



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN
CIENCIAS QUÍMICAS**

TEMA DE TESIS

REACTIVIDAD QUÍMICA DE LOS PRODUCTOS NATURALES BIOACTIVOS
TOQUINÓLIDA B Y DILIGUSTÍLIDA. DETERMINACIÓN DE LA
CONFIGURACIÓN ABSOLUTA DE ALGUNOS DERIVADOS

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA

Q.F.B. MARTHA ALEJANDRA LEÓN CABRERA



TUTOR: Dr. Guillermo Delgado Lamas

AÑO: 2011

JURADO

Presidente:	Dr. Eusebio Juaristi Cosío
Vocal:	Dr. Ricardo Reyes Chilpa
Vocal:	Dr. José Alfredo Vázquez Martínez
Vocal:	Dr. José Guillermo Penieres Carrillo
Secretario:	Dr. José Gustavo Ávila Zárraga

Esta tesis fue realizada en el laboratorio 1, edificio C, del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Guillermo Delgado Lamas.

Sustentante:

Tutor:

Q. F. B. Martha Alejandra León Cabrera

Dr. Guillermo Delgado Lamas

AGRADECIMIENTOS

- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. becario 181999) y al proyecto ALFA (AML/B7-311/97/0666/II-0375-FA) por el apoyo financiero otorgado.
- A la Coordinación de Estudios de Posgrado y al Posgrado en Ciencias Químicas.
- Al Dr. Guillermo Delgado Lamas por la confianza brindada, la invaluable y acertada asesoría y por permitirme formar parte de su grupo de trabajo.
- A los miembros del Comité Tutelar: Dra. María Yolanda Ríos Gómez y Dr. José Gustavo Ávila Zárraga por sus sugerencias, comentarios y consejos durante el desarrollo de la tesis.
- Al Dr. Olov Sterner por su apoyo y asesoría durante la estancia de investigación realizada en la Universidad de Lund, Suecia.
- Al Dr. Juan Antonio Cogordán por su valiosa ayuda en los análisis teóricos de la tesis.
- A la Dra. María Isabel Chávez Uribe por su amistad, apoyo y sugerencias.
- A la Dra. Beatriz Quiroz García, a la M. en C. Blanca Reyes y al M. en C. Arturo Cano por su amistad, apoyo, consejos y sugerencias brindadas durante el desarrollo de la tesis.
- A los miembros del Jurado: Dr. Eusebio Juaristi Cosío, Dr. Ricardo Reyes Chilpa, Dr. José Alfredo Vázquez, Dr. José Guillermo Penieres Carrillo y Dr. Gustavo Ávila Zárraga por las correcciones y comentarios de la tesis.
- Al personal técnico académico del Instituto de Química.
- A todos y cada uno de mis amigos y compañeros del laboratorio 1C y de Lund, Suecia, por haberme enseñado cada día algo nuevo.

*A mis padres José León y Martha Cabrera
con todo mi amor*

ÍNDICE

Abstract.....	16
1. Resumen.....	17
2. Introducción.....	18
3. Antecedentes.....	20
4. Justificación.....	41
Objetivos generales.....	41
Objetivos específicos.....	41
5. Discusión de resultados.....	43
5.1. Análisis por RMN ¹ H de los extractos de las raíces de <i>Ligusticum porteri</i>	43
5.2. Actividad sedante y espasmolítica de las ftálicas y algunos de sus derivados.....	52
5.3. Reactividad química de las ftálicas.....	56
5.3.1. Reacción de dimerización de <i>Z</i> -ligustílida (1).....	56
5.3.2. Reactividad química de <i>rac</i> -toquinólida B (<i>rac</i> - 3).....	57
5.3.3. Derivatización estereoselectiva de <i>rac</i> -toquinólida B (<i>rac</i> - 3).....	63
5.3.4. Reactividad química de <i>rac</i> -diligustílida (<i>rac</i> - 4).....	76
6. Sección experimental.....	83
7. Conclusiones.....	112
8. Referencias.....	113

9. Anexo.....	117
---------------	-----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Constituyentes químicos de <i>L. porteri</i>	19
Figura 2. Complejación de los iones carboxilato y enolato con el catión Na ⁺ en la formación de <i>rac</i> -ciclotoquinólida B (<i>rac</i> - 37).....	33
Figura 3. Algunas ftálicas naturales con actividad biológica.....	35
Figura 4. Algunos constituyentes químicos de <i>L. porteri</i>	44
Figura 5. Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃ , δ 8.00 – 0.00) completo de las raíces frescas de <i>L. porteri</i>	45
Figura 6. Espectros de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) de los extractos de acetona de las raíces frescas y de las raíces secas. Espectros de RMN ¹ H (500 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) de los extractos de raíces frescas y de las raíces secas.....	46
Figura 7. Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) de los extractos de acetona de las raíces frescas a 48 h, 72 h y 96 h de secado.....	47
Figura 8. Espectro DOSY del extracto de acetona de las raíces secas de <i>L. porteri</i>	48
Figura 9. Cortes del espectro DOSY con diferentes coeficientes de difusión.....	49
Figura 10. Curvas de calibración de <i>rac</i> - 3 , <i>rac</i> - 4 y <i>rac</i> - 5	50
Figura 11. Constituyentes químicos y algunos derivados semisintéticos de <i>L. porteri</i>	53
Figura 12. Vista ORTEP de difracción de rayos X de <i>rac</i> -4,5-deshidrotoquinólida B (64).....	54
Figura 13. Vista ORTEP de difracción de rayos X de la estructura <i>rac</i> - 65	59
Figura 14. Representación de las energías totales de <i>rac</i> - 37 , <i>rac</i> - 39 y <i>rac</i> - 65	61

Figura 15. Curvas pseudo-enantioméricas de dicroísmo circular de los compuestos diastereoméricos (-)- 67 y (+)- 68 obtenidos a partir de <i>rac-3</i> con (<i>R</i>)-(+)- α -metilbencilamina.....	68
Figura 16. Determinación de la quiralidad de (-)- 67	68
Figura 17. Determinación de la quiralidad de (+)- 68	69
Figura 18. Curvas pseudo-enantioméricas de dicroísmo circular de los derivados diastereoméricos (+)- 67 y (-)- 68 de <i>rac-3</i> con (<i>S</i>)-(-)- α -metilbencilamina.....	69
Figura 19a. Comparación entre las curvas de DC experimental (<i>a.</i> línea negra \times) y teórica (<i>b.</i> línea azul \diamond) de (+)- 67	71
Figura 19b. Comparación entre las curvas de DC experimental (<i>a.</i> línea negra \times) y teórica (<i>b.</i> línea azul \diamond) de (-)- 68	71
Figura 20. Interacciones NOE relevantes de 71	75
Figura 21. Curvas de dicroísmo circular de los derivados (-)- 71 y (+)- 72 obtenidos de <i>rac</i> -diligustílida (<i>rac-4</i>) con (<i>R</i>)-(+)- α -MBA.....	79
Figura 22. Determinación de la quiralidad de (-)- 71	79
Figura 23. Determinación de la quiralidad de (+)- 72	80
Figura 24. Curvas de dicroísmo circular de los derivados (+)- 73 y (-)- 74 obtenidos de <i>rac</i> -diligustílida (<i>rac-4</i>) con (<i>S</i>)-(-)- α -MBA.....	80

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Formación del dímero lineal 13	21
Esquema 2. Formación del dímero lineal 14	22
Esquema 3. Formación del dímero lineal 15	22
Esquema 4. Formación del dímero lineal 16	23
Esquema 5. Fotociclodimerización de <i>Z</i> -ligustílida (1).....	24

Esquema 6. Hidrogenación catalítica de <i>rac</i> -diligustílida (4).....	24
Esquema 7. Obtención de <i>rac</i> - 22 y <i>rac</i> - 28 a partir de <i>rac</i> - 4	26
Esquema 8. Condensaciones intramoleculares de <i>rac</i> - 4	27
Esquema 9. Tratamiento básico de <i>rac</i> - 4	28
Esquema 10. Derivados de condensaciones intramoleculares de <i>rac</i> -diligustílida (<i>rac</i> - 4).....	30
Esquema 11. Obtención de <i>rel</i> -(7'aS)-7',7'a-dihidrotoquinólida B (36).....	31
Esquema 12. Condensación intramolecular de <i>rac</i> -toquinólida B (<i>rac</i> - 3).....	31
Esquema 13. Mecanismo de formación de <i>rac</i> -ciclotoquinólida B (<i>rac</i> - 37).....	31
Esquema 14. Metilación de <i>rac</i> - 37	32
Esquema 15. Hidrólisis de <i>rac</i> -toquinólida B (<i>rac</i> - 3).....	32
Esquema 16. Preparación del <i>rac</i> -cetoéster de toquinólida B (<i>rac</i> - 40).....	32
Esquema 17. Reducción del <i>rac</i> -cetoácido de toquinólida B (<i>rac</i> - 39).....	33
Esquema 18. Reacción de obtención de <i>rac</i> -4,5-deshidrotoquinólida B (64).....	53
Esquema 19. Reacción Diels-Alder para la formación de las ftálidas diméricas <i>rac</i> - 3 y <i>rac</i> - 4	56
Esquema 20. Ensayo para obtención de sales diastereoméricas a partir de <i>rac</i> - 39	58
Esquema 21. Reacción para la obtención de <i>rac</i> - 65	58
Esquema 22. Formación de <i>rac</i> -ciclotoquinólida B (<i>rac</i> - 37).....	59
Esquema 23. Rutas mecanísticas sugeridas para la formación de <i>rac</i> - 3 , <i>rac</i> - 37 y <i>rac</i> - 65 a partir de <i>rac</i> - 39	60
Esquema 24. Reacción de <i>rac</i> - 39 con bencilamina para la formación de <i>rac</i> - 66	62

Esquema 25. Transformación enzimática de <i>rac-3</i>	64
Esquema 26. Relaciones estereoquímicas para los posibles derivados obtenidos a partir de <i>rac-3</i>	65
Esquema 27. Mecanismo sugerido para la formación de los compuestos estereoisoméricos (-)- 67 y (+)- 68	66
Esquema 28. Reacciones enantioselectivas de <i>rac</i> -toquinólida B (<i>rac-3</i>).....	70
Esquema 29. Reacción de derivatización de (+)- 67 y (-)- 68	74
Esquema 30. Mecanismo de formación de 69	75
Esquema 31. Hidrólisis de <i>rac</i> -diligustílida (<i>rac-4</i>) y derivatización con (<i>S</i>)-(-)- α -MBA.....	76
Esquema 32. Relaciones estereoquímicas de los posibles productos de reacción de <i>rac</i> -diligustílida (<i>rac-4</i>).....	77
Esquema 33. Mecanismo de formación propuesto para los derivados enantioméricos obtenidos a partir de <i>rac</i> -diligustílida (4).....	78
Esquema 35. Reacciones enantioselectivas de <i>rac</i> -diligustílida (4).....	81

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Resumen de las actividades biológicas de algunas ftálicas de origen natural.....	34
Tabla 2. Actividad antiproliferativa de diferentes ftálicas en cultivos celulares de músculo liso de aorta de ratón.....	38
Tabla 3. Resultados de la actividad anti-proliferativa de las ftálicas en relación con su estructura..	39
Tabla 4. Recobro de las ftálicas diméricas (%) después de la adición de cantidades conocidas de los compuestos auténticos.....	51
Tabla 5. Cuantificación de algunos constituyentes del extracto de acetona de <i>L. porteri</i> por RMN ^1H	51

Tabla 6. Efecto producido por 50 mg/Kg <i>i.p.</i> de pentobarbital de sodio en ratones pre-tratados con 50 mg/Kg de cada sustancia pura.....	55
Tabla 7. Inhibición del efecto producido por diferentes compuestos (50 µg/mL) y papaverina (10 µg/mL) sobre contracciones eléctricamente inducidas en íleo de cobayo <i>in vitro</i>	56
Tabla 8. Condiciones de reacción para la formación de las ftálicas diméricas <i>rac-3</i> y <i>rac-4</i>	57
Tabla 9. CI ₅₀ (µM) de <i>rac-3</i> , <i>rac-39</i> , <i>rac-37</i> y <i>rac-67</i>	61
Tabla 10: Energías totales de HOMO, LUMO y afinidad electrónica.....	62
Tabla 11. Evaluación de la CI ₅₀ (µM) del producto natural <i>rac-3</i> y derivados de <i>L. porteri</i>	72
Tabla 12. Condiciones de hidrólisis ensayadas con los derivados estereoisoméricos (-)- 67 , (+)- 67 , (+)- 68 o (-)- 68	73
Tabla 13. Evaluación de la CI ₅₀ (µM) de <i>rac-3</i> , 69 y 70	76
Tabla 14. Evaluación de la CI ₅₀ (µM) de los derivados de <i>rac</i> -diligustólida (4).....	81
Tabla 15. Condiciones experimentales para la obtención de <i>rac-64</i>	91
Tabla 16. Condiciones de reacción para la formación de las ftálicas diméricas <i>rac-3</i> y <i>rac-4</i>	95
 DIAGRAMAS	
Diagrama 1. Fraccionamiento primario y purificación de las ftálicas monoméricas y diméricas de <i>L. porteri</i>	84
 FOTOGRAFÍAS	
Fotografía 1. <i>Ligusticum porteri</i> Coult. & Rose.....	13
 ESPECTROS	
Espectro 1. RMN ¹ H (CDCl ₃ , 500 MHz) de <i>Z</i> -ligustólida (1).....	118
Espectro 2. RMN ¹ H (CDCl ₃ , 500 MHz) de <i>rac</i> -toquinólida B (3).....	119

Espectro 3. RMN ¹ H (CDCl ₃ , 500 MHz) de <i>rac</i> -diligustílida (4).....	120
Espectro 4. RMN ¹ H (CDCl ₃ , 500 MHz) de <i>rac</i> -riligustílida (5).....	121
Espectro 5. RMN ¹ H (CDCl ₃ , 300MHz) del <i>rac</i> -cetoácido de toquinólida B (39).....	122
Espectro 6. IR (CHCl ₃) del cetal <i>rac</i> - 65	123
Espectro 7. RMN ¹ H (CDCl ₃ , 500 MHz) del cetal <i>rac</i> - 65	124
Espectro 8. RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 125 MHz) del cetal <i>rac</i> - 65	125
Espectro 9. RMN ¹ H (CDCl ₃ , 500 MHz) de <i>rac</i> -ciclotoquinólida B (37).....	126
Espectro 10. IR (CHCl ₃) de <i>rac</i> - 66	127
Espectro 11. RMN ¹ H (CDCl ₃ , 500 MHz) de <i>rac</i> - 66	128
Espectro 12. RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 125 MHz) de <i>rac</i> - 66	129
Espectro 13. IR (CHCl ₃) de (-)- 67	131
Espectro 14. RMN ¹ H (CDCl ₃ , 500 MHz) de (-)- 67	132
Espectro 15. RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 125 MHz) de (-)- 67	133
Espectro 16. IR(CHCl ₃) de (+)- 68	134
Espectro 17. RMN ¹ H (CDCl ₃ , 500 MHz) de (+)- 68	135
Espectro 18. RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 125 MHz) de (+)- 68	136
Espectro 19. IR (CHCl ₃) de (+)- 67	138
Espectro 20. RMN ¹ H (CDCl ₃ , 500 MHz) de (+)- 67	139
Espectro 21. RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 125 MHz) de (+)- 67	140
Espectro 22. IR (CHCl ₃) de (-)- 68	141
Espectro 23. RMN ¹ H (CDCl ₃ , 500 MHz) de (-)- 68	142
Espectro 24. RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 125 MHz) de (-)- 68	143
Espectro 25. RMN ¹ H (CDCl ₃ , 500 MHz) de 69	144
Espectro 26. RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 125 MHz) de 69	145
Espectro 27. RMN ¹ H (CDCl ₃ , 500 MHz) de 70	146
Espectro 28. RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 125 MHz) de 70	147
Espectro 29. IR (CHCl ₃) de (-)- 71	148
Espectro 30. RMN ¹ H (CDCl ₃ , 500 MHz) de (-)- 71	149
Espectro 31. RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 125 MHz) de (-)- 71	150
Espectro 32. IR (CHCl ₃) de (+)- 72	151
Espectro 33. RMN ¹ H (CDCl ₃ , 500 MHz) de (+)- 72	152
Espectro 34. RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 125 MHz) de (+)- 72	153
Espectro 35. IR (CH ₃ Cl) de (+)- 71	154

Espectro 36. RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) de (+)- 71	155
Espectro 37. RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz,) de (+)- 71	156



Fotografía 1. *Ligusticum porteri* Coult. & Rose. - Apiaceae

LISTA DE ABREVIATURAS

AcOEt	Acetato de etilo
<i>a</i>	Amplitud
°C	Grado Celsius
CCPR	Cromatografía en Columna a Presión Reducida
CCDP	Cromatografía de Capa Delgada Preparativa
CLAR	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución
CL-EM	Cromatografía de Líquidos Acoplada a Espectrometría de Masas
CPP	Cromatografía de Placa Preparativa
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
CI ₅₀	Concentración Inhibitoria Media
COSY	Espectroscopia de Correlación (Correlation Spectroscopy)
d	Doblete
dd	Doblete de dobletes
ddd	Doblete de doblete de dobletes
dt	Doblete de tripletes
δ	Desplazamiento químico
DC	Dicroísmo Circular
DCE	Dicroísmo Circular Electrónico
DE ₅₀	Dosis Efectiva Media
DEPT	Aumento sin Distorsión por Transferencia de Polarización (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer)
DOSY	Espectroscopia de Difusión Ordenada (Diffusion Orderer Spectroscopy)
EM	Espectrometría de Masas
EMAR	Espectrometría de Masas de Alta Resolución
EMIE	Espectrometría de Masas de Impacto Electrónico
eV	Electronvolts
FAB	Bombardeo Rápido de Átomos (Fast Atom Bombardment)
g	Gramo
GABA	Ácido γ-aminobutírico
HMBC	Correlación Heteronuclear de Múltiples Enlaces (Heteronuclear Multiple Bond Correlation)

HSQC	Correlación Heteronuclear Cuántica Sencilla (Heteronuclear Single Quantum Correlation)
Hz	Hertz
IE	Impacto Electrónico
IR	Espectroscopia de Infrarrojo
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
λ	Longitud de onda (cm ⁻¹)
L	Litro
M ⁺	Ion Molecular
m	Multiplete
MBA	Metilbencilamina (Methylbenzylamine)
mL	Mililitro
μ M	Micromolar
<i>m/z</i>	Relación masa/carga
MeOH	Metanol
MHz	Megahertz
nm	Nanómetro
NOESY	Espectroscopia de Efecto Nuclear Overhauser (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy)
Pf	Punto de fusión
ppm	Partes por millón
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RMN ¹ H	Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno
RMN ¹³ C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13
RO	Rotación óptica
$[\alpha]_D^t$	Rotación Específica
s	Singulete
TMS	Tetrametilsilano
UV	Espectrofotometría de Ultravioleta

ABSTRACT

The rhizomes of *L. porteri* have been used traditionally by the Raramuri communities in preparations for alluviate colds and gastrintestinal disorders, and infusions of this material have been used in ritual curing ceremonies.^[1,2] The chemical study of the organic extracts of this vegetal species has established the presence of the substances **1–12**,^[3] from which, the dimeric phthalides *rac*-tokinolide B (*rac*-**3**), *rac*-diligustilide (*rac*-**4**) and *rac*-riligustilide (*rac*-**5**) are derived from two structural families as [$\pi 4s + \pi 2s$] and [$\pi 2s + \pi 2s$] cycloadducts from **1**,^[7,8] and have shown several biological activities.^[9,10] In this work, we report the results from the verification of the existence of *rac*-**3**–*rac*-**5** as natural products (and not as post-harvest products) and its quantification in acetone extracts by ¹H NMR. Additionally, some derivatives from *rac*-**3** and *rac*-**4** which were obtained and evaluated as sedative agentes (*rac*-**25**–*rac*-**27**, *rac*-**41**) and as smooth muscle relaxants (*rac*-**26**). Reaction conditions were found to produce selectively *rac*-**37** and *rac*-**67** from *rac*-**39** and the relative energies from each one were determined. The reaction of *rac*-**3** with (*R*)-(+)- α -MBA yielded (–)-**73** + (+)-**74**, while with (*S*)-(–)- α -MBA produced (+)-**73** + (–)-**74**. Treatment of *rac*-**4** with (*R*)-(+)- α -MBA afforded (–)-**77** + (+)-**78** and reaction with (*S*)-(–)- α -MBA yielded (+)-**77** + (–)-**78**. The absolute configurations of each enantiomer were determined by means of the analysis of their experimental circular dichroism curves and in some cases were confirmed by theoretical methods. Natural products (*rac*-**3**–*rac*-**5**), racemic derivatives (*rac*-**25**, *rac*-**26**, *rac*-**37**, and *rac*-**39**) and enantiopure derivatives ((–)-**73**, (+)-**74**, (+)-**73**, (–)-**74**, **75**, **76**, (–)-**77**, (+)-**78**, (+)-**77** y (–)-**78**) were evaluated as cytotoxic agents toward some human cancer cell lines.

1. RESUMEN

Los rizomas de *Ligusticum porteri* son utilizados tradicionalmente por los indígenas Rarámuri en preparaciones para el alivio de resfriados, padecimientos estomacales y las infusiones de este material son empleadas en rituales.^[1,2] El estudio químico de los extractos orgánicos del material vegetal ha establecido la presencia de las sustancias **1–12**,^[3] de las cuales, las ftálicas diméricas *rac*-toquinólida B (*rac*-**3**), *rac*-diligustílica (*rac*-**4**) y *rac*-riligustílica (*rac*-**5**) son derivadas de dos familias estructurales como cicloaductos [$\pi 2s + \pi 2s$] y [$\pi 4s + \pi 2s$] obtenidas a partir de **1**,^[7,8] y han mostrado diversa actividad biológica.^[9,10] En este trabajo se informan los resultados obtenidos de la verificación de la existencia de *rac*-**3–rac**-**5** como productos naturales (y no como productos post-cosecha) y su cuantificación en extractos por RMN ¹H. Adicionalmente, fueron obtenidos algunos derivados de *rac*-**3** y *rac*-**4**, mismos que se evaluaron como agentes sedantes (*rac*-**25–rac**-**27**, *rac*-**41**) y relajantes del músculo liso (*rac*-**26**). Se encontraron condiciones de reacción para producir selectivamente *rac*-**37** y *rac*-**67** a partir de *rac*-**39** y se determinaron las energías relativas de cada uno de ellos. La reacción de *rac*-**3** con (*R*)-(+)- α -MBA produjo (–)-**73** + (+)-**74**, mientras que la reacción con (*S*)-(–)- α -MBA generó (+)-**73** + (–)-**74**. El tratamiento de *rac*-**4** con (*R*)-(+)- α -MBA generó (–)-**77** + (+)-**78** y la reacción con (*S*)-(–)- α -MBA produjo (+)-**77** + (–)-**78**. Las configuraciones absolutas se determinaron por el análisis de las curvas de dicroísmo circular experimentales y en algunos casos se confirmaron por métodos teóricos. Los productos naturales (*rac*-**3–rac**-**5**), derivados racémicos (*rac*-**25**, *rac*-**26**, *rac*-**37** y *rac*-**39**) y enantiopuros ((–)-**73**, (+)-**74**, (+)-**73**, (–)-**74**, **75**, **76**, (–)-**77**, (+)-**78**, (+)-**77** y (–)-**78**) se evaluaron como agentes citotóxicos contra algunas líneas celulares cancerosas.

2. INTRODUCCIÓN

Las ftálicas y sus correspondientes dihidro, tetrahidro y dímeros análogos han sido encontrados como constituyentes de varios géneros de la familia Apiaceae. En particular, el estudio de *Ligusticum porteri* como fuente natural de este tipo de metabolitos secundarios ha mostrado relevancia, pues ha sido considerada como una alternativa en la medicina tradicional en el Noreste de nuestro país. Las raíces de esta planta son consumidas para aliviar dolores estomacales, cólicos, úlceras, diarreas y resfriados, asimismo, las infusiones de este vegetal son empleadas en rituales ceremoniales por los grupos indígenas Rarámuri (del Norte de nuestro país) y los Zuni (del Sur de Estados Unidos de América). En lo referente a las comunidades indígenas de los Tewa, también del Sur de los Estados Unidos de América, las raíces son altamente apreciadas para el tratamiento de la diarrea y otros desórdenes gastrointestinales.^[1,2] El estudio químico de los extractos orgánicos de este vegetal ha establecido la presencia de las sustancias **1–12**,^[3] entre las cuales, las ftálicas monoméricas como Z-ligustílida (**1**) y Z-butilidenftálica (**2**) han mostrado actividad biológica, como son agregación anti-plaquetaria, anti-trombosis, modulación de la función cardíaca y relajación del músculo liso^[4–6] entre algunas otras; mientras que las ftálicas diméricas como *rac*-toquinólida B (*rac*-**3**), *rac*-diligustílida (*rac*-**4**) y *rac*-riligustílida (*rac*-**5**), derivadas de dos familias estructurales como cicloaductos [$\pi 4s + \pi 2s$] y [$\pi 2s + \pi 2s$] obtenidas a partir de **1** y que además se encuentran como mezclas racémicas (Figura 1),^[7,8] han mostrado diversa actividad biológica,^[9,10] entre las que pueden destacarse la actividad del *rac*-dihidroderivado de diligustílida como activador del receptor de la progesterona y la actividad progestogénica de *rac*-riligustílida (*rac*-**5**)^[11] que también ha mostrado actividad de unión de 3H-diazepam a los receptores GABA.^[12]

Las ftálicas como un grupo de productos naturales no son únicamente interesantes por su amplio espectro de actividad biológica, sino también por su comportamiento químico. En el presente trabajo se presentan los resultados llevados a cabo del análisis detallado por RMN ¹H, de los extractos de raíces frescas y secas de *L. porteri* y por RMN DOSY, que permitieron establecer la presencia de los componentes individuales en los extractos de acetona, así como la verificación de la presencia de las ftálicas diméricas *rac*-**3**–*rac*-**5**. Por otro lado se implementó un protocolo para la cuantificación de algunos constituyentes químicos de la planta por RMN ¹H, mismo que se llevó a cabo con las áreas relativas de las integrales correspondientes a señales selectas de hidrógeno, con respecto a una cantidad conocida de un estándar interno, 4-dimetilaminopiridina, permitiendo determinar que las ftálicas diméricas *rac*-**3**–*rac*-**5** son productos naturales que se encuentran presentes en muestras de raíces frescas de *L. porteri*. Por otra parte, se muestran los resultados obtenidos de la reactividad

química de las ftálicas diméricas *rac*-toquinólida B (*rac*-**3**) y *rac*-diligustílica (*rac*-**4**) mediante la preparación de algunos derivados que pudieran ser evaluados como agentes sedantes, espasmolíticos y como agentes citotóxicos, contra algunas líneas celulares cancerosas.

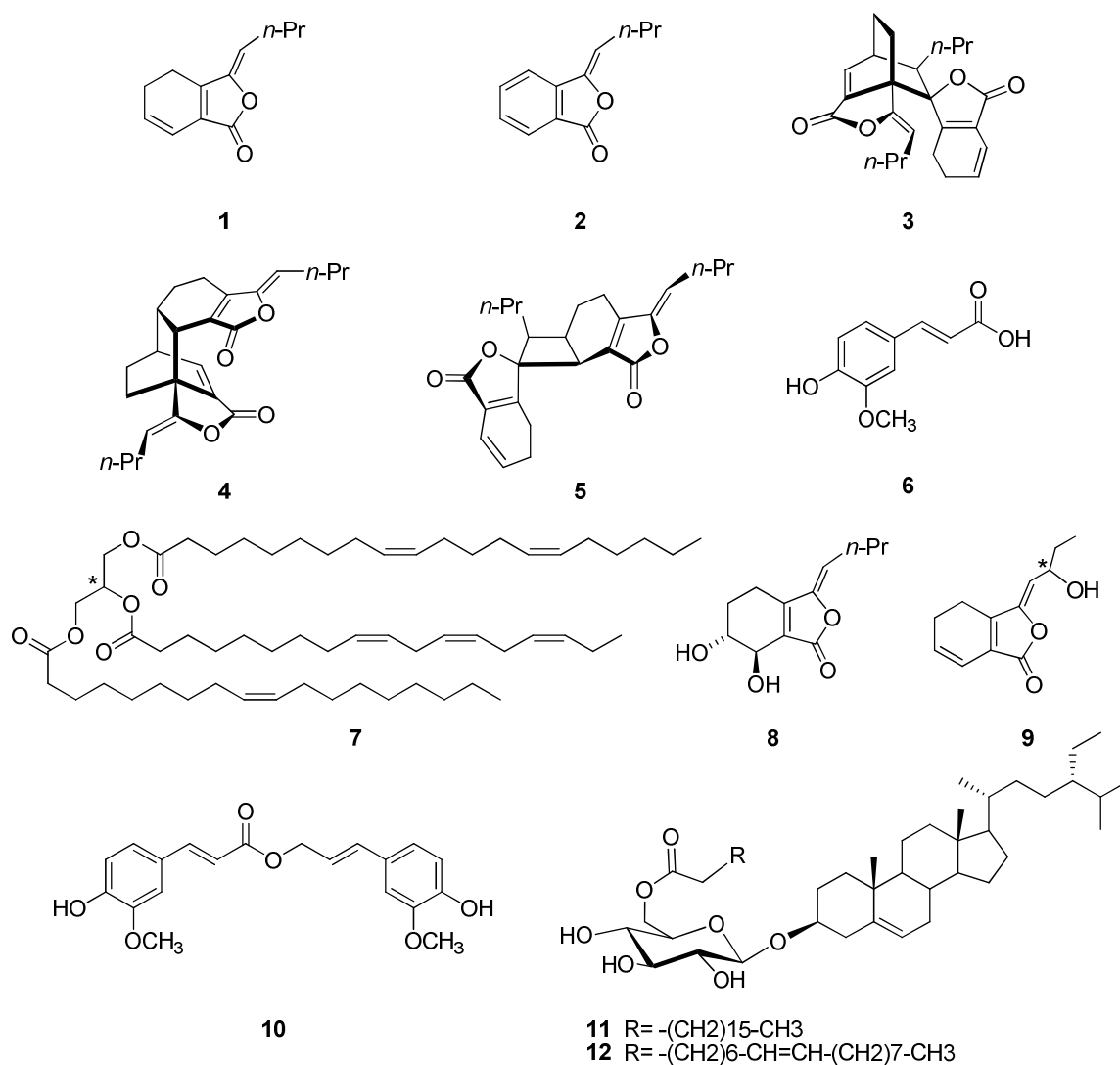


Figura 1. Constituyentes químicos de *L. porteri*

(*) La configuración del centro estereogénico indicado en la figura no se ha definido.

3. ANTECEDENTES

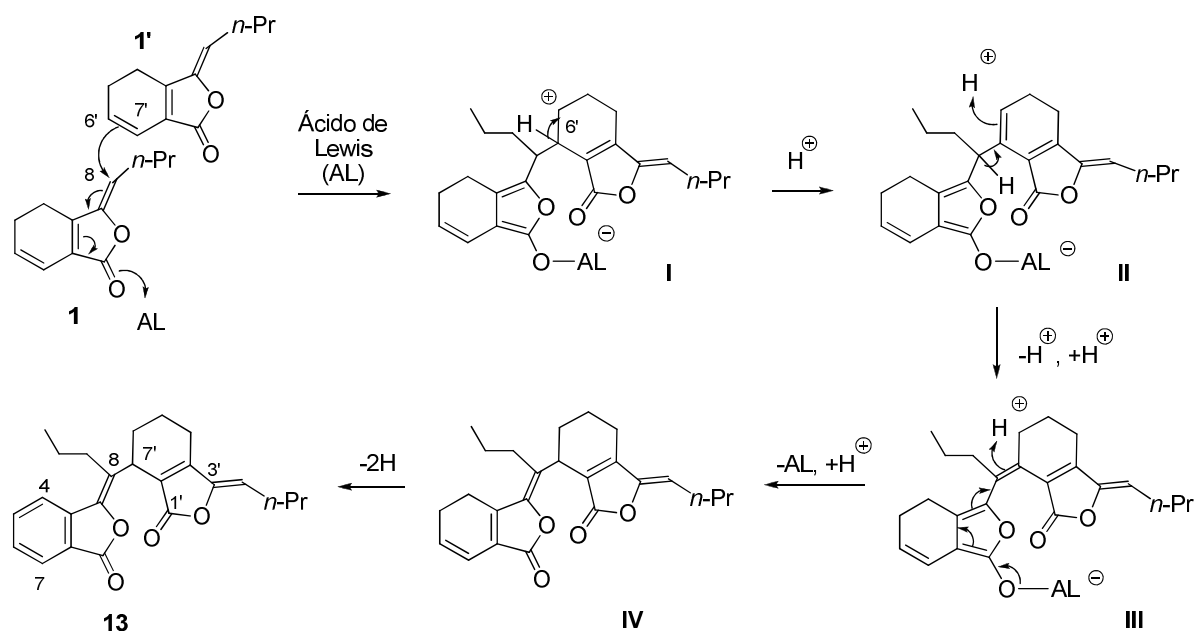
Las ftálicas monoméricas, diméricas y sus derivados análogos son un grupo de sustancias naturales que se encuentran principalmente en plantas de la familia Umbelliferae (Apiaceae) y que son derivadas biosintéticamente de precursores policétidos.^[13] Aunque existen pocos informes en la literatura que discuten específicamente la biosíntesis de las ftálicas, durante el período de 1960 se pensó que este proceso ocurría vía unión cabeza-cola de unidades de acetato.^[14] Resultados posteriores, sugirieron que las unidades de acetato fueron incorporadas dentro de ligustílica. No fue sino hasta finales de la década de los ochenta que los resultados obtenidos permitieron concluir que “las ftálicas alquílicas se biosintetizan a partir de precursores policétidos”.^[13] Esta afirmación se encuentra sustentada adicionalmente considerando que compuestos fenólicos, como el ácido ferúlico han sido aislados conjuntamente con las ftálicas.

Por otro lado, ciertas ftálicas de estructuras relativamente simples, han sido sintetizadas. A pesar de que algunas ftálicas se encuentran como moléculas aquirales, la presencia de lactonas $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -insaturadas, alqueno conjugado y fragmentos 1,3 dieno de las dihidro ftálicas proporciona múltiples sitios reactivos y quizás esto explique la diversa actividad biológica atribuida principalmente a Z-ligustílica (**1**).^[10]

La formación de ftálicas diméricas ha sido estudiada ampliamente, se ha observado que Z-ligustílica (**1**) en la mayoría de los casos es el precursor biogénico de este tipo de compuestos derivados de cicloadiciones [$\pi 4s + \pi 2s$] y [$\pi 2s + \pi 2s$]. Algunos ciclodímeros como *rac*-toquinólida B (*rac*-**3**) y *rac*-diligustílica (*rac*-**4**) han sido obtenidos mediante síntesis por relevo a partir de **1**.^[15,16] Wakamatsu y colaboradores han descrito la obtención de *rac*-tokinólida B (*rac*-**3**) y levistólida A (*rac*-diligustílica (*rac*-**4**)) en tubo sellado en presencia y ausencia de benceno, a diferentes lapsos de tiempo y temperatura, condiciones que han permitido la obtención de bajos rendimientos de los productos deseados y en algunos casos, la ausencia de los mismos. Se ha mencionado que la adición de ácidos de Lewis no contribuye a la formación de los dímeros.^[16]

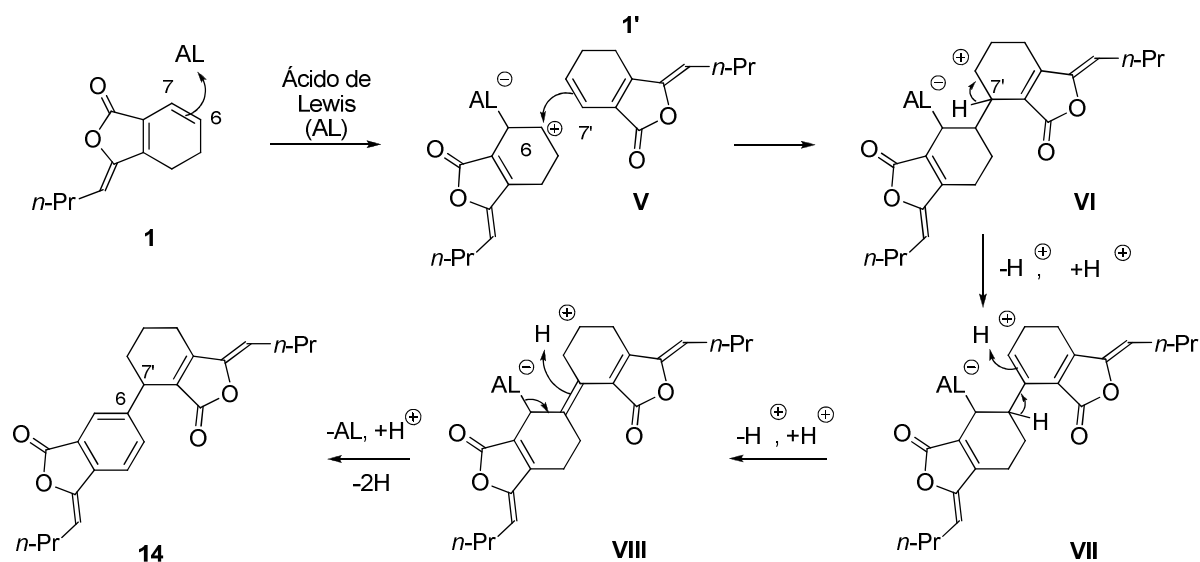
Las reacciones de Z-ligustílica (**1**) catalizadas por ácidos de Lewis,^[17] como es el caso de LiClO_4 en THF y Et_2AlCl_2 en CH_2Cl_2 producen mezclas de **1** y Z-butilidenftálica (**2**), sin embargo, al utilizarse Et_2OBF_3 se ha observado la obtención de la mezcla constituida por **2** y los dímeros lineales **13–16** (Esquemas 1–4). El mecanismo del producto mayoritario **13** se explica mediante la secuencia de reacciones mostrada en el Esquema 1, en el cual existe una complejación del ácido de Lewis con el grupo carbonilo de **1** promoviendo así, la regiodiferenciación de la adición nucleofílica del doble

enlace C-6'/C-7' de una segunda unidad de Z-ligustílida (**1**) al C-8 para generar un catión en C-6' (intermediario **I**, en Esquema 1), posteriormente isomerizaciones *via* serie de desplazamientos de protón (**I** → **II** → **III** → **IV**), seguido de deshidrogenación produce **13**.



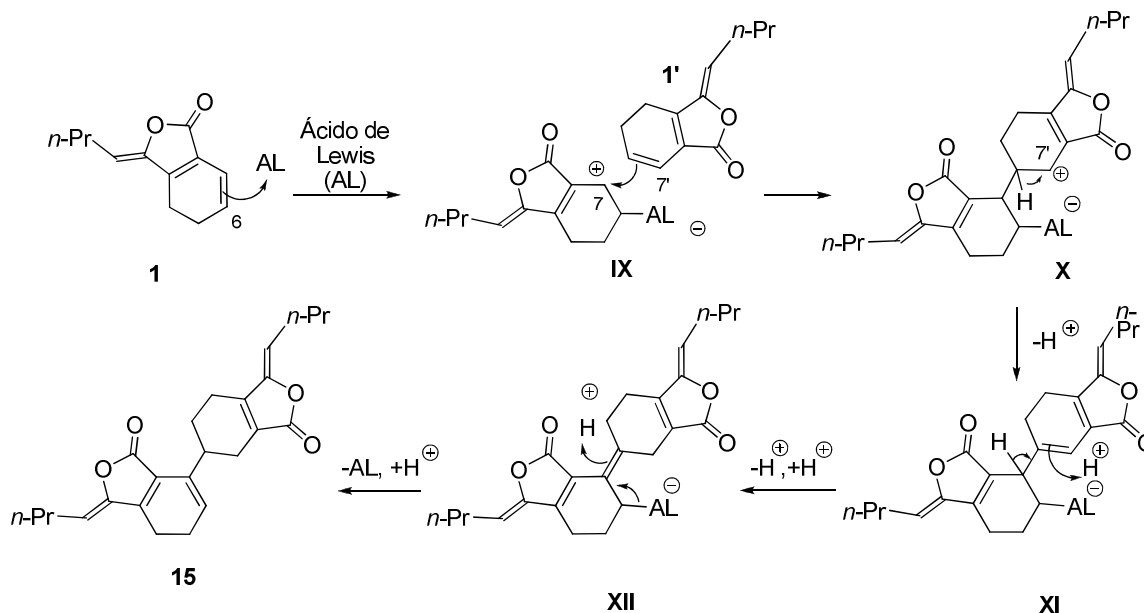
Esquema 1. Formación del dímero lineal **13**

En cuanto a la formación de **14**, isómero de **13**, se explica como se muestra en el Esquema 2. La complejación del ácido de Lewis al doble enlace C-6/C-7 de Z-ligustílida (**1**) produce un catión en C-6 (intermediario **V**, Esquema 2), promoviendo así la adición del doble enlace C-6'/C-7' de la segunda unidad monomérica, dando lugar al catión en posición C-6 (intermediario **VI**). El catión es estabilizado por la eliminación de hidrógeno (intermediario **VII**) y la isomerización indicada (**VII** → **VIII**), seguida por aromatización, produce 4,5-dideshidro-6',7'-dihidro, Z,Z'-6.7'-diligustílida (**14**).^[17]



Esquema 2. Formación del dímero lineal **14**

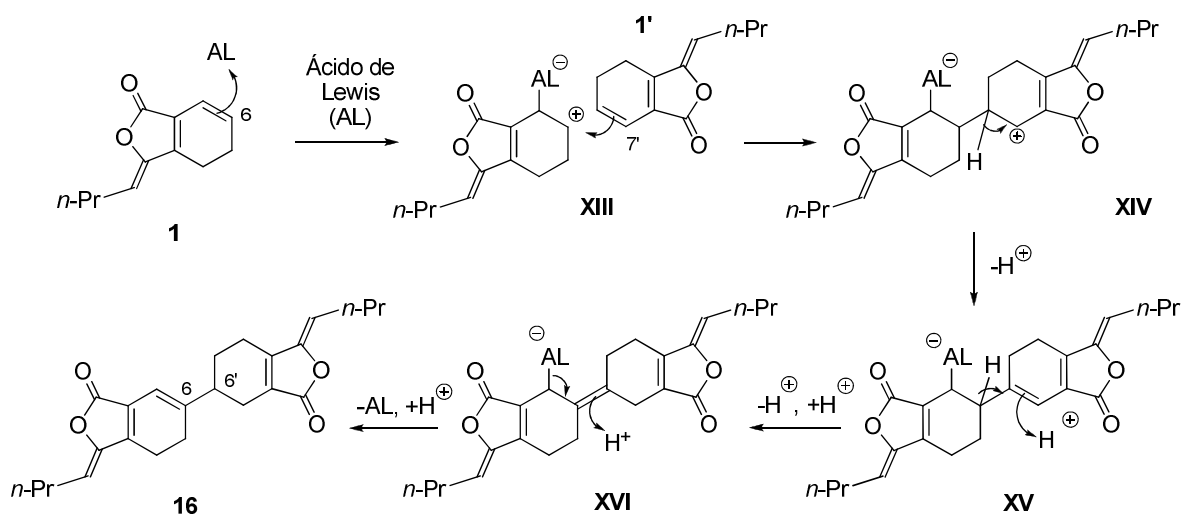
La complejación del ácido de Lewis con el doble enlace C-6/C-7 de Z-ligustílida (**1**), forma un catión en C-7 (intermediario **IX**, Esquema 3). Por otro lado, la olefina C-6'/C-7' de otra unidad de **1** produce un catión en C-7' (intermediario **X**), el cual es estabilizado por la secuencia **X** → **XI** → **XII** como se muestra en el Esquema 3, generando 6',7'-dihidro-7.6'-Z,Z'-diligustílida (**15**).



Esquema 3. Formación del dímero lineal **15**

El catión formado en C-6 (intermediario **XIII**, Esquema 4) promovido por el ácido de Lewis y seguido por la adición del doble enlace C-6'/C-7' a una segunda unidad de Z-ligustílida (**1**) produce

un catión en C-7' (intermediario **XIV**), el cual es estabilizado por la pérdida de un protón (intermediario **XV**). Subsecuentes estabilizaciones generan 6',7'-dihidro-Z,Z'-6.6'-diligustíflida (**16**).

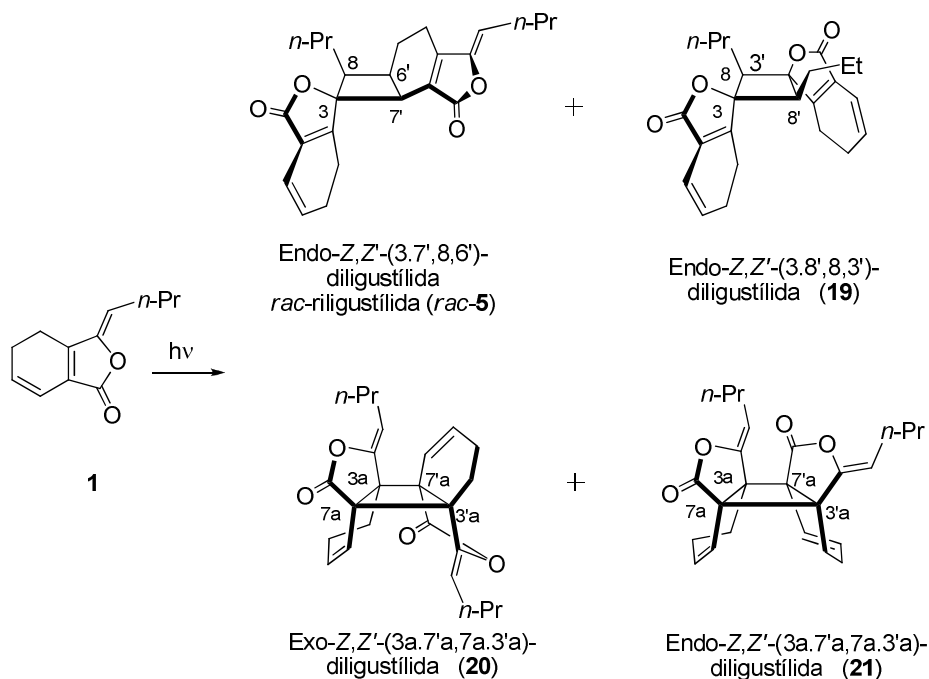


Esquema 4. Formación del dímero lineal **16**

El tratamiento de Z-ligustíflida (**1**) con SnCl_4 en CH_2Cl_2 produce mezclas de Z-butilidenftálida (**2**) como producto mayoritario, E-butilidenftálida (**17**), n-butilftálida (**18**), y los dímeros **13** y **14**.^[17]

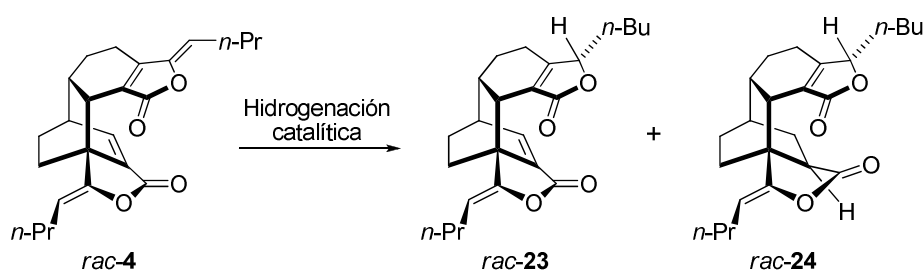
En este sentido, fue interesante notar que en los diferentes sitios de complejación del ácido de Lewis con **1** (O- y C- complejación) se generaron diferentes cationes, particularmente en las posiciones C-8, C-6 y C-7, mismos que fueron estabilizados por la adición de la olefina C-6'/C-7' al catión (mecanismos mostrados en los Esquemas 1-4). Las estructuras y rendimientos de los productos indicaron la tendencia de **1** para formar compuestos aromáticos, así como su baja reactividad frente a ácidos de Lewis, la ligera preferencia hacia la O-complejación (vs. C-complejación) y la baja nucleofilicidad y regioselección mostrada por el doble enlace C-6'/C-7'.^[17]

Por otro lado, estudios realizados sobre la formación de fotociclodímeros de Z-ligustíflida (**1**) mediante condiciones fotoquímicas (mediante la utilización de una lámpara de mercurio), dió como resultado la formación de rac-riligustíflida (*rac*-**5**) y tres ftálidas diméricas novedosas (*endo*-Z,Z'-(3.8',8.3')-diligustíflida (**19**), *exo*-Z,Z'-(3a.7a',7a.3a')-diligustíflida (**20**) y *endo*-Z,Z'-(3a.7a',7a.3a')-diligustíflida (**21**)). Su formación fue racionalizada por el análisis de los datos experimentales mediante la utilización del método de orbitales moleculares frontera (OMF) (Esquema 5).^[18]



Esquema 5. Fotociclodimerización de *Z*-ligustilida (**1**)

En cuanto a la reactividad química de las ftálicas diméricas, se ha informado la síntesis por relevo de *rel*-(3'*R*)-3',8'-dihidrodiligustilida (**22**) a partir de *Z*-ligustilida (**1**). La reacción térmica de **1** por 40 h a 160 °C en tubo sellado permitió la conversión en *rac*-diligustilida (*rac*-**4**, 22%), demostrándose la regio- y estereo- preferencia de la reacción. Una vez obtenida la ftálica dimérica, se llevaron a cabo ensayos para reducir selectivamente el doble enlace C-3'/C-8', mismos que fueron infructuosos. Sin embargo, hidrogenación catalítica directa de *rac*-**4** permitió la obtención de *rac*-**23** y *rac*-**24** (Esquema 6).^[19]

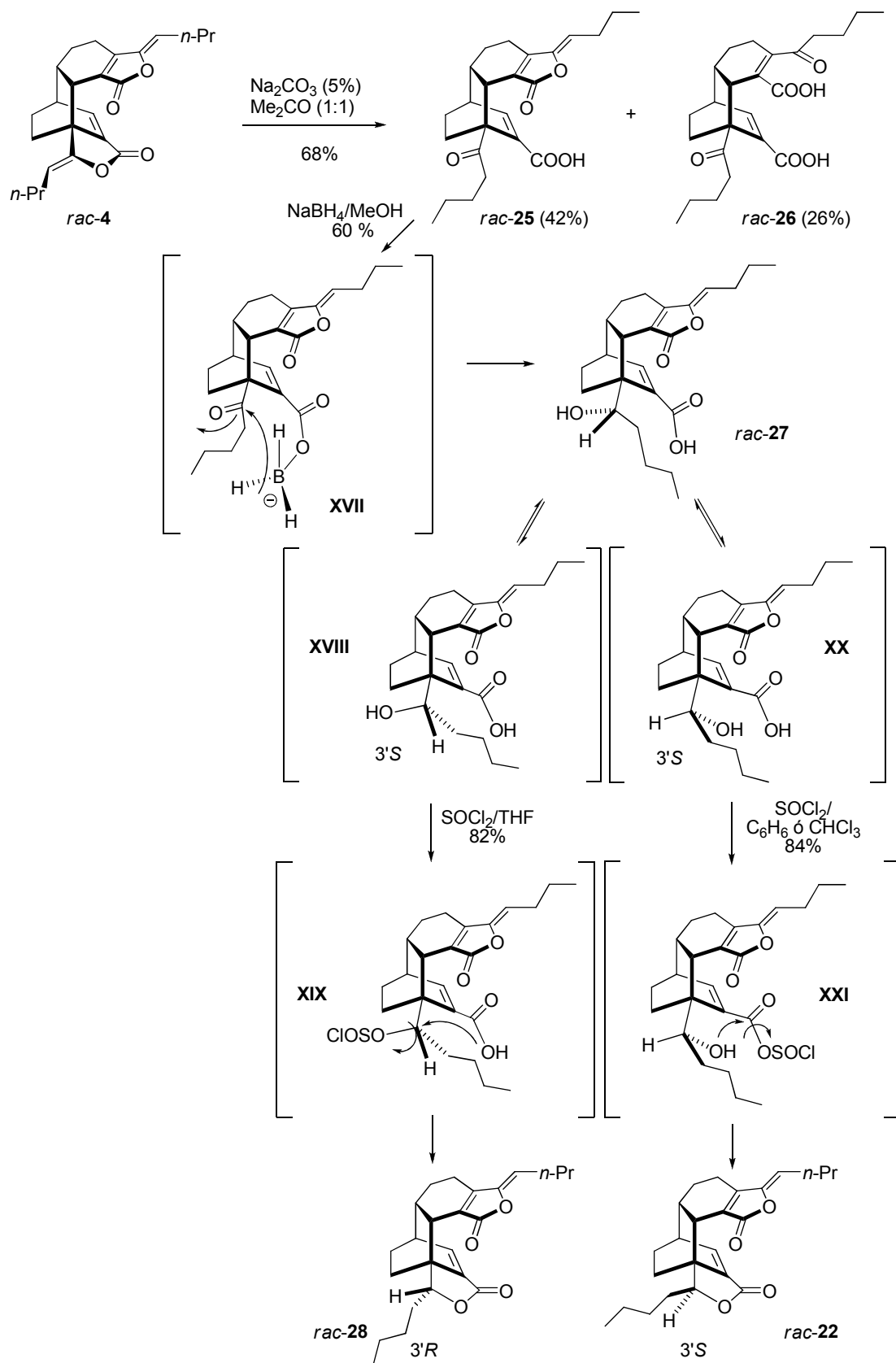


Esquema 6. Hidrogenación catalítica de *rac*-diligustilida (*rac*-**4**)

En vista de los resultados poco promisorios, se propuso la apertura estereoselectiva de una de las lactonas para obtener la cetona en C-3', y posteriormente la reducción de la misma para finalmente obtener nuevamente la relactonización (Esquema 7).^[18]

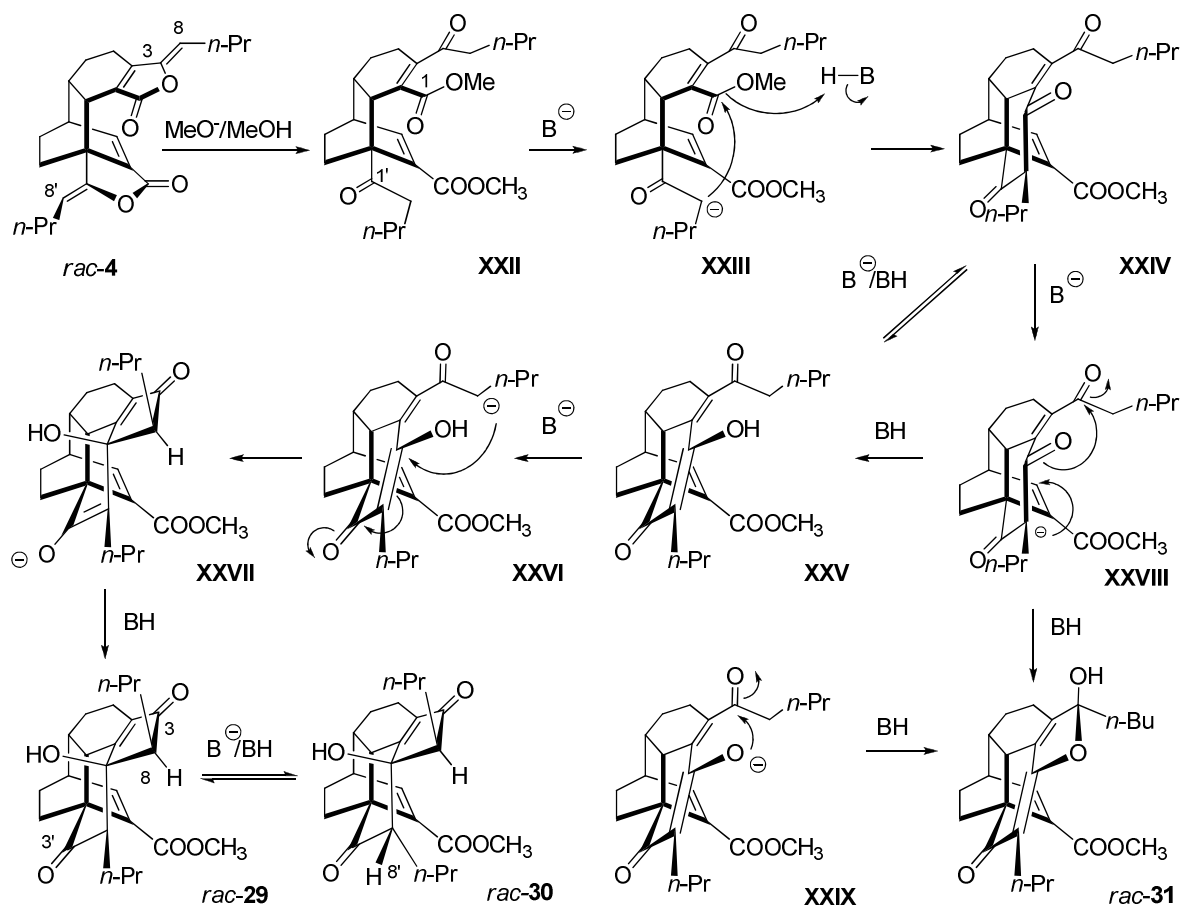
El mecanismo de formación de los productos mostrados en el Esquema 7, se explica de la siguiente manera: el tratamiento básico de *rac*-diligustilida (*rac*-**4**) permitió la obtención de la mezcla

de *rac*-**25** y *rac*-**26**. Posteriormente, el tratamiento de *rac*-desmetilwallichílida (*rac*-**25**) con NaBH₄ en metanol a temperatura ambiente generó el hidroxiácido *rac*-**27**. La selectividad diastereofacial en la reducción de *rac*-**25** fue racionalizada por la complejación del borohidruro con el ácido carboxílico, permitiendo la reducción del carbonilo cetónico (orientado *exo*- en la conformación preferida en metanol, **XVII**) por la cara *re* para producir el ácido *rel*-hidroxi-(3'*S*) (**27**). La relactonización de *rac*-**27** fue llevada a cabo en buenos rendimientos con cloruro de tionilo, cloruro de tosilo o cloruro de mesilo. Es interesante notar que la estereoquímica del producto fue dependiente del disolvente (Esquema 7). Cuando se utilizó THF como disolvente, el producto obtenido fue *rel*-(3'*R*)-3',8'-dihidro diligustílida (**28**), pero cuando la reacción fue llevada a cabo utilizando CHCl₃ o benceno como disolvente, el producto fue *rel*-(3'*S*)-3',8'-dihidro diligustílida (**22**). Los resultados de la reacción de la lactonización son explicados mediante la suposición de dos mecanismos de reacción que reflejan la fácil aproximación del electrófilo al átomo de oxígeno nucleofílico. Presumiblemente, en THF la conformación preferida es **XVIII**, donde el alcohol secundario es expuesto al disolvente, (el hidroxilo *exo*- y *anti*- al enlace σ C-3'/C-7'a) y entonces el electrófilo activa al alcohol mediante un mecanismo de desplazamiento tipo S_N2 con inversión en C-3' (**XIX**, Esquema 7). En contraste, en disolventes no polares, como benceno y cloroformo, *rac*-**27** presumiblemente existe en la conformación **XX** (cadena alquílica *n*-butil *exo*- y *anti*- al enlace C-3'a/C-7'a), de tal manera que el electrófilo (SOCl₂) activa al ácido para una reacción adición-eliminación (**XXI**), por lo que el alcohol secundario está impedido. Estos resultados proveen procedimientos estereoselectivos para la obtención de los dos epímeros en C-3' de 3',8'-dihidro diligustílida (*rac*-**22** y *rac*-**28**).



Esquema 7. Obtención de *rac-22* y *rac-28* a partir de *rac*-diligustíflida (*rac-4*)

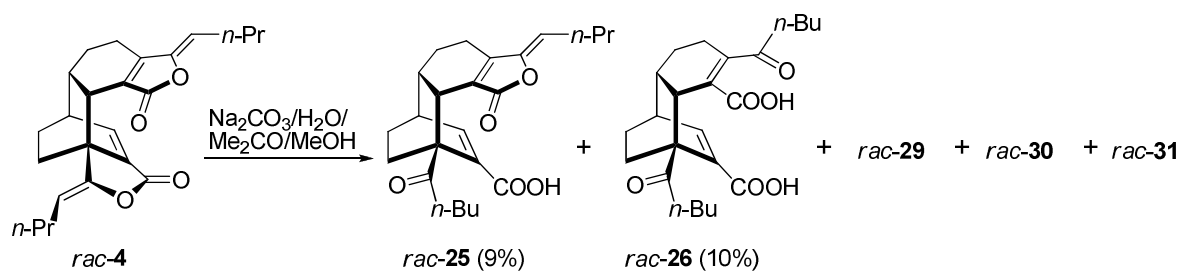
Por otra parte, se han llevado a cabo reacciones químicas sobre ftálicas diméricas, por ejemplo, el tratamiento con base de *rac*-diligustílida (*rac*-**4**) produce los compuestos pentacíclicos *rac*-**29**–*rac*-**31**, derivados de condensaciones intramoleculares con nuevas conectividades C–C (Esquema 8).^[20]



Esquema 8. Condensaciones intramoleculares de *rac*-**4**

Desde el punto de vista mecanístico, un intermediario dicetodiestere (**XXII**, formado por metanolisis a partir de *rac*-**4**, Esquema 8) sufre una reacción aldólica intramolecular, vía la desprotonación del metileno ácido en C-8' (intermediario **XXIII**) y una adición al carbonilo para generar los intermediarios tautoméricos **XXIV** y **XXV**, los cuales reaccionan para dar *rac*-**29** vía una adición tipo Michael del carbanión en C-8 y generación de los intermediarios **XXVI** y **XXVIII**, Esquema 8.

Los procedimientos que favorecen las condensaciones intramoleculares involucran las reacciones de *rac*-**4** con Na₂CO₃ en H₂O/MeOH/Me₂CO, mismos que generan los compuestos *rac*-**25** (*rac*-desmetilwallichilida, 9%), *rac*-**26** (*rac*-dicetodiestere de diligustílida, 10%), *rac*-**30** (*8'*-*epi*-**29**, 4%) y *rac*-**29** + *rac*-**31** (65%) (Esquema 9).^[20]



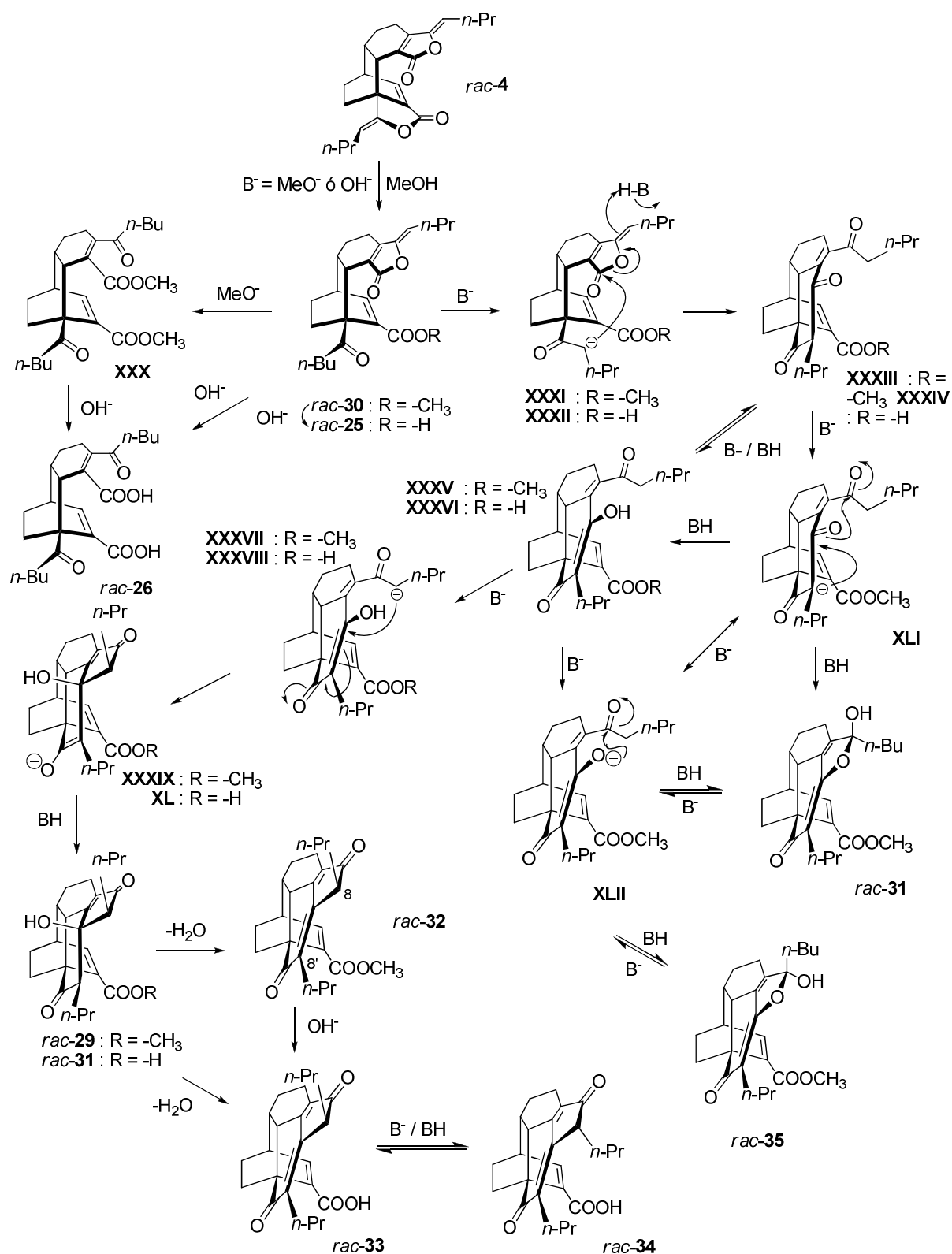
Esquema 9. Tratamiento básico de *rac-4*

La formación del éter enólico *rac-31* puede ser racionalizada por la *O*-alquilación de los intermediarios **XXVIII** ó **XXIX** (Esquema 8). En disolventes como THF e *i*-PrOH, la *C*-alquilación es preferida (obtención de *rac-29*), mientras que en sistemas acuosos, una carga negativa reside principalmente en el oxígeno, que permite la formación del hemicetal *rac-31*.

El tratamiento catalizado por base de la ftálide dimérica *rac*-diligustílida (*rac-4*), utilizando diversas condiciones de reacción ha permitido la obtención de una serie de productos de condensación intramolecular como se muestra en el Esquema 10.^[8] En la búsqueda de mejores condiciones para la obtención de los productos de condensación intramolecular *rac-29* y *rac-31* en forma separada, así como mejores rendimientos de *rac-25* y *rac-26*, fueron llevados a cabo diversos experimentos. Los resultados indicaron que los rendimientos de los productos son altamente dependientes de las diferentes condiciones de reacción. Así, por ejemplo, la presencia de agua en la reacción permite la formación del producto intramolecular *rac-31*; sin embargo, la presencia de un disolvente de menor polaridad como THF inhibe la formación del mismo.

Adicionalmente, los experimentos dieron evidencia de que a tiempos cortos de reacción se produce la metanólisis de *rac*-diligustílida (*rac-4*) obteniéndose *rac*-wallichílida (*rac-30*) y además se obtienen bajos rendimientos de los productos de condensación intramolecular *rac-29*, *rac-33* y *rac-34*. Ahora bien, las condiciones de hidrólisis para *rac*-diligustílida (*rac-4*) generan mezcla de *rac*-desmetilwallichílida (*rac-25*) y del *rac*-dicetodiácido (*rac-26*) misma que se ve favorecida en la mezcla de acetona/agua, presumiblemente debido a velocidades de reacción comparables en el ataque nucleofílico sobre ambos grupos carbonilo. Mecanísticamente, *rac*-wallichílida (*rac-30*) se obtiene mediante metanólisis de *rac*-diligustílida (*rac-4*, Esquema 10), misma que puede reaccionar con otra molécula del ión metóxido, generando el intermediario dicetodiéster **XXX**. La hidrólisis de ambos compuestos da lugar a los ácidos *rac*-desmetilwallichílida (*rac-25*) y el *rac*-dicetodiácido (*rac-26*), respectivamente. El compuesto *rac-30* experimenta una reacción aldólica intramolecular, mediante la desprotonación del metileno ácido en C-8' (intermediario **XXXI**) y apertura de la lactona por adición del carbonilo para producir los intermediarios tautoméricos **XXIII** y **XXXV**, los cuales a su vez reaccionan para dar lugar a *rac-29* vía una adición tipo Michael del carbanión en C-8 y formación de

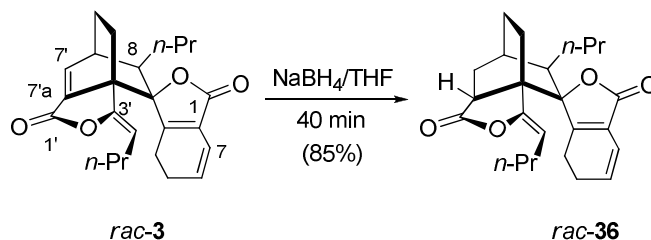
los intermediarios **XXXVII** y **XXXIX**, Esquema 10. La deshidratación de *rac-29* genera *rac-32* y la hidrólisis de éste produce los epímeros *rac-33* y *rac-34*. La formación del éter enólico *rac-31* y su epímero *rac-35* puede explicarse por la *O*-acilación de los intermediarios **XLI** ó **XLII** (Esquema 10). La adición de una base fuerte promueve la condensación intramolecular de *rac-25* a través de los intermediarios **XXXII** a **XL** para generar *rac-31* y los epímeros *rac-33* y *rac-34* por deshidratación del primero.^[8]



Esquema 10. Derivados de condensaciones intramoleculares de *rac*-diligustíflida (*rac-4*)

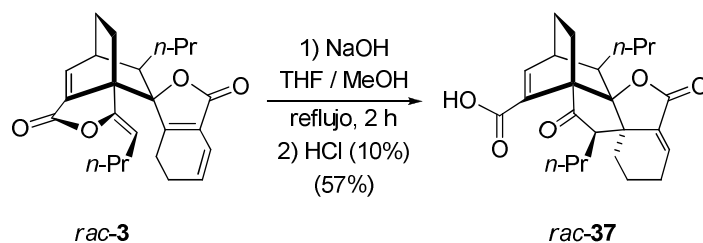
En cuanto a la ftálica dimérica *rac*-toquinólida B (*rac-3*) se refiere, la reducción con NaBH_4 en THF produce *rel*-(7'aS)-7',7'a-dihidrotoquinólida B (**36**, 85%, Esquema 11) mismo que presenta un

nuevo centro quiral en C-7'a con configuración *S*, debido al equilibrio existente en que procede la reacción.^[21]



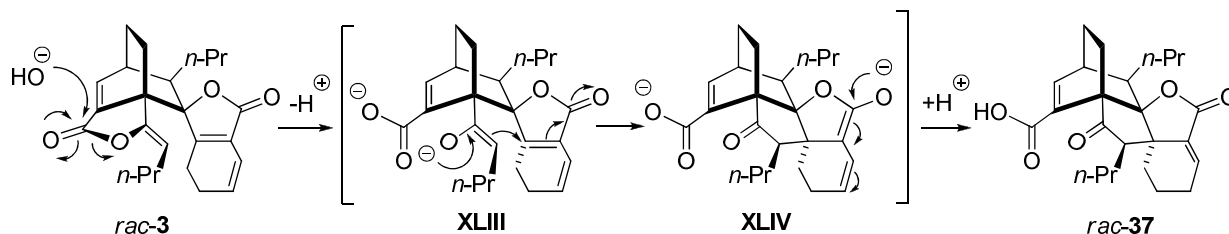
Esquema 11. Obtención de *rel*-(7'a*S*)-7',7'a-dihidrotoquinólida B (**36**)

Las reacciones de condensación intramolecular en medio básico (NaOH, THF/MeOH) de *rac*-toquinólida B (*rac-3*) como en el caso de *rac*-diligustílida (*rac-4*),^[15] permitieron la obtención del compuesto pentacíclico *rac*-ciclotoquinólida B (*rac-37*, Esquema 12).^[22]



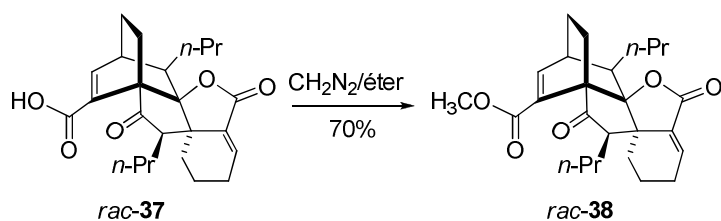
Esquema 12. Condensación intramolecular de *rac*-toquinólida B (*rac-3*)

El mecanismo de formación de *rac-37* se explica mediante el ataque nucleofílico quimioselectivo del hidróxido sobre el carbonilo C-1', que genera el enolato **XLIII** que pudiera seguir diferentes rutas (*C*- y *O*- alquilación ó *C*- y *O*- acilación), en este caso, una adición tipo Michael del carbanión a la enona (vía una ciclización 5-*exo*-trigonal favorecida^[20]) produce el intermediario **XLIV** que se transforma en medio ácido en *rac-37* (Esquema 13).



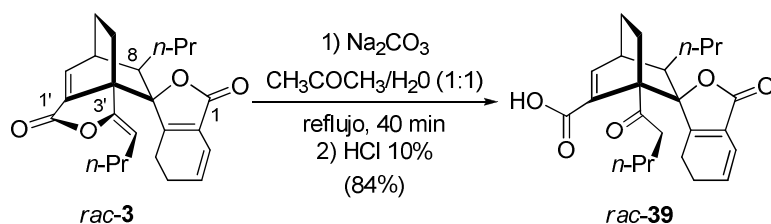
Esquema 13. Mecanismo de formación de *rac*-ciclotoquinólida B (*rac-37*)

Continuando con la descripción de la reactividad del producto natural *rac-3* y sus derivados, se ha informado que la metilación de *rac-37* con diazometano en éter (Esquema 14) produce el éster *rac-38*.^[22]



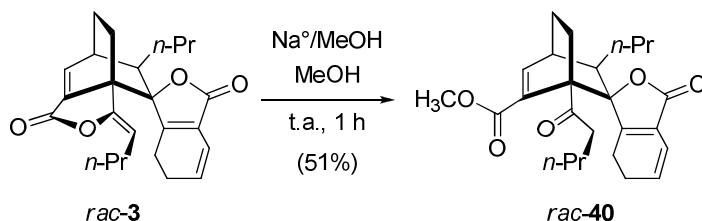
Esquema 14. Metilación de *rac-37*

La hidrólisis de *rac*-toquinólida B (*rac-3*) en medio básico Na_2CO_3 , $\text{CH}_3\text{COCH}_3/\text{H}_2\text{O}$ (1:1) (Esquema 15) genera el *rac*-cetoácido (*rac-39*, 84%),^[22] donde la γ -enol lactona de *rac-3* es hidrolizada fácilmente en comparación con *rac*-diligustólida (*rac-4*), que bajo las mismas condiciones genera sus correspondientes cetoácidos en bajos rendimientos.^[15] En este sentido, es interesante destacar que la espiro- γ -lactona de *rac-3* no es reactiva bajo diversas condiciones hidrolíticas, hecho que se debe al impedimento estérico de ambas caras del grupo carbonilo C-1, por la cadena *n*-propílica en C-8 y el sustituyente alquilideno en C-3'. El mismo fenómeno fue observado para angeólida, epímero de *rac*-toquinólida B (*rac-3*) en C-3.^[23–24]



Esquema 15. Hidrólisis de *rac*-toquinólida B (*rac-3*)

El tratamiento de *rac-3* con metóxido de sodio en metanol a temperatura ambiente, produce el correspondiente cetoéster *rac-40* (Esquema 16).^[22]



Esquema 16. Preparación del *rac*-cetoéster de toquinólida B (*rac-40*)

En este contexto, la presencia del ácido carboxílico en C-1' es necesaria para la reacción de ciclización para generar *rac*-ciclotoquinólida B (*rac-37*). Los hechos que sustentan dicha observación son los estudios de complejación del carboxilato y el enolato, intermediario **XLIII** (Esquema 13), con el catión (Na^+ ó K^+) que favorece la formación del enlace σ C-3a/C-8' (Figura 2).

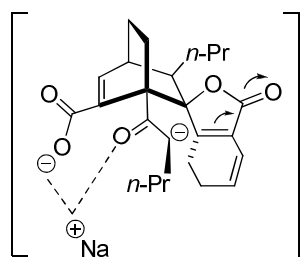
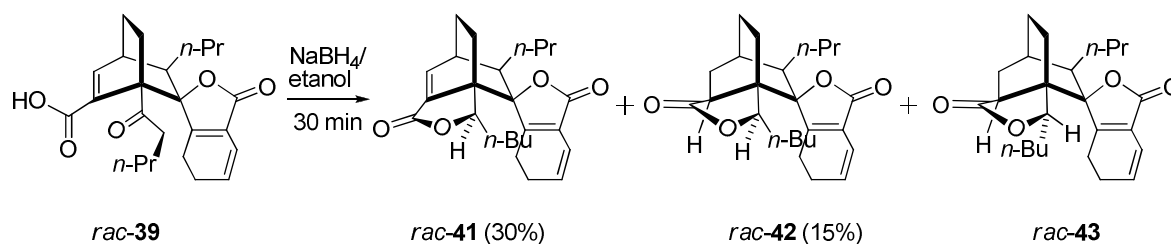


Figura 2. Complejación de los iones carboxilato y enolato con el catión Na^+ en la formación de *rac*-ciclotoquinólida B (*rac*-37)

Por otro lado, la reducción del *rac*-cetoácido de toquinólida B (*rac*-39) con NaBH_4 en etanol, permitió obtener *rac*-3',8'-dihidrotquinólida B (*rac*-41) así como una mezcla de los epímeros *rac*-42 y *rac*-43 (Esquema 17).



Esquema 17. Reducción del *rac*-cetoácido de toquinólida B (*rac*-39)

Los resultados obtenidos de los diversos tratamientos químicos de las ftálicas obtenidas a partir de *L. porteri* indican la existencia de mezclas en los productos de reacción, así como la competencia en la reactividad química debido a los diferentes grupos funcionales presentes en cada una de las ftálicas monoméricas y diméricas. Por tales motivos, es posible afirmar que presentan una reactividad química particular y que, generalmente, las ciclizaciones intramoleculares pueden ser consideradas como una característica para este tipo de sustancias. Por lo anterior, es importante el estudio de estos productos naturales con el objetivo de entender y racionalizar su reactividad química así como conocer la actividad biológica que pueda derivarse de las modificaciones químicas realizadas a los mismos.

Actividad biológica de las ftálicas

En cuanto a la actividad biológica se refiere, muchas de las ftálicas han mostrado ser activas en varios bioensayos. En general, la actividad biológica de las ftálicas se clasifican en seis categorías: a) acción sobre el sistema nervioso central, b) inhibición de la agregación plaquetaria y anti-trombosis, c) modulación de la función cardíaca y anti-angina, d) inhibición de la proliferación celular del músculo esquelético, e) protección contra isquemia cerebral y f) relajación del músculo liso (Tabla 1, Figura 3).

Tabla 1. Resumen de la actividad biológica de algunas ftálicas de origen natural^[9]

Actividad biológica	Ftálica
Anti-angina	Z-butildenftálica (2), butildenftálica (44)
Anti-convulsión	3R-butilftálica (46), 3S-butilftálica (47) sedanenólida (50)
Anti-agregación plaquetaria y anti-trombosis	Z-ligustfílida (1), butildenftálica (44), 3R-butilftálica (46), 3S-butilftálica (47), senquiunólida A (51)
Reducción de la viscosidad de la sangre	Butilftálica (18), cnidfílida (48), senquiunólida A (51), senquiunólida P (60), levistólida B (62)
Modulación de la función cardíaca	Butildenftálica (44), ligustfílida (49), senquiunólida A (51)
Inhibición del aprendizaje y pérdida de la memoria	Butilftálica (18), butildenftálica (44), 3R-butilftálica (46), 3S-butilftálica (47), senquiunólida A (51)
Inhibición de la proliferación celular del músculo liso	Butilftálica (18), butildenftálica (44), cnidfílida (48), ligustfílida (49), senquiunólida A (51), senquiunólida H (56), senquiunólida I (57), senquiunólida J (58)
Protección contra isquemia cerebral	Butilftálica (18), 3R-butilftálica (46), 3S-butilftálica (47)
Sedación y aumento del sueño	Butildenftálica (44), butilftálica (18), ligustfílida (49), sedanenólida (50)
Relajación del músculo liso	Z-Butildenftálica (2), rac-toquinólida B (rac-3), levistólida A (rac-diligustfílida, rac-4), rac-riligustfílida (rac-5), butildenftálica (44), ligustfílida (49), senquiunólida P (60)

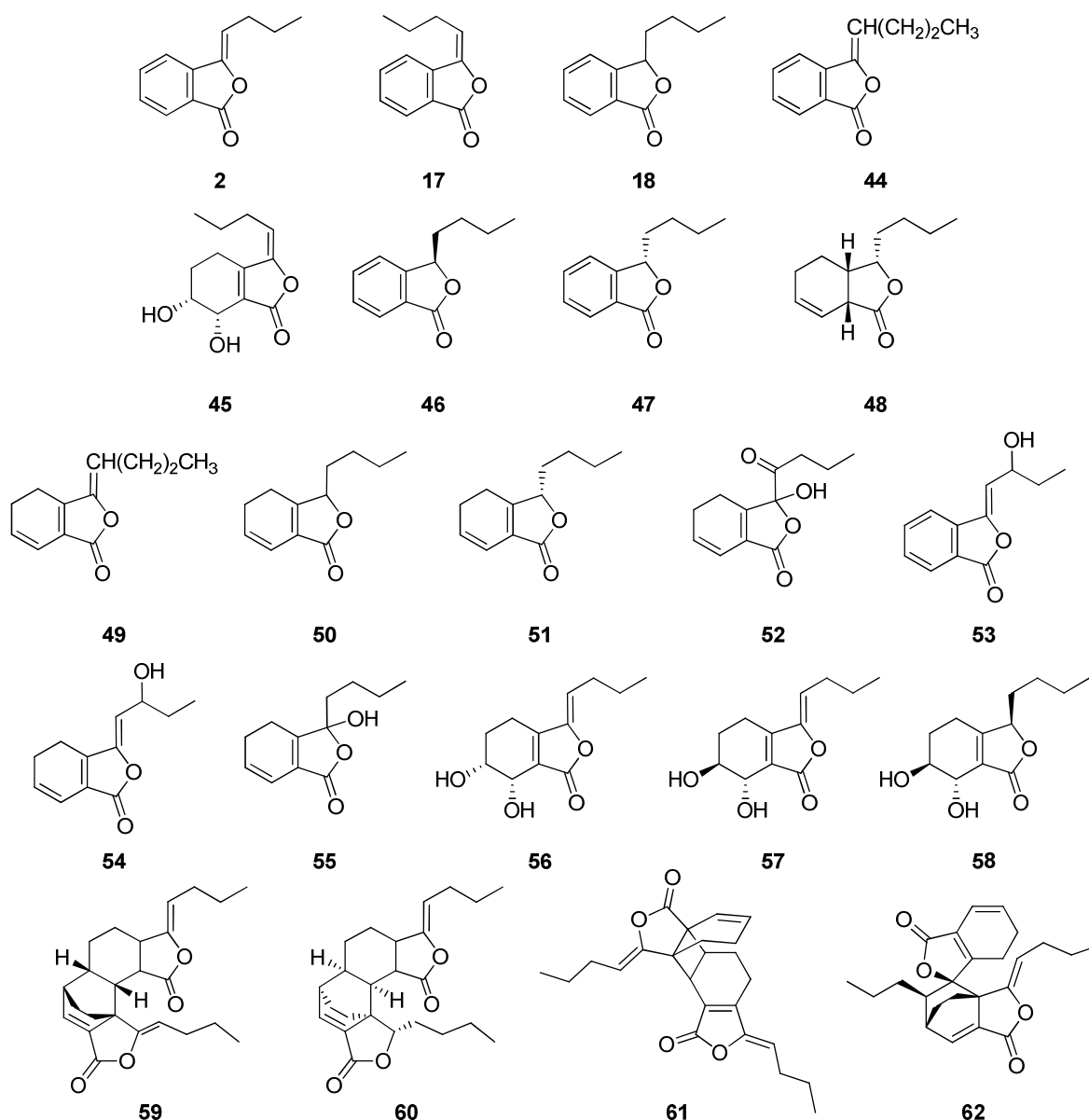


Figura 3. Algunas ftálicas naturales con actividad biológica^[9]

Actividad sobre el Sistema Nervioso Central (SNC)

Varias ftálicas han mostrado afectar el sistema nervioso central, por ejemplo, Matsumoto y col. han utilizado el modelo animal del sueño inducido por pentobarbital para probar butilidenftálica (**44**).^[25] En el diseño experimental, los ratones fueron alojados de manera conjunta y en forma individual por cuatro semanas previamente al tratamiento con pentobarbital. La comparación de esos dos grupos con los ratones control indicaron que el tiempo de sueño inducido por pentobarbital fue significativamente corto en los ratones albergados de forma individual. Sin embargo, después de una administración intraperitoneal de butilidenftálica (**44**), a una dosis de 20 mg/kg se observó que el tiempo de sueño en este grupo llegó a ser similar al grupo donde los ratones se albergaron de forma conjunta, siendo así,

un efecto dosis-dependiente en un rango de 10 a 30 mg/kg. Además, en los ratones alojados en grupo, el efecto del sueño inducido por pentobarbital fue significativamente reducido después del tratamiento con metoxamina (agonista α_1 -adrenoreceptor), yohimbina (agonista α_2 -adrenoreceptor) y FG7142 (agonista inverso GABA_A). La ftálica **44** a una dosis intraperitoneal de 20 mg/kg fue capaz de revertir la reducción del tiempo de sueño causado por los tres agentes antes mencionados. Los resultados sugirieron que los efectos de **44** sobre el tiempo sueño inducido por pentobarbital puede involucrar el sistema adrenérgico central y/o el sistema GABA_A.

