



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS

CENTRO DE INVESTIGACIONES QUIMICAS

**Análisis conformacional y determinación de la configuración
absoluta de los lignanos de *Leucophyllum ambiguum***

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Q.I. Yordin Donald Ocampo Acuña

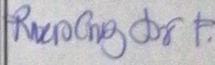
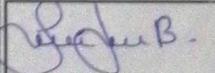
DIRECTOR DE TESIS

Dra. Ma. Yolanda Rios Gómez

DR. VICTOR BARBA LÓPEZ
COORDINADOR DEL POSGRADO EN CIENCIAS
PRESENTE

Atendiendo a la solicitud para emitir DICTAMEN sobre la revisión de la TESIS titulada "Análisis conformacional y determinación de la configuración absoluta de los lignanos de *Leucophyllum ambiguum*" que presenta el alumno Yordin Donald Ocampo Acuña (10009556) para obtener el título de **Maestro en Ciencias**.

Nos permitimos informarle que nuestro voto es:

NOMBRE	DICTAMEN	FIRMA
Dr. José Fausto Rivero Cruz FQ-UNAM	APROBADO	
Dra. Laura Patricia Álvarez Berber CIQ-UAEM	APROBADO	
Dra. María Luisa del Carmen Garduño Ramírez CIQ-UAEM	Aprobado	
Dra. Ma. Yolanda Ríos Gómez CIQ-UAEM	Aprobado	
M. en C. Silvia Marquina Bahena CIQ-UAEM	Aprobado	

Índice

INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES.....	3
Lignanos.....	3
Biosíntesis de lignanos.....	4
Clasificación.....	6
Aislamiento y Purificación.....	8
Cromatografía quiral.....	8
Resolución quiral de lignanos por cromatografía.....	10
Cromatografía fase reversa.....	10
Caracterización.....	11
UV.....	11
IR.....	11
RMN.....	12
Determinación de la configuración.....	12
Análisis por RMN con previa derivatización con auxiliar quiral.....	12
Reacción de esterificación de steglich.....	13
Difracción de rayos X.....	14
Determinación de la configuración absoluta por rayos x usando una referencia quiral interna.....	14
Dicroísmo circular.....	14
Actividad biológica.....	15
Lignanos de <i>Leucophyllum ambigum</i>	18
HIPOTESIS.....	19
JUSTIFICACIÓN.....	20
OBJETIVO.....	21
Objetivos específicos.....	21
Metodología.....	22
Procedimiento General.....	22
Separación de Ciquitn A y B.....	23

Primera separación de la mezcla de Ciquitin A y B por extracción en fase sólida.....	23
Segunda separación de la mezcla de Ciquitin A y B por extracción en fase sólida.....	23
Separación de la mezcla de Ciquitin A y B por columna abierta.	24
Separación de la mezcla de Ciquitin A y B por placa preparativa.	24
Reacción de esterificación de steglich.	24
Purificación del crudo de reacción.	24
Separación de las mezclas racémicas por HPLC.	24
Separación en columna quirál de la mezclade Ciquitin A.....	25
Separación en fase reversa de la mezcla esterificada de Ciquitin A y B.....	25
Cristalización y Rayos X de Ciquitin A.	25
Experimento de temperatura variable (RMN)de Ciquitin A.	25
Descenso de la temperatura.	26
Aumento de la temperatura.	26
DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	27
Análisis por RMN de la mezcla del Ciquitin A.....	27
Cromatografía	32
Derivatización	32
Separación de las mezclas racémicas por HPLC.....	32
Variación de Flujo.....	34
Variación del porcentaje de disolvente.	35
Separación de los lignanos esterificados.	37
Análisis por RMN de la mezcla del Ciquitin A esterificado.	39
Cristalización del Ciquitin A.....	43
Temperatura variable (RMN) del Ciquitin A.	43
Descenso de temperatura.	43
Asignación por RMN de los confórmeros del Ciquitin A.	46
MAYORITARIO:.....	47
MINORITARIO:.....	48
Análisis por RMN de la mezcla del Ciquitin B.	49

Análisis de constantes de acoplamiento.....	54
Asignacion de la configuración absoluta	56
Conclusiones	57
Bibliografía.....	58
ANEXOS	60

INTRODUCCIÓN

México cuenta con alrededor de 26,000 especies de plantas, lo que lo ubica como el cuarto país en cuanto a biodiversidad, solo detrás de Brasil, Colombia y China. La mayor parte de las plantas que crecen en México son endémicas y el resto fueron introducidas como consecuencia de la conquista. Aproximadamente 1,000 especies son utilizadas en la medicina tradicional, pero solo un 20 % cuenta con algún tipo de estudio.¹

Las plantas son organismos autótrofos, que además del metabolismo primario presente en todos los seres vivos, cuentan con un metabolismo secundario, el cual les permite acumular y producir compuestos de diversa naturaleza química. Los compuestos derivados de este tipo de metabolismo son denominados metabolitos secundarios.²

Los metabolitos secundarios o productos naturales pueden ser aislados de cualquier organismo, como hongos, bacterias, plantas o animales. No son directamente para la vida, son característicos para cada especie y son responsables de las propiedades biológicas de los organismos que los contienen.³ Existe una gran variedad estructural en ellos, entre los que se incluyen alcaloides, flavonoides, terpenoides, glucósidos, lignanos, entre otros.

Al igual que el resto de los grupos de metabolitos secundarios, los compuestos de tipo lignano poseen una gran variedad estructural y biológica,⁴ demostrando tener actividad citotóxica, antiviral, cardioprotectora, anti-bacteriana, anti-inflamatoria y hepatoprotectora.⁵ Además, algunos han sido reportados con actividad anti-acetilcolinesterasa,⁶ lo que los convierte en fármacos potenciales.

Entre los primeros pasos para el descubrimiento de nuevos fármacos provenientes de productos naturales están, su aislamiento, purificación y elucidación estructural. Uno de los métodos de separación más utilizados para la obtención de compuestos puros es la cromatografía. Esta técnica consta de un gran conjunto de métodos para la separación de mezclas complejas, los cuales incluyen desde métodos básicos como la cromatografía en papel, cromatografía en capa fina y cromatografía en columna abierta, hasta métodos que requieren equipo especializado, como la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) y la cromatografía de gases, así como sus variantes acopladas a otras técnicas como la espectrometría de masas.⁷

La cromatografía consta de dos fases, dispuestas de tal manera que, mientras una permanece fija dentro del sistema (fase estacionaria), la otra se desplaza a lo largo de la primera (fase móvil),⁸ la velocidad con la que se desplaza cada sustancia en este proceso depende de su afinidad por ambas fases, permitiendo así la separación.

En la cromatografía quirál, la afinidad por la fase estacionaria se define por la distribución espacial tanto de ésta, como de los componentes de la muestra, o bien, cuando la fase estacionaria no es quirál, se requiere de aditivos quirales en la fase móvil. La formación preferencial de complejos entre el agente de resolución quirál y uno de los isómeros dará como resultado la separación de diastereoisómeros.⁹ Por lo tanto, permite la separación de compuestos que son imágenes especulares no superponibles. Estas sustancias son llamadas enantiómeros.

Otra de las partes anteriormente mencionadas en el estudio de nuevas moléculas es su elucidación estructural, lo cual permite conocer la identidad de los compuestos desde la conectividad y la conformación que presentan hasta su orientación en el espacio (Estereoquímica de la molécula), lo cual se vuelve indispensable si lo que se desea es conocer la identidad inequívoca de un compuesto, para esto existen distintas técnicas como el dicroísmo circular, la difracción de rayos X, análisis por Resonancia Magnética Nuclear (RMN) con previa derivatización quirál entre otros.

En el presente trabajo A partir de los compuestos previamente aislados de *L. ambiguum*, se hará uso de la cromatografía para la purificación de metabolitos secundarios de tipo lignano, así como de las técnicas existentes para el establecimiento de su configuración absoluta.

ANTECEDENTES

Lignan

Estos metabolitos secundarios han sido identificados desde el siglo 19. El nombre de lignanos fue propuesto por Haworth en 1936. Este es un grupo de compuestos con una gran diversidad estructural y, por tanto, de actividades biológicas. Se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, en numerosas especies plantas, en todas sus partes, entre las que se incluyen raíces, rizomas, madera, cortezas, tallos, hojas, flores y semillas; en las cuales se presentan con diferentes niveles de abundancia. Estos también se pueden encontrar en sangre humana y otros mamíferos;¹⁰ sin embargo, el papel biológico de los lignanos en las plantas todavía está en discusión, generalmente se asume que se desempeñan en la defensa de la planta que los contiene, aunque también pueden desempeñar un papel importante en la regulación de su crecimiento. Los árboles viven mucho tiempo y no es sorprendente que contengan altas concentraciones lignanos y otros polifenoles. Las especies de madera blanda (angiospermas) contienen principalmente lignanos, mientras que las especies de madera dura (gimnospermas) contienen principalmente flavonoides. Recientemente, se ha descubierto que los nudos de los árboles contienen una concentración excepcionalmente alta en lignanos.

Los lignanos derivan principalmente del acoplamiento de dos unidades de fenilpropanoides (C_6-C_3), por lo que se consideran dímeros de fenilpropanoides $\beta-\beta'$. En algunas ocasiones estos dímeros vienen acompañados de pequeñas cantidades de trímeros o tetrámeros llamados comúnmente sesquilignanos o dilignanos, respectivamente. En 1961, Freudenberg *et al.* numeraron a los esqueletos de los lignanos de 1-9 para una de las unidades de los dímeros (C_6-C_3) y 1'-9' para la segunda unidad (A). El término neolignano es utilizado para aquellos compuestos cuyas unidades se encuentran enlazadas por cualquier otro átomo (B y C). Finalmente, en los oxineolignanos las unidades están enlazadas a través de oxígeno (D) **figura 1**.¹¹

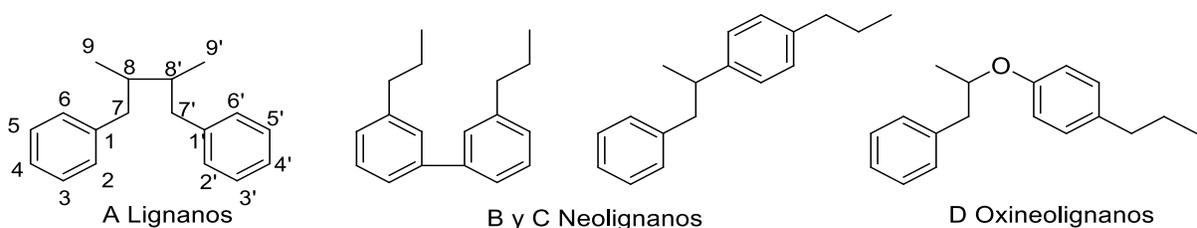


Figura 1. Distintas formas de unión de los dímeros

Biosíntesis de lignanos

Los lignanos y ligninas son formados por el acoplamiento oxidativo de dos alcoholes coniferílicos, estos alcoholes junto a los alcoholes 4-hidroxicinamínico y sinapílico, provienen de una secuencia de reacciones de metilación e hidroxilación sobre el ácido cinámico **Figura 2**.

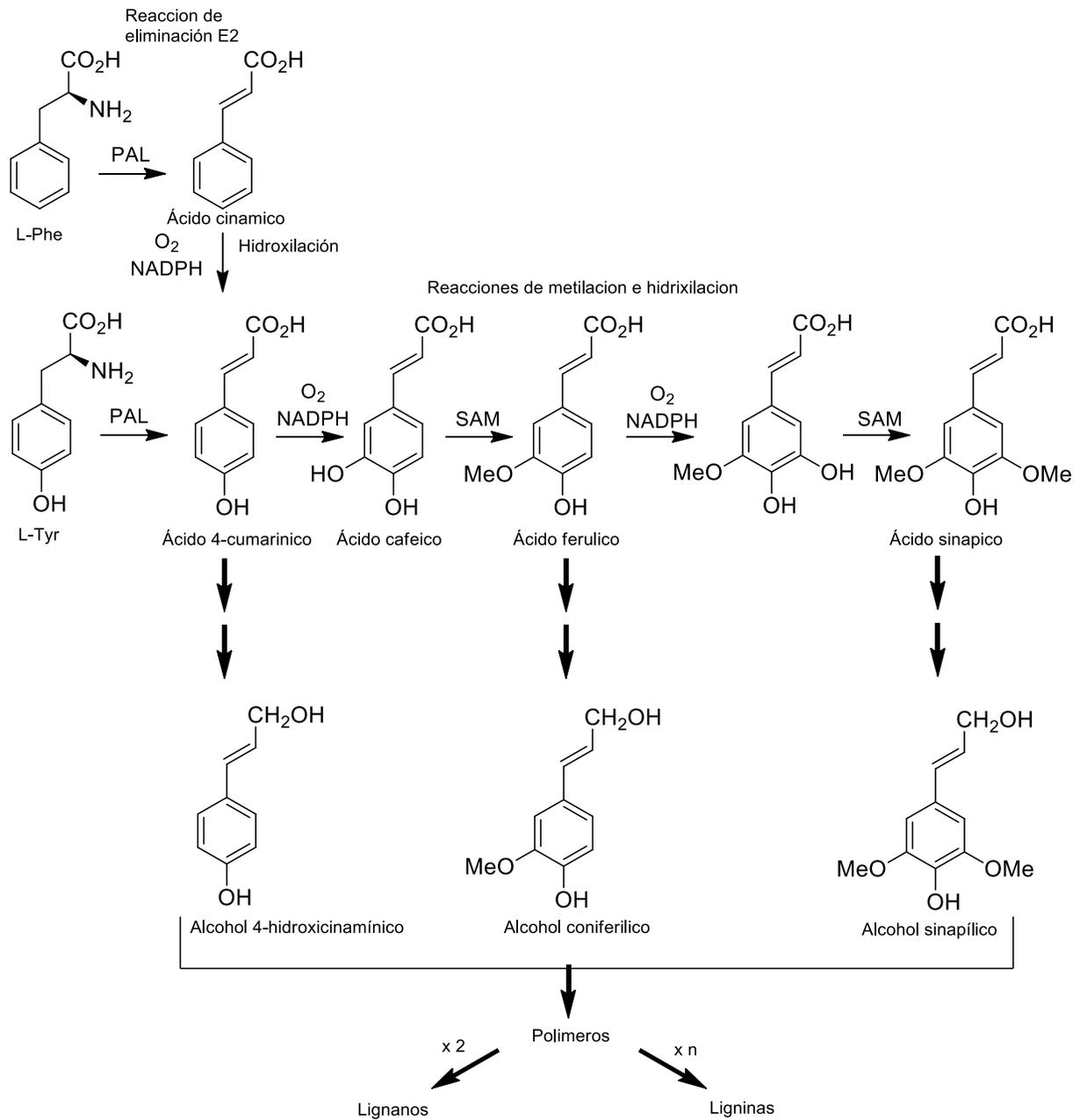


Figura 2. Biosíntesis de Lignanos.

Continuando con la biosíntesis de lignanos, la formación del enlace éster con la Coenzima A facilita el primer paso de reducción al introducir un mejor grupo saliente para la reacción dependiente de NADPH. El segundo paso de reducción del aldehído al alcohol utiliza una segunda molécula de NADPH y es **reversible** (Figura 3).

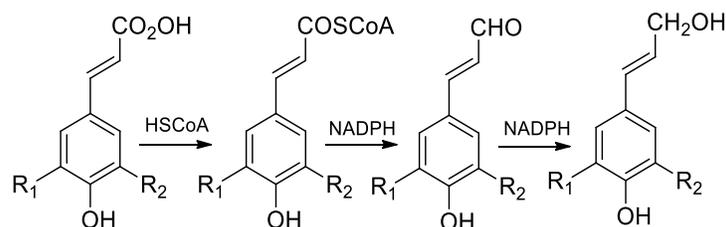


Figura 3. Formación de enlace éster con CoA e introducción un buen grupo saliente.

La enzima peroxidasa logra la oxidación de un electrón del grupo fenol. La oxidación de un electrón de un fenol simple permite la deslocalización del electrón no apareado, dando formas de resonancia en las que el electrón libre reside en las posiciones *orto* (C) y *para* (D) (Figura 4).

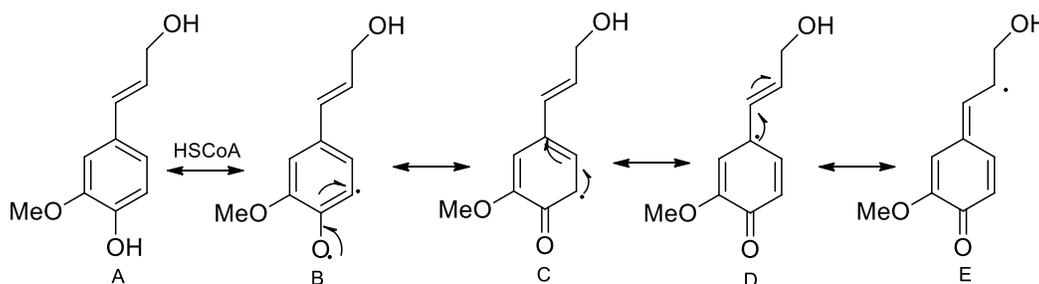
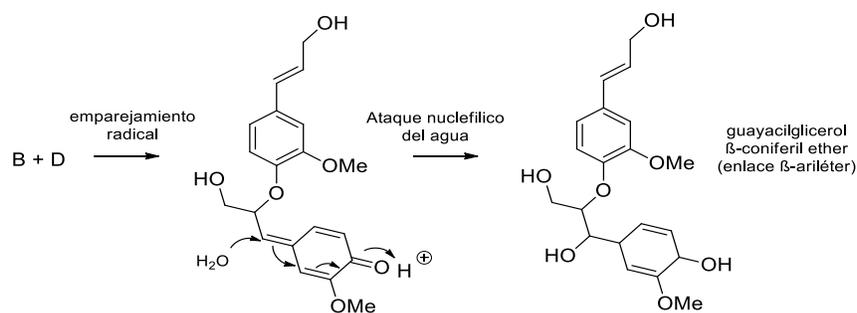


Figura 4. Formas de resonancia

La conjugación de los derivados del ácido cinámico permite que el electrón no apareado se deslocalice también en la cadena lateral (E). El emparejamiento radical de las estructuras de resonancia puede proporcionar una gama de sistemas diméricos. Por lo tanto, los monómeros de alcohol coniferílico pueden acoplarse, generando enlaces, como se ejemplifica en la **Figura 5**.¹²



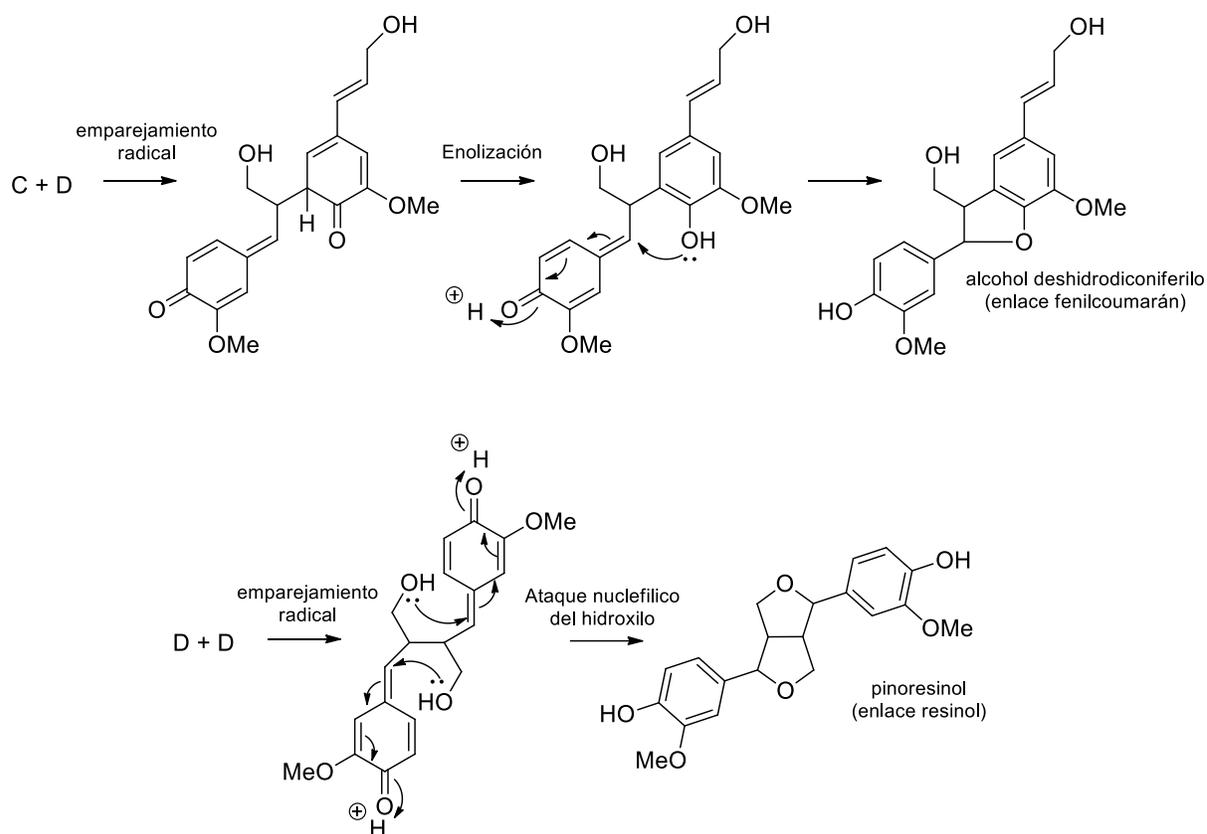
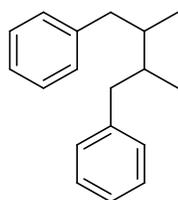


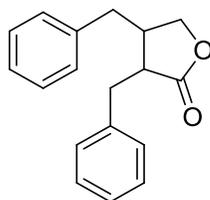
Figura 5. Acoplamiento de los monómeros de alcohol coniferílico.

Clasificación.

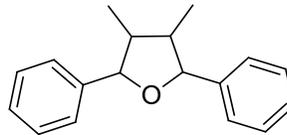
Existen varios tipos de unidades de fenilpropanoide en los lignanos, como propenil fenol, ácido cinámico, alil fenol, entre otros. En ocasiones existen sustituciones con oxígeno en los dos grupos fenilo, particularmente en C-3, C-4, C-5 o C-3', C-4', C-5'. El grado de oxidación en la cadena lateral puede ser variado, encontrándose con grupos hidroxilo, o formando parte de grupos carbonilo. Adicionalmente, se pueden encontrar anillos centrales, como tetrahidrofuranos y lactonas. Dentro de los esqueletos representativos se pueden encontrar: dibencilbutano, dibencilbutirolactona, tetrahidrofuranos, furanos, ariltetrahidronaftalenos, arilnaftalenos, dibenzociclooctadienos, ciclobutanos, y benzofuranos (Figura 6).⁵



Dibencilbutano



Dibencilbutirolactona



Tetrahidrofurano

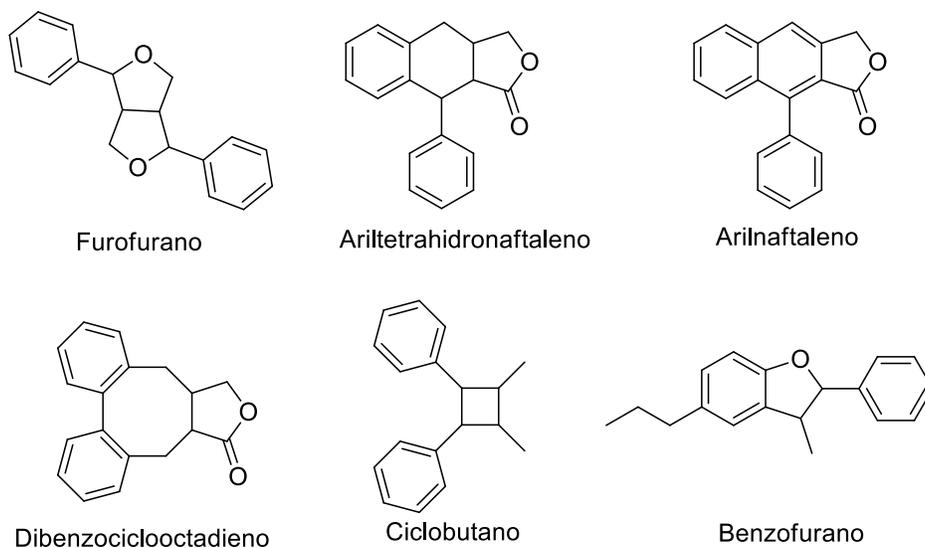


Figura 6. Esqueletos representativos

Como se ha demostrado los lignanos presentan una gran variedad estructural, muchas de ellas con un amplio espectro de actividades biológicas que van desde la inhibición del crecimiento celular por sus efectos citotóxicos, así como, por sus efectos antivirales, cardioprotectores, antibacteriales, antiinflamatorios y hepatoprotectores.¹⁰

Aislamiento y Purificación.

Debido a sus diversas estructuras químicas, los lignanos carecen de reacciones características comunes, estos productos naturales existen principalmente en fracciones lipídicas y pueden purificarse mediante cromatografía en columna. Lignanos que contienen grupos hidroxifenol pueden aislarse de la misma manera que sustancias tipo hidroxibenceno. En cromatografía en capa fina, los lignanos pueden identificarse rociando ácido fosfomolibdico al 5% en alcohol etílico y H₂SO₄ al 30 %, estos lignanos presentan diferentes colores al calentar la placa a más de 100 °C por unos minutos.¹³

Aunque es relativamente sencilla la identificación de estos metabolitos secundarios, este tipo de pruebas solo nos permiten saber si estos compuestos están o no presentes en dichas fracciones, sin embargo, como se menciona este tipo de productos naturales poseen una gran variedad estructural, con lo cual son necesarias técnicas de separación más avanzadas. Por otra parte, también se observa la presencia de centros estrogénicos, con lo que se hace más complicada su separación y para lo cual es necesario técnicas más específicas como lo son la cromatografía quiral.

Cromatografía quiral.

En los últimos años, la investigación de compuestos quirales se ha desarrollado de una manera muy rápida. Como bien sabemos, un número significativo de medicamentos y productos comerciales ya sea sintéticos o naturales, son de naturaleza quiral, por lo que la separación de compuestos quirales ha despertado gran interés. Uno de los métodos más utilizados para lograr la separación y purificación de estas mezclas es la cromatografía quiral. Esta separación se puede lograr utilizando diferentes técnicas cromatográficas:

- Cromatografías de gases
- Cromatografía de líquidos
- Cromatografía de fluidos supercríticos
- Electro cromatografía capilar

De los métodos anteriormente mencionados, la cromatografía de líquidos, en especial la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), es reconocida como una poderosa, rápida, selectiva, y altamente eficiente técnica, empleada con éxito en la separación de enantiómeros. Su separación mediante HPLC se puede efectuar de tres formas:¹⁴

1. Derivatización de la mezcla enantiomérica con un reactivo quiral enantioméricamente puro, de manera que se obtenga la correspondiente

pareja de diasterómeros, los cuales, por sus distintas propiedades físicas y químicas, pueden ser separados en columnas convencionales.

2. Mediante el empleo de fases móviles que contengan algún aditivo quiral.
3. Mediante fases estacionarias quirales (columnas quirales para HPLC).

Resolución quiral de lignanos por cromatografía

La separación quiral de lignanos se ha logrado, tanto en columnas quirales de fase normal como de fase reversa, normalmente de 4.6 mm de diámetro, con celulosa como fase estacionaria. Estas son habitualmente eluidas isocráticamente. Para la separación de los enantiómeros aislados de *Wikstroemia sikokiana* se utilizó una columna Chiralcel OC (250 mm x 4.6 mm), eluída a 0.5 mL/min isocráticamente, con una mezcla de etanol:hexano 1:1 como fase móvil. Para el estudio de los enantiómeros de las semillas de sésamo se utilizó una columna Chiralcel OD (250 mm x 4.6 mm), un detector UV a 280 nm, una mezcla etanol:ácido acético al 1% en hexano 15:85 como fase móvil y un flujo de 0.8 mL/min.¹¹

Cromatografía fase reversa.

Guo & Li, 2016 reportan la separación de Lignanos mediante HPLC con una columna fase reversa Diamonsil C18 (250 mm x 4.6 mm, 5 µm) a una temperatura de 35°C. La fase móvil consistió en agua (A) y metanol (B) utilizando un gradiente de elución: 50 % B a 0 min hasta 90% B a 40 min, a 1.0 mL/min e inyectando 5 µL.¹⁵

Caracterización

En los últimos 20 años los estudios acerca de los lignanos han tenido un gran avance, no solo porque han demostrado importantes actividades biológicas sino debido a sus complejas estructuras, se han propuesto novedosas técnicas y métodos que permiten el avance en este campo.

Luz UV

Las estructuras químicas de los lignanos pueden determinarse mediante el análisis de sus datos espectrales. La espectroscopia UV se utiliza para determinar las estructuras de sus anillos de fenilo.

Dibencilbutanos y benzofuranos muestran máximos de adsorción a 230 nm ($\log \epsilon > 4.0$) y 280 nm ($\log \epsilon 3.5$). Si se encuentra presente un doble enlace en la cadena lateral que está conjugado con el anillo bencilo, estos compuestos muestran una absorción característica en aproximadamente 235, 295 y 335 nm, como el caso de las dibencilbutirolactonas.

Si sus cadenas laterales forman un anillo de fenilo, como el caso de los arilnaftalenos, 220, 260, 295, 310 y 350, como en los arilnaftalenos.

Los lignanos de tipo benzofurano exhiben absorción en aproximadamente 320 nm. por lo que respecta a los lignanos dibenzociclooctadieno, las absorciones características correspondientes en UV 220, 250 y 285 nm.⁵

IR

Los espectros de infrarrojo se utilizan para identificar el patrón de oxidación y sustitución del anillo de los ciclooctadienos. En los espectros de IR, la mayoría de los lignanos presentan frecuencias características.

- 1500 a 1600 cm^{-1} para anillo fenilo.
- 1760 a 1780 cm^{-1} muestra lactonas aisladas de cinco miembros.
- 1740 a 1760 cm^{-1} muestra lactonas conjugadas de cinco miembros.
- 1725 cm^{-1} muestra lactonas insaturadas de cinco miembros.
- 1625 cm^{-1} corresponde al doble enlace de cadenas laterales.
- 1670 cm^{-1} corresponde a cetonas.
- 1640 cm^{-1} corresponde a diceteno.

RMN

La ^1H -RMN y la ^{13}C -RMN, así como la 2D-RMN, son los medios principales para determinar las estructuras químicas de lignanos. Hubo algunos estudios que trataron de resumir la espectroscopia de RMN de varios tipos de lignanos, pero fue difícil de poner en práctica por las distintas variaciones estructurales que presentan los distintos esqueletos de lignanos. De hecho, los espectros de ^{13}C -RMN son relativamente útiles para la determinación de esqueletos moleculares de lignanos y la sustitución de la cadena lateral.

Determinación de la configuración (Relativa y absoluta).

Cuando se determina la estructura de una molécula por RMN, es necesario establecer los grupos funcionales que incluye y la disposición espacial de las mismas. Esto se conoce como la configuración relativa. Cuando se determina qué enantiómero es el que se ha preparado o aislado, entonces se dice que se ha determinado la configuración absoluta.

Determinar la configuración absoluta de las moléculas quirales representa un gran reto. Para conseguir este objetivo existen diversas técnicas, entre las que se puede mencionar:

- RMN (con derivatización quiral)
- Difracción de rayos x
- Dicroísmo circular
- Dicroísmo Circular Vibracional

Análisis por RMN con previa derivatización con auxiliar quiral.

Como ya se ha mencionado, la gran virtud de la RMN consiste en ser un excelente auxiliar en la determinación de la configuración relativa de un compuesto, pero es inútil para asignar su configuración absoluta. Sin embargo, en ciertos casos, se puede asignar la configuración absoluta por RMN, sólo dependerá de los grupos funcionales presentes en la sustancia a estudiar. Por ejemplo, si tenemos un alcohol en la estructura, un método consiste en esterificarlo con ambos enantiómeros de un ácido carboxílico quiral, esto permitirá obtener un par de enantiómeros (R ó S). Las variaciones en los desplazamientos químicos entre señales diagnósticas en los espectros de ^1H -RMN de ambos diastereoisómeros, proporciona información de la orientación espacial del alcohol, permitiendo establecer la configuración absoluta del mismo. El ácido más utilizado es el fenilmetoxiacético (MPA). Al añadir iones Ba^{2+} al éster del ácido fenilmetoxiacético, el metal forma un complejo con el oxígeno del carbonilo y el oxígeno del metoxilo, originando una especie con conformación rígida, en la que el hidrógeno y el fenilo del éster quedan hacia lados opuestos.

El desplazamiento de las señales en el espectro de RMN¹H de los hidrógenos de G₁ y G₂ indicarán cuál de ellos está enfrentado al fenilo. Aquel sustituyente enfrentado al fenilo presentará señales de sus hidrógenos a campo más bajo, mientras que el sustituyente enfrentado al grupo metoxilo, tendrá señal de sus hidrógenos a campo más alto. En caso de observarse lo contrario, la otra disposición será la opuesta (Figura 7).¹⁶

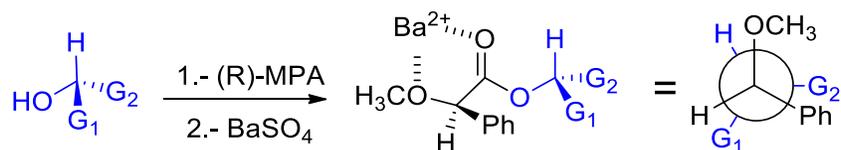


Figura 7. Asignación de Configuración con sales de bario

Reacción de esterificación de Steglich.

Para lograr llevar a cabo la asignación de la configuración absoluta por RMN por medio del método descrito anteriormente es necesario realizar la esterificación del alcohol, para esto existen distintas reacciones que llevaran al ester deseado. Una de estas es la esterificación de Steglich, una variación de una esterificación con diciclohexilcarbodiimida (DCC) como reactivo de acoplamiento y dimetilaminopiridina (DMAP) como catalizador. Esta reacción generalmente tiene lugar a temperatura ambiente con diclorometano como disolvente y su mecanismo de reacción se ilustra en la Figura 8.¹⁷

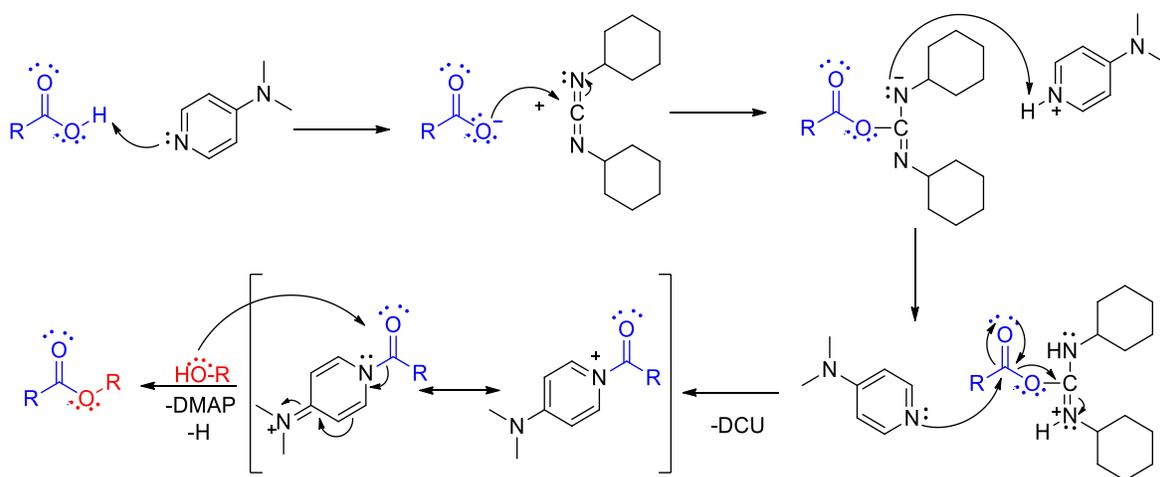


Figura 8. Reacción de esterificación.

Difracción de rayos X

La técnica puede aplicarse a compuestos de una amplia gama de composición química, ya que la difracción de rayos X tiene la capacidad de distinguir entre enantiómeros de una estructura cristalina quiral. La geometría molecular, las distancias de unión, los ángulos, y el empaquetamiento de las moléculas en el cristal son parte de la información química esencial observada en los resultados del análisis.

Sin embargo, tiene algunas limitantes. La determinación de la configuración absoluta depende de la capacidad de identificar pequeñas diferencias de intensidad de difracción entre dos modelos de estructura cristalina de quiralidad opuesta, por lo que, aun teniendo la estructura del cristal no se puede decir con exactitud si se trata del modelo de la estructura cristalina real o de su enantiómero. Para solucionarlo se puede hacer uso de una referencia quiral interna que nos ayude a realizar la asignación de los otros centros quirales presentes en la molécula.¹⁸

Determinación de la configuración absoluta por rayos X utilizando una referencia quiral interna

La presencia en una estructura cristalina de moléculas, grupos o centros quirales enantioméricamente puros de configuración absoluta conocida, conduce directamente a la determinación de la configuración absoluta de los otros centros quirales del cristal. Esto al hacer que la imagen de la disposición atómica se corresponda con la de la estructura cristalina, actuando de esta manera como una referencia interna. Estos centros quirales pueden introducirse al compuesto del que se desea determinar la configuración absoluta por reacción química.

Es importante destacar que la exactitud de la determinación de la configuración absoluta mediante una referencia quiral interna depende del conocimiento de la pureza enantiomérica del material de referencia y su configuración absoluta indicada.¹⁸

Dicroísmo circular.

