 ppm. El experimento APT (Figura 17) permite definir la naturaleza de cada uno de los carbonos, en el cual las señales cuya naturaleza sea C y CH_2 aparecen con fase positiva, mientras que aquellas correspondientes a CH y CH_3 se observan con fase negativa. Así, se evidenció que de las señales de los carbonos sp^2 , dos de ellas son de C cuaternarios y las otras dos corresponden a CH_2 , corroborando la presencia de los dos metilenos exocíclicos. Las señales base de oxígenos correspondieron a CH, mientras que en la zona de carbonos sp^3 se observó un carbono cuaternario (C), 2 carbonos de metino (CH), 4 carbonos de metileno (CH_2) y un carbono de metilo (CH_3). En la Figura 18, se muestra la comparación entre los espectros de ^{13}C y APT de la lactona **1**, lo cual nos permitió distinguir de manera clara entre las señales correspondientes a C-3 (CH_2) y C-5 (CH), así como las debidas a C-7 (CH) y C-9 (CH_2), ya que en su asignación inicial se tuvieron dudas debido a que los desplazamientos químicos entre estos dos grupos de carbonos resultaron muy cercanos.

Para corroborar la asignación de las señales tanto en el espectro de protón como en el de carbono-13 se hizo uso de los experimentos bidimensionales HMQC (Figuras 19 y 20) y HMBC (Figuras 21 y 22), en los cuales se observa el acoplamiento entre hidrógenos y carbonos a un enlace (HMQC) y a dos y tres enlaces (HMBC). En el experimento HMQC se usó en el trazo vertical el espectro APT de esta lactona, con

la finalidad de distinguir de manera más clara las señales de los carbonos de naturaleza CH y CH₂. En este espectro se pudieron apreciar todas las correlaciones esperadas, por ejemplo, las que mostraron la señales de los protones base de la lactona y base de OH (H-8 y H-2, respectivamente) con las señales de carbono en 76.62 y 66.89 ppm, confirmando la asignación de C-8 y C-2, correspondientemente. Finalmente, el espectro HMBC (Figuras 21 y 22) permitió confirmar las asignaciones hechas, tanto para hidrógenos como para carbonos de la molécula, particularmente aquellas para los carbonos cuaternarios. Así, la señal fue clara que presentaron los hidrógenos H-13 y H-13' del doble enlace conjugado al carbonilo de la lactona y H-7 con la señal en el dominio del carbono en 170.57 ppm, asignada al carbonilo C-12. Asimismo, se pudo apreciar la correlación de H-13, H-7 y H-6 β con la señal en 141.78 ppm, por lo cual ésta se asignó al C-11. En adición, los hidrógenos del metileno en C-3 y H-5 mostraron correlación con la señal en 145.91 ppm, permitiendo asignar esta señal para C-4. En la ampliación de este espectro (Figura 22) se observó, entre otras correlaciones, aquella que presentaron a tres enlaces los hidrógenos de los metilenos exocíclicos H-13 y H-13', así como H-15 y H-15' con los carbonos metínicos C-7 y C-5, respectivamente, permitiendo asignar adecuadamente dichos carbonos.

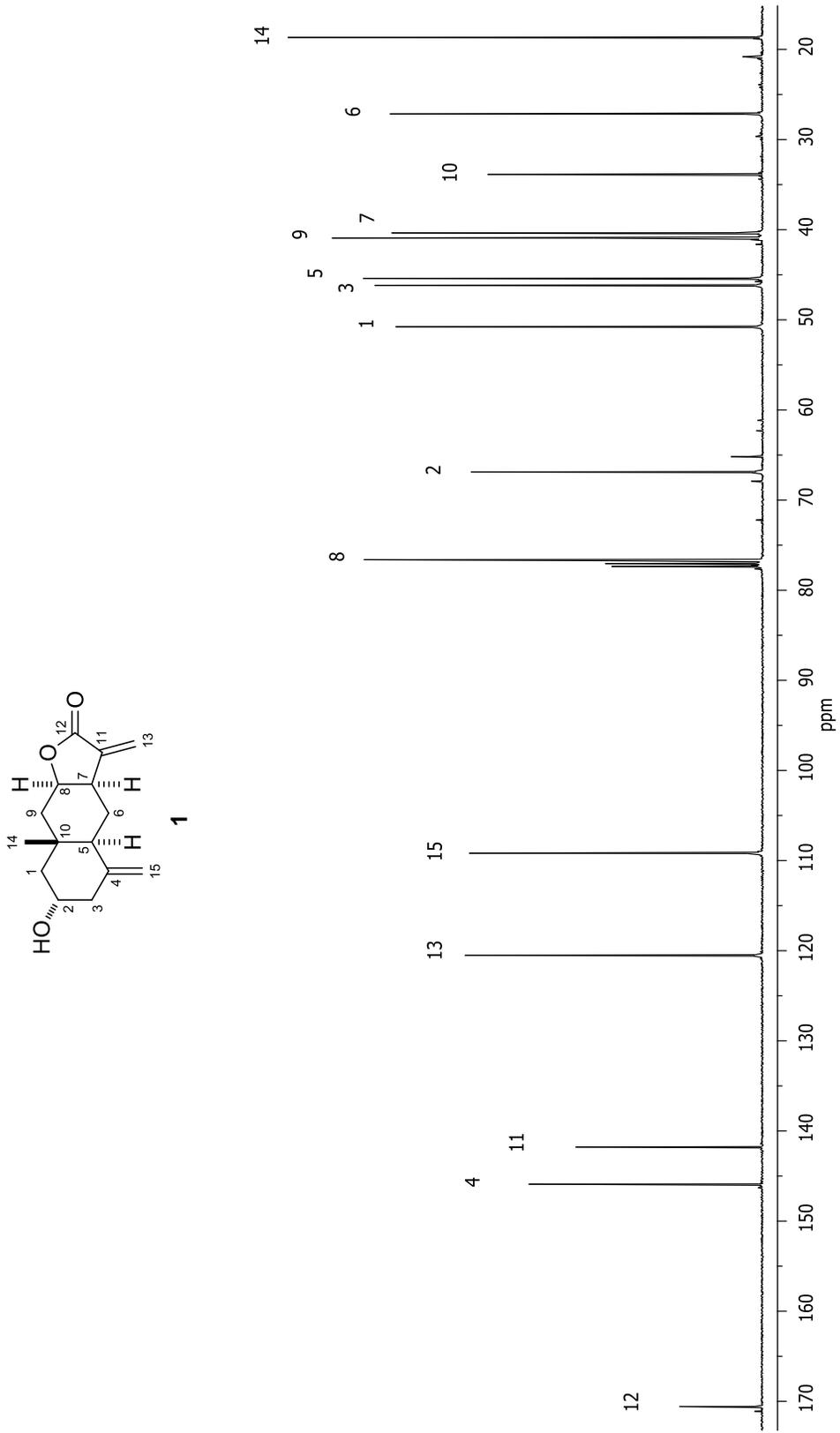


Figura 16. Espectro de RMN de ¹³C (100 MHz) de la (+)-ivalina (1) en CDCl₃.

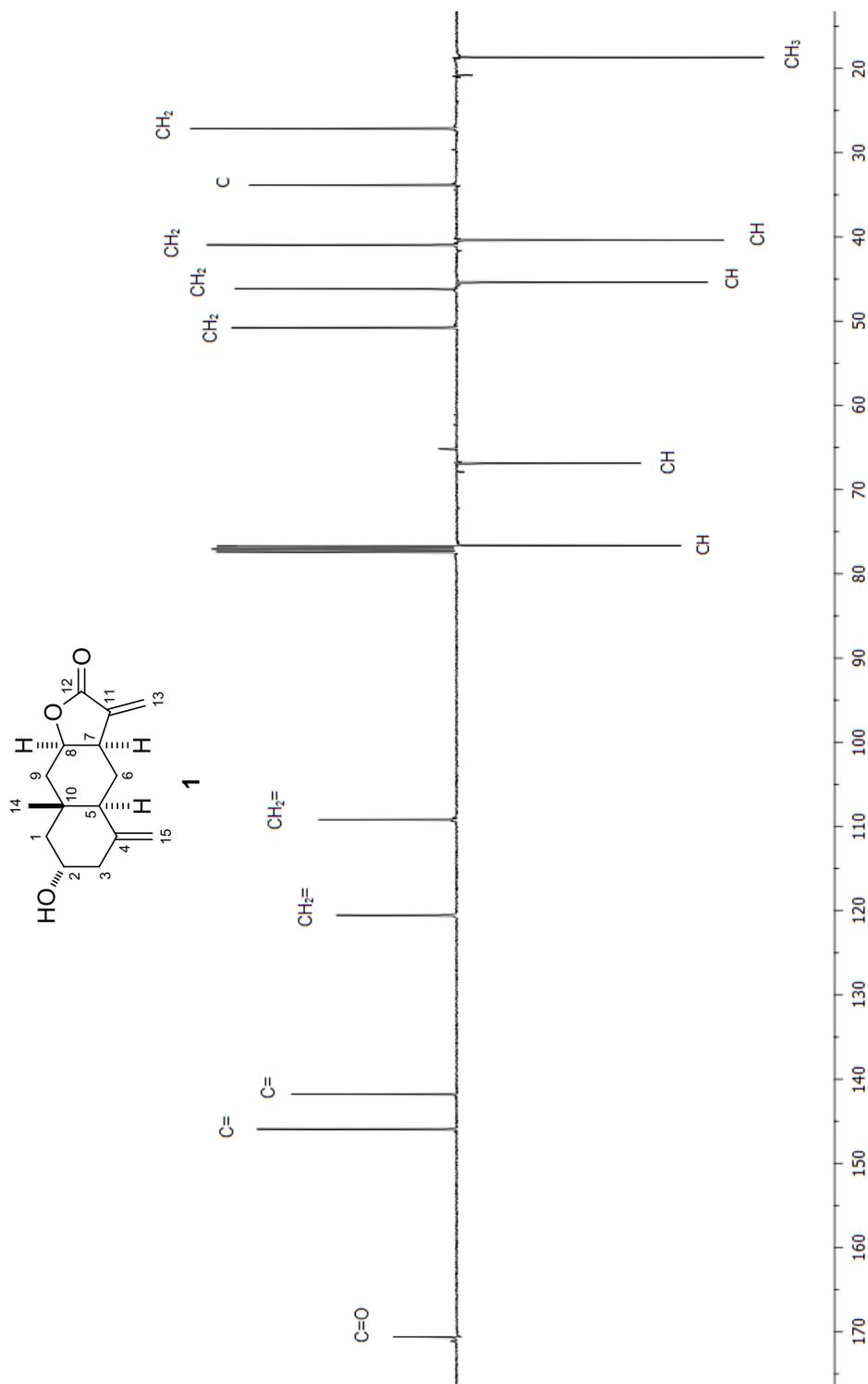


Figura 17. Espectro APT (100 MHz) de la (+)-ivalina (1) en CDCl₃.

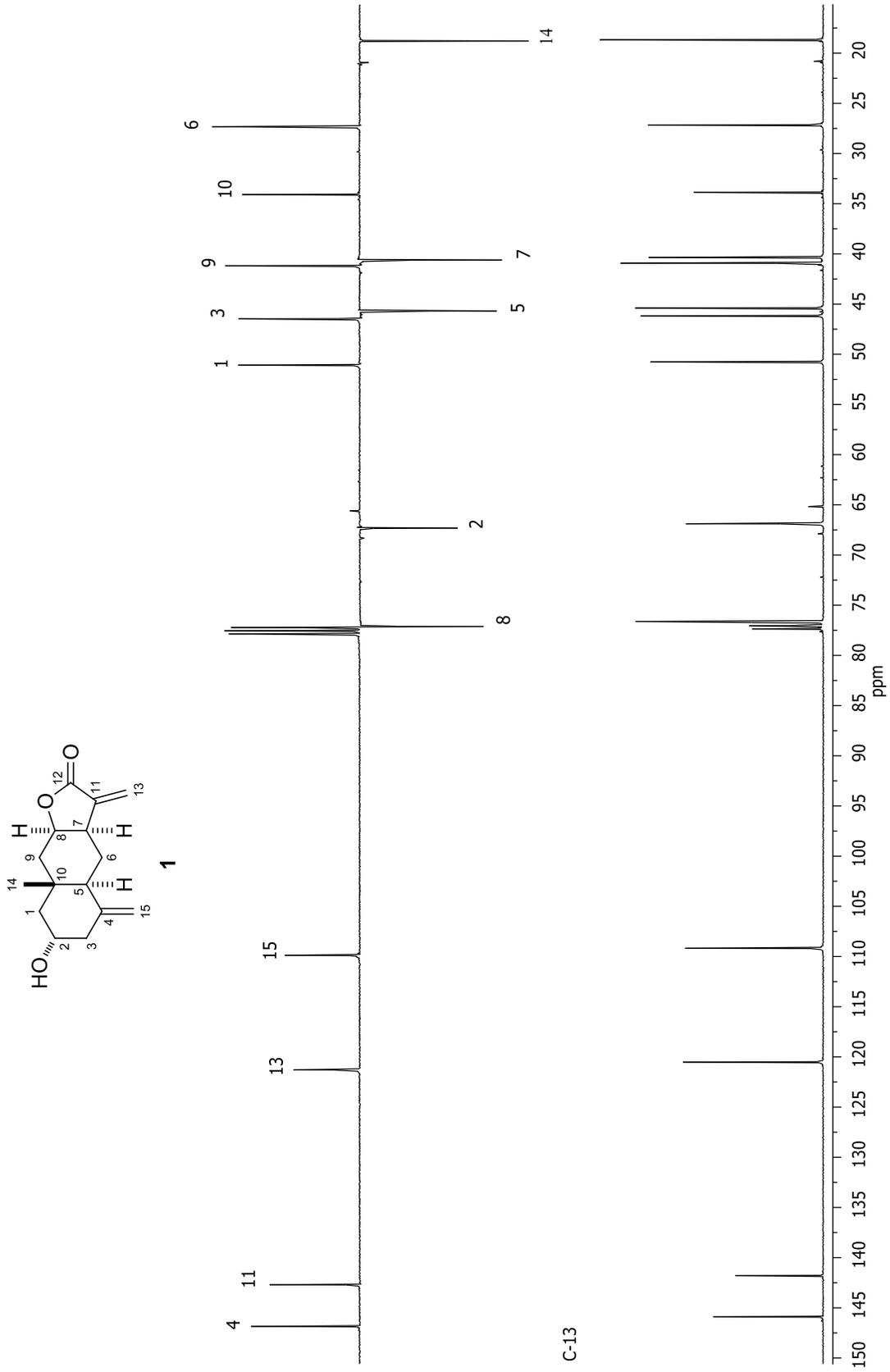


Figura 18. Espectros APT (arriba) y ^{13}C (abajo) (100 MHz) de la (+)-ivalina (1) en CDCl_3 .

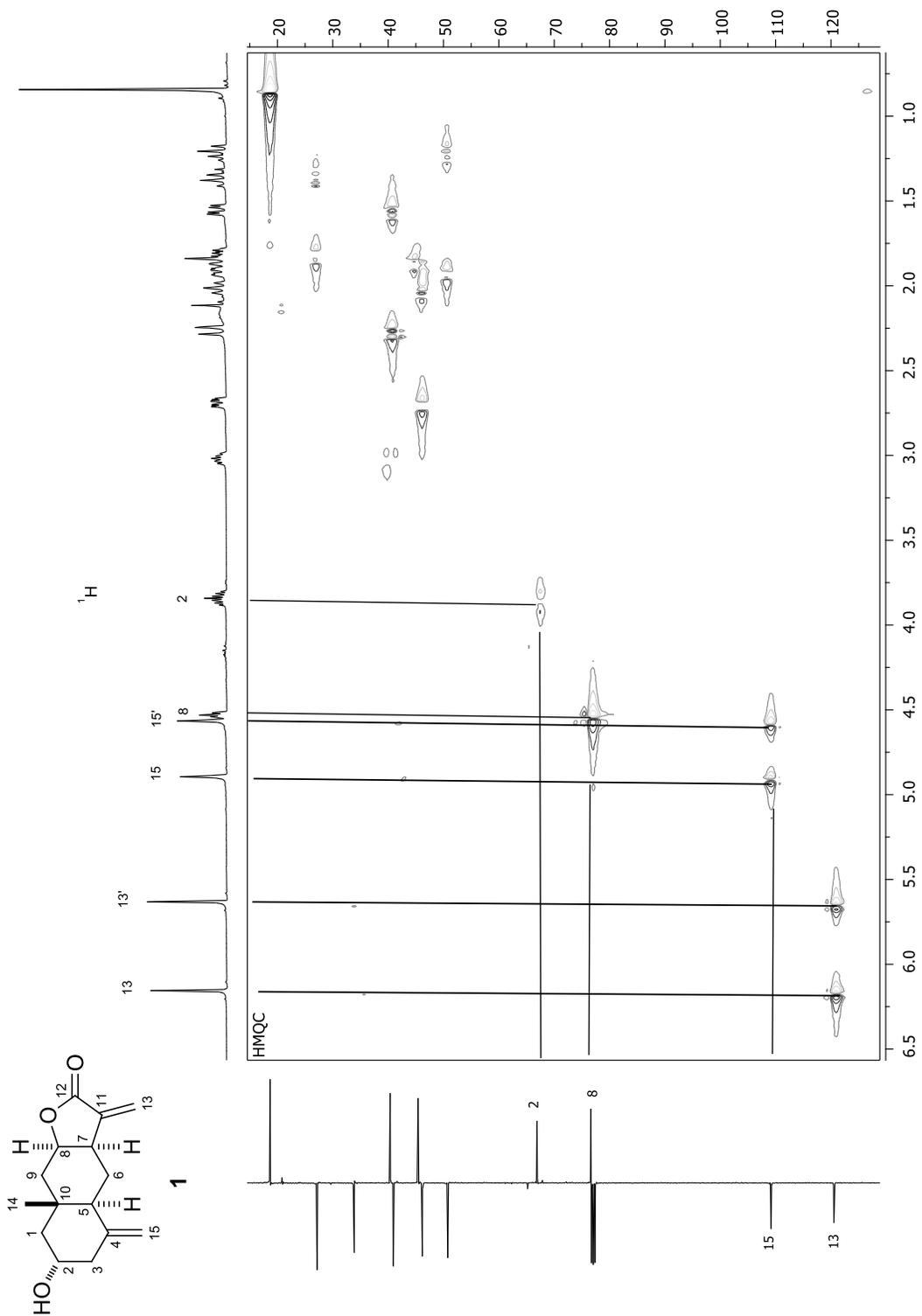


Figura 19. Espectro HMQC (400 MHz) de la (+)-ivalina (1) en CDCl_3 .

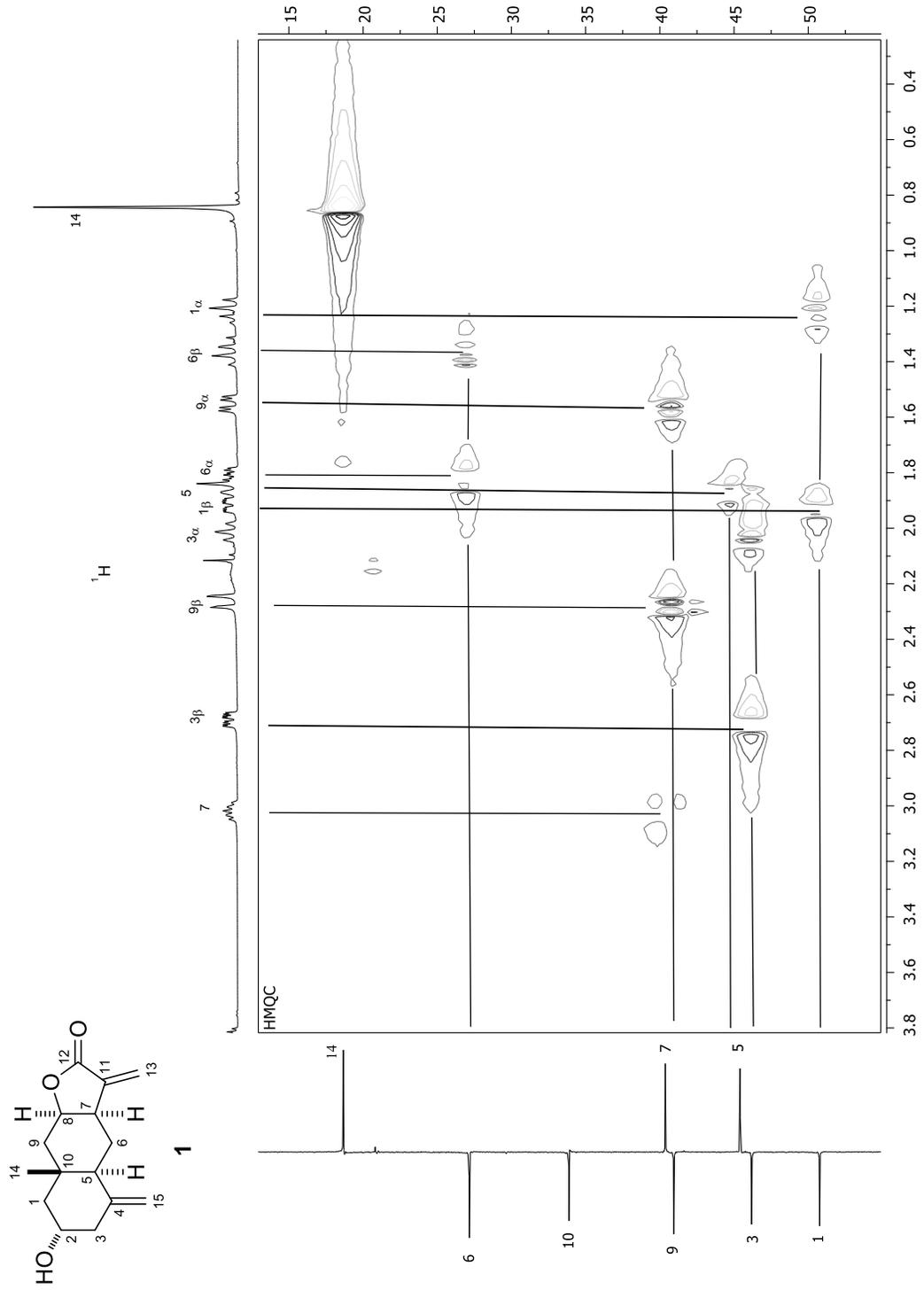


Figura 20. Ampliación del espectro HMQC (400 MHz) de la (+)-ivalina (1) en $CDCl_3$.

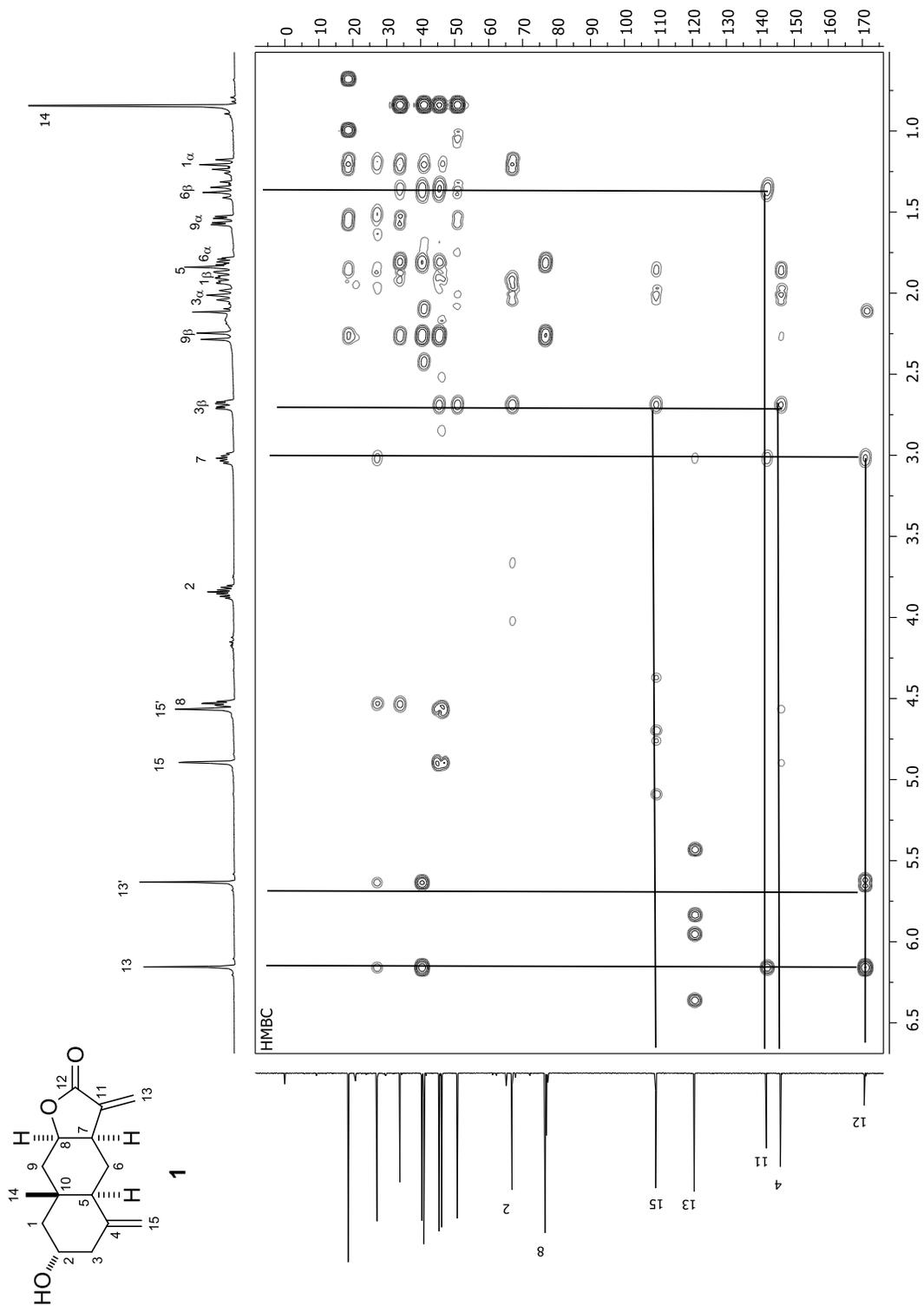


Figura 21. Espectro HMBC (400 MHz) de la (+)-ivalina (1) en CDCl₃.

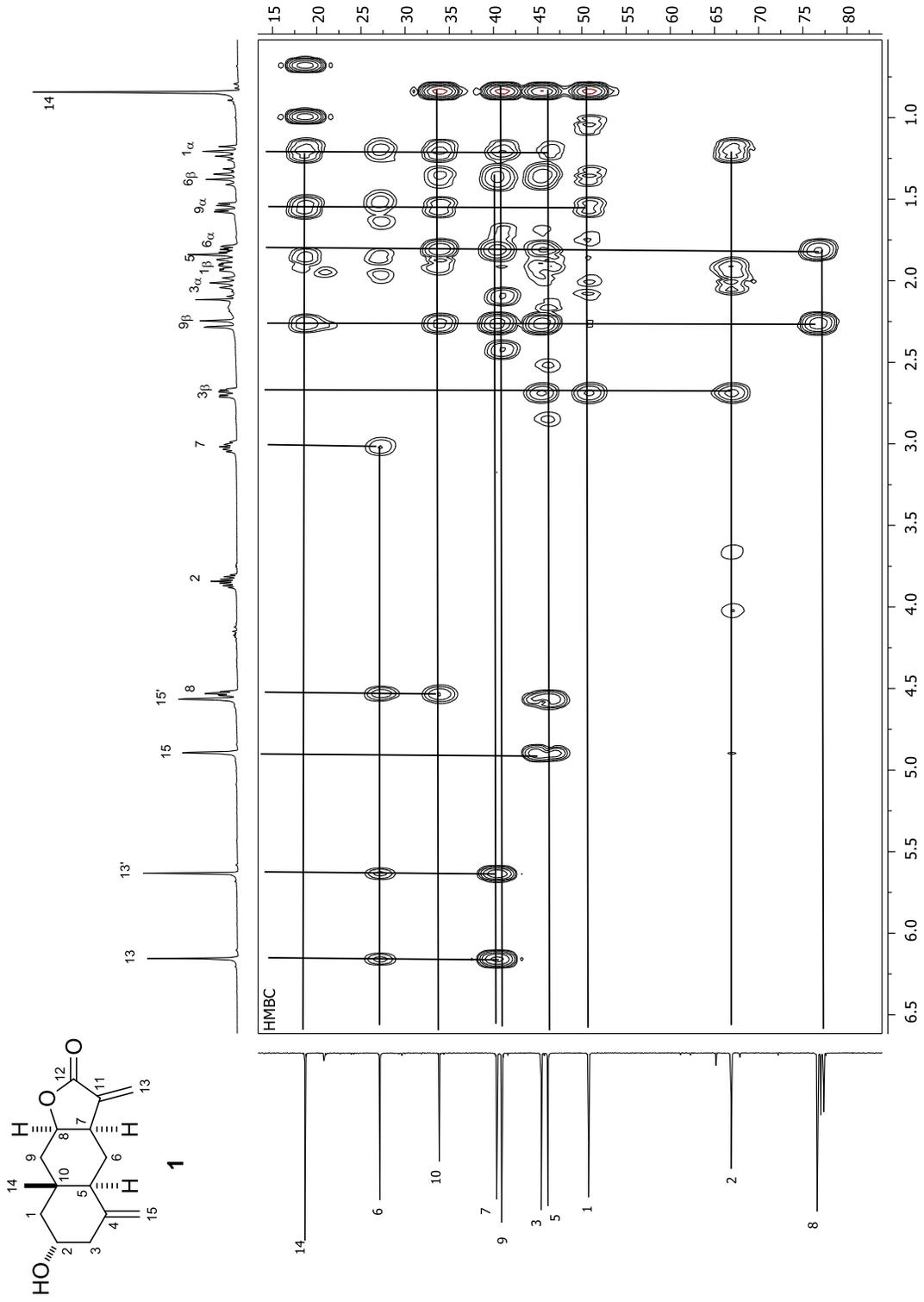


Figura 22. Ampliación del espectro HMBC (400 MHz) de la (+)-ivalina (1) en CDCl₃.