Por otro lado, en un modelo de comportamiento de evasión en rata,^[26] fue inducido daño de evasión por administración intracisternal de AF64A (neurotoxina colinérgica central), escopolamina (receptor muscarínico antagonista) o mecamilamina (receptor nicotínico antagonista). La combinación de escopolamina y mecamilamina mostraron un efecto sinérgico. La ftálica **44** a una dosis intraperitoneal de 50 mg/kg revertió marcadamente el daño de evasión inducido por esos tres antagonistas utilizados separadamente o concurrentemente con escopolamina y mecamilamina. El efecto inhibitorio de **44** sobre el daño del comportamiento de evasión no fue bloqueado por bromuro de metilo de escopolamina, un receptor muscarínico periférico antagonista. Se sugiere que la acción de **44** sobre el daño de comportamiento de evasión tiene relación con la ruta colinérgica central, vía receptores muscarínicos y/o nicotínicos.^[26]

Una sola administración intraperitoneal de butilftálica (**18**) (50–100 mg/kg) prolonga el tiempo de sueño inducido por pentobarbital en ratones machos albinos.^[27] Un efecto similar fue observado después de la inhalación de **18** a 0.5–1 mg/3L aire/min.^[28] Además, en un modelo de ataque crónico en rata inducido por lactona coriaria,^[29] se encontró daño significativo en neuronas cerebrales y en células Purkinje en animales control después de la inducción del ataque, pero no en ratas oralmente pretratadas con 700 mg/kg de la ftálica **18**. Asimismo, **18** antagonizó el daño en la memoria y el aprendizaje en el mismo modelo.

La inyección intraperitoneal de 3S-butilftálica (**47**) protege a ratones y a ratas contra ataques inducidos por audio- y electro-shock, y agentes convulsivos como metrazol o lactona coriaria.^[29] En modelo murino, la administración subcutánea del enantiómero *R* de **46** y su mezcla racémica inhibieron moderadamente los ataques metrazol inducido, pero no así el enantiómero *S* de **47**. Los enantiómeros *R*-(**46**) y *S*-(**47**), así como la mezcla racémica inhibieron los ataques electro-shock de manera dosis-dependiente con valores de DE₅₀ de 83.4, 104.8 y 73.1 mg/kg, respectivamente.

Agregación anti-plaquetaria y anti-trombosis

Ciertas ftálicas de origen natural han sido evaluadas por sus actividades anti-agregación plaquetaria y anti-trombosis. Como se resume en la Tabla 2, cinco ftálicas substituidas en la posición 3, conocidas como *Z*-ligustílica (**1**), butilidenftálica, (**44**), 3*R*-butilftálica (**46**), 3*S*-butilftálica (**47**), y senquiunólida A (**51**) fueron efectivas contra agregación plaquetaria. Teng y col.^[30] han investigado los efectos de la ftálica **44** sobre la agregación plaquetaria causada por varios inductores. En plaquetas de conejo, **44** inhibió de forma dosis-dependiente la agregación del ácido araquidónico (AA)- y colágeno-inducido. La potencia inhibitoria fue significativamente mayor en la agregación AA-inducido (IC₅₀ 70 μM) más que la agregación colágeno-inducido (CI₅₀ 120 μM). Además, ésta misma ftálica **44** inhibió la liberación de ATP ocasionada por el AA y el colágeno, y su potencia inhibitoria sobre la liberación de ATP fue mayor (AA: CI₅₀ 40 μM, colágeno CI₅₀ 60 μM), más que contra la agregación. Por otra parte, **44** inhibió marcadamente la formación del tromboxano B₂ (TXB₂) ocasionada por colágeno, AA, trombina, y el ionóforo A23187. A una concentración de 100 μM abolió la fase secundaria de la agregación plaquetaria y la liberación de ATP inducida por epinefrina.^[30]

Naito y colaboradores, investigaron la reducción de la viscosidad en sangre por nueve ftálicas.^[31] Entre los compuestos probados se encuentran dos ftálicas diméricas: *rac*-toquinólida B (*rac*-**3**) y senquiunólida P (**60**), y tres ftálicas substituidas en la posición 3, butilftálica (**18**), cnidílica (**48**) y senquiunólida A (**51**), mismos que redujeron la viscosidad en sangre en ratas Wistar. La reducción de viscosidad de sangre fue de 7.3%, 9.4%, 9.4%, 18.5% y 12.8% para **18**, **48**, **51**, **60** y **62**, respectivamente.

Modulación de la función cardíaca y anti-angina

Z-butilidenftálica (**2**) y su mezcla racémica fueron sugeridos como agentes anti-angina por Ko y colaboradores.^[32,33] Mediante el empleo de un modelo experimental angina variante en perros anestesiados y en ratas conscientes, *Z*-butilidenftálica (**2**) y butilidenftálica (**44**) inhibieron la pituitrina-inducida disminuyendo la onda T, señal que actúa como indicador electrocardiográfico de daño al miocardio.

Inhibición de la proliferación celular del músculo liso

Las ftálicas **18**, **44**, **48**, **49**, **51**, **56**, **57**, **58** y neocnidílica (**63**) han mostrado actividad anti-proliferativa con diferentes potencias en cultivos primarios de células de músculo liso de aorta de ratón (Tabla 2, Figura 3)

Tabla 2. Actividad antiproliferativa de diferentes ftálicas en cultivos celulares de músculo liso de aorta de ratón.

Ftálica	CI₅₀ (µg/mL)	Referencias
Butilidenftálica (44)	3.25	[34–36]
Butilftálica (18)	> 20	[35]
Cnidílica (48)	> 20	[35]
Ligustílica (49)	1.68	[34–36]
Neocnidílica (63)	6.22	[34–36]
Senquiunólida A (51)	1.52	[34–36]
Senquiunólida H (56)	0.1	[35, 36]

Kobayashi y col. han realizado investigación de la estructura actividad de diez ftálicas naturales.^[35,36] Utilizando el modelo de cultivo de células de músculo liso, se observó que la presencia de un grupo hidroxilo en la posición **3** ó una cadena hidroxilada en esa misma posición en las senquiunólidas D (**52**), E (**53**), F (**54**), y G (**55**) contribuyeron a la inactividad de los mismas. La potencia de progresión e inhibición de los derivados anti-proliferativos están en el siguiente orden **56** > **58** > **57** > **49** = **51** > **44**.^[36] Los resultados sugieren que las ftálicas que tienen disustituciones en las posiciones 6 y 7 en el anillo A fueron más potentes que aquellas que conservaron el doble enlace en la posición 6 y 7. Por otro lado, el grado de insaturación en el anillo A afecta la potencia de la actividad anti-proliferativa, pues los compuestos **56**, **57** y **58** son más potentes que **49** y **51**. La ftálica **44** con anillo aromático A mostró la potencia más baja (Tabla 3).

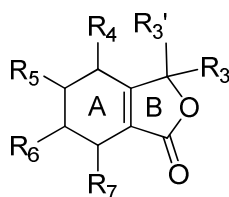


Tabla 3. Resultados de la actividad anti-proliferativa de las ftálidas en relación con su estructura

Ftálida	R ₃	R _{3'}	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇	Actividad
Senquiunólida H (56)			H	H			++++
Senquiunólida I (57)			H	H			+++
Senquiunólida J (58)		H	H	H			+++
Ligustílida (49)			H	H	=	=	++
Senquiunólida A (51)		H	H	H	=	=	++
Butilidenftálida (44)				=	=	=	+
Senquiunólida D (53)		OH	H	H	=	=	-
Senquiunólida E (56)				=	=	=	-
Senquiunólida F (54)			H	H	=	=	-
Senquiunólida G (55)		OH	H	H	=	=	-

Resultados de la referencia,^[36] se utilizaron unidades arbitrarias para expresar la actividad anti-proliferativa, ++++: significativamente activo; +++: muy activo; +: ligeramente activo; -: inactivo.

Protección contra isquemia cerebral

El primer indicio de que butilftálida (**18**) y sus dos enantiómeros **46** (3*R*-) y **47** (3*S*-) presentaron actividad anti-derrame cerebral, fue basado en sus capacidades para retrasar estos eventos cerebrales y prolongar la vida post-derrame en ratas propensas a derrame cerebral causado por hipertensión espontánea.^[37] Adoptando el modelo de isquemia focal de oclusión de la arteria cerebral media (MCAO, Middle Cerebral Artery Occlusion) inducido en rata, Feng y colaboradores demostraron que **18**, **46** y **47** disminuyeron el tamaño del infarto.^[38] A pesar de los extensos estudios de Feng y colaboradores,^[37, 38] los mecanismos de las acciones de cerebro-protección de las ftálidas **18**, **46** y **47** aún son inciertos. Sin embargo, estos metabolitos se mantienen como posibles agentes terapéuticos

para el tratamiento de isquemia cerebral, siendo así que la ftálica **18** ha sido ampliamente efectiva para el tratamiento de enfermedades cerebrovasculares, de acuerdo a registros de patentes chinas.^[39]

Relajación del músculo liso

La respuesta anti-espasmódica es una de las propiedades más reconocidas de las ftálicas. Alrededor de ellas están butilidenschaftálica (**44**) y su isómero *Z*-(**2**), quienes han sido bien documentadas como relajantes probados en varios modelos vasculares, intestinales, respiratorias y preparaciones de proliferación del músculo liso. Ko y colaboradores han reportado que las ftálicas **2** y **44** inhiben la pre-contracción inducida por KCl y fenilepinefrina de manera no competitiva y endotelio-independiente con potencias similares en venas.^[6, 40] El compuesto **44** reduce la vasoconstricción mediada por KCl y fenilepinefrina, pero es significativamente más potentemente antagonizada por altas concentraciones de iones K⁺ induciendo una despolarización de la membrana y activando los canales de Ca²⁺.^[6, 40] La ftálica **2** se comporta de forma similar.^[6, 40] La hipótesis radica en que **2** y **44** inhiben la movilización de Ca²⁺ vía canal de Ca²⁺ dependiente de voltaje menos selectivamente que otros mecanismos de contracción mediados por KCl y fenilepinefrina.^[6]

En otro bioensayo, Ko y colaboradores, descubrieron que el propanolol (β -adrenoreceptor antagonista), glibenclamida (inhibitor de canales de KATP), y caribdotoxina (inhibidor de canales de BKCa) fueron inefectivos contra la vasorelajación inducida por **44** en venas sanguíneas de perro.^[6] De la misma forma, se ha explorado como las ftálicas **2** y **44** median la vasorelajación. Sin embargo, en general, las potencias anti-espasmódicas de varias ftálicas en diferentes preparaciones de tejidos aislados son relativamente débiles y sus propiedades vasorelajadoras *in vitro* a veces fallan al ser trasladados a los efectos hipotensivos *in vivo*. Los beneficios potenciales de las ftálicas como agentes anti-hipertensivos continúan siendo investigados.^[9]

4. JUSTIFICACIÓN

Dado que la especie vegetal *Ligusticum porteri* es ampliamente utilizada en la medicina tradicional al norte de nuestro país y que de ella pueden obtenerse las ftálidas diméricas *rac*-toquinólida B (*rac*-**3**) y *rac*-diligustílida (*rac*-**4**), se consideró pertinente llevar a cabo experimentación conducente a la confirmación de estas sustancias como productos naturales, así como a la obtención de derivados bajo condiciones específicas que permitan conocer y racionalizar la reactividad química de las mismas, y correlacionar la estructura de los productos naturales y sus derivados (caracterizados mediante métodos experimentales y teóricos) con su bioactividad.

OBJETIVOS GENERALES

Generar conocimiento que permita entender y racionalizar la reactividad química de las ftálidas diméricas *rac*-toquinólida B (*rac*-**3**) y *rac*-diligustílida (*rac*-**4**) mediante la obtención de derivados. Asimismo, determinar la presencia y cuantificar la cantidad de *rac*-**3** y *rac*-**4** en extractos de acetona de raíces frescas y secas, y determinar la relación existente entre las estructuras de los productos naturales y derivados con su actividad biológica.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Comprobar la presencia de las ftálidas diméricas como productos naturales en un ejemplar fresco de *L. porteri* mediante RMN ¹H.
- b) Comprobar la presencia de las ftálidas diméricas en el extracto de acetona de raíces secas de *L. porteri* mediante RMN DOSY
- c) Desarrollar un método analítico para la cuantificación de los componentes presentes en los extractos de acetona de las raíces de *L. porteri*.
- d) Aislar, a partir de la fuente natural (*Ligusticum porteri*), las ftálidas monoméricas y diméricas (*Z*-ligustílida, *rac*-toquinólida B (*rac*-**3**), *rac*-diligustílida (*rac*-**4**) y *rac*-riligustílida (*rac*-**5**)).
- e) Optimizar la reacción de dimerización de *Z*-ligustílida (**1**).
- f) Llevar a cabo la experimentación conducente a derivatizar enantioselectivamente las mezclas racémicas **3** y **4** que sean separables mediante procedimientos cromatográficos convencionales.
- g) Explorar las reacciones del *rac*-cetoácido de toquinólida B (*rac*-**39**), con diferentes aminas para evaluar la posibilidad de condensaciones intramoleculares.

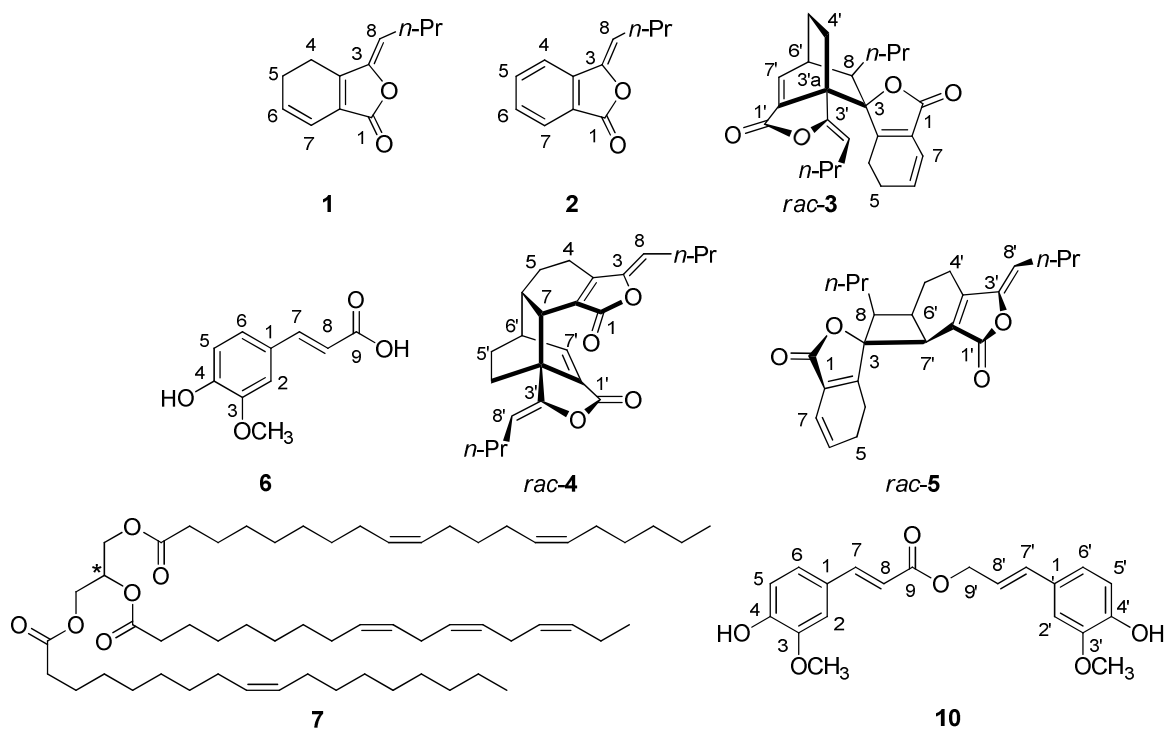
- h) Llevar a cabo experimentos exploratorios de biotransformación de *rac*-toquinólida B (*rac*-**3**) y *rac*-diligustílida (*rac*-**4**).
- i) Llevar a cabo la determinación de la configuración absoluta de los pares enantioméricos mediante la aplicación de métodos quiro-ópticos (interpretación de las curvas de dicroísmo circular).
- j) Hidrolizar los fragmentos quirales de los derivados diastereoméricos obtenidos a partir de las mezclas racémicas **3** y **4**.
- k) Llevar a cabo las evaluaciones sedantes, anti-espasmódicas y citotóxicas de los derivados generados durante la investigación y relacionar los resultados de las bioactividades.

5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En este capítulo se llevará a cabo la descripción del análisis de los resultados obtenidos, para lo cual se dividirá en tres secciones, de acuerdo a los subtemas incluidos en la investigación.

5.1. Análisis por resonancia magnética nuclear de los extractos de las raíces de *Ligusticum porteri*

En este apartado se realiza un análisis químico de los extractos de acetona de las raíces de la especie vegetal *Ligusticum porteri* por espectroscopia de resonancia magnética nuclear estableciendo la presencia de los componentes individuales. Este análisis verificó que las ftálicas diméricas *rac*-toquinólida B (*rac*-**3**), *rac*-diligustílica (*rac*-**4**) y *rac*-riligustílica (*rac*-**5**) son producidas naturalmente por la planta. Estos resultados estuvieron en concordancia con los reportados por Li y colaboradores para *Ligusticum chuanxiong* Hort. (Raíz Chuanxiong), los cuales informan que *rac*-**3** y *rac*-**5** se encuentran en las hierbas frescas.^[41] También se informan los resultados analíticos derivados del experimento RMN ¹H DOSY,^[42,43] técnica utilizada para llevar a cabo una separación virtual (sin llevar a cabo la separación física) de algunos de los componentes en el extracto de acetona de raíces secas de *L. porteri*, análisis que tuvo como objetivo determinar la presencia de las principales ftálicas diméricas *rac*-toquinólida B (*rac*-**3**) y *rac*-diligustílica (*rac*-**4**). Esta técnica experimental es una herramienta útil para analizar mezclas complejas basada en los diferentes coeficientes de difusión, *D*, que depende del peso molecular efectivo, tamaño y forma de cada compuesto. Los espectros DOSY están constituidos por los desplazamientos químicos en el eje horizontal y los coeficientes de difusión en el eje vertical, respectivamente. Por otro lado, también se desarrolló un protocolo sencillo para la cuantificación de algunos constituyentes de *L. porteri*, que se llevó a cabo por medio del cálculo del promedio de las áreas relativas de los picos de señales elegidas de protón para algunos compuestos con respecto a una señal conocida de un estándar interno (4-dimetilaminopiridina). El protocolo permitió una cuantificación rápida y directa de las ftálicas diméricas en un espécimen fresco de *L. porteri*. Estos hallazgos proporcionaron evidencia concluyente de la existencia de estos compuestos como productos naturales.



*Configuración del centro quiral no determinada

Figura 4. Algunos constituyentes de *L. porteri*

Algunos constituyentes de *L. officinale* (syn: *Cnidium officinale*) sufren transformaciones durante el almacenamiento,^[44] y asimismo los de algunas plantas relacionadas taxonómicamente procesadas para preparaciones utilizadas en la medicina tradicional asiática. Tales variaciones en la composición química también han sido detectadas por CLAR para *L. chuanxiang*.^[41] Otros reportes han identificado variaciones por comparación de los constituyentes químicos de varios preparados provenientes de umbelíferas utilizando CCF, CLAR y CL-EM.^[45] Por lo tanto, se llevó a cabo un análisis detallado del extracto de acetona de las raíces frescas de *L. porteri* para la identificación de sus principales componentes, verificando la presencia de las ftálicas diméricas y estableciendo las variaciones en la composición de la raíz a diferentes tiempos de secado. Las asignaciones fueron realizadas por comparación directa con espectros de muestras auténticas disponibles en nuestro laboratorio. El trazo en la Figura 5a muestra la riqueza del extracto de la planta (de las raíces frescas) reflejado en la complejidad del mismo. Para fines prácticos, el espectro fue dividido en cuatro secciones ampliadas con el fin de facilitar la asignación de señales (Figura 5b–e). La presencia de Z-ligustílida (**1**) fue confirmada por las señales en la Figura 5c a: δ 6.29 (*dt*, $J = 9.6, 2.1$, Hz, 1H, H–7), δ 6.00 (*dt*, $J = 9.7, 4.3$ Hz, 1H, H–6) y δ 5.22 (*t*, $J = 8.0$ Hz, 1H, H–8); Figura 5d a: δ 2.62–2.57 (*m*, 2H, H–4, H–5) y δ 2.38 (*dd*, $J = 15.2, 7.6$ Hz, 1H, H–9); y Figura 5e a: δ 1.51 (*q*, $J = 7.4$ Hz, 1H, H–10) y δ 0.96 (*t*, $J = 7.4$, 3H, H–11).

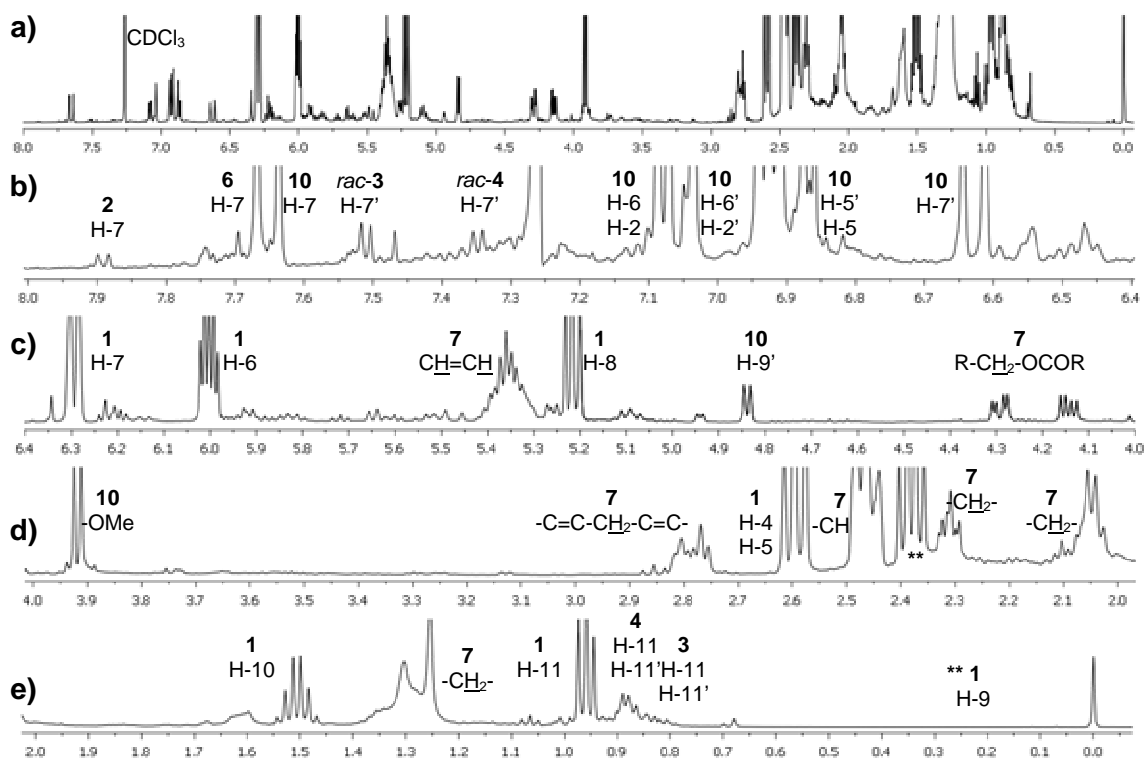


Figura 5. Espectro completo de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3 , δ 8.00 – 0.00) de las raíces frescas de *L. porteri* (a) y detalles del espectro; δ 8.00 – 6.40 (b); δ 6.40 – 4.00 (c); δ 4.00 – 2.00 (d); δ 2.00 – 0.00 (e). **1**: *Z*-ligustílica, **2**: *Z*-butilidenftálida, *rac*-**3**: *rac*-toquinólida B, *rac*-**4**: *rac*-diligustílica, **6**: ácido ferúlico, **7**: triacilglicérido, **10**: ferulato de coniferilo

La presencia de ferulato de coniferilo (**10**) fue confirmada por las señales en la Figura 5b a: δ 7.65 (*d*, $J = 15.9$ Hz, 1H, H-7), δ 7.08 (*dd*, $J = 8.2, 1.9$ Hz, 1H, H-6), δ 7.04 (*d*, $J = 1.9$ Hz, 1H, H-2), δ 6.94 (*d*, $J = 1.9$ Hz, 1H, H-2'), δ 6.92 (*d*, $J = 8.2$ Hz, 2H, H-5', H-6'), δ 6.87 (*d*, $J = 8.2$ Hz, 1H, H-5) y δ 6.63 (*d*, $J = 15.8$ Hz, 1H, H-7'); Figura 5c, a: δ 6.33 (*d*, $J = 15.9$ Hz, 1H, H-8), δ 6.21 (*dt*, $J = 15.8, 6.6$ Hz, 1H, H-8') y δ 4.84 (*dd*, $J = 6.6, 1.2$ Hz, 1H, H-9'); y Figura 5d a: δ 3.92 (*s*, 3H, -OMe) y δ 3.91 (*s*, 3H, -OMe). La presencia del triacilglicérido **7** fue verificada por las señales en la Figura 5c a: δ 5.42–5.29 (*m*, H-C=C-H) y δ 4.32–4.11 (*m*, R-CH₂-OCOR); Figura 5d, a: δ 2.83–2.75 (*m*, C=C-CH₂-C=C); y Figura 5e a: δ 1.25 (*s*, CH₂).

Las muestras puras de las ftálicas diméricas *rac*-**3**–*rac*-**5** de *L. porteri* mostraron señales distintivas en el espectro de ^1H NMR a δ 7.35 (*d*, $J = 6.6$ Hz, 1H, H-7'), δ 7.51 (*d*, $J = 6.7$ Hz, 1H, H-7') y δ 3.46 (*d*, $J = 7.6$ Hz, 1H, H-7') en CDCl_3 , respectivamente (Figura 6, trazos a y b), y a δ 7.64 (*d*, $J = 6.7$ Hz, 1H, H-7'), δ 7.50 (*d*, $J = 6.6$ Hz, 1H, H-7'), y δ 3.61 (*d*, $J = 7.5$ Hz, 1H, H-7') en $\text{DMSO}-d_6$, respectivamente (Figura 6, trazos c y d). Esas señales fueron claramente identificadas en los diferentes trazos de los espectros de los extractos de acetona de raíces secas y frescas (Figura 6),

proveyendo evidencia directa de que las ftálidas diméricas *rac-3*–*rac-5* existen como productos naturales.

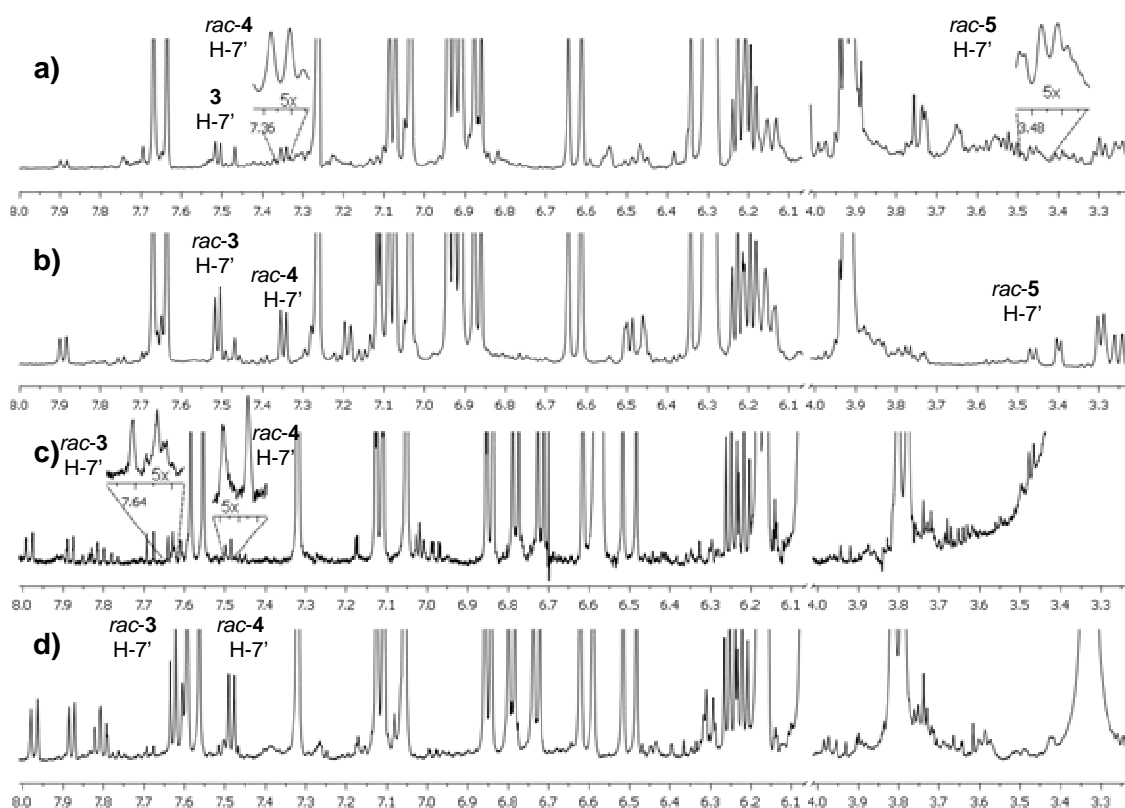


Figura 6. Espectros de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de los extractos de acetona de las raíces frescas (a) y de las raíces secas (b). Espectros de RMN ^1H (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de los extractos de raíces frescas (c) y de las raíces secas (d). Las ampliaciones (5 \times) muestran las señales distintivas de las ftálidas diméricas *rac*-toquinólida B (*rac-3*), *rac*-diligustílida (*rac-4*) y *rac*-riligustílida (*rac-5*)

Al compararse los perfiles de los espectros de RMN ^1H del extracto de acetona de las raíces frescas ($t = 0$, Figura 7a) con aquellos obtenidos a diferentes períodos de secado (Figura 7b: 48 h, Figura 7c: 72 h, y Figura 7d: 96 h), se observó que los perfiles no fueron idénticos a los diferentes tiempos, estableciendo que la composición química de las raíces fue ligeramente modificada con el secado. En particular, aparecieron señales para el ácido ferúlico (**6**, δ 7.70 (d , $J = 15.6$ Hz, 1H, H-7)) e incrementaron las señales para *Z*-butilidenftálida (**2**, δ 7.89 (dt , $J = 1.0, 7.7$ Hz, 1H, H-7)) en las muestras de los extractos de las raíces secadas por períodos de tiempo más largos. Esta observación evidenció la disminución del ferulato de coniferilo (**10**) con el secado de las muestras. Por otro lado, la labilidad de **10** en la producción de ácido ferúlico (**6**) y la transformación directa de *Z*-ligustílida (**1**) a *Z*-butilidenftálida (**2**) ha sido documentada.^[11, 44, 46]

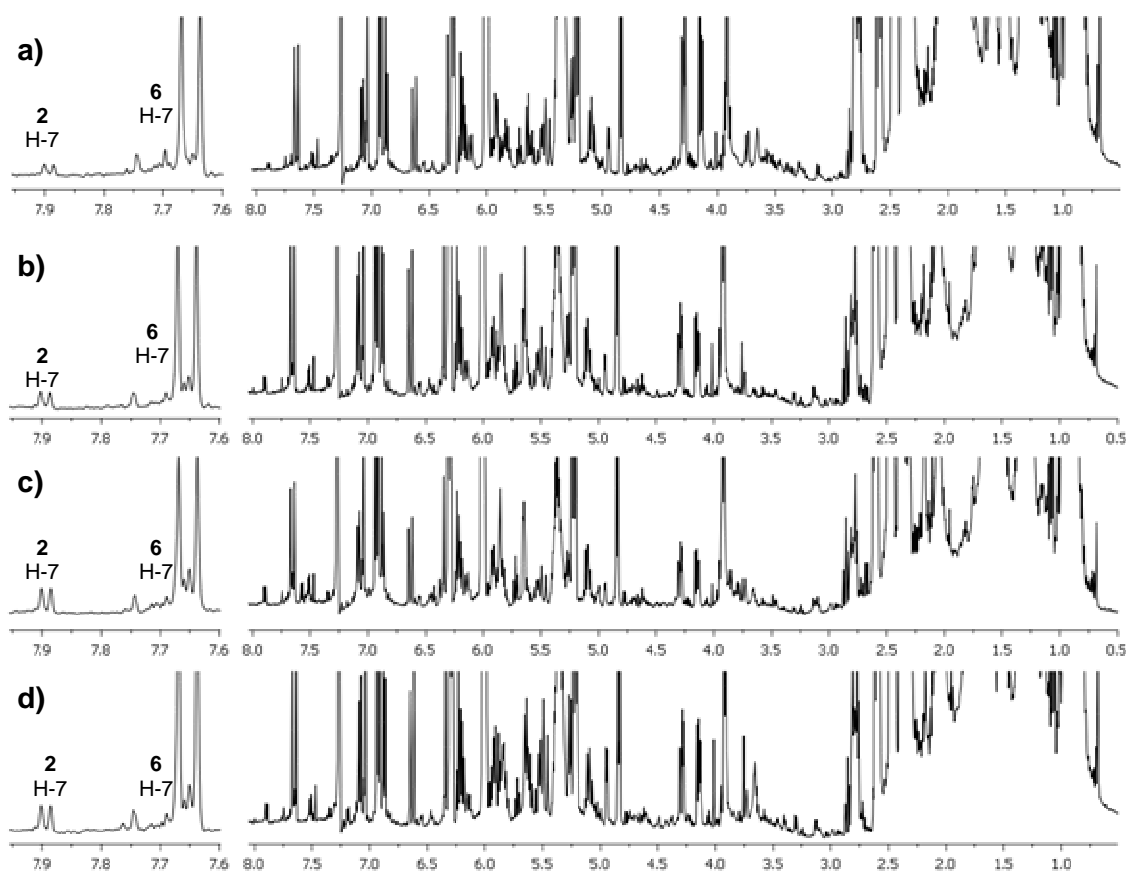


Figura 7. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de los extractos de acetona de las raíces frescas, antes (a) y después de secado a 48 h (b), 72 h (c) y 96 h (d). La sección a la izquierda indica las señales para *Z*-butilidenftálida (**2**) y ácido ferúlico (**6**)

Evidencia adicional de la presencia de *Z*-butilidenftálida (**2**), *rac*-toquinólida B (*rac*-**3**), *rac*-diligustílida (*rac*-**4**), ácido ferúlico (**6**) y ferulato de coniferilo (**10**) en el extracto de raíces secas de *L. porteri* fue obtenida del experimento de RMN ^1H DOSY. El espectro (obtenido en $\text{DMSO}-d_6$, debido a la mejor separación de los componentes en comparación con CDCl_3) mostró cuatro niveles de velocidad de difusión principales: A, B, C y D (Figura 8 y 9). En la región δ 7.00–4.3, las señales que aparecen con un coeficiente de difusión de $1.75 \times 10^{-10} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ (marcado como nivel A), corresponde a la mezcla de ácido ferúlico (**6**) y ferulato de coniferilo (**10**). En los niveles siguientes, B y C, los cuales se encuentran en un rango de coeficiente de difusión de $2.20\text{--}2.45 \times 10^{-10} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$, entre las señales más representativas se evidenciaron las de *rac*-diligustílida (*rac*-**4**) (H-7' a δ 7.50, H-8 a δ 5.35 y H-8' a δ 4.90) y las de *rac*-toquinólida B (*rac*-**3**) (H-7' a δ 7.64 y H-8' a δ 4.45). Este análisis permitió corroborar la existencia de las ftálicas diméricas mencionadas. Debido a la baja concentración de *rac*-riligustílida (*rac*-**5**), su separación no fue posible por esta técnica. El grupo de señales de los compuestos mayoritarios que mostraron coeficientes de difusión de $3.65 \times 10^{-10} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ (nivel D), correspondieron al monómero *Z*-ligustílida (**1**).

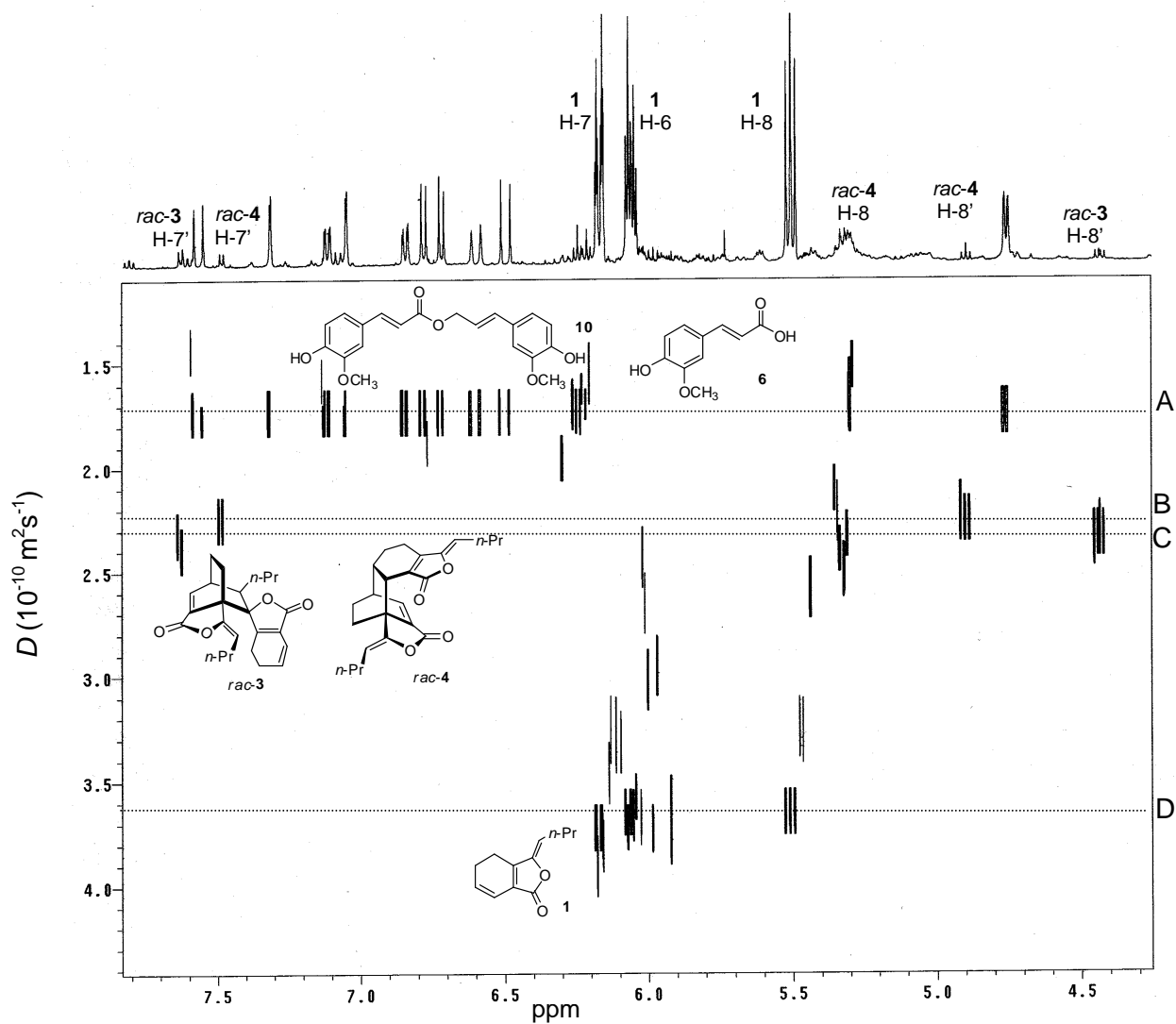


Figura 8. Espectro DOSY del extracto de acetona de *L. porteri*. Los grupos de señales de los componentes químicos están marcados en los niveles A, B, C y D. El espectro de RMN ^1H del extracto de acetona se muestra en la parte superior (eje horizontal) y se asignan las señales para *Z*-ligustílida (**1**), *rac*-toquinólida B (*rac*-**3**) y *rac*-diligustílida (*rac*-**4**)

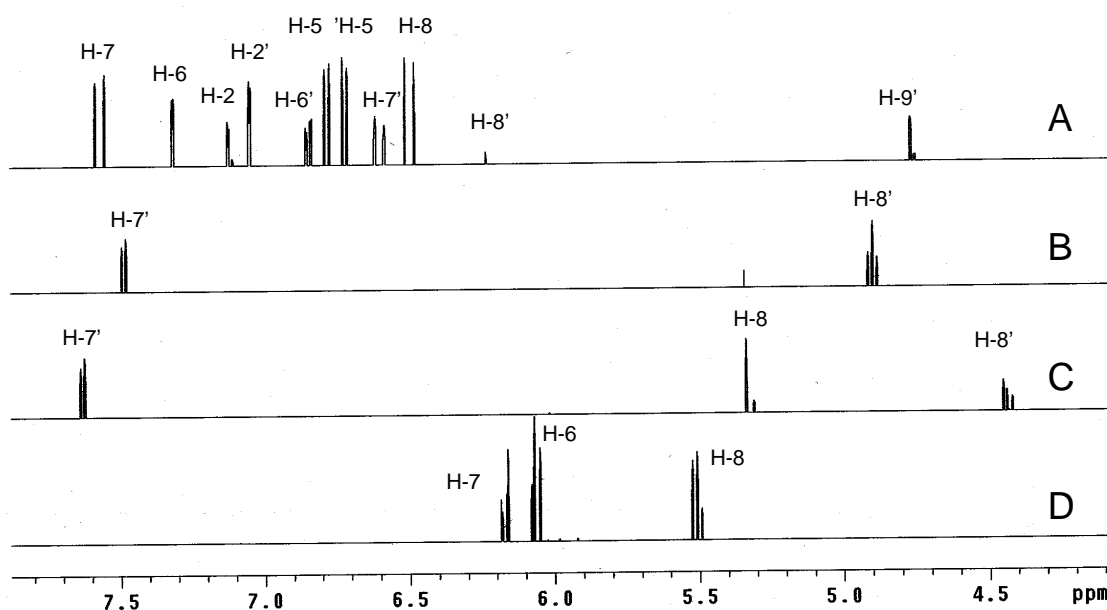


Figura 9. Cortes del espectro DOSY con diferentes coeficientes de difusión: nivel A, ($1.75 \times 10^{-10} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$), mezcla de ácido ferúlico (**6**) y ferulato de coniferilo (**10**); nivel B y C ($2.20\text{--}2.45 \times 10^{-10} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$) *rac*-diligustíflida (*rac*-**4**) y *rac*-toquinólida B (*rac*-**3**), respectivamente, y nivel D ($3.65 \times 10^{-10} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$) *Z*-ligustíflida (**1**)

Tomando en cuenta que la espectroscopia de RMN ha mostrado ser una herramienta muy útil para la cuantificación de compuestos en extractos,^[47] se procedió a calcular la cantidad de las ftálicas diméricas presentes en el extracto de raíces frescas de *L. porteri* sin el uso de separación cromatográfica. Para llevar a cabo este objetivo, fue necesario identificar las señales de RMN de los dímeros *rac*-**3**, *rac*-**4** y *rac*-**5**; para tal efecto, el análisis cualitativo del extracto total de acetona permitió la elección de las señales a utilizar en el procedimiento de cuantificación y, consecuentemente, la elección del estándar interno. Las señales a cuantificar para cada sustancia se muestran en la Figura 6 (trazos c y d): para *rac*-toquinólida B (*rac*-**3**), δ 7.64 (*d*, $J = 6.8$ Hz); *rac*-diligustíflida (*rac*-**4**), δ 7.50 (*d*, $J = 6.6$ Hz); y *rac*-riligustíflida (*rac*-**5**), δ 3.61 (*d*, $J = 6.6$ Hz). Esta selección fue realizada tomando en consideración que todas las señales estuvieran en regiones no congestionadas y bien separadas unas de otras. Así, fue adicionado un estándar interno al extracto de acetona de las raíces frescas de *L. porteri* para calcular la cantidad de las ftálicas y otros constituyentes presentes, y la cantidad de cada compuesto se determinó por medio de los promedios de las integrales relativas a partir de la concentración conocida del estándar interno. La señal de RMN ^1H del estándar interno (4-dimetilaminopiridina) seleccionada, se observó en δ 8.08 (*d*, $J = 5.5$ Hz), misma que no se

sobrepuso a ninguna otra señal de resonancia de los compuestos en el extracto a cuantificar. Este compuesto es soluble y estable dentro de la muestra y representó una buena elección para este análisis.

Para cada dímero puro se realizaron cinco diluciones que fueron preparadas a partir de una solución patrón. El rango de concentraciones utilizadas fueron: para *rac*-toquinólida B (*rac*-3) 0.0075–0.075 mM, 0.0068–0.068 mM para *rac*-diligustílida (*rac*-4) y 0.0094–0.094 mM para *rac*-riligustílida (*rac*-5). Los espectros de RMN ^1H de cada sustancia pura fueron obtenidos y posteriormente los valores de las integrales de las señales elegidas se graficaron, expresando la relación I_{FD}/I_{EI} , donde I_{FD} son los valores de la integral de los protones de cada ftálida dimérica e I_{EI} es el valor de la integral del protón del estándar interno, como función de la concentración de cada compuesto puro. Este cálculo, permitió la obtención de las curvas de calibración para los tres dímeros anteriormente mencionados (Figura 10).

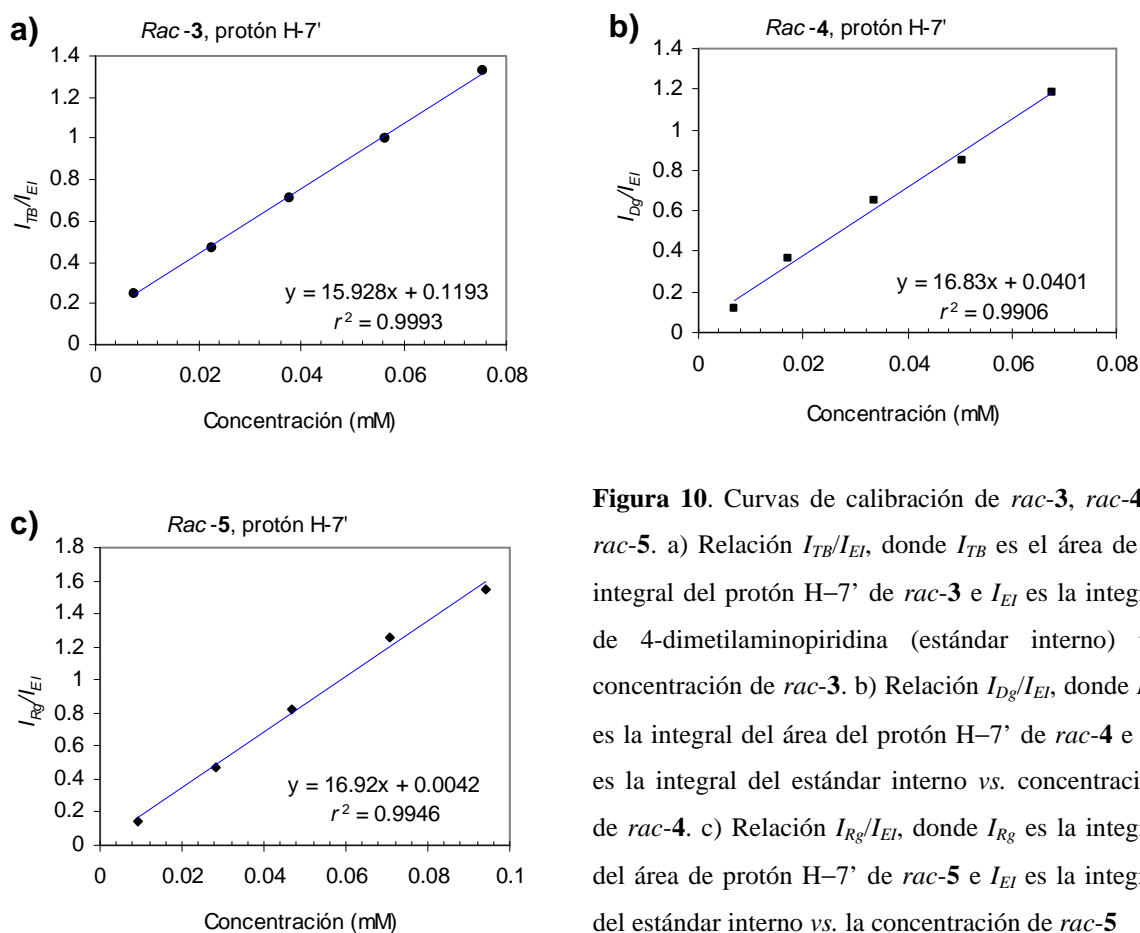


Figura 10. Curvas de calibración de *rac*-3, *rac*-4 y *rac*-5. a) Relación I_{TB}/I_{EI} , donde I_{TB} es el área de la integral del protón H-7' de *rac*-3 e I_{EI} es la integral de 4-dimetilaminopiridina (estándar interno) vs. concentración de *rac*-3. b) Relación I_{Dg}/I_{EI} , donde I_{Dg} es la integral del área del protón H-7' de *rac*-4 e I_{EI} es la integral del estándar interno vs. concentración de *rac*-4. c) Relación I_{Rg}/I_{EI} , donde I_{Rg} es la integral del área de protón H-7' de *rac*-5 e I_{EI} es la integral del estándar interno vs. la concentración de *rac*-5

Las relaciones de integración fueron proporcionales a la cantidad de cada compuesto, mismo que sirvió para evaluar la linealidad del método. Los parámetros de linealidad (r^2) fueron para *rac*-toquinólida B (*rac*-3) 0.9993, 0.9906 para *rac*-diligustílida (*rac*-4), y 0.9946 para *rac*-riligustílida

(*rac-5*). La precisión del método fue verificada mediante la adición de cantidades conocidas de los compuestos auténticos a las muestras de extracto. Una vez adicionadas esas cantidades, se determinó el área de la integral correspondiente a cada compuesto, misma que incrementó proporcionalmente con respecto a la concentración de compuesto adicionado. El recobro de cada ftálica dimérica fue más del 95% con el método implementado (Tabla 4).

Tabla 4. Recobro de las ftálicas diméricas (%) después de la adición de cantidades conocidas de los compuestos auténticos

<i>Rac</i> -toquinólida B (<i>rac-3</i>) ^a	<i>Rac</i> -diligustílida (<i>rac-4</i>) ^b	<i>Rac</i> -riligustílida (<i>rac-5</i>) ^c
95.0 (± 9.2)	96.5 (± 2.0)	99.4 (± 0.7)

Cada experimento fue realizado por triplicado. Las desviaciones estándar se encuentran en paréntesis.

^a 1.2 mg, ^b 1.35 mg, ^c 1.25 mg

Una vez que la metodología fue validada, se analizaron los extractos de acetona de una muestra de raíz fresca de *L. porteri*, utilizando el método de RMN ¹H desarrollado en este estudio. Z-ligustílida (**1**) fue el componente mayoritario en el extracto seguido del ferulato de coniferilo (**10**) y también se pudo determinar el porcentaje de las ftálicas diméricas *rac*-toquinólida B (*rac-3*) y *rac*-diligustílida (*rac-4*) (Tabla 5). La baja concentración de *rac*-riligustílida (*rac-5*) evitó su cuantificación en el extracto de acetona de la muestra de raíz fresca de *L. porteri*.

Tabla 5. Cuantificación de algunos constituyentes del extracto de acetona de *L. porteri* por RMN ¹H^a

Compuesto	Cuantificado por RMN ¹ H (mg/12 mg extracto)	Cuantificado por RMN ¹ H (mg/g peso húmedo)	Porcentaje en el extracto
1	2.0772 ± 0.0535	0.3450 ± 0.0089	17.21 ± 0.40
2	0.0183 ± 0.0047	0.0030 ± 0.0008	0.15 ± 0.04
<i>rac-3</i>	0.0437 ± 0.0049	0.0073 ± 0.0008	0.36 ± 0.04
<i>rac-4</i>	0.0420 ± 0.0040	0.0070 ± 0.0007	0.35 ± 0.03
6	0.5183 ± 0.0118	0.0861 ± 0.0020	4.30 ± 0.08

^a Los valores son los promedios de n = 3 (± desviación estándar).

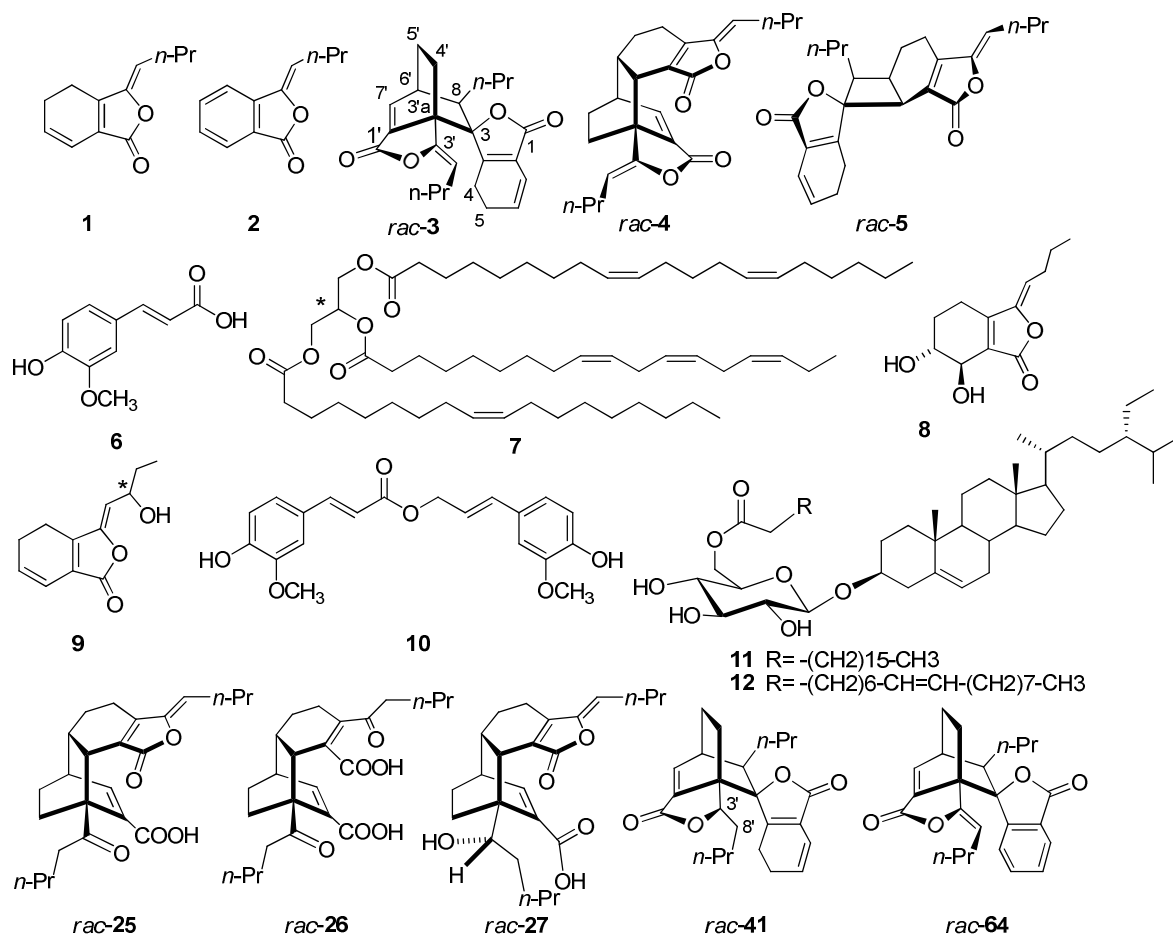
El análisis cualitativo por RMN ¹H permitió identificar y asignar directamente los compuestos conocidos de extractos de acetona de *L. porteri*. El análisis de los espectros de RMN ¹H y DOSY de los extractos de las raíces fresca y secas de *L. porteri* confirmó que las ftálicas diméricas son productos naturales de esta especie y que no son formadas como compuestos post-cosecha. Por otro lado, algunas variaciones en la composición de los extractos fueron observadas después del secado. El estudio mostró las similitudes de los constituyentes fenólicos y el contenido de ftálicas entre diferentes especies y géneros relacionados taxonómicamente, como *L. chuanxiong*, *L. officinalis* y *A. sinensis*.^[44, 46, 48] Los resultados del análisis cuantitativo desarrollado en este estudio, indicaron que el método fue

selectivo, lineal y preciso en el rango de concentraciones probadas e indicó que el método es apropiado para la cuantificación de ftálicas y otros compuestos presentes en el extracto.

5.2. Actividad sedante y espasmolítica de las ftálicas y algunos de sus derivados

En esta sección se describen aspectos del aislamiento y caracterización de los constituyentes químicos de los extractos orgánicos de las raíces de *L. porteri*, que incluyen *Z*-ligustílica (**1**), *Z*-butilidenftálica (**2**), *rac*-toquinólida (*rac*-**3**), *rac*-diligustílica (*rac*-**4**), *rac*-riligustílica (*rac*-**5**), ácido ferúlico (**6**), senquiunólidas F (**8**) e I (**9**), entre otros constituyentes. La preparación de *rac*-4,5-deshidrotoquinólida B (*rac*-**66**) a partir de *rac*-toquinólida B (*rac*-**3**) y su confirmación por análisis de difracción de rayos X. La actividad sedante y espasmolítica derivada de la aplicación de modelos *in vivo* e *in vitro* de algunos de los productos naturales y sus derivados obtenidos en este trabajo son también informados en este apartado.

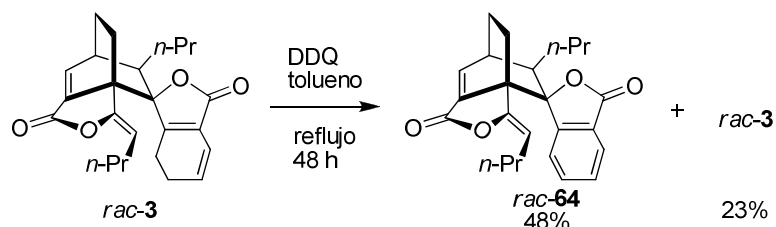
De los extractos orgánicos de las raíces de *L. porteri*, se aisló *Z*-ligustílica (**1**),^[45,49] *Z*-butilidenftálica (**2**), *rac*-toquinólida B (*rac*-**3**),^[50] *rac*-diligustílica (*rac*-**3**),^[51] *rac*-riligustílica (*rac*-**5**), triglicérido **7**,^[52,53] ácido ferúlico (**6**), ferulato de coniferilo (**10**),^[51] senquiunólidas I (**8**) y F (**9**),^[54] los acil-glucosil-esteroles **11** y **12**,^[55, 56] β -D-glucopiranosido de β -sitosterilo^[56] y sacarosa. Los compuestos fueron identificados por comparación directa con muestras auténticas. Cabe resaltar que varios de los constituyentes que se aislaron no han sido reportados previamente para esta especie, que incluyen los compuestos **7–9**, β -D-glucopiranosido de β -sitosterilo y sacarosa.



*La configuración del centro estereogénico indicado no se ha definido

Figura 11. Constituyentes químicos y algunos derivados semisintéticos de *L. porteri*

Por otro lado, se ha informado en un trabajo previo que *rac*-4,5-deshidrotoquinólida B (*rac*-64) es un producto natural de las raíces de *Ligusticum chuanxiong*. En ese trabajo, los autores dan a conocer que para confirmar la estructura de esta sustancia sería necesario un análisis de rayos X.^[11] Al tener disponible en nuestro laboratorio una cantidad manejable de *rac*-3, se preparó *rac*-64 en 48% de rendimiento, mediante el tratamiento de *rac*-3 con diclorodicianoquinona (DDQ) en tolueno (Esquema 18).



Esquema 18. Reacción de obtención de *rac*-4,5-deshidrotoquinólida B (*rac*-64)

La espectroscopia y los datos espectrométricos de *rac*-**64** fueron consistentes con aquellos reportados previamente.^[11] El análisis de rayos X de *rac*-**64** confirmó la estructura y la configuración relativa propuesta para este compuesto (Figura 12).

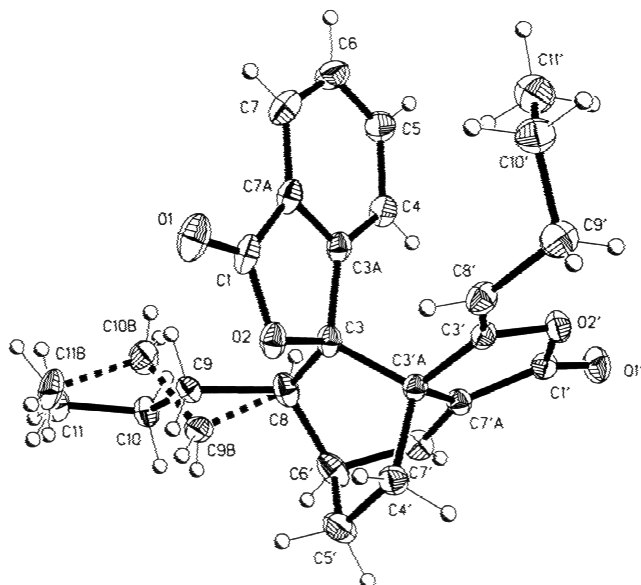


Figura 12. Vista ORTEP de difracción de rayos X de la estructura de *rac*-4,5-deshidrotoquinólida B (*rac*-**64**)

Por otra parte, estudios previos indican que algunas ftálicas monoméricas y diméricas despliegan diversa actividad biológica,^[9, 10] dentro de las cuales, su actividad sedante y anti-espasmódica son bien reconocidas. En particular, *Z*-ligustílida (**1**) y *Z*-butilidenftálica (**2**) han sido probadas como sedantes^[57] y como agentes relajantes^[5, 6]. Para explorar y conocer más acerca de la propiedad sedante de los componentes de *L. porteri*, y algunos de sus derivados, se investigaron algunos compuestos obtenidos en este trabajo. Se encontró que el tiempo de hipnosis inducido por pentobarbital sódico en ratón incrementó significativamente ($p < 0.05$) previo tratamiento con una dosis de 50 mg/Kg de *Z*-ligustílida (**1**), *rac*-toquinólida B (*rac*-**3**), *rac*-diligustílida (*rac*-**4**), senquiunólida F (**9**), *rac*-desmetilwallichílida (*rac*-**25**), *rac*-dicetodiácido de diligustílida (*rac*-**26**),^[15] *rel*-(3'*S*)-(3',8')-dihidrodesmetilwallichílida (**27**)^[15] y *rel*-(3'*R*)-3',8'-dihidrotoquinólida B (**41**). Todos los compuestos probados desplegaron tiempos de hipnosis que incrementaron la línea base en 46.3, 70.8, 24.6, 34.6, 52.3, 66.0, 36.2 y 100%, respectivamente (Tabla 6).

Tabla 6. Efecto producido por 50 mg/Kg *i.p.* de pentobarbital de sodio en ratones pre-tratados con 50 mg/Kg de cada sustancia pura^a

Compuesto	Hipnosis (minutos)
Control	22.66 ± 1.19
1	33.16 ± 2.33 **
<i>rac-3</i>	38.70 ± 1.68 **
<i>rac-4</i>	28.24 ± 3.34 *
9	30.50 ± 3.57 **
<i>rac-25</i>	37.62 ± 5.85 **
<i>rac-26</i>	34.50 ± 2.95 **
<i>rac-27</i>	30.86 ± 5.10 *
<i>rac-41</i>	45.50 ± 2.59 **

^aPara detalles, ver la parte experimental. Los resultados son el promedio ± D.E. de cinco observaciones. * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.005$ con un análisis t de Student

El producto natural *rac-3* fue bastante activo como sedante al igual que su derivado *rac-41* que mostró la mayor potencia entre el grupo de sustancias probadas, sugiriendo en este caso, la mayor bioactividad de los compuestos del tipo toquinólida B. Una observación interesante es que la única diferencia entre los compuestos *rac-3* y *rac-41* es la saturación del doble enlace en la posición C-3'/C-8'. Esta observación se destaca en un reporte en donde el doble enlace C-3/C-8 del monómero **1** ha sido implicado como sitio potencial de bioactividad.^[58]

Por otra parte, en este trabajo se probó la actividad espasmolítica *in vitro* utilizando preparaciones de íleon de cobayo. Los resultados del estudio mostraron que los tratamientos (50 µg/mL) con los compuestos **1**, *rac-3*, **9** y *rac-26* (Figura 11) fueron capaces de inhibir la contracción eléctricamente inducida en el íleon de cobayo en 41.5, 22.4, 54.6 y 9.34%, respectivamente (Tabla 7). Dentro de esta serie de compuestos, **9** fue el más efectivo, al compararse con el compuesto control (papaverina). La actividad anti-espasmolítica de los productos naturales **1**, *rac-3* y **9**, pese a ser moderada (Tabla 7), puede correlacionarse con algunos usos de esta planta en la medicina tradicional para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales.

Tabla 7. Inhibición por diferentes compuestos (50 µg/mL) y papaverina (10 µg/mL) sobre la contracción eléctricamente inducida en íleon de cobayo *in vitro*^a

Compuesto	% de inhibición
1	41.48 ± 7.0
<i>rac-3</i>	22.40 ± 3.4
9	54.59 ± 9.8
<i>rac-26</i>	9.34 ± 5.9
Papaverina	82.8 ± 2.1

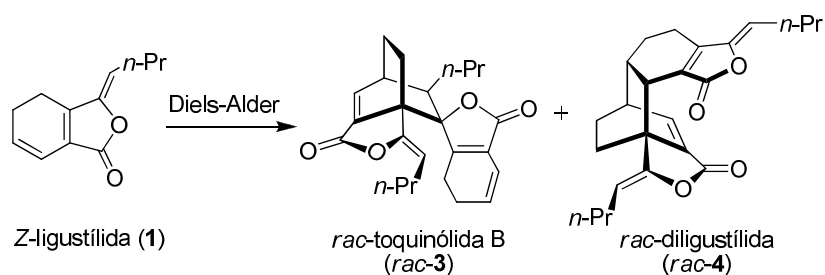
^aPara detalles, ver la parte experimental. Los resultados son el promedio ± D.E. de cinco observaciones

5.3. Reactividad química de las ftálicas

En esta sección se tratarán aspectos relacionados con la reactividad química de las ftálicas de *L. porteri*.

5.3.1. Reacción de dimerización de Z-ligustílida (1)

La ftálica Z-ligustílida (**1**), producto natural aislado y purificado a partir de la especie vegetal *L. porteri*, fue utilizada como materia prima en la reacción de dimerización con el objetivo de generar las ftálicas diméricas *rac*-toquinólida B (*rac-3*) y *rac*-diligustílida (*rac-4*). Así, **1** fue colocada en un reactor de acero inoxidable bajo diversas condiciones de reacción (Tabla 8).



Esquema 19. Reacción Diels-Alder para la formación de las ftálicas diméricas *rac-3* y *rac-4*

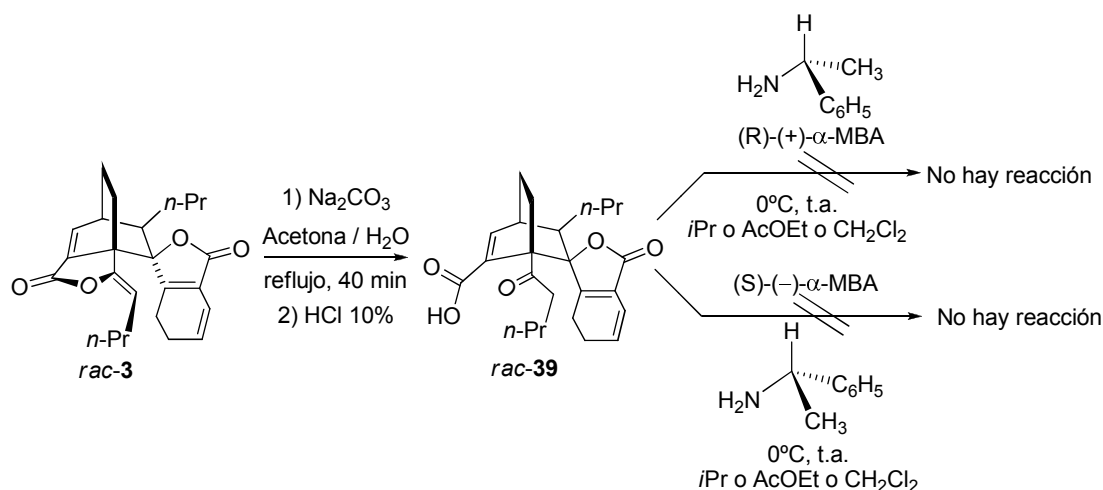
Tabla 8. Condiciones de reacción para la formación de las ftálicas diméricas *rac-3* y *rac-4*

Temp. (°C)	Tiempo (h)	Tolueno	<i>rac-3</i>	<i>rac-4</i>
150	1	—	—	—
150	5	—	—	—
150	8	—	—	—
120	72	15 mL	—	3.2%
111	120	15 mL	0.84%	10.34%

El análisis comparativo por medio de ccf del crudo de algunas reacciones con muestras auténticas de *rac*-toquinólida B (**3**) y *rac*-diligustílida (*rac-4*) aisladas previamente, la purificación mediante cromatografía en columna de los productos y el análisis de los mismos mediante RMN ¹H, permitió identificar a los productos como *rac-3* y *rac-4*. Sin embargo, los resultados mostrados en la Tabla 8 no mejoraron el rendimiento de lo previamente publicado.^[15,16] La utilización de ácidos de Lewis, no fue considerada, pues los reportes previos, indicaron, que su utilización conduce a mezclas de **1** y *Z*-butilidenftálica (**2**), *E*-butilidenftálica (**17**), *n*-butilftálica (**18**), así como a la obtención de mezclas de dímeros lineales y en algunos casos a la ausencia de los mismos.^[17]

5.3.2. Reactividad química de *rac*-toquinólida B (*rac-3*)

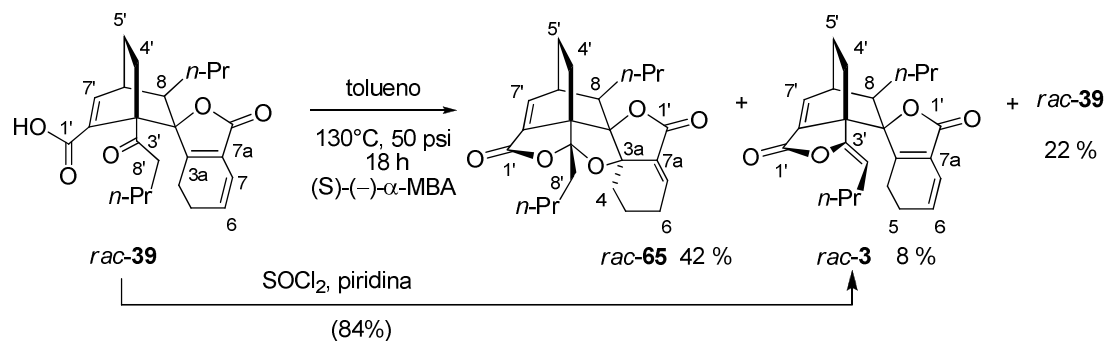
La apertura quimio-selectiva de uno de los anillos de lactona del producto natural *rac*-toquinólida B (*rac-3*) con carbonato de sodio en acetona a reflujo produjo *rac-39*^[22] en buen rendimiento. Con el objetivo de obtener sales diastereoméricas a partir del ácido *rac-39*, esta substancia se trató con las aminas quirales (*R*)-(+)- α -metilbencilamina o (*S*)-(-)- α -metilbencilamina^[59-61] a 0 °C ó a temperatura ambiente utilizando diferentes disolventes (*i*PrOH, AcOEt, CH₂Cl₂). Sin embargo, este tratamiento no generó los productos deseados. La ausencia de las sales esperadas puede ser atribuida al impedimento estérico del ácido carboxílico y a la amina que imposibilitaron la formación del producto (Esquema 20).



Esquema 20. Ensayo para la obtención de sales diastereoméricas a partir de *rac-39*

Por lo anterior, se consideró la posibilidad de obtener amidas diastereoméricas mediante otra ruta. Para este propósito fueron llevados a cabo varios experimentos hacia la preparación del cloruro de acilo correspondiente, el cual a su vez reaccionaría directamente con las aminas quirales. Sin embargo, el tratamiento de *rac-39* con SOCl_2 a diferentes temperaturas (-78°C , 0°C) y con diferentes disolventes (CH_2Cl_2 , THF) produjo *rac*-toquinólida B (*rac-3*) como único producto en buen rendimiento (84%) (Esquema 21).

Tomando en cuenta los resultados anteriores, se planteó la posibilidad de que la reacción directa del grupo ceto de *rac-39* con una amina quiral a presión pudiera generar los correspondientes productos diastereoméricos de interés. Después de considerable experimentación, se pudo observar que tratamiento del *rac*-cetoácido de toquinólida B (*rac-39*) con (*S*)-(-)- α -metilbencilamina (o con (*R*)-(+)- α -metilbencilamina o con (\pm)- α -metilbencilamina) en tolueno a 50 psi de presión resultó en la mezcla racémica del cetal *rac-65* y *rac*-toquinólida B (*rac-3*) en 42% y 8%, respectivamente (Esquema 21). La transformación no procedió en ausencia de base.



Esquema 21. Reacción para la obtención de *rac-65*

La estructura del nuevo compuesto *rac-65* fue determinada de acuerdo a la siguiente evidencia espectroscópica. La fórmula molecular ($C_{24}H_{30}O_5$ establecida por EMAR-FAB) indicó que el producto fue isomérico con la materia prima. Los datos de RMN ^{13}C mostraron 24 señales, las cuales fueron asignadas (mediante análisis DEPT) a dos carbonilos lactónicos, seis carbonos cuaternarios, cuatro metinos, diez metilenos, y dos grupos metilo. La ausencia de las señales asignadas al grupo cetona en RMN ^{13}C , así como el grupo carboxilo y los dobles enlaces C-6/C-7 y C-3a/C-7a en *rac-65* y en comparación con la materia prima, indican que esos grupos estuvieron involucrados en la transformación. La aparición de nuevas señales en δ_c 115.0, 129.8 y 141.6 correspondieron al carbón cetálico y a un doble enlace trisubstituido, respectivamente, estableciendo la estructura de *rac-65* para el producto, misma que fue confirmada por análisis de difracción de rayos X (Figura 13). La estructura del producto adicional (*rac-3*) fue asegurada por comparación directa con una muestra auténtica de nuestro grupo de trabajo.

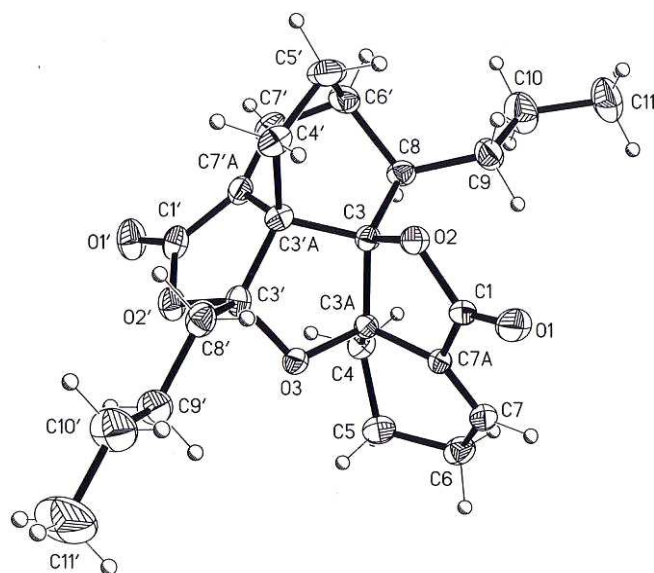
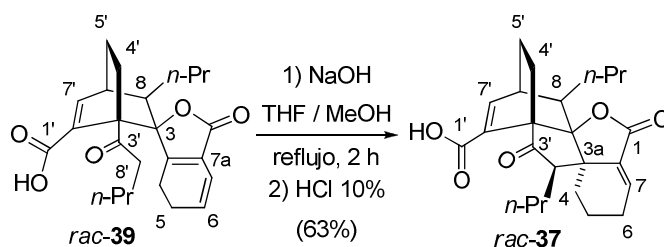


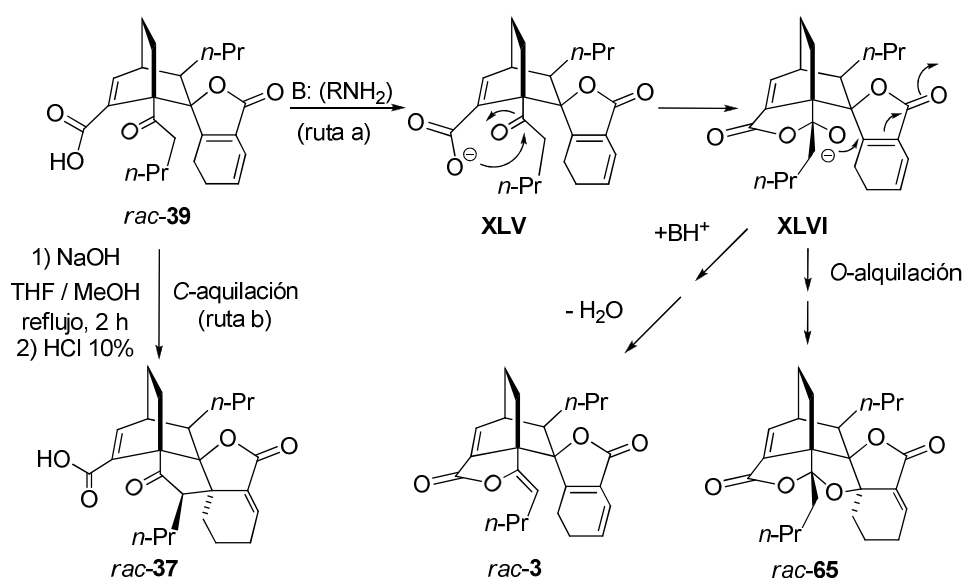
Figura 13. Vista ORTEP de difracción de rayos X de la estructura *rac-65*

Complementariamente a esta transformación, el tratamiento de *rac-39* con NaOH, THF y MeOH generó *rac*-ciclotoquinólida B (*rac-37*) (Esquema 22).^[22]



Esquema 22. Formación de *rac*-ciclotoquinólida B (*rac-37*)

Las rutas mecanísticas sugeridas para la formación de *rac*-toquinólida B (*rac*-**3**), el derivado *rac*-**65** y *rac*-ciclotoquinólida B (*rac*-**37**) se muestran en el Esquema 23. La sustracción del protón carboxílico por la (*S*)-(-)- α -metilbencilamina (R-NH₂, ruta a) produce la entidad **XLV**, promoviendo así el ataque nucleofílico sobre el grupo carbonilo C-3' (vía una ciclización 5-*exo*-trigonal^[20]) para formar el intermediario **XLVI**. Posterior adición tipo Michael del oxianión al doble enlace C-3a/C-7a con una segunda ciclización 5-*exo*-trigonal y estabilización subsecuente produce el cetal *rac*-**65**. Así, la existencia de una competencia entre la formación de *rac*-**3** y *rac*-**65** es evidente. La formación de *rac*-ciclotoquinólida B (*rac*-**37**) puede ser descrita vía formación del enolato el cual es C-alkilado (vía una ciclización 5-*enolendo*-*exo*-trigonal^[20]). Estos resultados demuestran claramente que el cetoácido *rac*-**39** genera estructuras policíclicas en medio básico.



Esquema 23. Rutas mecanísticas sugeridas para la formación de *rac*-**3**, *rac*-**37** y *rac*-**65** a partir de *rac*-**39**

Para determinar las estabildades relativas de *rac*-**37**, *rac*-**39** y *rac*-**65** (compuestos isoméricos, C₂₄H₃₀O₅), fueron realizados calculos teóricos de energía total. Para este propósito, cada compuesto fue modelado y una vez que la estructura fue completada, se calculó la optimización de la geometría global. Los procedimientos de modelado molecular fueron realizados con GaussView.^[62] Todos los cálculos computacionales fueron realizados a un nivel de teoría B3LYP/6-311G* mediante la utilización del conjunto de programas en Gaussian 03.^[63] El desempeño del funcional B3LYP/6-311G** en moléculas orgánicas ha sido descrito ampliamente.^[64] De las energías totales calculadas, se obtuvo ΔE (*rac*-**39**-*rac*-**37**) = 4.71 kcal/mol y ΔE (*rac*-**39**-*rac*-**65**) = 6.95 kcal/mol. El análisis teórico de las energías totales de las estructuras optimizadas indicaron que el compuesto *rac*-**65** es energéticamente más estable que *rac*-**37** por 2.24 kcal/mol. La estabilidad de *rac*-**65** puede ser

atribuida al número de anillos de la estructura, en este caso, seis anillos, en contraste con *rac-37*, que incorpora cinco anillos en su estructura. *Rac-39* se presentó como el compuesto energéticamente menos estable debido quizás a su naturaleza tetracíclica y a su incapacidad de mantener las cadenas alquílicas conformacionalmente rígidas (Figura 14).

