



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO BIOLÓGICAS

**“Determinación estructural de los metabolitos obtenidos del extracto hexánico
de los tallos de la *Bursera multijuga*”**

Tesis

que para obtener el Grado de

Maestra en Ciencias Químicas

Presenta:

Q.F.B. Yunuen Isabel Torres Blanco

Asesores:

Dr. Juan Diego Hernández-Hernández

Dr. Hugo Alejandro García-Gutiérrez

Morelia, Michoacán.

Julio 2013

AGRADECIMIENTOS

A mis padres:

Javier y Tita

Ustedes son el amor y el ejemplo de vida, gracias por hacer de mi lo que soy, por mostrarme el amor y el respeto por la naturaleza y apoyarme en mi realización profesional.

A mis hermanos:

Ileri, Bertha y Javi

Por el apoyo, el modelo y la complicidad. Ustedes son los mejores amigos que la vida me vino a regalar.

A Cesar:

Gracias por la paciencia, por alimentarme cuando lo olvidaba, por ser mi paño de lágrimas, por ayudarme a vencer mis temores y estar conmigo en los momentos peores. Y sobre todo gracias por tu Gran Amor.

A mis compañeros de Generación:

Mario, Julio y Lira

Gracias chicos por la complicidad y hacer de esta experiencia un viaje divertido. Y sobre todo gracias por llevarme a los taquitos...

A mis compañeros de Laboratorio:

Ale, Cecy, Yaz, Belén, Ángel y Toño

Gracias chicos por la compañía, las risas y los trueques.

Y a la protagonista de este estudio... La Madre naturaleza

Gracias por permitirme conocer una minúscula porción de tu maravillosa creación...

Todo por el amor de usted...

Mi más sincero agradecimiento...

Al Dr. Juan Diego Hernández-Hernández, por la confianza para permitirme formar parte de su equipo de trabajo, por su ayuda y consejos que han sido relevantes en mi formación profesional.

A el Dr. Hugo Alejandro García-Gutiérrez, por la paciencia, dedicación y por compartir conmigo parte de su invaluable experiencia.

A el Dr. Pedro Joshep Nathan y el Dr. Carlos M. Cerda-García-Rojas, por su hospitalidad y la gran ayuda brindada para la realización de este proyecto.

El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Química de Productos Naturales del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo bajo la dirección del D.C. Juan D. Hernández-Hernández y el D.C. Hugo A. García-Gutiérrez, con una beca de inversión en el conocimiento (264405) otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Con el apoyo económico de los proyectos: CIC-UMSNH y CONACYT Ciencia Básica (167952).

Parte de este trabajo se presentó en los siguientes eventos académicos:

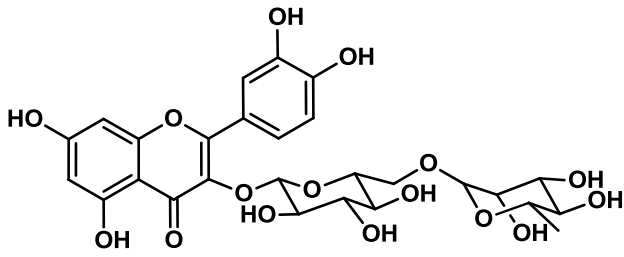
1. "Preparación de derivados epoxidados con esqueleto cembrenoide a partir de metabolitos de *Bursera multijuga*" **Yunuen I. Torres-Blanco**, Juan D. Hernández-Hernández, Hugo A. García-Gutiérrez, Luisa U. Román-Marín, Carlos M. Cerda-García-Rojas, Pedro Joseph-Nathan. Presentado en la 9ª Reunión Internacional de Investigación de Productos Naturales "Dra. Luisa Urania Román Marín" celebrada del 29 a 31 de mayo de 2013, Pachuca de Soto, Hidalgo. *Rev. Latinoamer. Quím.* **2013**, 41 (suplemento especial), 31, resumen O-22.
2. "Asignación de la configuración absoluta mediante dicroísmo circular vibracional del (1S,7R,8R)-7,8-epoxicembren-1-ol aislado de *Bursera multijuga*" **Yunuen I. Torres-Blanco**, Juan D. Hernández-Hernández, Hugo A. García-Gutiérrez, Luisa U. Román-Marín, Carlos M. Cerda-García-Rojas, Pedro Joseph-Nathan. Presentado en el 30 Congreso Latinoamericano de Química celebrado del 27 a 31 de octubre de 2012, Cancún, México. *Bol. Soc. Quím. Mex.* **2012**, 6 (número especial 1), 215, resumen P3-348.

ÍNDICE

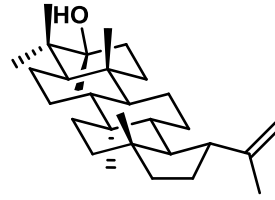
I	Resumen de estructuras	3
II	Índice de figuras	6
III	Índice de tablas	9
IV	Glosario	10
1.	RESUMEN	12
2.	ABSTRACT	13
3.	INTRODUCCIÓN	14
4.	PARTE TEORICA	22
4.1.	Especie de estudio	22
4.2.	Clasificación biosintética de los metabolitos secundarios	26
4.3.	Estudios previos al género <i>Bursera</i>	31
4.4.	Estructuras diterpénicas	34
4.4.1.	Cembranos	36
4.4.2.	Verticilanos	38
4.5.	Determinación de configuración absoluta	39
4.5.1.	Dicroísmo circular vibracional	42
4.6.	Funcionalización de estructuras por reacciones de oxidación	47
5.	JUSTIFICACIÓN	50
6.	OBJETIVOS	50
6.1.	Objetivo General	50
6.2.	Objetivos Específicos	50
7.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	51

7.1.	Procesamiento del extracto hexánico	51
7.1.1.	Metabolitos aislados	51
7.2.	Determinación de la configuración absoluta del epoxicembrenol 31	66
7.2.1.	Modelado molecular y búsqueda conformacional	67
7.2.2.	Comparación entre los espectros teóricos y el espectro experimental de DCV	69
7.3.	Reacciones de epoxidación sobre el epoxicembrenol 31	71
7.3.1.	Producto de epoxidación	74
8.	CONCLUSIONES	78
9.	PARTE EXPERIMENTAL	79
9.1.	Obtención del extracto hexánico	80
9.2.	Separación de los metabolitos secundarios	80
9.3.	Epoxidaciones del (1 <i>S</i> ,3 <i>E</i> ,7 <i>R</i> ,8 <i>R</i> ,11 <i>R</i>)-7,8-epoxicembra-3,11-dien-1-ol (31)	82
9.4.	Modelado molecular	82
10.	TABLAS DE DESPLAZAMIENTO QUÍMICO	83
11.	ESPECTROS	88
12.	BIBLIOGRAFÍA	95

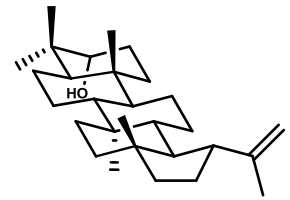
I. Resumen de estructuras



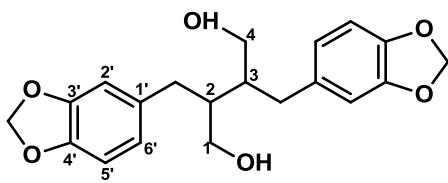
1



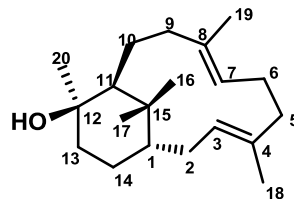
2



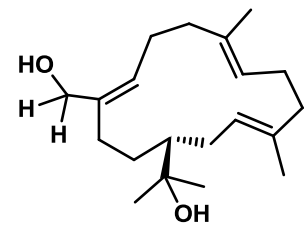
3



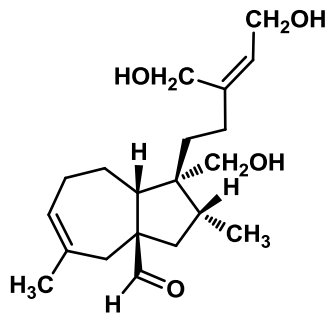
4



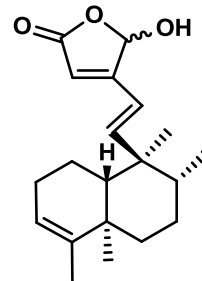
5



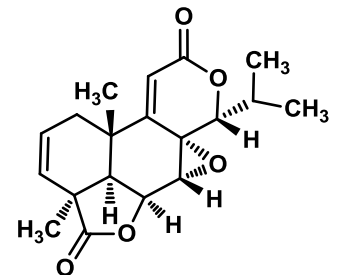
6



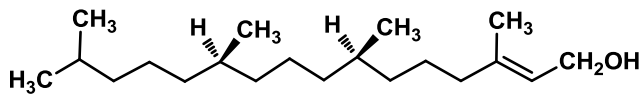
7



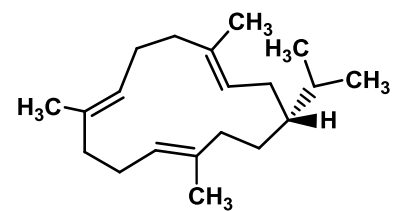
8



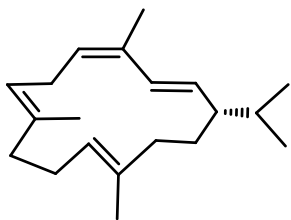
9



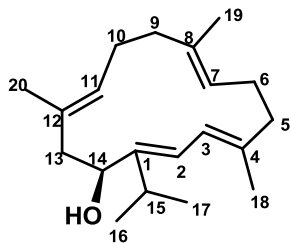
10



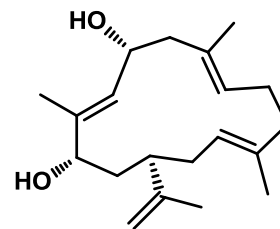
11



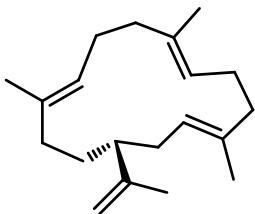
12



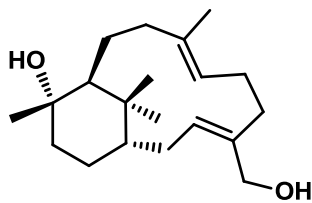
13



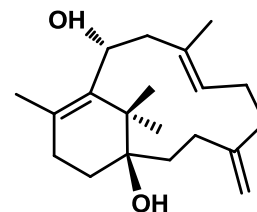
14



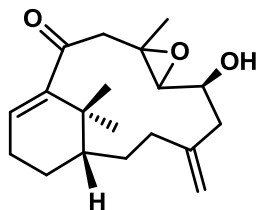
15



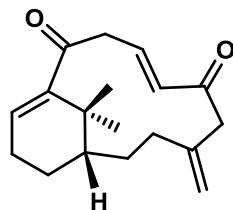
16



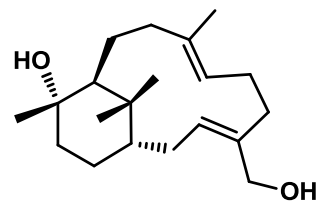
17



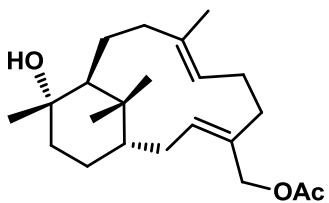
18



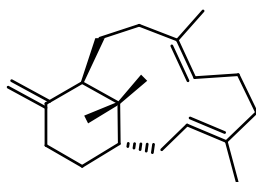
19



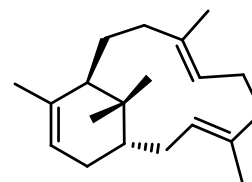
20



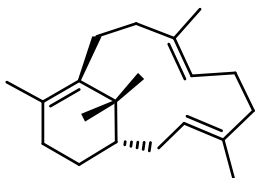
21



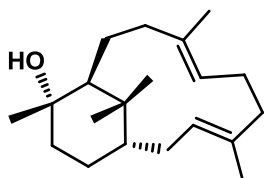
22



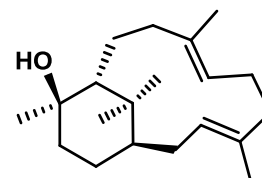
23



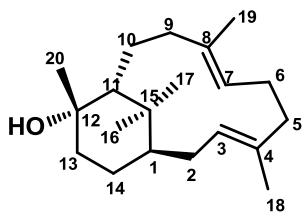
24



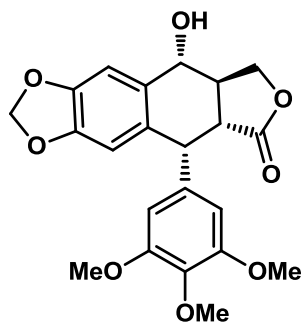
25



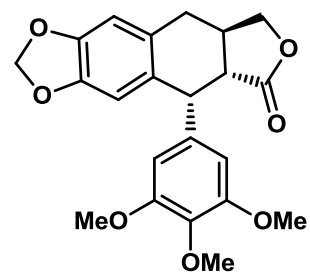
26



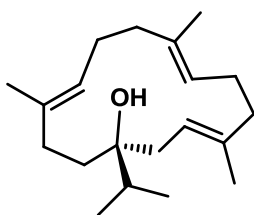
27



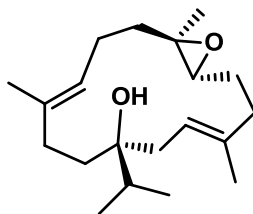
28



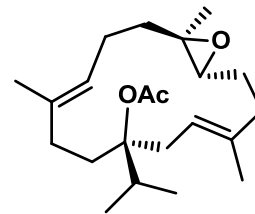
29



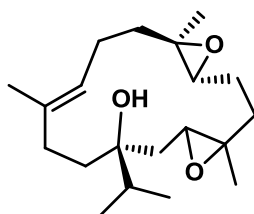
30



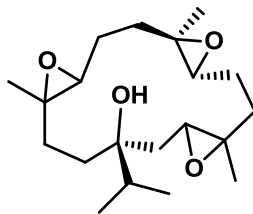
31



32



33



34

II. Índice de figuras

Figura 1.	Ubicación geográfica de la Sierra Madre Occidental.	14
Figura 2.	Bosque tropical caducifolio.	16
Figura 3.	Cajita de Olinalá.	17
Figura 4.	Cerca viva compuesta de árboles del género <i>Bursera</i> .	18
Figura 5.	Heinrich Gustav Adolf Engler.	22
Figura 6.	Arbusto de <i>Bursera multijuga</i> del jardín botánico del IIQB-UMSNH.	23
Figura 7.	Distribución geográfica de <i>Bursera multijuga</i> .	23
Figura 8.	Flor y frutos de <i>Bursera multijuga</i> .	25
Figura 9.	Tallo y hojas de <i>Bursera multijuga</i> .	25
Figura 10.	<i>Bursera multijuga</i> , rama con frutos y corteza externa.	26
Figura 11.	Fórmula desarrollada del isopreno.	28
Figura 12.	Relaciones biosintéticas entre las distintas clases de terpenos.	29
Figura 13.	Reacciones donde se utiliza IPP en la formación de difosfatos de prenilo.	30
Figura 14.	Reacción catalizada por la enzima prenil transferasa.	31
Figura 15.	Esqueletos diterpénicos derivados del núcleo de cembrano.	34
Figura 16.	Reacción catalizada por la enzima taxadieno sintasa.	36
Figura 17.	Ejemplo de estructuras enantioméricas y sus actividades.	40
Figura 18.	Esquema sobre la información que nos puede ofrecer la radiación infrarroja circularmente polarizada (DCV) o no (IR).	42
Figura 19.	Comparación de los espectros de DCV de ambos enantiómeros de la pseudoefedrina.	43
Figura 20.	a) Espectro de DCV experimental, b) Espectro de DCV DFT B3LYP/DCDZVP de la podofilotoxina 28 .	44

Figura 21.	a) Espectro de DCV experimental, b) Espectro de DCV DFT B3LYP/DGDZVP de la deoxipodofilotoxina 29 .	45
Figura 22.	a) Espectro experimental de DCV del (+)-verticilol 25 , b) Espectro calculado DFT a nivel B3LYP/6-31G(d,p); c) Espectro calculado DFT a nivel B3LYP/DGDZVP.	46
Figura 23.	Mecanismo concertado de epoxidación de alquenos con reactivos peroxiácidos.	47
Figura 24.	Ejemplos de regioselectividad y estereoselectividad de la reacción de epoxidación con <i>m</i> CPBA.	48
Figura 25.	Comparativo estructural y su influencia en la reactividad frente a perácidos.	49
Figura 26.	Espectro de RMN- ¹ H del metabolito 30 a 400 MHz.	52
Figura 27.	Espectro DEPT del metabolito 30 a 100 MHz.	53
Figura 28.	Espectro de RMN- ¹³ C del cembrenol (30) a 100 MHz.	55
Figura 29.	Espectro ampliado de RMN- ¹³ C del cembrenol (30) a 100 MHz.	56
Figura 30.	Espectro de RMN- ¹ H del cembrenol (30) a 400 MHz.	57
Figura 31.	Espectro de RMN- ¹ H del cembrenol (30) a 400 MHz, región de 2.4 a 0.7 ppm.	58
Figura 32.	Espectro de RMN- ¹ H del epoxicembrenol (31) a 400 MHz.	59
Figura 33.	Ampliación del espectro de RMN- ¹ H del epoxicembrenol (31) a 400 MHz.	60
Figura 34.	Espectro de RMN- ¹³ C del epoxicembrenol (31) a 100 MHz.	61
Figura 35.	Ampliación del espectro de RMN- ¹³ C del epoxicembrenol (31) a 100 MHz.	62
Figura 36.	Espectro de RMN- ¹ H del acetato de epoxicembrenol (32) a 400 MHz.	63
Figura 37.	Ampliación del espectro de RMN- ¹ H del acetato de epoxicembrenol (32) a 400 MHz.	64
Figura 38.	Espectro de RMN- ¹³ C del acetato de epoxicembrenol (32) a 100 MHz.	65
Figura 39.	Ampliación del espectro de RMN- ¹³ C del acetato de epoxicembrenol (32) a 100 MHz.	66
Figura 40.	Estructura del epoxicembrenol (31) obtenida por difracción de rayos X.	67

Figura 41.	Confórmeros del epoxicembrenol (31) optimizados por DFT a nivel B3LYP/DGDZVP.	68
Figura 42.	a) Espectro de DCV experimental del epoxicembrenol (31); b) Espectro de DCV calculado DFT a nivel B3LYP/DGDZVP del isómero 1 <i>S</i> ,7 <i>R</i> ,8 <i>R</i> ; C) Espectro de DCV calculado DFT a nivel B3LYP/DGDZVP del isómero 1 <i>R</i> ,7 <i>S</i> ,8 <i>S</i> .	70
Figura 43.	Reacción de epoxidación de 31 con <i>m</i> CPBA.	72
Figura 44.	Espectros de RMN- ¹ H de los crudos de reacción a 4 °C.	73
Figura 45.	Espectros de RMN- ¹ H de los crudos de reacción a temperatura ambiente.	74
Figura 46.	Espectro de RMN- ¹ H del diepoxido de cembrenol (33).	75
Figura 47.	Ampliación del espectro de RMN- ¹ H del diepóxido de cembrenol (33).	76
Figura 48.	Espectro de RMN- ¹ H del triepóxido de cembrenol (34).	77
Figura 49.	Ampliación del espectro <i>g</i> HMBC del cembrenol (30) en la región 5.4 a 4.7 ppm.	88
Figura 50.	Ampliación del espectro <i>g</i> HMBC del cembrenol (30) en la región 2.4 a 0.6 ppm.	89
Figura 51.	Ampliación del espectro <i>g</i> HMBC del cembrenol (30) en la región 5.4 a 4.7 ppm.	90
Figura 52.	Ampliación del espectro <i>g</i> HMBC del cembrenol (30) en la región 5.4 a 4.7 ppm.	91
Figura 53.	Ampliación del espectro <i>g</i> HMBC del cembrenol (30) en la región 2.4 a 0.8 ppm.	92
Figura 54.	Espectro DEPT del acetato de epoxicembrenol (32) a 100 MHz.	93
Figura 55.	Espectro DEPT del epoxicembrenol (31) a 100 MHz.	94

III. Índice de tablas

Tabla 1.	Relación cuantitativa de especies conocidas de <i>Bursera</i> por región.	21
Tabla 2.	Relación de materia extraída por número de maceración.	51
Tabla 3.	Comparación de los desplazamientos químicos de carbono del cembrenol (30).	54
Tabla 4.	Parámetros termoquímicos de los confórmeros del epoxicembrenol (31).	69
Tabla 5.	Condiciones de reacción a prueba.	72
Tabla 6.	Comparación de los desplazamientos de RMN- ¹ H de los derivados de cembreno 30 , 31 y 32 a 400 MHz.	83
Tabla 7.	Comparación de desplazamientos de RMN- ¹ H del metabolito 31 y sus productos de epoxidación 33 y 34 a 400 MHz.	84
Tabla 8.	Comparación de los desplazamientos de RMN- ¹³ C del cembrenol aislado por Kobayashi contra los asignados del cembrenol 30 a 100 MHz.	85
Tabla 9.	Comparación de los desplazamientos de RMN- ¹³ C de los derivados de cembreno 30 , 31 y 32 a 100 MHz.	86
Tabla 10.	Comparación de desplazamientos de RMN- ¹³ C del metabolito 31 y sus productos de epoxidación 33 y 34 a 100 MHz.	87

IV. Glosario

Acetil-CoA	Acetil coenzima A
AcOEt	Acetato de etilo
°C	Grados Celsius
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
CH ₂ Cl ₂	Cloruro de metileno
CHCl ₃	Cloroformo
DCV	Dicroísmo circular vibracional
DFT	Teoría de funcionales de la densidad
DMAPP	Difosfato de dimetil alilo
FPP	Difosfato de farnesilo
GGPP	Difosfato de geranil geranilo
GPP	Difosfato de geranilo
Hex	Hexano
IPP	Difosfato de isopentenilo
IR	Infrarrojo
kcal	Kilocalorías
<i>m</i> CPBA	Ácido <i>m</i> -cloroperbenzoico
MeOH	Metanol
MHz	Megahertz
MMFF	Mecánica molecular
msnm	Metros sobre el nivel del mar

ppm	Partes por millón
RMN	Resonancia magnética nuclear
SMO	Sierra Madre Occidental
ΔE	Diferencial de energía
ΔG	Diferencial de energía libre de Gibbs
ρ	Población en %

1. RESUMEN

Los productos naturales obtenidos de las plantas que pertenecen al género *Bursera* presentan una gran variedad estructural de compuestos. De particular interés se encuentran las especies de cuajotes rojos pertenecientes a la sección *Bursera*, en los cuales se han encontrado derivados del cembrano y del verticilano. Estos constituyen dos grupos relevantes de diterpenos cuyo esqueleto carbocíclico es intermediario en la biosíntesis de los taxanos.

Algunos cembrenoides han sido probados contra diversas líneas de células tumorales, por ejemplo, el sarcophytol A aislado de *Sarcophyton glaucum* inhibe las células cancerígenas de piel de ratón, además inhibe el desarrollo de tumores de mama, hígado y colon en ratones.

Este trabajo comprende el estudio del extracto hexánico de los tallos de la *Bursera multijuga*, especie endémica de la zona occidente del país. De la que se aislaron y caracterizaron tres metabolitos de esqueleto cembrenoide. El (1*S*,3*E*,7*E*,10*E*)-cembra-3,7,10-trien-1-ol (**30**), así como dos derivados epoxidados; el (1*S*,3*E*,7*R*,8*R*,11*E*)-7,8-epoxicembra-3,11-dien-1-ol (**31**) y el 1-acetato de (1*S*,3*E*,7*R*,8*R*,11*E*)-7,8-epoxicembra-3,11-dieno (**32**).

Debido a que la configuración absoluta de las moléculas juega un papel dominante en el comportamiento de éstas frente a sistemas biológicos se asignó la configuración absoluta del epoxicembrenol (**31**) de manera inequívoca empleando dicroísmo circular vibracional (DCV) en conjunto de cálculos teóricos. También se llevó a cabo la reasignación de las señales de RMN de **30**.

Finalmente se realizaron ensayos al metabolito **31** en condiciones oxidantes con ácido *m*-cloroperbenzoico, del cual se obtuvieron los derivados (11*E*)-3,4:7,8-diepoxicembren-1-ol (**33**) y 3,4:7,8:11,12-triepoxicembren-1-ol (**34**), estos al igual que a los 3 metabolitos naturales fueron caracterizados en base a sus datos de físicos y espectroscópicos.

2. ABSTRACT

Natural products from plants belonging to the genus *Bursera* have a variety of structural compounds. Of particular interest are the species belonging to red cuajotes *Bursera* section in which are found cembrane and verticillane derivatives. These diterpenes conform two relevant groups whose carbocyclic skeletons are intermediates in the biosynthesis of taxanes.

Some cembrenes with biological activity have been tested against various tumor cell lines. For example, sarcophytol A isolated by *Sarcophyton glaucum* inhibits mouse skin cancer cells, and the development of liver, colon and mammary tumors in mice.

This work includes the study of the hexane extract of the stems of *Bursera multijuga*, endemic to the west region of the country. Three metabolites with cembrenoid skeleton were isolated and characterized: (1*S*,3*E*,7*E*,10*E*)-cembra-3,7,10-trien-1-ol (**30**) as well as two epoxide derivatives, (1*S*,3*E*,7*R*,8*R*,11*E*)-7,8-epoxycembra-3,11-dien-1-ol (**31**) and (1*S*,3*E*,7*R*,8*R*,11*E*)-7,8-epoxycembra-3,11-dien-1-ol 1-acetate (**32**).

Given that the absolute configuration of molecules play a dominant role in the behavior of these compounds in biological systems, the absolute configuration for epoxycembrenol (**31**) was assigned using vibrational circular dichroism (VCD) and theoretical calculations as well. Also, unequivocal reassignment for some of the NMR signals of **30** were achieved in spite of this metabolite was known since 1989.

Finally oxidative assays were performed in **31** with *m*-chloroperbenzoic acid, obtaining derivatives (11*E*)-3,4:7,8-diepoxycembren-1-ol (**33**) and 3,4:7,8:11,12-triepoxycembran-1-ol (**34**). These and 3 natural metabolites were characterized by physical and spectroscopic data.

3. INTRODUCCIÓN

La Sierra Madre Occidental (SMO) es el complejo montañoso más largo y continuo de México, extendiéndose por casi 1200 km desde el noreste de Sonora hasta el norte de Jalisco, donde se une con el Eje Neovolcánico. Tiene un gran valor económico y ambiental por captar la mayor parte del agua que abastece los mantos freáticos e irriga a amplias zonas en el noroeste de México. La sierra tiene la forma de una meseta ligeramente inclinada al oriente que ha sido dislocada por fallas y cortada por corrientes que descienden tanto al Golfo de California y el Océano Pacífico, como al Altiplano Mexicano. Su flanco occidental es sumamente escarpado, con numerosas y profundas hondonadas (llamadas “barrancas” en Sonora y Chihuahua, “quebradas” en Durango y Sinaloa y “cañones” o “barrancas” en Zacatecas y norte de Jalisco), en algunos sitios de más de 1800 m de profundidad.



Figura 1. Ubicación geográfica de la Sierra Madre Occidental

A pesar de su gran importancia ambiental y económica, es todavía deficientemente conocida. Los tipos de vegetación y comunidades reconocidos se agrupan en tres grandes apartados: Madreño, Madreño-Xerófila y Tropical, correspondientes a las afinidades de los componentes de la vegetación que prevalece en las tres ecorregiones terrestres de México de nivel II que confluyen en el área: “Sierras templadas, Sierra Madre Occidental”, “Elevaciones semiáridas, piedemonte de la Sierra Madre Occidental” y “Bosques tropicales secos, planicie costera, lomeríos y cañones del Occidente”.

La vegetación tropical se desarrolla en las partes bajas y en las inmediaciones de la SMO e ingresa a través de las barrancas y quebradas de la vertiente occidental, entre 300 y 2000 m de altitud, en climas cálidos subhúmedos, semicálidos y secos cálidos.

El Bosque tropical caducifolio cubre extensas áreas adyacentes a la SMO, donde ocupa la mayor parte de la zona baja de las barrancas y quebradas al occidente y sur de la sierra y la base occidental de ésta, entre los 200 y los 2000 (-2160) msnm. En su límite boreal de distribución en Sonora sube hasta los 1100 m pero en Durango y Zacatecas alcanza a llegar al interior a través de las grandes quebradas como la del río Mezquital, alcanzando los 2160 m. Los climas predominantes son cálidos, aunque también hay semisecos; libres de heladas, con temperatura media anual > 20 °C, precipitación de 500 a 1200 mm y 6 a 9 meses de sequía, lo que propicia un cambio radical en el aspecto de las comunidades entre ambas temporadas ya que en buena parte del año el bosque presenta un aspecto seco en el que apenas se reconoce su afinidad tropical.¹

En estado natural o de poca perturbación, este bosque tropical caducifolio es una comunidad densa cuya altura oscila entre 5 y 12 metros y donde los elementos arbóreos pierden sus hojas casi por completo durante el periodo de sequía, comprendido entre diciembre y junio y por lo general florecen a fines de la época seca o bien a principios de la temporada de lluvias. Debido a que este tipo de vegetación se desarrolla entre el piedemonte occidental de la sierra y la planicie costera noroccidental con continuidad latitudinalmente, la composición de

las comunidades que lo representan desde Sonora hasta Nayarit y Jalisco es relativamente más uniforme. La estructura de este tipo de vegetación es de un solo estrato arbóreo aunque en ocasiones pueden existir dos; su composición florística es muy diversa y tiende a presentar algunas variaciones que se producen de acuerdo a las condiciones ecológicas imperantes en el sitio donde la vegetación prospera; además se reconoce que dentro de este bosque se encuentran especies que pertenecen al género *Bursera*.²



Figura 2. Bosque tropical caducifolio; A la izquierda imagen del bosque tropical caducifolio en época de lluvias, y a la derecha imagen de la misma zona en temporada de secas.

El género *Bursera* agrupa más de un centenar de especies de plantas leñosas. Las especies de *Bursera* han sido conocidas y usadas en México por las principales culturas mesoamericanas. A este género pertenecen los populares “copales” (náhuatl: *copalli* = incienso) y “cuajotes” (náhuatl: *quáuitl* = árbol; *xiotl* = lepra), cuya distribución se restringe al continente americano, en particular a la mitad septentrional de su porción intertropical, pues se extiende desde los extremos suroeste y sureste de los Estados Unidos hasta el norte de Perú y de Brasil, incluyendo las Antillas y las Galápagos. Su centro de diversidad se localiza en México, de donde hasta la fecha se conocen unas 80 especies más o menos claramente definidas, aunque todavía queda un amplio contingente por descubrir, por estudiar y por describir, por lo que este género en nuestro país posiblemente sobrepase las 100 especies.³

Género con más de cien especies, distribuidas desde el sur de los Estados Unidos hasta Sudamérica, concentrando notablemente su diversidad en la vertiente pacífica de México. Muchas de ellas constituyen elementos dominantes o codominantes de la selva baja caducifolia. La resina aromática (copal) de varias especies se emplea a modo de incienso y el aceite esencial de *B. linanoe*, es el linalol que se utiliza en la industria de los cosméticos y algunas artesanías como las cajitas de Olinalá, típicas del estado de Guerrero (Figura 3). En diversas partes de México y de Centroamérica se usan árboles de *Bursera* para construir cercas vivas, ya que sus ramas convenientemente cortadas y enterradas producen nuevos individuos. Esta facilidad de reproducción por estacas representa una situación ventajosa que debería aprovecharse en acciones de reforestación.⁴



Figura 3. Cajita de Olinalá.

Todas las especies de *Bursera* producen aceites esenciales del grupo de los terpenos, que a menudo proporcionan a las plantas intensos y variados aromas al estrujarse. Tales aromas permiten por lo general en el campo separar claramente entre sí las diversas especies que conviven en una determinada localidad. Sin embargo, un amplio estudio llevado a cabo mediante la cromatografía de gases ha mostrado que la presencia y la cuantía de los diferentes terpenos a menudo varía más entre las poblaciones de la misma especie que entre los diferentes taxones del género.³



Figura 4. Cerca viva compuesta de árboles del género *Bursera*.

