



UADY

POSGRADO  
INSTITUCIONAL  
EN CIENCIAS  
QUÍMICAS Y  
BIOQUÍMICAS

ESTABLECIMIENTO DE LA CONFIGURACIÓN  
RELATIVA DE LOS ADUCTOS 3,5-DI-*TER*-BUTIL-  
O-BENZOQUINONA – PRISTIMERINA

TESIS

PRESENTADA POR

FERNANDO JESÚS TUN ROSADO

EN OPCIÓN AL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS  
QUÍMICAS Y BIOQUÍMICAS

MÉRIDA, YUCATÁN, MÉXICO

2019





**UADY**

POSGRADO  
INSTITUCIONAL  
EN CIENCIAS  
QUÍMICAS Y  
BIOQUÍMICAS

**ESTABLECIMIENTO DE LA CONFIGURACIÓN  
RELATIVA DE LOS ADUCTOS 3,5-DI-*TER*-BUTIL-O-  
BENZOQUINONA - PRISTIMERINA**

**TESIS**

**PRESENTADA POR**

**FERNANDO JESÚS TUN ROSADO**

**EN OPCIÓN AL GRADO DE**

**MAESTRO EN CIENCIAS  
QUÍMICAS Y BIOQUÍMICAS**

**MÉRIDA, YUCATÁN, MÉXICO**

**2019**





Mérida, Yuc., 24 de noviembre de 2019  
Oficio Num.: PICQB/257/2019

**Asunto:** Autorización de digitalización

La tesis “**Establecimiento de la configuración relativa de los aductos 3,5-di-ter-butil-o-benzoquinona-pristimerina**” presentada por Fernando Jesús Tun Rosado, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar por el grado de Maestro en Ciencias Químicas y Bioquímicas, ha sido aprobada en cuanto a su contenido científico y en cuanto a lo establecido en el Manual de Procedimientos del Posgrado Institucional en Ciencias Químicas y Bioquímicas, por lo que se le autoriza la digitalización de los ejemplares correspondientes.

**Directores de la tesis**

  
Dr. Rolando David Cáceres Castillo

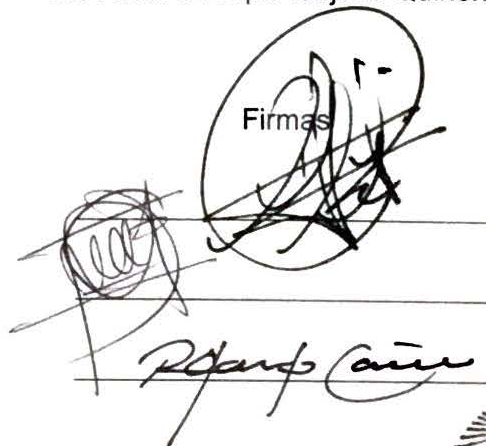
  
Dr. Ramiro Felipe Quijano Quiñones

**Sinodales**

Dr. Gonzalo Joaquín Mena Rejón

Dr. Gumersindo Mirón López

Dr. Rolando David Cáceres Castillo

  
Firmas

**ATENTAMENTE**  
“LUZ, CIENCIA Y VERDAD”

  
**DRA. MAIRA RUBI SEGURA CAMPOS**  
**COORDINADORA DEL POSGRADO INSTITUCIONAL**  
**EN CIENCIAS QUÍMICAS Y BIOQUÍMICAS**



**POSGRADO INSTITUCIONAL**  
**EN CIENCIAS QUÍMICAS**  
**Y BIOQUÍMICAS**

c.c. Archivo  
MRSC



## AGRADECIMIENTOS

Los resultados presentados en esta Tesis de Maestría fueron realizados en el período comprendido de enero de 2017 a Agosto de 2019, en el laboratorio de Química Farmacéutica de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Yucatán, bajo la asesoría del Dr. Rolando David Cáceres Castillo y el Dr. Ramiro Felipe Quijano Quiñones a quien el autor manifiesta su agradecimiento por la oportunidad de trabajar nuevamente en su grupo de investigación, por el apoyo en el proceso de aprendizaje y desarrollo de este trabajo de investigación. Por ultimo, por los invaluable consejos en la vida profesional que me servirán para mi desarrollo profesional.

A los miembros del honorable sínodo, Dr. Leovigildo Quijano (Instituto de Química, UNAM), Dr. Gonzalo Joaquín Mena Rejón (Facultad de Química, UADY), Dr. Gumersindo Mirón López (Laboratorio de Resonancia Magnética Nuclear, Facultad de Química, UADY) por la tutoría continua y la crítica constructiva realizada durante el desarrollo de la Tesis; así mismo, por dedicar su tiempo en la revisión y corrección de la misma. Al M. en C. Manlio Joaquín Graniel Sabido por la realización de los experimentos de Masas, al QFB. Carlos A. Pech quien proceso los experimentos de RMN.

A mis compañeros Q. Laura Hernández Lozano, Q. Mario Noh Burgos, Q. Jesús Aguilera, por su valiosa amistad, apoyo y sus consejos en relación con el trabajo experimental y en la escritura de este.

Finalmente, al Posgrado Institucional en Ciencias Químicas y Bioquímicas y a la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Yucatán.





Este trabajo de Tesis fue realizado en el Laboratorio de Química Farmacéutica de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Yucatán, bajo la dirección del Dr. Rolando David Cáceres Castillo y el Dr. Ramiro Felipe Quijano Quiñones como parte del proyecto “Desarrollo de compuestos con actividad antiproliferativa a partir de terpenoides y celastrolídeos aislados de celastráceas de Yucatán” (Sistproy FQUI-2016-0006).



## RESUMEN

Los dímeros triterpénicos son metabolitos secundarios característicos de la familia Celastraceae. Estos dímeros se consideran derivados hipotéticos de una reacción hetero Diels-Alder, debido a que se encuentran unidos por un fragmento 1,4-dioxano entre una unidad metilénquinona y una forma aromática de celastroloides. Aunque en los últimos años se ha acumulado evidencia acerca de la actividad dielsalderasa en la biosíntesis de metabolitos secundarios, el estudio de los dímeros triterpénicos aporta resultados circunstanciales sobre la reactividad necesaria para la formación de estos. Es por esto que con el fin de contribuir al estudio químico del proceso de cicloadición, en este trabajo se aborda la evaluación de la reactividad de la pristimerina como dienófilo en condiciones de cicloadición.

La pristimerina utilizada en las reacciones fue aislada a partir del extracto de diclorometano de la corteza de las raíces *Crossopetalum rhacoma* (Celastraceae), recolectada en Dzemul, Yucatán. La pristimerina se sometió a reacciones de cicloadición utilizando 3,5-di-ter-butil-1,2-benzoquinona como dieno, siendo posible obtener bajo irradiación por microondas y/o reflujo, la formación de cuatro heterodímeros de tipo benzodioxinopristimerina unidos en el anillo A de la pristimerina. Cada uno de los heterodímeros correspondía al par regio- y estéreo- químicos.

## ABSTRACT

Triterpene dimers are characteristic secondary metabolites of the Celastraceae family. These dimers are considered hypothetical derivatives of a hetero Diels-Alder reaction, because they are bound by an 1.4-dioxane fragment formed between a quinone methide unit and an aromatic form of celastrolids. Although evidence on natural Diels-Alderase has been accumulated in the biosynthesis of secondary metabolites, there has been no report on the structural details of natural Diels-Alderase, the study about of triterpene dimers formation only provides indirect results about a Diels-Alder reaction. Therefore, in order to contribute to the chemical study of the cycloaddition process, the aim of this work is to evaluate the reactivity of pristimerin as a dienophile under cycloaddition reactions with o-quinone as diene.

The pristimerin used in this work was isolated from dichloromethane extract from the bark of *Crossopetalum rhacoma* roots (Celastraceae), collected in Dzemul, Yucatán. Pristimerin was submitted in a cycloaddition reaction using 3.5-di-ter-butyl-1,2-benzoquinone as diene, and it was possible to obtain under microwave and/or reflux conditions, the formation of four benzodioxinopristimerin heterodimers joined in the ring A of pristimerin by an 1.4-dioxane fragment. Each of the heterodimers corresponded to the regio- and stereo- isomers.



## ÍNDICE

INTRODUCCIÓN .....	1
ANTECEDENTES .....	3
<b>Familia Celastraceae y metilénquinonas triterpénicas</b> .....	3
<i>Biosíntesis de metilénquinonas triterpénicas</i> .....	5
<b>Dímeros triterpénicos</b> .....	8
<b>Fitoquímica de <i>Crossopetalum rhacoma</i></b> .....	12
<b>Reacción de Diels-Alder</b> .....	13
<i>Regioquímica y estereoquímica</i> .....	14
<i>hetero Diels-Alder (HDA)</i> .....	15
<b>Reacciones de cicloadición de o-quinonas</b> .....	16
<b>Síntesis biomimética de dímeros triterpénicos</b> .....	17
<b>Determinación de la configuración absoluta</b> .....	22
<b>Radiación por microondas</b> .....	23
HIPÓTESIS .....	25
JUSTIFICACIÓN .....	27
OBJETIVOS .....	29
<b>Objetivo general</b> .....	29
<b>Objetivos específicos</b> .....	29
MATERIALES Y MÉTODOS .....	31
<b>Materiales y reactivos</b> .....	31
<b>Métodos de separación</b> .....	31
<i>Cromatografía en columna (CC)</i> .....	31
<i>Cromatografía en capa delgada (CCD)</i> .....	31
<b>Caracterización estructural</b> .....	31
<i>Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (RMN)</i> .....	31
<i>Espectrometría de masas (MS)</i> .....	32
<i>Espectroscopía en el infrarrojo (IR)</i> .....	32
<i>Rotación óptica (<math>[\alpha]_D</math>)</i> .....	32
<b>Reactor de microondas</b> .....	32
<b>Recolecta y preparación del material vegetal</b> .....	33
<b>Aislamiento de pristimerina</b> .....	33

<i>Fraccionamiento primario</i> .....	33
<i>Purificación de la pristimerina. 3-hidroxi-2-oxo-D:A-friedo-24-norolean-1(10):3:5:7-tetraen-29-oato de metilo. (1)</i> .....	35
<b>Reacción de hetero Diels-Alder</b> .....	37
<i>Secado del disolvente</i> .....	37
<i>Síntesis de derivados de tipo benzodioxinopristimerina</i> .....	37
<b>Métodos computacionales</b> .....	43
<i>Análisis conformacional</i> .....	43
<b>Cuantificación por RMN (RMN<math>q</math>)</b> .....	44
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	45
<b>Caracterización de la pristimerina</b> .....	45
<b>Pristimerina en reacciones de cicloadición</b> .....	46
<i>Síntesis de los derivados de benzodioxinopristimerina</i> .....	46
<i>Monitoreo de la reacción por RMN-<math>^1H</math></i> .....	50
<b>Caracterización de los productos de la reacción hetero-Diels-Alder</b> .....	55
<i>Compuesto 1 (C1)</i> .....	55
<i>Datos espectroscópicos de benzodioxinopristimerina (C1)</i> .....	62
<i>Compuesto 2 (C2)</i> .....	64
<i>Datos espectroscópicos de benzodioxinopristimerina (C2)</i> .....	70
<i>Compuesto 3 (C3)</i> .....	72
<i>Datos espectroscópicos de benzodioxinopristimerina (C3)</i> .....	79
<i>Compuesto 4 (C4)</i> .....	81
<i>Datos espectroscópicos de benzodioxinopristimerina (C4)</i> .....	88
<b>Análisis regio- y estereo- químico de los derivado benzodioxinopristimerina</b> .	90
<i>Análisis regioquímico de los aductos</i> .....	90
<i>Análisis estereoquímico de los aductos</i> .....	94
<b>CONCLUSIONES</b> .....	97
<b>REFERENCIAS</b> .....	99
<b>ANEXO I. ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	103
<b>ANEXO II. ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	105



## INTRODUCCIÓN

La familia *Celastraceae* se caracteriza por la producción de metabolitos secundarios de tipo metilénquinonas triterpénicas. Estos compuestos conforman un grupo de *norfriedoleanos*, que se encuentran restringidos a raíces de esta familia y se consideran como marcadores quimiotaxonómicos. El interés de estudiar estos compuestos radica en sus propiedades biológicas, reactividad química, en la diversidad estructural y en alta complejidad de estructuras que presentan. Un claro ejemplo de ello son los dímeros triterpénicos formados por dos unidades de metilénquinonas como pristimerina, tingenona, y/o sus congéneres, enlazados por una unión de tipo 1,4-dioxano con geometría *cis* entre un triterpeno aromático y un triterpeno quinónico. Estos metabolitos han sido aislados exclusivamente de especies de la familia *Celastraceae* y la ruta biosintética postulada para la formación de estos dímeros, se fundamenta en una actividad enzimática de tipo Diels-Alder (DA).<sup>1,2</sup>

Existe un número considerable de productos naturales presuntamente biosintetizados a través de una cicloadición [4+2] los cuales incluyen policétidos, terpenoides, fenilpropanoides, alcaloides y productos naturales formados a través de rutas biosintéticas mixtas. Sin embargo, pese a los esfuerzos realizados por la comunidad científica, no se ha logrado el aislamiento de un complejo enzimático en el reino vegetal capaz de catalizar este tipo de transformaciones, por lo que la existencia de este tipo de enzima "Dielsalderasa" es origen de una extensa investigación por la comunidad científica.<sup>2</sup>

La ruta biosintética postulada para la formación de los dímeros triterpénicos vía hetero Diels-Alder consiste en la interacción entre una metilénquinona triterpénica, como la pristimerina, con su forma *o*-quinónica para dar el cicloaducto. Esta propuesta ha sido sometida a prueba mediante estudios de reactividad de la pristimerina en condiciones de cicloadición. Sin embargo, este tipo de reactividad requiere de condiciones desfavorables, lo que limita el progreso de la cicloadición y en consecuencia se obtienen resultados parciales sobre la viabilidad del proceso pericíclico.<sup>2</sup>

De manera independiente a que los cicloaductos naturales se formen por un mecanismo enzimático o no, es de esperarse que la reactividad de los sustratos y la química asociada al proceso de adición permanezcan constantes; por lo que una prueba recurrente dentro de las propuestas biosintéticas a favor de una construcción pericíclica, se encuentra relacionada con la viabilidad del proceso por métodos no enzimáticos. A partir de este argumento, la evidencia experimental sobre la participación de las metilénquinonas triterpénicas en cicloadiciones concertadas no es del todo concluyente.

Un aspecto importante en la química de productos naturales es que muchas de las características importantes de estos compuestos, incluidas sus propiedades espectroscópicas, reconocimiento molecular y relación estructura-actividad, solo pueden estudiarse una vez determinada la configuración absoluta. La elucidación de la



estereoquímica de los productos naturales, así como derivados sintéticos, ha sido un gran desafío en la investigación en productos naturales debido, principalmente, a la cantidad limitada de muestra y a la poca estabilidad de los productos.

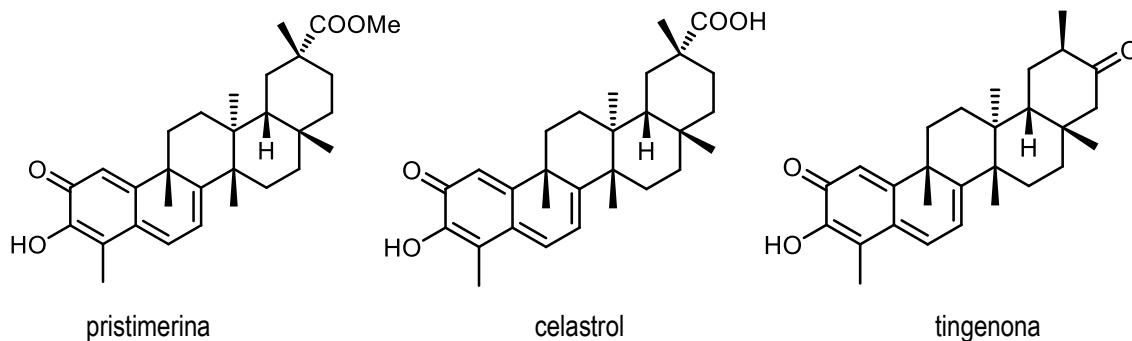
Con el propósito de aportar información a un proceso hasta ahora especulativo el objetivo de la investigación presentada aborda la evaluación de la reactividad de la pristimerina en reacciones de cicloadición de tipo DA asistida por microondas, para la obtención de heterodímeros triterpénicos y la determinación de la configuración absoluta de los mismos.

## ANTECEDENTES

### Familia Celastraceae y metilénquinonas triterpénicas

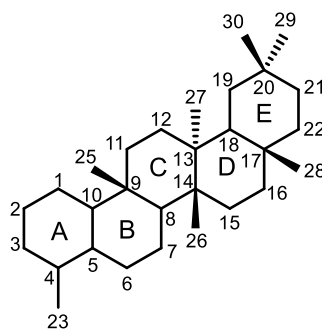
La familia *Celastraceae* se conoce como “familia agridulce”, debido al sabor de sus frutos, y está constituida por más de 92 géneros y cerca de 1300 especies de las cuales la gran mayoría adopta una distribución en zonas tropicales y subtropicales. Los géneros más representativos de esta familia son *Maytenus* (255 especies), *Euonymus* (200 especies), *Cassine* (40 especies) y *Celastrus* (30 especies). De esta familia se han aislado una gran variedad de metabolitos secundarios principalmente de tipo terpenico, tales como diterpenos, alcaloides sesquiterpénicos y metilénquinonas triterpénicas (MQT).<sup>1</sup>

Las MQT constituyen un grupo de *nor-D:A*-friedooleanos insaturados y oxigenados. En la naturaleza, estos compuestos se encuentran restringidos a las raíces de especies de la familia *Celastraceae* y se consideran como marcadores quimiotaxonómicos de esta familia, por lo que las MQT y los compuestos relacionados (fenoles triterpénicos y dímeros triterpénicos) son conocidos también como “celastroides” o “celastroloides”.<sup>2</sup> La importancia de estudiar estos compuestos radica en la complejidad estructural de sus compuestos y a la gran diversidad de actividades biológicas que presentan, como antiinflamatoria, antitumoral, citotóxica, antimicrobiana, antiparasitaria, antiviral y antioxidante, entre otras.<sup>3-5</sup> Es por lo anterior, actualmente existen varios estudios sobre la relación estructura-actividad para entender el mecanismo de acción de este tipo de triterpenos (Figura 1).<sup>2</sup>



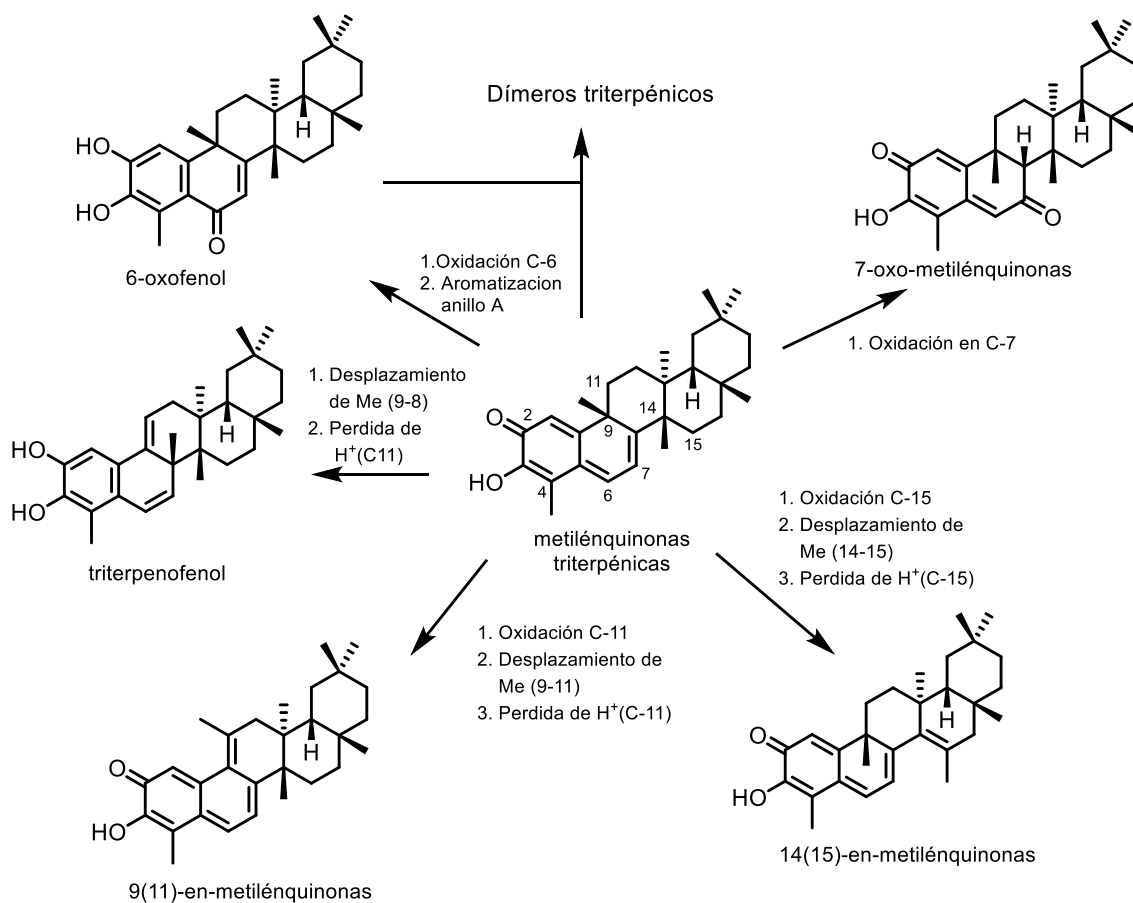
**Figura 1.** Metilénquinonas triterpénicas más comunes dentro de la familia Celastraceae.

Estructuralmente, las MQT presentan como esqueleto base el núcleo 24-*nor*-D:A-friedoleano con el sistema metilenquinónico extendido a lo largo del anillo A y B, con funciones oxigenadas en los carbonos C-2 y C-3 (Figura 2). Otras posiciones que pueden estar oxigenadas son C-6 y C-7. También se han descrito MQT con insaturaciones en C-9(11) o C-14(15) y desplazamientos de los grupos metilo, las cuales se conocen como 9(11)-en y 14(15)-en-metilenquinonas. La posición oxidada más común es el metilo C-29, que puede encontrarse como ácido carboxílico, aldehído, alcohol o éster.<sup>2</sup>



**Figura 2.** Estructura del esqueleto base 24-*nor*-D:A-friedoleano.

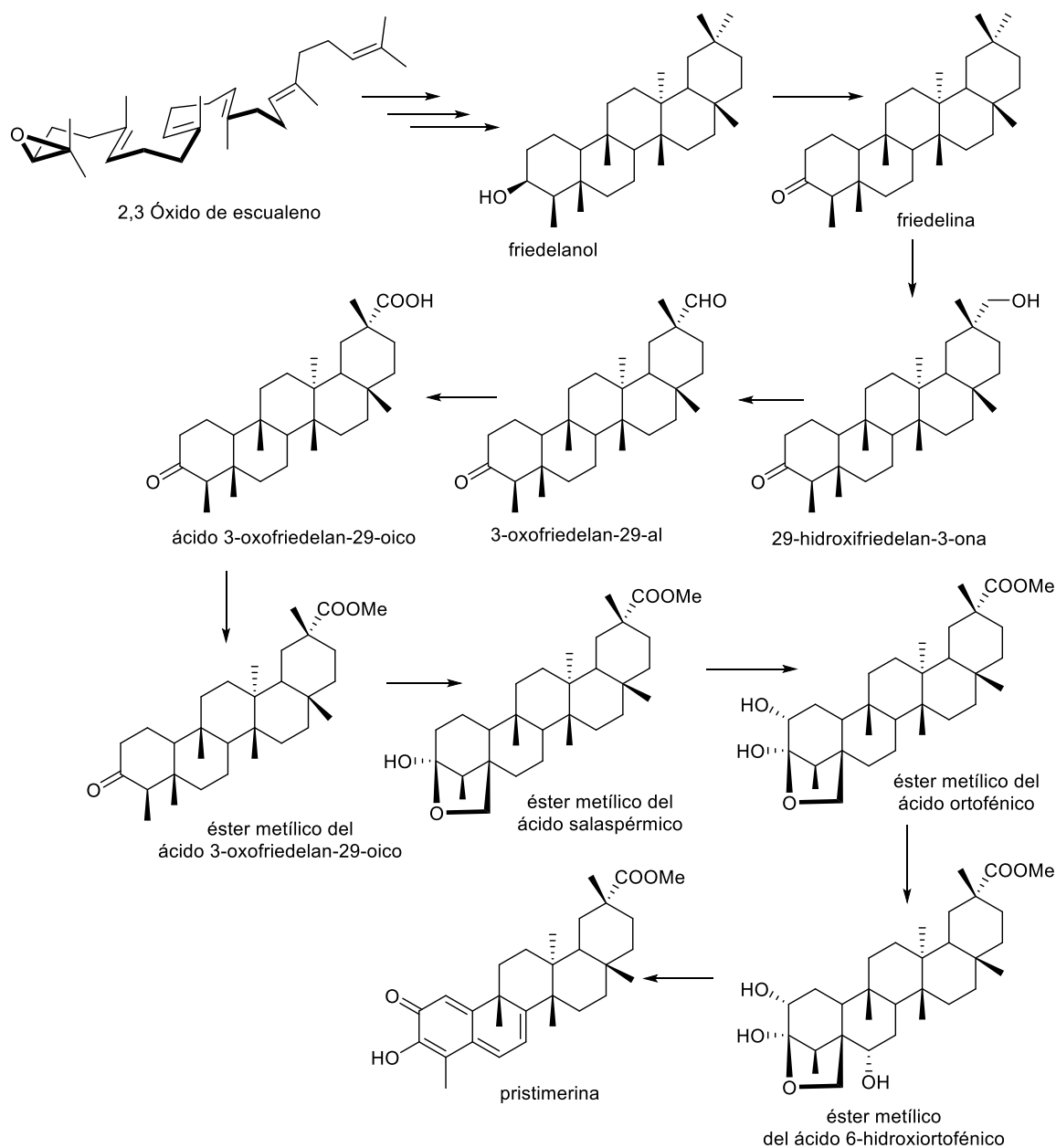
A través de los diferentes trabajos de aislamiento y elucidación se han encontrado metilenquinonas con posiciones oxigenadas en C-15, C-21, C-22, C-23 y C-28; además son comunes los derivados descarboxilados produciendo análogos de 29-*nor*. La clasificación más general de las MQT tomó como referencia la conjugación del cromóforo principal de la molécula. Las transformaciones posibles que dan origen a las principales clases de celastroloides a partir de sus congéneres metilenquinónicos se presentan en Figura 3.<sup>2</sup>



**Figura 3.** Clasificación y relación estructural de las metilénquinonas triterpénicas (MQT).

### *Biosíntesis de metilénquinonas triterpénicas*

La ruta biosintética de los terpenos inicia con la condensación de unidades de isoprenilo, isopentilpirofosfato (IPP), y su isómero dimetilalilpirofosfato (DMAPP), que constituyen los bloques de construcción de terpenos con esqueletos que van de 10 a 40 carbonos. Entre los terpenos, los triterpenos se derivan directamente de la ciclación enzimática del escualeno en bacterias o de la ciclación del óxido de escualeno en el caso de las eucariotas, y son catalizadas por oxidoescualeno ciclasa. La ciclación del óxido de escualeno inicia por la formación del carbocatión tetracíclico dammarenilo, el cual sufre una serie de reordenamientos que conducen a la formación del fridelanol, que a su vez mediante la acción de oxidorreductasas, es transformado en pristimerina (Figura 4). Entre los triterpenos pentacíclicos en las plantas, el germanicol es la molécula con el menor número de reordenamientos, mientras que la friedelina presenta el número más alto de reordenamientos.<sup>6,7</sup>



**Figura 4.** Ruta biogénica propuesta para la formación de las metilénquinonas triterpénicas.

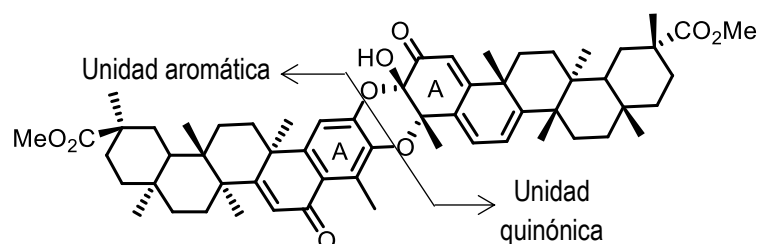
La identificación de metabolitos de tipo friedelano y metilénquinónico en hojas y raíces, respectivamente, en especies de celastráceas indican la existencia de una biosíntesis compartida entre estos órganos. La friedelina es el precursor de las quinonas triterpénicas (incluido el género *Hippocratea*). Se ha demostrado que la friedelina se sintetiza a partir de la ciclación del oxidoesqualeno en las hojas de *Maytenus aquifolium* y *Salacia campestris*, posteriormente se transporta a las raíces y son transformados en MQT.<sup>6,7</sup>

El estudio de la reducción de la pristimerina catalizada por paladio y carbono (Pd/C) a temperatura ambiente, condujo a la formación del derivado pristimerol. Además, se observó que al llevar a cabo la reacción en ácido acético glacial se obtenían el 6-deoxoblefarodol y el 8-epi-6-deoxoblefarodol. Estos resultados aunados al aislamiento de isoblefarodol, 7-oxoblefarodol, 6-deoxoblefarodol, 6-oxopristimerol, 7-hidroxi-6-oxopristimerol, demetilzeylasteral y demetilzeylasterona en *Maytenus blepharodes*; llevaron a la conclusión de la participación de oxidorreductasas encargadas de transformar los triterpenos de tipo friedelano a MQT.<sup>8</sup>

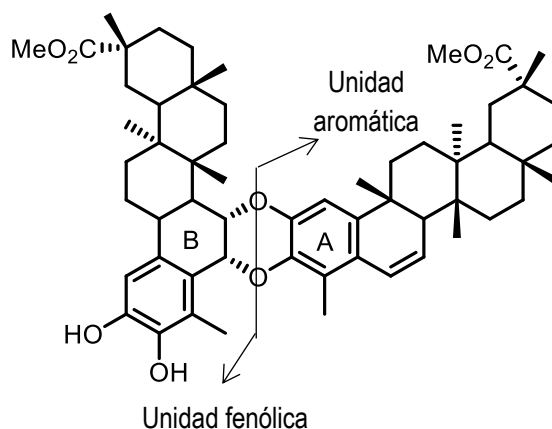
## Dímeros triterpénicos

Estos compuestos diméricos han sido aislados exclusivamente de especies de la familia *Celastraceae*, y representan el 76% de los aductos de Diels-Alder reportados en esta familia. Mas de 60 dímeros triterpénicos han sido aislados, principalmente, del género *Maytenus*<sup>9-18</sup> (*M. chuchuhuasca*, *M. ilicifolia*, *M. umbellata*, *M. magellanica*, *M. scutioides* y *M. blepharodes*), así como en otras especies de esta familia (*Rzedowskia tolantonguensis*<sup>19</sup> e *Hippocratea excelsa*<sup>20</sup>).

Los dímeros triterpénicos constituyen una clase de metabolitos secundarios formados por dos unidades de MQT como tingenona, 22- $\beta$ -hidroxitingenona, 7,8-dihidrotingenona, pristimerina, 7,8-dihidropristimerina, 6,7-dihidropristimerina, 21-cetopristimerina y netzahualcoyona, que presentan una unidad quinónica y la otra aromática, unidos por dos enlaces éter en disposición *cis* entre los anillos A de ambas unidades (dímeros A-A) o bien entre el anillo A de la unidad aromática y el anillo B de la unidad quinónica (dímero A-B), Figura 5. Los dímeros triterpénicos pueden ser clasificados en 5 categorías en base a la naturaleza del monómero en: tingenona-tingenona congéneres, pristimerina-pristimerina congéneres, tingenona-pristimerina congéneres y netzahualcoyona-pristimerina congéneres.<sup>20-22</sup>



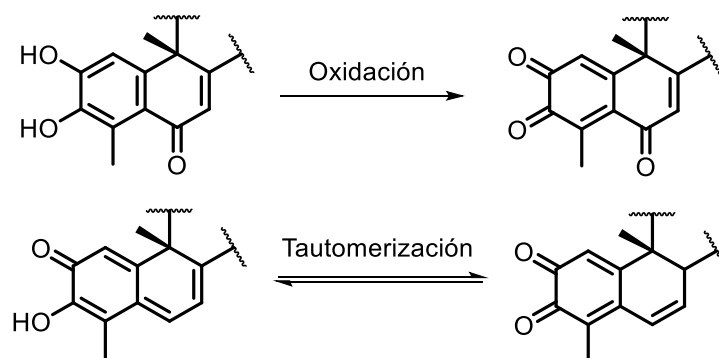
Dímero A-A



Dímero B-A

**Figura 5.** Estructura de los dímeros A-A y B-A.

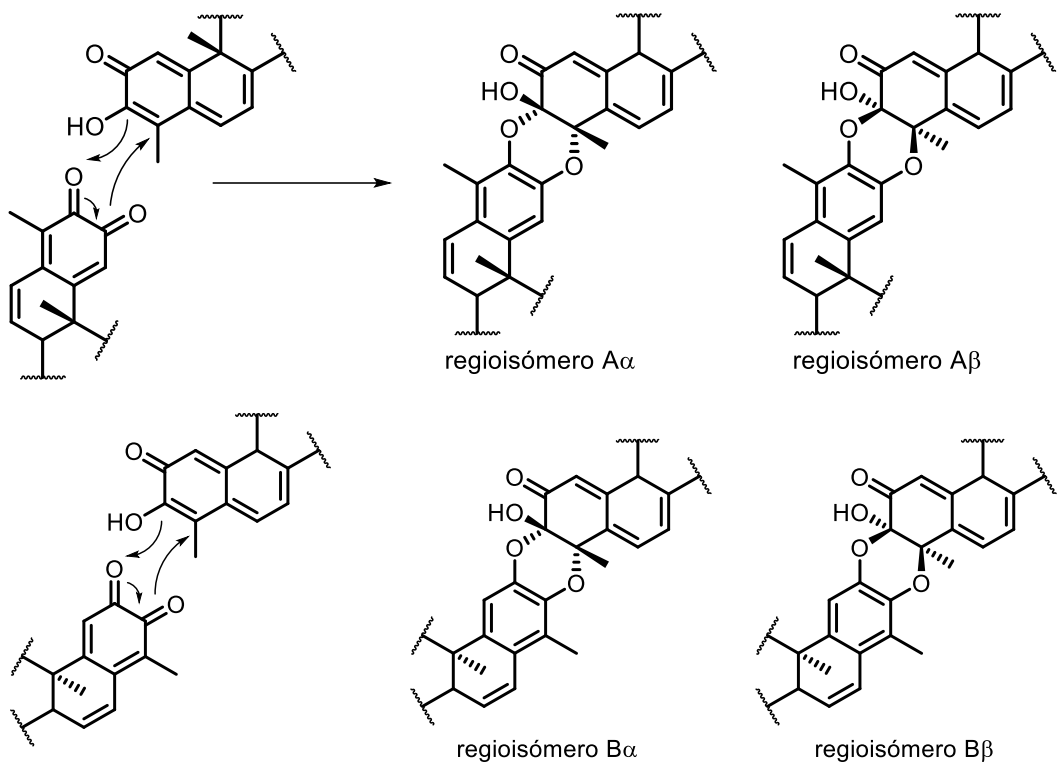
Itokawa y *col.*<sup>9,10</sup> propusieron la ruta biogénica para la formación de estos dímeros, la cual consiste en una cicloadición Diels-Alder, esto implica que una MQT, como la pristimerina, puede estar en equilibrio con una forma tautomérica de tipo 2,3-dicetona (*o*-quinona) y ambos tautómeros podrían reaccionar para formar el aducto correspondiente. Hasta el momento no existe evidencia experimental que demuestre la existencia de un tautómero *o*-quinónico de la pristimerina en condiciones de aislamiento, aunque se ha observado tautomería entre el 7-hidroxi-6-oxopristimerol y el 7-oxoblefarodol, donde la forma enol es la más favorable. Por otro lado, no se ha logrado la identificación de derivados *o*-quinónicos en el género *Maytenus* (de donde se han aislado la mayor cantidad de dímeros triterpénicos), pero se ha logrado identificar una especie poco estable de tipo 9(11)-en-metilen-*o*-quinona aislada de la especie *Celastrus orbiculatus*.<sup>24</sup> Los fenoles triterpénicos con agrupamiento de tipo catecol, como el 6-oxopristimerol y 6-oxotingenol, podrían (mediante la oxidación) ser los precursores de los triterpenos *o*-quinónicos, por lo que son considerados como los materiales de partida para la formación de los dímeros triterpénicos, Figura 6.



**Figura 6.** Las posibles rutas para la formación del derivado *o*-quinónico, ya sea por tautomerización u oxidación.

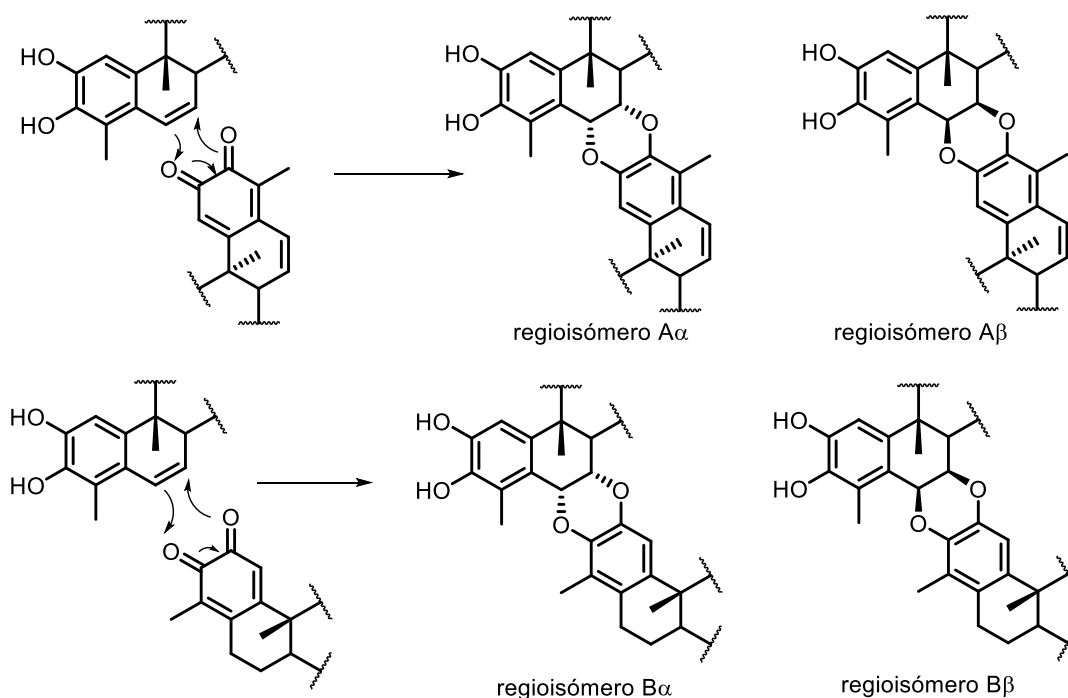
Según la orientación espacial que adopte la MQT (dienófilo) frente a la *o*-quinona (dieno) conduce a la formación de cuatro posibles isómeros para cada posible dímero. El ataque de la *o*-quinona puede ocurrir por la cara *si-si* o por la cara *re-re* del doble enlace la metilenquinona, dando como resultado la obtención de dímeros con estereoquímica  $\alpha$  o  $\beta$ . Los regioisómeros resultantes de la reacción entre los anillos A de la MQT y una *o*-quinona, (dímeros A-A) pueden presentar una unión de tipo [3-O-3', 4-O-2'] (regioisómero A o *iso*) o una unión [3-O-2', 4-O-3'] (regioisómero B), Figura 7.<sup>20-22</sup>





**Figura 7.** Formación de dímeros triterpénicos con uniones A-A.

Por otro lado, los regioisómeros resultantes de la reacción entre el enlace del anillo B de un fenol y la dicetona del anillo A de una *o*-quinona (dímero B-A) pueden presentar la unión [6-O-3', 7-O-2'] (regioisómeros A o *iso*) o la unión [6-O-2', 7-O-3'] (regioisómeros B), Figura 8.<sup>20-22</sup>



**Figura 8.** Formación de dímeros triterpénicos con uniones B-A.

Los dímeros B-A son considerados derivados de los triterpenofenoles. De los pocos casos conocidos de los dímeros B-A, desatacan las cangorosinas, los cuales son dímeros formados exclusivamente por unidades de isopristerol.

