



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

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

**“Actividad antiinflamatoria de santamarina aislada de *Tanacetum parthenium*
y sus derivados semisintéticos”**

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA

Q. EDITH VELA MENDEZ



TUTOR: Dr. José S. Calderón Pardo.

AÑO: 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

Presidente: Dr. Manuel Jiménez Estrada

Vocal: Dr. Ricardo Reyes Chilpa

Vocal: Dr. Enrique Ramón Ángeles Anguiano

Vocal: Dra. María Yolanda Ríos Gómez.

Secretario: Dr. José Fausto Rivero Cruz.

Este trabajo de investigación se desarrolló en el laboratorio 7 edificio "C" del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México. Con un apoyo económico de una beca otorgada por el Consejo Nacional De Ciencia Y Tecnología (CONACYT).

Asesor:

Dr. José Serafín Calderón Pardo.

Sustentante:

Q.I. Edith Vela Méndez.

AGRADECIMIENTOS

Al programa de maestría y doctorado en Ciencias Químicas de la Universidad Nacional autónoma de México.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca No. 211340 otorgada durante mis estudios de maestría.

Al Dr. José S. Calderón Pardo por su asesoría y apoyo brindado durante la realización del presente trabajo.

Al personal académico y técnico del Instituto de Química por todas las facilidades otorgadas para llevar a buen termino éste trabajo.

Con amor
a mis padres y hermanos:

*No hay ventura ni desgracia en el mundo,
sino la comparación de un estado con otro,
he ahí todo.*
*Sólo el que ha experimentado el colmo del infortunio
puede sentir la felicidad suprema,
y toda la sabiduría humana
estará resumida en dos palabras:
¡Confiar y esperar!*

Alejandro Dumas.

INDICE

	Página
LISTA DE TABLAS	I
LISTA DE FIGURAS	II
LISTA DE ESPECTROS	III
LISTA DE ABREVIATURAS	VI
INTRODUCCION	1
OBJETIVOS	2
JUSTIFICACION	3
CAPITULO 1. Marco Teórico	
1.1 ANTECEDENTES.	5
1.1.1 Familia Asteraceae.	5
1.1.2 Genero Tanacetum.	5
1.1.3 Composición química del genero <i>Tanacetum</i> .	5
1.1.4 Usos de <i>Tanacetum parthenium</i> .	6
1.2 INFLAMACION	7
1.2.1 Definición.	7
1.2.2 Cascada del ácido araquidónico.	10
1.2.3 Inhibición de la biosíntesis de prostaglandinas por acción de los antiinflamatorios no esteroideos.	13
1.2.4 Factor de transcripción nuclear NF- κ B.	15
1.2.5 Inhibición del factor de transcripción nuclear NF- κ B por lactonas sesquiterpénicas.	16

CAPITULO 2. Desarrollo experimental

2.1 Materiales, equipos y reactivos.	19
2.2 Colecta del material vegetal.	20
2.3 Obtención de extractos.	20
2.4 Cromatografía de los extractos de diclorometano.	21
2.4.1 Primera colecta	21
2.4.2 Segunda colecta	22
2.5 Preparación de derivados de santamarina.	24
2.5.1 Acetilación.	24
2.5.1.1 Reacción de santamarina con anhídrido acético.	24
2.5.2 Epoxidación.	25
2.5.2.1 Reacción de santamarina con mCPBA	25
2.5.3 Obtención de esteres de alto peso molecular.	26
2.5.3.1 Reacción de santamarina con anhídrido acético.	26
2.5.3.2 Reacción de santamarina con cloruro de octanoilo.	27
2.5.3.3 Reacción de santamarina con anhídrido decanóico.	28
2.5.3.4 Reacción de santamarina con cloruro de lauroilo.	29
2.5.3.5 Reacción de santamarina con cloruro de miristoilo.	31
2.5.3.6 Reacción de santamarina con cloruro de palmitoilo.	32
2.5.4 Obtención del éster metílico del acetato de saussureamina D.	33
2.5.4.1 Preparación de acetato de santamarina.	33
2.5.4.2 Condensación de santamarina con <i>L</i> -prolina.	33
2.5.4.3 Esterificación con diazometano.	33
2.5.4.4 Preparación de diazometano.	33
2.6 Prueba de actividad biológica.	35
2.6.1 Edema auricular inducido por esteres de forbol.	35
2.6.2 Edema auricular por TPA.	36

CAPITULO 3. Discusión de resultados

3.1 Santamarina.	38
3.2 Derivados.	39
3.2.1 Acetato de santamarina.	39
3.2.2 Epóxido de santamarina.	40
3.2.3 Hexanoato de santamarina.	40
3.2.4 Octanoato de santamarina.	42
3.2.5 Decanoato de santamarina.	43
3.2.6 Laurato de santamarina.	43
3.2.7 Miristato de santamarina.	44
3.2.8 Palmitato de santamarina.	45
3.2.9 Ester metílico del acetato de saussureamina D.	45
3.3 Actividad biológica.	47

CAPITULO 4. Conclusiones

4.1 Conclusiones	51
------------------	----

APENDICE

Espectros	52
-----------	----

LISTA DE TABLAS

	Página	
Tabla 2.1	Colectas realizadas de <i>Tanacetum parthenium</i> .	20
Tabla 2.2	Fracciones obtenidas de la CCG del extracto de diclorometano (Lote 1).	21
Tabla 2.3	Fracciones obtenidas de la CCG del extracto de diclorometano (Lote 2).	22
Tabla 2.4	Rendimientos de los derivados obtenidos de santamarina.	35
Tabla 3.1	Actividad antiinflamatoria en el modelo de inhibición del edema inducido en oreja de ratón con MPA.	47
Tabla 3.2	Actividad antiinflamatoria de los derivados de santamarina en el modelo inducido con ATP.	49

LISTA DE FIGURAS

	Página
Fig. 1.1 Lactonas sesquiterpénicas aisladas del género <i>Tanacetum</i> .	6
Fig. 1.2 Estructuras de prostanoídes derivados del ácido araquidónico	9
Fig. 1.3 Ruta biosintética cíclica de los prostanoídes	11
Fig. 1.4 Ruta biosintética lineal de los prostanoídes	13
Fig. 1.5 Activación del factor de transcripción nuclear NF- κ B	16
Fig. 3.1 Principales interacciones NOE del éster metílico del acetato de saussureamina D.	46

LISTA DE ESPECTROS

		Página
Espectro No. 1	RMN. ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) santamarina	53
Espectro No. 2	RMN. COSY (CDCl_3 , 500 MHz) santamarina	54
Espectro No. 3	RMN. ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) santamarina.	55
Espectro No. 4	RMN. HSQC (CDCl_3 , 500 MHz) santamarina.	56
Espectro No. 5	RMN. HMBC (CDCl_3 , 500 MHz) santamarina.	57
Espectro No. 6	RMN. ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) acetato de santamarina.	58
Espectro No. 7	RMN. ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) acetato de santamarina.	59
Espectro No. 8	RMN. HETCOR (CDCl_3 , 300 MHz) acetato de santamarina.	60
Espectro No. 9	RMN. ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) epóxido de santamarina.	61
Espectro No. 10	RMN. ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) epóxido de santamarina.	62
Espectro No. 11	RMN. HETCOR (CDCl_3 , 300 MHz) epóxido de santamarina.	63
Espectro No. 12	RMN. ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) hexanoato de santamarina.	64
Espectro No. 13	RMN. ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) hexanoato de santamarina.	65
Espectro No. 14	RMN. HETCOR (CDCl_3 , 300 MHz) hexanoato de santamarina.	66
Espectro No. 15	IR. (CHCl_3 , película) hexanoato de santamarina.	67
Espectro No. 16	Masas. (CHCl_3 , película) hexanoato de santamarina.	68
Espectro No. 17	RMN. ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) octanoato de santamarina.	69
Espectro No. 18	RMN. ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) octanoato de santamarina.	70

Espectro No. 19	RMN. HETCOR (CDCl ₃ , 300 MHz) octanoato de santamarina.	71
Espectro No. 20	IR (CHCl ₃ , película) octanoato de santamarina.	72
Espectro No. 21	Masas (CHCl ₃ , película) octanoato de santamarina.	73
Espectro No. 22	RMN. ¹ H (CDCl ₃ , 300 MHz) decanoato de santamarina.	74
Espectro No. 23	RMN. ¹³ C (CDCl ₃ , 75 MHz) decanoato de santamarina.	75
Espectro No. 24	RMN. HETCOR (CDCl ₃ , 300 MHz) decanoato de santamarina.	76
Espectro No. 25	IR. (CHCl ₃ , película) decanoato de santamarina.	77
Espectro No. 26	Masas (CHCl ₃ , película) decanoato de santamarina.	78
Espectro No. 27	RMN. ¹ H (CDCl ₃ , 300 MHz) laurato de santamarina.	79
Espectro No. 28	RMN. ¹³ C (CDCl ₃ , 75 MHz) laurato de santamarina.	80
Espectro No. 29	RMN. HETCOR (CDCl ₃ , 300 MHz) laurato de santamarina.	81
Espectro No. 30	IR. (CHCl ₃ , película) laurato de santamarina.	82
Espectro No. 31	Masas. (CHCl ₃ , película) laurato de santamarina.	83
Espectro No. 32	RMN. ¹ H (CDCl ₃ , 300 MHz) miristato de santamarina.	84
Espectro No. 33	RMN. ¹³ C (CDCl ₃ , 75 MHz) miristato de santamarina.	85
Espectro No. 34	RMN. HETCOR (CDCl ₃ , 300 MHz) miristato de santamarina.	86
Espectro No. 35	IR. (CHCl ₃ , película) miristato de santamarina.	87
Espectro No. 36	Masas. (CHCl ₃ , película) miristato de santamarina.	88

Espectro No. 37	RMN. ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) palmitato de santamarina.	89
Espectro No. 38	RMN. ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) palmitato de santamarina.	90
Espectro No. 39	IR. (CHCl_3 , película) palmitato de santamarina	91
Espectro No. 40	Masas. (CHCl_3 , película) palmitato de santamarina	92
Espectro No. 41	RMN. ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) éster metílico del acetato de saussureamina D.	93
Espectro No. 42	RMN. COSY (CDCl_3 , 300 MHz) éster metílico del acetato de saussureamina D.	94
Espectro No. 43	RMN. NOESY (CDCl_3 , 300 MHz) éster metílico del acetato de saussureamina D.	95
Espectro No. 44	RMN. ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) éster metílico del acetato de saussureamina D.	96
Espectro No. 45	RMN. HETCOR (CDCl_3 , 300 MHz) éster metílico del acetato de saussureamina D.	97
Espectro No. 46	IR. (CHCl_3 , película) éster metílico del acetato de saussureamina D.	98
Espectro No. 47	Masas. (CHCl_3 , película) éster metílico del acetato de saussureamina D.	99

ABREVIATURAS

Ácido Araquidónico.....	AA
Ciclooxigenasa.....	COX
Lactonas sesquiterpénicas.....	SLs
Acetato de Forbol Tetradecanoilo.....	TPA
Factor Activador de Plaquetas.....	PAF
Interleucinas.....	IL
Factor de Necrosis Tumoral alfa.....	TNF- α
Factor de Transcripción Nuclear κ B.....	NF- κ β
Inhibidor del Factor de Transcripción Nuclear.....	I κ β
Antiinflamatorios no Esteroideos.....	AINES
Cromatografía en Columna por Gravedad.....	CCG
Cromatografía en Capa Fina.....	CCF
Cromatografía en Capa Fina Preparativa.....	CCFP
Espectroscopia de Infrarrojo.....	IR
Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno.....	RMN ¹ H
Resonancia Magnética Nuclear de Carbono-13.....	RMN ¹³ C
Distortionless Enhancement by Polarization Transfer.....	DEPT
Heteronuclear Correlated Spectroscopy.....	HETCOR
Correlated Spectroscopy.....	COSY
Heteronuclear Simple Quantum Coherence.....	HSQC
Heteronuclear Múltiple Bond Correlation.....	HMBC
Heteronuclear Múltiple Quantum Correlation.....	HMQC
Partes por millón.....	ppm
Constante de acoplamiento.....	J
Cuarteto.....	c

Doble de doble.....	dd
Doble de cuartetos.....	dc
Doble de triples.....	dt
Doble.....	d
Simple ancha.....	sa
Triple.....	t
Múltiple.....	m
Simple.....	s
Desplazamiento (ppm).....	δ
Hertz.....	Hz

INTRODUCCION

Si reflexionamos un poco para determinar cuales son los problemas de salud más comunes veremos que una de las causas mas frecuentes del deterioro de la salud es el traumatismo común; esto es, el corte de un dedo, un fuerte impacto en alguna parte del cuerpo, una quemadura, un torcimiento de tobillo, radiaciones solares, etc. Cualquier traumatismo dispara la alarma para que actúe un servicio de salvamento y reparación inmediata, conocido como inflamación.

La inflamación no es una enfermedad sino precisamente lo opuesto, es decir, un signo de que se esta produciendo la curación y la reparación cuando menos mediante tres procesos beneficiosos esenciales para la recuperación. El primero de ellos es la lucha contra el agente extraño. El segundo consiste en despejar la zona dañada de las impurezas y toxinas resultantes. El tercero es la reparación y reconstitución de la zona lesionada.¹

Una vez iniciada la respuesta inflamatoria, entran en juego todos los componentes del sistema inmunitario y son activadas consecuentemente numerosas cascadas de reacciones enzimáticas, entre las cuales destacan la cascada del ácido araquidónico (AA) y la liberación del factor de transcripción nuclear NF- κ B.²

La cascada del ácido araquidónico consiste en la formación de eicosanoides ya sea por la acción de la ciclooxigenasa (COX) o la lipooxigenasa. Mientras que el NF- κ B es liberado en el complejo, de su inhibidor I κ B al momento del daño, esta liberación ocurre mediante la acción de las cinasas I κ k α e I κ k β las cuales fosforilan al I κ B.

1.- López M.D.; Williams R. Enzimas, la fuente de la vida. Edikamed, España, 1995.

2.- Gualde, N; Mundo científico, 1994, 60, 6.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Realizar un estudio biodirigido utilizando el bioensayo de inhibición de edema inducido en oreja de ratón con TPA (Acetato de Forbol Tetradecanoilo, por sus siglas en inglés) como agente inflamatorio de algunos derivados de la lactona sesquiterpénica santamarina.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 1.- Colectar la especie vegetal *T. parthenium*.
- 2.- Llevar a cabo el estudio biodirigido de los extractos de la planta *T. parthenium*.
- 3.- Fraccionar los extractos de diclorometano mediante cromatografía en columna para el aislamiento de la santamarina.
- 4.- Purificar la santamarina mediante cromatografía en capa fina.
- 5.- Obtener derivados de la lactona santamarina.
- 6.- Llevar a cabo la asignación total de ^1H y de ^{13}C de los derivados obtenidos mediante resonancia magnética uni y bidimensional (COSY, NOESY, DEPT, HETCOR, HSQC, HMBC).
- 7.- Determinar la actividad antiinflamatoria de los derivados obtenidos mediante el bioensayo de inhibición del edema inducido en oreja de ratón usando TPA como agente inflamatorio.

JUSTIFICACION

Estudios han demostrado que las lactonas santamarina y reynosina aisladas de *Tanacetum parthenium* inhiben el factor TNF- α ³ el cual a su vez promueve la liberación del factor NF- κ B^{4,5}. La inhibición de estos factores es importante ya que regulan la respuesta inflamatoria en el organismo, además la santamarina inhibe la producción de óxido nítrico⁶ el cual también es importante en el proceso inflamatorio.

Puesto que la santamarina muestra una actividad antiinflamatoria significativa en el bioensayo de inhibición de edema inducido en oreja de ratón con TPA como agente inflamatorio. Es necesario llevar a cabo un estudio estructura actividad biológica de derivados de dicha lactona con el propósito de evaluar la actividad antiinflamatoria de los derivados semisintéticos.

3.- Wagner, S., Hofmann, A., Siedle, B., Terfloth, L., Merfort, I. and Gasteiger, J., J. Med. Chem. **2006**, 49, 2241-2252.

4.- Castro, V., Murillo, R., Klaas, C., Meunier, C., Mora, G., Pahl, H. L. and Merfort, I., Planta Medica, **2000**, 66, 591-595.

5.- Siedle, B., Garcia-Piñeres, A., Murillo, R., Schulte-Molting, J., Castro, V., Rüngeler, P., Klaas, C., Da Costa, F., Kisiel, W., and Merfort, I. J. Med. Chem. **2004**, 47, 6042-6054.

6- Matsuda, H., Kagerura, T., Toguchida, I., Ueda, H., Morikawa, T., and Yoshikawa, M., Life Sciences, **2000**, 66, 2151-2157.

Capítulo 1

Marco teórico.

1.1 ANTECEDENTES.

1.2 INFLAMACIÓN.

1.1 ANTECEDENTES

1.1.1 Familia Asteraceae

También denominada familia de las compuestas (**Compositae** Giseke), contiene más de 23,000 especies por lo que es la familia de angiospermas con mayor riqueza y diversidad biológica.¹ En muchas regiones del mundo las Compuestas llegan a integrar hasta el 10% de la flora endémica.¹ La familia está caracterizada por presentar las flores dispuestas en una inflorescencia compuesta denominada capitulo la cual se halla rodeada de una o más filas de brácteas.¹

1.1.2 Género *Tanacetum*

Plantas anuales o perennes herbáceas, generalmente aromáticas. Las hojas son alternas y pinnadas. Las flores se reúnen en inflorescencias de tipo capítulo, que a su vez se reúnen en corimbos terminales. Las brácteas del involucre se disponen en tres filas. Las flores externas son liguladas, normalmente femeninas, blancas o amarillentas; las flores internas son tubulares y amarillas.²

El fruto es un aquenio, de 1.2 a 1.8 mm, de 3 – 10 costillas, sécil y sin glándulas mucilaginosas y está coronado por un vilano de pelos en forma de corona.²

1.1.3 Composición química del género *Tanacetum*

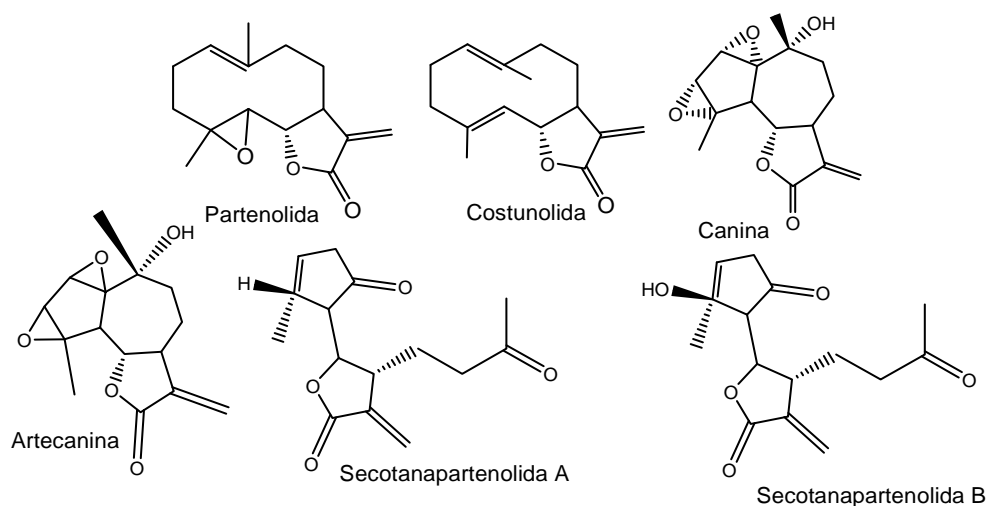
Las partes aéreas de las plantas son ricas en sustancias procedentes del metabolismo del ácido mevalónico; ésteres de monoterpenos bicíclicos (derivados del pinano y del bornano), hidrocarburos sesquiterpénicos (germacreno y β -farneseno).

1. - <http://es.wikipedia.org/wiki/Asteraceae>

2. - <http://www.asturnatura.com/genero/tanacetum.html>

Las actividades biológicas observadas *in vitro* se deben a la presencia de lactonas sesquiterpénicas que son en su totalidad α -metilen- γ -lactonas. El principal componente es una germacranólida (partenólida), que aparece acompañada de derivados semejantes (artemorina y costunolida), y de guayanólidas mono y diepoxidos (canina y artecanina), endoperoxidos y derivados formados por apertura (secotanapartenolidas A y B).³

Fig. 1.1 Lactonas sesquiterpénicas aisladas del género Tanacetum.



Phytochemistry, **1997**, 44, 471-474,

1.1.4 Usos de *Tanacetum parthenium*.

Las inflorescencias y las hojas son usadas para estimular o favorecer el flujo menstrual, como antiespasmódicas, tónicas e insecticidas.⁴ También para curar úlceras en la boca, irritación de la piel, dolor abdominal, indigestión, diarrea, dolor de cabeza y problemas urinarios.⁵ En dosis excesivas esta planta es tóxica produciendo mareos, vómitos, convulsiones y dolor abdominal.⁶

3. - <http://www.hipernatural.com/es/plmatricaria.html>

4.- "Las plantas medicinales de México" Maximino Martínez. 5ta. Edición. Ediciones Botas, **1969**, 286-287.

5.- "Plantas medicinales de México II. Composición, usos y actividad biológica" Carmen Márquez A. Francisco Lara O. Baldomero Esquivel R. Rachel Mata E. Instituto de química; dirección general de publicaciones y fomento editorial; UNAM, México **1999**; 1ra Edición

6.- Hewlett, M. J. Begley, M. J., Groenewegen, A., Heptinstall, S., Knight D. W., May J., Salan U. and Toplis D., J. Chem. Soc., Perkin Trans. **1996**, 1, 1979-1986

1.3 INFLAMACIÓN

1.2.1 Definición.

La inflamación es una compleja reacción del cuerpo que expresa la respuesta al daño de sus células y tejidos finos vascularizados. Estos daños pueden ser del tipo físico, químico, mecánico o infeccioso.⁷

La inflamación es un proceso que incluye una serie de fenómenos que pueden ser desencadenados por diversos estímulos. Cada tipo de estímulo desencadena un patrón característico de reacción o respuesta que constituye una variante relativamente menor del mismo fenómeno.⁸

La inflamación aguda puede estar relacionada con la respuesta de fase aguda, la cual es una respuesta de todo el cuerpo que se produce a las pocas horas de la infección. La respuesta de la fase aguda consiste en la producción de una serie de mediadores químicos que promueven y prolongan la inflamación.⁸ Cuatro áreas son particularmente importantes en la regulación de la respuesta inflamatoria: fiebre, dolor, edema y regulación de la función leucocitaria.⁹

a) Fiebre.

La fiebre es una respuesta compleja al daño y la infección, aun existe un debate de si es benéfica o no para el huésped. El incremento de la temperatura corporal en algunas especies se debe a la presencia de las prostaglandinas de la serie E. El incremento de la producción de prostaglandinas ocurre probablemente cuando en el sistema nervioso central hay la liberación de citocinas en respuesta a infecciones bacteriales.

Los inhibidores COX son utilizados clínicamente como agentes antipiréticos, puesto que estos inhiben la formación de prostaglandinas las cuales actúan como mediadores clave de la fiebre.¹⁰

7.- <http://nic.sav.sk/logos/books/scientific/node4.html>

8.- "Biology of disease" N. Ahmed, M. Dawson, C. Smith, E. Wood; Taylor y Francis group; 2007, pag. 77-78

b) Dolor.

La sola producción de prostaglandinas no ejerce una respuesta dolorosa. Sin embargo producen una condición conocida como hiperalgesia que es la respuesta a estímulos químicos, mecánicos y térmicos que producen dolor; estos estímulos son grandemente incrementados en la presencia de prostaglandinas. La PGE₂ y PGH₂ son las prostaglandinas más importantes a este respecto.

Los inhibidores COX son utilizados clínicamente como agentes analgésicos, dado que la producción de las prostaglandinas juega un rol muy importante en la percepción del dolor.¹⁰

c) Edema.

El edema, igual que el dolor no se produce solamente por la formación de las prostaglandinas. Sin embargo PGE₂ y PGI₂ tienen una gran influencia en la asociación del edema con la inflamación, debido a su habilidad para incrementar el flujo sanguíneo en el sitio inflamado. El aumento en el flujo sanguíneo por sí solo no promueve el edema, pero en la presencia de un agente que aumente la permeabilidad de las vénulas a las proteínas plasmáticas, se observa un aumento sinérgico en la fuga de plasma.

Inhibidores COX son utilizados clínicamente para reducir la inflamación unida a los efectos de la artritis reumatoide. Sugiriendo que los prostanoides contribuyen a la regulación de la permeabilidad vascular en dicha enfermedad.⁹

9. - Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates; 3ra Edition; J. I. Gallin, R. Snyderman; Lippincott Williams & Wilkins; 1999, pag 349-356, 361.

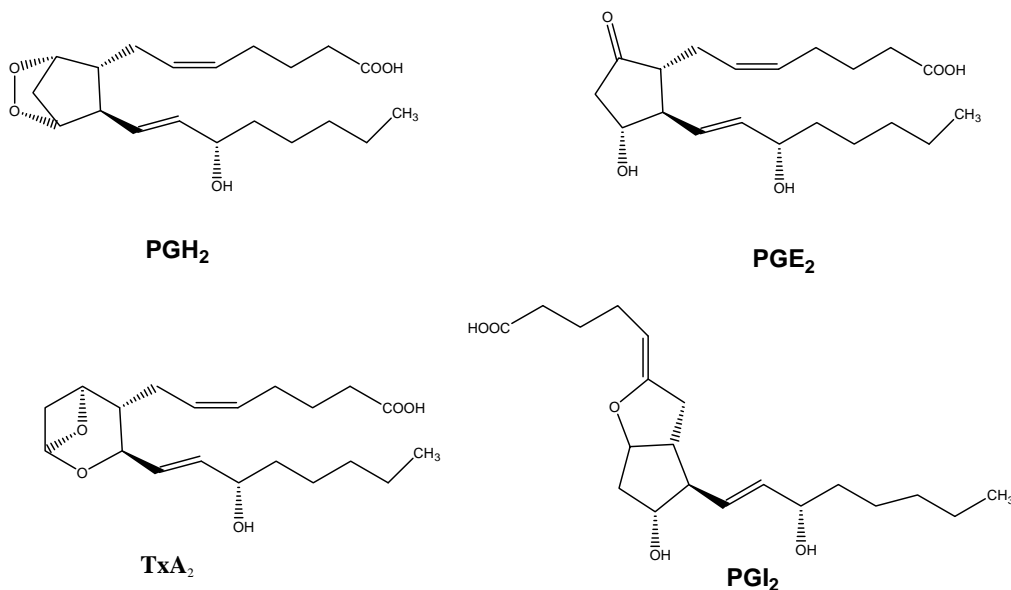
10.- "Manual de Química Orgánica" Beyer-Walter; 19° edición; Edit. Reverté; pag. 724-725.

d) Regulación de la función leucocitaria.

Las prostaglandinas también regulan la función leucocitaria sugiriendo que pueden también tener una baja regulación de la respuesta inflamatoria. Esto es paradójico dado que los fármacos que inhiben la síntesis de prostaglandinas son muy ampliamente usados como agentes antiinflamatorios. Sin embargo, existen evidencias que indican que la supresión de la respuesta inflamatoria inducida por prostaglandinas puede ocurrir en vivo. Las prostaglandinas PGE₂, PGD₂ y PGI₂ inhiben la activación de neutrofilos *in vitro*, medido por quimiotaxis o producción de superóxido.

Los efectos inhibitorios están asociados con el aumento de la formación de cAMP. La PGE₂ es también un buen inhibidor de la activación de monocitos, y el efecto más notable es la inhibición de la producción de TNF.⁹

Fig.1.2 Estructuras de prostanoides derivados del ácido araquidónico.



Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates; 3ra Edition; J. I. Gallin, R. Snyderman; Lippincott Williams & Wilkins; 1999; 350.

1.2.2 Cascada del ácido araquidónico.

Cuando un mastocito es activado, se pone en marcha la participación de dos enzimas de la membrana celular, las fosfolipasas A₂ y C. La fosfolipasa A₂ es activada por un aumento de los iones Ca²⁺ que penetran en la membrana. Esta última enzima ejerce dos acciones; por un lado promueve la síntesis de un compuesto lipídico (PAF), que produce agregación plaquetaria y coagulación de los capilares y por otro lado libera al ácido araquidónico mediante hidrólisis de la forma esterificada en que dicho ácido se encuentra en las membranas.

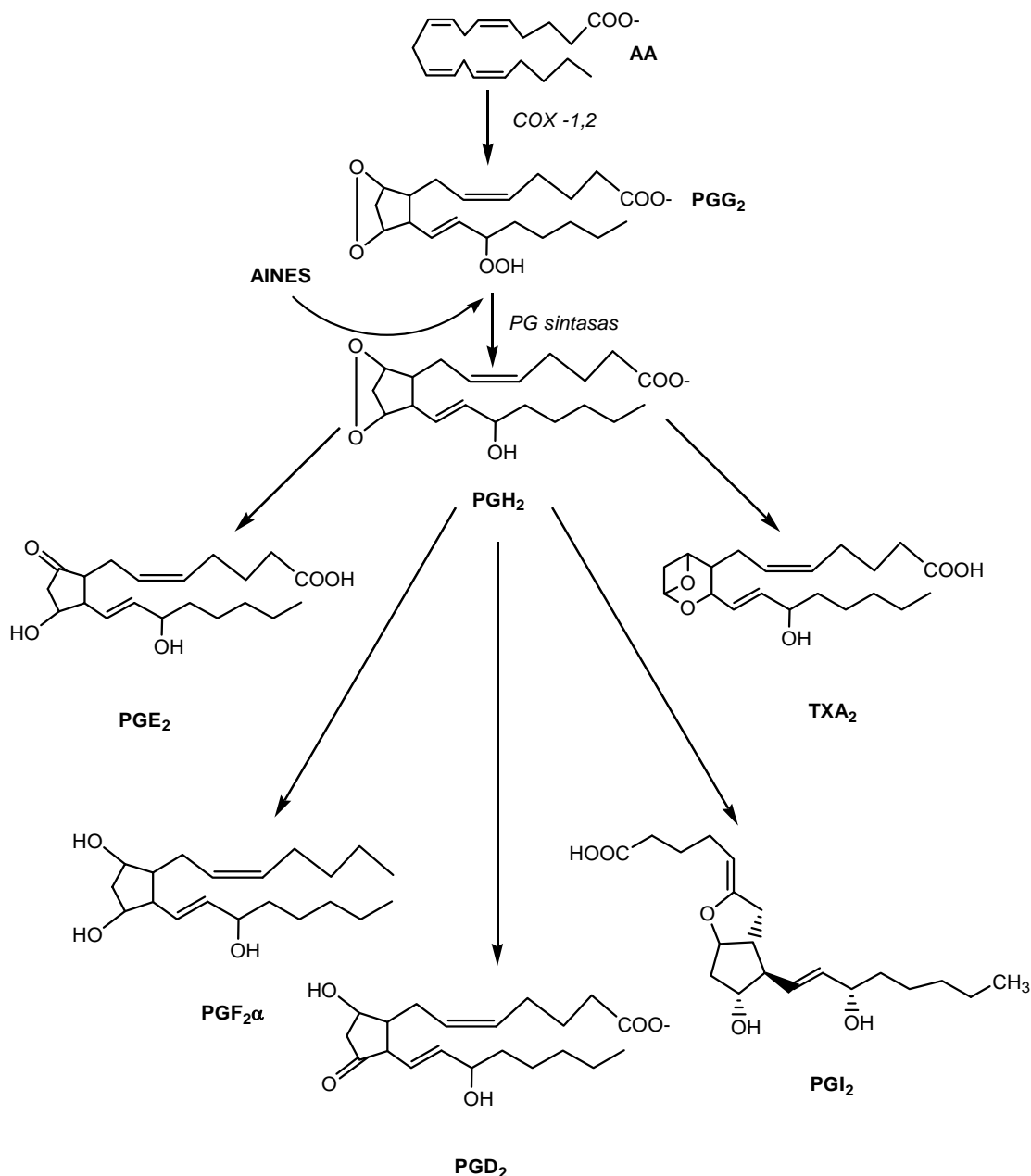
Una vez liberado el ácido araquidónico es metabolizado hasta obtener productos oxigenados por la acción de diferentes sistemas enzimáticos como las ciclooxygenasas, las lipooxygenasas y el citocromo P-450.^{11,12,13}

El ácido araquidónico (AA) liberado es convertido a endoperoxidos de prostaglandinas (PGG₂ y PGH₂) por dos isoenzimas COX-1 y COX-2. Ambas enzimas catalizan la inserción de oxígeno molecular en el C-11 del AA resultando en un endoperoxido ciclopentenil bicíclico, con puentes de oxígeno en los carbonos 9 y 11.⁹ (Fig. 1.8)

11. -Smith, Am. J. physiol **1992**, F181, 268.

12.- Gualde, N; Mundo científico, **1994**, 60, 6.

13.- Sigal, E; Amer. Physical Soc, **1991**

Fig. 1.3 Ruta biosintética cíclica de los prostanoides^{9,11}

La posterior inserción de oxígeno al C-15 produce PGG₂; la actividad peroxidasa también catalizada por COX-1 y COX-2 reduce el grupo 15-hidroperóxido al grupo 15-hidroxilo para formar PGH₂.

