# ESTUDIO DE ESPECIES AROMÁTICAS CON ALTO CONTENIDO DE TIMOL, CARVACROL, *TRANS*-ANETOL O ESTRAGOL Y EMPLEO DE FENOLES Y SUS DERIVADOS EN LA SÍNTESIS DE 2,5-DIHIDRO-1-BENZOXEPINAS Y EVALUACIÓN DE SUS ACTIVIDADES BIOLÓGICAS

**AMNER MUÑOZ ACEVEDO**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER**
**FACULTAD DE CIENCIAS**
**ESCUELA DE QUÍMICA**
**LABORATORIO DE CROMATOGRAFÍA**
**LABORATORIO DE QUÍMICA ORGÁNICA Y BIOMOLECULAR**
**BUCARAMANGA**
**2010**

# ESTUDIO DE ESPECIES AROMÁTICAS CON ALTO CONTENIDO DE TIMOL, CARVACROL, *TRANS*-ANETOL O ESTRAGOL Y EMPLEO DE FENOLES Y SUS DERIVADOS EN LA SÍNTESIS DE 2,5-DIHIDRO-1-BENZOXEPINAS Y EVALUACIÓN DE SU ACTIVIDADES BIOLÓGICAS

Autor:
**Amner Muñoz Acevedo**
(Químico, M.Sc.)

Tesis presentada como requisito parcial
para optar al título de DOCTOR EN QUÍMICA

Directora: Elena E. Stashenko, Química, *Ph.D*.
Co-director: Vladimir V. Kouznetsov, Químico, *Ph.D., D.Sc.*

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER**
**FACULTAD DE CIENCIAS**
**ESCUELA DE QUÍMICA**
**LABORATORIO DE CROMATOGRAFÍA**
**LABORATORIO DE QUÍMICA ORGÁNICA Y BIOMOLECULAR**
**BUCARAMANGA**
**2010**

## AGRADECIMIENTOS

A la excelentísima Dra. Elena Stashenko porque durante toda mi formación profesional (11 años), desde pregrado hasta doctorado, fue mi gran maestra. Además, de todas las enseñanzas desde la parte profesional, su vida como tal es un ejemplo de perseverancia y visión.

Al admirado Dr. Vladimir Kouznetsov, por arriesgarse a trabajar conmigo, a sabiendas de mi poca experiencia en síntesis orgánica. Gracias por su orientación, confianza, amistad y respeto.

Debo agradecer infinitamente la colaboración recibida por parte de los profesores evaluadores: Dr. Luis Enrique Cuca, Dr. Rodrigo Abonía, Dr. Juan Manuel Urbina y Dr. Herminzul Cano, quienes aceptaron y cumplieron con la solicitud de ser los críticos de este trabajo de investigación.

A BB, por nunca perder la esperanza en mí, por compartir conmigo cada momento de alegría, tristeza y desánimo, durante los estudios doctorales. Siempre has estado allí, apoyándome.

A la Lucía, la Carol, la Chechi, el Edwin, la Olga, la Andrea, la Deyny, la Angelina, los chicos que fueron mis estudiantes en pregrado y que desarrollaron su tesis en el Lab., con los cuales compartí jornadas de aseo, trasnochos, extracciones, actividades biológicas, horas felices, “aquí no hay quien viva”, etc. Momentos inolvidables para todos.

A los profesionales del Laboratorio de Cromatografia, encargados de servicios: Jenny, Adriana, Elkin, Deyni, Freys, personas que nunca dijeron NO al facilitarme el material y reactivos necesarios para algún experimento. A la doctora Geo y a Ciro, quienes me colaboraron con los cálculos computacionales; sin sus recomendaciones y soporte hubiese sido difícil llevar a cabo estar parte de la investigación.

A Leo, Diego Merchán (el gran compañero de viaje), Gregorio, Fernando Rojas, Arnold, compañeros del laboratorio de orgánica, quienes siempre dieron buenos consejos en el arte de la síntesis pero con quienes además la vida se compartía y disfrutaba.

Mi agradecimiento inmenso para personas que, siempre han estado allí en mi formación (pregrado hasta doctorado), que con su carisma y don de gentes, han mostrado los grandes seres humanos que son: Marthis, Amandis, Monis, Geo, Leo, Jenny, Adriana, Chechi, Carol, Ángela, Lucia, Edwin, Martín, con los cuales uno se goza la vida.

Finalmente, agradezco a todos los demás compañeros de los Laboratorios de Cromatografía y Química Orgánica y Biomolecular de la UIS, que de alguna forma contribuyeron a la realización de esta investigación.

## TABLA DE CONTENIDO


| | Pág. |
|---|---|
| INTRODUCCIÓN | 34 |
| 1. CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE EXTRACTOS Y ACEITES ESENCIALES DE ESPECIES VEGETALES DE LOS GÉNEROS *LIPPIA*, *PLECTRANTHUS*, *THYMUS*, *TAGETES*, *ARTEMISIA*, *FOENICULUM*, *ILLICIUM* Y *OCIMUM*: | 37 |
| 1.1 INTRODUCCIÓN | 37 |
| 1.2 GENERALIDADES POR FAMILIA | 39 |
| 1.2.1 Familias Lamiaceae y Verbenaceae. | 39 |
| 1.2.2 Familias Asteraceae y Umbelliferae. | 40 |
| 1.3 ALBAHACAS (*Ocimum sp.*) | 41 |
| 1.3.1 Principales especies de *Ocimum* conocidas. | 42 |
| 1.4 ORÉGANOS | 44 |
| 1.4.1 Especies de *Lippia* bajo estudio. | 44 |
| 1.4.2 Especies de *Plectranthus* y *Thymus* bajo estudio. | 45 |
| 1.4.3 Especies de *Origanum* y *Satureja* bajo estudio. | 46 |
| 1.5 ANISES Y ESTRAGONES | 47 |
| 1.5.1 Especies de *Tagetes* bajo estudio. | 47 |
| 1.5.2 Especies de *Foeniculum*, *Artemisia* e *Illicium* bajo estudio. | 48 |
| 1.6 RUTAS BIOSINTÉTICAS | 50 |
| 1.6.1 Rutas biosintéticas. | 50 |
| 1.6.1.1 Ruta del shiquimato. | 50 |
| 1.6.1.2 Rutas del ácido mevalónico y desoxixilulosa fosfato. | 52 |
| 1.6.1.2.1 1-Desoxi-D-xilulosa 5-fosfato. | 52 |
| 1.7 CIENCIOMETRÍA | 58 |

1.8 PARTE EXPERIMENTAL 60

1.8.1 Obtención de extractos y aceites esenciales. 60

1.8.1.1 Reactivos y sustancias patrón. 60

1.8.1.2 Material vegetal e identificación taxonómica. 60

1.8.1.3 Destilación-extracción simultánea con solvente. 63

1.8.1.4 Extracción con fluido supercrítico. 63

1.8.1.5 Hidrodestilación asistida por la radiación de microondas. 63

1.8.2 Análisis de la composición química. 64

1.8.3 Análisis estadístico multivariable. 65

1.9 ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS 65

1.9.1 Análisis de metabolitos secundarios volátiles aislados por SDE de hojas y flores de nueve especies y/o variedades de albahacas (*Ocimum sp.*). 65

1.9.1.1 Composición química de los extractos SDE. 65

1.9.1.2 Análisis estadístico multivariable. 72

1.9.2 Composición química de extractos y aceites esenciales de especies vegetales con alto contenido de timol y carvacrol. 76

1.9.2.1 Identificación de los componentes de extractos y aceites esenciales. 76

1.9.3 Composición química de extractos y aceites esenciales de especies vegetales con alto contenido de *trans*-anetol y estragol. 86

1.9.3.1 Identificación de los componentes de extractos y aceites esenciales. 87

1.10 CONCLUSIONES 100

1.11 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 101

2. SÍNTESIS DE 2,5-DIHIDRO-1-BENZOXEPINAS, SESQUITERPENOIDES ANÁLOGOS DE HELIANNANOS: EMPLEO DE ALGUNOS COMPUESTOS FENÓLICOS Y ACEITES ESENCIALES QUE LOS CONTIENEN 123

2.1 INTRODUCCIÓN 123

2.2 GENERALIDADES DE LOS DERIVADOS DE 1-BENZOXEPINAS 124

2.3 ESTUDIO SINTÉTICO DE LOS DERIVADOS DE HELIANNANOS 125

2.4 HERRAMIENTAS SINTÉTICAS PARA CONSTRUCCIÓN DE ENLACES C-C 130

2.4.1 Transposición de Claisen. 130

2.4.2 Metátesis olefínica. 132

2.4.2.1 Metátesis con cierre de anillo – RCM. 133

2.5 PARTE EXPERIMENTAL 137

2.5.1 Reactivos. 137

2.5.2 Seguimiento de la reacción y purificación de los compuestos. 137

2.5.3 Propiedades físicas y caracterización estructural de los compuestos. 138

2.5.4 Etapa I. *o*-Alilación de fenoles sustituidos. 138

2.5.5 Etapa II. Transposición de Claisen de alil-aril éteres sustituidos. 141

2.5.6 Etapa III (a). *o*-Alilación de 2-alil fenoles sustituidos. 144

2.5.7 Etapa III (b). *o*-Acilación de 2-alil fenoles sustituidos. 147

2.5.8 Etapa IV (a). Metátesis con cierre de anillo para los 2-alil-1-aliloxi bencenos sustituidos. 150

2.5.9 Etapa IV (b). Metátesis con cierre de anillo para los acrilatos de 2-alil fenilos sustituidos. 153

2.5.10 Otras posibilidades sintéticas: derivados de 3-metil-2,5-dihidro-1-benzoxepinas. 154

2.5.11 Aplicación de la ruta sintética de 2,5-dihidro-1-benzoxepina en un aceite esencial con alto contenido de carvacrol. 155

2.6 ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS 157

2.6.1 Alil-aril éteres sustituidos (**2a-e**) sintetizados en la etapa I. 157

2.6.2 2-Alil fenoles sustituidos (**3a-e**) sintetizados en la etapa II. 163

2.6.3 2-Alil-1-aliloxi bencenos sustituidos (**4a-e**) sintetizados en la etapa IIIa. 173

2.6.4 Acrilatos de 2-alil fenilos sustituidos (**5a-e**) sintetizados en la etapa IIIb. 180

2.6.5 2,5-Dihidro-1-benzoxepinas sustituidas (**6a-e**) sintetizadas en la etapa IVa. 187

2.6.6 Intento de síntesis de 1-benzoxepin-2(*5H*)-onas sustituidas (**7a-e**) (Etapa IVb). 197

2.6.7 2-Alil-4-metoxi-3-(2-metilaliloxi) benzaldehído sintetizado como precursor para 3-metil-2,5-dihidro-1-benzoxepina sustituida. 198

2.6.8 Aplicación de la síntesis en el aceite esencial de *Lippia origanoides* 201

2.7 CONCLUSIONES 208

2.8 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 209

3. EVALUACIÓN *IN-VITRO* DE ALGUNAS PROPIEDADES BIOLÓGICAS DE LOS ACEITES ESENCIALES CON ALTO CONTENIDO DE CARVACROL, TIMOL, *trans*-ANETOL, ESTRAGOL Y DE PRODUCTOS DE LA SÍNTESIS DE 2,5-DIHIDRO-1-BENZOXEPINAS SUSTITUIDAS 223

3.1 INTRODUCCIÓN 223

3.2 OXIDANTES, DETERIORO OXIDATIVO Y ANTIOXIDANTES 225

3.2.1 Especies reducidas de oxígeno y nitrógeno 225

3.2.2 Lípidos y radicales. 226

3.2.3 Inhibidores de oxidación. 227

3.2.3.1 Métodos para determinación de la actividad antioxidante. 228

3.2.3.1.1 Reactividad hacia radicales. 228

3.2.3.1.2 Medida de la actividad antioxidante. 229

3.3 INHIBIDORES DE LA ENZIMA ACETILCOLINESTERASA: EFECTOS SOBRE EL DETERIORO NEURODEGENERATIVO Y COMO AGROQUÍMICOS 230

3.3.1 Transmisión colinérgica. 231

3.3.2 Trastornos cognoscitivos e inhibidores de la AChE. 232

3.3.3 Agentes agroquímicos. 233

3.4 EFECTOS FARMACOLÓGICOS COMPROBADOS DE LOS ACEITES ESENCIALES 234

3.5 PARTE EXPERIMENTAL 236

3.5.1 Reactivos, solventes y sustancias patrón. 236

3.5.2 Equipos. 237

3.5.3 Ensayos de capacidad de la inhibición oxidativa. 237

3.5.3.1 Decoloración del catión-radical $ABTS^{+\bullet}$ por el método convencional. 238

3.5.3.2 Decoloración del catión-radical $ABTS^{+\bullet}$ por el método modificado. 239

3.5.3.3 Oxidación del ácido linoleico por sulfato ferroso. 239

3.5.4 Ensayo de inhibición de la enzima acetilcolinesterasa. 241

3.5.5 Otros ensayos biológicos preliminares. 242

3.5.6 Cálculos de potenciales de ionización de moléculas sintéticas. 244

3.6 ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS 244

3.6.1 Modificación del método de decoloramiento del catión-radical $ABTS^{+\bullet}$ 244

3.6.2 Evaluación de la capacidad antioxidante de aceites esenciales con alto contenido de timol, carvacrol, estragol o *trans*-anetol. 253

3.6.3 Evaluación de la capacidad antioxidante de precursores, intermediarios y productos finales de la síntesis de 2,5-dihidro-1-benzoxepinas. 257

3.6.4 Relación entre la capacidad antioxidante equivalente al Trolox® y potenciales de ionización calculados de las moléculas sintéticas. 264

3.6.5 Evaluación de la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa por aceites esenciales con alto contenido de timol, carvacrol, estragol y *trans*-anetol. 272

3.6.6 Evaluación de la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa de precursores, intermediarios y productos finales de la síntesis de 2,5-dihidro-1-benzoxepinas. 276

3.6.7 Otros ensayos biológicos *in vitro*. 279

3.7 CONCLUSIONES 283

3.8 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 285

RECOMENDACIONES 301

ANEXOS 302

## LISTA DE TABLAS


Pág.

**Tabla 1.1.** Información general de algunas especies de albahacas. 43

**Tabla 1.2.** Información general de las especies *L. origanoides* y *L. micromera.* 45

**Tabla 1.3.** Información general de las especies *P.amboinicus* y *T. vulgaris.* 46

**Tabla 1.4.** Información general de las especies *O. mejorana* y *S. brownei.* 47

**Tabla 1.5.** Información general de las especies *T. lucida* y *T. filifolia.* 48

**Tabla 1.6.** Información general de las especies *F. vulgare*, *A. dracunculus* e *I. verum*. 49

**Tabla 1.7.** Información química importante concerniente a los compuestos mayoritarios encontradas en la plantas bajo estudio. 54

**Tabla 1.8.** Clasificación botánica de las especies vegetales estudiadas. 61

**Tabla 1.9.** Especificaciones de los equipos CG-EM utilizados para el análisis de extractos y AE. 64

**Tabla 1.10.** Comparación de los índices de retención lineales de componentes presentes en los AE y extractos, sustancias patrón y los reportados en la literatura. 66

**Tabla 1.11.** Distribución por familias de compuestos de los extractos de las albahacas estudiadas. 68

**Tabla 1.12.** La cantidad relativa (>0.5) y la identificación por CG-EM de los componentes aislados por SDE de las albahacas estudiada. 70

**Tabla 1.13.** Agrupaciones y constituyentes de acuerdo con el PCA. 74

**Tabla 1.14.** Análisis de K-medias de extractos de flores y hojas de las albahacas estudiadas. 74

**Tabla 1.15.** Clasificación de extractos de flores y hojas de albahacas según sus constituyentes más importantes. 75

**Tabla 1.16.** Clasificación de los aceites y extractos estudiados, por familias de compuestos y según el contenido de timol y carvacrol. 77

**Tabla 1.17.** Identificación y cantidad relativa (>0,4%) de los metabolitos secundarios, obtenidos por SDE y SFE de *S. brownei*, *O. majorana*, *L. origanoides*, *L. micromera*, *P. amboinicus* y *T. vulgaris.* 78

**Tabla 1.18.** Comparación de las composiciones de extractos SDE y SFE con reportes de la literatura. 79

**Tabla 1.19.** Identificación y cantidad relativa de los constituyentes principales de los AE de *L. origanoides*, *L. micromera*, *P. amboinicus* y *T. vulgaris* aislados por MWHD. 80

**Tabla 1.20.** Comparación de las composiciones de AE con reportes de la literatura. 83

**Tabla 1.21.** Características cromatográficas y espectroscópicas del timol y carvacrol. 85

**Tabla 1.22.** Clasificación de los AE y extractos de las especies *A. dracunculus*, *F. vulgare*, *I. verum*, *Ocimum sp.* 2, *T. filifolia* y *T. lucida*, por familia de compuestos y contenido de estragol y *trans*-anetol. 88

**Tabla 1.23.** Identificación y cantidad relativa (>1%) de los metabolitos secundarios, obtenidos por diferentes métodos de extracción de *T. lucida*, *Ocimum sp.* y *A. dracunculus.* 89

**Tabla 1.24.** Identificación y cantidad relativa (>1%) de los metabolitos secundarios. obtenidos por diferentes métodos de extracción de *T. filifolia*, *I. verum.* y *F. vulgare*. 90

**Tabla 1.25.** Comparación de las composiciones de AE con reportes de la literatura. 93

**Tabla 1.26.** Características cromatográfico-espectroscópicas del *trans*-anetol, *cis*-anetol y estragol. 95

**Tabla 1.27.** Características cromatográfico-espectroscópicas de la asarona y la elemicina. 95

**Tabla 2.1.** Resumen general de los alil-aril éteres sustituidos obtenidos mediante la reacción de éteres de Williamson. 141

**Tabla 2.2.** Resumen general de los 2-alil fenoles sustituidos obtenidos mediante la transposición de Claisen. 144

**Tabla 2.3.** Resumen general de los 2-alil-1-aliloxi bencenos sustituidos obtenidos mediante la síntesis de éteres de Williamson. 147

**Tabla 2.4.** Resumen general de los acrilatos de 2-alil-fenilo sustituidos obtenidos mediante la síntesis modificada de Schotten-Baumann. 150

**Tabla 2.5.** Resumen general de las 2,5-dihidro-1-benzoxepinas sustituidas obtenidas mediante la reacción de metátesis con cierre de anillo. 153

**Tabla 2.6.** Iones característicos obtenidos por CG-EM de los compuestos **2a-e**. 158

**Tabla 2.7.** Señales características de los hidrógenos alílicos encontrados en los compuestos alil-aril éteres **2a-e**, basados en los espectros $^{1}$H-RMN. 162

**Tabla 2.8.** Experimentos realizados buscando condiciones óptimas para la transposición de Claisen en el alil-timil éter (**2e**). 164

**Tabla 2.9.** Propiedades físicas de los disolventes probados en la transposición de Claisen. 164

**Tabla 2.10.** Iones característicos obtenidos por CG-EM de los compuestos **3a-e**. 168

**Tabla 2.11.** Comparación de los iones moleculares, picos de base y *m/z* 41 obtenidos por CG-EM de los compuestos **2a-e** y **3a-e**. 169

**Tabla 2.12.** Señales características de los hidrógenos del sistema fenílico, grupo alilo y OH fenólico de los compuestos **2a-e** y **3a-e**, basados en los espectros $^{1}$H-RMN. 172

**Tabla 2.13.** Iones característicos obtenidos por CG-EM de los compuestos **4a-e**. 175

**Tabla 2.14.** Señales características de los hidrógenos alílicos encontrados en los compuestos 2-alil-1-aliloxi bencenos **4a-e**, basados en los espectros $^{1}$H-RMN. 178

**Tabla 2.15.** Iones característicos obtenidos por CG-EM de los compuestos **5a-e**. 181

**Tabla 2.16.** Señales características de los hidrógenos de los grupos acriloilo y alilo encontrados en los compuestos 1-acriloiloxi-2-alil bencenos **5a-e**, basados en los espectros $^{1}$H-RMN. 185

**Tabla 2.17.** Iones característicos obtenidos por CG-EM de los compuestos **6a-e**. 189

**Tabla 2.18.** Comparación de los iones moleculares, picos de base e iones diagnóstico obtenidos por CG-EM, de los compuestos **4a-e** y **6a-e**. 190

**Tabla 2.19.** Comparación de las señales características de los hidrógenos metilénicos (-$CH_{2AB}$) y olefínicos (H-C= y =$CH_{2AB}$) de los compuestos **4a-e** y **6a-e**, basados en los espectros $^{1}$H-RMN. 193

**Tabla 2.20.** Iones característicos obtenidos por CG-EM de los compuestos **2e** y **2f**. 203

**Tabla 2.21.** Señales características de los hidrógenos aromáticos y alílicos encontrados en los compuestos **2e** y **2f**, con base en los espectros $^{1}$H-RMN. 203

**Tabla 2.22.** Señales características de los hidrógenos del sistema arílico, OH y alilo de los compuestos **2f**, **3e** y **3f**, con base en los espectros $^{1}$H-RMN. 205

**Tabla 2.23.** Señales características de los hidrógenos alílicos encontrados en los compuestos **4e** y **4f**, basados en los espectros $^{1}$H-RMN. 206

**Tabla 2.24.** Resumen general de los compuestos **2**-**8f** obtenidos a partir del AE de *L. origanoides*. 207

**Tabla 3.1.** Especies radicalarias y no radicalarias de oxígeno y nitrógeno. 225

**Tabla 3.2.** Principales productos secundarios de oxidación de varios ácidos grasos. 230

**Tabla 3.3.** Comparación de valores de TEAC de las sustancias control, obtenidos por los métodos “convencional” y modificado. 247

**Tabla 3.4.** Comparación de los parámetros experimentales y estadísticos en ensayos del catión-radical $ABTS^{+\bullet}$ convencional y modificado. 252

**Tabla 3.5.** Valores de TAA y efecto protector (%) para las sustancias de referencia, de control y AE, obtenidos en los ensayos de decoloramiento de $ABTS^{+\bullet}$ e inhibición del ácido linoleico. 254

**Tabla 3.6.** Valores de TEAC y las concentraciones inhibitorias al 50% de las sustancias control y de referencia, junto con los fenoles precursores y 2-alil fenoles **3a-f**. 258

**Tabla 3.7.** Valores de TEAC y las concentraciones inhibitorias al 50% de alil-aril éteres (**2a-f**), 2-alil-1-aliloxi bencenos (**4a-f**), 2-alil-1-acriloiloxi bencenos (**5a-e**) y 2,5-dihidro-1-benzoxepinas (**6a-f**). 262

**Tabla 3.8.** Valores de TEAC y potenciales de ionización calculados de las sustancias control, patrones, fenoles precursores (**1a-f**) y 2-alil fenoles (**3a-f**). 265

**Tabla 3.9.** Valores de TEAC y potenciales de ionización calculados de alil-aril éteres (**2a-f**), 2-alil-1-aliloxi bencenos (**4a-f**), 2-alil-1-acriloiloxi bencenos (**5a-e**) y 2,5-dihidro-1-benzoxepinas (**6a-f**). 268

**Tabla 3.10.** Inhibición de la actividad AChE por carvacrol, estragol, *trans*- 273

anetol, timol y por AE que los contienen.

**Tabla 3.11.** Valores de la concentración de inhibición de la AChE por las sustancias control, de referencia y de fenoles precursores de la síntesis de 2,5-dihidro-1-benzoxepinas. 276

**Tabla 3.12.** Inhibición de la actividad AChE por los alil-aril éteres (**2a-f**), sintetizados en la etapa I de la síntesis de 2,5-dihidro-1-benzoxepinas. 277

**Tabla 3.13.** Inhibición de la actividad AChE por los 2-alil fenoles (**3a-f**), sintetizados en la etapa II de la síntesis de 2,5-dihidro-1-benzoxepinas. 278

**Tabla 3.14.** Inhibición de la actividad AChE por los 2-alil-1-aliloxi bencenos (**4a-f**), sintetizados en la etapa III de la síntesis de 2,5-dihidro-1-benzoxepinas. 278

**Tabla 3.15.** Inhibición de la actividad AChE por los 2-alil-1-acriloiloxi bencenos (**5a-d**), sintetizados en la etapa III de la síntesis de 2,5-dihidro-1-benzoxepinas. 279

**Tabla 3.16.** Inhibición de la actividad AChE por los 2,5-dihidro-1-benzoxepinas (**6a-f**), sintetizados en la etapa IV de la síntesis de 2,5-dihidro-1-benzoxepinas. 279

**Tabla 3.17.** Valores de concentraciones inhibitorias mínimas (μg/mL) de una serie de compuestos obtenidos en la síntesis de 2,5-dihidro-1-benzoxepinas, frente a un panel de hongos levaduriformes y filamentosos. 280

**Tabla 3.18.** Actividad antiparasitaría contra *T. cruzi* y citotoxicidad de los compuestos sintéticos evaluados. 282

**Tabla 3.19.** Actividad contra el parásito *L. chagasi* y citotoxicidad de los compuestos sintéticos evaluados. 283

## LISTA DE FIGURAS


Pág.

**Figura 1.1.** Combinación de unidades para la construcción de esqueletos carbonados para diferentes productos naturales. 50

**Figura 1.2.** Número de registros totales para anetol, estragol, timol, carvacrol y AE que los contienen. Fuente: *Web of Science*. Período consulta: 1990-2010. Fecha consulta: marzo 1 de 2010. Palabras claves: *anethole*, *estragole*, *carvacrol*, *thymol*, *essential oils*. 59

**Figura 1.3.** Cromatogramas (TIC) obtenidas por CG-EM (DB-5, 60 m; EI, 70 eV) de los extractos aislados por SDE de hojas de A. *O. basilicum*, B. *O. sanctum*, C. *O. sp. 2*, D. *O. sp. 1*, E. *O. americanum* tipo citral y F. *O. americanum* (híbrido). Véase **Tabla 1.12** para la identificación de los picos. 69

**Figura 1.4.** Espectro de masas (EI, 70 eV) de *trans*-cinamato de metilo. 69

**Figura 1.5.** Espectro de masas (EI, 70 eV) del fotocitral A. 71

**Figura 1.6.** PCA de extractos de flores y hojas de las especies *Ocimum sp.* estudiadas de acuerdo con sus componentes mayoritarios. 73

**Figura 1.7.** Corrientes iónicas totales reconstruidas obtenidas por CG-EM (DB-5, 60 m; EI, 70 eV) de los AE, cos en timol y carvacrol, aislados por MWHD de A. *P. amboinicus*, B. *L. micromera* y C. *T. vulgaris*. 82

**Figura 1.8.** Espectro de masas (EI, 70 eV) del timol. 84

**Figura 1.9.** Espectro de masas obtenido por CG-EM (DB-5, 60 m; EI, 70 eV) de metil-timil-éter. 85

**Figura 1.10.** Cromatogramas (TIC) obtenidos por CG-EM (DB-5, 60 m; EI, 70 eV) de los AE aislados por MWHD de **A.** *T. lucida*; **B.** *Ocimum sp.* 2; **C.** *A. dracunculus*; **D.** *T. filifolia* y **E.** *F. vulgare.* 92

**Figura 1.11.** Espectros de masas (EI, 70 eV) de la asarona y la elemicina. 96

**Figura 1.12.** Espectro de masas (EI, 70 eV) de la 7-metoxi-cumarina (herniarina). 97

**Figura 1.13.** Espectro de masas (EI, 70 eV) de la graveolona. 98

**Figura 1.14.** Espectro de masas (EI, 70 eV) de la foeniculina. 99

**Figura 2.1.** 1-Benzoxepina y algunos de sus derivados. 125

**Figura 2.2.** Heliannuoles B-D aislados de *Helianthus annuus.* 126

**Figura 2.3.** Heliannuoles F, I y J aislados de *Helianthus annuus*. 126

**Figura 2.4.** Ácido pterulínico (8), pterulona (9) y pterulona B (10). 128

**Figura 2.5.** Estructura de la radulanina A (23), del ácido 9-hidroxi-3-metil-2,5-dihidro-1-benzoxepin-7-carboxílico (24) y radulanina E (25). 129

**Figura 2.6.** Espectro de IR del alil-timil éter (**2e**). 158

**Figura 2.7.** Espectro de masas del alil-timil éter **2e**. 159

**Figura 2.8.** Espectro de $^{1}$H-RMN del alil-timil éter (**2e**). 160

**Figura 2.9.** Desdoblamientos y constantes de acoplamiento (*J*) de los hidrógenos olefínicos y metilénicos del grupo alilo en el espectro de $^{1}$H-RMN del compuesto **2e** (zona ampliada). 161

**Figura 2.10.** Correlación existente entre los 3 hidrógenos olefínicos y los 2 metilénicos del grupo alilo de acuerdo con el espectro de $^{1}$H-$^{1}$H-RMN del compuesto **2e**. 163

**Figura 2.11.** Espectro de IR del 2-alil-6-isopropil-3-fenol **3e**. 167

**Figura 2.12.** Espectro de masas del 2-alil-6-isopropil-3-metil fenol **3a**. 169

**Figura 2.13.** Espectro de $^{1}$H-RMN del 2-alil-6-isopropil-3-metil fenol **3e**. 170

**Figura 2.14.** Ampliación y comparación de la región aromática de los compuestos **2e** (alil-timil éter) y **3e** (2-alil timol) indicando la desaparición de la señal de 2-$H_{Ar}$. 171

**Figura 2.15.** Ampliación y comparación de la región olefínica y metilénica de los compuestos **2e** (alil-timil éter) y **3e** (2-alil timol) indicando la aparición de la señal de -OH y el corrimiento de las señales de protones olefínicos y metilénicos. 172

**Figura 2.16.** Ampliación y comparación de los espectros de $^{13}$C-RMN de **2e** y **3e**, indicando la redistribución de las señales de los C metilénico y olefínicos del grupos transpuesto. 173

**Figura 2.17.** Espectro de IR del 2-alil-1-aliloxi-6-isopropil-3-metil benceno **4e**. 175

**Figura 2.18.** Espectro de masas del 2-alil-1-aliloxi-6-isopropil-3-metil benceno **4e**. 176

**Figura 2.19.** Espectro de $^{1}$H-RMN del 2-alil-1-aliloxi-6-isopropil-3-metil benceno **4e**. 177

**Figura 2.20.** Desdoblamientos de los hidrógenos olefínicos y metilénicos de los 2 grupos alilo en el espectro de $^{1}$H-RMN del compuesto **4e** (zona ampliada). 177

**Figura 2.21.** Correlación existente entre los hidrógenos olefínicos y metilénicos de cada grupo alilo presente en el compuesto **4e**, de acuerdo con el espectro de $^{1}$H-$^{1}$H-RMN. 179

**Figura 2.22.** Espectro IR del acrilato de 2-alil-3-formil-6-metoxi fenilo (**5d**). 181

**Figura 2.23.** Espectro de masas del acrilato de 2-alil-3-formil-6-metoxi-fenilo **5d**. 182

**Figura 2.24.** Espectro de $^{1}$H-RMN del 1-acriloiloxi-2-alil-3-formil-6-metoxi benceno **5d**. 183

**Figura 2.25.** Desdoblamientos y constantes de acoplamiento (*J*) de los hidrógenos olefínicos del grupo acriloilo en el espectro de $^{1}$H-RMN del compuesto **5d** (zona ampliada). 185

**Figura 2.26.** Correlación existente entre los hidrógenos olefínicos y metilénicos de los grupos acriloilo (´) y alilo presente en el compuesto **5d**, de acuerdo con el espectro de $^{1}$H-$^{1}$H-RMN. 186

**Figura 2.27.** Espectro de $^{1}$H-$^{13}$C-RMN del 1-acriloiloxi-2-alil-3-formil-6-metoxi benceno **5d** donde se indica la conectividad entre los hidrógenos de los grupos acriloilo y alilo con sus respectivos carbonos. 187

**Figura 2.28.** Espectro de IR del 6-formilo-9-metoxi-2,5-dihidro-1-benzoxepina (**6d**). 188

**Figura 2.29.** Espectro de masas del 6-formilo-9-metoxi-2,5-dihidro-1-benzoxepina **6d**. 189

**Figura 2.30.** Espectro de $^{1}$H-RMN del 6-formilo-9-metoxi-2,5-dihidro-1-benzoxepina **6d**. 191

**Figura 2.31.** Ampliación y comparación de la región olefínica de los espectros $^{1}$H-RMN de **4d** y **6d**, indicando la desaparición de las 4 señales (dq) de los $=CH_{2AB}$ de los 2 grupos alilo. 192

**Figura 2.32.** Desdoblamientos de los hidrógenos olefínicos del anillo oxepínico en el espectro de $^{1}$H-RMN del compuesto **6d** (zona ampliada). 193

**Figura 2.33.** Ampliación y comparación de la región olefínica de los espectros $^{13}$C-RMN de **4d** y **6d**, indicando la desaparición de 2 señales de los $=CH_{2AB}$ de los 2 grupos alilo. 193

**Figura 2.34.** Correlación existente entre los hidrógenos olefínicos y 194

metilénicos de anillo oxepínico en el compuesto **6d**, de acuerdo con el espectro de $^{1}$H-$^{1}$H-RMN.

**Figura 2.35.** Estructura optimizada del compuesto **6d** obtenida por Gaussian 03 (B3LYP/6-311++G(d,p). **A.** Vista frontal; **B.** Conformación anillo oxepínico bote torsionado; **C.** Ubicación sobre plano principal (sobre sistema aromático); y **D.** Rotación sobre plano mostrando el anillo de 7 miembros. 195

**Figura 2.36.** Menores distancias de enlace permitidas para acoplamiento a largo alcance (alílico y homoalílico) de los hidrógenos metilénicos y olefínicos en el anillo oxepínico de **6d**. 196

**Figura 2.37.** Espectro de $^{1}$H-$^{13}$C-RMN del 6-formilo-9-metoxi-2,5-dihidro-1-benzoxepina (**6d**) señalando la conectividad entre los hidrógenos y carbonos del anillo oxepínico 197

**Figura 2.38.** Espectro IR del acrilato de 2-alil-4-metoxi-3-(2-metilaliloxi) benzaldehído **8d**. 199

**Figura 2.39.** Espectro de masas del 2-alil-4-metoxi-3-(2-metilaliloxi) benzaldehído. 200

**Figura 2.40.** Espectro de $^{1}$H-RMN del 2-alil-4-metoxi-3-(1-metilaliloxi) benzaldehído **8d**. 200

**Figura 2.41.** Ampliación de las diferentes multiplicidades de los hidrógenos metilénicos y olefínicos de los grupos alilo y 2-metilalilo, en el espectro de $^{1}$H-RMN del compuesto **8d**. 201

**Figura 2.42.** Ampliación y comparación de la región alifática de los compuestos **2e** y **2f** indicando el corrimiento de la señal de -C**H**-$(CH_3)_2$. 204

**Figura 2.43.** Comparación de los espectros de IR de 2-alil-3-isopropil-6-metil fenol (**3f**, línea negra) y 2-alil-6-isopropil-3-metil fenol (**3e**, línea roja). 205

**Figura 3.1.** Estructura química de la acetilcolina (ACh). 231

**Figura 3.2.** Estructuras de inhibidores de AChE disponibles comercialmente. 233

**Figura 3.3.** Mecanismo de acción de AChEI: para la AD y pesticidas-insecticidas.Tomado de Felmand [53]. 234

**Figura 3.4.** (**A.**) Espectrofotómetro Genesys 20 y (**B.**) Lector microplaca de 96 pozos Versamax. 237

**Figura 3.5.** Fotografía de una microplaca de 96 pozos con la reacción entre $ABTS^{+\bullet}$ y las sustancias “control” del experimiento modificado. 239

**Figura 3.6.** Fotografía de una microplaca de 96 pozos con la reacción entre DTNB, ioduro de acetilcolina, AChE y el sustrato a evaluar. 242

**Figura 3.7.** Ejemplo del comportamiento cinético de la inhibición del $ABTS^{+\bullet}$ para diferentes concentraciones de BHT. 246

**Figura 3.8.** Efecto de la inhibición de $ABTS^{+\bullet}$ por la adición de BHT a diferentes concentraciones. 248

**Figura 3.9.** Efecto de la inhibición de $ABTS^{+\bullet}$ por la adición de Trolox® a diferentes concentraciones. 249

**Figura 3.10.** Efecto de la inhibición de $ABTS^{+\bullet}$ por la adición de $\alpha$-tocoferol y BHA a diferentes concentraciones. 250

**Figura 3.11.** Modelos geométricos optimizados de la molécula neutra y del catión-radical de **3e**. 266

**Figura 3.12.** Relación entre los valores TEAC e IP calculados de fenoles precursores, sustancias control y 2-alil fenoles sintetizados. 267

**Figura 3.13.** Modelos geométricos optimizados de la molécula neutra y del catión radical de **2e**. 268

**Figura 3.14.** Representación de las geometrías óptimas de la molécula neutra y del catión-radical de 9-isopropil-6-metil 2,5-dihidro-1-benzoxepina (**6e**). 270

**Figura 3.15.** Relación entre los valores TEAC e IP calculados de alil-aril éteres (**2a-f**), 2-alil-1-aliloxi bencenos (**4a-f**), 2-alil-1-acriloiloxi bencenos (**5a-e**) y 2,5-dihidro-1-benzoxepinas (**6a-f**). 271

**Figura 3.16.** Estructura química del diazinón. 274

## LISTA DE ESQUEMAS


Pág.

**Esquema 1.1.** Ruta metabólica del ácido shiquímico. 51

**Esquema 1.2.** Ruta biogenética del 1-desoxi-D-xilulosa fosfato. 53

**Esquema 1.3.** Posible ruta de fragmentación de *trans*-cinamato de metilo. 71

**Esquema 1.4.** Posible ruta de fragmentación de fotocitral. 72

**Esquema 1.5.** Ruta de fragmentación del metil-timil-éter. EI, 70 eV. 86

**Esquema 1.6.** Ruta de fragmentación de la elemicina. 96

**Esquema 1.7.** Ruta de fragmentación de la 7-metoxi-cumarina. 97

**Esquema 1.8.** Ruta de fragmentación de la graveolona. 98

**Esquema 1.9.** Ruta de fragmentación de la foeniculina. 99

**Esquema 2.1.** Estrategias generales para la síntesis de oxaciclos de 7 miembros. 127

**Esquema 2.2.** Síntesis de heliannuoles A y D propuesta por Takabatake *et al.* 127

**Esquema 2.3.** Reacción de cicloanulación para la síntesis de pterulonas. 128

**Esquema 2.4.** Preparación de 7-bromobenzoxepin-3(*2H*)-ona (**22**) vía reacción de *o*-acilación/Wittig tandem. 128

**Esquema 2.5.** Procedimiento aplicado a la síntesis de radulanina A y su metil éter. 130

**Esquema 2.6.** Representación general del desplazamiento sigmatrópico [3,3] en función del átomo central X. 130

**Esquema 2.7.** Mecanismo general de la transposición de Claisen. 131

**Esquema 2.8.** Observación del desplazamiento alílico en transposición de Claisen. 131

**Esquema 2.9.** Tipos de metátesis olefínica. 133

**Esquema 2.10.** Diagrama general de metátesis con cierre de anillo. 133

**Esquema 2.11.** Mecanismo propuesto por Chauvin y Hérisson para la 135

metátesis olefínica.

**Esquema 2.12.** Preparación del catalizador de Grubbs de primera generación. 135

**Esquema 2.13.** Mecanismo de metátesis utilizando catalizador de Grubbs de primera generación. 136

**Esquema 2.14.** Esquema general para la síntesis propuesta de benzoxepinas a partir de fenoles. 137

**Esquema 2.15.** Esquema general para la reacción de RCM de acrilatos de 2-alil fenilos. 154

**Esquema 2.16.** Esquema general para la reacción de *o*-alilación de fenoles. 157

**Esquema 2.17.** Ruta de fragmentación de los alil-aril-éteres. 159

**Esquema 2.18.** Esquema general para la reacción de transposición de Claisen para alil-aril éteres. 166

**Esquema 2.19.** Posible ruta de fragmentación de los 2-alil fenoles. 169

**Esquema 2.20.** Esquema general para la reacción de *o*-alilación de 2-alil fenoles. 174

**Esquema 2.21.** Posible ruta de fragmentación de los 2-alil-1-aliloxi bencenos. 176

**Esquema 2.22.** Esquema general para la reacción de *o*-acilación de 2-alil fenoles. 180

**Esquema 2.23.** Posible ruta de fragmentación de los 1-acriloiloxi-2-alil bencenos. 182

**Esquema 2.24.** Esquema general para la reacción de RCM de 2-alil-1-aliloxi bencenos. 187

**Esquema 2.25.** Posible ruta de fragmentación de las 2,5-dihidro-1-benzoxepina. 190

**Esquema 2.26.** Esquema general para la obtención de compuesto metalilado y la ciclación mediante la reacción de RCM. 198

**Esquema 2.27.** Esquema general para la síntesis con el aceite esencial de *Lippia origanoides.* 202

**Esquema 3.1.** Mecanismo de autoxidación de lípidos. 226

**Esquema 3.2.** Reacciones competitivas de los radicales peroxilo: (**a**) Escisión $\beta$ y (**b**) Ciclación por reordenamiento intramolecular. 227

**Esquema 3.3.** Reacción del catión-radical $ABTS^{+\bullet}$ con el posible antioxidante. 238

**Esquema 3.4.** Reacción de la PFPH con aldehídos para la formación de los derivados hidrazónicos para análisis GC-ECD. 240

**Esquema 3.5.** Reacción para determinar la actividad inhibitoria de la AChE. 242

**Esquema 3.6.** Mecanismo hipotético de la transferencia de un segundo protón de grupo alilo y estabilidad de productos de los radicales fenoxilo formados a partir del *o*-eugenol **3c**. 260

**Esquema 3.7.** Hipótesis de la posible dimerización de los radicales fenoxilo a partir del *p*-eugenol. 261

**Esquema 3.8.** Mecanismos involucrados en la capacidad antioxidante de un fenol. 264

## LISTA DE ANEXOS


| | |
|---|---|
| ANEXO 1 | 303 |
| ANEXO 2 | 304 |
| ANEXO 3 | 306 |
| ANEXO 4 | 307 |

## ACRÓNIMOS

| | |
|---|---|
| $^{\bullet}OH$ | Radical hidroxilo |
| $^{13}C$-RMN | Resonancia magnética nuclear de $^{13}C$ |
| $^{1}H$-RMN | Resonancia magnética nuclear de protones |
| $^{1}O_2$ | Oxígeno singulete |
| $^{3}O_2$ | Oxigeno triplete |
| 4-HBA | 4-Hidroxibenzaldehído |
| ABTS | Ácido 2,2´-azino-*bis*-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) |
| $ABTS^{+\bullet}$ | Catión-radical del ácido 2,2´-azino-*bis*-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) |
| ACh | Acetilcolina |
| AChE | Enzima acetilcolinesterasa |
| AChEI | Inhibidores de la enzima acetilcolinesterasa |
| ACN | Acetonitrilo |
| AD | *Alzheimer diseases* (Enfermedad de Alzheimer) |
| ADMET | *Acyclic diene metathesis* (Metátesis acíclica de dienos) |
| ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| AE | Aceites esenciales |
| AGE | *Advanced aglication* (Glicación avanzada) |
| $AlCl_3$ | Cloruro de aluminio |
| AmB | Amfotericina B |
| AO | Antioxidante |
| AOC | *Antioxidant capacity* (Capacidad antioxidante) |
| ARP | *Anti-radical power* (poder anti-radical) |

| | |
|---|---|
| ASTA | *American Spice Trade Association* |
| ATC | Ioduro de acetiltiocolina |
| $BCl_3$ | Tricloruro de boro |
| BDE | *Bond Dissociation Energy* (Energía de disociación de enlace) |
| BHA | Butilhidroxianisol |
| BHT | Butilhidroxitolueno |
| $C_6$-PFPH | Hexanal en forma de su derivado hidrazónico |
| CA | *Cluster analysis* (Análisis de conglomerados) |
| CB | Carbamatos |
| CC | Cromatografía en columna |
| $CC_{50}$ | Concentración citotóxica al 50% |
| $CC_{90}$ | Concentración citotóxica al 90% |
| $CDCl_3$ | Cloroformo deuterado |
| CelulaTHP-1 | *The human acute monocytic leukemia cell* |
| CENIVAM | Centro Nacional de Investigación para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinales Tropicales |
| CG | Cromatografía de gases |
| ChAT | Enzima colina acetiltransferasa |
| ChE | Enzimas colinesterasas |
| CHO | Grupo formilo |
| CIM | Concentración inhibitoria mínima |
| CINTROP | Centro de Investigación de Enfermedades Tropicales |
| CM | *Crosslinked metathesis* (Metátesis entrecruzada) |
| CO | Otros compuestos oxigenados |
| CO | Grupo carbonilo |
| Co-A | Coenzima A |

| | |
|---|---|
| COL | Colombiano |
| CG-EM | Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas |
| COSY | *Correlation espectroscopy* (análisis bidimensional homonuclear) |
| CTP | Citidina trifosfato |
| DAHP | Ácido 3-desoxi-D-arabino-heptulosónico 7-fosfato |
| DB-5MS | Columna cromatográfica de 5%-fenil-poli(dimetilsiloxano) |
| DB-WAX | Columna cromatográfica de poli(etilenglicol) |
| DCB | 1,2-Diclorobenceno |
| DMAPP | Di-metil-alil-difosfato |
| DMF | Dimetilformadida |
| DMPO | *5,5-Dimethylpyrrolidine-1-oxide* |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| DPPD | N,N´-Difenil-*p*-fenilendiamina |
| DPPH | Radical $\alpha,\alpha$-Difenil-$\beta$-picrilhidracilo |
| DTNB | Ácido 2,2´-dinitro-5,5´-ditiobenzoico |
| DXP | 1-Desoxi-D-xilulosa 5-fosfato |
| ECD | *Electron capture detector* (Detector de captura de electrones) |
| EE.UU | Estados Unidos |
| EI | Energía de ionización |
| EP | Éter de petróleo |
| EPSP | Ácido 3-enolpiruvilsiquímico 3-fosfato |
| ESA | *European Spice Association* |
| ESR | Electron spin resonance (Resonancia de espín de electrones) |
| ET | Estado de transición |
| $Et_2AlCl$ | Cloruro de dietil aluminio |

| | |
|---|---|
| eV | Electrón-Voltios |
| FP | Fenilpropa(e)nos |
| FPP | Farnesil difosfato |
| GAE | Grupo aceptor de electrones |
| GDE | Grupo donador de electrones |
| GEA | Grupo electroaceptor |
| GED | Grupo electrodonador |
| GPP | Geranil difosfato |
| HC | Hidrocarburos |
| $H_2O_2$ | Peróxido de hidrogeno |
| HAT | *Hydrogen atom transfer* (Transferencia de átomo de hidrógeno) |
| HD | *Huntington disease* (Enfermedad de Huntington) |
| HD-HSME | Método de microextracción con solvente en *headspace* con hidrodestilación simultáneo |
| HMQC | *Heteronuclear multiple quantum coherence* |
| HOCl | Ácido hipocloroso |
| HOONO | Peroxinitrito |
| HPLC | *High performance liquid chromatography* (Cromatografía liquida de alta resolución) |
| $IC_{50}$ | *Inhibitory concentrations* 50% (Concentraciones inhibitorias al 50%) |
| $IC_{90}$ | *Inhibitory concentrations* 90% (Concentraciones inhibitorias al 90%) |
| IP | *Ionization potential* (Potencial de ionización) |
| IPP | Isopentenil fosfato |
| $I_R$ | Índice de retención con programación lineal de temperatura |
| IR | Infrarojo |
| $K_2HPO_4$ | Fosfato monoácido de potasio |

| | |
|---|---|
| KCl | Cloruro de potasio |
| $KH_2PO_4$ | Fosfato diácido de potasio |
| LDL | *Low density lipoprotein* (Lipoproteinas de baja densidad) |
| LPP | Linalil PP |
| mAChR | *Muscarinic acetylcholine receptors* |
| MH | *Monoterpene hydrocarbons* (Hidrocarburos monoterpénicos) |
| $MnO_2$ | Dióxido de manganeso |
| MO | Monoterpenos oxigenados |
| MOM | Metoximetilo |
| MOMCl | Cloruro de metoximetilo |
| MS | *Mass spectrometry* (Espectrometría de masas) |
| MTT | [Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol] |
| MVA | Ácido mevalónico |
| MWHD | *Microwave assisted hydrodistillation* (Hidrodestilación asistida por la radiación de microondas) |
| nAChR | *Nicotinic acetylcholine receptors* |
| NADH | Nicotinamida adenina dinucleótido en forma reducida |
| NaH | Hidruro de sodio |
| $NaH_2PO_4$ | Fosfato diácido de sodio |
| NBS | N-Bromosuccinimida |
| ND | No determinado |
| NO | Óxido nítrico |
| $NO^{\bullet}$ | Radical del oxido nítrico |
| NPP | Neril PP |
| $O_2^{-\bullet}$ | Anión superóxido |
| $O_3$ | Ozono |

| | |
|---|---|
| OP | Pesticidas organofosforados |
| P.M. | Peso molecular |
| PBS | *Phosphate buffer saline* (*buffer* fosfato salino) |
| PCA | *Principal component analysis* (Análisis de componentes principales) |
| PD | *Parkinson disease* (Enfermedad de Parkinson) |
| PDS | Persulfato de potasio ($K_2S_2O_8$) |
| PEP | Fosfoenolpiruvato |
| PFPH | Pentaflúorfenilhidracina |
| pH | Potencial de hidrógeno |
| PMA | Phorbol myristate acetate (Forbol miristato acetato) |
| PUFA | *Polyunsaturated fatty acids* (Ácidos grasos poli-insaturados) |
| $R^{\bullet}$ | Radical alquílico |
| RCM | *Ring-closing metathesis* (Metátesis con cierre de anillo) |
| RDA | Retro Diels-Alder |
| RNS | *Reduced nitrogen species* (Especies reducidas de nitrogeno) |
| $RO^{\bullet}$ | Radical alcóxilo |
| $RO_2^{\bullet}$ | Radical peroxilo |
| ROM | *Ring-opening metathesis* (Metátesis con apertura de anillo) |
| ROMP | *Ring-opening metathesis polymerization* (Polimerización por metatesis con apertura de anillo) |
| $ROO^{\bullet}$ | Radical peroxilo |
| ROOH | Peróxido orgánico |
| ROS | *Reduced oxygen species* (Especies reducidas de oxigeno) |
| SDE | *Simultaneous-distillation extraction* (Destilación-extracción simultánea con solvente) |
| SET | *Single electron transfer* (Transferencia de un sólo electrón) |

| | |
|---|---|
| SFE | *Supercritical fluid extraction* (Extracción con fluido supercrítico) |
| SH | *Sesquiterpenes hydrocarbons* (Hidrocarburos sesquiterpénicos) |
| SIDA | Síndrome de inmunodeficiencia adquirida |
| SNC | Sistema nervioso central |
| $SnCl_2$ | Cloruro estannoso |
| SO | Sesquiterpenos oxigenados |
| SOD-1 | *Superoxide dismutase* 1 |
| TAA | *Total antioxidant activity* (Actividad antioxidante total) |
| TBAF | *Tetra n-butylammonium fluoride* |
| TBS | *Tert-butyldimethylsilyl* |
| TBSCl | *Tert-butyldimethylsilyl chloride* (Cloruro de *ter*-butildimetilsililo) |
| TEAC | *Trolox equivalent antioxidant capacity* (Capacidad antioxidante equivalente al Trolox) |
| TLC | *Thin layer chromatography* (Cromatografía de capa fina) |
| TMS | Tetrametilsilano |
| $t_R$ | Tiempo de retención |
| U.S.A | *United State of America* (Estados Unidos de América) |
| UIS | Universidad Industrial de Santander |
| UK | *United Kingdom* (Reino unido) |
| UV-Vis | Ultravioleta-visible |
| VCEAC | *Vitamin C equivalent antioxidant capacity* (capacidad antioxidante equivalente a vitamina C) |
| VIS | Visible |

## RESUMEN

**TITULO:** ESTUDIO DE ESPECIES AROMÁTICAS CON ALTO CONTENIDO DE TIMOL, CARVACROL, *TRANS*-ANETOL O ESTRAGOL Y EMPLEO DE FENOLES Y SUS DERIVADOS EN LA SÍNTESIS DE 2,5-DIHIDRO-1-BENZOXEPINAS Y EVALUACIÓN DE SUS ACTIVIDADES BIOLÓGICAS*
**AUTOR:** AMNER MUÑOZ ACEVEDO, Químico, M.Sc.**
**PALABRAS CLAVES:** Timol, carvacrol, estragol, *trans*-anetol, aceites esenciales, 2,5-dihidro-1-benzoxepinas, antioxidante, acetilcolinesterasa

Este trabajo hace parte de las investigaciones del Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinales, CENIVAM. Estuvo enfocado en buscar especies aromáticas y medicinales enriquecidas con timol, carvacrol, estragol o *trans*-anetol, puesto que estos compuestos y sus AE tienen propiedades biológicas aprovechables y, por su posible aplicación en la industria. Asimismo, obtener nuevas benzoxepinas a través de modificaciones químicas empleando fenoles sustituidos y un AE con carvacrol, para demostrar la aplicabilidad de los AE como materia prima en síntesis; y, finalmente, estudiar algunas bioactividades (*e.g.*, antioxidantes y anti-acetilcolinesterasa) de los AE y de las moléculas sintéticas derivadas.

El primer capítulo contiene la recopilación de la composición química de: extractos de 9 especies de albahacas (flores y hojas), diferenciados por análisis estadístico multivariable; y, de extractos y aceites de especies aromáticas con alto contenido de timol, carvacrol, *trans*-anetol o estragol.

El segundo capitulo reporta la ruta sintética en cuatro etapas empleada para la obtención de nuevas 1-benzoxepinas sustituidas, a partir de fenoles sustituidos y un aceite esencial que contienen carvacrol. Se utilizaron como principales herramientas sintéticas la transposición de Claisen y la metátesis con cierre de anillo. Todos los compuestos involucrados en cada etapa fueron caracterizados mediante IR, CG-EM y RMN.

Finalmente, el tercer capítulo incluye las evaluaciones *in vitro* de las propiedades antioxidantes, mediante métodos colorimétricos de *screening* (ensayos con el catión-radical $ABTS^{+\bullet}$) y sistema modelo (oxidación del ácido linoleico), y de inhibición de la enzima acetilcolinesterasa de los AE bajo estudio junto con todas las moléculas sintetizadas. Adicionalmente, los datos obtenidos de los valores de TEAC de las moléculas sintéticas se correlacionaron con sus PI, determinados a través de cálculos computacionales. Se incluyen algunos resultados preliminares de actividades antifúngica, antiprotozoarios (*Leishmania chagasi* y *Trypanosoma cruzi*) y citotoxicidad.

* Tesis doctoral
** Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Directores: Profesora Elena E. Stashenko, Química, Ph.D. y Profesor Vladimir V. Kouznetsov, Químico, Ph.D., D.Sc.

## ABSTRACT

**TITLE:** STUDY OF AROMATIC SPECIES WITH HIGHEST CONTENT OF THYMOL, CARVACROL, *TRANS*-ANETHOLE OR ESTRAGOLE AND EMPLOYMENT OF PHENOLS AND THEIR DERIVATIVES IN THE SYNTHESIS OF 2,5-DIHYDRO-1-BENZOXEPINES AND ASSESSMENT OF THE BIOLOGICAL ACTIVITIES*
**AUTHOR:** AMNER MUÑOZ ACEVEDO, Chemist, M.Sc.**
**KEYWORDS:** Tymol, carvacrol, estragole, *trans*-anethole, essential oils, 2,5-dihydro-1-benzoxepines, antioxidant, acetylcholinesterase

This work is included on the research of the Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinales, CENIVAM. It was focused on to find some aromatic and medicinal plant enriched with thymol, carvacrol, trans-anethole or estragol, since these compounds and their essential oils (EO) have any exploitable biological properties, and, also for possible industrial applications. Additionally, synthesize a new set of benzoxepines through any chemical modifications using substituted phenols and EO with carvacrol, to demonstrate the potential applicability of the EO as a raw material in synthesis; and finally, to explore some bioactivities (*e.g.*, antioxidants and anti-acetylcholinesterase) of the EO and the synthetic molecules.

Chapter one contains the chemical composition information about the extracts from nine species of basil (flowers and leaves), which data were differentiated by multivariate statistical analysis; and, the extracts and EO of aromatic spices enriched with thymol, carvacrol, *trans*-anethole or estragol.

Chapter two includes the data about the new derivatives 1-benzoxepines, from substituted phenols and one essential oil containing carvacrol, obtained using a four-step synthetic route. Claisen rearrangement and ring-closing metathesis were used as main synthetic tools. All compounds were characterized by IR, GC-MS and NMR.

Finally, chapter three deals with the colorimetric methods (cation-radical ABTS+• assay) and model system (linoleic acid oxidation) used to determine the *in-vitro* antioxidant properties and the acetylcholinesterase enzyme inhibition on EO and synthetic molecules. Additionally, the TEAC values of the synthetic molecules were correlated with their ionization potential (IP), which were calculated by Gaussian software. Some preliminary results of antifungal and antiprotozoal (*Leishmania chagasi* and *Trypanosoma cruzi*) activities; and, cytotoxicity were included.

* Doctoral Thesis
** Sciences Faculty. Chemistry School. Directors: Professor Elena E. Stashenko, Chemist, Ph.D. and Professor Vladimir V. Kouznetsov, Chemist, Ph.D., D.Sc.

# INTRODUCCIÓN

Colombia es uno de los países con mayor diversidad biológica del mundo, debido a su posición geográfica en el planeta. El país cuenta con *ca*. 45-55 mil especies de plantas, de las cuales *ca*. 2000 son promisorias. Debido a esta gran diversidad (fauna y flora), sus beneficios para alimentación, medicina e industria se pueden aprovechar.

Muchos de los metabolitos (*e.g.*, terpenoides, alcaloides, cumarinas, saponinas, etc.) presentes en estas especies permitirían obtener productos que responderían a la solución de problemas alimenticios, medicinales o industriales. Así, los terpenoides, constituyentes mayoritarios de aceites esenciales (AE) de plantas, son de mucho interés debido a las diferentes funcionalidades que cumplen: desde protección de la misma especie de la depredación hasta su polinización por insectos, etc., y por los usos terapéuticos de estas especies atribuibles a estos constituyentes.

Desde estas mismas fuentes renovables se han aislado muchos compuestos activos, *ca*. 40%, que han actuado eficazmente sobre diversas enfermededades (*e.g.,* malaria, cáncer, SIDA, etc.); otra serie de compuestos son derivados hemisintéticos directos de productos naturales y sólo unos pocos, son el resultado de una síntesis total. La síntesis total y hemisíntesis son soluciones viables y oportunas para producir el compuesto de interés, sin comprometer el recurso natural (no llevando a la extinción), mediante algunas rutas sintéticas rápidas y ecónomicas; y para potencializar sus efectos farmacológicos, cambiando algunos sustituyentes dentro de las estructuras iniciales.

De ahí, la importancia del estudio de las actividades biológicas (*e.g*., citotoxicidad, antifúngica, antibacteriana, antioxidante, etc.), tanto de sustancias aisladas de fuentes naturales como de origen sintético, puesto que es necesario hoy día conocer y obtener información para su posible aplicación en medicina o industria.

Este trabajo hace parte de las líneas de investigación del Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinales, CENIVAM, y se desarrolló en los Laboratorios de Cromatografía y de Química Orgánica y Biomolecular de la UIS; estuvo enfocado en buscar especies aromáticas y medicinales autóctonas con un contenido alto de timol, carvacrol, estragol o *trans*-anetol, puesto que estos compuestos y sus AE tienen una gama de propiedades biológicas aprovechables y, sobre todo, por su aplicación que hoy día tienen en la industria. Asimismo, obtener a través de modificaciones químicas nuevas benzoxepinas empleando fenoles sustituidos y un AE con carvacrol y timol, para demostrar la aplicabilidad de los AE como materia prima en síntesis para producir las moléculas de interés; y, finalmente, estudiar algunas bioactividades (*e.g.*, antioxidantes y anti-acetilcolinesterasa) de los AE y de las moléculas sintéticas derivadas.

Durante el desarrollo de está investigación, los avances del trabajo se presentaron en diferentes eventos nacionales e internacionales (*e.g.*, *Free Radical and Antioxidants in* Chile 2009 – VI *Meeting of SFRBM-South American Group*, XII Congreso Latinoamericano de Cromatografía y Técnicas Relacionadas, Congreso Iberoamericano de Química y XXIV Congresos Peruano de Química, XXVII Congreso Latinoamericano de Química y VI Congreso Internacional de Química e Ingeniería Química¸ XII Congreso Colombiano de Farmacología y Terapéutica, X Congreso Colombiano de Fitoquímica, IX Congreso Colombiano de Fitoquímica, entre otros), con presentaciones orales y en *pósteres* y se han publicado en revistas nacionales e internacionales (Salud UIS, *Scientia et Technica*, *Scientia Chromatographica*, *Natural Product Communications*). Se encuentra sometido un artículo para su publicación en *Journal of Essential Oils Bearing Plants*.

El trabajo presentado está divido en tres capítulos, a saber: el primer capítulo contiene el estudio de la composición química de extractos obtenidos por destilación-extracción simultánea con solvente (SDE, por sus siglas en inglés) de nueve especies y/o variedades de albahacas, junto con los extractos y AE de especies aromáticas con alto contenido de timol, carvacrol, *trans*-anetol o estragol. El segundo capítulo se

dedica a la síntesis y caracterización estructural de nuevas 1-benzoxepinas sustituidas obtenidas a partir de fenoles sustituidos y AE con alto contenido de timol y carvacrol. Y, el capítulo final, incluye la evaluación *in vitro* de las actividades biológicas (antioxidante, acetilcolinesterasa, antifúngica y antiparasitaria) de los AE y de las moléculas sintetizadas.

# 1. CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE EXTRACTOS Y ACEITES ESENCIALES DE ESPECIES VEGETALES DE LOS GÉNEROS *LIPPIA*, *PLECTRANTHUS*, *THYMUS*, *TAGETES*, *ARTEMISIA*, *FOENICULUM*, *ILLICIUM* Y *OCIMUM*

## 1.1 INTRODUCCIÓN

Las especias y plantas aromáticas han desempeñado una importante función en la historia de muchos pueblos [1]. La observación de que ciertas de sus partes, *e.g.*, hojas, frutos, semillas y rizomas, no sólo mejoraban el sabor de los alimentos sino que tenían un efecto positivo sobre la salud, despertó mucho interés en su estudio. Es por ello que sus propiedades medicinales y farmacológicas potenciales de las especies aromáticas deben ser valoradas [2].

En términos económicos, las especias y plantas aromáticas tienen mayor importancia como ingredientes en las industrias de alimentos, bebidas alcohólicas, cosméticos, perfumería, colorantes, medicina y jardinería [3], por diversas propiedades biológicas (antioxidante, antimicrobiana, antifúngica, antiviral, nutricional, etc.) [4,5] y organolépticas [6]. Además, sus agradables olor, sabor, color y pungencia son indispensables en la preparación de exquisiteces culinarias.

Las especies vegetales aromáticas contienen desde aceites esenciales (AE) o aceites volátiles y oleorresinas hasta alcaloides y glicósidos de interés farmacológico, son productos del metabolismo secundario [1,6,7]. Los AE son los metabolitos secundarios de gran interés; están constituidos por compuestos volátiles que imparten el olor característico, propiedades terapéuticas y, en algunos casos, su toxicidad [7,8].

Se conocen alrededor de 3000 plantas aromáticas y sus AE, de los cuales menos de 300 son comercialmente importantes, destinados principalmente al mercado de fragancias y sabores [9,10]. Las plantas aromáticas, que gozan de los precios más altos en el mercado son pimienta, vainilla, jengibre, pimentón dulce, canela, nuez

moscada, laurel y mezclas de especias [1], son adquiridas por los mayores consumidores del mercado mundial, entre ellos figuran Estados Unidos, Unión Europea, Japón, Singapur, Arabia Saudita y Malasia [6].

Por otro lado, los países productores de estas especias son principalmente China, con 13.2% (jengibre y pimentón); India, con 8.6% (semillas de especias); Madagascar, con 8.2% (vainilla y clavo); Indonesia, con 7.3% (canela); Vietnam, con 5.1% (pimienta); Brasil, con 4.1% (canela); España, con 3.1% (tomillo); Guatemala (nuez moscada) y Sri Lanka (canela), con 2.8% [1,11]. A parte de la competencia por los mercados, los países exportadores y productores en vía de desarrollo (proveedores del 55% del mercado) experimentan varias dificultades, entre ellas, calidad variable o baja del producto, dado que las exportaciones están sujetas a estrictos estándares de calidad por *American Spice Trade Association* (ASTA) y *European Spice Association* (ESA) [12].

Como la demanda de especias procesadas de alta calidad está creciendo, los productos con valor agregado ofrecen nuevas oportunidades de negocios en el mercado de especias, sobre todo, si se compara con otro tipo de cultivos (horticultura) donde el área y producción de especias son limitadas.

El interés de este trabajo se centró en encontrar especies aromáticas y medicinales con alto contenido de los fenoles, timol y carvacrol, y los éteres aromáticos *trans*-anetol y estragol, debido a que ellos y los AE que los contienen han demostrado propiedades biológicas notables, tales como antifúngicos, antibacterianos y antioxidantes, etc. [13] y por su posible aplicación a nivel industrial como sustancias saborizantes, aromatizantes y preservantes en las industrias de alimentos y bebidas alcohólicas, en preparaciones farmacéuticas y la elaboración de perfumes, jabones y detergentes [3]. Estos estudios se enmarcan dentro de la misión y la visión del Centro de Investigación de Excelencia CENIVAM, como gestor e impulsador de la base técnico-científica de la cadena productiva de AE en el país.

Este capítulo constituye la recopilación sobre la composición química de todas las especies aromáticas estudiadas, así: *screening* de nueve especies y/o variedades de albahacas (flores y hojas), por SDE y cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM) y su diferenciación mediante análisis estadístico multivariable; extractos y aceites esenciales de especies aromáticas con alto contenido de timol y carvacrol; y extractos y aceites esenciales de especies aromáticas con alto contenido de *trans*-anetol y estragol.

## 1.2 GENERALIDADES POR FAMILIAS

**1.2.1 Familias Lamiaceae y Verbenaceae.** La familia Lamiaceae (o Labiatae) comprende unos 236 géneros y 3200-5600 especies, las cuales son hierbas perennes o anuales y algunos subarbustos [14] caracterizados por tener vellosidades (tricomas) glandulares, donde está el aceite esencial [15]. Sus flores son tubulares monosimétricas de dos labios bisexuales [16]. Los géneros *Thymus, Origanum, Satureja, Thymbra*, hacen parte de esta familia, donde el género *Origanum* es más conocido – tipos griego y turco [17].

La familia Verbenaceae distribuida principalmente en los trópicos, subtrópicos y algunas zonas templadas consta de 76-86 géneros y 1900-2600 especies [18], con plantas de interés económico, que proporcionan desde maderas (*Tectona grandis,* géneros *Melina, Vitex,* etc.) y aceites o frutos comestibles (*Verbena officinalis, Aloysia citriodora*), hasta plantas para jardinería y ornamentación (*Lantana*, *Duranta*); además, muchas especies cuentan con diversas propiedades medicinales [19,20]. Su inflorescencia es variable y bracteada, con algunas flores bisexuales muy similares a las de la familia Lamiaceae [21]. Aún se encuentra en discusión la circunscripción de las familias Verbenaceae y Lamiaceae, por ser difícilmente distinguibles [22].

Las familias Verbenaceae y Lamiaceae son muy similares en cuanto a los tipos de metabolitos secundarios, ya que ambas acumulan y contienen una gran variedad de monoterpenos, sesquiterpenos y diterpenos y algunos monoterpenos de tipo iridoide [23], sustancias biológicamente activas.

Especies representantes de estas familias son *Ocimum basilicum* (albahaca), *Thymus vulgaris* (tomillo), *Satureja hortensis* (ajedrea), *Hyssopus officinalis* (hisopo), *Lavandula angustifolia* (lavanda), *Melissa officinalis* (toronjil), *Origanum majorana* (mejorana), *Rosmarinus officinalis* (romero), *Salvia officinalis* (salvia), entre otras, etc. [18].

**1.2.2 Familias Asteraceae y Umbelliferae.** La familia Compositae (o Asteraceae) reúne 20000-30000 especies entre 900-1100 géneros [24,25], y es la familia de Angiospermas con mayor riqueza y diversidad biológica existente [21,26]. Son hierbas anuales o perennes, algunos arbustos y pocos árboles (*Leucomeris*, *Vernonia arborea*) [27]. Se caracteriza por tener inflorescencia compuesta ("capítulo") y su nombre deriva de "Aster" (estrella), relacionada con la forma de su flor. Está ampliamente distribuida en todo el mundo, desde los polos, desiertos y selvas hasta los trópicos, pantanos y picos montañosos [28]. Usualmente, sus especies contienen AE ricos en monoterpenos y en lactonas sesquiterpénicas [23,29,30]. Sin embargo, monoterpenos irregulares, *i.e.*, que no cumplen la regla de isopreno, constituidos por estructuras de artemisilo, crisantemilo y antolinilo, se encuentran principalmente en esta familia [23].

Especies, representantes de esta familia, son *Matricaria recutita* (manzanilla), *Tagetes lucida* (estragón mexicano), *Artemisia dracunculus* (estragón), *Tanacetum parthenium* (altamisa), *Helichrysum angustifolium* (planta de curry), entre otras [18].

Por su parte, la familia Umbelliferae o Apiaceae, contiene alrededor de 320 géneros y 2900-3000 especies extendidas por todo el mundo, siendo casi ausentes en el hemisferio sur y en trópicos [28,31]. Son, en su mayoría, hierbas y algunos arbustos anuales, bienales o perennes y su inflorescencia es en umbela simple o compuesta, usualmente bisexual actinomórfica [21,27,32]. La gran mayoría de estas especies contienen comúnmente AE ricos en fenilpropanos, furanocumarinas y, en menor proporción, poseen lactonas sesquiterpénicas [23].

Entre las especies, representantivas de esta familia, figuran *Angelica archangelica* (angélica), *Pimpinella anisum* (anís), *Coriandrum sativum* (cilantro), *Anethum graveolens* (eneldo), *Foeniculum vulgare* (hinojo), *Armoracia rusticana* (rábano), *Petroselinum crispum* (perejil), *Carum carvi* (alcaravea), *Cuminum cyminum* (comino), *Myrrhis odorata* (mirra), entre otras [18].

### 1.3 ALBAHACAS (*Ocimum sp.*)

El género *Ocimum* pertenece a la familia Lamiaceae y se halla distribuido en zonas tropicales de América, África y Asia. El número de especies varía entre 30 y 160 (entre hierbas y arbustos) y a las plantas de este género se les denomina colectivamente, *albahacas* [33]. Las albahacas poseen varias subespecies, variedades y formas, las cuales difieren entre sí, en morfología y composición química de sus AE. Esta variación se debe principalmente al polimorfismo de *O. basilicum* L. causado por hibridación interespecífica (polinización cruzada fácil) [34,35].

La composición química de los AE de este género se destaca por su alto contenido de monoterpenos oxigenados (linalol, eucaliptol, citral, etc.) y fenilpropa(e)nos (estragol, eugenol, cinamato de metilo, metil-eugenol, etc.), seguidos de sesquiterpenos (germacreno D, biciclogermacreno, etc.) y monoterpenos (β-mirceno, β-ocimeno, etc.) [2,34,36]. Ciertas variedades han presentado sesquiterpenos como componentes mayoritarios (*e.g.*, *O. micranthum*) [36,37]. Esta diversidad composicional le proporciona a los AE del género *Ocimum* la amplia gama de aplicaciones industriales, usos etnobotánicos y bioactividades reportadas.

Entre las aplicaciones más comunes encuentra su empleo en culinaria como condimentos y saborizantes (*e.g.*, salsas, guisos, ensaladas, vegetales encurtidos, vinagres y aceites fragantes) [38]; en la industria de alimentos en el área de confitería, productos horneados, productos cárnicos y licores [3,39]; y en perfumería, para la elaboración de jabones, champús y productos dentales [2,3,35,38].

Los extractos de albahacas se han aprovechado en etnomedicina para tratar trastornos físicos como dolores de cabeza, diarreas, flatulencias, cólicos, verrugas, resfriados, enfermedades de la piel y malfuncionamiento de riñones [40]. Así mismo, sus extractos se consideran antiespasmódicos [35], estomáquicos, carminativos, antimaláricos, febrífugos, diuréticos, expectorantes, laxantes, repelentes de insectos [38,40,41], diaforéticos y estimulantes del apetito [35,42], entre otros. La especia completa se usa para tratar piquetes de insectos y serpientes y para el tratamiento de úlceras gástricas [43]. Algunos cultivos se usan con fines ornamentales (decorativos), mágico-religiosos (ceremonias) y para aromatización [44].

Las bioactividades que exhiben las especies *Ocimum* son muy diversas, se puede mencionar, entre otras, las siguientes: antibacteriana [42], antifúngica, antioxidante [45], antimicrobiana [46], insecticida [47], anti-inflamatoria y hepatoprotectora; como reguladora del crecimiento de plantas, para la protección de productos almacenados, de animales y de enfermedades humanas; algunas albahacas registran efectos adaptogénico e inmunomodulante [42], anticarcinogénico [48], hipoglicémico; producen disminución de lípidos en sangre, ejercen efectos radioprotector y sobre efectos sobre el sistema nervioso central (SNC) y movimiento muscular [40,42,44,49].

**1.3.1 Principales especies de *Ocimum* conocidas.** De acuerdo con Paton *et al.* [33] se encuentran reportadas 65 especies de albahacas y dentro de éstas se presentan variedades particulares. En la **Tabla 1.1** se describen las especies de albahacas más importantes, clasificadas por su composición química particular, algunas hicieron parte de este estudio.

**Tabla 1.1.** Información general sobre algunas especies de albahacas.

| Nombre de la planta | | Distribución | Origen | Usos en medicina popular | Aceite esencial | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Botánico** | **Común** | | | | **Rendimiento, %** | **Compuestos mayoritarios** |
| *O. basilicum* | Albahaca común, reina, dulce | Trópicos de África, América, Asia [2,12] | Asia y trópicos [2,3,12] | Estimulante, carminativo, diurético, antibacteriano, antifúngico, insecticida [50,51] | 0.5-1.5 | Linalol (30-90%),estragol (50-90%), eucaliptol, eugenol, metil-eugenol [3,12,34,36,50] |
| *O. gratissimum* | Albahaca rusa, de clavo | África, India, Indochina, Malasia [2,33] | Neo-trópico | Febrífuga, anticólicos, antiséptico [50] | 0.1-2.4 | Timol (20-60%), eugenol (40-90%), citral (65%), *p*-cimeno, γ-terpineno, β-mirceno [2,34,36] |
| *O. americanum* | Albahaca american a limón, velluda, tipo alcanfor | Trópico, África, China, India | Neo-trópico [2,33] | Estimulante, carminativo, diaforético, febrífugo, bronquitis, dermatitis, hipoglicemia, leucorrea, antifúngico [50] | 0.2-1.1 | Alcanfor (60-80%), citral (75%), linalol (60-90%), eugenol, estragol, cinamato de metilo [2,34,36,50] |
| *O. sanctum* | Albahaca santa, sagrada, Thai, Tulsi | Asia tropical, América, India [2,33] | Trópico | Carminativa, antiasmática, antireumática, anti-espasmódica, antipirética, hepato-protectora, antimalárica, antibacteriano, antifúngico [50] | 0.2-4.1 | Eugenol (70%) [52], citral (70%), estragol y chavibetol, metileugenol, α-bisaboleno, β-bisaboleno [2,34,36] |
| *O. minimum* | Albahaca griega, pequeña, fina, arbusto | Asia, India [2,33] | India | Repelente, antibacteriano | 1.7-2.3 | Metil-eugenol (43-64%), estragol (36%), acetato de geranilo (70%) [36,53] |
| *O. micranthem um* | Albahaca peruana, silvestre, de gallina [54] | Florida, Bahamas, India [2] | Neo-trópico | Asma, catarro, anticonvulsivo, disentería, dismenorrea, fiebre [54] | 0.4-4.3 | Eugenol (70-97%), eucaliptol (20%), sesquiterpenos (48-86%), *i.e.*, *trans*-β-cariofileno, γ-elemeno [34,36] |

Se presume que la variación en la composición química de los aceites de albahaca se debe principalmente a los polimorfismos en *O. basilicum* causados por hibridaciones interespecíficas, lo que conduce a varios quimiotipos [55]. Existen variedades de especies como *O. gratissimum* var*. gratissimum*, *O. gratissimum* var*. macrophyllum*, *O. americanum* var*. americanum* y *O. americanum* var*. pilosum*, entre otras [33].

## 1.4 ORÉGANOS

El vocablo vernáculo "orégano" viene de las palabras griegas "*oros*" (montaña) y "*ganos*" (adorno) y se utiliza para designar una plétora de géneros y especies de plantas, utilizadas como especias, que tienen un olor y sabor general característicos [12]. 61 especies de los 17 géneros pertenecen a 6 familias denominadas "orégano". En la familia Lamiaceae el género *Origanum* es considerado el más importante, junto con dos géneros de la familia Verbenaceae (*Lantana* y *Lippia*), que se usan para producir herbajes de orégano [56]. Además, "orégano" es el nombre comercial establecido para aquellas especias que son ricas en los monoterpenoides fenólicos, carvacrol y timol [57].

**1.4.1 Especies de *Lippia* bajo estudio.** De diversas plantas, *Lippia* es el género más conocido en el Nuevo Continente (México), que evoca al orégano mediterráneo, en términos de aroma y sabor; sus hojas se comercializan como "orégano". Este género consta de *ca.* 200 especies, de las cuales 46 han sido químicamente examinadas [58]. Tres de estas especies, *i.e.*, *L. graveolens* [59], *L. micromera* [60] y *L. gracilis* [61], contienen timol y carvacrol como constituyentes principales [58]. En la **Tabla 1.2** se describen brevemente las especies *Lippia* que se estudiaron en este trabajo.

**Tabla 1.2.** Información general sobre las especies *L. origanoides* y *L. micromera*.

| Nombre de la planta | | Distribución | Origen | Usos en medicina popular | Aceite esencial | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Botánico** | **Común** | | | | **Rendimiento, %** | **Compuestos mayoritarios** |
| *L. origanoides* | Orégano de monte, de cerro, ancho | De México hasta Brasil (zona amazónica) | Centro-américa y Norte Sur-América [14,62] | Estomáquico, antidiarreico, náuseas, antiflatulencia, estimulante, emenagogo, febrífugo, antiséptico [14,62] | 0.4-3.6 | Carvacrol (33-44%) [62], timol (20-66%) [64], $\alpha$-terpineno (22%) y *p*-cimeno (28%) [65,66], $\alpha$-felandreno |
| *L. micromera* | Tomillo español, falso tomillo, oreganito [2,58] | México, Sur América [2,58,67] | Colombia Venezuela, islas del Caribe [67] | Antiasmático, anticatarral, antitusivo, estomáquico [68] | 1.5-2.0 | Carvacrol (26-42%), timol, citral [58,69] |

**1.4.2 Especies de *Plectranthus* y *Thymus* bajo estudio.** Otro importante género de la familia Lamiaceae es *Plectranthus*, al cual pertenecen alrededor de 300 especies, encontradas en África tropical, Asia y Australia. Las propiedades medicinales de las especies de este género son de las más aprovechadas, y sobrepasan el 85% de todos los usos descritos [70].

El género *Thymus* es uno de los 8 más importantes de la familia Labiatae, con 220 especies. La palabra “tomillo” se ha utilizado tradicionalmente para designar tanto al género, como a la especie usada comercialmente, *i.e.*, *Thymus vulgaris*. El género *Thymus* es muy frecuente en la región mediterránea donde algunas especies forman una vegetación de arbustos hasta con 50 cm de altura [15]. Las especies vegetales *Plectranthus amboinicus* y *Thymus vulgaris* se describen brevemente en la **Tabla 1.3**.

**Tabla 1.3.** Información general sobre las especies *P. amboinicus* y *T. vulgaris*.

| Nombre de la planta | | Distribución | Origen | Usos en medicina popular | Aceite esencial | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Botánico** | **Común** | | | | **Rendimiento, %** | **Compuestos mayoritarios** |
| *P. amboinicus* | Tomillo francés, orégano silvestre, brujo, francés, sugánda, oreganón [2] | América tropical, Brasil, África, India, Indonesia, Malasia, Filipinas | Trópico África, Asia, Australia [70] | Dispepsia, anticonvulsivo antiasmático, bronquitis, ronquera,tos, antifúngico enfermedades digestivas [50,70-73] | 0.1-0.2 | Timol (80%), carvacrol, alcanfor [50], limoneno linalol, β-mirceno [70] |
| *T. vulgaris* | Tomillo, tomillo común, tomillo de jardín [74] | Marruecos, España, Francia, Italia, Norte de América [2,33] | Mediterráneo [3,15] | Digestivo, laringitis, tranquilizante, expectorante, repelente, antibacteriano [12] | 0.5-2.0 | Timol (12-61%), carvacrol (0,4-20%), eucaliptol (0,2-14%) y *p*-cimeno (9-22%), terpinen-4-ol, borneol [2,3,12,75] |

**1.4.3 Especies de *Origanum* y *Satureja* bajo estudio.** El género *Origanum* se conoce en el mundo de las hierbas y especias por sus aceites volátiles y, junto con el de *Satureja*, contienen carvacrol y timol como constituyentes principales. El orégano (*O. vulgare*) y la mejorana (*O. majorana*) son las dos especies más comerciales del género *Origanum* [57].

El género *Satureja* (Familia Lamiaceae) contiene 130-150 especies de hierbas y arbustos llamados ajedreas o hisopillos. Estas especies son nativas de las regiones templadas del hemisferio norte [76] y sobresalen por la producción de aceites esenciales con composición variada [77]. La **Tabla 1.4** describe brevemente las características más importantes de las especies *O. mejorana* y *S. brownei*.

**Tabla 1.4.** Información general sobre las especies *O. mejorana* y *S. brownei*.

| Nombre de la planta | | Distribución | Origen | Usos en medicina popular | Aceite esencial | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Botánico** | **Común** | | | | **Rendimiento, %** | **Compuestos mayoritarios** |
| *O. majorana* | Mejorana dulce, anual [78] | Norte África, suroeste Asía, India, Alemania, Francia, España, Italia, Suramérica y Estados Unidos [2,12,50]. | Europa mediterránea, suroeste de Asia [3] | Emenagogo, carminativo, expectorante, astringente, anticonvulsivo desórdenes nerviosos [12,50] | 0.3-3% | *trans*-4-tujanol (8-40%), *cis*-4-tujanol (1-20%), terpinen-4-ol (18-48%), linalol (9-39%), sabineno, $\alpha$-tujeno, carvacrol, eugenol, estragol [3,12,50,57] |
| *S. brownei* | Menta, Poleo, Xautzí, Sactze, menta monte, toronjil [79-81] | América Central y del Sur [82] | Trópico | Afecciones estomacales, diarrea, hipotensora, calmante, digestiva, febrífuga [75,81]. | 0.1-1.0 | Pulegona (55-64%), mentona (20-33%) [83,84] |

## 1.5 ANISES Y ESTRAGONES

Las especias denominadas como “anises” son de interés particular por su intenso aroma y sabor, relacionados con sus aplicaciones en perfumes, en las industrias de licores, cosmética y culinaria, junto con sus beneficiosas propiedades digestivas y estimulantes [85]. Así mismo, las especias designadas como “estragones”, debido a su similitud composicional con las especies de anises, tienen propiedades organolépticas y farmacológicas muy similares [12], razón por la cual los estragones se utilizan como sustitutos de los anises.

**1.5.1 Especies de *Tagetes* bajo estudio.** *Tagetes* es un género con cerca de 60 especies de hierbas anuales o perennes de la familia de las Margaritas (Familia Asteraceae) y son nativas de Latinoamérica [54]. La **Tabla 1.5** describe brevemente las especies estudiadas de *Tagetes*.

**Tabla 1.5.** Información general sobre las especies *T. lucida* y *T. filifolia*.

| Nombre de la planta | | Distribución | Origen | Usos en medicina popular | Aceite esencial | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Botánico** | **Común** | | | | **Rendimiento, %** | **Compuestos mayoritarios** |
| *T. lucida* | Estragón de invierno, anisillo, pericón, tarragón español, yerba anís, yauhtli [2,12,54] | México, Guatemala, Meso-América, India [2,12] | Centroamérica y Suramérica [86] | Diarrea, disentería, anti-inflamatorio, diurético, laxativo, estimulante, alucinógeno [54,87,88] | 0.1-0.5 | Estragol (45-90%), metil-eugenol (0,5-24%), anetol (0,5-24%) [86,89-91], cumarinas [92] |
| *T. filifolia* | Anisillo, hierba anís, anísanís, anís cimarrón, anís común, ashpa anís [93] | México, Costa Rica, Colombia, Ecuador, Perú y norte de Argentina (Centro y Sur América) [2,94] | México y Suramérica | Carminativo, digestivo, emenagogo, diurético, emoliente, tónico, repelente, antibacteriano, antifúngico [91,95] | 0.2-0.5 | *cis*-Anetol (68%), *trans*-anetol (67%), estragol (14-90%) [96-98] |

**1.5.2 Especies de *Foeniculum*, *Artemisia* e *Illicium* bajo estudio.** *Foeniculum* es un género con alrededor de 6 especies de la familia Apiaceae o Umbelliferae. La denominación de *Foeniculum* proviene del latín “funiculus”=hilillos, que hace referencia a las hojas del género. La especie representante es *Foeniculum vulgare* [99]. Por su parte, *Artemisia* es uno de los 100 géneros más grandes de la familia Asteraceae y comprende 400 especies [100], encontradas principalmente en Asia, Europa y Norte América. Son en su mayoría hierbas o pequeños arbustos, perennes, frecuentemente fragantes y con constituyentes biológicamente activos (lactonas sesquiterpénicas) importantes [100,101].

Finalmente, *Illicium* (Familia Illiciaceae) es un género de árboles y arbustos, perennes, que florecen y que crecen principalmente en la selva subtropical. Alrededor de 40 especies están distribuidas en el Este de Norte América, México e Indias Occidentales; sin embargo, la mayor concentración de estas especies se encuentra en Myanmar y en el Sur de China, con 35 especies [102]. En la **Tabla 1.6** contiene información general de las especies estudiadas de *Foeniculum, Artemisia* e *Illicium*.

**Tabla 1.6.** Información general sobre las especies *F. vulgare*, *A. dracunculus* e *I. verum*.

| Nombre de la planta | | Distribución | Origen | Usos en medicina popular | Aceite esencial | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Botánico | Común | | | | Rendimiento, % | Compuestos mayoritarios |
| *F. vulgare* | Hinojo, finocchio hinojo amargo, hinojo común, millu. | Europa Central, Rusia, Alemania, Hungría, Argentina, EE.UU. [12] | Europa, región mediterránea [50,100,103] | Tos, bronquitis, diurético, carminativo, estomáquico emenagogo, galactagogo, estimulante, amenorrea, enuresis [50,104] | 1-8 | *trans*-Anetol (50%), fenchona (10-20%), limoneno (10-30%), α-felandreno (3-10%) α-, β-pinenos, α-tujeno, estragol [12,50,103] |
| *A. dracunculus* | Tarragón estragón francés, alemán, estragón falso estragón [105] | Europa, Siberia, Himalaya, Mongolia, China, Alaska, Canadá, EE.UU. [2,12] | Centro, Este Europa, Sur Rusia, Oeste Asia, Norte América [3,12,106] | Estimulante digestivo, eliminación toxinas, calmante | 0.5-2.5 | Estragol (60-75%), *trans*-anetol (10%), α-, β-pinenos, *cis*-, *trans*-ocimeno, canfeno, β-mirceno [3,12,50,106]. |
| *I. verum* | Anís estrella, anís chino, badiana, anís de la India, *Illicium* | Sureste China, Laos, Vietnam, Corea, Japón, Taiwán, Filipinas [2,12]. | Suroeste China, Norte Vietnam [3,12,107,108] | Carminativo, estimulante, diurético, estomáquico, reumatismo, insecticida, antigripal [50,86,104,107,108] | 2.5-3.5 (material fresco); 8-9 (material seco) | *trans*-Anetol (70-90%), foeniculina (15%), estragol, β-bisaboleno, β-farneseno, nerolidol [12,50,102,107,108] |

La otra variedad importante de esta especie es *F. vulgare* var. *dulce* (DC) Batt. et Trab. que se caracteriza por su menor contenido de fenchona (5%) y contenido de *trans*-anetol más alto (50-80%) [12,99].

Las descripciones anteriores fueron la base para la búsqueda y selección de las especies estudiadas que potencialmente podrían contener en sus AE timol, carvacrol, *trans*-anetol y estragol, como constituyentes mayoritarios. Estas sustancias químicas de interés pueden ser sintetizadas en la plantas a través de las vías del ácido mevalónico (MVA) o metileritritol fosfato (desoxixilulosa fosfato - DXP) y del ácido shiquímico.

## 1.6 RUTAS BIOSINTÉTICAS

Los AE (mezcla compleja de compuestos volátiles) producidos por las plantas, pueden cumplir distintas funciones, desde atraer y guiar polinizadores, inhibir o aniquilar bacterias u hongos hasta proteger de sus enemigos partes reproductivas valiosas, etc. Estos constituyentes se clasifican en terpenoides y fenilpropa(e)nos, que definen las propiedades de especias e hierbas [109]. Cada grupo de compuestos proviene de la ruta del ácido mevalónico (MVA) o metileritritol fosfato (desoxixilulosa fosfato - DXP) [110-113] o del ácido shiquímico, respectivamente [112,114].

**1.6.1 Rutas biosintéticas.** Los metabolitos secundarios se biosintetizan combinando unidades estrucuturales del mismo tipo o diferentes. Las características de estas unidades y las más frecuentemente encontradas en el esqueleto de carbono y nitrógeno de un producto natural se presentan en la **Figura 1.1**.

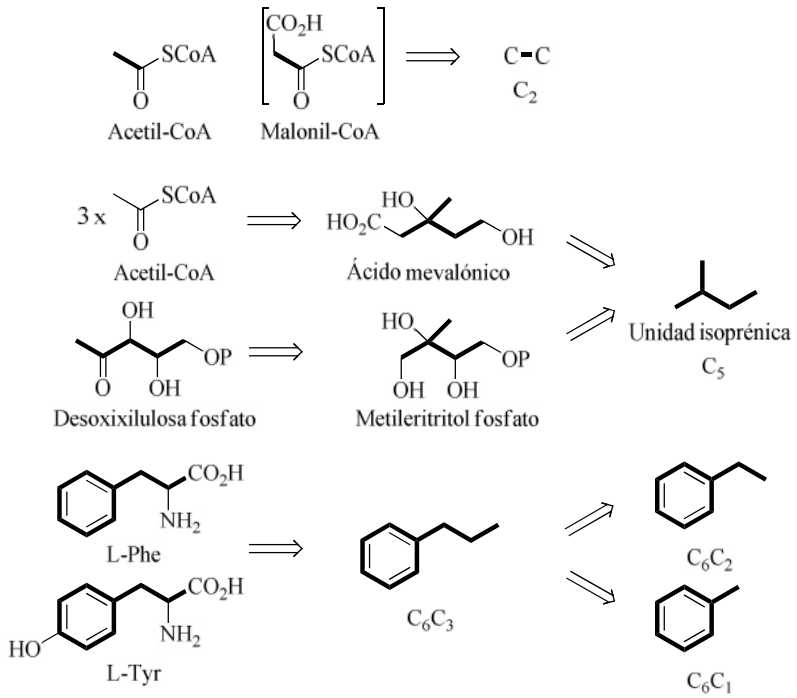
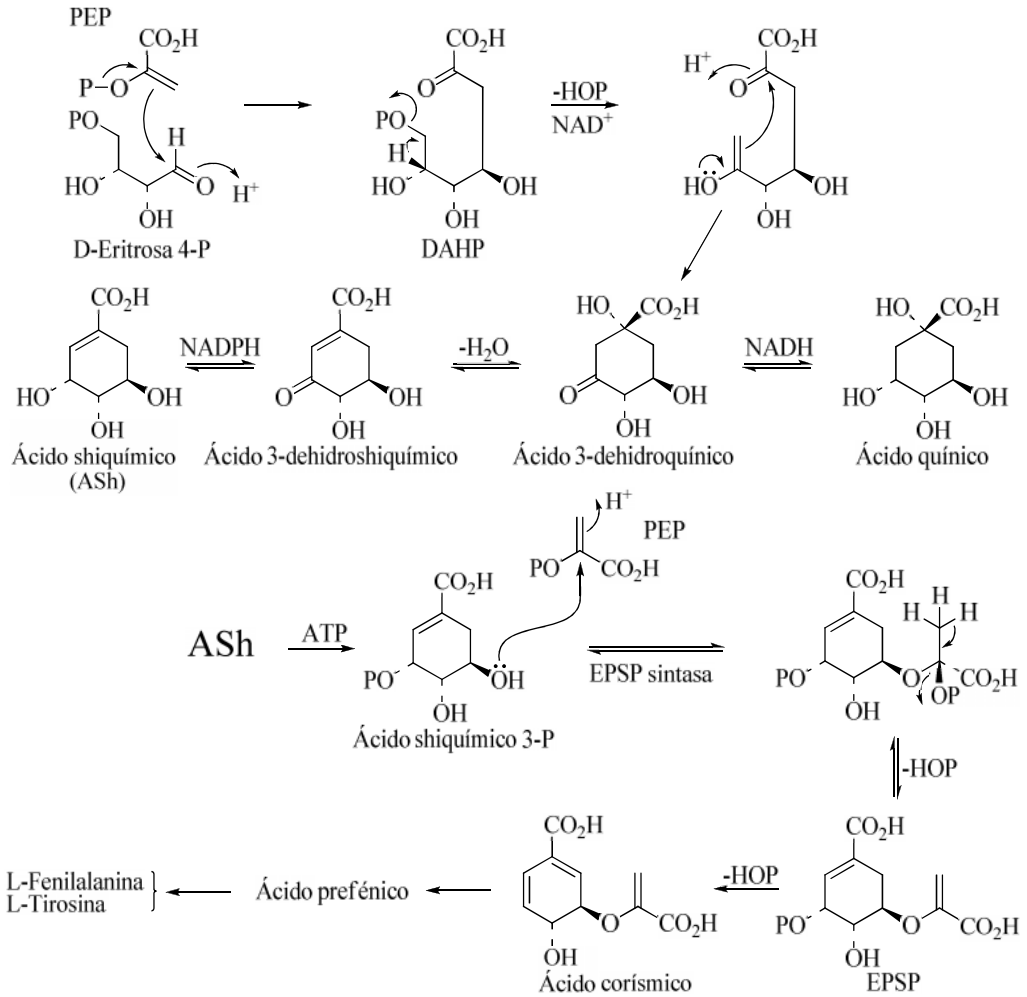



**Figura 1.1**. Combinación de unidades para la construcción de esqueletos carbonados para diferentes productos naturales.

**1.6.1.1 Ruta del shiquimato.** Los fenilpropa(e)nos son compuestos caracterizados por un anillo aromático unido a una cadena de 3 carbonos, derivados

biosintéticamente del ácido shiquímico, que es el precursor biogenético de la L-fenilalanina, L-tirosina y L-triptófano, que forman la base de las unidades $C_6C_3$ de fenilpropanos, *e.g.*, ácidos cinámico, cumarinas lignanos y flavonoides [112,114,115]. La ruta del shiquimato inicia con el acople del fosfoenolpiruvato (PEP) y D-eritrosa-4-fosfato produciendo el ácido 3-desoxi-D-arabino-heptulosónico 7-fosfato (DAHP). La eliminación de $H_3PO_4$ a partir de DAHP genera el ácido 3-dehidroquínico. El ácido shiquímico se forma a partir del ácido 3-dehidroquínico vía ácido 3-dehidroshiquímico por etapas de deshidratación y reducción (**Esquema 1.1**). Una molécula adicional de PEP se enlaza con el ácido shiquímico-3-fosfato para generar el ácido 3-enolpiruvilshiquímico 3-fosfato (EPSP). La transformación de EPSP al ácido corísmico involucra la eliminación de $H_3PO_4$ [112,114-116].



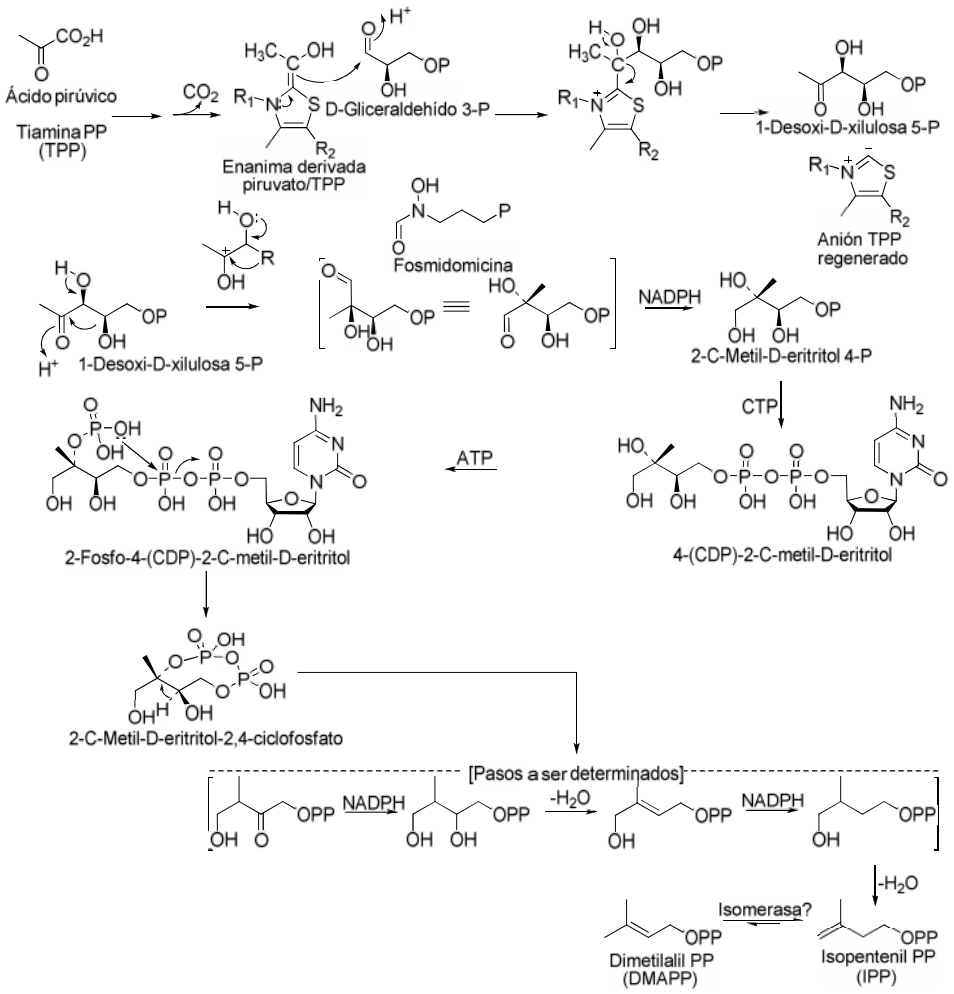

**Esquema 1.1.** Ruta metabólica del ácido shiquímico.

El ácido corísmico se transforma en el ácido prefénico y éste, a su vez, en fenilalanina y tirosina (unidades constructoras de $C_6C_3$). Estos dos aminoácidos producen ácidos cinámico y *p*-cumárico, respectivamente, los cuales por reducción se transformarán en el correspondiente alcohol cinamílico [112,114,115]. Esta es la ruta por la cual se biosintetizan el anetol y estragol, mediante isomerazas.

**1.6.1.2 Rutas del ácido mevalónico y desoxixilulosa fosfato.** Los terpenoides están conformados por unidades isoprénicas $C_5$, enlazadas de "cabeza-cola" [117-119], elaborados bioquímicamente y derivados de dos rutas: vía ácido mevalónico (MVA) y vía 1-desoxi-D-xilulosa fosfato (DXP) (o metileritritol fosfato); esta última ruta es probablemente la más utilizada en naturaleza [110-113].