El género está compuesto por árboles o a veces arbustos caducifolios, resinoso-aromáticos, dioicos o polígamo-dioicos, rara vez hermafroditas; la corteza externa de las partes lignificadas provista de una capa de clorénquima, la del tronco a menudo rojiza o amarillenta y exfoliante, otras veces gris, lisa y sin exfoliarse, las ramillas abreviadas (braquiblastos) comúnmente presentes; hojas sin estípulas, a menudo dispuestas en forma de roseta en los extremos de los braquiblastos, otras veces alternas y esparcidas sobre ramas jóvenes y vigorosas, en la mayor parte de las especies imparipinnadas y con los folíolos opuestos pero a veces (al menos parcialmente) bipinnadas, trifolioladas o simples (unifolioladas), el raquis con frecuencia alado, a las hojas normales en muchos casos les anteceden en aparición una o varias rosetas de catáfilos más o menos precozmente caedizos, de forma oblonga, lanceolada o triangular, y también es frecuente que las primeras hojas en aparecer sean trifolioladas o con un número de folíolos más reducido que el común para la especie; inflorescencias axilares,

originándose por lo general con o antes de las primeras hojas y entonces a menudo se observan como si fueran fasciculadas o aglomeradas sobre los braquiblastos, en forma de panículas, tirsos, (pseudo-) racimos, cimas, glomérulos, o bien, las flores solitarias por reducción, bractéolas por lo general presentes; flores casi siempre unisexuales, rara vez funcionalmente hermafroditas (aunque las femeninas regularmente aparentan tener el androceo bien desarrollado), pequeñas, trímeras a pentámeras, rara vez hexámeras; cáliz profundamente dividido, sus lóbulos abiertos en el botón; corola de prefloración valvada, a menudo conduplicado-valvada, los pétalos por lo general más largos que el cáliz, blanquecinos, amarillentos, verdosos o rojizos, con frecuencia cuculados; estambres dos veces más numerosos que los pétalos, dispuestos en dos series iguales o en ocasiones algo desiguales, insertos en la base del disco, anteras dorsifijas, por lo general más pequeñas y estériles en las flores femeninas, disco glandular, anular, ovario sésil, bi o trilocular, con 2 óvulos péndulos en cada lóculo, estilo por lo general corto o apenas evidente, a veces parcial o totalmente dividido en 2 ramas, estigmas 2 ó 3; fruto en forma de drupa ovoide, obovoide, elipsoide a esférica, biconvenxa o más o menos asimétricamente trígona, exocarpio al principio carnoso pero luego coriáceo y tardíamente dehiscente por medio de 2 ó 3 valvas, hueso parcial o totalmente cubierto por un pseudoarilo que al abrirse el fruto suele ser rojo, anaranjado o amarillento, pero por lo común pronto se torna gris o blanquecino; semilla por lo general una sola en cada fruto.

El género ha sido dividido en dos secciones por McVaugh y Rzedowski⁵ de acuerdo con la morfología de sus especies:

- Sección *Bursera* (cuajotes o papelillos). Presentan corteza exfoliante, frutos trivalvados, ovario trilocular, flores trímeras y pentámeras y hojas poco aromáticas.



- Sección *Bullockia* (copales). Presentan corteza lisa, no exfoliante, frutos bivalvados, ovario bilocular, flores tetrámeras o pentámeras y hojas muy aromáticas.



El arreglo taxonómico del género aún no es satisfactorio y las tendencias evolutivas de la química de este género aún no se conocen bien.⁶ En la Tabla 1 se resume la información cuantitativa relativa a la diversidad y amplitud de distribución geográfica de las especies definidas para las especies de *Bursera*. Cabe enfatizar el hecho de que los valores numéricos asignados corresponden al estado actual de conocimiento del grupo y que los futuros avances con seguridad los irán modificando en función de hallazgos de especies adicionales y de algunos cambios en la circunscripción de otras.³

Tabla 1. Relación cuantitativa de especies conocidas de *Bursera* por región.

Región	No. de especies conocidas
Cuenca del Balsas	49
Occidente de México (Jalisco, Colima y Nayarit)	27
Cuenca del río Tehuantepec y la región istemeña adyacente	21
Cuenca del Papaloapan	20
Antillas	13
Centroamérica	10
Sonora	10
Cuenca del Pánuco	9
Sudamérica	7
Baja California	6
Planicie costera de Veracruz	5

4. PARTE TEÓRICA

En el Laboratorio de Química de Productos Naturales se han realizado estudios abarcando alrededor de treinta y seis especies, de las que se han reportado componentes extraídos de las partes aéreas (hojas, tallos, frutillas, exudados y resinas) de las plantas.⁷⁻²⁵ El trabajo elaborado en esta tesis, forma parte de la continuación de los estudios sistemáticos relacionados con el género *Bursera*,²⁶⁻³⁶ el cual comprende el aislamiento y caracterización estructural de los componentes principales obtenidos del extracto hexánico de los tallos de la *Bursera multijuga* Engl.

4.1. Especie de estudio



Figura 5. Heinrich Gustav Adolf Engler.

Fue nombrada como *Bursera multijuga* Engl por el botánico y explorador alemán Heinrich Gustav Adolf Engler. Anteriormente fue conocida como *Bursera pringlei* S. Wats o *Bursera rubra* (Rose) Riley. Esta especie se encuentra distribuida geográficamente en nuestro país en los Estados de Aguascalientes, Colima, Durango, Jalisco, Michoacán, Nayarit, Sinaloa y Zacatecas.⁴ Forma parte del grupo 4 del género *Bursera*, al igual que la *Bursera morelensis*, *B. kerberi* y *B. suntui* por lo que queda comprendida dentro del grupo de los cuajotes rojos y es conocida con el nombre común de palo colorado.



Figura 6. Arbusto de *Bursera multijuga* del jardín botánico del IIQB-UMSNH.



Figura 7. Distribución geográfica de *Bursera multijuga*.

División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Subclase:	Rosidae
Orden:	Sapindales
Familia:	Burseraceae
Género:	<i>Bursera</i>
Especie:	<i>multijuga</i>

Es un árbol hasta de 12 m de alto, resinoso y poco aromático, glabro, con tronco hasta de 30 cm de diámetro, con corteza externa exfoliante en láminas delgadas de color pardo-rojizo, con resina amarillenta, transparente, poco aromática; ramillas jóvenes glabras, de color pardo-rojizo; hojas imparipinnadas, pecíolo de 2.5 a 3 cm de largo, raquis angostamente alado, ampliándose ligeramente hacia los folíolos terminales, con 17 a 23 folíolos, base redondeada a ligeramente cuneada, borde serrado, algunos folíolos con margen entero hacia la mitad inferior de ambos o uno de los lados, haz verde brillante, envés ligeramente glauco-amarillento; inflorescencias en panículas de 1.5 a 3.5 cm de largo en las axilas de las hojas terminales; flores masculinas pentámeras, sépalos triangulares, de 1.5 mm de largo, pétalos amarillento-verdosos, oblongos, de 5 mm de largo por 1.5 mm de ancho, estambres subiguales, filamentos de 1 mm de largo, anteras de 1.2 mm de largo, disco anular; flores femeninas similares a las masculinas con estaminodios presentes, ovario trilocular; pedúnculo del fruto de 6 a 14 mm de largo, algo curvo, fruto trivalvado, pardo oscuro en la madurez, de 6 a 8 mm de largo, el hueso recubierto totalmente por un pseudoarilo verdoso a pardo-amarillento al madurar. Se encuentra con fruto de agosto a noviembre.⁴



Figura 8. Flor y frutos de *Bursera multijuga*.



Figura 9. Tallo y hojas de *Bursera multijuga*.

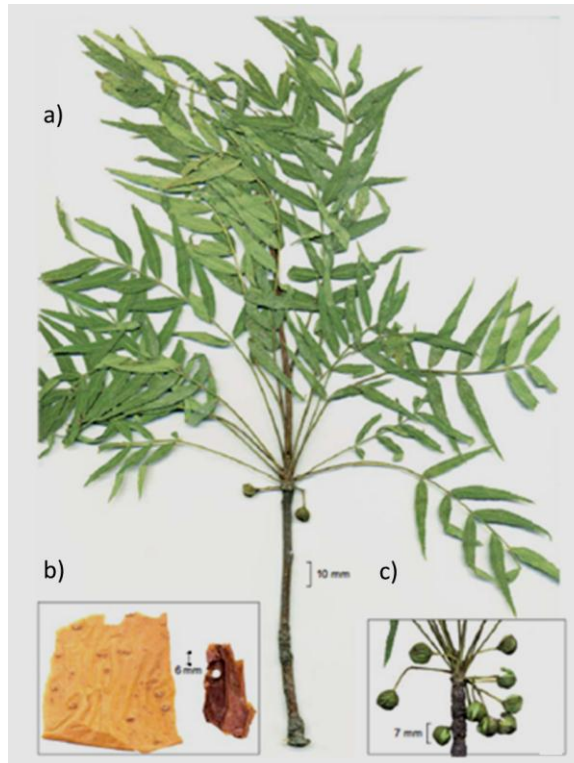


Figura 10. *Bursera multijuga*. a) rama con frutos; b) detalle de corteza externa; c) frutos.

4.2. Clasificación biosintética de metabolitos secundarios

Las plantas producen una gran cantidad y diversidad de compuestos orgánicos que no parecen tener una función directa en el crecimiento y desarrollo. Estas sustancias se conocen con el nombre de metabolitos secundarios. Los metabolitos secundarios no tienen función reconocida o directa en los procesos de fotosíntesis, respiración, síntesis de proteínas o asimilación de nutrientes.

Los metabolitos secundarios difieren de los metabolitos primarios (aminoácidos, nucleótidos, azúcares y lípidos) en que tienen una distribución restringida en el reino vegetal. Es decir, un metabolito secundario determinado se encuentra con frecuencia en una sola especie vegetal o grupo de especies relacionadas, mientras que los metabolitos primarios se encuentran en todo el reino vegetal.

El estudio de estos compuestos fue iniciado por los químicos orgánicos en el siglo diecinueve y principios del siglo veinte, quienes se interesaron en estas sustancias y las llamaron "productos naturales", debido a su importancia como drogas, venenos, sabores y materias industriales. Más recientemente, se descubrió que muchos metabolitos secundarios tenían importantes funciones en las plantas como; proteger a las plantas de la ingestión de herbívoros y de las infecciones por patógenos microbianos, también como atrayentes de polinizadores y dispensadores de semillas y como agentes de competencia planta-planta.

Los metabolitos secundarios pueden dividirse en tres grupos químicamente diferentes: terpenos, fenoles y compuestos que contienen nitrógeno.³⁷

Los terpenos, o terpenoides, constituyen el mayor grupo de productos secundarios. La existencia de características estructurales comunes en todas las sustancias terpenoides implica que también comparten sus orígenes biosintéticos. Ruzicka en 1953 formuló "la regla biogenética del isopreno", que predice las relaciones biosintéticas entre las distintas clases de terpenos. En la que todos los terpenoides son construidos en unidades de isopreno (metilbutadieno), de tal modo que se clasifican en función del número de estas unidades de isopreno, de fórmula molecular C_5H_8 el cual es un dieno conjugado llamado 2-metil-1,3-butadieno (Figura 11), cuya estructura posee 4 átomos de carbono en estado de hibridación sp^2 y un carbono metínico. Las principales clases de terpenos son: monoterpenos (2 unidades de isopreno), diterpenos (4 unidades de isopreno), sesquiterpenos (3 unidades de isopreno), sesterterpenos (5 unidades de isopreno), triterpenos (6 unidades de isopreno), tetraterpenos (8 unidades de isopreno) y politerpenos (más de 9 unidades de isopreno). El nombre de terpeno se deriva de un grupo de estas sustancias llamados isoprenoides que se derivan de la turpentina y se mostró que contenían dos unidades de isopreno. Con el tiempo, terpeno se convirtió en un nombre genérico para todas las clases de sustancias compuestas de unidades isopenteno independientemente del número de unidades presentes en la molécula. Las plantas superiores producen los miembros de todas estas clases de terpenos.

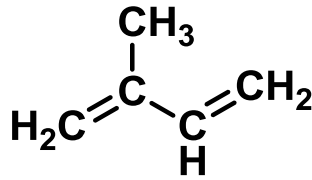


Figura 11. Fórmula desarrollada del isopreno.

Las investigaciones posteriores de las rutas biosintéticas han establecido la corrección esencial de estas ideas y han conducido a una vía común a partir de acetil-CoA a través de mevalonato al difosfato de isopentenilo, intermediario central (IPP). El IPP se isomeriza a difosfato de dimetilalilo (DMAPP) y también participa en la serie de pasos de elongación de la cadena para generar los precursores acíclicos de las diversas clases de terpenos, difosfato de geranilo (GPP, C10), difosfato de farnesilo (FPP, C15) y difosfato de geranilgeranilo (GGPP, C20). Estos precursores acíclicos (difosfatos prenil) se convierten a los diversos miembros de las clases monoterpenos, sesquiterpenos y diterpenos por una ciclación inicial, a menudo seguida de otras, sobre todo oxidativa para las transformaciones de los hidrocarburos cíclicos. En algunos casos, se producen reordenamientos y carbonos se han ganado o perdido, lo que resulta en estructuras en las que el esqueleto de isoprenoides regulares ya no esté intacto. El acoplamiento reductivo de dos moléculas de FPP en una manera "cabeza-a-cabeza" genera el triterpeno escualeno, que a su vez puede ser modificada por ciclación y esteroides relacionados. De manera análoga, GGPP es el precursor de los tetraterpenos que incluyen los carotenos y xantofilas. El resultado para politerpenos es el alargamiento adicional de GGPP, o en algunos casos FPP o GPP más directamente, mediante la adición de unidades de IPP. Con base en la consideración evidente de la Figura 12; los terpenos pueden ser definidos como aquellas sustancias que se derivan por biosíntesis del IPP.

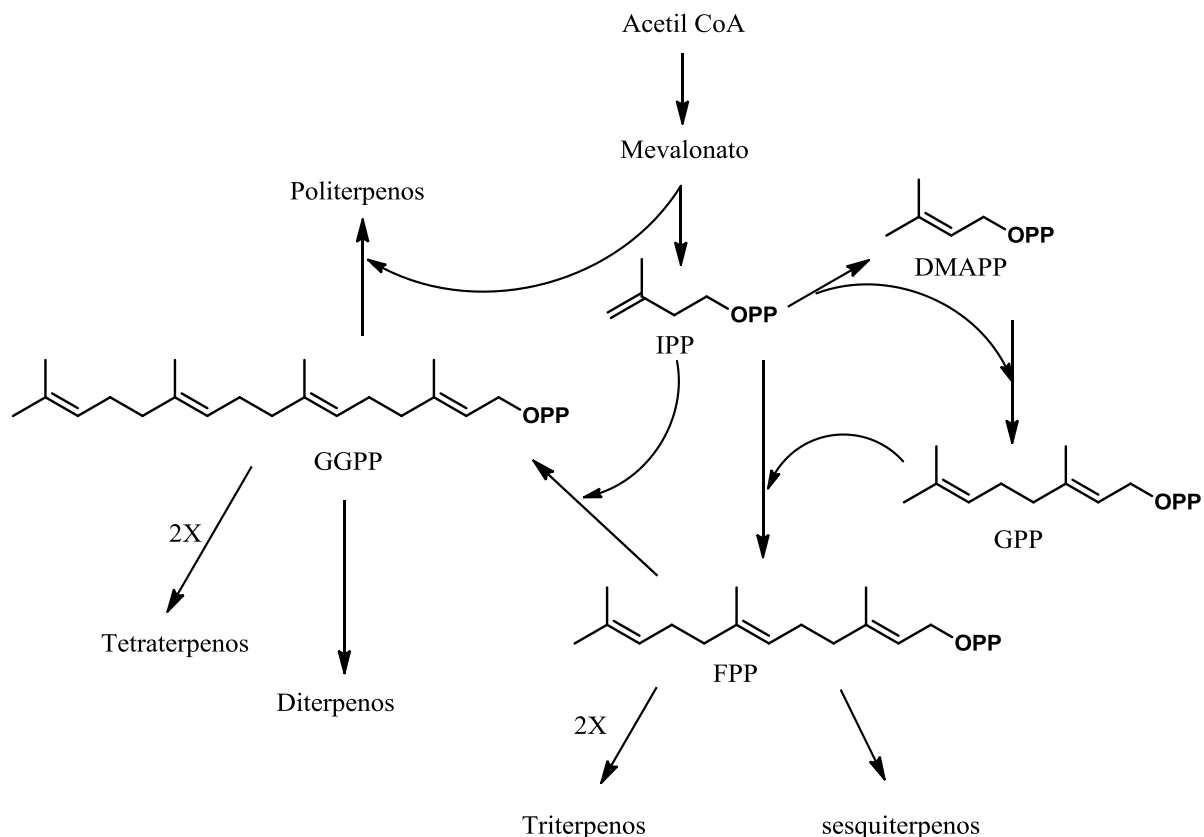


Figura 12. Relaciones biosintéticas entre las distintas clases de terpenos.

Las plantas superiores producen una gran variedad de sustancias isoprenoides. Algunos encontrados en la mayoría de las plantas tienen un papel en los procesos fundamentales de metabolismo de la energía y en conjuntos macromoleculares necesarios para el crecimiento. Los esteroides, que se requieren como componentes de la membrana, y los carotenos, que sirven como pigmentos fotosintéticos accesorios, son ejemplos de tales metabolitos terpenoides. Muchas otras sustancias isoprenoides son de una naturaleza más especializada en la que se encuentran en sólo una gama limitada de las plantas.

En los casos en los que se sabe o se sospecha que la función de los metabolitos secundarios, son reguladores que permiten a la planta que se adapte a los cambios en el medio ambiente o las tensiones biológicas. Por ejemplo, se cree que las fitoalexinas sesquiterpenoides y diterpenoides producidas por algunas plantas participan en la resistencia a infección por

patógenos microbianos. Muchas sustancias isoprenoides en plantas, como metabolitos secundarios en general, son de función desconocida.

El esquema representado en la Figura 12 muestra la importancia fundamental de la IPP como el precursor de todas las clases de terpenos. En la Figura 13 se ilustran las reacciones responsables de la conversión de la IPP a la familia de cuatro difosfatos de prenilo que sirven a su vez como precursores de todas las principales clases de terpenos.

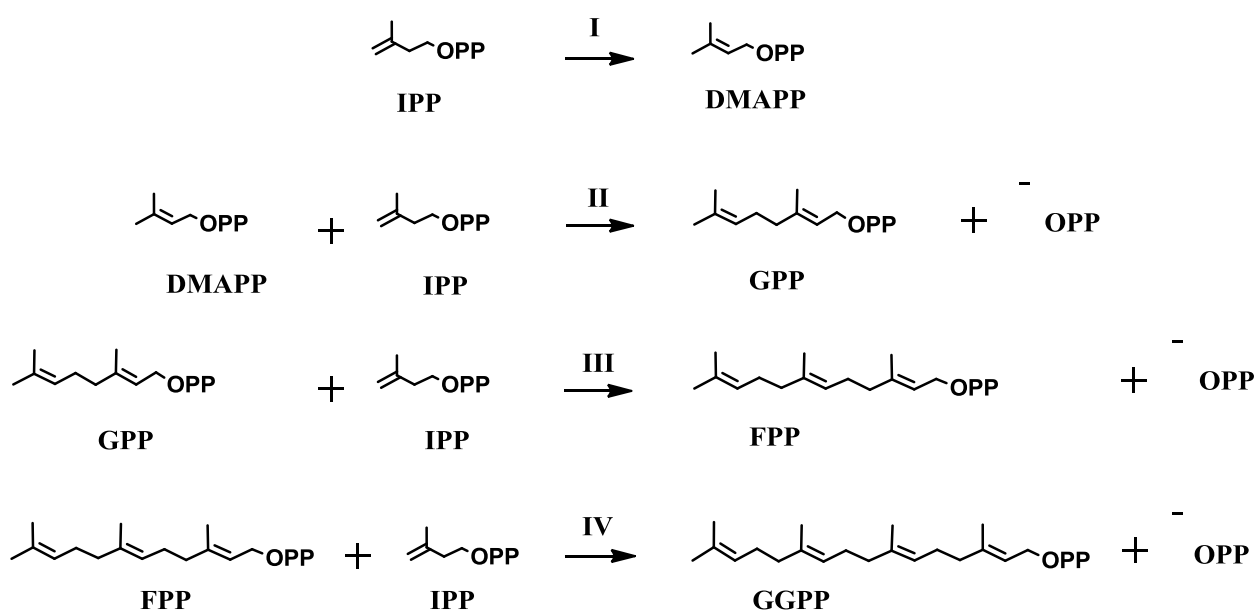


Figura 13. Las reacciones son catalizadas de forma enzimática por la difosfato de dimetilalilo isomerasa (I); dimetilalilo transferasa (II); geranyl transferasa (III); farnesil transferasa (IV).

El difosfato de dimetilalilo se forma a partir de IPP por una reacción de isomerización. Esto implica la adición de un protón en C-4 del IPP junto con la eliminación estereoespecífica de un protón del C-2 y el consiguiente desplazamiento del doble enlace que se encuentra entre C-3 y C-4 a la posición entre C-2 y C-3. Las actividades de la prenil transferasa son responsables de la transferencia de una unidad de prenilo de un donante difosfato prenil a difosfato de isopentenilo para generar un nuevo donante difosfato prenil con una unidad C-5-prenil adicional en la cadena. La reacción implica la adición electrofílica de un ion carbonio generado

en C-1 del donante prenil por eliminación de difosfato, a la posición rica en electrones C-4 de la molécula de IPP aceptor. Una eliminación de protones a partir del aducto establece el enlace doble en C2 y C3 del nuevo producto difosfato prenil para completar el proceso.³⁸

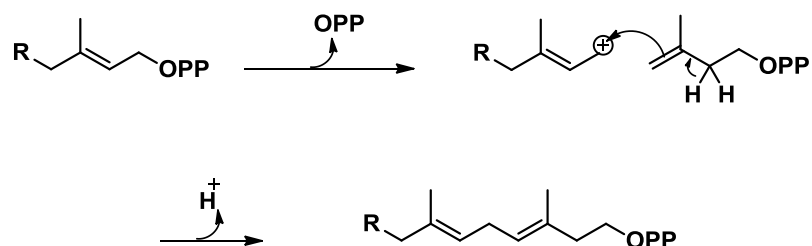
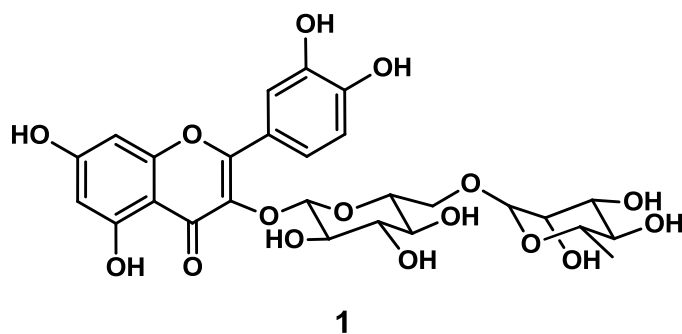


Figura 14. Reacción realizada por la enzima prenil transferasa.

4.3. Estudios previos al género *Bursera*

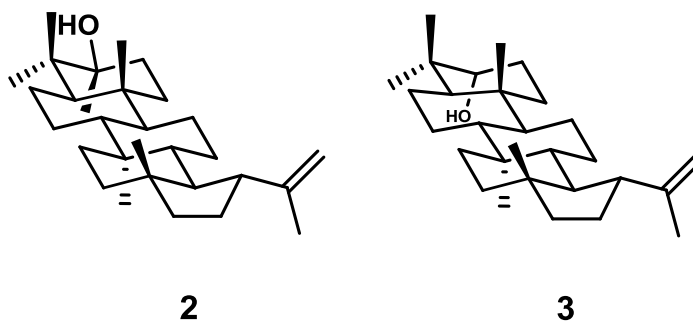
Los productos naturales obtenidos de las plantas que pertenecen al género *Bursera* presentan una gran variedad estructural de compuestos.

Las hojas de las plantas que pertenecen al género *Bursera* son particularmente ricas en estructuras químicas que contienen tanto oxhidrilos alifáticos pertenecientes a la parte del azúcar del glicósido y oxidrilos aromáticos pertenecientes a la parte de la aglicona relativa a la estructura a la cual pertenece un glicósido, como los glicósidos de naturaleza flavonoide obtenidos de los extractos polares de ellas. Un ejemplo es el glicósido disacárido flavonoide 3-O-rutinósido de quercetina “Rutina” (**1**). Este glicósido se ha obtenido con excelentes rendimientos de *la Bursera longipes*, *B. kerberi*, *B. fagaroides* HBK, *B. bonetii*, *B. penicilata*, *B. multijuga*, *B. morelensis* y *B. vejar-vazquezii*.³⁹⁻⁴⁰

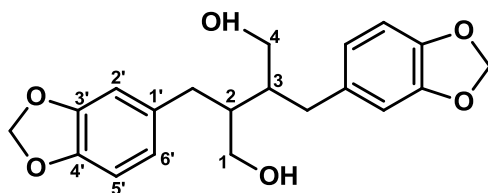


El estudio sistemático del género *Bursera* ha mostrado los siguientes resultados:

En más del 60% de las especies de *Burseras* que pertenecen a la sección *Bullockia*^{41,29} se presentan estructuras triterpénicas derivadas de los esqueletos de oleanano, ursano y lupano, tal es el caso del metabolito de esqueleto del lupano; 3 β -lupeol (**2**) y el 3-*epi*-lupeol (**3**), los cuales fueron obtenidos de los tallos de la *B. mirandae*.⁴²

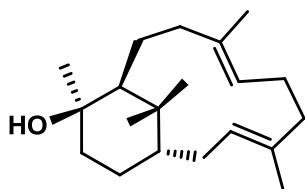


Tomando en consideración la clasificación existente en la que se agrupan las plantas del género *Bursera* en cuanto al tipo de corteza que presenta la especie, es característico que las *Burseras* denominadas “cuajotes amarillos” los compuestos se han aislado en mayor cantidad son de naturaleza lignánica,^{43,44} como es el caso de *bis*-2,3-(3,4-metilendioxi-bencil)-1,4-butanodiol (**4**) obtenido de la *Bursera fagaroides* HBK, *B. fagaroides* var. *elongata*, *B. fagaroides* var. *purpussi*, *B. discolor* y de la *B. bolivarii*.

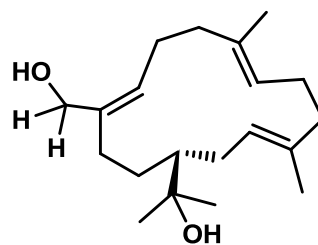


4

El 12-*epi*-verticilol (5), es un diterpeno de fórmula molecular $C_{20}H_{34}O$, aislado de los tallos de la *B. kerberi*,³⁰ con un esqueleto bicíclico tipo verticilano.^{45,26} Este tipo de esqueletos son característicos de los cuajotes rojos. Otro aislado del género *Bursera* de naturaleza diterpénica relacionado con los verticilanos son los cembranos; tenemos el caso de la *B. multifolia* de la que se aisló el cembrenol (6).⁴⁶



5



6

Se ha demostrado que ambos tipos de diterpenos son intermediarios en la biosíntesis de los taxanos, y en el caso de los cembranos, son intermediarios para la síntesis de otras familias de diterpenos como los basmanos, brareanos, eucilanos, seconervitanos entre otros.⁴⁷

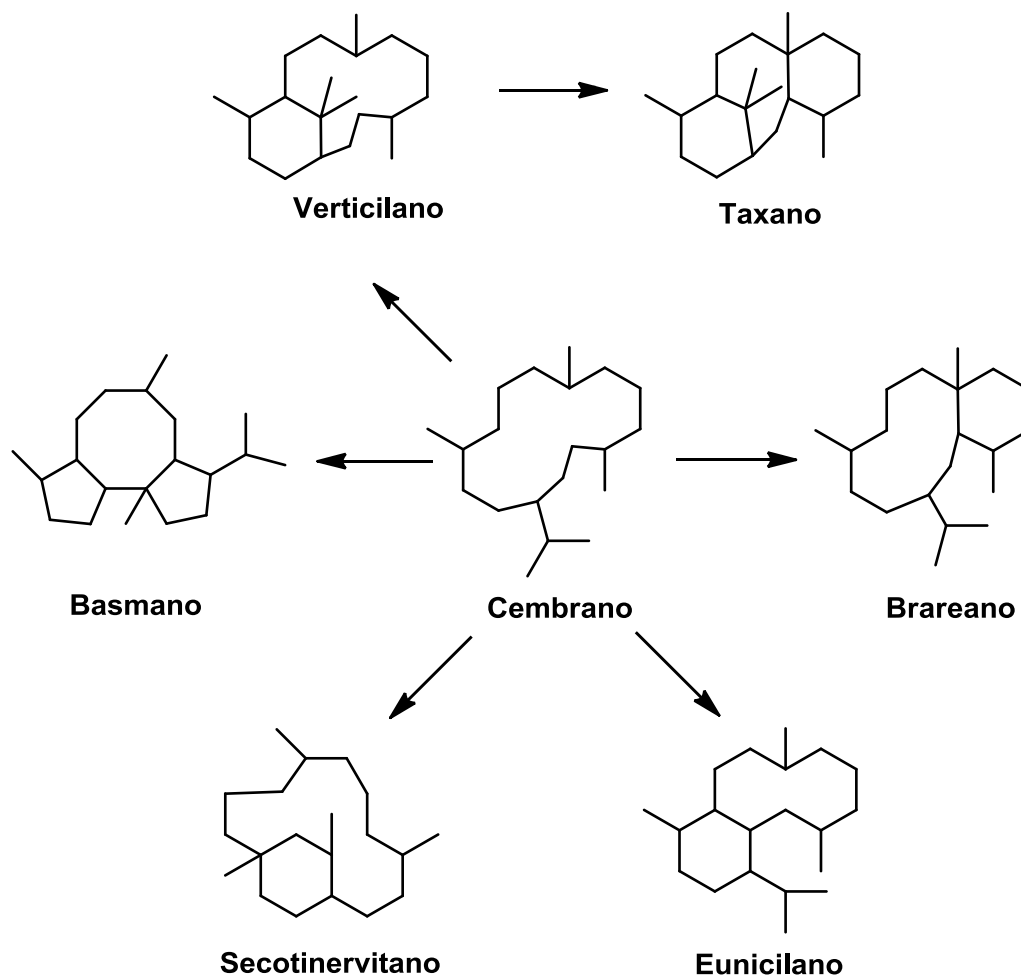
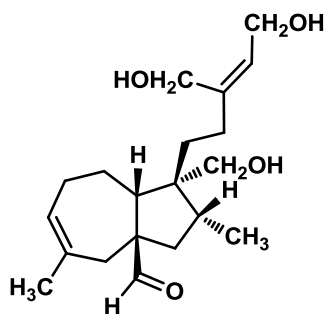


Figura 15. Esqueletos diterpénicos derivados del núcleo de cembrano.

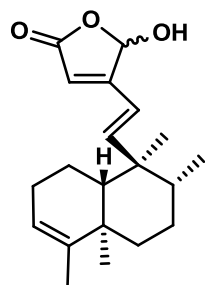
4.4. Estructuras diterpénicas

Los diterpenos se definen por su origen biosintético, el precursor difosfato de geranil geranilo (C₂₀). El cual se deriva de cuatro unidades de isopreno. Los diterpenos pueden ser clasificados arbitrariamente de acuerdo con el número de anillos presentes en el sistema. Por lo tanto, hay compuestos bicíclicos tales como el portulal (**7**) aislado de la planta *Portulaca grandiflora*, tricíclicos como el clerodano (**8**) obtenido de *Callicarpa americana*⁴⁸ y estructuras tetracíclicas tales como la podolida (**9**). Además, hay compuestos acíclicos, como por ejemplo el

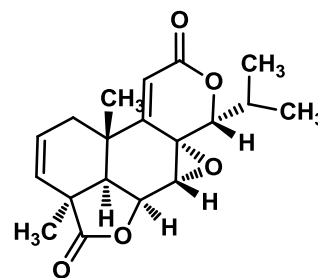
fitol (**10**) y sustancias macrocíclicas de tipo cembreño; como el neocembrano (**11**)⁴⁹ aislado de la termita *Nasutitermis exitiosus* y el verticilano como el 12-*epi*-verticilol (**5**) aislado en *B. kerberi*.