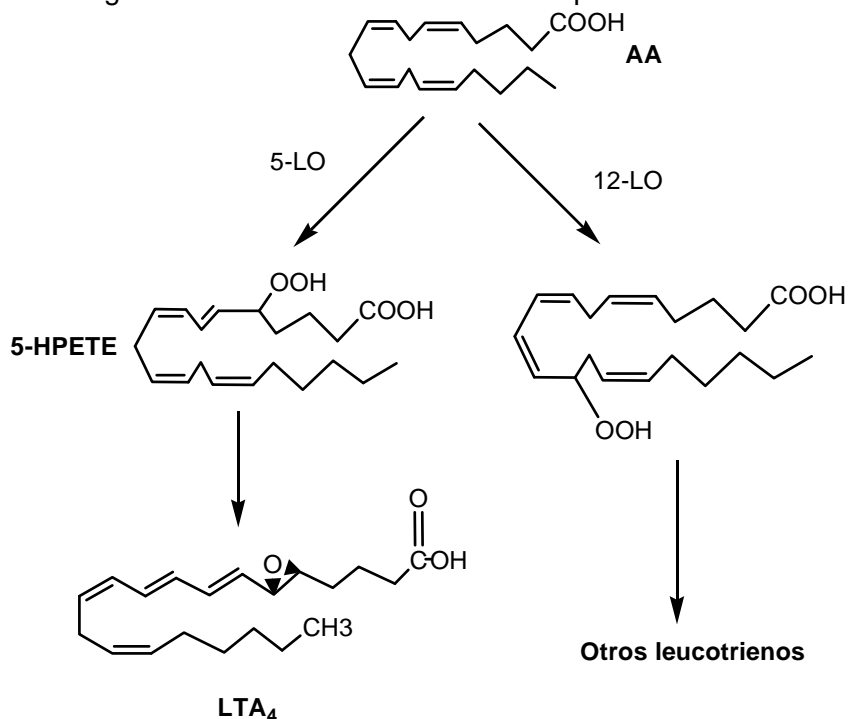
La descomposición espontánea de PGH₂ en solución acuosa, forma una mezcla de PGD₂, PGE₂ y PGF₂.⁹

Los patrones de expresión celular de cada una de estas sintasas pueden ser influenciados por el tipo de prostaglandina producida por una célula en particular. Por ejemplo: las plaquetas producen predominantemente tromboxano A_2 , las células endoteliales PGI_2 y los mastocitos PGD_2 .⁹

La vía de las lipooxigenasas esta representa por tres tipos de enzimas, las llamadas 5, 12 y 15- lipooxigenasas, nombradas así por su habilidad para insertar oxígeno en un carbono específico del ácido araquidónico, cada una de ellas inicia la generación de los diferentes leucotrienos.^{12,13}

La acción de 5-lipooxigenasa (5-LO) sobre el ácido araquidónico (AA) promueve la formación de leucotrienos. La 5-lipooxigenasa es una enzima que actúa como una dioxigenasa estereoespecífica que cataliza la inserción de oxígeno molecular en el ácido araquidónico para la formación de ácido 5-hidroxi-eicosatetraenoico (5-HPETE), la posterior deshidratación enzimática por 5-LO forma leucotrieno A_4 (LTA_4)⁹ (Fig. 1.9)

Todas las sustancias liberadas en ambas vías son responsables del aumento en la permeabilidad vascular, vasodilatación y vasoconstricción, así como el dolor en el sitio de la inflamación.^{12,13}

Fig. 1.4 Ruta biosintética lineal de los prostanoides^{9,14}

1.2.3 Inhibición de la biosíntesis de prostaglandinas por acción de los antiinflamatorios no esteroideos.

Se sabe que existen dos tipos de ciclooxigenasa; ciclooxigenasa-1 (COX-1) y ciclooxigenasa-2 (COX-2) la primera es una isoforma constitutiva que aparece en vasos sanguíneos, riñones y estomago (órgano donde ejerce la citoprotección gástrica). La segunda se presenta en los sitios de inflamación y es regulada por citocinas y mediadores inflamatorios.¹⁵

El ácido acetilsalicílico y los antiinflamatorios no esteroideos inhiben a la enzima ciclooxigenasa pero no a la lipooxigenasa, por cuanto la prostaglandina sintetizada mediante la COX-1 desarrolla protección de la mucosa gastrointestinal, al mantener la capa protectora de moco, aumentar la producción de bicarbonato y disminuir la concentración de ácido clorhídrico.²⁴

14. - Biochemistry; segunda edición; D. Voet & J.G. Voet; John Wiley & Sons, INC; Pag. 707-712

15. - <http://www.laberma.com/dolor/04-inhibicion.htm>

La inhibición de la enzima COX-1 por acción de los diferentes AINES, bloquea la producción de estas prostaglandinas citoprotectoras y como resultado disminuye el valor del pH, se pierde el efecto protector y se causa ulceración gástrica. Por esto se desarrollaron los fármacos antiinflamatorios que no inhiben la COX-1, es decir que no presentan gastropatías postadministración, pero si acción anti-COX-2, bien sea preferencial o específica.¹⁶

En la estructura de la COX-1 la aspirina acetila la serina 530, de modo que impide que se ligue el ácido araquidónico al sitio activo de la enzima y de ese modo, la posibilidad de que esta última elabore prostaglandinas. En el caso de la COX-2, la aspirina acetila una serina homóloga en la posición 516.¹⁵

Las dos isoformas de la ciclooxigenasa difieren en la posición 523; en la COX-2 se posiciona valina que por su estructura permite la creación de un bolsillo lateral de pequeño tamaño. La COX-1 en cambio presenta en dicha posición isoleucina de mayor tamaño, la cual obstruye, oculta y vuelve inaccesible la hendidura para los AINES que actúan sobre ella.¹⁵

Los inhibidores selectivos, se unen a la enzima COX-2 mediante el residuo valina 523, dejando libre la posición serina 530. Los efectos benéficos de los AINES, están asociados con la inhibición de la COX-2 mientras que los efectos adversos perjudiciales, están asociados con la inhibición de la COX-1.¹⁵

Recientemente fue clonada la COX-3, esta enzima cuenta con la propiedad de ser constitutiva como la COX-1,¹⁷ se encuentra presente en el hombre en la corteza cerebral, en el corazón, en la aorta y en la microcirculación de los endotelios.¹⁸ Se estableció que su papel es a nivel de la producción de la fiebre, el dolor a nivel central y no a nivel de la

inflamación.¹⁷ Así mismo se determino que el paracetamol es un inhibidor específico de dicha isoforma.¹⁸

Las plaquetas son especialmente sensibles a la inhibición de la ciclooxigenasa mediada por la aspirina, debido a que poseen escasa o nula habilidad para la biosíntesis de proteínas y de ese modo no regeneran la enzima ciclooxigenasa. En términos prácticos, ello significa que una sola dosis de fármaco inhibirá la ciclooxigenasa plaquetaria durante toda la vida de la plaqueta.¹⁵

1.2.4 Factor de transcripción nuclear Nf-κB.

El NF-κB es un medidor central de la respuesta inmune humana; en la mayoría de las células tipo, esta proteína está compuesta de subunidades p50 y p65. El factor NF-κB es retenido en un complejo citoplásmico el cual está inactivo por permanecer unido a la unidad inhibitoria IκB.

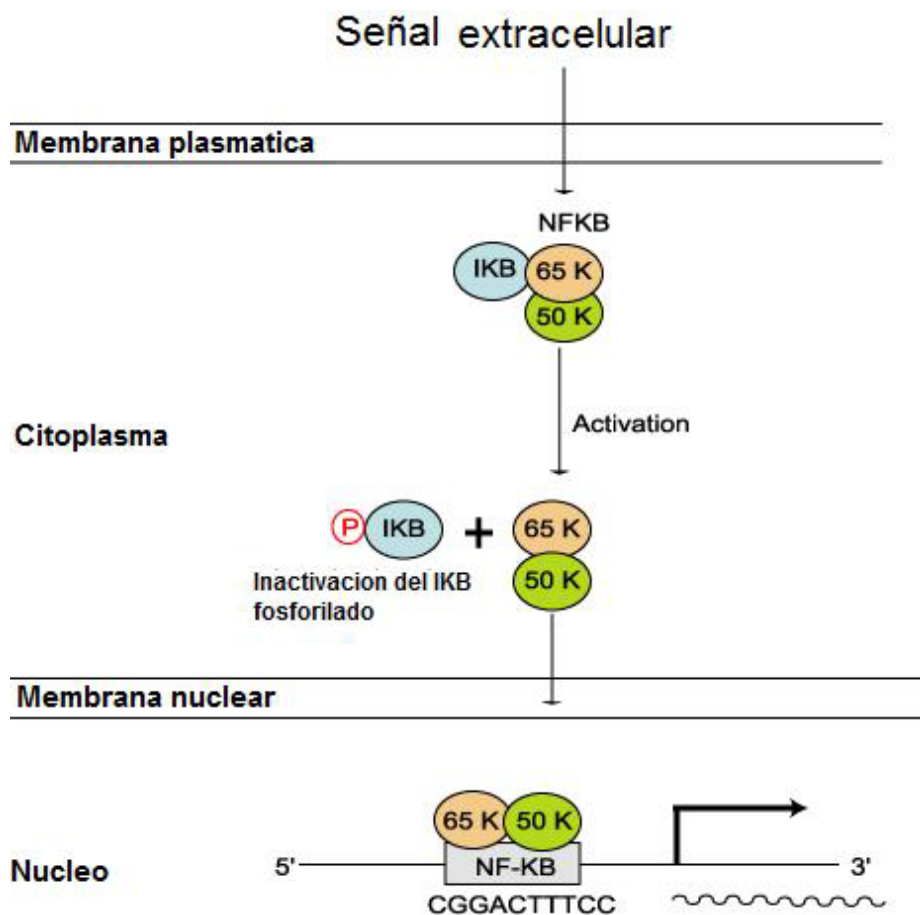
Una larga variedad de condiciones inflamatorias como son infecciones bacteriales y virales, así como, las citoquinas inflamatorias inducen la actividad del NF-κB que regula la transcripción de varias citoquinas inflamatorias como son IL-1, IL-2, IL-6, IL-8 y TNF-α (Fig. 1.10).

16. - <http://www.laberma.com/dolor/03-clasificacion.htm>

17.- Pradilla Vesga, O. E., Med. UNAB; **2004**, 7, No. 21; 181-184.

18.- Laudanno, O. M., San Miguel, P., Aramberry, L. J., Cesolari, J.A., A. Ge. La., **2003**, 33,183-185.

Fig. 1.5 Activación del factor de transcripción nuclear NF-κB



Adaptado de www.chiroweb.com/archives/20/21/18.html.

1.2.5 Inhibición del factor de transcripción nuclear NF-κB por lactonas sesquiterpénicas (SLs).

Las lactonas sesquiterpénicas SLs actúan en la inhibición de los procesos inflamatorios mediante un mecanismo de adición tipo Michael, entre los grupos tiol (-SH) de los residuos de cisteína (Cys) de diversas proteínas con los grupos activos, α -metileno- γ -lactonas ó ciclopentanonas α,β -insaturadas presentes en las lactonas sesquiterpénicas.¹⁹

19.- Rüngeler, P., Castro, V., Mora, G., Gören, N., Vichnewki, W., Pahl, M. L., Merfort, I., and Schmidt, T. J., *Bioorganic and medicinal chemistry*, **1997**, 7, 2343-2352.

20. - www.chiroweb.com/archives/20/21/18.html.

Es de destacar que algunas SLs pueden contener más de un grupo activo, por lo que su grado de actividad antiinflamatoria puede ser mayor.¹⁸

Una sola molécula de SLs bifuncional puede alquilar los residuos 38 y 120 de cisteína en el ADN. Los grupos reactivos de la lactona sesquiterpénica reaccionan con los grupos sulfidrilos de las cisteínas por una adición tipo Michael. Por lo tanto los grupos tiol expuestos en los residuos de cisteína en las proteínas actúan como el objetivo primario para las lactonas sesquiterpénicas.¹⁹

La actividad antiinflamatoria de las SLs fue probada en vivo en edema de pata de rata y en edema de oreja de ratón, observándose que inhiben la formación del enlace entre el ADN y el NF- κ B.²⁰

Anteriormente se encontró evidencia de que las SLs como la partenólida y la helenalina, probablemente actúen por alquilación de la cys-38 en la subunidad p65, mientras que la subunidad p50 no es modificada. Aunque fue detectada una escasa inhibición de la degradación de I κ B por SLs, cuando se determinaron sus efectos secundarios a la alquilación de p65; hay un gran indicio de que este es un mecanismo general de las SLs cuando poseen grupos carbonilos α , β - ó α,β,γ - insaturados reaccionando con nucleófilos, especialmente grupos sulfidrilos por adición tipo Michael.²⁰

Las SLs estudiadas pueden dividirse en tres grupos activos: a) alta actividad inhibitoria, mostrando inhibición (IC₁₀₀) a concentraciones entre 5 y 20 μ M (Grupo 1), b) compuestos con actividad intermedia (IC₁₀₀) con una concentración de 50 μ M (grupo2) y c) baja potencia inhibitoria (Grupo 3) con valores de IC₁₀₀ arriba de 100 μ M.¹⁹

Capítulo 2

Desarrollo Experimental.

2.1 MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS.

2.2 COLECTA DEL MATERIAL VEGETAL.

2.3 OBTENCION DE EXTRACTOS.

2.4 CROMATOGRAFIA DE LOS EXTRACTOS DE DICLOROMETANO.

2.5 PREPARACION DE DERIVADOS DE SANTAMARINA.

2.6 PRUEBA DE ACTIVIDAD BIOLOGICA.

2.1 MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS.

Para aislar la lactona santamarina usada en este trabajo, se utilizó la cromatografía en columna por gravedad (CCG). Estas se realizaron adsorbiendo el extracto vegetal en sílica gel (35-70), en una proporción 1:3 y la sílica gel (70-230), utilizada en la columna en una proporción de 1:30. Las cromatografías en capa delgada (CCD); utilizadas fueron de dos tipos: Preparativa; donde se usaron cromatoplasmas de sílice gel 100 G/UV₂₅₄ 20x20 y 1.0 mm de espesor marca macherey-nagel y analítica donde se utilizaron cromatoplasmas de sílica gel G7UV 254 de 20x20 cm y 0.20 mm de espesor.

Para la evaporación de los disolventes se usó un rotavapor BÜCHI R114 y baño de agua BÜCHI B-480. La visualización de los componentes de cada placa cromatográfica se llevó a cabo mediante la exposición a la luz ultravioleta proveniente de una lámpara portátil modelo Moder-UVLS-26 (254-365 nm) y posterior revelado por aspersion sobre la placa cromatográfica con una solución de sulfato cérico.

Los datos espectroscópicos de RMN-¹H y RMN-¹³C se obtuvieron en equipos Varian-Unity 300 MHz, Varian-Gemini 200 MHz, Eclipse 300 MHz JEOL y Varian-Inova 500 MHz; utilizando en todos los casos disolventes deuterados y TMS como referencia.

Los espectros de infrarrojo (IR) se obtuvieron en los equipos Perkin-Elmer 337 y Bruker Tensor 37. Los espectros de masas se obtuvieron por la técnica de impacto electrónico (EI) en un aparato JEOL JMS-AX5505HA (70eV).

Todos los reactivos utilizados fueron de pureza analítica y/o grado reactivo marca Aldrich y fueron los siguientes: Anhídrido acético, anhídrido hexanoico, anhídrido decanoico, cloruro de lauroilo, cloruro de miristoilo,

cloruro de octanoilo, cloruro de palmitoilo, piridina, ácido-3-cloroperoxibenzoico, tetrahidrofurano, hidróxido de sodio, cloroformo. Los disolventes; hexano, diclorometano, metanol y acetona se adquirieron comercialmente y se destilaron en el laboratorio.

2.2 COLECTA DEL MATERIAL VEGETAL

La planta *Tanacetum parthenium* (L.) Schultz-Bip fue colectada en la Delegación Tlalpan del Distrito Federal. En la Tabla 2.1 se indican las diferentes colectas realizadas para la misma.

Peso de la planta	Extractos obtenidos			Fechas de colecta
	Hex.	Dicl.	Met.	
166.0 gr	3.3 gr	11.6 gr	6.3 gr	16/Jul/2007
500.0 gr	9.9 gr	34.0 gr	18.9 gr	20/May/2008

Tabla 2.1 Colectas realizadas de *Tanacetum parthenium*

2.3 OBTENCION DE EXTRACTOS.

Al material vegetal se le realizaron maceraciones con disolventes de diferentes polaridades a temperatura ambiente, con los siguientes disolventes: éter de petróleo, diclorometano, y metanol. Los disolventes se eliminan por destilación a presión reducida. En la Tabla 2.1 se muestran las cantidades de los extractos obtenidos.

2.4 CROMATOGRAFIA DE LOS EXTRACTOS DE DICLOROMETANO.

2.4.1 Primera colecta (Lote 1).

El extracto de diclorometano (11.6 gr) fue adsorbido en 38.5 g de sílica gel 35/70 para el punto de aplicación, colocándose en una columna empacada con 275 gr de sílica gel 70/230. La columna fue eluída a presión atmosférica primero con hexano al 100%, incrementando posteriormente la polaridad con mezclas de hexano-acetato de etilo a diferentes concentraciones obteniéndose 163 fracciones de 250 ml c/u. La Tabla 2.2 indica las fracciones reunidas según el análisis practicado mediante cromatografía en capa fina, así como los metabolitos secundarios aislados a partir de las mismas.

Eluato	Fracción	Peso (mg)	Sistema de elusión (Hex-AcOEt)	Sustancia identificada
1-11	A	—	100:0	—
12-18	B	—	95:05	—
19-25	C	—	90:10	—
26-41	D	—	80:20	—
42-57	E	—	70:30	—
58-69	F	—	60:40	—
70-75	G	947.7	60:40	santamarina
76-81	H	484.6	60:40	santamarina y reynosina
82-91	I	1033.8	60:40	reynosina
93-99	J	205.6	60:40	santina
103-123	K	—	50:50	—
124-134	L	—	40:60	—

Tabla 2.2 Fracciones obtenidas de la CCG del extracto de diclorometano (Lote 1)

2.4.2 Segunda colecta (Lote 2).

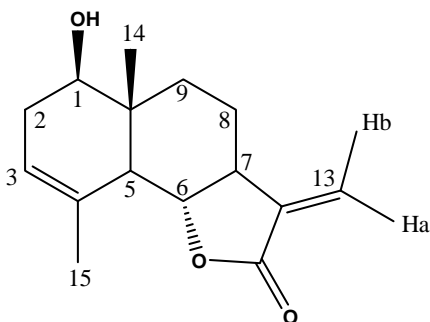
Del extracto de diclorometano 10.0 gr fueron adsorbidos en 25.0 g de sílica gel 35/70 para el punto de aplicación, colocándose en una columna empacada con 250 gr de sílica gel 70/230. La columna fue eluída a presión atmosférica primero con hexano al 100%, incrementando posteriormente la polaridad con mezclas de hexano-acetato de etilo a diferentes concentraciones obteniéndose 103 fracciones de 250 ml c/u. La Tabla 2.3 indica las fracciones reunidas según el análisis practicado mediante cromatografía en capa fina, así como los metabolitos secundarios aislados a partir de las mismas.

<i>Eluato</i>	<i>Fracción</i>	<i>Peso (mg)</i>	<i>Sistema de elusión (Hex-AcOEt)</i>	<i>Sustancia identificada</i>
1 – 10	A	—	100:0	—
11–20	B	—	95:05	—
21–28	C	—	90:05	—
29–32	D	—	80:20	—
33–40	E	—	70:30	—
46–52	F	387.3	60:40	flavona
53–57	G	377.9	60:40	santamarina
58–70	H	1180.5	60:40	santamarina y reynosina
74–81	I	514.8	60:40	reynosina
82-90	J	241.2	60:40	santina
91-95	K	—	60:40	—
96-103	L	—	50:50	—

Tabla 2.3 Fracciones obtenidas de la CCG del extracto de diclorometano (Lote 2)

SANTAMARINA

En las fracciones eluidas con hexano-acetato de etilo (6:4), se aisló la lactona santamarina, como un sólido incoloro, la cual presenta los siguientes datos espectroscópicos.



RMN ^1H (CDCl_3), 500 MHz, δ ppm: 0.88 (3H,s, H-14); 1.31 (1H, td, $J=14.0$ y 4.0 Hz, H-9 α); 1.65 (1H, cd, $J=12.5$ y 3.5 Hz, H-8 β); 1.84 (3H, sa, H-15); 1.98 (1H, m, H-2 β); 2.06 (1H, m, H-9 β); 2.08 (1H, m, H-8 α); 2.35 (1H, da $J=11.5$ Hz, H-5); 2.39 (1H, m, H-2 α); 2.50 (1H, m, H-7); 3.68 (1H, dd, $J=9.5$ y 6.5 Hz, H-1); 3.95 (1H, t, $J=11.0$ Hz, H-6); 5.35 (1H, sa, H-3); 5.41 (1H, d, $J=3.0$ Hz, H-13a); 6.07 (1H, d, $J=3.5$ Hz, H-13b).

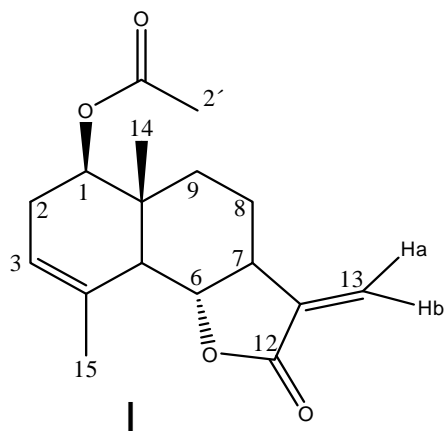
RMN ^{13}C (CDCl_3), 125 MHz, δ ppm: 11.03 (C-14); 21.17 (C-8); 23.26 (C-15); 32.77 (C-2); 34.28 (C-9); 40.88 (C-10); 51.03 (C-7); 51.18 (C-5); 75.17 (C-1); 81.53 (C-6); 116.71 (C-13); 121.32 (C-3); 133.41 (C-4); 139.04 (C-11); 170.73 (C-12).

2.5 PREPARACION DE DERIVADOS DE SANTAMARINA.

2.5.1 ACETILACION

2.5.1.1 Reacción de santamarina con anhídrido acético (I).

En un matraz de 20 ml se disolvieron 70.0 mg (0.2823 mmol) de santamarina en 1.0 ml de piridina; a esta disolución se le agregaron lentamente 0.5 ml de anhídrido acético con agitación y a temperatura ambiente. Se dejó reaccionar durante 2 horas; pasado este tiempo se eliminó el solvente con una bomba de vacío quedando un residuo café el cual se purificó mediante cromatografía en placa preparativa con una mezcla de hexano/acetona 7:3, obteniéndose 58.8 mg (0.2028 mmol) de acetato de santamarina, con un rendimiento de 71.84 %



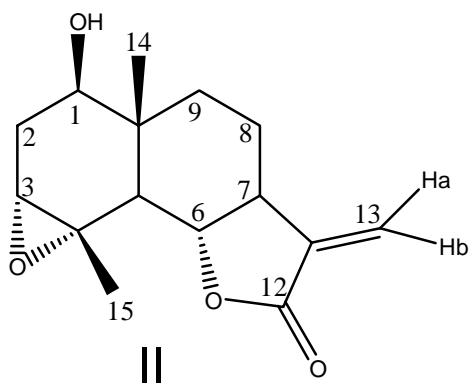
RMN ^1H (CDCl_3), 300 MHz, δ ppm: 0.98 (3H, sa, H-14); 1.26 (1H, m, H-9 α); 1.32 (1H, dt, $J=12.9$ y 4.2 Hz, H-8 β); 1.62 (1H, dc, H-8 α); 1.82 (1H, m, H-9 β); 1.85 (3H, sa, H-15); 2.02 (1H, m, H-2 β); 2.06 (3H, s, H-2'); 2.49 (3H, m, H-2 α , H-5, H-7); 3.93 (1H, t, $J=11.1$ Hz, H-6); 4.90 (1H, dd, $J=6.6$ y 9.9 Hz, H-1); 5.35 (1H, s,a, H-3); 5.41 (1H, d, $J=3.0$ Hz, H-13a); 6.10 (1H, d, $J=3.3$ Hz, H-13b).

RMN ^{13}C (CDCl_3), 75.4 MHz, δ ppm: 12.25 (C-14); 20.96 (C-8); 21.02 (C-2'); 23.16 (C-15); 29.36 (C-2); 34.03 (C-9); 39.66 (C-10); 50.82 (C-7); 50.94 (C-5); 76.72 (C-1); 81.08 (C-6); 116.84 (C-13); 120.86 (C-3); 133.26 (C-4); 138.38 (C-11); 170.50 (C-12); 170.58 (C-1').

2.5.2 EPOXIDACION

2.5.2.1 Reacción de santamarina con mCPBA¹ (II).

En un matraz de 20 ml se disolvieron 43.0 mg (0.1733 mmol) de santamarina en 10.0 ml de cloroformo; a esta disolución se le agregaron 90.0 mg de ácido meta-cloro-perbenzoico, con agitación y a temperatura ambiente. Se dejó reaccionar durante 10 minutos; pasado este tiempo se extrae el solvente con una solución al 5% de carbonato de sodio, se evaporó el solvente a presión reducida quedando un residuo el cual se purifica mediante cromatografía en placa preparativa con una mezcla de hexano/acetona 6:4, obteniéndose 34.4 mg (0.1211 mmol) de epóxido de santamarina, con un rendimiento de 69.89 %.



RMN ¹H (CDCl₃), 300 MHz, δ ppm: 0.90 (3H, sa, H-14); 1.20 (1H, m, H-9 α); 1.47 (3H, sa, H-15); 1.85 (1H, m, H-2 α); 1.92 (1H, m, H-9 β); 2.38 (1H, m, H-2 β); 2.46 (1H, ddd, $J=12.0$ y 3.3 Hz, H-7); 3.00 (1H, d, $J=3.0$ Hz, H-3); 3.36 (1H, dd, $J=6.6$ y 9.9 Hz, H-6); 3.93 (1H, t, $J=11.3$ Hz, H-1); 5.43 (1H, d, $J=3.0$ Hz, H-13a); 6.06 (1H, d, $J=3.3$ Hz, H-13b).

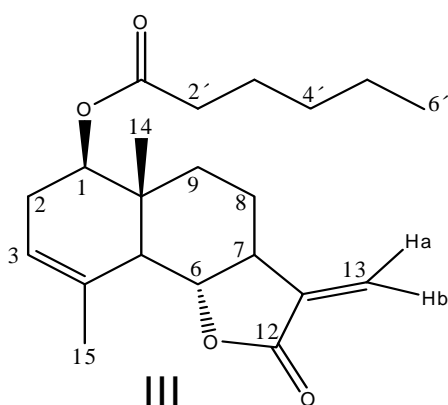
RMN ¹³C (CDCl₃), 75.4 MHz, δ ppm: 11.28 (C-14); 20.47 (C-8); 21.09 (C-15); 30.50 (C-2); 33.79 (C-9); 39.75 (C-10); 49.95 (C-7); 52.09 (C-5); 56.72 (C-4); 60.45 (C-3); 72.32 (C-1); 80.41 (C-6); 116.54 (C-13); 138.19 (C-11); 169.80 (C-12).

1.- Phytochemistry, **1978**, 17, 953-954)

2.5.3 OBTENCION DE ESTERES DE ALTO PESO MOLECULAR

2.5.3.1 Reacción de santamarina con anhídrido hexanoico.

En un matraz de 20 ml se disolvieron 50.0 mg (0.2016 mmol) de santamarina en 1.0 ml de piridina; a esta disolución se le agregaron 50 mg de anhídrido hexanoico, se reflujo con agitación por 2 horas, pasado este tiempo se eliminó el solvente con una bomba de vacío quedando un residuo café el cual se purificó mediante cromatografía en placa preparativa con una mezcla de hexano/acetona 8:2, obteniéndose 46.0 mg (0.1330 mmol) de hexanoato de santamarina (III) con un rendimiento de 65.97 %.



RMN ^1H (CDCl_3), 300 MHz, δ ppm: 0.90 (3H, t, $J=6.9$ Hz, H-6'); 0.97 (3H, sa, H-14); 1.32 (5H, m, H-9 α , H-5', H-4'); 1.63 (2H, m, H-8 β , H-3'); 1.79 (1H, m, H-9 β); 1.85 (3H, sa, H-15); 2.01 (1H, m, H-8 α); 2.06 (1H, m, H-2 β); 2.31 (2H, t, $J=7.5$ Hz, H-2'); 2.45 (1H, m, H-5); 2.49 (2H, m, H-2 α , H-7); 3.92 (1H, t, $J=11.1$ Hz, H-6); 4.89 (1H, dd, $J=6.9, 9.9$ Hz, H-1); 5.35 (1H, s,a, H-3); 5.40 (1H, d, $J=3.0$ Hz, H-13a); 6.07 (1H, d, $J=3.3$ Hz, H-13b).

RMN ^{13}C (CDCl_3), 75.4 MHz, δ ppm: 12.38 (C-14); 13.88 (C-6'); 21.04 (C-8); 22.27 (C-5'); 23.22 (C-15); 24.71 (C-3'); 29.48 (C-2); 31.28 (C-4'); 34.11 (C-9); 34.53 (C-2'); 39.75 (C-10); 50.88 (C-7); 51.01 (C-5); 76.50 (C-1); 81.14 (C-6); 116.84 (C-13); 120.94 (C-3); 133.30 (C-4); 138.86 (C-11); 170.53 (C-12); 173.33 (C-1').

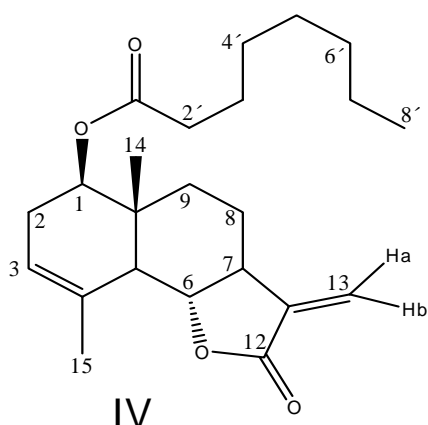
IR ν max. cm^{-1} (CHCl_3): 1773 (C=O lactona); 1734 (C=O éster alifático).

EMIE 70 eV m/z (Int. Rel.): 346 M^+ [$\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{O}_4$] (1.4); 230 [$\text{M}^+ - \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_2$] (100); 215 [230 - CH_3] (31.3).

2.5.3.2 Reacción de santamarina con cloruro de octanoilo.

En un matraz de 20 ml se disolvieron 70.0 mg (0.2823 mmol) de santamarina en 1.0 ml de tetrahidrofurano; a esta disolución se le adicionó lentamente 0.5 ml de cloruro de octanoilo y gota a gota 1.0 ml de hidróxido de sodio. La reacción se deja en reflujo por 6 horas. Pasado este tiempo la reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente eliminando el disolvente en un rotavapor a presión reducida, obteniéndose un residuo que se lavó con una solución de carbonato de sodio al 5% para eliminar el ácido formado. El residuo se purificó mediante cromatografía en placa preparativa con una mezcla de hexano/acetona 8:2, obteniéndose 24.5 mg (0.066 mmol) de octanoato de santamarina (IV), con un rendimiento de 23.21 %.

Este éster no pudo obtenerse con la técnica con la cual se obtuvo el acetato de santamarina.



RMN ^1H (CDCl_3), 300 MHz, δ ppm: 0.89 (3H, t, $J=6.9$ Hz, H-8'); 0.98 (3H, sa, H-14); 1.29 (9H, m, H-9 α , H-4' H-5', H-6', H-7'); 1.62 (3H, m, H-8 β , H-3'); 1.82 (1H, m, H-9 β); 1.85 (3H, sa, H-15); 2.01 (1H, m, H-8 α); 2.06 (1H, m, H-2 β); 2.31 (2H, t, $J=7.8$ Hz, H-2'); 2.46 (1H, m, H-5); 2.49 (2H, m, H-2 α , H-7); 3.93 (1H, t, $J=10.8$ Hz, H-6); 4.90 (1H, dd, $J=6.7, 9.7$ Hz, H-1); 5.35 (1H, sa, H-3); 5.41 (1H, d, $J=3.0$ Hz, H-13a); 6.09 (1H, d, $J=3.3$ Hz, H-13b).

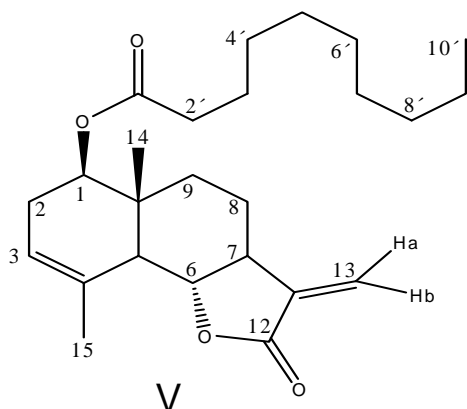
RMN ^{13}C (CDCl_3), 75.4 MHz, δ ppm: 12.36 (C-14); 14.06 (C-8'); 21.00 (C-8); 22.58 (C-7'); 23.28 (C-15); 25.05 (C-3'); 28.90 (C-5'); 29.09 (C-4'); 29.43 (C-2); 31.65 (C-6') 34.00 (C-9); 34.57 (C-2'); 39.71 (C-10) 50.85 (C-7); 50.95 (C-5); 76.43 (C-1); 81.13 (C-6); 116.97 (C-13); 120.93 (C-3); 133.27 (C-4); 138.78 (C-11); 170.63 (C-12); 173.39 (C-1')

IR ν max. cm^{-1} (CHCl_3): 1766 (C=O lactona); 1726 (C=O éster alifático).

EMIE 70 eV m/z (Int. Rel.): 402 M^+ [$\text{C}_{25}\text{H}_{38}\text{O}_4$]; 230 [$\text{M}^+ - \text{C}_{10}\text{H}_{20}\text{O}_2$] (100); 215 [$230 - \text{CH}_3$] (48.3).

2.5.3.3 Reacción de santamarina con anhídrido decanóico.

En un matraz de 20 ml se disolvieron 62.0 mg (0.25 mmol) de santamarina en 1.0 ml de piridina; a esta disolución se le agregaron 80 mg de anhídrido decanóico, la reacción se dejó en reflujo con agitación por 10 horas. Pasado este tiempo se llevó a temperatura ambiente y se eliminaron los reactivos con una bomba de vacío, obteniéndose un residuo café el cual se purificó mediante cromatografía en placa preparativa con una mezcla de hexano/acetona 8:2, obteniéndose 20.0 mg (0.050 mmol) de decanoato de santamarina (V) con un rendimiento de 19.9 %



RMN ^1H (CDCl_3), 300 MHz, δ ppm: 0.89 (3H, t, $J=6.9$ Hz, H-10'); 0.98 (3H, sa, H-14); 1.27 (13H, m, H-9 α , H-4' H-5', H-6', H-7', H-8', H-9'); 1.62 (3H, m, H-8 β , H-3'); 1.82 (1H, m, H-9 β); 1.85 (3H, sa, H-15); 2.00 (1H, m, H-8 α); 2.06 (1H, m, H-2 β); 2.35 (2H, t, $J=7.8$ Hz, H-2'); 2.46 (1H, m, H-5); 2.49 (2H, m, H-2 α , H-7); 3.93 (1H, t,

$J=10.8$ Hz, H-6); 4.90 (1H, dd, $J=6.7, 9.7$ Hz, H-1); 5.35 (1H, sa, H-3); 5.41 (1H, d, $J=3.0$ Hz, H-13a); 6.09 (1H, d, $J=3.3$ Hz, H-13b).

RMN ^{13}C (CDCl_3), 75.4 MHz, δ ppm: 12.35 (C-14); 14.08 (C-10'); 21.02 (C-8); 22.63 (C-9'); 24.67 (C-15); 25.05 (C-3'); 29.04 (C-4'); 29.13 (C-5'); 29.22 (C-7'); 29.36 (C-2); 29.40 (C-6'); 31.82 (C-8'); 33.94 (C-2'); 34.58 (C-9); 39.70 (C-10); 50.86 (C-7); 50.96 (C-5); 76.58 (C-1); 81.16 (C-6); 116.95 (C-13); 120.94 (C-3); 133.29 (C-4); 138.80 (C-11); 170.65 (C-12); 173.43 (C-1').

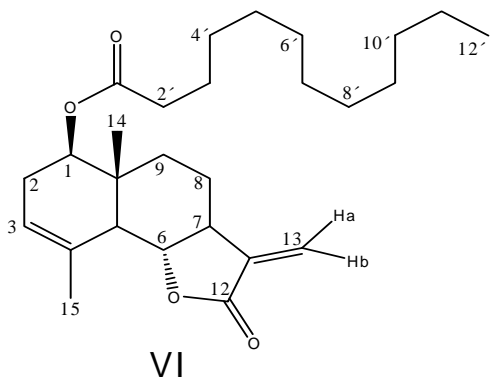
IR ν max. cm^{-1} (CHCl_3): 1775 (C=O lactona); 1735 (C=O éster alifático).

EMIE 70 eV m/z (Int. Rel.): 402 M^+ [$\text{C}_{25}\text{H}_{38}\text{O}_4$] (0.7); 230 [$\text{M}^+ - \text{C}_{10}\text{H}_{20}\text{O}_2$] (100); 215 [230 - CH_3] (28.8).

2.5.3. Reacción de santamarina con cloruro de lauroilo.

En un matraz de 20 ml se disolvieron 50.0 mg (0.2016 mmol) e santamarina en 10 ml de tetrahidrofurano; a esta disolución se le agregó lentamente 0.5 ml de cloruro de lauroilo y tres gotas de trietilamina; la reacción se reflujo con agitación durante 16 horas, y pasado este tiempo se dejó enfriar a temperatura ambiente eliminando el solvente por evaporación en un rotavapor a presión reducida, quedando un residuo que se disuelve en acetato de etilo y se lava con carbonato de sodio al 5% para eliminar el ácido formado. La solución se secó con sulfato de sodio anhidro y el disolvente se eliminó en un rotavapor a presión reducida. El residuo se purificó en cromatografía preparativa con una mezcla de hexano/acetona 8:2, obteniéndose 40.0 mg (0.093 mmol) de laurato de santamarina (VI), con un rendimiento de 46.14 %.

En la reacción de esterificación con cloruro de lauroilo en presencia de una solución de hidróxido de sodio no se obtuvo el éster correspondiente, por lo que fue necesario usar una base orgánica (triethyl amina).



RMN ^1H (CDCl_3), 300 MHz, δ ppm: 0.88 (3H, t, $J=10.8$ Hz, H-12'); 0.98 (3H, sa, H-14); 1.26 (17H, m, H-9 α , H-4', H-5', H-6', H-7', H-8', H-9', H-10', H-11'); 1.62 (3H, m, H-8 β , H-3'); 1.81 (1H, m, H-9 β); 1.85 (3H, sa, H-15); 2.02 (1H, m, H-8 α); 2.05 (1H, m, H-2 β); 2.30 (2H, $J=7.8$ Hz, H-2'); 2.45 (1H, m, H-5); 2.49 (2H, m, H-2 α , H-7); 3.92 (1H, t, $J=10.8$ Hz, H-6); 4.89 (1H, dd, $J=6.6, 9.9$ Hz, H-1); 5.35 (1H, sa, H-3); 5.40 (1H, d, $J=3.0$ Hz, H-13a); 6.08 (1H, d, $J=3.3$ Hz, H-13b).