**1.6.1.2.1 1-Desoxi-D-xilulosa 5-fosfato.** El 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato (DXP) se forma a partir del ácido pirúvico y del gliceraldehído 3-fosfato provenientes de la ruta glicolítica. Sucesivamente, se libera el portador TPP con el que se genera desoxixilulosa fosfato, que se transforma al 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato. Éste contiene el esqueleto equivalente a la unidad isoprénica, pero la secuencia de pasos conducente al intermediario isopentenil fosfato (IPP) no ha sido elucidado aún [112,120]. El 2-fosfato resultante de la reacción del metileritritol fosfato con citidina trifosfato (CTP) se convierte a un fosfoanhídro-cíclico. Este ciclofosfato, por pasos aún no conocidos, conduce a IPP y enlaza la ruta del desoxixilulosa con la del mevalonato. El dimetilalil difosfato (DMAPP) se deriva a IPP por isomerismo (**Esquema 1.2**) [112,113,115,120].

La unión de DMAPP e IPP produce geranil difosfato (GPP) y por medio de isomerazas, linalil PP (LPP) y neril PP (NPP). Estas tres moléculas generan una gama de monoterpenos lineales encontrados como componentes de AE [111,112,119]. El rango de monoterpenos es considerable debido a las reacciones de ciclación que generan sistemas mono- y bicíclicos. Además, la adherencia de una unidad IPP al GPP conduce al precursor fundamental de los sesquiterpenos, farnesil difosfato (FPP) y éste dará lugar a sesquiterpenos lineales y cíclicos [112,119,121].




**Esquema 1.2.** Ruta biogenética del 1-desoxi-D-xilulosa fosfato.

Los fenoles naturales surgen de tres maneras: a.) Derivados de ácidos con tres unidades de mevalonato, siendo intermediarios en la biosíntesis de fenoles; b.) Anillos aromáticos oxidados *in vivo* por mono-oxigenasas y c.) Anillos acíclicos con funciones de oxígeno reducidos/oxidados a fenoles (timol y carvacrol, derivados de monoterpenos monocíclicos con una función de oxígeno en posición 2- y 3- [122]) [112,123].

La **Tabla 1.7** presenta información resumida acerca de los compuestos encontrados en las plantas de interés relacionada con su biogénesis y sobre plantas que los contienen, sus propiedades y aplicaciones.

**Tabla 1.7.** Información química importante concerniente a los compuestos mayoritarios encontradas en las plantas bajo estudio.

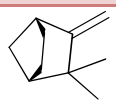
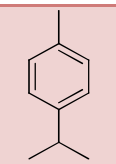
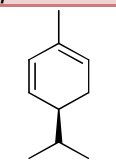
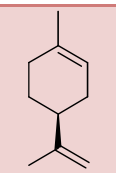
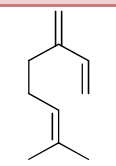
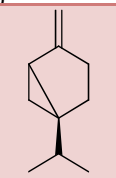
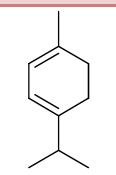
| Compuesto mayoritario | Planta | Biogenésis [7] | Propiedades biológicas [8] | Aplicaciones o usos [124] |
|---|---|---|---|---|
| **Hidrocarburos monoterpénicos** | | | | |
|  Canfeno | *A. dracunculus* | Ruta del DXP; Precursor: LPP | No tóxico, no irritante, no sensibilizante | Intermediario para síntesis de compuestos *flavour* (borneol) y en la industria química [125] |
|  *p*-Cimeno | *L. origanoides* *T. vulgaris* | Ruta del DXP; Precursor: GPP (□-terpineno) | No tóxico, mediana irritabilidad, no sensibilizante | Poco usado en perfumería; intermediario para síntesis de *p*-cresol [126] |
|  α-Felandreno | *F. vulgare* | Ruta del DXP; Precursor: LPP | Ópticamente activo, no tóxico, irritante de piel | Materia prima para síntesis de compuestos *flavour*, inhalante. |
|  Limoneno | *F. vulgare* | Ruta del DXP; Precursor: LPP | Ópticamente activo, no tóxico, mediana irritabilidad, no sensibilizante | Materia prima para síntesis de compuestos *flavour* (alcohol perilílico [127]; α-terpineol [128]), saborizantes |
|  β-Mirceno | *F. vulgare* | Ruta del DXP; Precursor: LPP | No tóxico, no irritante, no sensibilizante; anticáncer [129]; analgésico [130] | Perfumería y como aditivo de alimentos [130] |
|  Sabineno | *A. dracunculus* | Ruta del DXP; Precursor: LPP | No tóxico, bactericida [131] | Industrias de fragancias y cosmética |
|  α-Terpineno | *L. origanoides* | Ruta del DXP; Precursor: LPP | Potencial hepatotoxicidad | Materia prima para síntesis de compuestos *flavour*, industrias farmacéutica y cosmética [132] |

**Tabla 1.7** continuación.

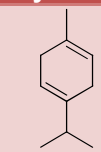
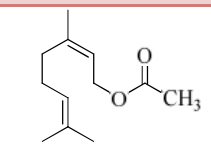
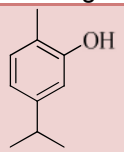
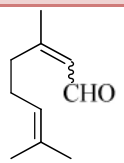
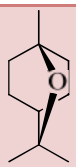
| Compuesto mayoritario | Planta | Biogenésis [7] | Propiedades biológicas [8] | Aplicaciones o usos [124] |
|---|---|---|---|---|
|  γ-Terpineno | *L. origanoides*<br>*T. vulgaris*<br>*L. micromera* | Ruta del DXP; Precursor: LPP | No tóxico, no irritante, no sensibilizante, antioxidante [133] | Materia prima para síntesis de compuestos *flavour*, industrias farmacéutica y cosmética |
| **Monoterpenos oxigenados** | | | | |
|  Alcanfor | *O. americanum*<br>*P. amboinicus* | Ruta del DXP; Precursor: LPP | Ópticamente activo, es tóxico ($LD_{50}$ 0.05-0.55 mg/kg) [8] | Confitería, en alimentos, bebidas alcohólicas, jabones, condimentos, solvente [3] |
|  Acetato de geranilo | *O. minimum* | Ruta del DXP; Precursor: LPP | No tóxico, no sensibilizante | Éster utilizado en perfumería, industrias farmacéutica y cosmética |
|  Carvacrol | *L. origanoides*<br>*L. micromera*<br>*P. amboinicus*<br>*T. vulgaris* | Ruta del DXP; Precursor: LPP (γ-terpineno) | Irritante, corrosivo, sensibilizante, tóxico ($LD_{50}$ 0.1-0.81 mg/kg), antiséptico, antioxidante [134], antibacteriano [135] | Materia prima para síntesis de *flavour*, industrias farmacéutica, cosmética, en alimentos, bebidas, condimentos |
|  Citral | *O. gratissimum*<br>*O. americanum*<br>*O. sanctum*<br>*L. micromera*<br>*P. amboinicus* | Ruta del DXP; Precursor: GPP y NPP | No tóxico, sensibilidad dérmica, antiséptico, antibacteriano [136] | Sustancia utilizada como fragancia, industrias farmacéutica y cosmética y materia prima para síntesis de vitamina A. |
|  Eucaliptol (1,8-cineol) | *O. basilicum*<br>*O. micranthemum*<br>*T. vulgaris* | Ruta del DXP; Precursor: LPP | No tóxico, no irritante, no sensibilizante, antibacteriano [137] | Sustancia química utilizada como fragancia, *flavours* (*e.g.*, productos de higiene oral) y cosméticos |

**Tabla 1.7** continuación.

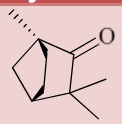
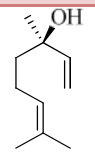
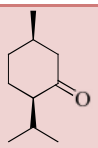
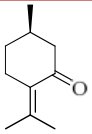
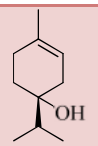
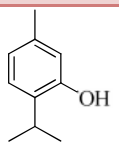
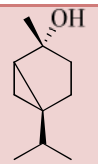
| Compuesto mayoritario | Planta | Biogenésis [7] | Propiedades biológicas [8] | Aplicaciones o usos [124] |
|---|---|---|---|---|
|  Fenchona | *F. vulgare* | Ruta del DXP; Precursor: LPP | No tóxico, no irritante, no sensibilizante, contrairritante [138] | Preparación de AE artificiales y productos perfumados de hogar |
|  Linalol | *O. basilicum*<br>*O. americanum*<br>*O. majorana* | Ruta del DXP; Precursor: LPP | Ópticamente activo, sedativo, anticonvulsivo [139], no tóxico, no irritable, no sensibilizante | Alcohol terpénico muy importante en perfumería, confiteria, en alimentos, bebidas alcohólicas, condimentos |
|  Mentona | *S. brownei* | Ruta del DXP; Precursor: LPP | Ópticamente activo, no hepatotóxica, estimula SNC | Materia prima para síntesis de *flavour* (mentol) y AE sintéticos de menta y bases |
|  Pulegona | *S. brownei* | Ruta del DXP; Precursor: LPP | Ópticamente activo, tóxico ($LD_{50}$ 0.5 mg/kg), no irritante, no sensibilizante | Intermediario para síntesis de compuestos *flavours* (mentol), fragancia, farmacéutica |
|  Terpinen-4-ol | *O. majorana* | Ruta del DXP; Precursor: LPP | Antibacteriano [140], antiséptico, anti-inflamatorio [141], mediana irritabilidad, no sensibilizante | En AE artificiales de geranio y pimienta y en perfumería |
|  Timol | *O. gratissimum*<br>*L. origanoides*<br>*L. micromera*<br>*P. amboinicus*<br>*T. vulgaris* | Ruta del DXP; Precursor: LPP ($\gamma$-terpineno) | Antiséptico, desinfectante, antioxidante, antibacteriano [135], antifúngico [142], irritante | Materia prima para síntesis de *flavours*, bebidas, fragancias, en alimentos productos de higiene oral, condimentos |
|  *cis*-4-Tujanol | *O. majorana* | Ruta del DXP; Precursor: LPP | Insecticida | Sustancia química utilizada como fragancia, en alimentos |

**Tabla 1.7** continuación.

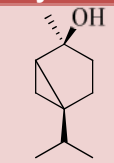
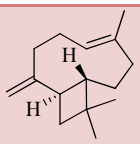
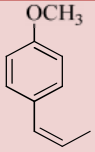
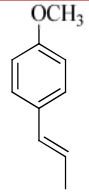
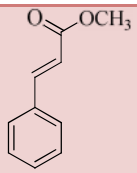
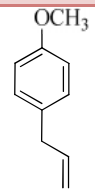
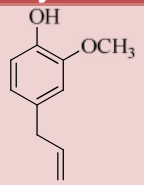
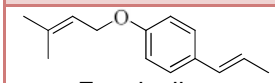
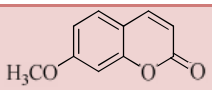
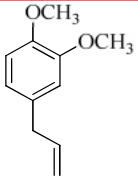
| Compuesto mayoritario | Planta | Biogenésis [7] | Propiedades biológicas [8] | Aplicaciones o usos [124] |
|---|---|---|---|---|
|  *trans*-4-Tujanol | *O. majorana* | Ruta del DXP; Precursor: LPP | Insecticida | Sustancia química utilizada como fragancia, en alimentos |
| **Hidrocarburos sesquiterpénicos** | | | | |
|  *trans*-β-Cariofileno | *O. micranthemum* | Ruta del DXP; Precursor: FPP | No tóxico, mediana irritabilidad, no sensibilizante, anestésico [143], anti-inflamatorio [144] | Industria de alimentos y cosmética [145] |
| **Propa(e)noides** | | | | |
|  *cis*-Anetol | *T. filifolia* | Ruta del ácido shiquímico; Precursor: ácido cinámico | Tóxico | No tiene usos industriales debido a su toxicidad y sabor desagradable [145] |
|  *trans*-Anetol | *T. lucida*<br>*T. filifolia*<br>*F. vulgare*<br>*A. dracunculus*<br>*I. verum* | Ruta del ácido shiquímico; Precursor: ácido cinámico | No tóxico, no irritante, no sensibilizante, no genotóxico ni carcinogénico [147,148], anestésico [149] | Saborizante, en alimentos, bebidas alcohólicas, condimentos, productos de higiene oral |
|  *trans*-Cinamato de metilo | *O. americanum* | Ruta del ácido shiquímico; Precursor: ácido cinámico | Antimicrobiano [150] | Sustancia utilizada como fragancia, en perfumería, en alimentos |
|  Estragol | *O. basilicum*<br>*O. sanctum*<br>*O. mínimum*<br>*T. lucida*<br>*T. filifolia*<br>*A. dracunculus* | Ruta del ácido shiquímico; Precursor: ácido cinámico | Genotóxico, potencial carcinogéno ($LD_{50}$ 1.25 mg/kg) [147], mediana irritante, no sensibilizante | Perfumería, saborizante, en alimentos, bebidas alcohólicas, condimentos |

**Tabla 1.7** continuación.

| Compuesto mayoritario | Planta | Biogenésis [7] | Propiedades biológicas [8] | Aplicaciones o usos [124] |
|---|---|---|---|---|
|  Eugenol | *O. gratissimum*<br>*O. sanctum*<br>*O.micranthemum* | Ruta del ácido shiquímico; Precursor: ácido cinámico | Analgésico [151], sedativo, antiséptico, antioxidante [152] antibacteriano [153], irritante, no genotóxico, no carcinógeno [148], no sensibilizante, antiplaquetario | Dentistería, perfumería, saborizante, alimentos, condimentos |
|  Foeniculina | *I. verum* | Ruta del ácido shiquímico; Precursor: ácido cinámico | Insecticida [154] | — |
|  Herniarina | *T. lucida* | Ruta del ácido shiquímico; Precursor: ácido cinámico (umbeliferona) | Herbicida, antibiótico, antifúngico [155], antidermatofito [156] | No se utiliza como fragancia |
|  Metil-eugenol | *O. mínimum*<br>*T. lucida* | Ruta del ácido shiquímico; Precursor: ácido cinámico | Genotóxico, carcinógeno ($LD_{50}$ 0.81-1.56 mg/kg), no irritante, no sensibilizante, antimicrobial [157] | Sustancia utilizada en perfumería y en composiciones de *flavour* |

$LD_{50}$ - Dosis letal media determinadas en ratas.

## 1.7 CIENCIOMETRÍA

La "medición" del estado actual del tema se realizó de acuerdo con el análisis cienciométrico utilizando como instrumentos los indicadores bibliométricos en función del recuento de publicaciones científicas. En el período de 1990-2010, usando la plataforma ***ISI Web of Knowledge***$^{sm}$, se encontró que el número de registros totales sobre anetol, estragol, carvacrol y timol fueron 486, 184, 997 y 1564, consecutivamente; y para aceites esenciales que los contienen fueron 143, 57, 763 y 702 publicaciones, respectivamente (**Figura 1.2**).

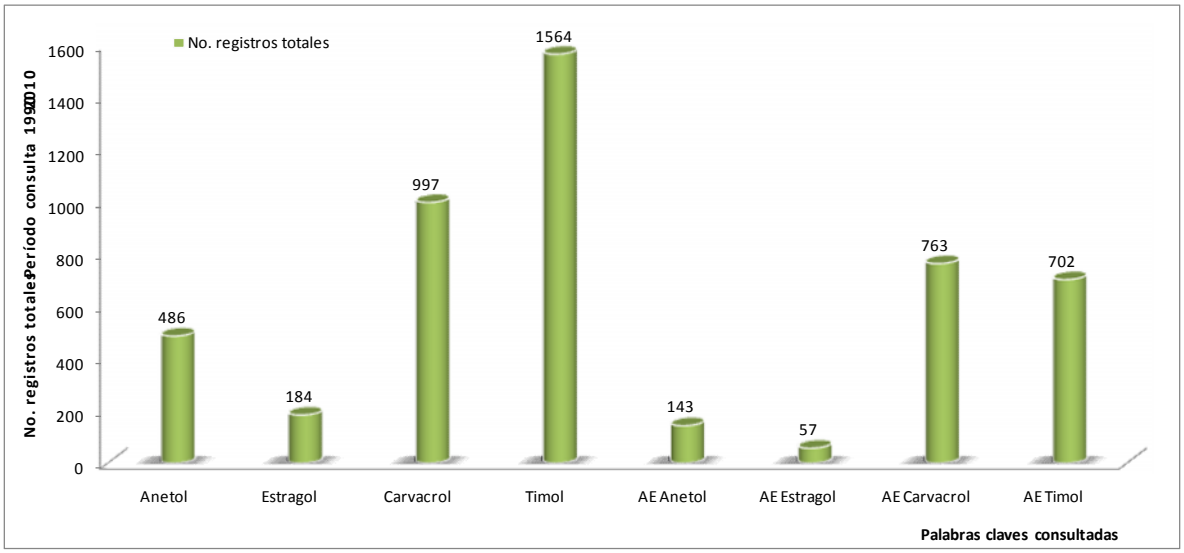



**Figura 1.2.** Número de registros totales para anetol, estragol, timol, carvacrol y AE que los contienen. Fuente: *Web of Science*. Período de consulta: 1990-2010. Fecha de consulta: marzo 1 de 2010. Palabras clave: *anethole*, *estragole*, *carvacrol*, *thymol*, *essential oils*.

Así, en el año 2009 se presentó el mayor número de registros para timol (168), carvacrol (154) y AE que los contienen (98 y 113, respectivamente); mientras que, para anetol (42), estragol (20) y sus AE (20 y 10, consecutivamente) el número mayor de publicaciones se registró en el 2008. La evolución de publicaciones en el tiempo ha estado en aumento, a excepción de trabajos sobre estragol y sus AE. El número amplio de registros encontrados refleja el interés sobre estos compuestos por la comunidad científica.

Las dos áreas de conocimiento, con las cuales ha estado asociada la mayoría de publicaciones encontradas sobre anetol, estragol, carvacrol, timol y los AE que los contienen, son ciencia, tecnología de alimentos y química aplicada. Sin embargo, otras áreas, no menos importantes, pero con menor número de artículos, son farmacología y farmacia, química medicinal y ciencias de las plantas. Estas publicaciones están enfocadas en la determinación de la composición química de extractos y AE de diversas plantas y su potencial actividad biológica (*e.g.*, alelopática, citotóxica, antioxidante, antibacteriana, repelente, antifúngica, entre otras). Otro interés particular revelado en estos reportes es sobre su aroma y su aplicación en alimentos. Se resalta, que toxicología es el área de mayor número de registros para el estragol debido a su potencial carcinogénico [8]. Esto indica que las investigaciones

sobre los cuatro componentes y sus AE, en la actualidad, están enfocados en la búsqueda de sus nuevos usos y aplicaciones en la industria.

## 1.8 PARTE EXPERIMENTAL

Los extractos de las especies estudiadas se obtuvieron por destilación-extracción simultánea con solvente (SDE) y por extracción con fluido supercrítico (SFE), junto con los aceites esenciales (AE), que se aislaron por hidrodestilación asistida por la radiación de microondas (MWHD). La composición química de los AE y los extractos se determinó mediante su análisis por cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM), utilizando dos columnas cromatográficas (DB-5MS y DB-WAX), como sistemas de separación. Los espectros de masas de los compuestos aislados se compararon con los de las bases de datos Wiley138, NIST02 y ADAMS, se usaron también los índices de retención lineales ($I_R$) y sustancias patrón.

### 1.8.1 Obtención de extractos y aceites esenciales.

**1.8.1.1 Reactivos y sustancias patrón**. Los siguientes fueron patrones certificados utilizados en la investigación, a saber: β-mirceno (95%), eucaliptol (99%), fenchona (98%), β-pineno (98%), canfeno (95%), 1-octen-3-ol (98%), linalol (97%), alcanfor (96%), borneol (97%), terpinen-4-ol (98%), α-terpineol (97%), limoneno (97%), *trans*-anetol (98%), estragol (98%), citral (neral y geranial, 96%), *trans*-β-cariofileno (98%), humuleno (98%), *p*-cimeno (99%), eugenol (98%), timol (99%) y carvacrol (98%), adquiridos de *Sigma-Aldrich* (St. Louis, EE.UU.). Gases especiales para cromatografía se obtuvieron de *Aga-Fano* S.A. (99,995-99,999%, Grupo Linde Gas, Bogotá, Colombia). El diclorometano fue grado analítico de Mallinckrodt Baker Inc. (J.T. Baker, Phillipsburg, EE.UU.)).

**1.8.1.2 Material vegetal e identificación taxonómica**. Las hojas y flores de las nueve especies de albahacas (*Ocimum sp*.), junto con las hojas de tomillo (*Thymus vulgaris*), orégano fránces (*Plectranthus amboinicus*), orégano de monte (*Lippia origanoides*), tomillo español (*Lippia micromera*), menta monte (*Satureja brownei*),

mejorana (*Origanum majorana*), estragón de invierno (*Tagetes lucida*), anisillo (*Tagetes filifolia*), estragón francés (*Artemisia dracunculus*) y sígueme morado (*Ocimum sp.*) se obtuvieron de plantas frescas, cultivadas en el Complejo Agroindustrial Piloto CENIVAM en la Universidad Industrial de Santander; mientras que, la otra especie de anisillo (*T. filifolia*) provino del municipio de Bolivar (Santander). La recolección del material vegetal de todas las especies y las extracciones fueron realizadas en época de verano (julio-octubre 2006) (ver **Anexo 1**).

La identificación taxonómica de muestras botánicas se llevó a cabo en el Instituto de Ciencias Naturales, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia (Bogotá) por el doctor J.L. Fernández. Los pliegos testigo de cada planta quedaron depositados como muestra permanente en el Herbario Nacional Colombiano (COL, Bogotá) y en el Herbario del CENIVAM (UIS, Bucaramanga) (**Tabla 1.8**).

**Tabla 1.8.** Clasificación botánica de las especies vegetales estudiadas.

| Planta | No. COL | Lugar de colecta | Fecha de colecta (adquisición) | Estado fenológico | Parte de planta utilizada | Métodos de extracción |
|---|---|---|---|---|---|---|
| *Ocimum sp* 1 | 512283 | Cultivo experimental CENIVAM | Julio-06 | Madurez, con inflorescencia | Hojas y flores | SDE |
| *Ocimum sp* 2 | 512280 | Cultivo experimental CENIVAM | Julio-06 | Madurez, con inflorescencia | Hojas y flores | SDE, SFE y MWHD |
| *Ocimum americanum* | 526758 | Cultivo experimental CENIVAM | Agosto-06 | Madurez, con inflorescencia | Hojas y flores | SDE |
| *Ocimum americanum* | 519795 | Cultivo experimental CENIVAM | Agosto-06 | Madurez, con inflorescencia | Hojas y flores | SDE |
| *Ocimum basilicum* | 526759 | Cultivo experimental CENIVAM | Julio-06 | Madurez, con inflorescencia | Hojas y flores | SDE |
| *Lippia origanoides* | 512270 | Cultivo experimental CENIVAM | Sept.-06 | Madurez, con inflorescencia | Hojas y flores | SDE, SFE y MWHD |
| *Lippia micromera* Schauer | 519797 | Cultivo experimental CENIVAM | Sept.-06 | Madurez, con inflorescencia | Hojas | SDE, SFE y MWHD |
| *Plectrantus amboinicus* (Lour.) Spreng | 523701 | Cultivo experimental CENIVAM | Sept.-06 | Madurez, sin inflorescencia | Hojas | SDE, SFE y MWHD |

**Tabla 1.8** continuación.

| Planta | No. COL | Lugar de colecta | Fecha de colecta (adquisición) | Estado fenológico | Parte de planta utilizada | Métodos de extracción |
|---|---|---|---|---|---|---|
| *Satureja brownei (Sw.) Briqn* | 519796 | Cultivo experimental CENIVAM | Sept.-06 | Madurez, con inflorescencia | Hojas | SDE |
| *Tagetes lucida* | 512074 | Cultivo experimental CENIVAM | Agosto-06 | Madurez, con inflorescencia | Hojas y flores | SDE, SFE y MWHD |
| *Tagetes filifolia* | ——— | Cultivo experimental CENIVAM y municipio Bolivar | Sept.-06 | Madurez, con inflorescencia | Hojas | SDE, SFE y MWHD |
| *Origanum majorana*[1] | ——— | Cultivo experimental CENIVAM | Sept.-06 | Madurez, sin inflorescencia | Hojas | SDE |
| *Tagetes filifolia* | ——— | Cultivo experimental CENIVAM y municipio Bolivar | Sept.-06 | Madurez, con inflorescencia | Hojas | SDE, SFE y MWHD |
| *Artemisia dracunculus*[1] | ——— | Cultivo experimental CENIVAM | Sept.-06 | Madurez, sin inflorescencia | Hojas | SDE y MWHD |
| *Thymus vulgaris*[1] | ——— | Cultivo experimental CENIVAM | Sept.-06 | Madurez, sin inflorescencia | Hojas | SDE, SFE y MWHD |
| *Ocimum sanctum*[1] | ——— | Cultivo experimental CENIVAM | Agosto-06 | Madurez, sin inflorescencia | Hojas | SDE |
| *Ocimum basilicum var. purpurascens*[1] | ——— | Cultivo experimental CENIVAM | Agosto-06 | Madurez, con inflorescencia | Hojas y flores | SDE |
| *Ocimum americanum* híbrido* | ——— | Cultivo experimental CENIVAM | Agosto-06 | Madurez, sin inflorescencia | Hojas | SDE |
| *Foeniculum vulgare*[2] | ——— | Mercado local - Bga | Agosto-06 | Madurez, con inflorescencia | Hojas | SDE, SFE y MWHD |
| *Illicum verum*[2] | ——— | Mercado local - Bga | Sept.-06 | ——— | Frutos | SDE, SFE y MWHD |

[1]Cultivadas a partir de semillas certificadas; [2]Adquiridas en el mercado local; *posiblemente surgió por hidridación interespecífica entre *O. americanum*.

Algunas de las especies de *Ocimum* (purpúreas) analizadas fueron producto de hibridación de la especies O. *americanum*. La especie *Foeniculum vulgare* y los frutos de *I. verum*, etiquetadas con estos nombres por parte de la casa empacadora, fueron adquiridos en el mercado local (Bucaramanga). *O. sanctum*, *O. basilicum var. purpurascens*, *A. dracunculus*, *O. majorana* y *T. vulgaris* fueron cultivadas en el

Complejo Agroindustrial Piloto CENIVAM, a partir de semillas certificadas (Fercon Ltda., Cali, Colombia) (**Tabla 1.8**).

**1.8.1.3 Destilación-extracción simultánea con solvente**. Los metabolitos secundarios de las plantas estudiadas se extrajeron utilizando un equipo tipo Likens & Nickerson a microescala, modificado por Godefroot *et al.* [158], para solventes de alta densidad (ver **Anexo 2**). Se utilizaron 10-15 g de hojas y flores finamente picadas. El solvente de extracción, diclorometano (2 mL), se empleó durante 1 h 20 min para el aislamiento de los volátiles. Los extractos obtenidos se concentraron, se les adicionó el patrón interno (*n*-tetradecano, 1 μL) y se aforaron hasta 1 mL. Finalmente, 1 μL del extracto se inyectó al cromatógrafo de gases acoplado a espectrómetro de masas (CG-EM).

**1.8.1.4 Extracción con fluido supercrítico**. Para la obtención de los componentes de mediana a baja volatilidad presentes en las plantas estudiadas se utilizó un extractor Soxhlet de alta presión (J & W Scientific, Folsom, CA, EE.UU.), siguiendo la metodología descrita por Stashenko *et al.* [159]; se utilizaron material vegetal (10 g) e hielo seco (300g $CO_2$) como fuente de fluido supercrítico. La extracción se llevó a cabo a 45-50°C durante 2 h, a una presión de 1100 psi (ver **Anexo 2**). El extracto obtenido se disolvió en diclorometano (2 mL), se agregó el patrón interno (*n*-tetradecano) y un 1 μL de la solución se inyectó al CG-EM.

**1.8.1.5 Hidrodestilación asistida por la radiación de microondas**. La hidrodestilación se realizó en un equipo de destilación tipo *Clevenger* modificado con reservorio de destilación *Dean-Stark*, usando como fuente de calor un horno microondas (LG, modelo MS-1242ZK, 1200 W). El material vegetal (300 g) se introdujo en un balón de 1L con agua (300 mL). Se realizaron 3 extracciones con un tiempo de extracción de 20 min, consecutivas (ver **Anexo 2**). El AE se separó del agua por decantación y una alícuota del aceite (50 μL) se diluyó con diclorometano (1 mL) para el análisis cromatográfico [65].

**1.8.2 Análisis de la composición química.** La identificación de los componentes presentes en los extractos y AE se realizó mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, en dos equipos diferentes (**Tabla 1.9**). Los índices de retención lineales se calcularon según la Ecuación 1.1, usando datos de CG ($t_R$, min) de una serie homóloga de hidrocarburos alifáticos saturados $C_{10}$–$C_{25}$, analizados en las mismas columnas y bajo las mismas condiciones usadas en CG para cada aceite o extracto. La identificación de los compuestos presentes en los extractos se realizó por comparación de sus espectros de masas con los de las bases de datos Wiley138K, Quadlib 2004 y NIST 2002 y por comparación de los índices de retención lineales con los reportados en la literatura [160,161], así como determinados para las sustancias patrón (Véase **Numeral 1.8.1.1.**).

**Tabla 1.9.** Especificaciones de los equipos CG-EM utilizados para el análisis de extractos y AE.

| Tipo Equipo | Columna | Programación de temperatura del horno | Parámetros operacionales | *Software* |
|---|---|---|---|---|
| GC (*Agilent Technol.* 6890 *Plus*) - MS (*Agilent Technol.* MSD 5973) | DB-5MS (60 m (L) x 0.25 mm (D.I.) x 0.25 μm ($d_f$)), 5%-fenil-poli(metilsiloxano). | 45ºC (5 min) @ 4ºC/min hasta 150ºC (2 min) @ 5ºC/min hasta 250ºC (5 min) y @ 10ºC/min hasta 275ºC (15 min) | $P_{entrada}$: 17 psi<br>$V_{lineal}$: 26 cm/s.<br>$Vln_{inyección}$: 1 μL<br>Rel. *split*: 1:30.<br>$T_{inyector}$: 250 °C<br>$T_{cámara\text{-}ion}$: 250°C<br>$T_{línea\text{-}transf.}$: 285°C<br>EI: 70 eV. | *MS ChemStation* (Version D.02.00.275) |
| GC (*Agilent Techn.* 6890 *Network*) - MS (*Agilent Technol.* MSD 5975K) | DB-Wax (60 m (L) x 0.25 mm (D.I.) x 0.25 μm ($d_f$)), poli(etilenglicol) entrecruzada e inmovilizada. | 45ºC (5 min) @ 3ºC/min hasta 150ºC (3 min) @ 4ºC/min hasta 220ºC (5 min) | $P_{entrada}$: 20 psi<br>$V_{lineal}$: 39 cm/s.<br>$Vln_{inyección}$: 1 μL<br>Rel. *split*: 1:30.<br>$T_{inyector}$: 250 °C<br>$T_{cámara\text{-}ion}$: 250°C<br>$T_{línea\text{-}transf.}$: 250°C<br>EI: 70 eV. | |

$$I_R = 100\,n + 100\left[\frac{t_{Rx} - t_{Rn}}{t_{RN} - t_{Rn}}\right] \qquad \textbf{Ecuación 1.1}$$

Donde:

$I_R$: Índice de retención lineal del compuesto de interés;

*n*: Número de átomos de carbono del *n*-alcano que eluye antes del compuesto de interés;
N: Número de átomos de carbono del *n*-alcano que eluye después del compuesto de interés, N>n;
$t_{Rx}$: Tiempo de retención (min) del compuesto de interés;
$t_{Rn}$: Tiempo de retención (min) de *n*-alcano que eluye antes del compuesto de interés;
$t_{RN}$: Tiempo de retención (min) de *N*-alcano que eluye después del compuesto x.

**1.8.3 Análisis estadístico multivariable.** Los análisis de componentes principales (PCA) y de *cluster* o conglomerados (CA) se aplicaron sobre los datos obtenidos por SDE-CG-EM y se realizaron con el *software* Statistica Ver. 6.0 (StatSoft, Inc., 2001, Tulsa, OK, EE.UU.). A partir de los datos iniciales, se construyó la gráfica bidimensional de componentes principales, basada en la diagonalización simétrica de la matriz (correlaciones), que se utilizó para determinar si las composiciones de los extractos de albahacas se podrían agrupar en diferentes clases. Para CA, se emplearon dos métodos: el de árbol o dendograma y el de K-medias. Para el método de dendograma se construyó la gráfica de árbol jerárquico horizontal, usando las distancias Euclidianas y como reglas de enlace, el método de Ward [162]. Con el método de K-medias se construyeron 5 *clusters* y se seleccionaron para los centros iniciales de *cluster* las distancias similares y se hicieron a intervalos constantes.

## 1.9 ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

### 1.9.1 Análisis de metabolitos secundarios volátiles aislados por SDE de hojas y flores de nueve especies y/o variedades de albahacas (*Ocimum sp.*).

**1.9.1.1 Composición química de los extractos SDE.** En los extractos aislados por SDE de las albahacas bajo estudio, se detectaron por CG-EM entre 31 y 84 componentes en cantidades relativas >0.5%, de los cuales se identificaron positivamente *ca.* 84-96%, con base en los índices de retención lineales medidos en las columnas polar y no-polar, y en sus espectros de masas (EI, 70 eV). La **Tabla 1.10** muestra la comparación de los índices de retención lineales calculados y los

reportados en la literatura [160,161] de algunos componentes encontrados en los extractos o AE, como herramienta para la identificación tentativa.

**Tabla 1.10.** Comparación de los índices de retención lineales de componentes presentes en los AE y extractos estudiados, sustancias patrón y los reportados en la literatura [160,161].

| Compuesto | ÍNDICES DE RETENCIÓN LINEALES | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Columna apolar DB-5MS (60 m) | | | Columna polar DBWAX (60 m) | | |
| | AE (T, °C) | Sustancia patrón | Literatura [160] | AE (T, °C) | Sustancia patrón | Literatura [161] |
| *p*-Cimeno | 1028 (130.8) | 1029 | 1025 | 1272 (131.5) | 1271 | 1272 |
| Eucaliptol (1,8-cineol) | 1040 (132.8) | 1038 | 1031 | 1211 (120.6) | 1209 | 1209 |
| Linalol | 1114 (143.4) | 1102 | 1097 | 1555 (174.0) | 1550 | 1552 |
| Estragol | 1219 (160.6) | 1203 | 1196 | 1682 (190.7) | 1679 | 1677 |
| Neral | 1248 (165,4) | 1245 | 1238 | 1692 (191.9) | 1687 | 1680 |
| Geranial | 1276 (169,6) | 1274 | 1267 | 1744 (198.3) | 1739 | 1730 |
| Timol | 1301 (173.2) | 1291 | 1290 | 2183 (247.2) | 2185 | 2189 |
| *trans*-Anetol | 1323 (174.1) | 1293 | 1285 | 1843 (210.2) | 1838 | 1835 |
| Carvacrol | 1306 (174,3) | 1294 | 1299 | 2217 (250.5) | 2215 | 2227 |
| Eugenol | 1362 (182.7) | 1358 | 1359 | 2174 (246.3) | 2178 | 2172 |
| *trans*-β-Cariofileno | 1434 (193.5) | 1435 | 1430 | 1610 (181.3) | 1611 | 1608 |

El propósito principal de cualquier análisis cromatográfico es resolver mezclas complejas en sus constituyentes individuales y obtener información acerca de la retención o afinidad ($t_R$) de las sustancias por la fase estacionaria, que sirve para la identificación tentaiva de compuestos. Con la necesidad de expresar estos datos en un sistema normalizado, los $I_R$ son el parámetro que mejor se ajusta porque muestra la retención de los compuestos de interés en una escala uniforme. Además, los $I_R$ son confiables (*e.g.*, *p*-cimeno – $I_R$ experimental: 1028; $I_{R\text{-literatura}}$: 1025) y reproducibles (error ± 10 unidades) independientemente del sistema analítico, aunque dependen del tipo de fase estacionaria. El *Analytical Methods Committee* [163] recomienda usar dos columnas con diferentes fases estacionarias para tener dos índices de retención y

aumentar así el grado de confianza en la asignaciónes (*e.g.*, neral – $I_{R\text{-}apolar}$: 1248, $I_{R\text{-}literatura}$: 1238; $I_{R\text{-}polar}$: 1692, $I_{R\text{-}literatura}$: 1680).

CG-EM se aprovecha para la "identificación" de compuestos, sin embargo, el análisis de isómeros o sustancias estructuralmente similares (componentes de AE, *e.g.*, neral y geranial; timol y carvacrol; estragol y *trans*-anetol) puede convertise en una tarea difícil e incluso imposible cuando se aplica el método más simple y frecuente de identificación; es decir, la comparación del espectro de masas del componente problema con el de las bases de datos del MS. Sin embargo, el empleo de sustancias patrón, aumenta el grado de confiabilidad y hace la identificación confirmatoria, porque existe concordancia con el $t_R$ y el espectro de masas.

El cálculo de los índices de retención de las sustancias patrón (**Tabla 1.10**) y componentes de AE analizados bajo las mismas condiciones cromatográficas, resulta ser una herramienta efectiva. El uso de los índices de retención lineales, junto con la información estructural aportada por CG-EM y el empleo de sustancias-patrón se aceptan ampliamente para confirmar la identidad estructural de los compuestos químicos presentes en la mezcla [164].

En la **Tabla 1.11** se presenta la distribución por familias de compuestos de los metabolitos secundarios volátiles identificados en los extractos aislados por SDE de las especies bajo estudio. Se utilizó la enumeración romana para facilitar la clasificación de estos extractos. Como se observa en la **Tabla 1.11**, los extractos se clasificaron con base en el contenido alto de monoterpenos oxigenados (>50%) y fenilpropa(e)nos (>30%), respectivamente.

La **Figura 1.3** presenta los perfiles cromatográficos (corrientes iónicas totales reconstruidas) típicos de los extractos aislados por SDE de las hojas de *O. basilicum*, *O. sanctum*, *Ocimum sp. 2*, *Ocimum sp.* 1, *O. americanum*, tipo citral, y *O. americanum* (híbrida). La identificación de los componentes de los extractos aislados de las hojas y flores de *Ocimum sp*. aparece en la **Tabla 1.12**, donde se registran tanto su cantidad relativa (>0.5%) como la identidad química.

**Tabla 1.11.** Distribución por familias de compuestos de los extractos de las albahacas estudiadas.

| Planta (No. Voucher) | Código interno | Parte utilizada | Cantidad relativa, % | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | H | MH | SH | MO | SO | CO | FP |
| *O. americanum* (híbrido) | I | Flores | — | 0.6 | 23 | 52 | 12 | 0.8 | 11 |
| | II | Hojas | — | 5 | 7 | 44 | 4 | 2 | 38 |
| *O. americanum* (Nº COL 526758) | III | Flores | — | 0.6 | 24 | 50 | 14 | 0.8 | 11 |
| | IV | Hojas | — | 3 | 9 | 42 | 9 | 2 | 35 |
| *O. basilicum* (Nº COL 526759) | V | Flores | — | 2 | 25 | 43 | 8 | 3 | 20 |
| | VI | Hojas | — | 0.6 | 13 | 53 | 2 | 0.9 | 31 |
| *O. sanctum* (Semillas certificadas) | VII | Hojas | — | 6 | 10 | 33 | 2 | 2 | 47 |
| *Ocimum sp. 2* (Nº COL 512280) | VIII | Flores | 0.05 | 1 | 16 | 45 | 8 | 2 | 27 |
| | IX | Hojas | — | 8 | 10 | 24 | 5 | 2 | 51 |
| *O. basilicum var. purpurascens* (híbrido) | X | Hojas | 0.1 | 2 | 22 | 47 | 7 | 3 | 20 |
| *Ocimum sp. 1* (Nº COL 512283) | XI | Flores | — | 1 | 17 | 26 | 4 | 0.4 | 51 |
| | XII | Hojas | — | 3 | 7 | 28 | 2 | 0.9 | 60 |
| *O. americanum* (Nº COL 519795) | XIII | Flores | 0.1 | 0.6 | 22 | 68 | 2 | 7 | 0.0 |
| | XIV | Hojas | 0.08 | 0.0 | 9 | 81 | 1 | 7 | 0.0 |
| *O. basilicum var. purpurascens* | XV | Flores | 0.04 | 2 | 28 | 51 | 7 | 0.7 | 12 |
| | XVI | Hojas | 0.07 | 6 | 16 | 43 | 4 | 2 | 30 |

**H** – Hidrocarburos, **MH** – Hidrocarburos monoterpénicos, **SH** – Hidrocarburos sesquiterpénicos, **MO** – Monoterpenos oxigenados, **SO** – sesquiterpenos oxigenados, **CO** – otros compuestos oxigenados y **FP** – fenilpropa(e)nos.

Los compuestos más abundantes presentes en la mayoría de los extractos fueron linalol (13-50%), eugenol (10-47%), $\tau$-cadinol (2-9%), germacreno D (1-7%), *trans*-$\alpha$-bergamoteno (1-10%), $\gamma$-cadineno (1-3%) y $\beta$-elemeno (1-4%). El citral (25-59%), citrol (7-29%), *trans*-cinamato de metilo (40-41%) y estragol (1-50%) estuvieron presentes como componentes mayoritarios en cinco extractos analizados (Véase **Tabla 1.12** extractos IX, XI, XII, XIII y XIV).

La **Figura 1.4** presenta el espectro de masas del *trans*-cinamato de metilo, componente mayoritario de *Ocimum sp. 1* y su ruta de fragmentación se propone en el **Esquema 1.3**.

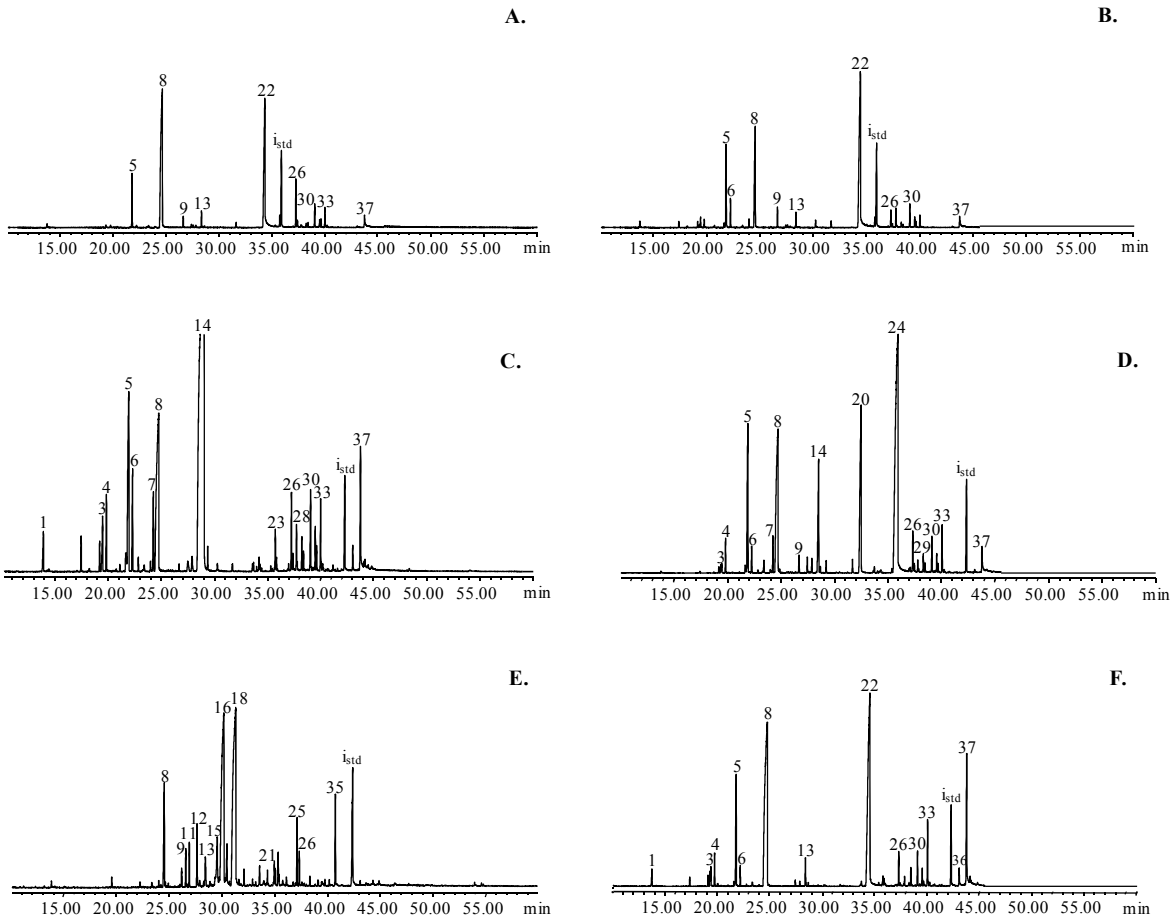



**Figura 1.3.** Cromatogramas (TIC) obtenidas por CG-EM (DB-5, 60 m; EI, 70 eV) de los extractos aislados por SDE de hojas de: **A.** *O. basilicum*, **B.** *O. sanctum*, **C.** *O. sp. 2*, **D.** *O. sp. 1*, **E.** *O. americanum* tipo citral y **F.** *O. americanum* (híbrido). Véase **Tabla 1.12** para la identificación de los picos.

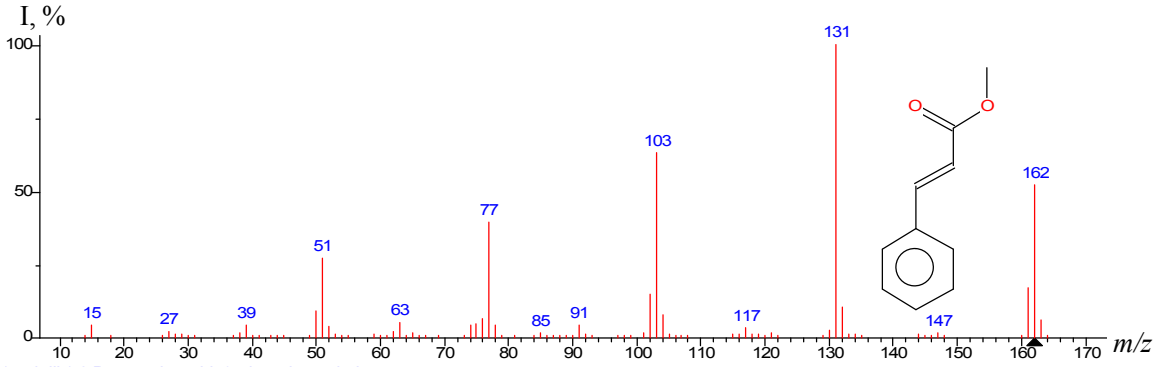


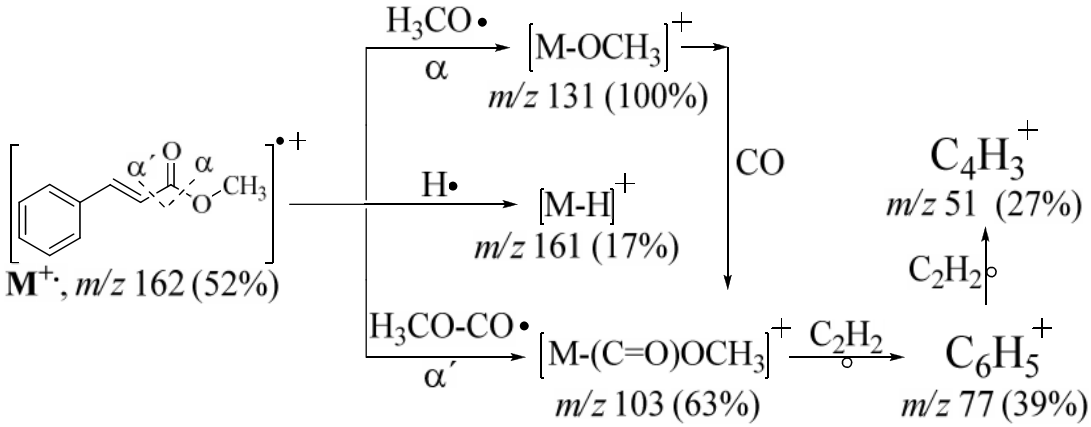

**Figura 1.4.** Espectro de masas (EI, 70 eV) de *trans*-cinamato de metilo.

**Tabla 1.12.** La cantidad relativa (>0.5%) y la identificación por CG-EM de los componentes aislados por SDE de las albahacas estudiadas.

| No. Pico | Compuesto | $I_R$ | | CANTIDAD RELATIVA, % | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | DB-5 | DB-Wax | I | II | III | IV | V | VI | VII | VIII | IX | X | XI | XII | XIII | XIV | XV | XVI |
| 1 | *trans*-3-Hexen-1-ol | 849 | 1385 | tr | 0.8 | tr | 0.5 | tr | tr | 0.6 | tr | 1.1 | 1.2 | tr | 0.6 | 0.5 | tr | 0.5 | 1.2 |
| 3 | β-Pineno* | 980 | 1104 | tr | 1.0 | tr | 0.9 | tr | tr | 1.0 | tr | 0.7 | tr | tr | tr | — | — | 0.6 | 1.3 |
| 4 | β-Mirceno* | 990 | 1162 | tr | 1.1 | tr | 1.6 | tr | tr | 0.6 | tr | 1.5 | 0.7 | tr | 0.9 | tr | — | tr | 1.7 |
| **5** | **Eucaliptol*** | **1038** | **1211** | **1.3** | **5.7** | **1.5** | **7.2** | **2.8** | **4.8** | **8.8** | **2.1** | **7.7** | **11.1** | **2.4** | **7.7** | **tr** | **—** | **5.4** | **13.3** |
| 6 | *trans*-β-Ocimeno | 1047 | 1251 | tr | 0.7 | tr | 1.1 | 0.4 | — | 2.4 | 0.5 | 2.4 | — | tr | 0.7 | tr | — | — | — |
| 7 | Fenchona* | 1095 | 1401 | — | — | — | tr | — | — | — | tr | 1.9 | 1.2 | — | 1.1 | tr | tr | — | 1.1 |
| **8** | **Linalol*** | **1112** | **1552** | **48.5** | **34.1** | **50.1** | **35.0** | **37.1** | **44.7** | **19.0** | **42.0** | **13.1** | **29.8** | **22.7** | **16.6** | **8.3** | **5.0** | **45.0** | **24.4** |
| 9 | Alcanfor* | 1156 | 1525 | — | — | — | — | 0.6 | 0.9 | 1.8 | — | tr | — | tr | 0.5 | — | — | — | — |
| | Fotocitral A | 1156 | 1511 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | 0.6 | 1.3 | — | — |
| 10 | *cis*-Verbenol | 1166 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | 1.4 | — | — |
| 11 | *trans*-Verbenol | 1186 | 1576 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | 2.3 | — | — |
| 12 | α-Terpineol* | 1201 | 1703 | — | 1.0 | — | 1.0 | 0.6 | 1.0 | 1.4 | — | — | 3.0 | 1.5 | 2.0 | 1.5 | 1.6 | 0.6 | 2.1 |
| **13** | **Estragol*** | **1211** | **1675** | **0.3** | **0.2** | — | **0.2** | **0.2** | **0.5** | — | **26.7** | **49.5** | — | **1.0** | **3.7** | — | — | **0.4** | — |
| 14 | Nerol | 1236 | 1807 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | 18.9 | 4.0 | — | — |
| **15** | **Neral*** | **1248** | **1688** | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | **11.6** | **26.7** | — | — |
| 16 | Geraniol | 1259 | 1853 | tr | — | — | — | — | — | 0.9 | 0.9 | — | — | — | — | 9.9 | 2.8 | tr | — |
| **17** | **Geranial*** | **1276** | **1739** | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | **13.1** | **32.1** | — | — |
| 18 | Acetato de bornilo | 1290 | 1590 | — | — | — | — | 1.7 | tr | 0.6 | tr | tr | — | tr | tr | — | — | — | tr |
| **19** | ***cis*-Cinamato de metilo** | **1309** | **1966** | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | **8.1** | **13.1** | — | — | — | — |
| 20 | Acetato de nerilo | 1358 | 1728 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | 1.0 | 0.7 | — | — |
| **21** | **Eugenol*** | **1365** | **2179** | **10.6** | **34.1** | **11.0** | **38.0** | **19.7** | **30.8** | **46.7** | **tr** | **tr** | **19.2** | **tr** | **tr** | — | — | **10.5** | **29.7** |
| 22 | β-Elemeno | 1398 | 1597 | 3.1 | 0.5 | 3.2 | 0.5 | 2.3 | 1.1 | 1.0 | 2.3 | 0.9 | 1.3 | — | — | 0.5 | 0.4 | 3.5 | 1.3 |
| **23** | ***trans*-Cinamato de metilo** | **1399** | **2095** | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | **39.7** | **40.9** | — | — | — | — |
| 24 | *trans*-β-Cariofileno* | 1434 | 1613 | — | — | — | — | — | — | — | tr | tr | 1.0 | 0.9 | tr | 5.4 | 2.2 | 1.8 | 0.8 |
| **25** | ***trans*-α-Bergamoteno** | **1441** | **1596** | — | **1.3** | — | **1.2** | **5.2** | **4.3** | **1.5** | **tr** | **1.5** | **10.2** | — | **1.2** | **2.3** | **1.0** | **7.1** | **6.6** |
| 26 | α-Guaieno | 1446 | 1657 | 1.7 | tr | 1.6 | tr | 1.8 | 0.7 | tr | 1.4 | tr | 0.5 | 2.4 | tr | — | — | 2.2 | 0.7 |
| 27 | *trans*-β-Farneseno | 1456 | 1669 | — | tr | — | tr | — | tr | 1.8 | tr | 1.0 | tr | 1.1 | tr | 0.8 | tr | tr | tr |
| 28 | α-Humuleno* | 1470 | 1685 | 0.7 | tr | 0.6 | tr | 0.9 | tr | 0.5 | 0.6 | 0.6 | 0.5 | 1.2 | 0.5 | 1.0 | tr | 0.8 | tr |
| 29 | Germacreno D | 1496 | 1723 | 7.4 | 1.4 | 6.8 | 1.2 | 5.3 | 2.2 | 2.2 | 4.0 | 1.7 | 1.6 | 3.8 | 1.1 | 3.4 | tr | 4.3 | 1.4 |
| 30 | Biciclogermacreno | 1508 | 1751 | 1.0 | 0.7 | 1.0 | 0.5 | 1.0 | 0.7 | 1.0 | 1.1 | 0.8 | 1.1 | 1.1 | 0.6 | tr | — | 1.4 | 0.8 |
| 31 | α-Bulneseno | 1513 | 1730 | 2.1 | tr | 2.1 | tr | 2.1 | 0.7 | 0.6 | 1.5 | 0.5 | 0.7 | 2.4 | tr | — | — | 2.5 | 0.8 |
| 32 | γ-Cadineno | 1525 | 1772 | 3.3 | 2.6 | 3.1 | 2.0 | 2.5 | 1.7 | 1.1 | 1.9 | 1.4 | 2.3 | 2.0 | 1.4 | 0.5 | tr | 0.9 | 1.4 |
| 33 | β-Sesquifelandreno | 1532 | 1849 | tr | tr | tr | tr | tr | tr | — | tr | tr | 1.0 | tr | tr | tr | — | 0.5 | 0.5 |
| 34 | *trans*-α-Bisaboleno | 1548 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | 6.3 | 2.8 | — | — |
| 35 | 1.10-*di*-*epi*-Cubenol | 1630 | 2082 | 1.2 | 0.9 | 1.1 | tr | 0.7 | tr | — | 0.8 | 0.5 | 0.9 | tr | tr | — | — | tr | tr |
| **36** | **τ-Cadinol** | **1658** | **2189** | **8.9** | **7.3** | **8.1** | **3.1** | **5.6** | **1.9** | **2.0** | **5.4** | **3.2** | **5.6** | **2.5** | **1.4** | — | **tr** | **3.3** | **2.9** |
| 37 | β-Eudesmol | 1673 | 2256 | 0.6 | tr | 0.6 | — | 0.6 | — | — | tr | 0.5 | tr | 1.0 | — | tr | tr | 0.9 | tr |
| 38 | *trans*-*cis*-Farnesol | 1759 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | 1.9 | — | — | — |

* Identificados con base en las sustancias patrón certificadas.

Las pérdidas de fragmentos más importantes, encontradas en este espectro, evidenciaron la presencia de los diferentes grupos funcionales presentes en la estructura. La pérdida de 31 unidades de masa corresponde al grupo $OCH_3$ y la pérdida de *m/z* 59 será la del grupo $(C=O)OCH_3$. Los fragmentos en *m/z* 77 y 51 son característicos del grupo fenilo.




**Esquema 1.3.** Posibles rutas de fragmentación de *trans*-cinamato de metilo (EI, 70 eV).

Un compuesto particular encontrado en los extractos de *O. americanum* (tipo citral) fue el fotocitral A, que fue reportado como un producto de la fotólisis del citral (conversión por cicloadición intramolecular) [165] y que presumiblemente deteriora el olor en extractos o en AE que lo contienen [166], además, es un fuerte fotosensibilizador. El espectro de masas y la posible fragmentación de este compuesto se muestran en la **Figura 1.5** y en el **Esquema 1.4**, respectivamente.

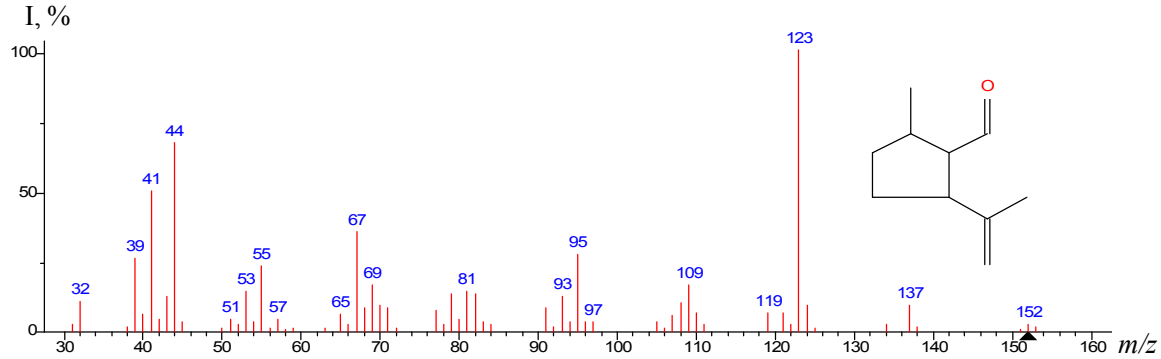
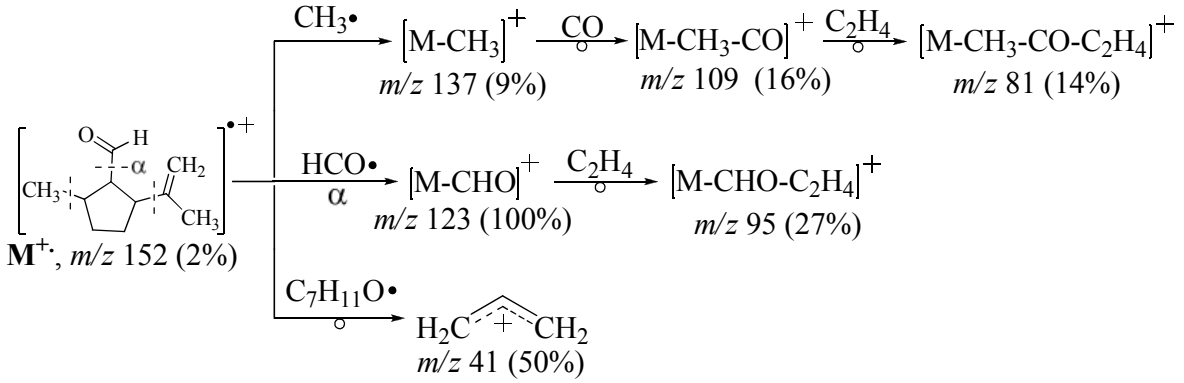



**Figura 1.5.** Espectro de masas (EI, 70 eV) del fotocitral A.

El espectro de masas del fotocitral A está caracterizado por la presencia de tres iones principales relacionados con las funciones químicas presentes en esta estructura; a saber: los iones productos de las pérdidas de 29 y 15 unidades revelan la presencia de los grupos CHO y $CH_3$, respectivamente; así mismo, la aparición del ion en *m/z* 41 es un vestigio de la existencia del grupo $C_3H_5$ en la estructura. Estas rupturas son características de las estructuras monoterpénicas [167].




**Esquema 1.4.** Posible ruta de fragmentación de fotocitral

**1.9.1.2 Análisis estadístico multivariable.** La aplicación de técnicas multivariable, que incluyen los análisis de componentes principales (PCA) y *cluster* o conglomerados (CA), son herramientas útiles para clasificar y relacionar diversas variables. El PCA reduce la dimensionalidad de variables aleatorias usando combinaciones lineales, así los componentes principales identificados se organizan en orden decreciente de importancia [168]. El CA clasifica "individuos" de acuerdo con la matriz de datos multivariable de un gran número de individuos (u objetos), construyendo subgrupos o conglomerados de "individuos" según su "similitud", con base en algunos criterios apropiados [169]. El conjunto de datos conformado por 16 extractos (casos) y 38 compuestos químicos (variables) se sometieron al análisis por técnicas multivariables para determinar similitudes o diferencias composicionales entre las especies estudiadas.

*** Análisis de componentes principales.** La representación gráfica de los casos, que contiene el 51% de la información de las variables (**Figura 1.6**), mostró que existen tres grupos (A, B y C). Sin embargo, la discriminación de estos agrupamientos no fue

considerable ya que los dos primeros componentes principales no reunieron toda la información de las variables.

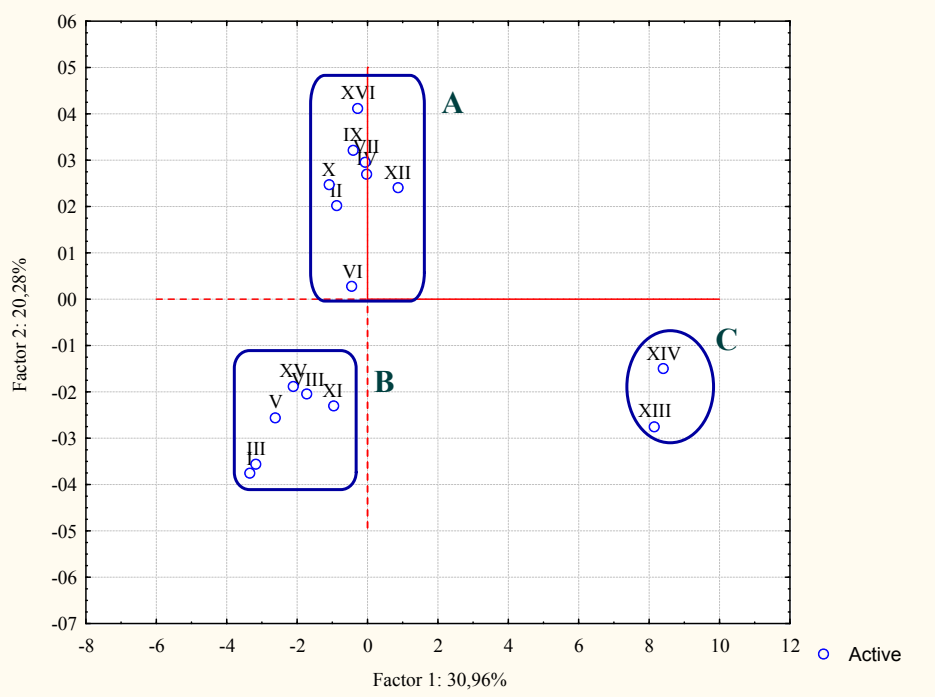



**Figura 1.6.** PCA de extractos de flores y hojas de las especies *Ocimum sp.* estudiadas de acuerdo con sus componentes mayoritarios.

Las variables de mayor contribución al Factor 1 (31% información) fueron el linalol, fotocitral A, nerol, neral, geraniol, geranial, acetato de nerilo, *trans*-β-cariofileno, biciclogermacreno, γ-cadineno, *trans*-α-bisaboleno y τ-cadinol. Para el Factor 2 (20% información) los siguientes fueron los compuestos contribuyentes: β-mirceno, eucaliptol, *trans*-3-hexen-1-ol, 1-octen-3-ol, β-pineno, fenchona, α-guaieno, germacreno D y α-bulneseno (ver **Anexo 3**). La **Tabla 1.13** muestra la disposición de los grupos formados de acuerdo con el PCA.

*** Análisis *Cluster*.** Debido a la información reducida obtenida del análisis PCA y la posibilidad existente de excluir alguna información relevante para la diferenciación, se utilizaron los métodos de análisis *Cluster* como dendogramas y K-medias, para relacionar y discriminar por similitudes o diferencias entre variables. El análisis de K-medias examina las medias de cada *cluster* (predefinido) en cada dimensión y evalua cuán distintos son los *n Clusters*. Además, discrimina las dimensiones entre *Cluster*

de acuerdo con los valores F a partir del análisis de varianza ejecutado sobre cada dimensión. El análisis de K-medias aplicado sobre los extractos de flores y hojas de *Ocimum sp.* se registra en la **Tabla 1.14**.

**Tabla 1.13.** Agrupaciones y constituyentes de acuerdo con el PCA.

| GRUPOS | CASOS (EXTRACTOS) | VARIABLES INFLUYENTES (COMPUESTOS) |
|---|---|---|
| **A** | II, IV, VI, VII, IX, X, XII, XVI | Eucaliptol, β-mirceno, 1-octen-3-ol, β-pineno, fenchona, α-terpineol, estragol, *trans*-cinamato de metilo, *cis*-cinamato de metilo, alcanfor, *trans*-β-farneseno y β-sesquifelandreno. |
| **B** | I, III, V, VIII, XI, XV | Linalol, biciclogermacreno, α-humuleno, α-guaieno, α-bulneseno, germacreno D, γ-cadineno y β-elemeno. |
| **C** | XIII, XIV | Neral, geranial, fotocitral A, nerol, geraniol, *trans*-β-cariofileno y farnesol. |

**Tabla 1.14.** Análisis de K-medias de extractos de flores y hojas de las albahacas estudiadas.

| ***Cluster* No.** | **Casos (Extractos)** | **Variables representantivas (Compuestos)** |
|---|---|---|
| **1** | I, III, V, VI, X y XV | Linalol, eugenol y τ-cadinol. |
| **2** | XIII y XIV | Geranial, neral, geraniol y nerol. |
| **3** | II, IV, VII y XIV | Eugenol, linalol y eucaliptol. |
| **4** | VIII y IX | Estragol, linalol y eucaliptol. |
| **5** | XI y XII | *trans*-Cinamato de metilo, linalol y *cis*-cinamato de metilo. |

De acuerdo con el análisis de conglomerados, se determinaron 5 *clusters* y este mismo número se utilizó para el análisis de K-medias. La discusión de los valores de F, reveló que la variable (compuesto) de mayor aporte a la diferenciación entre los extractos fue el *trans*-cinamato de metilo (F=10855). Aunque, otras variables también contribuyeron a la diferenciación general con valores de F menores (F≥13), *i.e.*, acetato de nerilo (F=77.3), *cis*-cinamato de metilo (F=43.3), estragol (F=25.9), eugenol (F=19.1), fotocitral A (F=17.7), *trans*-α-bisaboleno (F=16.3), neral (F=15.5) y geranial (F=13.6). Con base en el análisis de K-medias, la clasificación se realizó de acuerdo con los constituyentes más importantes y se presenta en la **Tabla 1.15**.

**Tabla 1.15.** Clasificación de extractos de flores y hojas de albahacas según sus constituyentes más importantes.

| Subgrupos No. | Compuesto mayoritario | Extractos | Otros constituyentes | Reportes en Literatura |
|---|---|---|---|---|
| **I** | Linalol (30-50%) | Flores I, III, V, XV y hojas VI, X | Eugenol (11-31%)<br>Germacreno D (2-7%)<br>τ-Cadinol (2-9%) | *O. basilicum* [35,170-173]; *O. canum* [174], *O. basilicum* var. *purpurascens* [172], *O. menthaefolium* y *O. sanctus* [34,36,175] |
| **II** | Citral (25-59%) | Flores XIII y hojas XIV | Nerol (4-19%)<br>Geraniol (3-10%)<br>Linalol (5-8%)<br>*trans*-α-Bisaboleno (3-6%) | Albahaca tipo limón (*Lemon Balm Basil*) o *O. citriodorum* y *O. basilicum* var. *citriodorum* [175,176] |
| **III** | Eugenol (30-47%) | Hojas II, IV, VII y XVI | Linalol (19-35%)<br>*trans*-α-Bergamoteno (1-7%)<br>τ-Cadinol (2-7%) | *O. basilicum*, *O. sanctum*, *O. canum*, *O. trichodon* [177], *O. micranthum* [49] y *O. gratissimum* [34,36,175,178] |
| **IV** | Estragol (27-50%) | Flores VIII y hojas IX | Linalol (13-42%)<br>Germacreno D (2-4%)<br>τ-Cadinol (3-5%) | Albahacas de Australia, Yemen, E.E.U.U., Brasil, Tailandia, Reino Unido, Islas Comoras [34,170,172,173, 178-180] |
| **V** | *trans*-Cinamato de metilo (40-41%) | Flores XI y hojas XII | Linalol (17-23%)<br>*cis*-Cinamato de metilo (8-13%)<br>Eucaliptol (2-8%)<br>Germacreno D (1-4%) | *O. basilicum*, *O. canum*, *O. americanum* (países tropicales y africanos) y albahaca tipo “cinamaldehído” (Australia) [34,36,55,180]. |

Se resalta, que en los AE de *O. gratissimum* se ha identificado timol (46%); en *O. suave*, *p*-cimeno (59%) en [173]; en *O. basilicum*, metileugenol (78%); en *O. minimum*, acetato de geranilo (70%) [53] y en *O. keniense* Ayobaringa, eucaliptol (38%) [181].

La aplicación de técnicas estadísticas multivariable al gran conjunto de datos permitió relacionar los extractos estudiados de acuerdo con sus similitudes y diferencias: el PCA, que es una de las herramientas más utilizadas, sin embargo, no aportó la información suficiente para diferenciarlas, aunque sí los agrupó en tres conjuntos; mientras que, el análisis de K-media (usando el número de *cluster* según el análisis de dendogramas) enlazó los extractos con base en sus similitudes composicionales pero también permitió vislumbrar las pequeñas diferencias entre ellos.

**1.9.2 Composición química de extractos y aceites esenciales de especies vegetales con alto contenido de timol y carvacrol.** Los fenoles naturales, timol y carvacrol, han sido identificados como componentes principales en muchos aceites y extractos aislados de las especies de los géneros *Origanum*, *Lippia, Satureja* y *Thymus*, con variaciones en su contenido. Tanto los dos fenoles monoterpénicos como los AE o extractos que los contienen, han demostrado diferentes propiedades biológicas, *e.g.*, antifúngicas, antibacterianas y antioxidantes [20]. Esto abre la posibilidad de emplearlos como conservantes para alimentos y cosméticos [13], cuando su uso no afecta las características organolépticas del producto.

**1.9.2.1 Identificación de los componentes de extractos y aceites esenciales.** Para seleccionar las especies ricas en timol y carvacrol, se analizaron los extractos obtenidos por SDE, con base en las cantidades de timol y carvacrol. *O. majorana* y *S. brownei* presentaron los dos fenoles a nivel de trazas o como constituyentes minoritarios (~3%), respectivamente. La clasificación, con base en familias de compuestos y contenido de timol y carvacrol, de los AE y extractos de las especies vegetales obtenidos por tres métodos de extracción, MWHD, SDE y SFE, se presenta en la **Tabla 1.16**. Asimismo, los compuestos identificados en los extractos SDE y SFE de las plantas de los géneros *Plectranthus*, *Satureja*, *Lippia*, *Thymus* y *Origanum*, junto con sus cantidades relativas (%), se registran en la **Tabla 1.17**.

**Tabla 1.16.** Clasificación de los aceites y extractos estudiados, por familias de compuestos y según el contenido de timol y carvacrol.

| Planta (parte usada) | Rendimiento aceite (%, p/p) | Familia de compuestos, cantidad relativa (%) | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | Constituyentes | SDE | MWHD | SFE |
| L *micromera* (Hojas) | 1.6 | **Timol** | **34.1** | **25.8** | **32.8** |
| | | **Carvacrol** | **1.0** | **3.5** | **1.5** |
| | | Monoterpenoides | 38.8 | 36.6 | 28.7 |
| | | Sesquiterpenoides | 5.3 | 10.0 | 11.5 |
| | | Otros compuestos* | 14.4 | 16.5 | 14.0 |
| | | Hidrocarburos** | — | — | 2.5 |
| *L. origanoides* (Flores) | — | **Timol** | **6.9** | — | — |
| | | **Carvacrol** | **42.3** | — | — |
| | | Monoterpenoides | 31.1 | — | — |
| | | Sesquiterpenoides | 7.8 | — | — |
| | | Otros compuestos* | 3.9 | — | — |
| *L. origanoides* (Hojas) | 2.3 | **Timol** | **10.6** | **14.3** | **8.8** |
| | | **Carvacrol** | **42.6** | **44.4** | **51.8** |
| | | Monoterpenoides | 28.8 | 29.4 | 18.3 |
| | | Sesquiterpenoides | 6.9 | 4.9 | 6.4 |
| | | Otros compuestos* | 4.6 | 2.9 | 4.2 |
| | | Hidrocarburos** | — | — | 3.4 |
| *O. majorana* (Hojas) | — | Timol | tr | — | — |
| | | **Carvacrol** | — | — | — |
| | | Monoterpenoides | 90.5 | — | — |
| | | Sesquiterpenoides | 3.3 | — | — |
| | | Otros compuestos* | — | — | — |
| *P. amboinicus* (Hojas) | 0.1 | **Timol** | **0.9** | **0.8** | — |
| | | **Carvacrol** | **62.0** | **53.7** | **14.2** |
| | | Monoterpenoides | 21.1 | 25.1 | 2.4 |
| | | Sesquiterpenoides | 9.7 | 15.9 | 4.6 |
| | | Otros compuestos* | 2.5 | — | 14.7 |
| | | Hidrocarburos** | — | — | 63.5 |
| *S. brownei* (Hojas) | — | **Timol** | **2.0** | — | — |
| | | **Carvacrol** | **0.9** | — | — |
| | | Monoterpenoides | 84.7 | — | — |
| | | Sesquiterpenoides | 1.6 | — | — |
| | | Otros compuestos* | 7.8 | — | — |
| *T. vulgaris* (Hojas) | 0.2 | **Timol** | **36.3** | **34.7** | **20.8** |
| | | **Carvacrol** | **4.3** | **6.4** | **3.1** |
| | | Monoterpenoides | 44.2 | 40.2 | 4.6 |
| | | Sesquiterpenoides | 1.7 | 5.7 | 2.3 |
| | | Otros compuestos* | 8.1 | 4.7 | 22.3 |
| | | Hidrocarburos** | — | — | 33.9 |

*Alcoholes, cetonas y éteres **Hidrocarburos no terpénicos

**Tabla 1.17.** Identificación y cantidad relativa (>0.4%) de los metabolitos secundarios, obtenidos por SDE y SFE de *S. brownei*, *O. majorana*, *L. origanoides*, *L. micromera*, *P. amboinicus* y *T. vulgaris.*

| No. Pico | Compuesto | $I_R$ | | CANTIDAD RELATIVA, % | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | DB-5 | DB-Wax | *S. brownei* | *O. majorana* | *L. origanoides* | | | *L. micromera* | | *P. amboinicus* | | *T. vulgaris* | |
| | | | | SDE | SDE | SDE (F)[a] | SDE (H)[b] | SFE | SDE | SFE | SDE | SFE | SDE | SFE |
| 1 | α-Tujeno | — | 1023 | tr | 0.8 | 1.6 | 1.5 | tr | 1.8 | 0.9 | 0.5 | — | 1.8 | tr |
| 2 | α-Pineno* | — | 1018 | 1.1 | 0.9 | 0.4 | tr | tr | 0.9 | tr | tr | — | 1.1 | tr |
| **3** | **Sabineno** | — | **1118** | **0.5** | **5.8** | **tr** | **tr** | — | **1.6** | **0.4** | — | — | **tr** | — |
| 4 | 1-Octen-3-ol | — | 1395 | — | — | tr | tr | — | tr | — | 1.7 | — | 1.2 | tr |
| 5 | β-Mirceno* | — | 1162 | 0.5 | 2.1 | 2.4 | 2.4 | 1.5 | 2.2 | 1.5 | 0.8 | — | 1.9 | tr |
| **6** | **α-Terpineno** | **1022** | **1176** | **0.4** | **8.1** | **2.8** | **2.7** | **tr** | **2.2** | **0.9** | **1.8** | — | **1.9** | **tr** |
| 7 | *p*-Cimeno* | 1030 | 1269 | 0.9 | 2.6 | 9.8 | 10.1 | 8.8 | 6.3 | 7.7 | 7.5 | 0.9 | 19.5 | 4.6 |
| 8 | Limoneno* | 1034 | 1195 | 0.4 | 2.1 | 0.4 | 0.7 | tr | 0.9 | 0.5 | tr | — | 0.6 | tr |
| 9 | Eucaliptol* | 1038 | 1208 | 0.5 | 2.2 | 1.1 | tr | tr | 6.6 | 2.2 | — | — | 0.7 | tr |
| **10** | **γ-Terpineno** | **1063** | **1244** | **2.2** | **11.6** | **8.9** | **8.2** | **6.9** | **9.6** | **11.4** | **9.5** | **1.5** | **9.7** | **0.6** |
| 11 | *trans*-4-Tujanol | 1079 | 1553 | tr | 2.7 | tr | 0.4 | tr | 0.5 | tr | — | — | 0.9 | tr |
| 12 | α-Terpinoleno | 1092 | 1179 | tr | 3.7 | tr | tr | — | tr | tr | tr | — | tr | — |
| 13 | Linalol* | 1104 | 1547 | 0.4 | 4.2 | 0.4 | tr | tr | tr | tr | — | — | 1.9 | 0.4 |
| **14** | ***cis*-4-Tujanol** | **1114** | **1553** | **tr** | **6.1** | **tr** | **tr** | **tr** | **tr** | **tr** | — | — | **tr** | **tr** |
| 15 | *cis-p*-Ment-2-en-1-ol | 1135 | 1570 | — | 3.9 | — | — | — | — | — | — | — | tr | — |
| 16 | *trans-p*-Ment-2-en-1-ol | 1159 | 1636 | — | 1.7 | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| **17** | **Mentona** | **1171** | **1472** | **36.0** | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| **18** | ***iso*-Mentona** | **1177** | **1498** | **4.1** | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 19 | *neo*-Mentol | 1180 | 1602 | 2.0 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 20 | *iso*-Pulegona | 1186 | 1592 | 1.0 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| **21** | **Terpinen-4-ol*** | **1191** | **1615** | **tr** | **25.9** | **1.5** | **1.6** | **0.5** | **1.6** | **tr** | **1.0** | — | **1.6** | **tr** |
| 22 | α-Terpineol | 1201 | 1702 | tr | 4.5 | tr | — | — | 0.6 | tr | — | — | tr | — |
| 23 | *cis*-Piperitol | 1212 | 1682 | — | 1.5 | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 24 | *trans*-Piperitol | 1222 | 1682 | — | 1.0 | — | tr | — | tr | — | — | — | tr | — |
| **25** | **Metil-timil-éter** | **1237** | **1595** | **2.0** | — | **2.8** | **1.7** | **1.0** | **13.8** | **12.4** | — | — | **3.3** | **tr** |
| 26 | Carvacril-metil-éter | 1244 | 1607 | — | — | 0.4 | 0.4 | tr | — | — | — | — | 2.1 | tr |
| **27** | **Pulegona** | **1254** | **1662** | **33.5** | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |

* Se usaron sustancias patrón; [a](F): Flores; [b] (H): Hojas; tr: < 0.4%

**Tabla 1.17** continuación.

| No. Pico | Compuesto | $I_R$ | | CANTIDAD RELATIVA. % | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | DB-5 | DB-Wax | *S. brownei* | *O. majorana* | *L. origanoides* | | | *L. micromera* | | *P. amboinicus* | | *T. vulgaris* | |
| | | | | SDE | SDE | SDE (F)[a] | SDE (H)[b] | SFE | SDE | SFE | SDE | SFE | SDE | SFE |
| **28** | **Timol*** | **1291** | **2186** | **2.0** | **tr** | **6.9** | **10.6** | **8.8** | **34.1** | **32.8** | **0.9** | **—** | **35.8** | **20.8** |
| | ***trans*-Anetol*** | **1293** | **1834** | **4.0** | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| **29** | **Carvacrol*** | **1295** | **2223** | **0.9** | **—** | **42.3** | **42.6** | **51.8** | **1.0** | **1.5** | **62.0** | **14.2** | **4.3** | **3.1** |
| 30 | Acetato de timilo | 1348 | 1855 | tr | — | tr | tr | — | 3.4 | 2.5 | — | — | tr | — |
| 31 | Acetato de carvacrilo | 1375 | 1880 | — | — | 2.4 | 0.9 | — | tr | — | — | — | — | — |
| **32** | ***trans*-β-Cariofileno*** | **1434** | **1607** | **1.6** | **2.1** | **4.0** | **3.4** | **3.5** | **3.3** | **6.2** | **4.7** | **2.5** | **1.7** | **1.0** |
| 33 | *trans*-α-Bergamoteno | 1443 | 1591 | — | — | 0.6 | 0.8 | 0.5 | tr | tr | 2.3 | 1.5 | — | — |
| 34 | 2,6-Dihidroxi-3-metilacetofenona** | 1445 | — | — | — | — | — | 0.8 | 0.6 | 1.1 | — | — | — | 5.4 |
| 35 | α-Humuleno* | 1474 | 1682 | tr | tr | 2.5 | 2.0 | 1.8 | 0.7 | 0.8 | 1.5 | 0.6 | tr | — |
| 36 | 4,6-Dihidroxi-2,3-dimetilacetofenona** | 1481 | 2455 | — | — | 1.1 | 2.3 | 2.4 | tr | — | — | — | — | — |
| 37 | Germacreno D | 1495 | 1723 | tr | — | tr | tr | — | 1.3 | 3.1 | — | — | tr | tr |
| 38 | Biciclogermacreno | 1511 | 1748 | — | 1.2 | — | tr | — | tr | 0.8 | — | — | — | — |
| 39 | Óxido de cariofileno | 1598 | 2013 | — | tr | tr | tr | tr | tr | tr | 1.2 | tr | tr | 0.8 |
| 40 | Acido palmítico | 1958 | — | — | — | — | — | tr | — | 0.5 | — | — | — | 3.6 |
| 41 | Fitol | 2112 | — | — | — | — | — | — | — | tr | — | — | — | 2.0 |
| 42 | Ácido linolénico | 2138 | — | — | — | — | — | tr | — | — | — | — | — | 4.2 |
| 43 | Ácido esteárico | 2158 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | 1.1 |
| 44 | **α-Tocoferol** | **2394** | — | — | — | — | — | — | — | — | — | **6.5** | — | — |
| 45 | Heptacosano | — | — | — | — | — | — | tr | — | 0.4 | tr | — | — | 1.9 |
| 46 | Escualeno | — | — | — | — | — | — | 0.5 | — | tr | — | 0.9 | — | 2.7 |
| 47 | Hexacosanal** | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | 1.1 |
| 48 | Nonacosano | — | — | — | — | — | — | 0.4 | — | 2.5 | — | 1.1 | — | 14.8 |
| 49 | γ-Sitosterol | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | 7.3 | — | — |
| | **Hidrocarburo. $C_{20}$-$C_{30}$** | — | — | — | — | — | — | **2.9** | — | — | — | **61.5** | — | **12.3** |

* Se usaron sustancias patrón; ** Identificado tentativamente; [a](F): Flores; [b](H): Hojas; tr: < 0.4%

Los siguientes fueron los componentes más abundantes (25-62%) identificados en los extractos obtenidos por SDE de las especies estudiadas: carvacrol (*L. origanoides* y *P. amboinicus*), timol (*T. vulgaris* y *L. micromera*), mentona y pulegona (*S. brownei*) y terpinen-4-ol (*O. majorana*). En los extractos SDE de *S. brownei* y *O. majorana* los monoterpenoides fueron los constituyentes mayoritarios, conformaron 84.7 y 90.5%, respectivamente. La comparación detallada de la composición química de los extractos de las especies colombianas estudiadas con las reportadas en la literatura se presenta en la **Tabla 1.18**.

**Tabla 1.18**. Comparación de las composiciones de extractos SDE y SFE de las especies colombianas estudiadas con reportes de la literatura.

| Especie estudiada | Compuestos mayoritarios | Autores | País | Compuestos mayoritarios | Referencias |
|---|---|---|---|---|---|
| *S. brownei* | Mentona (36%), pulegona (34%) | Rojas y Usubillaga | Venezuela | Pulegona (64%), mentona (20%) | [83] |
| | | Pino *et al.* | Cuba | Pulegona (55%), mentona (33%) | [84] |
| *O. majorana* | Terpinen-4-ol (26%), γ-terpineno (12%), α-terpineno (8%), sabineno (6%) | Misharina *et al.* | Hungría | Terpinen-4-ol (26%), *trans*-4-tujanol (15%) | [182,183] |
| | | Vera y Chane-Men | Isla Reunión | Terpinen-4-ol (38%), *trans*-4-tujanol (15%), *p*-cimeno (7%), γ-terpineno (7%) | [184] |
| | | Richter y Schellenberg | Alemania | Terpinen-4-ol (23%), *trans*-4-tujanol (21%), γ-terpineno (11%) | [185] |
| | | Busatta *et al.* | Egipto | Terpinen-4-ol (30%), γ-terpineno (14%), *trans*-4-tujanol (10%), α–terpineno (8%) | [186] |
| | | Giordani *et al.* | Argelia | Timol (25-41%), carvacrol (2-21%) | [187] |
| *P. amboinicus* | Hidrocarburos $C_{20}$-$C_{30}$ (62) %, α-tocoferol (7%) | Pino *et al.* | Cuba | Carvacrol (90%) | [188] |

La **Tabla 1.19** registra los compuestos identificados y las cantidades relativas (%) de los AE obtenidos por MWHD, de las plantas de los géneros *Plectranthus*, *Lippia* y *Thymus* estudiados. En el trabajo se detectaron por CG-EM 19-33 componentes en

cantidades relativas >0.4%, de los cuales 87-97% se identificaron positivamente, con base en los índices de retención lineales, medidos en columnas polar y no-polar, espectros de masas (EI, 70 eV) y sustancias-patrón. La composición química de los AE y extractos de cada especie, obtenidos por MWHD y SDE, fue bastante similar, aunque se observaron diferencias pequeñas en las cantidades relativas (%) y los constituyentes más volátiles, que se lograron aislar mejor, con mayor eficiencia por SDE.

**Tabla 1.19.** Identificación y cantidad relativa de los constituyentes principales de los AE de *L. origanoides*, *L. micromera*, *P. amboinicus* y *T. vulgaris* aislados por MWHD.

| ‡No. Pico | Compuesto | $I_R$ | | CANTIDAD RELATIVA, % | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | DB-5 | DB-Wax | *L. origanoides* | *L. micromera* | *P. amboinicus* | *T. vulgaris* |
| 1 | α-Tujeno | — | 1023 | 1,3 | 2.1 | tr | 1.3 |
| 2 | α-Pineno* | — | 1018 | tr | 0.8 | tr | 0.9 |
| 3 | Canfeno* | — | 1061 | tr | tr | tr | 0.9 |
| 4 | 1-Octen-3-ol* | — | 1395 | tr | — | tr | 1.3 |
| 5 | β-Mirceno* | — | 1162 | 2.2 | 2.1 | 0.9 | 1.5 |
| 6 | α-Terpineno | 1022 | 1176 | 2.6 | 1.8 | 2.2 | 1.4 |
| **7** | ***p*-Cimeno*** | **1030** | **1269** | **9.5** | **19.2** | **8.6** | **17.7** |
| 8 | Eucaliptol* | 1038 | 1208 | 0.5 | 2.8 | — | 0.7 |
| **9** | **γ-Terpineno** | **1063** | **1244** | **10.0** | **4.8** | **10.6** | **6.8** |
| 10 | *trans*-4-Tujanol | 1079 | 1553 | 0.5 | 0.5 | 1.2 | 1.6 |
| 11 | Linalol* | 1104 | 1547 | tr | tr | tr | 2.7 |
| 12 | Alcanfor* | 1158 | 1526 | — | 0.4 | — | 1.2 |
| 13 | Borneol * | 1184 | 1712 | — | — | tr | 1.2 |
| | Butirato de *trans*-3-hexenilo | 1188 | 1462 | — | — | — | 1.3 |
| 14 | Terpinen-4-ol* | 1191 | 1615 | 0.8 | 1.4 | 0.8 | 1.3 |
| **15** | **Metil-timil-éter** | **1237** | **1595** | **1.6** | **16.5** | — | **1.2** |
| 16 | Carvacril-metil-éter | 1244 | 1607 | tr | — | — | 0.9 |
| 17 | 2-Isopropil-4-metil-fenol | 1282 | 2168 | tr | 1.1 | tr | 0.7 |
| **18** | **Timol*** | **1291** | **2186** | **14.3** | **24.7** | **0.9** | **34.0** |
| **19** | **Carvacrol*** | **1295** | **2223** | **44.4** | **3.5** | **53.7** | **6.4** |
| **20** | ***trans*-β-Cariofileno*** | **1434** | **1607** | **2.7** | **4.5** | **6.6** | **2.8** |
| 21 | *trans*-α-Bergamoteno | 1443 | 1591 | 0.4 | 0.4 | 3.7 | tr |
| 22 | α-Humuleno* | 1474 | 1682 | 1.5 | 0.8 | 2.5 | tr |
| 23 | 4,6-Dihidroxi-2,3-dimetilacetofenona** | 1481 | 2455 | 1.3 | — | — | — |
| 24 | Germacreno D | 1495 | 1723 | tr | 0.7 | — | 0.5 |
| 25 | Biciclogermacreno | 1511 | 1748 | 0.7 | 0.5 | — | tr |
| 26 | Óxido de cariofileno | 1598 | 2013 | tr | 2.0 | 1.8 | 1.2 |

‡Asignado en **Figura 1.7**; * Se usaron sustancias patrón; ** Identificado tentativamente; tr: < 0.4%.

La **Figura 1.7** presenta los perfiles cromatográficos (corrientes iónicas totales reconstruidas) típicos de los AE aislados por MWHD de *P. amboinicus*, *L. micromera* y *T. vulgaris*, ricos en timol y carvacrol.

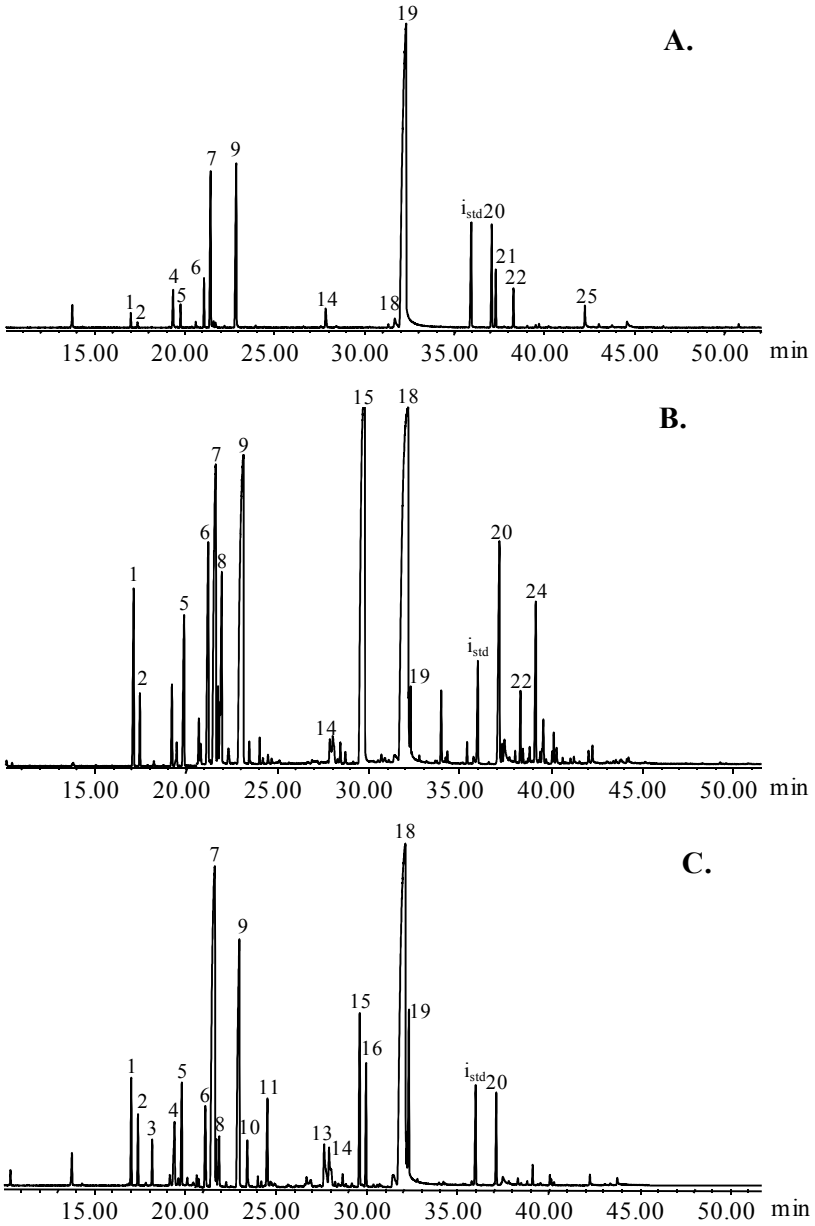



**Figura 1.7**. Corrientes iónicas totales reconstruidas obtenidas por CG-EM (DB-5, 60 m; EI, 70 eV) de los AE, ricos en timol y carvacrol, aislados por MWHD de: **A.** *P. amboinicus*, **B.** *L. micromera* y **C.** *T. vulgaris*. Veáse **Tabla 1.19** para la identificación de los picos.

Los siguientes fueron compuestos mayoritarios de los AE de las especies analizadas: carvacrol (53.7%), γ-terpineno (10.6%), *p*-cimeno (8.6%) y *trans*-β-cariofileno (6.6%)

para *P. amboinicus*; carvacrol (44.4%), timol (14.3%), γ-terpineno (10.0%) y *p*-cimeno (9.5%) para *L. origanoides*; en *T. vulgaris* se hallaron timol (34.0%), *p*-cimeno (17.7%), γ-terpineno (6.8%) y carvacrol (6.4%); y para *L. micromera* se identificaron como mayoritarios timol (24.7%), *p*-cimeno (19.2%), metil-timil-éter (16.5%) y γ-terpineno (4.8%). La comparación detallada de las composiciones químicas de los AE de las especies estudiadas y reportadas en la literatura se presenta en la **Tabla 1.20**.

**Tabla 1.20**. Comparación de las composiciones de AE con reportes de la literatura.

| Especie estudiada | Componentes mayoritarios | Método aislamiento (rendimiento,%) | País | Componentes mayoritarios | Referencias |
|---|---|---|---|---|---|
| *P. amboinicus* | Carvacrol (54%), γ-terpineno (11%), *p*-cimeno (9%), β-cariofileno (7%) | Destilación con vapor (0.6) | Cuba | Carvacrol (51%), α-terpineno + *p*-cimeno (10%), γ-terpineno (6%), *trans*-□-cariofileno (8%) | [188] |
| | | Hidrodestilación (NR) | India | Carvacrol (70%), *trans*-β-cariofileno (6%), *p*-cimeno (6%), γ-terpineno (5%) | [189] |
| | | Hidrodestilación (0.6) | India | Timol (94%) | [190] |
| | | Destilación con vapor, hidrodestilación (0.01-0.5) | Brasil, India, Cuba, Martinica | Limoneno, linalol, β-mirceno, patchulol | [66,70,191-193] |
| *T. vulgaris* | Timol (34%), *p*-cimeno (18%), γ-terpineno (7%), carvacrol (6%) | MWHD, hidrodestilación (1.9-2.4) | Irán | Timol (34%), *p*-cimeno (18%), γ-terpineno (7%), carvacrol (6%) | [194] |
| | | Destilación con vapor (NR) | España | Timol (58%), *p*-cimeno (19%), carvacrol (3%) | [195] |
| | | Destilación con vapor (2-4) | España | Eucaliptol (29-36), acetato de terpenilo (18-25) | [196] |
| | | Hidrodestilación (NR). | Irán | Timol (71%), α-terpineno (7%), acetato de bornilo (5%) | [197] |
| | | Destilación con vapor (0.2-1.2) | Italia | Timol (19-54%), carvacrol (1-4%), *p*-cimeno (12-22%), γ-terpineno (1-23%) | [198] |
| | | Baño de agua 40ºC (NR) | Austria | Carvacrol (26-38%), linalol (22-67%), *trans*-4-tujanol (16-33%), geraniol (32%), *p*-cimeno (28%) | [199] |

NR – No reportada

**Tabla 1.20** continuación.

| Especie estudiada | Componentes mayoritarios | Método aislamiento (rendimiento,%) | País | Componentes mayoritarios | Referencias |
|---|---|---|---|---|---|
| *L. origanoides* | Carvacrol (44%), timol (14%), γ-terpineno (10%), *p*-cimeno (10%) | Hidrodestilación (1.0) | Brasil | Carvacrol (39%), timol (18%), *p*-cimeno (10%), γ-terpineno (4%) | [62] |
| *L. micromera* | Timol (25%), *p*-cimeno (19%), metiltimil-éter (16%), γ-terpineno (5%) | Hidrodestilación (4.6) | Brasil | Carvacrol (34-43%), *p*-cimeno (12-16%), γ-terpineno (8-10%), metil-timil-éter (6-9%), timol (5-8%) | [200] |
| | | MWHD (1.2-2.3) | Colombia | Timol (60%), carvacrol (44%), *p*-cimeno (16%) | [201] |
| | | MWHD (1.5) | Colombia | Timol (29%), metil-timil-éter (15%), *p*-cimeno (13%), γ-terpineno (12%) | [65] |
| | | Destilación con vapor (1.0) | Cuba | Carvacrol (42%), β-cariofileno (12%), α-bergamoteno (9%) | [60] |
| | | Hidrodestilación (0.7) | E.E.U.U. | Carvacrol (26%), γ-terpineno (22%), *p*-cimeno (12%), timol (7%) | [202] |

Debido a la similitud estructural y naturaleza química del timol y carvacrol (isómeros de posición), sus $t_R$ (32.09 y 32.28 min, en columna apolar, respectivamente) y espectros de masas son muy similares (**Figura 1.8**). Sin embargo, los datos cromatográficos y espectrales detallados permitieron mostrar las diferencias al comparar las estabilidades relativas de iones moleculares y fragmentos, además de los valores de los índices de retención ($I_R$), que se presentan en la **Tabla 1.21**.

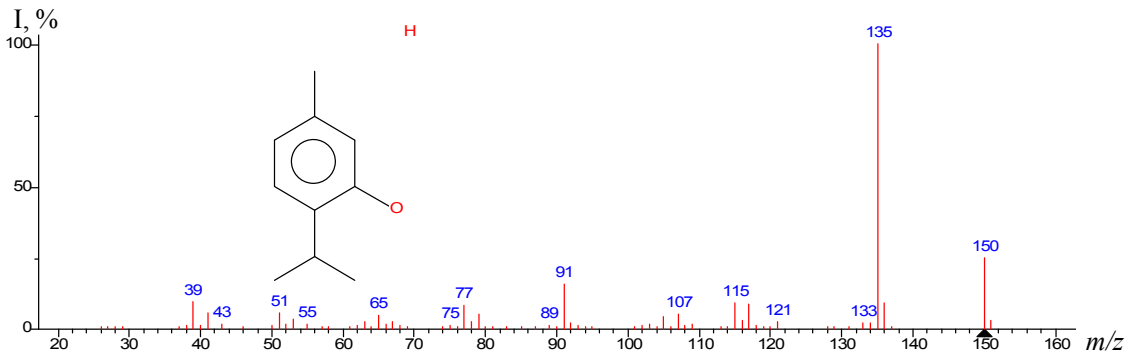



**Figura 1.8.** Espectro de masas (EI, 70 eV) del timol.

**Tabla 1.21**. Características cromatográficas y espectroscópicas del timol y carvacrol.

| Compuesto | Índice de retención Columna apolar | Columna polar | μ, D | $W_{M+}$ | $I_{[M-CH3]}/I_M^+$ | $I_{[M-CH3-H2O]}/I_M^+$ | $I_{[M-CH3-H2O-C2H2]}/I_M^+$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Timol | 1301 | 2183 | 1.341* | 8.0 | 3.10 | 0.24 | 0.44 |
| Carvacrol | 1306 | 2217 | 1.439** | 8.8 | 2.44 | 0.13 | 0.32 |

*Valor literatura; **Valor calculado (con optimización geometría)

A pesar de que los valores de $I_R$ de timol y carvacrol son tan cercanos en columna apolar, la comparación de sus momentos dipolares (μ) muestra el mayor carácter polar del carvacrol, lo que se evidencia por su mayor rentención en columna polar y respectivamente por valor más alto del $I_R$. Los cálculos de estabilidad de los iones moleculares indican que el ion molecular del carvacrol es más estable y tiene una fragmentación menos intensa que el timol, aunque ambos presentan los mismos iones importantes. Sin embargo, las relaciones de intensidades iónicas, *e.g.*, $I_{[M-CH3]}/I_M^+$ que es la relación entre el ion pico de base (*m/z* 135) y el respectivo ion molecular (*m/z* 150), difieren notoriamente: mayor impedimento estérico más fácil se elimina $CH_3$.