El dicroísmo circular se expresa frecuentemente como la propiedad que poseen algunos materiales de absorber la luz a diferentes grados, dependiendo de la forma de polarización del haz incidente. Se dice que un material presenta dicroísmo circular cuando la absorción de la luz circularmente polarizada en una dirección (derecha) es diferente de la absorción de la luz circularmente polarizada en la dirección opuesta (izquierda). Cuando la luz se polariza circularmente, surge un componente secundario de absorbancia. Este componente secundario de absorbancia se mide como el cambio entre la luz polarizada circularmente (RCP) a

la derecha e izquierda, y la diferencia resultante se expresa como absorbancia en la **Figura 9** se ilustran los componentes del equipo de dicroísmo circular.¹⁹

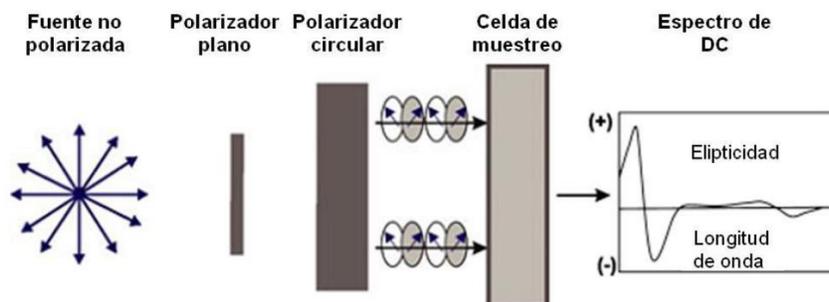
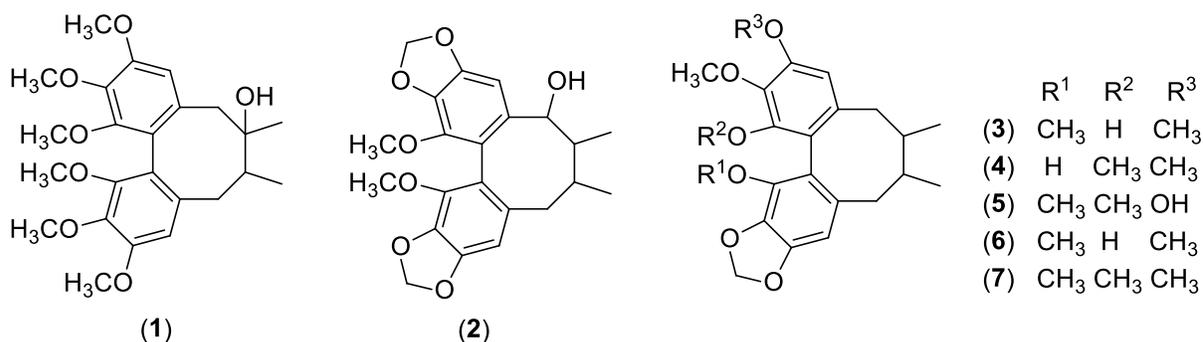


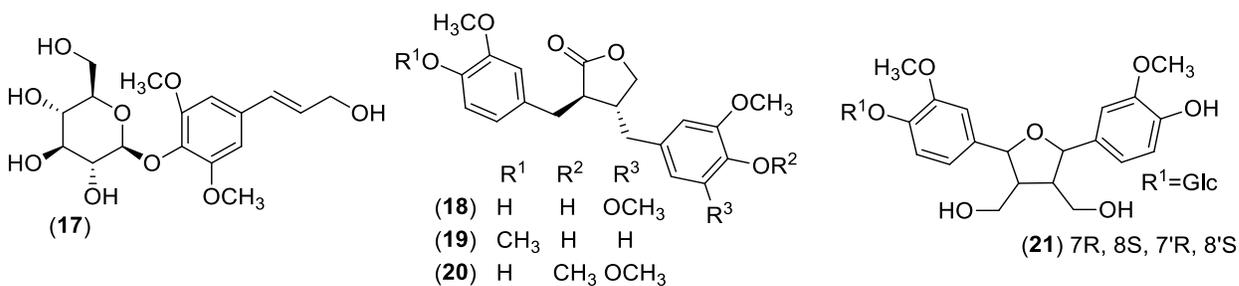
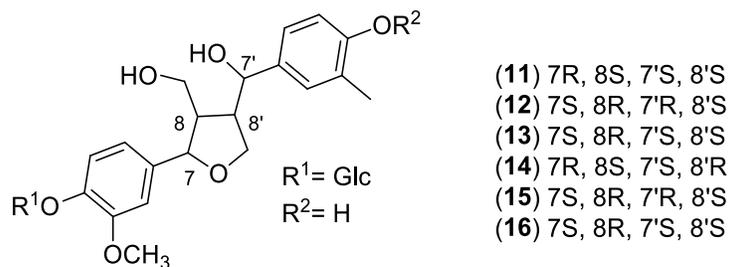
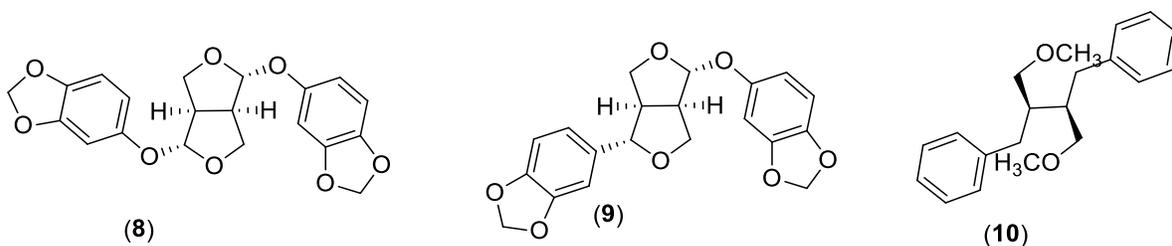
Figura 9. Diagrama del equipo de Dicroísmo.

Actividad biológica

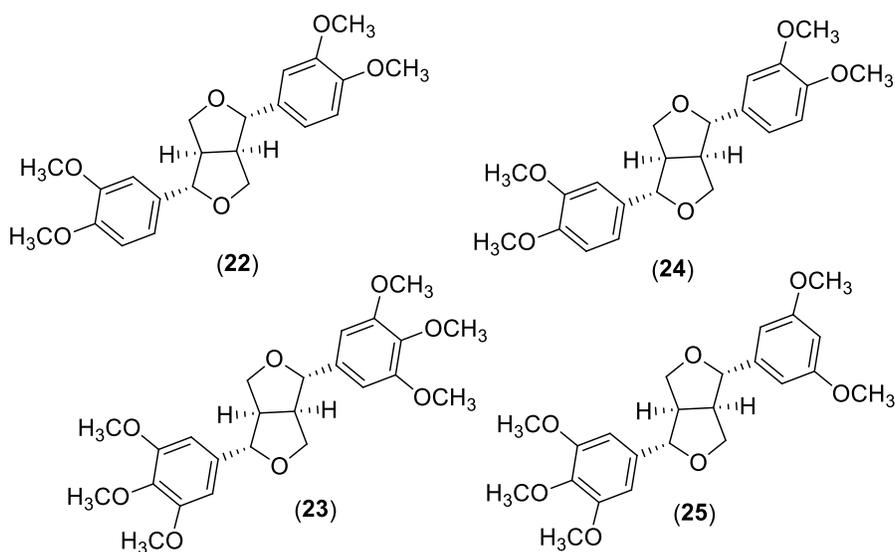
El uso de terapéutico de lignanos se remonta a tiempos antiguos, cuando extractos de plantas que los contenían fueron empleados como remedios caseros en varias culturas.

De acuerdo con estudios realizados, los lignanos son una fuente importante de compuestos con actividad hepatoprotectora, como es el caso de aquellos de tipo dibenzociclooctadieno (compuestos **1-7**); con estructura tipo furofurano, como es el caso de simplexolina (**8**) y sesamolina (**9**); lignanos abiertos como filantina (**10**); lignanos furánicos como **11-16**; lignanos glicosilados como eleuterósido B (**17**); lignanos de tipo dibencilbutirolactona como **18-20**; y finalmente, el lignano de tipo tetrahidrofurano (**21**).²⁰⁻²³

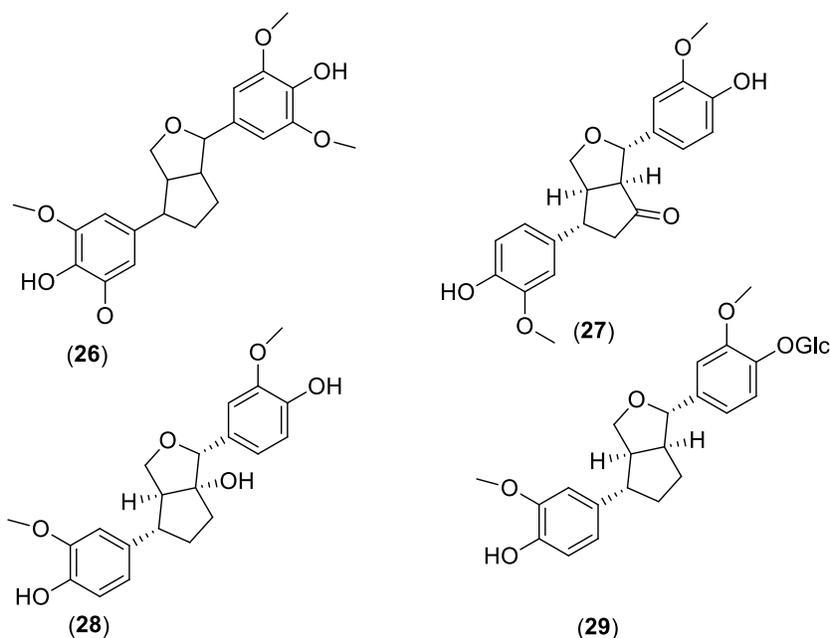




Los compuestos **22-25** de tipo furofurano son reportados con actividad antiinflamatoria.²⁴



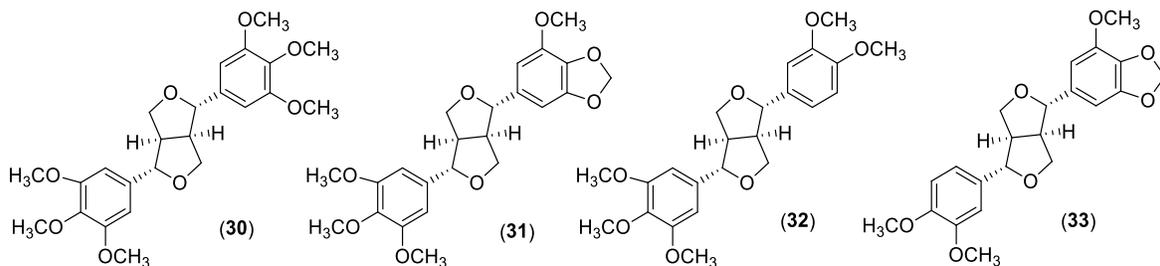
El extracto metanólico crudo de hojas y raíces de *Leucophyllum frutesces*, de donde se han reportado lignanos, demostró actividad antimicrobiana y citotóxica contra *Staphylococcus aureus*, además de mostrar actividad antituberculosa contra cepas sensibles y resistentes de *Mycobacterium tuberculosis*.²⁵ Algunos lignanos de tipo furofurano han sido reportados con actividad inhibitoria de acetilcolinesterasa (**26-29**), una enzima encargada de hidrolizar al neurotransmisor acetilcolina.²⁶ Disminución de este neurotransmisor conduce a la enfermedad de Alzheimer,²⁷ una enfermedad neurodegenerativa progresiva que afecta principalmente a adultos mayores. Por tanto, la inhibición de la enzima permite conservar el neurotransmisor en cantidades apropiadas para la salud. Se estima que del 50-60 % de los casos de demencia se presenta en personas mayores a los 65 años, entre algunos de los síntomas están la pérdida de memoria, disminución de las funciones cognitivas, déficit de lenguaje, y depresión, entre otras.²⁸



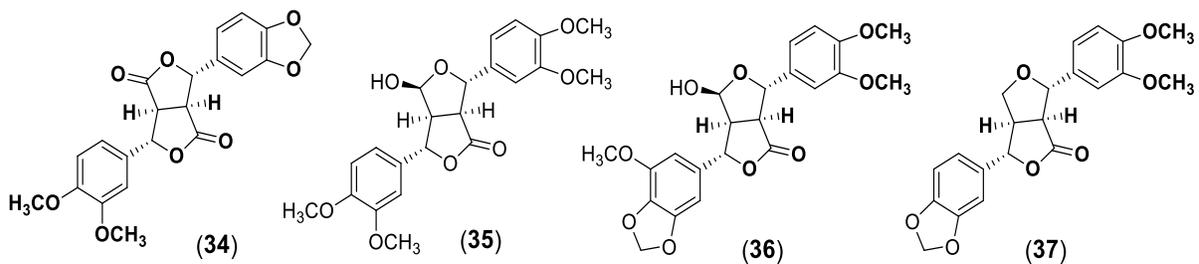
Entre las estrategias más utilizadas para el tratamiento del Alzheimer se encuentra el uso de inhibidores de la enzima acetilcolinesterasa, por lo que la búsqueda de compuestos con esta actividad ha conducido al descubrimiento de: galantamina, tacrina, donepezil, metrifonato y rivastigmina. No obstante, muchos de estos compuestos presentan efectos secundarios, como náuseas, vómito, dolor abdominal, etc. Aunque no son malestares severos, otro efecto de estos compuestos es la hepatotoxicidad, la cual obliga a la búsqueda de nuevos fármacos para el tratamiento de esta enfermedad.²⁷

Lignanos de *Leucophyllum ambigum*.

En el extracto metanólico de esta especie se aislaron en total ocho lignanos, cuatro de ellos se lograron purificar, yangambina (**30**), sesartemina (**31**), magnolina (**32**), y 3'-metoxikobusina (**33**).



y cuatro se aislaron como mezclas diastereoméricas Ciquitin D (**34**), Ciquitin A (**35**), Ciquitin B (**36**) y Ciquitin C (**37**).²⁹



HIPOTESIS

De acuerdo con el análisis espectroscópico realizado a los siete lignanos aislados en *L. ambigum*, tres se obtuvieron en forma de mezcla. Sus datos apuntan a que estas mezclas pueden corresponder a diastereoisómeros o confórmeros. Mediante la aplicación de técnicas de separación (Cromatografía convencional y HPLC), de derivatización (reacción con un auxiliar quiral), y análisis estructural (Rayos-X y Resonancia Magnética Nuclear) será posible establecer si estos compuestos están en mezcla diastereoisomérica o conformacional además de establecer la configuración absoluta de dichas mezclas.

JUSTIFICACIÓN

Es importante conocer la identidad de las tres mezclas aisladas de *L. ambiguum* y establecer su configuración absoluta con el fin de llevar a cabo una correcta evaluación de estos compuestos, ya que, los lignanos son productos naturales a los que se les ha demostrado diversas actividades biológicas, entre estas se encuentra la anti-acetilcolinesterasa.

OBJETIVO.

Contribuir al conocimiento estructural y de actividad biológica de los lignanos presentes en *L. ambiguum*.

Objetivos específicos

- Caracterizar las mezclas mediante RMN
- Demostrar si las tres mezclas de lignanos aislados de *Leucophillum ambigum* corresponden a diastereoisómeros o confórmeros mediante experimentos de Temperatura variable en RMN.
- Llevar a cabo la determinación de la configuración de cada uno de los centros quirales presentes en estos lignanos por medio de difracción de rayos X con un auxiliar quiral.

METODOLOGÍA

Procedimiento General

El proceso cromatográfico se llevó a cabo en Cromatografía en Columna Abierta (CCA) utilizando gel de sílice *flash* (*mesh* 230:400) como fase estacionaria, extracción en fase sólida utilizando cartuchos de gel de sílice fase normal LC-SI de 1ml y en capa fina preparativa, en placa de base de vidrio 20 x 10 cm de 2 mm de espesor. Para seguir el desarrollo de las distintas técnicas de separación se realizó Cromatografía en Capa Fina (CCF), utilizando placas de base de aluminio que soportan como fase estacionaria gel de sílice, utilizando para su visualización una lámpara de UV modelo UVGL-25 a 234 y 366 nm. Posteriormente, se utilizó como revelador sulfato cérico amoniacal $[(\text{NH}_4)_4\text{Ce}(\text{SO}_4)]$ al 1% en ácido sulfúrico (H_2SO_4) 2N con calentamiento. Las fracciones obtenidas de la CCA se concentraron con ayuda de un rotaevaporador Buchi modelo B-100.

Adicionalmente se utilizó el cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC) Dionex Ultimate 3000 Tabla 1, en el que se intentó la separación de las mezclas utilizando como fase estacionaria dos columnas, la primera de ellas fase reversa Dionex Acclaim C_{18} de 250 x 4.6 mm de 5 μ de relleno de partícula, y una columna quiral Phenomenex Lux cellulose-1 de 150 x 4.6 cm de 3 μm de relleno de partícula, para la fase móvil se utilizaron los siguientes disolventes grado HPLC: metanol, Agua, 2-propanol, acetonitrilo, ácido trifluoroacético, los cuales fueron previamente filtrados con un sistema de filtración Gelman Sciences, con ayuda de membranas de Nylon Supelco de 0.45 μm x 47mm.

Cromatógrafo de líquidos de alta resolución (CLAR) Dionex Ultimate 3000		
Componente	Marca	Modelo
Bomba cuaternaria	DIONEX	Ultimate 3000 Pump
Inyector	DIONEX	Ultimate 3000 Autosampler
Compartimiento de columna	DIONEX	Ultimate 3000 Column Compartment
Detector de arreglo de diodos	DIONEX	Ultimate 3000 Diode Array Detector
Programa	DIONEX	Chromleon, versión 6.80

Tabla 1. Componentes del CLAR

Para la elucidación estructural se utilizaron los equipos de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) Varian Mercury de 200 y 400 MHz, Bruker Avance de 500 MHz en disolventes deuterados como cloroformo (CDCl_3), Acetona (CD_3COCD_3), Tolueno ($\text{C}_6\text{D}_5\text{CD}_3$) y Metanol (CD_3OD).

Separación de Ciquitina A y B.

Primera separación de la mezcla de Ciquitina A y B por extracción en fase sólida.

Se comenzó a trabajar con un tubo de extracción de fase sólida LC-Si, el gel de sílice del tubo se activó pasando 3 cargas de 6 mL de Hex (1 carga = 6 mL), posteriormente se colocó 1 g de la mezcla de Ciquitina A y Ciquitina B suspendida en un sistema 7:3 Hex-AcOEt, recolectándose dos cargas para cada fracción, incrementándose la polaridad hasta 1:9 Hex-AcOEt.

Segunda separación de la mezcla de Ciquitina A y B por extracción en fase sólida.

Se comenzó a trabajar con un tubo de extracción de fase sólida LC-Si, el gel de sílice del tubo se activó pasando 3 cargas de 6 mL de Hex (1 carga = 6 mL), posteriormente se colocaron 833 mg de la mezcla de Ciquitina A y B suspendida en DCM, recolectándose dos cargas para cada fracción, incrementándose la polaridad con acetona hasta 91:9 DCM:Acetona.

Primera separación			Segunda separación	
	Fracción	Recuperado (mg)	Fracción	Recuperado (mg)
1	7:3 Hex-AcOEt	4	DCM	78
2	6:4 Hex-AcOEt	6	A) 99:1 DCM:Acetona	74
			B) 99:1 DCM:Acetona	76
3	5:5 Hex-AcOEt	35	A) 98:3 DCM:Acetona	95
			B) 98:3 DCM:Acetona	72
4	4:6 Hex-AcOEt	22	A) 97:5 DCM:Acetona	101
			B) 97:5 DCM:Acetona	80
5	3:7 Hex-AcOEt	11	A) 96:7 DCM:Acetona	89
			B) 96:7 DCM:Acetona	52
6	2:8 Hex-AcOEt	26	A) 95:9 DCM:Acetona	55
			B) 95:9 DCM:Acetona	33
7	1:9 Hex-AcOEt	31		
8	AcOEt	32		
	Total recuperado	167		805

Tabla 2. Fraccionamiento de las extracciones en fase sólida.

Separación de la mezcla de Ciquitina A y B por columna abierta.

Se adsorbieron 835 mg recuperados de la extracción en fase sólida en 500 mg de gel de sílice, los cuales se colocaron en una columna de 3.5 cm de diámetro empaquetada con 7 pulgadas de gel de sílice "Flash", comenzándose a eluir con un sistema 6:4 Hex-AcOEt y recolectando fracciones de 50 mL.

Separación de la mezcla de Ciquitina A y B por placa preparativa.

Se disolvieron 50 mg de la mezcla de Ciquitina A y B en aproximadamente 3 mL de CH₂Cl₂, los cuales fueron aplicados en una placa 20 x 10 cm de 2 mm de espesor, para realizar la aplicación de la muestra se realiza un canal de aproximadamente 0.5 mm de profundidad a lo largo de la placa y 1 cm de altura.

La placa fue eluida con un sistema 4:6 Hex:AcOEt, los lignanos fueron recuperados por raspado de la placa, posteriormente se extrajeron de la sílice realizando varios lavados con CH₂Cl₂ monitoreándolos por CCF.

Reacción de esterificación de steglich.

Se llevo a cabo un reacción de esterificación para favorecer la separación, para esto se colocaron 30 mg (0.07 mmol) de la materia prima de la mezcla de Ciquitina A y B con 16 mg (0.07) de naproxeno en un matraz de tres bocas, se añadieron 2 mL de CH₂Cl₂ con ayuda de un jeringa de vidrio, posteriormente se adicionaron 412 mg (0.14mmol) de DCC y 1 mg (0.007) de DMAP como catalizador, la mezcla se dejó reaccionar durante 2.5 hr. Al término de la reacción, al crudo se filtró al vacío y se lavó con CH₂Cl₂, finalmente se concentró con ayuda de un rotaevaporador.

Purificación del crudo de reacción.

Se adsorbieron 100 mg del crudo de reacción en 80 mg de gel de sílice "flash", los cuales se colocaron en una columna de 1 cm de diámetro con 7 pulgadas de gel de sílice "flash", se comenzó a eluir con un sistema 6.4 Hex-AcOEt, recolectando fracciones de 5 mL, las fracciones 6 y 8 fueron enviadas a RMN y la fracción 15 a RMN de 2D (COSY, HSQC, DEPTq y HMBC).

Separación de las mezclas racémicas por HPLC.

Las mezclas racémicas de los lignanos aislados de *L. ambiguum* se eluyeron, mediante método isocrático reportado por Guo & Li, 2016, en una columna de fase reversa C₁₈ de 250 x 4.6 mm, de 5 μ de diámetro, con MeOH:H₂O 7:3 como fase móvil, a un flujo de 0.5 mL/min, inyectando 20 μL de la muestra previamente disuelta en metanol, detectando los analitos a una longitud de onda de 290 nm, durante 20 min.³⁰

Separación en columna quiral de la mezcla de Ciquitin A.

Se comenzó a trabajar con la columna quiral Phenomenex Lux cellulose-1 de 150x4.6 cm, 3 μ , utilizando el programa cromatográfico descrito por Guo & Li, 2016, pero detectando a 220 nm, se modificó el método aumentando el porcentaje de metanol.

Posteriormente se probaron las condiciones descritas por Wilfor 2009 y Bravatti et al 2011, realizando un programa cromatográfico el cual consistía en una rampa que combina las condiciones de ambos métodos, a continuación, se modificaron los porcentajes de los disolventes y flujo.

Separación en fase reversa de la mezcla esterificada de Ciquitin A y B.

Para esta separación se utilizó la columna de fase reversa C₁₈ de 250 x 4.6 mm, de 5 μ de diámetro, para la elución se modificó el programa cromatográfico descrito por Guo & Li, 2016, incluyendo 2-propanol en el método y modificando la longitud de onda a 205 nm, se probaron varios métodos en los cuales se modificó: porcentaje de disolventes, cambio de disolventes, flujo y tipo de programa cromatográfico.

Cristalización y Rayos X de Ciquitin A.

Se disolvieron 10 mg de Ciquitina A en aproximadamente 1 mL de distintos disolventes donde se conocía su baja solubilidad. Se emplearon metanol, benceno y etanol, y se disolvieron de dos formas distintas para el metanol y etanol, trabajándose 6 condiciones de cristalización distintas:

- 1.- Se calentaron los disolventes 10 grados por debajo de su punto de ebullición, hasta que se logró la disolución completa del lignano y se dejó reposar para evaporación muy lenta del disolvente a temperatura ambiente.
- 2.- Se agregaron gotas de un disolvente en el que se sabía que el compuesto era soluble (DCM) hasta lograr la disolución del compuesto, se dejó reposar para evaporación muy lenta de la mezcla de disolventes, para la mezcla de benceno se optó por este método.

Una vez obtenidos los cristales en los 6 ensayos probados, fueron enviados a rayos X, se analizaron 5 cristales encada uno y de todos ellos se observó una sola estructura, por lo que se reunieron y fueron enviados a RMN.

Experimento de temperatura variable (RMN) de Ciquitin A.

El lignano 67 fue enviado a RMN de 500 MHz disuelto en cloroformo deuterado para realizar un experimento de temperatura variable y confirmar la presencia de confórmeros, al no observar cambio alguno se decidió realizar el experimento en MeOH para tener un rango mayor de temperatura.

Descenso de la temperatura.

Se bajó la temperatura de la muestra con ayuda de nitrógeno líquido de 10 en 10 grados, adquiriendo un espectro de ^1H en cada descenso para observar si se generaban cambios en las señales, se comenzó el enfriamiento de la muestra en 25 °C hasta llegar a -57 °C.

Aumento de la temperatura.

Se sube la temperatura de la muestra 10 en 10 grados, adquiriendo un espectro de ^1H en cada incremento de temperatura con el fin de observar cambios en las señales. Se comenzó el calentamiento de la muestra en 25°C hasta 55 °C.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

Como se mencionó anteriormente, del estudio CARACTERIZACIÓN DE COMPUESTOS TIPO LIGNANO de *Leucophyllum ambiguum* (Scrophulariaceae), se lograron caracterizar 8 lignanos entre los que destacan 3, por constituir productos naturales no reportados en la literatura y porque se encontraban en mezcla. Partiendo de esto y con el objetivo de lograr su separación y caracterización estructural individual, se decide comenzar a trabajar con las mezclas de Ciquitin A y Ciquitin B, quienes asumiendo una mezcla de 2 compuestos.

Análisis por RMN de la mezcla del Ciquitin A.

En el espectro de RMN ^1H del Ciquitin A (**Figura 10**) se observan señales que sugieren la presencia de una mezcla de compuestos, las cuales se analizarán a continuación.

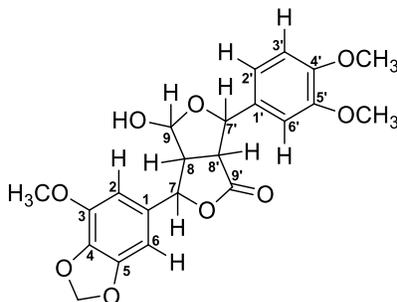


Figura 10. Estructura del Ciquitin A

En la zona de hidrógenos aromáticos que comprende de 6.4-7.1 ppm, se observa un par de señales que corresponden a cuatro anillos aromáticos, dos de ellos para el lignano mayoritario en la mezcla con señales en 6.96 ppm ($\text{H-2}'$), como un doble de doble (dd) con constantes de acoplamiento de 8.3 y 2.0 Hz, el cual se acopla con la señal en 6.91 ppm que presenta una constante de acoplamiento 2.00 Hz y que pertenece al hidrogeno $\text{H-6}'$, la constante de 8.3 Hz la comparte con la señal doble (d) en 6.85 ppm, la cual es asignada al hidrogeno $\text{H-3}'$, lo que completa un sistema ABX para el primero de los anillos. El segundo anillo presenta un sistema de tipo AB, cuyas señales se encuentran en 6.45 y 6.46 ppm, ambas dobles, que se acoplan entre ellas con una constante de 1.95 Hz.

Los anillos aromáticos del lignano minoritario en la mezcla presentan el mismo patrón de sustitución que los anillos del lignano mayoritario. Sus señales se encuentran en 7.07 ppm, señal doble que pertenece al hidrogeno $\text{H-2}'$, el cual comparte constante de acoplamiento de 2.0 Hz con la señal dd en 7.03 ppm,

correspondiente al hidrogeno H-2', que a su vez se acopla con la señal doble en 6.85 ppm (H-3') con una constante de 8.3 Hz. De la misma manera estas señales reproducen el sistema ABX previamente descrito para el componente mayoritario de esta mezcla. Para el sistema AB del segundo anillo del componente minoritario, las señales características son ambas dobles, y comparten una constante de acoplamiento de 1.5 Hz en 6.51 ppm.

Por otra parte, se tiene la presencia de un grupo metilendioxi ya que, en el espectro de RMN se pueden observar dos señales simples que integran cada una para dos hidrógenos, una de ellas en 6.00 ppm perteneciente al lignano minoritario y la segunda en 5.97 ppm que corresponde al compuesto mayoritario. (Figura 11)

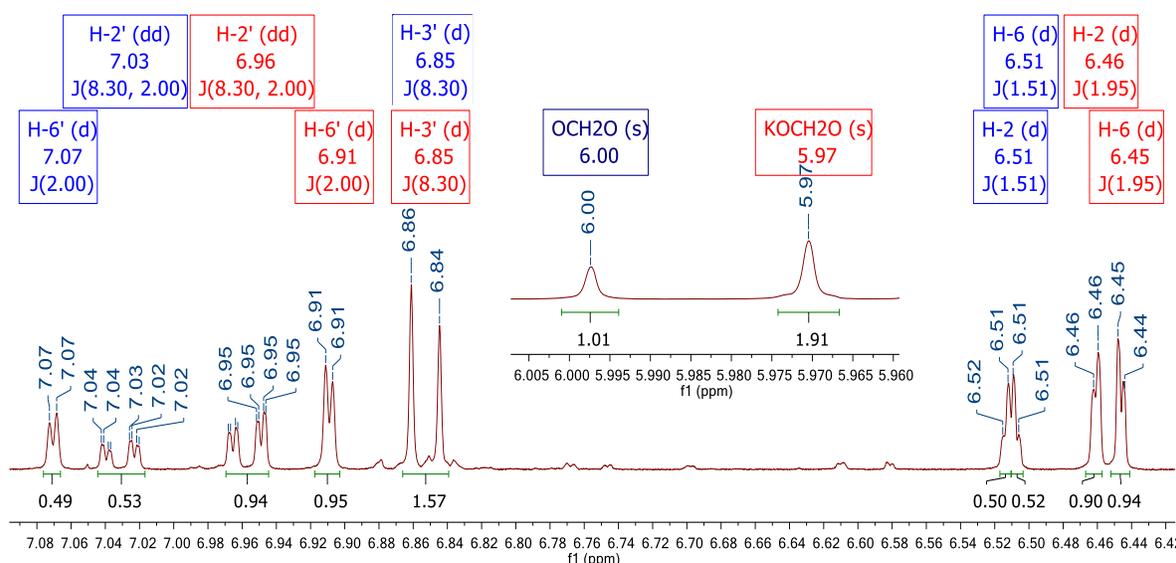


Figura 11. Señales de los anillos aromáticos de la mezcla del Ciquitin A.

Las señales que describen el centro de tipo furofurano para el lignano mayoritario son, un doble con constante de acoplamiento de 5.0 Hz en 5.91 ppm asignado a H-9, otro doble en 5.73 ppm con constante de 1.7 Hz perteneciente a H-7, ambas señales se acoplan con un doble de doble de doble (ddd) en 3.22 ppm que corresponde a H-8 y que presenta constantes de acoplamiento de 5.0 y 1.7 Hz respectivamente, además de presentar una constante más de 10.40 Hz con la que acopla con la señal dd en 3.34 ppm (H-8') y esta a su vez acopla con el doble en 5.48 ppm asignado a H-7' con una constante de 4.50 Hz, con la cual termina el sistema de spines.

Para el lignano minoritario tenemos dos señales dobles, una en 5.73 ppm (H-9) y otra en 5.48 ppm (H-7), las cuales acoplan con el ddd en 3.25 ppm con constantes de 1.70 y 4.5 Hz, respectivamente. Este hidrógeno presenta una constante más de 8.60 Hz con la cual acopla con la señal dd en 3.55 ppm, correspondiente a H-8', por último

está acopla con el doble en 5.34 ppm con una constante de 5.90 Hz, señal asignada a hidrogeno H-7, presentes en las **figuras 12 y 13**.

En la zona de metoxilos se logran observar 6 señales, tres de las cuales corresponden al lignano mayoritario y los 3 restantes al minoritario.

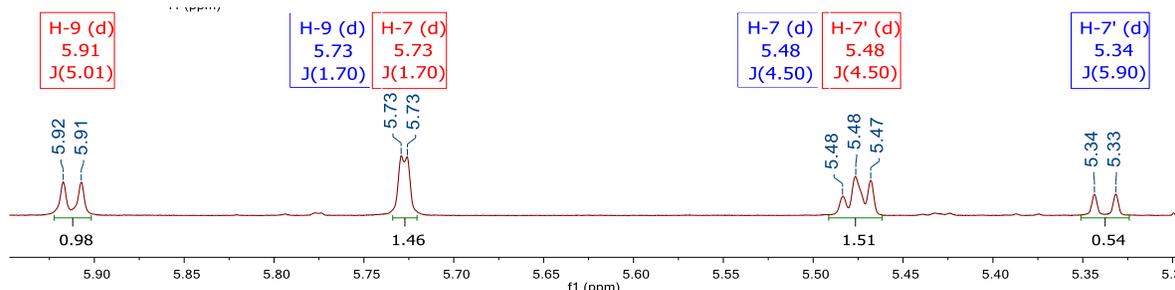


Figura 12. Señales del centro Furofurano de la mezcla del Ciquitin A.

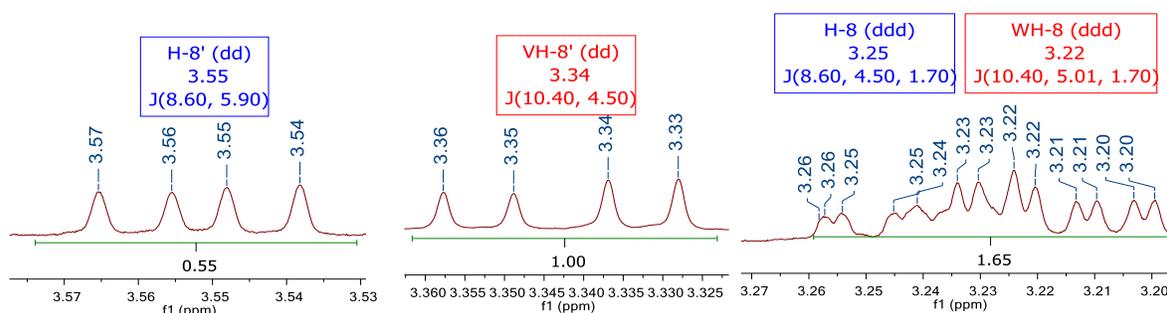


Figura 13. Señales del centro furofurano de la mezcla del Ciquitina A.

Del espectro de ^{13}C se observan 36 señales correspondientes a la mezcla de los lignanos **Figura 14**.

En la parte correspondiente a los carbonos alifáticos para el lignano mayoritario encontramos 3 señales, 1 de ellas es asignada a los metoxilos, mientras que las 4 restantes corresponden al centro de furofurano, 2 de ellas en 53.91 ppm y 51.6 ppm son asignadas a los carbonos C8' y C8 respectivamente. Continuando con el análisis del centro, tenemos que los carbonos en 79.63, 81.06, 99.33 ppm corresponden a los carbonos base de oxígeno C7, C7' y C9, mientras que la señal en y 176.88 ppm es asignada a C9' un carbono de carbonilo.

Por otra parte, las señales en la zona alifática 52.52 (C8') ppm, 58.54 (C8) ppm y las señales pertenecientes a carbonos base de oxígeno. 82.66 (C7'), 85.01 (C7), 102.97 (C9), además de la señal de carbonilo en 175.95 ppm corresponden al lignano minoritario de la mezcla.

Las señales en 101.47 y 102.02 ppm corresponden a los grupos metilendioxi, la primera de ellas para el lignano mayoritario y la segunda para el minoritario. En la zona que comprenden los carbonos de anillos aromáticos entre 104 y 150 ppm encontramos 22 señales que corresponden a los anillos aromáticos de los dos lignanos presentes en la mezcla.

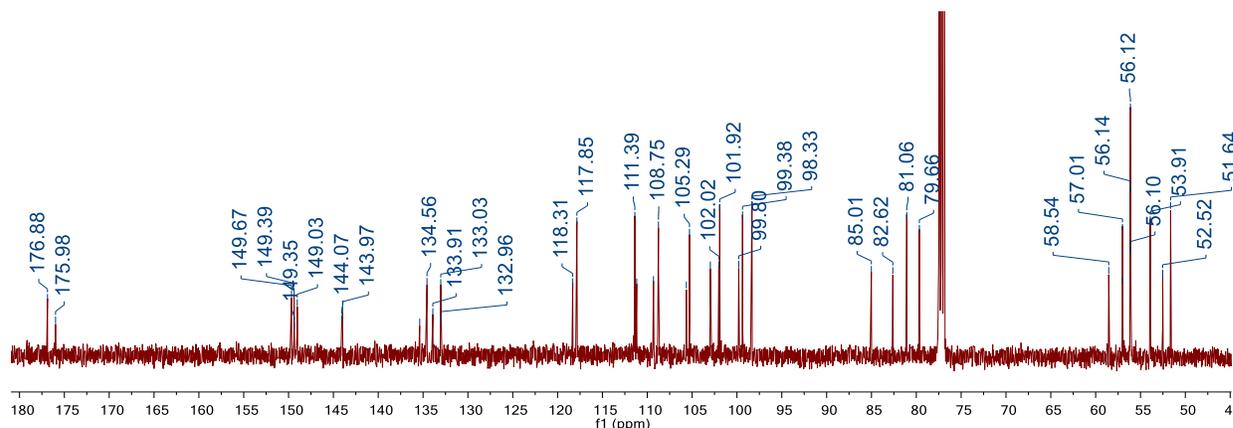


Figura 14. Señales de espectro de ^{13}C

Las señales más características y que nos permiten asegurar que se trata de una mezcla son los cuatro carbonos base de oxígeno en 79.66, 81.06, 82.62 y 85.01 ppm, los carbonos cuaternarios en la zona aromática 130-140 ppm y la presencia de las señales de carbonilo una en 176.88 y la otra en 175.98 ppm (Figura 15).

