

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA**



**OBTENCIÓN DE DERIVADOS DE RIOLOZATRIONA Y
EVALUACIÓN DE SU ACTIVIDAD ANTIHERPÉTICA *In vitro*.**

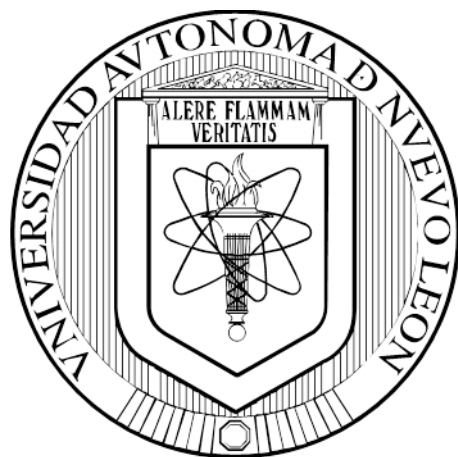
POR

YOLANDA DANIELA ESTRADA CHAVARRÍA

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN QUÍMICA
BIOMÉDICA.**

NOVIEMBRE, 2016

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA**



**OBTENCIÓN DE DERIVADOS DE RIOLOZATRIONA Y
EVALUACIÓN DE SU ACTIVIDAD ANTIHERPÉTICA *In vitro*.**

POR

Q.F.B. YOLANDA DANIELA ESTRADA CHAVARRÍA

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN QUÍMICA
BIOMÉDICA.**

NOVIEMBRE, 2016

**OBTENCIÓN DE DERIVADOS DE RIOLOZATRIONA Y EVALUACIÓN DE SU
ACTIVIDAD ANTIHERPÉTICA *In vitro*.**

Aprobación de la Tesis:



Dra. Verónica Mayela Rivas Galindo

Directora de Tesis



Dra. Tannya Rocío Ibarra Rivera

Co-Directora de Tesis



Dr. David Arturo Silva Mares

Miembro de la comisión



Dr. med. Raquel Garza Guajardo

Subdirectora de Estudios de Posgrado

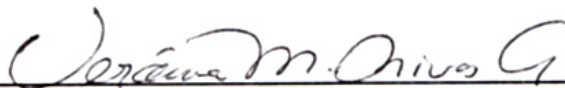
OBTENCIÓN DE DERIVADOS DE RIOLOZATRIONA Y EVALUACIÓN DE SU
ACTIVIDAD ANTIHERPÉTICA *In vitro*.

Presentado por:

Q.F.B. YOLANDA DANIELA ESTRADA CHAVARRÍA

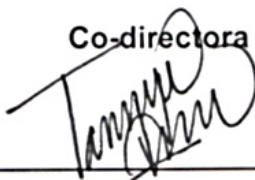
Este trabajo se realizó en el Departamento de Química Analítica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección de la Dra. Verónica Mayela Rivas Galindo y la Co-dirección de la Dra. Tannya Rocío Ibarra Rivera y como miembro de la comisión el Dr. David Arturo Silva Mares.

Directora



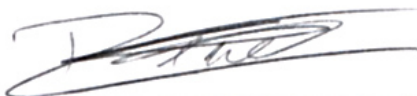
Dra. en C. Verónica Mayela Rivas Galindo

Co-directora



Dra. en Q. Tannya Rocío Ibarra Rivera

Miembro de la comisión



Dr. en C. David Arturo Silva Mares

DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado a la persona que me enseñó que no importa que tan grande sea tu éxito, siempre debes ser humilde y generoso.

A mi padre

Luis Estrada Núñez

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por siempre estar conmigo y por todas las cosas que me ha dado y a la Virgen María por siempre cuidarme e interceder por mí.

A mi Directora de tesis la Dra. Verónica Rivas por su apoyo tanto moral como académico durante estos dos años, por confiar en mí sin conocerme y aceptarme como su estudiante, por siempre explicarme y transmitirme su conocimiento y por su buen humor ante cualquier situación.

A mi Co-directora de tesis la Dra. Tannya Ibarra por todo el conocimiento que me compartió, por tener la paciencia para explicarme cualquier duda que le preguntaba, y motivarme para terminar este trabajo.

Al Dr. David Silva por apoyarme con los ensayos biológicos en este proyecto y por todo el conocimiento que me compartió.

A mi compañero de generación Héctor, por ser un excelente compañero en estos dos años, por el apoyo y el buen humor que tomabas ante todos los momentos difíciles de la maestría.

A Ivonne por siempre ayudarme en todas las dudas que tenía, por la paciencia que me tuviste, por compartir tu experiencia y por todos los consejos que me diste durante mi estancia en el laboratorio

Al Team Riolo, Juan y Elda por todos los momentos de risa y las pláticas que hacían más ameno el trabajo de laboratorio, y por la Riolo que me ayudaron a purificar son muy buenos.

A mis compañeros Cecy, Omar, Fernando, Perla, Marco y Gualberto por todos los momentos divertidos en el cubículo.

A mis compañeros de maestría el cuadro chico, Claudia, Sonia, Elda, Erick, Daniel, Roque y Héctor por todos los momentos divertidos y pláticas que hicieron más amena la maestría.

A mi madre Yolanda, mami sabes que no hubiera podido terminar sin tu ayuda, en verdad no tengo palabras para agradecer todos los momentos que me ayudaste con Fátima y con muchas más cosas. Eres la mejor.

A mi hermano Luis por siempre apoyarme y a pesar de todas las cosas que pasamos estos dos años siempre te esforzaste por demostrar fortaleza y brindar a la familia estabilidad.

A mi hermano Mario por siempre motivarme para terminar la maestría, por hacerme reír y ayudarme con las dudas, y por atenderme en estos dos años que me enferme mucho.

A mi padre Luis por motivarme para iniciar un posgrado, sé que desde el cielo me apoyas y estas orgulloso de mi.

A mi esposo Pablo y a mi bebe Fátima por ser un gran apoyo estos dos años, por aguantar todos los momentos difíciles que pase estos dos años y por motivarme a terminar.

A mis amigos Damaris, Trinny, Ana, Luis, Moisés, Iliana y Guillermo por su valiosa amistad que me brindan desde que los conocí y que me ayudó mucho estos dos años.

Al departamento de Química Analítica por aceptarme para realizar la maestría en Química Biomédica

A CONACyT por la beca que me brindo estos dos años.

*“Investigar es ver lo que todo el mundo ha visto,
y pensar lo que nadie más ha pensado”.-*

(Albert Szent. Premio Nobel de Medicina 1937)

RESUMEN

Q.F.B. Yolanda Daniela Estrada Chavarria

Fecha de graduación: Noviembre, 2016

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Medicina

Título del Estudio:

OBTENCIÓN DE DERIVADOS DE RIOLOZATRIONA
Y EVALUACIÓN DE SU ACTIVIDAD
ANTIHERPÉTICA *In vitro*.

Número de páginas: 120

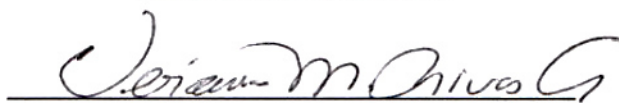
Candidato para el grado de Maestro en Ciencias
con Orientación en Química Biomédica.

Área de estudio: Química Analítica

Propósito y Método de Estudio: Las infecciones virales han representado una gran problemática mundial. Entre las infecciones más comunes se encuentran las causadas por los virus VHS-1 y VHS-2, los cuales causan lesiones en la zona orofacial y genital, además de que se han asociado con la aparición de otras enfermedades como Alzheimer y SIDA. Así mismo se ha reportado la resistencia del virus a los fármacos de primera opción para tratar estas infecciones. Por esta razón es necesario continuar la búsqueda de nuevas moléculas con actividad antiherpética. La Riolozatriona es un diterpeno que se aisló de la especie *Jatropha dioica* y tiene una demostrada actividad moderada antiherpética *In vitro*. Sin embargo aún no se sabe cuál es el mecanismo de acción de esta molécula. Como una estrategia para determinar su mecanismo de acción y además evaluar su reactividad química frente a diferentes condiciones de reacción, se planteó realizar modificaciones estructurales específicas a la Riolozatriona y ver como impactan éstas en su citotoxicidad y actividad antiherpética *in vitro*. Por tanto, el objetivo del presente trabajo fue obtener derivados del compuesto Riolozatriona y evaluar su actividad antiherpética *In vitro*. Se logró obtener seis derivados de riolozatriona y la elucidación estructural de cada uno se hizo por RMN de 1D y 2D y EM. La citotoxicidad se realizó mediante el ensayo de Mossmann modificado, y la actividad antiherpética se realizó por el ensayo de reducción de placas virales en células Vero.

Contribuciones y conclusiones: Se obtuvieron seis derivados estructurales a partir del compuesto riolozatriona, El compuesto **1** se obtuvo por reacción con el ácido de Lewis Yb(OTf)₃. Los compuesto **2**, **3**, **4** y **5** se obtuvieron mediante reacción con NaBH₄ como agente reductor. EL compuesto 6 se obtuvo a partir de la hidrogenación en Pd/C. En cuanto a la actividad biológica todos los compuestos resultaron menos citotóxicos comparados con la riolozatriona, a excepción del compuesto 6. El compuesto 1 resultó con un IS mayor a 10, por lo que se infiere que el anillo de dimetilciclopropano no es indispensable para la actividad antiherpética. Por otro lado, se observó que el compuesto **2** (reducido del carbonilo cinco y catorce, sin el doble enlace y con un hidroxilo en el carbono ocho) no presentó actividad antiherpética. La reducción en el doble enlace de la Riolozatriona aumentó su actividad antiherpética y citotóxica, sin embargo el IS es similar al de la riolozatriona.

Firma del Director de Tesis



Dra. Verónica Mayela Rivas Galindo

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Herpes simplex	1
1.2 Plantas medicinales	5
1.3 Rioloatriona	8
1.4 Modificación Estructural	13
1.5 Justificación	16
1.6 Objetivos	17
• Objetivo General	
• Objetivos Específicos	

2. MATERIALES Y MÉTODOS	18
2.1 Material Biológico	18
2.2 Material de laboratorio	19
2.3 Equipos	20
2.4 Reactivos	20
2.5 Disolventes	21
2.6 Metodología	22
2.6.1 Colecta de la planta	22
2.6.2 Obtención del extracto	22
2.6.3 Purificación de Rioloatriona	22
2.6.4 Análisis de la Separación Cromatografía por CLAR	23
2.6.5 Obtención de los derivados de Rioloatriona	23
2.6.5.1 Transformación del anillo de dimetil-ciclopropano	23
2.6.5.2 Reducción del doble enlace del sistema cetona α,β insaturado	24
2.6.5.3 Reducción de los carbonilos del sistema 1,3 dicetona	24

2.6.6 Caracterización Estructural de los compuestos obtenidos	24
2.6.7 Determinación de la citotoxicidad (CC ₅₀)	25
2.6.8. Determinación de la actividad antiherpética (CI ₅₀)	26
2.6.9. Determinación del índice de Selectividad	27

3. RESULTADOS

3.1 Aislamiento y purificación del compuesto Riolozatriona	28
3.2 Obtención de derivados de Riolozatriona	28
3.2.1 Modificación del anillo de dimetilciclopropano en la Riolozatriona	30
3.2.1.1 Elucidación de la Estructura del compuesto 1 .	30
3.2.2 Modificación del sistema 1,3 dicetona del anillo de seis miembros en la Riolozatriona..	33
3.2.2.1 Elucidación de la estructura del compuesto 2 .	35
3.2.2.2 Elucidación de la estructura del compuesto 3	38
3.2.2.3 Elucidación de la estructura del compuesto 4	41
3.2.2.4 Elucidación de la estructura del compuesto 5	44
3.2.3 Reducción del doble enlace del sistema cetona α,β insaturado.	47

3.2.3.1 Elucidación de la Estructura del compuesto 6 .	48
3.3 Evaluación de la Actividad Citotóxica (CC_{50}) de los derivados obtenidos	51
3.4 Evaluación de la Actividad Antiherpética (IC_{50}) de los derivados obtenidos.	51
3.5 Determinación de Índice de Selectividad de los derivados obtenidos.	52
4. DISCUSIÓN	53
5. CONCLUSIONES y PERSPECTIVAS	75
6. BIBLIOGRAFÍA	77
7. ANEXO	82

LISTA DE FIGURAS

Figuras	Página
1. Mecanismo de acción del Aciclovir	4
2. Estructura de la Rioloatriona	9
3. Estructura de terpenos tipo Tigliano.	10
4. Estructura de terpenos tipo Latirano.	11
5. Estructura de compuestos tipo Sesquiterpenoide.	11
6. Estructura del compuesto Licochalcona A y Licochalcona A reducido.	12
7. Estructura de compuestos cíclicos con el sistema 1,3 dicetona.	12
8. Cromatografía en capa fina de las reacciones para la obtención del compuesto 1 .	29
9. Estructura del compuesto 1	31
10. Comparación de los Espectros RMN- ¹ H del compuesto 1 y Rioloatriona	31
11. Comparación de la primera parte del espectros RMN- ¹³ C del compuesto 1 y Rioloatriona	32
12. Comparación de la segunda parte del espectros ¹³ C-RMN del compuesto 1 y Rioloatriona	32

13. Cromatografías en capa fina de la reacción para la obtención de los compuestos 2, 3, 4, 5 .	34
14. Estructura del compuesto 2	36
15. Comparación de los Espectros ^1H -RMN del compuesto 2 y Rioloatriona	36
16. Comparación de la primera parte del espectro ^{13}C -RMN del compuesto 2 y Rioloatriona	37
17. Comparación de la segunda parte del espectro ^{13}C -RMN del compuesto 2 y Rioloatriona	37
18. Estructura del compuesto 3	39
19. Comparación de los Espectros ^1H RMN del compuesto 3 y Rioloatriona	39
20. Comparación de la primera parte del espectro ^{13}C -RMN del compuesto 3 y Rioloatriona	40
21. Comparación de la segunda parte del espectro ^{13}C -RMN del compuesto 3 y Rioloatriona	40
22. Estructura del compuesto 4	42
23. Comparación de los Espectros ^1H -RMN del compuesto 4 y Rioloatriona	42
24. Comparación de la primera parte del espectro ^{13}C -RMN del compuesto 4 y Rioloatriona	43
25. Comparación de la segunda parte del espectro ^{13}C -RMN del compuesto 4 y Rioloatriona	43
26. Estructura del compuesto 5	45
27. Comparación de los Espectros ^1H -RMN del compuesto 5 y Rioloatriona	45

28. Comparación de la primera parte del espectro ^{13}C -RMN del compuesto 5 y Rioloatriona	46
29. Comparación de la segunda parte del espectro ^{13}C -RMN del compuesto 5 y Rioloatriona	46
30. Cromatografía en capa fina de la reacción para la obtención del compuesto 6	47
31. Estructura del compuesto 6	49
32. Comparación de los Espectros ^1H -RMN del compuesto 6 y Rioloatriona	49
33. Comparación de la primera parte del espectro ^{13}C -RMN del compuesto 6 y Rioloatriona	50
34. Comparación de la segunda parte del espectro ^{13}C -RMN del compuesto 6 y Rioloatriona	50
35. Representación del efecto NOE en los compuestos 2 y 5	66
36. Representación de la correlación COSY en el compuesto 2	67
37. Representación del efecto NOE en los compuestos 3 y 4	68
38. Comparación de los datos de citotoxicidad del compuesto 1 con la Rioloatriona	70
39. Comparación de los datos de citotoxicidad de los compuesto 2,3,4 con la Rioloatriona	71
40. Comparación del índice de selectividad del compuesto 6 con la Rioloatriona	72

LISTA DE ECUACIONES

Ecuación	Página
1. Derivados propuesto a partir de la transformación de dimetil-ciclopropano con Yb(OTf).	54
2. Derivados obtenidos a partir de las reacciones con NaBH ₄ .	58
3. Resultado de la hidrogenación asistida por paladio (Pd/C)	68

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Condiciones utilizadas en las Reacciones con Yb(OTf) ₃	29
2. Condiciones utilizadas en las reacciones con NaBH ₄	33
3. Condiciones utilizadas en las reacciones con Pd/C	47
4. Determinación de la actividad citotóxica de los derivados obtenidos.	51
5. Determinación de la actividad antiherpética de los derivados obtenidos.	51
6. Determinación del índice de selectividad de los derivados obtenidos.	52

ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

%	Por ciento
°C	Grados centígrados
¹³C-RMN	Resonancia Magnética Nuclear de carbono
CI₅₀	Concentración inhibitoria media
CC₅₀	Concentración citotóxica media
CLAR	Cromatografía de líquidos de alta resolución
COSY	COrrrelation SpectroscopY
EM	Espectrometría de masas
DMSO	Dimetilsulfóxido
G	Gramos
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Coherence
HSQC	Heteronuclear single quantum coherence
¹H-RMN	Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno
Hz	Hertz
Min	Minuto
Mg	Miligramo
mL	Mililitro

mg/mL	Miligramo por mililitro
µg	Microgramos
µg/mL	Microgramos por mililitro
µL	Microlitro
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
OMS	Organización Mundial de la Salud
ppm	Partes por millón
pH	Potencial de Hidrogeno
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
TLC	Thin Layer Chromatography
UANL	Universidad Autónoma de Nuevo León
UV-Vis	Ultravioleta-Visible
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana
VHS-1	Virus del Herpes simplex tipo 1
VHS-2	Virus del Herpes simplex tipo 2

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Herpes simplex

Existen dos tipos de virus del *Herpes simplex*: el tipo 1 (VHS-1) y tipo 2 (VHS-2). Ambos están estrechamente relacionados, y son transmitidos a través de las células de la mucosa epitelial, pero difieren en la epidemiología. VHS-1 se asocia tradicionalmente con la enfermedad orofacial; mientras que el VHS-2 se asocia tradicionalmente con la enfermedad genital, sin embargo, la ubicación de la lesión no es necesariamente indicativa del tipo viral.[1]

VHS-1 y VHS-2 son virus de ADN que pertenecen a la familia *Alphaherpesviridae*, y a la subfamilia de *Herpesviridae*. [2] El virión del Herpes simplex consta de cuatro componentes: un núcleo denso de electrones que contiene el ADN viral, una cápside icosaédrica, un tegumento formado de

proteínas y enzimas virales, y una envoltura lipídica con glicoproteínas virales.[3]

La Organización Mundial de la Salud reporta que la infección por el VHS-2 es un problema mundial, y se calcula que hay en el mundo 400 millones de personas infectadas. En 2012, la prevalencia estimada de la infección era más elevada en África (31,5%), seguida de las Américas (14,4%). También se ha verificado que aumenta con la edad, pese a que el mayor número de infecciones se produce en adolescentes. Para el 2012, se estimó que había más mujeres que hombres infectados por el VHS-2, 267 y 150 millones respectivamente.[4]

El VHS-2 también se ha asociado con el virus del VIH, la OMS reporta que existe un mayor riesgo de contraer el virus de VIH si se tiene la infección por el virus del VHS-2, esto puede deberse a las úlceras genitales que ocasiona este virus.[4]

La infección genital por el VHS-2 también representa un riesgo para los neonatos. Alrededor del 70% de las infecciones neonatales por VHS-2 son resultado de la exposición del neonato a la infección genital asintomática de la madre.[2] El Herpes neonatal es una complicación grave de gran mortalidad. Si la infección no es tratada se estima que la mortalidad de los neonatos infectados es del 60%.[4]

Por otro lado, el virus del VHS-1 se ha asociado con la aparición de la enfermedad de Alzheimer. Existe evidencia de la presencia y reactivación del VHS-1 en cerebros de pacientes con encefalitis herpética. Estudios realizados en ratones, han concluido que el VHS-1 presente en el cerebro, se reactiva de manera recurrente promoviendo así la neuroinflamación mediante la activación de receptores tipo toll (TLRs), confiriendo un riesgo de neurodegeneración, que por consiguiente, puede provocar efectos nocivos para la cognición.[5]

El tratamiento de primera opción para las infecciones por VHS-1 y VHS-2 son los nucleósidos sintéticos como: el Aciclovir, Famciclovir o Valaciclovir, éstos pueden reducir la intensidad de los síntomas, sin embargo, no curan la infección debido a que el virus permanece en estado de latencia en el ser humano.[4]

Para describir el mecanismo de acción de los antivirales de tipo nucleósido sintético, se puede tomar como ejemplo el Aciclovir, el cual es un análogo de guanosina, que es convertido selectivamente en aciclo-guanosina monofosfato (aciclo-GMP) mediante la timidina-quinasa del virus, y luego es fosforilada para formar aciclo-guanosina trifosfato (aciclo-GTP) por la quinasa celular. Aciclo-GTP compite con trifosfato de desoxiguanosina (dGTP) por la unión con la ADN polimerasa viral. La incorporación de aciclo-GTP provoca la terminación prematura de la cadena de ADN viral (Figura 1).[6]

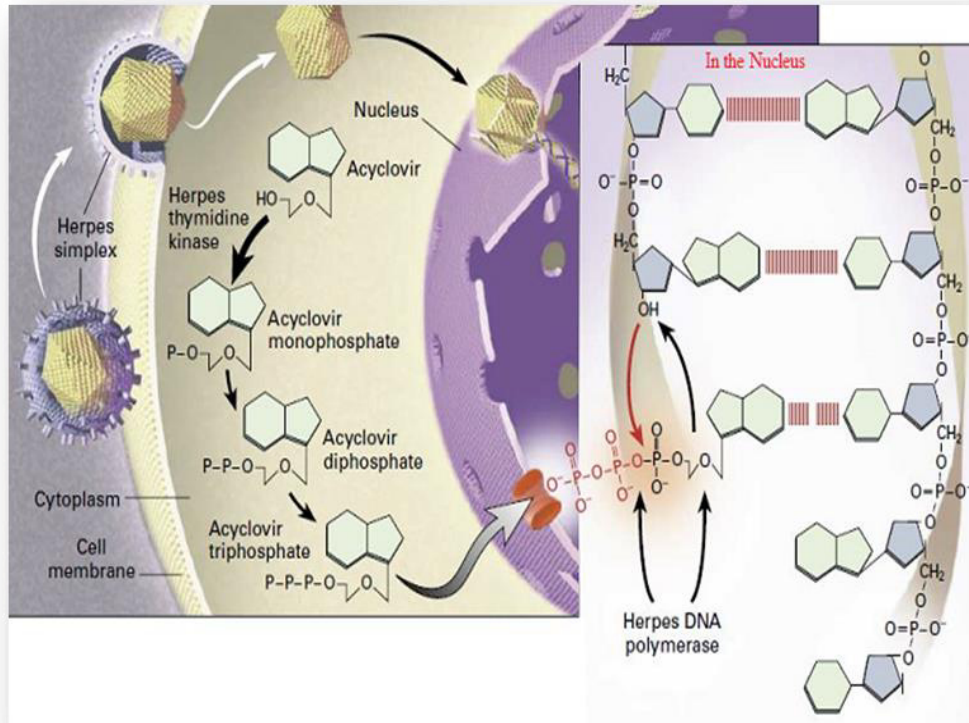


Figura 1. Mecanismo de acción del Aciclovir

Actualmente, existen reportes de que el uso incontrolado de Aciclovir ha provocado la aparición de cepas de HSV-1 resistentes. En los aislados clínicos de los virus resistentes al aciclovir, se han encontrado mutaciones en el gen que codifica a la timidina-quinasa viral y en el gen que codifica a la ADN polimerasa viral. Estas mutaciones dan como resultado la prevención de la fosforilación del aciclovir por la timidina-quinasa, y por otro lado, la disminución de la afinidad de la ADN polimerasa viral por aciclo-GTP, continuando así la elongación de la cadena viral con dGTP.[6]

Debido a la resistencia que ha desarrollado el virus del Herpes simplex, a este tipo de antivirales y que no existe un fármaco que elimine el virus, es necesario continuar con la búsqueda de nuevas alternativas para su tratamiento.

1.2 Plantas Medicinales

A lo largo de los siglos, los seres humanos han dependido de la naturaleza para satisfacer sus necesidades básicas, no menos importante la obtención de medicamentos para el tratamiento de un amplio espectro de enfermedades. Las plantas en particular, han formado la base de los sistemas de medicina tradicional, con los primeros registros que datan del año 2,600 a.C, en donde se reporta el uso de alrededor de 1,000 sustancias de origen vegetal, utilizadas para tratar diferentes padecimientos.[7]

Las plantas producen metabolitos secundarios, compuestos químicos que expresan la individualidad de cada especie, y se producen en ésta bajo diferentes condiciones ambientales, o en defensa contra los depredadores. El metabolismo secundario de las plantas, proporciona la mayor parte de los compuestos con actividad farmacológica obtenidos a partir de fuentes naturales.[8]

Una de las familias de plantas, que son de gran interés en la búsqueda de nuevos fármacos basados en productos naturales es la *Euphorbiaceae*. Las especies pertenecientes a esta familia, son conocidas por su amplia variedad de metabolitos con propiedades farmacológicas diversas, y por su gran diversidad de compuestos con alta variabilidad estructural.[9]

Una de la especies de la familia *Euphorbiaceae*, que ha despertado el interés por la actividad biológica que poseen algunos de los compuestos químicos aislados, es la *Jatropha dioca*. [9] Esta especie es un arbusto de 50 cm a 1.50 m de altura, sus ramas son de color rojizo; produce un látex característico color amarillo que al contacto con el aire se oxida y su color cambia a rojo; por esta característica se le conoce a este especie comúnmente como “sangre de drago”. Es originaria de México y en su hábitat prevalecen los climas secos y semisecos. El uso medicinal de esta planta es muy antiguo, se utiliza con mayor frecuencia para tratar la caída del cabello y gastritis, así como diversas infecciones bucales. [10]

Entre los estudios realizados a esta especie, se encuentra la evaluación de su actividad antioxidante. Para ello, se obtuvo el extracto agua-etanol a partir de sus tallos y raíces; posteriormente se evaluó su porcentaje de reducción de DPPH y su porcentaje de inhibición de oxidación de lípidos, en ambos casos se obtuvieron resultados menores al 20%. [11]

En otro estudio realizado por Silva Belmares y cols., se evaluó su actividad antimicrobiana, frente a especies de bacterias gram positivas, gram negativas y algunas especies de hongos. Para ello, se obtuvo el extracto de etanol, acetona y hexano a partir de la raíz; posteriormente se evaluó el diámetro de inhibición por el método de difusión con disco en agar. El extracto más activo fue el hexánico, que presentó actividad frente a las especies de *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus* (gram positivas), y frente a las especies de *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium* (gram negativas). También presentó actividad frente a las especies de hongos de *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Cryptococcus neoformans* y *Sporothrix schenckii*. [12]

En el departamento de Química Analítica de la Facultad de Medicina de la UANL, también se han realizado estudios de la actividad biológica de la especie *J. dioica*. En un estudio hecho por Alanis y cols., se evaluó su actividad antifúngica y se determinó la concentración inhibitoria media (CIM) de los extractos hidroalcohólico, hexánico, de acetato de etilo y butanol, frente a diferentes especies de hongos: *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Coccidioides immitis* e *Histoplasma capsulatum*. Los extractos de *J. dioica* solo presentaron actividad frente a la especie de *Candida albicans*. [13]

Posteriormente, en otro estudio realizado por Silva Mares y cols. en el mismo departamento con la especie *Jatropha dioica*, se evaluó la actividad antiherpética

de diversos extractos frente a los virus VHS-1 y VHS-2, mediante el ensayo de reducción de placas en células Vero, y la citotoxicidad mediante el ensayo de Mosmman en células Vero. Los extractos se obtuvieron a partir de la raíz, y el más activo fue el extracto hexánico con una CI_{50} de 300 ± 24 frente a VHS-1, y 270 ± 30 frente a VHS-2. Se obtuvo una CC_{50} de 882 ± 89 . Con estos datos el índice de selectividad obtenido fue de 2.9 - 3.3.[14]

Posteriormente, se realizó el aislamiento biodirigido en base a la actividad antiherpética, del compuesto Riolozatriona y se evaluó su actividad *in vitro* frente a los virus VHS-1 y VHS-2 así como su citotoxicidad. Se obtuvo una CI_{50} de 66 ± 8.6 frente a VHS-1 y 66 ± 5.9 frente a VHS-2. En cuanto a su citotoxicidad se obtuvo una CC_{50} de 384 ± 1.9 . Con estos datos el índice de selectividad obtenido fue de 5.8.[14]

1.3 Riolozatriona

La Riolozatriona (figura 2) diterpeno de estructura única con esqueleto de tipo Riolozano, aislado por primera vez por Domínguez y colaboradores de la especie *Jatropha dioca*. [15]

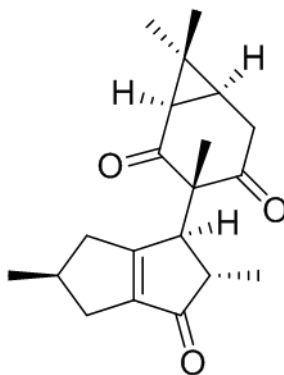


Figura 2. Estructura de la Riolozatriona

Es importante mencionar que no se conoce el mecanismo de acción de la Riolozatriona relacionado con su actividad antiherpética, ni se ha evaluado su reactividad química. Sin embargo, en la estructura de este compuesto existen diferentes zonas estructurales que podrían ser responsables de su actividad biológica como: el grupo del dimetil-ciclopropano, la cetona α,β insaturada y el sistema 1,3 dicetona del anillo de seis miembros.

Esta suposición se debe a que existen reportes de diferentes terpenos, que presentan en su estructura el anillo de dimetil-ciclopropano, al cual se le ha asociado con diferentes actividades biológicas, entre ellas la actividad antiviral.

En compuestos terpénicos de tipo Tigliano (figura 3) que contienen en su estructura el anillo de dimetil-ciclopropano se evaluó su actividad como activadores de la Proteína kinasa C (PKC). La activación de esta proteína es usada en el tratamiento de VIH debido a que desencadena una serie de mecanismos que afectan los reservorios de las células T CD4⁺ con infección

latente. Estos compuestos presentan una alta actividad como inhibidores del virus VIH.[16]

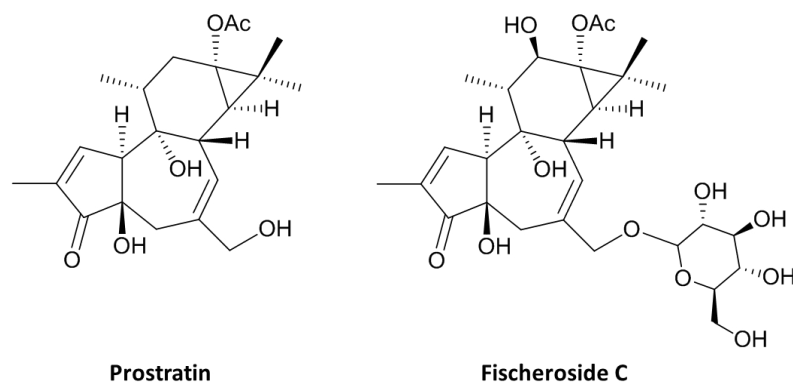


Figura 3. Estructura de terpenos tipo Tigliano.

Se han encontrado compuestos de tipo Latirano (Figura 4) que presentan actividad disminuyendo la expresión del antígeno del Citomegalovirus (CMV), además han demostrado reactivar el reservorio viral latente del virus de VIH.[16] Lo anterior es importante debido a que, entre las nuevas estrategias que se investigan para tratar el virus del VIH, se encuentra la de reactivar el reservorio viral latente en combinación con la terapia antirretroviral.[9]

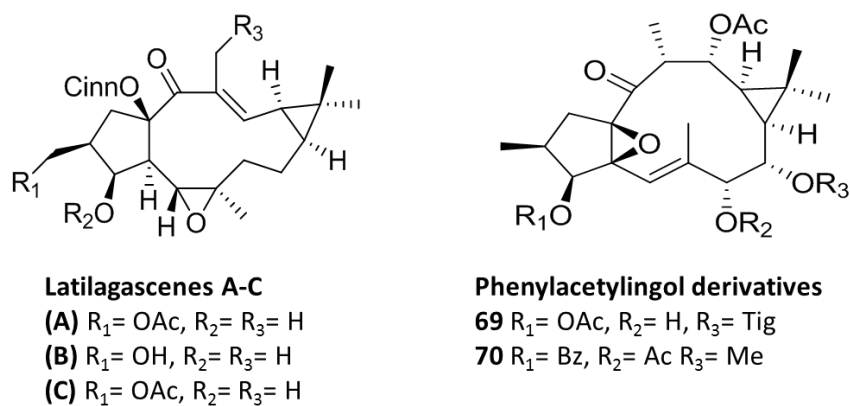


Figura 4. Estructura de compuestos tipo Latirano.