El mayor contenido del éter metílico del timol permite diferenciar al AE de *L. micromera* del de *T. vulgaris*. El espectro de masas y la ruta de fragmentación del metil-timil-éter se presentan en la **Figura 1.9** y el **Esquema 1.5**, respectivamente.

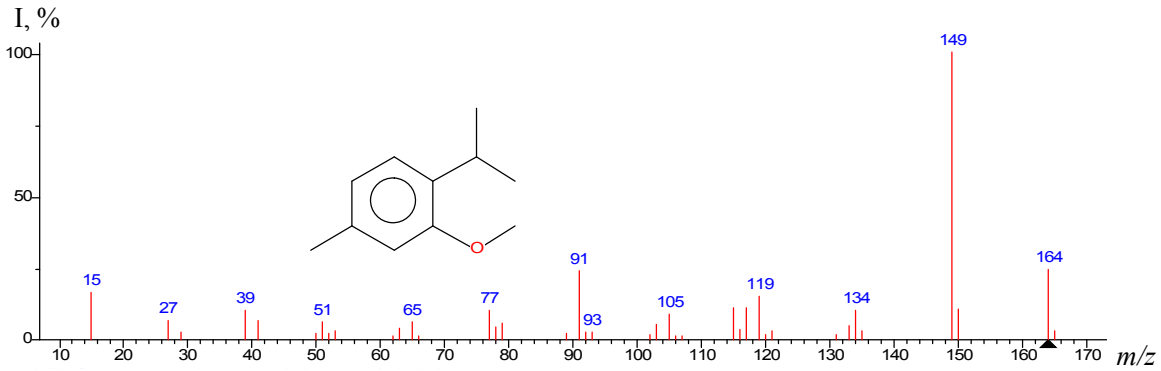
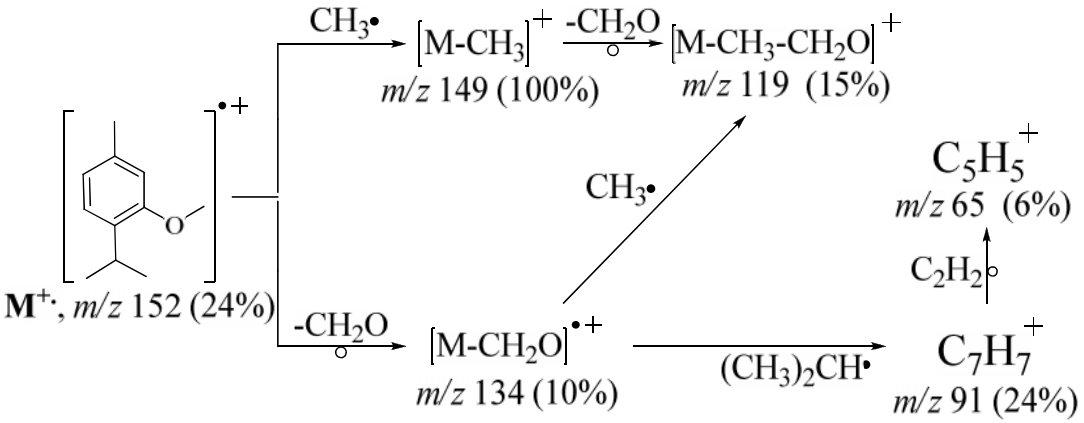



**Figura 1.9.** Espectro de masas obtenido por CG-EM (DB-5, 60 m; EI, 70 eV) de metil-timil-éter.

Las pérdidas más importantes encontradas en el espectro se relacionaron con los grupos funcionales presentes en la estructura: 15 unidades de masa corresponden al grupo $CH_3$ saliente, 31 unidades coinciden con $OCH_3$ y 30 unidades másicas, con el grupo $CH_2O$ proveniente del grupo metoxi. Los fragmentos en *m/z* 91 y 65 son característicos del grupo bencilo.




**Esquema 1.5.** Ruta de fragmentación del metil-timil-éter. EI, 70 eV.

La combinación de los $I_R$ lineales, datos espectrales de sustancias-patrón y espectros de masas experimentales aumentaron la confiabilidad de la identificación de los componentes de extractos y AE bajo estudio. El análisis SDE-CG-EM de las especies vegetales pertenecientes a los géneros *Origanum*, *Lippia, Satureja* y *Thymus* permitió seleccionar las especies con alto contenido de timol y carvacrol (*P. amboinicus*, *L. origanoides*, *T. vulgaris* y *L. micromera*). Los AE de estas cuatro especies presentaron cantidades relativas entre 7-36% y 4-62% de timol y carvacrol, respectivamente, con rendimientos en la obtención de AE entre 0.1-2.3%.

**1.9.3 Composición química de extractos y aceites esenciales de especies vegetales con alto contenido de *trans*-anetol y estragol.** El *trans*-anetol y el estragol se utilizan como sustancias saborizantes y aromatizantes en las industrias de alimentos y bebidas alcohólicas [124]; para la elaboración de perfumes, jabones y detergentes [3] y como precursores en síntesis orgánica [203]. Estos compuestos presentan actividades anti-inflamatoria, antibacteriana, insecticida y anestésica [204,205], en AE de muchas especies aromáticas, *e.g.*, el tarragón, el estragón francés, la albahaca, el hinojo, el anís y el anís estrellado [206].

**1.9.3.1 Identificación de los componentes de extractos y aceites esenciales.** La metodología de SDE también se utilizó para clasificar las especies ricas en *trans*-anetol y estragol; se encontró que la mayoría de las especies estudiadas (*I. verum*, *Ocimum sp.* 2, *T. filifolia*, *T. lucida* y *F. vulgare*) contenía estas sustancias en alta proporción. *A. drancunculus* estuvo constituido por metileugenol (45%). La especie de *T. filifolia*, cultivada en el municipio Bolivar y en el cultivo experimental de CENIVAM, presentó estragol y *trans*-anetol en cantidades relativamente altas, 27 y 70 %, respectivamente. La clasificación, con base en familias de compuestos y contenido del *trans*-anetol y del estragol, de los AE y extractos de las especies vegetales obtenidos por diferentes métodos MWHD, SDE y SFE, se presenta en la **Tabla 1.22**.

Las **Tablas 1.23** y **1.24** registran los compuestos identificados y las cantidades relativas (> 1%) de los AE y extractos obtenidos por MWHD, SDE y SFE, de las plantas de *T. lucida*, *Ocimum sp. 2*, *A. dracunculus*, *I. verum* y *F. vulgare*. Por cada método de extracción se detectaron por CG-EM 20-84 componentes, de los cuales se identificaron positivamente 85-99%, con base en los índices de retención lineales, medidos en columnas polar y no-polar, espectros de masas (EI, 70 eV) y sustancias-patrón.

El *trans*-anetol, el estragol, el metileugenol y el sabineno fueron los componentes mayoritarios identificados en los extractos obtenidos por SDE de las 6 especies analizadas, con 21-89% de cantidad relativa.

En todos los extractos obtenidos por SDE y SFE y los AE aislados por MWHD de todas las plantas estudiadas, se encontaron el *trans*-anetol y estragol. En los extractos SFE se hallaron también hidrocarburos no-terpénicos, en algunos casos, éstos constituyeron la familia de compuestos principal (63%), *e.g.*, en *F. vulgare*; y cumarinas (herniarina) en flores (18%) y hojas (70%) de la especie *T. lucida*. Otros componentes de interés en los extractos SFE de *I. verum* y *F. vulgare* fueron *trans*-foeniculina, fotoanetol y graveolona, respectivamente.

**Tabla 1.22.** Clasificación de los AE y extractos de las especies *A.dracunculus*, *F. vulgare*, *I. verum*, *Ocimum sp.* 2, *T. filifolia* y *T. lucida*, por familias de compuestos y contenido de estragol y *trans*-anetol.

| Planta (parte usada) | Rendimiento aceite (%, p/p) | Familia de compuestos, cantidad relativa (%) | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | Constituyentes | SDE | MWHD | SFE |
| *A. dracunculus* (Hojas) | 0.5 | **Estragol** | **0.9** | — | — |
| | | ***trans*-Anetol** | — | — | — |
| | | Monoterpenoides | 40.1 | 24.5 | — |
| | | Sesquiterpenoides | 1.8 | 1.2 | — |
| | | Otros compuestos* | 52.9 | 67.6 | — |
| *F. vulgare* (Hojas) | 0.3 | **Estragol** | **5.6** | **5.8** | — |
| | | ***trans*-Anetol** | **72.6** | **73.9** | **8.6** |
| | | Monoterpenoides | 18.7 | 16.8 | — |
| | | Sesquiterpenoides | — | — | 2.1 |
| | | Otros compuestos* | 0.5 | 0.9 | 23.3 |
| | | Hidrocarburos** | — | — | 65.5 |
| *I. verum* (Frutos) | 2.0 | **Estragol** | **2.9** | **3.4** | **0.7** |
| | | ***trans*-Anetol** | **73.0** | **83.4** | **69.2** |
| | | Monoterpenoides | 14.4 | 7.0 | 3.0 |
| | | Sesquiterpenoides | 0.7 | — | 0.5 |
| | | Otros compuestos* | 2.0 | 3.0 | 12.0 |
| | | Hidrocarburos** | — | — | 3.2 |
| *Ocimum sp.* 2 (Hojas) | 0.2 | **Estragol** | **49.5** | **49.9** | **47.9** |
| | | ***trans*-Anetol** | — | — | — |
| | | Monoterpenoides | 30.5 | 24.4 | 20.4 |
| | | Sesquiterpenoides | 12.3 | 15.1 | 9.7 |
| | | Otros compuestos* | 1.9 | 1.0 | 1.2 |
| | | Hidrocarburos** | — | — | 6.0 |
| *T. filifolia* (Hojas) | 1.6 | **Estragol** | **27.0** | **27.4** | **24.8** |
| | | ***trans*-Anetol** | **70.5** | **70.6** | **64.4** |
| | | Monoterpenoides | — | — | 0.6 |
| | | Sesquiterpenoides | — | — | — |
| | | Otros compuestos* | — | 0.7 | — |
| | | Hidrocarburos** | — | — | 0.6 |
| *T. lucida* (Flores) | 0.5 | **Estragol** | **87.5** | **93.2** | **45.3** |
| | | ***trans*-Anetol** | — | — | **1.7** |
| | | Monoterpenoides | 7.6 | 4.2 | 1.3 |
| | | Sesquiterpenoides | 0.9 | 0.6 | 0.5 |
| | | Otros compuestos* | 1.5 | — | 27.2 |
| | | Hidrocarburos** | — | — | 14.9 |
| *T. lucida* (Hojas) | 0.9 | **Estragol** | **93.2** | **89.0** | **24.3** |
| | | ***trans*-Anetol** | — | — | — |
| | | Monoterpenoides | 4.2 | 6.8 | — |
| | | Sesquiterpenoides | 0.6 | — | — |
| | | Otros compuestos* | — | 2.3 | 70.5 |
| | | Hidrocarburos** | — | — | 0.5 |

*Alcoholes, cetonas, aldehídos, éteres y ésteres **Hidrocarburos no terpénicos

**Tabla 1.23.** Identificación y cantidad relativa (>1%) de los metabolitos secundarios, obtenidos por diferentes métodos de extracción de *T. lucida*, *Ocimum sp.* y *A. dracunculus.*

| ‡No. Pico | Compuesto | $I_R$ | | CANTIDAD RELATIVA, % | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | *T. lucida* | | | | | | *Ocimum sp.* 2 | | | *A. dracunculus* | | |
| | | DB-5 | DB-Wax | Flores | | | Hojas | | | | | | | | |
| | | | | SDE | MWHD | SFE | SDE | MWHD | SFE | SDE | MWHD | SFE | SDE | MWHD | SFE |
| **1** | *trans*-3-Hexen-1-ol | — | 1386 | tr | — | — | tr | — | — | 1.1 | tr | — | tr | — | — |
| 2 | **Sabineno** | — | **1118** | **tr** | — | — | — | — | — | **0.5** | **tr** | **0.5** | **20.9** | **15.3** | — |
| 3 | **β-Mirceno*** | — | **1162** | **4.8** | **2.5** | **1.3** | **4.6** | **3.4** | **tr** | **1.5** | **0.8** | **1.2** | **1.6** | **1.1** | — |
| **4** | α-Terpineno | 1020 | 1176 | — | — | — | — | — | — | tr | tr | — | 1.0 | tr | — |
| **5** | Limoneno* | 1034 | 1195 | tr | tr | tr | tr | tr | — | 0.8 | 0.9 | 0.6 | tr | 0.9 | — |
| **6** | *cis*-β-Ocimeno | 1036 | 1235 | tr | tr | — | tr | tr | — | — | — | — | 1.7 | 2.4 | — |
| **7** | Eucaliptol* | 1040 | 1208 | — | — | — | — | — | — | 7.7 | 6.4 | 6.7 | — | — | — |
| 8 | ***trans*-β-Ocimeno** | **1049** | **1250** | **1.8** | **0.7** | **tr** | **1.5** | **1.1** | **tr** | **2.4** | **2.6** | **2.0** | **7.3** | **3.6** | — |
| **9** | γ-Terpineno* | 1062 | 1244 | — | — | — | — | — | — | tr | tr | tr | 1.7 | tr | — |
| **10** | Fenchona* | 1095 | 1401 | — | — | — | — | — | — | 1.9 | 2.4 | 1.6 | — | — | — |
| 11 | **Linalol*** | **1108** | **1552** | **1.0** | **1.0** | **tr** | **0.7** | **0.6** | **tr** | **13.1** | **11.3** | **7.1** | **0.7** | **tr** | — |
| **12** | Terpinen-4-ol* | 1189 | 1615 | — | — | — | — | — | — | 0.5 | tr | — | 3.6 | 0.9 | — |
| 13 | **Estragol*** | **1222** | **1675** | **87.5** | **93.2** | **45.3** | **89.0** | **93.8** | **24.3** | **49.5** | **49.9** | **47.9** | **0.9** | **0.5** | — |
| 14 | ***trans*-Anetol*** | **1292** | **1834** | **tr** | **tr** | **1.7** | **tr** | **tr** | — | **tr** | **tr** | **tr** | — | — | — |
| **15** | Acetato de citronelilo | 1349 | 1663 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | 2.9 | 1.9 | — |
| **16** | Acetato de geranilo | 1378 | 1757 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | 3.3 | 1.2 | — |
| 17 | **Metil-eugenol** | **1400** | **2015** | — | **tr** | — | — | **tr** | — | **tr** | **0.5** | **tr** | **45.1** | **14.2** | — |
| **18** | *trans*-α-Bergamoteno | 1442 | 1591 | — | — | — | — | — | — | 1.5 | 2.5 | 2.2 | — | — | — |
| **19** | *cis*-β-Farneseno | 1456 | 1669 | 0.9 | 0.6 | tr | — | tr | tr | 1.0 | 1.7 | 1.3 | — | — | — |
| **20** | α-Humuleno* | 1470 | 1682 | tr | tr | — | — | — | — | 0.6 | 1.1 | tr | tr | — | — |
| **21** | Germacreno D | 1495 | 1723 | tr | tr | tr | tr | tr | tr | 1.7 | 2.4 | 1.8 | 0.8 | 0.6 | — |
| **22** | *trans*-Metil-isoeugenol | 1498 | 2184 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | 1.6 | 2.3 | — |
| **23** | Biciclogermacreno | 1509 | 1748 | — | — | — | — | — | — | 0.8 | 1.2 | 0.6 | 1.0 | tr | — |
| **24** | γ-Cadineno | 1525 | 1778 | — | — | — | — | — | — | 1.2 | 1.4 | 1.2 | tr | tr | — |
| 25 | **Elemicina** | **1557** | **2235** | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | **33.3** | — |
| 26 | ***cis*-Asarona** | **1653** | **2406** | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | **14.7** | — |
| **27** | τ-Cadinol | 1657 | 2136 | — | — | tr | — | — | — | 3.2 | 3.1 | 2.1 | — | — | — |
| 28 | **7-Metoxi-cumarina** | **1744** | **2278** | **0.9** | **tr** | **18.0** | **1.7** | **0.6** | **69.9** | — | — | — | — | **tr** | — |
| **29** | Ácido palmítico | 1957 | — | — | — | 2.1 | — | — | tr | — | — | tr | — | — | — |
| **30** | α-Tocoferol* | 2386 | — | — | — | 1.3 | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| **31** | Escualeno | — | — | — | — | 0.8 | — | — | tr | — | — | 1.2 | — | — | — |
| **32** | γ-Sitosterol | — | — | — | — | 3.3 | — | — | — | — | — | 1.2 | — | — | — |
| | Hidrocarburos $C_{21}$-$C_{28}$ | | | | | 14.1 | | | | | | 3.4 | | | |

‡Asignado en **Figura 1.10 (A,B,C)**; * Se usaron sustancias patrón; ** Identificado tentativamente; tr: < 1%

**Tabla 1.24.** Identificación y cantidad relativa (>1%) de los metabolitos secundarios, obtenidos por diferentes métodos de extracción de *T. filifolia. I. verum.* y *F. vulgare*.

| ‡No. Pico | Compuesto | $I_R$ | | CANTIDAD RELATIVA. % | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | DB-5 | DB-Wax | *T. filifolia* | | | | *I. verum* | | | *F. vulgare* | | |
| | | | | CENIVAM | | | Bolivar | | | | | | |
| | | | | SDE | MWHD | SFE | MWHD | SDE | MWHD | SFE | SDE | MWHD | SFE |
| **1´** | *trans*-3-Hexen-1-ol | 849 | 1386 | tr | — | — | — | — | — | — | tr | — | 4.5 |
| **2´** | α-Pineno* | 935 | 1018 | — | — | — | — | 1.2 | tr | tr | 4.1 | 3.5 | 0.7 |
| **3´** | α-Felandreno | 1010 | 1177 | — | — | — | — | 0.5 | tr | tr | 1.1 | 1.3 | — |
| **4´** | δ-3-Careno | 1013 | 1156 | — | — | — | — | 0.8 | 0.5 | — | tr | — | — |
| **5´** | *p*-Cimeno* | 1030 | 1269 | — | — | — | — | 0.6 | tr | — | tr | tr | — |
| 6´ | **Limoneno** | **1034** | **1195** | — | **tr** | — | — | **5.1** | **3.0** | **2.5** | **10.4** | **8.5** | **1.4** |
| **7´** | β-Felandreno | 1035 | 1207 | — | — | — | — | 1.0 | 0.6 | tr | 0.6 | 0.5 | — |
| **8´** | Eucaliptol* | 1040 | 1208 | — | — | — | — | 1.0 | 0.7 | tr | — | — | — |
| **9´** | α-Tolualdehído | 1049 | 1647 | tr | — | tr | tr | tr | tr | tr | 0.5 | tr | — |
| **10´** | Fenchona* | 1095 | 1401 | — | — | — | — | — | — | — | 1.9 | 2.5 | — |
| **11´** | Linalol* | 1108 | 1552 | — | — | tr | — | 2.4 | 0.9 | 0.5 | tr | — | — |
| **12´** | Terpinen-4-ol* | 1189 | 1615 | — | — | — | — | 1.2 | 0.6 | tr | — | — | — |
| **13´** | α-Terpineol | 1201 | 1702 | — | — | — | — | 0.6 | 0.7 | tr | — | — | — |
| 14´ | **Estragol*** | **1222** | **1675** | **27.0** | **27.4** | **24.8** | **23.6** | **2.9** | **3.4** | **0.7** | **5.6** | **5.8** | **tr** |
| **15´** | *cis*-Anetol | 1258 | 1761 | tr | tr | tr | tr | tr | 0.9 | tr | 0.6 | 0.6 | tr |
| **16´** | Anisaldehído | 1270 | 2036 | tr | 0.7 | tr | 0.5 | tr | 1.9 | 5.6 | tr | 0.9 | tr |
| 17´ | ***trans*-Anetol*** | **1308** | **1844** | **70.5** | **70.6** | **64.4** | **73.0** | **73.0** | **82.5** | **69.2** | **72.0** | **73.3** | **8.6** |
| **18´** | Acetato 3-alilfenol | 1343 | — | — | — | 0.6 | — | — | — | — | — | — | — |
| **19´** | *p*-Acetonilanisol | 1398 | 2165 | tr | tr | tr | — | 0.6 | tr | 0.6 | — | tr | — |
| **20´** | Ácido *p*-anisídico | 1420 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | 2.7 |
| **21´** | *trans*-α-Bergamoteno | 1442 | 1591 | — | — | tr | — | 0.7 | tr | 0.5 | — | — | — |
| 22´ | ***trans*-Foeniculina** | **1686** | **2268** | — | — | — | — | **1.4** | **1.1** | **5.3** | — | — | — |
| **23´** | Neofitadieno | 1838 | — | — | — | — | — | — | — | — | tr | tr | 2.6 |
| **24´** | Acido palmítico | 1957 | — | — | — | tr | — | — | — | tr | — | — | 0.9 |
| **25´** | Fitol | 2117 | 2648 | tr | — | tr | — | — | — | — | tr | tr | 5.9 |
| 26´ | **Graveolona** | **2213** | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | **1.6** |
| **27´** | Fotoanetol | 2308 | — | — | — | tr | — | — | — | 0.5 | — | — | — |
| **28´** | 4-Estigmasten-3-ona | 2490 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | 7.7 |
| | Hidrocarburo. $C_{20}$-$C_{30}$ | | — | — | — | 0.6 | — | — | — | 3.2 | — | — | 62.9 |

‡Asignado en **Figura 1.10 (D,E)**; * Se usaron sustancias patrón; ** Identificado tentativamente; tr: < 1%

Las especies de la familia Apiaceae se conocen por su producción de cumarinas, que tienen diversas propiedades, *e.g.*, actividades analgésica, anticoagulante, anti-inflamatoria, anti-alérgica, antibiótica, antibacteriana, antiviral, hepatoprotectora y anticarcinogénica [207,208]. En el extracto aislado por SFE de *F. vulgare* se identificó la graveolona (piranocumarina), que se encontró también en extractos de perejil (*Petroselinum crispum* M.) [209] y eneldo (*Anethum graveolens* L.) [210]. La presencia de graveolona, empero, no es muy frecuente en la familia Apiaceae.

La familia Asteraceae, igual que la familia Apiaceae (Umbelífera), presenta también un grupo grande de cumarinas. Una de ellas, la herniarina (7-metoxi-cumarina), se identificó en los extractos y AE de las flores y hojas de la especie *T. lucida* bajo estudio. Céspedes *et al.* [211] aislaron e identificaron 7 cumarinas en esta misma especie, incluyendo la herniarina, que demostró ser activa contra levaduras, hongos y bacterias e inhibidores de crecimiento de plantas [212], esta sustancia se encontró también, en *Lavandula angustifolia*, *Matricaria recutita*, *Apium graveolens* [213]. El fotoanetol (dímero del anetol), detectado en el anís (*Pimpinela anisum*) e hinojo posee moderados efectos estrogénicos, lo que explica su uso en medicina tradicional, para incrementar la secreción de prolactina [214]. Esta sustancia se encontró en el extracto de SFE de *I. verum*, sin embargo, no se registró en el extracto SFE, aislado de *F. vulgare*.

Los siguientes fueron componentes principales en los AE de las 6 especies estudiadas, a saber: en *A. dracunculus*, elemicina (33.3%), sabineno (15.3%), asarona (14.7%) y metileugenol (14.2%); en *Ocimum sp.* 2, estragol (49.9%), linalol (11.3%) y eucaliptol (6.4%); en las hojas de *T. lucida* se hallaron estragol (93.8%) y β-mirceno (3.4%) y en sus flores, los mismos constituyentes, pero en cantidades más bajas, *i.e.*, 93.2 y 1.3%, respectivamente; en *T. filifolia* (cultivo experimental CENIVAM) se identificaron *trans*-anetol (70.6%) y estragol (27.4%), mientras que, la especie cultivada en el municipio de Bolivar presentó la misma composición, pero en cantidades ligeramente diferentes, *trans*-anetol (73.0%) y estragol (23.6%); en *F. vulgare* se identificaron *trans*-anetol (73.3%), limoneno (8.5%) y estragol (5.8%); y de *I. verum* se aislaron *trans*-anetol (82.5%), estragol (3.4%), limoneno (3.0%) y

foeniculina (1.1%). La **Figura 1.10** presenta los perfiles cromatográficos (corrientes iónicas totales reconstruidas) típicos de los AE aislados por MWHD de *T. lucida*, *Ocimum sp.* 2, *A. dracunculus*, *T. filifolia* y *F. vulgare*, ricos en *trans*-anetol y estragol.

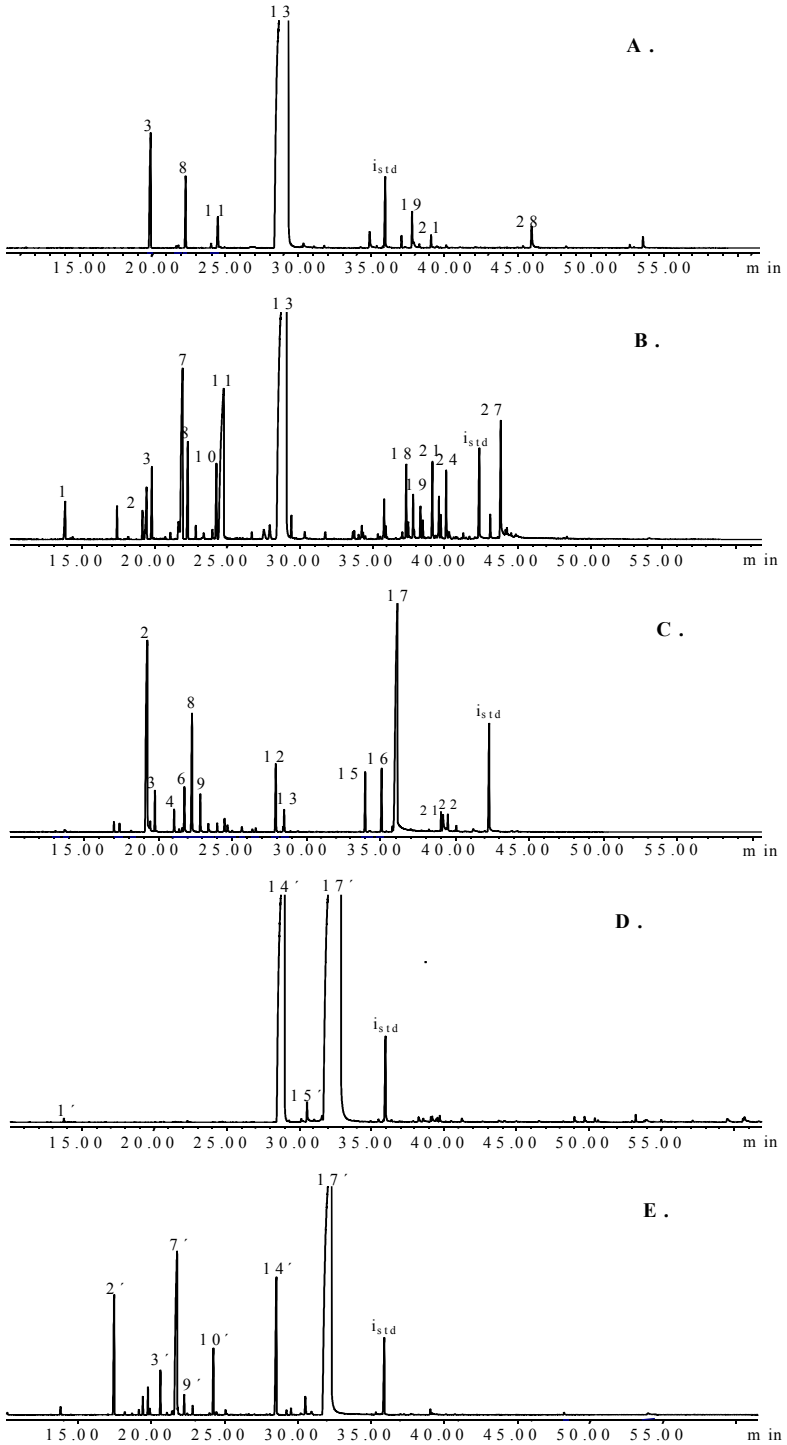



**Figura 1.10.** Cromatogramas (TIC) obtenidos por CG-EM (DB-5, 60 m; EI, 70 eV) de los AE aislados por MWHD de: **A.** *T. lucida*; **B.** *Ocimum sp.* 2; **C.** *A. dracunculus*; **D.** *T. filifolia* y **E.** *F. vulgare*.

La comparación detallada de las composiciones químicas de los AE de las especies estudiadas y reportadas en la literatura se presenta en la **Tabla 1.25**.

**Tabla 1.25**. Comparación de las composiciones químicas de los AE estudiados con reportes de la literatura.

| Especie estudiada | Composición encontrada | Método aislamiento (rendimiento, %) | País | Composición reportada | Referencias |
|---|---|---|---|---|---|
| *A. dracunculus* | Elemicina (33%), sabineno (15%), asarona (15%), metileugenol (14%) | Hidrodestilación (1.0-3.4) | Francia, Rusia | Estragol (69%) sabineno (39%), elemicina (16%), metileugenol (15%) | [3,12,215] |
| | | Hidrodestilación (NR) | Rusia | Sabineno (30%), metileugenol (>25%) | [105] |
| | | Hidrodestilación (4) | Irán | *trans*-Anetol (21%), α-ocimeno (21%), limoneno (12%) | [216] |
| | | Destilación con vapor (4.6) | Italia | *trans*-Anetol (53%), *cis*-allo-ocimeno (15%), *cis*-ocimeno (11%), *trans*-ocimeno (9%) | [217] |
| | | Hidrodestilación (1) | Turquía | *cis*-Anetol (81%) | [218] |
| | | Hidrodestilación (NR) | Albania | 5-Fenil-1,3-pentadiino (11%), metileugenol (9%), capilarina (4%) | [219] |
| | | Hidrodestilación (0.4) | Canadá | Metileugenol (36%), terpinoleno (19%), estragol (16%) | [220] |
| *T. lucida* | Estragol (flores-93%; hojas - 93%) | Hidrodestilación (0.07) | Costa Rica | Estragol (flores-93%; hojas - 93%) | [86] |
| *I. verum* | *trans*-Anetol (82%) | Destilación con vapor (3-3.5) | Vietnam, China | *trans*-Anetol (85-90%) | [3,108] |
| | | Destilación con vapor (NR) | India | *trans*-Anetol (94%) | [221] |
| | | — | Serbia | *trans*-Anetol (91%) | [222] |
| | | Microextracción con solvente *headspace* - hidrodestilación (HD-HSME) | Irán | *trans*-Anetol (81%) | [223] |
| *T. filifolia* | *trans*-Anetol (73%) estragol (24%) | Hidrodestilación | Argentina | *trans*-Anetol - estragol (97%) | [96] |
| | | Hidrodestilación (0.5) | Perú | *cis*-Anetol (68%), estragol (14%) | [97] |
| | | Destilación con vapor (1.2) | Italia | Estragol (78%) | [89] |
| | | NR | E.E.U.U. | Estragol (95%) | [98] |

NR – No reportada

**Tabla 1.25** continuación.

| Especie estudiada | Composición encontrada | Método aislamiento (rendimiento,%) | País | Composición reportada | Referencias |
|---|---|---|---|---|---|
| *F. vulgare* | *trans*-Anetol (73%) limoneno (8%), estragol (6%) | Hidrodestilación (2.5) | Irán | *trans*-anetol (69%), fenchona (11%), limoneno (10%). | [224] |
| | | Hidrodestilación (1.2) | India | *trans*-Anetol (70%), fenchona (9%), estragol (5%) | [225] |
| | | Destilación con vapor (0.04-0.4) | Italia | ($QT_1$) *trans*-Anetol (31%), estragol (24%), α-felandreno (23%); ($QT_2$) *trans*-anetol (28%), α-pineno (24%), limoneno (23%); ($QT_3$) estragol (43%), α-felandreno (33%); ($QT_4$) estragol (47%), α-pineno (21%); ($QT_5$) α-felandreno (82%) | [226] |
| | | Destilación con vapor (0.1-3.0) | Israel | Limoneno (14-74%), *trans*-anetol (11-84%) | [227] |
| | | Hidrodestilación (3-6) | Turquía | *trans*-Anetol (82-88%). | [228] |
| *Ocimum sp.* 2 | Estragol (50%), linalol (11%) | Hidrodestilación (0.2-0.5) | Irán | Estragol (52%), linalol (20%); Estragol (40%) geranial (28%), neral (18%) | [229] |
| | | Hexano (0.4-1.7) | Malasia | Estragol (30,9-81,0%) | [230] |
| | | Hidrodestilación (0.4-9.0) | Australia | Estragol (13-87%), linalol (30-65%) | [179] |
| | | Hidrodestilación | Nigeria | Estragol (60%), linalol (10%) | [231] |
| | | Destilación con vapor (NR) | Japón | Estragol (1-83%) | [55] |
| | | Destilación con vapor (NR) | Brasil | Estragol (33-52%), linalol (17-42%) | [172] |

NR – No reportada, QT - Quimiotipo

El interés mostrado por las especies con alto contenido de *trans*-anetol y estragol y su posible aplicación en la industria de sabores y aromas, se debe a que estos compuestos tienen propiedades organolépticas similares quizás por su parecido estructural (isómeros de posición). Sin embargo, con los datos cromatográficos y espectrales (**Tabla 1.26**) se pueden observar varias diferencias al comparar las estabilidades relativas de iones moleculares ($W_{M+\cdot}$) y fragmentos junto con los parámetros de retención cromatográfica ($I_R$).

**Tabla 1.26.** Características cromatográfico-espectroscópicas del *trans*-anetol, *cis*-anetol y estragol.

| Compuesto | Índice de retención Columna apolar | Columna polar | μ, D | $W_{M+}$ | $I_{[M-H]}/I_M^+$ | $I_{[M-CH3]}/I_M^+$ | $I_{[M-OCH3]}/I_M^+$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Estragol | 1219 | 1682 | 1.241** | 6.22 | 0.56 | 0.21 | 0.30 |
| *cis*-Anetol | 1258 | 1767 | NC | 5.13 | 0.54 | 0.20 | 0.24 |
| *trans*-Anetol | 1323 | 1843 | 1.449* | 5.07 | 0.50 | 0.24 | 0.31 |

NC – No calculado; *Valor experimental; **Valor calculado

De acuerdo con los $I_R$ registrados en la **Tabla 1.26**, la retención de los tres isómeros, estragol, *cis*-anetol y *trans*-anetol, fue diferente en las columnas cromatográficas. El mayor carácter polar del *trans*-anetol se evidencia por su mayor retención en la columna polar ($I_R$) y concuerda con el valor de su momento dipolar ($\mu$).

La estabilidad de los iones moleculares de los tres compuestos, basados en los cálculos, indica que el ion molecular del estragol es el más estable; las relaciones entre intensidades de los iones producto de pérdidas comunes, *e.g.*, $H^{\cdot}$, $CH_3^{\cdot}$ y $CH_3O^{\cdot}$, y las de sus iones moleculares, para los tres compuestos son diferentes.

La asarona (15%) y la elemicina (33%) fueron los constituyentes encontrados en el AE de *A. dracunculus*, que son derivados metoxilados del *trans*-anetol y estragol, respectivamente. Se presume que la elimicina posee propiedades alucinógenas o psicotrópicas [8], anti-estrés [232] y potencial actividad antibacteriana [233]; la asarona presenta efectos sedativo y estimulante [234].

Los espectros de masas y la disociación que padece la elemicina se presentan en la **Figura 1.11** y en el **Esquema 1.6**, respectivamente. Los datos cromatográficos y espectrales detallados confirman las diferencias estructurales presentes (**Tabla 1.27**).

**Tabla 1.27**. Características cromatográficas y espectroscópicas de la asarona y la elemicina.

| Compuesto | Índice de retención Columna apolar | Columna polar | $W_{M+}$ | $I_{[M-CH3]}/I_M^+$ | $I_{[M-CH3-CO]}/I_M^+$ | $I_{[M-CH3O]}/I_M^+$ | $I_{[M-CH3-CH3O]}/I_M^+$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Elemicina | 1557 | 2235 | 0.054 | 0.57 | 0.08 | 0.07 | 0.008 |
| Asarona | 1653 | 2406 | 0.065 | 0.49 | 0.34 | 0.05 | 0.14 |

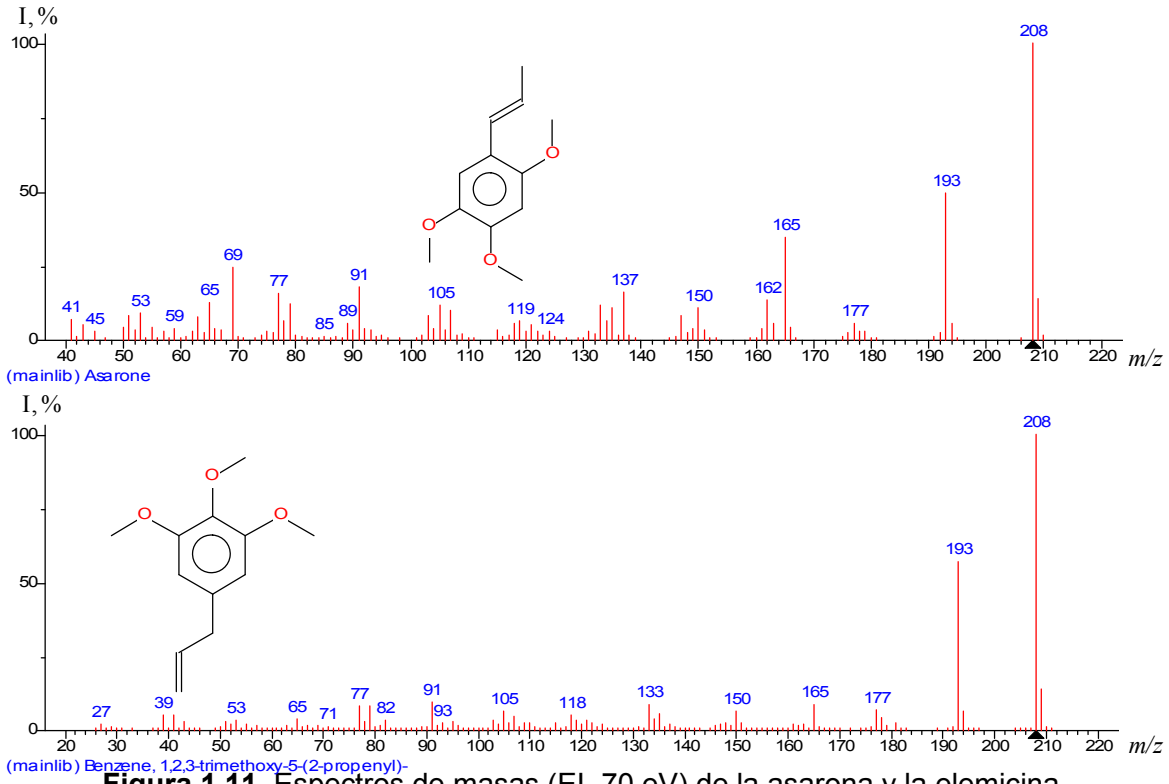
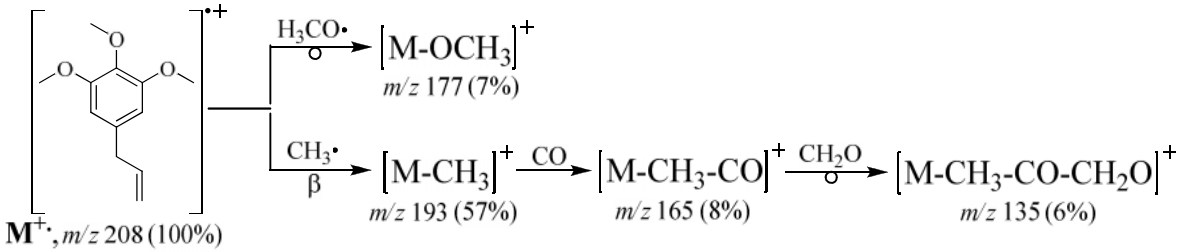



**Figura 1.11.** Espectros de masas (EI, 70 eV) de la asarona y la elemicina.

Según la **Tabla 1.27**, los cálculos de estabilidad de los iones moleculares , $W_{M+\cdot}$, de los dos compuestos muestran que ellos producen muchos iones-fragmento a partir de sus iones moleculares; los cocientes entre intensidades de los iones producto de pérdidas comunes, *e.g.*, $CH_3^{\cdot}$, $CH_3O^{\cdot}$ y CO, y las de sus iones moleculares, tienen valores diferentes. El valor para la elemicina del cociente $I_{[M-CH3-CH3O]}/I_{M+\cdot}$ es bajo (~0), puesto que el ion correspondiente en *m/z* 162, es de muy baja intensidad en su espectro de masas.




**Esquema 1.6.** Ruta de fragmentación de la elemicina.

Los grupos sustituyentes presentes en la estructura de la elemicina se relacionaron con las pérdidas más importantes en el espectro de masas, así: el grupo $CH_3$ (15

unidades), $CH_3O$ (31 unidades), $CH_2O$ (30 unidades) proveniente de $CH_3O$ y el grupo CO (28 unidades) de la función éter en el anillo aromático. Los fragmentos con *m/z* 91 y 65 son característicos del grupo bencilo.

Los espectros de masas de las cumarinas identificadas por CG-EM (EI, 70 eV), en los extractos aislados por SFE de *T. lucida* y *F. vulgare*, se muestran en las **Figuras 1.12** y **1.13**. Estas sustancias (herniarina y graveolona) son de interés particular por sus actividades biológicas demostradas [235,236]. La ruta de fragmentación de cada molécula se exhibe en los **Esquemas 1.7** y **1.8**, correspondientemente.

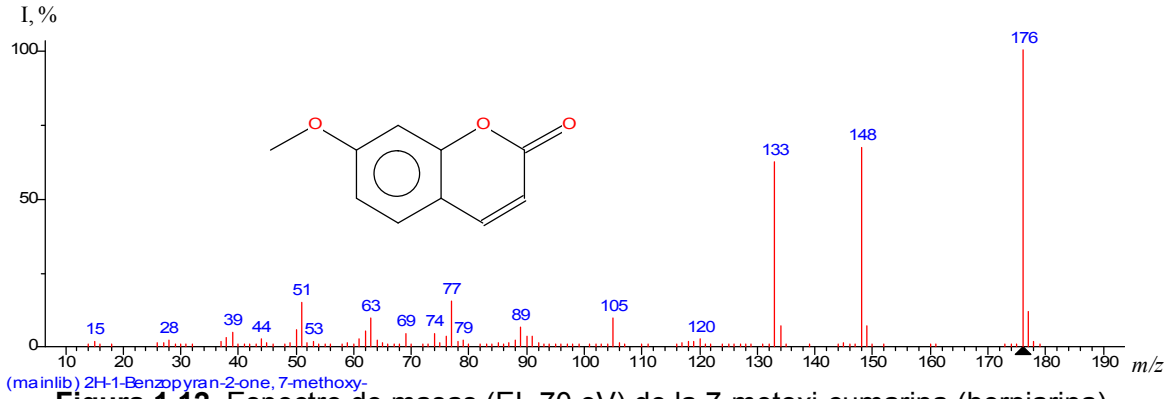
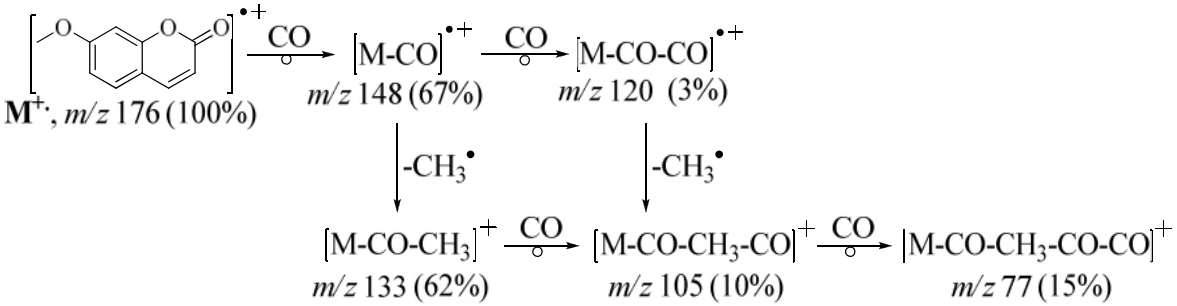



**Figura 1.12.** Espectro de masas (EI, 70 eV) de la 7-metoxi-cumarina (herniarina).

El patrón de fragmentación de la herniarina está definido por las pérdidas de las funciones químicas presentes en la estructura, así: los grupos CO (28 unidades) de la funciones éster y éter del anillo y $CH_3$ (15 unidades) del grupo metoxi.




**Esquema 1.7.** Ruta de fragmentación de la 7-metoxi-cumarina.

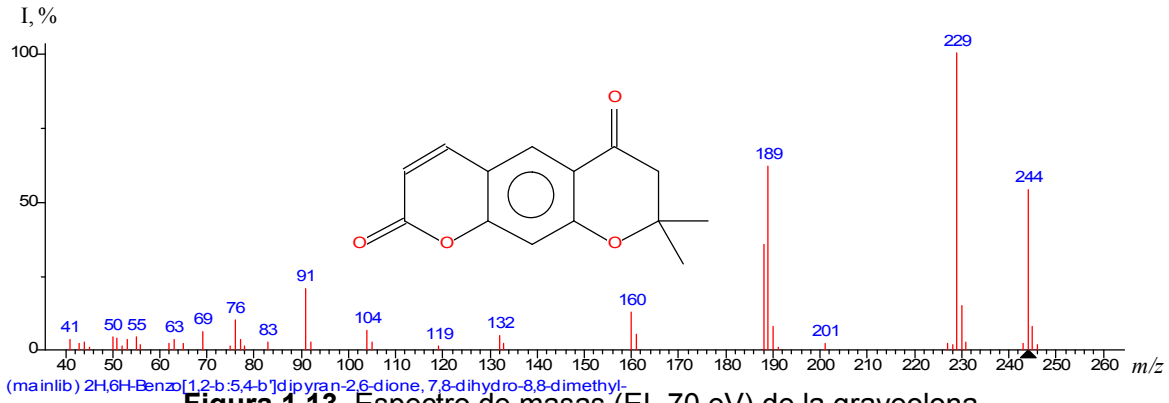
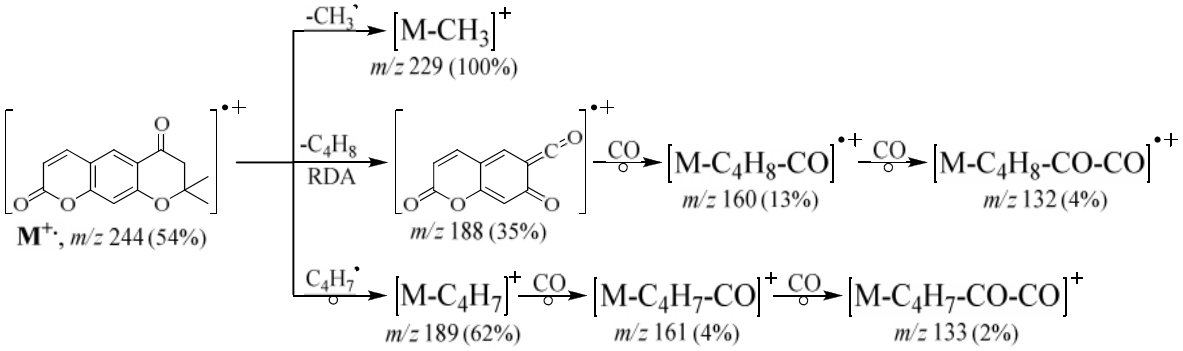



**Figura 1.13.** Espectro de masas (EI, 70 eV) de la graveolona.




**Esquema 1.8.** Ruta de fragmentación de la graveolona.

Las pérdidas de las funciones químicas constituyen la fragmentación de la estructura de graveolona, así: 15 unidades ($CH_3$) del metoxi, 28 unidades del grupo CO de las funciones éster, éter y cetona de los anillos. Las pérdidas isobutileno ($C_4H_8$, 56 unidades) y su radical ($C_4H_7$, 55 unidades) produjeron iones-diagnóstico en *m/z* 188 y 189, respectivamente, la primera como consecuencia de la ruptura retro Diels-Alder (RDA).

La foeniculina (isopentenil éter del chavicol) es uno de los biomarcadores de la familia Umbelliferae y se ha encontrado también en el AE de hinojo [237]; sin embargo, en esta investigación no se detectó en ninguno de los extractos y AE aislados de *F. vulgare*. Sin embargo, si se encontró en el AE y en los extractos de *I. verum*. La foeniculina es uno de los constituyentes importantes de los extractos (hasta 5%) y AE de *I. verum* [107,238,239] y su presencia en el AE de *Pimpinella anisum* es un indicador de su adulteración con AE de *I. verum* [240]. El espectro de masas y su ruta

de fragmentación se muestran en la **Figura 1.14** y en el **Esquema 1.9**, respectivamente.

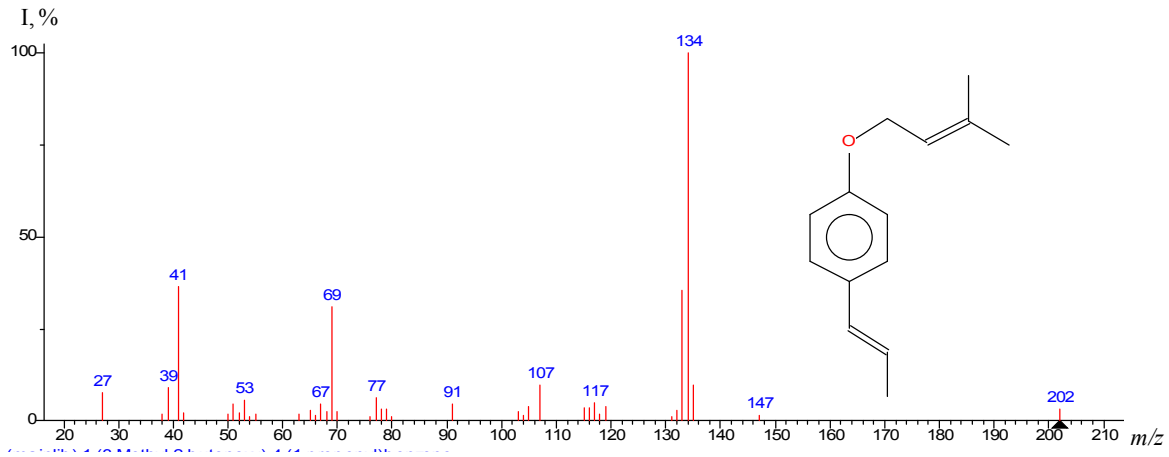
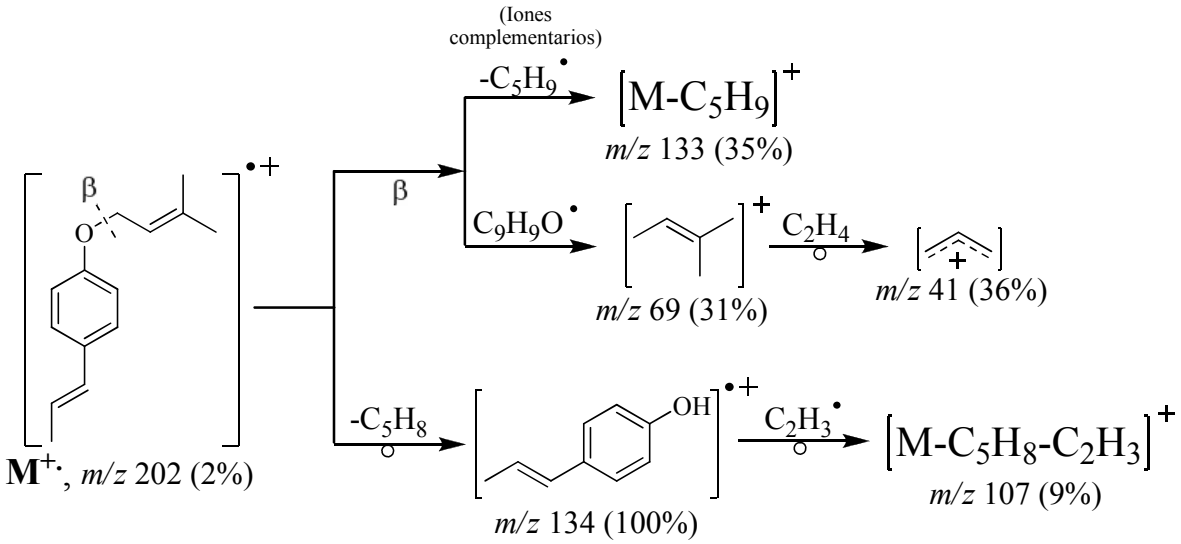



**Figura 1.14.** Espectro de masas (EI, 70 eV) de la foeniculina.




**Esquema 1.9.** Ruta de fragmentación de la foeniculina.

El patrón de fragmentación de la foeniculina se distingue por las pérdidas de la unidad de isopreno ($C_5H_8$) y de los radicales $C_5H_9^{\cdot}$ (isoprenilo) y $C_9H_9O^{\cdot}$, estos dos últimos siendo los iones complementarios de la estructura; y por la aparición del ion alilo ($C_3H_5$) en *m/z* 41.

Los datos cromatográfico-espectroscópicos de los éteres analizados (*trans*-anetol, estragol, elemicina, y asarona) fueron una herramienta útil para la diferenciación

estructural de estos compuestos. Los AE de las especies vegetales de *F. vulgare*, *I. verum*, *Ocimum sp.* 2, *T. filifolia* y *T. lucida* presentaron cantidades relativas entre 70-83% y 6-93% de *trans*-anetol y estragol, respectivamente, con rendimientos entre 0.2-2.0%.

## 1.10 CONCLUSIONES

1. Los AE de la mayoría de las especies estudiadas de la familia Asteraceae, tuvieron como constituyentes principales al estragol y *trans*-anetol: los AE de las flores y hojas de *Tagetes lucida* y *Tagetes filifolia* fueron una fuente de estragol (93%) y *trans*-anetol (70%), respectivamente, con un buen rendimiento en sus AE (0.9% para *T. lucida* y 1.6% para *T. filifolia*); en el AE de *Artemisia dracunculus* se identificaron como constituyentes mayoritarios la elemicina, metileugenol y asarona (~62%); en los extractos SFE de las flores y hojas de *T. lucida* se encontró herniarina, componente más abundante (70%) en el extracto de las hojas. El aislamiento de esta cumarina sería importante para determinar su rol en las propiedades biológicas atribuidas a *Tagetes lucida*.

2. Las cetonas monoterpénicas (mentonas y pulegonas) y los alcoholes monoterpénicos (terpineoles) fueron los componentes más abundantes identificados en los extractos de *S. brownei* y *O. majorana*. No obstante, los compuestos de interés (timol, carvacrol, estragol y *trans*-anetol) se encontraron en estos extractos en cantidades muy bajas (*S. brownei*) o no se encontraron (*O. majorana*).

3. De los AE y extractos estudiados, en cuanto al contenido de timol y carvacrol, se encontró que el AE de *T. vulgaris* presentó el mayor contenido de timol (34%); mientras que, el carvacrol fue el componente mayoritario (~54%) del AE de *P. amboinicus*. Sin embargo, los rendimientos fueron muy bajos: 0.2 y 0.1%, respectivamente. El AE con mayor rendimiento (2.3%) fue *L. origanoides* que presentó 44% de carvacrol, convirtiéndolo en una especie promisoria para la industria de AE.

4. La aplicación del análisis estadístico multivariable a los resultados obtenidos, de los extractos por SDE de las albahacas, permitió relacionar las especies estudiadas con su composición química, encontrándose además, las variables que afectaban significativamente esta clasificación. Los subgrupos fueron: especies con alto contenido de **citral**, **estragol**, ***trans*-cinamato de metilo**, **linalol** y **eugenol**.

5. La especie *Ocimum sp.* 2 (familia Lamiaceae) exhibió como principal constituyente al estragol (45.0%); las especies *F. vulgare* (Umbelliferae) e *I. verum* (Illiciaceae) presentaron al *trans*-anetol como compuesto mayoritario en sus AE: 73 y 82%, correspondientemente; además, en sus extractos por SFE se identificaron graveolona (piranocumarina) y fotoanetol, los cuales no han sido reportados aún en la literatura para estas especies.

## 1.11 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS


1. PARTHASARATHY, V.A.; CHEMPAKAM, B. and ZACHARIAH, T.J. Chemistry of spices. En: _____ Introduction. London: CAB International, **2008**, p. 1-20.

2. SEIDEMANN, J. World spice plants. Economic usage, botany, taxonomy. Heilderberg: Springer-Verlag, **2005**, 591p.

3. BURDOCK, G.A. Fenaroli´s handbook flavor ingredients. 6 ed. Boca Raton: CRC Press, **2010**. 1943p.

4. LAHLOU, M. Essential oils and Fragrance compounds: bioactivity and mechanism of action. *Flavour Frag. J.* **2004**, 19; p. 159-165.

5. EDRIS, A.E. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. *Phytother. Res.* **2007**, 21; p. 308-323.

6. PETER, K.V. Handbook of herbs and spices. Vol. 2. En: _____ Introduction. Cambridge: Woodhead Publishing Ltd and CRC Press LLC, **2004**. p. 1-7.

7. DEWICK, P.M. Medicinal natural products. Chichester: John Wiley & Sons Ltd., **2002**. 507p.

8. TISSERAND, R. and BALACS, T. Essential oil safety. A guide for health care professionals. London: Harcourt Publishers Limited, **1999**. 279p.

9. BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. *Int. J. Food Microbiol.* **2004**, 94; p. 223-253.

10. Report on a study into the potential aromatic plants for essential oils in Mozambique. Stellenbosch and Cape Town, **2006**: MBB Consulting Services South (Pty) Ltd and with African Business Access. 193p.

11. DUKE, J.A.; BOGENSCHUTZ-GODWIN, M.J.; DUCELLIER, J.; DUKE, P.-A.K. CRC handbook of medicinal spices. Boca Raton: CRC Press LLC, **2003**. 326p.

12. RAGHAVAN, S. Handbook of spices, seasonings, and flavorings. 2 ed. Boca Raton: CRC Press LLC and Taylor & Francis Group, **2007**. 330p.

13. BARATTA, M.T.; DORMAN, H.J.D.; DEANS, S.G.; FIGUEIREDO, A.C.; BARROSO, J.G. and RUBERTO, G. Antimicrobial and antioxidant properties of some commercial essential oils. *Flavour Fragr. J.* **1998**, 13; p. 235-244.

14. GARCÍA BARRIGA, H. Flora medicinal de Colombia. Vol. 3. Bogota: Tercer Mundo, **1992**. 507p.

15. MORALES, R. The history, botany and taxonomy of the genus *Thymus*. En: Stahl-Biskup, E. and Sáez, F. Thyme: the genus *Thymus.* London: Taylor & Francis, Inc, **2002**. p. 1-43.

16. KADEREIT, J.W. Flowering plants dicotyledons. Lamiales (except Acanthaceae including Avicenniaceae). En: Kubitzki, K. The families and genera of vascular plants. Vol. VII. Heilderberg: Springer-Verlag, **2004**. 478p.

17. KINTZIOS, S.E. Oregano: the genera Origanum and Lippia. En: _____ Profile of the multifaceted prince of the herbs. London: Taylor & Francis, **2002**. p. 3-8.

18. INGROUILLE, M.J. and EDDIE, B. Plants. Diversity and evolution. Cambridge: Cambridge University Press, **2006**. 247p.

19. LÓPEZ GONZÁLEZ, G.A. Guía de los árboles y arbustos de la peninsula ibérica y baleares. 2 ed. Madrid: Mundi Prensa, **2004**. 893p.

20. BAYDAR, H.; SAĞDIÇ, O.; ÖZKAN, G. and KARADOĞAN, T. Antibacterial activity and composition of essential oils from *Origanum*, *Thymbra* and *Satureja* species with commercial importance in Turkey. *Food Control*, **2004**, 15; p. 169-172.

21. MONTIEL LONGHI, M. Introducción a la flora de Costa Rica. 3 ed. San José de Costa Rica: Universidad de Costa Rica, **2000**. 345p.

22. WILLMANN, D; SCHMIDT, E.M.; HEINRICH, M. and RIMPLER, H. Verbenaceae J.St.-Hil. En: Flora del valle de Tehuacán-Cuicatlan. México: Universidad Autónoma de México, **2000**, 27; p. 26.

23. SEIGLER, D.S. Plant secondary metabolism. 2 ed. Norwell: Kluwer Academic Publishers, **1998**. 759p.

24. KEELER, R.F. and TU, A.T. Toxicology of plant and fungal compounds. Vol. 6. Boca Raton: CRC Press LCL, **1991**. 665p.

25. PUNT, W. and HOEN, P.P. The northwest european pollen flora, 70. Asteraceae — Asteroideae. *Rev. Palaeobot. Palynol.* **2009**; 162p. *In press*.

26. PANERO, J.L. and CROZIER, B.S. Asteraceae sunflower. The tree of life web project [En línea]. <http://tolweb.org/Asteraceae/20780/2008.04.04.> [Citado el 1 de septiembre de 2008].

27. SHARMA, O.P. Plant taxonomy. New Delhi: McGraw-Hill Education, **1993**. 441p.

28. STEVENS, P.F. Angiosperm phylogen. Angiosperm Phylogeny Website [En línea]. <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/> [Citado el 1 de septiembre de 2008].

29. HEINRICH, M.; ROBLES, M.; WEST, J.E.; ORTÍZ DE MONTELLANO, B.R. and RODRÍGUEZ, E. Ethnopharmacology of mexican Asteraceae (Compositae). A*nnual Rev. Pharmacol. Toxicol.* **1998**, 38; p. 539-565.

30. SEAMAN, F.C. Sesquiterpene lactones as taxonomic characters in the Asteraceae. *Bot. Rev.* **1982**, 48; p. 121-595.

31. NAIK, V.N. Taxonomy of angiosperms. New Delhi: McGraw-Hill, **1984**. 304p.

32. REICHLING, J. and GALATI, E.M. Chemical constituents of the genus *Pimpinella*. En: Miró Jodral, M. *Illicium*, *Pimpinella* and *Foeniculum*. Boca Ratón: CRC Press, **2004**. 18p.

33. PATON, A.; HARLEY, M.R. and HARLEY, M.M. *Ocimum*: an overview of classification and relationship. En: Hiltunen, R. and Holm, Y. Basil. The genus *Ocimum.* Amsterdam: Harwood Academic Publishers, **1999**. p. 1-38.

34. GÜENTHER, E. The essential oils. En: _____ Individual essential oils of the plant families Rutaceae and Labiatae. Vol. III. Malabar: Robert E. Krieger Publishing Company, **1949**. p. 399-434.

35. MAROTTI, M.; PICCAGLIA, R. and GIOVANELLI, E. Differences in essential oil composition of basil (*Ocimum basilicum* L.) italian cultivars related to morphological characteristics. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, 44(12); p. 3926-3929.

36. HILTUNEN, R. and HOLM, Y. Basil. The genus Ocimum. En: _____ Essential oil of *Ocimum*. Amsterdam: Harwood Academic Publishers, **1999**; p. 77-111.

37. CHARLES, D.J.; SIMON, J.E. and WOOD, K.V. Essential oil constituents of *Ocimum micranthum* Willd. *J. Agric. Food Chem.* **1990**, 38(1); p. 120-122.

38. FERNÁNDEZ POLA, J. Cultivos de plantas medicinales, aromáticas y condimenticias. Barcelona: Ediciones Omega S.A., **1996**. p. 32-35.

39. PUTIEVSKY, E. and GALAMBOSI, B. Production systems of sweet basil. En: Hiltunen, R. and Holm, Y. Basil. The genus *Ocimum.* Amsterdam: Harwood Academic Publishers, **1999**. p. 39-65.

40. THOMSON, D.R. The essential oil reference book. 5 ed. Chilliwack: British Columbia Institute for Holistic Studies, **2002**. p. 10-12.

41. MOHIUDDIN, S.; QURESHI, R.A.; KHAN, M.A.; NASIR, M.K.A.; KHATRI, L.M. and QURESHI, S.A. Laboratory investigations on the repellency of some plant oils to red flour beetle, *Tribolium castaneum* Herbst. *Pak. J. Sci. Ind. Res.* **1987**, 30(10); p. 754-756.

42. HOLM, Y. Bioactivity of basil. En: Hiltunen, R. and Holm, Y. Basil. The genus *Ocimum.* Amsterdam: Harwood Academic Publishers, **1999**. p. 113-135.

43. AKHTAR, M.S.A.; AKHTAR, A.H. and KHAN, M.A. Antiulcerogenic effects of *Ocimum basilicum* extracts, volatile oils and flavonoid glycosides in albino rats. *Int. J. Pharmacogn.* **1992**, 30; p. 97-104.

44. MÄKINEN, S.M. and PÄÄKKÖNEN, K.K. Processing and use of basil in foodstuffs, beverages and in food preparation. En: Hiltunen, R. and Holm, Y. Basil. The genus *Ocimum.* Amsterdam: Harwood Academic Publishers, **1999**. p. 137-152.

45. LEE, K.-G. and SHIBAMOTO, T. Determination of antioxidant potential of volatile extracts isolated from various herbs and spices. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, 50(17); p. 4947-4952.

46. SUPPAKUL, P.; MILTZ, J.; SONNEVELD, K. and BIGGER, S.W. *A*ntimicrobial properties of basil and its possible application in food packaging. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51(11); p. 3197-3207.

47. BHAMAGAR, M.; KAPUR, K.K.; JALEE, S. and SHARMA, S.K. Laboratory evaluation of insecticidal properties of *Ocimum basilicum* Linnaeus and *O. sanctum* Linnaeus plants essential oils and their major constituents against vector mosquito species. *J. Entomol. Res.* **1993**, 17; p. 21-26.

48. SALLES TREVISAN, M.T.; VASCONCELOS SILVA, M.G.; PFUNDSTEIN, B.; SPIEGELHALDER, B. and OWEN, R.W. Characterization of the volatile pattern and antioxidant capacity of essential oils from different species of the genus *Ocimum. J. Agric. Food Chem.* **2006**, 54(12); p. 4378-4382.

49. SACCHETTI, G.; MEDICI, A.; MAIETTI, S.; RADICE, M.; MUZZOLI, M.V.; MANFREDINI, S.; BRACCIOLI, E. and BRUNI, R. Composition and functional properties of the essential oil of amazonian basil, *Ocimum micranthum* Willd., Labiatae in comparison with commercial essential oils. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, 52(12); p. 3486-3491.

50. KHARE, C.P. Indian medicinal plants. An illustrated dictionary. Heidelberg: Springer-Verlag, **2007**. 812p.

51. WIART, C. Medicinal plants of the Asia-Pacific: Drugs for the future? Singapore: World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd, **2006**. 719p.

52. PRAKASH, P. and GUPTA, N. Therapeutic uses of *Ocimum sanctum* Linn (Tulsi) with a note on eugenol and its pharmacological actions: a short review. *Indian J. Physiol. Pharmacol.* **2005**, 49(2); p. 125-131.

53. ÖZCAN, M. and CHALCHAT, J.C. Essential oil composition of *Ocimum basilicum* L.and *Ocimum minimum* L. in Turkey. *Czech J. Food Sci.* **2002**, 20(6); p. 223-228.

54. DUKE, J.A.; BOGENSCHUTZ-GODWIN, M.J. and OTTESEN, A.R. Duke's Handbook of medicinal plants of Latin America. Boca Raton: CRC Press LCL and Taylor & Francis Group, **2009**. 901p.

55. HASEGAWA, Y.; TAJIMA, K.; TOI, N. and SUGIMURA, Y. Characteristic components found in the essential oil of *Ocimum basilicum* L. *Flavour Fragr. J.* **1997**, 12; p. 195-200.

56. KINTZIOS, S.E. Oregano. En: Peter, K. V. Handbook of herbs and spices. Vol. 2. Cambridge: Woodhead Publishing Ltd and CRC Press LLC, **2004**. p. 212-227.

57. SKOULA, M. and HARBORNE, J.B. The taxonomy and chemistry of *Origanum*. En: Kintzios, S. E. Oregano: the genera *Origanum* and *Lippia.* London: Taylor & Francis, **2002**. p. 67-108.

58. CATALAN, C.A.N. and LAMPASONA, M.E.P. The chemistry of the genus Lippia (Verbenaceae). En: Kintzios, S. E. Oregano: The genera *Origanum* and *Lippia*. London: Taylor & Francis, **2002**. p. 127-149.

59. TERBLANCHÉ, F.C. and KORNELIUS, G. Essential oil constituents of genus *Lippia* (Vebenaceae)-A literature review. *J. Essent. Oil Res.* **1996**, 8; p. 471-485.

60. PINO, J.A.; ROSADO, A. and MENENDEZ, R. Leaf oil of *Lippia micromera* Schauer in DC. from Cuba. *J. Essent. Oil Res.* **1998**, 10; p. 189-190.

61. LEMOS, T.L.G.; MONTE, F.J.Q.; MATOS, F.J.A.; ALENCAR, J.W.; CRAVEIRO, A.A.; BARBOSA, R.C.S.B. and LIMA, E.O. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from Brazilian plants. *Fitoterapia* **1992**, 63; p. 266-268.

62. OLIVEIRA, D.R. LEITÃO, G.G.; BIZZO, H.R.; LOPES, D.; ALVIANO, D.S.; ALVIANO, C.S. and LEITÃO, S.G. Chemical and antimicrobial analyses of essential oil of *Lippia origanoides* H.B.K. *Food Chem.* **2007**, 101; p. 236-240.

63. BANDONI, A.L. Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica. Su aprovechamiento industrial para la producción de aromas y sabores. Buenos Aires: CYTED, **2002**. 417p.

64. RUÍZ, C.A. Estudio de los metabolitos secundarios volátiles de *Lippia origanoides* H.B.K., en tres estados fenalógicos. Bucaramanga, **2008**, 118p. Trabajo de grado (Químico). Universidad Industrial de Santander. Escuela de Química.

65. MUÑOZ CASTAÑEDA, M.L. Estudio de la composición química y la actividad biológica de los aceites esenciales de diez plantas aromáticas colombianas. Bucaramanga, **2007**, 195p. Trabajo de grado (Química). Universidad Industrial de Santander. Escuela de Química.

66. MAIA, S.J.G. and ANDRADE, E.H.A. Database of the Amazon aromatic plants and their essential oils. *Quim. Nova* **2009**, 32(3); p. 595-622.

67. STAPLES, G. and KRISTIANSEN, M.S. Ethnic culinary herbs: a guide to identification and cultivation in Hawai´i. Hawai´i: University of Hawaai´i Press, **1999**. 122p.

68. BEYRA, Á. LEÓN, M.C.; IGLESIAS, E.; FERRÁNDIZ, D.; HERRERA, R.; VOLPATO, G.; GODÍNEZ, D.; GUIMARAIS, M. and ÁLVAREZ, R. Estudios etnobotánicos sobre plantas medicinales en la provincia de Camagüey (Cuba). *Anales del Jardín Botánico de Madrid* **2004**, 61(2); p. 185-204.

69. PASCUAL, M.E.; SLOWING, K.; CARRETERO, E.; SÁNCHEZ-MATA, D. and VILLAR, A. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. *J. Ethnopharmacol.* **2001**, 76; p. 201-214.

70. LUKHOBA, C.W.; SIMMONDS, M.S.J. and PATON, A.J. *Plectranthus*: A review of ethnobotanical uses. *J. Ethnopharmacol.* **2006**, 103; p. 1-24.

71. DE OLIVEIRA DE ARAUJO, R.G.; LIMA, E.O.; DE SOUZA, E.L.; VIEIRA, W.L.; FREIRE, K.R.L.; TRAJANO, V.N.; LIMA, I.O.; SILVA-FILHO, R.N. Interference of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng essential oil on the anti-Candida activity of some clinically used antifungals. *Brazilian J. Pharmacogn.* **2007**, 172; p. 186-190.

72. BARIČEVIČ, D. and BARTOL, T. The biological/pharmacological activity of the *Origanum* genus. En: Kintzios, S. E. Oregano: The genera *Origanum* and *Lippia.* London: Taylor & Francis, **2002**. p. 177-213.

73. HERNÁNDEZ CANO, J. and VOLPATO, G. Herbal mixtures in the traditional medicine of Eastern Cuba. *J. Ethnopharmacol.* **2004**, 90; p. 293-316.

74. FUENTES FIALLO, V.R. and ALFONSO, J.C. Estudios fenológicos en plantas medicinales. XIV. *Rev. Cubana Plant. Med.* **1998**, 3(1); p. 12-17.

75. STAHL-BISKUP, E. and VENSKUTONIS, R.P. Thyme. En: Peter, K. V. Handbook of herbs and spices. Vol. 2. Cambridge: Woodhead Publishing Ltd and CRC Press LLC, **2004**. p. 294-318.

76. REICHE, K. Familia Labiadas. Estudios críticos sobre la flora de Chile. 79; p. 241-271.

77. TUCKER, A.O. Botanical nomenclature of culinary herbs and potherbs. En: Craker, L. E. and Simon, J. E. Herbs, spices, and medicinal plants: Recent advances in botany, horticulture and pharmacology. Vol. 1. Binghamton: Food Products Press, **1986**. p. 33-80.

78. BASER, K.H.C. The turkish *Origanum* species. En: Kintzios, S. E. Oregano: The genera *Orinagum* and *Lippia.* Boca Raton: Taylor & Francis, **2002**. p. 109-126.

79. VELÁSQUEZ, J. Plantas acuáticas vasculares de Venezuela. Caracas: Talleres de Anauco Ediciones, C.A., **1994**. 992p.

80. ANKLI, A; STICHER, O. and HEINRICH, M. Medical ethnobotany of the yucatec maya: healers´ consensus as a quantitative criterion. *Econ. Bot.* **1999**, 53(2); p. 144-160.

81. MARTÍNEZ ARÉVALO, J.V. Guatemala: Informe nacional para la Conferencia Técnica Internacional de la FAO sobre los recursos fitogenéticos (Leipzig, 1996). Guatemala, 1995, 58p: FAO.

82. MITCHELL, S.A. and AHMAD, M.H. A review of medicinal plant research at the University of the West Indies, Jamaica, 1948-2001. *West Indian. Med. J.* **2006**, 55(4); p. 243-269.

83. ROJAS, L.B. and USUBILLAGA, A. Composition of the essential oil of *Satureja brownei* (SW.) Briq. from Venezuela. *Flavour Fragr. J.* **2000**, 15(1); p. 21-22.

84. PINO, J.A.; ESTARRÓN, M. and FUENTES, V. Essential oil of *Satureja brownei* (Sw.) Briq. grown in Cuba. *J. Essential Oil Res.* **1997**, 9; p. 595-596.

85. DWECK, A.C. General Introduction to *Pimpinella* and *Illicium*. En: Miró Jodral, M. *Illicium*, *Pimpinella* and *Foeniculum.* Boca Raton: CRC Press LLC, **2004**. p. 1-18.

86. CICCIÓ, J.F. Source of almost pure methyl chavicol: volatile oil from the aerial parts of *Tagetes lucida* (Asteraceae) cultivated in Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.* **2005**, 52(4); p. 853-857.

87. OSUNA TORRES, L.; TAPIA PÉREZ, M.E. y AGUILAR CONTRERAS, A. Plantas medicinales de la medicina tradicional mexicana para tratar afecciones gastrointestinales. Estudio etnobotánico, fitoquímico y farmacológico. Barcelona: Publicacions 1 Edicions de la Universitat de Barcelona, **2005**. 173p.

88. ETKIN, N.L. Plants in indigenous medicine & diet: biobehavioral approaches. Abingdon: Routledge - Taylor & Francis Group, **1986**. 336p.

89. MAROTTI, M.; PICCAGLIA, R.; BIAVATI, B. and MAROTTI, I. Characterization and yield evaluation of essential oils from different *Tagetes* species (a). *J. Essent. Oil Res.* **2004**, 9(10); p. 16-20.

90. BICCHI, C.; RUBIOLO, M.; FRESIA, P.; MONTI, D.; FRANZ, C. and GOEHLER, I. Constituents of *Tagetes lucida* Cav. *ssp. lucida* essential oil. *Flavour Fragr. J.* **1997**, 12; p. 47-52.

91. VASUDEVAN, P.; KASHYAP, S. and SHARMA, S. *Tagetes*: a multipurpose plant. *Bioresour. Technol.* **1997**, 62; p. 29-35.

92. RAI, M. and CARPINELLA, M.C. Advances in Phytomedicine Series - Naturally Occurring Bioactive Compounds. Vol 3. Oxford: Elsevier, **2006**. 502p.

93. DE PASQUALE, A. Therapeutic and pharmacologic properties of the genus *Pimpinella*. En: Miró Jodral, M. *Illicium*, *Pimpinella*, and *Foeniculum.* Boca Raton: CRC Press LLC, **2004**. p. 141-170.

94. JOHNSON, T. CRC ethnobotany desk reference. Boca Raton: CRC Press, **1999**. 1211p.

95. RÍOS, M; KOZIOL, M.J.; PEDERSEN, H.B. and GRANDA, G. Plantas útiles del Ecuador: aplicaciones, retos y perspectivas. Quito: Herbario QCA, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, **2007**. 652p.

96. ZIGADLO, J.A.; LAMARQUE, A.L.; MAESTRI, D.M.; GUZMÁN, C.A. and GROSSO, N.R. Composition of the inflorescence oils of some *Tagetes* species from Argentina. *J. Essent. Oil Res.* **1993**, 5(6); p. 679-682.

97. DE FEO, V.; DELLA PORTA, G.; URRUNAGA SORIA, E.; URRUNAGA SORIA, R. and SENATORE, F. Composition of the essential oil of *Tagetes filifolia* Lag. *Flavour Fragr. J.* **1998**, 13; p. 145-147.

98. BOHRMANN, H. and YOUNGKEN, H.W. Esdragole, the main compound in the oil of *Tagetes filifolia* (Compositae). *Phytochemistry* **1968**, 7(8); p. 1415-1416.

99. DE, A.K. The genus *Foeniculum*. En: Miró Jodral, M. *Illicium*, *Pimpinella* and *Foeniculum.* Boca Raton: CRC Press LLC, **2004**. p. 204-221.

100. GEISSMAN, T.A. and IRWIN, M.A. Chemical contributions to taxonomy and phylogeny in the genus *Artemisia*. *Pure Appl. Chem.* **1970**, 21(2); p. 167-180.

101. MUCCIARELLI, M. and MAFFEI, M. Introduction to the genus. En: Wright, C.W. *Artemisia.* London: Taylor & Francis, **2002**. p. 1-50.

102. FUKUYAMA, Y. and HUANG, J.-M. Chemical constituents of the genus *Illicium*. En: Miró Jodral, M. *Illicium*, *Pimpinella* and *Foeniculum.* Boca Raton: CRC Press LLC, **2004**. p. 30-67.

103. AZEEZ, S. Fennel. En: Parthasarathy, V.A.; Chempakam, B. and Zachariah, T.J. Chemistry of spices. Cambridge: CAB International, **2008**. p. 227-241.

104. ARVY, M.P. and GALLOUIN, F. Especias, aromatizantes y condimentos. Madrid: Mundi Prensa Libros S.A, **2007**. 413p.

105. AGLAROVA, A.M.; ZILFIKAROV, I.N. and SEVERTSEVA, O.V. Biological characteristics and useful properties of tarragon (*Artemisia dracunculus* L.) (review). *Pharm. Chem. J.* **2008**, 42(2); p. 31-35.

106. DEANS, S.G. and SIMPSON, E.J.M. *Artemisia dracunculus*. En: Wright, C.W. *Artemisia.* London: Taylor & Francis, **2002**. p. 91-98.

107. CHEMPAKAM, B. and BALAJI, S. Star anise. En: Parthasarathy, V. A.; Chempakam, B. and Zachariah, T. J. Chemistry of spices. Cambridge: CAB International, **2008**. p. 319-330.

108. GEORGE, C.K. Star anise. En: Peter, K. V. Handbook of herbs and spices.Vol. 2. Boca Raton: Woodhead Publishing Ltd and CRC Press LLC, **2004**. p. 287-293.

109. GANG, D.R.; WANG, J.; DUDAREVA, N.; HEE NAM, K.; SIMON, J.E.; LEWINSOHN, E. and PICHERSKY, E. An investigation of the storage and biosynthesis of phenylpropenes in sweet basil. *Plant Physiol.*, **2001**, 125; p. 539-555.

110. RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN, M. Early steps in isoprenoid biosynthesis: multilevel regulation of the supply of common precursors in plant cells. *Phytochem. Rev.*, **2006**, 5; p. 1-15.

111. DUDAREVA, N.; PICHERSKY, E. and GERSHENZON, J. Biochemistry of plant volatiles. *Plant Physiol.*, **2004**, 135; p. 1893-1902.

112. DEWICK, P.M. Medicinal natural products - a biosynthetic approach. John Wiley & Sons Ltd., Chichester, **2002**. 507p.

113. BOUVIER, F.; RAHIER, A. and CAMARA, B. Review - Biogenesis, molecular regulation and function of plant isoprenoids. *Prog. Lipid Res.*, **2005**, 44; p. 357-429.

114. DEWICK, P.M. The biosynthesis of shikimate metabolites. *Nat. Prod. Rep.,* **1995**, 12; p. 579-607.

115. TAIZ, L. and ZEIGER, E. Plant physiology. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts, **2002**. p. 283-307.

116. BOTTING, N.P. The shikimic acid pathway. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1993**, 3(7); p. 1397-1398.

117. THEIS, N. and LERDAU, M. The evolution of function in plant secondary metabolites. *Int. J. Plant Sci.*, **2003**, 164(3 Suppl.); p. S93–S102.

118. HANSON, J.R. Introduction and nomenclature. En: Newman, A.A. Chemistry of terpenes and terpenoids. London: Academic Press, **1972**. p. 1-10.

119. CROTEAU, R. Biosynthesis and catabolism of monoterpenoids. *Chem. Rev*., **1987**, 87(5); p. 929-954.

120. RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN, M. and BORONAT, A. Elucidation of the methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria and plastids. A metabolic milestone achieved through genomics. *Plant Physiol.*, **2002**, 130; p. 1079-1089.

121. ROBERTS, J.S. The sesquiterpenes. En: Newman, A.A. Chemistry of terpenes and terpenoids. London: Academic Press, **1972**; p. 88-154.

122. POULOSE, A.J. and CROTEAU, R. Biosynthesis of aromatic monoterpenes. Conversion of □-terpinene to *p*-cymene and thymol in *Thymus vulgaris* L. *Arch. Biochem. Biophys.*, **1978**, 187(2); p. 307-314.

123. NGUYEN, M.T.; KRYACHKO, E.S. and VANQUICKENBORNE, L.Q. General and theoretical aspects of phenols. En: Rappoport, Z. Chemistry of phenols. Chichester: John Wiley & Sons, **2003**. p. 140.

124. BAUER, K.; GARBE, D. and SURBURG, H. Common fragance and flavor materials: Preparation, properties and uses. 4 ed. Weinheim: Wiley-VCH, **2001**. 293p.

125. COMELLI, N.A.; GRZONA, L.M.; MASINI, O.; PONZI, E.N. and PONZI, M.I. Obtention of camphene with $H_3PW_{12}O_{40}$ catalysts supported on $TiO_2$, $SiO_2$ and $ZrO_2nH_2O$. *J. Chil. Chem. Soc.*, **2004**, 49(3); p. 245-250.

126. ROBERGE, D.M.; BUHL, D.; NIEDERER, J.P.M.; HÖLDERICH, W.F. Catalytic aspects in the transformation of pinenes to *p*-cymene. *Appl. Catal. A-Gen.* **2001**, 215; p. 111-124.

127. DUETZ, W.A.; WITHOLT, B and JOURDAT, C. Process for the preparation of perillyc alcohol. United States Patent Application Publication. Pub. No. US 20040077063A1. **2004**. 9p.

128. TAN, Q. and DAY, D.F. Bioconversion of limonene to a-terpineol by immobilized *Penicillium digitatum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1998**, 49; p. 96-101.

129. MYERS, C.E.; TREPEL, J.; SAUSVILLE, E.; SAMID, D; MILLER, A. and CURT, G. Monoterpenes, sesquiterpenes and diterpenes as cancer therapy. United States Patent Application Publication. Pub. No. US 005602184A. **1997**. 13p.

130. PAUMGARTTEN, F.J.; DELGADO, I.F.; ALVES, E.N.; NOGUEIRA, A.C.; DE-FARIAS, R.C. and NEUBERT, D. Single dose toxicity study of beta-myrcene, a natural analgesic substance. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **1990**, 23(9); p. 873-877.

131. CAMANO, R.M. Essential oil composition with bactericide activity. United States Patent Application Publication. Pub. No. US 005635184A. **1997**. 10p.

132. ARAUJO, I.B.; SOUZA, C.A.M. ; DE-CARVALHO, R.R.; KURIYAMA, S.N.; RODRIGUES, R.P.; VOLLMER, R.S.; ALVES, E.N. and PAUMGARTTEN, F.J.R. Study of the embryofoetotoxicity of α-terpinene in the rat. *Food Chem. Toxicol*. **1996**, 34(5); p. 477-482.

133. LI, G.-X. and LIU, Z.-Q. Unusual antioxidant behavior of α- and γ-terpinene in protecting methyl linoleate, DNA, and erythrocyte. *J. Agric. Food Chem.*, **2009**, 57(9); p. 3943-3948.

134. AESCHBACH, R.; LÖLIGER, J.; SCOTT, B.C.; MURCIA, A.; BUTLER, J.; HALLIWELL, B. and ARUOMA, O.I. Antioxidant actions of thymol, carvacrol, 6-gingerol, zingerone and hydroxytyrosol. *Food Chem. Toxicol.* **1994**, 32(1); p. 31-36.

135. DIDRY, N.; DUBREUIL, L. and PINKAS, M. Activity of thymol, carvacrol, cinnamaldehyde and eugenol on oral bacteria. *Pharm. Acta Helv.* **1994**, 69(1); p. 25-28.

136. STEVENS, K.L.; JURD, L.; KING, A.D. and MIHARA, K. *Cell. Mol. Life Sci.* **1971**, 27(5); p. 600-602.

137. KARLOVIĆ, Z.; ANIĆ, I.; MILETIĆ, I.; PRPIĆ-MEHIČIĆ, G.; PEZELJ-RIBARIĆ, S. and MARŠAN, T. Antibacterial activity of halothane, eucalyptol and orange oil. *Acta Stomatol. Croat.* **2000**, 34(3); p. 307-309.

138. STEFANINI, M.B.; MING, L.C.; MARQUES, M.O.M.; FACANALI, R.; MEIRELES, M.A.A.; MOURA, L.S.; MARCHESE, J.A. and SOUSA, L.A. Essential oil constituents of different organs of fennel (*Foeniculum vulgare* var. *vulgare*). *Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu*. **2006**, 8; p.193-198.

139. SILVA BRUM, L.F.; EMANUELLI, T.; SOUZA, D.O. and ELISABETSKY, E. Effects of linalool on glutamate release and uptake in mouse cortical synaptosomes. *Neurochem. Res.* **2001**, 26(3); p. 191-194.

140. HAMMER, K.A.; CARSON, C.F. and RILEY, T.V. Antifungal activity of the components of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. *J. Appl. Microbiol.* **2003**, 95; p. 853–860.

141. HART, P.H., BRAND, C.; CARSON, C.F.; RILEY, T.V.; PRAGER, R. H. and FINLAY-JONES, J.J. Terpinen-4-ol, the main component of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil), suppresses inflammatory mediator production by activated human monocytes. *Inflamm. Res.* **2000**, 49(11); p. 619-626.

142. BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D. and IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. *Food Chem. Toxicol.* **2008**, 46; p. 446-475.

143. GHELARDINI, C.; GALEOTTI, N.; DI CESARE MANNELLI, L.; MAZZANTI, G. and BARTOLINI, A. Local anaesthetic activity of β-caryophyllene. *Farmaco* **2001**, 56(5-7); p. 387-389.

144. GERTSCH, J.; LEONTI, M.; RADUNER, S.; RACZ, I.; CHEN, J.-Z.; XIE, X.-Q.; ALTMANN, K.-H.; KARSAK, M. and ZIMMER, A. Beta-caryophyllene is a dietary cannabinoid. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, **2008**, 105(26); p. 9099-9104.

145. SKÖLD, M.; KARLBERG, A.T.; MATURA, M. and BÖRJE, A. The fragrance chemical beta-caryophyllene-air oxidation and skin sensitization. *Food Chem. Toxicol.* **2006**, 44; p.538-545.

146. PLATOVA, A.I.; KOLOMNIKOV, I.S.; VOL´PIN, M.E. and KHEIFITS, L.A. *cis-trans* Isomerization of anethole in presence of homogeneous catalysts. *Rus. Chem. Bull.* **1975**, 24(6); p. 1322-1324.

147. SWANSON, A.B.; CHAMBLISS, D.D.; BLOMQUIST, J.C.; MILLER, E.C. and MILLER, J.A. The mutagenicities of safrole, estragole, eugenol, *trans*-anethole, and some of their known or possible metabolites for *Salmonella typhimurium* mutants. *Mut. Res.-Fund. Mol M.* **1979**, 60(2); p. 143-153.

148. ABRAHAM, S.K. Anti-genotoxicity of *trans*-anethole and eugenol in mice. *Food Chem. Toxicol.* **2001**, 39(5); p. 493-498.

149. GHELARDINI, C.; GALEOTTI, N. and MAZZANTI, G. Local anaesthetic activity of monoterpenes and phenylpropanes of essential oils. *Planta Med.* **2001**, 67(6); p. 564-566.

150. BARBOSA, J.M.; LIMA, C.S.A.; CAMORIM, E.L.; DE SENA, K.X.F.R.; ALMEIDA, J.R.G.S.; VASCONCELOS DA-CUNHA, E.; SILVA, M.S.; AGRA, M.F. and BRAZ, R.

Botanical study, phytochemistry and antimicrobial activity of *Tabebuia aurea*. Fyton **2004**, 73(27); p. 221-228.

151. DANIEL, A.N.; SARTORETTO, S.M.; SCHMIDT, G.; CAPARROZ-ASSEF, S.M.; BERSANI-AMADO, C.A. and CUMAN, R.K.N. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of eugenol essential oil in experimental animal models. *Rev. Bras. Farmacogn.* **2009**, 19(1b); p. 212-217.

152. CHEN, F.; SHI, Z.; NEOH, K.G. and KANG, E.T. Antioxidant and antibacterial activities of eugenol and carvacrol-grafted chitosan nanoparticles. *Biotechnol. Bioeng.* **2009**, 104(1); p. 30-39.

153. CHENG, S.-S.; LIU, J.-Y.; CHANG, E.-H. and CHANG, S.-T. Antifungal activity of cinnamaldehyde and eugenol congeners against wood-rot fungi. *Bioresource Technol.* **2008**, 99(11); p. 5145-5149.

154. OSEI-SARFO, D.; ADDAE-MENSAH, I.; ASOMANING, W.A.; GARNEAU, F.-X.; KOUMAGLO, H.K. and OPPONG, I.V. Insecticidal properties of *Clausena anisata* (Willd) Hook F.ex BENTH. *Actes du Colloque de laval,* Universite du Quebec a Chicoutimi, Quebec. **2001**.

155. JURD, L.; KING Jr., A.D. and MIHARA, K. Antimicrobial properties of umbelliferone derivatives. *Phytochemistry* **1971**, 10(12); p. 2965-2970.

156 MARES, D.; ROMAGNOLI, C. and BRUNI A. Antidermatophytic activity of herniarin in preparations of *Chamomilla recutita* (L.) Rauschert. *Plant. Med. Phytother.* **1993**, 26(2); p. 91-100.

157. KOBA, K.; POUTOULI, P.W.; RAYNAUD, C.; CHAUMONT, J.-P. and SANDA, K. Chemical composition and antimicrobial properties of different basil essential oils chemotypes from Togo. *Bangladesh J. Pharmacol.* **2009**, 4; p. 1-8.

158. GODEFROOT, M.; SANDRA, P. and VERZELE, M. New method for quantitative essential oil analysis. *J. Chromatogr.*, **1981**, 203; p. 325-335.

159. STASHENKO, E.E.; ACOSTA, R. and MARTÍNEZ, J.R. High-resolution gas-chromatographic analysis of the secondary metabolites obtained by subcritical-fluid extraction from Colombian rue (*Ruta graveolens* L.). *J. Biochem. Bioph. Method,* **2000**, 43; p. 379-390.

160. ADAMS, R. Identification of essential oils components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy. Carol Stream: Ed. Allured Publishing Corporation, **2004**. 456p.

161. DAVIES, N.W. Gas chromatographic retention indices of monoterpenes and sesquiterpenes on methyl silicone and carbowax 20M phases. *J. Chromatogr.* **1990**, 503; p. 1-24.

162. IZENMAN, A.J. Modern multivariate statistical techniques. Regression, classification, and manifold learning. New York: Springer Science+Business Media, LLC, **2008**. 731p.

163. Analytical Methods Committee. Application of gas-liquid chromatography to the analysis of essential oils. Part VIII. Fingerprinting of essential oils by temperature-programmed gas-liquid chromatography using methyl silicone stationary phases. *Analyst* **1981**,106; p. 448-455.

164. D'ACAMPORA ZELLNER, B.; BICCHI, C.; DUGO, P.; RUBIOLO, P.; DUGO, G. and MONDELLO, L. Linear retention indices in gas chromatographic analysis: a review *Flavour Fragr. J.* **2008**, 23; p. 297-314

165. COOKSON, R.C. Stereospecificity in photochemical reactions of ketones. *Pure Appl. Chem.* **1964**, 9(4); p. 575-584.

166. TATEBA, H.; IWANAMI, Y.; KODAMA, N. and KISHINO, K. Changes in lemon flavouring components during UV-irradiation. En: Taylor, A.J. and Mottram, D.S. Flavour science: recent developments. Cambridge: Royal Society of Chemistry, **1996**. p. 82-85.

167. VERNIN, G. La spectrométrie de masse dans l´analyse des terpènes. *Parf. Cosm. Sav.* **1969**, 12(4); p. 179-188.

168. GARDINER, W.P. Statistical analysis methods for chemists. A software-based approach. En: _____ Multivariate analysis methods in chemistry. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, **1997**. p. 293-328.

169. HÄRDLER, W. and SIMAR, L. Applied multivariate statistical analysis. Version 29th, **2003**. p. 233-301.

170. GRAYER, R.J.; KITE, G.C.; GOLDSTONE, F.J.; BRYAN, S.E.; PATON, A. and PUTIEVSKY, E. Infraspecific taxonomy and essential oil chemotypes in sweet basil, *Ocimum basilicum. Phytochemistry* **1996**, 43; p. 1033-1039.

171. AKGÜL, A. Volatile oil composition of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) cultivating in Turkey. *Die Nahrung* **1989**, 33(1); p. 87-88.

172. VASCONCELOS SILVA, M.G.; MATOS, F.J.A.; MACHADO, M.I.L. and CRAVEIRO, A.A. Essential oils of *Ocimum basilicum* L., *O. basilicum.* var. *minimum* L. *and O. basilicum.* var. *purpurascens* Benth. grown in north-eastern Brazil. *Flavour Fragr. J.* **2003**, 18; p. 13-14.

173. KÉITA, S.M.; VINCENT, C.; SCHMIT, J.-P. and BÉLANGER, A. Essential oil composition of *Ocimum basilicum* L., *O. gratissimum* L. and *O. suave* L. in the Republic of Guinea. *Flavour Fragr. J.* **2000**, 15; p. 339-341.

174. GUPTA, S.C. Variation in herbage yield, oil yield and major component of various *Ocimum* species/varieties (chemotypes) harvested at different stages of maturity. *J. Essent. Oil Res.* **1996**, 8; p. 275-279.

175. TELCI, I.; BAYRAM, E.; YILMAS, G. and AVCI, B. Variability in essential oil composition of turkish basils (*Ocimum basilicum* L.). *Biochem. Syst. Ecol.* **2006**, 34; p. 489-497.

176. DARRAH, H.H. Investigations of the cultivars of basils (*Ocimum*). *Econ. Bot.* **1974**, 28; p. 63-67.

177. NTEZURUBANZA, L.; SHEFFER, J.J.C. and BAERHEIM SVENDSEN, A. Composition of the essential oil of *Ocimum trichodon* grown in Rwanda. *J. Nat. Prod.* **1986**, 49; p. 945-947.

178. NTEZURUBANZA, L.; SHEFFER, J.J.C. and BAERHEIM SVENDSEN, A. Composition of the essential oil of *Ocimum gratissimum* grown in Rwanda. *Planta Med.* **1987**, 53; p. 421-423.

179. LACHOWICZ, K.J.; JONES, G.P.; BRIGGS, D.R.; BIENVENU, F.E.; PALMER, M.V.; TING, S.S.T. and HUNTER, M. Characteristics of essential oil from basil (*Ocimum basilicum* L.) grown in Australia. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, 44(3); p. 877-881.

180. LACHOWICZ, K.J.; JONES, G.P.; BRIGGS, D.R.; BIENVENU, F.E; PALMER, M.V.; MISHRA, V. and HUNTER, M.M. Characteristics of plants and plant extracts from five varieties of basil (*Ocimum basilicum* L.) grown in Australia. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, 45(7); p. 2660-2665.

181. MWANGI, J.W.; LWANDE, W. and HASSANALI, A. Composition of the leaf essential oil of *Ocimum keniense* Ayobangira. *Flavour Fragr. J.* **1994**, 9; p. 75-76.

182. BAŞER, K.H.C. and DEMIRCI, F. Chemistry of Essential Oils. En: Berger, R. G.. Flavours and fragrances: chemistry, bioprocessing and sustainability. Heidelberg: Springer, **2007**.p. 43-86.

183. MISHARINA, T.A.; POLSHKOV, A. N.; RUCHKINA, E. L. and MEDVEDEVA, I.B. Changes in the composition of the essential oil of marjoram during storage. *Appl. Biochem. Microbiol.* **2003**, 39(3); p. 311-316.

184. VERA, R.R. and CHANE-MING, J. Chemical composition of the essential oil of marjoram (*Origanum majorana* L.) from Reunion Island. *Food Chem.* **1999**, 66; p. 143-145.

185. RICHTER, J. and SCHELLENBERG, I. Comparison of different extraction methods for the determination of essential oils and related compounds from aromatic plants and optimization of SPME/GC. *Anal. Bioanal. Chem.* **2007**, 387; p. 2207-2217.

186. BUSATTA, C.; VIDAL, R.S.; POPIOLSKI, A.S.; MOSSI, A.J.; DARIVA, C.; RODRIGUES, M.R.A.; CORAZZA, F.C.; CORAZZA, M.L.; OLIVEIRA, J.V. and CANSIAN, R.L. Application of *Origanum majorana* L. essential oil as an antimicrobial agent in sausage. *Food Microbiol.* **2008**, 25; p. 207-211.

187. GIORDANI, R.; HADEF, Y. and KALOUSTIAN, J. Compositions and antifungal activities of essential oils of some Algerian aromatic plants. *Fitoterapia* **2008**, 79(3); p. 199-203.

188. PINO, J.A.; GARCÍA, J. and MARTÍNEZ, M.A. Comparative chemical composition of the volatiles of *Coleus aromaticus* produced by steam distillation, solvent extraction and supercritical carbon dioxide extraction. *J. Essent. Oil Res.* **1996**, 8; p. 373-375.

189. MURTHY, P.S.; RAMALAKSHMI, K. and SRINIVAS, P. Fungitoxic activity of Indian borage (*Plectranthus amboinicus*) volatiles. *Food Chem.* **2009**, 114; p. 1014-1018.