Con respecto al comportamiento farmacológico de esta clase de metabolitos, la mayoría de estos compuestos han sido evaluados por su actividad antimicrobiana y citotóxica, pero en la mayoría de los casos no presentaron una apreciable actividad. Lo que contrasta con las diversas propiedades biológicas de las MQT que son potentes agentes antimicrobianos y citotóxicos. Esto sugiere que el tamaño de estos compuestos desempeña un papel clave en la bioactividad, por lo que la razón de ser de estos compuestos (incluso los trímeros triterpénicos) sería la de unidades de reserva según la cual cuando la concentración de monómeros aumenta y se hace tóxica, la planta los transforma en dímeros (o trímeros) inactivos, y por tanto no tóxicos. Estos polímeros pueden liberar unidades activas como *o*-quinonas o metilénquinonas vía una reacción *retro*-Diels-Alder (*retro*-DA) dependiendo de las necesidades de la planta.<sup>23</sup>

## Fitoquímica de *Crossopetalum rhacoma*

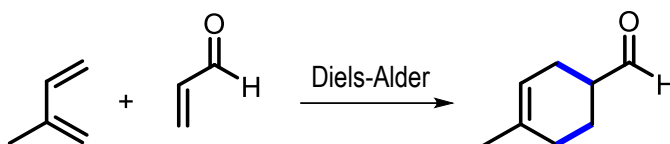
La familia Celastraceae posee aproximadamente 55 géneros y 850 especies, de las cuales 9 crecen en la Península de Yucatán: *Elaeodendron trichotomum* (Campeche, Q. Roo.), *E. xylocarpum* (Yucatán, Q. Roo), *Maytenus phyllantoides* (Yucatán), *Crossopetalum parviflorum* (Q. Roo), *C. eucymosa* (Yucatán, Q. Roo), *C. latifolia* (Q. Roo), *C. puberula* (Q. Roo), *C. rhacoma* (Yucatán, Q. Roo) y *C. gaumeri* (Yucatán, Q. Roo). En América Tropical el género *Crossopetalum* está representado por 36 especies y se encuentra distribuido básicamente en América Central y las Antillas, solo una especie ha sido reportada en Sudamérica, *Crossopetalum rhacoma* Crantz. En América del Norte esta especie se encuentra ampliamente distribuida en Florida, con el nombre común de Rhacoma o Maidenberry; tanto en Yucatán se encuentran tres especies de *Crossopetalum*: *C. eucymosa*, *C. gaumeri* y *C. rhacoma*.<sup>25</sup>

Estudios fitoquímicos de la corteza de la raíz de ejemplares de *C. rhacoma* recolectados en la Península de Yucatán, resultaron en el aislamiento del sesquiterpeno ejap-2 y sugiol, diterpeno de tipo abietano; triterpenos de tipo friedelano. En este mismo estudio, se identificaron cuatro aductos de tipo Diels-Alder, dos de ellos constituidas por dos unidades de tipo triterpenoquinona y los dos últimos por dos unidades diterpénicas.<sup>26</sup>

Del extracto hexánico de la corteza de los tallos de *C. rhacoma*, se aislaron los compuestos antranorina, liquexantona y las antraquinonas ficcion y fragilina, y el 24-etilcolest-4-en-3-ona.<sup>27</sup> Por otro lado, se detectó la presencia de lupeol, alfa y beta-amirina en el extracto hexánico y metanólico de las hojas de *C. rhacoma*. Además, del extracto metanólico de las hojas se aisló el galactitol y lup-20(29)-en-3 $\beta$ -28-diol (betulina).<sup>23</sup>

## Reacción de Diels-Alder

La reacción de Diels-Alder (DA) es la reacción de cicloadición mejor conocida y más utilizada en síntesis orgánica, ya que permite la formación de un sistema cíclico de seis miembros con la presencia de hasta dos dobles enlaces endocíclicos y hasta cuatro centros estereogénicos con alta regio- y estereoselectividad a partir de un dieno conjugado en conformación *s-cis* y un dienófilo (un doble o triple enlace), Figura 9. Durante la reacción, 4 electrones  $\pi$  del dieno interactúan con 2 electrones  $\pi$  del dienófilo, produciendo la formación de dos nuevos enlaces  $\sigma$ ; por tal motivo las reacciones DA son conocidas como cicloadición [4+2], donde 4 y 2 hacen referencia al número de electrones  $\pi$  involucrados en el reagrupamiento electrónico y también al número de átomos que originan el anillo insaturado de seis miembros.<sup>22</sup> El potencial de controlar la estereo- y regioquímica de las cicloadiciones [4+2] demuestra ser un recurso valioso para la construcción de una gran variedad de moléculas complejas de origen natural con actividad biológica.<sup>29</sup>



**Figura 9.** Reacción de Diels-Alder con la formación de los nuevos enlaces  $\sigma$  (azul).

Los factores que gobiernan la reactividad y la estereoquímica de las reacciones DA están relacionados con la simetría orbital. La teoría de Orbitales Moleculares Frontera (FMO, *Frontier Molecular Orbital Theory*) sugiere que las reacciones de cicloadición están determinadas por la fuerza de interacción del HOMO (HOMO, *Highest Occupied Molecular Orbital*) de un reactivo con el LUMO (LUMO, *Lowest Unoccupied Molecular Orbital*) del otro. En base a la teoría FMO, las reacciones de DA se pueden dividir en demanda electrónica normal (*den*-DA) y demanda electrónica inversa (*dei*-DA). En *den*-DA la diferencia energética  $\text{HOMO}_{\text{dieno}}\text{-LUMO}_{\text{dienófilo}}$  es menor (comparado con la diferencia  $\text{HOMO}_{\text{dienófilo}}\text{-LUMO}_{\text{dieno}}$ ), en tanto en las reacciones *dei*-DA están gobernadas por la diferencia  $\text{HOMO}_{\text{dienófilo}}\text{-LUMO}_{\text{dieno}}$ . En ambos casos existe un solapamiento entre los orbitales donde los nuevos enlaces se forman donde el dieno y dienófilo reaccionan en la misma cara del sistema conjugado (suprafacial).<sup>30</sup>

La diferencia energética depende del carácter electrónico de los sustituyentes presentes en los reactivos; en *den*-DA, grupos donadores de electrones (GDE) en el dieno con dienófilos que presentan grupos sustractores de electrones (GSE) disminuye la brecha energética entre  $\text{HOMO}_{\text{dieno}}\text{-LUMO}_{\text{dienófilo}}$ . En caso contrario, las reacciones de demanda electrónica inversa, el dienófilo presenta grupos GDE haciendo que estos reaccionen de forma más favorable con dienos que presenten grupos GSE.<sup>30</sup>

## Regioquímica y estereoquímica

La regioquímica de las reacciones DA está controlada por las energías de los orbitales frontera. En base a que *den*-DA procede por la reacción de dienos nucleofílicos con dienófilos electrofílicos, se ha formulado la regla *orto-para*: las reacciones Diels-Alder proceden en colocar al sustituyente más electro-donador presente en el dieno y al sustituyente más electro-sustractor presente en el dienófilo en una orientación (1,2) *orto* o (1,4) *para*, según la posición de los sustituyentes en el dieno.<sup>30</sup>

El desarrollo de la cicloadición transcurre de manera suprafacial con respecto al par dieno-dienófilo, esto deriva en la retención de la configuración de los reactivos en el cicloaducto. Un dienófilo que presenta sustituyentes con una configuración *E*, genera un producto con estereoquímica *trans*, un dienófilo *Z* sustituido forma un aducto con estereoquímica *cis*. Por otro lado, la configuración de los sustituyentes en el dieno en posiciones 1 y 4, se mantiene en el aducto. Un dieno (*E*, *Z*) disustituido lleva a la formación de un aducto en el cual los sustituyentes están *trans* con respecto al otro, mientras que a partir de un dieno (*E*, *E*) se obtiene un aducto con los sustituyentes en *cis*.<sup>30</sup>

La geometría del estado de transición en la DA influye en la diastereoselectividad de la cicloadición. Durante una reacción DA, existen dos formas en las cuales el dienófilo puede aproximarse al dieno. Los dienófilos monosustituidos pueden orientarse de dos maneras respecto al dieno, si el sustituyente se orienta hacia el lado opuesto donde se encuentran los orbitales  $\pi$  del dieno, se genera el producto denominado *exo*; por otra parte, si la orientación del sustituyente se orienta hacia el sistema de orbitales  $\pi$  del dieno, el producto será *endo*. Cuando la reacción se realiza empleando dienos sustituidos, la reacción puede producir estereoisómeros. El modo de adición *endo* es usualmente preferido cuando un grupo sustractor de electrones se encuentra presente como sustituyente en el dienófilo. Esta preferencia se conoce como Regla *endo* o Regla de Alder. Esta regla aplica igual para la reacción de demanda electrónica inversa; en este caso, el grupo con mayor carácter donador de electrones en el dienófilo prefiere la posición *endo*.<sup>30</sup>

La Regla Alder es una guía inicial útil en la predicción de la estereoquímica de las reacciones Diels-Alder. Sin embargo, la relación *endo/exo* puede variar mucho dependiendo de las condiciones de reacción y los sustratos. En algunos casos se ha observado, que la proporción del producto *endo* cuando ácidos de Lewis son empleados para acelerar las reacciones Diels-Alder. El incremento en las interacciones estéricas puede voltear a favor de la formación del producto *exo*. En las Diels-Alder intramoleculares la formación de los productos depende más de la preferencia conformacional, los productos *endo/exo* depende de las condiciones de reacción y de las propiedades del sustrato. La preferencia de la formación del producto *endo* se le ha atribuido a la existencia de interacciones orbitálicas secundarias (SOI, *secondary orbital interactions*)<sup>30</sup> de los orbitales *p* no involucrados directamente en la formación de los nuevos enlaces  $\sigma$ , las cuales contribuyen a la estabilización del estado de transición del

producto *endo*. Sin embargo, la existencia de estas interacciones secundarias no explica del todo la estereoselectividad encontrada en las reacciones pericíclicas; la preferencia del producto *endo* puede atribuirse a otros factores como efectos del disolvente, interacciones estéricas, formación de puente de hidrógeno, fuerzas electrostáticas, así como a la diferencia de los volúmenes de activación y a la polaridad de los estados de transición.

#### *hetero Diels-Alder (HDA)*

Las reacciones hetero Diels-Alder (HDA) son una variante de la reacción DA, en el cual el dieno o el dienófilo presentan un heteroátomo en su estructura, y son nombrados como heterodienos y heterodienófilo, respectivamente; lo cual permite la formación de heterociclos de seis miembros. La reacción HDA es formalmente idéntica a la DA, con lo que es posible observar las mismas consecuencias regio- y estereoselectivas. Los heteroátomos más involucrados son el N, O y S, que pueden ser incorporados tanto en el dieno como en el dienófilo.<sup>29</sup>

## Reacciones de cicloadición de *o*-quinonas

La química de los compuestos quinónicos han sido empleados en la síntesis de una gran variedad de compuestos ya sean de origen natural o no. De todos estos compuestos, las benzoquinonas han sido objeto de mucho más estudio. Las *o*-quinonas pueden participar como componentes  $4\pi$  o  $2\pi$  en la reacción de cicloadición; proporcionando derivados de tipo benzodioxina con dienos heterocíclicos como furanos, pirroles y fulvenos, estos últimos como dienófilos y la *o*-quinona como heterodieno. El carbodieno altamente deficiente en electrones de la *o*-quinona sufre reacciones de Diels-Alder con dienos carbocíclicos, pentafulvenos, estireno y acetilenos proporcionando un sistema biciclo[2.2.2]; se ha observado que el biciclo[2.2.2]octenediona es susceptible a transformaciones fotoquímicas y mediadas por ácidos de Lewis. Se ha demostrado que la *o*-quinona actúa como un dienófilo deficiente en electrones en reacciones con 2,3-dimetilbitadieno y 1-acetoxibutadieno vía demanda electrónica inversa. Las *o*-quinonas también pueden actuar como heterodienófilos debido a la presencia de los dos grupos carbonilos activados, lo cual fue evidente de su reacción con 1,4-diacetoxibutadieno, proporcionando el derivado benzodioxina a través de un rearrreglo sigmatrópico [3,3] del espiroproducto a altas temperaturas.<sup>31,32</sup>

El carácter de carbo-/hetero- dieno de las *o*-quinonas en reacciones de Diels-Alder ha sido objeto de investigación por Lemal y *col.*<sup>33</sup> Un estudio experimental y teórico de la reacción de cicloadición del *o*-fluoranilo con varios dienófilos demostró que la ruta de formación de los productos de una Diels-Alder se encuentran favorecidos cinéticamente, en tanto los productos resultado de la hetero-Diels-Alder están favorecidos termodinámicamente. Cálculos basados en la teoría funcional de la densidad, así como evidencia experimental, sugiere que el *o*-fluoranilo prefiere reaccionar como un carbodienófilo. La *o*-quinona tiende a reaccionar como heterodieno al incrementar la demanda estérica asociada a la cicloadición.

## Síntesis biomimética de dímeros triterpénicos

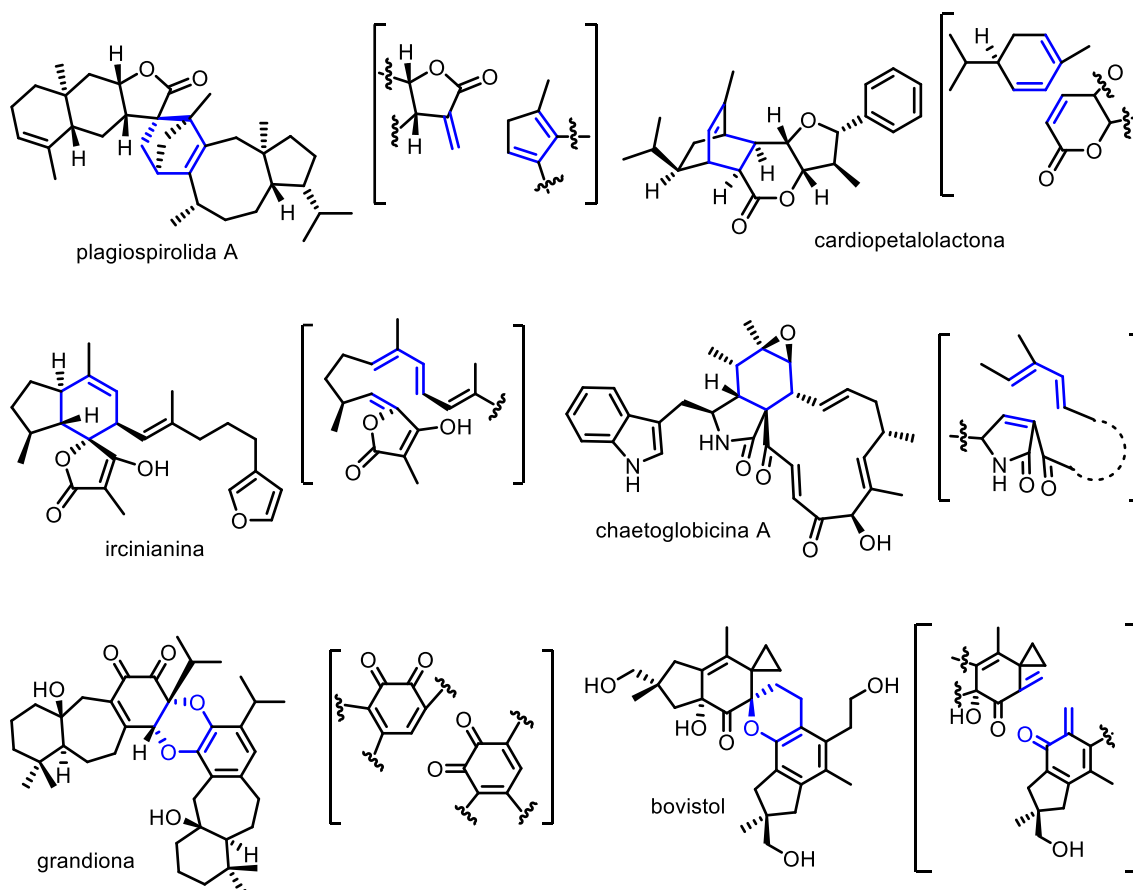
La síntesis biomimética es una rama de la síntesis orgánica relacionada con la construcción de productos naturales a través de rutas sintéticas hipotéticas establecidas por la naturaleza. La teoría de la síntesis biomimética fue propuesta por primera vez por Sir Robert Robinson en la síntesis de tropinona (muchos años antes que se elucidara la biosíntesis real) a través de la condensación de succinaldehído, metilamina y ácido acetoadicarbóxico. Años más tarde el concepto fue desarrollado por van Tamelen bajo el título de síntesis biogenética y la definió como una reacción específica o secuencia de reacciones que imitan una ruta biológica.<sup>34</sup>

Existen una gran variedad de productos naturales en los cuales se ha postulado la reacción de Diels-Alder como pasos clave en sus rutas biogenéticas. Estos productos naturales de tipo DA engloban más de 300 cicloaductos, incluyendo policétidos, terpenoides, fenilpropanoides, alcaloides y productos naturales formados a través de rutas biosintéticas mixtas. Ejemplos representativos de cicloaductos [4+2] naturales se presentan en la Figura 10. Estos incluyen aductos intermoleculares (plagiospirolida A, cardiopetalolactona), aductos intramoleculares (ircinianina, chaetoglobocina A) y un aducto HDA (grandiona, bovistol).<sup>35-37</sup> Los criterios establecidos por Oikawa<sup>35</sup> acerca de la posibilidad de un aducto pueda ser biosintetizado a través de una reacción DA se puede resumir en los siguientes puntos:

1. El aislamiento de un aducto junto con su correspondiente precursor.
2. La identificación de los regio- y diastereoisómeros de un tipo de aducto.
3. Estructura dimérica de un solo componente.
4. Factibilidad no-enzimática de la reacción.
5. Quiralidad de los aductos.

Además, la notable regio- y diastereo- selectividad de los aductos no es evidencia concluyente de una reacción catalizada por enzimas. Aunado a lo anterior, la presencia de un anillo de ciclohexeno no es condición suficiente para proponer una ruta Diels-Alder, ya que este puede ser sintetizado a través de un mecanismo catiónico, nucleofílico o radicalario.<sup>36</sup>





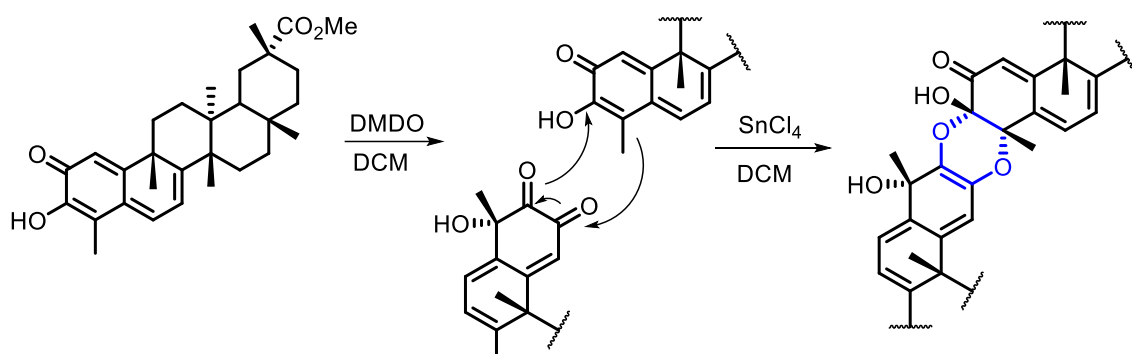
**Figura 10.** Productos naturales cuyo mecanismo de formación se ha propuesto una reacción Diels-Alder.

La posible participación de una reacción Diels-Alder en la biosíntesis de productos naturales ha sido un área de gran interés en la comunidad científica. Varios intentos para identificar enzimas que podrían funcionar como catalizadores de una reacción Diels-Alder ha resultado en una investigación activa. Sin embargo, hasta el momento ha sido difícil verificar la existencia de una enzima Diels-Alder. La enzima macrofomato sintasa (MPS),<sup>38</sup> identificada en el hongo *Macrophoma commelinae*, ha sido objeto de una particular controversia dentro de la formación del ácido macrofómico. Aunque la alta estereoespecificidad en la formación del núcleo bicíclico [2.2.2] de precursores del ácido macrofómico se consideró en primera instancia de un proceso concertado, estudios teóricos revelan una mayor estabilidad para los estados de transición de un mecanismo de tipo Michael-Aldol.

Por otro lado, hasta el momento no se ha aislado un complejo enzimático capaz de catalizar estas reacciones en alguna especie del reino vegetal; hasta el momento, solo se han identificado sistemas enzimáticos con actividad Diels-Alderasa (DAasa) a partir de especies de hongos. Por otro lado, es posible que las DAasas puedan actuar como

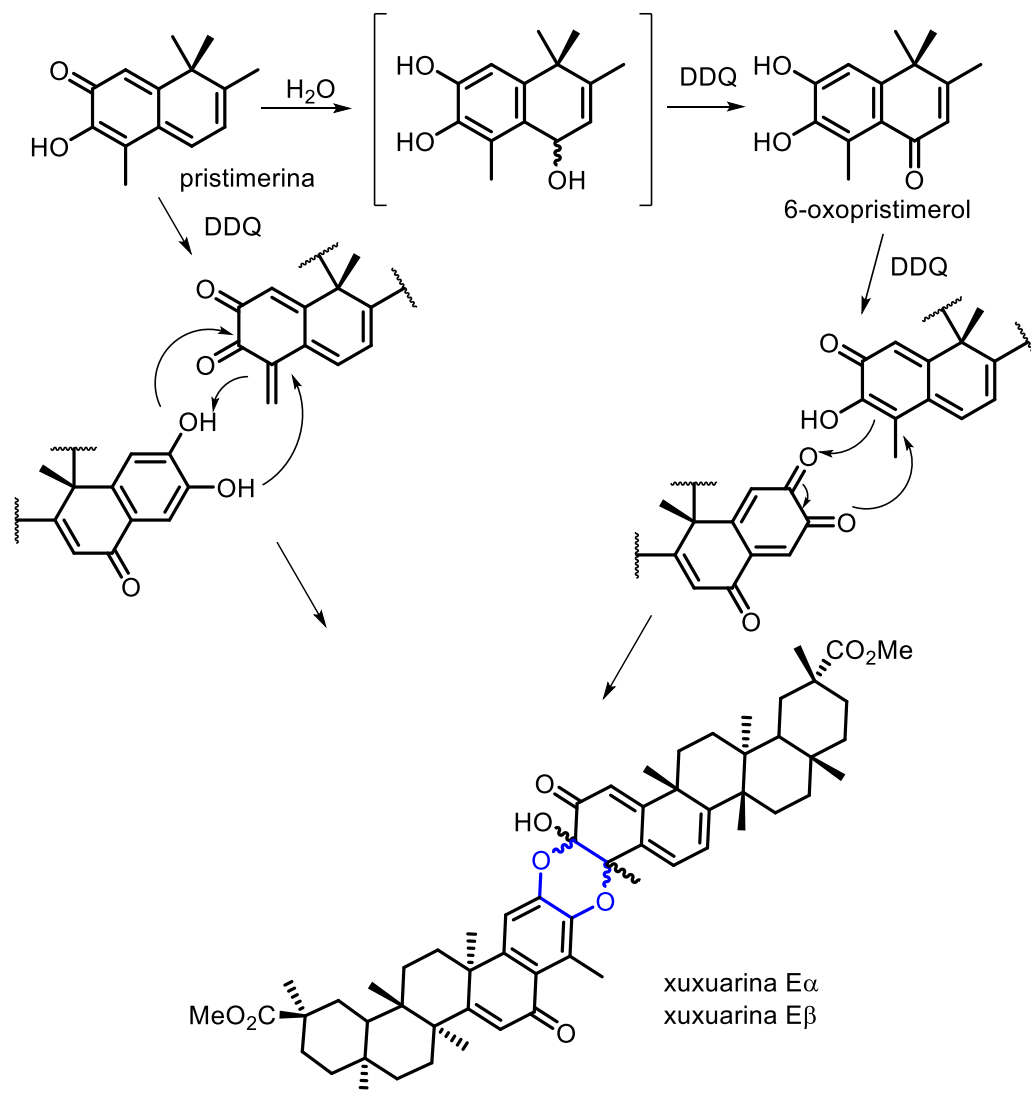
enzimas bifuncionales, las cuales catalicen no solo la formación de las especies reactivas, sino también la cicloadición [4+2] en el mismo sitio activo.<sup>34</sup>

En particular, la formación de dímeros triterpénicos a través de una reacción HDA se ha llevado a cabo sometiendo a las metilénquinonas triterpénicas en condiciones de cicloadición. Tomando esto en cuenta, González y *col.*<sup>14</sup> efectuaron la oxidación de la pristimerina con dimetildioxirano (DMDO) para obtener la 4-hidroxipristimerina, que posteriormente funcionó como heterodieno en una reacción con pristimerina, obteniendo un dímero que no ha sido aislado de fuentes naturales (Figura 11).



**Figura 11.** Reacción de oxidación y dimerización de la pristimerina.

Por su parte, Jacobsen y *col.*<sup>39</sup> realizaron la oxidación de la pristimerina con 2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona (DDQ) en solución con dioxano, obteniendo una mezcla de dos dímeros triterpénicos, xuxuarina E $\alpha$  y xuxuarina E $\beta$ , además de un subproducto que podría deberse al acoplamiento de la pristimerina con DDQ (Figura 12).



**Figura 12.** Posibles rutas de reacción para la formación de dímeros triterpénicos, mediante la oxidación de la pristimerina por DDQ.

Sin embargo, estos trabajos implican la formación del derivado *o*-quinónico *in situ*, el cual hasta el momento no ha podido ser aislado y/o identificado en el medio de reacción. Como la formación de los dímeros implica que la metilénquinona triterpénica actúe como dienófilo frente a una *o*-quinona, hace preciso conocer la reactividad de las metilénquinonas en condiciones de cicloadición en presencia de *o*-quinonas (dieno), con

la condición de que esta última no sea formada *in situ*. En este sentido, se estudió el comportamiento de la pristimerina como dienófilo en un proceso HDA con una *o*-quinona de origen comercial como heterodieno (3,5-di-*ter*-butil-1,2-benzoquinona), a 130 °C, 17 psi y 150 W por 45 min asistida por microondas, obteniendo un rendimiento del 11-15%.<sup>40</sup> Además, se observó un ligero aumento de rendimiento en sistema cerrado en comparación del sistema abierto; esto puede indicar que la presión influye en la cicloadición de la pristimerina. Se logró la identificación del heterodímero de tipo benzodioxinopristimerina que confirma que la pristimerina actúa como dienófilo en condiciones de cicloadición con *o*-quinonas. No obstante, no se ha asignado la configuración absoluta de los nuevos centros estrogénicos en el derivado benzodioxinopristimerina, lo cual aportaría información importante de la aproximación de los reactivos en la cicloadición, así como contar con una descripción completa del mecanismo de reacción.

Una manera de obtener información acerca del mecanismo de reacción en sistemas donde los datos experimentales es reducida, como es el caso de la biosíntesis de productos naturales; es haciendo uso de la Química Computacional (QC), la cual permite determinar las estructuras de los estados de transición, así como el cálculo de las propiedades electrónicas y energéticas, lo que hace posible analizar el mecanismo de reacción desde un enfoque diferente y complementar los resultados obtenidos con los experimentales, con el fin de proporcionar una descripción detallada del sistema bajo estudio. En base a esto, Quesada-Rojas y *col.*<sup>41</sup> llevaron a cabo el estudio teórico del posible mecanismo de formación de ocho dímeros triterpénicos vía cicloadición hetero Diels-Alder a un nivel de teoría M06-2X/6-31G(d). En este estudio se encontró evidencia que una reacción HDA es un mecanismo factible para formación de los dímeros triterpénicos, en el cual los estados de transición encontrados corresponden a un mecanismo concertado y asincrónico polar.

## Determinación de la configuración absoluta

La forma molecular, la simetría y la quiralidad son conceptos clave en la investigación de productos naturales. Muchas características importantes de un compuesto natural, incluidas sus propiedades espectroscópicas, reconocimiento molecular y relaciones estructura-actividad, solo pueden estudiarse después de que se haya determinado la configuración absoluta. La elucidación de la estereoquímica de los productos naturales, así como derivados sintéticos, ha sido un gran desafío en la investigación en productos naturales debido a la cantidad limitada de muestra con la que se dispone o desconoce alguna información de la configuración absoluta al menos que se pueda relacionar biogenéticamente y/o estructuralmente con metabolitos previamente aislados.<sup>42,43</sup>

Las características estereoquímicas de una molécula quiral pueden estudiarse por RMN, difracción de rayos-X o cristalografía de rayos-X y métodos quirópticos. La cristalografía de rayos-X a menudo no es una opción factible debido a la dificultad de obtener cristales adecuados del compuesto a estudiar. En su lugar, los métodos basados en RMN y el dicroísmo circular, incluso asistidos por predicciones no empíricas de los parámetros espectrales, se emplean comúnmente para el análisis estereoquímico de los productos naturales. La solución ideal para un problema estereoquímico sería sintetizar todos los estereoisómeros posibles y comparar sus datos espectroscópicos con la molécula a considerar; a veces, la síntesis de fragmentos clave es suficiente para estudios comparativos.<sup>42,43</sup>

Los métodos quirópticos, que surgen de la interacción diferencial de una muestra quiral no racémica con la radiación polarizada circular (RPC), incluyen la rotación óptica (RO), la variación de la RO en función de la longitud de onda de la ración incidente se conoce como dispersión óptica rotatoria (DOR), el dicroísmo circular electrónico (DCE) cuando la absorción ocurre en la región UV-Vis y vibracional (DCV) en la región del IR. Los métodos quirópticos son muy útiles para determinar la configuración absoluta sin la necesidad de cristalización o el uso de auxiliares quirales y son métodos no destructivos. La espectroscopía de DCV, que, en conjunto con otras técnicas espectroscópicas RMN y rayos-X, se ha empleado en la determinación de la configuración absoluta de productos naturales, productos farmacéuticos, y otras moléculas quirales, incluyendo productos de síntesis asimétricas; además, de ser sensible a los cambios conformaciones y a las interacciones intermoleculares con el solvente.<sup>42,43</sup>

La elucidación estructural de los dímeros triterpénicos se ha hecho a través del uso combinado de las técnicas de RMN, espectrometría de masas (MS) y DC. Itokawa y *col.*<sup>9</sup> llevaron a cabo la elucidación estructural de los dímeros triterpénicos xuxuarina A $\alpha$  y A $\beta$ , aislados de la especie *M. chuchhuasca*; se estableció la configuración *cis* entre -OH (C-3) y el grupo metilo (C-4), tanto que la estereoquímica en éstas posición se determinó por dicroísmo circular. Además, con el propósito de confirmar la orientación *cis* del enlace 3,4-dioxano en éstos dímeros y analizar las características conformacionales de estas estructuras; realizaron un análisis conformacional con Dinámica Molecular; en el

cual las conformaciones calculadas mostraron estar en concordancia con los datos experimentales.

### **Radiación por microondas**

El calentamiento por microondas en química sintética ha surgido como una valiosa alternativa a los métodos convencionales de calentamiento. Este campo de la química se conoce como síntesis orgánica asistida por microondas (MAOS, *microwave-assisted organic synthesis*). Esta técnica es capaz de proporcionar velocidades de calentamiento más rápidas, un aumento en las velocidades y rendimientos de las reacciones, así como proporcionar una mayor pureza del producto. Las ventajas de la radiación por microondas se le atribuye a la existencia de efectos térmicos y a efectos específicos (no necesariamente térmicos), siendo la combinación de estas dos contribuciones la responsable de los efectos observados por microondas. Pese a que la justificación de los efectos debidos por la radiación de microondas son objeto de considerable debate y controversia, se han reportado experimentos en los cuales los efectos térmicos explican los resultados obtenidos mientras en otros no son condición suficiente para explicar los resultados.<sup>44,45</sup>

En el caso de las reacciones de cicloadición, estas requieren condiciones drásticas como largos tiempos de reacción, elevadas temperaturas y en ocasiones altas presiones, y/o el uso de catalizadores de Lewis; condiciones que no son compatibles con reactivos o productos sensibles, lo cual es importante en la síntesis de productos naturales. Además, la aplicación de las reacciones de Diels-Alder se encuentran limitadas por la reversibilidad de la reacción cuando se requieren largos tiempos de reacción. Estos problemas pueden ser resueltos por el rápido calentamiento producido por la radiación de microondas, lo cual no se logra por métodos convencionales. Además, se ha reportado modificación en la quimio-, regio- y estereoselectividad en comparación con los productos obtenidos por calentamiento clásico.<sup>44,45</sup>



## HIPÓTESIS

Es posible obtener cicloaductos a partir de la metilénquinona triterpénica pristimerina con la 3,5-di-ter-butil-o-benzoquinona a través de una reacción hetero-Diels-Alder asistida por radiación en microondas.





## JUSTIFICACIÓN

La familia *Celastraceae* se caracteriza por la producción de metabolitos secundarios de tipo metilénquinonas triterpénicas. Estos compuestos conforman un grupo de *norfriedoleanos*, que se encuentran restringidos a raíces de esta familia y se consideran como marcadores quimiotaxonómicos. El interés de estudiar estos compuestos radica en sus propiedades biológicas, reactividad química, en la diversidad estructural y en alta complejidad de estructuras que presentan. Un claro ejemplo de ello son los dímeros triterpénicos, metabolitos aislados exclusivamente de especies de la familia *Celastraceae* y cuya ruta biosintética se fundamenta en una actividad enzimática de tipo Diels-Alder (DA).

Existe un número considerable de productos naturales presuntamente biosintetizados a través de una cicloadición [4+2]; sin embargo, pese a los esfuerzos realizados por la comunidad científica, no se ha logrado el aislamiento de un complejo enzimático en el reino vegetal capaz de catalizar este tipo de transformaciones, por lo que la existencia de este tipo de enzima "Dielsalderasa" es origen de una extensa investigación por la comunidad científica.

La ruta biosintética postulada para la formación de los dímeros triterpénicos ha sido sometida a prueba mediante estudios de reactividad de la pristimerina en condiciones de cicloadición. Sin embargo, este tipo de reactividad requiere de condiciones desfavorables, lo que limita el progreso de la cicloadición y en consecuencia se obtienen resultados parciales sobre la viabilidad del proceso pericíclico. La evidencia experimental sobre la participación de las metilénquinonas triterpénicas en cicloadiciones concertadas no es del todo concluyente.

Un aspecto importante en la química de productos naturales es que muchas de las características importantes de estos compuestos, incluidas sus propiedades espectroscópicas, reconocimiento molecular y relación estructura-actividad, solo pueden estudiarse una vez determinada la configuración absoluta. La elucidación de la estereoquímica de los productos naturales, así como derivados sintéticos, ha sido un gran desafío en la investigación en productos naturales debido, principalmente, a la cantidad limitada de muestra y a la poca estabilidad de los productos.



## OBJETIVOS

### Objetivo general

Establecer la configuración relativa de los aductos obtenidos de 3,5-di-*ter*-butil-*o*-benzoquinona con pristimerina, a través de técnicas espectroscópicas y computacionales.

### Objetivos específicos

1. Aislar la pristimerina del extracto obtenido con diclorometano de la corteza de la raíz de *Crossopetalum rhacoma*.
2. Establecer las condiciones de reactividad hetero-Diels-Alder utilizando radiación por microondas para la cicloadición de la pristimerina con 3,5-di-*ter*-butil-*o*-benzoquinona.
3. Purificar el aducto de tipo benzodioxinopristimerina aplicando técnicas cromatográficas.
4. Analizar la estructura de la benzodioxinopristimerina a través de métodos espectroscópicos y espectrométricos.
5. Asignar la configuración relativa por técnicas espectroscópicas.
6. Realizar el análisis conformacional de los aductos sintetizados.
7. Seleccionar los conformeros que de encuentren hasta 1.5 Kcal/mol con respecto al conformero de mínima energía.
8. Optimizar las estructuras de cada uno de los conformeros seleccionados.



## MATERIALES Y MÉTODOS

### Materiales y reactivos

Los disolventes utilizados para el proceso de extracción, separación y purificación fueron de grado industrial y se destilaron previamente a su uso. Los reactivos y disolventes utilizados en la reacción de cicloadición fueron de la marca Sigma-Aldrich.

### Métodos de separación

#### *Cromatografía en columna (CC)*

Las separaciones por cromatografía en columna se realizaron en columnas de vidrio empacadas con Sephadex LH-20 y SiO<sub>2</sub> (Sigma Aldrich) con tamaños de partícula de 40-63 μm (malla 230-400) y de 2-25 μm (CCD).

#### *Cromatografía en capa delgada (CCD)*

Para los análisis por cromatografía en capa delgada se utilizaron cromatofolios de aluminio de 20 x 20 cm (Sigma Aldrich) con gel de sílice G60 de 0.25 mm de espesor e indicador de fluorescencia F<sub>254</sub>. Como agentes reveladores se utilizaron luz ultravioleta de onda corta (254 nm) y onda larga (365 nm); así como óleum (ácido acético glacial, agua y ácido sulfúrico en proporciones 20:4:1) con calentamiento posterior.