Otros compuestos de tipo sesquiterpenoide que contienen en su estructura el anillo de dimetil-ciclopropano han demostrado una significativa actividad inhibitoria de la transcriptasa reversa del virus del VIH (Figura 5). Además de presentar actividad inhibitoria frente al virus Epstein-Barr, el cual al igual que los virus Herpes simplex y Citomegalovirus pertenece a la familia *Herpesviridae*. [17]

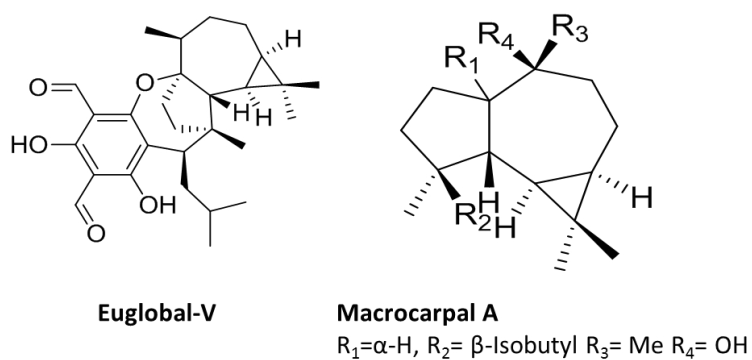


Figura 5. Estructura de compuestos tipo Sesquiterpenoide.

Por otro lado, con respecto a compuestos que contienen en su estructura un sistema de cetona α,β insaturada, en un estudio realizado con la Licochalcona A (Figura 6), la cual presenta actividad antiinflamatoria, se evaluó si la presencia del doble enlace del sistema cetona α,β insaturada era necesario para que el compuesto presentara la capacidad de inhibir la activación del NF- κ B (factor nuclear kappa de las células B). A través de la obtención del compuesto reducido en el doble enlace, se comprobó que éste era necesario en la estructura para presentar su actividad biológica.[18]

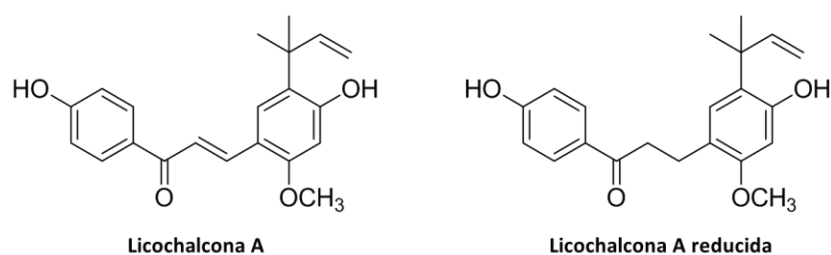


Figura 6. Estructura del compuesto Licochalcona A y Licochalcona A reducido.

Con respecto a compuestos que presentan el sistema cíclico 1,3 dicetona, se puede mencionar un estudio en el que se evaluó la actividad apoptótica en células tumorales y en células normales de diferentes compuestos con el sistema 1,3 dicetona. Se observó que este tipo de compuestos (Figura 7), presentaron una citotoxicidad muy cercana en células tumorales y en células normales con lo cual se obtuvo así un índice de selectividad cercano a 1.[19]

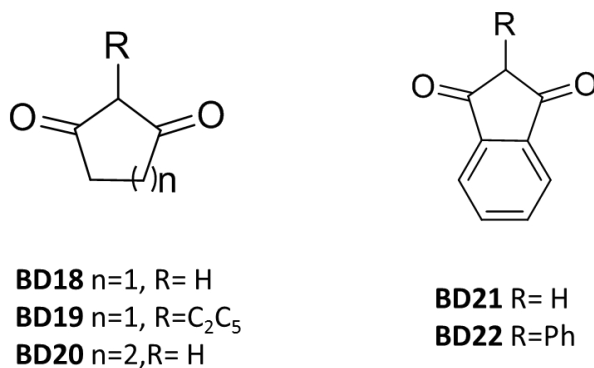


Figura 7. Estructura de compuestos cíclicos con el sistema 1,3 dicetona.

1.4 Modificación Estructural

Uno de los objetivos fundamentales de la Química Terapéutica, es la búsqueda de nuevos fármacos que resulten más potentes, más selectivos y menos tóxicos en su acción terapéutica. La principal estrategia para lograr esto, suele ser la modificación estructural de los fármacos ya conocidos, entre ellos, los productos naturales.[20]

Recientemente, Newman y colaboradores reportaron una revisión sobre el origen de los fármacos aprobados en todo el mundo, durante el periodo de 1981 al 2010. En general, el 50% de todos los fármacos están relacionados con productos naturales. El 21% incluye a los fármacos que provienen de productos naturales modificados (natural derived) a través de semi-síntesis. En el mismo análisis, se reporta que de todos los fármacos antivirales aprobados en este

periodo, el 29% eran naturales derivados.[21]

En base a reportes previos encontrados en la literatura científica se plantean las siguientes modificaciones químicas a la Rioloatriona:

1. Para la modificación del anillo de 1,1-dimetil-ciclopropano, se tomará como referencia el estudio realizado por Sterner y Col. en el que usan trifluorometanosulfonato de Iterbio para modificar selectivamente el anillo de dimetil-ciclopropano. Como alternativa se podrían usar otros ácidos Lewis como el $\text{BF}_3 \cdot \text{OMe}$.

2. El sistema cetona α,β insaturada puede ser modificado mediante una hidrogenación selectiva del doble enlace. Diversos reportes en la literatura describen la reducción selectiva del doble enlace del sistema de cetona α,β insaturada bajo las condiciones de hidrógeno gas (H_2), como catalizador paladio/C en etanol a temperatura ambiente.[22]

3. Por otro lado, el 9-borabicyclononano (9-BBN) se ha descrito como un agente selectivo para la reducción exclusiva del carbonilo de cetonas α,β insaturadas.[23]

4. En cuanto al sistema 1,3-dicetona del anillo de seis miembros existen reportes que describen la reducción selectiva de sistemas 1,3 dicetona utilizando diversas condiciones con el NaBH_4 .

Las modificaciones estructurales de la Rioloatriona que se realizarán en este trabajo serán en base a las condiciones presentes en los antecedentes descritos como condiciones iniciales y se podrán modificar en base a los resultados que se obtengan.

Los resultados obtenidos de este proyecto darán información importante sobre la reactividad química de compuestos de tipo estructural de Riolozano, serán de utilidad para establecer la relación estructura-actividad de este tipo de compuestos y se podrá dar inicio a estudios encaminados a establecer el mecanismo de acción biológica de la Rioloatriona.

1.5 Justificación

Debido a la escasa información sobre las propiedades químicas de Rioloatriona y a su demostrada actividad antiherpética *in vitro*, es importante realizar modificaciones estructurales específicas y selectivas que permitan evaluar el impacto en su actividad citotóxica y antiherpética *in vitro*, mediante un estudio de relación estructura-actividad.

1.6 Objetivos

Objetivo General

Obtener derivados de Riolozatriona y evaluar su actividad antiherpética *in vitro*.

Objetivos Específicos.

1. Obtener derivados del compuesto Riolozatriona mediante las siguientes estrategias:
 - a) La transformación del anillo de dimetil-ciclopropano.
 - b) La transformación del sistema de la cetona α,β insaturada.
 - c) La transformación del sistema 1,3-dicetona del anillo de seis miembros.

2. Evaluar la actividad antiherpética *in vitro* de los derivados obtenidos mediante la determinación del índice de selectividad.

CAPÍTULO 2

MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Material Biológico

- Raíz de la Planta *Jatropha dioica* (folio de identificación UAN-24077, Herbario de la Facultad de Ciencias Biológicas, U.A.N.L), colectada en el ejido El Potrero, perteneciente al municipio de Villaldama Nuevo León.
- Células epiteliales de riñón de mono verde africano *Chlorocebus sabaues* (Vero) Donadas por el Dr. Miguel Déctor, del Departamento de Anatomía Patológica y Citopatología de la Facultad de medicina, UANL.
- Aislado clínico de virus del Herpes simplex tipo 1 (VHS-1), orofacial confirmado en cultivo celular y mediante el ensayo de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para el gen timidina-quinasa (*tk*) con primers específicos contra VHS-1, tipificados y donados por el Dr. Ernesto Torres del laboratorio de Inmunovirología del Departamento de Inmunología de la Facultad de Medicina, UANL.

2.2 Material de Laboratorio

- Agitador magnético
- Cromatofolios Al TLC Sílica gel 60 F₂₅₄, Merck ®
- Cubas CAMAG para cromatografías TLC 13 X 8 X 10 cm
- Embudo de filtración rápida
- Espátula
- Filtros de papel No. 40 Whatman ®
- Gradilla
- Matraz bola de 25, 100, 500 mL
- Matraz Erlenmeyer de 250 y 500 mL
- Pipetas Pasteur
- Pipetas automáticas de 100-1000 µL
- Pipetas automáticas de 10-100 µL
- Placa de calentamiento
- Placas de cultivo de 6 pocillos
- Placas de 96 pocillos
- Probeta de 10, 50, 100 mL
- Puntillas estériles desechables de 100-1000 µL
- Soporte Universal
- Termómetro
- Vaso de Precipitado de 50, 250 y 500 mL

2.3 Equipos

- Cromatógrafo de Líquidos Analítico Waters 2695 con detector arreglo de diodos Waters 2996.
- Balanza analítica OHAUS®
- Espectrómetro RMN 400 MHz Bruker Avance III HD, equipado con gradientes.
- Espectrómetro Ultravioleta Visible 340 Turner
- Espectrómetro 4000 Qtrap Sciex
- Rotavapor BÜCHI RE 121 con baño de agua BÜCHI 161
- Incubadora con agitación SHEL LAB®

2.4 Reactivos

Reactivos de Reacción

- 9-borabicyclononano (9-BBN)
- Borohidruro de sodio (NaBH_4)
- Gas hidrógeno (H_2)
- Trifluorometanosulfonato $\text{Yb}(\text{OTf})_3$
- Paladio/ carbono
- Sílica gel 60
- Sulfato de sodio anhidro

- Celita®

Reactivos de ensayos biológicos

- Medio Eagles Modificado de Dulbecco (DMEM)
- Bromuro de 3-(4,5-Dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio (MTT)
- Buffer de fosfatos salino (PBS)
- Colorante Giemsa

2.5 Disolventes

- Acetato de etilo
- Acetona
- Diclorometano
- Dimetilsulfóxido
- Etanol
- Hexano
- Metanol
- Cloroformo deuterado 99.8% D, Sigma.
- Tetrahidrofurano (THF)

2.6 Metodología

2.6.1 Colecta de la planta

La planta se recolecta en el ejido "El Potrero" perteneciente al municipio de Villaldama, Nuevo León, México. Una muestra se envió al Herbario Institucional de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL donde se le asignó el folio de identificación UAN-24077. Se realizaron colectas en primavera, verano, otoño e invierno de los años 2012 a 2016.

2.6.2 Obtención de los extractos

La planta se seca a temperatura ambiente, se separa la raíz y se pulveriza. La raíz pulverizada se somete a extracción con diclorometano a temperatura ambiente con agitación constante. El extracto obtenido se lleva a sequedad por evaporación a presión reducida. Posteriormente se calcula su porcentaje de recuperación y se almacena en frascos ámbar con atmósfera de nitrógeno a 4°C hasta su uso.

2.6.3 Purificación de la Riolozatriona

Se emplea cromatografía en columna a baja presión para la separación de los componentes del extracto de diclorometano de *Jatropha dioica*. Se realizan varias columnas empacadas con sílica (0.04-0.063 μm) Aldrich ® y se eluyen con diclorometano/acetona (19:1), las fracciones enriquecidas con Riolozatriona se someten a separación en las mismas condiciones con un sistema de elución

hexano/acetato de etilo (6:4) para obtener el compuesto puro. Se calcula el porcentaje de recuperación de la Rioloatriona.

2.6.4 Análisis de la Separación Cromatográfica por CLAR

La Rioloatriona pura se analiza por CLAR. Se utiliza el Cromatógrafo de Líquidos Analítico Waters 2695 con detector arreglo de diodos a λ de 254 nm, una columna AccQ Tag 3.9 x 150 mm tamaño de partícula 4 μ m y un sistema de elución isocrático acetonitrilo-agua en una proporción 50:50. El volumen de inyección es de 10 μ L. El flujo 0.2 mL/ min y el tiempo de corrida 0.35 minutos.

2.6.5 Obtención de los derivados de Rioloatriona

A continuación se presentan diversas estrategias para la obtención de compuestos derivados de Rioloatriona.

2.6.5.1 Transformación del anillo de dimetil-ciclopropano

En un matraz bola se disolvió Rioloatriona (1 mmol) en metanol (5 mL) y se adicionó el trifluorometanosulfonato de iterbio $\text{Yb}(\text{Otf})_3$ (1 mmol) a temperatura ambiente. Después de aproximadamente 72 horas de reacción se adicionó salmuera (10 mL) y se realizó una extracción con acetato de etilo (3 veces de 5 mL).²¹ Los extractos orgánicos se combinaron y se secaron con sulfato de sodio anhidro. Se eliminaron los volátiles a presión reducida. Se realizó una purificación en cromatografía en columna flash o de baja presión (fase estacionaria Silica gel 60 y fase móvil hexano/acetato de etilo 6:4).

2.6.5.2 Reducción del doble enlace del sistema cetona α,β insaturado

En un matraz bola se disolvió la Riolozatriona (1 mmol) en etanol y se agregó Pd/C (5% en agua, 5% mmol). Se burbujeo hidrogeno gas (H_2) directamente a la mezcla de reacción a temperatura ambiente.²² Después de 30 minutos la mezcla se filtró sobre celita® y se evaporaron los volátiles a presión reducida.

2.6.5.3 Reducción de los carbonilos del sistema 1,3-dicetona

En un matraz bola se disolvió la Riolozatriona (1 mmol) en una mezcla MeOH/ CH_2Cl_2 (1:1) y se agregó el $NaBH_4$ (1 mmol.) a $-15^\circ C$ [24] La mezcla se agitó a la misma temperatura durante aproximadamente 3 horas en atmósfera de argón. Para terminar la reacción se adicionó agua.[25] Se realizó una purificación con cromatografía preparativa en TLC (fase estacionaria Silica gel 60 y fase móvil hexano:acetato de etilo 6:4).

2.6.6 Caracterización estructural de los compuestos obtenidos

Los compuestos derivados de Riolozatriona se analizaron por las siguientes técnicas:

- **Espectroscopia Ultravioleta-Visible**

Se pesó un miligramo de cada compuesto y se disolvió en un mililitro de metanol, la lectura se hizo en una celda de cuarzo de 1 mL de capacidad. El equipo utilizado fue el Espectrómetro Ultravioleta Visible

340 Turner.

- **Resonancia Magnética Nuclear**

Se pesó dos miligramos de cada compuesto y se disolvió en 0.5 mg de cloroformo-d 99.8% D, Sigma, la lectura se hizo en tubo de 178 mm de longitud, 4.97 de diámetro externo y 4.20 de diámetro interno. El equipo utilizado fue el Espectrómetro RMN 400 MHz Bruker Avance III HD, equipado con gradientes.

- **Espectrometría de Masas**

Se pesó 1mg y se disolvió en un 1mL de metanol con 0.1% de ácido fórmico, posteriormente se tomó 100µL de la solución anterior y se aforó a un mL con metanol con 0.1% de ácido fórmico. La lectura se hizo por inyección directa en el Espectrómetro 4000 Qtrap Sciex.

2.6.7 Determinación de la citotoxicidad (CC₅₀)

Se sembraron 100,000 células por pozo en una placa de 96 pocillos con medio DMEM suplementado con suero fetal bovino, aminoácidos no esenciales, glutamina y antibióticos. Se incubaron a 24 h a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO₂, se retiró el sobrenadante y se reemplazó con soluciones de los compuestos obtenidos de 125, 250, 500 y 1000 µg/mL disueltos en DMEM al 1

% en DMSO y se incubaron nuevamente por 72 h. Este experimento se llevó a cabo por triplicado para cada compuesto. Se utilizó como control negativo células Vero sin exponer al compuesto. Después de tres días de incubación, la viabilidad celular se determinó mediante la adición de 10 μ L de una solución de 5 mg/mL de MTT por pozo, se incubaron 3 h a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5%. El medio de cultivo se removió, 100 μ L de DMSO se añadió para disolver los cristales de formazán y se midió la absorbancia a 570 nm. Posteriormente se graficaron curvas de dosis respuesta de las diferentes concentraciones utilizadas. La CC₅₀ se determinó como la concentración del compuesto necesaria para reducir la viabilidad celular en un 50%, se tomó como 100% de viabilidad celular el control negativo.[14]

2.6.8 Determinación de la Actividad Anti-herpética (CI₅₀)

La actividad anti-herpética, se determinó mediante el ensayo de reducción de placas virales. Se sembraron 100,000 células Vero por pocillo en placas de 24 pozos y se incubaron con 25 UFP del VHS-1 durante 1 h, a 37 °C en agitación constante. Posteriormente, el sobrenadante se desechó y se agregó a los pocillos concentraciones de 125, 250 y 500 μ g/mL de los compuestos disueltos en DMEM suplementado con DMSO al 1% y 0.32% de IgG, esterilizados por filtración. Las células se incubaron 72 h. Se utilizó para los ensayos controles de crecimiento celular, control negativo (Mock) y células Vero infectadas y tratadas con ACV a una concentración de 0.5 μ g/mL como control positivo. Por último, las células se fijaron con 1 mL de metanol y se tiñeron con 1 mL de

Giemsa. La CI_{50} se determinó como la concentración en la que se observó reducción del 50% de la formación de Unidades Formadoras de Placa (UFP) comparado contra el 0% de reducción del control negativo, todos los ensayos se realizaron por triplicado.[14]

2.6.9 Determinación del Índice de Selectividad

La determinación del índice de selectividad se realizó con la siguiente fórmula.

$$\text{Índice de selectividad} = CC_{50} / CI_{50}$$

La concentración inhibitoria media se obtuvo al determinar la actividad anti-herpética con el ensayo de reducción de placas virales y la concentración citotóxica media se obtuvo mediante el método de Mossmann modificado.¹³

CAPITULO 3

RESULTADOS

3.1 Aislamiento y Purificación de Rioloatriona

Se utilizó la raíz molida de la *Jatropha dioica* como fuente de obtención del compuesto Rioloatriona. La purificación de dicho compuesto se llevó a cabo según el método descrito en la sección 2.6.4. Se realizó la purificación hasta obtener 2 gramos de Rioloatriona, Se utilizaron 2500 g de raíz molida y se obtuvo un porcentaje de rendimiento de 0.08%.

3.2 Obtención de derivados de Rioloatriona.

3.2.1 Modificación del anillo de dimetilciclopropano en la Rioloatriona

Se realizó lo descrito en la sección 2.6.5.1. Las condiciones de reacción utilizadas en la apertura del anillo de dimetilciclopropano con el $\text{Yb}(\text{OTf})_3$ de cada experimento están descritos en la tabla 1. A partir de estas condiciones solo se aisló e identificó un derivado que se nombró compuesto 1.

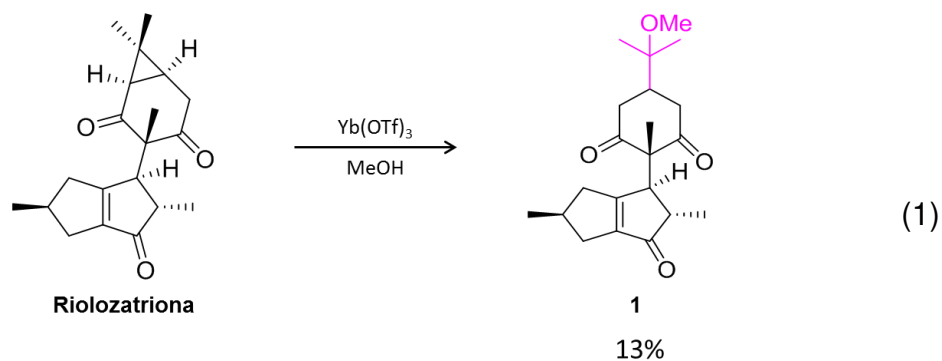
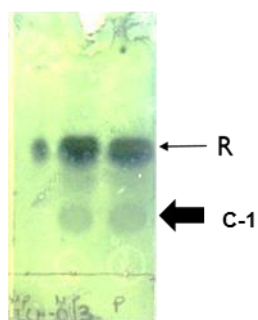


Tabla 1. Condiciones utilizadas en las reacciones con Yb(OTf)_3

Ejemplo	Yb(OTf)_3	Riolozatriona	Temperatura	Tiempo
1	1 Eq.	50 mg	25°C	72 horas
2	1 Eq.	40 mg	55°C	10 horas
3	1 Eq.	70 mg	70°C	10 horas
4	2 Eq.	70 mg	25°C	72 horas
6	2 Eq.	70 mg	25°C	72 horas
7	2 Eq.	70 mg	70°C	10 horas

10 horas



72 horas

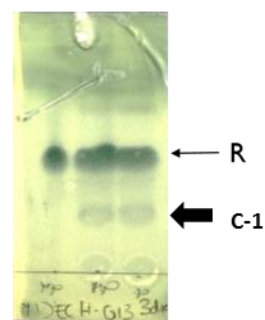


Figura 8. Cromatografías en capa fina de las reacciones para la obtención del compuesto **1**. (Fase móvil: hexano: acetato de etilo 6:4, revelador ácido fosfomolibdico).

3.2.1.1 Elucidación de la estructura del compuesto 1

El compuesto 1 se purificó según el procedimiento descrito en la sección 2.6.5.1 y se realizó la caracterización estructural por medio de espectrometría UV-Vis, RMN de 1D y 2D y EM.

Longitud de onda de máxima absorción: 254 nm

Peso molecular: 346.46

Fórmula molecular: $C_{21}H_{30}O_4$

Masa exacta: 346.21

Los espectros de 1H -RMN y ^{13}C -RMN con las asignaciones completas de Hidrógeno y Carbono se muestran en las figuras 10, 11 y 12. Los espectros de 1D y 2D (COSY, HSQC, HMBC y NOESY).se encuentran en la sección de anexo.

Como resultado del análisis de cada uno de los espectros anteriores la figura 9 muestra la estructura propuesta para el compuesto 1

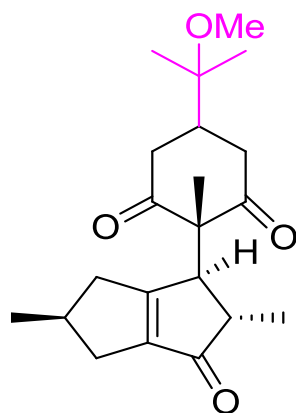


Figura 9. Estructura del compuesto 1

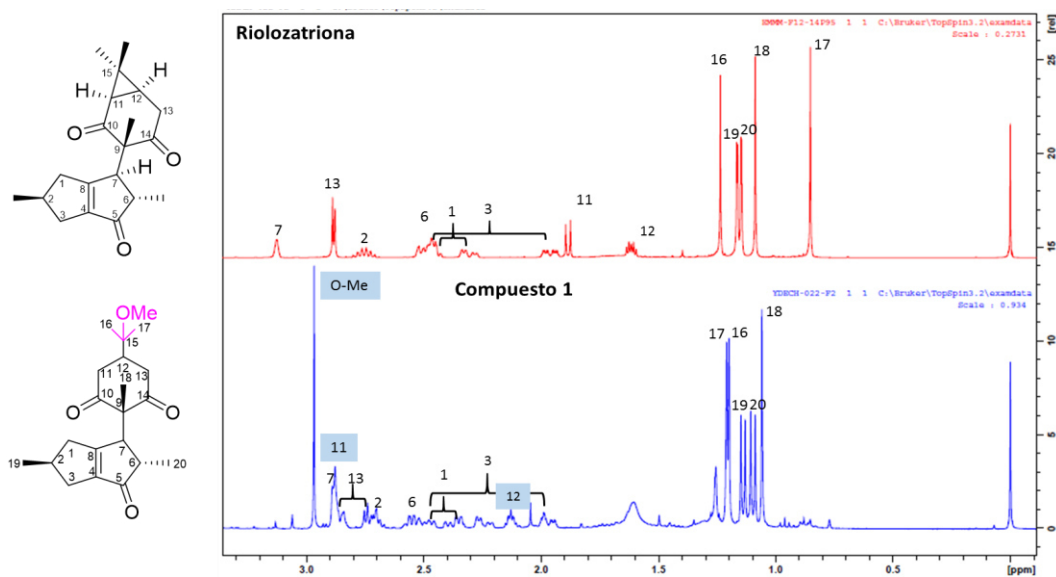


Figura 10. Comparación de los espectros de ¹H-RMN del compuesto 1 con Riolozatriona.

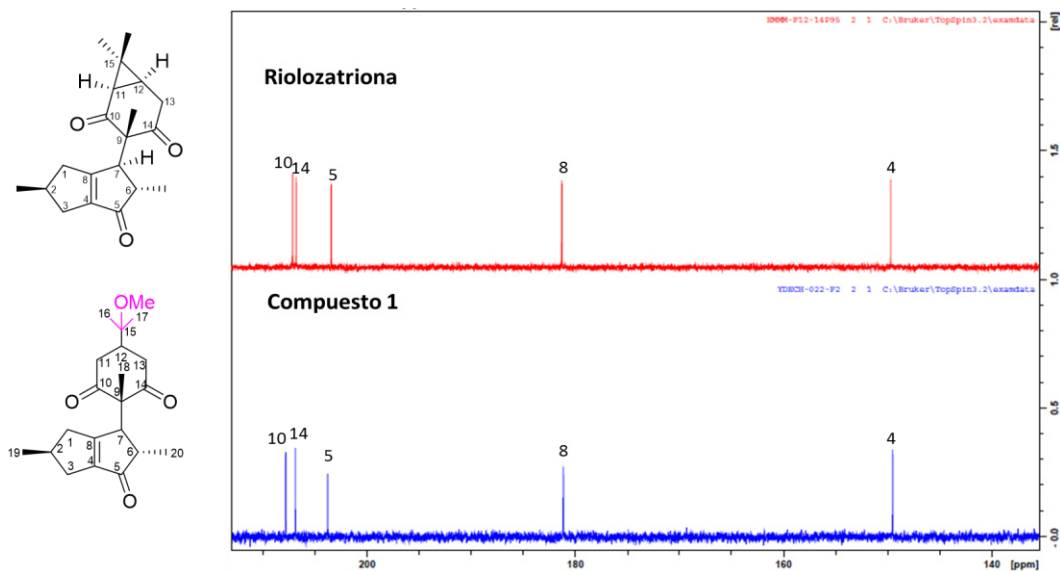


Figura 11. Comparación de la primera parte del espectro de ^{13}C -RMN del compuesto **1** con Rioloatriona

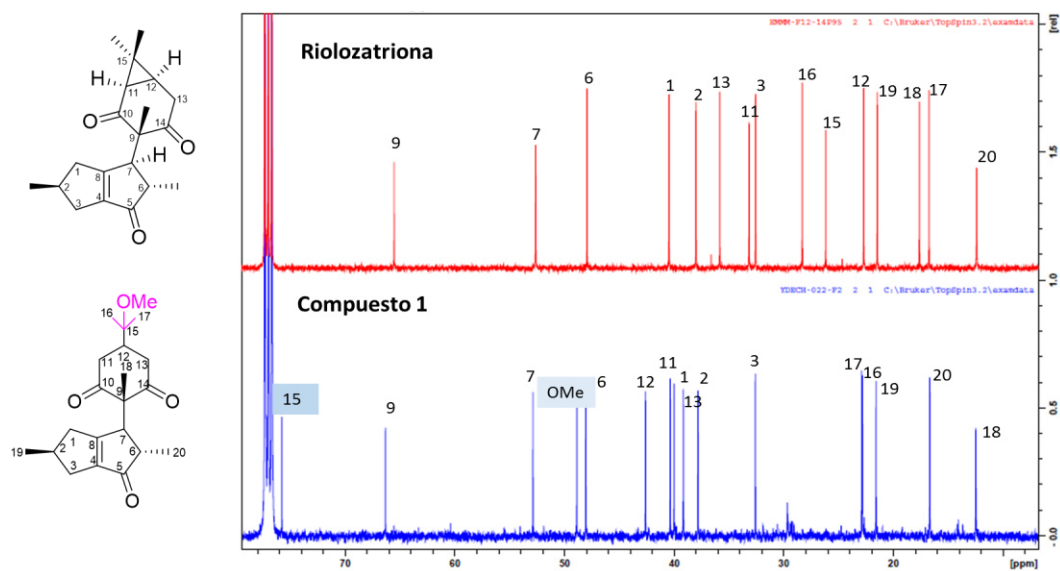


Figura 12. Comparación de la segunda parte del espectro de ^{13}C -RMN del compuesto **1** y Rioloatriona

3.2.2 Modificación del sistema 1,3-dicetona del anillo de seis miembros en la Riolozatriona.

Se realizó la reacción de reducción con NaBH_4 mediante el procedimiento descrito en la sección 2.6.5.3. Las condiciones probadas de reducción de los carbonilos del sistema 1,3-dicetona con NaBH_4 están descritos en la tabla 2. Bajo estas condiciones de reacción se aislaron e identificaron los compuestos **2**, **3**, **4** y **5** con rendimientos de 38%, 30%, 18% y 10% respectivamente.

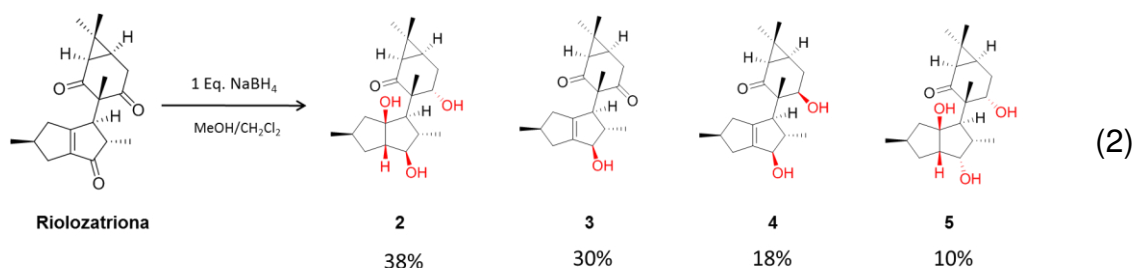


Tabla 2. Condiciones utilizadas en las reacciones con NaBH_4

Ejemplo	Riolozatriona	$\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$	Temperatura	Tiempo
1	70 mg	50/50	-80°C	3 horas
2	70 mg	50/50	-15°C	1 hora
3	60 mg	100/0	-15°C	30 min
4	60 mg	12/82	-15°C	30 min

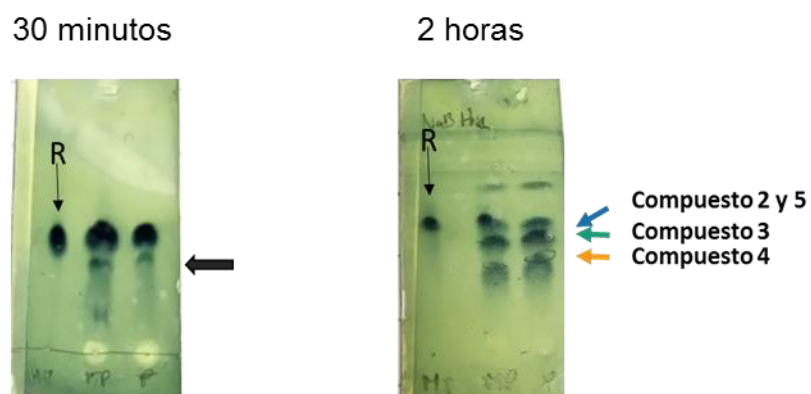


Figura 13. Cromatografías en capa fina de la reacción para la obtención del compuesto **2**, **3**, **4** y **5**. (Fase móvil: hexano: acetato de etilo 6:4, revelador ácido fosfomolibdico).

3.2.2.1 Elucidación de la estructura del compuesto 2

El compuesto **2** se purificó según el procedimiento descrito en la sección 2.6.5.3 y se realizó la caracterización estructural por medio de espectrometría UV-Vis, RMN de 1D y 2D y EM.

Longitud de onda de máxima absorción: no absorbe en el rango de 220-780 nm.

Peso molecular: 336.47

Fórmula molecular: C₂₀H₃₂O₄

Masa exacta: 336.23

Los espectros de ¹H-RMN y ¹³C-RMN con las asignaciones completas de Hidrógeno y Carbono se muestran en las figuras 15, 16 y 17. Los espectros de 1D y 2D (COSY, HSQC, HMBC y NOESY) se encuentran en la sección de anexo.