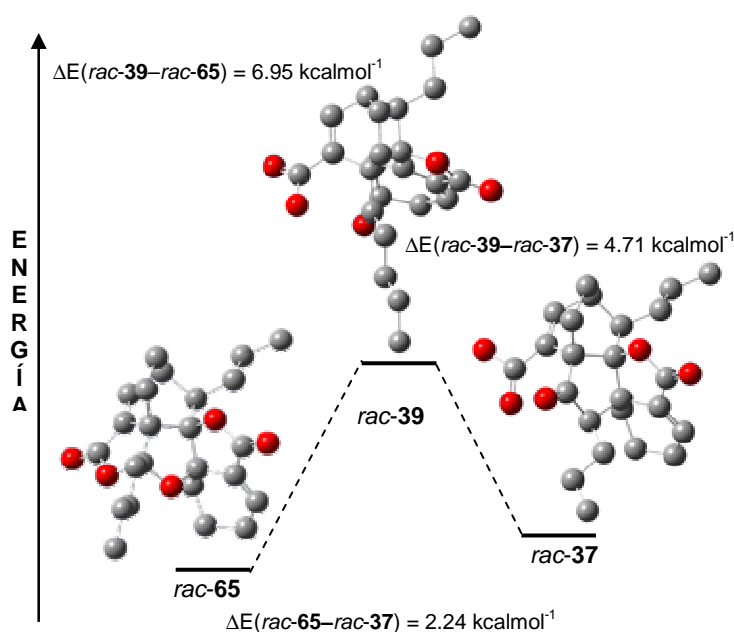


Figura 14. Representación de las energías totales de *rac-37*, *rac-39* y *rac-65*. Los hidrógenos han sido omitidos para claridad. Los cálculos moleculares fueron realizados a un nivel de teoría B3LYP/6-311G**.[63]

Por otro lado, dado que el potencial citotóxico de las ftálicas diméricas es desconocido, se evaluó la actividad de los compuestos *rac-3*, *rac-37*, *rac-39* y *rac-65* frente a las líneas celulares cancerosas humanas de leucemia (K562), colon (HCT-15) y pulmón (SKLU-1).^[65] Los valores de CI_{50} (Tabla 9) indicaron actividad moderada contra algunas líneas celulares al ser comparadas con el control positivo (helenalina).

Tabla 9. CI_{50} (μM) de *rac-3*, *rac-39*, *rac-37* y *rac-65*^a

Compuesto	K562 ^b	HCT-15 ^c	SKLU-1 ^d
<i>rac-3</i>	26.6 ± 1.4	10.5 ± 0.9	7.1 ± 0.6
<i>rac-37</i>	21.9 ± 1.3	28.4 ± 0.8	22.9 ± 1.4
<i>rac-39</i>	>100	>100	>100
<i>rac-65</i>	30.6 ± 3.1	23.1 ± 1.8	37.4 ± 3.6

^aPara detalles, ver la parte experimental. ^bLeucemia. ^cColon. ^dPulmón. Control positivo (helenalina) mostró $CI_{50} = 0.28 \pm 0.02$, 0.29 ± 0.02 y $0.21 \pm 0.02 \mu M$ contra K562, HCT-15 y SKLU-1, respectivamente. Los resultados son los promedios ± Error Estándar de la Media

El producto natural *rac-3* mostró actividad moderada contra las líneas celulares HCT-15 y SKLU-1, mientras que el cetoácido *rac-39* no mostró citotoxicidad.

Por otra parte, fueron obtenidas las energías de HOMO, LUMO y afinidades electrónicas de los compuestos *rac-3*, *rac-37*, *rac-39* y *rac-65* (Tabla 10). Los valores de afinidad electrónica de *rac-3* y su derivado *rac-65* mostraron la capacidad de aceptar electrones más fácilmente al ser comparados con *rac-39* y *rac-37*.

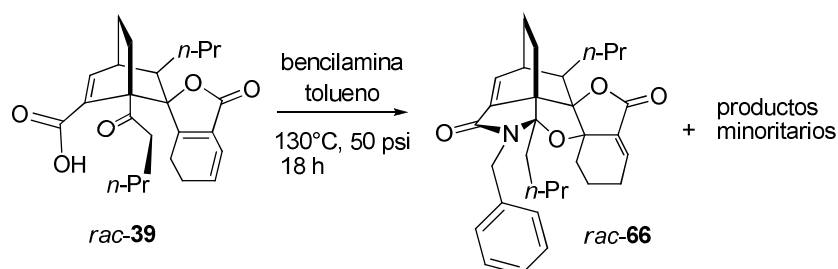
Las diferencias de las energías totales de HOMO y LUMO ayudaron a determinar la excitabilidad de las moléculas *rac-3*, *rac-37*, *rac-39* y *rac-65*, a menor energía, más fácilmente pueden ser excitadas. Los datos ayudaron a confirmar que efectivamente *rac-65* fue el compuesto energéticamente más estable.

Tabla 10. Energías totales de HOMO y LUMO y afinidad electrónica

Compuesto	HOMO (eV)	LUMO (eV)	Δ HOMO-LUMO (eV)	Afinidad electrónica (kcalmol ⁻¹)
<i>rac-3</i>	-6.53	-2.48	-4.05	20.26
<i>rac-39</i>	-6.20	-1.85	-4.35	15.35
<i>rac-37</i>	-6.72	-2.01	-4.71	15.93
<i>rac-65</i>	-7.51	-1.96	-5.55	16.08

Energías obtenidas de las moléculas neutras

En continuación con la exploración de la formación de productos de adición a partir de *rac-39*, se llevó a cabo la reacción de este mismo compuesto con bencilamina en tolueno en sistema cerrado (50 psi), para generar *rac-66* y productos minoritarios (Esquema 24).



Esquema 24. Reacción de *rac-39* con bencilamina para la formación de *rac-66*

La fórmula molecular C₂₁H₃₇O₄N fue asignada al compuesto *rac-66* mediante EMAR-FAB. Su espectro de IR mostró absorciones en 1751 y 1686 cm⁻¹, indicando la presencia de al menos dos grupos carbonilo pertenecientes a una γ -lactona y a una γ -lactama. El análisis de RMN ¹H y ¹³C de **66**, asistido por los experimentos de 2D HSQC, HMBC, COSY y NOESY, indicaron la presencia de dos carbonilos (δ_C 171.6 y 164.6), dos dobles enlaces, de los cuales dos carbonos fueron trisustituidos (δ_C 130.7 y 138.8) y siete carbonos más sustituidos (δ_C 140.2, δ_H 6.90, *dd*, *J* = 7.0, 4.0 Hz; δ_C 138.1, δ_H

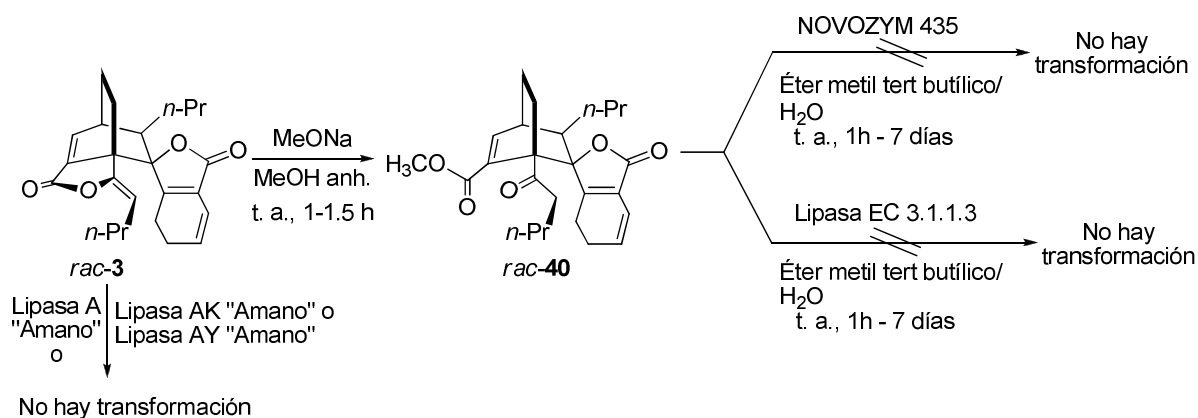
7.23, *d*, $J = 6.5$ Hz; δ_C 128.5, δ_H 7.38, *dd*, $J = 8.5, 1.5$ Hz, δ_C 128.5, δ_H 7.27, *dt*, $J = 7.5, 1.5$ Hz y δ_C 127.2, δ_H 7.21, *dddd*, $J = 8.5, 7.5, 1.5, 1.5$ Hz), tres carbonos cuaternarios sp^3 unidos a oxígeno (δ_C 95.5, 84.9 y 57.1) y un carbono cuaternario sp^3 (δ_C 100.5). Los catorce carbonos remanentes fueron asignados a dos metinos sp^3 , once metilenos sp^3 y dos metilos.

5.3.3. Derivatización estereoselectiva de *rac*-toquinólida B (*rac*-3)

Actualmente, existe un gran número de rutas de síntesis para la obtención de compuestos en forma enantioméricamente pura; gran parte de estas metodologías implican: (1) partir de un sustrato conocido con quiralidad definida, (2) utilizar un reactivo quiral o (3) emplear catálisis asimétrica para inducir la formación estereoselectiva del producto.^[66] Por otra parte, una alternativa interesante a estas metodologías, es el uso de biocatalizadores, debido a sus propiedades quimio- regio- y enantio-específicas, además de poder trabajar bajo condiciones suaves de reacción, con alta eficiencia y sin dañar el medio ambiente. Pese a ello, estos métodos biocatalíticos aún no son ampliamente aplicados, pues hasta el momento solo algunas enzimas presentan actividad y estereoselectividad frente a sustratos precursores. De esta manera, en el presente trabajo, se llevaron a cabo experimentos exploratorios de transformación enzimática para resolver la mezcla *rac*-3.

5.3.3.1 Mediante la utilización de enzimas (lipasa A “Amano”, lipasa AK “Amano” y lipasa AY “Amano”) para llevar a cabo una reacción enantiodiferenciadora, se variaron las condiciones de reacción (pH, temperatura, agitación). Sin embargo, no se obtuvo transformación química de las mezclas racémicas. La experimentación exhaustiva no produjo ningún resultado satisfactorio.

5.3.3.2 También, se realizaron experimentos exploratorios para resolver la mezcla racémica del derivado *rac*-40 en la búsqueda de lograr la hidrólisis enantioselectiva con la utilización de enzimas (NOVOZYM 435, enzima inmovilizada de *Candida antártica* lipasa B y lipasa EC 3.1.1.3 tipo VII de *Candida rugosa*), variando condiciones de reacción (disolvente, tiempo, temperatura, agitación). Sin embargo, no se obtuvo transformación química de *rac*-40. La experimentación exhaustiva no produjo resultado favorable (Esquema 25).



La experimentación conducente a derivatizar estereoselectivamente la mezcla *rac-3* con el fin de formar diastereoisómeros separables mediante procedimientos cromatográficos convencionales se llevó a cabo mediante la experimentación que a continuación se describe:

5.3.3.3. Reacción directa de la ftálica dimérica *rac*-toquinólida B (*rac-3*) con (*R*)-(+)- α -metilbencilamina,^[59-61] a temperatura ambiente, a diferentes lapsos de tiempo y variando las relaciones estequiométricas condujo a la recuperación de las materias primas de partida *rac-3* y (*R*)-(+)- α -MBA.

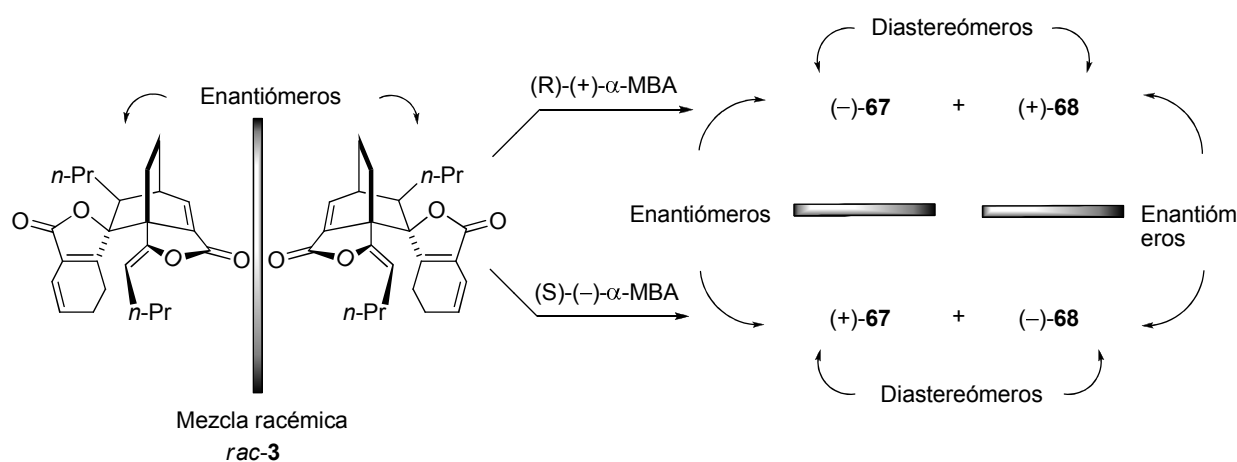
5.3.3.4. Reacción de *rac*-toquinólida B (*rac-3*) con (*R*)-(+)- α -metilbencilamina^[59-61] a reflujo con y sin disolvente (tolueno), variando las relaciones estequiométricas, resultó en la obtención de la mezcla de *rac-3* y *rac-64*.

5.3.3.5. Reacción de *rac*-toquinólida B (*rac-3*) con (*R*)-(+)- α -metilbencilamina^[59-61] usando catalizadores de Lewis y Brønsted (p. ej.: AlCl₃, 2-hidroxipiridina) en presencia y ausencia de tolueno, donde fue recuperada la mezcla de *rac-3* y *rac-64*, y en algunos casos mezclas no caracterizadas.

En estos casos los ensayos fueron infructuosos para la obtención de los diastereómeros derivados de *rac*-toquinólida B (*rac-3*).

5.3.3.6. Conjuntamente, se llevaron a cabo experimentos exploratorios para la resolución de *rac-3*, mediante la generación de su correspondiente ácido carboxílico. Una vez formado el ácido se evaluaron las condiciones de reacción para activar los grupos carboxilo con agentes de acoplamiento, en este caso con dicitclohexilcarbodiimida (DCC) y asimismo, hacer reaccionar éste con los reactivos quirales correspondientes. De esta experimentación no se obtuvieron resultados satisfactorios, solamente fue recuperada *rac*-toquinólida B (*rac-3*).

Por otra parte, considerando que *rac*-toquinólida B (**3**) es una mezcla racémica que posee diferentes sitios electrofílicos, pudo preverse que el tratamiento con una amina enantioméricamente pura como nucleófilo (por ejemplo, (*R*)-(+)- α -metilbencilamina^[59-61] pudiera generar un par de productos de adición diastereoméricos que pudiesen ser separados por métodos convencionales (Esquema 26). Complementariamente, el tratamiento de *rac*-**3** con la amina enantiomérica ((*S*)-(-)- α -metilbencilamina) pudiera producir otro par de diastereómeros derivados de la reacción de adición. Considerando que las reacciones pueden generar pares de productos diastereo- y enantioméricamente puros, puede anticiparse que (-)-**67** sea el enantiómero de (+)-**67**, mientras que (+)-**68** sea enantiómero de (-)-**68**. A su vez, (-)-**67** sea epímero de (-)-**68**, mientras que (+)-**67** sea epímero de (+)-**68**. Las relaciones estereoquímicas entre los pares de productos obtenidos por el tratamiento de *rac*-toquinólida B (*rac*-**3**) se presentan en el Esquema 26. La configuración absoluta de los productos puede ser determinada mediante la aplicación de métodos quiro-ópticos y teóricos, como previamente se ha reportado para varios productos naturales.^[67]



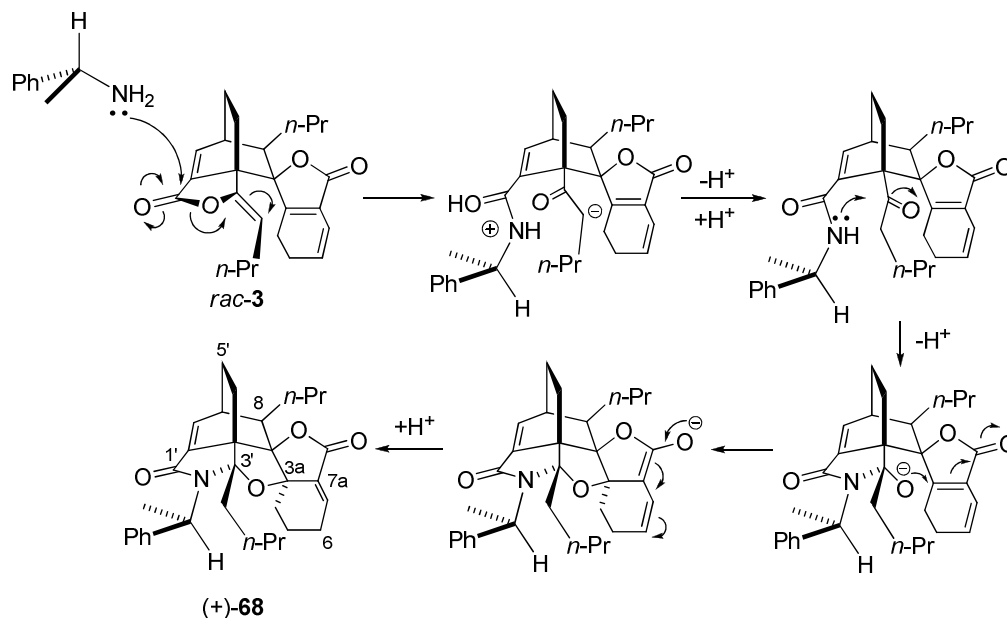
Esquema 26. Relaciones estereoquímicas para los posibles derivados obtenidos a partir de *rac*-**3**

El tratamiento de *rac*-toquinólida B (*rac*-**3**) en tolueno a presión (50 psi) con (*R*)-(+)- α -metilbencilamina generó un par de compuestos diastereoméricos: el compuesto levorrotatorio (-)-**67** (producto menos polar, 41%) y el compuesto dextrorrotatorio (+)-**68** (producto más polar, 29%) como productos mayoritario y minoritario, respectivamente. Como fue anticipado, cuando se utilizó (*S*)-(-)- α -metilbencilamina como nucleófilo bajo las mismas condiciones, el producto dextrorrotatorio (+)-**69** (menos polar, 19%) y el compuesto levorrotatorio (-)-**70** (más polar, 70%) fueron obtenidos como productos minoritario y mayoritario de la purificación por cromatografía en columna, respectivamente. Esas relaciones estereoquímicas fueron confirmadas por la identidad de las propiedades espectroscópicas de (-)-**67** y (+)-**67**, y las de (+)-**68** y (-)-**68** y por las rotaciones ópticas específicas y por las curvas de dicroísmo circular.

Los productos (-)-**67**, (+)-**67**, (+)-**68** y (-)-**68** (Esquema 28) son estereoisoméricos ($C_{32}H_{39}O_4N$) y derivados de la adición de la amina ($C_8H_{11}N$) a la materia prima ($C_{24}H_{28}O_4$), de acuerdo con sus fórmulas moleculares establecidas por EMAR-FAB. La presencia de (a) una γ -lactama conjugada con un doble enlace endocíclico trisustituido (1685 cm^{-1} para (-)-**67** y (+)-**67**; 1689 cm^{-1} para (+)-**68** y (-)-**68**); (b) un anillo tetrahidrofurano (δ_C 85.2, C-3a (ver Esquema 28 para numeración)) para (-)-**67** y (+)-**67**; δ_C 84.9, C-3a para (+)-**68** y (-)-**68**); (c) un carbono cuaternario unido a un oxígeno y a un nitrógeno (δ_C 101.8, C-3' para (-)-**67** y (+)-**67**; δ_C 101.5, C-3' para (+)-**68** y (-)-**68**) y (d) una γ -lactona conjugada con un doble enlace exocíclico trisustituido (δ_C 168.2, C-1 y δ_H 6.87, H-7 para (-)-**67** y (+)-**67**; δ_C 168.0, C-1 y δ_H 6.98, H-7 para (+)-**68** y (-)-**68**) establecen la conectividad molecular de las estructuras estereoisoméricas.

Todas las señales de carbono (32) y las señales de hidrógeno (39) fueron asignadas en los espectros de ^{13}C y 1H (por DEPT, HSQC, HMBC) confirmando las estructuras propuestas.^[68]

El mecanismo para la formación de las lactamas, mostrado para uno de los productos en el Esquema 27, inicia con el ataque nucleofílico de la amina quiral sobre el grupo carbonilo de la lactona enólica (C-1') para formar la ceto amida, seguido de un ataque del nitrógeno de la amida sobre el grupo (C-3') (vía ciclización 5-*exo*-trigonal^[20]) seguida de una adición tipo Michael del oxianión a el doble enlace C-3a/C-7a, produciendo un éter vía una segunda ciclización trigonal. La tautomerización subsecuente genera los productos (Esquemas 27 y 28).



Esquema 27. Mecanismo sugerido para la formación de los compuestos estereoisoméricos (-)-**67** y (+)-**68**

Las configuraciones absolutas de los compuestos (-)-**67**, (+)-**67**, (+)-**68** y (-)-**68** fueron establecidas por el análisis de las curvas de dicroísmo circular (DC) con la aplicación del método de la quiralidad del excitón. Este método predice que cuando dos (o más) cromóforos exhiben interacciones $\pi \rightarrow \pi^*$ fuertes y éstos se encuentren localizados cercanamente a posiciones quirales, la orientación entre los cromóforos determinará el signo del extremo de la longitud de onda más larga de DC y estará de acuerdo con el sentido de los momentos de transición interactuantes.^[65-67] Las curvas de DC de los productos derivados de la reacción de *rac*-**3** con (*R*)-(+)- α -metilbencilamina se muestran en la Figura 15 y son pseudo-enantioméricas. En consecuencia, la curva de DC del compuesto levorrotatorio obtenido con (*R*)-(+)- α -metilbencilamina (menos polar y compuesto mayoritario) mostró dos efectos Cotton de signos opuestos en la región de transición de transferencia de carga intramolecular. El primer efecto Cotton positivo a una longitud de onda larga presentó un valor de 246 nm ($\Delta\epsilon$ +9.11), mientras que el segundo efecto Cotton a una longitud de onda corta mostró un valor de 224 nm ($\Delta\epsilon$ -20.29) debido al acoplamiento del excitón entre dos diferentes cromóforos: la γ -lactona α,β -insaturada y la γ -lactama α,β -insaturada, respectivamente, indicando que los momentos de transición dipolo de los dos cromóforos estuvieron orientados a favor de las manecillas del reloj (Figura 16). Para propósitos ilustrativos se consideró la proyección de Newman (Figura 15, **XLVII**, (-)-**67**) a través del enlace σ C-8 (al frente)/C-6' (atrás) (Figura 15, **XLVIII**), la cual muestra la orientación de los dos cromóforos a favor de las manecillas del reloj definiendo una quiralidad positiva (Figura 15, **XLIX**). Esta representación puede simplificarse como se muestra en la Figura 15 **L**. El sentido absoluto del giro es, por supuesto, el mismo si el espectador observa de C-8 a C-6' ó bien, de C-6' (al frente) a C-8 (atrás), permitiendo la asignación de la configuración absoluta *3S*, *3aS*, *8S*, *3'R*, *3'aS*, *6'R*, *2''R* para el compuesto de la Figura 15 **XLVII** (estructura (-)-**67**, Esquema 28).

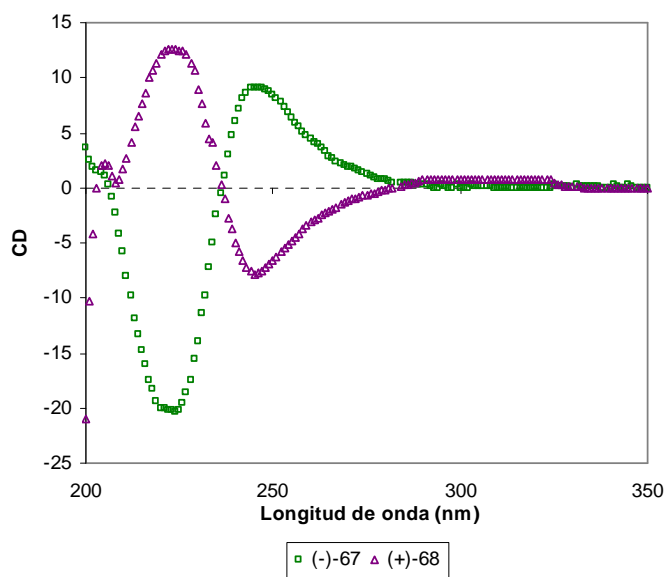


Figura 15. Curvas pseudo-enantioméricas de dicroísmo circular de los compuestos diastereoméricos (-)-**67** y (+)-**68** obtenidos a partir de *rac*-**3** con (*R*)-(+)- α -metilbencilamina

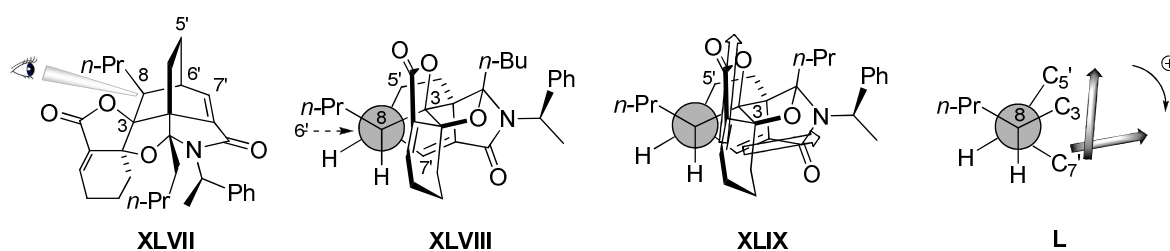


Figura 16. Determinación de la quiralidad de (-)-**67**

Complementariamente, (+)-**79**, producto minoritario, también obtenido con (*R*)-(+)- α -metilbencilamina (compuesto más polar) mostrado en la Figura 17 **XLI**, mostró un efecto Cotton negativo (Figura 15) el cual puede explicarse considerando las proyecciones de Newman a través nuevamente del enlace σ C-8 (al frente)/C-6' (atrás) (Figuras 17, **LII** y **LIII**). El arreglo de los cromóforos determina una quiralidad del excitón en contra de las manecillas del reloj (245 nm ($\Delta\epsilon -7.89$), 223 nm ($\Delta\epsilon + 12.62$), Figura 17, **LIII** y **LIV**), confirmando la estructura **LI** para (+)-**68** y permitiendo la asignación *3R*, *3aR*, *8R*, *3'S*, *3'aR*, *6'S*, *2''R* como la configuración absoluta.

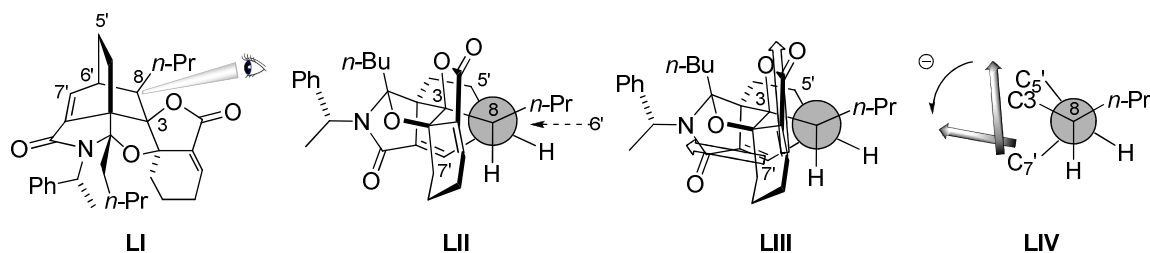


Figura 17. Determinación de la quiralidad de (+)-68

Los productos obtenidos de la reacción con (*S*)-(-)- α -metilbencilamina mostraron efectos Cotton de signos opuestos comparados con (-)-67 y (+)-68 (Figura 18): 245 nm ($\Delta\epsilon$ -39.65), 224 nm ($\Delta\epsilon$ +90.08) para una quiralidad negativa, estableciendo la configuración absoluta 3*R*, 3*aR*, 8*R*, 3'*S*, 3'*aR*, 6'*S*, 2''*S* para (+)-67, y 245 nm ($\Delta\epsilon$ +34.43), 223 nm ($\Delta\epsilon$ -57.65) para una quiralidad positiva (Figura 18), estableciendo la configuración absoluta 3*S*, 3*aS*, 8*S*, 3'*R*, 3'*aS*, 6'*R*, 2''*S* para (-)-68, respectivamente. Las estructuras que incluyen las configuraciones absolutas y las relaciones estereoquímicas de los productos de reacciones se muestran en el Esquema 29.

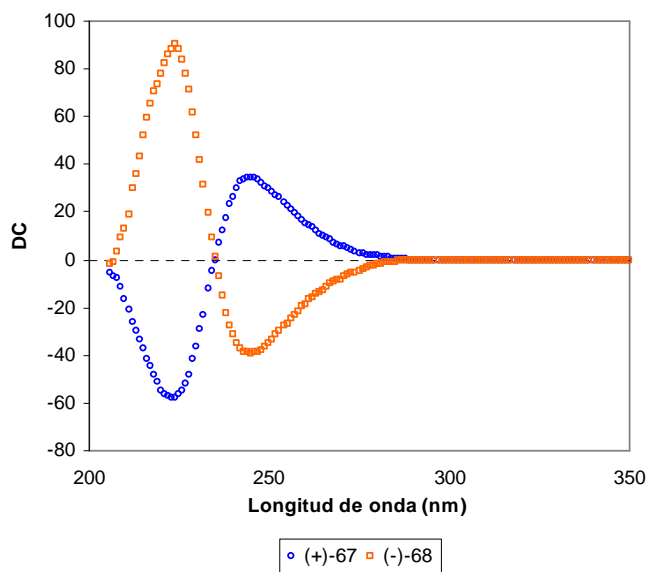
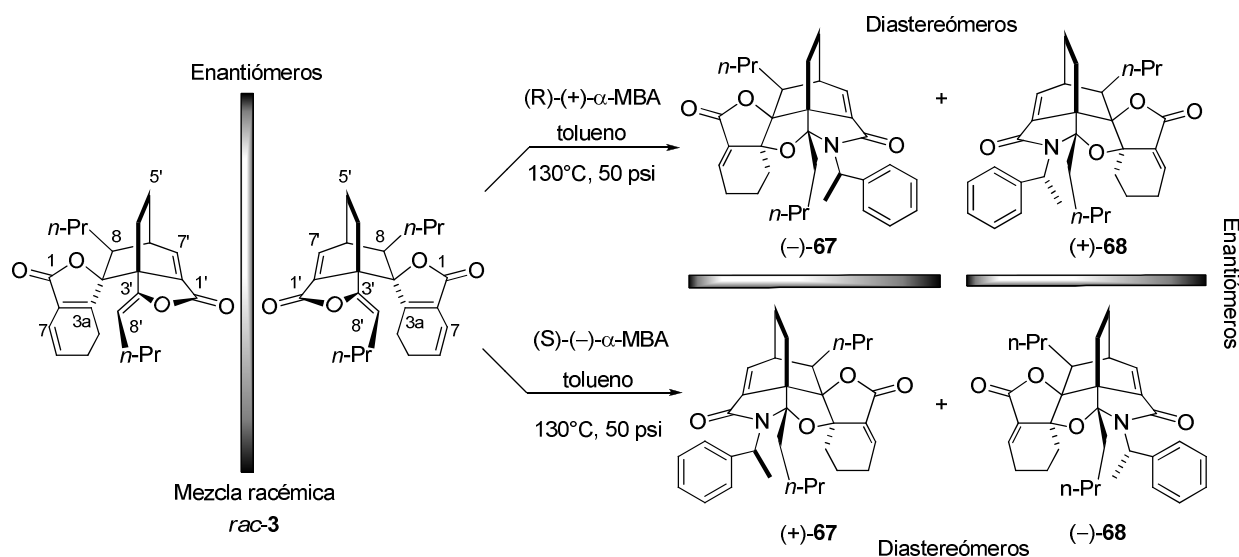


Figura 18. Curvas pseudo-enantioméricas de dicroísmo circular de los derivados diastereoméricos (+)-67 y (-)-68 de *rac*-3 con (*S*)-(-)- α -metilbencilamina



Esquema 28. Reacciones enantioselectivas de *rac*-toquinólida B (*rac-3*)

Apoyo adicional a las conclusiones derivadas de la interpretación de las curvas de DC experimentales, está dado por los cálculos teóricos. La configuración absoluta propuesta fue confirmada por las curvas teóricas de DCE (Dicroísmo Circular Electrónico) de (+)-**67** y (-)-**68**. Siguiendo los detalles computacionales descritos en la parte experimental, la fuerza rotatoria fue calculada para los formalismos de velocidad y fuerza,^[72-74] y los datos obtenidos fueron utilizados para reproducir las curvas experimentales de DC. Los efectos Cotton obtenidos en las curvas de DCE teóricas para ambos compuestos (+)-**67** y (-)-**68** estuvieron en concordancia con aquellos obtenidos experimentalmente (Figuras 19a y 19b). Las curvas muestran el perfil característico debido a la interacción del excitón, dipolo-dipolo eléctrico, debido en este caso, a la disposición de los cromóforos γ -lactona α,β -insaturada y γ -lactama α,β -insaturada. El primer efecto Cotton positivo y el segundo negativo, así como el primer efecto negativo seguido por un segundo efecto Cotton positivo de las curvas de DCE de (+)-**67** y (-)-**68**, respectivamente, están en completo acuerdo con las curvas de DC experimentales (Figuras 19a y 19b).

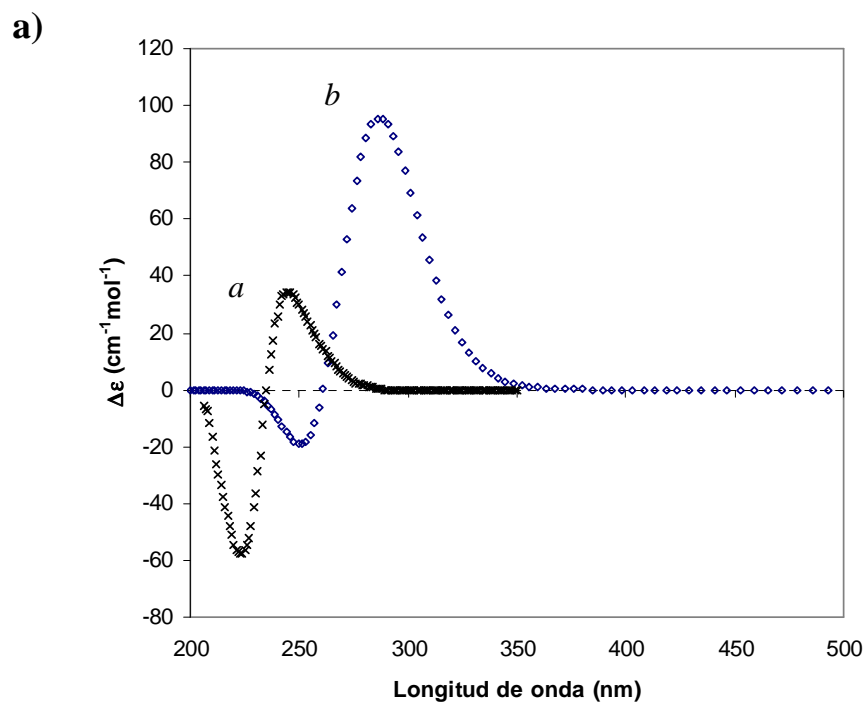


Figura 19a. Comparación entre las curvas de DC experimental (a. línea negra \times) y teórica (b. línea azul \diamond) de (+)-**67**

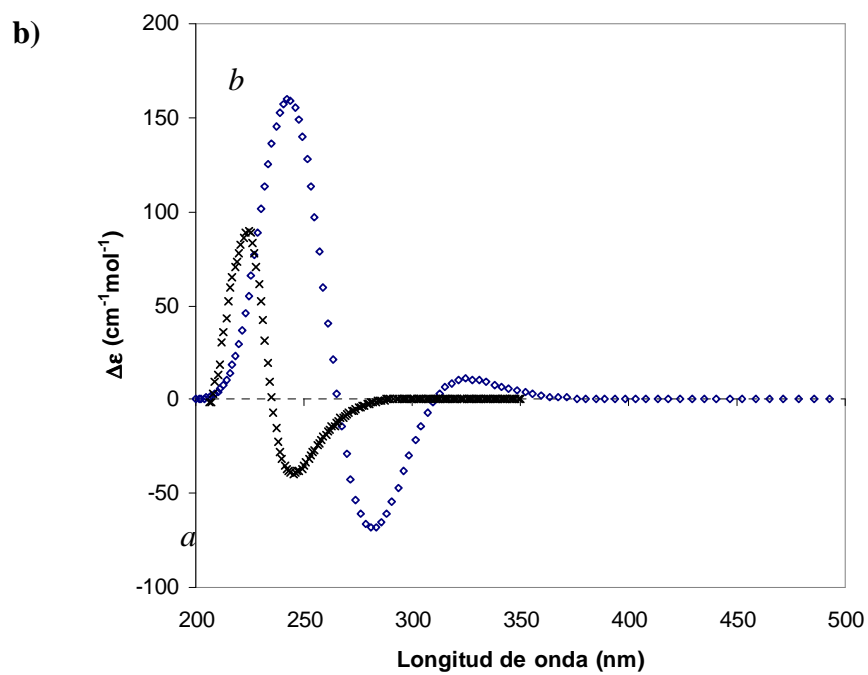


Figura 19b. Comparación entre las curvas de DC experimental (a. línea negra \times) y teórica (b. línea azul \diamond) de (-)-**68**

Tomando en cuenta la actividad biológica previamente informadas de los derivados (pág. 52–56), se decidió investigar la actividad citotóxica de estos compuestos en tres líneas cancerosas humanas, siguiendo el protocolo estandarizado.^[65] Los valores de CI_{50} se muestran en la Tabla 11. Los dos pares de enantiómeros (–)-**67**/(+)-**67** y (+)-**68**/(–)-**68** mostraron ser más potentes al compararse con *rac-3* y con *rac-5*, aunque menos potentes comparados con el control positivo (helenalina). Además, se observó que los compuestos (–)-**67** y (–)-**68** fueron significativamente más activos que sus enantiómeros (+)-**67** y (+)-**68** en las líneas celulares K562 y HCT-15. Esto sugiere que los compuestos ejercen su efecto citotóxico mediante la interacción con un blanco quiral. Para la línea celular SKLU-1 únicamente se observaron pequeñas diferencias entre los enantiómeros.

Tabla 11. Evaluación de la CI_{50} (μM) del producto natural y derivados de *L. porteri*

Compuesto	K562 ^a	HCT-15 ^b	SKLU-1 ^c
<i>Rac-3</i>	26.6 ± 1.4	10.5 ± 0.9	7.1 ± 0.6
<i>Rac-5</i>	46.1 ± 3.8	44.8 ± 1.3	13.2 ± 1.3
(–)- 67	5.7 ± 0.9	5.4 ± 0.5	4.1 ± 0.1
(+)- 68	21.7 ± 1.3	8.5 ± 0.6	5.9 ± 0.5
(+)- 67	13.9 ± 1.6	7.5 ± 0.5	4.9 ± 0.3
(–)- 68	5.2 ± 0.3	5.2 ± 0.2	4.3 ± 0.4

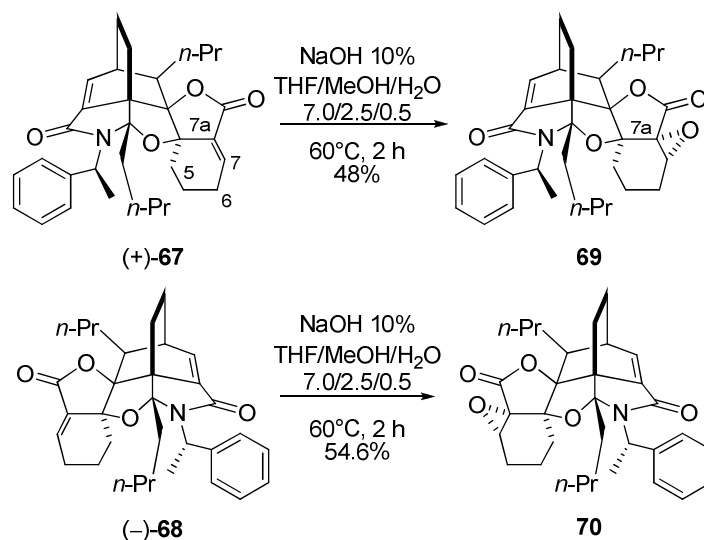
^aLeucemia, ^bcolon, ^cpulmón. El control positivo (helenalina), mostró $CI_{50} = 0.28 \pm 0.02$, 0.29 ± 0.02 y $0.21 \pm 0.02 \mu M$ contra K562, HCT-15 y SKLU-1, respectivamente. Los Resultados son el promedio ± D.E.M.

Por otra parte, en la búsqueda para obtener los productos enantioméricos de *rac-3* a partir de los derivados **67** y **68**, se procedió a hidrolizar los fragmentos quirales de acuerdo a las condiciones mostradas en la Tabla 12. Los resultados mostrados indicaron la baja o nula reactividad en las condiciones señaladas de los compuestos (–)-**67**, (+)-**67**, (+)-**68** y (–)-**68**, misma que es atribuida al impedimento estérico de las estructuras altamente funcionalizadas.

Tabla 12. Condiciones de hidrólisis ensayadas con los derivados estereoisoméricos (–)-**67**, (+)-**67**, (+)-**68** o (–)-**68**

Experimento	Condiciones	Disolvente	Temperatura (°C)	Tiempo (h)	Observación
1	NaOH 10%	Acetona	TA	1 a 4	No hay reacción
2	NaOH 10%	Acetona	Reflujo	0 a 3	Mezcla compleja
3	NaOH 5M	EtOH	TA	2	No hay reacción
4	HCl 10%	Acetona	TA	1 a 3	No hay reacción
5	HCl 2M	EtOH	TA, Reflujo	1	Mezcla compleja
6	H ₂ SO ₄ 2N	Acetona	TA, Relujo	0.5	Mezcla compleja
7	H ₂ O/HCO ₂ H	Acetona	TA	4	No hay reacción
8	Na ₂ CO ₃ 10%	Acetona	Reflujo	0.5	Mezcla compleja
9	KOH 10%	Acetona	Reflujo	1	Mezcla compleja
10	KOH 5M	EtOH	TA, Reflujo	1	No hay reacción / mezcla compleja
11	Na ₂ CO ₃ 10% (6 eq)	THF/MeOH/ H ₂ O (5:1:5)	Reflujo	1 a 2	Mezcla compleja
12	Na ₂ CO ₃ 10% (5 eq)	THF/MeOH/ H ₂ O (7:3:1)	Reflujo	5	No hay reacción
13	NaOH 10% (3 eq)	THF/H ₂ O (1:1)	Reflujo	1 a 6	No hay reacción
14	Na ₂ CO ₃ 10% (6 eq)	THF/MeOH/ H ₂ O (5:1:5)	Reflujo	1 a 2	Mezcla compleja
15	Na ₂ CO ₃ 10% (5 eq)	THF/MeOH/ H ₂ O (7:3:1)	Reflujo	5	No hay reacción
16	NaOH 10% (3 eq)	THF/H ₂ O (1:1)	Reflujo	1 a 6	No hay reacción
17	NaOH 10% (14 eq)	THF/MeOH/ H ₂ O (7:2.5:0.5)	Reflujo	2	Producto más polar

Dentro de las condiciones de reacción probadas, fue posible obtener dos nuevos derivados (Esquema 29).



Esquema 29. Reacción de derivatización de (+)-**67** y (-)-**68**

La fórmula molecular de los compuestos **69** y **70** fue establecida como $\text{C}_{32}\text{H}_{39}\text{O}_5\text{N}$ por EMAR-FAB (m/z 518.2905 and 518.2907, respectivamente) y fue confirmada por las 32 señales de carbono observadas en los espectros de RMN ^{13}C , las cuales correspondieron por análisis del espectro DEPT a 10 metinos, 10 metilenos, tres metilos y nueve carbonos cuaternarios. Los espectros de RMN ^1H mostraron nuevas señales a campo alto (δ_{H} 3.73 (1H, t, $J = 2$ Hz, H-7)) que correspondieron a los protones geminales del epóxido para **69** y **70**. Además, se observó la desaparición de la señal perteneciente al protón vinílico H-7 de las materias primas en δ_{H} 6.87 y δ_{H} 6.98. El cambio del desplazamiento químico en δ_{C} 140.2 para C-7 y δ_{C} 130.7 para C-7a de la materia prima a δ_{C} 58.7 y δ_{C} 59.4 respectivamente para **69** y δ_{C} 139.9 para C-7 y δ_{C} 130.8 para C-7a a δ_{C} 57.8 y δ_{C} 58.9 para **70** indicaron que los dobles enlaces C-7/C-7a estuvieron involucrados en la transformación. En el caso de los espectros de NOESY, revelaron las interacciones de H-7 con H-5 β lo cual permitió asignar la orientación α (Figura 20).

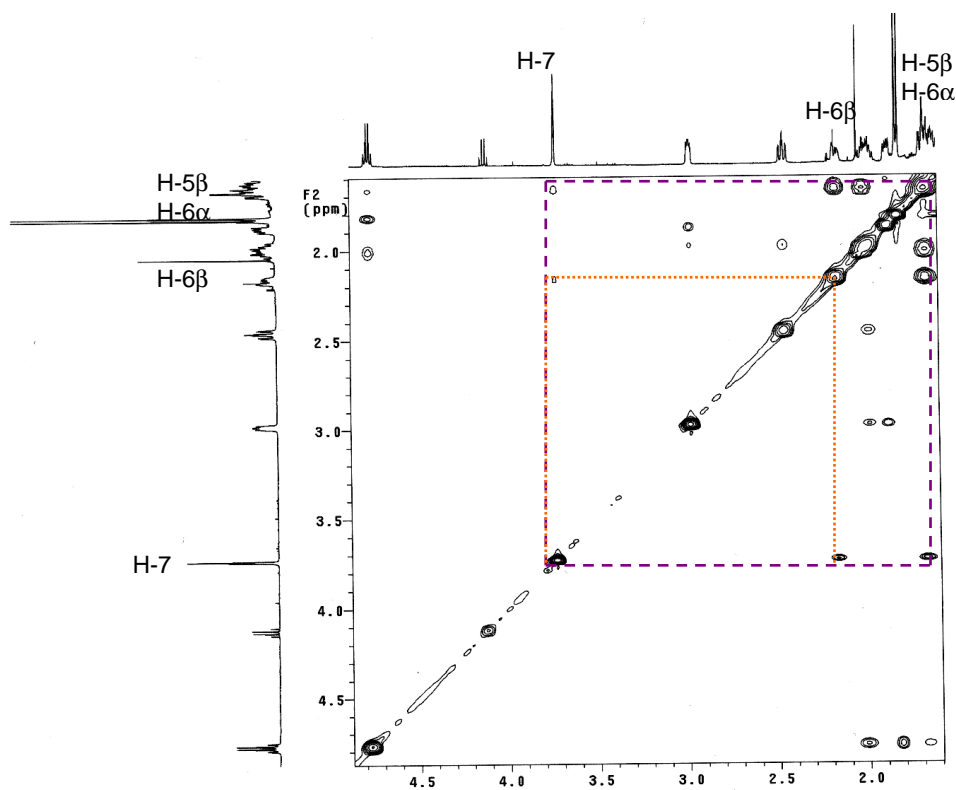
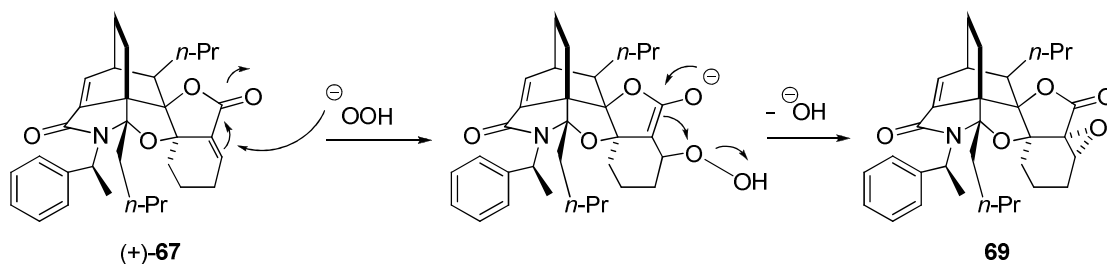


Figura 20. Interacciones NOE relevantes de **69**

El mecanismo de reacción hipotético se puede explicar mediante la adición tipo Michael del ión hidropéroxido (presumiblemente formado como resultado de la presencia de oxígeno en el medio) a la enona conjugada por la cara menos impedida estéricamente seguida de un equilibrio tautomérico subsecuente que permite la formación del epóxido y la eliminación del ión hidróxido (Esquema 30)



Esquema 30. Mecanismo de formación de **69**

La actividad citotóxica de **69** y **70** se determinó en tres líneas cancerosas humanas, siguiendo el protocolo estandarizado^[65] y los valores de CI_{50} son los mostrados en la Tabla 13.

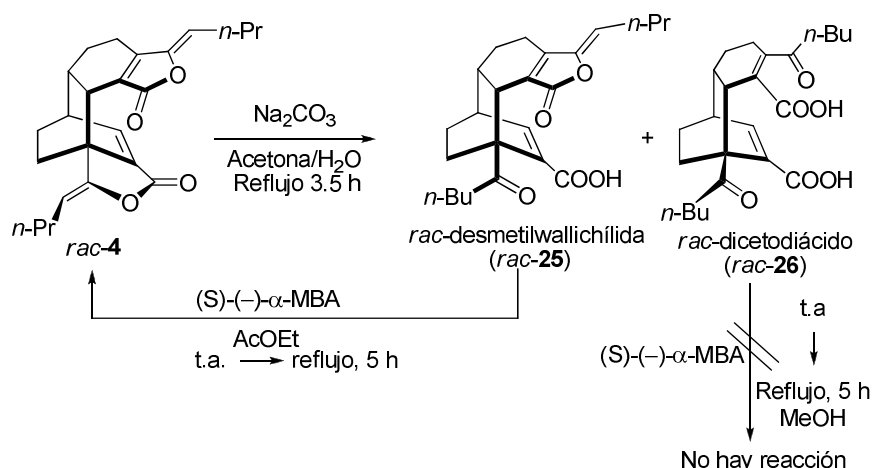
Tabla 13. Evaluación de la CI_{50} (μM) de *rac-3*, **69** y **70**

Compuesto	K562 ^a	HCT-15 ^b	SKLU-1 ^c
<i>rac-3</i>	26.6 ± 1.4	10.5 ± 0.9	7.1 ± 0.6
69	5.8 ± 1.6	6.5 ± 0.3	3.9 ± 0.2
70	6.2 ± 0.4	5.1 ± 0.2	4.5 ± 0.4

^aLeucemia, ^bcolon, ^cpulmón. El control positivo (helenalina), mostró $CI_{50} = 0.28 \pm 0.02$, 0.29 ± 0.02 y $0.21 \pm 0.02 \mu M$ contra K562, HCT-15 y SKLU-1, respectivamente. Los Resultados son el promedio \pm D.E.M.

5.3.4. Reactividad química de *rac*-diligustílida (*rac-4*)

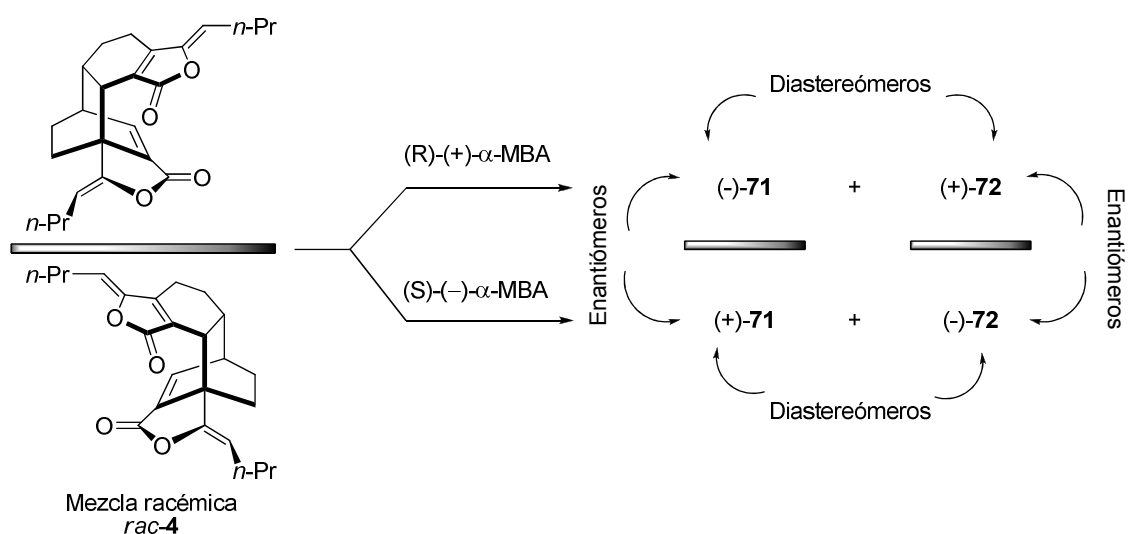
Con respecto a la reactividad de *rac*-diligustílida (*rac-4*), se llevaron a cabo intentos para obtener las sales diastereoisoméricas a partir de la preparación de los correspondientes ácidos carboxílicos *rac*-desmetilwallichílida (*rac-25*) y el *rac*-dicetodiácido (*rac-26*) con aminas enantioméricamente puras (Esquema 32). De esta experimentación se obtuvo la relactonización de *rac-25* que generó *rac-4*. Por otra parte, no fue observada reacción de la amina quiral con *rac-26*.



Esquema 31. Hidrólisis de *rac*-diligustílida (*rac-4*) y derivatización con (S)-(-)- α -MBA

Se realizaron experimentos exploratorios análogos a los descritos para *rac*-toquinólida B (*rac-3*) de transformación enzimática para resolver la mezcla racémica **4**, mediante la utilización de las enzimas lipasa A “Amano”, lipasa AK “Amano” y lipasa AY “Amano” para llevar a cabo una reacción enantiodiferenciadora. Se variaron las condiciones de reacción (pH, temperatura, agitación). Sin embargo, no se obtuvo transformación química de las mezclas racémicas. La experimentación exhaustiva no produjo ningún resultado satisfactorio.

Con respecto a la formación de derivados enantioméricamente puros a partir de *rac*-diligustílida (*rac*-**4**), se procedió de manera análoga al caso de *rac*-toquinólida B (*rac*-**3**). El tratamiento directo de *rac*-**4** con las aminas enantioméricamente puras (*R*)-(+)- α -metilbencilamina y (*S*)-(-)- α -metilbencilamina^[59-61] produjo dos productos de adición diastereoméricos. Así, el tratamiento de *rac*-**4** con (*R*)-(+)- α -metilbencilamina, como en el caso de *rac*-toquinólida B (*rac*-**3**), produjo un par distereomérico (-)-**71** y (+)-**72**, mientras que el tratamiento con (*S*)-(-)- α -metilbencilamina generó un segundo par (+)-**71** y (-)-**72** con las relaciones estereoquímicas mostradas en el Esquema 32.



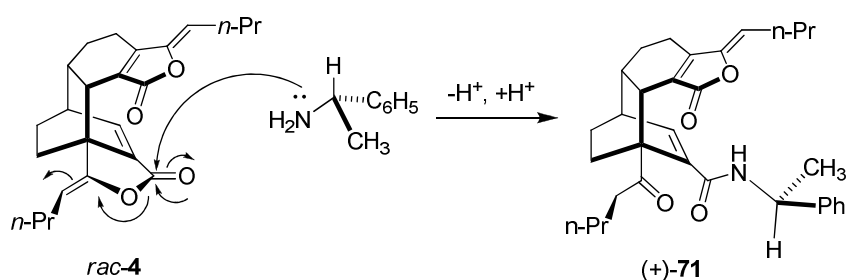
Esquema 32. Relaciones estereoquímicas de los posibles productos de reacción de *rac*-diligustílida (*rac*-**4**)

El tratamiento de *rac*-diligustílida (*rac*-**4**) en tolueno a reflujo con (*R*)-(+)- α -metilbencilamina generó el compuesto levorrotatorio (-)-**71** (menos polar, 33%) y el compuesto dextrorrotatorio (+)-**72** (más polar, 38%) como productos minoritario y mayoritario, respectivamente. Cuando se empleó (*S*)-(-)- α -metilbencilamina fueron obtenidos como producto dextrorrotatorio mayoritario (+)-**71** (39%) y (-)-**72** (36%) como levorrotatorio minoritario, respectivamente. La relación estereoquímica entre ellos fue confirmada por medio de sus propiedades espectroscópicas, así como por sus rotaciones específicas ópticas y por sus perfiles en las curvas de dicroísmo circular.

(-)-**71**, (+)-**71**, (+)-**72** y (-)-**72**, derivados de la reacción de adición de las aminas enantioméricamente puras ($C_8H_{11}N$) a la materia prima ($C_{24}H_{28}O_4$) fueron separados por CPP y se presentaron como productos estereoisoméricos ($C_{32}H_{39}O_4N$) de acuerdo a sus fórmulas moleculares establecidas por EMAR-FAB. El análisis espectroscópico evidenció las bandas de absorción de tres grupos carbonilo 1763, 1705, 1656 cm^{-1} para (-)-**71**, 1760, 1707, 1658 cm^{-1} para (+)-**71**, 1768, 1704,

1658 cm^{-1} (+)-**72** y 1761, 1706, 1642 cm^{-1} para (-)-**72**, respectivamente. Las 32 señales de carbono observadas en los espectros de RMN ^{13}C para cada estructura fueron asignados por análisis del experimento DEPT a tres grupos carbonilo: cetona, lactona y amida; un carbono cuaternario, cinco carbonos vinílicos, once metinos, nueve metilenos, y tres grupos metilo. El cambio en el desplazamiento del C-1' y la señal nueva para C-3' como grupo cetona fue parte de la evidencia de la transformación. Además, el espectro de RMN ^{13}C indicó que esos carbonos estuvieron involucrados en la conversión. Asimismo se observó la ausencia del doble enlace C-3'/C-8' en los productos (desplazamiento de los carbonos a δ_{C} 150.4 y 108.5 en la materia prima); se identificaron nuevas señales correspondientes a las aminas enantiopuras para cada caso (ver parte experimental). Las señales nuevas en los espectros de RMN ^1H a δ_{H} 7.22–7.37 para (-)-**71**, (+)-**71**, (+)-**72** y (-)-**72**, así como las señales correspondientes a H-1'' y H-2'' también fueron indicativas de la adición de la amina a la materia prima. El análisis de los experimentos de 2D HSQC, HMBC, COSY y NOESY ayudó a confirmar la conectividad molecular de los productos.

El mecanismo para la transformación observada se explica mediante el ataque quimioselectivo de la amina al grupo carbonilo de una de las lactonas de *rac*-**4**. La apertura de la misma y posterior estabilización, da lugar a los productos (Esquema 33).



Esquema 33. Mecanismo de formación propuesto para los derivados enantioméricos de *rac*-diligustílida (*rac*-**4**)

Las configuraciones absolutas de los compuestos (-)-**71**, (+)-**71**, (+)-**72** y (-)-**72** se determinaron mediante el análisis de las curvas de DC y el método de la quiralidad del excitón.^[69–71] Se identificaron los cromóforos con bandas de transición fuertes $\pi \rightarrow \pi^*$ y se pudo observar que cada compuesto contenía más de tres cromóforos excitónicamente acoplados: una γ -lactona α,β -insaturada, un doble enlace (C-3/C-8), un grupo carbonilo de cetona, una amida α,β -insaturada y un anillo de benceno. Para facilidad de la explicación se consideraran estructuras de las Figuras 22 y 23. Para los productos obtenidos de *rac*-**4** y (*R*)-(+)- α -metilbencilamina, se consideraron las proyecciones de Newman a través de varios enlaces, enfocándonos a C-7/C-2'' (ambos son centros estereogénicos

dentro de la molécula y cercanos a grupos cromóforos, Figura 22, **LVI** y **LVII**). La curva de DC del compuesto levorrotatorio (+)-**71** (Figura 21) mostró dos efectos Cotton del grupo cetona ($n \rightarrow \pi^*$ 304 nm ($\Delta\epsilon +2.19$); $\pi \rightarrow \pi^*$ 267 nm ($\Delta\epsilon -5.25$)) que no contribuyen a la quiralidad del excitón de la molécula y que son más débiles que aquellos mostrados para la γ -lactona α,β -insaturada y para el anillo de benceno que contribuyen a la quiralidad de la molécula, el primero de ellos, negativo, se presentó en 237 nm ($\Delta\epsilon -11.46$) seguido por un segundo efecto positivo 206 nm ($\Delta\epsilon + 7.27$) indicando así una quiralidad negativa (Figura 22, **LVII** y **LVIII**) y estableciendo la configuración absoluta $6R, 7R, 3'aR, 6'S, 2''R$ para **LV** (Figura 22).

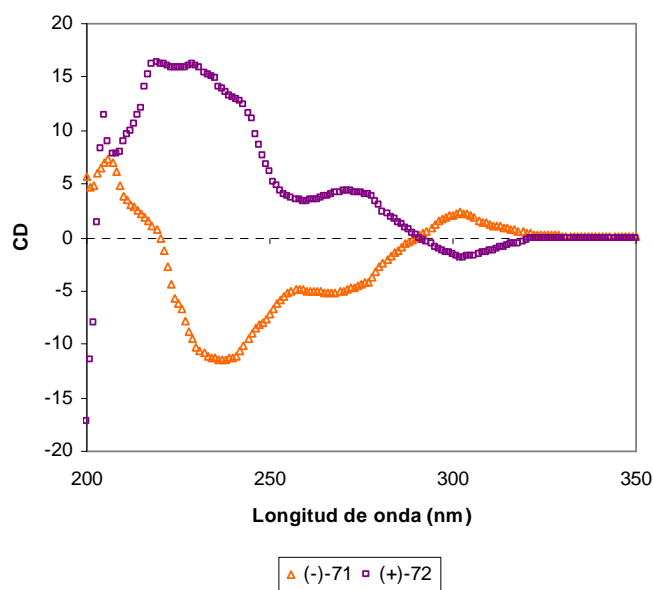


Figura 21. Curvas de dicroísmo circular pseudo-enantioméricas de los derivados diastereoméricos (-)-**73** y (+)-**74** obtenidos de *rac*-diligustólida (*rac*-**4**) con (*R*)-(+)- α -MBA

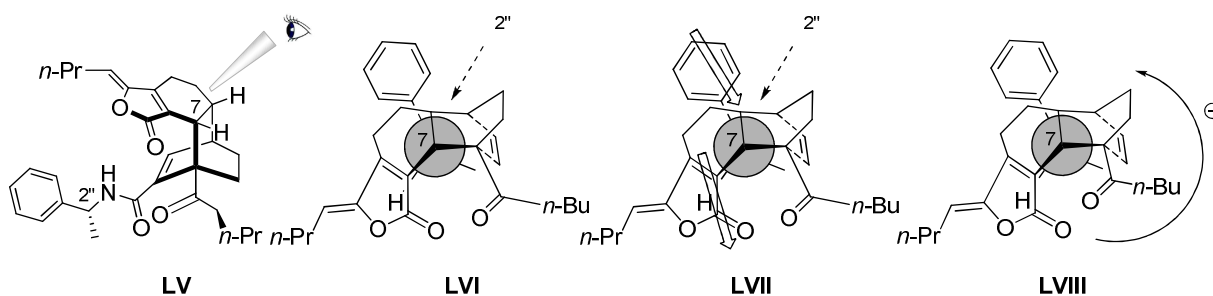


Figura 22. Determinación de la quiralidad de (-)-**71**

(+)-**72**, obtenido también a partir de (*R*)-(+)- α -metilbencilamina (compuesto más polar, Figura 23, **LIX**) presentó un efecto Cotton positivo a 209 nm ($\Delta\epsilon + 16.34$) (Figura 20), los efectos Cotton atribuidos al grupo cetona ($n \rightarrow \pi^*$ 302 nm ($\Delta\epsilon -1.87$) y $\pi \rightarrow \pi^*$ 271 nm ($\Delta\epsilon + 4.42$)) nuevamente en este caso, fueron más débiles que los atribuidos al grupo benceno y a la γ -lactona α,β -insaturada presentándose una quiralidad a favor de las manecillas del reloj (Figura 23, **LXI** y **LXII**) y por lo tanto una configuración absoluta $6S, 7S, 3'aS, 6'S, 2''R$ (Figura 23, **LIX**).

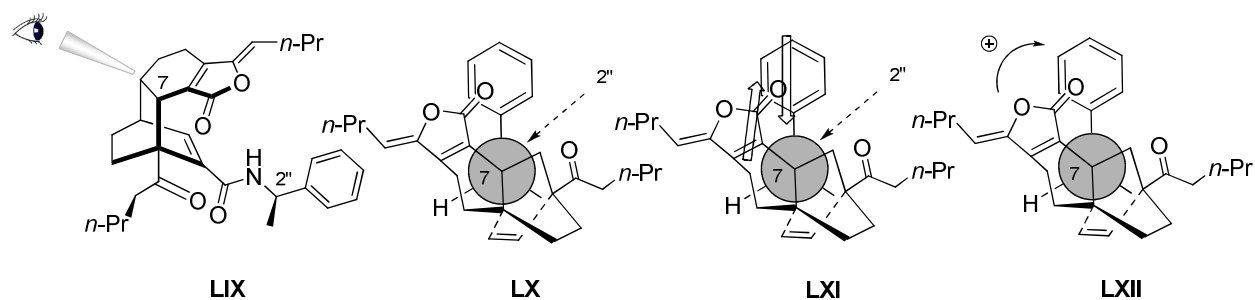


Figura 23. Determinación de la quiralidad de (+)-**72**

Los productos de *rac-4* con (*S*)-(-)- α -metilbencilamina (+)-**71** y (-)-**72**, mostraron efectos Cotton de signos opuestos comparados con (-)-**71** y (+)-**72**, siendo estos: 271 nm ($\Delta\epsilon +11.96$), 203 nm ($\Delta\epsilon -8.23$) para (+)-**71** e indicando una quiralidad positiva $6S, 7S, 3'aS, 6'S$ y $2''S$; y 272 nm ($\Delta\epsilon -11.35$) (Figura 24), para dar lugar a un efecto Cotton negativo (Figura 24) y una configuración absoluta para (-)-**72** $6R, 7R, 3'aS, 6'S, 2''S$ (Esquema 34).

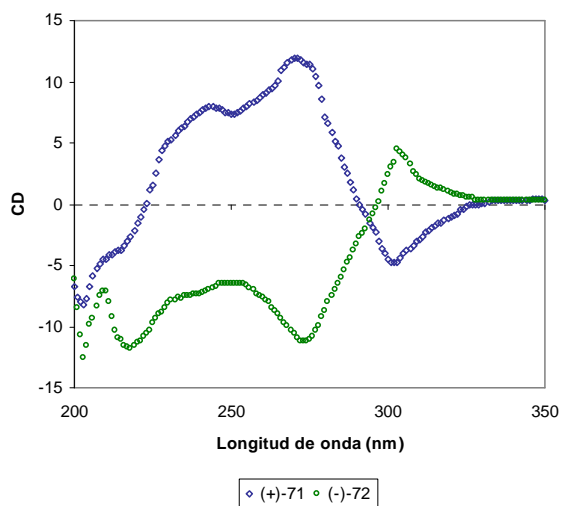
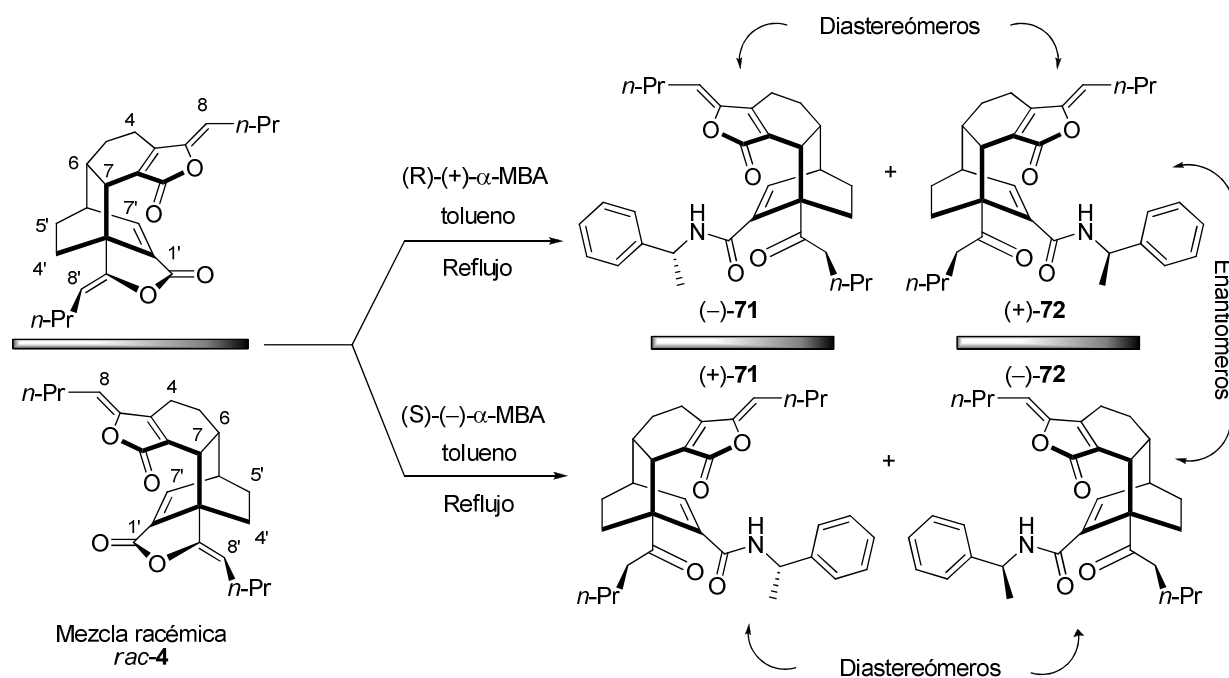


Figura 24. Curvas pseudo-enantioméricas de dicroísmo circular de los derivados diastereoméricos (+)-**71** y (-)-**72** obtenidos de *rac*-diligustíflida (*rac-4*) con (*S*)-(-)- α -MBA



Esquema 35. Reacciones enantioselectivas de *rac*-diligustílida (*rac-4*)

De acuerdo a la importancia farmacológica de las ftálicas, se consideró pertinente llevar a cabo las evaluaciones citotóxicas de los derivados de *rac-4* frente a tres líneas celulares cancerosas, resultados que se muestran en la Tabla 14 (valores de CI_{50} de acuerdo al protocolo estándar^[65]). Los resultados indican claramente la alta dependencia de las variaciones estructurales. Los derivados enantioméricos mostraron ser más activos que los productos naturales y que los derivados *rac-25* y *rac-26* obtenidos de las hidrólisis básicas de *rac*-diligustílida (*rac-4*).

Tabla 14. Evaluación de la CI_{50} (μM) de los derivados de *rac*-diligustílida (*rac-4*)

Compuesto	K562 ^a	HCT-15 ^b	SKLU-1 ^c
<i>Rac-4</i>	46.09 \pm 3.8	11.86 \pm 1.1	10.25 \pm 1.0
<i>Rac-25</i>	47.20 \pm 4.6	> 100	137.7 \pm 10.8
<i>Rac-26</i>	19.9 \pm 0.5	71.6 \pm 3.0	42.6 \pm 3.5
(-)- 71	13.8 \pm 0.7	36.7 \pm 0.3	27.0 \pm 0.3
(+)- 72	10.4 \pm 0.5	32.5 \pm 3.0	26.9 \pm 2.5
(+)- 71	4.4 \pm 1.3	12.2 \pm 0.4	7.3 \pm 0.4
(-)- 72	17.1 \pm 0.4	9.6 \pm 0.6	7.1 \pm 0.7

^aLeucemia, ^bcolon, ^cpulmón. El control positivo (helenalina), mostró $CI_{50} = 0.28 \pm 0.02$, 0.29 ± 0.02 y $0.21 \pm 0.02 \mu M$ contra K562, HCT-15 y SKLU-1, respectivamente. Los Resultados son el promedio \pm D.E.M.

En la búsqueda por obtener los productos enantioméricos de *rac*-**4**, se trataron de hidrolizar las amidas generadas de acuerdo a las mismas condiciones utilizadas en la Tabla 12. Los resultados indicaron la nula reactividad de los compuestos (-)-**71**, (+)-**71**, (+)-**72** y (-)-**72** misma que se atribuye al acomodo de los diversos grupos funcionales con los que cuenta la estructura impidiendo así la hidrólisis.

6. SECCIÓN EXPERIMENTAL

6.1. Material y equipo

La separación y purificación de los constituyentes químicos de los extractos orgánicos, así como de los derivados semisintéticos obtenidos a partir de la especie vegetal *L. porteri* se efectuó mediante técnicas cromatográficas usuales, como son: cromatografía en columna a presión reducida (CCPR), cromatografía de capa delgada preparativa (CCDP) y cromatografía de placa preparativa (CPP). Los procesos de purificación cromatográfica tuvieron como fase estacionaria sílica gel (SiO₂), marca Macherey-Nagel, malla 70/230, 230/400 ASTM. Los disolventes utilizados como fase móvil fueron *n*-hexano, acetato de etilo, diclorometano, tolueno y benceno en diferentes proporciones. El análisis por cromatografía en capa fina se efectuó en cromatofolios de sílica gel de la marca Merck® 60 F₂₅₄ (0.20 mm de espesor). La visualización del análisis de cromatografía en capa fina (CCF) se llevó a cabo mediante la utilización de una lámpara de *UV Spectroline ENF-240C* (λ de 254 y 365 nm), una solución de sulfato cérico amoniacal ((NH₄)₄Ce(SO₄)₄) al 1% en ácido sulfúrico 2N y una solución de ácido fosfomolibdico (12MoO₃-H₃PO₄) 20% en etanol. Las cromatografías en capa fina preparativas y analíticas se realizaron en placas preparativas Merck® (2 mm y 0.20 mm de grosor, respectivamente y una superficie de 20 × 20 cm). Los puntos de fusión se determinaron en un aparato *Fisher Johns* y no fueron corregidos. Los espectros de infrarrojo se obtuvieron en un equipo *FT-IR Bruker TENSOR 750* en CHCl₃. Los espectros de UV fueron obtenidos en un espectrofotómetro *Shimadzu UV160U*. Los espectros de Dicroísmo Circular fueron determinados en un dicrógrafo *Jasco-J720*. La determinación de la rotación óptica se realizó en un polarímetro *Perkin-Elmer 341*. Los espectros de espectrometría de masas se obtuvieron en un espectrómetro marca *Jeol JMS-AX505HA* utilizando la técnica de impacto electrónico con un potencial de ionización de 70 eV y una corriente de ionización de 100 μ A y espectrómetro *Jeol JMX-SX102A* para la técnica de ionización por bombardeo rápido de átomos (FAB⁺). Los espectros de RMN ¹H y ¹³C, fueron llevados a cabo a 25°C utilizando los espectrómetros: *Varian Inova 500* (a 500/125 MHz), *Bruker* (400/100 Mz), *Varian XR-300* (a 300/75 MHz) y *Bruker ARX300* (a 300/75 MHz). Los espectros fueron obtenidos en CDCl₃ y en DMSO como disolvente, utilizando tetrametilsilano (TMS) como estándar interno. Los valores de desplazamiento químico se encuentran en ppm. Se recurrió a experimentos bidimensionales de RMN COSY, NOESY, DEPT, HMQC y HMBC para los derivados novedosos. Adicionalmente, el análisis por difracción de rayos X fue realizado mediante un difractómetro automático *Bruker Smart Apex* con un detector de área CCD.

6.2. Material Vegetal

Las raíces de *Ligusticum porteri*, fuente natural para la obtención de las materias primas, fueron adquiridas en el mercado de Sonora, México. La identificación fue confirmada por comparación morfológica con especímenes identificados con anterioridad por el Dr. Robert Bye y la M. en C. Edelmira Linares del Jardín Botánico del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México (Número de registro: R. B. & E. L. 14148). Las raíces frescas fueron obtenidas de un espécimen vivo, crecido de semillas colectadas en Chihuahua, México y cultivadas en el Jardín Botánico, Instituto de Biología de la UNAM (Número de registro: R. B. 34467).

6.3. Extracción, aislamiento y purificación

Las raíces de la especie vegetal *Ligusticum porteri* de lotes diferentes fueron pulverizadas (15.9 Kg) y posteriormente se obtuvo el correspondiente extracto (1263.4 g) a partir de la maceración con acetona (tres ocasiones \times 48 h) a temperatura ambiente, mismo que fue concentrado a presión reducida obteniéndose el respectivo residuo que fue adsorbido en sílica gel (proporción 1:1.5) y aplicado en seis columnas empacadas con sílice (malla 230/400). La cromatografía fue desarrollada mediante elución a presión reducida^[75,76] utilizando como eluyente mezclas de *n*-hexano/acetato de etilo de polaridad creciente. Los eluatos obtenidos en cada proceso de purificación fueron monitoreados por CCF analítica y reunidos de acuerdo a su similitud cromatográfica. Las fracciones unidas de acuerdo a su perfil fueron sometidas a recromatografías sucesivas (Diagrama 1).

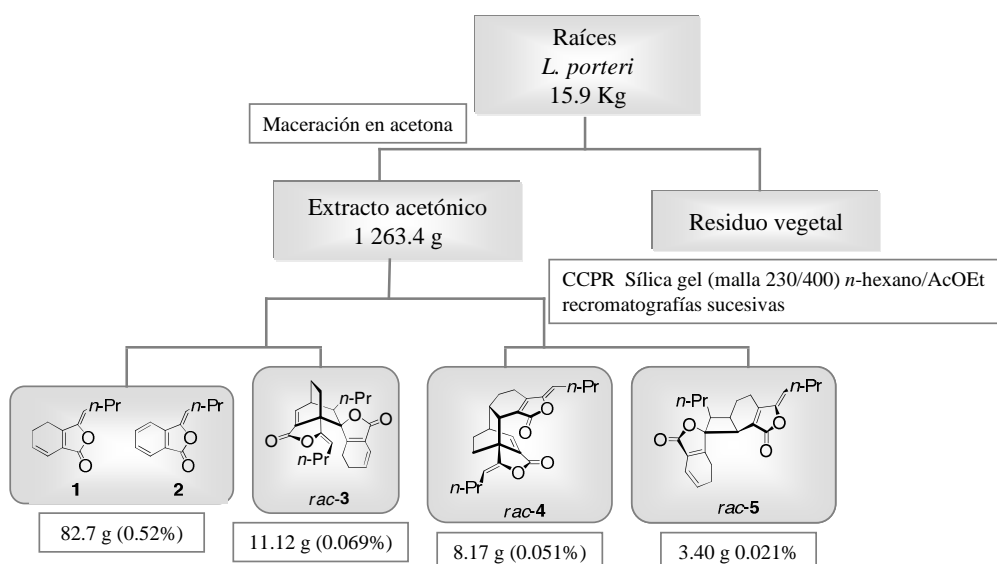
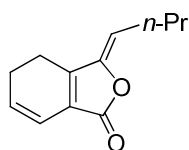


Diagrama 1. Fraccionamiento primario y purificación de las ftálicas monoméricas y diméricas de *L. porteri*

Mediante la aplicación de los procedimientos cromatográficos descritos, fueron obtenidas las materias primas *Z*-ligustílida (**1**), *rac*-toquinólida B (*rac*-**3**) y *rac*-diligustílida (*rac*-**4**), éstas sustancias se caracterizaron de acuerdo a su análisis por cromatografía en capa fina (CCF) tomando como referencia estándares aislados y caracterizados con anterioridad en nuestro grupo de investigación y mediante la comparación de sus datos espectroscópicos con los reportados en la literatura.^[3, 8, 17]

Z-ligustílida (**1**) fue obtenida como un aceite de color amarillo a rojizo que se caracterizó por tener un olor característico penetrante. Se observó que esta sustancia se transforma espontáneamente a temperatura ambiente y a la exposición de la luz a *Z*-butilidenftálida (**2**).