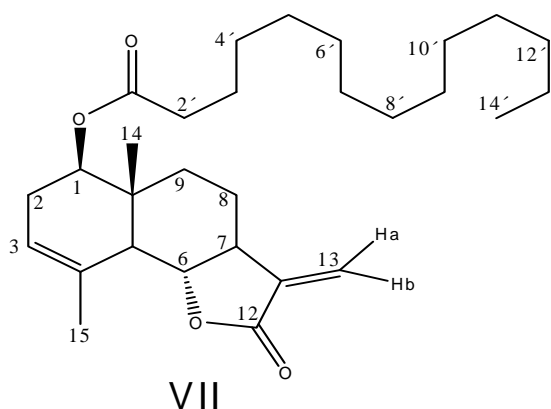
RMN ^{13}C (CDCl_3), 75.4 MHz, δ ppm: 12.35 (C-14); 14.05 (C-12'); 21.03 (C-8); 22.63 (C-11); 23.20 (C-15); 25.05 (C-3'); 29.12 (C-4'); 29.20 (C-5'); 29.29 (C-9'); 29.44 (C-2); 29.47 (C-7'); 29.55 (C-6' y C-8'); 31.87 (C-10'); 34.11 (C-2'); 34.56 (C-9); 39.74 (C-10); 50.88 (C-7); 50.99 (C-5); 76.48 (C-1); 81.11 (C-6); 116.83 (C-13); 120.94 (C-3); 133.30 (C-4); 138.86 (C-11); 170.51 (C-12); 173.32 (C-1').

IR ν max. cm^{-1} (CHCl_3): 1777 (C=O lactona); 1735 (C=O éster alifático).

EMIE 70 eV m/z (Int. Rel.): 430 M^+ [$\text{C}_{27}\text{H}_{42}\text{O}_4$] (0.7); 230 [$\text{M}^+ - \text{C}_{12}\text{H}_{24}\text{O}_2$] (100.0); 215 [230 - CH_3] (40.2).

2.5.3.5 Reacción de santamarina con cloruro de miristoilo.

En un matraz de 20 ml se disolvieron 75.0 mg (0.3024 mmol) de santamarina en 10 ml de tetrahidrofurano; a esta disolución se le agregó lentamente 0.5 ml de cloruro de miristoilo y tres gotas de trietilamina. Siguiendo el mismo procedimiento para la obtención de laurato de santamarina se obtuvieron 38.5 mg (0.084 mmol) de miristato de santamarina (VII), con un rendimiento de 27.80 %.



RMN ^1H (CDCl_3), 500 MHz, δ ppm: 0.88 (3H, t, $J=10.8$ Hz, H-14'); 0.98 (3H, sa, H-14); 1.26 (21H, m, H-9 α , H-4', H-5', H-6', H-7', H-8', H-9', H-10', H-11', H-12', H-13'); 1.62 (3H, m, H-8 β , H-3'); 1.81 (1H, m, H-9 β); 1.85 (3H, sa, H-15); 2.02 (2H, m, H-8 α , H-2 β); 2.31 (2H, $J=7.8$ Hz, H-2'); 2.46 (1H, m, H-5); 2.49 (2H, m, H-2 α , H-7); 3.92 (1H, t, $J=10.8$ Hz, H-6); 4.90 (1H, dd, $J=6.6, 9.9$ Hz, H-1); 5.35 (1H, sa, H-3); 5.40 (1H, d, $J=3.0$ Hz, H-13a); 6.08 (1H, d, $J=3.3$ Hz, H-13b).

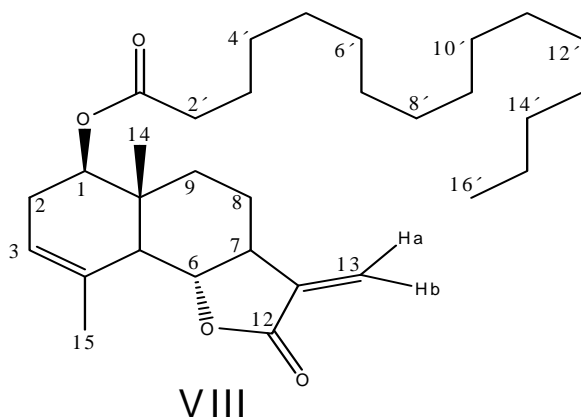
RMN ^{13}C (CDCl_3), 125.7 MHz, δ ppm: 12.37 (C-14); 14.08 (C-14'); 21.04 (C-8); 22.66 (C-13'); 23.23 (C-15); 25.06 (C-3'); 29.13 (C-4'); 29.23 (C-5'); 29.33 (C-11'); 29.45 (C-2); 29.47 (C-6' y C-10'); 29.57 (C-7'); 29.62 (C-8'); 29.66 (C-9'); 31.90 (C-12'); 34.11 (C-2'); 34.58 (C-9); 39.74 (C-10); 50.88 (C-7); 51.00 (C-5); 76.47 (C-1).

IR ν max. cm^{-1} (CHCl_3): 1777 (C=O lactona); 1735 (C=O éster alifático).

EMIE 70 eV m/z (Int. Rel.): 458 M^+ [$\text{C}_{29}\text{H}_{46}\text{O}_4$]; 230 [$\text{M}^+ - \text{C}_{14}\text{H}_{28}\text{O}_2$] (100); 215 [$230 - \text{CH}_3$] (24.2).

2.5.3.6 Reacción de santamarina con cloruro de palmitoilo.

En un matraz de 20 ml se disolvieron 75.6 mg (0.3048 mmol) de santamarina en 10 ml de tetrahidrofurano; a esta disolución se le agregan lentamente 0.5 ml de cloruro de palmitoilo y tres gotas de trietilamina. Siguiendo el mismo procedimiento para la obtención de laurato de santamarina se obtuvieron 44.0 mg (0.0905 mmol) de palmitato de santamarina (VIII), con un rendimiento de 29.70 %.



VIII

RMN ^1H (CDCl_3), 500 MHz, δ ppm: 0.88 (3H, t, $J=10.8$ Hz, H-16'); 0.98 (3H, sa, H-14); 1.26 (25H, m, H-9 α , H-4', H-5', H-6', H-7', H-8', H-9', H-10', H-11', H-12', H-13', H-14', H-15'); 1.62 (3H, m, H-8 β , H-3'); 1.81 (1H, m, H-9 β); 1.85 (3H, sa, H-15);

2.02 (2H, m, H-8 α , H-2 β); 2.31 (2H, $J=7.8$ Hz, H-2'); 2.46 (1H, m, H-5); 2.49 (2H, m, H-2 α , H-7); 3.92 (1H, t, $J=10.8$ Hz, H-6); 4.90 (1H, dd, $J=6.6, 9.9$ Hz, H-1); 5.35 (1H, sa, H-3); 5.40 (1H, d, $J=3.0$ Hz, H-13a); 6.08 (1H, d, $J=3.3$ Hz, H-13b).

RMN ^{13}C (CDCl_3), 75.4 MHz, δ ppm: 12.39 (C-14); 14.10 (C-16'); 21.07 (C-8); 22.68 (C-15'); 23.25 (C-15); 25.08 (C-3'); 29.16 (C-4' y C-12'); 29.25 (C-5' y C-13'); 29.35 (C-6' y C-10'); 29.48 (C-2); 29.60 (C-7' y C-11'); 29.66 (C-8'); 29.68 (C-9'); 31.93 (C-14'); 34.16 (C-2'); 34.61 (C-9); 39.78 (C-10); 50.92 (C-7); 51.04 (C-5); 76.50 (C-1); 81.14 (C-6); 116.84 (C-13); 120.98 (C-3); 133.35 (C-4); 138.89 (C-11); 170.53 (C-12); 173.35 (C-1').

IR ν max. cm^{-1} (CHCl_3): 1773 (C=O lactona); 1734 (C=O éster alifático).

EMIE 70 eV m/z (Int. Rel.): 486 M^+ [$\text{C}_{31}\text{H}_{50}\text{O}_4$]; 230 [$\text{M}^+ - \text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{O}_2$] (100); 215 [$230 - \text{CH}_3$] (35.3).

2.5.4 OBTENCION DEL ESTER METILICO DEL ACETATO DE SAUSSUREAMINA D² (IX)

2.5.4.1 Preparación de acetato de santamarina.

Se prepararon 59 mg (0.2034 mmol) de acetato de santamarina con la técnica descrita anteriormente.

2.5.4.2 Condensación de santamarina con L-prolina.

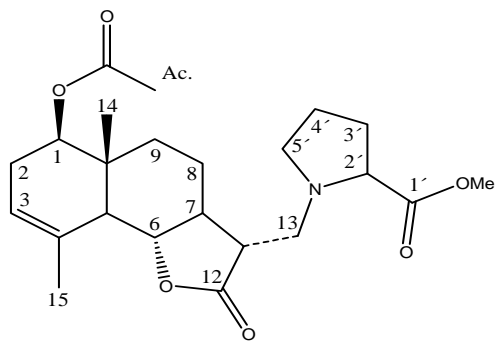
En un matraz de 20 ml se disolvieron 59 mg de acetato de santamarina en 5.0 ml de etanol; a esta disolución se le agregaron 60.0 mg de L-Prolina y 0.05 ml de trietilamina la reacción se mantuvo a reflujo con agitación durante 2 horas. Pasado este tiempo llevó a temperatura ambiente y se eliminó el solvente por evaporación en un rotavapor a presión reducida quedando un residuo viscoso.

2.5.4.3 Esterificación con diazometano.

El residuo anterior se disolvió en diclorometano y se le adicionó una solución recién preparada de diazometano. Se dejó reaccionar durante una hora; pasado este tiempo se eliminó el solvente en un rotavapor, quedando un residuo que se purificó mediante cromatografía en placa preparativa con una mezcla de hexano/acetona 8:2, obteniéndose 32.7 mg (0.0784 mmol) del éster metílico del acetato de saussureamina D con un rendimiento de 38.55 %

2.5.4.4 Preparación de diazometano.

En un embudo de separación se agregaron 15.0 ml de solución de hidróxido de potasio al 40% y 5.0 ml de éter etílico, se agregaron lentamente y sin mezclar 100.0 mg de nitroso-metil-urea y se dejó reposar hasta que cese el burbujeo; pasado este tiempo se eliminó la solución de hidróxido de potasio, quedando una solución etérea de diazometano.



IX

RMN ^1H (CDCl_3), 300 MHz, δ ppm: 0.98 (3H, sa, H-14); 1.28 (1H, dt, $J=14.0$ y 4.0 Hz, H-9 α); 1.53 (1H, dc, $J=12.5$ y 3.5 Hz, H-8 β); 1.78 (1H, m, H-9 β); 1.80 (2H, m, H-4'); 1.81 (3H, sa, H-15); 1.94 (1H, m, H-7); 1.98 (3H, m, H-8 α , H-3'); 2.05 (3H, sa, Ac); 2.44 (4H, m, H-2, H-5, H-11);

2.61 (1H, m, H-5'a); 2.93 (1H, m, H-13); 3.04 (1H, m, H-5'b); 3.10 (1H, dd, $J=5.4, 8.1$ Hz, H-13); 3.45 (1H, sa, H-2'); 3.70 (3H, s, OMe); 3.94 (1H, t, $J=10.8$ Hz, H-6); 4.88 (1H, dd, $J=6.9, 9.9$ Hz, H-1); 5.33 (1H, s,a, H-3).

RMN ^{13}C (CDCl_3), 75.4 MHz, δ ppm: 12.31 (C-14); 21.06 (C-2Ac); 22.76 (C-8); 23.19 (C-15); 23.65 (C-4'); 29.25 (C-3'); 29.45 (C-2); 34.48 (C-9); 39.53 (C-10); 45.59 (C-11); 49.57 (C-7); 50.52 (C-5); 51.65 (C-13 y MeO); 54.09 (C-5'); 66.35 (C-2'); 80.99 (C-6); 76.87 (C-1); 120.69 (C-3); 133.54 (C-4); 170.58 (C-1Ac.); 174.56 (C-1'); 178.12 (C-12).

IR ν max. cm^{-1} (CHCl_3): 1769 (C=O lactona); 1733 (C=O acetato y C=O éster metílico).

EMIE 70 eV m/z (Int. Rel.): 419 M^+ [$\text{C}_{23}\text{H}_{33}\text{NO}_6$] (2.1); 360 [$\text{M}^+ - \text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2$] (100); 300 [$\text{M}^+ (-\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2 - \text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)$] (1.4); 232 [$\text{M}^+ (\text{C}_6\text{H}_{10}\text{NO}_2 - \text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)$] (0.7); 142 (7.5).

Muestra	mg	Rendimiento
Acetato	58.8 mg	71.84 %
Epóxido	34.4 mg	69.89 %
Hexanoato	46.0 mg	65.97 %
Octanoato	24.5 mg	23.21 %
Decanoato	32.0 mg	19.90 %
Laurato	40.0 mg	46.14 %
Miristato	38.5 mg	27.80 %
Palmitato	44.0 mg	29.70 %
Ester metílico del acetato de saussureamina D	32.7 mg	38.55 %

Tabla 2.4 Rendimientos de los derivados obtenidos de santamarina.

2.6 PRUEBA DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA.

2.6.1 Edema Auricular Inducido Por Esteres De Forbol.

Fundamentación teórica.

El método del edema auricular se basa en la aplicación de un agente irritante en la oreja del ratón. Los agentes más usados son los esterres de forbol: TPA (Acetato de Tetradecanoil Forbol, por sus siglas en inglés). Este último es uno de los componentes responsables de la acción irritante del aceite de crotón en el pabellón auditivo del ratón. La respuesta inflamatoria que se origina por acción de éstos agentes consiste en eritema, edema, e infiltración por leucocitos polimorfonucleares.

También se liberan mediadores tipo eicosanoides y se induce la degranulación de mastocitos; en consecuencia las sustancias inhibidoras de la biosíntesis de prostaglandinas y leucotrienos son evaluables por este modelo.

2.6.2 Edema auricular por TPA.

Fueron usados lotes de 4 ratones suizos machos pesando entre 20 y 25 g cada uno. Los ratones fueron adquiridos del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. Todos los animales se mantuvieron en condiciones de laboratorio estándar a temperaturas de 27 ± 1 °C con un ciclo de 12/12 horas de luz- oscuridad. Estos fueron alimentados con dieta y agua *ad libitum*.

Descripción de la técnica:

El TPA se disolvió en acetona (0.4 mg/1ml) La aplicación en la oreja del ratón se hizo con micro pipeta, depositando 5 μ L por cada cara (interna y externa) del pabellón de la oreja derecha, de tal modo que la cantidad final de PMA fuera 4 μ g.

Diez minutos después el extracto o sustancia a probar fueron aplicados en la cara interna y externa de la oreja derecha a diferentes dosis. A la oreja izquierda se le aplicaron únicamente 10 μ L de acetona. El fármaco de referencia que se utilizó fue la indometacina.

Transcurridas 4 horas los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y con ayuda de un sacabocados, se corta una porción circular de aproximadamente 7 mm de la oreja inflamada (derecha) y otra igual de la oreja no inflamada (izquierda). La inflamación fue determinada como la diferencia en peso entre las porciones circulares de cada oreja. El porcentaje de inhibición del edema (% EI) fue calculado mediante la siguiente ecuación.

$$\%EI = 100 - (B \times 100) / A$$

Donde:

A = Edema inducido por MPA

B = Edema inducido por MPA + Muestra

Capítulo 3

Discusión de Resultados

3.1 SANTAMARINA.

3.2 DERIVADOS DE SANTAMARINA.

3.3 ACTIVIDAD BIOLÓGICA.

3.1 SANTAMARINA.

En un estudio previo de *Tanacetum parthenium* en el año de 1965, la lactona sesquiterpénica santamarina fue aislada por Romo de Vivar¹. En vista de que en este estudio se publicaron parcialmente los desplazamientos químicos de los hidrógenos. En el presente trabajo se determino la asignación completa de los hidrógenos y carbonos de la molécula de la siguiente manera.

En el espectro COSY (Espectro 2) las señales a campo bajo en δ 5.41 y 6.07 ppm asignadas a los protones H-13 del metileno exocíclico, presentan una correlación con la señal en δ 2.50 ppm la cual es asignada a H-7. En el espectro también se observa que la señal en δ 3.95 ppm asignada a H-6 muestra correlación con las señales múltiples en δ 2.35 y 2.50 ppm, puesto que la señal en δ 2.50 ppm corresponde con H-7 se deduce que la señal en δ 2.35 ppm corresponde a H-5. Por otra parte la señal en δ 3.68 ppm que corresponde al protón H-1 mostró una correlación con las señales en δ 1.98 y 2.39 las cuales son asignadas a los dos protones H-2. Mientras que la señal en δ 2.50 ppm asignada previamente a H-7 muestra correlación con las señales múltiples en δ 1.65 y 2.08 las cuales se asignan a los dos protones H-8. Por último la señal en δ 1.65 ppm (H-8 β), mostró correlación con la señal en δ 1.31 ppm y con la señal múltiple en δ 2.06 ppm la cual se encuentra traslapada con H-8 α y que son asignadas a los dos protones H-9. La señal en δ 5.35 ppm que es una señal ancha fue asignada al protón vinílico H-3 la cual muestra correlación en δ 1.84 ppm correspondiente al metilo H-15.

1.- de Vivar, A. Romo; Jiménez, H. Tetrahedron, **1965**, 21, 1741-5.

Una vez que fueron asignados los desplazamientos químicos de todos los protones de la molécula de santamarina, la asignación de los carbonos se realizó mediante la correlación a un enlace sigma en el espectro HSQC (Ver parte experimental). La asignación de los carbonos cuaternarios y el grupo carbonilo fueron determinados sin ambigüedad mediante el espectro HMBC. Donde se observa que la señal en δ 6.07 ppm asignada al protón H-13 muestra correlación a tres enlaces con la señal en δ 170.73 ppm y a dos enlaces con la señal en δ 139.04 ppm por lo que se deduce que la primera señal corresponde con el carbonilo C-12 y la segunda señal con el carbono vinílico C-11. Finalmente se observó una correlación de la señal simple en δ 1.84 ppm (H-15) a dos enlaces con la con la señal en δ 133.41 ppm asignándose al carbono vinílico C-4. De esta manera se asignaron de forma total los desplazamientos de hidrogeno y carbono de la santamarina.

3.2 DERIVADOS DE SANTAMARINA.

3.2.1 Acetato de santamarina.

La reacción de santamarina con anhídrido acético dio un líquido viscoso en cuyo espectro de RMN ^1H (Espectro 6) se observa que la señal en δ 3.68 ppm asignada al protón base del hidroxilo secundario en la santamarina sufrió un desplazamiento a bajo campo en 4.90 ppm lo que sugiere la formación de un grupo acetato. Además muestra una señal simple que integra para tres protones en δ 2.06 ppm y que corresponde al grupo metilo del acetato.

En el espectro de RMN ^{13}C (Espectro 7) se observa la presencia de dos señales una en δ 21.02 ppm y otra en δ 170.58 ppm las cuales fueron asignadas al grupo metilo y al grupo carbonilo del acetato respectivamente, confirmando la formación del acetato de santamarina.

La asignación total de los hidrógenos y carbonos de la molécula se llevo a cabo utilizando las técnicas mono y bidimensionales COSY, DEPT, HETCOR y por comparación con los datos para santamarina previamente obtenidos.

3.2.2 Epóxido de santamarina.

La reacción de santamarina con ácido m-cloroperbenzoico dio el correspondiente 3-4 epóxido, en cuyo espectro de RMN ¹H (Espectro 9) se observa la ausencia de las señales del protón vinílico H-3 (δ 5.30 ppm) y la señal para el metilo vinílico H-15 (δ 1.84 ppm) y la presencia de las señales en δ 3.00 ppm y en δ 1.46 ppm sugiriendo la epoxidación del doble enlace C-3, C-4.

En el espectro de RMN ¹³C del epóxido, se observa un desplazamiento a campo alto para las señales de los carbonos vinílicos C-3 y C-4, ya que estos aparecen ahora en δ 60.45 y 56.72 ppm, confirmando la formación del epóxido de santamarina. También es posible apreciar un cambio en el desplazamiento del C-5 con respecto a la molécula de santamarina debido esto a que dicho carbono ya no es un carbono alílico.

La asignación total de los hidrógenos y carbonos de la molécula se llevo a cabo utilizando las técnicas mono y bidimensionales COSY, DEPT, HETCOR y por comparación con los datos de santamarina previamente obtenidos.

3.2.3 Hexanoato de santamarina.

La reacción de santamarina con anhídrido hexanóico dio un liquido viscoso, el cual presentó en su espectro de IR (Espectro 15) dos bandas, una en 1733 cm⁻¹ que fue asignada a un carbonilo de éster y otra en 1772 cm⁻¹ atribuida a un carbonilo de lactona. El espectro de masas (Espectro 16)

nos da un peso molecular de 346 g/mol, el cual corresponde con una formula molecular de $C_{21}H_{30}O_4$ y presenta un pico base en 230 M^+ que corresponde a la pérdida de 116 unidades de masa, lo que sugiere la pérdida de un ácido de 6 átomos de carbono.

El espectro de RMN- 1H (Espectro 12), muestra en la región de campo alto señales en δ 0.97, 1.85 y 0.90, las cuales corresponden a los protones de un metilo cuaternario (H-14), un metilo vinílico (H-15) y un metilo primario (H-6'), respectivamente. Muestra además una señal triple en δ 3.92 ppm ($J=11.1$ Hz) la cual fue atribuida a un protón base de lactona y una señal doble de doble en δ 4.89 ppm ($J=9.9$ y 6.9 Hz) que fue asignada al protón base del grupo éster.

En el espectro de RMN 1H se observó también a campo bajo una señal simple ancha en δ 5.32 que se asignó a un protón vinílico, el cual esta acoplado con un metilo vinílico en δ 1.81 ppm, sugiriendo un doble enlace trisustituido. Mostró además a campo bajo señales dobles en δ 6.05 y 5.38 ppm ($J=3.0$ y 3.3 Hz) características para un grupo metileno de una γ -lactona.

El espectro de RMN ^{13}C (Espectro 13) muestra la presencia de 21 señales correspondientes a cada uno de los átomos de carbono presentes en la molécula.

La asignación de los carbonos protonados de la molécula se llevó a cabo por la correlación C-H a un enlace en el espectro HETCOR (Espectro 14), donde se observa que la señal en δ 12.38 ppm correlaciona con la señal simple en δ 0.97 ppm, asignándose a C-14, mientras que la señal en δ 13.88 ppm correlaciona con un triplete en δ 0.90 ppm la cual se asigna a C-6' de la cadena lateral, la señal en δ 23.22 ppm correlaciona con una señal simple ancha en δ 1.85 ppm la cual se atribuye al metilo vinílico, C-15. Este

espectro muestra además la correlación entre la señal en δ 76.50 ppm con la señal doble de doble en δ 4.89 ppm por lo que esta corresponde al C-1; de igual forma la señal en δ 81.14 ppm se asigna a C-6 ya que esta muestra correlación con la señal triple en δ 3.92 ppm.

En el espectro HETCOR se observa una señal a campo bajo en δ 120.94 ppm la cual correlaciona con la señal en δ 5.38 ppm y que se asigna al carbono vinílico C-3, mientras que la señal en δ 116.84 ppm se asignó al metileno exocíclico (C-13), ya que esta correlacionó con las señales en δ 5.38 y 6.05 ppm.

La asignación de los carbonos de la cadena se llevó a cabo mediante comparación con la asignación del ácido hexanoico publicado en el catalogo Sadtler (418C).

3.2.4 Octanoato de santamarina.

La reacción de santamarina con cloruro de octanoilo dio un líquido viscoso, el cual presentó en su espectro de IR (Espectro 20) dos bandas, una en 1726 cm^{-1} que fue asignada a un carbonilo de éster y otra en 1766 cm^{-1} atribuida a un carbonilo de lactona. El espectro de masas (Espectro 21) nos da un peso molecular de 374 g/mol el cual corresponde con una fórmula molecular de $\text{C}_{23}\text{H}_{34}\text{O}_4$ y presenta un pico base en 230 M^+ que corresponde a la pérdida de 144 unidades de masa, lo que sugiere la pérdida de un ácido de 8 átomos de carbono.

La asignación completa de los hidrógenos y carbonos de la molécula se llevó a cabo utilizando las técnicas mono y bidimensionales DEPT y HETCOR y por comparación con los datos previamente obtenidos del hexanoato de santamarina. De la misma manera la asignación de los

carbonos de la cadena lateral se realizo mediante comparación con la asignación del ácido octanóico publicado en el catalogo Sadtler (302C).

3.2.5 Decanoato de santamarina.

La reacción de santamarina con anhídrido decanóico dio un liquido viscoso, el cual presentó en su espectro de IR (Espectro 25) dos bandas, una en 1735 cm^{-1} que fue asignada a un carbonilo de éster y otra en 1775 cm^{-1} atribuida a un carbonilo de lactona. El espectro de masas (Espectro 26) nos da un peso molecular de 402 g/mol el cual corresponde con una formula molecular de $\text{C}_{25}\text{H}_{38}\text{O}_4$ y presenta un pico base en 230 M^+ que corresponde a la pérdida de 172 unidades de masa, que concuerda con la pérdida de un ácido de 10 átomos de carbono.

La asignación completa de los hidrógenos y carbonos de la molécula se realizó utilizando las técnicas mono y bidimensionales DEPT y HETCOR y por comparación con los datos previamente obtenidos del hexanoato de santamarina. Así mismo la asignación de los carbonos de la cadena lateral se llevo a cabo mediante comparación con la asignación del ácido decanóico publicado en el catalogo Sadtler (497C).

3.2.6 Laurato de santamarina.

La reacción de santamarina con cloruro de lauroilo dio un liquido viscoso, el cual presentó en su espectro de IR (espectro 30) dos bandas, una en 1735 cm^{-1} que fue asignada a un carbonilo de éster y otra en 1777 cm^{-1} atribuida a un carbonilo de lactona. El espectro de masas (Espectro 31) nos da un peso molecular de 430 g/mol el cual corresponde con una formula molecular de $\text{C}_{27}\text{H}_{42}\text{O}_4$ y presenta un pico base en 230 M^+ que corresponde

a la pérdida de 200 unidades de masa, que concuerda con la pérdida de un ácido de 12 átomos de carbono.

La asignación de los hidrógenos y carbonos de la molécula se realizó con los datos previamente obtenidos del hexanoato de santamarina así como con las técnicas uni y bidimensionales DEPT y HETCOR. La asignación de los carbonos de la cadena lateral se llevó a cabo mediante comparación con la asignación del ácido laúrico publicado en el catalogo Sadtler (5C).

3.2.7 Miristato de santamarina.

La reacción de santamarina con cloruro de miristoilo dio un liquido viscoso, el cual presentó en su espectro de IR (Espectro 35) dos bandas, una en 1735 cm^{-1} que fue asignada a un carbonilo de éster y otra en 1777 cm^{-1} atribuida a un carbonilo de lactona. El espectro de masas (Espectro 36) nos da un peso molecular de 458 g/mol el cual corresponde con una formula molecular de $\text{C}_{29}\text{H}_{46}\text{O}_4$ y presenta un pico base en 230 M^+ que corresponde a la pérdida de 228 unidades de masa, que concuerda con la pérdida de un ácido de 14 átomos de carbono.

La asignación completa de los hidrógenos y carbonos de la molécula se llevó a cabo utilizando las técnicas mono y bidimensionales DEPT y HETCOR y por comparación con los datos previamente obtenidos del hexanoato de santamarina. De la misma manera la asignación de los carbonos de la cadena se llevó a cabo mediante comparación con la asignación del ácido mirístico publicado en el catalogo Sadtler (1415C).

3.2.8 Palmitato de santamarina.

La reacción de santamarina con cloruro de palmitoilo dio un líquido viscoso, el cual presentó en su espectro de IR (Espectro 39) dos bandas, una en 1734 cm^{-1} que fue asignada a un carbonilo de éster y otra en 1773 cm^{-1} atribuida a un carbonilo de lactona. El espectro de masas (Espectro 40) nos da un peso molecular de 486 g/mol el cual corresponde con una fórmula molecular de $\text{C}_{29}\text{H}_{46}\text{O}_4$ y presenta un pico base en 230 M^+ que corresponde a la pérdida de 256 unidades de masa, que concuerda con la pérdida de un ácido de 16 átomos de carbono.

La asignación de los carbonos de la cadena se llevó a cabo utilizando el programa ChemDraw Ultra 8.0. La asignación completa de los hidrógenos y carbonos de la molécula se llevó a cabo utilizando las técnicas mono y bidimensionales DEPT y HETCOR y por comparación con los datos previamente obtenidos del hexanoato de santamarina.

3.2.9 Ester metílico del acetato de saussureamina D.

La reacción del acetato de santamarina con prolina y su posterior metilación con diazometano dio un líquido viscoso, el cual presentó en su espectro de IR (Espectro 46) dos bandas, una en 1733 cm^{-1} que fue asignada a dos carbonilos (éster metílico y acetato) y otra en 1767 cm^{-1} atribuida a un carbonilo de lactona. El espectro de masas (Espectro 47) nos da un peso molecular de 419 g/mol el cual corresponde con una fórmula molecular de $\text{C}_{23}\text{H}_{33}\text{NO}_6$ y presenta un pico base en 360 M^+ que corresponde a la pérdida de 59 unidades de masa, que concuerda con la pérdida de un grupo COOMe y un pico en $m/z\ 300$ que corresponde a la pérdida de COOMe y CH_3COOH .

En el espectro de RMN ^1H (Espectro 41) no aparecen las señales típicas del metileno exocíclico sugiriendo que la molécula ha sufrido una reacción tipo Michael con el aminoácido prolina, se aprecia también una señal simple en δ 3.70 ppm indicando la metilación del grupo ácido de la prolina, se observa además una señal doble de doble en δ 3.10 ppm asignada al metileno H-13, La asignación de los carbonos del grupo prolina fue realizada con la ayuda del espectro obtenido previamente de dicho aminoácido y los hidrógenos por la correlación a un enlace con los carbonos respectivos en el espectro HETCOR. La asignación total de los hidrógenos y carbonos de la molécula se llevo a cabo utilizando las técnicas mono y bidimensionales COSY, DEPT, HETCOR y por comparación con los datos de santamarina obtenidos previamente.

Se estableció la estereoquímica del C-13 como alfa en base a los datos obtenidos en el espectro NOESY las principales interacciones se observan en la figura 3.1

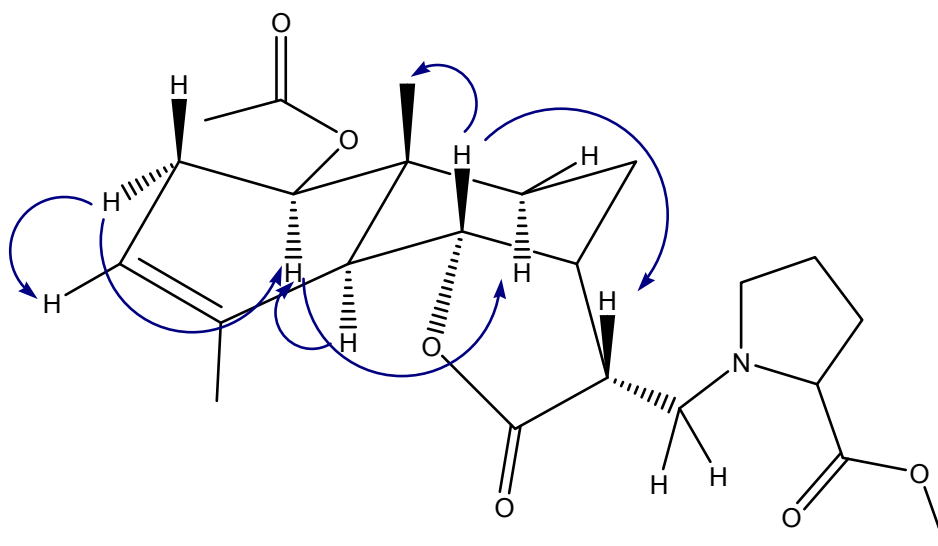


Fig. 3.1 Principales interacciones NOE del éster metílico del acetato de saussureamina D.

3.3 ACTIVIDAD BIOLÓGICA.

La lactona santamarina aislada de un extracto de la planta *Tanacetum parthenium* fue evaluada en el laboratorio de pruebas biológicas del Instituto de Química de la UNAM como probable antiinflamatorio, utilizando el bioensayo de edema inducido en oreja de ratón con TPA como agente antiinflamatorio.

La Tabla 3.1 muestra los porcentajes de inhibición obtenidos y las dosis suministradas de la santamarina así como su comparación con los datos obtenidos para el antiinflamatorio no esteroideo indometacina, se observa también que la lactona santamarina mostró una actividad antiinflamatoria similar a la indometacina, ya que se encontró que el IC₅₀ para la santamarina fue de 0.098 mg/oreja mientras que para la indometacina fue de 0.097 mg/oreja.

Muestra	Dosis (mg/oreja)	Dosis (μmol/oreja)	Edema (mg) (promedio ± ES)	% de Inhibición	IC ₅₀
Santamarina	0	0	18.27 ± 0.31	-	
	0.031	0.125	15.17 ± 0.39	16.9	
	0.056	0.226	11.57 ± 1.06 *	36.65	0.395 μmol/oreja
	0.1	0.40	7.72 ± 0.88 *	57.73	0.098 mg/oreja
	0.31	1.25	6.57 ± 1.54 *	64.02	(ρ = 0.96)
	1	4.03	1.30 ± 0.45 *	92.89	
Indometacina	0	0	16.24 ± 0.86	-	
	0.046	0.128	10.53 ± 1.04 *	35.148 ± 6.41	
	0.085	0.238	8.18 ± 0.34 *	48.183 ± 2.08	0.272 μmol/oreja
	0.150	0.42	7.10 ± 1.34 *	56.287 ± 8.244	0.097 mg/oreja
	0.268	0.75	4.97 ± 1.70 *	69.42 ± 10.48	(ρ = 0.97)
	0.465	1.30	1.57 ± 0.33 *	89.19 ± 2.65	

Tabla 3.1 Actividad antiinflamatoria en el modelo de edema inducido con TPA.

*Nivel de significancia ($p \leq 0.05$) con respecto al grupo control, prueba t de Student.

Puesto que la santamarina mostro una buena actividad muy similar a la del antiinflamatorio indometacina utilizado como control, se procedió a sintetizar algunos derivados para llevar a cabo un estudio estructura actividad biológica en el modelo de edema inducido con TPA; al primer derivado (Acetato de santamarina), se le determinó su actividad antiinflamatoria a una concentración de 1.0 $\mu\text{mol/oreja}$ obteniendo una inhibición del edema de 72.28%, ésta fue superior a la mostrada por la lactona santamarina a una concentración de 1.25 $\mu\text{mol/oreja}$ (64.02%). En vista de este resultado se decidió llevar a cabo la síntesis de esteres de santamarina con ácidos de mayor peso molecular, con la finalidad de incrementar la lipofilicidad de la molécula y por lo tanto aumentar su actividad.

A los esteres sintetizados se les determinó su actividad antiinflamatoria a una concentración de 1 $\mu\text{mol/oreja}$, los resultados obtenidos se muestran en la tabla 3.2, de acuerdo a los resultados podemos observar que ninguno de ellos presento una actividad mayor a la del acetato, solamente el éster con ocho átomos de carbono fue el que presento la mayor actividad antiinflamatoria, además se puede suponer que debido a que los esteres con mayor numero de átomos de carbono presentan actividades negativas, el efecto estérico predominó sobre el efecto lipofílico.

También se llevó a cabo la síntesis del epóxido de santamarina debido a que se tiene conocimiento de que los compuestos de origen natural que contienen un grupo epóxido presentan una mayor actividad, sin embargo como se puede observar en la tabla 3.2 el epóxido no presento una actividad antiinflamatoria significativa, puesto que a una concentración de 1.0 $\mu\text{mol/oreja}$ presentó una inhibición del 27.97%

En un estudio realizado a la planta *Saussurea lappa*² se determinó la estructura y configuración absoluta de varios derivados de aminoácidos de la lactona santamarina los cuales mostraron actividad gastroprotectora; por lo que se decidió llevar a cabo la síntesis del acetato de saussureamina D, ya que éste presenta un átomo de nitrógeno en la molécula que pudiera aumentar su actividad, además de no contener el metileno exocíclico lo cual disminuiría su toxicidad.