Como resultado del análisis de cada uno de los espectros anteriores la figura 14 muestra la estructura propuesta para el compuesto **2**.

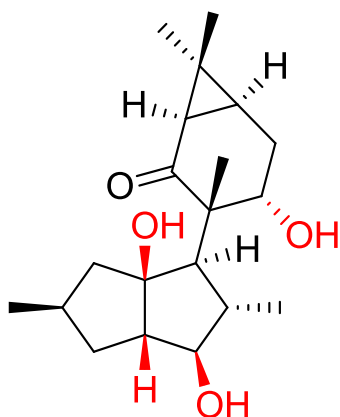


Figura 14. Estructura del compuesto 2

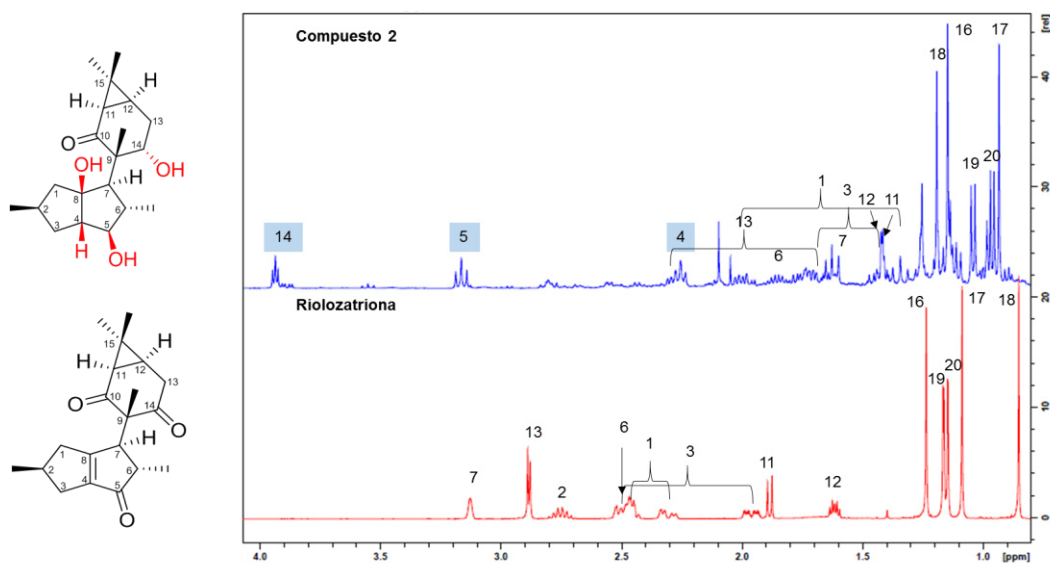


Figura 15. Comparación de los espectros de ^1H -RMN del compuesto 2 y Riolozatriona

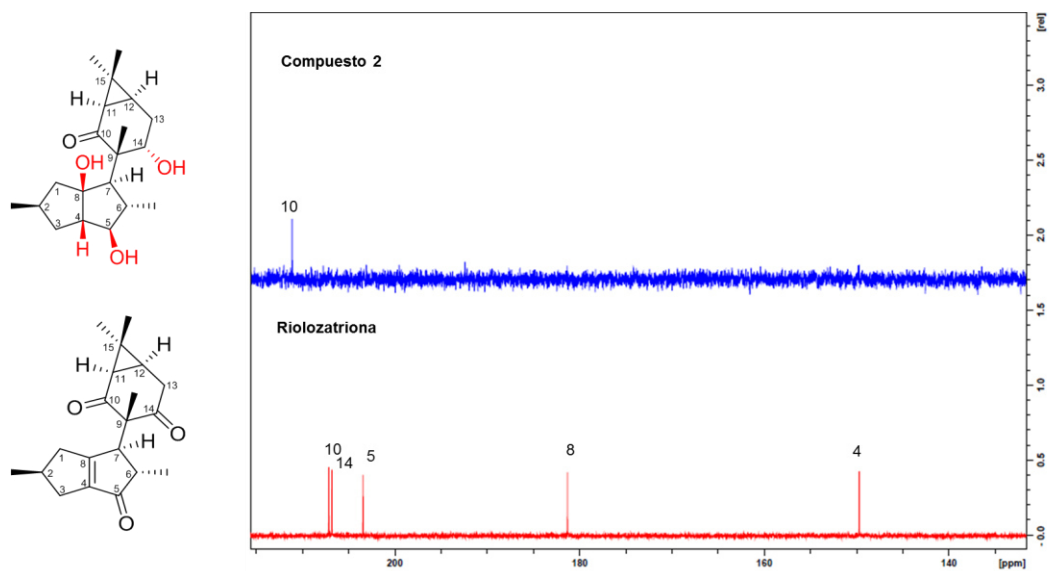


Figura 16. Comparación de la primera parte del espectro ^{13}C -RMN del compuesto **2** y Riolozatriona

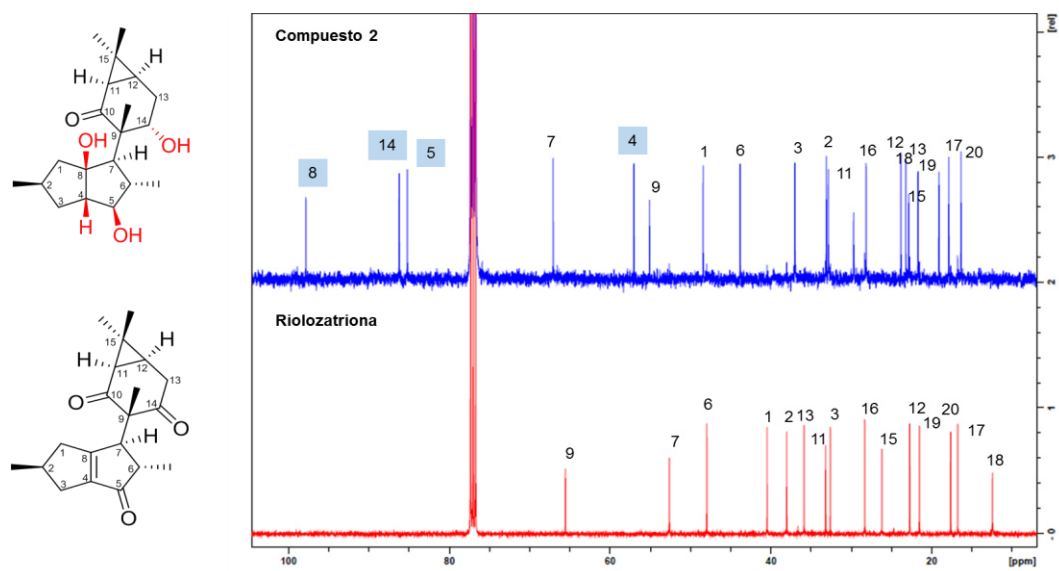


Figura 17. Comparación de la segunda parte del espectro ^{13}C -RMN del compuesto **2** y Riolozatriona

3.2.2.2 Elucidación de la estructura del Compuesto 3

El compuesto **3** se purificó según el procedimiento descrito en el punto 2.6.5.3 y se realizó la caracterización estructural por medio de espectrometría UV-Vis, RMN de 1D y 2D y EM.

Longitud de onda de máxima absorción: No absorbe en el rango de 220-780 nm.

Peso molecular: 316.43

Fórmula molecular: C₂₀H₂₈O₃

Masa exacta: 316.20

Los espectros de ¹H-RMN y ¹³C-RMN con las asignaciones completas de Hidrógeno y Carbono se muestran en las figuras 19, 20 y 21. Los espectros de 1D y 2D (COSY, HSQC, HMBC y NOESY) se encuentran en la sección de anexo.

Como resultado del análisis de cada uno de los espectros anteriores la Figura 18 muestra la estructura propuesta para el compuesto **3**.

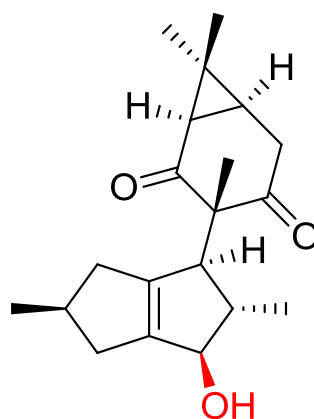


Figura 18. Estructura del compuesto 3

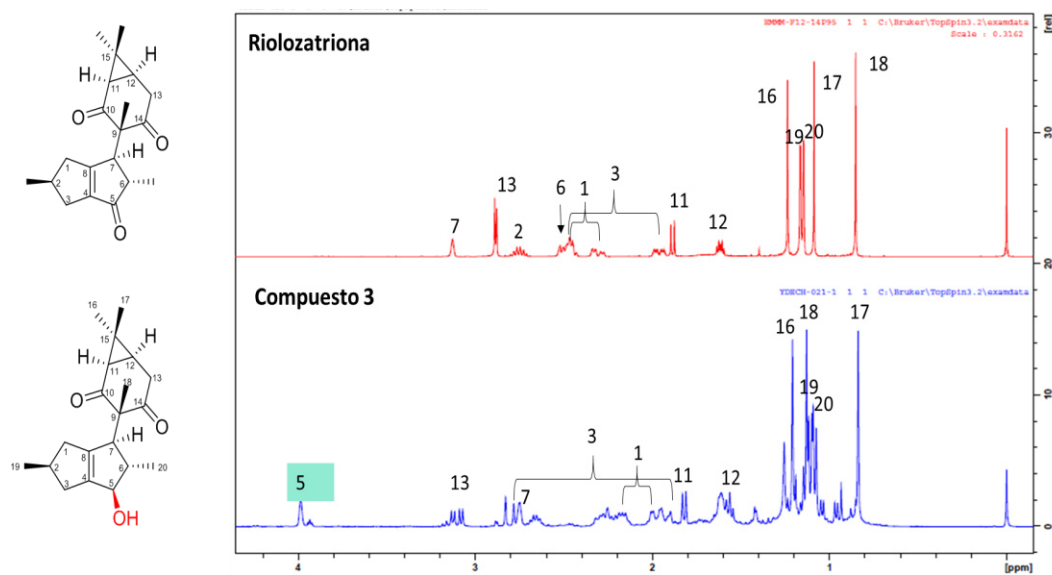


Figura. 19. Comparación de los espectros de ¹H-RMN del compuesto 3 y Riolozatriona

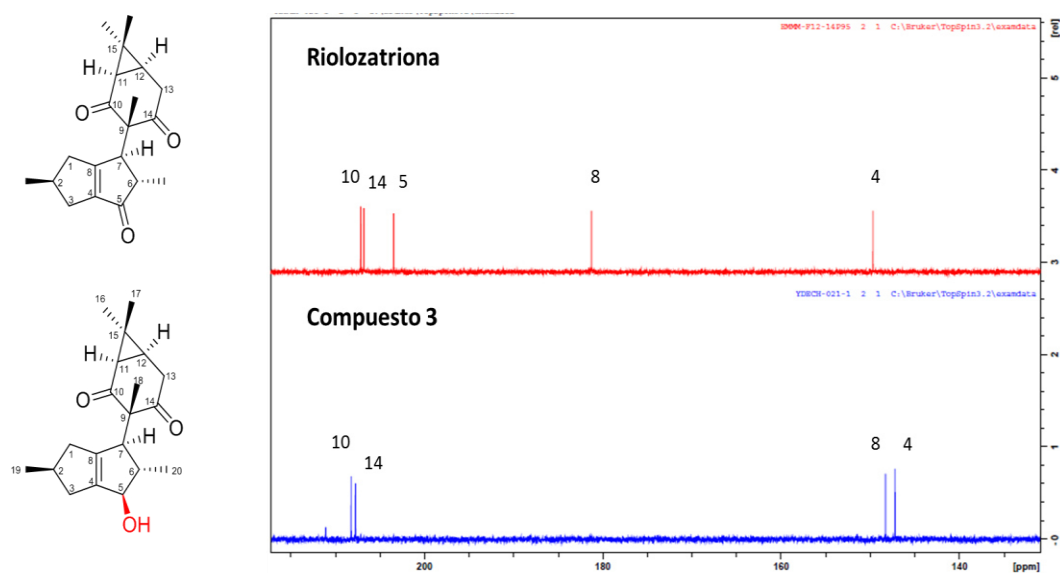


Figura 20. Comparación de la primera parte del espectro ^{13}C -RMN del compuesto **3** y Riolozatriona

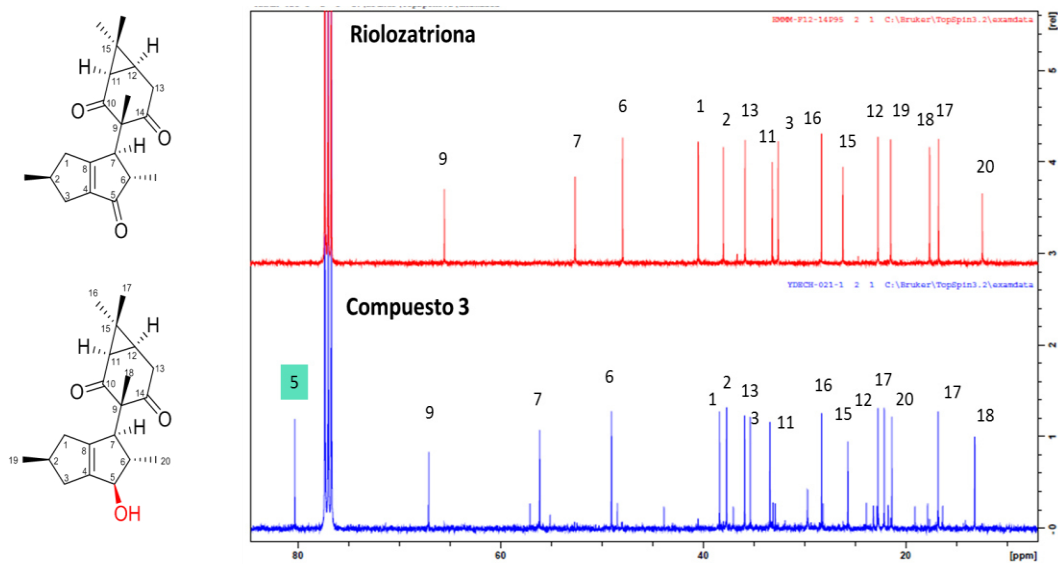


Figura 21. Comparación de la segunda parte del espectro ^{13}C -RMN del compuesto **3** y Riolozatriona

3.2.2.3 Elucidación de la estructura del Compuesto 4

El compuesto **4** se purificó según el procedimiento descrito en el punto 2.6.5.3 y se realizó la caracterización estructural por medio de espectrometría UV-Vis, RMN de 1D y 2D y EM.

Longitud de onda de máxima absorción. No absorbe en el rango de 220-780 nm.

Peso molecular 318.45

Fórmula molecular $C_{20}H_{30}O_3$

Masa exacta 318.22

Los espectros de 1H -RMN y ^{13}C -RMN con las asignaciones completas de Hidrógeno y Carbono se muestran en las figuras 23, 24 y 25. Los espectros de 1D y 2D (COSY, HSQC, HMBC y NOESY) se encuentran en la sección de anexo.

Como resultado del análisis de cada uno de los espectros anteriores la Figura 22 muestra la estructura propuesta para el compuesto **4**.

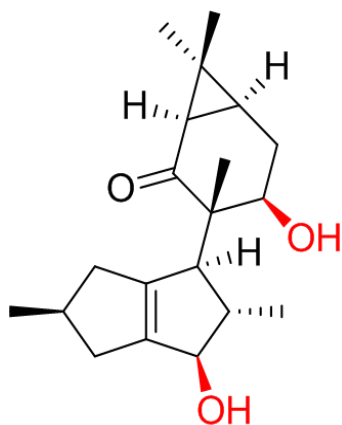


Figura 22. Estructura del compuesto 4

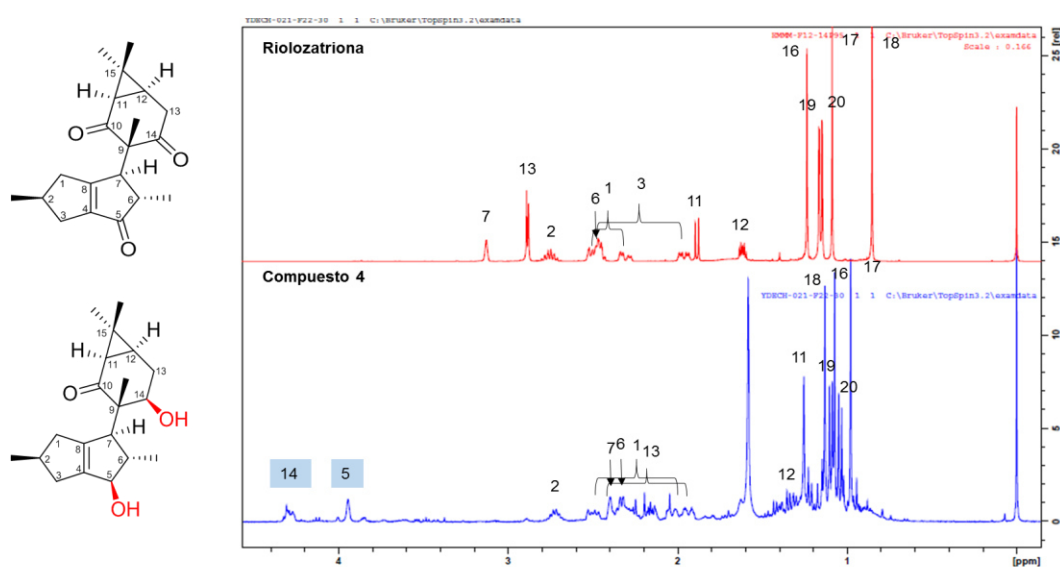


Figura 24. Comparación de los espectros de ¹H-RMN del compuesto 4 y Riolozatriona

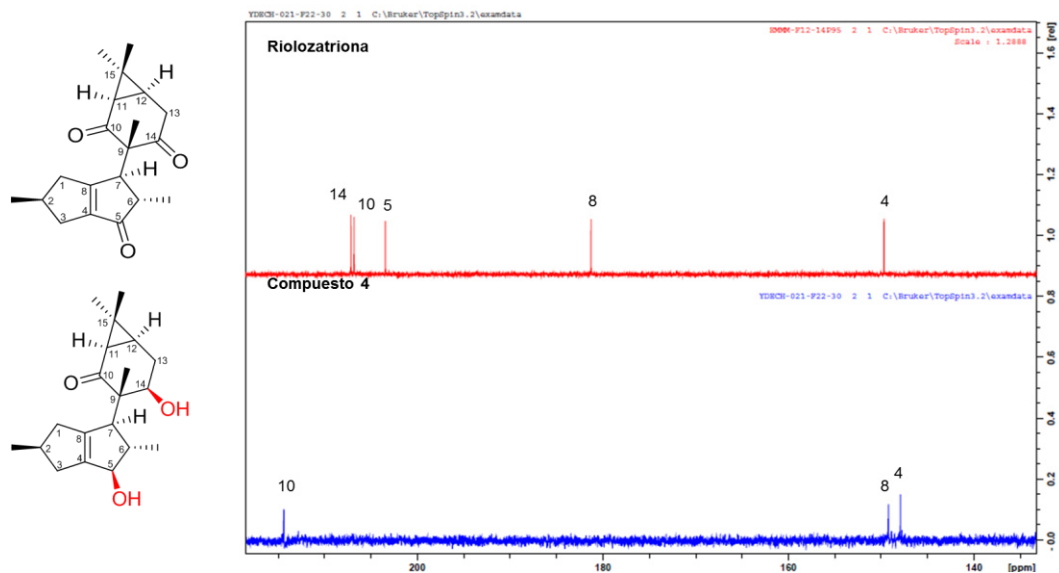


Figura 25. Comparación de la primera parte del espectro ^{13}C -RMN del compuesto 3 y Riolozatriona

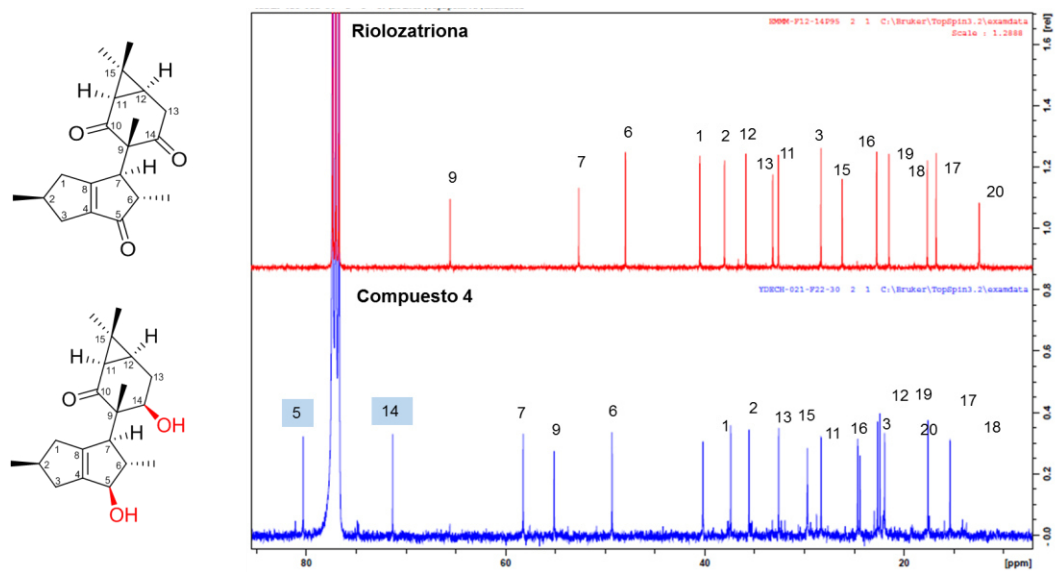


Figura 26. Comparación de la segunda parte del espectro ^{13}C -RMN del compuesto 4 y Riolozatriona

3.2.2.4 Elucidación de la estructura del Compuesto 5

El compuesto **5** se purificó según el procedimiento descrito en el punto 2.6.5.3 y se realizó la caracterización estructural por medio de espectrometría UV-Vis, RMN de 1D y 2D y EM.

Longitud de onda de máxima absorción: no absorbe en el rango de 220-780 nm.

Peso molecular: 336.47

Fórmula molecular: $C_{20}H_{32}O_4$

Masa exacta: 336.23

Los espectros de 1H -RMN y ^{13}C -RMN con las asignaciones completas de Hidrógeno y Carbono se muestran en las figuras 27, 28 y 29. Los espectros de 1D y 2D (COSY, HSQC, HMBC y NOESY) se encuentran en la sección de anexo.

Como resultado del análisis de cada uno de los espectros anteriores la Figura 26 muestra la estructura propuesta para el compuesto **5**.

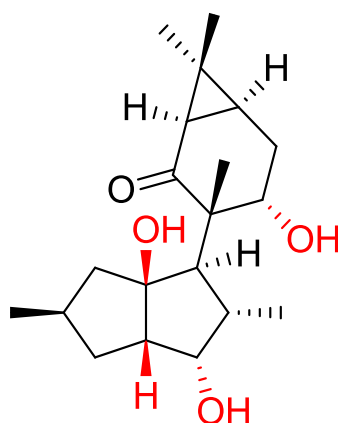


Figura 26. Estructura del compuesto 5

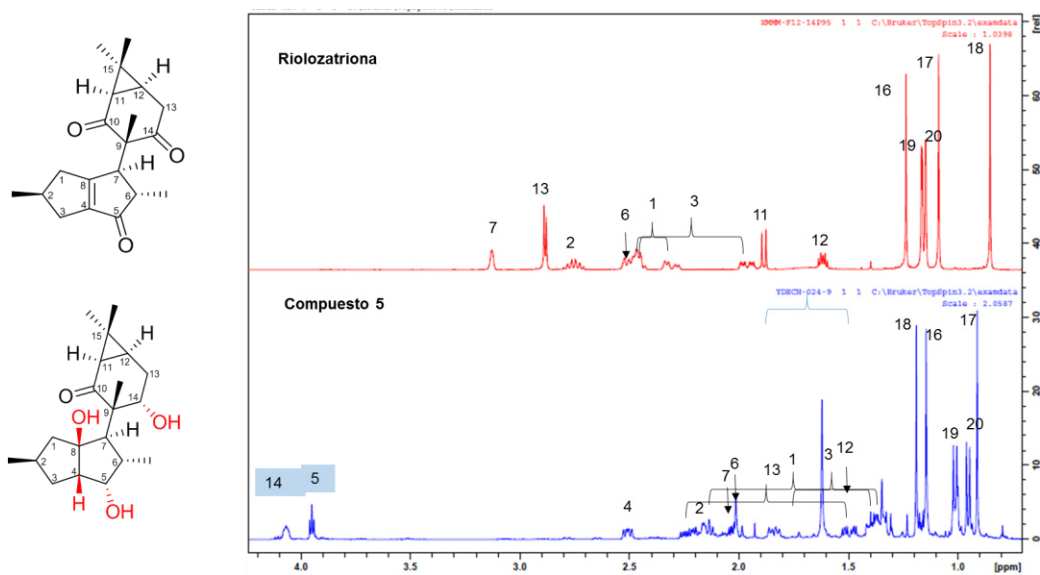


Figura 27. Comparación de los espectros de ¹H-RMN del compuesto 5 y Riolozatriona

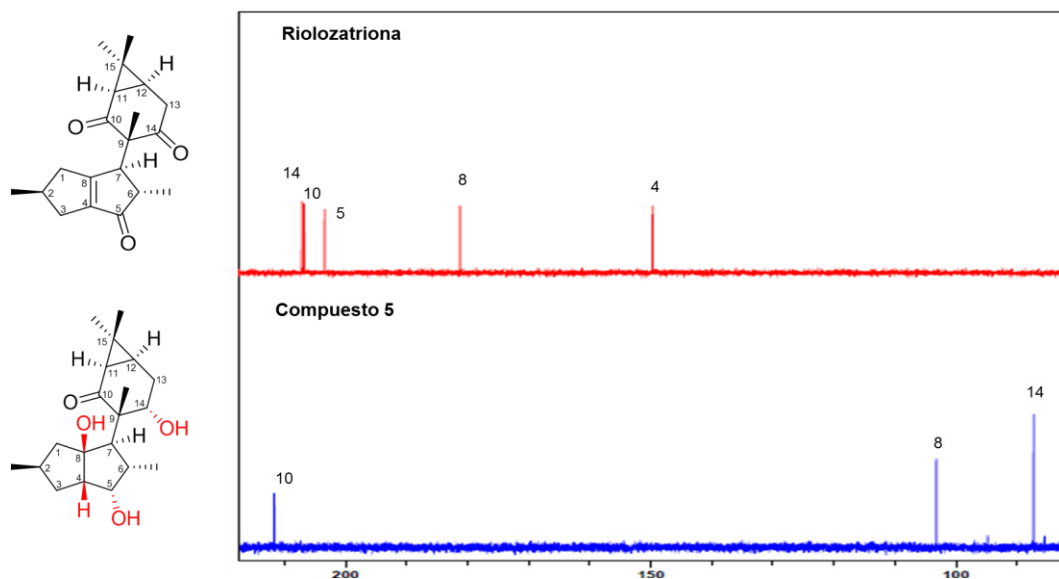


Figura 28. Comparación de la primera parte del espectro ^{13}C -RMN del compuesto **5** y Riolozatriona

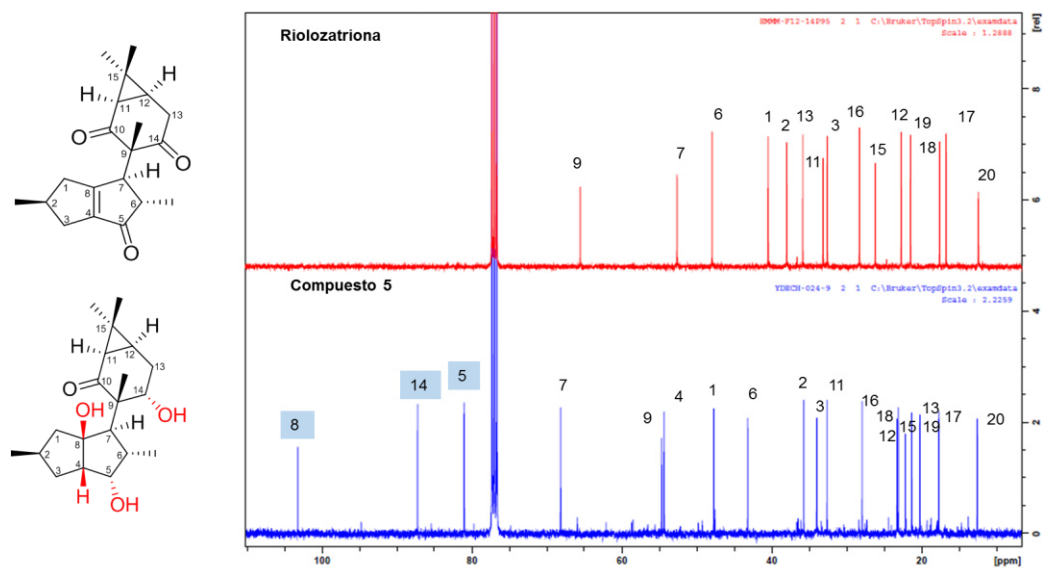


Figura 30. Comparación de la segunda parte del espectro ^{13}C -RMN del compuesto **5** y Riolozatriona

3.2.3 Reducción del doble enlace del sistema cetona α,β insaturado

Se realizó lo descrito en la sección 2.6.5.2, Las condiciones de reducción del doble enlace del sistema cetona α,β insaturado con Pd/C están descritos en la tabla 3. Bajo estas condiciones se obtuvo como único producto el compuesto 6.

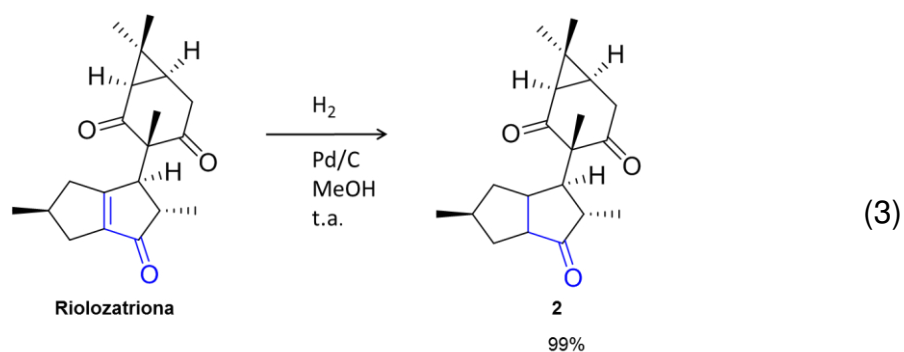


Tabla 3. Condiciones utilizadas en las reacciones con Pd/C

Ejemplo	Pd/C	Rioloatriona	Temperatura	Tiempo
1	1 Eq.	60 mg	t.a.	30 minutos

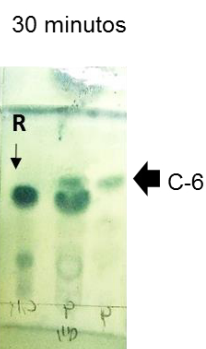


Figura 31. CCF de la reacción de obtención del compuesto 6 (fase móvil: hexano: acetato de etilo 6:4. revelador ácido fosfomolibdico).

3.2.3.1 Elucidación de la estructura del compuesto 6

El compuesto **6** se purificó según el procedimiento descrito en la sección 2.6.5.2 y se realizó la caracterización estructural por medio de espectrometría UV-Vis, RMN de 1D y 2D y EM.

Longitud de onda de máxima absorción: No absorbe en el rango de 220-780 nm.

Peso molecular: 316.43

Fórmula molecular: C₂₀H₂₈O₃

Masa exacta: 316.20

Los espectros de ¹H-RMN y ¹³C-RMN con las asignaciones completas de Hidrógeno y Carbono se muestran en las figuras 32, 33 y 34. Los espectros de 1D y 2D (COSY, HSQC, HMBC y NOESY) se encuentran en la sección de anexo.

Como resultado del análisis de cada uno de los espectros anteriores la Figura 31 muestra la estructura propuesta para el compuesto **6**.