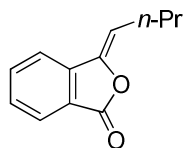


Z-ligustílida (**1**)

Aceite amarillo-naranja

R_F 0.38 (*n*-hexano/AcOEt 95:5)

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 6.29 (1H, *dt*, *J* = 9.5, 2.0 Hz, H-7), 6.00 (1H, *dt*, *J* = 10.0, 4.0 Hz, H-6), 5.22 (1H, *t*, *J* = 8.0 Hz, H-8), 2.61–2.44 (2H, *m*, H-4, H-5), 2.39 (1H, *c*, *J* = 7.5 Hz, H-9), 1.52 (1H, *c*, *J* = 7.5 Hz, H-10), 0.95 (3H, *t*, *J* = 7.0 Hz, H-11)



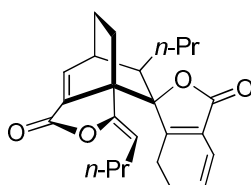
Z-butilidenftálida (**2**)

Aceite amarillo

R_F 0.39 (*n*-hexano/AcOEt 95:5)

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 7.89 (1H, *ddd*, *J* = 7.0, 1.0, 1.0 Hz, H-7), 7.67 (1H, *ddd*, *J* = 7.0, 1.0, 1.0 Hz, H-5), 7.64 (1H, *ddd*, *J* = 7.0, 1.0, 1.0 Hz, H-4), 7.51 (1H, *ddd*, *J* = 8.0, 6.5, 1.0 Hz, H-6), 5.64 (1H, *t*, *J* = 8.0 Hz, H-8), 2.46 (2H, *c*, *J* = 8.0 Hz, H-9), 1.56 (2H, *sext*, *J* = 7.5 Hz, H-10), 0.99 (3H, *t*, *J* = 7.5 Hz, H-11)

Por otro lado, *rac*-toquinólida B (*rac*-**3**), sufre aromatización a *rac*-4,5-deshidrotoquinólida (*rac*-**64**) al almacenarse durante largos períodos de tiempo si no es almacenada a bajas temperaturas y en atmósfera de nitrógeno.



rac-toquinólida B (*rac*-3)

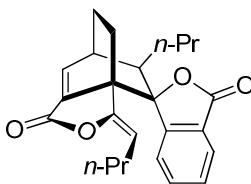
Agujas blancas

R_F 0.46 (*n*-hexano/AcOEt 4:1)

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 7.51 (1H, *d*, *J* = 7.0 Hz, H-7'), 6.17 (1H, *dt*, *J* = 9.5, 2.0 Hz, H-7), 5.92 (1H, *dt*, *J* = 9.5, 4.5 Hz, H-6), 4.62 (1H, *dd*, *J* = 8.5, 6.5 Hz), 3.11 (1H, *m*, H-6'), 2.50 (1H, *m*, H-4'a), 2.29 (1H, *m*, H-5), 2.17 (2H, *m*, H-4a, H-9'a), 2.06 (2H, *m*, H-4b, H-5'a), 1.98 (1H, *m*, H-9'b), 1.67 (1H, *m*, H-9'b), 1.67 (1H, *m*, H-8), 1.47 (2H, *m*, H-9a, H-10a), 1.29 (5H, *m*, H-4'b, H-5'b, H-9b, H-10'), 1.13 (1H, *m*, H-10b), 0.89 (3H, *t*, *J* = 7.0 Hz, H-11), 0.82 (3H, *t*, *J* = 7.0 Hz, H-11')

RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃): δ 170.4 (C-1), 164.2 (C-1'), 161.7 (C-3a), 148.5 (C-3'), 132.9 (C-7'a), 129.3 (C-6), 125.5 (C-7a), 116.6 (C-7), 107.5 (C-8'), 89.6 (C-3), 50.1 (C-3'a), 42.7 (C-8), 36.6 (C-6'), 28.3 (C-9), 28.1 (C-4'), 26.9 (C-9'), 22.6 (C-5), 22.5 (C-10'), 21.1 (C-10), 21.0 (C-4), 16.9 (C-5'), 14.1 (C-11), 13.5 (C-11')

RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 7.64 (1H, *d*, *J* = 6.7 Hz, H-7'), 6.03 (1H, *dt*, *J* = 9.5, 1.9 Hz, H-7), 5.95 (1H, *dt*, *J* = 9.6, 4.5 Hz, H-6), 4.44 (1H, *dd*, *J* = 9.3, 6.2 Hz, H-8'), 3.11 (1H, *dddd*, *J* = 6.5, 4.5, 4.5, 2.2 Hz, H-6'), 2.50 (1H, *q*, *J* = 9.0 Hz H-4'a), 2.27–2.20 (2H, *m*, H-5), 2.08 (1H, *ddd*, *J* = 7.0, 2.5, 2.5 Hz, H-4a), 1.97–1.91 (1H, *m*, Hz, H-9'a), 1.88 (1H, *ddd*, *J* = 7.0, 2.5, 2.5 H-4b), 1.84–1.78 (2H, *m*, H-5', H-9'b), 1.40–1.22 (4H, *m*, H-8, H-9a, H-10a, H-10'), 1.22–1.16 (2H, *m*, H-9b, H-5'b), 1.17–1.12 (1H, *m*, H-4'b), 1.11–1.02 (1H, *m*, H-10b), 0.82 (3H, *t*, *J* = 7.2 Hz, H-11), 0.74 (3H, *t*, *J* = 7.4 Hz, H-11')



rac-4,5-deshidrotoquinólida B (*rac*-64)

Polvo blanco

R_F 0.46 (*n*-hexano/AcOEt 4:1)

M.p. 88–90°C

UV (MeOH) λ_{max} nm (log ε): 275 (3.6), 228.0 (4.3), 204.4 (4.4)

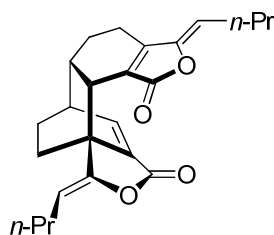
IR (CHCl₃) ν_{max}: 2961, 2933, 2873, 1766, 1704, 1663, 1465, 1285, 1177, 1096, 1022, 947 cm⁻¹

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3 , asignaciones por COSY, HSQC, HMBC y NOESY): δ 7.80 (1H, *dt*, $J = 7.5, 1.0$ Hz, H-7), 7.69 (1H, *d*, $J = 6.5$ Hz, H-7'), 7.57 (1H, *td*, $J = 7.5, 1.0$ Hz, H-5), 7.47 (1H, *td*, $J = 6.5, 1.0$ Hz, H-6), 7.09 (1H, *d*, $J = 7.0$ Hz, H-4), 4.56 (1H, *dd*, $J = 8.8, 6.8$ Hz, H-8'), 3.17–3.15 (1H, *m*, H-6'), 2.57 (1H, *t*, $J = 9.3$ Hz, H-4'a), 2.16–2.09 (1H, *m*, H-5'a), 1.97–1.916 (1H, *m*, H-8), 1.89–1.80 (1H, *m*, H-9'a), 1.79–1.68 (1H, *m*, H-9'b), 1.53–1.47 (1H, *m*, H-9a), 1.45–1.32 (3H, *m*, H-4'b, H-5'b, H-9b), 1.26–1.13 (1H, *m*, H-10a), 1.06–0.94 (2H, *m*, H-10b, H-10'a), 0.93–0.82 (1H, *m*, H-10'b), 0.79 (3H, *t*, $J = 7.3$ Hz, H-11), 0.55 (3H, *t*, $J = 7.5$ Hz, H-11')

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3 , asignaciones por DEPT, HSQC y HMBC): δ 170.0 (C-1), 164.3 (C-1'), 152.5 (C-3a), 148.4 (C-3'), 145.4 (C-7'), 134.8 (C-5), 133.2 (C-7'a), 129.5 (C-6), 126.2 (C-7a), 125.2 (C-7), 121.0 (C-4), 107.2 (C-8'), 88.5 (C-3), 51.1 (C-3'a), 47.2 (C-8), 32.7 (C-6'), 28.9 (C-9), 27.4 (C-4'), 26.7 (C-9'), 22.1 (C-10'), 21.1 (C-10), 17.1 (C-5'), 14.0 (C-11), 13.2 (C-11')

EMIE m/z (rel. int.): 378 [M^+] (3), 190 (100), 189 (15), 161 (24), 148 (50), 146 (5), 134 (4), 105 (10), 103 (3), 77 (4), 55 (8), 18 (5)

Rac-diligustílida (*rac*-4) resultó ser el compuesto natural más estable de la misma forma que *rac*-riligustílida (5).



rac-diligustílida (*rac*-4)

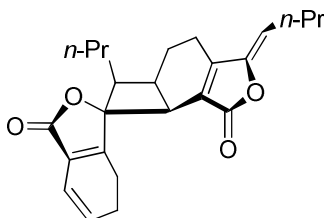
Cristales incoloros

R_F 0.5 (*n*-hexano/AcOEt 3:2)

RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz): δ 7.36 (1H, *d*, $J = 7.0$ Hz, H-7'), 5.07 (1H, *t*, $J = 7.5$ Hz, H-8), 5.00 (1H, *t*, $J = 7.5$ Hz, H-6), 3.26 (1H, *d*, $J = 8.5$ Hz), 2.97 (1H, *m*, H-6'), 2.55 (1H, *m*, H-6), 2.29 (2H, *c*, $J = 7.5$ Hz, H-9), 2.17 (2H, *c*, $J = 7.5$ Hz, H-9'), 2.06 (3H, *m*, H-4, H-4'a), 1.90 (3H, *m*, H-5, H-4'b), 1.45 (2H, *c*, $J = 7.4$ Hz, H-10), 1.44 (2H, *c*, $J = 7.4$ Hz, H-10'), 1.40 (2H, *m*, H-5'), 0.93 (3H, *t*, $J = 7.0$ Hz, H-11), 0.92 (3H, *t*, $J = 7.0$ Hz, H-11')

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3): δ 168.4 (C-1), 164.8 (C-1'), 154.9 (C-3a), 150.4 (C-3'), 147.9 (C-3), 142.0 (C-7'), 134.1 (C-7'a), 126.5 (C-7a), 112.0 (C-8), 108.5 (C-8'), 47.5 (C-3'a), 41.4 (C-7), 41.2 (C-6'), 38.2 (C-6), 30.9 (C-4'), 28.9 (C-5), 27.9 (C-9), 27.4 (C-9'), 25.7 (C-5'), 22.5 (C-10), 21.5 (C-10'), 19.6 (C-4), 13.9 (C-11), 13.8 (C-11')

RMN ^1H (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 7.50 (1H, *d*, $J = 6.5$ Hz, H-7'), 5.35 (1H, *t*, $J = 7.5$ Hz, H-8), 4.90 (1H, *t*, $J = 7.5$ Hz, H-8'), 3.20 (1H, *d*, $J = 8.5$ Hz, H-7), 2.97–2.95 (1H, *m*, H-6'), 2.53–2.21 (2H, *m*, H-6a, H-6b), 2.20 (2H, *q*, $J = 7.5$ Hz, H-9), 2.11–2.05 (3H, *m*, H-4, H-4'a), 2.01 (2H, *q*, $J = 7.5$ Hz, H-9'), 1.96–1.80 (3H, *m*, H-5, H-4'b, H-5'), 1.4 (2H, *q*, $J = 7.5$ Hz, H-10'), 1.27 (2H, *td*, $J = 12.1, 2.9$ Hz, H-10'), 1.17–1.11 (2H, *m*, H-5'), 0.88 (3H, *t*, $J = 7.0$ Hz, H-11), 0.86 (3H, *t*, $J = 7.0$ Hz, H-11')



rac-riligustilida (rac-5)

Cristales incoloros

R_F : 0.47 (*n*-hexano/AcOEt 7:3)

RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz): δ 6.17 (1H, *dt*, $J = 9.5, 2.0$ Hz, H-7), 5.93 (1H, *dt*, $J = 10.0, 4.0$ Hz, H-6), 5.21 (1H, *t*, $J = 7.5$ Hz, H-8'), 3.47 (1H, *d*, $J = 7.0$ Hz, H-7'), 2.94 (1H, *c*, $J = 7.5$ Hz, H-8), 2.78–2.71 (1H, *m*, H-4'), 2.63–2.49 (3H, *m*, H-5, H-6'), 2.34 (2H, *ddd*, $J = 7.5, 3.0, 3.0$, H-9'), 2.24–2.12 (1H, *m*, H-5'a), 2.17 (1H, *m*, H-5'b), 2.06–2.00 (2H, *m*, H-4), 1.48 (4H, *sextup*, $J = 7.5$ Hz, H-10, H-10'b), 0.95 (3H, *t*, $J = 7.5$ Hz, H-11'), 0.86 (3H, *t*, $J = 7.5$ Hz, H-11)

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3): δ 170.3 (C-1), 168.5 (C-1'), 160.1 (C-3a), 154.6 (C-3'a), 149.1 (C-3'), 128.7 (C-6), 123.5 (C-7'a), 122.3 (C-7a), 116.9 (C-7), 112.1 (C-8'), 91.9 (C-3), 44.0 (C-7'), 34.9 (C-6'), 32.3 (C-8), 27.9 (C-9'), 26.9 (C-5'), 22.6 (C-10'), 22.4 (C-10), 20.9 (C-4), 20.5 (C-9 y C-5), 19.6 (C-4'), 14.9 (C-11), 13.8 (C-11')

(500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 6.03 (1H, *dt*, $J = 10.0, 2.0$ Hz, H-7), 5.95 (1H, *dt*, $J = 9.5, 4.0$ Hz, H-8), 5.51 (1H, *t*, $J = 8.0$ Hz, H-8'), 3.61 (1H, *t*, $J = 7.0$ Hz, H-7'), 3.06 (1H, *q*, $J = 10.0$ Hz, H-8), 2.76–2.64 (1H, *m*, H-4'), 2.62–2.54 (3H, *m*, H-5, H-6'), 2.49 (2H, *dt*, $J = 3.6, 1.8$ Hz, H-6'), 2.43 (2H, *td*, $J = 10.6, 4.2, 2.0$ Hz, H-9'), 2.25 (2H, *dt*, $J = 10.1, 5.0$ Hz, H-9), 2.0–1.94 (2H, *m*, $J = 7.5$ Hz, H-5'a), 1.78 (2H, *ddd*, $J = 24.8, 12.0, 4.4$ Hz, H-5'b), 1.45 (2H, *dqd*, $J = 14.4, 7.3, 1.9$ Hz, H-9), 1.39–1.26 (2H, *m*, H-4), 1.15–0.99 (4H, *m*, H-10, H-10'), 0.90 (3H, *t*, $J = 7.5$ Hz, H-11'), 0.80 (3H, *t*, $J = 7.5$ Hz, H-11)

Finalmente, fueron obtenidos 82.7 g de *Z*-ligustilida (**1**), 11.12 g de *rac*-toquinólida B (*rac*-**3**), 8.17 g de *rac*-diligustilida (*rac*-**4**) y 3.40 g de *rac*-riligustilida (*rac*-**5**). El porcentaje correspondiente del peso total de la raíz seca de cada ftálica fue de 0.52%, 0.069%, 0.051% y 0.021%, respectivamente (Diagrama 1).

6.4. Análisis por resonancia magnética nuclear de los extractos de las raíces de *Ligusticum porteri*

6.4.1. Preparación de los extractos de *L. porteri* para el análisis cualitativo de RMN ¹H

El espécimen fue crecido de semillas colectadas en la localidad de Basigochi en el Estado de Chihuahua, México. Las raíces fueron cortadas y divididas en cuatro partes, con el fin de llevar a cabo el análisis a diferentes períodos de tiempo de secado. Parte de este material (4 g) fue extraído inmediatamente (t = 0) con acetona (tres veces durante 20 min a temperatura ambiente y concentrado al alto vacío) para obtener 10.2 mg de extracto. El material de raíz remanente fue secado por 48, 72 y 96 h. Los extractos subsecuentes fueron preparados utilizando 750 mg de raíces con el procedimiento arriba descrito para obtener 4.3, 4.2 y 4.2 mg de extractos, respectivamente.

6.4.2. Preparación de las muestras de RMN ¹H, adquisición y procesamiento de datos para el análisis cualitativo

Las muestras de los extractos de acetona fueron preparados por disolución de 4 mg del residuo en 0.8 mL de CDCl₃. Un total de 128 scans fueron colectados con 6999 Hz con un espacio de 10s y 30 pulsos con una amplitud de 2.7μs. El procesamiento y análisis de los datos de los espectros de RMN ¹H se realizó con el programa MestReNova v6.2.0-7163. Se aplicó línea de amplificación de 0.3 Hz a los espectros de transformada de Fourier, fase y línea base de corrección.

6.4.3. Preparación de los extractos de *L. porteri* para el análisis cuantitativo

Fueron transferidos 12 mg del extracto de acetona de la planta fresca, 0.4 mL de DMSO y 1.0 mg del estándar interno a un tubo de RMN de 5 mm. Los espectros fueron adquiridos usando una secuencia de pulsos estándar s2pul, 30 pulsos de amplitud de 3 μs, tiempo de relajación de 10 s, una amplitud espectral de 6498.8 Hz y un tiempo de adquisición de 3 s en 38992 puntos. Un total de 128 scans fueron llevados a cabo para cada muestra, generando un tiempo de análisis de ca. 28 min por muestra. Los archivos de RMN ¹H fueron procesados y analizados con el programa MestReNova v6.2.0-7163 para determinar las áreas de las integrales.

6.4.4. Especificidad, linealidad, precisión y reproducibilidad del método de RMN

La especificidad del método fue establecida para cada sustancia de prueba mediante la demostración de la ausencia de interferencia entre cada una de ellas en los trazos de los espectros, así como de la no interferencia con el estándar interno y con el disolvente. La linealidad del método fue evaluada mediante la relación entre la respuesta del detector de RMN y la concentración de la muestra empleada

con el análisis de regresión lineal de los datos de la respuesta. Para ello, cinco muestras conteniendo 12.0 mg del extracto de acetona de las raíces de la planta fresca, 1.0 mg de 4-dimetilaminopiridina y cantidades crecientes 2.0, 6.0, 10.0, 15.0 y 20.0 mg de *rac*-toquinólida B (*rac*-**3**), 1.8, 4.6, 9.0, 13.5 y 18.0 mg de *rac*-diligustíflida (*rac*-**4**) y 2.5, 7.5, 12.5, 18.75 y 25.0 mg de *rac*-riligustíflida (*rac*-**5**) en 0.4 mL de DMSO fueron preparadas; después de cada adición de los dímeros, el espectro de RMN ¹H resultante de la muestra fue realizado por triplicado, después de obtener los 15 espectros, todos los parámetros de validación fueron obtenidos por el análisis de la cantidad de los componentes representativos presentes en el extracto de las raíces frescas de la planta de *L. porteri*.

6.4.5. RMN para DOSY y análisis cualitativo

Los espectros se realizaron en un espectrómetro *Varian Inova 500* con 5 mm en una sonda de gradiente-z inverso, el disolvente (DMSO) fue utilizado como referencia interna. El espectro de RMN ¹H fue adquirido con una amplitud espectral de 6498.8 y 38992 puntos, el tiempo de adquisición fue de 5 s a 90 pulsos, amplitud de 8.25 μs y 128 transientes.

El experimento RMN DOSY fue adquirido utilizando el método del par de pulsos de difusión bipolar echo estimulado (diffusion bipolar pulse pair stimulated echo (DBPPSTE) method).^[42,77] Los datos fueron obtenidos con un tiempo de espera de difusión de 170 ms, amplitudes de gradientes de pulso en un rango de 0.30 a 28 Gcm⁻¹, durante 3 ms, un gradiente de estabilización de tiempo de espera de 300 ms. El procesamiento se llevó a cabo en el programa DOSY macro en el instrumento Varian.

6.5. Actividades sedantes y espasmolíticas de las ftálicas y algunos de sus derivados

6.5.1. Preparación de *rac*-4,5-dehidrotoquinólida B (*rac*-**64**)

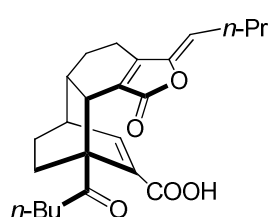
A una solución de *rac*-toquinólida B (*rac*-**3**, 66 mg, 0.17 mmol) en tolueno (5 mL) fue adicionado vía cánula una solución de DDQ (93.7 mg, 0.412 mmol) en tolueno (5 mL) a temperatura ambiente y después se dejó a reflujo por 48 h en atmósfera de nitrógeno. La mezcla de reacción de dejó enfriar a temperatura ambiente, fue diluida con AcOEt (10 mL) y se lavó con NaHCO₃ (3 × 15 mL). Las fases orgánicas de reunieron y se lavaron con solución saturada de NaCl (2 × 10 mL), se secaron con Na₂SO₄ anhidro y se concentraron al vacío. El residuo se purificó mediante CCFP (tolueno/CH₂Cl₂, 4:1, seis veces) obteniéndose el compuesto *rac*-**64** *R*_f: 0.56 (*n*-hexano/AcOEt, 7:3) (31.5 mg, 48%) cuyas constantes espectroscópicas fueron idénticas a las informadas por Lim y colaboradores,^[11] y materia prima *rac*-**3** *R*_f: 0.55 (*n*-hexano/AcOEt, 7:3) (15 mg, 22.8%). Algunos ensayos más, se muestran en la Tabla 15.

Tabla 15. Condiciones experimentales para la obtención de **64**

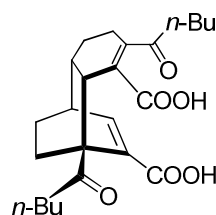
Experimento	Condiciones	<i>Rac-3</i>	<i>Rac-64</i>
1	DDQ (5 eq.) C ₆ H ₆ , N ₂ reflujo, 24 h	34.9%	23%
2	DDQ (2 eq.), C ₆ H ₆ , N ₂ 60 °C, 40 h	22.5%	3.4%
3	DDQ (2.4 eq.), tolueno, N ₂ reflujo, 48 h	22.8%	48%

6.6. Preparación de *rac*-desmetilwallichílida (*rac-25*) y *rac*-dicetodiácido de diligustílida (*rac-26*)

Se disolvieron 200 mg de *rac*-diligustílida (*rac-4*) en 10 mL de acetona. A la solución resultante se le adicionaron 10 mL de una solución de Na₂CO₃ al 2% y se mantuvo en reflujo durante 3.5 h. Al cabo del tiempo señalado, la mezcla de reacción se dejó enfriar, se aciduló con una solución de HCl 10% hasta pH 4, se extrajo con AcOEt (3 × 10 mL). Las fases orgánicas fueron reunidas, se lavaron con una solución saturada de NaCl, se secaron con Na₂SO₄ anhidro y finalmente se concentraron a presión reducida. La purificación de los productos se llevó a cabo mediante CC utilizando mezclas crecientes de *n*-hexano/AcOEt para obtener *rac-4* (64 mg, 32%), *rac-25* (88 mg, 42%) y *rac-26* (54.7 mg, 25%).^[15]



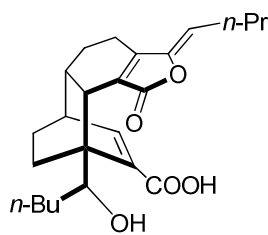
rac-25



rac-26

6.7. Preparación de *rel*-(3'S)-(3',8')-dihidrodsmetilwallichílida (**27**)

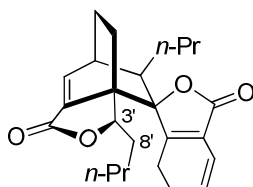
Se disolvieron 464 mg (1.17 mmol) de *rac*-desmetilwallichílida (*rac-25*) en 15 mL de metanol y a la solución resultante se le adicionó un exceso de NaBH₄ (350 mg). La mezcla resultante se dejó con agitación a temperatura ambiente por 2 h y la reacción se dió por terminada al adicionar H₂O. Se adicionaron 20 mL de AcOEt, y se aciduló con una solución de HCl al 10%. Se realizaron extracciones con AcOEt (3 × 15 mL). Las fases orgánicas de reunieron, se lavaron con solución saturada de NaCl, se secaron con Na₂SO₄ anhidro y se concentraron a presión reducida. El residuo fue purificado por CC con mezclas de *n*-hexano/AcOEt de polaridad creciente, obteniéndose materia prima (236.2 mg, 50%), *rac-27* (166.9 mg, 35.8%) y un producto minoritario (*rac-79*) (14.9 mg, 32%).



27

6.8. Preparación de *rac*-3',8'-dihidrotoquinólida B (*rac*-41)

Una solución de *rac*-cetoácido de toquinólida B (100 mg, 0.26 mmol) y CeCl_3 (150 mg, 0.6 mmol) en EtOH (8 mL) fue agitada por 10 min y después fue adicionado NaBH_4 (10 mg, 0.26 mmol) manteniéndose a temperatura ambiente. Después de 16 h, la CCF de la reacción mostró únicamente la materia prima, entonces se adicionó nuevamente NaBH_4 (5 mg, 0.13 mmol). Después de 2h, el análisis por CCF no mostró ningún avance, por lo que se procedió a adicionar *i*-propanol (3 mL) y un exceso de NaBH_4 (10 mg, 0.27 mmol). La mezcla de reacción se dejó en agitación nuevamente. Después de 19 h, la CCF indicó la presencia de un compuesto de menor polaridad. A la mezcla de reacción se le adicionó H_2O (5 mL) y se extrajo con AcOEt (3×20 mL). Las fases orgánicas se reunieron y se lavaron con una solución saturada de NaCl, se secaron con Na_2SO_4 anhidro y se concentraron a presión reducida. El residuo se purificó mediante CPP (*n*-hexano/acetona, 88:12, tres veces) de donde se obtuvo el compuesto *rac*-41 (16 mg, 16%) y materia prima (40 mg, 40%).



rac-41

P.f.: 136–141 °C

UV (EtOH) λ_{max} nm (log ϵ): 205 (3.61)

IR (CHCl_3) ν_{max} (cm^{-1}): 2962, 2934, 2875, 1749

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , asignaciones por COSY, HSQC, HMBC y NOESY): δ 7.49 (1H, *d*, $J = 6.0$ Hz, H-7'), 6.18 (1H, *dt*, $J = 9.0$ Hz, H-7), 5.92–5.98 (1H, *m*, H-6), 4.36–4.31 (1H, *m*, H-3'), 3.04–3.03 (1H, *m*, H-6')

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , asignaciones por DEPT, HSQC y HMBC): δ 170.1 (C-1), 167.1 (C-1'), 162.7 (C-3a), 144.8 (C-7'), 135.2 (C-7'a), 129.5 (C-6), 116.5 (C-7), 89.6 (C-3), 89.0 (C-3'), 49.9

(C-3'a), 44.9 (C-8), 35.2 (C-6'), 29.6 (C-9), 29.3 (-CH₂), 28.7 (-CH₂), 27.3 (-CH₂), 22.6 (-CH₂), 22.2 (-CH₂), 21.4 (-CH₂), 20.9 (-CH₂), 17.4 (-CH₂), 14.0 (C-11), 13.6 (C-11').

EM-IE *m/z* (%): 382 (5) [M⁺], 193 (100), 161 (20), 148 (50), 137 (5).

EMAR-IE *m/z* 382.2142 (obs); calculado para C₂₄H₃₀O₄ *m/z* 382.2144.

6.9. Actividad biológica

Animales. Se utilizaron ratones machos (peso: 22.25–23.5 g) para los experimentos *in vivo*, en grupos de cinco y para el efecto del reflejo peristáltico fue utilizado íleon de cobayos machos (peso: 400–600 g).

6.9.1. Efecto de potenciación del pentobarbital sódico

Siguiendo el método descrito por Tortoriello et al.^[78] se utilizó un grupo control, al cual se le administró el vehículo (250 µL, solución de tween 80, 10%) utilizando la ruta intraperitoneal, mientras que los otros grupos fueron tratados con 50 mg/kg of **1**, *rac-3*, *rac-4*, **9**, *rac-25*, *rac-26*, *rac-27* y *rac-41* por la misma ruta de administración. El pentobarbital sódico (50 mg/kg) fue administrado 30 min después. La pérdida del reflejo de enderezamiento fue utilizada para determinar el inicio del tiempo hipnótico, mientras que el retorno del reflejo de enderezamiento fue utilizado como índice de espabilamiento. Los tiempos promedio de los grupos tratados fueron comparados con los grupos control mediante una prueba “t” de Student (Tabla 6).

6.9.2. Efecto de la contracción inducida eléctricamente en íleon de cobayo

De acuerdo con la metodología descrita por Lozoya et al.,^[79] los animales fueron sacrificados y se obtuvieron los fragmentos de íleon terminales (10–12 cm), y una porción de 3 cm fue montada en una cámara de perfusión intraluminal y fijado con dos electrodos unidos a los extremos. El tejido fue mantenido en 20 mL de solución Tyrode y burbujeado con O₂ 95% y CO₂ 5% a 37°C. La misma solución Tyrode fue perfundida intraluminalmente por el sistema de la cámara. Los preparados se dejaron reposar durante 30 min para su estabilización. Las contracciones musculares fueron inducidas por aplicación de pulsos eléctricos (20 V, 10 ms, 1 Hz, 5 s, cada 3 min) de un estimulador Phipps y Bird y captadas en un polígrafo Grass modelo 79D equipado con un transductor de desplazamiento FTO3. Después de que las respuestas del control fueron obtenidas, **1**, *rac-3*, **9** y *rac-26* se disolvieron en una solución acuosa de PVP (0.05 mg/mL) y fueron aplicados directamente a la cámara de incubación. La capacidad de las sustancias de inhibir la contracción eléctricamente-inducida fue medida (Tabla 7).

6.10. Reacción de dimerización de Z-ligustílida (1)

Se realizaron experimentos exploratorios para formar los dímeros *rac*-toquinólida B (*rac*-3) y *rac*-diligustílida (*rac*-4) a partir de Z-ligustílida (1), mediante reacciones de cicloadición (Diels-Alder). Para ello fue necesario purificar por cromatografía en columna Z-ligustílida (1). Una vez purificada la materia prima mediante cromatografía en columna, se realizaron los experimentos de reacción de dimerización, donde se probaron diversas condiciones (Tabla 3). Para cada ensayo, se colocaron en un recipiente de acero inoxidable (20 mL, sistema cerrado, alta presión) aproximadamente 10 g de Z-ligustílida (1), en algunos casos se adicionaron vía jeringa de vidrio 15 mL de tolueno recién destilado, el sistema fue purgado con nitrógeno, sellado e introducido en un baño de aceite previamente caliente a las temperaturas y tiempos señalados en la Tabla 16. Una vez terminada la reacción, se dejó enfriar, se evaporó el disolvente en rotavapor de alta presión, y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna con mezclas crecientes de *n*-hexano-AcOEt para obtener los rendimientos señalados en la Tabla 16.

Tabla 16. Condiciones de reacción para la formación de las ftálicas diméricas *rac*-3 y *rac*-4

Temp. (°C)	Tiempo (h)	Tolueno	<i>Rac</i> -3	<i>Rac</i> -4
150	1	—	—	—
150	5	—	—	—
150	8	—	—	—
120	72	15 mL	—	3.2%
111	120	15 mL	0.84%	10.34%

6.11. Reactividad química de *rac*-toquinólida B (*rac*-3)

6.11.1. Tratamiento del *rac*-cetoácido de toquinólida B (*rac*-39) con (*R*)-(+)- α -metilbencilamina

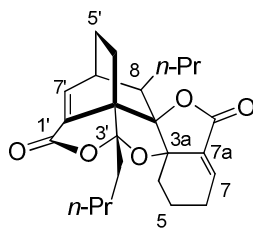
Una mezcla de *rac*-39 (50.2 mg, 0.12 mmol) e *i*PrOH (0.5 mL) se calentó a 55°C bajo atmósfera de nitrógeno hasta disolución total de la muestra. Posteriormente, se adicionó (*R*)-(+)- α -metilbencilamina (16 μ L, 0.12 mmol). La mezcla de reacción resultante se dejó enfriar a temperatura ambiente y fue guardada a 0°C de 12 a 96 h. Los mismos ensayos fueron llevados a cabo utilizando diferentes disolventes (AcOEt, CH₂Cl₂, EtOH) y con (*S*)-(-)- α -metilbencilamina. Después del trabajo usual, únicamente se recuperó la materia prima.

6.11.2. Tratamiento del *rac*-cetoácido de toquinólida B (*rac*-39) con SOCl₂

A una solución de *rac*-39 (91.1 mg, 0.22 mmol) en CH₂Cl₂ seco (3 mL) y piridina anhidra (30 μL, 0.37 mmol) a -78 °C se añadió SOCl₂ (30 μL, 0.41 mmol) bajo atmósfera de nitrógeno. La mezcla de reacción se mantuvo en agitación por 2 h hasta alcanzar 0°C. Después de transcurrido este tiempo, se añadió (*R*)-(+)-α-metilbencilamina (50 μL, 0.45 mmol), la reacción se dejó en agitación por 2.5 h hasta alcanzar temperatura ambiente. Finalmente, se adicionó CH₂Cl₂ para diluir y después de trabajo usual de la mezcla de reacción, se obtuvo un aceite amarillo, mismo que fue purificado mediante cromatografía en columna (*n*-hexano/AcOEt, gradiente) obteniéndose *rac*-toquinólida B (*rac*-3) como único producto de reacción (73.7 mg, 84%). Los mismos resultados fueron obtenidos al utilizar THF en lugar de CH₂Cl₂.

6.11.3. Preparación del compuesto *rac*-65

A una solución de *rac*-cetoácido de toquinólida B (*rac*-39, 36 mg, 0.095 mmol) en tolueno anh. (10 mL), colocada en un reactor de acero inoxidable (20 mL) se le adicionó (*R*)-(+)-α-metilbencilamina, (*S*)-(-)-α-metilbencilamina o (±)-α-metilbencilamina (0.02 mL, 0.15 mmol) bajo atmósfera de nitrógeno. El sistema se selló y se colocó en un baño de aceite previamente caliente (130°C) por 18 h (presión: 50 psi). Después del tiempo señalado, el sistema se dejó enfriar a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se concentró a presión reducida y seguidamente se le adicionó AcOEt (10 mL), la fase orgánica se lavó con una solución de HCl (10%, 3 × 5 mL), la fase acuosa se re-extrajo con AcOEt (3 × 10 mL). Finalmente las fases orgánicas se reunieron, se lavaron con solución saturada de NaCl, se secaron con Na₂SO₄ anhidro y se concentraron en rotavapor. El residuo se purificó por cromatografía en columna (*n*-hexano/AcOEt, gradiente) dando como resultado la obtención de *rac*-3 (3 mg, 8%, compuesto menos polar) y *rac*-65 (cristales blancos, 15.4 mg, 42%). La utilización de períodos de reacción extensos favoreció la formación de productos minoritarios, mientras que, tiempos de reacción cortos disminuyeron el rendimiento de *rac*-3 y *rac*-65. Los ensayos llevados a cabo en ausencia de disolvente sólo produjeron un residuo oscuro y materia prima fue recuperada de ensayos realizados en ausencia de base.



rac-65

P.f.: 204–206°C

R_f : 0.51 (*n*-hexano/AcOEt, 4:1)

UV (MeOH) λ_{\max} nm (ϵ): 217 (29077)

IR (CHCl₃) ν_{\max} : 3028, 2875, 1757, 1686, 1665, 1329, 1126, 1068, 1041, 1011, 955, 887 cm⁻¹

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃, asignaciones por COSY, HSQC, HMBC y NOESY): δ 7.43 (1H, *d*, *J* = 7.0 Hz, H-7'), 7.01 (1H, *dt*, *J* = 7.0, 2.5 Hz, H-7), 3.04 (1H, *m*, H-6'), 2.46 (1H, *m*, H-6a), 2.40 (1H, *m*, H-4a), 2.14 (1H, *m*, H-6b), 2.01 (1H, *m*, H-5a'), 1.85 (2H, *m*, H-5, H-8'), 1.67 (1H, *m*, H-8), 1.62 (1H, *m*, H-4a), 1.50 (2H, *m*, H-9, H-9a), 1.33 (2H, *m*, H-4, H-4b'), 1.09 (2H, *m*, H-10b, H-9b), 0.89 (3H, *t*, *J* = 7.5 Hz, H-11'), 0.87 (3H, *t*, *J* = 7.5 Hz, H-11)

RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃, asignaciones por DEPT, HSQC y HMBC): δ 167.6 (C-1), 165.2 (C-1'), 144.8 (C-7'), 141.6 (C-7), 135.5 (C-7a'), 129.8 (C-7a), 115.0 (C-3'), 94.3 (C-3), 86.2 (C-3a), 59.3 (C-3a'), 44.9 (C-8), 37.9 (C-6'), 35.6 (C-8'), 29.2 (C-4), 28.9 (C-9), 25.1 (C-6), 24.7 (C-9'), 22.8 (C-10'), 22.6 (C-4'), 21.1 (C-10), 17.4 (C-5), 16.7 (C-5'), 14.1 (C-11), 13.8 (C-11')

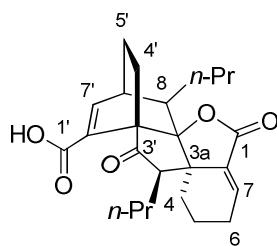
EIMS *m/z* (rel. int.): 398 [M⁺] (21), 380 (9), 356 (100), 338 (65), 309 (11), 296 (13), 271 (15), 253 (10), 207 (5), 190 (38), 189 (10), 149 (7), 91 (5), 79 (5)

EM-AR (FAB⁺) *m/z*: Calculado para [C₂₄H₃₀O₅ + H]⁺: 399. 2094; observado 399.2092

Análisis de Rayos-X. Todos los datos fueron colectados en un difractorómetro Bruker Smart Apex CCD utilizando 1.51 θ – 25.53 θ a 294(2) K. El compuesto *rac*-**65** pertenece al sistema ortorómbico, grupo espacial *Pbc* a con *a* = 12.1979(9) Å, α = 90°, *b* = 12.744(1) Å, β = 90°, *c* = 26.941(2) Å, γ = 90°. Los métodos de refinamiento fueron matrices completas de mínimos cuadrados sobre F^2 . Los datos cristalográficos para esta estructura se encuentran depositados en Cambridge Crystallographic Data Centre CCDC 712971. deposit@ccdc.cam.ac.uk <http://www.ccdc.cam.ac.uk/deposit>. Teléfono: (44) 01223 762910.

6.11.4. Preparación de *rac*-ciclotoquinólida B (*rac*-**37**) a partir del *rac*-cetoácido de toquinólida B (*rac*-**39**)

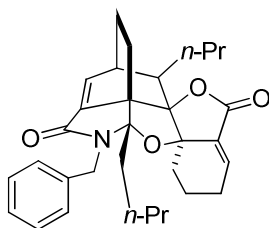
A una solución del *rac*-cetoácido de toquinólida B (*rac*-**39**, 22 mg, 0.06 mmol) en THF (5 mL) y MeOH (1 mL) se adicionó NaOH (33.1 mg, 0.83 mmol), después de 2 h de reflujo en atmósfera de nitrógeno, la reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente y se concentró en rotavapor. La mezcla de reacción se diluyó con CH₂Cl₂ (10 mL), se lavó con HCl (10%, 2 × 10 mL), la fase acuosa se re-extrajo con CH₂Cl₂ (3 × 10 mL) y finalmente las fases orgánicas se reunieron, se lavaron con una solución saturada de NaCl (2 × 10 mL), se secaron con Na₂SO₄ anhidro y se concentraron en rotavapor. El residuo obtenido se purificó mediante cromatografía de capa fina preparativa (*n*-hexano/EtOAc, 3:2) permitiendo obtener el compuesto *rac*-**37** (13.8 mg, 63%).



rac-37

6.11.5. Derivatización del *rac*-cetoácido de toquinólida B (*rac*-39) con bencilamina

A una solución del *rac*-cetoácido de toquinólida B (*rac*-39, 59.4 mg, 0.15 mmol) en tolueno anhidro (6 mL) colocada en un reactor de acero inoxidable en atmósfera de nitrógeno, se le adicionó bencilamina (0.08 mL, 78.56 mg, 0.75 mmol). El reactor se selló y calentó (130°C, 50 psi) por 18 h. Transcurrido el tiempo, el sistema se dejó enfriar a temperatura ambiente, y a la mezcla de reacción se le adicionó AcOEt (15 mL), se neutralizó con HCl (10%), se extrajo con AcOEt (3 × 10 mL), se reunieron las fases orgánicas, se lavaron con una solución saturada de NaCl, se secaron con Na₂SO₄ anhidro y finalmente se concentró a presión reducida. La purificación se llevó a cabo por medio de cromatografía de capa fina preparativa (*n*-hexano/AcOEt, 1:1, 2 veces) recuperándose materia prima (8.0 mg, 13.5%) y el derivado *rac*-66 (18.7 mg, 25.7%).



rac-66

Polvo amorfo beige

P.f.: 157–159 °C

R_f: 0.45 (*n*-hexano/AcOEt, 3:2)

IR (CHCl₃) ν_{max}: 3506, 3020, 2961, 2932, 2873, 1759, 1686, 1460, 1402, 1352, 1242, 1190, 1128, 1040, 953, 922 cm⁻¹

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃; asignaciones por COSY, NOESY y HMQC): δ 7.38 (2H, *dd*, *J* = 8.5, 1.5 Hz, H-4'', H-8''), 7.27 (2H, *td*, *J* = 7.5, 1.0 Hz, H-5'', H-7''), 7.21 (1H, *dddd*, *J* = 8.5, 7.5, 1.5, 1.5, H-6''), 7.23 (1H, *d*, *J* = 6.5 Hz, H-7'), 6.9 (1H, *dd*, *J* = 7.0, 4.0 Hz, H-7), 4.61 (1H, *d*, *J* = 15.0 Hz, H-2''a), 4.52 (1H, *d*, *J* = 15.0 Hz, H-2''b), 2.93 (1H, *dddd*, *J* = 10.5, 5.5, 4.0, 2.5 Hz, H-6'), 2.45 (1H, *ddd*, *J* = 11.0, 2.0, 2.0 Hz, H-4'a), 2.26 (1H, *dddd*, *J* = 10.5, 6.0, 4.5, 4.5 Hz, H-6a), 2.06 (1H, *dddd*, *J* = 11.5, 6.5, 3.0, 3.0 Hz, H-6b), 1.98 (1H, *dddd*, *J* = 11.0, 7.5, 2.5, 2.5 Hz, H-5'a), 1.92 (1H, *ddd*, *J* =

11.5, 4.0, 4.0, Hz, H-8'a), 1.39–1.29 (4H, *m*, H-5b, H-9a, H-10a H-5'b), 1.24–1.13 (3H, *m*, H-4'b, H-9'a, H-10'a), 1.13–1.05 (4H, *m*, H-9b, H-10b, H-9'b, H-10'b), 1.75 (1H, *ddd*, $J = 11.5, 4.0, 4.0$ Hz, H-8'b), 1.62 (1H, *dd*, $J = 10.5, 4.0, 4.0$ Hz, H-8), 1.53–1.45 (2H, *m*, H-4a, H-5a), 0.94 (1H, *ddd*, $J = 9.5, 6.0, 5.5$, Hz, H-4b), 0.85 (3H, *t*, $J = 7.5$ Hz, H-11), 0.75 (3H, *t*, $J = 7.0$ Hz, H-11')

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3 , asignaciones por DEPT, HSQC y HMBC): δ 168.1 (C-1), 165.1 (C-1'), 140.2 (C-7), 138.8 (C-7'a), 138.6 (C-3''), 138.1 (C-7'), 130.7 (C-7a), 128.5 (C-4'', C-5'', C-7'', C-8''), 127.2 (C-6''), 100.5 (C-3'a), 95.5 (C-3), 84.9 (C-3a), 57.1 (C-3'), 45.4 (C-8), 43.6 (C-2''), 36.3 (C-6'), 34.9 (C-8'), 28.9 (C-4), 28.8 (C-9), 25.5 (C-9'), 24.9 (C-6), 23.9 (C-4'), 22.9 (C-10'), 20.9 (C-10), 17.5 (C-5'), 17.0 (C-5), 14.1 (C-11), 13.7 (C-11')

EIMS m/z (rel. int.) 487 [M^+] (8), 502 (5), 364 (100), 336 (12), 296 (8), 280 (86), 191 (80), 149 (12), 106 (15), 91 (82) 69 (8), 57 (8), 18 (34)

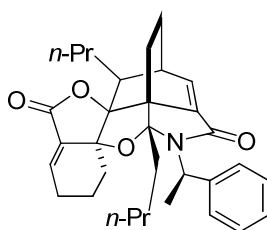
EM-AR (FAB^+) m/z : Observado 488.2791 [MH^+]. Calculado para $\text{C}_{31}\text{H}_{37}\text{O}_4\text{N}+\text{H}^+$ 488.2801 [MH^+]

6.12. Procedimientos computacionales

La obtención del cálculo de energía de *rac*-**37**, *rac*-**39** y *rac*-**65** se inició con la optimización de la geometría de cada una de las moléculas. La metodología que se llevó a cabo para la optimización de la geometría se realizó como a continuación se menciona: a) se modelaron y optimizaron los fragmentos rígidos más grandes de cada compuesto en consideración, b) al fragmento obtenido del paso previo (inciso a) se le adicionó un nuevo fragmento y se realizó la optimización de la geometría, c) se llevó a cabo el escaneo de la energía potencial relajada (RPES, relaxed potencial energy scan) sobre los ángulos diedros entre los dos fragmentos moleculares unidos en el paso b. El RPES consiste en la optimización de la geometría de todos los grados de libertad de la molécula, con una única excepción, en este caso, el valor asignado del ángulo diedro. En los cálculos, el ángulo fue variado de cero a 360 grados, con incrementos de 45 grados; d) la conformación molecular con el mínimo de energía en el paso c) fue seleccionado para la optimización de la geometría. Los pasos b) a d) fueron repetidos antes de que el compuesto en consideración fuera completado. Los fragmentos moleculares con movilidad fueron las cadenas *n*-propílicas para *rac*-**37**, *rac*-**39** y *rac*-**65**, además, para *rac*-**37** y *rac*-**39** se consideró el fragmento O(1')–C(1')–O(2')–H(2') y para *rac*-**65**, la lactona fusionada con el ciclohexeno se tomó en cuenta como otro fragmento. GaussView se utilizó en todos los pasos de modelado^[62]. Todos los cálculos moleculares fueron realizados a un nivel de teoría B3LYP/6–311G** y fueron llevados a cabo con el conjunto de programas en Gaussian 03^[63].

6.13. Derivatización de *rac*-toquinólida B (*rac*-3) con (*R*)-(+)- α -metilbencilamina

A una solución de *rac*-toquinólida (*rac*-3 100.8 mg, 0.26 mmol) en tolueno anhidro (5 mL) colocada en un reactor de acero inoxidable (20 mL) en atmósfera de nitrógeno, fue adicionada (*R*)-(+)- α -metilbencilamina (0.06 mL, 57.12 mg, 0.47 mmol). El reactor se selló e introdujo en un baño de aceite caliente (130°C) por 20 h (presión: 50 psi). Después de enfriamiento a temperatura ambiente, la mezcla de reacción fue concentrada a presión reducida en rotavapor. Se adicionó AcOEt (10 mL), la fase orgánica generada se neutralizó con HCl (10%), se extrajo con AcOEt (3 \times 10 mL). La fase orgánica fue lavada con solución saturada de NaCl, secada con Na₂SO₄ anhidro y concentrada a presión reducida. La purificación del residuo mediante cromatografía en columna (*n*-hexano/AcOEt, gradiente) permitió la obtención de dos productos (76.6 mg, 70%): (–)-67 (45.3 mg, 41%) y (+)-68 (38.9mg, 29%).



(–)-67

Aceite amarillo pálido

R_f: 0.47 (*n*-hexano/AcOEt, 65:35)

[α]_D²⁵ –54.8 (*c* 1.35 \times 10⁻³, MeOH)

IR (CHCl₃) ν_{\max} : 3349, 3061, 2959, 2872, 1766, 1689, 1494, 1454, 1351, 1214, 1166, 1037, 924, 752 cm⁻¹

UV (MeOH) λ_{\max} (log ϵ): 211 (4.4)

CD (*c* 9.6 \times 10⁻⁶, MeOH): 246 nm ($\Delta\epsilon$ +9.11), 224 nm ($\Delta\epsilon$ –20.29)

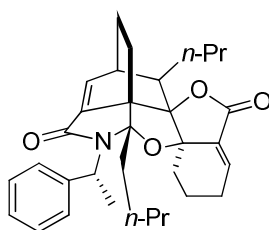
¹H NMR (500 MHz, CDCl₃; asignaciones por COSY, NOESY y HMQC): δ 7.58 (2H, *dd*, *J* = 8.5, 1.5 Hz, H-4'', H-8''), 7.27 (2H, *ddd*, *J* = 8.5, 7.5, 1.5 Hz, H-5'', H-7''), 7.20 (1H, *dddd*, *J* = 8.5, 7.5, 1.5, 1.5, H-6''), 7.15 (1H, *d*, *J* = 6.5 Hz, H-7'), 6.87 (1H, *dd*, *J* = 7.0, 4.0 Hz, H-7), 4.85 (1H, *c*, *J* = 7.0 Hz, H-2''), 2.90 (1H, *dddd*, *J* = 10.5, 6.5, 4.0, 4.0 Hz, H-6'), 2.42 (1H, *ddd*, *J* = 9.5, 7.0, 2.0 Hz, H-4'a), 2.20 (1H, *dt*, *J* = 10.5, 4.5 Hz, H-6a), 1.98–1.92 (3H, *m*, H-6b, H-5'a, H-8'a), 1.90 (1H, *d*, *J* = 7.5 Hz, H-9''), 1.76 (1H, *ddd*, *J* = 9.5, 6.0, 6.0 Hz, H-8'b), 1.59 (1H, *dd*, *J* = 10.5, 4.0, Hz, H-8), 1.45 (1H, *dd*, *J* = 10.5, 4.0 Hz, H-4a), 1.35–1.32 (3H, *m*, H-5a, H-10a, H-5'b), 1.30–1.28 (1H, *m*, H-9a), 1.28–1.25 (4H, *m*, H-9'a, H-9'b, H-10'a, H-10'b), 1.19 (1H, *ddd*, *J* = 11.5, 6.0, 6.0 Hz,

H-4'b), 1.12–1.05 (2H, *m*, H-5b, H-10b), 0.99 (1H, *dd*, $J = 10.0, 4.0$ Hz, H-9b), 0.90 (1H, *ddd*, $J = 10.0, 6.0, 6.0$ Hz, H-4b), 0.86 (3H, *t*, $J = 7.0$ Hz, H-11), 0.83 (3H, *t*, $J = 7.5$ Hz, H-11')

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3 , asignaciones por DEPT, HSQC y HMBC): δ 168.18 (C-1), 165.2 (C-1'), 143.4 (C-3''), 140.2 (C-7), 139.2 (C-7'a), 137.4 (C-7'), 130.7 (C-7a), 128.2 (C-5'', C-7''), 127.9 (C-4'', C-8''), 127.1 (C-6''), 101.8 (C-3'), 95.3 (C-3), 85.2 (C-3a), 56.9 (C-3'a), 52.7 (C-2''), 45.5 (C-8), 36.2 (C-6'), 34.9 (C-8'), 28.9 (C-4), 28.8 (C-9), 25.7 (C-9'), 24.9 (C-6), 23.9 (C-4'), 22.9 (C-10'), 20.9 (C-10), 19.5 (C-9''), 17.3 (C-5'), 16.8 (C-5), 14.1 (C-11), 13.7 (C-11')

EMIE m/z (rel. int.) 501 [M^+] (15), 378 (17), 310 (8), 274 (33), 191 (100), 149 (10), 120 (32), 105 (28), 55 (5)

EMAR (FAB $^+$) m/z : Observado 502.2959 [MH^+]. Calculado para $\text{C}_{32}\text{H}_{39}\text{O}_4\text{N}+\text{H}^+$ 502.2957 [MH^+]



(+)-68

Aceite amarillo pálido

R_f : 0.44 (*n*-hexano/AcOEt, 65:35)

$[\alpha]_D^{25} +7.8$ ($c 1.15 \times 10^{-3}$, MeOH)

IR (CHCl_3) ν_{max} : 3347, 3060, 2958, 2872, 1765, 1688, 1526, 1495, 1452, 1352, 1214, 1036, 1013, 924, 751 cm^{-1}

UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ): 210 (4.5)

CD ($c 7.2 \times 10^{-6}$, MeOH): 245 nm ($\Delta\epsilon -7.89$), 223 nm ($\Delta\epsilon +12.62$)

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3 ; asignaciones por COSY, NOESY y HMQC): δ 7.47 (2H, *dd*, $J = 7.5, 1.5$ Hz, H-4'', H-8''), 7.29 (2H, *ddd*, $J = 7.5, 7.5, 1.5$ Hz, H-5'', H-7''), 7.22 (1H, *dddd*, $J = 7.5, 7.5, 1.5, 1.5$, H-6''), 7.22 (1H, *d*, $J = 6.5$ Hz, H-7'), 6.98 (1H, *dd*, $J = 7.0, 4.0$ Hz, H-7), 4.69 (1H, *c*, $J = 7.0$ Hz, H-2''), 2.93 (1H, *dddd*, $J = 10.0, 6.5, 4.0, 4.0$ Hz, H-6'), 2.46–2.39 (2H, *ddd*, $J = 11.0, 4.0, 4.0$ Hz, H-6a, H-4'a), 2.19–2.16 (1H, *m*, H-6b), 1.99–1.89 (3H, *m*, H-5a, H-5'a, H-8'a), 1.85 (3H, *d*, $J = 7.0$ Hz, H-9''), 1.63 (1H, *ddd*, $J = 11.0, 4.5, 4.5$ Hz, H-8'b), 1.65 (1H, *ddd*, $J = 10.0, 3.0, 3.0$ Hz, H-8), 1.51 (1H, *ddd*, $J = 10.0, 4.5, 4.5$ Hz, H-4a), 1.37–1.33 (3H, *m*, H-5b, H-10a, H-5'b), 1.73 (1H, *dt*, $J = 6.5, 3.0$ Hz, H-9a), 1.28–1.25 (1H, *m*, H-9b), 1.23–1.17 (2H, *m*, H-10b, H-4'b), 1.15–1.09 (2H, *m*, H-9'a, H-10'a), 1.02–0.96 (3H, *m*, H-4b, H-9'b, H-10'b), 0.87 (3H, *t*, $J = 7.0$ Hz, H-11), 0.66 (3H, *t*, $J = 7.0$ Hz, H-11')

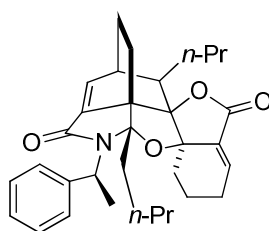
RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3 , asignaciones por DEPT, HSQC y HMBC): δ 168.0 (C-1), 164.9 (C-1'), 143.2 (C-3''), 139.9 (C-7), 139.6 (C-7'a), 137.4 (C-7'), 130.8 (C-7a), 128.4 (C-5'', C-7''), 126.9 (C-4'', C-8''), 126.9 (C-6''), 101.5 (C-3'), 95.7 (C-3), 84.9 (C-3a), 56.9 (C-3'a), 54.0 (C-2''), 45.4 (C-8), 36.3 (C-6'), 34.8 (C-8'), 29.0 (C-4), 28.8 (C-9), 25.6 (C-9'), 25.0 (C-6), 24.0 (C-4'), 22.8 (C-10'), 20.9 (C-10), 20.3 (C-9''), 17.6 (C-5'), 17.3 (C-5), 14.1 (C-11'), 13.6 (C-11)

EMIE m/z (rel. int.) 501 [M^+] (24), 378 (60), 310 (16), 274 (86), 228 (10), 191 (100), 149 (18), 120 (38), 105 (58), 79 (8), 55 (7)

EMAR (FAB^+) m/z : Observada 502.2961 [MH^+]. Calculada para $\text{C}_{32}\text{H}_{39}\text{O}_4\text{N}+\text{H}^+$ 502.2957 [MH^+]

6.14. Derivatización de *rac*-toquinólida B (*rac*-3) con (*S*)-(-)- α -metilbencilamina

A una solución de *rac*-toquinólida B (*rac*-3, 250 mg, 0.65) en tolueno anhidro (5mL) colocada en un reactor de acero inoxidable (20 mL) bajo atmósfera de nitrógeno, se adicionó (*S*)-(-)- α -metilbencilamina (0.16 mL, 152.3 mg, 1.25 mmol). El sistema se selló y se introdujo en un baño de aceite caliente (130°C) por 20 h (presión: 50 psi), después de enfriamiento a temperatura ambiente, la mezcla de reacción fue concentrada y posteriormente diluida con AcOEt (10 mL), la fase orgánica se neutralizó con HCl (10%), se extrajo con AcOEt (3 \times 10 mL). Las fases orgánicas se reunieron, se lavaron con solución saturada de NaCl, se secaron con Na_2SO_4 anhidro y fueron concentradas a presión reducida (294.1 mg, 89%). La purificación se realizó por medio de CC (*n*-hexano/AcOEt, gradiente) permitiendo la obtención de una mezcla de productos que nuevamente fueron purificados mediante cromatografía de capa fina preparativa (*n*-hexano/EtOAc, 3:2, 3 veces) que permitió la obtención de dos nuevos productos: (+)-67 (63.3 mg, 19%) y (-)-68 (230.8 mg, 70%).



(+)-67

Aceite amarillo pálido

R_f : 0.50 (*n*-hexano/AcOEt, 65:35)

$[\alpha]_D^{25}$ -45.2 (c 1.30×10^{-3} , MeOH)

IR (CHCl_3) ν_{max} : 3339, 2961, 2875, 1760, 1685, 1494, 1454, 1411, 1353, 1266, 1165, 1039, 957 cm^{-1}

UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ): 217 (4.3)

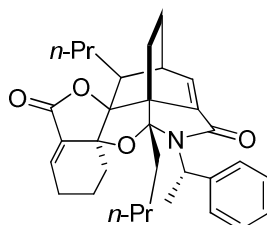
CD (c 4.0×10^{-6} , MeOH): 245.5 nm ($\Delta\epsilon$ -39.65), 224.5 nm ($\Delta\epsilon$ +90.08)

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3 ; asignaciones por COSY, NOESY y HMQC): δ 7.58 (2H, *dd*, $J = 8.5, 1.0$ Hz, H-4'', H-8''), 7.28 (2H, *ddd*, $J = 8.0, 7.5, 1.0$ Hz, H-5'', H-7''), 7.21 (1H, *dddd*, $J = 7.5, 7.5, 1.5, 1.5$, H-6''), 7.15 (1H, *d*, $J = 6.0$ Hz, H-7'), 6.87 (1H, *dd*, $J = 7.0, 4.0$ Hz, H-7), 4.85 (1H, *c*, $J = 7.0$ Hz, H-2''), 2.90 (1H, *dddd*, $J = 10.0, 6.5, 3.5, 3.5$ Hz, H-6'), 2.42 (1H, *ddd*, $J = 11.0, 9.0, 1.5$ Hz, H-4'a), 2.21 (1H, *ddd*, $J = 11.5, 5.0, 5.0$ Hz, H-6a), 1.98– 1.93 (3H, *m*, H-6b, H-5'a, H-8'a), 1.90 (1H, *d*, $J = 7.5$ Hz, H-9''), 1.78–1.76 (1H, *m*, Hz, H-8'b), 1.59 (1H, *ddd*, $J = 10.5, 4.0, 4.0$, Hz, H-8), 1.47 (1H, *ddd*, $J = 10.0, 5.0, 5.0$ Hz, H-4a), 1.29–1.23 (6H, *m*, H-5a, H-9a, H-5'b, H-9'a, H-10'a, H-10'b), 1.22–1.19 (2H, *m*, H-4'b, H-9'b), 1.12–1.06 (2H, *m*, H-5b, H-10b), 0.99 (1H, *ddd*, $J = 10.0, 3.5, 3.5$ Hz, H-9b), 0.89 (1H, *ddd*, $J = 10.0, 4.0, 4.0$ Hz, H-4b), 0.86 (3H, *t*, $J = 7.0$ Hz, H-11), 0.83 (3H, *t*, $J = 7.5$ Hz, H-11')

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3 , asignaciones por DEPT, HSQC y HMBC): δ 168.2 (C-1), 165.1 (C-1'), 143.4 (C-3''), 140.2 (C-7), 139.1 (C-7'a), 137.4 (C-7'), 130.7 (C-7a), 128.2 (C-5'', C-7''), 127.9 (C-4'', C-8''), 127.1 (C-6''), 101.8 (C-3'), 95.3 (C-3), 85.2 (C-3a), 56.9 (C-3'a), 52.6 (C-2''), 45.5 (C-8), 36.1 (C-6'), 34.9 (C-8'), 28.9 (C-4), 28.8 (C-9), 25.7 (C-9'), 24.9 (C-6), 23.9 (C-4'), 22.9 (C-10'), 20.9 (C-10), 19.5 (C-9''), 17.3 (C-5'), 16.8 (C-5), 14.0 (C-11), 13.7 (C-11')

EMIE m/z (rel. int.) 501 [M^+] (15), 378 (15), 310 (8), 274 (27), 191 (100), 149 (8), 120 (45), 105 (28), 55 (6), 18 (26)

EMAR (FAB^+) m/z : Observada 502.2964 [MH^+]. Calculado para $\text{C}_{32}\text{H}_{39}\text{O}_4\text{N}+\text{H}^+$ 502.2957 [MH^+]



(-)-68

Aceite Amarillo pálido

R_f : 0.44 (*n*-hexano/ AcOEt , 65:35)

$[\alpha]_D^{25} +8.12$ ($c 1.60 \times 10^{-3}$, MeOH)

IR (CHCl_3) ν_{max} : 3337, 2961, 2874, 1759, 1685, 1455, 1414, 1130, 1040, 1012, 955 cm^{-1}

UV (MeOH) λ_{max} ($\log \epsilon$): 216 (4.3)

CD ($c 4.4 \times 10^{-6}$, MeOH): 245 nm ($\Delta\epsilon +34.43$), 223 nm ($\Delta\epsilon -57.65$)

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3 ; asignaciones por COSY, NOESY y HMQC): δ 7.48 (2H, *dd*, $J = 7.5, 1.0$ Hz, H-4'', H-8''), 7.29 (2H, *ddd*, $J = 7.5, 7.5, 1.5$ Hz, H-5'', H-7''), 7.22 (1H, *dddd*, $J = 7.0, 7.0, 1.5, 1.5$, H-6''), 7.18 (1H, *d*, $J = 6.5$ Hz, H-7'), 6.98 (1H, *dd*, $J = 7.0, 4.0$ Hz, H-7), 4.69 (1H, *c*, $J = 7.0$ Hz, H-2''), 2.94 (1H, *dddd*, $J = 10.5, 6.0, 5.0, 5.0$ Hz, H-6'), 2.44 (2H, *ddd*, $J = 11.0, 4.0, 4.0$ Hz,

H-6a, H-4'a), 2.21–2.13 (1H, *m*, H-6b), 2.00–1.89 (3H, *m*, H-5a, H-5'a, H-8'a), 1.85 (3H, *d*, $J = 7.0$ Hz, H-9''), 1.63 (1H, *ddd*, $J = 11.0, 4.0, 4.0$ Hz, H-8'b), 1.66 (1H, *ddd*, $J = 10.5, 4.0, 4.0$ Hz, H-8), 1.51 (1H, *ddd*, $J = 10.0, 5.5, 4.5$ Hz, H-4a), 1.39–1.26 (4H, *m*, H-5b, H-9b, H-10a, H-5'b), 1.73 (1H, *dt*, $J = 10, 3.5$ Hz, H-9a), 1.24–1.16 (2H, *m*, H-10b, H-4'b), 1.15–1.08 (2H, *m*, H-9'a, H-10'a), 1.03–0.95 (3H, *m*, H-4b, H-9'b, H-10'b), 0.87 (3H, *t*, $J = 7.0$ Hz, H-11), 0.66 (3H, *t*, $J = 7.0$ Hz, H-11')

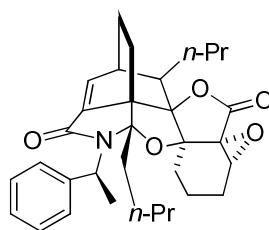
RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3 , asignaciones por DEPT, HSQC y HMBC): δ 168.0 (C-1), 164.9 (C-1'), 143.2 (C-3''), 139.9 (C-7), 139.6 (C-7'a), 137.4 (C-7'), 130.8 (C-7a), 128.4 (C-5'', C-7''), 126.9 (C-4'', C-8''), 126.9 (C-6''), 101.5 (C-3'), 95.7 (C-3), 84.9 (C-3a), 56.9 (C-3'a), 54.0 (C-2''), 45.4 (C-8), 36.3 (C-6'), 34.8 (C-8'), 29.0 (C-4), 28.8 (C-9), 25.6 (C-9'), 25.0 (C-6), 24.0 (C-4'), 22.8 (C-10'), 20.9 (C-10), 20.3 (C-9''), 17.6 (C-5'), 17.3 (C-5), 14.1 (C-11), 13.6 (C-11')

EMIE m/z (rel. int.) 501 [M^+] (20), 378 (43), 310 (12), 274 (58), 191 (100), 149 (12), 120 (44), 105 (47), 79 (7), 55 (7), 18 (10).

EMAR (FAB $^+$) m/z : Observado 502.2964 [MH^+]. Calculado para $\text{C}_{32}\text{H}_{39}\text{O}_4\text{N}+\text{H}^+$ 502.2957 [MH^+]

6.15. Preparación de 69

A una solución de (+)-**67** (44.8, 0.09 mmol) en THF/MeOH/ H_2O (10 mL, 7:2.5:0.5) se le adicionó NaOH al 10% (0.5 mL, 50 mg, 1.25 mmol) y se mantuvo en agitación a 60°C. Después de 1 h, la reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente, se acidificó con una solución de HCl (10%, pH 5), se extrajo con AcOEt (4 \times 10 mL), las fases orgánicas se reunieron, se lavaron con solución saturada de NaCl, se secaron con Na_2SO_4 anhidro y se concentraron a presión reducida en rotavapor. El residuo (50.7 mg) se purificó por CC (*n*-hexano/AcOEt, 7:3) obteniéndose **69** (25.3 mg, 55%).



69

Aceite incoloro

R_f : 0.43 (*n*-hexano/AcOEt, 3:2)

IR (CHCl_3) ν_{max} : 3546, 3365, 2962, 2874, 1787, 1686, 1602, 1494, 1454, 1415, 1352, 1279, 1233, 1127, 1073, 956, 920 cm^{-1}

UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ): 227.5 (4.0), 210 (4.2)

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃; asignaciones por COSY, NOESY y HMQC): δ 7.45 (2H, *dd*, *J* = 8.0, 1.5 Hz, H-4'', H-8''), 7.29 (2H, *td*, *J* = 7.5, 1.0 Hz, H-5'', H-7''), 7.22 (1H, *dddd*, *J* = 8.5, 7.5, 1.5, 1.5, H-6''), 7.20 (1H, *d*, *J* = 6.5 Hz, H-7'), 4.77 (1H, *c*, *J* = 7.5 Hz, H-2''), 3.73 (1H, *t*, *J* = 2 Hz, H-7), 2.98 (1H, *dddd*, *J* = 10.5, 6.0, 4.0, 4.0 Hz, H-6'), 2.46 (1H, *ddd*, *J* = 11.0, 2.0, 2.0 Hz, H-4'a), 2.18–2.14 (1H, *m*, H-6a), 2.02–1.97 (2H, *m*, H-5'a, H-8'a), 1.87 (1H, *ddd*, *J* = 5.0, 4.7, 4.7 Hz, H-8), 1.82 (3H, *d*, *J* = 7.0 Hz, H-9''), 1.69–1.58 (4H, *m*, H-5a, H-6b, H-9a, H-8'b), 1.58–1.52 (1H, *m*, H-4a), 1.43–1.33 (3H, *m*, H-5b, H-10a, H-5'b), 1.33–1.13 (5H, *m*, H-9b, H-10b, H-4'b, H-9'a, H-10'a), 1.10–1.03 (3H, *m*, H-4b, H-9'b, H-10'b), 0.91 (3H, *t*, *J* = 7.5 Hz, H-11), 0.69 (3H, *t*, *J* = 7.5 Hz, H-11')

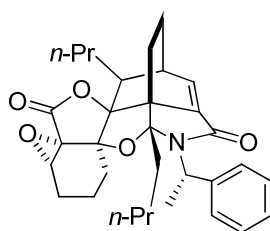
RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃, asignaciones por DEPT, HSQC y HMBC): δ 171.5 (C-1), 164.6 (C-1'), 142.9 (C-3''), 139.4 (C-3'a), 137.6 (C-7'), 128.4 (C-5'', C-7''), 126.9 (C-4'', C-8''), 126.9 (C-6''), 102.3 (C-3'), 96.2 (C-3a), 84.2 (C-3), 59.4 (C-7a), 58.7 (C-7), 57.6 (C-7'a), 53.9 (C-2''), 45.9 (C-8), 34.7 (C-6'), 34.7 (C-8'), 29.8 (C-9), 29.4 (C-4), 25.8 (C-9'), 24.6 (C-6), 23.9 (C-4'), 22.8 (C-10'), 20.9 (C-10), 20.4 (C-9''), 17.5 (C-5'), 14.8 (C-5), 14.2 (C-11), 13.6 (C-11')

EMIE *m/z* (rel. int.) 517 [M⁺] (100), 502 (5), 475 (10), 398 (15), 378 (20), 274 (60), 251 (15), 191 (49), 120 (56), 105 (52), 55 (10)

EMAR (FAB⁺) *m/z*: Observado 518.2905 [MH⁺]. Calculado para C₃₂H₃₉O₄N+H⁺ 518.2906 [MH⁺]

6.16. Preparación de 70

A una solución de (-)-**68** (34.3 mg, 0.07 mmol) en THF/MeOH/H₂O (10 mL, 7:2.5:0.5) se adicionó NaOH ac. 10% (0.5 mL, 50 mg, 1.25 mmol) y se mantuvo en agitación a 60°C. Después de 2 h, la mezcla de reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente, se acidificó con una solución de HCl (10%, pH 5), se extrajo con AcOEt (4 × 10 mL), las fases orgánicas se reunieron, se lavaron con solución saturada de NaCl, se secaron con Na₂SO₄ anhidro y finalmente se concentró en rotavapor a presión reducida. El residuo (44.2 mg) se purificó mediante CCP (*n*-hexano/AcOEt, 7:3, dos veces) permitiendo la obtención de **70** (15 mg, 42.3%)



70

Aceite incoloro

R_f: 0.53 (*n*-hexano/AcOEt, 1:1)

IR (CHCl₃) ν_{max}: 3548, 3365, 2962, 2874, 1788, 1686, 1604, 1494, 1456, 1415, 1353, 1279, 1235, 1190, 1128, 1073, 1008, 956, 920 cm⁻¹

UV (MeOH) λ_{max} (log ε): 227 (4.1), 209 (4.2)

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃; asignaciones por COSY, NOESY y HMQC): δ 7.45 (2H, *dd*, *J* = 8.5, 1.5 Hz, H-4'', H-8''), 7.29 (2H, *ddd*, *J* = 7.5, 7.5, 1.5 Hz, H-5'', H-7''), 7.22 (1H, *dddd*, *J* = 8.5, 8.5, 1.5, 1.5, H-6''), 7.20 (1H, *d*, *J* = 6.5 Hz, H-7'), 4.77 (1H, *c*, *J* = 7.0 Hz, H-2''), 3.73 (1H, *t*, *J* = 2 Hz, H-7), 2.97 (1H, *dddd*, *J* = 10.5, 6.5, 4.0, 4.0 Hz, H-6'), 2.46 (1H, *ddd*, *J* = 11.5, 2.0, 2.0 Hz, H-4'a), 2.17–2.15 (1H, *m*, H-6a), 2.03–1.95 (2H, *m*, H-5'a, H-8'a), 1.87 (1H, *ddd*, *J* = 10.0, 4.5, 4.5 Hz, H-8), 1.82 (3H, *d*, *J* = 7.5 Hz, H-9''), 1.69–1.57 (4H, *m*, H-5a, H-6b, H-9a, H-8'b), 1.54 (1H, *ddd*, *J* = 9.5, 5, 5, H-4a), 1.46–1.35 (3H, *m*, H-5b, H-10a, H-5'b), 1.30–1.16 (5H, *m*, H-9b, H-10b, H-4'b, H-9'a, H-10'a), 1.11–1.06 (3H, *m*, H-4b, H-9'b, H-10'b), 0.91 (3H, *t*, *J* = 7.5 Hz, H-11), 0.70 (3H, *t*, *J* = 7.5 Hz, H-11')

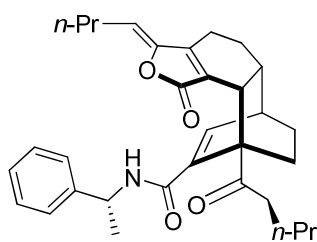
RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃, asignaciones por DEPT, HSQC y HMBC): δ 171.8 (C-1), 164.8 (C-1'), 143.2 (C-3''), 139.6 (C-3'a), 137.8 (C-7'), 128.7 (C-5'', C-7''), 127.2 (C-4'', C-8''), 127.2 (C-6''), 102.5 (C-3'), 96.5 (C-3a), 84.4 (C-3), 59.6 (C-7a), 58.9 (C-7), 57.8 (C-7'a), 54.2 (C-2''), 46.2 (C-8), 36.9 (C-6'), 34.9 (C-8'), 30.1 (C-9), 29.6 (C-4), 26.0 (C-9'), 24.8 (C-6), 24.2 (C-4'), 23.0 (C-10'), 20.2 (C-10), 20.7 (C-9''), 17.7 (C-5'), 15.1 (C-5), 14.5 (C-11), 13.9 (C-11')

EMIE *m/z* (rel. int.) 517 [M⁺] (100), 502 (5), 475 (7), 398 (6), 378 (20), 355 (10), 274 (55), 251 (8), 190 (52), 120 (56), 105 (54), 79 (6), 55 (10)

EMAR (FAB⁺) *m/z*: Observado 518.2907 [MH⁺]. Calculado para C₃₂H₃₉O₄N+H⁺ 518.2906 [MH⁺]

6.17. Derivatización de *rac*-diligustílida (*rac*-4) con (*R*)-(+)-α-metilbencilamina

A una solución de *rac*-diligustílida (*rac*-4, 99.2 mg, 0.26 mmol) en tolueno anhidro (10 mL) se le adicionó (*R*)-(+)-α-metilbencilamina (57.12 mg, 0.47 mmol), se mantuvo en agitación y reflujo bajo atmósfera de nitrógeno por 20 h. La mezcla de reacción se dejó enfriar, se neutralizó con HCl (10%), se extrajo con con AcOEt (3 × 10 mL), las fases orgánicas se reunieron, se lavaron con solución saturada de NaCl, se secaron con Na₂SO₄ anhidro y finalmente el disolvente se eliminó a presión reducida. El residuo (aceite amarillo, 115.3 mg) fue purificado mediante CCFP (*n*-hexano/AcOEt 7:3, 4 veces), de este proceso se recuperó parte de la materia prima (7.9%) y se obtuvieron (-)-73 (43.18 mg, 33%) y (+)-74 (49.36 mg, 37.7%).



(-)-71

Aceite incoloro

R_f: 0.50 (*n*-hexano/AcOEt, 3:2, dos veces)

[α]_D²⁵ -96.1 (*c* 1.3 × 10⁻³, MeOH)

IR (CHCl₃) ν_{max}: 3435, 3012, 2961, 2937, 2874, 1763, 1705, 1656, 1496, 1451, 1378, 1233, 1167, 1133, 997 cm⁻¹

UV (MeOH) λ_{max} (log ε): 269 (3.6), 208 (4.3)

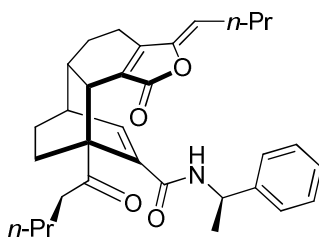
CD (*c* 1.68 × 10⁻⁵, MeOH): 304 nm (Δε +2.19), 267 nm (Δε -5.25), 237 nm (Δε -11.46), 206 nm (Δε +7.27)

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃, asignaciones por COSY, NOESY y HMQC): δ 7.30 (2H, *ddd*, *J* = 8.5, 8.5, 1.0 Hz, H-5'', H-7''), 7.27 (2H, *dd*, *J* = 8.5, 1.5 Hz, H-4'', H-8''), 7.22 (1H, *dddd*, *J* = 8.5, 8.5, 1.5, 1.5, H-6''), 6.50 (1H, *d*, *J* = 6.5 Hz, H-7'), 5.45 (1H, *d*, *J* = 8.0 Hz, H-1''), 5.09 (1H, *t*, *J* = 7.5 Hz, H-8), 5.05 (1H, *dddd*, *J* = 7.5 Hz, H-2''), 3.19 (1H, *d*, *J* = 8.5 Hz, H-7), 2.88 (1H, *ddd*, *J* = 18.5, 7.5, 7.5 Hz, H-8'a), 2.60-2.53 (2H, *m*, H-6', H-8'b), 2.46-2.44 (1H, *m*, H-6), 2.31 (2H, *dddd*, *J* = 13.0, 7.5, 7.5, 7.5 Hz, H-9a, H-9b), 2.23 (1H, *t*, *J* = 4.5 Hz, H-4a), 2.19-2.16 (1H, *m*, H-4b), 2.14 (1H, *ddd*, *J* = 12.5, 6.0, 3.0, 3.0 Hz, H-4'a), 1.88 (1H, *dddd*, *J* = 15.5, 6.5, 3.0, 3.0 Hz, H-5a), 1.81 (1H, *dddd*, *J* = 14.0, 8.5, 4.0, 4.0 Hz, H-5'a), 1.70-1.63 (3H, *m*, H-4'b, H-9'a, H-9'b), 1.63-1.58 (1H, *m*, H-5'b), 1.45 (2H, *c*, *J* = 7.5 Hz, H-10a, H-10b), 1.46 (1H, *d*, *J* = 6.5 Hz, H-9''), 1.43-1.40 (1H, *m*, H-5b), 1.36 (2H, *dddd*, *J* = 15.0, 7.5, 7.5, 7.5 Hz, H-10'a, H-10'b), 0.93 (3H, *t*, *J* = 7.0 Hz, H-11), 0.92 (3H, *t*, *J* = 7.5 Hz, H-11')

RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃, asignaciones por DEPT, HSQC y HMBC): δ 208.5 (C-3'), 168.9 (C-1), 168.3 (C-1'), 152.8 (C-3a), 148.5 (C-3), 143.7 (C-3''), 141.8 (C-7'a), 135.6 (C-7'), 128.5 (C-5'', C-7''), 128.0 (C-7a), 127.0 (C-6''), 126.1 (C-4'', C-8''), 111.2 (C-8), 57.3 (C-3'a), 48.6 (C-2''), 39.4 (C-7), 39.2 (C-8'), 37.9 (C-6'), 37.6 (C-6), 29.4 (C-4'), 28.5 (C-5'), 28.0 (C-5), 27.9 (C-9), 25.3 (C-9'), 22.4 (C-10), 22.4 (C-10'), 21.6 (C-9''), 19.4 (C-4), 14.0 (C-11'), 13.8 (C-11)

EMIE *m/z* (rel. int.) 501 [M⁺] (23), 461 (11), 444 (4), 381 (7), 311 (25), 226 (8), 191 (100), 120 (98), 105 (77), 79 (10), 57 (9), 43 (6), 29 (5)

EMAR (FAB⁺) *m/z*: Observado 502.2955 [MH⁺]. Calculado para C₃₂H₃₉O₄N+H⁺ 502.2957 [MH⁺].



(+)-72

Aceite incoloro

R_f: 0.45 (*n*-hexane/AcOEt, 3:2, dos veces)

[α]_D²⁵+117.0 (*c* 1.35 × 10⁻³, MeOH)

IR (CHCl₃) ν_{max}: 3436, 3012, 2961, 2874, 1768, 1704, 1658, 1496, 1450, 1377, 1232, 1167, 1133, 997, 920 cm⁻¹

UV (MeOH) λ_{max} (log ε): 277 (3.5), 207.8 (4.3)

CD (*c* 2.4 × 10⁻⁵, MeOH): 302 nm (Δε -1.87), 271 nm (Δε +4.42), 219 nm (Δε +16.34), 205 nm (Δε +11.40)

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃, asignaciones por COSY, NOESY y HMQC): δ 7.31 (2H, *ddd*, *J* = 7.5, 7.5, 1.5 Hz, H-5'', H-7''), 7.35 (2H, *dd*, *J* = 8.5, 1.5 Hz, H-4'', H-8''), 7.23 (1H, *dddd*, *J* = 8.5, 7.0, 1.5, 1.5, H-6''), 6.58 (1H, *d*, *J* = 6.5 Hz, H-7'), 5.68 (1H, *d*, *J* = 8.0 Hz, H-1'), 4.99 (1H, *t*, *J* = 8.0 Hz, H-8), 5.08 (1H, *dddd*, *J* = 7.0 Hz, H-2''), 3.29 (1H, *da*, *J* = 9.0 Hz, H-7), 2.95 (1H, *ddd*, *J* = 15.0, 6.0, 6.0 Hz, H-8'a), 2.59–2.56 (1H, *m*, H-8'b), 2.56–2.53 (1H, *m*, H-6'), 2.48–2.44 (1H, *m*, H-6), 2.28 (2H, *c*, *J* = 7.5, Hz, H-9a, H-9b), 2.22 (1H, *c*, *J* = 7.5 Hz, H-4a), 2.14–2.07 (2H, *m*, H-4b, H-4'a), 1.89 (1H, *dddd*, *J* = 15.5, 6.5, 3.5, 3.5 Hz, H-5a), 1.79 (1H, *dddd*, *J* = 14.0, 8.5, 3.5, 3.5 Hz, H-5'a), 1.69–1.54 (4H, *m*, H-4'b, H-5'b, H-9'a, H-9'b), 1.34 (2H, *c*, *J* = 7.5 Hz, H-10a, H-10b), 1.47 (1H, *d*, *J* = 6.5 Hz, H-9''), 1.43–1.40 (1H, *m*, H-5b), 1.34 (2H, *c*, *J* = 7.5 Hz, H-10'a, H-10'b), 0.92 (3H, *t*, *J* = 7.5 Hz, H-11), 0.89 (3H, *t*, *J* = 7.5 Hz, H-11')

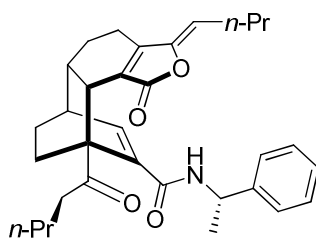
RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃, asignaciones por DEPT, HSQC y HMBC): δ 208.5 (C-3'), 169.2 (C-1), 167.7 (C-1'), 152.9 (C-3a), 148.4 (C-3), 143.2 (C-3''), 141.5 (C-7'), 136.5 (C-7'), 128.5 (C-5'', C-7''), 127.6 (C-7a), 127.0 (C-6''), 126.4 (C-4'', C-8''), 111.0 (C-8), 57.2 (C-3'a), 48.3 (C-2''), 39.4 (C-7), 39.0 (C-8'), 37.9 (C-6'), 37.8 (C-6), 29.8 (C-4'), 28.4 (C-5'), 28.2 (C-5), 27.9 (C-9), 25.6 (C-9'), 22.4 (C-10), 22.4 (C-10'), 21.3 (C-9''), 19.2 (C-4), 14.0 (C-11), 13.8 (C-11')

EMIE *m/z* (rel. int.) 501 [M⁺] (17), 461 (6), 444 (4), 381 (5), 341 (7), 311 (16), 227 (10), 191 (73), 105 (100), 79 (12), 60 (55), 43 (94), 29 (19), 18 (24)

EMAR (FAB⁺) *m/z*: Observado 502.2961 [MH⁺]. Calculado para C₃₂H₃₉O₄N+H⁺ 502.2957 [MH⁺]

6.18. Derivatización de *rac*-diligustílida (*rac*-4) con (S)-(-)- α -metilbencilamina

A una solución de *rac*-diligustílida (*rac*-4, 100 mg, 0.26 mmol) en tolueno anhidro (10 mL) se añadió (S)-(-)- α -metilbencilamina (63.7 mg, 0.52 mmol) y se mantuvo en agitación y reflujo en atmósfera de nitrógeno por 24 h. La mezcla de reacción se dejó enfriar, se neutralizó con una solución de HCl (10%) y se extrajo con AcOEt (3 \times 10 mL). Las fases orgánicas se reunieron, se lavaron con solución saturada de NaCl, se secaron con Na₂SO₄ anhidro y finalmente el disolvente se eliminó a presión reducida. La purificación del residuo (aceite amarillo, 120 mg) se llevó a cabo mediante cromatografía de capa fina preparativa (*n*-hexano/AcOEt 4:1, 4 veces) recuperándose 6.3% de *rac*-4 y obteniéndose 92.36 (76%) de los productos siguientes: (+)-71 (48.13 mg, 40%) y (-)-74 (44.23 mg, 36%).