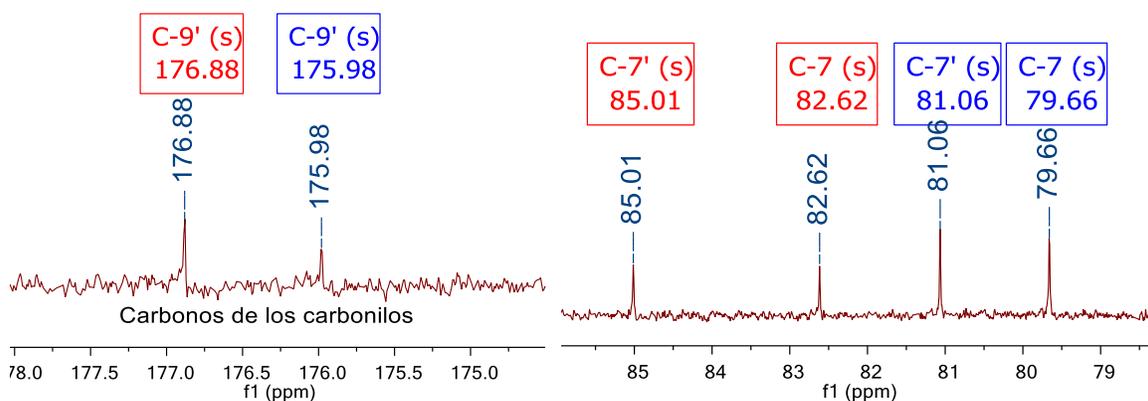


Figura 15. Ampliaciones del espectro de carbono.

Tabla 3. Señales de la Mezcla del Ciquitin A.

	¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C
1		133.03		134.56
2	6.46 (1H, d, J= 1.95)	105.29	6.51 (1H, d, J= 1.5)	105.64
3		143.97		
4		135.38		
5		149.67		
6	6.45 (1H, d, J= 1.95)	99.38	6.51 (1H, d, J= 1.5)	99.80
7	5.73 (1H, d, J= 1.75)	79.63	5.48 (1H, d, J= 5.0)	85.01
8	3.23 (1H, ddd, J= 10.4 ,5.0, 1.75)	51.6	3.23 (1H, ddd, J= 8.6, 4.5, 1.70)	58.54
9	5.91 (1H, d, J= 5.0)	99.33	5.73 (1H, d, J= 1.75)	102.97
9'		176.88		175.95
8'	3.34 (1H, dd, J= 10.4, 4.5)	53.91	3.55 (1H, dd, J= 8.6, 5.9)	52.52
7'	5.48 (1H, d, J= 4.5)	81.06	5.48 (1H, d, J= 4.5)	82.66
6'	6.91 (1H, d, J= 2.0)	108.75	7.07 (1H, d, J= 2.0)	109.31
5'		149.35		
4'		149.03		
3'	6.85 (1H, d, J= 8.3)		7.05 (1H, d, J= 8.3)	118.31
2'	6.97 (1H, d, J= 8.3,2)	111.18	6.85(1H, d, J= 8.3,2)	111.39
1'		132.96		133.91

Todas las señales y sus correlaciones fueron asignadas inequívocamente mediante RMN de dos dimensiones: COSY, HSQC, HMBC y NOESY en un trabajo previo,²⁹ por lo que no se discutirán. El objetivo del presente proyecto consiste en la separación y determinación de su configuración.

Cromatografía

Con la extracción en fase sólida, no se logró la separación de la mezcla de Ciquitina A y B, atribuyendo esto a la baja solubilidad de la mezcla en la fase móvil, por lo que se cambia a una fase donde la mezcla sea más soluble, repitiéndose la separación en fase sólida; sin embargo, aun con estas condiciones no se logró la separación.

De la columna abierta se lograron obtener 70 mg del Ciquitin A, mientras que la mezcla quiral de Ciquitin B no se logró aislar, De la cromatografía en capa fina preparativa se logró aislar la mezcla del Ciquitin A (24 mg) y la del Ciquitin B, sin embargo, esta última en muy bajo rendimiento.

Derivatización

La reacción de esterificación de Steglich procedió con rendimientos del 85 %, después de la purificación por cromatografía en columna abierta, se logró recuperar el producto 38 de los 46 mg de materia prima.

Separación de las mezclas racémicas por HPLC.

De la inyección de las mezclas de Ciquitina A y B, así como la mezcla de estos en la columna de fase reversa C₁₈ de 250 x 4.6 mm, de 5 µ de diámetro, siguiendo el método reportado por Guo & Li, 2016, se observa un solo pico para las mezclas separadas (**Figura 16 y 17**), mientras que para la mezcla de Ciquitina A y B se observan dos picos mayoritarios. Lo que sugiere que las mezclas no contienen ningún compuesto más, por lo que se continúa con la separación de ambas.

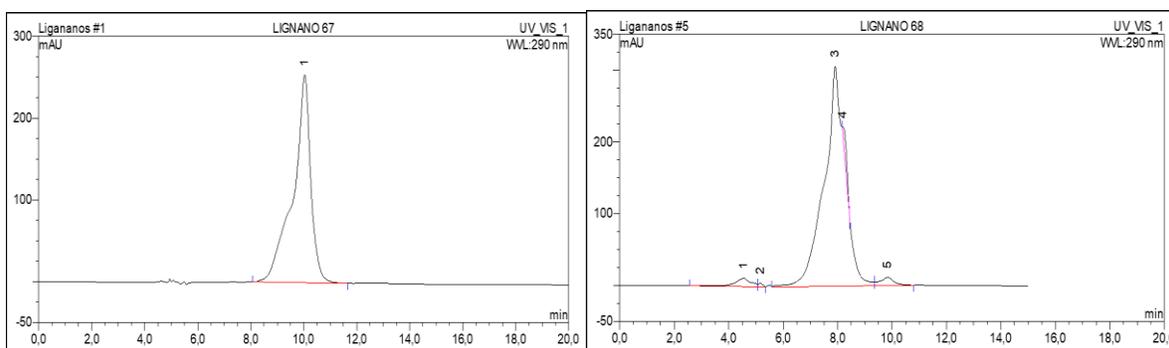


Figura 16. Cromatogramas de Ciquitina A y B.

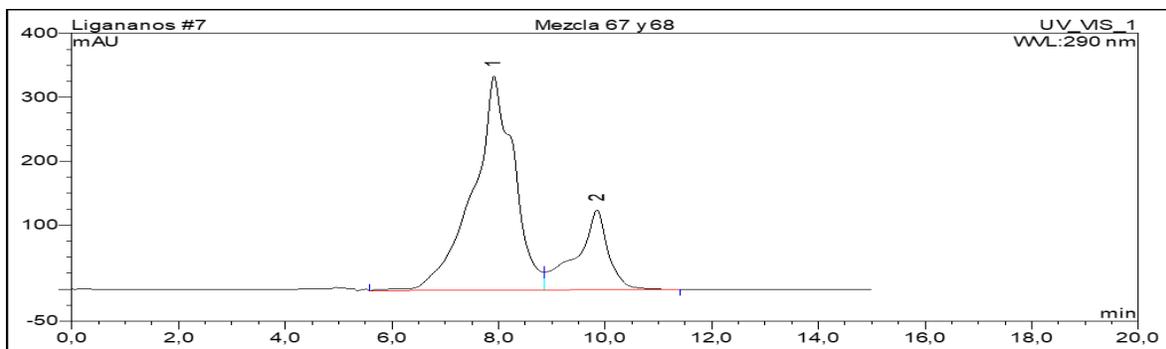


Figura 17. Cromatogramas de la Mezcla de Ciquitina A y B.

De la separación de Ciquitina A en la columna quiral Phenomenex Lux cellulose-1 de 150x4.6 cm, 3 μ en la cual se comenzó probando una rampa de MeOH:H₂O. Se observa un solo pico para el Ciquitin A en aproximadamente 60 min Figura 8, debido a esto se decide probar con el programa cromatográfico reportado por Wilfor 2009 y Bravatti et al 2011. Una rampa Hex 30-70%, 2-propanol 90 a 10% por 40 min, con lo cual se ve disminuido el tiempo de retención del pico en 8.75 min (6); sin embargo, no se logró su separación, además de la aparición de dos picos minoritarios en 8.25 (5) y 2.51 (1) (Figura 18 y19).

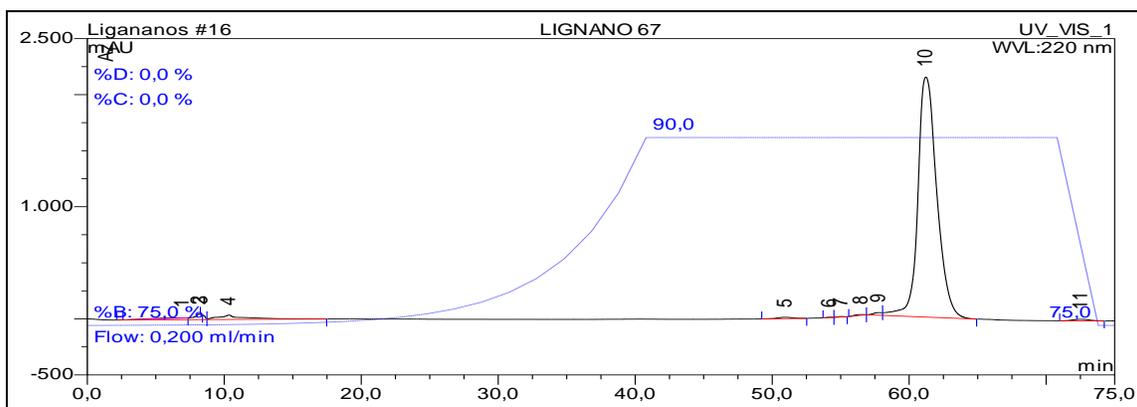


FIGURA 18. Cromatogramas de la mezcla del Ciquitina A.

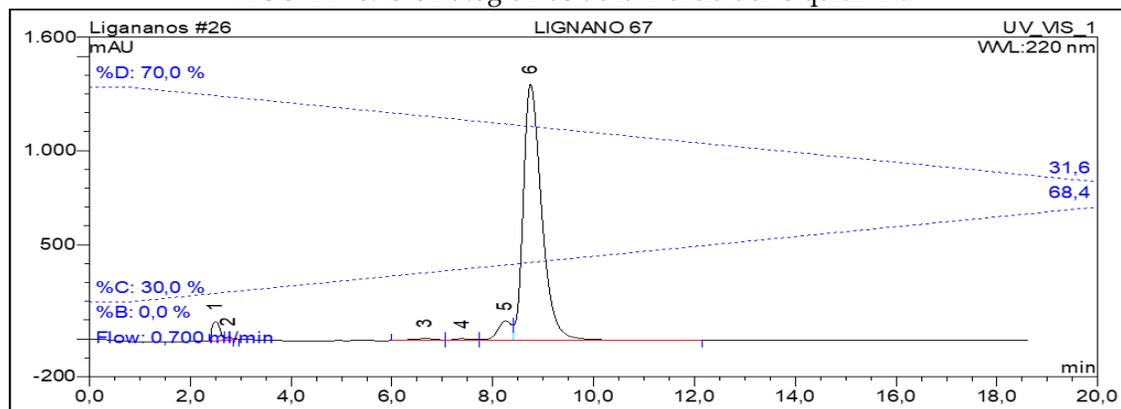


FIGURA 19. Cromatograma de la mezcla del Ciquitina A

Variación de proporciones de disolvente y flujo.

Se decidió probar con un programa de multigradiente, en el cual se variaron porcentaje de disolvente y flujo, de esto se obtiene que la variación del flujo no tiene otro efecto más que aumento en el tiempo de retención del pico de interés sin lograr la separación de la mezcla (Figuras 20-25)

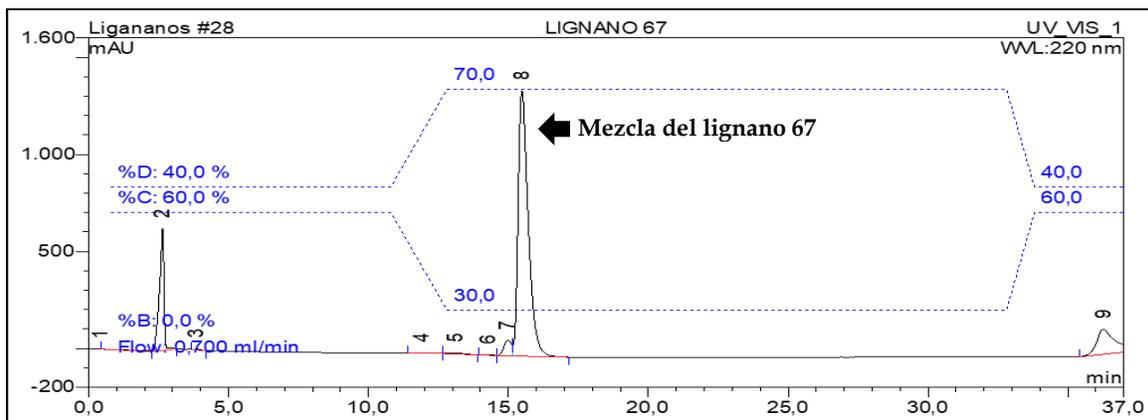


FIGURA 20. Cromatograma de la mezcla de Ciquitina A.

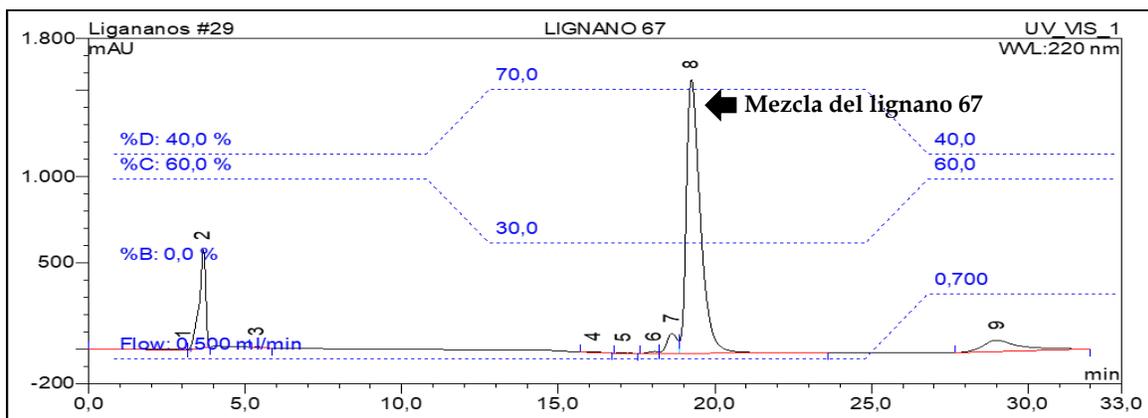


Figura 21. Cromatograma de la mezcla del Ciquitina A.

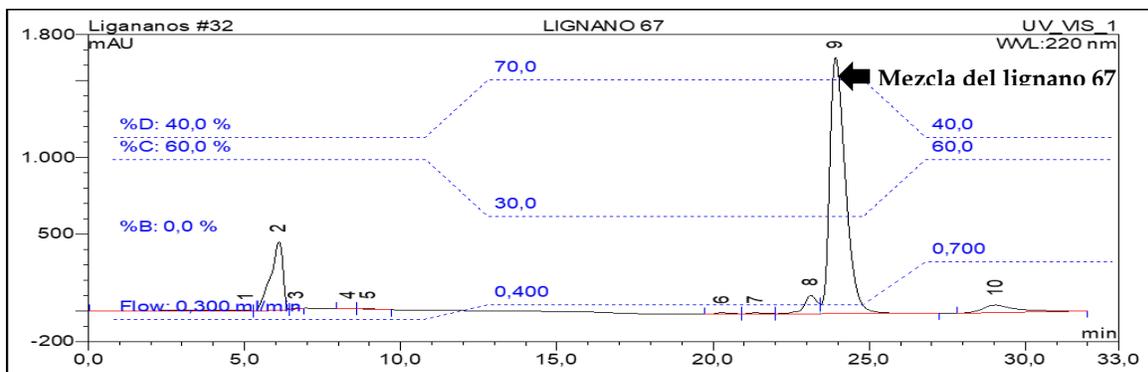


Figura 22. cromatograma de la mezcla del Ciquitina A.

Variación del porcentaje de disolvente.

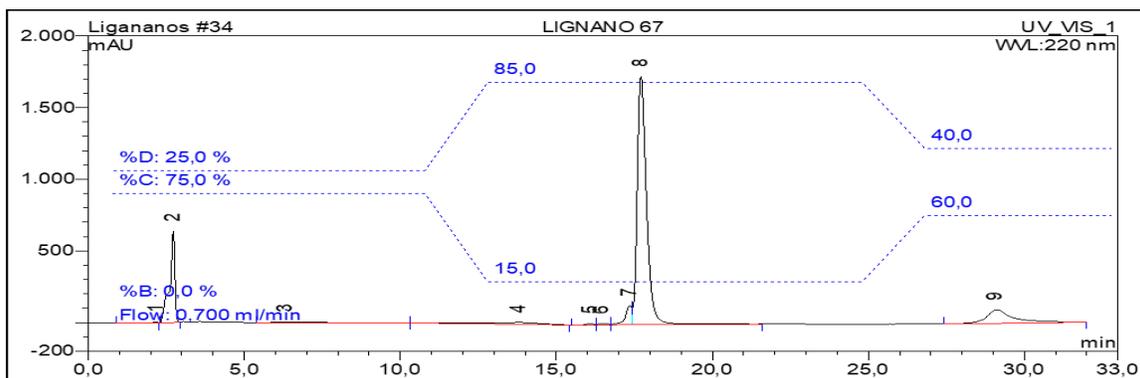


Figura 23. Cromatograma de la mezcla del Ciquitina A.

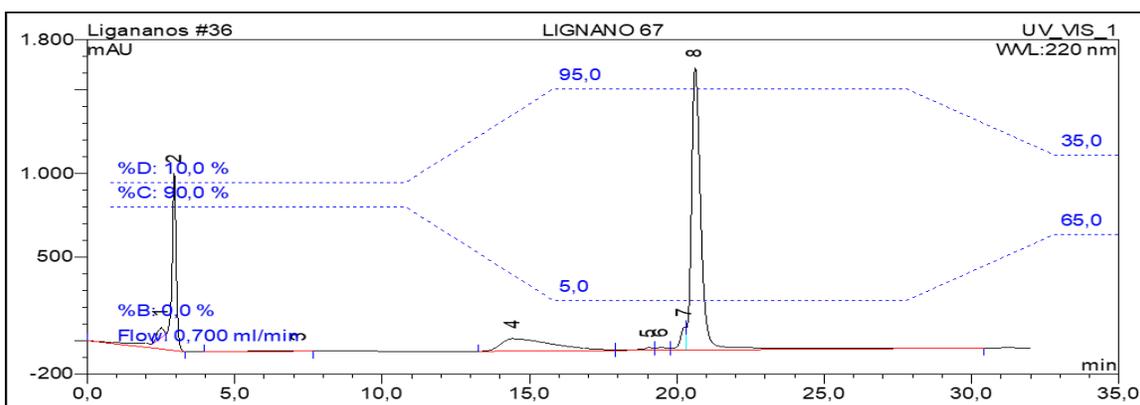


Figura 24. Cromatograma de la mezcla del Ciquitina A.

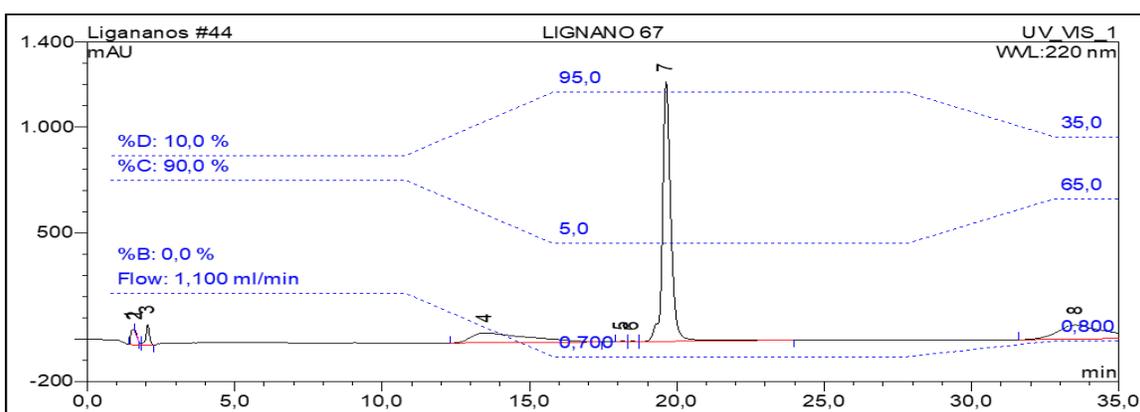


Figura 25. Cromatograma de la mezcla del Ciquitina A.

Como se observa en los cromatogramas de las Figuras 23-25 no se logró separar la mezcla del Ciquitina A, por lo que se procedió a cambiar los disolventes para esto se

partió del programa cromatográfico reportado por Guo & Li, 2016 agregando en esta ocasión propanol. Sin embargo, no se logró observar una separación de la mezcla, por el contrario, como se muestra en los cromatogramas solo se observa un solo pico, por lo que una vez obtenidos los productos de la reacción de esterificación se inyectaron al HPLC, utilizando para esto la columna de fase reversa, partiendo del método de Guo & Li, 2016,

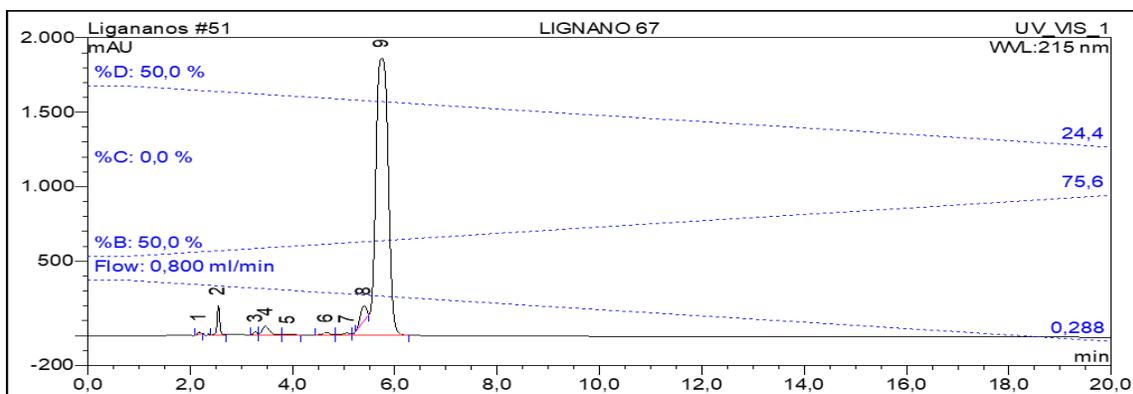


FIGURA 26. Cromatograma de la mezcla del Ciquitina A.

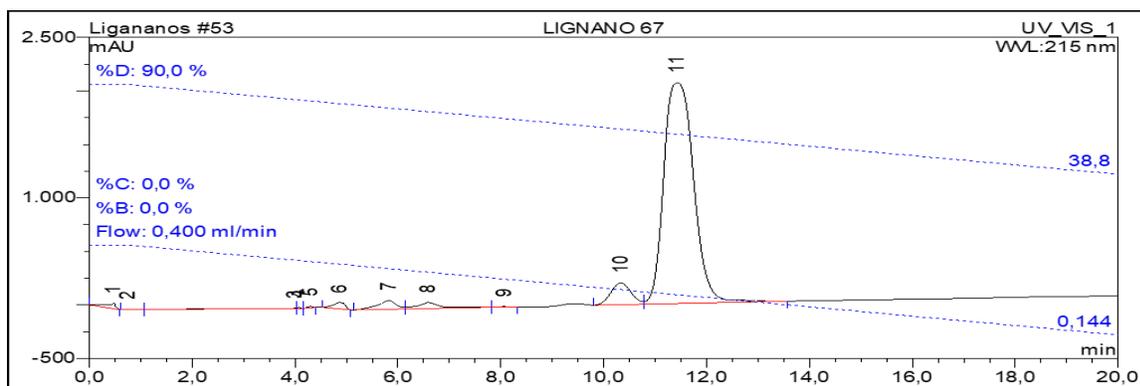


FIGURA 27. Cromatograma de la mezcla del Ciquitina A.

Separación de los lignanos esterificados.

De la inyección de las mezclas de los lignanos esterificados al equipo de HPLC, se observan dos picos para cada una de las mezclas lo que sugeriría la separación de los estereoisómeros, sin embargo, al modificar el porcentaje de disolventes así como, la velocidad del flujo uno de los picos decrece y aparece un tercero lo que hace pensar que aún existe presencia de materia prima (**Figuras 28-31**).

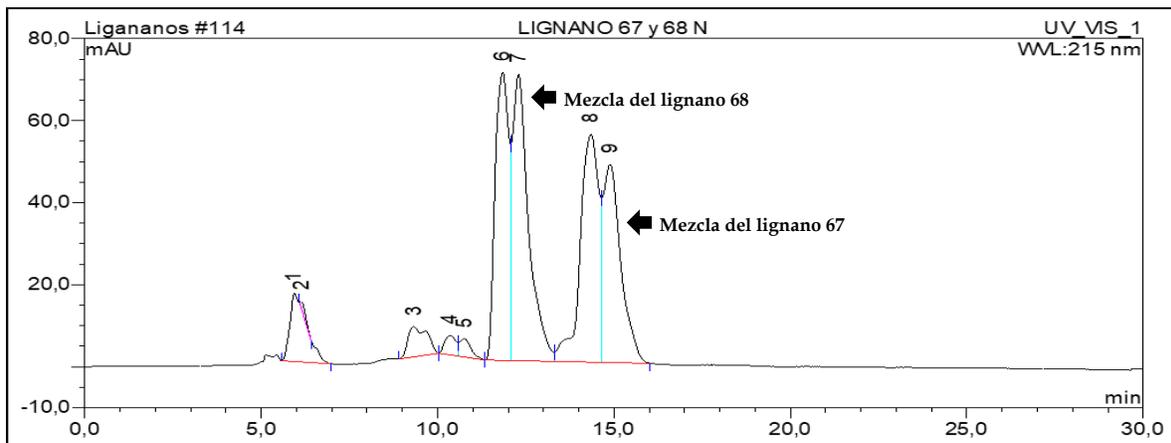


FIGURA 28. Cromatograma de la mezcla de lignanos 67 y 68 esterificados.

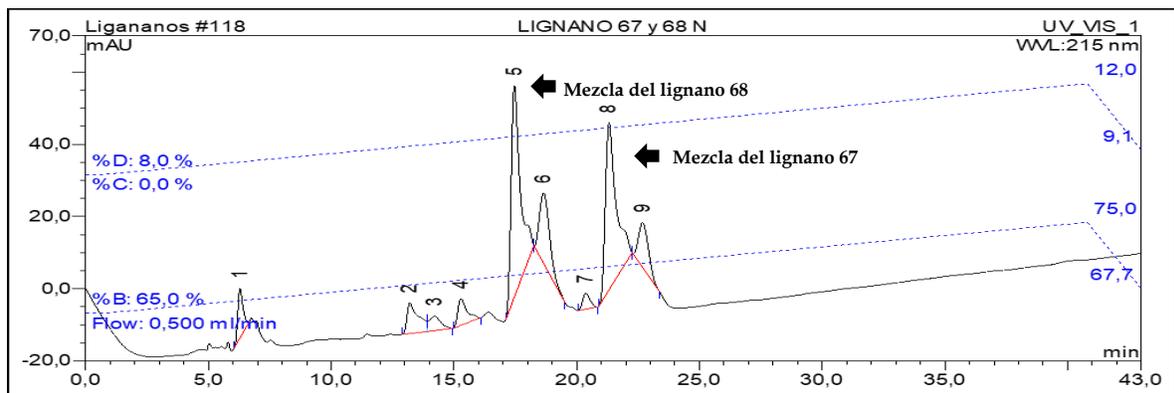


FIGURA 29. Cromatograma de la mezcla de lignanos 67 y 68 esterificados.

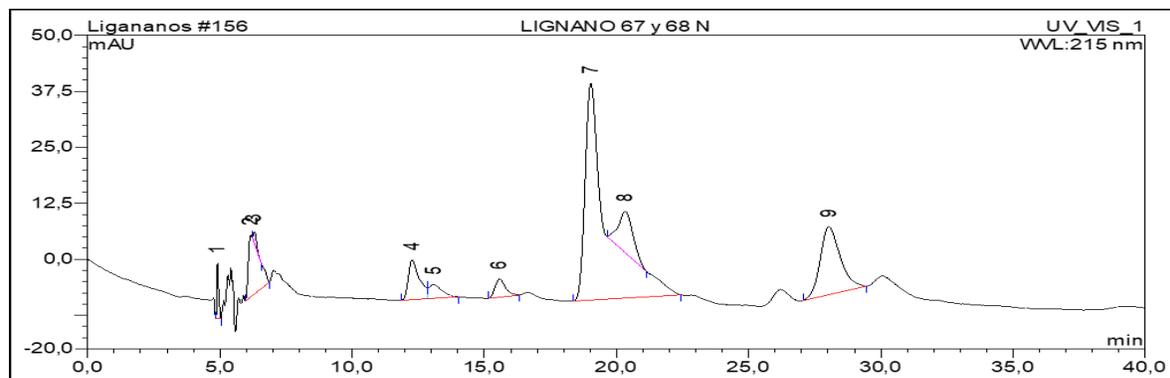


FIGURA 30. Cromatograma de la mezcla de lignanos 67 y 68 esterificados.

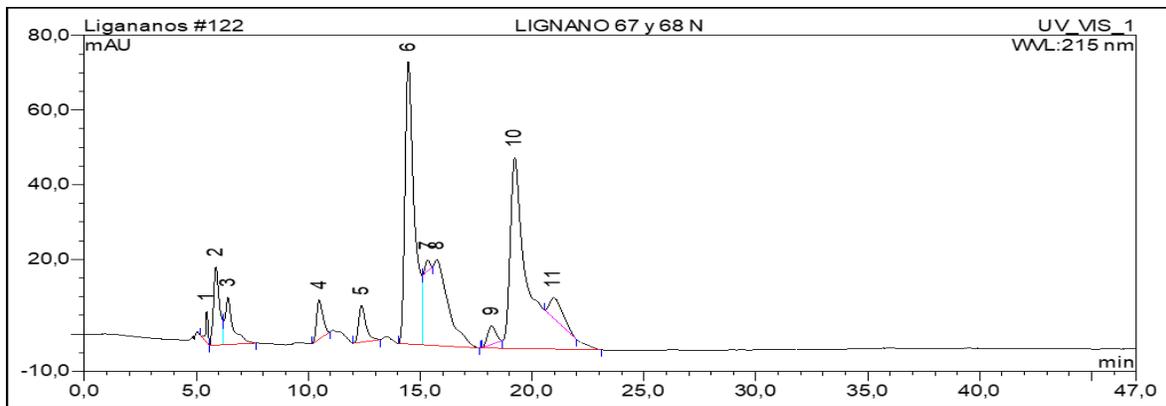


FIGURA 31. Cromatograma de la mezcla de lignanos 67 y 68 esterificados.

Análisis por RMN de la mezcla del Ciquitin A esterificado.

De la purificación de la mezcla esterificada de Ciquitin A y B se enviaron a RMN fracciones que por CCF se observaban puras, se realizaron experimentos de ^1H , DEPTq, COSY, HSQC y HMBC, para fines prácticos solo se discutirán las señales del centro de furofurano, ya que son las más interpretables, además solo se analizará una de las fracciones ya que el resto resultaron idénticas.

Del espectro de ^1H se observan las mismas tres zonas de señales que para el compuesto sin esterificar (**Figura 32**), Zona aromática (A) correspondiente a los anillos aromáticos de la mezcla y del naproxeno, zona entre 5 y 6 ppm (B) asignada los hidrógenos base de oxígeno de los anillos fusionados de furano, por último, la zona entre 3 y 4 ppm (C), donde encontramos los metoxilos y las señales de los hidrógenos alifáticos del centro de furofurano.

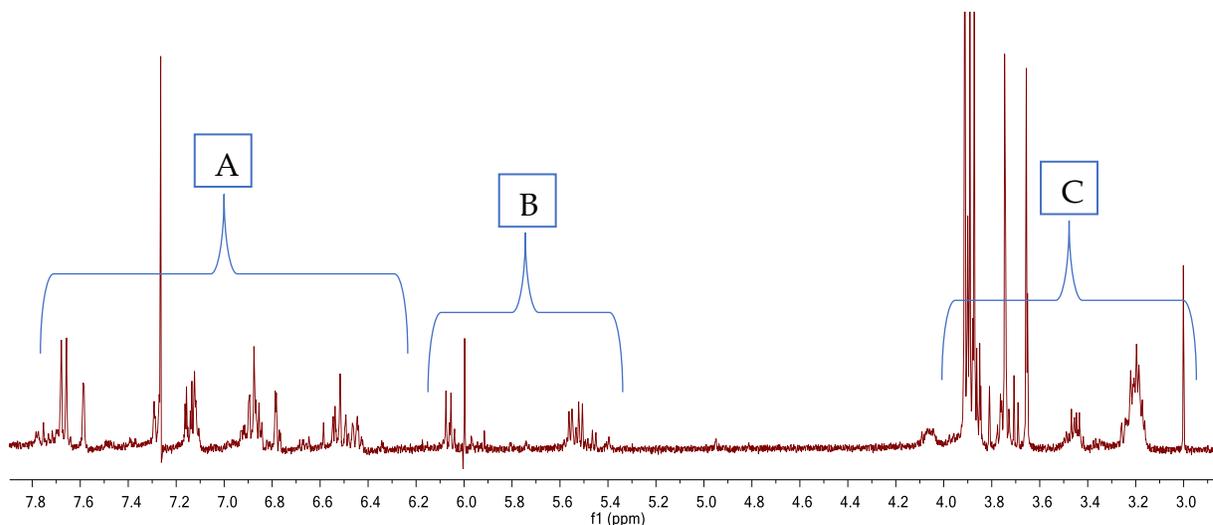


Figura 32. Espectro de ^1H del Ciquitin A esterificado.

En la zona B se logran observar 4 señales dobles en 5.55, 5.54, 5.51 y 5.46 ppm con constantes de 4.85, 4.78, 6.06 y 5.91 Hz, y deben pertenecer a las señales de los hidrógenos H-7, H-7', el hidrógeno H-9 se encuentra en 6.51 ppm, una señal simple y amplia que integra para más de un hidrógeno de la mezcla del Ciquitina A, Posteriormente se analizan las correlaciones de estas señales con la de los hidrógenos H-8 y H-8' en la zona C (**Figura 33**).

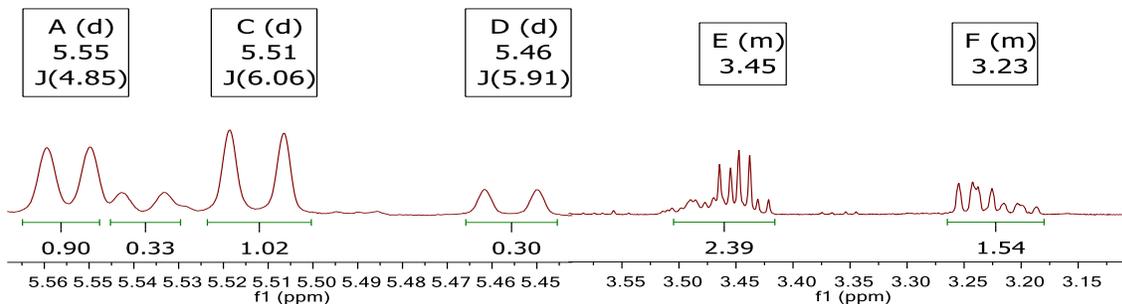


Figura 33. Expansión de la zona B y C del Ciquitin A esterificado.

En el espectro COSY se observan las siguientes correlaciones: la señal del hidrógeno H-8 en 3.45 ppm que correlaciona con la señal en 5.55 y 3.23 ppm, a su vez esta última tiene correlación con los hidrógenos en 6.51, 5.51 y 5.46 ppm. Por lo que, por desplazamiento químico, y con base en estas correlaciones, la señal en 6.51 debe corresponder al hidrogeno H-9, donde se llevó a cabo la esterificación (**Figura 34**).

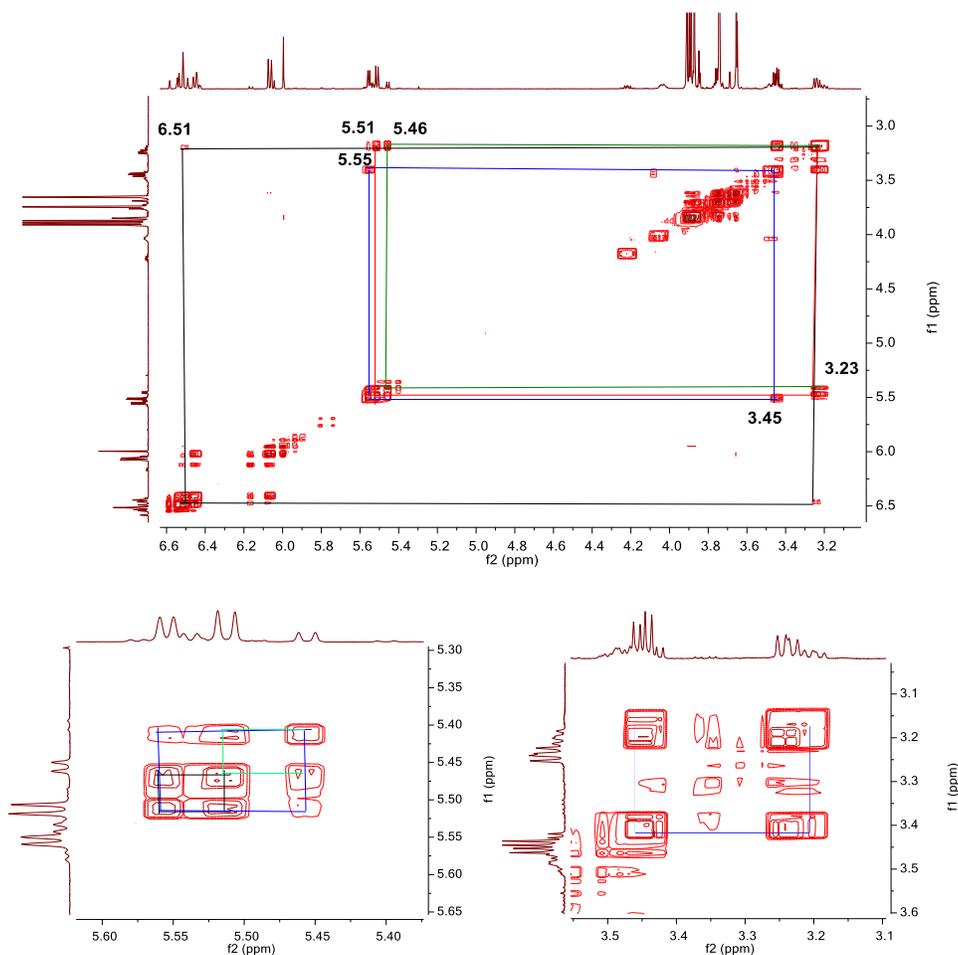


Figura 34. Expansión del espectro de COSY

Tabla 4. Correlaciones COSY del Ciquitina A esterificado

Posición	δ ¹ H	Correlación
H-7 mayoritario	5.55	3.45
H-7 o 7 minoritario	5.54	
H-7' mayoritario	5.51	3.23
H-7 o 7' minoritario	5.46	3.23
H-8	3.45	5.55, 3.23
H-8'	3.23	6.51, 5.51 y 5.46 ppm

En el experimento de HSQC se observan las correlaciones correspondientes a los hidrógenos de los anillos fusionados de furano (Tabla 3), el hidrógeno H-8 correlaciona con el carbono en 57.8 ppm, el hidrogeno H-8' con el carbono en 52.2 ppm, mientras que la señal en 6.51 ppm asignada como H-9 correlaciona con 102.9 ppm, los hidrógenos correspondientes a la zona de bases de oxígeno 5.55, 5.51 y 5.46 ppm presentan correlación con los carbonos en 86.0, 82.4 y 82.3 ppm, respectivamente. Debido a que todas las señales correlacionan con carbonos con desplazamientos característicos causados por la desprotección de un oxígeno, se asignan estas 3 señales más la señal en 5.54, de la cual no se observa su correlación a los hidrógenos H-7 y H-7'.