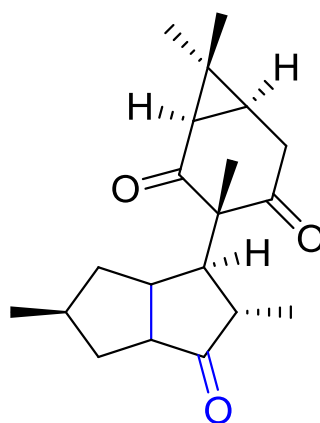


Figura 31. Estructura del compuesto 6

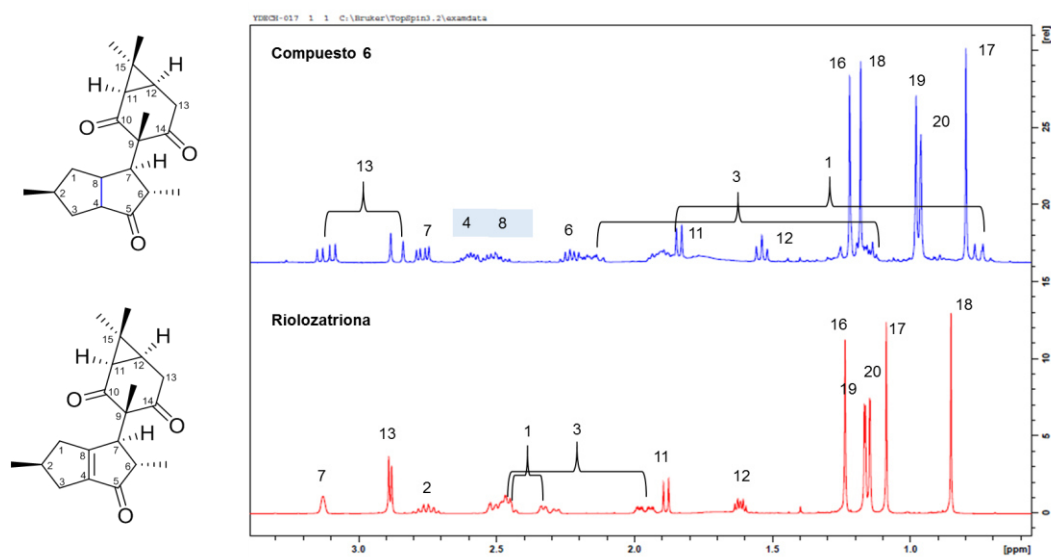


Figura 32. Comparación de los espectros de ¹H-RMN- del compuesto 6 y Riolozatriona

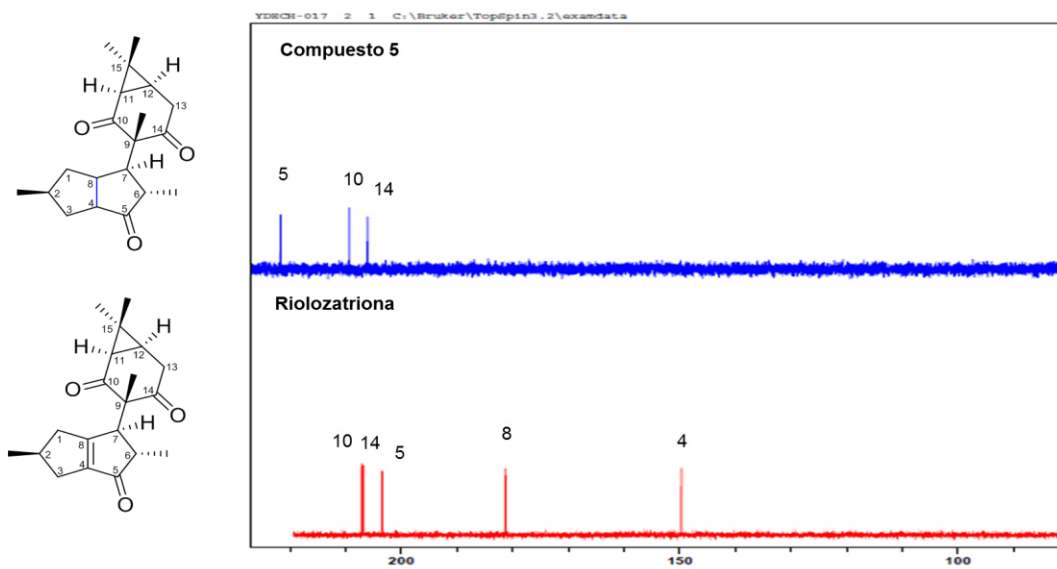


Figura 33. Comparación de la primera parte del espectro ^{13}C -RMN del compuesto **6** y Riolozatriona

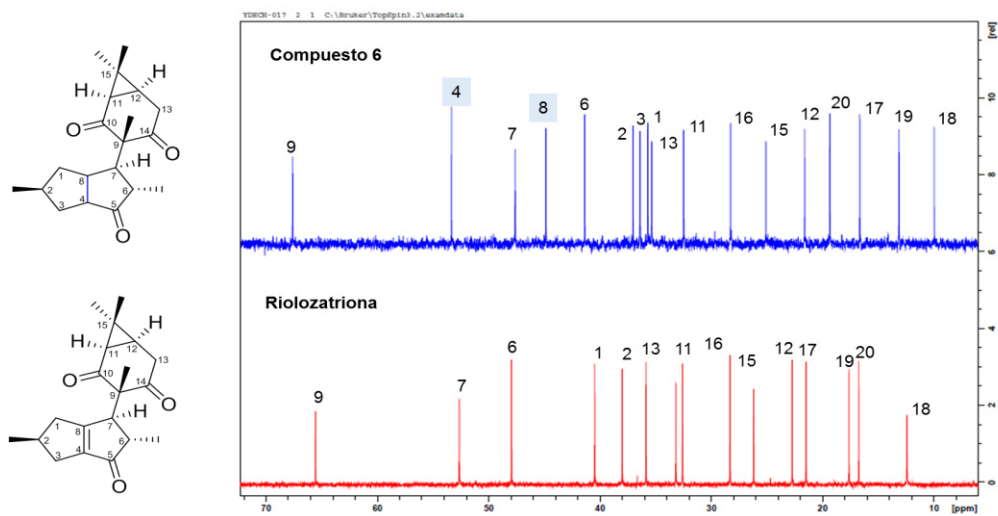


Figura 34. Comparación de la segunda parte del espectro ^{13}C -RMN del compuesto **6** y Riolozatriona

3.3 Evaluación de la Actividad Citotóxica (CC₅₀) de los derivados obtenidos.

Se determinó la actividad citotóxica como se describió en la sección 2.6.7. En la tabla 4 se muestra la CC₅₀ obtenida de los derivados.

Tabla 4. Determinación de la actividad citotóxica de los derivados obtenidos.

Compuesto	CC ₅₀	D.E.
1	>1600 µg/mL (ND)	NC
2	718 µg/mL	± 66.8
3	1624 µg/mL	± 5.18
4	1537 µg/mL	± 18.9
6	102 µg/mL	± 10.1

NC: no calculado

3.4 Evaluación de la Actividad Antiherpética (IC₅₀) de los derivados obtenidos.

Se determinó la actividad antiherpética contra VHS-1 como se describió en la sección 2.6.8. En la tabla 5 se muestra la IC₅₀ obtenida de los derivados.

Tabla 5. Determinación de la actividad antiherpética contra VHS-1 de los derivados obtenidos.

Compuesto	IC ₅₀	D.E.
1	147.22 µg/mL	± 6.30
2	>500 µg/mL	NC
3	222.24 µg/mL	±11.87
6	23.65 µg/mL	± 1.24

NC: no calculado

3.5 Determinación de Índice de Selectividad de los derivados obtenidos.

Se determinó el índice de selectividad como se describió en la sección 2.6.8. En la tabla 6 se muestran los valores obtenidos de los compuestos 1, 2, 3 y 6.

Tabla 6. Determinación del índice de selectividad de los derivados obtenidos.

Compuesto	Índice de Selectividad VHS-1
1	>10.87
2	<1.44
3	7.32
6	5.31

CAPÍTULO 4

DISCUSIÓN

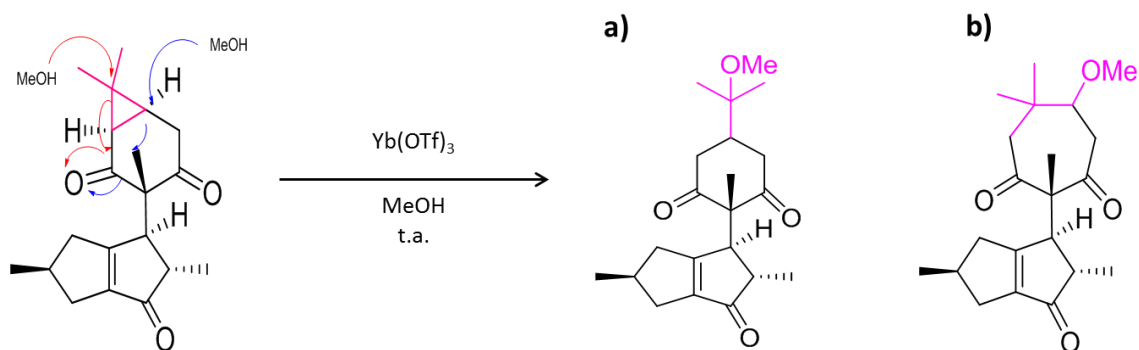
La Rioloatriona es un diterpeno de estructura única el cual solo se ha aislado de la especie *Jatropha dioica*.^[15] Esta especie pertenece a la familia de las Euphorbiales, las plantas de esta familia son conocidas por tener metabolitos secundarios de tipo terpeno con actividad biológica.^[16] La Rioloatriona fue aislada por primera vez por Domínguez y colaboradores sin embargo no se probó la actividad biológica del compuesto aislado.^[15] En el trabajo realizado por Silva Mares en el 2003, se realizó el aislamiento biodirigido de compuestos con actividad antiherpética de la raíz de *Jatropha dioica*, donde la Rioloatriona mostró un índice de selectividad de 5.8 el cual se considera moderado.^[14]

Hasta nuestro conocimiento existen pocos reportes sobre este compuesto y su mecanismo de acción relacionado con su actividad antiherpética, por esta razón se obtuvieron derivados a partir del compuesto Rioloatriona en donde se buscó modificar diferentes partes de la estructura y ver cómo afectan estos cambios en su actividad biológica.

Para la obtención de cantidad suficiente de Rioloatriona y de esta forma dar cumplimiento a los objetivos planteados en este trabajo, fue necesario hacer la purificación mediante el método descrito en la sección 2. A partir de 2.5 kg de raíz *J. dioica* molida y seca, con lo cual se lograron obtener 2 g de Rioloatriona pura.

1. Transformación del sistema dimetil-ciclopropano de la Rioloatriona.

En base a la búsqueda bibliográfica, las condiciones más favorables para la modificación del anillo dimetil-ciclopropano de la Rioloatriona incluyen el $\text{Yb}(\text{OTf})_3$. De acuerdo a lo reportado por Sterner, el $\text{Yb}(\text{OTf})_3$ es un ácido de Lewis suave y selectivo que ya ha sido utilizado en otros terpenos (latirano) con buenos resultados.[26] Con base en la literatura el $\text{Yb}(\text{OTf})_3$ puede favorecer la apertura del anillo de ciclopropano mediante dos vías y conducir a la formación de dos compuestos **a** y **b**. El producto **a** es consecuencia del ataque nucleofílico del metano en el carbono 15. En cambio en el producto **b** el metanol se adiciona en el carbono 12.



Ecuación 1. Derivados propuestos a partir de la transformación de dimetil-ciclopropano con $\text{Yb}(\text{OTf})_3$

Cuando la Rioloatriona se hizo reaccionar con el $\text{Yb}(\text{OTf})_3$ en metanol, se aisló como producto el compuesto **1**. Probablemente la formación de este compuesto se favorece debido a que el carbono cuaternario del dimetil-ciclopropano es más electrofílico.[27]

Las condiciones de reacción se variaron ligeramente con el fin de mejorar el bajo rendimiento de la reacción. Inicialmente se calentó la mezcla de reacción a $55\text{ }^\circ\text{C}$ y posteriormente a $70\text{ }^\circ\text{C}$, sin embargo el rendimiento fue igual de bajo. La cantidad de $(\text{YbOTf})_3$ se aumentó a 2 equivalente sin éxito. En compuestos similares, el rendimiento de la apertura de este tipo de anillo es igual de bajo, se reportan rendimientos del 15-20%.[26]

En el espectro de ^1H -RMN del compuesto **1** se observan cambios importantes como la señal correspondiente al grupo metoxi a 2.95 ppm, las señales de los hidrógenos de los carbonos 11 y 12 y 13 en los cuales hubo un cambio en su desplazamiento químico comparado con la Rioloatriona.

En cuanto al espectro de ^{13}C -RMN aparecen 21 señales de carbono; a campo bajo se observan las señales de los carbonilos y del doble enlace presentes en la Rioloatriona, de esta forma aseguramos que esas partes de la molécula no cambiaron. Sin embargo a campo alto se observa una señal de carbono a 51 ppm que no se encuentra en el espectro de ^{13}C -RMN de la Rioloatriona y que corresponde al grupo metoxilo. También se observó el cambio en la señal del carbono 15, la cual se desplazó a campo bajo (80.2 ppm) debido a que el carbono se encuentra ahora oxigenado.

En el experimento DEPT-90, se observó en el compuesto **1** cuatro carbonos de tipo metino, a diferencia de la Rioloatriona que tiene cinco carbonos metinos.[28]

Con el experimento DEPT-135 el cual nos permite identificar cuales carbonos son metinos y metilos (debido a que las señales se observan hacia arriba de la línea base) y cuales son metilenos (debido a que las señales se observan hacia abajo de la línea base), se observó que la señal nueva que aparece a 51 ppm corresponde a un metilo. Además, se observó que hay cuatro señales de carbono que corresponden a metilenos, a diferencia de la Rioloatriona que solo presenta tres.[28]

Debido a que existía la posibilidad de obtener dos derivados a partir de la reacción con $\text{Yb}(\text{OTf})_3$ se realizaron experimentos de 2D de RMN para hacer una elucidación estructural y asignación inequívoca de todas las señales.

Con ayuda del experimento HSQC se identificó la correlación a un enlace carbono-hidrógeno, y se observaron cambios en el desplazamiento químico de varias señales comparado con la Rioloatriona.[28]

Posteriormente, se realizó el experimento de HMBC el cual nos permite identificar la correlación carbono-hidrógeno a 2 o 3 enlaces.[28]

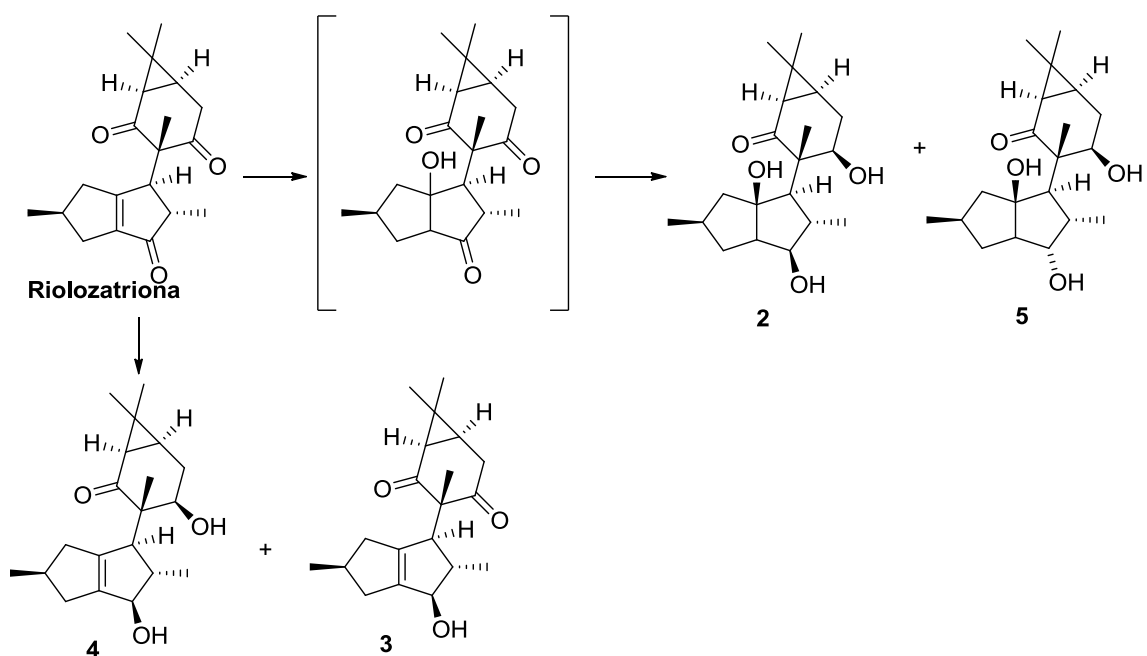
Mediante este experimento se logró confirmar cuál de los dos derivados se formó debido a que se observa una correlación a larga distancia entre la señal de hidrógeno del metoxilo que aparece a 2.95 ppm y la señal de C-15 que aparece 76 ppm, la cual se confirmó en el experimento DEPT-135 que

corresponde a un carbono cuaternario. Mediante la correlación a larga distancia con la señal del grupo metoxilo, se identificó que el ataque nucleofílico ocurrió en C-15. Si el ataque nucleofílico hubiera sido en C-12 la señal de los hidrógenos del grupo metoxilo darían correlación con un carbono metino correspondiente a C-12, al no observar esta correlación se definió que el compuesto formado fue el compuesto

1. Transformación del sistema 1,3-dicetona del anillo de seis miembros.

Para la transformación del sistema 1,3-dicetona del anillo de seis miembros se propuso la reducción de los carbonilos del anillo de seis miembros utilizando NaBH_4 en metanol/diclorometano (1:1) a -15°C . Estas condiciones han sido usadas para reducir selectivamente cetonas alquílicas sobre cetonas conjugadas en buenos resultados [24] Cuando la Rioloatriona se mezcló con el borohidruro de sodio en estas condiciones el compuesto **2** fue el producto que se obtuvo en mayor cantidad (38%). Su formación se explica con un doble proceso: adición conjugada de una molécula de agua seguido de la reducción del carbonilo del anillo 1,3-dicetona y ciclopentanona (Ecuación 2). El compuesto **5** es un epímero del compuesto **2**, por lo que se considera sigue la misma ruta adición conjugada reducción en menor proporción (10%). El compuesto **3**, fue el segundo compuesto obtenido en mayor cantidad (30%) y es resultado de una reducción selectiva de la cetona conjugada sobre la 1,3-ciclohexadienona. Por último el compuesto **4** que se obtuvo en un rendimiento

del 18% el tercero en cantidad, se explica a través de la reducción de la cetona conjugada seguido de uno de los carbonilos de la 1,3-dicetona.



Ecuación 2. Derivados obtenidos a partir de las reacciones con NaBH_4

De acuerdo a la literatura, se conoce que la cetona saturada se reduce más rápidamente que las cetonas insaturadas debido a que la conjugación del doble enlace con la cetona reduce el carácter electropositivo del carbonilo previniendo la adición de los hidruros.[29][24][30] La reducción del carbonilo más impedido de la 1,3-dicetona no fue observada en ninguno de los compuestos recuperados. El NaBH_4 es un agente reductor que se ve afectado por el impedimento estérico, y debido a ello las reducciones con NaBH_4 se consideran estereoselectivas. Los ataques de este agente reductor siempre será por el lado

menos impedido de la molécula.[30] Por otro lado, la adición conjugada que da origen a los compuestos **2** y **5** se debe la existencia de agua en la mezcla de reacción. Si bien la reacción se realiza bajo condiciones anhidras, el metanol es muy higroscópico.[25]

Tanto la reducción en el tiempo y el aumento en la temperatura no modificaron la aparición de los productos ni sus proporciones.

Cuando la reacción se condujo usando un solo equivalente de borohidruro en únicamente metanol como disolvente (-15°C por 30 min), el compuesto **3** fue el producto que obtuvo en mayor cantidad, seguido del compuesto **2** y no se observó la formación del compuesto **4** y **5**.

Por otro lado se hizo la reacción con diclorometano/metanol en una proporción 88:12 con un equivalente de NaBH₄ a -15°C por 30 min. En esta reacción el producto mayoritario fue el compuesto **2** seguido en rendimiento el compuesto **3**, este resultado es el mismo que en las condiciones iniciales, sin embargo no se observa la formación del compuesto **4** esto puede deberse a que el tiempo de reacción es menor que el de las condiciones iniciales.

Bajo todos estos cambios en las condiciones no se pudo evitar la formación del compuesto **4**, por lo que es necesario hacer más pruebas experimentales y utilizar otro tipo de agentes reductores para poder identificar el factor que está favoreciendo la formación de este producto.

Elucidación estructural del compuesto 2

Se realizaron los espectros de ^1H -RMN en donde se puede apreciar la aparición de señales de hidrogeno a campo bajo, las cuales corresponden a los hidrógenos de los carbonos que antes eran carbonilos: estas son tres señales tripletes a 3.93 ppm, a 3.16 ppm y a 2.25 ppm.

En el espectro de ^{13}C -RMN del compuesto **2**, solo se observa una señal en la zona de los carbonilos a 211.11 ppm a diferencia del espectro de ^{13}C -RMN de la Rioloatriona en el cual se observan 3 señales de carbonilo. Por otro lado en la zona donde aparecen las señales de los carbonos sp^2 no se observan señales. Con estos datos identificamos que nuestro derivado se redujo en dos de los tres carbonilos posibles y además desapareció el doble enlace en la molécula.

En el experimento DEPT 90 se observan 8 señales, lo que indica que el compuesto **2** tiene en su estructura 8 metinos a diferencia de en la Rioloatriona que presenta 5 metinos.

En el experimento DEPT 135 se observan 13 señales positivas y 3 señales negativas, de las 13 señales positivas 8 corresponden a metinos y 5 a metilos, las tres señales negativas son metilenos. Las señales que no se observan en estos experimentos son los carbonos cuaternarios. En base a esto se determinó que nuestro derivado tiene 4 carbonos cuaternarios, a diferencia de en la Rioloatriona que tiene 7 carbonos cuaternarios.

A través del experimento de HSQC se relacionó la señal triple que aparece 3.93 ppm en el espectro de hidrógeno con la señal de CH a 86.22 ppm en el

espectro de ^{13}C , esta señal se encuentra muy desplazado a campo bajo únaló cual es congruente con un carbono oxigenado. La señal de H que aparece a 3.16 ppm, mostró correlación con la señal de CH a 85.21 ppm, por lo que también se atribuye a un carbono oxigenado debido a su desplazamiento a campo bajo. Por último, la señal que aparece a 2.25 ppm muestra relación con la señal de CH a 57.04 ppm, la cual podía asignarse tanto al C-4 como al C-8.

En el experimento H,H-COSY se observó que la señal de 3.16 ppm muestra relación con la señal a 2.25 pm y con la señal de H-6 a 1.62 ppm. Con estas correlaciones podemos definir que la señal a 3.16 ppm corresponde a H-5, que si bien en la Rioloatriona es un carbonilo en el compuesto **2** se redujo y es un CH hidroxilado. Además, en base a que la señal a 2.25 ppm mostraba correlación con H-3 y H-5 se definió que esta señal correspondía al H-4, el cual en la Rioloatriona pertenece al doble enlace y en el compuesto **2** es un metino.

Otra señal importante de carbono cuaternario que aparece a 97.81 ppm, se encuentra desplazada a campo bajo, lo que concuerda con un carbono oxigenado, muestra correlación a la larga distancia en el experimento de HMBC con las señales de hidrogeno del C-1, por lo que se asignó a C-8 que en la Rioloatriona este pertenece al doble enlace. Con estos resultados se puede comprobar la adición 1,4 del grupo –OH en C-8.

En cuanto a la señal de hidrógeno que aparece a 3.93 ppm, esta mostró correlación con la señal en el espectro de ^{13}C -RMN correspondiente al carbonilo y con la señal de correspondiente ^a C-13 por lo que se determinó que el carbonilo que se redujo en el anillo de seis miembros es el C-14.

Con todos estos datos espectroscópicos se determinó que el compuesto **2** presenta la estructura que se muestra en la figura **14**.

Elucidación estructural del compuesto 3

En el espectro de ^1H -RMN del compuesto **3** se observa una señal singlete ancho a 3.99 ppm que no se encuentra en el espectro de ^1H -RMN de la Rioloatriona.

En el espectro de ^{13}C -RMN en la zona de los carbonilos se observan 2 señales a diferencia de en la Rioloatriona que se observan 3 señales. En la zona de los dobles enlaces se observan dos señales. Con estos datos se definió que solo uno de los 3 carbonilos se había reducido y que el doble enlace también estaba presente en el compuesto **3** igual que en la Rioloatriona.

En el experimento DEPT-90 se observan 6 señales positivas, este resultado nos indica que el compuesto **2** tiene en su estructura 6 metinos a diferencia de en la Rioloatriona que presenta 5 metinos.

En el experimento DEPT 135 se observan 11 señales positivas y 3 señales negativas, de las 11 señales positivas 6 corresponden a metinos y 5 a metilos, las tres señales negativas son metilenos. En base a esto se determinó que nuestro derivado tiene 6 carbonos cuaternarios, a diferencia de en la Rioloatriona que tiene 7 carbonos cuaternarios.

En el experimento HSQC se observó que la señal a 3.98 ppm en el espectro de ^1H -RMN muestra correlación a un enlace con la señal de CH a 80.29, y debido a su desplazamiento químico se definió que es un carbono oxigenado.

En el experimento HMBC se observó que la señal de H a 3.98 ppm muestra correlación con la señal del espectro de ^{13}C -RMN que aparece a 147.22 ppm y que corresponde al doble enlace del bi-ciclopenteno. Con toda esta información se determinó el compuesto **3** es producto de la reducción del carbonilo 5 de la Rioloatriona. La estructura de **3** se presenta en la figura **18**.

Elucidación estructural del compuesto 4

En el espectro de ^1H -RMN del compuesto **4** se observan dos señales a 3.94 ppm y otra a 4.29 ppm que no se encuentran en el espectro de ^1H -RMN de la Rioloatriona.

En el espectro de ^{13}C -RMN se observa 1 señal de C en la zona de los carbonilos a diferencia del espectro de carbono de la Rioloatriona que se observan 3 señales. En la zona de los dobles enlaces se observan dos señales. Con estos datos se definió que dos carbonilos se habían reducido y que el doble enlace estaba presente en el compuesto **4** igual que en la Rioloatriona.

En el experimento DEPT 90 se observan 7 señales positivas, este resultado indica que el compuesto **4** tiene en su estructura 7 metinos a diferencia de en la Rioloatriona que presenta 5 metinos.

En el experimento DEPT 135 se observan 12 señales positivas y 3 señales negativas; de las 12 señales positivas 7 corresponden a metinos y 5 a metilos, las tres señales negativas son metilenos. En base a esto se determinó que

nuestro derivado **4** tiene 5 carbonos cuaternarios, a diferencia de la Rioloatriona que tiene 7 carbonos cuaternarios.

En el experimento HSQC se observó que la señal de hidrogeno a 3.98 ppm muestra correlación con la señal de CH a 80.29 ppm, y por su desplazamiento químico se definió que es un carbono oxigenado.

En el experimento HMBC se observó que la señal de CH a 80.29 ppm muestra correlación a larga distancia con la señal hidrógeno que aparece a 2.34 ppm, que corresponde H-6. Por otro lado en el mismo experimento se observó que la señal de CH que aparece a 71.31 ppm correlaciona con la señal de hidrogeno a 2.18 que corresponde H-13. Con toda esta información se determinó que la reducción se llevó a cabo en los carbonilos 5 y 14 de la Rioloatriona.

Con todos estos datos espectroscópicos se determinó que el compuesto **4** tiene la estructura que se muestra en la figura **22**.

Elucidación estructural del compuesto 5.

Se realizaron los espectros de ^1H -RMN en donde se puede apreciar la aparición de señales de hidrogeno a campo bajo: que una señal triplete a 3.95 ppm, otra señal simple ancha a 4.07 ppm y otra señal doble-doblete a 2.51 ppm.

En el espectro de ^{13}C -RMN del compuesto en la zona de los carbonilos solo se observa solo una señal a 211.67 ppm a diferencia del espectro de ^{13}C -RMN de la Rioloatriona en el cual se observan 3 señales. Por otro lado en la zona donde aparecen las señales de los carbonos de doble enlace no se observan

señales. Con estos datos identificamos que nuestro derivado **5** había sido reducido en dos de los tres carbonilos posibles y además había desaparecido el doble enlace en la molécula.

En el experimento DEPT-90 se observan 8 señales positivas, este resultado indica que el compuesto **5** tiene en su estructura 8 metinos a diferencia de en la Rioloatriona que presenta 5 metinos.

En el experimento DEPT-135 se observan 13 señales positivas y 3 señales negativas, de las 13 señales positivas 8 corresponden a metinos y 5 a metilos, las tres señales negativas son metilenos. En base a esto se determinó que nuestro derivado **5** tiene 4 carbonos cuaternarios, a diferencia de en la Rioloatriona que tiene 7 carbonos cuaternarios.

En cuanto al experimento de HSQC se relacionó que la señal de hidrógeno que aparece 4.07 ppm correlaciona con la señal de CH a 81.03 ppm, esta señal se encuentra muy desplazada por lo que se definió que era un carbono oxigenado, Otra señal de hidrógeno importante es la señal que aparece a 3.95 ppm la cual mostró correlación con la señal de carbono a 87.24 ppm, esta señal también corresponde a un metino y debido a su desplazamiento a campo bajo se definió que también es un carbono oxigenado. La siguiente señal de hidrógeno importante que aparece a 2.51 ppm, y muestra relación con la señal de carbono a 54.36 ppm que corresponde a un metino.

En el experimento H,H-COSY- se observó que la señal de 4.07 ppm muestra correlación con la señal a 2.51 ppm. Además la señal en 2.51 ppm mostró

relación con las señales de H-3 por lo que se definió que la señal a 4.07 ppm corresponde H-5 que si bien en la Rioloatriona es un carbonilo en el compuesto **5** se redujo y es un carbono hidroxilado. También en base a que la señal a 2.51 ppm mostraba correlación con las señales de hidrogeno 3 y 5, se definió que esta señal corresponde al metino H-4, el cual pertenece en la Rioloatriona al carbono del doble enlace.

Otra señal de carbono cuaternario la cual no se había identificado es la señal que aparece a 103.20 ppm se encuentra desplazada a campo bajo por lo que se determinó que es un carbono oxigenado y debido a que en el experimento de HMBC muestra correlación a la larga distancia con las señales de H-1 se determinó que esa señal de carbono corresponde C-8 que en la Rioloatriona pertenece al doble enlace.

En cuanto a la señal de hidrógeno que aparece a 3.95 ppm, esta mostró correlación con la señal del carbonilo y con la señal de C-13, por lo que se determinó que el carbonilo que se redujo en el anillo de seis miembros es el del carbono 14.

Con todos estos datos espectroscópicos se determinó que el compuesto **5** tiene la estructura que se muestra en la figura **26**.

Como se observa en los datos espectroscópicos el compuesto **2** y el compuesto **5** parecen tener los mismos cambios estructurales, sin embargo al analizar los datos del experimento NOESY se observó que estos son diastereoisómeros debido a que el hidroxilo del C-5 esta hacia adelante en el

plano en el compuesto **2** (*S*) y en el compuesto **5** esta hacia atrás en el plano (*R*).

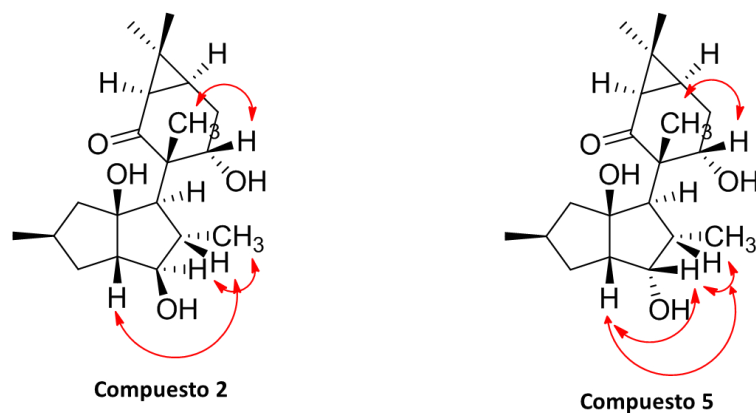


Figura 36. Representación del efecto NOE en los compuestos **2** y **5**

Mediante el experimento NOESY también se logró determinar la orientación de los hidroxilos C-14 y C-8 sin embargo, en estos grupos no hubo diferencia de orientación entre los derivados **2** y **5** como se observa en la figura 36.

Otro aspecto importante que se definió fue si la hidroxilación se llevó a cabo en C-8 o en C-4. Esto se determinó con el experimento COSY debido a que la señal de H-4 presentó correlación con los H-3, como se muestra en la figura 37.