### Caracterización estructural

#### *Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (RMN)*

Los espectros de resonancia magnética nuclear de protón (RMN-<sup>1</sup>H) y de carbono 13 (RMN-<sup>13</sup>C) a 400 y 100 MHz, respectivamente; así como los experimentos homonucleares (1H-1H, COSY y NOESY) y heteronucleares (1H-13C, HSQC y HMBC), se obtuvieron en un espectrómetro Bruker DPX400 Avance, equipado con una sonda BBO de 5 mm. Los desplazamientos químicos (δ) se proporcionan en partes por millón (ppm) y los valores para las constantes de acoplamiento (J) en Hertz (Hz). La señal de referencia utilizada fue la señal residual del disolvente correspondiente. Los experimentos selectivos NOESY-1D fueron obtenidos a 25 °C (400 MHz para <sup>1</sup>H). Para la excitación selectiva se utilizó un pulso focalizado con una anchura de banda adecuada y el tiempo de mezclado (t<sub>m</sub>) fue pre-optimizado a 750 ms.

### *Espectrometría de masas (MS)*

Los espectros de masas (MS), tanto de baja (LRMS, *Low Resolution Mass Spectrometry*) como de alta resolución (HRMS, *High Resolution Mass Spectrometry*) se realizaron en un espectrómetro de masas Jeol GC-Mate II. Las técnicas utilizadas fueron impacto electrónico (EI, *Electronic Impact*) (70 eV), y bombardeo por átomos rápidos en modo positivo (FAB, *Fast Atom Bombarding*) empleando Xe como gas ionizante y alcohol 3-nitrobencílico (NBA, *nitrobenzyl alcohol*) como matriz, disuelto en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (relación 2:1 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>–NBA). La determinación de la masa exacta se realizó con un calibrador de PEG-400 y como matriz tioglicerol a una resolución de 500 con un voltaje de filamento de 6 Kv.

### *Espectroscopía en el infrarrojo (IR)*

Los espectros en el infrarrojo (IR) se obtuvieron en un espectrómetro con transformada de Fourier Nicolet iS5 FTIR (Thermo Scientific), equipado con un dispositivo de ATR (Reflectancia Total Atenuada) iD7-ATR. Para el análisis de los espectros se utilizó el software OMNIC<sup>MR</sup> (v. 9.3.32 Thermo Nicolet Corp.). Previo registro de la medición de fondo, las muestras se depositaron como películas sobre una ventana de KBr y el análisis se realizó utilizando una ventana espectral de 500 a 4000 cm<sup>-1</sup>, con 32 barridos y una resolución de 4 cm<sup>-1</sup>.

### *Rotación óptica ([α]<sub>D</sub>)*

La rotación óptica ([α]<sub>D</sub>) fue obtenida a 25 °C en un polarímetro Rudolph Research, modelo Analytical Autopol IV. La medición de las muestras **C1** – **C4** se realizaron con 0.33% (m/v) a 589 nm en una celda de 1 mL de volumen y 50 mm de pasó óptico, utilizando CHCl<sub>3</sub> grado espectrofotométrico (Sigma-Aldrich) como disolvente.

### **Reactor de microondas**

Las reacciones se realizaron utilizando radiación por microondas, las cuales se realizaron en un reactor focalizado CEM Discover con una frecuencia de 2450 MHz; la temperatura se monitoreo a lo largo de la reacción a través de un pirómetro infrarrojo incluido dentro del reactor. La temperatura se midió en grados Celsius (°C), la presión en libras sobre pulgada cuadrada (lb/in<sup>2</sup>, psi) y la potencia en Watts (W).

## Recolecta y preparación del material vegetal

La recolección del material vegetal de *Crossopetalum rhacoma*, se realizó en el mes de febrero de 2018 en Xtampú, municipio de Dzemul, Yucatán. Las raíces obtenidas se separaron, limpiaron y descortezaron; el material vegetal se secó en un desecador para herbario a una temperatura de 50 °C durante cinco días en ausencia de luz. Posteriormente, se procedió a la reducción del tamaño de partícula del material vegetal mediante un molino Pulvex Mini 100 sin enfriamiento y equipado con un tamiz número 10. Se obtuvieron, 452.18 g de corteza de raíz seca y molida.

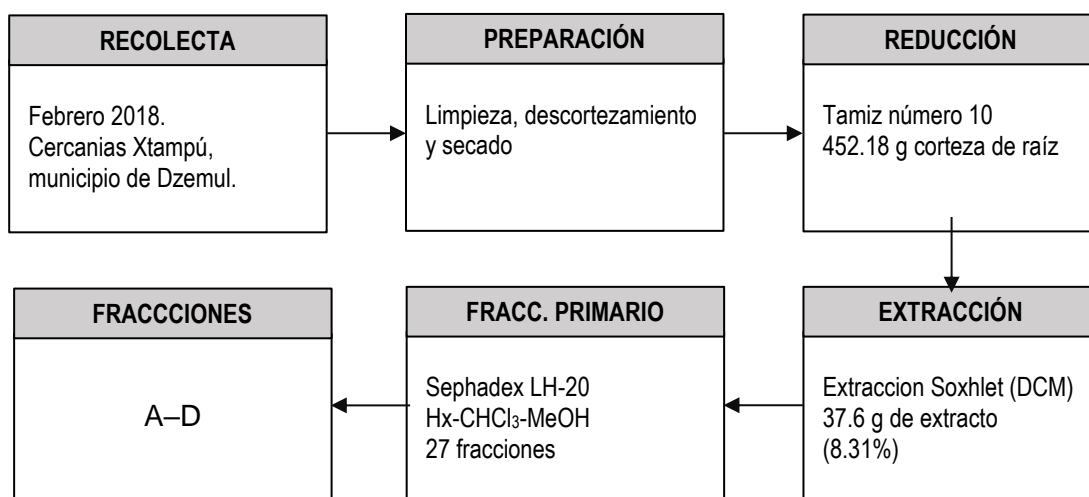
## Aislamiento de pristimerina

Para el cumplimiento de los objetivos del proyecto se estableció como prioridad inicial el aislamiento de la pristimerina a partir de la corteza de los tallos de *C. rhacoma*; esto con la finalidad de asegurar la cantidad suficiente para los ensayos de reactividad. La corteza de las raíces secas y molidas (452.18 g) se sometieron a extracción continua y exhaustiva con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  por medio de un equipo Soxhlet. El extracto diclorometánico fue concentrado en un evaporador rotario a presión reducida obteniendo un total de 37.6 g de extracto crudo.

### *Fraccionamiento primario*

El residuo del extracto (37.6 g) fue fraccionado mediante cromatografía por exclusión molecular empleando una columna de vidrio empacada con Sephadex lipofílico LH-20 y eluída con una mezcla de hexano (Hx)– $\text{CHCl}_3$ – $\text{CH}_3\text{OH}$  en proporciones 2:1:1. De esta columna primaria se obtuvieron 27 fracciones que se analizaron por cromatografía de capa delgada (CCD) empleando como fase móvil el sistema Hx–acetato de etilo (AcOEt) en proporciones 7:3; y reunidas de acuerdo a su similitud, reduciéndose en cuatro fracciones primarias (A-D) (Figura 13), las cuales fueron pesadas después de eliminar el disolvente a presión reducida (Tabla 1).





**Figura 13.** Obtención de las fracciones primarias del extracto de *C. rhacoma*.

**Tabla 1.** Fracciones primarias del extracto con diclorometano de corteza de raíces *Crossopetalum rhacoma*.

Clave	Reuniones	Peso seco (g)
A	1-5	4.3
B	6-11	12.8
C	12-17	18
D	18-27	4.7

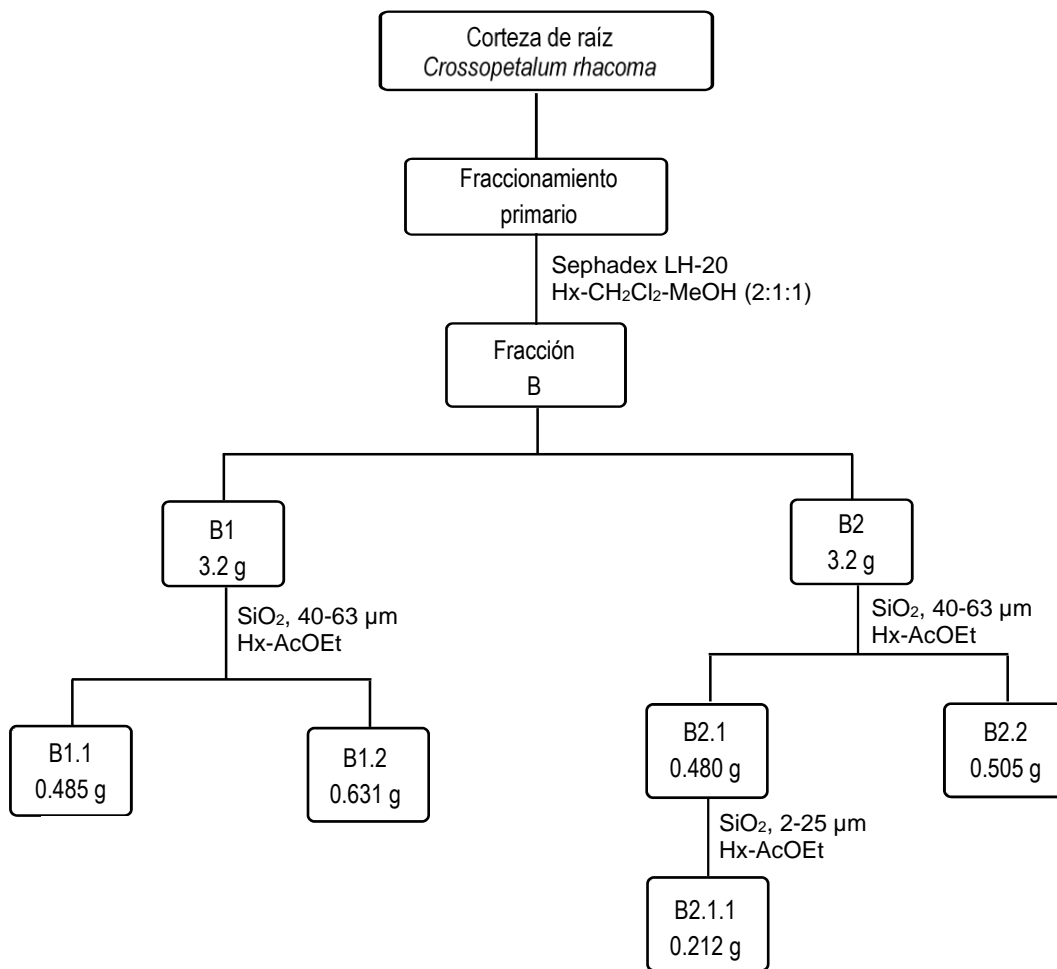
*Purificación de la pristimerina. 3-hidroxi-2-oxo-D:A-friedo-24-norolean-1(10):3:5:7-tetraen-29-oato de metilo. (1)*

El análisis de las fracciones B y C mostraron en su composición la presencia de metilénquinonas triterpénicas. Se tomaron 6.4 g de la fracción B para llevar a cabo la purificación de la pristimerina, esta fracción se dividió para facilitar el proceso de purificación. La primera fracción (B1, 3.2 g) fue separada por cromatografía en columna (CC) empacada con gel de sílice (40-63  $\mu\text{m}$ ) como fase estacionaria y eluida a gradiente con mezclas de Hx–AcOEt en proporciones 9:1, 8.5:2.5, 8:2,7.5:2.5,7:3 y AcOEt. De esta columna se obtuvieron un total de 40 fracciones, las cuales posterior a su evaluación por CCD (Hx–AcOEt, 7:3), se observó la presencia de pristimerina junto a otros compuestos en las fracciones 1 a 5 (B1.1, 0.485 g). A partir de la evaporación lenta de la fase móvil (Hx–AcOEt) de la fracción 6 a 11 (B1.2, 0.631 g) se obtuvieron cristales de color naranja en forma de agujas, que al ser comparados con un estándar se confirmó la obtención de pristimerina. Estos cristales se filtraron a gravedad y se lavaron con hexano frío (Figura 14).

Los 3.2 g (B2) restantes purificó por cromatografía en columna, en las mismas condiciones descritas anteriormente. Las 40 fracciones obtenidas se analizaron por CCD (Hx–AcOEt, 7:3) y se observó un patrón similar al primer fraccionamiento. La primera reunión (B2.1, 0.480 g) presentó en mayor proporción la pristimerina junto con otras impurezas. El segundo grupo de fracciones reunidas (B2.2, 0.505 g) presentó cristales naranjas en forma de aguja pertenecientes únicamente a la pristimerina.

La fracción marcada como B2.1 se sometió a CC utilizando gel de sílice (2-25  $\mu\text{m}$ ) como fase estacionaria y como fase móvil mezclas de Hx–AcOEt en proporciones 9:1, 8.5:2.5, 8:2,7.5:2.5,7:3 y AcOEt. Se obtuvieron 31 fracciones que al ser analizadas por cromatografía en CCD y al ser comparadas con un estándar de pristimerina se reunieron las fracciones 9 a 12 (B2.1.1, 0.212 g) donde se observó únicamente la presencia de pristimerina.

Se obtuvo como agujas de color naranja (1.34 g); RMN- $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.02 (dd, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 7.2$ , Hz,  $^5J_{\text{HH}} = 1.4$  Hz, H-6), 6.97 (s, 1H, OH), 6.54 (d, 1H,  $^5J_{\text{HH}} = 1.4$ , H-1), 6.35 (d, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 7.2$ , H-7), 3.54 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 2.43 (1H, H-19), 2.21 (1H, H-23), 2.17 (1H, H-21), 2.14 (1H, H-11), 2.04 (1H, H-22), 1.88 (1H, H-16), 1.86 (1H, H-11), 1.81 (1H, H-12), 1.70 (1H, H-19), 1.67 (1H, H-12), 1.66 (1H, H-15), 1.58 (m, 1H, H-18), 1.56 (1H, H-15), 1.49 (1H, H-16), 1.44 (s, 3H, H-25), 1.37 (1H, H-21), 1.25 (s, 3H, H-26), 1.17 (s, 3H, H-30), 1.09 (s, 3H, H-28), 0.97 (1H, H-22), 0.52 (s, 3H, H-27).



**Figura 14.** Purificación de pristimerina a partir de la fracción B.

## Reacción de hetero Diels-Alder

### *Secado del disolvente*

La malla molecular con tamaño de 3 Å se sometió a un protocolo de secado previo a su uso. En un matraz de tres bocas secado en estufa se agregó el 10 % en peso de malla molecular de acuerdo con el volumen total del disolvente a secar. Posteriormente, se selló el matraz y fue puesto bajo calentamiento en una placa a 300 °C por 24 h y conectado a una línea de vacío. Transcurridas las 24 h, la malla se retiró de la placa, se incorporó una atmósfera de nitrógeno y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Con la ayuda de una jeringa de vidrio, previamente secada en estufa y purgada en atmósfera de nitrógeno, se agregó el tolueno, el cual se dejó en contacto con la malla por 24 h con atmósfera de nitrógeno.

### *Síntesis de derivados de tipo benzodioxinopristimerina*

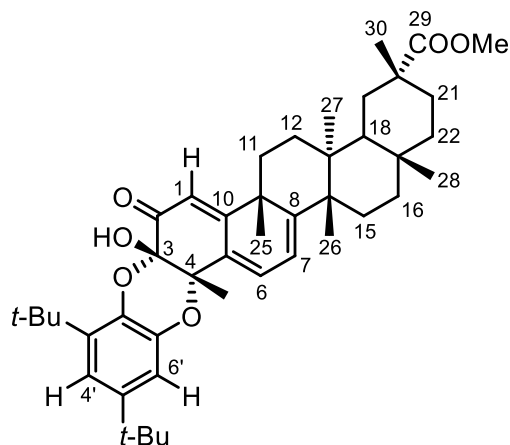
Las reacciones se llevaron a cabo en atmósfera de nitrógeno y utilizando material de vidrio previamente secado en estufa. Los productos obtenidos fueron nombrados de acuerdo con la nomenclatura IUPAC, utilizando el programa ChemDraw 2012.

**Irradiación por microondas:** En un tubo de microondas previamente secado en estufa, purgado a vacío y en atmósfera de nitrógeno, se agregó 0.096 mmol de 3,5-di-tert-butil-1,2-benzoquinona (3 eq., 0.021 g) con 0.032 mmol de pristimerina (1 eq., 0.015 g) y se disolvieron en 5 mL de tolueno anhidro (previamente secado en malla). A continuación, se cerró el tubo y se irradió hasta 160 °C durante 45 min con una potencia de 150 W a 150 psi de presión. Al finalizar la reacción se evaporó el disolvente a presión reducida y el crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna (CC) empacada con gel de sílice (2-25 µm) como fase estacionaria y empleando Hx, mezclas de Hx–AcOEt (99:1, 98:2, 97:3, 96:4, 95:5) y AcOEt, como fase móvil. De esta columna se obtuvieron 30 fracciones que se analizaron por CCD (Hx–AcOEt, 9:1); y fueron reunidas de acuerdo con su similitud. Las reuniones de 2-7 se observó la presencia de un único compuesto etiquetado como **C1**, la segunda reunión (10-15) la presencia de un segundo compuesto etiquetado como **C2** y finalmente, las reuniones de 18-23 la presencia un tercer compuesto etiquetado como **C3**.

**Calentamiento clásico:** En un matraz balón previamente secado en estufa, purgado a vacío y en atmósfera de nitrógeno, se agregó 0.096 mmol de 3,5-di-tert-butil-1,2-benzoquinona (3 eq., 0.021 g) con 0.032 mmol de pristimerina (1 eq., 0.015 g) y se disolvieron en 5 mL de tolueno anhidro. La reacción se llevó a cabo a reflujo y bajo agitación constante en atmósfera de nitrógeno durante 8 h en placa de calentamiento. Se llevó a cabo el monitoreo de la reacción por CCD tomando alícuotas cada hora. Al finalizar la reacción se evaporó el disolvente a presión reducida y el crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna (CC) empacada con gel de sílice (2-25 µm) como fase estacionaria, empleando Hx y mezclas de Hx–AcOEt (99:1, 98:2, 97:3, 96:4,

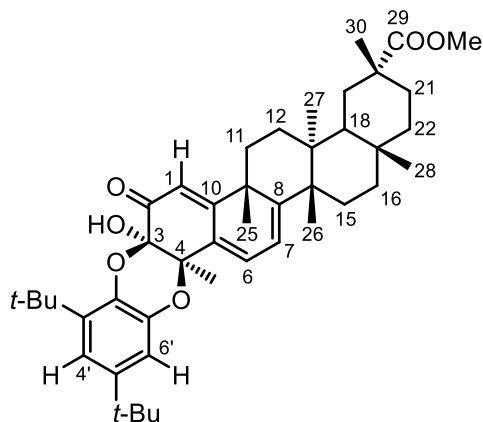
95:5) y AcOEt, como eluyente. Se aislaron e identificaron la presencia de cuatro productos (**C1**, **C2**, **C3** y **C4**).

(3*R*,4*bS*,6*aR*,16*bS*,18*aS*)-10,12-di-ter-butil-8*a*-hidroxi-3,4*b*,6*a*,14*a*,16*b*,18*a*-hexametil-8-oxo-1,2,3,4,4*a*,4*b*,5,6,6*a*,8,8*a*,14*a*,16*b*,17,18,18*a*-hexadecahidrobenczo[*b*]piceno[3,4-*e*][1,4]dioxina-3-carboxilato de metilo. (**C1**)



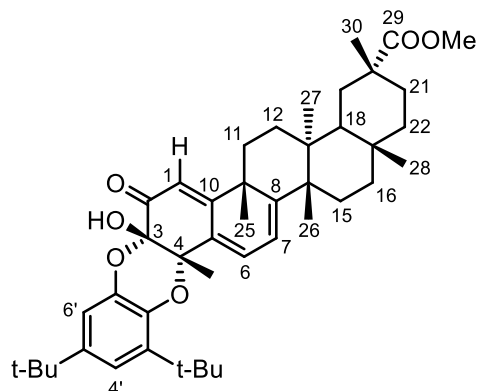
Sólido amarillo;  $[\alpha]_D^{25}$ : +2.82. **IR**  $\nu_{\max}$  (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 3452 (O–H), 2955 ( $\text{C}_{\text{sp}^3}\text{–H}$ ), 1731 (C=O), 1672 (C=O). **RMN-<sup>1</sup>H** (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  6.90 (d, 1H,  $^4J_{\text{HH}} = 2.32$  Hz,  $\text{H}_{\text{Ar}}$ ), 6.82 (d, 1H,  $^4J_{\text{HH}} = 2.32$  Hz,  $\text{H}_{\text{Ar}}$ ), 6.28 (dd, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 1.7$  Hz,  $^5J_{\text{HH}} = 1.6$  Hz, H-6), 6.08 (d, 1H,  $^5J_{\text{HH}} = 1.7$ , H-1), 5.88 (d, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 6.6$ , H-7), 4.93 (s, 1H, OH), 3.53 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 2.35 (1H, H-19), 2.17 (1H, H-21), 2.01 (1H, H-22), 1.93 (1H, H-11), 1.91 (1H, H-11), 1.86 (1H, H-16), 1.75 (1H, H-12), 1.64 (1H, H-19), 1.64 (1H, H-12), 1.53 (m, 1H, H-18), 1.52 (s, 3H, H-23), 1.61 (1H, H-15), 1.49 (1H, H-16), 1.57 (1H, H-15), 1.40 (s, 3H, H-25), 1.36 (1H, H-21), 1.27 (s, 9H, *t*-Bu), 1.22 (s, 9H, *t*-Bu), 1.42 (s, 3H, H-26), 1.16 (s, 3H, H-30), 1.06 (s, 3H, H-28), 0.95 (1H, H-22), 1.18 (s, 3H, H-27). **RMN-<sup>13</sup>C** (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  191.3 (C, C-2), 179.2 (C, C-29), 174.5 (C, C-10), 161.2 (C, C-8), 142.2 (C, C-5'), 140.9 (C, C-1'), 138.3 (C, C-2'), 137.6 (C, C-3'), 130.8 (C, C-5), 126.9 (CH, C-6), 116.3 (CH, C-7), 115.4 (CH, C-4'), 115.4 (CH, C-1), 112.3 (CH, C-6'), 91.8 (C, C-3), 78.5 (C, C-4), 51.6 ( $\text{CH}_3$ ,  $\text{OCH}_3$ ), 44.5 (C, C-14), 44.3 (CH, C-18), 41.7 (C, C-9), 40.5 (C, C-20), 35.2 ( $\text{CH}_3$ , C-25), 38.4 (C, C-13), 36.4 ( $\text{CH}_2$ , C-16), 34.6 (C, C-*t*-Bu), 34.6 ( $\text{CH}_2$ , C-22), 34.6 (C, C-*t*-Bu), 33.9 ( $\text{CH}_2$ , C-11), 31.6 ( $\text{CH}_3$ , C-30), 17.7 ( $\text{CH}_3$ , C-28), 31.6 ( $\text{CH}_3$ , *t*-Bu), 30.6 ( $\text{CH}_2$ , C-19), 30.7 (C, C-17), 29.8 ( $\text{CH}_2$ , C-21), 29.7 ( $\text{CH}_3$ , *t*-Bu), 28.5 ( $\text{CH}_2$ , C-12), 28.8 ( $\text{CH}_2$ , C-15), 22.3 ( $\text{CH}_3$ , C-23), 35.2 ( $\text{CH}_3$ , C-26), 22.3 ( $\text{CH}_3$ , C-27). **HRMS** (FAB) Calculado para  $\text{C}_{44}\text{H}_{60}\text{O}_6$  ( $m/z$  684.44), encontrado:  $m/z$  684.4381 (Error: 0.0019 uma).

(3*R*,4*bS*,6*aR*,16*bS*,18*aS*)-10,12-di-ter-butil-8*a*-hidroxi-3,4*b*,6*a*,14*a*,16*b*,18*a*-hexametil-8-oxo-1,2,3,4,4*a*,4*b*,5,6,6*a*,8,8*a*,14*a*,16*b*,17,18,18*a*-hexadecahidrobenzo[*b*]piceno[3,4-*e*][1,4]dioxina-3-carboxilato de metilo. (**C2**)



Sólido amarillo;  $[\alpha]_D^{25}$ : -2.19. IR  $\nu_{\max}$  (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 3444 (O–H), 2953 ( $\text{C}_{\text{sp}^3}\text{–H}$ ), 1731 ( $\text{C=O}$ ), 1668 ( $\text{C=O}$ ). **RMN-<sup>1</sup>H** (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  6.87 (d, 1H,  $^4J_{\text{HH}} = 2.3$  Hz,  $\text{H}_{\text{Ar}}$ ), 6.80 (d, 1H,  $^4J_{\text{HH}} = 2.3$  Hz,  $\text{H}_{\text{Ar}}$ ), 6.62 (dd, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 6.9$ , Hz,  $^5J_{\text{HH}} = 1.5$  Hz, H-6), 6.1 (d, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 6.9$ , H-7), 6.08 (d, 1H,  $^5J_{\text{HH}} = 1.5$ , H-1), 4.97 (s, 1H, OH), 3.59 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 2.39 (1H, H-19), 2.17 (1H, H-21), 2.04 (1H, H-22), 1.93 (1H, H-11), 1.88 (1H, H-11), 1.81 (1H, H-16), 1.76 (1H, H-12), 1.68 (1H, H-19), 1.65 (1H, H-12), 1.52 (m, 1H, H-18), 1.51 (s, 3H, H-23), 1.5 (1H, H-15), 1.44 (1H, H-16), 1.43 (1H, H-15), 1.40 (s, 3H, H-25), 1.36 (1H, H-21), 1.26 (s, 9H, *t*-Bu), 1.22 (s, 9H, *t*-Bu), 1.18 (s, 3H, H-26), 1.17 (s, 3H, H-30), 1.06 (s, 3H, H-28), 0.93 (1H, H-22), 0.52 (s, 3H, H-27). **RMN-<sup>13</sup>C** (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  190.4 (C, C-2), 178.8 (C, C-29), 173.6 (C, C-10), 162.6 (C, C-8), 143.6 (C, C-5'), 140.5 (C, C-1'), 137.8 (C, C-2'), 137.5 (C, C-3'), 132.7 (C, C-5), 128.6 (CH, C-6), 117.3 (CH, C-7), 115.9 (CH, C-4'), 114.9 (CH, C-1), 112.4 (CH, C-6'), 90.0 (C, C-3), 75.9 (C, C-4), 51.6 ( $\text{CH}_3$ ,  $\text{OCH}_3$ ), 44.2 (C, C-14), 44.2 (CH, C-18), 43.7 (C, C-9), 40.4 (C, C-20), 39.3 ( $\text{CH}_3$ , C-25), 38.7 (C, C-13), 36.3 ( $\text{CH}_2$ , C-16), 34.8 (C, C-*t*-Bu), 34.7 ( $\text{CH}_2$ , C-22), 34.3 (C, C-*t*-Bu), 32.8 ( $\text{CH}_2$ , C-11), 32.7 ( $\text{CH}_3$ , C-30), 31.5 ( $\text{CH}_3$ , C-28), 31.5 ( $\text{CH}_3$ , *t*-Bu), 30.7 ( $\text{CH}_2$ , C-19), 30.5 (C, C-17), 29.8 ( $\text{CH}_2$ , C-21), 29.7 ( $\text{CH}_3$ , *t*-Bu), 29.5 ( $\text{CH}_2$ , C-12), 28.6 ( $\text{CH}_2$ , C-15), 24.2 ( $\text{CH}_3$ , C-23), 22.4 ( $\text{CH}_3$ , C-26), 18.1 ( $\text{CH}_3$ , C-27). **HRMS** (FAB) Calculado para  $\text{C}_{44}\text{H}_{60}\text{O}_6$  ( $m/z$  684.44), encontrado:  $m/z$  684.4381 (Error: 0.0019 uma).

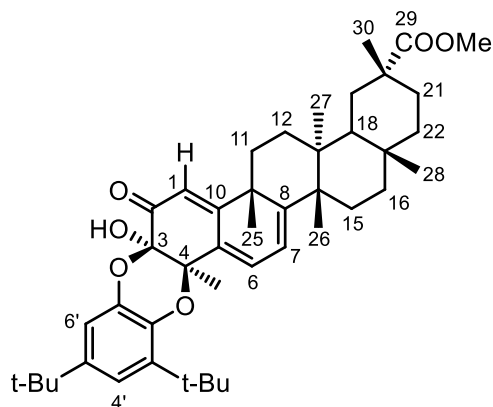
(3*R*,4*bS*,6*aR*,16*bS*,18*aS*)-10,12-di-ter-butil-8*a*-hidroxi-3,4*b*,6*a*,14*a*,16*b*,18*a*-hexametil-8-oxo-1,2,3,4,4*a*,4*b*,5,6,6*a*,8,8*a*,14*a*,16*b*,17,18,18*a*-hexadecahidrobenzo[*b*]piceno[3,4-*e*][1,4]dioxina-3-carboxilato de metilo. (**C3**)



Sólido amarillo;  $[\alpha]_D^{25}$ : +1.14. **IR**  $\nu_{\max}$  (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 3469 (O–H), 2955 ( $\text{C}_{\text{sp}^3}\text{--H}$ ), 1727 ( $\text{C=O}$ ), 1672 ( $\text{C=O}$ ). **RMN- $^1\text{H}$**  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  6.87 (d, 1H,  $^4J_{\text{HH}} = 2.3$  Hz,  $\text{H}_{\text{Ar}}$ ), 6.80 (d, 1H,  $^4J_{\text{HH}} = 2.3$  Hz,  $\text{H}_{\text{Ar}}$ ), 6.62 (dd, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 6.9$ , Hz,  $^5J_{\text{HH}} = 1.5$  Hz, H-6), 6.1 (d, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 6.9$ , H-7), 6.08 (d, 1H,  $^5J_{\text{HH}} = 1.5$ , H-1), 4.97 (s, 1H, OH), 3.59 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 2.39 (1H, H-19), 2.17 (1H, H-21), 2.04 (1H, H-22), 1.93 (1H, H-11), 1.88 (1H, H-11), 1.81 (1H, H-16), 1.76 (1H, H-12), 1.68 (1H, H-19), 1.65 (1H, H-12), 1.52 (m, 1H, H-18), 1.51 (s, 3H, H-23), 1.5 (1H, H-15), 1.44 (1H, H-16), 1.43 (1H, H-15), 1.40 (s, 3H, H-25), 1.36 (1H, H-21), 1.26 (s, 9H, *t*-Bu), 1.22 (s, 9H, *t*-Bu), 1.18 (s, 3H, H-26), 1.17 (s, 3H, H-30), 1.06 (s, 3H, H-28), 0.93 (1H, H-22), 0.52 (s, 3H, H-27). **RMN- $^{13}\text{C}$**  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  190.4 (C, C-2), 178.8 (C, C-29), 173.6 (C, C-10), 162.6 (C, C-8), 143.6 (C, C-5'), 140.5 (C, C-1'), 137.8 (C, C-2'), 137.5 (C, C-3'), 132.7 (C, C-5), 128.6 (CH, C-6), 117.3 (CH, C-7), 115.9 (CH, C-4'), 114.9 (CH, C-1), 112.4 (CH, C-6'), 90.0 (C, C-3), 75.9 (C, C-4), 51.6 ( $\text{CH}_3$ ,  $\text{OCH}_3$ ), 44.2 (C, C-14), 44.2 (CH, C-18), 43.7 (C, C-9), 40.4 (C, C-20), 39.3 ( $\text{CH}_3$ , C-25), 38.7 (C, C-13), 36.3 ( $\text{CH}_2$ , C-16), 34.8 (C, C-*t*-Bu), 34.7 ( $\text{CH}_2$ , C-22), 34.3 (C, C-*t*-Bu), 32.8 ( $\text{CH}_2$ , C-11), 32.7 ( $\text{CH}_3$ , C-30), 31.5 ( $\text{CH}_3$ , C-28), 31.5 ( $\text{CH}_3$ , *t*-Bu), 30.7 ( $\text{CH}_2$ , C-19), 30.5 (C, C-17), 29.8 ( $\text{CH}_2$ , C-21), 29.7 ( $\text{CH}_3$ , *t*-Bu), 29.5 ( $\text{CH}_2$ , C-12), 28.6 ( $\text{CH}_2$ , C-15), 24.2 ( $\text{CH}_3$ , C-23), 22.4 ( $\text{CH}_3$ , C-26), 18.1 ( $\text{CH}_3$ , C-27). **HRMS** (FAB) Calculado para  $\text{C}_{44}\text{H}_{60}\text{O}_6$  ( $m/z$  684.44), encontrado:  $m/z$  684.4381 (Error: 0.0019 uma).



(3*R*,4*bS*,6*aR*,16*bS*,18*aS*)-10,12-di-ter-butil-8a-hidroxi-3,4*b*,6*a*,14*a*,16*b*,18*a*-hexametil-8-oxo-1,2,3,4,4*a*,4*b*,5,6,6*a*,8,8*a*,14*a*,16*b*,17,18,18*a*-hexadecahidrobenczo[*b*]piceno[3,4-*e*][1,4]dioxina-3-carboxilato de metilo. (**C4**)



Solido amarillo;  $[\alpha]_D^{25}$ : -1.91. IR  $\nu_{\max}$  (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 3446 (O–H), 2954 ( $\text{C}_{\text{sp}^3}\text{--H}$ ), 1730 (C=O), 1668 (C=O). **RMN- $^1\text{H}$**  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  6.87 (d, 1H,  $^4J_{\text{HH}} = 2.3$  Hz,  $\text{H}_{\text{Ar}}$ ), 6.80 (d, 1H,  $^4J_{\text{HH}} = 2.3$  Hz,  $\text{H}_{\text{Ar}}$ ), 6.62 (dd, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 6.9$ , Hz,  $^5J_{\text{HH}} = 1.5$  Hz, H-6), 6.1 (d, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 6.9$ , H-7), 6.08 (d, 1H,  $^5J_{\text{HH}} = 1.5$ , H-1), 4.97 (s, 1H, OH), 3.59 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 2.39 (1H, H-19), 2.17 (1H, H-21), 2.04 (1H, H-22), 1.93 (1H, H-11), 1.88 (1H, H-11), 1.81 (1H, H-16), 1.76 (1H, H-12), 1.68 (1H, H-19), 1.65 (1H, H-12), 1.52 (m, 1H, H-18), 1.51 (s, 3H, H-23), 1.5 (1H, H-15), 1.44 (1H, H-16), 1.43 (1H, H-15), 1.40 (s, 3H, H-25), 1.36 (1H, H-21), 1.26 (s, 9H, *t*-Bu), 1.22 (s, 9H, *t*-Bu), 1.18 (s, 3H, H-26), 1.17 (s, 3H, H-30), 1.06 (s, 3H, H-28), 0.93 (1H, H-22), 0.52 (s, 3H, H-27). **RMN- $^{13}\text{C}$**  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  190.4 (C, C-2), 178.8 (C, C-29), 173.6 (C, C-10), 162.6 (C, C-8), 143.6 (C, C-5'), 140.5 (C, C-1'), 137.8 (C, C-2'), 137.5 (C, C-3'), 132.7 (C, C-5), 128.6 (CH, C-6), 117.3 (CH, C-7), 115.9 (CH, C-4'), 114.9 (CH, C-1), 112.4 (CH, C-6'), 90.0 (C, C-3), 75.9 (C, C-4), 51.6 ( $\text{CH}_3$ ,  $\text{OCH}_3$ ), 44.2 (C, C-14), 44.2 (CH, C-18), 43.7 (C, C-9), 40.4 (C, C-20), 39.3 ( $\text{CH}_3$ , C-25), 38.7 (C, C-13), 36.3 ( $\text{CH}_2$ , C-16), 34.8 (C, C-*t*-Bu), 34.7 ( $\text{CH}_2$ , C-22), 34.3 (C, C-*t*-Bu), 32.8 ( $\text{CH}_2$ , C-11), 32.7 ( $\text{CH}_3$ , C-30), 31.5 ( $\text{CH}_3$ , C-28), 31.5 ( $\text{CH}_3$ , *t*-Bu), 30.7 ( $\text{CH}_2$ , C-19), 30.5 (C, C-17), 29.8 ( $\text{CH}_2$ , C-21), 29.7 ( $\text{CH}_3$ , *t*-Bu), 29.5 ( $\text{CH}_2$ , C-12), 28.6 ( $\text{CH}_2$ , C-15), 24.2 ( $\text{CH}_3$ , C-23), 22.4 ( $\text{CH}_3$ , C-26), 18.1 ( $\text{CH}_3$ , C-27). **HRMS** (FAB) Calculado para  $\text{C}_{44}\text{H}_{60}\text{O}_6$  ( $m/z$  684.44), encontrado:  $m/z$  684.4381 (Error: 0.0019 uma).

## Métodos computacionales

Los cálculos se realizaron con el programa Gaussian 09, en su versión para Linux. Este programa implementa el método de combinación lineal de orbitales atómicos (LCAO, *Linear Combination of Atomic Orbitals*) usando combinaciones lineales de funciones Gaussianas como método de solución para resolver las ecuaciones de Kohn–Sham. Para la optimización de cada conformero se consideraron los siguientes criterios de convergencia: i) máxima fuerza sobre cada átomo  $< 0.023$  eV/ Å, ii) desviación cuadrática media de la máxima fuerza con respecto al ciclo anterior  $< 0.0153$  eV/ Å, iii) máximo desplazamiento de cada átomo con respecto a su posición en el ciclo anterior  $< 0.0095$  Å y iv) desviación cuadrática media del medio desplazamiento de cada átomo con respecto a su posición en el ciclo anterior  $< 0.00064$  Å. Todos los cálculos fueron realizados en fase gaseosa, a 298.15 K y 1 atm, y en solución.

### *Análisis conformacional*

Se realizó la exploración de la superficie de energía potencial para hallar la distribución de conformeros empleando métodos dinámica molecular (QMD, *Quenched Molecular Dynamic*), implementado en el programa Open3Dalign. La estructura geométrica de inicio fue minimizada con el método de Merck para mecánica molecular (MMFF94s), con el objetivo de explorar el espacio conformacional se proporcionó una energía equivalente a 1000 K a cada molécula con una duración de 10 ps, incrementando la temperatura 10 K cada 0.1 ps; el conformero obtenido se minimizó con mecánica molecular (MMFF94s). Se llevó a cabo la optimización geométrica de todos los conformeros con métodos basados en la Teoría Funcional de la Densidad (DFT, *Density Functional Theory*), se seleccionó el funcional híbrido  $\omega$ B97X-D para la energía de intercambio y correlación, con el conjunto base 6-31G(d,p), el efecto del solvente (tolueno) se simuló con el modelo de solvatación del polarizable continuo (PCM, *Polarizable Continuum Model*).