(+)-71

Aceite incoloro

R_f: 0.56 (*n*-hexano/AcOEt, 2:3, dos veces)

$[\alpha]_D^{25} +46.3$ (*c* 9.5 $\times 10^{-4}$, MeOH)

IR (CHCl₃) ν_{\max} : 3436, 2961, 2939, 2872, 1760, 1707, 1658, 1497, 1453, 1374, 1234, 1210, 1169, 1133, 997, 949 cm⁻¹

UV (MeOH) λ_{\max} (log ϵ): 276.5 (3.8), 207.5 (4.3)

CD (*c* 2.2 $\times 10^{-5}$, MeOH): 302 nm ($\Delta\epsilon$ -4.80), 271 nm ($\Delta\epsilon$ +11.96), 243 nm ($\Delta\epsilon$ +8.01), 203 nm ($\Delta\epsilon$ -8.23)

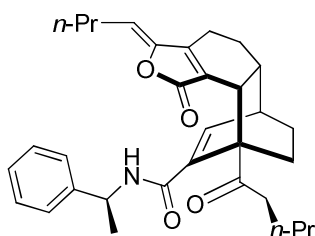
RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃, asignaciones por COSY, NOESY y HMQC): δ 7.31 (2H, *ddd*, *J* = 8.5, 8.5, 1.0 Hz, H-5'', H-7''), 7.37 (2H, *dd*, *J* = 8.5, 1.5 Hz, H-4'', H-8''), 7.22 (1H, *dddd*, *J* = 8.5, 8.5, 1.5, 1.5, H-6''), 6.50 (1H, *d*, *J* = 6.5 Hz, H-7'), 5.46 (1H, *d*, *J* = 8.0 Hz, H-1''), 5.08 (1H, *t*, *J* = 8.0 Hz, H-8), 5.05 (1H, *dddd*, *J* = 7.5 Hz, H-2''), 3.20 (1H, *d*, *J* = 8.5 Hz, H-7), 2.87 (1H, *ddd*, *J* = 18.5, 7.5, 7.5 Hz, H-8'a), 2.59–2.52 (2H, *m*, H-6'), 2.45–2.42 (1H, *m*, H-6), 2.30 (2H, *dddd*, *J* = 13.0, 7.0, 7.0, 7.0 Hz, H-9a, H-9b), 2.20 (1H, *t*, *J* = 4.5 Hz, H-4a), 2.18–2.14 (1H, *m*, H-4b), 2.13 (1H, *ddd*, *J* = 12.5, 6.5, 3.0, 3.0 Hz, H-4'a), 1.89 (1H, *dddd*, *J* = 15.5, 6.5, 3.0, 3.0 Hz, H-5a), 1.80 (1H, *dddd*, *J* = 14.5, 8.5, 4.0, 4.0 Hz, H-5'a), 1.70–1.63 (3H, *m*, H-4'b, H-9'a, H-9'b), 1.64–1.58 (1H, *m*, H-5'b), 1.46 (2H, *c*, *J* = 7.5 Hz, H-10a, H-10b), 1.45 (1H, *d*, *J* = 7.5 Hz, H-9''), 1.42–1.39 (1H, *m*, H-5b),

1.35 (2H, *dddd*, $J = 15.0, 7.5, 7.5, 7.5$ Hz, H-10'a, H-10'b), 0.92 (3H, *t*, $J = 7.0$ Hz, H-11), 0.91 (3H, *t*, $J = 7.5$ Hz, H-11')

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3 , asignaciones por DEPT, HSQC y HMBC): δ 208.5 (C-3'), 169.0 (C-1), 168.9 (C-1'), 152.8 (C-3a), 148.5 (C-3), 143.7 (C-3''), 141.8 (C-7'a), 135.6 (C-7'), 128.5 (C-5'', C-7''), 128.1 (C-7a), 127.0 (C-6''), 126.1 (C-4'', C-8''), 111.1 (C-8), 57.3 (C-3'a), 48.6 (C-2''), 39.4 (C-7), 39.2 (C-8'), 37.9 (C-6'), 37.6 (C-6), 29.4 (C-4'), 28.5 (C-5'), 28.0 (C-5), 27.9 (C-9), 25.3 (C-9'), 22.4 (C-10), 22.4 (C-10'), 21.6 (C-9''), 19.4 (C-4), 14.0 (C-11'), 13.8 (C-11)

EMIE m/z (rel. int.) 501 [M^+] (25), 444 (4), 381 (5), 311 (19), 226 (6), 191 (100), 120 (82), 105 (62), 79 (9), 69 (17), 28 (16), 18 (23)

EMAR (FAB $^+$) m/z : Observado 502.2954 [MH^+]. Calculado para $\text{C}_{32}\text{H}_{39}\text{O}_4\text{N}+\text{H}^+$ 502.2957 [MH^+]



(-)-72

Aceite incoloro

R_f: 0.54 (*n*-hexano/AcOEt, 2:3, dos veces)

$[\alpha]_{\text{D}}^{25} -125.8$ ($c 8.5 \times 10^{-4}$, MeOH); IR (CHCl_3) ν_{max} : 3434, 3273, 2961, 2935, 2873, 1761, 1706, 1642, 1504, 1452, 1378, 1239, 1168, 1132, 920 cm^{-1}

UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ): 278 (3.9), 207 (4.3)

CD ($c 1.9 \times 10^{-5}$, MeOH): 303 nm ($\Delta\epsilon +4.47$), 272 nm ($\Delta\epsilon -11.35$), 218 nm ($\Delta\epsilon -11.82$), 203 nm ($\Delta\epsilon -12.50$)

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3 , asignaciones por COSY, NOESY y HMQC): δ 7.31 (2H, *ddd*, $J = 7.0, 7.0, 1.5$ Hz, H-5'', H-7''), 7.36 (2H, *dd*, $J = 8.0, 1.5$ Hz, H-4'', H-8''), 7.23 (1H, *dddd*, $J = 7.0, 7.0, 1.5, 1.5$, H-6''), 6.58 (1H, *d*, $J = 6.5$ Hz, H-7'), 5.68 (1H, *d*, $J = 8.0$ Hz, H-1''), 4.99 (1H, *t*, $J = 8.0$ Hz, H-8), 5.08 (1H, *dddd*, $J = 7.0$ Hz, H-2''), 3.29 (1H, *da*, $J = 9.0$ Hz, H-7), 2.95 (1H, *ddd*, $J = 15.0, 6.5, 6.5$ Hz, H-8'a), 2.61–2.50 (2H, *m*, H-6', H-8'b), 2.49–2.42 (1H, *m*, H-6), 2.27 (2H, *c*, $J = 7.5$, Hz, H-9a, H-9b), 2.19 (1H, *c*, $J = 7.5$ Hz, H-4a), 2.13–2.04 (2H, *m*, H-4b, H-4'a), 1.88 (1H, *dddd*, $J = 15.5, 5, 3.0, 3.0$ Hz, H-5a), 1.80 (1H, *dddd*, $J = 13.5, 8.0, 4.0, 4.0$ Hz, H-5'a), 1.68–1.59 (4H, *m*, H-4'b, H-5'b, H-9'a, H-9'b), 1.34 (2H, *c*, $J = 7.5$ Hz, H-10a, H-10b), 1.47 (1H, *d*, $J = 7.0$ Hz, H-9''), 1.42–1.39 (1H, *m*, H-5b), 1.34 (2H, *c*, $J = 7.5$ Hz, H-10'a, H-10'b), 0.91 (3H, *t*, $J = 7.0$ Hz, H-11), 0.89 (3H, *t*, $J = 7.5$ Hz, H-11')

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3 , asignaciones por DEPT, HSQC y HMBC): δ 208.5 (C-3'), 169.2 (C-1), 167.7 (C-1'), 153.0 (C-3a), 148.4 (C-3), 143.2 (C-3''), 141.5 (C-7'a), 136.5 (C-7'), 128.5 (C-5'', C-7''), 127.7 (C-7a), 127.0 (C-6''), 126.3 (C-4'', C-8''), 110.9 (C-8), 57.2 (C-3'a), 48.3 (C-2''), 39.4 (C-7), 38.9 (C-8'), 37.9 (C-6'), 37.8 (C-6), 29.8 (C-4'), 28.4 (C-5'), 28.2 (C-5), 27.9 (C-9), 25.6 (C-9'), 22.4 (C-10), 22.4 (C-10'), 21.3 (C-9''), 19.2 (C-4), 14.0 (C-11), 13.8 (C-11')

EMIE m/z (rel. int.) 501 [M^+] (22), 444 (4), 381 (5), 311 (17), 226 (5), 191 (100), 148 (12), 120 (67), 105 (56), 57 (52), 43 (26), 28 (7)

EMAR (FAB^+) m/z : Observado 502.2956 [MH^+]. Calculado para $\text{C}_{32}\text{H}_{39}\text{O}_4\text{N}+\text{H}^+$ 502.2957 [MH^+]

6.19. Ensayo de Citotoxicidad

Las líneas celulares de tumores humanos, colon (HCT-15), leucemia (K-562) y pulmón (SKLU-1), fueron proporcionadas por el Instituto Nacional del Cáncer de Estados Unidos de América. Las propiedades citotóxicas de los productos naturales así como de algunos de sus derivados frente a dichas células tumorales fueron determinadas usando el ensayo de crecimiento celular mediante el método de la sulforrodamina B (SRB, colorante de unión a proteínas).^[65] Las líneas celulares fueron cultivadas en el medio RPMI-1640 (Sigma Chemical Co., Ltd., St. Louis, MO, USA), enriquecido con Suero Bovino Fetal al 10%, 2 μM de L-glutamina, 100 IU/mL de penicilina G, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de sulfato de estreptomina y 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de anfotericina B (Gibco). Se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera de 5 % de CO_2 y 95 % de humedad. Para realizar el ensayo, se tomaron suspensiones celulares de 5×10^4 células/mL (K562), 10×10^4 células/mL (HCT-15) y 7500 células/mL (SKLU-1). Se sembraron 100 μL de las suspensiones celulares en los pozos de un microplato (96 pozos) y se incubaron para permitir la fijación de las células a las paredes del pozo. Después de 24 h de incubación se adicionaron 100 μL de cada muestra y de la sustancia usada como control positivo. Transcurridas 48 h de haber agregado las sustancias a probar, las células adheridas fueron fijadas *in situ* mediante la adición de 50 μL de ácido tricloroacético (TCA) frío al 50 % (*peso/vol*) y se incubaron nuevamente a 4 °C por 60 min. El sobrenadante fue descartado y los platos fueron lavados tres veces con agua destilada y posteriormente secados con aire. Los cultivos fijados con TCA fueron coloreados con 100 μL de una solución de SRB al 0.4% por 30 min. El colorante unido a proteínas fue extraído con 10 μM de una base sin búfer. Las densidades ópticas de las soluciones coloreadas extraídas fueron leídas en un Lector Ultra de Microplatos (*Elx 808, BIO-TEK Instruments, Inc.*), a una longitud de onda de 515 nm. Los resultados fueron expresados como concentraciones inhibitorias medias (CI_{50}) y fueron calculados de acuerdo al protocolo de Monks,^[65] donde, la curva dosis-respuesta fue graficada para cada sustancia y la concentración CI_{50} obtenida fue estimada mediante la ecuación de una regresión lineal. Los valores de CI_{50} para las sustancias están reportados como la media \pm error estándar y se encuentran mostrados en tablas en la sección de discusión de resultados.

7. CONCLUSIONES

La determinación de las condiciones experimentales para la obtención de diferentes productos (*rac-67*, *via O*-alquilación y *rac-37*, *via C*-alquilación) a partir del *rac*-cetoácido de toquinólida B (*rac-39*), la obtención del derivado *rac-68* con bencilamina y con *rac-39* y las reacciones de *rac*-toquinólida B (*rac-3*) y *rac*-diligustílida (*rac-4*) con (*R*)-(+)- α - y con (*S*)-(–)- α -metilbencilamina que produjeron pares enantioméricos ((–/+)-**69**, (–/+)-**70**, (–/+)-**73** y (–/+)-**74**), permitieron la obtención de sustancias enantioméricamente puras y la generación de conocimiento acerca de la reactividad química particular de las ftálicas diméricas y que, en algunos casos las ciclizaciones intramoleculares pueden ser consideradas como una característica de las mismas.

Por otro lado, la determinación de la presencia de las ftálicas *rac-3* y *rac-4* se llevó a cabo en los extractos de las raíces (a) frescas y (b) secas de *L. porteri* mediante el análisis cualitativo por RMN ^1H y RMN DOSY. El análisis permitió concluir que *rac-3* y *rac-4* son productos naturales y no son formados como productos post-cosecha. Adicionalmente, fue desarrollado un método analítico selectivo, lineal y preciso mediante el cual fue posible cuantificar mediante RMN ^1H los constituyentes mayoritarios y las ftálicas diméricas presentes en el extracto de las raíces frescas.

La investigación referente a la relación existente entre las estructuras de los productos naturales y derivados con su actividad biológica permitió determinar que los compuestos de tipo toquinólida B (*rac-3* y *rac-41*.) incrementaron el tiempo de hipnosis causado por el pentobarbital sódico (70.8 y 100%, respectivamente), mientras que los compuestos monoméricos, como es el caso de senquiunólida F (**9**), mostraron actividad anti-espasmódica moderada (65%). Las actividades citotóxicas de los pares enantioméricos obtenidos de las reacciones de *rac*-toquinólida B (*rac-3*) y *rac*-diligustílida (*rac-4*) con (*R*)-(+)- α - y con (*S*)-(–)- α -metilbencilamina fueron más potentes al compararse con los productos naturales *rac-3*, *rac-4* y *rac-5*. La determinación de la inhibición de la proliferación celular permitió concluir que algunas ftálicas diméricas constituyen agentes citotóxicos novedosos.

8. REFERENCIAS

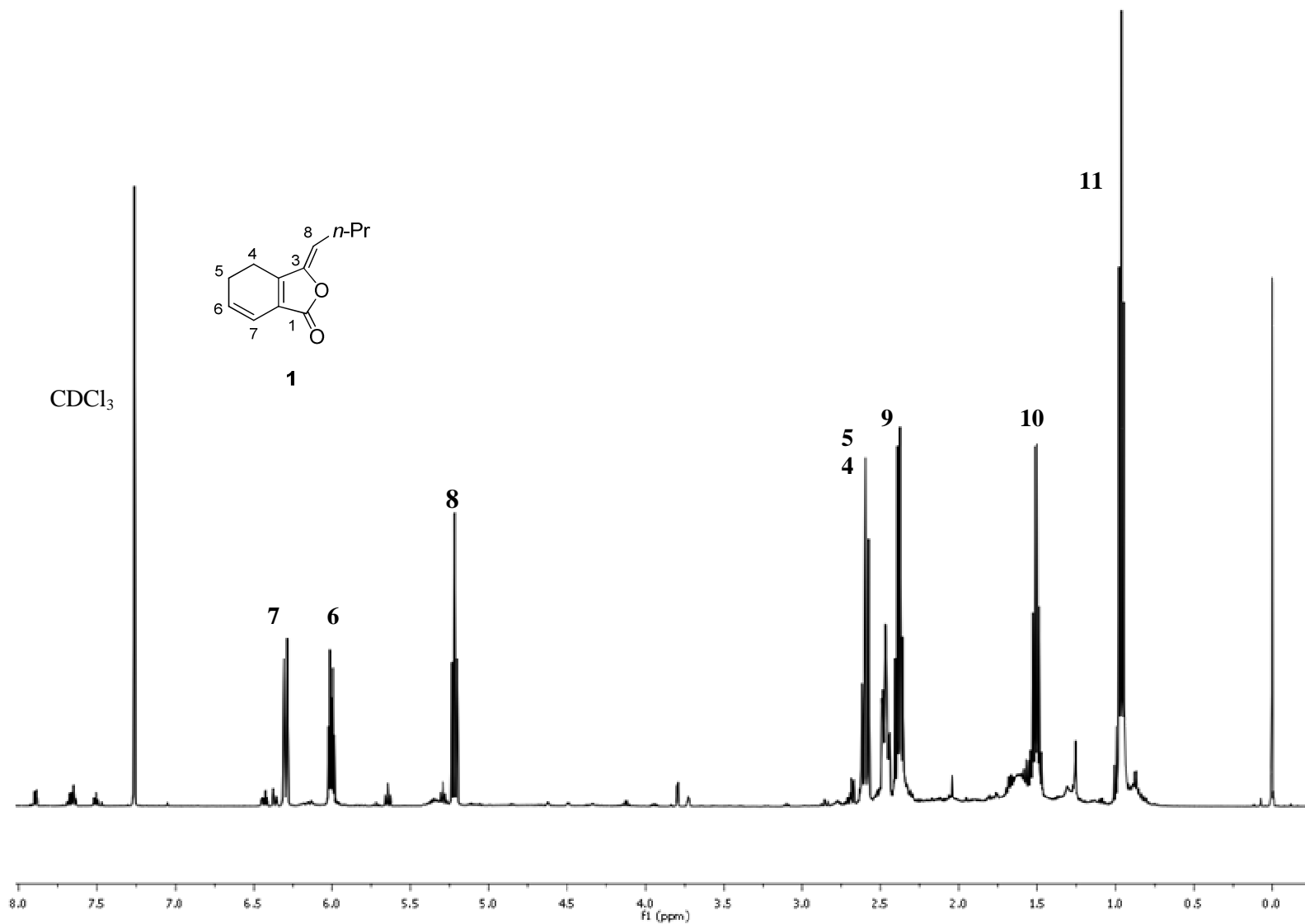
1. Linares, E.; Bye, R. A. *J. Ethnopharmacol.* **1987**, *19*, 153–183.
2. Bye, R. A. *Economic Botany* **1986**, *40*, 103–124.
3. Delgado, G.; Reza-Garduño, R. G.; Rios, Y. M.; del Rio, F. *Planta Med.* **1992**, *58*, 570–571.
4. Teng, C.-M.; Chen, W.-Y.; Ko, W.-C.; Ouyang, C. *Biochim. Biophys. Acta* **1987**, *924*, 375–382.
5. Ko, W.-C.; Sheu, J.-R.; Tzeng, S.-H.; Chen, C.-M. *Planta Med.* **1998**, *64*, 229–232.
6. Ko, W. C.; Liao, C.-C.; Shih, C.-H.; Lei, C.-B.; Chen, C.-M. *Planta Med.* **2002**, *68*, 1004–1009.
7. Delgado, G.; Reza-Garduño, R. G.; Toscano, R. A.; Bye, R.; Linares, E. *Heterocycles* **1988**, *27*, 1305–1312.
8. Quiroz-García, B.; Hernández-Ortega, S.; Sterner, O.; Delgado, G. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 3681–3688.
9. Lin, G.; Chan, S. S. K.; Chung, H. S.; Li, S. L. en *Studies in Natural Products Chemistry* ed. Attatur-Rahman, Elseveir, Amsterdam, 2006, vol. 32. Bioactive Natural Products Parte L, pp. 611–669.
10. Beck, J. J.; Chou, S. J. *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 891–900.
11. Lim, L. S.; Shen, P.; Gong, Y. H.; Yong, E. L. *Phytochemistry* **2006**, *67*, 728–734.
12. Deng, S.; Chen, S.-N.; Lu, J.; Wang, Z. J.; Nikolic, D.; van Breemen, R. B.; Santarsiero, B. D.; Mesecar A.; Fong, H. H. S.; Farnsworth, N. R.; Pauli, G. F. *Phytochem. Anal.* **2006**, *17*, 398–405.
13. Kobayashi, M.; Mitsuhashi, H. *Chem. Pharm. Bull.* **1987**, *35*, 4789–4792.
14. Mitsuhashi, H.; Nomura, M. *Chem Pharm. Bull.* **1966**, *14*, 777–778.
15. Rios, M. Y.; Delgado, G.; Toscano, R. A. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 3355–3366.
16. Ogawa, Y.; Mori, Y.; Maruno, M.; Wakamatsu, T. *Heterocycles* **1997**, *45*, 1869–1872.
17. Rios, M. Y.; Delgado, G. *Rev. Soc. Quím. Méx.* **1999**, *43*, 127–132.
18. Quiroz-García, B.; Figueroa, R.; Cogordán, J. A.; Delgado, G. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 3003–3006.
19. Rios, M. Y.; Delgado, G.; Espinoza-Pérez, G. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 6605–6608.
20. Baldwin, J. E.; Lusch, M. J. *Tetrahedron* **1982**, *38*, 2939–2947.
21. Delgado, G.; Hernández, L. Resultados en proceso de publicación.
22. Quiroz-García, B.; Hernández, L.; Toscano, R. A.; Sterner, O.; Delgado, G. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 2509–2512.
23. Banerjee, S.; Gupta, B. D; Sheldrick, W. S.; Höfle, G.; *Liebigs Ann. Chem.* **1982**, 699–707.
24. Wiley, R. H. The chemistry of heterocyclic compounds. Pyrazoles, pyrazolines, pyrazolidines, indazoles and condensed rings. Interscience Publisher **1967**, 177–271.

25. Matsumoto, K.; Kohno, S.-I.; Ojima, K.; Tezuka, Y.; Kadota, S.; Watanabe, H. *Life Sci.* **1998**, *62*, 2073–2082.
26. Hsieh, M.-T.; Wu, C.-R.; Lin, L. W.; Hsieh, C.-C.; Tsai, C.-H. *Planta Med.* **2001**, *67*, 38–42.
27. Bjeldanes, L. F.; Kim, I.-S. *J. Food Sci.* **1978**, *43*, 143–144.
28. Sato, H.; Yorozu, H.; Yamaoka, S. *Biomed Res.* **1993**, *14*, 385–390.
29. Yu, S. R.; You, S. Q.; Chen, H. Y. *Acta Pharm. Sin.* **1984**, *19*, 486–490.
30. Teng, C. M.; Chen, W. Y.; Ko, W. C.; Ouyang, C. H. *Bioch. Bioph. Acta*, **1987**, *924*, 373–382.
31. Naito, T.; Kubota, K.; Shimoda, Y.; Sato, T.; Ikeya, Y.; Okada, M.; Maruno, M. *Nat. Med.* **1995**, *49*, 288–292.
32. Ko, W. C.; Chang, L. D.; Wang, G. Y.; Lin, L. C. *Phytother. Res.* **1994**, *8*, 321–326.
33. Ko, W. C.; Sheu, J.; Tzeng, S. H.; Chen, C. M. *Planta Med.* **1998**, *64*, 229–232.
34. Kimura, M.; Harada, M.; Sekida, S.; Yuda, M. *Jpn. Kokai Tokio Koho, Jp.*, **1989**, 5 pp.
35. Kobayashi, S.; Mimura, Y.; Notoya, K.; Kimura, I.; Kimura, M. *Jpn. J. Pharmacol.* **1992**, *60*, 397–401.
36. Kobayashi, S.; Mimura, Y.; Naitoh, T.; Kimura, I.; Kimura, M. *Jpn. J. Pharmacol.* **1993**, *63*, 353–359.
37. Zheng, L. Y.; Feng, Y. P. *Acta Pharm. Sin.* **1996**, *31*, 18–23.
38. Lin, J. F.; Feng, Y. F. *Acta Pharm. Sin.* **1996**, *31*, 166–170.
39. Zhou, G. Faming Zhuanli Shenqing Gongkai Shomingshu, China, 2002.
40. Ko, W. C.; Charng, C. Y.; Sheu, J. R.; Tzeng, S. H.; Chen, C. M. *J. Pharm. Pharmacol.* **1998**, *50*, 1365–1369.
41. Li, S.-L.; Yan, R.; Tam, Y.-K.; Lin, G. *Chem. Pharm. Bull.* **2007**, *55*, 140–144.
42. Johnson, C. S. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **1999**, *34*, 203–256.
43. Morris, G. A. Diffusion-Ordered Spectroscopy (DOSY), en D. M. Grant, R. K. Harris (Eds.), *Encyclopedia of Nuclear Magnetic Resonance*, John Wiley & Sons Ltd., Chichester, 2002, pp. 35–44.
44. Kobayashi, M.; Fujita, M.; Mitsuhashi, H. *Chem. Pharm. Bull.* **1987**, *35*, 1427–1433.
45. Mitsuhashi, H.; Maramatsu, T.; Nagai, U.; Nakano, T.; Ueno, K. *Chem. Pharm. Bull.* **1963**, *11*, 1317–1319.
46. Zschocke, S.; Liu, J.-H.; Stuppner, H.; Bauer, R. *Phytochem. Anal.* **1998**, *9*, 283–290.
47. Pauli, G. F.; Jaki, B. U.; Lankin, D. C. *J. Nat. Prod.* **2005**, *68*, 133–149.
48. Lu, G.-H.; Chan, K.; Chan, C.-L.; Leung, K.; Jiang, Z.-H.; Zhao, Z.-Z. *J. Chromatogr. A* **2004**, *1046*, 101–107.
49. Mitsuhashi, H.; Nagai, U.; Muramatsu, T. *Chem. Pharm. Bull.* **1960**, *8*, 243–245.

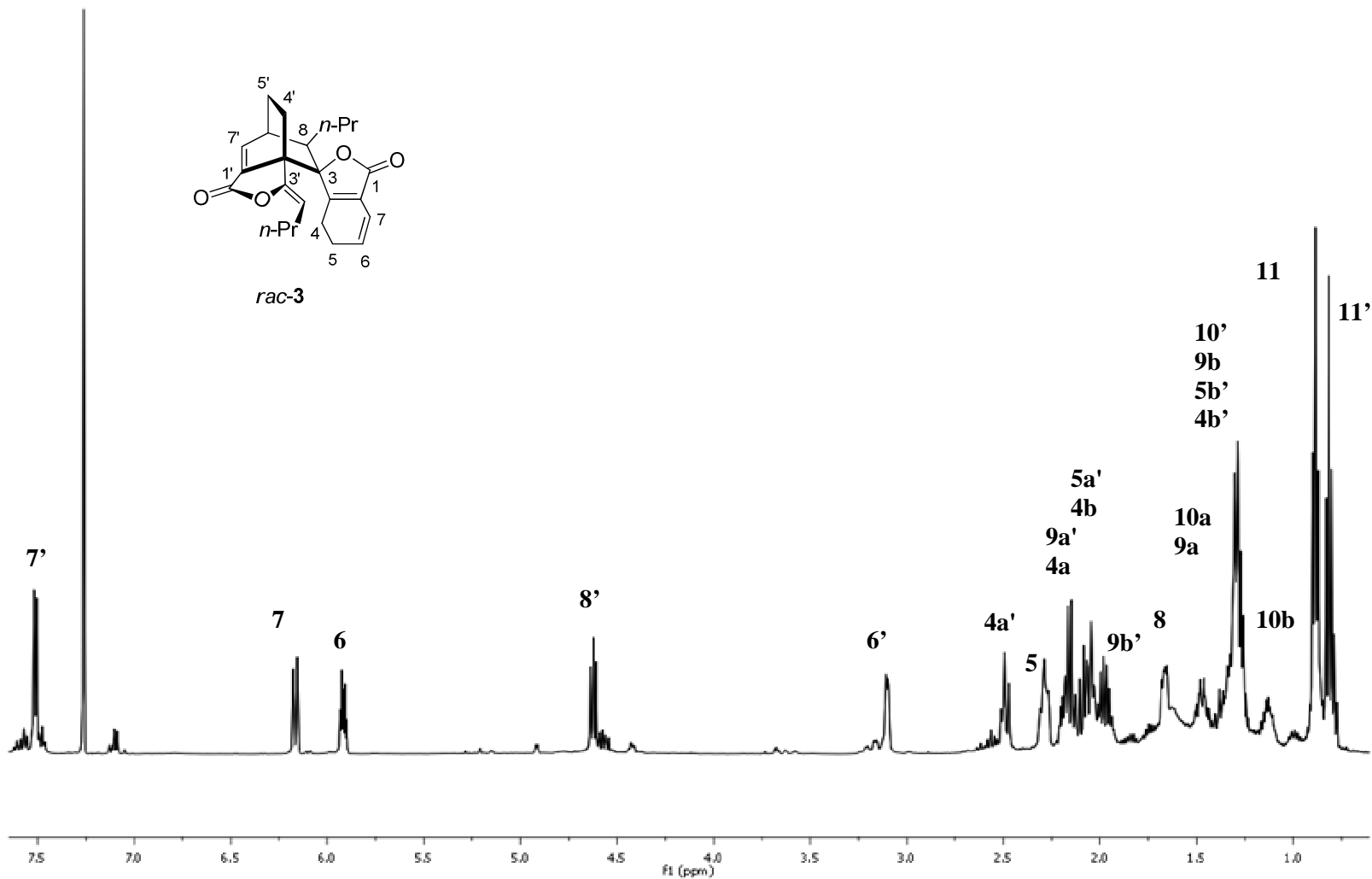
50. Tsuchida, T.; Kobayashi, M.; Kaneko, K.; Mitsunashi, H. *Chem. Pharm. Bull.* **1987**, *35*, 4460–4464.
51. Kaouadji, M.; De Pachtere, F.; Pouget, C.; Chulia, A. J. *J. Nat. Prod.* **1986**, *49*, 872–877.
52. Calvano, C.; Palmisano, F.; Zambonin, C. G. *Rapid Comm. Mass Spectrom.* **2005**, *19*, 1315–1320.
53. Yang, B.; Heikki, K. *Lipids* **2006**, *41*, 381–392.
54. Kobayashi, M.; Fujita, M.; Mitsunashi, H. *Chem. Pharm. Bull.* **1984**, *32*, 3770–3773.
55. Ghosal, S. *Phytochemistry* **1985**, *24*, 1807–1810.
56. Greca, M. D.; Monaco, P.; Previtera, L. *J. Nat. Prod.* **1990**, *53*, 1430–1435.
57. Matsumoto, K.; Kohno, S.-Y.; Ojima, K.; Tezuka, Y.; Kadota, S.; Watanabe, H. *Life Science* **1998**, *62*, 2073–2082.
58. Beck, J. J.; Stermitz, F. R. *J. Nat. Prod.* **1995**, *58*, 1047–1055.
59. Bandala, Y.; Juaristi, E. *Aldrichim. Acta*, **2010**, *43*, 65–78.
60. Juaristi, E.; Escalante, J.; León-Romo, J. L.; Reyes, A. *Tetrahedron: Assymetry* **1998**, *9*, 715–740.
61. Juaristi, E.; León-Romo, J. L.; Reyes, A.; Escalante, J. *Tetrahedron: Assymetry* **1999**, *10*, 2441–2495.
62. Dennington II, R.; Keith, T.; Millam, J. GaussView, Version 4.1, Semichem, Inc. Shawnee Mission, K S. 2007.
63. Gaussian 03, Revision C 02, Gaussian, Inc.; Pittsburgh, P. A. 2004.
64. Tirado-Rives, J.; Jorgensen, W. L. *J. Chem. Theory Comput.*, **2008**, *4*, 297–306.
65. Monks, A.; Scudiero, D.; Skehan, P.; Shoemaker, R.; Paull, K.; Vistica, D.; Hose, C.; Langley, J.; Cronise, P.; Vaigro-Wolff, A.; Gray-Goodrich, M.; Campbell, H.; Mayo, J.; Boyd, M. *J. Natl. Cancer Inst.*, **1991**, *83*, 757–766.
66. Juaristi, E. *Introducción a la Estereoquímica y al Análisis Conformacional*, El Colegio Nacional, México, 2007.
67. García, A.; Ramírez-Apan, T.; Cogordán, J. A.; Delgado, G. *Can. J. Chem.* **2006**, *84*, 1593–1602.
68. Es interesante notar que en los espectros de RMN ^1H de los compuestos (+)-**68** y (–)-**68** los grupos metilo H–11' se encuentran protegidos [δ_{H} 0.66 (3H, t, $J = 7$ Hz)] presumiblemente debido al alineamiento de este grupo con el benceno. Para los protones de los grupos metilo H–11' de los enantiómeros (–)-**67** and (+)-**67** este efecto no fue observado [δ_{H} 0.86 (3H, t, $J = 7$ Hz)].
69. Harada, N.; Nakanishi, K. *Acc. Chem. Res.* **1972**, *5*, 257–263.
70. Harada, N.; Nakanishi, K. *Circular Dichroic Spectroscopy-Exciton Coupling in Organic Stereochemistry*, University Science. Book, Mill Valley, CA and Oxford University Press, Oxford, **1983**.

71. Berova, N; Di Bari, L.; Pescitelli, G. *Chem. Soc. Rev.*, **2007**, *36*, 914–931.
72. Hay, J.; Wadt, W. R. *J. Chem. Phys.* **1985**, *82*, 270–283. Hay, J.; Wadt, W. R. *J. Chem. Phys.* **1985**, *82*, 284–298.
73. Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Montgomery, J. A.; Vreven, T.; Kudin, K. N.; Burant, J. C.; Millam, J. M.; Lyengar, S. S.; Tomasi, J.; Barone, V.; Mennucci, B.; Cossi, M.; Scalmani, G.; Rega, N.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Klene, M.; Li, X.; Knox, J. E.; Hratchian, H. P.; Cross, J. B.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Stratmann, R. E.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J.; Ayala, P. Y.; Morokuma, K.; Voht, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Zakrzewski, V. G.; Dapprich S.; Daniels, A. D.; Strain, M. C.; Farkas, O.; Malick, D. K.; Rabuck, A. D.; Raghavachari, K.; Raghavachari, K.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cui, Q.; Baboul, A. G.; Clifford, S.; Cioslowski, J.; Stefanov, B. B.; Liu, G.; Liashenko, A.; Piskorz, P.; Komaromi, I.; Martin, R. L.; Fox, D. J.; Keith, T.; Al-Laham, M. A.; Peng, C. Y.; Nanayakkara, A.; Challacombe, M.; Gill, P. M. W.; Johnson, B. G.; Chen, W.; Wong, M. W.; Gonzalez, C.; Pople, J. A. Gaussian 03. Revision B. 05. Gaussian, Inc., Pittsburgh, PA. 2003.
74. Diedrich, C.; Grimme, S. *J. Phys. Chem. A* **2003**, *107*, 2524–2539.
75. Coll, J. C.; Bowden, B. F. *J. Nat. Prod.* **1986**, *49*, 934–936.
76. Still, C. W.; Kahn, M.; Mitra, A. *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 2923–2925.
77. Pelta, M. D.; Barjat, H.; Morris, G. A.; Davis, A. L.; Hammond, S. J. *Magn. Reson. Chem.* **1998**, *36*, 706–714.
78. Tortoriello, J.; Aguilar-Santamaría, L. *J. Ethnopharmacol.* **1996**, *53*, 157–163.
79. Lozoya, X.; Becerril, G.; Martínez, M. *Archivos de Investigación Médica* **1990**, *21*, 155–162.

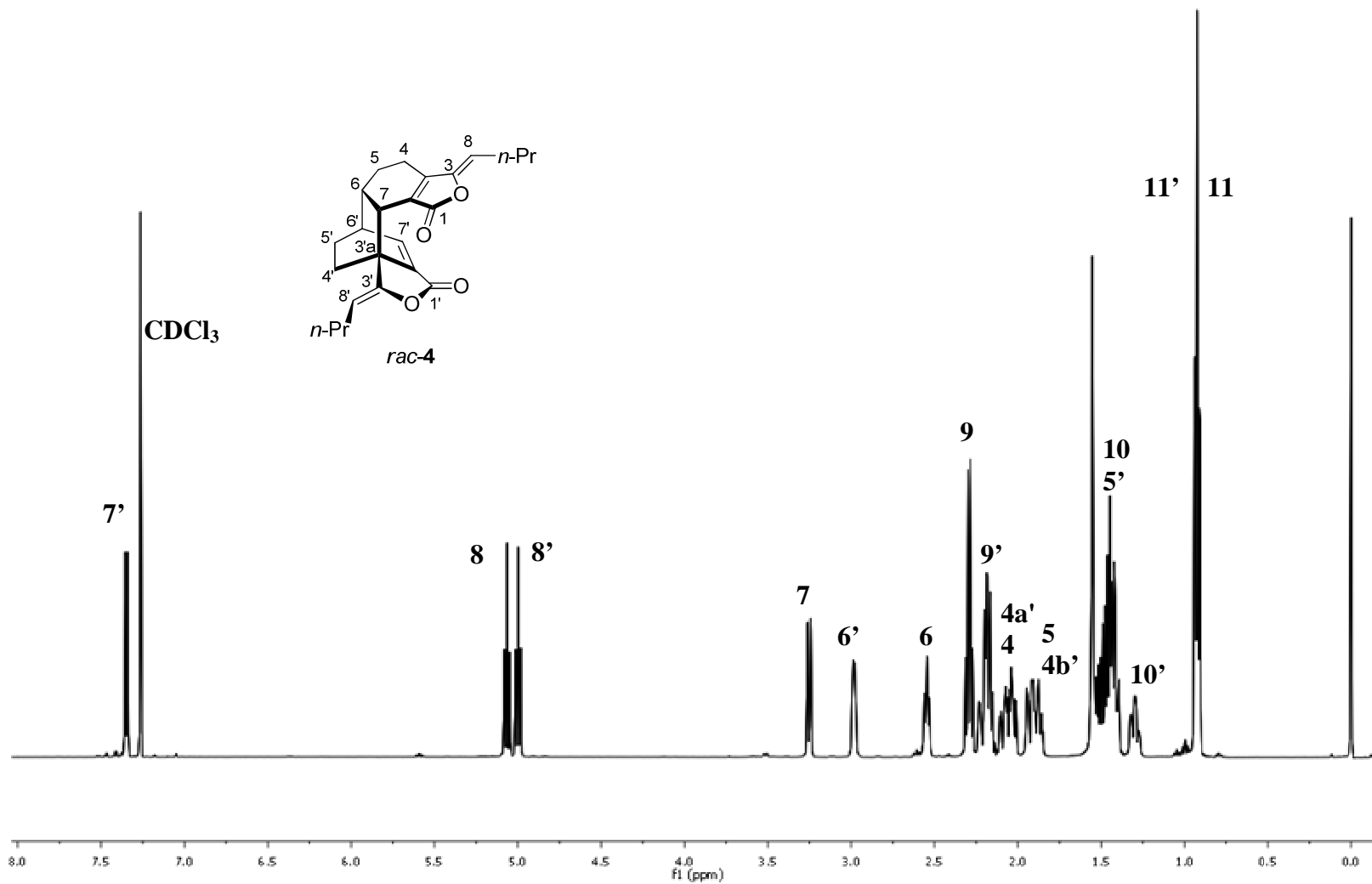
Espectros



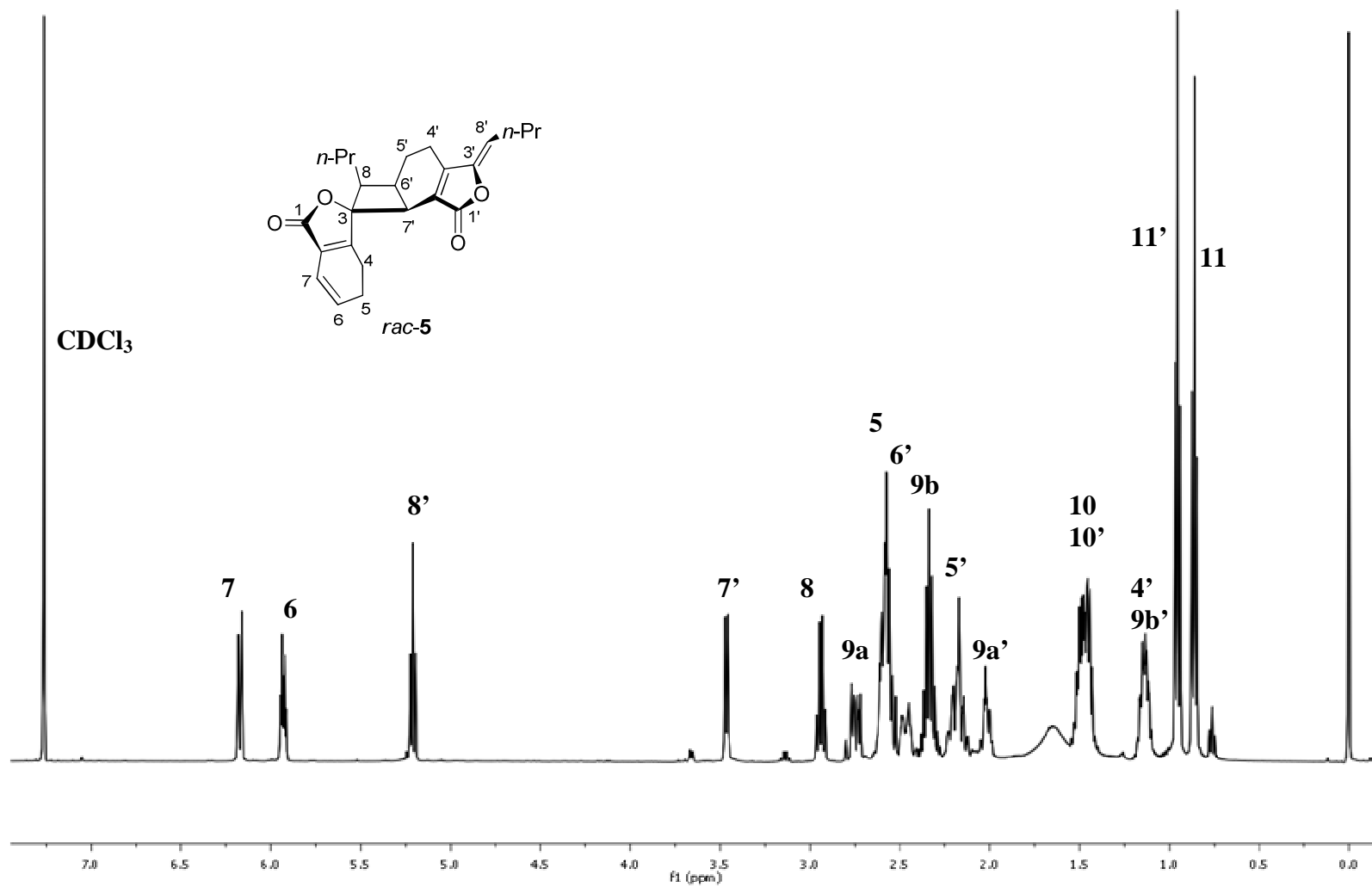
Espectro 1. RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de Z-ligustílida (1)



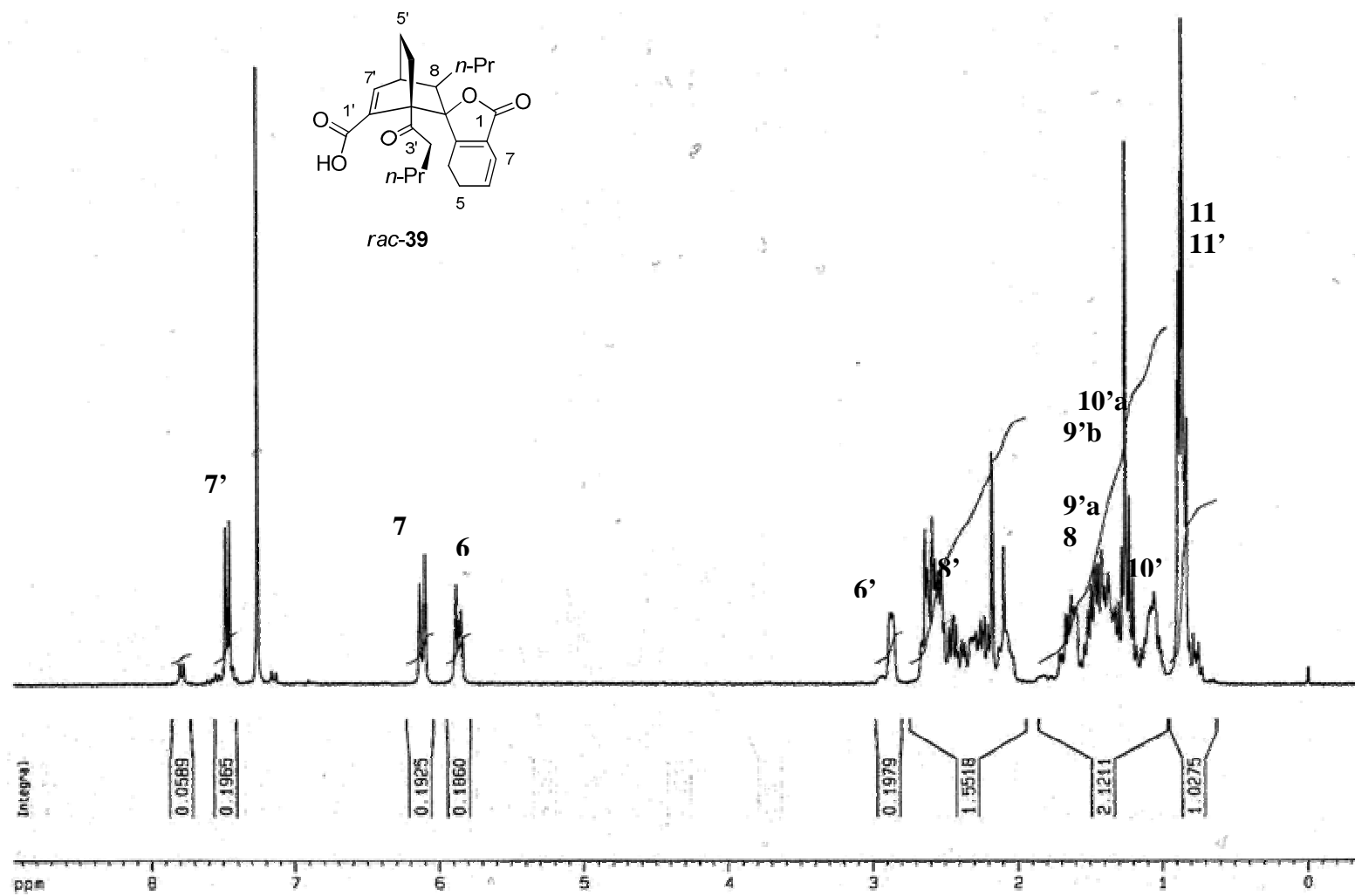
Espectro 2. RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de *rac*-toquinólida B (*rac*-3)



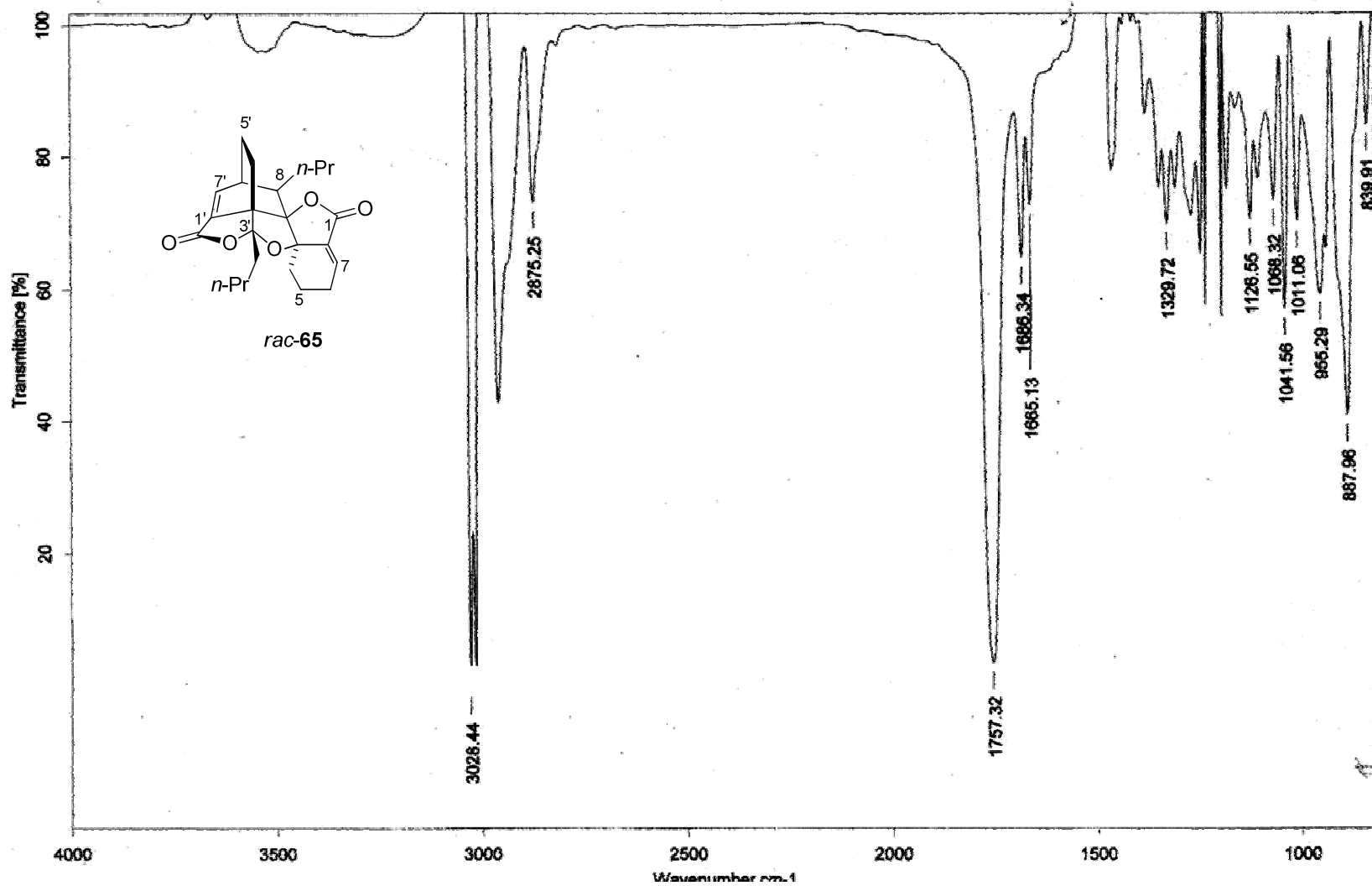
Espectro 3. RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz) de *rac*-diligustílida (*rac*-4)



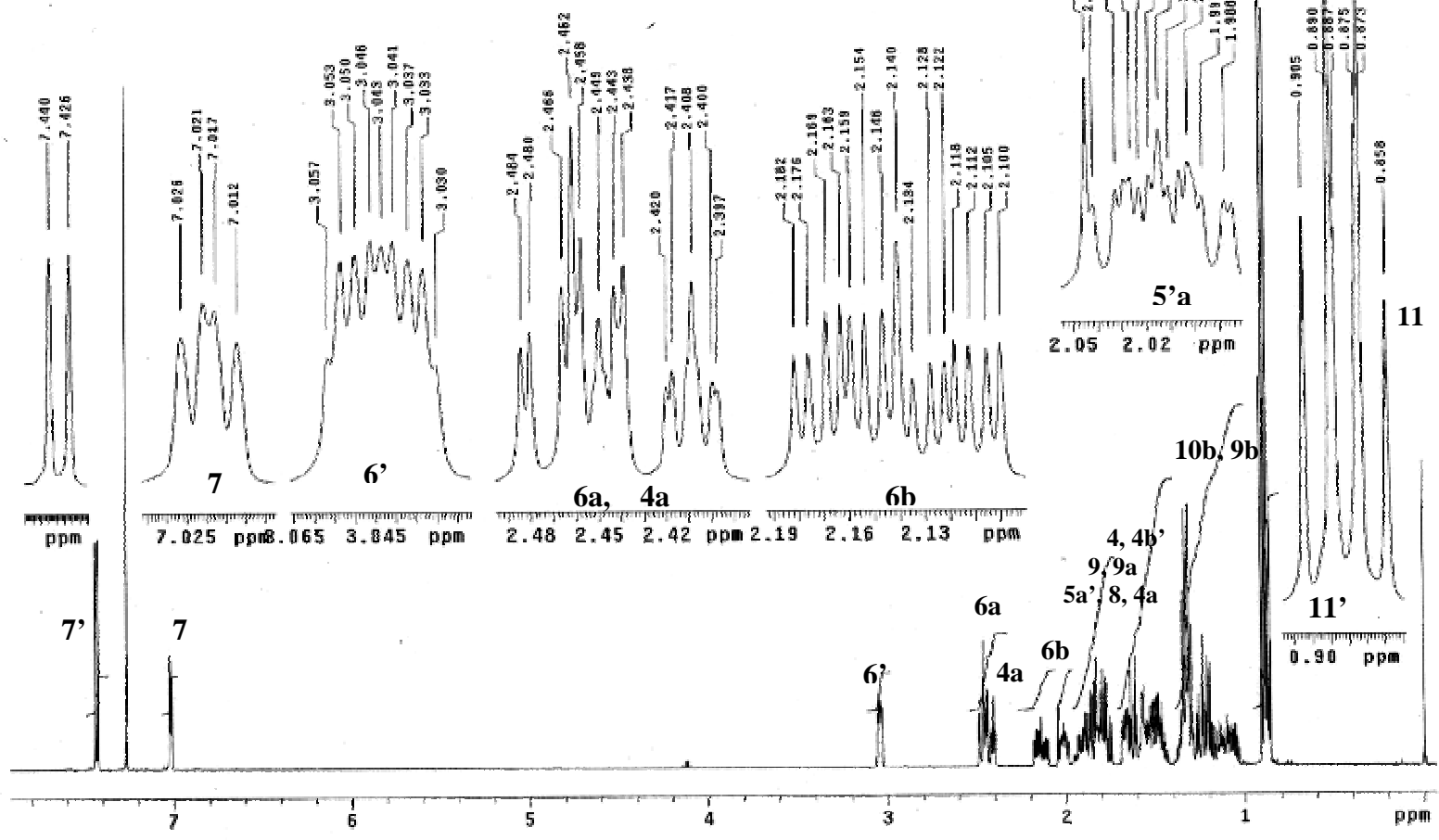
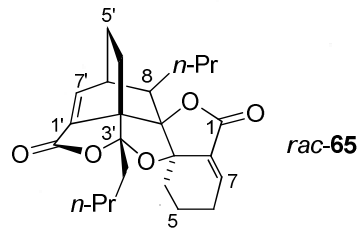
Espectro 4. RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de *rac*-riligustílida (*rac*-5)



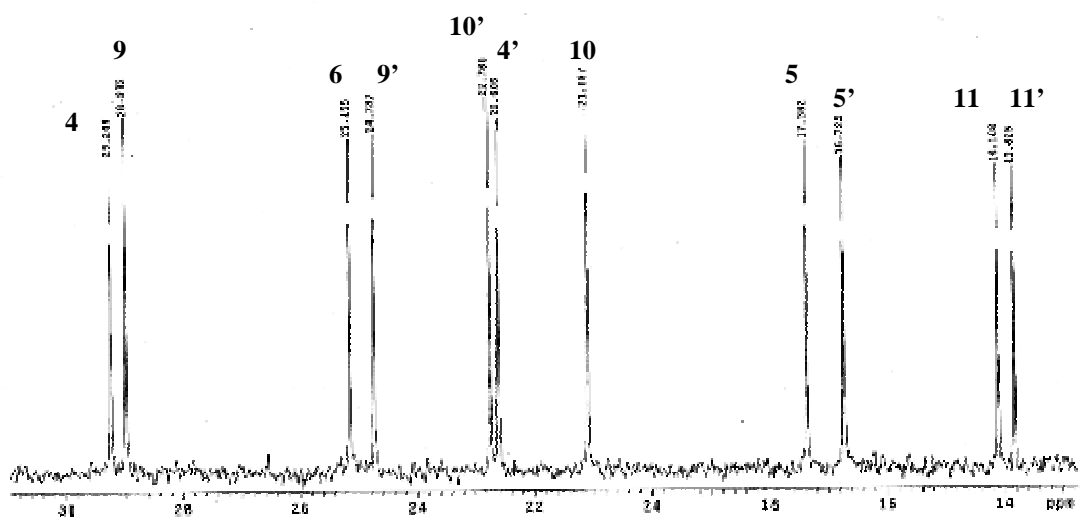
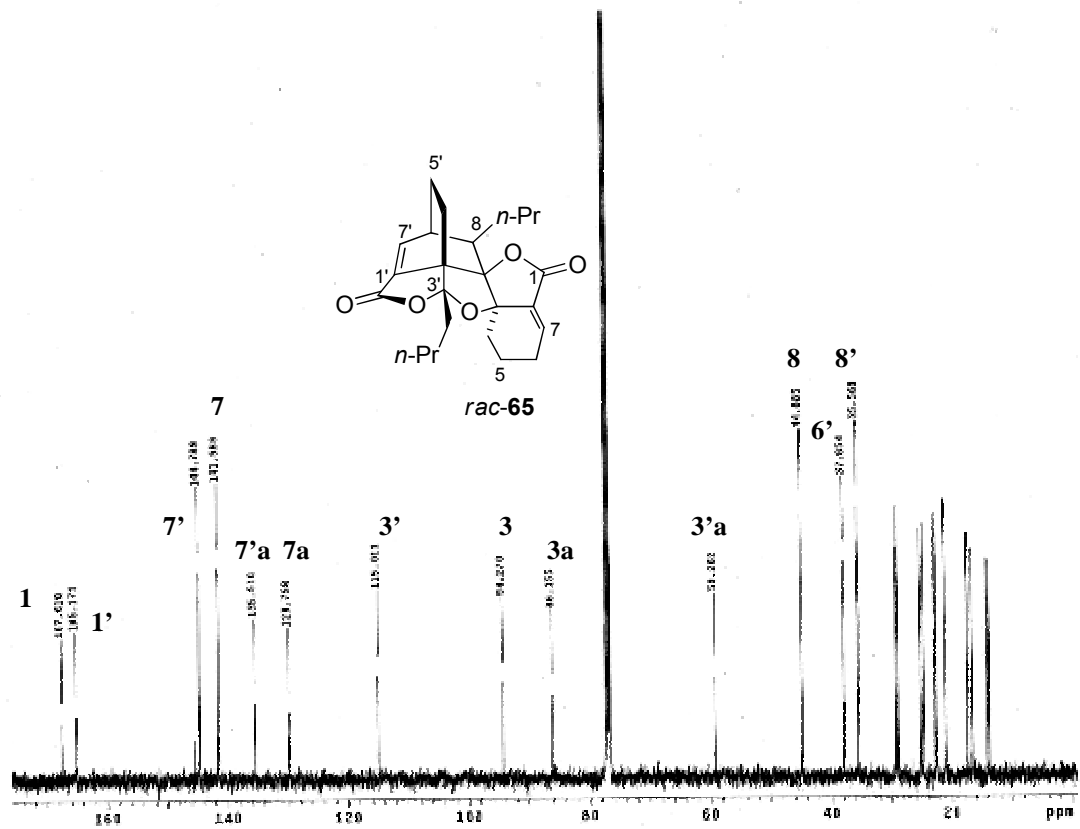
Espectro 5. RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) del *rac*-cetoácido de toquinólida B (*rac*-39)



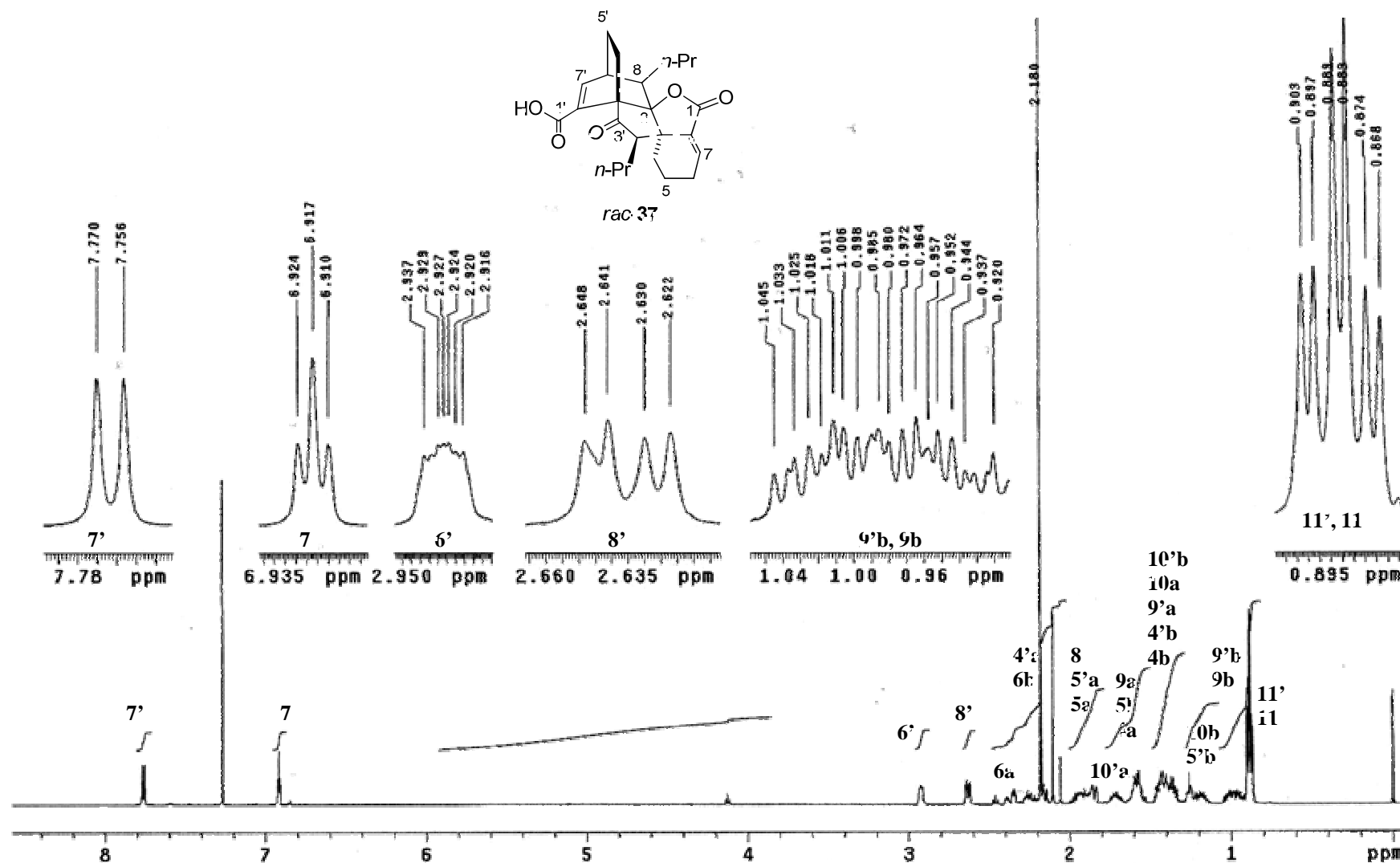
Espectro 6. IR (CHCl_3) de *rac-65*



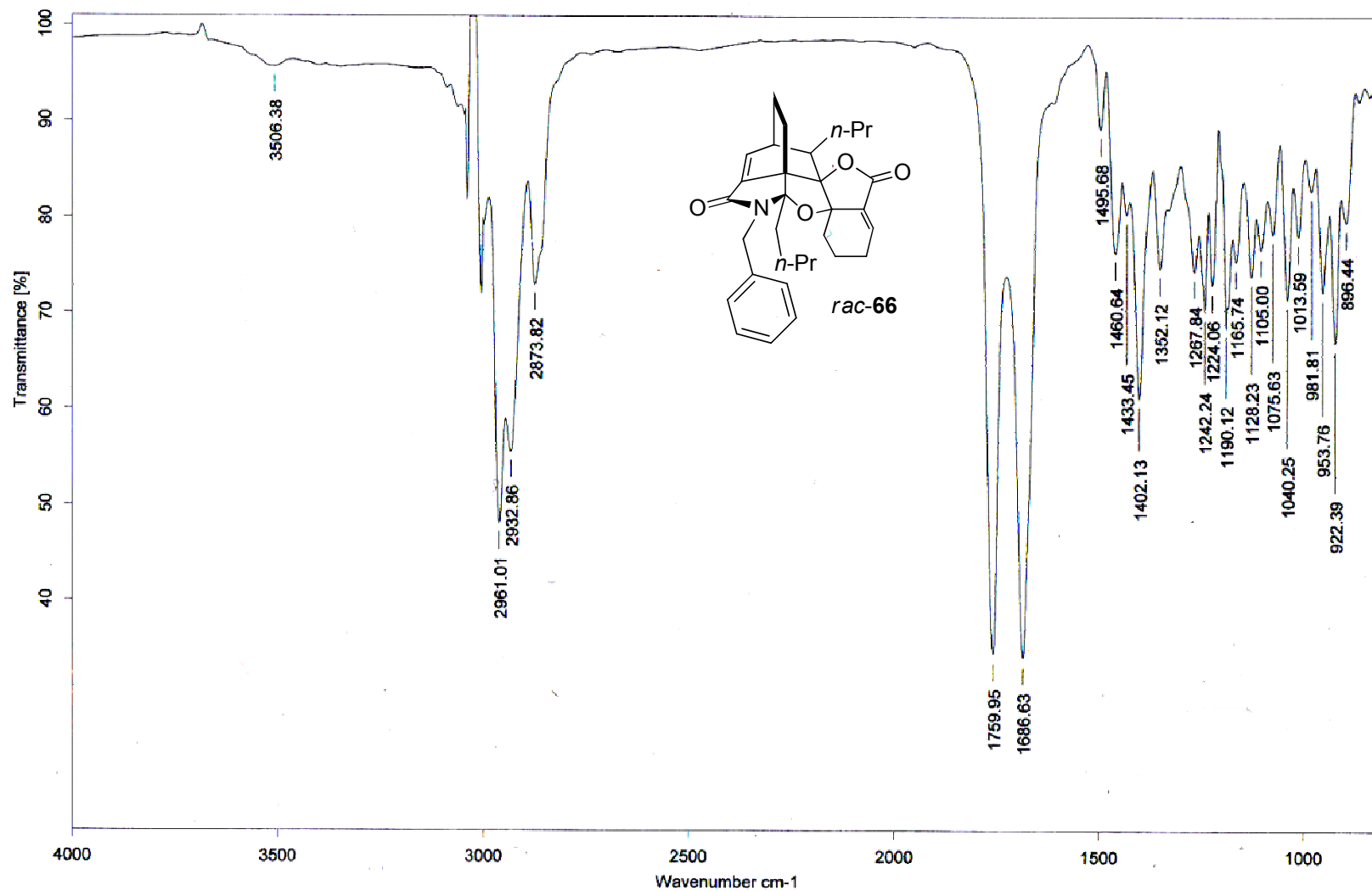
Espectro 7. RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz) de *rac-65*



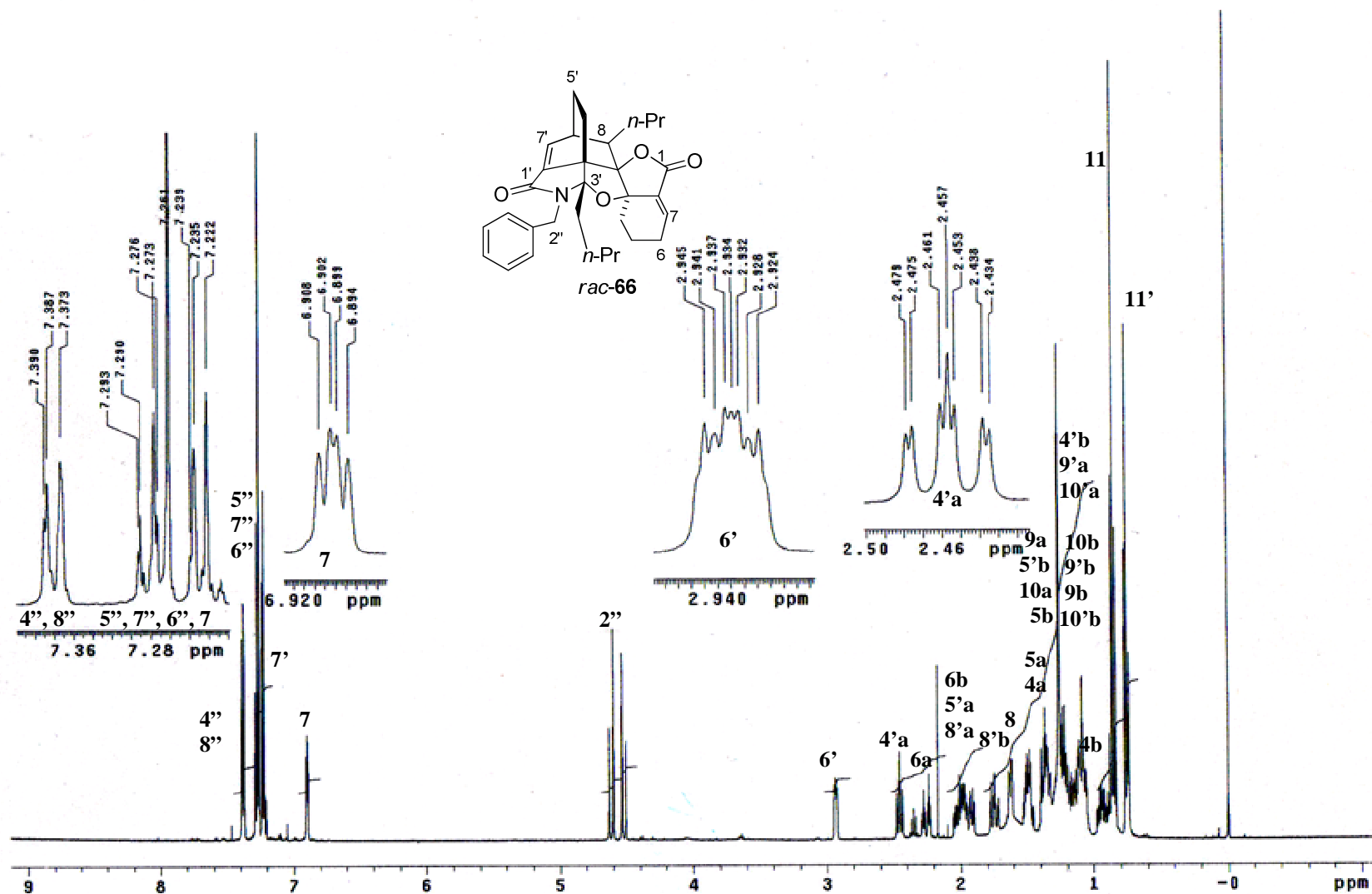
Spectro 8. RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) de *rac-65*



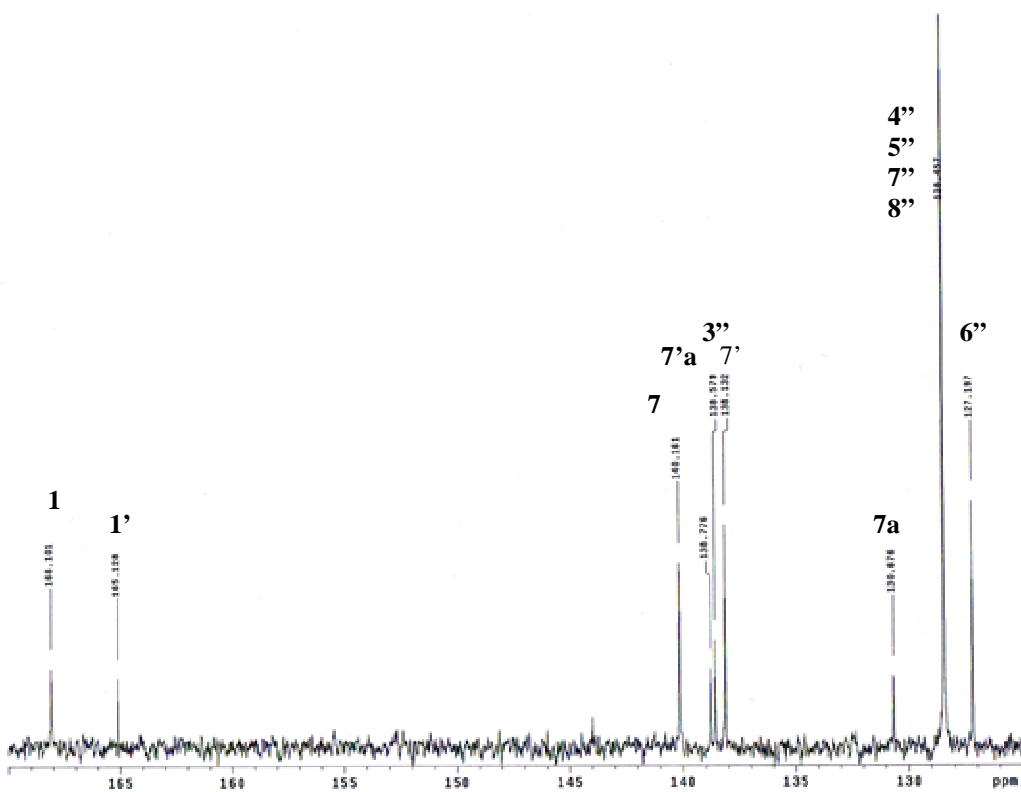
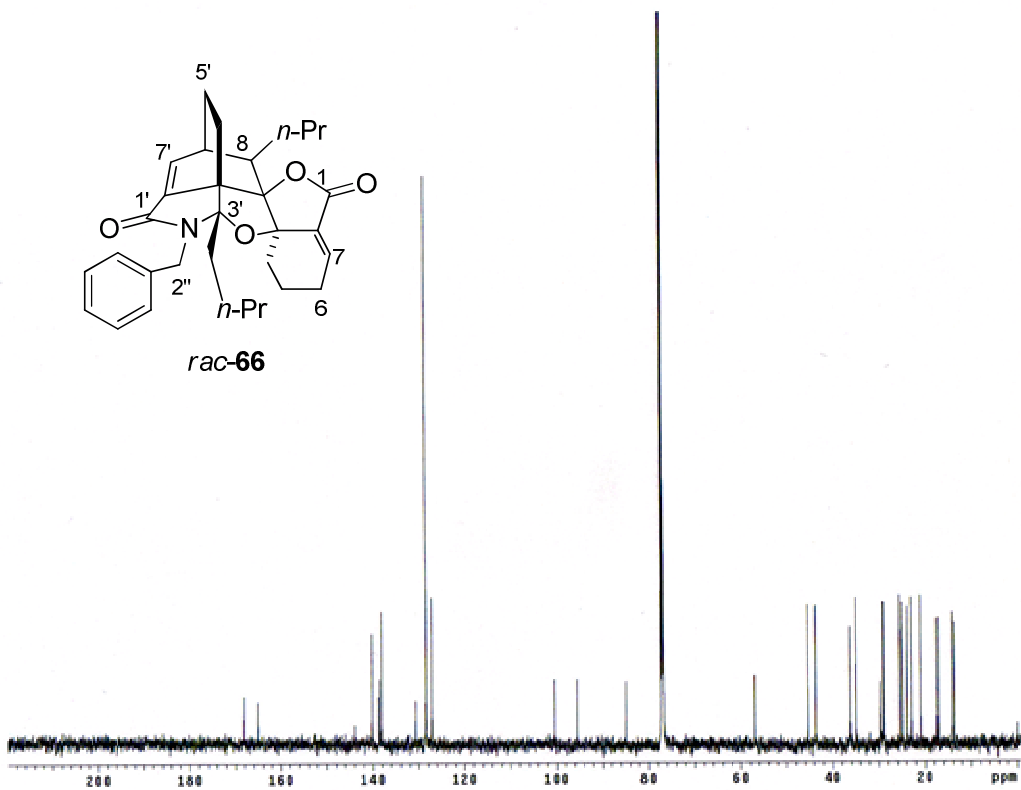
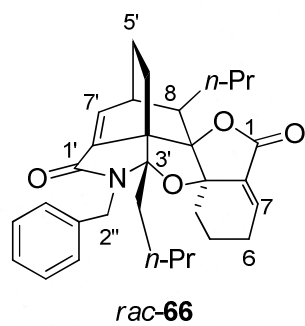
Espectro 9. RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de *rac*-ciclotoquinólida B (*rac*-37)



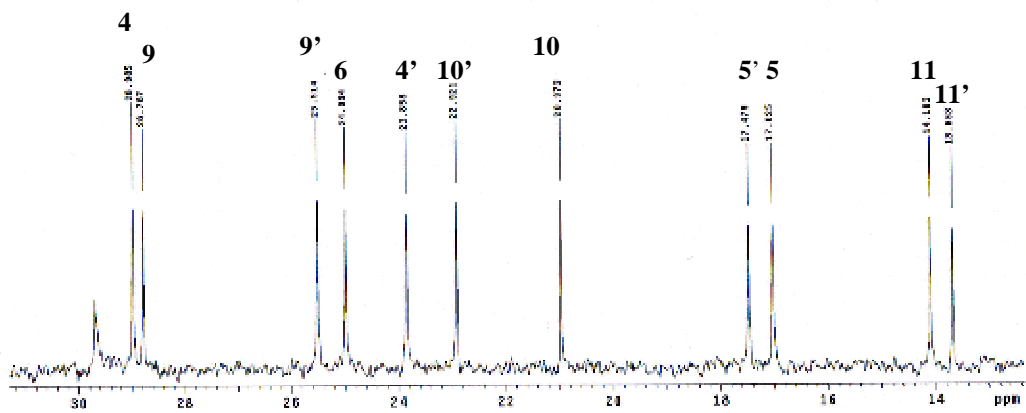
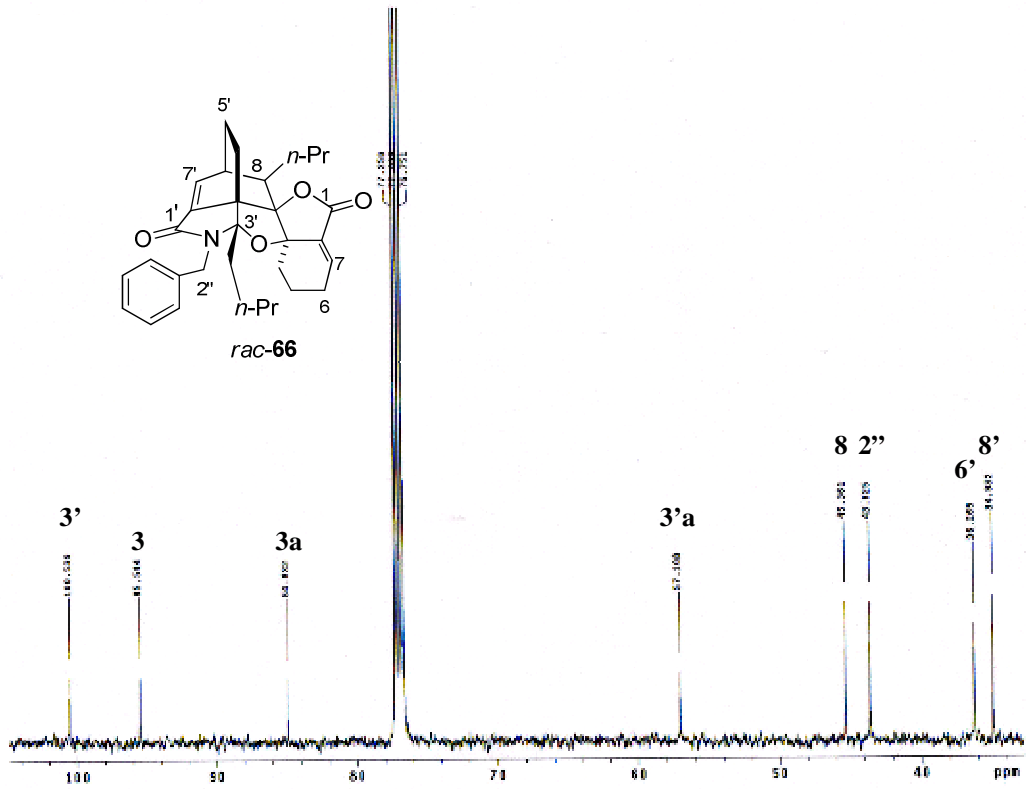
Espectro 10. IR (CHCl₃) de *rac-66*



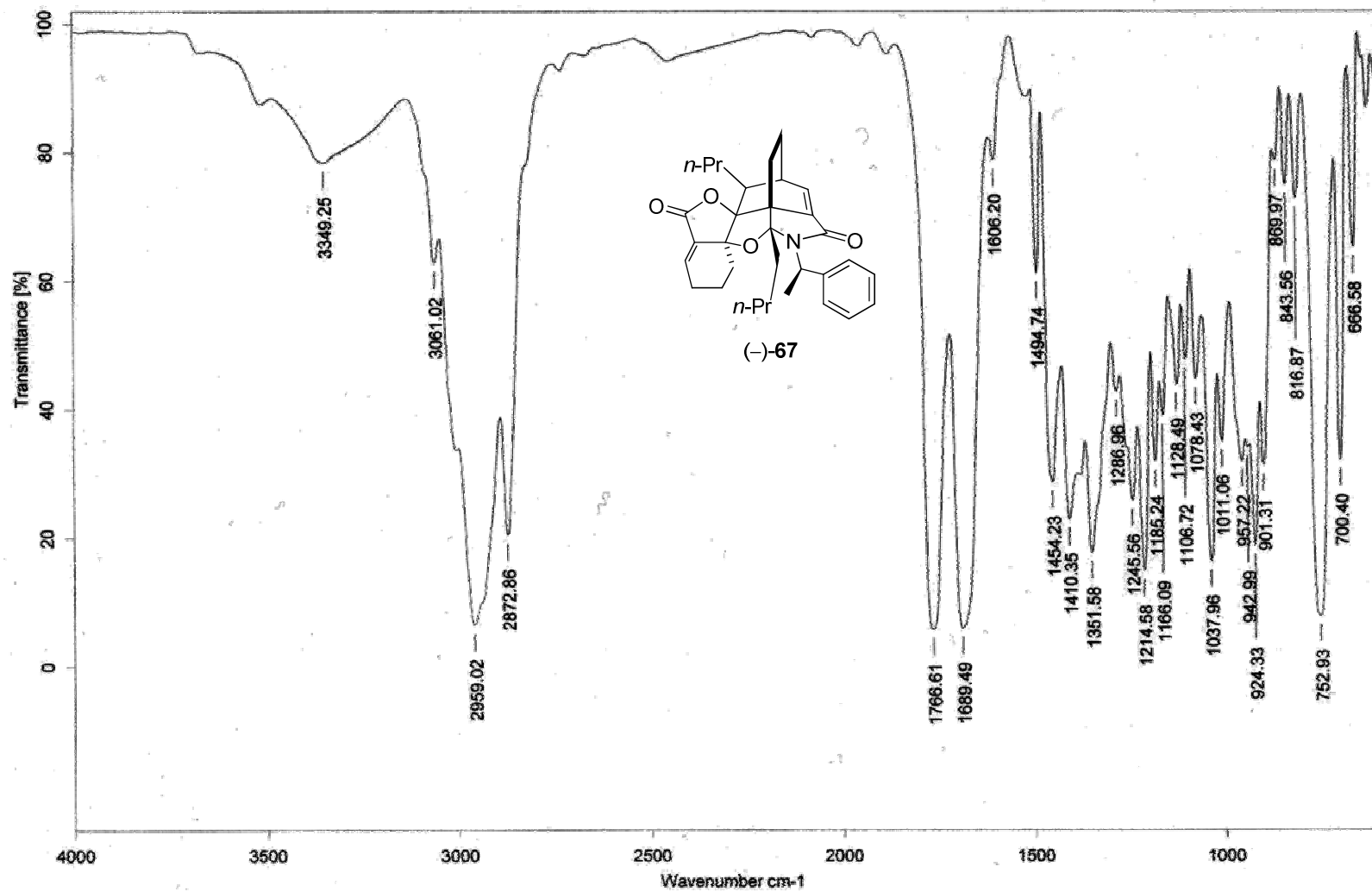
Espectro 11. RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de *rac-66*