Al obtener la actividad antiinflamatoria del éster metílico del acetato de saussureamina D se observó que presentó una inhibición de 52.54% a una concentración de 1.0 $\mu\text{mol/oreja}$. En vista de este resultado se ha pensado sintetizar derivados de las lactonas partenólida, santamarina y reynosina con aminoácidos mediante condensación de Michael y llevar a cabo un estudio estructura actividad biológica.

Muestra	Dosis	Edema (mg)	Inhibición (%)
CONTROL	-	12.75 \pm 1.63	-
Acetato	1.0 $\mu\text{mol/oreja}$	4.58 \pm 0.39	72.28**
Epóxido	1.0 $\mu\text{mol/oreja}$	11.90 \pm 0.63	27.97*
Hexanoato	1.0 $\mu\text{mol/oreja}$	10.30 \pm 3.33	19.22*
Octanoato	1.0 $\mu\text{mol/oreja}$	6.70 \pm 0.20	47.45**
Decanoato	1.0 $\mu\text{mol/oreja}$	10.50 \pm 3.2	21.15*
Laurato	1.0 $\mu\text{mol/oreja}$	13.67 \pm 1.5	-7.19
Miristato	1.0 $\mu\text{mol/oreja}$	12.93 \pm 1.73	-1.44
Palmitato	1.0 $\mu\text{mol/oreja}$	11.43 \pm 1.02	10.33
Ester metílico del acetato de saussureamina D	1.0 $\mu\text{mol/oreja}$	5.60 \pm 1.87	52.54**
Santamarina	1.25 $\mu\text{mol/oreja}$	6.57 \pm 1.54 *	64.02**

Tabla 3.2 Actividad antiinflamatoria de los derivados de santamarina en el modelo inducido con TPA.

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

Capítulo 4

Conclusiones

4.1 CONCLUSIONES.

4.1 CONCLUSIONES.

Se aisló y purificó la lactona sesquiterpénica santamarina de un extracto obtenido de la planta *Tanacetum parthenium*, a esta lactona se le probó su actividad antiinflamatoria en un bioensayo en edema inducido en oreja de ratón con TPA como agente inflamatorio y como control positivo el antiinflamatorio no esteroideo indometacina. Los resultados obtenidos mostraron que la santamarina posee una actividad significativa, similar a la indometacina utilizada como control.

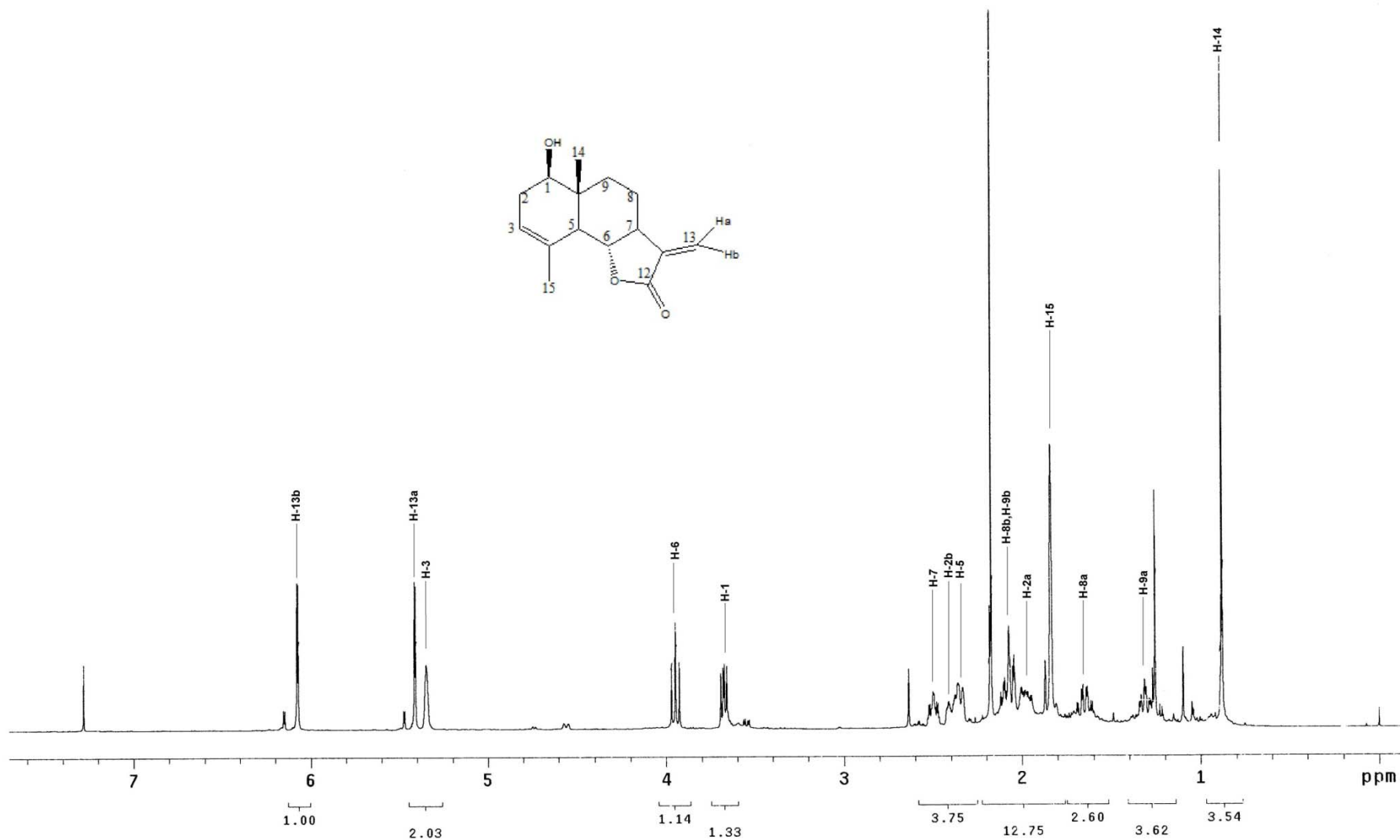
Se llevo a cabo la asignación total de los hidrógenos y carbonos de la santamarina así como de sus derivados obtenidos, utilizando técnicas espectroscópicas (^1H , ^{13}C , COSY, NOESY, DEPT, HETCOR, HMBC Y HSQC)

Se determinó la actividad antiinflamatoria de los derivados semisintéticos de santamarina con el modelo de edema inducido en oreja de ratón con TPA como agente inflamatorio, utilizando como control la lactona santamarina probada anteriormente, donde se observó que los derivados que presentaron una mayor actividad antiinflamatoria fueron el éster de ocho átomos de carbono con 47.45 % y el éster metílico del acetato de saussureamina D con un 52.54 % a una concentración de $1\ \mu\text{mol/oreja}$.

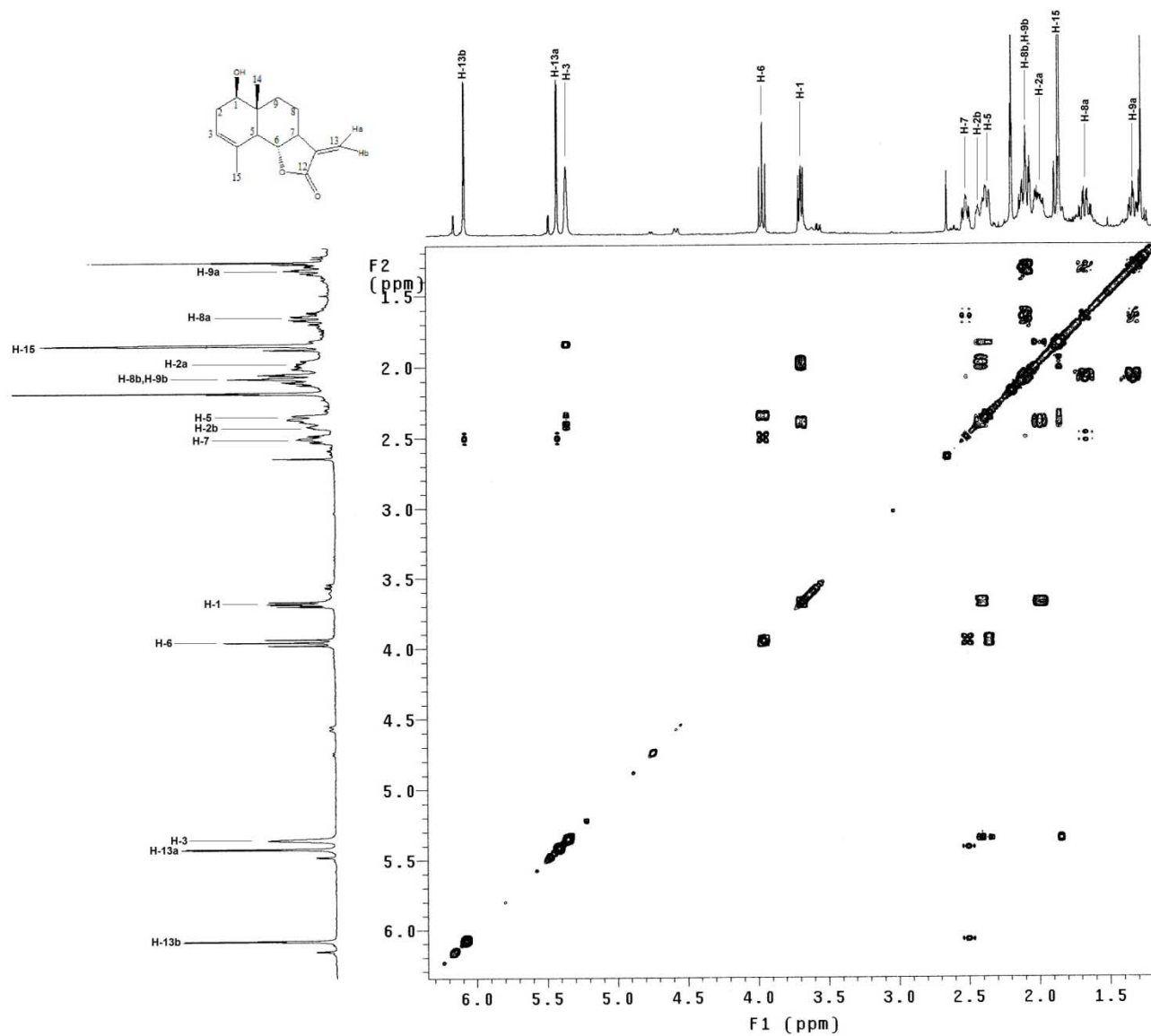
Como perspectivas a futuro se ha planteado realizar la semisíntesis de algunas lactonas sesquiterpénicas (Costunolida, partenólida, santamarina y reynosina), mediante condensación de Michael con varios aminoácidos esenciales con la finalidad de realizar estudios toxicológicos y biológicos de estos derivados

APENDICE

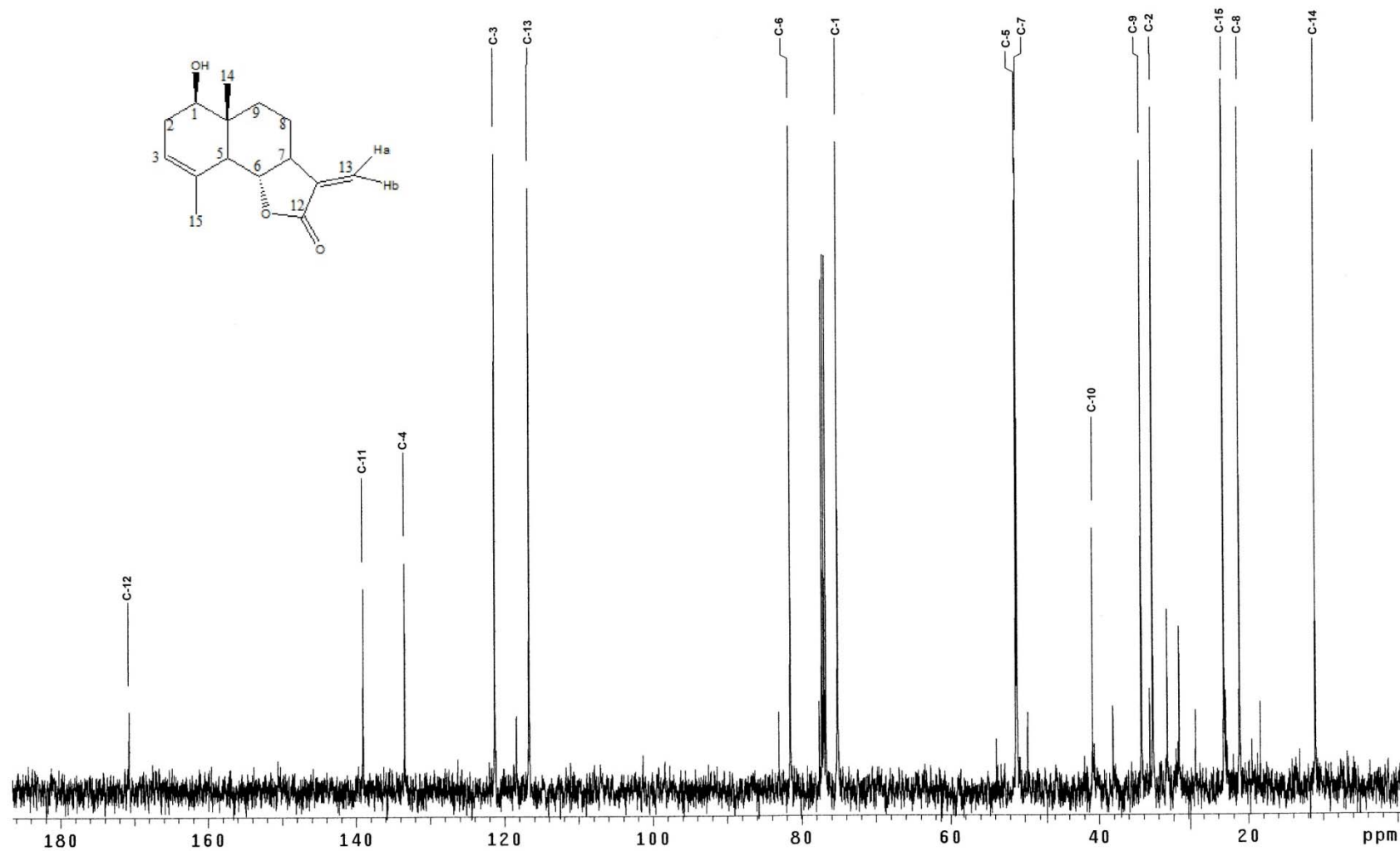
Espectros.



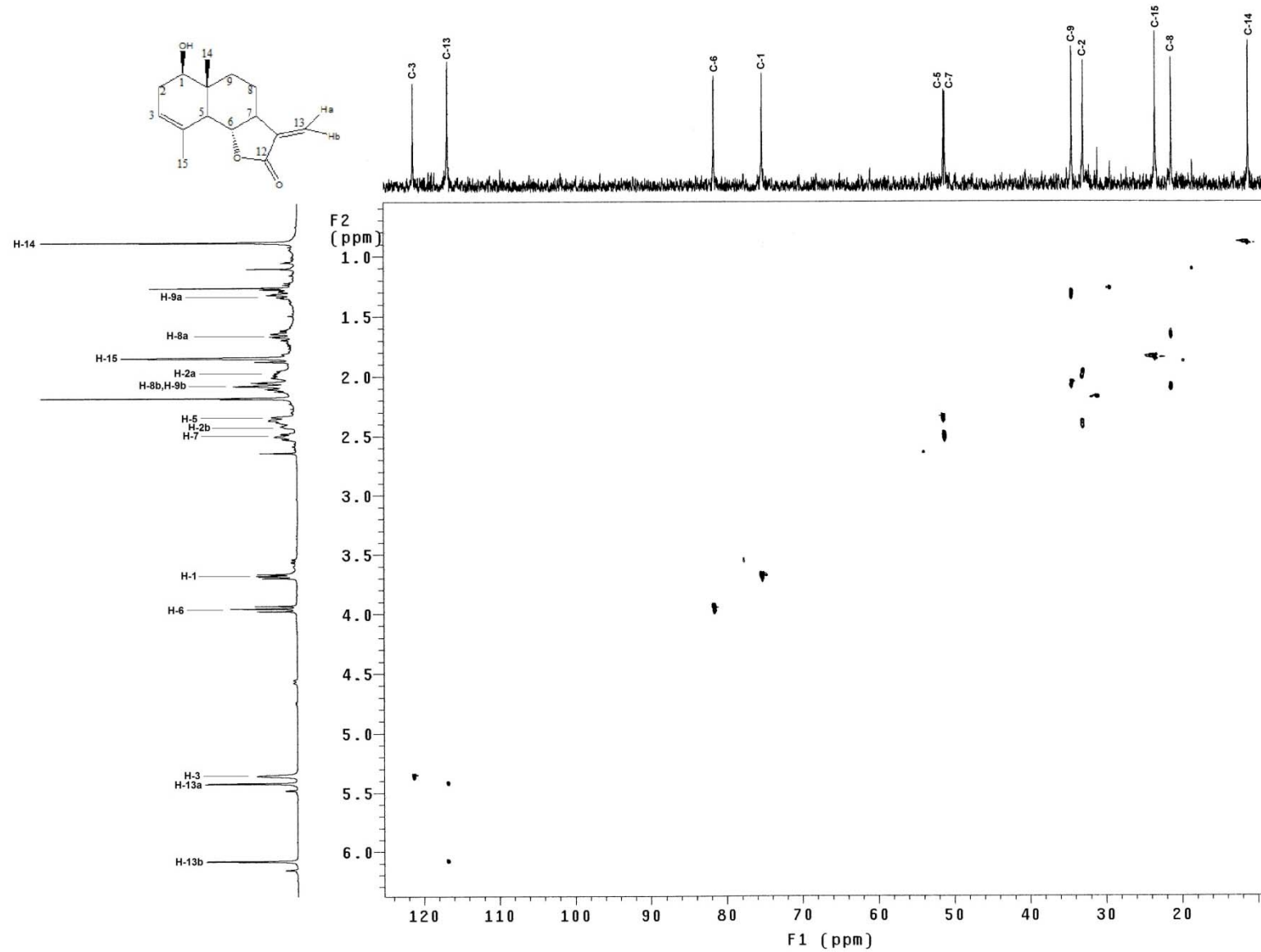
Espectro 1 RMN. ¹H (CDCl₃, 500 MHz) santamarina.



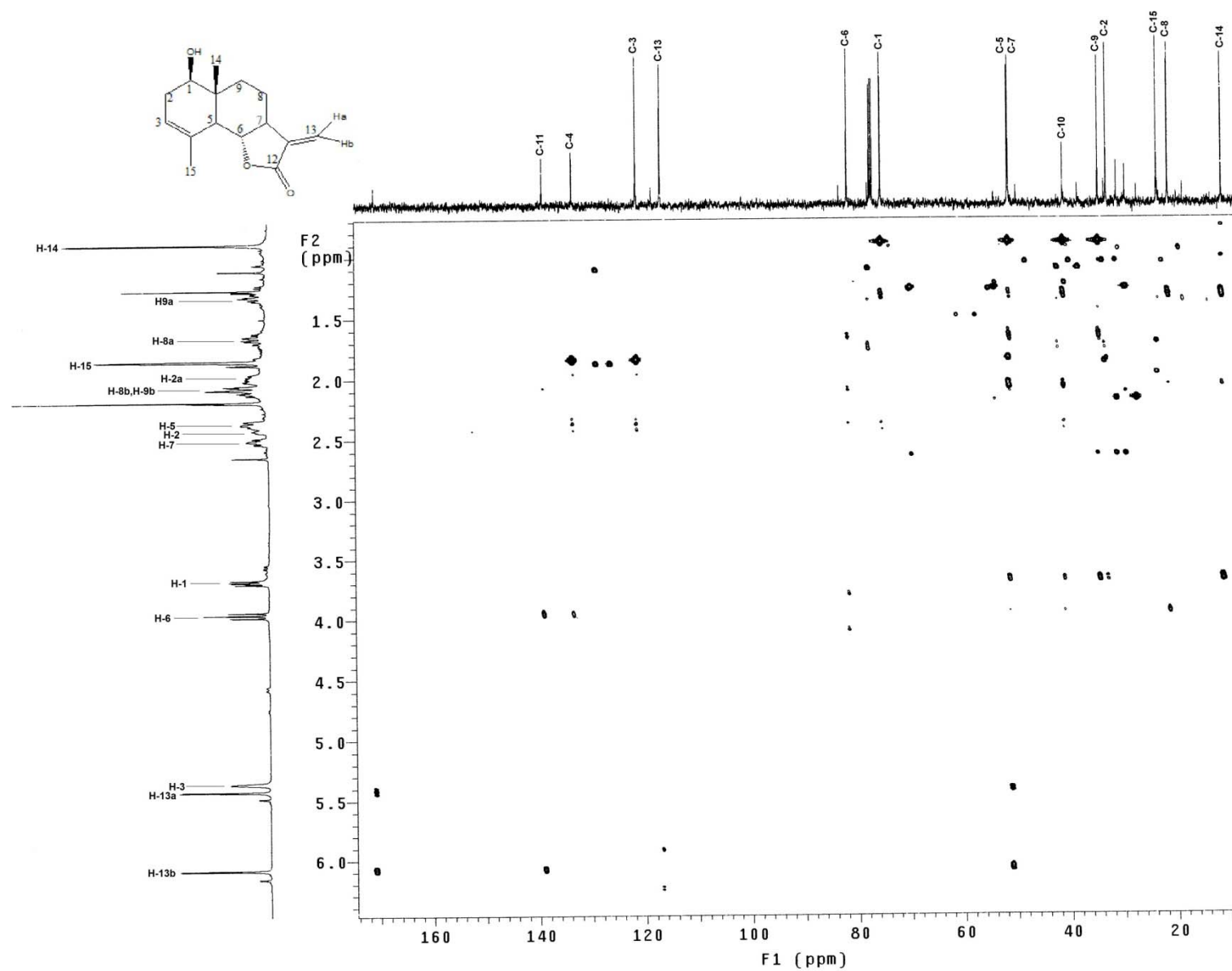
Espectro 2 RMN. COSY (CDCl₃, 500 MHz) santamarina.



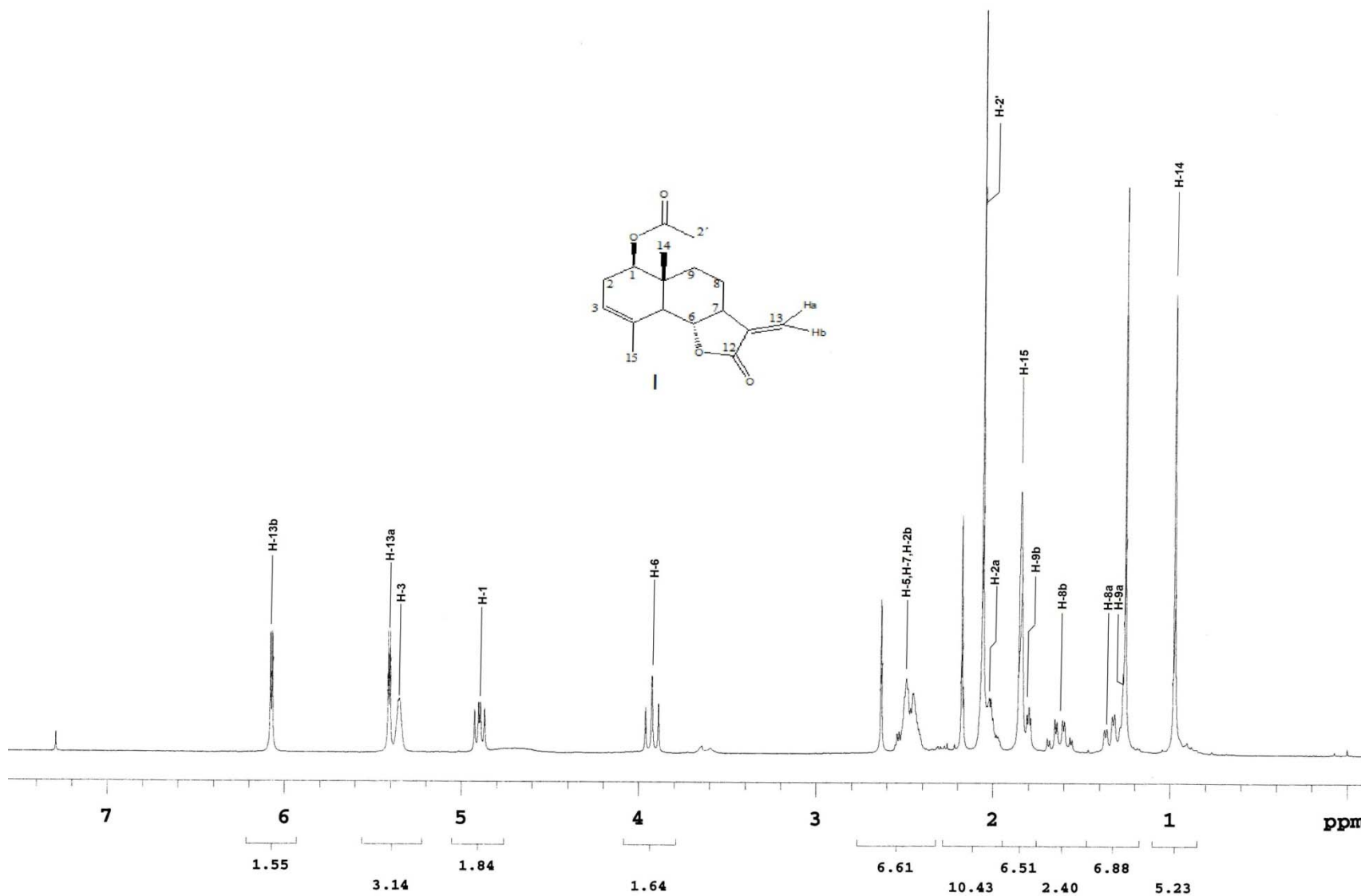
Espectro 3 RMN. ¹³C (CDCl₃, 125 MHz) santamarina.



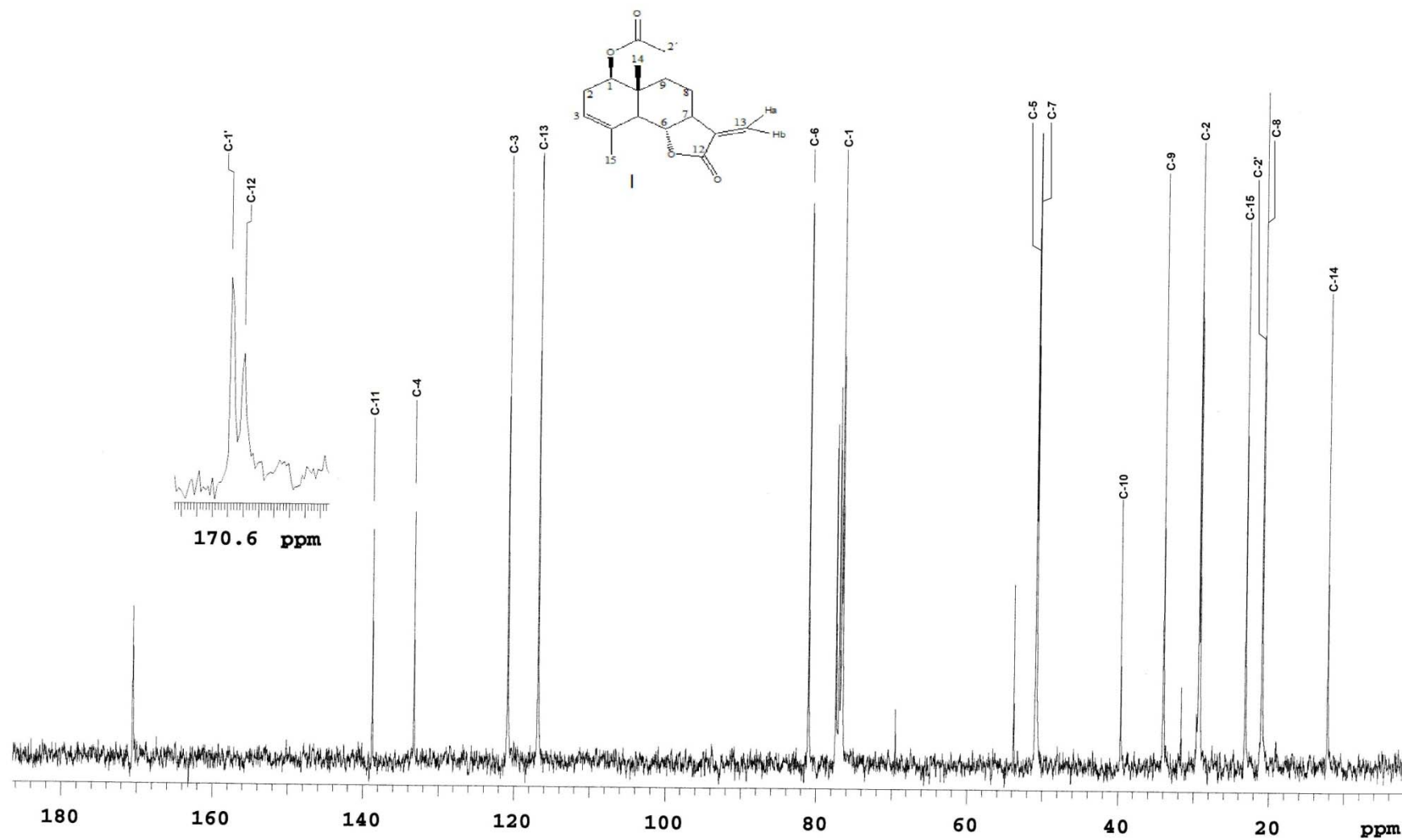
Espectro 4 RMN. HSQC (CDCl₃, 500 MHz) santamarina.



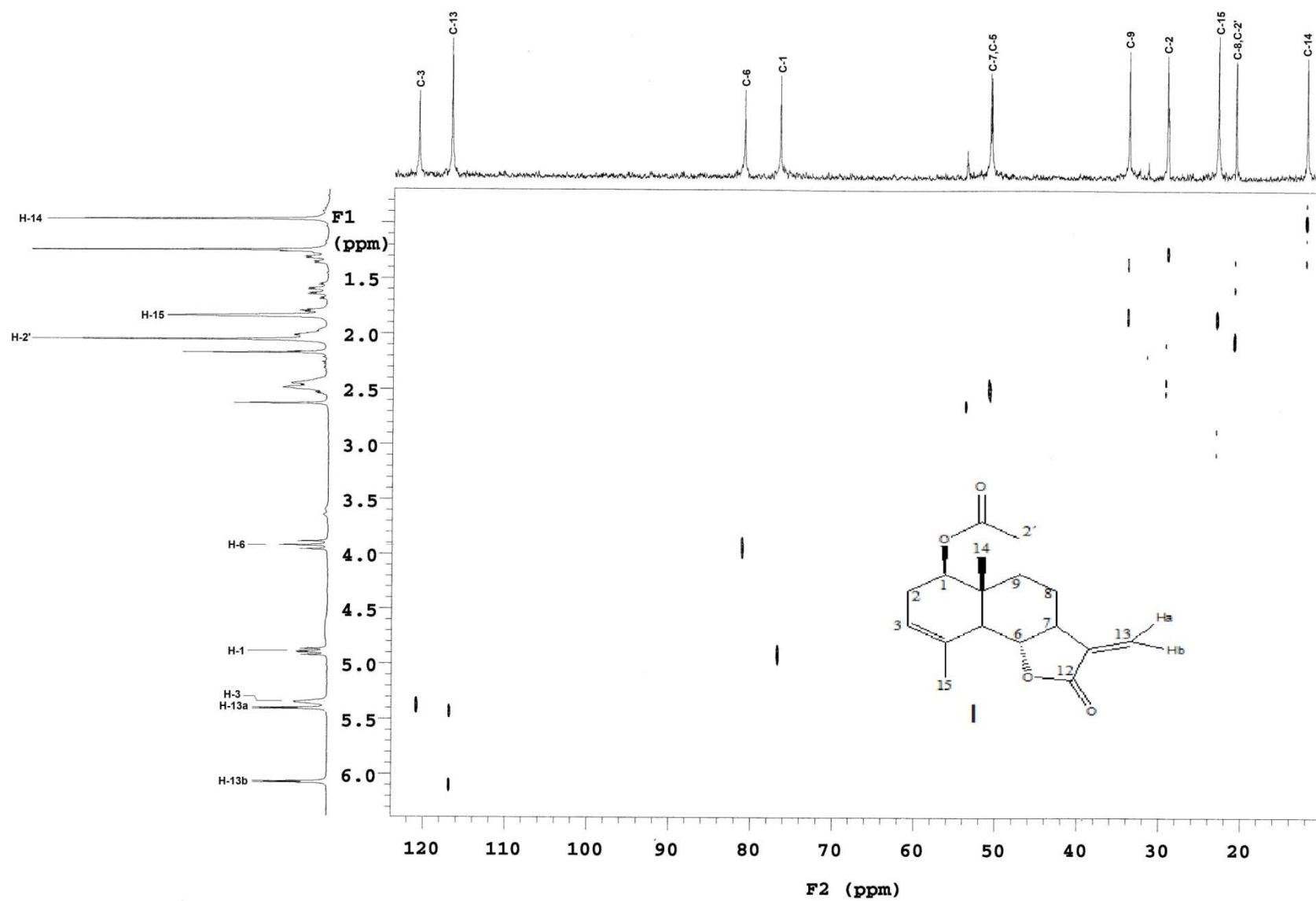
Espectro. 5 RMN. HMBC (CDCl₃, 500 MHz) santamarina.



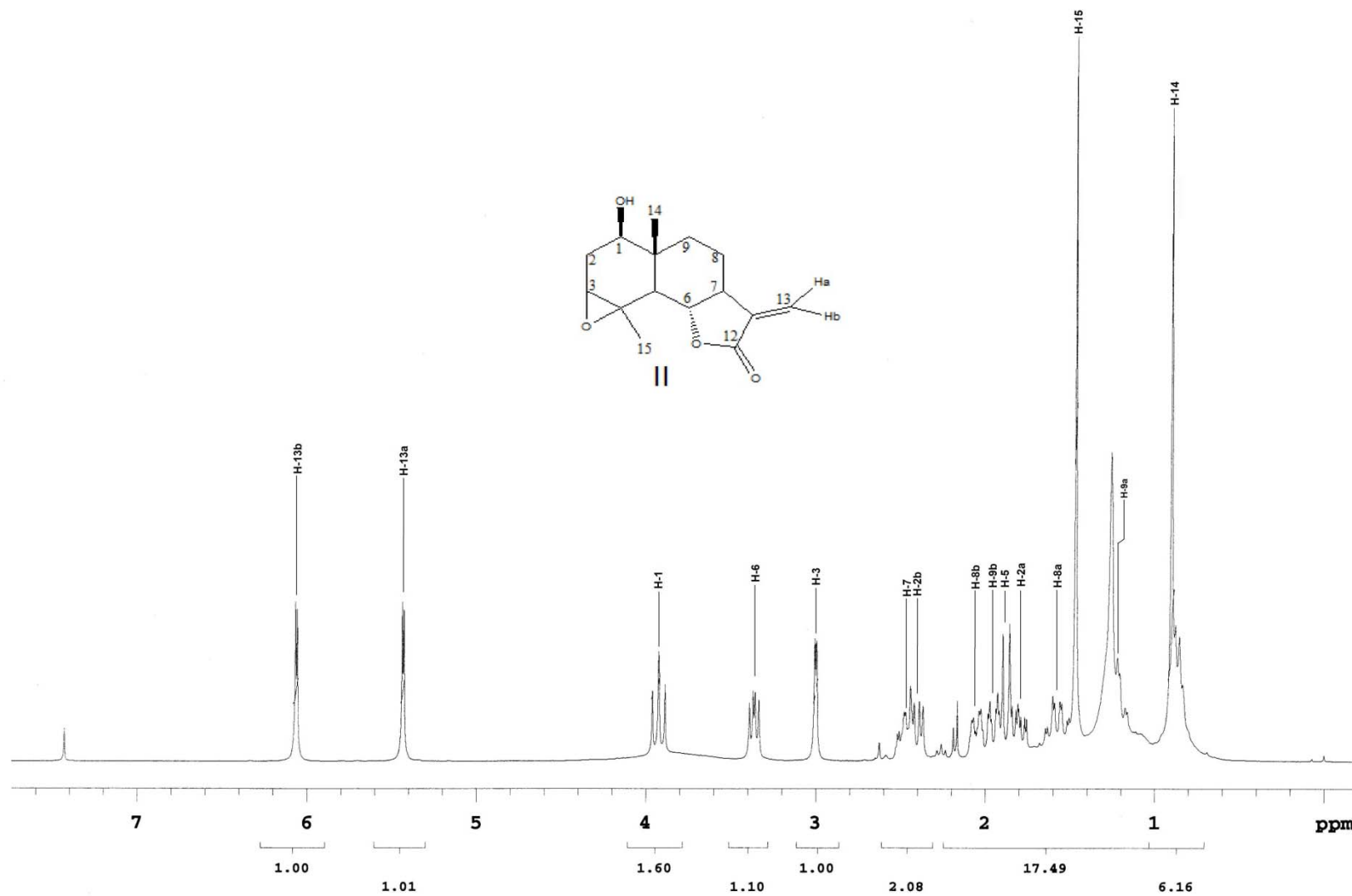
Espectro 6 RMN. ¹H (CDCl₃, 300 MHz) acetato de santamarina.