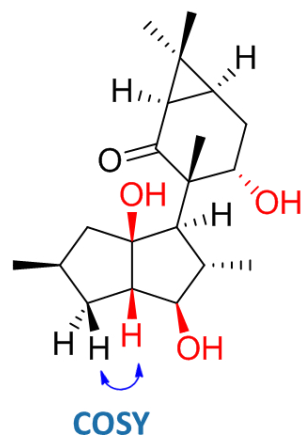


Figura 37. Representación de la correlación COSY en el compuesto **2**

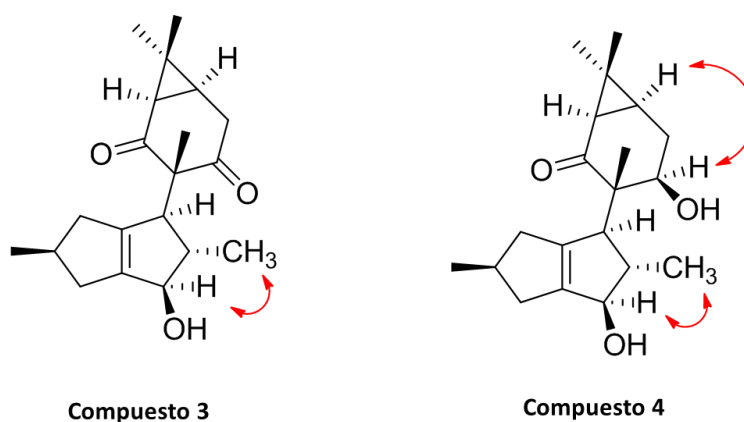


Figura 38. Representación del efecto NOE en los compuestos **3** y **4**

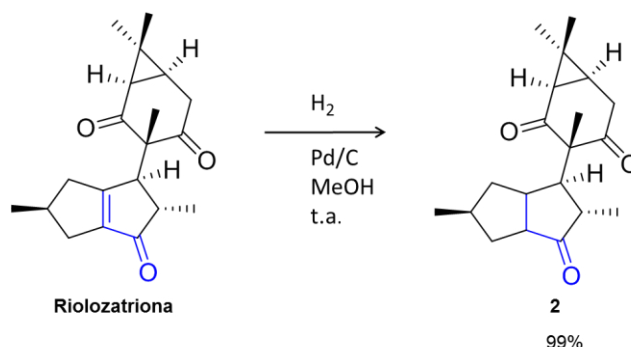
Con respecto a la determinación de la orientación de los hidroxilos en los compuestos **3** y **4**, se determinó que en ambos compuestos el hidroxilo del carbono 5 estaba hacia delante en el plano. En el caso del hidroxilo en C-14 del compuesto **4** este también está hacia delante en el plano (Figura 38).

Los resultados de estos experimentos también son importantes para tener una idea de por cuál cara de la molécula existe menos impedimento estérico.[30]

Debido a que en el compuesto mayoritario, el grupo hidroxilo de C-5 y de C-8 se encuentra hacia adelante en el plano, se puede suponer que por este lado es más fácil el ataque del NaBH_4 en la Rioloatriona. Por otro lado en el hidroxilo 14 no está muy claro porque lado esta menos impedida la molécula debido a que en el compuesto mayoritario este se encuentra orientado hacia atrás, pero en los compuestos **3** y **4** se encuentra hacia adelante en el plano.

3. Transformación del sistema de la cetona α,β insaturada.

La reducción del doble enlace se realizó mediante una hidrogenación asistida por paladio (Pd/C) en etanol a temperatura ambiente,[22] obteniéndose el derivado **6** en rendimiento cuantitativo (Ecuación 3).



Ecuación 3. Resultado de la hidrogenación asistida por paladio (Pd/C)

Elucidación estructural del compuesto **6**

Se realizó el espectro de ^1H -RMN en donde se puede apreciar la aparición de dos señales multipletes de hidrógeno a 2.58 ppm y a 2.51 ppm que

corresponden a los hidrógenos de los carbonos que antes formaban el doble enlace.

En el espectro de ^{13}C -RMN del compuesto **6** se observan 3 señales de C en la zona de los carbonilos, como en la Rioloatriona. Además no se observan señales en la zona donde aparecen las señales de los carbonos sp^2 . Con estos datos se asegura que el derivado **6** es el producto de la reducción del doble enlace de la Rioloatriona.

Mediante los experimentos DEPT-90 y 135, HSQC, HMBC y COSY-HH se asignaron inequívocamente las señales de hidrógeno y carbono. La estructura química del derivado **6** es la que se presenta en la figura 31.

Citotoxicidad y actividad antiherpética

Como una forma de evaluar como afectaban los cambios estructurales hechos en la Rioloatriona en la actividad biológica, a los compuestos obtenidos se les determinó la citotoxicidad en células Vero mediante el ensayo de Mosmman modificado y la actividad antiherpética mediante el ensayo de reducción de placas virales también en células Vero.

Como se muestra en la tabla **4**, se obtuvieron los resultados de citotoxicidad de los compuestos **1**, **2**, **3**, **4** y **6**. Se obtuvo en muy poca cantidad el compuesto **5**, y por esta razón no se pudo evaluar su actividad antiherpética y citotóxica. Por otro lado se determinó la actividad antiviral *in vitro* contra VHS-1 de los compuestos **1**, **2**, **3** y **6** (Tabla 5). Del compuesto **4** no se logró determinar la

actividad antiherpética debido a la poca cantidad que se forma en la reacción de este compuesto.

En cuanto a la primera transformación química, se observó que la introducción del grupo metoxilo en C-15, junto con la desaparición del anillo de dimetilciclopropano provocó una disminución de la citotoxicidad (figura 38).

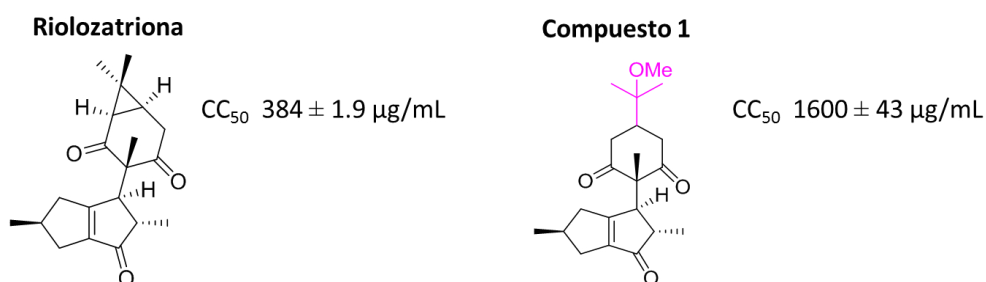


Figura 38. Comparación de los datos de citotoxicidad del compuesto **1** y la Riolozatriona

Por otro lado, la actividad antiherpética del compuesto **1** fue de $147 \mu\text{g/mL}$ dando como resultado un índice de selectividad mayor a 10, este índice es mayor que el de la Riolozatriona por lo cual se definió que este cambio en la molécula afectó la actividad antiherpética de forma positiva.

En cuanto a los derivados obtenidos a través de la reducción con NaBH_4 se observó en general que todos resultaron ser menos tóxicos que la Riolozatriona (Figura 39). Además, aparentemente la reducción de los carbonilos 14 y 5 disminuyó más aún la citotoxicidad. Sin embargo, al parecer la presencia del grupo hidroxilo en el carbono 8 aumenta la citotoxicidad en el compuesto **2** con respecto a los compuestos **3** y **4**.

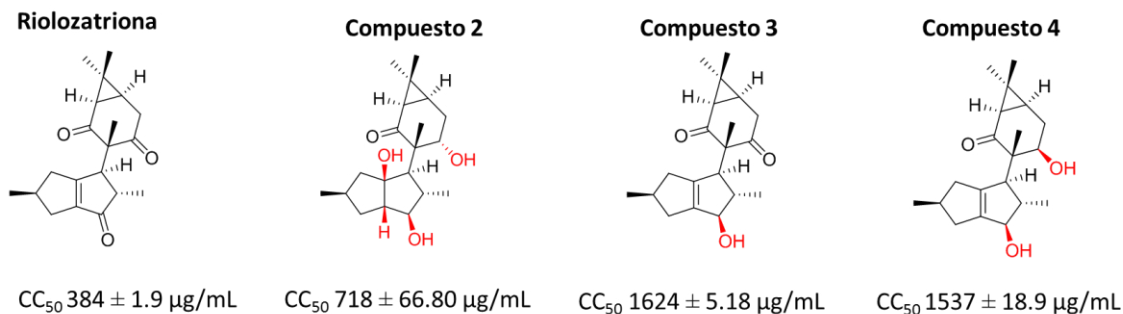


Figura 39. Comparación de los datos de citotoxicidad de los compuesto **2**, **3**, **4** y la Riolozatriona.

Respecto a la actividad antiherpética del compuesto **2** esta fue mayor a 500 µg/mL, con un índice de selectividad de 1.4 este es menor que el de la Riolozatriona (IS= 5.8), por lo que se determinó que la reducción de los hidroxilos 14 y 5 y la adición del hidroxilo en el carbono 8 afectan de forma negativa la actividad biológica de la molécula.

Con respecto a la actividad antiherpética in vitro del compuesto **3**, esta fue de 222 µg/mL, con un índice de selectividad de 7.32. Este es mayor que en la Riolozatriona, por lo cual se puede decir que la reducción del carbonilo 5 en la molécula afecta de forma positiva la actividad biológica.

Los datos de citotoxicidad (102 µg/mL) y actividad antiherpética (23.65 µg/mL) del compuesto **6** fueron muy cercanos al de la Riolozatriona dando como

resultado un índice de selectividad de 4.3. Aunque este índice es muy cercano es importante mencionar que este derivado fue más citotóxico (CC_{50} :102 $\mu\text{g}/\text{mL}$) que la Riolozatriona y en los otros derivados.

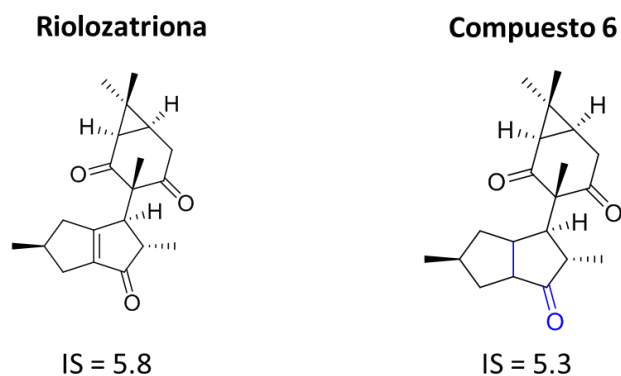


Figura 40. Comparación del índice de selectividad del compuesto 6 y la Riolozatriona.

Este es el primer reporte de transformación química de un terpenoide con esqueleto de tipo riolozano y de obtención de derivados con este mismo tipo de esqueleto. El comportamiento químico de la Riolozatriona se apejó casi en su totalidad a los reportes encontrados de transformaciones químicas hechas a compuestos con grupos funcionales similares. Resulta interesante que las actividades biológicas obtenidas para los diferentes derivados obtenidos, son contrarias a lo esperado de acuerdo a datos de actividad biológica obtenida en transformaciones químicas similares a compuestos naturales con grupos funcionales del mismo tipo. Por ejemplo, se esperaba que la presencia del dimetil-ciclopropano en la Riolozatriona resultara imprescindible para su

actividad biológica, sin embargo, el derivado **1** resultó con un mejor valor de IS, aunque el valor de CI_{50} obtenido sea mayor que en la Rioloatriona. Por otro lado, se esperaba que la presencia del doble enlace en la Rioloatriona fuera importante para su actividad biológica, sin embargo, se observó que el compuesto **6** tuvo un menor valor de IC_{50} , aunque también resultó con mayor citotoxicidad que la Rioloatriona.

Resultará interesante realizar otras transformaciones químicas con el uso de otros nucleófilos y también de electrófilos.

El presente trabajo representa un paso inicial para un estudio completo de relación cuantitativa de estructura-actividad (por sus siglas en inglés QSAR) de la Rioloatriona y de diterpenos de tipo riolozano que en un futuro se puedan obtener.

CAPITULO 5

CONCLUSIONES

- Se obtuvieron seis derivados a partir del diterpeno Rioloatriona.
- Se transformó selectivamente los grupos funcionales orgánicos más importantes en la estructura de la Rioloatriona.
- La reducción con borohidruro de sodio condujo a la formación de varios compuestos reducidos, evidenciando que la cetona conjugada es más electrofílica hacia el ataque nucleofílico de los hidruros en comparación con las cetonas de la 1,3-ciclohexadiona.
- Se determinó la citotoxicidad de cinco derivados y solo uno de éstos resultó con mayor citotoxicidad.
- Se determinó el índice de selectividad en base a la actividad antiherpética de cuatro derivados, de los cuales dos resultaron con índice de selectividad mayor a la Rioloatriona, aunque solo uno presentó un menor valor de CI_{50} con respecto a la Rioloatriona.

PERSPECTIVAS

- Probar otras transformaciones en la Rioloatriona como adiciones a la cetona α,β insaturada o reacciones con reactivos electrófilos.
- Mejorar la selectividad de la reacción de reducción con NaBH_4 .
- Ampliar la información acerca de la relación estructura-actividad de la Rioloatriona.

CAPITULO 7

BIBLIOGRAFÍA

- [1] C. Johnston, M. Saracino, S. Kuntz, A. Magaret, S. Selke, M. Huang, J. Schiffer, L. Koelle, D., Corey, and A. Wald, “Standard-dose and high-dose daily antiviral therapy for short episodes of genital HSV-2 reactivation: three randomised, open-label, cross-over trials,” *Lancet*, pp. 641–647, 2012.
- [2] E. Anzivino, D. Fioriti, M. Mischitelli, A. Bellizzi, V. Barucca, F. Chiarini, and V. Pietropaolo, “Herpes simplex virus infection in pregnancy and in neonate: status of art of epidemiology, diagnosis, therapy and prevention,” *Viol. J.*, vol. 6, no. 1, p. 40, 2009.
- [3] R. J. Whitley, D. W. Kimberlin, B. Roizman, R. J. Whitley, and D. W. Kimberlin, “Herpes Simplex Virus,” *Oxford Journals*, vol. 26, no. 3, pp. 541–553, 2012.
- [4] “OMS | Virus del herpes simple.”
- [5] R. F. Itzhaki, “Herpes simplex virus type 1 and Alzheimer disease: increasing evidence for a major role of the virus,” *Front. Aging Neurosci.*, vol. 6, no. August, pp. 1–9, 2014.

- [6] A. Hussin, N. S. Md Nor, and N. Ibrahim, "Phenotypic and genotypic characterization of induced acyclovir-resistant clinical isolates of herpes simplex virus type 1," *Antiviral Res.*, vol. 100, no. 2, pp. 306–313, 2013.
- [7] G. M. Cragg and D. J. Newman, "Natural products: A continuing source of novel drug leads," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1830, no. 6, pp. 3670–3695, 2013.
- [8] P. Dewick, *Medicinal Natural Products a Biosynthetic Approach.*, 3rd .Ed. United Kingdom: John Wiley & Sons, LTD, 2009.
- [9] M. B. Ares and I. G. Collado, "Biologically active diterpenes containing a gem - dimethylcyclopropane subunit : an intriguing source of PKC modulators †," *R. Soc. Chem.*, pp. 940–952, 2014.
- [10] "BIBLIOTECA" [Online]. Available: [http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Jatropha dioica&id=7483](http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Jatropha%20dioica&id=7483). [Accessed: 06-Nov-2015].
- [11] J. E. Wong-Paz, J. C. Contreras-Esquivel, R. Rodríguez-Herrera, M. L. Carrillo-Inungaray, L. I. López, G. V. Nevárez-Moorillón, and C. N. Aguilar, "Total phenolic content, in vitro antioxidant activity and chemical composition of plant extracts from semiarid Mexican region," *Asian Pac. J. Trop. Med.*, vol. 8, no. 2, pp. 104–111, 2015.
- [12] Y. Silva-Belmares, C. Rivas-Morales, E. Viveros-Valdez, M. G. de la Cruz-Galicia, and P. Carranza-Rosales, "Antimicrobial and Cytotoxic Activities from *Jatropha dioica* Roots.," *Pakistan J. Biol. Sci.*, vol. 17, pp. 748–750,

2013.

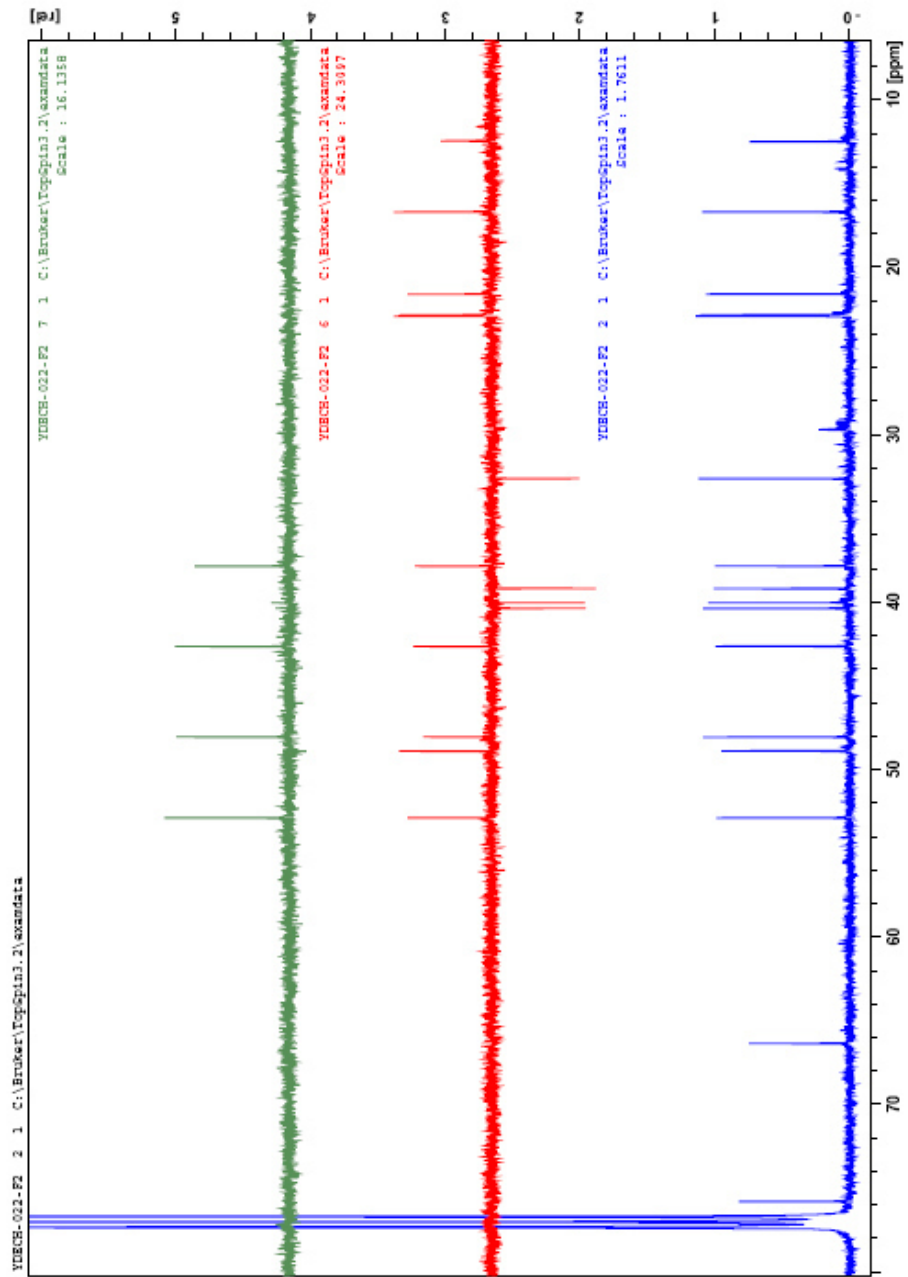
- [13] B. a. Alanís-Garza, G. M. González-González, R. Salazar-Aranda, N. Waksman de Torres, and V. M. Rivas-Galindo, "Screening of antifungal activity of plants from the northeast of Mexico," *J. Ethnopharmacol.*, vol. 114, no. 3, pp. 468–471, 2007.
- [14] D. Silva-Mares, E. Torres-López, A. M. Rivas-Estilla, P. Cordero-Pérez, N. Waksman-Minsky, and V. Rivas-Galindo, "Plants from Northeast Mexico with Anti-HSV Activity," *Nat. Prod. Commun.*, vol. 8, no. Table 2, pp. 9–12, 2013.
- [15] X. . Dominguez, G. Cano, F. R, V. A.M, W. H. Watson, and Z. V, "Riolozatrione, a new class of diterpene from *Jatropha dioica* var. *sessiliflora*," *Phytochemistry*, no. 7651, p. 2478, 1980.
- [16] M. J. Durán-Peña, J. M. Botubol Ares, I. G. Collado, and R. Hernández-Galán, "Biologically active diterpenes containing a gem-dimethylcyclopropane subunit: an intriguing source of PKC modulators.," *Nat. Prod. Rep.*, vol. 31, no. 7, pp. 940–52, 2014.
- [17] M. J. Durán-Peña, J. M. Botubol Ares, J. R. Hanson, I. G. Collado, and R. Hernández-Galán, "Biological activity of natural sesquiterpenoids containing a gem-dimethylcyclopropane unit," *Nat. Prod. Rep.*, vol. 32, p. 1236, 2015.
- [18] M. Funakoshi-Tago, K. Nakamura, R. Tsuruya, M. Hatanaka, T. Mashino, Y. Sonoda, and T. Kasahara, "The fixed structure of Licochalcone A by

alpha, beta-unsaturated ketone is necessary for anti-inflammatory activity through the inhibition of NF-kappaB activation.," *Int. Immunopharmacol.*, vol. 10, no. 5, pp. 562–71, 2010.

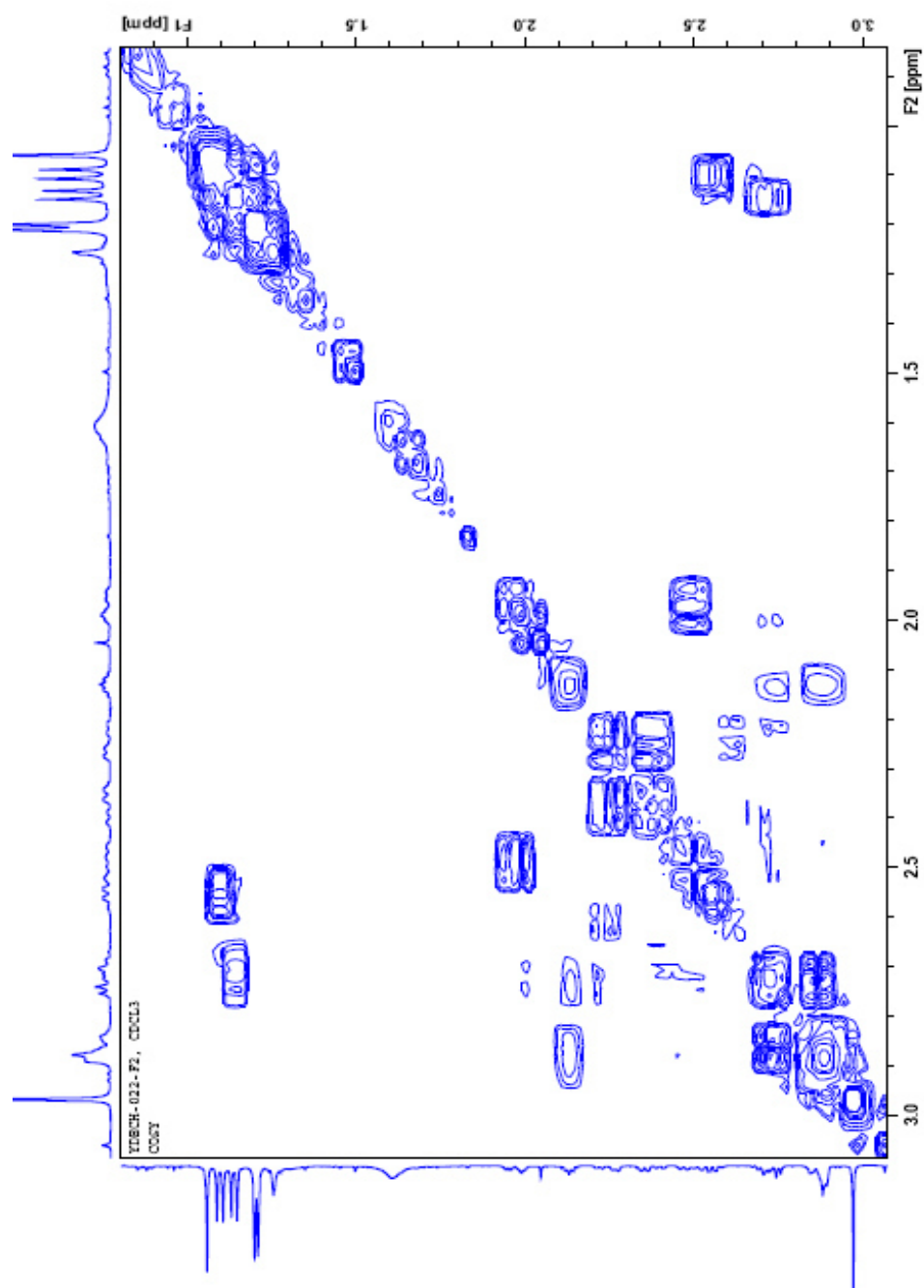
- [19] K. Nakano, T. Nakayachi, E. Yasumoto, S. R. M. D. Morshed, K. E. N. Hashimoto, H. Kikuchi, H. Nishikawa, K. Sugiyama, O. Amano, M. Kawase, and H. Sakagami, "Induction of Apoptosis by α,β -Diketones in Human Tumor Cells," *Anticancer Res.*, vol. 24, pp. 711–718, 2004.
- [20] A. Delgado Cirilo, C. Minguillón Llombart, and J. Joglar Tamargo, *Introducción a la Química Terapéutica*, 2da. Ed. Madrid: Diaz de Santos, 2003.
- [21] D. Newman, G. Cragg, and K. Snader, "Natural products as sources of new drugs over the period 1981– 2002," *J. Nat. Prod.*, vol. 66, pp. 1022–1037, 2003.
- [22] L. Augustine, D. C. Migliorini, E. R. Foscante, S. C. Sodano, and M. J. Sisbarro, "Catalytic Hydrogenation of α,β -Unsaturated Ketones. IV. The Effect of the Medium on Product Stereochemistry," vol. 34, no. 4, p. 1075, 1969.
- [23] D. E. Ward and J. Shen, "Enantioselective Total Synthesis of Cyanthin A3," *Org. Lett.*, vol. 9, no. 7, pp. 2843–2846, 2007.
- [24] B. M. Trost and I. Fleming, Eds., *Comprehensive Organic Synthesis, Selectivity. Strategy & Efficiency in Modern Organic Chemistry*, Volume 7. Elsevier, LTD, 1991.

- [25] M. T. Mariappan Periasamy, "Methods of enhancement of reactivity and selectivity of sodium borohydride for applications in organic synthesis," *J. Organomet. Chem.*, vol. 609, pp. 137–151, 2000.
- [26] G. Appendino, G. C. Tron, T. Jarevang, and O. Sterner, "Unnatural natural products from the transannular cyclization of lathyrane diterpenes," *Org. Lett.*, vol. 3, no. 11, pp. 1609–1612, 2001.
- [27] L. M. Yu, "Structure and reactivity of cyclopropane and its derivatives," *Russ. Chem. Rev.*, vol. 31, 1962.
- [28] H. Friebolin, *Basic One-and Two Dimensional NMR Spectroscopy*, Second. 1990.
- [29] D. E. Ward and C. K. Rhee, "Chemoselective reductions with sodium borohydride," *Can. J. Chem.*, vol. 67, no. 7, pp. 1206–1211, 1989.
- [30] F. A. R. J. S. Carey, *Advanced Organic Chemistry*. Springer US, 2007.