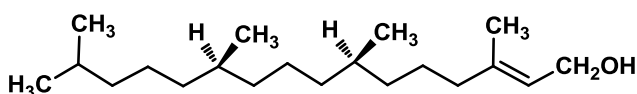
7



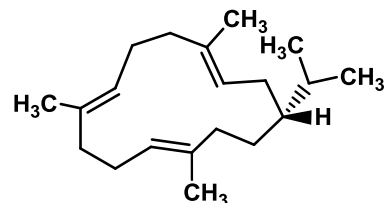
8



9



10



11

Los derivados del verticilano y el cembreño constituyen un grupo relevante de diterpenos cuyo esqueleto de carbono cíclico es un intermediario clave en la biosíntesis de los taxanos. El mecanismo de la ciclación es catalizada por la enzima taxadieno sintasa, donde el difosfato de geranilgeranilo (GGPP) procede por ciclación inicial a formar un biciclo[9.3.1]pentadeca-3,7-dieno formando el carbocatión intermediario verticilen-12-ilo donde ocurre una transferencia de protón de C-11 a C-7 que conduce a la formación del anillo C del taxadieno.⁵⁰

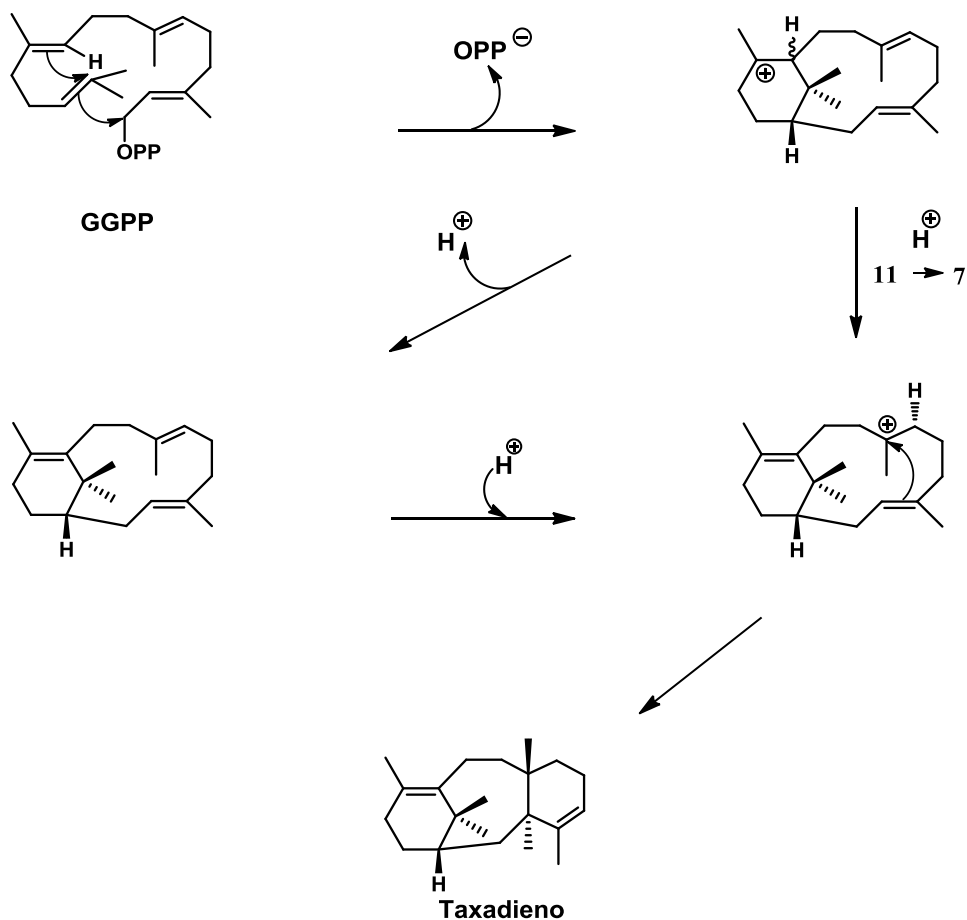


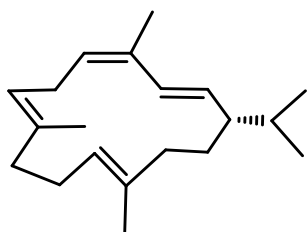
Figura 16. Reacción catalizada por la enzima taxadieno sintasa.

4.4.1. Cembranos

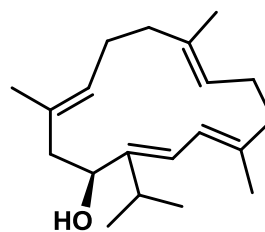
Los metabolitos que poseen esqueleto de cembrano fueron estudiados en la década de los 60, primeramente por los grupos de investigación de Dauben, Thiessen y Resnick⁵¹ por un lado, y por otro lado por Kobayashi y Akiyoshi.^{52,53} Estos grupos publicaron simultáneamente la estructura del cembrano (**12**) obtenido de la resina de *Pinus albicaulis*.

Desde entonces han sido aislados de diversas fuentes tales como el Cleospinol A (**13**) aislado de *Cleome spinosa*,⁵⁴ en corales como el *Sarcophyton glaucum*⁵⁵ el sarcophytol A (**14**) y en animales como el *Alligator sinensis* el Cembrano A (**15**).⁵⁶ A algunos cembranos se les han realizados ensayos biológicos, como ejemplo el sarcophytol A, el cual presentó actividad

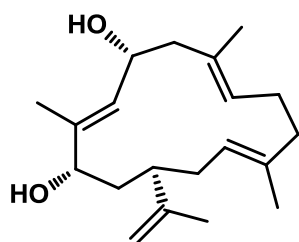
antitumoral y también una potente actividad inhibitoria en contra de diversas clases de promotores tumorales, se demostró que inhibe el desarrollo de tumores espontáneos en órganos como las mamas y el hígado. En los experimentos no mostró ningún efecto tóxico sobre los animales de experimentación, por lo que se coloca como un potencial agente quimiopreventivo.⁵⁵



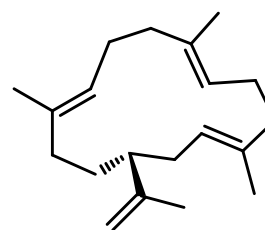
12



13



14

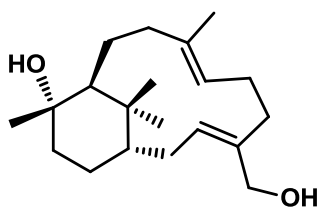


15

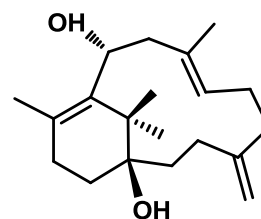
La nomenclatura de estos compuestos se basó en el grupo taxonómico de los pinos *Cembrae*, los cuales incluían al *Pinus albicaulis* de donde Dauben y colaboradores aislaron el cembreno (**12**).⁵¹ Otro nombre conocido para estas estructuras fue “duvano” que proviene de la palabra serbia “duvan” que quiere decir tabaco, este nombre fue introducido por Rowland y Roberts ya que aislaron metabolitos de este esqueleto en la planta del tabaco.^{57, 58}

4.4.2. Verticilanos

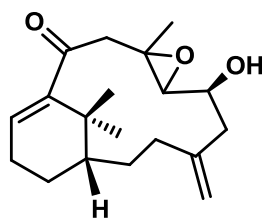
Los compuestos con esqueleto tipo verticilano han sido aislados de coníferas como *Sciadopitys verticillata*.⁵⁹ De esta conífera del cual su sinónimo es *Taxus verticillata* se origina su nombre haciendo alusión a la disposición de sus hojas en forma de verticilos. También ha sido aislado **16** de la planta hepática *Jackiella javanica*,⁶⁰ así como **17** del coral suave *Cespitularia hypotentaculata*⁶¹ y de *C. taeniata*⁶² la cespitularina C (**18**) y D (**19**).



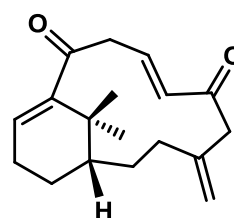
16



17



18

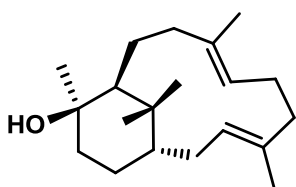


19

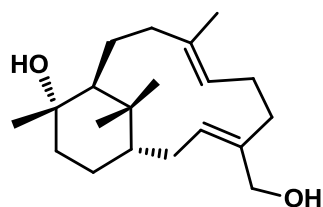
De los tallos de *Bursera suntui* se aislaron los derivados de tipo verticilano, (1*S*,3*Z*,7*E*,11*S*,12*S*)-(+)-verticila-3,7-dien-12,20-diol (**20**), el 20-acetato (1*S*,3*Z*,7*E*,11*S*,12*S*)-(+)-verticila-3,7-dien-12,20-diol (**21**), (1*S*,3*E*,7*E*,11*R*)-(+)-3-verticila-7,12,18-trieno (**22**), (1*R*,3*E*,7*E*,11*R*,12*Z*)-(+)-verticila-3,7,12-trieno (**23**), (1*R*,7*E*,11*Z*)-(-)-verticila-4,7,11-trieno (**24**), y (1*S*,3*E*,7*E*,11*S*,12*S*)-(+)-verticila-3,7-dien-12-ol (**25**).

De los tallos de *B. kerberi* se aisló el (1*S*,3*E*,7*E*,11*S*,12*R*)-(+)-verticila-3,7-dien-12-ol (**5**), el cual es epímero de **25**. Así como **22**, **23** y **24**. Sus estructuras y estereoquímica fueron determinadas por los datos de resonancia magnética nuclear, mientras que la configuración absoluta se determinó por comparación de los datos de dispersión óptica rotatoria con la del (1*S*,3*E*,7*E*,11*S*,12*S*)-(+)-verticila-3,7-dien-12-ol (**25**), obtenido a partir de *Sciadopitys verticillata*,⁵⁹

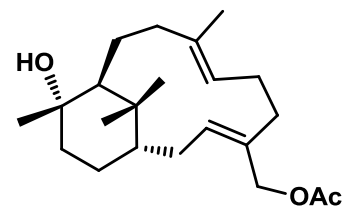
y los de (1*R*,3*E*,7*E*,11*R*,12*R*)-(-)-verticila-3,7-dien-12-ol (**26**) y (1*R*,3*E*,7*E*,11*R*,12*S*)-(-)-verticila-3,7-dien-12-ol (**27**), aislado a partir de la hepática *Jackiella javanica*.^{30,60}



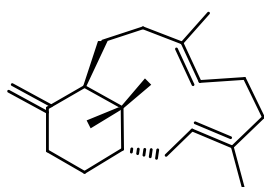
5



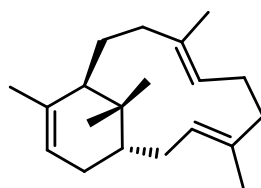
20



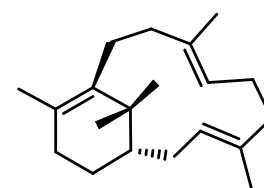
21



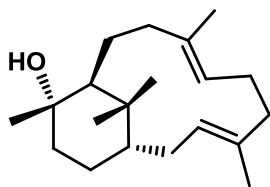
22



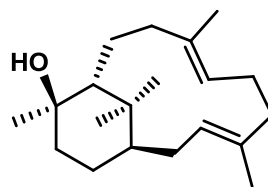
23



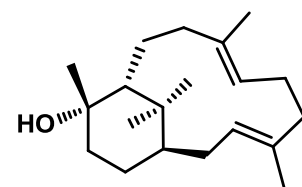
24



25



26



27

4.5. Determinación de configuración absoluta

Por otro lado es bien conocido que los fármacos son sustancias que en cantidades relativamente pequeñas provocan una respuesta por parte de los organismos vivos. Este efecto resulta de la interacción entre las moléculas del fármaco y un sitio específico de la superficie celular; es decir, un bioreceptor. Dichos receptores poseen características estructurales que

actúan en una forma complementaria con el fármaco para iniciar una serie de eventos que conducen a la respuesta biológica. Y esta relación no se limita a los fármacos. Otras moléculas que también muestran una complementariedad específica hacia sus sustratos potenciales son las enzimas y los anticuerpos, que al igual que los receptores biológicos se enlazan con el sustrato mediante interacciones de tipo puente de hidrógeno, dipolo-dipolo, Van der Waals y fuerzas de polarización, más que a través de la formación de enlaces covalentes.⁶³

Las investigaciones realizadas sobre la relación estructura-actividad en estos sistemas sugieren su analogía con la manera en que una llave debe complementarse con la cerradura para provocar su efecto. Se conocen muchos ejemplos de la estereoespecificidad observada donde un estereoisómero es activo, pero no así su enantiómero que es inactivo. Como la *S*-asparagina que tiene un sabor amargo, mientras que su enantiómero *R*-asparagina es dulce. El ácido (+)-ascórbico posee propiedades curativas contra el escorbuto, mientras que el isómero (-) es inactivo.⁶⁴

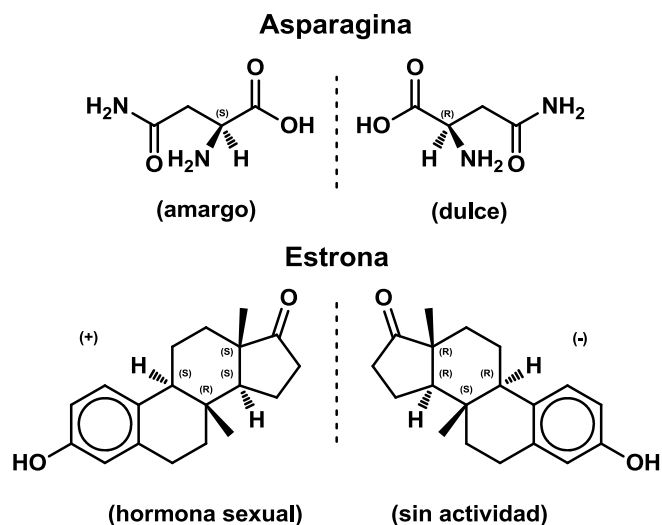


Figura 17. Ejemplos de estructuras enantioméricas y sus actividades.

Debido a lo anteriormente mencionado queda claro que la configuración absoluta de las moléculas juega un papel dominante en el comportamiento de estas frente a sistemas biológicos, los métodos para establecer configuraciones absolutas son de primordial importancia. De hecho, la determinación de la configuración absoluta de cualquier molécula no fue posible sino hasta 1951, cuando Bijvoet y colaboradores desarrollaron modificaciones a las

técnicas de difracción de rayos X con el objeto de “dar profundidad” a los patrones fotográficos empleados en este método. El cual consiste en usar rayos X cuya longitud de onda coincida parcialmente con el espectro de absorción de un átomo (Rubidio, Bromo, etc.) introducido a la molécula de modo que produzca una diferencia entre los caminos recorridos de rayos X de cada átomo antes de incidir en la placa fotográfica.

Otro método usado ha sido la correlación química, el cual se basa en el conocimiento químico sobre el mecanismo de las reacciones orgánicas, el cual permite la asignación de la estereoquímica en los compuestos derivados de uno cuya configuración absoluta es conocida.

Dentro de los métodos espectroscópicos se encuentra el uso de reactivos de desplazamiento químico quirales como son los que están hechos a base de metales lantánidos (europio y praseodimio) que tienen la facultad de producir grandes variaciones en las posiciones de las señales de una muestra, mediante las interacciones que llevan a cabo con la misma. Cuando los metales de transición empleados están unidos a ligandos quirales, las interacciones que se establecen con dos sustancias enantiómeras son distintas y por lo tanto, las señales se desplazan en distinta magnitud en uno y otro caso.⁶⁴

El método de Mosher, utiliza MTPA (ácido metoxitri-fluorofenilacético) como auxiliar quiral e involucra la comparación de dos espectros. La asignación de la configuración absoluta se basa en el uso de RMN para correlacionar la estereoquímica absoluta del centro estereogénico del agente auxiliar (de configuración conocida) con el del sustrato (configuración desconocida). Lo que se tiene en cuenta en este caso son los cambios en los desplazamientos químicos de los sustituyentes del carbono asimétrico del sustrato en los dos derivados. La diferencia de desplazamientos químicos tendrá signo opuesto en ambos sustituyentes, y dependerá de la estereoquímica absoluta del centro estereogénico del sustrato.

La estructura de un auxiliar quiral debe incorporar grupos con funciones específicas:

- Un grupo polar o voluminoso para fijar una conformación particular.
- Un grupo funcional (por ej. ácido carboxílico) que dará lugar a la unión covalente con el sustrato.

- Un grupo que sea capaz de producir un efecto anisotrópico eficiente y orientado en el espacio (por ej. grupo aromático), que afecte selectivamente a los sustituyentes del sustrato.⁶⁵

4.5.1. Dicroísmo circular vibracional

Una de las técnicas que está atrayendo la atención de los químicos orgánicos es la medición del dicroísmo circular vibracional (DCV). La técnica se basa esencialmente en el hecho de que cuando una molécula se irradia con radiación infrarroja circularmente polarizada, diferentes configuraciones absolutas exhiben diferentes espectros. Ambos enantiómeros de una molécula muestran el mismo espectro de luz no polarizada infrarroja (IR).

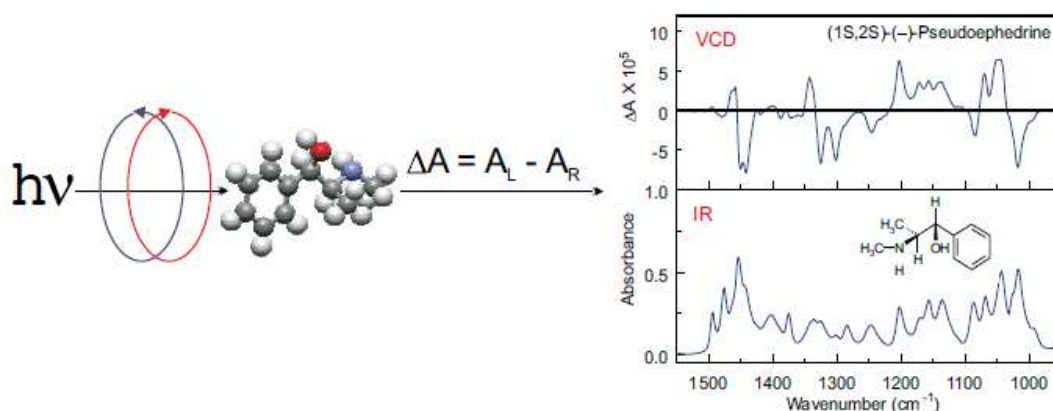


Figura 18. Esquema sobre la información que nos puede ofrecer la radiación infrarroja circularmente polarizada (DCV) o no (IR).

Cuando se utiliza la radiación infrarroja circularmente polarizada, el espectro de absorción diferencial presenta simetría de espejo de un enantiómero al otro. Por lo tanto, aunque la ubicación de los picos de absorción sigue siendo el mismo en DCV como en IR, en DCV

tienen un signo diferente. Como resultado, un espectro DCV contiene información sobre la configuración absoluta de una molécula.⁶⁶

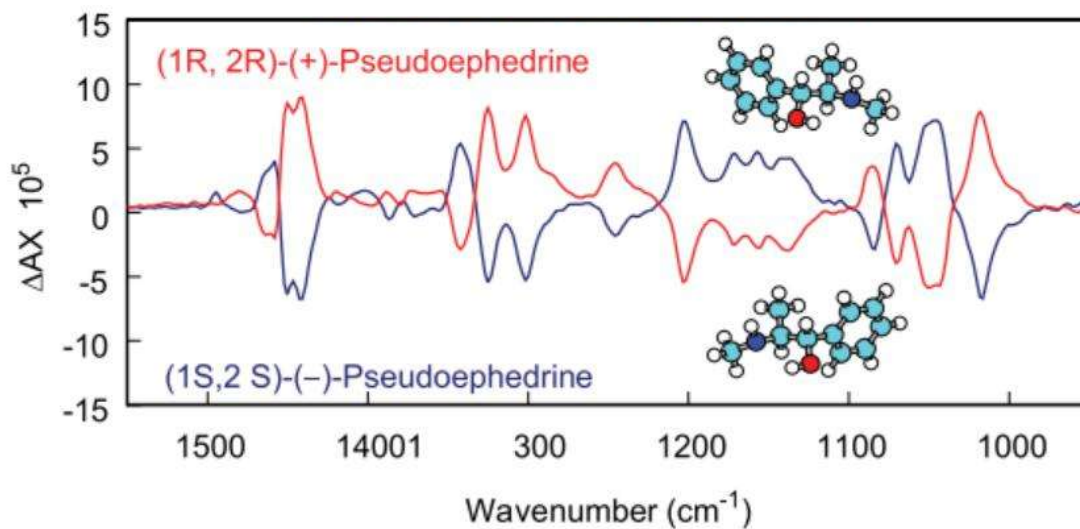
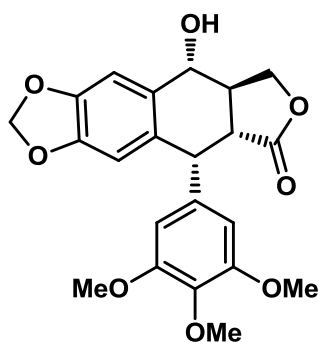


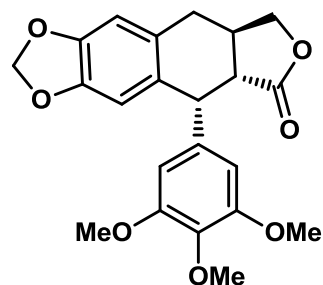
Figura 19. Comparación de los espectros de DCV de ambos enantiómeros de la Pseudoefedrina.

Esta técnica ha sido cada vez más empleada para estudiar la configuración absoluta de los productos naturales. El método se basa en la comparación del espectro experimental de dicroísmo circular vibracional (VCD) en combinación con un protocolo de modelado molecular y la curva teórica obtenida por cálculos de Teoría Funcionales de la Densidad (DFT).⁶⁷

Tal es el caso de la (7*R*,7'*R*,8*R*,8'*R*)-podofilotoxina (**28**) y la (7'*R*,8*R*,8'*R*)-deoxipodofilotoxina (**30**) obtenidas del extracto etanólico de *B. fagaroides*, cuyos modelos moleculares se construyeron de acuerdo con la configuración absoluta representada en **28** y **29**.



28



29

Las frecuencias DCV de los conformeros de **28**, se ponderaron según su contribución poblacional generando el espectro calculado el cual se comparó con el espectro DCV experimental en la Figura 20. La similitud DCV espectral para el enantiómero correcto fue de 77,2%.⁶⁷

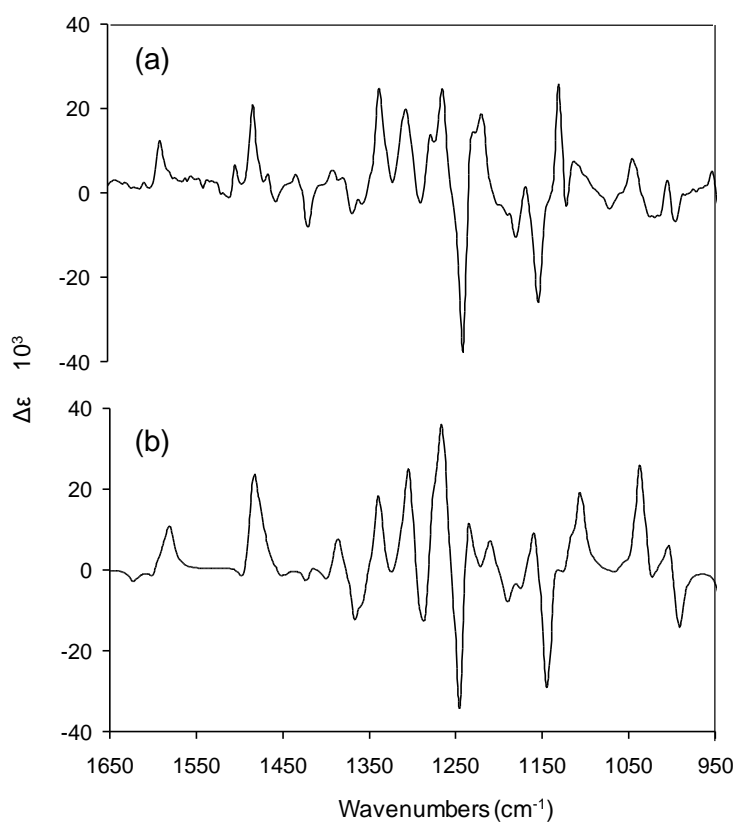


Figura 20. a) Espectro de DCV experimental, b) Espectro de DCV DFT B3LYP/DGDZVP de la podofilotoxina **28**.



Figura 21. a) Espectro DCV experimental, b) Espectro de DCV DFT B3LYP/DGDZVP de la deoxipodofilotoxina **29**.

El mismo procedimiento se aplicó para la determinación de la configuración absoluta de **30**. Obteniendo una similitud espectral dicroísmo circular vibracional para el enantiómero correcto de 86,5% determinando así la configuración absoluta de estos compuestos como: (7*R*,7*R*,8*R*,8'*R*)-(–)-podofilotoxina (**28**) y (7'*R*,8*R*,8'*R*)-(–)-deoxipodofilotoxina (**29**).⁶⁷

Otro ejemplo del uso de esta técnica es el metabolito (1*S*,11*S*,12*S*)-(+)-verticila-3*E*,7*E*-dien-12-ol (**25**) aislado de la *B. suntui*,⁶⁸ al cual también se le asignó su configuración absoluta por medio de la comparación del espectro de DCV, contra espectros calculados por Teoría de Funcionales de la Densidad a nivel B3LYP/6-31G(d,p) y B3LYP/DGDZVP. Donde la mayor correlación espectral con el espectro experimental la presentó el espectro teórico obtenido a nivel de teoría B3LYP/DGDZVP.

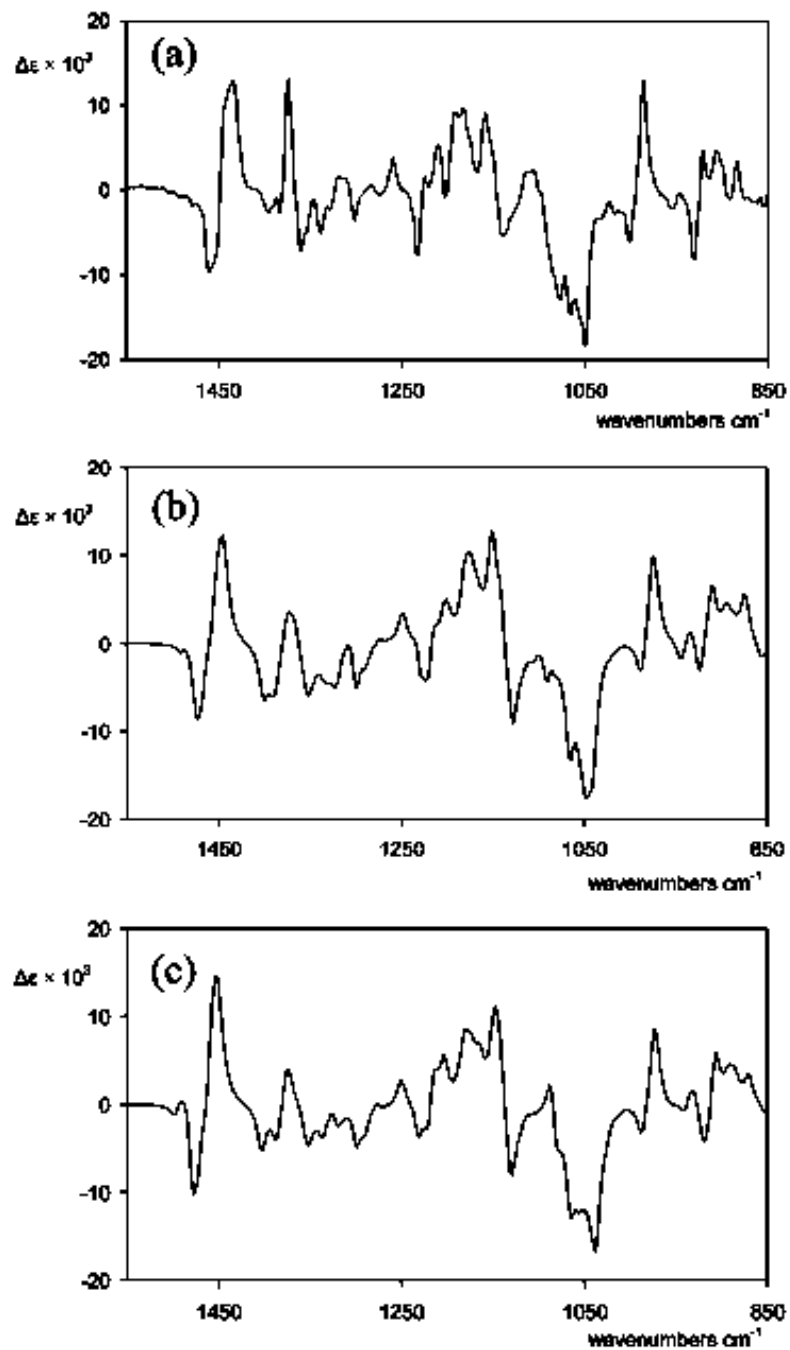
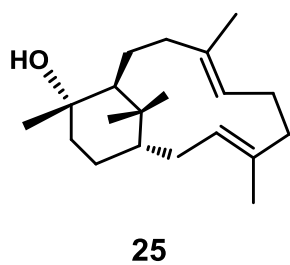


Figura 22. a) Espectro experimental de DCV del (+)-verticilol (**25**), b) Espectro calculado DFT a nivel B3LYP/6-31G(d,p), c) Espectro calculado DFT a nivel B3LYP/DGDZVP.

4.6. Funcionalización de estructuras por reacciones de oxidación.

Es conocido que la mayoría de las moléculas activas sobre sistemas biológicos se encuentran funcionalizadas, es por eso que es conveniente funcionalizar en lo posible las moléculas con presumible actividad biológica para obtener derivados con mayor actividad y especificidad sobre los blancos terapéuticos.^{69, 70}

En concordancia con lo anterior, en las moléculas orgánicas se buscan sitios reactivos donde se puedan llevar a cabo tales funcionalizaciones, como son los dobles enlaces. Los cuales son susceptibles de sufrir reacciones de adición y/u oxidación. Una de las reacciones sobre dobles enlaces son las epoxidaciones. Los reactivos más utilizados para la conversión de alquenos a epóxidos son el ácido peroxiacético aunque el ácido *m*-cloroperoxibenzoico (*m*CPBA) es el reactivo más utilizado.

Se ha demostrado que hay intermediarios iónicos involucrados en la epoxidación de alquenos. La velocidad de reacción no es muy sensible al disolvente. Además de observarse de manera estereoespecífica, ya que la reacción se lleva a cabo por el lado menos impedido. La oxidación se realiza en un proceso concertado ya que el plano que incluye el peróxido es aproximadamente perpendicular al plano del anillo de oxirano en desarrollo, de modo que el oxígeno que se transfiere se encuentra en una posición espiro.

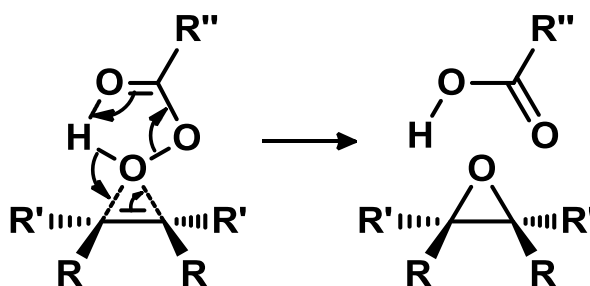


Figura 23. Mecanismo concertado de epoxidación de alquenos con reactivos peroxiácidos.

La tasa de epoxidación de alquenos se incrementa con grupos alquilo y otros sustituyentes electrodonadores, y la reactividad de los peroxiácidos se incrementa por sustituyentes electroattractores. Estas relaciones estructura-reactividad demuestran que el ácido

actúa como un peroxi-electrófilo en la reacción. La baja reactividad es exhibida por los dobles enlaces que están conjugados con sustituyentes fuertemente electroattractores, peroxiácidos muy reactivos, tales como ácido trifluoroperoxiacético, son necesarios para la oxidación de tales compuestos.

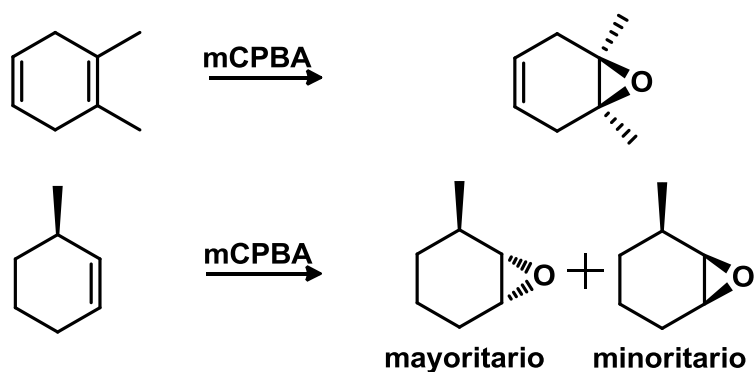


Figura 24. Ejemplos de regioselectividad y estereoselectividad de la reacción de epoxidación con mCPBA.