El compuesto **2** se obtuvo como un polvo blanco (13 mg, 0.14%) con un punto de fusión de 140-142 °C. El análisis de RMN de ^1H y de ^{13}C (Figuras 23, 24, 26 y 27), así como la comparación con datos descritos (Bohlmann et al., 1978; Diaz et al., 1998) y con los datos de la (+)-ivalina (**1**), hizo evidente de que se trataba de la (+)-acetilivalina (**2**). El espectro de RMN de ^1H de **2** (Figuras 23 y 24) (Tabla 5) fue muy similar al del compuesto **1**, excepto por la señal simple en 2.03 ppm, la cual integró para tres protones y que es característica del metilo de un grupo acetato. Adicionalmente, se observó el desplazamiento a frecuencias mayores que tuvo el hidrógeno 2 (4.90 ppm), lo cual evidenció que el grupo éster se encontraba en esta posición de la molécula. El resto de los protones presentó pequeñas modificaciones en cuanto a desplazamiento químico con respecto a la lactona **1**. El experimento COSY (Figura 25) confirmó las asignaciones de las señales en el espectro de ^1H . En los recuadros de esta figura se resaltan las principales correlaciones entre los protones de la molécula.

De igual manera, el espectro de ^{13}C de la sustancia **2** (Figuras 26 y 27, Tabla 6) fue muy semejante al de **1**. A diferencia de este último, se observaron 17 señales, una de las cuales correspondió al carbonilo del grupo acetato (C-16) que presentó un desplazamiento muy cercano al del carbonilo de la lactona (C-12). De hecho estos dos carbonos tuvieron un desplazamiento de 170.82 y 170.81 ppm, haciendo difícil diferenciarlos. La otra señal extra observada correspondió al metilo del grupo acetato (C-17) en 21.09 ppm. Como era de esperarse, los carbonos 1, 2 y 3 presentaron desplazamientos a frecuencias un poco mayores que los respectivos carbonos para la lactona **1**. En el resto de las señales no se apreciaron cambios significativos.

En las Figuras 28 y 29 se muestran los experimentos APT, y HMQC, respectivamente, lo cual nos permitió completar la caracterización de la lactona **2**. En estas figuras se muestran las señales debidamente etiquetadas y en los recuadros se resaltan las principales correlaciones observadas entre hidrógenos y carbonos de la estructura.

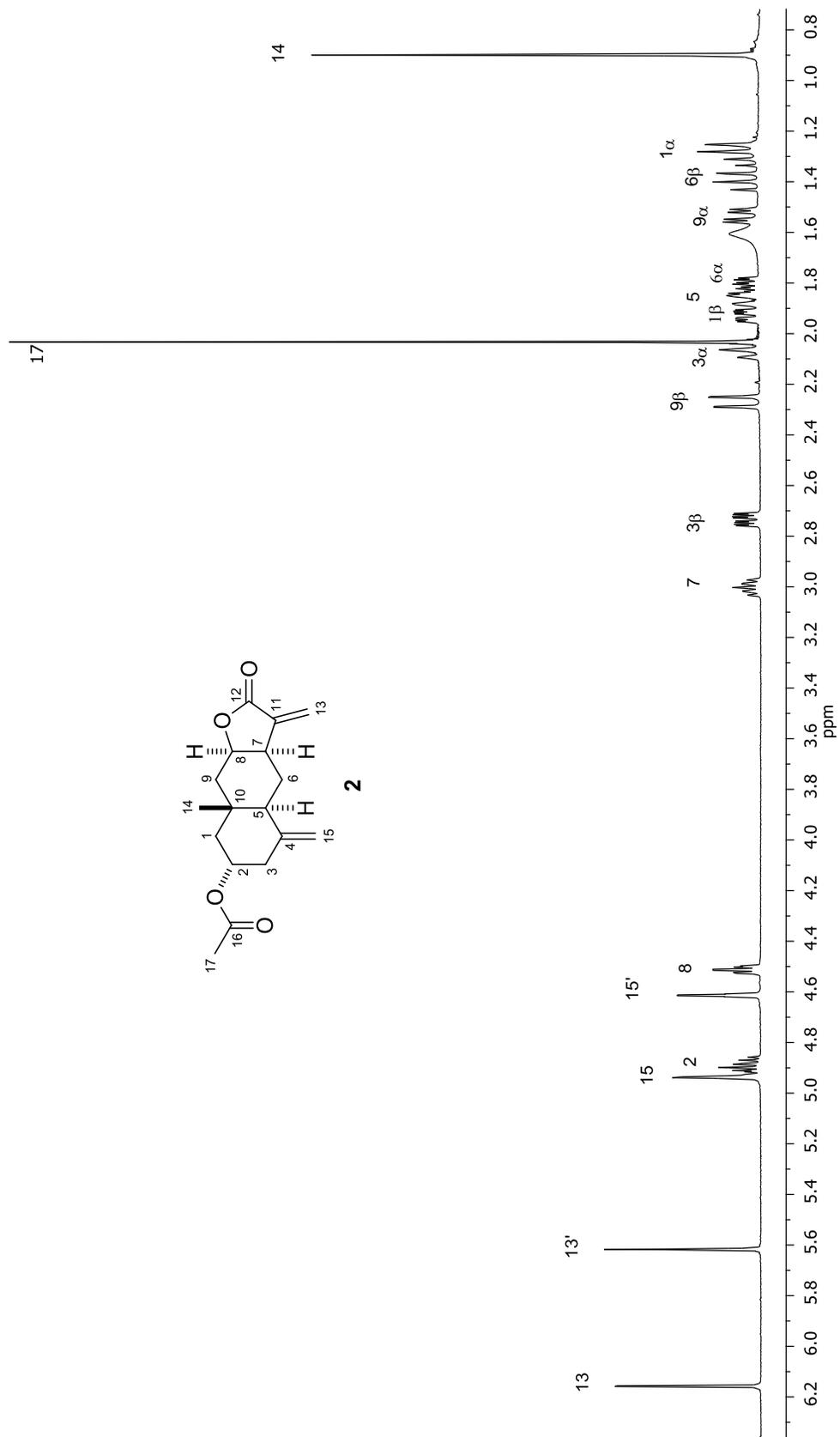


Figura 23. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) de la (+)-acetilivalina (**2**) en CDCl_3 .

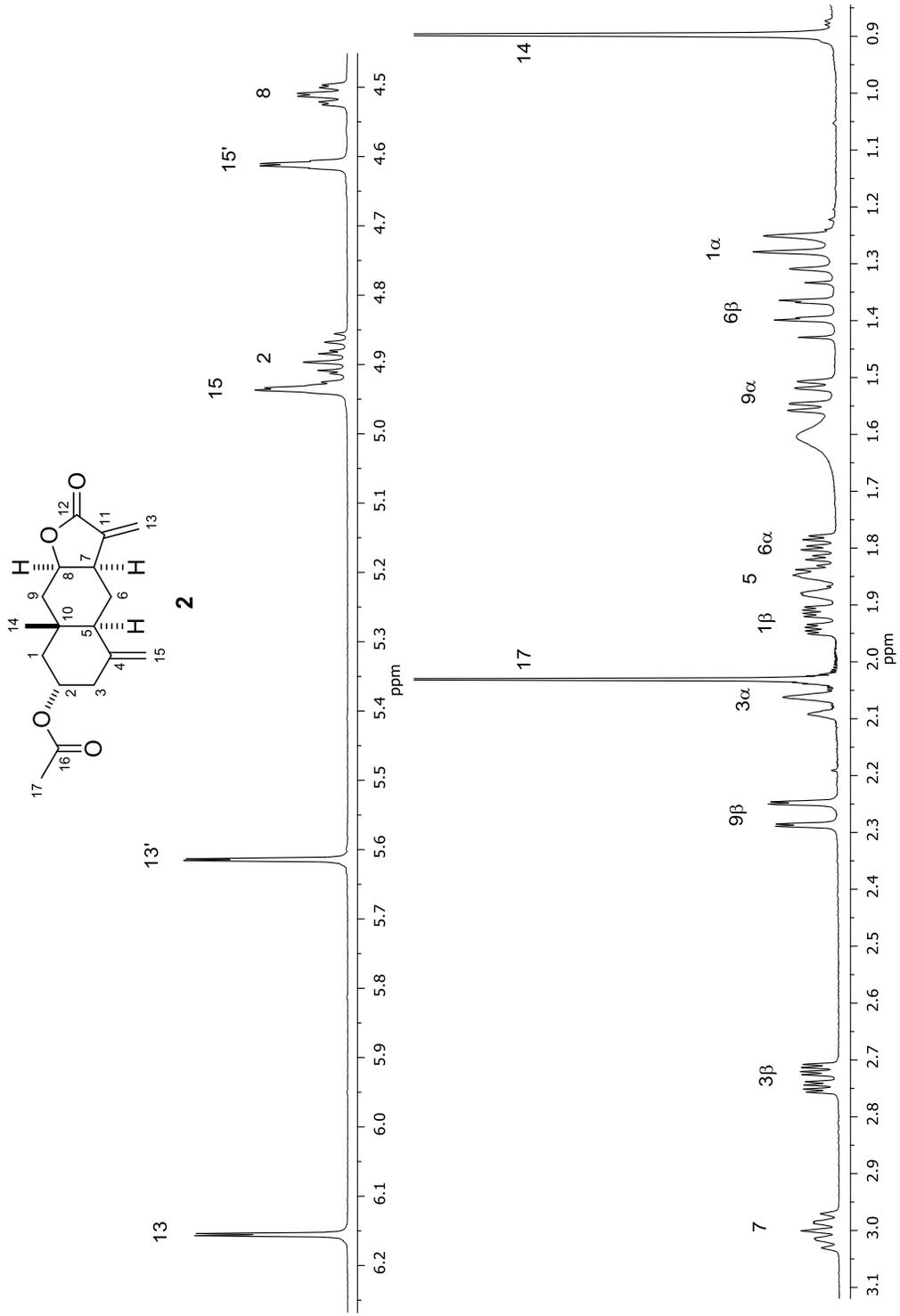


Figura 24. Ampliaciones del espectro de RMN de ¹H (400 MHz) de la (+)-acetilivalina (2) en CDCl₃.

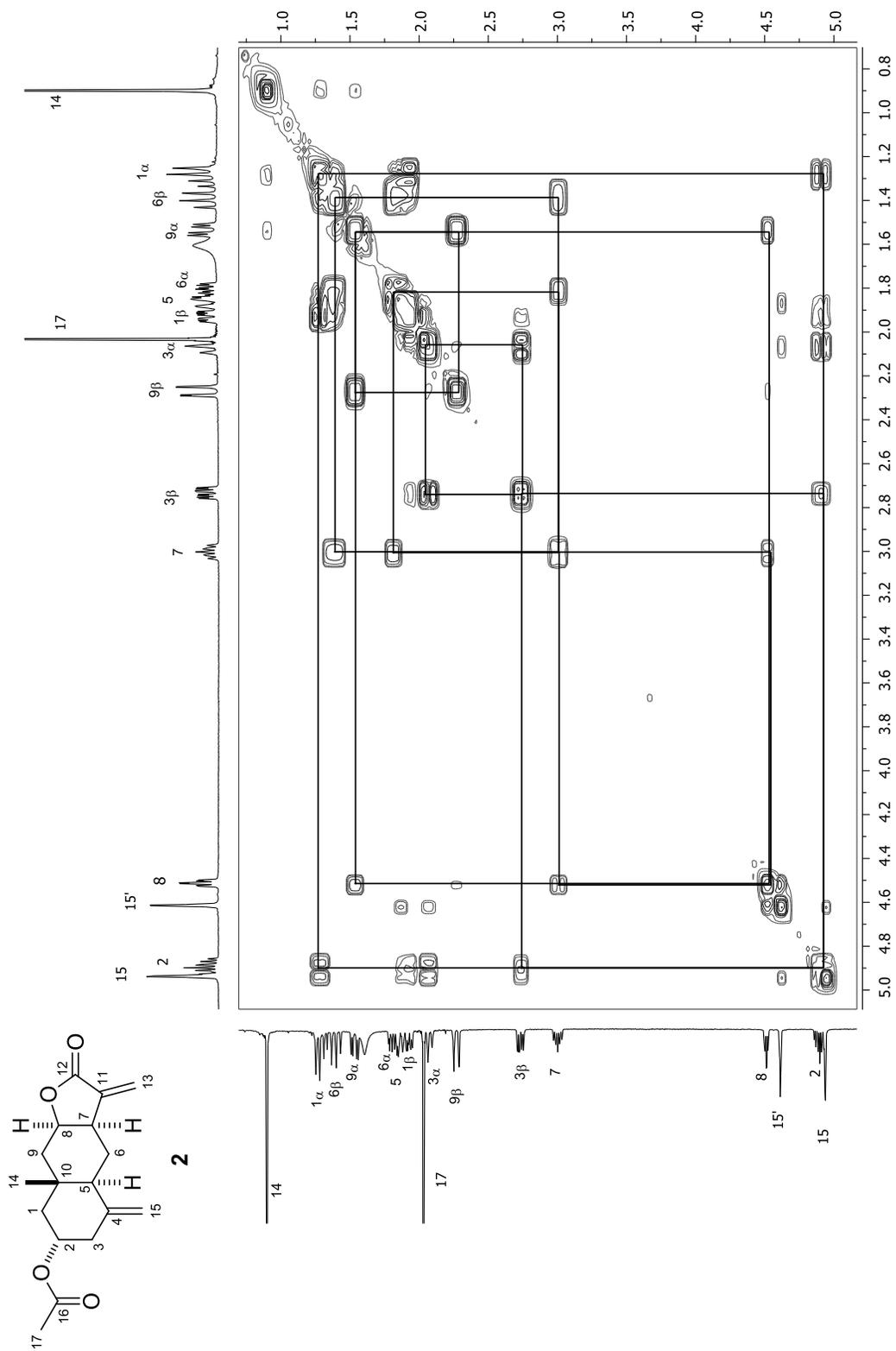


Figura 25. Espectro COSY (400 MHz) de la (+)-acetilivalina (2) en CDCl₃.

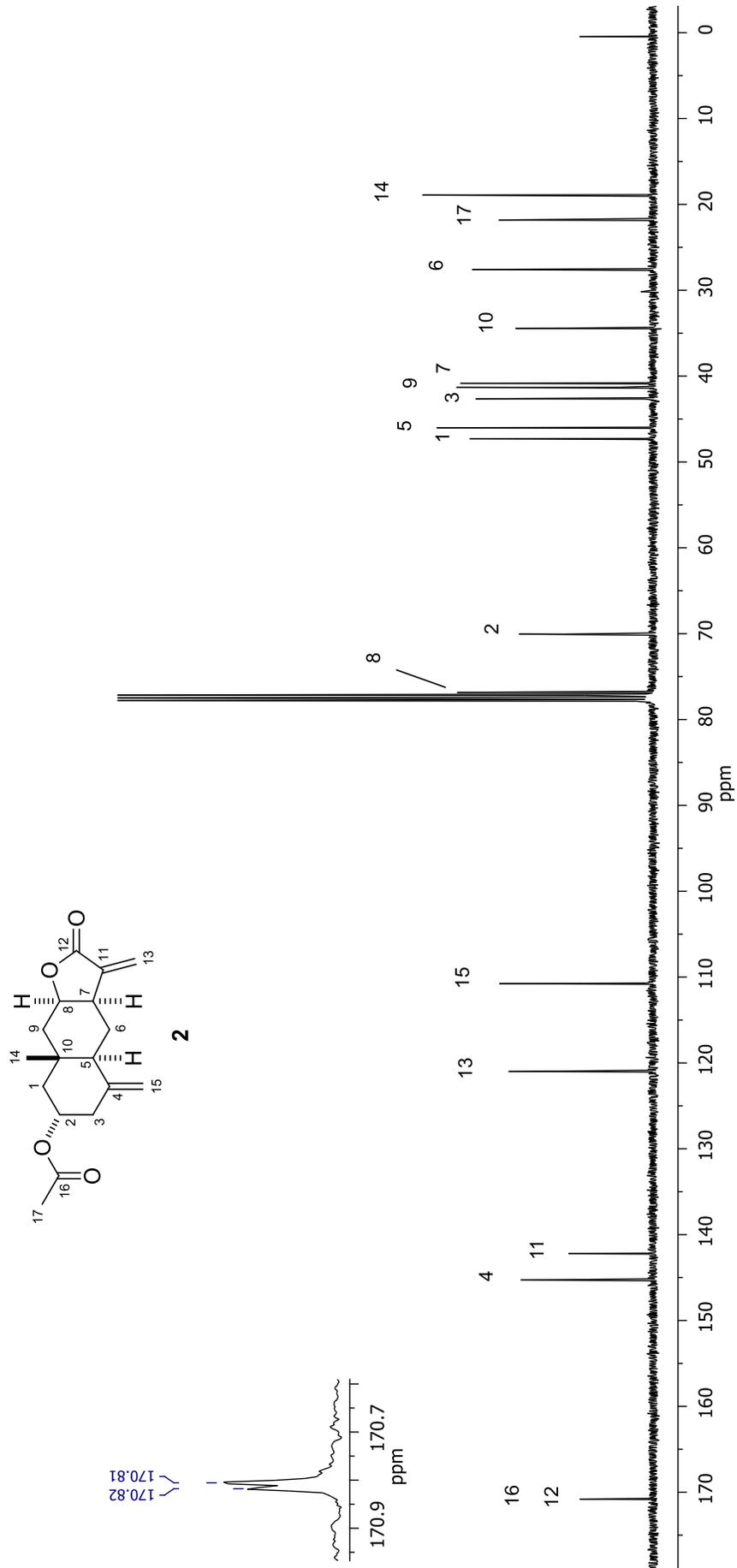


Figura 26. Espectro de RMN de ¹³C (100 MHz) de la (+)-acetilvalina (2) en CDCl₃.

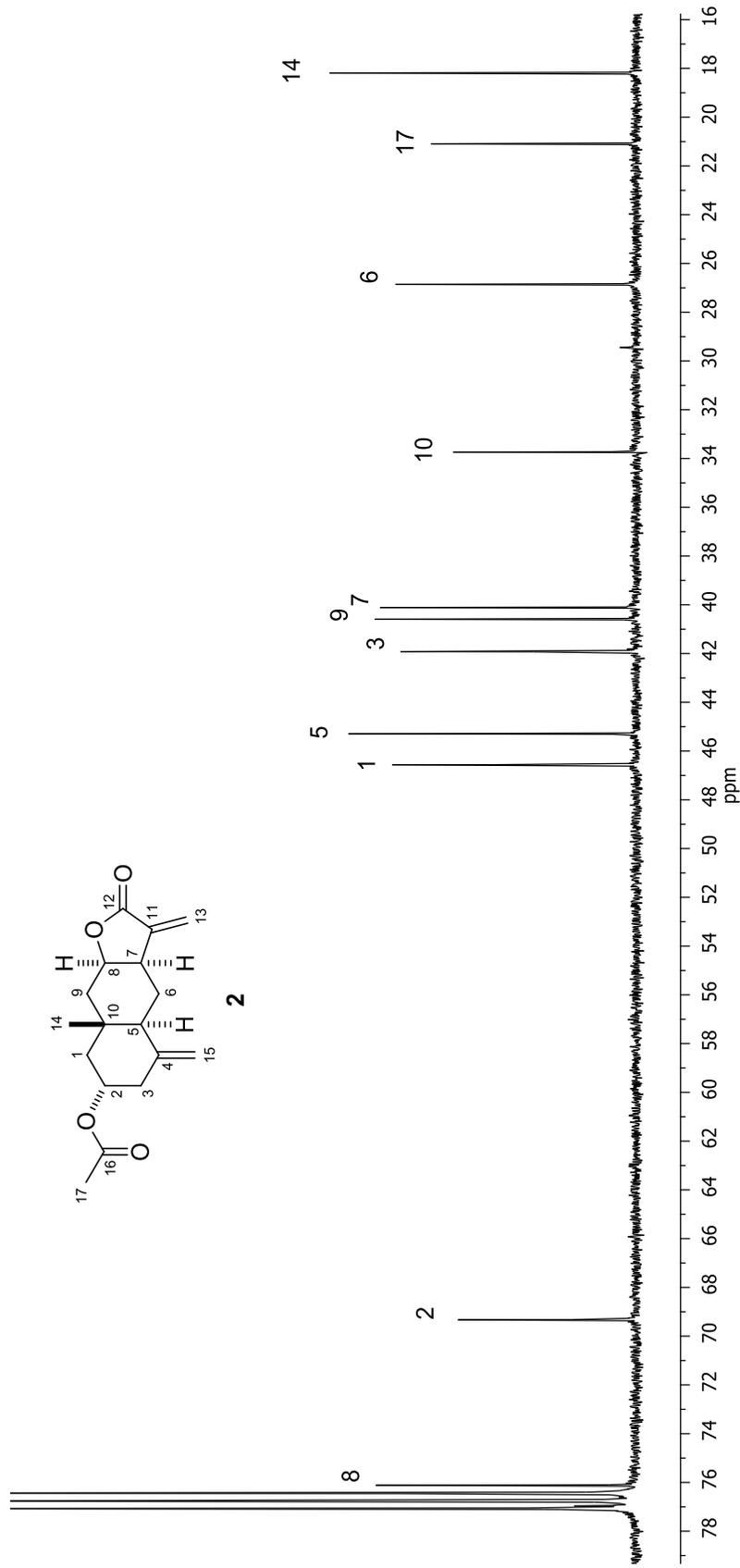


Figura 27. Ampliación del espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) de la (+)-acetilivalina (2) en CDCl_3 .

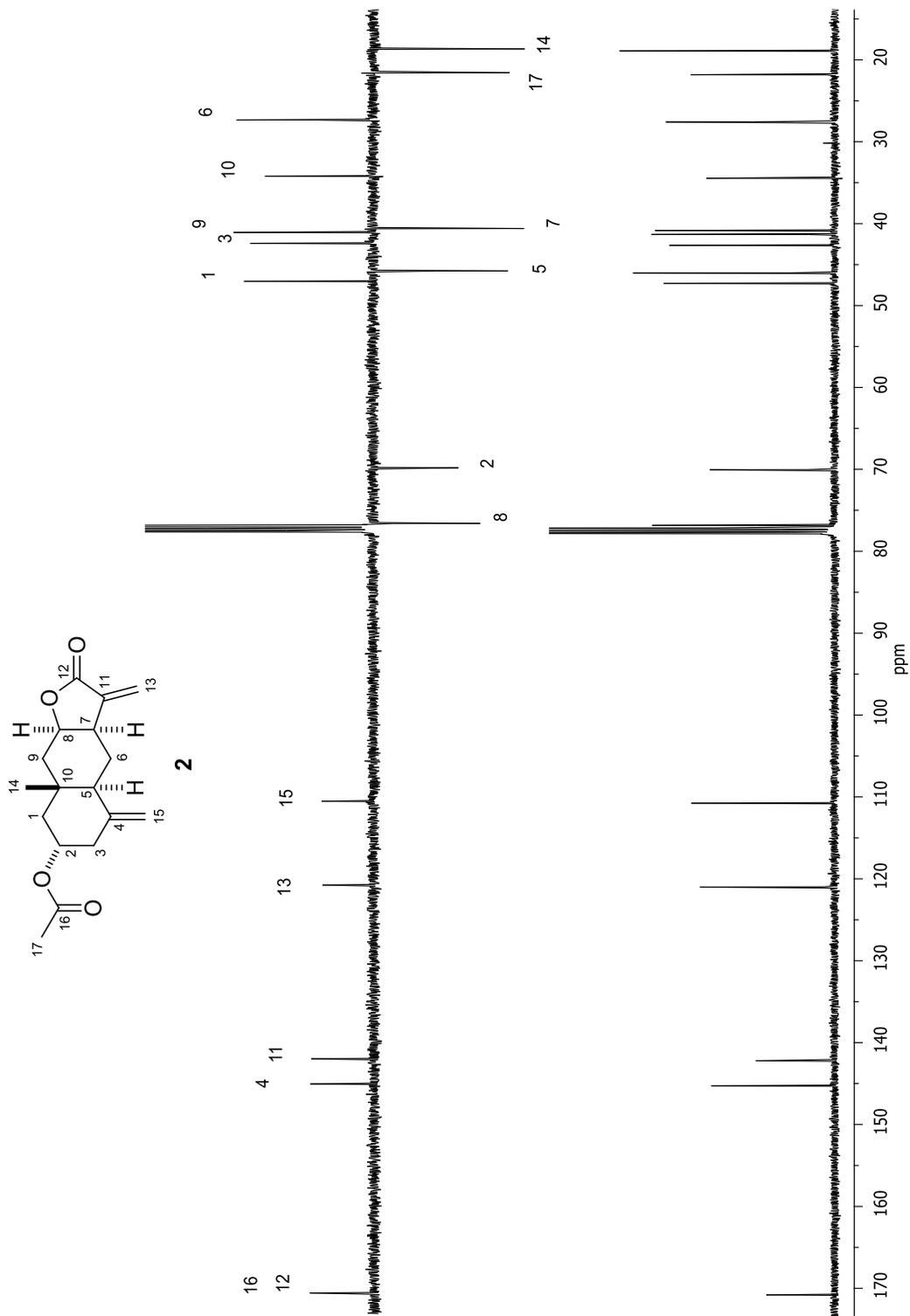


Figura 28. Espectros APT (arriba) y ^{13}C (abajo) (100 MHz) de la (+)-acetilivalina (2) en CDCl_3 .