Tabla 4. Correlaciones HSQC del Ciquitina A esterificado

Posición	δ ¹ H	δ ¹³ C
H-7 mayoritario	5.55	86.0
H-7 o 7 minoritario	5.54	
H-7' mayoritario	5.51	82.4
H-7 o 7' minoritario	5.46	82.3
H-8	3.45	52.2
H-8'	3.23	57.8

En el experimento HMBC, la señal asignada a H-9 correlaciona con los carbonos en 52.2, 57.8, 86.0 ppm y el carbono de uno de los carbonilos en 173.61 ppm. Los hidrógenos H-8 y H-8' presentan las siguientes correlaciones: con los carbonos base de oxígeno 86.0, 82.4 y 82.3 ppm, el carbono del carbonilo en 175.5 ppm. Por último, H-8 correlaciona con el carbono en 57.8 perteneciente a H-8' y un carbono cuaternario en 132.7 ppm, que corresponde a uno de los anillos aromáticos, mientras H-8' correlaciona con el carbono de H-8 y el carbono cuaternario en 130.6 ppm, asignado por esta correlación a C-1.

Para las señales de la zona de bases de oxígeno se analizarán las correlaciones que nos permitan asignarlas de manera inequívoca, así bien, la señal en 5.55 ppm presenta correlaciones con los carbonos C-8 en 52.2 y el carbono cuaternario C-1 en 132.7 ppm. Teniendo en cuenta estas correlaciones se puede asignar esta señal al

hidrógeno H-7, la señal en 5.51 ppm es asignada a H-7' al observar las correlaciones con los carbonos en 57.8 ppm (C-8') y 130.6 ppm asignado a C-1', mientras que las señales del minoritario no se logran asignar (**Figura 35**).

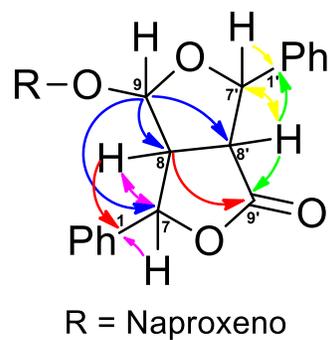


Figura 35. Asignación de las señales del centro de furofurano del lignano mayoritario

Cristalización del Ciquitina A.

Dado que no se logra la separación de la mezcla, se opta por intentar una cristalización de la cual, se logran obtener cristales y una estructura de rayos X (**Figura 36**). De acuerdo con dicha estructura y el análisis del conjunto de cristales analizados por Rayos-X mediante ^1H RMN, se descarta la hipótesis de que se trate de una mezcla racémica, y se plantea la existencia del Ciquitina A como una mezcla de confórmeros.

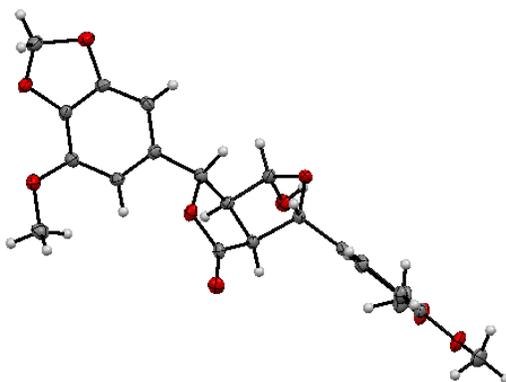


Figura 36. Estructura de rayos X del Ciquitina A.

Temperatura variable (RMN) del Ciquitina A.

Descenso de temperatura.

A una temperatura de $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ se logran distinguir 6 señales correspondientes a los hidrógenos base de oxígeno H7, H7' y H9 del centro de furofurano, 3 de ellas pertenecientes a lo que parece ser el conformero mayoritario y las tres restantes asignadas al minoritario, a medida que se desciende la temperatura de la muestra las señales pertenecientes al conformero minoritario comienzan a colapsar.

A $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ se observa que estas señales casi desaparecen mientras que al llegar a -60 grados han desaparecido por completo **Figura 37**. Además de monitoriar las señales pertenecientes a los hidrógenos base de oxígeno, se analizaron las señales correspondientes a los metoxilos (**Figura 38**) y las señales asignadas a los hidrógenos H-8 y H-8' (**Figura 39**). Ambos grupos de señales presentan el mismo efecto.

Para los metoxilos a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ tenemos seis señales mientras que a $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ solo logramos observar tres de estas seis señales. Los hidrógenos alifáticos comienzan a colapsar en una sola señal a partir de los $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta lograr dos únicas señales a $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$.

De este análisis de los espectros de RMN ^1H obtenidos a temperatura variable hacia el enfriamiento (**Figuras 27-29**), se logra observar a -25°C una considerable disminución en las señales pertenecientes al componente minoritario, lo que confirma la existencia del Ciquitina A como una mezcla de confórmers.

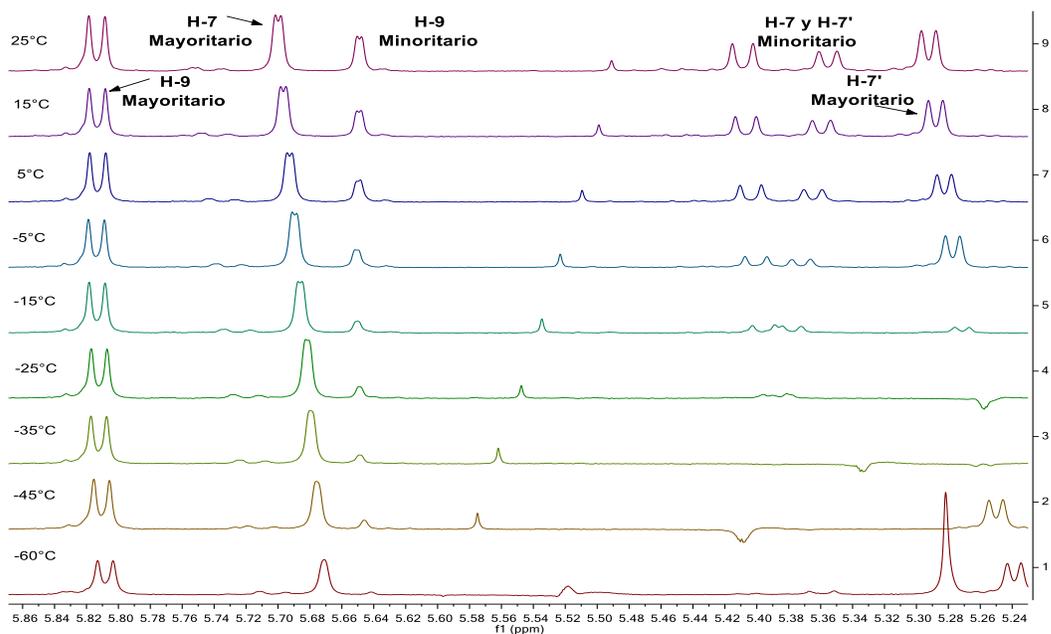


Figura 37. Espectros de la zona de bases de oxígeno de ciquitina A a diferentes temperaturas.

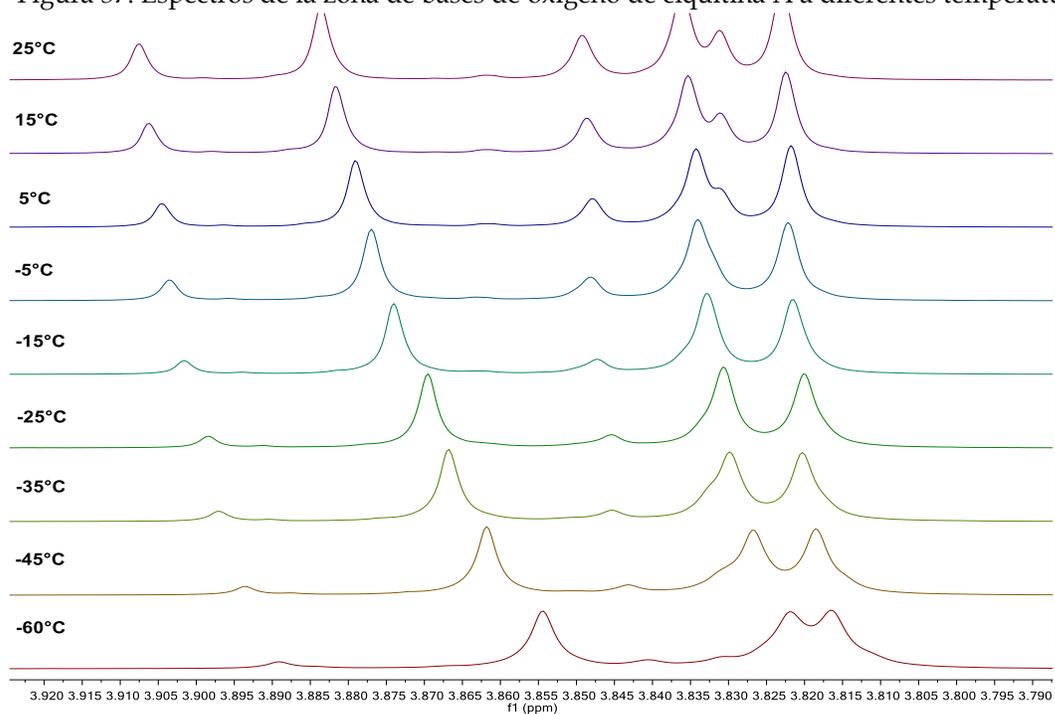


Figura 38. Espectros de las señales de los metoxilos de ciquitina A a diferentes temperaturas.

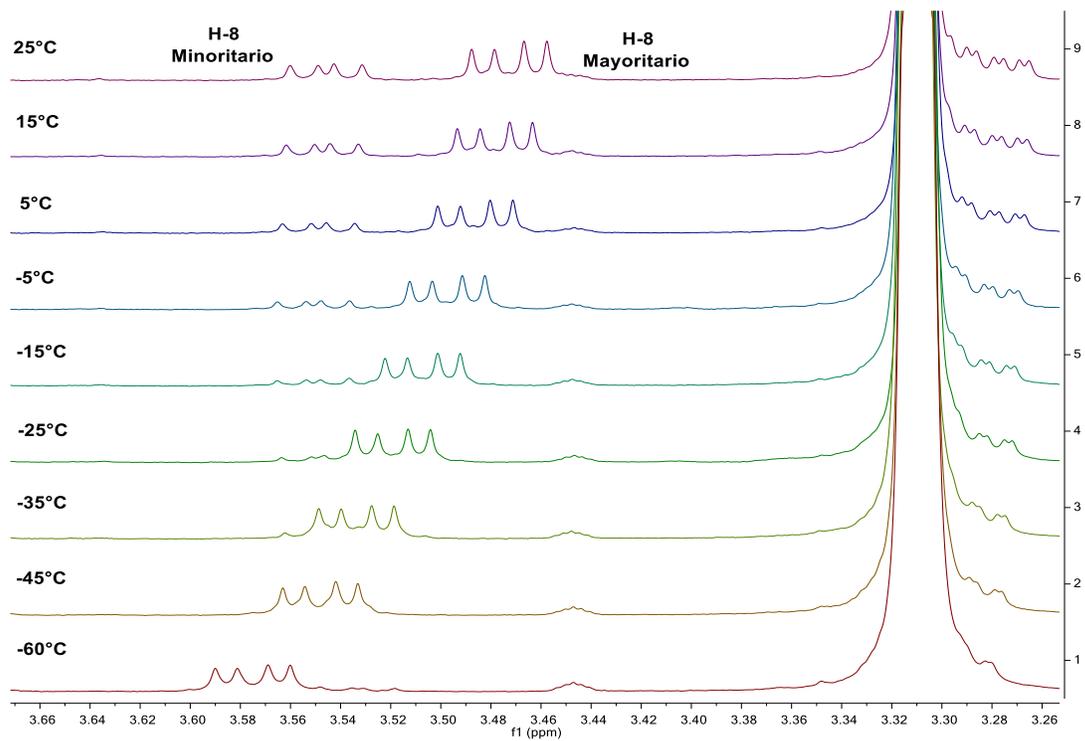


Figura 39. Espectros de la zona alifática del Ciquitin A a diferentes temperaturas..

Asignación por RMN de los conformeros del Ciquitina A.

Del espectro de RMN ^1H , para el centro de furofurano encontramos 6 señales, 3 de ellas debidas al conformero mayoritario en rojo, un doble en 5.81 ppm, asignado a H-9 y otro doble más en 5.70 ppm que pertenece a H-7, ambos acoplan con el hidrógeno H-8 con constantes de acoplamiento de 5.00 y 2.00 Hz, el hidrógeno H-8 en 3.47 ppm presenta un acoplamiento más con una constante de 10.5 Hz con la señal en 3.28 (H-8'), mientras H-8' acopla con la señal doble en 5.29 ppm con $J = 4.6$ Hz.

Para el conformero minoritario tenemos dos señales dobles, una en 5.65 ppm (H-9) y otra en 5.41 ppm (H-7), las cuales acoplan con el ddd en 3.55 ppm con constantes de 1.70 y 4.5 Hz, respectivamente. Este hidrógeno presenta una constante más de 8.8 Hz, acoplado con la señal dd en 3.17 ppm correspondiente a H-8'. Por último, esta señal se acopla con el doble en 5.35 ppm con una constante de 5.90 Hz, señal asignada al hidrógeno H-7' (Figura 40 y 41).

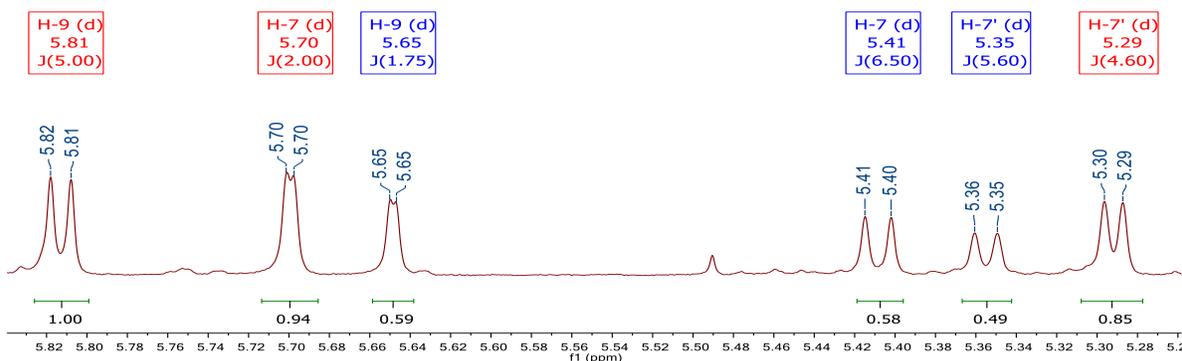


Figura 40. Señales del centro de furofurano de Ciquitina A.

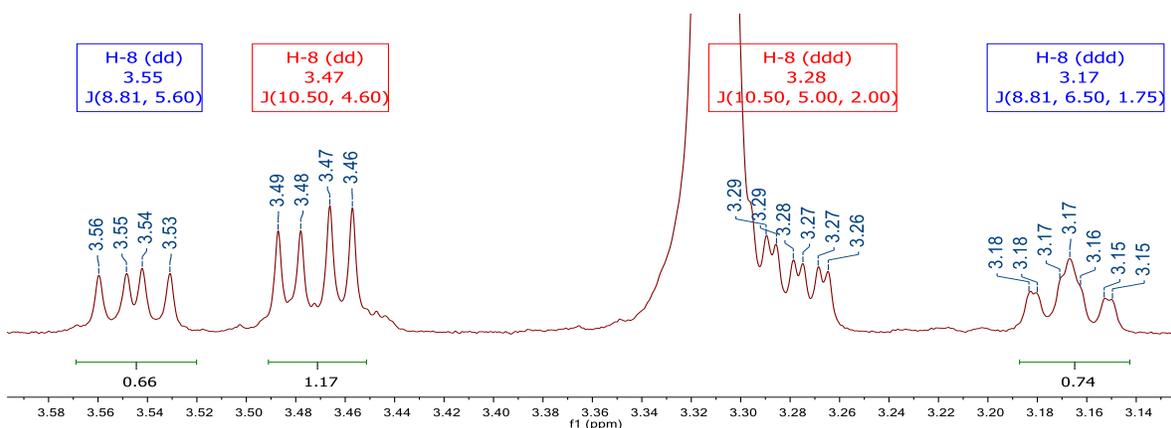


Figura 41. Señales de los hidrógenos H-8 y H-8' de Ciquitina A.

En el experimento de HSQC se observan las correlaciones correspondientes a los hidrógenos de los anillos fusionados de furano (**Tabla 6**): para el conformero mayoritario el hidrogeno H-8 correlaciona con el carbono en 52.9 ppm, el hidrogeno H-8' con el carbono en 54.3 ppm, mientras que la señal en 5.81 ppm asignada como H-9 correlaciona con 98.5 ppm, H-7 correlaciona con 81.2 ppm y finalmente el doble en 5.29 (H-7') presenta una correlación con el carbono 81.1.

Tabla 6. Asignaciones HSQC para los dos conformeros.

Posición	δ ¹ H	δ ¹³ C
Mayoritario		
H-9	5.81 (1H, d, J = 5.0 Hz)	98.5
H-7	5.70 (1H, d, J = 2.0 Hz)	81.2
H-7'	5.29 (1H, d, J = 4.6 Hz)	81.1
H-8'	3.47 (1H, dd, J = 10.5, 4.6 Hz)	52.9
H-8	3.28 (1H, ddd, J = 10.5, 5.0, 2.0 Hz)	54.3
Minoritario		
H-9	5.65 (1H, d, J = 1.75 Hz)	102.7
H-7	5.41 (1H, d, J = 6.5 Hz)	83.7
H-7'	5.35 (1H, d, J = 5.6 Hz)	84.5
H-8'	3.55 (1H, dd, J = 8.8, 5.6 Hz)	53.9
H-8	3.17 (1H, ddd, J = 8.8, 6.5 1.75 Hz)	59.2

Para el conformero minoritario se observan las correlaciones de los hidrógenos en 3.55 ppm (H-8) y 3.17 ppm (H-8') con los carbonos base de oxígeno 53.9 y 59.2 respectivamente, para el doble en 5.65 (H-9) se observa la correlación con la señal del carbono en 102.7 ppm, el hidrogeno en 5.41 asignado a H-7 correlaciona con el carbono 83.7, y por último, la señal en 5.35 perteneciente a H-7' correlaciona con 84.5.

MAYORITARIO:

En el experimento HMBC se observan las correlaciones del hidrógeno H-9 en 5.81 ppm con los carbonos en 52.9 (C-8') y 81.2 ppm (C-7), H-7 presenta correlaciones con 98.5 ppm (C-9), 107.2 ppm que debe pertenecer a uno de los anillos aromáticos, y por ultimo con el carbono del carbonilo en 179.1 (C-9'), la señal doble en 5.29 ppm correlaciona con 110.7, 119.5 ppm que pertenecen al anillo aromático, además de correlacionar con el carbono del carbonilo en 179.1, H-8' correlaciona con los carbonos en 81.1 ppm perteneciente a C-7', 98.5 ppm carbono asignado a C-9, un carbono del anillo aromático en 136.2 ppm y el C-9', para la señal correspondiente a H-8 no se logran observar correlaciones.

MINORITARIO:

Se logra observar una correlación del hidrógeno en 5.65 ppm (H-9) con el carbono en 84.5 ppm (C-7'), para H-7 solo se observan correlaciones con carbonos aromáticos 103.41 y 107.15 ppm, al igual que para H-7' con los carbonos 110.7 y 119.5, además con el carbono del carbonilo en 177.75 ppm. Por último, para las señales correspondientes a H-8 y H-8' no se observan sus correlaciones; sin embargo, con esta información y teniendo en cuenta la comparación con el espectro obtenido en cloroformo, se pueden asignar las señales de los dos confórmeros.

Análisis por RMN de la mezcla de Ciquitin B.

En el espectro de RMN ^1H del Ciquitin B (**Figura 42**) También se observan señales que sugieren la presencia de una mezcla de compuestos, se analizarán y discutirán las señales pertenecientes al centro de furofurano ya que son las que nos ayudaran a establecer la configuración.

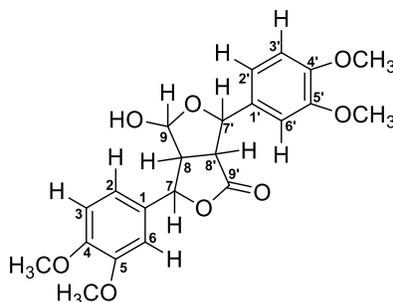


Figura 42. Estructura del Ciquitin B

En la zona comprendida entre 5.0 y 6.0 ppm encontramos las primeras señales que describen el centro de tipo furofurano del lignano mayoritario, mientras que el segundo grupo de señales están ubicadas entre 3.0 y 4.0 ppm y son, un doble con constante de acoplamiento de 5.0 Hz en 5.92 ppm para H-9, otro doble en 5.79 ppm con constante de 1.70 Hz perteneciente a H-7, ambas señales acoplan con un doble de doble de doble (ddd) en 3.25 ppm que corresponde a H-8 con constantes de acoplamiento de 5.0 y 1.70 Hz, respectivamente; además de presentar una constante más de 10.40 Hz con la que acopla con la señal dd en 3.36 ppm (H-8'), esta a su vez acopla con el doble en 5.48 ppm asignado a H-7' con una constante de 5.0 Hz que completa el sistema de spines para este centro.

Para el lignano minoritario en la misma zona descrita anteriormente, encontramos dos señales dobles, una en 5.73 ppm (H-9) y otra en 5.48 ppm (H-7) ambas acoplado con el ddd en 3.25 ppm con constantes de 2.00 y 4.5 Hz respectivamente. Este hidrogeno presenta una constante más de 8.60 Hz con la cual acopla con la señal dd en 3.56 ppm, correspondiente a H-8', por último, está acopla con el doble en 5.34 ppm con una constante de 6.0 Hz, señal asignada a hidrógeno H-7, presentes en las **figuras 43 y 44**.

En la zona de metoxilos se logran observar 6 señales, tres de las cuales corresponden al lignano mayoritario y los 3 restantes al minoritario.

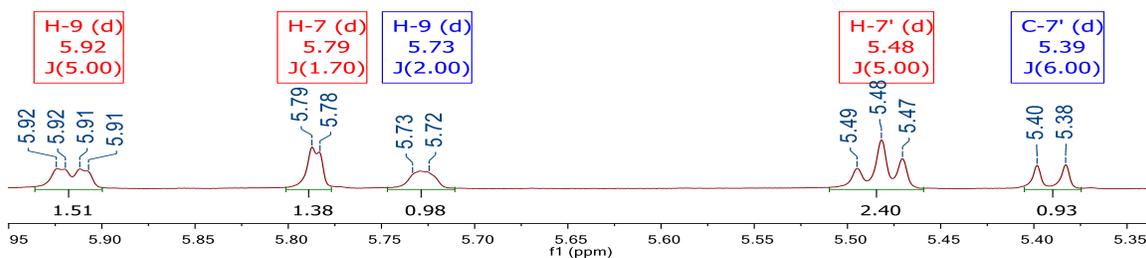


Figura 43. Señales del centro Furofurano de la mezcla del Ciquitin A.

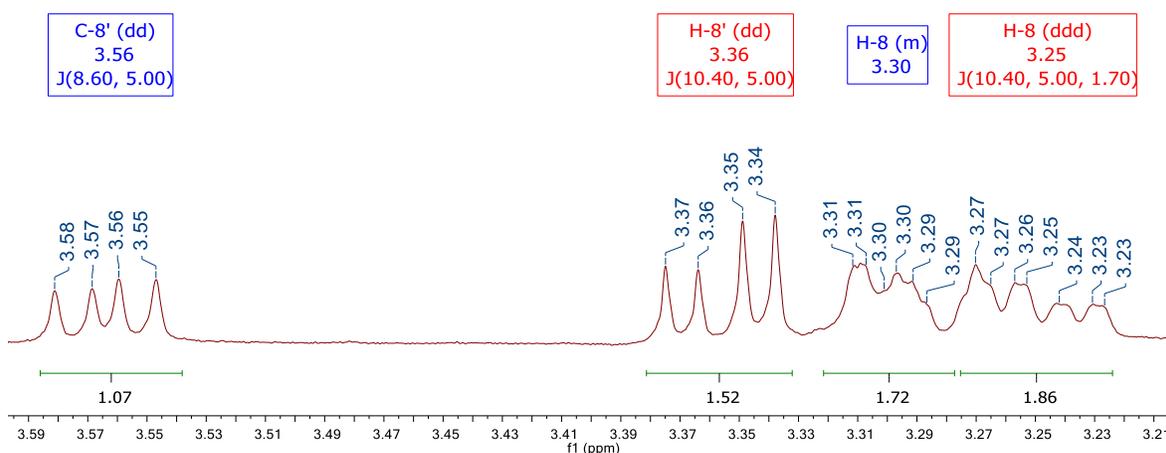


Figura 44. Señales del centro furofurano de la mezcla del Ciquitin A.

Del espectro de ^{13}C (**Figura 45**) al igual que para el experimento de protón se analizan las señales pertenecientes al centro furofurano de la mezcla de lignanos.

Para los carbonos alifáticos del lignano mayoritario encontramos 3 señales, 1 de ellas es asignada a los metoxilos, mientras que los 4 restantes corresponden al centro de furofurano, 2 de ellas en 53.70 ppm y 51.76 ppm son asignadas a los carbonos C8' y C8, respectivamente. Continuando con el análisis del centro, tenemos que los carbonos en 79.79, 81.02, 98.37 ppm corresponden a los carbonos base de oxígeno C7, C7' y C9, mientras que la señal en y 177.14 ppm es asignada a C9' un carbono de carbonilo.

Por otra parte, las señales en la zona alifática 52.73 (C8') ppm, 58.36 (C8) ppm y las señales pertenecientes a carbonos base de oxígeno. 82.78 (C7'), 85.01 (C7), 102.83 (C9), además de la señal de carbonilo en 176.16 ppm corresponden al lignano minoritario de la mezcla (**Figura 46**).

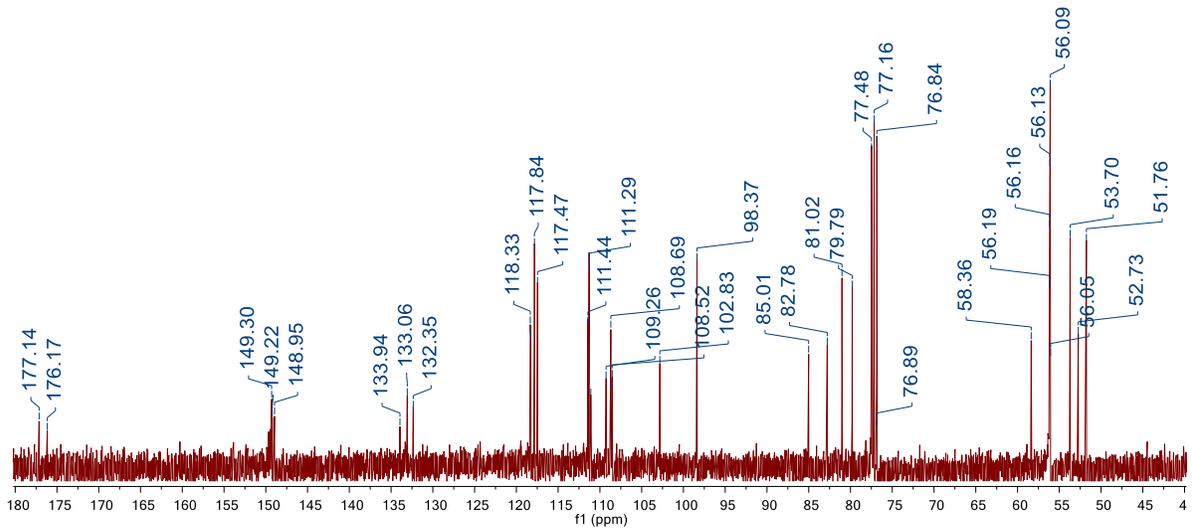


Figura 45. Señales de espectro de ^{13}C

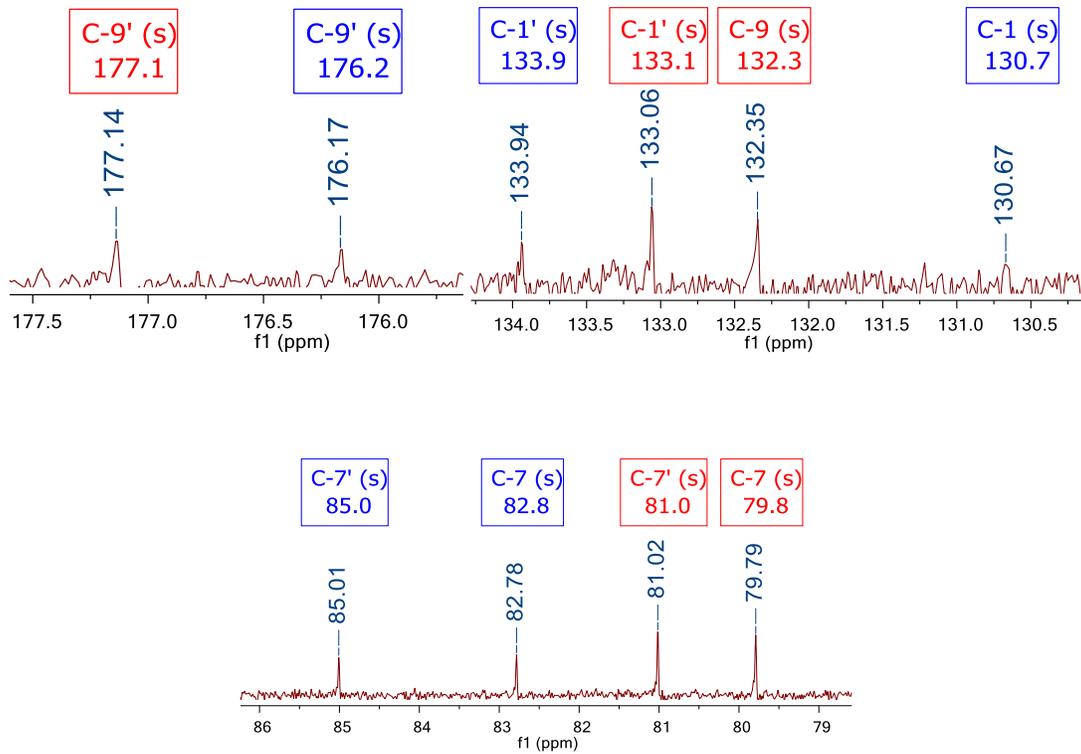


Figura 46, señales que evidencian la presencia de una mezcla.

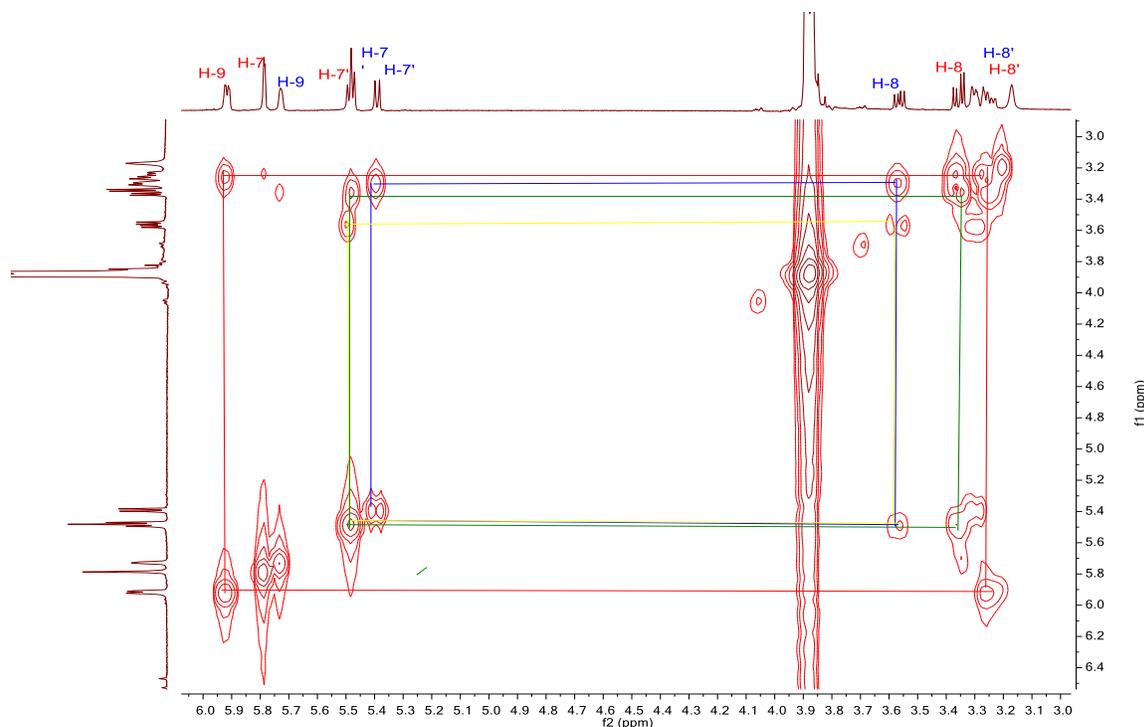


Figura 47. Expansiones del espectro de COSY.

En el espectro COSY **Figura 47** se observan las siguientes correlaciones: la señal del hidrógeno H-8 en 3.25 ppm que correlaciona con la señal en 5.92, 5.79 y 3.25 ppm, a su vez esta última tiene correlación con los hidrógenos en 5.48 ppm lo que confirma el sistema de espines para el lignano mayoritario.

El sistema de espines para el minoritario está compuesto por la señal en aproximadamente 3.30 ppm la cual presenta correlación a tres ligaduras sigma con las señales en 5.73 (H-9), 5.48 (H-7) y 3.56 ppm asignada a H-8' señal que correlaciona con 5.39 ppm (H-7') y que cierra el sistema de espines (Figura 47).

Tabla 8. Correlaciones COSY.

Posición	δ ^1H	Correlación
H-7 mayoritario	5.55	3.45
H-7 o 7 minoritario	5.54	
H-7' mayoritario	5.51	3.23
H-7 o 7' minoritario	5.46	3.23
H-8	3.45	5.55, 3.23
H-8'	3.23	6.51, 5.51 y 5.46 ppm

En el experimento de HSQC se corroboran las correlaciones asignadas a los hidrógenos de los anillos fusionados de furano para el mayoritario (Tabla 9), el hidrogeno H-8 correlaciona con el carbono en 53.7 ppm, H-8' con el carbono en 51.76 ppm, mientras que la señal en 5.92 ppm asignada como H-9 correlaciona con 98.4 ppm, las señales correspondientes a 5.79 (H-7) y 5.48 (H-7') ppm presentan correlación con los carbonos en 79.8 y 81.0 ppm, respectivamente. Mientras el centro furofurano para el minoritario está compuesto por los carbonos alifáticos en 52.7 y 57.2 ppm que correlacionan con los hidrógenos H-8' y H-8, respectivamente, las señales en la zona de bases de oxígeno 102.8, 82.8 y 85.0 ppm las cuales presentan una correlación con las señales en 5.73, 5.48 y 5.39 ppm.

Tabla 9. Correlaciones HSQC del Ciquitin B esterificado

Posición	δ ¹ H	δ ¹³ C
H-7 mayoritario	5.55	86.0
H-7 o 7 minoritario	5.54	
H-7' mayoritario	5.51	82.4
H-7 o 7' minoritario	5.46	82.3
H-8	3.45	52.2
H-8'	3.23	57.8

Las asignaciones discutidas anteriormente se terminan de confirmar mediante el experimento HMBC, para el mayoritario el hidrógeno H-9 correlaciona con los carbonos en 53.7 (C-8) y 79.8 (C-7), la señal doble en 5.79 asignada a H-7 presenta las siguientes correlaciones, con el carbono en 53.7 ppm (C-8), 98.4 ppm (C-9), con los carbonos de la zona aromática 108.5 (C-6) ppm, 117.5 ppm (C-2), 132.3 (C-1) ppm y 177.1 carbono de carbonilo.

El centro de furofurano del lignano minoritario se describe por las siguientes correlaciones, la señal asignada a H-9 correlaciona con los carbonos en 85.0 ppm (C-7') y 82.8 (C-7), el hidrogeno H-7' correlaciona con los carbonos en 58.4 ppm (C-8), 57.7 ppm (C-8'), tres carbonos aromáticos en 133.1, 118.3, 109.3 que corresponden a C-1', C-2' y C-6' respectivamente, la señal en 3.55 ppm presenta correlación con los carbonos C-7 y 7', C-9 y con el carbono carbonilo en 102.8 ppm.

Todas las señales y sus correlaciones fueron asignadas inequívocamente mediante RMN de dos dimensiones: COSY, HSQC, HMBC y NOESY en un trabajo previo, por lo que no se discutirán.

Análisis de constantes de acoplamiento.