La tensión anular aumenta la reactividad de alquenos hacia la epoxidación. El norborneno es aproximadamente dos veces más reactivo que el ciclopenteno en presencia del ácido peroxiacético. El *trans*-cicloocteno es 90 veces más reactivo que el ciclohexeno. La estereoselectividad de epoxidación con ácidos peroxicarboxílicos se ha estudiado extensamente. La aportación de oxígeno se produce preferentemente por el lado menos impedido de las moléculas no polares. El norborneno, por ejemplo, da una relación 96:4 entre el *exo:endo*. En moléculas donde dos posibles enfoques no son muy diferentes se forma una mezcla de productos.⁷¹

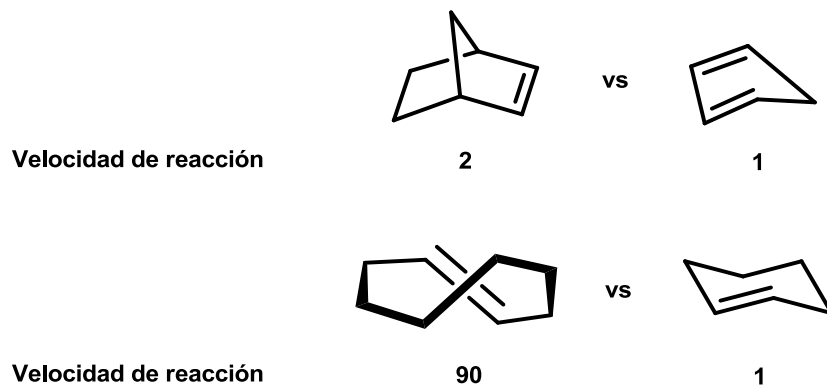


Figura 25. Comparativo estructural y su influencia en la reactividad frente a perácidos.

5. JUSTIFICACIÓN

En nuestro país posiblemente el género *Bursera* sobrepasa las 100 especies.³ Por lo que el presente trabajo contribuye a incrementar el número de especies estudiadas del género *Bursera*, en busca de compuestos de tipo diterpénico, lo que representa un marco importante para estudios desde el punto de vista de la variabilidad de estructuras encontradas en el mismo, así como la obtención de estructuras funcionalizadas que permita llevar a cabo transformaciones químicas que apunten hacia sistemas tricíclicos cercanos a los taxoles o a sistemas taxoides bicíclicos.

6. OBJETIVOS

6.1. Objetivo general

- Aislar metabolitos secundarios de *Bursera multijuga*, elucidar su estructura y determinar su configuración absoluta.

6.2. Objetivos específicos

- Estudiar el extracto hexánico de los tallos de *Bursera multijuga*.
- Caracterizar metabolitos tipo C20 de *Bursera multijuga* empleando métodos físicos y espectroscópicos.
- Asignar la configuración absoluta de los metabolitos por medio de dicroísmo circular vibracional.
- Preparar derivados funcionalizados a partir de los metabolitos naturales empleando reacciones de oxidación.

7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

7.1. Procesamiento de extracto hexánico

De los procesos de extracción se lograron los resultados que se muestran en la Tabla 2. Los extractos que se obtuvieron fueron líquidos, de aspecto verdoso-amarillento, ligeramente oscuros y densos. Enseguida se sometieron 8 mL a un proceso cromatográfico en una columna empacada con sílica gel y un 1% de peso en alúmina. El número de fracciones obtenidas fueron de 220 por lote de 125 mL cada una.

Tabla 2. Relación de materia extraída por número de maceración.

	1er porrón	2º porrón
1ª maceración	51 g	60 g
2ª maceración	15 g	15 g
3ª maceración	15 g	13g

7.1.1. Metabolitos aislados.

De las fracciones obtenidas con hexano se observaron aceites traslúcido, solidos cerosos y cristales. Se obtuvieron 3 secciones de fracciones que corresponden a 3 metabolitos distintos. La primera sección correspondiente a las fracciones 42 a 55, con apariencia aceitosa y transparente. Del cual se obtuvo el su espectro de RMN-¹H representado en la Figura 27, en el cual se observan a campo bajo entre 5.4 y 4.6 ppm 3 señales correspondientes a hidrógenos vinílicos, al desplazarnos a campo alto entre 2.5 hasta 1.6 ppm se encuentran señales correspondientes a hidrógenos metínicos y metilénicos, entre 1.6 y 1.5 ppm se encuentran las señales de tres metilos vinílicos y finalmente a campo más alto antes de 1 ppm se encuentra

algo que parece ser un triplete, sin embargo integran para 6 hidrógenos por lo que la señal corresponde a un isopropilo donde los dobletes de los metilos se encuentran traslapados.

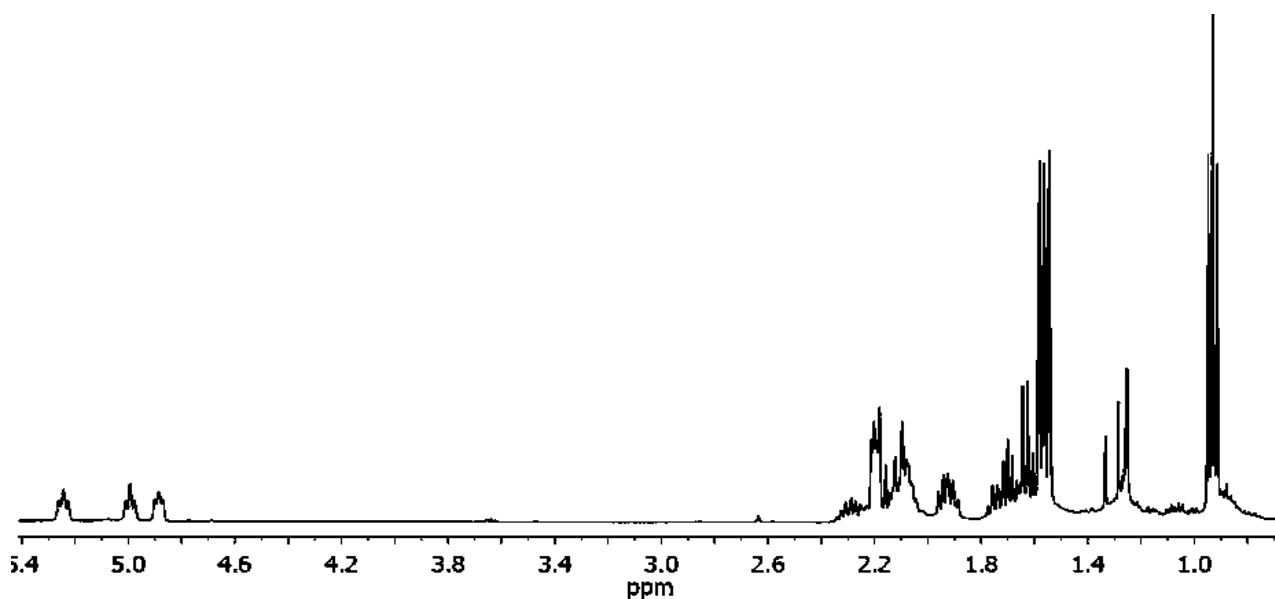


Figura 26. Espectro de RMN-¹H del metabolito **30** a 400 MHz.

Con base en el espectro de RMN-¹³C, así como su experimento DEPT, se observa el número total de carbonos y su hibridación.

En el espectro DEPT se pueden observar 20 carbonos, 16 de estos protonados de los cuales; 4 son carbonos metínicos (3 son sp^2 y 1 sp^3), 7 metilenos, 5 metilos y 4 cuaternarios (3 vinílicos y 1 base de alcohol el cual se encuentra sobrepuesto con la señal del cloroformo).

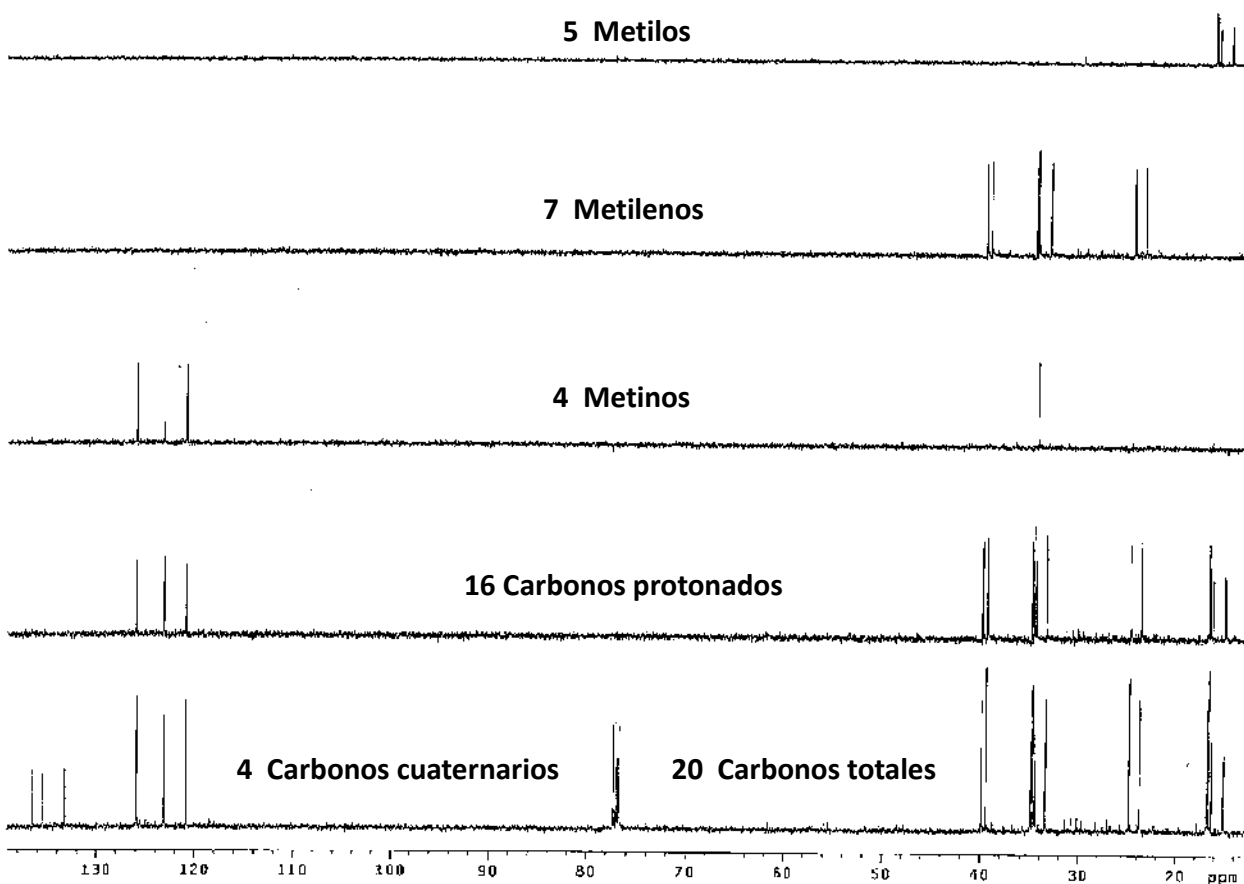
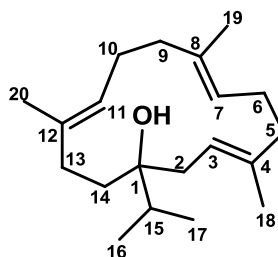


Figura 27. Espectro DEPT del metabolito **30** a 100 MHz.

Tomando en cuenta la información que nos brinda el espectro de hidrógeno de 3 señales correspondientes a hidrógenos vinílicos, 3 metilos base de olefina, el isopropilo. Así como la fórmula molecular que nos da el DEPT y el espectro de carbono de $C_{20}H_{34}O$, se sugiere una estructura diterpénica, con 3 dobles enlaces trisustituidos, un isopropilo y una ciclación.

Haciendo una búsqueda y comparación con lo reportado en la literatura resultó ser el compuesto descrito como cembrenol (**30**) en 1989 por Kobayashi,⁷² los cuales presentaron los mismos desplazamientos ya reportados, con algunas discrepancias en las asignaciones de los carbonos en el experimento de RMN- ^{13}C , las cuales se resolvieron gracias al espectro de correlación bidimensional heteronuclear *g*HMBC.



30

Tabla 3. Comparación de los desplazamientos químicos de carbono del cembrenol (**30**).

Carbono	Kobayashi	Experimentales
C-1	76.9	76.7
C-2	33.5 ^a	34.6 ^e
C-3	121.0	120.8
C-4	133.3 ^b	136.3 ^d
C-5	39.6	39.3
C-6	23.8	23.6
C-7	123.3	123.0
C-8	135.6	135.4
C-9	39.9 ^c	33.4 ^a
C-10	24.9	24.7
C-11	126.0	125.8
C-12	136.6 ^d	133.1 ^b
C-13	34.7 ^e	39.5 ^c
C-14	35.0	34.8
C-15	34.7	34.4
C16	15.2 ^h	16.7 ^{*g}
C17	16.4 ^f	16.5 ^{*f}
C18	16.7 ^g	14.9
C19	16.9	16.2
C20	16.9	15.0 ^h

Los superíndices en los desplazamientos químicos corresponden a las señales que fueron reasignadas. *Pueden estar intercambiados.

El espectro de carbono representado en las Figuras 34 y 35 del cembrenol muestra las 20 señales de los carbonos ya asignadas inequívocamente; en la región sp^3 se observan los carbonos C-18 y C-20 a 14.9 y 15 ppm respectivamente, seguido del C-19 a 16.2 ppm que corresponden a los metilos vinílicos, los carbonos metílicos del isopropilo C-17 Y C-16 a 16.5 y

16.7 ppm. Continuando a campo bajo los carbonos C-6 y C-10 a 23.6 y 24.7 ppm respectivamente, el C-9 a 33.4 ppm seguido de los metilenos C-2 y C-14 α al hidroxilo aparecen a 34.6 y 34.8 ppm, así como los carbonos C-5 y C-13 39.3 y 39.5 ppm. También se observan 4 señales correspondientes a metinos, la primera a 34.4 ppm para el carbono terciario del isopropilo C-15, más desplazados a campo bajo los carbonos terciarios base de olefina C-3 a 120.8 ppm, C-7 a 123.0 ppm y el C-11 a 125.8 ppm. El C-1 base de alcohol es la señal de 76.7 ppm y finalmente los carbonos vinílicos C-4, C-8, y C-12 aparecen a 136.3, 135.4 y 133.1 ppm respectivamente.

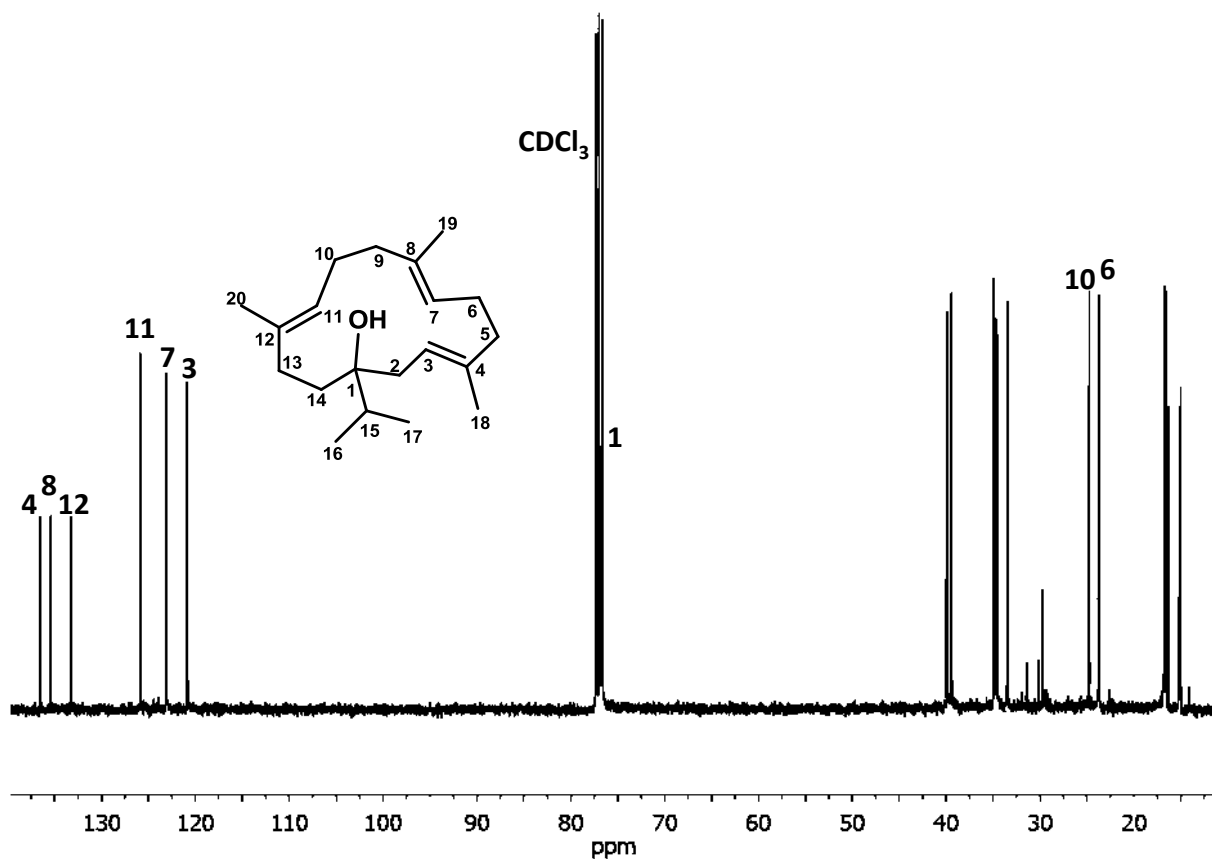


Figura 28. Espectro de RMN- ^{13}C del cembrenol (30) a 100 MHz.

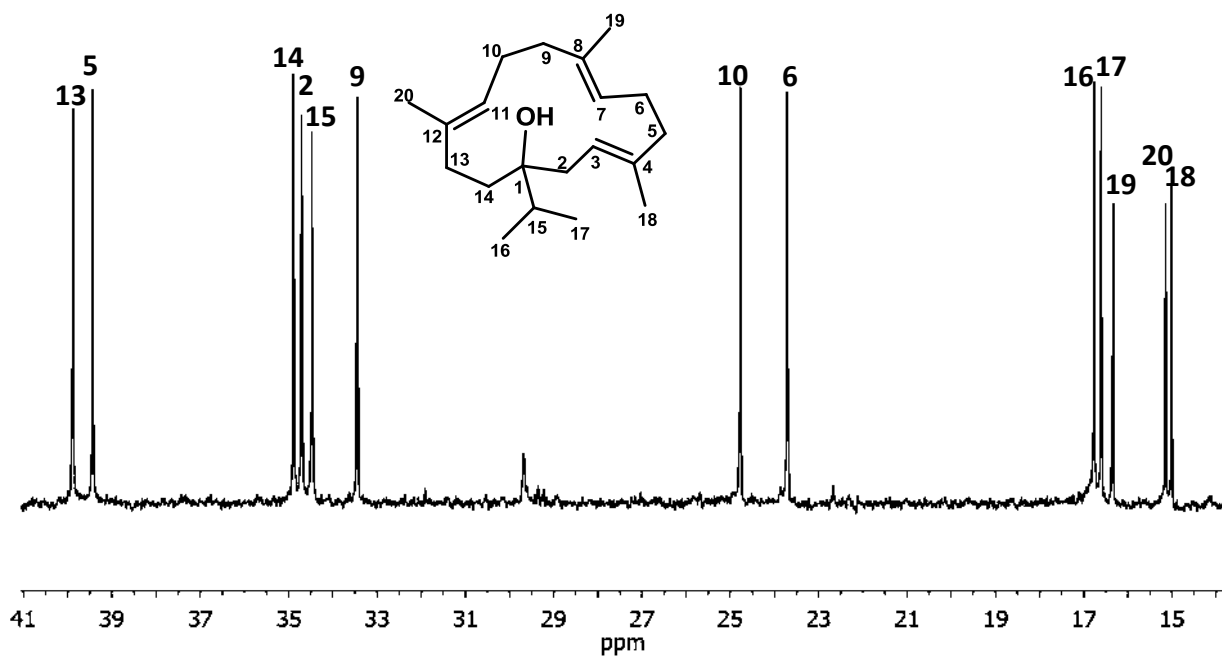


Figura 29. Espectro ampliado de RMN- ^{13}C del cembrenol (**30**) a 100 MHz.

Las señales reasignadas el espectro de RMN- ^1H del cembrenol (**30**) se muestra en las Figuras 30 y 31.

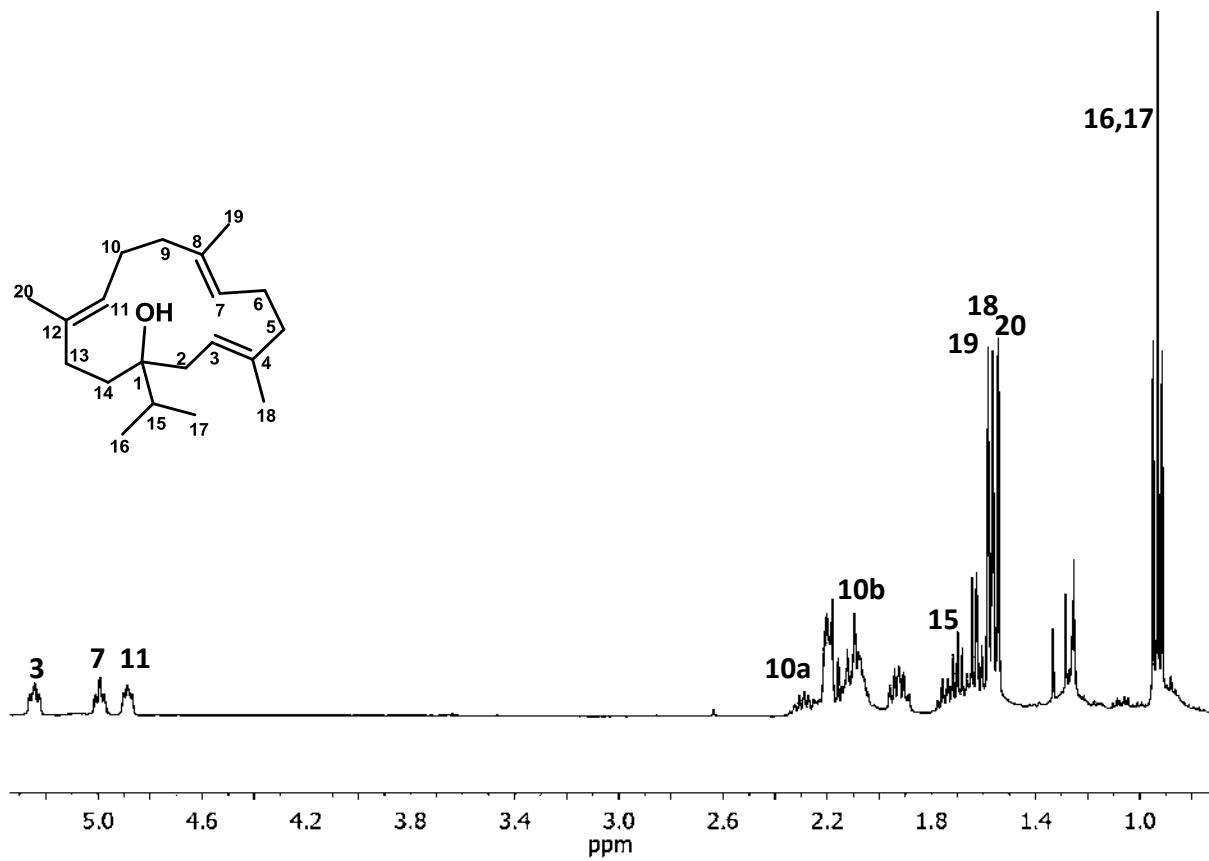


Figura 30. Espectro de RMN-¹H del cembrenol (**30**) a 400 MHz.

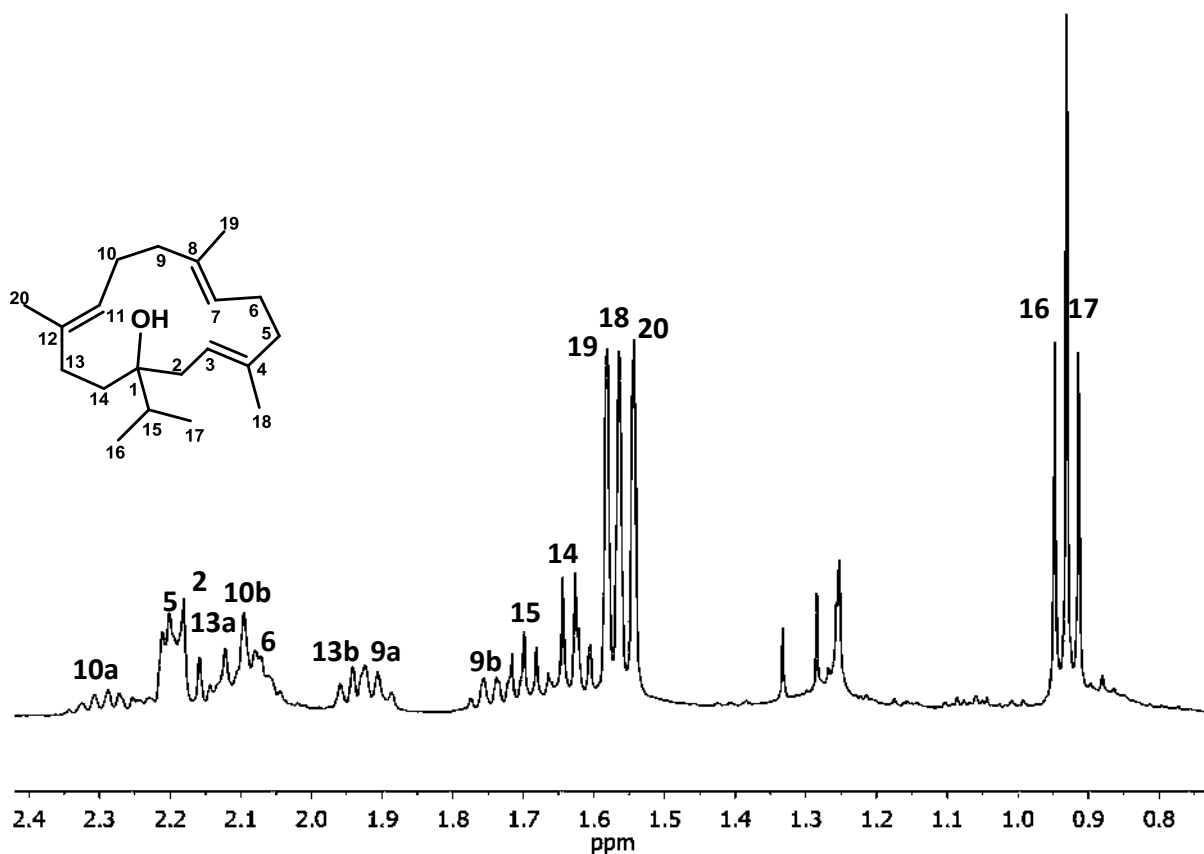
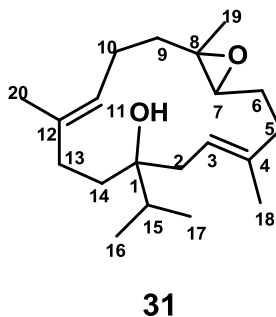


Figura 31. Espectro de RMN-¹H del cembrenol (**30**) a 400 MHz, región de 2.4 a 0.7 ppm.

Se aisló también de las fracciones 115 a 174 en la polaridad de 3:2 hasta 1:9 (Hex:CH₂Cl₂) un sólido blanco ceroso con un espectro de RMN-¹H muy similar al cembrenol, distinguiéndose por tener una señal de protón vinílico menos, el cual se desplazó a campo alto, correspondiendo a un base de oxígeno, así como también uno de los metilos vinílicos se desplazó a campo alto, ya que el doble enlace que se encontraba entre C-7 y C-8 se encuentra epoxidado, todo esto se observa en los espectros del epoxicembrenol (**31**).



En los espectros de protón representados en las Figuras 32 y 33 se distinguen los hidrógenos vinílicos H-3 y H-11 en 5.39 ppm y 5.11 ppm respectivamente, el hidrógeno base de epóxido H-7 a 2.65 ppm, la señal del H-5 a 2.32 ppm, seguido de los metilos vinílicos 18 y 20 a 1.66 ppm, 1.58 ppm, el metilo base de epóxido 19 a 1.27 ppm, y finalmente los metilos del isopropilo 16 y 17 a 0.95 ppm y 0.93 ppm respectivamente.

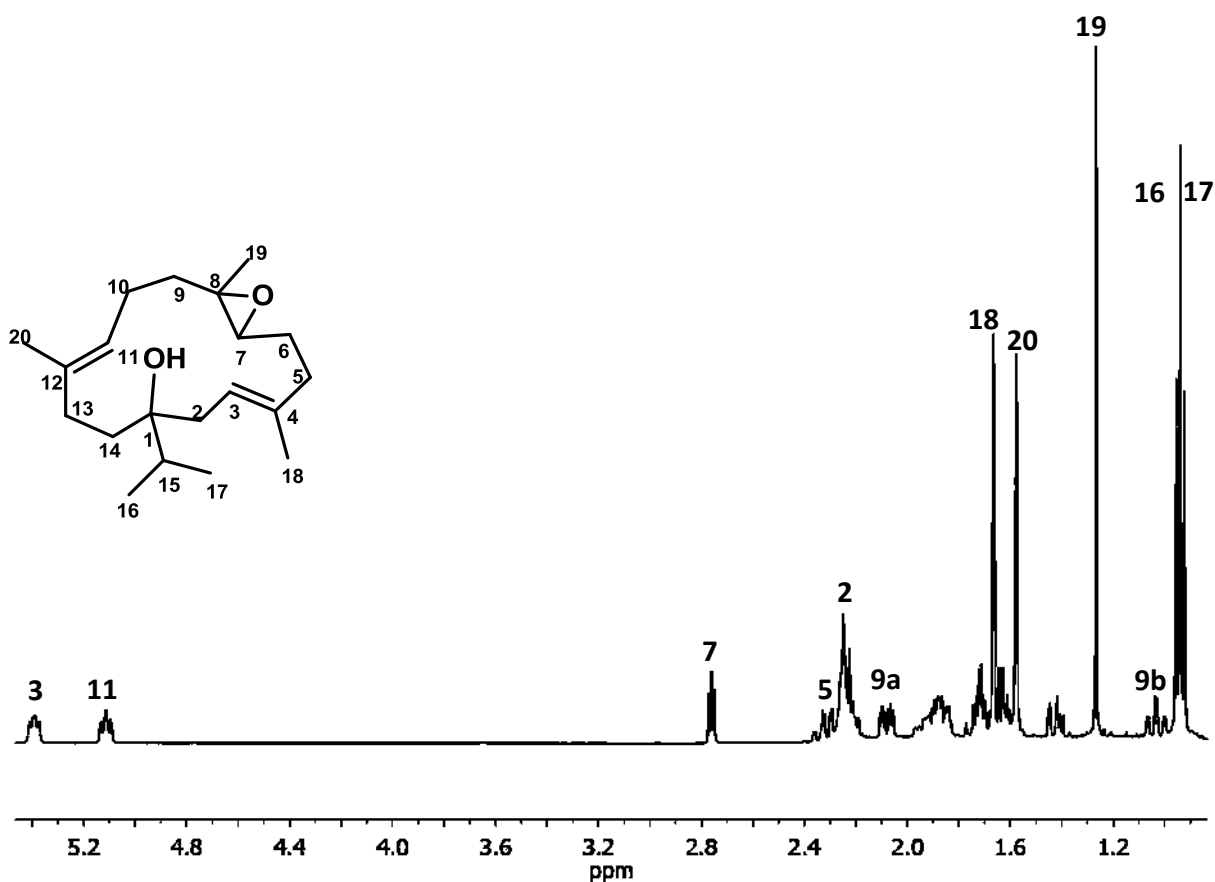


Figura 32. Espectro de RMN- ^1H del epoxicambrenol (31) a 400 MHz.