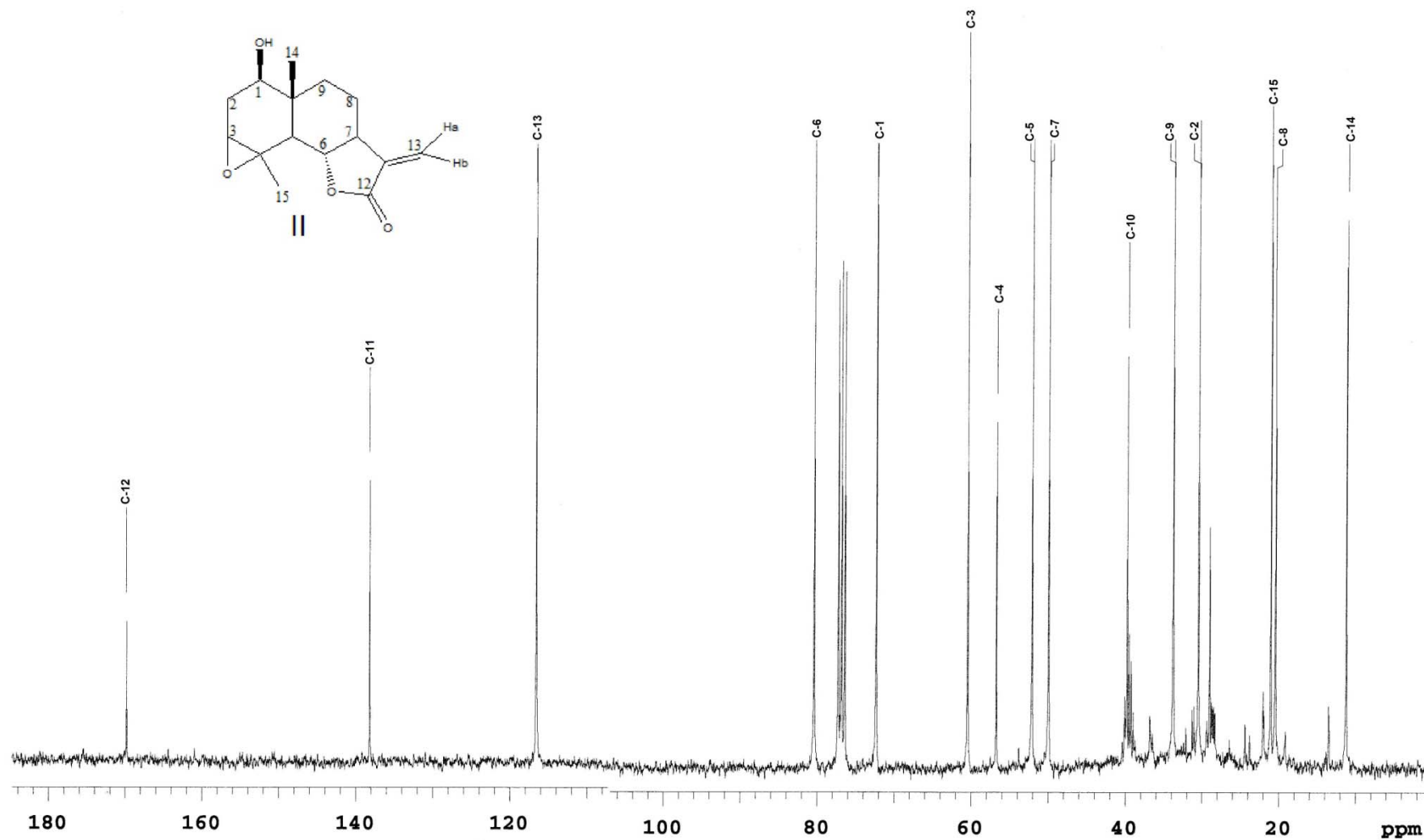
Espectro 7 RMN. ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) acetato de santamarina.



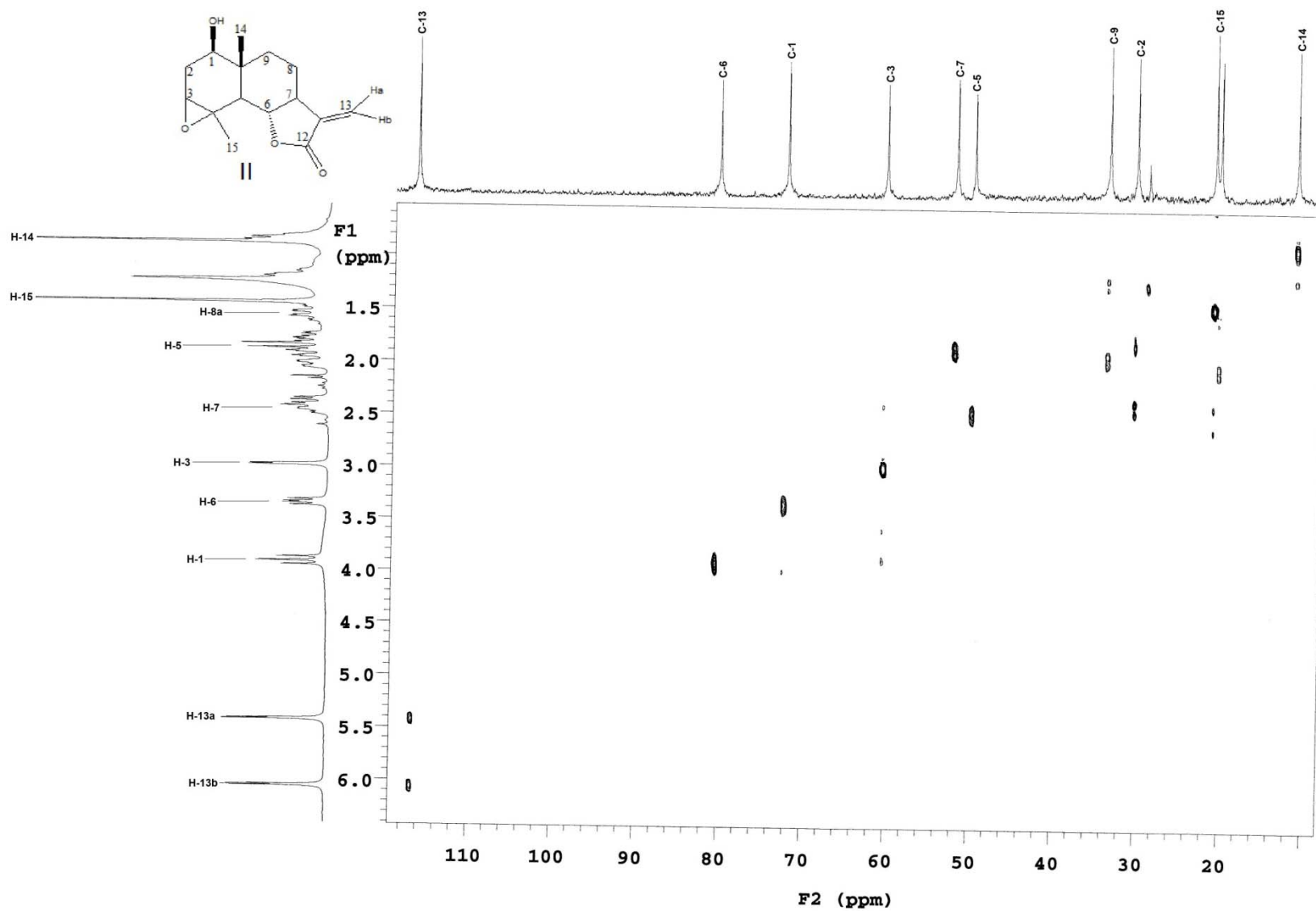
Espectro 8 RMN. HETCOR (CDCl₃, 300 MHz) acetato de santamarina.



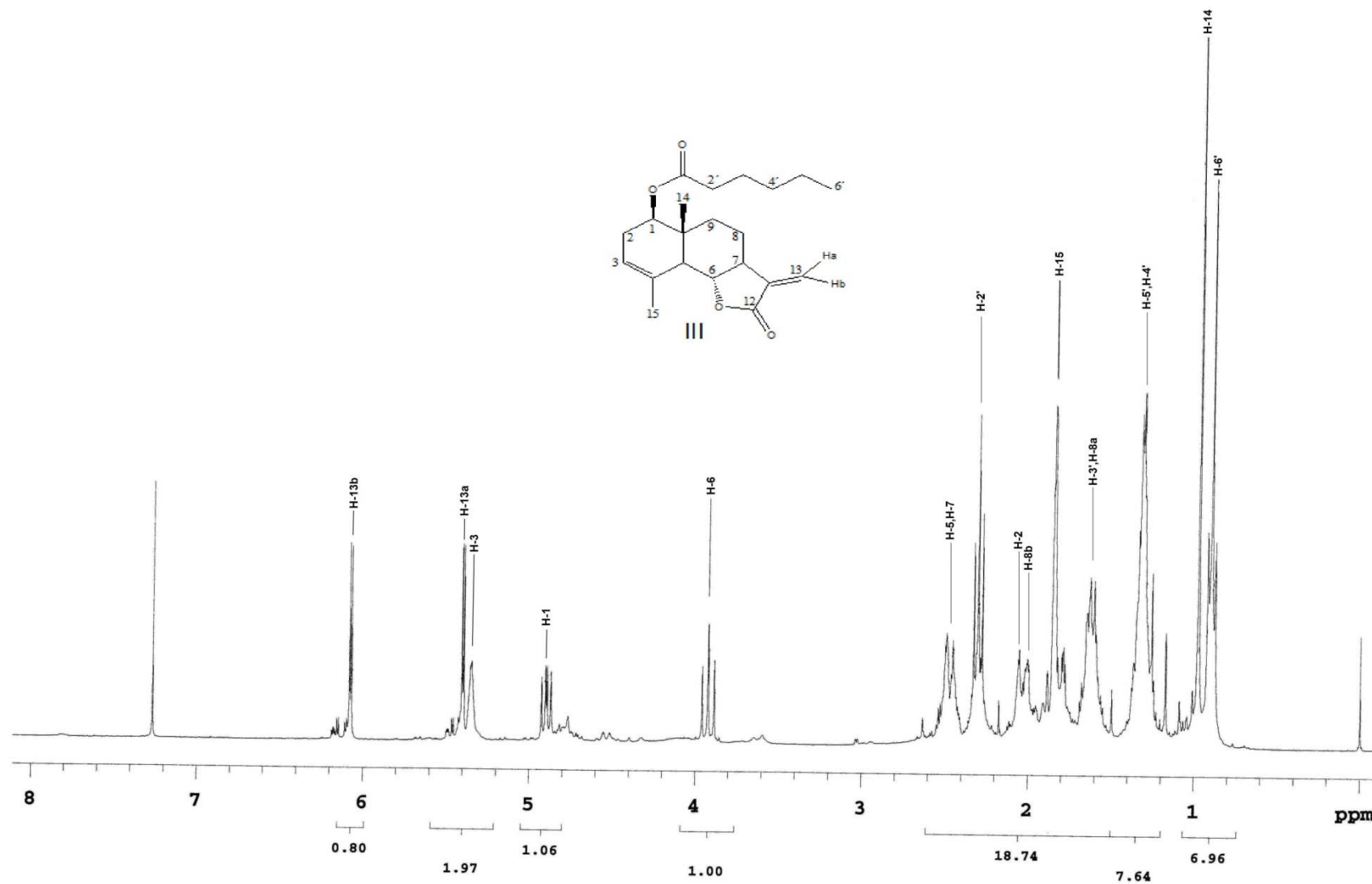
Espectro 9 RMN. ¹H (CDCl₃, 300 MHz) epóxido de santamarina.



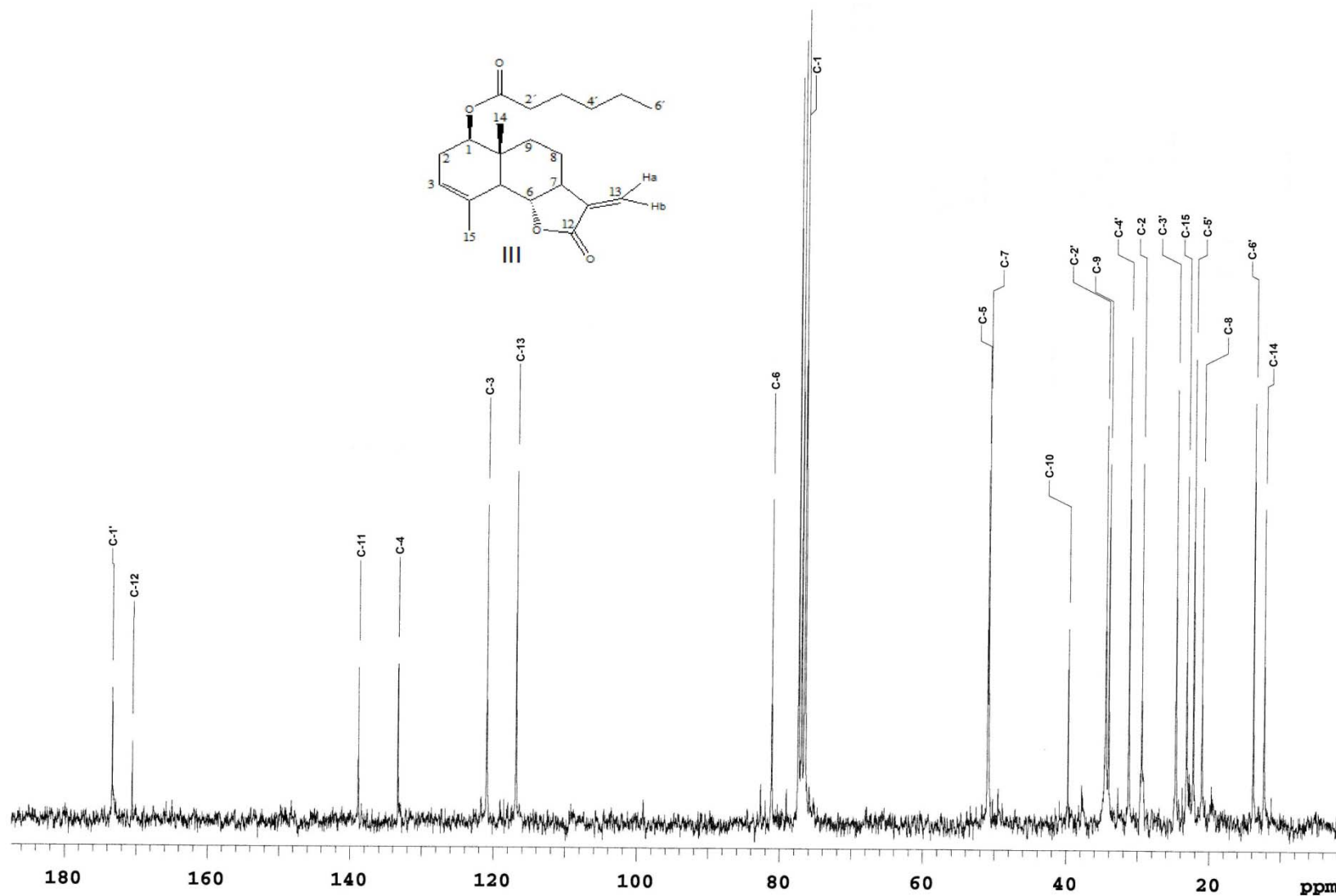
Espectro 10 RMN. ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) epóxido de santamarina.



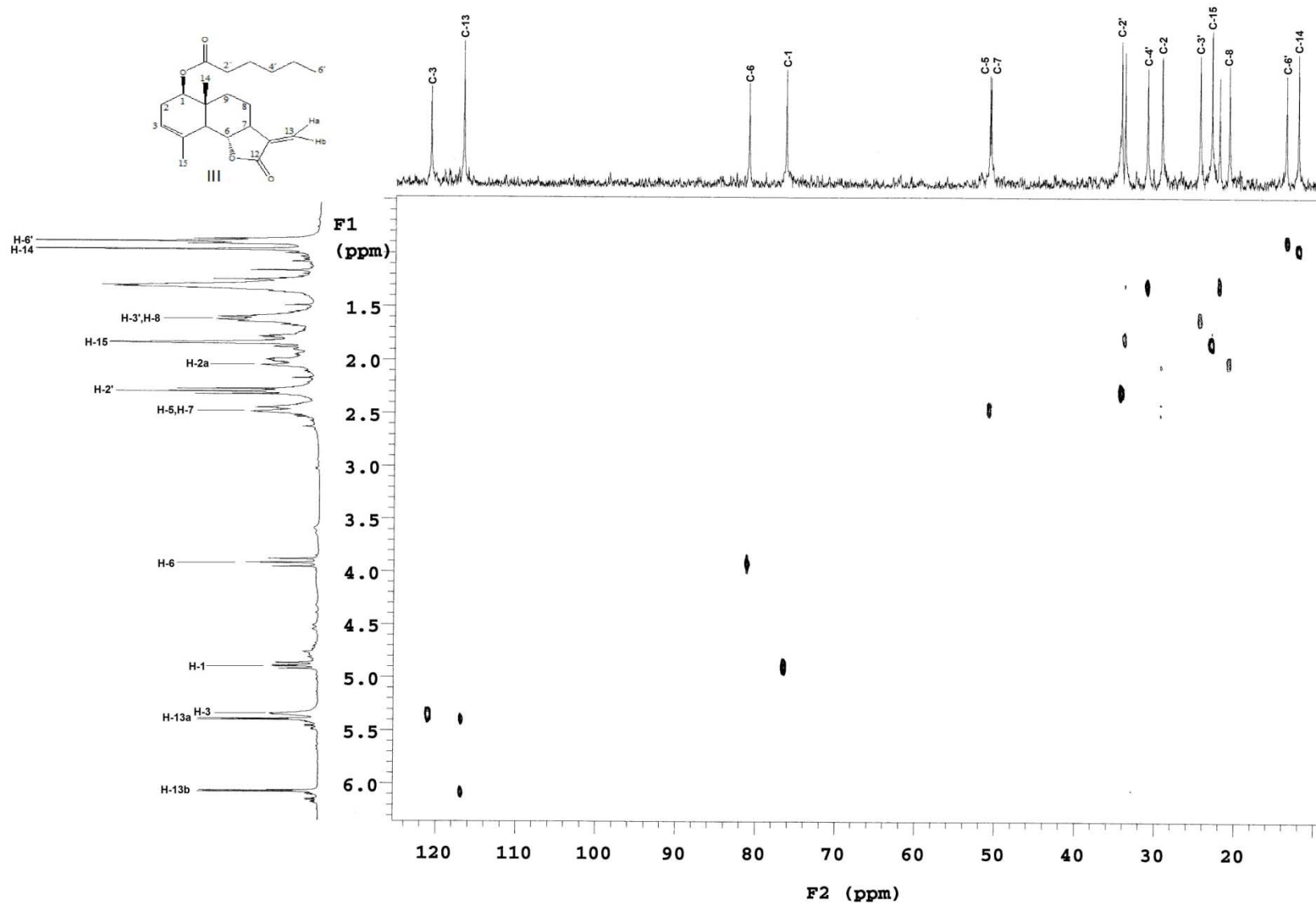
Espectro 11 RMN. HETCOR (CDCl₃, 300 MHz) epóxido de santamarina.



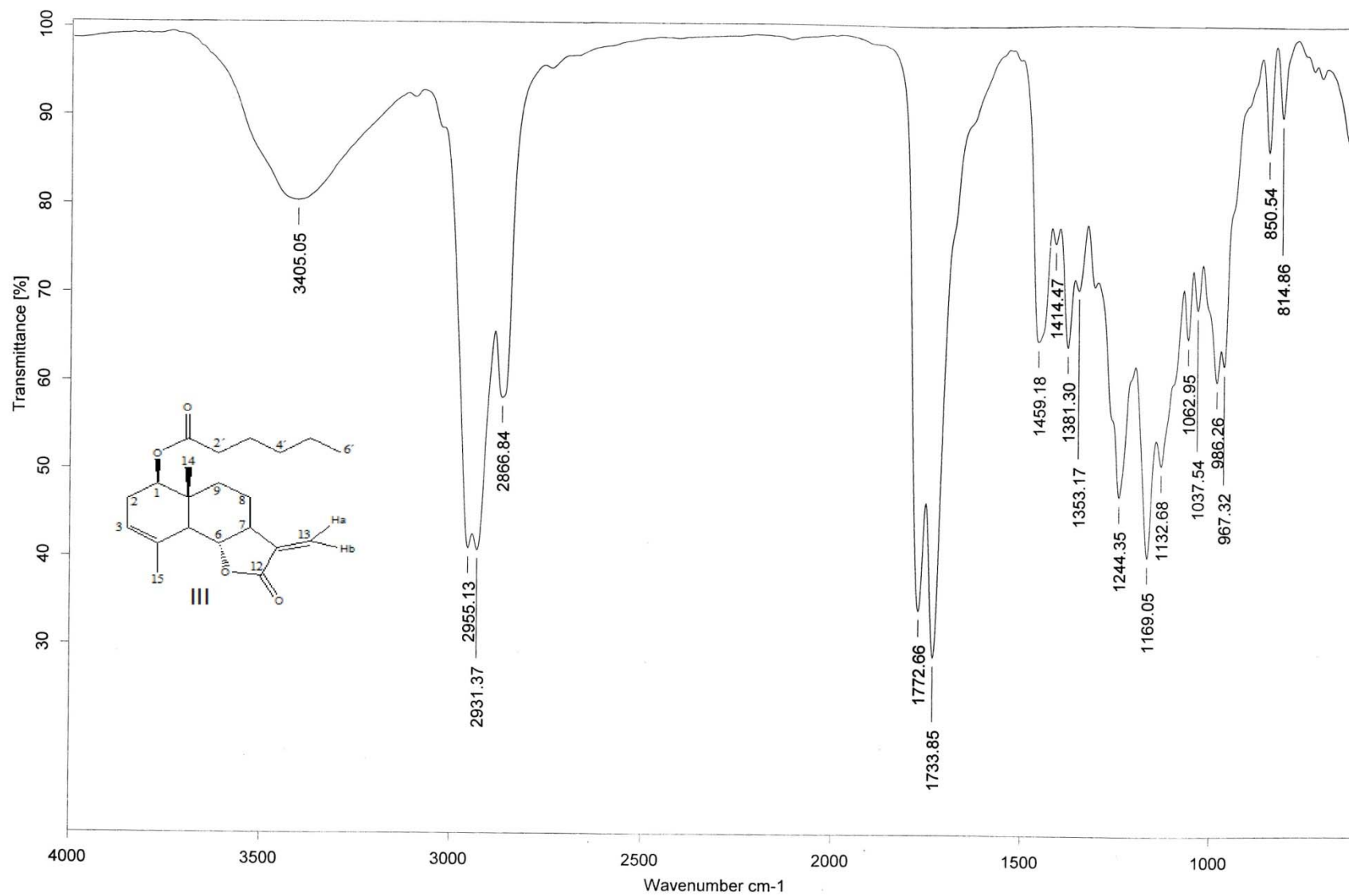
Espectro 12 RMN. ¹H (CDCl₃, 300 MHz) hexanoato de santamarina.



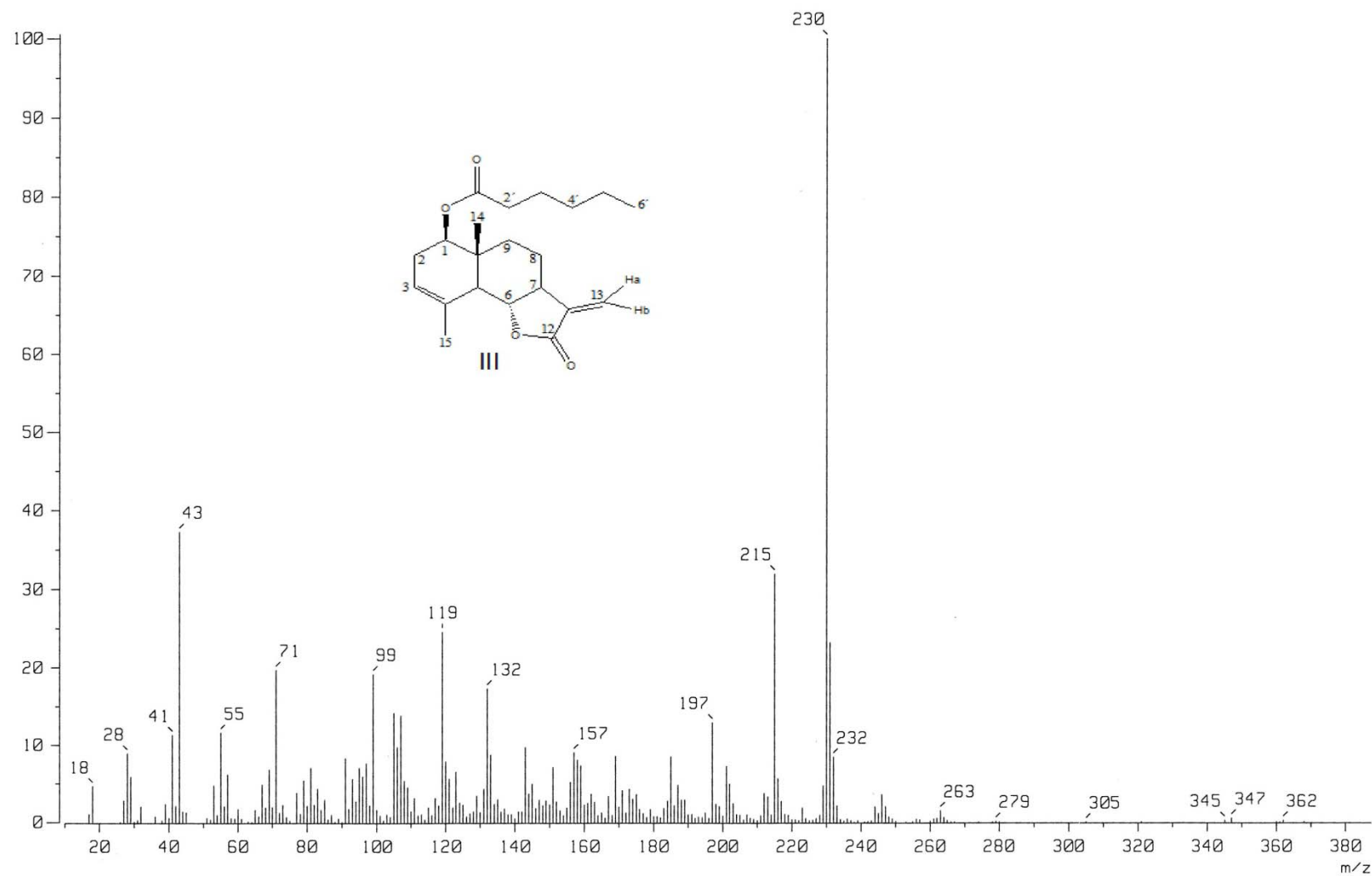
Espectro 13 RMN. ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) hexanoato de santamarina.



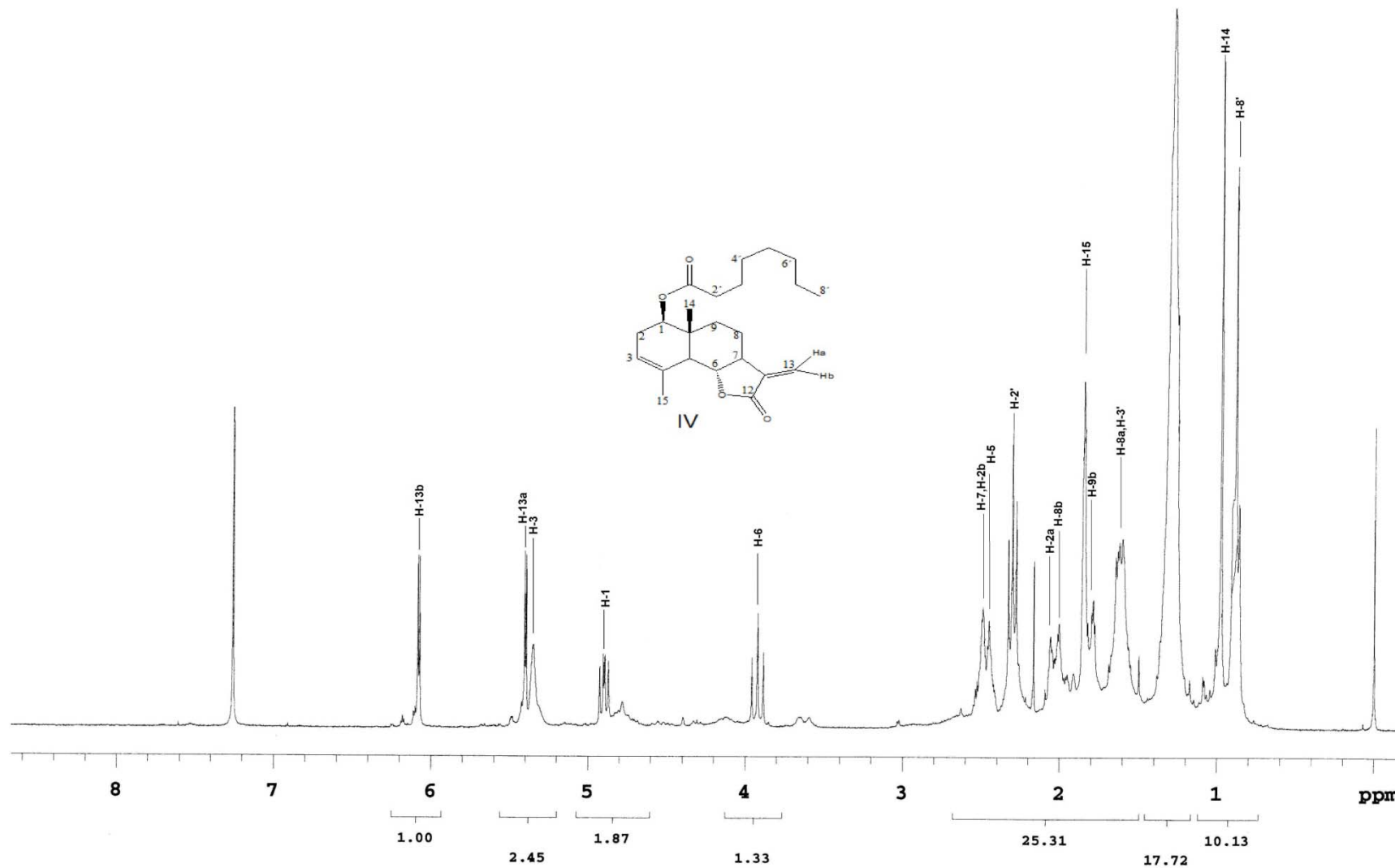
Espectro 14 RMN. HETCOR (CDCl₃, 300 MHz) hexanoato de santamarina.

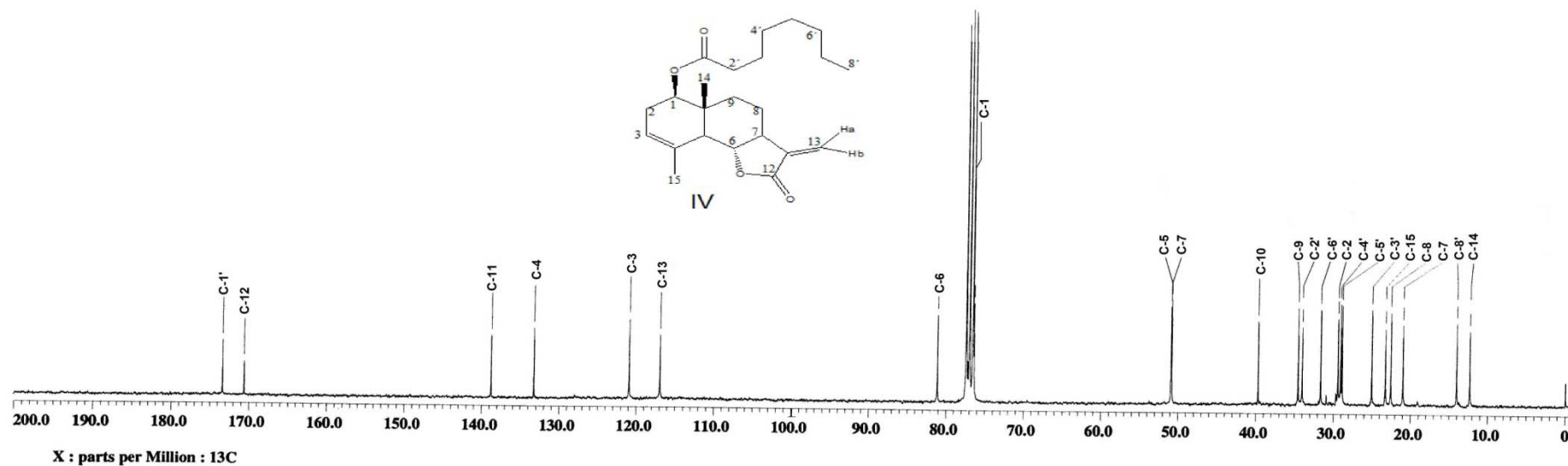


Espectro 15 IR. (CHCl₃, película) hexanoato de santamarina.

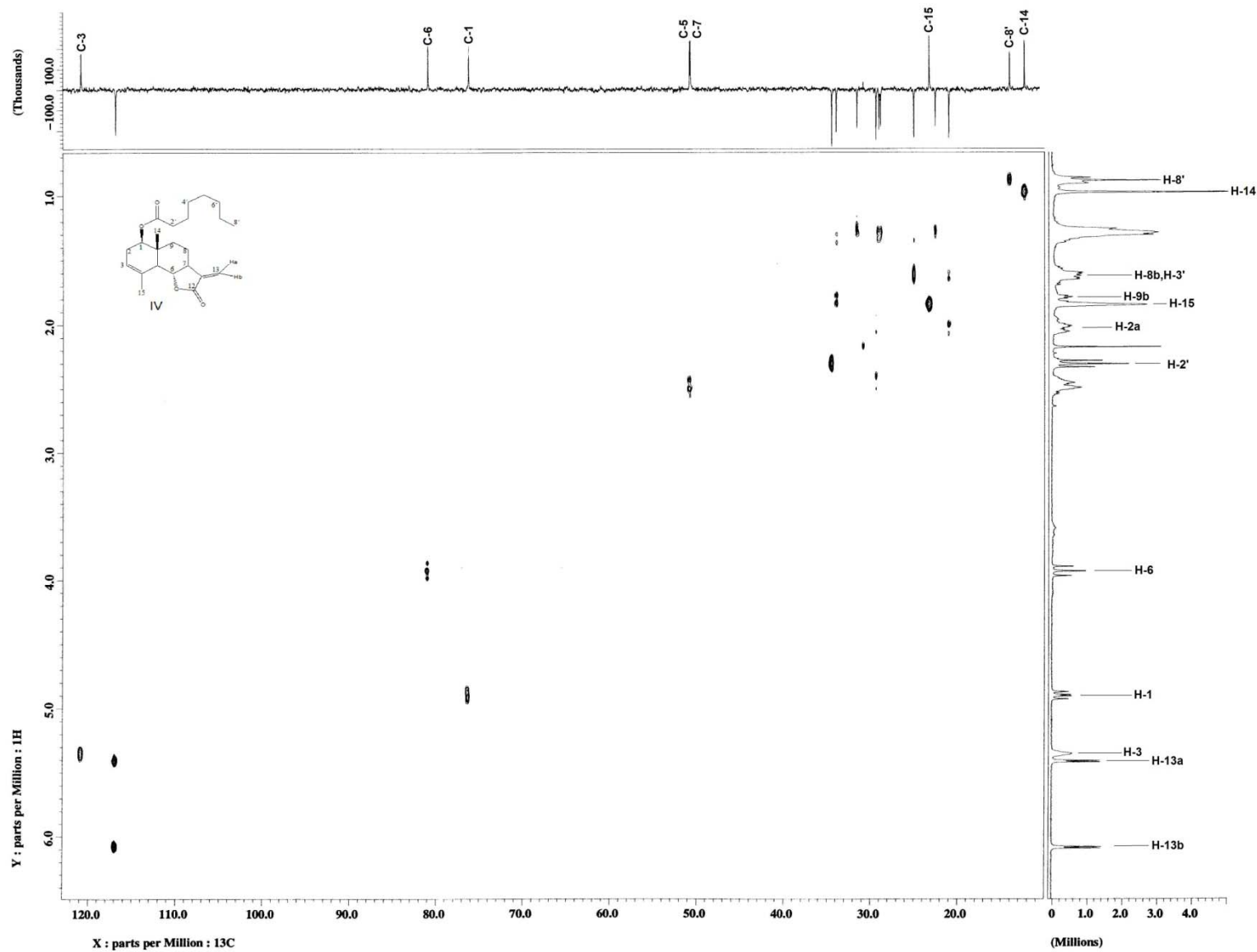


Espectro 16 Masas (IE. 70 eV) hexanoato de santamarina.