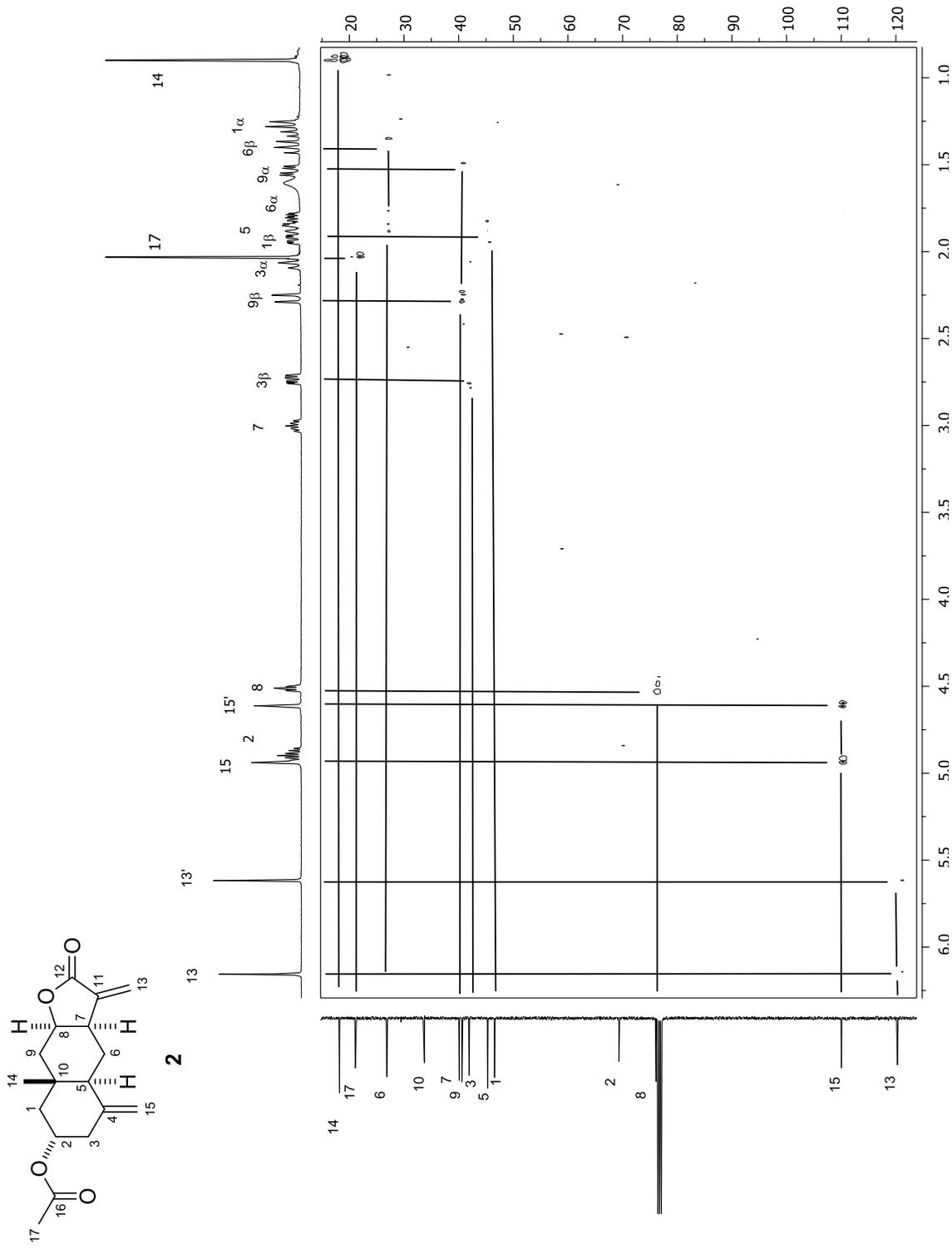


Figura 29. Espectro HMQC (400 MHz) de la (+)-acetivalina (2) en CDCl₃.

5.3. Decocción de la parte aérea

Debido al uso medicinal en forma de decocción de *Z. triloba*, se decidió llevar a cabo el estudio de la extracción con agua caliente de la parte aérea de la planta, con la intención de conocer si en este extracto también están presentes las lactonas sesquiterpénicas **1** y **2**, u otras. Esto es relevante debido a la actividad biológica importante de las sustancias, la cual se explicó ya en la sección de Antecedentes.

Así, una muestra seca y triturada (100 g) se sometió a extracción con agua hirviendo (decocción, 750 mL). Posteriormente, la solución se extrajo con AcOEt, la fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se concentró para obtener un residuo de color café (1.37 g, 1.37%) que se analizó mediante CCF (Figura 30) y RMN de ¹H (Figura 31), mostrando estar constituido principalmente por la (+)-ivalina (**1**) y trazas de la (+)-acetilivalina (**2**). La fase acuosa se evaporó a sequedad en el rotavapor y el residuo se analizó por RMN de ¹H (Figura 32), en donde no se apreciaron señales para **1**, ni de ningún otro compuesto de naturaleza terpénica. Lo anterior nos permitió concluir que la (+)-ivalina (**1**) se extrajo casi por completo en la fase de AcOEt, y que, de acuerdo con lo observado en el espectro de RMN de ¹H, esta parte contiene aproximadamente un 75% de la lactona **1**.

Una comparación mediante CCF (Figura 30) de los extractos de AcOEt y la parte de AcOEt del extracto acuoso contra muestras auténticas de la (+)-ivalina (**1**) y la (+)-acetilivalina (**2**), obtenidas en este trabajo, reveló la presencia de las dos sustancias en la parte de AcOEt del extracto acuoso, siendo **1** el compuesto mayoritario con

respecto a **2**. La placa se reveló con sulfato cérico amoniacal y posterior calentamiento.

Lo anterior evidenció que efectivamente las lactonas **1** y **2** están presentes en la decocción de la parte aérea de la especie, pero que **2** se extrae en pequeñas cantidades con respecto a **1**, de tal suerte que no se pudieron apreciar sus señales por RMN de ^1H .

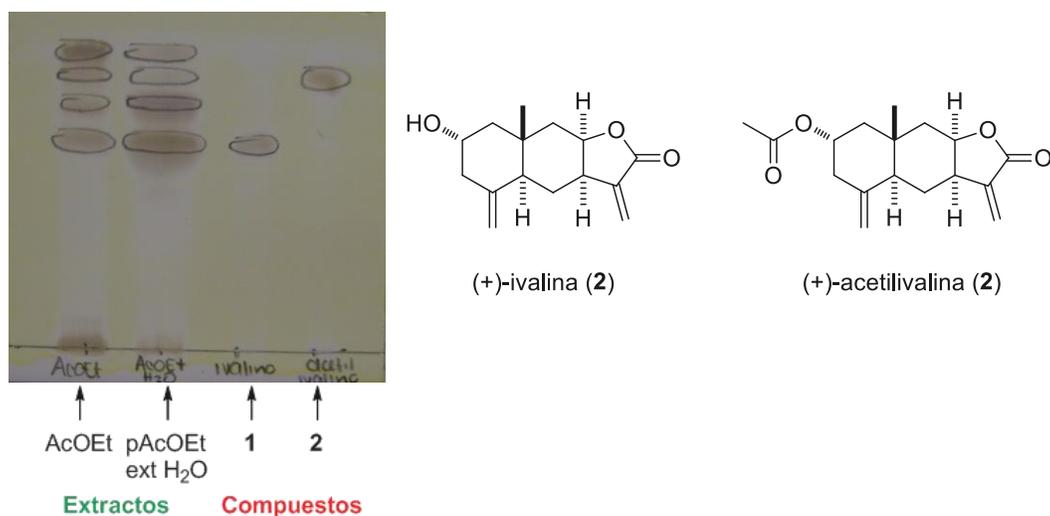


Figura 30. Cromatografía en capa fina (elusión con CHCl_3 – acetona 2:1) de los extractos de AcOEt, parte AcOEt del extracto acuoso (decocción) y estructuras de la (+)-ivalina (**1**) y la (+)-acetilivalina (**2**).

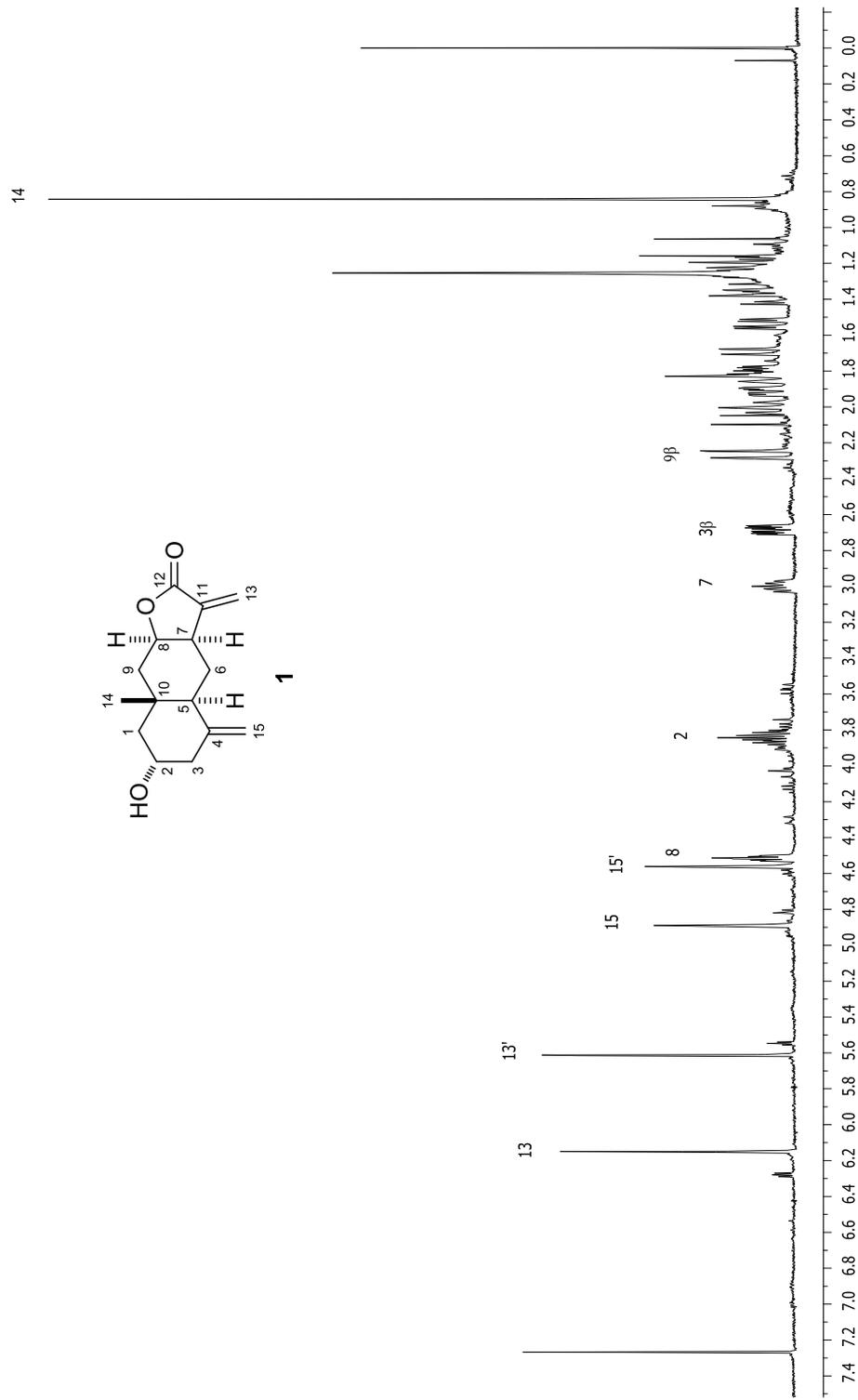


Figura 31. Espectro de RMN de ¹H (400 MHz) de la parte AcOEt del extracto acuoso de *Z. triloba* en CDCl₃.

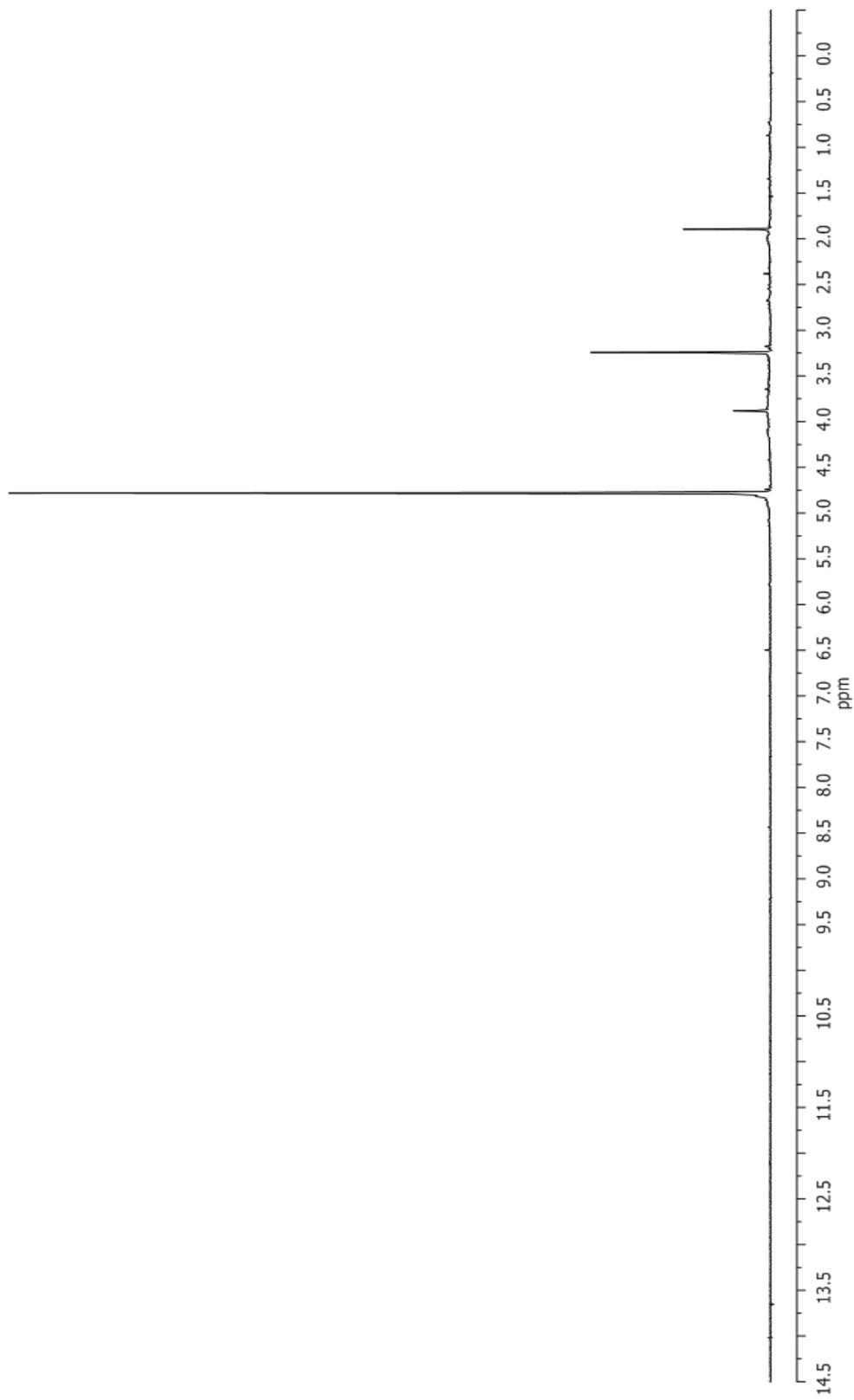


Figura 32. Espectro de RMN de ¹H (400 MHz) de la fase acuosa de la decocción de *Z. triloba* en D₂O.

5.4. Maceración acuosa de la parte aérea

Con base en los resultados obtenidos del estudio de la decocción de la parte aérea de *Z. triloba*, se decidió explorar también el extracto acuoso obtenido mediante maceración de esta misma parte. De tal manera que la parte aérea fresca de *Z. triloba* (100 g) se maceró con H₂O destilada durante cuatro días a temperatura ambiente, proceso en el cual se observó fermentación (Figura 33).

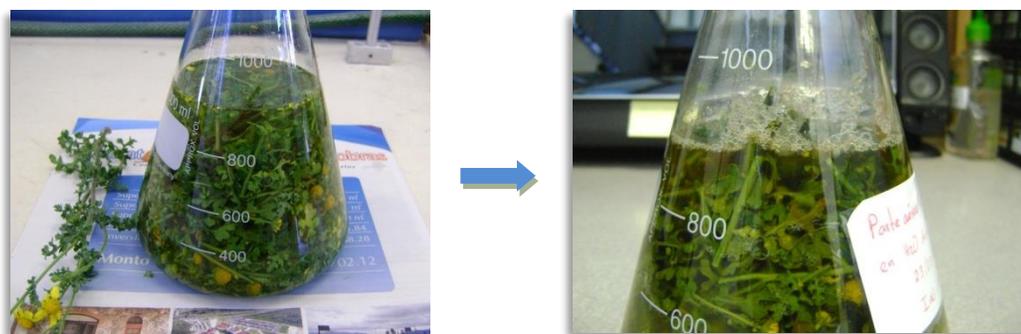


Figura 33. Maceración acuosa y fermentación de la parte aérea de *Z. triloba*.

La solución se filtró, se extrajo con AcOEt, la fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se concentró para obtener un producto de color café (1.23 g, 1.23%). El residuo se analizó mediante CCF y RMN de ¹H (Figura 35), mostrando estar constituido principalmente por la (+)-ivalina (**1**). Posteriormente, se sometió a separación mediante cromatografía en columna, usando gel de sílice y cloroformo-acetona(3:1) como eluyente. Este proceso condujo a la obtención de una fracción que mostró la presencia de la (+)-ivalina (**1**) junto con otro compuesto que en ese

momento se pensó que podría ser también una lactona sesquiterpénica. En su espectro de ^1H (Figura 36) se apreció que los compuestos tenían una proporción de aproximadamente 1:1. Se continuó la separación de dicha fracción por CC en gel de sílice y hexano-AcOEt permitiendo obtener el compuesto **1** y otro compuesto en forma de un polvo ligeramente amarillo (10 mg, .81%) que presentó p.f. de 144–145 °C. Del análisis por RMN de ^1H y de ^{13}C , así como por la comparación con los datos de los compuestos **1** y **2**, se concluyó que se trataba de la (+)-11 α ,13-dihidroivalina (**3**). La sustancia **3** difiere de **1** en la reducción del doble enlace en C-11(C-13) (Figura 34), y es posible que se haya formado por medio de la actividad enzimática del microorganismo responsable de la fermentación.

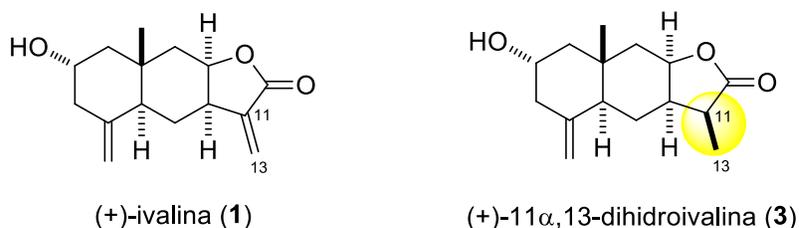


Figura 34. Lactonas sesquiterpénicas aisladas de la maceración y fermentación de la parte aérea de *Z. triloba*.

En el espectro de ^1H de la sustancia **3** (Figuras 37 y 38) (Tabla 5), comparado con el de la lactona **1**, se observó la desaparición de las señales correspondientes al metileno exocíclico H-13 y H-13'. En su lugar se apreció una señal doble ($J = 8$ Hz) característica de un metilo secundario en 1.23 ppm, la cual integró para 3 protones. Adicionalmente, se observó una señal quintuple ($J = 8$ Hz) en 2.83 ppm que integró para un protón. Estas señales se asignaron al Me-13 y a H-11, respectivamente. En

la Figura 38 se muestra la ampliación de 0.8 a 2.9 ppm de este espectro donde se puede observar con mayor claridad la multiplicidad de las señales correspondientes al resto de los protones. En el espectro de RMN de ^{13}C (Figuras 39 y 40) (Tabla 6) se observaron 15 señales que, comparándolo con el espectro de la (+)-ivalina (**1**), se apreció el cambio en el desplazamiento a frecuencias menores de los carbonos C-11 y C-13, como era lógico de esperar ya que ahora estos carbonos tienen hibridación sp^3 , en lugar de sp^2 en el compuesto **1**. Como en los casos anteriores, también se hizo uso de experimentos de RMN en 2D (Figuras 41–46) para corroborar la asignación de sus señales en los espectros de ^1H y ^{13}C . Así, por ejemplo, en las Figuras 42 y 43 se muestra el experimento HMQC de **3** asignado.

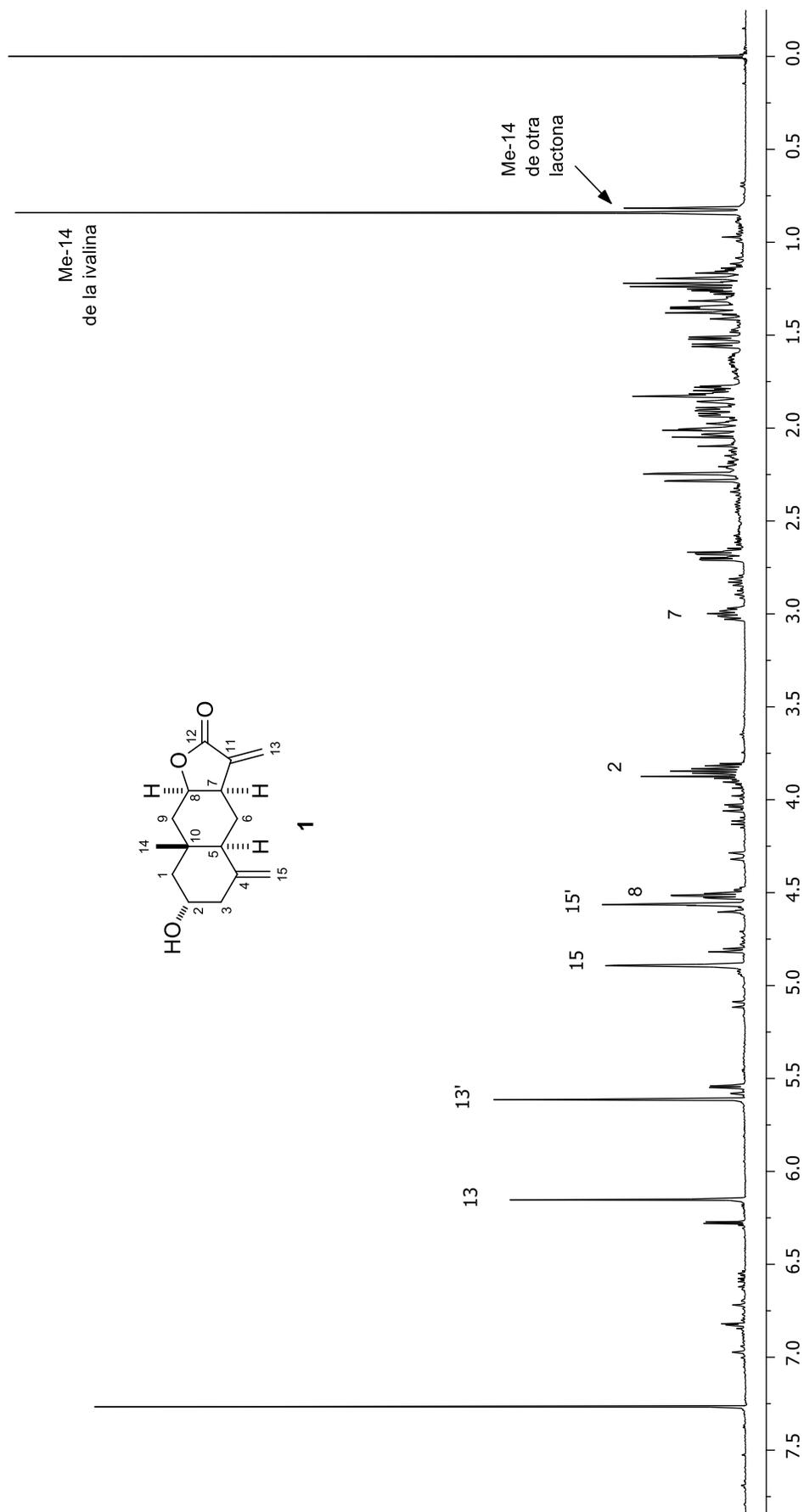


Figura 35. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) del extracto con AcOEt de la maceración acuosa de la parte aérea de *Z. triloba* en CDCl_3 .

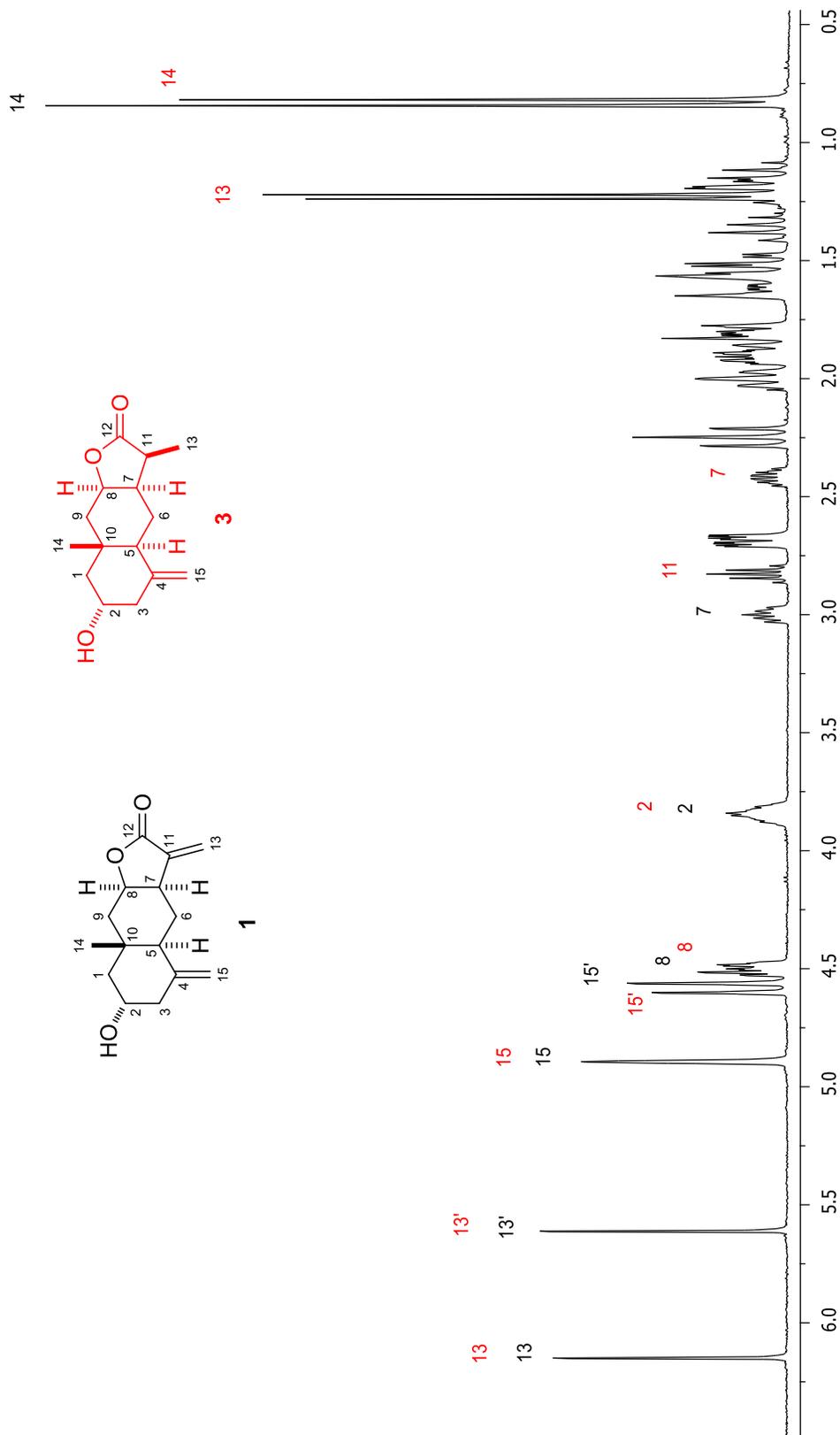


Figura 36. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) de la fracción (8-13) de la cromatografía en columna del extracto con AcOEt de la maceración acuosa de la parte aérea de *Z. triloba* en CDCl_3 . Mezcla de **1** y **3** aproximadamente (1:1).