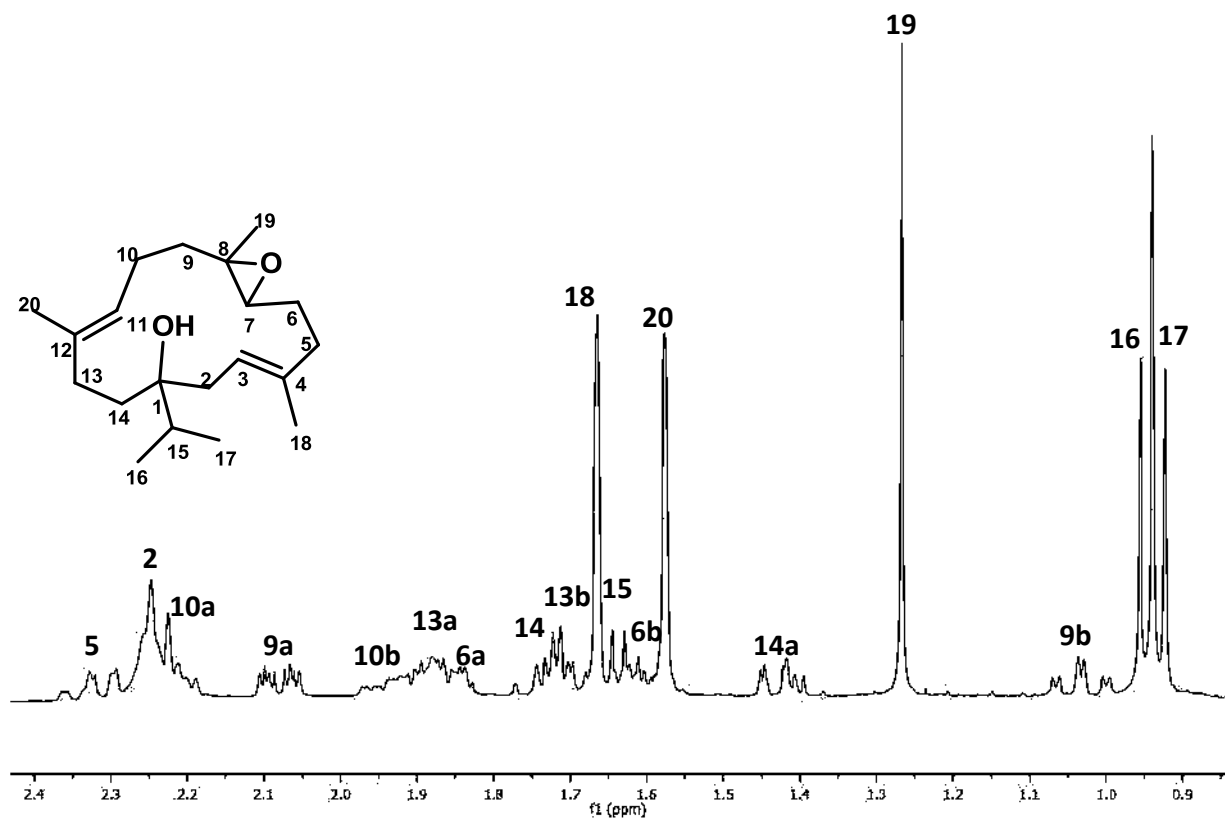


Figura 33. Ampliación del espectro de RMN-¹H del epoxicembrenol (**31**) a 400 MHz.

En el espectro de carbono del epoxicembrenol (**31**) distinguimos a diferencia del cembrenol (**31**); 4 carbonos en la región sp^2 que son los que pertenecen a los 2 dobles enlaces intactos, de campo bajo a alto primero aparecen los carbonos cuaternarios C-12 y C-4 a 136.4 y 134.8 ppm, seguidos de los carbonos terciarios C-11 y C-3 a 123.0 y 121.5 ppm. Ya que ahora C-8 y C-7 tienen hibridación sp^3 formando un anillo de oxirano, se encuentran desplazados a 59.8 y 62.3 ppm aproximadamente.

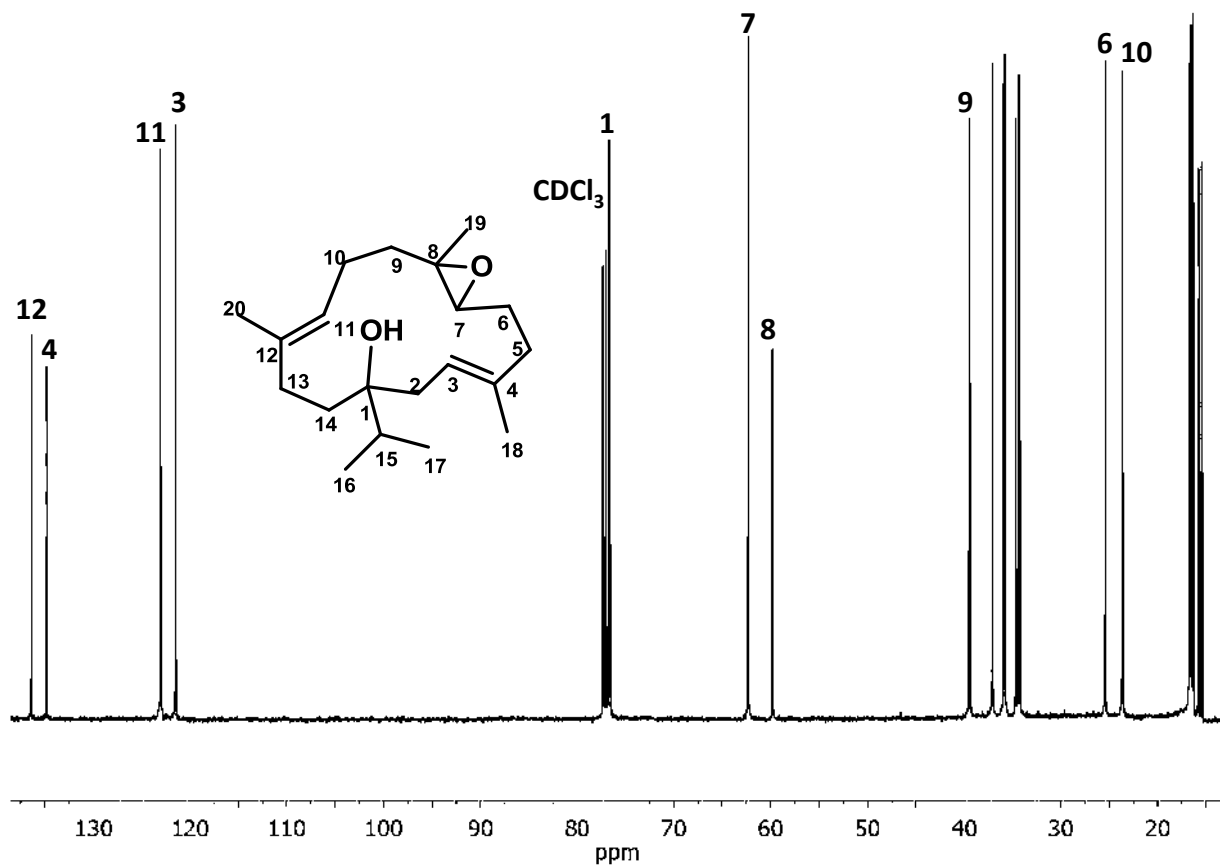


Figura 34. Espectro de RMN- ^{13}C del epoxicembrenol (31) a 100 MHz.

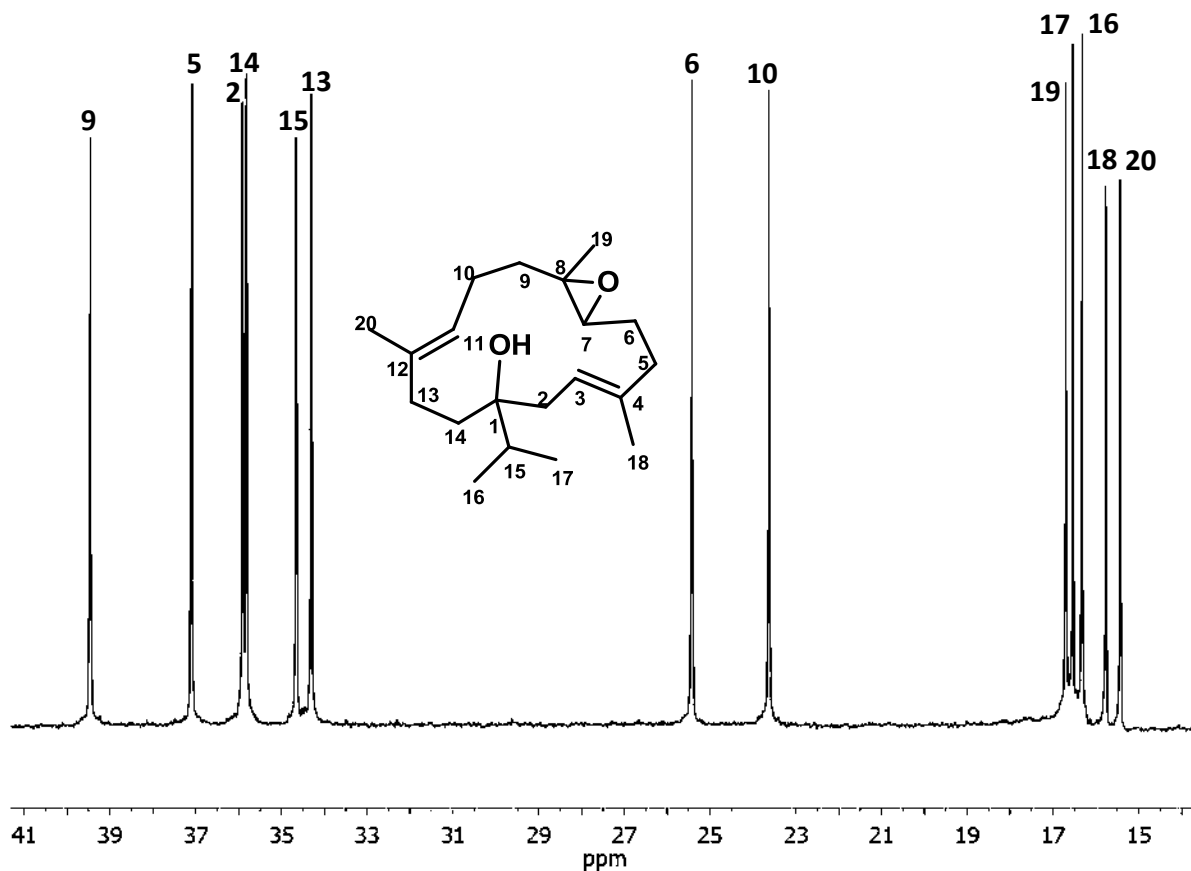
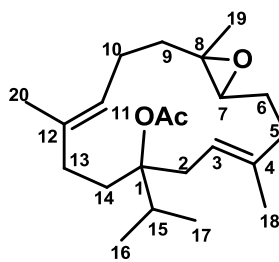


Figura 35. Ampliación del espectro de RMN- ^{13}C del epoxicembrenol (**31**) a 100 MHz.

Poco antes se aisló entre las fracciones 65-90 en la polaridad de 4:1 y 7:3 (Hex: CH_2Cl_2) un metabolito con apariencia de un aceite incoloro, muy parecido en su espectroscopía al epoxicembrenol el cual difiere al de **31** en una señal característica de metilo de acetilo (**32**) en su espectro RMN- ^1H pero mantiene la señal del H-7 base de epóxido.



32

En el espectro de RMN-¹H del acetato de epoxicembrenol (**32**) (Figuras 36 y 37), observamos de campo bajo a alto a 5.29 y 5.08 ppm las señales correspondientes a los protones H-3 y H-11 vinílicos, desplazado a campo alto el protón base de epóxido H-7 a 2.80 ppm, otras señales características son el metilo del acetato en 2.00 ppm, los metilos vinílicos H-18 y H-20 a 1.67 y 1.58 ppm respectivamente. El metilo base de epóxido H-19 desplazado a campo alto a 1.26 ppm y finalmente los metilos de isopropilo H-16 y H-17 a 0.95 y 0.96 ppm.

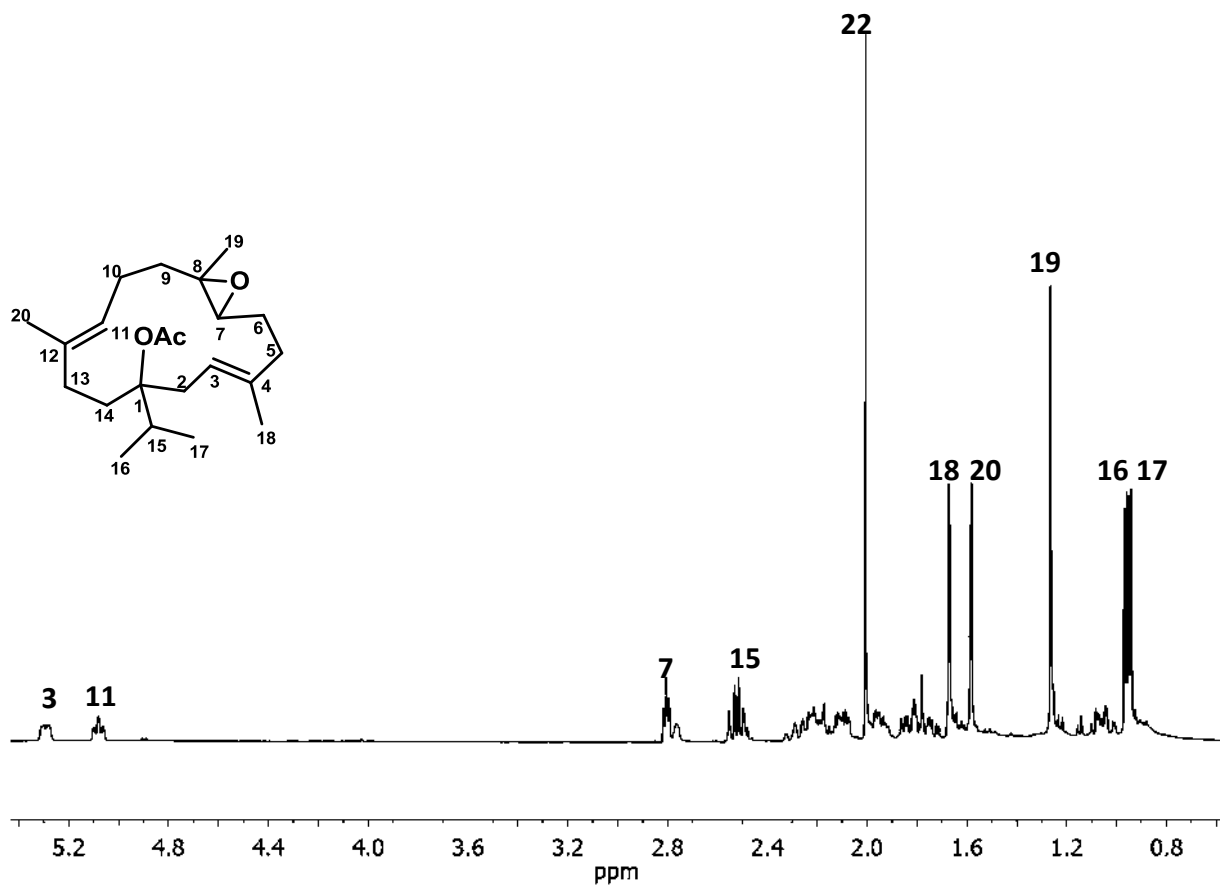


Figura 36. Espectro de RMN-¹H del acetato de epoxicembrenol (**32**) a 400 MHz.

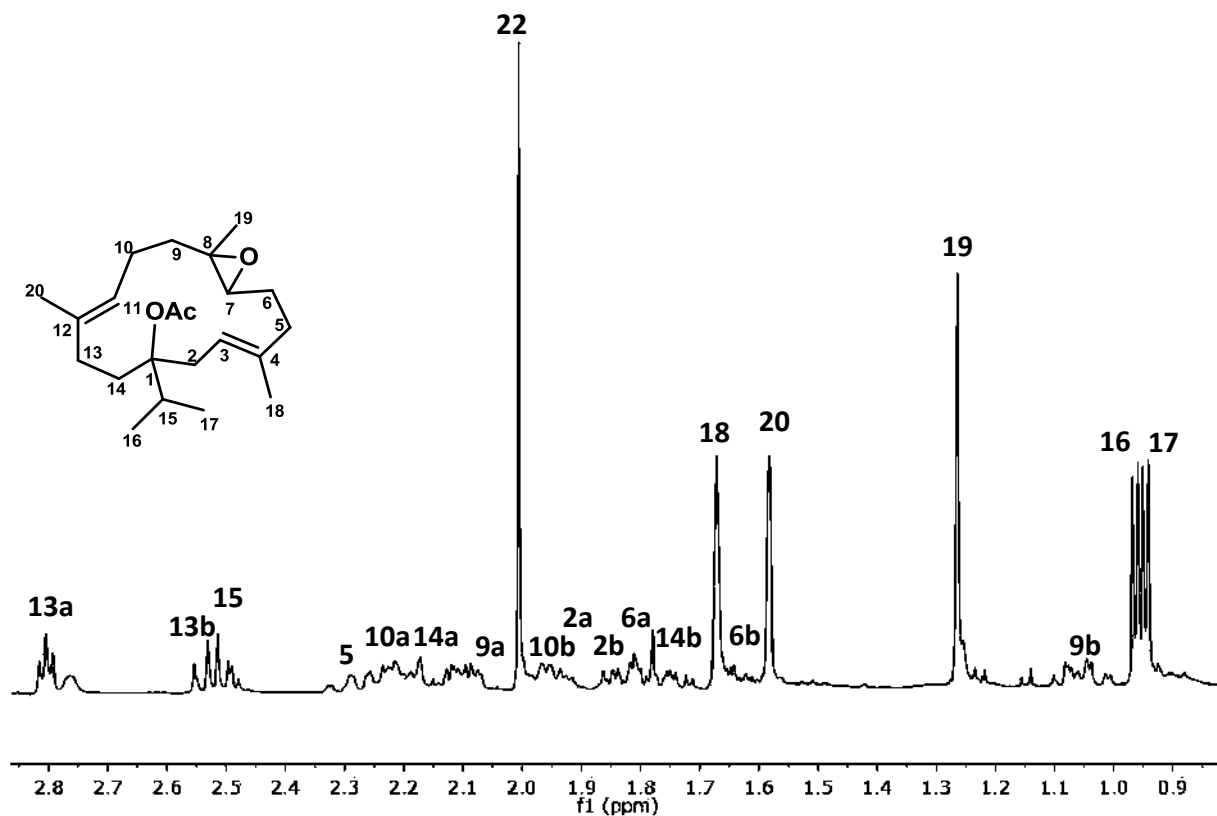


Figura 37. Ampliación del espectro de RMN-¹H del acetato de epoxicembrenol (**32**) a 400 MHz.

En el espectro de carbono del acetato de epoxicembrenol **32** se observan 22 carbonos. Como señales características tenemos a campo bajo; la señal del C-21 a 170.0 ppm que corresponde al carbonilo del acetato, a 136.3 y 134.7 ppm se encuentran los carbonos cuaternarios sp^2 C-12 y C-4. Continuando a 123.1 y 120.7 ppm aparecen los carbonos terciarios sp^2 C-11 y C-3. Ahora en la región de los sp^3 primero encontramos el carbono C-1 base de acetato anómalamente desplazado a 90.7 ppm, y los carbonos base de epóxido C-7 y C-8 que aparecen a 62.3 y 69.7 ppm respectivamente.

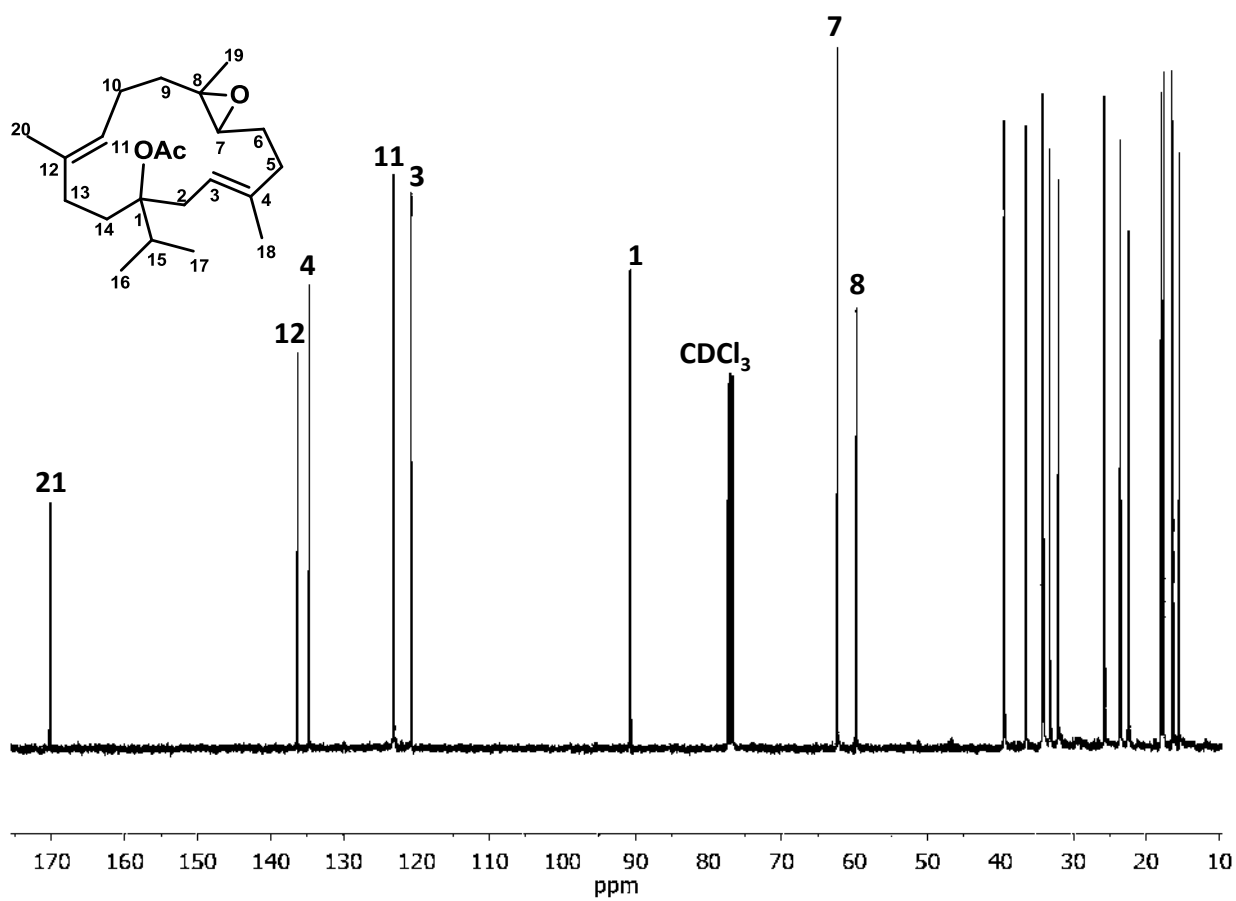


Figura 38. Espectro de RMN- ^{13}C del acetato de epoxicembrenol (**32**) a 100 MHz.

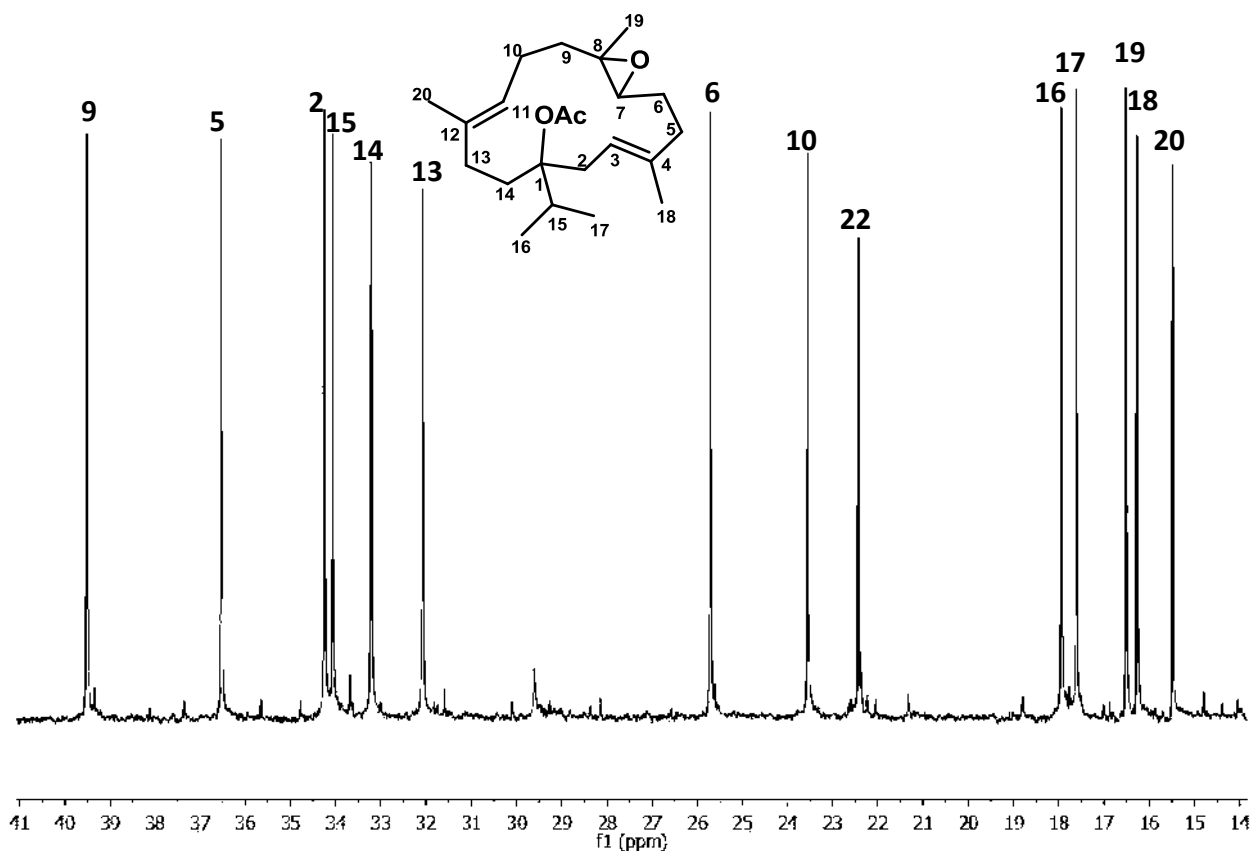


Figura 39. Ampliación del espectro de RMN- ^{13}C del acetato de epoxicembrenol (**32**) a 100 MHz.

7.2. Determinación de la configuración absoluta del epoxicembrenol **31**

Al derivado epoxidado del cembrenol **31** se le asignó su configuración absoluta por medio de dicroísmo circular vibracional. El método se basa en la comparación del espectro experimental de DCV y la curva teórica obtenida por Teoría de Funcionales de la Densidad a nivel de cálculo B3LYP/DGDZVP.

7.2.1. Modelado molecular y búsqueda conformacional

Los modelos moleculares fueron construidos en base a los rayos X de **31** y su enantiómero. Los cristales fueron obtenidos a una mezcla de 1:4 hexano:CH₂Cl₂.

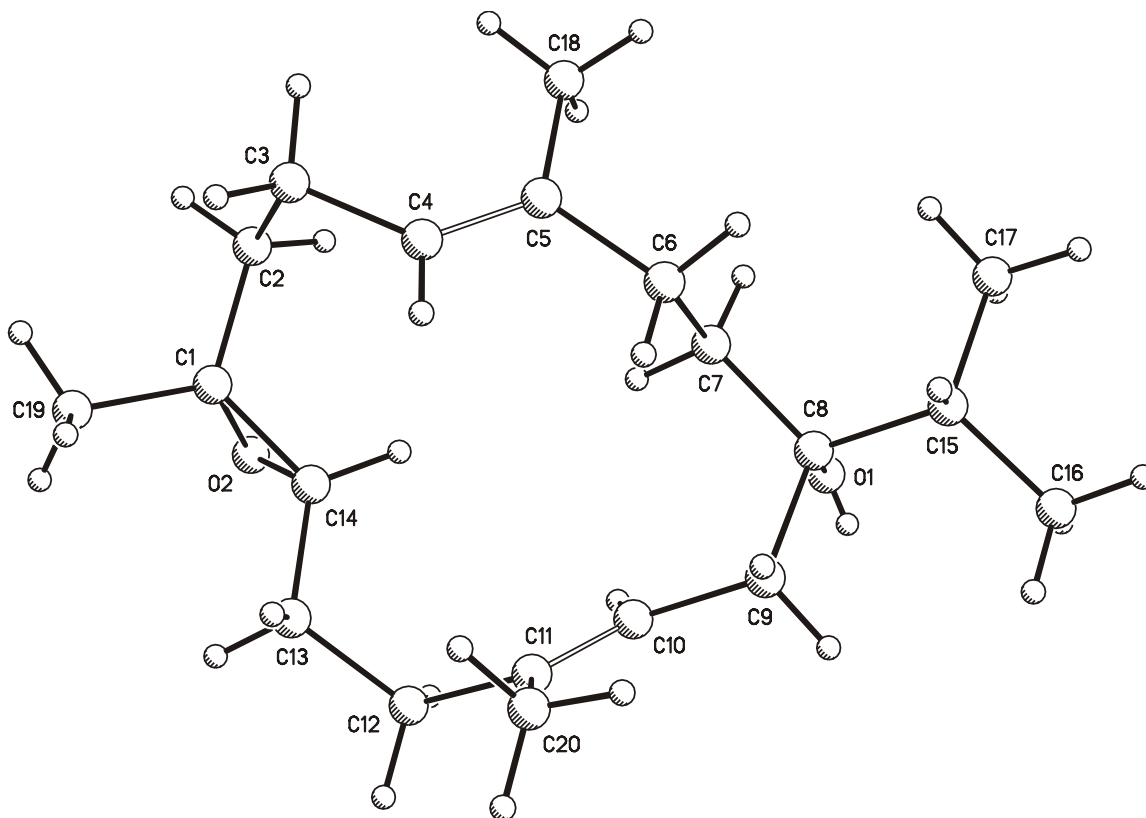


Figura 40. Estructura del epoxicembrenol (**31**) obtenida por difracción de rayos X.

El modelo del epoxicembrenol (**31**) se sometió a una búsqueda conformacional por el método de Monte Carlo utilizando el campo de fuerza de mecánica molecular (MMFF94).⁷³ De este procedimiento se obtuvieron 13 conformeros dentro del corte de 5 kcal/mol con una contribución poblacional del 99.99%. La optimización de la geometría de los conformeros obtenidos por mecánica molecular se realizó empleando la Teoría de Funcionales de la Densidad a nivel de cálculo B3LYP/DGDZVP que produjo 10 conformeros relevantes mostrados en la Figura 47. Los modelos seleccionados no sobrepasan los 2.5 kcal/mol (ΔG) de energía relativa respecto al conformero más estable (**31-1**).

Los 3 conforméros principales preservan las mismas disposiciones espaciales con cambios en la rotación del grupo hidroxilo.

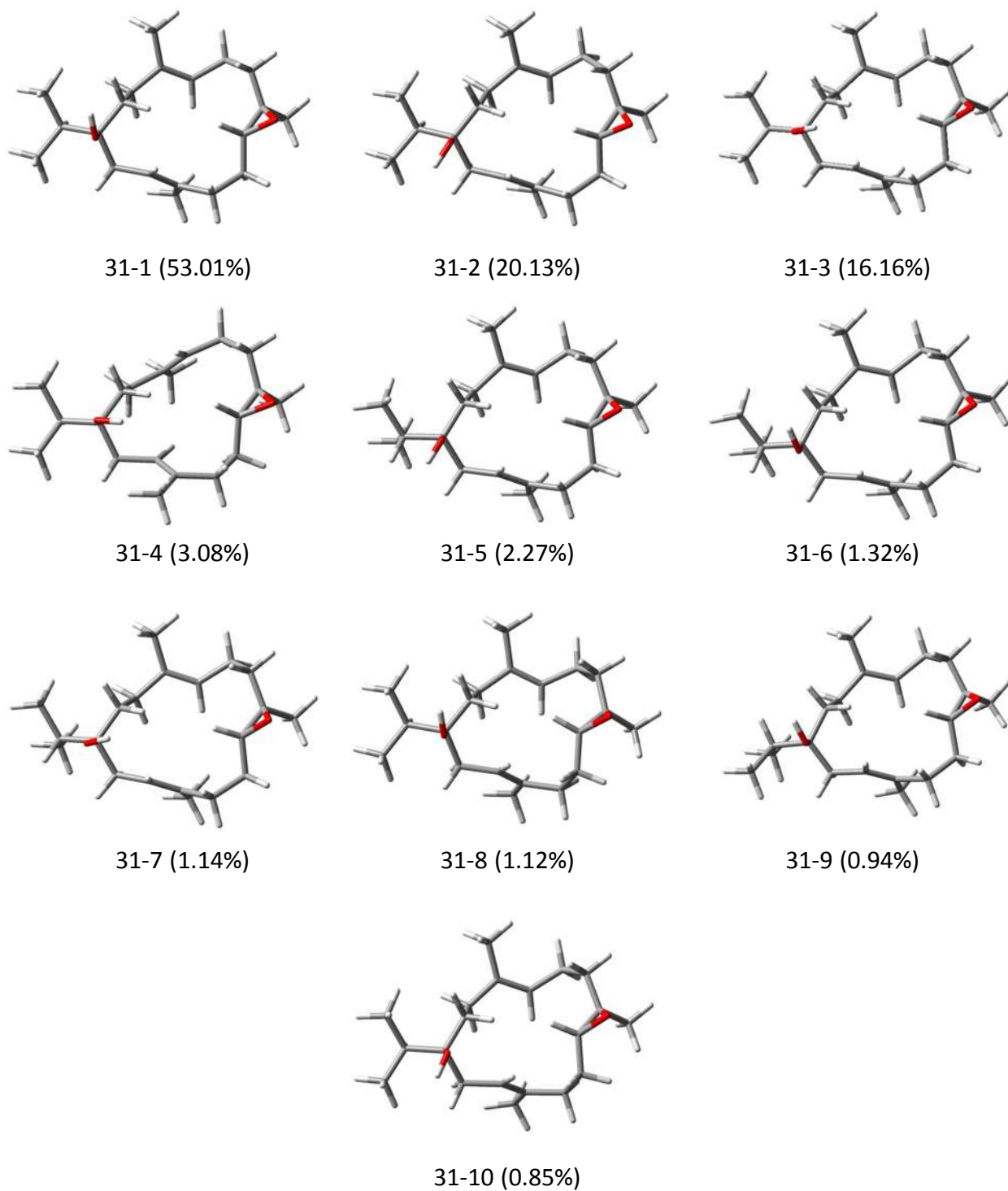


Figura 41. Conformeros del epoxicembrenol (**31**) optimizados por DFT a nivel B3LYP/DGDZVP.