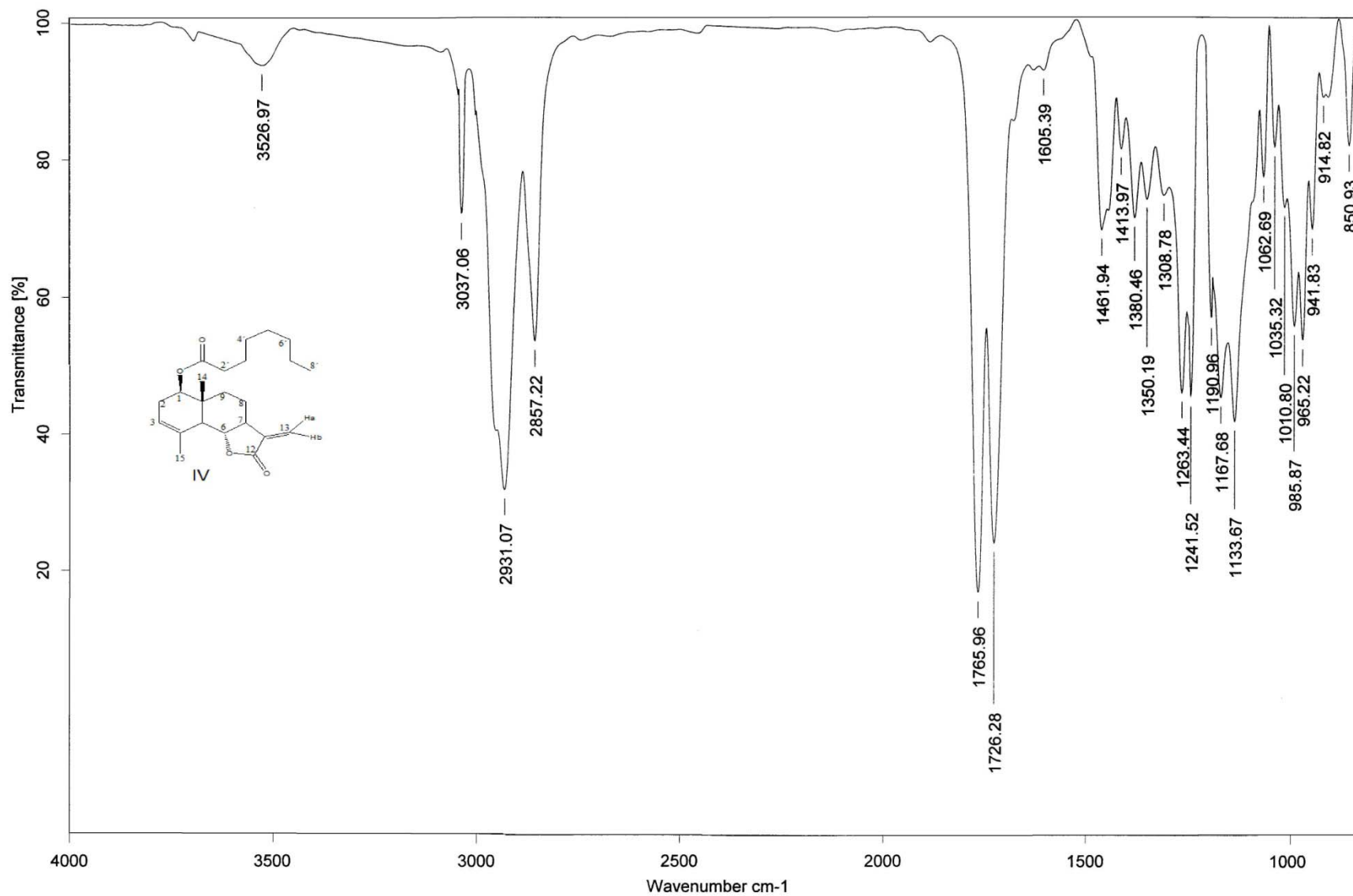
Espectro 17 RMN. ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) octanoato de santamarina.

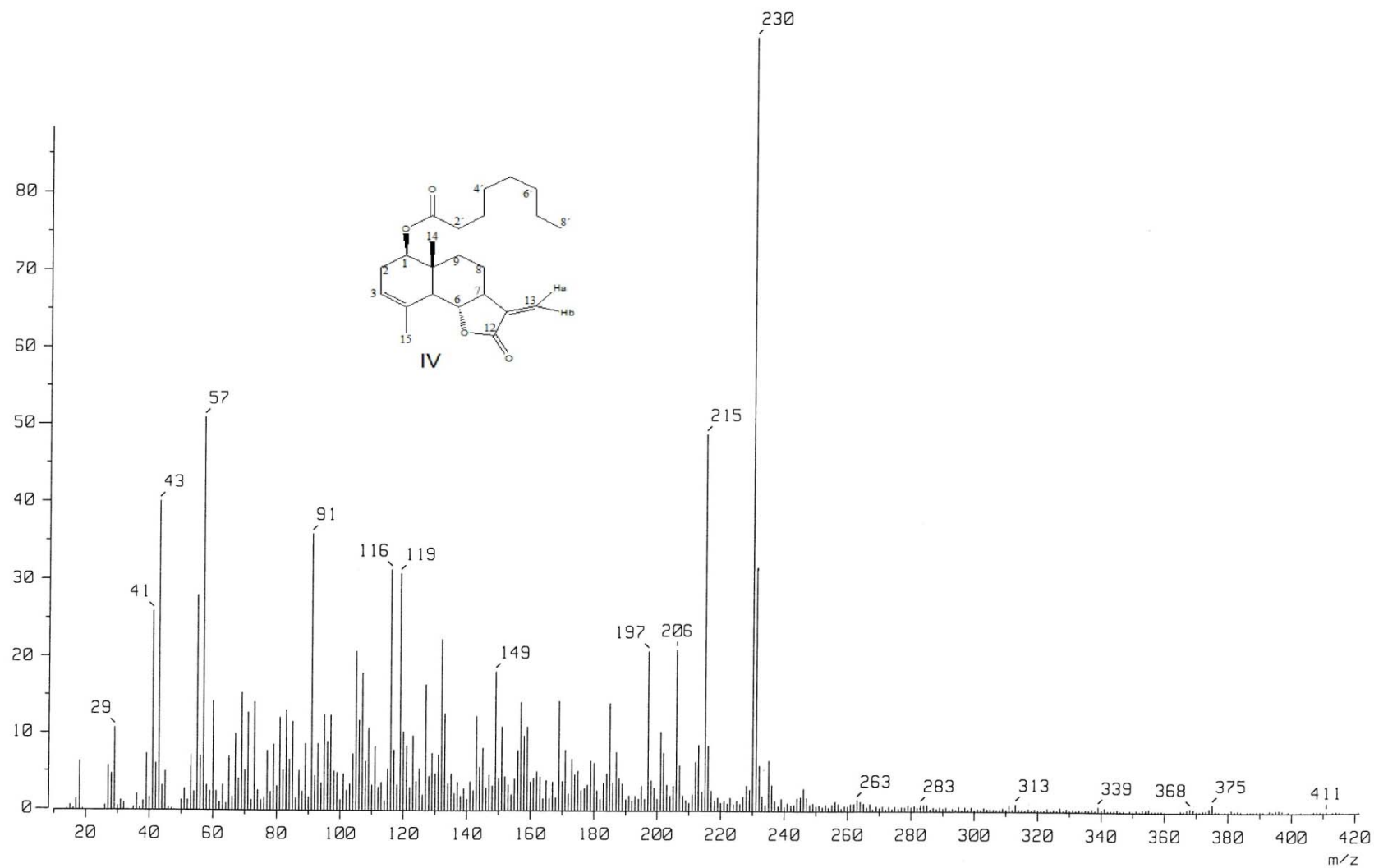


Espectro 18 RMN. ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) octanoato de santamarina.

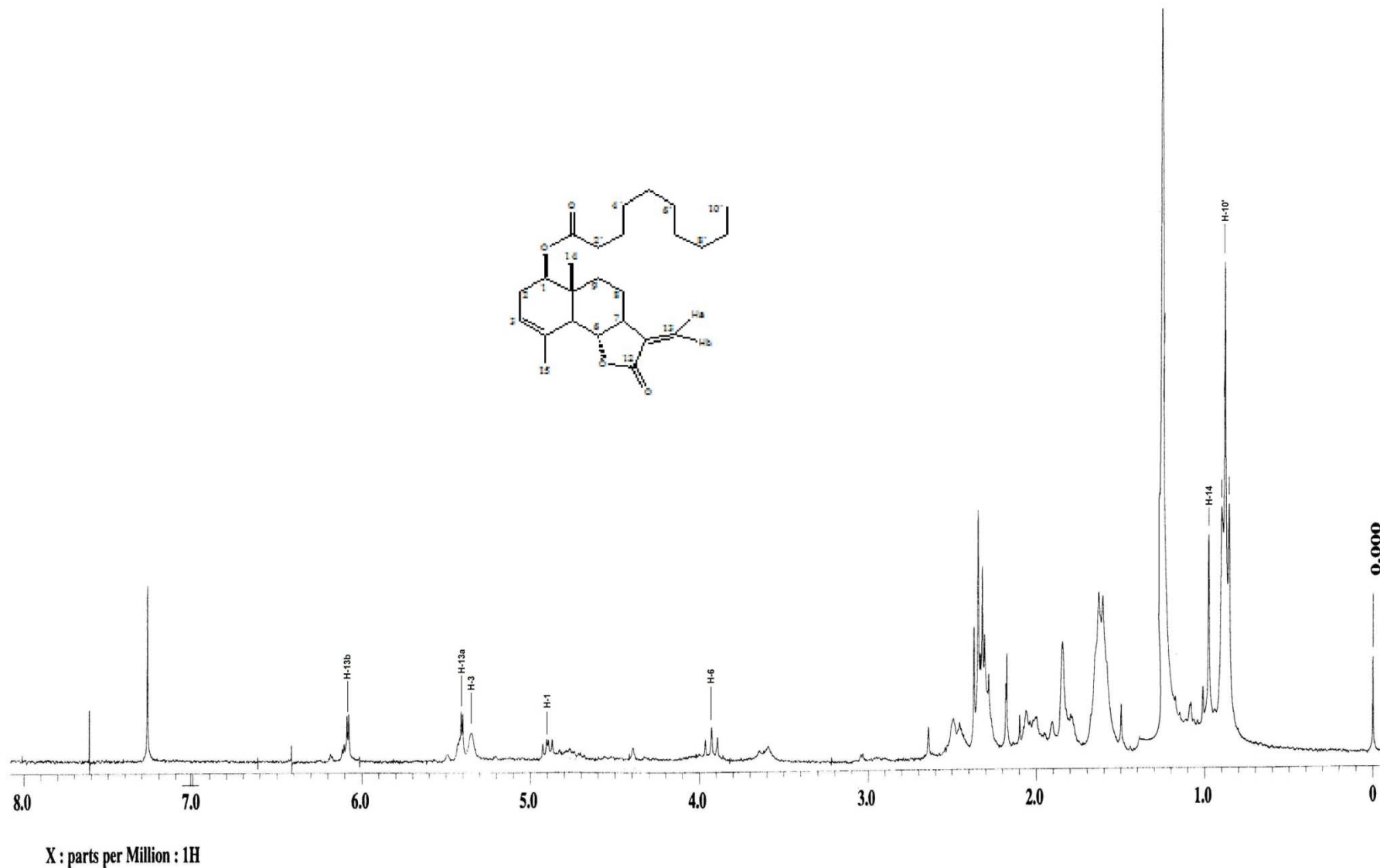


Espectro 19 RMN. HETCOR (CDCl₃, 300 MHz) octanoato de santamarina.

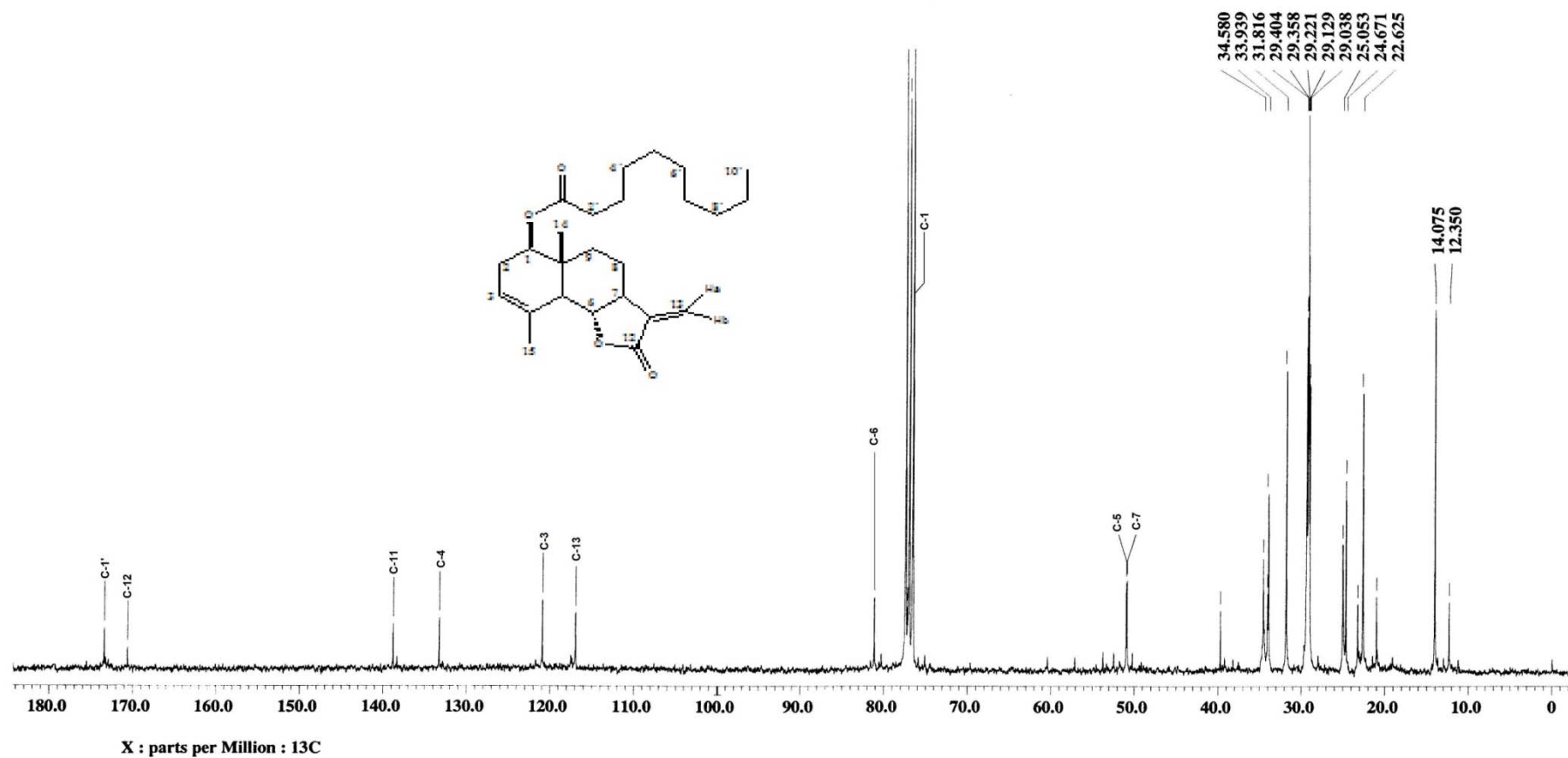
Espectro 20 IR (CDCl₃, Película) octanoato de santamarina.

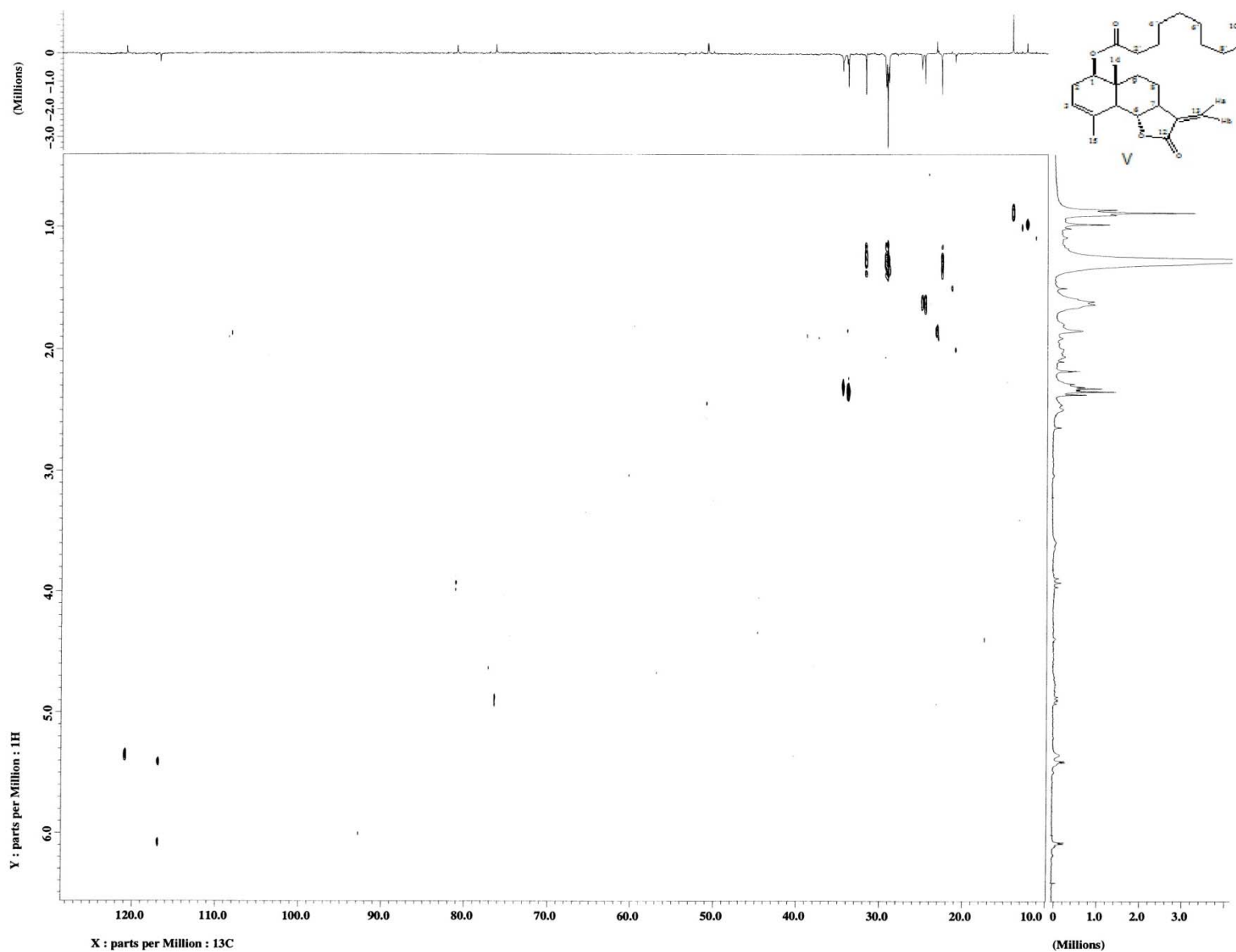


Espectro 21 Masas (IE. 70 eV) octanoato de santamarina.

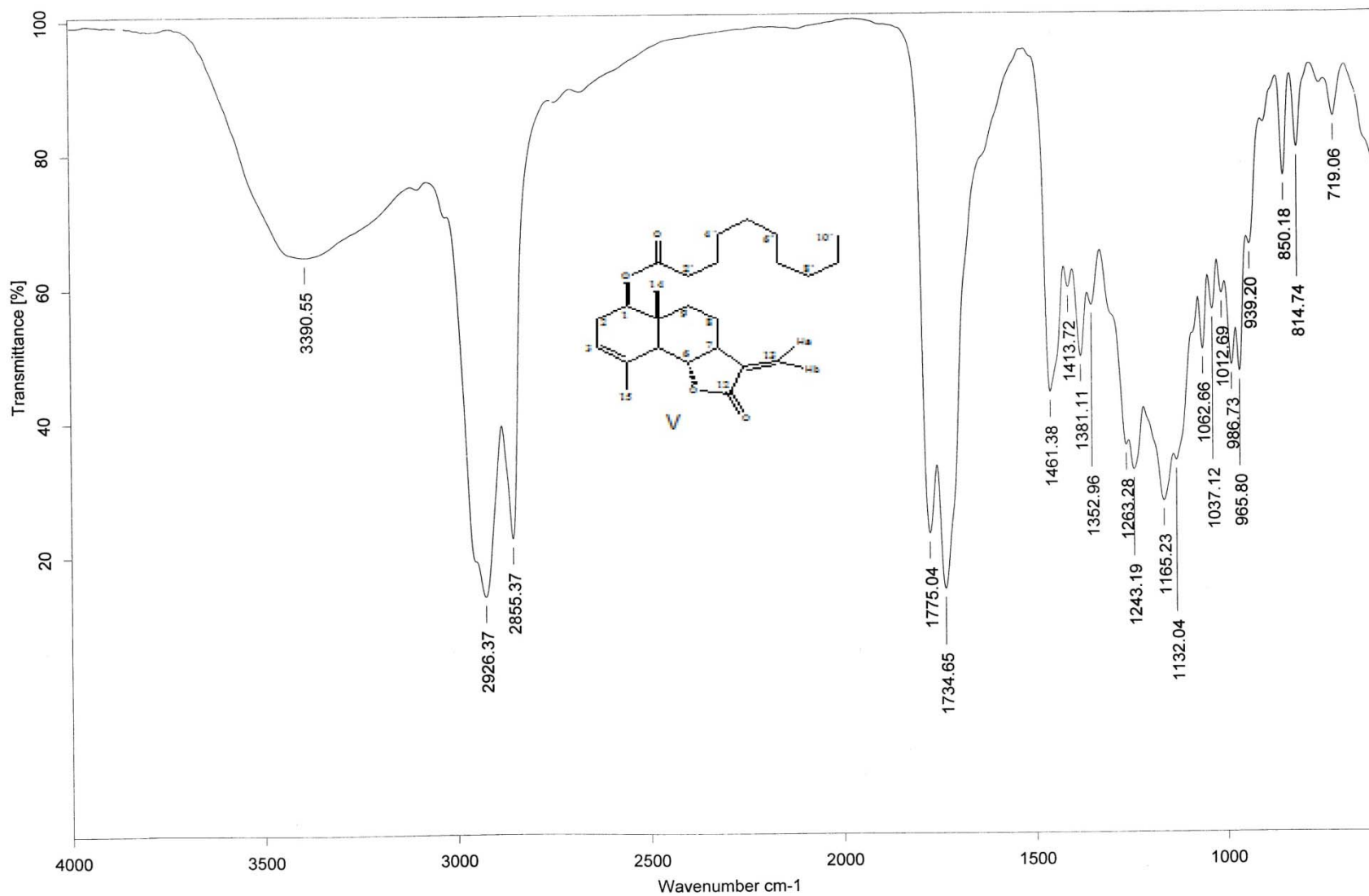


Espectro 22 RMN. ¹H (CDCl₃, 300 MHz) decanoato de santamarina.

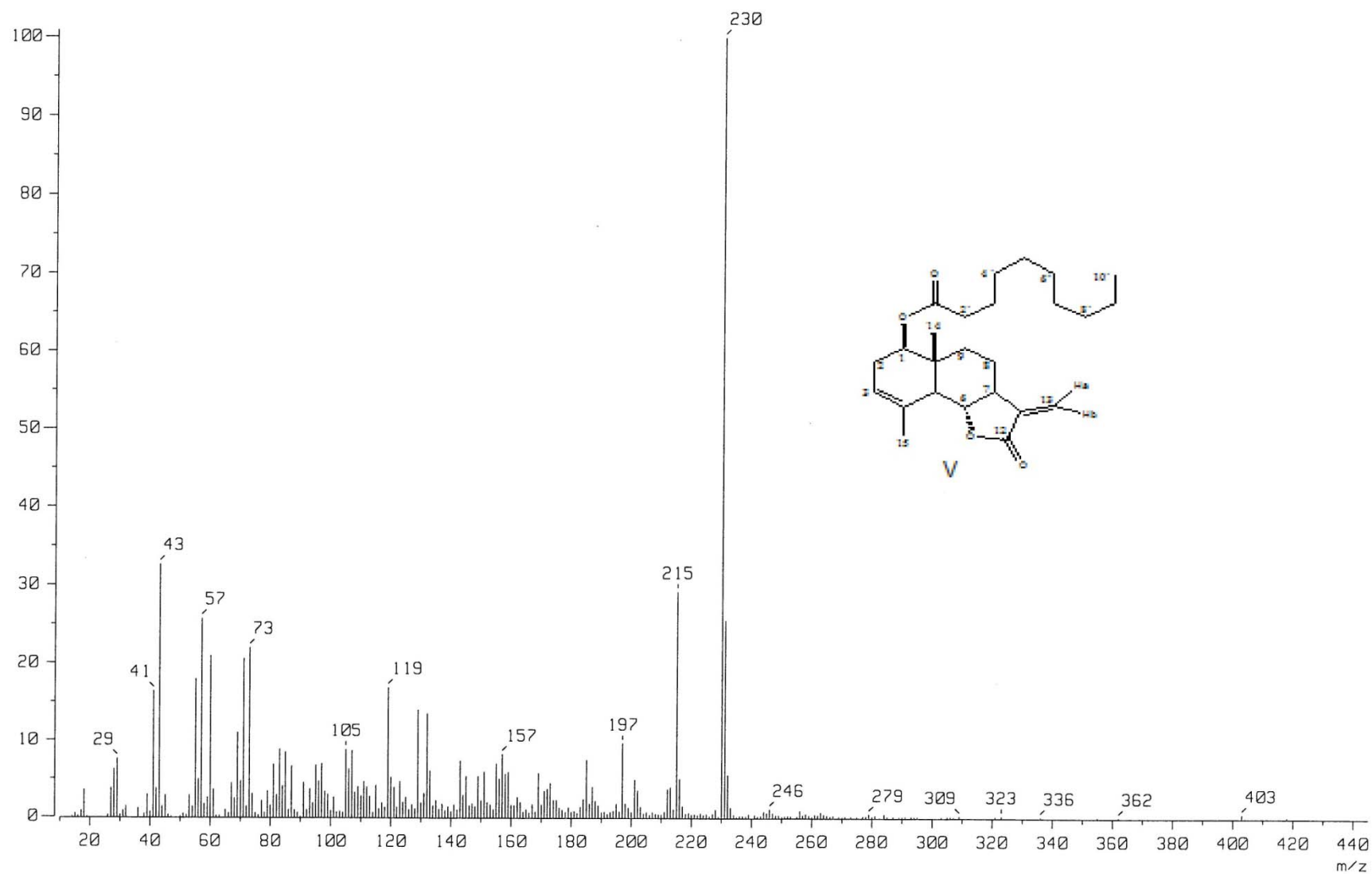
Espectro 23 RMN. ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) decanoato de santamarina.



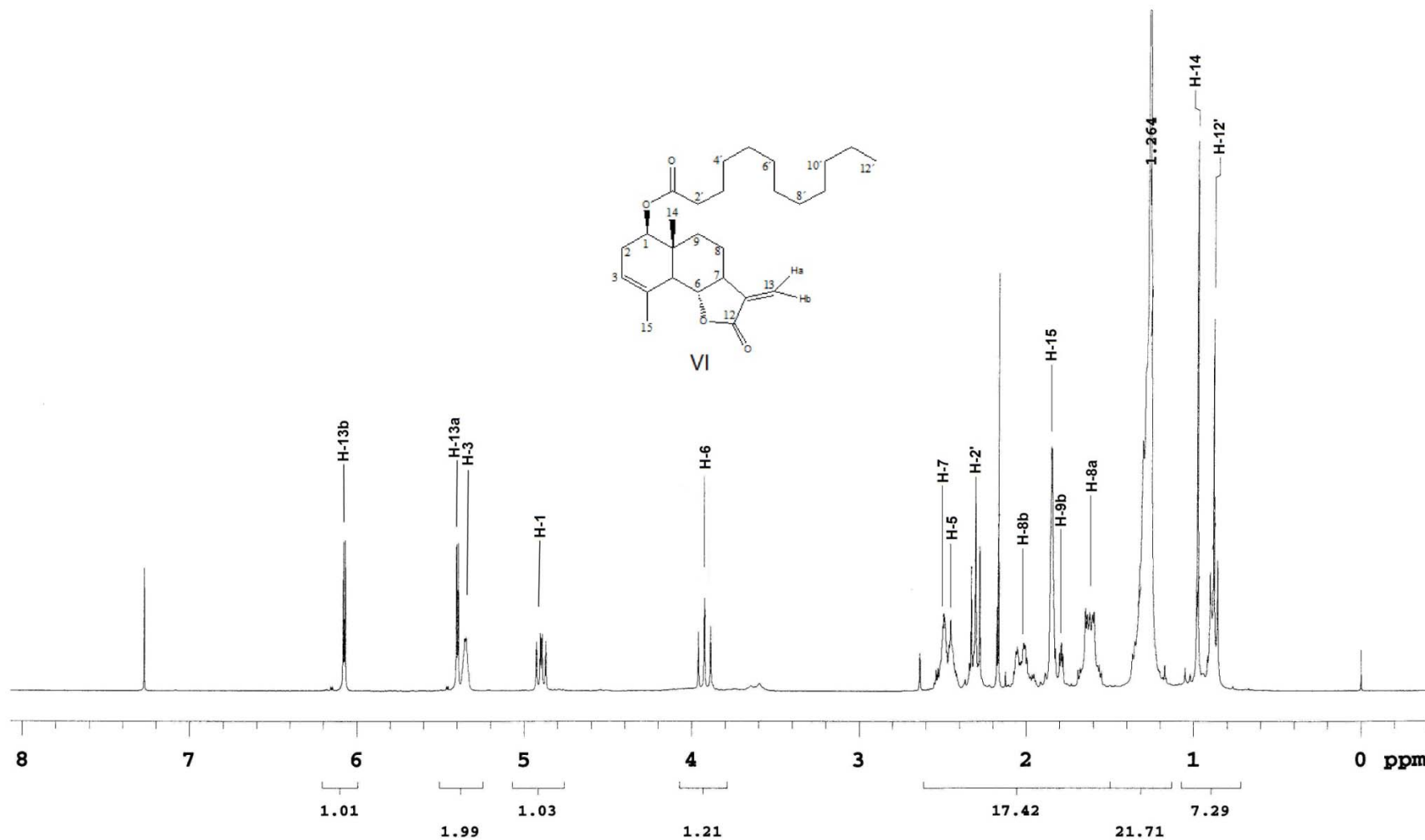
Espectro 24 RMN HETCOR (CDCl_3 , 300 MHz) decanoato de santamarina.



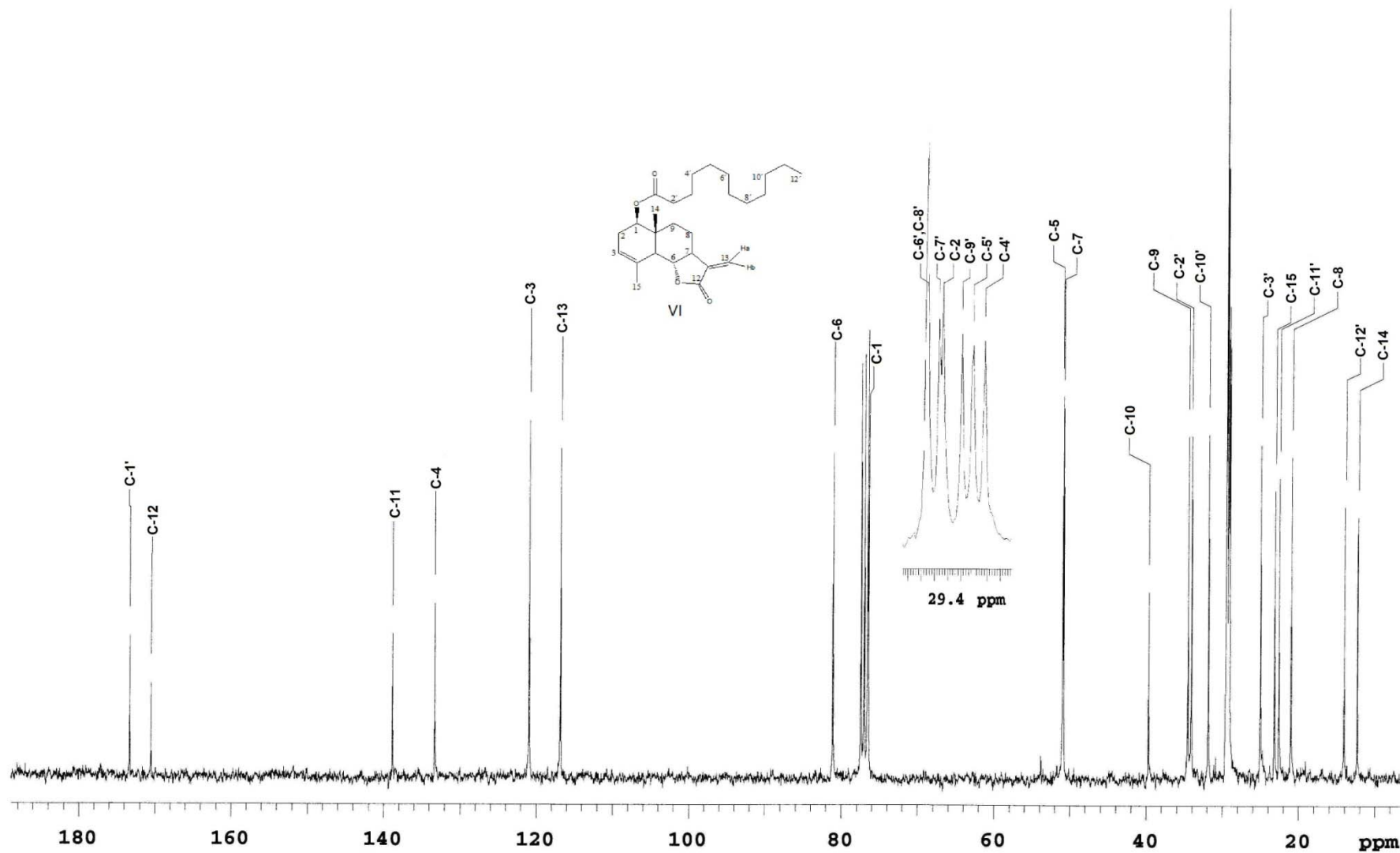
Espectro 25 IR (CDCl₃, Película) decanoato de santamarina.