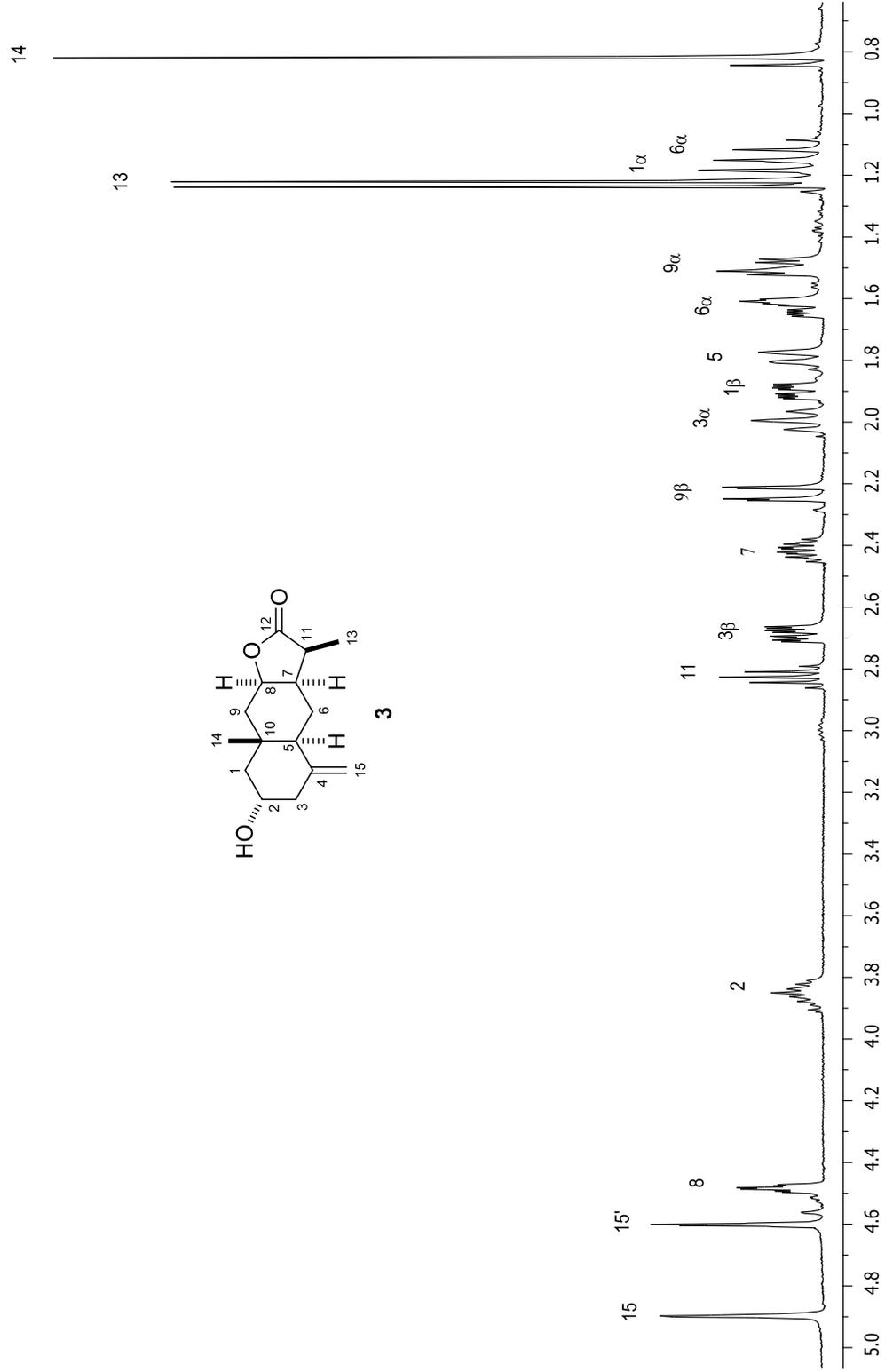


Figura 37. Espectro de RMN de ¹H (400 MHz) de la (+)-11α,13-dihidroivalina (**3**) en CDCl₃.

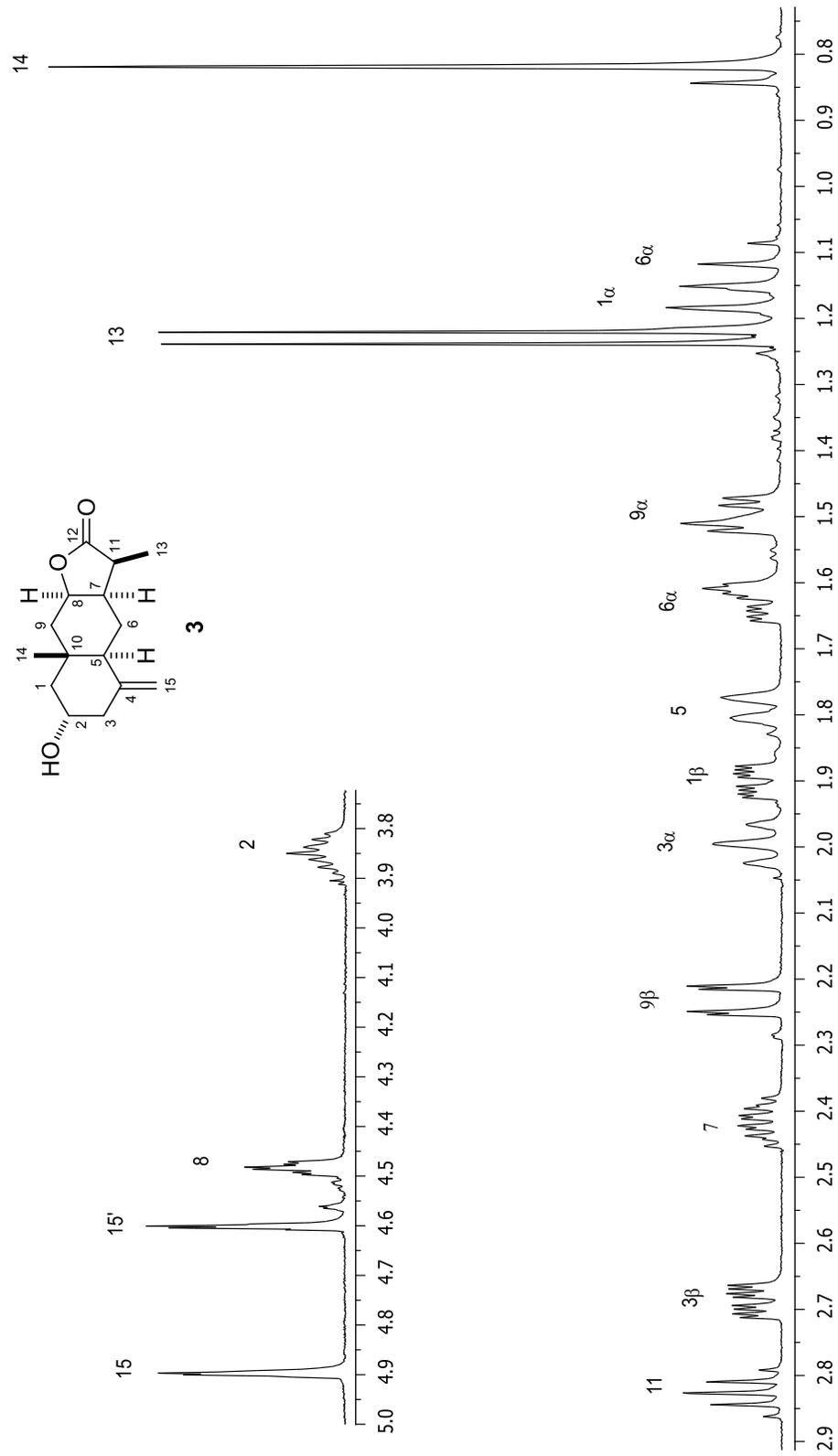


Figura 38. Ampliaciones del espectro de RMN de ^1H (400 MHz) de la (+)-11 α ,13-dihidrovalina (**3**) en CDCl_3 .

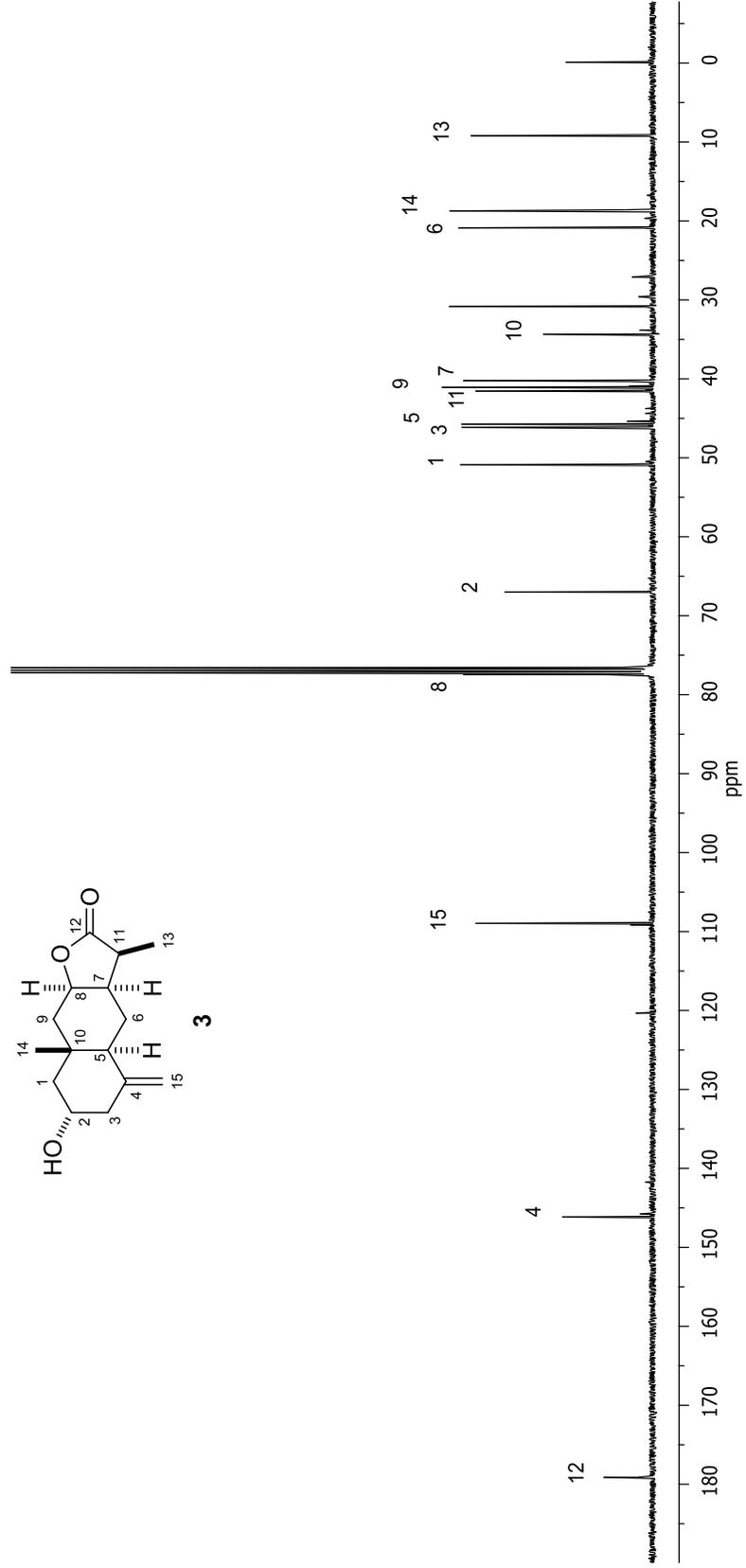


Figura 39. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) de la (+)-11 α ,13-dihidroivalina (**3**) en CDCl_3 .

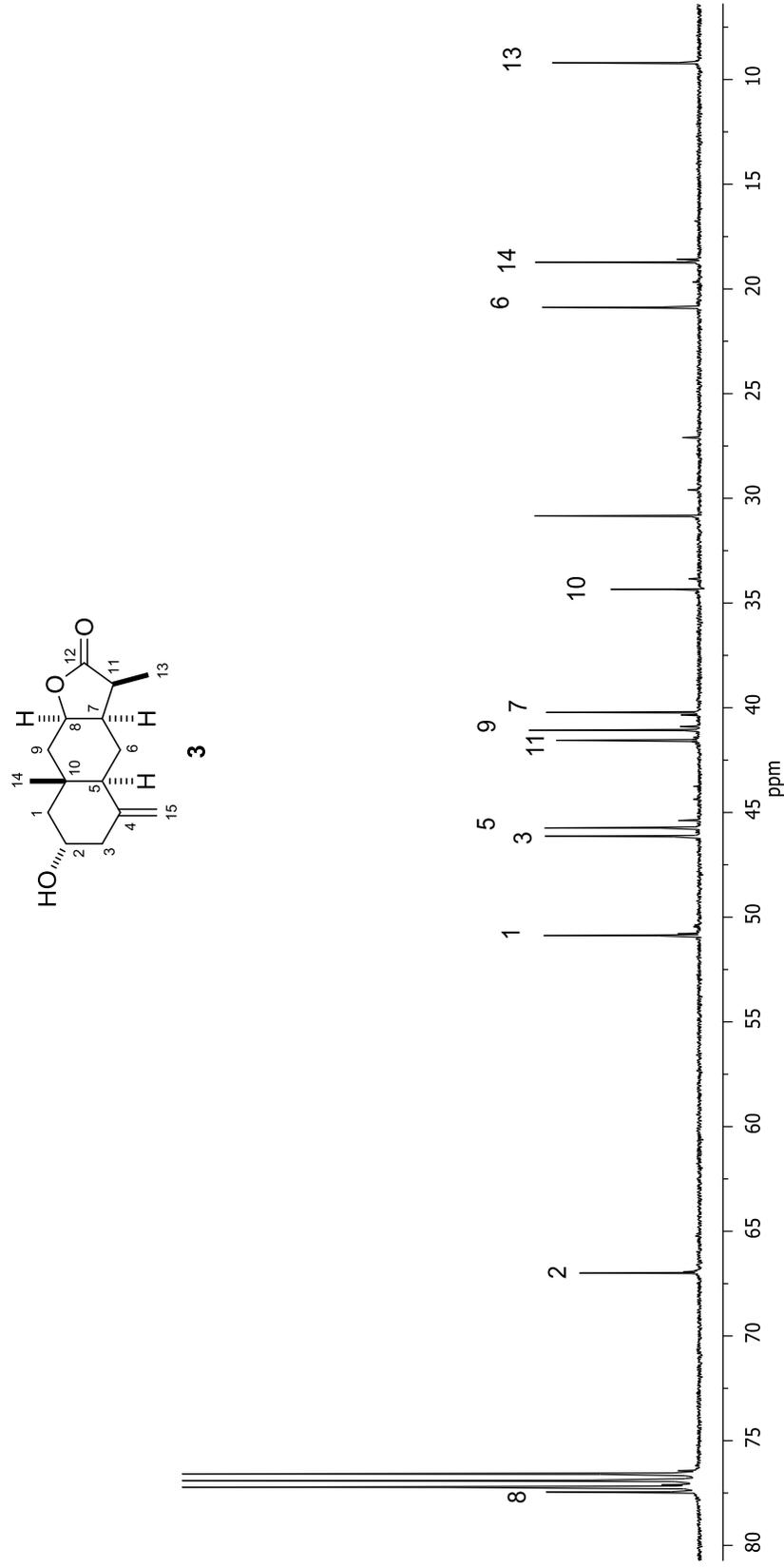


Figura 40. Ampliación del espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) de la (+)-11 α ,13-dihidroivalina (**3**) en CDCl_3 .

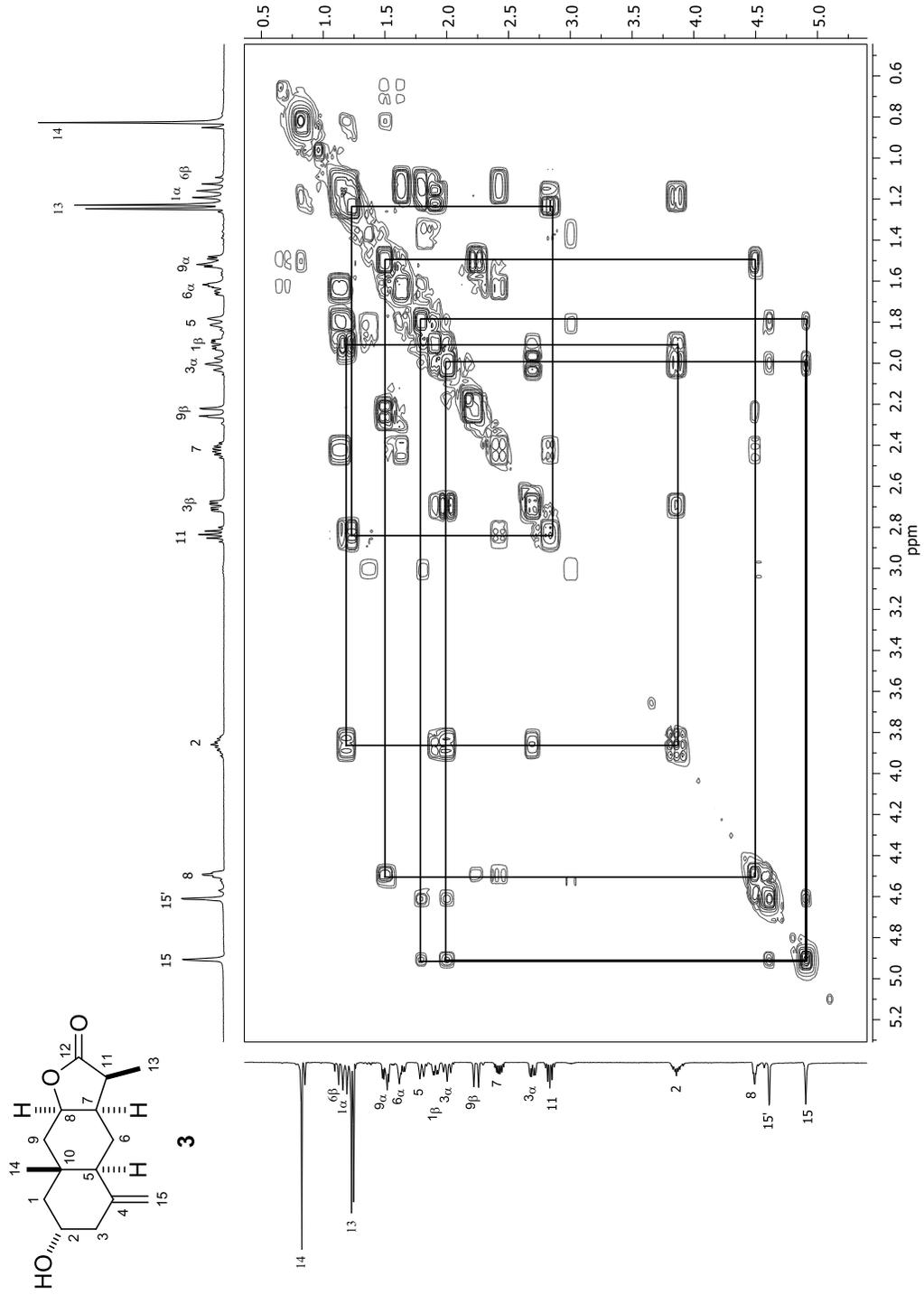


Figura 41. Espectro COSY (400 MHz) de la (+)-11 α ,13-dihidrovalina (**3**) en CDCl₃.

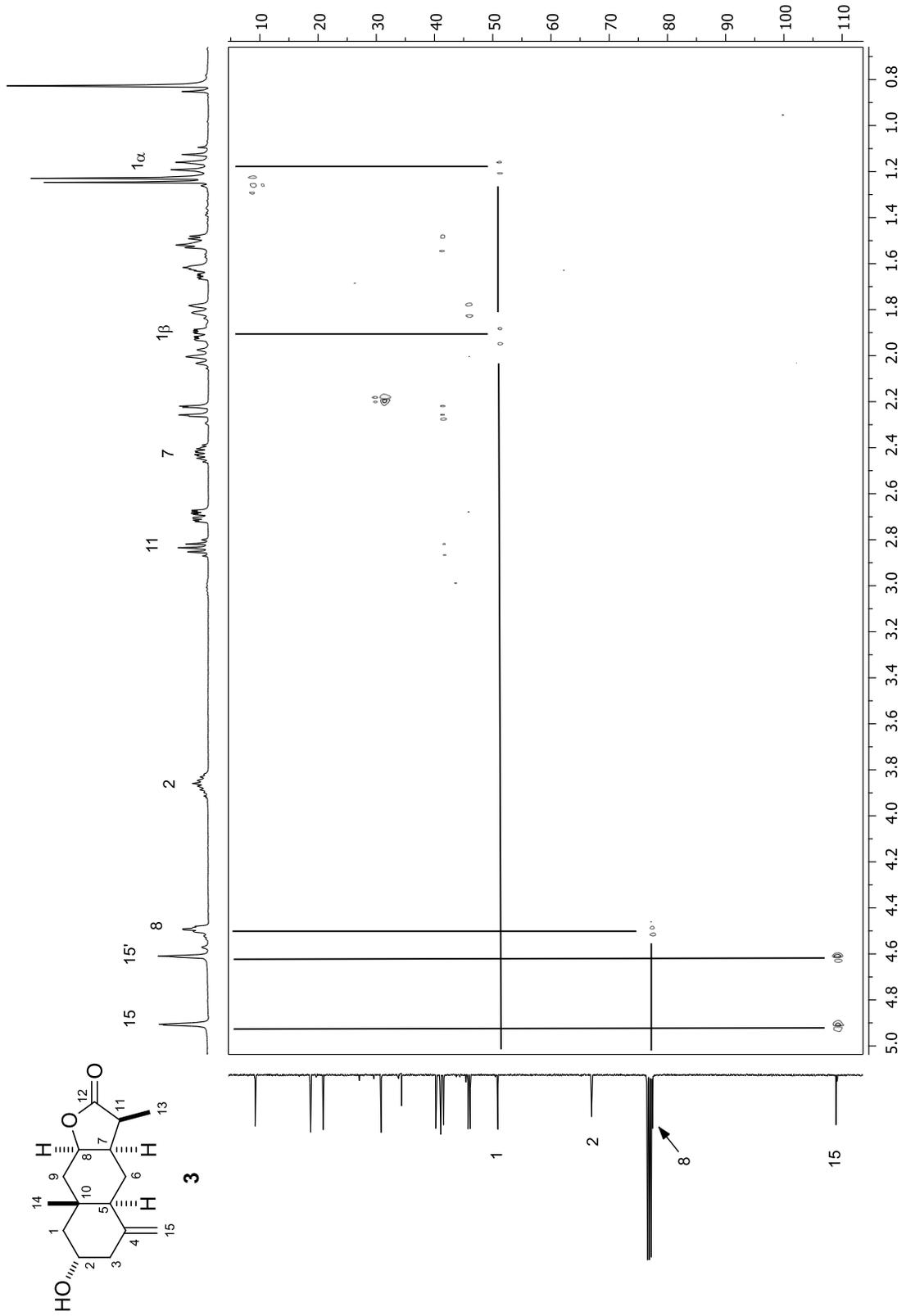


Figura 42. Espectro HMQC (400 MHz) de la (+)-11 α ,13-dihidrovalina (**3**) en CDCl₃.

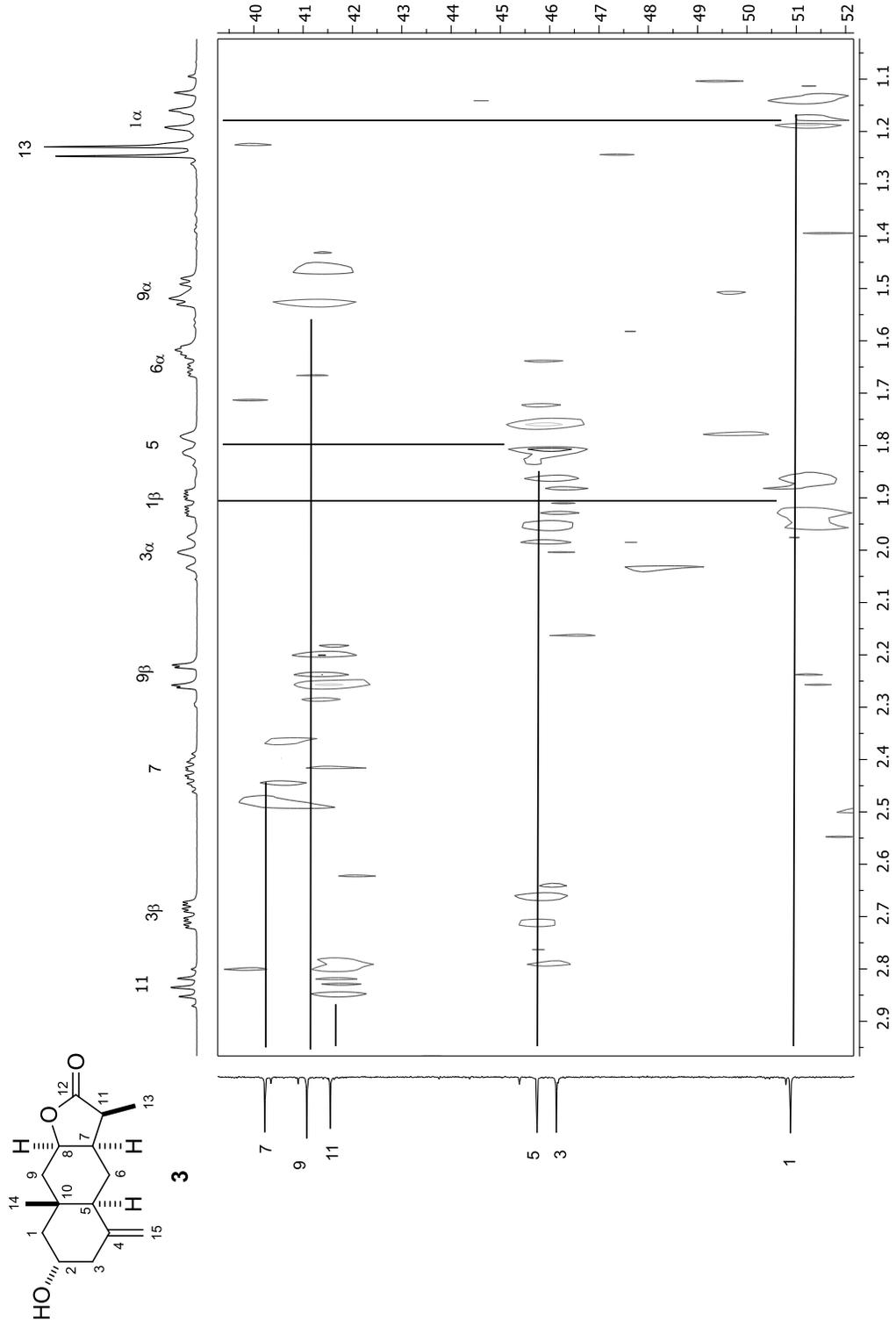


Figura 43. Ampliación de espectro HMQC (400 MHz) de la (+)-11 α ,13-dihidrovalina (**3**) en CDCl₃.

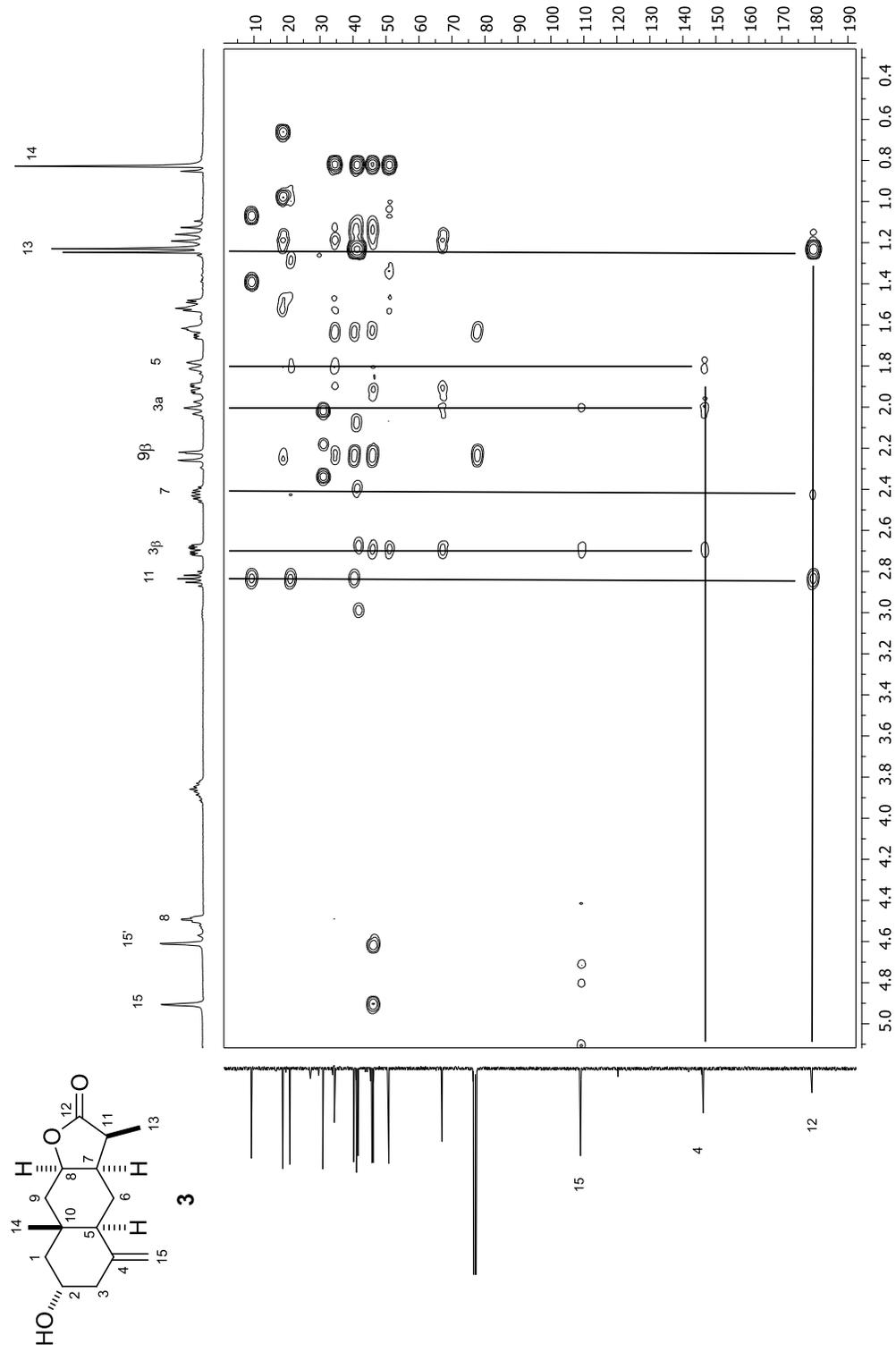


Figura 44. Espectro HMBC (400 MHz) de la (+)-11 α ,13-dihidrovalina (**3**) en CDCl₃.