## Cuantificación por RMN (RMNq)

Se llevó a cabo el seguimiento de la reacción hetero-Diels-Alder a reflujo por 30 min en el cual se tomaron alícuotas (0.2 mL) del crudo de reacción cada minuto durante el transcurso de la reacción, cada alícuota se transfirió a tubos de ensayo de 10 mL siendo etiquetados con el tiempo en que fueron tomadas. Al finalizar, se eliminó el solvente de cada tubo en un evaporador rotatorio a presión reducida. Una vez secos, a cada muestra se le adicionó 0.05  $\mu\text{L}$  de 1,4-dioxano (estándar interno) en 0.5 mL de  $\text{CDCl}_3$  y se homogeneizaron por agitación para finalmente ser transferidas a tubos para RMN de 5 mm. La señal estándar a 5.70 ppm se normalizó al 100% para ser empleada como señal de referencia. Las correcciones de fase y de la línea base se realizaron de forma manual. Para el análisis cuantitativo se seleccionaron las señales a 6.26 ppm (**C1**, H-6, 1H) y 6.62 ppm (**C2**, H-6, 1H), fueron integradas por triplicado de forma manual y se realizó el promedio de los valores de integración obtenidos. La cantidad de ambos estereoisómeros en el crudo de reacción, se determinaron utilizando la ecuación

$$m_x = m_{ST} \frac{N_{ST} I_x M_x}{N_x I_{ST} M_{ST}}$$

donde  $m_x$  es la masa desconocida de los compuestos **C1** o **C2**;  $m_{ST}$  es el peso del estándar;  $M_{ST}$  y  $M_x$  hacen referencia al peso molecular del estándar, **C1** y **C2**, respetivamente;  $I_{ST}$  e  $I_x$  representan el valor de la integral (área) de las señales del estándar y de los compuestos **C1** y **C2**;  $N_{ST}$  y  $N_x$  corresponden al número de protones de las señales integradas para el estándar y los compuestos **C1** y **C2**.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Caracterización de la pristimerina

De acuerdo con el esquema de purificación por CC se obtuvo 1.34 g de pristimerina, como agujas de color naranja. La identificación estructural de la pristimerina se realizó mediante el análisis por RMN-<sup>1</sup>H (Figura 15). El espectro de RMN-<sup>1</sup>H se caracterizó por la presencia de dos grupos principales de resonancia, uno en la región aromática y otro en la región alifática. En la región de los grupos metilos se observan los correspondientes a las posiciones 23, 25, 26, 30, 28 y 27 que dan lugar a señales simples con  $\delta_H$  2.2, 1.45, 1.26, 1.17, 1.09, 0.53, respectivamente. La presencia de estas señales de grupos metilo; así como, la presencia de una señal simple con  $\delta_H$  3.55 el cual corresponde a un éster metílico; son indicaciones de un triterpeno pentacíclico de tipo friedelano. La región insaturada mostró un patrón distintivo a una estructura de tipo quinoide caracterizado por una señal doble a  $\delta_H$  6.34 (1H, *d*, *J* = 7.2 Hz, H-7), un doble  $\delta_H$  6.53 (1H, *d*, *J* = 1.3 Hz, H-1) y un doble de doble a  $\delta_H$  7.01 (1H, *dd*, *J* = 7.2, 1.3 Hz, H-6).

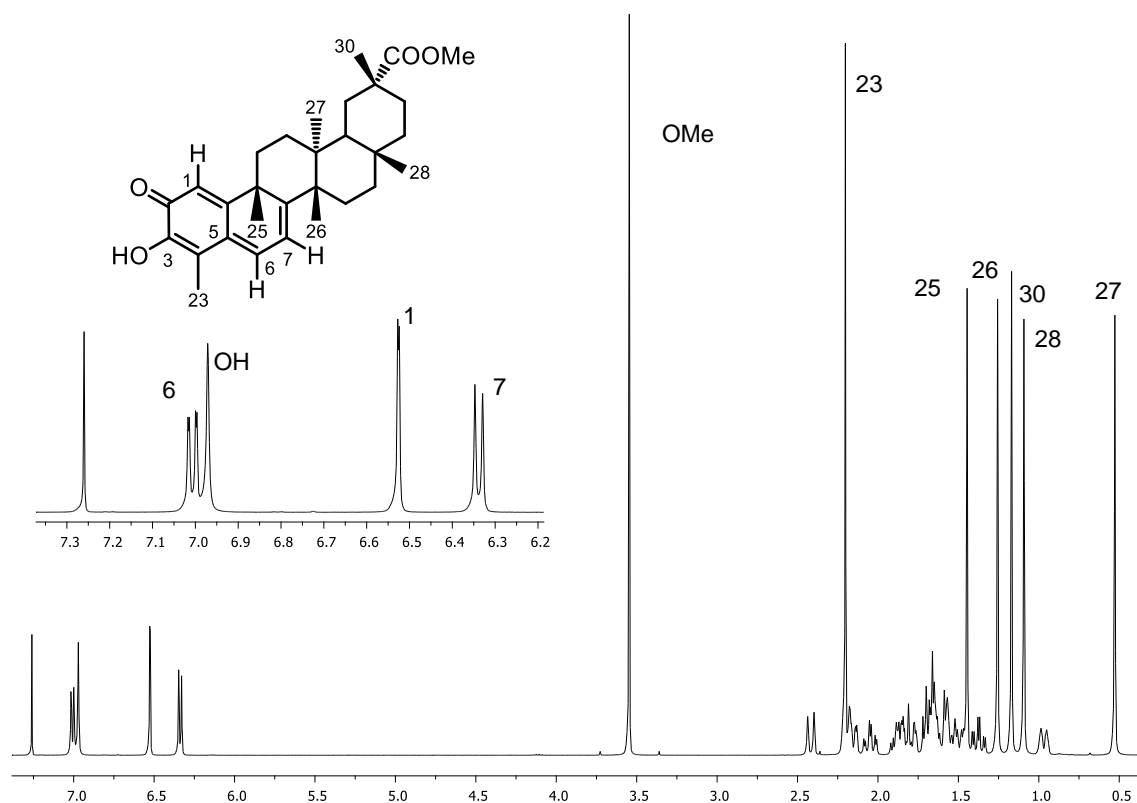
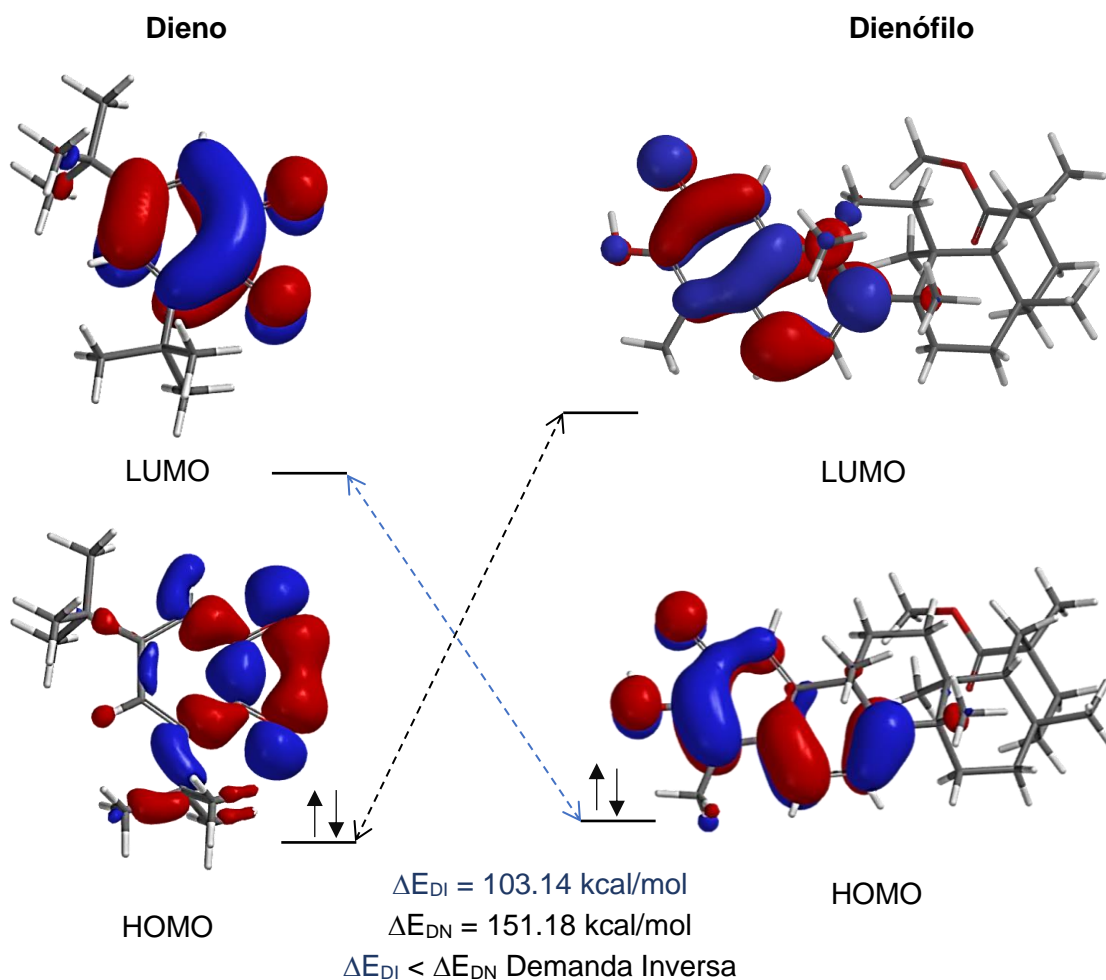


Figura 15. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de la pristimerina (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz).

## Pristimerina en reacciones de cicloadición

### Síntesis de los derivados de benzodioxinopristimerina

En los diferentes tipos de reacciones pericíclicas, parte de los factores que gobiernan la reactividad y la estereoquímica del proceso están relacionadas con la simetría orbital. La teoría FMO (*frontier molecular orbital*) permite racionalizar los resultados observados en reacciones pericíclicas como la Diels-Alder, en términos del traslape de los orbitales frontera HOMO-LUMO y la diferencia energética entre tales orbitales moleculares. Se calcularon las energías para los orbitales frontera de la *o*-benzoquinona y pristimerina, de donde se encontró que reacción corresponde a un proceso de demanda electrónica inversa (Figura 16).



**Figura 16.** Demanda energética de los orbitales frontera de la reacción HDA.

Es importante resaltar que las predicciones de reactividad de las reacciones de Diels-Alder se basan, generalmente, en la brecha energética de los orbitales frontera del par dieno/dienófilo, se han reportado sistemas en donde la magnitud entre las energías de los orbitales HOMO y LUMO no es directamente proporcional a la barrera energética de la reacción.<sup>46</sup>

Una vez aislada y caracterizada la pristimerina (**1**) se llevaron a cabo las reacciones de cicloadición empleando como dieno la 3,5-di-*tert*-butil-1,2-benzoquinona (**2**) y utilizando tolueno como disolvente, esto debido a la polaridad del sustrato triterpénico. Las condiciones de reacción empleadas en este trabajo se resumen en la Tabla 2, en estas se optó por evaluar el efecto de la temperatura y presión sobre la formación de los heterodímeros en condiciones de irradiación por microondas ( $\mu$ W). Cabe mencionar que la purificación de los productos fue posible a través de métodos cromatográficos convencionales.

**Tabla 2.** Condiciones de reacción hetero-DA entre 3,5-di-*ter*-butil-1,2-benzoquinona y la pristimerina.

Entrada	Condiciones de reaccion <sup>a</sup>	Rendimiento <sup>b</sup>			
		C1	C2	C3	C4
1	$\mu$ W, 130 °C, 8 psi, 150 W	1.25	5.0	0.0	0.0
2	$\mu$ W, 160 °C, 15 psi, 150 W	11.41	10.5	6.84	0.0
3	$\mu$ W, 180 °C, 12 psi, 150 W	5.08	3.39	1.27	0.0
4	$\mu$ W, 200 °C, 16 psi, 150W	10.73	13.41	5.7	0.0
5	$\mu$ W, 215 °C, 17 psi, 150 W	15.36	17.07	1.7	0.0
6	$\mu$ W, 230 °C, 23 psi, 200 W	38.1	11.44	0.00	0.0
7	$\mu$ W, 130 °C, 150 W, 0.2 mL Bmim-PF <sub>6</sub>	1.8	9.1	6.8	0.0
8	$\mu$ W, 160 °C, 150 W, 0.1 mL Bmim-PF <sub>6</sub>		Descomposición		
9	$\mu$ W, 160 °C, 150W, 0.05 mL Bmim-BF <sub>6</sub>		Descomposición		
10	$\mu$ W, 160 °C, 150W, 0.025 mL Bmim-BF <sub>6</sub>		Descomposición		
11	Reflujo, 45 min	6.3	8.1	0.0	0.0
12	Reflujo, 8 h	17.1	21.7	2.2	3.1

<sup>a</sup>Relación dieno/dienófilo 3:1 (eq)

<sup>b</sup>Una vez purificado los productos por CC

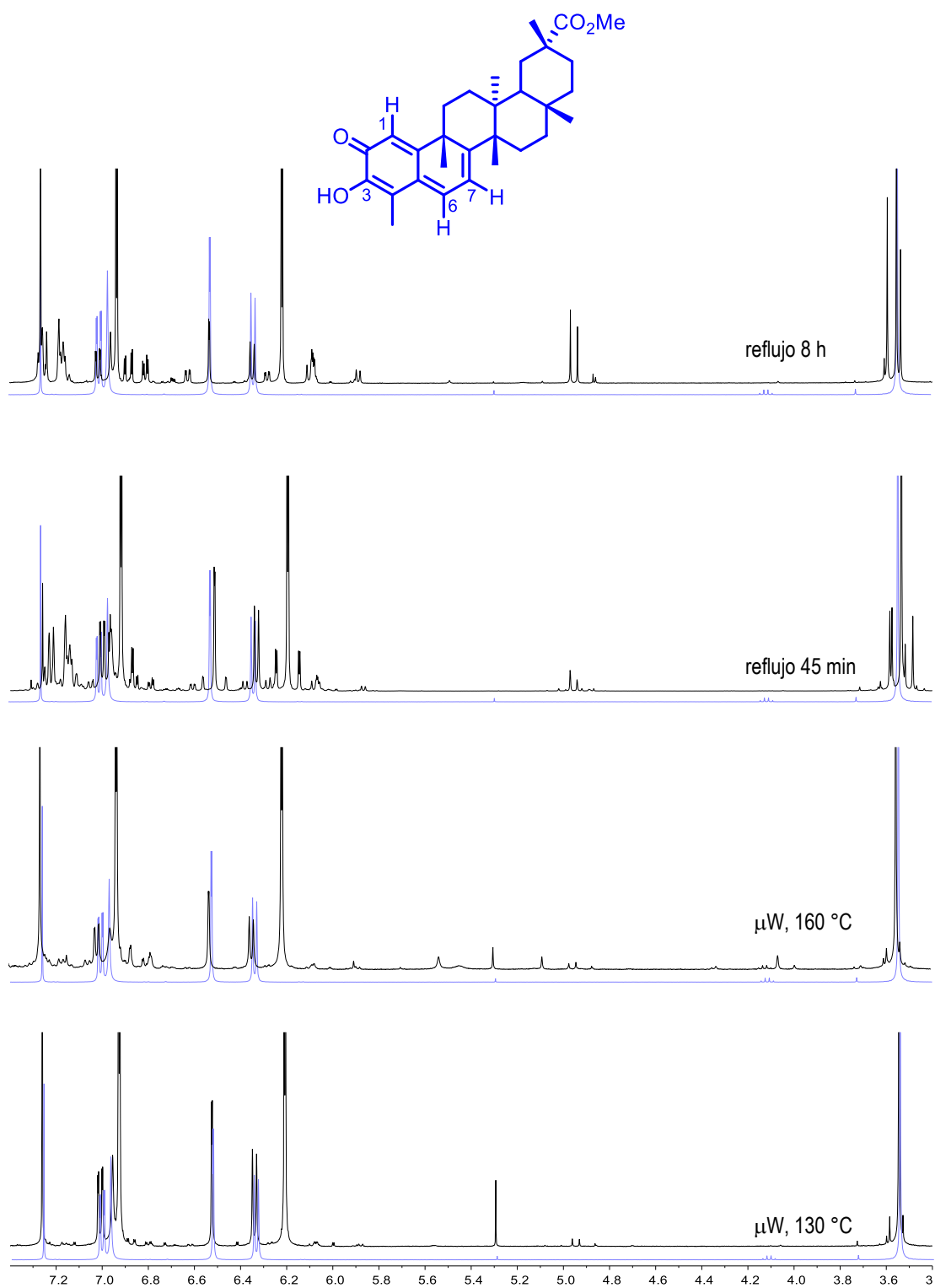
Se evaluó como condición inicial de reacción a 130 °C en el cual, posterior al proceso de purificación, se logró el aislamiento de los heterodímeros **C1** y **C2**. Se observa que el aumento de la temperatura a 215 °C condujo a un aumento en la presión del sistema de 15 psi, así como un aumento de ~5% para **C1** de ~17% para **C2** (entrada 5). La reacción a 180 °C (presión máxima de 12 psi) se obtuvo la formación de **C3** (entrada 3). Para llevar al sistema a 230 °C se tuvo que aumentar la potencia de la radiación (entrada 6)

lo que condujo a la formación y aislamiento de únicamente de **C1** y **C2**. Con base a los resultados obtenidos (entradas 1-6), se observa que no hay una correlación en el aumento de la temperatura a una mayor formación de los productos, sino que puede deberse a un efecto en conjunto entre la temperatura y la presión hacia la formación de los heterodímeros.

Por otro lado, se ha demostrado que solventes no polares como hexano, tolueno, tetrahidrofurano (THF) y dioxano pueden calentarse (en un breve periodo de tiempo) a temperaturas por encima de sus puntos de ebullición en recipientes sellados utilizando pequeñas cantidades de líquidos iónicos (LIs) al ser irradiados por microondas. Los líquidos iónicos forman parte de los compuestos conocidos como susceptores, los cuales absorben la radiación de microondas de manera eficiente y la convierten en energía térmica la cual es transferida al medio de reacción. Con el objetivo de establecer las condiciones de reactividad HDA con líquido iónico en tolueno se recurrió a la revisión bibliográfica. Los resultados obtenidos de la hetero Diels-Alder de 2(1*H*)-pirazinonas por Kappe y *col.*<sup>47</sup> demuestran que la adición de líquidos iónicos en irradiación por microondas reduce el tiempo de reacción de 50 min (sin líquido iónico) a 18 min, mientras que en condiciones convencionales de calentamiento se requieren de 2-3 días para una reacción completa.

De este modo se tomó la decisión de adicionar 0.2 mL de Bmim-PF<sub>6</sub> (hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazolio) con lo que se llegó a un aumento en la formación de los aductos, en comparación sin la presencia del LI; sin embargo, la adición de 0.1 mL del Bmim-PF<sub>6</sub> a 160 °C no presentó la formación de producto. Por lo cual se procedió a emplear Bmim-BF<sub>6</sub> (hexafluoroborato de 1-butil-3-metilimidazolio) y en la disminución del volumen empleado; sin embargo, no se observó la formación de producto debido a una descomposición de los materiales de partida (entradas 7-10, Tabla 2).

Con el objetivo de confirmar que la reacción es favorecida únicamente por un efecto térmico como consecuencia del calentamiento por microondas, se llevó a cabo la reacción (conservando la misma relación de reactivos y solvente) a temperatura de reflujo por calentamiento convencional por 45 min. Bajo estas condiciones y posterior al proceso de purificación, se aislaron e identificaron los heterodímeros **C1** y **C2**, previamente obtenidos en las reacciones asistidas por microondas. Posteriormente, se extendió el tiempo de reacción a 8 h y se monitorizó por CCD cada hora; observando al final de la reacción la formación de cuatro posibles heterodímeros por CCD, posterior al proceso de purificación del crudo se logró el aislamiento e identificación de un cuarto dímero (**C4**, 0.7 mg). Los experimentos realizados a reflujo permitieron observar un perfil de reacción similar al encontrado por microondas (Figura 17).



**Figura 17.** Espectros de RMN- $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de la reacción de la HDA promovida por microondas y a reflujo con espectro de la pristimerina (azul).

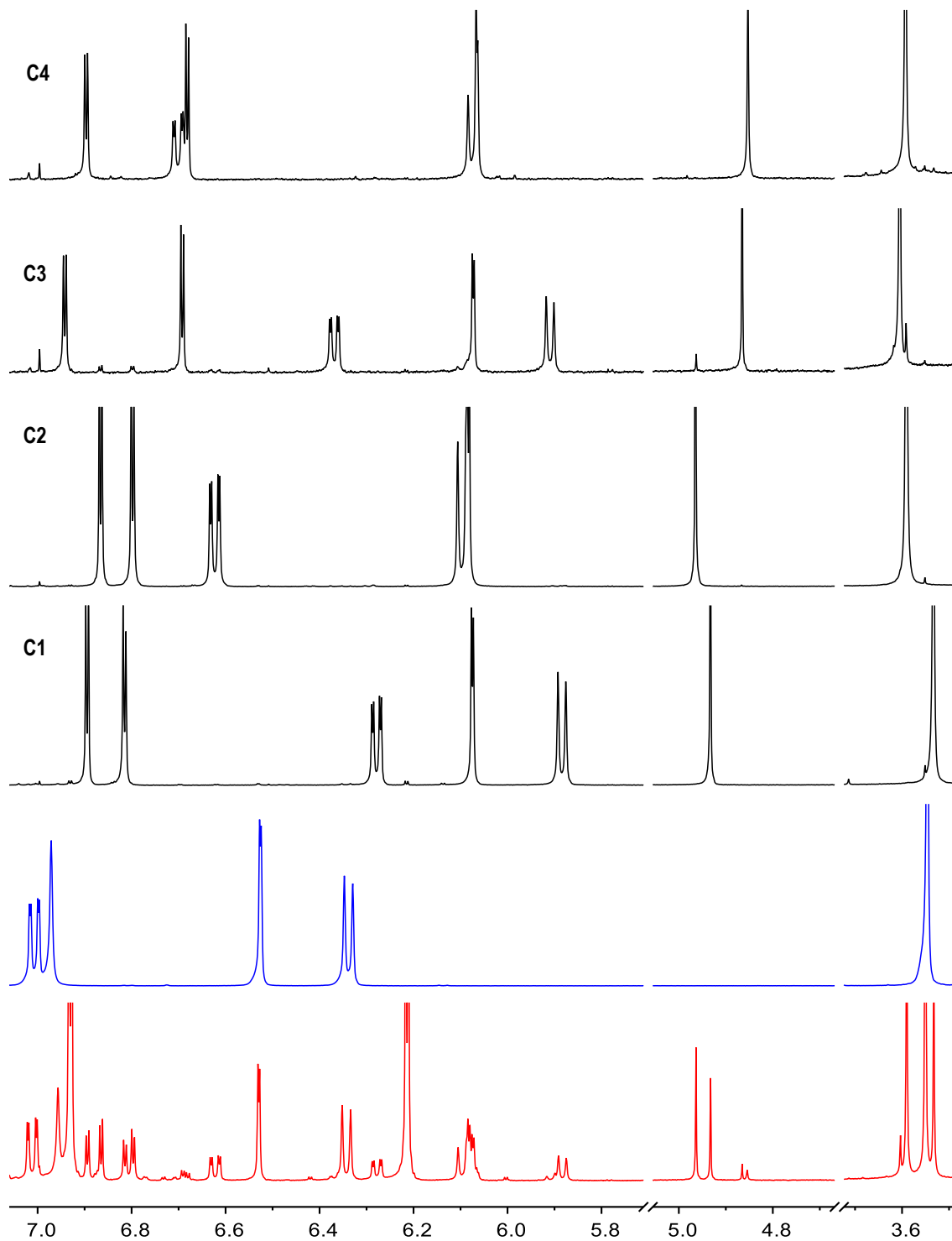


### *Monitoreo de la reacción por RMN-<sup>1</sup>H*

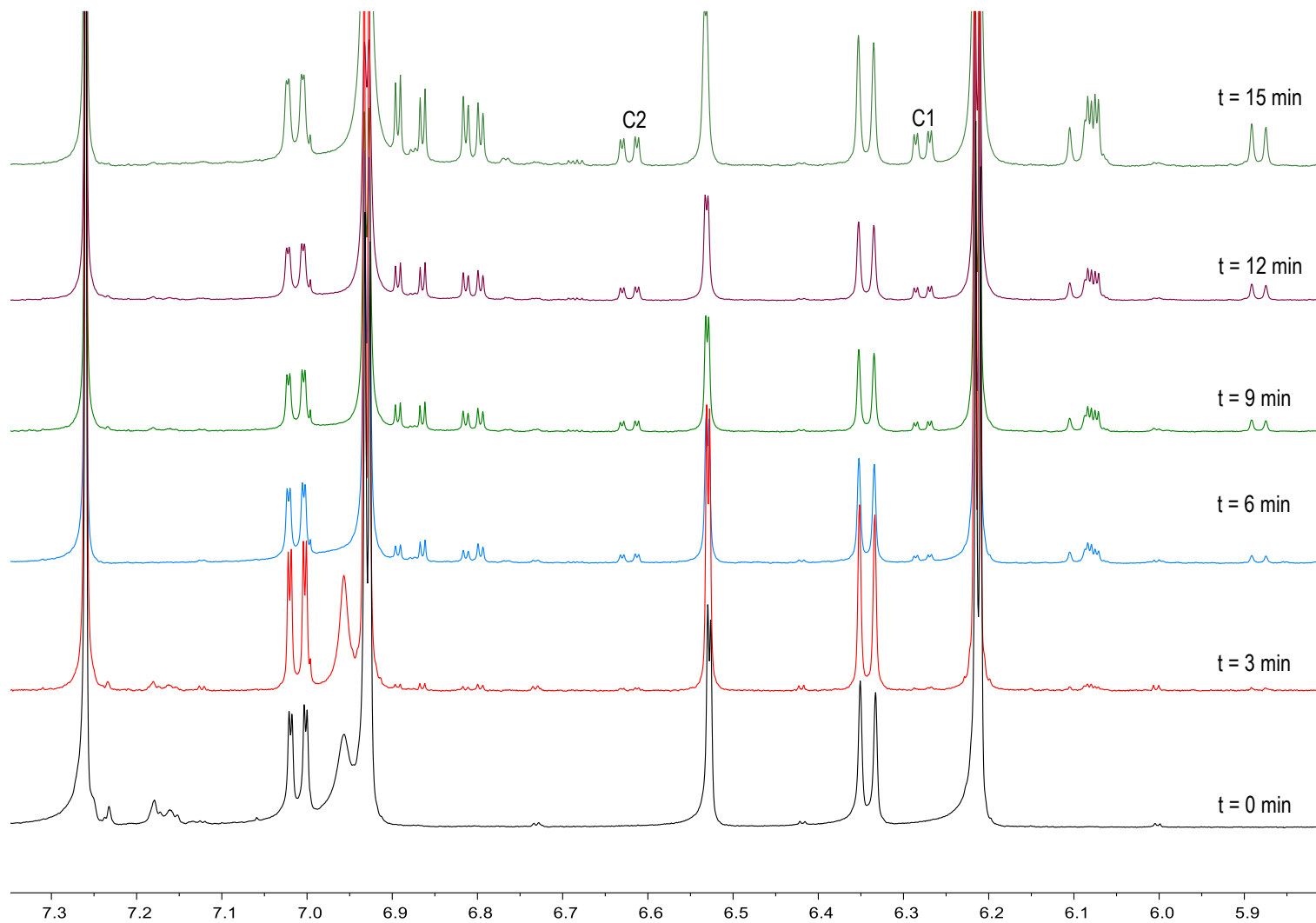
La identificación y aislamiento de los cuatro heterodímeros en las condiciones de reflujo por calentamiento convencional y además que fue la única metodología en este trabajo que condujo a la obtención del cuarto heterodímero, permitió extender el análisis de la formación de los heterodímeros a través del seguimiento de la reacción por RMN-<sup>1</sup>H. Para este propósito, se realizó la identificación de las señales correspondientes a cada heterodímero en el crudo de reacción, al comparar los espectros de RMN-<sup>1</sup>H de estos, con el crudo de la reacción del reflujo a 8 h, Figura 18.

El monitoreo de la reacción a reflujo durante 8 h por CCD reveló la posible presencia del producto en el crudo de reacción a una hora de haber iniciado. Tomando esto en consideración, se decidió realizar el seguimiento de la reacción por 35 min una vez que el solvente inició el reflujo. Se realizó la toma periódica de alícuotas de forma manual del crudo de reacción durante los 35 min, se etiquetaron y se evaporó el disolvente a presión reducida.

La adquisición de los espectros de RMN-<sup>1</sup>H de cada una de las muestras tomadas se realizó de acuerdo con el procedimiento descrito previamente en este trabajo. En la Figura 19 se muestra el monitoreo de la reacción y en la Tabla 3 se presentan los resultados obtenidos de la cuantificación por RMN-<sup>1</sup>H.



**Figura 18.** Identificación en los espectros de RMN- $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de las señales para cada heterodímero en el crudo de reacción a reflujo por 8 h (rojo) respecto a la pristimerina (azul).



**Figura 19.** Seguimiento de la reacción a reflujo por 35 min por RMN- $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

**Tabla 3.** Cuantificación de **C1** y **C2** por RMN-<sup>1</sup>H.<sup>a</sup>

Muestra	C1		C2	
	I <sub>C1</sub>	mg <sub>C1</sub>	I <sub>C2</sub>	mg <sub>C2</sub>
1	5.920	0.190	5.337	0.172
2	6.487	0.209	6.620	0.213
3	4.903	0.158	6.163	0.198
4	1.973	0.063	1.187	0.038
5	8.940	0.287	8.660	0.278
6	9.530	0.306	8.983	0.289
7	9.467	0.304	9.700	0.312
8	13.143	0.423	13.010	0.418
9	9.750	0.313	9.437	0.303
10	11.987	0.385	11.637	0.374
11	11.917	0.383	11.243	0.361
12	11.903	0.383	11.197	0.360
13	9.427	0.303	8.087	0.260
14	11.323	0.364	10.057	0.323
15	12.817	0.412	11.520	0.370
16	11.673	0.375	10.660	0.343
17	10.223	0.328	7.717	0.248
18	12.393	0.368	10.060	0.323
19	10.643	0.356	8.967	0.288
20	9.510	0.321	8.167	0.263
21	10.513	0.348	7.857	0.253
22	7.193	0.251	5.200	0.167
23	3.383	0.117	3.123	0.100
24	8.687	0.288	6.270	0.202
25	14.957	0.500	11.430	0.367
26	13.967	0.472	10.140	0.326
27	12.640	0.394	9.017	0.290
28	10.807	0.357	7.720	0.248
29	11.673	0.388	8.193	0.263
30	17.350	0.571	12.160	0.391
31	12.240	0.410	8.667	0.279
32	11.533	0.360	8.273	0.266
33	12.027	0.392	7.430	0.239
34	9.883	0.319	7.060	0.227
35	11.410	0.378	7.877	0.253

<sup>a</sup>I<sub>C1</sub> e I<sub>C2</sub> integrales promedio de las señales de **C1** y **C2**; mg<sub>C1</sub> y mg<sub>C2</sub> cantidades de **C1** y **C2** determinado por RMN-<sup>1</sup>H.

De acuerdo con los datos de la Tabla 3, se puede observar que la cantidad de **C1** presente en el crudo de reacción es ligeramente mayor a la cantidad de **C2** en el mismo. Sin embargo, a las 8 h (Tabla 2, entrada 12) se observa que **C2** es 4 unidades mayor que **C1**. Por otro lado, resultó imposible la cuantificación de **C3** y **C4** por RMNq debido al solapamiento de sus señales. Los resultados obtenidos por RMNq aunados a los adquiridos a través de la variación de las condiciones de reacción presentes en la Tabla 2; se observa que todas las condiciones evaluadas conducían a la obtención de los heterodímeros **C1** y **C2** (excepto en el caso con LI's), mientras que para **C3** y **C4** solo fue posible su obtención al aumentar la temperatura en caso de microondas (**C3**) o por tiempos largos de reacción en reflujo (**C4**). El hecho de que **C1** y **C2** siempre se forman en las condiciones de reacción evaluadas, así como que hayan presentado los mejores rendimientos puede ser indicio que ambos heterodímeros sean los productos termodinámicos de la HDA entre la pristimerina y la 3,5-di-*tert*-butil-1,2-benzoquinona.

## Caracterización de los productos de la reacción hetero-Diels-Alder

Los cuatro compuestos (**C1-C4**) se aislaron como sólidos amorfos de color amarillo; y todos ellos presentaron la misma fórmula molecular  $C_{44}H_{60}O_6$  determinadas por HRMS-FAB(+). Las masas exactas de cada uno de los compuestos a  $m/z$  684.4381 para **C1**;  $m/z$  684.4380 para **C2**,  $m/z$  684.4375 para **C3** y  $m/z$  684.4395 para **C4**, están de acuerdo con esta fórmula molecular para los cuatro heterodímeros obtenidos.

### Compuesto 1 (**C1**)

En el espectro de RMN- $^1H$  (Figura 20), se observó la presencia de dos señales dobles con  $\delta_H$  6.89 y 6.81, con un valor de  $J = 2.3$  Hz, el cual corresponde a un acoplamiento de tipo *meta*; evidencia de la unión del componente benzoquinónico con la pristimerina. A su vez se observa un patrón modificado para el sistema conjugado de la pristimerina, se observa una señal con  $\delta_H$  6.27 (*dd*,  $J = 6.9, 1.5$  Hz) el cual, de acuerdo con la multiplicidad que presenta, corresponde al H-6 de la unidad triterpénica, dado el acoplamiento vecinal con H-7 a  $\delta_H$  5.88 (*d*,  $J = 6.9$  Hz) y a larga distancia con H-1 a  $\delta_H$  6.07 (*d*,  $J = 1.5$  Hz). También, se presentan señales simples a  $\delta_H$  4.93 y 3.53, que corresponden al protón del grupo hidroxilo y al metoxilo, respectivamente. Se identificaron dos señales  $\delta_H$  con 1.19 y 1.28, los cuales pertenecen a los grupos t-Bu. Finalmente, es importante hacer notar la modificación en el  $\delta_H$  de la señal del -OH ( $\delta_H$  4.93) y Me-23 ( $\delta_H$  1.52), que en la pristimerina se observan a  $\delta_H$  6.97 y 2.21, respectivamente, lo que es indicio de una modificación en el anillo A de la pristimerina.

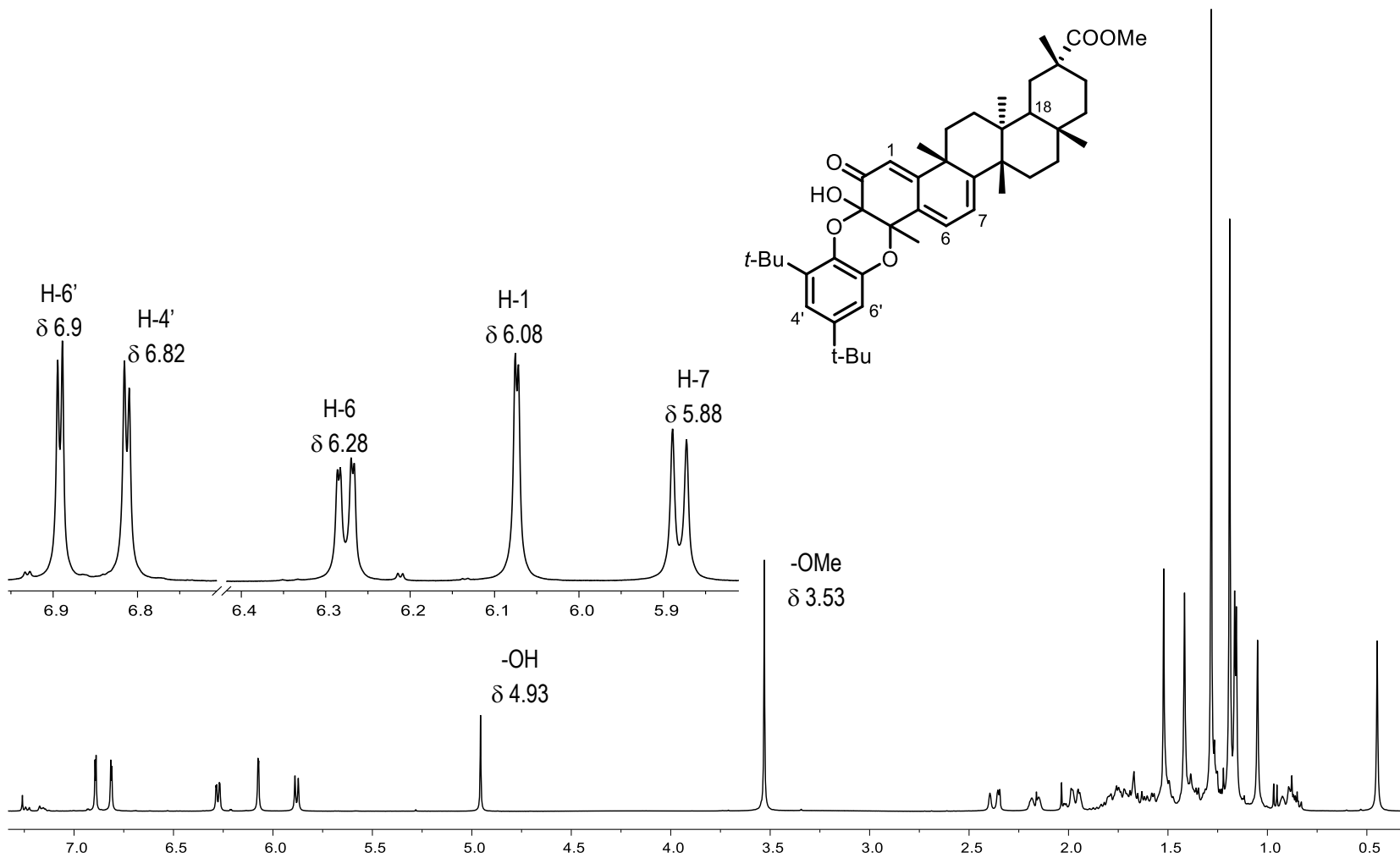
En el espectro de RMN- $^{13}C$  (APT), Figura 21, se observaron dos señales con  $\delta_C$  91.81 y 78.48 características de carbonos  $sp^3$  unido a oxígenos, estos datos confirman la unión tipo éter entre la benzoquinona y la pristimerina. En donde la señal con  $\delta_C$  91.83 corresponde a la posición 3 del anillo A del fragmento triterpénico, debido a la unión del C-3 con dos oxígenos; por lo que la señal a  $\delta_C$  78.52 corresponde al C-4. En el experimento de DEPT-90 (Figura 22) se identificaron seis grupos metino, de los cuales cinco corresponden a carbonos  $sp^2$ , lo cual indica que la señal con  $\delta_C$  44.36 corresponde al único protón unido al carbono  $sp^3$  en posición 18.