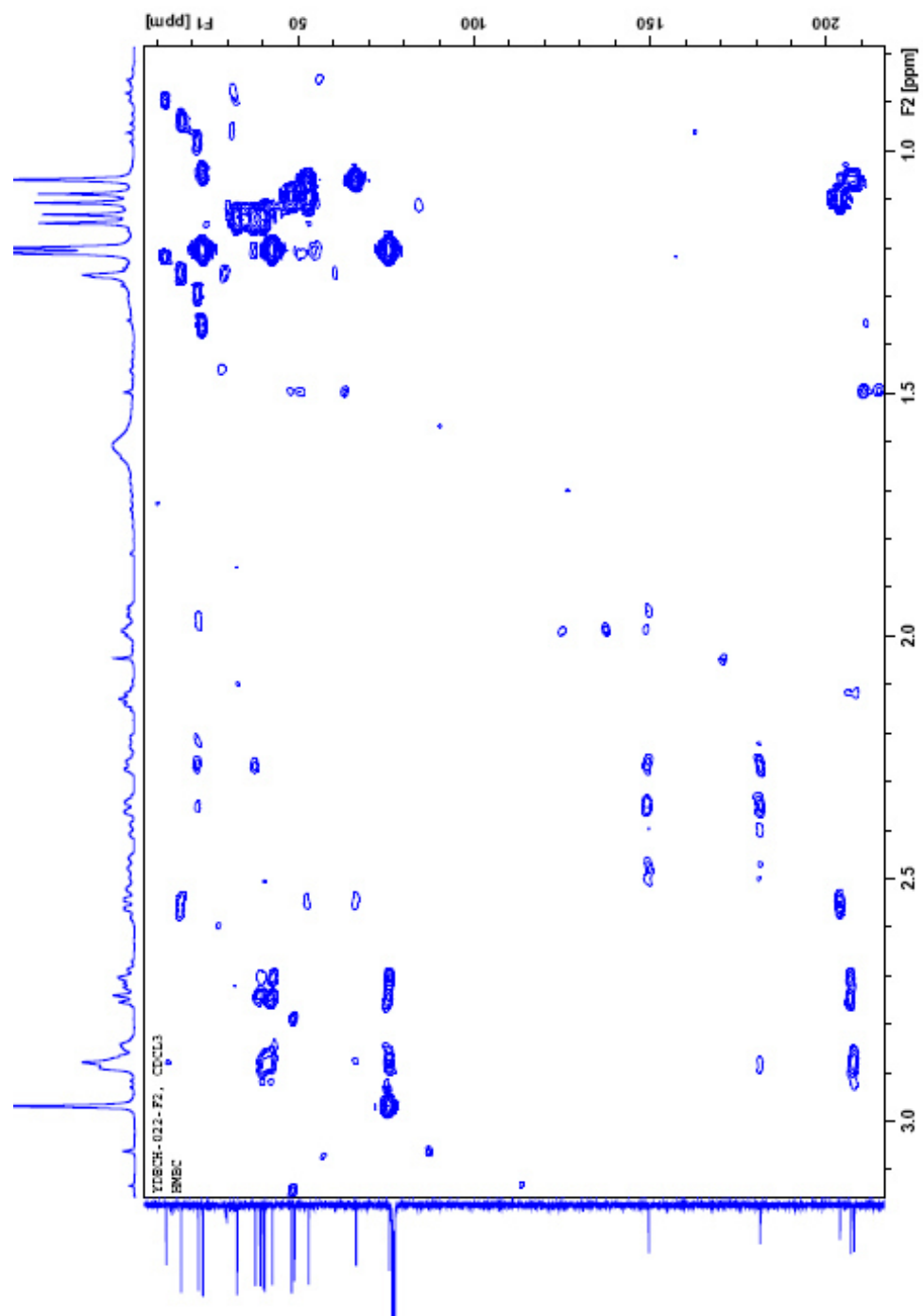
8. ANEXOS



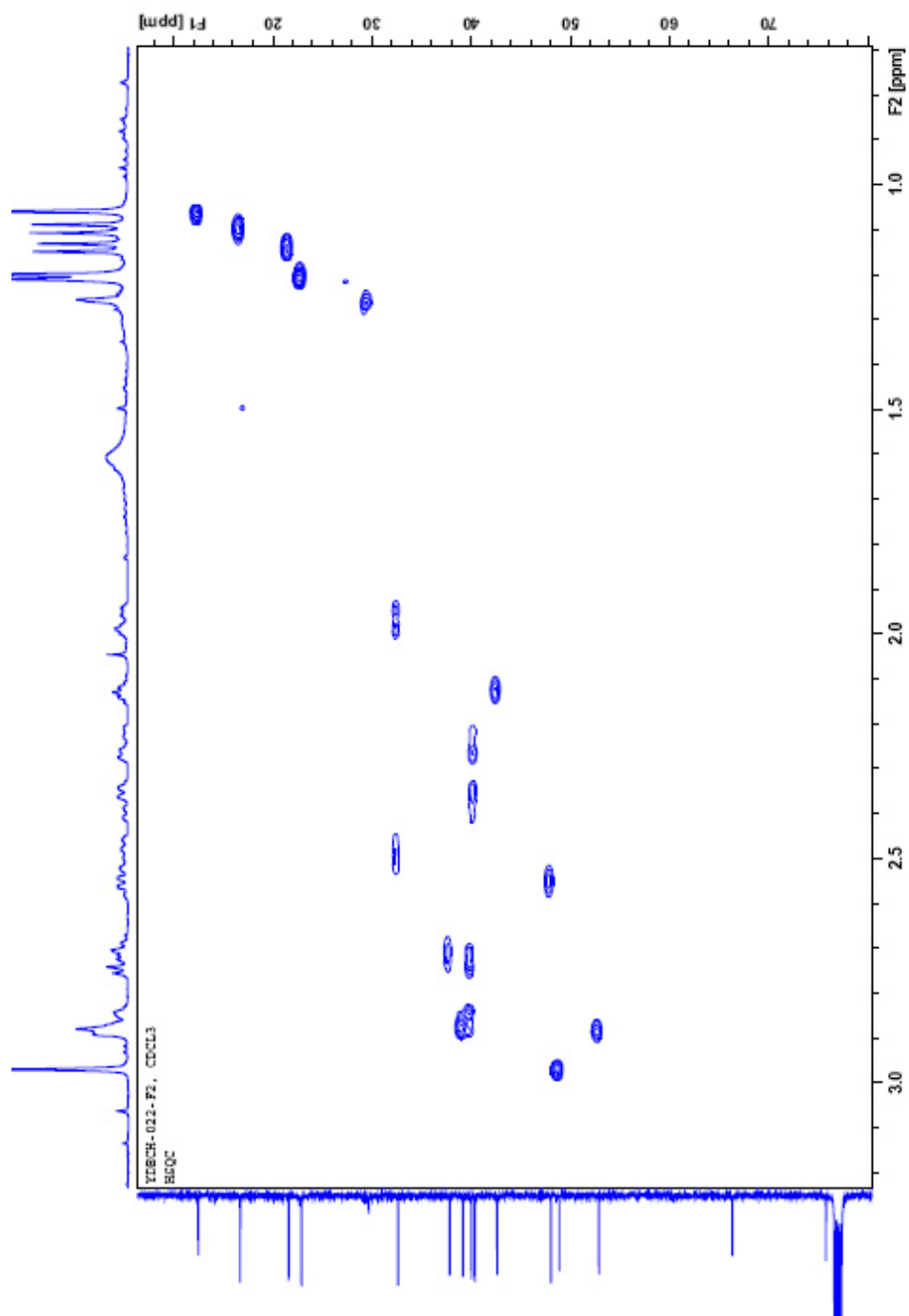
Anexo 1. Experimento DEPT-90 y DEPT-135 del compuesto 1



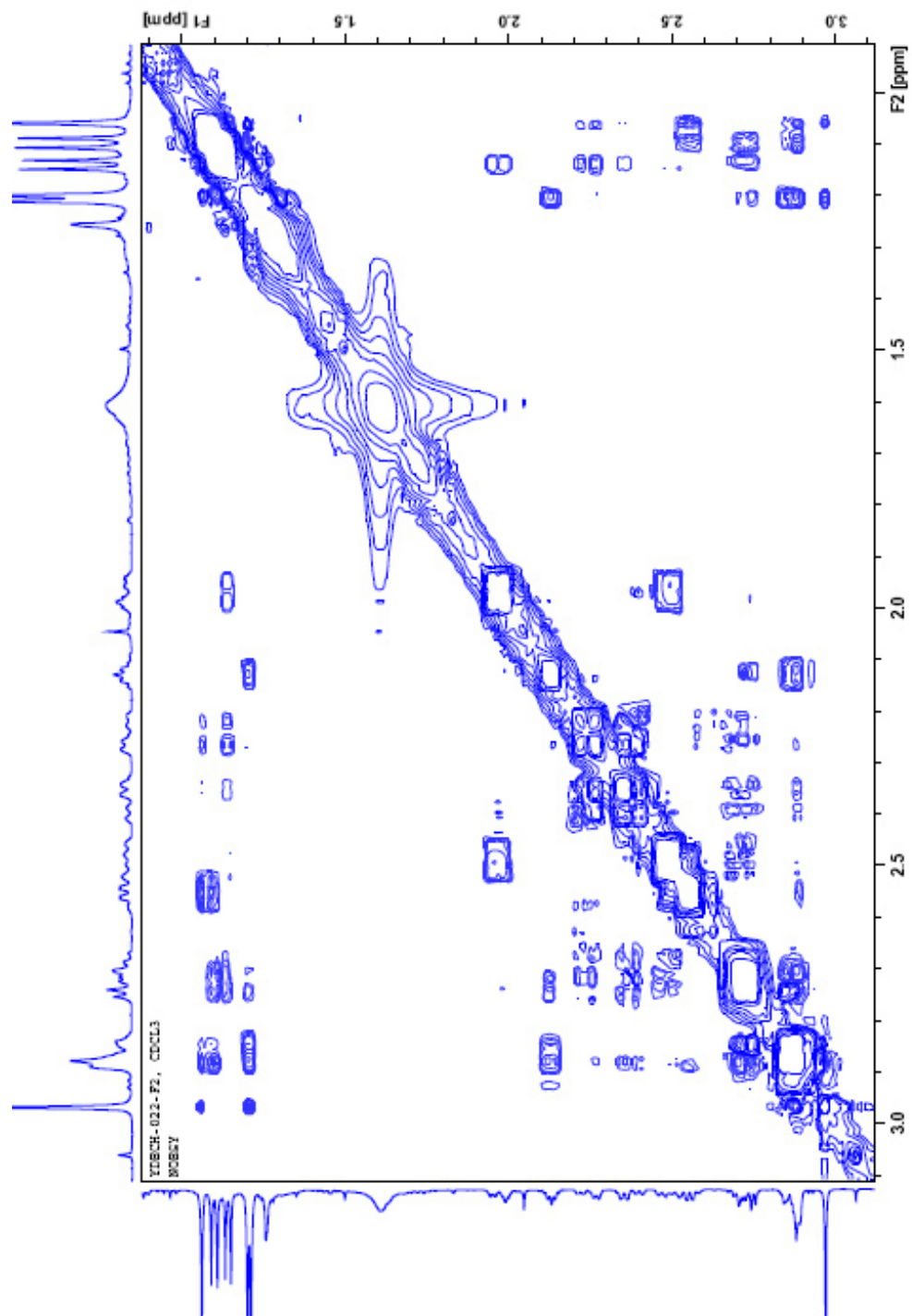
Anexo 2. Experimento H,H-COSY del compuesto 1



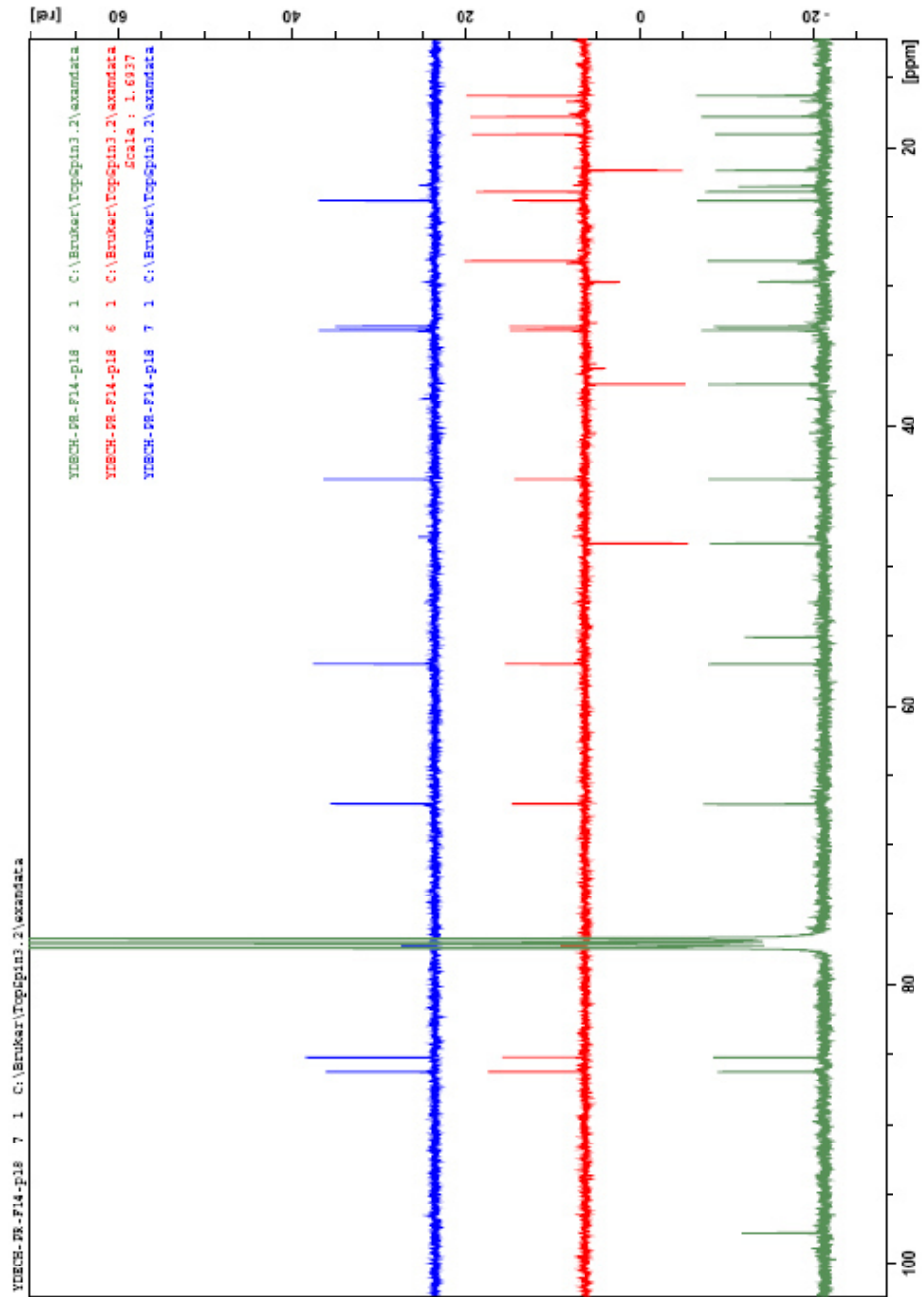
Anexo 3. Experimento HMBC del compuesto 1



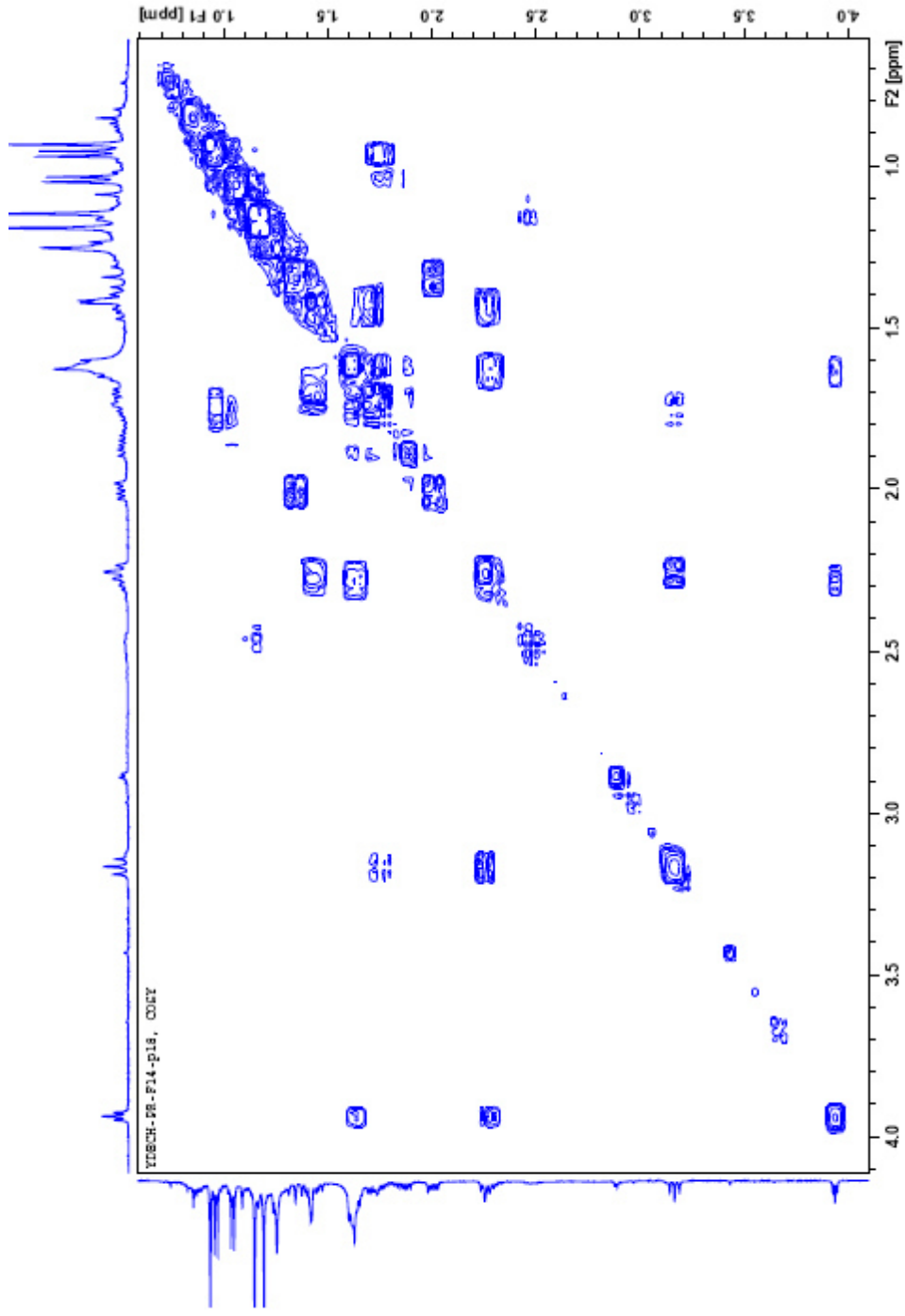
Anexo 4. Experimento HSQC del compuesto 1



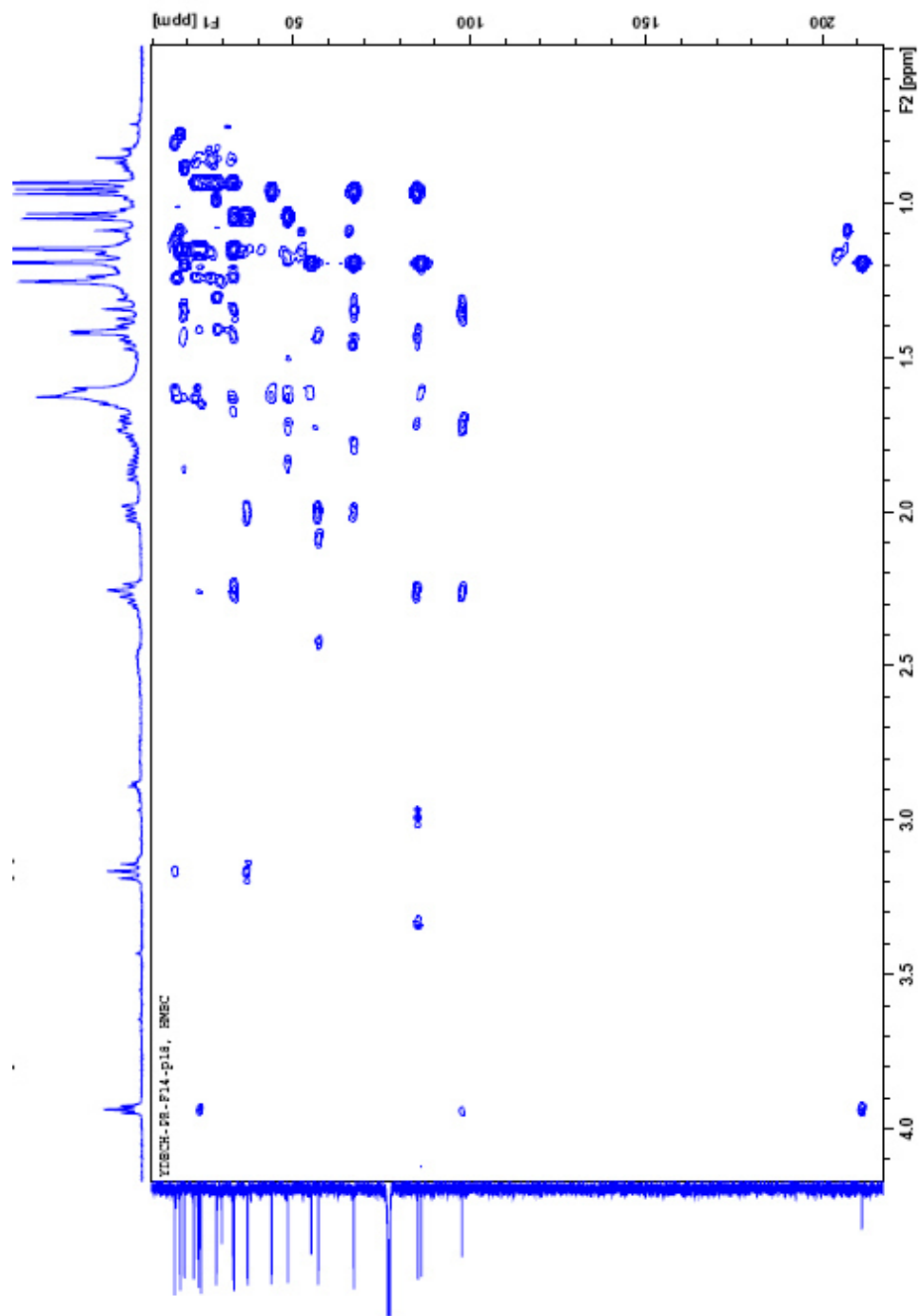
Anexo 5. Experimento NOESY del compuesto 1



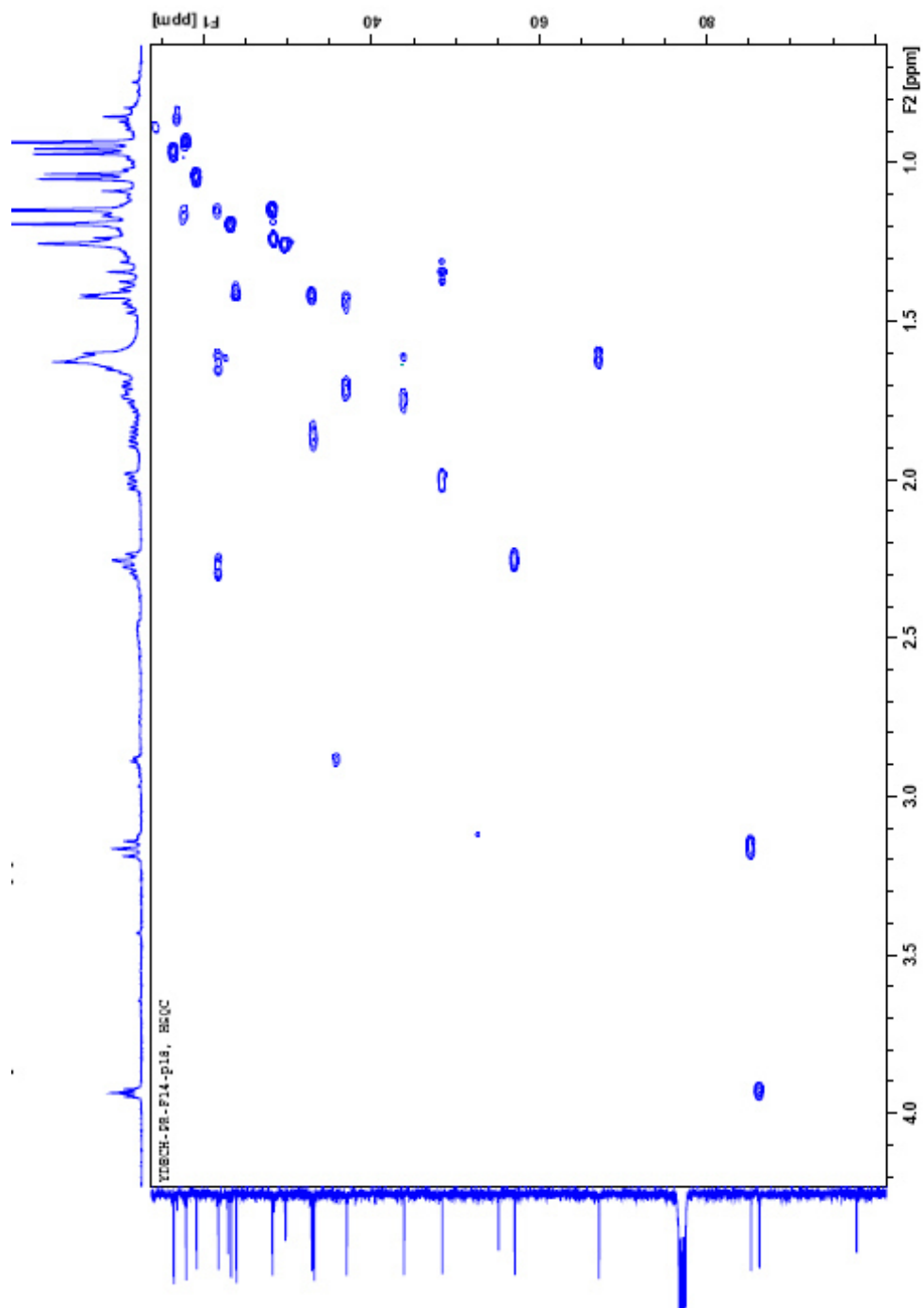
Anexo 6. Experimento DEPT 90 y 135 del compuesto 2



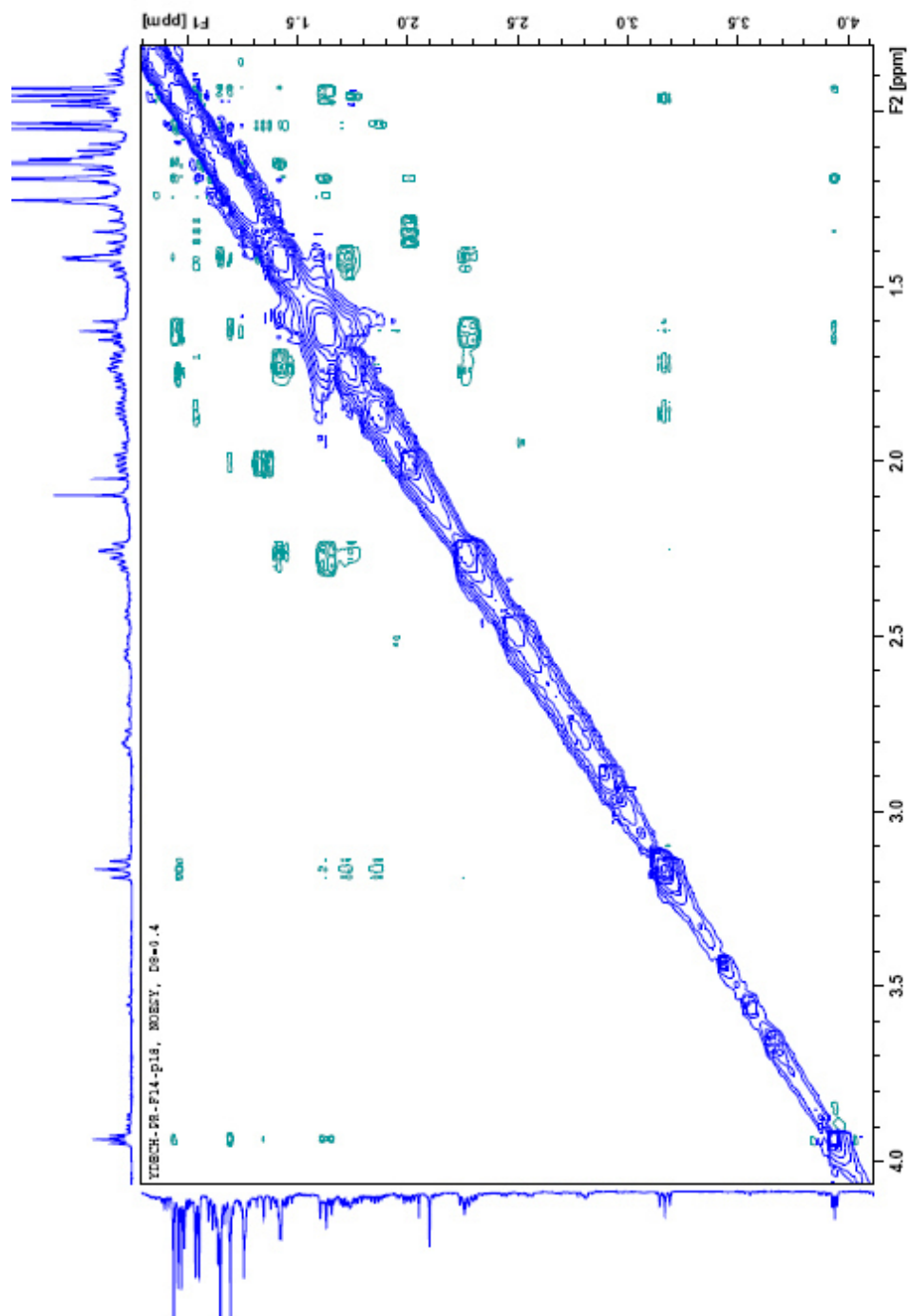
Anexo 7. Experimento H,H-COSY del compuesto 2



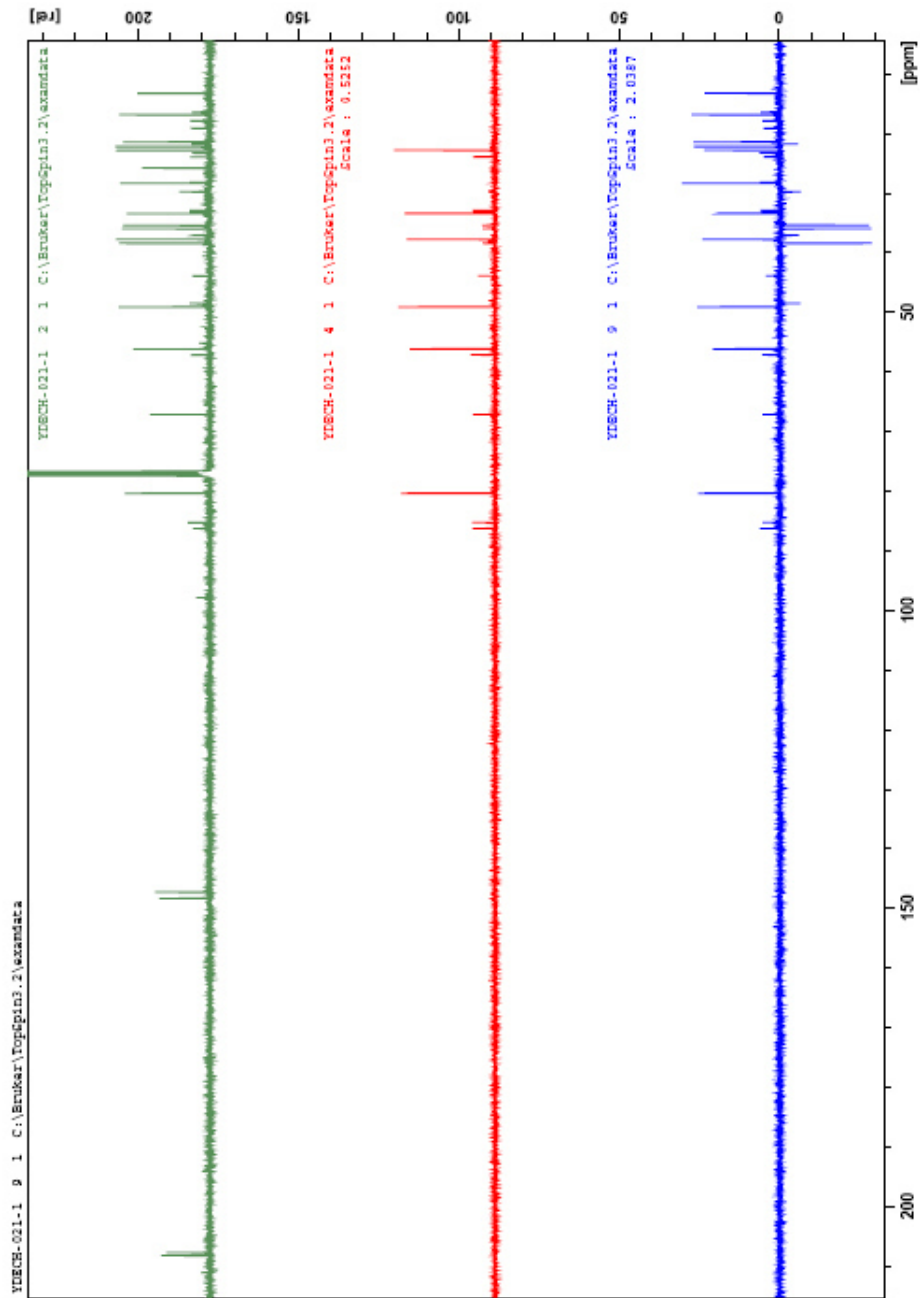
Anexo 8. Experimento HMBC del compuesto 2



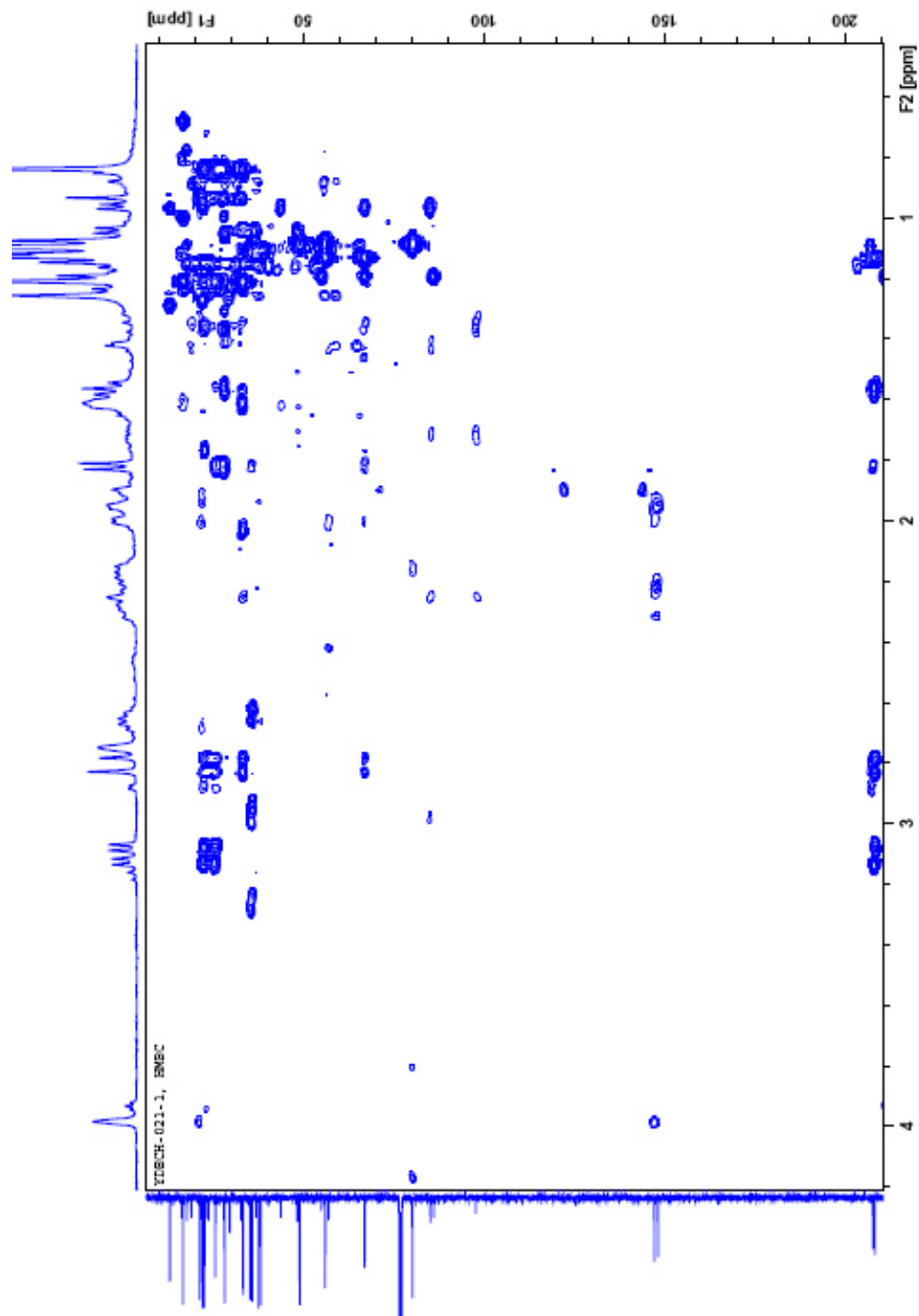
Anexo 9. Experimento HSQC del compuesto 2