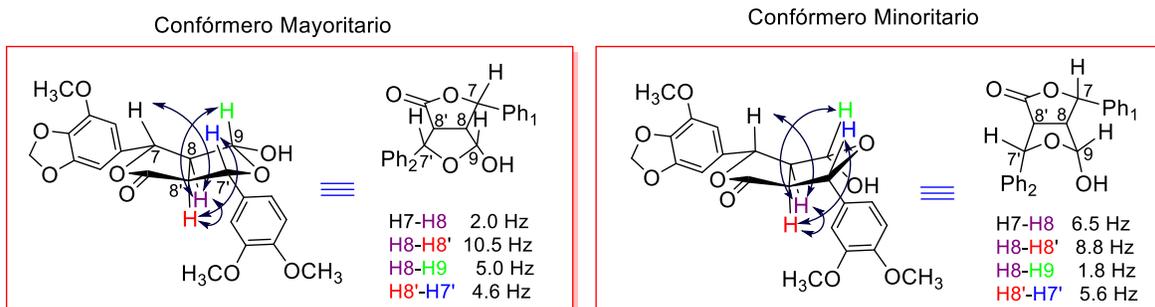


Figura 48. Constantes de acoplamiento de los confórmeros.

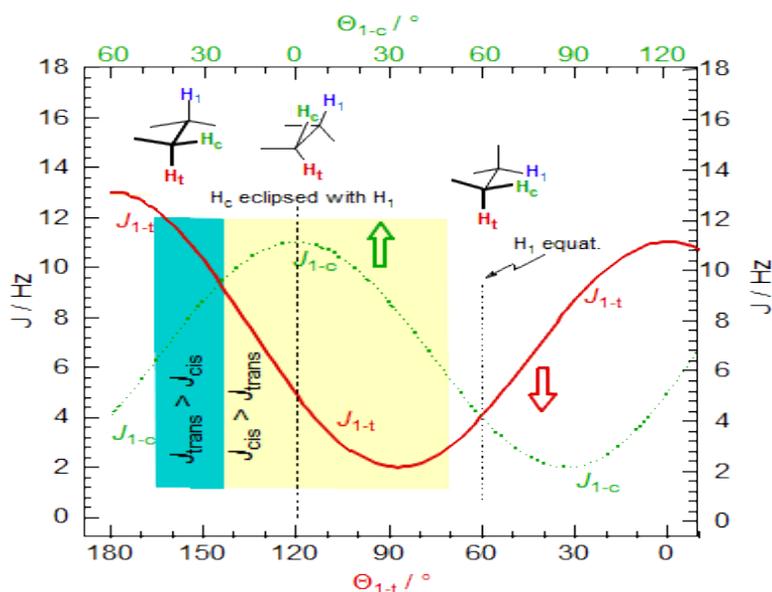


Figura 49. Curva de karplus para ciclopentanos.

Al observar cómo se comportan los ángulos en función de las constantes de acoplamiento y teniendo en cuenta la curva de Karplus para ciclopentanos se pueden predecir los ángulos que presentarían nuestros conformeros. Así bien, de acuerdo con la **Figura 49** y analizando las constantes de acoplamiento de nuestros conformeros (**Figura 48**), se tiene:

Para el conformero mayoritario el hidrógeno H-7 presenta un ángulo diedro con H-8 de alrededor de 90° de acuerdo con su constante de 2.0 Hz. los hidrógenos H-9 y H-7' exhiben un ángulo diedro con H-8 y H-8' respectivamente, mayor a 120° de acuerdo con sus constantes de acoplamiento.

El confórmero minoritario presenta ángulos diedros mayores a 120° para los Hidrógenos H-7 y H-7' con H-8 y H-8' presentando constantes de acoplamiento de 5.6 y 6.5 Hz, mientras que el Hidrogeno asignando a H-9 tendría un ángulo diedro alrededor de 90° ya que presenta una constante de 1.75 Hz.

Este mismo análisis se realiza con la segunda mezcla de lignanos

Tabla 10 Comparación con Ciquitin B.

Posición	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$		
Mayoritario				
Ciquitin A			Ciquitin B	
H7-H8	2.0 Hz	90°	1.70	90°
H8-H8'	10.5 Hz	120°	10.4	120°
H8'-H9	5.0 Hz	120°	5.0	120°
H8'-H7'	4.6 Hz	120°	5.0	120°
Minoritario				
H7-H8	6.5 Hz	120°	5.0	120°
H8-H8'	8.8 Hz	120°	8.6	120°
H8'-H9	1.8 Hz	90°	2.00	90°
H8'-H7'	5.6 Hz	120°	6.00	120°

Asignación de la configuración absoluta

Como se observa en la tabla 10 del análisis de constantes de acoplamiento el Ciquitin B presenta las mismas conformaciones que el Ciquitin A. Estas conformaciones son confirmadas mediante la estructura obtenida por difracción de rayos X de la cristalización del producto esterificado

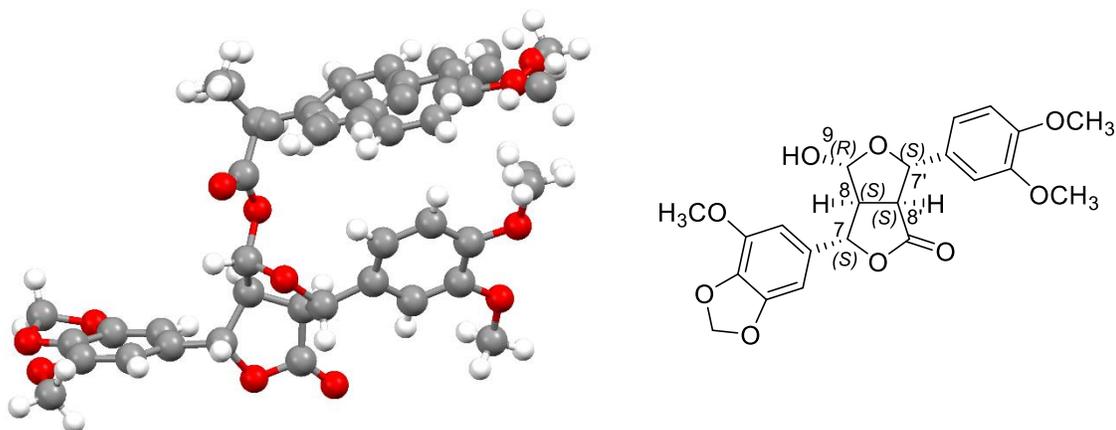
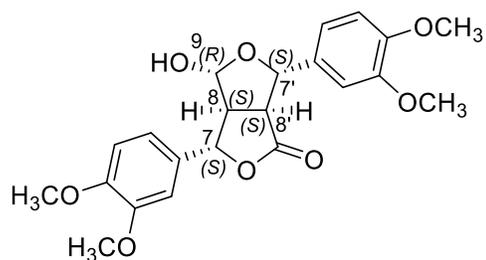


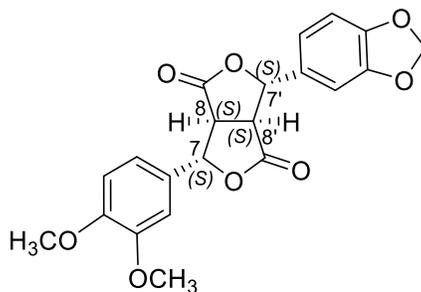
Figura 50. Configuración absoluta establecida mediante rayos-X usando (S)-naproxeno como auxiliar quiral

(7S,7'S,8S,8'S,9R)-Ciquitan A (1)

Con base en estos resultados y su aplicación al análisis de las dos mezclas adicionales de conforméros de lignanos de *L. ambiguum* (compuestos 2 y 3), se pudo establecer su identidad como (7S,7'S,8S,8'S)- Ciquitina B (2) y (7S,7'S,8S,8'S,9R)-Ciquitina C (3). Los lignanos 1 y 2 constituyen productos naturales no reportados en la literatura científica, mientras que 3 ha sido reportados como producto de síntesis.



(7S,7'S,8S,8'S,9R)- Ciquitina B (2)



(7S,7'S,8S,8'S)- Ciquitina C (3)

Conclusiones

L. ambiguum contiene ocho lignanos naturales, tres de los cuales se presentan como mezclas de dos compuestos diferenciables por RMN¹H.

Estos lisómeros no pueden ser resueltos mediante métodos cromatográficos convencionales, ni por HPLC, tanto en fase reversa como en cromatografía quiral.

De acuerdo con su análisis mediante Rayos-X, en estado sólido estas mezclas diferenciables por RMN¹H se comportan como un lignano puro.

Las señales en RMN¹H para estos compuestos coalescen uno en favor del otro al disminuir o aumentar la temperatura, lo que confirma que son isómeros conformacionales.

El análisis por RMN¹H de los cristales recuperados del análisis de Rayos-X demuestra que en solución estos lignanos recuperan su libertad conformacional.

La configuración absoluta del lignano **35** denominado Ciquitin A corresponde a *7S,7'S,8S,8'S,9R*, determinada mediante derivatización con (*S*)-naproxeno y análisis del su producto mediante rayos-X.

El análisis integral de los datos obtenidos del estudio de este lignano permitió establecer la misma configuración absoluta para los dos lignanos restantes, que fueron identificados como (*7S,7'S,8S,8'S,9R*)-Ciquitina B (**2**) y (*7S,7'S,8S,8'S,9R*)-Ciquitina C (**3**).

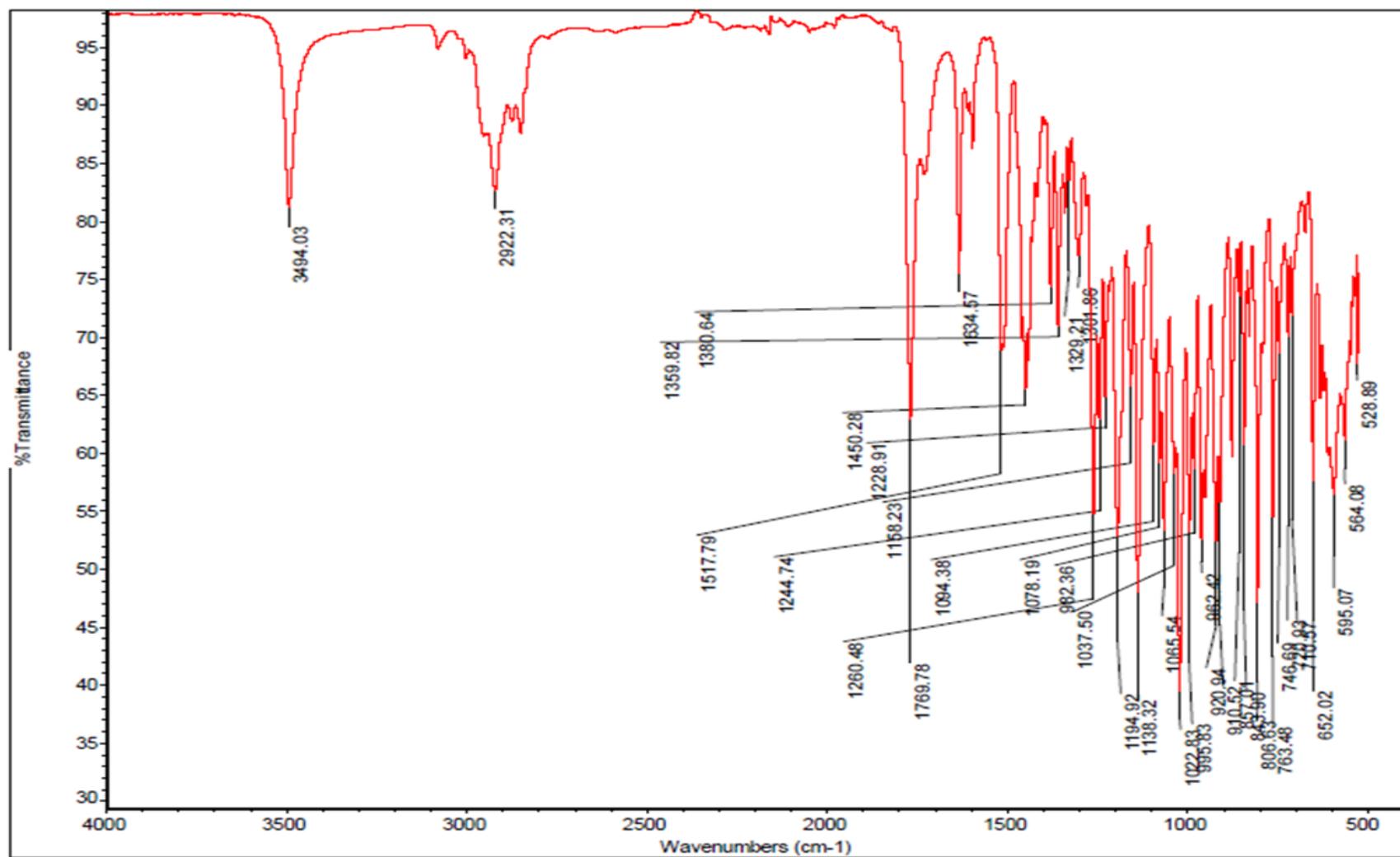
Los lignanos **1** y **2** constituyen nuevos productos naturales.

Bibliografía

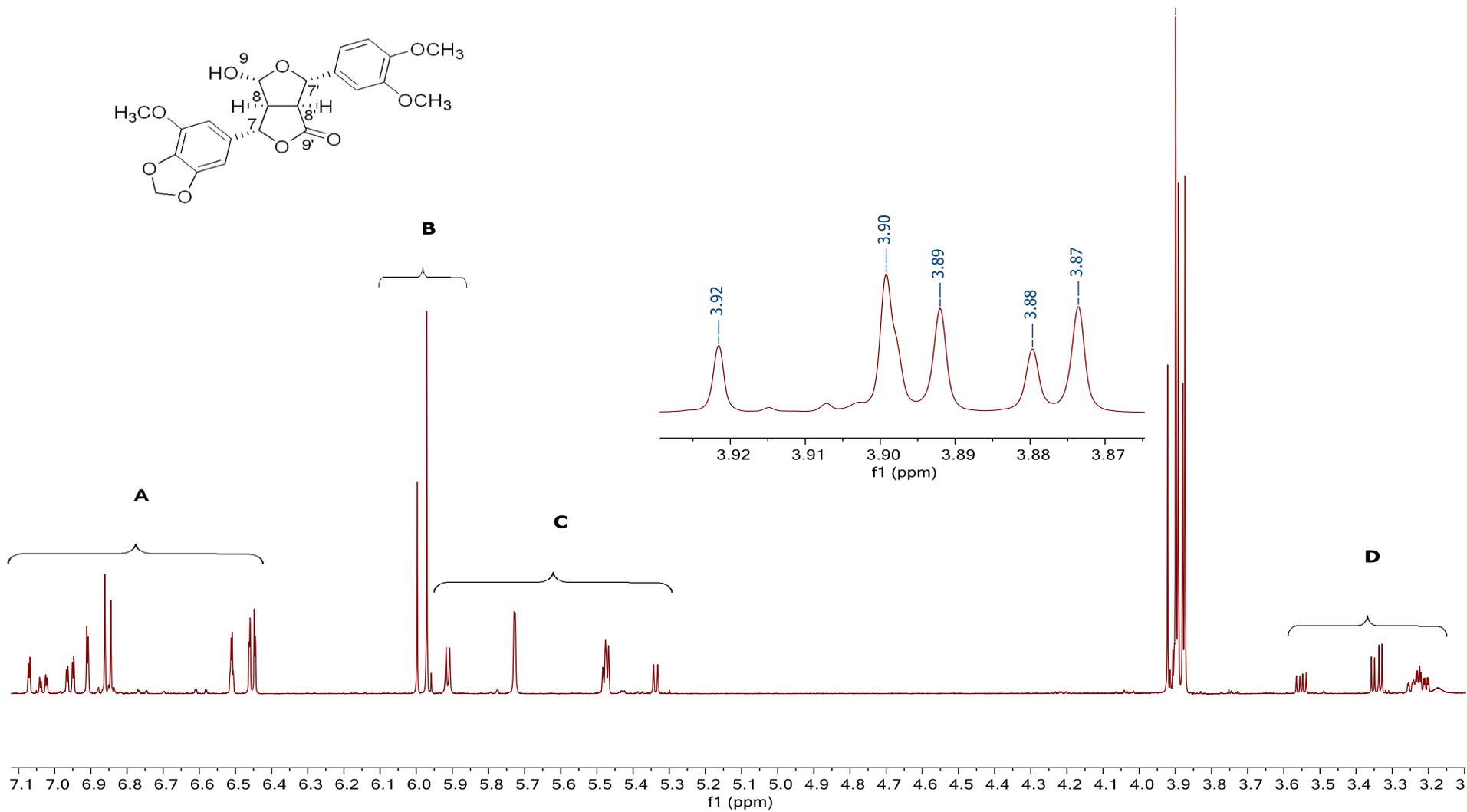
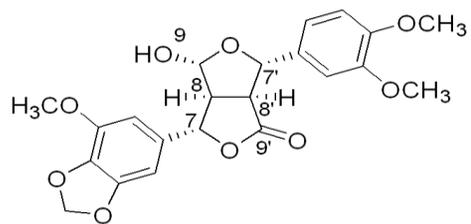
1. Desarrollo I y. "ANALIZAN EN LA UNAM LA QUÍMICA DE LAS PLANTAS." http://www.dgcs.unam.mx/boletin/bdboletin/2015_397.html. Accessed June 22, 2016.
2. Ávalos García A, Pérez-Urria Carril E. Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología)*. 2011;2(3):119-145.
3. Delgado G, Romo de Vivar A, eds. Temas Selectos de Química de Productos Naturales. In: *Temas Selectos de Química de Productos Naturales*. Primera ed. Ciudad de México; 2015:1,2.
4. Lee K-H, Xiao Z. Lignans in treatment of cancer and other diseases. *Phytochem Rev*. 2003;2(3):341-362.
5. Xu R, Ye Y, Zhao W. *Introduction to Natural Products Chemistry*. Florida, E.U.: CRC Press; 2012.
6. El-Hassan A, El-Sayed M, Hamed AI, et al. Bioactive constituents of *Leptadenia arborea*. *Fitoterapia*. 2003;74(1):184-187. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0367-326X\(02\)00314-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0367-326X(02)00314-3).
7. Skoog DA, Holler FJ, Nieman T, et al. *Principios de Análisis Instrumental*.; 2002.
8. Unam. Técnicas Cromatográficas. *Quim Anal Instrum II*. 2007:1-123.
9. Skoog DA, Holler F, Timothy ADA. *Principios de Análisis Instrumental*. McGraw-Hill Interamericana de España,; 2001.
10. Lee, K.H. Xiao Z. Lignans in treatment of cancer and other diseases. *Phytochem Rev*. 2003;2(3):341-362. doi:10.1023/B:PHYT.0000045495.59732.58.
11. Willför SM, Smeds AI, Holmbom BR. Chromatographic analysis of lignans. *J Chromatogr A*. 2006;1112(1-2):64-77. doi:10.1016/j.chroma.2005.11.054.
12. Dewick PM. *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*. John Wiley & Sons; 2002.
13. Slanina J, Táborská E, Lojková L. Lignans in the seeds and fruits of *Schisandra chinensis* cultured in Europe. *Planta Med*. 1997;63(3):277-280.
14. He Z, Zhang Y, Yao S, Tu B, Song H. A New Method of Discrimination for Peaks of Enantiopure Compounds in Chiral Separation of HPLC. *Asian J Chem*. 2013;25(8):4351.
15. Guo T, Li Y-H. Determination of four lignanoids in roots, stems and leaves of *Zanthoxylum armatum* DC by HPLC-DAD with HPLC-ESI-QTOF-MS confirmation. *J Anal Chem*. 2016;71(5):527-533. doi:10.1134/S1061934816050130.
16. Cedrón JC. Métodos para determinar la configuración absoluta de una molécula. *Rev Química*. 2008;22(1-2):19-31.
17. Neises B, Steglich W. Simple method for the esterification of carboxylic acids. *Angew Chemie Int Ed English*. 1978;17(7):522-524.
18. Configuration A. Review Article The Use of X-ray Crystallography to Determine Absolute Configuration. 2008;690(May 2007):681-690. doi:10.1002/chir.
19. Mata E. Dicroísmo Circular. *Métodos Físico Químicos en Biotecnol*. 2013:1-78.
20. Kim SH, Jang YP, Sung SH, Kim CJ, Kim JW, Kim YC. Hepatoprotective dibenzylbutyrolactone lignans of *Torreya nucifera* against CCl₄-induced toxicity in primary cultured rat hepatocytes. *Biol Pharm Bull*. 2003;26(8):1202-1205.

21. Kim S-J, Min H-Y, Lee EJ, et al. Growth inhibition and cell cycle arrest in the G0/G1 by schizandrin, a dibenzocyclooctadiene lignan isolated from *Schisandra chinensis*, on T47D human breast cancer cells. *Phyther Res.* 2010;24(2):193-197. doi:10.1002/ptr.2907.
22. He T, Wang Q-Y, Shi J-Z, et al. Synthesis and the hepatoprotective activity of dibenzocyclooctadiene lignan derivatives. *Bioorg Med Chem Lett.* 2014;24(7):1808-1811. doi:https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2014.02.020.
23. Yang YN, Huang XY, Feng ZM, Jiang JS, Zhang PC. Hepatoprotective activity of twelve novel 7-O-Hydroxy lignan glucosides from *arctii fructus*. *J Agric Food Chem.* 2014;62(37):9095-9102. doi:10.1021/jf501859x.
24. Kim JY, Lim HJ, Lee DY, et al. In vitro anti-inflammatory activity of lignans isolated from *Magnolia fargesii*. *Bioorg Med Chem Lett.* 2009;19(3):937-940. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2008.11.103.
25. Vega-Menchaca M del C, Verde-Star J, Oranday-Cárdenas A, et al. Actividad antibacteriana y citotóxica de *Leucophyllum frutescens* (Berl) IM Johnst del Norte de México contra *Staphylococcus aureus* de aislados clínicos. *Rev Mex ciencias Farm.* 2013;44(2):24-30.
26. Riaz N, Tabussum A, Saleem M, et al. Bioactive Secondary Metabolites from *Chrozophora plicata*. 2014;36(2):296-304.
27. Rhee IK, Meent M Van De, Ingkaninan K, Verpoorte R. Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. 2001;915:217-223.
28. Barbosa Filho JM, Medeiros KCP, Diniz M de FFM, et al. Natural products inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase. *Rev Bras Farmacogn.* 2006;16(2):258-285.
29. Lezama González RG. CARACTERIZACIÓN DE COMPUESTOS TIPO LIGNANO de *Leucophyllum ambiguum* (Scrophulariaceae). 2015.
30. Wu L, Yu L, Ding X, et al. Magnetic solid-phase extraction based on graphene oxide for the determination of lignans in sesame oil. *Food Chem.* 2017;217:320-325. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.08.109.

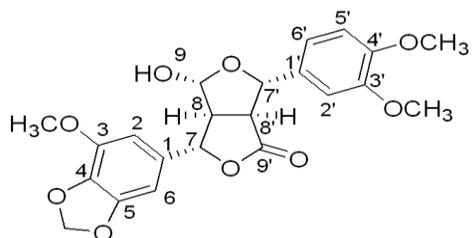
ANEXOS



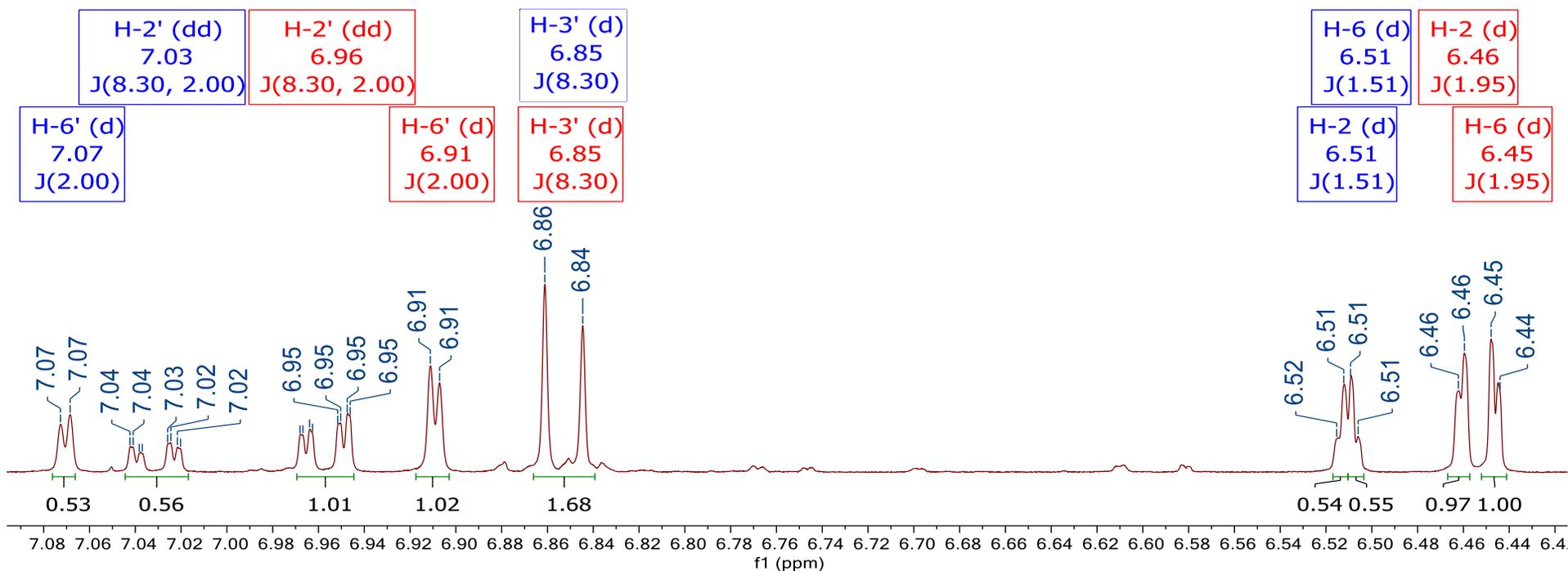
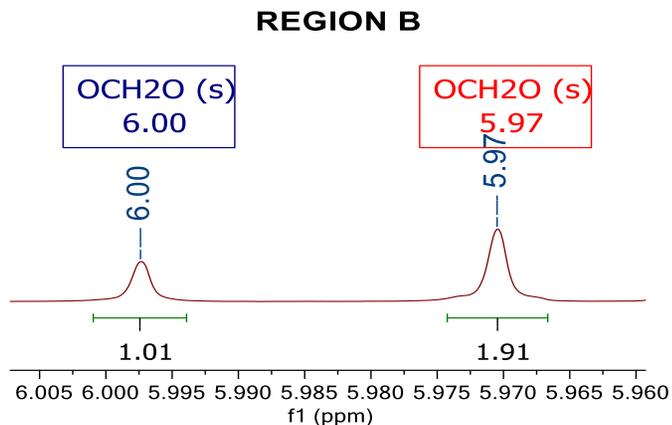
Espectro 1. IR (CDCl₃) de ciquitina A (35)



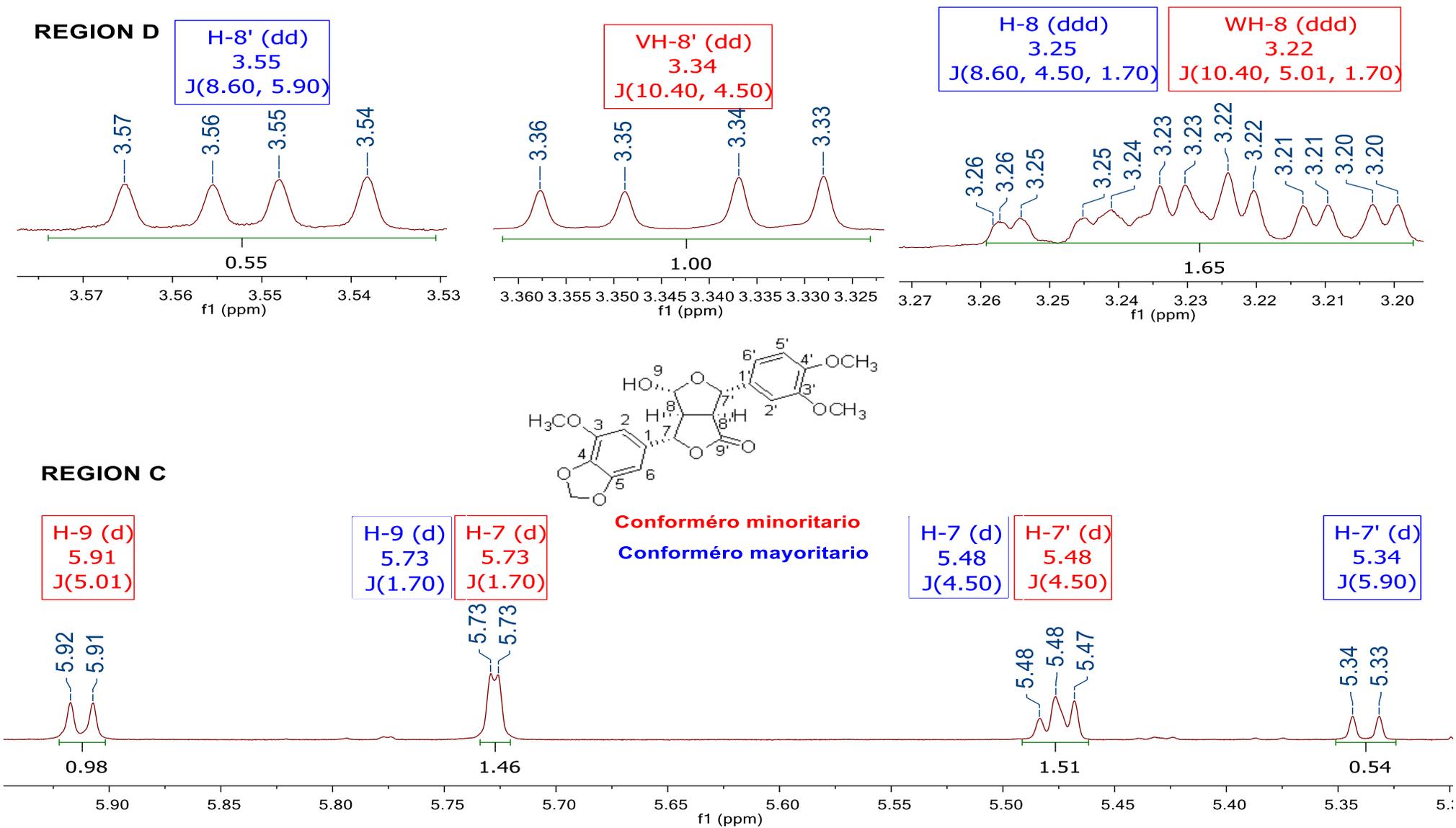
Espectro 2. ¹HNMR (CDCl₃, 400 MHz) de ciquitin A (35)



REGION A



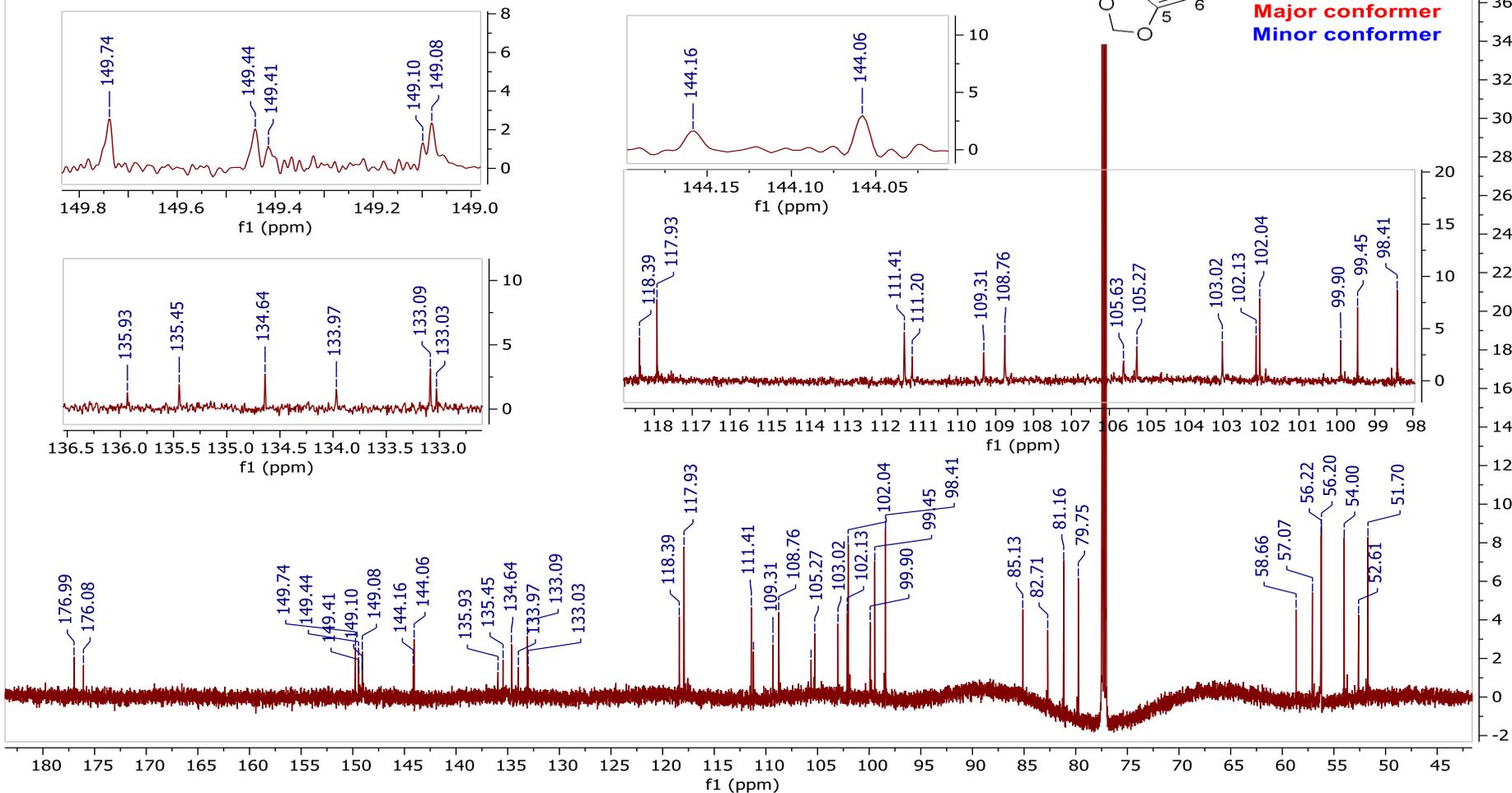
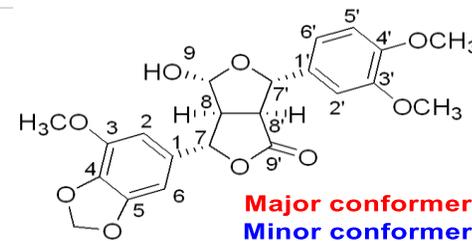
Espectro 2 ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) Ampliación de δ 5.9 a 7.1 de ciquitin A (35)



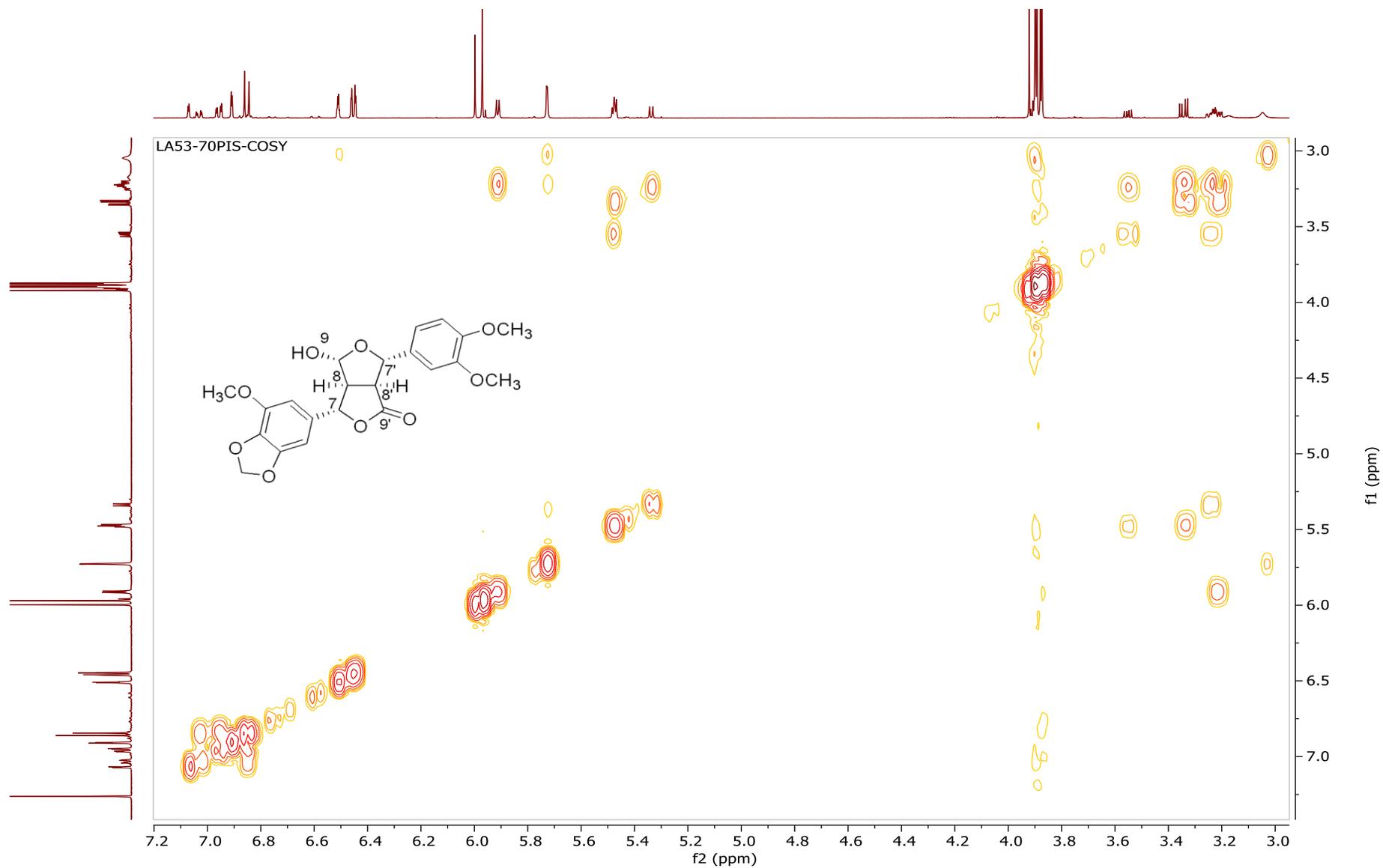
Espectro 2. $^1\text{HRMN}$ (CDCl_3 , 400 MHz) Ampliación de δ 5.3 to 5.9 y δ 3.1 to 3.6 de ciquitin A (**35**)