190. SINGH, G.; SINGH, O.P.; PRASAD, Y.R.; DE LAMPASONA, M.P. and CATALAN, C. Studies on essential oils, Part 33: chemical and insecticidal investigations on leaf oil of *Coleus amboinicus* Lour. *Flavour Fragr. J.* **2002**, 17(6); p. 440-442.

191. BASLAS, R.K. and KUMAR, P. Chemical examination of essential oil of *Coleus aromaticus* Benth. *J. Indian Chem. Soc.* **1981**, 58; p. 103-104.

192. MENÉNDEZ CASTILLO, R.A. and PAVÓN GONZÁLEZ, V. *Plecthranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. *Rev. Cuba. Plantas Med.* **1999**, 4(3); p. 110-115.

193. PRUDENT, D.; PERINEAU, F.; BESSIERE, J.M.; MICHEL, G.M. and BACCOU, J.C. Analysis of the essential oil of wild oregano from Martinique (*Coleus aromaticus* Benth.): evaluation of its bacteriostatic and fungistatic properties. *J. Essential Oil Res.* **1995**, 7; p. 165-173.

194. GOLMAKANI, M.-T. and REZAEI, K. Comparison of microwave-assisted hydrodistillation with the traditional hydrodistillation method in the extraction of essential oils from *Thymus vulgaris* L. *Food Chem.* **2008**, 109; p. 925-930.

195. ROTA, M.C.; HERRERA, A.; MARTÍNEZ, R.M.; SOTOMAYOR, J.A. and JORDAN, M.J. Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils. *Food Control* **2008**, 19; p. 681-687.

196. JORDAN, M.J.; MARTÍNEZ, R.M.; GOODNER, K.L.; BALDWIN, E.A. and SOTOMAYOR, J.A. Seasonal variation of *Thymus hyemalis* Lange and Spanish *Thymus vulgaris* L. essential oils composition. *Ind. Crops Prod.* **2006**, 24; p. 253-263.

197. RAZZAGHI-ABYANEH, M.; SHAMS-GHAHFAROKHI, M.; REZAEE, M.-B.; JAIMAND, K.; ALINEZHAD, S.; SABERI, R. and YOSHINARI, T. Chemical composition and antiaflatoxigenic activity of *Carum carvi* L., *Thymus vulgaris* and *Citrus aurantifolia* essential oils. *Food Control* **2009**, 20; p. 1018-1024.

198. HUDAIB, M.; SPERONI, E.; DI PIETRA, A.M. and CAVRINI, V. GC/MS evaluation of thyme (*Thymus vulgaris* L.) oil composition and variations during the vegetative cycle. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2002**, 29; p. 691-700.

199. CHIZZOLA, R.; MICHITSCH, H. and FRANZ, C. Antioxidative properties of *Thymus vulgaris* Leaves: Comparison of different extracts and essential oil chemotypes. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, 56(16): p. 6897-6904.

200. SANTOS, F.J.B.; LOPES, J.A.D.; CITO, A.M.G.L.; OLIVEIRA, E.H.; LIMA, G.S. and REIS, F.A.M. Composition and biological activity of essential oils from *Lippia origanoides* H.B.K. *J. Essent. Oil Res.* **2004**, Sep/Oct; p. 504-506.

201. STASHENKO, E.E.; MARTÍNEZ, J.R.; RUIZ, C.A.; ARIAS, G.; DURAN, C.; SALGAR, W. and CALA, M. *Lippia origanoides* chemotype differentiation based on

essential oil GC-MS and principal component analysis. *J. Sep. Sci.* **2010**, 33(1); p. 93-103.

202. TUCKER, A.O.; MACIARELLO, M.J.; ESPAILLAT, J.R. and FRENCH, E.C. The essential oil of *Lippia micromera* Schauer in DC. (Verbenaceae). *J. Essent. Oil Res.* **1993**, 5; p. 683-685.

203. FREIRE, R.S.; MORAIS, S.M; CATUNDA-JUNIOR, F.E and PINHEIRO, D.C. Synthesis and antioxidant, anti-inflammatory and gastroprotector activities of anethole and related compounds. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, 13; p. 4353-4358.

204. CHANG, C.L.; CHO, I.K. and LI, Q.X. Insecticidal activity of basil oil, *trans*-anethole, estragole, and linalool to adult fruit flies of *Ceratitis capitata*, *Bactrocera dorsalis*, and *Bactrocera cucurbitae*. *J. Econ. Entomol.* **2009**, 102(1); p. 203-209.

205. FUJITA, K.-I. and KUBO, I. Potentiation of fungicidal activities of *trans*-anethole against *Saccharomyces cerevisiae* under hypoxic conditions. *J. Biosci. Bioeng.* **2004**, 98(6); p. 490-492.

206. GÜENTHER, E. and ALTHAUSEN, D. The essential oils. En: _____ The constituents of essential oils. Vol. II. Malabar: Robert E. Krieger Publishing Company, **1975**. p. 508-512.

207. KOSTOVA, I. Synthetic and natural coumarins as cytotoxic agents. *Curr. Med. Chem.* **2005**, 5; p. 29-46.

208. TANDON, S. and RASTOGI, R.P. Recent advances in naturally occurring coumarins. *J. Sci. Ind. Res.* **1979**, 38; p. 428-441.

209. BEIER, R.C.; IVIE, G.W. and OERTLI, E.H. Linear furanocoumarins and graveolone from the common herb parsley. *Phytochemistry* **1994**, 36(4); p. 869-872.

210. APLIN, R.T. and PAGE, C.B. The constituents of native Umbelliferae. Part 1. Coumarins from dill (*Anetheum graveolens* L.). *J. Chem. Soc. C*: *Organic* **1967**; p. 2593-2596.

211. CÉSPEDES, C.L.; ÁVILA, J.G.; MARTÍNEZ, A.; SERRATO, B.; CALDERÓN-MUGICA, J.C. and SALGADO-GARCIGLIA, R. Antifungal and antibacterial activities of mexican tarragon (*Tagetes lucida*). *J. Agric. Food Chem.* **2006**, 54(10); p. 3521-3527.

212. HARBORNE, J.B.; BAXTER, H. and MOSS, G.P. Phytochemical dictionary: a handbook of bioactive compounds from plants. 2 ed. Wallington: Taylor & Francis, **1999**. 976p.

213. ROBINSON, T. The organic constituents of higher plants. Their chemistry and interrelationship. Minneapolis: Burgess Publishing Company, **1963**. 306p.

214. BRÜCKNER, C. A survey on herbal galactagogues used in Europe. En: COLLOQUE EUROPÉEN D'ETHNOPHARMACOLOGIE ET CONFÉRENCE INTERNATIONALE D'ETHNOMÉDECINE (24-27 mars: 1993: Heidelberg). Actes du 2e Colloque Européen d'Ethnopharmacologie et de la 11e Conférence internationale d'Ethnomédecine. Médicaments et aliments: l´approche ethnopharmacologuique. Heidelberg: 24-27 mars **1993**. p. 140-145.

215. ARABHOSSEINI, A.; PADHYE, S; . VAN BEEK, T.A.; VAN BOXTEL, A.J.B.; HUISMAN, W.; POSTHUMUS, M.A. and MÜLLER, J. Loss of essential oil of tarragon (*Artemisia dracunculus* L.) due to drying. *J. Sci. Food Agric.* **2006**, 86; p. 2543-2550.

216. SAYYAH, M.; NADJAFNIA, L. and KAMALINEJAD, M. Anticonvulsant activity and chemical composition of *Artemisia dracunculus* L. essential oil. *J. Ethnopharmacol.* **2004**, 94; p. 283-287.

217. CURINI, M.; EPIFANO, F.; GENOVESE, S.; TAMMARO, F. and MENGHINI, L. Composition and antimicrobial activity of essential oil of *Artemisia dracunculus* "piemontese" from Italy. *Chem. Nat. Compd.* **2006**, 42(6); p. 738-739.

218. KORDALI, S.; KOTAN, R.; MAVI, A.; CAKIR, A.; ALA, A. and YILDIRIM, A. Determination of the chemical composition and antioxidant activity of the essential oil of *Artemisia dracunculus* and of the antifungal and antibacterial activities of turkish *Artemisia absinthium*, *A. dracunculus*, *Artemisia santonicum*, and *Artemisia spicig*. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53(24); p. 9452-9458.

219. MEEPAGALA, K.M.; STURTZ, G. and WEDGE, D.E. Antifungal constituents of the essential oil fraction of *Artemisia dracunculus* L. var. *dracunculus*. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, 50(24); p. 6989-6992.

220. LOPES-LUTZ, D.; ALVIANO, D.S.; ALVIANO, C.S. and KOLODZIEJCZYK, P.P. Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Artemisia* essential oils. *Phytochemistry* **2008**, 69; p. 1732-1738.

221. PADMASHREE, A.; ROOPA, N.; SEMWAL, A.D.; SHARMA, G.K.; AGATHIAN, G. and BAWA, A.S. Star-anise (*Illicium verum*) and black caraway (*Carum nigrum*) as natural antioxidants. *Food Chem.* **2007**, 104; p. 59-66.

222. DZAMIC, A.; SOKOVIC, M.; RISTIC, M.S.; GRIJIC-JOVANOVIC, S.; JELENA, V. and PETAR, D.M. Chemical composition and antifungal activity of *Illicium verum* and *Eugenia caryophyllata* essential oils. *Chem. Nat. Compd.* **2009**, 45(2); p. 259-261.

223. GHOLIVAND, M.B.; RAHIMI-NASRABADI, M. and CHALABI, H. Determination of essential oil components of star anise (*Illicium verum*) using simultaneous hydrodistillation-static headspace liquid-phase microextraction-gas chromatography mass spectrometry. *Anal. Lett.* **2009**, 42(10); p. 1382-1397.

224. YAMINI, Y.; SEFIDKON, F. and POURMORTAZAVI, S. M. Comparison of essential oil composition of Iranian fennel (*Foeniculum vulgare*) obtained by supercritical carbon dioxide extraction and hydrodistillation methods. *Flavour Fragr. J.* **2002**, 17; p. 345-348.

225. SINGH, G.; MAURYA, S; LAMPASONA, M.P. and CATALAN, C. Chemical constituents, antifungal and antioxidative potential of *Foeniculum vulgare* volatile oil and its acetone extract. *Food Control* **2006**, 17; p. 745-752.

226. PICCAGLIA, R. and MAROTTI, M. Characterization of some italian types of wild fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.). *J. Agric. Food Chem.* **2001**, 49(1); p. 239-244.

227. RAVID, U.; PUTIEVSKY, E. and SNIR, N. The volatile components of oleoresins and the essential oils of *Foeniculum vulgare* in Israel. *J. Nat. Prod.* **1983**, 46(6); p. 848-851.

228. TELCI, I.; DEMIRTAS, I. and SAHIN, A. Variation in plant properties and essential oil composition of sweet fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) fruits during stages of maturity. *Ind. Crops Prod.* **2009**, 30; p. 126-130.

229. SAJJADI, S.E. Analysis of the essential oils of two cultivated basil (*Ocimum basilicum* L.) from Iran. *DARU* **2006**, 14(3); p. 128-130.

230. RASEETHA VANI, S.; CHENG, S.F. and CHUAH, C.H. Comparative study of volatile compounds from genus *Ocimum*. *Am. J. Appl. Sci.* **2009**, 6(3); p. 523-528.

231. KASALI, A.A.; ESHILOKUN, A.O.; ADEOLA, S.; WINTERHALTER, P.; KNAPP, H.; BONNLANDER, B. and KOENIG,W.A. Volatile oil composition of new chemotype of *Ocimum basilicum* L. from Nigeria. *Flavour Fragr. J.* **2005**, 20; p. 45-47.

232. KRISHNAMOORTHY, B. and REMA, J. Nutmeg and mace. En: Peter, K. V. Handbook of herbs and spices. Vol 1. Cambridge: Woodhead Publishing Ltd and CRC Press LLC, **2001**. p. 238-248.

233. ROSSI, P.G.; BAO, L.; LUCIANI, A.; PANIGHI, J.; DESJOBERT, J.-M.; COSTA, J.; CASANOVA, J.; BOLLA, J.-M. and BERTI, L. (*E*)-Methylisoeugenol and elemicin: antibacterial components of *Daucus carota* L. essential oil against *Campylobacter jejuni. J. Agric. Food Chem.* **2007**, 55(18); p. 7332-7336.

234. RAVINDRAN, P.N. and PILLAI, G.S. Under-utilized herbs and spices. En: Peter, K. V. Handbook of herbs and spices. Cambridge: Woodhead Publishing Ltd and CRC Press LLC, **2004**. p. 52-102.

235. Cropwatch. Furanocoumarins – their properties and distribution in natural aromatic ingredients: an A-Z listing [En línea]. <http://www.cropwatch.org/FC's%20A-Z%20listing%20in%20Natural%20Ingredients%20v%201.04.pdf>. [Citado el 15 de septiembre de 2009].

236. IRANSHAHI, M.; ASKARI, M.; SAHEBKAR, A. and HADJIPAVLOU-LITINA, D. Evaluation of antioxidant, anti-inflammatory and lipoxygenase inhibitory activities of the prenylated coumarin umbelliprenin. *DARU* **2009**, 17(2); p. 128-130.

237. RAPISARDA, A. Economic importance and market trends of the genera *Pimpinella*, *Illicium*, and *Foeniculum*. En: Miró, J., M. *Illicium*, *Pimpinella* and *Foeniculum*. Boca Raton: CRC Press LLC, **2004**. p. 185-212.

238. ZIEGLER, H. Flavourings: production, composition, applications, regulations. 2 ed. Weinheim: Wiley-VCH, **2007**. 827p.

239. HOWES, M.-J.R.; KITE, G. C. and SIMMONDS, M.S.J. Distinguishing chinese star anise from japanese star anise using thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, 57(13); p. 5783-5789.

240. LEES, M. Food authenticity and traceability. Cambridge: Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC, **2003**. 612p.

# 2. SÍNTESIS DE 2,5-DIHIDRO-1-BENZOXEPINAS, SESQUITERPENOIDES ANÁLOGOS DE HELIANNANOS: EMPLEO DE ALGUNOS COMPUESTOS FENÓLICOS Y ACEITES ESENCIALES QUE LOS CONTIENEN

## 2.1 INTRODUCCIÓN

Los heliannanos son un tipo de sesquiterpenoides oxigenados relativamente nuevos (*ca*. 15 años), aislados de especies del reino vegetal, como el girasol (*Helianthus annuus*) [1] y de animales, como la esponja indo-pacífica *Haliclona fascigera* [2], que tienen en común un anillo aromático fusionado con un heterociclo de tamaño variable (6-8 miembros), que posee un átomo de oxígeno. Este tipo de compuestos en *Helianthus annuus* mostraron, inicialmente, propiedades alelopáticas que inhibieron el crecimiento de especies dicotiledóneas [3] y, posteriormente, se descubrió su amplio espectro de actividades biológicas [1,4-6].

Sin embargo, a pesar de las benéficas y particulares bioactividades que los heliannanos exhiben, su cantidad en las fuentes naturales es muy baja, lo que limita su posible uso directo, *e.g.*, como herbicida [7], lo que implica la eliminación de esta fuente o se requiere una inversión muy alta para su industrialización. Así que, desde el advenimiento de la síntesis orgánica, como respuesta a estas dificultades, junto con el desarrollo de las técnicas analíticas para su identificación [8], hoy día se pudo ontener y caracterizar estructuralmente, no solamente heliannanos sino una plétora de sustancias bioactivas similares, a través de muchas y variables rutas sintéticas.

Los heliannanos no son los únicos compuestos encontrados en la naturaleza que presentan un heterociclo con un átomo de oxígeno, existe también una inmensa diversidad de productos naturales que contienen en su estructura molecular un oxaciclo de siete miembros [9]. No obstante, el desarrollo de rutas sintéticas para la preparación de anillos oxigenados fusionados de siete miembros ha atraído la atención debido a su interesante y amplia farmacología (actividades herbicida,

antiviral, antifúngica y propiedades de bloqueo del canal iónico) de los compuestos que poseen este esqueleto heterocíclico [10]. Los persistentes retos asociados con la construcción de oxaciclos *orto*-condensados con estereoquímica absoluta [11] trae como consecuencia de esta importante característica el desarrollo de una multitud de rutas sintéticas para formar los sistemas de anillo benzoxepínico.

En la literatura se han reportado las síntesis de derivados de 1-benzoxepinas a partir de fenoles [10,12], pero su química y propiedades apenas se conocen. Algunos métodos sintéticos presentan ciertas desventajas como condiciones severas y pasos de reacción múltiples, intermediarios comercialmente no-disponibles y la baja eficiencia. Por lo tanto, es necesario desarrollar y ampliar métodos más prácticos y eficientes para la preparación de 1-benzoxepinas sustituidas. Desde que Grubbs *et al.* [13], descubrieron en 1995 un nuevo complejo de rutenio-alquilideno como catalizador para la metátesis con cierre de anillo (RCM), este catalizador ha venido aplicándose en extenso en la síntesis orgánica y ha sido útil en la construcción de anillos heterocíclicos de tamaño mediano [14].

El propósito de esta parte del trabajo de investigación fue desarrollar una ruta sintética en cuatro etapas para la obtención de nuevas 1-benzoxepinas sustituidas, a partir de fenoles sustituidos y aceites esenciales que contienen timol y carvacrol. Se utilizaron como principales herramientas sintéticas la transposición de Claisen y la metátesis con cierre de anillo. Todos los compuestos precursores, intermediarios y productos finales fueron caracterizados mediante las técnicas espectroscópicas convencionales [infrarojo (IR), cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) y resonancia magnética nuclear (RMN)].

## 2.2 GENERALIDADES DE LOS DERIVADOS DE 1-BENZOXEPINAS

Una benz[*b*]oxepina o 1-benzoxepina es un *o*-heterociclo con un anillo de benceno (**A**) *orto*-fusionado a un monociclo de siete miembros (**B**) con un átomo de oxígeno (**Figura 2.1a**) [15]. En la naturaleza se encuentran derivados de 1-benzoxepinas con una variedad de sustituyentes como 2,5-dihidro-1-benzoxepinas (**Figura 2.1b**) y

2,3,4,5-tetrahidro-1-benzoxepinas (**Figura 2.1c**), que constituyen la estructura base de algunos sesquiterpenos con ciertas bioactividades. Estos compuestos han sido aislados de plantas como *Helianthus annuus* [3,16], *Radula complanata* [17], *Hemizonia lobbii* [18], *Delphinium formosum* [19], *Ptæroxylon obliquum* [20], *Bauhinia racemosa* Lamk. [21], *Aglaia edulis* [22] y otras especies [23], del hongo *Ulocladium botrytis* obtenido de la esponja marina *Myxilla incrustans* [24,25], de la esponja indo-pacífica *Haliclona fascigera* [2], de la resina del hongo *Mycena galopus* [26], del hongo *Flammulina velutipes* [27] y de la fermentación de hongos de especies *Pterula* [4,5,28].

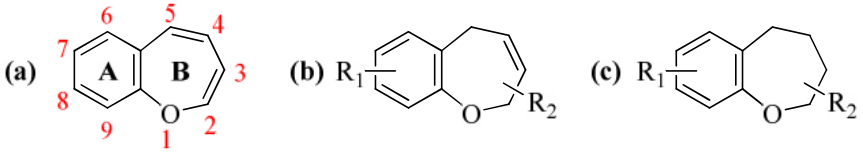



**Figura 2.1.** 1-Benzoxepina y algunos de sus derivados.

Estos compuestos han presentado bioactividades alelopáticas, herbicida [7,29-31], antibiótica [4,32], fungicida [5], insecticida [6], antimicrobiana [27] y antagónica en la vasopresina, inhibitoria para la calmodulina [10] y antagónica contra NADH:ubiquinona-oxidoreductasa [5,28,33]; además, de su posible utilización como estrógeno no esteroidal en terapia alternativa de reemplazo del estradiol [34], como agentes anti-implante [35], $\alpha$-simpatomimético y anorexigénico [36].

## 2.3 ESTUDIO SINTÉTICO DE LOS DERIVADOS DE HELIANNANOS

Los heliannuoles B-D (**1-3**) (**Figura 2.2**) fueron los primeros compuestos biológicamente activos con esta estructura heterocíclica, aislados de las hojas de girasoles *Helianthus annuus*, mostraron actividad alelopática comprobada contra especies dicotiledóneas (*Lactuca sativa* y *Lepidium sativum*) [3].

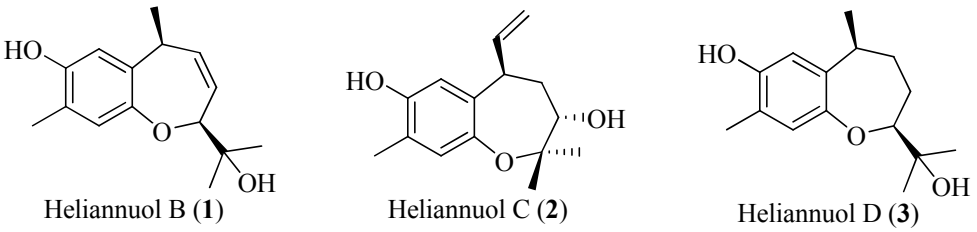



**Figura 2.2.** Heliannuoles B-D aislados de *Helianthus annuus*.

En el año 1999, Macías *et al.* [37] aislaron y caracterizaron 3 nuevos heliannuoles (F, I y J) (**4-6**) (**Figura 2.3**) de la misma especie *Helianthus annuus* con la misma estructura base. De éstos, los heliannuoles F e I también inhibieron el crecimiento de especies dicotiledóneas.

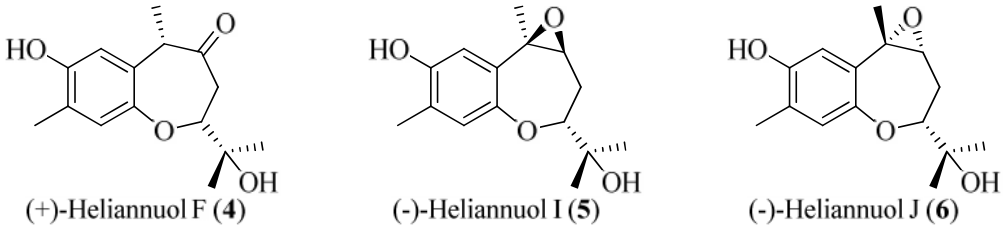
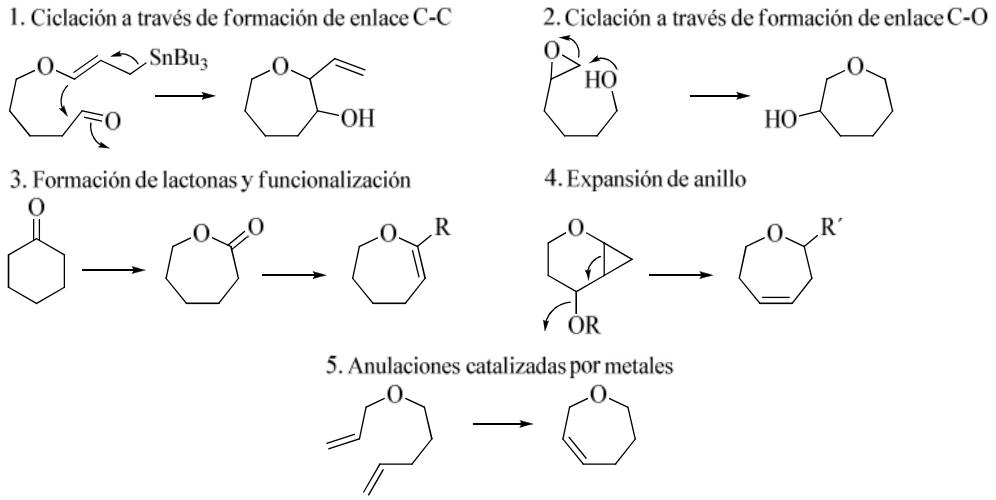



**Figura 2.3.** Heliannuoles F, I y J aislados de *Helianthus annuus*.

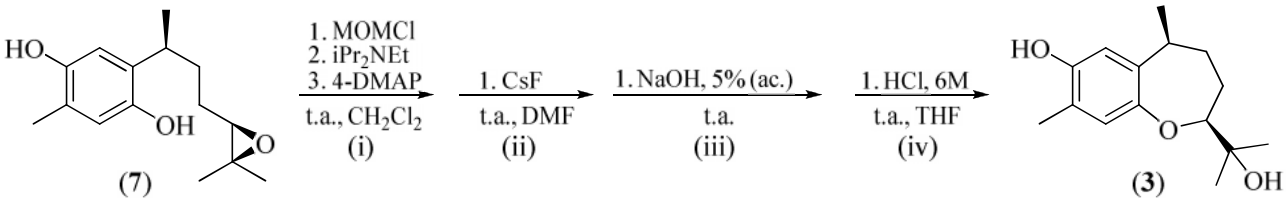
La síntesis de compuestos con oxaciclos de este tipo se encuentra clasificada en cinco estrategias generales (**Esquema 2.1**). Las dos primeras estrategias involucran la ciclación de precursores acíclicos a través de formación de enlaces C-C o enlaces C-O [9,11,38,39]. La formación de enlaces C-O se efectúa por medio de ataque intramolecular de alcoholes sobre epóxidos, carbonilos y acetales, siendo ésta la ruta más desarrollada ya que ofrece métodos altamente eficientes. La tercera ruta consiste en la formación de lactonas por oxidación de Baeyer-Villiger [40,41] y lactonización de hidroxi-ácidos [42,43], con posterior conversión en oxepenos [9,11]. La penúltima alternativa, es la expansión de anillo de 3-6 miembros [38] y finalmente, ciclación mediante metales de transición que incluye metátesis olefínica, diazo-ciclaciones y acoplamiento catalizado por paladio (alquilación), que involucran la generación tanto de enlaces C-C, como enlaces C-O [9,11,39].

Los primeros compuestos de 1-benzoxepina sintetizados fueron los heliannuoles. Una de la síntesis formal propuesta para el heliannuol D (**3**) fue realizada por Tuhina *et al.* [25], quienes usaron una táctica de expansión de anillo.

Su síntesis total enantiocontrolada fue realizada por Takabatake *et al.* [44] vía ciclación intramolecular mediada por una base de un epóxido fenólico (**7**), cuya reacción intramolecular para formar el éter arílico produjo el heliannuol D mediante el modo de ciclación 7-*exo*, con establecimiento de la estructura absoluta (**Esquema 2.2**).




**Esquema 2.1.** Estrategias generales para la síntesis de oxaciclos de 7 miembros.




MOMCl - Metoximetilcloruro; 4-DMAP -

**Esquema 2.2.** Síntesis de heliannuoles A y D propuesta por Takabatake.

Otros compuestos con estructura base de 1-benzoxepina son el ácido pterulínico (**8**), pterulona (**9**) y pterulona B (**10**) (**Figura 2.4**), los cuales son sustancias halogenadas aisladas de especies *Pterula* [4] y presentan potente actividad antifúngica [5].

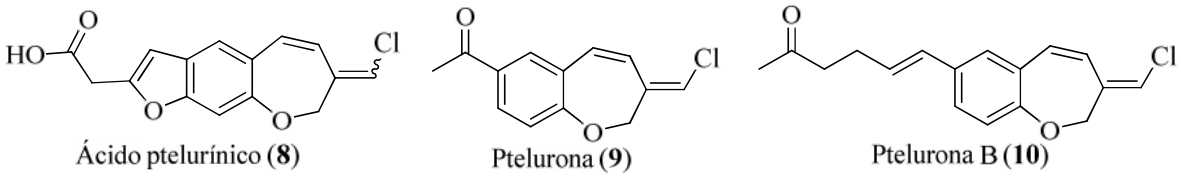
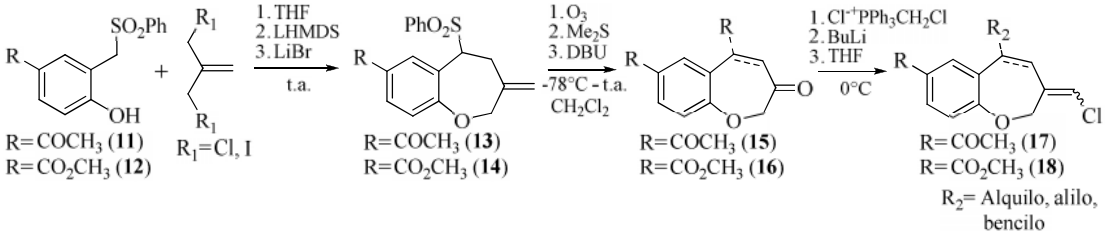


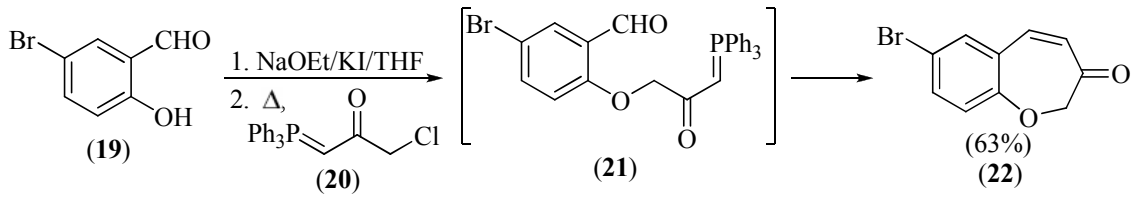

**Figura 2.4.** Ácido pterulínico (**8**), pterulona (**9**) y pterulona B (**10**).

Lemaire *et al.* [45] sintetizaron este tipo de moléculas (**17**,**18**) mediante una reacción de cicloanulación que involucra 2-hidroxibenzil-fenil-sulfonas (**11**,**12**) como reactivo 1,4-dinucleofílico y 3-halo-2-halometil-1-propilenos como reactivos 1,3-dielectrofílico (**Esquema 2.3**).



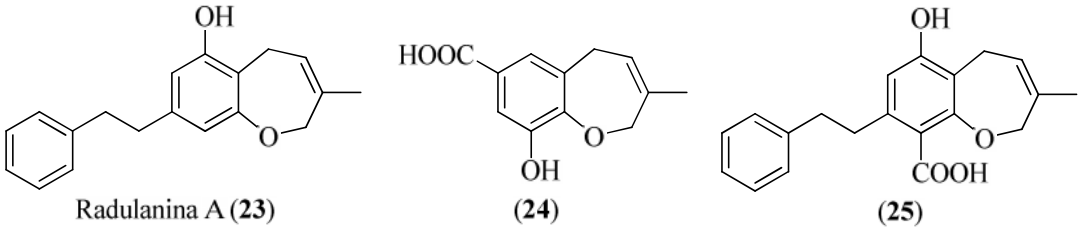

**Esquema 2.3.** Reacción de cicloanulación para la síntesis de pterulonas.

Otras rutas reportadas para la síntesis de pterulona son: (a) empleo de reacciones de Wittig y Friedel-Crafts [46]; (b) uso de un éter bidentado y dos reacciones de Wittig sucesivas en 4 ó 5 etapas [33,47] y (c): empleo de RCM y reacciones de oxidación y de Wittig [48]. Dentro de estos métodos, el de Huang *et al.* [33] parece sobresalir por su elegancia. La síntesis del compuesto (**22**) consiste en la reacción de *o*-acilación del aldehído salicílico (**19**) con el reactivo de Wittig (**20**), que produce un intermedio (**21**) capaz de reaccionar intramolecularmente y formar un anillo de 1-benzoxepin-3(*2H*)-ona (**22**) (**Esquema 2.4**).




**Esquema 2.4.** Preparación de 7-bromobenzoxepin-3(*2H*)-ona (**22**) vía reacción de *o*-acilación/Wittig tandem.

Radulanina A (**23**) y sus análogos (**24**) y (**25**) son otros derivados interesantes del tipo de 2,5-dihidro-1-benzoxepina (**Figura 2.5**).

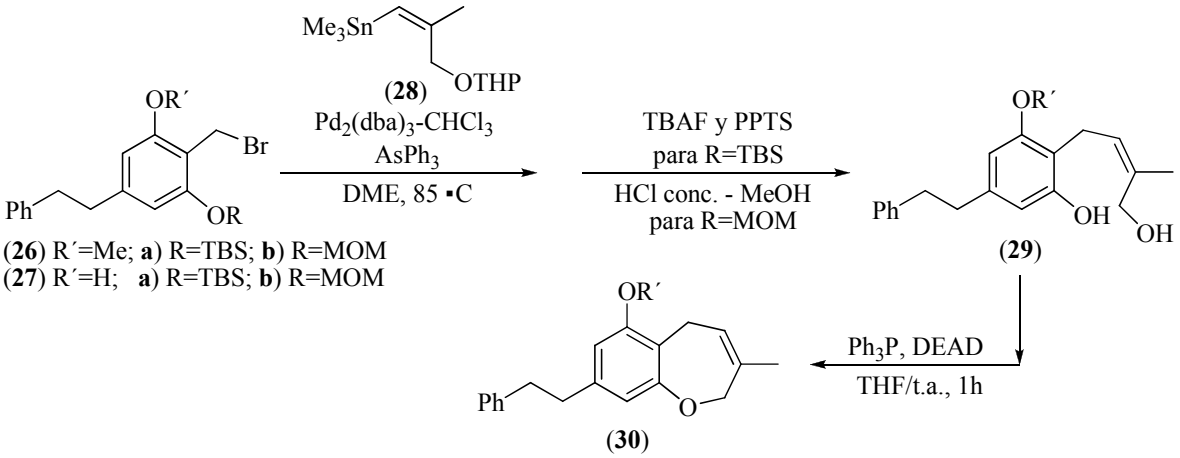



Radulanina A (**23**) (**24**) (**25**)

**Figura 2.5.** Estructura de la radulanina A (**23**), del ácido 9-hidroxi-3-metil-2,5-dihidro-1-benzoxepin-7-carboxílico (**24**) y radulanina E (**25**).

Estas moléculas fueron aisladas de especies *Radula*, *Haliclona fascigera* y *Hemizonia lobbii* y se reportan 3 tácticas para su preparación: (a) síntesis, que usa como herramientas sintéticas RCM y metalación *orto*-dirigida regioespecífica, propuesta y realizada por Snieckus y su grupo [49]; (b) síntesis, que involucra el acoplamiento de Stille y la reacción de Mitsunobu en su versión intramolecular, diseñada por Yamaguchi *et al.* [12]; (c) la síntesis de análogos de la radulanina (**24**) y (**25**), a partir de 3-metil-6-oxo-8-(feniletil)-2,5-dihidro-1-benzoxepina *o*-protegida, formilación de Vilsmeier y oxidación del grupo carbaldehído [50].

La síntesis de Yamagachi, en tres pasos, se basa en: i) protección del grupo OH (con TBSCl o MOMCl) y bromación de metilo (con NBS o $PBr_3$) del *o*-cresol; ii) acoplamiento Stille (catalizado por Pd) y desprotección de TBS y MOM con TBAF y HCl con la obtención de (**29**); y iii) ciclación Mitsunobu del diol (**29**) empleando trifenilfosfina y azodicarboxilato de dietilo en THF a temperatura ambiente, lo que genera el producto final (**30**) (**Esquema 2.5**).

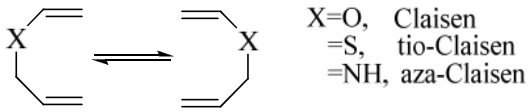



(**26**) R´=Me; **a**) R=TBS; **b**) R=MOM
(**27**) R´=H; **a**) R=TBS; **b**) R=MOM

**Esquema 2.5.** Procedimiento aplicado a la síntesis de radulanina A y su éter metílico.

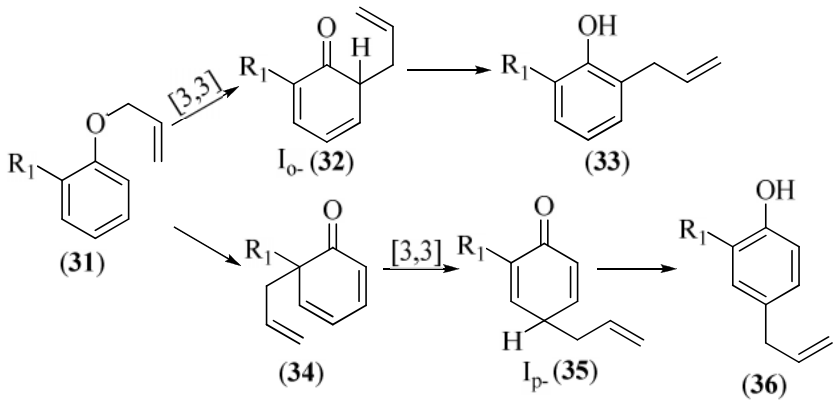
## 2.4 HERRAMIENTAS SINTÉTICAS PARA CONSTRUCCIÓN DE ENLACES C-C

**2.4.1 Transposición de Claisen.** Esta transposición pertenece al grupo de las reacciones pericíclicas, un "desplazamiento o transposición sigmatrópica", donde hay migración intramolecular de un átomo de H o de un grupo alquílico a un enlace  por acción térmica o fotoquímica [51]. La transposición de Claisen fue reportada en 1912 e involucra la transformación térmica (temperaturas entre 150-225°C) de un alil-vinil-éter en un compuesto carbonil-homoalílico [51-54] (**Esquema 2.6**).



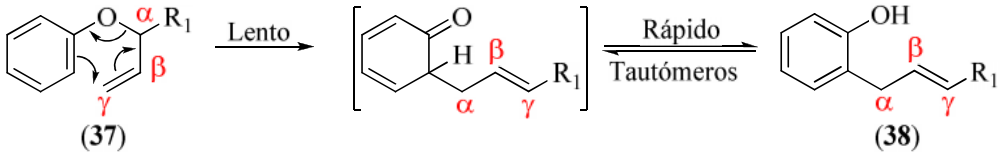

**Esquema 2.6.** Representación general del desplazamiento sigmatrópico [3,3] en función del átomo central X.

Cuando los alil-aril-éteres (**31**) se someten a calentamiento se reordenan a los *o*-alil-fenoles (**33**). Si los éteres (**31**) no contienen sustituyentes en la posición *orto* (**31**, $R_1$=H), el desplazamiento sigmatrópico [3,3] inicial dará un intermediario tipo *orto*-dienona (**32**), que se enoliza para formar el producto más estable, el *o*-alil-fenol (**33**) [51,53,55,56]. Si la posición *orto* de los éteres está ocupada por un sustituyente (**31**, $R_1$≠H), un subsecuente desplazamiento [3,3] resultará en la formación del *p*-alil-fenol (**36**), vía intermediarios (I) *o*-quinónico (**34**) y *p*-quinónico (**35**) (**Esquema 2.7**) [57,58].




**Esquema 2.7.** Mecanismo general de la transposición de Claisen.

En la migración *orto*- el grupo alílico siempre experimenta un desplazamiento alílico; es decir, el sustituyente α al oxígeno es ahora γ al anillo y viceversa [51,59] (**Esquema 2.8**). En cambio, en la migración *para*- nunca hay desplazamiento alílico: el grupo alilo se encuentra exactamente como estaba en el éter original [51,54,55,58,59].




**Esquema 2.8.** Observación del desplazamiento alílico en transposición de Claisen.

La evidencia de que la transposición de Claisen es un proceso concertado se apoya en que la reacción no utiliza catalizador, es de primer orden respecto al éter, la ausencia de productos cruzados cuando hay mezclas y la existencia del desplazamiento alílico (presente sólo por este mecanismo) [51,58,60,61], demostrado este último por marcaje isotópico con $^{14}C$ [62]. Aunque, no se puede analizar la geometría del estado de transición (ET) por medios directos, se emplean métodos cinéticos indirectos [59,63] y cálculos teóricos [64], lo que sugieren, el carácter cíclico intramolecular con preferencia por la topología de silla, pero no hay información suficiente acerca del grado de especificidad en la selectividad silla-bote [53,58,60,64,65].

Puesto que el mecanismo de la transposición de Claisen es no-iónico [51], no debería depender del tipo de sustituyente presente en el anillo. Sin embargo, grupos

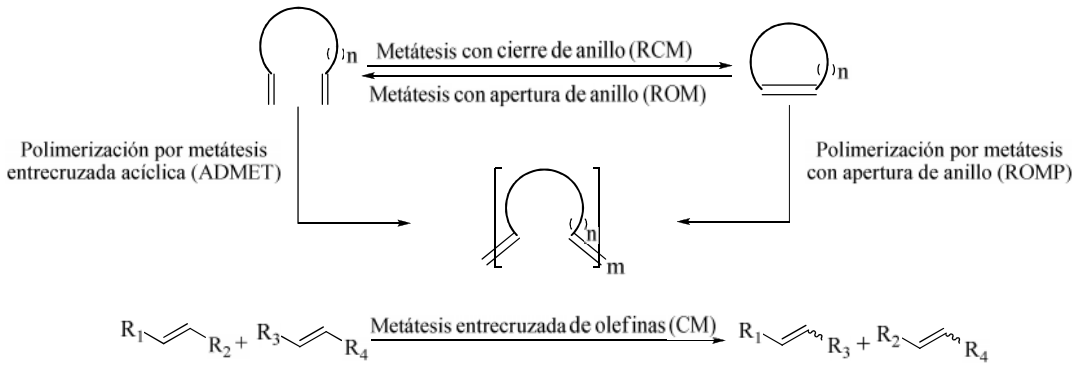
electrodonadores incrementan la velocidad de reacción y grupos electroatrayentes la disminuyen, aunque este efecto es menor si se compara con otras variables (temperatura, tiempo). Por otro lado, la influencia del disolvente es marcada: las velocidades variaron en un rango de 300 veces cuando se probaron 17 disolventes diferentes, de acuerdo con White y Wolfarth [66,67]. Un disolvente adecuado fue el ácido trifluoroacético [68,69], en el cual la reacción se puede llevar a cabo a temperatura ambiente [53,55,58,60].

La mayoría de las transposiciones de Claisen se efectúan sin catalizador; no obstante, se han utilizado algunos ácidos de Lewis ($AlCl_3$, $BCl_3$, $SbCl_5$, $ZnCl_2$ y $BF_3$) [53,55,58,70-73], ácidos de Brönsted, bases, complejos Rh (I) y Pt (0), sílica gel, zeolitas y arcillas aciduladas como catalizadores [53,55,56,58,70]. También, se han empleado la radiación de microondas sobre gel de sílice para inducir la transposición [74,75] junto con líquidos iónicos con una reducción de tiempo y una alta eficiencia del proceso [76]; y agua como disolvente en un reactor por lotes con microondas presurizado y en autoclaves con calentamiento convencional, a una temperatura de 300°C [78-80].

**2.4.2 Metátesis olefínica.** La metátesis (del griego *meta* – cambio y *thesis* – posición) olefínica es un proceso catalítico cuyo paso clave es la reacción entre una olefina y un complejo metal-alquilideno, generando intercambio de grupos en los enlaces C-C alrededor del doble enlace [13,81-85]. Este tipo de metátesis no utiliza reactivos adicionales sino la cantidad catalítica del metal-carbeno y el único producto adicional de la reacción es, en la mayoría de los casos, una olefina volátil como el etileno [86].

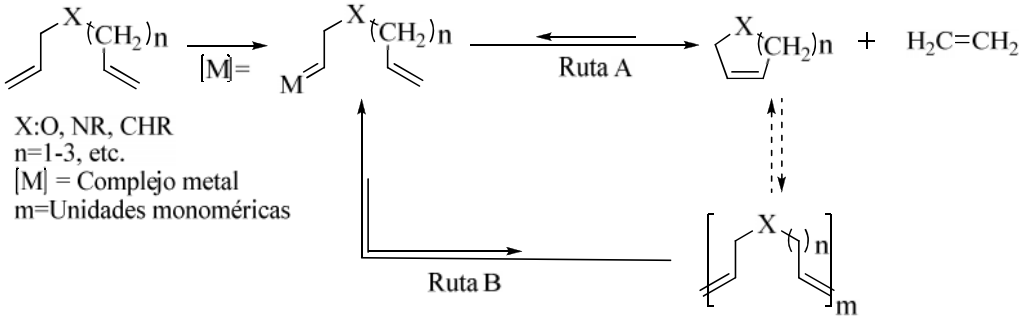
La metátesis olefínica se encuentra clasificada en cinco tipos de reacción fundamentales (**Esquema 2.9**) y dependiendo de la estructura de la olefina, la metátesis puede ocurrir inter- o intramolecularmente. La metátesis intermolecular de dos alquenos se denomina metátesis entrecruzada (CM). Si la metátesis intermolecular de $\alpha,\omega$-dienos conduce a estructuras poliméricas, se le conoce como metátesis acíclica de dienos (ADMET). La metátesis intramolecular de estos sustratos produce cicloalquenos (metátesis con cierre de anillo – RCM) y la reacción inversa es

la escisión de un cicloalqueno con etileno u otro alqueno (metátesis con apertura de anillo – ROM). En la ausencia de un alqueno acíclico, la metátesis con apertura de anillo puede ser el paso inicial para una reacción de polimerización (polimerización por metátesis con apertura de anillo – ROMP) [82,84-87].




**Esquema 2.9.** Tipos de metátesis olefínica: (1) RCM; (2) ROM; (3) ROMP; (4) CM y (5) ADMET.

**2.4.2.1 Metátesis con cierre de anillo – RCM.** En el proceso de RCM, una α,ω-diolefina reacciona con un metal-alquilideno para producir un cicloalqueno y un alqueno volátil, como consecuencia de la metátesis olefínica intramolecular. El intermediario metal-alquilideno dentro del sistema presenta dos rutas competitivas: (a) la RCM produciendo cicloaductos (ruta A) o (b) reacciones intermoleculares para formar aductos poliméricos (ADMET, ruta B) (**Esquema 2.10**). Además, la reacción se puede complicar por la posibilidad que ocurra la ROMP [13,88].



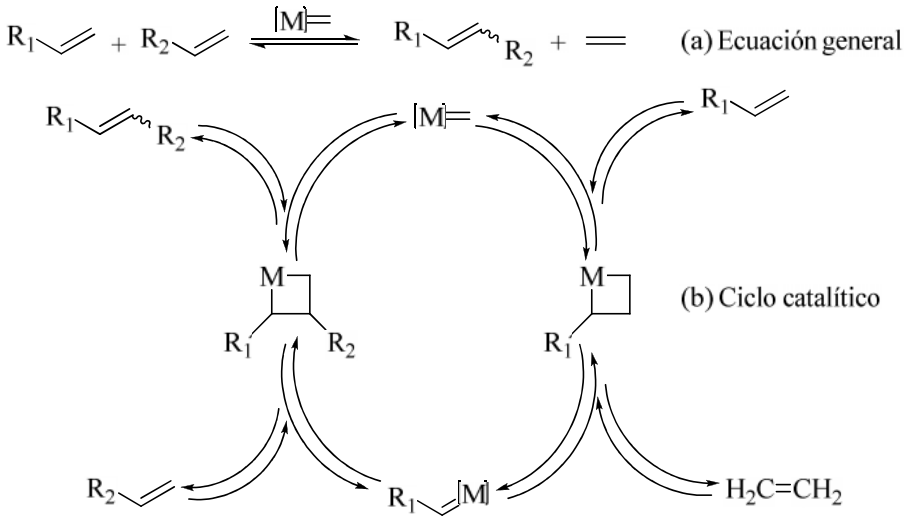

**Esquema 2.10.** Diagrama general de metátesis con cierre de anillo.

El éxito de la reacción de ciclación a través la metátesis olefínica está influido en gran medida, por los dos factores principales: (1) eficiencia del catalizador y (2) naturaleza

de los anillos resultantes: tamaño de los anillos y grupos funcionales/sustituyentes presentes en el sustrato [89,90].

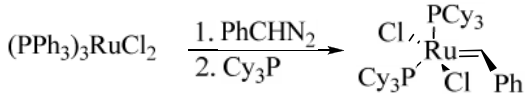
*** Mecanismo de metátesis olefínica.** Aunque la estabilidad relativa de los carbenos y metalociclobutanos cambia con las condiciones de reacción, composición del catalizador y sustitución de los alquenos [91], el mecanismo de metátesis olefínica es el mismo para todos los catalizadores [83]. Durante el período de exploración de la metátesis, varias hipótesis mecanísticas existieron [92-95], incluyendo los modelos del ciclobutano-metal coordinado y metalo-ciclopentano. Sin embargo, en el año 1971 Yves Chauvin (del Instituto Francés del Petróleo) y Jean-Louis Hérisson publicaron el mecanismo que es aceptado hoy día por la comunidad científica [83].

En la parte (a), un metal-carbeno actúa como catalizador para metatetizar dos alquenos terminales, en un alqueno interno (mezcla de isómeros *E* y *Z*) y etileno. La parte (b) muestra el ciclo catalítico propuesto por Chauvin (**Esquema 2.11**). El metal-alquilideno reacciona con la olefina, experimentando una cicloadición [2+2] para formar un intermediario metalociclobutano. La cicloreversión de este intermediario produce etileno y una nueva especie metal-alquilideno, constituido por el metal con su ligando y un alquilideno de la olefina de partida. Sucesivamente, se repiten la cicloadición [2+2] entre el nuevo metal-alquilideno y una nueva molécula olefínica (otro intermediario metalociclobutano) y, la cicloreversión de este último intermediario para producir el alqueno de interés y regenerar el metal-metileno de partida, el cual está listo para iniciar el ciclo catalítico [83,85,90].



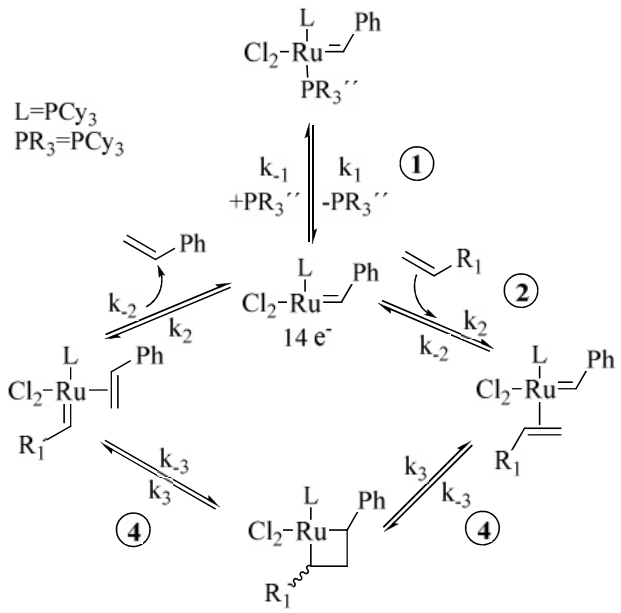

**Esquema 2.11.** Mecanismo propuesto por Chauvin y Hérisson para la metátesis olefínica.

*** Catalizador de Grubbs de primera generación.** En el año 1996 se desarrolló una ruta eficiente para la preparación de complejo de bencilideno-rutenio, que demostró la alta actividad y rápida iniciación de esta familia de catalizadores (**Esquema 2.12**) [96,97]. Sin embargo, este complejo forma dímeros (enlaces entre los átomos de Ru) después de la disociación del ligando de la fosfina en solución [98,99], con ello, la concentración del catalizador disminuye y los números *turnover* (**#** de reacciones por unidad de tiempo) bajan durante la metátesis.




**Esquema 2.12.** Preparación del catalizador de Grubbs de primera generación.

El paso inicial y determinante de la reacción con el catalizador de Grubbs en el ciclo catalítico es la disociación de la fosfina ($PCy_3$) [100] desde el centro del metal, generando la especie intermediaria de monofosfina con 14 $e^-$ [101-103]. El segundo paso es la coordinación de la olefina con el intermediario de rutenio, la cual se logra cuando ellos se orientan colinealmente, maximizando el enlazamiento  alrededor del centro octahedral $d^6$ del metal [82]. El tercer paso es la formación del metalociclobutano y el último paso es el reordenamiento del doble enlace para generar el producto (**Esquema 2.13**) [90,103,104].



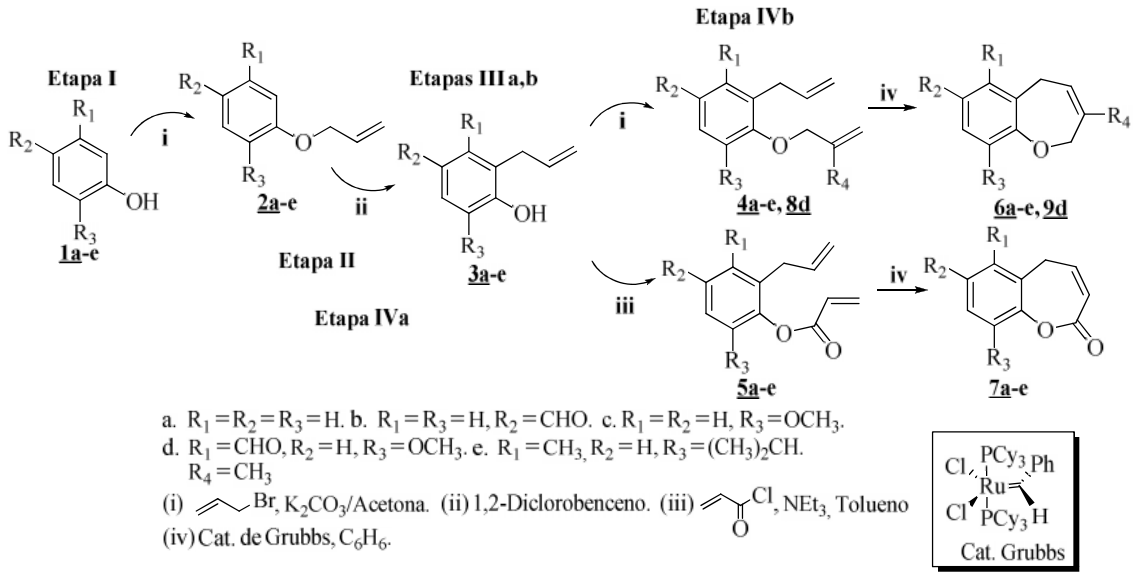

**Esquema 2.13.** Mecanismo de metátesis utilizando catalizador de Grubbs de primera generación.

Con la generación de nuevos catalizadores, la reacción de metátesis olefínica ha ofrecido nuevas oportunidades y mejoras en la investigación académica e industrial, para la síntesis de nuevas moléculas y compuestos comercialmente viables; nuevos polímeros, sus aditivos y combustibles, de sustancias biológicamente activos (feromonas de insectos, herbicidas y fármacos) [83,105,106].

La reacción RCM se ha empleado para la construcción de anillos de 5-7 miembros, como heterociclos insaturados oxigenados [107], nitrogenados [108], azufrados [109] y fosforados [110]; además, de moléculas con diversas funcionalidades [111-114]. Otra aplicación muy importante ha sido en la química de péptidos para la síntesis de amino-ésteres de 6-7 miembros altamente funcionalizados [115], diversos aminoácidos [116,117], lactamas cíclicas [118,119] y péptidos macrocíclicos [120,121]. Asimismo, se ha utilizado para la construcción de sistemas cíclicos grandes (> 8 miembros) altamente flexibles: lactonas [122,123], calix[4]arenos [124], macrolactamas [125] y lactonas polifuncionales [126,127].

## 2.5 PARTE EXPERIMENTAL

Para la obtención de las nuevas 2,5-dihidro-1-benzoxepinas sustituidas, se propuso una ruta sintética en cuatro etapas sucesivas, teniendo como precursores al fenol (**1a**), 4-hidroxibenzaldehído (**1b**), guayacol (**1c**), isovainillina (**1d**) y timol (**1e**) (**Esquema 2.14**).




**Esquema 2.14.** Esquema general para la síntesis propuesta de benzoxepinas a partir de fenoles.

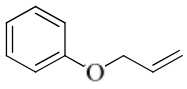
**2.5.1 Reactivos.** Los reactivos y disolventes utilizados en las diferentes etapas sintéticas fueron el fenol (99%), 4-hidroxibenzaldehído (98%), guayacol (98%), isovainillina (99%), timol (99%), bromuro de alilo (97%) y 1,2-diclorobenceno (99%), adquiridos de *Sigma Aldrich* (St. Louis, EE.UU.). El carbonato de potasio, acetona, tolueno, benceno, diclorometano, acetato de etilo y éter de petróleo, fueron grado para síntesis. Todos los disolventes utilizados se secaron y destilaron de acuerdo con el procedimiento respectivo.

**2.5.2 Seguimiento de la reacción y purificación de los compuestos.** El monitoreo de las reacciones se realizó empleando cromatografía en capa fina (TLC) sobre cromato-placas de Silufol $UV_{254}$ de 0.25 mm de grosor, reveladas en una cámara de luz UV de 254 nm o en vapores de yodo. La separación y purificación de los

compuestos se llevó a cabo por cromatografía en columna (CC), empleando gel de sílice 60 (0.063-0.200 mm) como soporte y como fase móvil diferentes tipos de solventes (acetato de etilo (AE) – éter de petróleo (EP)) en mezclas de polaridad creciente.

**2.5.3 Propiedades físicas y caracterización estructural de los compuestos.** Los puntos de fusión se determinaron en un fusiómetro FISHER-JOHNSON. El establecimiento de las estructuras absolutas de los compuestos sintetizados se efectuó mediante técnicas instrumentales como espectroscopías infrarroja (IR) y de resonancia magnética nuclear (RMN) y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM). Los espectros IR se adquirieron en un equipo INFRALUM FT con transformada de Fourier; la separación de los compuestos y sus espectros de masas se obtuvieron en un cromatógrafo de gases HP 5890A Series II (*Hewlett-Packard*, Palo Alto, C.A, U.S.A) acoplado a un detector selectivo de masas HP-5972 (*Hewlett-Packard*) con ionización electrónica (70 eV) y analizador másico cuadrupolar (*m/z* 41-350, en modo *full scan*). La adquisición de los espectros de $^{1}H$ y $^{13}C$-RMN y de correlación heteronuclear, se realizó en el espectrómetro *Bruker* AM-400 utilizando cloroformo deuterado ($CDCl_3$) como disolvente y tetrametilsilano (TMS) como patrón interno.

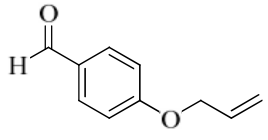
**2.5.4 Etapa I. *o*-Alilación de fenoles sustituidos.** Protocolo general de la síntesis de Williamson. Se colocaron 6-10 mmoles del fenol de interés (**1a-e**), 20-26 mmoles de carbonato de potasio y 20-32 mmoles de bromuro de alilo en 50-80 mL de acetona y se sometieron a reflujo durante 6-18 horas [128]. Seguidamente, se destiló el disolvente de reacción y se extrajo el compuesto de interés con diclorometano (3 x 20 mL). Los extractos orgánicos se recogieron sobre sulfato de sodio y se rotoeovaporaron para eliminar el solvente de extracción. Los crudos aceitosos fueron purificados por cromatografía en columna sobre gel de sílice (EP:AE – 2:1-90:1), obteniéndose los respectivos compuestos (**2a-e**).



**2a – 1-Aliloxi benceno**

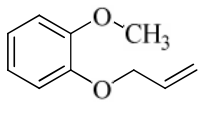
1.0 g (10.6 mmoles) de fenol (**1a**) junto con 2.9 g (21.2 mmoles) de

$K_2CO_3$ y 3.9 g (31.8 mmoles) de bromuro de alilo se sometieron a reflujo con acetona anhidra durante 12 h. El producto crudo fue purificado por CC con mezcla EP:AE 80:1, obteniéndose 1.1 g (8.0 mmol) de **2a** como un aceite incoloro con olor característico. Rto: 80%; IR (película delgada): ($\nu_{=C-H}$) 3070 $cm^{-1}$, ($\nu_{COC-asim}$) 1254 $cm^{-1}$, ($\nu_{COC-sim}$) 1026 $cm^{-1}$; $^1$H-RMN ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 7.35-7.30 (2H, td, *J*=7.4, 1.4 Hz, 3,5-$H_{Ar}$), 7.00 (1H, dt, *J*=7.3 Hz, 4-$H_{Ar}$), 6.98-6.95 (2H, m, 2 y 6-$H_{Ar}$), 6.11 (1H, dddd, *J*=17.4, 10.4, 5.3, 1.4 Hz, H-C=), 5.46 (1H, dq, *J*=17.2, 1.6 Hz, =$CH_2$), 5.32 (1H, dq, *J*=10.5, 1.4 Hz, =$CH_2$), 4.58 (1H, t, *J*=1.5 Hz, -$CH_2$), 4.57 (1H, t, *J*=1.5 Hz, -$CH_2$); $^{13}$C-RMN ($CDCl_3$, 100 MHz): δ 158.5, 133.3, 129.4, 129.4, 120.8, 117.5, 114.7, 114.7, 68.6 ppm; CG-EM (EI, 70 eV), *m/z* (%): 134 ($M^{+\cdot}$, 50), 41 (100).



**2b – 4-Aliloxi benzaldehído**

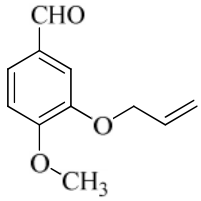
1.0 g (8.2 mmoles) de 4-hidroxibenzaldehído (**1b**) junto con 3.4 g (24.6 mmoles) de $K_2CO_3$ y 3.0 g (24.6 mmoles) de bromuro de alilo se sometieron a reflujo con acetona anhidra durante 12 h. El producto crudo fue purificado por CC con mezcla EP:AE 50:1, obteniéndose 1.0 g (6.2 mmol) de **2b** como un aceite incoloro con olor característico. Rto: 76%; IR (película delgada): ($\nu_{=C-H}$) 3077 $cm^{-1}$, ($\nu_{C=O}$) 1689 $cm^{-1}$, ($\nu_{COC-asim}$) 1257 $cm^{-1}$, ($\nu_{COC-sim}$) 1015 $cm^{-1}$; $^1$H-RMN ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 9.87 (1H, s, H-C=O), 7.83 (1H, t, *J*=2.3 Hz, 5-$H_{Ar}$), 7.81 (1H, t, *J*=2.3 Hz, 3-$H_{Ar}$), 7.01 (1H, t, *J*=2.2 Hz, 6-$H_{Ar}$), 6.99 (1H, t, *J*=2.3 Hz, 2-$H_{Ar}$), 6.04 (1H, dddd, *J*=17.2, 10.8, 5.3, 1.4 Hz, H-C=), 5.42 (1H, dq, *J*=17.3, 16 Hz, =$CH_2$), 5.32 (1H, dq, *J*=10.5, 1.4 Hz, =$CH_2$), 4.62 (1H, t, *J*=1.5 Hz, -$CH_2$), 4.60 (1H, t, *J*=1.5 Hz, -$CH_2$); $^{13}$C-RMN ($CDCl_3$, 100 MHz): δ 190.7, 163.5, 132.3, 131.9, 131.9, 130.0, 118.3, 114.9, 114.9, 68.9 ppm; CG-EM (EI, 70 eV), *m/z* (%): 162 ($M^{+\cdot}$, 54), 41 (100).



**2c – 1-Aliloxi-2-metoxi benceno**

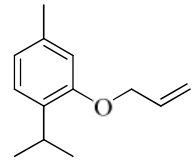
1.0 g (8.1 mmoles) de guayacol (**1c**) junto con 3.3 g (24.2 mmoles) de $K_2CO_3$ y 2.9 g (24.2 mmoles) de bromuro de alilo se sometieron a reflujo con acetona anhidra durante 12 h. El producto crudo fue purificado por CC con mezcla EP:AE 70:1, obteniéndose 1.3 g (7.7 mmol) de **2c** como un aceite incoloro e inodoro. Rto: 96%; IR (película delgada): ($\nu_{=C-H}$) 3062 $cm^{-1}$, ($\nu_{COC-asim}$) 1249

$cm^{-1}$, ($\nu_{COC\text{-}sim}$) 1025 $cm^{-1}$; $^1$H-RMN ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 6.96-6.90 (2H, m, 4 y 5-$H_{Ar}$), 6.90-6.88 (2H, m, 3 y 6-$H_{Ar}$), 6.10 (1H, dddd, *J*=17.7, 10.6, 5.4, 1.3 Hz, H-C=), 5.41 (1H, dq, *J*=17.3, 1.6 Hz, =$CH_2$), 5.29 (1H, dq, *J*=10.7, 1.4 Hz, =$CH_2$), 4.62 (1H, t, *J*=1.5 Hz, -$CH_2$), 4.61 (1H, t, *J*=1.5 Hz, -$CH_2$), 3.87 (3H, s, -$OCH_3$); $^{13}$C-RMN ($CDCl_3$, 100 MHz): δ 149.4, 147.9, 133.3, 121.1, 120.6, 117.7, 113.5, 111.6, 69.7, 55.7 ppm; CG-EM (EI, 70 eV), *m/z* (%): 164 ($M^{+\cdot}$, 73), 95 (100).




**<u>2d</u> – 3-Aliloxi-4-metoxi benzaldehído**

1.0 g (6.5 mmoles) de isovainillina (**<u>1d</u>**) junto con 2.7 g (19.8 mmoles) de $K_2CO_3$ y 2.4 g (19.8 mmoles) de bromuro de alilo se sometieron a reflujo con acetona anhidra durante 8 h. El producto crudo fue purificado por CC con mezcla EP:AE 2:1, obteniéndose 1.3 g (6.6 mmol)de **<u>2d</u>** como un aceite rosado translúcido e inodoro. Rto: 85%; IR (película delgada): ($\nu_{=C\text{-}H}$) 3077 $cm^{-1}$, ($\nu_{C=O}$) 1689 $cm^{-1}$, ($\nu_{COC\text{-}asim}$) 1265 $cm^{-1}$, ($\nu_{COC\text{-}sim}$) 1018 $cm^{-1}$; $^1$H-RMN ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 9.79 (1H, s, H-C=O), 7.41 (1H, dd, *J*=8.2, 1.9 Hz, 4-$H_{Ar}$), 7.36 (1H, d, *J*=1.8 Hz, 2-$H_{Ar}$), 6.94 (1H, d, *J*=8.2 Hz, 5-$H_{Ar}$), 6.04 (1H, dddd, *J*=17.7, 10.7, 5.4, 1.2 Hz, H-C=), 5.40 (1H, dq, *J*=17.2, 1.4 Hz, =$CH_2$), 5.27 (1H, dq, *J*=10.5, 1.3 Hz, =$CH_2$), 4.62 (1H, t, *J*=1.3 Hz, -$CH_2$), 4.61 (1H, t, *J*=1.3 Hz, -$CH_2$), 3.91 (3H, s, -$OCH_3$); $^{13}$C-RMN ($CDCl_3$, 100 MHz): δ 190.7, 154.7, 148.4, 132.4, 129.8, 126.6, 118.4, 110.7, 110.6, 69.6, 56.0 ppm; CG-EM (EI, 70 eV), *m/z* (%): 192 ($M^{+\cdot}$, 77), 95 (100).




**<u>2e</u> – 1-Aliloxi-2-isopropil-5-metil benceno**

1.0 g (6.7 mmoles) de timol (**<u>1e</u>**) junto con 2.8 g (20.3 mmoles) de $K_2CO_3$ y 3.2 g (26.6 mmoles) de bromuro de alilo se sometieron a reflujo con acetona anhidra durante 18 h. El producto crudo fue purificado por CC con mezcla EP:AE 90:1, obteniéndose 1.3 g (6.7 mmol) de **<u>2e</u>** como un aceite incoloro e inodoro. Rto: 89%; IR (película delgada): ($\nu_{C\text{-}H}$) 2962 $cm^{-1}$, ($\nu_{COC\text{-}asim}$) 1257 $cm^{-1}$, ($\nu_{COC\text{-}sim}$) 1032 $cm^{-1}$; $^1$H-RMN ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 7.14 (1H, d, *J*=7.7 Hz, 3-$H_{Ar}$), 6.79 (1H, d, *J*=7.7 Hz, 4-$H_{Ar}$), 6.70 (1H, s, 6-$H_{Ar}$), 6.12 (1H, dddd, *J*=17.2, 10.5, 4.9, 1.7 Hz, H-C=), 5.48 (1H, dq, *J*=17.3, 1.7 Hz, =$CH_2$), 5.30 (1H, dq, *J*=10.6, 1.6 Hz, =$CH_2$), 4.58 (1H, t, *J*=1.6 Hz, -$CH_2$), 4.56 (1H, t, *J*=1.6 Hz, -$CH_2$), 3.37

(1H, sep, *J*=6,9 Hz, -CH), 2.35 (3H, s, $-CH_3$), 1.26 (6H, d, *J*=6.9 Hz, $-(CH_3)_2$); $^{13}$C-RMN ($CDCl_3$, 100 MHz): δ 155.6, 136.2, 134.3, 133.7, 125.9, 121.3, 116.6, 112.6, 68.7, 26.6, 22.8, 22.8, 21.3 ppm; CG-EM (EI, 70 eV), *m/z* (%): 190 ($M^{+\cdot}$, 76), 175 (100).

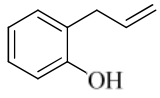
La **Tabla 2.1** presenta un resumen general de los compuestos **2a-e** sintetizados, purificados y caracterizados en la etapa I de la síntesis, con sus rendimientos y propiedades físicas.

**Tabla 2.1.** Resumen general de los alil-aril éteres sustituidos obtenidos mediante la reacción de éteres de Williamson.

| Comp. No. | Nombre | Fórmula condensada | P.M., (g/mol) | Relación EP:AE | Rto (%) | Características físicas |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **2a** | Alil-fenil-éter [130-133] | $C_9H_{10}O$ | 134.18 | 80:1 | 80 | Aceite incoloro, olor fuerte |
| **2b** | 4-Aliloxi-benzaldehído | $C_{10}H_{10}O_2$ | 162.19 | 50:1 | 76 | Aceite incoloro, olor fuerte |
| **2c** | 2-Aliloxi-1-metoxi-benceno [134,135] | $C_{10}H_{12}O_2$ | 164.20 | 70:1 | 96 | Aceite incoloro e inodoro |
| **2d** | 3-Aliloxi-4-metoxi-benzaldehído [10,136,137] | $C_{11}H_{12}O_3$ | 192.21 | 2:1 | 85 | Aceite rosado, translúcido e inodoro |
| **2e** | 1-Aliloxi-2-isopropil-5-metil-benceno | $C_{13}H_{18}O$ | 190.28 | 90:1 | 89 | Aceite incoloro e inodoro |

Rto: Rendimiento

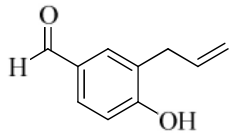
**2.5.5 Etapa II. Transposición de Claisen de alil-aril éteres sustituidos.** Protocolo general. La solución del alil-aril éter (5-8 mmoles) en 1,2-diclorobenceno (DCB) (20-50 mL) fue calentada a reflujo durante 10-40 h (control TLC). Seguidamente, se destiló el 1,2-DCB. El producto crudo fue purificado por cromatografía en columna sobre gel de sílice (EP:AE – 10:1-90:1), obteniéndose los compuestos deseados (**3a-e**).




**3a – 2-Alil fenol**

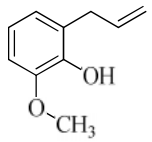
1.0 g (7.5 mmoles) de alil-fenil éter (**2a**) se calentaron a reflujo con 20 mL de 1,2-DCB durante 40 h. El producto crudo fue purificado por CC con mezcla EP:AE 90:1, obteniéndose 0.6 g (4.1 mmol) de **3a** como un aceite amarillo translúcido y con olor característico. Rto: 55%; IR (película delgada): ($\nu_{OH}$) 3530 $cm^{-1}$, ($\nu_{=C-H}$) 3070 $cm^{-1}$, ($\nu_{-CH2-}$) 2838 $cm^{-1}$, ($\nu_{C-O}$) 1275 $cm^{-1}$; $^1$H-RMN ($CDCl_3$, 400

MHz): δ 7.15 (1H, t, *J*=7.6 Hz, 5-$H_{Ar}$), 7.13 (1H, d, *J*=7.6 Hz, 3-$H_{Ar}$), 6.90 (1H, t, *J*=7.5 Hz, 4-$H_{Ar}$), 6.82 (1H, d, *J*=7.8 Hz, 6-$H_{Ar}$), 6.04 (1H, dddd, *J*=17.0, 9.6, 6.3, 1.8 Hz, H-C=), 5.19 (1H, dq, *J*=6.1, 1.7 Hz, =$CH_2$), 5.15 (1H, t, *J*=1.6 Hz, =$CH_2$), 5.02 (1H, s, -OH), 3.45 (1H, t, -$CH_2$), 3.44 (1H, t, -$CH_2$); $^{13}$C-RMN ($CDCl_3$, 100 MHz): δ 154.1, 136.4, 130.4, 127.9, 125.3, 120.9, 116.4, 115.8, 35.1 ppm; CG-EM (EI, 70 eV), *m/z* (%): 134 ($M^{+\cdot}$, 100).



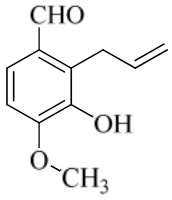
**<u>3b</u> – 3-Alil-4-hidroxi benzaldehído**

1.0 g (6.2 mmoles) de 4-aliloxi benzaldehído (**<u>2b</u>**) se calentaron a reflujo con 50 mL de 1,2-DCB durante 40 h. El producto crudo fue purificado por CC con mezcla EP:AE 10:1, obteniéndose 0.8 g (4.6 mmol) de **<u>3b</u>** como un sólido cristalino blanco. $P_f$: 61-62°C. Rto: 75%; IR (KBr): ($\nu_{OH}$) 3139 $cm^{-1}$, ($\nu_{-CH2-}$) 2838 $cm^{-1}$, ($\nu_{C-O}$) 1280 $cm^{-1}$; $^1$H-RMN ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 9.81 (1H, s, H-C=O), 7.71 (1H, s, 2-$H_{Ar}$), 7.69 (1H, dd, *J*=8.2, 2.0 Hz, 5-$H_{Ar}$), 7.48 (1H, m, -OH), 7.00 (1H, d, *J*=8.2 Hz, 6-$H_{Ar}$), 6.02 (1H, dddd, *J*=17.2, 9.4, 6.5, 2.0 Hz, H-C=), 5.18 (1H, s, =$CH_2$), 5.15-5.13 (1H, m, =$CH_2$), 3.48 (1H, s, -$CH_2$), 3.46 (1H, s, -$CH_2$); $^{13}$C-RMN ($CDCl_3$, 100 MHz): δ 192.1, 160.7, 135.5, 132.7, 131.0, 129.4, 127.1, 117.0, 116.1, 34.4 ppm; CG-EM (EI, 70 eV), *m/z* (%): 162 ($M^{+\cdot}$, 100).



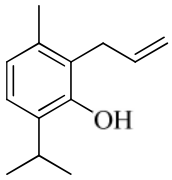
**<u>3c</u> – 2-Alil-6-metoxi fenol**

1.0 g (6.1 mmoles) de 2-aliloxi-1-metoxi benceno (**<u>2c</u>**) se calentaron a reflujo con 35 mL de 1,2-DCB durante 10 h. El producto crudo fue purificado por CC con mezcla EP:AE 90:1, obteniéndose 0.7 g (4.3 mmol)de **<u>3c</u>** como un aceite incoloro e inodoro. Rto: 70%; IR (película delgada): ($\nu_{OH}$) 3533 $cm^{-1}$, ($\nu_{=C-H}$) 3070 $cm^{-1}$, ($\nu_{-CH2-}$) 2838 $cm^{-1}$, ($\nu_{C-O}$) 1272 $cm^{-1}$; $^1$H-RMN ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 6.80 (1H, t, *J*=7.6 Hz, 4-$H_{Ar}$), 6.78-6.74 (2H, m, 3 y 5-$H_{Ar}$), 6.02 (1H, dddd, *J*=17.6, 10.2, 6.6, 1.5 Hz, H-C=), 5.70 (1H, s, -OH), 5.08 (1H, dq, *J*=14.8, 1.8 Hz, =$CH_2$), 5.05 (1H, dq, *J*=10.0, 1.4 Hz, =$CH_2$), 3.89 (3H, s, -$OCH_3$), 3.43 (1H, t, *J*=1.4 Hz, -$CH_2$), 3.41 (1H, t, *J*=1.4 Hz, -$CH_2$); $^{13}$C-RMN ($CDCl_3$, 100 MHz): δ 146.4, 143.4, 136.6, 125.8, 122.2, 119.4, 115.4, 108.6, 56.0, 33.8 ppm; CG-EM (EI, 70 eV), *m/z* (%): 164 ($M^{+\cdot}$, 100).




**<u>3d</u> – 2-Alil-3-hidroxi-4-metoxi benzaldehído**

1.0 g (5.2 mmoles) de 3-aliloxi-4-metoxi benzaldehído (**<u>2d</u>**) se calentaron a reflujo con 50 mL de 1,2-DCB durante 15 h. El producto crudo fue purificado por CC con mezcla EP:AE 10:1, obteniéndose 0.7 g (3.8 mmol) de **<u>3d</u>** como un sólido cristalino amarillo. $P_f$: 54-55°C. Rto: 74%; IR (KBr): ($\nu_{OH}$) 3533 $cm^{-1}$, ($\nu_{C=O}$) 1673 $cm^{-1}$, ($\nu_{C-O}$) 1280 $cm^{-1}$; $^1$H-RMN ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 10.01 (1H, s, H-C=O), 7.44 (1H, d, *J*=8.5 Hz, 5-$H_{Ar}$), 6.87 (1H, d, *J*=8.5 Hz, 6-$H_{Ar}$), 6.02 (1H, dddd, *J*=17.8, 10.5, 6.0, 1.1 Hz, H-C=), 5.94 (1H, s, -OH), 5.03-4.97 (2H, m, =$CH_2$), 3.96 (3H, s, -$OCH_3$), 3.89 (1H, s, -$CH_2$), 3.87 (1H, s, -$CH_2$); $^{13}$C-RMN ($CDCl_3$, 100 MHz): δ 191.4, 150.7, 143.8, 136.2, 128.2, 127.5, 125.4, 115.3, 108.1, 56.1, 28.3 ppm; CG-EM (EI, 70 eV), *m/z* (%): 192 ($M^{+\cdot}$, 54), 177 (100).




**<u>3e</u> – 2-Alil-6-isopropil-3-metil fenol**

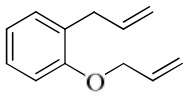
1.0 g (5.3 mmoles) de 1-aliloxi-2-isopropil-5-metil benceno (**<u>2e</u>**) se calentaron a reflujo con 40 mL de 1,2-DCB durante 30 h. El producto crudo fue purificado por CC con mezcla EP:AE 80:1, obteniéndose 0.5 g (2.7 mmol) de **<u>3e</u>** como un aceite amarillo translúcido e inodoro. Rto: 52%; IR (película delgada): □□$_{OH}$) 3564 $cm^{-1}$, □□$_{=C-H}$) 3070 $cm^{-1}$, ($\nu_{-CH2-}$) 2870 $cm^{-1}$, ($\nu_{C-O}$) 1265 $cm^{-1}$; $^1$H-RMN ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 7.05 (1H, d, *J*=7.8 Hz, 5-$H_{Ar}$), 6.81 (1H, d, *J*=7.8 Hz, 4-$H_{Ar}$), 6.02 (1H, dddd, *J*=17.0, 10.2, 5.9, 1.6 Hz, H-C=), 5.17-5.13 (2H, m, =$CH_2$), 4.98 (1H, s, -OH), 3.49 (1H, t, *J*=1.7 Hz, -$CH_2$), 3.48 (1H, t, *J*=1.7 Hz, -$CH_2$), 3.22 (1H, sep, *J*=6,9 Hz, -CH), 2.32 (3H, s, -$CH_3$), 1.29 (6H, d, *J*=6.9 Hz, -$(CH_3)_2$); $^{13}$C-RMN ($CDCl_3$, 100 MHz): δ 151.5, 135.6, 134.8, 132.3, 123.8, 123.1, 122.4, 115.9, 31.2, 27.0, 22.7, 22.7, 19.6 ppm; CG-EM (EI, 70 eV), *m/z* (%): 190 ($M^{+\cdot}$, 27), 175 (100).

La **Tabla 2.2** presenta un resumen general de los compuestos **<u>3a</u>-e** sintetizados, purificados y caracterizados en la etapa II de la síntesis, con sus rendimientos y características físicas.

**Tabla 2.2.** Resumen general de los 2-alil fenoles sustituidos obtenidos mediante la transposición de Claisen.

| Comp. No. | Nombre | Fórmula condensada | P.M., (g/mol) | Relación EP:AE | Rto (%) | Características físicas |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **3a** | 2-Alil-fenol [136] | $C_9H_{10}O$ | 134.18 | 90:1 | 55 | Aceite amarillo, translúcido y olor característico |
| **3b** | 3-Alil-4-hidroxi-benzaldehído | $C_{10}H_{10}O_2$ | 162.19 | 10:1 | 75 | Cristales blancos, $P_f$:61-62°C |
| **3c** | 2-Alil-6-metoxi-fenol [134,135,138] | $C_{10}H_{12}O_2$ | 164.20 | 90:1 | 70 | Aceite incoloro e inodoro |
| **3d** | 2-Alil-3-hidroxi-4-metoxi-benzaldehído [10,136,137,139,140] | $C_{11}H_{12}O_3$ | 192.21 | 10:1 | 74 | Cristales amarillos, $P_f$:54-55°C |
| **3e** | 2-Alil-6-isopropil-3-metil-fenol [141] | $C_{13}H_{18}O$ | 190.28 | 80:1 | 52 | Aceite amarillo, translúcido e inodoro |

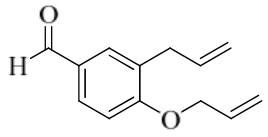
**2.5.6 Etapa III (a). *o*-Alilación de 2-alil fenoles sustituidos.** Protocolo general. Se colocaron 5-8 mmoles del 2-alil fenol de interés (**3a-e**), 16-22 mmoles de carbonato de potasio y 16-22 mmoles de bromuro de alilo en 20-50 mL de acetona y se sometieron a reflujo durante 12-15 h. Seguidamente, se destiló el solvente de reacción y se extrajo el compuesto de interés con diclorometano (3 x 50 mL). Los extractos orgánicos se recogieron sobre sulfato de sodio y éstos fueron rotoeovaporados para eliminar el solvente de extracción. Los productos crudos fueron purificados por cromatografía en columna sobre gel de sílice (EP:AE – 2:1-80:1), obteniéndose los respectivos compuestos (**4a-e**).



**4a – 2-Alil-1-aliloxi benceno**

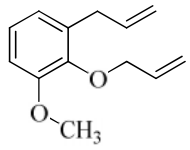
1.0 g (7.5 mmoles) de 2-alil fenol (**3a**) junto con 3.1 g (22.4 mmoles) de $K_2CO_3$ y 2.7 g (22.4 mmoles) de bromuro de alilo se sometieron a reflujo con acetona anhidra durante 12 h. El producto crudo fue purificado por CC con mezcla EP:AE 10:1, obteniéndose 1.1 g (6.3 mmol) de **4a** como un aceite incoloro con olor característico. Rto**:** 88%; IR (película delgada): ($\nu_{=C-H}$) 3077 $cm^{-1}$, ($\nu_{COC\text{-}asim}$) 1241 $cm^{-1}$, ($\nu_{COC\text{-}sim}$) 1015 $cm^{-1}$; $^1$H-RMN ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 7.19 (1H, t, 5-$H_{Ar}$), 7.17 (1H, d, *J*=7.9 Hz, 3-$H_{Ar}$), 6.92 (1H, t, *J*=7.4 Hz, 4-$H_{Ar}$), 6.86 (1H, d, *J*=8.0 Hz, 6-$H_{Ar}$), 6.13-6.05 (1H, m, H-C=)$_{aliloxi}$, 6.04-5.99 (1H, m, H-C=)$_{alil}$, 5.44 (1H, dq, *J*=17.3, 1.6 Hz, =$CH_{2A}$)$_{aliloxi}$, 5.28 (1H, dq, *J*=10.6, 1.4 Hz, =$CH_{2B}$)$_{aliloxi}$, 5.12-5.07 (1H, m, =$CH_2$)$_{alil}$, 5.06-5.04 (1H, m, =$CH_2$)$_{alil}$, 4.57 (1H, t, *J*=1.6 Hz, -$CH_2$)$_{aliloxi}$,

4.56 (1H, t, *J*=1.6 Hz, -$CH_2$)$_{aliloxi}$, 3.45 (1H, s, -$CH_2$)$_{alil}$, 3.44 (1H, s, -$CH_2$)$_{alil}$; $^{13}$C-RMN ($CDCl_3$, 100 MHz): δ 156.2, 137.0, 133.5, 129.8, 129.0, 127.2, 120.7, 116.8, 115.4, 111.7, 68.7, 34.4 ppm; CG-EM (EI, 70 eV), *m/z* (%): 174 ($M^{+\cdot}$, 50), 133 (100).



**<u>4b</u> – 3-Alil-4-aliloxi benzaldehído**

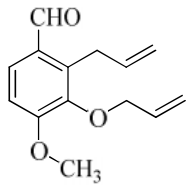
1.0 g (6.2 mmoles) de 3-alil-4-hidroxi benzaldehído (**<u>3b</u>**) junto con 2.6 g (18.5 mmoles) de $K_2CO_3$ y 2.2 g (18.5 mmoles) de bromuro de alilo se sometieron a reflujo con acetona anhidra durante 12 h. El producto crudo fue purificado por CC con mezcla EP:AE 10:1, obteniéndose 0.9 g (4.6 mmol) de **<u>4b</u>** como un aceite amarillo translucido e inodoro. Rto: 74%; IR (película delgada): ($\nu_{=C-H}$) 3077 $cm^{-1}$, ($\nu_{C=O}$) 1689 $cm^{-1}$, ($\nu_{COC-asim}$) 1265 $cm^{-1}$, ($\nu_{COC-sim}$) 995 $cm^{-1}$; $^1$H-RMN ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 9.86 (1H, s, H-C=O), 7.72 (1H, dd *J*=8.3, *J*=2.1 Hz, 5-$H_{Ar}$), 7.70 (1H, s, 2-$H_{Ar}$), 6.93 (1H, d, *J*=8.2 Hz, 6-$H_{Ar}$), 6.06 (1H, dddd, *J*=17.3, 10.2, 5.0, 1.6 Hz, H-C=)$_{aliloxi}$, 6.02-5.94 (1H, m, H-C=)$_{alil}$, 5.44 (1H, dq, *J*=17.3, 1.6 Hz, =$CH_2$)$_{aliloxi}$, 5.31 (1H, dq, *J*=10.6, 1.4 Hz, =$CH_2$)$_{aliloxi}$, 5.11 (1H, dq, *J*=7.5, 1.6 Hz, =$CH_2$)$_{alil}$, 5.08 (1H, t, *J*=1.4 Hz, =$CH_2$)$_{alil}$, 4.64 (1H, t, *J*=1.6 Hz, -$CH_2$)$_{aliloxi}$, 4.63 (1H, t, *J*=1.6 Hz, -$CH_2$)$_{aliloxi}$, 3.46 (1H, s, -$CH_2$)$_{alil}$, 3.44 (1H, s, -$CH_2$)$_{alil}$; $^{13}$C-RMN ($CDCl_3$, 100 MHz): δ 191.0, 161.2, 135.7, 132.4, 131.0, 130.7, 129.8, 129.7, 117.7, 116.4, 111.2, 68.9, 34.2 ppm; CG-EM (EI, 70 eV), *m/z* (%): 202 ($M^{+\cdot}$, 36), 41 (100).



**<u>4c</u> – 2-Alil-1-aliloxi-6-metoxi benceno**

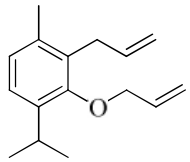
1.0 g (6.1 mmoles) de *o*-eugenol (**<u>3c</u>**) junto con 2.6 g (18.3 mmoles) de $K_2CO_3$ y 2.2 g (18.3 mmoles) de bromuro de alilo se sometieron a reflujo con acetona anhidra durante 12 h. El producto crudo fue purificado por CC con mezcla EP:AE 60:1, obteniéndose 1.1 g (5.6 mmol) de **<u>4c</u>** como un aceite incoloro e inodoro. Rto: 91%; IR (película delgada): ($\nu_{=C-H}$) 3077 $cm^{-1}$, ($\nu_{COC-asim}$) 1272 $cm^{-1}$, ($\nu_{COC-sim}$) 1079 $cm^{-1}$; $^1$H-RMN ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 7.00 (1H, t, *J*=8.1 Hz, 4-$H_{Ar}$), 6.80 (1H, q, *J*=1.5 Hz, 3-$H_{Ar}$), 6.78 (1H, q, *J*=1.5 Hz, 5-$H_{Ar}$), 6.10 (1H, dddd, *J*=17.5, 10.4, 5.7, 1.0 Hz, H-C=)$_{aliloxi}$, 5.97 (1H, dddd, *J*=17.5, 10.1, 6.6, 1.5 Hz, H-C=)$_{alil}$, 5.37 (1H, dq, *J*=17.2, 1.6 Hz, =$CH_2$)$_{aliloxi}$, 5.22 (1H, dq, *J*=10.4, 1.4 Hz, =$CH_2$)$_{aliloxi}$, 5.07 (1H, dq, *J*=11.5, 1.7 Hz, =$CH_2$)$_{alil}$, 5.04-5.02 (1H, m, =$CH_{2B}$)$_{alil}$,

4.49 (1H, t, *J*=1.4 Hz, -$CH_2$)$_{aliloxi}$, 4.48 (1H, t, *J*=1.4 Hz, -$CH_2$)$_{aliloxi}$, 3.85 (3H, s, -$OCH_3$), 3.44 (1H, t, *J*=1.3 Hz, -$CH_2$)$_{alil}$, 3.42 (1H, t, *J*=1.3 Hz, -$CH_2$)$_{alil}$,; $^{13}$C-RMN ($CDCl_3$, 100 MHz): δ 152.8, 145.8, 137.3, 134.5, 134.2, 123.8, 121.9, 117.1, 115.5, 110.4, 73.7, 55.7, 34.2 ppm; CG-EM (EI, 70 eV), *m/z* (%): 204 ($M^{+\cdot}$, 27), 103 (100).




**<u>4d</u> – 2-Alil-3-aliloxi-4-metoxi benzaldehído**

1.0 g de 2-alil-3-hidroxi-4-metoxi benzaldehído (**<u>3d</u>**) (5.2 mmoles) junto con 2.2 g de $K_2CO_3$ (15.6 mmoles) y 1.9 g de bromuro de alilo (15.6 mmoles) se sometieron a reflujo con acetona anhidra durante 8 h. El producto crudo fue purificado por CC con mezcla EP:AE 5:1, obteniéndose 1.3 g de **<u>4d</u>** (6.6 mmol) como un aceite amarillo, translúcido e inodoro. Rto: 91%; IR (película delgada): ($\nu_{=C-H}$) 3065 $cm^{-1}$, ($\nu_{C=O}$) 1681 $cm^{-1}$, ($\nu_{COC-asim}$) 1272 $cm^{-1}$, ($\nu_{COC-sim}$) 1054 $cm^{-1}$; $^1$H-RMN ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 10.04 (1H, s, H-C=O), 7.64 (1H, d, *J*=8.6 Hz, 5-$H_{Ar}$), 6.91 (1H, d, *J*=8.6 Hz, 6-$H_{Ar}$), 6.08 (1H, dddd, *J*=17.5, *J*=10.4, *J*=5.7, *J*=1.0 Hz, H-C=)$_{aliloxi}$, 6.00 (1H, dddd, *J*=17.5, 10.2, 5.8, 1.1 Hz, H-C=)$_{alil}$, 5.37 (1H, dq, *J*=17.2, 1.6 Hz, =$CH_2$)$_{aliloxi}$, 5.23 (1H, dq, *J*=10.4, 1.3 Hz, =$CH_2$)$_{aliloxi}$, 5.00 (1H, dq, *J*=10.2, 1.6 Hz, =$CH_2$)$_{alil}$, 4.90 (1H, dq, *J*=17.1, 1.7 Hz, =$CH_2$)$_{alil}$, 4.46 (1H, t, *J*=1.4 Hz, -$CH_2$)$_{aliloxi}$, 4.45 (1H, t, *J*=1.4 Hz, -$CH_2$)$_{aliloxi}$, 3.92 (3H, s, -$OCH_3$), 3.87 (1H, t, *J*=1.7 Hz, -$CH_2$)$_{alil}$, 3.86 (1H, t, *J*=1.7 Hz, -$CH_2$)$_{alil}$,; $^{13}$C-RMN ($CDCl_3$, 100 MHz): δ 190.9, 157.5, 146.0, 137.0, 136.3, 133.8, 128.9, 127.9, 117.5, 115.6, 109.8, 73.9, 55.8, 28.8 ppm; CG-EM (EI, 70 eV), *m/z* (%): 232 ($M^{+\cdot}$, 16), 103 (100).




**<u>4e</u> – 2-Alil-1-aliloxi-6-isopropil-3-metil benceno**

1.0 g (5.3 mmoles) de 2-alil-6-isopropil-3-metil fenol (**<u>3e</u>**) junto con 2.2 g (15.8 mmoles) de $K_2CO_3$ y 1.9 g (15.8 mmoles) de bromuro de alilo se sometieron a reflujo con acetona anhidra durante 12 h. El producto crudo fue purificado por CC con EP, obteniéndose0.8 g (6.7 mmol) de **<u>4e</u>** como un aceite incoloro e inodoro. Rto: 70%; IR (película delgada): ($\nu_{=C-H}$) 3077 $cm^{-1}$, ($\nu_{C-H}$) 2962 $cm^{-1}$, ($\nu_{COC-asim}$) 1257 $cm^{-1}$, ($\nu_{COC-sim}$) 995 $cm^{-1}$; $^1$H-RMN ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 7.10 (1H, d, *J*=7.9 Hz, 5-$H_{Ar}$), 6.97 (1H, d, *J*=7.9 Hz, 4-$H_{Ar}$), 6.13 (1H, dddd, *J*=17.5, 10.5, 5.3, 1.4 Hz, H-C=)$_{aliloxi}$, 5.99 (1H, dddd, *J*=17.5, 10.2, 5.7, 1.3

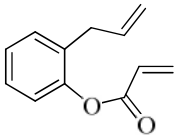
Hz, H-C=)$_{alil}$, 5.48 (1H, dq, *J*=17.2, 1.7 Hz, =$CH_2$)$_{aliloxi}$, 5.29 (1H, dq, *J*=10.5, 1.5 Hz, =$CH_2$)$_{aliloxi}$, 5.04 (1H, dq, *J*=10.2, 1.8 Hz, =$CH_2$)$_{alil}$, 4.96 (1H, dq, *J*=17.1, 1.9 Hz, =$CH_2$)$_{alil}$, 4.32 (1H, t, *J*=1.5 Hz, -$CH_2$)$_{aliloxi}$, 4.31 (1H, t, *J*=1.5 Hz, -$CH_2$)$_{aliloxi}$, 3.50 (1H, t, *J*=1.8 Hz, -$CH_2$)$_{alil}$, 3.48 (1H, t, *J*=1.8 Hz, -$CH_2$)$_{alil}$, 3.32 (1H, sep., *J*=6,9 Hz, -CH), 2.29 (3H, s, -$CH_3$), 1.25 (6H, d, *J*=6.9 Hz, -$(CH_3)_2$); $^{13}$C-RMN ($CDCl_3$, 100 MHz): δ 154.6, 139.4, 136.6, 135.8, 134.1, 131.1, 126.2, 124.3, 116.6, 114.9, 75.2, 31.3, 26.4, 24.1, 24.1, 19.2 ppm; CG-EM (EI, 70 eV), *m/z* (%): 230 ($M^{+\cdot}$, 16), 41 (100).

La **Tabla 2.3** presenta un resumen general de los compuestos **4a-e** sintetizados, purificados y caracterizados en la etapa III(a) de la síntesis, con sus rendimientos y características físicas.

**Tabla 2.3.** Resumen general de los 2-alil-1-aliloxi bencenos sustituidos obtenidos mediante la síntesis de éteres de Williamson.

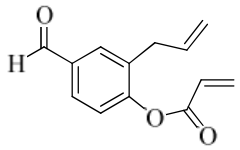
| Comp. No. | Nombre | Fórmula condensada | P.M., (g/mol) | Relación EP:AE | Rto (%) | Características físicas |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **4a** | 2-Alil-1-aliloxi-benceno | $C_{12}H_{14}O$ | 174.24 | 10:1 | 88 | Aceite incoloro, olor fuerte |
| **4b** | 3-Alil-4-aliloxi-benzaldehído | $C_{13}H_{14}O_2$ | 202.25 | 10:1 | 74 | Aceite amarillo, translúcido e inodoro |
| **4c** | 2-Alil-1-aliloxi-6-metoxi-benceno | $C_{13}H_{16}O_2$ | 204.26 | 60:1 | 91 | Aceite incoloro e inodoro |
| **4d** | 2-Alil-3-aliloxi-4-metoxi-benzaldehído [142] | $C_{14}H_{16}O_3$ | 232.28 | 5:1 | 91 | Aceite amarillo, translúcido e inodoro |
| **4e** | 2-Alil-1-aliloxi-6-isopropil-3-metil-benceno | $C_{16}H_{22}O$ | 230.35 | Éter | 70 | Aceite incoloro e inodoro |

**2.5.7 Etapa III (b). *o*-Acilación de 2-alil fenoles sustituidos.** Se colocaron 5-8 mmoles del 2-alil-fenol de interés (**3a-e**), 10-18 mmoles de trietilamina y 16-18 mmoles de cloruro de acriloilo en 40 mL de tolueno y se sometieron a agitación durante 2-4 h, en un baño de hielo (-5°C). Seguidamente, se neutralizó la reacción, con bicarbonato de sodio al 20% y se extrajo el compuesto de interés con diclorometano (3 x 10 mL). Los extractos orgánicos se recogieron sobre sulfato de sodio y fueron rotoeovaporados para eliminar el solvente de extracción y reacción. Los productos crudos fueron purificados por cromatografía en columna sobre gel de sílice (EP:AE – 2:1-60:1), obteniéndose los respectivos compuestos (**5a-e**).



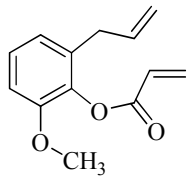
**5a – Acrilato de 2-alil fenilo**

1.0 g (7.5 mmoles) de 2-alil fenol (**3a**) junto con 1.5 g (14.9 mmoles) de $NEt_3$ y 2.0 g (22.3 mmoles) de cloruro de acriloilo se agitaron con tolueno durante 2 h. El producto crudo fue purificado por CC con mezcla EP:AE 30:1, obteniéndose 1.2 g de **5a** (6.1 mmol) como un aceite viscoso e incoloro. Rto: 82%; IR (película delgada): ($\nu_{=C-H}$) 3077 $cm^{-1}$, ($\nu_{-CH2-}$) 2861 $cm^{-1}$, ($\nu_{C=O}$) 1751 $cm^{-1}$, ($\nu_{CO-O-}$) 1149 $cm^{-1}$; $^1$H-RMN ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 7.28-7.16 (3H, m, 3, 4 y 5-$H_{Ar}$), 7.09-7.06 (1H, m, 6-$H_{Ar}$), 6.60 (1H, dd, *J*=17.3, 1.4 Hz, $=CH_2)_{acrilato}$, 6.33 (1H, dd, *J*=17.3, 10.4 Hz, H-C=)$_{acrilato}$, 6.01 (1H, dd, *J*=10.4, 1.4 Hz, $=CH_2)_{acrilato}$, 5.89 (1H, dddd, *J*=17.1, 9.5, 6.6, 1.8 Hz, H-C=)$_{alil}$, 5.07 (1H, td *J*=1.6, 0.6 Hz, $=CH_2)_{alil}$, 5.02 (1H, dq, *J*=6.2, 1.5 Hz, $=CH_2)_{alil}$, 3.32 (1H, t, *J*=2.0 Hz, $-CH_2$), 3.29 (1H, t, *J*=2.0 Hz, $-CH_2$); $^{13}$C-RMN ($CDCl_3$, 100 MHz): δ 164.4, 148.8, 135.8, 132.5, 132.0, 130.4, 127.8, 127.4, 126.2, 122.3, 116.2, 34.6 ppm; CG-EM (EI, 70 eV), *m/z* (%): 188 ($M^{+\cdot}$, 6), 55 (100).