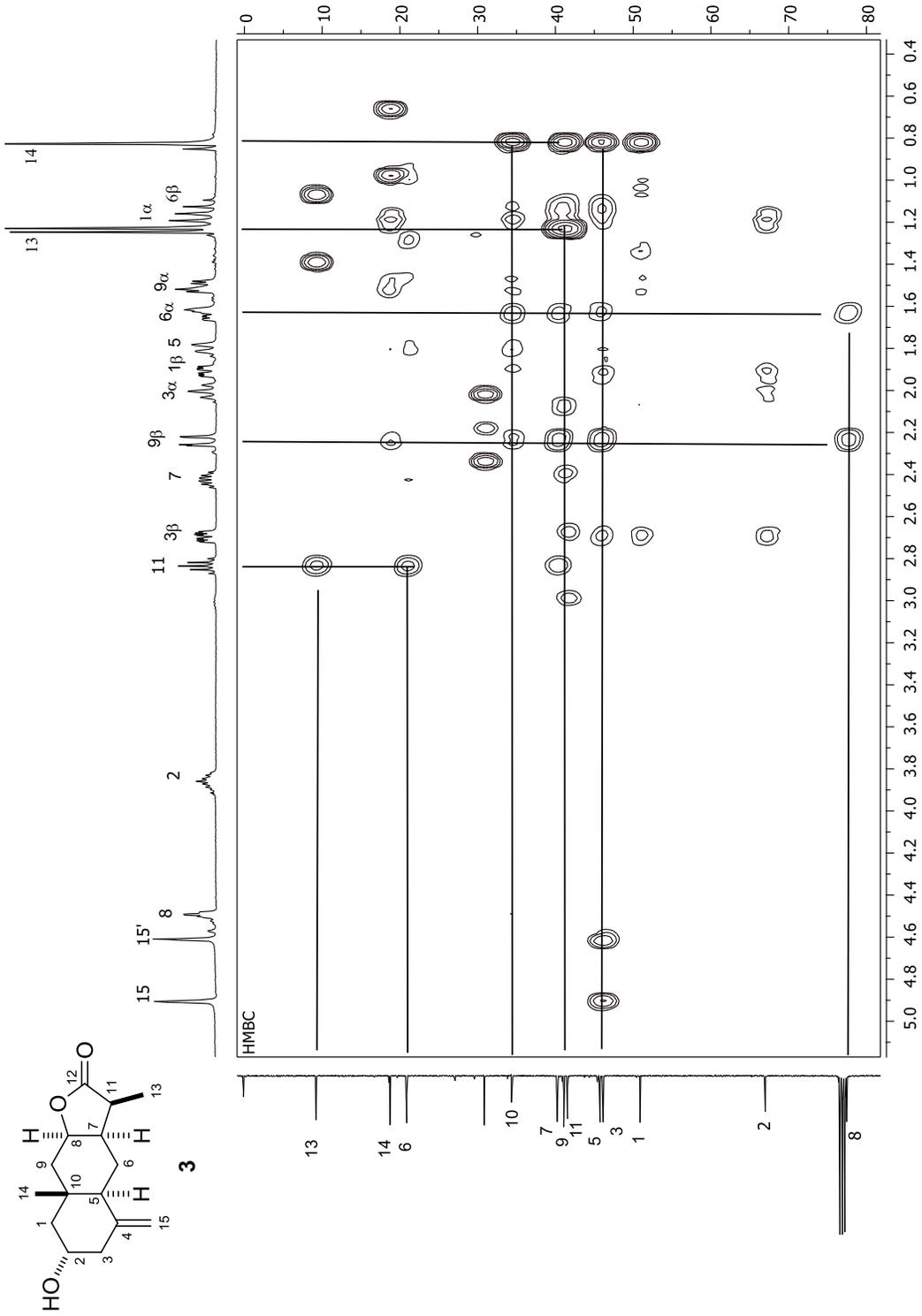


Figura 45. Ampliación de espectro HMBC (400 MHz) de la (+)-11 α ,13-dihidrovalina (**3**) en CDCl₃.

Después de lo anterior, se regresó al análisis del espectro de ^1H inicial del extracto con AcOEt de la maceración acuosa (Figura 35). En este espectro se hicieron ampliaciones cuidadosas y se integraron algunas de sus señales, como por ejemplo la del metilo-14, lo cual condujo a saber que en la fracción de AcOEt se obtuvieron en mezcla las lactonas **1** y **3** en una proporción de aproximadamente 5:1, respectivamente.

La (+)-11 α ,13-dihidroivalina (**3**) es un compuesto conocido, y sus datos físicos y espectroscópicos resultaron iguales a los descritos (Topçu et al., 1993). **3** tiene un centro estereogénico adicional (C-11) con respecto a las lactonas **1** y **2**, cuya configuración absoluta se ha descrito como *S*, con base en la constante de acoplamiento observada entre los hidrógenos H-7 y H-11, la cual ha sido reportada de 7.0 Hz (Topçu et al., 1993). En nuestro caso, la constante de acoplamiento determinada entre estos dos protones fue de 7.1 Hz, lo cual está de acuerdo con la estereoquímica propuesta de C-11.

Tabla 5. Datos de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) de los compuestos **1-3**.

Protón	Desplazamiento en ppm (m, <i>J</i> en Hz)		
	1	2	3
1 α	1.20 (dd, 12.2, 11.5)	1.28 (t, 12)	1.19 (q, 12.8)
1 β	1.92 (ddd, 12.4, 4.4, 2.0)	1.93 (ddd, 14.8, 4.8, 2.0)	1.91 (tt, 12.2, 4.4, 2.4)
2	3.83 (tt, 11.2, 11.2, 6.4, 4.8)	4.90 (tt, 11.7, 11.7, 5.0, 4.8)	3.85 (dddd, 11.4, 11.4, 4.4, 4.4)
3 α	2.00 (dd, 11.6, 11.6)	2.06 (dd, 12.8, 12.8)	2.00 (dd, 11.6, 11.6)
3 β	2.68 (ddd, 12.2, 5.2, 2.0)	2.73 (ddd, 12.4, 4.8, 2.4)	2.70 (ddd, 12.0, 5.2, 2.4)
5	1.86 (m)	1.88 (m)	1.80 (m)
6 α	1.82 (ddd, 14.0, 6.8, 2.8)	1.64 (m)	1.63 (m)
6 β	1.37 (ddd, 13.2, 13.2, 12.4)	1.26 (m)	1.13 (t, 13.6)
7	3.02 (ddd, 10.8, 6.8, 5.2,)	3.00 (ddd, 11.6, 6.2, 6.2)	2.43 (ddt, 10.4, 6.2, 4.2)
8	4.51 (td, 5.0, 1.5)	4.51 (ddd, 4.8, 4.8, 1.6)	4.49 (ddd, 4.4, 4.4, 1.8)
9 β	2.26 (dd, 15.7, 1.6)	2.26 (dd, 15.6, 1.6)	2.23 (dd, 15.2, 1.6)
11	–	–	2.83 (quíntuple, 8.0)
13	5.60 (d, 1.0)	5.62 (d, 1.2)	1.23 (d, 8.0)
13'	6.14 (d, 1.0)	6.16 (d, 1.2)	–
14	0.84 (s)	0.90 (s)	0.83 (s)
15	4.90 (d br, 1.3)	4.94 (d br, 1.2)	4.91 (d, 1.2)
15'	4.55 (d br, 1.3)	4.61 (d, 1.2)	4.61 (d, 1.6)
17	–	2.03 (s)	–

Tabla 6. Datos de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de los compuestos **1-3**.

Carbono	Desplazamiento en ppm		
	1	2	3
1	50.78	46.56	50.88
2	66.89	69.33	66.99
3	46.19	41.92	46.16
4	145.91	145.35	146.30
5	45.42	45.32	45.70
6	27.17	26.85	20.87
7	40.38	40.11	40.22
8	76.62	76.16	77.45
9	40.95	40.59	41.07
10	33.92	33.73	34.32
11	141.78	142.26	41.55
12	170.57	170.81	179.07
13	120.52	121.00	9.20
14	18.69	181.18	18.77
15	110.00	110.76	108.96
16	—	170.81	—
17	—	21.09	—

5.5. Cuantificación de la (+)-ivalina en el té de la parte aérea de *Z. triloba*

La parte aérea seca y molida (2.5 g) se extrajo con H₂O caliente (infusión, 250 mL) por 10 minutos, resultando una solución de color café que se filtró y se extrajo con AcOEt (250 mL). La fase orgánica se concentró en el rotavapor para obtener un residuo (46 mg, 1.84%), el cual se analizó por triplicado mediante HPLC para determinar la (+)-ivalina (**1**). La cuantificación se llevó a cabo mediante comparación con una curva estándar obtenida usando concentraciones conocidas de muestras auténticas de **1** aislada en este trabajo, como se muestra en la Tabla 7.

Tabla 7. Muestras de la solución estándar de la (+)-ivalina (**1**) a diferentes concentraciones.

No. de muestra	1	2	3	4	5	6
Concentración (mg/mL)	4.4	3	2.4	2	1	0.2

Las muestras de referencia se disolvieron en CH₃CN para su análisis por HPLC en el cual se utilizó una columna de fase reversa, eluyendo con CH₃CN-H₂O (1:1). Los cromatogramas de una muestra del estándar, así como de la muestra por analizar (té) se observan en la Figura 46. En la Figura 47 se aprecia la curva estándar que se utilizó en esta cuantificación, usando el método de los estándares externos para obtener el factor de proporcionalidad cumpliendo con la ley de Beer que dice que la absorbancia está relacionada linealmente con la concentración de las especies

absorbentes, obteniéndose la ecuación de regresión lineal $B=mx+y$ (Skoog et al.1997), donde el factor de correlación fue $R^2 = 0.9951$. Las muestras del té se prepararon a una concentración de 4 mg/mL del extracto con AcOEt en CH_3CN .

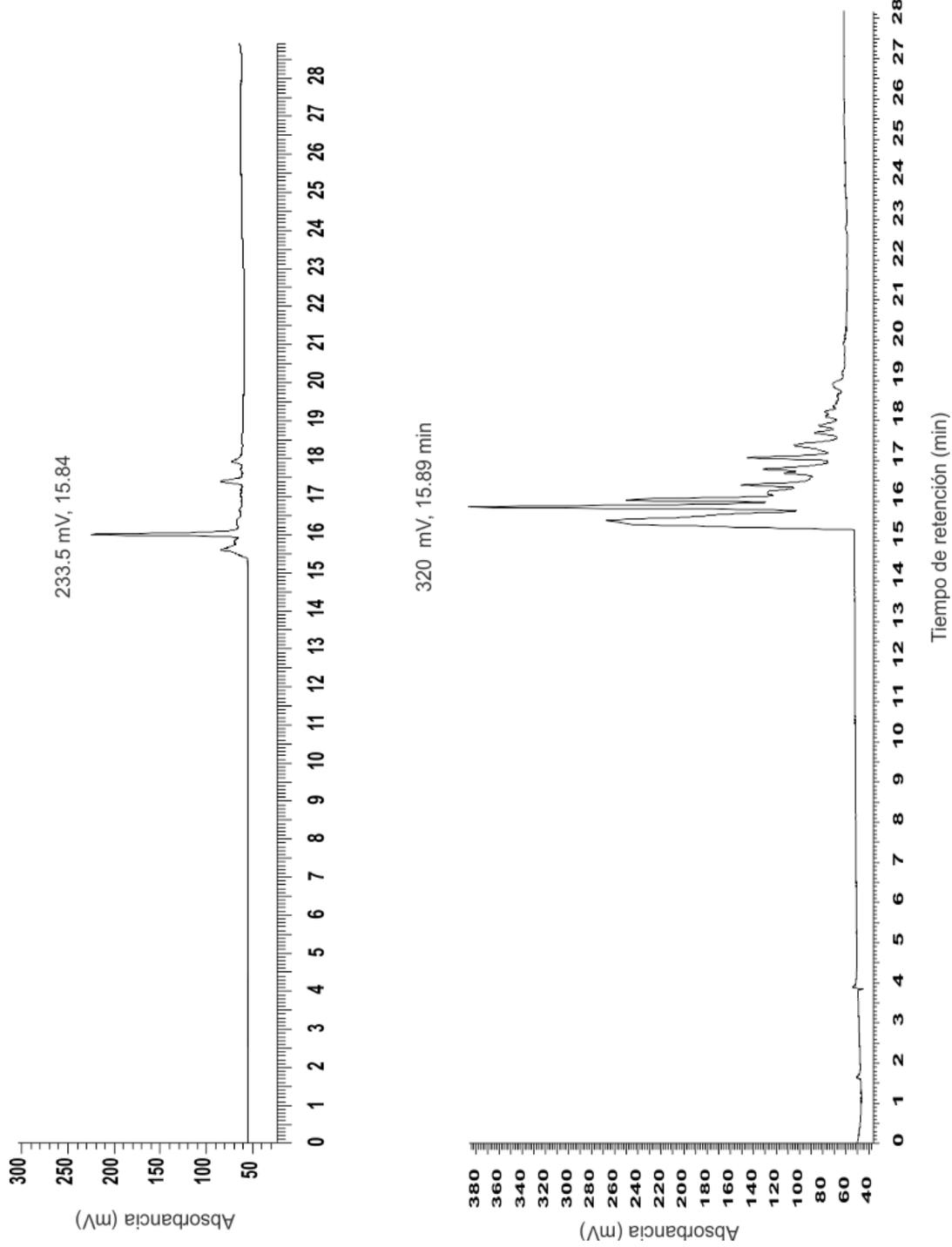


Figura 46. Cromatogramas del estándar (arriba, concentración 2.4 mg/mL) y de la muestra del extracto con AcOEt del té de *Z. triloba* (abajo).

Los picos de la muestra se identificaron comparándolos con los tiempos de retención del estándar (Figura 46), el cual fue de 15.84 minutos.

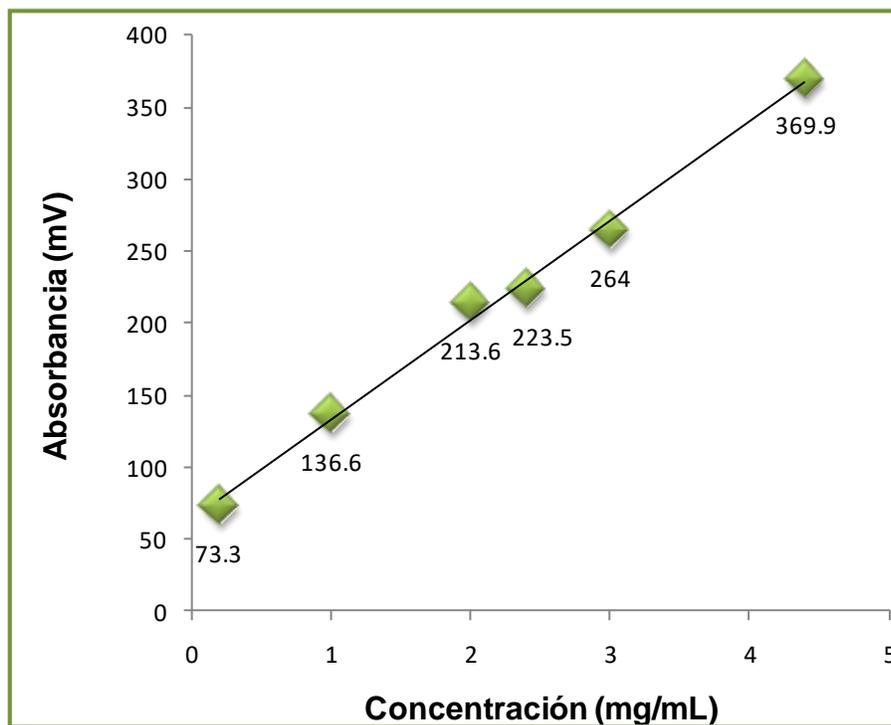


Figura 47. Curva del estándar (+)-ivalina (1) a diferentes concentraciones.

Los resultados obtenidos utilizando la ecuación de regresión lineal, indicaron que tal cantidad de infusión (té, 250 mL) de la parte aérea de *Z. triloba* (2.5 g) contiene 30 mg de la (+)-ivalina (**1**) (1.2%) (Figura. 48).



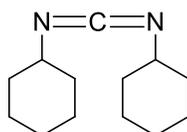
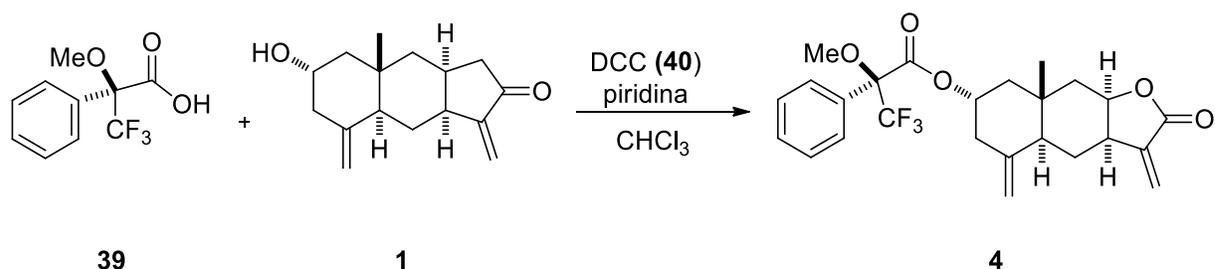
Figura 48. El té de *Z. triloba* y contiene 30 mg del antilucémico (+)-ivalina (**1**).

5.6. Esterificación de la (+)-ivalina con el ácido de Mosher (S)-(-)- α -metoxi- α -(trifluorometil)fenilacético

Con la finalidad complementar la caracterización y configuración absoluta de las lactonas sesquiterpénicas aisladas en este trabajo, se decidió obtener un derivado de la (+)-ivalina (**1**) que pudiera formar cristales adecuados para un estudio por difracción de rayos-X. Entonces se pensó en formar un éster empleando un ácido carboxílico de configuración absoluta conocida, cuyo centro estereogénico serviría de referencia para asignar la configuración de los centros quirales de la lactona **1**. En nuestro laboratorio se contaba con el ácido de Mosher (S)-(-)- α -metoxi- α -(trifluorometil)fenilacético (**39**), el cual es un reactivo comercial comúnmente empleado en los laboratorios de química orgánica para determinar configuraciones absolutas de alcoholes y aminas quirales mediante el uso de la RMN. Como se mencionó arriba, en nuestro caso no fue la intención de llevar a cabo un estudio por RMN, si no el obtener un derivado que proporcionara cristales para rayos-X.

Con base en lo anterior, el compuesto **1** (100 mg) se trató con diciclohexilcarbodiimida (DCC) (**40**), piridina y el ácido de Mosher (S)-(-)- α -metoxi- α -(trifluorometil)fenilacético (**39**), usando como disolvente CHCl_3 , para obtener el éster de Mosher de la (+)-ivalina (**4**) con un rendimiento del 23%, después de su purificación mediante CC utilizando gel de sílice y hexano-AcOEt como eluyente (Esquema 5). El rendimiento de la formación de este compuesto no fue muy alto probablemente debido al impedimento estérico de los compuestos, dado que se trata

de la reacción de un alcohol secundario y un ácido carboxílico con sustituyentes *alfa* voluminosos como lo son los grupos fenilo y metoxilo.



Diciclohexilcarbodiimida (DCC) (**40**)

Esquema 5. Obtención del éster de Mosher de la (+)-ivalina (**4**).

El éster de Mosher **4** representa un compuesto nuevo y se caracterizó mediante espectroscopía de RMN de ^1H y ^{13}C , así como por comparación con los datos del compuesto **1**. Desafortunadamente, el compuesto resultó ser un aceite por lo cual no se pudo llevar a cabo el estudio de rayos-X.

En el espectro de RMN de ^1H (Figura 49, Tabla 8) mostró dos señales múltiples cercano a 7.5 ppm correspondiente al grupo fenilo, dos señales dobles en 6.13 y 5.61 ppm para los protones H-13 y H-13', una señal triple de triples en 5.16 ppm correspondiente a H-2, que en comparación del espectro de RMN de ^1H del

compuesto **1**, apareció a frecuencias más altas ya que ahora es base de un grupo éster. En 4.97 y 4.65 ppm se observaron dos señales dobles anchas correspondientes a los protones H-15 y H-15', mientras que la señal característica del hidrógeno 8 base de la lactona de este tipo de sustancias se apreció en 4.51 ppm. En adición se observó una señal simple en 3.55 ppm para los protones del grupo metoxilo. En la Figura 50 y 51 se muestran ampliaciones del espectro donde se pueden observar con más detalle la multiplicidad de las señales que corresponden al resto de los protones del compuesto. En el experimento COSY (Figura 52) se observaron la mayoría de las correlaciones esperadas en los hidrógenos de la molécula, permitiéndonos corroborar la asignación de las señales en su espectro de ^1H .

En el espectro de RMN de ^{13}C (Figuras 53-55, Tabla 8) se observaron 20 señales, cuyos desplazamientos químicos fueron similares a los de la (+)-ivalina (**1**), diferenciándose por supuesto en las señales adicionales para la parte del ácido carboxílico. En este espectro se observó la señal C-1' del carbonilo del éster en 165.72 ppm, cuatro señales cercano a 130 ppm para los carbonos del anillo aromático, en 123.26 ppm se observó una señal cuádruple para el carbono del grupo CF_3 (C-3') debida al acoplamiento a un enlace entre el carbono y el flúor cuyo valor fue de 1148 Hz. En 84.54 ppm también se observó una señal cuádruple para el carbono cuaternario C-2' debida al acoplamiento a 2 enlaces entre este carbono y el flúor, la cual fue de 108 Hz. En 55.36 ppm se apreció la señal del grupo OMe, mientras que el C-8 base de la lactona y C-2 base del éster presentaron un desplazamiento químico de 76.19 y 72.24 ppm.

También para corroborar la asignación de las señales de este compuesto se hizo uso de los diagramas de correlación heteronuclear de ^1H y ^{13}C HMQC (Figuras 56 y 57) y HMBC que se muestran en las Figuras 58 y 59.

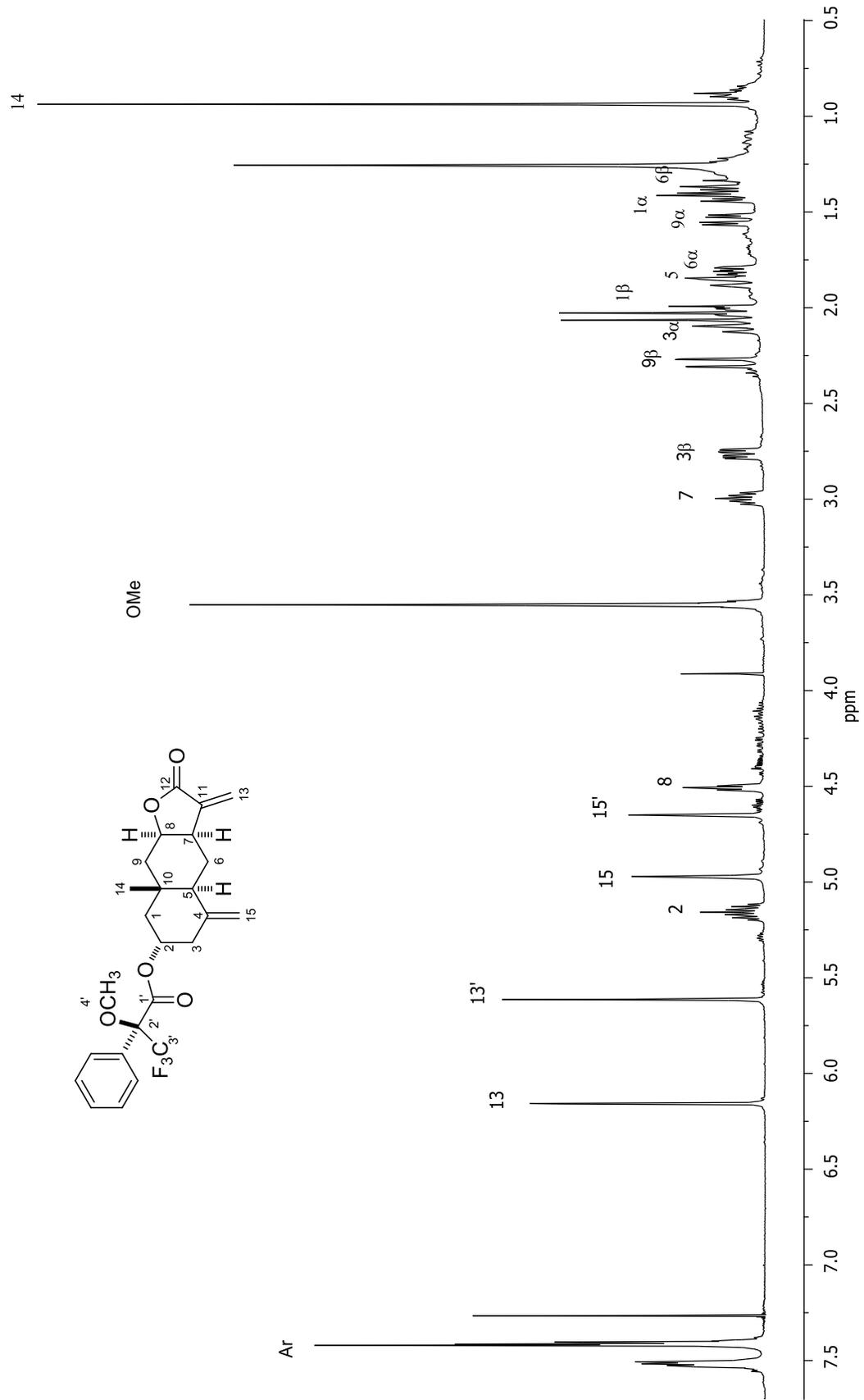


Figura 49. Espectro de RMN de ¹H (400 MHz) del éster de Mosher 4 en CDCl₃.