El experimento HSQC (Figura 23), permitió correlacionar los seis grupos metinos observados en el DEPT-90. De esta manera, las señales dobles del anillo aromático con  $\delta_H$  6.89 y 6.81, pertenecen a los metinos C-6' ( $\delta_C$  112.31) y C-4' ( $\delta_C$  115.95); al sistema conjugado del componente terpénico le corresponden los metinos C-6 ( $\delta_C$  126.89,  $\delta_{H-6}$  6.27), C-1 ( $\delta_C$  115.49,  $\delta_{H-1}$  6.07) y C-7 ( $\delta_C$  116.36,  $\delta_{H-7}$  5.88) y el desplazamiento de  $\delta_C$  144.36 se correlacionó con el  $\delta_H$  1.5 (H-18). Por último, en la región comprendida entre 0.5-1.52 ppm fue posible correlacionar las señales propias de los seis metilos angulares del esqueleto friedoleano.

El producto de cicloadición se confirmó mediante el experimento HMBC (Figura 24), en el cual se observaron correlaciones para las señales con  $\delta_C$  78.48 y 91.81, que

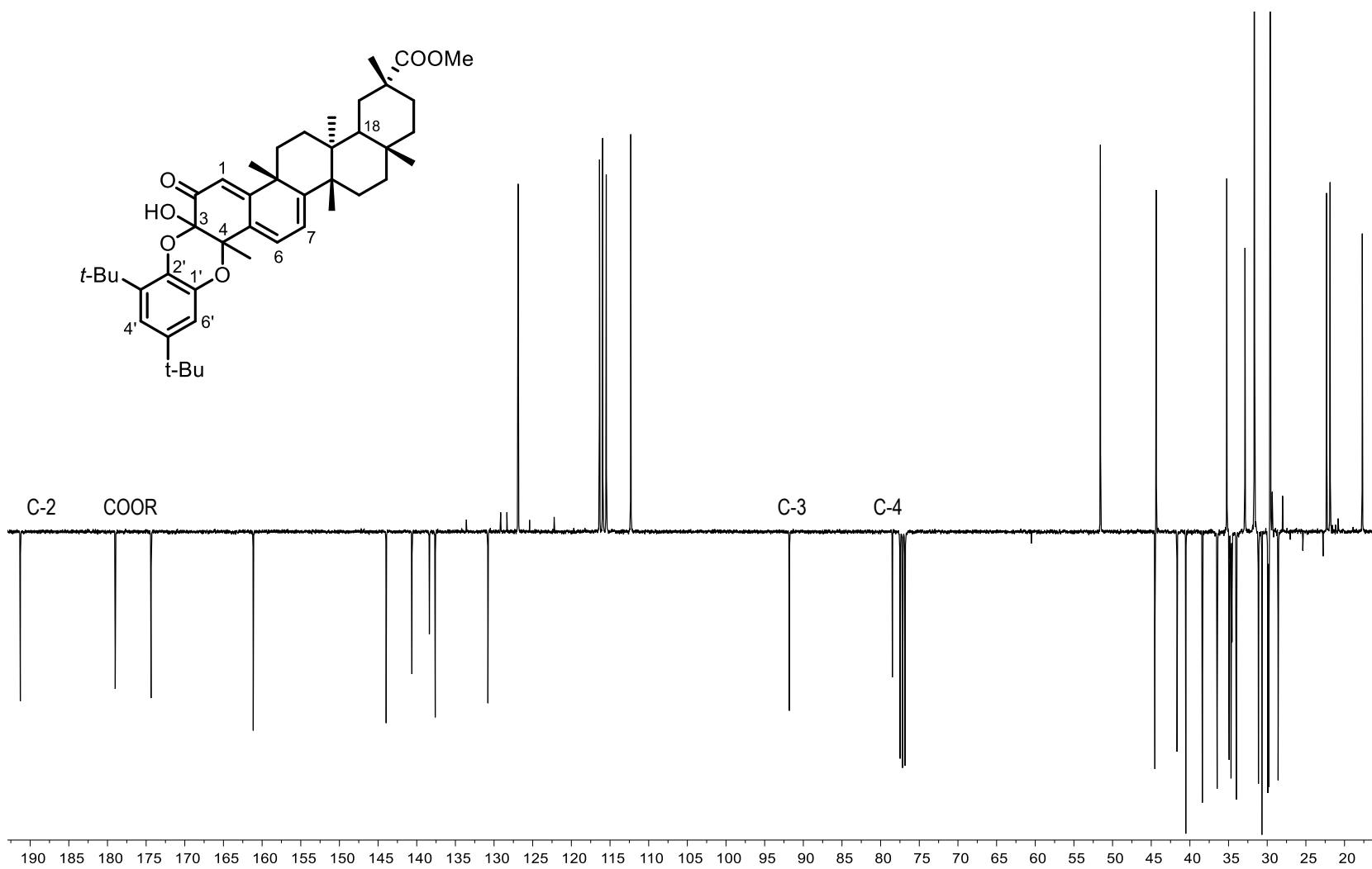
sugieren un sistema bicíclico en donde las cabezas de puente son carbonos cuaternarios oxigenados. El análisis del experimento HMBC partió del hecho de ubicar el grupo -OH en la posición 3, considerando la correlación con el grupo carbonilo C-2 ( $\delta_C$  191.28). La señal a  $\delta_C$  78.48, presentó interacciones con la señal del hidrógeno vinílico H-6 ( $\delta_H$  6.27), el protón del grupo 3-OH ( $\delta_H$  4.95), y los protones del grupo metilo en 23 ( $\delta_H$  1.52). Por otro lado, la señal con  $\delta_C$  91.81 presentó las mismas correlaciones con OH-3 y Me-23, sin embargo, la interacción con el protón vinílico correspondió con H-1 ( $\delta_H$  6.07). Con estos datos se confirmó las asignaciones de los  $\delta_C$  91.81 y 78.48 para los C-3 y C-4, respectivamente.

Por otra parte, para el componente benzoquinónico (Figura 25) la señal con  $\delta_H$  6.81 presentó interacciones con el grupo metino C-6' (112.31) y con el carbono aromático cuaternario C-2' (138.36); con respecto a la señal con  $\delta_H$  6.89 se observaron interacciones con el grupo metino C-4' ( $\delta_C$  115.95) y con dos carbonos aromáticos cuaternarios en C-2' ( $\delta_C$  138.36) y C-1' ( $\delta_C$  140.62), que confirma que las señales con  $\delta_H$  6.81 y 6.89 corresponden a las posiciones 4' y 6', respectivamente. La asignación para el anillo aromático se completó al observar la interacción entre la señal para un grupo *t*-Bu a  $\delta_H$  1.19 con el carbono aromático C-3' ( $\delta_C$  137.61) y la señal del grupo *t*-Bu a  $\delta_H$  1.28 con el carbono aromático C-5' ( $\delta_C$  143.95), confirmando la distribución meta para los grupos *t*-Bu. Un análisis detallado del espectro de HMBC indicó la presencia de una correlación a larga distancia  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  ( $^4J_{\text{CH}}$ ) entre Me-23 ( $\delta_H$  1.52) y C-1' ( $\delta_C$  140.62), lo cual sugiere una conectividad de tipo C(2')-O-C(3')-C(4')-O-C(1'). La asignación completa de las señales observadas por RMN- $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  se presentan en la Tabla 4.

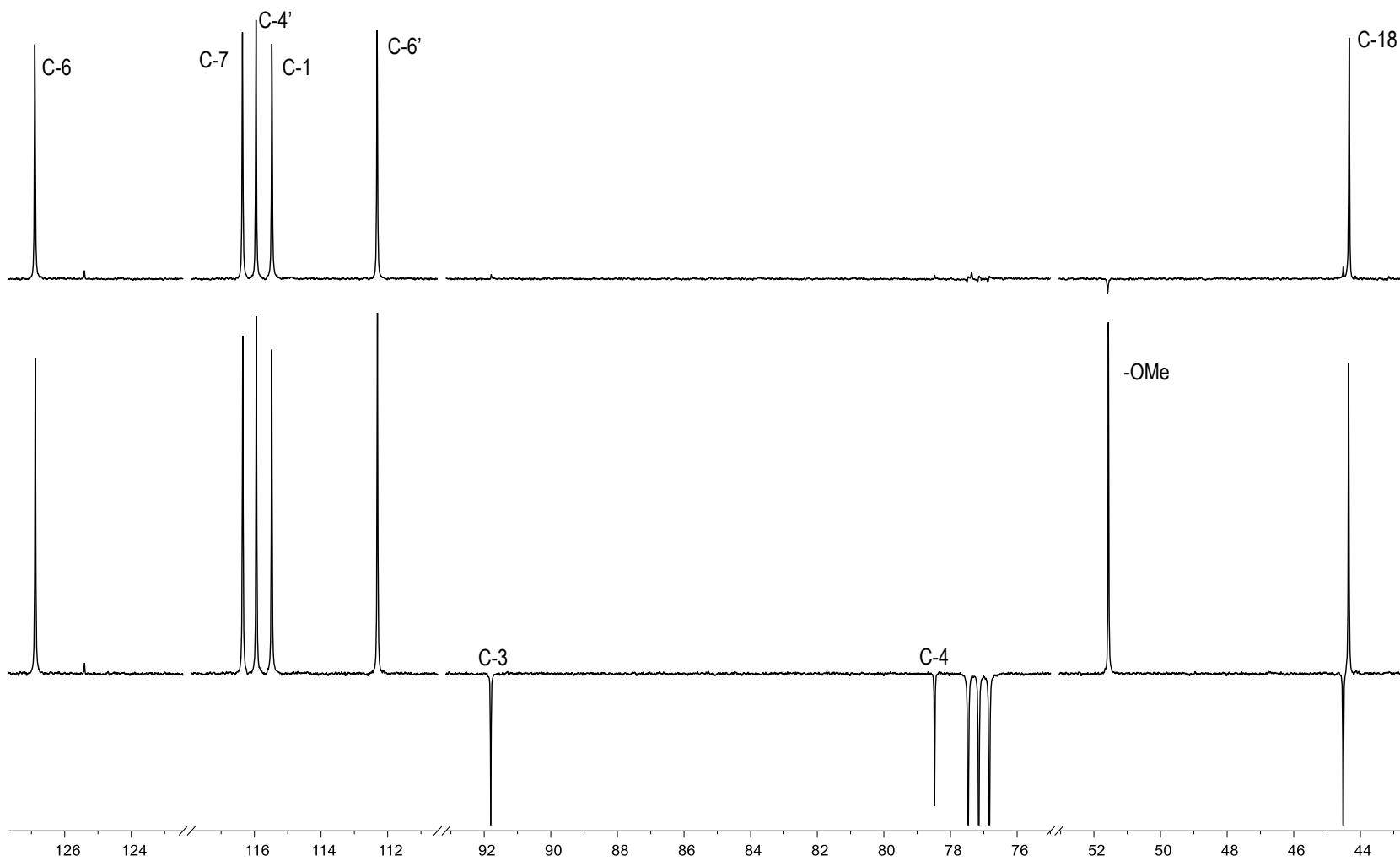


**Figura 20.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de **C1**.





**Figura 21.** Espectro de RMN-<sup>13</sup>C (APT, 100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de **C1**.



**Figura 22.** Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  (APT) y experimento DEPT-90 (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de **C1**.

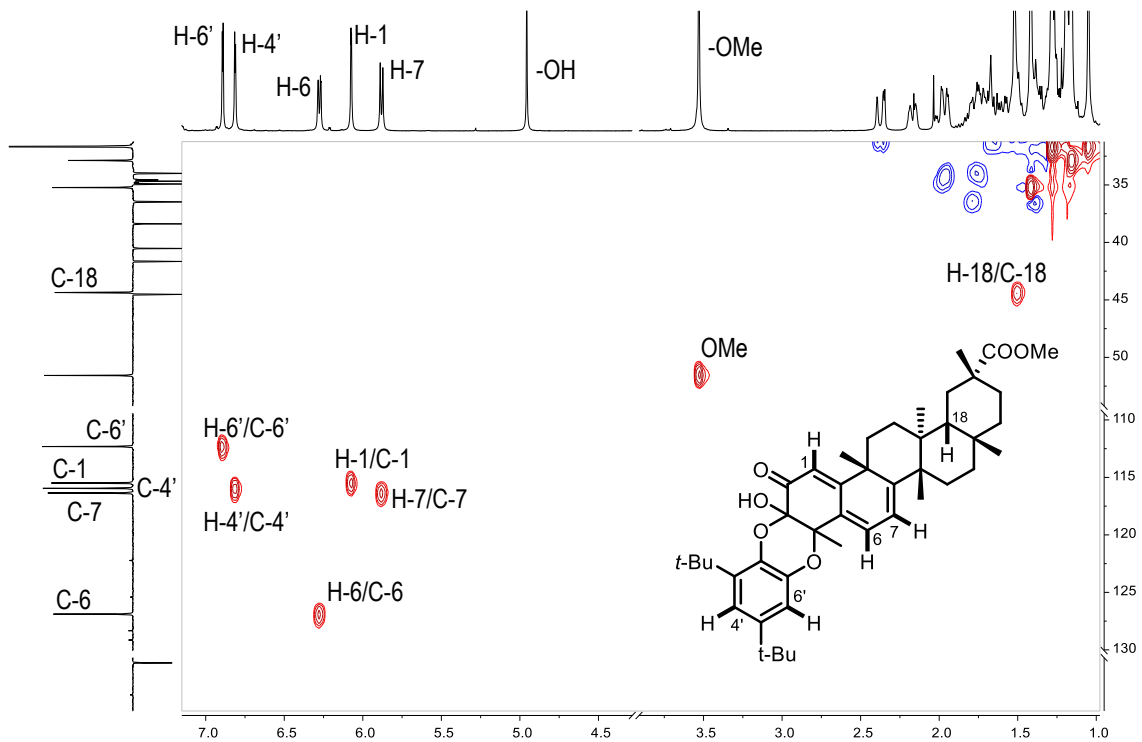


Figura 23. Experimento de correlación heteronuclear HSQC de C1.

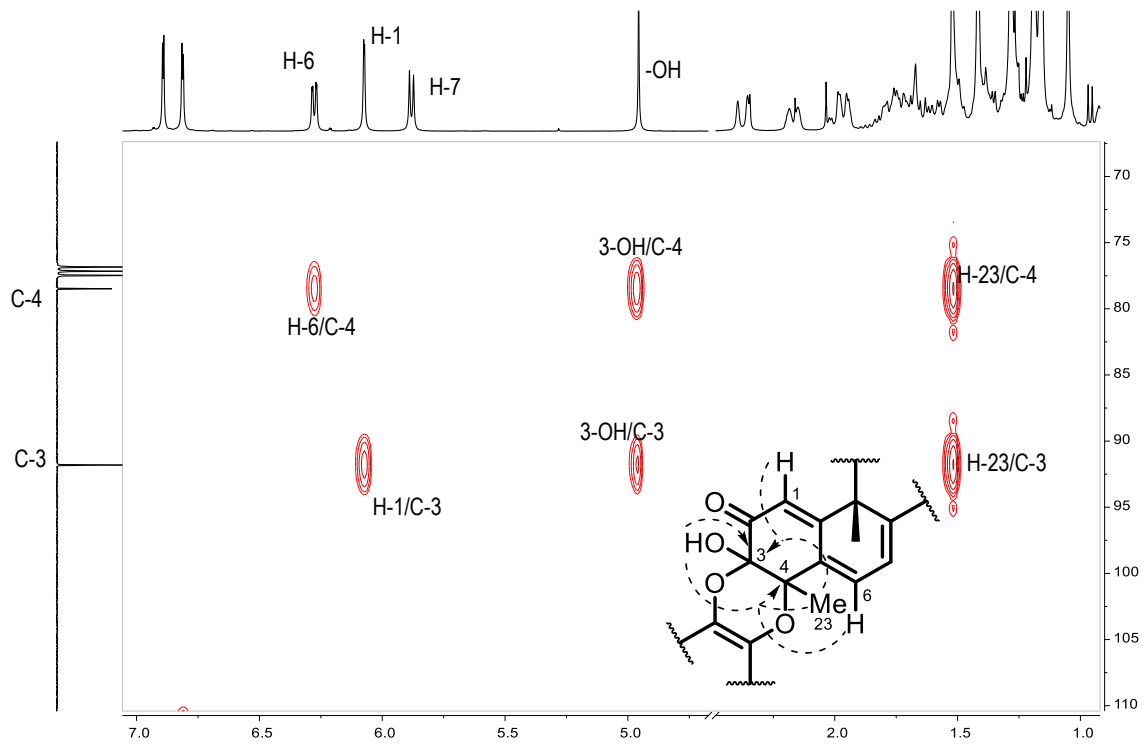
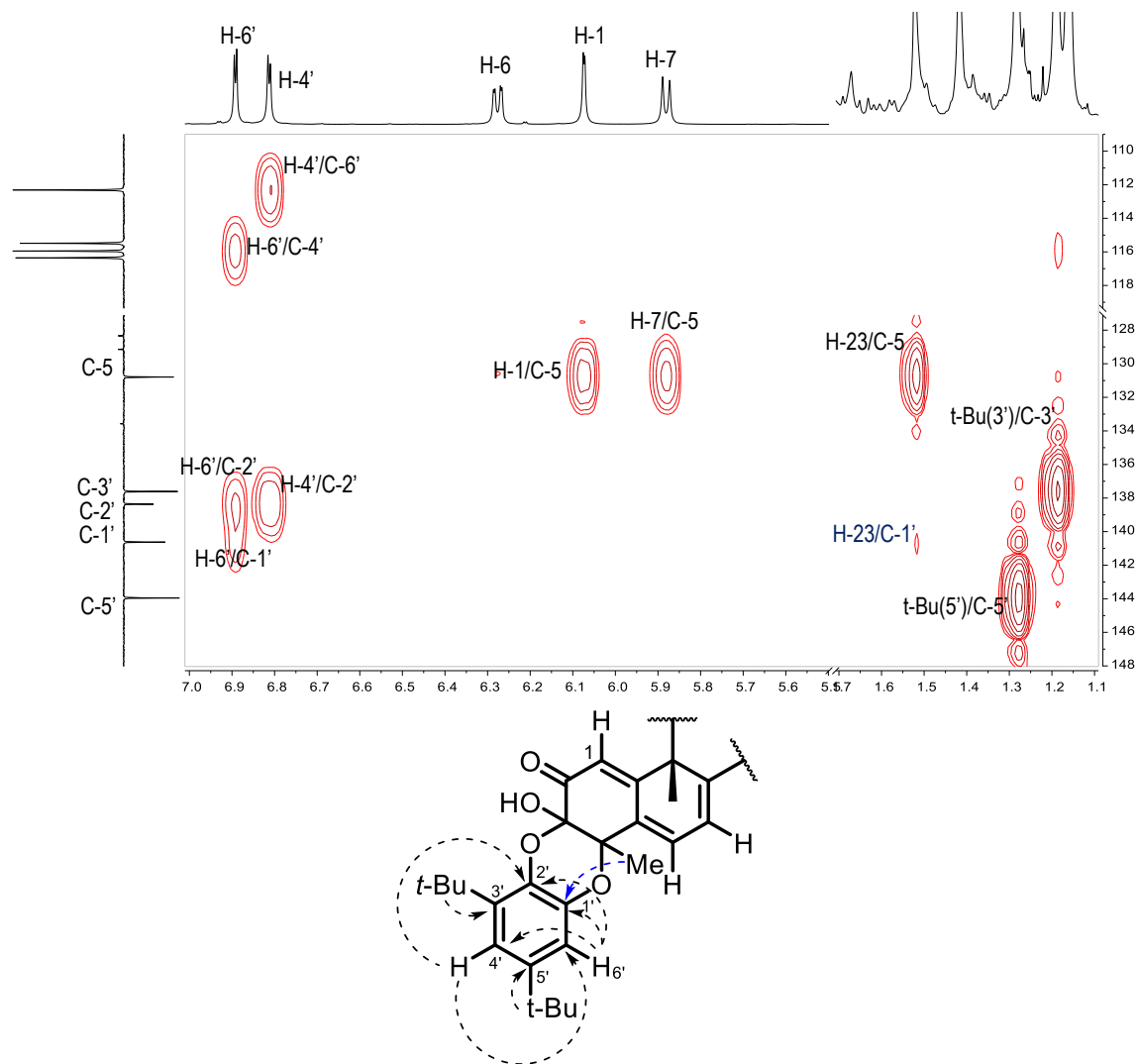
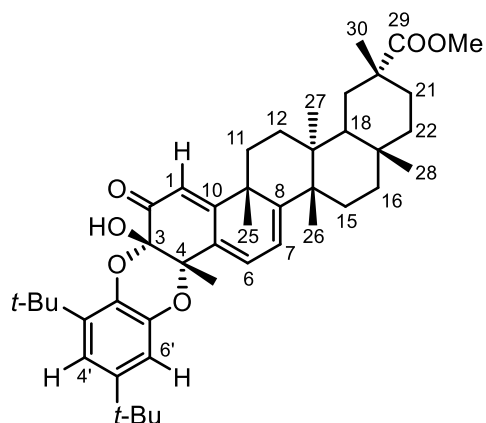


Figura 24. Experimento HMBC (H  $\cdots$  C) para el fragmento 3,4-dioxina de C1.



**Figura 25.** Experimento HMBC (H $\rightarrow$ C) para la unidad quinoide y aromática de **C1**.

Datos espectroscópicos de benzodioxinopristimerina (**C1**)



**Tabla 4.** Desplazamientos químicos ( $\delta$ ) del heterodímero **C1** ( $^1\text{H}$  400 MHz,  $^{13}\text{C}$  100 MHz en  $\text{CDCl}_3$ ).

Posición	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{b}}$	HMBC <sup>c</sup>
1	6.07 d (1.47)	115.49 d	
2	-	191.28 s	3-OH
3	-	91.81 s	1, 3-OH, 23
4	-	78.48 s	6, 3-OH, 23
5	-	130.79	1, 6, 7, 23
6	6.27 dd (6.97, 1.47)	126.89 d	7
7	5.88 d (6.97)	116.36 d	
8	-	161.15 s	6, 25, 26
9	-	41.66 s	1, 7, 25
10	-	174.36 s	6, 25
11	1.88, 1.93	34.00 t	25
12	1.65, 1.76	29.80 t	27
13	-	38.39 s	27
14	-	44.52 s	7, 26, 27
15	1.43, 1.50	28.59 t	26
16	1.44, 1.81	36.47 t	28
17	-	30.68 s	19, 28
18	1.50 m	44.36 d	27, 28
19	1.68, 2.39	31.13 t	18, 30
20	-	40.53 s	18, 30
21	1.6, 2.17	29.91 t	30
22	0.93, 2.04	34.68 t	18, 28
23	1.52 s	21.86 c	
25	1.41 s	35.23 c	11
26	1.17 s	22.31 c	15
27	0.45 s	17.70 c	18
28	1.05 s	31.63 c	18

**Tabla 4.** Continuación.

Posición	$\delta_H^a$	$\delta_C^b$	HMBC <sup>c</sup>
29	-	179.00 s	19, 30, 29-OCH <sub>3</sub>
30	1.16 s	32.87 c	19
COOCH <sub>3</sub>	3.52 s	51.57 c	
OH	4.95 s	-	
1'	-	140.62 s	6', 23
2'	-	138.36 s	4', 6'
3'	-	137.61 s	3'-t-Bu
4'	6.81 d (2.2)	115.95 d	6'
5'	-	143.95 s	5'-t-Bu
6'	6.89 d (2.2)	112.31 d	4'
C-t-Bu (3')	-	34.92 s	3'-t-Bu
t-Bu (3')	1.19 s	29.61 c	
C-t-Bu (5')	-	34.55 s	4', 6', 5'-t-Bu
t-Bu (5')	1.28 s	31.67 c	

<sup>a</sup> Las multiplicidades fueron corroboradas con experimentos COSY, las constantes de acoplamiento (en Hz) se indican entre paréntesis.

<sup>b</sup> Las multiplicidades de las señales de RMN-<sup>13</sup>C, se determinaron a través de experimentos DEPT, s = C, d = CH, t = CH<sub>2</sub>, c = CH<sub>3</sub>.

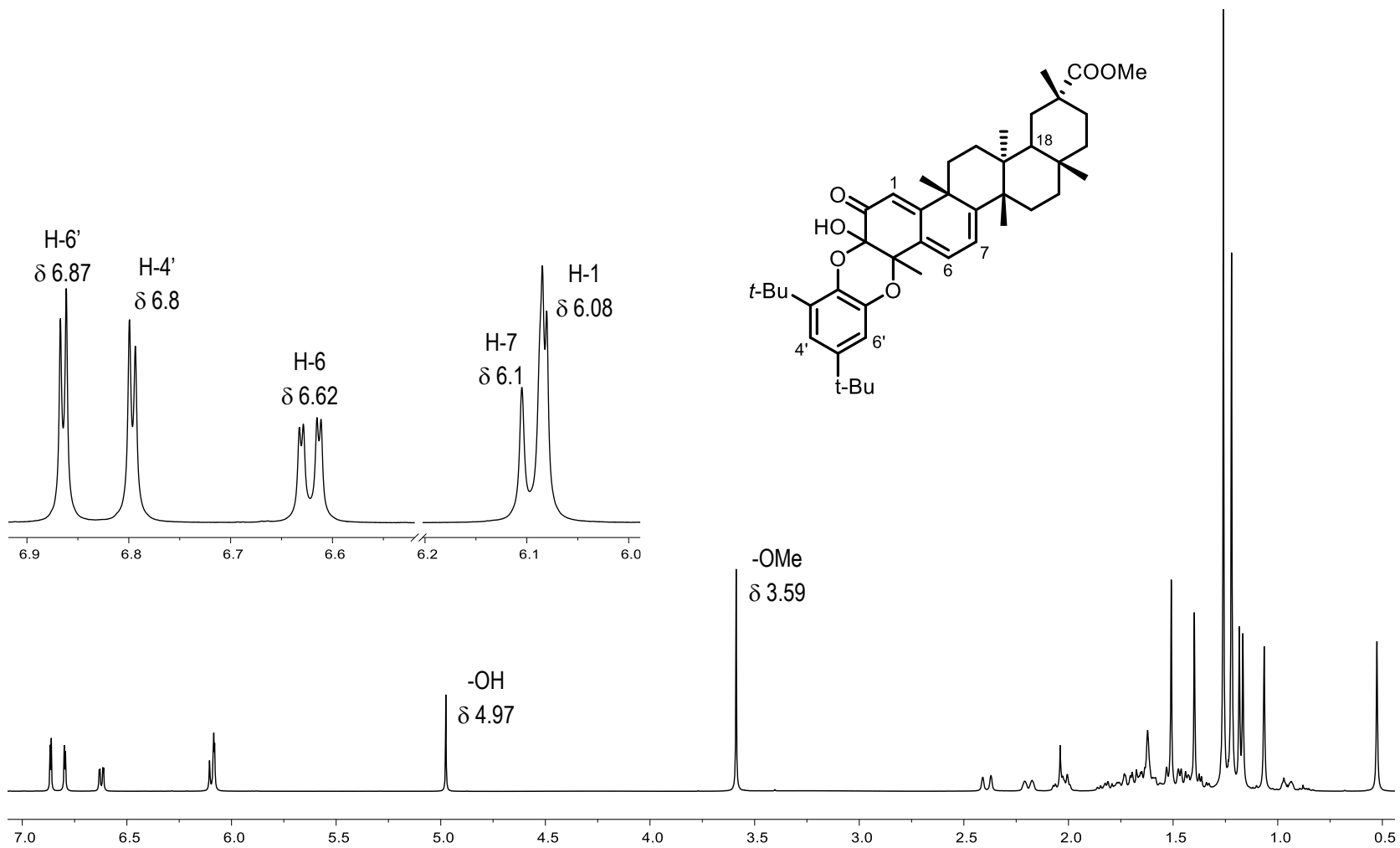
<sup>c</sup> Protones que correlacionan a larga distancia con el carbono indicado.

## Compuesto 2 (C2)

El espectro de RMN-<sup>1</sup>H (Figura 26), presentó un perfil similar en los desplazamientos observado para **C1**. Se identificaron las señales correspondientes para el sistema metilenquinónico de la pristimerina con  $\delta_{\text{H}}$  6.62 (1H, *dd*,  $J = 6.97, 1.47$  Hz, H-6), 6.1 (H-7) y 6.08 (H-1); se observó que las señales dobles correspondientes a los protones H-7 y H-1 presentaron solapamiento; además de la presencia de las señales a  $\delta_{\text{H}}$  4.97 (1H, *s*) y 3.59 (1H, *s*) correspondientes al grupo -OH y -OMe, respectivamente. Así mismo, se identificaron las señales  $\delta_{\text{H}}$  6.86 *dd* y 6.79 *dd*, con  $J = 2.3$  Hz, correspondientes a los protones del anillo aromático H-6' y H-4', respectivamente.

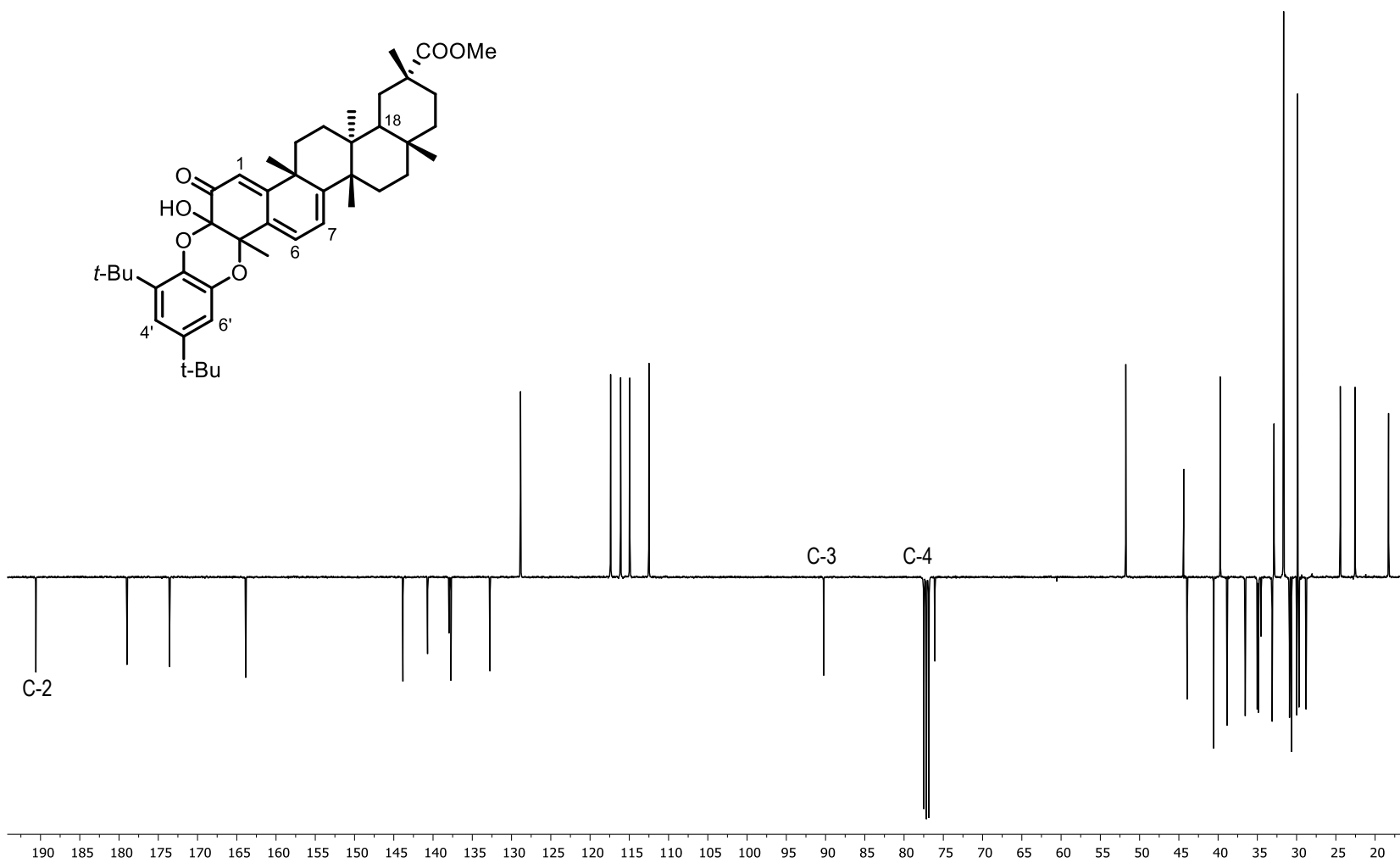
La inspección de los datos de RMN-<sup>13</sup>C (APT y DEPT-90) sugiere que este compuesto es estructuralmente similar a **C1**, Figura 27. Destacan las señales de los carbonos *sp*<sup>3</sup> unidos a oxígenos (puente di-éter del anillo A de la pristimerina y la benzoquinona) con  $\delta_{\text{C}}$  90.24 (C-3) y 76.08 (C-4); mientras que para **C1** ambas se señales aparecieron más desplazadas ( $\delta_{\text{C}}$  91.81, C-3) y ( $\delta_{\text{C}}$  78.48, C-4). El experimento HSQC (Figura 29), permitió correlacionar los seis grupos metinos observados en el DEPT-90 (Figura 28); las del anillo aromático con C-6' ( $\delta_{\text{C}}$  112.5,  $\delta_{\text{H-6'}}$  6.86) y C-4' ( $\delta_{\text{C}}$  116.1,  $\delta_{\text{H-4'}}$  6.79), mientras que al sistema conjugado del componente terpénico le corresponden los metinos C-6 ( $\delta_{\text{C}}$  128.85,  $\delta_{\text{H-6}}$  6.62), C-1 ( $\delta_{\text{C}}$  114.95,  $\delta_{\text{H-1}}$  6.08) y C-7 ( $\delta_{\text{C}}$  117.38,  $\delta_{\text{H-7}}$  6.1) y C-18 ( $\delta_{\text{C}}$  44.38,  $\delta_{\text{H-18}}$  1.52). Por último, en la región comprendida entre 0.5-1.52 ppm fue posible correlacionar las señales propias de los seis metilos angulares del esqueleto friedoleano.

El producto de cicloadición de se confirmó mediante el experimento HMBC (Figura 30), observando las correlaciones de  $\delta_{\text{C}}$  90.24 (C-3) con OH-3 ( $\delta_{\text{H}}$  4.98), Me-23 ( $\delta_{\text{H}}$  1.51) y H-1 ( $\delta_{\text{H}}$  6.08); mientras que  $\delta_{\text{C}}$  76.08 (C-4) presentó correlaciones con H-6 ( $\delta_{\text{H}}$  6.62) 3-OH ( $\delta_{\text{H}}$  4.98), Me-23 ( $\delta_{\text{H}}$  1.51). En cuanto al componente aromático (Figura 31) la señal con  $\delta_{\text{H}}$  6.79 presentó interacciones con el grupo metino C-6' ( $\delta_{\text{C}}$  112.5) y con el carbono aromático C-2' ( $\delta_{\text{C}}$  137.97); mientras que la señal con  $\delta_{\text{H}}$  6.86 se observaron interacciones con el grupo metino C-4' ( $\delta_{\text{C}}$  116.1) y con los carbonos aromáticos C-2' ( $\delta_{\text{C}}$  137.97) y C-1' ( $\delta_{\text{C}}$  140.7), que confirma que las señales con  $\delta_{\text{H}}$  6.81 y 6.89 corresponden a las posiciones 4' y 6', respectivamente. Un análisis detallado del espectro de HMBC de **C2** indicó la presencia de una correlación la larga distancia <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C (<sup>4</sup>*J*<sub>CH</sub>) entre Me-23 ( $\delta_{\text{H}}$  1.51) y C-1' ( $\delta_{\text{C}}$  140.7), lo cual sugiere una conectividad de tipo C(2')-O-C(3')-C(4')-O-C(1'). La asignación completa de las señales observadas por RMN-<sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C se presentan en la Tabla 5.