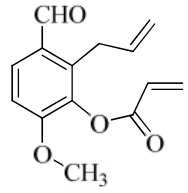
**5b – Acrilato de 2-alil-4-formil fenilo**

1.0 g (6.2 mmoles) de 3-alil-4-hidroxi benzaldehído (**3b**) con 1.9 g (18.5 mmoles) de $NEt_3$ y 1.7 g (18.5 mmoles) de cloruro de acriloilo se agitaron con tolueno durante 3 h. El producto crudo fue purificado por CC con mezcla EP:AE 50:1, obteniéndose 1.1 g (4.9 mmol) de **5b** como un aceite viscoso e incoloro. Rto: 80%; IR (película delgada): ($\nu_{=C-H}$) 3077 $cm^{-1}$, ($\nu_{-CH2-}$) 2831 $cm^{-1}$, ($\nu_{C=O}$) 1743 $cm^{-1}$, ($\nu_{CO-O-}$) 1149 $cm^{-1}$; $^1$H-RMN ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 9.97 (1H, s, H-C=O), 7.80 (1H, s, 3-$H_{Ar}$), 7.79 (1H, dd, *J*=8.1, 2.1 Hz, 5-$H_{Ar}$), 7.28 (1H, d, *J*=8.1 Hz, 6-$H_{Ar}$), 6.64 (1H, dd, *J*=17.3, 1.1 Hz, $=CH_2)_{acrilato}$, 6.34 (1H, dd, *J*=17.3, 10.5 Hz, H-C=)$_{acrilato}$, 6.07 (1H, dd, *J*=10.5, 1.1 Hz, $=CH_2)_{acrilato}$, 5.89 (1H, dddd, *J*=17.5, 10.1, 6.6, 1.5 Hz, H-C=)$_{alil}$, 5.11 (1H, dq, *J*=9.5, 1.4 Hz, $=CH_2)_{alil}$, 5.08 (1H, dq, *J*=16.9, 1.6 Hz, $=CH_2)_{alil}$, 3.38 (1H, t, $-CH_2$), 3.36 (1H, t, $-CH_2$); $^{13}$C-RMN ($CDCl_3$, 100 MHz): δ 191.1, 163.6, 153.5, 134.7, 134.3, 133.4, 133.3, 131.8, 129.2, 127.2, 123.2, 117.2, 34.4 ppm; CG-EM (EI, 70 eV), *m/z* (%): 216 ($M^{+\cdot}$, 3), 55 (100).



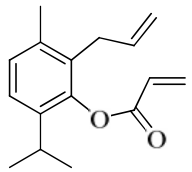
**<u>5c</u> – Acrilato de 2-alil-6-metoxi fenilo**

1.0 g (6.1 mmoles) de *o*-eugenol (**<u>3c</u>**) junto con 1.8 g (18.3 mmoles) de $NEt_3$ y 1.7 g (18.3 mmoles) de cloruro de acriloilo se agitaron con tolueno durante 2 h. El producto crudo fue purificado por CC con mezcla EP:AE 60:1, obteniéndose 1.1 g (4.9 mmol) de **<u>5c</u>** como un aceite incoloro con olor característico. Rto: 81%; IR (película delgada): ($\nu_{=C-H}$) 3077 $cm^{-1}$, ($\nu_{-CH2-}$) 2838 $cm^{-1}$, ($\nu_{C=O}$) 1743 $cm^{-1}$, ($\nu_{CO-O-}$) 1157 $cm^{-1}$; $^1$H-RMN ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 7.16 (1H, t, *J*=8.0 Hz, 4-$H_{Ar}$), 6.87 (1H, dd, *J*=3.5 Hz, 3-$H_{Ar}$), 6.85 (1H, dd, *J*=4.1, 1.2 Hz, 5-$H_{Ar}$), 6.62 (1H, dd, *J*=17.3, 1.3 Hz, $=CH_2)_{acrilato}$, 6.37 (1H, dd, *J*=17.3, 10.4 Hz, H-C=)$_{acrilato}$, 6.02 (1H, dd, *J*=10.4, 1.3 Hz, $=CH_2)_{acrilato}$, 5.89 (1H, dddd, *J*=17.5, 10.3, 6.6, 1.4 Hz, H-C=)$_{alil}$, 5.07 (1H, dq, *J*=8.6, 1.6 Hz, $=CH_2)_{alil}$, 5.04 (1H, t, *J*=1.4 Hz, $=CH_2)_{alil}$, 3.81 (3H, s, $-OCH_3$), 3.31 (1H, t, $-CH_2$), 3.29 (1H, t, $-CH_2$); $^{13}$C-RMN ($CDCl_3$, 100 MHz): δ 163.7, 151.3, 137.9, 135.8, 133.4, 132.4, 127.5, 126.4, 121.7, 116.1, 110.3, 55.9, 34.5 ppm; CG-EM (EI, 70 eV), *m/z* (%): 218 ($M^{+\cdot}$, 19), 55 (100).



**<u>5d</u> – Acrilato de 2-alil-3-formil-6-metoxi fenilo**

1.0 g (5.2 mmoles) de 2-alil-3-hidroxi-4-metoxi benzaldehído (**<u>3d</u>**) junto con 1.1 g (10.4 mmoles) de $NEt_3$ y 1.4 g (15.6 mmoles) de cloruro de acriloilo se agitaron con tolueno durante 3 h. El producto crudo fue purificado por CC con mezcla EP:AE 2:1, obteniéndose 0.9 g (3.6 mmol) de **<u>5d</u>** como un aceite altamente viscoso blanco. Rto: 70%; IR (película delgada): ($\nu_{=C-H}$) 3077 $cm^{-1}$, ($\nu_{-CH2-}$) 2846 $cm^{-1}$, ($\nu_{C=O}$) 1751 $cm^{-1}$, ($\nu_{CO-O-}$) 1288 $cm^{-1}$, ($\nu_{O-C=C}$) 1157 $cm^{-1}$; $^1$H-RMN ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 10.07 (1H, s, H-C=O), 7.77 (1H, d, *J*=8.6, Hz, 4-$H_{Ar}$), 6.98 (1H, d, *J*=8.6 Hz, 5-$H_{Ar}$), 6.62 (1H, dd, *J*=17.3, 1.2 Hz, $=CH_2)_{acrilato}$, 6.36 (1H, dd, *J*=17.2, 10.5 Hz, H-C=)$_{acrilato}$, 6.05 (1H, dd, *J*=10.5, 1.2 Hz, $=CH_2)_{acrilato}$, 5.90 (1H, dddd, *J*=17.1, 10.2, 6.1, 1.5 Hz, H-C=)$_{alil}$, 5.00 (1H, dq, *J*=10.1, 1.5 Hz, $=CH_2)_{alil}$, 4.95 (1H, dq, *J*=17.1, 1.7 Hz, $=CH_2)_{alil}$, 3.88 (3H, s, $-OCH_3$), 3.75 (1H, s, $-CH_2$), 3.73 (1H, s, $-CH_2$); $^{13}$C-RMN ($CDCl_3$, 100 MHz): δ 190.4, 163.3, 155.8, 138.5, 135.7, 135.3, 133.0, 131.9, 127.7, 127.1, 116.2, 109.8, 56.1, 29.3 ppm; CG-EM (EI, 70 eV), *m/z* (%): 246 ($M^{+\cdot}$, 3), 55 (100).



**5e – Acrilato de 2-alil-6-isopropil-3-metil fenilo**

1.0 g (5.3 mmoles) de 2-alil-6-isopropil-3-metil fenol (**3e**) junto con 1.6 g (15.8 mmoles) de $NEt_3$ y 1.4 g (15.8 mmoles) de cloruro de acriloilo se agitaron con tolueno durante 4 h. El producto crudo fue purificado por CC con mezcla EP:AE 20:1, obteniéndose 1.0 g (4.0 mmol) de **5e** como un aceite amarillo, translúcido, con olor característico. Rto: 75%; IR (película delgada): ($\nu_{=C-H}$) 3077 $cm^{-1}$, ($\nu_{C=O}$) 1743 $cm^{-1}$, ($\nu_{CO-O-}$) 1157 $cm^{-1}$; $^1$H-RMN ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 7.14 (1H, d, *J*=7.9 Hz, 5-$H_{Ar}$), 7.08 (1H, d, *J*=8.0 Hz, 4-$H_{Ar}$), 6.64 (1H, dd, *J*=17.3, 1.3 Hz, $=CH_2)_{acrilato}$, 6.38 (1H, dd, *J*=17.3, 10.4 Hz, H-C=)$_{acrilato}$, 6.04 (1H, dd, *J*=10.4, 1.3 Hz, $=CH_2)_{acrilato}$, 5.82 (1H, dddd, *J*=17.1, 10.2, 6.2, 1.6 Hz, H-C=)$_{alil}$, 5.00 (1H, dq, *J*=9.6, 1.6 Hz, $=CH_2)_{alil}$, 4.97 (1H, dq, *J*=16.9, 1.8 Hz, $=CH_2)_{alil}$, 3.28-3.26 (2H, bs, $-CH_2$), 2.88 (1H, sep, *J*=6,9 Hz, -CH), 2.31 (3H, s, $-CH_3$), 1.20 (6H, d, *J*=6.9 Hz, $-(CH_3)_2$); $^{13}$C-RMN ($CDCl_3$, 100 MHz): δ 164.6, 146.6, 138.2, 135.7, 135.1, 132.4, 130.0, 128.3, 127.8, 124.2, 115.4, 31.9, 27.4, 23.1, 23.1, 19.2 ppm; CG-EM (EI, 70 eV), *m/z* (%): 244 ($M^{+\cdot}$, 9), 55 (100).

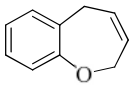
La **Tabla 2.4** presenta un resumen general de los compuestos **5a-e** sintetizados, purificados y caracterizados en la etapa III(b) de la síntesis, con sus rendimientos y características físicas.

**Tabla 2.4.** Resumen general de los acrilatos de 2-alil-fenilo sustituidos obtenidos mediante la síntesis modificada de Schotten-Baumann.

| Comp. No. | Nombre | Fórmula condensada | P.M., (g/mol) | Relación EP:AE | Rto (%) | Características físicas |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **5a** | Acrilato de 2-alil-fenilo | $C_{12}H_{12}O_2$ | 188.22 | 30:1 | 82 | Aceite viscoso, incoloro |
| **5b** | Acrilato de 2-alil-4-formil-fenilo | $C_{13}H_{12}O_3$ | 216.23 | 50:1 | 80 | Aceite viscoso, incoloro |
| **5c** | Acrilato de *o*-eugenilo | $C_{13}H_{14}O_3$ | 218.25 | 60:1 | 81 | Aceite incoloro, olor particular |
| **5d** | Acrilato de 2-alil-3-formil-6-metoxi-fenilo | $C_{14}H_{14}O_4$ | 246.26 | 2:1 | 70 | Aceite viscoso, blancuzco |
| **5e** | Acrilato de 2-alil-6-isopropil-3-metil-fenilo | $C_{16}H_{20}O_2$ | 244.33 | 20:1 | 75 | Aceite amarillo, translúcido, olor característico |

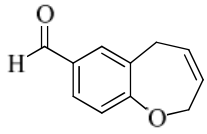
**2.5.8 Etapa IV (a). Metátesis con cierre de anillo para los 2-alil-1-aliloxi bencenos sustituidos.** Se colocaron 1-3 mmol del alil-aliloxi-benceno y 2-5% en mol del catalizador de Grubbs (1ª generación) en 20 mL de benceno y se sometieron a

agitación durante 12-24 h (control TLC) en atmósfera inerte. Seguidamente, se realizó columna de limpieza y el extracto final fue rotoeovaporado para eliminar el disolvente. Los productos crudos fueron purificados por cromatografía en columna sobre gel de sílice (EP:AE – 4:1-60:1), obteniéndose los respectivos compuestos (**6a-e**).



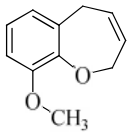
**6a – 2,5-Dihidro-1-benzoxepina**

0.5 g (2.9 mmoles) de 2-alil-1-aliloxi-benceno (**4a**) junto con el catalizador de Grubbs de 1ª generación al 2% mol se agitaron con benceno durante 12 h. El producto crudo fue purificado por CC con mezcla EP:AE 40:1, obteniéndose 0.3 g (2.1 mmol) de **6a** como un aceite incoloro e inodoro. Rto: 72%; IR (película delgada): ($\nu_{=C-H}$) 3023 $cm^{-1}$, ($\nu_{COC-asim}$) 1241 $cm^{-1}$, ($\nu_{COC-sim}$) 1103 $cm^{-1}$; $^1$H-RMN ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 7.24-7.16 (2H, m, 7 y 8-H), 7.09 (1H, d, *J*=7.4 Hz, 9-H), 7.05 (1H, d, *J*=7.0 Hz, 6-H), 5.84 (1H, dddd, *J*=13.4, 7.6, 2.2, 1.4 Hz, 3-H), 5.46 (1H, dsep, *J*=11.5, 4.6, 2.8, 1.5 Hz, 4-H), 4.59 (1H, t, *J*=2.4 Hz, 5-H), 4.58 (1H, t, *J*=2.5 Hz, 5-H), 3.49 (1H, q, *J*=2.2 Hz, 2-H), 3.48 (1H, q, *J*=2.2 Hz, 2-H); CG-EM (EI, 70 eV), *m/z* (%): 134 ($M^{+\cdot}$, 100).



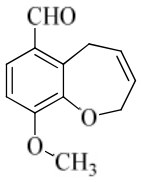
**6b – 2,5-Dihidro-1-benzoxepin-7-carbaldehído**

0.5 g (2.5 mmoles) de 3-alil-4-aliloxi-benzaldehído (**4b**) junto con el catalizador de Grubbs de 1ª generación al 5% mol se agitaron con benceno durante 24 h. El producto crudo fue purificado por CC con mezcla EP:AE 9:1, obteniéndose 0.3 g (2.0 mmol) de **6b** como un aceite incoloro. Rto: 80%; IR (película delgada): ($\nu_{=C-H}$) 3023 $cm^{-1}$, ($\nu_{CH2}$) 2854 $cm^{-1}$, ($\nu_{COC-asim}$) 1241 $cm^{-1}$, ($\nu_{COC-sim}$) 1110 $cm^{-1}$; $^1$H-RMN ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 9.91 (1H, s, H-C=O), 7.72 (1H, dd, *J*=8.2 2.1 Hz, 8-H), 7.63 (1H, sd, *J*=2.0 Hz, 6-H), 7.15 (1H, d, *J*=8.1 Hz, 9-H), 5.93 (1H, dddd, *J*=13.0, 7.4, 2.0, 1.3 Hz, 3-H), 5.55 (1H, dsep, *J*=11.4, *J*=4.9, 3.3, 1.6 Hz, 4-H), 4.67 (1H, t, *J*=2.1 Hz, 5-H), 4.65 (1H, t, *J*=2.0 Hz, 5-H), 3.57 (1H, q, *J*=1.9 Hz, 2-H), 3.56 (1H, q, *J*=1.8 Hz, 2-H); $^{13}$C-RMN ($CDCl_3$, 100 MHz): δ 191.2, 164.0, 135.9, 132.3, 130.5, 130.4, 127.0, 126.3, 109.9, 68.7, 34.1 ppm; CG-EM (EI, 70 eV), *m/z* (%): 174 ($M^{+\cdot}$, 100).



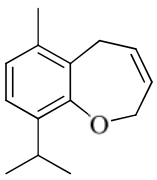
**6c – 9-Metoxi-2,5-dihidro-1-benzoxepina**

0.5 g de 2-alil-1-aliloxi-6-metoxi-benceno (**3c**) (2.4 mmoles) junto con el catalizador de Grubbs de 1ª generación al 3% mol se agitaron con benceno durante 12 h. El producto crudo fue purificado por CC con mezcla EP:AE 60:1, obteniéndose 0.4 g (2.0 mmol) de **6c** como un aceite incoloro e inodoro. Rto: 81%; IR (película delgada): ($\nu_{=C-H}$) 3016 $cm^{-1}$, ($\nu_{CH2}$) 2838 $cm^{-1}$, ($\nu_{COC-asim}$) 1265 $cm^{-1}$, ($\nu_{COC-sim}$) 1087 $cm^{-1}$; $^1$H-RMN ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 6.96 (1H, t, *J*=7.9 Hz, 7-H), 6.81 (1H, dd, *J*=8.2, 1.4 Hz, 8-H), 6.69 (1H, dd, *J*=7.6, 1.4 Hz, 6-H), 5.83 (1H, dddd, *J*=13.2, 7.7, 2.3, 1.6 Hz, 3-H), 5.46 (1H, dsep, *J*=11.5, 4.4, 2.8, 1.6 Hz, 4-H), 4.60 (1H, t, *J*=2.4 Hz, 5-H), 4.59 (1H, t, *J*=2.5 Hz, 5-H), 3.85 (3H, s, -$OCH_3$), 3.47 (1H, q, *J*=2.2 Hz, 2-H), 3.46 (1H, q, *J*=2.2 Hz, 2-H); $^{13}$C-RMN ($CDCl_3$, 100 MHz): δ 152.2, 147.0, 138.1, 127.5, 125.5, 124.0, 120.5, 110.6, 70.4, 55.9, 31.4 ppm; CG-EM (EI, 70 eV), *m/z* (%): 176 ($M^{+\cdot}$, 100).



**6d – 9-Metoxi-2,5-dihidro-1-benzoxepin-6-carbaldehído**

0.5 g (2.2 mmoles) de 2-alil-3-aliloxi-4-metoxi-benzaldehído (**3d**) junto con el catalizador de Grubbs de 1ª generación al 5% mol se agitaron con benceno durante 18 h. El producto crudo fue purificado por CC con mezcla EP:AE 4:1, obteniéndose 0.4 g (2.0 mmol) de **6d** como un sólido cristalino blanco. $P_f$: 73-74°C. Rto: 94%; IR (KBr): ($\nu_{=C-H}$) 3016 $cm^{-1}$, ($\nu_{CH}$) 2846 $cm^{-1}$, ($\nu_{COC-asim}$) 1288 $cm^{-1}$, ($\nu_{COC-sim}$) 1087 $cm^{-1}$; $^1$H-RMN ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 10.06 (1H, s, H-C=O), 7.56 (1H, d, *J*=8.6 Hz, 7-H), 6.94 (1H, d, *J*=8.6 Hz, 8-H), 5.88 (1H, dddd, *J*=13.8, 8.1, 2.4, 1.4 Hz, 3-H), 5.46 (1H, dsep, *J*=11.4, 4.0, 2.6, 1.4 Hz, 4-H), 4.62 (1H, t, *J*=2.4 Hz, 5-H), 4.60 (1H, t, *J*=2.4 Hz, 5-H), 4.07 (1H, q, *J*=1.8 Hz, 2-H), 4.05 (1H, q, *J*=1.8 Hz, 2-H), 3.94 (3H, s, -$OCH_3$); $^{13}$C-RMN ($CDCl_3$, 100 MHz): δ 191.3, 156.8, 147.3, 141.4, 130.7, 127.7, 126.3, 125.2, 109.7, 70.3, 55.9, 23.0 ppm; CG-EM (EI, 70 eV), *m/z* (%): 204 ($M^{+\cdot}$, 100).



**6e – 9-Isopropil-6-metil-2,5-dihidro-1-benzoxepina**

0.5 g (2.2 mmoles) de 2-alil-1-aliloxi-6-isopropil-3-metil-benceno (**3e**) junto con el catalizador de Grubbs de 1ª generación al 3% mol se agitaron con benceno durante 12 h. El producto crudo fue

purificado por CC con mezcla EP:AE 30:1, obteniéndose 0.3 g (1.6 mmol) de **6e** como un aceite incoloro e inodoro. Rto: 80%; IR (película delgada): 3016 $cm^{-1}$, ($\nu_{CH2}$) 2838 $cm^{-1}$, ($\nu_{COC\text{-}asim}$) 1288 $cm^{-1}$, ($\nu_{COC\text{-}sim}$) 1087 $cm^{-1}$; $^{1}$H-RMN ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 7.20 (1H, d, *J*=7.9 Hz, 8-$H_{Ar}$), 7.00 (1H, d, *J*=8.2 Hz, 7-$H_{Ar}$), 5.87 (1H, dddd, *J*=13.6, 8.0, 2.2, 1.3 Hz, 3-H), 5.43 (1H, dsep, *J*=11.2, 4.4, 2.8, 1.4 Hz, 4-H), 4.56 (1H, t, *J*=2.4 Hz, 5-H), 4.54 (1H, t, *J*=2.3 Hz, 5-H), 3.49 (1H, q, *J*=1.9 Hz, 2-H), 3.47 (1H, q, *J*=1.8 Hz, 2-H), 3.36 (1H, sep., *J*=6,8 Hz, -CH), 2.36 (3H, s, -$CH_3$), 1.22 (6H, d, *J*=6.8 Hz, -$(CH_3)_2$); $^{13}$C-RMN ($CDCl_3$, 100 MHz): δ 156.8, 138.7, 137.9, 137.2, 136.0, 130.8, 126.0, 124.9, 71.9, 31.3, 26.3, 24.1, 24.1, 20.2 ppm; CG-EM (EI, 70 eV), *m/z* (%): 202 ($M^{+\cdot}$, 64), 187 (100)

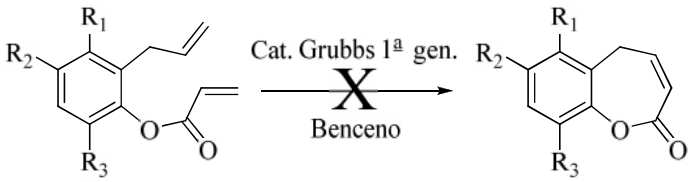
La **Tabla 2.5** presenta un resumen general de los compuestos **6a-e** sintetizados, purificados y caracterizados en la etapa IV(a) de la síntesis, con sus rendimientos y características físicas.

**Tabla 2.5.** Resumen general de las 2,5-dihidro-1-benzoxepinas sustituidas obtenidas mediante la reacción de metátesis con cierre de anillo.

| Comp. No. | Nombre | Fórmula condensada | P.M., (g/mol) | Relación EP:AE | Rto (%) | Características físicas |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **6a** | 2,5-Dihidro-1-benzoxepina [143,144] | $C_{10}H_{10}O$ | 146.19 | 40:1 | 72 | Aceite viscoso, amarillo |
| **6b** | 2,5-Dihidro-1-benzoxepin-7-carbaldehído | $C_{11}H_{10}O_2$ | 174.20 | 9:1 | 80 | |
| **6c** | 9-Metoxi-2,5-dihidro-1-benzoxepina | $C_{11}H_{12}O_2$ | 176.21 | 60:1 | 81 | Aceite incoloro, olor característico |
| **6d** | 9-Metoxi-2,5-dihidro-1-benzoxepin-6-carbaldehído | $C_{12}H_{12}O_3$ | 204.22 | 4:1 | 80 | Cristales blancos |
| **6e** | 9-Isopropil-6-metil-2,5-dihidro-1-benzoxepina | $C_{14}H_{18}O$ | 202.29 | 30:1 | 75 | Aceite amarillo, traslúcido |

**2.5.9 Etapa IV (b). Metátesis con cierre de anillo para los acrilatos de 2-alil fenilos sustituidos.** La preparación de 1-benzoxepin-2(*5H*)-onas mediante RCM no fue posible puesto que el catalizador de Grubbs de 1ª generación fue ineficaz para realizar la ciclación, por la interacción de éste con el grupo CO. El catalizador que

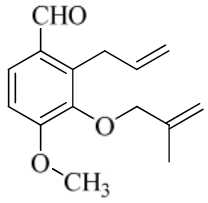
podría ser utilizado para este fin es el catalizador de Grubbs de 2ª generación que no está disponible comercialmente y su adquisición fue imposible.




a. $R_{1-3}$=H;
b. $R_{1,3}$=H, $R_2$=CHO;
c. $R_{1,2}$=H, $R_3$=$OCH_3$;
d. $R_1$=CHO, $R_2$=H, $R_3$=$OCH_3$;
e. $R_1$=$CH_3$, $R_2$=H, $R_3$=$(CH_3)_2CH$.

**Esquema 2.15.** Esquema general para la reacción de RCM de acrilatos de 2-alil fenilos.

**2.5.10 Otras posibilidades sintéticas: derivados de 3-metil-2,5-dihidro-1-benzoxepinas.** En vista de la limitante anterior, se realizó un experimento de prueba para ver la posibilidad de obtener compuestos metalilados y posterior ciclación por medio de RCM con el catalizador de Grubbs de 1ª generación.



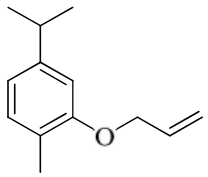
**<u>8d</u> – 2-Alil-4-metoxi-3-(2-metilaliloxi) benzaldehído**

1.0 g (5.2 mmoles) de 2-alil-3-hidroxi-4-metoxi benzaldehído (**<u>3d</u>**) junto con 0.6 g (15.6 mmoles) de NaH y 1.4 g (15.6 mmoles) de cloruro de metalilo se sometieron a reflujo en DMF anhidra durante 8 h. El producto crudo fue purificado por CC con mezcla EP:AE 10:1, obteniéndose 1.0 g (3.9 mmol) de **<u>8d</u>** como un aceite incoloro e inodoro. Rto: 80%; IR (película delgada): ($\nu_{=C-H}$) 3077 $cm^{-1}$, ($\nu_{CH3}$) 2977 $cm^{-1}$, ($\nu_{CH2-asim}$) 2923 $cm^{-1}$, ($\nu_{COC-asim}$) 1280 $cm^{-1}$, ($\nu_{COC-sim}$) 1087 $cm^{-1}$; $^1$H-RMN ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 10.07 (1H, s, H-C=O), 7.66 (1H, d, *J*=8.6 Hz, 4-$H_{Ar}$), 6.93 (1H, d, *J*=8.6 Hz, 5-$H_{Ar}$), 6.03 (1H, dddd, *J*=17.0, 11.6, 5.8, 1.4 Hz, H-C=)$_{alil}$, 5.14 (1H, bs, =$CH_2$)$_{met}$, 5.02 (1H, dq, *J*=10.2, 1.6 Hz, =$CH_2$)$_{alil}$, 4.98 (1H, bs, =$CH_2$)$_{met}$, 4.93 (1H, dq, *J*=17.1, 1.7 Hz, =$CH_2$)$_{alil}$, 4.34 (2H, s, -$CH_2$)$_{met}$, 3.93 (3H, s, -$OCH_3$), 3.89 (1H, t, *J*=1.7 Hz, -$CH_2$)$_{alil}$, 3.86 (1H, t, *J*=1.7 Hz, -$CH_2$)$_{alil}$, 1.88 (3H, s, -$CH_3$)$_{met}$; $^{13}$C-RMN ($CDCl_3$, 100 MHz): δ 191.0, 157.6, 146.2, 141.5, 137.1, 136.4, 129.0, 128.0, 115.6, 112.5, 109.8, 55.8, 28.8, 19.6, 19.6 ppm; CG-EM (EI, 70 eV), *m/z* (%): 246 ($M^{+\cdot}$, 2), 191 (100).

El compuesto **<u>8d</u>** se sometió a RCM de acuerdo con la metodología propuesta por Stefinovic y Snieckus [49]. Para lo cual se colocaron 0.1 mmol del **<u>8d</u>** y 25% en mol del catalizador de Grubbs (1ª generación) en 20 mL de tolueno y se sometieron a

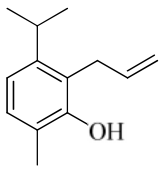
reflujo durante 36 h (control TLC) en atmósfera inerte. Seguidamente, se realizó columna de limpieza y el extracto final fue rotoeovaporado para eliminar el disolvente. El producto crudo fue purificado por cromatografía en columna sobre gel de sílice (EP:AE – 30:1), obteniéndose el compuesto **9d**, análogo de la radulanina.

**2.5.11 Aplicación de la ruta sintética de 2,5-dihidro-1-benzoxepina en un aceite esencial con alto contenido de carvacrol.** Las condiciones determinadas en la ruta sintética para la preparación de 2,5-dihidro-1-benzoxepinas se aplicó al aceite esencial (AE) de *Lippia origanoides* que contiene a carvacrol y timol como constituyentes principales (45 y 15%, respectivamente).



**2f – 1-Aliloxi-5-isopropil-2-metil benceno**

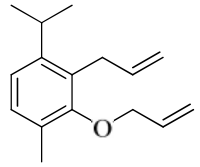
1.7 g de aceite esencial de *Lippia origanoides* (1 g (6.7 mmoles) de carvacrol (**1f**)) junto con 2.8 g (20.3 mmoles) de $K_2CO_3$ y 3.2 g (26.6 mmoles) de bromuro de alilo se sometieron a reflujo con acetona anhidra durante 18 h. El producto crudo fue purificado por CC con mezcla EP:AE 90:1, obteniéndose 1.3 g (6.7 mmol) de **2f** como un aceite incoloro e inodoro. Rto: 90%; IR (película delgada): ($\nu_{=C-H}$) 3077 $cm^{-1}$, ($\nu_{C-H}$) 2962 $cm^{-1}$, ($\nu_{COC-asim}$) 1257 $cm^{-1}$, ($\nu_{COC-sim}$) 1025 $cm^{-1}$; $^1$H-RMN ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 7.08 (1H, d, *J*=7.5 Hz, 3-$H_{Ar}$), 6.76 (1H, d, *J*=7.6 Hz, 4-$H_{Ar}$), 6.72 (1H, s, 6-$H_{Ar}$), 6.11 (1H, dddd, *J*=17.3, 10.5, 5.0, 1.7 Hz, H-C=), 5.46 (1H, dq, *J*=17.3, 1.7 Hz, =$CH_2$), 5.30 (1H, dq, *J*=10.5, 1.5 Hz, =$CH_2$), 4.58 (1H, t, *J*=1.4 Hz, -$CH_2$), 4.57 (1H, t, *J*=1.4 Hz, -$CH_2$), 2.88 (1H, sep, *J*=6,9 Hz, -CH), 2.24 (3H, s, -$CH_3$), 1.26 (6H, d, *J*=6.9 Hz, -$(CH_3)_2$); $^{13}$C-RMN ($CDCl_3$, 100 MHz): δ 156.7, 147.8, 133.8, 130.5, 124.2, 118.2, 116.8, 109.9, 68.7, 34.1, 24.1, 24.1, 15.8 ppm; CG-EM (EI, 70 eV), *m/z* (%): 190 ($M^{+\cdot}$, 100).



**3f – 2-Alil-3-isopropil-6-metil fenol**

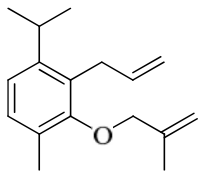
1.0 g (5.3 mmoles) de 1-aliloxi-5-isopropil-2-metil benceno (**2f**) se calentaron a reflujo con 40 mL de 1,2-DCB durante 40 h. El producto crudo fue purificado por CC con mezcla EP:AE 80:1, obteniéndose 0.5 g (2.7 mmol) de **3e** como un aceite amarillo translúcido e inodoro. Rto: 52%; IR (película delgada): ($\nu_{OH}$) 3563 $cm^{-1}$, ($\nu_{=C-H}$) 3077

$cm^{-1}$, ($\nu_{-CH2-}$) 2869 $cm^{-1}$, ($\nu_{C-O}$) 1187 $cm^{-1}$; $^1$H-RMN ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 7.04 (1H, d, *J*=7.9 Hz, 5-$H_{Ar}$), 6.84 (1H, d, *J*=7.9 Hz, 4-$H_{Ar}$), 6.03 (1H, dddd, *J*=17.9, 11.4, 5.7, 1.1 Hz, H-C=), 5.13 (1H, dq, *J*=10.1, 1.6 Hz, =$CH_2$), 5.08 (1H, dq, *J*=17.2, 1.8 Hz, =$CH_2$), 4.87 (1H, s, -OH), 3.52 (1H, t, *J*=1.6 Hz, -$CH_2$), 3.51 (1H, t, *J*=1.6 Hz, -$CH_2$), 3.12 (1H, sep, *J*=6,8 Hz, -CH), 2.24 (3H, s, -$CH_3$), 1.23 (6H, d, *J*=6.9 Hz, -$(CH_3)_2$); $^{13}$C-RMN ($CDCl_3$, 100 MHz): δ 152.3, 146.0, 136.5, 128.8, 122.0, 121.0, 117.2, 115.7, 30.0, 29.2, 24.0, 24.0, 15.8 ppm; CG-EM (EI, 70 eV), *m/z* (%): 190 ($M^{+\cdot}$, 20), 175 (100).



**<u>4f</u> – 1-Aliloxi-2-alil-3-isopropil-6-metil benceno**

1.0 g (5.3 mmoles) de 2-alil-3-isopropil-6-metil fenol (**<u>3f</u>**) junto con 2.2 g (15.8 mmoles) de $K_2CO_3$ y 1.9 g (15.8 mmoles) de bromuro de alilo se sometieron a reflujo con acetona anhidra durante 12 h. El producto crudo fue purificado por CC con EP, obteniéndose 0.8 g (6.7 mmol) de **<u>4f</u>** como un aceite incoloro e inodoro. Rto: 70%; IR (película delgada): ($\nu_{=C-H}$) 3077 $cm^{-1}$, ($\nu_{C-H}$) 2962 $cm^{-1}$, ($\nu_{COC-asim}$) 1265 $cm^{-1}$, ($\nu_{COC-sim}$) 995 $cm^{-1}$; $^1$H-RMN ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 7.06 (1H, d, *J*=7.9 Hz, 5-$H_{Ar}$), 6.98 (1H, d, *J*=7.9 Hz, 4-$H_{Ar}$), 6.08 (1H, dddd, *J*=17.6, 10.5, 5.3, 1.4 Hz, H-C=)$_{aliloxi}$, 5.96 (1H, dddd, *J*=17.8, 11.3, 5.6, 1.4 Hz, H-C=)$_{alil}$, 5.44 (1H, dq, *J*=17.2, 1.7 Hz, =$CH_2$)$_{aliloxi}$, 5.25 (1H, dq, *J*=10.5, 1.4 Hz, =$CH_2$)$_{aliloxi}$, 5.01 (1H, dq, *J*=10.2, 1.7 Hz, =$CH_2$)$_{alil}$, 4.89 (1H, dq, *J*=17.1, 1.9 Hz, =$CH_2$)$_{alil}$, 4.29 (1H, t, *J*=1.4 Hz, -$CH_2$)$_{aliloxi}$, 4.28 (1H, t, *J*=1.4 Hz, -$CH_2$)$_{aliloxi}$, 3.50 (1H, t, *J*=1.8 Hz, -$CH_2$)$_{alil}$, 3.49 (1H, t, *J*=1.8 Hz, -$CH_2$)$_{alil}$, 3.08 (1H, sep., *J*=6,8 Hz, -CH), 2.26 (3H, s, -$CH_3$), 1.18 (6H, d, *J*=6.8 Hz, -$(CH_3)_2$); $^{13}$C-RMN ($CDCl_3$, 100 MHz): δ 155.7, 146.8, 137.9, 136.6, 134.2, 129.3, 126.2, 121.0, 116.7, 114.8, 73.7, 30.0, 28.8, 24.1, 24.1, 16.4 ppm; CG-EM (EI, 70 eV), *m/z* (%): 230 ($M^{+\cdot}$, 40), 41 (100).



**<u>8f</u> – 2-Alil-3-isopropil-6-metil-1-(2-metilaliloxi) benceno**

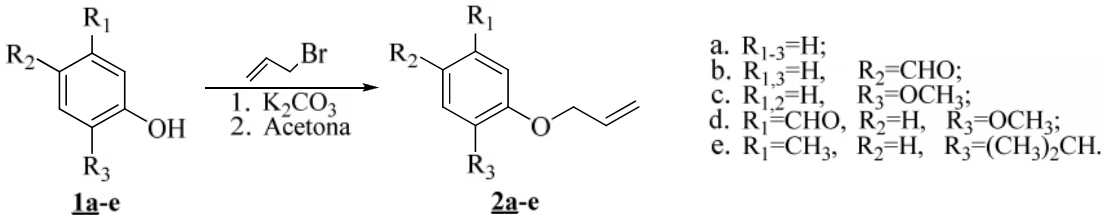
1.0 g (5.3 mmoles) de 2-alil-3-isopropil-6-metil fenol (**<u>3f</u>**) junto con 0.6 g (15.8 mmoles) de NaH y 1.4 g (15.8 mmoles) de cloruro de metalilo se sometieron a reflujo en DMF anhidra durante 8 h. El producto crudo fue purificado por CC con mezcla EP:AE 70:1, obteniéndose 1.0 g (4.2 mmol) de **<u>8f</u>** como un aceite incoloro e inodoro. Rto: 80%; IR

(película delgada): ($\nu_{=C-H}$) 3077 $cm^{-1}$, ($\nu_{CH3}$) 2962 $cm^{-1}$, ($\nu_{COC-asim}$) 1257 $cm^{-1}$; $^1$H-RMN ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 7.05 (1H, d, *J*=7.9 Hz, 4-$H_{Ar}$), 6.98 (1H, d, *J*=7.9 Hz, 5-$H_{Ar}$), 6.00 (1H, dddd, *J*=17.6, 10.4, 5.5, 1.3 Hz, H-C=)$_{alil}$, 5.17 (1H, bs, =$CH_2$)$_{met}$, 5.00 (1H, dq, *J*=10.2, 1.8 Hz, =$CH_2$)$_{alil}$, 4.97 (1H, bs, =$CH_2$)$_{met}$, 4.89 (1H, dq, *J*=17.1, 1.8 Hz, =$CH_2$)$_{alil}$, 4.16 (2H, s, -$CH_2$)$_{met}$, 3.50 (1H, t, *J*=1.9 Hz, -$CH_2$)$_{alil}$, 3.49 (1H, t, *J*=1.9 Hz, -$CH_2$)$_{alil}$, 3.08 (1H, sep, *J*=6,8 Hz, -CH), 2.26 (3H, s, -$CH_3$), 1.86 (3H, s, -$CH_3$)$_{met}$, 1.18 (6H, d, *J*=6.8 Hz, -$(CH_3)_2$); $^{13}$C-RMN ($CDCl_3$, 100 MHz): δ 155.5, 146.9, 141.8, 138.0, 129.3, 128.2, 126.2, 121.0, 114.7, 111.7, 76.2, 30.0, 28.8, 24.1, 24.1, 19.6, 16.2 ppm.

## 2.6 ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

De acuerdo con las 4 etapas propuestas para la síntesis de las 1-benzoxepinas sustituidas (**Esquema 2.14**) cada molécula obtenida fue caracterizada estructuralmente por las técnicas espectroscópicas de IR, MS y RMN, como se describió en el **Numeral 2.5**. A continuación se discute en detalle las características estructurales más relevantes por familia de compuestos en cada etapa.

**2.6.1 Alil-aril éteres sustituidos (2a-e) sintetizados en la etapa I.** Las eficiencias de la reacción de Williamson para la obtención de los alil-aril éteres fueron altas (76-96%) (**Esquema 2.16** y **Tabla 2.1**) y la característica física común de estos compuestos fue su estado físico (líquido).



**1a-e** **2a-e**

**Esquema 2.16.** Esquema general para la reacción de *o*-alilación de fenoles.

La introducción del grupo alilo en las estructuras de los fenoles **1a-e**, para convertirlos en sus respectivos alil-aril éteres **2a-e**, se puso de manifiesto en los espectros IR por la desaparición de las frecuencias de tensión y deformación del grupo hidroxilo y la aparición de las bandas de absorción características del grupo alilo. El espectro de IR

del alil-timil éter **2e** se muestra en la **Figura 2.6**, donde las frecuencias de tensión del enlace =C-H olefínico asimétrico y las del enlace C=C del grupo alilo aparecieron en 3070 y 1648 $cm^{-1}$, respectivamente. Asimismo, se exhibieron las absorciones características de la función éter C-O-C, observándose las vibraciones de estiramientos asimétrico (1257 $cm^{-1}$) y simétrico (1025 $cm^{-1}$) de los enlaces C-O-C y la tensión C-H de la función -$OCH_2$- (2870 $cm^{-1}$). Los demás alil-aril éteres (**2a-d**) sintetizados presentaron las mismas bandas distintivas (ver **Numeral 2.5.4**).

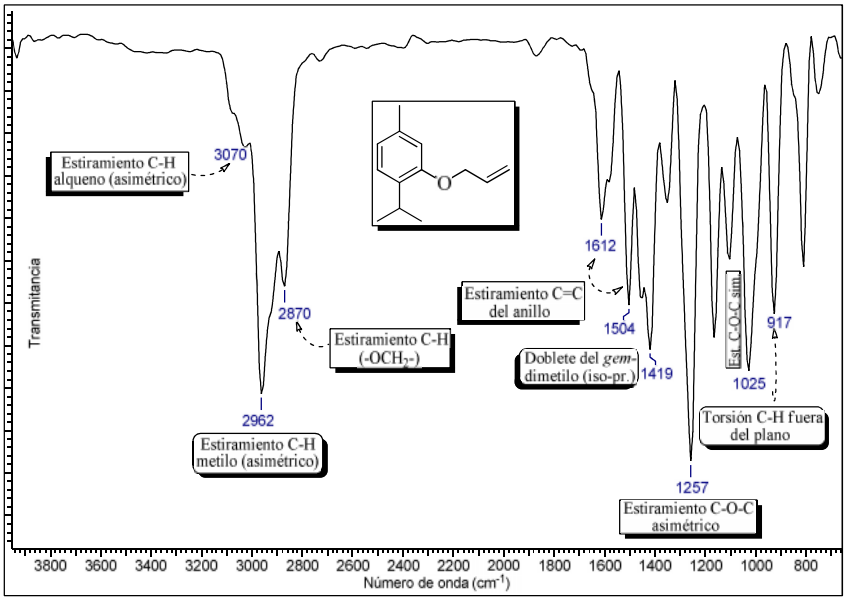



**Figura 2.6.** Espectro de IR del alil-timil éter (**2e**).

La determinación de la masa molecular y el reconocimiento del grupo alilo en los compuestos **2a-e** se llevaron a cabo mediante espectrometría de masas. Los iones moleculares junto con sus iones fragmentos (> 9% de intensidad) característicos para cada alil-aril éter se reportan en la **Tabla 2.6**. El espectro de masas típico para el alil-timil éter se ilustra en la **Figura 2.7**.

**Tabla 2.6.** Iones característicos obtenidos por CG-EM de los compuestos **2a-e**.

| Comp. | Nombre | Iones característicos, *m/z* (I%) |
|---|---|---|
| **2a** | Alil-fenil-éter | 134 ($M^{+\cdot}$, 50%); 119 (23%); 65 (34%); 94 (32%); 41 (100%) |
| **2b** | 4-Aliloxi-benzaldehído | 162 ($M^{+\cdot}$, 54%); 121 (23%); 65 (27%); 41 (100%) |
| **2c** | 2-Aliloxi-1-metoxi-benceno | 164 ($M^{+\cdot}$, 73%); 123 (91%); 95 (100%); 77 (73%); 52 (54%); 41 (59%) |
| **2d** | 3-Aliloxi-4-metoxi-benzaldehído | 192 ($M^{+\cdot}$, 77%); 151 (91%); 95 (100%); 77 (54%); 41 (77%) |

| | | |
|---|---|---|
| **2e** | 1-Aliloxi-2-isopropil-5-metil-benceno | 190 (**$M^{+\cdot}$**, 76%); 175 (100%); 147 (47%); 133 (34%); 121 (69%); 105 (33%); 91 (35%); 41 (9%) |

Un fuerte indicativo de la incorporación del grupo alilo en las estructuras se debió a la presencia, en los espectros de masas, del ión en *m/z* 41 (catión alílico), con intensidades que oscilaron entre 77-100%. Los otros iones fragmento encontrados están relacionados con los sustituyentes presentes en las estructuras como CHO-, -$OCH_3$, -$CH_3$, -CH-$(CH_3)_2$.

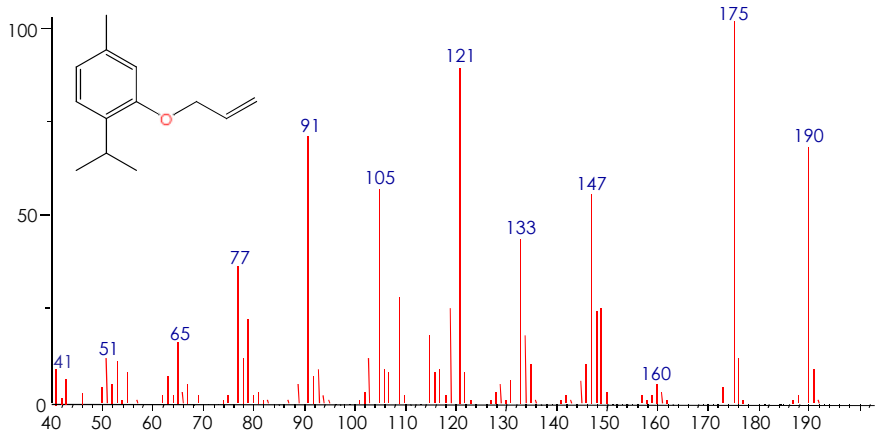
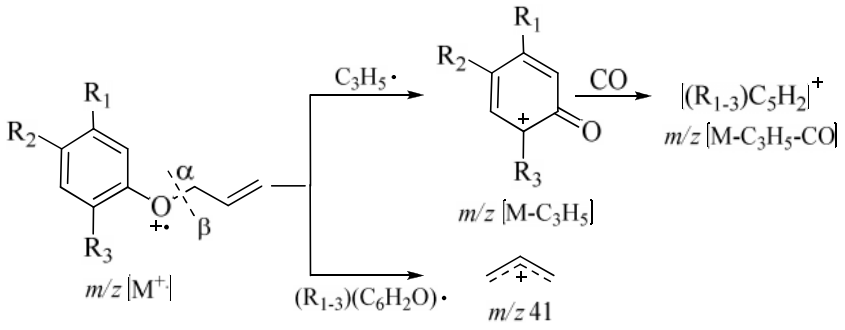



**Figura 2.7.** Espectro de masas del alil-timil éter **2e**.

La ruta de fragmentación general de los compuestos **2a-e**, conducente a la generación de iones diagnóstico y comunes, se propone en el **Esquema 2.17**.




**Esquema 2.17.** Ruta de fragmentación de los alil-aril-éteres.

Los iones moleculares de los alil-aril éteres sufren una ruptura □ (respecto al O) o □ (respecto al anillo aromático) produciendo el ion $C_3H_5^+$ con *m/z* 41 (ion diagnóstico); sin embargo, si estas mismas rupturas promueven las eliminaciones del radical $C_3H_5^{\bullet}$

y de la molécula de CO sucesivamente, se producirán los iones con *m/z* [M-$C_3H_5$] (ion complementario [$(R_{1\text{-}3})C_6H_2O]^+$) y *m/z* [M-$C_3H_5$-CO], comunes para todas las estructuras.

La confirmación de las estructuras de estos alil-aril éteres se realizó con base en la determinación espectroscópica por RMN de $^1$H y de $^{13}$C junto con el experimento bidimensional homonuclear COSY. En la **Figura 2.8** se muestra el espectro de $^1$H-RMN del alil-timil éter con la siguiente distribución de hidrógenos: 3 hidrógenos en la región aromática, 3 hidrógenos en la región olefínica y 12 hidrógenos en la región alifática, los cuales son consistentes con la estructura esperada. Por su parte, el espectro de $^{13}$C-RMN exhibió 12 señales (una de ellas incrementada al doble) correspondientes a los 13 carbonos que constituyen la estructura de **2e**.

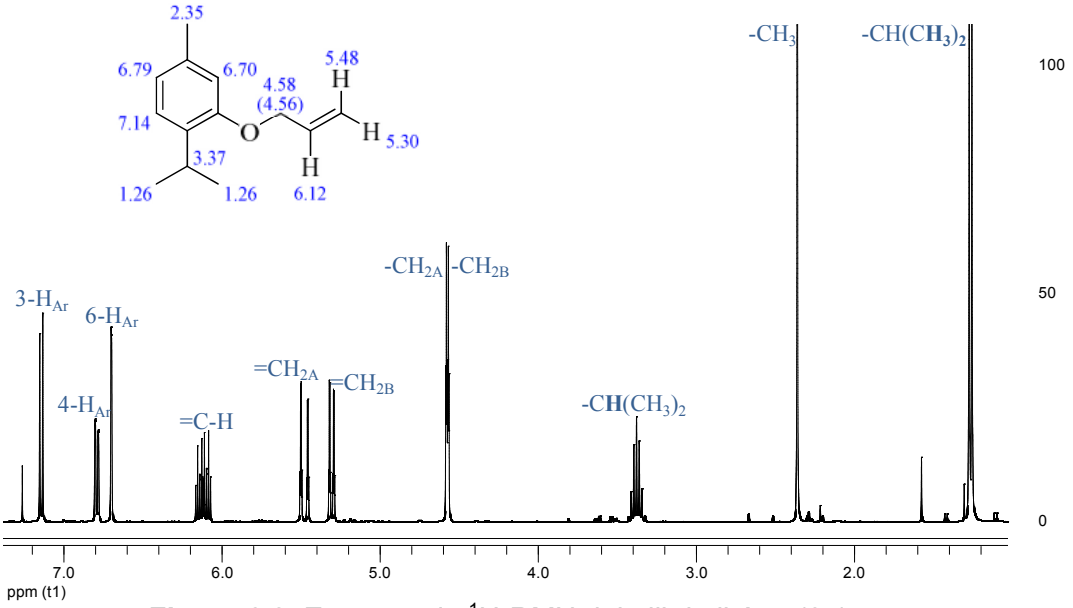



**Figura 2.8.** Espectro de $^1$H-RMN del alil-timil éter (**2e**).

Las señales, producidas por los desdoblamientos presentados por los 3 hidrógenos olefínicos y los 2 metilénicos debido a su entorno químico, se ilustran en la **Figura 2.9**. Se incluyen, además, las constantes de acoplamiento y tipo de multiplicidad presentada. Estas señales fueron comunes para todos los alil-aril éteres sintetizados, aunque con algunas diferencias en sus desplazamientos químicos. La multiplicidad de señal encontrada para el hidrógeno interno olefínico (**H**-C=) fue un doblete de

dobletes de dobletes de dobletes, puesto que en su entorno estuvieron 4 hidrógenos diferenciados (2 olefínicos terminales y 2 metilénicos). Sus cuatro constantes de acoplamiento fueron *J*=17.4, 10.4, 5.3 y 1.4 Hz. En el caso de los hidrógenos terminales de la parte olefínica del grupo alilo (=C**H**$_2$), cada uno de ellos mostró la multiplicidad de doble cuarteta. Estos hidrógenos se diferenciaron por sus dos constantes de acoplamiento: para =C**H**$_{2A}$ - *J*=17.2 y 1.6 Hz; y para =C**H**$_{2B}$ - *J*=10.5 y 1.4 Hz, cuyos hidrógenos son *trans*- y *cis*- respecto al hidrógeno interno olefínico (**H**-C=), correspondientemente.

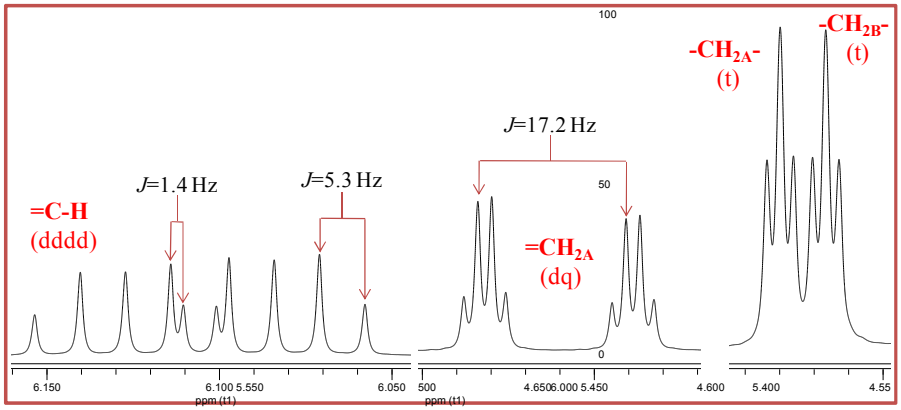



**Figura 2.9.** Desdoblamientos y constantes de acoplamiento (*J*) de los hidrógenos olefínicos y metilénicos del grupo alilo en el espectro de $^1$H-RMN del compuesto **2e** (zona ampliada).

La presencia de dos tripletes entre 4.60 y 4.57 ppm, un doblete de dobletes de dobletes de dobletes entre 6.16 y 5.99 ppm y dos dobles cuartetas entre 5.46 y 5.32 ppm (correspondientes a -C**H**$_2$-, **H**-C= y =C**H**$_2$, respectivamente) confirman la presencia del grupo alilo en las estructuras (**Tabla 7**).

**Tabla 2.7.** Señales características de los hidrógenos alílicos encontrados en los compuestos alil-aril éteres **2a-e**, basados en los espectros $^1$H-RMN.

| Compuesto | Señales $^1$H-RMN [δ (ppm), multiplicidad y *J* (Hz)] | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | H-C= | $=CH_{2A}$ | $=CH_{2B}$ | $-CH_{2A}$ | $-CH_{2B}$ |
| **2a** | 6.11, dddd, *J*=17.4, 10.4, 5.3, 1.4 | 5.46, dq, *J*=17.2, 1.6 | 5.32, dq, *J*=10.5, 1.4 | 4.58, t, *J*=1.5 | 4.57, t, *J*=1.5 |
| **2b** | 6.04, dddd, *J*=17.2, 10.8, 5.3, 1.4 | 5.42, dq, *J*=17.3, 1.6 | 5.32, dq, *J*=10.5, 1.4 | 4.62, t, *J*=1.5 | 4.60, t, *J*=1.5 |
| **2c** | 6.10, dddd, *J*=17.7, 10.6, 5.4, 1.3 | 5.41, dq, *J*=17.3, 1.6 | 5.29, dq, *J*=10.7, 1.4 | 4.62, t, *J*=1.5 | 4.61, t, *J*=1.5 |
| **2d** | 6.04, dddd, *J*=17.7, 10.7, 5.4, 1.2 | 5.40, dq, *J*=17.2, 1.4 | 5.27, dq, *J*=10.5, 1.3 | 4.62, t, *J*=1.3 | 4.61, t, *J*=1.3 |
| **2e** | 6.12, dddd, *J*=17.2, 10.5, 4.9, 1.7 | 5.48, dq, *J*=17.3, 1.7 | 5.30, dq, *J*=10.6, 1.6 | 4.58, t, *J*=1.6 | 4.56, t, *J*=1.6 |

El espectro de RMN bidimensional $^1$H-$^1$H del 1-aliloxi-2-isopropil-5-metil benceno (**Figura 2.10**) mostró claramente las correlaciones existentes entre los 5 protones del grupo alilo, indicado con óvalos de colores así: color verde relacionó al protón interno del grupo (**H**-C=) con los 2 protones metilénicos (-C**H$_{2A,B}$**-) los cuales fueron vecinales a él. Mientras que, el color negro correlacionó al mismo protón interno con los dos protones terminales del alqueno (=C**H$_{2A,B}$**). Además, en este espectro se observó el acoplamiento a largo alcance entre los hidrógenos del -C**H$_{2AB}$**- con los hidrógenos terminales =C**H$_{2AB}$**. (acoplamiento *alílico* a cuatro enlaces - conectividad "W") [145,146]. El mecanismo propuesto para este acoplamiento es la interacción $\pi$-$\sigma$ (hiperconjugación) donde se genera cierto solapamiento entre el orbital $\pi$ del doble enlace y el orbital 1s del hidrógeno metilénico, lo que permite que el acoplamiento se transmita más eficientemente, y por ende, que se prolongue el camino de acoplamiento y se incremente la magnitud de la constante de acoplamiento (*J*= 0–3 Hz ) [147]. El valor promedio obtenido de las constantes vecinales fue 1.5 Hz, para los dos grupos de protones (-C**H$_2$** y =C**H$_2$**).

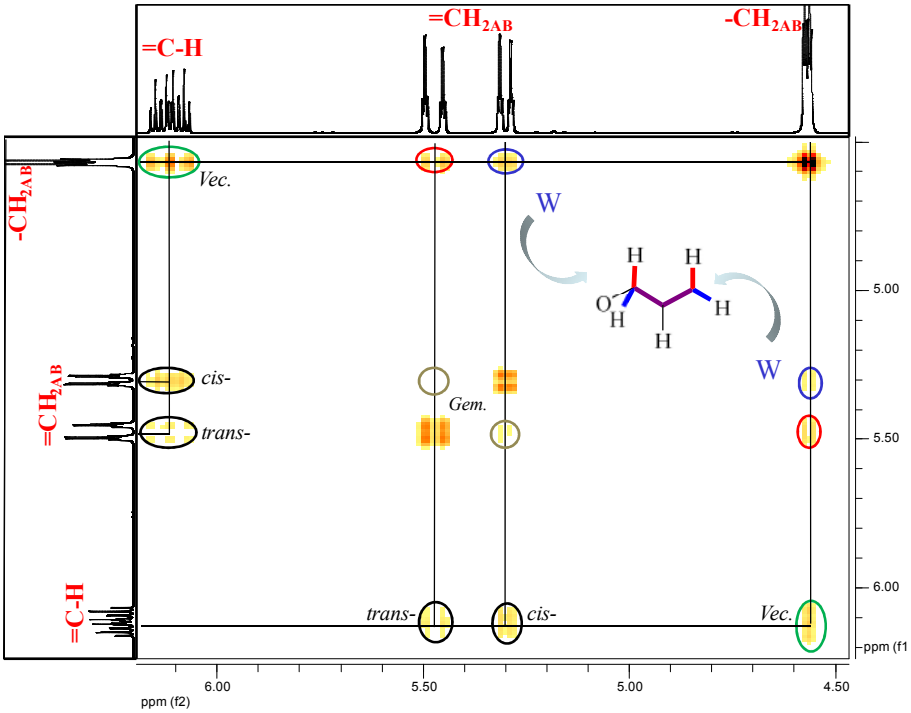



**Figura 2.10.** Correlación existente entre los 3 hidrógenos olefínicos y los 2 metilénicos del grupo alilo de acuerdo con el espectro de $^{1}$H-$^{1}$H-RMN del compuesto **2e**.

**2.6.2 2-Alil fenoles sustituidos (3a-e) sintetizados en la etapa II.** Con el propósito de lograr que los compuestos *o*-alilados experimentaran la transposición de Claisen, se efectuaron 13 experimentos variando las condiciones: calentamiento neto del compuesto *o*-alilado (sin disolvente, con agitación y alta temperatura), empleo de ácidos de Lewis (dieterato de trifluoruro de boro, cloruro de aluminio, etc.), utilización de disolventes [tolueno, acetonitrilo (ACN) y 1,2-diclorobenceno (1,2-DCB)] y calentamiento asistido por la radiación de microondas del compuesto *o*-alilado soportado sobre alúmina. Los detalles de la transposición se dan en la **Tabla 2.8**.

**Tabla 2.8.** Experimentos realizados buscando condiciones óptimas para la transposición de Claisen en el alil-timil éter (**2e**).

| Experimentos | Tratamiento | Condiciones | Producto transpuesto obtenido (rto. %)* |
|---|---|---|---|
| EXP. 1 | Térmico | 220°C, 14 h | Mezcla isómeros (*o*-, *m*-, *p*-) (*orto*-, 36%) |
| EXP. 2 | Catalizador ácido Lewis | $BF_3{\cdot}OEt_2$, $t_{amb.}$-70°C, 6h | Ninguno |
| EXP. 3 | Catalizador ácido Lewis | $BF_3{\cdot}OEt_2$, 140°C, 2h, reflujo | Ninguno |
| EXP. 4 | Disolvente y cat. ácido Lewis | 1,2-DCB, gotas $BF_3{\cdot}OEt_2$, 180°C, reflujo | Mezcla isómeros: *orto*- (36%), *meta*- (22%) y *para*- (35%) |
| EXP. 5 | Soporte sólido | $Al_2O_3$, MW (800W, 6 min) | Ninguno - no cambió **2e** |
| EXP. 6 | Disolvente y cat. ácido Lewis | 1,2-DCB, 2h, $BF_3{\cdot}OEt_2$ (1:1), 180°C, reflujo | Transpuesto *para*- (24%) |
| EXP. 7 | Disolvente y cat. ácido Lewis | 1,2-DCB, 2h, $BF_3{\cdot}OEt_2$ (1:1), 70°C, reflujo | Transpuesto *para*- (8%) |
| EXP. 8 | Disolvente y cat. ácido Lewis | ACN, 4h, %20 $BF_3OEt_2$, reflujo | Ninguno - no cambió **2e** |
| EXP. 9 | Disolvente y cat. ácido Lewis | Tolueno, ACN (trazas), %50 $BF_3{\cdot}OEt_2$, reflujo | Transpuesto *para*- (21%) |
| EXP. 10 | Disolvente y cat. ácido Lewis | Tolueno, %50 $BF_3OEt_2$, reflujo | Transpuesto *para*- (15%) |
| EXP. 11 | Disolvente y cat. ácido Lewis | 1,2-DCB, $AlCl_3$, $H_2O$, $t_{amb}$-reflujo | Transpuesto *para*- (1%) |
| EXP. 12 | Disolvente | 1,2-DCB, 20 h, reflujo | Transpuesto *orto*- (80%) |
| EXP. 13 | Disolvente y cat. ácido Lewis | Diclorometano, $SnCl_2$ $2H_2O$, $t_{amb.}$, 4 h | Transpuesto *orto*- (1%) |

* El crudo de reacción fue analizado por CG-EM.

El calentamiento del compuesto *o*-alilado sin ningún tipo de coadyuvante condujo a la formación de los tres isómeros de posición del 2-alil timol (Exp.1), aunque de acuerdo con los reportes de la literatura, sólo deberían formarse los isómeros *orto*- y *para*- [51,55,58,148]. Sin embargo, la utilización de $BCl_3$ como catalizador favorece la transposición en posición *meta*- [53]. Los ácidos de Lewis utilizados en los ensayos no contribuyeron a acelerar la reacción ni mucho menos a la formación del producto deseado. El $BF_3{\cdot}OEt_2$, bajo las condiciones empleadas, desde temperatura ambiente hasta ebullición y en cantidades catalíticas y/o estequiométricas, en la mayoría de casos no condujo al producto deseado o se obtuvieron mezclas de isómeros (Exp. 2-11, 13).

Otros ácidos de Lewis como $AlCl_3$ y $SnCl_2$ ensayados, tampoco favorecieron la transposición de Claisen (Exp. 5 y 13). Aunque algunos ácidos de Lewis ($BCl_3$, $Et_2AlCl$, etc.) han asistido eficientemente la transposición de Claisen, también han mostrado algunos inconvenientes porque no sólo se obtiene el compuesto *orto*-transpuesto sino en algunos casos la mezcla *orto*-, *para*- o ciclaciones no esperadas [53,55,58].

En la búsqueda de las mejores condiciones para la transposición de Claisen se probaron tres disolventes con diferentes puntos de ebullición y polaridad. Estas propiedades físicas se reportan en la **Tabla 2.9**. De acuerdo con varios autores [55,66,67] la transposición de Claisen está influida directamente por el tipo de disolvente utilizado. Cuando se utilizó acetonitrilo (solvente polar aprótico) la reacción de transposición no se efectuó ni siquiera con la adición de un ácido Lewis (Exp. 8). Esto pudo ser debido a las bajas condiciones térmicas (~82°C). Con tolueno, hubo una pequeña conversión al compuesto transpuesto en *para*- y la adición del dieterato de trifluoruro de boro lo incrementó hasta un 15% (Exp. 10). La inclusión de acetonitrilo en este sistema produjo un 21% del compuesto *para*-transpuesto. Sin embargo, el producto deseado fue obtenido en menos de un 5% (Exp. 9).

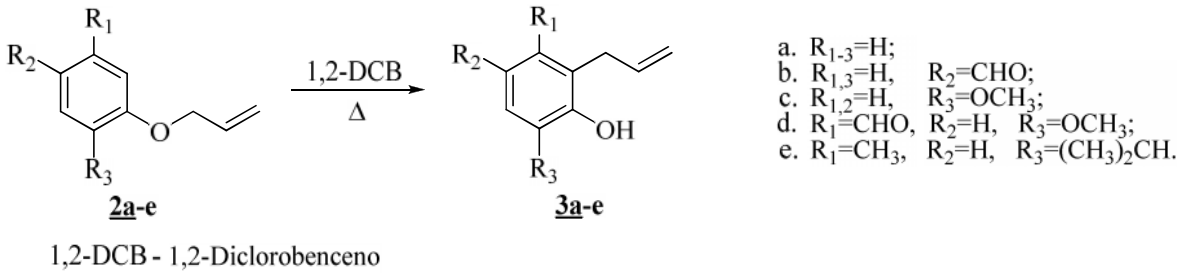
**Tabla 2.9.** Propiedades físicas de los disolventes probados en la transposición de Claisen.

| Nombre | Fórmula | P.M., g/mol | $T_{eb.}$, °C | Momento dipolar ($\mu$), D | Polaridad ($\varepsilon$) |
|---|---|---|---|---|---|
| Acetonitrilo | $CH_3CN$ | 41,05 | 81,6 | 3,86 | 36,6 |
| Tolueno | $C_6H_5CH_3$ | 92,14 | 110,6 | 0,38 | 2,4 |
| 1,2-Diclorobenceno | $C_6H_4Cl_2$ | 147,01 | 180,1 | 2,50 | 12,1 |

Finalmente, el experimento que permitió alcanzar eficientemente la transposición de Claisen fue el calentamiento con 1,2-diclorobenceno (Exp. 12), un disolvente con alta temperatura de ebullición y con cierto carácter polar, que de acuerdo con White y Wolfart [66] son los parámetros más importantes de un disolvente para asistir la transposición de Claisen.

La eficiencia de la transposición de Claisen en la generación de los 2-alil fenoles fue moderadamente alta (52-75%) (**Esquema 2.18** y **Tabla 2.2**). De igual manera, los tiempos empleados para esta reacción variaron entre compuestos (10-40 h). Así, los

alil-aril éteres **2c-e** que presentaron sustituyentes electrodonadores (-$OCH_3$, -$CH_3$ y -$CH(CH_3)_2$) en el anillo fueron los que gastaron menor tiempo; mientras que los compuestos **2a-b** sin sustituyentes o sustituyentes electroatrayentes (-CHO) fueron los que emplearon el mayor tiempo de reacción, poniendo en evidencia la fuerte influencia de los grupos sustituyentes en la transposición de Claisen, estando en desacuerdo con alguno reportes que consideran que el efecto de los sustituyentes en la transposición de Claisen no tiene un efecto significativo [55,67]. Además, se observó que si estos sustituyentes son voluminosos no sólo se produce el compuesto transpuesto en la posición *orto*- sino los isómeros *para*- y *meta*- (caso del alil-timil éter **2e**).




**2a-e** **3a-e**

1,2-DCB - 1,2-Diclorobenceno

**Esquema 2.18.** Esquema general para la reacción de transposición de Claisen para alil-aril éteres.

El reordenamiento intramolecular del grupo alilo en las estructuras de los alil-aril éteres **2a-e** y su transformación en los respectivos 2-alil fenoles (**3a-e**), se evidenció en los espectros IR por el surgimiento, nuevamente, de las frecuencias de tensión y deformación del grupo hidroxilo y la conservación y reorganización de las bandas de absorción características del grupo alilo. El espectro de IR del 2-alil-6-isopropi-3-metil fenol **3e** se exhibe en la **Figura 2.11**.

El espectro IR de este 2-alil fenol presentó cuatro bandas de absorción características: 3564, 1450, 1265 y 1196 $cm^{-1}$, las cuales se pueden atribuir a las vibraciones de tensión del O-H, de torsión o flexión del O-H y de estiramientos del C-OH, respectivamente.

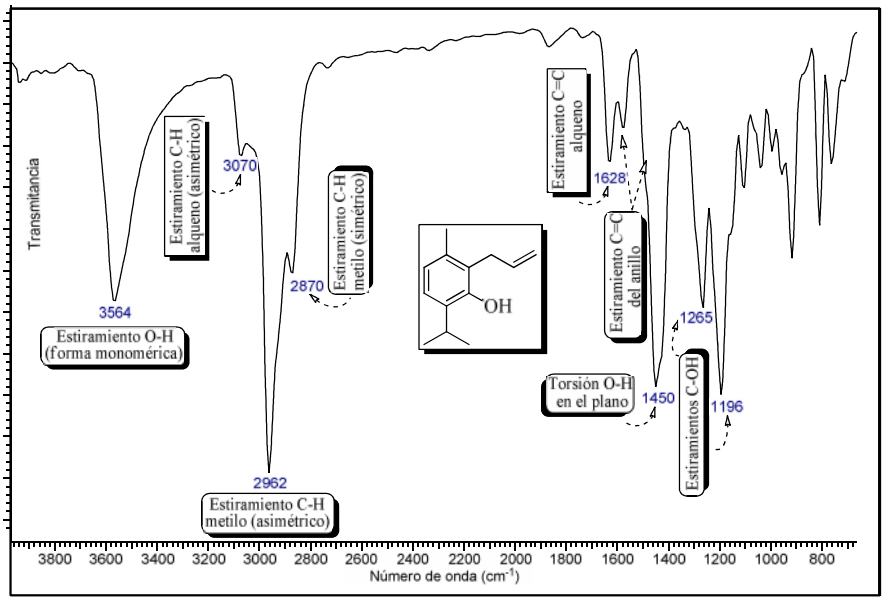



**Figura 2.11.** Espectro de IR del 2-alil-6-isopropil-3-fenol **3e**.

A diferencia de las bandas de absorción por estiramiento del OH de los fenoles **1a-e**, que fueron anchas por la formación de enlace de hidrógeno intermolecular y registrándose a menor frecuencia, los 2-alil fenoles presentaron bandas de absorción agudas y a menor longitud de onda debido a que en la mayoría de estos fenoles sus posiciones *orto*- estaban sustituidas, evitando la formación de enlaces de hidrógeno intermoleculares por impedimento estérico (aumento entre la distancia de enlace del grupo (OH…OH) [149]. Las bandas observadas corresponden a formas monoméricas o diméricas de los 2-alil fenoles [150]. Los demás 2-alil fenoles **3a-d** sintetizados presentaron las mismas bandas distintivas (ver **Numeral 2.5.5**).

El reconocimiento del reordenamiento intramolecular del grupo alilo en los compuestos **3a-e** se realizó por espectrometría de masas. Los iones moleculares junto con sus respectivos iones fragmentos (> 11% de intensidad) característicos para cada 2-alil fenol se registran en la **Tabla 10**. El espectro de masas típico para la molécula **3e** se muestra en la **Figura 2.12**.

De acuerdo con esta **Tabla**, todos los 2-alil fenoles obtenidos presentaron iones moleculares de alta intensidad (27-100%) y en el 60% de los casos (*e.g.*, compuestos **3a-c**) fueron el mismo ion pico de base (100%). El mayor indicio del reordenamiento

del grupo alilo en las estructuras fue el cambio en las intensidades de las relaciones *m/z* entre los dos grupos de moléculas **2a-e** y **3a-e** (**Tablas 2.6** y **2.7**).

**Tabla 2.10.** Iones característicos obtenidos por CG-EM de los compuestos **3a-e**.

| Comp. | Nombre | Iones característicos, *m/z* (I%) |
|---|---|---|
| **3a** | 2-Alil-fenol | 134 ($\mathbf{M}^{+\cdot}$, 100%); 133 (41%); 119 (32%); 115 (41%); 91 (59%); 77 (45%) |
| **3b** | 3-Alil-4-hidroxi-benzaldehído | 162 ($\mathbf{M}^{+\cdot}$, 100%); 161 (77%); 133 (27%); 115 (18%); 105 (23%); 77 (32%); 51 (18%); |
| **3c** | 2-Alil-6-metoxi-fenol | 164 ($\mathbf{M}^{+\cdot}$, 100%); 149 (32%); 131 (34%); 121 (34%); 103 (41%); 91 (34%); 77 (45%); |
| **3d** | 2-Alil-3-hidroxi-4-metoxi-benzaldehído | 192 ($\mathbf{M}^{+\cdot}$, 54%); 177 (100%); 131 (30%); 103 (36%); 91 (30%); 77 (34%); 65 (27%) |
| **3e** | 2-Alil-6-isopropil-3-metil-fenol | 190 ($\mathbf{M}^{+\cdot}$, 27%); 175 (100%); 147 (34%); 115 (11%); 91 (14%); 77 (11%) |

En la **Tabla 2.11** se comparan los iones moleculares, pico de base y *m/z* 41 (alilo) de las moléculas *o*-aliladas y transpuestas con base en las intensidades relativas. Se observa que, en los casos donde el catión alilo (*m/z* 41) fue el ion pico de base en los espectros de masas de las moléculas *o*-aliladas (*e.g.*, **2a** y **2b**), el mismo catión disminuyó su intensidad significativamente en los espectros de las moléculas transpuestas (*e.g.*, **3a** y **3b**) y el ion molecular pasó a ser el ion pico de base. En las otras moléculas, hubo disminución considerable del ion en *m/z* 41 y cambios de las intensidades entre los iones producidos.

Los demás iones fragmento encontrados están relacionados con los sustituyentes presentes en las estructuras como CHO-, $-OCH_3$, $-CH_3$, $-CH-(CH_3)_2$. El **Esquema 2.19** plantea, en forma general, la posible ruta de fragmentación de los compuestos **3a-e**, que favorece la formación de iones comunes y diagnóstico.

La ruptura $\beta$ (padecida por la mayoría de los 2-alil fenoles), a partir de los iones moleculares, favorece la salida del radical vinílico ($C_2H_3^{\bullet}$, *m/z* 25) y la formación del catión con *m/z* [$M-C_2H_3$]. Las sucesivas eliminaciones de las moléculas de CO y $H_2$, producen los iones $[(R_{1\text{-}3})C_6H_2]^+$ con *m/z* [$M-C_2H_3-CO-H_2$]. Por otra parte, los fenoles típicamente se fragmentan en las uniones de los enlaces $HCO^{\bullet}$, evidenciadas en el espectro de masas por el registro de las señales con *m/z* [M-CO-H] pertenecientes a los iones $[(R_{1\text{-}3})C_8H_6]^+$. Seguidamente, las salidas de dos moléculas neutras ($C_2H_2$ y

$H_2$) desde este último ion, asisten la generación de los iones $[(R_{1\text{-}3})C_6H_2]^+$ con *m/z* [M-CO-H-$C_2H_2$-$H_2$].

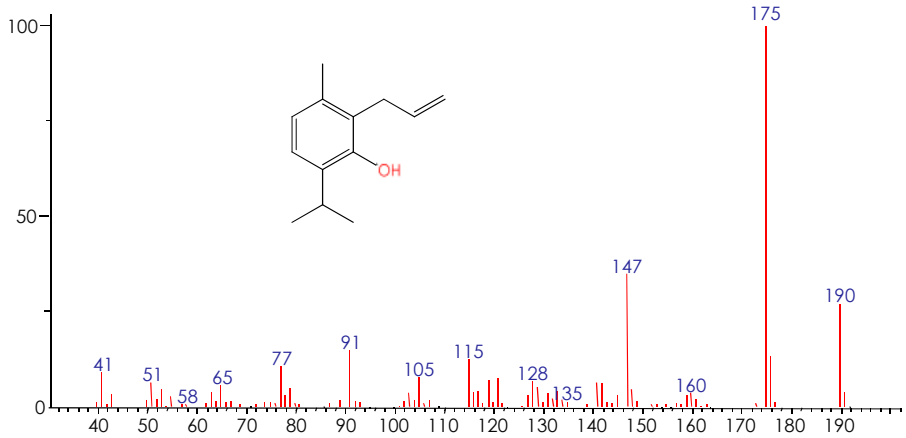
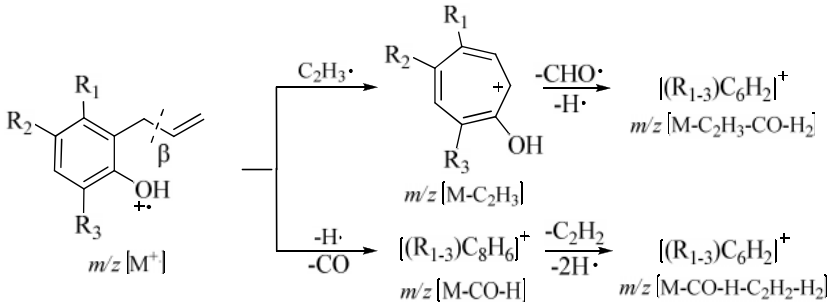



**Figura 2.12.** Espectro de masas del 2-alil-6-isopropil-3-metil fenol **3a**.

**Tabla 2.11.** Comparación de los iones moleculares, picos de base y *m/z* 41 obtenidos por CG-EM de los compuestos **2a-e** y **3a-e**.

| Comp. | Nombre | Iones característicos | | |
|---|---|---|---|---|
| | | $M^{+\cdot}$, *m/z* (I%) | Ion pico de base (100%) | Ion *m/z* 41 (I%) |
| **2a** | Alil-fenil-éter | 134 (50%) | *m/z* 41 | 100 |
| **3a** | 2-Alil-fenol | 134 (100%) | *m/z* 134 | 1 |
| **2b** | 4-Aliloxi-benzaldehído | 162 (54%) | *m/z* 41 | 100 |
| **3b** | 3-Alil-4-hidroxi-benzaldehído | 162 (100%) | *m/z* 162 | 1 |
| **2c** | 2-Aliloxi-1-metoxi-benceno | 164 (73%) | *m/z* 95 | 59 |
| **3c** | 2-Alil-6-metoxi-fenol | 164 (100%) | *m/z* 41 | 1 |
| **2d** | 3-Aliloxi-4-metoxi-benzaldehído | 192 (77%) | *m/z* 95 | 77 |
| **3d** | 2-Alil-3-hidroxi-4-metoxi-benzaldehído | 192 (54%) | *m/z* 177 | 4 |
| **2e** | 1-Aliloxi-2-isopropil-5-metil-benceno | 190 (76%) | *m/z* 175 | 8 |
| **3e** | 2-Alil-6-isopropil-3-metil-fenol | 190 (27%) | *m/z* 175 | 8 |




**Esquema 2.19.** Posible ruta de fragmentación de los 2-alil fenoles.

La confirmación estructural de los 2-alil fenoles **3a-e** se llevó a cabo por RMN de $^{1}H$ y $^{13}C$. En la **Figura 2.13**, se muestra el espectro de $^{1}H$-RMN del 2-alil-6-isopropil-3-metil fenol **3e**. En este espectro se encontraron 2 hidrógenos en la región aromática, 3 hidrógenos en la región olefínica, 1 hidrógeno de muy alta intensidad en posible región de fenoles y 12 hidrógenos en la región alifática, acorde con la estructura deseada. En cuanto al contenido de C, el espectro de $^{13}C$-RMN presentó 12 señales (una de ellas incrementada al doble) correspondientes a los 13 carbonos constituyentes de la estructura de **3e**.

Los espectros de RMN de las moléculas transpuestas presentaron diferencias marcadas en las señales de protones correspondientes al sistema fenílico y al grupo alilo junto con la aparición de la señal del protón del OH fenólico. La comparación de estos cambios en las señales de los espectros se ilustra en las **Figuras 2.14** y **2.15**, respectivamente. La primera evidencia de la transposición del grupo alilo en la posición *orto*- del anillo fue la desaparición de la señal singulete del hidrógeno "2" del sistema arílico (adyacente al grupo *o*-alil) ubicado a 6.70 ppm (**Figura 2.14**) junto con la aparición de una señal singulete en 4.98 ppm, que no se registró en el espectro del compuesto *o*-alilado, la cual se encontró dentro de la región característica de los fenoles (5-8 ppm) (**Figura 2.15**).

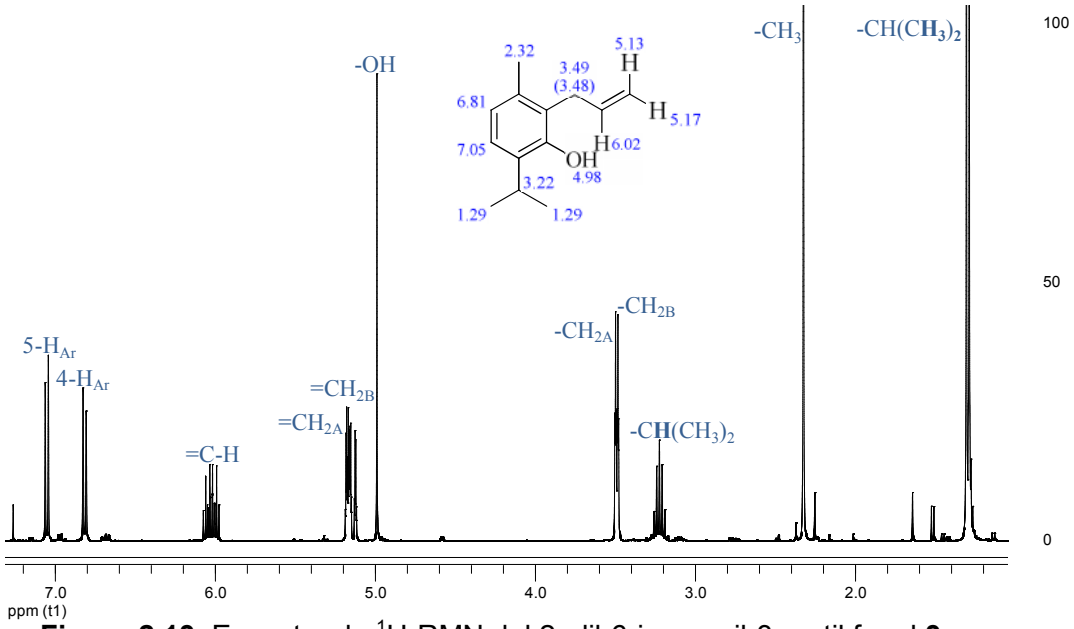



**Figura 2.13.** Espectro de $^{1}H$-RMN del 2-alil-6-isopropil-3-metil fenol **3e**.

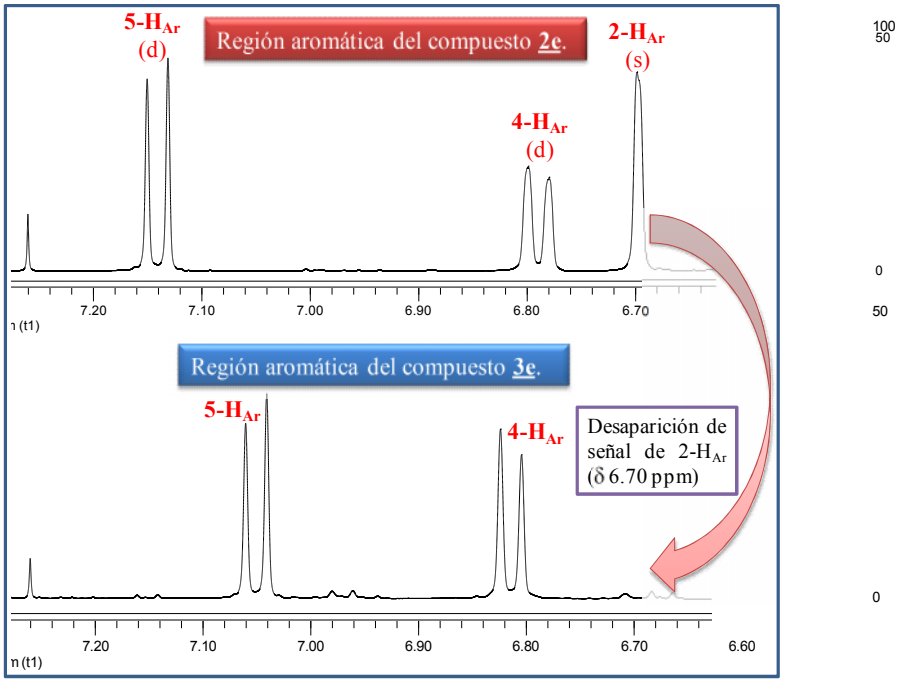



**Figura 2.14.** Ampliación y comparación de la región aromática de los compuestos **2e** (alil-timil éter) y **3e** (2-alil timol) indicando la desaparición de la señal de 2-$H_{Ar}$.

La segunda evidencia, no menos importante que la anterior, fue el cambio o corrimiento de los desplazamientos químicos de los protones olefínicos y metilénicos en los compuestos transpuestos. Así pues, los 2 protones terminales =C**H$_{2A,B}$** se encontraron a menores frecuencias (5.17-5.13 ppm) que cuando el grupo alilo estaba unido al oxígeno (5.48-5.30 ppm) (**Figura 2.15**).

Aunque este corrimiento no es desmesurado, la multiplicidad (dq) se vio afectada debido al solapamiento de las dos señales y en algunos casos (**Tabla 2.12**), a la pérdida completa de su forma bien definida y simetría (de doble cuarteta a multiplete). Por su parte, los dos tripletes del -C**H$_{2A,B}$**-, que en el espectro del compuesto **2e** aparecían a frecuencias altas (δ 4.58-4.56 ppm), se desplazaron a frecuencias bajas (δ 3.49-3.48 ppm), indicando que su entorno químico cambió drásticamente. Igualmente, estas señales presentaron cambios en su forma pasando de multiplicidad triplete a singulete (**3a**, **3b**, **3d**). La desaparición de las señales del protón 2(6) del anillo aromático (δ 6.70-7.36 ppm) junto con la aparición de una señal (δ 4.98-7.48 ppm, atribuible al protón del OH fenólico) y el corrimiento a menores frecuencias de

los protones metilénicos (δ 3.89-3.48 ppm) demuestran el reordenamiento[100] intramolecular del grupo alilo en las estructuras (**Tabla 2.12**).

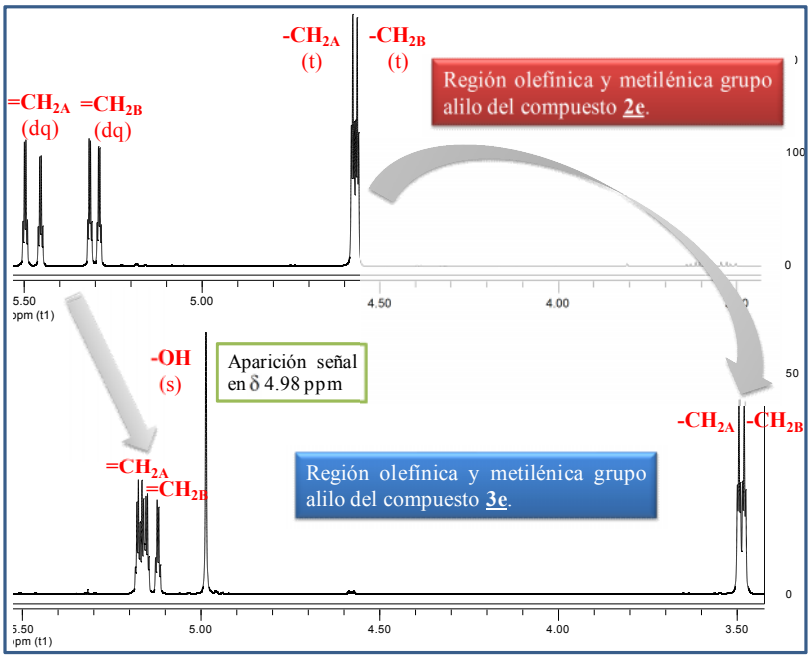



**Figura 2.15.** Ampliación y comparación de la región olefínica y metilénica de los compuestos **2e** (alil-timil éter) y **3e** (2-alil timol) indicando la aparición de la señal de -OH y el corrimiento de las señales de protones olefínicos y metilénicos.

**Tabla 2.12.** Señales características de los hidrógenos del sistema fenílico, grupo alilo y OH fenólico de los compuestos **2a-e** y **3a-e**, basados en los espectros $^{1}$H-RMN.

| Compuesto | Señales $^{1}$H-RMN [δ (ppm), multiplicidad y *J* (Hz)] | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 2(6)-$H_{Ar}$ | $=CH_{2A}$ | $=CH_{2B}$ | -OH | $-CH_{2A}$ | $-CH_{2B}$ |
| **2a** | 6.97, d, *J*=7.8 | 5.46, dq, *J*=17.2, 1.6 | 5.32, dq, *J*=10.5, 1.4 | ---- | 4.58, t, *J*=1.5 | 4.57, t, *J*=1.5 |
| **3a** | ---- | 5.19, dq, *J*=6.1, 1.7 | 5.15, t, *J*=1.6, | 5.02, s | 3.44, t | 3.44, t |
| **2b** | 6.99, t, *J*=2.3 | 5.42, dq, *J*=17.3, 1.6 | 5.32, dq, *J*=10.5, 1.4 | ---- | 4.62, t, *J*=1.5 | 4.60, t, *J*=1.5 |
| **3b** | ---- | 5.18, s | 5.15-5.13, m | 7.48, m | 3.48, s | 3.46, s |
| **2c** | 6.89, d, *J*=4.0 | 5.41, dq, *J*=17.3, 1.6 | 5.29, dq, *J*=10.7, 1.4 | ---- | 4.62, t, *J*=1.5 | 4.61, t, *J*=1.5 |
| **3c** | ---- | 5.08, dq, *J*=14.8, 1.8 | 5.05, dq, *J*=10.0, 1.4 | 5.70, s | 3.43, t, *J*=1.4 | 3.41, t, *J*=1.4 |
| **2d** | 7.36, d, *J*=1.8 | 5.40, dq, *J*=17.2, 1.4 | 5.27, dq, *J*=10.5, 1.3 | ---- | 4.62, t, *J*=1.3 | 4.61, t, *J*=1.3 |
| **3d** | ---- | 5.03-4.97, m, | 5.03-4.97, m | 5.94, s | 3.89, s | 3.87, s |
| **2e** | 6.70, s | 5.48, dq, *J*=17.3, 1.7 | 5.30, dq, *J*=10.6, 1.6 | ---- | 4.58, t, *J*=1.6 | 4.56, t, *J*=1.6 |
| **3e** | ---- | 5.17, m | 5.13, dq, *J*=12.8, 1.8 | 4.98, s | 3.49, t, *J*=1.7 | 3.48, t, *J*=1.7 |

Otro cambio espectral notorio fue la redistribución de las señales en el espectro de $^{13}C$. Es así, como el carbono ubicado a 68.7 ppm en el espectro del compuesto **2e**, se desplazó a campos altos (31.2 ppm) en el espectro del compuesto **3e** (**Figura 2.16**). Los otros carbonos localizados en la región olefínica y aromática del compuesto **2e**, se redistribuyeron notoriamente, en esta misma región en el espectro del compuesto **3e**. Estas señales fueron comunes para todos los 2-alil fenoles sintetizados, aunque con algunas diferencias en sus desplazamientos químicos (*e.g.*, compuesto **3b**).

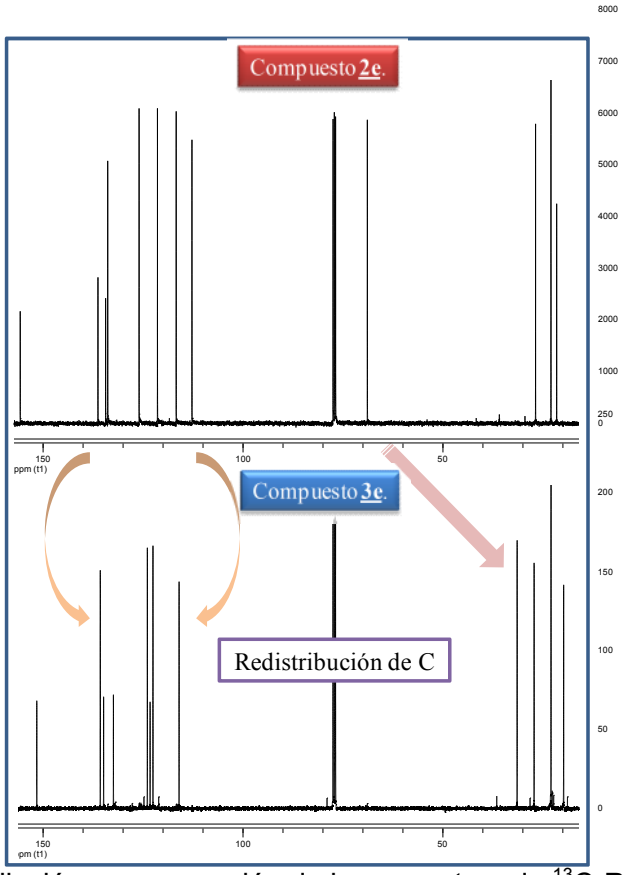
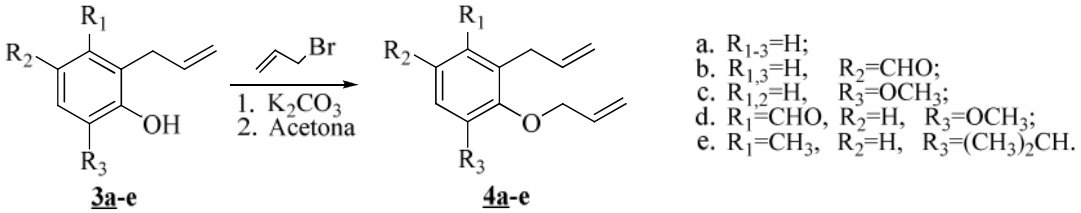



**Figura 2.16.** Ampliación y comparación de los espectros de $^{13}C$-RMN de **2e** y **3e**, indicando la redistribución de las señales de los C metilénico y olefínicos del grupos transpuesto.

**2.6.3 2-Alil-1-aliloxi bencenos sustituidos (4a-e) sintetizados en la etapa IIIa.** Los rendimientos obtenidos para las segundas o-alilaciones de los 2-alil fenoles mediante la reacción de Williamson fueron altos (70-91%) (**Esquema 2.20** y **Tabla 2.3**).

La inserción de otro grupo alilo en las estructuras de los 2-alil-aliloxi bencenos **4a-e**, se reveló en los espectros IR por la desaparición de las frecuencias de tensión-

deformación del grupo hidroxilo, por la conservación y aumento de intensidad de las bandas de absorción características del grupo alilo y la aparición de las vibraciones de absorción de la función éter.




**3a-e** **4a-e**

**Esquema 2.20.** Esquema general para la reacción de *o*-alilación de 2-alil fenoles.

La **Figura 2.17** exhibe el espectro de IR del 2-alil-1-aliloxi-6-isopropil-3-metil benceno **4e**. Las bandas características del espectro IR del compuesto **4e** fueron de gran intensidad, debido a la presencia de dos grupos alilo en la estructura; así, las frecuencias de tensión del enlace =C-H olefínico asimétrico y las del enlace C=C del alqueno aparecieron a 3070 y 1635 $cm^{-1}$, respectivamente. El estiramiento C-H asimétrico de los 2 grupos metilénicos apareció a 2923 $cm^{-1}$ (el cual no fue observado en los espectros de los compuestos *o*-alilados **2a-e** ni en los transpuestos **3a-e**). Igualmente, se presentaron las bandas de absorción de tensiones asimétrica (1257 $cm^{-1}$) y simétrica (1020 $cm^{-1}$) de los enlaces C-O-C y las de deformación del OH en el plano (1450 $cm^{-1}$) y las de estiramiento del C-OH fueron vestigios del cambio del compuesto **3e** al compuesto **4e**. Todos los demás 2-alil-1-aliloxi bencenos **4a-d** sintetizados presentaron las mismas bandas distintivas (ver **Numeral 2.5.6**).

La determinación de la presencia de otro grupo alilo en la estructura y de la masa molecular de los compuestos **4a-e** se llevaron a cabo mediante espectrometría de masas. Los iones fragmentos (> 39% de intensidad) característicos junto con los respectivos iones moleculares para cada 2-alil-1-aliloxi bencenos se reportan en la **Tabla 2.13**. En la **Figura 2.18** se enseña el espectro de masas del 2-alil-1-aliloxi-6-isopropil-3-metil benceno.

Como en el caso de las moléculas **2a-e**, el mayor indicativo de la inserción de otro grupo alilo en las estructuras se debió a la presencia del catión en *m/z* 41 (ion alilo), en sus espectros de masas, con intensidades que oscilaron entre el 41-100%.

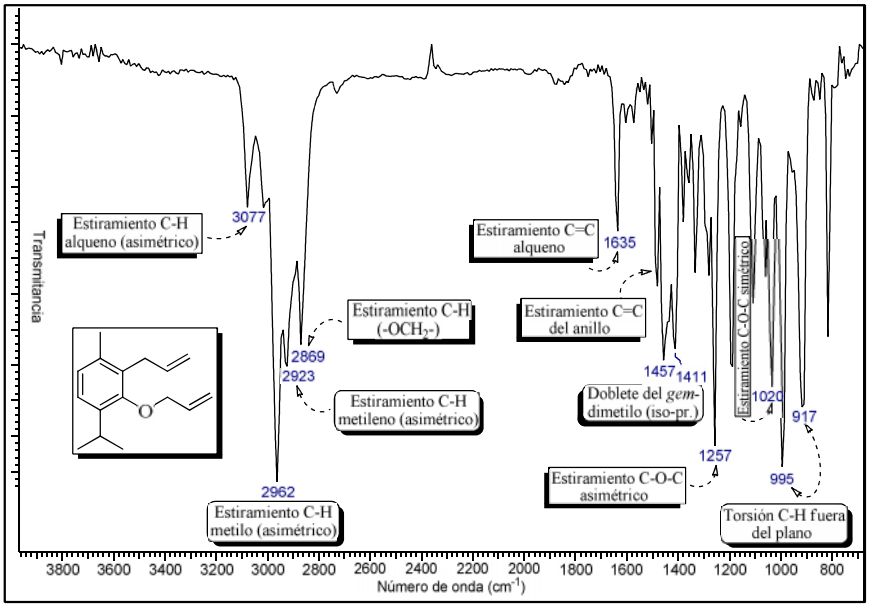



**Figura 2.17.** Espectro de IR del 2-alil-1-aliloxi-6-isopropil-3-metil benceno **4e**.

**Tabla 2.13.** Iones característicos obtenidos por CG-EM de los compuestos **4a-e**.

| Comp. | Nombre | Iones característicos, *m/z* (I%) |
|---|---|---|
| **4a** | 2-Alil-1-aliloxi-benceno | 174 (**$M^{+\cdot}$**, 50%); 133 (100%); 131 (59%); 105 (95%); 79 (50%); 77 (64%); 41 (59%) |
| **4b** | 3-Alil-4-aliloxi-benzaldehído | 202 (**$M^{+\cdot}$**, 36%); 159 (34%); 133 (64%); 105 (64%); 77 (59%); 41 (100%) |
| **4c** | 2-Alil-1-aliloxi-6-metoxi-benceno | 204 (**$M^{+\cdot}$**, 27%); 163 (50%);135 (41%); 105 (45%); 103 (100%); 91 (82%); 41 (41%) |
| **4d** | 2-Alil-3-aliloxi-4-metoxi-benzaldehído | 232 (**$M^{+\cdot}$**, 4%); 191 (86%); 135 (64%); 103 (100%); 91 (73%); 65 (43%); 41 (59%) |
| **4e** | 2-Alil-1-aliloxi-6-isopropil-3-metil-benceno | 230 (**$M^{+\cdot}$**, 16%); 147 (68%); 119 (39%); 115 (41%); 91 (59%); 77 (36%); 41 (100%) |

El **Esquema 2.21** propone, la ruta de fragmentación más viable de las moléculas **4a-e**, que resulta en la formación de iones diagnóstico y comunes. La aparición del ion $C_3H_5^+$ con *m/z* 41 (ion diagnóstico), en los espectros de masas, es la consecuencia de la ruptura $\alpha$ (respecto al O) o $\beta$ (respecto al anillo aromático), a partir de los iones moleculares de los 2-alil-1-aliloxi bencenos. No obstante, esta misma escisión favorece la eliminación del radical alilo ($C_3H_5^{\bullet}$) y la formación del ion $[(R_{1\text{-}3})C_9H_6O]^+$ con *m/z* $[M\text{-}C_3H_5]$, que es el ion complementario. Las salidas sucesivas de CO y

[$C_2H_3^{\bullet}$, $H^{\bullet}$] desde este último ion, producen los iones $[(R_{1\text{-}3})C_8H_6]^+$ y $[(R_{1\text{-}3})C_6H_2]^+$ con *m/z* [M-$C_3H_5$-CO] y *m/z* [M-$C_3H_5$-CO-$C_2H_3$-H], respectivamente, comunes para todas las estructuras.