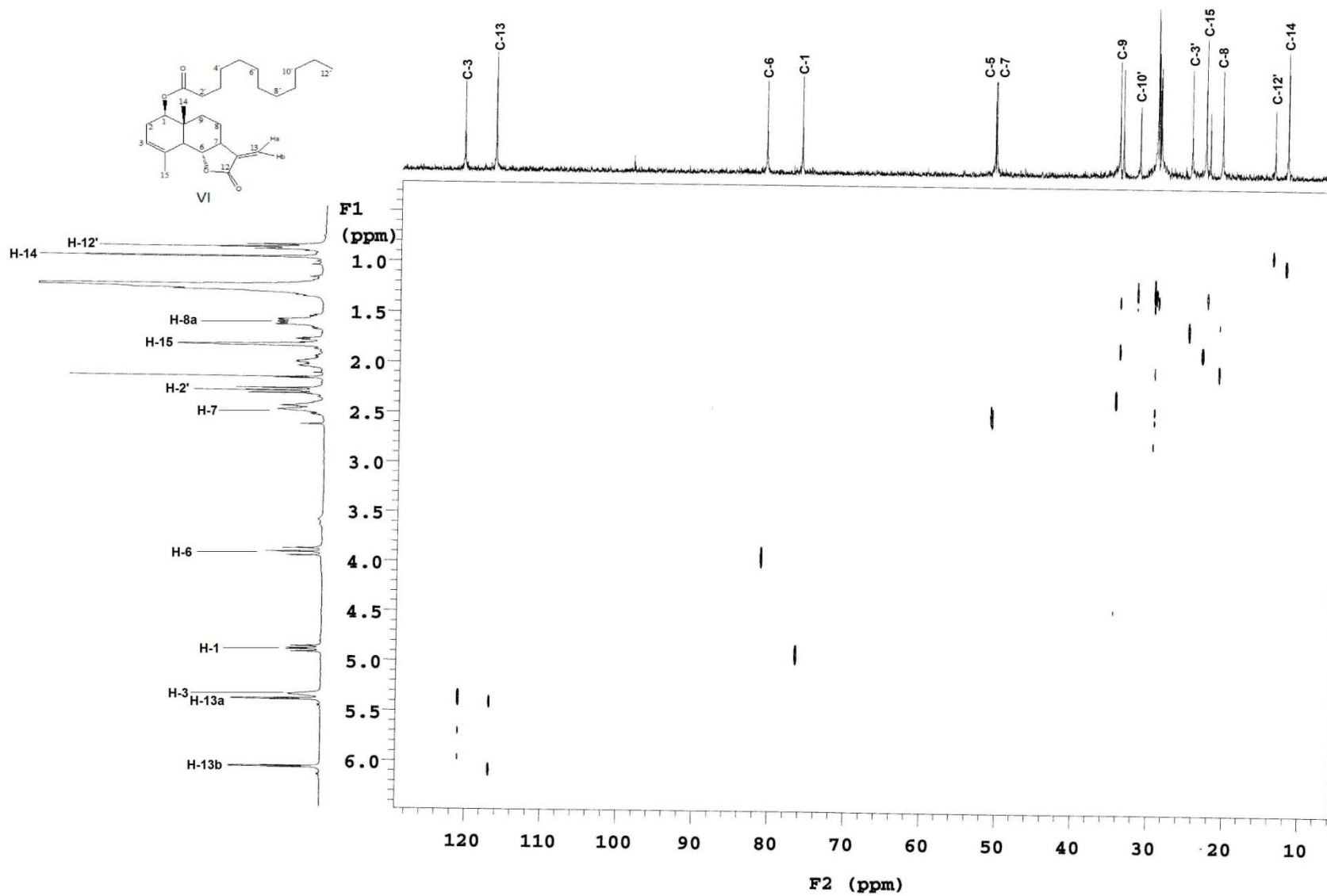
Espectro 26 Masas (IE. 70 eV) decanoato de santamarina.



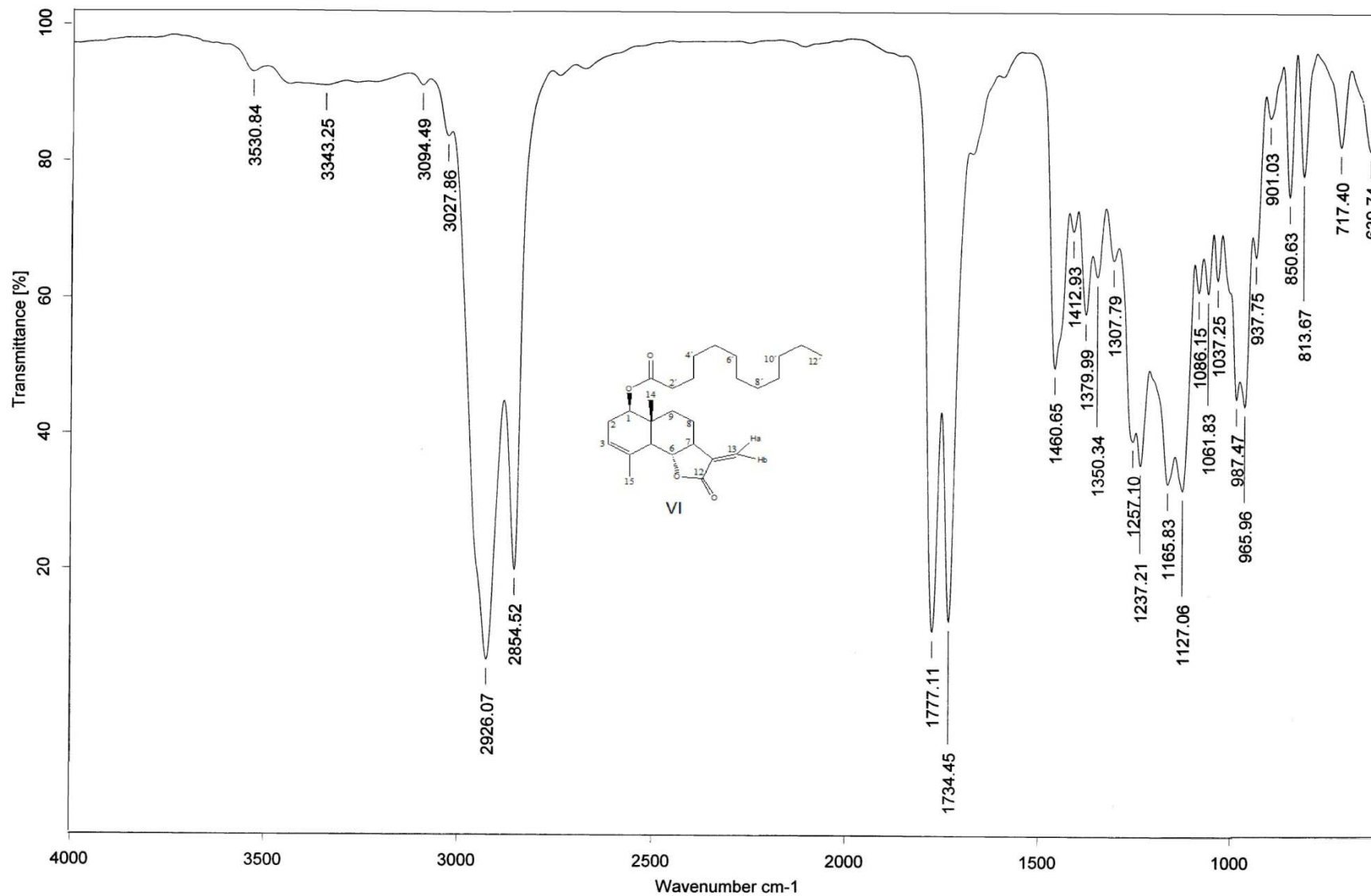
Espectro 27 RMN. ¹H (CDCl₃, 300 MHz) laurato de santamarina.



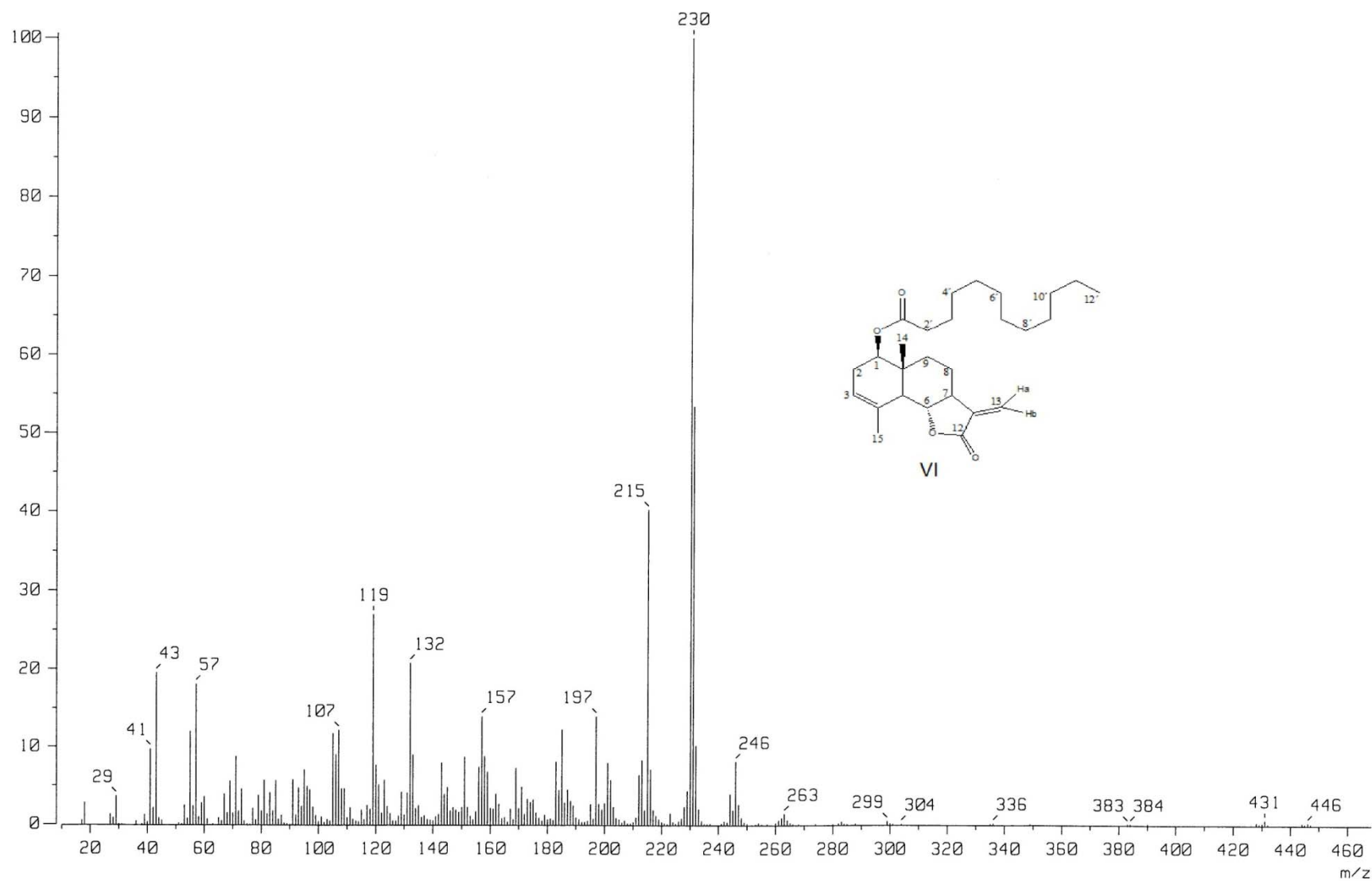
Espectro 28 RMN. ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) laurato de santamarina.



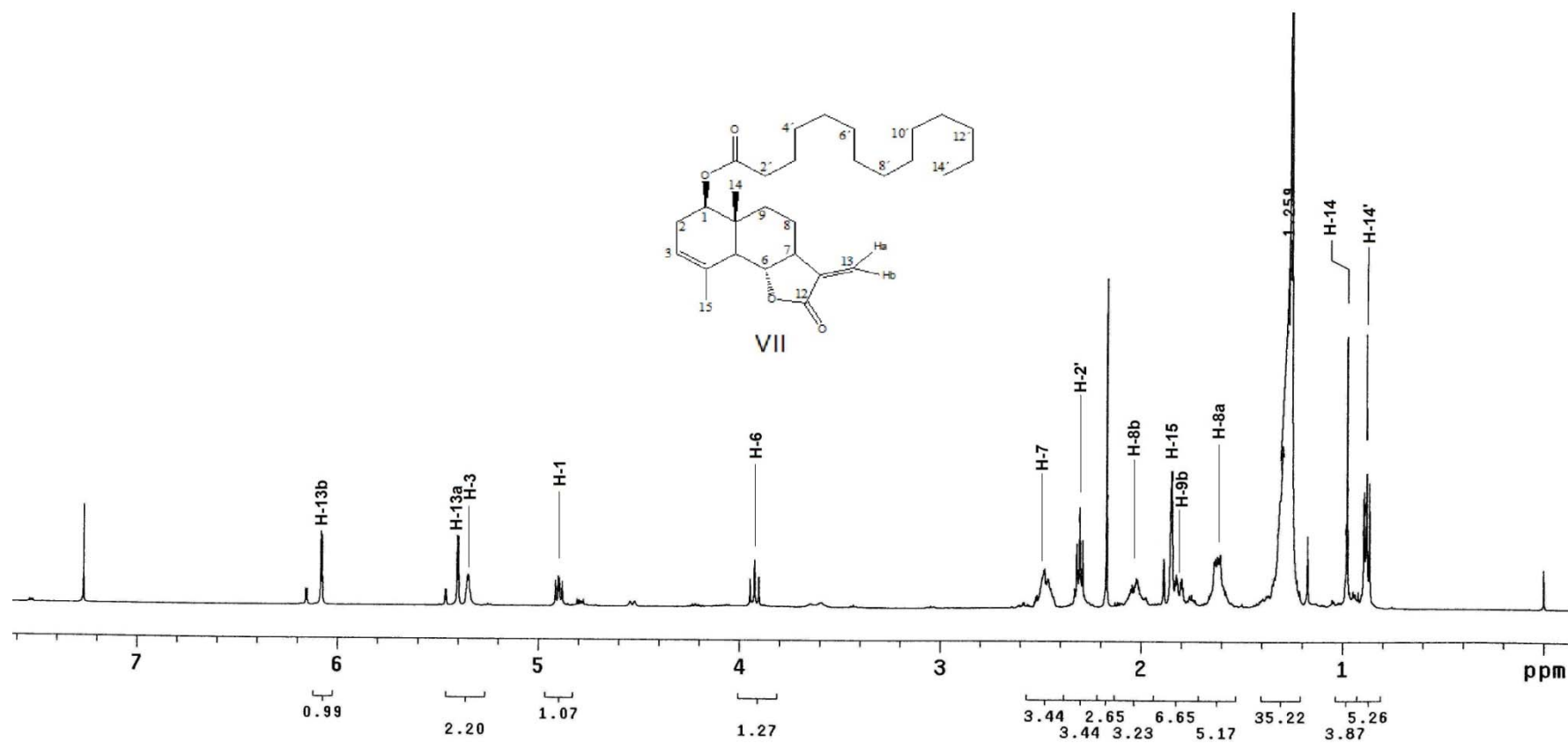
Espectro 29 RMN HETCOR (CDCl₃, 300 MHz) laurato de santamarina.



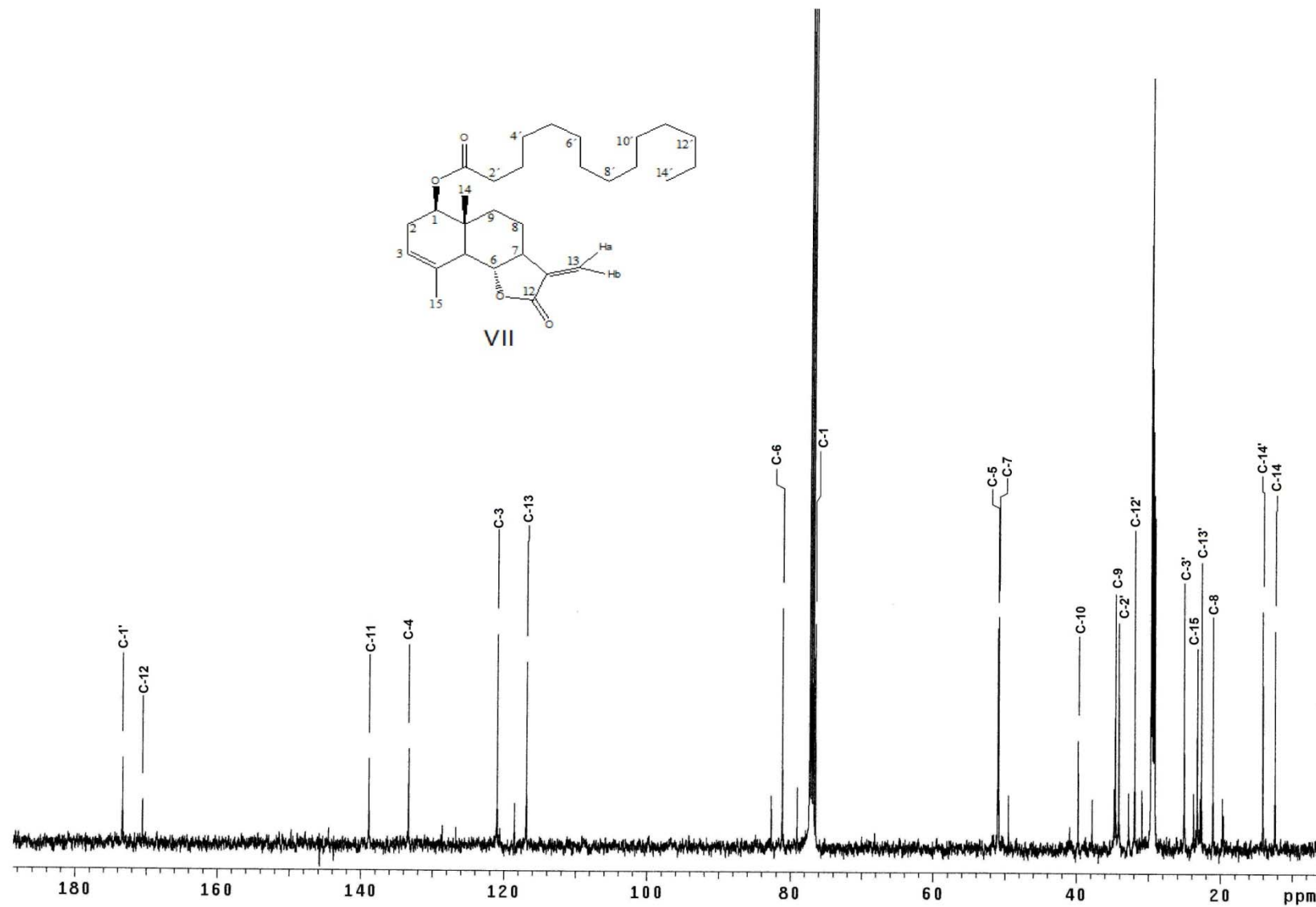
Espectro 30 IR (CDCl₃, Película) laurato de santamarina.



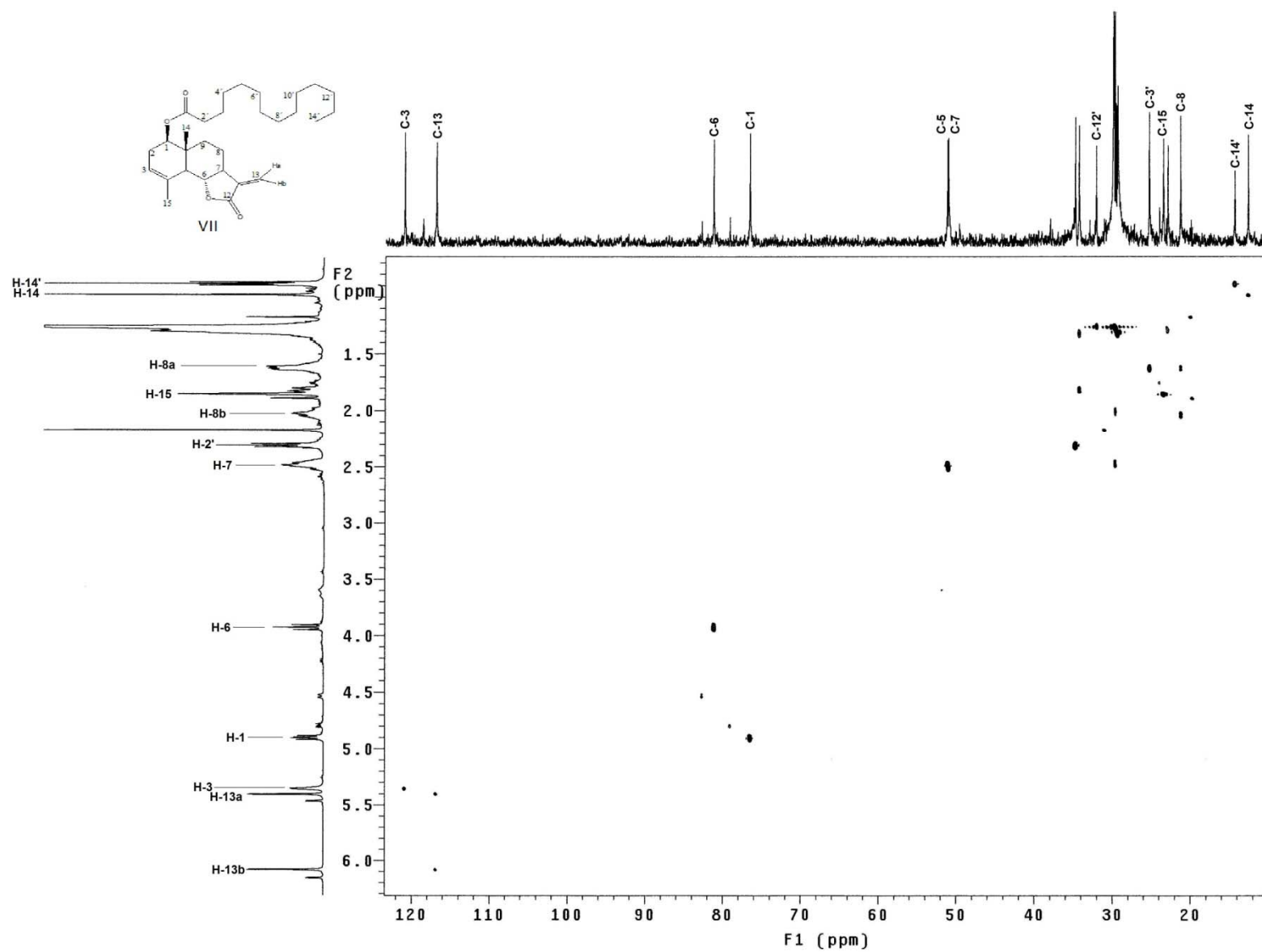
Espectro 31 Masas (IE. 70 eV) laurato de santamarina.



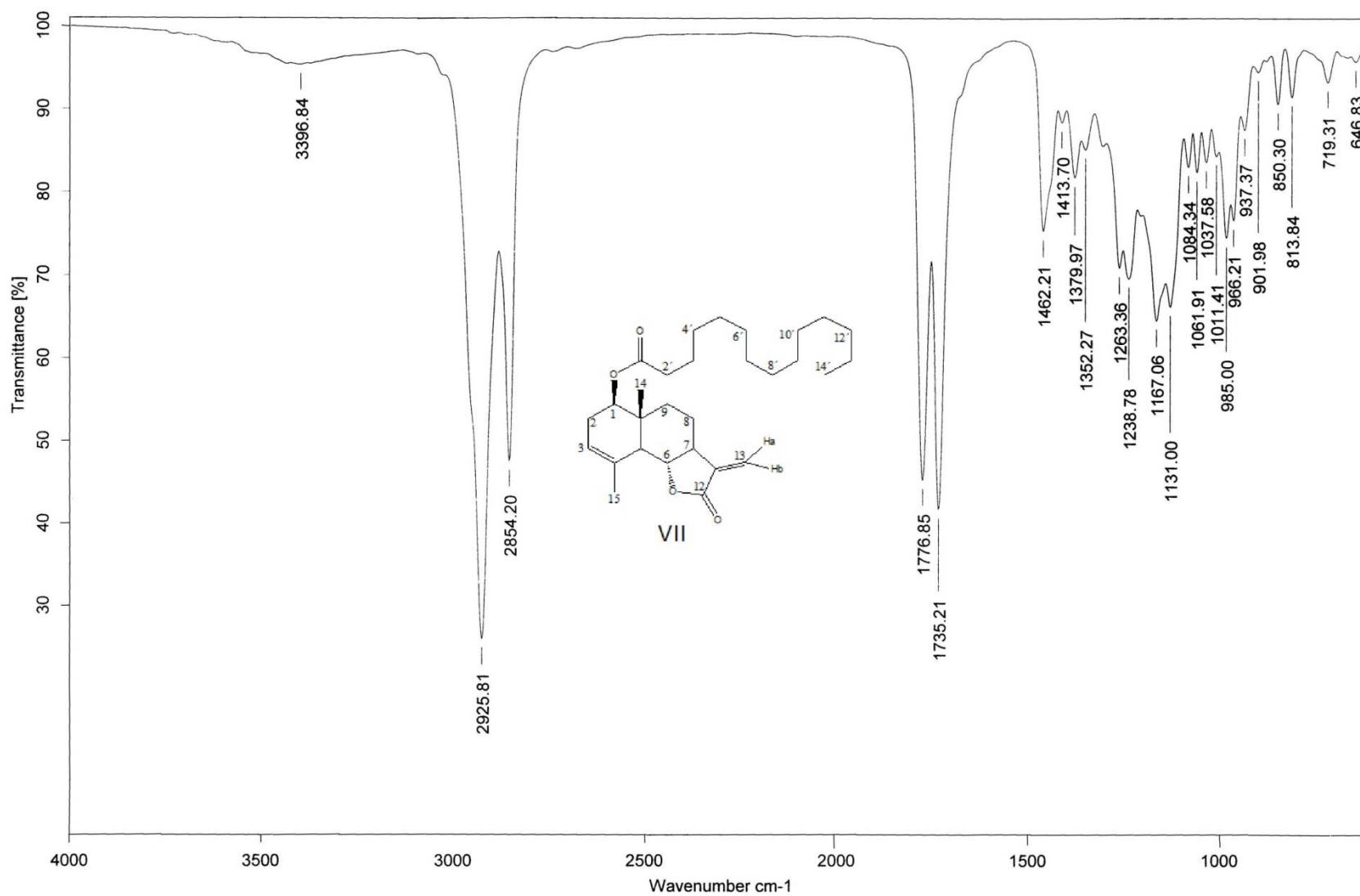
Espectro 32 RMN. ¹H (CDCl₃, 500 MHz) miristato de santamarina.



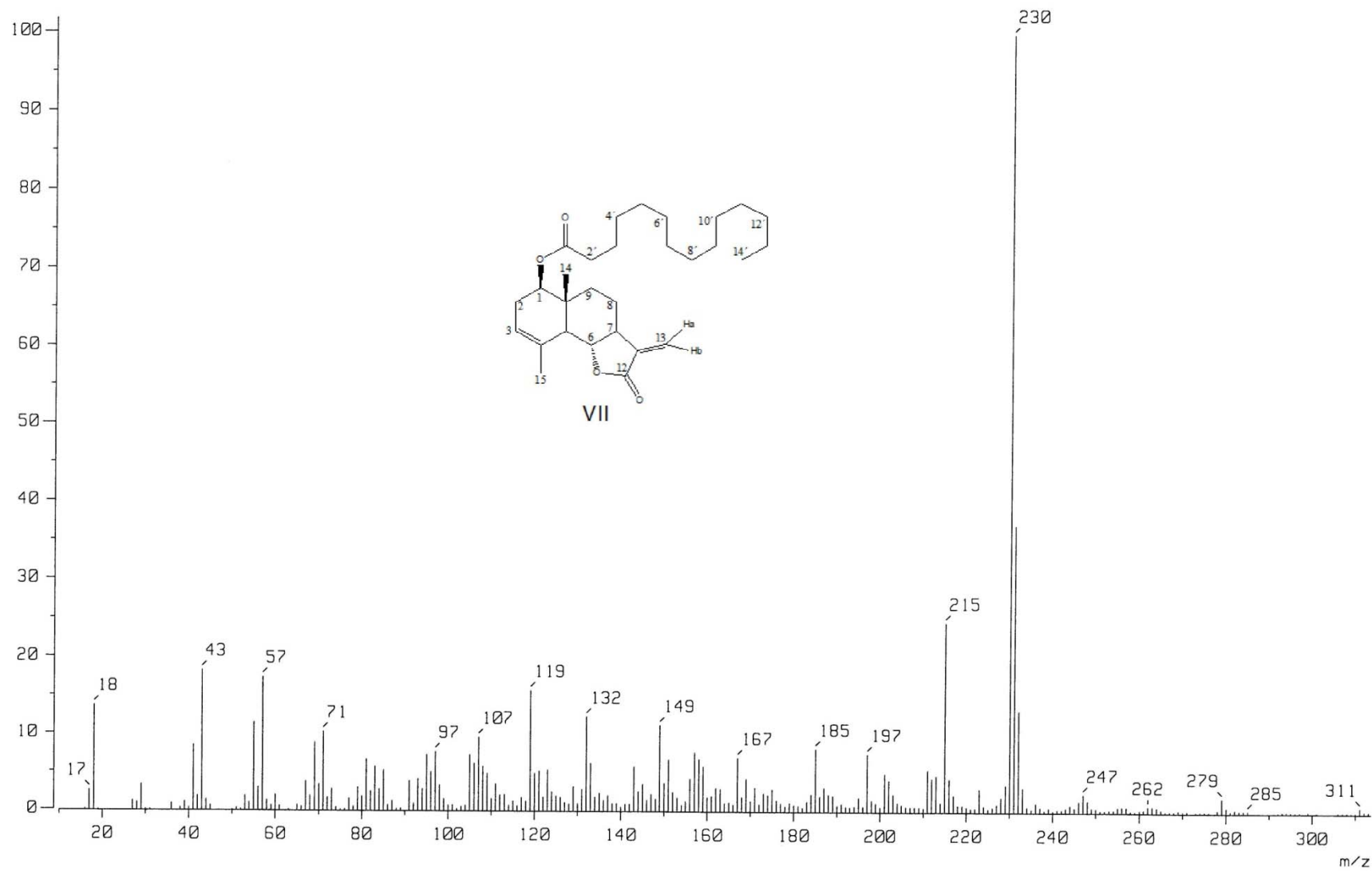
Espectro 33 RMN. ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) miristato de santamarina.



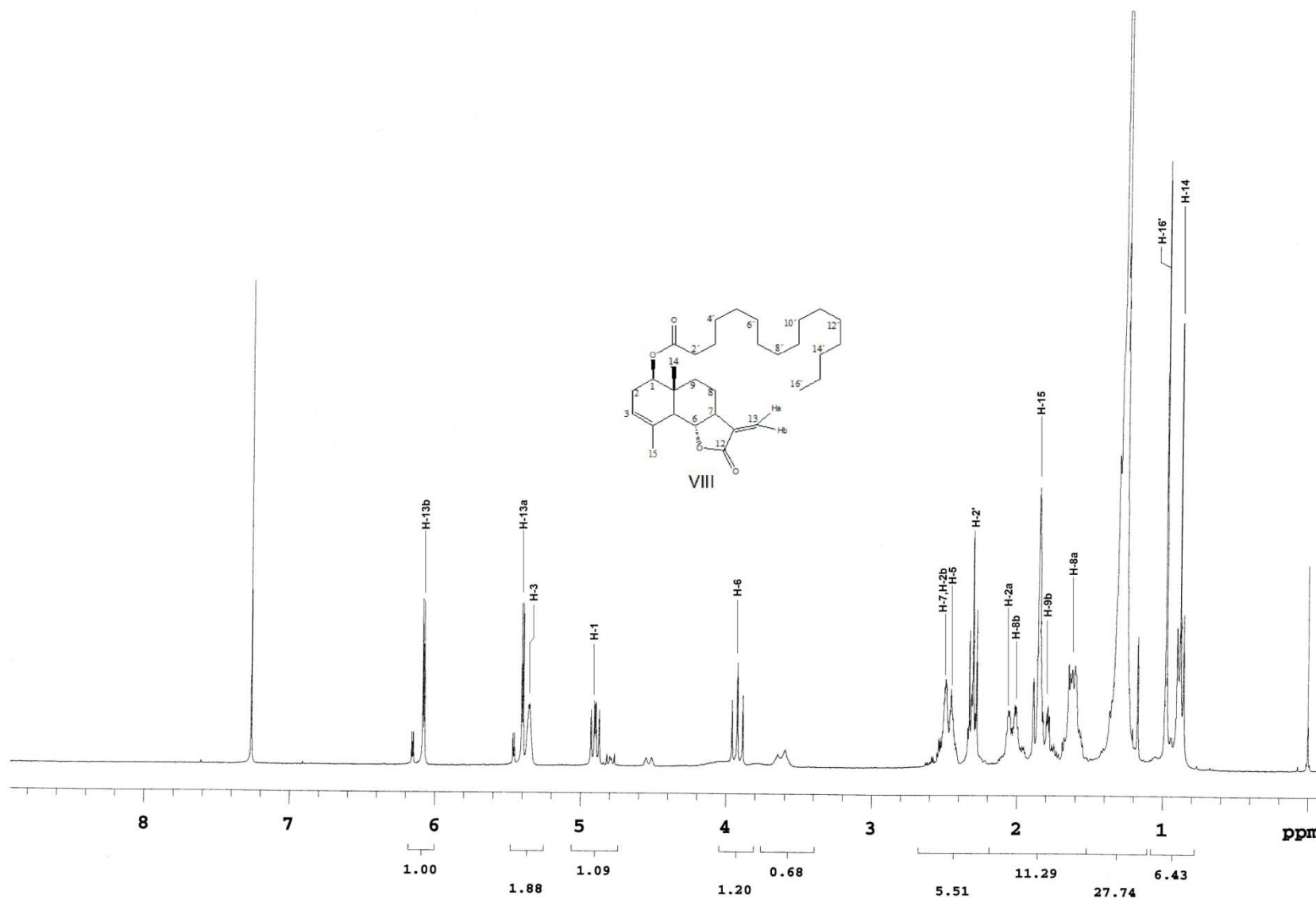
Espectro 34 RMN HSQC (CDCl₃, 500 MHz) miristato de santamarina.



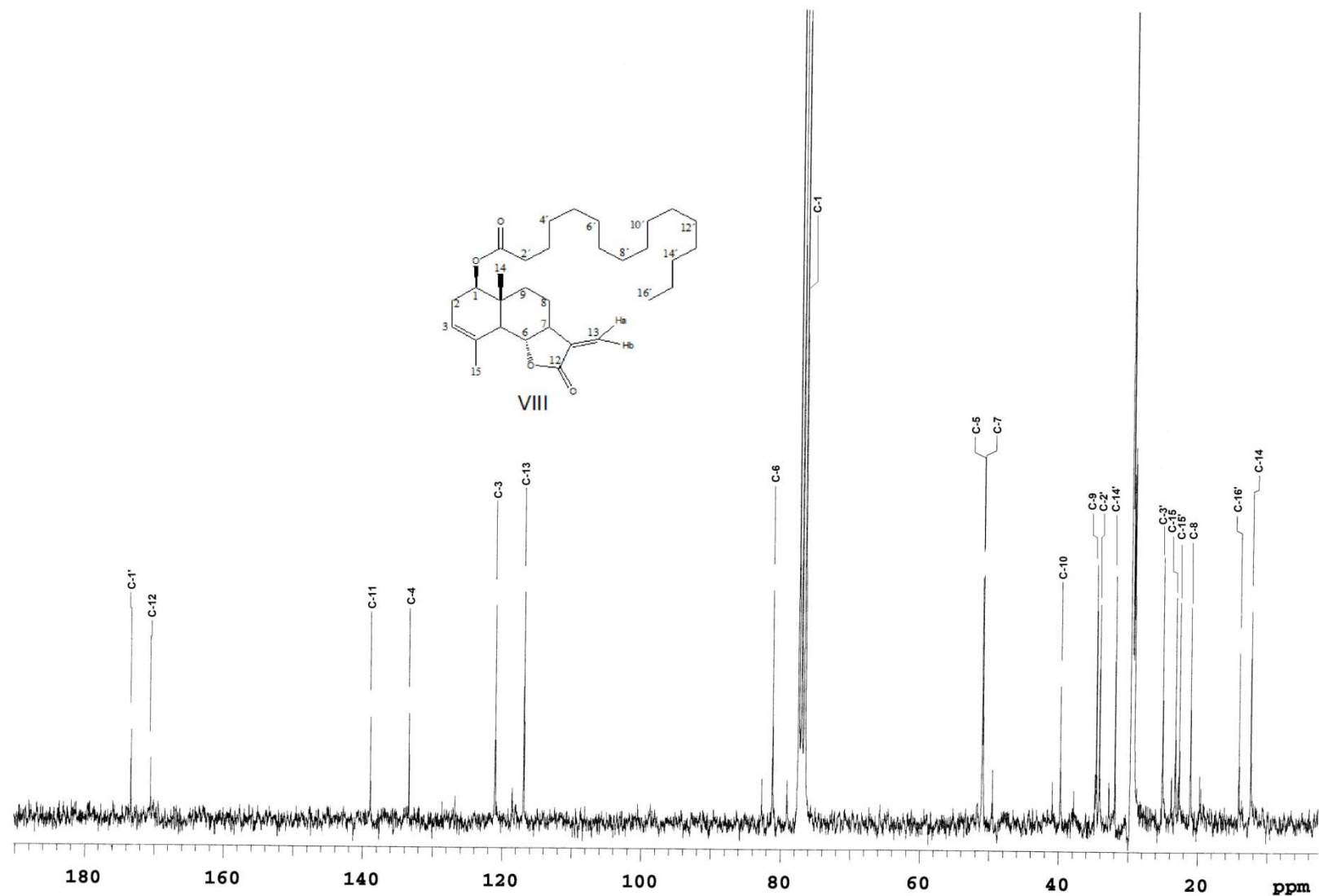
Espectro 35 IR. (CHCl₃, película) miristato de santamarina.