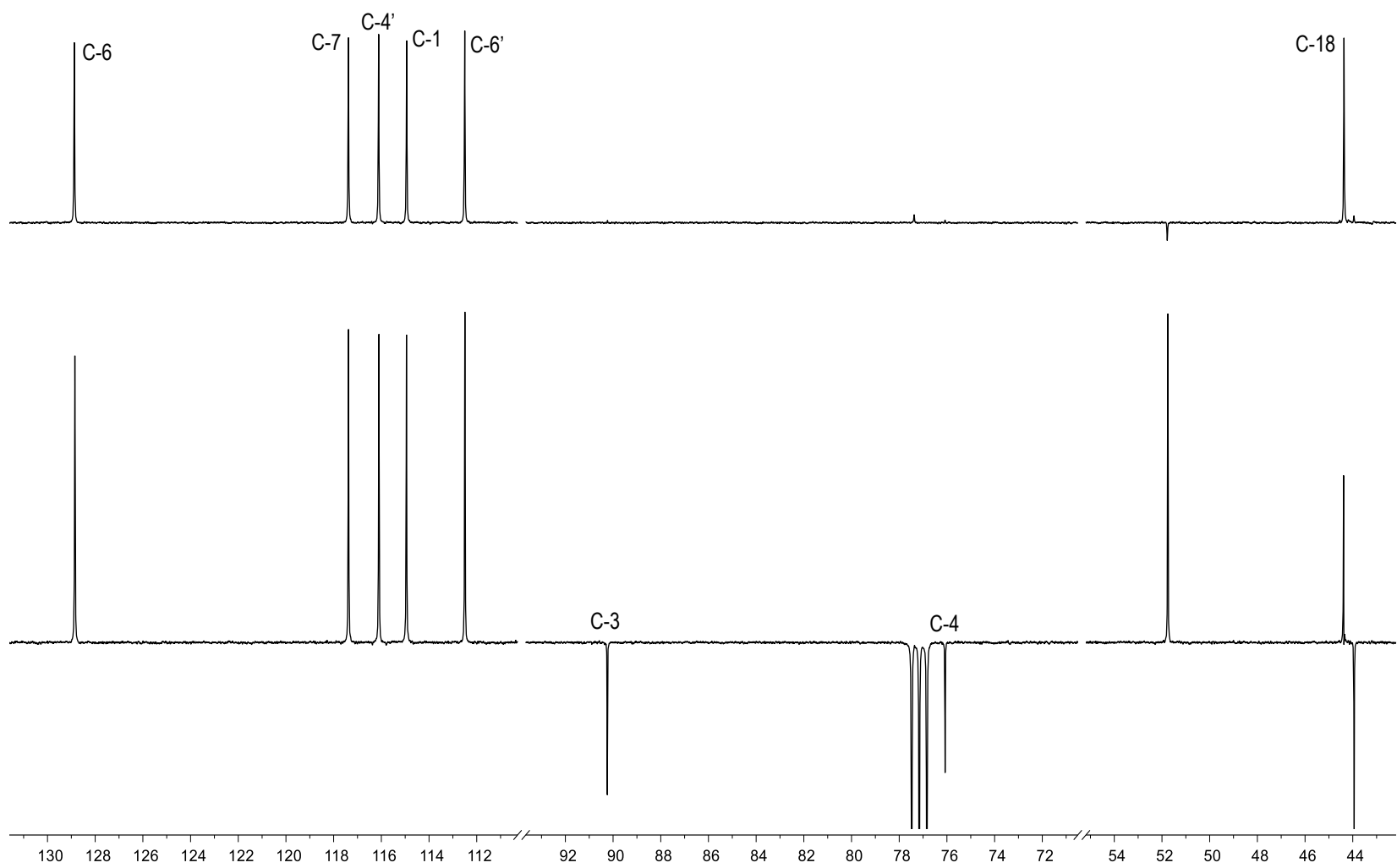


**Figura 26.** Espectro de RMN- $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de **C2**.

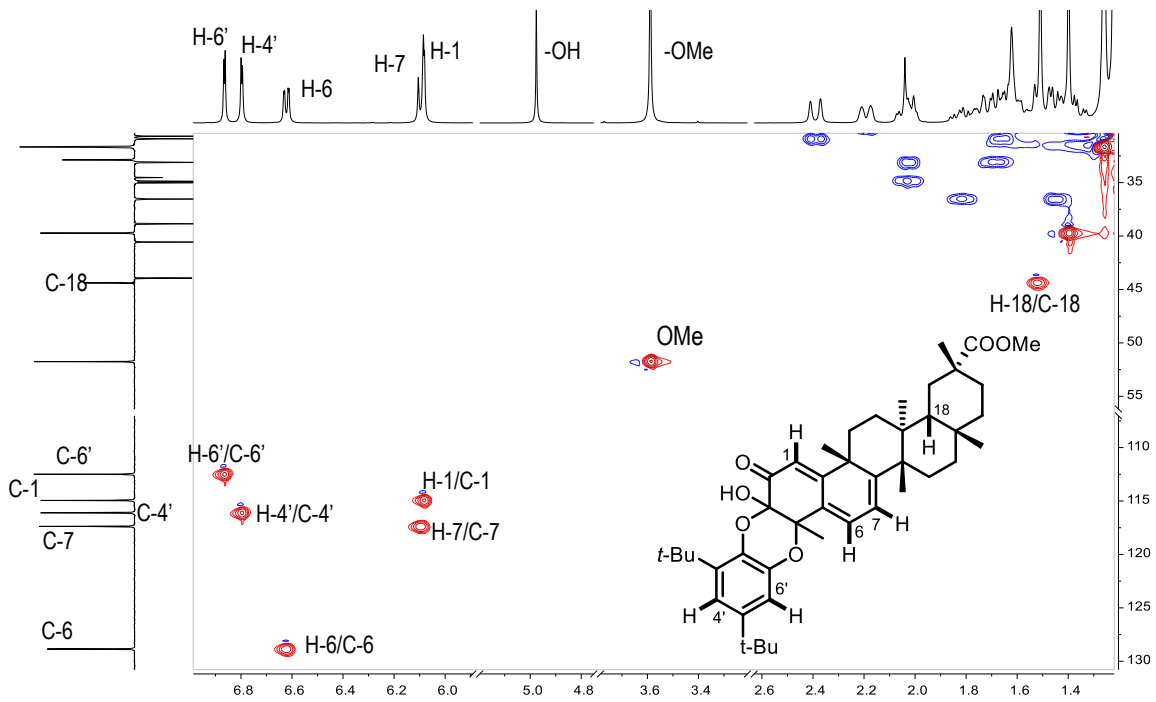




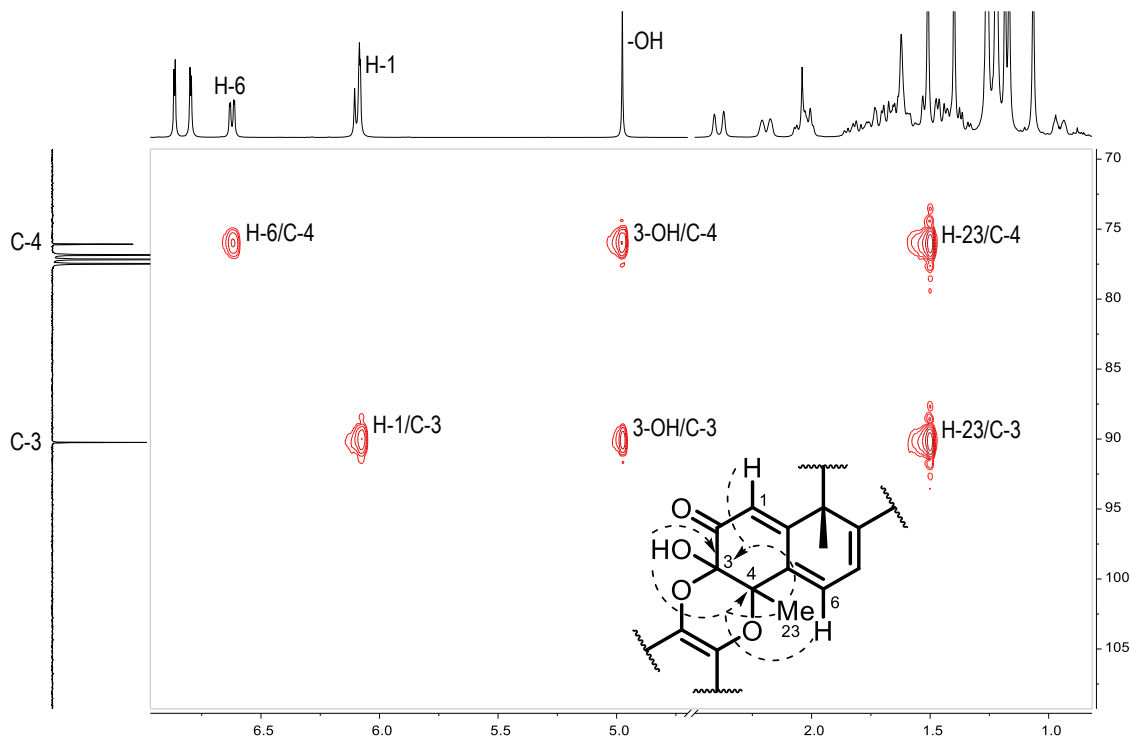
**Figura 27.** Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  (APT, 100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de **C2**



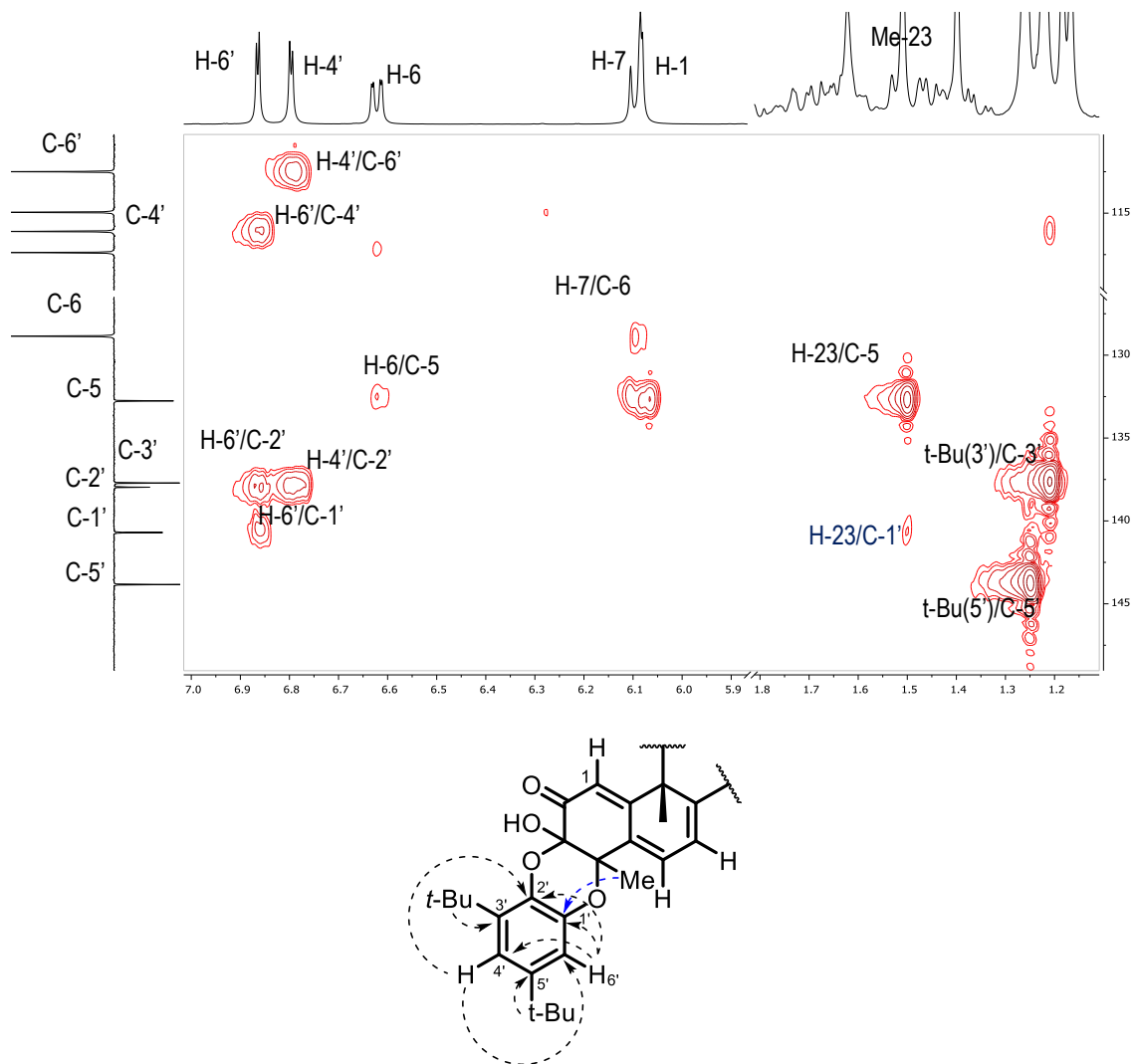
**Figura 28.** Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  (APT) y experimento DEPT-90 (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de **C2**.



**Figura 29.** Experimento de correlación heteronuclear HSQC de C2.

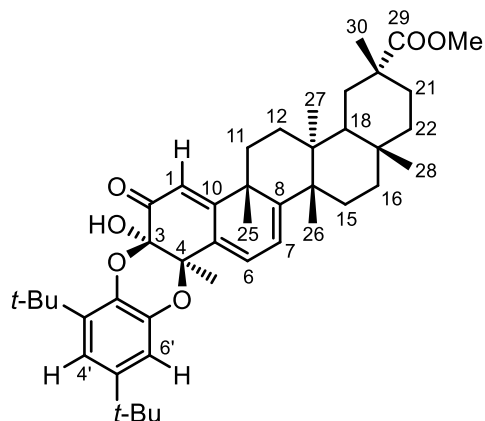


**Figura 30.** Experimento HMBC (H $\cdots$ ► C) para el fragmento 3,4-dioxina de C2.



**Figura 31.** Experimento HMBC (H $\rightarrow$ C) para la unidad quinoide y aromática de **C2**.

Datos espectroscópicos de benzodioxinopristimerina (**C2**)



**Tabla 5.** Desplazamientos químicos ( $\delta$ ) del heterodímero **C2** ( $^1\text{H}$  400 MHz,  $^{13}\text{C}$  100 MHz en  $\text{CDCl}_3$ ).

Posición	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{b}}$	HMBC <sup>c</sup>
1	6.08 d (1.47)	114.95 d	
2	–	190.59 s	3-OH
3	–	90.24s	1, 3-OH, 23
4	–	76.08 s	6, 3-OH, 23
5	–	132.76 s	1, 7, 23
6	6.62 dd (6.97, 1.47)	128.85 d	7
7	6.1 da (6.97)	117.38 d	
8	–	163.85 s	6, 25, 26
9	–	43.94 s	1, 7, 25
10	–	173.56 s	6, 25
11	1.88, 1.93	33.11 t	25
12	1.65, 1.76	29.70t	27
13	–	38.86 s	27
14	–	44.35 s	7, 26, 27
15	1.43, 1.50	28.79 t	26
16	1.44, 1.81	36.54 t	28
17	–	30.66 s	19, 28
18	1.52 m	44.38 d	26, 27, 28
19	1.68, 2.39	30.90 t	18, 30
20	–	40.56 s	18, 30
21	1.36, 2.17	29.98 t	30
22	0.93, 2.04	34.88 t	28
23	1.51 s	24.43 c	
25	1.40 s	39.73 c	
26	1.18 s	22.55 c	

**Tabla 5.** Continuación.

Posición	$\delta^a_{\text{H}}$	$\delta^b_{\text{C}}$	HMBC <sup>c</sup>
27	0.52 s	18.29 c	18
28	1.06 s	31.69 c	
29	-	178.99 s	19, 30, 29-OCH <sub>3</sub>
30	1.17 s	32.87 c	19
COOCH <sub>3</sub>	3.59 s	51.76 c	
OH	4.97 s	-	
1'	-	140.70 s	6', 23
2'	-	137.97 s	4', 6'
3'	-	137.71 s	3'-t-Bu
4'	6.80 d (2.2)	116.10 d	6'
5'	-	143.84 s	5'-t-Bu
6'	6.87 d (2.2)	112.50 d	4'
<u>C</u> -t-Bu (3')	-	35.01 s	3'-t-Bu
t-Bu (3')	1.22 s	29.88 c	
<u>C</u> -t-Bu (5')	-	34.53 s	5'-t-Bu
t-Bu (5')	1.26	31.65 c	

<sup>a</sup> Las multiplicidades fueron corroboradas con experimentos COSY, las constantes de acoplamiento (en Hz) se indican entre paréntesis.

<sup>b</sup> Las multiplicidades de las señales de RMN-<sup>13</sup>C, se determinaron a través de experimentos DEPT, s = C, d = CH, t = CH<sub>2</sub>, c = CH<sub>3</sub>.

<sup>c</sup> Protones mostrando correlaciones a larga distancia con el carbono indicado.

### Compuesto 3 (C3)

El espectro de RMN-<sup>1</sup>H (Figura 32), se observó la presencia de dos señales dobles con  $\delta_H$  6.94 y 6.69, con un valor de  $J = 2.3$  Hz, el cual corresponde a un acoplamiento de tipo *meta*; evidencia de la unión del componente benzoquinónico con la pristimerina. A su vez se observa un patrón modificado para el sistema conjugado de la pristimerina, se observa una señal con  $\delta_H$  6.36 (*dd*) el cual, de acuerdo con la multiplicidad que presenta, corresponde al H-6 de la unidad triterpénica, dado el acoplamiento vecinal con H-7 ( $J = 6.9$  Hz) y a larga distancia con H-1 ( $J = 1.5$  Hz). A  $\delta_H$  6.07 presenta una señal doble estrecho para H-1, en cuanto la señal a  $\delta_H$  5.91 corresponde a H-7. También, se presentan señales simples a  $\delta_H$  4.87 y 3.60, que corresponden al protón del grupo hidroxilo y al metoxilo, respectivamente. Se identificaron dos señales  $\delta_H$  con 1.24 y 1.50, los cuales pertenecen a los grupos t-Bu. Finalmente, es importante hacer notar la modificación en el  $\delta_H$  de la señal del -OH ( $\delta_H$  4.87) y Me-23 ( $\delta_H$  1.56), que en la pristimerina se observan a  $\delta_H$  6.97 y 2.21, respectivamente, lo que es indicio de una modificación en el anillo A de la pristimerina.

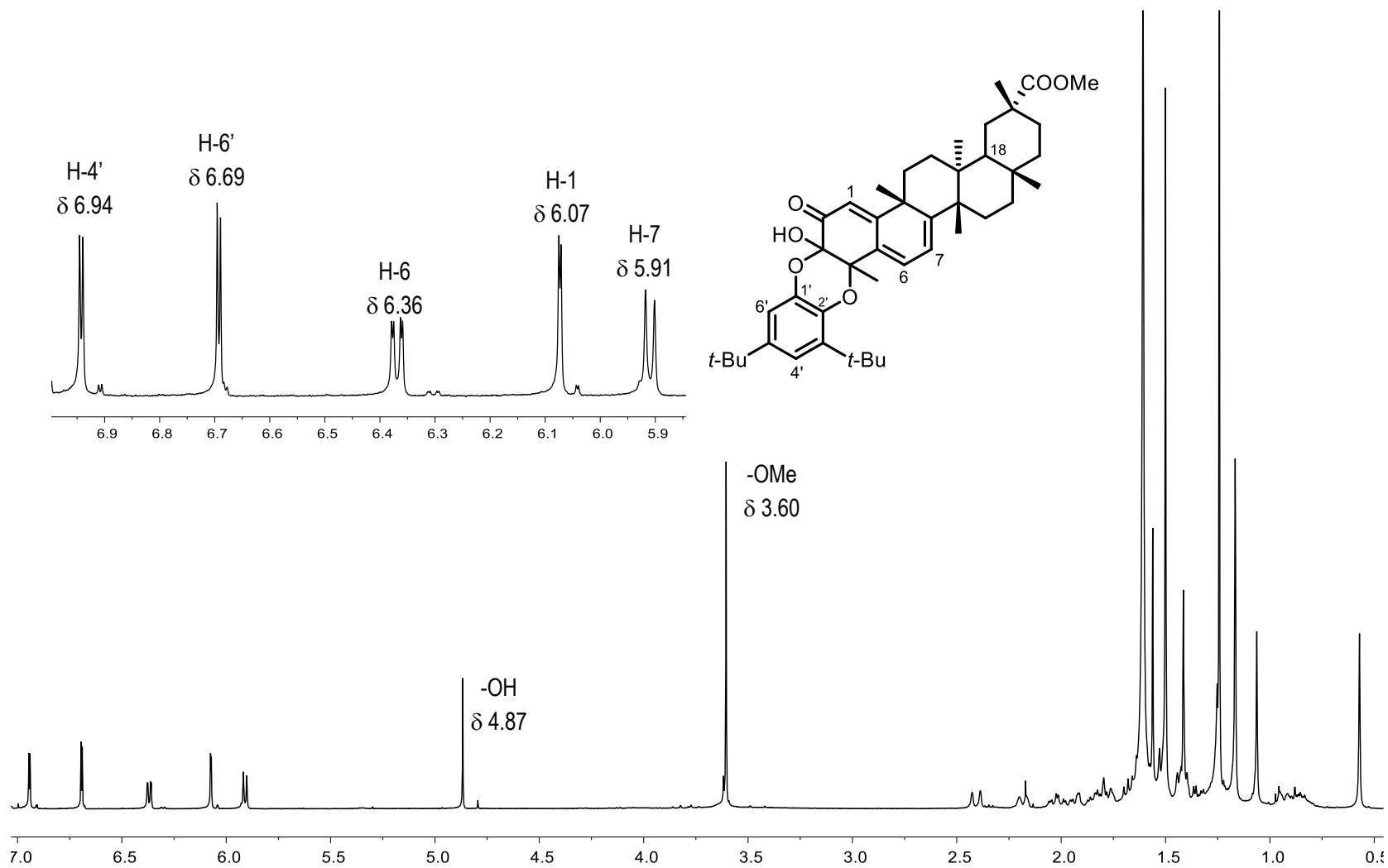
En el espectro de RMN-<sup>13</sup>C (APT), Figura 33, se observaron las señales características a un átomo de carbono  $sp^3$  unido a oxígenos con  $\delta_C$  91.57 y 80.05, confirmando la unión tipo éter entre la benzoquinona y la pristimerina. En donde la señal con  $\delta_C$  91.57 corresponde a la posición 3 del anillo A del fragmento triterpénico, debido a la unión del C-3 con dos oxígenos; por lo que la señal a  $\delta_C$  80.05 corresponde al C-4. En el experimento de DEPT-90 (Figura 34) se identificaron seis grupos metino, de los cuales cinco corresponden a carbonos  $sp^2$ , lo cual indica que la señal con  $\delta_C$  44.31 corresponde al protón en posición 18.

El experimento HSQC (Figura 35), permitió correlacionar los seis grupos metinos observados en el DEPT-90. De esta manera, las señales dobles del anillo aromático con  $\delta_H$  6.94 y 6.69, pertenecen a los metinos C-4' ( $\delta_C$  117.29) y C-6' ( $\delta_C$  113.38); al sistema conjugado del componente terpénico le corresponden los metinos C-6 ( $\delta_C$  126.20,  $\delta_{H-6}$  6.36), C-1 ( $\delta_C$  115.59,  $\delta_{H-1}$  6.07) y C-7 ( $\delta_C$  116.33,  $\delta_{H-7}$  5.91) y el desplazamiento de  $\delta_C$  44.31 se correlacionó con el  $\delta_H$  1.53 (H-18). Por último, en la región comprendida entre 0.5-1.52 ppm fue posible correlacionar las señales propias de los seis metilos angulares del esqueleto friedoleano.

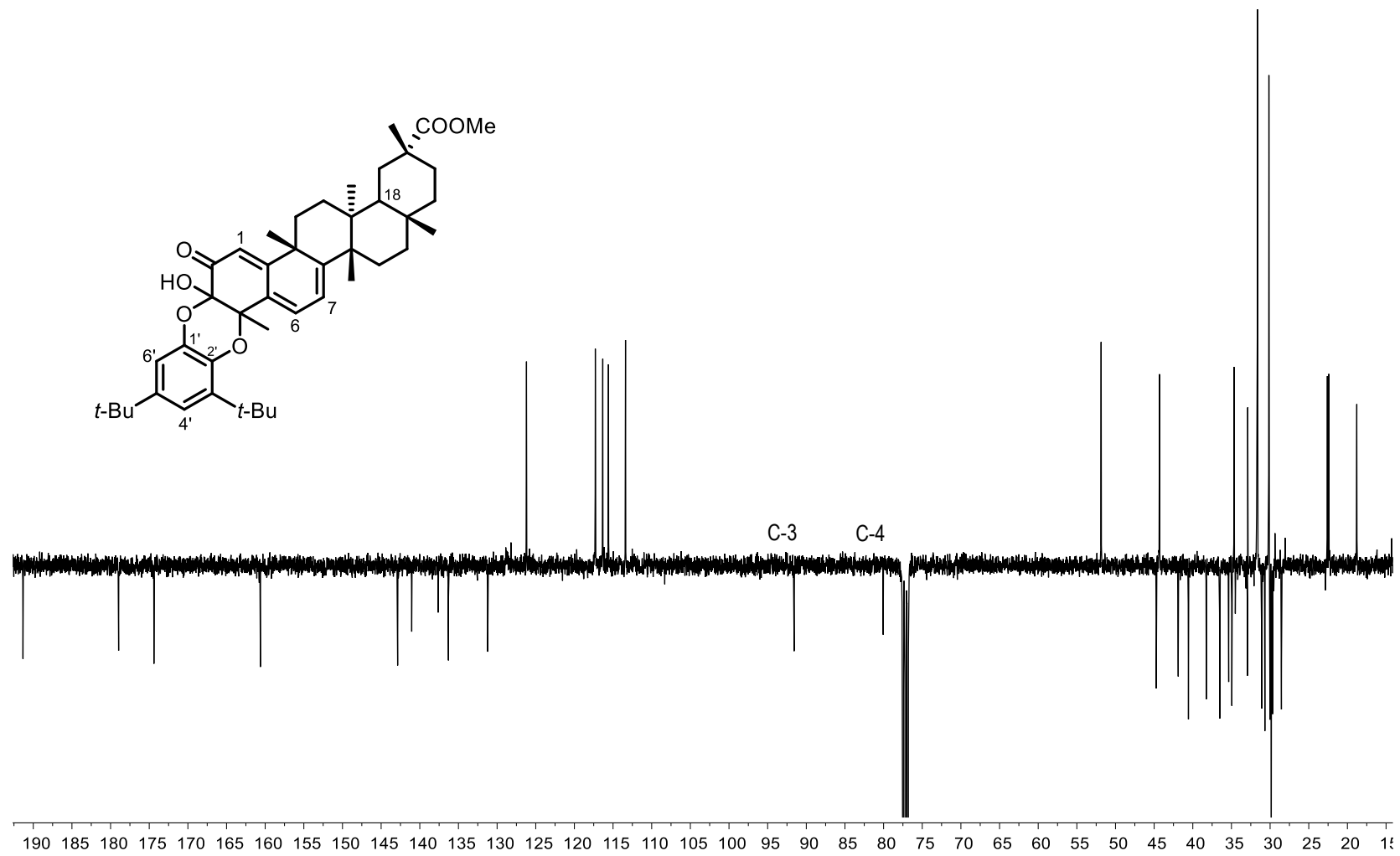
Las correlaciones heteronucleares a larga distancia, HMBC (Figura 36), confirman que el producto es un cicloaducto, al observar las correlaciones para las señales con  $\delta_C$  91.57 y 80.05, que sugieren un sistema bicíclico en donde las cabezas de puente son carbonos cuaternarios oxigenados. La señal a  $\delta_C$  80.05, presentó interacciones con la señal del hidrógeno vinílico H-6 ( $\delta_H$  6.36), el protón del grupo 3-OH ( $\delta_H$  4.87), y los protones del grupo metilo en 23 ( $\delta_H$  1.56). Por otro lado, la señal con  $\delta_C$  91.57 presentó las mismas correlaciones con 3-OH y Me-23, sin embargo, la interacción con el protón vinílico correspondió con H-1 ( $\delta_H$  6.07). Con estos datos se confirmó la asignación de los  $\delta_C$  91.57 y 80.05 para los C-3 y C-4, respectivamente.

Para la unidad aromática (Figura 37) la señal con  $\delta_H$  6.94 presentó interacciones con el grupo metino C-6' ( $\delta_C$  126.20) y con el carbono aromático cuaternario C-2' ( $\delta_C$  137.62); con respecto a la señal con  $\delta_H$  6.69 se observaron interacciones con el grupo metino C-4' ( $\delta_C$  117.29) y con dos carbonos aromáticos cuaternarios en C-2' ( $\delta_C$  137.62) y C-1' ( $\delta_C$  141.04), que confirma que las señales con  $\delta_H$  6.94 y 6.69 corresponden a las posiciones 4' y 6', respectivamente. La asignación para el anillo aromático se completó al observar la interacción entre la señal para un grupo *t*-Bu a  $\delta_H$  1.50 con el carbono aromático C-3' ( $\delta_C$  136.30) y la señal del grupo *t*-Bu a  $\delta_H$  1.24 con el carbono aromático C-5' ( $\delta_C$  142.86), confirmando la distribución *meta* para los grupos *t*-Bu. Un análisis detallado del espectro de HMBC de **C3** indicó la presencia de una correlación a larga distancia  $^1H$ - $^{13}C$  ( $^4J_{CH}$ ) entre Me-23 ( $\delta_H$  1.56) y C-2' ( $\delta_C$  137.62), lo cual sugiere una conectividad de tipo C(1')-O-C(3)-C(4)-O-C(2'). La asignación completa de las señales observadas por RMN- $^1H$  y  $^{13}C$  se presentan en la Tabla 6.

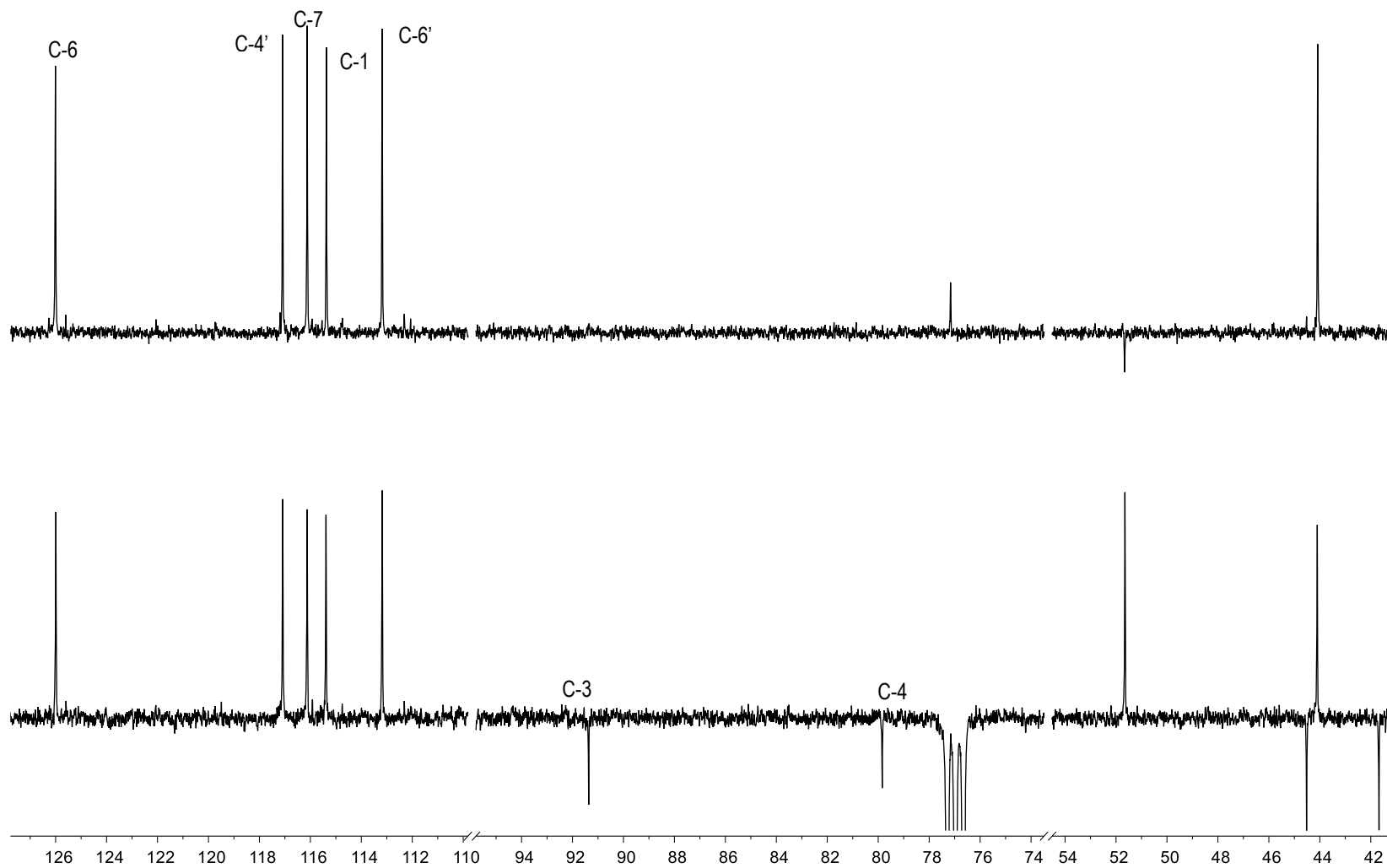




**Figura 32.** Espectro de RMN- $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de **C3**.



**Figura 33.** Espectro de RMN-<sup>13</sup>C (APT, 100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de **C3**.



**Figura 34.** Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  (APT) y experimento DEPT-90 (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de **C3**.

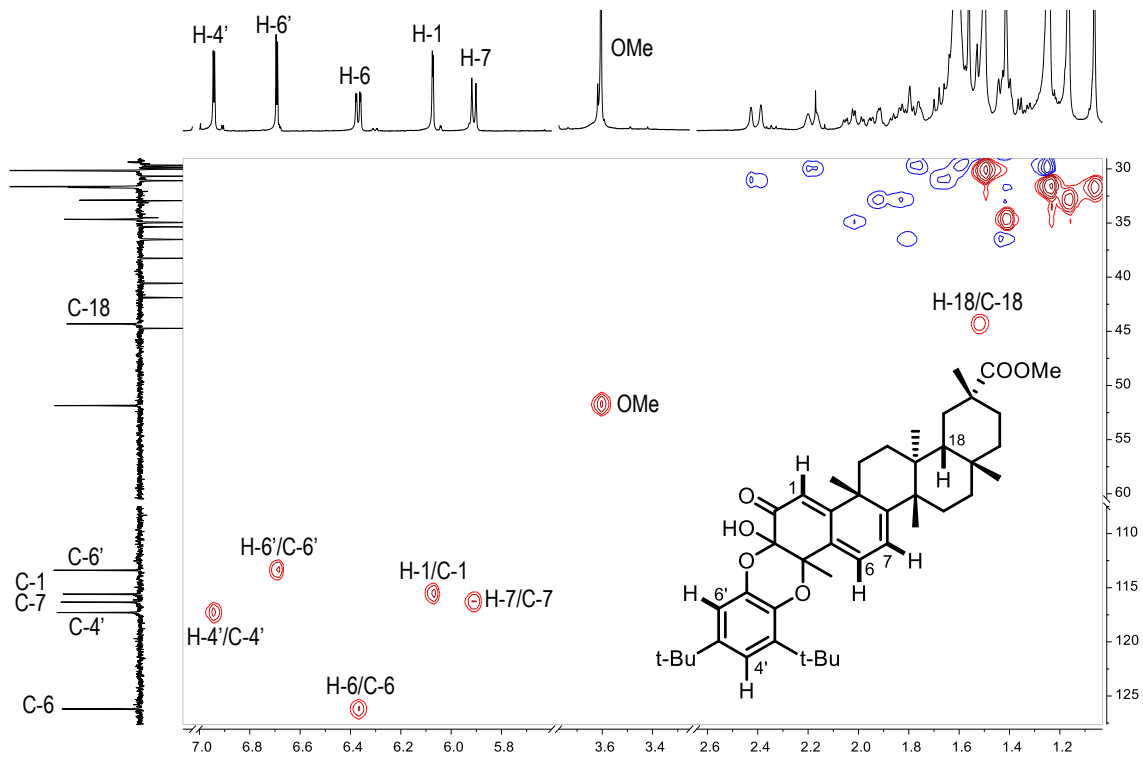


Figura 35. Experimento de correlación heteronuclear HSQC de **C3**.

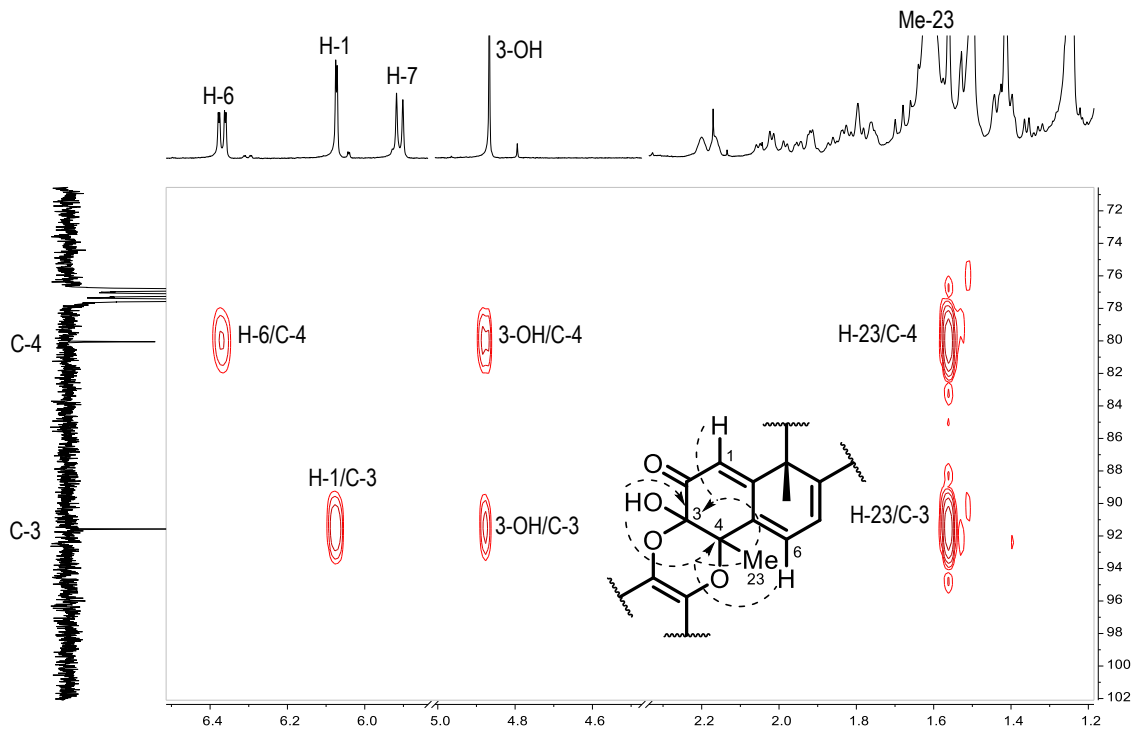
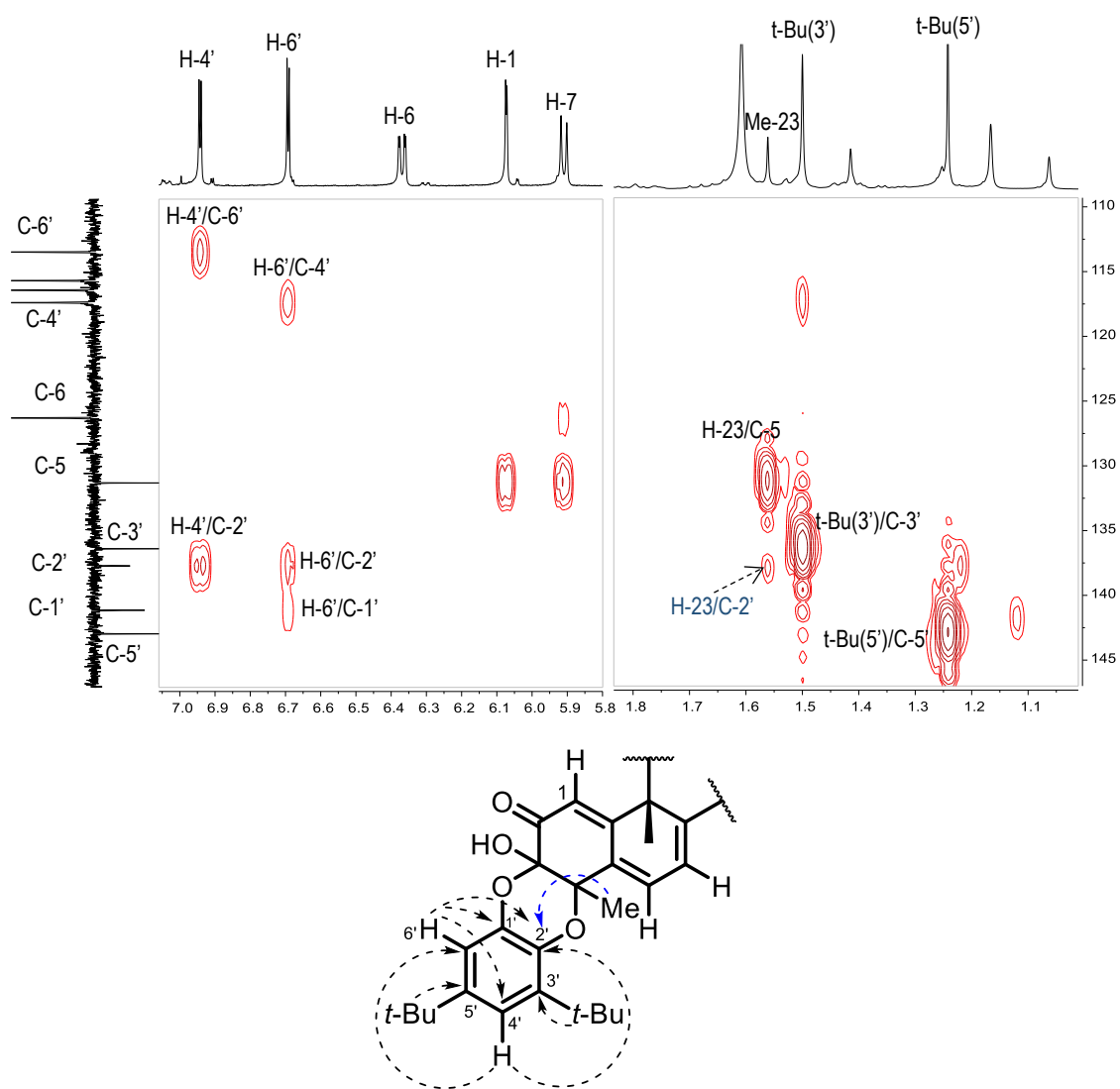
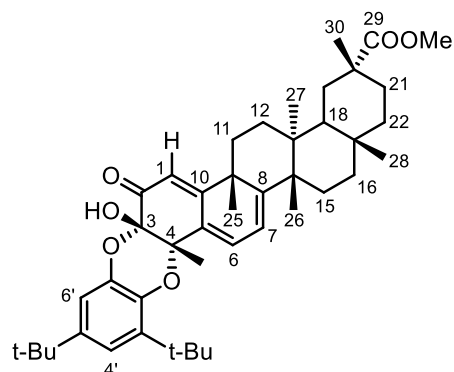


Figura 36. Experimento HMBC (H $\cdots$ C) para el fragmento 3,4-dioxina de **C3**.