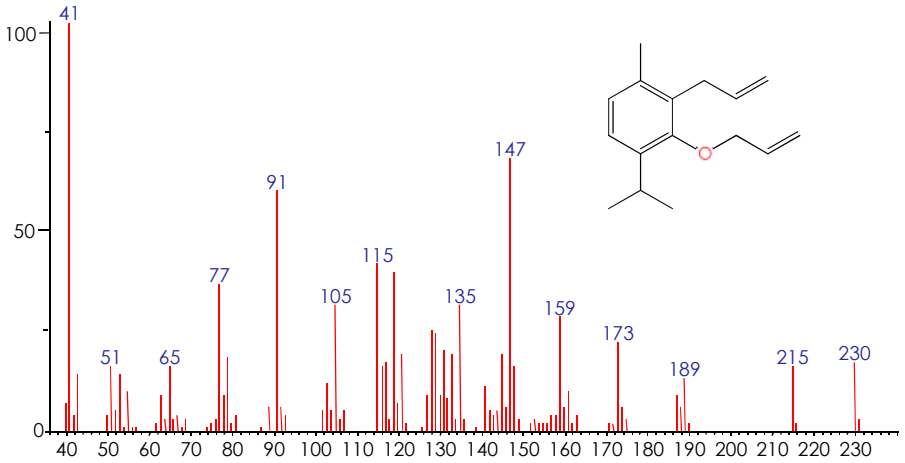
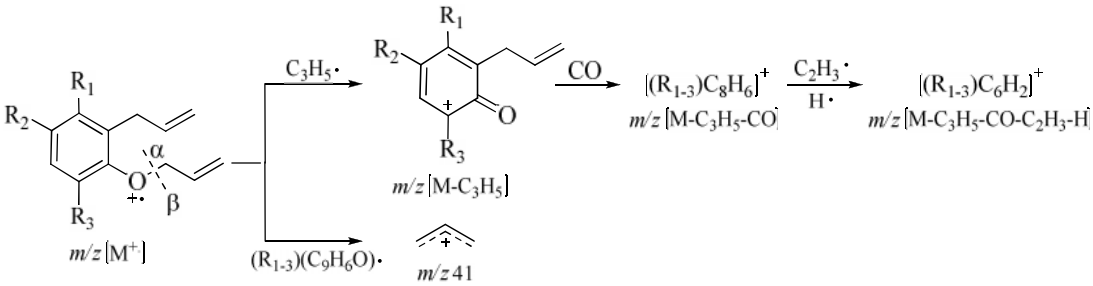



**Figura 2.18.** Espectro de masas del 2-alil-1-aliloxi-6-isopropil-3-metil benceno **4e**.




**Esquema 2.21.** Posible ruta de fragmentación de los 2-alil-1-aliloxi bencenos.

Las estructuras de los 2-alil-1-aliloxi bencenos fueron confirmadas por RMN de $^1$H, $^{13}$C y $^1$H-$^1$H-COSY.

El espectro de $^1$H-RMN del 2-alil-1-aliloxi-6-isopropil-3-metil benceno (**4e**) se exhibe en la **Figura 2.19**, en el que se encontraron 2 hidrógenos en la región aromática, 6 hidrógenos en la región olefínica y 14 hidrógenos en la región alifática, conforme con la estructura propuesta. Además, con base en el espectro de $^{13}$C-RMN, las 15 señales (una de ellas incrementada al doble) presentes estuvieron de acuerdo con el número de carbonos (16) esperado para la estructura de **4e**.

La inclusión del otro grupo alilo en las estructuras de los 2-alil fenoles fue indudable por la ausencia, en todos los espectros de los compuestos **4a-e,** de la señal protónica

del OH fenólico (δ 4.98-7.48 ppm) junto con la aparición de tres nuevos grupos de señales (2 dq, 1 dddd y 2 t). En la **Figura 2.20** se amplían los desdoblamientos producidos por los 5 hidrógenos del grupo alilo transpuesto junto con los 5 hidrógenos del grupo alilo adicionado.

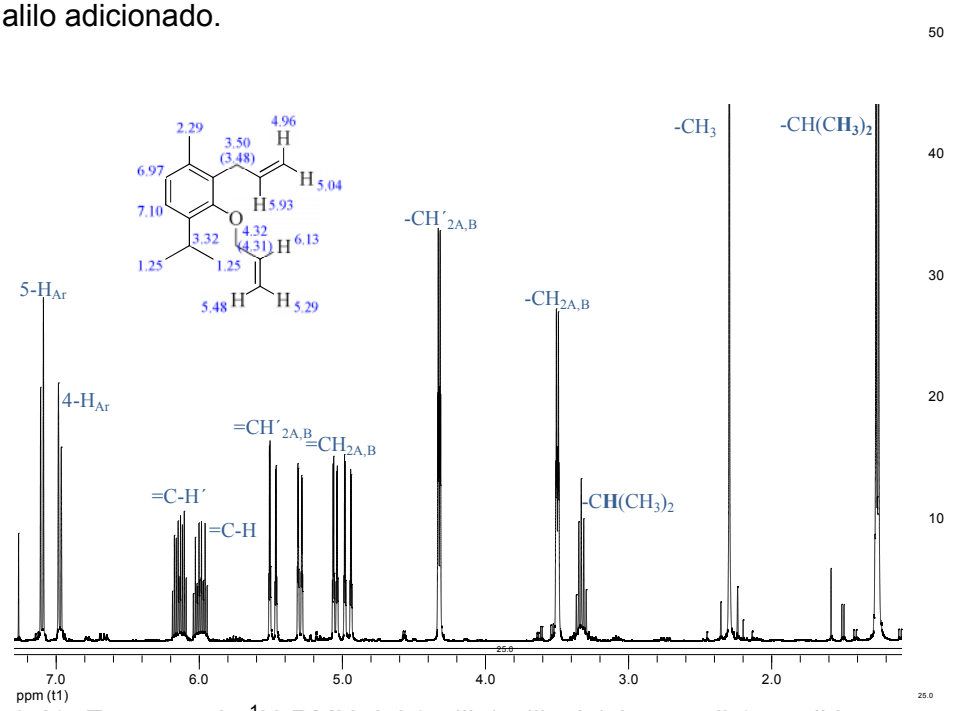



**Figura 2.19.** Espectro de $^1$H-RMN del 2-alil-1-aliloxi-6-isopropil-3-metil benceno **4e**.

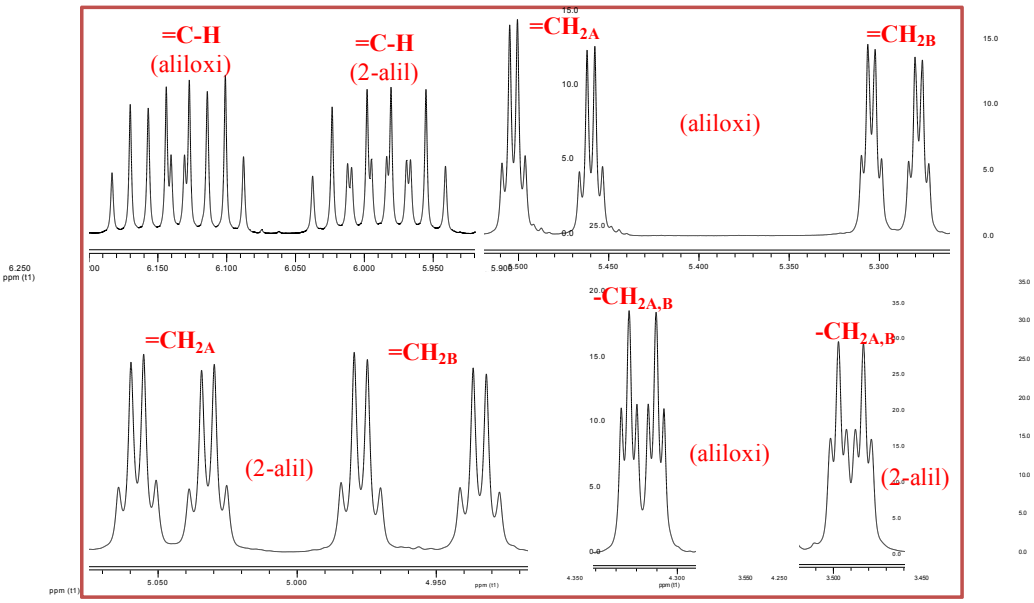



**Figura 2.20.** Desdoblamientos de los hidrógenos olefínicos y metilénicos de los 2 grupos alilo en el espectro de $^1$H-RMN del compuesto **4e** (zona ampliada).

El desplazamiento químico para **H**-C= del alilo unido al oxígeno (O-$CH_2CH=CH_2$) fue 6.13 ppm y el del grupo alilo unido al anillo en posición 2 ($C_{Ar}$-$CH_2CH=CH_2$), fue 5.99 ppm. Las siguientes señales de interés en el espectro correspondieron a los hidrógenos terminales de la parte olefínica (=C**$H_{2A,B}$**) de los 2 grupos alilo, cuyos desplazamientos químicos fueron 5.48 (*J*=17.2 Hz) y 5.29 ppm (*J*=10.5 Hz) para el grupo aliloxi, y 5.04 (*J*=10.2 Hz) y 4.96 ppm (*J*=17.1 Hz) para el grupo alilo unido al arilo. El mismo comportamiento de los grupos alilo (O-$CH_2CH=CH_2$ y $C_{Ar}$-$CH_2CH=CH_2$) de otros compuestos **4** se puede notar en la **Tabla 2.14**.

**Tabla 2.14.** Señales características de los hidrógenos alílicos encontrados en los compuestos 2-alil-1-aliloxi bencenos **4a-e**, basados en los espectros $^1$H-RMN.

| Comp. | Señales $^1$H-RMN [δ (ppm), multiplicidad y *J* (Hz)] | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | **H´-C=** | **H-C=** | **=CH´$_{2A}$** | **=CH´$_{2B}$** | **=CH$_{2A}$** | **=CH$_{2B}$** | **-CH´$_{2A}$** | **-CH´$_{2B}$** | **-CH$_{2A}$** | **-CH$_{2B}$** |
| **4a** | 6.13-6.05, m | 6.04-5.99, m | 5.44, dq, *J*=17.3, 1.6 | 5.28, dq, *J*=10.6, 1.4 | 5.12-5.07, m | 5.06-5.04, m | 4.57, t, *J*=1.6 | 4.56, t, *J*=1.6 | 3.45, s | 3.44, s |
| **4b** | 6.06, dddd, *J*=17.3, 10.2, 5.0, 1.6 | 6.02-5.94, m | 5.44, dq, *J*=17.3, 1.6 | 5.31, dq, *J*=10.6, 1.4 | 5.11, dq, *J*=7.5, 1.6 | 5.08, t, *J*=1.4 | 4.64, t, *J*=1.6 | 4.63, t, *J*=1.6 | 3.46, s | 3.44, s |
| **4c** | 6.10, dddd, *J*=17.5, 10.4, 5.7, 1.0 | 5.97, dddd, *J*=17.5, 10.1, 6.6 | 5.37, dq, *J*=17.2, 1.6 | 5.22, dq, *J*=10.4, 1.4 | 5.07, dq, *J*=11.5, 1.7 | 5.04-5.02, m | 4.49, t, *J*=1.4 | 4.48, t, *J*=1.4 | 3.44, t, *J*=1.3 | 3.42, t, *J*=1.3 |
| **4d** | 6.08, dddd, *J*=17.5, 10.4, 5.7, 1.0 | 6.00, dddd, *J*=17.5, 10.2, 5.8, 1.1 | 5.37, dq, *J*=17.2, 1.6 | 5.23, dq, *J*=10.4, 1.3 | 5.00, dq, *J*=10,2, 1.6 | 4.90, dq, *J*=17.1, 1.7 | 4.46, t, *J*=1.4 | 4.45, t, *J*=1.4 | 3.87, t, *J*=1.7 | 3.86, t, *J*=1.7 |
| **4e** | 6.13, dddd, *J*=17.5, 10.5, 5.3, 1.4 | 5.99, dddd, *J*=17.5, 10.2, 5.7, 1.3 | 5.48, dq, *J*=17.2, 1.7 | 5.29, dq, *J*=10.5, 1.5 | 5.04, dq, *J*=10.2, 1.8 | 4.96, dq, *J*=17.1, 1.9 | 4.32, t, *J*=1.5 | 4.31, t, *J*=1.5 | 3.50, t, *J*=1.8 | 3.48, t, *J*=1.8 |

´ Hidrógenos pertenecientes al grupo aliloxi

La **Figura 2.21** exhibe el espectro bidimensional $^1$H-$^1$H-RMN del 2-alil-1-aliloxi-6-isopropil-3-metil benceno, en el que se indican todas las posibles conectividades

(encerradas en círculos o rectángulos) detectables entre los diferentes protones de los dos grupos alilo de interés.

Las correlaciones entre los protones del grupo alilo unido en posición 2 al sistema aromático se delinearon con rectángulos negros; es así, como se corrobora (por la intensidad de la mancha) que el protón de =C**H**$_2$ que está a mayor frecuencia es el de la posición *cis*- (*vecinal*) respecto a **H**-C= y por el contrario el protón *trans*- (*vecinal*) está a menor frecuencia. Por otro lado, los protones correlacionados entre sí del grupo aliloxi, se resaltaron con rectángulos verdes. En este caso, el protón del grupo =C**H**$_2$ que está a campos más bajos es el de la posición *trans*- (menos intensidad de la mancha) respecto al **H**-C= y el protón *cis*- (*vecinal*) está a campos más altos.

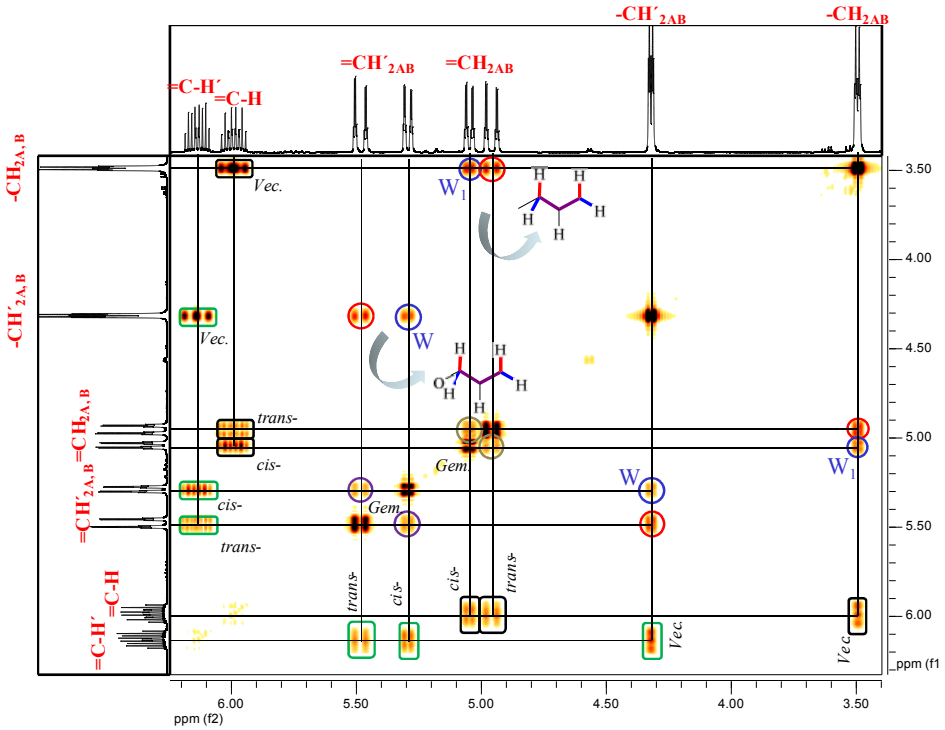
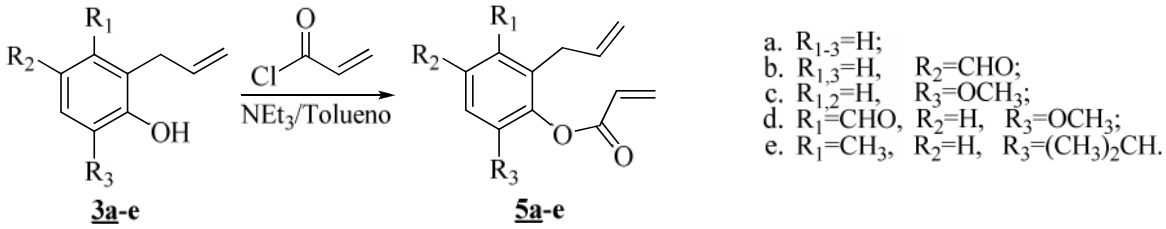



**Figura 2.21.** Correlación existente entre los hidrógenos olefínicos y metilénicos de cada grupo alilo presente en el compuesto **4e**, de acuerdo con el espectro de $^{1}$H-$^{1}$H-RMN.

En este mismo espectro se resaltan las correlaciones a cuatro enlaces, *e.g.*, acoplamiento "alílico" ("W" círculos azul y rojo), de los protones =C**H**$_2$ y -C**H**$_2$- del respectivo grupo alilo. De igual forma como en la discusión anterior, los acoplamientos "W" de los protones del alilo unido al anillo ($W_1$) aparecieron a mayores frecuencias;

mientras que, el mismo tipo de acoplamiento de los protones del alilo unido al oxígeno (W) apareció a menor frecuencia.

**2.6.4 Acrilatos de 2-alil fenilos sustituidos (5a-e) sintetizados en la etapa IIIb.** Las eficiencias obtenidas de la reacción modificada de Schotten-Baumann para la obtención de los ésteres acrílicos fueron altas (70-82%) (**Esquema 2.22** y **Tabla 2.4**).




**Esquema 2.22.** Esquema general para la reacción de *o*-acilación de 2-alil fenoles.

La inserción del grupo acriloilo en los 2-alil fenoles **3a-e**, transformándolos en los 2-alil-acriloiloxi bencenos **5a-e**, se observó en los espectros IR por la desaparición de las bandas de flexión-tensión del OH y el surgimiento de las frecuencias vibracionales características de la función éster. En la **Figura 2.22** se pone a la vista el espectro IR del 1-acriloiloxi-2-alil-3-formil-6-metoxi benceno **5d**, donde se destaca por presentar bandas de absorción provenientes de las vibraciones de los enlaces (C=O)-O-, -C=O-C=C, =C-H, C-C-O y CH. La absorción de tensión del carbonilo del éster estuvo a una mayor frecuencia (1751 $cm^{-1}$) que las correspondientes cetonas (1715 $cm^{-1}$) por su vecindad con el átomo de oxígeno, debido al aumento de su momento dipolar.

Además, la posición de la banda del grupo C=O también se vio afectada por la conjugación con el doble enlace del grupo vinilo. El efecto de la conjugación carbonilo-olefina mostró dos bandas fuertes producto de la vibración de tensión C=C entre 1690-1600 $cm^{-1}$. Los demás 1-acriloiloxi-2-alil bencenos **5a-c**,**e** sintetizados presentaron las mismas bandas distintivas (ver **Numeral 2.5.7**).

Las masas moleculares y el reconocimiento del grupo acriloilo en las estructuras de los compuestos **5a-e** se determinaron por espectrometría de masas. Los iones fragmentos (> 6% de intensidad) característicos junto con los iones moleculares para esta familia de compuesto se registran en la **Tabla 2.15**.

De esta **Tabla** se infiere que todos los 1-acriloiloxi-2-alil bencenos sintetizados presentaron sus respectivos iones moleculares, aunque de baja intensidad (3-19%), ajustados a las masas moleculares esperadas. El mayor indicador de la incorporación del grupo acriloilo en las estructuras fue la presencia, en sus espectros de masas, del ion en *m/z* 55 (catión acriloilo) con una intensidad del 100% (ion pico de base). El espectro de masas del acrilato de 2-alil-3-formil-6-metoxi-fenilo se muestra en la **Figura 2.23**.

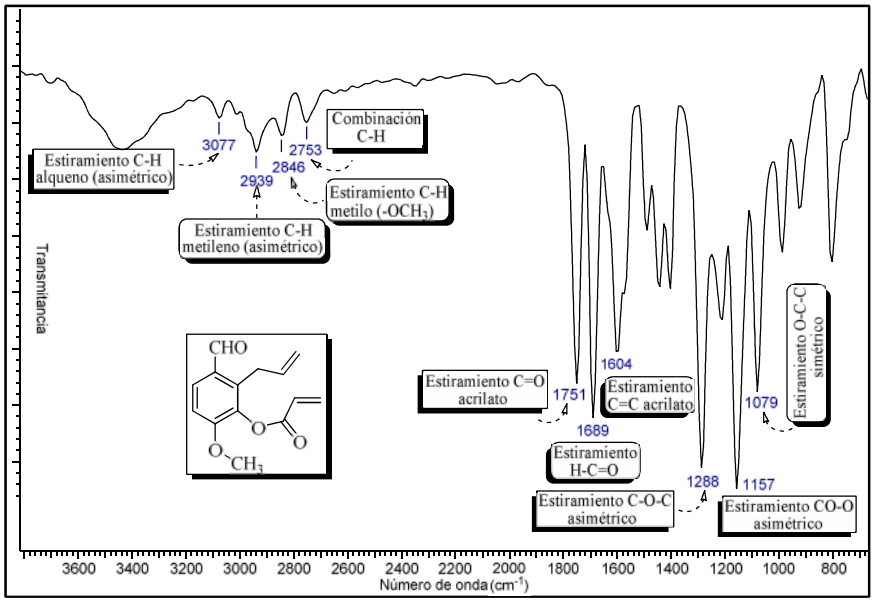



**Figura 2.22.** Espectro IR del acrilato de 2-alil-3-formil-6-metoxi fenilo (**5d**).

**Tabla 2.15.** Iones característicos obtenidos por CG-EM de los compuestos **5a-e**.

| Comp. | Nombre | Iones característicos (*m/z*, I%) |
|---|---|---|
| **5a** | Acrilato de 2-alil-fenilo | 188 ($M^{+\cdot}$, 6%); 133 (23%); 118 (6%); 77 (11%); 55 (100%) |
| **5b** | Acrilato de 2-alil-4-formil-fenilo | 216 ($M^{+\cdot}$, 7%); 172 (6%); 161 (13%); 133 (4%); 115 (4%); 77 (10%); 55 (100%) |
| **5c** | Acrilato de 2-alil-6-metoxi-fenilo | 218 ($M^{+\cdot}$, 19%); 164 (50%); 148 (18%); 131 (11%); 103 (15%); 91 (20%); 77 (11%); 55 (100%) |
| **5d** | Acrilato de 2-alil-3-formil-6-metoxi-fenilo | 246 ($M^{+\cdot}$, 3%); 192 (14%); 174 (14%); 159 (9%); 103 (7%); 91 (10%); 65 (6%); 55 (100%) |
| **5e** | Acrilato de 2-alil-6-isopropil-3-metil-fenilo | 244 ($M^{+\cdot}$, 9%); 189 (28%); 175 (26%); 159 (16%); 147 (18%); 115 (7%); 91 (9%); 77 (6%); 55 (100%) |

En el **Esquema 2.23** se sugiere la posible ruta de fragmentación de las moléculas **5a-e** (centrada en iones comunes y diagnóstico). El ion pico de base $C_3H_3O^+$ en *m/z* 55 (catión acriloilo) en todos los espectros de masas es el resultado de la ruptura β (respecto al anillo) o α (respecto al O y/o C=O), desde los iones moleculares de los 1-acriloiloxi-2-alil bencenos. Sin embargo, para algunas moléculas **5a**,**b**,**e**, este mismo rompimiento beneficia la salida del radical acriloilo ($C_3H_3O^{\bullet}$) y la constitución del catión $[(R_{1\text{-}3})C_9H_6O]^+$ con *m/z* $[M\text{-}C_3H_3O]$, el cual es su ion complementario. Las eliminaciones progresivas de CO y $[C_2H_3^{\bullet}, H^{\bullet}]$ desde este último ion, generan los iones $[(R_{1\text{-}3})C_8H_6]^+$ (*m/z* $[M\text{-}C_3H_3O\text{-}CO]$) y $[(R_{1\text{-}3})C_6H_2]^+$ (*m/z* $[M\text{-}C_3H_3O\text{-}CO\text{-}C_2H_3\text{-}H]$), comunes para estas estructuras.

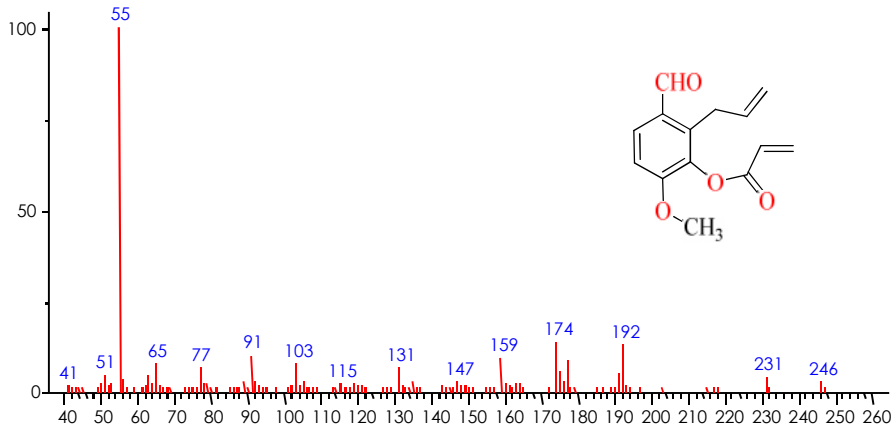
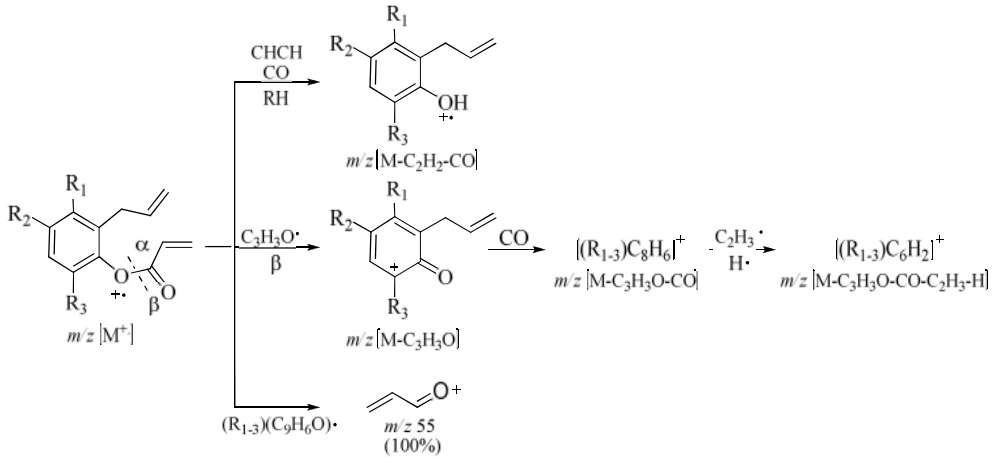



**Figura 2.23.** Espectro de masas del acrilato de 2-alil-3-formil-6-metoxi-fenilo **5d**.




**Esquema 2.23.** Posible ruta de fragmentación de los 1-acriloiloxi-2-alil bencenos.

Por otro lado, el ion complementario de la ruptura □ de los iones moleculares de **5c,d** fue de muy baja intensidad en los espectros de masas. No obstante, los iones diagnóstico de estas moléculas se generaron a partir de un reordenamiento de H y eliminaciones simultáneas de $C_2H_2$ y CO para producir los cationes radicales con *m/z* [M-$C_2H_2$-CO]. Estos cationes radicales junto con la fragmentación subsiguiente, fueron similares a los obtenidos para los 2-alil fenoles respectivos (**3c,d**).

La verificación de las estructuras de los 1-acriloiloxi-2-alil bencenos se realizó por RMN de $^1H$ y $^{13}C$. Además, para el compuesto **5d** se realizaron experimentos bidimensionales como $^1H$-$^1H$-COSY y acoplamientos $^1H$-$^{13}C$ a un enlace (HMQC).

La **Figura 2.24** enseña el espectro de $^1H$-RMN del 1-acriloiloxi-2-alil-3-formil-6-metoxi benceno (**5d**) distinguido por presentar 1 hidrógeno en la región aldehídica, 2 hidrógenos en la región aromática, 6 hidrógenos en la región olefínica y 5 hidrógenos en la región alifática, coherente con la estructura propuesta. Además, con base en el espectro de $^{13}C$-RMN, las 14 señales presentes estuvieron de acuerdo con el número de carbonos (14) esperado para la estructura de **5d**. La introducción del grupo acriloilo en las estructuras de los 2-alil fenoles fue incuestionable por la desaparición, en todos los espectros de $^1H$-RMN de los compuestos **5a-e,** de la señal del H-O fenólico (δ 4.98-7.48 ppm) junto con la aparición de tres nuevos grupos de señales.

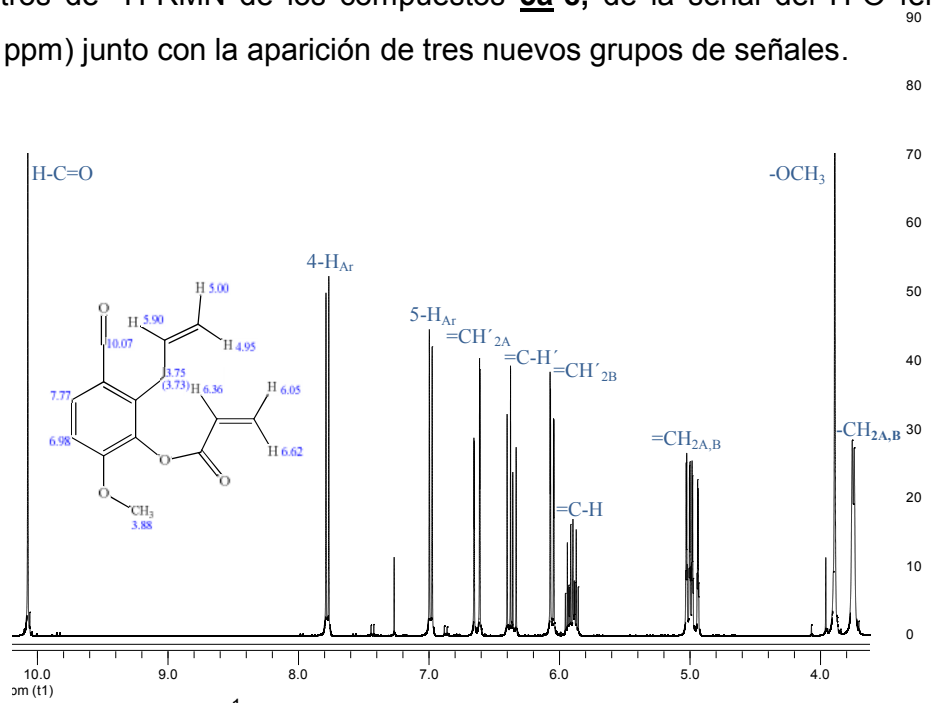



**Figura 2.24.** Espectro de $^1H$-RMN del 1-acriloiloxi-2-alil-3-formil-6-metoxi benceno **5d**.

Los desdoblamientos producidos por los 3 hidrógenos del grupo acriloilo se amplían en la **Figura 2.25**. Estas señales se encontraron en todos los 1-acriloiloxi-2-alil bencenos sintetizados, con pequeñas diferencias en sus desplazamientos químicos.

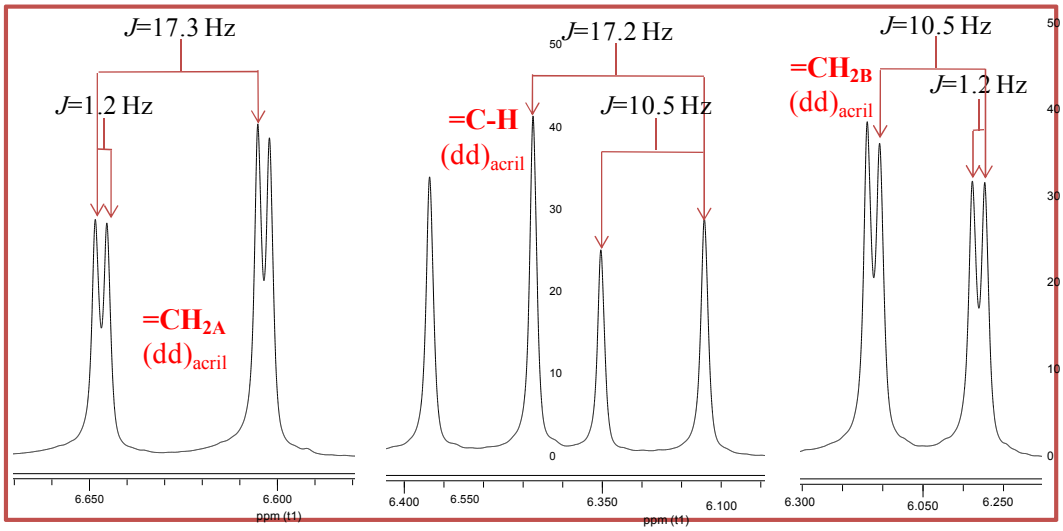



**Figura 2.25.** Desdoblamientos y constantes de acoplamiento (*J*) de los hidrógenos olefínicos del grupo acriloilo en el espectro de $^{1}$H-RMN del compuesto **5d** (zona ampliada).

El desdoblamiento presentado por **H**-C= del grupo acriloilo (O-(C=O)CH=$CH_2$) fue una doble dupleta no simétrica (δ 6.36 ppm) con diferencias en sus intensidades, caracterizado por las constantes de acoplamiento $J_{trans}$=17.3 Hz y $J_{cis}$=10.5 Hz mostrando las equivalencias magnéticas con los hidrógenos terminales del alqueno. Las multiplicidades de estos últimos (=C**H$_{2A,B}$**) fueron dupletas duplicadas (dd) distinguidas por sus desplazamientos químicos y sus respectivas constantes de acoplamiento: δ 6.62 ppm para =C**H$_{2A}$** con *J*=17.3 y *J*=1.2 Hz y para =C**H$_{2B}$**, δ 6.05 ppm con *J*=10.5 y *J*=1.2 Hz.

Los desplazamientos químicos y las multiplicidades de los protones del grupo alilo ($C_{Ar}$-$CH_2$CH=$CH_2$) transpuesto no mostraron cambio significativo. Así, δ para **H**-C= del alilo estuvo en 5.90 ppm y para los hidrógenos terminales del mismo grupo (=C**H$_{2A,B}$**), 5.00 y 4.95 ppm. Los hidrógenos metilénicos (-C**H$_{2A,B}$**-), por su parte, se localizaron en 3.75 y 3.73 ppm. Las asignaciones de los protones de los grupos alilo y acriloilo de los otros compuestos 5 están resumidos en la **Tabla 2.16**.

**Tabla 2.16.** Señales características de los hidrógenos de los grupos acriloilo y alilo encontrados en los compuestos 1-acriloiloxi-2-alil bencenos **5a-e**, basados en los espectros $^1$H-RMN.

| Comp. | Señales $^1$H-RMN [δ (ppm), multiplicidad y *J* (Hz)] | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | =CH´$_{2A}$ | H´-C= | =CH´$_{2B}$ | H-C= | =CH$_{2A}$ | =CH$_{2B}$ | -CH$_{2A}$ | -CH$_{2B}$ |
| **5a** | 6.60, dd, *J*=17.3, 1.4 | 6.33, dd, *J*=17.3, 10.4 | 6.01, dd, *J*=10.4, 1.4 | 5.89, dddd, *J*=17.1, 9.5, 6.6, 1.8 | 5.07, td *J*=1.6, 0.6 | 5.02, dq, *J*=6.2, 1.5 | 3.32, t, *J*=2.0 | 3.29, t, *J*=2.0 |
| **5b** | 6.64, dd, *J*=17.3, 1.1 | 6.34, dd, *J*=17.3, 10.5 | 6.07, dd, *J*=10.5, 1.1 | 5.89, dddd, *J*=17.5, 10.1, 6.6 | 5.11, dq *J*=9.5, 1.4 | 5.08, dq, *J*=16.9, 1.6 | 3.38, t | 3.36, t |
| **5c** | 6.62, dd, *J*=17.3, 1.3 | 6.37, dd, *J*=17.3, 10.4 | 6.02, dd, *J*=10.4, 1.3 | 5.89, dddd, *J*=17.5, 10.3, 6.6, 1.4 | 5.07, dq *J*=8.6, 1.6 | 5.04, t, *J*=1.4 | 3.31, t | 3.29, t |
| **5d** | 6.62, dd, *J*=17.3, 1.2 | 6.36, dd, *J*=17.2, 10.5 | 6.05, dd, *J*=10.5, 1.2 | 5.90, dddd, *J*=17.1, 10.2, 6.1 | 5.00, dq *J*=10.1, 1.5 | 4.95, dq, *J*=17.1, 1.7 | 3.75, s | 3.73, s |
| **5e** | 6.64, dd, *J*=17.3, 1.3 | 6.38, dd, *J*=17.3, 10.4 | 6.04, dd, *J*=10.4, 1.3 | 5.82, dddd, *J*=17.1, 10.2, 6.2 | 5.00, dd *J*=9.6, 1.6 | 4.97, dq, *J*=16.9, 1.8 | 3.28-3.26, bs | 3.28-3.26, bs |

´ Hidrógenos pertenecientes al grupo acriloiloxi.

El espectro bidimensional $^1$H-$^1$H-RMN del compuesto **5d** se muestra en la **Figura 2.26**, donde se indican todas las posibles conectividades (encerradas en círculos o rectángulos) detectables entre los diferentes protones de los grupos acriloiloxi y alilo de interés.

En la parte inferior izquierda de la **Figura**, se muestran las conectividades existentes entre los 3 protones olefínicos del grupo acriloilo, delineados con rectángulos negros. En donde, el protón *trans*- (*vecinal*) respecto a **H**-C= estuvo a mayor frecuencia que el protón de la posición *cis*- (*vecinal*). Asimismo, las correlaciones entre los protones del grupo alilo (rectángulos verdes) se evidenciaron por las intensidades de las manchas indicando que el protón de =C**H$_2$** que estuvo a mayor desplazamiento, fue el de la posición *cis*- (*vecinal*) respecto a **H**-C=; mientras que, el protón *trans*- (*vecinal*) estuvo a menor desplazamiento. También, se resaltaron las conectividades a través del acoplamiento "W" (cuatro enlaces, círculos azul y rojo), de los protones =C**H$_2$** y -C**H$_2$**- del grupo alilo, en el cual el acoplamiento "W" de estos protones apareció a mayor frecuencia.

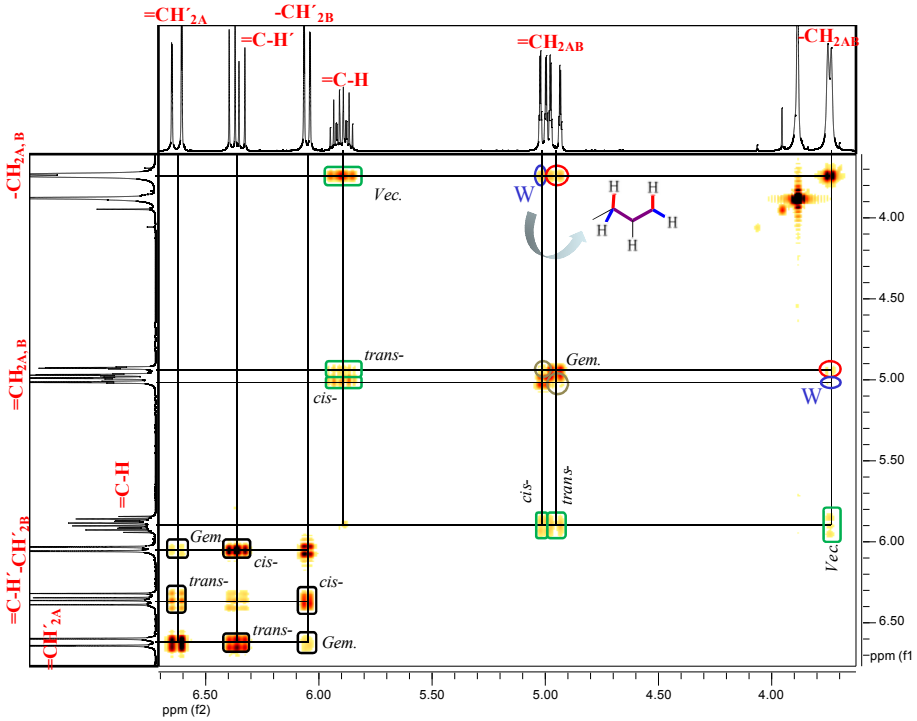



**Figura 2.26.** Correlación existente entre los hidrógenos olefínicos y metilénicos de los grupos acriloilo (´) y alilo presente en el compuesto **5d**, de acuerdo con el espectro de $^{1}$H-$^{1}$H-RMN.

El espectro del experimento de correlación inversa CH vía acoplamiento $^{13}$C-$^{1}$H a un enlace (HMQC) del mismo compuesto se ilustra en la **Figura 2.27**, en el que se indica la correlación entre los protones de los grupos acriloiloxi y alilo con sus respectivos carbonos (enmarcados en rectángulos).

Los carbonos que enlazaron a los hidrógenos **H**-C= y =C**H$_{2AB}$**, de la parte vinílica del grupo acriloilo, fueron $C_{3'}$ y $C_{2'}$ ubicados en 133.0 y 127.1 ppm, respectivamente. El carbono $C_{3'}$ interactúa con los 2 hidrógenos terminales ($\delta$ 6.62 y 6.02 ppm); mientras que, el carbono $C_{2'}$ con el hidrógeno interno a 6.36 ppm. Las conectividades C-H del grupo alilo se iniciaron con el carbono $C_{2''}$ ($\delta$ 135.3 ppm) que acopló con el hidrógeno interno (**H**-C=) ubicado en 5.90 ppm. Por su parte, los 2 hidrógenos =C**H$_{2AB}$** localizados en 5.00 y 4.95 ppm encajaron con el carbono $C_{3''}$ con desplazamiento de 116.2 ppm. Finalmente, el carbono ubicado en 29.3 ppm ($C_{1''}$) acopló con los dos hidrógenos metilénicos -C**H$_{2AB}$**- ($\delta$ 3.75 y 3.73 ppm) del grupo.

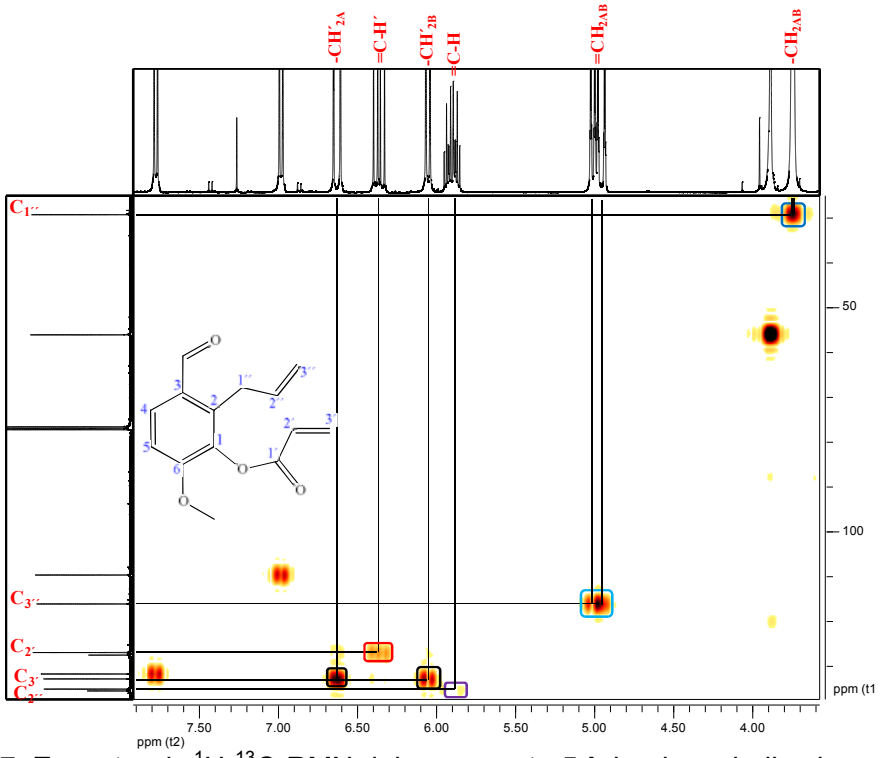
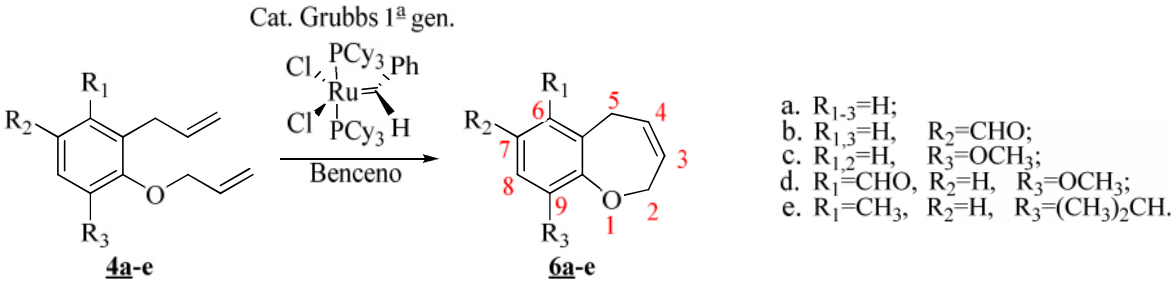



**Figura 2.27.** Espectro de $^{1}$H-$^{13}$C-RMN del compuesto **5d** donde se indica la conectividad entre los hidrógenos de los grupos acriloilo y alilo con sus respectivos carbonos.

**2.6.5 2,5-Dihidro-1-benzoxepinas sustituidas (6a-e) sintetizadas en la etapa IVa.** Después que los compuestos **4a-e** se sometieron a la reacción de RCM y se obtuvieron los compuestos ciclados **6a-e** con rendimientos entre 72 y 81% (**Esquema 2.24** y **Tabla 2.5**), se realizó el respectivo análisis por IR. La **Figura 2.28** da a conocer el espectro IR del 6-formilo-9-metoxi-2,5-dihidro-1-benzoxepina **6d**.




**Esquema 2.24.** Esquema general para la reacción de RCM de 2-alil-1-aliloxi bencenos.

Aunque este análisis no mostró cambios contundentes entre los espectros anterior y posterior a la reacción RCM (para los tipos de bandas de absorción), si se percibieron cambios en cuanto a las intensidades de las vibraciones características.

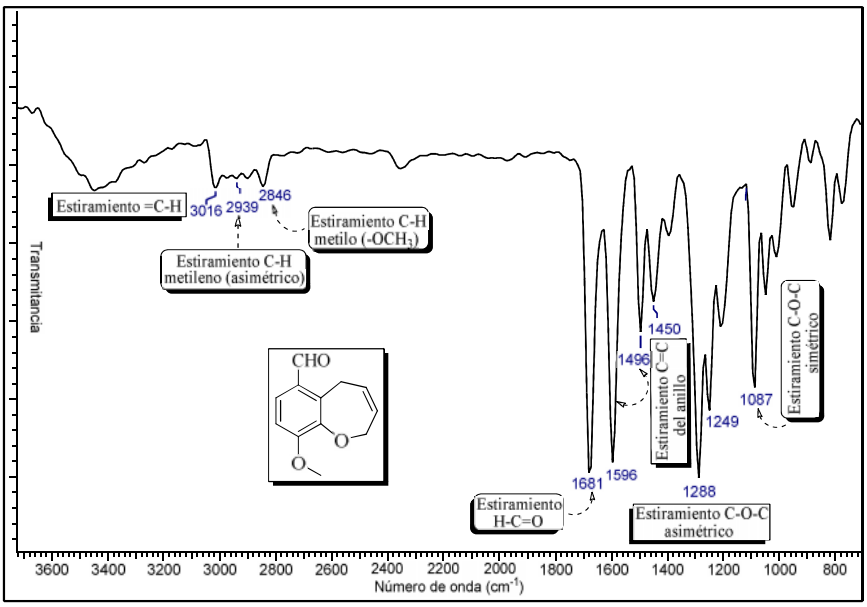



**Figura 2.28.** Espectro de IR del 6-formil-9-metoxi-2,5-dihidro-1-benzoxepina (**6d**).

Sin embargo, el indicio más importante fue la desaparición de la banda de absorción en 3070 $cm^{-1}$, propia de la tensión asimétrica de los grupos metilénicos olefínicos (=$CH_2$) de los dos grupos alilo en las moléculas **4a-e**. Las demás 2,5-dihidro-1-benzoxepinas **6a-c,e** sintetizados presentaron las mismas bandas características (ver **Numeral 2.5.8**).

De acuerdo con la RCM, la generación de una molécula olefínica volátil durante el transcurso de la reacción garantiza que se ha efectuado la ciclación intramolecular. Aunque la olefina producida (etileno) no fue monitoreada ni analizada durante la reacción, el análisis por espectrometría de masas de los compuestos obtenidos corroboró la efectividad de la misma. Así, las masas moleculares determinadas de los compuestos **6a-e** fueron menores, en 28 unidades de masa (*m/z* del etileno), que sus compuestos precursores **4a-e**, confirmando de esta forma la ciclación mediante RCM de los compuestos dialilados. La **Tabla 2.17** reporta los iones fragmentos (> 17% de intensidad) junto con los iones moleculares para cada 2,5-dihidro-1-benzoxepina sustituida sintetizada; y el espectro de masas del 6-formil-9-metoxi-2,5-dihidro-1-benzoxepina **6d** se expone en la **Figura 2.29**.

**Tabla 2.17.** Iones característicos obtenidos por CG-EM de los compuestos **6a-e**.

| Comp. | Nombre | Iones característicos, *m/z* (I%) |
|---|---|---|
| **6a** | 2,5-Dihidro-1-benzoxepina | 146 (**M**$^{+\cdot}$, 100%); 116 (59%); 115 (81%); 89 (29%); 63 (35%); |
| **6b** | 7-Formil-2,5-dihidro-1-benzoxepina | 174 (**M**$^{+\cdot}$, 100%); 145 (91%); 127 (71%); 115 (66%); 117 (47%); 173 (46%); 159 (40%); 91 (30%); 63 (19%) |
| **6c** | 9-Metoxi-2,5-dihidro-1-benzoxepina | 176 (**M**$^{+\cdot}$, 100%); 161 (45%); 144 (70%); 143 (43%); 116 (48%); 115 (88%); 105 (27%); 77 (37%); 51 (23%) |
| **6d** | 6-Formil-9-metoxi-2,5-dihidro-1-benzoxepina | 204 (**M**$^{+\cdot}$, 100%); 189 (48%); 161 (36%); 143 (39%); 142 (27%); 115 (69%); 103 (20%); 77 (37%); 51 (20%) |
| **6e** | 9-Isopropil-6-metil-2,5-dihidro-1-benzoxepina | 202 (**M**$^{+\cdot}$, 64%); 187 (100%); 172 (19%); 159 (47%); 145 (45%); 128 (21%); 115 (25%); 91 (23%); 77 (17%) |

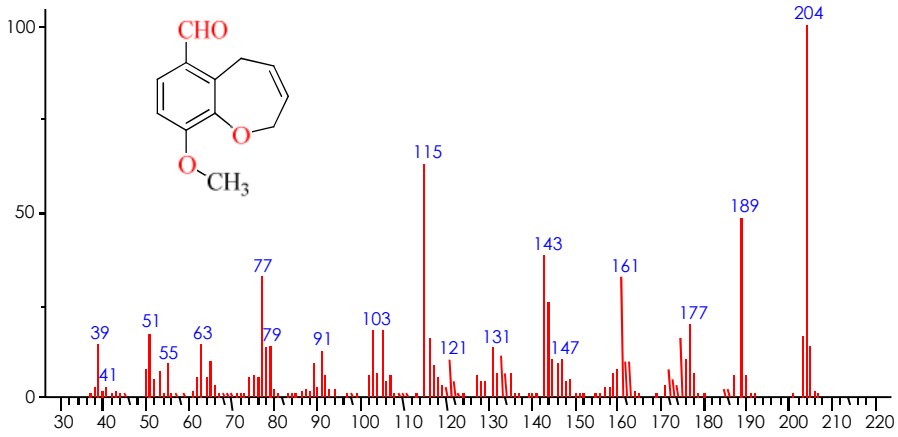



**Figura 2.29.** Espectro de masas del 6-formilo-9-metoxi-2,5-dihidro-1-benzoxepina **6d**.

Con base en la **Tabla** anterior, las 2,5-dihidro-1-benzoxepinas sintetizadas exhibieron iones moleculares de muy alta intensidad (64-100%) y en el 80% de los casos (*e.g.*, compuestos **6a-d**) fueron el mismo ion pico de base (100%). El mayor vestigio de la ciclación intramolecular de estas moléculas fue la diferencia de 28 unidades másica entre los precursores **3a-e** (expuesto anteriormente) y la redistribución, cambio en las intensidades de las relaciones *m/z* y los iones diagnóstico, entre los dos grupos de moléculas (**Tabla 2.18**).

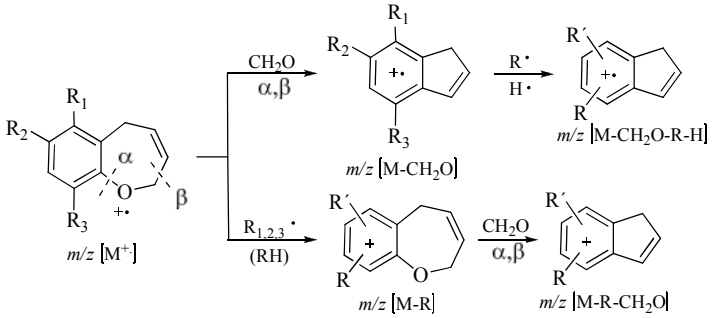
Las moléculas dialiladas **4a-e** se caracterizaron porque el ion diagnóstico fue el ion con *m/z* 41 y el pico de base varió de acuerdo con los sustituyentes presentes en las estructuras. Para el caso de las moléculas cicladas, el ion pico de base fue

principalmente el ion molecular (excepto para **6e**), mientras que, el ion con *m/z* 115 (catión con posible estructura indénica) correspondió al ion diagnóstico.

**Tabla 2.18.** Comparación de los iones moleculares, picos de base e iones diagnóstico obtenidos por CG-EM, de los compuestos **4a-e** y **6a-e**.

| Comp. | Nombre | Iones característicos | | |
|---|---|---|---|---|
| | | $M^{+\cdot}$, *m/z* (I%) | I. pico base (100%) | I. diagnóstico, *m/z* (I%) |
| **4a** | 2-Alil-1-aliloxi-benceno | 174 (50%) | *m/z* 133 | 41 (59%) |
| **6a** | 2,5-Dihidro-1-benzoxepina | 146 (100%) | *m/z* 146 | 115 (69%) |
| **4b** | 3-Alil-4-aliloxi-benzaldehído | 202 (36%) | *m/z* 41 | 41 (100%) |
| **6b** | 7-Formil-2,5-dihidro-1-benzoxepina | 174 (100%) | *m/z* 174 | 115 (66%) |
| **4c** | 2-Alil-1-aliloxi-6-metoxi-benceno | 204 (27%) | *m/z* 103 | 41 (41%) |
| **6c** | 9-Metoxi-2,5-dihidro-1-benzoxepina | 176 (100%) | *m/z* 176 | 115 (88%) |
| **4d** | 2-Alil-3-aliloxi-4-metoxi-benzaldehído | 232 (4%) | *m/z* 103 | 41 (59%) |
| **6d** | 6-Formil-9-metoxi-2,5-dihidro-1-benzoxepina | 204 (100%) | *m/z* 204 | 115 (69%) |
| **4e** | 2-Alil-1-aliloxi-6-isopropil-3-metil-benceno | 230 (16%) | *m/z* 41 | 41 (100%) |
| **6e** | 9-Isopropil-6-metil-2,5-dihidro-1-benzoxepina | 202 (64%) | *m/z* 187 | 115 (25%) |

En el **Esquema 2.25** se propone, la posible ruta de fragmentación de los compuestos **6a-e**.




**Esquema 2.25.** Posible ruta de fragmentación de las 2,5-dihidro-1-benzoxepina.

El ion con *m/z* 115 fue el efecto de la eliminación sucesiva de todos los sustituyentes presentes (como radicales o como moléculas neutras) por reordenamiento de H junto con $CH_2O$ (del anillo oxepínico) desde el ion molecular. La estructura del ion diagnóstico, posiblemente es la de un catión de indeno ($C_9H_7^+$). Para algunas de las moléculas (**6d**,**e**), primero sucedió la eliminación de formaldehído seguido de las salidas de los sustituyentes como molécula neutra y radical; mientras que para las otras (**6b**,**c**), primero fue la salida de los sustituyentes como radical y después la eliminación de formaldehído.

La confirmación estructural de las 2,5-dihidro-1-benzoxepinas fue llevada a cabo por experimentos de RMN monodimensionales ($^{1}$H y $^{13}$C) y bidimensionales de ($^{1}$H-$^{1}$H-COSY y HMQC ($^{1}$H-$^{13}$C-RMN)). En el espectro de $^{1}$H-RMN del 6-formil-9-metoxi-2,5-dihidro-1-benzoxepina **6d** (**Figura 2.30**) se muestra sistemas de multipletes cuya integración son consistentes con los 12 hidrógenos de la fórmula condensada ($C_{12}H_{12}O_3$) del compuesto **6d**, distribuidos así: 1 hidrógeno en la región aldehídica, 2 hidrógenos en la región aromática, 2 hidrógenos en la región olefínica y 7 hidrógenos en la región alifática. Asimismo, el espectro de $^{13}$C-RMN exhibió 12 señales que coincidieron con el número de carbonos (12) esperado.

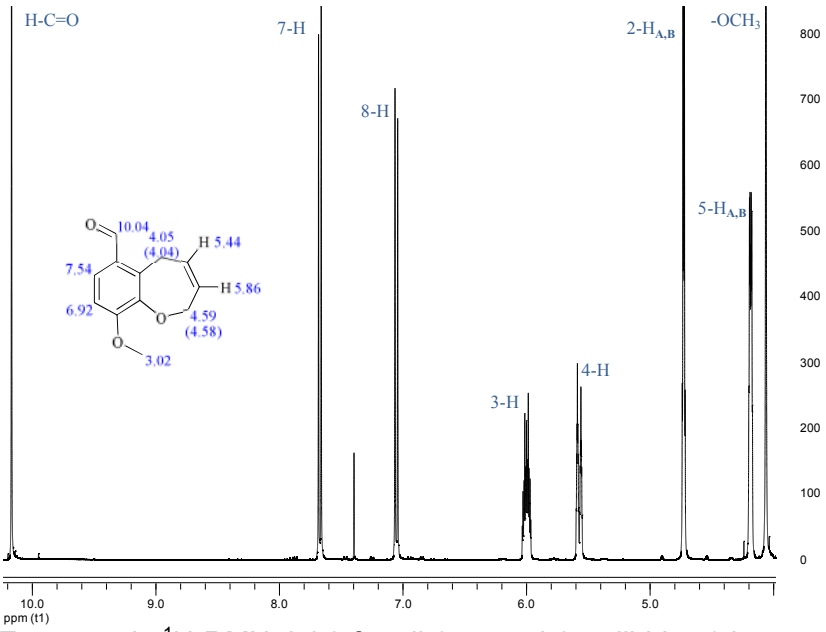



**Figura 2.30.** Espectro de $^{1}$H-RMN del 6-formil-9-metoxi-2,5-dihidro-1-benzoxepina **6d**.

Los espectros de resonancia de las moléculas cicladas **6a-e** presentaron diferencias marcadas en las señales de los protones y carbonos correspondientes a los sistemas olefínicos. La comparación de estos cambios en las señales de los espectros se ilustra en las **Figuras 2.31-2.33**.

La disminución en 28 unidades de masa a partir de los compuestos dialilados, implicó que en los espectros de $^{1}$H y de $^{13}$C de las moléculas **6a-e**, se notara la ausencia de 4 H y 2 C en las regiones olefínicas, respectivamente. La evidencia más fuerte de la ciclación intramolecular padecida por los compuestos **4a-e** fue la desaparición de las

cuatro señales de dobles cuartetas, asignadas a los hidrógenos =C**H$_{2AB}$** de los dos grupos alilo (**Figura 2.31**). Las señales de estos hidrógenos estuvieron localizadas entre 5.40 y 4.88 ppm.

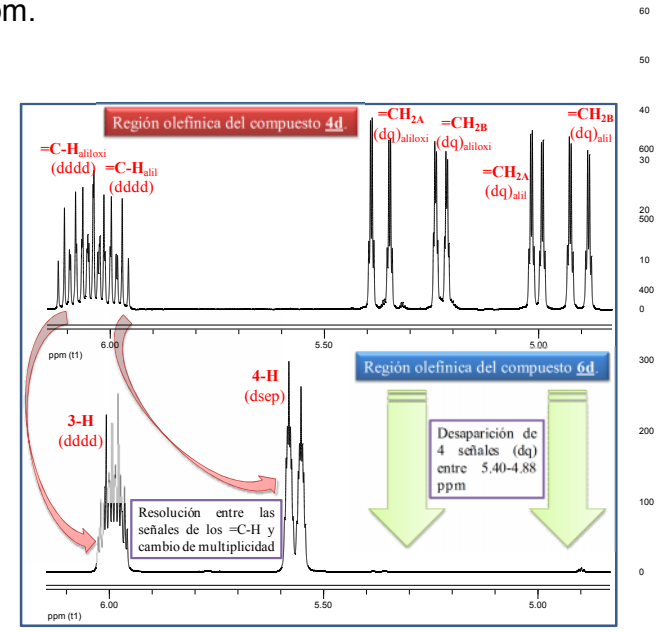



**Figura 2.31.** Ampliación y comparación de la región olefínica de los espectros $^{1}$H-RMN de **4d** y **6d**, indicando la desaparición de las 4 señales de los =CH$_{2AB}$ de los 2 grupos alilo.

Por otra parte, las señales correspondientes a los hidrógenos internos (**H**-C=) de los grupos aliloxi y alilo de las moléculas abiertas, prácticamente se solapaban y no se podían distinguir fácilmente. Los hidrógenos olefínicos en las moléculas cicladas presentaron diferentes desplazamientos químicos y multiplicidades: el protón 3-**H** con multiplicidad de dddd estuvo ubicado en 5.88 ppm, mientras que, el protón 4-**H** fue una doble septeta localizada en 5.46 ppm. Las multiplicidades de estas señales y sus desplazamientos químicos se exhiben en la **Figura 2.32**. Otro cambio espectral notorio fue la ausencia de 2 señales en la región olefínica del espectro de resonancia de $^{13}$C del compuesto **6d**, las cuales se encontraban ubicadas en 117.5 y 115.6 ppm en el espectro de **4d**. De la misma forma, como las señales de los hidrógenos metilénicos alifáticos se redistribuyeron, también lo hicieron las señales de los carbonos respectivos. Todos estos cambios se indican en la **Figura 2.33**.

La **Tabla 2.19** resume las asignaciones protónicas para todos los compuestos sintetizados por RCM.

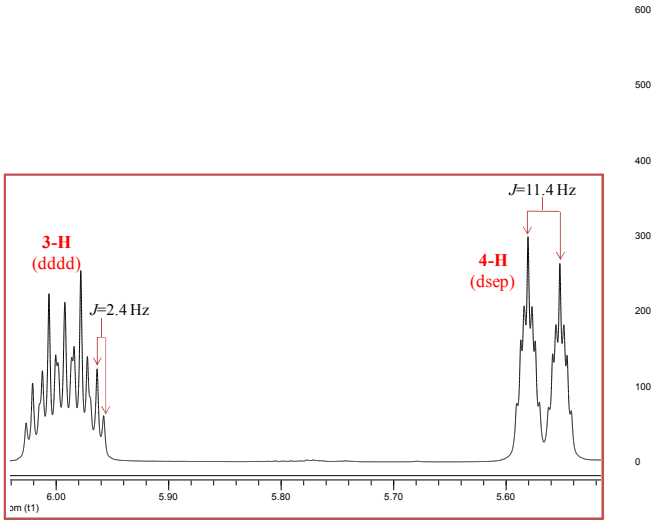



**Figura 2.32.** Desdoblamientos de los hidrógenos olefínicos del anillo oxepínico en el espectro de $^{1}$H-RMN del compuesto **6d** (zona ampliada).

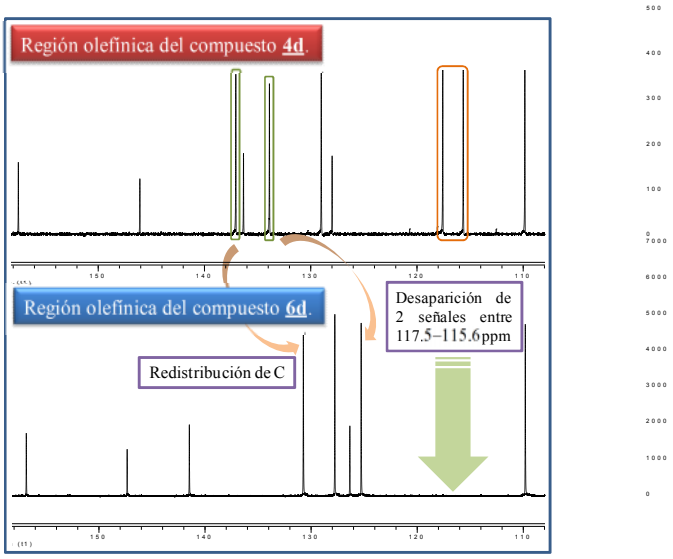



**Figura 2.33.** Ampliación y comparación de la región olefínica de los espectros $^{13}$C-RMN de **4d** y **6d**, indicando la desaparición de 2 señales de los =$CH_{2AB}$ de los 2 grupos alilo.

**Tabla 2.19.** Señales características de los hidrógenos metilénicos (-$CH_{2A}$-) y olefínicos (H-C=C-H) de los compuestos **6a-e**, basados en los espectros $^{1}$H-RMN.

| Comp. | Señales $^{1}$H-RMN [δ (ppm), multiplicidad y *J* (Hz)] | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | **2-$H_A$** | **2-$H_B$** | **3-$H_A$** | **4-$H_A$** | **5-$H_A$** | **5-$H_B$** |
| **6a** | 4.59, t, *J*=2.4 | 4.58, t, *J*=2.5 | 5.84, dddd, *J*=13.4, 7.6, 2.2 | 5.46, dsep, *J*=11.5, 4.6, 2.8, 1.5 | 3.49, q, *J*=2.2 | 3.48, q, *J*=2.2 |
| **6b** | 4.67, t, *J*=2.1 | 4.65, t, *J*=2.0 | 5.93, dddd, *J*=13.0, 7.4, 2.0 | 5.55, dsep, *J*=11.4, 4.9, 3.3, 1.6 | 3.57, q, *J*=1.9 | 3.56, q, *J*=1.8 |
| **6c** | 4.60, t, *J*=2.4 | 4.59, t, *J*=2.5 | 5.83, dddd, *J*=13.2, 7.7, 2.3 | 5.46, dsep, *J*=11.5, 4.4, 2.8, 1.6 | 3.47, q, *J*=2.2 | 3.46, q, *J*=2.2 |
| **6d** | 4.62, t, *J*=2.4 | 4.60, t, *J*=2.4 | 5.88, dddd, *J*=13.8, 8.1, 2.4 | 5.46, dsep, *J*=11.4, 4.0, 2.6, 1.4 | 4.07, q, *J*=1.8 | 4.05, q, *J*=1.8 |
| **6e** | 4.56, t, *J*=2.4 | 4.54, t, *J*=2.3 | 5.87, dddd, *J*=13.6, 8.0, 2.2 | 5.55, dsep, *J*=11.2, 4.4, 2.8, 1.4 | 3.49, q, *J*=1.9 | 3.47, q, *J*=1.8 |

El espectro $^{1}$H-$^{1}$H-RMN del 6-formil-9-metoxi-2,5-dihidro-1-benzoxepina, se muestra en la **Figura 2.34**, donde se señalan todas las posibles correlaciones (encerradas en rectángulos) existentes entre los 6 protones del anillo oxepínico de la estructura. En la parte inferior izquierda del espectro se encuentra indicados los acoplamientos que relaciona los dos hidrógenos olefínicos (**H**´-C=C-**H**) de **6d**, mostrando una conectividad vecinal (3 enlaces). Se señala además, las conectividades entre este tipo de H con sus respectivos hidrógenos metilénicos vecinales (-C**H$_2$**-C(-**H**´)=CH-CH$_2$- y -CH$_2$-H´C=(**H**-)C-C**H$_2$**-), aunque las intensidades de estas manchas fueron bajas.

Sin embargo, llama la atención que este espectro $^{1}$H-$^{1}$H mostró la conectividad de largo alcance (4 y 5 enlaces) entre los hidrógenos olefínicos y los metilénicos. Es así, como se muestra el acoplamiento *alílico* o "W" a 4 enlaces y el acoplamiento *homoalílico* o *bis-alílico* (a 5 enlaces) entre los H metilénicos [147,151,152]. El acoplamiento W (letra roja) entre los hidrógenos metilénicos unido directamente al anillo con el protón olefínico a 4 enlaces (-CH$_2$-(**H**-)C=CH-C-**H$_2$**-) presentó mayor intensidad posiblemente a que la distancia entre ellos fue menor que la distancia entre los hidrógenos metilénicos unido al oxígeno con su respectivo protón olefínico a 4 enlaces (-**H$_2$**-C-HC=C-(**H**)-CH$_2$-), también con acoplamiento W (letra azul).

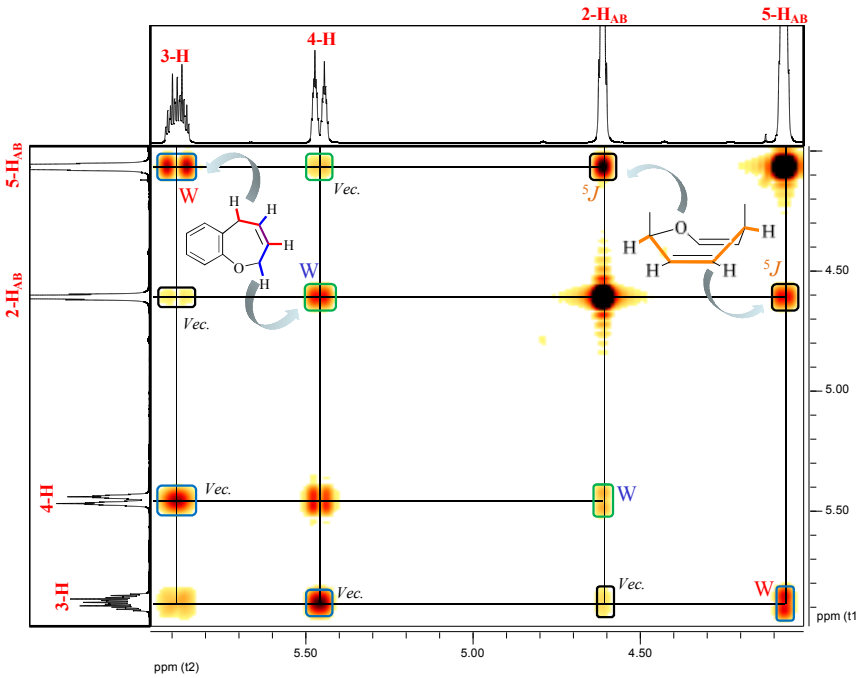



**Figura 2.34.** Correlación existente entre los hidrógenos olefínicos y metilénicos de anillo oxepínico en el compuesto **6d**, de acuerdo con el espectro de $^{1}$H-$^{1}$H-RMN.

Lo expuesto anteriormente se argumentó de acuerdo con la optimización de la geometría de la estructura **6d** (y de las otras moléculas cicladas) mediante cálculos computacionales empleando el software Gaussian 03 con método/conjunto base B3LYP/6-311++G(d,p). La **Figura 2.35** ilustra la estructura optimizada de la 6-formil-9-metoxi-2,5-dihidro-1-benzoxepina orientada de 4 formas diferentes, donde se observa que el anillo oxepínico presentó una conformación de bote torsionado (**B.**), lo cual está en concordancia con lo reportado por van Otterlo *et al.* del análisis por rayos-X de monocristal de una benzoxepina [153]. La conformación de bote torsionado es una de las cuatro posibles conformaciones que puede tomar una anillo de siete miembros [154-156] (ver **Anexo 4**).

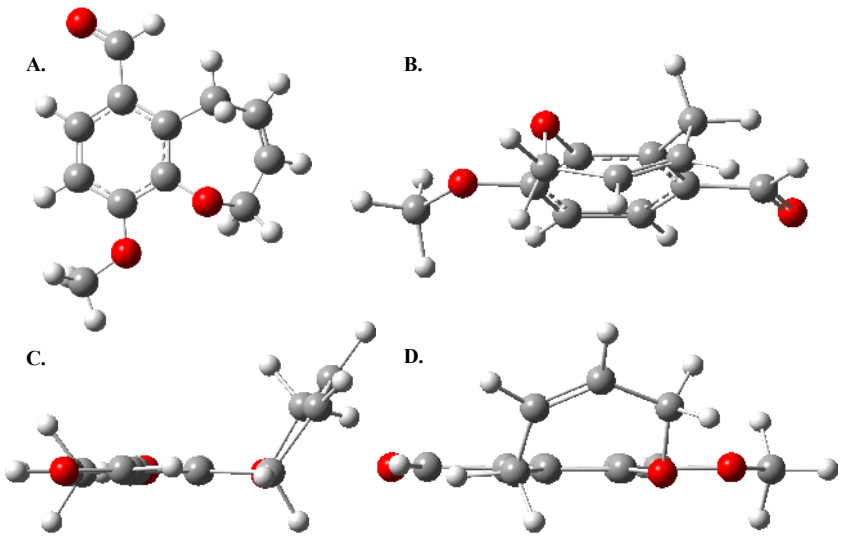



**Figura 2.35.** Estructura optimizada del compuesto **6d** obtenida por Gaussian 03 (B3LYP/6-311++G(d,p). **A.** Vista frontal; **B.** Conformación anillo oxepínico bote torsionado; **C.** Ubicación sobre plano principal (sobre sistema aromático); y **D.** Rotación sobre plano mostrando el anillo de 7 miembros.

Los datos de las distancias de enlace entre los átomos que conformaron el anillo oxepínico, según los cálculos fueron: 1.37 Å ($C_{10}$-$O_1$), 1.43 Å ($O_1$-$C_2$), 1.50 Å ($C_2$-$C_3$), 1.33 Å ($C_3$=$C_4$), 1.52 Å ($C_4$-$C_5$), 1.52 Å ($C_5$-$C_{11}$) y 1.40 Å ($C_{11}$-$C_{10}$). Estos datos mostraron que hay una discrepancia considerada entre las longitudes de enlace entre los dos grupos metilénicos, respecto al $C_3$=$C_4$ y posiblemente esto se reflejó en los espectros de RMN (no tan sólo en el experimento bidimensional sino en el monodimensional), *e.g.*, las diferentes multiplicidades que presentaron los 2 H

olefínicos (**$CH_2$-**C(-**H**´)=C(-**H**)-$CH_2$-), a pesar de su aparente similitud (ver **Figura 2.32**).

Así es como la distancia interatómica más corta, entre $CH_2$-(**H**-)C=CH-C-**$H_2$**-, fue de 3.93 Å; mientras que, la misma distancia entre -**$H_2$**-C-HC=C-(**H**)-$CH_2$-, fue de 4.11 Å (**Figura 2.36**), lo cual podría justificar la diferencia en la forma e intensidad de los acoplamientos "W" entre los H olefínicos y los metilénicos respectivos. Las constantes de acoplamiento calculadas para estos protones no mostraron este alcance. Realmente interesante, resultó el acoplamiento *bis-alílico* (acoplamiento a cinco enlaces) entre los protones metilénicos del anillo de 7 miembros. El mecanismo propuesto para este acoplamiento es el mismo que el del acoplamiento alílico (hiperconjugación), y como se presentó en una estructura cíclica, tiene una dependencia notable del ángulo diédrico involucrado [147]. En este caso, los dos grupos metilénicos tuvieron ángulos diédricos de 126.3-126.9° y la distancia interatómica más corta, entre ellos (-**$H_2$**-C-HC=CH-C-**$H_2$**-) fue de 3.83 Å (**Figura 2.36**).

De ahí el hecho, que en el espectro $^1$H-$^1$H el acoplamiento entre los H metilénicos fue mayor en intensidad, que los mismos acoplamientos "W" entre los H metilénicos y olefínicos respectivos (puesto que presentaron mayores distancias comparadas con la del acoplamiento homoalílico). El valor promedio obtenido de las *J* para los dos grupos de protones metilénicos fue 2.1 Hz, cercana a los valores determinados para este acoplamiento (J= 1–2 Hz) [146].

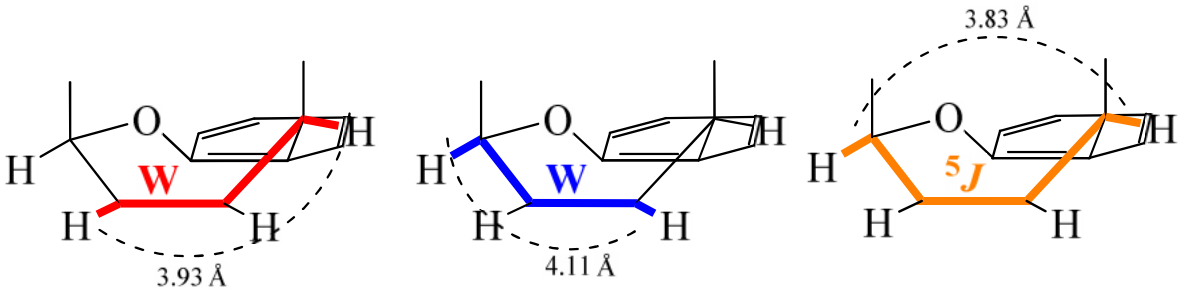



**Figura 2.36.** Menores distancias de enlace permitidas para acoplamiento a largo alcance (alílico y homoalílico) de los hidrógenos metilénicos y olefínicos en el anillo oxepínico de **6d**.

El espectro del experimento HMQC vía acoplamiento $^{13}C$-$^{1}H$ del 6-formil-9-metoxi-2,5-dihidro-1-benzoxepina se presenta en la **Figura 2.37**, en el que se señala la relación entre los protones y carbonos del anillo oxepínico (enmarcados en rectángulos).

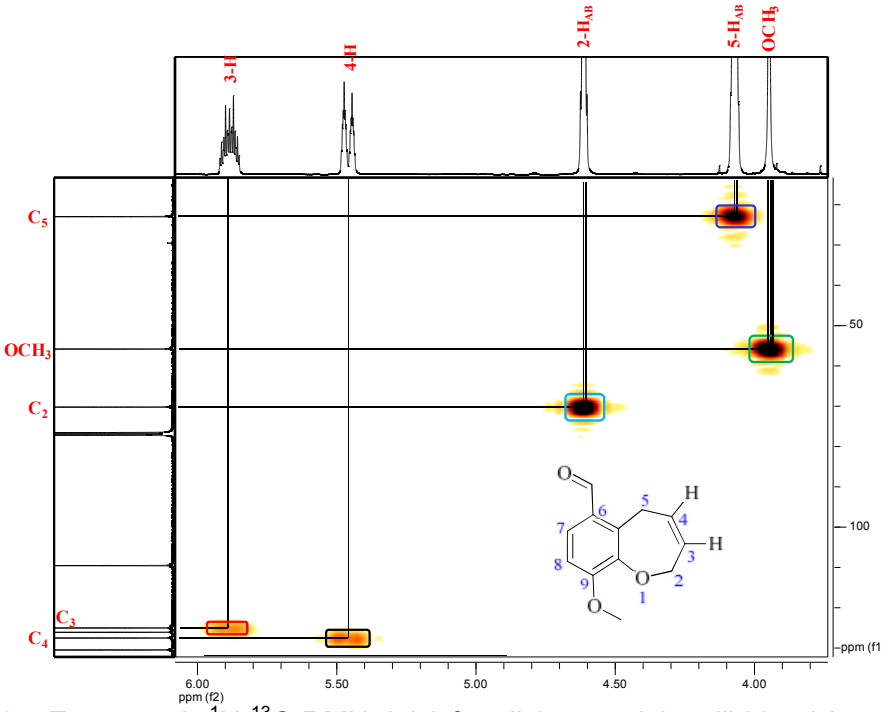


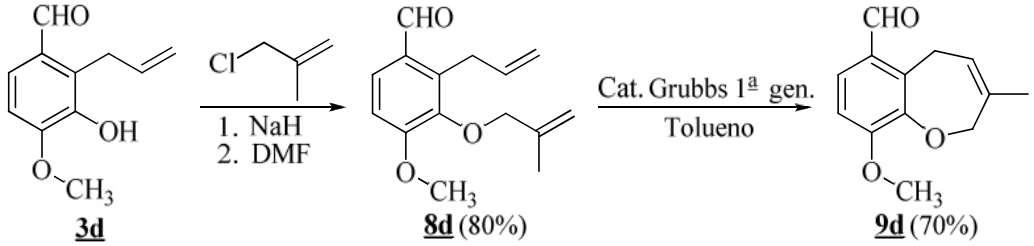

**Figura 2.37.** Espectro de $^{1}H$-$^{13}C$-RMN del 6-formil-9-metoxi-2,5-dihidro-1-benzoxepina (**6d**) señalando la conectividad entre los hidrógenos y carbonos del anillo oxepínico.

Los carbonos que enlazaron a los 2 hidrógenos olefínicos (-$CH_2$-(**H**)-**C**=**C**-(**H**)-$CH_2$-) del anillo oxepínico, fueron $C_4$ y $C_3$ ubicados en 127.7 y 125.2 ppm, respectivamente. El carbono $C_4$ acopló con el hidrógeno olefínico localizado a menor frecuencia ($\delta$ 5.46 ppm); mientras que, el carbono $C_3$ con el hidrógeno olefínico ubicado a mayor frecuencia ($\delta$ 5.88 ppm). Las conectividades C-H de los grupos metilénicos (-**$H_2$**-**C**-CH=CH-**C**-**$H_2$**-) fueron $C_2$ ($\delta$ 70.3 ppm) que acopló con los 2 hidrógenos ubicados en 4.62 y 4.60 ppm y los otros 2 hidrógenos localizados en 4.07 y 4.05 ppm enlazaron con el carbono $C_5$ con desplazamiento de 23.0 ppm.

**2.6.6 Intento de síntesis de 1-benzoxepin-2(*5H*)-onas sustituidas (7a-e) (Etapa IVb).** Como se mencionó anteriormente en el **Numeral 2.5.9**, la preparación de 1-benzoxepin-2(*5H*)-onas mediante RCM, en las mismas condiciones, no fue posible

puesto que el catalizador de Grubbs de 1ª generación fue ineficaz para realizar la ciclación, por la interacción de éste con el grupo CO, impidiendo la metátesis olefínica por la formación de un hipotético quelato metálico estable improductivo de ocho miembros (coordinación del grupo éster con el carbeno intermediario de Ru) [123,157,158].

**2.6.7 2-Alil-4-metoxi-3-(2-metilaliloxi) benzaldehído sintetizado como precursor para 3-metil-2,5-dihidro-1-benzoxepina sustituida.** La introducción del grupo 2-metilalilo en la estructura del fenol **3d**, se observó en el espectro IR del compuesto **8d** (**Figura 2.38**), por la ausencia de las bandas de flexión-tensión del OH, por la conservación e incremento de la intensidad de las bandas de absorción características de las olefinas (grupos alilo y 2-metilalilo) y la manifestación de las frecuencias vibracionales características de la función éter.




**Esquema 2.26.** Esquema general para la obtención de compuesto metalilado y la ciclación mediante la reacción de RCM.

El espectro de IR del compuesto **8d** mostró las diferentes bandas de absorción provenientes de las vibraciones de los enlaces =C(H), $-CH_2-$ y $-CH_3$ presentes en los grupos alilo y metatilo en la estructura; así, las frecuencias de tensión del enlace =C-H olefínico asimétrico, las del enlace C-H de metilo y metilenos asimétrico y simétrico se encontraron en 3077, 2977, 2923 y 2846 $cm^{-1}$, respectivamente. Estas bandas fueron de gran intensidad si se comparan con el espectro IR de **5d**. Nuevamente, las absorciones características de la función éter C-O-C se evidenciaron como bandas muy intensas por las vibraciones de estiramientos asimétrico (1280 $cm^{-1}$) y simétrico (1087 $cm^{-1}$) de estos enlaces. La ausencia de las vibraciones del estiramiento del O-H intermolecular (3564 $cm^{-1}$), las de torsión del OH en el plano (1450 $cm^{-1}$) y las de tensión del C-OH (1265 y 1196 $cm^{-1}$) indicaron la conversión del compuesto **3d** a **8d**.

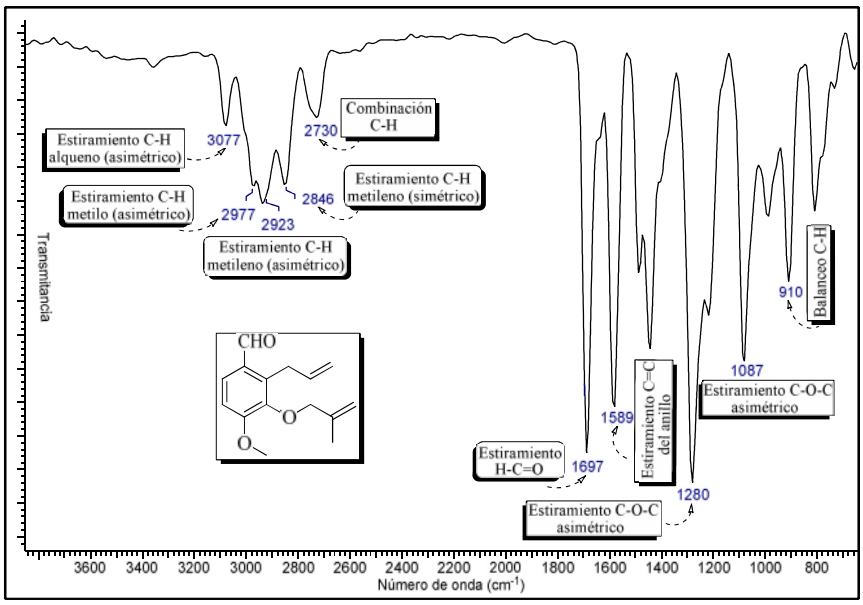



**Figura 2.38.** Espectro IR del acrilato de 2-alil-4-metoxi-3-(2-metilaliloxi) benzaldehído **8d**.

La identificación del grupo 2-metilalilo y la determinación de la masa molecular de **8d** (**Figura 2.39**) se realizó por espectrometría de masas. Este compuesto presentó un ion molecular de baja intensidad (2%) con *m/z* 246, coincidente con la masa esperada. Su ion pico de base presentó una relación *m/z* de 191 correspondiente a la pérdida de 55 unidades másica (radical metalilo) desde el ion molecular. No obstante, el catión metalilo $C_4H_7^+$ (ion complementario) también se encontró en el espectro de masas con relación *m/z* 55 (26%).

La confirmación estructural del 2-alil-4-metoxi-3-(2-metilaliloxi) benzaldehído se efectuó por RMN de $^1$H y $^{13}$C. La **Figura 2.40**, enseña el espectro de $^1$H-RMN del compuesto **8d** y tiene indicado los hidrógenos encontrados: 1 hidrógeno en la región aldehídica, 2 hidrógenos en la región aromática, 5 hidrógenos en la región olefínica y 10 hidrógenos en la región alifática. El contenido de carbono se determinó con base en el espectro de $^{13}$C-RMN, el cual exhibió 14 señales (una de ellas incrementada al doble) correspondientes a los 15 carbonos del esqueleto estructural de **8d**.

La introducción del grupo 2-metilalilo en la estructura del 2-alil-3-hidroxi-4-metoxi benzaldehído **3d** fue innegable por la ausencia, en el espectro de $^1$H-RMN del compuesto **8d**, de la señal del H-O fenólico ( 5.94 ppm) junto con la aparición de 4

nuevas señales singulete. Los desdoblamientos producidos por los 5 hidrógenos del grupo alilo transpuesto junto con 4 de los 7 hidrógenos del grupo metalilo adicionado, se amplían en la **Figura 2.41**.

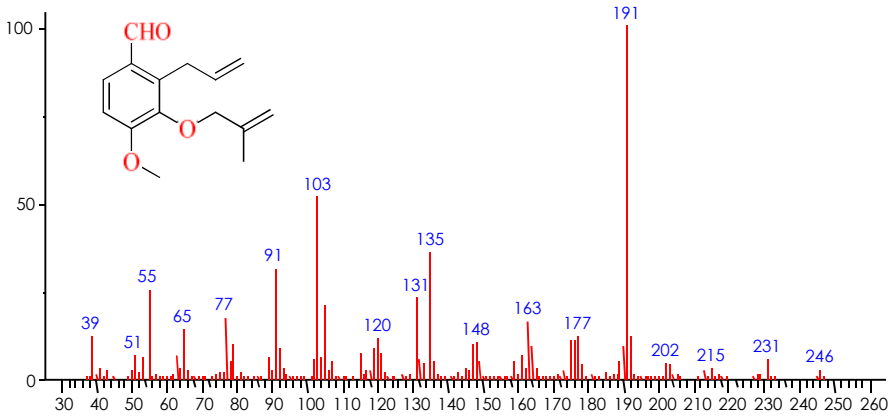



**Figura 2.39.** Espectro de masas del 2-alil-4-metoxi-3-(2-metilaliloxi) benzaldehído.

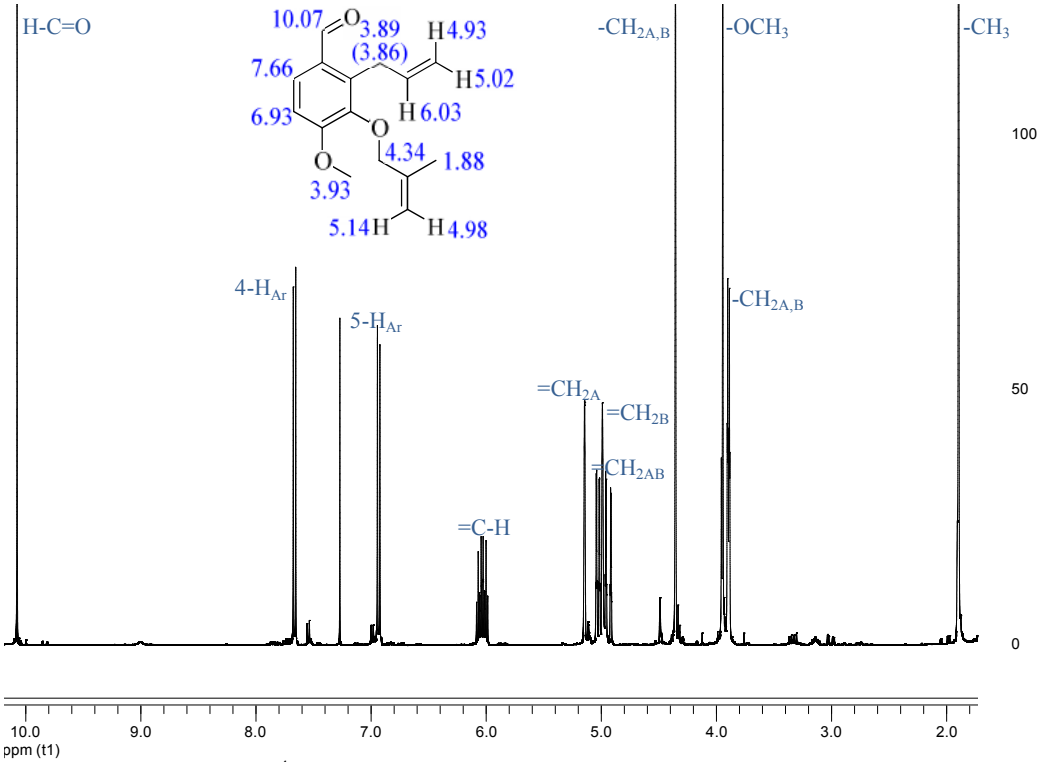



**Figura 2.40.** Espectro de $^{1}$H-RMN del 2-alil-4-metoxi-3-(1-metilaliloxi) benzaldehído **8d**.

Debido a la estructura de la función 2-metilalilo (-$CH_2$-C(=$CH_2$)-$CH_3$), prácticamente cada grupo de hidrógeno se encontró aislado y no se observaron desdoblamientos (los hidrógenos más cercanos estuvieron a cuatro enlaces). Por lo cual, sus

multiplicidades correspondieron para todos los casos a singuletes. Sin embargo, los hidrógenos metilénicos olefínicos (-$CH_2$-C(=C**H**$_2$)-$CH_3$)) presentaron diferentes desplazamientos químicos (δ 5.14 y 4.98 ppm) con multiplicidad de singuletes anchos.

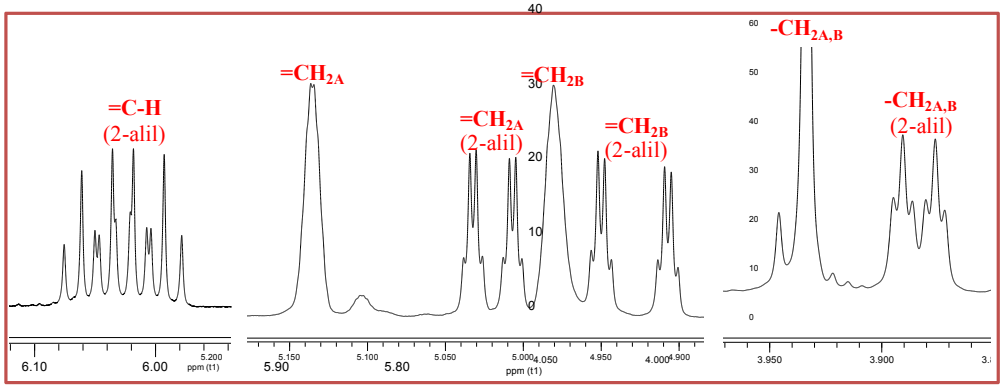


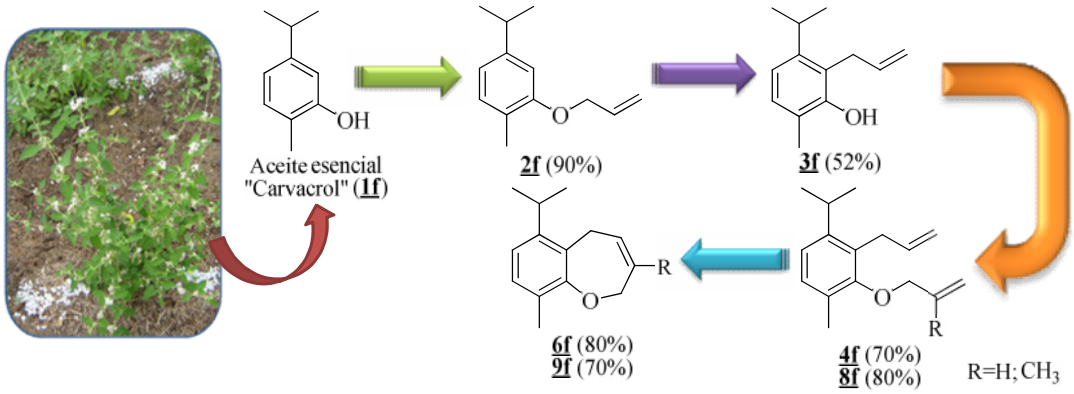

**Figura 2.41.** Ampliación de las diferentes multiplicidades de los hidrógenos metilénicos y olefínicos de los grupos alilo y 2-metilalilo, en el espectro de $^1$H-RMN del compuesto **8d**.

En cuanto a los 2 hidrógenos metilénicos (-C**H**$_2$-C(=$CH_2$)-$CH_3$)) se localizaron a 4.34 ppm; mientras que, los 3 hidrógenos del metilo (-$CH_2$-C(=$CH_2$)-C**H**$_3$) estuvieron a 1.88 ppm. Los desplazamientos y las multiplicidades de los hidrógenos del grupo alilo fueron similares a los obtenidos anteriormente en las otras series de compuestos: H interno olefínico (-$CH_2$-(**H**)-C=$CH_2$), 6.03 ppm (dddd, *J*=17.0 Hz); hidrógenos terminales olefínicos (-$CH_2$-HC=C**H**$_2$), 5.02 (dq, *J*=10.2 Hz) y 4.93 ppm (dq, *J*=17.1 Hz). Los hidrógenos metilénicos (-C**H**$_2$-HC=$CH_2$), por su parte, se localizaron en 3.89 y 3.86 ppm (t, *J*=1.7 Hz).

La presencia de cuatro singuletes distribuidos 2 entre la región de señales olefínicas (δ 5.14 y 4.98 ppm) y 2 entre la región de señales alifáticas (δ 4.34 y 1.28 ppm) constatan la presencia del grupo 2-metilalilo en la estructura. Además, la aparición de 4 nuevas señales a 141.5, 112.5, 28.8 y 19.6 ppm (correspondientes a -**C**$H_2$-**C**(=**C**$H_2$)-**C**$H_3$), en el espectro de $^{13}$C, confirman la presencia del grupo 2-metilalilo en la estructura.

**2.6.8 Aplicación de la síntesis en el aceite esencial de *Lippia origanoides*.** La validación de la ruta sintética se efectuó sobre el aceite esencial de *Lippia origanoides* que tiene alrededor de 19 componentes (ver **Capitulo 1**), destacándose por su alto

contenido de carvacrol y timol (45 y 15 %, respectivamente). A esta mezcla compleja no se le realizó pre-purificación sino que se utilizó como un todo (tomándose una cantidad suficiente del AE que permitiera obtener por lo menos 1 g del compuesto **2f**), en la primera etapa de la síntesis (**Esquema 2.27**).




**Esquema 2.27.** Esquema general para la síntesis con el aceite esencial de *Lippia origanoides*.

Durante la discusión de esta parte, los datos que a continuación se reportan se basan en la comparación con los datos obtenidos y verificados para todas las series realizadas con el timol. Las condiciones experimentales empleadas para este AE fueron las mismas que se determinaron para el compuesto **1e**.

Las bandas características de absorción de los espectros IR tomados para todas las moléculas **2**-**4f** fueron muy similares a las de las moléculas análogas **2**-**4e**, presentando pequeños corrimientos en los números de onda (ver **Numeral 2.5.11**). Sin embargo, algunos espectros de masas de las moléculas preparadas (*e.g.*, **2e** y **2f**) mostraron diferencias notorias en las intensidades (**Tabla 2.20**) aunque el patrón de fragmentación fue el mismo (las mismas relaciones *m/z*). El valor de masa molecular esperada (*m/z* 190) junto con la presencia del ion en *m/z* 41 (catión alilo) y la marcada diferencia (en intensidades) con el espectro de masas del compuesto **2e** son buenos indicadores de la efectiva obtención de la molécula **2f**.

La confirmación estructural se realizó por RMN de $^{1}$H y de $^{13}$C. La distribución de hidrógenos del compuesto **2f** fue la misma que la del compuesto **2e**: 3 hidrógenos en la región aromática, 3 hidrógenos en la región olefínica y 12 hidrógenos en la región

alifática, los cuales son consistentes con la estructura esperada. Por su parte, el espectro de $^{13}$C-RMN exhibió 12 señales (una de ellas incrementada al doble) correspondientes a los trece carbonos que constituyen la estructura de **2f**.

**Tabla 2.20.** Iones característicos obtenidos por CG-EM de los compuestos **2e** y **2f**.

| Comp. | Nombre | Iones característicos, *m/z* (I%) |
|---|---|---|
| **2e** | 1-Aliloxi-2-isopropil-5-metil-benceno | 190 ($\mathbf{M^{+\cdot}}$, 76%); 175 (100%); 147 (47%); 133 (34%); 121 (69%); 105 (33%); 91 (35%); 41 (9%) |
| **2f** | 1-Aliloxi-5-isopropil-2-metil-benceno | 190 ($\mathbf{M^{+\cdot}}$, 100%); 175 (92%); 149 (44%); 147 (69%); 133 (35%); 121 (28%); 105 (54%); 91 (46%); 41 (16%) |

En la **Tabla 2.21**, se encuentran publicados los desplazamientos químicos y las multiplicidades de los hidrógenos del anillo y del grupo alilo de los compuestos **2e** y **2f**.