7.2.2. Comparación entre los espectros teóricos y el espectro experimental de DCV

Las frecuencias de dicroísmo circular vibracional de los 10 conformeros de **32** se calcularon y se ponderaron tomando en cuenta su fracción molar para generar un espectro teórico. El espectro de dicroísmo circular vibracional teórico que mostró mayor concordancia fue la de la estructura con la estereoquímica (1*S*,7*R*,8*R*), la evaluación cuantitativa de esta concordancia se realizó empleando el software CompareVOA, el cual calcula la superposición integrada de los datos experimentales y teóricos como función de un cambio relativo.

Tabla 4. Parámetros termoquímicos de los conformeros del epoxicembrenol (**31**).

Conformero	$\Delta E_{\text{MMFF}}^{\text{a}}$	$\rho_{\text{MMFF}}^{\text{b}}$	$\Delta E_{\text{DFT}}^{\text{c}}$	$\rho_{\text{DFT}}^{\text{d}}$	$\Delta G_{\text{OPT}}^{\text{e}}$	$\rho_{\text{OPT}}^{\text{f}}$
31-1	0.3329	0.2404	0.0000	0.4181	0.0000	0.5301
31-2	0.4145	0.2095	0.2240	0.2865	0.5735	0.2013
31-3	0.0000	0.4217	0.5151	0.1753	0.7034	0.1618
31-4	2.8681	0.0033	1.5344	0.0314	1.6993	0.0301
31-5	2.5681	0.0055	1.7662	0.0212	1.8643	0.0228
31-6	2.9463	0.0029	2.1281	0.0115	2.1850	0.0133
31-7	2.7404	0.0041	2.0243	0.0137	2.2703	0.0148
31-8	1.5023	0.0334	1.8312	0.0190	2.2848	0.0112
31-9	3.7204	0.0008	2.7662	0.0039	2.3864	0.0094
31-10	1.6835	0.0246	2.2188	0.0099	2.4454	0.0085

^a Energía relativa a partir de mecánica molecular de **31-3** $E_{\text{MMFF}} = 69.3648$ kcal/mol.

^b Población en % calculada a partir de mecánica molecular, $\Delta E_{\text{MMFF}} = -RT \ln K$.

^c Energía relativa a partir de DFT a nivel B3LYP/6-31G(d) de **31-1** $E_{6-31G(d)} = -585, 519.8676$ kcal/mol.

^d Población en % calculada a partir de DFT a nivel B3LYP/6-31G(d), $\Delta E_{6-31G(d)} = -RT \ln K$.

^e Energía libre de Gibbs relativa a partir de DFT a nivel B3LYP/6-31G(d) de **31-1** $G_{\text{DGDZVP}} = -585236.0814$ kcal/mol.

^f Población en % calculada a partir de $\Delta G = -RT \ln K$ a nivel B3LYP/DGDZVP.

La aplicación de este procedimiento nos ha permitido obtener el factor de anarmonicidad óptima de 0.981, y la similitud DCV espectral para el modelo correcto de 73.9% y para el enantiómero de 19.8% con un nivel de confianza del 100% para la asignación configuración absoluta de manera inequívoca.

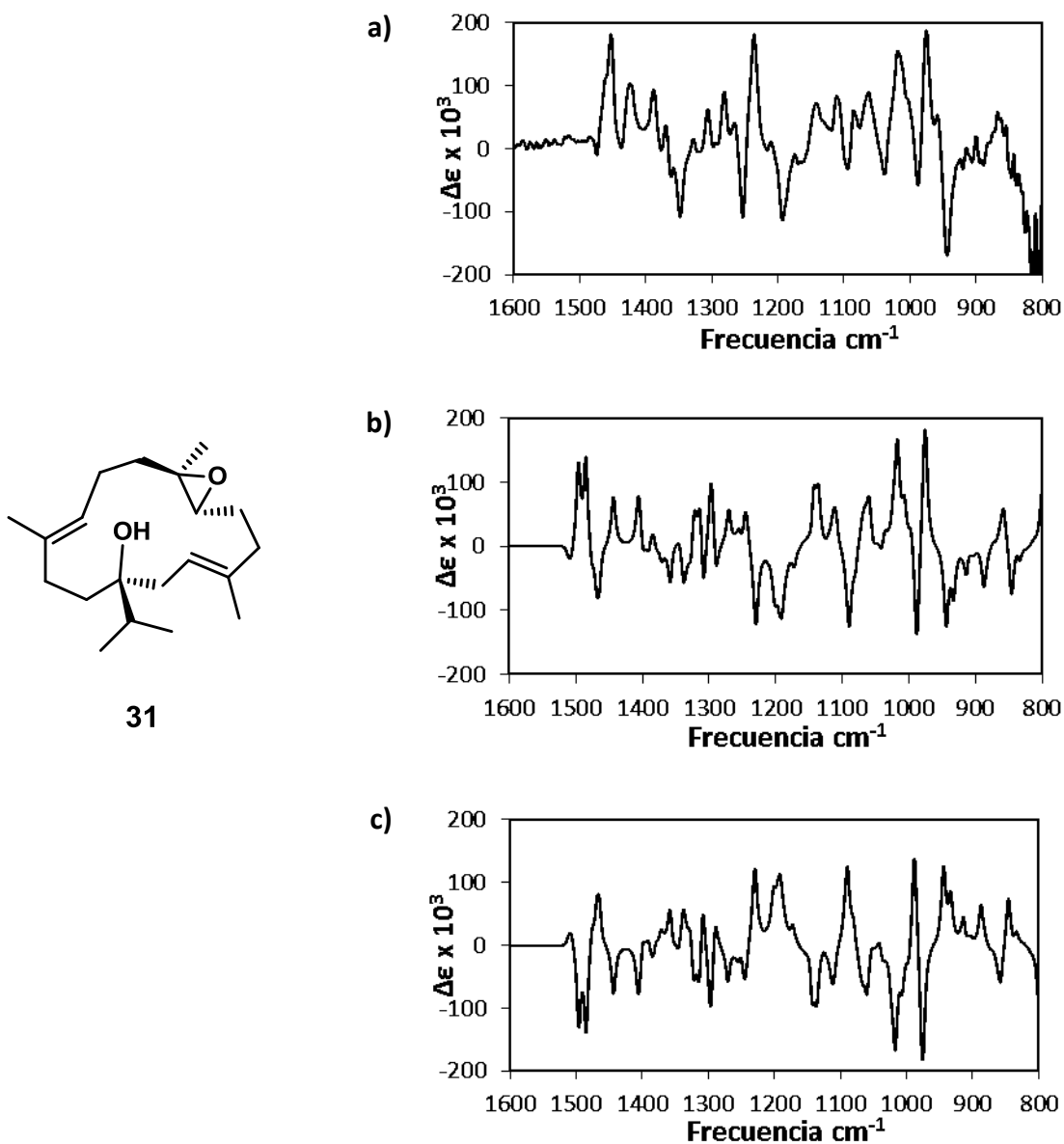


Figura 42. a) Espectro de DCV experimental del epoxicembrenol (**31**), b) Espectro de DCV calculado DFT a nivel B3LYP/DGDZVP del isómero 1S,7R,8R, c) Espectro de DCV calculado DFT a nivel B3LYP/DGDZVP del isómero 1R,7S,8S.

Cabe señalar que el estudio conformacional no solo se realizó con los isómeros 1*S*,7*R*,8*R* y 1*R*,7*S*,8*S*, sino que también se realizó con los isómeros de configuración 1*S*,7*S*,8*S* y 1*R*,7*R*,8*R*, estos nos arrojaron 13 conformeros principales, los cuales también se optimizaron y sus espectros de dicroísmo circular vibracional se compararon con el experimental. De las comparaciones se obtuvo para 1*R*,7*R*,8*R* una similitud espectral de 51%, para el isómero 1*S*,7*S*,8*S* una correspondencia de 0%. Esto era lo que esperábamos ya que estos estereoisómeros no corresponden a los datos cristalográficos obtenidos por difracción de rayos X.

Debido a esta comparación con los espectros calculados de los diferentes isómeros, el epoxicembrenol fue asignado con la configuración de (1*S*,3*E*,7*R*,8*R*,11*E*)-7,8-epoxicembra-3,11-dien-1-ol (**31**). Así como su correspondiente derivado natural acetilado, el 1-acetato de (1*S*,3*E*,7*R*,8*R*,11*E*)-7,8-epoxicembra-3,11-dien-1-ol (**32**).

7.3. Reacciones de epoxidación sobre el epoxicembrenol 31

Debido a que estos derivados de cembrano podrían presentar actividad citotóxica, se tomó la decisión de someterlos a reacción de oxidación debido a que poseen dobles enlaces y una epoxidación natural. Se tomó como base la reacción de epoxidación por medio de peroxiácidos a dobles enlaces. En este caso se utilizó ácido *meta*-cloroperbenzoico como reactivo oxidante.

Se realizaron pruebas al metabolito (1*S*,3*E*,7*R*,8*R*,11*E*)-7,8-epoxicembra-3,11-dien-1-ol (**31**), ya que se aisló en mayor cantidad a partir del extracto hexánico. Se asignaron como variables, la temperatura y el tiempo. Obteniendo mejores resultados a temperatura ambiente, y ya que no se presentó mayor diferencia con el tiempo se optó por el menor de 2 h.

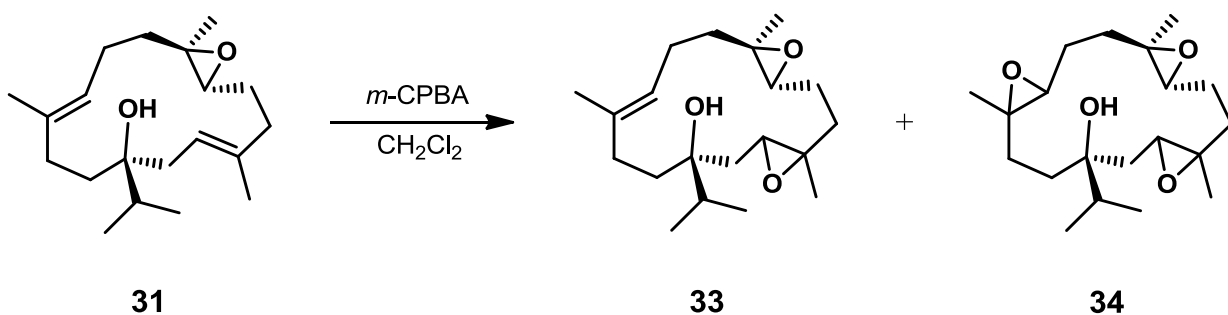


Figura 43. Reacción de epoxidación de **31** con *m*CPBA.

Tabla 5. Condiciones de reacción a prueba.

Tiempo (h)	Temperatura (°C)
2	4
6	4
2	ambiente
5	ambiente

En la Figura 44 se logra distinguir entre 5 y 6 ppm los protones vinílicos, en el crudo de reacción a 2 h aún se ven las 2 señales originadas por H-3 y H-11, en cambio, en el espectro de RMN-¹H del crudo de reacción a 6 h, sólo se observa un protón vinílico. También en la Figura 45 observamos entre 5 y 6 ppm la señal de protón vinílico que quedó. En los dos casos no se observan diferencias de señales entre ellas.

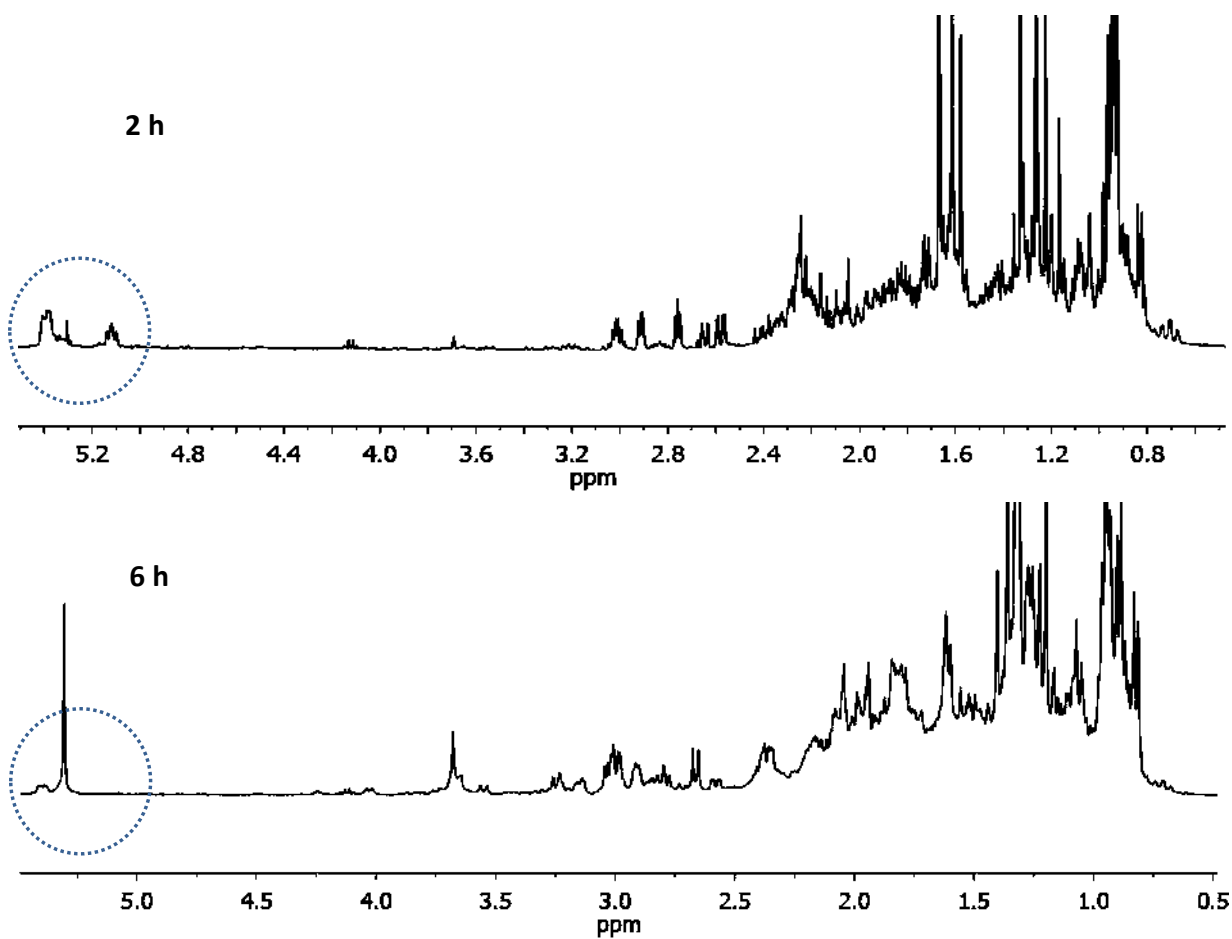


Figura 44. Espectros de RMN- ^1H de los crudos de reacción a 4 °C.

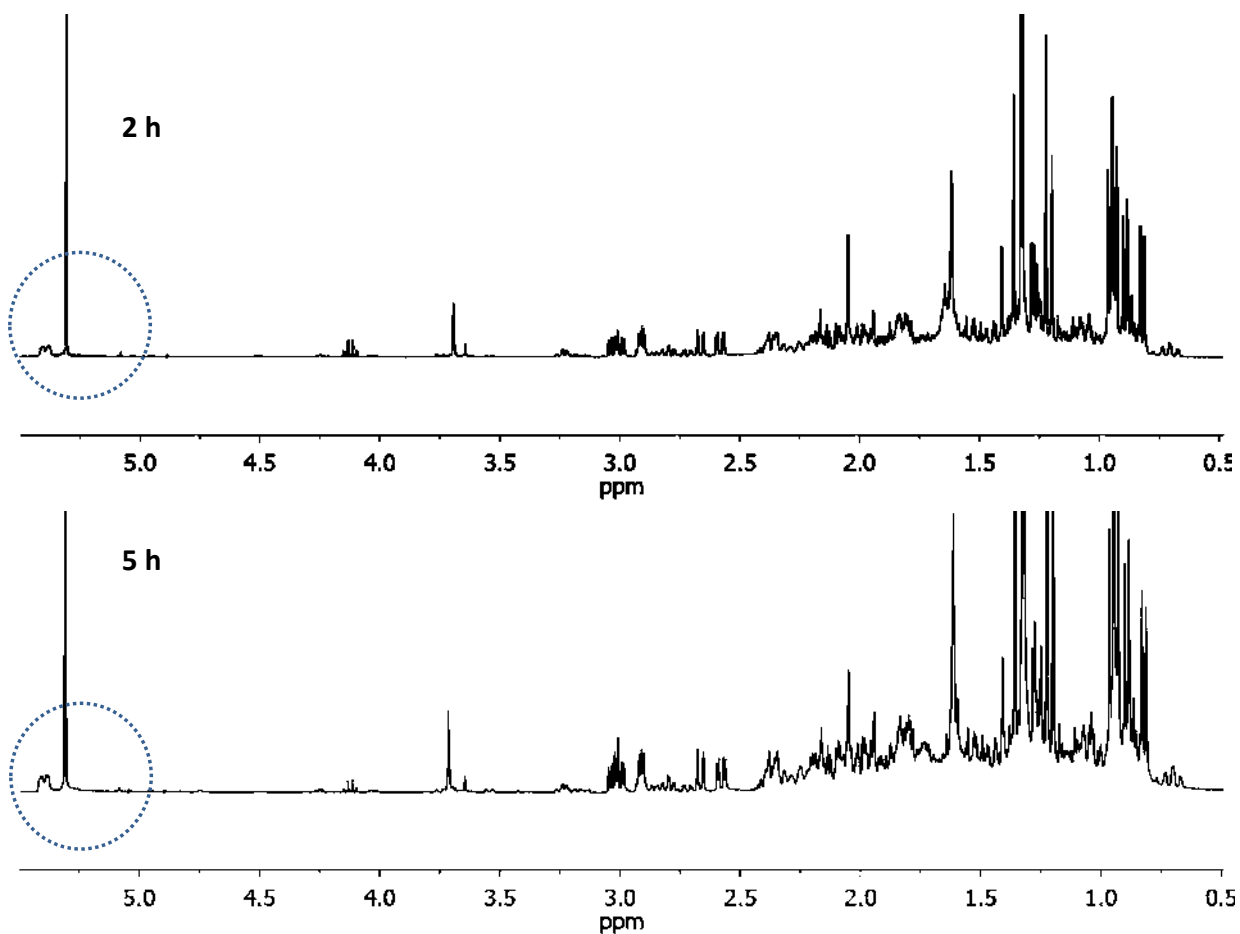


Figura 45. Espectros de RMN¹-H de los crudos de reacción a temperatura ambiente.

7.3.1. Productos de Epoxidación

Enseguida se procedió a purificar el producto, primero se realizó en cromatografía en columna en gel de sílice, del cual no se logró separar y distinguir el producto de reacción. Entonces se realizó una cromatografía con alúmina neutra con la cual se obtuvieron los siguientes productos; un diepóxido de cembrenol, el cual posee la nueva epoxidación entre los carbonos C-3 y C-4. En la Figura 46 se muestra el espectro de RMN¹-H del 3,4:7,8-diepóxido de cembrenol (**33**) donde se distinguen como señales características con respecto a la materia prima; a campo bajo la señal de protón vinílico que se conserva sin reaccionar a 5.32 ppm que

corresponde al hidrógeno 11, en 3.80 y 3.40 ppm aparecen las señales que corresponden a los hidrógenos base de epóxido 3 y 7, la señal del metilo vinílico 20 aparece en 1.59 ppm, y los metilos de epóxido 19 y 18 se encuentran desplazados a campo alto, 1.14 y 1.06 ppm respectivamente. Finalmente en 0.99 y 0.88 ppm aparecen los metilos de isopropilo 16 y 17 como dos señales dobles ($J=6.5$ Hz)

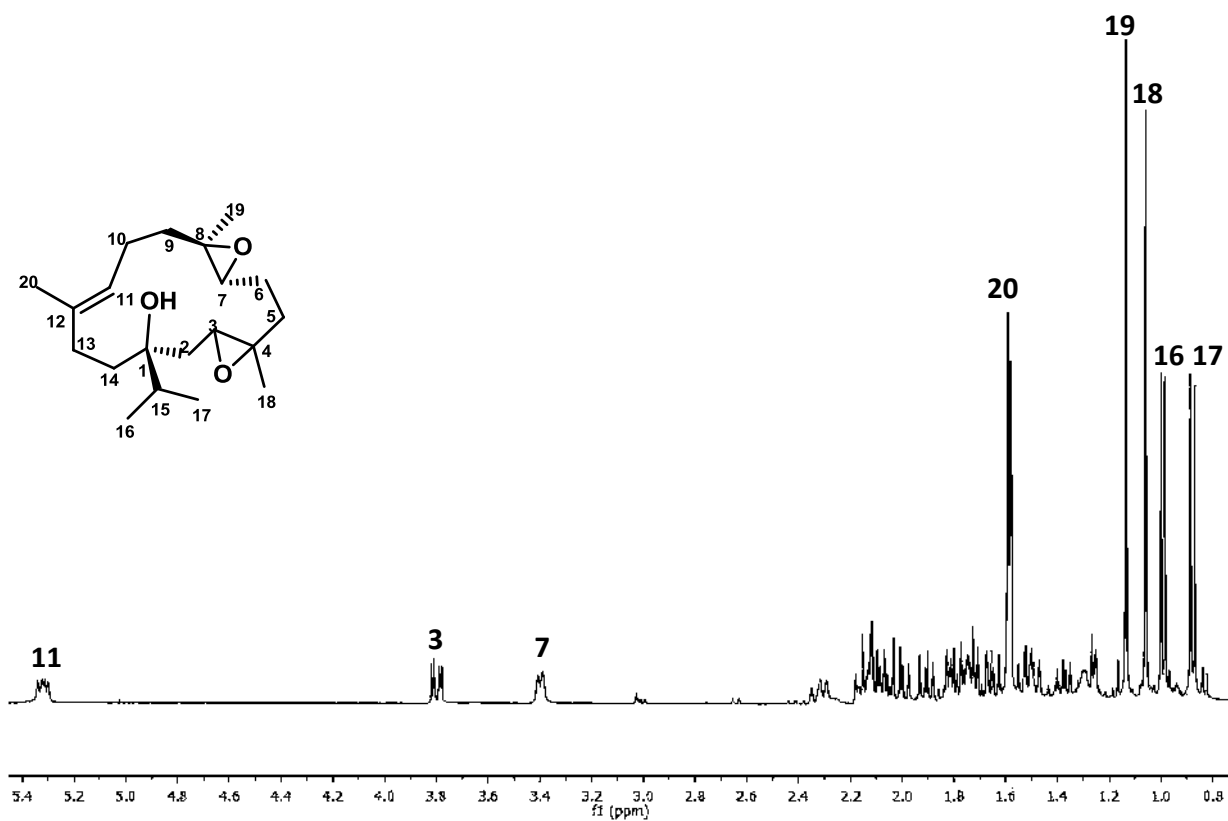
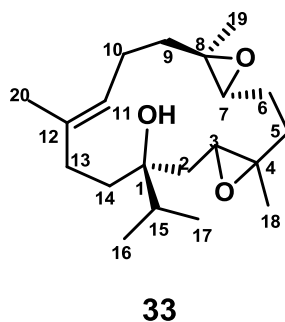


Figura 46. Espectro de RMN-¹H del diepóxido de cembrenol (**33**).

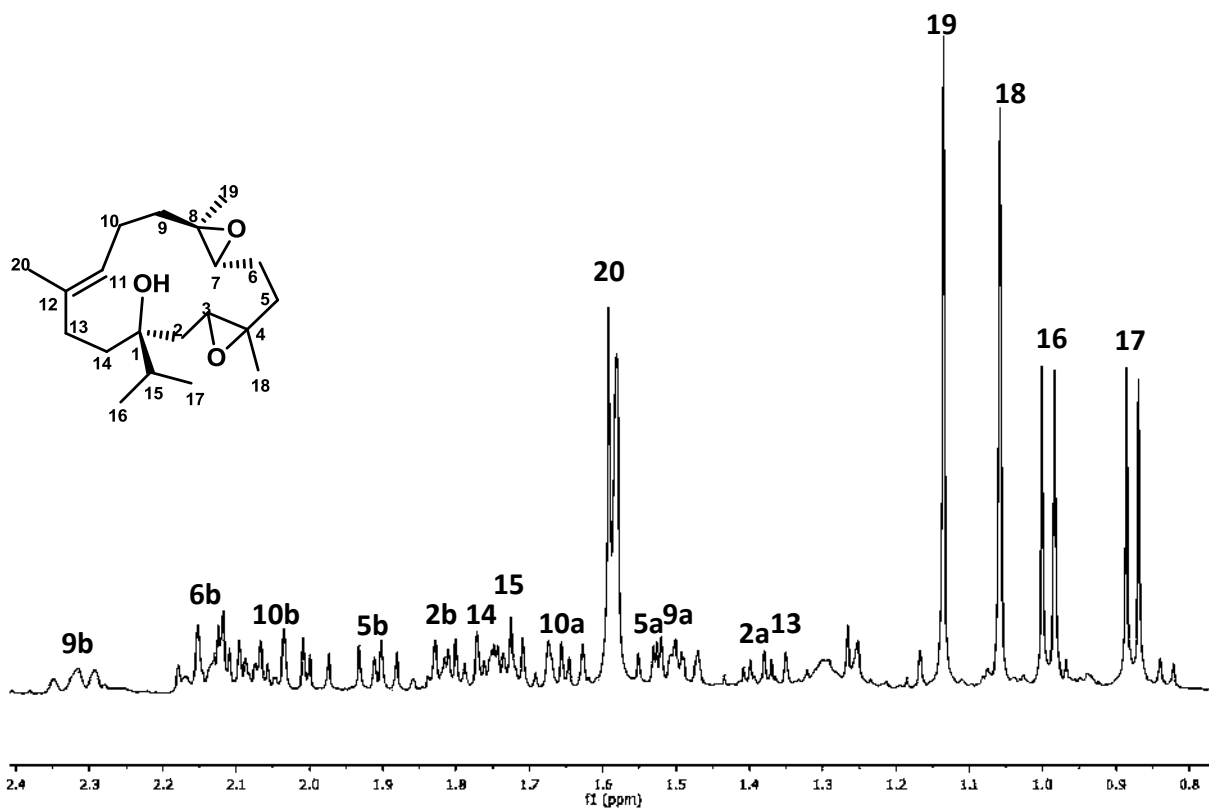


Figura 47. Ampliación del espectro de RMN-¹H del diepóxido de cembrenol (**33**).

Otro producto de reacción fue el derivado totalmente epoxidado del metabolito **31**; el 3,4:7,8:11,12-triepoxicembran-1-ol (**34**). En la Figura 48 se observan como señales características los 3 protones base de epóxido en 3.01, 2.66 y 2.35 ppm correspondientes a los hidrógenos 3, 7 y 11 respectivamente. Así como los metilos base de oxígeno 19 a 1.36 ppm, 18 a 1.32 ppm y 20 a 1.22 ppm, y los metilos de isopropilo 16 y 17 a 0.89 y 0.82 ppm.

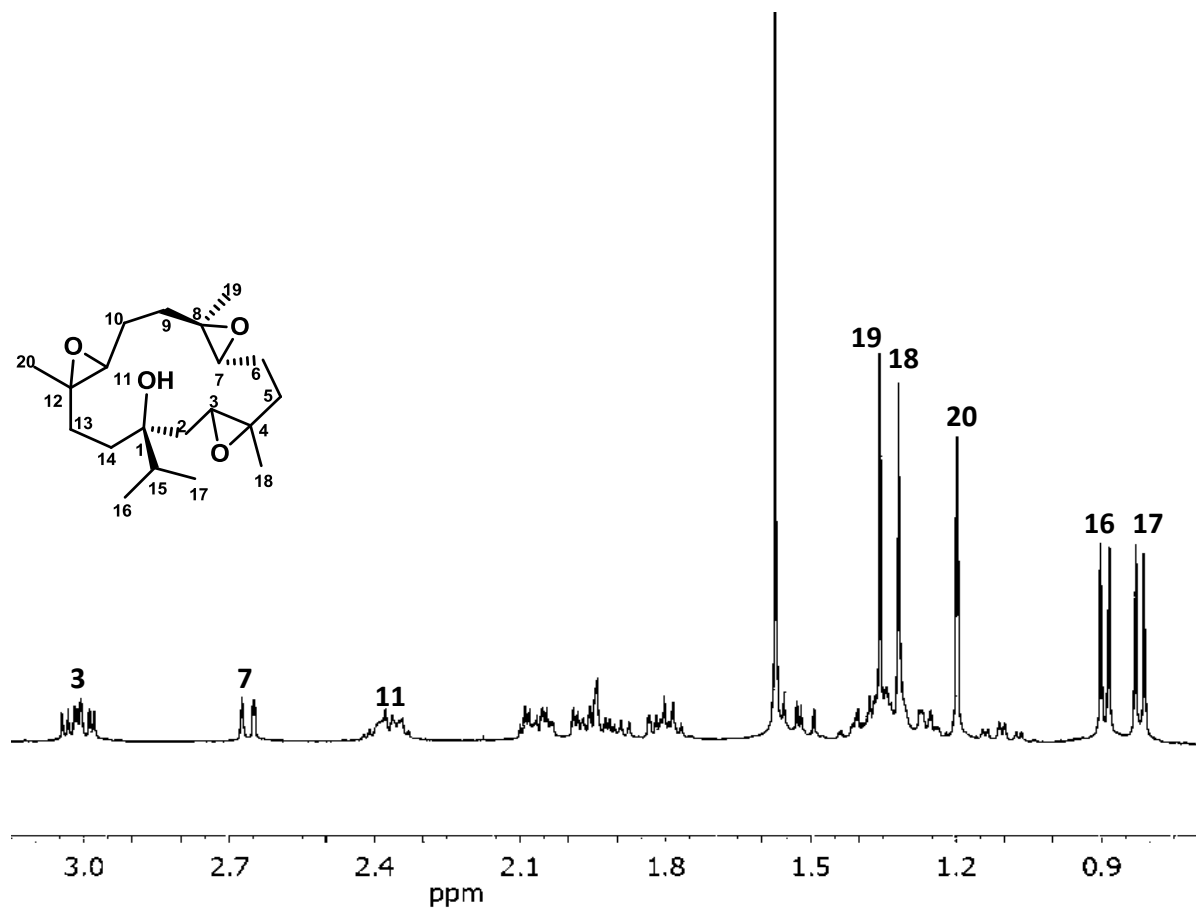


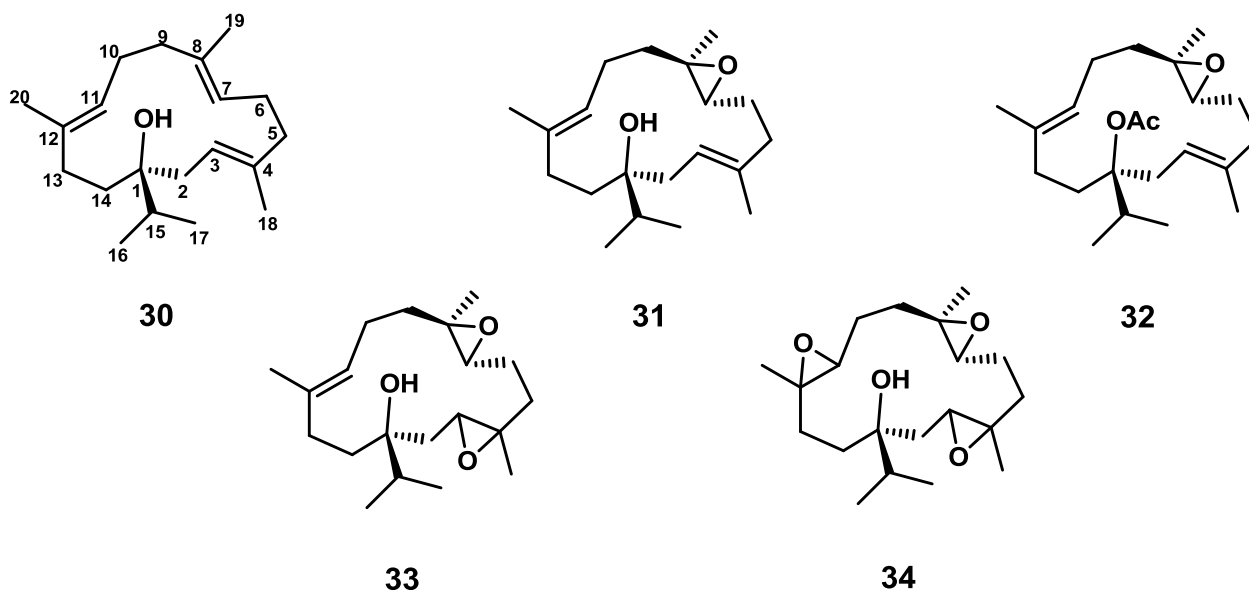
Figura 48. Espectro de RMN- ^1H del triepóxido de cembrenol (**34**).