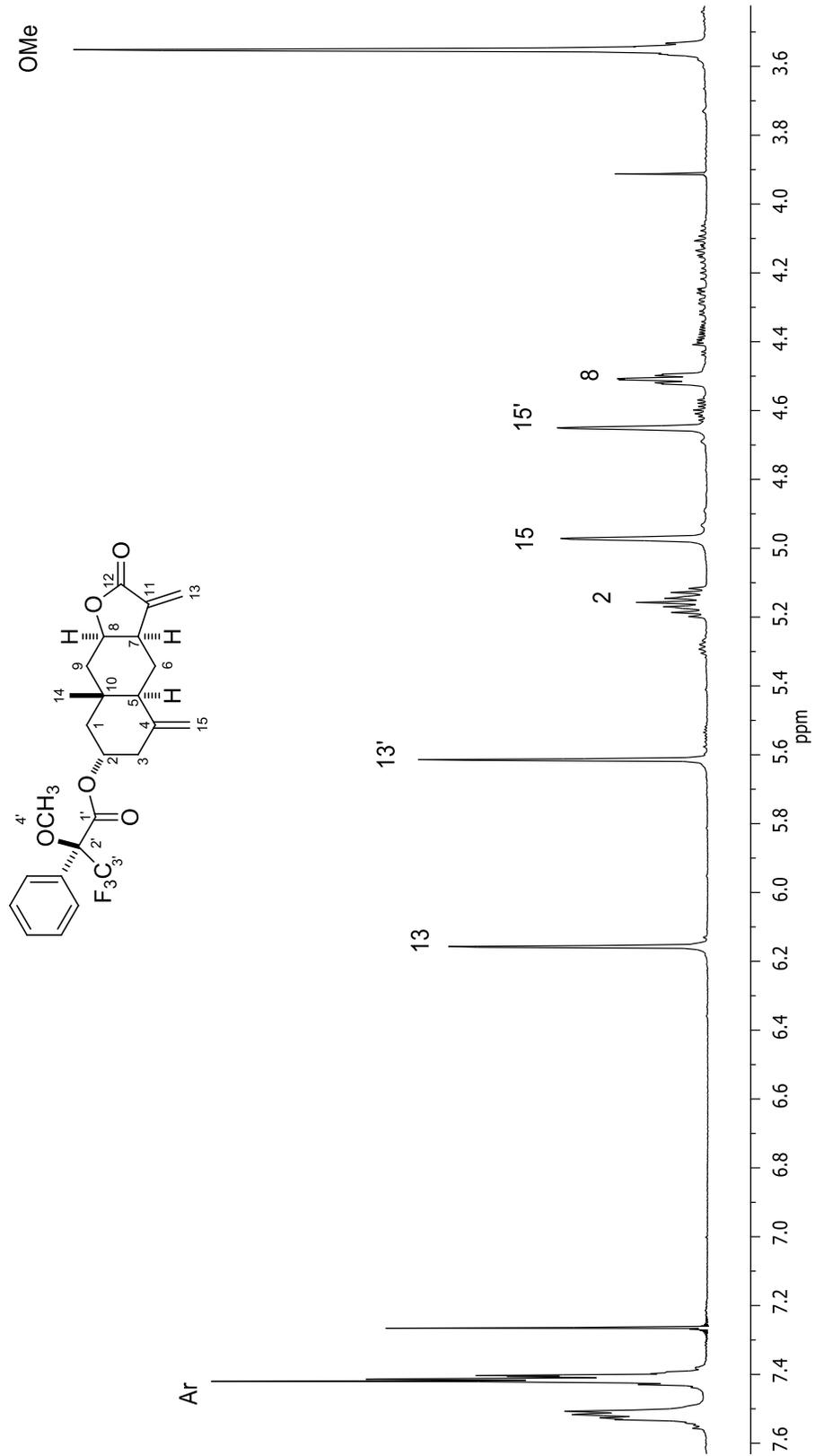


Figura 50. Ampliación del espectro de RMN de ¹H (400 MHz) del éster de Mosher **4** en CDCl₃.

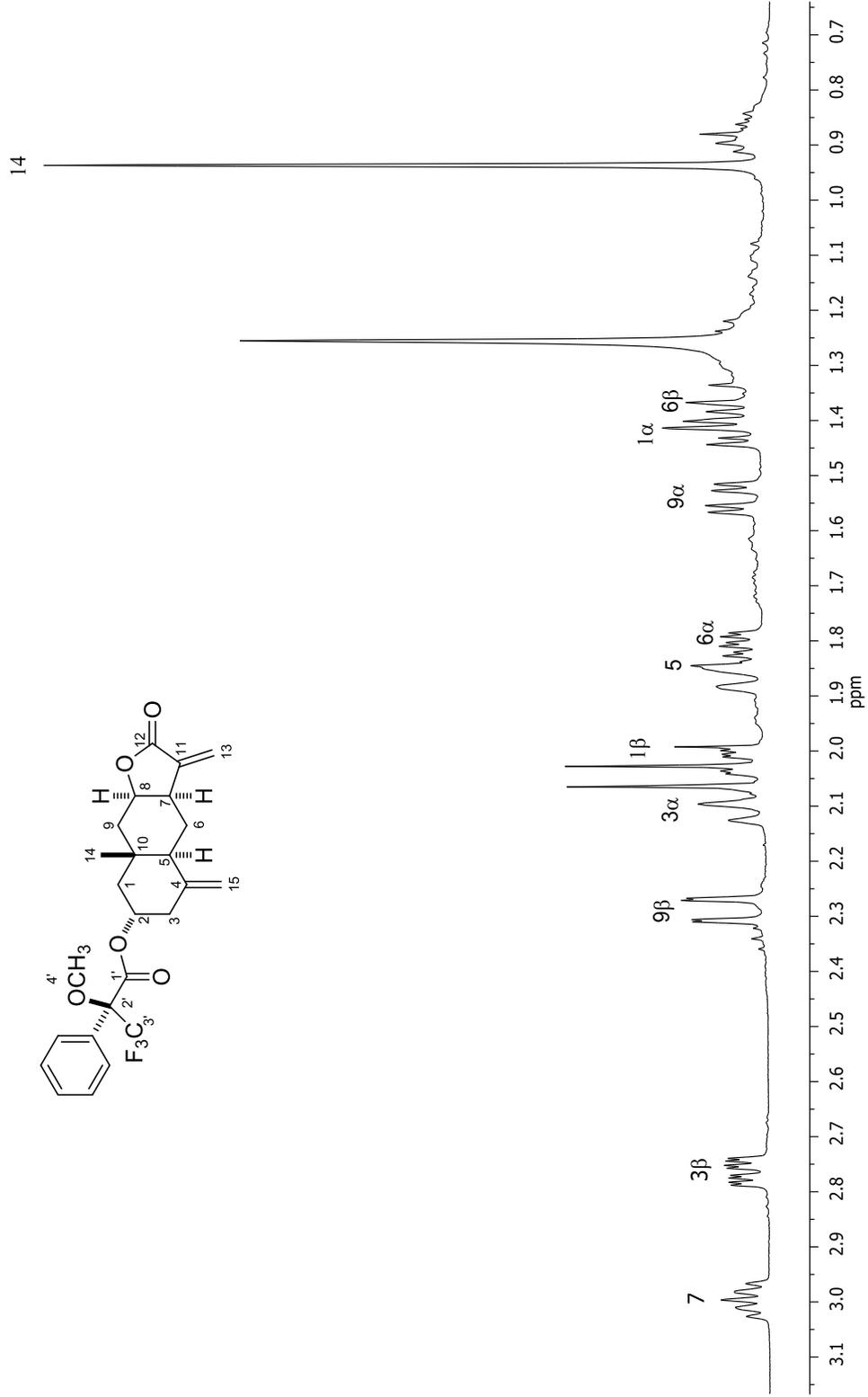


Figura 51. Ampliación del espectro de RMN de ^1H (400 MHz) del éster de Mosher **4** en CDCl_3 .

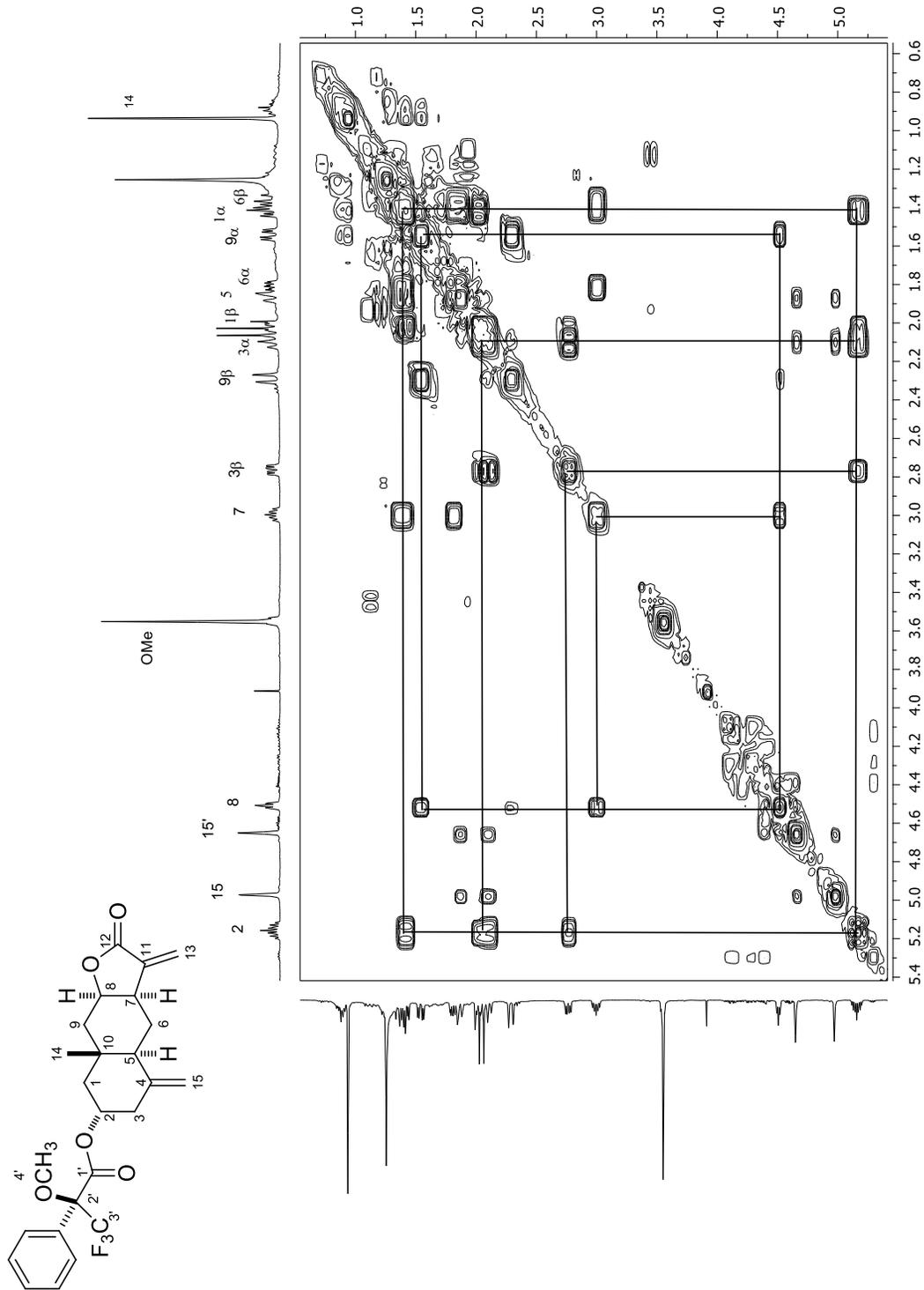


Figura 52. Espectro COSY (400 MHz) del éster de Mosher 4 en $CDCl_3$.

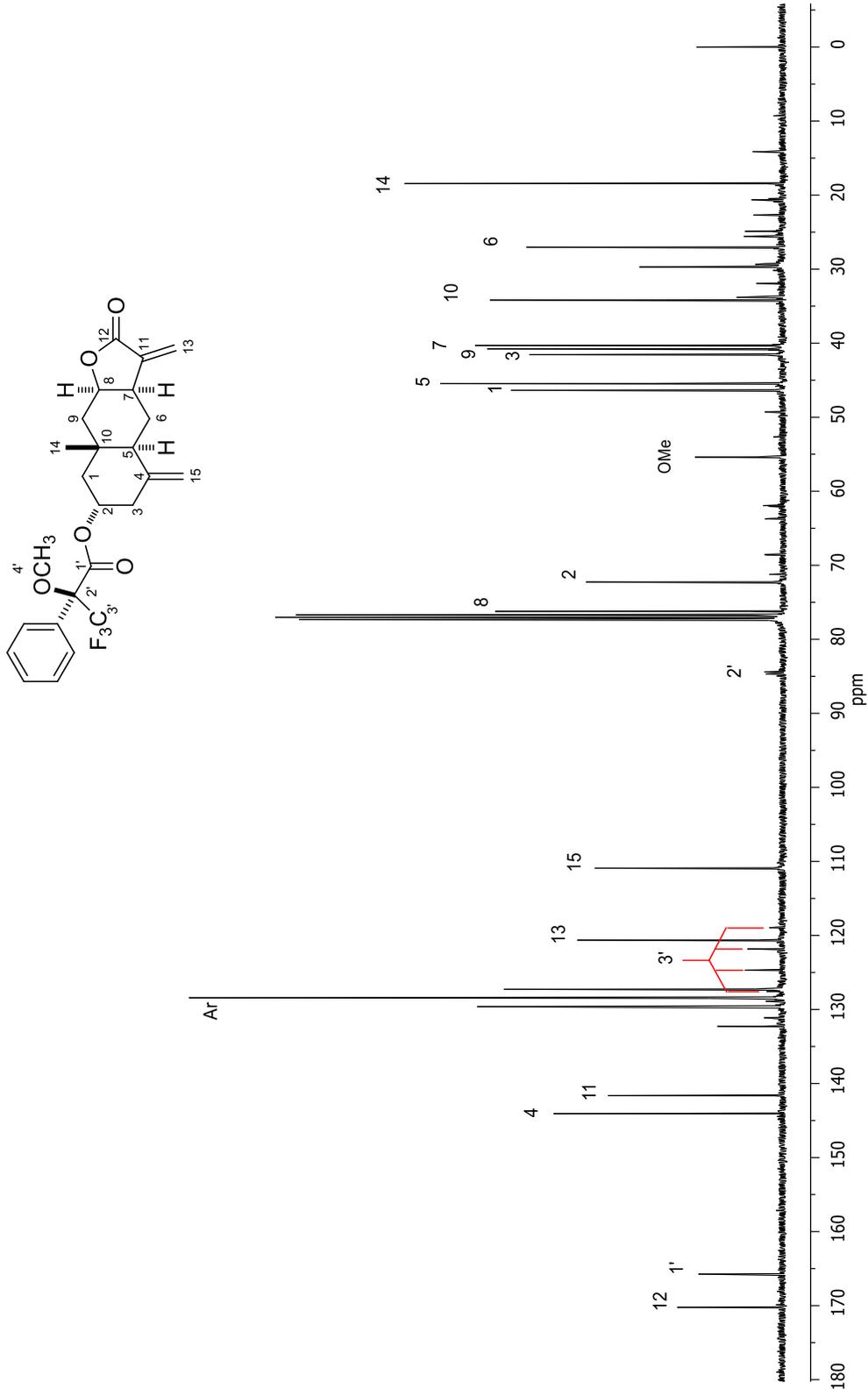


Figura 53. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) del éster de Mosher 4 en CDCl_3 .

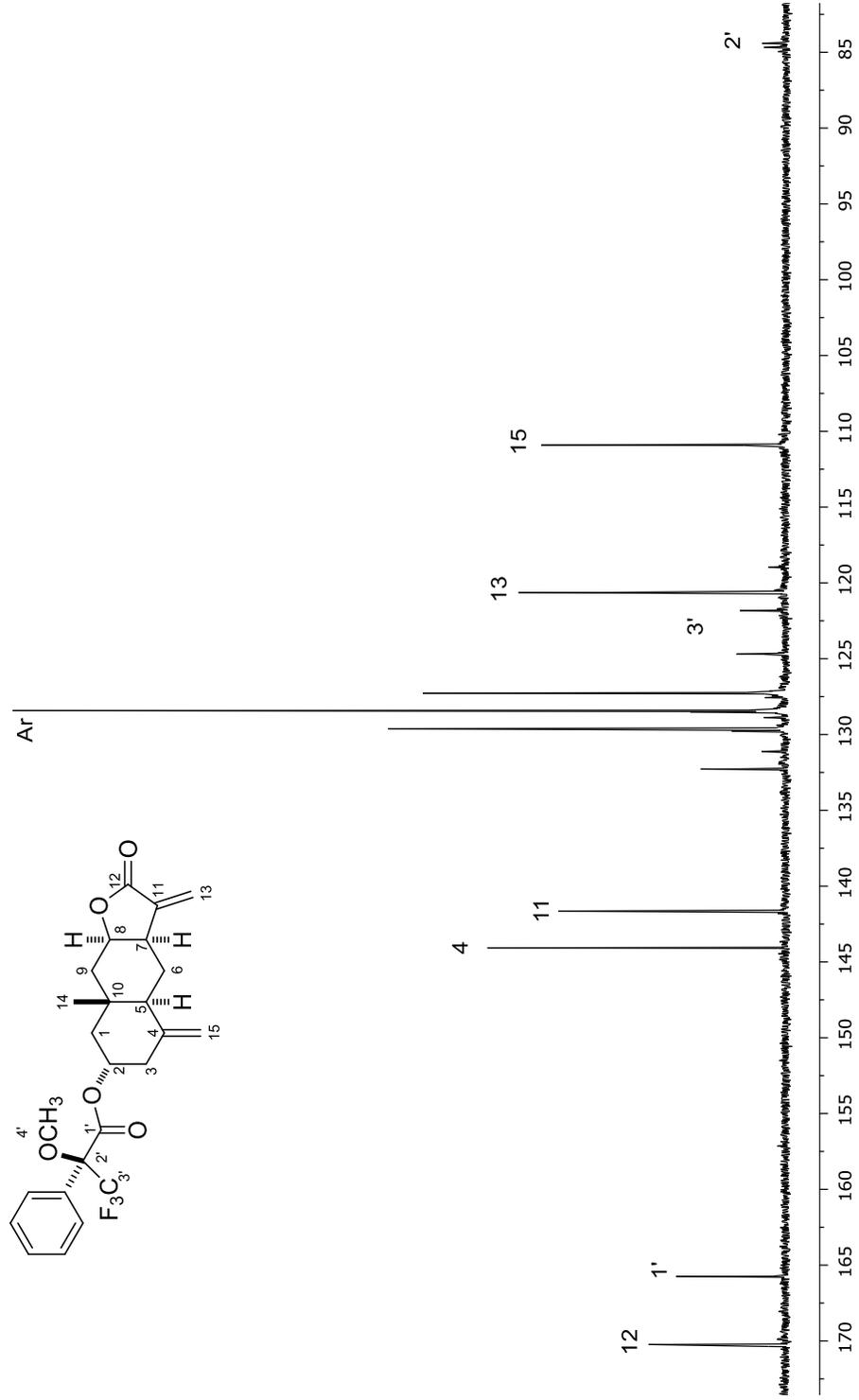


Figura 54. Ampliación de espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) del éster de Mosher **4** en CDCl_3 .

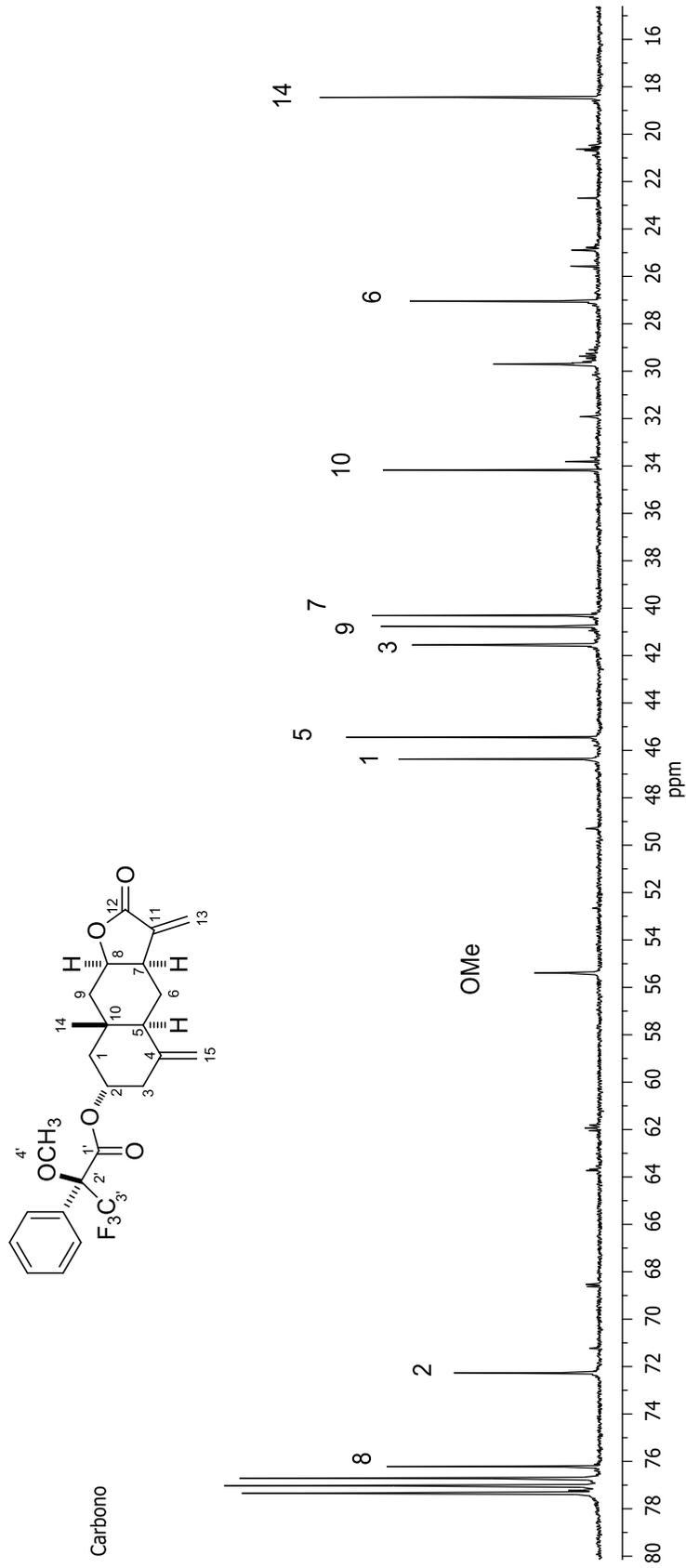


Figura 55 Ampliación de espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) del éster de Mosher **4** en CDCl_3 .

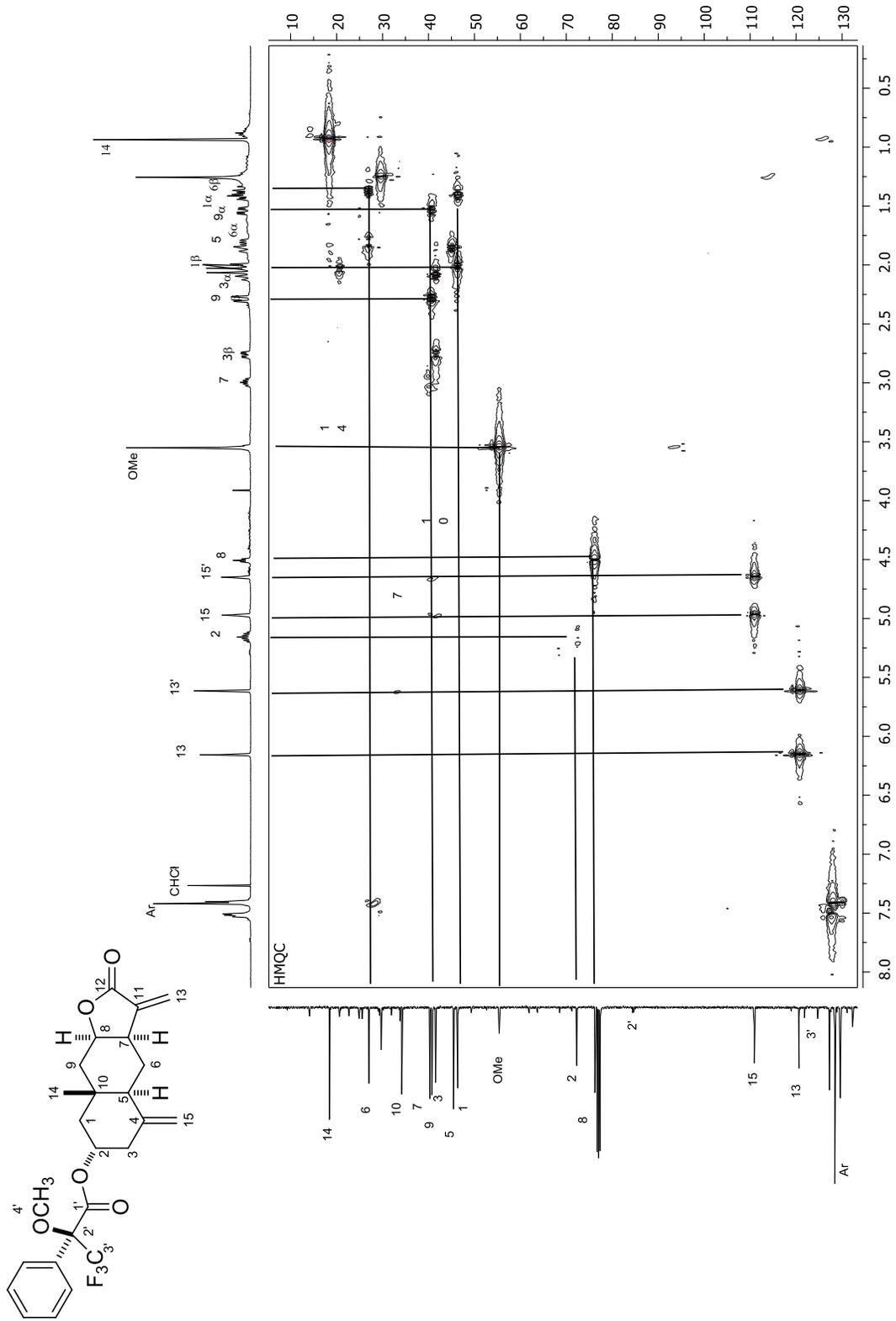


Figura 56. Espectro HMOC (400 MHz) del éster de Mosher 4 en CDCl₃.

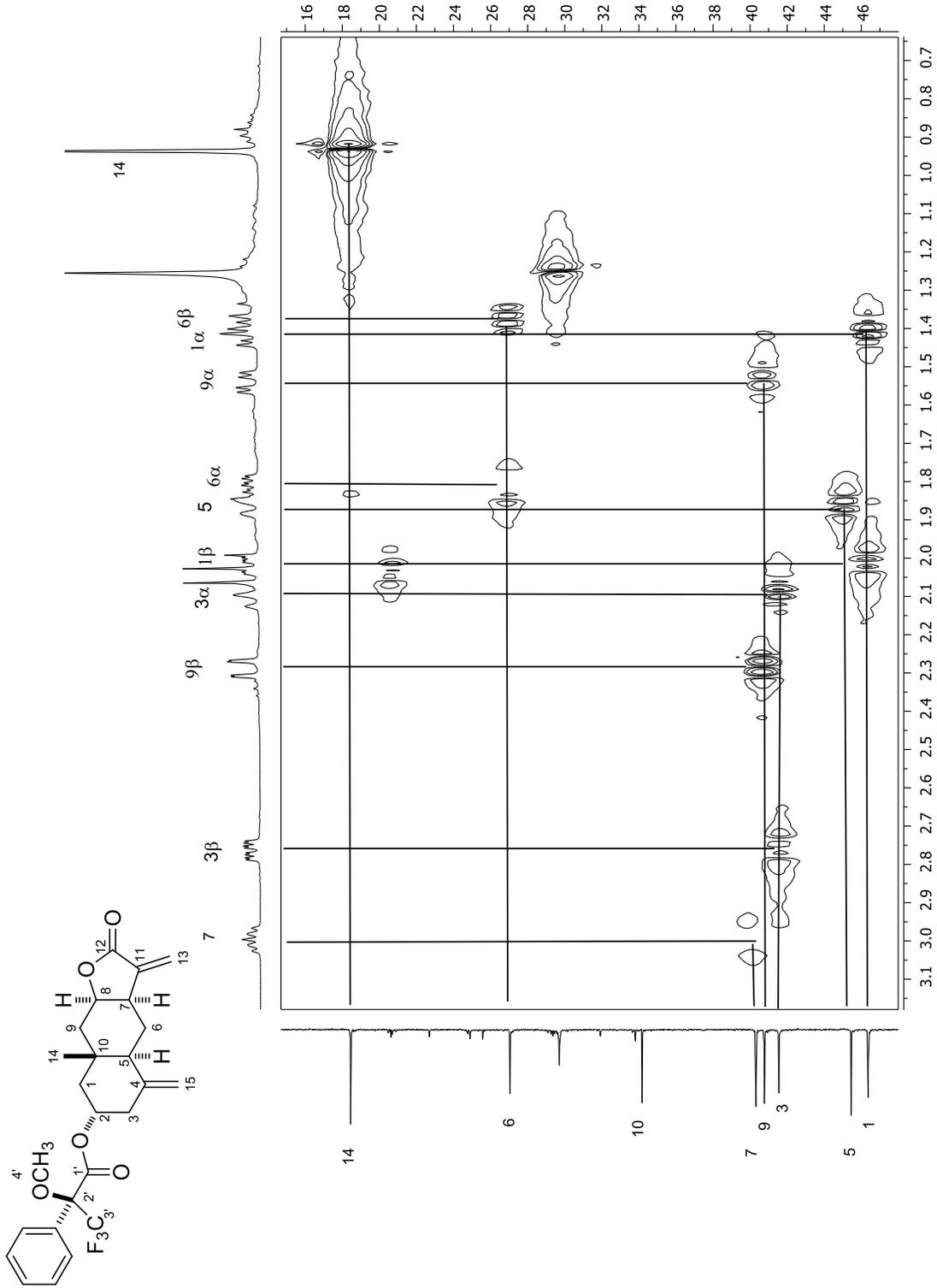


Figura 57. Ampliación del espectro HMQC (400 MHz) del éster de Mosher 4 en CDCl₃.