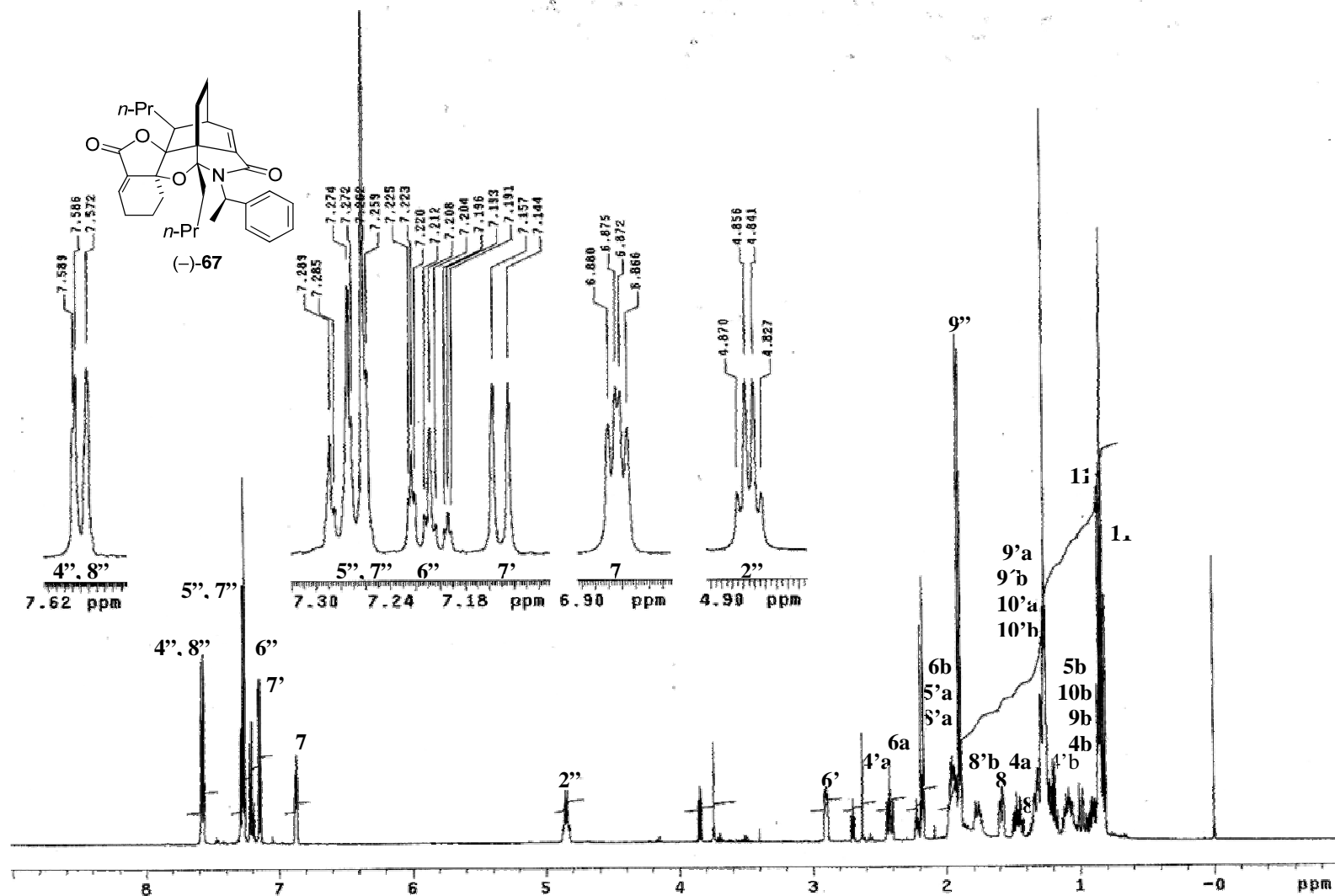
Espectro 12. RMN ^1H (CDCl_3 , 125 MHz) de *rac-66*



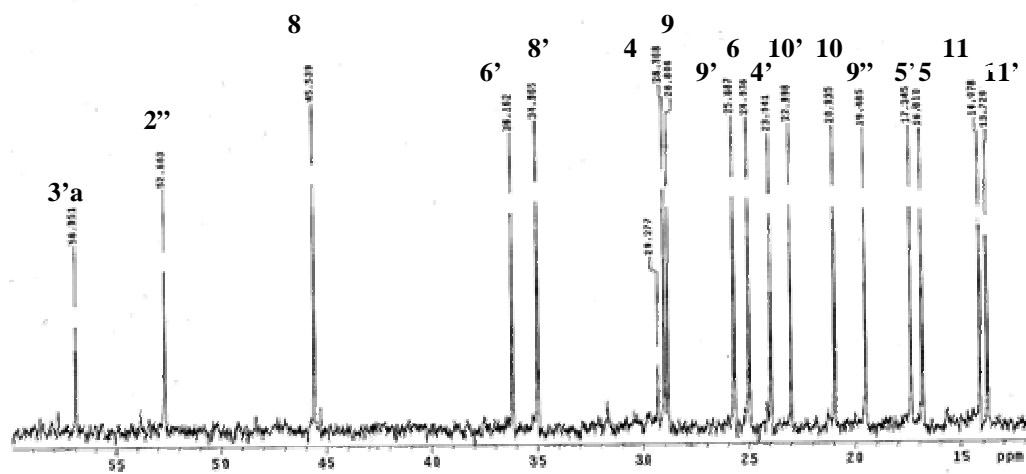
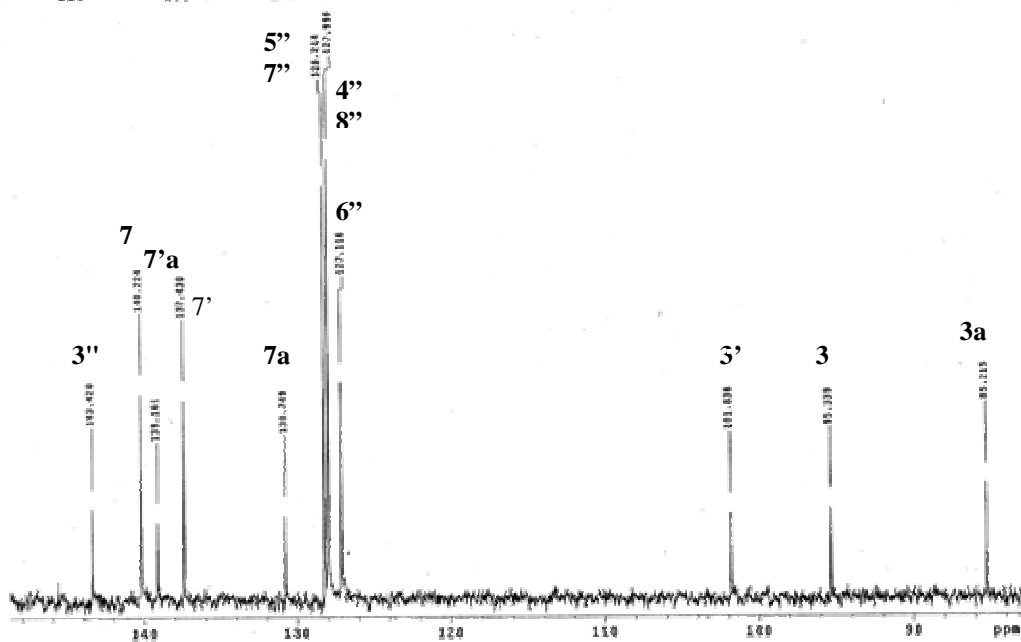
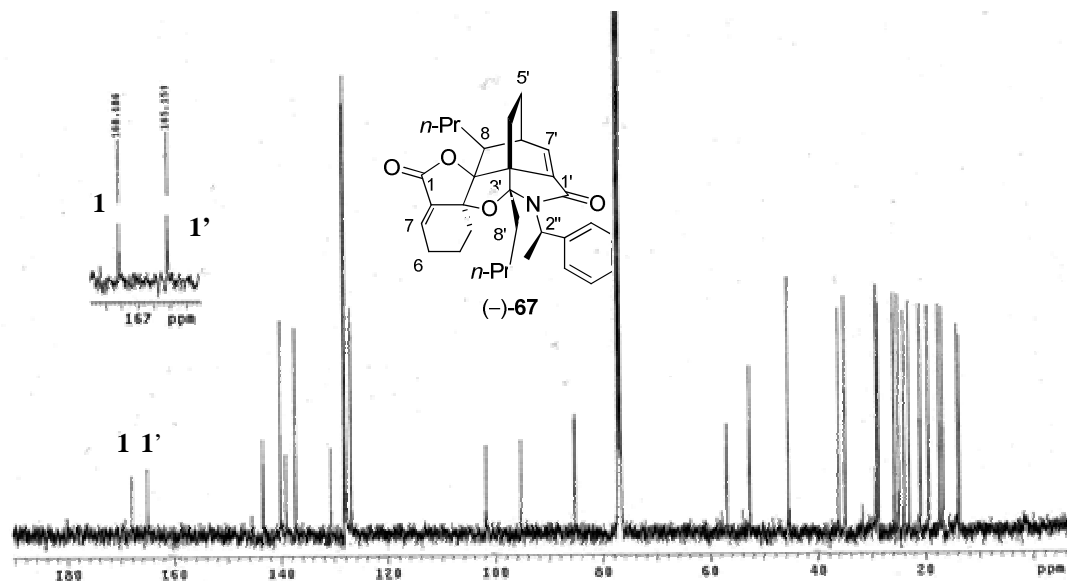
Cont. Espectro 12. RMN ^1H (CDCl_3 , 125 MHz) de *rac-66*



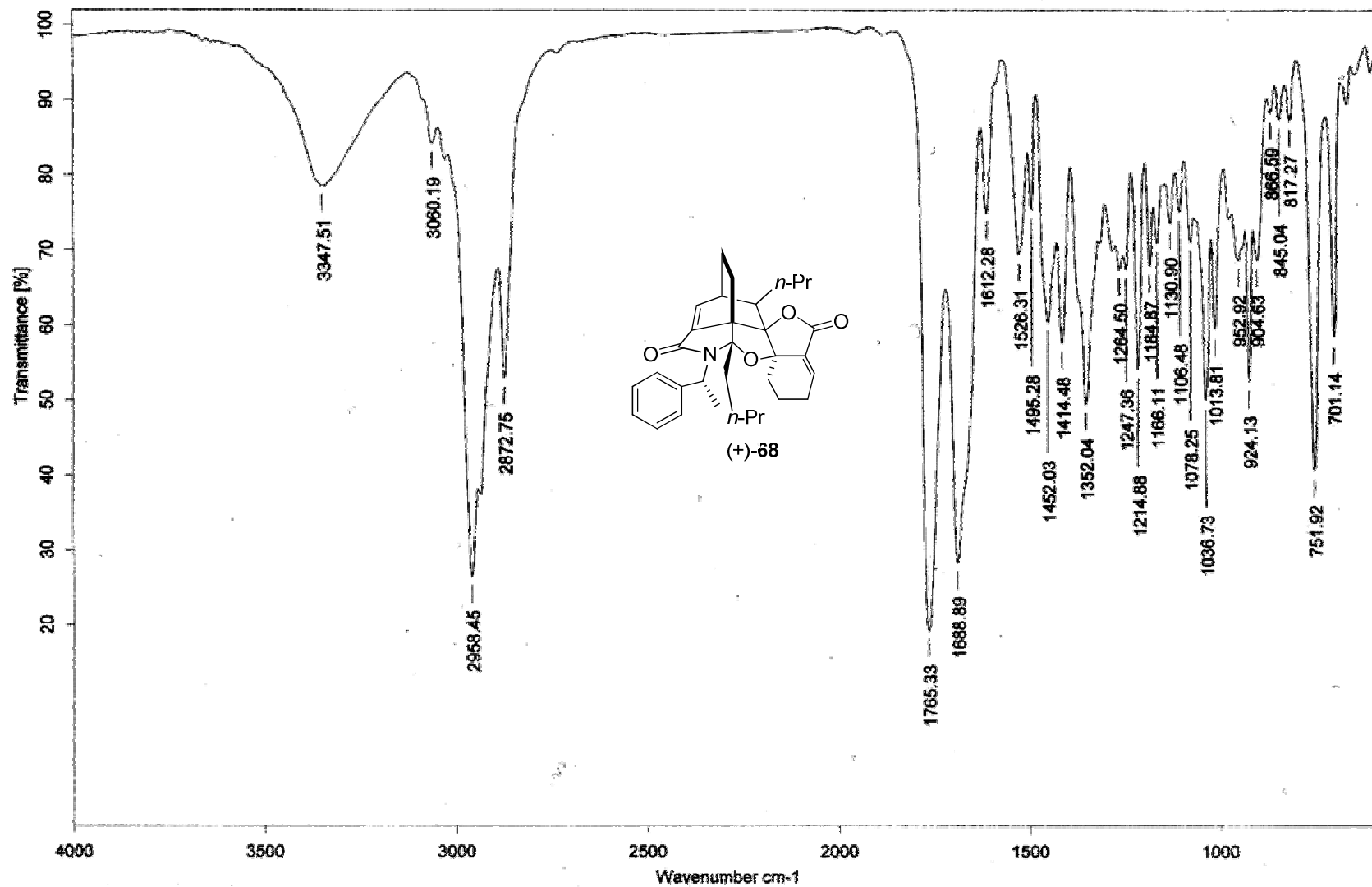
Espectro 13. IR (CHCl₃) de (-)-67



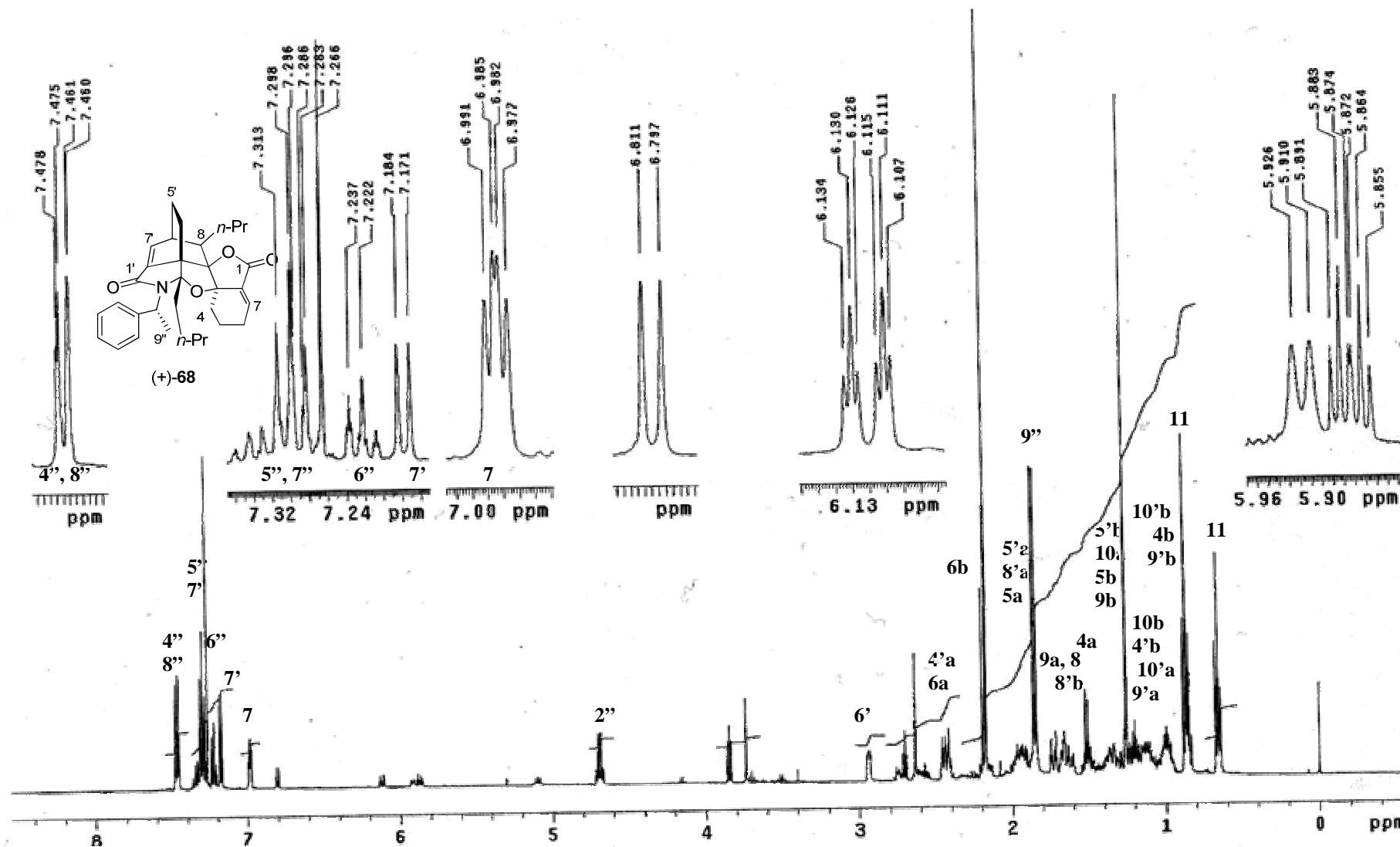
Espectro 14. RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz) de (-)-67



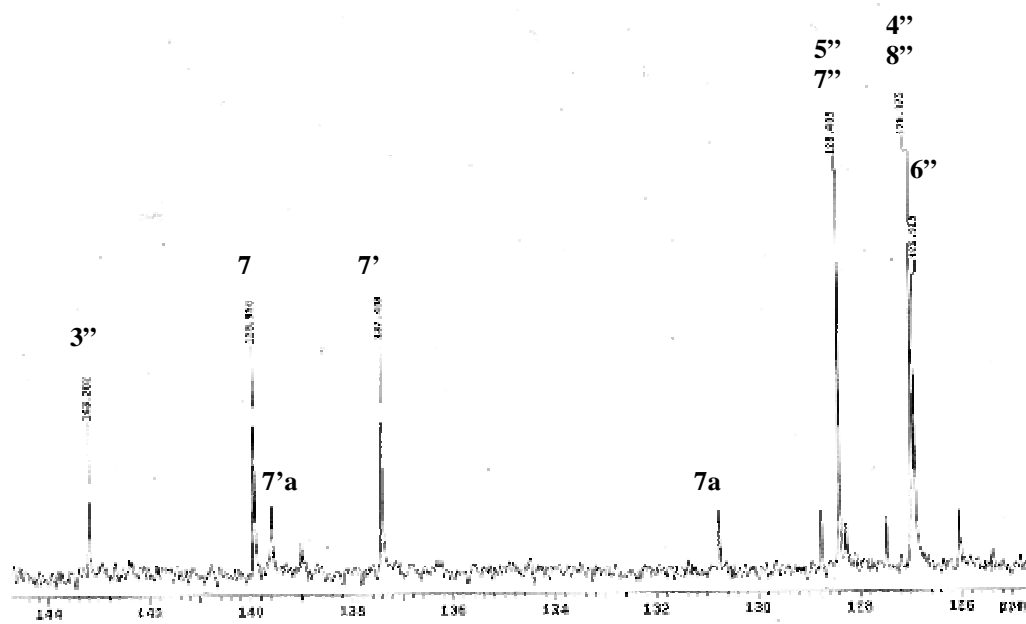
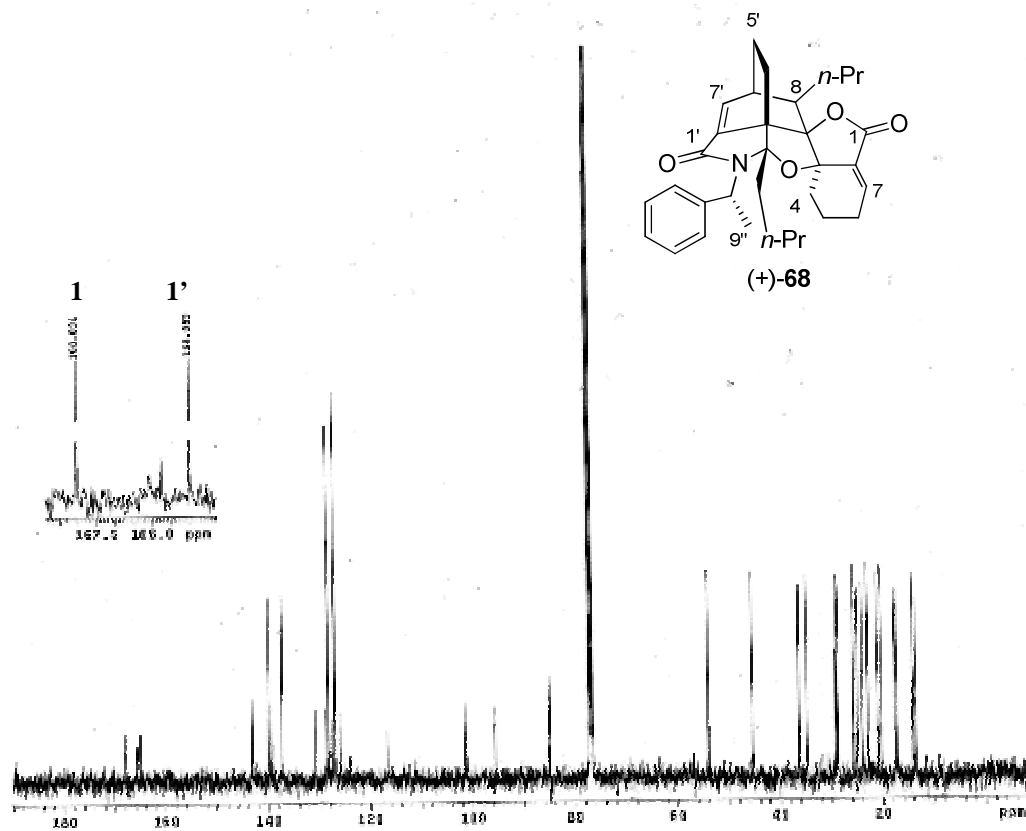
Espectro 15. RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) de (-)-67



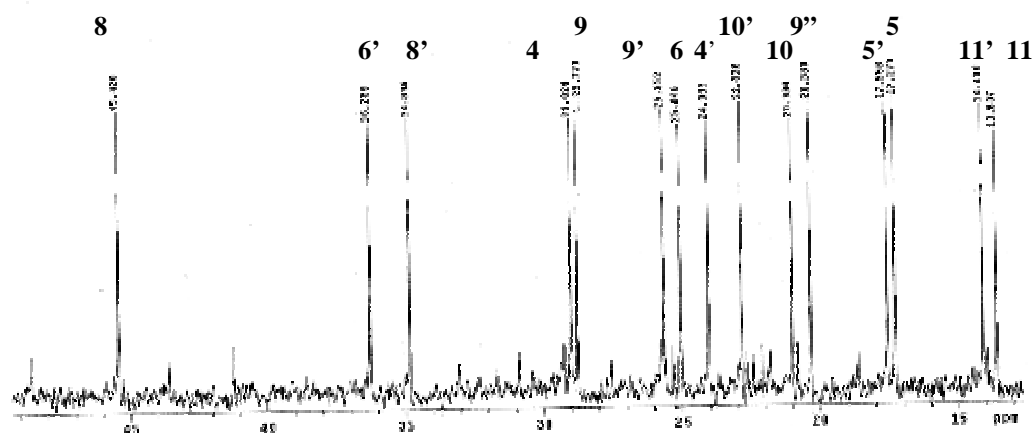
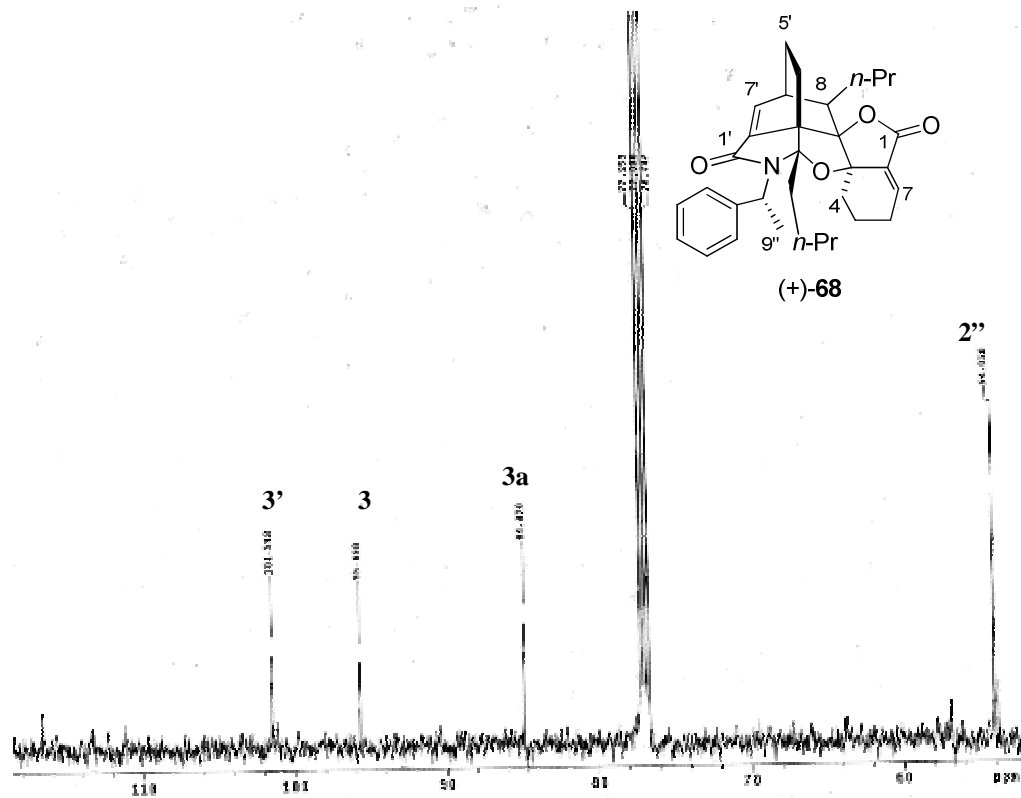
Spectro 16. IR (CHCl₃) de (+)-68



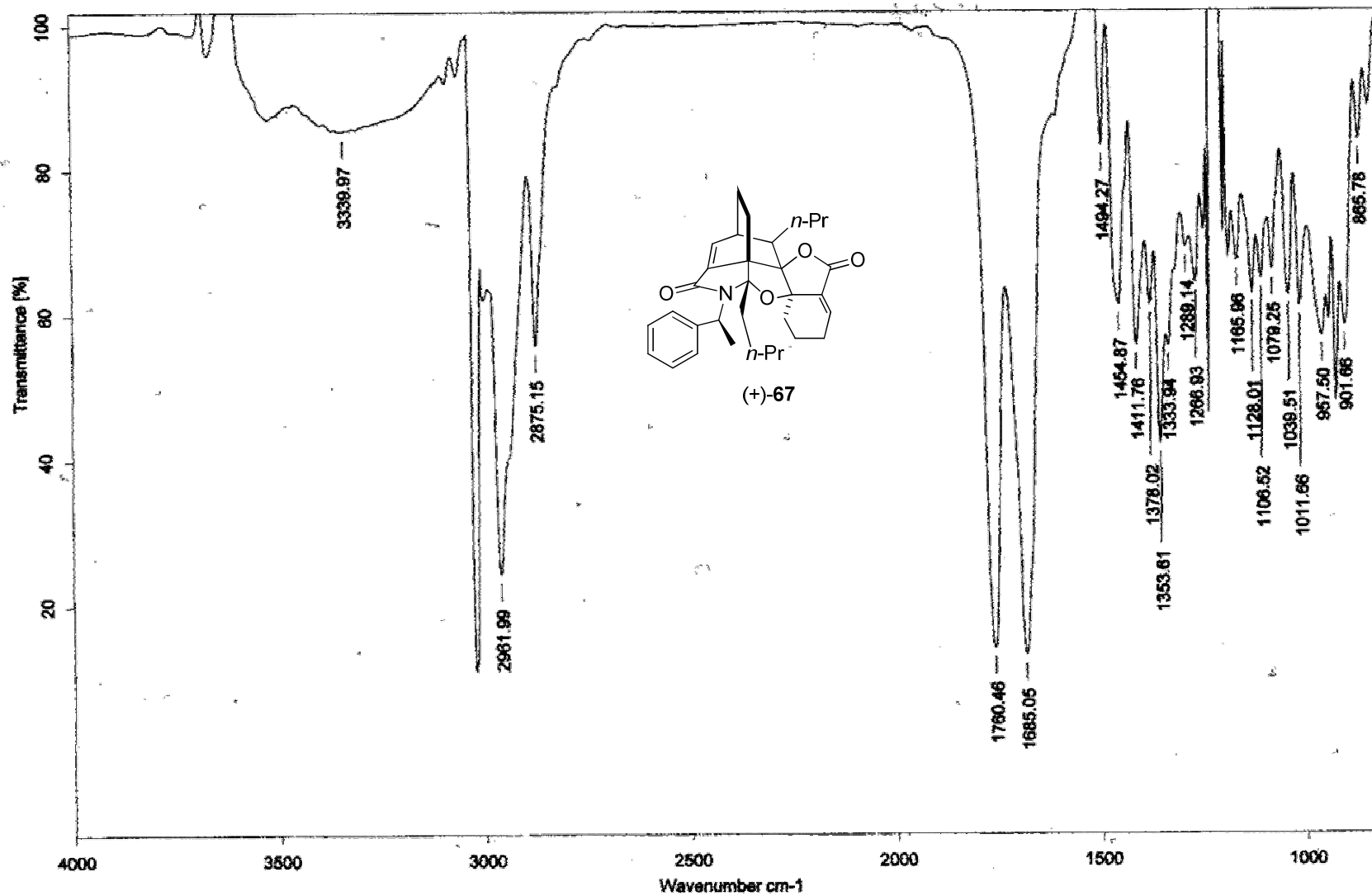
Espectro 17. RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de (+)-68



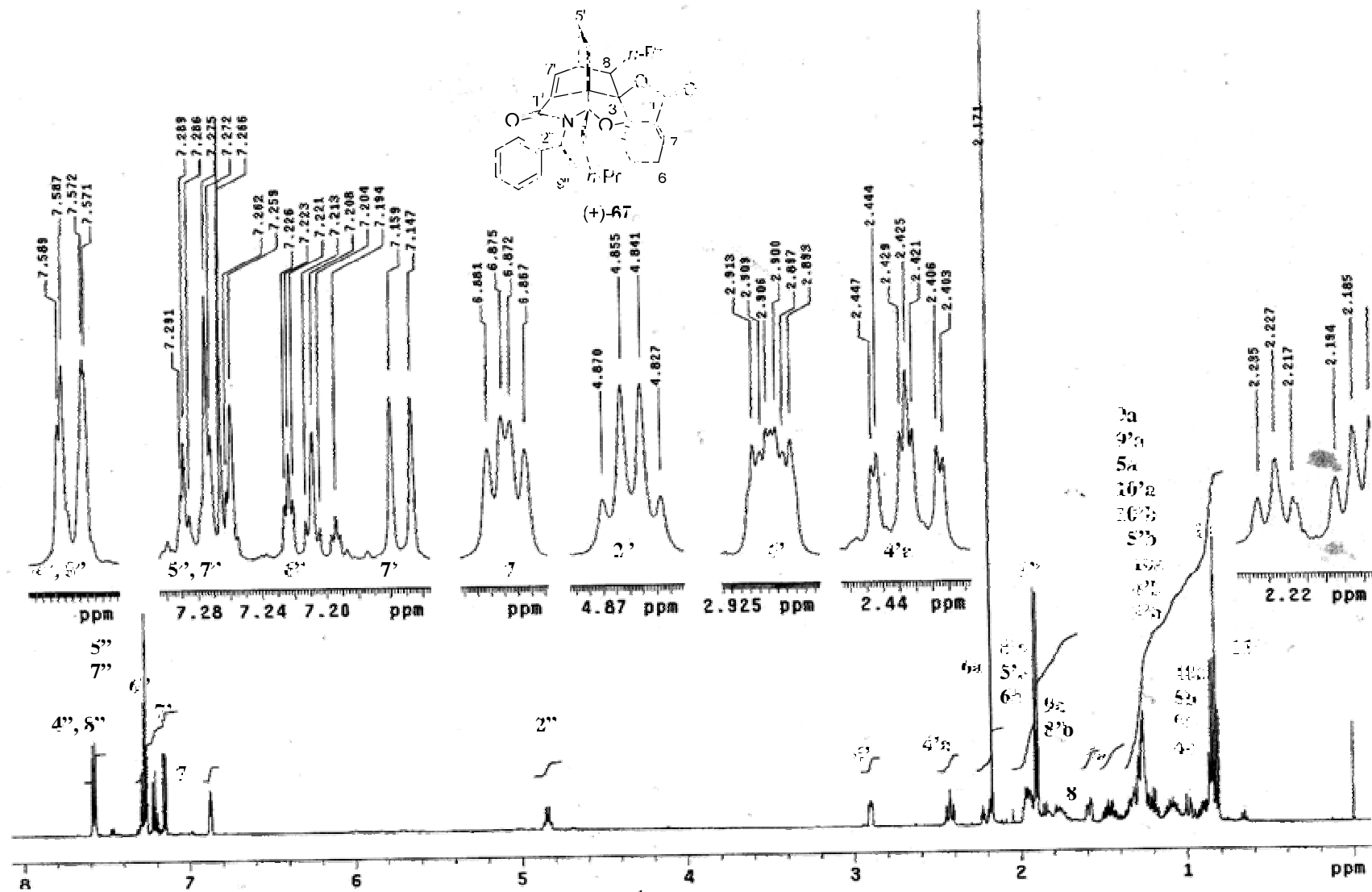
Espectro 18. RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) de (+)-68



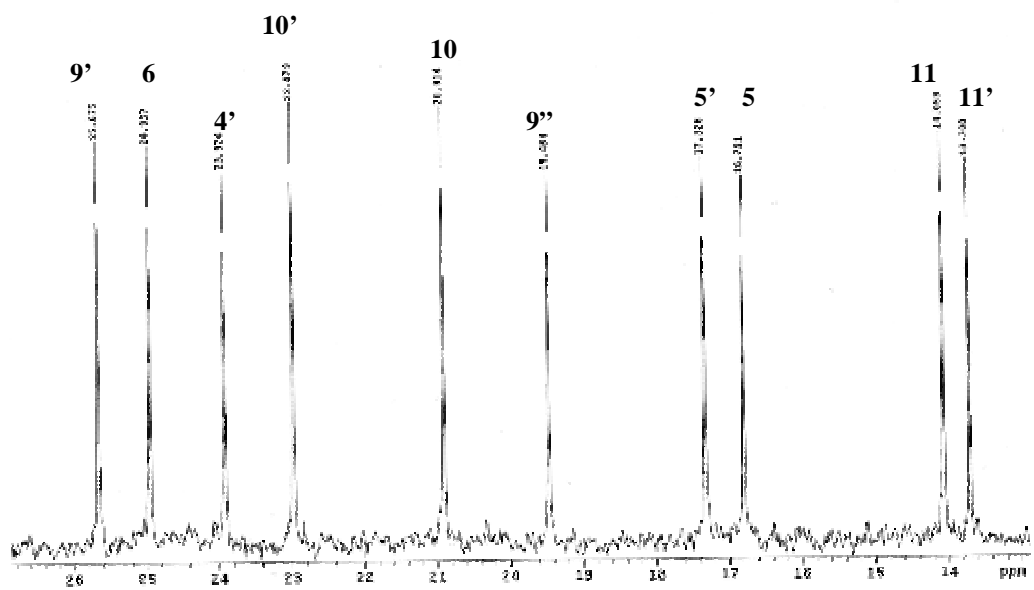
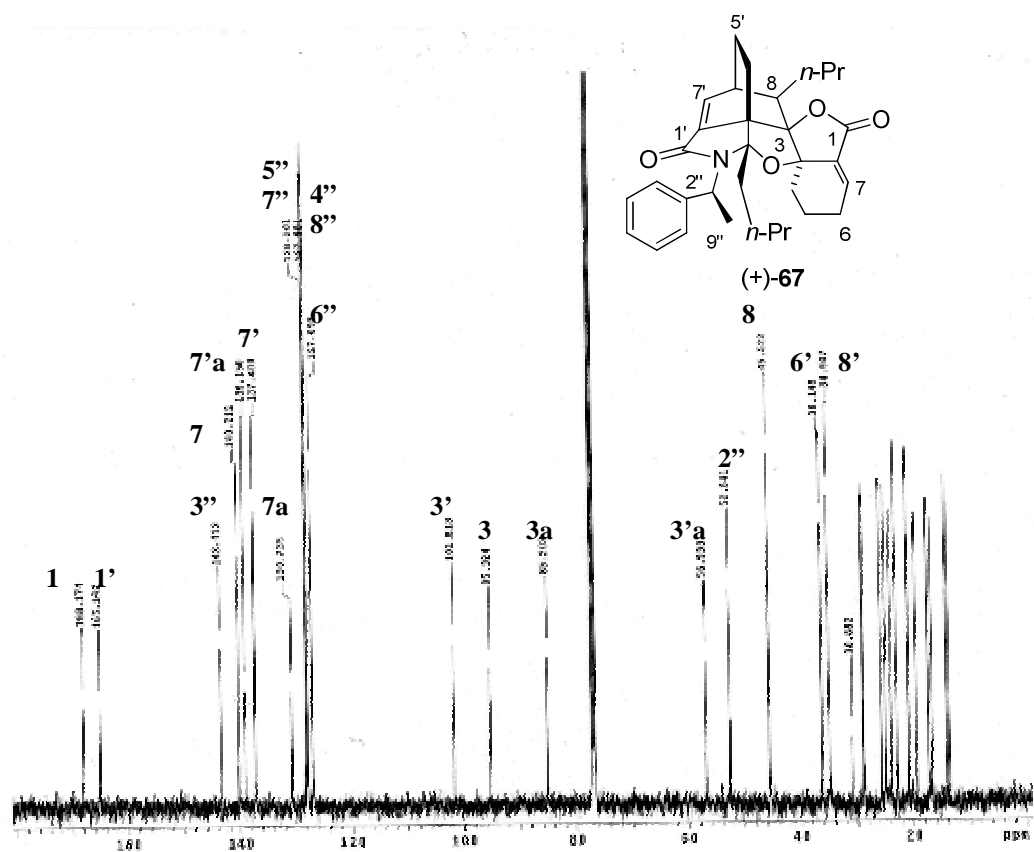
Cont. Espectro 18. RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) de (+)-68



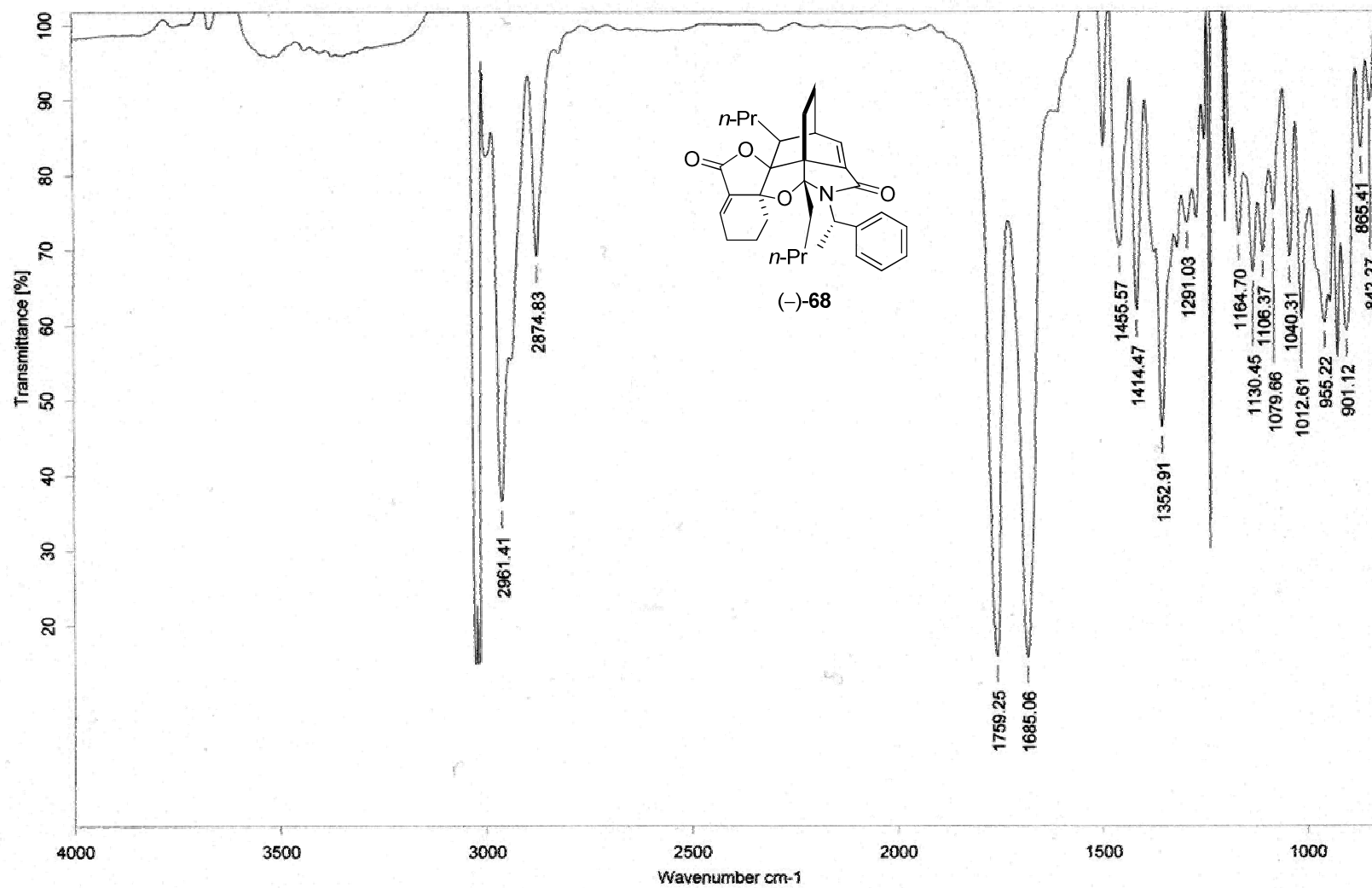
Espectro 19. IR (CHCl₃) de (+)-67



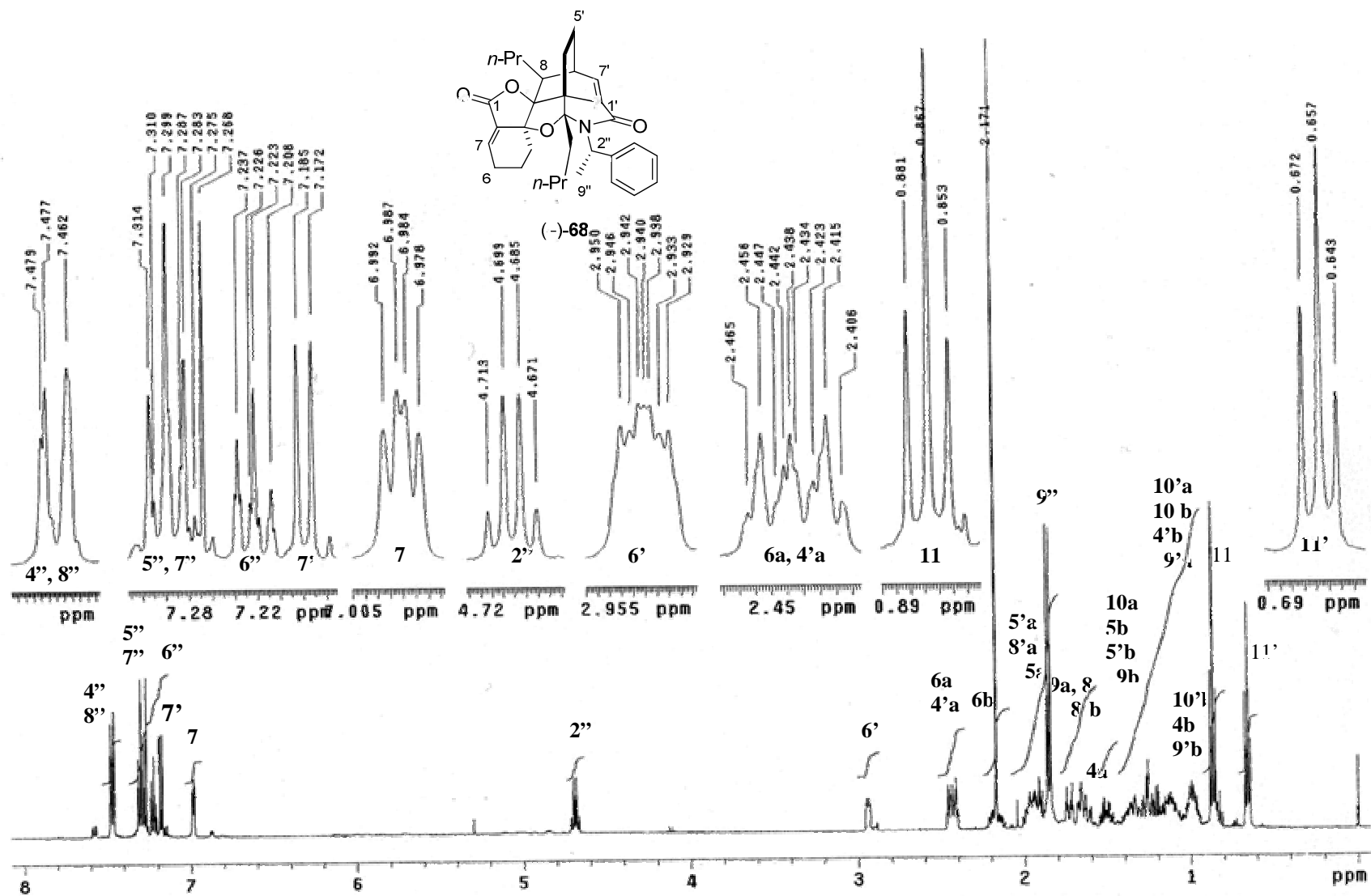
Espectro 20. RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz) de (+)-67



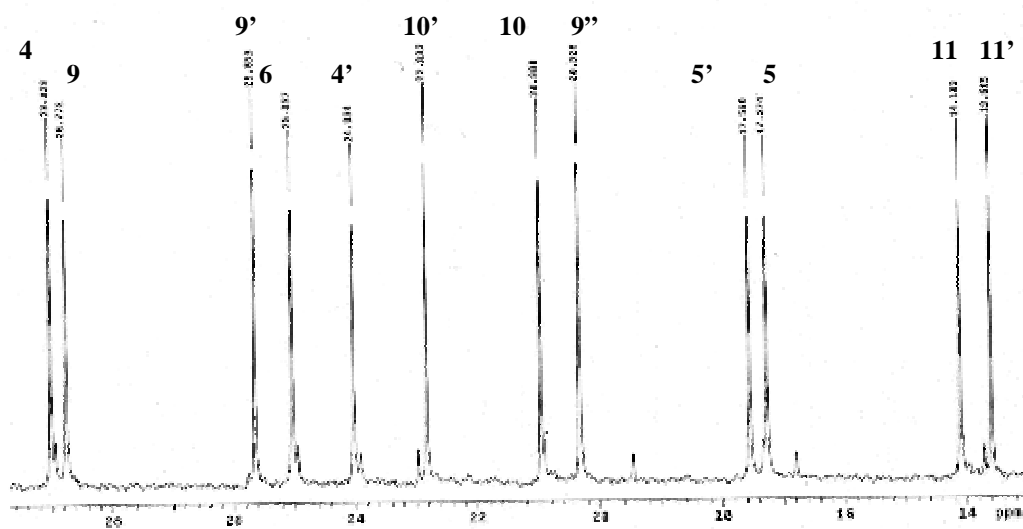
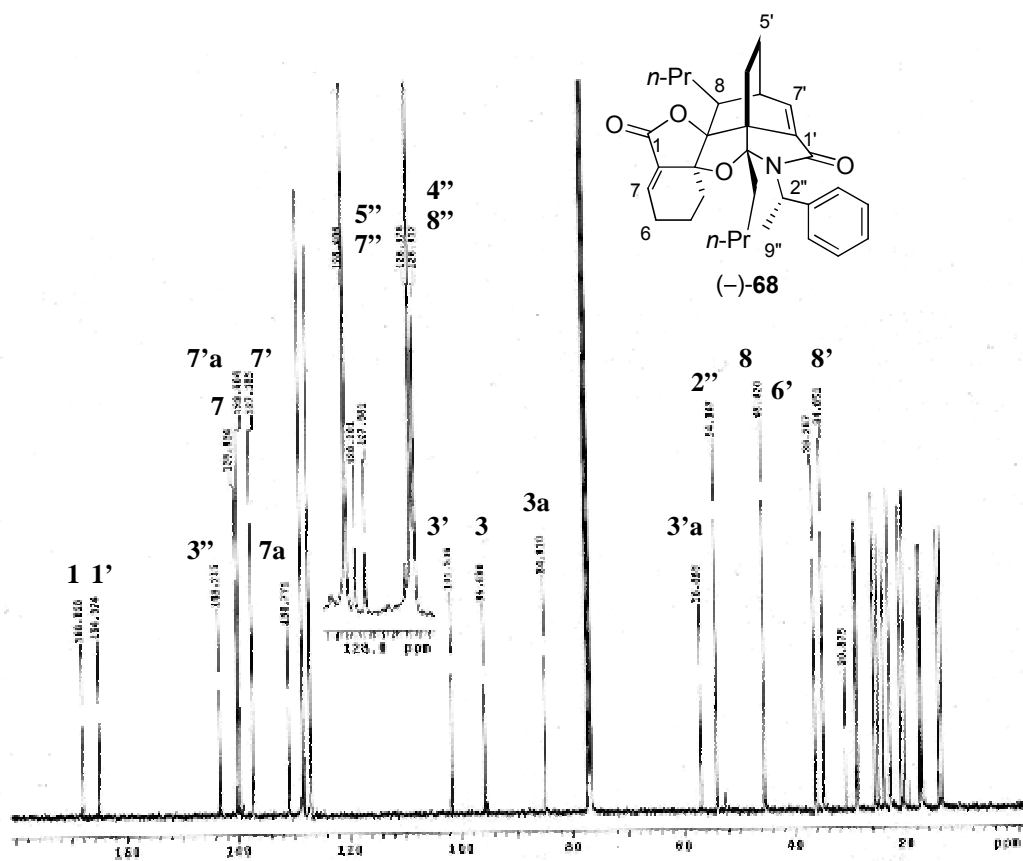
Espectro 21. RMN ¹³C (CDCl₃, 125 MHz) de (+)-67



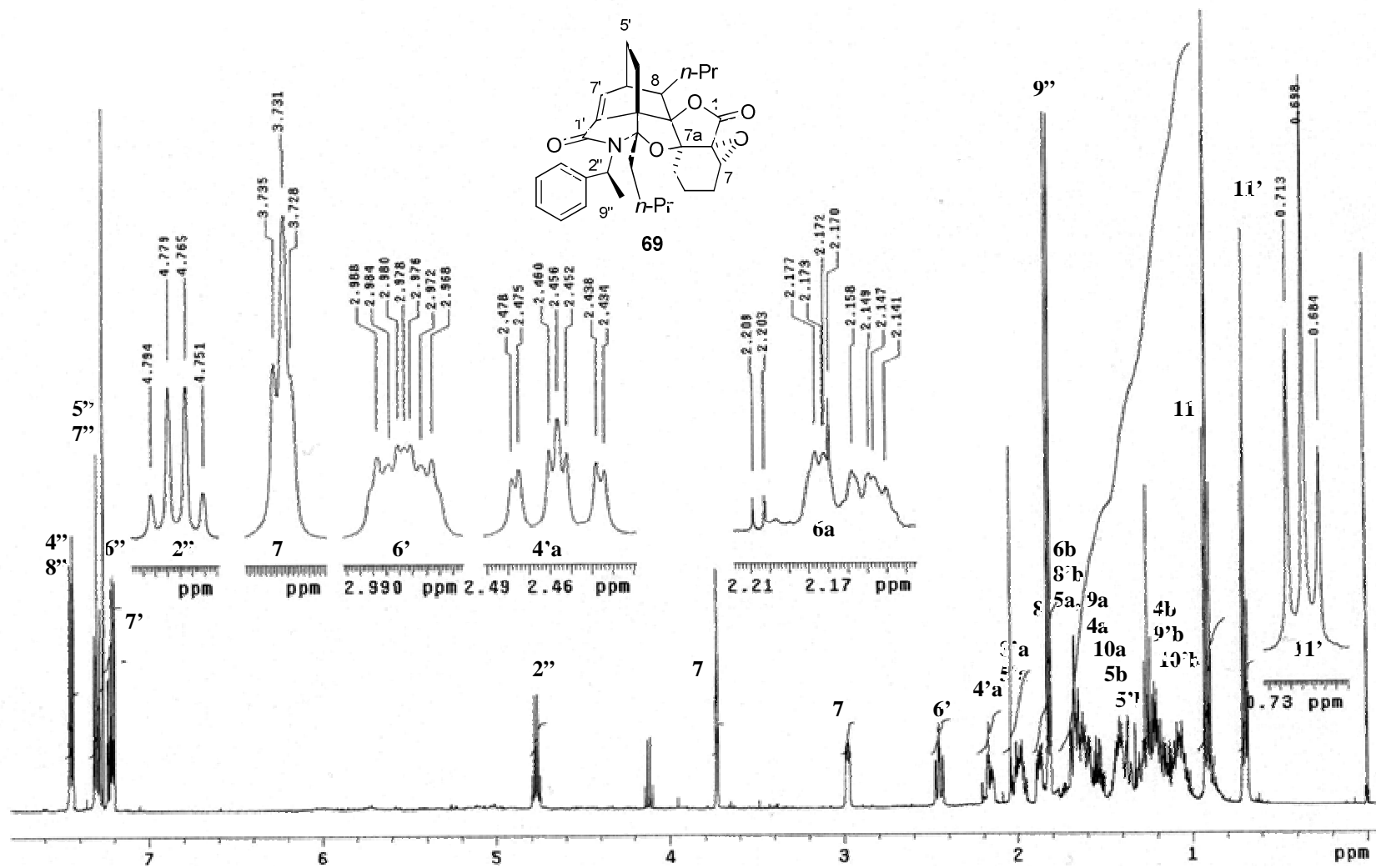
Espectro 22. IR (CHCl₃) de (-)-68



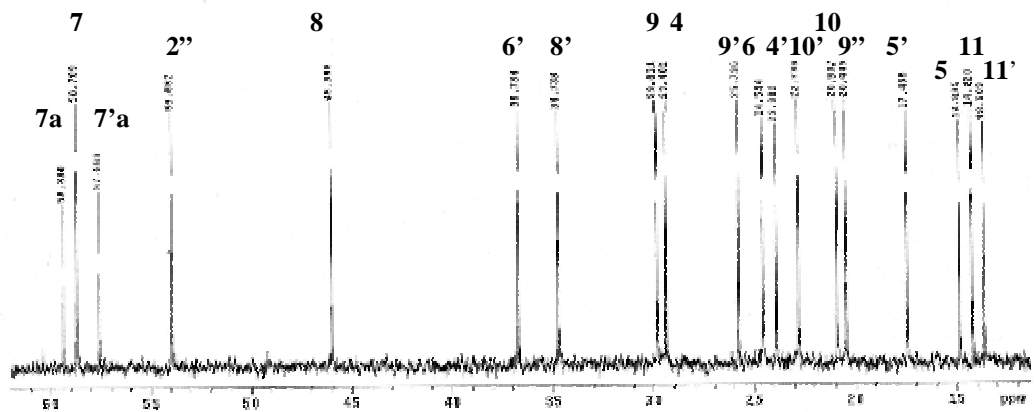
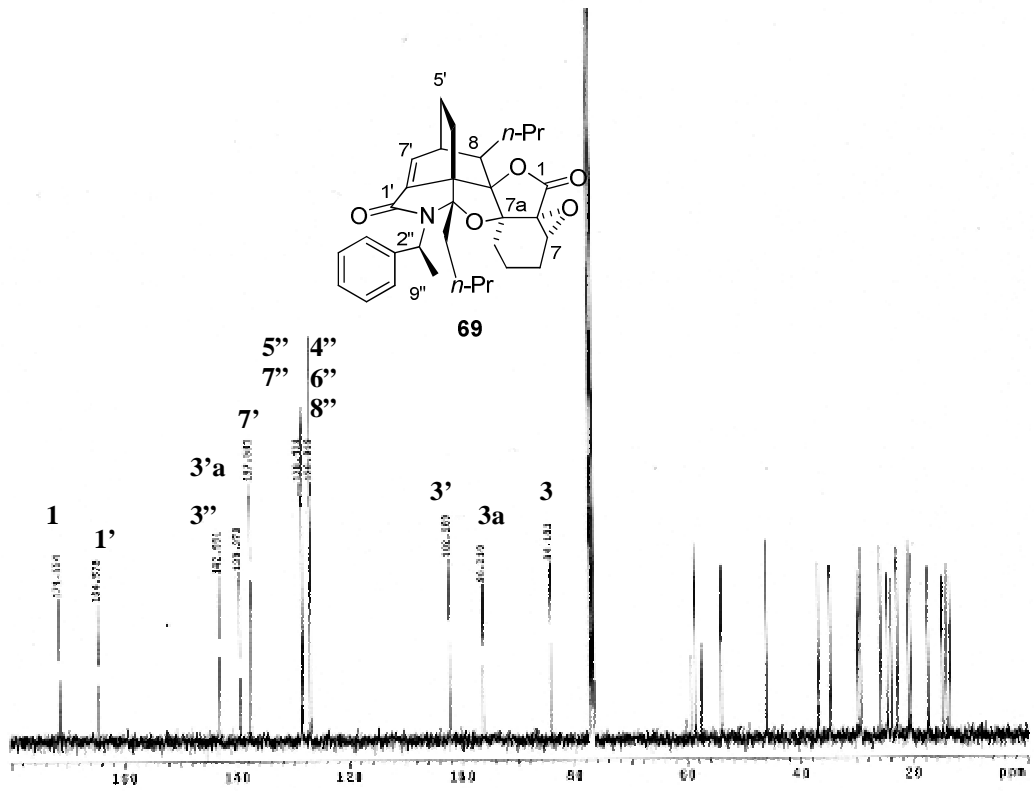
Espectro 23. RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz) de (-)-68



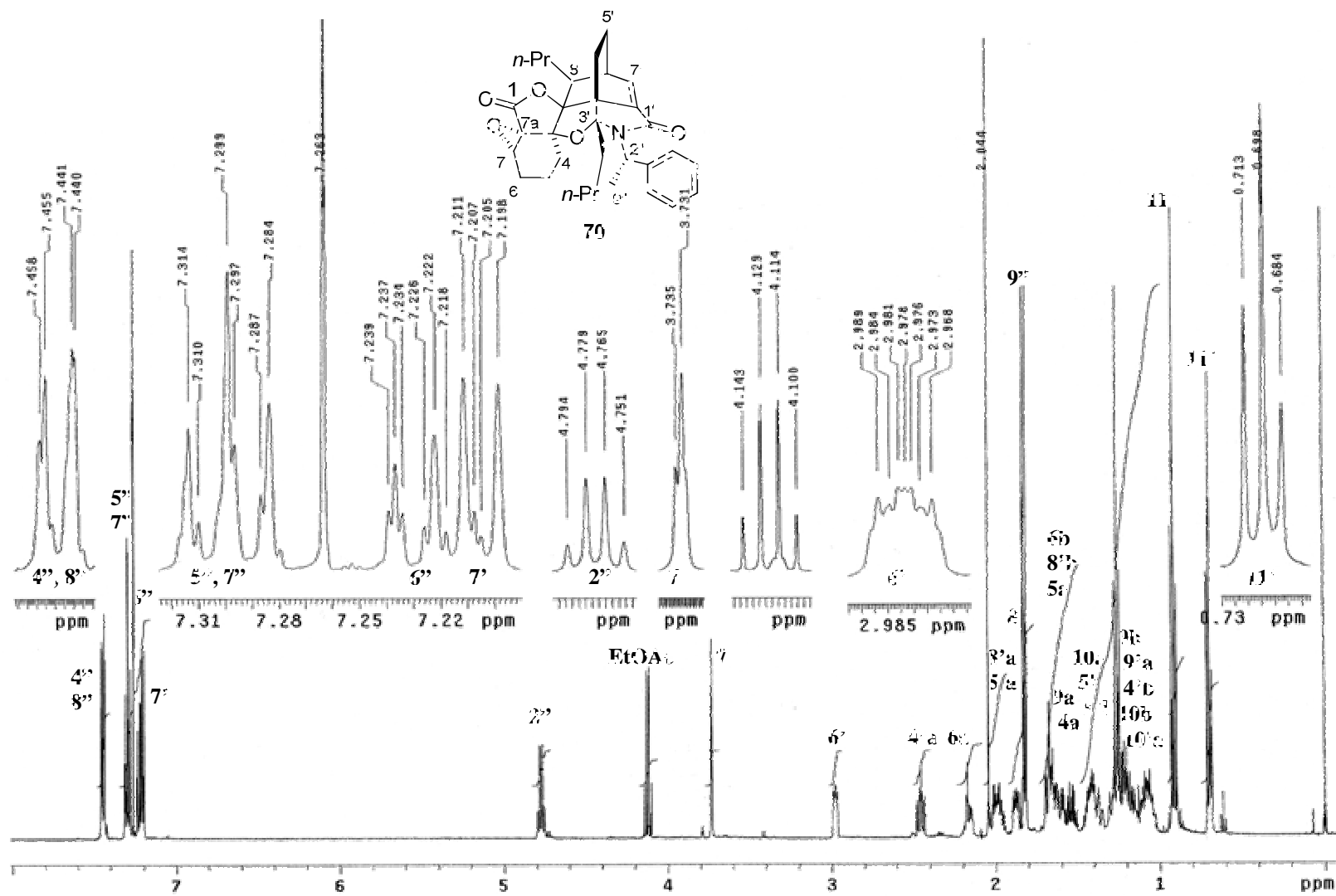
Espectro 24. RMN ¹³C (CDCl₃, 125 MHz) de (-)-68



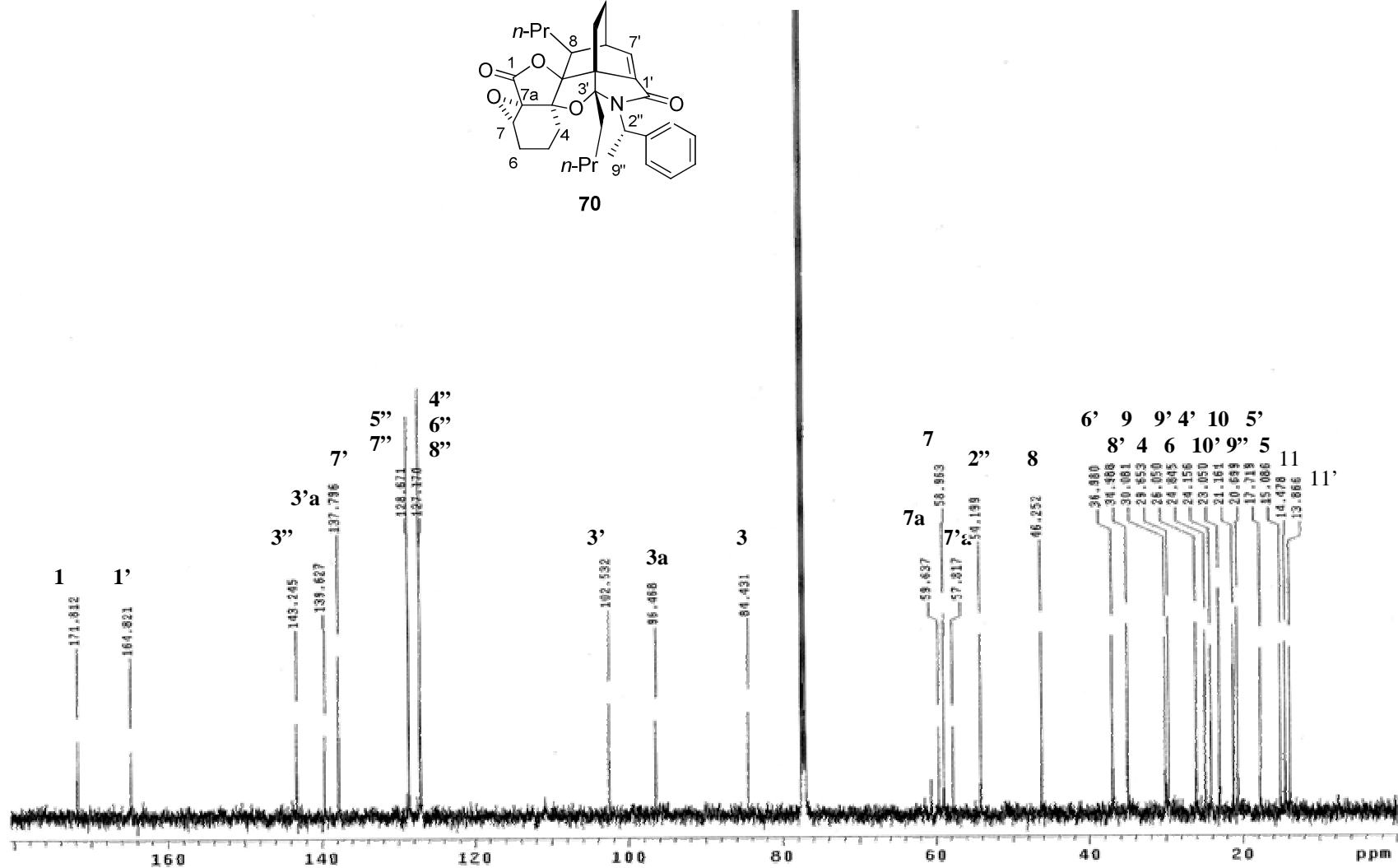
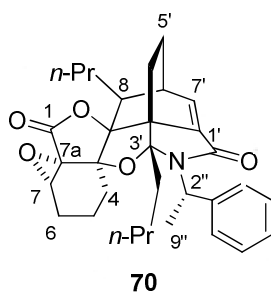
Espectro 25. RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de **69**



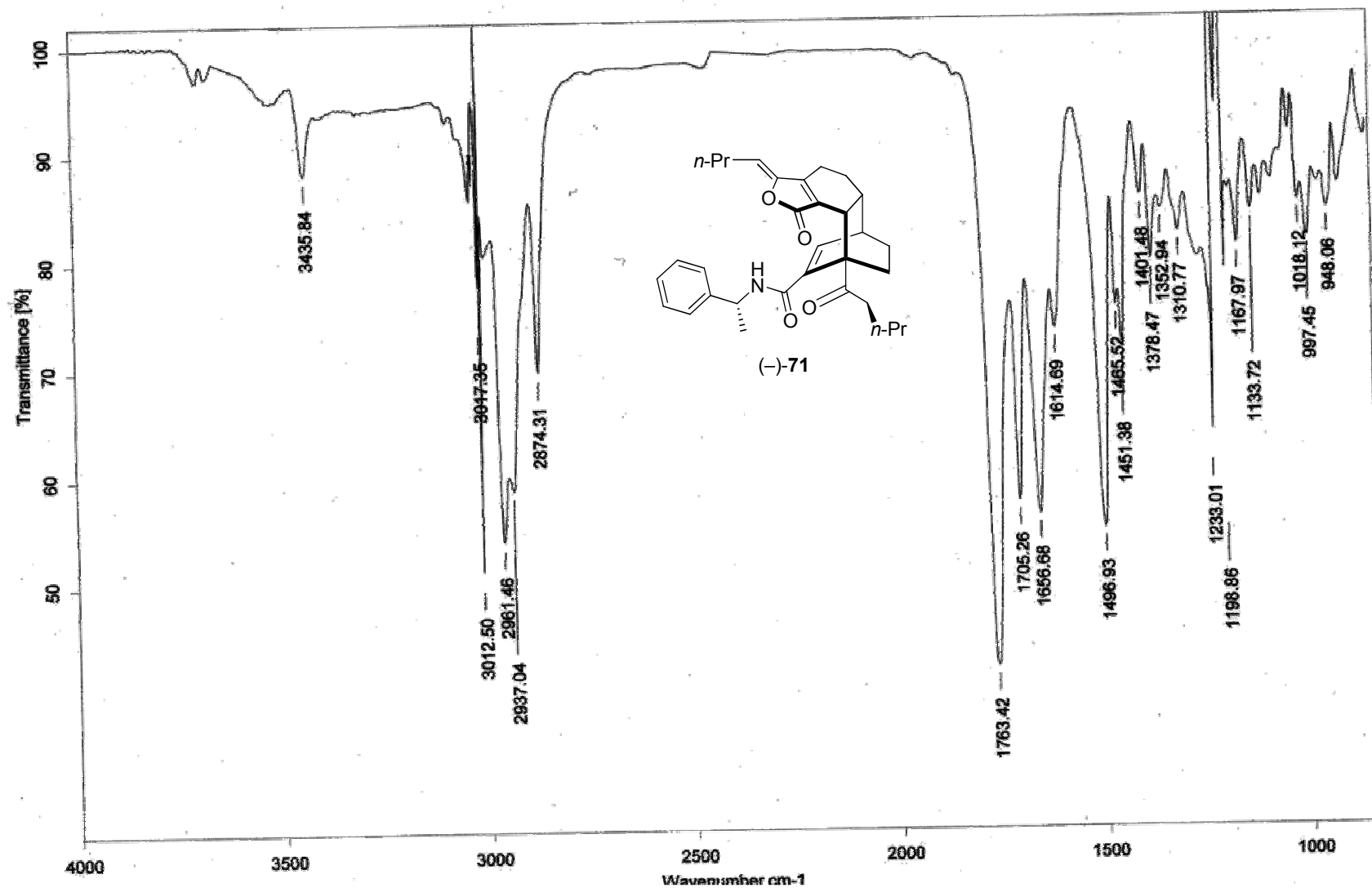
Espectro 26. RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) de **69**



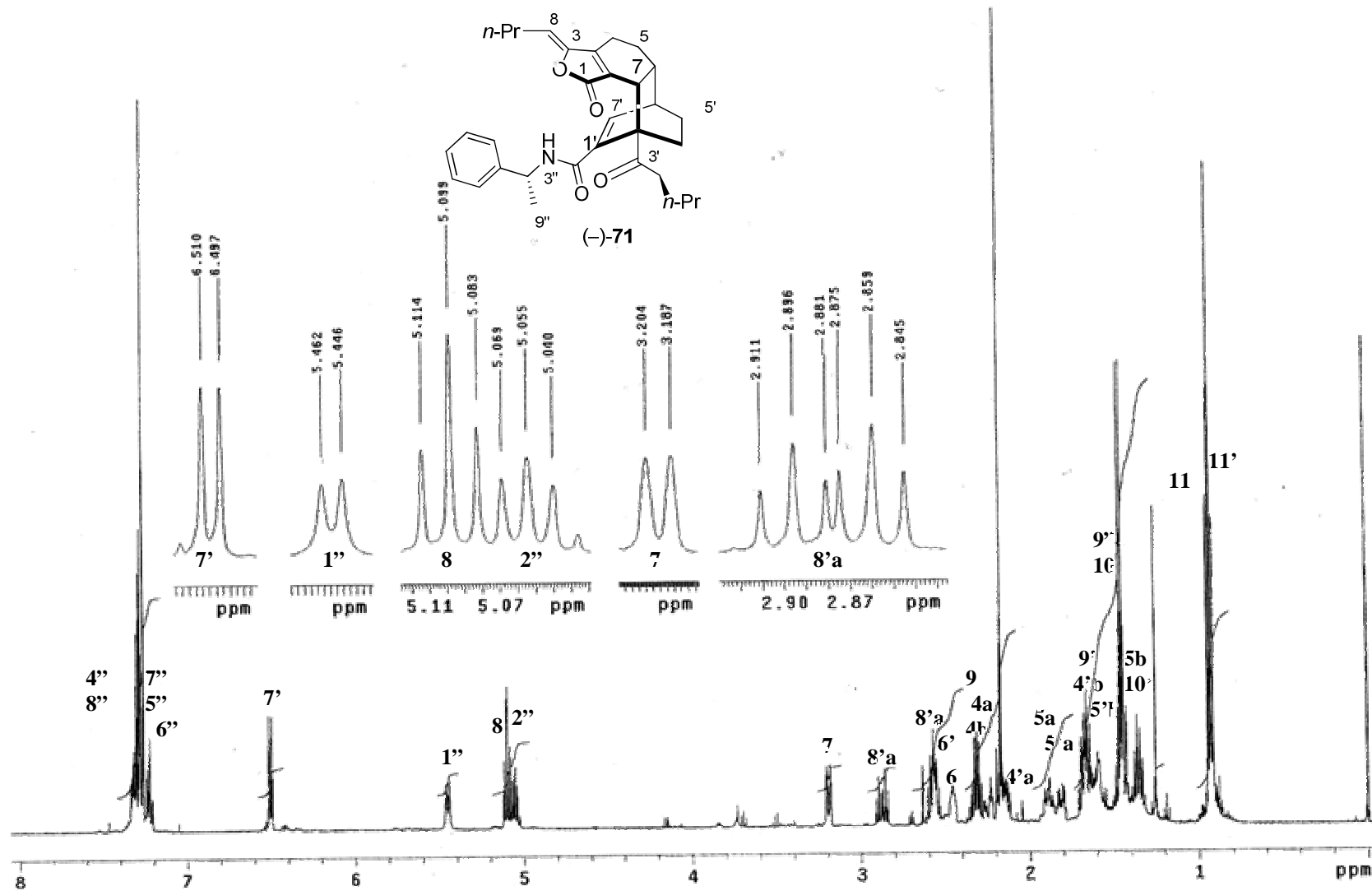
Espectro 27. RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de **70**



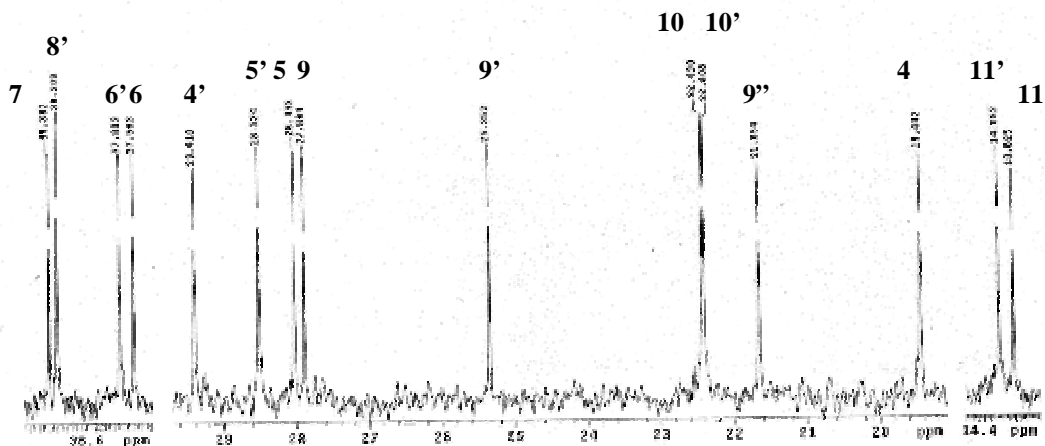
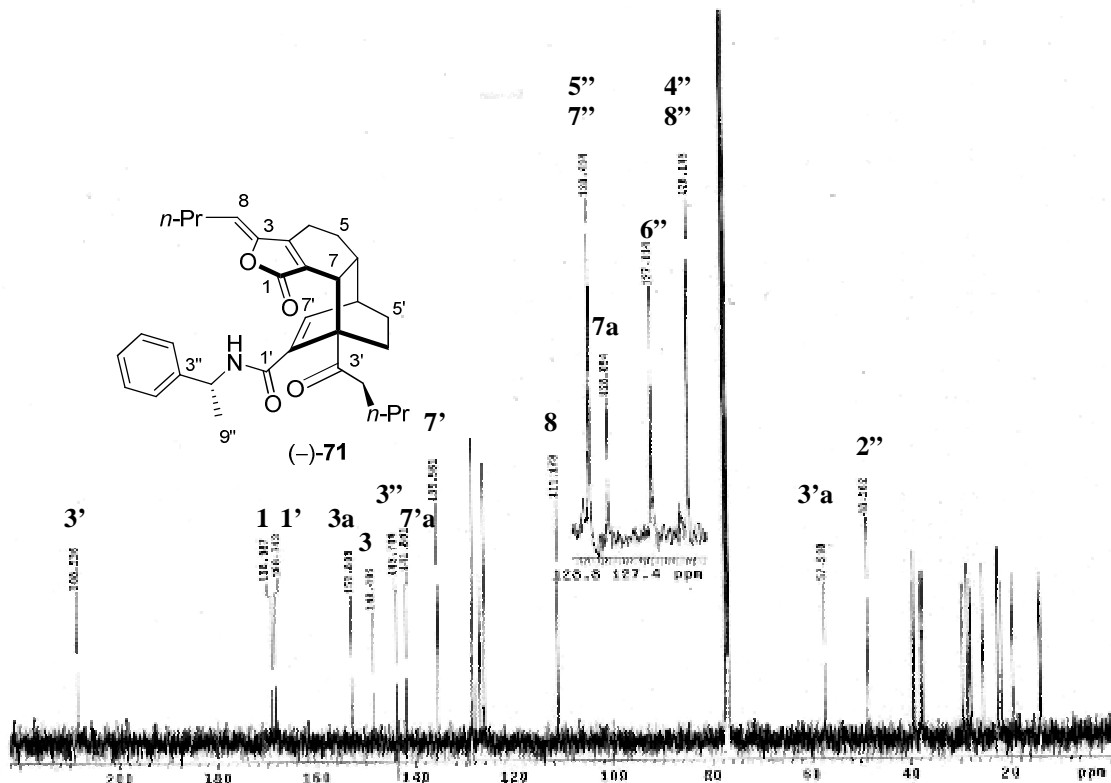
Espectro 28. RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) de **70**



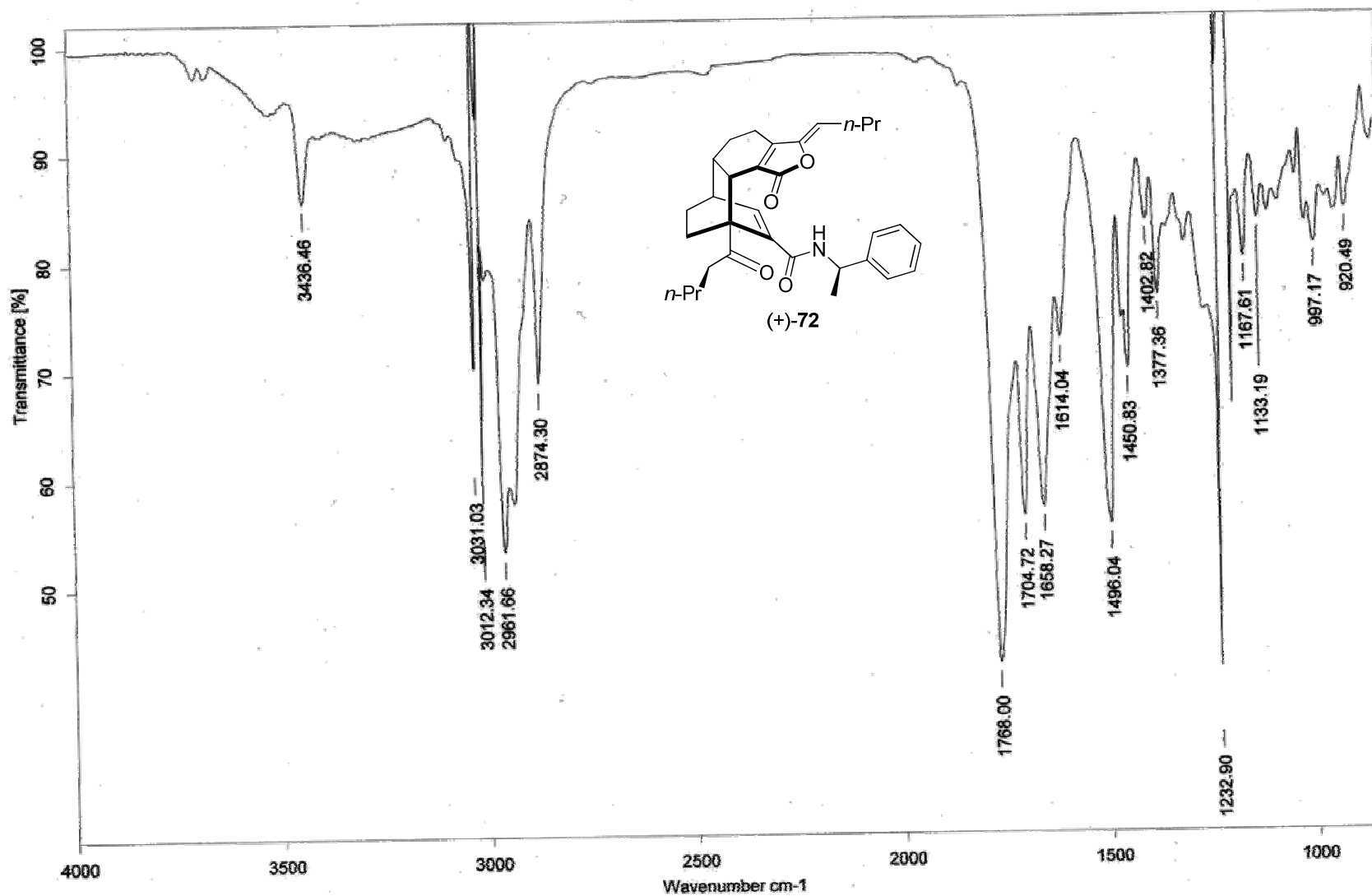
Spectro 29. IR (CHCl₃) de (-)-71



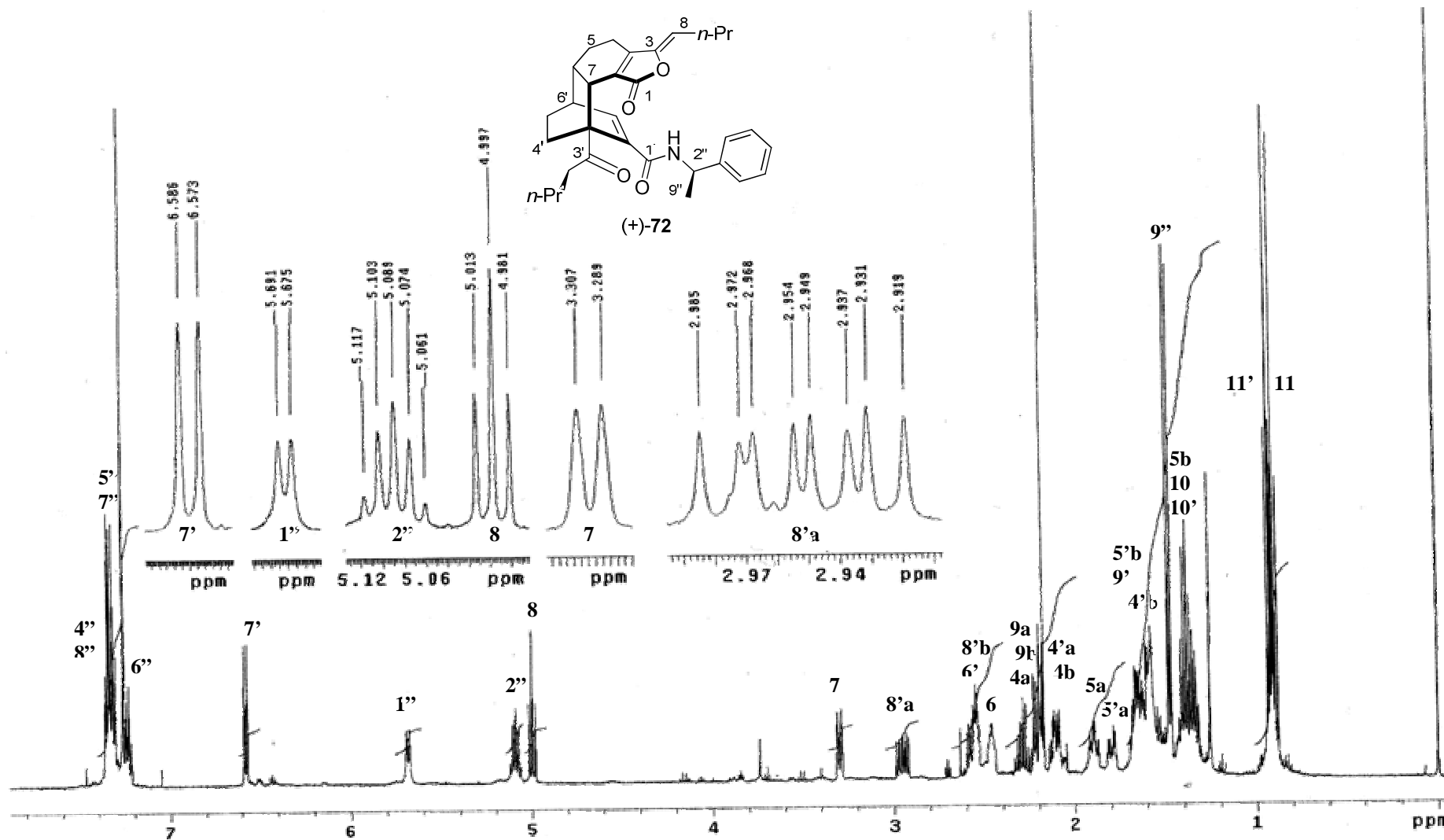
Espectro 30. RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de (-)-71