8. CONCLUSIONES

Del extracto hexánico de la *Bursera multijuga* se obtuvieron compuestos diterpénicos con esqueleto cembrenoide; el (1*S*,3*E*,7*E*,10*E*)-cembra-3,7,10-trien-1-ol (**30**) reportado en 1989, el (1*S*,3*E*,7*R*,8*R*,11*E*)-7,8-epoxicembra-3,11-dien-1-ol (**31**) y el 1-acetato de (1*S*,3*E*,7*R*,8*R*,11*E*)-7,8-epoxicembra-3,11-dien-1-ol (**32**) aun no reportados. La caracterización de estos compuestos se realizó en base a sus datos de RMN-¹H y RMN-¹³C y experimentos de 2 dimensiones. Se llevó a cabo la reasignación inequívoca algunas de las señales de RMN del (1*S*,3*E*,7*E*,10*E*)-cembra-3,7,10-trien-1-ol (**30**), metabolito conocido desde 1989. El cual es aislado por primera vez en el género *Bursera*.

Se asignó la configuración absoluta del metabolito **31** por medio de DCV y cálculos computacionales, partiendo de MMFF y optimizando la geometría con DFT a nivel de cálculo B3LYP/DGDZVP, obteniendo como configuración absoluta (1*S*,7*R*,8*R*).

Se realizaron epoxidaciones sobre el (1*S*,3*E*,7*R*,8*R*,11*E*)-7,8-epoxicembra-3,11-dien-1-ol (**31**) con ácido *m*-cloroperbenzoico con el fin de funcionalizar más la molécula y probar su reactividad ante peroxiácidos, obteniendo como productos el (1*E*)-3,4:7,8-diepoxicembren-1-ol (**33**) y el 3,4:7,8:10,11-triepoxicembran-1-ol (**34**).



9. PARTE EXPERIMENTAL

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato de Fisher Johns y no están corregidos. Las rotaciones específicas se determinaron en CHCl_3 en un polarímetro Perkin-Elmer 341 y las concentraciones están dadas en g/100 mL.

Los espectros de resonancia magnética nuclear a 400 MHz para ^1H , ^{13}C a 100 MHz, HETCOR y NOESY, se determinaron en el equipo Varian Mercury Plus 400 del IIQB-UMSNH. Los experimentos HMBC y HSQC se determinaron en un equipo Varian Mercury 300 en el CINVESTAV- IPN. En todos los casos se empleó cloroformo deuterado como disolvente y tetrametilsilano como referencia interna.

Los espectros de masas (EIMS), se determinaron en un Varian Saturno 2000 por impacto electrónico acoplado a cromatografía de gases.

Las separaciones cromatográficas se realizaron empleando gel de sílice MERCK (70-230 Mesh ASTM) y Alúmina neutra 90 MERCK.

El modelado molecular para el estudio conformacional se realizó en el programa Spartan'04 así como la búsqueda conformacional. Los cálculos de optimización de geometría y frecuencias se realizaron en el programa Gaussian 03W.

Los espectros de DCV y IR fueron medidos en un equipo dualPEM Chiral/IR FT-VCD BioTools

Los análisis por difracción de rayos X del producto natural que cristalizó de forma adecuada se llevó a cabo en un difractómetro Bruker-Nonius CAD4 a 298 K equipado con radiación de $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1.54184 \text{ \AA}$). Los datos colectados se resolvieron con el programa SHELXS-97.⁷⁴

Los espectros de infrarrojo, masas y el espectro de DCV, se determinaron en el Departamento de Química del CINVESTAV-IPN, México, D.F., dentro de los trabajos en colaboración que se realizan con el Dr. Carlos M. Cerda-García-Rojas y el Dr. Pedro Joseph-Nathan.

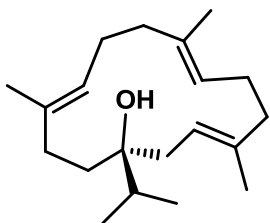
9.1. Obtención del extracto hexánico

La colecta de *Bursera multijuga* se llevó a cabo el 5 de marzo del 2011 en el estado de Jalisco colindando con el Estado de Zacatecas, en el municipio de San Cristóbal de la Barranca, el cual se localiza en el centro norte del Estado de Jalisco. Posee un clima cálido, semiseco, la temperatura media anual es de 20 °C, y tiene una precipitación media anual de 713 mm con régimen de lluvias en los meses de julio y agosto. Presenta una topografía de relieves un tanto irregulares, característica de las zonas aledañas a la Sierra Madre Occidental.

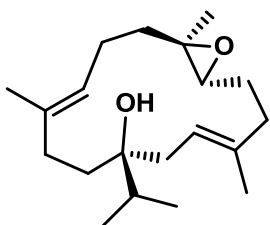
Se llenaron 2 porrones de 20 L hexano c/u con 8 kg de tallos cortados en pequeños canutos de 5 cm aproximadamente y hexano. Se dejó transcurrir la maceración de 1 a 2 semanas y el hexano se extrajo por rotavapor a 65 °C realizando 3 maceraciones por porrón hasta agotar la sustancia a extraer, obteniendo así seis extractos hexánicos por separado.

9.2. Separación de los metabolitos secundarios

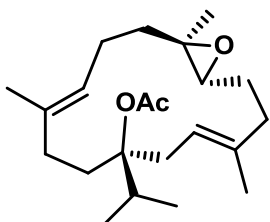
Se tomaron 8 ml del 1er extracto hexánico y se sometió a columna cromatográfica abierta de 3 cm de diámetro con 40 g de gel de sílice y 5 g de alúmina neutra. La elución se llevó a cabo por incremento de polaridad, comenzando con hexano, seguidas de mezclas hexano:CH₂Cl₂, CH₂Cl₂, mezclas CH₂Cl₂:AcOEt, AcOEt y finalizando con metanol.



(1S,3E,7E,11E)-cembra-3,7,11-trien-1-ol (30). Se aisló en las fracciones 42 hasta 55 en la polaridad hexánica y 9:1 hex:CH₂Cl₂, como un aceite incoloro. Obteniendo 220 mg en promedio por columna cromatográfica. $[\alpha]_{589} -74$, $[\alpha]_{578} -77$, $[\alpha]_{546} -88$, $[\alpha]_{436} -170$, $[\alpha]_{365} -265$ (c 2.7, EtOH). RMN¹H; ver Tabla 6. RMN¹³C; ver Tabla 8 y 9.



(1S,3E,7R,8R,11R)-7,8-epoxicembra-3,11-dien-1-ol (31). Encontrado en las fracciones 115 hasta 164 en las polaridades 6:4 hasta 1:9 hex:CH₂Cl₂, con apariencia de sólido blanco ceroso. Obteniendo 650 mg en promedio por columna cromatográfica. Con punto de fusión 94°C–96°C. $[\alpha]_{589} -16$, $[\alpha]_{578} -17$, $[\alpha]_{546} -20$, $[\alpha]_{436} -35$, $[\alpha]_{365} -59$ (c 0.4, CHCl₃). RMN¹H; ver Tabla 6. RMN¹³C; ver Tabla 9. EMIE *m/z* (rel. int.): 306 [M]⁺ (16), 289 (12), 271 (15), 227 (12), 161 (18), 135 (63), 109 (81), 95 (64), 81 (50), 67 (66), 57 (10), 43 (100); EMAR (electrospray) *m/z* 329.2463 (calculado para C₂₀H₃₄O₂ + Na, 329.2457).



1-acetato de (1S,3E,7R,8R,11R)-7,8-epoxicembra-3,11-dien-1-ol (32). Aislado en las entre las fracciones 65 a 90 en las polaridades 8:2 hasta 7:3 hex:CH₂Cl₂, como un aceite incoloro. Obteniendo 500 mg en promedio por columna cromatográfica. $[\alpha]_{589} -28$, $[\alpha]_{578} -30$, $[\alpha]_{546} -35$, $[\alpha]_{436} -61$, $[\alpha]_{365} -99$ (c 1.17, CHCl₃). RMN¹H; ver Tabla 6. RMN¹³C; ver Tabla 9. EMIE *m/z* (rel. int.): 288 [M – AcOH]⁺ (14), 271 (16), 255 (8), 227 (39), 203 (14), 189 (16), 175 (19), 161 (27), 147 (35), 121 (100), 107 (81), 95 (42), 81 (34), 67 (34), 53 (17); EMAR (electrospray) *m/z* 371.2567 (calculado para C₂₂H₃₆O₃ + Na, 371.2562).

9.3. Epoxidaciones del (1*S*,3*E*,7*R*,8*R*,11*R*)-7,8-epoxicembra-3,11-dien-1-ol (**31**)

En un matraz se diluyeron 217 mg de (1*S*,3*E*,7*R*,8*R*,11*R*)-7,8-epoxicembra-3,11-dien-1-ol (**31**) con 8 ml de CH₂Cl₂, se colocó el matraz cerrado 1 h a 4 °C. Enseguida se adicionaron 200 mg de *m*CPBA, se disolvió el ácido y se dejó a temperatura ambiente por 2 h. Transcurrido el tiempo se le realizaron lavados con solución saturada de NaHCO₃, seguido de lavados con agua destilada. Se secó con sulfato de sodio anhidro. Los productos de reacción: (11*E*)-3:4,7:8-diepoxicembren-1-ol (**33**) y 3:4,7:8,10:11-triepoxicembran-1-ol (**34**) poseen apariencia de polvo blanco con p.f. de 143-145 °C para **33**.

RMN¹-H y RMN¹³-C de ambos; ver Tablas 7 y 10

9.4. Modelado Molecular

Las coordenadas de difracción de rayos X se utilizaron para construir el modelo molecular del (1*S*,3*E*,7*R*,8*R*,11*R*)-7,8-epoxicembra-3,11-dien-1-ol (**31**), se llevó a cabo la búsqueda conformacional empleando el protocolo Monte Carlo utilizando el campo de fuerza de mecánica molecular (MMFF94) en el programa Spartan'04. Se encontraron un total de 13 estructuras de mínima energía, que se optimizaron mediante DFT a nivel B3LYP/DGDZVP con el programa Gaussian 03W. De cada confórmero se obtuvo su curva de dicroísmo circular vibracional y la sumatoria ponderada de dichas curvas se llevó a cabo de acuerdo a la población conformacional calculada en función de ΔG . La concordancia que se obtuvo entre las curvas de DCV experimental y teórica permitió asignar la configuración absoluta de **31** como (1*S*,7*R*,8*R*).

10. TABLAS DE DESPLAZAMIENTO QUÍMICO

Tabla 6. Comparación de los desplazamientos de RMN-¹H de los derivados de cembreno **30**, **31** y **32** a 400 MHz.

Protón	30	31	32 ^a
H-2a	2.18 (m)	2.25 (m)	1.92 (m)
H-2b			1.84 (m)
H-3	5.24 (br t, <i>J</i> =7.1 Hz)	5.39 (br t, <i>J</i> =6.8 Hz)	5.29 (ddd, <i>J</i> =8.7, 4.0, 2.0 Hz)
H-5a	2.20 (m)	2.32 (m)	2.29 (m)
H-5b			
H-6a	2.07 (m)	1.85 (m)	1.81 (m)
H-6b		1.61 (m)	1.63 (m)
H-7	4.99 (br t, <i>J</i> =6.8 Hz)	2.76 (br t, <i>J</i> =4.3 Hz)	2.80 (br t, <i>J</i> =4.7 Hz)
H-9a	1.91 (m)	2.08 (ddd, <i>J</i> =12.8, 4.9, 2.8 Hz)	2.10 (m)
H-9b	1.75 (m)	1.03 (td <i>J</i> = 13.2, 3.2 Hz)	1.04 (m)
H-10a	2.29 (m)	2.22 (m)	2.21 (m)
H-10b	2.09 (m)	1.94 (m)	1.95 (m)
H-11	4.89 (br t, <i>J</i> =6.2 Hz)	5.11 (br t, <i>J</i> =7.6 Hz)	5.08 (br t, <i>J</i> =7.6 Hz)
H-13a	2.15 (m)	1.88 (m)	2.80 (m)
H-13b	1.94 (m)	1.71 (m)	2.53 (m)
H-14a	1.63 (m)	1.75 (m)	2.18 (m)
H-14b		1.43 (m)	1.75 (m)
H-15	1.7 (m)	1.64 (m)	2.51 (m)
H-16	0.94 (d, <i>J</i> =7.5 Hz)	0.95 (d, <i>J</i> =6.4 Hz)	0.96 (d, <i>J</i> =3.2 Hz)
H-17	0.92 (d, <i>J</i> =6.9 Hz)	0.93 (d, <i>J</i> =6.5 Hz)	0.95 (d, <i>J</i> =3.3 Hz)
H-18	1.56 (s)	1.66 (s)	1.67 (s)
H-19	1.58 (s)	1.27 (s)	1.26 (s)
H-20	1.54 (s)	1.58 (s)	1.58 (s)

^aCH₃COO: 2.00 ppm (s).

Tabla 7. Comparación de desplazamientos de RMN-¹H del metabolito **31** y sus productos de epoxidación **33** y **34** a 400 MHz.

Protón	31	33	34
H-2a	2.25 (m)	1.37 (m)	
H-2b		1.81 (dd, $J=11.41$, 3.41 Hz)	
H-3	5.39 (br t, $J=6.8$ Hz)	3.80 (dd, $J=11.5$, 4.4 Hz)	3.0 (m)
H-5a	2.32 (m)	1.73 (m)	
H-5b		1.91 (m)	
H-6a	1.85 (m)	2.12 (m)	
H-6b	1.61 (m)		
H-7	2.76 (br t, $J=4.3$ Hz)	3.40 (br d, $J=8$ Hz)	2.65 (br d, $J=9.7$ Hz)
H-9a	2.08 (ddd, $J=12.8$, 4.9, 2.8 Hz)	2.32	
H-9b	1.03 (td, $J=13.2$, 3.2 Hz)	1.49 (br t, $J=13.3$ Hz) (m)	
H-10a	2.22 (m)	2.02 (m)	
H-10b	1.94 (m)	1.65 (m)	
H-11	5.11 (br t, $J=7.6$ Hz)	5.32 (dd, $J=10.2$, 5.9 Hz)	2.39 (m)
H-13a	1.88 (m)	1.35 (m)	
H-13b	1.71 (m)		
H-14a	1.75 (m)	1.77 (m)	
H-14b	1.43 (m)		
H-15	1.64 (m)	1.73 (m)	
H-16	0.95 (d, $J=6.4$ Hz)	0.99 (d, $J=7.0$ Hz)	0.90 (d, $J=6.9$ Hz)
H-17	0.93 (d, $J=6.5$ Hz)	0.88 (d, $J=6.7$ Hz)	0.83 (d, $J=7.5$ Hz)
H-18	1.66 (s)	1.06 (s)	1.32 (s)
H-19	1.27 (s)	1.14 (s)	1.36 (s)
H-20	1.58 (s)	1.59 (s)	1.20 (s)

Tabla 8. Comparación de los desplazamientos de RMN-¹³C del cembrenol aislado por Kobayashi contra los asignados del cembrenol **30** a 100 MHz.

Carbono	Kobayashi (1989)	30
C-1	76.9	76.7
C-2	33.5	34.6
C-3	121.0	120.8
C-4	133.3	136.3
C-5	39.6	39.3
C-6	23.8	23.6
C-7	123.3	123.0
C-8	135.6	135.4
C-9	39.9	33.4
C-10	24.9	24.7
C-11	126.0	125.8
C-12	136.6	133.1
C-13	34.7	39.5
C-14	35.0	34.8
C-15	34.7	34.4
C-16	15.2	16.7*
C-17	16.4	16.5*
C-18	16.7	14.9
C-19	16.9	16.2
C-20	16.9	15.0

* Pueden estar intercambiados

Tabla 9. Comparación de los desplazamientos de RMN-¹³C de los derivados de cembreno **30**, **31** y **32** a 100 MHz.

Carbono	30	31	32^a
C-1	76.7	76.6	90.7
C-2	34.6	35.9	34.2
C-3	120.8	121.5	120.7
C-4	136.3	134.8	134.7
C-5	39.3	37.1	36.5
C-6	23.6	25.4	25.7
C-7	123.0	62.3	62.3
C-8	135.4	59.8	59.7
C-9	33.4	39.4	39.5
C-10	24.7	23.6	23.5
C-11	125.8	123.0	123.1
C-12	133.1	136.4	136.3
C-13	39.5	34.3	32.0
C-14	34.8	35.8	33.2
C-15	34.4	34.6	34.0
C-16	16.7*	16.3	17.9
C-17	16.5*	16.5	17.6
C-18	14.9	15.7	16.2
C-19	16.2	16.7	16.5
C-20	15.0	15.4	15.4

^aCH₃COO: 170 y 22.4 ppm

* Pueden estar intercambiados

Tabla 10. Comparación de desplazamientos de RMN-¹³C del metabolito **31** y sus productos de epoxidación **33** y **34** a 100 MHz.

Carbono	31	33	34
C-1	76.6	89.3	74.9
C-2	35.9	38.5	34.5
C-3	121.5	87.3	60.6
C-4	134.8	85.3	66.6
C-5	37.1	31.6	35.1
C-6	25.4	29.0	24.7
C-7	62.3	81.9	61.2
C-8	59.8	82.2	62.7
C-9	39.4	32.0	31.6
C-10	23.6	29.2	25.2
C-11	123.0	122.7	61.6
C-12	136.4	134.1	62.4
C-13	34.3	39.8	39.4
C-14	35.8	33.1	33.1
C-15	34.6	36.8	31.4
C-16	16.3	16.6	15.2
C-17	16.5	19.1	15.9
C-18	15.7	20.1	16.2
C-19	16.7	26.7	17.8
C-20	15.4	15.7	16.4

11. ESPECTROS

a) (1*S*,3*E*,7*E*,11*E*)-cembra-3,7,11-trien-1-ol (**30**)

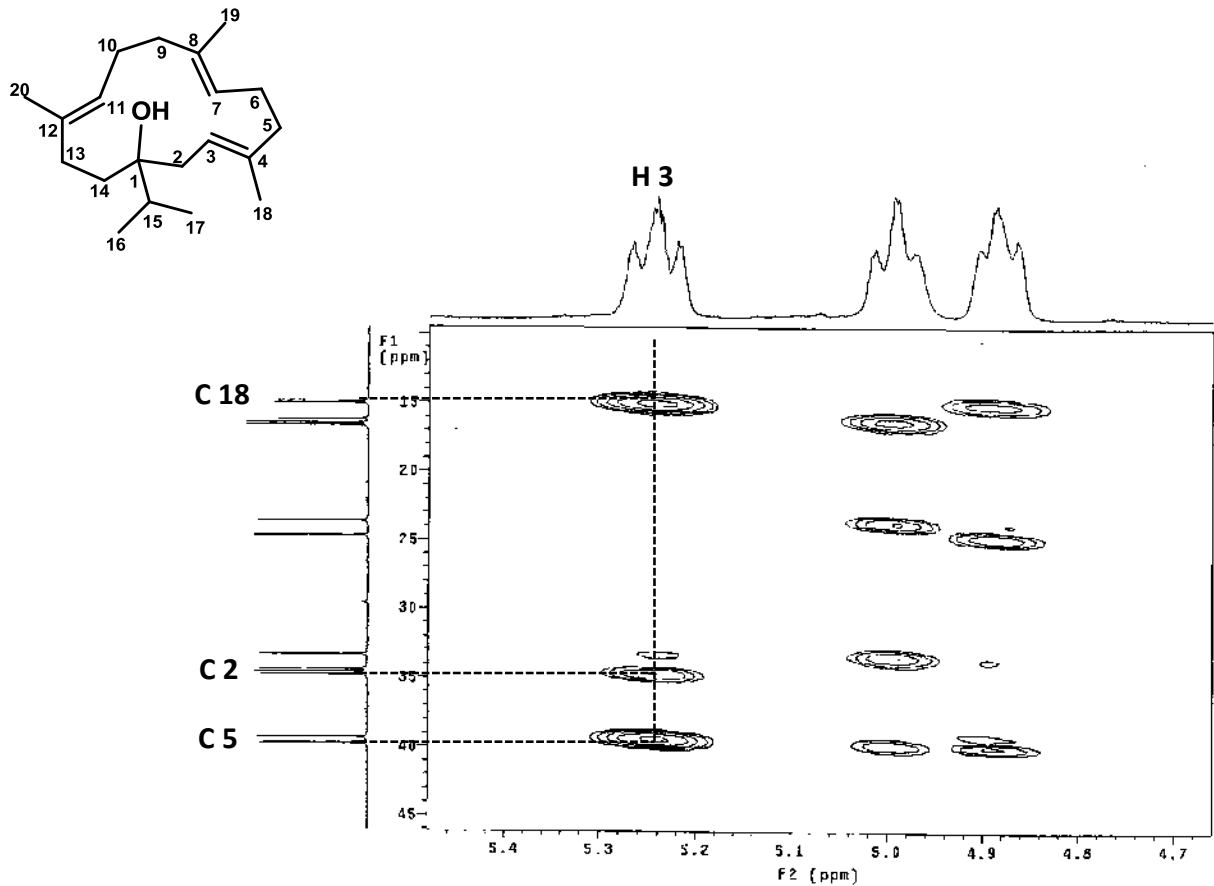


Figura 49. Ampliación del espectro bidimensional de correlación heteronuclear *g*HMBC del metabolito **30**, donde se observa el desplazamiento de C-2 es de 34.6 ppm y no de 33.5 ppm como lo señala la literatura.

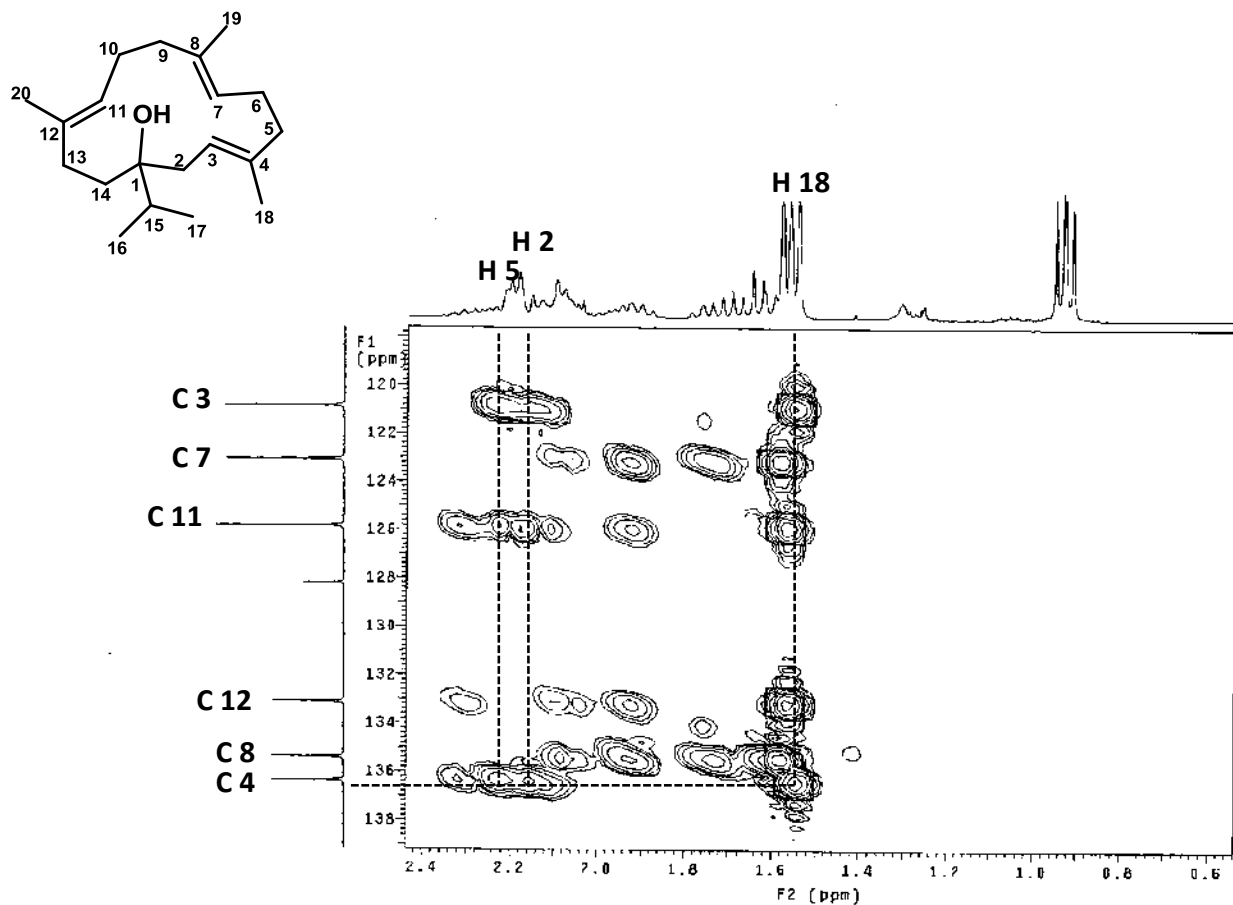


Figura 50. Ampliación del espectro bidimensional de correlación heteronuclear g HMBC del metabolito **30**, donde se observa el desplazamiento de C-4 es de 136.1 ppm y no de 133.3 ppm el cual correspondería a C-12 ya que están intercambiados en la literatura.

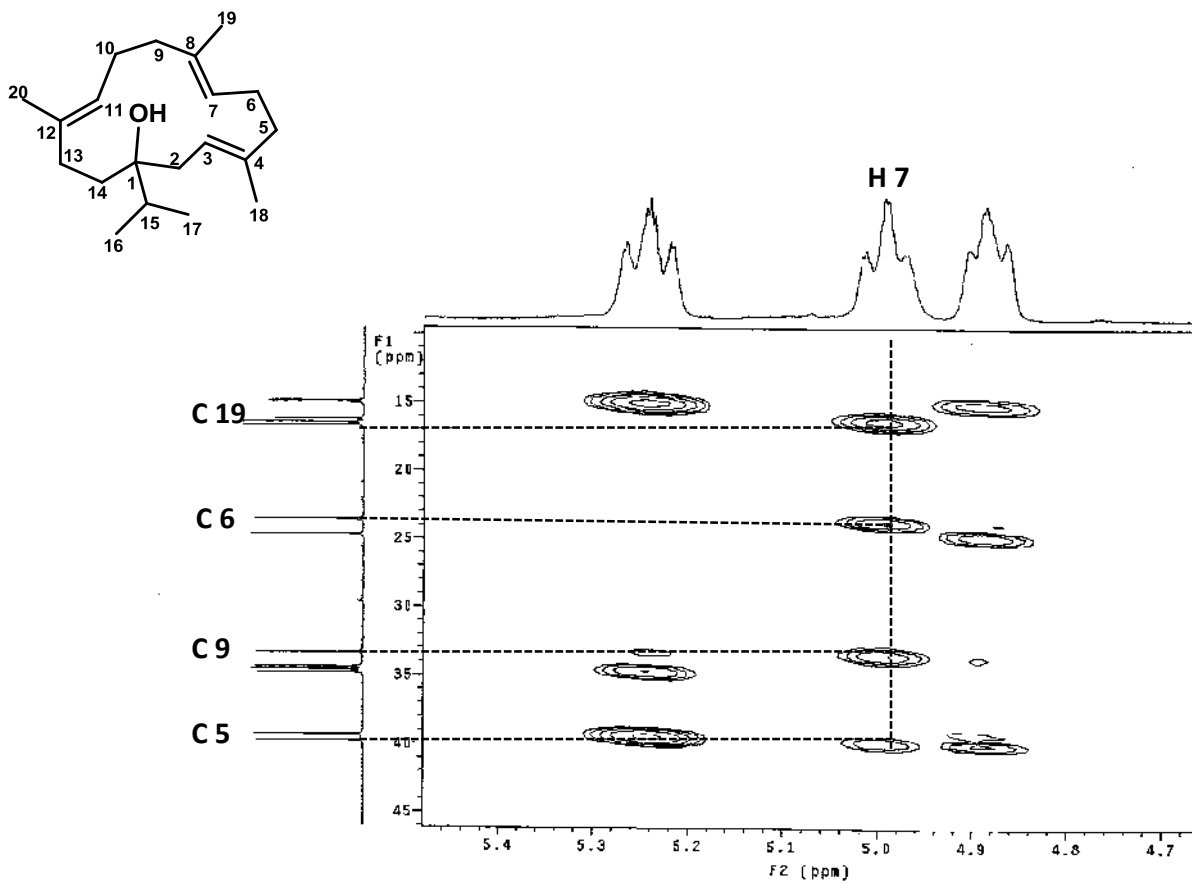


Figura 51. Ampliación del espectro bidimensional de correlación heteronuclear g HMBC del metabolito **30**, donde se corrige el desplazamiento de C-9 a 33.4 ppm del reportado a 39.9 ppm.

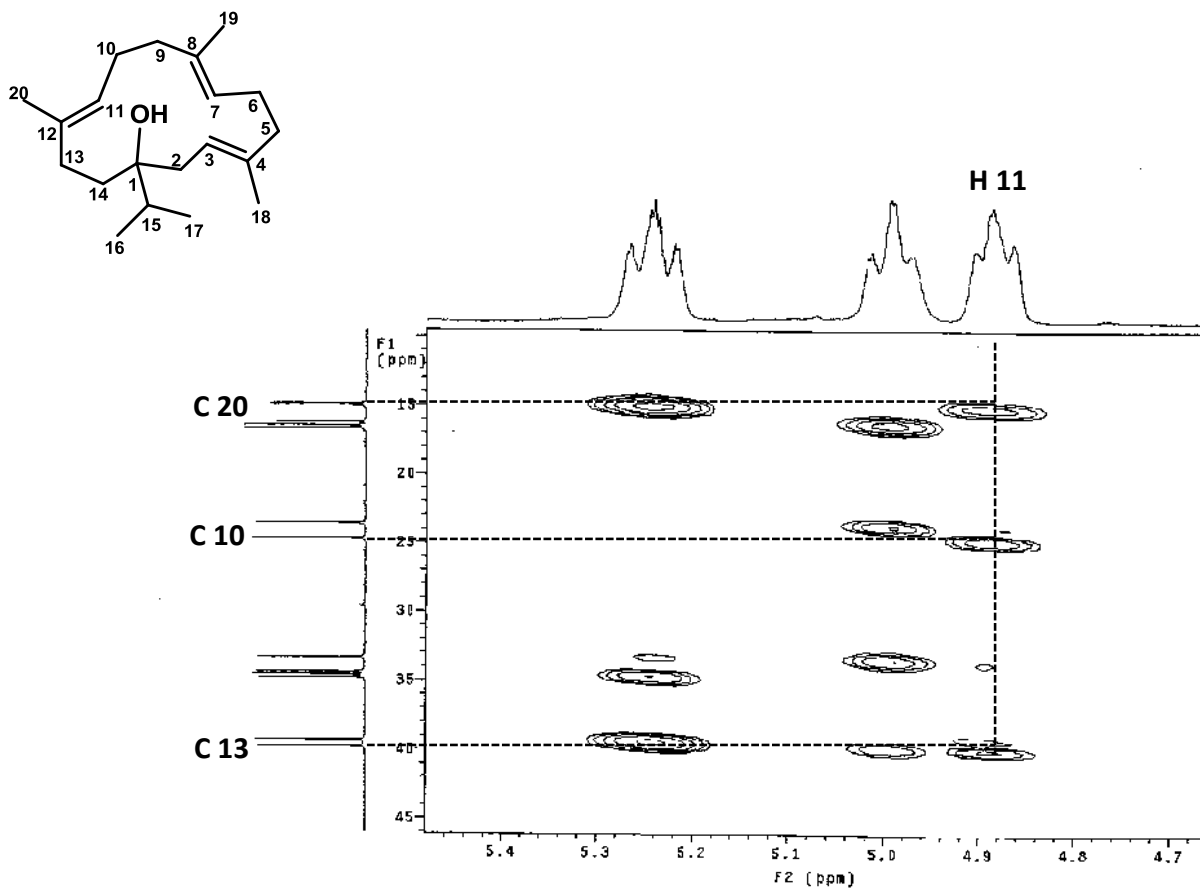


Figura 52. Ampliación del espectro bidimensional de correlación heteronuclear g HMBC del metabolito **30**, donde se corrige el desplazamiento de C-13 en 34.7 ppm reportado en 39.5 ppm.