LA53-70P15-C

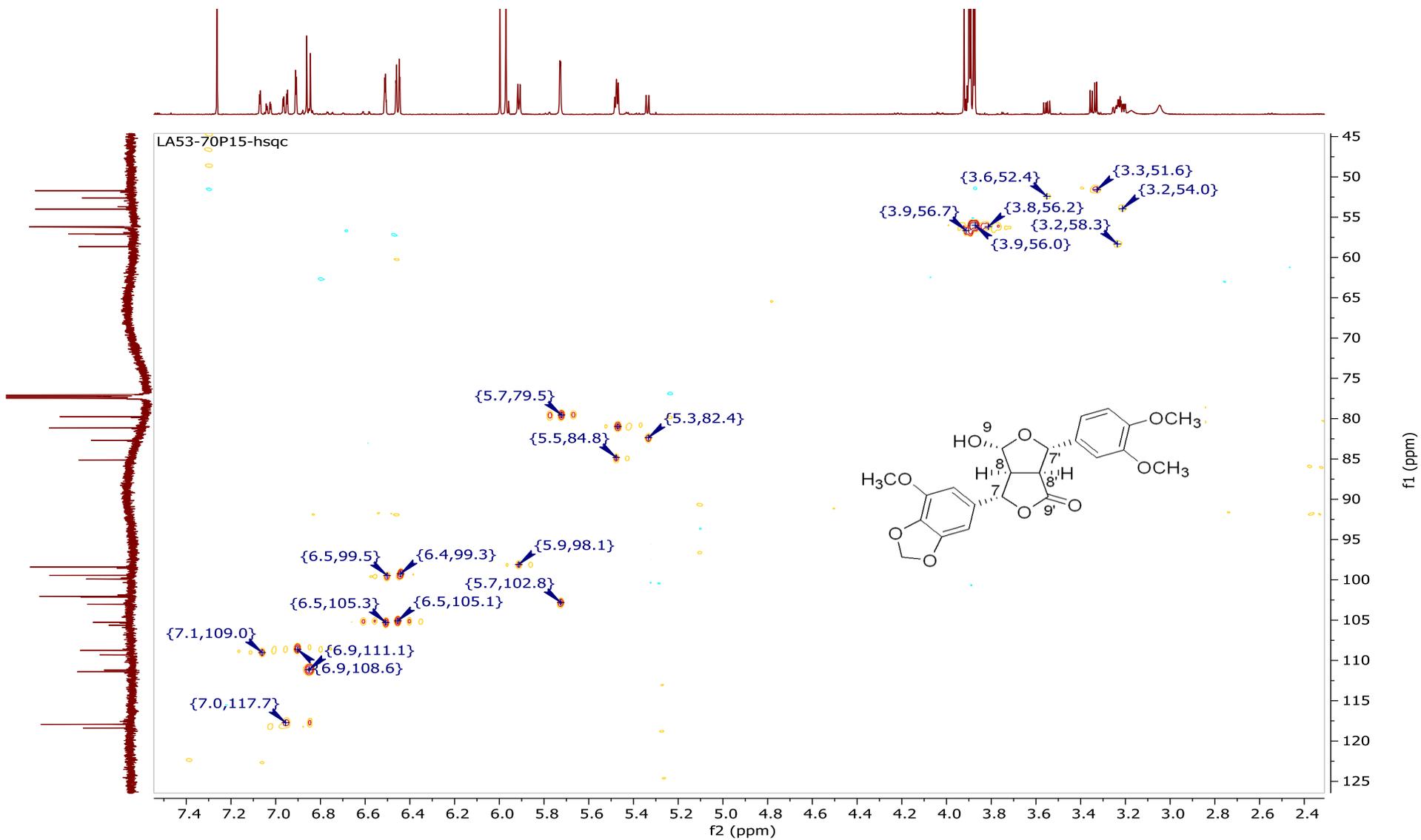
^{13}C NMR (175 MHz, CDCl_3) δ 176.99, 176.08, 149.74, 149.74, 149.44, 149.41, 149.10, 149.08, 144.16, 144.06, 135.93, 135.45, 134.64, 133.97, 133.09, 133.03, 118.39, 117.93, 111.41, 111.20, 109.31, 108.76, 105.63, 105.27, 103.02, 102.13, 102.04, 99.90, 99.45, 98.41, 85.13, 82.71, 81.16, 79.75, 58.66, 57.10, 57.07, 56.22, 56.20, 54.00, 52.61, 51.70



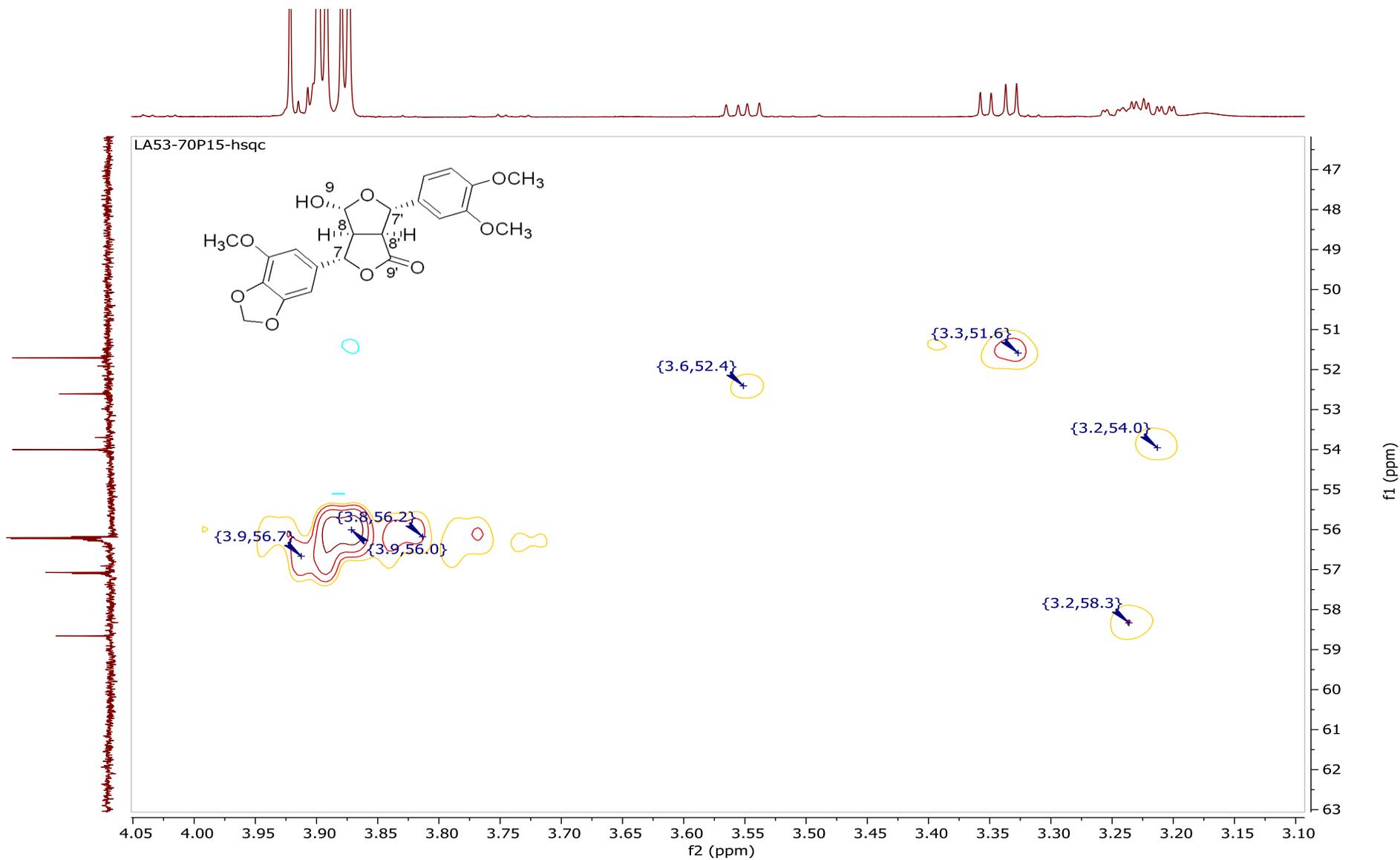
Espectro 3. ^{13}C RMN (CDCl_3 , 175 MHz) de ciquitin A (35)



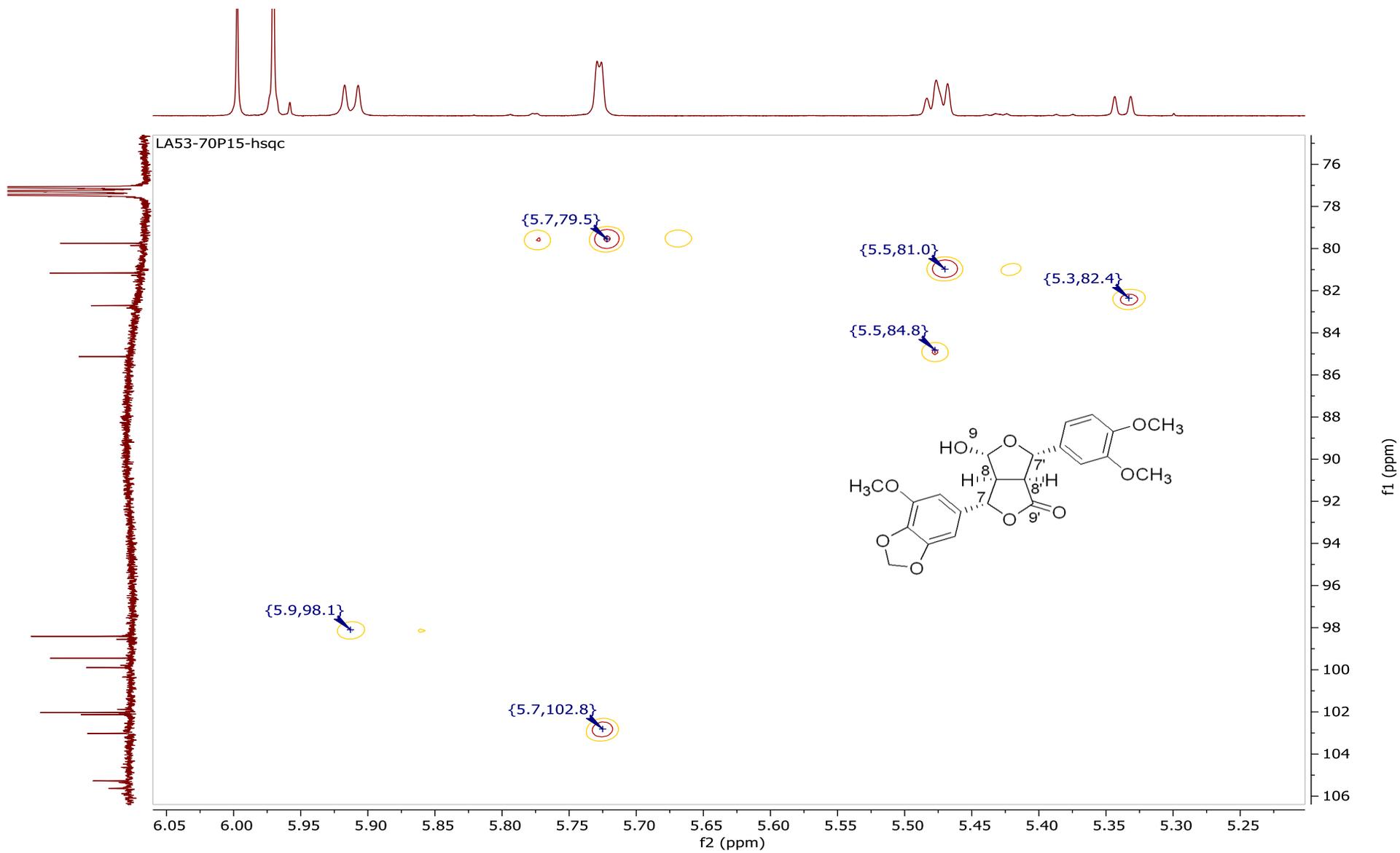
Espectro 4. COSY (CDCl₃, 400 MHz) de ciquitin A (35)



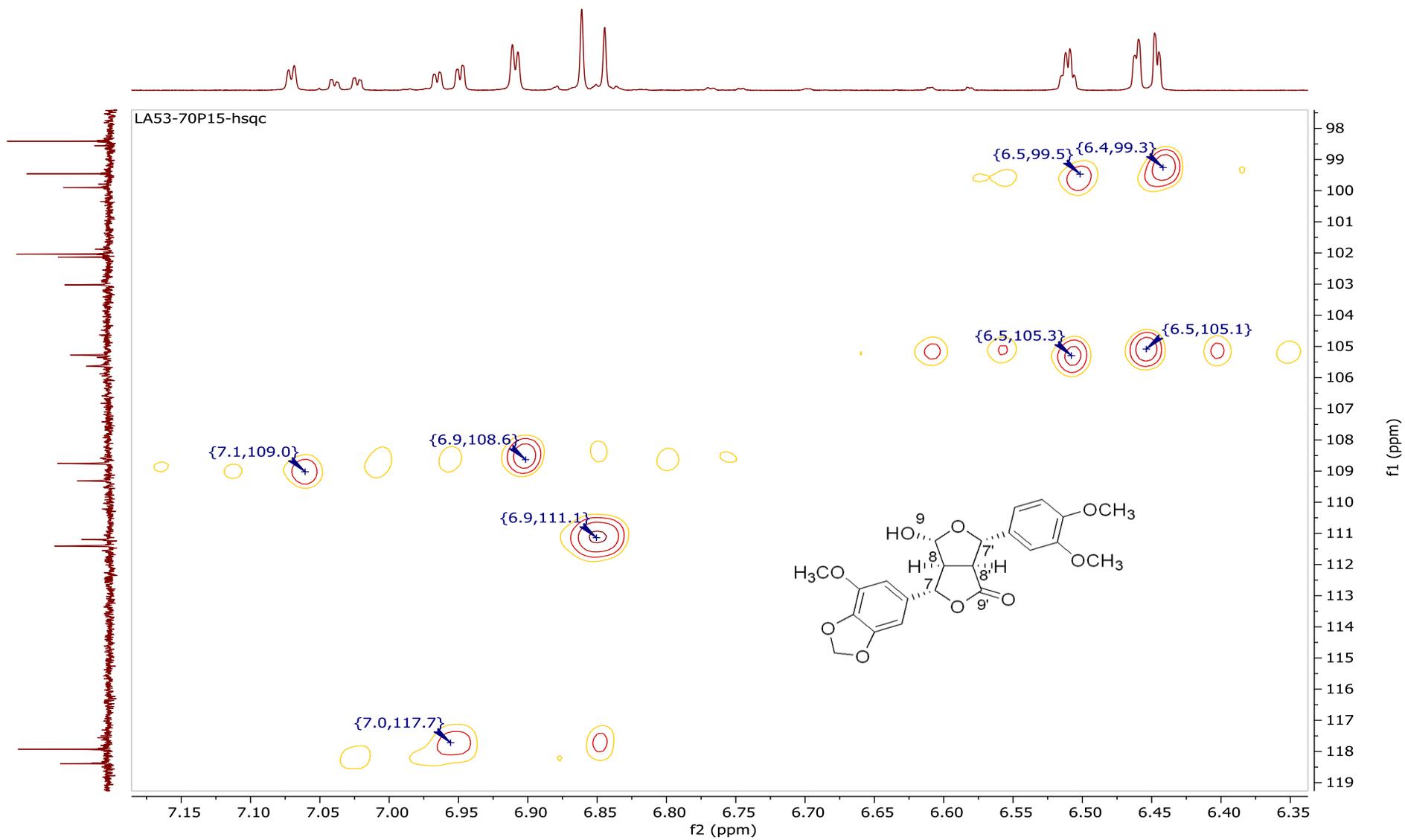
Espectro 5. HSQC (CDCl₃, 400 MHz) de ciquitin A (35)



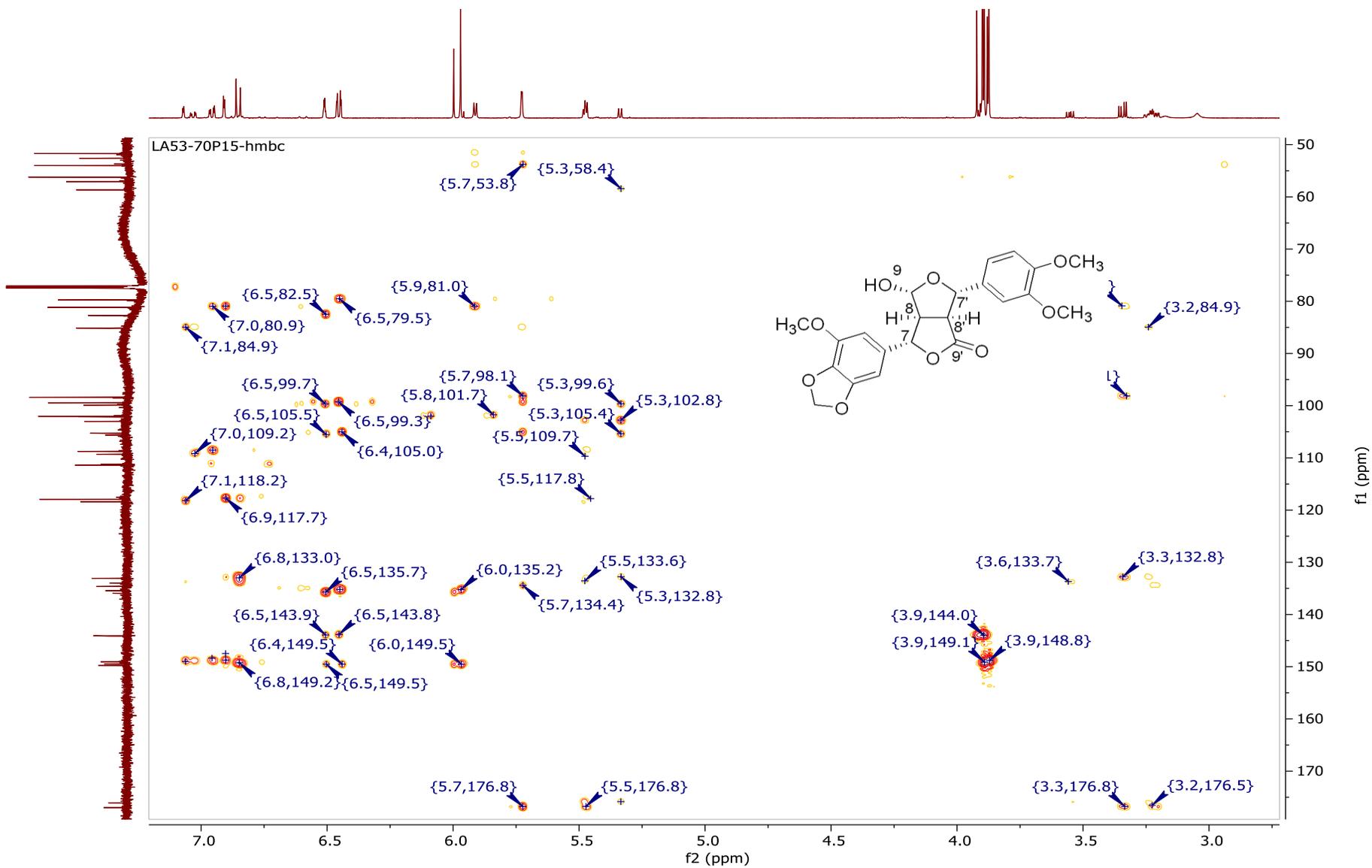
Espectro 6. HSQC (CDCl₃, 400 MHz) de ciquitin A (**35**)



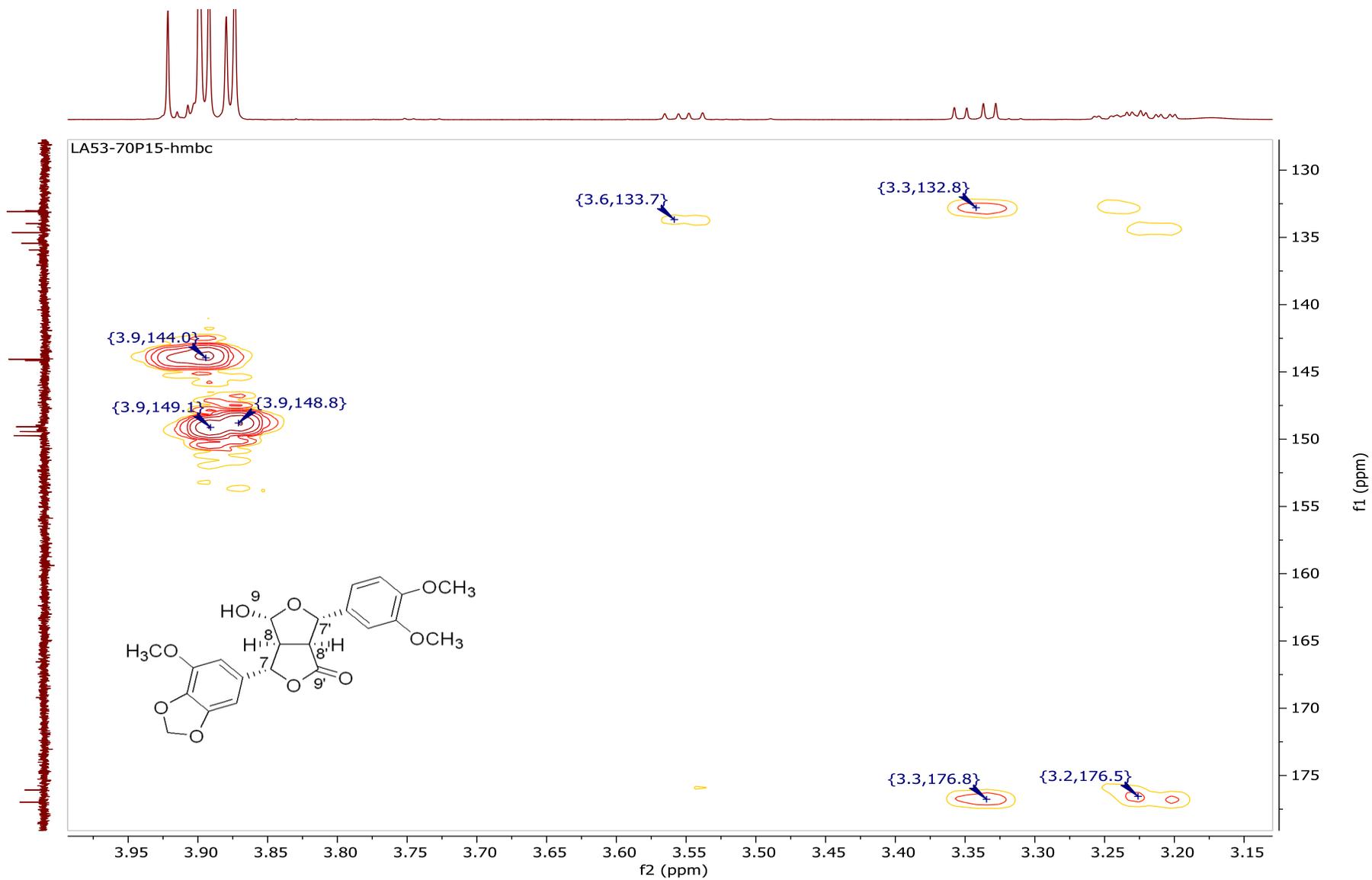
Espectro 7. HSQC (CDCl₃, 400 MHz) de ciquitin A (35)



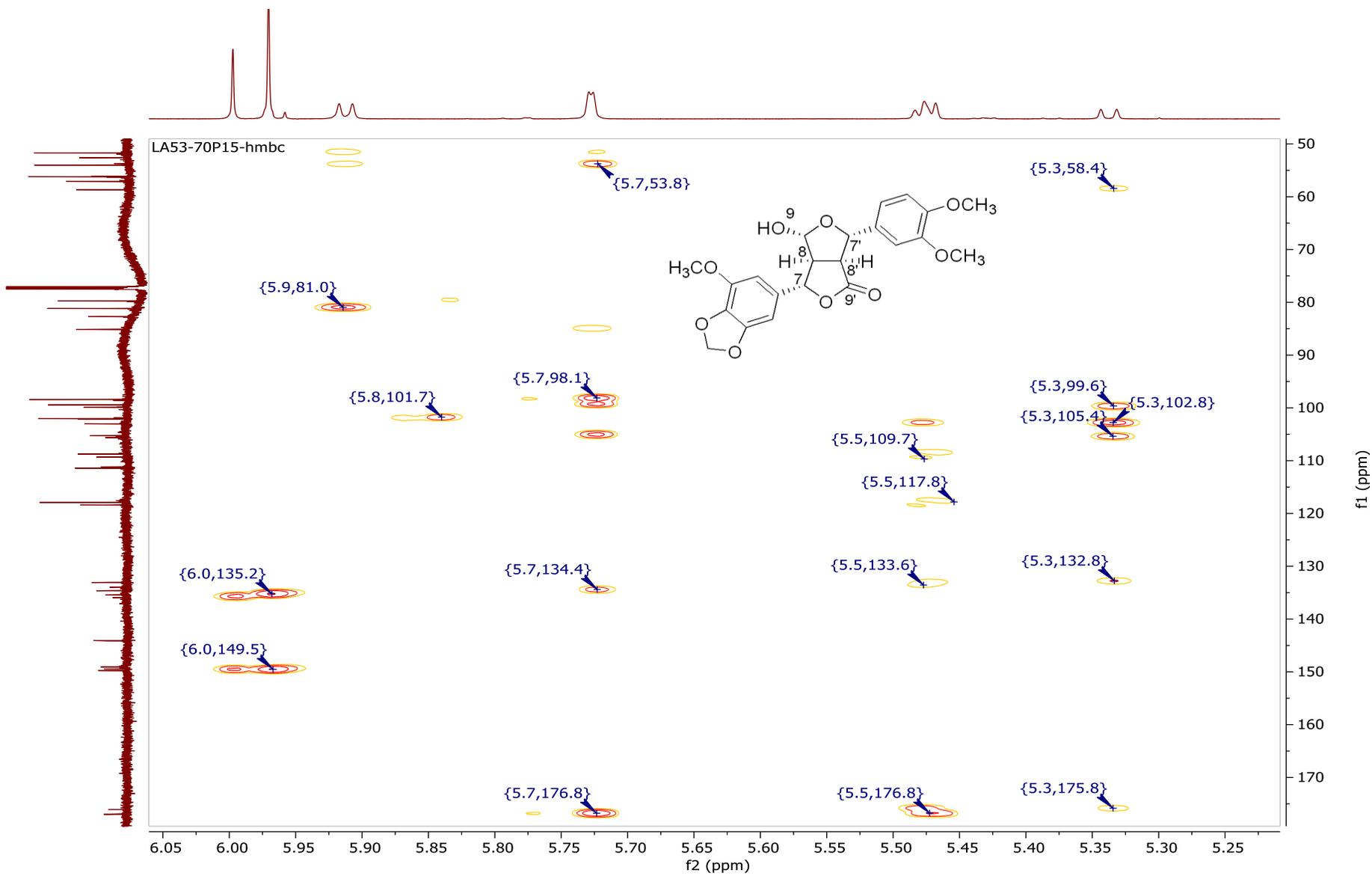
Espectro 8 HSQC (CDCl₃, 400 MHz) de ciquitin A (35)



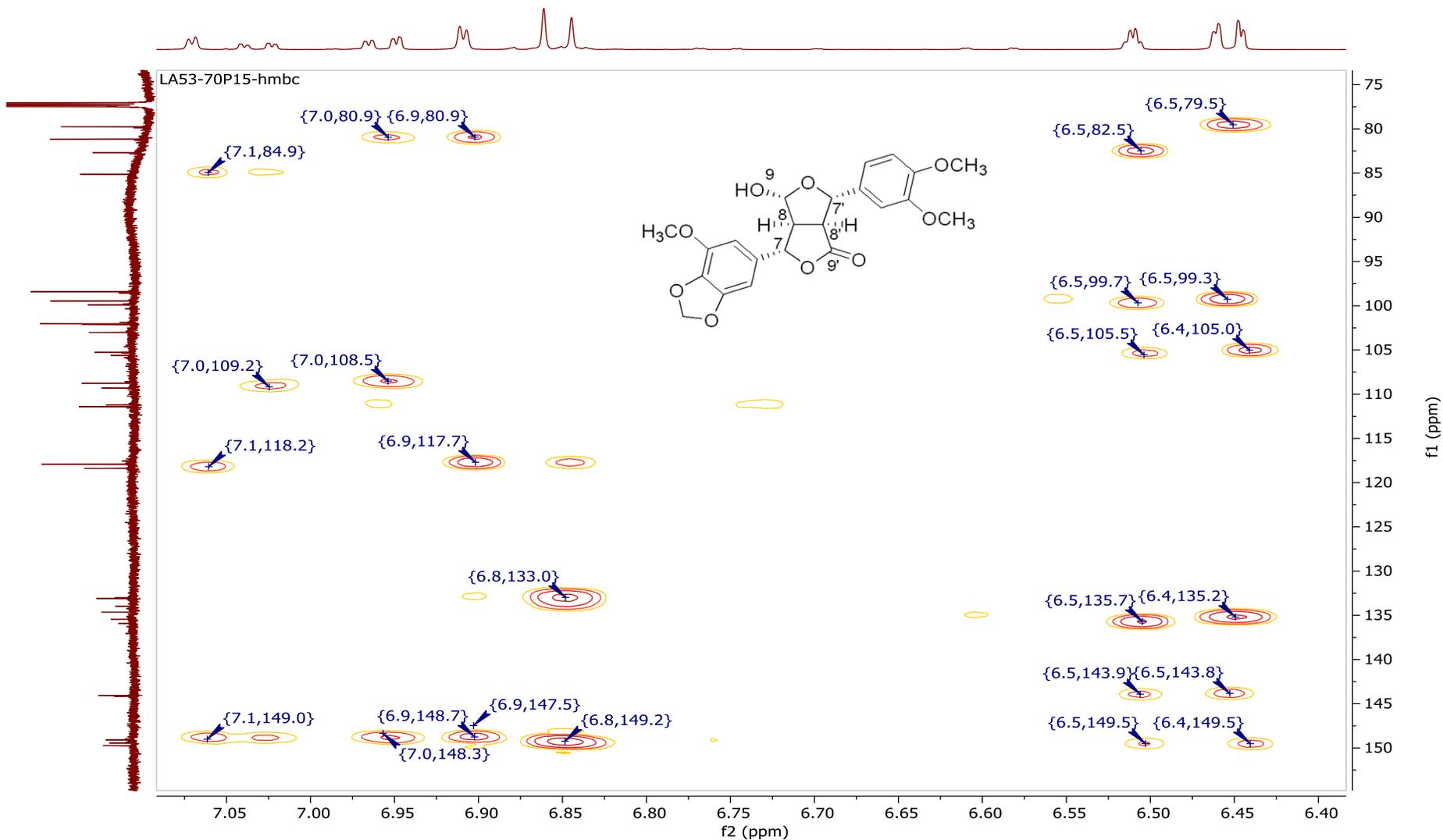
Espectro 9 HMBC (CDCl₃, 400 MHz) de ciquitin A (35)



Espectro 10 HMBC (CDCl₃, 400 MHz) de ciquitin A (**35**)



Espectro 11 . HMBC (CDCl₃, 400 MHz) de ciqutin A (35)



Espectro 12 HMBC (CDCl₃, 400 MHz) de ciquitin A (35)

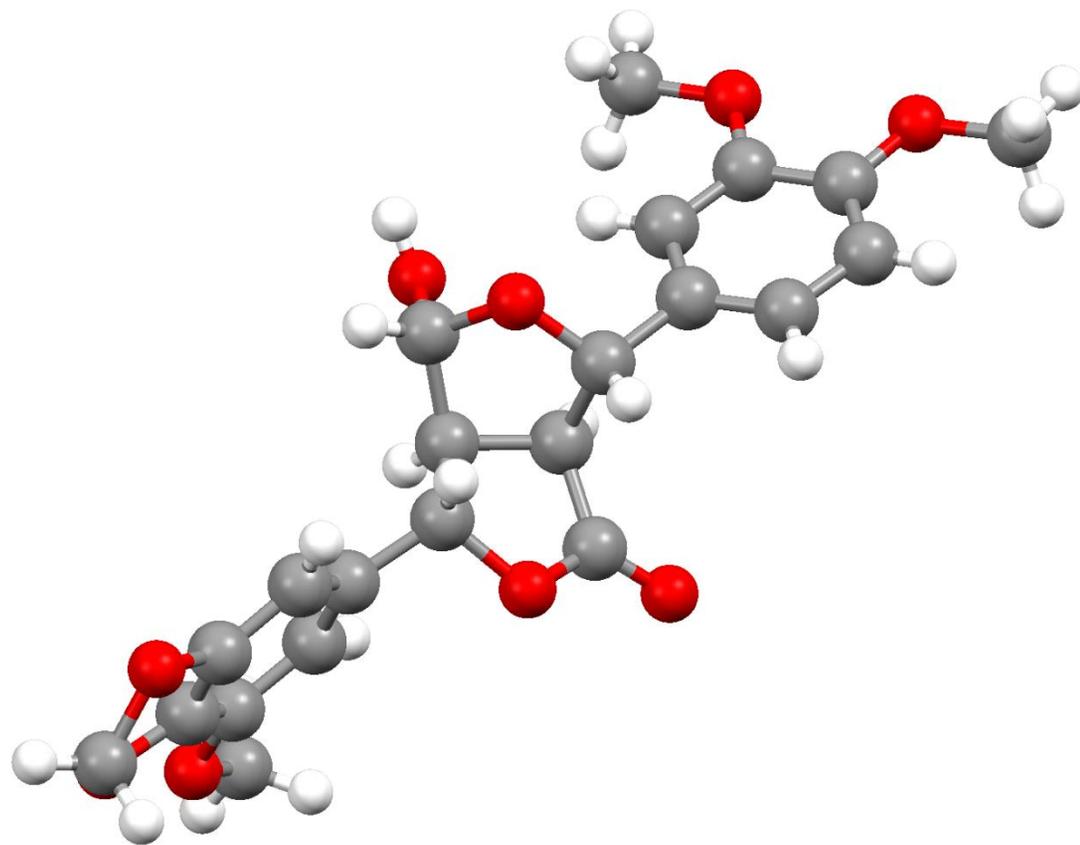
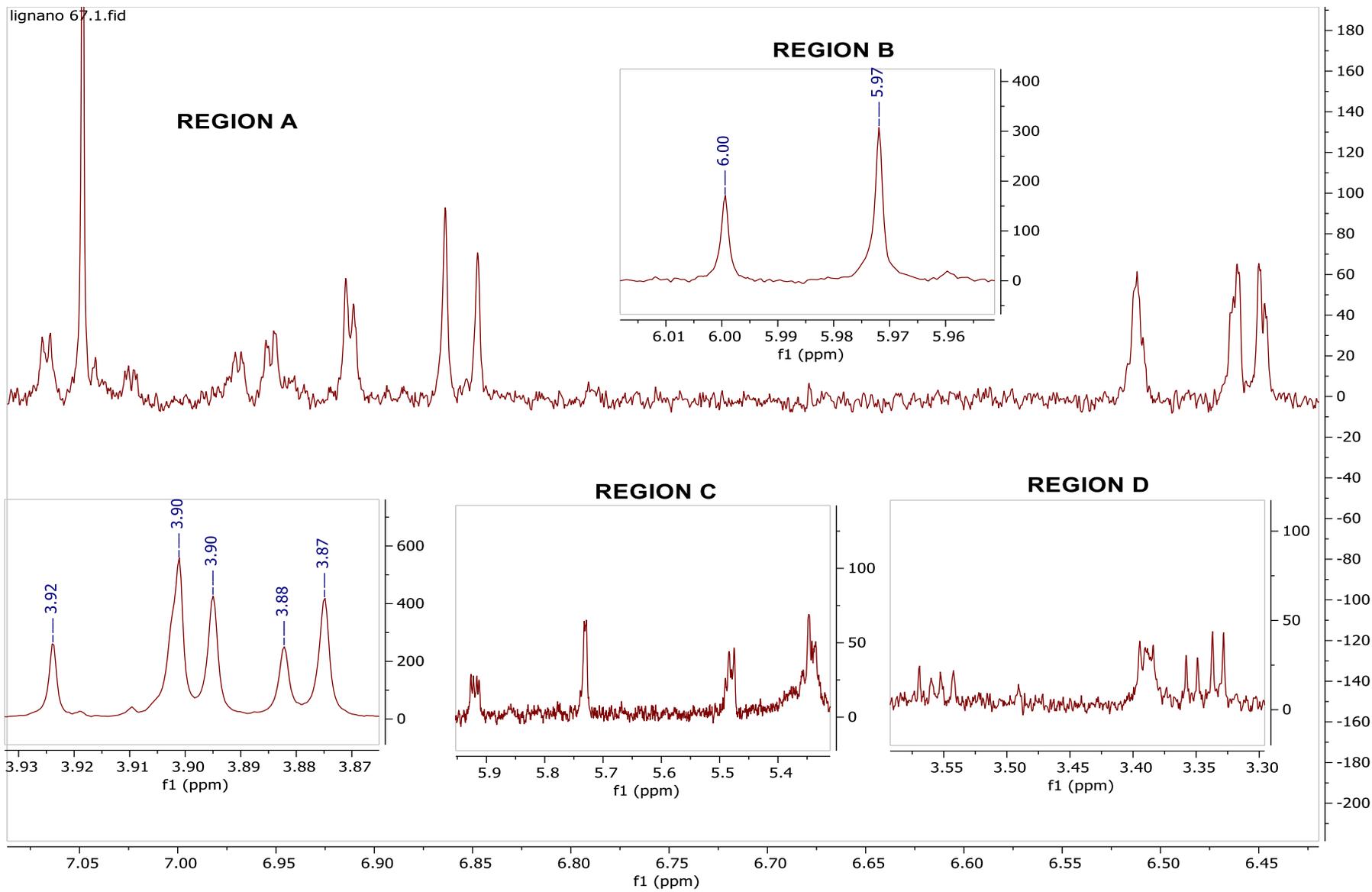


Figura 51 . Cristalografía de Rayos-X-Ray de ciquitin A (35)

Table 1. Crystal data and structure refinement for ciquitin A (1)_0m.