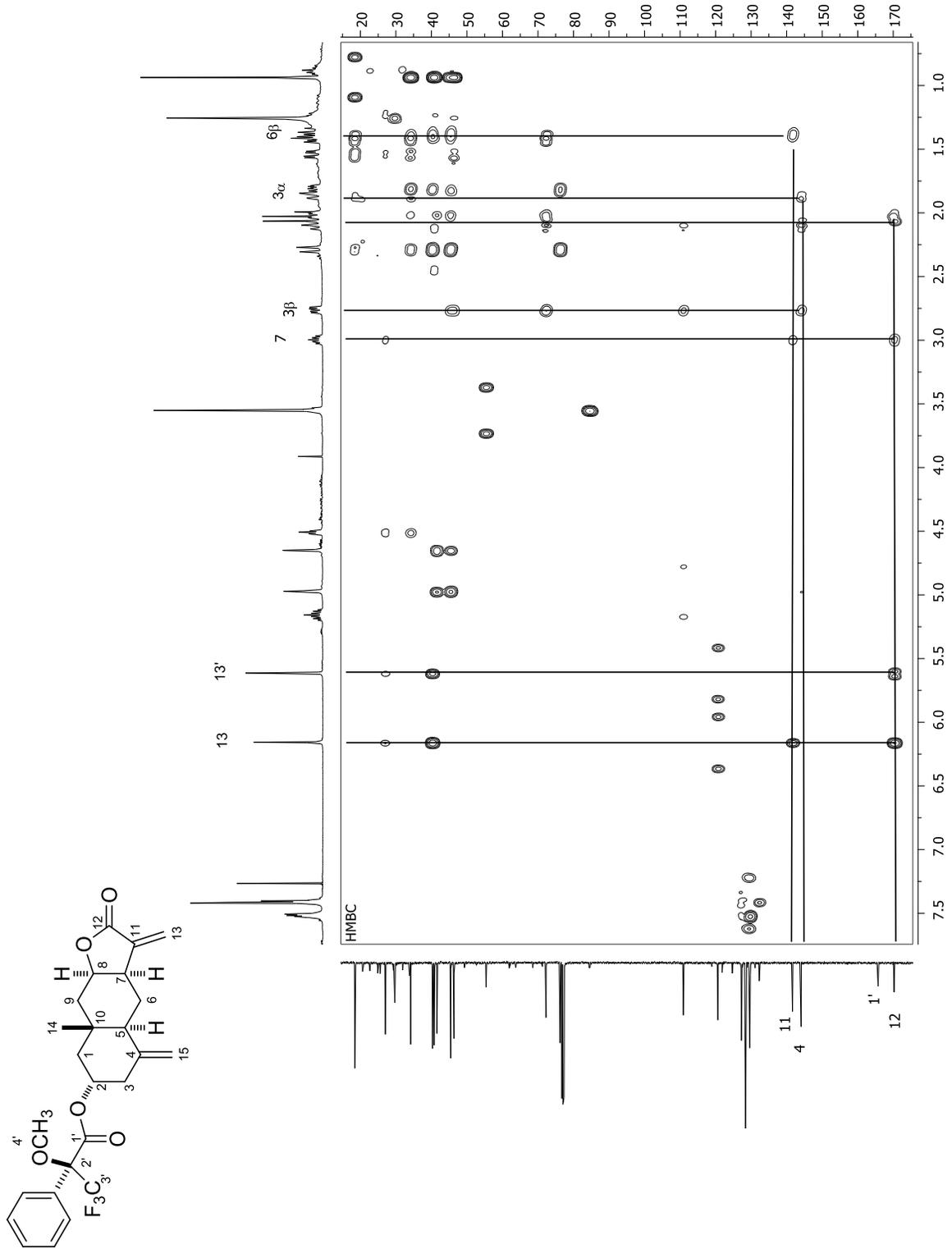


Figura 58. Espectro HMBC (400 MHz) del éster de Mosher **4** en CDCl₃.

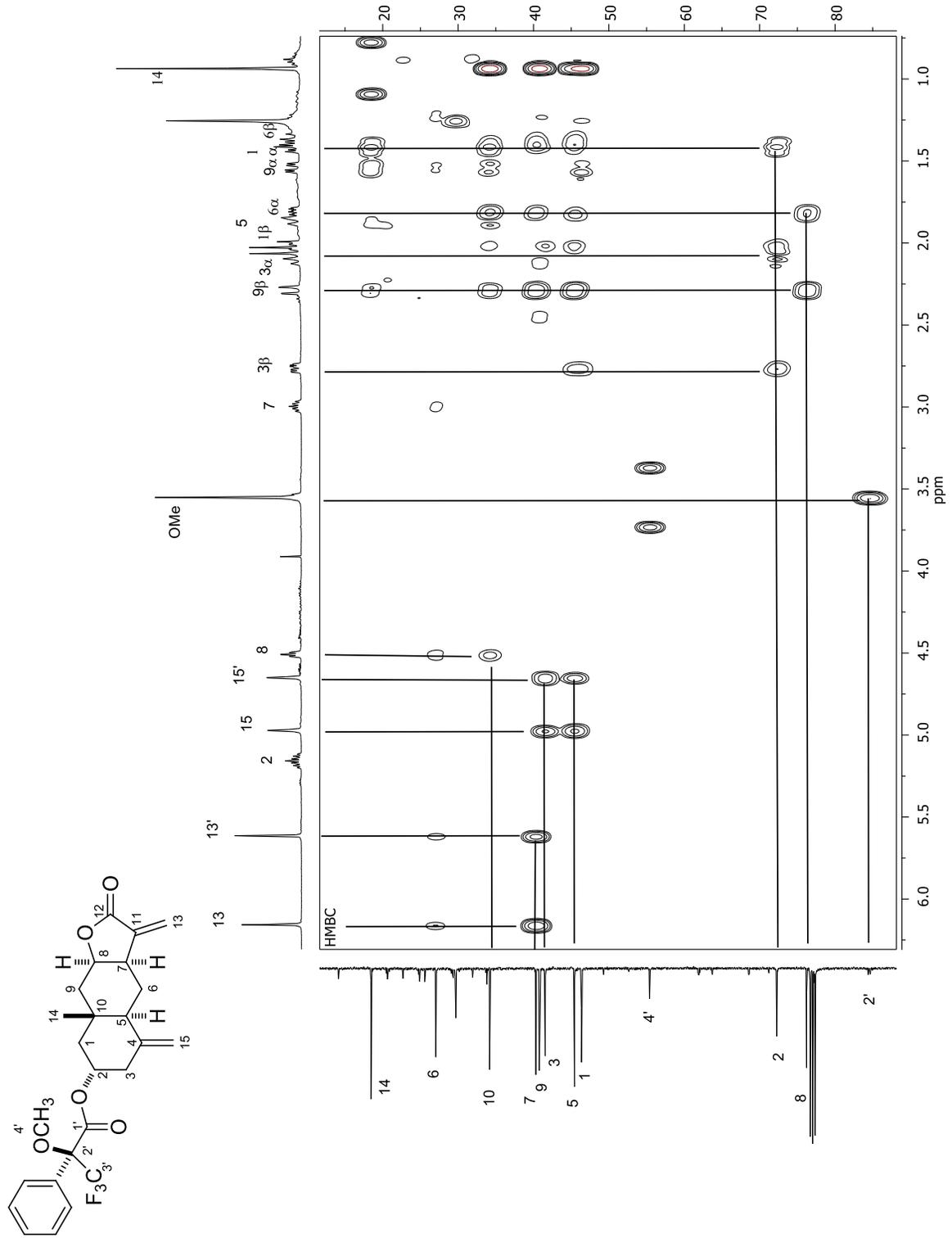


Figura 59. Ampliación del espectro HMBC (400 MHz) del éster de Mosher **4** en CDCl₃.

Tabla 8. Datos de RMN de ^1H (400 MHz) y ^{13}C (100 MHz) en CDCl_3 de **4**.

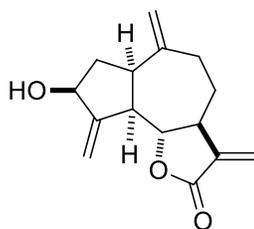
Protón	Desplazamiento en ppm (m, <i>J</i> en Hz)	Carbono	Desplazamiento en ppm
1 α	1.41 (dd, 12.2, 11.5)	1	46.37
1 β	2.02 (ddd, 12.2, 4.4, 2.2)	2	72.24
2	5.16 (tt, 16.0, 4.0)	3	41.55
3 α	2.09 (dd, 12.4, 12.0)	4	144.13
3 β	2.77 (ddd, 12.4, 5.2, 2.0)	5	45.51
5	1.84 (m)	6	27.04
6 α	1.80 (ddd, 11.6, 6.8, 2.4)	7	40.36
6 β	1.37 (ddd, 13.9, 13.8, 12.2)	8	76.19
7	3.00 (quintuple, 5.6)	9	40.76
8	4.51 (ddd, 9.6, 4.8, 1.6)	10	34.20
9 α	1.53 (dd, 15.7, 4.8)	11	141.64
9 β	2.26 (dd, 15.7, 1.8)	12	170.34
11	–	13	120.63
13	5.61 (d, 1.0)	14	18.49
13'	6.13 (d, 1.0)	15	110.91
14	0.94 (s)	1'	165.72
15	4.65 (d br, 1.5)	2'	84.54
15'	4.97 (d br, 1.5)	3'	*123.26
4'	3.55 (s)	4'	**55.36
Ar	7.5 (m)	Ar	132.27-127.27

*q, *J* = 108 Hz; **q, *J* = 1148 Hz.

5.7. Estudio comparativo de las decocciones de la parte aérea de *Z. triloba* colectada en Mineral de la Reforma y en el Valle del Mezquital del estado de Hidalgo

En una investigación previa, en nuestro grupo de trabajo se llevó a cabo el estudio químico de una especie colectada en el Valle del Mezquital, en las cercanías de Ixmiquilpan, Hidalgo (Téllez-Reyes, 2005). Dicha especie ha sido considerada hasta la fecha como *Zaluzania triloba* (Ort.) Pers. (Asteracea-Compositae), y se encuentra registrada en la base de datos de la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO) en la siguiente liga: <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/asteraceae/zaluzania-triloba/fichas/ficha.htm>.

El estudio condujo al aislamiento y caracterización de la lactona sesquiterpénica denominada zaluzanina C (**22**), en adición de otras lactonas relacionadas estructuralmente. La sustancia **22** resultó ser el metabolito principal de esta especie y se caracterizó adecuadamente mediante sus datos físicos y espectroscópicos, incluyendo un estudio por difracción de rayos-X.



zaluzanina C (**22**)

En el presente trabajo se pretendía complementar el estudio químico de la especie, esperando aislar las lactonas minoritarias en adición de la lactona sesquiterpénica **22**, pero no ocurrió así sino que se obtuvieron la (+)-ivalina (**1**) y su derivado acetilado **2**. Cabe recordar que la especie estudiada en este trabajo se colectó en el municipio de Mineral de la Reforma, Hidalgo.

Debido a lo anterior, se llevó a cabo una colecta de la especie considerada como *Z. triloba* en el Valle del Mezquital (Figura 60), sobre la Carretera Ixmiquilpan-Actopan, en Abril de 2010, con la intención de realizar un estudio comparativo de los extractos acuosos (decocción) de la parte aérea de ambas especies. El siguiente procedimiento se hizo con las dos especies.



Figura 60. Imagen de la especie considerada como *Zaluzania triloba* colectada en el Valle del Mezquital, Hidalgo.

La parte aérea fresca (100 g), se sometió a decocción durante 15 min con H₂O destilada (700 mL). Posteriormente, se filtró, se extrajo con AcOEt (700 mL), se secó la fase orgánica, se filtró y se concentró en el rotavapor para obtener el extracto de AcOEt (parte AcOEt). Este producto se analizó por RMN de ¹H (400 MHz, en CDCl₃). En el caso de la especie del Valle del Mezquital se observó como componente principal la zaluzanina C (**22**) (aproximadamente el 70% de la muestra), mientras que en el caso de la especie de Mineral de la Reforma se observó como metabolito principal la (+)-ivalina (**1**), (resultados iguales a los descritos anteriormente en el punto 5.3 de este trabajo). En la Figura 61 se muestra una comparación de los espectros de protón para ambos casos, poniendo en evidencia que ambas especies biosintetizan lactonas sesquiterpénicas distintas, aunque más o menos en igual proporción.

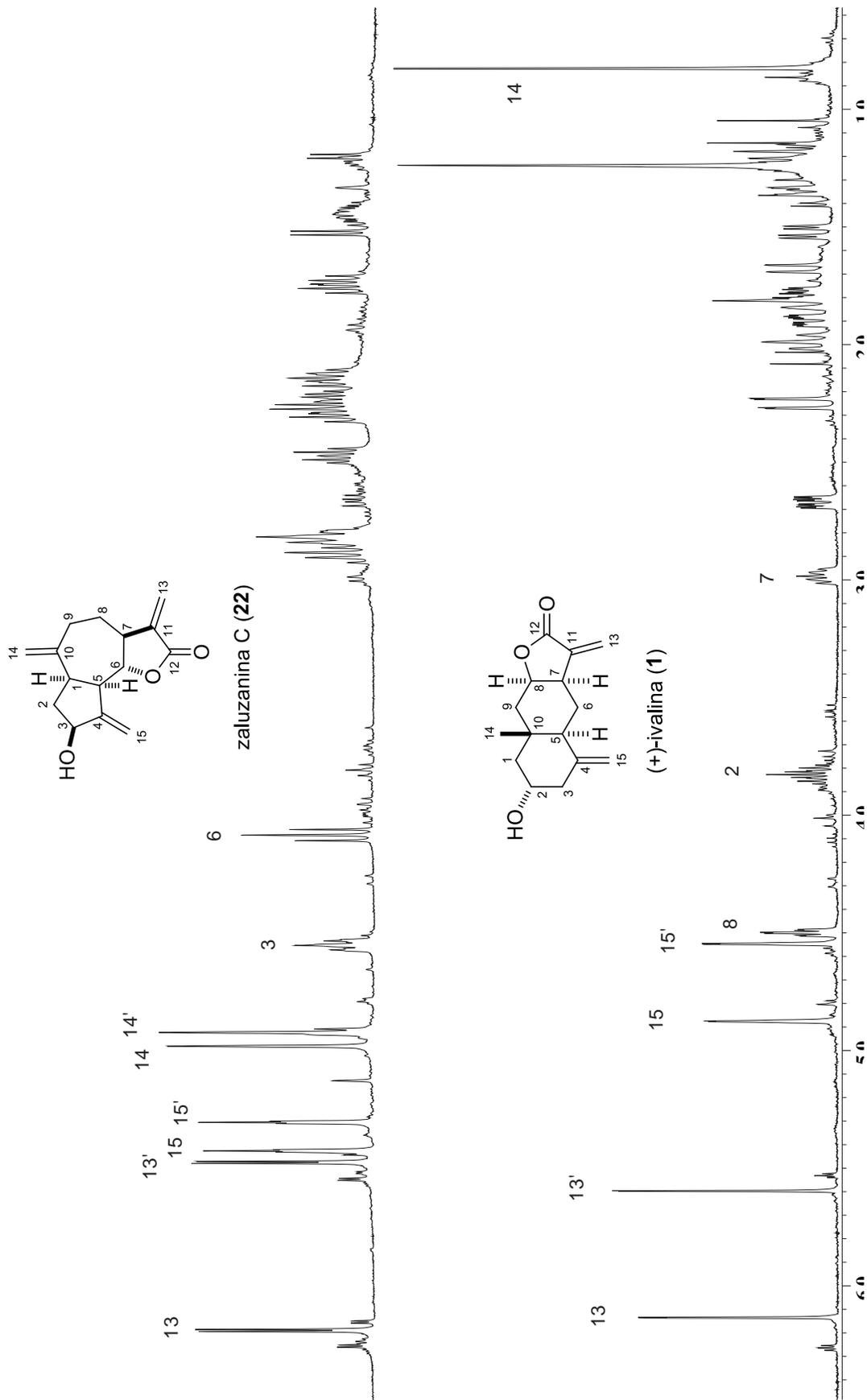


Figura 61. Espectros de RMN de ^1H (400 MHz) en CDCl_3 , de las partes AcOEt de la decocción de la parte aérea

de *Z. triloba* del Valle del Mezquital y Mineral de la Reforma, Hidalgo. Los espectros tienen la misma escala.

Con estos resultados, en Abril de 2010, se llevó a cabo una colecta de las especies del Valle del Mezquital y la de Mineral de la Reforma, las cuales se llevaron ese mismo día (especímenes frescos) al Herbario del Centro de Investigaciones Biológicas de la UAEH, con la finalidad de su clasificación botánica, debido a que se sospechó que las plantas no pertenecen a la misma especie. El análisis botánico de las especies por parte de M. en C. Manuel González Ledesma, responsable del Herbario, condujo a la conclusión de que la especie del Valle del Mezquital es realmente *Zaluzania parthenioides* (DC.) Rzedowski, mientras que la de Mineral de la Reforma es *Zaluzania triloba* (Ort.) Pers.

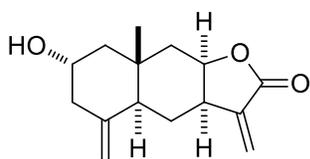
La revisión más reciente del género *Zaluzania* reconoce como una sola especie a *Z. triloba* y *Z. parthenioides* (Rzedowski, 1968). Según Sharp (1935) separó estos dos taxones por la pubescencia erecta y las hojas más menudamente dividida para la primera, y la pubescencia de pelos encorvados y las hojas más claramente trilobadas para la segunda, Olsen (1979) concluye que los caracteres utilizados para separar estas dos especies se sobreponen (intergradan) completamente (Olsen, 1979). El análisis de las plantas utilizadas en el presente estudio, unas provenientes de Mineral de la Reforma y otros de Ixmiquilpan, muestran claras diferencias morfológicas (pubescencia y forma de hojas), lo que adicionado a la composición química diferente detectada sugiere claramente dos especies. Una posible explicación a la sobreposición de caracteres señalada es la existencia de zonas de hibridación entre los dos taxones (M. González L. com. p.).

6. CONCLUSIONES

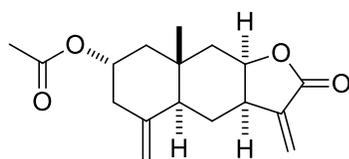
Se llevó a cabo la colecta, la identificación botánica y el estudio químico de *Zaluzania triloba* (Ort.) Pers., la cual es una especie muy abundante en varios municipios del estado de Hidalgo con uso tradicional para el dolor de estómago, inflamación y heridas.

La separación cromatográfica del extracto AcOEt, así como la decocción de la parte aérea de esta especie, condujo al aislamiento de las lactonas sesquiterpénicas conocidas como (+)-ivalina (**1**) y (+)-acetilivalina (**2**), siendo en los dos casos la lactona **1** el compuesto mayoritario. La caracterización de las sustancias se llevó a cabo mediante sus propiedades físicas y espectroscópicas, principalmente por RMN de ^1H y ^{13}C en 1D y 2D, así como por comparación con datos descritos.

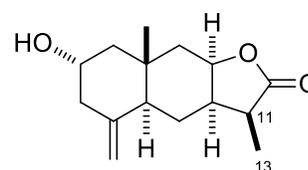
De la maceración acuosa de esta especie, proceso en el cual se observó fermentación, se aisló la (+)-11 α ,13-dihidroivalina (**3**) y la lactona **1**. El compuesto **3** difiere de **1** en la reducción del doble enlace en C-11(C-13), lo que hace que **3** contenga un centro estereogénico en C-11, y que fue asignado como S con base en la constante de acoplamiento de H-11 con H-7 y por comparación con datos descritos. Es posible que la lactona **3** se formó a partir de **1** debido a la actividad enzimática del microorganismo responsable de la fermentación.



(+)-ivalina (1)



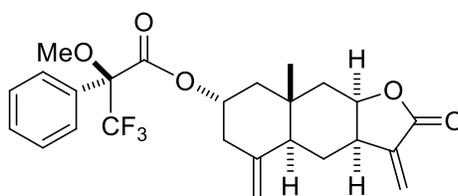
(+)-acetil ivalina (2)



(+)-11 α ,13-dihidroivalina (3)

Se llevó a cabo la cuantificación de la (+)-ivalina (1) en la infusión de la parte aérea de la especie mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), indicando que el té (2.5 g en 250 mL) contiene aproximadamente 30 mg (1.2%) de dicha sustancia, la cual, como se dijo ya, posee propiedades antileucémicas.

Finalmente, se obtuvo el éster de Mosher de la (+)-ivalina (4) mediante un procedimiento conocido de esterificación. El éster 4 representa un compuesto nuevo y se caracterizó mediante RMN de ^1H y ^{13}C en 1D y 2D. Esta sustancia se preparó con la finalidad de contar con un derivado que permitiera obtener cristales adecuados para un estudio por difracción de rayos-X y así corroborar la configuración absoluta de la (+)-ivalina (1), pero debido a que no fue cristalina dicho estudio no se llevó a cabo.



éster de Mosher de la (+)-ivalina (4)

7. PARTE EXPERIMENTAL

7.1. General

Las separaciones cromatográficas se llevaron a cabo en gel de sílice 60, Merk, 0.04-0.063 mm (Aldrich, 230-400 mesh ASTM) en columnas de vidrio de 5, 3.5, 2, 1 y 0.5 cm de diámetro interno por 60 y 37 cm de largo. Las CCF se realizaron en cromatofolios de gel de sílice sobre aluminio de 2.5 x 5.0 cm, el revelado de las placas se realizó con sulfato sérico amoniacal. Los espectros de RMN de ^1H (400 MHz) y de ^{13}C (100 MHz), incluyendo los experimentos APT, COSY, HSQC, HMBC se determinaron en los equipos JEOL 400 Eclipse y VARIAN 400, usando como disolventes CDCl_3 y D_2O . Los espectros de masa se obtuvieron en un espectrómetro de masa Varian 220 acoplado a un cromatógrafo de gases Varian 450-GC, por medio de impacto electrónico a 70 eV. Las rotaciones ópticas se determinaron en CHCl_3 en un polarímetro Perkin-Elmer 341. La cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) se llevó a cabo en un cromatógrafo Perkin-Elmer serie 200 usando una columna de fase reversa Alltech C18 d.i. de 250 x 4.6 mm en un sistema de disolventes H_2O (A) y CH_3CN (B), gradiente de 100% A \rightarrow 100% B, en un tiempo total de 30 minutos, a velocidad de flujo de 1.0 mL/min empleando un detector UV-visible a 256 nm y 25 °C.

7.2. Recolección e identificación de la planta

Los ejemplares de *Zaluzania triloba* (Ort.) Pers. se colectaron en Agosto de 2008 en Mineral de la Reforma, Hidalgo. Otros lotes de la especie se colectaron durante Febrero–Mayo de 2010 en la misma zona, mientras que *Zaluzania parthenioides* (DC.) Rzedowski se colectó a bordo de la carretera Actopan-Ixmiquilpan, Hidalgo. Un espécimen de cada especie se preparó y se envió al herbario del Centro de Investigaciones Biológicas de la UAEH para su identificación botánica por parte del M. en C. Manuel González Ledesma (No. de depósito: JM Torres-Valencia 130 y JM Torres-Valencia 131).

7.3. Obtención y separación del extracto de acetato de etilo de la parte aérea de *Zaluzania triloba*

La parte aérea seca y molida (0.5 Kg) se sometió a maceración con AcOEt (4 L) durante 7 días. Posteriormente se refluó por 3 h, se filtró y se concentró en el rotavapor, obteniendo un residuo de color verde oscuro. Este proceso se repitió una vez más para obtener 26.5 g (5.3 %) de extracto. Una alícuota de este residuo (1 g) se sometió a separación mediante cromatografía en columna, (CC) usando gel de sílice y mezclas de hexano-AcOEt (3:1 500 mL, 2:1 300 mL, 1:1 400 mL y 1:2 300 mL) y AcOEt-acetona (5:1 500 mL). Se colectaron fracciones de cada polaridad, las cuales se etiquetaron como A (80 mg), B (94 mg), C (150 mg), D (167 mg) y E (78 mg). Esto se repitió 9 veces.

La fracción B (0.876 g) se sometió a purificación mediante cromatografía en columna, empleando gel de sílice y hexano-AcOEt (2:1 500 mL y 1:3 150 mL) como eluyente. Se colectaron 34 eluatos de 20 mL, los cuales se juntaron con base en su relación de frente (R_f) en CCF. En los eluatos 11–16 se obtuvo la (+)-acetilivalina (**2**) (13 mg) p.f. de 140-142 °C, $[\alpha]_D^{20} = +122$ (c 0.7, CHCl₃), IR (KBr) $\nu_{\max}^{\text{cm}^{-1}}$ 1763.0, 1730.7 (C=O), 1254.7, 1240.2 (C=O), EIME m/z (intensidad relativa): 231 (40, M⁺ -60 = acetato), 213 (50), 185 (47), 169 (22), 143 (20), 119 (100), 105 (21), 91 (19), 43 (23), mientras que de los eluatos 32–43 se aisló la (+)-ivalina (**1**) (21 mg).

La fracción C (1 g) se separó por cromatografía en columna, en gel de sílice y utilizando como eluyentes hexano-AcOEt (1:1 500 mL) y MeOH (200 mL). Se colectaron 30 eluatos de 10 mL, los cuales se analizaron por CCF y se juntaron con base en su R_f para obtener las fracciones Ca, Cb, Cc y Cd. La fracción Cd se purificó por CC usando CHCl₃-acetona (4:1 50 mL), obteniendo el compuesto **1** (18.5 mg).

La fracción D se purificó en las mismas condiciones que la fracción C, permitiendo también obtener la lactona sesquiterpénica **1** (73 mg).

Con la finalidad de acumular mayor cantidad de ivalina se procedió a obtener el compuesto directamente del extracto AcOEt (3 g) utilizando como eluyentes CHCl₃-acetona (2:1, 600 mL), obteniéndose 40 eluatos de 5 mL cada uno. Este procedimiento se realizó 3 veces; dando 1.75 g del compuesto **1**, el cual se purificó en gel de sílice utilizando como eluyentes hexano-AcOEt (1:1, 600 mL), obteniéndose 34 eluatos de 5 mL. En los eluatos 18–31 se obtuvo **1** en forma de cristales (332 mg) con p.f. 125–127 °C y $[\alpha]_D^{20} = +134$ (c 1.0, CHCl₃) IR (KBr) $\nu_{\max}^{\text{cm}^{-1}}$

3365 (OH), 2929.3, 2853.1 (CH) 1759.8 (CO) 1647.8, 1557.8 (C=C), 1264.1, 1045.7, 890.7 (C-O) EIME m/z (intensidad relativa): 281 (100, M⁺ - 17 = alcohol), 213 (23), 185 (53), 159 (12), 133 (17) 119 (35), 105 (23), 53 (15)..

7.4. Decocción de la parte aérea de *Zaluzania triloba* (Ort.) Pers.

La parte aérea fresca y triturada (100 g) se sometió a una extracción con agua hirviente (decocción, 750 mL) por 15 minutos. Posteriormente se filtró y la solución se extrajo con AcOEt (750 mL), la fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se concentró en el rotavapor para obtener un residuo (1.37 g) que se etiquetó como P-AcOEt. Esta muestra se analizó mediante CCF Y RMN de ¹H, mostrando estar constituida principalmente por (**1**) (aproximadamente 75%). La fase acuosa se evaporó a sequedad en el rotavapor y el residuo se analizó por RMN de ¹H, en donde no se apreciaron señales para la (+)-ivalina, ni de ningún otro compuesto de naturaleza terpénica.