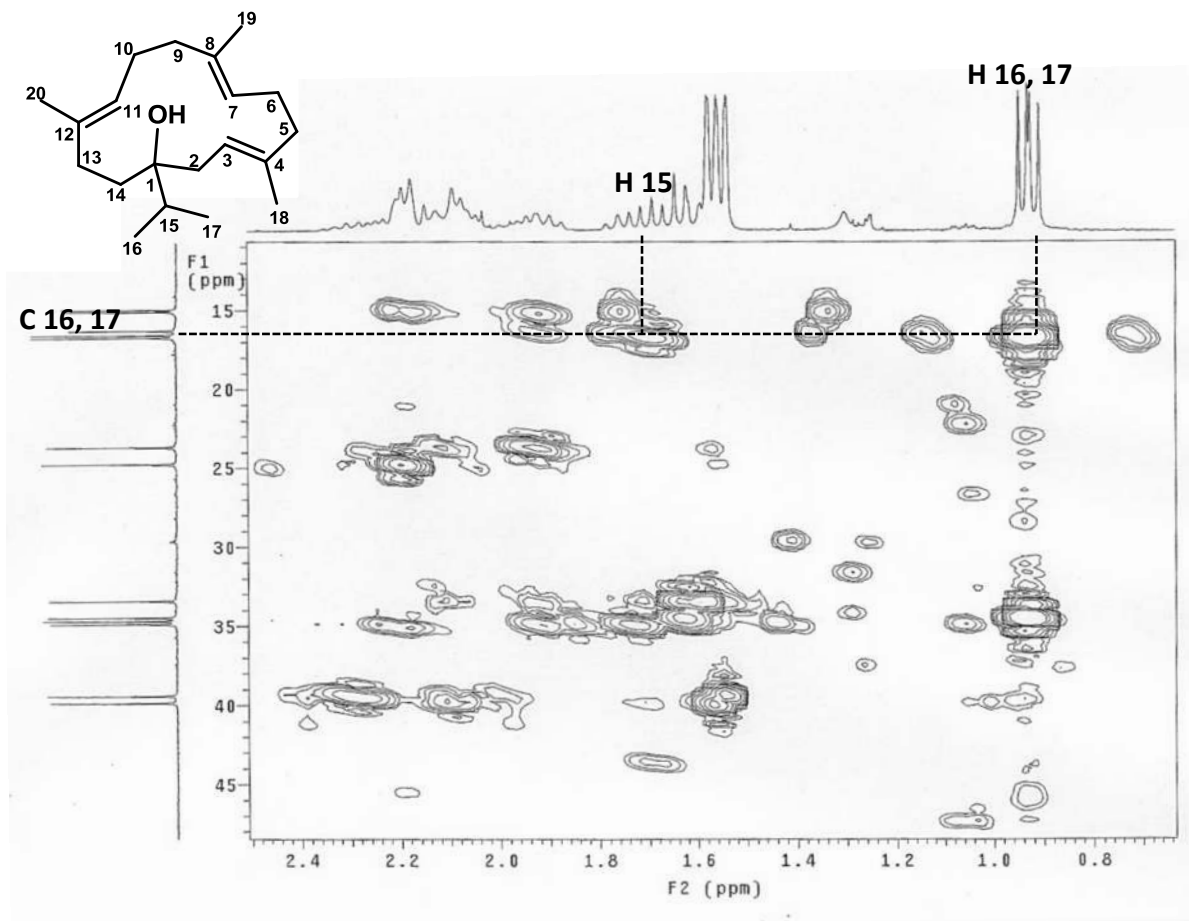


Figura 53. Ampliación del espectro bidimensional de correlación heteronuclear *g*HMBC del metabolito **30**, donde se reasignan el desplazamiento de C-16 y C-17 a 16.7 ppm ya que se encontraban intercambiados con los C-18 y C-20 según Kobayashi.

b) 1-acetato de (1*S*,3*E*,7*R*,8*R*,11*R*)-7,8-epoxicembra-3,11-dien-1-ol (32).

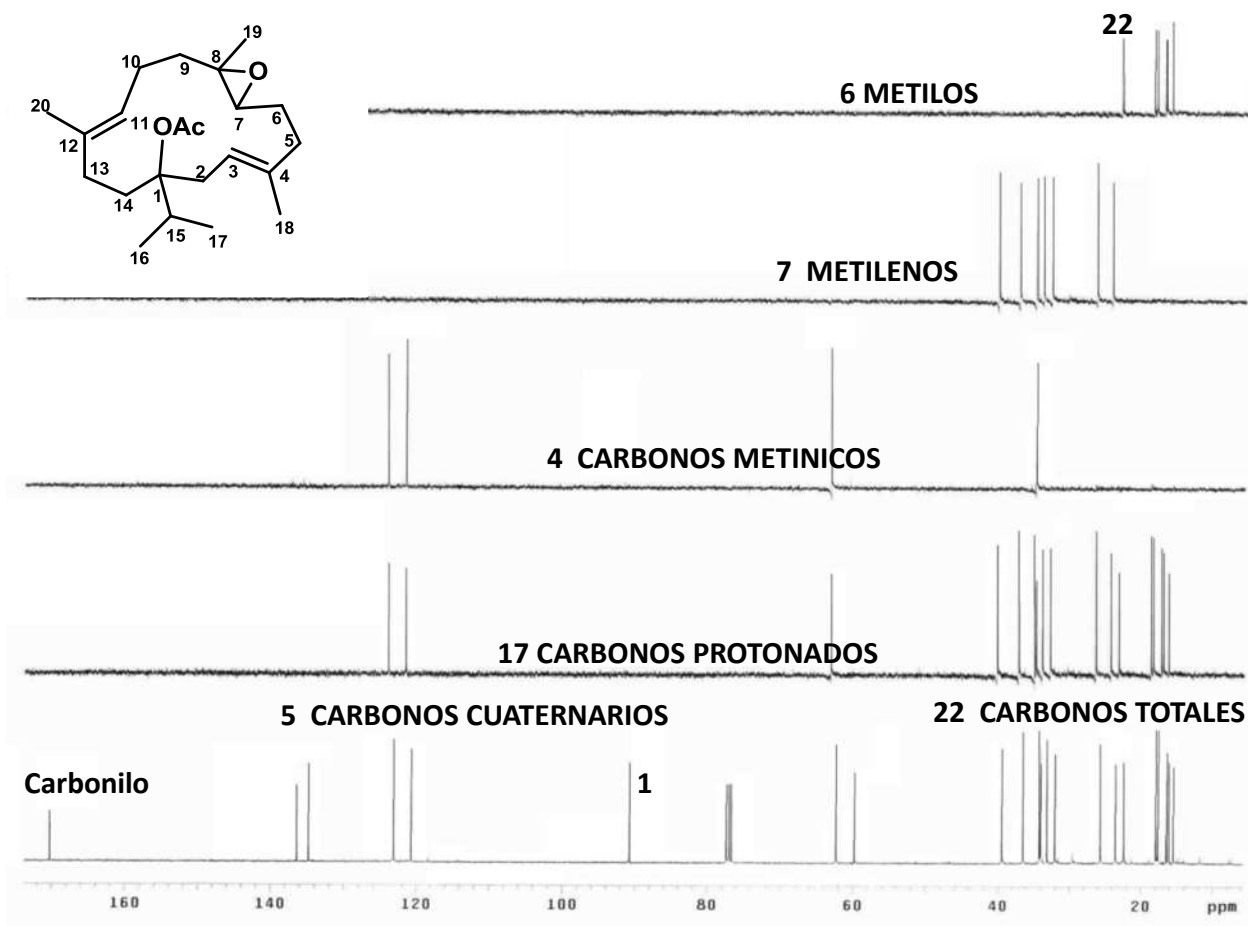


Figura 54. Espectro DEPT del acetato de epoxicembrenol (32) a 100 MHz.

c) (1*S*,3*E*,7*R*,8*R*,11*R*)-7,8-epoxicembra-3,11-dien-1-ol (31)

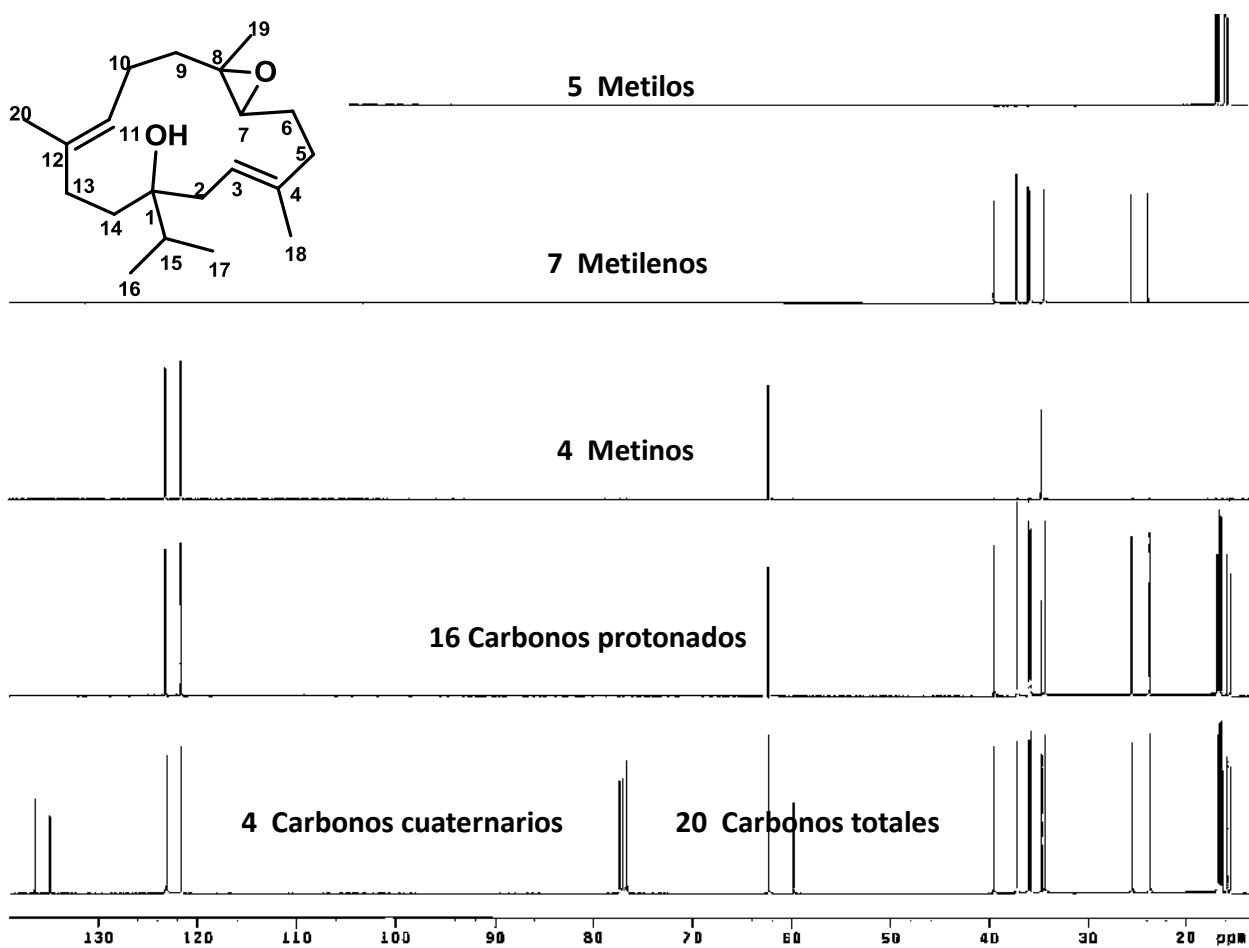


Figura 55. Espectro DEPT del epoxicembrenol (31) a 100 MHz.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. González-Elizondo, M. S., González-Elizondo, M., Tena-Flores, J. A., Ruacho-González L., López-Enríquez, I. L., "Vegetación de la Sierra Madre Occidental, México: una síntesis". *Acta Botánica Mexicana*. **2012**, *100*, 351-403.
2. Fernández Nava, R., Rodríguez Jiménez, C., Arreguín Sánchez, M. A., Rodríguez Jiménez, A., "Listado Florístico de la Cuenca del Río Balsas, México". *Polibotánica*. **1998**, *9*, 1-151.
3. Rzedowski, J., Medina Lemus, R., Calderón de Rzedowski, G., "Las especies de *Bursera* (*Burseraceae*) en la cuenca superior del río Papaloapan (México)". *Acta Botanica Mexicana*. **2004**, *66*, 23-151.
4. De la Cerda-Lemus, M. E., "La familia *Burseraceae* en el Estado de Aguascalientes, México". *Acta Botánica Mexicana*. **2011**, *94*, 1-25.
5. Rzedowski, J., Mc Vaugh, R., "La Vegetación de Nueva Galicia", *Contr. Univ. Mich. Herb.* **1966**, *9*, 1-123.
6. Guzmán, R., Sánchez, G., "Estudio preliminar morfológico y fitoquímico de las especies *Bursera arborea* (Rose) Riley y *Bursera instabilis* McVaugh y Rzed en la Estación Biológica de Chamela, Jalisco". Universidad Simón Bolívar Investigación Universitaria Multidisciplinaria [online]. 2004, n.3 [citado 2011-08-08]. Disponible en: http://www.usb.edu.mx/downloads/publicaciones/No5/r05_art08.pdf
7. Hernández-Hernández, J. D., Román-Marín, L. U., Espiñeira, J., Joshep-Nathan, P., "Ariensin, a new lignan from *Bursera ariensis* HBK". *Planta Medica*. **1983**, *47*, 193.
8. Hernández-Hernández, J. D., Román-Marín, L. U., Manzo, S., Joshep-Nathan, P., "Estudio Químico de la resina del Papelillo". *Rev. Soc. Quím. Méx.* **1987**, *31*, 172.
9. Manzo Andrade, S., "Aislamiento y Estudio Químico de los componentes de la resina de *Bursera ariensis* HBK" Tesis para obtener el Título de Químico-Farmacobiólogo, presentada a la escuela de Químico-Farmacobiología de la U.M.S.N.H. **1988**.
10. Hernández-Hernández, J. D., Román-Marín, L. U., Alvarez, E. C., Manzo, S., Joshep-Nathan P., "Aislamiento y Reacciones de Lignanos derivados del género *Bursera*". *Rev. Soc. Quím. Méx.* **1989**, *33*, 231.

11. Hernández-Hernández, J. D., García, R. Reyes, L., Guzmán, J., Román-Marín, L. U., "Caracterización de los componentes principales de aceites esenciales obtenidos de *Burseras*". XIII Taller de Otoño de Productos Naturales, Mérida, Yuc., *Memorias*. **1995**.
12. Hernández-Hernández, J. D., García, M., Román-Marín, L. U., "Terpenoides de resina y fruto de *Bursera cuneata* (Schlecht.) Engl".V Encuentro Universitario de Investigación Científica, Tecnológica y Humanística., *Memorias*. **1995**, 53.
13. Hernández-Hernández, J. D., Guzmán, J. C., Sánchez, M. A., Román-Marín, L. U., "Análisis por CG de Aceites Esenciales de frutos de *Burseras*". *Rev. Soc. Quím. Méx.* **1996**, *40*, C/42, 112.
14. García Velgara, M., "Estudio Químico de la parte aérea de la *Bursera cuneata* y de *Eupatorium arsenei* Rob" Tesis para obtener el Título de Químico-Farmacobiólogo, presentada a la escuela de Químico-Farmacobiología de la U.M.S.N.H. el 8 de Febrero de **1996**.
15. Hernández-Hernández, J. D., Guzmán, J. C., García, L., Román-Marín, L. U., "Cromatografía de Gases de aceites esenciales de frutos de siete especies de *Burseras*". *Anuario VII del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, U.M.S.N.H.* **1997**, 69-86.
16. Hernández-Hernández, J. D., Alvarez, R., Magaña, J., Tapia, I., Pardo, R., Guzmán, J. C., "β-Felandreno, componente mayoritario obtenido de los extractos hexánicos de las ramas y frutillas de tres especies de Burseraceae".IX Encuentro Universitario de Investigación Científica, Tecnológica y Humanística., *Memorias*. **1999**, 29.
17. Alvarez García, R., "Estudio Químico de algunos componentes obtenidos de *Bursera attenuata*, *Bursera fagaroides* var. *elongata*, *Bursera mirandae* y *Bursera submoniliformis*". Tesis para obtener el Título de Químico-Farmacobiólogo, presentada a la escuela de Químico-Farmacobiología de la U.M.S.N.H. el 10 de Enero de **2001**.
18. Hernández-Hernández, J. D., Alvarez-García, R., Guzman-Martínez, J. C., Hernández, A., Román-Marín, L. U., "Flavonoid glycosides, Terpenoids and other constituents from *Bursera* Species". 42nd Annual Meeting of the American Society of Pharmacognosy., *Memorias, ASP*. **2001**, 129.
19. Hernández-Hernández, J. D., Alvarez-García, R., Guzmán-Martínez, J. C., Armenta, C., Beiza, L., Tapia, I., Román-Marín, L. U., "Essential oils from branches and fruits of twenty five Mexican *Bursera* Species". 42nd Annual Meeting of the American Society of Pharmacognosy., *Memorias, ASP*. **2001**, 129.

20. Hernández-Hernández, J. D., Álvarez-García, R., Román-Marín, L. U., "Análisis de partes aéreas de cuajotes amarillos". *Rev. Soc. Quím. Méx.* **2001**, 45, C/2, 98. XXXVI Congreso Mexicano de Química.
21. Hernández-Hernández, J. D., Beiza, L., Martínez, I. A., López, Y., Álvarez, A., "Ariensina-B un lignano obtenido de tallos de *Bursera bolivarii*". XI Encuentro Universitario de Investigación Científica, Tecnológica y Humanística., *Memorias.* **2001**, 28.
22. Hernández-Hernández, J. D., Beiza, L., Álvarez, A., "Diterpenos de tipo Verticilano obtenidos de *Burseraceae*". XI Encuentro Universitario de Investigación Científica, Tecnológica y Humanística., *Memorias.* **2001**, 35.
23. Hernández-Hernández, J. D., Álvarez-García, R., Beiza, L., Cerezo, S., Guzmán-Martínez, J.C., " α -Felandreno obtenido del aceite esencial de *Bursera morelensis* y *Bursera penicillata*". XI Encuentro Universitario de Investigación Científica, Tecnológica y Humanística., *Memorias.* **2001**, 27.
24. Hernández-Hernández, J. D., López-Camacho, Y., Álvarez, A., Román-Marín, L. U., "Preparación de derivados lignánicos del 2-(3,4-dimetoxibencil)-3-(3,4-dimetilendioxibencil)-1,4-butanodiol". *Rev. Soc. Quím. Méx.* **2002**, 46, C/113, 131.
25. Hernández-Hernández, J. D., Herrero, N., López, Y. P., Román-Marín, L. U., Cerda-García-Rojas, C. M., Joseph-Nathan, P., "Preparación de derivados bromados y nitrados del diacetato de 2-(3,4-metilendioxibencil)-3-(3',4'-dimetoxibencil)-1,4-butanodiol (I), obtenido de *Bursera bolivarii*". *Rev. Soc. Quím. Méx.* **2003**, 47, C/96, 147.
26. Hernández-Hernández, J. D., Herrero, N., López, P. Y., Román-Marín, L. U., Cerda-García-Rojas, C. M., Joseph-Nathan, P., "Nuevos derivados tipo verticilano obtenidos de *Bursera multifolia*". *Rev. Soc. Quím. Méx.* **2003**, 47, R-80, 105.
27. Hernández-Hernández, J. D., Reyes, V., Herrero, N., Tapia, I., Román-Marín, L. U., Cerda-García-Rojas, C. M., Joseph-Nathan P., "Nuevos (+)-verticilenos de *Bursera kerberi* y *Bursera multifolia*". *Rev. Soc. Quím. Méx.* **2004**, 48, R-12, 90.
28. Hernández-Hernández, J. D., Reyes, V., Herrero, N., Pérez, J., Román-Marín, L. U., Cerda-García-Rojas, C. M., Joseph-Nathan, P., "Preparación de epóxidos a partir de (+)-verticiloles aislados de *Burseraceae*". *Rev. Soc. Quím. Méx.* **2004**, 48, R-13, 90.
29. Hernández-Hernández, J. D., Hernández, A., Álvarez, R., Guzmán-Martínez, J. C., Beiza, L., López, Y., Tapia, I., Herrero, N., Román-Marín, L. U., "Distribución de terpenoides en *Burseraceae*". *XIII Congreso Italo-Latinoamericano de Etnomedicina.* **2004**, CO/35.

30. Hernández-Hernández, J. D., Román-Marín, L. U., Cerda-García-Rojas, C. M., Joseph-Nathan, P., "Verticillane derivatives from *Bursera suntui* and *Bursera kerberi*". *Journal of Natural Products*. **2005**, *68*, 1598-1602.
31. Hernández-Hernández, J. D., Román-Marín, L. U., Guzmán- Martínez, J. C., Murillo-Galeana, L., Tapia-Quintero, I., Murillo-Galeana, V., "Aspectos Fitoquímicos de *Bursera penicillata*, *Bursera graveolens* y *Bursera fragantissima*, Tres especies de la Sección *Bullockia*". *Revista Latinoamericana de Química*. ISSN 0370-5943, **2005**, *33*, 189.
32. Cerda-García-Rojas, C. M., Hernández-Hernández, J. D., Román-Marín, L. U., Joseph-Nathan, P., "Estudio Conformacional de Diterpenos Macrocíclicos". *Rev. Soc. Quím. Méx.* **2005**, *49*, 60-61.
33. Hernández-Hernández, J. D., Reyes-Olivares, V., Román-Marín, L. U., Tapia-Quintero, I., Cerda-García-Rojas, C. M., Joseph-Nathan, P., "Cembra-3,7,11,15-tetraeno, un Diterpeno hidrocarbonado Macrocíclico obtenido de *Bursera kerberi*". *Rev. Soc. Quím. Méx.* **2005**, *49*, C/146, 171.
34. Hernández-Hernández, J. D., Herrero-Pineda, N., Reyes-Olivares, V., Román-Marín, L. U., Cerda-García-Rojas, C. M., Joseph-Nathan, P., "Dos nuevos derivados epoxidados de verticila-3,7-dien-12,20-diol aislados de *Bursera suntui*". *Rev. Soc. Quím. Méx.* **2005**, *49*, C/147, 171.
35. Hernández-Hernández, J. D., Murillo-Galeana, V., Murillo-Galeana, L., Román-Marín, L. U., Cerda-García-Rojas, C. M., Joseph-Nathan, P., "Dos nuevos Diterpenos Macrocíclicos de tipo Cembranoide aislados de *Bursera multijuga*". *Rev. Soc. Quím. Méx.* **2005**, *49*, C/146, 171.
36. Hernández-Hernández, J. D., Velázquez-Jiménez, R., Reyes-Olivares, V., Alarcón-Zúñiga, A., Román-Marín, L. U., "Agentes antitumorales obtenidos de *Burseraceae* Michoacanas". 2º Congreso Estatal de Ciencia y Tecnología, *Memorias*. **2006**, 37.
37. Taiz, L., Zeiger, E., "Fisiología Vegetal". *Publicacions de la Universitat Jaume I*. **2006**, Vol 1, 533-536.
38. Dennis, D.T., Turpin, D. H., Lefebvre, D. D., Layzell, D. B., "Plant Metabolism". *Longman*, 2nd Edition, **1997**, 430-438.
39. Hernández-Hernández, J. D., García, L., Guzmán, J. C., Román-Marín, L. U., Rutina un Glicósido Flavonoide obtenido de hojas de *Bursera multijuga*, *Bursera penicillata*,

Bursera kerberi y *Bursera fagaroides* HBK. VI Encuentro Universitario de Investigación Científica, Tecnológica y Humanística. Memorias, **1996**, 40.

40. García Heredia, L., "Glicósidos Flavonoides de hojas de cuatro especies del Género *Bursera*." Tesis para obtener el Título de Químico Farmacobiólogo, presentada a la Facultad de Químico-Farmacobiología de la U.M.S.N.H. **1996**.
41. Hernández-Hernández, J. D., Elías-Rubio, K.N., Velázquez-Jiménez, R., Armenta-Salinas, C., Álvarez-García, R., Guzmán-Martínez, J.C., Román- Marín, L. U., *Bursera mirandae*, una *Bursera* de la Sección *Bullockia*. *Bol. Soc. Quim. Mex.* **2007**, 1, Número Especial, 235.
42. Hernández-Hernández, J. D., Álvarez-García, R., Tapia, I., Román-Marín, L. U., Derivados de 3-lupenona, un triterpeno pentacíclico obtenido de *Bursera mirandae* sp". *Rev. Soc. Quím. Méx.* **1998**, 42, R-1, 49.
43. López Camacho, P. Y., "Compuestos químicos obtenidos a partir del componente principal extraído de la *Bursera bolivarii*". Tesis para obtener el Título de Químico Farmacobiólogo, presentada a la Facultad de Químico-Farmacobiología de la U.M.S.N.H. **2003**.
44. Hernández-Hernández, J. D., López-Camacho, Y., Alvarez, A., Román-Marín, L. U., "Preparación de derivados lignánicos del 2-(3,4-dimetoxibencil)-3-(3,4-dimetoxibencil)-1,4-butanodiol". *Rev. Soc. Quím. Méx.* **2002**, 46, C/113, 131.
45. Hernández-Hernández, J. D., Beiza, L., Román-Marín, L. U., Cerda-García-Rojas, C. M., Joshep-Nathan, P., Dos nuevos diterpenos macrocíclicos de *Bursera Kerberi*. *Rev. Soc. Quim. Mex.* **2002**, 46, C-21, 106, XXV Congreso Latinoamericano de Química.
46. Alarcón Zuñiga, A. "Determinación estructural de algunos componentes obtenidos de *Bursera multifolia*." Tesis para obtener el Título de Químico Farmacobiólogo, a la Escuela de Químico-Farmacobiología de la U.M.S.N.H., **2006**.
47. Raldugin, V. A., Shevtsov, S. A., "Polycyclic diterpenoids biogenetically related to the cembranoids". *Khimiya Prirodnikh Soedinenii.* **1987**, 3, 327-342.
48. Jones, W. P., Lobo-Echeverri, T., Mi, Q., Hee-Byung, C., Soejarto, D. D., Cordell, G. A., Swanson, S. M., Kinghorn, A. D., "Cytotoxic constituents from the Fruiting Branches of *Callicarpa americana* collected in Southern Florida". *J. Nat. Prod.* **2007**, 70, 372-377.
49. Jeffrey, B. Harborne., Herbert Baxter., "Phytochemical Dictionary". *Taylor & Francis.* **1993**, 645

50. Jin, Y., Williams, D.C., Croteau, R., Coates R.M. "Taxadiene synthase-catalyzed cyclization of 6-fluorogeranylgeranyl diphosphate to 7-fluorovercillenes". *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 7834–7842.
51. Dauben, W. G., Thiessen, W. E., Resnick, P. R., "Cembrene, a Fourteen-Membered Ring Diterpene Hydrocarbon*,1,2". *J. Org. Chem.* **1965**, *30*, 1693–1698.
52. Kobayashi, H., Akiyoshi, S., "Thunbergene, a macrocyclic diterpene". *Bull. Chem. Soc. Japan.* **1962**, *35*, 1044.
53. Kobayashi, H., Akiyoshi, S., "Terpenoids IV. Structure of Thunbergene". *Bull. Chem. Soc. Japan.* **1963**, *36*, 823-826.
54. Collins, D. O., Reynolds, W. F., Reese, P. B., "New Cembranes from *Cleome spinosa*". *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 179-183.
55. Takayanagi, H., Kitano, Y., Morinaka, Y., "Total Synthesis of Sarcophytol A, an Anticarcinogenic Marine Cembranoid". *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 2700-2706.
56. Mattern, D. L., Scott, W. D., MacDaniel, C. A., Weldon, P. J., Graves, D. E., "Cembrene A and a Congeneric Ketone Isolated from the Paracloacal Glands of the Chinese Alligator (*Alligator sinensis*)". *J. Nat. Prod.* **1997**, *60*, 828-831.
57. Rowland, R. L., Rodgman, A., Schumacher, J. N., Roberts, D. L., Cook, L. C., Walker, Jr. W. E., "Macrocyclic Diterpene Hydroxy Ethers from Tobacco and Cigarette Smoke". *J. Org. Chem.* **1964**, *29*, 16-21.
58. Rowland, R. L., Rodgman, A., Schumacher, J. N., Roberts, D. L., "Flue-cured Tobacco. II. Neophytadiene". *J. Org. Chem.* **1957**, *79*, 5007-5010.
59. Karlsson, B., Pilotti, A. M., Soderholm, A. C. "The structure and absolute configuration of verticillol, a macrocyclic diterpene alcohol from the wood of *Sciadopitys verticillata* sieb. et zucc. (taxodiaceae)". *Tetrahedron.* **1978**, *34*, 2349-2354.
60. Nagashima, F., Tamada, A., Fuji, N., Asakawa, Y. "Terpenoids from the Japanese liverworts *Jackiella javanica* and *Jungermannia infusca*". *Phytochemistry.* **1997**, *46*, 1203-1208.
61. Duh, C. Y., El-Gamal, A. A. H., Wang, S. K., Dai, C. F., "Novel terpenoids from the formosan soft coral *Cespitularia hypotentaculata*". *J. Nat. Prod.* **2002**, *65*, 1429.

62. Shen, Y. C., Lin, J. J., Wu, Y. R., Chang, J. Y., Duh, C. Y., Lo, K. L. "New norditerpenoids from *Cespitularia hypotentaculata*". *Tetrahedron lett.* **2006**, *47*, 6651.
63. Morón-Rodríguez, F.J., Levy Rodríguez, M. "Farmacología General". *Editorial Ciencias Médicas*, La Habana, **2002**, 55.
64. Juaristi, E., "Introducción a la estereoquímica y al análisis conformacional". *El Colegio Nacional*, México, **2007**, 19-21,32,119-123,148.
65. Louzas Pernas, I. "Aplicaciones de la RMN a la determinación de la configuración absoluta de cianhidrinas. Evaluación de medios de alineamiento para la medida de acoplamiento dipolares." Tesis para obtener el Título de Doctor, presentada a la Facultad de Química de la U.S.C., **2009**.
66. Kuppens, T., Vandyck, K., Van der Eycken, J., Herrebout, W., Van der Veken, B. J., Bultinck, P., "Determination of the Absolute Configuration of Three as-Hydrindacene Compounds by Vibrational Circular Dichroism". *J. Org. Chem.*, **2005**, *70*, 9103-9114.
67. Velázquez-Jiménez, R., Torres-Valencia, J. M., Cerda-García-Rojas, C. M., Hernández-Hernández, J. D., Román-Marín, L. U., Manríquez-Torres, J. J., Gómez-Hurtado, M. A., Valdez-Calderón, A., Motilva, V., García-Mauriño, S., Talero, E., Avila, J., Joseph-Nathan, P., "Absolute configuration of podophyllotoxin related lignans from *Bursera fagaroides* using vibrational circular dichroism". *Phytochemistry*. **2011**, *72*, 2237-2243.
68. Cerda-García-Rojas, C. M., García-Gutiérrez, H. A., Hernández-Hernández, J. D., Román-Marín, L. U., Joseph-Nathan, P., "Absolute Configuration of Verticillane Diterpenoids by Vibrational Circular Dichroism". *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 1167-1172.
69. Katzung, B. G., MD, PhD., "Farmacología Básica y Clínica" *El Manual Moderno*, S.A. de C.V., **1991**, 4ª Ed, 11.
70. Kingston David G. I., "A Natural Love of Natural Products". *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 3975-3984.
71. Carey, F. A., Sundberg, R. J., "Advanced Organic Chemistry, Part A: Structure and Mechanisms". *Springer Science+Business Media, LLC*, **2007**, 503-505.
72. Kobayashi, M., Iesaka, T., Nakano., "Marine Terpenes and Terpeoids. IX: Structures of Six New Cembranoids, Sarcophytols F, K, P, Q, R and S, from the Soft Coral Sarcophyton glaucum". *Chem. Pharm Bull.* **1989**, *37*, 2053-2057.

73. Chang, G., Guida, W.C., Still, W.C., "An internal-coordinate Monte Carlo method for searching conformational space". *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 4379–4386.
74. Sheldrick, G. M. *Programs for Crystal Structure Analysis*; Institut für Anorganische Chemie der Universität: Göttingen, Germany, **1998**.