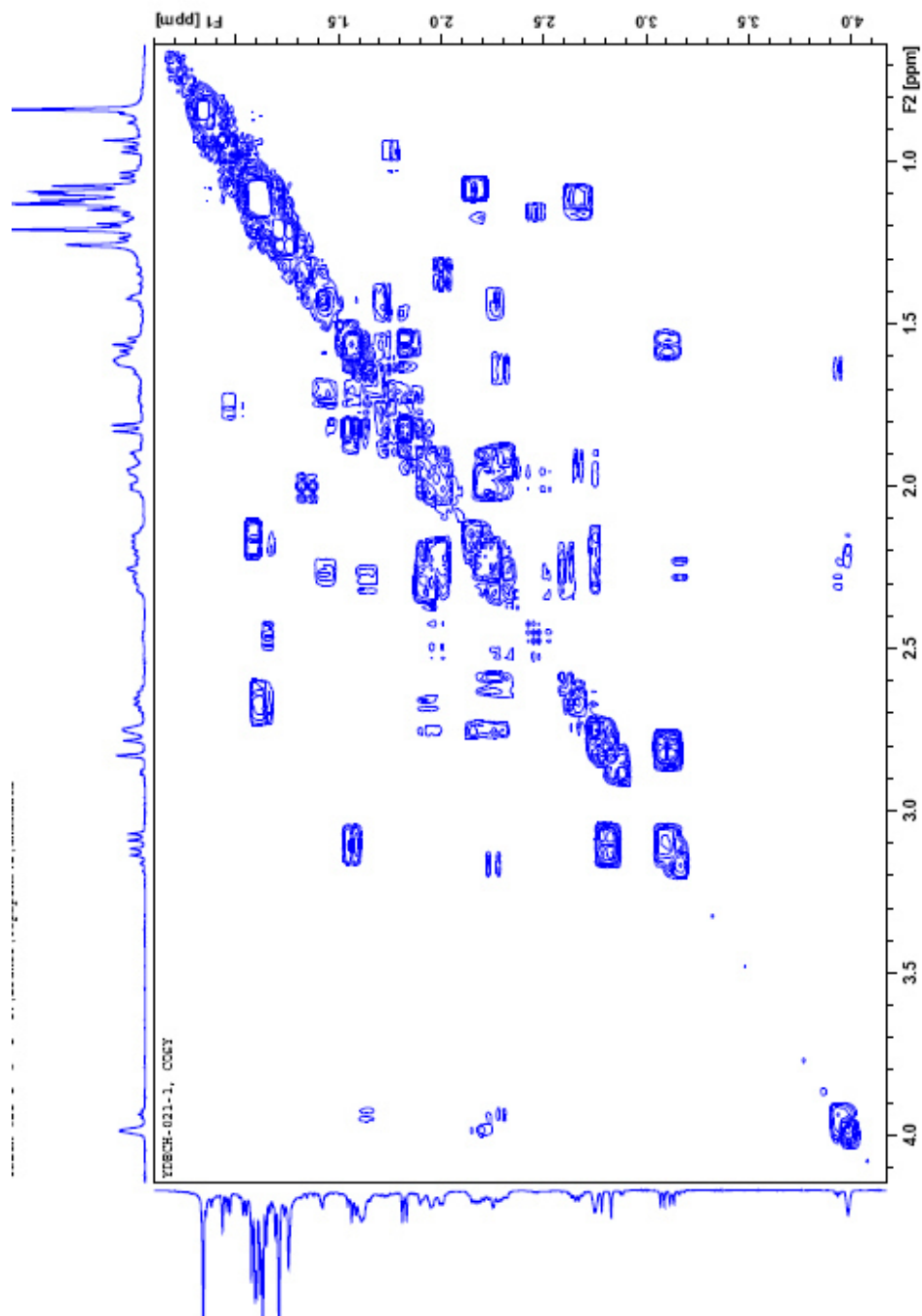
Anexo 10. Experimento NOESY del compuesto 2



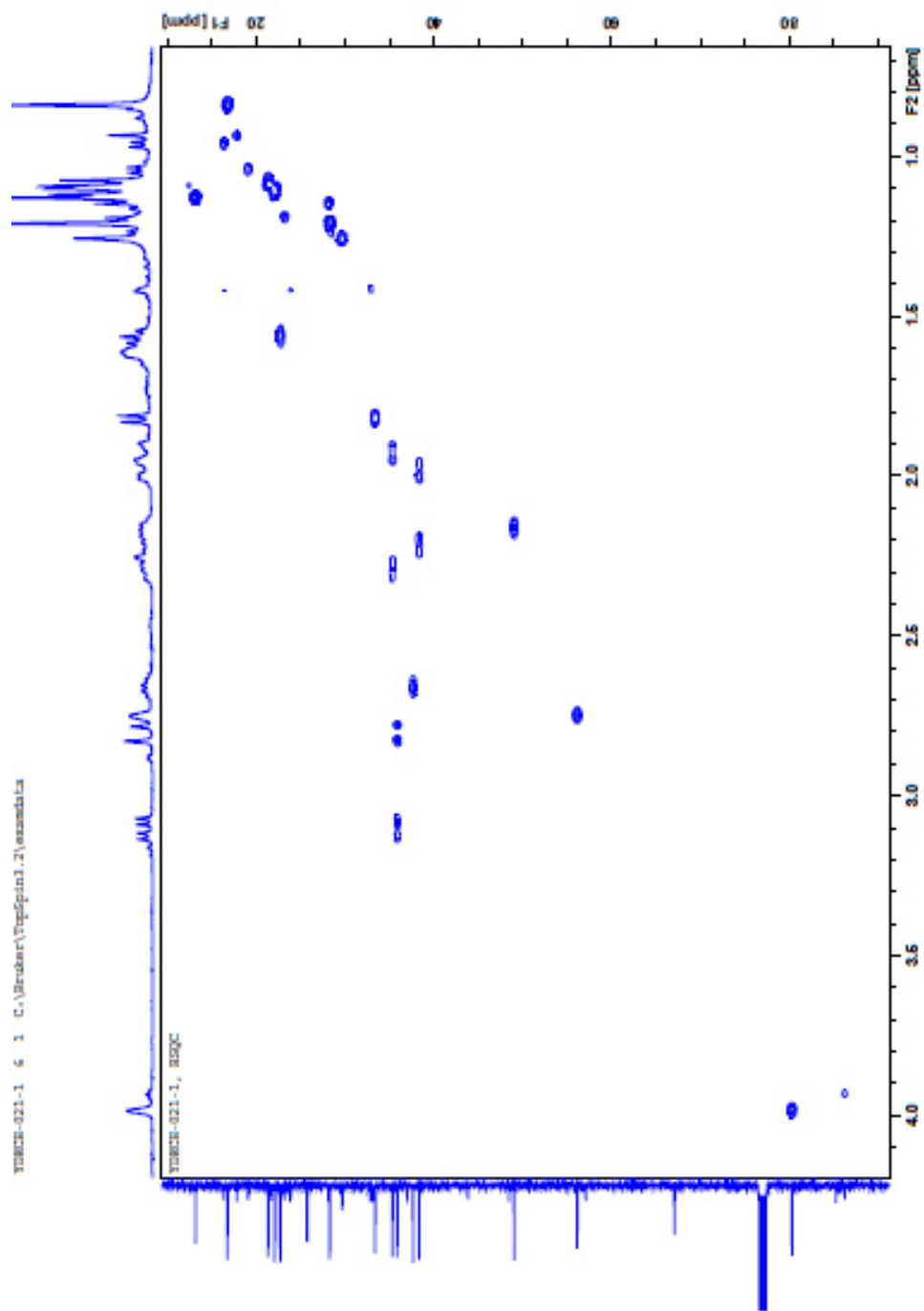
Anexo 11. Experimento DEPT 90 y 135 del compuesto 3



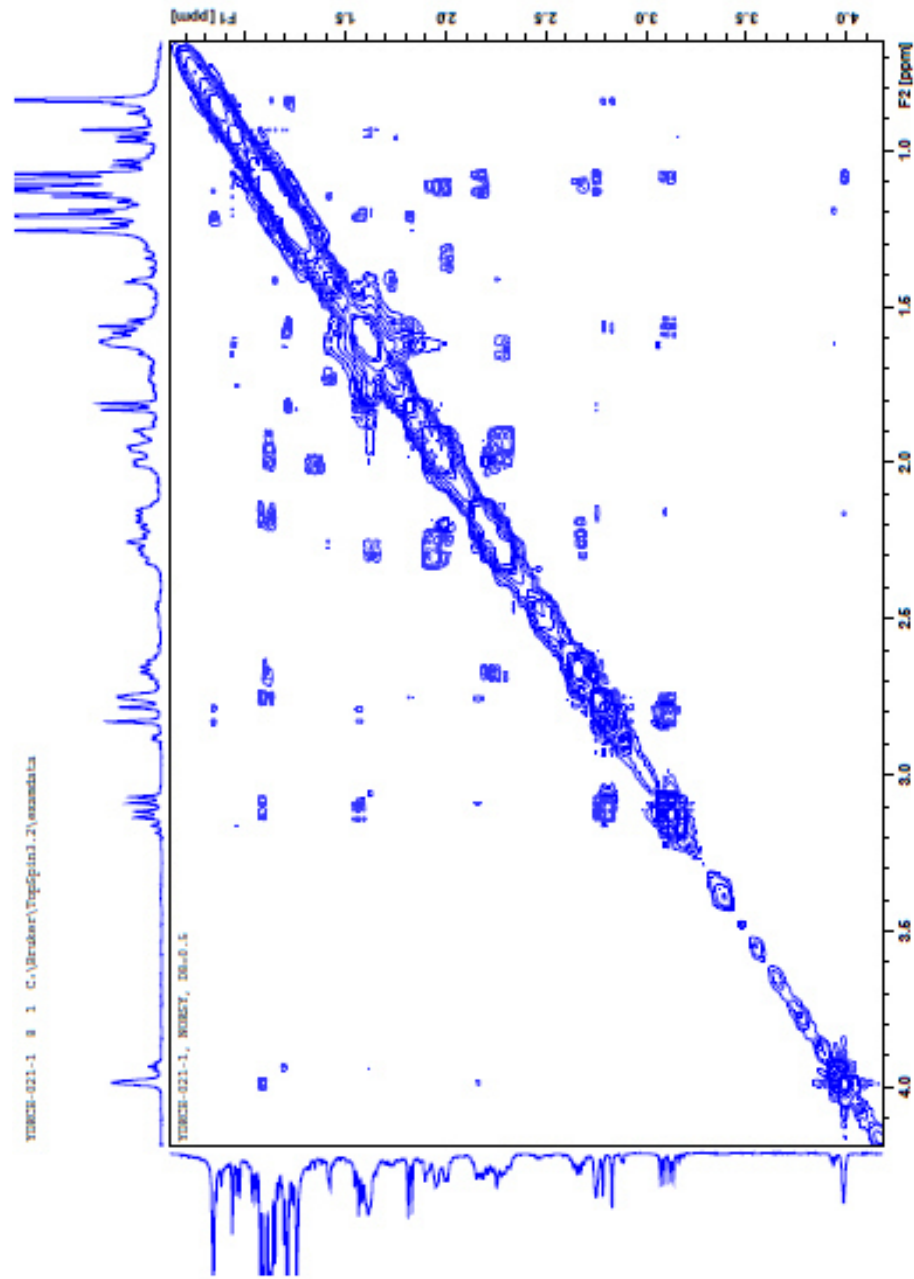
Anexo 12. Experimento HMBC del compuesto 3



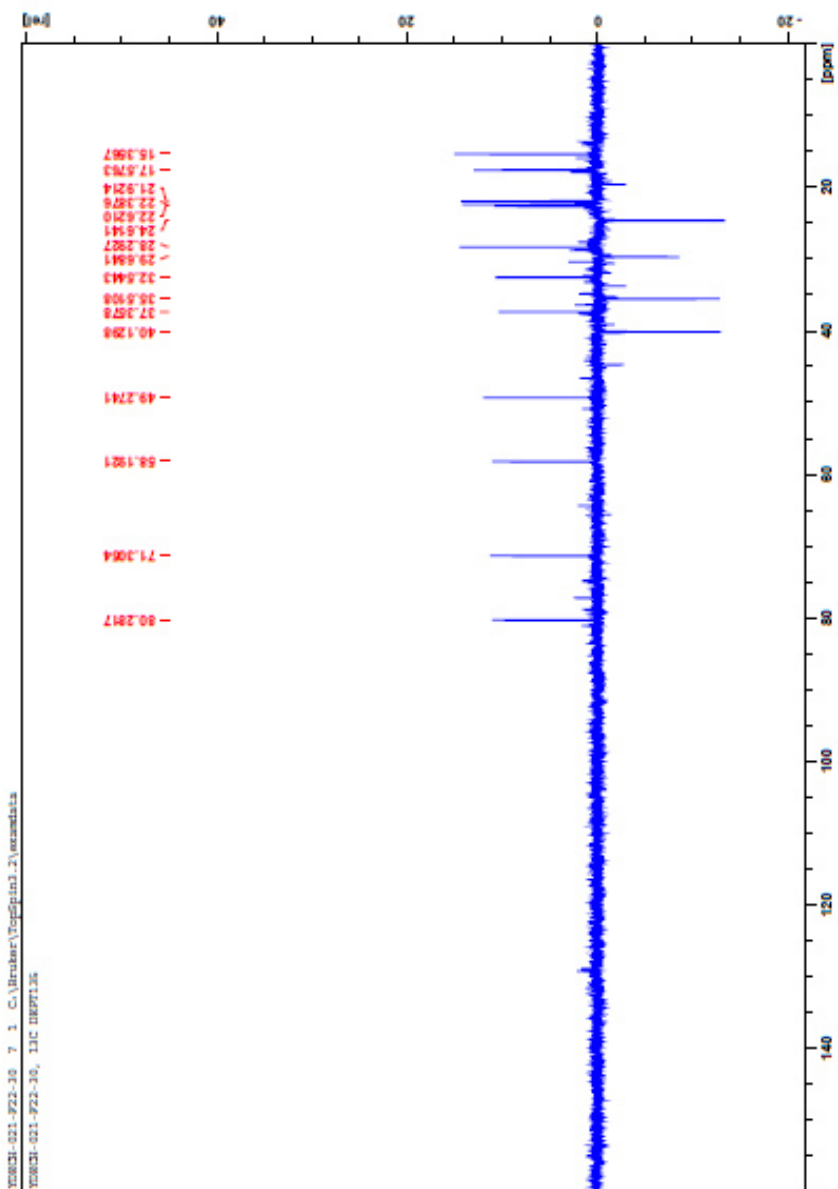
Anexo 13. Experimento H,H-COSY del compuesto 3

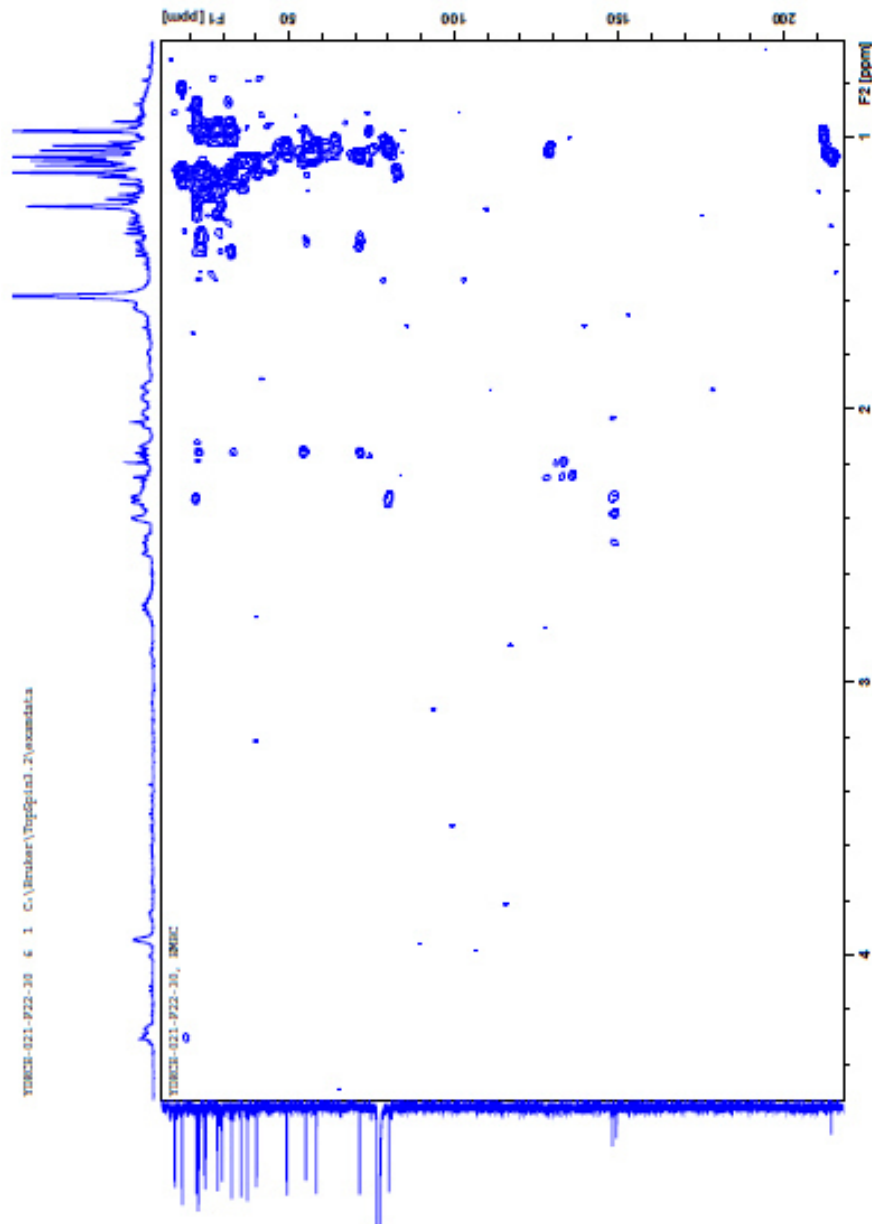


Anexo 14. Experimento HMQC del compuesto 3

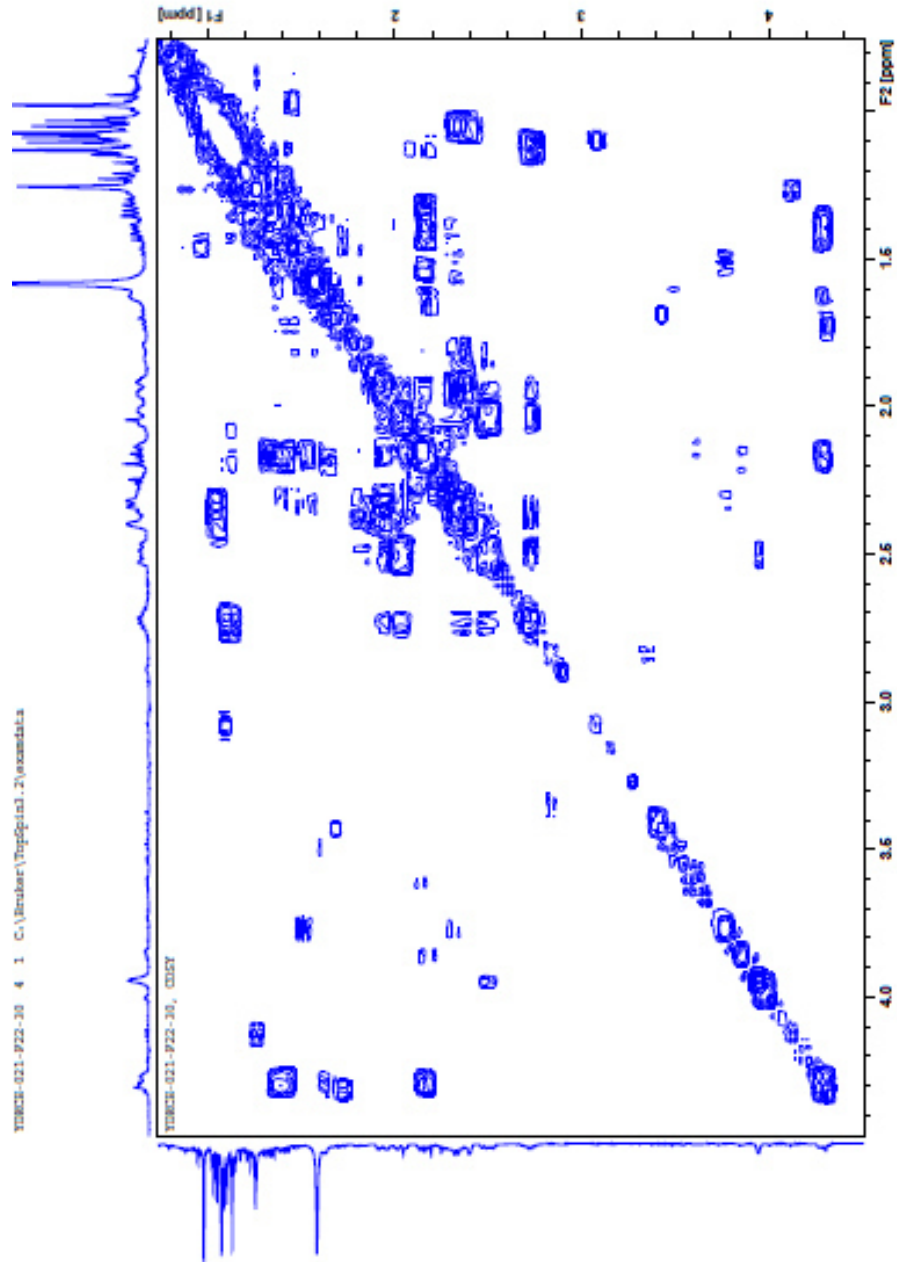


Anexo 15. Experimento NOESY del compuesto 3

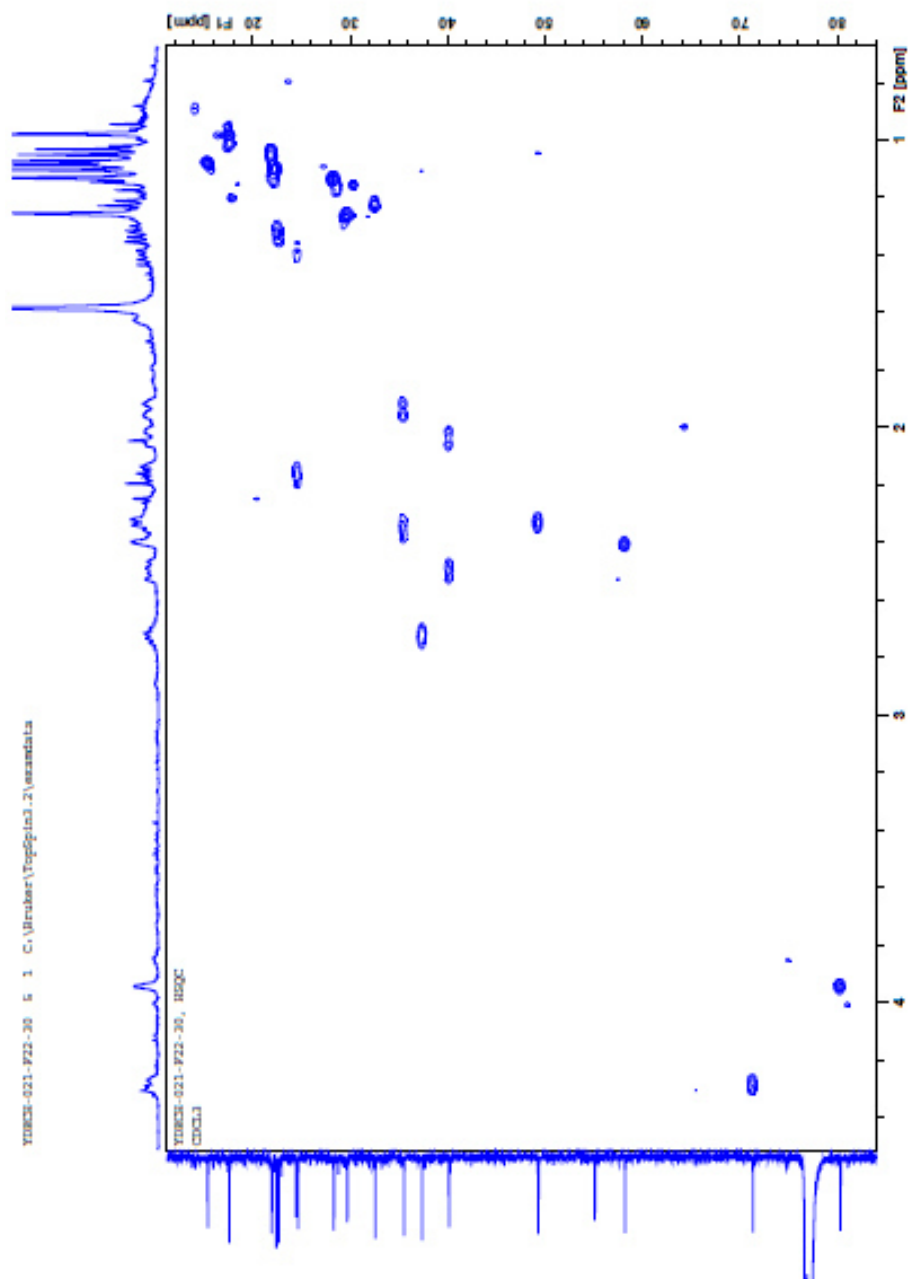
**Anexo 16.** Experimento DEPT 135 del compuesto 4

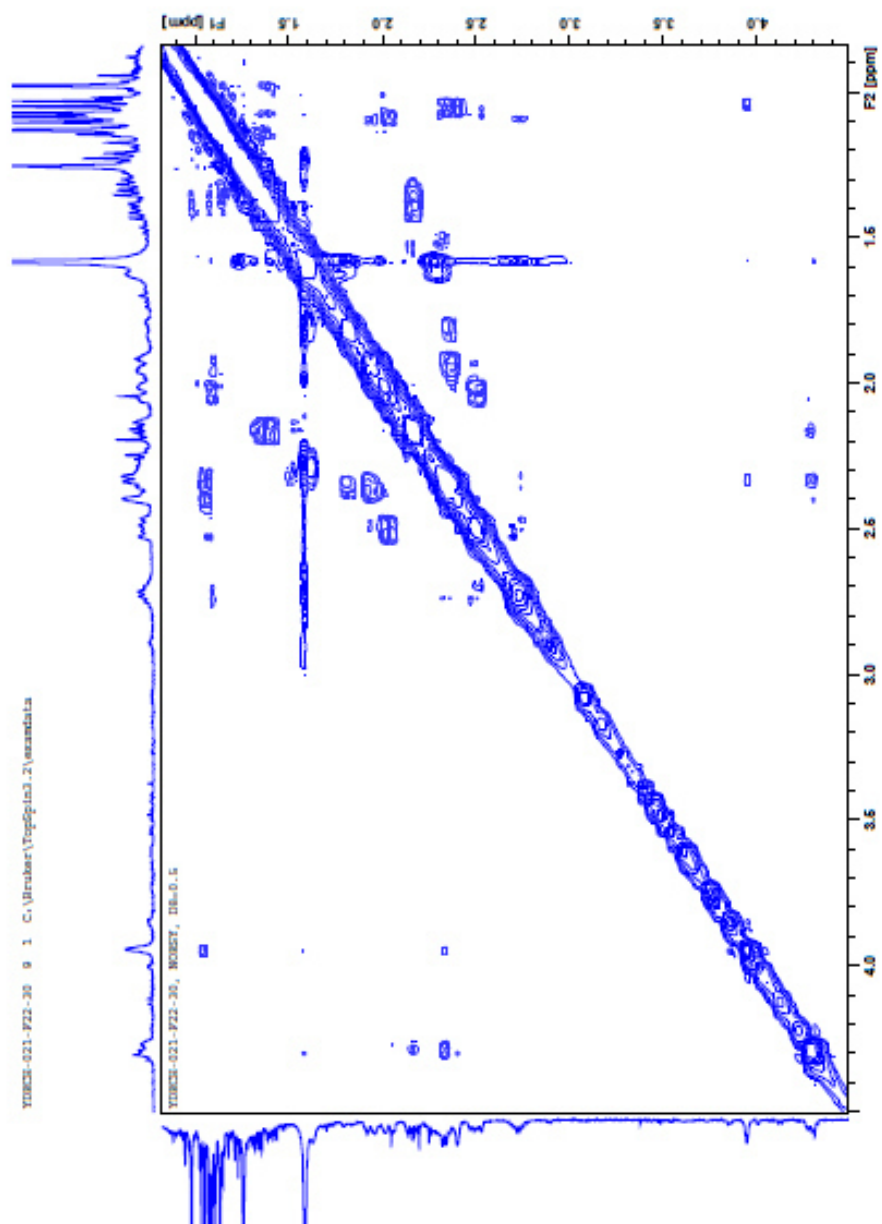


Anexo 17. Experimento HMBC del compuesto 4

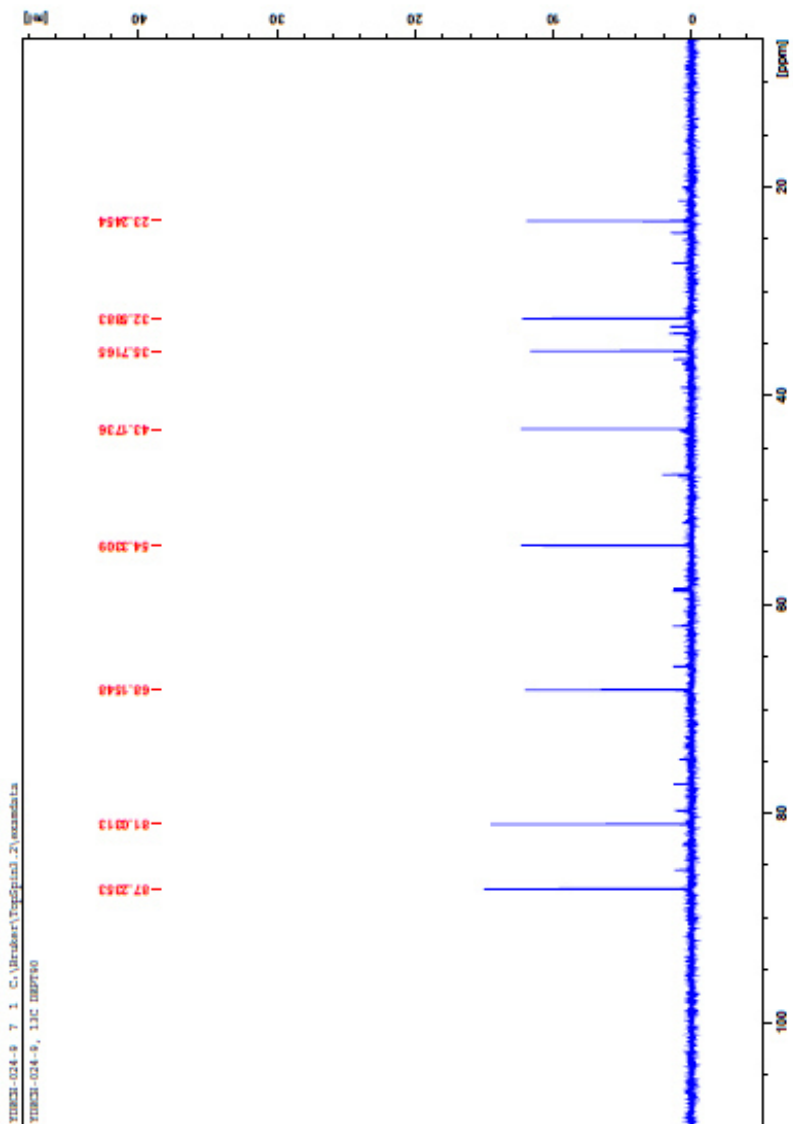


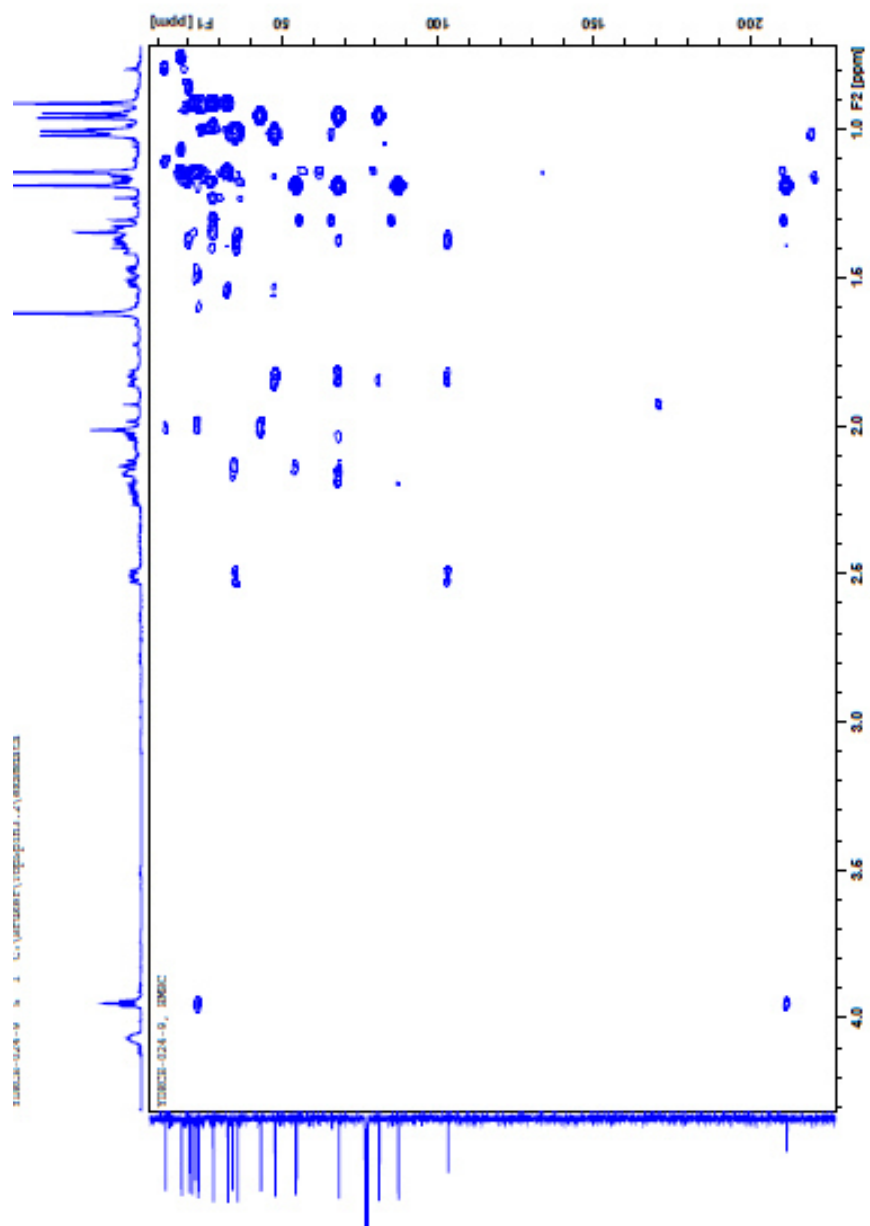
Anexo 18. Experimento H,H-COSY del compuesto 4