**Figura 37.** Experimento HMBC (H<sup>1</sup>→C<sup>13</sup>) para la unidad quinoide y aromática de **C3**.

Datos espectroscópicos de benzodioxinopristimerina (**C3**)



**Tabla 6.** Desplazamientos químicos del heterodímero **C3** ( $^1\text{H}$  400 MHz,  $^{13}\text{C}$  100 MHz en  $\text{CDCl}_3$ ).

Posición	$\delta^{\text{a}}_{\text{H}}$	$\delta^{\text{b}}_{\text{C}}$	HMBC <sup>c</sup>
1	6.07 d (1.7)	115.59 d	
2	–	191.33 s	3-OH
3	–	91.57 s	1, 3-OH, 23
4	–	80.05 s	6, 3-OH, 23
5	–	131.22 s	1, 6, 7
6	6.36 dd (6.9, 1.7)	126.20 d	7
7	5.91 d (6.9)	116.33 d	
8	–	160.62 s	6, 25, 26
9	–	41.88 s	1, 7, 25
10	–	174.39 s	6, 25
11	1.88, 1.93	31.09 t	25
12	1.65, 1.76	29.67 t	27
13	–	38.25 s	27
14	–	44.77 s	7, 26, 27
15	1.43, 1.50	28.54 t	26
16	1.44, 1.81	36.51 t	28
17	–	30.01 s	19, 28
18	1.53 m	44.31 d	16, 27, 28
19	1.68, 2.41	30.68 t	18, 30
20	–	40.57 s	18, 30
21	1.35, 2.17	29.85 t	30
22	0.93, 2.04	35.36 t	28
23	1.56 s	22.41 c	
25	1.41 s	34.66 c	
26	1.19 s	22.59 c	

**Tabla 6.** Continuación.

Posición	$\delta^a_{\text{H}}$	$\delta^b_{\text{C}}$	HMBC <sup>c</sup>
27	0.57 s	18.78 c	18
28	1.06 s	31.72 c	
29	–	178.96 s	19, 30, 29-OCH <sub>3</sub>
30	1.17 s	32.89 c	19
COOCH <sub>3</sub>	3.60 s	51.86 c	
OH	4.87 s	-	
1'	–	141.04 s	6'
2'	–	137.62 s	4', 6', 23
3'	–	136.30 s	3'-t-Bu
4'	6.94 d (2.2)	117.29 s	6'
5'	–	142.86 s	5'-t-Bu
6'	6.69 d (2.2)	113.38 s	4'
C-t-Bu (3')	–	34.95 s	3'-t-Bu
t-Bu (3')	1.50 s	30.15 c	
C-t-Bu (5')	–	32.93 s	5'-t-Bu
t-Bu (5')	1.24 s	31.64 c	

<sup>a</sup> Las multiplicidades fueron corroboradas con experimentos COSY, las constantes de acoplamiento (en Hz) se indican entre paréntesis.

<sup>b</sup> Las multiplicidades de las señales de RMN-<sup>13</sup>C, se determinaron a través de experimentos DEPT, s = C, d = CH, t = CH<sub>2</sub>, c = CH<sub>3</sub>.

<sup>c</sup> Protones mostrando correlaciones a larga distancia con el carbono indicado.

#### Compuesto 4 (C4)

El compuesto **C4** se obtuvo como un sólido de color de amarillo, en el análisis de RMN-<sup>1</sup>H (Figura 38) se observó un patrón modificado para el sistema metilenquinónico de la pristimerina, la señal  $\delta$  6.70 (*dd*,  $J = 6.9, 1.7$  Hz) el cual corresponde al H-6 de la unidad triterpénica, dado el acoplamiento vecinal con H-7 y a larga distancia con H-1. También fue posible establecer la señal con  $\delta$  4.85 al hidrógeno del grupo -OH y una señal simple con  $\delta$  3.59 correspondiente a los protones del grupo -OMe. Se confirmó la unión del componente benzoquinónico con la pristimerina al observar en el espectro la presencia de dos señales dobles con  $\delta$  6.89 y 6.68, con un valor de  $J = 2.3$  Hz correspondiente a un acoplamiento *meta*. Mediante el experimento COSY se determinó que la señal con  $\delta$  6.08 corresponde al hidrogeno vinílico H-7.

En el espectro de RMN-<sup>13</sup>C (APT) Figura 39, se observaron las señales con  $\delta$  90.4 (C-3) y 77.5 (C-4) concernientes a un átomo de carbono  $sp^3$  unidos a oxígenos, estos datos confirman la unión éter entre la benzoquinona y la pristimerina. En el experimento DEPT-90 (Figura 40) se identificaron seis grupos metinos, de los cuales 5 corresponden a carbonos  $sp^2$ , lo que indica que la señal con  $\delta_C$  90.40 corresponde al protón unido al carbono  $sp^3$  en posición C-18. Por último, en la región comprendida entre 0.5 y 1.5 ppm fue posible correlacionar las señales propias de los seis metilos angulares.

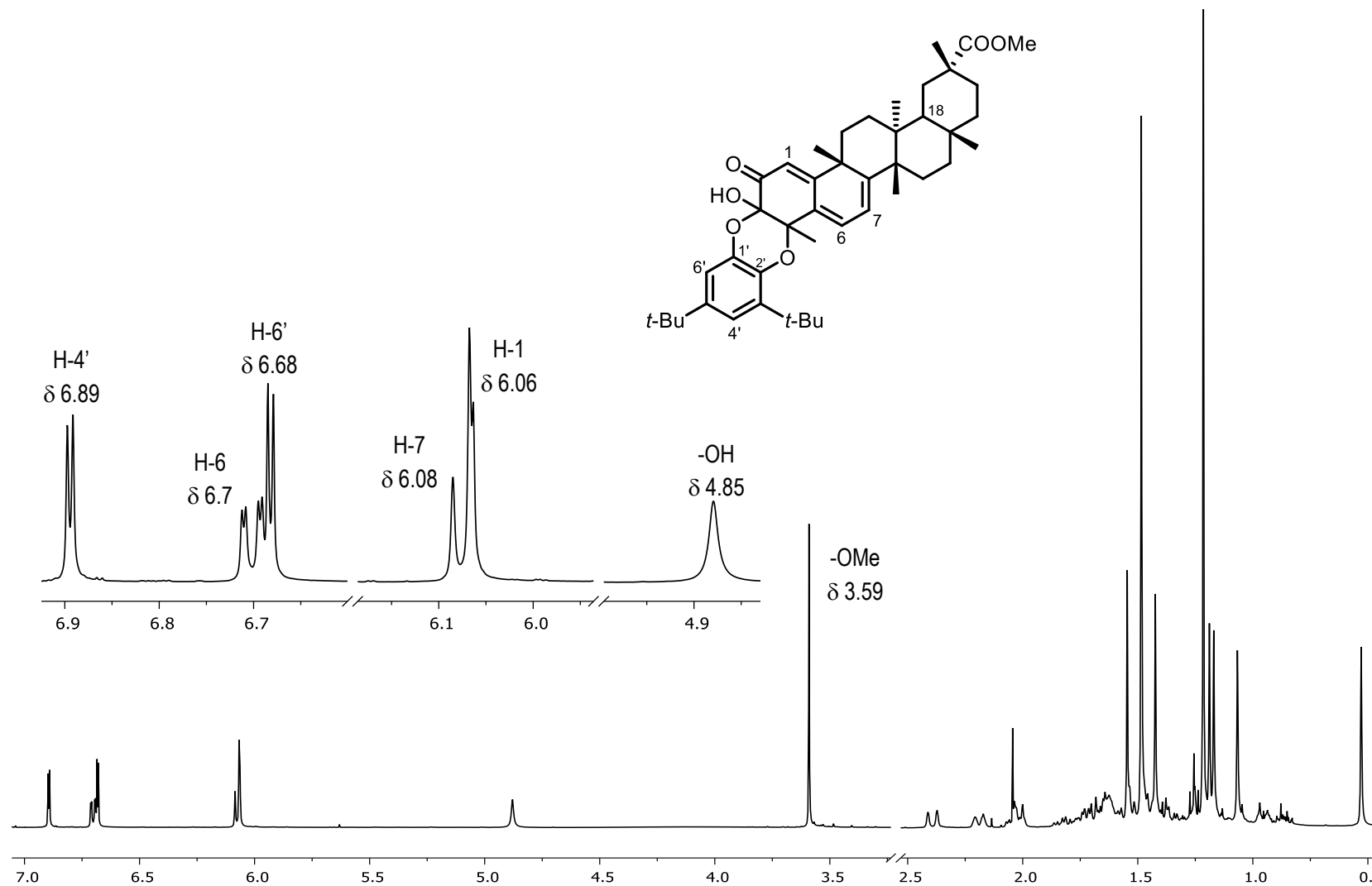
El experimento HSQC (Figura 41), permitió correlacionar los 6 grupos metinos observados en el DEPT-90. De esta manera las señales dobles del anillo aromático con  $\delta_H$  6.89 y 6.68, pertenecen a los metinos C-4' ( $\delta_C$  116.9) y C-6' ( $\delta_C$  112.7), respectivamente. Para el sistema conjugado del componente triterpénico le corresponden los metinos C-1 ( $\delta_C$  115.02), C-6 ( $\delta_C$  128.9), C-7 ( $\delta_C$  117.2) y considerando el desplazamiento del grupo metino a  $\delta_C$  44.3, este fue asignado a la posición C-18. El desplazamiento a  $\delta_C$  51.76 se correlacionó con los protones del grupo -OMe ( $\delta_H$  3.59).

Del experimento de HMBC (Figura 42) se observaron correlaciones para las señales con  $\delta_C$  77.5 y 90.4, que sugiere la existencia de un sistema bicíclico con carbonos cuaternarios oxigenados como cabezas de puente, lo que confirma la obtención del producto de ciclación. La señal con  $\delta$  90.4 (C-3), presentó interacciones con la señal del hidrógeno vinílico H-1 ( $\delta_H$  6.06), el protón del grupo -OH ( $\delta_H$  4.85) en posición 3 y los protones del grupo metilo en 23 ( $\delta_H$  1.52); adicionalmente la señal con  $\delta_C$  77.5 (C-4), presentó las mismas correlaciones con OH-3 y Me-23, sin embargo, la interacción con el protón vinílico correspondió a la posición H-6 ( $\delta_H$  6.70).

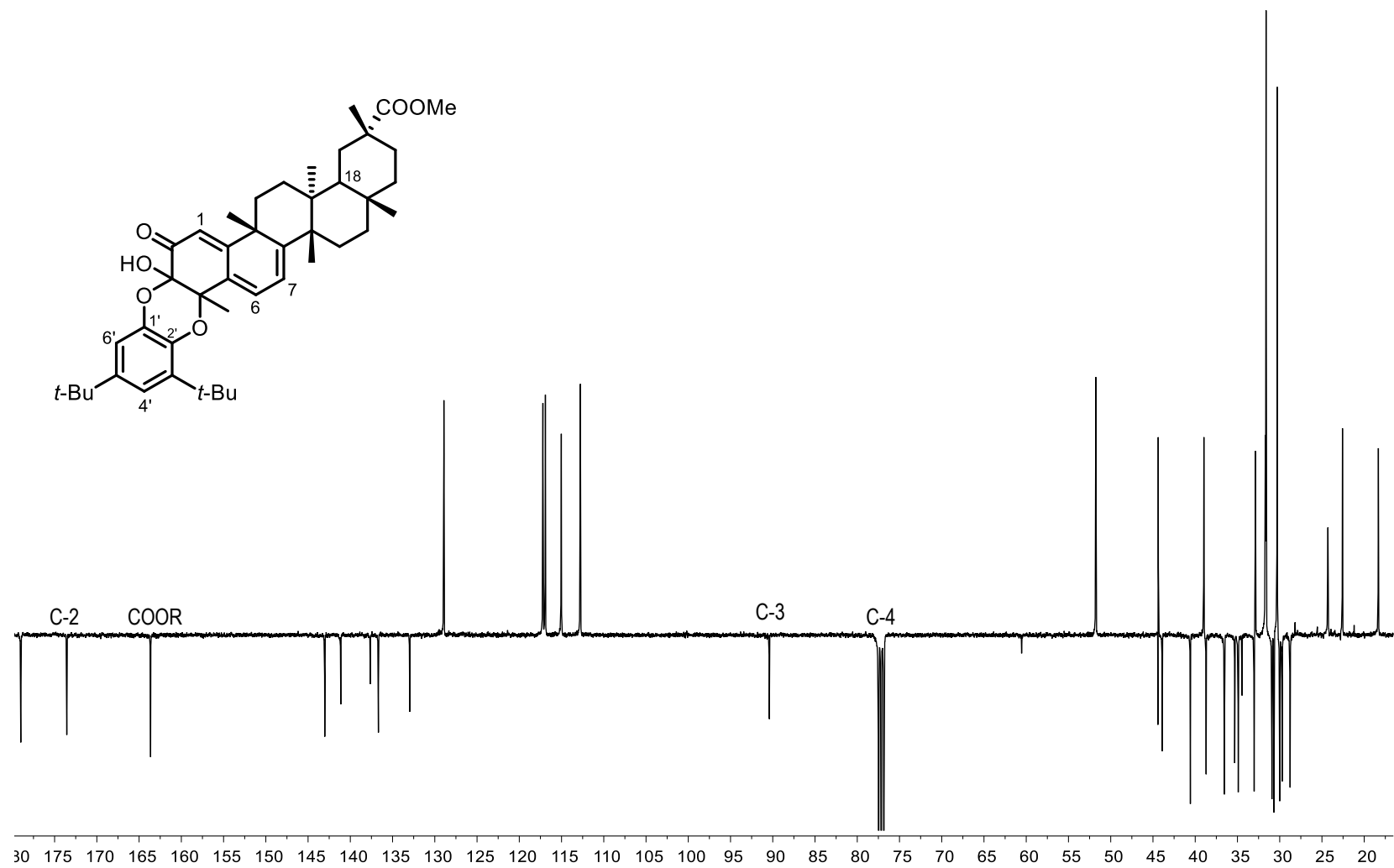
Por otra parte, para el componente benzoquinónico (Figura 43) la señal con  $\delta_H$  6.89 presentó interacciones con el grupo metino C-6' ( $\delta_C$  112.7) y con el carbono cuaternario aromático C-2' ( $\delta_C$  137.6); con respecto a la señal con  $\delta_H$  6.68 se observaron interacciones con el grupo metino C-4' ( $\delta_C$  116.0) y con dos carbonos aromáticos cuaternarios C-2' ( $\delta_C$  137.6) y C-1' ( $\delta_C$  141.1), lo que confirma que las señales con  $\delta_H$



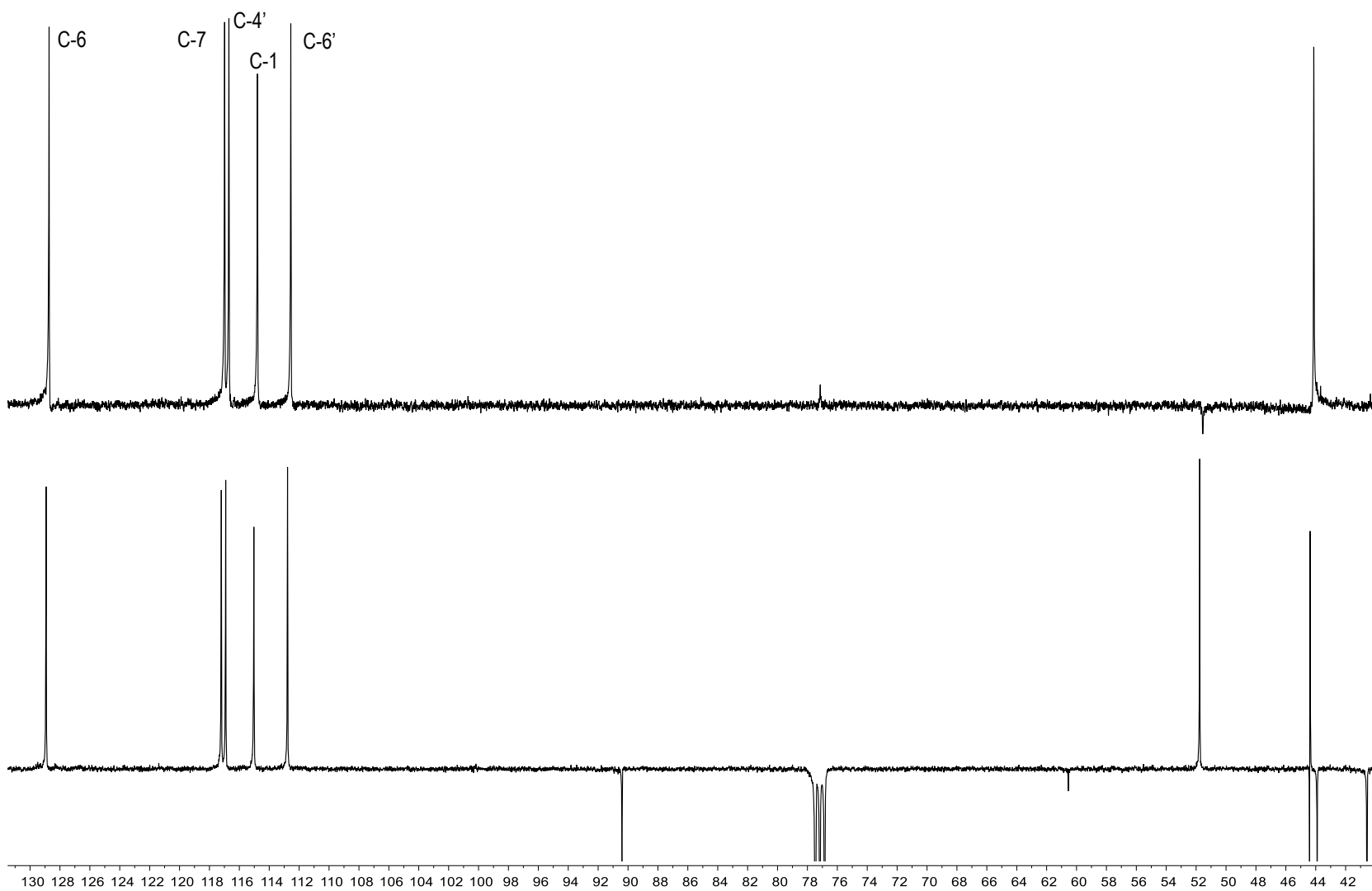
6.89 y 6.68 corresponden a las posiciones 4' y 6', respectivamente. La asignación para el anillo aromático se completó al observar la interacción entre la señal para un grupo *t*-Bu con  $\delta_H$  1.21 con el carbono aromático C-5' ( $\delta_C$  143.0) y la señal del grupo *t*-Bu con  $\delta_H$  1.48 con el carbono aromático C-3' ( $\delta_C$  136.6), confirmando la distribución *meta* de los grupos *t*-Bu. La asignación completa de las señales observadas por RMN- $^1H$  y  $^{13}C$  se presentan en la Tabla 7.



**Figura 38.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de **C4**.



**Figura 39.** Espectro de RMN-<sup>13</sup>C (APT, 100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de **C4**.



**Figura 40.** Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  (APT) y experimento DEPT-90 (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de **C4**

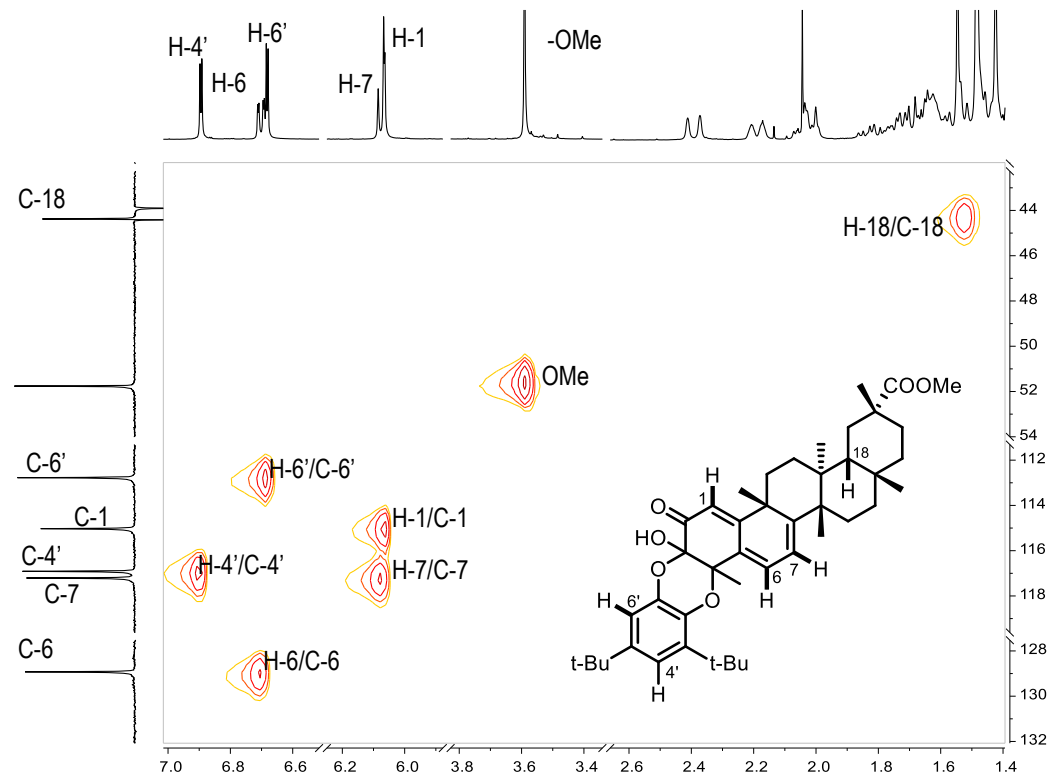


Figura 41. Experimento de correlación heteronuclear HSQC de C4.

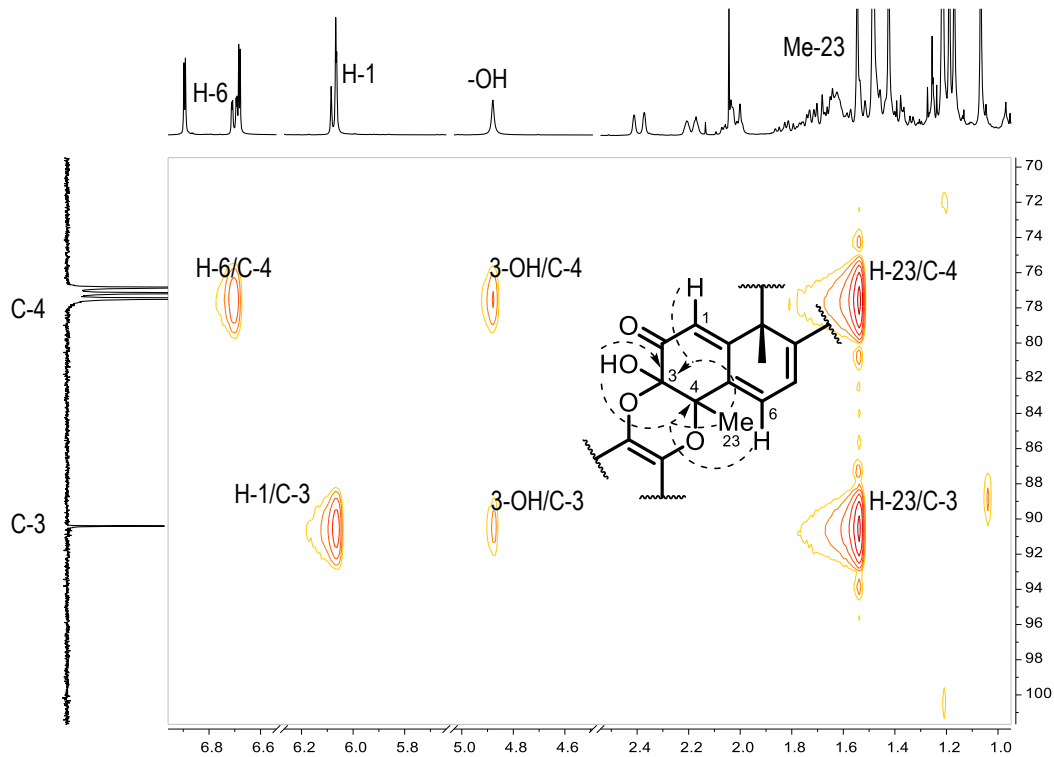
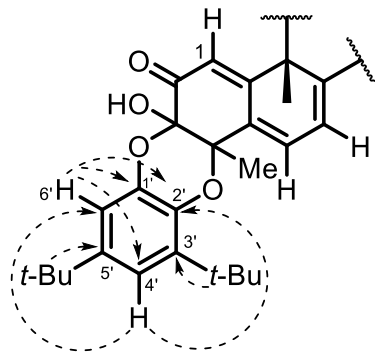
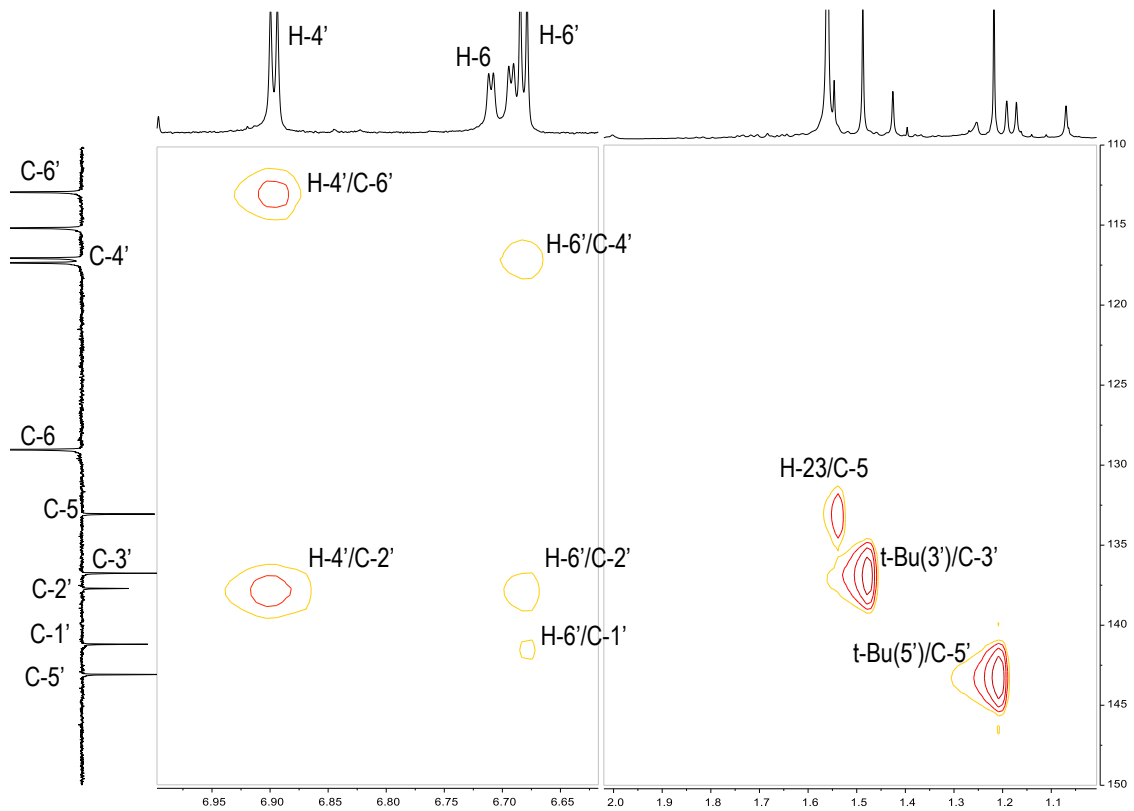
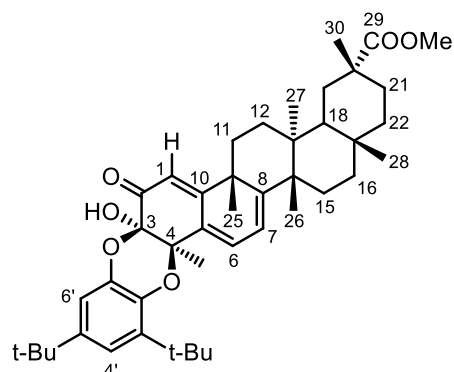


Figura 42. Experimento HMBC (H $\cdots$ C) para el fragmento 3,4-dioxina de C4.



**Figura 43.** Experimento HMBC (H  $\cdots\rightarrow$  C) para la unidad quinoide y aromática de **C4**.

Datos espectroscópicos de benzodioxinopristimerina (**C4**)



**Tabla 7.** Desplazamientos químicos ( $\delta$ ) del heterodímero **C4** ( $^1\text{H}$  400 MHz,  $^{13}\text{C}$  100 MHz en  $\text{CDCl}_3$ ).

Posición	$\delta^a_{\text{H}}$	$\delta^b_{\text{C}}$	HMBC <sup>c</sup>
1	6.06 d (1.7)	115.02 d	
2	–	190.77 s	3-OH
3	–	90.4 s	1, 3-OH, 23
4	–	77.5 s	6, 3-OH, 23
5	–	132.9 s	1, 6, 7
6	6.7 dd (6.9, 1.7)	128.9 d	7
7	6.08 da (6.9)	117.2 d	
8	–	163.64 s	6, 25, 26
9	–	43.9s	1, 7, 25
10	–	173.56 s	6, 25
11	1.88, 1.93	33.02 t	25
12	1.65, 1.76	29.7 t	27
13	–	38.71 s	27
14	–	44.41 s	7, 26, 27
15	1.43, 1.50	28.77 t	26
16	1.44, 1.81	36.55 t	28
17	–	30.68 s	19, 28
18	1.53 m	44.33 d	16, 27, 28
19	1.68, 2.41	30.92 t	18, 30
20	–	40.57 s	18, 30
21	1.35, 2.17	30.0 t	30
22	0.93, 2.04	34.91 t	28
23	1.54 s	24.29 c	
25	1.43 s	38.98 c	
26	1.19 s	22.57 c	

**Tabla 7.** Continuación.

Posición	$\delta^a_{\text{H}}$	$\delta^b_{\text{C}}$	HMBC <sup>c</sup>
27	0.53 s	18.32 c	18
28	1.07 s	31.7 c	
29	–	179 s	19, 30, 29-OCH <sub>3</sub>
30	1.17 s	32.88 c	19
COOCH <sub>3</sub>	3.59 s	51.76 c	
OH	4.85 s	-	
1'	–	141.13 s	6'
2'	–	137.63 s	4', 6'
3'	–	136.68 s	3'-t-Bu
4'	6.89 d (2.3)	116.91 s	6'
5'	–	143.03 s	5'-t-Bu
6'	6.68 d (2.3)	112.77 s	4'
C-t-Bu (3')	–	35.33 s	3'-t-Bu
t-Bu (3')	1.48 s	30.29 c	
C-t-Bu (5')	–	34.46 s	5'-t-Bu
t-Bu (5')	1.21 s	31.62 c	

<sup>a</sup> Las multiplicidades fueron corroboradas con experimentos COSY, las constantes de acoplamiento (en Hz) se indican entre paréntesis.

<sup>b</sup> Las multiplicidades de las señales de RMN-<sup>13</sup>C, se determinaron a través de experimentos DEPT, s = C, d = CH, t = CH<sub>2</sub>, c = CH<sub>3</sub>.

<sup>c</sup> Protones mostrando correlaciones a larga distancia con el carbono indicado.



## Análisis regio- y estereo- químico de los derivado benzodioxinopristimerina

### Análisis regioquímico de los aductos

Considerando los dos posibles regioisómeros (Figura 44), se realizaron los experimentos selectivos NOESY-1D irradiando en cada caso al protón de la posición H-6 de la unidad triterpénica, Figura 45 y 46; de forma adicional se midieron las distancias entre el H-6 y H-6' para cada conformero optimizado de los regioisómeros posibles (Figura 47). Que confirma la regioquímico de la unión 3,4-dioxi como [3-O-2'] [4-O-1'] para los para los aductos **C1** y **C2**.

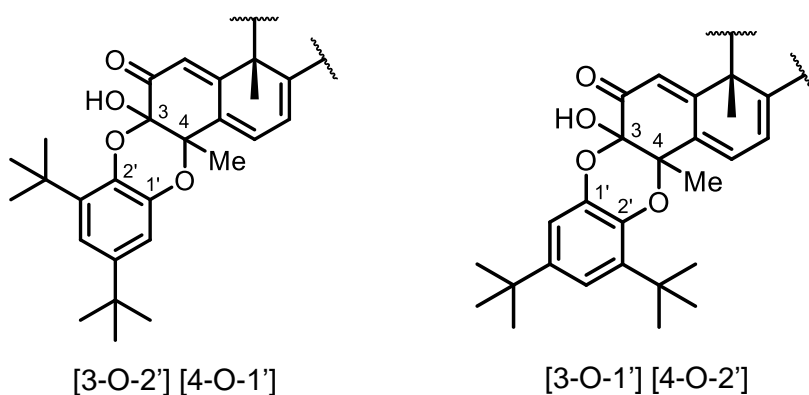


Figura 44. Posibles regioisómeros para los heterodímeros **C1** – **C4**.

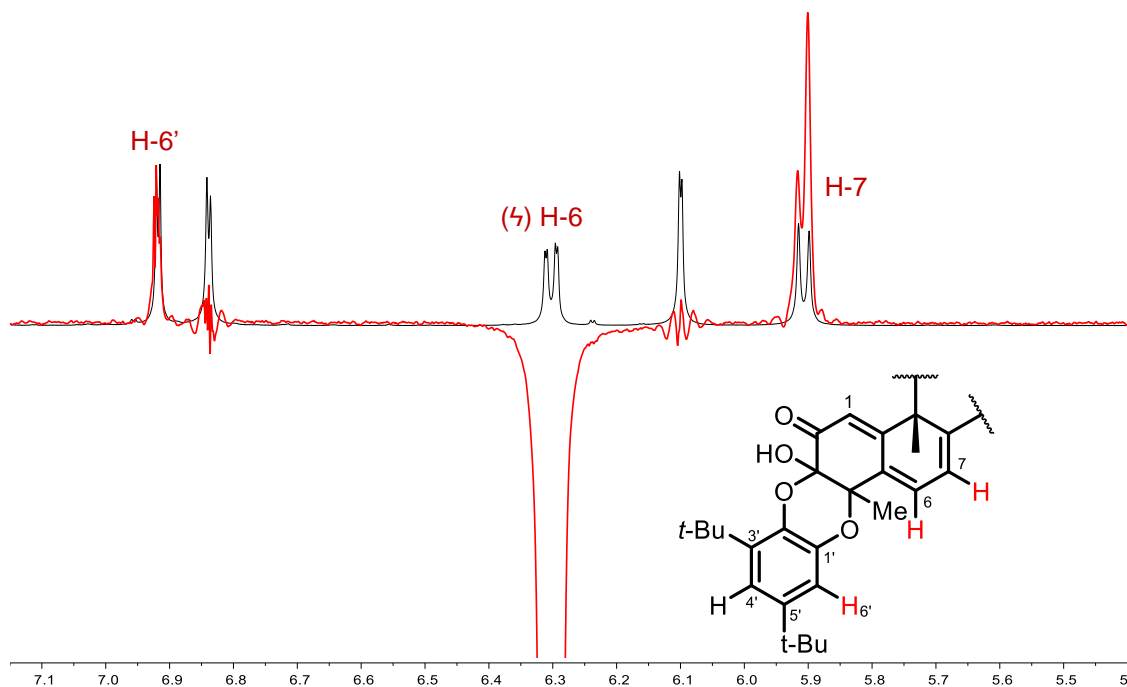
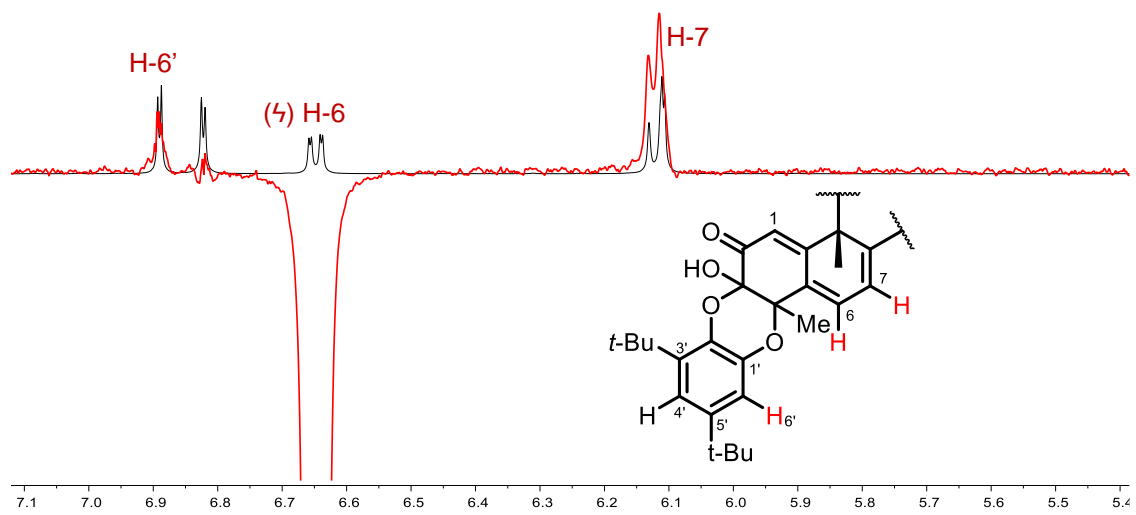
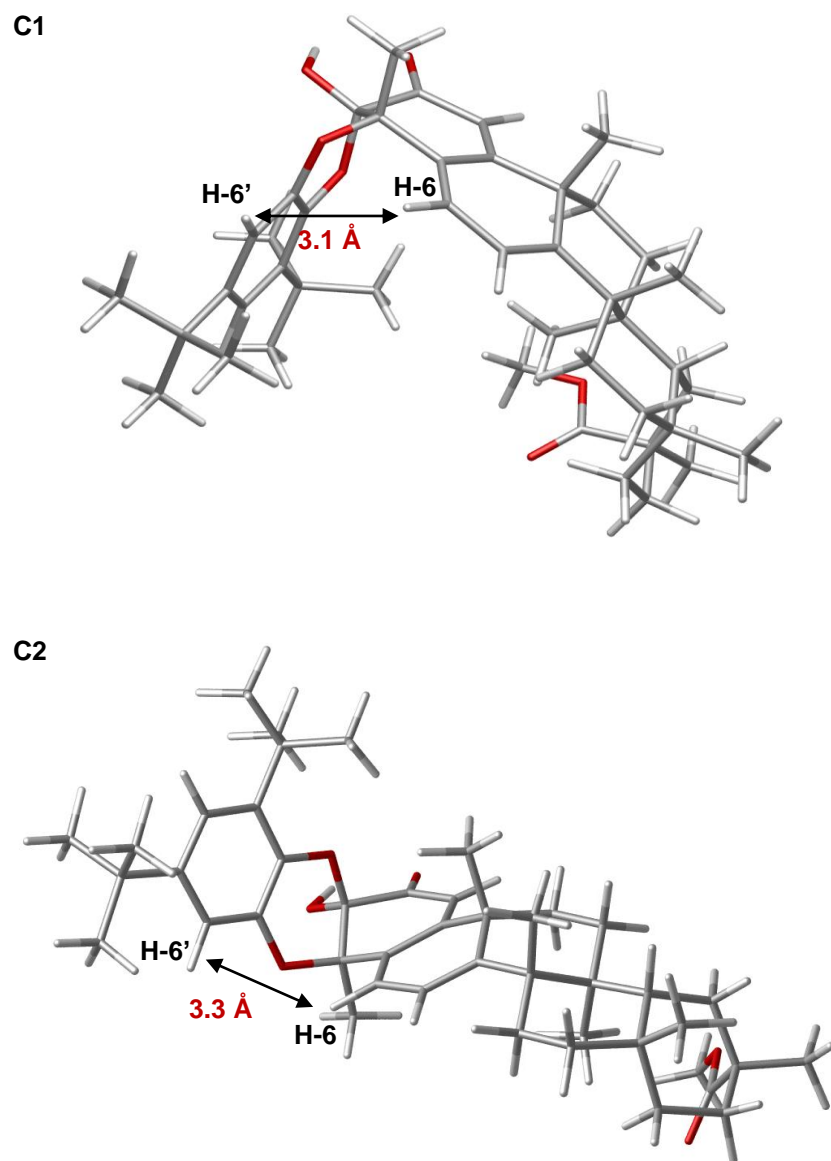


Figura 45. Experimento selectivo NOESY-1D (irradiando  $\delta_H$  6.27) del heterodímero **C1**.