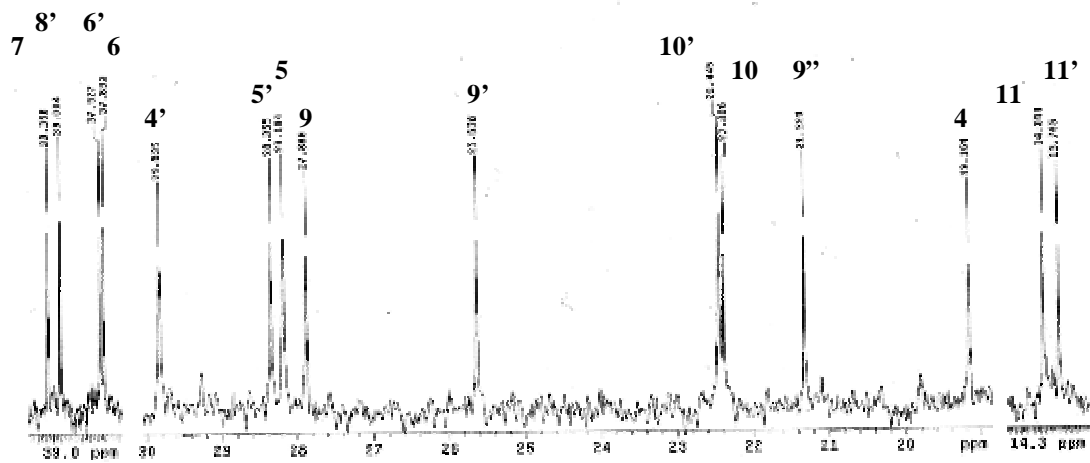
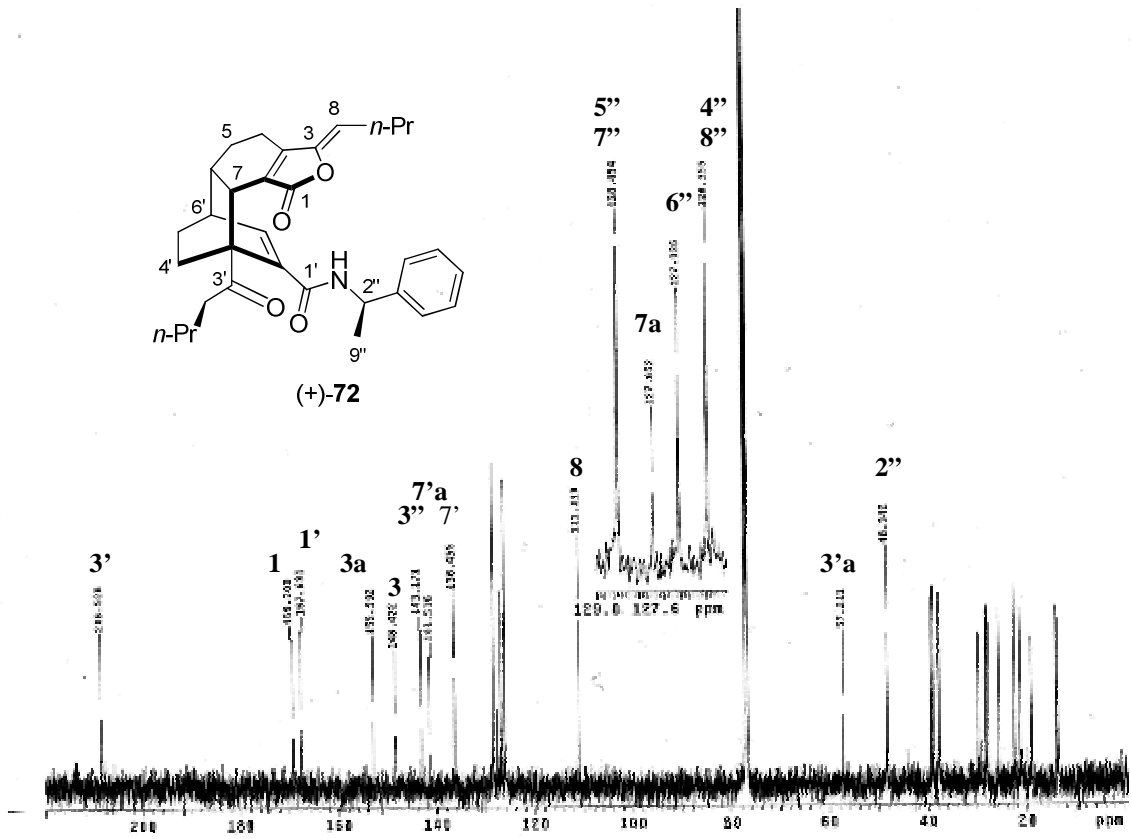
Espectro 31. RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) de (-)-71



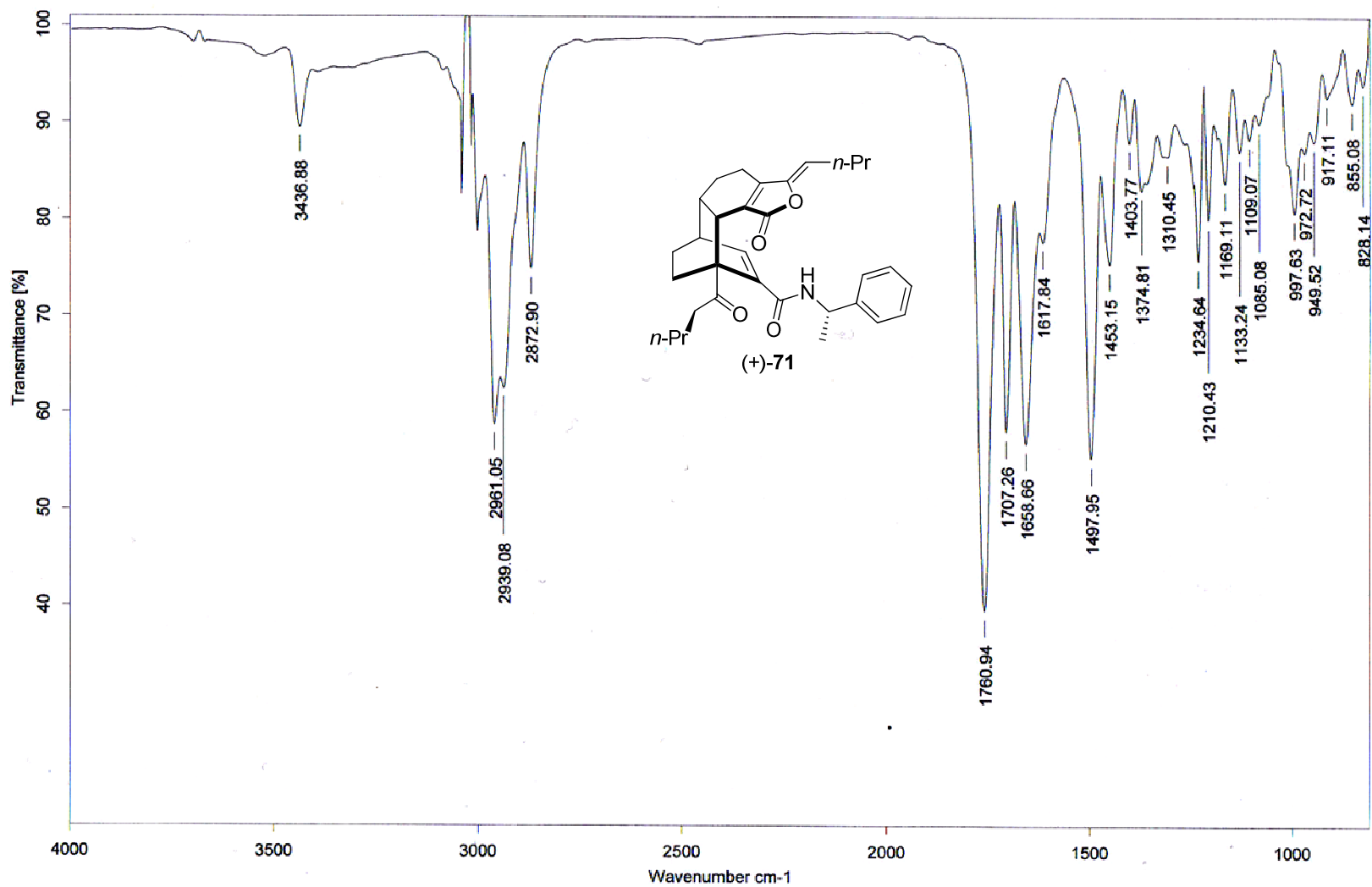
Espectro 32. IR (CHCl₃) de (+)-72



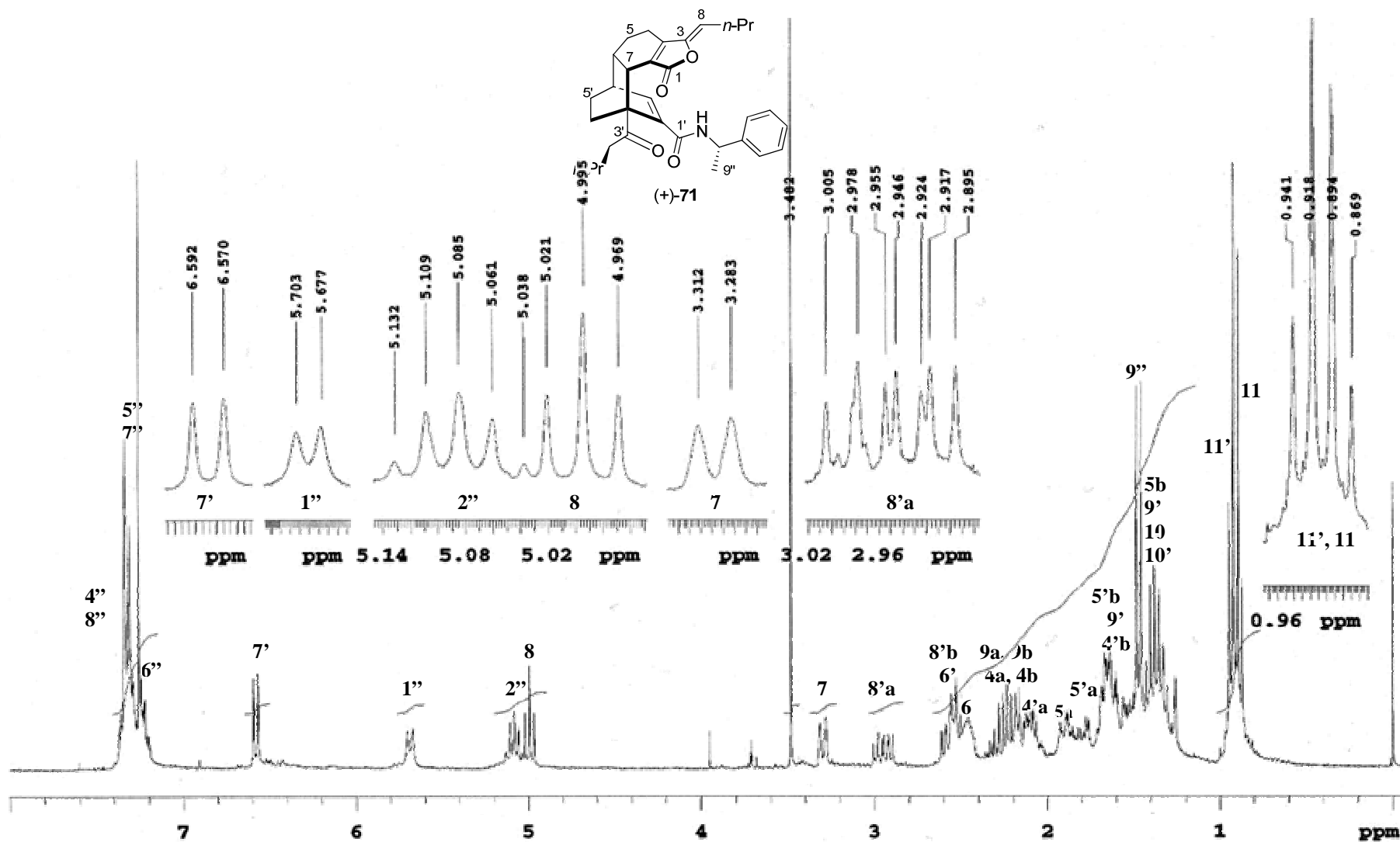
Espetro 33. RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de (+)-72



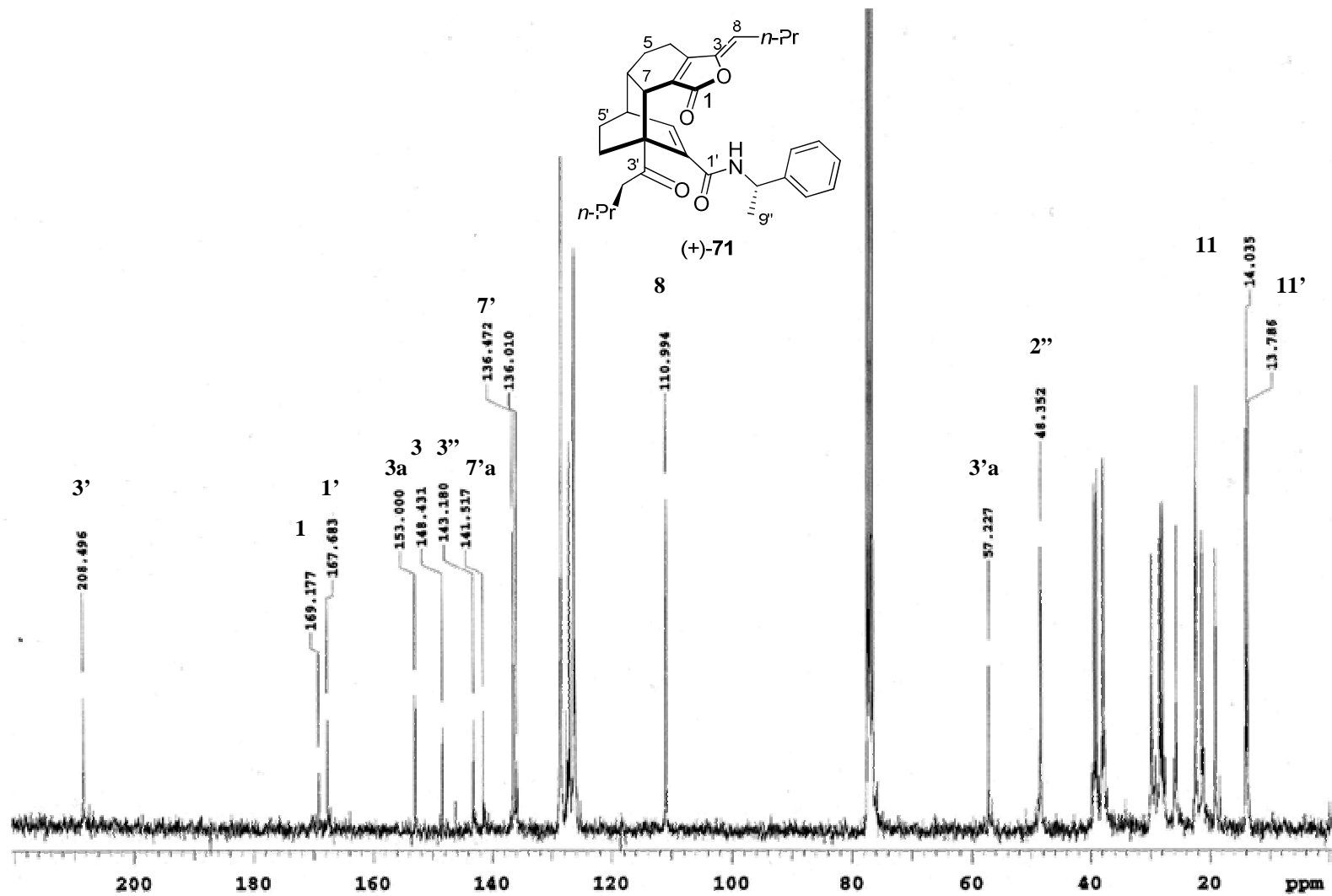
Espectro 34. RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) de (+)-74



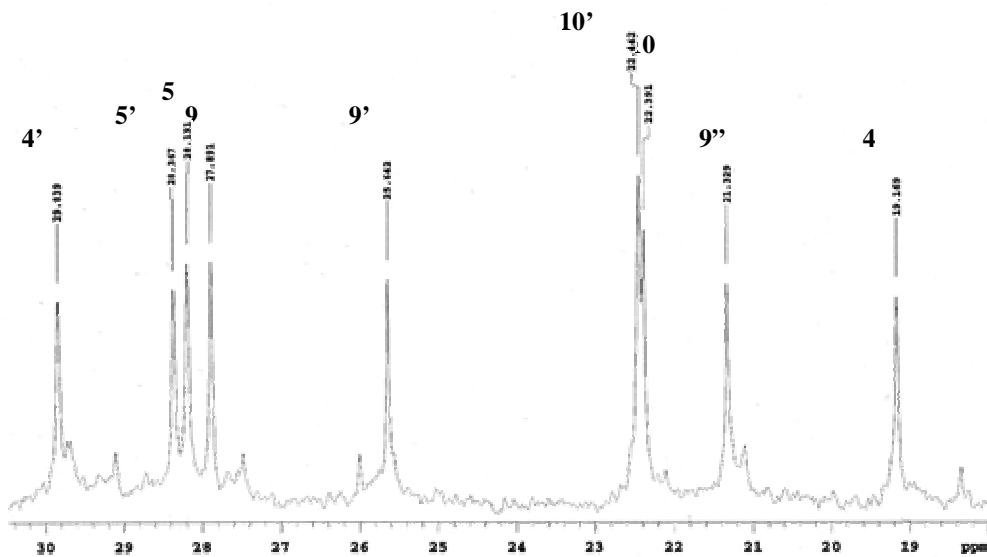
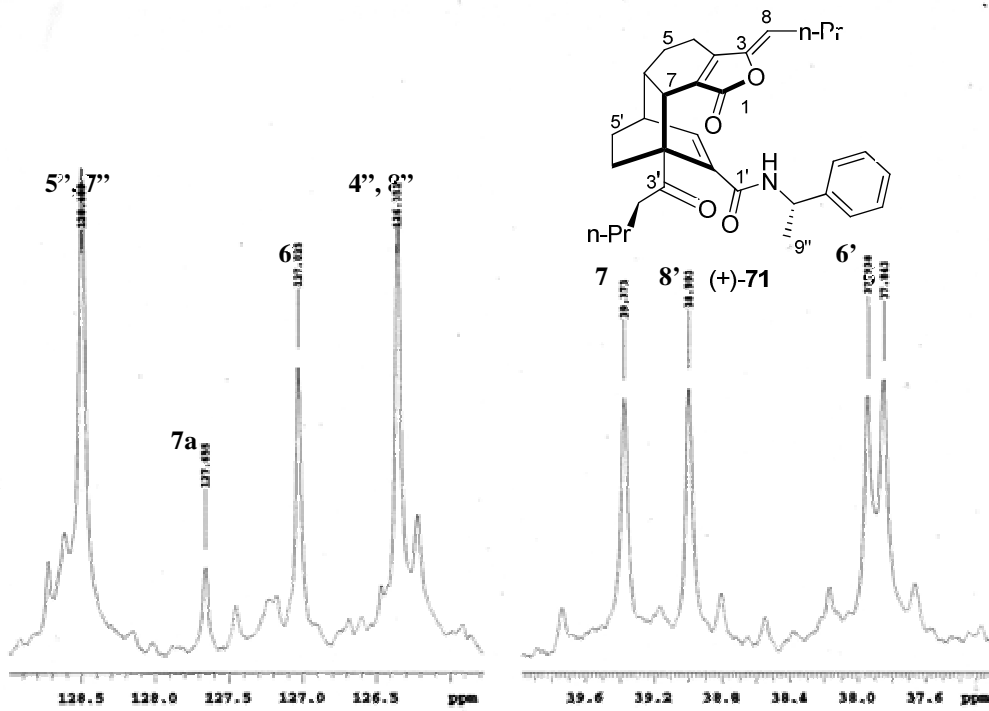
Espectro 35. IR (CHCl₃) de (+)-71



Espectro 36. RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) de (+)-71



Espectro 37. RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) de (+)-71



Cont. Espectro 37. RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) de (+)-71



Artículos

HETEROCYCLES, Vol. 82, No. 2, 2011, pp. 1567 - 1576. © The Japan Institute of Heterocyclic Chemistry
Received, 25th August, 2010, Accepted, 26th October, 2010, Published online, 16th November, 2010
DOI: 10.3987/COM-10-S(E)1113

DIFFERENTIATED CYCLIZATION OF THE KETOACID DERIVED FROM TOKINOLIDE B

Alejandra León, Rubén A. Toscano, J. Antonio Cogordán, and Guillermo Delgado*

Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, Coyoacán 04510, México, D.F. Telephone +55-5622-4446. Fax: +55-5414-7241. e-mail: delgado@unam.mx

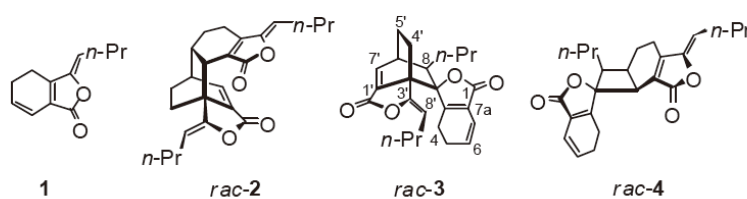
Abstract – Treatment of the ketoacid derivative (**5**) of the bioactive natural dimeric phthalide tokenolide B under weakly basic conditions and pressure, produced the novel ketal compound **6** via addition of the carboxylate of **5** to the ketone, followed by Michael addition of the alcoholate (*O*-alkylation) and equilibration. On the other hand, treatment of **5** with strong base (NaOH, THF, MeOH) promoted *C*-alkylation, affording cyclotokenolide B (**7**). Relative theoretical energies indicated that derivatives **6** and **7** are energetically more stable than the starting material **5**. The cytotoxicities of the natural product **3** and its analogues **5–7** against selected human cancer cells are reported.

INTRODUCTION[§]

Phthalides are a small group of less than one hundred natural acetogenins that includes around twenty natural dimeric substances derived from $[\pi 2\sigma + \pi 2\sigma]$ and $[\pi 4\sigma + \pi 2\sigma]$ cycloadducts of *Z*-ligustilide (**1**) or structural analogues. These substances are found mainly in plants belonging to the family Umbelliferae (Apiaceae) used in traditional medicine in Asia, Europe, and North America.¹ In Northern Mexico and the Southern United States *Ligusticum porteri* is considered one of the most important medicinal remedies in the region² and is used for the treatment of stomachaches, tuberculosis, bronchitis, colds, pneumonia, and diabetes. Chemical analysis of this species allowed the isolation of **1**, and the dimeric racemic compounds diligustilide (levistolide A) (**2**), tokenolide B (**3**) and riligustilide (**4**) (Scheme 1).³ The preparation of linear dimers from *Z*-ligustilide (**1**) has been reported,⁴ as well as the relay synthesis of **2–4** from the same monomer (**1**).⁵ Our earlier studies on the chemical reactivity of these intriguing racemic cycloadducts

[§] This paper is dedicated to Professor Albert Eschenmoser for his 85th birthday

revealed the feasibility of intramolecular reactions to afford polycyclic compounds.⁵ In accordance with the diverse ethnomedicinal uses of plants containing dimeric phthalides, preliminary bioassays indicated that these substances displayed various biological activities.^{1,6-8}



Scheme 1. Phthalides from *L. porteri*

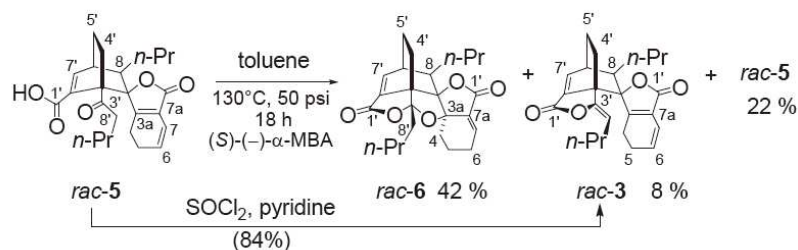
Our consideration of the limited predictive knowledge of the chemistry of dimeric phthalides, the experimental difficulties in obtaining derivatives, and the unknown potential of these types of substances as cytotoxic agents, led us to investigate the chemical reactivity of the ketoacid of tokinolide B (**5**), a derivative of the natural dimeric phthalide **3**, in order to obtain derivatives that could be bioevaluated. Our results, reported herein, encompass (a) the characterization of an unexpected cyclization product from **5** whose preparation was compared with the formation of cyclotokinolide B (**7**), (b) the determination of the relative theoretical energies of the starting material and the obtained products, and (c) the evaluation of the cytotoxic potential of compounds **3**, **5**, **6**, and **7** against three human tumor cell lines.

RESULTS AND DISCUSSION

Compound **5** was obtained in good yield by chemoselective lactone ring opening of the natural product **3** with base in acetone under reflux,⁹ but treatment of **5** with (*R*)-(+)- or (*S*)-(-)- α -methylbenzylamine at 0 °C or at room temperature using different solvents (*i*PrOH, EtOAc, CH₂Cl₂) did not afford products. The absence of the expected salts could be due to the steric hindrance of both the carboxylic acid and the amine, preventing the formation of the product. Therefore, we considered the possibility of obtaining diastereomeric amides. For this purpose, we undertook several attempts toward the preparation of the corresponding acyl chloride, which in turn could react directly with the chiral amine. However, treatment of **5** using SOCl₂ with different solvents (CH₂Cl₂, THF) at different temperatures (-78 °C, 0 °C, room temp.) afforded only tokinolide B (**3**) as the sole product in good yields (Scheme 2).

We then proposed that direct reaction of the keto group of **5** with a chiral amine under pressure could afford the corresponding diastereomeric addition products. After extensive experimentation, however, we found that treatment of **5** with (*S*)-(-)- α -methylbenzylamine in toluene (or with (*R*)-(+)- α -methylbenzylamine or with (\pm)- α -methylbenzylamine) under 50 psi unexpectedly resulted in a

mixture of the racemic ketal **6** and tokinolide B (**3**) in 42% and 8% yield, respectively, and 22% of starting material (Scheme 2). The transformation did not proceed in the absence of base.



The structure of the new compound **6** was determined according to the following spectroscopic evidence. The molecular formula ($C_{24}H_{30}O_5$ established by HRMS) indicated that the product was isomeric with the starting material; the ^{13}C NMR data for **6** showed 24 signals which were assigned (by DEPT analysis) to two lactonic carbonyls, six quaternary carbons, four methines, ten methylenes and two methyl groups. The disappearance of the ^{13}C NMR signals assigned to the ketone group, the carboxylic group and the C(6)–C(7), C(3a)–C(7a) double bonds for **6**, in comparison with the starting material, indicated that these groups were involved in the transformation. The new signals at δ_c 115.01, 129.75 and 141.58 corresponded to a ketalic carbon and a trisubstituted double bond (assignments by HSQC, HMBC, and NOESY experiments) respectively, establishing the structure **6** for the product, which was confirmed by X-ray analysis (Figure 1). The structure of the additional product (**3**) was secured by direct comparison with an authentic sample from our laboratory.

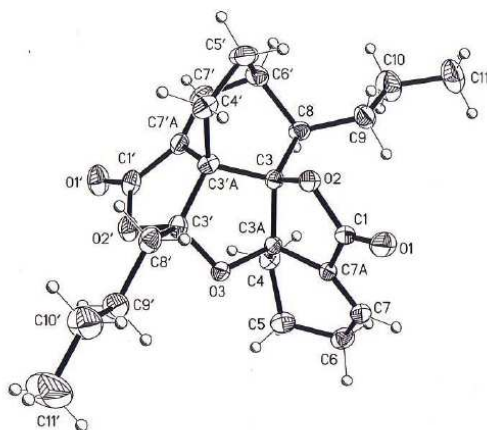
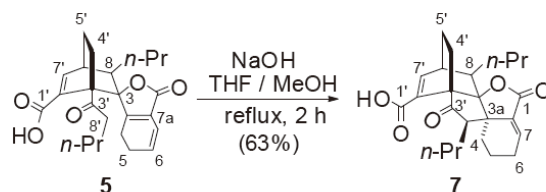


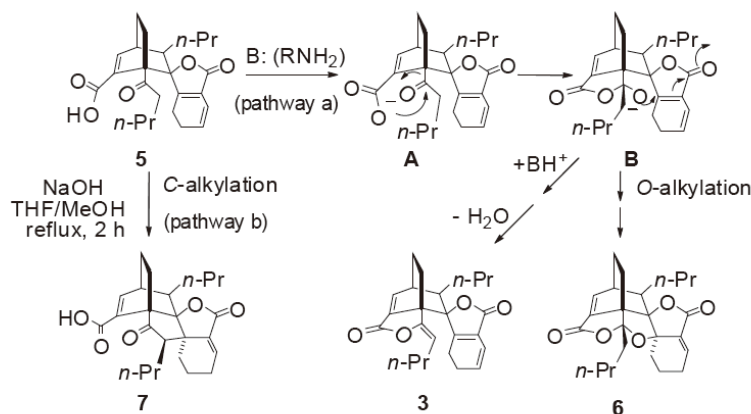
Figure 1. ORTEP view of the X-ray diffraction structure of **6**

Complementary to this transformation, treatment of **5** with NaOH, THF, MeOH afforded cyclotokinolide **B** (**7**)⁹ (Scheme 3).



Scheme 3. Formation of cyclotokinolide **B** (**7**)

The suggested mechanistic routes for the formation of **3**, **6** and **7** from **5** are shown in Scheme 4. The abstraction of the carboxylic proton by methylbenzylamine ($R-NH_2$) afforded entity **A** (pathway a), promoting the nucleophilic attack on the C-3' carbonyl group (via 5-*exo*-trigonal cyclization) to form the intermediate **B**. Michael addition of the oxyanion to the double bond C(3a)-C(7a) with a second 5-*exo*-trigonal cyclization (*O*-alkylation) and subsequent equilibration afforded the unexpected enone **6**. The formation of **3** could be explained via protonation and dehydration of **B**. Therefore, there is competition between the formation of **3** and **6**. Complementary, the transformation of **5** into **7** could be described via formation of the enolate which is *C*-alkylated (via 5-enolendo-*exo*-trigonal cyclization)¹⁰ to afford cyclotokinolide **B** (**7**) (Scheme 4, pathway b). These results clearly demonstrated that keto acid **5** is endowed with potential to generate polycyclic structures.



Scheme 4. Suggested mechanistic routes for the formation of **3**, **6** and **7** from **5**

To determine the relative stabilities of **5**, **6** and **7** (they are isomeric compounds), we conducted theoretical total energy calculations. For this purpose, each compound was modeled and once the

structure was completed, global geometry optimization was computed. Molecular modeling procedures were made with GaussView.¹¹ All molecular computations were performed at the B3LYP/6–311G level of theory using the suite of programs in Gaussian 03.¹² The performance of the B3LYP functional over a set of organic molecules has been described.¹³ From the computed total energies we obtained ΔE (5–6) = 6.95 kcal/mol and ΔE (5–7) = 4.71 kcal/mol.

This theoretical analysis of total energies of the optimized structures indicated that compound 6 was energetically more stable than 7 by 2.24 kcal/mol. The stability of 6 could be attributed to the greater number of rings, in this case six rings, in contrast with 7 which incorporates five rings. 5 was found to be the energetically less stable compound, perhaps due to its tetracyclic nature and its inability to maintain conformationally rigid alkyl chains (Figure 2).

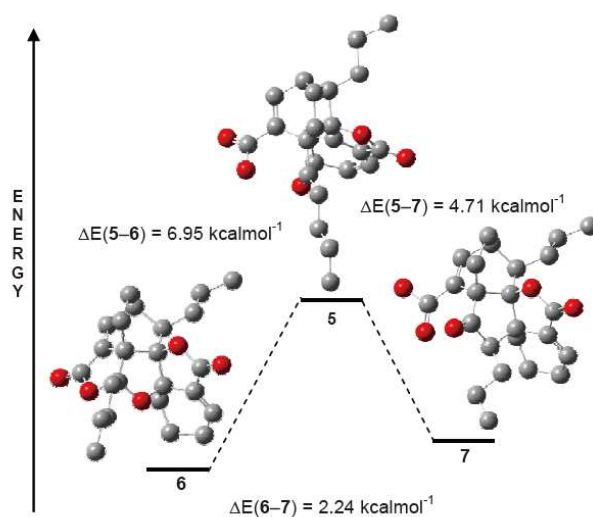


Figure 2. Representation of total energies of 5, 6 and 7. Hydrogens have been omitted for clarity. Molecular computations were done at the B3LYP/6–311G level of theory¹²

Since the cytotoxic potential of dimeric phthalides is not known, we tested the activities of the obtained compounds 3, 5, 6, and 7 against human leukemia (K562), colon (HCT-15), and lung (SKLU-1) cancer cell lines following standard protocols.¹⁴ The IC_{50} values (Table 1) indicated moderate selectivities toward certain cell lines, compared with the positive control (helenalin).

Table 1. IC₅₀ (μM) of **3**, **5**, **6** and **7**^a

Compound	K562 ^b	HCT-15 ^c	SKLU-1 ^d
3	26.6 ± 1.4	10.5 ± 0.9	7.1 ± 0.62
5	>100	>100	>100
6	30.6 ± 3.1	23.1 ± 1.8	37.4 ± 3.6
7	21.9 ± 1.3	28.4 ± 0.8	22.9 ± 1.4

^aFor experimental details, see the Supporting Information. ^bLeukaemia.

^cColon. ^dLung. The positive control (helenalin), showed IC₅₀ = 0.28 ± 0.02, 0.29 ± 0.02 and 0.21 ± 0.02 μM against K562, HCT-15 and SKLU-1 respectively. Results are mean ± SEM.

Natural product **3** exhibited moderate activity against the cell lines HCT-15 and SKLU-1, while **5** showed lack of cytotoxicity.

In conclusion, we have developed experimental conditions to afford different cyclization products from **5**. Treatment with weak base and pressure afforded the unexpected ketal (**6**) *via* *O*-alkylation while treatment with strong base afforded cyclotokinolide B (**7**) *via* *C*-alkylation. The theoretical results indicated that **6** was the structure with relatively lower energy, followed by **7**, and this outcome may be correlated with the number of rings and conformational constraints in the structures. These results are in agreement with previous observations suggesting that the intramolecular cyclizations of the dimeric phthalides are a general feature for these types of substances. Our demonstrations of these characteristics should extend our predictive capacity for the reactivity of dimeric phthalides. Compounds **3**, **6**, and **7** exhibited moderate cytotoxic activities toward the tested cell lines.

EXPERIMENTAL

GENERAL

Melting points were measured on a Fisher Johns apparatus and are uncorrected. Infrared spectra were recorded with FTIR Bruker TENSOR 27 instrument. Ultraviolet spectra were determined on a Shimadzu UV160U Instrument. EISM and HRMS (FAB⁺) were recorded on a JEOL SX102A Mass Spectrometer. The ¹H- and ¹³C-NMR experiments were performed at 25 °C using Varian 500 spectrometer (at 500/125 MHz) and Bruker AVANCE (at 300/75 MHz), and the chemical shifts are expressed in parts per million (δ) relative to trimethylsilane. 1D and 2D homo- and heteronuclear NMR techniques, COSY, NOESY, gHMQC and gHMBC, were employed to elucidate the structure of **6**. Analytical TLC was carried out using Merck aluminum silica gel 60 F₂₅₄ plates and the visualization was accomplished with a UV lamp and a solution of ammonium cerium sulfate. Column chromatography was performed using silica gel 60 (230–400 meshes, Merck®). The solvent system is specified in each experiment. Tokinolide B (**3**) was

isolated from the acetonic extract of the roots of *Ligusticum porteri* by successive column chromatographies.³

Treatment of **5** with (*R*)-(+)- α -Methylbenzylamine

5 (50.2 mg, 0.12 mmol) was dissolved in *i*PrOH (0.5 mL) at 55 °C under nitrogen; the solution was cooled at room temperature. (*R*)-(+)- α -methylbenzylamine (16 μ L, 0.12 mmol) was then added to the reaction mixture and kept from 12 to 96 h at room temperature at 0 °C. The same assays were carried out using different solvents (EtOAc, CH₂Cl₂, EtOH) and with (*S*)-(-)- α -methylbenzylamine. After usual work up, only the starting material was recovered.

Treatment of **5** with SOCl₂

To a solution of **5** (91.1 mg, 0.22 mmol) in dry CH₂Cl₂ (3 mL) and dry pyridine (30 μ L, 0.37 mmol) at -78 °C was added SOCl₂ (30 μ L, 0.41 mmol) under nitrogen. The mixture was stirred for 2 h to reach 0 °C. After this time, (*R*)-(+)- α -methylbenzylamine (50 μ L, 0.45 mmol) was added and stirred for 2.5 h to reach room temperature. The reaction mixture was diluted with CH₂Cl₂ and usual work up allowed affording a yellow oil which was purified by column chromatography (*n*-hexane/EtOAc, gradient) to obtain compound **3** as the only reaction product (73.7 mg, 84%). The same results were obtained using THF instead of methylene chloride.

Preparation of compound **6**

To a solution of ketoacid of tokenolide B (**5**, 36 mg, 0.095 mmol) in anhydrous toluene (10 mL) placed in a stainless steel reactor (100 mL) was added (*S*)-(-)- α -methylbenzylamine or (*R*)-(+)- α -methylbenzylamine or (\pm)- α -methylbenzylamine (0.02 mL, 0.15 mmol) under nitrogen atmosphere. The reactor was sealed and heated (130 °C) for 18 h (pressure: 50 psi). After cooling to room temperature, the reaction mixture was concentrated at reduced pressure. EtOAc was added and the organic phase was washed with HCl (10%, 3 \times 5 mL), and aqueous phase was re-extracted with EtOAc (3 \times 10 mL). The organic layers were combined, washed with brine, dried with Na₂SO₄ and concentrated under vacuum. The residue was purified by column chromatography (*n*-hexane/EtOAc, gradient) to obtain compound **3** (3 mg, 8% as the less polar compound), **6** (white crystals, 15.4 mg, 42%) and the starting material was recovered (8 mg, 22%). Using longer reaction times for the reaction favored the formation of additional minor products, while shorter reaction times lowered the yield of **3** and **6**. Attempts to carry out the transformation without solvent afforded an insoluble dark brown residue. The starting material was recovered from assays carried out with the absence of base. Mp 204–206 °C; *R*_F: (*n*-hexane/AcOEt, 4:1) 0.51; UV (MeOH) λ_{\max} nm (ϵ): 217 (29077); IR (CHCl₃) ν_{\max} (cm⁻¹): 3028, 2875, 1757, 1686, 1665, 1329, 1126, 1068, 1041, 1011, 955, 887; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, assignments by COSY, HSQC, HMBC, NOESY) δ : 7.43 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H, H-7'), 7.01 (dt, *J* = 7.0, 2.5 Hz, 1H, H-7),

3.04 (m, 1H, H-6'), 2.46 (m, 1H, H-6a), 2.40 (m, 1H, H-4a), 2.14 (m, 1H, H-6b), 2.01 (m, 1H, H-5a'), 1.85 (m, 2H, H-5, H-8'), 1.67 (m, 1H, H-8), 1.62 (m, 1H, H-4a), 1.50 (m, 2H, H-9, H-9a), 1.33 (m, 2H, H-4, H-4b'), 1.09 (m, 2H, H-10b, H-9b), 0.89 (t, $J = 7.5$ Hz, 3H, H-11'), 0.87 (t, $J = 7.5$ Hz, 3H, H-11). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3 , assignments by DEPT, HSQC, HMBC) δ : 167.61 (C-1), 165.17 (C-1'), 144.78 (C-7'), 141.58 (C-7), 135.51 (C-7a'), 129.75 (C-7a), 115.01 (C-3'), 94.27 (C-3), 86.15 (C-3a), 59.262 (C-3a'), 44.88 (C-8), 37.85 (C-6'), 35.56 (C-8'), 29.24 (C-4), 28.99 (C-9), 25.15 (C-6), 24.73 (C-9'), 22.76 (C-10'), 22.60 (C-4'), 21.09 (C-10), 17.36 (C-5), 16.72 (C-5'), 14.10 (C-11), 13.82 (C-11'). EIMS m/z (rel. int.): 398 [M^+] (21), 380 (9), 356 (100), 338 (65), 309 (11), 296 (13), 271 (15), 253 (10), 207 (5), 190 (38), 189 (10), 149 (7), 91 (5), 79 (5); HRMS (FAB $^+$) m/z : Calcd. for $[\text{C}_{24}\text{H}_{30}\text{O}_5 + \text{H}]^+$: 399.2094; found 399.2092. X-Ray analysis data: All data were collected on Bruker Smart Apex CCD diffractometer using 1.510-25.530 at 294(2) K. Compound **6** belongs to the orthorhombic system, space group Pbc_a with $a = 12.1979(9)$ Å, $\alpha = 90^\circ$, $b = 12.744(1)$ Å, $\beta = 90^\circ$, $c = 26.941(2)$ Å, $\gamma = 90^\circ$. The refinement methods was full-matrix least squares on F^2 . Crystallographic data for the structure reported in this paper has been deposited with the Cambridge Crystallographic Data Centre CCDC 712971. deposit@ccdc.cam.ac.uk <http://www.ccdc.cam.ac.uk/deposit>. Telephone: (44) 01223 762910.

Preparation of cyclotokinolide B (7) from 5

To a solution of ketoacid of tokinolide B 9 (**5**, 22 mg, 0.06 mmol) in THF (5 mL) and MeOH (1 mL) was added NaOH (33.1 mg, 0.83 mmol), after 2 h of reflux under nitrogen, the reaction mixture was cooled to room temperature and concentrated under vacuum. The reaction mixture was diluted with methylene CH_2Cl_2 (10 mL), washed with aq. HCl (10%, 2×10 mL), the aqueous layer was re-extracted with methylene CH_2Cl_2 (3×10 mL). The organic layers were combined and washed with brine (2×10 mL), dried over Na_2SO_4 and concentrated under vacuum. The residue was purified by preparative thin layer chromatography (*n*-hexane/EtOAc, 3:2) to obtain compound **7** 9 (13.8 mg, 63%).

Computational Details

To compute the total energy here reported for **5**, **6** and **7**, it was necessary to proceed first to a geometry optimization procedure for each molecule. Our geometry optimization paradigm was: a) model and geometry optimize the largest rigid molecular fragment of the compound in consideration, b) to the fragment from the previous step add a new molecular fragment and perform a geometry optimization, c) carry out a relaxed potential energy scan (RPES) over the dihedral angle between the two recently added molecular fragments in step b). This RPES consists in the geometry optimization of all degrees of freedom of the molecule, with the only exception, in this case, of the assigned value to the dihedral angle. In our calculations this angle was varied from zero to 360 degrees, with increments of 45 degrees. d) The molecular conformation with the minimum energy in step c) was selected for a global geometry

optimization. The steps b) to d) were repeated until the compound in consideration was completed. The identified molecular fragments with mobility were the *n*-propyl chains for **5**, **6** and **7**, in addition, for **5** and **7** the fragment O(1')–C(1')–O(2')–H(2') was considered, and for **6**, the lactone ring fused with the cyclohexene was considered as another fragment. GaussView was used in all the modeling steps¹¹. All molecular calculations were calculated at B3LYP/6–311G level of theory and were carried out with the suite of programs in Gaussian 03.¹²

Cytotoxic assay

Colon (HCT-15), leukaemia (K-562) and lung (SKLU-1) human tumor cell lines were supplied by National Cancer Institute (NCI), USA. The cytotoxicity of the tumors cells with the test compounds was determined using the protein-binding dye sulforhodamine B (SRB) in microculture assay to measure cell growth [23]. The cell lines were cultured in RPMI-1640 (Sigma Chemical Co., Ltd., St. Louis, MO, USA), supplemented with 10% fetal bovine serum, 2 μ M L-glutamine, 100 IU/mL penicillin G, 100 μ g/mL streptomycin sulfate, and 0.25 μ g/mL amphotericin B (Gibco). They were maintained at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere with 95% humidity. For the assay, 5 \times 10⁴ cell/mL (K562), 10 \times 10⁴ cell/well (HCT-15) and 7500 cell/mL (SKLU-1), and 100 μ L/well of these cells suspension were seeded in 96-well microtiter plates and incubated to allow the cell attachment. After 24 h, 100 μ L of each test compounds and positive substances were added to each well. Later 48 h, adherent cell cultures were fixed *in situ* by adding 50 μ L of cold 50% (wt/vol) trichloroacetic acid (TCA) and incubated for 60 min at 4 °C. The supernatant was discarded and the plates were washed three times with water and air-dried. Cultured fixed with TCA were stained for 30 min with 100 μ L of 0.4% SRB solution. Protein-bound dye was extracted with 10 μ M unbuffered tris base and the optical densities were read on an Ultra Microplate Reader (Elx 808, BIO-TEK Instruments, Inc.), with a test wavelength of 515 nm. Results were expressed as inhibitory concentration 50 (IC₅₀) values, they were calculated according to the protocol of Monks¹⁴ where a dose-response curve was plotted for each compound, and the concentration giving 50% inhibition (IC₅₀) was estimated from linear regression equations. The IC₅₀ values (mean \pm standard error) are shown in Table 1.

ACKNOWLEDGEMENTS

A. L. acknowledges the financial supports of CONACyT (scholarship 181999) and Dirección General de Estudios de Posgrado, UNAM. J. A. C. is grateful to Dirección General de Servicios de Cómputo Académico, UNAM for the allocation of CPU time. The authors thank María Teresa Ramírez-Apan, María Isabel Chávez, Eréndira García, Beatriz Quiroz-García, Luis Velasco, Javier Pérez Flores, and David Vázquez for technical assistance.

REFERENCES

1. J. J. Beck and Sh.-C. Chou, *J. Nat. Prod.*, 2007, **70**, 891; M. J. M. Gijbels, J. J. C. Scheffer, and A. B. Svendsen, *Riv. Ital. EPPOS*, 1979, **61**, 335.
2. E. Linares and R. A. Bye, *J. Ethnopharmacol.*, 1987, **19**, 153.
3. G. Delgado, R. G. Reza-Garduño, R. A. Toscano, R. A. Bye, and E. Linares, *Heterocycles*, 1988, **27**, 1305.
4. M. Y. Rios and G. Delgado, *Rev. Soc. Quím. Méx.*, 1999, **43**, 127.
5. B. Quiroz-García, S. Hernández-Ortega, O. Sterner, G. Delgado, *Tetrahedron*, 2004, **60**, 3681; M. Y. Rios, G. Delgado, and R. A. Toscano, *Tetrahedron*, 1998, **54**, 3355; Y. Ogawa, Y. Mori, M. Maruno, and T. Wakamatsu, *Heterocycles*, 1997, **45**, 1869; B. Quiroz-García, R. Figueroa, J. A. Cogordán, and G. Delgado, *Tetrahedron Lett.*, 2005, **46**, 3003.
6. S. Deng, S-N. Chen, P. Yao, D. Nikolic, R. B. Van Breemen, J. L. Bolton, H. H. S. Fong, N. R. Farnsworth, and G. F. Pauli, *J. Nat. Prod.*, 2006, **69**, 536.
7. L. S. Lim, P. Shen, Y. H. Gong, and E. L. Yong, *Phytochemistry*, 2006, **67**, 728.
8. S. Deng, S-N. Chen, J. Lu, Z. J. Wang, D. Nikolic, R. B. van Breemen, B. D. Santarsiero, A. Mesezar, H. H. S. Fong, N. R. Farnsworth, and G. F. Pauli, *Phytochem. Anal.*, 2006, **17**, 398.
9. B. Quiroz-García, L. Hernández, R. A. Toscano, O. Sterner, and Delgado, G. *Tetrahedron Lett.*, 2003, **44**, 2509.
10. J. E. Baldwin and M. J. Lusch, *Tetrahedron*, 1982, **38**, 2939.
11. R. Dennington II, T. Keith, and J. Millam, GaussView, Version 4.1, Semichem, Inc.; Shawnee Mission, KS. 2007.
12. Gaussian 03, Revision C 02, Gaussian, Inc.; Pittsburgh, P. A. 2004.
13. J. Tirado-Rives and W. L. Jorgensen, *J. Chem. Theory Comput.*, 2008, **4** (2), 297.
14. A. Monks, D. Scudiero, P. Skehan, R. Shoemaker, K. Paull, D. Vistica, C. Hose, J. Langley, P. Cronise, A. Vaigro-Wolff, M. Gray-Goodrich, H. Campbell, J. Mayo, and M. Boyd, *J. Natl. Cancer Inst.*, 1991, **83**, 757.

Phthalides and other constituents from *Ligusticum porteri* sedative and spasmolytic activities of some natural products and derivatives

Alejandra León^a, Rubén A. Toscano^a, Jaime Tortoriello^b and Guillermo Delgado^{a*}

5 ^aInstituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, Coyoacán 04510, México, D.F.; ^bCentro de Investigación Biomédica del Sur, Centro de Investigación de Plantas Medicinales, IMSS, Argentina No. 1, Xochitepec, Morelos 62790, México, D.F.

(Received 12 May 2010; final version received 11 September 2010)

10 The chemical constituents of the organic extracts from the rhizomes of *Ligusticum porteri* were isolated, characterised and identified as *Z*-ligustilide, *Z*-butylidenephthalide, diligustilide, tokinolide B, riligustilide, senkyunolides F and I, ferulic acid, among other known compounds. The preparation of 4,5-dehydrotokinolide B from tokinolide B is reported, and its structure confirmed by X-ray analysis. The sedative and spasmolytic activities of some of these natural products and derivatives were evaluated by applying them to *in vivo* and *in vitro* models. Several of these dimeric phthalides displayed sedative and spasmolytic properties that may correlate with some popular uses of *L. porteri*.

15
20 **Keywords:** *Ligusticum porteri*; phthalides; sedative activity; spasmolytic activity

1. Introduction

The rhizome of *Ligusticum porteri* (Umbelliferae) is representative of a complex of medicinal plants termed ‘chuchupate’, but recently more commonly referred to as ‘oshá’. Oshá is used traditionally by the Raramuri and Zuni communities in Northern Mexico and Southern United States for treatment of bronchitis, colic, ulcers, stomachaches and diarrhea, diabetes, tuberculosis, pneumonia, colds, sore throats and ritual-curing ceremonies (Bye & Linares, 1986; Linares & Bye, 1987). Previous studies reported the constituents of *L. porteri*, including alkylphthalides (e.g. *Z*-ligustilide (1), *Z*-butylidenephthalide (2)), dimeric phthalides (e.g. diligustilide (3), tokinolide B (4) and riligustilide (5)), phenolic constituents (e.g. ferulic acid (6) and isovanillin) and monoterpene hydrocarbons (Beck & Chou, 2007; Delgado, Reza-Garduño, Rios, & Del Rio, 1992; Delgado, Reza-Garduño, Toscano, Bye, & Linares, 1988). Furthermore, a broad diversity of bioactivities has been reported for some of these constituents (Beck & Chou, 2007; Lin, Chan, Chung, & Li, 2006). Herein, we report the chemical analysis of the organic extracts from the rhizome of

*Corresponding author. Email: delgado@servidor.unam.mx

2 A. León et al.

3 this species which led to the to the isolation of the above mentioned metabolites, in
4 addition to glyceride (7), senkyunolides I (8) and F (9), coniferyl ferulate (10),
5 acylglucosyl sterols (11, 12), β -sitosteryl β -D-glucopyranoside and sucrose.
6 Additionally, we report the chemical transformation of tokinolide B (4) to 4,5-
7 dehydrotokinolide B (13) (Lim, Shen, Gong, & Yong, 2006), whose structure was
8 confirmed by X-ray analysis. The sedative and spasmolytic activities of selected
9 compounds are also reported and these activities are in agreement with some of the
10 uses of this plant in traditional medicine.

45 2. Results and discussion

11 From the organic extracts of the rhizome of *L. porteri* were isolated *Z*-ligustilide (1)
12 (Mitsuhashi, Muramatsu, Nagai, Nakano, & Ueno, 1963; Mitsuhashi, Nagai, &
13 Muramatsu, 1960), *Z*-butylidenephthalide (2), diligustilide (3) (Kaouadji, De
14 Pachtere, Pouget, & Chulia, 1986), tokinolide B (4) (Tsuchida, Kobayashi,
15 Kaneko, & Mitsuhashi, 1987), riligustilide (5), glyceride (7) (Calvano, Palmisano,
16 & Zambonin, 2005; Yang & Heikki, 2006), ferulic acid (6), coniferyl ferulate (10)
17 (Tsuchida et al., 1987), senkyunolides I (8) and F (9) (Kobayashi, Fujita, &
18 Mitsuhashi, 1984), the acyl-glucosyl-sterols (11) and (12) (Ghosal, 1985; Greca,
19 Monaco, & Previtera, 1990), β -sitosteryl β -D-glucopyranoside (Greca et al., 1990)
20 and sucrose (Figure 1). The compounds were identified by direct comparison with
21 authentic samples. Several of the constituents that we isolated have not been
22 previously reported for this species, including compounds 7-9, β -sitosteryl β -D-
23 glucopyranoside and sucrose.

24 A recent preliminary report identified 4,5-dehydrotokinolide B (13) as a natural
25 product from the rhizomes of *Ligusticum chuanxiong*, but the authors reported that
26 an X-ray analysis of this substance was necessary to confirm the proposed structure
27 (Lim et al., 2006). In this study compound 13 was prepared by treating 4 (isolated
28 from *L. porteri*) with dichlorodicyanoquinone (DDQ) in toluene. The spectroscopic
29 and spectrometric data of 13 were consistent with those previously reported
30 (Lim et al., 2006). An X-ray analysis of 13 confirmed the structure and relative
31 stereochemistry proposed for this compound (Figure 2).

32 Previous reports indicated that some monomeric and dimeric phthalides
33 displayed different biological activities (Beck & Chou, 2007; Lin et al., 2006);
34 indeed, their sedative and anti-spasmodic activities are well recognised. In particular,
35 *Z*-ligustilide (1) and *Z*-butylidenephthalide (2) were tested as sedatives (Matsumoto
36 et al., 1998) and as relaxant agents (Ko, Liao, Shih, Lei, & Chen, 2002; Ko, Sheu,
37 Tzeng, & Chen, 1998). To further explore the potential sedative properties of the
38 components of *L. porteri*, and some associated derivatives, the bioactivities of several
39 compounds were investigated. It was found that the hypnotic time induced by
40 sodium pentobarbital in mice was increased significantly ($p < 0.05$) by pre-treatment
41 with 50 mg kg⁻¹ doses of *Z*-ligustilide (1), diligustilide (3), tokinolide B (4),
42 senkyunolide F (9), the diketodiacid of diligustilide (14) (Rios, Delgado, &
43 Toscano, 1998), demethylwallichilide (15), *rel*-(3'S)-(3',8')-dihydrodemethylwallichilide
44 (16) (Rios et al., 1998) and *rel*-(3'R)-3',8'-dihydrotokinolide B (17). All tested
45 compounds displayed activity since the hypnotic times, expressed as percentages,
46 were increased by 46.3, 24.6, 70.8, 34.6, 66.0, 52.3, 36.2 and 100% above baseline,

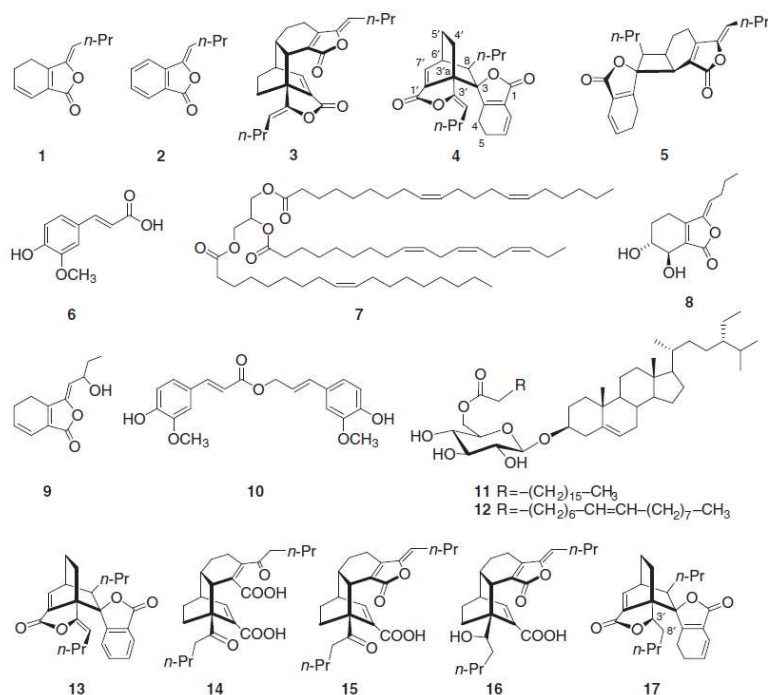


Figure 1. Molecular structures of the constituents isolated from the rhizomes of *L. porteri* and some chemical derivatives.

respectively. Table 1 shows the results expressed in minutes. The natural product 4 was highly active as sedative and its derivative 17 showed the highest activity among this group of substances, suggesting a major bioactivity for tokinolide-type compounds. The only difference between compounds 4 and 17 is lack of the double bond between positions C-3 and C-8. This observation is noteworthy owing to the report that the C-3, C-8 double bond has been implicated as one of the potential sites of bioactivity (Beck & Stermitz, 1995), and warrants further investigation.

Several compounds were tested for spasmolytic activity *in vitro* using guinea pig ileum preparations. Investigation determined that treatments ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$) with compounds 1, 4, 9 and 14 were able to inhibit the electrical contraction induced by the guinea pig ileum by 41.5, 22.4, 54.6 and 9.34%, respectively (Table 2). Within this series of compounds, 9 was the most effective, displaying 65% of the anti-spasmodic activity of the control compound papaverine. The spasmolytic activity found for the natural compounds 1, 4 and 9, although relatively weak (Table 2), may correlate with some of the uses of this plant in traditional folk medicine for the treatment of gastrointestinal ailments.

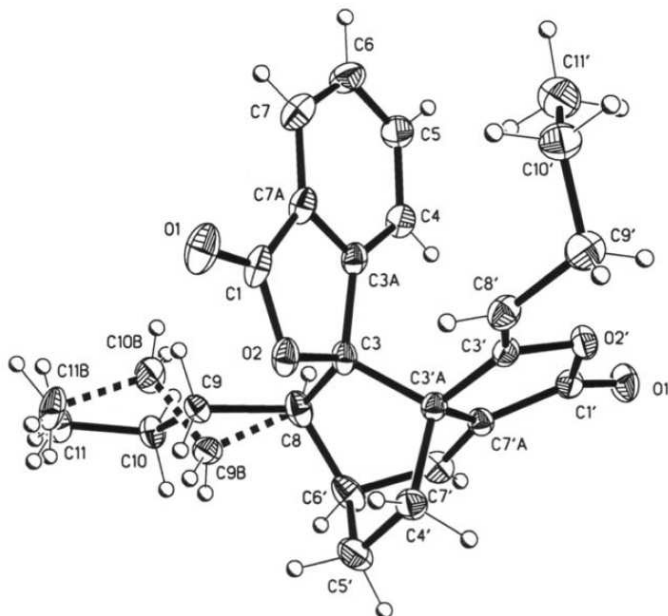
4 *A. León et al.*

Figure 2. ORTEP view of the X-ray diffraction structure of 4,5-dehydrotokinolide B (13).

Table 1. Effect produced by 50 mg kg⁻¹ *i.p.* of sodium pentobarbital in mice pre-treated with 50 mg kg⁻¹ of each pure substance.

Compound	Hypnotic time (min)
Control	22.66 ± 1.19
1	33.16 ± 2.33**
3	28.24 ± 3.34*
4	38.70 ± 1.68**
9	30.50 ± 3.57**
14	34.50 ± 2.95**
15	37.62 ± 5.85**
16	30.86 ± 5.10*
17	45.50 ± 2.59**

Notes: Results are mean ± SD of five observations.

p* < 0.05; *p* < 0.005 with Student's *t*-test.

3. Experimental

100 3.1. General procedures

Column chromatography (CC) was carried out on silica gel (70–230, 230–400 mesh and TLC grade; Merck®). Thin layer chromatography (TLC) analyses were made on

Table 2. Inhibition effect produced by different compounds ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$) and papaverine ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) on electrically induced contractions of guinea pig ileum *in vitro*.

Compound	Percentage of inhibition
1	41.48 ± 7.0
4	22.40 ± 3.4
9	54.59 ± 9.8
14	9.34 ± 5.9
Papaverine	82.8 ± 2.1

Note: Results are mean \pm SD of five observations.

105 aluminum silica gel 60 F₂₅₄ plates (Merck®) and visualisation was accomplished with
either a UV lamp or a solution of ammonium cerium sulphate. Melting points were
measured on a Fisher Johns apparatus and are uncorrected. Infrared spectra were
110 recorded with FT-IR Bruker Tensor 27 instrument. UV spectra were determined on a
Shimadzu UV160U Instrument. EIMS and HRMS (FAB⁺) were recorded on a
JEOL SX102A mass spectrometer. The ¹H- and ¹³C-NMR experiments were
performed at 25°C using Varian UnityPlus 500 spectrometer (at 500/125 MHz) and
Varian XR-300 (at 300/75 MHz), and the chemical shifts are expressed in parts per
million (δ) relative to trimethylsilane.

3.2. Plant material

115 The dried rhizomes of *L. porteri* were obtained in the Sonora market of Mexico City,
on August 1996. The identification was confirmed by morphological comparison
with specimens by Robert. A. Bye and Edelmira Linares, from Botanic Garden,
Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México (Voucher R.B. &
E.L. 14148).

3.3. Extraction and isolation

120 The dried rhizomes of *L. porteri* (5 kg) were cut into small pieces and extracted
consecutively three times with *n*-hexane, acetone and MeOH at room temperature.
The hexane extract was concentrated to give a residue (262 g), which was then
subjected to CC (SiO₂, gradient *n*-hexane/EtOAc) to give, in sequence of elution, **1** as
a yellow oil (32 g), fatty acids, **7** (300 mg), **4** (2.5 g), β -sitosterol (1.3 mg), stigmasterol
125 (1.5 mg), **3** (22.8 mg) and **5** (31 mg). The acetone extract (292 g) was separated by CC
(SiO₂, gradient *n*-hexane/EtOAc) affording **1** (16.5 g), **2** (8.1 g), **7** (120 mg), **4** (6.7 g),
3 (2.2 g), **9** (243.0 mg), **10** (75 mg), **6** (20 mg) and **8** (118 mg). The methanol extract
(190 g) was chromatographed on SiO₂ eluting with *n*-hexane/EtOAc and CHCl₃/
130 MeOH gradient elution system to afford in sequence of increasing polarity **7** (78 mg),
3 (1.2 g), **4** (400 mg), isovanillin (20 mg), 4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid (ferulic
acid (**6**), 939 mg), **11** and **12** (200 mg), β -sitosteryl β -D-glucopyranoside (200 mg) and
sucrose (30 mg).

6 A. León et al.

3.4. Preparation of 4,5-dehydrotokinolide B (13)

To a solution of tokinolide B (4, 66 mg, 0.17 mmol) in toluene (5 mL) was added *via* cannula a solution of DDQ (93.7 mg, 0.412 mmol) in toluene (5 mL) at room temperature and then refluxed 48 h under nitrogen. The reaction mixture was cooled at room temperature, diluted with EtOAc (10 mL), washed with NaHCO₃ (3 × 15 mL). The organic layer was washed with brine (2 × 10 mL), dried over Na₂SO₄ and concentrated under vacuum. The residue was purified by preparative TLC (toluene/CH₂Cl₂, 4:1, six times) to obtain compound 13 *R*_f: 0.56 (*n*-hexane/EtOAc, 7:3) (31.5 mg, 48%) whose physical and spectroscopic data are identical to those reported (Lim et al., 2006), and starting material 4 *R*_f: 0.55 (*n*-hexane/EtOAc, 7:3) (15 mg, 22.7%).

3.4.1. X-ray crystal structure determination of 13

All data were collected on Siemens P4/PC diffractometer using 2.11–25.00 θ at 293(2) K. The refinement methods was full-matrix least squares on F^2 (Figure 2).

3.5. Preparation of diketodiacid of diligustilide (14)

In accordance with the methodology described by Quiroz-García, Hernández, Toscano, Sterner, and Delgado (2003).

3.6. Preparation of demethylwallichilide (15)

Demethylwallichilide (15) was prepared in accordance with the procedure described by Rios et al. (1998).

3.7. Preparation of *rel*-(3'*S*)-(3',8')-dihydrodemethylwallichilide (16)

Rel-(3'*S*)-(3',8')-dihydrodemethylwallichilide was prepared in accordance with the methodology described by Rios et al. (1998).

3.8. Preparation of 3',8'-dihydrotokinolide B (17)

A solution of ketoacid of tokinolide B (Quiroz-García et al., 2003) (100 mg, 0.26 mmol) and CeCl₃ (150 mg, 0.6 mmol) in EtOH (8 mL) was stirred for 10 min and then NaBH₄ (10 mg, 0.26 mmol) was added. The reaction mixture was maintained at room temperature. After 16 h, TLC of the reaction showed only the starting material and then NaBH₄ (5 mg, 0.13 mmol) was added. After 2 h, the TLC analysis did not show any product, then was added *i*-propanol (3 mL) and an excess of NaBH₄ (10 mg, 0.27 mmol). The reaction mixture was stirred at room temperature. After 19 h TLC indicated the presence of a less polar compound. To the reaction mixture was added water (5 mL) and was extracted with EtOAc (3 × 20 mL). The organic layer was washed with brine, dried over Na₂SO₄ and concentrated under vacuum. The residue was purified by preparative TLC (*n*-hexane/acetone, 88:12, three times) to obtain compound 17 (16 mg, 16%) and starting material (ketoacid of tokinolide B; Quiroz-García et al., 2003; 40 mg, 40%).

3.8.1. *Physical, spectroscopic and spectrometric data of 17*

170 M.p. 136–141°C. UV (EtOH) λ_{\max} nm (log ϵ): 205 (3.61). IR (CHCl₃) ν_{\max} : 2962, 2934, 2875 and 1749/cm. ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, assignments by COSY, HSQC, HMBC, NOESY): δ 7.49 (1H, d, $J=6.0$ Hz, H-7'), 6.18 (1H, dt, $J=9.0$ Hz, H-7), 5.92–5.98 (1H, m, H-6), 4.36–4.31 (1H, m, H-3'), 3.04–3.03 (1H, m, H-6'). ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃, assignments by DEPT, HSQC, HMBC) 170.1 (C-1), 167.1 (C-1'), 162.7 (C-3a), 144.8 (C-7'), 135.2 (C-7'a), 129.5 (C-6), 116.5 (C-7), 89.6 (C-3), 89.0 (C-3'), 49.9 (C-3'a), 44.9 (C-8), 35.2 (C-6'), 29.6 (C-9), 29.3 (–CH₂), 28.7 (–CH₂), 27.3 (–CH₂), 22.6 (–CH₂), 22.2 (–CH₂), 21.4 (–CH₂), 20.9 (–CH₂), 17.4 (–CH₂), 14.0 (C-11), 13.6 (C-11'). EIMS m/z (%): 382 (5) [M⁺], 193 (100), 161 (20), 148 (50), 137 (5). HREIMS m/z 382.2142 (obs); Calcd for C₂₄H₃₀O₄ m/z 382.2144.

180 **3.9. Biological activity**3.9.1. *Animal*

Male albino mice (22.25–23.5 g body weight) were used for the *in vivo* experiments, grouped into five animals each, and for the effect on peristaltic reflex of guinea pig ileum, male guinea pigs (400–600 g body weight) were used.

185 3.9.2. *Effect on potentiation of sodium pentobarbital*

Following the method described by Tortoriello and Aguilar-Santamaria (1996), a control group was used, which was given the vehicle (250 μ L, tween 80 solution, 10%) using the intraperitoneal (i.p.) route, while other groups were treated with 50 mg kg⁻¹ of **1**, **3**, **4**, **9** and **14–17** by the same route. Sodium pentobarbital (50 mg kg⁻¹) was administered after 30 min. The loss of righting reflex was used to determine the beginning of hypnotic time, whereas the return of the righting reflex was used as an index of awakening. Mean hypnotic times of the treated groups were compared with the control by Student's 't'-test (Table 1).

195 3.9.3. *Effect on electrically induced contraction of guinea pig ileum*

In accordance with the methodology described by Lozoya, Becerril, and Martínez, 1990, the animals were sacrificed and the terminal ileum was then excised (10–12 cm), and a 3 cm portion was mounted in the intraluminal perfusion chamber and fixed with two electrodes attached to the ends. Tissue was maintained in 20 mL of Tyrode solution and bubbled with O₂ 95% and CO₂ 5% at 37°C. The same Tyrode solution was perfused intraluminally by the camera system. Preparations were allowed to stand for 30 min for stabilising. Muscle contractions were induced by applying electric pulses (20 V, 10 ms, 1 Hz, 5 s) every 3 min from a Phipps and Bird stimulator and recorded on a Grass polygraph model 79D equipped with a displacement transducer FTO3. After control responses were obtained, **1**, **4**, **9** and **14** dissolved in aqueous PVP solution (0.05 mg mL⁻¹) were directly applied to the incubation chamber. The ability of the substances to inhibit electrically-induced contraction was measured (Table 2).

8 A. León et al.

Supplementary material

CCDC-746173 contains the supplementary crystallographic data for this article.
210 These data can be obtained free of charge via http://www.ccdc.cam.ac.uk/data_request/cif

Acknowledgements

Financial support from CONACyT and DGEP-UNAM is gratefully acknowledged. We thank
215 Beatriz Quiroz-García, María Yolanda Ríos, María Isabel Chávez, Liliana Hernández, Luis Velasco, Javier Pérez Flores and Rocío Patiño for providing technical assistance. We also thank Robert Bye and Edelmira Linares for the identification of the plant material, and John J. Beck for providing interesting comments.

References

- 220 Beck, J.J., & Chou, S.-C. (2007). The structural diversity of phthalides from the Apiaceae.
Journal of Natural Products, 70, 891–900.
- Beck, J.J., & Stermitz, F.R. (1995). Addition of methyl thioglycolate and benzylamine to
(Z)-ligustilide, a bioactive unsaturated lactone constituent of several herbal medicines.
An improved synthesis of (Z)-ligustilide. *Journal of Natural Products*, 58, 1047–1055.
- 225 Bye, R.A., & Linares, E. (1986). Ethnobotanical notes from the valley of San Luis, Colorado.
Journal of Ethnobiology, 6, 289–306.
- Calvano, C., Palmisano, F., & Zambonin, C.G. (2005). Laser desorption/ionization time-
of-flight mass spectrometry of triacylglycerols in oils. *Rapid Communications in Mass
Spectroscopy*, 19, 1315–1320.
- 230 Delgado, G., Reza-Garduño, R.G., Ríos, Y., & Del Río, F. (1992). Phthalides and
monoterpenes of the hexane extract of the roots of *Ligusticum porteri*. *Planta Medica*,
58, 570–571.
- Delgado, G., Reza-Garduño, R.G., Toscano, R.A., Bye, R., & Linares, E. (1988). Secondary
metabolites from the roots of *Ligusticum porteri* (Umbelliferae). X-ray structure of
Z-6.6',7.3a'-diligustilide. *Heterocycles*, 27, 1305–1312.
- 235 Ghosal, S. (1985). Steryl glycosides from *Musa paradisiaca*. *Phytochemistry*, 24, 1807–1810.
- Greca, M.D., Monaco, P., & Previtera, L. (1990). Stigma sterols from *Typha latifolia*. *Journal
of Natural Products*, 53, 1430–1435.
- Kaouadji, M., De Pachtere, F., Pouget, C., & Chulia, A.J. (1986). Three additional phthalides
derivatives an epoxy monomer and two dimmers from *Ligusticum wallachii* rhizomes.
240 *Journal of Natural Products*, 49, 872–877.
- Ko, W.C., Liao, C.-C., Shih, C.-H., Lei, C.-B., & Chen, C.-M. (2002). Relaxant effects of
butylidenephthalide in isolated dog blood vessels. *Planta Medica*, 68, 1004–1009.
- Ko, W.-C., Sheu, J.-R., Tzeng, S.-H., & Chen, C.-M. (1998). The selective antianginal effect
without changing blood pressure of butylidenephthalide in conscious rats. *Planta
245 Medica*, 64, 229–232.
- Kobayashi, M., Fujita, M., & Mitsuhashi, H. (1984). Components of *Cnidium officinale*
Makino: occurrence of pregnolone, coniferyl ferulate, and hydroxyphthalides. *Chemical
& Pharmaceutical Bulletin*, 32, 3770–3773.
- 250 Kobayashi, M., Fujita, M., & Mitsuhashi, H. (1987). Studies on the constituents of
Umbelliferae plants XV. Constituents of *Cnidium officinale*: occurrence of pregneno-
lone, coniferyl ferulate and hydroxyphthalides. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 35,
1427–1433.

- Lim, L., Shen, S.P., Gong, Y.H., & Yong, E.L. (2006). Dimeric progestins from rhizomes of *Ligusticum chuanxiong*. *Phytochemistry*, *67*, 728–734.
- 255 Lin, G., Chan, S.S.-K., Chung, H.-S., & Li, S.-L. (2006). Chemistry and biological activities of naturally occurring phthalides. *Studies in Natural Products Chemistry*, *32*, 611–669.
- Linares, E., & Bye, R.A. (1987). A study of four medicinal plant complexes of Mexico and adjacent United States. *Journal of Ethnopharmacology*, *19*, 153–183.
- 260 Lozoya, X., Becerril, G., & Martínez, M. (1990). Intraluminal perfusion model *in vitro* guinea pig's ileum as a model of study of the antidiarrheic properties of the guava (*Psidium guajava*). *Archivos de investigación Médica*, *21*, 155–162.
- Matsumoto, K., Kohno, S.-Y., Ojima, K., Tezuka, Y., Kadota, S., & Watanabe, H. (1998). Effects of the methylenechloride-soluble fraction of Japanese *Angelica* root extract, ligustilide and butylidenephthalide, on pentobarbital sleep in group-housed and socially isolated mice. *Life Science*, *62*, 2073–2082.
- 265 Mitsuhashi, H., Muramatsu, T., Nagai, U., Nakano, T., & Ueno, K. (1963). Studies on the constituents of Umbelliferae plants. VIII. Distribution of alkyphthalides in Umbelliferae plants. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, *10*, 1317–1319.
- Mitsuhashi, H., Nagai, U., & Muramatsu, T. (1960). Constituents of Umbelliferae plants II. Isolation of the active principles of *Ligusticum* root. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, *8*, 243–245.
- 270 Rios, M.Y., Delgado, G.R., & Toscano, A. (1998). Relay synthesis of diligustilide, *rel*-(3'R)-3'-8'-dihydrodiligustilide and wallichilide. *Tetrahedron*, *54*, 3355–3366.
- 275 Tortoriello, J., & Aguilar-Santamaría, L. (1996). Evaluation of the calcium-antagonist, antidiarrhoeic and central nervous system activities of *Baccharis serraefolia*. *Journal of Ethnopharmacology*, *53*, 157–163.
- Tsuchida, T., Kobayashi, M., Kaneko, K., & Mitsuhashi, H. (1987). Studies on the constituents of Umbelliferae plants. XVI. Isolation and structures of three new ligustilide derivatives from *Angelica acutiloba*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, *35*, 4460–4464.
- 280 Quiroz-García, B., Hernández, L., Toscano, R.A., Sterner, O., & Delgado, G. (2003). Base-catalyzed intramolecular condensation of tokinolide B. *Tetrahedron Letters*, *44*, 2509–2512.
- 285 Yang, B., & Heikki, K. (2006). Analysis of triacylglycerols of seeds and berries of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) of different origins by mass spectrometry and tandem mass spectrometry. *Lipids*, *41*, 381–392.



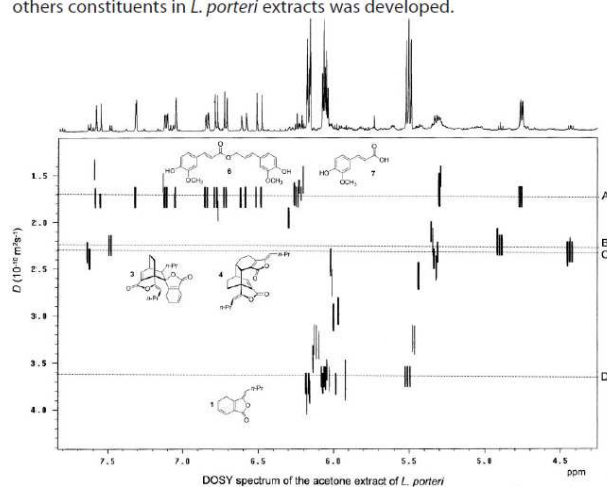
Research Article

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39

The presence of tokinolide B (**3**), diligustilide (**4**), riligustilide (**5**) and some additional constituents in the extracts from *Ligusticum porteri* rhizomes was established by NMR spectroscopy. DOSY experiment provided virtual separation and structural information for the natural products in an acetone extract. Complementary, a procedure for quantification by ^1H NMR of **3**, **4** and others constituents in *L. porteri* extracts was developed.

 ^1H and DOSY NMR spectroscopy analysis of *Ligusticum porteri* rhizome extracts 000

A. León, M. I. Chávez and G. Delgado*

40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78

●¹H and DOSY NMR spectroscopy analysis of *Ligusticum porteri* rhizome extracts

Alejandra León, María Isabel Chávez and Guillermo Delgado*

The presence of dimeric phthalides and other constituents in extracts of the vegetal species *Ligusticum porteri* was established by NMR spectroscopy. In comparative qualitative ¹H NMR analyses of acetone extracts of rhizomes from fresh and dried *L. porteri* samples, we found that the dimeric phthalides tokinolide B (3), diligustilide (4) and riligustilide (5) were naturally produced by the plant and not post-harvest products. We also obtained DOSY ¹H NMR data that provided both virtual separation and structural information for the phthalides present in a dry acetone extract of *L. porteri*. In addition, we developed a protocol for the quantification of dimeric phthalides, which is performed by calculating the relative ratio of the peak area of selected proton signals for some compounds with respect to the known signal of the internal standard, 4-dimethylaminopyridine. The protocol allows the rapid and direct quantification of dimeric phthalides and others constituents in fresh *L. porteri* rhizomes. Copyright © 2011 John Wiley & Sons, Ltd.

Keywords: NMR; DOSY NMR; ¹H; qNMR; quantification; *Ligusticum porteri*; dimeric phthalides; Z-ligustilide; tokinolide B; diligustilide; riligustilide; coniferyl ferulate

Introduction

The vegetal species *Ligusticum porteri* (Umbelliferae) is recognized by the biosynthesis of monomeric and dimeric phthalides including Z-ligustilide (1), Z-butylidenephthalide (2), tokinolide B (3), diligustilide (4) and riligustilide (5), as well as phenolic compounds, such as coniferyl ferulate (6), and ferulic acid (7) (Fig. 1).^[1] Bioactivities have been mainly attributed to just two phthalides, Z-ligustilide (1) and Z-butylidenephthalide (2). These compounds display anti-proliferative effects,^[2] anti-spasmodic^[3–5] and anticholinergic activity.^[6] In contrast, the 3,8-dihydro derivative of diligustilide (4) exhibits a potent progesterone-like activity, and progestogenic activity has been recognized for riligustilide (5),^[7] diligustilide (4), and some of its derivatives, such as the diketoaicid of diligustilide, demethylwallichilide, *rel*-(3'5)-(3',8')-dihydrodemethylwallichilide and tokinolide B (3), as well as its derivative *rel*-(3'R)-3',8'-dihydrotokinolide B increased the hypnotic effect of sodium pentobarbital as a sedative agent. In addition, tokinolide B (3) displays spasmolytic activity.^[8]

Examples of ethnomedical uses of *L. porteri* include tea made from the rhizomes to alleviate diarrhea and stomach aches, or to treat bronchitis, the common cold, tuberculosis, pneumonia and diabetes. In Northern Mexico, the plant is used in ritual curing ceremonies.^[9,10] Several publications have identified and quantified monomeric phthalides,^[11,12] and the determination of the dimeric phthalides in organic extracts has been performed by HPLC-DAD and HPLC-ESI-MS.^[13–15]

Here, we report a qualitative chemical analysis of an acetone extract from the rhizomes of this species using ¹H NMR to establish the presence of individual components. This analysis verified that the dimeric phthalides tokinolide B (3), diligustilide (4) and riligustilide (5) were natural products in the fresh *L. porteri* rhizomes. These results are in concordance with those reported by Li *et al.* for *Ligusticum chuanxiong* (Rhizoma Chuanxiong), which indicated that 3 and 5 are found in fresh herbs.^[16] We also report an alternative analytical DOSY NMR experiment^[17,18] that was

used to carry out a virtual separation (without physical separation) of some components in the acetone extract of the rhizomes of *L. porteri*, which aimed to determine the presence of the major dimeric phthalides, such as tokinolide B (3) and diligustilide (4). This experimental technique is a powerful tool for analyzing complex mixtures based on different translation diffusion coefficients, *D*, which depend on the effective molecular weight, size and shape of each compound. The DOSY spectrum is displayed with the ¹H NMR chemical shift on the horizontal axis and the derived diffusion coefficients on the vertical axis.

Finally, we developed a protocol for quantifying some constituents of *L. porteri*, which is performed by calculating the relative ratio of the peak area of the selected proton signals of some compounds with respect to the known signal of the internal standard, 4-dimethylaminopyridine. All these findings provide conclusive evidence of the existence of these compounds as natural products.