**Tabla 2.21.** Señales características de los hidrógenos aromáticos y alílicos encontrados en los compuestos **2e** y **2f**, con base en los espectros $^{1}$H-RMN.

| Comp. | Señales $^{1}$H-RMN [ (ppm), multiplicidad y *J* (Hz)] | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 3-$H_{Ar}$ | 4-$H_{Ar}$ | 6-$H_{Ar}$ | H-C= | =$CH_{2A}$ | =$CH_{2B}$ | -$CH_{2A}$ | -$CH_{2B}$ |
| **2e** | 7.14, d, *J*=7.7 | 6.79, d, *J*=7.7 | 6.70, s | 6.12, dddd, *J*=17.2, 10.5, 4.9, 1.7 | 5.48, dq, *J*=17.3, 1.7 | 5.30, dq, *J*=10.6, 1.6 | 4.58, t, *J*=1.6 | 4.56, t, *J*=1.6 |
| **2f** | 7.08, d, *J*=7.5 | 6.76, d, *J*=7.6 | 6.72, s | 6.11, dddd, *J*=17.3, 10.5, 5.0, 1.7 | 5.46, dq, *J*=17.3, 1.7 | 5.30, dq, *J*=10.5, 1.5 | 4.58, t, *J*=1.4 | 4.57, t, *J*=1.4 |

Como se observa de esta **Tabla**, las diferencias existentes en desplazamientos químicos y las constantes de protones del sistema aromático y grupo alilo, entre los dos compuestos son muy pequeñas (de ahí la similitud estructural). Sin embargo, las diferencias espectrales la aporta el hidrógeno central del grupo isopropilo (-C**H**-$(CH_3)_2$) el cual en el compuesto **2e** se encuentra a 3.37 ppm; mientras que, se ubica en 2.88 ppm, en el compuesto **2f** (**Figura 2.42**). Es así, como este protón es el que percibe la influencia del átomo de oxígeno en su entorno.

Aunque con el espectro de protones sólo se pudo encontrar una diferencia entre **2e** y **2f**, la diferenciación de las estructuras la aportó el espectro de $^{13}$C puesto que los

desplazamientos químicos para mayoría de carbonos fueron completamente diferentes en las dos moléculas.

Seguidamente, el compuesto **2f** fue sometido a la transposición de Claisen, con base en la metodología descrita en el **Numeral 2.5.5**, obteniéndose **3f** como un aceite amarillo translúcido muy similar al compuesto **3e**. Esta similitud nuevamente se observó en los espectros de masas e IR.

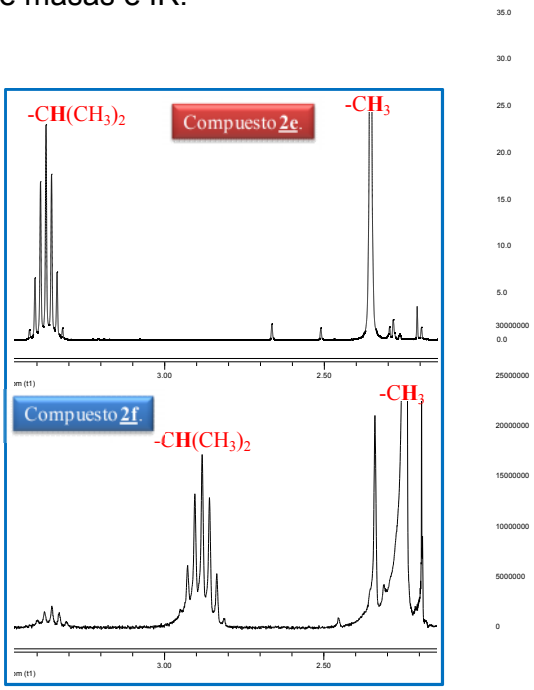



**Figura 2.42.** Ampliación y comparación de la región alifática de los compuestos **2e** y **2f** indicando el corrimiento de la señal de -C**H**-$(CH_3)_2$

La demostración de la similitud estructural se resalta en la **Figura 2.43**, la cual enseña la comparación de los espectros IR de los compuestos **3e** (línea roja) y **3f** (línea negra). El espectro IR de la molécula **3f** presentó las mismas cuatro bandas de absorción características de la molécula **3e**: 3563, 1457, 1263 y 1187 $cm^{-1}$ (con pequeñas diferencias en los números de onda e intensidades), atribuidas las vibraciones de tensión del O-H, de torsión o flexión del O-H y de estiramientos del C-OH, respectivamente.

La conversión de **2f** al **3f** a través del reordenamiento intramolecular de Claisen se verificó por RMN de $^{1}H$ y de $^{13}C$. En el espectro de $^{1}H$-RMN se encontró la siguiente distribución de hidrógenos: 2 hidrógenos en la región aromática, 3 hidrógenos en la

región olefínica, 1 hidrógeno en la región de fenoles y 12 hidrógenos en la región alifática, conforme con la estructura esperada. Por otro lado, el espectro de $^{13}$C-RMN exhibió 12 señales (una de ellas incrementada al doble) correspondientes a los 13 carbonos que constituyen la estructura de **3f**, pero con diferentes $\delta$ que los del compuesto precursor **2f**.

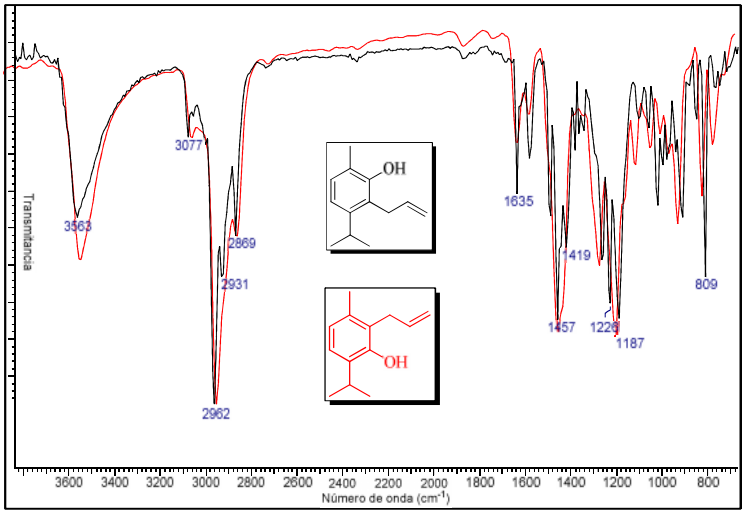



**Figura 2.43.** Comparación de los espectros de IR de 2-alil-3-isopropil-6-metil fenol (**3f**, línea negra) y 2-alil-6-isopropil-3-metil fenol (**3e**, línea roja).

La comparación de los acoplamientos y $\delta$ de los hidrógenos del sistema arílico y de los grupos OH y alilo de los compuestos **3e** y **3f**, se reportan en la **Tabla 2.22.** Con base en esta **Tabla** se aprecian claramente las diferencias entre el compuesto **2f** y el **3f**.

**Tabla 2.22.** Señales características de los hidrógenos del sistema arílico, OH y alilo de los compuestos **2f**, **3e** y **3f**, con base en los espectros $^{1}$H-RMN.

| Comp. | Señales $^{1}$H-RMN [$\delta$ (ppm), multiplicidad y *J* (Hz)] | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 5(3)-$H_{Ar}$ | 4-$H_{Ar}$ | 6-$H_{Ar}$ | =$CH_{2A}$ | =$CH_{2B}$ | -OH | -$CH_{2A}$ | -$CH_{2B}$ |
| **2f** | 7.08, d, *J*=7.5 | 6.76, d, *J*=7.6 | 6.72, s | 5.46, dq, *J*=17.3, 1.7 | 5.30, dq, *J*=10.5, 1.5 | ---- | 4.58, t, *J*=1.4 | 4.57, t, *J*=1.4 |
| **3e** | 7.05, d, *J*=7.8 | 6.81, d, *J*=7.8 | ---- | 5.17, m | 5.13, dq, *J*=12.8, 1.8 | 4.98, s | 3.49, t, *J*=1.7 | 3.48, t, *J*=1.7 |
| **3f** | 7.04, d, *J*=7.9 | 6.84, d, *J*=7.9 | ---- | 5.13, dq, *J*=10.1, 1.6 | 5.08, dq, *J*=17.2, 1.8 | 4.87, s | 3.52, t, *J*=1.6 | 3.51, t, *J*=1.6 |

Los compuestos **4f** y **8f** se obtuvieron mediante la reacción de síntesis de éteres de Williamson sobre **3f** empleando bromuro de alilo y cloruro de metalilo, de acuerdo con

las metodologías descritas en los **Numerales 2.5.6** y **2.5.10**, respectivamente. Los productos obtenidos fueron líquidos aceitosos incoloros. El compuesto **4f** presentó similitud estructural con el compuesto **4e**, evidenciado nuevamente en los espectros de IR y $^{1}$H-RMN.

El espectro de $^{1}$H-RMN mostró la siguiente distribución de hidrógenos: 2 hidrógenos en la región aromática, 6 hidrógenos en la región olefínica y 14 hidrógenos en la región alifática, concordante con la estructura esperada. El espectro de $^{13}$C-RMN, por su parte presentó 15 señales (una de ellas incrementada al doble) correspondientes a los 16 carbonos que constituyen la estructura de **4f**. La inclusión del otro grupo alilo en la estructura **3f** fue evidente por la ausencia de la señal protónica del OH fenólico ($\delta$ 4.87 ppm) junto con la aparición de tres nuevos grupos de señales. En la **Tabla 2.23** se comparan los datos de los desplazamientos químicos y las multiplicidades observadas en los compuestos **4e** y **4f**. La diferencia estructural de estos dos compuestos sólo de observa en la distribución de carbonos en el espectro de $^{13}$C-RMN.

**Tabla 2.23.** Señales características de los hidrógenos alílicos encontrados en los compuestos **4e** y **4f**, basados en los espectros $^{1}$H-RMN.

| Comp. | Señales $^{1}$H-RMN [$\delta$ (ppm), multiplicidad y *J* (Hz)] | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | H´-C= | H-C= | =CH´$_{2A}$ | =CH´$_{2B}$ | =CH$_{2A}$ | =CH$_{2B}$ | -CH´$_{2A}$ | -CH´$_{2B}$ | -CH$_{2A}$ | -CH$_{2B}$ |
| **4e** | 6.13, dddd, *J*=17.5, 10.5, 5.3, 1.4 | 5.99, dddd, *J*=17.5, 10.2, 5.7, 1.3 | 5.48, dq, *J*=17.2, 1.7 | 5.29, dq, *J*=10.5, 1.5 | 5.04, dq, *J*=10.2, 1.8 | 4.96, dq, *J*=17.1, 1.9 | 4.32, t, *J*=1.5 | 4.31, t, *J*=1.5 | 3.50, t, *J*=1.8 | 3.48, t, *J*=1.8 |
| **4f** | 6.08, dddd, *J*=17.6, 10.5, 5.3, 1.4 | 5.96, dddd, *J*=17.8, 11.3, 5.6, 1.4 | 5.44, dq, *J*=17.2, 1.7 | 5.25, dq, *J*=10.5, 1.4 | 5.01, dq, *J*=10.2, 1.7 | 4.89, dq, *J*=17.1, 1.9 | 4.29, t, *J*=1.4 | 4.28, t, *J*=1.4 | 3.50, t, *J*=1.8 | 3.49, t, *J*=1.8 |

El cuadro similar de IR para el compuesto **8f** confirmó la inserción del grupo 2-metilalilo en la estructura de **3f** presentándose las frecuencias de tensión del enlace =C-H olefínico asimétrico y las del enlace C=C del alqueno a 3077 y 1643 cm$^{-1}$, respectivamente. También se observaron las vibraciones típicas asimétrica (1257 cm$^{-}$

$^{1}$) y simétrica (1010 $cm^{-1}$) de los enlaces C-O-C y la tensión C-H de la función -$OCH_2$- (2869 $cm^{-1}$).

La estructura del compuesto **8f** fue confirmada con el espectro de $^{1}$H-RMN caracterizado porque se encontraron 2 hidrógenos en la región aromática, 5 hidrógenos en la región olefínica y 17 hidrógenos en la región alifática, relacionados con la estructura esperada. Además, 16 señales (una de ellas incrementada al doble) se registraron en el espectro de $^{13}$C-RMN, ajustados a los 17 carbonos que constituyen la estructura de **8f**. La inclusión del grupo 2-metilalilo en la estructura **3f** fue evidente por la ausencia de la señal protónica del OH fenólico ($\delta$ 4.87 ppm) junto con la aparición de cuatro nuevos singuletes correspondientes a los hidrógenos de -C**H$_2$**-C(=C**H$_{2AB}$**)-C**H$_3$**.

La etapa final de ciclación por RCM de las moléculas **4f** y **8f** se llevó a cabo cuya estructura se confirmó por IR y CG-EM. La **Tabla 2.24** presenta un resumen de los compuestos **2**-**8f** sintetizados (a partir del AE de *L. origanoides*), purificados y caracterizados en las etapas de la síntesis de 2,5-dihidro-1-benzoxepinas, con sus rendimientos y propiedades físicas.

**Tabla 2.24.** Resumen general de los compuestos **2**-**8f** obtenidos a partir del AE de *L. origanoides*.

| Comp. No. | Nombre | Fórmula condensada | P.M., (g/mol) | Relación EP:AE | Eficiencia (%) | Características físicas |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **2f** | 1-Aliloxi-5-isopropil-2-metil-benceno | $C_{13}H_{18}O$ | 190.28 | 90:1 | 89 | Aceite incoloro e inodoro |
| **3f** | 2-Alil-3-isopropil-6-metil-fenol | $C_{13}H_{18}O$ | 190.28 | 80:1 | 52 | Aceite amarillo, translúcido e inodoro |
| **4f** | 1-Aliloxi-2-alil-3-isopropil-6-metil-benceno | $C_{16}H_{22}O$ | 230.35 | Éter | 70 | Aceite incoloro e inodoro |
| **8f** | 2-alil-3-isopropil-6-metil-1-(2-metilaliloxi)-benceno | $C_{17}H_{24}O$ | 244.18 | 70:1 | 80 | Aceite incoloro e inodoro |
| **6f** | 6-Isopropil-9-metil-2,5-dihidro-1-benzoxepina | $C_{14}H_{18}O$ | 202.29 | 30:1 | 75% | Aceite amarillo, traslúcido |

## 2.7 CONCLUSIONES

1. La ruta sintética seleccionada de cuatro etapas, utilizando la reacción de Williamson, transposición de Claisen y metátesis olefínica con cierre de anillo, permitió eficientemente obtener cada uno de los intermediarios requeridos (alil-aril éteres, 2-alil fenoles y 2-alil-1-aliloxi bencenos) y los productos finales deseados (2,5-dihidro-1-benzoxepina), con rendimientos comprendidos entre 51-96%. La mayoría de compuestos sintetizados no se encuentran reportados en la literatura, lo que permite que puedan ser estudiadas sus actividades biológicas.

2. La transposición de Claisen de las moléculas *o*-aliladas puso de manifiesto la influencia de los sustituyentes del sistema aromático junto con el tipo de disolvente utilizado en la velocidad de dicha reacción. Así, los sustituyentes electrodonadores y electroatrayentes respectivamente, incrementaron y disminuyeron la velocidad de la reacción. A pesar que se obtuvieron los compuestos transpuestos de interés con rendimiento buenos (52-75%), es necesario buscar metodologías con condiciones más suaves para evitar la descomposición de los compuestos, ahorro de tiempo y energía y regio-control más preciso.

3. Todas las estructuras de los precursores, intermediarios y productos finales de la ruta propuesta fueron caracterizadas por métodos físico-químicos (IR, CG-EM, RMN). La mayor utilidad que presentaron estas herramientas instrumentales fue en el seguimiento de las reacciones de transposición de Claisen y en la metátesis olefínica con cierre de anillo, donde se confirmaron los reordenamientos y las ciclaciones intramoleculares, respectivamente. Este análisis espectroscópico detallado de las moléculas obtenidas sería muy útil en la identificación estructural de los compuestos fenólicos que abundan en el mundo vegetal y animal.

4. Mediante cálculos computacionales se precisó la estructura y se propuso la conformación más estable (bote torsionado) que puede presentar los anillos 1-benzoxepínicos obtenidos, en concordancia con lo reportado en la literatura. La

optimización de la geometría de estas moléculas permitió explicar los acoplamientos a largo alcance (alílicos y homoalílicos) de los espectros bidimensionales de RMN de estos compuestos, basados en las distancias interatómicas y ángulos diédricos.

5. La ruta sintética aplicada sobre el aceite esencial del *Lippia origanoides*, enriquecido en carvacrol, permitió obtener eficientemente la serie de compuestos correspondientes al carvacrol, demostrando por primera vez, el potencial sintético de los aceites esenciales como reactivos renovables.

## 2.8 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS


1. MACÍAS, F.A.; VARELA, R.M.; TORRES, A. and MOLINILLO, J.M.G.. Potential allelopathic guaianolides from cultivar sunflower leaves, cv. SH-222. *Phytochemistry*. **1993**, 34; p. 669-674.

2. HARRISON, B. and CREWS, P. The structure and probable biogenesis of Helianane, a heterocyclic sesquiterpene, from the Indo-Pacific sponge *Haliclona ?fascigera*. *J. Org. Chem.* **1996**, 62; p. 2646-2648.

3. MACÍAS, F.A.; MOLINILLO, J.M.G.; VARELA, R.M.; TORRES, A. and FRONCZEK, F.R. Structural elucidation and chemistry of a novel familiy of bioactive sesquiterpenes: Heliannuols. *J. Org. Chem.* **1994**, 59; p. 8261-8266.

4. ENGLER, M.; ANKE, T. and STERNER, O. Production of antibiotics by *Collybia nivalis*, *Omphalotus olearius*, a *Favolaschia* and a *Pterula* species on natural substrates. *Z. Naturforsch.* **1998**, 53c; p. 318-324.

5. ENGLER, M.; ANKE, T; STERNER, O. and BRANDT, U. Pterulinic acid and pterulone, two novel inhibitors of NADH: ubiquinone oxidoreductase (complex I) produced by a *Pterula* species. I. Production, isolation and biological activities. *J. Antibiot.* **1997**, 50(4); p. 325-329.

6. DREYER, M.; NUGROHO, B.W.; BOHNENSTENGEL, F.I.; EBEL, R.; WRAY, V.; WITTE, L.; BRINGMANN, G.; MÜHLBACHER, J.; HEROLD, M.; HUNG, P.D.; KIET, L. C. and PROKSCH, P. New insecticidal rocaglamide derivatives and related compounds from *Aglaia oligophylla*. *J. Nat. Prod.* **2001**, 64(4); p. 415-420.

7. MACÍAS, F. A.; MOLINILLO, J.M.G.; CHINCHILLA, D. and GALINDO, J.C.G. Heliannuoles – A structure-activity relationship (SAR) study. En: Macías, F.A.; Galindo, J.C.G.; Molinillo, J.M.G. and Cutler, H.G. Allelopathy: chemistry and mode of action of allelochemicals. Boca Ratón: CRC Press LLC, **2004**. p. 103-124.

8. BAUER, K.; GARBE, D. and SURBURG, H. Common fragance and flavor materials: preparation, properties and uses. Weinheim: Wiley-VCH, **2001**. 293p.

9. SNYDER, N.L.; HAINES, H.M. and PECZUH, M.W. Recent developments in the synthesis of oxepines. *Tetrahedron*. **2006**, 62; p. 9301-9320.

10. WANG, E.C.; HSU, M.K.; LIN, Y.L. and HUANG, K.S. A new synthesis of substituted 2,5-dihydro[*b*]oxepines. *Heterocycles*. **2002**, 57(11); p. 1997-2010.

11. HOBERG, J.O. Synthesis of seven-membered oxacycles. *Tetrahedron*. **1998**, 54; p. 12631-12670.

12. YAMAGUCHI, S.; FURIHATA, K.; MIYAZAWA, M.; YOKOYAMA, H. and HIRAI, Y. A new preparation of 2,5-dihydro-1-benzoxepins using Mitsunobu cyclization, and the synthesis of natural radulanins. *Tetrahedron Lett.* **2000**, 41; p. 4787-4790.

13. GRUBBS, R.H.; MILLER, S.J. and FU, G.C. Ring-closing metathesis and related processes in organic synthesis. *Acc. Chem. Res.* **1995**, 28; p. 446-452.

14. SCHWAB, P.; FRANCE, M.B.; ZILLER, J.W. and GRUBBS, R.H. A series of well-defined metathesis catalysts-synthesis of [$RuCl_2$(=CHR )($PR_3$)$_2$] and its reactions. *Angew.Chem.*, *Int. Ed. Engl.* **1995**, 34(18); p. 2039-2041.

15. MOSS, G.P. Nomenclature of fused and bridged fused ring systems (IUPAC recommendations 1998). *Pure Appl. Chem.* **1998**, 70(1); p. 143-216.

16. MACÍAS, F.A.; VARELA, R.M.; TORRES, A. and MOLINILLO, J.M.G.. Novel sesquiterpene from bioactive fractions of cultivar sunflowers. *Tetrahedron Lett.* **1993**, 34; p. 1999-2002.

17. ASAKAWA, Y.; KUSUBE, E.; TAKEMOTO, T. and SUIRE, C. New bibenzyls from *Radula complanata*. *Phytochemistry*. **1978**, 17; p. 2115-2117.

18. BREUER, M.; LEEDERA, G.; PROKSCHA, P. and HERBERT, B. Protocatechuic acid derivatives from *Hemizonia lobbii*. *Phytochemistry*. **1986**, 25(2); p. 495-497 .

19. MERIÇLI, F.; MERIÇLI, H.; BECKER, H. and ULUBELEN, A. A benzoxepine derivative from *Delphinium formosum*. *Phytochemistry*. **1996**, 42(4); p. 1257-1258.

20. DEAN, F.M. and TAYLOR, D.A.H. Extractives from east african timbers. Part ll. *Ptæroxylon obliquum*. *J. Chem. Soc. C*. **1966**; p. 114-116.

21. COMBER, M.F. and SARGENT, M.V. The synthesis of pacharin: a dibenzoxepine from the heartwood of *Bauhinia racemosa* Lamk. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*. **1990**; p. 1371-1373.

22. BACHER, M.; HOFER, O.; BRADER, G.; VAJRODAYA, S. and GREGER, H. Thapsakins: possible biogenetic intermediates towards insecticidal cyclopenta[*b*]benzofurans from *Aglaia edulis*. *Phytochemistry*. **1999**, 52; p. 253-263.

23. GREGER, H.; PACHER, T.; BREM, B.; BACHER, M. and HOFER, O. Insecticidal flavaglines and other compounds from Fijian *Aglaia* species. *Phytochemistry*. **2001**, 57; p. 57-64.

24. BUGNI, T.S. and IRELAND, C.M. Marine-derived fungi: a chemically and biologically diverse group of microorganisms. *Nat. Prod. Rep.* **2004**, 21; p. 143-163.

25. TUHINA, K.; BHOWMIK, D.R. and VENKATESWARAN, R.V. Formal syntheses of heliannuols A and D, allelochemicals from *Helianthus annus*. *Chem. Commun.* **2002**, p. 634-635.

26. WIJNBERG, J.B.P.A.; VAN VELDHUIZEN, A.; SWARTS, H.J.; FRANKLAND, J.C. and FIELD, J.A. Novel monochlorinated metabolites with a 1-benzoxepin skeleton from *Mycena galopus*. *Tetrahedron Lett*. **1999**, 40; p. 5767-5770.

27. ISHIKAWA, N.K.; YAMAJI, K.; TAHARA, S.; FUKUSHI, Y. and TAKAHASHI, K. Highly oxidized cuparene-type sesquiterpenes from a mycelial culture of *Flammulina velutipes*. *Phytochemistry*. **2000**, 54; p. 777-782.

28. ENGLER, M.; ANKE, T; STERNER, O. and BRANDT, U. Pterulinic acid and pterulone, two novel inhibitors of NADH: ubiquinone oxidoreductase (complex I) produced by a *Pterula* species. II. Physico-chemical properties and structure elucidation. *J. Antibiot*. **1997**, 50(4); p. 330-333.

29. MACÍAS, F.A.; VARELA, R.M.; TORRES, A.; OLIVA, R. M. and MOLINILLO, J. M. G. Bioactive norsesquiterpenoids from *Helianthus annuus* with potential allelopathic activity. *Phytochemistry*. **1998**, 48; p. 631-636.

30. _____. Potential allelopathic activity of natural plant heliannanes: a proposal of absolute configuration and nomenclature. *J. Chem. Ecol.* **2000**, 26; p. 2173-2186.

31. _____. Allelochemicals from sunflower leaves cv. Peredovick. *Phytochemistry*. **1999**, 52; p. 613-621.

32. GRUIJTERS, B.W.T.; VAN VELDHUIZEN, A.; WEIJERS, C.A.G.M. and WINJBERG, J.B.P.A. Total synthesis and bioactivity of some naturally occurring pterulones. *J. Nat. Prod.* **2002**, 65(4); p. 558-561.

33. HUANG, S.T.; KUO, H.S. and CHEN, C.T. Total synthesis of NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) antagonist pterulone and its analogue. *Tetrahedron Lett.* **2001**, 42; p. 7473-7475.

34. SARKHEL, S.; SHARON, A.; TRIVEDI, V.; MAULIK, P.R.; SINGH, M.M.; VENUGOPALAN, P. and RAY, S. Structure-based drug design: synthesis, crystal structure, biological evaluation and docking studies of mono- and bis-benzo[b]oxepines as non-steroidal estrogens. *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, 11; p. 5023-5033.

35. TANDON, V.K. and RAI, S. 2,3,4,5-Tetrahydro-1-benzoxepines a novel class of anti-implantation agents. *Lett. Drug Des. Discov.* **2005**, 2(1); p. 36-39.

36. TANDON, V.K.; SINGH, K.A.; AWASTHI, A.K.; KHANNA, J.M.; LAL, B. and ANAND, N. Chemo- and stereoselective synthesis of benzocycloheptene and 1-benzoxepin derivatives as $\alpha$-sympathomimetic and anorexigenic agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, 14; p. 2867-2870.

37. MACÍAS, F.A.; VARELA, R.M.; TORRES, A. and MOLINILLO, J.M.G. New bioactive plant heliannuols from cultivar sunflower leaves. *J. Nat. Prod.* **1999**, 62; p. 1636-1639.

38. ELLIOTT, M.C. Recent developments in the synthesis of medium-ring ethers. *Contemp. Org. Synth.* **1994**, 1; p. 457-474.

39. _____. Saturated oxygen heterocycles. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*. **2002**; p. 2301–2323.

40. KROW, G.R. The Baeyer-Villiger oxidation of ketones and aldehydes. *Org. React.* **1993**, 43; p. 251-798.

41. RENZ, M. and MEUNIER, B. 100 years of Baeyer-Villiger oxidations. *Eur. J. Org. Chem.* **1999**, 4; p. 737-750.

42. NICOLAOU, K.C.; XU, J.-Y.; KIM, S.; OHSHIMA, T.; HOSOKAWA, S. and PFEFFERKORN, J. Synthesis of the tricyclic core of eleutherobin and sarcodictyins and total synthesis of sarcodictyin A. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119; p. 11353-11354.

43. OKA, T. and MURAI, A. Synthetic studies on ciguatoxin [1]; construction of the spiro acetal part (C46-C55). *Tetrahedron*. **1998**, 54; p. 1-20.

44. TAKABATAKE, K.; NISHI, I.; SHINDO, M. and SHISHIDO, K. Enantioselective total synthesis of heliannuols D and A. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*. **2000**; p. 1807-1808.

45. LEMAIRE, P.; BALME, G.; DESBORDES, P. and VORS, J.P. Efficient syntheses of pterulone, pterulone B and related analogues. *Org. Biomol. Chem.* **2003**, 1; p. 4209-4219.

46. KAHNBERG, P. and STERNER, O. Synthesis of the antifungal 1-benzoxepin pterulone. *Tetrahedron*. **2001**, 57; p. 7181-7184.

47. LIN, Y.-L.; KUO, H.-S.; WANG, Y.-W.; HUANG, S.-T. Efficient entry to 1-benzoxepine ring skeleton via tandem $SN_2$/Wittig reaction. Total synthesis of NADH: ubiquinone oxidoreductase (complex I) antagonist pterulinic acid. *Tetrahedron*. **2003**, 59; p. 1277-1281.

48. KAHNBERG, P.; LEE, C.W.; GRUBBS, R.H. and STERNER, O. Alternative routes to pterulone. *Tetrahedron*. **2002**, 58; p. 5203-5208.

49. STEFINOVIC, M. and SNIECKUS, V. Connecting directed ortho metalation and olefin metathesis strategies. Benzene-fused multiring-sized oxygen heterocycles. First syntheses of Radulanin A and Helianane. *J. Org. Chem.* **1998**, 63(9); p. 2808-2809.

50. YAMAGUCHI, S.; TSUCHIDA, N.; MIYAZAWA, M. and HIRAI, Y. Synthesis of two naturally ocurring 3-methyl-2,5-dihydro-1-benzoxepin carboxylic acids. *J. Org. Chem.* **2005**, 70(19); p. 7505-7511.

51. JEFFERSON, A. and SCHEINMANN, F. Molecular rearrangements related to the Claisen rearrangement. *Q. Rev. Chem. Soc.* **1968**, 3; p. 391-421.

52. MOULAY, S. The most well-known rearrangements in organic chemistry at hand. *Chem. Educ. Res. Pract. Europe*. **2002**, 3(1); p. 33-64.

53. LUTZ, R.P. Catalysis of the cope and Claisen rearrangements. *Chem. Rev.* **1984**, 84(3); p. 205-247.

54. HUTSON, L.K. Synthesis of benzoxazoles containing pendant allyl crosslinking sites via claisen rearrangements. Dayton, **1999**, 57p. Thesis (Master of Science). Wright State University.

55. ITO, H. and TAGUCHI, T. Aromatic Claisen rearrangement. En: Hiersemann, M. and Nubbemeyer, U. The Claisen rearrangement. Methods and applications. Weinheim: Wiley-VCH, **2007**. p. 86-116.

56. LUKYANOV, S.M. and KOBLIK, A.V. Tautomeric equilibria and rearrangements involving phenols. En: Rappoport, Zvi. Chemistry of phenols. Chichester: John Wiley & Sons, **2003**. p. 713-838.

57. BRUCE, J.M. and ROSHAN-ALI, Y. Claisen rearrangement of meta-substituted allyl phenyl ethers. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*. **1981**; p. 2677-2679.

58. MARTÍN CASTRO, A.M. Claisen rearrangement over the past nine decades. *Chem. Rev.* **2004**, 104: p. 2939-3002.

59. KUPCZYK-SUBOTKOWSKA, L.; SAUNDERS, W.H. Jr and SHINE, H.J. The Claisen rearrangement of allyl phenyl ether: heavy-atom kinetic isotope effects and bond orders in the transition structure. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110(21); p. 7153-7159.

60. SMITH, M. B and MARCH, J. March´s advanced organic chemistry. Reactions, mechanisms and structures. New York: John Wiley & Sons Inc., **2001**. p. 1449-1452.

61. YAMABE, S.; OKUMOTO, S. and HAYASHI, T. Transition structures for the aromatic Claisen rearrangements by the molecular orbital method. *J. Org. Chem.* **1996**, 61; p. 6218-6226.

62. BARLETT, P.A. Stereocontrol in the synthesis of acyclic systems: applications to natural product synthesis. *Tetrahedron*. **1980**, 36; p. 2-72.

63. GOERING, H.L. and JACOBSON, R.R. A kinetic study of the ortho-Claisen rearrangement. *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, 80(13); p. 3277-3285.

64. MEYER, M.P.; DELMONTE, A.J. and SINGLETON, D.A. Reinvestigation of the isotope effects for the Claisen and aromatic Claisen rearrangements: the nature of the Claisen transition states. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121(47); p. 10865-10874.

65. REHBEIN, J. and HIERSEMANN, M. Mechanistic aspects of the aliphatic Claisen rearrangement. En: Hiersemann, M. and Nubbemeyer, U. The Claisen rearrangement. Methods and applications. Weinheim: Wiley-VCH, **2007**. p. 525-558.

66. WHITE, W.N. and WOLFARTH, E.F. The ortho Claisen rearrangement. VIII. Solvent effects. *J. Org. Chem.* **1970**, 35(7); p. 2196-2199.
67. _____. The ortho Claisen rearrangement. IX. The effect of solvent on the substituent effect. *J. Org. Chem.* **1970**, 56(10); p. 3585.
68. SVANHOLM, U. and PARKER, V. The *ortho*-Claisen rearrangement of phenyl allyl ethers in trifluoroacetic acid. *J. Chem. Soc., Chem. Comm.* **1972**; p. 645-646.
69. _____. Acid catalysed ortho-Claisen rearrangement of allyl aryl ethers in trifluoroacetic acid. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. II.* **1974**; p. 169-173.
70. MAJUMDAR, K.C.; ALAM, S. and CHATTOPADHYAY, B. Catalysis of the Claisen rearrangement. *Tetrahedron*. **2008**, 64; p. 597-643.
71. MARUYAMA, K.; NAGAI, N. and NARUTA, Y. Lewis acid mediated Claisen-type rearrangement of aryl dienyl ethers. *J. Org. Chem.* **1986**, 51(26); p. 5083-5092.
72. YOON, T.P., DONG, V.M. and MACMILLAN, D.W.C. Development of a new lewis acid-catalyzed Claisen rearrangement. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121(41), p. 9726-9727.
73. HELMBOLDT, H. and HIERSEMANN, M. Synthesis and Lewis acid catalyzed Claisen rearrangement of 2-(1,3-oxazolin-2-yl)-substituted allyl vinyl ethers. *Tetrahedron*. **2003**, 59; p. 4031-4038.
74. KOTHA, S.; DONG, V.M. and MACMILLAN, D.W.C. Microwave-assisted Claisen rearrangement on a silica gel support. *Tetrahedron Lett.* **2004**, 45; p. 9603-9605.
75. SCHOBERT, R.; GORDON, G.J.; MULLEN, G. and STEHLE, R. Microwave-accelerated Claisen rearrangements of allyl tetronates and tetramates. *Tetrahedron Lett.* **2004**, 45; p. 1121-1124.
76. LIN, Y.-L.; CHENGY, J.-Y. and CHU, Y.-H. Microwave-accelerated Claisen rearrangement in bicyclic imidazolium [b-3C-im][NTf2] ionic liquid. *Tetrahedron*. **2007**, 63; p. 10949-10957.
77. LI, C.-J. and CHEN, L. Organic chemistry in water. *Chem. Soc. Rev.* **2006**, 35; p. 68-82.
78. AN, J.; BAGNELL, L.; CABLEWSKI, T.; STRAUSS, C.R. and TRAINOR, R.W. Applications of high-temperature aqueous media for synthetic organic reactions. *J. Org. Chem.* **1997**, 62(8); p. 2505-2511.

79. WIPF, P. and RODRÍGUEZ, S. Water-accelerated Claisen rearrangements. *Adv. Synth. Catal.* **2002**, 344; p. 434-440.

80. MUKAIDE, M.; URASAKI, Y.; TAKEGOSHI, K. and KAJIMOTO, O. Rates of Claisen rearrangement determined with a flow-type high-temperature and high-pressure NMR probe. *J. Supercrit. Fluids*. **2007**, 42; p. 104-109.

81. DONOHOE, T.J.; ORR, A.J. and BINGHAM, M. Ring-closing metathesis as a basis for the construction of aromatic compounds. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45; p. 2664-2670.

82. SURESH, C.H. and KOGA, N. Orbital interactions in the ruthenium olefin metathesis catalysts. *Organometallics*. **2004**, 23; p. 76-80.

83. AHLBERG, P. Development of the metathesis method in organic synthesis. Kungl. Vetenskapsakademien (Advances Information on the Nobel Prize in Chemistry 2005). The Royal Swedish Academy of Sciences, **2005**. p. 1-12.

84. SCHROCK, R.R. Olefin metathesis by well-defined complexes of molybdenum and tungsten. En: Fürstner, A. Topics in organometallic chemistry - I. Alkene metathesis in organic synthesis. Berlin: Springer-Verlag, **1998**. p. 1-36.

85. SCHMIDT, B. and HERMANNS, J. Olefin metathesis directed to organic synthesis: principles and applications. En: Dötz, K. H. Topics in organometallic chemistry. XIII. Metal carbene in organic synthesis. Heidelberg: Springer-Verlag, **2004**. p. 223-267.

86. GRUBBS, R.H. and CHANG, S. Recent advances in olefin metathesis and its application in organic synthesis. *Tetrahedron.* **1998**, 54; p. 4413-4450.

87. NICOLAOU, K.C.; BULGER, P.G and SARLAH, D. Metathesis reactions in total synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44; p. 4490-4527.

88. HAN, S.-Y. and CHANG, S. General ring-closing metathesis. En: Grubbs, R. H. Handbook of metathesis. Applications in organic synthesis. Weinheim: Wiley-VCH, **2003**. p. 5-127.

89. GHOSH, S.; GHOSH, S. and SARKAR, N. Factors influencing ring closure through olefin metathesis - a perspective. *J. Chem. Sci.* **2006**, 118(3); p. 223-235.

90. FÜRSTNER, A. Ruthenium-catalyzed metathesis reactions in organic synthesis. En: _____. Topics in organometallic chemistry - I. Alkene metathesis in organic synthesis. Berlin: Springer-Verlag, **1998**. p. 37-72.

91. KIRKLAND, T.A. and GRUBBS, R.H. Effects of olefin substitution on the ring-closing metathesis of dienes. *J. Org. Chem.* **1997**, 62(21); p. 7310-7318.

92. CALDERÓN, N.; CHEN, H.Y. and SCOTT, K.W. Olefin metathesis - a novel reaction for skeletal transformations of unsaturated hydrocarbons. *Tetrahedron Lett.* **1967**, 34; p. 3327-3329.

93. MOL, J.C.; MOULIJN, J.A. and BOELHOUWER, C. Carbon-14 studies on the mechanism of the disproportionation of propene. *Chem. Commun.* **1968**, 11; p. 633-635.

94. CALDERÓN, N. The olefin metathesis reaction. *Acc. Chem. Res.* **1972**, 5(4); p. 127-132.

95. GRUBBS, R.H. and BRUNCK, T.K. Possible intermediate in the tungsten-catalyzed olefin metathesis reaction. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, 94; p. 2538-2540.

96. SCHWAB, P.; GRUBBS, R.H. and ZILLER, J.W. Synthesis and applications of $RuCl_2(=CHR')(PR_3)_2$: the influence of the alkylidene moiety on metathesis activity. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118(1); p. 100-110.

97. NGUYEN, S.T. and TRNKA, T.M. The discovery and development of well-defined, ruthenium-based olefin metathesis catalysts. En: Grubbs, R. H.. Handbook of metathesis. Catalyst development. Weinheim: Wiley-VCH, **2003**. p. 61-85.

98. ULMAN, M. and GRUBBS, R.H. Ruthenium carbene-based olefin metathesis initiators: catalyst decomposition and longevity. *J. Org. Chem.* **1999**, 64(19); p. 7202-7207.

99. AMOROSO, D.; YAP, G.P.A. and FOGG, D.E. Deactivation of ruthenium metathesis catalysts via facile formation of face-bridged dimers. *Organometallics*. **2002**, 21(16); p. 3335-3343.

100. SANFORD, M.S.; LOVE, J.A. and GRUBBS, R.H. Mechanism and activity of ruthenium olefin metathesis catalysts. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123(27); p. 6543-6554.

101. GRUBBS, R.H. Olefin metathesis. *Tetrahedron*. **2004**, 60; p. 7117-7140.

102. ROMERO, P.E. and PIERS, W.E. Direct observation of a 14-electron ruthenacyclobutane relevant to olefin metathesis. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127(14); p. 5032-5033.

103. SANFORD, M.S. and LOVE, J.A. Mechanism of ruthenium-catalyzed olefin metathesis reactions. En: Grubbs, R. H. Handbook of metathesis. Catalyst development. Weinheim: Wiley-VCH, **2003**. p. 112-131.

104. DIAS, E.L.; NGUYEN, S.T. and GRUBBS, R.H. Well-defined ruthenium olefin metathesis catalysts: mechanism and activity. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119(17); p. 3887-3897.

105. GRUBBS, R.H. Handbook of metathesis. Applications in organic synthesis. Weinheim: Wiley-VCH, **2003**. 511p.

106. _____. Handbook of metathesis. Applications in polymer synthesis. Weinheim: Wiley-VCH, **2003**. 519p.

107. FU, G.C. and GRUBBS, R.H. The application of catalytic ring-closing olefin metathesis to the synthesis of unsaturated oxygen heterocycles. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114(13); p. 5426-5427.

108. _____. The synthesis of nitrogen heterocycles via catalytic ring-closing olefin metathesis of dienes. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114(18); p. 7324-7325.

109. SHON, Y.S. and LEE, T.R. Catalytic ring-closing olefin metathesis of sulfur-containing species: heteroatom and other effects. *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38(8); p. 1283-1286.

110. HANSON, P.R. and STOIANOVA, D.S. Ring-closing metathesis strategy to P-heterocycles. *Tetrahedron Lett.* **1999**, 40; p. 3297-3300.

111. CHANG, S. and GRUBBS, R.H. A simple method to polyhydroxylated olefinic molecules using ring-closing olefin metathesis. *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38(27); p. 4757-4760.

112. OVERKLEEFT, H.S. and PANDIT, U.K. A formal synthesis of castanospermine using an olefin metathesis cyclisation reaction as a key step. *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37(4); p. 547-550.

113. FUJIMURA, O. and GRUBBS, R.H. Asymmetric ring-closing metathesis: kinetic resolution catalyzed by a chiral molybdenum alkylidene complex. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118(10); p. 2499-2500.

114. FUJIMURA, O.; DE LA MATA, F.J. and GRUBBS, R.H. Synthesis of new chiral ligands and their group VI metal alkylidene complexes. *Organometallics*. **1996**, 15(7); p. 1865-1871.

115. RUTJES, F.P.J.T. and SCHOEMAKER, H.E. Ruthenium-catalyzed ring closing olefin metathesis of non-natural α-aminoacids. *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38(4); p. 677-680.

116. HAMMER, K. and UNDHEIM, K. Ruthenium (II) in ring closing metathesis for the stereoselective preparation of cyclic 1-amino-1-carboxylic acids. *Tetrahedron*. **1997**, 53(6); p. 2309-2322.

117. _____. Synthesis of conformationally restricted serine derivatives through ruthenium (II) – catalized ring closing metathesis. *Tetrahedron.* **1997**, 53(16); p. 5925-5936.

118. BARRET, A.G.M.; BAUGH, S.P.D.; GIBSON, V.C.; GILES, M.R.; MARSHALL, E.L. and PROCOPIOU, P.A. Alkene metathesis in the synthesis of novel α-lactams. *Chem. Commun.* **1996**; p. 2231-2232.

119. _____. Highly functionalised monocyclic and bicyclic-α-lactams via alkene metathesis. *Chem. Commun.* **1997**; p. 155-156.

120. CLARK, T.D. and GHADIRI, M.R. Supramolecular design by covalent capture. Design of a peptide cylinder via hydrogen-bond-promoted intermolecular olefin metathesis. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117(49); p. 12364-12365.

121. MILLER, S.J. and GRUBBS, R.H. Synthesis of conformationally restricted amino acids and peptides employing olefin metathesis. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117(21); p. 5855-5856.

122. FÜRSTNER, A. and KINDLER, N. Macrocycle formation by ring-closing-metathesis. An efficient synthesis of enantiomerically pure (R)-(+)-lasiodiplodin. *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37(39); p. 7005-7008.

123. FÜRSTNER, A. and LANGEMANN, K. Conformationally unbiased macrocyclization reactions by ring closing metathesis. *J. Org. Chem.* **1996**, 61(12); p. 3942-3943.

124. McKERVEY, M.A. and PITARCH, M. Synthesis of bridged and oligocalix[4]arenes via ruthenium-catalysed ring closing metathesis . *Chem. Commun.* **1996**; p. 1689-1690.

125. XU, Z.; JOHANNES, C.W.; SALMAN, S.S.; HOVEYDA, A.H. Enantioselective total synthesis of antifungal agent Sch 38516. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118(44); p. 10926-10927.

126. TAYLOR, R.E. and HALEY, J.D. Towards the synthesis of epothilone A: enantioselective preparation of the thiazole sidechain and macrocyclic ring closure. *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38(12); p. 2061-2064.

127. MENG, D.; SU, D.S.; BALOG, A.; BERTINATO, P.; SORENSEN, E.J.; DANISHEFSKY, S.J.; ZHENG, Y.-H.; CHOU, T.-C.; HE, L. and HORWITZ, S.B. Remote effects in macrolide formation through ring-forming olefin metathesis: an application to the synthesis of fully active epothilone congeners. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119(11); p. 2733-2734.

128. KÜRTI, L. and CZAKÓ, B. Strategic applications of named reactions in organic synthesis. London: Elsevier Academic Press, **2005**. 500p.

129. LI, J.-J. Name reactions: a collection of detailed reaction mechanisms. Heidelberg: Springer-Verlag, **2003**. 465p.

130. KORNBLUM, N. and LURIE, A.P. Heterogeneity as a factor in the alkylation of ambident anions: phenoxide ions. *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, 81(11); p. 2705-2715.

131. LAROCK, R.C and LEE, N.-H. Synthesis of allylic aryl ethers via palladium-catalyzed decarboxylation of allylic aryl carbonates. *Tetrahedron Lett*. **1991**, 32(44); p. 6315-6318.

132. XU, C.; LU, S. and HUANG, X. A new synthesis of allyl ethers via allyldialkyltelluronium salts. *Synth. Commun*. **1993**, 23(18); p. 2527-2531.

133. SURYA PRAKASH RAO, H. and SENTHILKUMAR, S.P. A convenient procedure for the synthesis of allyl and benzyl ethers from alcohols and phenols. *Proc. Indian Acad. Sci. (Chem. Sci.)*. **2001**, 113(3); p. 191-196.

134. ALLEN, C.F.H. and GATES, J.W. Jr. *O*-Eugenol. *Org. Synth.* **1945**, 25; p. 49.

135. NGUYEN VAN, T.; DEBENEDETTI, S. and DE KIMPE, N. Synthesis of coumarins by ring-closing metathesis using Grubbs' catalyst. *Tetrahedron Lett.* **2003**, 44; p. 4199-4201.

136. CHANDRASEKHAR, S.; BASU, D.; SAILU, M.; KOTAMRAJU, S. Novel synthetic route to the tricyclic core of (±)-galanthamine. *Tetrahedron Lett.* **2009**, 50; p. 4882-4884.

137. HUANG, K.-S.; WANG, E.-C and CHEN, H.-M. Syntheses of substituted naphthalenes and naphthols. *J. Chin. Chem. Soc. (Taipei, Taiwan)*. **2004**, 51(3); p. 585-605.

138. BRAUER, G.M.; MORRIS, R.W. and HOWE, W.B. Synthesis of isomers of eugenol. *J. Res. Nat. Bur. Stand. (A. Physics and Chemistry)*. **1963**, 67A(3); p. 253-257.

139. WANG, E.-C.; WANG, E.-C. and CHEN, H.-M. Synthesis of dibenzo-fused 10-membered cyclic ethers from isovanillin via ring-closing metathesis. *Heterocycles*. **2006**, 68(81); p. 125-136.

140. HUANG, K.-S.; WANG, E.-C. and CHEN, H.-M. Syntheses of substituted naphthalenes and naphthols. *J. Chin. Chem. Soc. (Taipei, Taiwan)*. **2004**, 51(3); p. 585-605.

141. TSAI, T.-W.; WANG, E.-C.; LI, S.-R.; CHEN, Y.-H.; LIN, Y.-L.; WANG, Y.-F. and HUANG, K.-S. A new synthesis of benzofurans from phenols via Claisen rearrangement and ring-closing metathesis. *J. Chin. Chem. Soc. (Taipei, Taiwan)*. **2004**, 51(6); p. 1307-1318.

142. VAN OTTERLO, W.A.L.; MORGANS, G.L.; MADELEY, L.G.; KUZVIDZA, S.; MOLEELE, S.S.; THORNTON, N. and DE KONING, C.B. An isomerization-ring-closing metathesis strategy for the synthesis of substituted benzofurans. *Tetrahedron.* **2005**, 61(32); p. 7746-7755.

143. CLAVIER, H. and NOLAN, S.P. *N*-Heterocyclic carbene and phosphine ruthenium indenylidene precatalysts: a comparative study in olefin metathesis. *Chem. Eur. J.* **2007**, 13(28); p. 8029-8036.

144. CLAVIER, H.; AUDIC, N.; GUILLEMIN, J.-C. and MAUDUIT, M. Olefin metathesis in room temperature ionic liquids using imidazolium-tagged ruthenium complexes. *J. Organomet. Chem.* **2005**, 690(15); p. 3585-3599.

145. MACOMBER, R.S. A complete introduction to modern NMR spectroscopy. New York: John Wiley & Sons, Inc, **1998**. 378p.

146. LAMBERT, J.B. and MAZZOLA, E.P. Nuclear magnetic resonance spectroscopy. An introduction to principles, applications, and experimental methods. Upper Saddle River: Prentice Hall - Pearson Education, Inc., **2003**. 357p.

147. ABRAHAM, R.J. and MOBLI, M. Modelling $^{1}$H NMR spectra of organic compounds. Theory, applications and NMR prediction software. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, **2008**. 380p.

148. MARVELL, E.N.; RICHARDSORN, B.; ANDERSON, R.; STEPHENSON, J.L. and CRANDALT, T. Claisen rearrangement of allyl 2-alkylphenyl ethers. *J. Org. Chem.* **1965**, 30(4); p. 1032-1035.

149. NYQUIST, R.A. Interpreting infrared, raman, and nuclear magnetic resonance spectra. Variables in data interpretation of infrared and raman spectra. Midland: Elsevier, **2001**. 447p.

150. CONLEY, R.T.; CALDERÓN MARTÍNEZ, J. y AVENDAÑO RUÍZ, R. Espectroscopía infrarroja. Madrid: Alhambra S.A., **1979**. 345p.

151. JACOBSEN, N.E. NMR spectroscopy explained. Simplified theory, applications and examples for organic chemistry and structural biology. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc., **2007**. 668p.

152. CLARIDGE, T.D.W. High-resolution NMR techniques in organic chemistry. Second edition. Oxford: Elsevier Ltd., **2009**. 383p.

153. VAN OTTERLO, W.A.L.; NGIDI, E.L.; DE KONING, C.B. and FERNANDES, M.A. Synthesis of dienynes from alkenes and diynes using ruthenium-mediated ring-closing metathesis. *Tetrahedron Lett.* **2004**, 45; p. 659-662.

154. ELIEL, E.L; WILEN, S.H. and MANDER, L.N. Stereochemistry of organic compounds. New York: John Wiley & Sons, Inc, **1994**. 1267p.

155. HART, H. and CORBIN, J.L. Conformations of seven-membered rings. Benzocycloheptenes. *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, 87(14); p. 3135-3139.

156. GLAZER, E.S.; KNORR, R.; GANTER, C. and ROBERTS, J.D. Nuclear magnetic resonance spectroscopy. Conformational equilibration of cycloheptane and cycloheptene derivatives. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, 94(17); p. 6026-6032.

157. GHOSH, A.K.; CAPPIELLO, J. and SHIN, D. Ring-closing metathesis strategy to unsaturated □- and □-lactones: synthesis of hydroxyethylene isostere for proteases inhibitors. *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39; p. 4651-4654.

158. FÜRSTNER, A. Recent advancements in ring closing olefin metathesis. *Top. Catal.* **1997**, 4; p. 285-299.

# 3. EVALUACIÓN *IN-VITRO* DE ALGUNAS PROPIEDADES BIOLÓGICAS DE LOS ACEITES ESENCIALES CON ALTO CONTENIDO DE CARVACROL, TIMOL, *trans*-ANETOL, ESTRAGOL Y DE PRODUCTOS DE LA SÍNTESIS DE 2,5-DIHIDRO-1-BENZOXEPINAS SUSTITUIDAS

## 3.1 INTRODUCCIÓN

El estudio de los AE como materia prima para la industria, se ha transformado hoy día, en una de las áreas de investigación y desarrollo más importante en muchos países, ya que muchas industrias están buscando fuentes alternativas o sustitutas, naturales y ambientalmente amigables, de agentes de protección de cultivos, contra microorganismos patógenos, insectos y pestes, para evitar la utilización de productos químicos de síntesis, muchos altamente tóxicos y algunos dañinos para la salud del hombre y su medio [1-3]. Asimismo, el creciente interés de los investigadores en las especies y las hierbas aromáticas se debe a sus diversas propiedades biológicas y terapéuticas, *e.g.* antioxidante, antimicrobiana, antiviral, sedativa, insecticida, etc. [4], de las cuales algunas se conocen y hasta superan varias veces la actividad de las sustancias sintéticas y naturales usadas actualmente [1]. Sin embargo, de las que aún no se conocen, es de mucho interés obtener una nueva información sobre las aplicaciones de las plantas y sobre el potencial uso de sus extractos.

En la búsqueda de nuevos agentes farmacológicamente activos se han descubierto muchos compuestos de fuentes naturales como extractos y AE de plantas, que cumplen un rol importante en el tratamiento de enfermedades y para aplicaciones agroindustriales. Cada año, cientos de estos metabolitos encontrados en la naturaleza están siendo aislados, caracterizados estructuralmente y sintetizados mediante métodos eficientes pero datos sobre su actividad biológica son escasos y se tiene sólo para unos pocos [2].

Por otro lado, la exposición de las sustancias al aire promueve su degradación oxidativa, la cual no es ajena a los sistemas biológicos y que se encuentra relacionada con diversas patologías (cáncer, arteriosclerosis, etc.), enfermedades neurodegenerativas y procesos de envejecimiento [5-7]. Se cree también que el estrés oxidativo, manifestado por la peroxidación lipídica, oxidación de proteínas y otras biomoléculas, está asociado con estas patologías y procesos biológicos [8-10].

La degradación oxidativa en alimentos, es responsable de su rancidez (*off-flavour*) y ocasiona la disminución de la calidad nutricional y seguridad, causada por la formación de compuestos secundarios, algunos potencialmente tóxicos [11,12]. Pero el problema de las reacciones de oxidación se presenta no sólo en la industria de alimentos, sino también para otras especies y productos oxidables, tales como artículos cosméticos, fármacos y plásticos, donde los antioxidantes se necesitan para prevenir su deterioro oxidativo [13,14]. El consumo y la adición de antioxidantes se requieren para preservar las propiedades funcionales, fisicoquímicas y evitar la degradación oxidativa de lipoproteínas en sistemas vivos, aroma, color y vitaminas en alimentos, entre otros [12,15].

En los últimos años, se ha incrementado considerablemente la exploración de fuentes vegetales y la selección de materias primas para aislar nuevos antioxidantes y terapias nuevas para el manejo de enfermededades neurodegenerativas (*e.g.*, AD), que pueden ser usados en alimentos y como base de nuevos fármacos, además, que puedan reemplazar los antioxidantes sintéticos [16] y los medicamentos aprobados para uso terapéutico (*e.g.*, tacrina, galantamina, etc) de AD, los cuales están cada vez más restringidos por sus posibles efectos carcinogénicos [17,18] y su hepatotoxicidad [19].

Esta parte del trabajo consistió en evaluar y determinar *in vitro* las propiedades antioxidantes, mediante métodos colorimétricos de *screening* (ensayos con el catión-radical $ABTS^{+\bullet}$) y sistema modelo (oxidación del ácido linoleico), y de inhibición de la enzima acetilcolinesterasa de los AE con alto contenido de timol, carvacrol, *trans*-anetol y estragol. También se evaluaron las moléculas sintetizadas en las 4 etapas de

la ruta propuesta para las 2,5-dihidro-1-benzoxepinas sustituidas. Los datos obtenidos de los valores de capacidad antioxidante equivalente al Trolox® (TEAC) de las moléculas sintéticas se correlacionaron con sus potenciales de ionización (PI) determinados a través de cálculos computacionales. Se incluyen algunos resultados preliminares de actividades antifúngica, antiprotozoarios (*Leishmania chagasi* y *Trypanosoma cruzi*) y citotoxicidad.

## 3.2 OXIDANTES, DETERIORO OXIDATIVO Y ANTIOXIDANTES

Los radicales están involucrados en una gran variedad de procesos de deterioro biológico, tales como mutación, carcinogénesis, enfermedades degenerativas, inflamación y envejecimiento [6,20,21]. Estos radicales, aunque están presentes en bajas concentraciones, pueden causar daños a blancos biológicos tales como lípidos, ADN y proteínas [5,21,22].

**3.2.1 Especies reducidas de oxígeno y nitrógeno.** El más importante aceptor de electrones en la biosfera es el óxigeno molecular, el cual por su naturaleza biradical, acepta electrones para originar una serie de especies parcialmente reducidas, conocidas como especies reducidas (o reactivas) de oxígeno (ROS) y si reacciona con óxido nítrico ($NO^{\bullet}$) producirá las especies reducidas de nitrógeno (RNS) [23]. Los grupos de especies, que promueven la oxidación, se clasifican en dos tipos de compuestos: radicalarios y no-radicalarios [21,24] (Tabla 1).

**Tabla 3.1.** Especies radicalarias y no radicalarias de oxígeno y nitrógeno.

| Radicales de oxígeno y nitrógeno | | Esp. no-radicalarias de oxígeno y nitrógeno | |
|---|---|---|---|
| Oxígeno (biradical) | $^3O_2$ | Peróxido de hidrógeno | $H_2O_2$ |
| Ion superóxido | $O_2^{-\bullet}$ | Peróxido orgánico | ROOH |
| Hidroxilo | $OH^{\bullet}$ | Ácido hipocloroso | HOCl |
| Peroxilo | $ROO^{\bullet}$ | Ozono | $O_3$ |
| Alcoxilo | $RO^{\bullet}$ | Peroxinitrito | HOONO |
| Óxido nítrico | $NO^{\bullet}$ | Oxígeno singulete | $^1O_2$ |

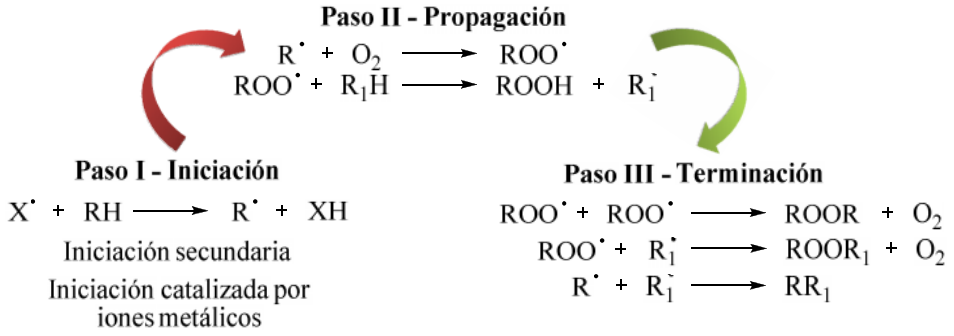
Una de las características más importante del $^3O_2$ es la facilidad con la cual interactúa con moléculas orgánicas (en estados electrónicos excitados) en reacciones fotoquímicas (UV-Vis), que involucran la abstracción de H por una especie

fotosensible, que genera radicales $R^{\bullet}$ o $ROO^{\bullet}$ (radical peroxilo, cuando reacciona con el $O_2$), o en la transferencia de los estados excitados de las moléculas al oxígeno.

**3.2.2 Lípidos y radicales.** El incesante flujo de ROS de fuentes endógenas y exógenas resulta en un deterioro contínuo y acumulativo de componentes celulares, que alteran muchas de sus funciones; siendo especialmente vulnerables las membranas celulares (fosfolípidos) debido a su alto contenido de ácidos grasos poli-insaturados (PUFA); lo mismo sucede en los alimentos, por estar constituidos por lípidos [25,26].

Otro proceso importante que padecen los lípidos es la auto-oxidación, que es una reacción espontánea con el oxígeno molecular, siendo la reacción más común conducente al deterioro oxidativo y al *off-flavour* o rancidez de los alimento [25]. Los PUFA tienen la habilidad de descomponerse por la auto-oxidación, como ácidos grasos libres o haciendo parte de los glicéridos, en presencia de iniciadores como luz, fotosensibilizadores, metales (Cu y Fe) o algunas enzimas [27].

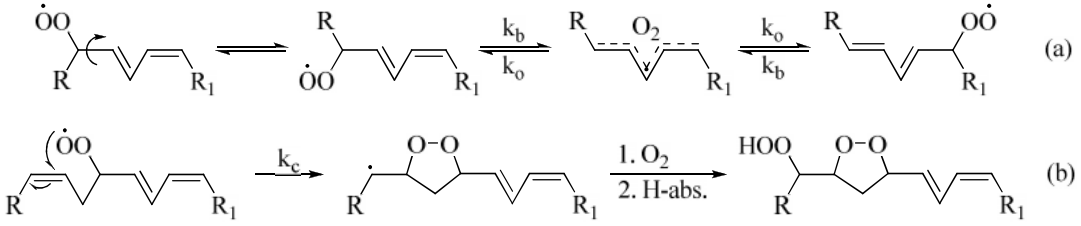
La autoxidación de los lípidos (fórmula general R-H) sucede en los siguientes tres pasos (**Esquema 3.1**): el primer paso es la iniciación, en la cual los radicales lipídicos se forman a partir de las moléculas lipídicas por la abstracción de un H por una especie reactiva (iones metálicos, radicales o metaloproteínas) o métodos físicos (calor, radiación ionizante o impacto fotónico) [28].




**Esquema 3.1.** Mecanismo de autoxidación de lípidos.

Después de la iniciación, transcurren las reacciones de propagación (Paso II) donde el radical lipídico se convierte en un nuevo radical. Estas reacciones suceden rápidamente ($k$ = $10^9$ $M^{-1}s^{-1}$) e involucran la abstracción de un H de la molécula de lípido o la adición de oxígeno a un radical alquílico [7]. La salida del H toma lugar en carbonos donde la energía de disociación de enlace (*Bond Dissociation Energy* - BDE) es menor [29]; esto es, en el grupo metilénico entre dos grupos alquénicos en un PUFA.

El radical formado puede estabilizarse por medio de la deslocalización de un electrón desapareado entre los cinco carbonos y generar el radical 1,4-pentadienilo [7,29]; la reacción con oxígeno toma lugar por adición en uno de los carbonos terminales de esta estructura, llevando a la formación de 9- y 13-hidroperóxidos, y esto propaga la cadena. Estos radicales peroxilo están involucrados en reacciones competitivas, tales como escisión-β y ciclación por reordenamiento intramolecular con formación de dihidroperóxidos y moléculas cíclicas que contienen oxígeno (**Esquema 3.2**) [21,25,26,29,30].




**Esquema 3.2.** Reacciones competitivas de los radicales peroxilo: (a) Escisión β y (b) Ciclación por reordenamiento intramolecular.

Las reacciones de terminación (Paso III) suceden cuando los radicales interaccionan entre sí, deteniendo la reacción de propagación, es decir, el radical se combina para formar moléculas con su octeto de electrones completo; estas reacciones son mucho más lentas ($k$ = $10^1$ $M^{-1}s^{-1}$) que las de propagación [21,25,26].

**3.2.3 Inhibidores de oxidación.** El estrés oxidativo se define como el desbalance entre oxidantes y antioxidantes [31]; y un "antioxidante" es cualquier sustancia que cuando está presente en bajas concentraciones, comparada con aquellas en las

cuales se encuentra un sustrato oxidable, significativamente retarda o inhibe la oxidación de éste, iniciada por un pro-oxidante (sustancia que puede causar daños oxidativos) [20,32,33]. Así, esta sustancia inhibidora puede eficientemente reducir la actividad de un pro-oxidante, formando un producto con baja o ninguna toxicidad [34].

Los antioxidantes pueden actuar en las diferentes fases en la secuencia oxidativa, de las siguientes maneras: (1) removiendo el $O_2$ o disminuyendo su concentración local; (2) removiendo iones metálicos catalíticos; (3) removiendo ROS (*e.g.*, $O_2^{-\bullet}$ y $H_2O_2$); (4) atrapando (secuestrando) radicales iniciadores como $^{\bullet}OH$, $RO^{\bullet}$, $RO_2^{\bullet}$; (5) interrumpiendo (rompiendo) la cadena de propagación; y, (6) atenuación (*quenching*) o secuestramiento de $^1O_2$. Los antioxidantes que inhiben la oxidación lipídica por los mecanismos (1)-(4) y (6), son antioxidantes preventivos. Los que actúan por el mecanismo (5), son antioxidantes de ruptura de cadena o atrapadores de radicales y estos antioxidantes y los que actúan por el mecanismo (2) y (6) se extinguen mientras efectúan sus funciones protectoras [20].

**3.2.3.1 Métodos para determinación de la actividad antioxidante.** La eficacia de los compuestos antioxidantes depende de su naturaleza [35] y además, debe tenerse en cuenta el mecanismo por el cual el antioxidante ejerce su efecto (*e.g.*, atrapamiento de radicales, descomposición catalítica, supresión pro-oxidante) y funciones, velocidad de atrapamiento, selectividad del sustrato o medio (*e.g.*, fase acuosa, superficie o lipídica), concentración efectiva (moles de radicales atrapados por mol de antioxidante), distribución, localización, destino de los radicales derivados de los antioxidantes, interacción con otros antioxidantes y metabolismo [15,35]; cada factor se debe considerar y evaluar separadamente.

**3.2.3.1.1 Reactividad hacia radicales.** Hay numerosos reportes sobre mediciones de actividades hacia radicales de compuestos antioxidantes y mezclas complejas [34]. Las actividades se miden siguiendo la cinética del antioxidante con radicales estables como $\alpha,\alpha$-difenil-$\beta$-picrilhidracilo (DPPH) [36] o 2,6-di-*ter*-butil-4-(4-metoxifenil)-fenoxilo [37] empleando técnicas espectroscópicas (UV-VIS, ESR, etc.) o utilizando métodos inhibitorios, donde la especie radicalaria se genera y el efecto del

antioxidante se mide a partir de la inhibición de esta reacción (*e.g.*, radical $^{\bullet}$OH generado por reacción Fenton en presencia DMPO, reacciones de decoloración de compuestos de referencia: reacción de N,N´-difenil-*p*-fenilendiamina (DPPD), del ácido 2,2´-azino-*bis*-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS), etc.) [21,35]. En estos métodos se emplean los antioxidantes más comúnes de uso en alimentos, tanto de origen natural (*e.g.*, $\alpha$-tocoferol, ácido ascórbico) como sintético (*e.g.*, BHT, BHA), como sustancias de referencia o "control" del método.

*** Ensayo de capacidad antioxidante equivalente al Trolox® - TEAC.** El ensayo de capacidad antioxidante equivalente al Trolox® (TEAC) fue reportado por primera vez por Miller *et al.* [38] y modificado posteriormente por Re *et al.* [39]. El ensayo TEAC se basa en la inhibición de la absorbancia del catión-radical $ABTS^{+\cdot}$ (absorciones máximas $\lambda$: 660, 734 y 820 nm) por antioxidantes y mide la habilidad de un compuesto para reducir el $ABTS^{+\bullet}$ (fase acuosa), comparada con la sustancia de referencia, Trolox®. El $ABTS^{+\bullet}$ no es necesariamente un pro-oxidante debido a que es muy estable comparado con las ROS. El ensayo TEAC modificado usa radicales $ABTS^{+\bullet}$ preformados por oxidación de ABTS con persulfato de potasio (PDS) [39]. La ventaja de utilizar este método es su rapidez y amplio rango de valores de pH, tanto en sistemas de medios orgánicos como acuosos [40].

**3.2.3.1.2 Medida de la actividad antioxidante.** La actividad antioxidante de muchas sustancias y mezclas se ha evaluado en diferentes sistemas y métodos. En general, la oxidación se efectúa en presencia o ausencia de pro-oxidantes y se mide el alcance de su supresión, con la velocidad de oxidación y duración de la inhibición producida por el antioxidante. La eficiencia de la oxidación se determina estimando el oxígeno residual, formación de peróxidos, dienos conjugados, entre otros [35].

*** Monitoreo de marcadores de daño oxidativo en lípidos.** La descomposición de productos principales de la oxidación lipídica genera una mezcla compleja de componentes volátiles con olor que incluye epóxidos, cetonas (*e.g.*, butanonas, pentanonas, octanonas), alcoholes, hidrocarburos y aldehídos saturados e insaturados [15,22]. Los aldehídos (*e.g.*, el hexanal) junto con los compuestos

carbonílicos como el pentanal, deca-2,4-dienal y octa-3,5-dien-2-ona (**Tabla 3.2**) contribuyen al *off-flavour* que se desarrolla durante la oxidación [41] y adicionalmente, pueden causar la decoloración de alimentos (*e.g.*, carotenoides) y disminuir su calidad nutricional y seguridad después de la cocción y procesamiento [11].

**Tabla 3.2.** Principales productos secundarios de oxidación de varios ácidos grasos.

| Parte oleosa | Productos secundarios | |
|---|---|---|
| | **Auto-oxidación** | **Foto-oxidación** |
| Oleato | Nonanal, octanal | Dec-2-enal |
| Linoleato | Hexanal, pentano, deca-2,4-dienal | Hexanal, hept-2-enal |
| Linolenato | Hepta-2,4-dienal, etano | Propanal, but-2-enal |

La actividad antioxidante se puede calcular como un porcentaje de la inhibición de uno o más de los productos secundarios de oxidación relativo a una sustancia de control. El hexanal (formado vía 13-hidroperóxido) se determina frecuentemente para estimar la formación de productos secundarios, porque es el producto final más común. El significado del hexanal como un marcador de la oxidación (y en estudios de eficiencia antioxidante) se demuestra en que este compuesto se forma habitualmente en un orden de magnitud mayor que la mayoría de productos secundarios de oxidación y es de interés no sólo porque indica los niveles de autoxidación sino su reactividad y citotoxicidad [15,42].

## 3.3 INHIBIDORES DE LA ENZIMA ACETILCOLINESTERASA: EFECTOS SOBRE EL DETERIORO NEURODEGENERATIVO Y COMO AGROQUÍMICOS

La acetilcolinesterasa (AChE) es la enzima responsable por el catabolismo extracelular de la acetilcolina (ACh) y su inhibición retarda la degradación del neurotransmisor ACh, amplificando su efecto endógeno [43]. La acetilcolina (**Figura 3.1**) es uno de los principales neurotransmisores en células animales [44] y, es la responsable de la transmisión de los impulsos eléctricos en los sistemas nerviosos central (SNC) y periférico.

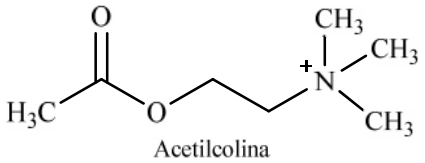



**Figura 3.1.** Estructura química de la acetilcolina (ACh).

**3.3.1 Transmisión colinérgica.** Los efectos específicos de la ACh en una sinápsis colinérgica particular están considerablemente determinados por el tipo de receptor de ACh en esa sinápsis. Los receptores colinérgicos están divididos en dos grandes clases: (1) los receptores muscarínicos (mAChR) y (2) los receptores nicotínicos (nAChR), los cuales se encuentran principalmente en las terminaciones neuromusculares [45]. El receptor nicotínico cumple varias funciones centrales, entre las que figuran: control voluntario del movimiento, memoria y atención, sueño y alerta, dolor y ansiedad. Por su parte, el receptor de ACh tipo muscarínico tiene dentro de sus funciones principales la disminución de la contractibilidad cardíaca y velocidad del corazón, contracción de los tejidos musculares lisos y estimulación de la secreción glandular, temperatura corporal, entre otras. [45,46].

La síntesis, almacenamiento y liberación de la ACh siguen una serie de pasos similares en todas las neuronas colinérgicas. La ACh se sintetiza a partir de la colina y la acetil coenzima A (acetil Co-A) por medio de la enzima colina acetiltransferasa (ChAT) y es almacenada dentro de las vesículas sinápticas. Cuando la ACh se libera y difunde dentro de la hendidura sináptica, se enlaza a los receptores pre-sinápticos y post-sinápticos tanto nicotínicos como muscarínicos, los cuales ejercen su respectiva función biológica. Simultáneamente, la ACh remanente, se degrada rápidamente en colina y ácido acético por la AChE (dentro del tiempo límite de la transmisión sináptica), para iniciar nuevamente la transmisión colinérgica [45-47].

La enzima acetilcolinesterasa, hace parte de la familia de hidrolasas especializadas en ésteres carboxílicos que rompen los ésteres de colina [colinesterasas (ChE)] [48] y su función es regular la excitación en el SNC destruyendo la ACh y mantener la transmisión apropiada de impulsos entre neuronas, músculos y células glandulares. El sitio activo está compuesto por un sitio “aniónico” y un sitio “esterático (acilación)”, en el cual se cataliza la hidrólisis [49,50].

Los inhibidores de la AChE (AChEI) son sustancias de origen natural (galantamina, fisostigmina, etc.) o sintético (tacrina, rivastigmina, pesticidas-insecticidas) que bloquean, retardan o inactivan [51] competitiva o irreversiblemente la AChE, mimetizando la acetilcolina en la sinápsis colinérgica [52] y aumentando la neurotransmisión [53]. Para enfermedades de Alzheimer, glaucoma y helmintiasis, estos inhibidores resultan benéficos como su tratamiento [54]; mientras que su aplicación como agroquímicos (insecticidas-pesticidas) repercute en el envenenamiento de las especies animales involucradas.

**3.3.2 Trastornos cognoscitivos e inhibidores de la AChE.** El SNC es particularmente vulnerable al estrés oxidativo debido a que el cerebro presenta bajo contenido de antioxidantes, alto contenido de ácidos grasos insaturados y, consume cerca del 18% del oxígeno que ingresa al cuerpo [55], lo cual favorece el incremento del metabolismo del oxígeno. La presencia de microglias en el SNC, que son la principal fuente de producción del anión superóxido y radical $NO^{\bullet}$, causan daño celular mediante la formación de radicales $HO^{\bullet}$ (reacción Fenton) y peroxi-nitritos, por el alto contenido de $Fe^{+2}$ en el cerebro. El incremento de la actividad de microglias está asociado con las enfermedades de Alzheimer y Parkinson, que son ejemplos típicos del desbalance entre prooxidantes y oxidantes [56]. La enfermedad de Alzheimer (forma de demencia) es un desórden progresivo, degenerativo e irreversible del cerebro y el incremento de la edad (envejecimiento) es el mayor riesgo para su desarrollo [46,57,58]. Los marcadores neuropatológicos de la AD son las deposiciones de agregados extracelulares del péptido □-amiloide (mayores componentes de placas seniles), los cuales se consideran que son los causantes de la neurodegeneración que conduce a la AD y está suposición se conoce como la "hipótesis amiloide" de la AD [46,56,59-62].

Las estrategias terapeúticas de la AD se dirigen principalmente al desarrollo de medicamentos que puedan evitar la formación de las placas □-amiloide o que mejoren la transmisión colinérgica [46]. No obstante, las terapias más desarrolladas son las de los inhibidores en las diferentes etapas de las sinápsis colinérgica, fundamentalmente

los AChEI. Estos agentes inhibidores de la AChE, elevan la concentración de ACh en la hendidura sináptica y su acumulación activa los receptores colinérgicos cercanos [45].

Los primeros AChEI descubiertos provinieron de fuentes naturales, *e.g.*, alcaloide fisostigmina (**Figura 3.2**), que fue aislado de *Physostigmina venenosum* L. (Fabiaceae) y empleado como tratamiento de la AD en 1979 [54]. Sin embargo, este compuesto mostró ciertas desventajas: inhibición limitada de AChE, poca selectividad y baja penetración de la barrera hemo-encefálica, con lo cual se estimuló el desarrollo exitoso de una nueva generación de AChEI. Hoy día, se encuentran en el mercado cuatro AChEI aprobados como tratamiento de la AD: la tacrina (1993), donepezilo (1996), rivastigmina (2000) y galantamina (2001). Estos medicamentos actúan al retrasar la descomposición de la ACh facilitando así, la funcionalidad normal de las células nerviosas [53].

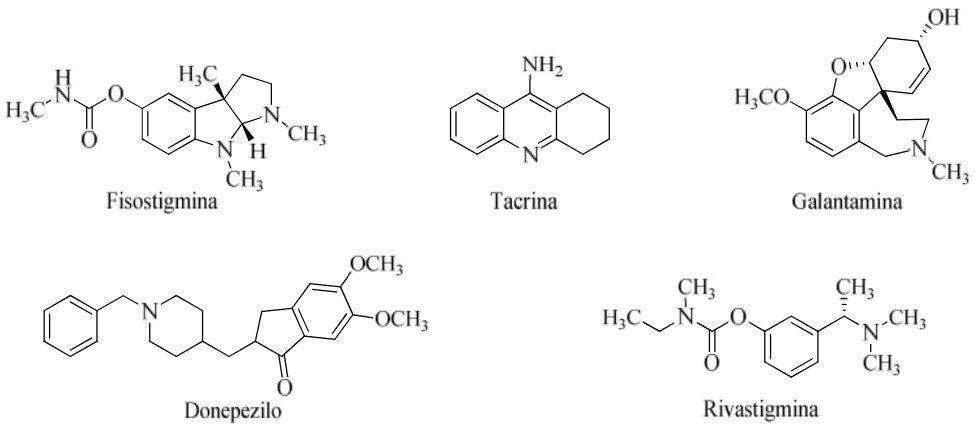



**Figura 3.2.** Estructuras de inhibidores de AChE disponibles comercialmente.

**3.3.3 Agentes agroquímicos.** Dentro de los inhibidores de la AChE se encuentran los ésteres organofosforados (OP), que se sintetizaron como armas químicas (*e.g.* Sarin, Soman y Tabun) [46] en los años 1930-1940 en Alemania. Sus derivados han sido adaptados al uso agrícola como insecticidas y pesticidas [50,63] junto con los carbamatos (CB) que son otros potentes AChEI. Algunos compuestos con estructura de OP y CB han sido desarrollados como medicamentos contra distintas patologías que están relacionadas con el SNC.

Los plaguicidas CB y OP inhiben la actividad enzimática porque actúan como sustratos competitivos y alternos a ACh. Así, cuando los CB o los OP interactúan e inhiben la AchE, causan acumulación de ACh en la hendidura sináptica y sobre-estimulación de los receptores colinérgicos (nAChR y mAChR) [46,50,53,64], poniendo de manifesto el conjunto de síntomas clínicos por envenenamiento [44,46,50]. El mecanismo de acción para ambos grupos de compuestos es casi idéntico, diferenciándose solamente en que los OP inhiben a la AChE cuasi irreversible; mientras que, los CB la inhiben reversiblemente [50] (**Figura 3.3**).

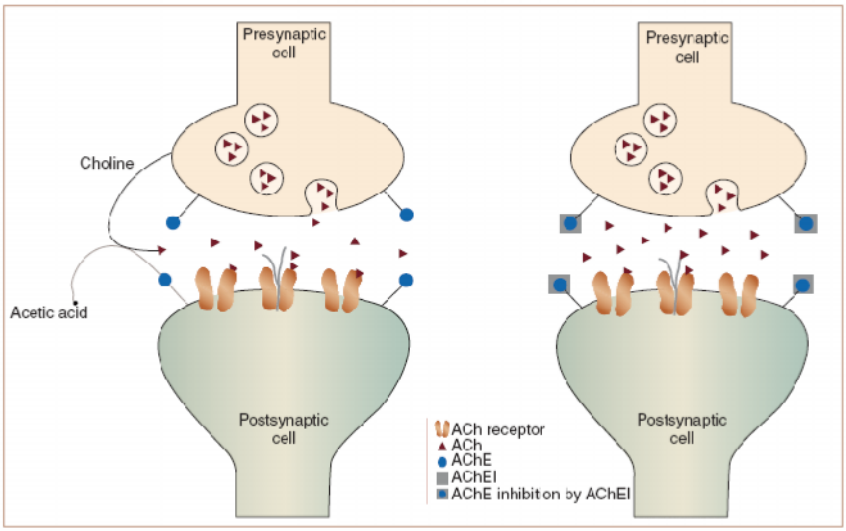



**Figura 3.3.** Mecanismo de acción de AChEI: para la AD y pesticidas-insecticidas. Tomado de Felmand [53].

## 3.4 EFECTOS FARMACOLÓGICOS COMPROBADOS DE LOS ACEITES ESENCIALES

Los AE se han estudiado no sólo por sus fragancias (fuerte olor) sino también por sus propiedades medicinales y antisépticas (contra bacterias, hongos y virus). Se han utilizado como preservantes de alimentos y como antimicrobianos [65], analgésicos, sedativos, anti-inflamatorios, etc [66-68]. En la naturaleza, cumplen un importante papel en la protección de las plantas contra bacterias, virus, hongos, insectos y contra herbívoros, reduciendo su apetito por tales plantas [69]. Además, pueden atraer algunos insectos para favorecer la dispersión del polen y semillas, o repeler otros indeseables. Debido a sus propiedades bactericidas y fungicidas, los productos

alimenticios y farmacéuticos los están utilizando cada vez más, como alternativas a los productos químicos sintéticos para proteger el equilibrio ecológico [70].

Algunos investigadores han reportado sobre una serie de propiedades biológicas muy interesantes atribuidas principalmente a los AE. Dudai *et al.* [71] demostraron que los AE de *Origanum syriacum* (60% de carvacrol), *Micromeria fruticosa* (60% de pulegona) y *Cymbopogon citratus* (32 y 43% de neral y geranial, respectivamente) inhibieron el crecimiento de trigo y semillas de maleza.

Edris [72], por su parte, hace una revisión de los potenciales usos terapéutico y farmacéutico de los AE y sus constituyentes individuales. En forma general, discute sobre la aplicación extensa de los AE para prevenir y tratar algunas enfermedades como cáncer, arterioesclerosis y trombosis; también de su actividad antibacteriana [65], antiviral [73], antioxidante [74] y como agente antidiabético [75]. Por ejemplo, el AE de *Myristica fragrans* (nuez moscada) mostró un fuerte efecto hepatoprotector contra ciertas sustancias químicas y esta actividad protectora fue atribuida a la miristicina, su componente mayoritario [76].

Los AE ricos en constituyentes fenólicos, *e.g.*, eugenol y timol, tienen altas actividades antioxidantes contra la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) [77] y pueden cambiar la afinidad de las partículas de LDL por su receptor. El incremento de las LDL oxidadas en el colesterol podría dar inicio a la arterioesclerosis, permitiendo el depósito y acumulación de grasa en forma de placas, en las capas internas de las arterias [78]. Además, de los constituyentes fenólicos, el □-terpineno ha demostrado inhibir la oxidación de la LDL.

El AE de lavanda (*Lavandula hybrida* Reverchon cv.) mostró un efecto antiplaquetal de amplio espectro y fue capaz de inhibir agregaciones plaquetales inducidas por ácido araquidónico y colágeno. Se presumió, que el agente antiplaquetal de la lavanda fue el acetato de linalilo (36%) [79]. Por otro lado, se conocen bien los efectos benéficos cardiovasculares de la cebolla (*Allium cepa*) y su alto consumo está

asociado con la disminución del riesgo de padecer enfermedades trombóticas y arteroescleróticas [80].

Finalmente, otros reportes importantes de los efectos farmacológicos comprobados de los AE han sido acerca de sus actividades sobre el sistema nervioso central [81,82], desórdenes reumáticos [83], efectos citotóxicos [70], antiparasitarios [84], sedativos y analgésicos [85], antiespasmolítico e insecticida [4] y antimicobacterianos [86].

## 3.5 PARTE EXPERIMENTAL

En el presente trabajo, las metodologías *in-vitro* que se utilizaron para evaluar la capacidad antioxidante de los AE y sustancias sintéticas fueron el ensayo de decoloración del catión-radical $ABTS^{+\bullet}$ (metodología convencional y modificada) y la oxidación del ácido linoleico en un sistema modelo. Para el ensayo de inhibición de la enzima acetilcolinesterasa, se usó el ensayo colorimétrico del DTNB (ácido 2,2´-dinitro-5,5´-ditiobenzoico). Los métodos empleaos se describen a continuación.

**3.5.1 Reactivos, solventes y sustancias patrón.** Los siguientes reactivos y patrones certificados utilizados en el trabajo fueron adquiridos de *Sigma-Aldrich* (St. Louis, EE.UU.): Trolox® (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico; 97%,), $\alpha$-tocoferol (97%), butilhidroxianisol (BHA, 99%), butilhidroxitolueno (BHT, 99%), timol (99%), carvacrol (99%), *trans*-anetol (98%), estragol (98%), fenol (99,5%), guaiacol (98%), isovainillina (99%), eugenol (99%), 4-hidroxibenzaldehído (98%), galantamina (>97%), diazinón (>99%), fisostigmina (>98%), hexanal (98%), ácido linoleico (97%), ABTS (sal de diamonio del ácido 2,2´-azino-*bis*-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico; 99%), pentaflúorfenilhidracina (PFPH, 97%), la AChE del *Electrophorus electricus*, DTNB (ácido 2,2´-dinitro-5,5´-ditiobenzoico) y ATC (ioduro de acetiltiocolina). El persulfato de potasio (97%), sulfato de hierro (98%), dodecilsulfato de sodio (98 %) cloruro de potasio (99%), cloruro de sodio (99%), $NaH_2PO_4$ (99%), $K_2HPO_4$ (99%), $KH_2PO_4$ (99%) y *Tris*, fueron comprados a Merck (Darmstadt, Alemania). Gases especiales para cromatografía se obuvieron de *Aga-Fano* S.A. (99,995-99,999%, Grupo Linde Gas, Bogotá, Colombia). Todos los solventes

(metanol, etanol, hexano, agua, DMSO) fueron grado HPLC de Mallinckrodt Baker Inc. (J.T. Baker, Phillipsburg, EE.UU.).

**3.5.2 Equipos.** Los ensayos colorimétricos de $ABTS^{+\bullet}$ e inhibición de la enzima acetilcolinesterasa se llevaron a cabo en dos equipos: un espectrofotómetro visible Genesys 20 de Thermospectronic (Waltham, EE.UU) y un lector microplaca de 96 pozos Versamax de Molecular Devices (Sunnyvale, EE.UU.) con software para adquisición de datos SoftMax® Pro-software (Molecular Devices, Sunnyvale, EE.UU.) (**Figura 3.4**).

El análisis de los productos de la oxidación del ácido linoleico (hexanal en forma de su derivado hidrazónico, $C_6$-PFPH), se llevó cabo en un cromatógrafo de gases HP5890A Series II, *(Hewlett-Packard*, Palo Alto, CA, USA) con inyector *split/splitless* (relación *split* 1:10), equipado con un detector de captura de electrones $^{63}Ni$ (ECD), operado a 280°C, con gas auxiliar $Ar/CH_4$ (10 mL/min). Se usó una columna capilar HP-5 [5%-fenil-poli(metilsiloxano)] de 30 m x 0.25 mm (D.I.) y con un espesor de fase estacionaria de 0.25 μm. El gas de arrastre fue helio (*Aga-Fano* S. A., 99.995%, Bogotá, Colombia) con presión de entrada de 15 psi y un flujo de 1 mL/min. La programación de la temperatura del horno fue desde 100°C con una rampa de 10°C/min, hasta 250°C, temperatura que se mantuvo constante durante 5min.

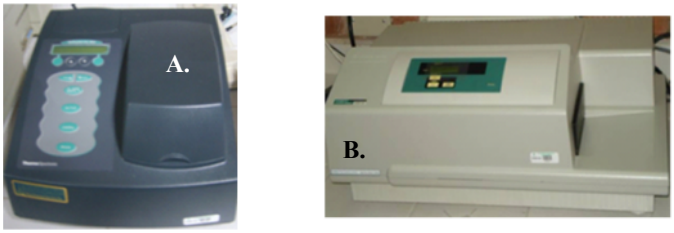



**Figura 3.4.** (A.) Espectrofotómetro Genesys 20 y (B.) Lector microplaca de 96 pozos Versamax.

**3.5.3 Ensayos de capacidad de la inhibición oxidativa.** Para la determinación de la capacidad de inhibición de la oxidación por los aceites esenciales y por las sustancias sintetizadas se emplearon ensayos *in vitro* de atrapamiento de radicales y peroxidación lipídica.

**3.5.3.1 Decoloración del catión-radical $ABTS^{+\bullet}$ por el método convencional.** La determinación de la capacidad AO de los AE, de las sustancias "control" (vitamina E, BHT, BHA), patrones de fenoles y derivados etéreos y moléculas sintetizadas se realizó con base en el procedimiento descrito por Re *et al.* [39] mediante espectroscopía VIS a 734 nm (ThermoSpectronic, Genesys 20). Se preparó una solución de $ABTS^{+\bullet}$ (7 mM) con persulfato de potasio (2.45 mM), disuelto en agua (5 mL) grado HPLC; la mezcla se dejó reaccionar durante 16 h a temperatura ambiente, en ausencia de luz y se ajustó la absorbancia hasta $0.700 \pm 0.02$.

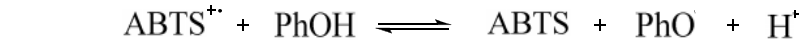
Seguidamente, las muestras de AE fueron diluidas hasta que la adición de 30 μL de ellas a 3 mL de la solución de $ABTS^{+\bullet}$, resultara en una inhibición entre el 20 y el 80 % del blanco de la absorbancia. La respuesta-concentración de las sustancias, como porcentaje de la absorbancia del catión-radical $ABTS^{+\bullet}$ sin inhibir se calculó de acuerdo con la **Ecuación 3.1**:

$$\text{Inhibición de } A_{\lambda:734}\ (\%) = (1-A_f/A_o) \times 100 \qquad \textbf{Ecuación 3.1}$$

Donde:

$A_o$: es la absorbancia del catión-radical sin inhibir;
$A_f$: es la absorbancia medida a los 6 min después de la adición del posible antioxidante.

La actividad se determina mediante la disminución del color azul-verdoso del catión-radical $ABTS^{+\bullet}$, cuando reacciona con el posible antioxidante y se produce el ABTS neutro incoloro (**Esquema 3.3**).




**Esquema 3.3.** Reacción del catión-radical $ABTS^{+\bullet}$ con el posible antioxidante

Todos los ensayos se realizaron por quintuplicado y se determinaron tanto la capacidad antioxidante equivalente al Trolox® (TEAC - mmol de Trolox®/mmol antioxidante evaluado) para las sustancias "control", como la capacidad antioxidante

total (TAA - mmol de Trolox®/kg sustancia evaluada) para los AE. Estas capacidades se calcularon como la relación entre las pendientes de las gráficas de % inhibición *Vs*. concentración del antioxidante en cuestión y Trolox®.

**3.5.3.2 Decoloración del catión-radical $ABTS^{+\bullet}$ por el método modificado.** La metodología implementada se basó en el ensayo convencional de decoloramiento del catión-radical $ABTS^{+\bullet}$, desarrollada en un lector microplaca de 96 pozos Versamax (Molecular Devices, Sunnyvale, EE.UU.). La solución *stock* del catión-radical $ABTS^{+\bullet}$ se preparó de la forma descrita en el **Numeral 3.5.3.1**. Para las sustancias evaluadas, se prepararon soluciones *stock* de $1x10^{-3}$ M, las cuales se diluyeron hasta que, después de introducir alícuotas de 10 µL de estas soluciones a las nuevas soluciones de $ABTS^{+\bullet}$ (200 µL), se produjeran inhibiciones entre el 20 y 80% de la absorbancia del blanco. El porcentaje de inhibición medido a los 30 min se graficó como una función de la concentración evaluada. La respuesta-concentración se calculó con base en la **Ecuación 3.1**. Todos los ensayos se realizaron por quintuplicado y para el cálculo del TEAC y TAA se utilizó la relación entre las concentraciones inhibitorias al 50% ($IC_{50}$) de Trolox® y de las sustancias evaluadas. La **Figura 3.5** muestra una microplaca de 96 pozos conteniendo la reacción entre la solución del catión-radical $ABTS^{+\bullet}$, las sustancias "control" y los blancos de la medida.

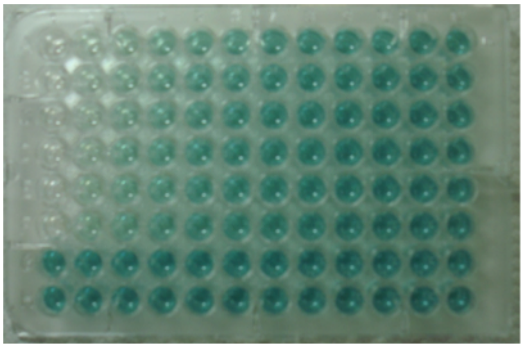


**Figura 3.5.** Fotografía de una microplaca de 96 pozos con la reacción entre $ABTS^{+\bullet}$ y las sustancias "control" del experimiento modificado.

**3.5.3.3 Oxidación del ácido linoleico por sulfato ferroso.** Para el ensayo *in vitro* de la oxidación del ácido linoleico se siguieron las metodologías descrita por Tamura y Yamagami [87] y la modificada en el Laboratorio de Cromatografia [88]. El ácido linoleico (8.9 mM) se diluyó con solución *buffer* de Trizma (0.25 mM, pH 7.4),

compuesta por KCl (0.75 mM) y dodecilsulfato de sodio (2000 ppm). La peroxidación lipídica se indujo por iones $Fe^{+2}$ [sulfato de hierro (20 mM) en presencia de oxígeno]. Seguidamente, se le añadió la solución antioxidante (AE, sustancias de referencia y patrones) en concentraciones de 10.0 g/L (0.5 mL). La incubación se efectuó a 37°C durante 16 h en un cuarto oscuro y se detuvo la reacción adicionando una solución alcohólica de BHT (90.8 mM).

El hexanal, producto secundario principal de la degradación oxidativa del ácido linoleico, se utilizó como marcador del avance del proceso, para lo cual éste se derivatizó con pentaflúorfenilhidracina (**Esquema 3.4**) en hexano (6800 ppm) seguido de la extracción líquido-líquido en fase condensada, según la metodología descrita por Stashenko *et al.* [89]. Luego, cada solución se inyectó (1 μL) al GC-ECD para su análisis cromatográfico.




**Esquema 3.4.** Reacción de la PFPH con aldehídos para la formación de los derivados hidrazónicos para análisis GC-ECD.

Los efectos protectores de los AE y las sustancias de referencia y patrones de fenoles y derivados etéreos se determinaron mediante la **Ecuación 3.2**. Se usó el valor del área del pico del derivado del hexanal (isómero *syn*-), en el cromatograma de compuestos carbonílicos volátiles.

$$\text{Efecto protector (\%)} = (A_{Blanco}-A_{Sustancia}/A_{Blanco}) \times 100 \qquad \textbf{Ecuación 3.2}$$

Donde:

$A_{Blanco}$: Área del derivado del hexanal determinada en el sistema sometido a peroxidación sin antioxidante (blanco);

$A_{Sustancia}$: Área del derivado del hexanal determinada en el sistema sometido a peroxidación en la presencia de antioxidante.

**3.5.4 Ensayo de inhibición de la enzima acetilcolinesterasa.** La determinación de la actividad inhibitioria de la AChE de los AE, de las sustancias de referencia (galantamina, fisostigmina, diazinón), patrones y moléculas sintetizadas se realizó con base en el procedimiento descrito por Ellman *et al.* [90], usando la AChE aislada del pez *Electrophorus electricus*, mediante espectroscopía VIS a 412 nm.

Las muestras a evaluar, preparadas en concentraciones comprendidas entre $1x10^{-3}$ y $1x10^{-7}$ M y disueltas en *buffer* fosfato salino (PBS), se colocaron a reaccionar con la enzima AChE durante 30 min. Seguidamente, se les adicionó la solución sustrato compuesta por el ácido 2,2´-dinitro-5,5´-ditiobenzoico (50 μL) y el yoduro de acetiltiocolina (50 μL). 5 min después, se leyó la absorbancia a 412 nm en el lector de microplacas. La respuesta-concentración de las sustancias, como porcentaje de la absorbancia del DTNB sin inhibir se calculó con base en la **Ecuación 3.3**:

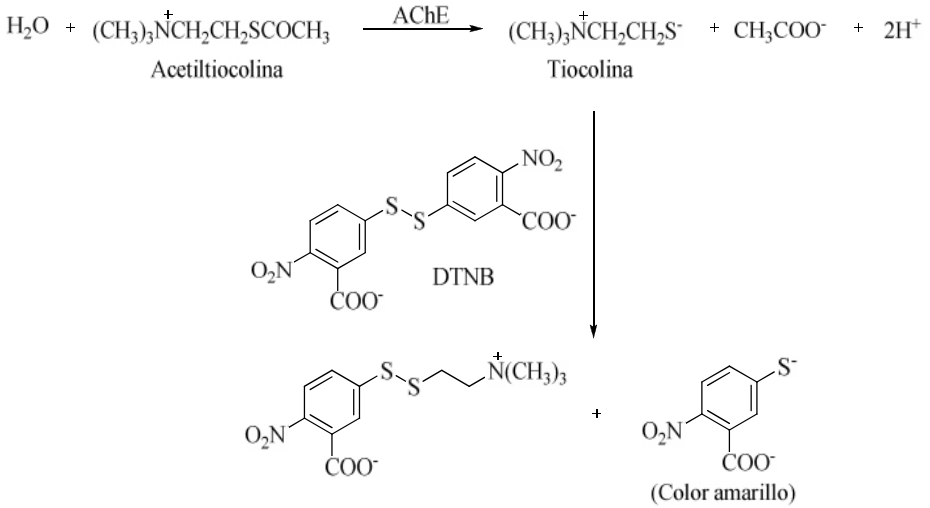
$$\text{Inh. } A_{412}\ (\%) = 100-[(A_E- A_B)/(A_C- A_B)] \times 100 \qquad \textbf{Ecuación 3.3}$$

Donde:

$A_E$: es la absorbancia medida a los 5 min del posible inhibidor (muestra);
$A_C$: es la absorbancia medida a los 5 min de la sustancia de referencia (galantamina, etc);
$A_B$: es la absorbancia medida a los 5 min del blanco del experimento (sin ningún inhibidor).

Todos los ensayos se realizaron por quintuplicado y los valores de las $IC_{50}$ (concentración inhibitoria al 50%) se obtuvieron a partir de las gráficas del porcentaje de inhibición (a los 5 min) *Vs*. concentración de la sustancia evaluada, utilizando el *software* SoftMax Pro 5.2 de Molecular Devices.

Así, la actividad enzimática se determinó mediante el incremento del color amarillo producido por la formación del anión del ácido tionitrobenzoico como consecuencia de la reacción del anión ditiobisnitrobenzoato con la tiocolina generada por la hidrólisis de la acetilcolina (**Esquema 3.5**).




**Esquema 3.5.** Reacción para determinar la actividad inhibitoria de la AChE.

La **Figura 3.6** muestra una fotografía de una microplaca de 96 pozos con la reacción entre el DTNB, ioduro de acetilcolina, AchE y las sustancias evaluadas.

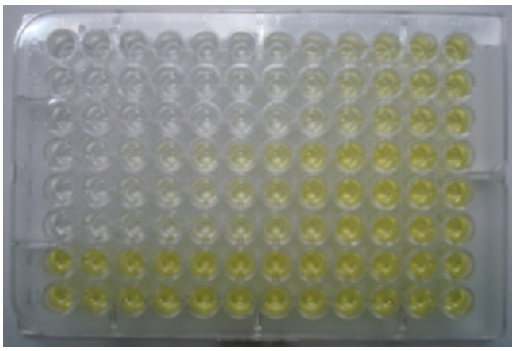


**Figura 3.6.** Fotografía de una microplaca de 96 pozos con la reacción entre DTNB, ioduro de acetilcolina, AChE y el sustrato a evaluar.

**3.5.5 Otros ensayos biológicos preliminares.** Se realizaron algunos ensayos *in vitro* de actividad antifúngica, antiparasitarios (*T. cruzi* y *L. chagasi*) y de citotoxicidad (células Vero y células THP-1) de algunas moléculas sintéticas. Los ensayos antifúngicos fueron realizados por la Dra Leonor Yamile Vargas Méndez en el Laboratorio de Farmacognosia de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas de la Universidad Nacional del Rosario (Argentina), bajo la dirección de la Dra. Susana Zacchino, siguiendo los procedimientos del Comité Nacional de Estándares para Laboratorios Clínicos (EE.UU). Los protocolos M27-A2 (NCCLS,

2002-a) y M38A (NCCLS, 2002-b) se emplearon para hongos levaduriformes y filamentosos, respectivamente.

La concentración inhibitoria mínima (CIM), que es la concentración mínima a la cual se inhibe totalmente el crecimiento del microorganismo, se determinó usando la metodología de microdilución en caldo, en placas de 96 pocillos. Las muestras se prepararon en dimetilsulfóxido (DMSO) a una concentración de 12.5 mg/mL y se disolvieron en medio *Saboreau* hasta una concentración de 250 μg/mL, para obtener el valor CIM de las muestras. Se utilizó como sustancia control ketoconazol, que es uno de los compuestos formulados para el tratamiento contra hongos.

Los ensayos antiparasitarios y de citotoxicidad fueron realizados en el Laboratorio del Centro de Investigación de Enfermedades Tropicales (CINTROP) bajo la dirección de la Dra Patricia Escobar. Las cepas evaluadas de los parásitos *T. cruzi* y *L. chagasi* se encontraron en los estadios de epimastigotes, promastigotes y amastigotes. Para la evaluación de la citotoxicidad se utilizaron células Vero y THP-1.