Identification code	cu_250RGY18_0m	
Empirical formula	C22 H22 O9	
Formula weight	430.39	
Temperature	100(2) K	
Wavelength	1.54178 Å	
Crystal system	Orthorhombic	
Space group	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	
Unit cell dimensions	a = 6.52327(7) Å	$\alpha = 90^\circ$.
	b = 12.13824(14) Å	$\beta = 90^\circ$.
	c = 25.2248(3) Å	$\gamma = 90^\circ$.
Volume	1997.33(4) Å ³	
Z	4	
Density (calculated)	1.431 Mg/m ³	
Absorption coefficient	0.947 mm ⁻¹	
F(000)	904	
Crystal size	0.236 x 0.180 x 0.096 mm ³	
Theta range for data collection	3.504 to 69.133°.	
Index ranges	-7<=h<=7, -14<=k<=14, -30<=l<=30	
Reflections collected	20548	
Independent reflections	3716 [R(int) = 0.0265]	
Completeness to theta = 67.679°	99.9 %	
Absorption correction	None	
Refinement method	Full-matrix least-squares on F ²	
Data / restraints / parameters	3716 / 1 / 286	
Goodness-de-fit on F ²	1.089	
Final R indices [I>2sigma(I)]	R1 = 0.0266, wR2 = 0.0701	
R indices (all data)	R1 = 0.0266, wR2 = 0.0702	
Absolute structure parameter	0.05(3)	
Extinction coefficient	n/a	
Largest diff. peak and hole	0.309 and -0.182 e.Å ⁻³	



Espectro 13 ^1H RMN (CDCl_3 , 700 MHz) ciquitin A (35)

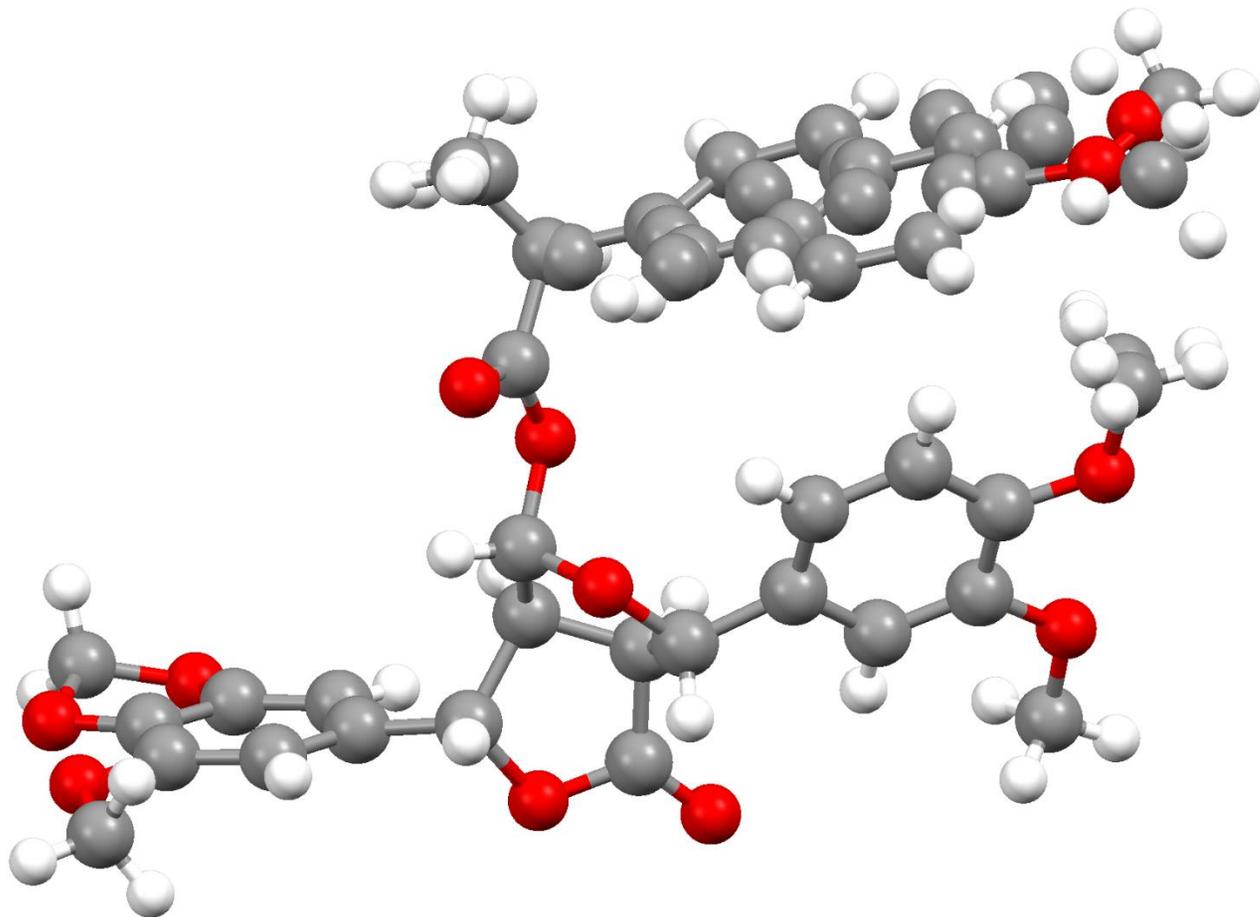
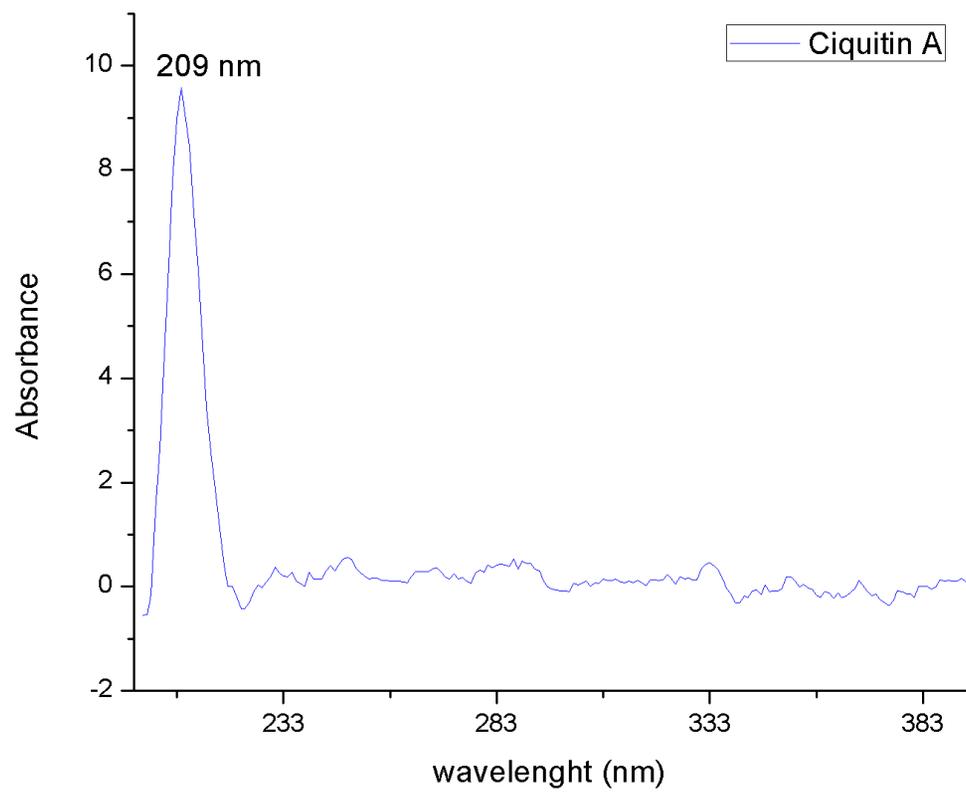


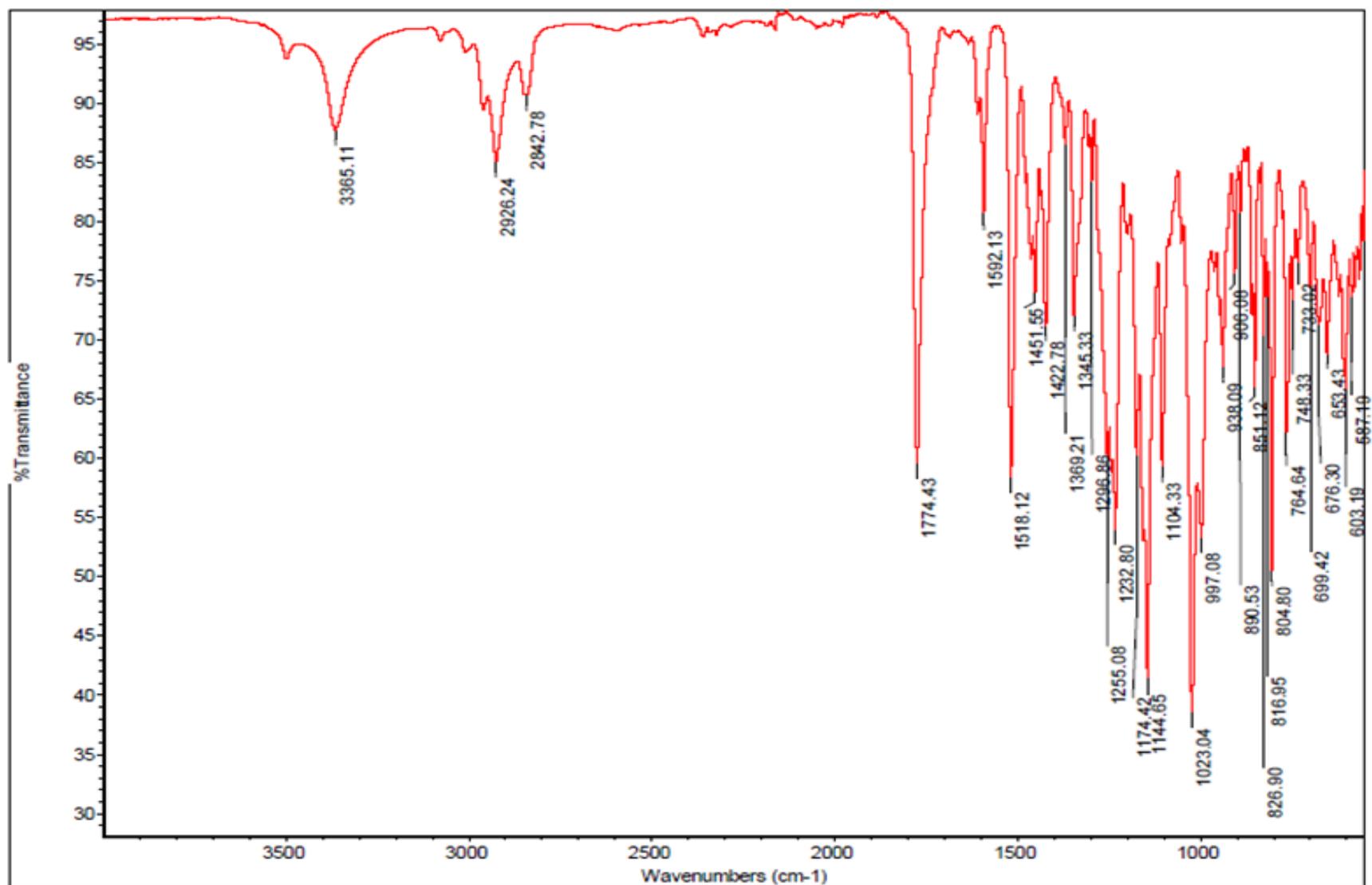
Figura 52. X-Ray crystallography de 9-(*S*)-naproxen derivative de ciquitin A (**1B**)

Table 2. Crystal data and structure refinement for cu_047RGMY19_0m.

Identification code	cu_047RGMY19_0m	
Empirical formula	C38.87 H37.28 O11	
Formula weight	680.36	
Temperature	100(2) K	
Wavelength	1.54178 Å	
Crystal system	Monoclinic	
Space group	P2 ₁	
Unit cell dimensions	a = 13.6524(5) Å	$\alpha = 90^\circ$.
	b = 6.5443(3) Å	$\beta = 104.473(3)^\circ$.
	c = 19.0669(8) Å	$\gamma = 90^\circ$.
Volume	1649.48(12) Å ³	
Z	2	
Density (calculated)	1.370 Mg/m ³	
Absorption coefficient	0.832 mm ⁻¹	
F(000)	717	
Crystal size	0.189 x 0.033 x 0.023 mm ³	
Theta range for data collection	2.393 to 71.059°.	
Index ranges	-16<=h<=16, -8<=k<=7, -23<=l<=23	
Reflections collected	26939	
Independent reflections	6035 [R(int) = 0.0528]	
Completeness to theta = 67.679°	100.0 %	
Absorption correction	None	
Refinement method	Full-matrix least-squares on F ²	
Data / restraints / parameters	6035 / 1176 / 689	
Goodness-of-fit on F ²	1.030	
Final R indices [I>2sigma(I)]	R1 = 0.0510, wR2 = 0.1251	
R indices (all data)	R1 = 0.0629, wR2 = 0.1340	
Absolute structure parameter	-0.19(15)	
Extinction coefficient	n/a	
Largest diff. peak and hole	0.540 and -0.342 e.Å ⁻³	

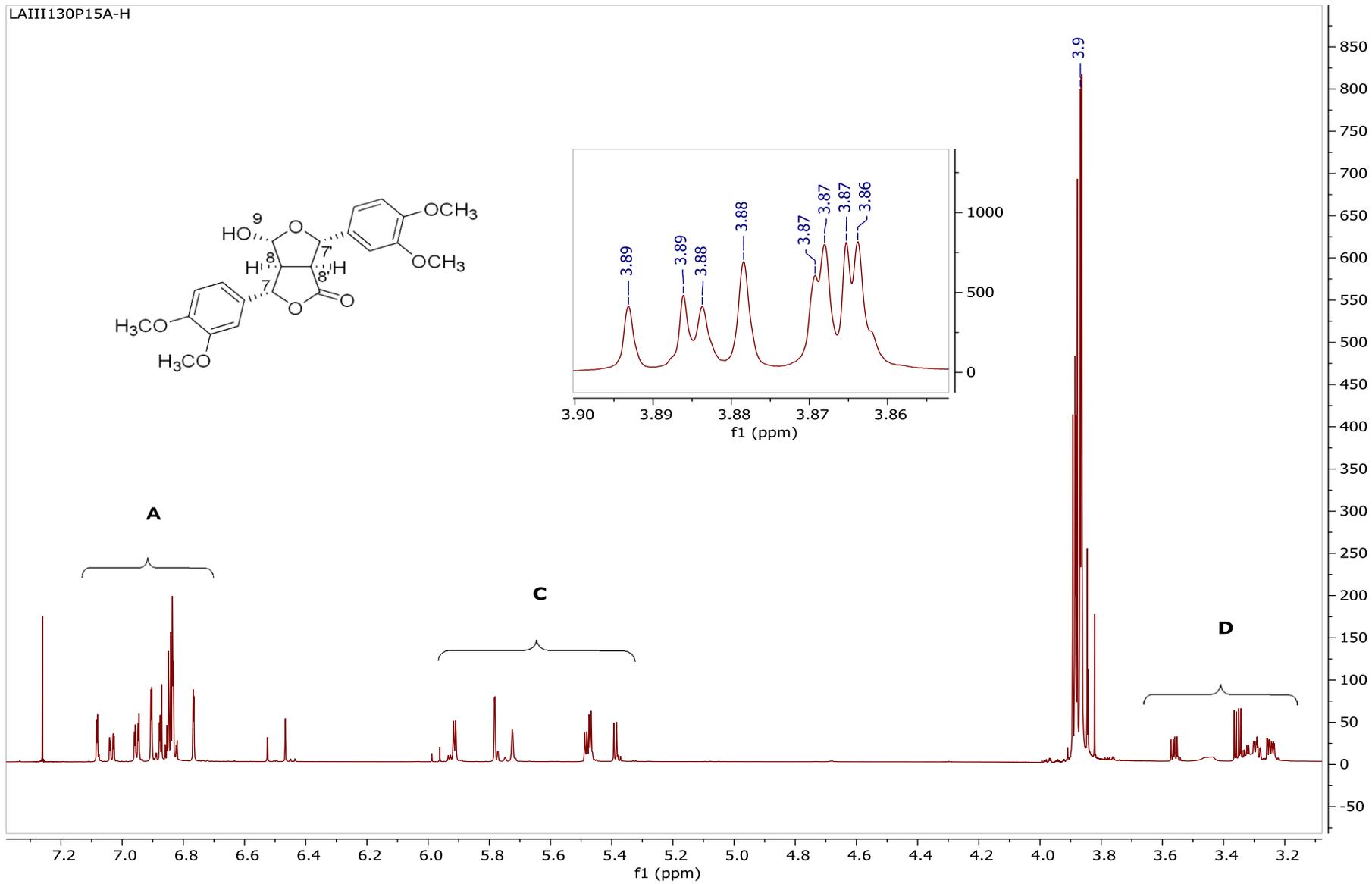


Espectro 14 Dicroísmo circular de ciquitin A (1 , 1 x 10⁻⁵M)

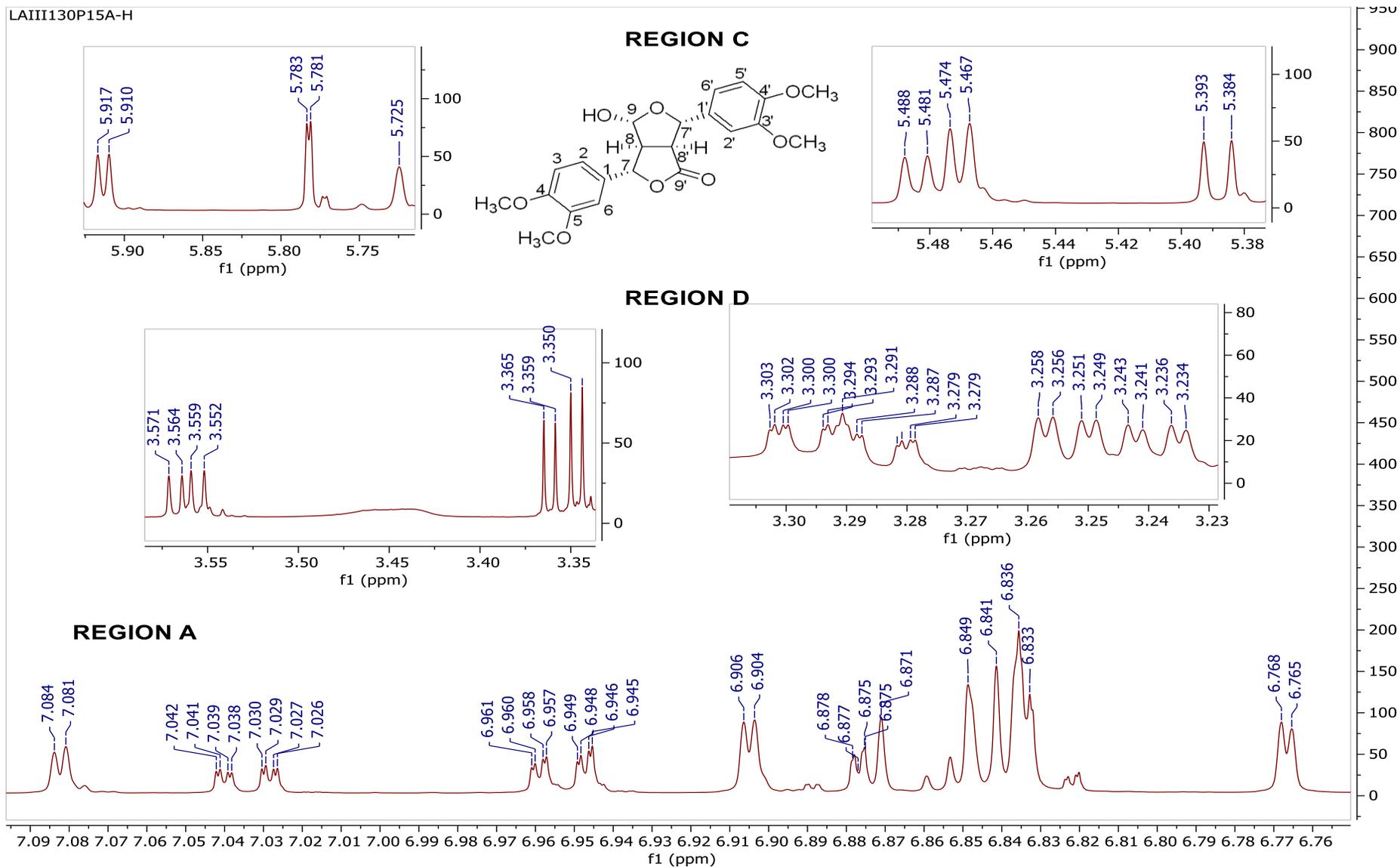


Espectro 15. IR (CDCl₃) de ciquitin B (36)

LAI1130P15A-H



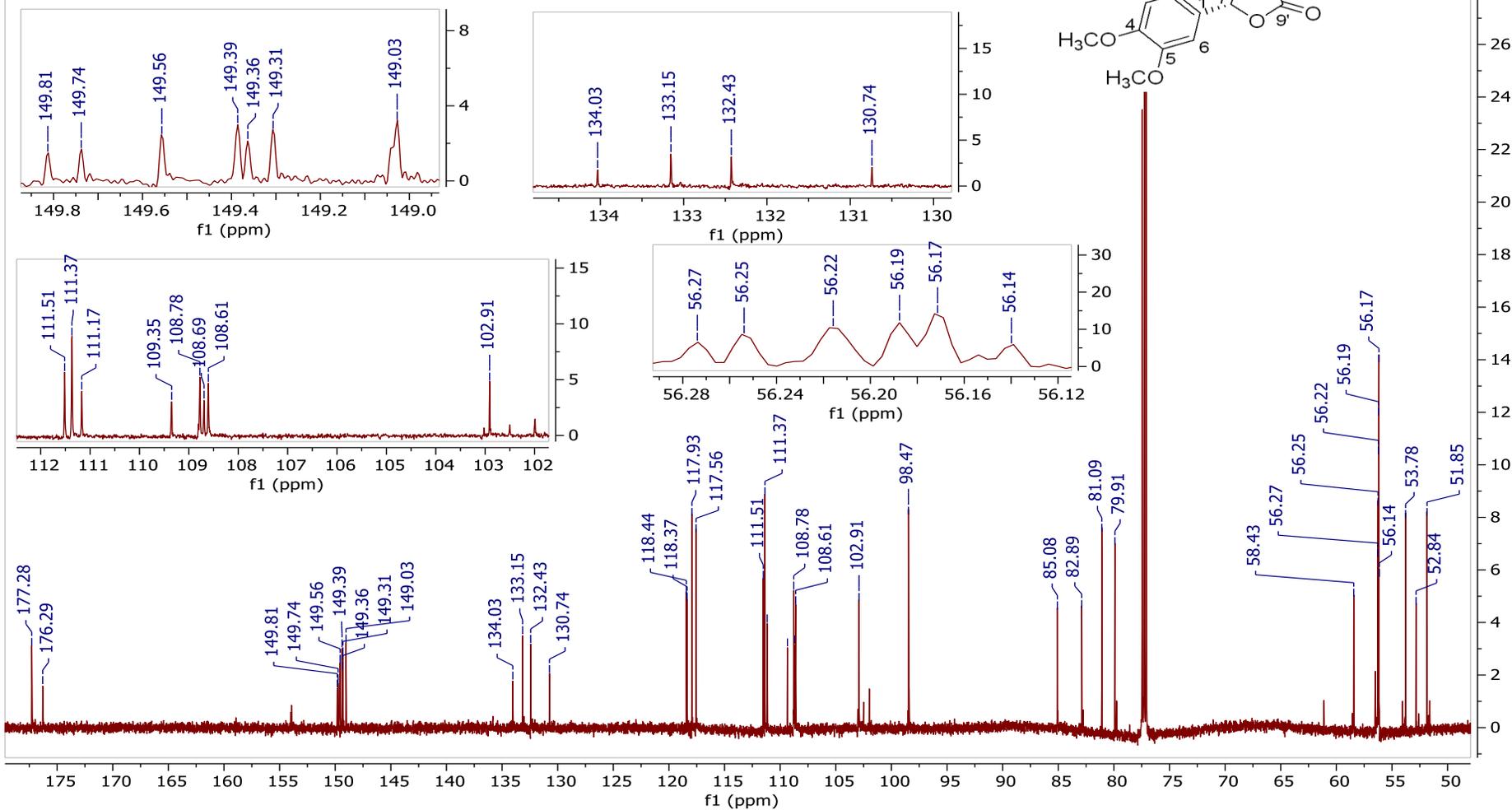
Espectro 16. ^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz) de ciquitin B (36)



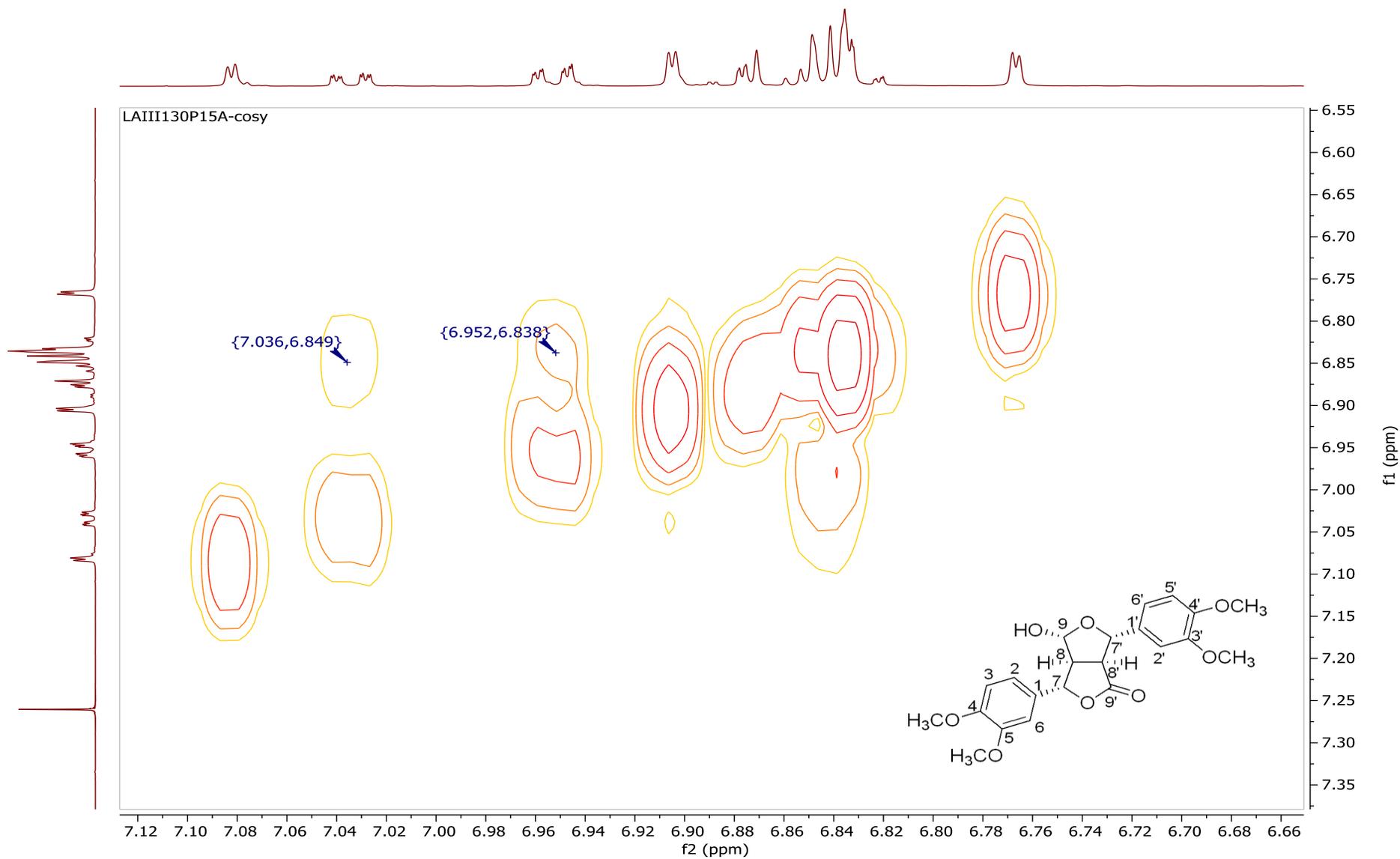
Espectro 16. ^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz) ampliaci3n de ciquitin B (36)

LAI1130P15A-c

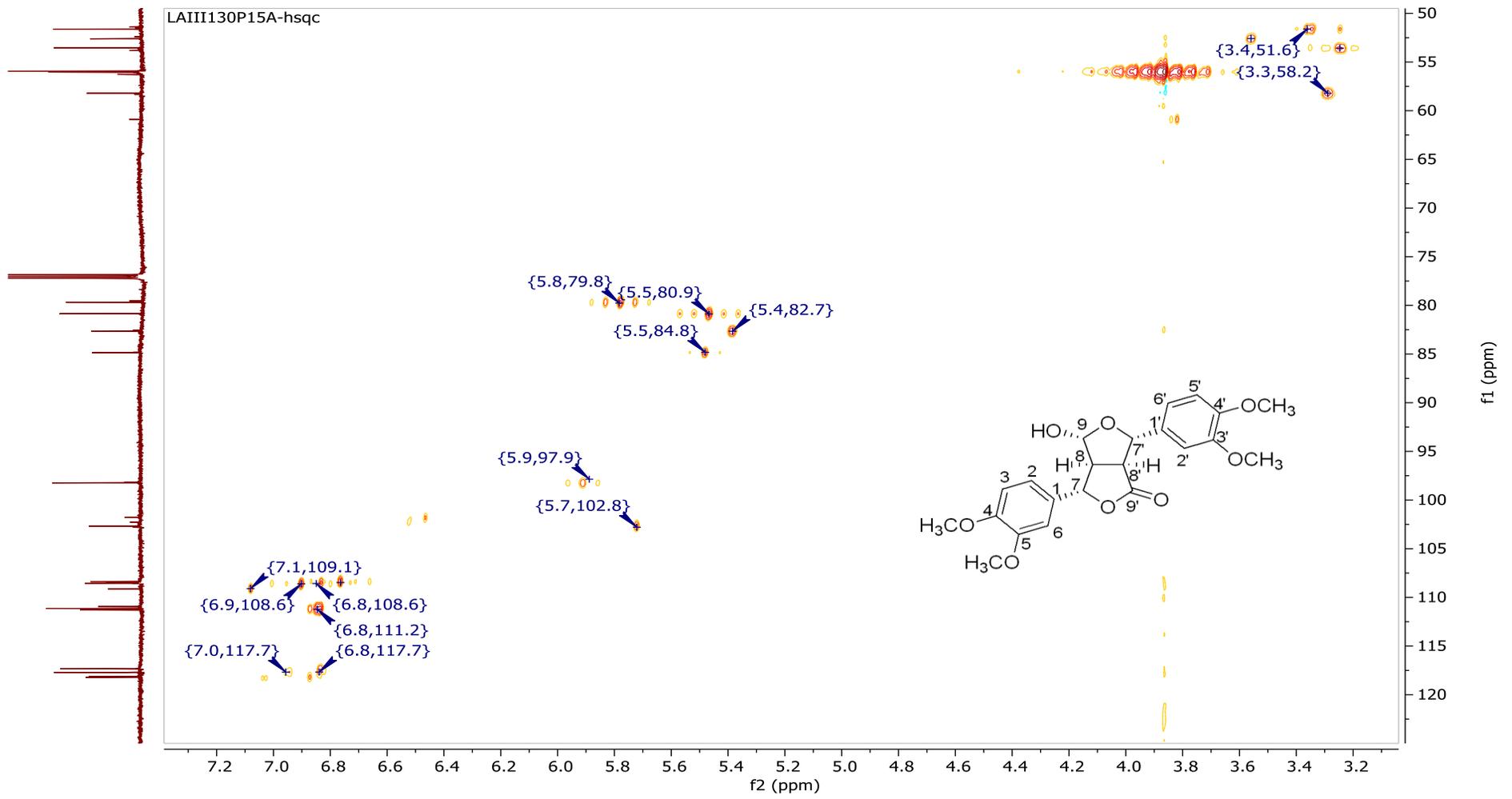
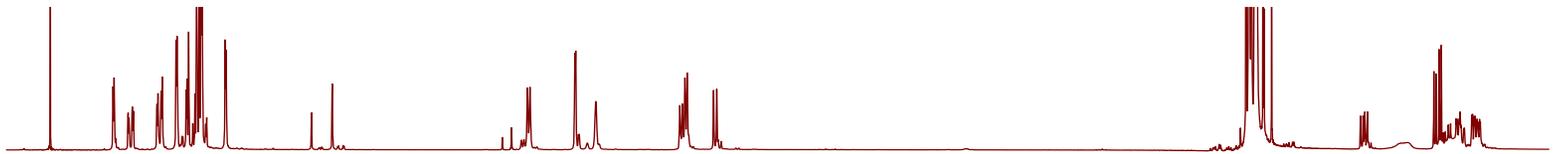
^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 177.28, 176.29, 149.81, 149.74, 149.56, 149.39, 149.36, 149.31, 149.05, 149.03, 134.03, 133.15, 132.43, 130.74, 118.44, 118.37, 117.93, 117.56, 111.51, 111.37, 111.37, 111.17, 109.35, 108.78, 108.69, 108.61, 102.91, 98.47, 85.08, 82.89, 81.09, 79.91, 58.43, 56.27, 56.25, 56.22, 56.22, 56.19, 56.17, 56.17, 56.14, 53.78, 52.84, 51.85



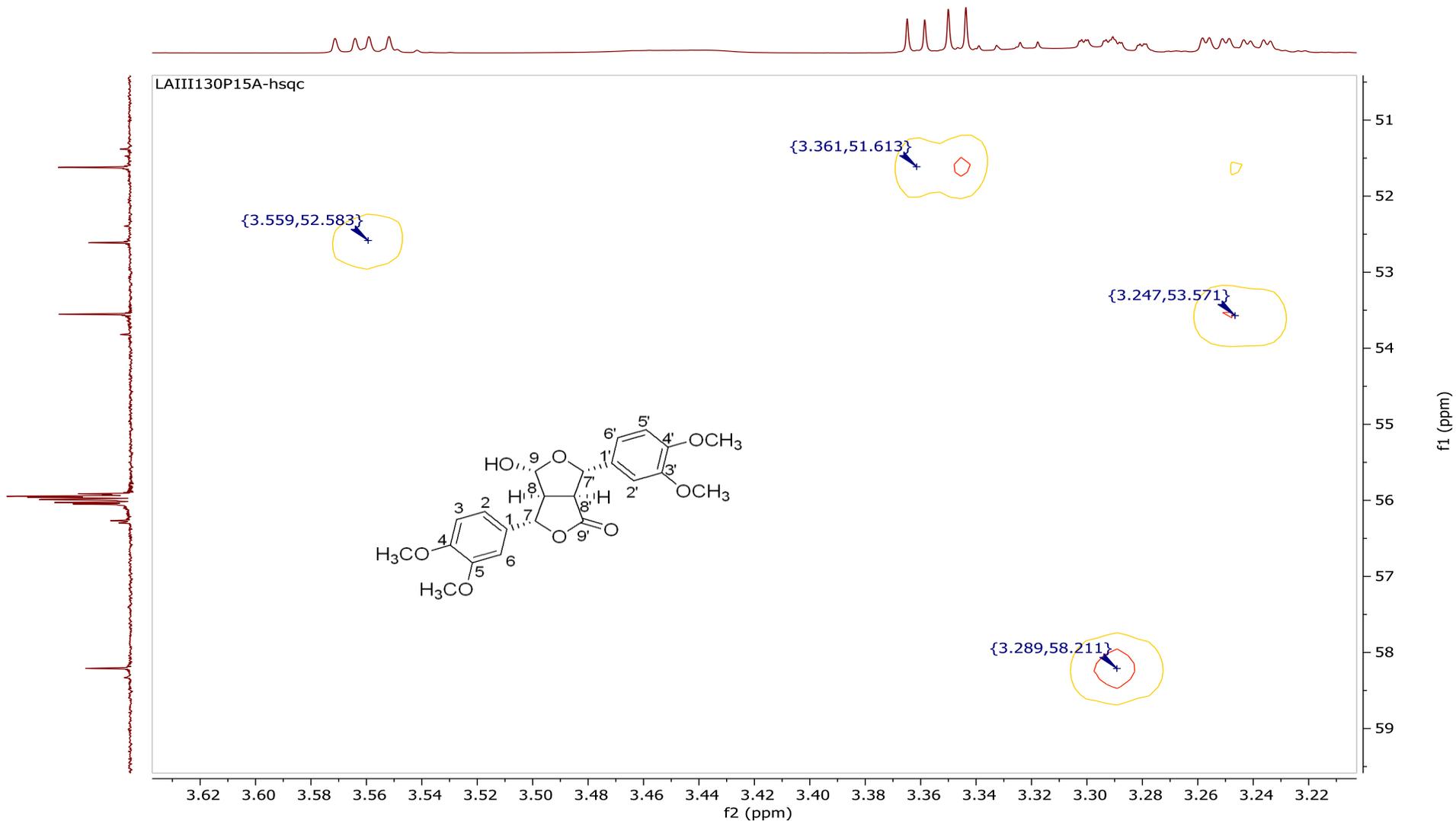
Espectro 17. ^{13}C CRMN (CDCl_3 , 100 MHz) de ciquitin B (36)