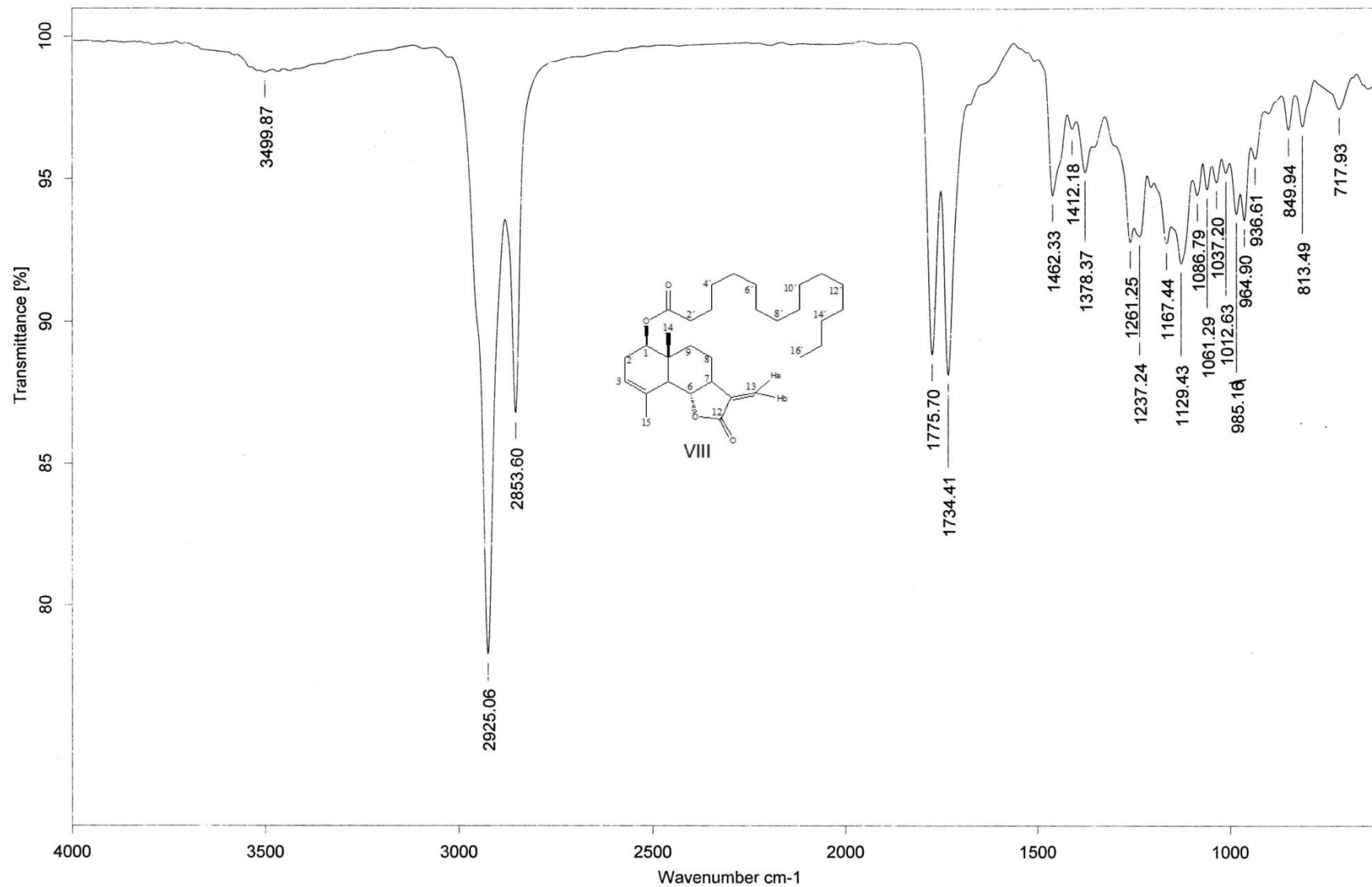
Espectro 36 Masas (IE. 70 eV) miristato de santamarina.



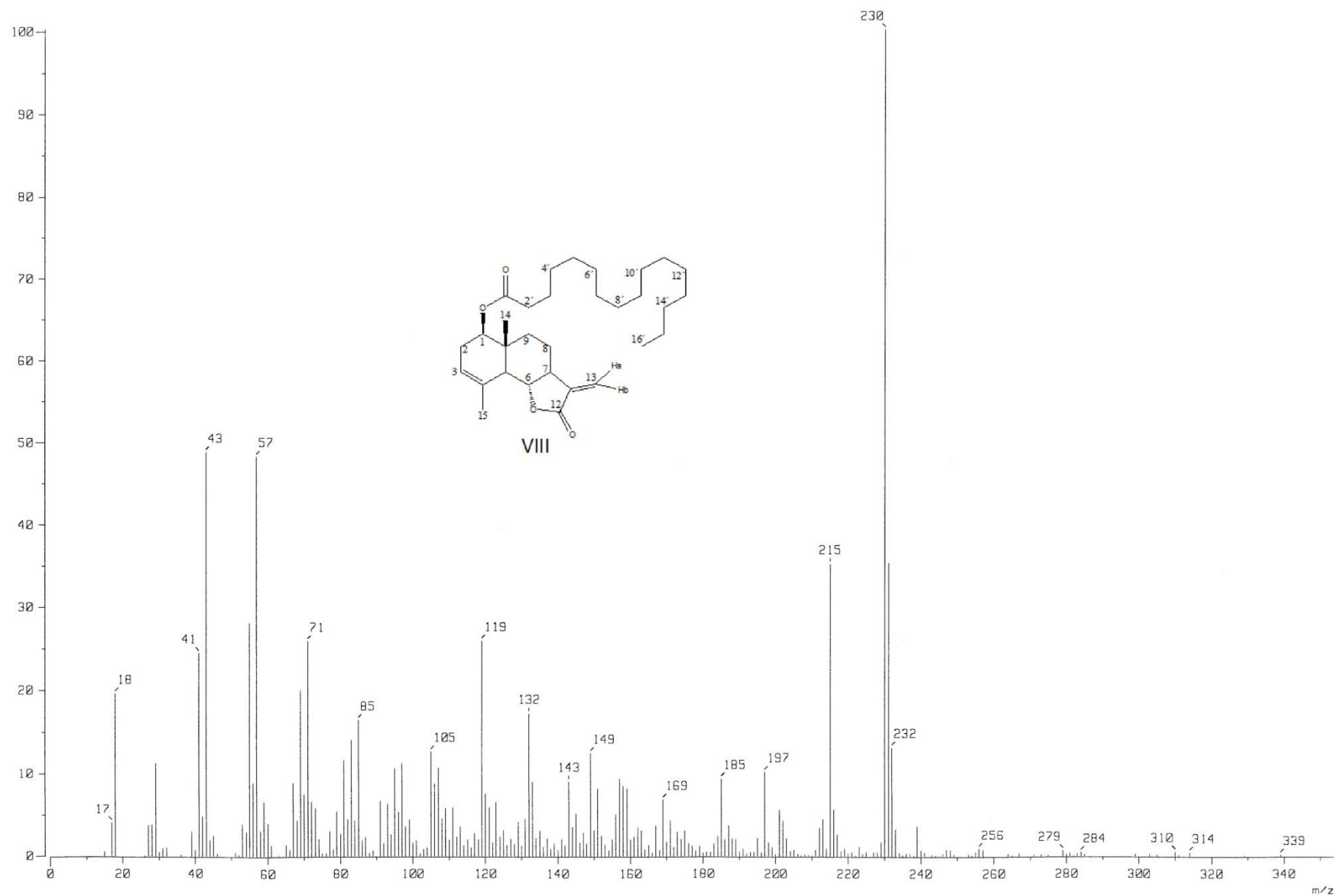
Espectro 37 RMN. ¹H (CDCl₃, 300 MHz) palmitato de santamarina.



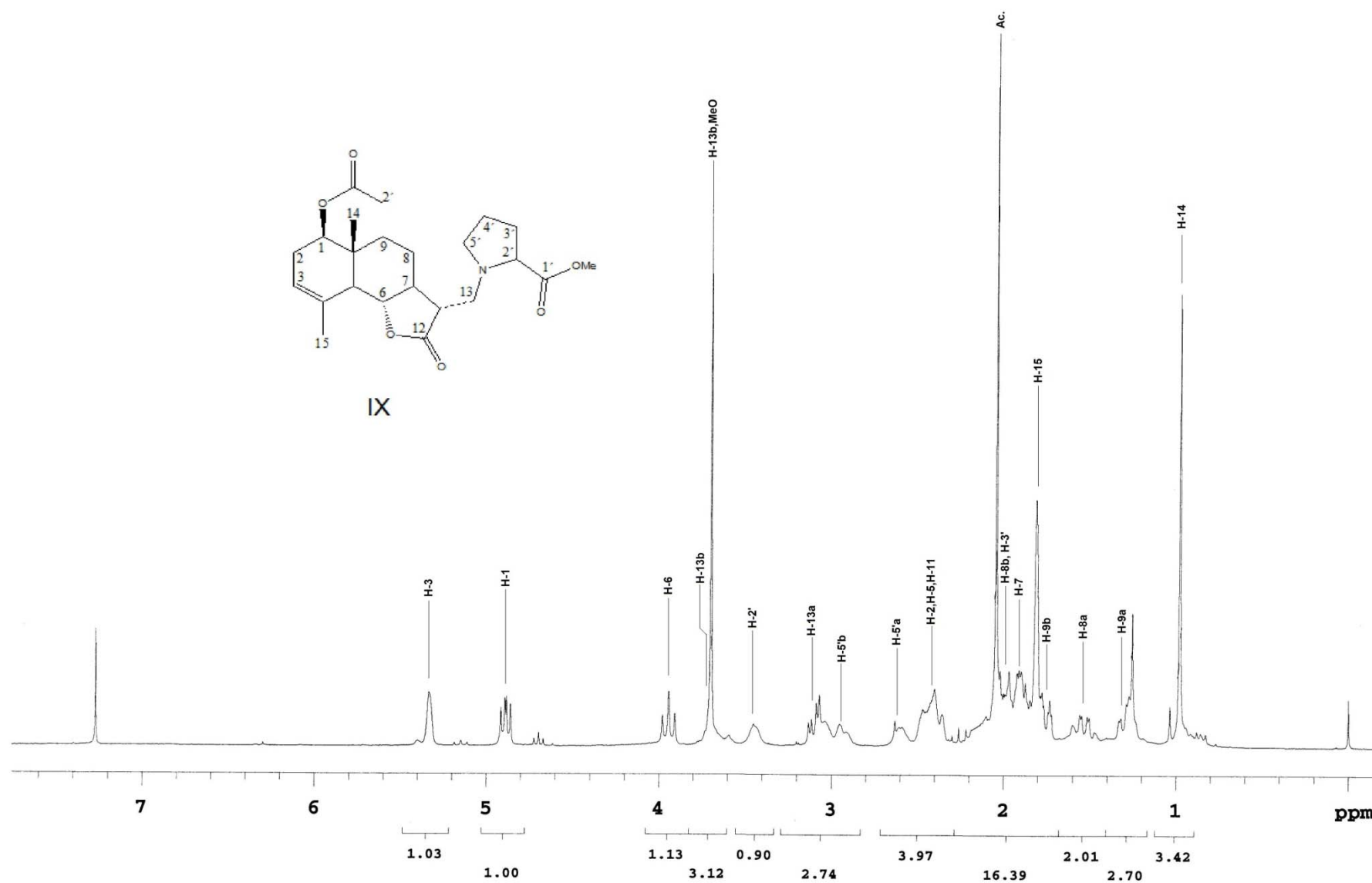
Espectro 38 RMN. ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) palmitato de santamarina.

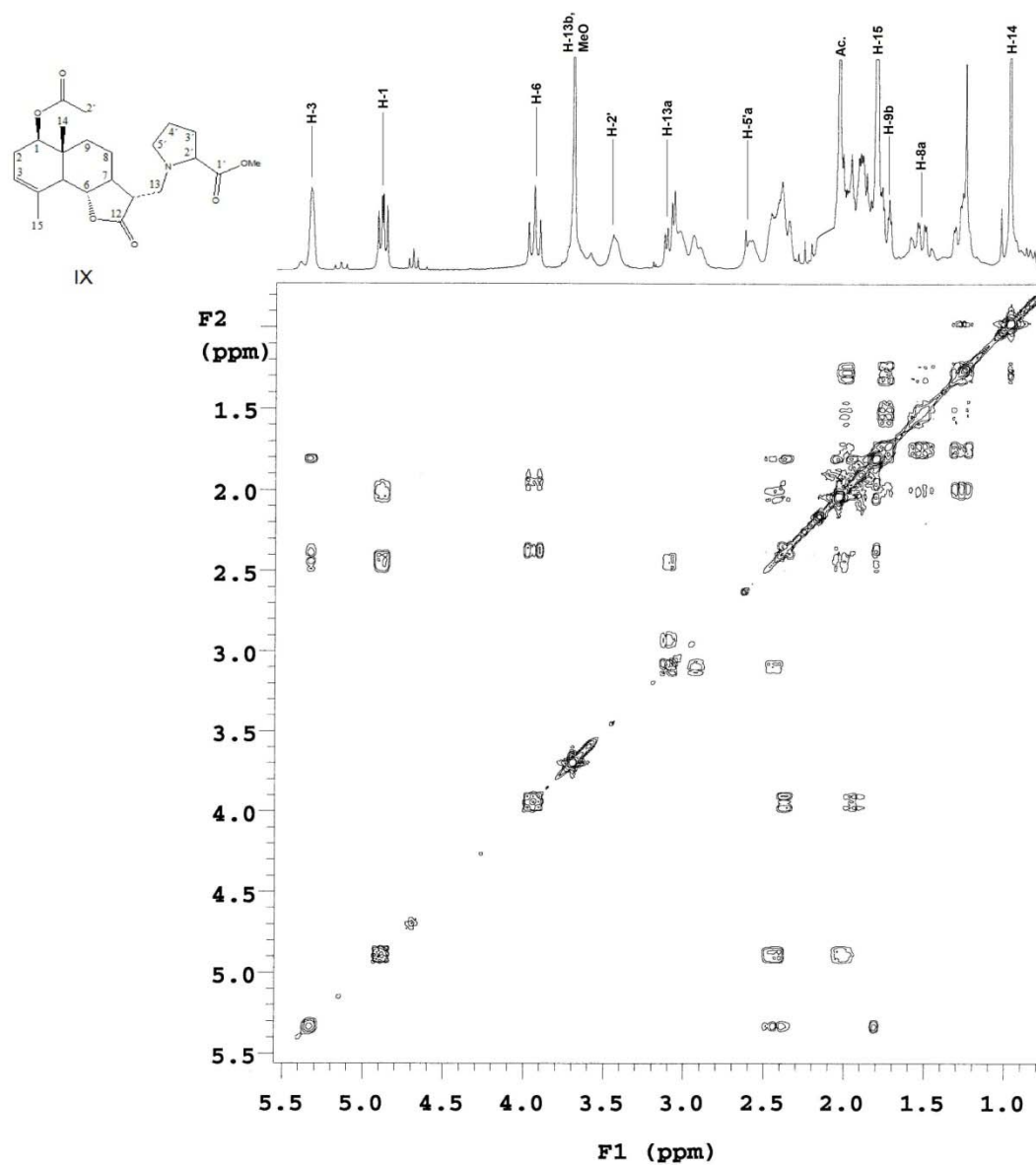


Espectro 39 IR. (CHCl₃, película) palmitato de santamarina.

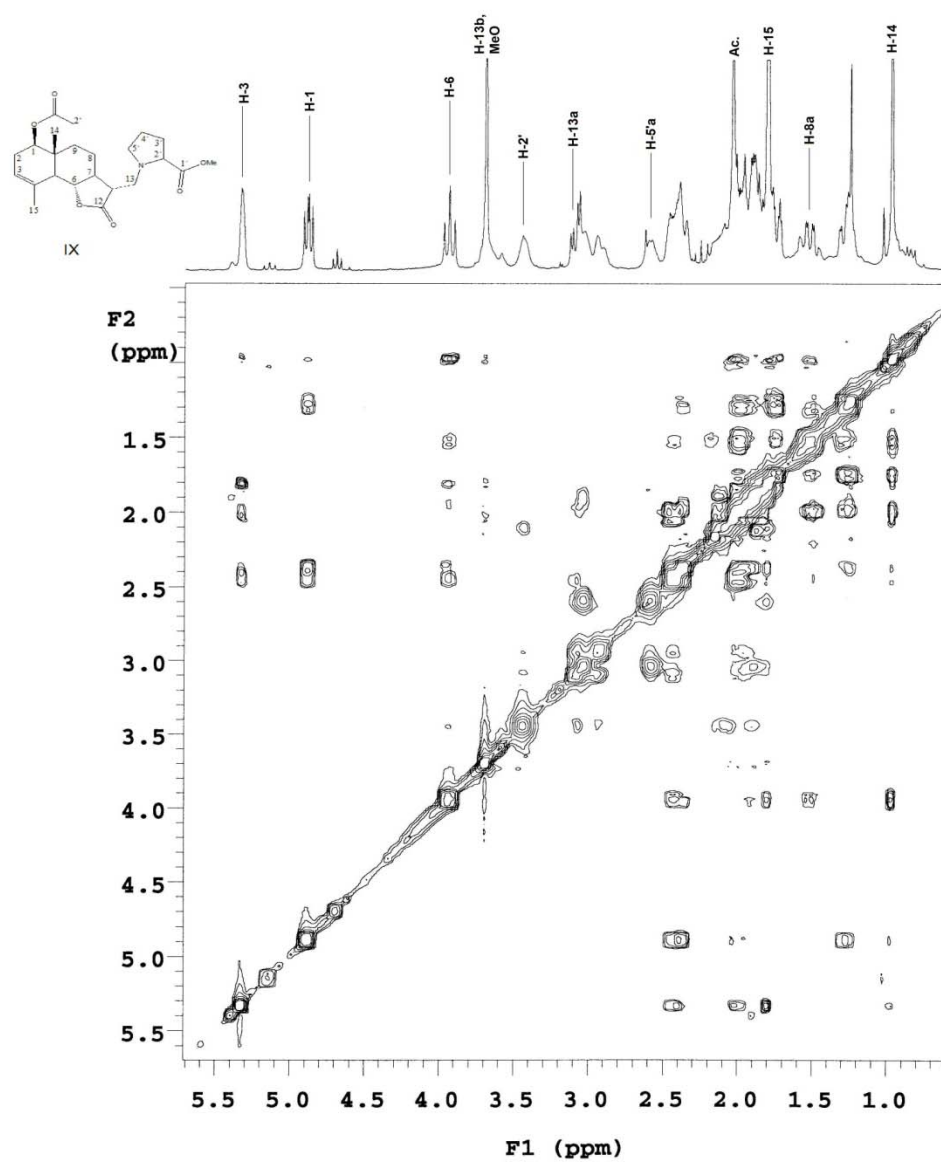


Espectro. 40 Masas (IE. 70 eV) palmitato de santamarina.

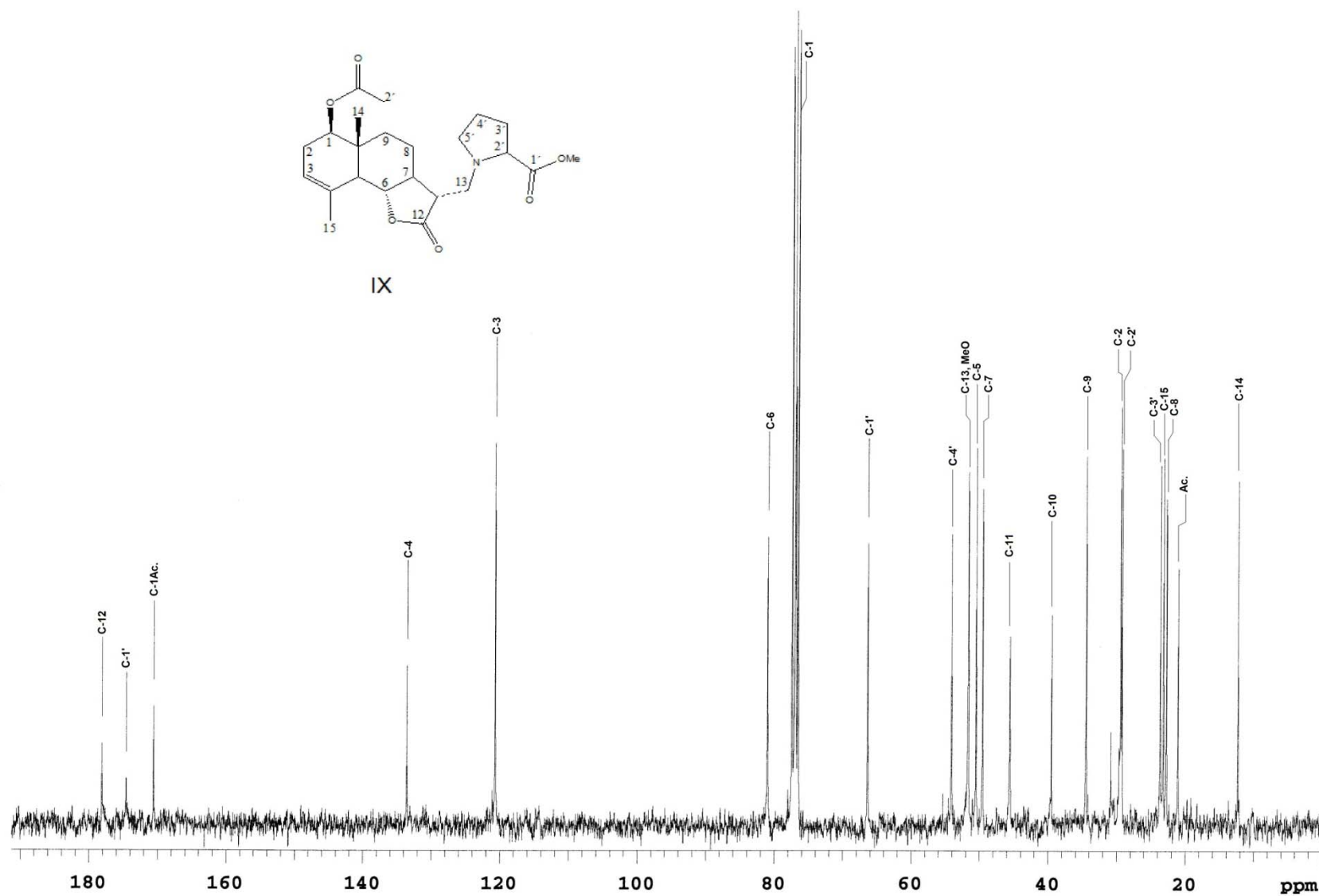
Espectro 41 RMN. ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) éster metílico del acetato de saussureamina D.



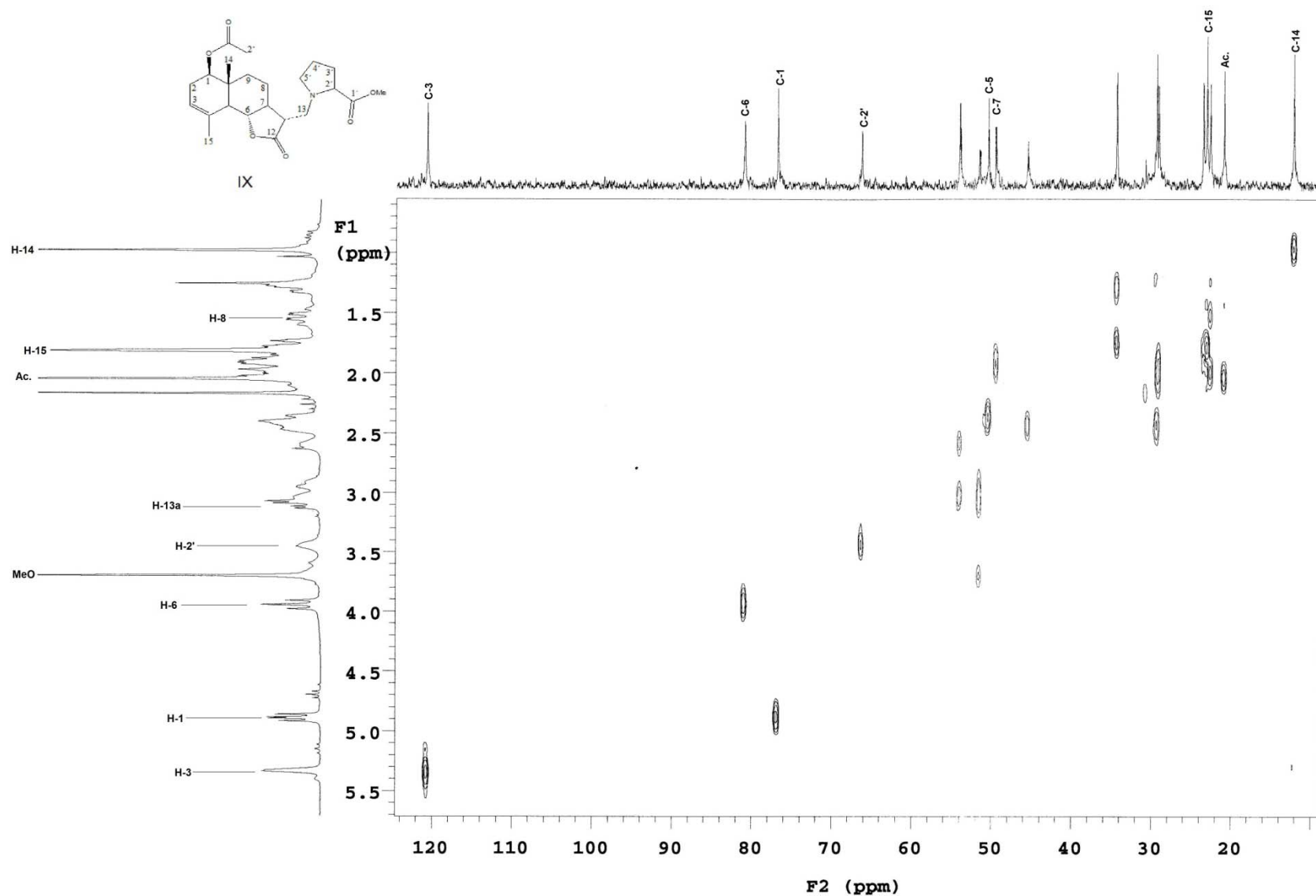
Espectro 42 RMN. COSY (CDCl₃, 300 MHz) éster metílico del acetato de saussureamina D.



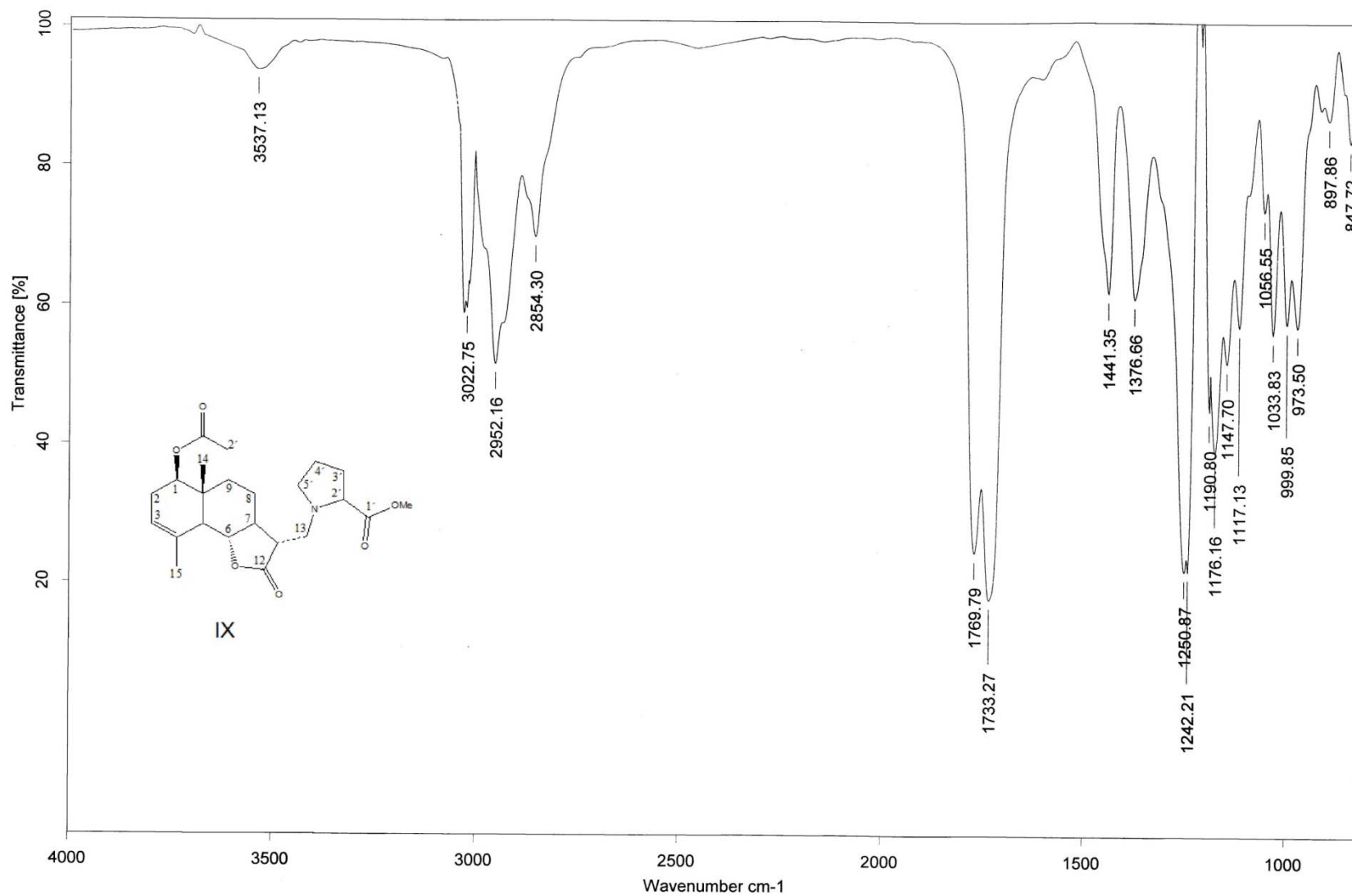
Espectro 43 RMN. NOESY (CDCl₃, 300 MHz) éster metílico del acetato de saussureamina D.

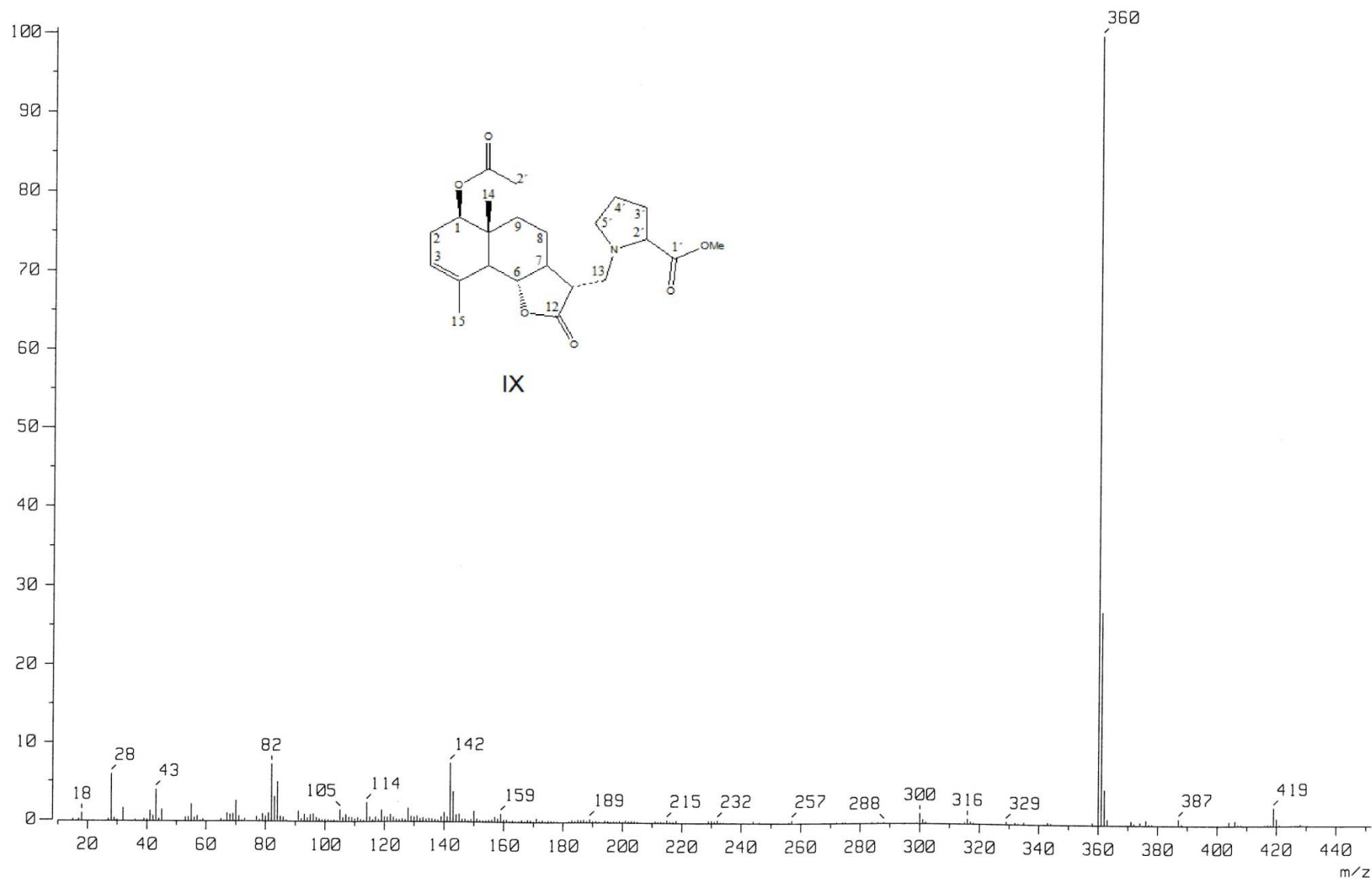


Espectro 44 RMN. ¹³C (CDCl₃, 75 MHz) éster metílico del acetato de saussureamina D.



Espectro 45 RMN. HETCOR (CDCl₃, 300 MHz) éster metílico del acetato de saussureamina D.

Espectro 46 IR. (CHCl₃, película) éster metílico del acetato de saussureamina D.



Espectro 47 Masas (IE. 70 eV) éster metílico del acetato de saussureamina D.