Otro lote de la parte aérea fresca y molida (100 g) se extrajo con H₂O (700 mL) mediante maceración por 4 días a temperatura ambiente, se observó fermentación en la muestra. Posteriormente, se sometió a ebullición por 30 minutos, se filtró y se concentró en el rotavapor obteniéndose un residuo (1.23 g) que se etiquetó como Pf-AcOEt. El análisis por RMN de ¹H de este producto reveló la presencia de la ivalina en mezcla con otra lactona sesquiterpénica en una proporción aproximadamente 5:1. Esta muestra se separó mediante cromatografía en columna utilizando como

eluyentes CHCl₃-acetona (3:1, 200 mL) y acetona (50 mL) obteniéndose 36 eluatos de 7 mL cada uno y se juntaron en base a su R_f en CCF. Esto condujo a la obtención de la (+)-ivalina (**1**) y (+)-11 α ,13-dihidroivalina (**3**) en mezcla en los eluatos 8-13 (640 mg). Para la separación de estos dos compuestos se llevó a cabo una recromatografía de la fracción (8-13) obtenida anteriormente utilizando como eluyentes hexano (50 mL) y hexano-AcOEt (1:1, 320 mL), colectando 66 eluatos de 3 mL, lo cual condujo a la separación de (+)-ivalina (**1**) en los eluatos 41–59 y a la (+)-11 α ,13 dihidroivalina (**3**) (10 mg) en los eluatos 63 y 64 con p.f. 144.-145 °C y $[\alpha]_D^{20} = + 32$ (c 0.86, CHCl₃), IR (KBr) ν_{\max} cm⁻¹ 3399 (OH), 2921.2 (CH), 1761.3 (C=O), 1647.7, 1453.5 (C=C), 1163.3, 1042.4 y 968 (C-O).

7.5. Cuantificación de (+)-ivalina en el té de la parte aérea de *Zaluzania triloba*

Una muestra previamente seca y molida de la parte aérea (2.5 g) se extrajo con H₂O a 50 °C (infusión, 250 mL) durante 10 minutos, obteniéndose una solución de color café que se extrajo con AcOEt (250 mL), la fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se evaporó en el rotavapor para obtener un residuo (46 mg). Este residuo se analizó por triplicado mediante HPLC con la finalidad de medir la cantidad de la (+)-ivalina (**1**). La cuantificación se llevó a cabo mediante la comparación de la curva estándar obtenida usando diferentes concentraciones de una muestra auténtica de **1** obtenida en este trabajo. Así, se preparó una solución madre con 110 mg de la muestra auténtica, se aforó a 25 mL utilizando CH₃CN y de esta solución se

prepararon 5 soluciones a diferentes concentraciones (Tabla 9) que se aforaron también a 10 mL cada uno.

Tabla 9. Muestras de la solución estándar a diferentes concentraciones de la ivalina.

No. de muestra	1	2	3	4	5	6
Concentración (mg/mL)	4.4	3	2.4	2	1	0.2

7.6. Esterificación de la (+)-ivalina con el ácido de Mosher (S)-(-)- α -metoxi- α -(trifluorometil)fenilacético

A una solución de la (+)-ivalina (**1**) (100 mg) en CHCl_3 (10 mL) se le agregaron 80 mg de ácido (S)-(-)-metoxi- α -(trifluorometil)fenilacético disueltos en 80 mL de CHCl_3 , a esta mezcla se le adicionaron 0.3 mL de DCC en 5 mL de CHCl_3 y 0.2 mL de piridina y se dejó reaccionar durante un día con agitación constante a temperatura ambiente. Posteriormente, el producto se filtró y concentró en el rotavapor obteniendo un residuo (260 mg) que se disolvió en CHCl_3 y se analizó por CCF, observándose una mezcla de dos compuestos, uno de ellos la (+)-ivalina y otro el éster de Mosher de la (+)-ivalina (**4**). Se realizó una cromatografía de este producto utilizando como eluyentes CHCl_3 -acetona (5:1, 60 mL), colectando 14 eluatos de 5 mL. Del eluato 5 se obtuvo el éster de Mosher **4**, mientras que en los eluatos 7–14 se recuperó la (+)-ivalina (**1**). En seguida, se llevó a cabo la purificación del éster **4** por medio de una CC, utilizando hexano, hexano-AcOEt (8:2, 7:3, 6:4 y 1:1), 20 mL de cada polaridad,

para obtener 18 eluatos de 5 mL cada uno, los cuales se analizaron por CCF. Se juntaron los eluatos 12–16 en los cuales se obtuvo el éster **4** (23 mg) y $[\alpha]_D^{20} = +13.7$ (c 0.56, CHCl_3), IR (KBr) $\nu_{\text{max}} \text{ cm}^{-1}$ 3328.9, 2927.5 y 2850.6 (CH), 1755.4 (C=O), 1628.5, (C=O), 1045.9 (C-O).

7.7. Decocción de la parte aérea de *Zaluzania parthenioides*

La parte aérea triturada (100 g) se sometió a una extracción con agua hirviendo (decocción, 600 mL) por 45 minutos. Posteriormente, se filtró y la solución se extrajo con AcOEt (600 mL), la fase orgánica se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró en el rotavapor para obtener el extracto de AcOEt (0.5 g). Esta muestra se analizó por RMN de ^1H , mostrando como componente principal la lactona sesquiterpénica conocida como zaluzanina C (**22**).

8. REFERENCIAS

- Abdallah AO, Taha MS, Saad MK, Yousef EI, Michael G, **1984**. Guaianolides from *Cynara sibthorpiana*. *Phytochemistry* 23, 2381-2382.
- Bohlmann F, Mahanta PK, Jakupovic J, Rastogi RC, Natu AA, **1978**. New sesquiterpene lactones from *Inula* species. *Phytochemistry* 17, 1165-1172.
- Coetzer J, Kruger GJ, Levendis DC, **1982**. Molecular and crystal structure of ivalin. *Journal of Chemistry* 35, 103-104.
- Cortez V, Macedo J, Hernández M, Arteaga G, Espinosa D, Rodriguez JF, **2004**. Farmacognosia: breve historia de sus orígenes y su relación con las ciencias médicas. *Rev. Biomed.* 15, 123-136.
- Dewick PM, **2009**. *Medicinal Natural Products: a Biosynthetic Approach*. John Wiley and Sons Ltd. 3ª edición, Great Britain.
- Diaz E, Barrios H, Nava JL, Enriquez RG, Guzmán A, **1997**. Stereoselective Michael addition of 6-amino-1,3-dimethyl-2,4-pyrimidinedione to the exocyclic methylene of three sesquiterpene lactones. ^1H and ^{13}C NMR evidence of a new C-C bond and lactam formation. *J. Heterocyclic Chem.* 34, 1037-1041.

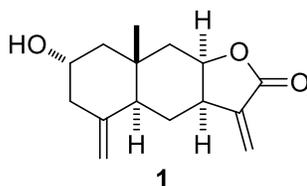
- Diaz E, Ortega A, Guerrero C, Guzman A, Lizama BE, Benitez AF, **1998a**. ^1H and ^{13}C NMR of synthetic allenic derivatives from eudesmanolides and pseudoguayanolides. *Nat. Prod. Lett.* **12**, 241-254.
- Diaz E, Nava JL, Barrios H, Quiroz B, Guzmán A, León GL, Fuentes BA, **1998b**. 2D ^1H and ^{13}C NMR evidence for stereoselective formation of a new bond C-N, C-S or C-C in the reaction of ivalin acetate with substituted pyrimidines. *Spectrochimica Acta Part A* **54**, 567-574.
- Herz W, Högenauer G, **1962**. Ivalin, a new sesquiterpene lactone. *J. Org. Chem.* **27**, 905-910.
- Martínez M, **1979**. Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas. Fondo de cultura económica, S. A. de C. V. México.
- Lozoya-Legorreta X, **1994**. Plantas, medicina y poder. Breve historia de la herbolaria Mexicana. Pax, México. México.
- Olsen JS, **1979**. Syatematics of *Zaluzania* (Asteraceae:Heliantheae). *Rhodora.* **81**, 449-500.
- Pérez-Escandón BE, Villavicencio-Nieto MA, Ramírez-Aguirre A, **2003**. Lista de plantas útiles del Estado de Hidalgo.UAEH. Pachuca, Hidalgo, México, p. 60.
- Plantsystematic, **2010**. <http://www.plantsystematics.org/>. Ingreso en Noviembre, 2010.

- Romo de Vivar A, Cabrera A, Ortega A, Romo J, **1967**. Constituents of *Zaluzania* species II structures of zaluzanin C and zaluzanin D. *Tetrahedron* 23, 3903-3907.
- Romo J, De Vivar AR, Nathan PJ, **1967**. The constituents of *Zaluzania augusta* the structures of zaluzanins A and B. *Tetrahedron* 23, 29-35.
- Rzedowski J, **1968**. Nota sobre la identidad de los géneros *Aiolothea* DC. y *Tonalantheus* T.S. Brandege (Compositae). *Britonia* 20, 166-168.
- Skoog DA, West DM, Holler FJ, **1997**. Fundamentos de química analítica. 4^{ta} edición. Reverté, S. A. Barcelona, España.
- Spring O, Buschmann H, Vogler B, Schilling EE, Spraul M, Hoffmann M, **1995**. Sesquiterpene lactone chemistry of *Zaluzania grayana* from on-line LC-NMR measurements. *Phytochemistry* 39, 609-612.
- Téllez-Reyes M, **2005**. Aislamiento y caracterización de lactonas sesquiterpénicas de *Zaluzania triloba*. Tesis de licenciatura. UAEH. Centro de Investigaciones Químicas.
- Tomioka K, Masumi F, Yamashita T, Koga K, **1984**. Asymmetric total synthesis of antileukemic sesquiterpene (+)-ivalin. *Tetrahedron Lett.* 25, 333-336.
- Topçu G, Öksüz S, Shieh H-L, Cordell GA, Pezzuto JM, Bozok-Johansson C, **1993**. Cytotoxic and antibacterial sesquiterpenes from *Inula graveolens*. *Phytochemistry* 33, 407-410.

- Villavicencio MA, **2010**. Plaguicidas vegetales del Estado de Hidalgo, México: alternativas eficaces para controlar plagas y seguras para el medio ambiente. Tesis Doctoral. UAEH. Área académica de Biología.
- Villavicencio-Nieto MA, Pérez-Escandón BE, **2006**. Plantas útiles del estado de Hidalgo III. UAEH. Pachuca, Hidalgo, México, p. 41.
- Willuhn G, Junior I, Kresken J, Pretzsch G, Wendisch D, **1985**. Sesquiterpenlactone aus *Arnica chamissonis* IV. Ivalin und andere sesquiterpenlactone aus den Blütenkörbchen der Subspecies *genuina*. *Planta Med.* 51, 398-401.
- Willuhn G, Skibinski A, Schmidt TJ, **1998**. Structure revision of xanthalongin and further sesquiterpene lactones from flowers of *Arnica longifolia*. *Planta Med.* 64, 635-639.
- Yabuta G, Olsen JS, Mabry TJ, **1978**. Sesquiterpen lactones from the genus *Zaluzania* (Compositae:Heliantheae). *Rev. Latinoamer. Quím.* 9, 83-85.
- Yang C, Shi Y-P, Jia Z-J, **2002**. Sesquiterpene lactone glycosides, eudesmanolides, and other constituents from *Carpesium macrocephalum*. *Planta Med.* 68, 626-630.
- Yang C, Zhu Y, Jia Z-J, **2003**. Sesquiterpene lactones and other constituents from the aerial parts of *Carpesium macrocephalum*. *Aust. J. Chem.* 56, 621-624.

9. ANEXOS

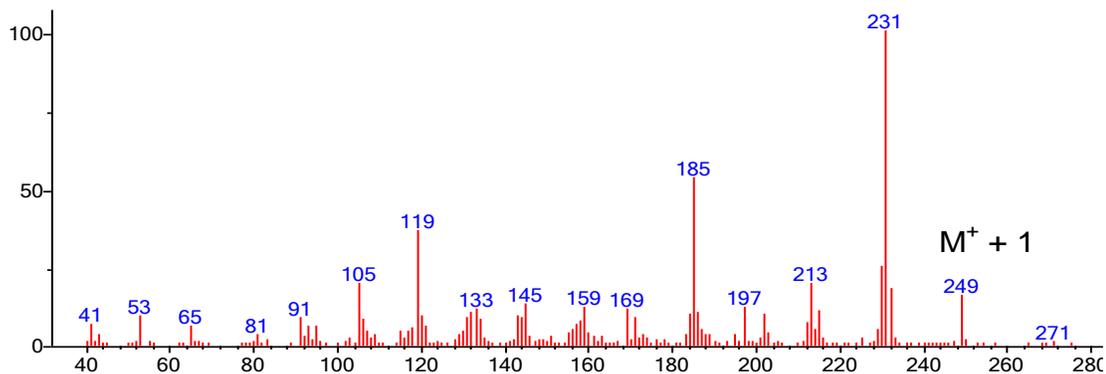
Datos espectroscópicos de la (+)-ivalina (1).



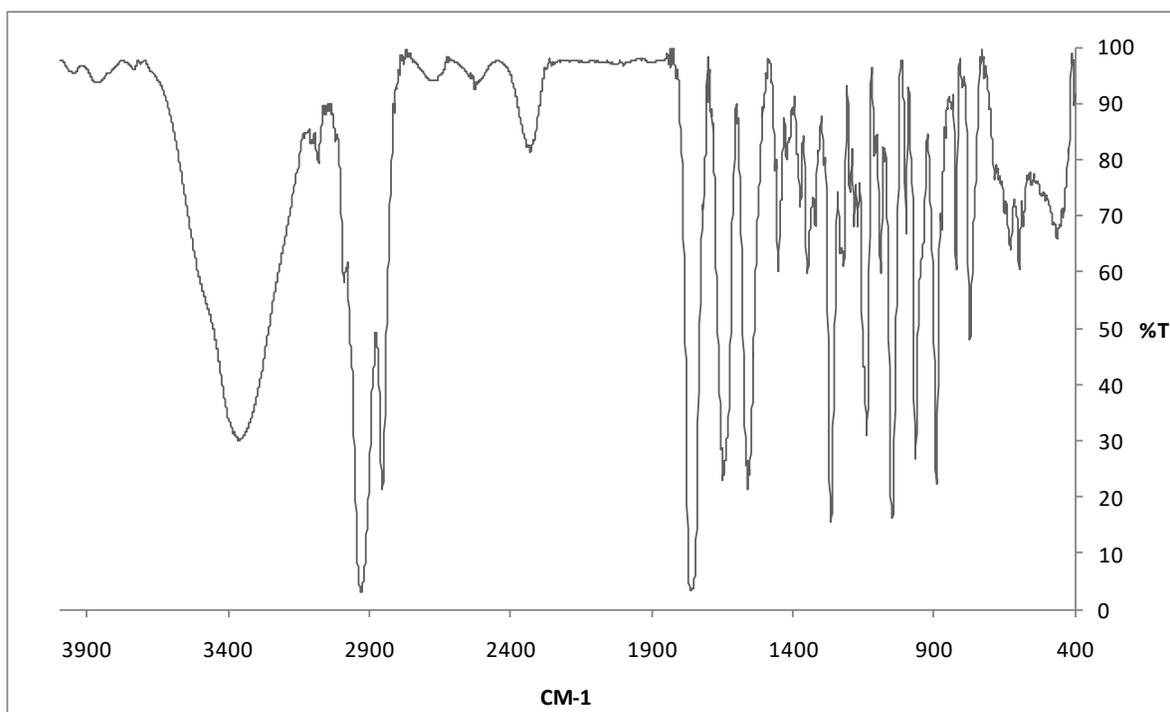
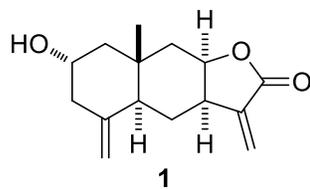
Cristales amorfos, p.f. 125-125.6 °C, IR (KBr) ν_{\max} cm^{-1} 3365 (OH), 2929.3, 2853.1 (CH) 1759.8 (C=O) 1647.8, 1557.8 (C=C), 1264.1, 1045.7, 890.7 (C-O).

$$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = \frac{589 \quad 578 \quad 546 \quad 436 \quad 365}{+133.4 \quad +139.4 \quad +159.2 \quad +277.7 \quad *} \quad (c = 1, \text{CHCl}_3)$$

* no se pudo determinar

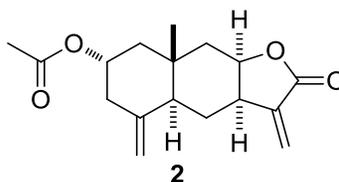


Espectro de masa de la (+)-ivalina (1).



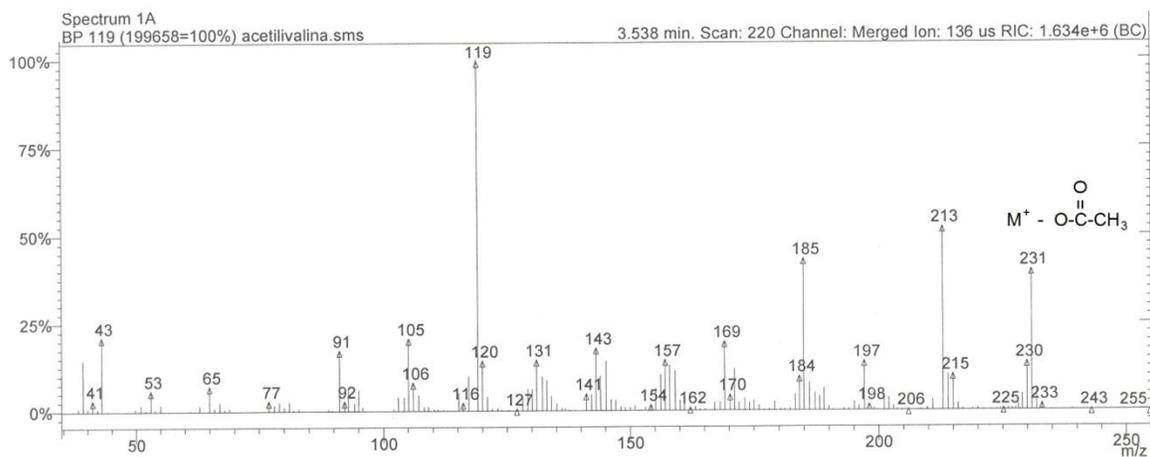
Espectro de IR de la (+)-ivalina (1).

Datos espectroscópicos de la (+)-acetilivalina (2).

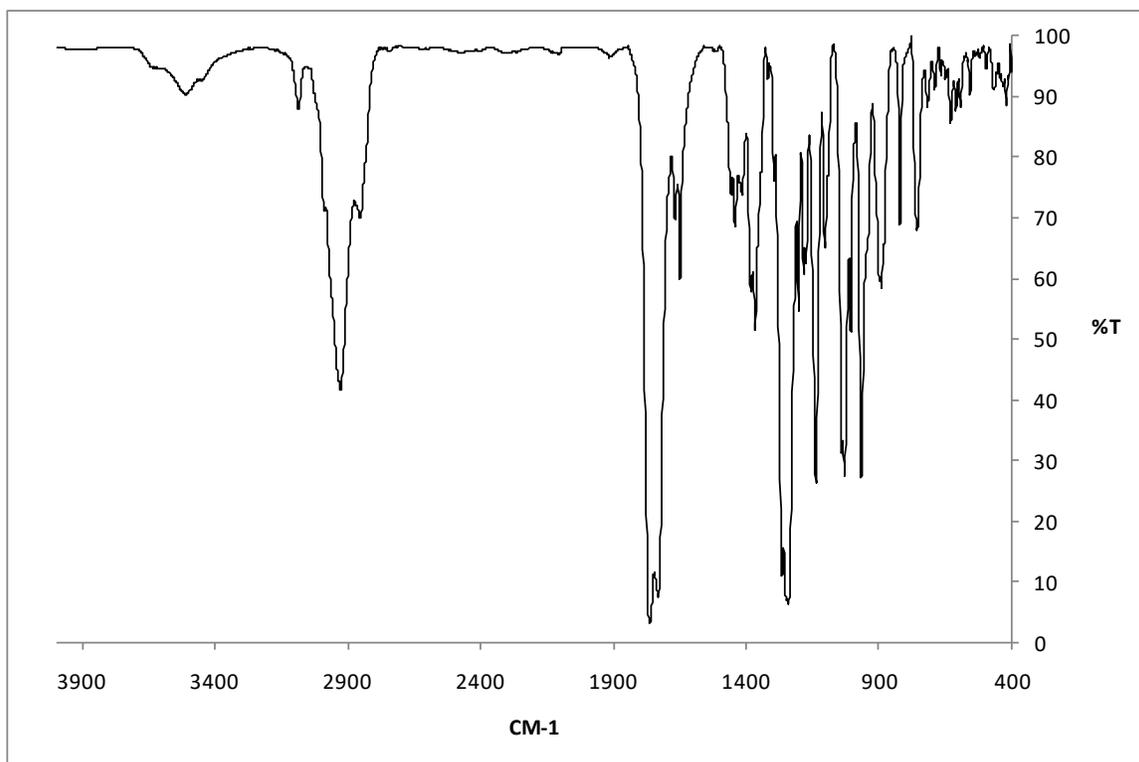
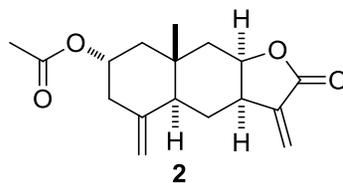


Polvo blanco, p.f. 140.3-140.9 °C, IR (KBr) ν_{\max} cm^{-1} 1763.0, 1730.7 (C=O), 1254.7 y 1240.2 (C-O).

$$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = \frac{589 \quad 578 \quad 546 \quad 436 \quad 365}{+122.0 \quad +126.9 \quad +145.4 \quad +255.1 \quad +414.6} \quad (c = 0.7, \text{CHCl}_3)$$

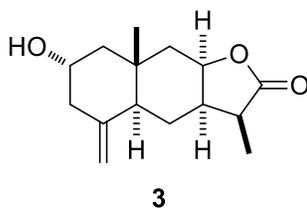


Espectro de masa de la (+)-acetilivalina (2).



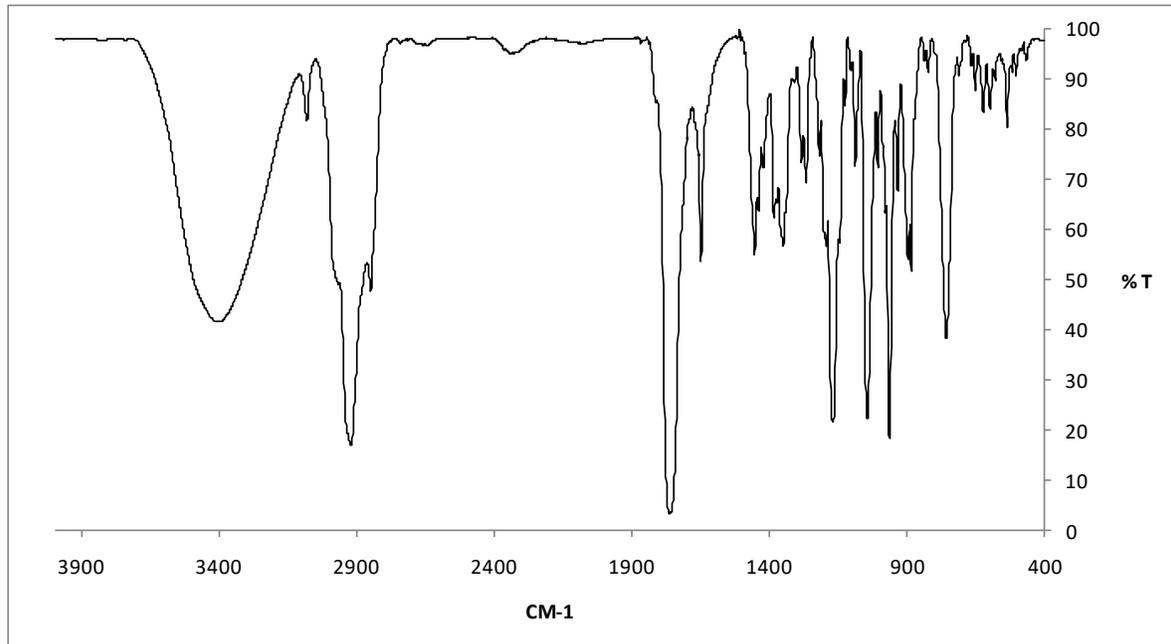
Espectro de IR de la (+)-acetilivalina (2).

Datos espectroscópicos de la (+)-11 α ,13-dihidroivalina (**3**).



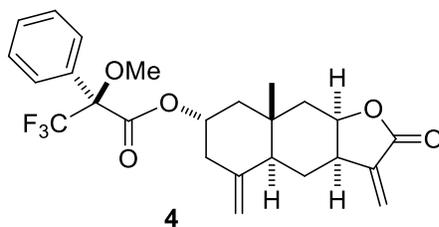
Polvo amarillento, p.f. 144.3-145 °C, IR (KBr) ν_{\max} cm^{-1} 3399 (OH), 2921.2 (CH), 1761.3 (C=O), 1647.7, 1453.5 (C=C), 1163.3, 1042.4 y 968 (C-O).

$$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = \frac{589 \quad 578 \quad 546 \quad 436 \quad 365}{+32.0 \quad +33.4 \quad +38.4 \quad +62.8 \quad +95.6} \quad (c = 0.86, \text{CHCl}_3)$$



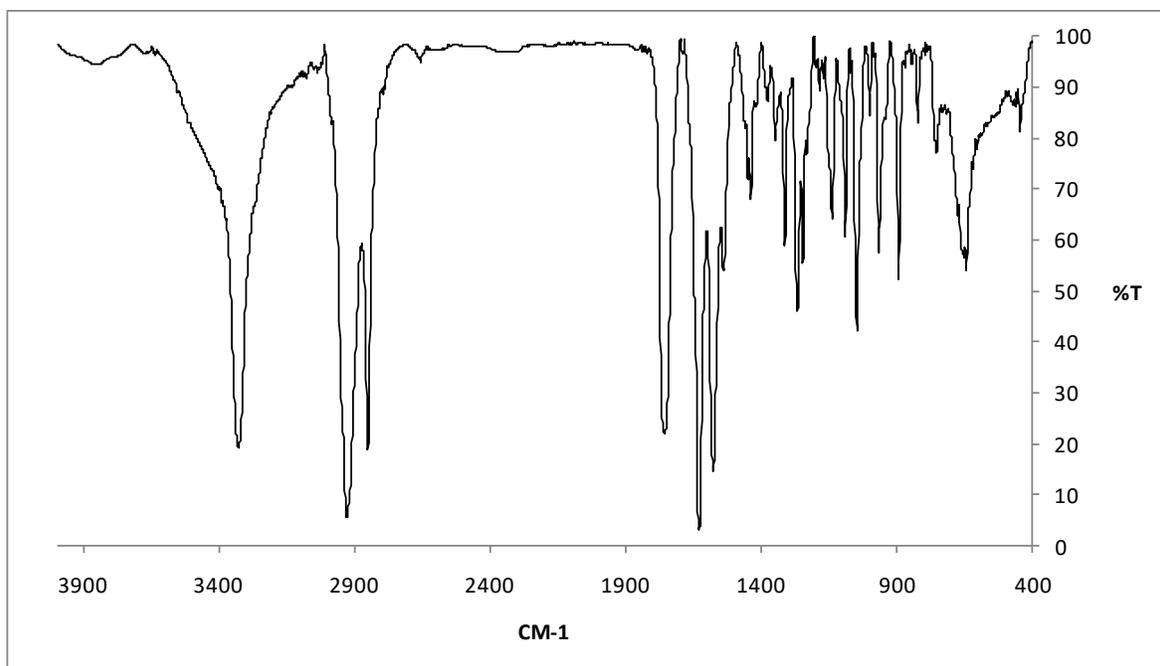
Espectro de IR de la (+)-11 α ,13-dihidroivalina (**3**).

Datos espectroscópicos del Éster de Mosher de la (+)-ivalina (**4**).



Aceite, IR (KBr) ν_{\max} cm^{-1} 3328.9, 2927.5 y 2850.6 (CH), 1755.4 (C=O), 1628.5, (C=O), 1045.9 (C-O).

$$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = \frac{589 \quad 578 \quad 546 \quad 436 \quad 365}{+13.7 \quad +14.6 \quad +15.5 \quad +29.6 \quad +45.9} \quad (c = 0.56, \text{CHCl}_3)$$



Espectro de IR del éster de Mosher da la (+)-ivalina (**4**).

Tabla 10. Resultados del HPLC de la solución estándar (ivalina) a diferentes concentraciones

Concentración (mg/mL)	Absorbancia (mV)
4.4	369.9
3.0	264.0
2.4	223.5
2.0	213.6
1.0	136.6
0.2	73.3