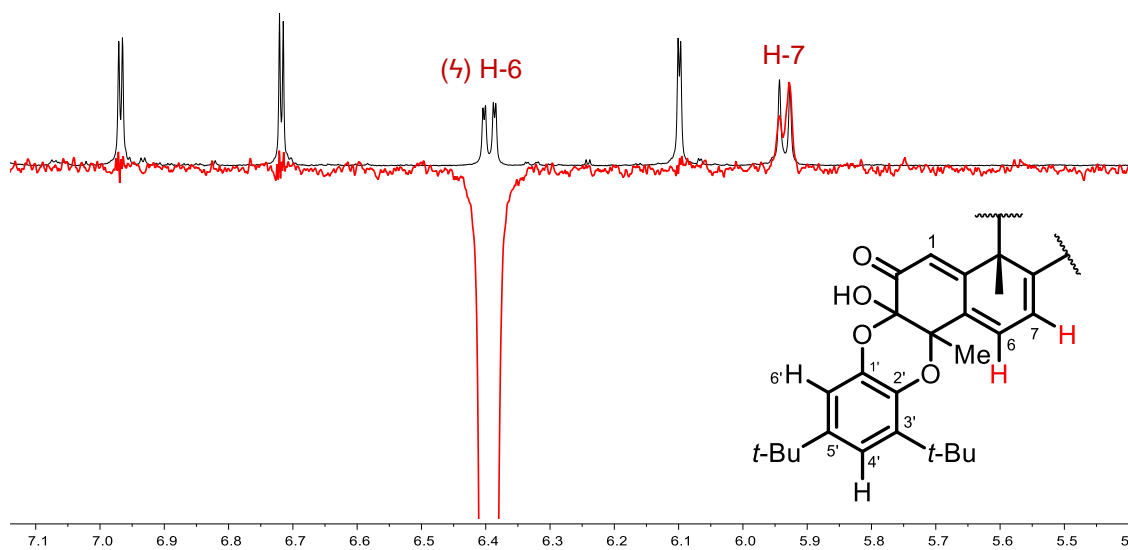


**Figura 46.** Experimento selectivo NOESY-1D (irradiando  $\delta_H$  6.62) del heterodímero **C2**.

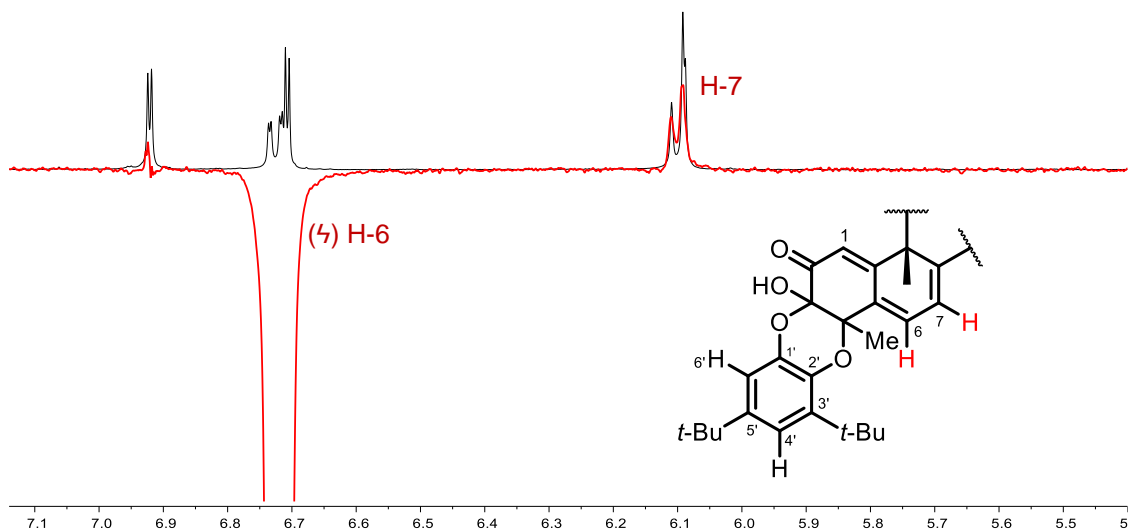


**Figura 47.** Estructuras optimizadas a  $\omega$ B97X-D/6-31G(d,p) para los conformeros más estables de **C1** y **C2**.

De igual manera se confirmó la regioquímica de la unión 3,4-dioxi como [3-O-1'] [4-O-2'] para los para los aductos **C3** (Figura 48) y **C4** (Figura 49) con el experimento selectivo NOESY-1D irradiando al protón de la posición H-6 de la unidad triterpénica.



**Figura 48.** Experimento selectivo NOESY-1D (irradiando  $\delta_H$  6.36) del heterodímero **C3**.



**Figura 49.** Experimento selectivo NOESY-1D (irradiando  $\delta_H$  6.70) del heterodímero **C4**.

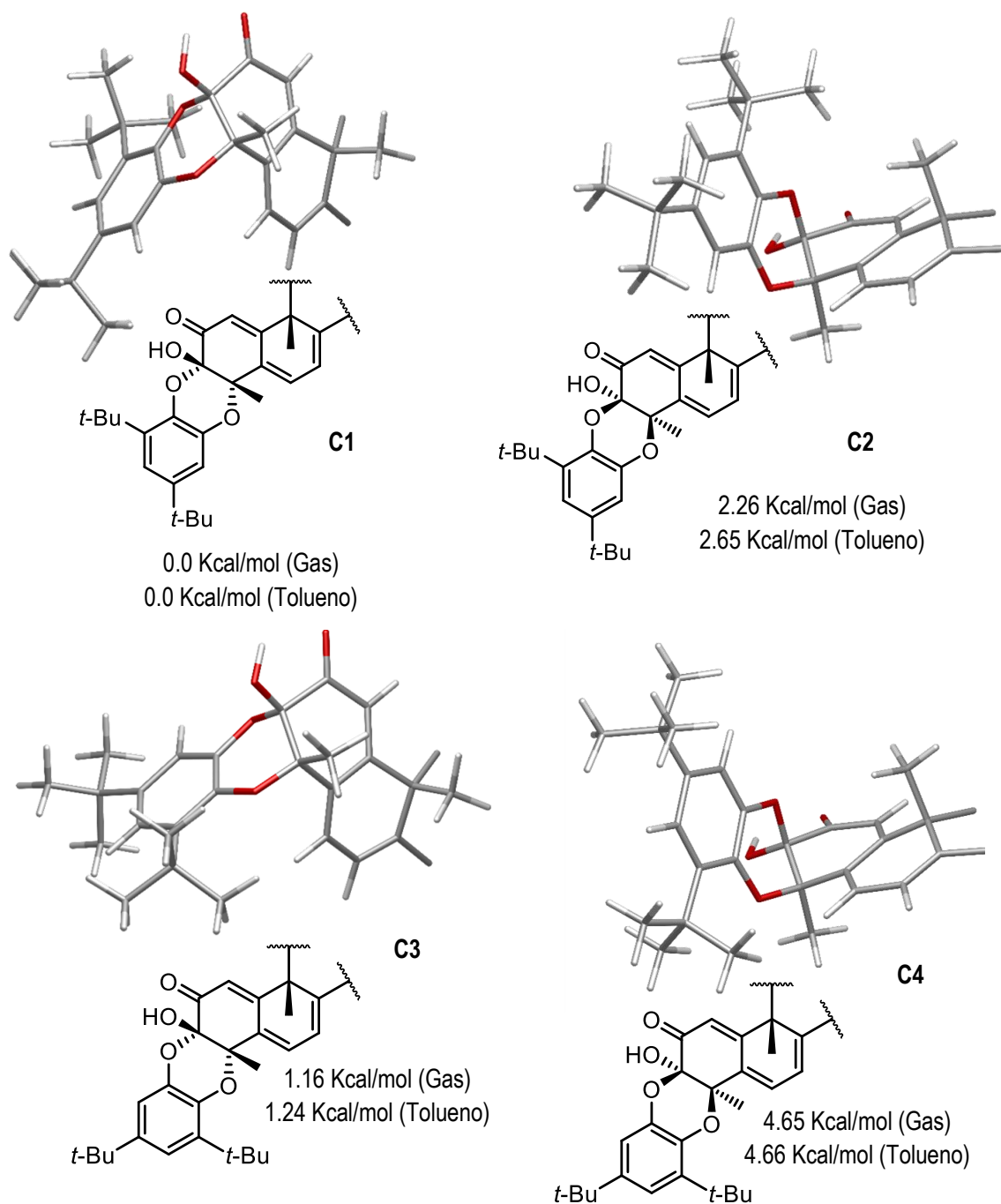
### Análisis estereoquímico de los aductos

Los aductos sintetizados comparten la misma unidad triterpénica que los derivados diméricos de la pristimerina con sus congéneres (6-oxotingenol, 22 $\beta$ -hidroxi-6-oxotingenol, 6-oxopristimerol) en el cual se sustituyó la unidad aromática, tanto los compuestos **C1** – **C4** comparten la unión 3-hidroxi-4-metil-3,4-dioxi. Del análisis de los datos espectroscópicos de los dímeros triterpénicos aislados, Shirota y *col.*<sup>11</sup> han establecido una metodología general para la elucidación de los regio- y estereoisómeros en base a los  $\delta$  en los espectros de RMN-<sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C, correlaciones NOE (o ROE), los espectros de masa e interpretación de los espectros de dicroísmo circular; para los dímeros con estereoquímica  $\alpha$  y  $\beta$  con respecto a los enlaces de la unión *cis* 3-hidroxi-4-metil-3,4-dioxi de la pristimerina con la unidad aromática. Los  $\delta$  de C-3, C-4, C-23 y H-6 con  $\delta_C$  92, 79, 22 y  $\delta_H$  6.3 corresponden a una estereoquímica de tipo  $\alpha$ , mientras que  $\delta_C$  91, 77, 24 y  $\delta_H$  6.5 a una estereoquímica  $\beta$ ; donde se puede observar que para los dímeros  $\alpha$  los C-3 y C-4 presentan un mayor  $\delta_C$  en comparación con los  $\beta$ . Los  $\delta$  de los C-3, C-4, C-23 y H-6 aparecen a  $\delta_C$  91.81, 78.48, 21.86 y  $\delta_H$  6.27 para **C1**;  $\delta_C$  90.24, 76.08, 24.43 y  $\delta_H$  6.62 para **C2**;  $\delta_C$  91.57, 80.05, 22.41 y  $\delta_H$  6.36 para **C3**;  $\delta_C$  90.4, 77.5, 24.29 y  $\delta_H$  6.7 para **C4**; estos desplazamientos al ser comparados con los dímeros naturales de tipo A-A se observa la misma tendencia, por tanto los aductos sintetizados y aislados, **C1** y **C3** son los heterodímeros- $\alpha$ , mientras que los aductos **C2** y **C4** son los heterodímeros- $\beta$ .

Adicionalmente, se determinó la rotación óptica ( $[\alpha]_D$ ) para los heterodímeros sintetizados, obteniendo los valores de +2.82, -2.19, +1.14 y -1.91 para **C1**, **C2**, **C3** y **C4**, respectivamente; los cuales se compararon con los reportados para los dímeros naturales tipo A-A. Jacobsen y *col.*<sup>39</sup> determinaron la rotación óptica para la xuxuarina E $\alpha$  ( $[\alpha]_D = +361.7$ ) y E $\beta$  ( $[\alpha]_D = -349.7$ ), obtenidas a partir de la síntesis biomimética. Por otro lado, Wu y *col.*<sup>24</sup> aislaron dímeros triterpénicos a partir de las raíces de la *Celastrus orbiculatus*: Celastrolina A $\alpha$  ( $[\alpha]_D = +488$ ) y A $\beta$  ( $[\alpha]_D = -366$ ). Se puede observar en los dímeros naturales, que aquellos con una estereoquímica  $\alpha$ , respecto a la unión *cis* 3-hidroxi-4-metil-3,4-dioxi, presentan una rotación positiva, mientras que la estereoquímica  $\beta$  una rotación negativa. Esta evidencia refuerza la asignación **C1** y **C3** son los heterodímeros- $\alpha$ , entre tanto, **C2** y **C4** son los heterodímeros- $\beta$ .

A partir de la asignación de la estereoquímica para los heterodímeros, se obtuvieron las estructuras de mínima energía de los reactivos y los productos, se calcularon los cambios energéticos asociados a la formación de los heterodímeros (Figura 50). Se compararon las energías relativas de los isómeros marcando un orden de estabilidad es **C1** > **C3** > **C2** > **C4**. Los datos teóricos indican que C1 corresponde al mínimo en la superficie de energía de reacción siendo el producto estable termodinámicamente, además que los aductos con estereoquímica  $\alpha$  son más estables que los aductos con estereoquímica  $\beta$ . Al comparar estos resultados con lo reportado en la Tabla 2 (entradas 11 y 12) el mayor rendimiento lo presenta **C2**; y en la entrada 12, el producto **C3** es 10 veces menor en rendimiento en relación con **C2**. Esta discrepancia entre los resultados teóricos y experimentales puede deberse a factores como la existencia de interacciones

no covalentes con el disolvente que modifiquen las características energéticas, electrónicas y/o estructurales del estado de transición.



**Figura 50.**  $\Delta G$  relativas de los isómeros, calculados a nivel  $\omega$ B97X-D/6-31G(d,p) con modelos de solvatación PCM.

Adicionalmente se calcularon la energía libre de activación ( $\Delta G_{act}$ ) para los estados de transición *endo/exo* para los heterodímeros formados (Tabla 8). De acuerdo con las energías de activación para los estados de transición *endo/exo* el heterodímero **C1**, es también el producto cinético.

**Tabla 8.** Energías libres de activación  $\Delta G_{act}$  (Kcal/mol) para los ET *endo/exo* de los heterodímeros formados, calculados a  $\omega$ B97X-D/6-31G(d,p).

Isómero	ET <sub>endo</sub>			ET <sub>exo</sub>		
	$\Delta G$	$\Delta H$	$\Delta S$	$\Delta G$	$\Delta H$	$\Delta S$
Fase gaseosa						
C2	31.01	11.94	-19.07	34.25	16.29	-17.96
C1	30.40	10.18	-20.21	35.28	17.90	-17.37
C4	32.37	13.25	-19.11	36.53	19.62	-16.91
C3	35.36	15.23	-20.12	38.46	20.60	-17.86
Solvente tolueno						
C2	34.91	17.09	-17.81	36.18	18.97	-17.20
C1	30.88	11.82	-19.06	35.92	19.54	-16.37
C4	32.98	14.86	-18.11	38.49	22.14	-16.35
C3	35.73	16.83	-18.90	39.52	22.41	-17.10

## CONCLUSIONES

Se logró el aislamiento de pristimerina a partir de la especie vegetal de la corteza de la raíz de *Crossopetalum rhacoma*, en el cual se identificó y aisló la pristimerina necesaria (1.43 g) para llevar a cabo las pruebas de reactividad.

Se evaluó la reactividad de la pristimerina como dienófilo en condiciones de una cicloadición Diles-Alder con el hetero-dieno 3,5-di-*ter*-butil-*o*-benzoquinona.

A partir de las condiciones evaluadas en la reacción de cicloadición. En la reacción a 130 °C se identificó la formación de dos productos (**C1** y **C2**) obteniendo un 5% de rendimiento, en un incremento a 160 °C se identificó la formación de un tercer producto (**C3**). La adición del líquido iónico resultó en un aumento del rendimiento a 130 °C; sin embargo, el incremento de la temperatura de la reacción a 160 °C resultó en la descomposición de los materiales de partida, por lo que la presencia del líquido iónico no tuvo efecto en la selectividad en la formación de los heterodímeros.

Se llevó a cabo la reacción a reflujo con calentamiento convencional lo cual dio lugar a la formación de un cuarto heterodímero adicional a los productos aislados por radiación por microondas. Dado que se obtuvieron los mismos productos por calentamiento que por microondas, se puede observar que la formación de los productos es debido solamente a un efecto térmico. Se logró la síntesis, aislamiento e identificación de los cuatro posibles productos de la reacción hetero-Diels-Alder de la *o*-quinona con pristimerina.

No fue posible establecer la configuración absoluta de los nuevos centros estereogénicos de los heterodímeros, por lo que en base a los desplazamientos químicos de los carbonos cuaternarios oxigenados C-3 y C-4, al ser comparados con dímeros triterpénicos A-A alrededor del enlace 3,4-dioxi, se estableció la configuración relativa. Dado que se ha reportado que los  $\delta_c$  en estos carbonos son diferentes para la configuración  $\alpha$  y  $\beta$ . Asignando de esta forma a los productos **C1** – **C4** como los isómeros  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\alpha$  y  $\beta$ , respectivamente.





## REFERENCIAS

1. Alvarenga, N.; Ferro, E. A. Bioactive Triterpenes and Related Compounds from Celastraceae. *Studies in Natural Products Chemistry*, 33, Elsevier, Gran Bretaña, 2006, pp 239-307.
2. Gunatilaka, A. A. L, *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*, 67, Springer-Verlag, Nueva York, 1996, pp 18-19.
3. Zhou, Q. Natural Diterpene and Triterpene Quinone Methides: Structure, Synthesis and Biological Potentials. En *Quinone Methides*; Rokita, S, E., Ed.; Wiley: New Jersey; pp. 269-275.
4. dos Santos, V. A. F. F. M.; Leite, K. M.; da Costa Siquiera, M. et al. Antiprotozoal Activity of Quinonemethide Triterpenes from *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae). *Molecules* **2013**, *18*, 1053-1062.
5. Mu, X.; Shi, W. et al. Pristimerin, a Triterpenoid, Inhibits Tumor Angiogenesis by Targeting VEGFR2 Activation. *Molecules* **2012**, *17*, 6854-6868.
6. Pina, S. E.; Silva, B. D.; Teixeira, P. S. et al. Mevalonate-derived quinonemethide triterpenoid from *in vitro* roots of *Peritassa laevigata* and their localization in root tissue by MALDI imaging. *Scientific Reports*, **2015**, *6*, 22627.
7. Souza-Moreira, M. T.; Alves, B. T.; Pinheiro, A. K.; et al. Friedelin synthase from *Maytenus ilicifolia*: Leucine 482 plays an essential role in the production of the most rearranged pentacyclic triterpene. *Scientific Reports*, **2016**, *6*, 36858.
8. Rodríguez, M. F.; López, M. R.; Jiménez, I. A.; Moujir, L.; Ravelo, A. G.; Bazzocchi, I. L. New phenolic triterpenes from *Maytenus blepharodes*. Semisynthesis of 6-deoxoblepharodol from pristimerin. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 2513-2519.
9. Shirota, O.; Morita, H.; Takeya, K.; Itokawa, H.: Structure of xuxuarines, stereoisomeric triterpene dimers from *Maytenus chuchuhuasca*. *Tetrahedron* **1995**, *51*, 1107-1120.
10. Shirota, O.; Morita, H.; Takeya, K.; Itokawa, H.: Five new triterpene dimers from *Maytenus chuchuhuasca*. *J. Nat. Prod.* **1997**, *60*, 1100-1104.
11. Shirota, O.; Sekita, S.; Satake, M.; Morita, H.; Takeya, K.; Itokawa, H. Nine New Isoxuxuarine-Type Triterpene Dimers from *Maytenus chuchuhuasca*. *Chem. Biodiversity*, **2004**, *1*, 1296-1307.
12. Gonzalez, A. G.; Rodríguez, F.M.; Bazzocchi, I. L.; Ravelo, A.G.:New terpenoids from *Maytenus blepharodes*. *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 48-51.
13. Shirota, O.; Sekita, S.; Satake, M.; Morita, H.; Takeya, K.; Itokawa, H. Nine Regioisomeric and Stereoisomeric Triterpene Dimers from *Maytenus chuchuhuasca* *Chem. Pharm. Bull.* **2004**, *52*, 739-746.
14. Gonzalez, A. G.; Alvarenga, N. L.; Estevez-Braun, A.; Ravelo, A. G.; Bazzocchi, I. L.; Moujir, L. M.: Structure and Absolute Configuration of triterpene dimers from *Maytenus scutioides*. *Tetrahedron.* **1996** *52*, 9597-9608.
15. Shirota, O.; Morita, H.; Takeya, K.; Itokawa, H.: New geometric and stereoisomeric triterpene dimers from *Maytenus chuchuhuasca*. *Chem. Pharm. Bull.* **1998**, *46*, 102-106.
16. Shirota, O.; Morita, H.; Takeya, K.; Itokawa, H.: Revised structures of cangorosins, triterpene dimers from *Maytenus ilicifolia*. *J. Nat. Prod.* **1997**, *60*, 111-115.
17. Shirota, O.; Sekita, S.; Satake, M.; Morita, H.; Takeya, K.; Itokawa, H. Nine Triterpene Dimers from *Maytenus chuchuhuasca*. *Helv. Chim. Acta* **2004**, *87*, 1536-1544.

18. Gonzalez, A. G.; Crespo, A.; Ravelo, A. G.; Munoz, O.M.: Magellanin a new triterpene dimer from *Maytenus magellanica* (Celastraceae). *Nat. Prod. Lett.* **1994**, *4*, 165-169.
19. Gonzalez, A. G.; Mendoza, J. J.; Luis, J. G.; Ravelo, A. G.; Bazzocchi, I. L. New Epimeric Di-Triterpene Quinone Ethers. Their Partial Synthesis and that of Netzahualcoyene from Pristimerin and DDQ. *Tetrahedron Lett.*, **1989**, *30*, 863-866.
20. Mena-Rejon, G. J.; Perez-Espadas, A. R.; Moo-Puc, R. E.; Cedillo-Rivera, R.: Bazzocchi, I. L.; Jimenez-Diaz, I. A.; Quijano, L. Antigiardial Activity of Triterpenoids from Root Bark of *Hippocratea excelsa*. *J. Nat. Prod.*, **2007**, *70*, 863-865.
21. Rodriguez Perez, F. M. Estudio fitoquímico de especies de la familia Celastraceae (flora panameña): *Maytenus blepharodes* y *Crossopetalum lobatum*. Tesis Doctoral, Universidad de La Laguna, La Laguna, Octubre 2000.
22. Rodriguez Perestelo, N. I. Metabolitos secundarios aislados de *Maytenus jelskii* (Celastraceae): Estudio de relación estructura-actividad. Tesis Doctoral, Universidad de La Laguna, La Laguna, Octubre 2009.
23. Bazzocchi, L. I.; Núñez, J. M.; Reyes, P. C. Diels-Alder adducts from Celastraceae species. *Phytochem Rev.* **2018**, *17*, 669-690.
24. Wu, J.; Zhou, Y.; Wang, L.; Zuo, J. Zhao, W. Terpenoids from root bark of *Celastrus orbiculatus*. *Phytochemistry* **2012**, *75*, 159-168.
25. Martín quintal, Z. R. Estudio fitoquímico de los extractos hexánico y metanólico de las hojas de *Crossopetalum rhacoma* L.. Tesis de Licenciatura, Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, México, Septiembre 2003.
26. Pérez Espadas, A. R. Búsqueda de compuestos con actividad anti-giardíasis en *Crossopetalum rhacoma* (Celastraceae). Tesis de Maestría, Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, México, Septiembre 2007.
27. Chel Guerrero, L. D. Contribuciones al estudio fitoquímicos y a la actividad biológica en *Crossopetalum rhacoma* y *C. gaumeri*. Tesis de Maestría, Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, México, 2014.
28. Mirón López, G. Estudio fitoquímico de los tallos de *Crossopetalum rhacoma* Tesis de Licenciatura, Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, México, 2002.
29. Carey, F. A. Sundberg, R. Advanced Organic Chemistry. Part A: Structure and Mechanism, 5 ed.; Springer: New York, 2007; pp 841-847.
30. Grossman, B. R. The art of writing reasonable organic reaction mechanisms, 2 ed.; Springer-Verlag: New York; 2003; pp 148-196.
31. Nair, V.; Menon, R. S.; Biju, A. T. 1,2-benzoquinones in Diels-Alder reactions, dipolar cycloadditions, nucleophilic additions, multicomponent reactions and more. *Chem. Soc. Rev.*, **2012**, *41*, 1050-1059.
32. Nair, V. S.; Kumar, G.; Anilkumar, Nair, J. S. Diels-Alder reactions of o-benzoquinones with 6-substituted fulvenes: facile synthesis of 1-aryl and 1,1-diarylmethylene-4,7-ethanoindene-8,9-diones. *Tetrahedron*, **1995**, *51*, 9155.
33. Lemal, D. M.; Snag, D.; Ramanathan, S. o-fluoranil: stereochemistry and mechanism of its Diels-Alder Reactions. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 7804-7811.
34. de la Torre, M. C.; Sierra, M. A. Comments on recent achievements in biomimetic organic synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 160-181.
35. Minami, A.; Oikawa, H. Recent advance of Diels-Alderase involved in natural product biosynthesis. *Journal of Antibiotics*, **2016**, *69*, 500-506.
36. Oikawa, H.; Tokiwano, T. Enzymatic catalysis of the Diels-Alder reaction in the biosynthesis of natural products. *Nat. Prod. Rep.*, **2004**, *21*, 321-352.

37. Klas, K.; Tsukamoto, S.; Sherman, D. H.; William, R. M. Natural Diels-Alderases: Elusive and irresistible. *J. Org. Chem.*, **2015**, *80*, 11672-11685.
38. Guimaraes, C. R. W.; Udier-Blagoviv, M.; Jogensen, W. L. Macrophomate synthase: QM/MM simulations address the Diels-Alder versus Michael-Aldol reaction mechanism. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 35577-3588.
39. Jacobsen, N. E.; Wijeratne, E. M. K.; Corsino, J.; Furlan, M.; Bolzani, V. de S.; Gunatilaka, L. Biomimetic Synthesis of Xuxuarines E and E: Structure Revision of *Rzedowskia bistriterpenoids*. *Bioorg. Med. Chem.*, **2008**, *16*, 1884-1889.
40. Moguel Pardío, F. I. Síntesis de aductos hetero Diels-Alder asistida por microondas. Tesis de Maestría, Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, México, 2015.
41. Quesadas-Rojas, M.; Mena-Rejón, G. J.; Cáceres-Castillo, D.; Cuevas, G.; Quijano-Quiñones, R. F.; *Molecules* **2016**, *21*, 1551-1564.
42. Batista Jr. J, M.; Bolzani, V. de S. Determination of the Absolute Configuration of Natural Product Molecules Using Vibrational Circular Dichroism. En *Studies in Natural Products Chemistry*, *41*, Elsevier, Gran Bretaña, 2014, pp 383-417.
43. Joseph-Nathan, P.; Gordillo-Román, B. Vibrational Circular Dichroism Absolute Configuration Determination of Natural Products. En *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products 100*, Kinghorn, A. D.; Falk, H.; Kobayashi, J., Eds.; Springer International Publishing: Suiza, 2015, pp 311-452.
44. Appkuttan, P.; Mehta, V. P.; Van der Eycken, E. V. Microwave-assisted cycloaddition reactions. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 1467-1477.
45. de Cózar, A.; Millán, M. C.; Prieto, P.; Díaz-Ortiz, A.; de la Hoz, A.; Cossio, F. P.; Computational calculations in microwave-assisted organic synthesis (MAOS). Application to cycloaddition reactions. *Org. Biomol. Chem.*, 2010, *8*, 1000-1009.
46. Spino, C.; Rezaei, H.; Dory, Y. L. Characteristics oh the two Frontier Orbital Interactions in the Diels-Alder Cycloaddition. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 757-764.
47. Van der Eycken, E.; Appukkuttan, P.; De Borggraeve, W.; Dehaen, W.; Dallinger, D.; Kappe, C. O. High-speed microwave-promoted hetero-Diels-Alder reactions of 2(1*H*)-pyrazinones in ionic liquid doped solvents. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 7904-7907.



## ANEXO I. ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Metilénquinonas triterpénicas más comunes dentro de la familia Celastraceae. ....	3
<b>Figura 2.</b> Estructura del esqueleto base 24- <i>nor</i> -D:A-friedoleano. ....	4
<b>Figura 3.</b> Clasificación y relación estructural de las metilénquinonas triterpénicas (MQT). ....	5
<b>Figura 4.</b> Ruta biogenética propuesta para la formación de las metilénquinonas triterpénicas. ..	6
<b>Figura 5.</b> Estructura de los dímeros A-A y B-A. ....	8
<b>Figura 6.</b> Las posibles rutas para la formación del derivado o-quinónico, ya sea por tautomerización u oxidación. ....	9
<b>Figura 7.</b> Formación de dímeros triterpénicos con uniones A-A. ....	10
<b>Figura 8.</b> Formación de dímeros triterpénicos con uniones B-A. ....	11
<b>Figura 9.</b> Reacción de Diels-Alder con la formación de los nuevos enlaces $\sigma$ (azul). ....	13
<b>Figura 10.</b> Productos naturales cuyo mecanismo de formación se ha propuesto una reacción Diels-Alder. ....	18
<b>Figura 11.</b> Reacción de oxidación y dimerización de la pristimerina. ....	19
<b>Figura 12.</b> Posibles rutas de reacción para la formación de dímeros triterpénicos, mediante la oxidación de la pristimerina por DDQ. ....	20
<b>Figura 13.</b> Obtención de las fracciones primarias del extracto de <i>C. rhacoma</i> . ....	34
<b>Figura 14.</b> Purificación de pristimerina a partir de la fracción B. ....	36
<b>Figura 15.</b> Espectro de RMN- <sup>1</sup> H de la pristimerina (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz). ....	45
<b>Figura 16.</b> Demanda energética de los orbitales frontera de la reacción HDA. ....	46
<b>Figura 17.</b> Espectros de RMN- <sup>1</sup> H (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de la reacción de la HDA promovida por microondas y a reflujo con espectro de la pristimerina (azul). ....	49
<b>Figura 18.</b> Identificación en los espectros de RMN- <sup>1</sup> H (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de las señales para cada heterodímero en el crudo de reacción a reflujo por 8 h (rojo) respecto a la pristimerina (azul). ....	51
<b>Figura 19.</b> Seguimiento de la reacción a reflujo por 35 min por RMN- <sup>1</sup> H (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ). ....	52
<b>Figura 20.</b> Espectro de RMN- <sup>1</sup> H (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de <b>C1</b> . ....	57
<b>Figura 21.</b> Espectro de RMN- <sup>13</sup> C (APT, 100 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de <b>C1</b> . ....	58
<b>Figura 22.</b> Espectro de RMN- <sup>13</sup> C (APT) y experimento DEPT-90 (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de <b>C1</b> . ....	59
<b>Figura 23.</b> Experimento de correlación heteronuclear HSQC de <b>C1</b> . ....	60
<b>Figura 24.</b> Experimento HMBC (H ----> C) para el fragmento 3,4-dioxina de <b>C1</b> . ....	60
<b>Figura 25.</b> Experimento HMBC (H ----> C) para la unidad quinoide y aromática de <b>C1</b> . ....	61
<b>Figura 26.</b> Espectro de RMN- <sup>1</sup> H (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de <b>C2</b> . ....	65
<b>Figura 27.</b> Espectro de RMN- <sup>13</sup> C (APT, 100 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de <b>C2</b> . ....	66
<b>Figura 28.</b> Espectro de RMN- <sup>13</sup> C (APT) y experimento DEPT-90 (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de <b>C2</b> . ....	67
<b>Figura 29.</b> Experimento de correlación heteronuclear HSQC de <b>C2</b> . ....	68
<b>Figura 30.</b> Experimento HMBC (H ----> C) para el fragmento 3,4-dioxina de <b>C2</b> . ....	68
<b>Figura 31.</b> Experimento HMBC (H ----> C) para la unidad quinoide y aromática de <b>C2</b> . ....	69
<b>Figura 32.</b> Espectro de RMN- <sup>1</sup> H (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de <b>C3</b> . ....	74
<b>Figura 33.</b> Espectro de RMN- <sup>13</sup> C (APT, 100 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de <b>C3</b> . ....	75
<b>Figura 34.</b> Espectro de RMN- <sup>13</sup> C (APT) y experimento DEPT-90 (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de <b>C3</b> . ....	76
<b>Figura 35.</b> Experimento de correlación heteronuclear HSQC de <b>C3</b> . ....	77
<b>Figura 36.</b> Experimento HMBC (H ----> C) para el fragmento 3,4-dioxina de <b>C3</b> . ....	77
<b>Figura 37.</b> Experimento HMBC (H ----> C) para la unidad quinoide y aromática de <b>C3</b> . ....	78
<b>Figura 38.</b> Espectro de RMN- <sup>1</sup> H (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de <b>C4</b> . ....	83
<b>Figura 39.</b> Espectro de RMN- <sup>13</sup> C (APT, 100 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de <b>C4</b> . ....	84
<b>Figura 40.</b> Espectro de RMN- <sup>13</sup> C (APT) y experimento DEPT-90 (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de <b>C4</b> . ....	85

<b>Figura 41.</b> Experimento de correlación heteronuclear HSQC de <b>C4</b> .	86
<b>Figura 42.</b> Experimento HMBC (H ----> C) para el fragmento 3,4-dioxina de <b>C4</b> .	86
<b>Figura 43.</b> Experimento HMBC (H ----> C) para la unidad quinoide y aromática de <b>C4</b> .	87
<b>Figura 44.</b> Posibles regioisómeros para los heterodímeros <b>C1</b> – <b>C4</b> .	90
<b>Figura 45.</b> Experimento selectivo NOESY-1D (irradiando $\delta_H$ 6.27) del heterodímero <b>C1</b> .	90
<b>Figura 46.</b> Experimento selectivo NOESY-1D (irradiando $\delta_H$ 6.62) del heterodímero <b>C2</b> .	91
<b>Figura 47.</b> Estructuras optimizadas ( $\omega$ B97X-D/6-31G(d,p)) para los conformeros más estables de <b>C1</b> y <b>C2</b> .	92
<b>Figura 48.</b> Experimento selectivo NOESY-1D (irradiando $\delta_H$ 6.36) del heterodímero <b>C3</b> .	93
<b>Figura 49.</b> Experimento selectivo NOESY-1D (irradiando $\delta_H$ 6.70) del heterodímero <b>C4</b> .	93
<b>Figura 50.</b> $\Delta G$ relativas de los isómeros, calculados a nivel $\omega$ B97X-D/6-31G(d,p) con modelos de solvatación PCM.	95

## ANEXO II. ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Fracciones primarias del extracto con diclorometano de corteza de raíces Crossopetalum rhacoma. ....	34
<b>Tabla 2.</b> Condiciones de reacción hetero-DA entre 3,5-di-ter-butil-1,2-benzoquinona y la pristimerina. ....	47
<b>Tabla 3.</b> Cuantificación de <b>C1</b> y <b>C2</b> por RMN- <sup>1</sup> H. <sup>a</sup> .....	53
<b>Tabla 4.</b> Desplazamientos químicos ( $\delta$ ) del heterodímero <b>C1</b> ( <sup>1</sup> H 400 MHz, <sup>13</sup> C 100 MHz en CDCl <sub>3</sub> ). ....	62
<b>Tabla 5.</b> Desplazamientos químicos ( $\delta$ ) del heterodímero <b>C2</b> ( <sup>1</sup> H 400 MHz, <sup>13</sup> C 100 MHz en CDCl <sub>3</sub> ). ....	70
<b>Tabla 6.</b> Desplazamientos químicos del heterodímero <b>C3</b> ( <sup>1</sup> H 400 MHz, <sup>13</sup> C 100 MHz en CDCl <sub>3</sub> ). .....	79
<b>Tabla 7.</b> Desplazamientos químicos ( $\delta$ ) del heterodímero <b>C4</b> ( <sup>1</sup> H 400 MHz, <sup>13</sup> C 100 MHz en CDCl <sub>3</sub> ). ....	88
<b>Tabla 8.</b> Energías libres de activación $\Delta G_{act}$ (Kcal/mol) para los ET endo/exo de los heterodímeros formados, calculados a $\omega$ B97X-D/6-31G(d,p). ....	96