**Anexo 19.** Experimento HMQC del compuesto 4

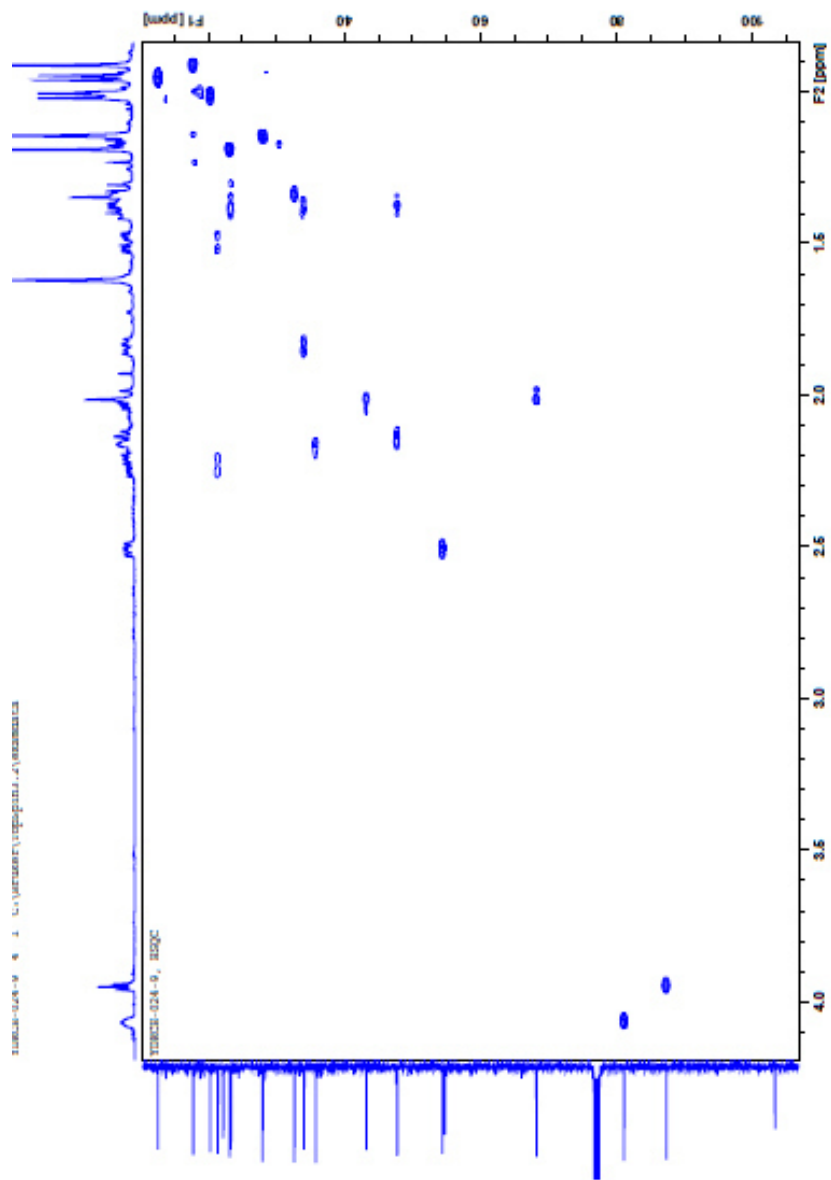


Anexo 20. Experimento NOESY del compuesto 4

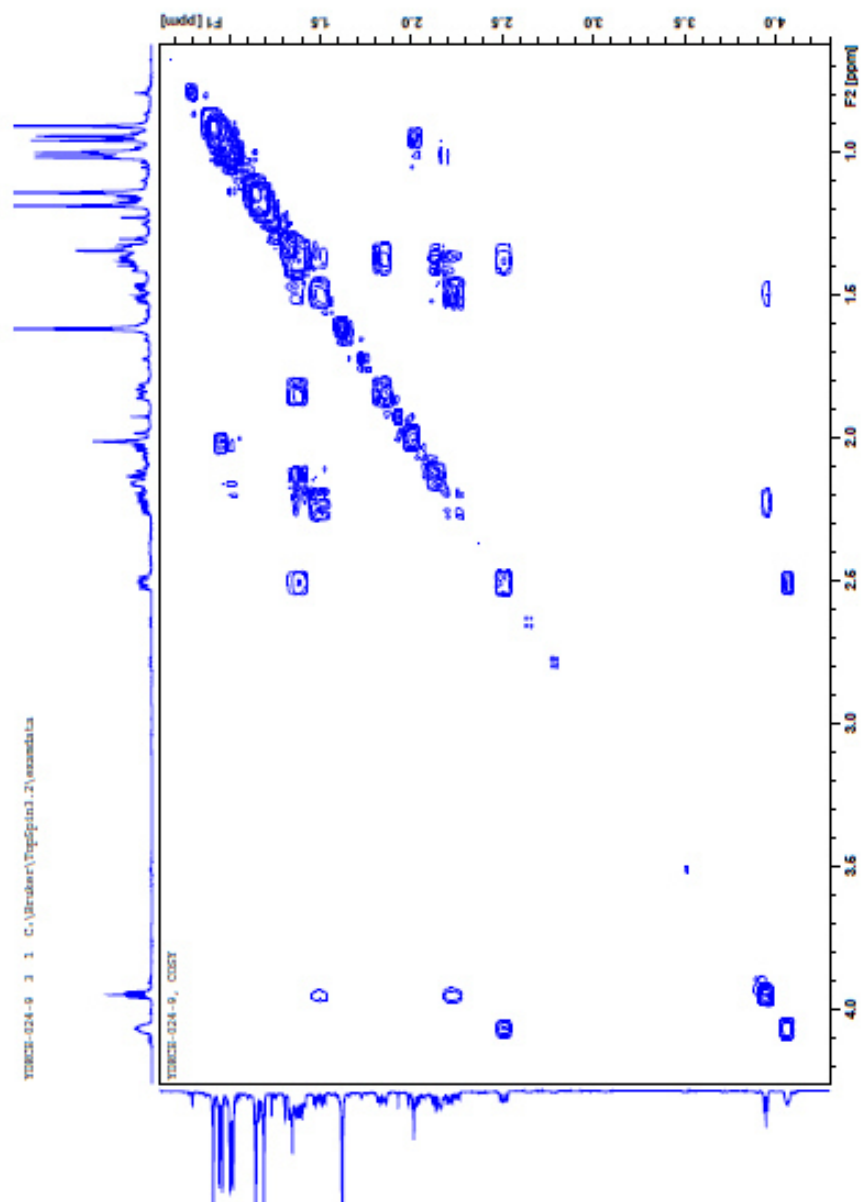
**Anexo 21.** Experimento DEPT 90 del compuesto 5



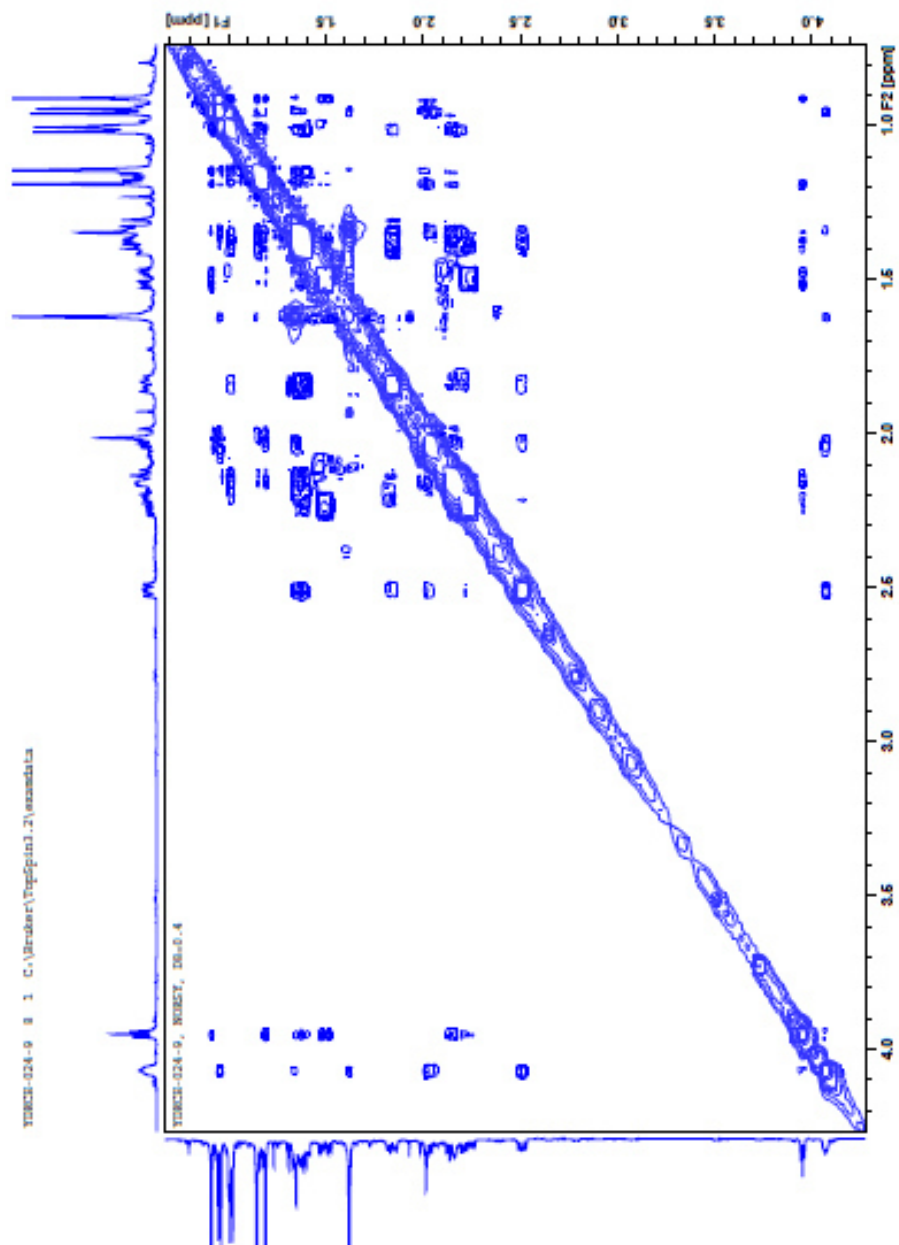
Anexo 22. Experimento HMBC del compuesto 5

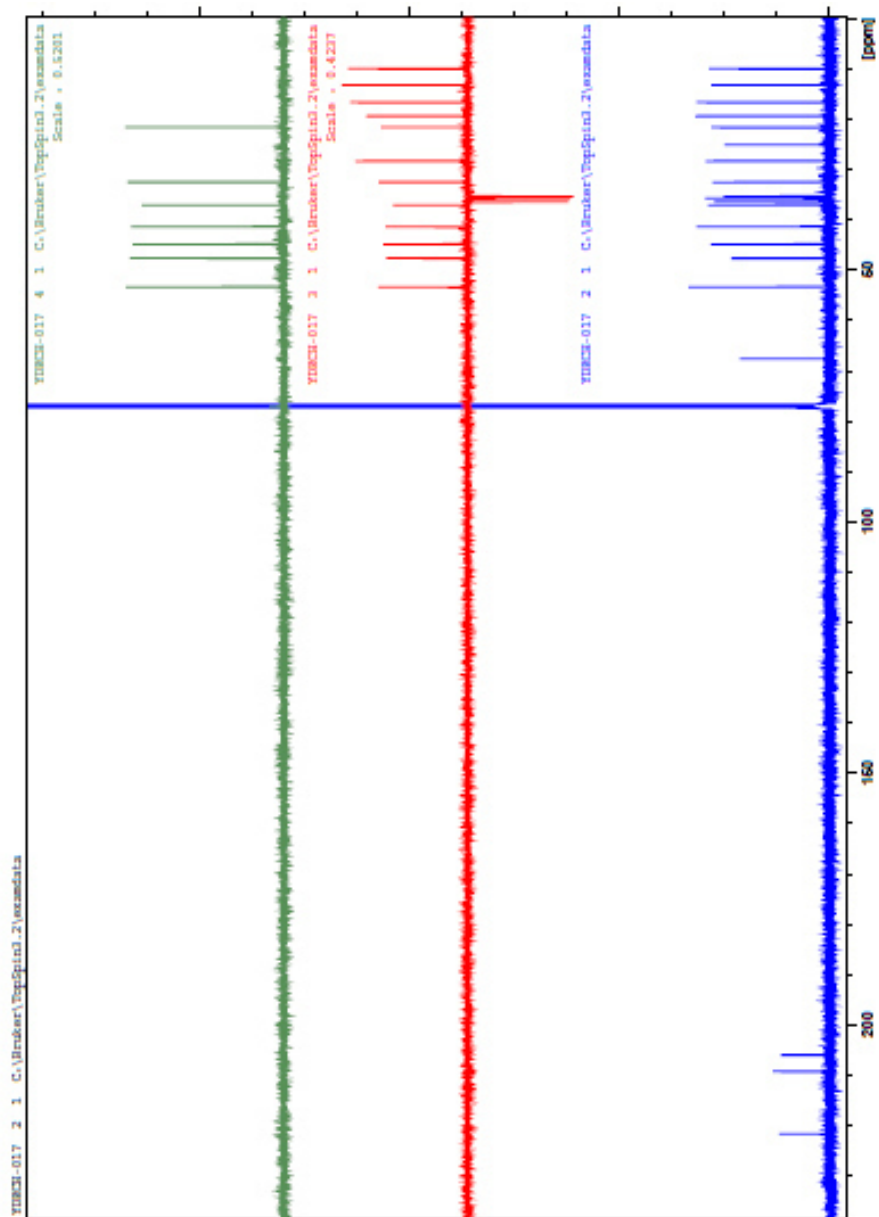


Anexo 23. Experimento HSQC del compuesto 5

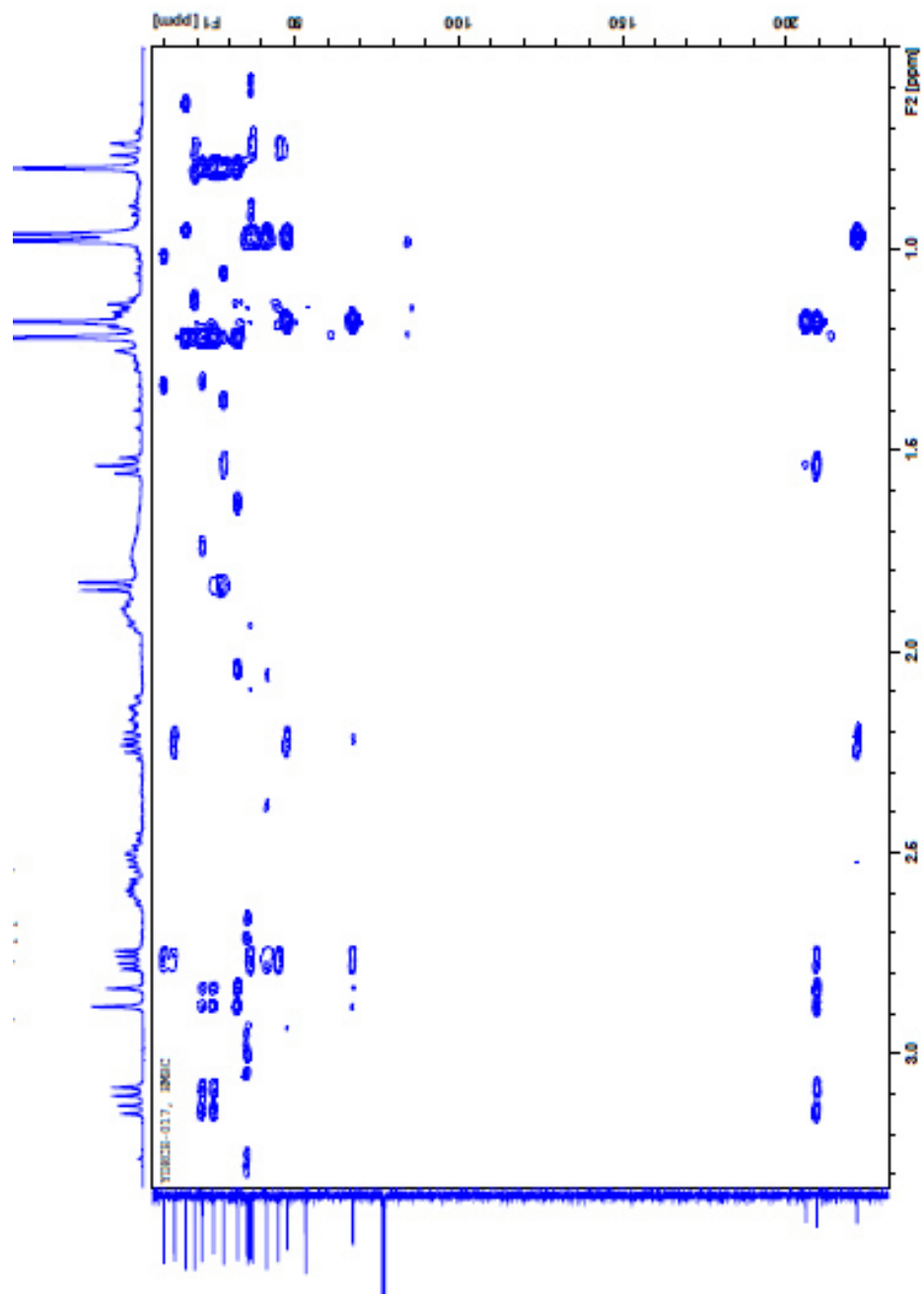


Anexo 24. Experimento H,H-COSY del compuesto 5

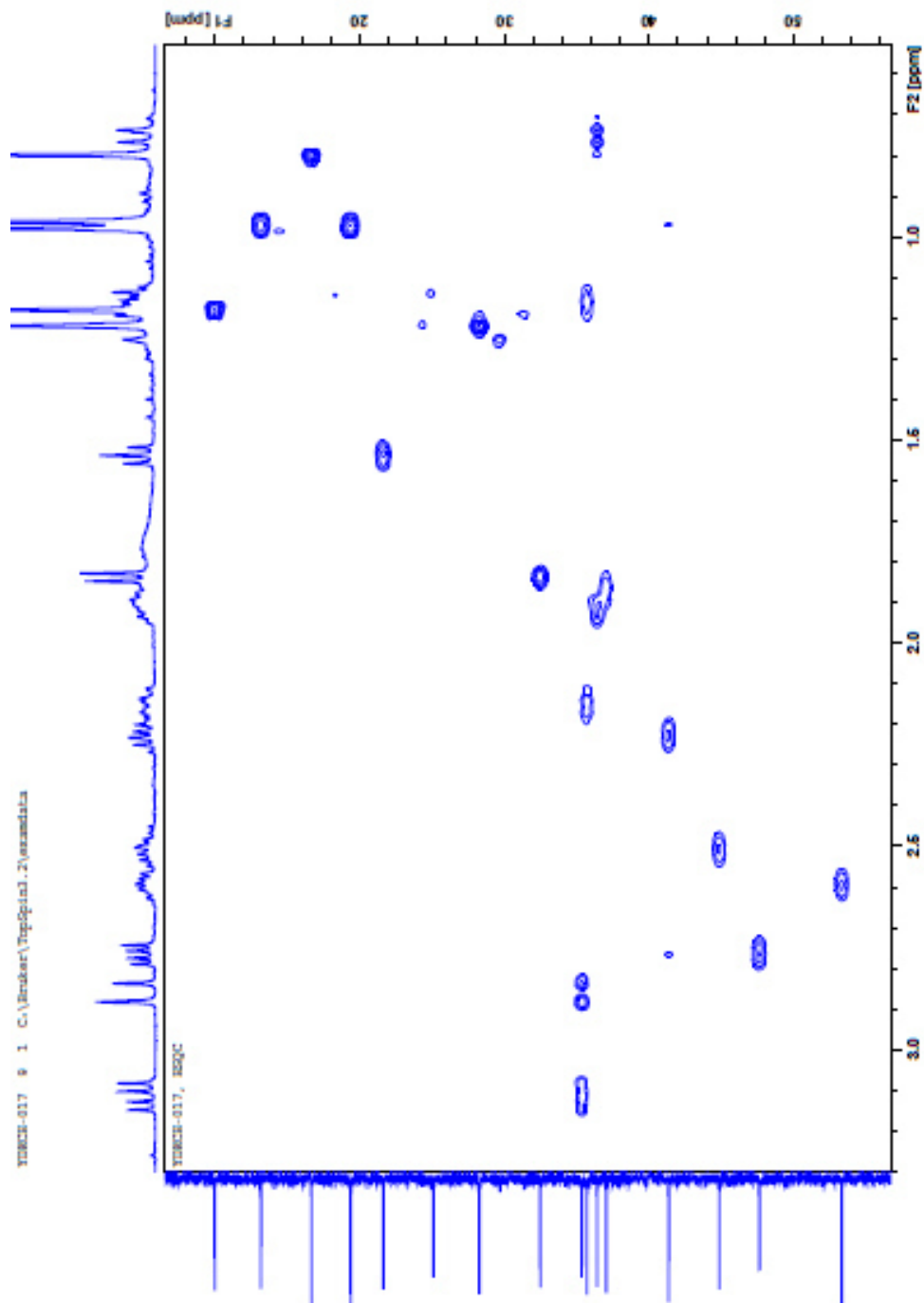
**Anexo 25.** Experimento NOESY del compuesto 5



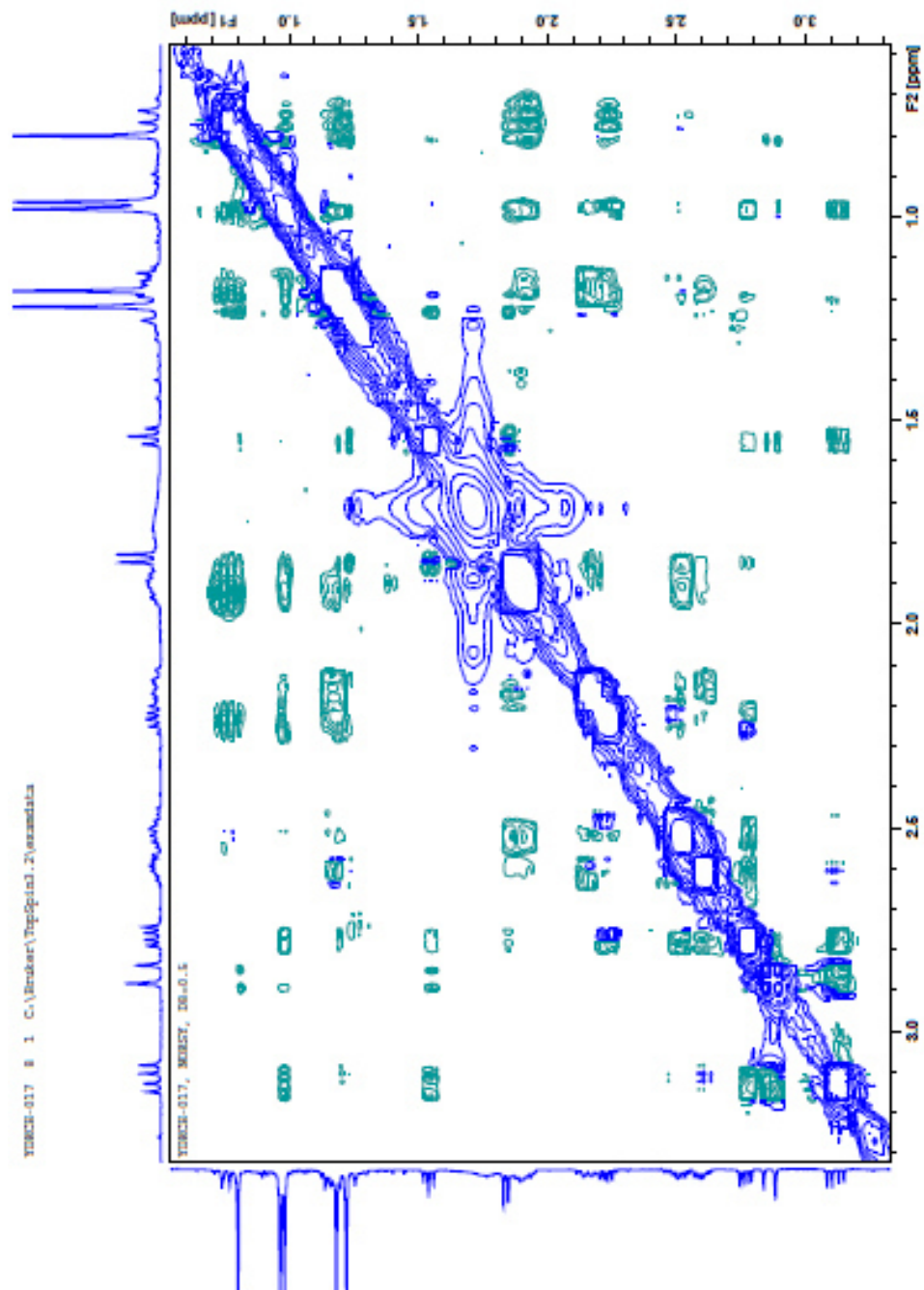
Anexo 26. Experimento DEPT 90 Y 135 del compuesto 6



Anexo 27. Experimento HMBC del compuesto 6



Anexo 28. Experimento HSQC del compuesto 6



Anexo 29. Experimento NOESY del compuesto 6

Anexo 31. Tabla de desplazamiento químico de RMN-¹H en ppm

Desplazamiento químico en RMN- ¹ H en ppm						
N. de C	Compuesto 1	Compuesto 2	Compuesto 3	Compuesto 4	Compuesto 5	Compuesto 6
1	α 2.37 m	α 1.99 m	α 2.31 m	α 2.47 m	α 2.05 m	α 1.90 m
	β 2.24 m	β 1.34 m	β 1.81 m	β 2.01 m	β 1.39 m	β 0.75 m
2	2.71 m	1.80 m	2.65 m	2.72 m	2.16	1.87 m
3	α 2.48 m	α 1.75 m	α 2.82 m	α 2.49 m	α 2.05 m	α 2.15 m
	β 1.96 m	β 1.39 m	B 1.96 m	β 2.05 m	β 1.48 m	β 1.15 m
4	-----	2.25 m	-----	-----	2.51 m	2.54 m
5	-----	3.6 t (9.3)	3.98 s ancho	3.94 s ancho	3.95 t	-----
6	2.55 cd (7.4,2.1)	1.80 m	2.78 m	2.32 m	2.02 m	2.23 cd (6.9,5.6)
7	2.88 s ancho	1.70 m	2.75 s ancho	2.39 s ancho	2.03 m	2.76 dd (12.6,5.6)
8	-----	-----	-----	-----	-----	2.51 m
9	-----	-----	-----	-----	-----	-----
10	-----	-----	-----	-----	-----	-----
11	2.87 m	1.41 s	1.82 d (8.16)	1.15 s	1.32 m	1.83 d (7.6)

12	2.12 m	1.42 m	1.56 m	1.4 m	1.35 m	1.53 t (7.8)
13	α 2.86 m	α 2.27 m	α 3.12 dd (18.4,7.8)	α 2.48 m	α 1.83 m	α 3.11 dd (18.1,8.0)
	β 2.79 m	β 1.72 m	B 3.07 dd (18.33,7.77)	β 1.92 m	β 1.37 m	β 2.86 d (18.1)
14	-----	3.93 t (4.5)	-----	4.29 m	4.06 s ancho	-----
15	-----	-----	-----	-----	-----	-----
16	1.19 s	1.14 s	1.20 s	1.073 s	1.14 s	1.22 s
17	1.21 s	0.93 s	0.83 s	0.97 s	0.91 s	0.79 s
18	1.05 s	1.19 s	1.12 s	1.13 s	1.18 s	1.18 s
19	1.13 d (6.9)	1.04 d (6.36)	1.10 d (7.1)	1.10 d (7.18)	1.01 d (6.24)	0.91 d (6.3)
20	1.09 d (7.4)	0.96 d (6.2)	1.08 d (7.32)	1.04 d (7.44)	0.95 d (6.16)	0.97 d (6.9)
21	2.96 s	-----	-----	-----	-----	-----

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

YOLANDA DANIELA ESTRADA CHAVARRÍA

Candidato para el Grado de

Maestro en Ciencias con Orientación en Química Biomédica

Título de tesis

**OBTENCIÓN DE DERIVADOS DE RIOLOZATRIONA Y EVALUACIÓN DE SU
ACTIVIDAD ANTIHERPÉTICA *In vitro*.**

Campo de estudio: Química Analítica

Biografía

Datos Personales:

Nacida en Monterrey, Nuevo León, el 8 de Junio de 1992. Hija de Yolanda Chavarría Sánchez y Luis Estrada Núñez.

Educación:

Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Químicas.

Grado obtenido:

Lic. Químico Farmacéutico Biólogo

Experiencia Profesional:

Servicio Social en el Laboratorio de Química de Productos Naturales en la Facultad de Ciencias Químicas, UANL.

Prácticas Profesionales en la planta Industrial Symrise S de R.L. de C.V.

Trabajo actual: Responsable del Laboratorio de la Unidad de Nutrición, CIDICS, UANL.