Results and Discussion

Chemical variation occurs in some constituents of *L. officinale* (syn: *Cnidium officinale*) during storage^[19] as well as in some taxonomically related plant material processed for preparations used in traditional Asian medicine. Variations in the chemical composition have also been detected by HPLC for *L. chuanxiong*.^[16] Other reports have identified variations by comparing the constituents of several umbelliferous drugs using TLC, HPLC and LC-MS.^[20] Thus, we performed a detailed ¹H NMR analysis on fresh

* Correspondence to: Guillermo Delgado, Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, Coyoacán 04510, México. E-mail: delgado@unam.mx

Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, Coyoacán, México, D.F. 04510, México

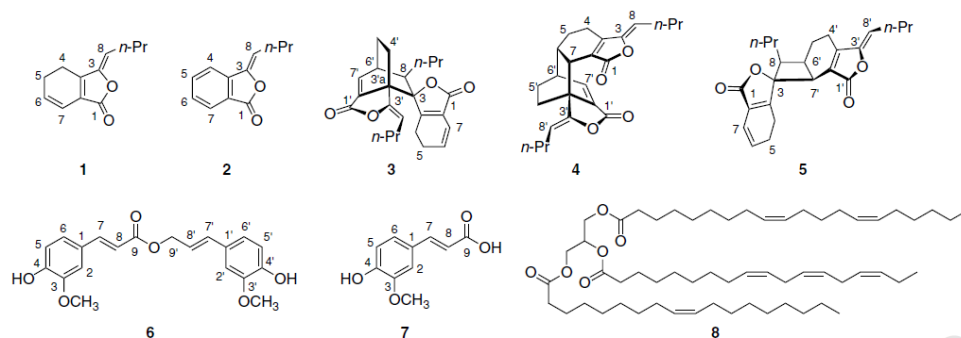


Figure 1. The chemical structures of *Z*-ligustilide (1), *Z*-butylidenephthalide (2), tokinolide B (3), diligustilide (4), riligustilide (5), coniferyl ferulate (6), ferulic acid (7) and triacylglyceride (8).

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42

acetone extracts of *L. porteri* to identify their major components, verifying the presence of the dimeric phthalides and establishing variations in the composition of the rhizome at different drying times. The assignments were made by comparisons with the spectra of authentic samples available in our laboratory. The trace in Fig. 2(a) shows the richness of the plant extract (of the fresh rhizomes) in the complexity of the profile. The spectrum was divided into four sections in order to facilitate signal assignment (Fig. 2(b)–(e)). The presence of *Z*-ligustilide (1) was confirmed by the signals in Fig. 2(c) at: δ 6.29 (dt, $J = 9.6, 2.1$ Hz, 1H, H-7), δ 6.00 (dt, $J = 9.7, 4.3$ Hz, 1H, H-6) and δ 5.22 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H, H-8); Fig. 2(d) at: δ 2.62–2.57 (m, 2H, H-4, H-5) and δ 2.38 (dd, $J = 15.2, 7.6$ Hz, 1H, H-9); and Fig. 2(e) at: δ 1.51 (q, $J = 7.4$ Hz, 1H, H-10) and δ 0.96 (t, $J = 7.4, 3$ Hz, H-11). The presence of coniferyl ferulate (6) was confirmed by the signals in Fig. 2(b) at: δ 7.65 (d, $J = 15.9$ Hz, 1H, H-7), δ 7.08 (dd, $J = 8.2, 1.9$ Hz, 1H, H-6), δ 7.04 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H, H-2), δ 6.94 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H, H-2'), δ 6.92 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, H-5', H-6'), δ 6.87 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, H-5) and δ 6.63 (d, $J = 15.8$ Hz, 1H, H-7'); Fig. 2(c), at: δ 6.33 (d, $J = 15.9$ Hz, 1H, H-8), δ 6.21 (dt, $J = 15.8, 6.6$ Hz, 1H, H-8') and δ 4.84 (dd, $J = 6.6, 1.2$ Hz, 1H, H-9'); and Fig. 2(d) at: δ 3.92 (s, 3H, –OMe) and δ 3.91 (s, 3H, –OMe). The presence of the triacyl glyceride **8** was verified by the signals in Fig. 2(c) at: δ 5.42–5.29 (m, H–C=C–H) and δ 4.32–4.11 (m, R–CH₂–OCOR); Fig. 2(d), at: δ 2.83–2.75 (m, C=C–CH₂–C=C); and Fig. 2(e) at: δ 1.25 (s, CH₂).

We compared the ¹H NMR spectrum profiles of the acetone extract of fresh rhizomes ($t = 0$, Fig. 4(a)) with those obtained after different drying periods (Fig. 4(b): 48 h, Fig. 4(c): 72 h, and Fig. 4(d): 96 h). We found that the profiles were not identical at times, establishing that the chemical composition of the rhizomes was slightly modified with drying. In particular, signals for ferulic acid (7, δ 7.70 (d, $J = 15.6$ Hz, 1H, H-7)) appeared and the signals for *Z*-butylidenephthalide (2, δ 7.89 (dt, $J = 1.0, 7.7$ Hz, 1H, H-7)) increased in the extracts of samples that were dried for longer times. This analysis also provided direct evidence for the decline of coniferylferulate (6) with drying. The lability of 6 in the production of ferulic acid (7), and the direct transformation of *Z*-ligustilide (1) to *Z*-butylidenephthalide (2) was previously documented.^[7,11,19]

Additional evidence for the presence of *Z*-butylidenephthalide (2), tokinolide B (3), diligustilide (4), coniferyl ferulate (6) and ferulic acid (7) in the acetone extract of dry rhizomes of *L. porteri* was obtained from DOSY NMR experiment. The spectrum (obtained

in DMSO, due to the better separation of the components in comparison with CDCl₃) revealed four main diffusion rate levels: A, B, C and D (Figs 5 and 6). Looking at the δ 7.00–4.3 region, the signals that appear with a diffusion coefficient of $1.75 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ (highlighted as level A), corresponds to a mixture of coniferyl ferulate (6) and ferulic acid (7). On the next levels, B and C, which occurred at a diffusion coefficient range of $2.20\text{--}2.45 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$, the most representative signals were found for diligustilide (4) (H-7' at δ 7.50, H-8 at δ 5.35 and H-8' at δ 4.90) and tokinolide B (3) (H-7' at δ 7.64 and H-8' at δ 4.45). This analysis corroborates the existence of the dimeric phthalides. Due to the low concentration of riligustilide (5), its separation was not possible by this method. The signals of the major compounds, which displayed a diffusion coefficient of $3.65 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ (level D), belong to the group of signals corresponding to the monomer *Z*-ligustilide (1).

Nuclear magnetic resonance spectroscopy offers several important advantages as technique for qualitative analysis, including (a) the easiness with which multicomponent mixtures can be analyzed, (b) the non-destructive nature of NMR, and (c) direct proportionality of the integrated resonance intensity and concentration of nuclei giving the resonance. Nevertheless, NMR has the disadvantage of inherently low sensitivity relative to other spectroscopic and chromatographic methods (NMR (LOD (mol): 10^{-9} to 10^{-11}), fluorescence (LOD (mol): 10^{-18} to 10^{-23}), mass spectrometry (LOD (mol): 10^{-13} to 10^{-21}), electrochemical (LOD (mol): 10^{-15} to 10^{-19}), radiochemical (LOD (mol): 10^{-14} to 10^{-19}) and UV–Vis absorbance (LOD (mol): 10^{-13} to 10^{-16})).^[21,22] However, the sensitivity of NMR instrumentation has increased over the past decade, so it is now possible to obtain ¹H spectra from nanomoles of material.^[22] HPLC-DAD-ESI-MS, HPLC-DA, HPLC-UV and HPLC-ESI-MS have been used for the quantification of phthalides,^[11–15] and HPLC with UV detection has been used for simultaneous analysis of these compounds,^[11] but it proves to be difficult to separate all components in a single run and some contaminations cannot be detected because they lack UV absorbance. The qNMR does not require chromatographic clean-up steps.

To solve the problems associated with these analytical techniques, and taking into account that the NMR spectroscopy has been shown to be a useful tool for quantifying single compounds in crude extracts,^[23] we proceeded to calculate the amount of dimeric phthalides present in acetone extracts from fresh *L. por-*

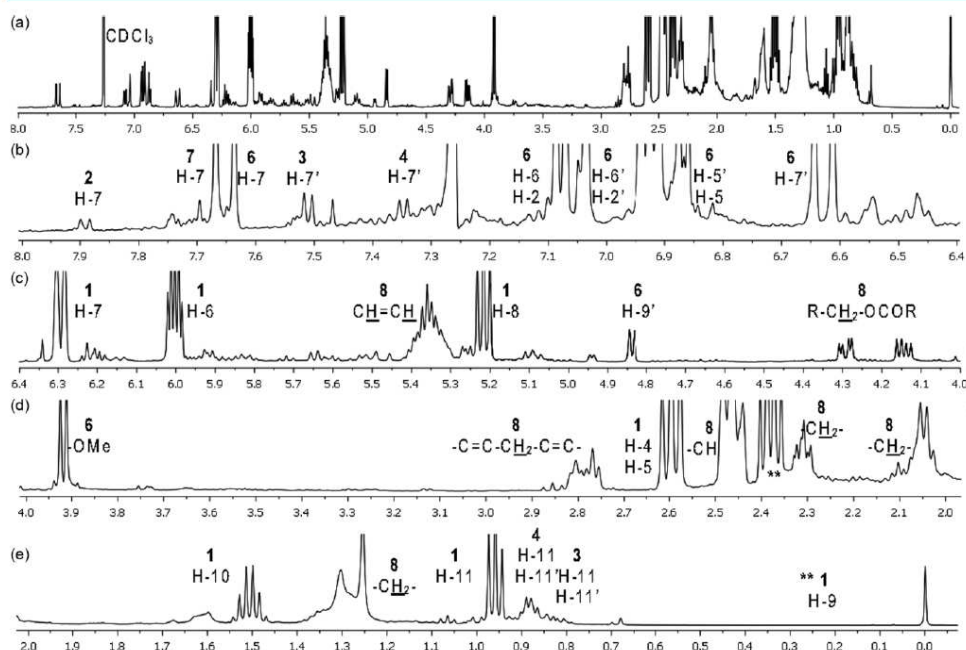


Figure 2. Complete ¹H NMR spectrum (500 MHz, CDCl₃, δ 8.00–0.00) of fresh rhizomes of *L. porteri* (a) and details of the spectrum: δ 8.00–6.40 (b); δ 6.40–4.00 (c); δ 4.00–2.00 (d); δ 2.00–0.00 (e). (1) Z-ligustilide, (2) Z-butylidenephthalide, (3) tokinolide B, (4) diligustilide, (6) coniferyl ferulate, (7) ferulic acid and (8) triacylglyceride. Pure samples of dimeric phthalides 3–5 from *L. porteri* displayed distinctive signals in the ¹H NMR spectra at δ 7.35 (d, *J* = 6.6 Hz, 1H, H-7'), δ 7.51 (d, *J* = 6.7 Hz, 1H, H-7') and δ 3.46 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, H-7') in CDCl₃, respectively, and at δ 7.64 (d, *J* = 6.7 Hz, 1H, H-7'), δ 7.50 (d, *J* = 6.6 Hz, 1H, H-7') and δ 3.61 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, H-7') in DMSO, respectively. These signals were clearly identified in the different expanded traces of the spectra for dry and fresh acetone extracts of the rhizomes (Fig. 3), providing direct evidence that the dimeric phthalides 3–5 exist as natural products.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25

teri specimens without the use of chromatographic separation. To achieve this aim, identifying the NMR signals of the individual dimers 3, 4 and 5, was necessary; the qualitative analysis of the whole acetone extract allowed the signals to be used in the quantification procedure and, consequently, the choice of internal standard. The signals selected to quantify each substance are shown in Fig. 3: for tokinolide B (3), δ 7.64 (d, *J* = 6.8 Hz, H-7', Fig. 3(b)); diligustilide (4), δ 7.50 (d, *J* = 6.6 Hz, H-7', Fig. 3(b)); and riligustilide (5), δ 3.61 (d, *J* = 6.6 Hz, H-7', Fig. 3(b)). Additionally, the proton signals H-6 (δ 6.06 (dt, *J* = 9.2, 4.7 Hz)), H-7 (δ 6.17 (dt, *J* = 9.6, 2.1 Hz)) and H-8 (δ 5.52 (d, *J* = 7.9 Hz)) for compound Z-ligustilide (1) were taken into account to ensure the quantification of this compound, and the ratio 1:1:1 was observed. The same procedure was done for H-7' and H-8' (δ 4.44 (dd, *J* = 9.3, 6.2 Hz)) of tokinolide B (3), for diligustilide (4) only H-7' was analyzed, for coniferyl ferulate (6) were considered H-7 (δ 7.57 (d, *J* = 15.9 Hz)), H-3 (δ 3.78 (s)) and H-3' (δ 3.80 (s)), and finally for Z-butylidenephthalide (2) H-7 (δ 7.98 (ddd, *J* = 8.0, 1.5, 0.5 Hz)) was the unique proton not overlapped. This selection was made by taking into consideration that all the signals were in a non-crowded region and well separated from one another. An internal standard was added in order to calculate the amount of the compound present in the extract by comparing the integral ratios. The ¹H NMR signal of 4-dimethylaminopyridine at δ 8.08 (d,

J = 5.5 Hz) does not overlap with any resonance signals of the extract to be quantified. This compound is soluble and stable in sample media, representing a good choice for this analysis.

For each pure dimer, five diluted solutions were prepared from the stock solution. The range of concentrations used for tokinolide B (3) was 0.0075–0.075 mM, 0.0068–0.068 mM for diligustilide (4) and 0.0094–0.094 mM for riligustilide (5). The spectra of each pure substance were obtained and the selected integral values plotted. The integration ratios were proportional to the amount of each compound and used to evaluate the linearity of the method. The linearity parameters (*R*²) for tokinolide B (3) were 0.9993, 0.9906 for diligustilide (4) and 0.9946 for riligustilide (5). The accuracy of the method was checked by adding known amounts of authentic compounds to the extract samples, with the peak areas corresponding to each constituent being studied increasing proportionally to the concentration of the added standard. For the evaluation of the robustness of the method, all important parameters of data acquisition, processing and evaluation of NMR (see Section on Experimental) were determined.^{22–24} The specificity and the selectivity of the method were established for each test substance by demonstrating the lack of interference among them, as well as from the internal standard and the solvent. The recovery of each dimeric phthalide was more than 95% with the used method (Table 1), indicating the accuracy of the

26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50

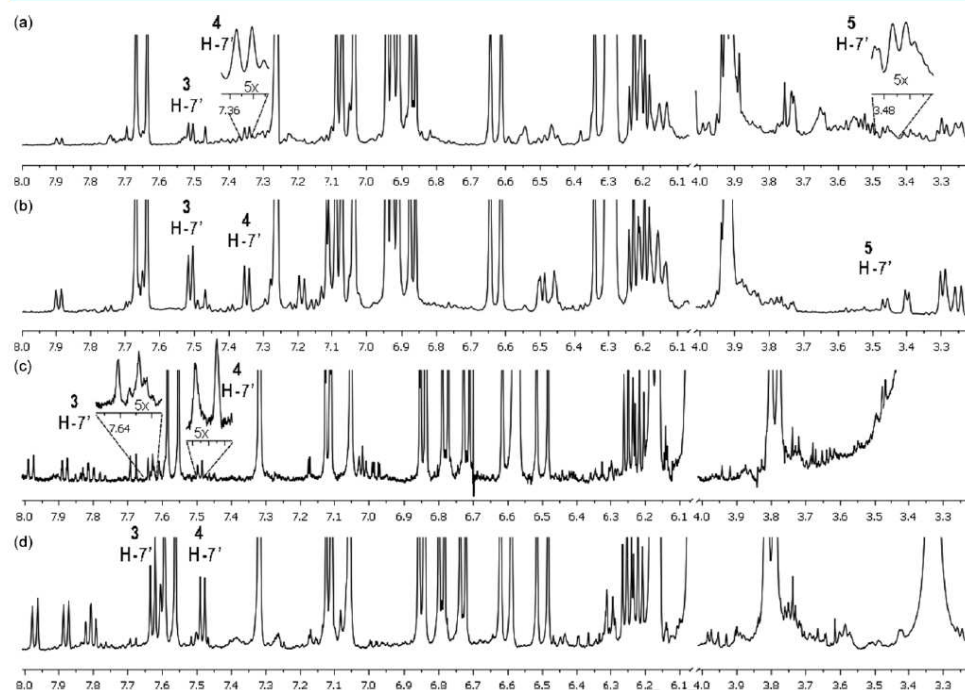


Figure 3. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) spectrum of the acetone extract of fresh rhizomes (a) and of dry rhizomes (b). ^1H NMR (500 MHz, d_6 -DMSO) spectrum of the acetone extract of fresh rhizomes (c) and of dry rhizomes (d). The insets are amplifications (5 \times) of distinctive signals of the dimeric phthalides tokinolide B (3), diligustilide (4) and riligustilide (5).

Tokinolide B (3) ^a	Diligustilide (4) ^b	Riligustilide (5) ^c
95.0 (± 9.2)	96.5 (± 2.0)	99.4 (± 0.7)

Each experiment was performed in triplicate. Standard deviations are given in parentheses.
^a 1.2 mg.
^b 1.35 mg.
^c 1.25 mg.

method.^[22–24] The repeatability of the method was demonstrated by determining the concentrations of 1, 3, 4 and 6 in three samples whose NMR profile remained unchanged during three consecutive days.

Once the methodology was validated, we analyzed the acetone extract of a fresh sample of *L. porteri* using ^1H NMR method developed in this study. Z-ligustilide (1) was a major component in the extract followed by coniferyl ferulate (7) and we could determine the percentage of the dimeric phthalides tokinolide B (3) and diligustilide (4) (Table 2). The low concentration of riligustilide (5) prevented its quantification in the acetone extract of the fresh sample of *L. porteri*.

Compound	Quantified by ^1H NMR (mg/12 mg extract)	Quantified by ^1H NMR in plant's rhizomes (mg/g wet weight)	Percentage in extract
1	2.087 \pm 0.054	0.345 \pm 0.009	17.21 \pm 0.40
2	0.018 \pm 0.005	0.003 \pm 0.001	0.15 \pm 0.04
3	0.044 \pm 0.005	0.007 \pm 0.001	0.36 \pm 0.04
4	0.042 \pm 0.004	0.007 \pm 0.001	0.35 \pm 0.03
6	0.518 \pm 0.012	0.086 \pm 0.002	4.30 \pm 0.08

^a Values shown are means (\pm standard deviation) based on triplicate measurements.

The qualitative analysis by ^1H NMR allowed identifying and assigning directly known compounds from extracts of *L. porteri*. Analysis of the ^1H NMR and DOSY spectra of extracts of the fresh and dry rhizomes of *L. porteri* confirmed that dimeric phthalides are natural products from this species and they are not formed as post-harvest compounds. Some variations on the composition of the extracts were observed after drying. The study showed the similarities of phenolic constituents and phthalides content between taxonomically related different species and genera, such

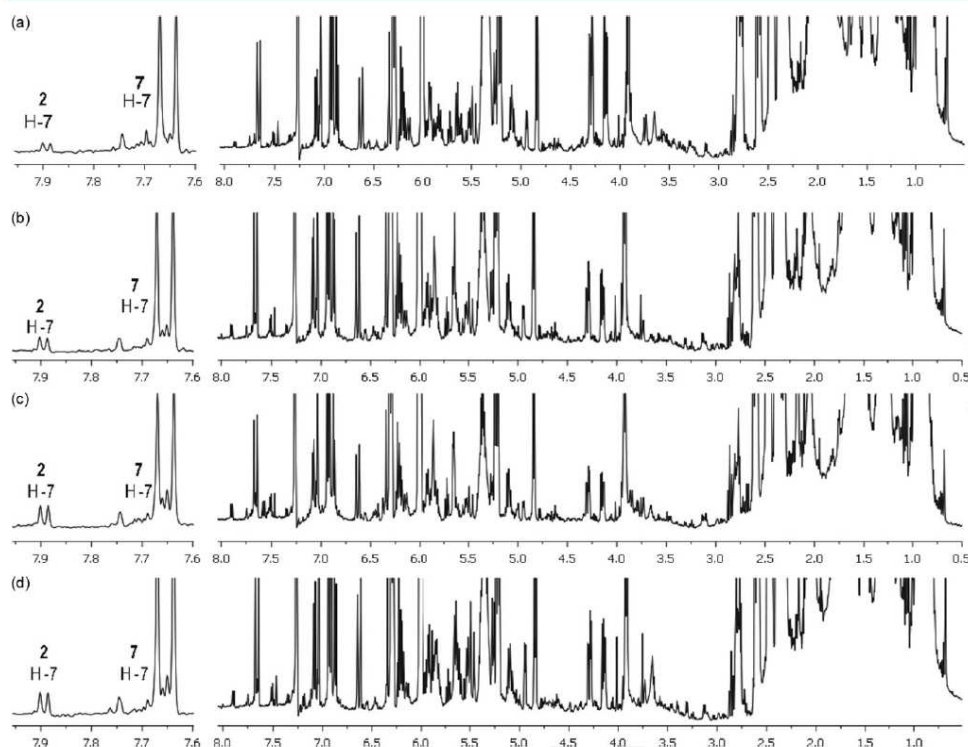


Figure 4. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) spectra of acetone extracts of fresh rhizomes, before (a) and after drying at 48 h (b), 72 h (c), 96 h (d). The left section indicates the signals for Z-butylidenephthalide (2) and ferulic acid (7).

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24

as *L. chuanxiang*, *L. officinalis* and *A. sinensis*.^[11,12,19] The results of the quantitative analysis developed in this study indicated that the method was selective, linear, accurate and precise in the range of concentrations tested and indicated that the method could be a valid procedure for other plant extracts and for analyzing mixtures of phthalides, considering that the proton signals are in a non-crowded region and well separated from one another.

Experimental

General

Column chromatography (CC) was carried out on silica gel (70–230 and 230–400 mesh). Thin-layer chromatography analyses were made on aluminum silica gel 60 F₂₅₄ plates (Merck®) and visualization was accomplished with either a UV lamp or a solution of ammonium cerium sulfate. The ¹H experiments were performed at 25 °C using Varian Inova 500 spectrometer (at 500 MHz), and the chemical shifts are expressed in parts per million (δ) relative to trimethylsilane. 4-Dimethylaminopyridine was purchased from Sigma–Aldrich (ReagentPlus®, 99%). Deuterated chloroform (CDCl₃, 99.8%) and deuterated DMSO-*d*₆ were obtained from

Aldrich and Cambridge. All organic solvents were of analytical grade.

Pure phthalides were previously isolated and identified by us.^[1,8] The following isolated compounds were used for the quantification: Z-ligustilide (1), Z-butylidenephthalide (2), tokinolide B (3), diligustilide (4) and coniferyl ferulate (7).

Plant material

Dry rhizomes of *L. porteri* were purchased in the Sonora Market (Mexico). Fresh rhizomes were obtained from a living specimen, grown from seeds collected in Chihuahua, Mexico, and cultivated at the Botanic Garden, Instituto de Biología, UNAM (Voucher R. B. 34467).

Extraction and isolation

The dried rhizomes of *L. porteri* (7.6 kg) were grounded and extracted three times with acetone at room temperature. The acetone extract (698.3 g) was subjected to repeated CC (SiO₂, gradient, *n*-hexane/EtOAc) to give 1 (129.3 g), 2 (1.23 g), 3 (2.96 g), 4 (2.54 g), 5 (340 mg), 6 (30.38 g) and 7 (199.8 mg).



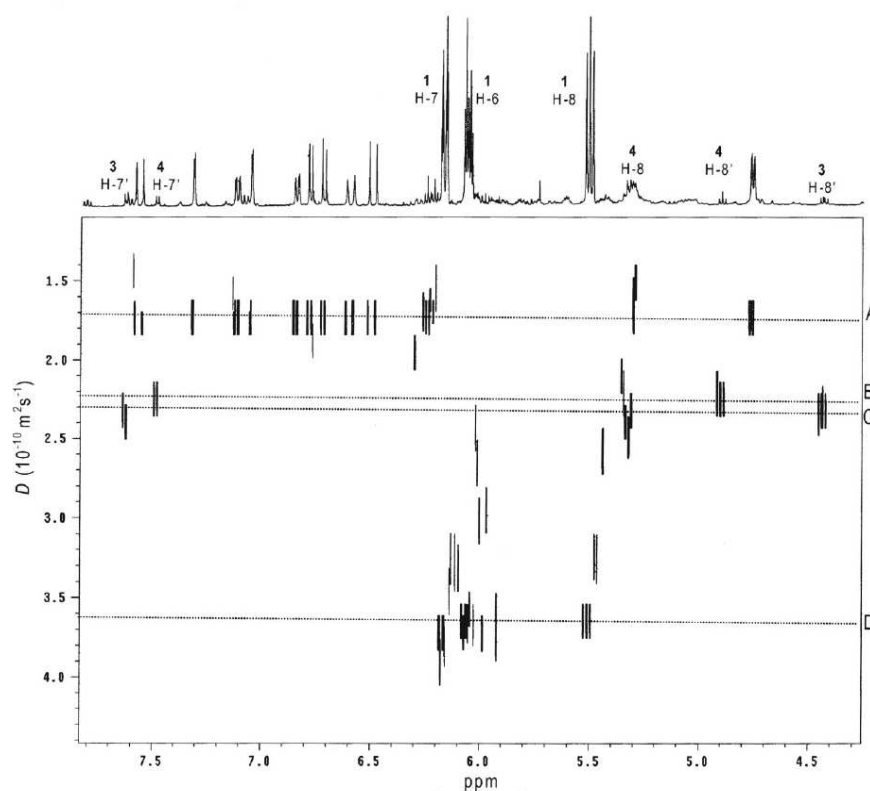


Figure 5. DOSY spectrum of the acetone extract of *L. porteri*. Groups of signals are observed in the levels marked A, B, C and D. The ^1H NMR spectrum of the acetone extract is shown at the top and assigned the signals for Z-ligustilide (1), tokinolide B (3) and diligustilide (4).

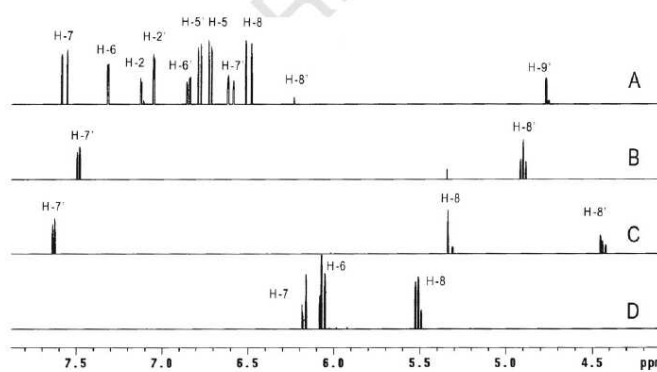


Figure 6. DOSY slice spectrum with different diffusion coefficients: level A ($1.75 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$), mixture of coniferyl ferulate (6) and ferulic acid (7); levels B and C ($2.20\text{--}2.45 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$) diligustilide (4) and tokinolide B (3), respectively, and level D ($3.65 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$) Z-ligustilide (1).

The ¹H NMR data in DMSO-*d*₆ for the compounds **3**, **4** and **5** have not been previously reported in the literature and are the following:

¹H NMR data of **3** (500 MHz, DMSO-*d*₆)

δ_{H} 7.64 (1H, d, *J* = 6.7 Hz, H-7'), 6.03 (1H, dt, *J* = 9.5, 1.9 Hz, H-7), 5.95 (1H, dt, *J* = 9.6, 4.5 Hz, H-6), 4.44 (1H, dd, *J* = 9.3, 6.2 Hz, H-8'), 3.11 (1H, dddd, *J* = 6.5, 4.5, 4.5, 2.2 Hz, H-6'), 2.50 (1H, q, *J* = 9.0 Hz, H-4'a), 2.27–2.20 (2H, m, H-5), 2.08 (1H, ddd, *J* = 7.0, 2.5, 2.5 Hz, H-4a), 1.97–1.91 (1H, m, H-9'a), 1.88 (1H, ddd, *J* = 7.0, 2.5, 2.5, H-4b), 1.84–1.78 (2H, m, H-5', H-9'b), 1.40–1.22 (4H, m, H-8, H-9a, H-10a, H-10'), 1.22–1.16 (2H, m, H-9b, H-5'b), 1.17–1.12 (1H, m, H-4'b), 1.11–1.02 (1H, m, H-10b), 0.82 (3H, t, *J* = 7.2 Hz, H-11), 0.74 (3H, t, *J* = 7.4 Hz, H-11').

¹H NMR data of **4** (500 MHz, DMSO-*d*₆)

δ 7.50 (1H, d, *J* = 6.5 Hz, H-7'), 5.35 (1H, t, *J* = 7.5 Hz, H-8), 4.90 (1H, t, *J* = 7.5 Hz, H-8'), 3.20 (1H, d, *J* = 8.5 Hz, H-7), 2.97–2.95 (1H, m, H-6'), 2.53–2.21 (2H, m, H-6a, H-6b), 2.20 (2H, q, *J* = 7.5 Hz, H-9), 2.11–2.05 (3H, m, H-4, H-4'a), 2.01 (2H, q, *J* = 7.5 Hz, H-9'), 1.96–1.80 (3H, m, H-5, H-4'b, H-5'), 1.4 (2H, q, *J* = 7.5 Hz, H-10'), 1.27 (2H, td, *J* = 12.1, 2.9 Hz, H-10'), 1.17–1.11 (2H, m, H-5'), 0.88 (3H, t, *J* = 7.0 Hz, H-11), 0.86 (3H, t, *J* = 7.0 Hz, H-11').

¹H NMR data of **5** (500 MHz, DMSO-*d*₆)

δ 6.03 (1H, dt, *J* = 10.0, 2.0 Hz, H-7), 5.95 (1H, dt, *J* = 9.5, 4.0 Hz, H-8), 5.51 (1H, t, *J* = 8.0 Hz, H-8'), 3.61 (1H, t, *J* = 7.0 Hz, H-7'), 3.06 (1H, q, *J* = 10.0 Hz, H-8), 2.76–2.64 (1H, m, H-4'), 2.62–2.54 (3H, m, H-5, H-6'), 2.49 (2H, dt, *J* = 3.6, 1.8 Hz, H-6'), 2.43 (2H, tdd, *J* = 10.6, 4.2, 2.0 Hz, H-9'), 2.25 (2H, dt, *J* = 10.1, 5.0 Hz, H-9), 2.0–1.94 (2H, m, *J* = 7.5 Hz, H-5'a), 1.78 (2H, ddd, *J* = 24.8, 12.0, 4.4 Hz, H-5'b), 1.45 (2H, dqd, *J* = 14.4, 7.3, 1.9 Hz, H-9), 1.39–1.26 (2H, m, H-4), 1.15–0.99 (4H, m, H-10, H-10'), 0.90 (3H, t, *J* = 7.5 Hz, H-11'), 0.80 (3H, t, *J* = 7.5 Hz, H-11).

Preparation of the extracts from *L. porteri* for ¹H NMR qualitative analysis

The specimen was grown from seeds collected in the town of Basigochi from Chihuahua State, Mexico. The rhizomes were cut and divided into four parts, in order to carry out the analysis at different periods of drying time. Part of this material (4 g) was extracted immediately (*t* = 0) with acetone (three times over 20 min at room temperature and concentrated at high vacuum) to obtain 10.2 mg extract. The remaining plant material was left to dry for 48, 72 and 96 h. The subsequent acetone extracts were prepared by using 750 mg of rhizomes, with the procedure described above, to obtain 4.3, 4.2 and 4.2 mg of extracts, respectively.

Preparation of the samples, ¹H NMR acquisition and processing data for qualitative analysis

The samples of the acetone extracts were prepared by dissolving 4 mg of the residue in 0.8 ml of CDCl₃. A total of 128 scans were collected over spectral width of 6999 Hz with a delay of 10 s and 30 pulse width of 2.7 μ s. Data processing and analysis of ¹H NMR spectra were performed using MestReNova v6.2.0-7163 program. A line broadening of 0.3 Hz was applied to the spectra Fourier transformation, phasing and baseline correction.

Preparation of the extracts from *L. porteri* for ¹H NMR quantitative analysis

The acetone extract (12 mg) from fresh plant, deuterated DMSO-*d*₆ (0.4 ml, using the DMSO-*d*₆ impurity in the deuterated DMSO solvent as the internal chemical shift reference) and 4-dimethylaminopyridine (1.0 mg as the internal standard) were transferred to 5-mm NMR tubes. The spectra were acquired using the standard s2pul sequence, a 30-pulse width of 3 μ s, a relaxation delay of 10 s, a spectral width of 6498.8 Hz and an acquisition time of 3 s in 38 992 data points. A total of 128 scans were recorded for each sample, yielding an analysis time of ca 28 min per sample.^[23] NMR files were processed and analyzed with the MestReNova v6.2.0-7163 program to determine the peak integrals.

Specificity, linearity, accuracy and reproducibility of the NMR method

The specificity of the method was established for each test substance by demonstrating the lack of interference among them, as well as from the internal standard and the solvent. The linearity of the method was evaluated by measuring the relationship between the NMR detector response and the sample concentration employing a regression analysis of the response data. Five samples containing 12.0 mg of the acetone extract of fresh plant, 1.0 mg of 4-dimethylaminopyridine and increasing amounts 2.0, 6.0, 10.0, 15 and 20 mg of tokinolide **3** (1.8, 4.6, 9.0, 13.5 and 18.0 mg of diligustilide (**4**) and 2.5, 7.5, 12.5, 18.75 and 25.0 mg of riligustilide (**5**) in 0.4 ml of deuterated DMSO-*d*₆ were prepared; after each addition of dimers, the ¹H NMR spectrum of the resulting sample was recorded in triplicate, after obtaining all 15 spectra, all validation parameters were obtained by analyzing the quantity of the representative components present in the acetone extract of the fresh rhizomes of *L. porteri*.

NMR for DOSY and qualitative analysis

The spectra were performed on a Varian Inova 500 spectrometer with a 5-mm z-gradient inverse probe; the resonance solvent DMSO-*d*₆ was used as the internal reference. The ¹H NMR spectrum was acquired with a spectral width of 6498.8 and 38 992 data points, acquisition time of 5 s, a 90 pulse width of 8.25 μ s and 128 transients.

DOSY NMR experiment was acquired using the diffusion bipolar pulse pair stimulated echo (DBPPSTE) method.^[17,25] The data were obtained with a diffusion delay of 170 ms, gradient pulse amplitudes ranging from 0.30 to 28 G cm⁻¹, during 3 ms a gradient of stabilization of delay of 300 ms. The processing program used the DOSY macro in a Varian Instrument.

Acknowledgements

Financial support from CONACyT and from Dirección General de Estudios de Posgrado is gratefully acknowledged. We thank Robert Bye and Edelmira Linares for the identification and providing the plant material.

References

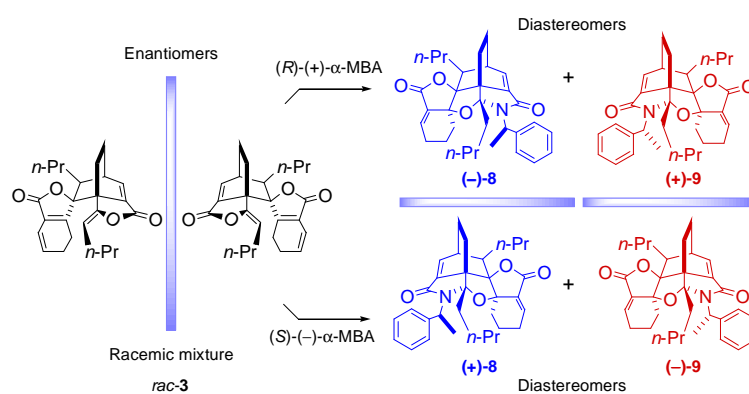
- [1] G. Delgado, R. G. Reza-Garduño, R. A. Toscano, E. Linares, *Heterocycles* **1988**, *27*, 1305. DOI: 10.3987/COM-87-4476.
- [2] S. Kobayashi, Y. Mimura, K. Notoya, I. Kimura, M. Kimura, *Jpn. J. Pharmacol.* **1992**, *60*, 397. DOI: 10.1254/jjp.60.397.

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11 AQ2
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100
101
102
103
104
105
106
107
108
109
110
111
112
113
114
115
116
117
118
119
120
121
122
123
124
- [3] M. J. Liang, L. C. He, G. D. Yang, *Life Sci.* **2005**, *78*, 128. DOI: 10.1016/j.lfs.2005.04.038.
- [4] Y. X. Cao, W. Zhang, J. Y. He, L. C. He, C. B. Xu, *Vasc. Pharmacol.* **2006**, *45*, 171. DOI: 10.1016/j.vph.2006.05.004.
- [5] J. R. Du, B. Bai, X. Kuang, Y. Yu, C. Y. Wang, Y. Ke, Y. J. Xu, A. H. Tzang, Z. M. Qian, *J. Ethnopharmacol.* **2006**, *108*, 54. DOI: 10.1016/j.jep.2006.04.011.
- [6] H. Mitsuhashi, U. Nagai, T. Muramatsu, H. Tashiro, *Chem. Pharm. Bull.* **1960**, *8*, 243.
- [7] L. S. Lim, P. Shen, Y. H. Gong, E. L. Yong, *Phytochemistry* **2006**, *67*, 728. DOI: 10.1016/j.phytochem.2006.01.024.
- [8] A. León, R. A. Toscano, J. Tortoriello, G. Delgado, *Nat. Prod. Res.* **2011**, (•in press).
- [9] E. Linares, R. A. Bye, *J. Ethnopharmacol.* **1987**, *19*, 153. DOI: 10.1016/0378-8741(87)90039-0.
- [10] R. A. Bye, E. Linares, *J. Ethnobiol.* **1986**, *6*, 289.
- [11] S. Zschocke, J.-H. Liu, H. Stuppner, R. Bauer, *Phytochem. Anal.* **1998**, *9*, 283. DOI: 10.1002/(SICI)1099-1565(199811/12)9:6<283::AID-PCA419>3.0.CO;2-9.
- [12] G.-H. Lu, K. Chan, C.-L. Chan, K. Leung, Z.-H. Jiang, Z.-Z. Zhao, *J. Chromatogr. A* **2004**, *1046*, 101. DOI: 10.1016/j.chroma.2004.06.083.
- [13] T. Yi, K. S.-Y. Leung, G.-H. Lu, K. Chan, H. Zhang, *Chem. Pharm. Bull.* **2006**, *54*, 255. DOI: 10.1248/cpb.54.255.
- [14] T. Yi, K. S.-Y. Leung, G.-H. Lu, H. Zhang, *Planta Med.* **2007**, *73*, 392. DOI: 10.1055/s-2007-967139.
- [15] R. Yan, S.-L. Li, H.-S. Chung, Y.-K. Tam, G. Lin, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2005**, *37*, 87. DOI: 10.1016/j.jpba.2004.09.054.
- [16] S.-L. Li, R. Yan, Y.-K. Tam, G. Lin, *Chem. Pharm. Bull.* **2007**, *55*, 140. DOI: 10.1248/cpb.55.140.
- [17] C. S. Johnson, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **1999**, *34*, 203. DOI: 10.1016/S0079-6565(99)00003-5.
- [18] G. A. Morris, in *Encyclopedia of Nuclear Magnetic Resonance, Advances in NMR*, vol. 2 (Eds: D. M. Grant, R. K. Harris), John Wiley & Sons Ltd: Chichester, **2002**, pp. 35.
- [19] M. Kobayashi, M. Fujita, H. Mitsuhashi, *Chem. Pharm. Bull.* **1987**, *35*, 1427.
- [20] H. Mitsuhashi, T. Maramatsu, U. Nagai, T. Nakano, K. Ueno, *Chem. Pharm. Bull.* **1963**, *11*, 1317.
- [21] M. E. Lacey, R. Subramanian, D. L. Olson, A. G. Webb, J. V. Sweedler, *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 3133. DOI: 10.1021/cr980140f.
- [22] D. L. Rabenstein, D. A. Keire, in *Modern NMR Techniques and Their Applications in Chemistry* (Eds: A. Popov, K. Hallenga), *Practical Spectroscopy Series*, Marcel Dekker **1990**, pp. 323.
- [23] G. F. Pauli, B. U. Jaki, D. C. Lankin, *J. Nat. Prod.* **2005**, *68*, 133. DOI: 10.1021/np0497301.
- [24] F. Malz, in *NMR Spectroscopy in Pharmaceutical Analysis*, (Eds: U. Holzgrabe, I. Wawer, B. Diehl), Elsevier: Oxford, UK, **2008**, pp. 45.
- [25] M. D. Pelta, H. Barjat, G. A. Morris, A. L. Davis, S. J. Hammond, *Magn. Reson. Chem.* **1998**, *36*, 706. DOI: 10.1002/(SICI)1097-58X(199810)OMR363>3.0.CO;2-W.

Enantiomeric derivatives of *rac*-tokinolide B: Absolute configurations and biological properties

Alejandra León, J. Antonio Cogordán, Olov Sterner, and Guillermo Delgado*

Reaction of the natural product *rac*-tokinolide B with the chiral amines (*R*)- and (*S*)-MBA afforded the cytotoxic enantiomeric lactams whose absolute configuration were assigned by experimental and theoretical circular dichroism.



Enantiomeric derivatives of *rac*-tokinolide B: Absolute configurations and biological properties

Alejandra León,^a J. Antonio Cogordán,^a Olov Sterner,^b and Guillermo Delgado^{*a}

Received (in XXX, XXX) Xth XXXXXXXXXX 20XX, Accepted Xth XXXXXXXXXX 20XX

DOI: 10.1039/b000000x

The enantiomeric lactams (–)-**8**, (+)-**8**, (+)-**9** and (–)-**9** were formed by the reaction under pressure of the dimeric phthalide *rac*-tokinolide B (*rac*-**3**) with the chiral amines (*R*)-(+)- α -methylbenzylamine and (*S*)-(–)- α -methylbenzylamine. The absolute configuration of compounds **8** and **9** were assigned by experimental (circular dichroism) and theoretical (simulation of the electronic circular dichroism spectra using 6-311G* approach) methods for (+)-**8** and (–)-**9**. Compounds *rac*-**3**, *rac*-**5**, (–)-**8**, (+)-**8**, (+)-**9** and (–)-**9** display cytotoxic activity towards several human tumor cell lines, (–)-**8** and (–)-**9** being the most potent.

Introduction

Natural phthalides are found in plants of the Umbelliferae family. The monomers *Z*-ligustilide (**1**) and *Z*-butylidenephthalide (**2**), as well as the dimers *rac*-tokinolide B (**3**), *rac*-diligustilide (**4**) and *rac*-riligustilide (**5**) have been isolated from *Ligusticum porteri*, the dimers^{1–4} being formed from **1** via $[\pi 4s + \pi 2s]$ and $[\pi 2s + \pi 2s]$ cycloadditions. These natural phthalides are interesting for their chemical behavior; previous studies have shown that the photochemical reaction of **1** gave *rac*-**5**,⁵ the relay synthesis of *rac*-**3**–*rac*-**5** have been studied,^{6,7} as well as the formation of linear dimers from **1**.⁸ Addition of methyl thioglycolate and benzylamine to *Z*-ligustilide (**1**) has established the electrophilic character of this monomer.⁹ Under basic conditions *rac*-**3** produced the pentacyclic compound cyclotokinolide B;¹⁰ whereas base catalyzed treatment of *rac*-**4** afforded products from intramolecular reactions.⁴ In Northern Mexico, the rhizomes of *L. porteri* are used by the Raramuri community for treating gastrointestinal disorders and for ritual curing ceremonies.^{11,12} *Z*-ligustilide (**1**) and *Z*-butylidenephthalide (**2**) have exhibited several bioactivities e.g. anti-platelet aggregation, anti-thrombosis, cardiac function modulation and smooth muscle relaxation,^{13–15} and the wide biological activities of dimeric phthalides have been well recognized.^{16,17} Considering the particular chemistry of the dimeric phthalides as well as their pharmacological activities, including the cytotoxic activities towards human cancer cell lines reported here, we were interested in preparing enantiomeric derivatives of *rac*-tokinolide B (*rac*-**3**) of known configuration that could be evaluated as cytotoxic agents.

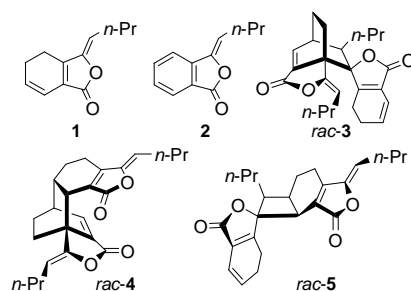
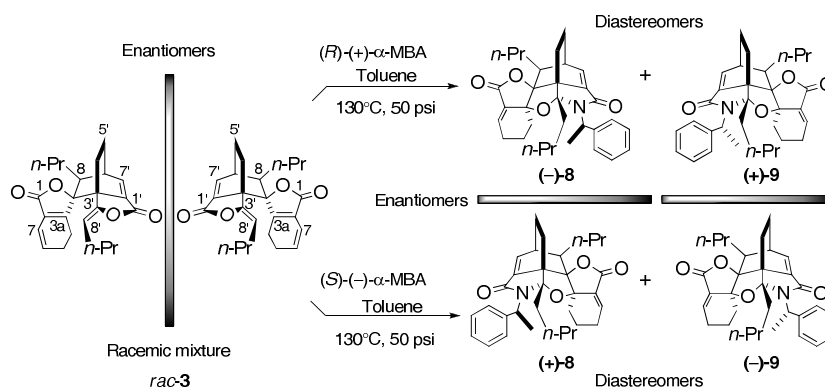


Figure 1. Representative monomeric and dimeric phthalides from *Ligusticum porteri*

Results and Discussion

Bearing in mind that *rac*-tokinolide B (*rac*-**3**) possesses different electrophilic sites, it was envisaged that treatment with an enantiomerically pure amine as nucleophile (such as (*R*)-(+)- α -methylbenzylamine) would afford a pair of diastereomeric addition products ((-)-**8** + (+)-**9**) that could be separated by conventional methods. Treatment of *rac*-**3** with the enantiomeric amine ((*S*)-(-)- α -methylbenzylamine) would produce another pair of diastereomers ((+)-**8** + (-)-**9**) derived from the addition reaction. The expected stereochemical relationships between the two pairs of products obtained by treatment of *rac*-**3** with (*R*)-(+)- α -methylbenzylamine and (*S*)-(-)- α -methylbenzylamine are shown in Scheme 1. The absolute configuration of the products could be determined by the application of chiroptical and theoretical methods, as previously reported for several natural compounds.¹⁸



Scheme 1. Stereochemical relationships of (-)-**8**, (+)-**8**, (+)-**9**, and (-)-**9**

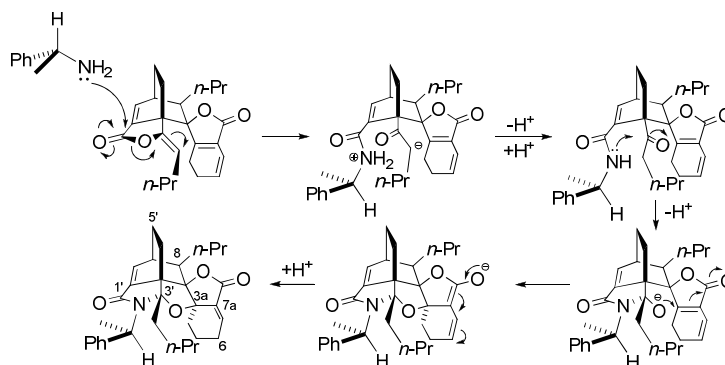
Treatment of *rac*-tokinolide B (*rac*-**3**) in toluene under pressure (50 psi) with (*R*)-(+)- α -methylbenzylamine afforded a pair of diastereomeric compounds: a levorotatory compound (-)-**8** (less polar product) and a dextrorotatory compound (+)-**9** (more polar product) as major and minor products, respectively. As anticipated, when (*S*)-(-)- α -methylbenzylamine was used as nucleophile under the same conditions, a dextrorotatory product (+)-**8** (less polar) and a levorotatory compound (-)-**9** (more polar) were obtained as minor and major products, respectively. These stereochemical relationships were confirmed by the identity of the spectroscopic properties of (-)-**8** and (+)-**8**, and those of (+)-**9** and (-)-**9**, by the specific optical rotations and by the CD curves (see below and experimental).

The products (-)-**8**, (+)-**8**, (+)-**9**, and (-)-**9** (Scheme 1) were stereoisomeric ($C_{32}H_{39}O_4N$) and derived from the addition of the amine ($C_8H_{11}N$) to the starting material ($C_{24}H_{28}O_4$), according to their molecular formulas established by FABHRMS. The presence of (a) a γ -lactam conjugated with an endocyclic trisubstituted double bond (1685 cm^{-1} for (-)-**8** and (+)-**8**; 1689 cm^{-1} for (+)-**9** and (-)-**9**); (b) a tetrahydrofuran ring (δ_C 85.22, C-3a (see Scheme 1 for numbering) for (-)-**8** and (+)-**8**; δ_C 84.94, C-3a for (+)-**9** and (-)-**9**); (c) a quaternary carbon linked to an oxygen and a nitrogen (δ_C 101.84, C-3' for (-)-**8** and (+)-**8**; δ_C 101.51, C-3' for (+)-**9** and (-)-**9**) and (d) a γ -lactone conjugated with an exocyclic trisubstituted double bond (δ_C 168.18, C-1 and δ_H 6.87, H-7 for (-)-**8** and (+)-**8**; δ_C 168.03, C-1 and δ_H 6.98, H-7 for (+)-**9** and (-)-**9**) established the heptacyclic nature and the molecular connectivity of the stereoisomeric structures.

All carbon signals (32) and hydrogen signals (39) were assigned in the ^{13}C and 1H NMR spectra (by DEPT, HMQC, HMBC, NOESY experiments) confirming the proposed structures.¹⁹

The mechanism which explains the formation of the resulting lactam (illustrated for one of the

products in Scheme 2), starts with a nucleophilic attack by the chiral amine on the carbonyl group of the enolic lactone (C-1') to form a keto amide, followed by an attack by the amide nitrogen on the keto group (C-3') (via 5-*exo*-trigonal cyclization²⁰) followed by a Michael addition of the oxyanion to the C-3a/C-7a double bond, producing an ether bridge via a second 5-*exo*-trigonal cyclization. Subsequent equilibration afforded the products (Schemes 1 and 2). Interestingly, the transformation does not proceed at room temperature or reflux at normal pressure.



Scheme 2. Suggested mechanism for the formation of the stereoisomeric compounds **8** and **9** from *rac*-**3**

The absolute configurations of compounds (–)-**8**, (+)-**8**, (+)-**9**, and (–)-**9** were established by analysis of the circular dichroism curves (CD) with the aid of exciton chirality method which predicts that when two (or more) chromophores exhibiting strong $\pi \rightarrow \pi^*$ interactions are located in chiral positions with respect to each other, the orientation between the chromophores will determine the sign of the longer wavelength CD extremum and it is then in agreement with the sense of handedness of the interacting transition moments.^{21–23} The products derived from the reaction with (*R*)-(+)- α -methylbenzylamine are shown in Figures 2 and 3. Accordingly, the CD spectrum of the levorotatory compound obtained with (*R*)-(+)- α -methylbenzylamine (less polar and major product) exhibited two Cotton effects of opposite signs in the region of the intramolecular charge transfer transition; the first positive Cotton effect at longer wavelength has a value of 246 nm ($\Delta\epsilon$ +9.11), while the second Cotton effect at shorter wavelength has a value of 224 nm ($\Delta\epsilon$ –20.29) due to exciton coupling between the two different chromophores: the α,β -unsaturated γ -lactone and the α,β -unsaturated γ -lactam, respectively, indicating that the transition dipole moments of the two chromophores were oriented in a clockwise manner. For illustrative purposes the Newman projection of the structure (shown in Figure 2A) can be considered through the C-8/C-6' σ bond (Figure 2B), which clearly shows the clockwise orientation of the two chromophores defining a positive chirality (Figure 2C). This representation can be simplified as shown in Figure 2D. The absolute sense of twist is of course the same whether viewed from C-6' to C-8 or from the opposite direction, leading to the assignment of the absolute configuration 3*S*, 3a*S*, 8*S*, 3'*R*, 3'a*S*, 6'*R*, 2''*R* for compound 2A (structure (–)-**8**, Scheme 2).

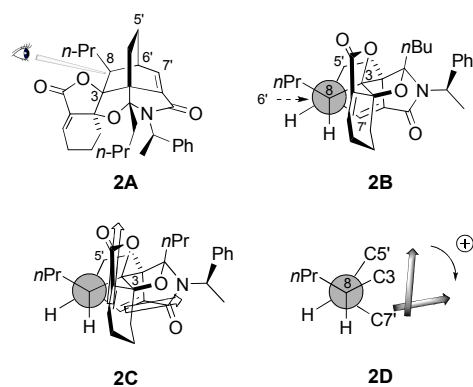


Figure 2. Representations of the orientation of the chromophoric groups to define the chirality of (-)-**8**

(+)-**9**, the minor product obtained from the reaction with (*R*)-(+)- α -methylbenzylamine (more polar product, shown in Figure 3A), displays a negative Cotton effect which can be explained considering the Newman projections through the C–8/C–6' σ bond (Figures 3B and 3C). The arrangement of the chromophores determines a left exciton chirality (245 nm ($\Delta\epsilon$ -7.89), 223 nm $\Delta\epsilon$ $+12.62$, Figures 3C and 3D), confirming structure 3A for (+)-**9**, allowing the assignment of 3*R*, 3*aR*, 8*R*, 3'*S*, 3'*aR*, 6'*S*, 2''*R* as its absolute configuration.

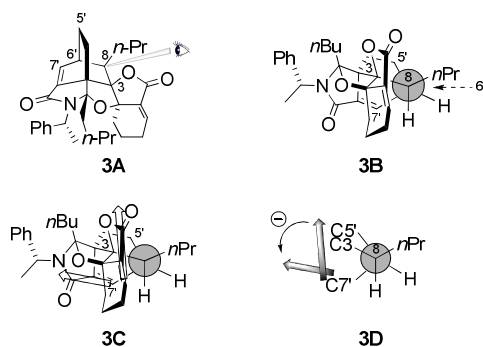


Figure 3. Representations of the orientation of the chromophoric groups to define the chirality of (+)-**9**

On the other hand, the products obtained from the reaction with (*S*)-(–)- α -methylbenzylamine showed Cotton effects of opposite signs compared with (–)-**8** and (+)-**9**: 245 nm ($\Delta\epsilon$ -39.65), 224 nm ($\Delta\epsilon$ $+90.08$) for the negative chirality establishing the absolute configuration 3*R*, 3*aR*, 8*R*, 3'*S*, 3'*aR*, 6'*S*, 2''*S* for (+)-**8**, and 245 nm ($\Delta\epsilon$ $+34.43$), 223 nm ($\Delta\epsilon$ -57.65) for the positive chirality establishing the absolute configuration 3*S*, 3*aS*, 8*S*, 3'*R*, 3'*aS*, 6'*R*, 2''*S* for (–)-**9**, respectively. The absolute configurations for all enantiomers are shown in Scheme 1.

The absolute configuration proposed by the experimental data was confirmed by the calculated ECD spectra of the optimized structures of (+)-**8** and (–)-**9** (see Electronic Supplementary Information).

Following the computational details described in the experimental section, rotatory strengths were calculated for the velocity and length formalism,^{24–26} and the computed data were used to reproduce the experimental ECD spectra. The two Cotton effects for both compounds (+)-**8** and (–)-**9** are in agreement with the experimental data (Figure 4). The computed ECD spectra of (+)-**8** and (–)-**9** exhibit the characteristic exciton-split CD curves due to the dipole-electric dipole interaction of the

α,β -unsaturated γ -lactone and the α,β -unsaturated γ -lactam chromophores. This exciton splitting could be attributed to the $\pi\rightarrow\pi^*$ transitions of the interacting electric transition moments of the chromophores of both molecules. The first positive Cotton effect and the second negative effect, and the first negative Cotton effect followed by a second positive Cotton effect of the theoretically computed ECD spectra of (+)-**8** and (-)-**9**, respectively, are consequently in complete agreement with the experimental CD curves.

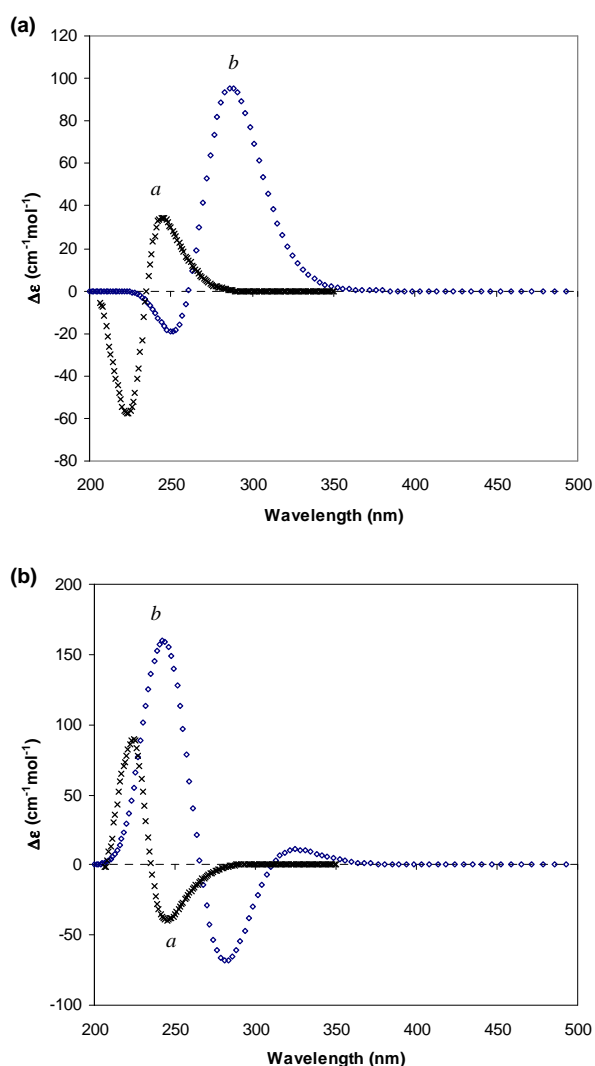


Figure 4. Comparison between the experimental (a. black \times line) and the theoretical CD spectra (b. blue \diamond line) of (a) (+)-**8** and (b) (-)-**9**, respectively.

Encouraged by the previously reported biological activities of the natural phthalides, and taking into consideration their pharmacological importance, it was decided to investigate the cytotoxic activity of these enantiomerically pure compounds towards three human cancer cell lines, following standard protocols.²⁷ The IC_{50} values determined are shown in Table 1 and all the compounds displayed activity. The two pairs of enantiomers (-)-**8**/(+)-**8** and (+)-**9**/(-)-**9** are more potent compared with *rac*-**3** and *rac*-**5**, although less potent compared to the positive control (helenalin).

Moreover, it was observed that compounds (–)-**8** and (–)-**9** were significantly more active than their enantiomers (+)-**8** and (+)-**9** in the cell lines K562 and HCT-15. This suggests that the compounds exert their cytotoxic effect by interacting with a chiral target, and other derivatives of **8** and **9** would possibly shed light on this. For the SKLU-1 cell line only small differences between the enantiomers are noted.

Table 1. Evaluation of the IC₅₀ (µM) of the natural products and derivatives of *L. porteri*

Compound	K562 ^a	HCT-15 ^b	SKLU-1 ^c
<i>rac</i> - 3	26.6 ± 1.4	10.5 ± 0.9	7.1 ± 0.6
<i>rac</i> - 5	46.1 ± 3.8	44.8 ± 1.3	13.2 ± 1.3
(–)- 8	5.7 ± 0.9	5.4 ± 0.5	4.1 ± 0.1
(+)- 9	21.7 ± 1.3	8.5 ± 0.6	5.9 ± 0.5
(+)- 8	13.9 ± 1.6	7.5 ± 0.5	4.9 ± 0.3
(–)- 9	5.2 ± 0.3	5.2 ± 0.2	4.3 ± 0.4

^aLeukaemia, ^bcolon, ^clung. The positive control (helenalin), showed IC₅₀ = 0.28 ± 0.02, 0.29 ± 0.02 and 0.21 ± 0.02 µM against K562, HCT-15 and SKLU-1, respectively. Results are means ± SEM.

Conclusions

The reaction between the racemic mixture *rac*-tokinolide B (*rac*-**3**) and (*R*)-(+)- α -methylbenzylamine, as well as (*S*)-(–)- α -methylbenzylamine, yielded two pairs of enantiomers, (–/+)-**8** and (–/+)-**9**, derived from the intramolecular cyclizations of the dimeric phthalides. The circular dichroism method and its rules together with the exciton chirality method was used to determine the absolute configurations of (–)-**8**, (+)-**8**, (–)-**9** and (+)-**9**. The theoretical ECD simulation by 6-311G** of (+)-**8** and (–)-**9**, respectively showed that the Cotton effects are due to the dipole-electric dipole interaction of the γ -lactam and the γ -lactone chromophores, and are in agreement with the experimental spectra. The four enantiomers prepared are more potent towards three human cancer cell lines compared to the natural products *rac*-**3** and *rac*-**5**, and (–)-**8** and (–)-**9** are, in general, more potent compared to their antipodes.

Experimental Section

Rac-tokinolide B (*rac*-**3**) was isolated from the acetonetic extract of the rhizomes of *Ligusticum porteri* by repeated column chromatography,³ carried out on silica gel (230–400 mesh, Merck®). Preparative TLC separations were performed on glass-coated (2 mm thickness) 20 × 20 cm plates (Merck®). Thin layer chromatography analyses were made on aluminum-backed silica gel 60 F254 plates (0.20 mm thickness) plates (Merck®) and visualization of chromatograms were first visualized under UV lamp and then with solution of ammonium cerium sulfate, followed by drying and gentle heating. Melting points were measured on a Fisher Johns apparatus and are uncorrected. Infrared spectra were recorded with FTIR Bruker TENSOR 27 instrument. Ultraviolet spectra were determined on a SHIMADZU UV160U Instrument. The optical rotation was measured in MeOH using a Perkin-Elmer 341 polarimeter. The ¹H and ¹³C NMR experiments were performed at 25 °C using Varian UnityPlus 500 spectrometer (at 500/125 MHz) and Varian XR-300 (at 300/75 MHz); the spectra were recorded in CDCl₃ and the solvent residual signals (7.26 and 77.0 ppm, for ¹H and ¹³C NMR, respectively) as reference. The chemical shifts (δ) are expressed in parts per million relative to tetramethylsilane, and the coupling constants (*J*) in Hz. EIMS and HRMS (FAB+) spectra were recorded on a JEOL SX102A mass spectrometer, and the accurate mass was calculated using polyethylene glycol 400 as standard.

Derivatization of *rac*-tokinolide B (*rac*-3) with (*R*)-(+)- α -methylbenzylamine

To a solution of *rac*-tokinolide B (*rac*-3, 100.8 mg, 0.26 mmol) in anhydrous toluene (5 mL) placed in a stainless steel reactor (100 mL) was added (*R*)-(+)- α -methylbenzylamine (0.06 mL, 57.12 mg, 0.47 mmol) under nitrogen atmosphere. The reactor was sealed and heated (130 °C) for 20 h (pressure: 50 psi). After cooling to room temperature, the reaction mixture was concentrated at reduced pressure. EtOAc (10 mL) was added, the organic phase was washed with HCl (10%) which subsequently was extracted with EtOAc (3 \times 10 mL). The combined organic layer was washed with brine, dried with Na₂SO₄ and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography (*n*-hexane/EtOAc, gradient) to afford two products (76.6 mg, 70.2%).

(-)-**8** (44.6 mg, 40.9%) as a pale oil; *R*_f 0.47 (*n*-hexane/EtOAc, 65:35); [α]_D²⁵ -54.8 (*c* 1.35 \times 10⁻³ in MeOH); IR (CHCl₃) ν_{\max} /cm⁻¹ 3349, 3061, 2959, 2872, 1766, 1689, 1494, 1454, 1351, 1214, 1166, 1037, 924, 752; UV λ_{\max} (MeOH)/nm 211 (ϵ /dm³ mol⁻¹ cm⁻¹ 25 119); CD (*c* 9.6 \times 10⁻⁶ in MeOH)/nm: 246 ($\Delta\epsilon$ +9.11), 224 ($\Delta\epsilon$ -20.29); ¹H NMR δ_{H} (500 MHz, CDCl₃; assignments by COSY, NOESY and HMQC) 7.58 (2 H, dd, *J* = 8.5, 1.5 Hz, 4''-H, 8''-H), 7.27 (2 H, ddd, *J* = 8.5, 7.5, 1.5 Hz, 5''-H, 7''-H), 7.20 (1 H, dddd, *J* = 8.5, 7.5, 1.5, 1.5, 6''-H), 7.15 (1 H, d, *J* = 6.5 Hz, 7'-H), 6.87 (1 H, dd, *J* = 7.0, 4.0 Hz, 7-H), 4.85 (1 H, q, *J* = 7.0 Hz, 2''-H), 2.90 (1 H, dddd, *J* = 10.5, 6.5, 4.0, 4.0 Hz, 6'-H), 2.42 (1 H, ddd, *J* = 9.5, 7.0, 2.0 Hz, 4'a-H), 2.20 (1 H, dt, *J* = 10.5, 4.5 Hz, 6a-H), 1.98-1.92 (3 H, m, 6b-H, 5'a-H, 8'a-H), 1.90 (1 H, d, *J* = 7.5 Hz, 9''-H), 1.76 (1 H, ddd, *J* = 9.5, 6.0, 6.0 Hz, 8'b-H), 1.59 (1 H, dd, *J* = 10.5, 4.0 Hz, 8-H), 1.45 (1 H, dd, *J* = 10.5, 4.0 Hz, 4a-H), 1.35-1.32 (3 H, m, 5a-H, 10a-H, 5'b-H), 1.30-1.28 (1 H, m, 9a-H), 1.28-1.25 (4 H, m, 9'a-H, 9'b-H, 10'a-H, 10'b-H), 1.19 (1 H, ddd, *J* = 11.5, 6.0, 6.0 Hz, 4'b-H), 1.12-1.05 (2 H, m, 5b-H, 10b-H), 0.99 (1 H, dd, *J* = 10.0, 4.0 Hz, 9b-H), 0.90 (1 H, ddd, *J* = 10.0, 6.0, 6.0 Hz, 4b-H), 0.86 (3 H, t, *J* = 7.0 Hz, 11-Me), 0.83 (3 H, t, *J* = 7.5 Hz, 11'-Me); ¹³C NMR δ_{C} (125 MHz, CDCl₃, assignments by DEPT, HSQC and HMBC) 168.18 (C-1), 165.16 (C-1'), 143.42 (C-3''), 140.22 (C-7), 139.16 (C-7'a), 137.43 (C-7'), 130.75 (C-7a), 128.21 (C-5'', C-7''), 127.99 (C-4'', C-8''), 127.12 (C-6''), 101.84 (C-3'), 95.34 (C-3), 85.22 (C-3a), 56.95 (C-3'a), 52.66 (C-2''), 45.54 (C-8), 36.16 (C-6'), 34.97 (C-8'), 28.97 (C-4), 28.81 (C-9), 25.69 (C-9'), 24.98 (C-6), 23.94 (C-4'), 22.99 (C-10'), 20.94 (C-10), 19.49 (C-9''), 17.35 (C-5'), 16.81 (C-5), 14.08 (C-11), 13.73 (C-11'); EIMS *m/z* 501 (M⁺, 15%), 378 (17), 310 (8), 274 (33), 191 (100), 149 (10), 120 (32), 105 (28), 55 (5); HRMS (FAB⁺) *m/z* (Found: [M+H]⁺ 502.2959. C₃₂H₃₉O₄N+H⁺ requires [M+H]⁺ 502.2957).

(+)-**9** (31.9 mg, 29.3%) as a pale oil; *R*_f 0.44 (*n*-hexane/EtOAc, 65:35); [α]_D²⁵ +7.8 (*c* 1.15 \times 10⁻³ in MeOH); IR (CHCl₃) ν_{\max} /cm⁻¹ 3347, 3060, 2958, 2872, 1765, 1688, 1526, 1495, 1452, 1352, 1214, 1036, 1013, 924, 751; UV λ_{\max} (MeOH)/nm 210 (ϵ /dm³ mol⁻¹ cm⁻¹ 31 623); CD (*c* 7.2 \times 10⁻⁶ in MeOH)/nm: 245 ($\Delta\epsilon$ -7.89), 223 ($\Delta\epsilon$ +12.62); ¹H NMR δ_{H} (500 MHz, CDCl₃; assignments by COSY, NOESY and HMQC) 7.47 (2 H, dd, *J* = 7.5, 1.5 Hz, 4''-H, 8''-H), 7.29 (2 H, ddd, *J* = 7.5, 7.5, 1.5 Hz, 5''-H, 7''-H), 7.22 (1 H, dddd, *J* = 7.5, 7.5, 1.5, 1.5, 6''-H), 7.22 (1 H, d, *J* = 6.5 Hz, 7'-H), 6.98 (1 H, dd, *J* = 7.0, 4.0 Hz, 7-H), 4.69 (1 H, q, *J* = 7.0 Hz, 2''-H), 2.93 (1 H, dddd, *J* = 10.0, 6.5, 4.0, 4.0 Hz, 6'-H), 2.46-2.39 (2 H, ddd, *J* = 11.0, 4.0, 4.0 Hz, 6a-H, 4'a-H), 2.19-2.16 (1 H, m, 6b-H), 1.99-1.89 (3 H, m, 5a-H, 5'a-H, 8'a-H), 1.85 (3 H, d, *J* = 7.0 Hz, 9''-H), 1.63 (1 H, ddd, *J* = 11.0, 4.5, 4.5 Hz, 8'b-H), 1.65 (1 H, ddd, *J* = 10.0, 3.0, 3.0 Hz, 8-H), 1.51 (1 H, ddd, *J* = 10.0, 4.5, 4.5 Hz, 4a-H), 1.37-1.33 (3 H, m, 5b-H, 10a-H, 5'b-H), 1.73 (1 H, dt, *J* = 6.5, 3.0 Hz, 9a-H), 1.28-1.25 (1 H, m, 9b-H), 1.23-1.17 (2 H, m, 10b-H, 4'b-H), 1.15-1.09 (2 H, m, 9'a-H, 10'a-H), 1.02-0.96 (3 H, m, 4b-H, 9'b-H, 10'b-H), 0.87 (3 H, t, *J* = 7.0 Hz, 11-Me), 0.66 (3 H, t, *J* = 7.0 Hz, 11'-Me); ¹³C NMR δ_{C} (125 MHz, CDCl₃, assignments by DEPT, HSQC and HMBC): 168.03 (C-1), 164.98 (C-1'), 143.20 (C-3''), 139.95 (C-7), 139.59 (C-7'a), 137.41 (C-7'), 130.76 (C-7a), 128.41 (C-5'', C-7''), 126.98 (C-4'', C-8''), 126.92 (C-6''), 101.51 (C-3'), 95.69 (C-3), 84.92 (C-3a), 56.89 (C-3'a), 54.05 (C-2''), 45.42 (C-8), 36.29 (C-6'), 34.84 (C-8'), 29.02 (C-4),

28.77 (C-9), 25.65 (C-9'), 25.05 (C-6), 24.03 (C-4'), 22.84 (C-10'), 20.98 (C-10), 20.33 (C-9''), 17.56 (C-5'), 17.27 (C-5), 14.10 (C-11'), 13.61 (C-11); EIMS m/z 501 (M^+ , 24%), 378 (60), 310 (16), 274 (86), 228 (10), 191 (100), 149 (18), 120 (38), 105 (58), 79 (8), 55 (7); HRMS (FAB⁺) m/z (Found $[M+H]^+$ 502.2961. $C_{32}H_{39}O_4N+H^+$ requires $[M+H]^+$ 502.2957).

Derivatization of *rac*-tokinolide B (*rac*-3) with (*S*)-(-)- α -methylbenzylamine

To a solution of *rac*-tokinolide B (*rac*-3, 250 mg, 0.65 mmol) in dry toluene (5 mL) placed in a stainless steel reactor (100 mL) was added (*S*)-(-)- α -methylbenzylamine (0.16 mL, 152.3 mg, 1.25 mmol) under nitrogen atmosphere. The reactor was sealed and heated (130 °C) for 20 h (pressure: 50 psi). After cooling to room temperature, the reaction mixture was concentrated at reduced pressure. EtOAc (10 mL) was added and the organic phase was washed with HCl (10%) which subsequently was extracted with EtOAc (3 \times 10 mL). The combined organic layer was washed with brine, dried with Na_2SO_4 and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography (*n*-hexane/EtOAc, gradient) afforded (234 mg, 71%) as two pure products. The NMR data were identical to their enantiomers.

(+)-**8** (96.24 mg, 29.2%) as a pale oil; $[\alpha]_D^{25} +46.2$ (c 1.30×10^{-3} in MeOH); UV λ_{max} (MeOH)/nm 217 ($\epsilon/dm^3 mol^{-1} cm^{-1}$ 19 953); CD (c 4.0×10^{-6} in MeOH)/nm 245.5 ($\Delta\epsilon$ -39.65), 224.5 ($\Delta\epsilon$ +90.08).

(-)-**9** (137.8 mg, 41.8%) as a pale oil; $[\alpha]_D^{25} -8.12$ (c 1.60×10^{-3} in MeOH); UV λ_{max} (MeOH)/nm 216 ($\epsilon/dm^3 mol^{-1} cm^{-1}$ 19 953); CD (c 4.4×10^{-6} in MeOH)/nm 245 ($\Delta\epsilon$ +34.43), 223 ($\Delta\epsilon$ -57.65).

The reaction of *rac*-3 with (*S*)- or (*R*)- α -methylbenzylamine does not proceed without pressure.

Cytotoxicity assay

Colon (HCT-15), leukaemia (K-562) and lung (SKLU-1) human tumor cell lines were supplied by National Cancer Institute (NCI), USA. The cytotoxicity of the tumors cells with the test compounds was determined using the protein-binding dye sulforhodamine B (SRB) in microculture assay to measure cell growth.²⁰ The cell lines were cultured in RPMI-1640 (Sigma Chemical Co., Ltd., St. Louis, MO, USA), supplemented with 10% fetal bovine serum, 2 μ M L-glutamine, 100 IU/mL penicillin G, 100 μ g/mL streptomycin sulfate, and 0.25 μ g/mL amphotericin B (Gibco). They were maintained at 37°C in a 5% CO_2 atmosphere with 95% humidity. For the assay, 5×10^4 cell/mL (K562), 10×10^4 cell/well (HCT-15) and 7500 cell/mL (SKLU-1), and 100 μ L/well of these cells suspension were seeded in 96-well microtiter plates and incubated to allow the cell attachment. After 24 h, 100 μ L of each test compounds and positive substances were added to each well. Later 48 h, adherent cell cultures were fixed *in situ* by adding 50 μ L of cold 50 % (wt/vol) trichloroacetic acid (TCA) and incubated for 60 min at 4°C. The supernatant was discarded and the plates were washed three times with water and air-dried. Cultured fixed with TCA were stained for 30 min with 100 μ L of 0.4% SRB solution. Protein-bound dye was extracted with 10 μ M unbuffered tris base and the optical densities were read on an Ultra Microplate Reader (Elx 808, BIO-TEK Instruments, Inc.), with a test wavelength of 515 nm. Results were expressed as inhibitory concentration 50 (IC₅₀) values, they were calculated according to the protocol of Monks,²⁷ where a dose-response curve was plotted for each compound, and the concentration giving 50% inhibition (IC₅₀) was estimated from linear regression equations. The IC₅₀ values (mean \pm standard error) are shown in Table 1.

Computational Details

To obtain minimum energy conformations for structures (+)-**8** and (-)-**9** we followed a geometry optimization by consecutive addition of a molecular fragment at the time. For this purpose a basic central molecular fragment was modeled. This fragment was submitted to a geometry optimization computation with AM1²⁴ followed by a subsequent density functional GO, with the hybrid

functional B3LYP using a 6-311G** basis set.²⁵ A new molecular fragment was modeled on the previously optimized one, and a new GO with AM1 and B3LYP was carried out. This paradigm was followed until the full molecular structure was completed. Once (+)-**8** and (-)-**9** were completed and optimized, an ECD calculation was carried out within the time dependent density functional theory formalism, using the B3LYP functional with the 6-311G** basis set previously employed. All the described molecular modeling was done with Gauss View,²⁴ whereas the described quantum mechanical computations were carried out with the suite of programs in Gaussian 03.²⁵

The ECD spectrum was simulated by overlapping Gaussian functions for each transition according to:

$$\Delta \varepsilon(E) = \left(\frac{1}{2.297 \cdot 10^{39}} \right) \left(\frac{1}{\sqrt{2\pi\sigma}} \right) \sum_{\alpha} (\Delta E_{0\alpha}) (R_{0\alpha}) \exp \left[- \left(\frac{E - \Delta E_{0\alpha}}{2\sigma} \right)^2 \right]$$

Where σ is the width of the band at 1/e height and $\Delta E_{0\alpha}$ and $R_{0\alpha}$ are the excitations energies and rotatory strengths. A σ value of 0.2 eV was used.²⁶

Notes and references

^a Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, Coyoacán 04510, México, D.F. Fax: +52 (55) 5622-4457; Tel: +52 55 5622 4446; E-mail: delgado@unam.mx

^b Division of Organic Chemistry, Lund University, PO Box 124, SE-22100 Lund, Sweden. Fax+46 46 2228209; Tel: +46 46-2228213; E-mail: Olov.Sterner@organic.lu.se

† Electronic Supplementary Information (ESI) available: [details of any supplementary information available should be included here]. See DOI: 10.1039/b000000x/

Financial support from CONACyT (scholarship 181999), DGEP-UNAM and from ALFA-project AML/B7-311/97/0666/II-0375-FA (Sweden) is gratefully acknowledged. JAC is grateful to DGSCA-UNAM for the generous allocation of CPU time. We thank María Isabel Chávez, Beatriz Quiroz-García, María Teresa Ramírez-Apan, Eréndira García, Rocío Patiño, Javier Pérez Flores, Luis Velasco and David Vázquez for technical assistance. This work was taken in part from the Ph.D. thesis of A. L.

- 1 G. Delgado, R. G. Reza-Garduño, Y. M. Rios and F. del Rio, *Planta Med.*, 1992, **58**, 570.
- 2 A. León, R. A. Toscano, J. Tortoriello and G. Delgado, *Natural Product Research*, in press.
- 3 G. Delgado, R. G. Reza-Garduño, R. A. Toscano, R. Bye and E. Linares, *Heterocycles*, 1988, **27**, 1305.
- 4 B. Quiroz-García, S. Hernández-Ortega, O. Sterner and G. Delgado, *Tetrahedron*, 2004, **60**, 3681.
- 5 B. Quiroz-García, R. Figueroa, J. A. Cogordán and G. Delgado, *Tetrahedron Lett.*, 2005, **46**, 3003.
- 6 M. Y. Rios, G. Delgado and R. A. Toscano, *Tetrahedron* 1998, **54**, 3355.
- 7 Y. Ogawa, Y. Mori, M. Maruno and T. Wakamatsu, *Heterocycles*, 1997, **45**, 1869.
- 8 M. Y. Rios and G. Delgado, *Rev. Soc. Quím. Méx.* 1999, **43**, 127.
- 9 J. J. Beck and F. R., *J. Nat Prod.* 1995, **58**, 1047.
- 10 B. Quiroz-García, L. Hernández, R. A. Toscano, O. Sterner and G. Delgado, *Tetrahedron Lett.*, 2003, **44**, 2509.
- 11 E. Linares and R. A. Bye, *J. Ethnopharmacol.*, 1987, **19**, 153.
- 12 R. A. Bye, *Economic Botany*, 1986, **40**, 103.
- 13 C.-M. Teng, W.-Y. Chen, W.-C. Ko and C. Ouyang, *Biochim. Biophys. Acta*, 1987, **924**, 375.
- 14 W.-C. Ko, J.-R. Sheu, S.-H. Tzeng and C.-M. Chen, *Planta Med.*, 1998, **64**, 229.
- 15 W.-C. Ko, C.-C. Liao, C.-H. Shih, C. B. Lei and C.-M. Chen, *Planta Med.*, 2002, **68**, 1004.
- 16 G. Lin, S. S. K. Chan, H. S. Chung and S. L. Li, in *Studies in Natural Products Chemistry* ed. Atta-ur-Rahman, Elsevier, Amsterdam, 2006, vol. 32. Bioactive Natural Products Part L, pp. 611–669.
- 17 J. J. Beck and S. J. Chou, *J. Nat. Prod.*, 2007, **70**, 891.
- 18 A. García, T. Ramírez-Apan, J. A. Cogordán and G. Delgado, *Can. J. Chem.*, 2006, **84**, 1593.
- 19 It is interesting to note that in the ¹H NMR spectra of compounds (+)-**9** and (-)-**9** the methyl group 11'-Me is shielded [δ_{H} 0.66 (3 H, t, $J = 7$ Hz)] presumably due to the alignment of this group above the

- benzene moiety. For the methyl protons 11'-Me of the enantiomers (-)-**8** and (+)-**8** this effect was not observed [δ_{H} 0.86 (3 H, t, $J = 7$ Hz)].
- 20 J. E. Baldwin and M. J. Lusch, *Tetrahedron*, 1982, **38**, 2939.
 - 21 N. Harada and K. Nakanishi, *Acc. Chem. Res.*, 1972, **5**, 257.
 - 22 N. Harada and K. Nakanishi in *Circular Dichroic Spectroscopy-Exciton Coupling in Organic Stereochemistry* ed. University Science. Book, Mill Valley, CA and Oxford University Press, Oxford, **1983**.
 - 23 N. Berova, L. Di Bari and G. Pescitelli, *Chem. Soc. Rev.*, 2007, **36**, 914.
 - 24 R. Dennington II, T. Keith, J. Millam, GaussView, Version 4.1, Semichem, Inc., Shawnee Mission, KS, 2007.
 - 25 Gaussian 03, Revision C.02, M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, J. A. Montgomery, Jr., T. Vreven, K. N. Kudin, J. C. Burant, J. M. Millam, S. S. Iyengar, J. Tomasi, V. Barone, B. Mennucci, M. Cossi, G. Scalmani, N. Rega, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, M. Klene, X. Li, J. E. Knox, H. P. Hratchian, J. B. Cross, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, P. Y. Ayala, K. Morokuma, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, V. G. Zakrzewski, S. Dapprich, A. D. Daniels, M. C. Strain, O. Farkas, D. K. Malick, A. D. Rabuck, K. Raghavachari, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, Q. Cui, A. G. Baboul, S. Clifford, J. Cioslowski, B. B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R. L. Martin, D. J. Fox, T. Keith, M. A. Al-Laham, C. Y. Peng, A. Nanayakkara, M. Challacombe, P. M. W. Gill, B. Johnson, W. Chen, M. W. Wong, C. Gonzalez and J. A. Pople, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2004.
 - 26 C. Diedrich and S. Grimme, *J. Phys. Chem. A.*, 2003, **107**, 2524.
 - 27 A. Monks, D. Scudiero, P. Skehan, R. Shoemaker, K. Paull, D. Vistica, C. Hose, J. Langley, P. Cronise, A. Vaigro-Wolff, M. Gray-Goodrich, H. Campbell, J. Mayo and M. Boyd, *J. Natl. Cancer Inst.*, 1991, **83**, 757.