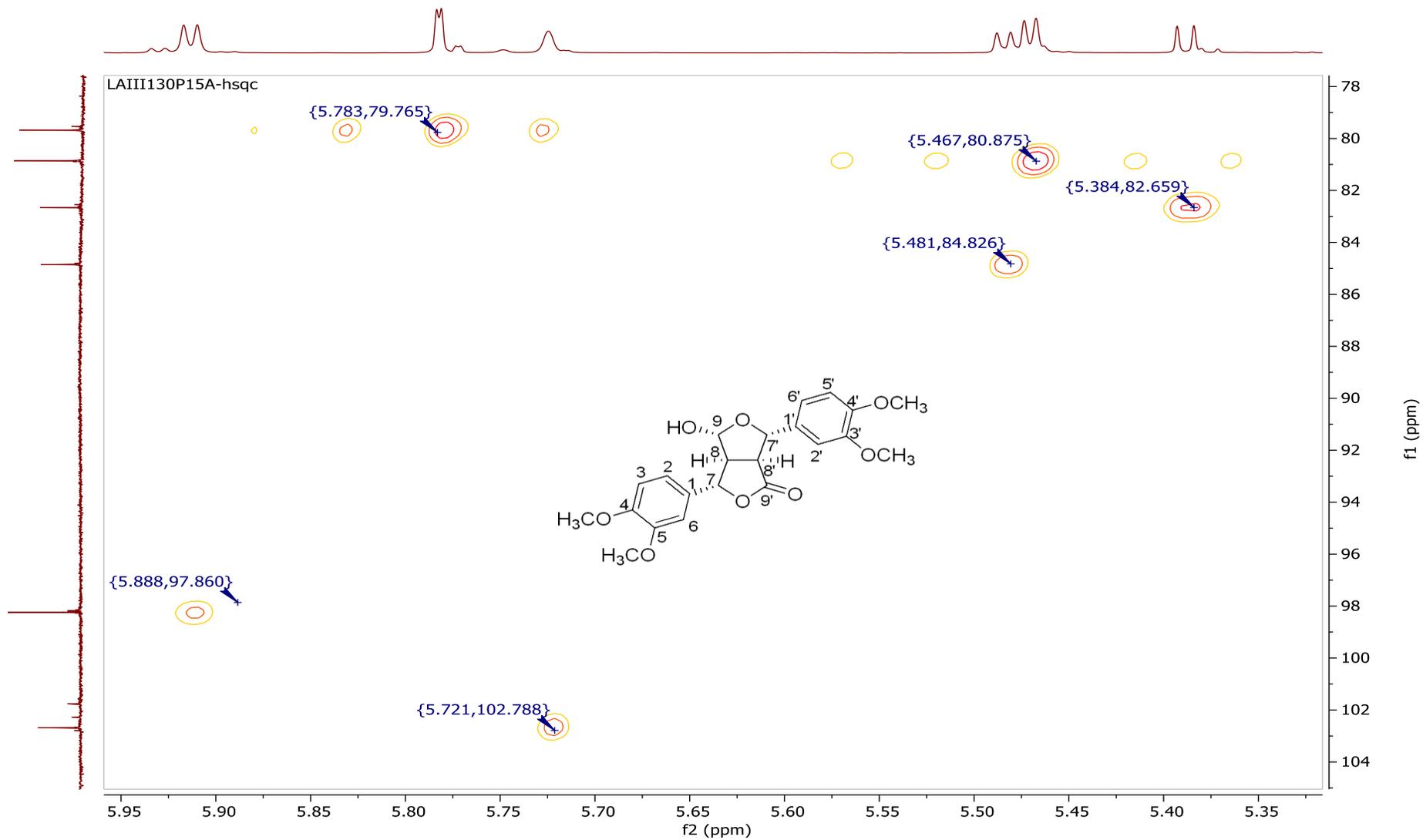
Espectro 19. Expansion COSY (CDCl₃, 400 MHz) de ciquitin B (36)



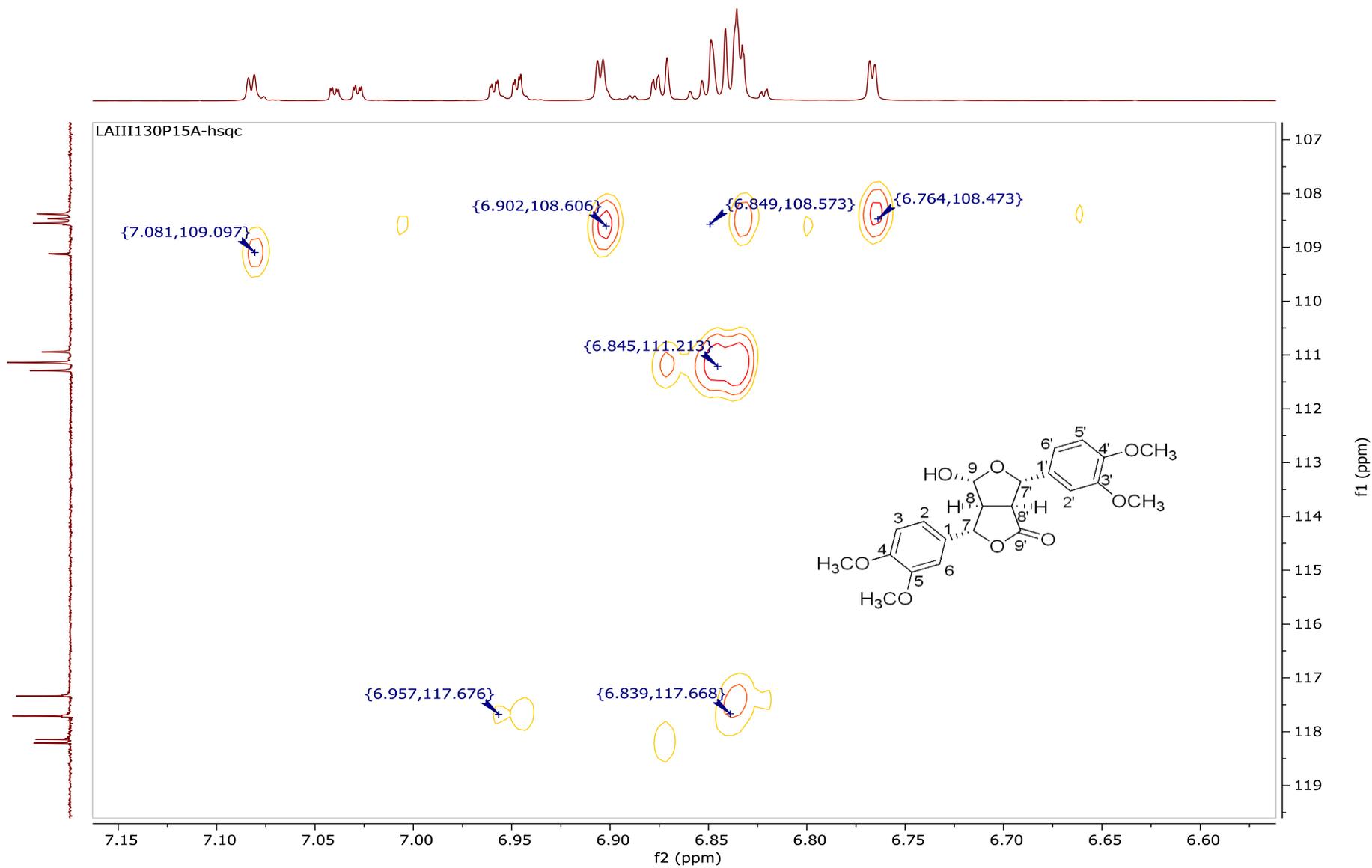
Espectro 20. HSQC (CDCl₃, 400 MHz) de ciquitin B (36)



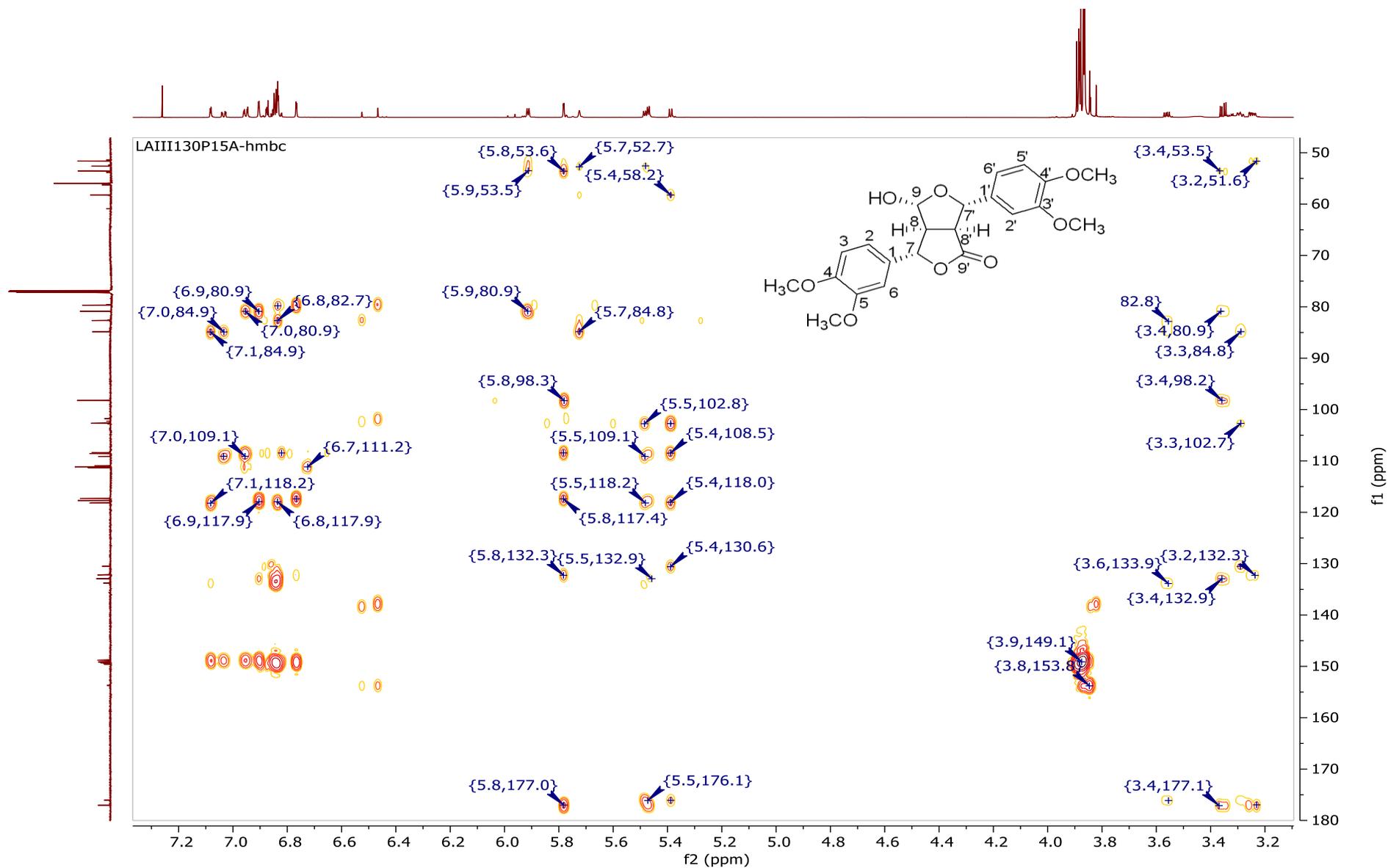
Espectro 21 HSQC (CDCl₃, 400 MHz) de ciquitin B (36)



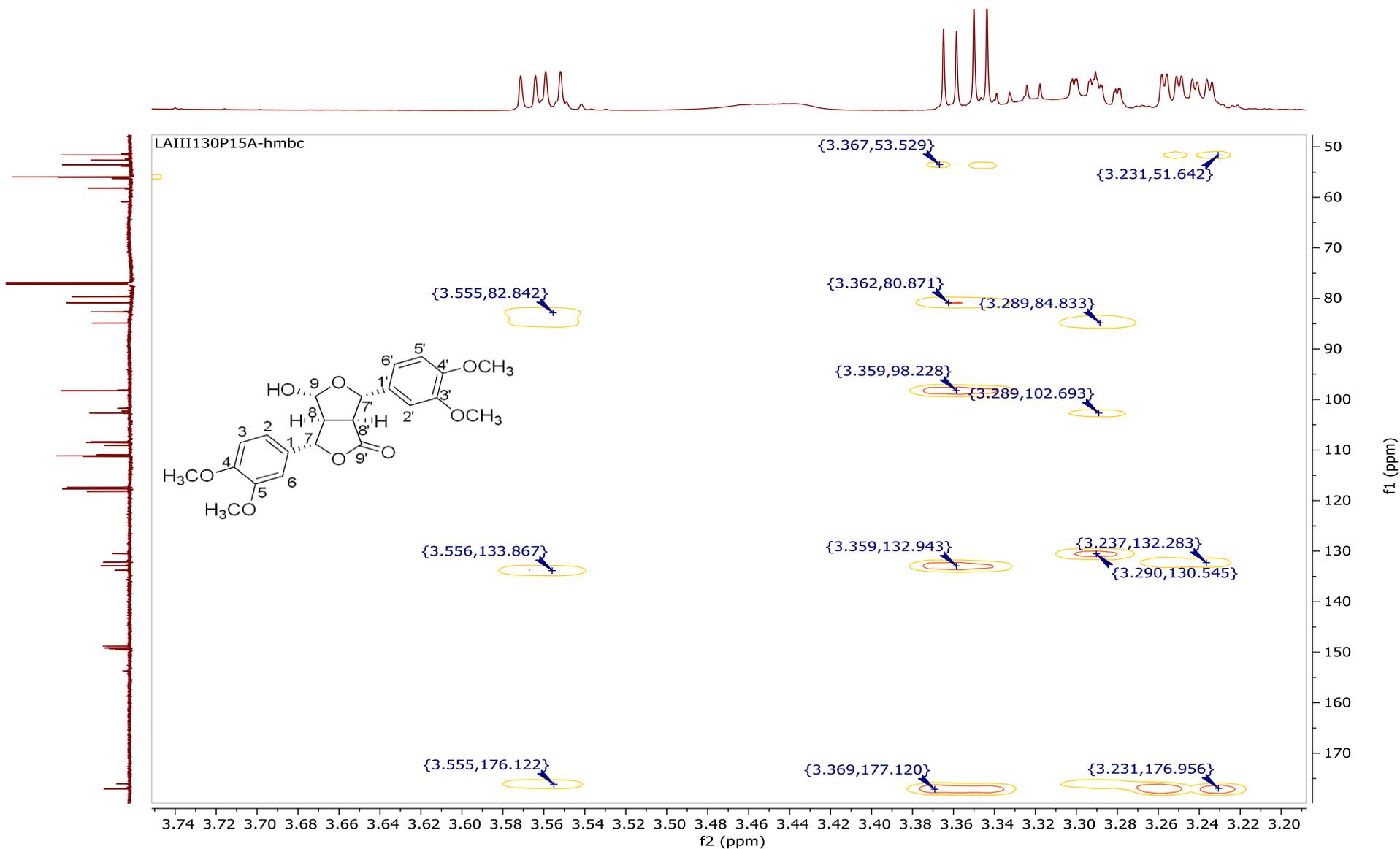
Espectro 22. HSQC (CDCl₃, 400 MHz) de ciquitin B (**36**)



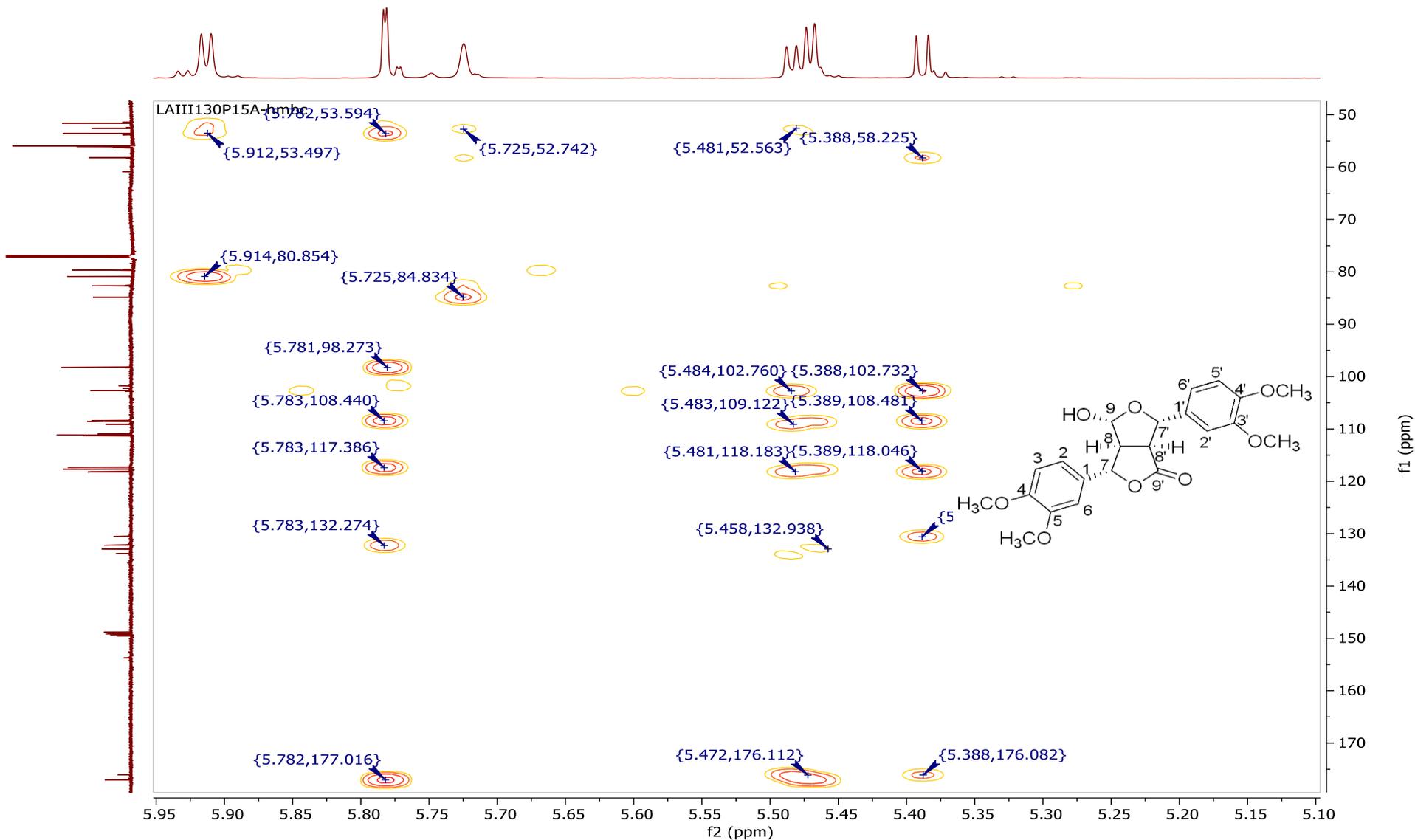
Espectro 23. HSQC (CDCl₃, 400 MHz) de ciquitin B (36)



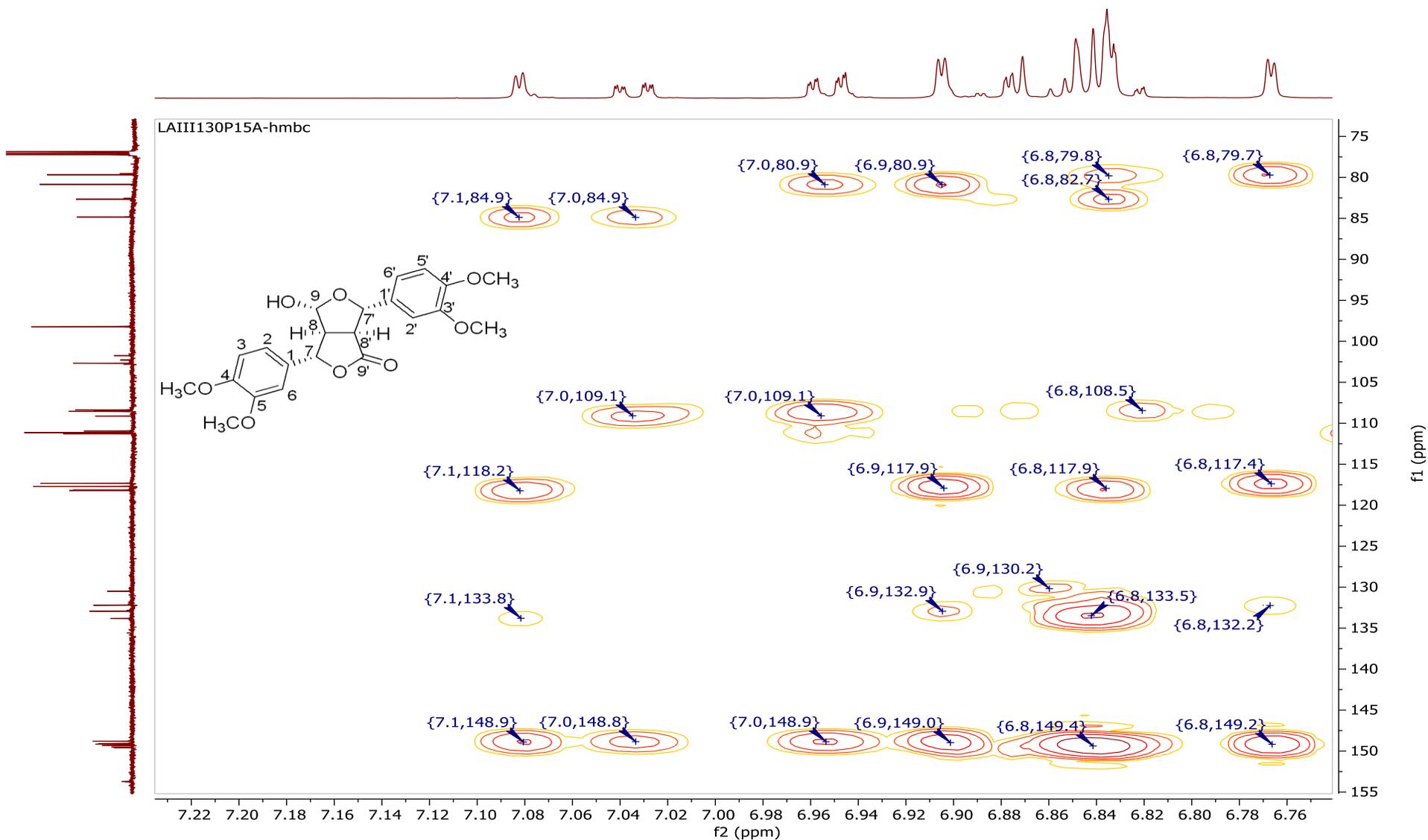
Espectro 24. HMBC (CDCl₃, 400 MHz) de ciquitin B (36)



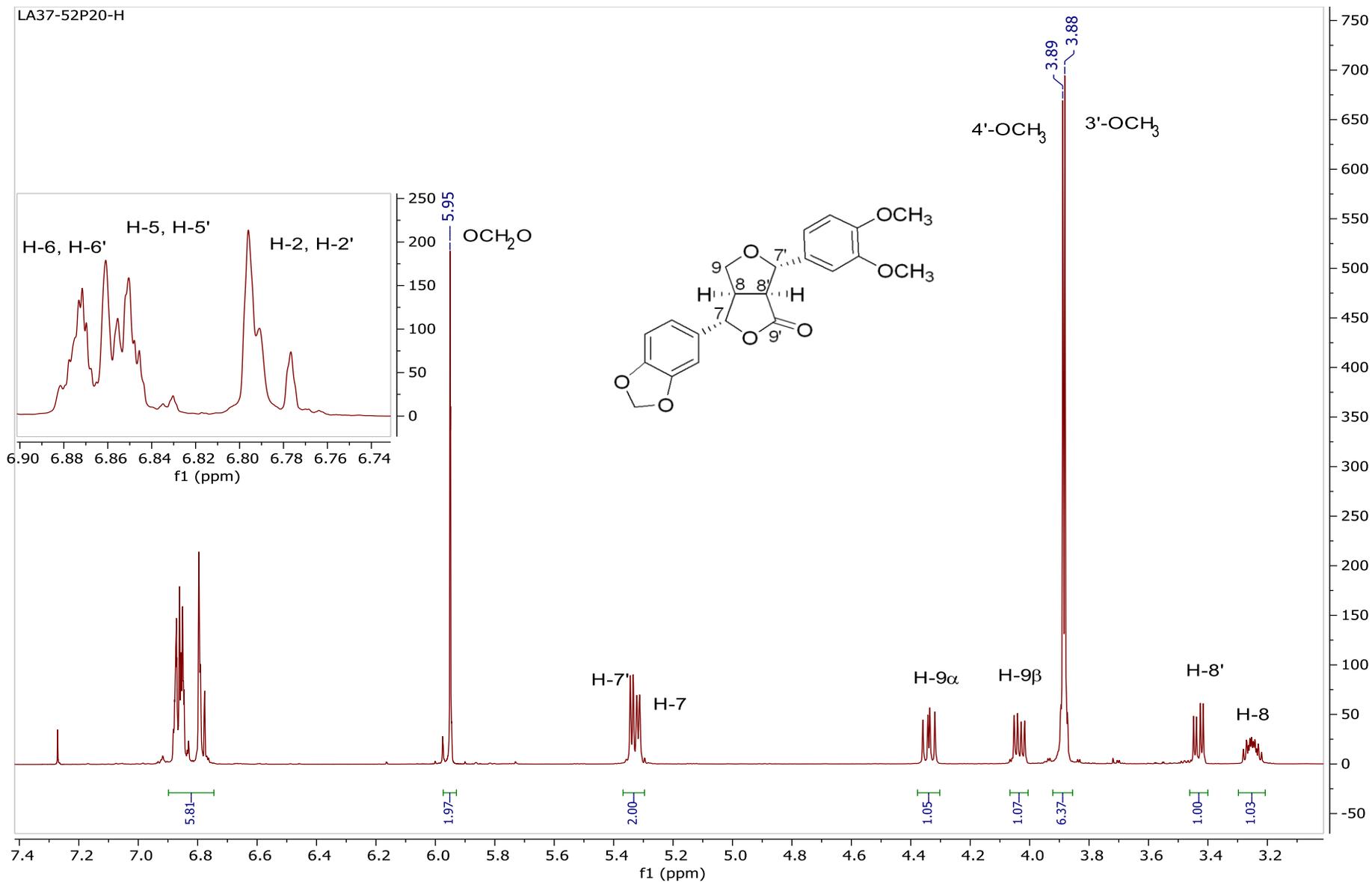
Espectro 25. HMBC (CDCl₃, 400 MHz) de ciquitin B (**36**)



Espectro 26. HMBC (CDCl₃, 400 MHz) de ciquitin B (**36**)

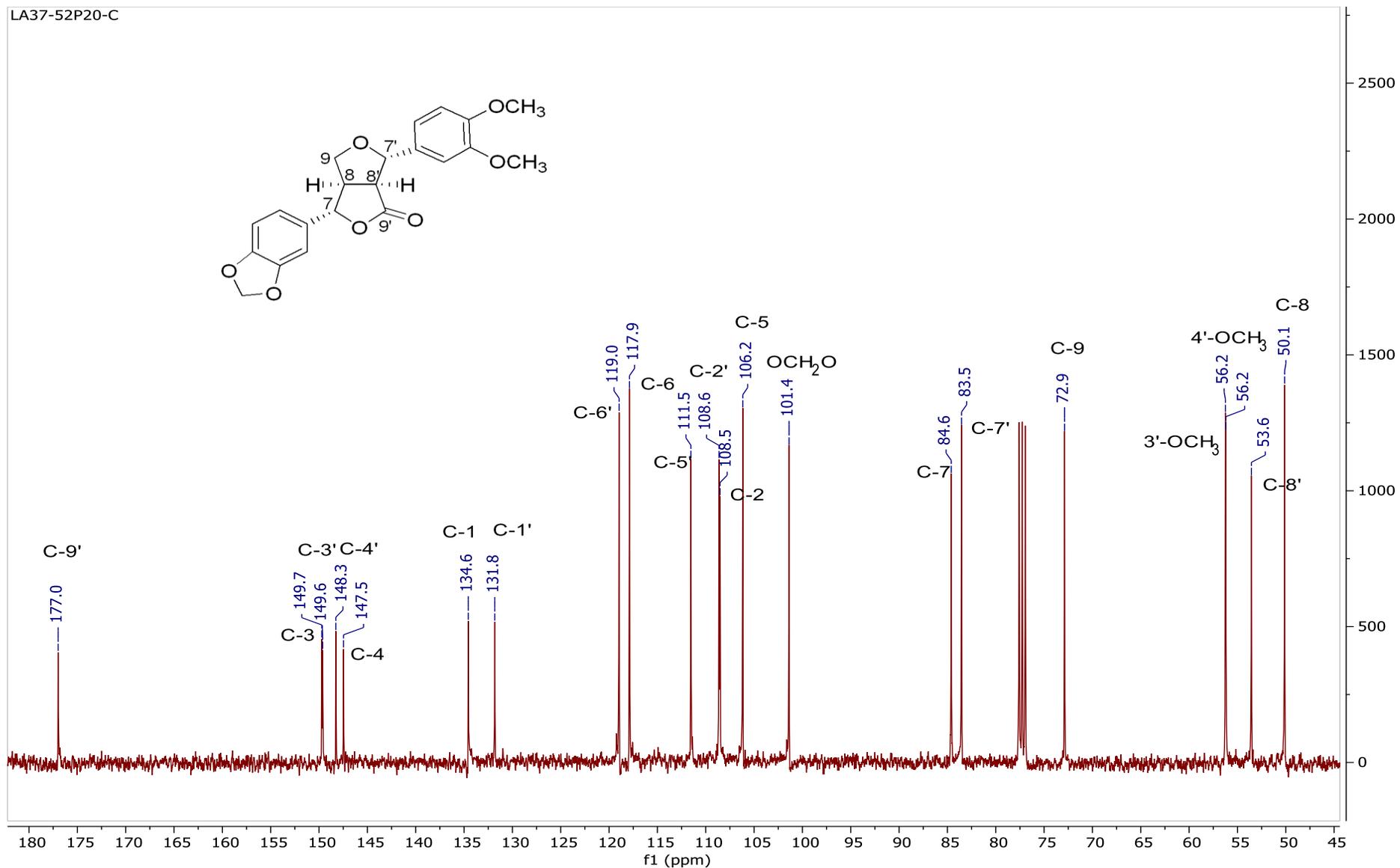
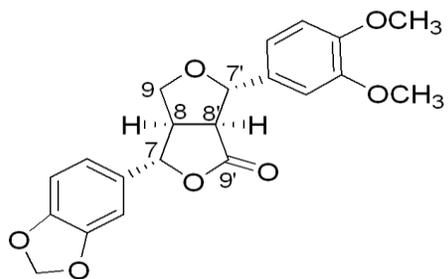


Espectro 27. HMBC (CDCl₃, 400 MHz) de ciquitin B (36)

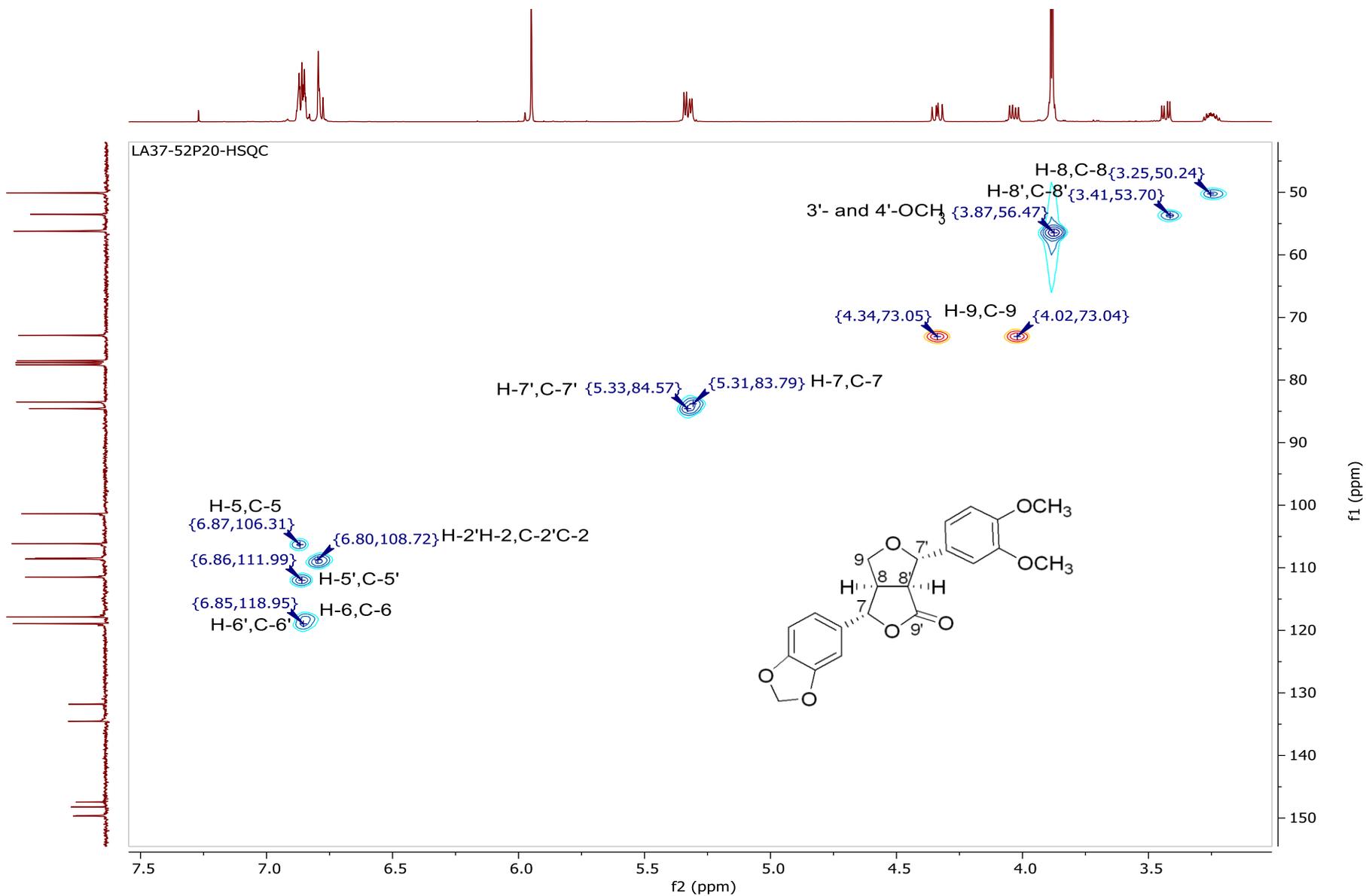


Espectro 28 ^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz) de ciquitin C (37)

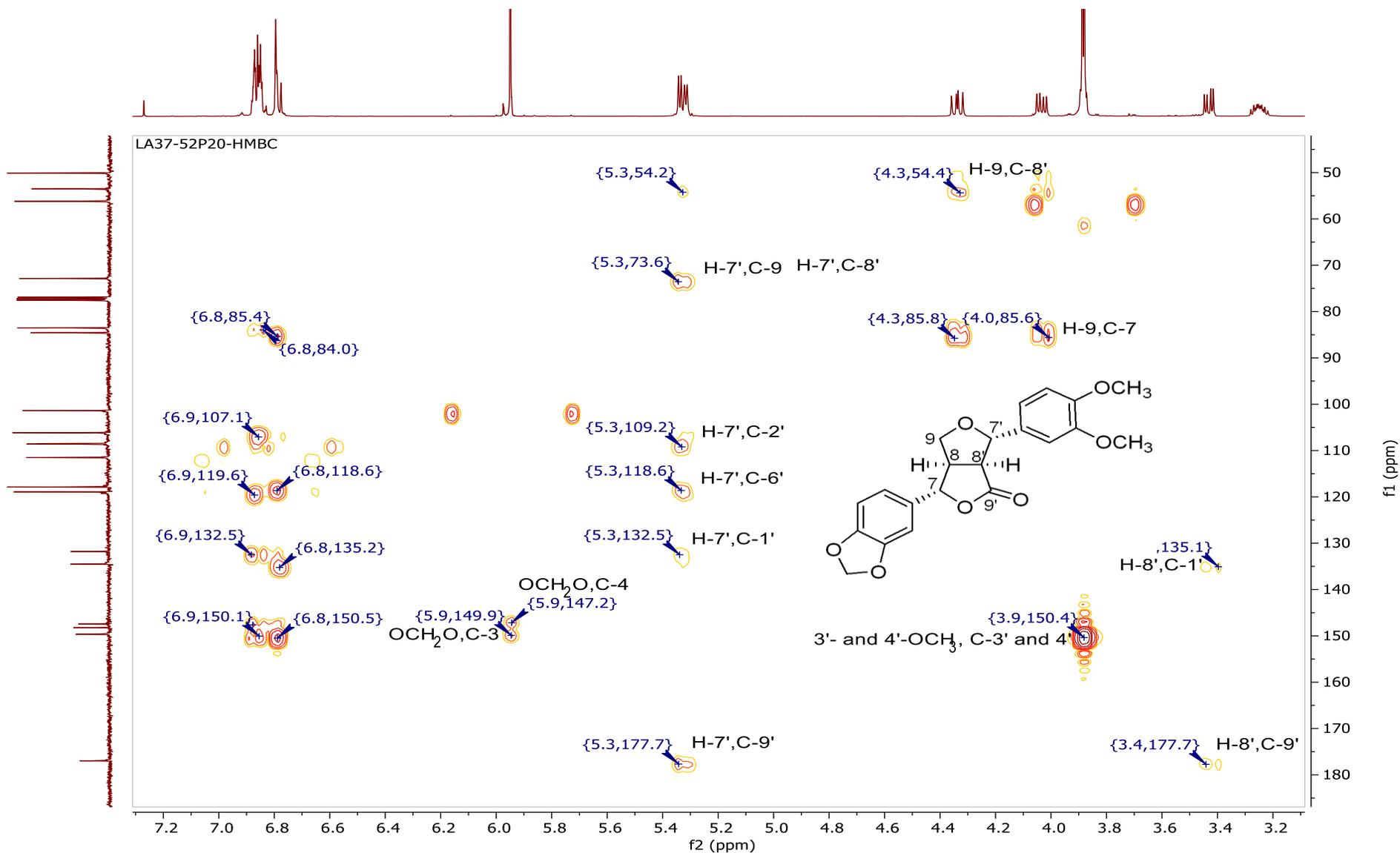
LA37-52P20-C



Espectro 29. ¹³CRMN (CDCl₃, 400 MHz) de ciquitin C (37)



Espectro 30 HSQC (CDCl₃, 400 MHz) de ciquitin C (37)



Espectro 31. HMBC (CDCl₃, 400 MHz) de ciquitin C (36)