Los ensayos se realizaron en las formas extracelulares e intracelulares de los dos parásitos. Las formas extracelulares ($5 \times 10^5$ parásitos/mL) de *T. cruzi* (epimastigotes) y de *L. chagasi* (promastigotes) preparadas en placas de 96 pozos fueron tratadas con los compuestos de interés y los medicamentos de referencia (0-100 μg/mL) aplicando diluciones seriadas 1:3, durante 5 días a 37ºC, en ambiente aerobio $CO_2$ al 5% y aire al 95%. Finalmente, los parásitos fueron contados en la cámara de Neubauer después de 72 h de incubación. Todos los experimentos se realizaron por triplicado. Todas las muestras se prepararon en DMSO (100X) como soluciones *stock* y a partir de ellas las soluciones de trabajo se adecuaron en el medio de cultivo antes de hacer las valoraciones biológicas.

Para el ensayo de citotoxicidad, las células Vero y células THP-1 se transformaron con PMA, se colocaron en microplacas de 96 pozos y tratadas con los compuestos de interés (0-100 μg/mL) durante 72 h a 37ºC, en medio aeróbico (mezcla aire (95%) - $CO_2$ (5%)). La viabilidad celular se determinó mediante el ensayo colorimétrico con

MTT [bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol], mediante espectroscopía VIS ($\lambda$=540 nm, solución púrpura). El porcentaje de citotoxicidad se calculó con la siguiente fórmula (OD grupo control- OD grupo tratado)/ OD grupo control x 100.

La dosis-respuesta de la actividad anti-*Leishmania* y anti-*T. cruzi* fue expresada en concentraciones inhibitorias al 50% ($IC_{50}$) y al 90% ($IC_{90}$). Asimismo, la dosis-respuesta de la actividad en células de mamífero fue expresada en concentración citotóxica al 50% ($CC_{50}$) y al 90% ($CC_{90}$). Los datos fueron calculados utilizando el *software* (Msxlfitä; ID Business Solution, Guildford, UK).

**3.5.6 Cálculos de potenciales de ionización de moléculas sintéticas.** Los datos obtenidos de los valores de capacidad antioxidante equivalente al Trolox® (TEAC) de las moléculas sintéticas se correlacionaron con sus potenciales de ionización determinados a través de cálculos computacionales usando el *software* Gaussian 03 (versión 6.0, Gaussian, Inc.); se empleó el método/conjunto base B3LYP/6-311++G(d,p). Se seleccionó este método/conjunto base debido a la similitud del valor experimental del potencial de ionización del fenol con el valor del potencial de ionización calculado [91].

## 3.6 ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

**3.6.1 Modificación del método de decoloramiento del catión-radical $ABTS^{+\bullet}$**. El ensayo de *capacidad antioxidante equivalente al Trolox*® (TEAC) es un método ampliamente utilizado para estimar la habilidad de una sustancia antioxidante (AO) para reducir al catión-radical $ABTS^{+\bullet}$ [38]. En este ensayo, el antioxidante se adiciona a una solución pre-formada del catión-radical $ABTS^{+\bullet}$ y en un período fijo de tiempo el catión radical $ABTS^{+\bullet}$ residual, se cuantifica espectrofotométricamente. La disminución de su concentración, producida por la oxidación del antioxidante a una concentración dada, se determina como función de la concentración y tiempo y su decoloración se calcula relativa a la reactividad del *Trolox*®, lo que permite obtener el valor de TEAC del antioxidante [39]. Este ensayo ha sido utilizado para valorar la capacidad

antioxidante de sustancias individuales y extractos vegetales tanto hidrofílicos como lipofílicos debido a la solubilidad de $ABTS^{+\bullet}$ y en disolventes acuosos y orgánicos [92-95].

Sin embargo, bajo las condiciones en las cuales el ensayo se realiza, la reacción entre la mayoría de antioxidantes y el catión-radical es incompleta lo que conduce a la subestimación del valor de TEAC para estos antioxidantes; ya que se observan diferencias sustanciales en los valores reportados. Así, por ejemplo, los valores de TEAC de quercetina, rutina, crisina y BHT varían en los intervalos 3.1-6.4; 2.4-5.6; 1.4-2.4 y 0.10-0.76; respectivamente [96-98]. Las variaciones de los datos no pueden ser atribuidas al método, puesto que realizando el mismo procedimiento para algunas sustancias en particular, el valor de TEAC varía, lo que genera la necesidad de ajustar el método para tener en cuenta todos los subproductos formados en la reacción y así, determinar adecuadamente el valor de la *capacidad antioxidante total* representada en la suma de la capacidad antioxidante del compuesto "padre" y de los productos de oxidación de éste [99].

Además, de acuerdo con Prior *et al.* [93] el ensayo TEAC es uno de los métodos de capacidad antioxidante (AOC) que debe estandarizarse para uso de las medidas AOC de alimentos y fitoquímicos, debido a su relativa simplicidad operacional, requerimiento de instrumentación, mecanismos, medidas tanto en el punto final como de sustancias hidrofílicas y lipofílicas. Aunque, este ensayo no involucra un sustrato [15] ni el $ABTS^{+\bullet}$ (oxidante) representa a cualquier ROS que reacciona con sistemas biológicos [92-94,100,101]. Por lo tanto, el ensayo TEAC es un método de *screening* para estimar la reactividad hacia radicales de compuestos antioxidantes y de mezclas complejas [35].

De acuerdo con el **Numeral 3.5.3.2**, las soluciones de trabajo (40-560 □M) de las sustancias evaluadas se prepararon a partir de una solución *stock* de 1 mM, las cuales se diluyeron en serie en las microplacas de 96 pozos (placa de dilución). Tan pronto como la placa del experimento de lectura estuvo lista, las cantidades finales de los antioxidantes se encontraron entre 0.08-5 □g. La reacción entre las moléculas

evaluadas y el $ABTS^{+\bullet}$ se monitoreó cada minuto hasta alcanzar un estado estacionario durante 30 min a 25°C. Las cinéticas de las reacciones se graficaron (**Figura 3.7**) y a partir de éstas se determinó el porcentaje remanente de $ABTS^{+\bullet}$.

En varios trabajos realizados y reportados por el Laboratorio de Cromatografía, donde se estudió la capacidad antioxidante de aceites esenciales [102,103] y muestras sintéticas [104] usando la metodología convencional de decoloramiento del catión-radical $ABTS^{+\bullet}$, se observaron algunos inconvenientes asociados con este procedimiento, a saber: el método es muy laborioso, las cantidades de muestra y de disolvente requeridos son grandes y se observan ausencias o diferencias en los valores de TEAC [96-98,105] para aquellas sustancias que tienen una cinética de reacción muy lenta o cinética múltiple, debido a la presencia de diferente grupos funcionales reactivos en la molécula [106]; o, en el caso de los extractos de origen natural, a su complejidad composicional [107].

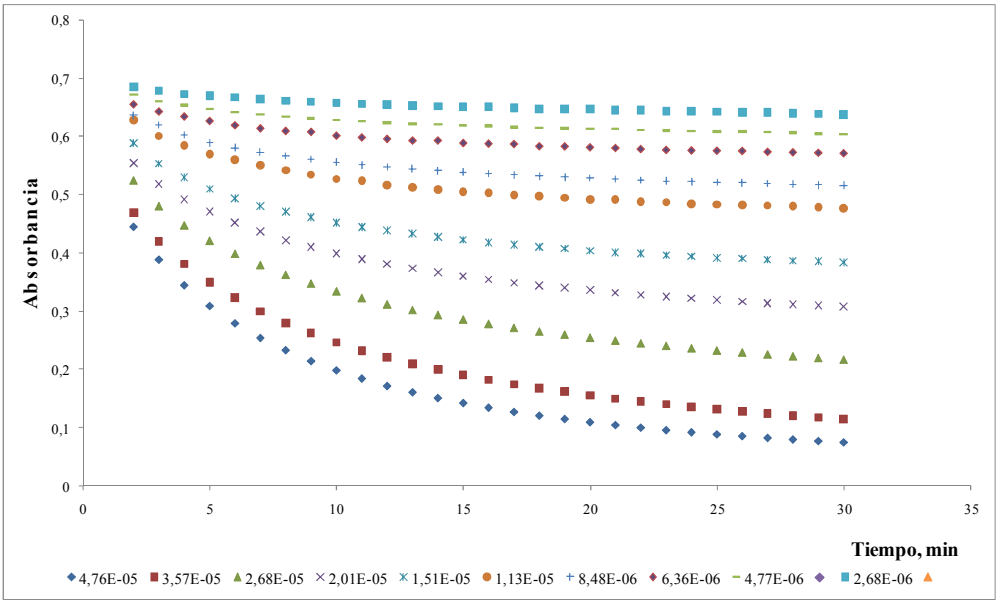



**Figura 3.7.** Ejemplo del comportamiento cinético de la inhibición del $ABTS^{+\bullet}$ para diferentes concentraciones de BHT.

Todo ello condujo a la necesidad de cambios metodológicos que permitieron superar estas dificultades, posibilitaron el *screening* de un gran número de muestras de origen natural y/o sintético en corto tiempo (*ca.* 7 muestras/h), con un control estricto de las

variables (dosificación de soluciones de muestra y del catión-radical $ABTS^{+\bullet}$, tiempo y temperatura del ensayo, blancos de las medidas, etc.), y la reproducibilidad, repetibilidad y alta eficiencia del experimento.

Las sustancias que inicialmente se evaluaron por los métodos convencional y microescalado fueron los antioxidantes control: $\alpha$-tocoferol, BHA y BHT. La **Tabla 3.3** presenta la comparación de los valores de TEAC obtenidos de las relaciones de las pendientes (***m***) y de los valores de $IC_{50}$, calculados a partir de las gráficas de % de inhibición *Vs* concentración al aplicar los dos métodos evaluados, respectivamente.

Cuando se grafica el % de inhibición *Vs* concentración para la reacción del $ABTS^{+\bullet}$ con el BHT (**Figura 3.8**), para calcular el valor de TEAC como la relación de las pendientes de las sustancias evaluadas (BHT y Trolox®), se observa claramente que debido a la forma de la curva (función logarítmica) ésta tendría una serie de pendientes y no sólo una como en el caso de Trolox® (**Figura 3.9**).

**Tabla 3.3.** Comparación de valores de TEAC de las sustancias control, obtenidos por los métodos "convencional" y modificado.

| AO | Método Re, *et al.* [39] | | Método propuesto | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | TEAC (*m* AO/*m* Trolox®) | | TEAC ($IC_{50}$ Trolox®/$IC_{50}$ AO) | | | |
| | Lectura, 6 min | | Lectura, 6 min | | Lectura, 30 min | |
| | ***m*** | TEAC[a] | $IC_{50}$ (M) | TEAC[a] | $IC_{50}$ (M) | TEAC[a] |
| Trolox® | $2.37x10^{6}$ | ---- | $2.08x10^{-5}$ | ---- | $2.09\ x10^{-5}$ | ---- |
| $\alpha$-Tocopherol | $2.49x10^{6}$ | **1.05** ± 0.03 | $2.54\ x10^{-5}$ | **0.82** ± 0.02 | $2.35\ x10^{-5}$ | **0.89** ± 0.01 |
| BHA | $2.21x10^{6}$ | **0.95** ± 0.01 | $2.08\ x10^{-5}$ | **1.00** ± 0.02 | $2.05\ x10^{-5}$ | **1.02** ± 0.04 |
| BHT | $1.01x10^{6}$ (20-50% inh.) | **0.42** ± 0.02 | $3.83\ x10^{-5}$ | **0.54** ± 0.01 | $1.61\ x10^{-5}$ | **1.29** ± 0.04 |
| | $4.05x10^{5}$ (50-80% inh.) | **0.170** ± 0.002 | | | | |

[a] Valor promedio ± desviación estándar, n = 5 (réplicas) ***m***: pendiente de la curva % inh. *Vs* conc.

Esto indica que la determinación de valor de TEAC para el BHT por el método convencional dependerá del rango de inhibición seleccionado y, por lo tanto, no es un sólo valor sino que posiblemente será un rango, lo cual está en concordancia con lo reportado por Buenger *et al.* [97]. En este experimento el BHT presentó dos valores de pendientes; se observaron diferencias sustanciales en los valores reportados, 0.42 ± 0.02 y 0.170 ± 0.002, respectivamente.

Las variaciones de los valores de TEAC, calculados con base en las pendientes de la curva de %inhibición del BHT, no pueden atribuirse al procedimiento, ya que los datos se extrajeron de la misma curva, ello sugirie que el valor de TEAC considerado a los 6 min es subestimado y no representa el valor del punto final del equilibrio de la reacción de oxidación-reducción.

La evolución de las diferentes cinéticas de reacción depende de la naturaleza del antioxidante probado [108]. Tres tipos de comportamientos se observaron: rápido, para el BHA; intermedio, para el $\alpha$-tocoferol; y lento, para el BHT (**Figura 3.7**).

El BHA reaccionó rápidamente con $ABTS^{+\bullet}$ alcanzando el equilibrio durante los primeros 5 min. El comportamiento intermedio del $\alpha$-tocoferol condujo a la decoloración del $ABTS^{+\bullet}$ durante 5-15 min. Este tipo de cinéticas presentan curvas lineales de % inhibición *Vs* concentración (**Figura 3.10**), esto posibilita inferir que los subproductos de oxidación (*e.g.*, tipo-quinona) no participan en la reacción con $ABTS^{+\bullet}$ [109] y, en consecuencia, no contribuyen a la capacidad antiradicalaria.

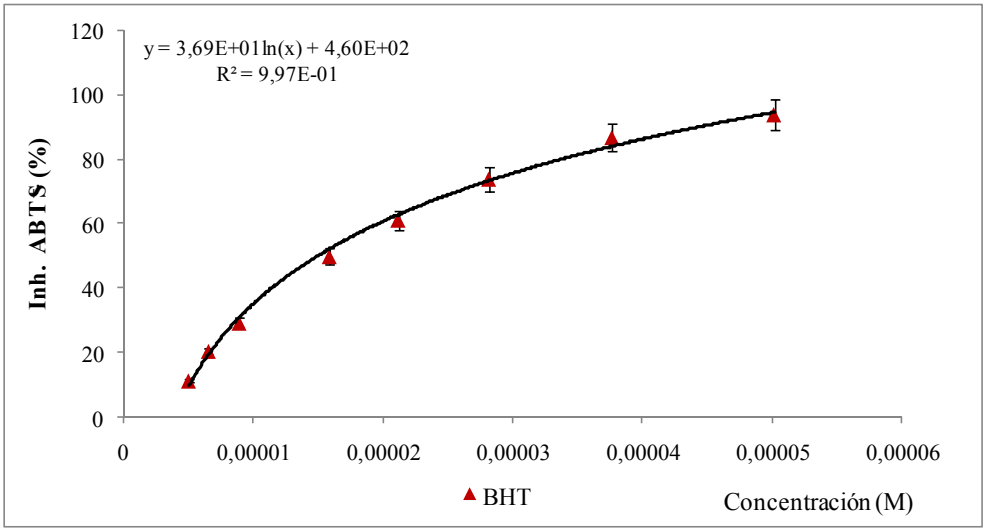



**Figura 3.8.** Efecto de la inhibición de $ABTS^{+\bullet}$ por la adición de BHT a diferentes concentraciones.

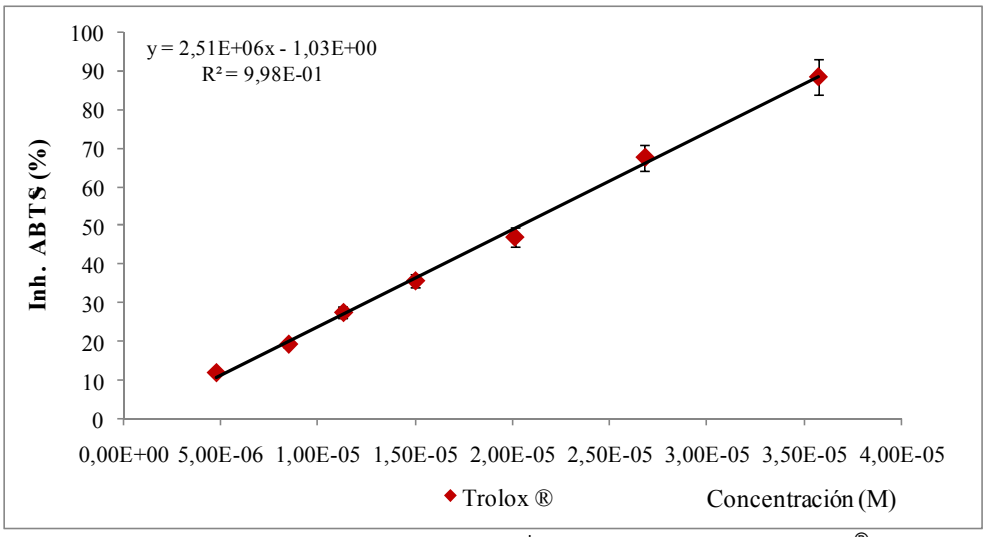



**Figura 3.9.** Efecto de la inhibición de $ABTS^{+\bullet}$ por la adición de Trolox® a diferentes concentraciones.

El BHT por su parte, reaccionó lentamente con el $ABTS^{+\bullet}$**,** se obtuvo una curva logarítmica de % inhibición *Vs* concentración (**Figura 3.8**), que indica una cinética compleja [110] y que los subproductos de oxidación quizá contribuyan a la capacidad antioxidante [99,109]. En este sentido, para aquellas sustancias antioxidantes con cinéticas de oxidación-reducción complejas, el valor de TEAC relativo, determinado en tiempos de ensayo cortos (6 min), puede subestimar la capacidad antiradicalaria total. Así que, el valor de TEAC absoluto de compuestos individuales sólo debe determinarse cuando las reacciones de redox han alcanzado el estado estacionario o *plateau* (condiciones cercanas al equilibrio) [107].

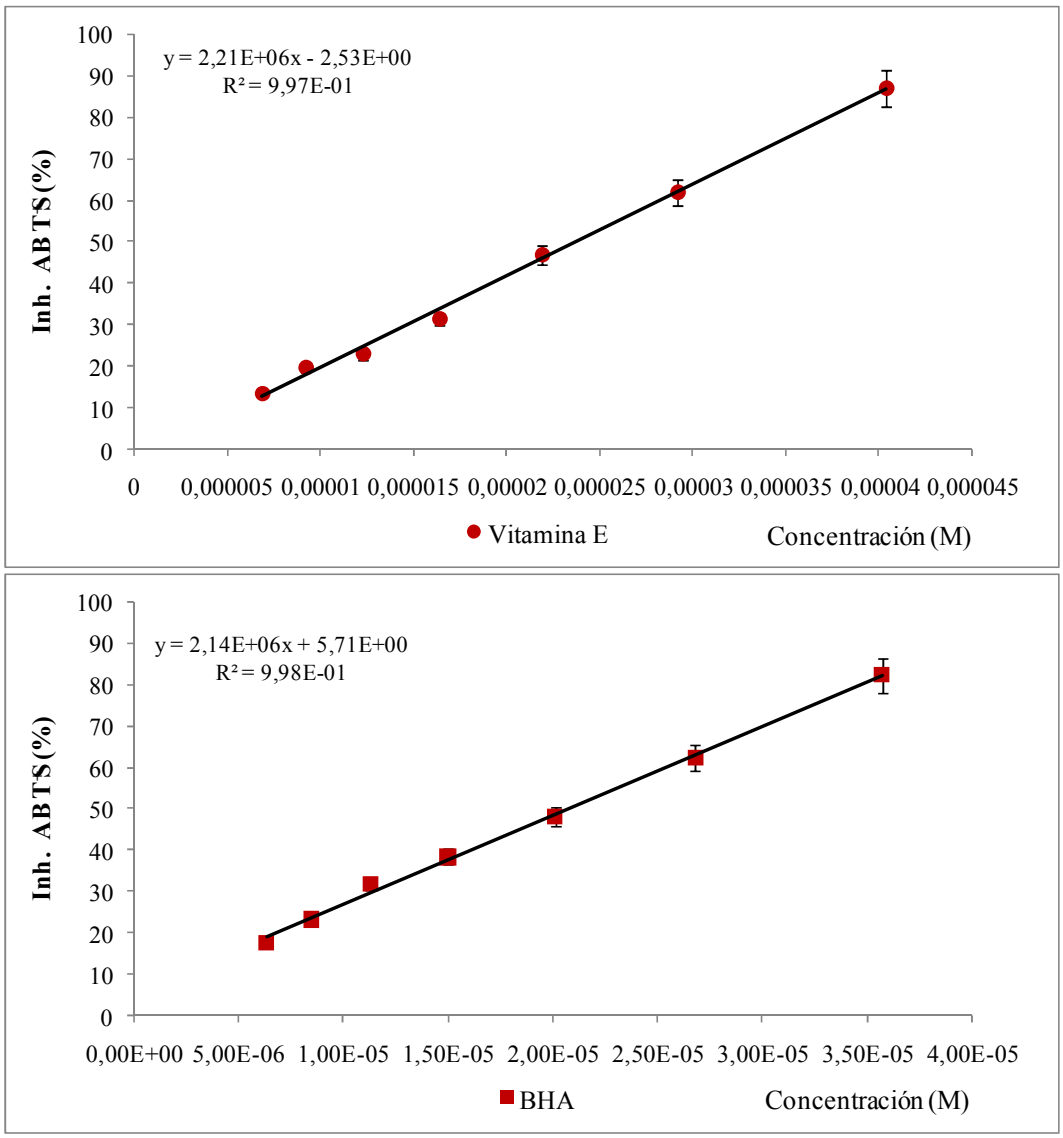



**Figura 3.10.** Efecto de la inhibición de $ABTS^{+\bullet}$ por la adición de $\alpha$-tocoferol y BHA a diferentes concentraciones.

Con base en la subestimación del valor de TEAC, al realizar el ensayo del catión-radical $ABTS^{+\bullet}$ en condiciones de no-equilibrio, el rango de valores de TEAC para una misma sustancia (*e.g.*, BHT), junto con las grandes cantidades de disolvente (3 mL) y muestra (10-500 mg) utilizada, y la baja repetibilidad (CV ≥ 10%) de los experimentos, se planteó llevar a cabo este ensayo en un lector microplaca de 96 pozos minimizando todas las desventajas anteriormente mencionadas. Aunque Henning *et al.* [111], Seeram *et al.* [112], Kambayashi *et al.* [113] y Lee *et al.* [114] han adaptado el ensayo $ABTS^{+\bullet}$ a microplacas, cada uno de ellos presentaron diferencias con el método propuesto.

Seeram *et al.* [112] y Henning *et al.* [111] efectuaron el ensayo de TEAC de acuerdo con la metodología de Miller *et al.* [115]. Ellos prepararon la solución del catión-radical $ABTS^{+\bullet}$ adicionando $MnO_2$ como oxidante, que muestra una velocidad de descomposición muy rápida [116], y leyeron su absorbancia a 750 nm durante 75 min, cada 15 min. El valor de TEAC se calculó a partir de la curva estándar de Trolox® para bebidas ricas en polifenoles y muestras de plasma después de consumir diferentes tés, respectivamente. El ensayo TEAC se adaptó al lector microplaca de 96 pocillos sólo por razones técnicas, explicaron los autores en su trabajo.

Mientras tanto, Kambayashi *et al.* [113] establecieron un ensayo eficiente para determinar la capacidad antioxidante total (TAC) en plasma humano. En este caso, la TAC fue estimada usando el tiempo de retardo entre antioxidantes y $ABTS^{+\bullet}$ oxidado por mioglobina-$H_2O_2$ y aplicada a sustratos biológicos (plasma humano saludable) [117]. Además, sólo utilizaban 8 pozos para la medida simultánea de TAC. Sin embargo, el coeficiente de variación intradía del ensayo fue de 2.4%. Finalmente, el propósito de implementar el ensayo en microplaca de 96 pocillos fue determinar las TAC de muchas muestras de manera simultánea.

Lee *et al.* [114] mejoraron el método para determinar la capacidad total de atrapamiento de radicales de antioxidantes y alimentos. En este ensayo, el método ABTS descrito por Kim *et al.* [118] se utilizó con modificaciones (la solución de $ABTS^{+\bullet}$ se ajustó hasta una absorbancia de $0.300 \pm 0.02$). El objetivo del estudio fue mejorar su anterior método mediante el desarrollo de un método analítico rápido y práctico, con alta reproducibilidad y sensibilidad, para medir la TAC de los antioxidantes contenidos en alimentos, expresada como la capacidad antioxidante equivalente a vitamina C (VCEAC), usando las gráficas linealmente interpoladas y el área bajo la curva. Según los autores, este ensayo puede ser aplicado simultáneamente a un gran número de antioxidantes y alimentos, con cantidades de muestra pequeñas y utilizando un lector microplaca de 96 pozos.

En la **Tabla 3.4** se muestra la comparación de los parámetros experimentales y estadísticos obtenidos por los métodos convencional y modificado. Así, el ensayo microescalado del catión-radical $ABTS^{+\bullet}$ permitió hacer un *screening* de un número elevado de muestras (30-40) en poco tiempo (8 h) con una disminución considerable en las cantidades de reactivos, disolventes (aprox. 95%), uso de equipos y, lo más relevante, en las cantidades de sustancia probadas (0.08-20 mg).

**Tabla 3.4.** Comparación de los parámetros experimentales y estadísticos en ensayos del catión-radical $ABTS^{+\bullet}$ convencional y modificado.

| Parámetros | Método convencional | Método microescalado |
|---|---|---|
| Repetibilidad (CV, %) | 1-10% | 1-4% |
| Tiempo de lectura ensayo | 6 min | 30 min |
| Número muestra/hora | 1 muestra | 6 muestras (por duplicado) |
| Blancos/muestra | 3 blancos | 12 blancos (por placa) |
| Número concentración/mtra | 6 soluciones | 12 soluciones |
| Réplicas por muestra | 5-10 | 1-4 |
| Cantidad muestra/lectura | 10-500 mg | 0.08-20 mg |
| Volumen disolvente/lectura | 3 mL | 200 μL |
| Volumen disolvente/muestra | 30 mL (6 conc. -3 blancos) | 3 mL (12 conc. -12 blancos) |
| Procesamiento de datos | Laborioso (cálculo de *pendiente* de curvas) | Manejable (cálculo $IC_{50}$) |

La realización del ensayo modificado de $ABTS^{+\bullet}$ sobre el antioxidante BHT permitió calcular el valor absoluto de TEAC para el BHT (1.29±0.04) (**Tabla 3.3**), que fue mayor que los valores reportados (0-0.7) [97,102,105,119]. Los valores inferiores reportados de TEAC para el BHT, son consecuencia de las condiciones no adecuadas (reacción no finalizada) en la determinación del valor de TEAC. Cuando se comparan los valores de TEAC para BHT, BHA y □-tocoferol (sustancias control), mediante el método microescalado, se encontró que éstos fueron muy próximos; lo que coincide con los resultados obtenidos por Brand-Williams *et al.* [108] sobre los valores de ARP (poder anti-radicalario) del BHT, BHA y □-tocoferol: BHT (4.20) ≥ BHA (4.17) > □-tocoferol (4.0); quienes emplearon el método del decoloramiento del radical $DPPH^{\bullet}$, método con un mecanismo similar al del catión-radical $ABTS^{+\bullet}$.

De acuerdo con Campos y Lissi [106], aquellas moléculas que poseen tienen un grupo que facilite la reactividad con el catión-radical $ABTS^{+\bullet}$, tendrán coeficientes (factores) estequiométricos ***n*** entre 1 y 2. Este coeficiente estequiométrico ***n*** es proporcional a la

*pendiente* de la curva, lo que revela que ***n*** depende de la sustancia. Los valores más altos de ***n*** sólo se presentan cuando existe más de un grupo reactivo en la estructura de la sustancia.

A continuación, se presentan los resultados y la discusión de las capacidades antioxidantes de AE y moléculas sintéticas empleando los métodos convencional y modificado. Se menciona que las modificaciones realizadas al *ensayo de capacidad antioxidante equivalente al Trolox*®, fueron realizadas conjuntamente con Leonor Yamile Vargas, Qca. M.Sc., Ph.D., en el Laboratorio de Química Orgánica y Biomolecular de la UIS.

**3.6.2 Evaluación de la capacidad antioxidante de aceites esenciales con alto contenido de timol, carvacrol, estragol o *trans*-anetol.** La capacidad antioxidante total (TAA), expresada en equivalentes de Trolox®, empleando los métodos convencional y microescalado, y la inhibición de la oxidación del ácido linoleico se determinaron para los AE: *Plectranthus amboinicus*, *Lippia origanoides*, *Thymus vulgaris*, *Lippia micromera*, *Tagetes lucida* (hojas y flores), *Ocimum sp.*, *Illicium verum*, *Tagetes filifolia*, proveniente del municipio de Bolivar y del cultivo experimental Cenivam), y *Foeniculum vulgare*, seleccionados por su alto contenido de timol, carvacrol, estragol o *trans*-anetol. Además, se emplearon patrones de estos 4 constituyentes principales, con fines comparativos. Los datos obtenidos de las capacidades antioxidantes de los aceites se reportan en la **Tabla 3.5**.

La capacidad antioxidante estimada por el método convencional $ABTS^{+\bullet}$ para los AE ricos en carvacrol y timol, presentó valores de TAA (mmol de Trolox®/kg de AE) de 2040 ± 21, 890 ± 32, 800 ± 24, 670 ± 24 para *L. origanoides*, *P. amboinicius*, *T. vulgaris* y *L. micromera*, respectivamente. Estos resultados mostraron que los AE evaluados presentaron una menor actividad comparada con los antioxidantes BHA (7000 ± 487) y $\alpha$-tocoferol (2590 ± 33). Sin embargo, tres de la especies presentaron capacidad antiradicalaria cercanas a la del BHT (990 ± 31), con excepción de la *L. origanoides,* cuyo valor de TAA fue más alto que el del BHT.

**Tabla 3.5.** Valores de TAA y efecto protector (%) para las sustancias de referencia, de control y AE, obtenidos en los ensayos de decoloramiento de $ABTS^{+\bullet}$ e inhibición del ácido linoleico.

| Sustancia evaluada | Inhibición $ABTS^{+\bullet}$ TAA (mmol Trolox®/kg AO) | | Inhibición ácido linoleico |
|---|---|---|---|
| | Método convencional | Método en multipozo | Efecto protector, % (5 mg AO) |
| Trolox® | — | — | 60 ± 3 |
| α-Tocoferol | 2590 ± 33 | 3300 ± 47 | 39,8 ± 0,7 |
| BHA | 6900 ± 487 | 8000 ± 184 | 90 ± 4 |
| BHT | 990 ± 31 | 21000 ± 308 | 80 ± 2 |
| Carvacrol | — | 6100 ± 69 | 70 ± 5 |
| Timol | — | 6200 ± 43 | 64,2 ± 0,2 |
| Estragol | — | (21% - 0.04M) | 46 ± 4 |
| *trans*-Anetol | — | (33% - 0.04M) | 77 ± 6 |
| *Lippia micromera* | 670 ± 24 | 1840 ± 3 | 70 ± 6 |
| *Plectranthus amboinicus* | 800 ± 24 | 5000 ± 198 | 80 ± 8 |
| *Lippia origanoides* | 2040 ± 21 | 4800 ± 337 | 80 ± 5 |
| *Thymus vulgaris* | 890 ± 32 | 3100 ± 84 | 70 ± 6 |
| *Tagetes lucida* (flores) | 3.68 ± 0.06 | 13.6 ± 0.2 | 68 ± 2 |
| *Tagetes lucida* (hojas) | 3.8 ± 0.2 | 11.6 ± 0.03 | 70 ± 2 |
| *Artemisia dracunculus* | 0.00023 ± 0.00001 | NR | 30 ± 6 |
| *Ocimum sp*. | 5.1 ± 0.2 | 12.7 ± 0.2 | 47 ± 2 |
| *Tagetes filifolia* (cultivo Cenivam) | 2.6 ± 0.2 | NR | 56 ± 2 |
| *Tagetes filifolia* (cultivo Bolivar) | 1.5 ± 0.1 | 3.7 ± 0.2 | 60 ± 1 |
| *Illicium verum* | 5.6 ± 0.1 | 4.7 ± 0.3 | 59 ± 5 |
| *Foeniculum vulgare* | 0.00015 ± 0.00001 | 1.52 ± 0.05 | 37 ± 5 |

NR – No realizado

La misma evaluación para los AE con alto contenido de estragol y *trans*-anetol arrojó valores de TAA (mmol de Trolox®/kg de AE) de 5.6 ± 0.1, 5.1 ± 0.2, 3.8 ± 0.2, 3.68 ± 0.06, 2.6 ± 0.2, 1.5 ± 0.1, 0.00023 ± 0.00001 y 0.00015 ± 0.00001 para *I. verum*, *Ocimum sp.*, *T. lucida* (hojas), *T. lucida* (flores), *T. filifolia* (cultivo Complejo Cenivam), *T. filifolia* (cultivo Municipio de Bolivar), *A. dracunculus* y *F. vulgare*, correspondientemente. La capacidad antioxidante de estos AE medida por este método, en comparación con los antioxidantes sintéticos BHA (7000 ± 487), BHT (990 ± 31) y α-tocoferol (2590 ± 33), fue menor lo que puede ser atribuido a la ausencia/poca cantidad de fenoles o sustancias capaces de donar electrones e hidrógenos [120].

Se debe recordar, que los valores TAA obtenidos para los AE evaluados por el método convencional son subestimados debido a que no se determinaron en condiciones cercanas al equilibrio. Los valores TAA obtenidos por el método modificado para los AE de *P. amboinicius*, *L. origanoides*, *T.* y *L. micromera* disminuyeron así: 5000 ± 198 > 4800 ± 337 > 3100 ± 84 > 1840 ± 3, respectivamente. El atrapamiento de radicales por el método microescalado evidenció que los AE evaluados presentaron una menor actividad que la de los antioxidantes BHT (21000 ± 308) y BHA (8000 ± 184). Sin embargo, *T. vulgaris* exhibió capacidad antiradicalaria cercana a las del $\alpha$-tocoferol (3300 ± 47) y de *P. amboinicus*, junto con *L. origanoides*, superaron el valor de TAA del $\alpha$-tocoferol. De la misma forma, los valores de TAA, por el método de microescalado para los AE de *T. lucida* (flores), *Ocimum sp.*, *T. lucida* (hojas), *I. verum*, *T. filifolia* (cultivo municipio de Bolivar) y *F. vulgare*, decreció así: 13.6 ± 0.2 > 12.7 ± 0.2 > 11.62 ± 0.03 > 4.7 ± 0.3 > 3.7 ± 0.2 > 1.52 ± 0.05, consecutivamente.

La capacidad antioxidante de todos estos AE se puede atribuir a los compuestos activos presentes en ellos; es decir, tanto a los componentes principales, como aquellos constituyentes en pequeñas cantidades, o la sinergia entre ellos [121].

Si se comparan los valores de TAA por los 2 métodos de $ABTS^{+\bullet}$ para todos los AE evaluados, se observó, que la diferencia entre los valores TAA calculados fue mucho más notoria en los AE que contuvieron fenoles, lo que indica que debido a la presencia de timol y carvacrol la cinética entre estos AE y el $ABTS^{+\bullet}$ fue lenta.

Al analizar los valores TAA (**Tabla 3.5**) entre los AE con sus constituyentes principales individuales, timol, carvacrol, estragol o *trans*-anetol, y se considera su composición, la variación en la capacidad antioxidante de estos aceites puede atribuirse a las diferencias de las cantidades de estos componentes en dichos aceites [122].

Por ejemplo, el carvacrol constituye *ca.* 54% del AE de *P. amboinicus*, mientras que, timol + carvacrol conforman *ca.* 28% en la totalidad del AE de *L. micromera*. Asimismo, el estragol alcanza *ca.* 93% del AE de *T. lucida*; y el *trans*-anetol contribuye

con *ca.* 83% de la totalidad del AE de *I. verum*. Sin embargo, quizá lo más interesante es la supuesta falta de actividad de los componentes restantes de los AE de *P. amboinicus* y *L. micromera* (46 y 72%, respectivamente). Por esta razón los AE, en su totalidad mostraron valores inferiores que los de sus componentes principales individuales, timol y carvacrol, lo que podría atribuirse a un posible efecto antagónico [72,122] entre los constituyentes mayoritarios y minoritarios en estos AE.

La baja inhibición demostrada por estragol y *trans*-anetol, como sustancias puras, comparada con los AE que los contienen y basados en los datos generados a partir de este ensayo permitiría inferir que estos componentes, bajo las condiciones experimentales, no parecen poseer propiedades antioxidantes [120,122]. Sin embargo, la presencia de componentes tales como eugenol, *iso*-eugenol, chavicol, *etc*., fenoles identificados en cantidades mínimas, podrían ser los responsables de la inhibición manifiesta por los AE evaluados [72]. Los AE, en su totalidad, mostraron valores superiores que los de sus componentes principales individuales, estragol y *trans*-anetol, lo que podría explicarse por un posible efecto sinérgico [72,122] entre los constituyentes mayoritarios y minoritarios en estos AE.

Por otra parte, los ensayos de peroxidación lipídica se realizaron con 5 mg de cada sustancia. Los AE de 7 especies mostraron un efecto protector mayor que la vitamina E y Trolox®, siendo los más activos *P. amboinicus* y *L. origanoides*, seguidos de *L. micromera* y *T. vulgaris*, *T. lucida* (hojas y flores), *I. verum* [123] y *T. filifolia* (Cultivos de Bolívar y Cenivam). Mientras que, los AE de *F. vulgare* y *A. dracunculus* fueron los que menor efecto protector presentaron en la inhibición del ácido linoleico, comparados con todos los antioxidantes de referencia evaluados. Estos resultados confirman el uso potencial de los AE de plantas en la preservación en la industria farmacéutica y/o de alimentos [124,125].

Al comparar los valores de inhibición de los componentes mayoritarios individuales con los de los AE obtenidos por este método, se encontró que no hay una diferencia significativa; siendo la inhibición de los AE igual o mayor a la del timol o carvacrol, lo que podría presumir un posible efecto sinérgico entre todos los constituyentes. Los AE

con estragol y *trans*-anetol, en su gran mayoría, superaron el efecto protector de las sustancias puras; con excepción de los AE de *F. vulgare* y *A. dracunculu*s, en cuyo caso sus inhibiciones fueron inferiores a la de $\alpha$-tocoferol.

La confrontación de los resultados del ensayo de decoloración de $ABTS^{+\bullet}$ y los de la oxidación del ácido linoleico mostró una tendencia similar, sin embargo, los mecanismos de acción son diferentes, con lo cual se podría considerar que: (1) debido a la presencia de fenoles en los AE, éstos presentarían la habilidad de atrapamiento de radicales por transferencia de un electrón o un hidrógeno [126,127]; 2. Los otros constituyentes, presentes diferentes a fenoles, *i.e.*, éteres, hidrocarburos insaturados, activan otro mecanismo de protección, *e.g.*, a través de "sacrificio" de terpenos que se oxidan más rápidamente, que el ácido linoleico [128,129], dando un posible indicio de cómo estos AE podrían obstruir la propagación en cadena de la peroxidación lipídica.

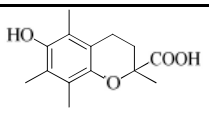
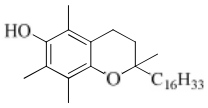
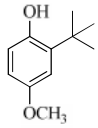
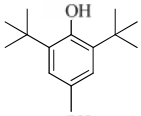
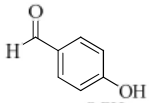
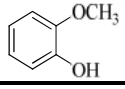
**3.6.3 Evaluación de la capacidad antioxidante de precursores, intermediarios y productos finales de la síntesis de 2,5-dihidro-1-benzoxepinas.** La capacidad antioxidante de las moléculas sintetizadas y sus precursores se determinó mediante el método $ABTS^{+\bullet}$ microescalado, expresada en equivalentes de Trolox® (TEAC – mmol Trolox®/mmol AO). Este ensayo permitió obtener información valiosa sobre las relaciones químicas involucrada entre los compuestos evaluados y el catión-radical $ABTS^{+\bullet}$.

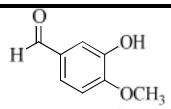
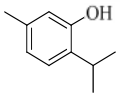
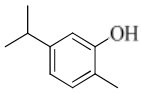
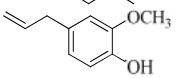
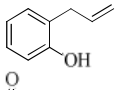
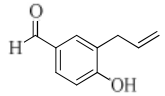
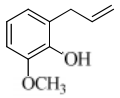
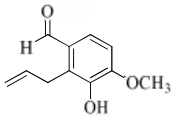
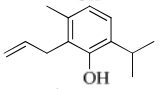
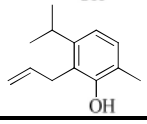
De los compuestos fenólicos que se seleccionaron como precursores (fenol, 4-hidroxibenzaldehído, guaiacol, timol e isovainillina) para la síntesis de 2,5-dihidro-1-benzoxepinas, la mayoría se encuentran en algunas plantas aromáticas y medicinales [130,131]. Estas sustancias, junto con las plantas que los contienen, son ampliamente utilizados en las industrias cosmética (fragrancias, preservativos, antisépticos), alimentos y bebidas (especias, *flavours*), y perfume (fragrancias), en medicina tradicional y agricultura (herbicidas e insecticidas) [4,68,72,130,132]; *e.g.*, vainilla (*Vanilla planifolia*) produce el agente saborizante comercial vainillina, pero además,

esta especia contiene guaiacol, 4-hidroxibenzaldehído y fenol [133]. El clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) es otra especie de valor que contiene eugenol [134].

La **Tabla 3.6** contiene los valores de capacidad antioxidante TEAC y las concentraciones inhibitorias al 50% de las sustancias control, de referencia, de los fenoles precursores y 2-alil fenoles **3a-f**. Los valores TEAC de los precursores fenólicos **1a-f** fueron menores que el valor de BHT. Sin embargo, guaiacol (**1c**), timol (**1e**) y carvacrol (**1f**) tuvieron valores muy cercanos y/o mayores que BHA y vitamina E. Por otro lado, los compuestos con sustituyentes desactivantes (**1b** y **1d**) en el sistema aromático como el grupo formilo (CHO) no inhibieron al catión radical $ABTS^{+\bullet}$ (**Tabla 3.6**), ya que los grupos electroatrayentes incrementan la fuerza del enlace O-H [135]. Sin embargo, la presencia del grupo metoxi (electrodonador) en la isovainillina (**1d**) le permitió alcanzar un valor de TEAC superior al del 4-hidroxibenzaldehído (**1b**).

**Tabla 3.6.** Valores de TEAC y las concentraciones inhibitorias al 50% de las sustancias control y de referencia, junto con los fenoles precursores y 2-alil fenoles **3a-f**.

| Nombre compuesto | Estructura | Tipo sustituyente | TEAC (mmol Trolox®/mmol AO) | $IC_{50}$ (μM)* |
|---|---|---|---|---|
| Trolox® |  | Grupo donador electrones (GDE) | — | 20.9 ± 0.5 |
| α-Tocoferol |  | GDE | 0.89 ± 0.01 | 23.5 ± 0.5 |
| BHA |  | GDE | 1.02 ± 0.04 | 20.5 ± 0.3 |
| BHT |  | GDE | 1.29 ± 0.04 | 16.1 ± 0.2 |
| Fenol (**1a**) |  | GDE | 0.62 ± 0.06 | 34 ± 2 |
| 4-Hidroxibenzaldehído (**1b**) |  | Grupo aceptor electrones (GAE) | 0.00036 ± 0.00001 | 57000 ± 1209 |
| Guaiacol (**1c**) |  | GDE | **1.25 ± 0.04** | **16.7 ± 0.2** |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| *iso*-Vainillina (**1d**) |  | GDE, GAE | 0.014 ± 0.001 | 1500 ± 133 |
| Timol (**1e**) |  | GDE | 0.943 ± 0.004 | 22.1 ± 0.6 |
| Carvacrol (**1f**) |  | GDE | 0.94 ± 0.05 | 22.2 ± 0.8 |
| Eugenol (**1g**) |  | GDE | **1.85 ± 0.05** | **11.3 ± 0.2** |
| **3a** |  | GDE | 0.98 ± 0.02 | 21.0 ± 0.9 |
| **3b** |  | GDE, GAE | 0.0019 ± 0.0001 | 10000 ± 1058 |
| **3c** |  | GDE | **1.45 ± 0.04** | **14.4 ± 0.3** |
| **3d** |  | GDE, GAE | 0.49 ± 0.02 | 42 ± 1 |
| **3e** |  | GDE | 0.905 ± 0.003 | 22.8 ± 0.5 |
| **3f** |  | GDE | **0.99 ± 0.03** | **19.5 ± 0.5** |

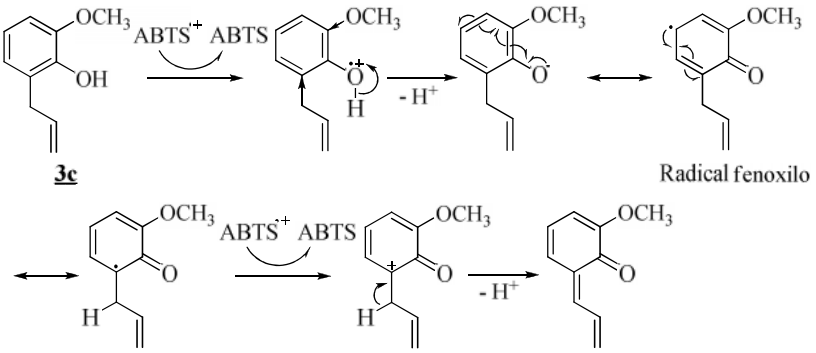
* Los valores en negrita indican los compuestos más activos

Por otro lado, los 2-alil fenoles **3a-f** también inhibieron notoriamente al catión-radical $ABTS^{+\bullet}$, aunque sólo el compuesto **3c** superó la inhibición presentada por el BHT. Para analizar mejor los resultados obtenidos se incluyó un compuesto que no fue usado en el esquema sintético – eugenol (**1g**), el cual es un derivado C-alilado del guaiacol (**1c**). Ahora, al observar la serie de fenoles transpuestos **3a-f**, estos compuestos son análogos C-alilados de eugenol y guaiacol. Por consiguiente, deberían ejercer positivamente sobre la estabilidad de los radicales generados de éstos. De antemano, se podría predecir que el grupo electrodonador adicional, aunque débil, ejerce sobre la estabilidad del radical de este compuesto.

La demostración clara de la influencia del grupo alilo, en toda la serie **3**, se percibe a través de la comparación entre todas las parejas moleculares: los fenoles simples (**1a-f**) y sus análogos 2-C-alilados (**3a-f**). Así, el grupo alilo introducido en posición *orto*-,

en la mayoría de las estructuras, les aportó mayor capacidad de inhibición respecto a los fenoles precursores iniciales **1a-f**; esto podría atribuirse al hecho de que el grupo alilo (electrodonador) adicionado al sistema aromático permitió posiblemente donar un segundo hidrógeno (**Esquema 3.6**), y por lo tanto, mejorar la capacidad de deslocalización de la carga, generando por ende mayor estabilidad del producto formado [108,136].

El compuesto **3c** (*o*-eugenol), que exhibió la inhibición más alta en esta serie de fenoles, es el isómero de posición del eugenol, y fue la sustancia con mayor capacidad antioxidante (1.85 ± 0.05), superando significativamente al BHT. La comparación de estas dos moléculas (*o*-eugenol **3c** y *p*-eugenol **1g**) confirmó que la posición del grupo alilo también cumple un rol de estabilización y capacidad de donación electrónica. De acuerdo con los reportes de literatura [137,138], la capacidad de deslocalización para dos estructuras isómeras con el mismo grupo electrodonador en diferentes posiciones *orto*- y *para*- serían las mismas (**Esquema 3.7**).

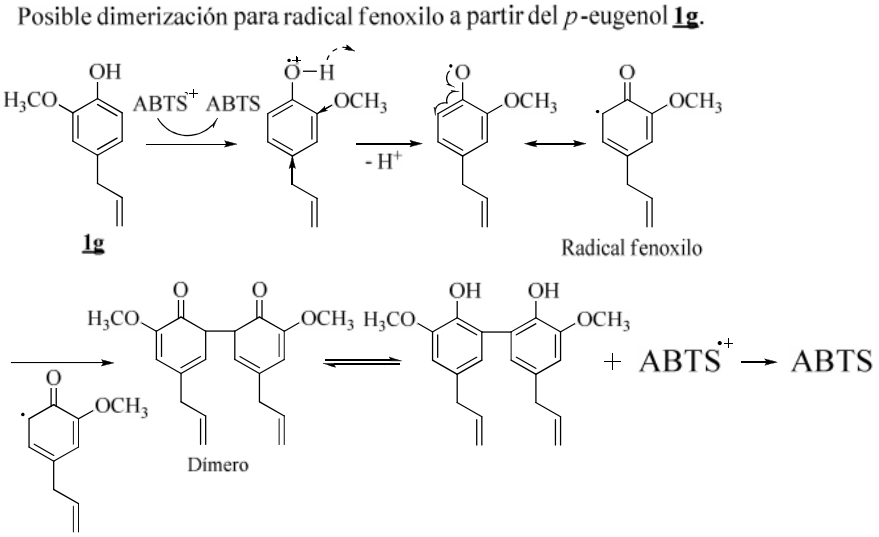



**Esquema 3.6.** Mecanismo hipotético de la transferencia de un segundo protón de grupo alilo y estabilidad de productos de los radicales fenoxilo formados a partir del *o*-eugenol **3c**.

Los dímeros, productos de los radicales fenoxilo del *p*-eugenol y *o*-eugenol, por transferencia de H intramolecular, conduciría a una nueva molécula con dos OH [139,140], que podrían nuevamente reaccionar con el $ABTS^{+\bullet}$.

Se resalta, que las moléculas que mayor reactividad presentaron ante el catión-radical $ABTS^{+\bullet}$ fueron los fenoles que presentaron el grupo $CH_3O$ en posiciones *orto*-, lo cual

está en concordancia con lo reportado por Fujisawa *et al.* [140], que dicen que la combinación de grupos OH y $CH_3O$ en posición *orto*- o *para*- en estructuras aromáticas, incrementa la acción antioxidante [141] por el solapamiento entre los orbitales tipo p del oxígeno y la nube electrónica $\pi$ del anillo [142], lo que generaría antioxidantes efectivos [138].

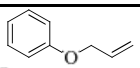
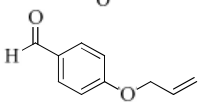
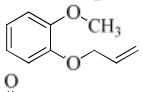
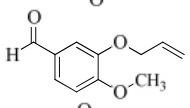
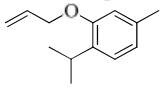
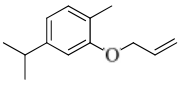
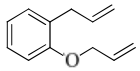
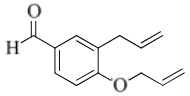
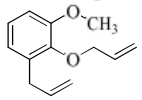
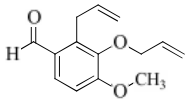
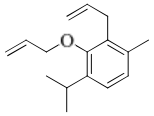
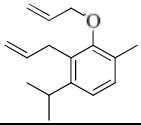



**Esquema 3.7.** Hipótesis de la posible dimerización de los radicales fenoxilo a partir del *p*-eugenol.

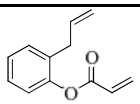
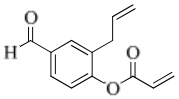
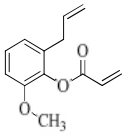
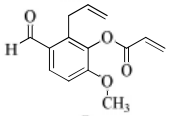
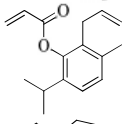
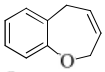
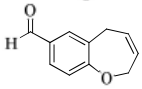
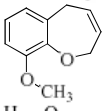
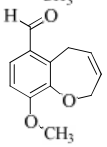
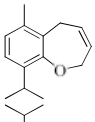
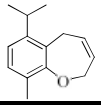
En general, la reactividad hacia el $ABTS^{+\bullet}$ de los fenoles evaluados dependió de los grupos funcionales presentes en los anillos aromáticos. Compuestos con grupos electrodonadores, como metilo, isopropilo, metoxi y alilo en posiciones *orto*- y *para*- con respecto al OH fenólico, mostraron los más altos valores de TEAC, *e.g.*, **3a**, eugenol (**1g**), **3c**, guaiacol (**1c**), **3e**, timol (**1e**), **3f** y carvacrol (**1f**), lo que se explica por el hecho que estos sustituyentes producen un debilitamiento del enlace OH que preferencialmente estabiliza el radical fenóxido formado o desestabiliza las moléculas fenólicas como resultado de los factores electrónicos y estéricos [142-145]. Por otro lado, aquellas sustancias con grupos electro-atrayentes como formilo (iso-vainillina, **3b**, 4-HBA y **3d**) redujeron considerablemente su eficiencia antiradicalaria (TEAC < 0.5), particularmente cuando este grupo estuvo en posición *orto*- o *para*- con respecto al grupo OH. En este caso, los factores estéricos y electrónicos estabilizan los compuestos fenólicos o desestabilizan a los respectivos radicales que se forman.

Si se confrontan los datos de $IC_{50}$ de todos los fenoles **1** y **3** evaluados con los obtenidos para el Trolox® (sustancia de referencia del método), se puede concluir que se requiere que el valor $IC_{50}$ para una sustancia antioxidante debe ser igual o inferior que 20.9 ± 0.5 μM: para este trabajo se encontraron 4 moléculas con estos valores (**Tabla 3.6**). La **Tabla 3.7** contiene los valores de capacidad antioxidante TEAC y las concentraciones inhibitorias al 50% de los alil-aril éteres (**2a-f**), 2-alil-1-aliloxi bencenos (**4a-f**), 2-alil-1-acriloiloxi bencenos (**5a-e**) y 2,5-dihidro-1-benzoxepinas (**6a-f**).

**Tabla 3.7.** Valores de TEAC y las concentraciones inhibitorias al 50% de alil-aril éteres (**2a-f**), 2-alil-1-aliloxi bencenos (**4a-f**), 2-alil-1-acriloiloxi bencenos (**5a-e**) y 2,5-dihidro-1-benzoxepinas (**6a-f**).

| Nombre compuesto | Estructura | TEAC (mmol Trolox®/mmol AO) | $IC_{50}$ (μM) |
|---|---|---|---|
| **2a** |  | (20 ± 1 % - 0.05M) | — |
| **2b** |  | 0.01073 ± 0.00004 | 2000 ± 39 |
| **2c** |  | 0.000720 ± 0.000004 | 29000 ± 310 |
| **2d** |  | 0.0028 ± 0.0003 | 8000 ± 718 |
| **2e** |  | 0.0027 ± 0.0001 | 8000 ± 346 |
| **2f** |  | ND | — |
| **4a** |  | 0.00263 ± 0.00005 | 7840 ± 8 |
| **4b** |  | 0.013 ± 0.001 | 1600 ± 91 |
| **4c** |  | 0.00138 ± 0.00004 | 15000 ± 729 |
| **4d** |  | 0.00079 ± 0.00004 | 30000 ± 1825 |
| **4e** |  | (17 ± 1 % - 0.03M) | — |
| **4f** |  | (3.0 ± 0.2 % - 0.005M) | — |

Continuación **Tabla 3.7**

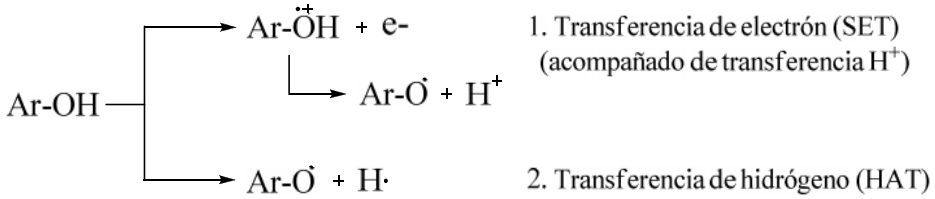
| Nombre compuesto | Estructura | TEAC (mmol Trolox®/mmol AO) | $IC_{50}$ (μM) |
|---|---|---|---|
| **5a** |  | 0.00301 ± 0.00002 | 7000 ± 158 |
| **5b** |  | (30.4 ± 0.3 % - 0.009M) | ── |
| **5c** |  | 0.00875 ± 0.00003 | 2400 ± 48 |
| **5d** |  | 0.023273 ± 0.000002 | 900 ± 15 |
| **5e** |  | 0.0051020 ± 0.0000008 | 4100 ± 68 |
| **6a** |  | 0.01615 ± 0.00003 | 1300 ± 19 |
| **6b** |  | 0.0187 ± 0.0003 | 1100 ± 39 |
| **6c** |  | (22.7 ± 0.3 % - 0.01M) | ── |
| **6d** |  | 0.0027 ± 0.0003 | 8000 ± 776 |
| **6e** |  | 0.0385 ± 0.0003 | 540 ± 4 |
| **6f** |  | ND | ND |

ND – No determinado

Los éteres (**2a**-**f** y **4a**-**f**), acrilatos (**5a**-**e**) y compuestos ciclados (**6a**-**e**) evaluados con el ensayo $ABTS^{+\bullet}$, presentaron valores de TEAC mucho más bajos (<0.1) que los exhibidos por los antioxidantes control (BHT, BHA y α-tocoferol). En algunos casos, no se pudo calcular el valor TEAC, sino un porcentaje de inhibición a una concentración dada (**2a**, **4e**, **5b** y **6c**), lo que indica una reactividad baja hacia el catión-radical $ABTS^{+\bullet}$. Se podría suponer que estas moléculas no transfieren el electrón al catión-radical en cuestión o que los productos generados después de la

transferencia electrónica no son estables. Cuando se compararon los valores TEAC de los compuestos dialilados (**4a-f**) con los obtenidos para las moléculas cíclicas (**6a-f**) se observó, que el proceso de ciclación (para la mayoría de las moléculas, excepto para **6c**) favoreció la reacción con el catión-radical, lo que se manifestó a través de los valores de TEAC (en un orden de magnitud más altos) para la mayoría de moléculas cicladas con respecto a los de las moléculas dialiladas.

**3.6.4 Relación entre la capacidad antioxidante equivalente al Trolox® y potenciales de ionización calculados de las moléculas sintéticas.** La capacidad antioxidante de los fenoles y sus derivados ha sido comprobada experimentalmente por diferentes métodos. De acuerdo con la reacción química involucrada, los ensayos de capacidad antioxidante se pueden dividir según sus mecanismos: (1) reacciones por transferencia de electrón (SET) y (2) por transferencia de átomo de hidrógeno (HAT) [94,144] (**Esquema 3.8**). El resultado final es el mismo, no depende del mecanismo, pero la cinética y el potencial de las reacciones secundarias son diferentes. El potencial de ionización (IP) y la energía de disociación de enlace (BDE) son los dos factores más importantes que determinan el mecanismo y la eficacia de los antioxidantes [144]. En general, basándose en los principios químicos de los fenoles, se puede anticipar que aquellas moléculas con bajos IP deberían ser mejores antioxidantes, ya que el IP está relacionado fuertemente con la fuerza del enlace OH presente en el anillo aromático.



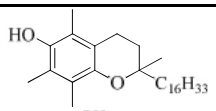
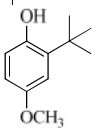
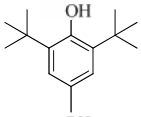
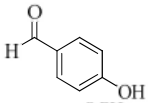
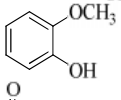
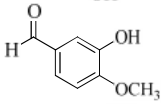
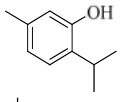
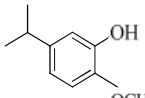
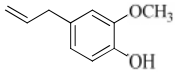
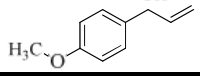

**Esquema 3.8.** Mecanismos involucrados en la capacidad antioxidante de un fenol.

En esta parte del trabajo se compararon los valores TEAC obtenidos de cada uno de los compuestos sintéticos preparados con sus potenciales de ionización calculados, para correlacionarlos con la habilidad de transferir un electrón y reducir al catión-radical $ABTS^{+\bullet}$.

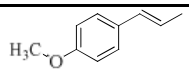
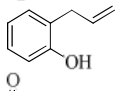
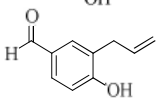
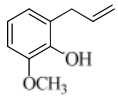
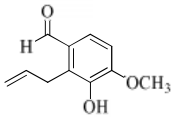
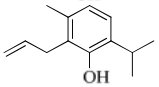
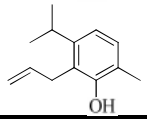
El potencial de ionización teórico se determinó como la diferencia entre las energías de las estructuras optimizadas de las moléculas neutras y su respectivo catión-radical, empleando el método/conjunto base B3LYP/6-311++G(d,p) [144], que se seleccionó de acuerdo con la similitud obtenida entre los valores de IP teórico y experimental del fenol (8.49 eV) y con base en los reportes de la literatura [13,144,146].

La **Tabla 3.8** contiene los valores de TEAC y los potenciales de ionización calculados de las antioxidantes control, sustancias patrón, fenoles precursores y los 2-alil fenoles sintetizados.

**Tabla 3.8.** Valores de TEAC y potenciales de ionización calculados de las sustancias control, patrones, fenoles precursores (**1a-f**) y 2-alil fenoles (**3a-f**).

| Nombre compuesto | Estructura | Potenciales de ionización calculados (eV) | TEAC (mmol Trolox®/mmol AO) |
|---|---|---|---|
| α-Tocoferol |  | ND | 0.89 ± 0.01 |
| BHA |  | 7.18 | 1.02 ± 0.04 |
| BHT |  | 7.32 | 1.29 ± 0.04 |
| Fenol (**1a**) |  | 8.33 | 0.62 ± 0.06 |
| 4-Hidroxibenzaldehído (**1b**) |  | 8.68 | 0.00036 ± 0.00001 |
| Guaiacol (**1c**) |  | 7.73 | 1.25 ± 0.04 |
| *iso*-Vainillina (**1d**) |  | 8.23 | 0.014 ± 0.001 |
| Timol (**1e**) |  | 7.75 | 0.943 ± 0.004 |
| Carvacrol (**1f**) |  | 7.80 | 0.94 ± 0.05 |
| Eugenol (**1g**) |  | ND | 1.85 ± 0.05 |
| Estragol (**1h**) |  | 7.68 | (21 ± 1 % - 0.03M) |

Continuación **Tabla 3.8**

| Nombre compuesto | Estructura | Potenciales de ionización calculados (eV) | TEAC (mmol Trolox®/mmol AO) |
|---|---|---|---|
| *trans*-Anetol (**1i**) |  | 7.19 | (33 ± 4 % - 0.03M) |
| **3a** |  | 8.06 | 0.98 ± 0.02 |
| **3b** |  | 8.33 | 0.0019 ± 0.0001 |
| **3c** |  | 7.59 | 1.45 ± 0.04 |
| **3d** |  | 7.89 | 0.49 ± 0.02 |
| **3e** |  | 7.51 | 0.905 ± 0.003 |
| **3f** |  | 7.34 | 0.99 ± 0.03 |

ND – no determinado

De acuerdo con la **Tabla 3.8** se observa una correlación entre el potencial de ionización y el valor de capacidad antioxidante equivalente al Trolox® para los fenoles evaluados. Las moléculas con potencial de ionización más alto poseen sustituyentes electroatrayentes (**1b**, **1d**, **3b** y **3d**) [91]. La **Figura 3.11** presenta los modelos geométricos optimizados de la molécula neutra y del catión-radical de 2-alil-6-isopropil-3-metil fenol (**3e**).

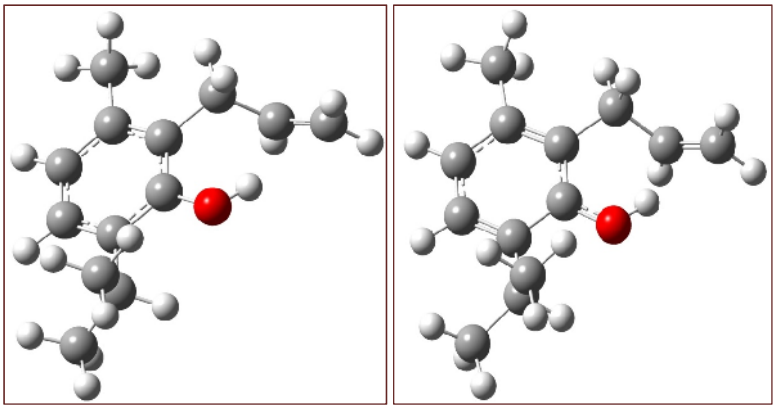


**Figura 3.11.** Modelos geométricos optimizados de la molécula neutra y del catión-radical de **3e**.

Se encontró que la inclusión de alilo en los fenoles precursores condujo a una disminución de los potenciales de ionización en las moléculas 2-alil fenólicas, *e.g.*, el fenol posee un IP de 8.33 eV y su análogo alilado **3a**, de 8.06 eV. Esta misma disminución se observó también en las moléculas con los sustituyentes electroatrayentes, *e.g.*, *iso*-vainillina (IP 8.23 eV) y 2-alil-*iso*-vainillina (IP 7.89 eV). En la **Figura 3.11** se indica la deslocalización de la carga con líneas discontinuas tanto de la molécula neutra como la del catión radical. De acuerdo con los cálculos teóricos, se observó que el oxígeno del grupo OH participó en la distribución de carga en el catión-radical, debido a la presencia de los pares electrónicos no enlazantes, los cuales requerirían menor energía para la ionización.

En la **Figura 3.12** se ilustra la relación entre los valores TEAC y los potenciales de ionización teóricos de los fenoles estudiados (precursores (**1a-f**), sustancias control, patrones y compuestos sintetizado (**3a-f**)). En la gráfica se se puede observar que las sustancias con valores de TEAC más altos poseen potencial de ionización más bajos. Aunque todas las sustancias en estas gráficas fueron fenoles sustituidos, se evidencia la influencia de los grupos electroatrayentes sobre los valores TEAC y los potenciales de ionización.

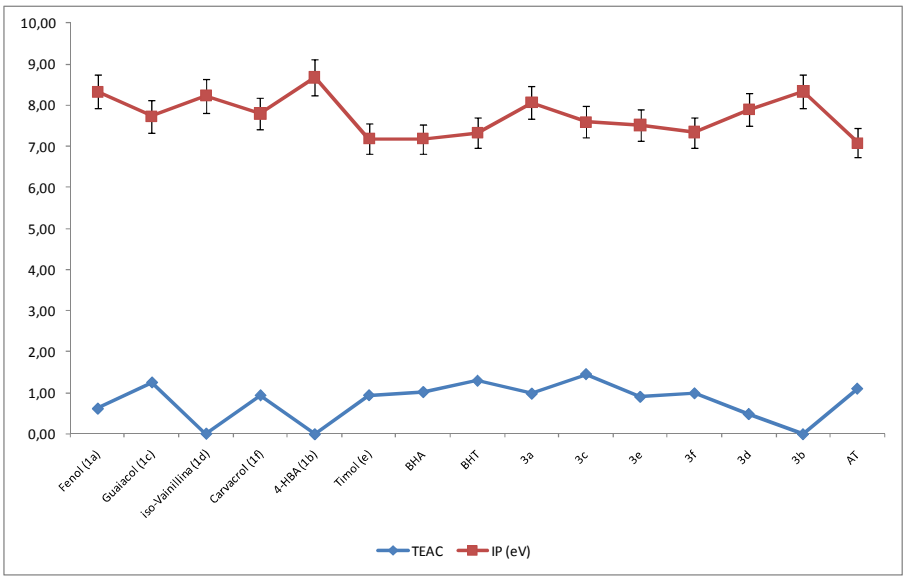



**Figura 3.12.** Relación entre los valores TEAC e IP calculados de fenoles precursores, sustancias control y 2-alil fenoles sintetizados.

La **Tabla 3.9** registra los potenciales de ionización calculados y los valores de TEAC de los alil-aril éteres (**2a-f**), 2-alil-1-aliloxi bencenos (**4a-f**), 2-alil-1-acriloiloxi bencenos (**5a-e**) y 2,5-dihidro-1-benzoxepinas (**6a-f**) y la **Figura 3.13** ilustra las estructuras optimizadas de la molécula neutra y del catión-radical del 1-aliloxi-2-*iso*-propil-5-metil benceno (**2e**).

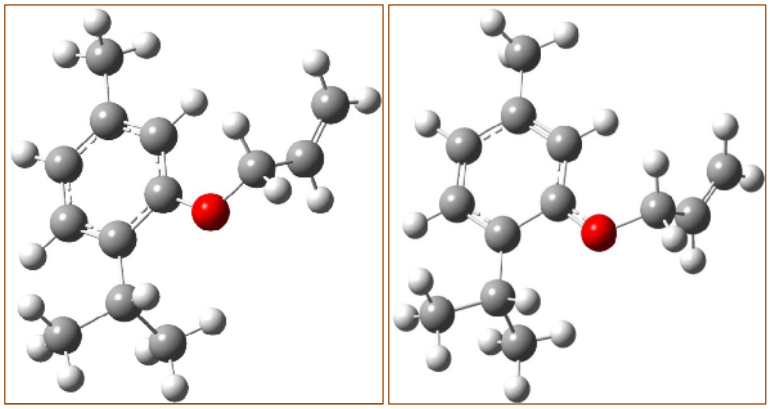
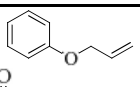
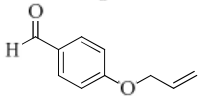
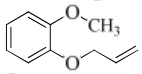
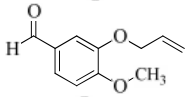
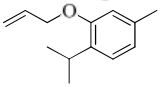
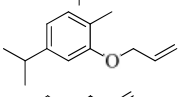
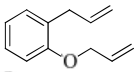
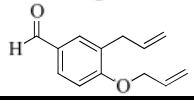
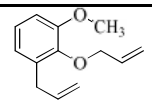
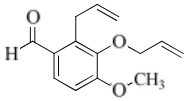
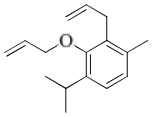
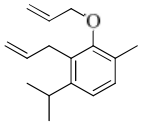
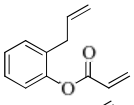
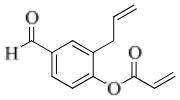
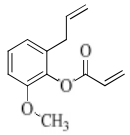
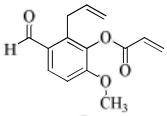
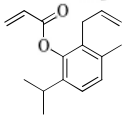
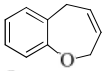
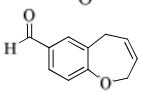
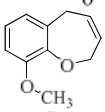
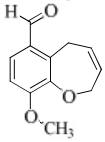
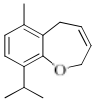
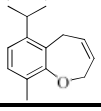


**Figura 3.13.** Modelos geométricos optimizados de la molécula neutra y del catión radical de **2e**.

**Tabla 3.9.** Valores de TEAC y potenciales de ionización calculados de alil-aril éteres (**2a-f**), 2-alil-1-aliloxi bencenos (**4a-f**), 2-alil-1-acriloiloxi bencenos (**5a-e**) y 2,5-dihidro-1-benzoxepinas (**6a-f**).

| Nombre compuesto | Estructura | Potenciales de ionización calculados (eV) | TEAC (mmol Trolox®/mmol AO) |
|---|---|---|---|
| **2a** |  | 7.89 | (20 ± 1 % - 0.05M) |
| **2b** |  | 8.28 | 0.01073 ± 0.00004 |
| **2c** |  | 7.40 | 0.000720 ± 0.000004 |
| **2d** |  | 7.75 | 0.0028 ± 0.0003 |
| **2e** |  | 7.43 | 0.0027 ± 0.0001 |
| **2f** |  | 7.44 | ND |
| **4a** |  | 7.69 | 0.00263 ± 0.00005 |
| **4b** |  | 8.07 | 0.013 ± 0.001 |

Continuación **Tabla 3.9**

| Nombre compuesto | Estructura | Potenciales de ionización calculados (eV) | TEAC (mmol Trolox®/mmol AO) |
|---|---|---|---|
| **4c** |  | ND | 0.00138 ± 0.00004 |
| **4d** |  | ND | 0.00079 ± 0.00004 |
| **4e** |  | 7.51 | (17 ± 1 % - 0.03M) |
| **4f** |  | ND | (3.0 ± 0.2 % - 0.005M) |
| **5a** |  | 7.92 | 0.00301 ± 0.00002 |
| **5b** |  | 8.15 | (30.4 ± 0.3 % - 0.009M) |
| **5c** |  | ND | 0.00875 ± 0.00003 |
| **5d** |  | ND | 0.023273 ± 0.000002 |
| **5e** |  | ND | 0.0051020 ± 0.0000008 |
| **6a** |  | 7.82 | 0.01615 ± 0.00003 |
| **6b** |  | 8.15 | 0.0187 ± 0.0003 |
| **6c** |  | 7.36 | (22.7 ± 0.3 % - 0.01M) |
| **6d** |  | 7.71 | 0.0027 ± 0.0003 |
| **6e** |  | 7.51 | 0.0385 ± 0.0003 |
| **6f** |  | 7.47 | ND |

La comparación entre los valores TEAC de los éteres y compuestos ciclados **6a-f** con sus IP calculados no demostraron la misma correlación que se encontró para los valores IP y TEAC de los fenoles estudiados. Esto es, que a pesar de que estos grupos de moléculas tuvieron energía de ionización iguales o menores que los de los fenoles precursores y sus análogos *orto*-alilados, los valores TEAC de estas moléculas fueron cercanos a cero (no inhibieron eficientemente al catión-radical $ABTS^{+\bullet}$). Se hace notorio al comparar las **Tablas 3.8** y **3.9**, que a medida que se fue introduciendo el grupo alilo a las estructuras, los potenciales de ionización calculados fueron cada vez menores. Por ejemplo, las energías de ionización del fenol (**1a**), alil-fenil éter (**2a**), 2-alil fenol (**3a**) y 2-alil-1-aliloxi benceno (**4a**) fueron 8.33, 7.89, 8.06 y 7.69 eV, respectivamente. La ciclación en algunos casos condujo a valores IP ligeramente mayores o iguales que los de los dialilados. *e.g.*, el IP de 2,5-dihidro-1-benzoxepina (**6a**) (7.82 eV) fue ligeramente más alto que el del dialilado del fenol.

La capacidad de los alil-fenil éteres, 2-alil-1-aliloxi bencenos y 2,5-dihidro-1-benzoxepinas de reducir el catión-radical $ABTS^{+\bullet}$ fue muy similar, demostrada por sus muy bajos y cercanos valores de TEAC (grado de inhibición). Las respresentaciones de las geometrías óptimas de la molécula neutra y del catión-radical del 9-isopropil-6-metil 2,5-dihidro-1-benzoxepina (**6e**) se proporcionan en la **Figura 3.15**.

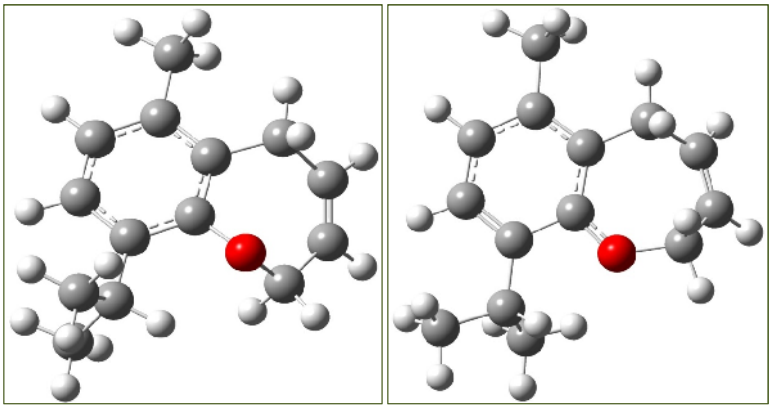


**Figura 3.14.** Representación de las geometrías óptimas de la molécula neutra y del catión-radical de 9-isopropil-6-metil 2,5-dihidro-1-benzoxepina (**6e**).

La mayoría de las benzoxepinas sustituidas evaluadas presentaron valores TEAC ligeramente más altos que los de sus respectivos 2-alil-1-aliloxi bencenos, lo que

indica que la ciclación proporciona una mayor habilidad para reducir al catión-radical $ABTS^{+\bullet}$.

En la **Figura 3.15** se expone la relación entre los valores de los potenciales de ionización calculados y TEAC de los alil-aril éteres (**2a-f**), 2-alil-1-aliloxi bencenos (**4a-f**), 2-alil-1-acriloiloxi bencenos (**5a-e**) y 2,5-dihidro-1-benzoxepinas (**6a-f**). La tendencia indica que aunque la mayoría de los compuestos tuvieron bajos potenciales de ionización no inhibieron eficientemente al catión-radical $ABTS^{+\bullet}$, lo que podría atribuirse a la ausencia de grupos donadores de protones en la estructura molecular. La reactividad relativa de las reacciones SET se basan principalmente en los potenciales de ionización y la desprotonación de los grupos funcionales [93].

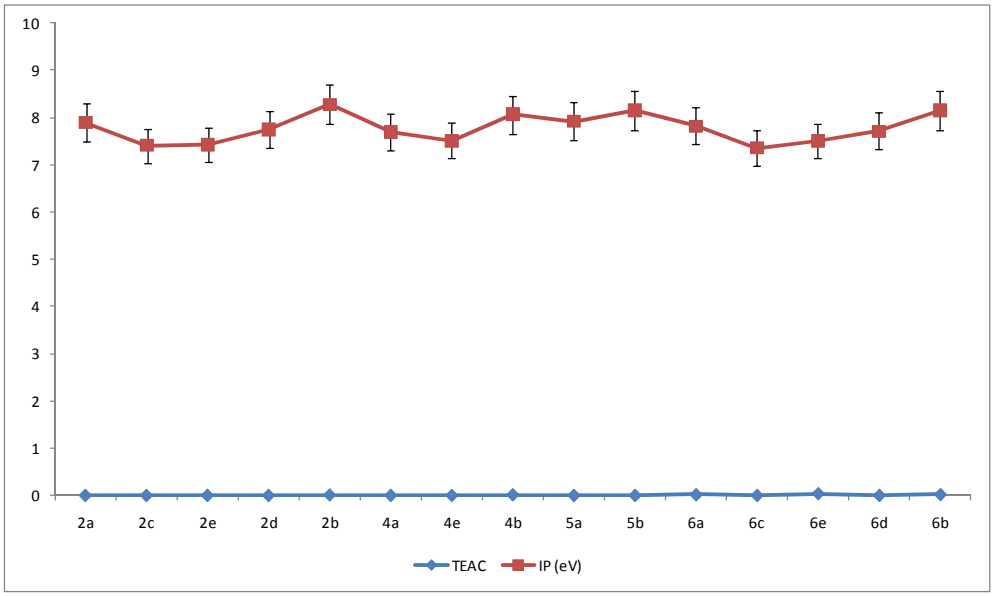



**Figura 3.15.** Relación entre los valores TEAC e IP calculados de alil-aril éteres (**2a-f**), 2-alil-1-aliloxi bencenos (**4a-f**), 2-alil-1-acriloiloxi bencenos (**5a-e**) y 2,5-dihidro-1-benzoxepinas (**6a-f**).

Con base, en los resultados obtenidos, se puede suponer que el mecanismo propuesto para el ensayo de inhibición del catión-radical $ABTS^{+\bullet}$, de sólo transferencia de electrones, no es completo, porque moléculas con potenciales de ionización bajos no inhibieron eficientemente al catión-radical. Por lo tanto, es necesario, que los grupos presentes adicionalmente tengan la habilidad de donador protones; así

entonces, el mecanimo para ABTS sería de transferencia electrónica acoplada con la de protón.

**3.6.5 Evaluación de la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa por aceites esenciales con alto contenido de timol, carvacrol, estragol y *trans*-anetol.** Debido a que los efectos adversos colaterales de los medicamentos empleados para la AD son pronunciados y de cuidado, hoy día los investigadores buscan intensamente, nuevos AChEI, menos tóxicos, con pocos o ningún efecto secundario. Estos agentes inhibidores podrían provenir de fuentes de origen natural o sínteticos.

Tradicionalmente, las sociedades del Oriente han utilizado un conjunto de plantas para tratar los desordenes cognoscitivos, incluyendo enfermedades neurodegenerativas [82,144]. Las sociedades occidentales se han interesado también, por la etnomedicina, la cual se ha percibido como un tratamiento "natural" y más "suave", comparado con el uso de los medicamentos sintéticos [148,149].

La sociedad está preocupada también por los efectos nocivos de los pesticidas sobre la salud humana y el ambiente, lo que obligó el retiro del mercado de pesticidas comerciales, pero incrementó la vulnerabilidad de los cultivos a plagas y enfermedades, junto con el desasosiego producido por el aumento de la resistencia creada por las plagas a los pesticidas permitidos [2]. Estos perjuicios han estimulado el desarrollo de métodos de protección de cultivos, que se centran en la búsqueda de nuevos pesticidas que sean: eficaces, con un menor impacto ambiental, y permitir disminuir la resistencia de insectos-plagas.

En las últimas dos décadas, el descubrimiento de nuevos productos agroquímicos ha decaído de una cincomilaba parte a una veintemilaba parte de compuestos probados. Este descenso pone de manifiesto la necesidad de identificar nuevas fuentes de plaguicidas [3]. Existe en la naturaleza, una plétora de plantas con propiedades conocidas para control contra pestes, donde más de 2000 de ellas han demostrado sus propiedades insecticidas. Sin embargo, se estima que tan sólo el 5-15% de las 250000 a 500000 especies vegetales existentes han sido valoradas para bioactividad

y hay poca información sobre las propiedades biológicas en la gran mayoría de especies de plantas tropicales [2]. El conocimiento sobre la producción y localización de compuestos biológicamente activo durante el desarrollo de la planta puede ayudar en elaborar las estrategias efectivas para proteger diversos cultivos [3,150].

A continuación, se discuten los resultados sobre el estudio de la inhibición de la AChE por los AE obtenidos de las plantas de los géneros *Lippia* (*L. micromera*, *L. origanoides*), *Thymus* (*T. vulgaris*), *Tagetes* (*Tagetes filifoli*a, *T. lucida*), *Foeniculum* (*Foeniculum vulgare*), *Illicium* (*Illicium verum*), *Ocimum* (*Ocimum sp.*), *Plectranthus* (*P. amboinicus*), junto con sus constituyentes principales individuales: carvacrol, timol, estragol y *trans*-anetol. Los valores obtenidos de inhibición sobre la actividad de AChE se presentan en la **Tabla 3.10**.

**Tabla 3.10.** Inhibición de la actividad AChE por carvacrol, estragol, *trans*-anetol, timol y por AE que los contienen.

| **Sustancia o mezcla evaluadas** | **Actividad inhibitoria AChE** | |
|---|---|---|
| | **$IC_{50}$, μg/mL** | **Inhibición a 25 μg/mL, %** |
| Fisostigmina | 0.0056 ± 0.0001 | — |
| Galantamina | 0.30 ± 0.01 | — |
| Diazinón (OP) | 0.568 ± 0.008 | — |
| Trolox® | 20.2 ± 0.9 | — |
| α-Tocoferol | 42 ± 2 | — |
| BHA | 11.9 ± 0.6 | — |
| BHT | 22.8 ± 0.3 | — |
| Carvacrol | 11.5 ± 0.2 | — |
| Timol | 15.5 ± 0.3 | — |
| *trans*-Anetol | 16.18 ± 0.02 | — |
| Estragol | 19.6 ± 0.4 | — |
| *Lippia micromera* | — | 20 ± 1 |
| *Plectranthus amboinicus* | 30.7 ± 0.2 | — |
| *Lippia origanoides* | 43 ± 3 | — |
| *Thymus vulgaris* | — | 20 ± 3 |
| *Tagetes lucida* (flores) | — | 4.3 ± 0.2 |
| *Tagetes lucida* (hojas) | — | 4.7 ± 0.2 |
| *Ocimum sp*. | — | 8.4 ± 0.4 |
| *Tagetes filifolia* | — | 5.8 ± 0.2 |
| *Illicium verum* | — | 6.6 ± 0.6 |
| *Foeniculum vulgare* | — | 5.4 ± 0.4 |

La galantamina y fisostigmina (**Figura 3.2**), empleadas como sustancias contro, son medicamentos aceptados para el tratamiento de la AD; el diazinón (OP) (**Figura 3.16**)

se empleó como sustancia control, por ser un pesticida organofosforado ampliamente utilizado en la agricultura.

Como se puede observar de la **Tabla 3.10**, la mayoría de los AE evaluados mostraron cierta actividad inhibitoria de la AChE, aunque ninguno de éstos superó la actividad de las tres sustancias control. Los AE más activos, son los aislados de *P. amboinicus* y *L. origanoides*, ambos se caracterizan por su contenido alto de carvacrol (> 40%).

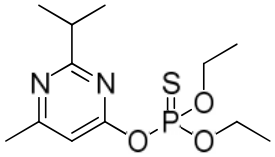



**Figura 3.16.** Estructura química del diazinón.

Los AE ricos en timol (*T. vulgaris* y *L. micromera*) siguen en orden decreciente de inhibición, los valores de inhibición de estos aceites fueron muy similares, así como sus composiciones químicas. Los AE, abundantes en *trans*-anetol y estragol, presentaron una muy baja inhibición de la AChE, cuando ésta se determinó a una concentración de 25 µg/mL. Las sustancias puras (fenoles y derivados etéreos) evaluadas inhibieron eficientemente la AChE (< 20 µg/mL). Los monoterpenos fenólicos, carvacrol y timol, mostraron las inhibiciones más fuertes.

En la literatura científica existen reportes sobre la actividad anticolinesterásica de algunos AE estudiados [151]. El AE de *F. vulgare* (con el mismo contenido de *trans*-anetol aquí reportado) y de una especie de tomillo (*Thymus serpyllum*), con alto contenido de carvacrol (56%), fueron estudiados por Mata *et al.* [152]. Los autores, encontraron que estos AE inhibieron moderadamente la AChE con valores de 252 y 190 g/mL, respectivamente. Si se comparan con los datos obtenidos en este trabajo, se observan diferencias marcadas, puesto que los AE que fueron ricos en carvacrol mostraron la mayor inbihición de la enzima (*P. amboinicus* – 30 µg/mL y *L. origanoides* - 43 µg/mL), mientras que, el AE de *F. vulgare* no inhibió a la AChE.

Jukić *et al*. [153] estimaron la actividad inhibitoria de la AChE de los constituyentes individuales (timol, linalol, carvacrol, timoquinona y timohidroquinona) y del AE de T.

*vulgaris*. Sus resultados mostraron que el orden de inhibición fue: timohidroquinona > carvacrol > timoquinona > AE > timol > linalol; y que la acción inhibitoria del carvacrol fue 10 veces mayor que la de su isómero timol. La confrontación de los resultados de Jukić y colaboradores, con los obtenidos en este trabajo difieren un poco. Concuerda, que el carvacrol fue el compuesto que mayor inhibición mostró, por encima de los AE evaluados, pero hay diferencias en que los AE ricos en timol fueron inferiores al timol como sustancia pura. En este trabajo, el orden de inhibición fue el siguiente: carvacrol > timol > *trans*-anetol > estragol > *P. amboinicus* > *L. origanoides* > *T. vulgaris* ≥ *L. micromera*.

Dohi *et al.* [154] reportaron la acción de inhibición de la AChE de los AE comerciales obtenidos de las especies *Artemisia dracunculus*, *Inula graveolens*, *Lavandula officinalis* Chaix y *Ocimum sanctum*, sus constituyentes principales fueron estragol, acetato de bornilo, acetato de linalilo y eugenol, respectivamente. De acuerdo con los autores, el AE de *A. dracunculus* mostró mayor inhibición comparado con los otros AE evaluados.

Miyazawa *et al.* [155], evaluaron 31 AE con alto contenido de mentanos (pulegona, mentona, mentol, linalol, óxido de piperitona, carvona) como agentes anticolinesterásicos. 28 AE inhibieron la AChE, pero sólo 12, presentaron valores de $IC_{50}$ menores que 50 μg/mL. De los 6 constituyentes individuales evaluados, sólo dos inhibieron la AChE (óxido de piperitona y pulegona). Miyazama y Yamafuji [156] estudiaron la inhibición de la AChE de 17 monoterpenoides bicíclicos encontrados en diferentes AE.

Interesantes resultan los trabajos sobre la actividad anticolinesterásica alta de los AE del género *Salvia*: *S. lavandulaefolia* y *S. officinalis*, que han sido utilizadas en la medicina tradicional europea para ayudar a mejorar la memoria [54,157]. El AE de *S. lavandulaefolia* es rico en monoterpenoides (alcanfor, eucaliptol y α-pineno) que inhibieron significativamente la AChE [158,159] y se les atribuye la actividad del AE. Otras especies de este género también han sido estudiadas [160] y mostraron la inhibición de la AChE [149,161].

Se estudiaron también los AE de las especies *Melissa officinalis* (constituyentes principales citral y citronelal) y *Rosmarinus officinalis* [147,162], pero su acción inhbitoria de la enzima AChE fue muy baja.

**3.6.6 Evaluación de la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa de precursores, intermediarios y productos finales de la síntesis de 2,5-dihidro-1-benzoxepinas.** Los datos de inhibición enzimática de serie de compuestos sintéticos mostraron algunos resultados interesantes (**Tablas 3.11-3.16**): la mayoría de las moléculas ensayadas bloquearon la acción de la AChE, y, para algunos compuestos la inhibición se observó en el orden de $10^{-5}$ M (> 10 < 100 μM).

La **Tabla 3.11** registra los valores de inhibición de la AChE expresados μg/mL y μM de las sustancias control, los antioxidantes de referencia naturales y sintéticos (α-tocoferol, BHA y BHT), sustancias patrón (eugenol, *trans*-anetol y estragol) y los fenoles precursores (**1a-f**) de las síntesis de 2,5-dihidro-1-benzoxepinas. Los antioxidantes fenólicos, sustancias patrón y fenoles precursores bloquearon de una u otra manera la actividad de AChE, pero ninguno de ellos sobrepasó la concentración inhibitoria de las sustancias control.

**Tabla 3.11.** Valores de la concentración de inhibición de la AChE por las sustancias control, de referencia y de fenoles precursores de la síntesis de 2,5-dihidro-1-benzoxepinas.

| Sustancia evaluada | Actividad inhibitoria AChE | |
|---|---|---|
| | $IC_{50}$ (μg/mL) | $IC_{50}$ (μM) |
| Fisostigmina | 0.0056 ± 0.0001 | 0.0202 ± 0.004 |
| Galantamina | 0.30 ± 0.01 | 1.06 ± 0.04 |
| Diazinón (pesticida) | 0.568 ± 0.008 | 1.92 ± 0.05 |
| Trolox ® | 20.2 ± 0.9 | 81 ± 4 |
| α-Tocoferol | 42 ± 2 | 98 ± 5 |
| BHA | 11.9 ± 0.6 | 66 ± 3 |
| BHT | 22.8 ± 0.3 | 101 ± 1 |
| Fenol (**1a**) | 10.4 ± 0.3 | 110 ± 4 |
| 4-Hidroxibenzaldehído (**1b**) (4HBA) | 13.4 ± 0.7 | 110 ± 5 |
| Guaiacol (**1c**) | 13.7 ± 0.3 | 110 ± 3 |
| *iso*-Vainillina (**1d**) | 16.5 ± 0.9 | 108 ± 6 |
| Timol (**1e**) | 15.5 ± 0.3 | 103 ± 2 |

| | | |
|---|---|---|
| Carvacrol (**1f**) | 11.5 ± 0.2 | 77 ± 1 |
| *trans*-Anetol | 16.18 ± 0.02 | 109.2 ± 0.1 |
| Estragol | 19.6 ± 0.4 | 132 ± 2 |
| Eugenol | 20 ± 2 | 124 ± 9 |

De todos los compuestos evaluados, el $\alpha$-tocoferol (antioxidante eficiente), requirió mayor cantidad (42 $\mu$g/mL) para inhibir la AChE. Cuatro sustancias exhibieron las de mayor inhibición en orden: fenol > carvacrol > BHA > 4-HBA. Se podría suponer que la actividad relativamente alta del fenol y del carvacrol se debe a su alta toxicidad [66,163]. El resto de compuestos evaluados tuvieron inhibiciones en el rango 13 – 23 $\mu$g/mL.

En la **Tabla 3.12** se reportan los valores de concentraciones inhibitorias de la AChE de los compuestos de la serie de alil-fenil éteres (**2a-f**). Este grupo de moléculas posee valores de inhibición entre 51 y 80 µM.

**Tabla 3.12.** Inhibición de la actividad AChE por los alil-aril éteres (**2a-f**), sintetizados en la etapa I de la síntesis de 2,5-dihidro-1-benzoxepinas.

| **Sustancia evaluada** | **Actividad inhibitoria AChE** | |
|---|---|---|
| | **$IC_{50}$ ($\mu$g/mL)** | **$IC_{50}$ ($\mu$M)** |
| **2a** | 9.9 ± 0.0 | 74 ± 0 |
| **2b** | 10.8 ± 0.7 | 67 ± 4 |
| **2c** | 12.3 ± 0.1 | 74.9 ± 0.8 |
| **2d** | 12.8 ± 0.4 | 66 ± 2 |
| **2e** | 13.1 ± 0.2 | 69 ± 1 |
| **2f** | 9.82 ± 0.07 | 51.6 ± 0.4 |

De la **Tabla 3.12** se aprecia claramente que el grado de inhibición que mostraron estas sustancias fue moderado, ya que sus $IC_{50}$ fueron mayores de 15 $\mu$g/mL. Los compuestos más activos fueron **2f**, **2a** y **2b**, éstos son los derivados alilados de carvacrol, fenol y 4-HBA. En las moléculas **2a-f**, la alilación potencializó su actividad hacia la enzima.

Las $IC_{50}$ de los compuestos 2-alil fenoles (**3a-f**) aparecen en la **Tabla 3.13**. La inhibición de la AChE de este grupo de moléculas fue relativamente baja, con valores de $IC_{50}$ entre 91 y 100 µM. El compuesto **3f** mostró un valor de inhibición muy bueno y se está verificando nuevamente.

La tendencia observada en los datos reportados fue similar a la de los compuestos alilados: las $IC_{50}$ fueron mayores de 20 μg/mL. Los compuestos más activos correspondieron a **3f**, **3a** y **3b**, derivados *orto*- alilados de carvacrol, fenol y 4-HBA. Se puede suponer que la trasposición del grupo alilo reduce la actividad de estos compuestos sobre la enzima, ya que los valores $IC_{50}$ de **3a-e** fueron más altos que los de **2a-e**.

**Tabla 3.13.** Inhibición de la actividad AChE por los 2-alil fenoles (**3a-f**), transpuestos en la etapa II de la síntesis de 2,5-dihidro-1-benzoxepinas.

| Sustancia evaluada | Actividad inhibitoria AChE | |
|---|---|---|
| | $IC_{50}$ (μg/mL) | $IC_{50}$ (μM) |
| **3a** | 12.7 ± 0.2 | 95 ± 1 |
| **3b** | 14.2 ± 0.9 | 88 ± 6 |
| **3c** | 16.8 ± 0.5 | 102 ± 3 |
| **3d** | 18.4 ± 0.4 | 96 ± 2 |
| **3e** | 17.8 ± 0.5 | 94 ± 2 |
| **3f*** | **4.1 ± 0.3** | **22 ± 2** |

* Dato sujeto a verificación

En la **Tabla 3.14** se registran las concentraciones de inhibición de la AChE de las moléculas de la serie 2-alil-1-aliloxi bencenos (**4a-f**). Las $IC_{50}$ para este grupo variaron entre 98 y 114 μM.

**Tabla 3.14.** Inhibición de la actividad AChE por los 2-alil-1-aliloxi bencenos (**4a-f**), sintetizados en la etapa III de la síntesis de 2,5-dihidro-1-benzoxepinas.

| Sustancia evaluada | Actividad inhibitoria AChE | |
|---|---|---|
| | $IC_{50}$ (μg/mL) | $IC_{50}$ (μM) |
| **4a** | 17.8 ± 0.4 | 102 ± 3 |
| **4b** | 22.0 ± 0.3 | 109 ± 1 |
| **4c** | 22.0 ± 0.2 | 108 ± 1 |
| **4d** | 26.5 ± 0.6 | 114 ± 3 |
| **4e** | 25.0 ± 0.6 | 108 ± 3 |
| **4f** | 22.6 ± 0.1 | 98.0 ± 0.5 |

La introducción de un nuevo grupo alilo en las estructuras **4a-f** disminuyó ligeramente su acción inhibitoria sobre la enzima. Los compuestos **4a** y **4f** fueron los más activos: sus $IC_{50}$ variaron en el rango 17 - 27 μg/mL.

La actividad de los 2-alil acrilatos de fenilo (**5a-d**) se evaluó y sus resultados se exhiben en la **Tabla 3.15**. De las cinco moléculas analizadas sólo una (**5a**) no inhibió a la enzima. Los demás compuestos presentaron concentraciones inhibitorias entre 120 y 180 µM. Llama la atención el hecho de que siendo ésteres, las inhibiciones de estas moléculas fueron moderadas (altos valores de $IC_{50}$) o casi nula. En este grupo la mayor inhibición la exhibieron los compuestos **5b** y **5e**, con $IC_{50}$ de 27 y 31 µg/mL, respectivamente.

**Tabla 3.15.** Inhibición de la actividad AChE por los 2-alil-1-acriloiloxi bencenos (**5a-d**), sintetizados en la etapa III de la síntesis de 2,5-dihidro-1-benzoxepinas.

| Sustancia evaluada | Actividad inhibitoria AChE | |
|---|---|---|
| | $IC_{50}$ (µg/mL) | $IC_{50}$ (µM) |
| **5a** | (37.6 ± 0.5% a 250 □M) | |
| **5b** | 27.0 ± 0.3 | 125 ± 1 |
| **5c** | 35 ± 2 | 161 ± 8 |
| **5d** | 42.6 ± 0.9 | 173 ± 4 |
| **5e** | 31.4 ± 0.1 | 128.4 ± 0.6 |

Se determinaron las inhibiciones para los derivados benzoxepínicos (**Tabla 3.16**). En la serie de compuestos **6a-f**, sólo dos moléculas (**6b** y **6f**) mostraron actividad por la enzima AChE, con $IC_{50}$ de 124 y 105 µM, respectivamente. Las otras 2,5-dihidro-1-benzoxepinas evaluadas, no mostraron actividad suficiente para medir las $IC_{50}$.

**Tabla 3.16.** Inhibición de la actividad AChE por los 2,5-dihidro-1-benzoxepinas (**6a-f**), sintetizados en la etapa IV de la síntesis de 2,5-dihidro-1-benzoxepinas.

| Sustancia evaluada | Actividad inhibitoria AChE | |
|---|---|---|
| | $IC_{50}$ (µg/mL) | $IC_{50}$ (µM) |
| **6a** | (12.7 ± 0.4% a 250 µM) | |
| **6b** | 21.6 ± 0.3 | 124 ± 2 |
| **6c** | (11.2 ± 0.5% a 250 µM) | |
| **6d** | (9.5 ± 0.5% a 250 µM) | |
| **6e** | (0% a 250 µM) | |
| **6f** | 21.2 ± 0.3 | 105 ± 1 |

### 3.6.7 Otros ensayos biológicos *in vitro.*

*** Evaluación de la inhibición de una serie de compuestos sintéticos seleccionados contra hongos filamentos y levaduriformes.** Las personas

inmunodeprimidos, *e.g.*, pacientes con cáncer, SIDA, transplantados y recién nacidos, ponen en riesgo sus vidas cuando tienen infección micótica [164]. El continuo aumento de la recurrencia de infecciones fúngicas, el incremento de la resistencia, la toxicidad de medicamentos efectivos, los efectos secundarios y la moderada eficiencia hacia los hongos (medicamentos fungiestáticos), hace necesario encontrar nuevos compuestos con potencial antifúngico.

La **Tabla 3.17** exhibe los valores de CIM de unas moléculas obtenidas en la síntesis de 2,5-dihidro-1-benzoxepinas, evaluados en 10 diferentes tipos de hongos.

**Tabla 3.17.** Valores de concentraciones inhibitorias mínimas (μg/mL) de una serie de compuestos obtenidos en la síntesis de 2,5-dihidro-1-benzoxepinas, frente a un panel de hongos levaduriformes y filamentosos.

| Sustancia | Hongos levaduriformes y filamentosos (CIM - μg/mL) | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Ca[1] | Ct[2] | Sc[3] | Cn[4] | Afu[5] | Afl[6] | An[7] | Mg[8] | Tr[9] | Tm[10] |
| **Ketoconazol** | 0.5 | 0.125 | 0.5 | 0.25 | 0.125 | 0.5 | 0.25 | 0.05 | 0.025 | 0.025 |
| **2e** | >250 | >250 | >250 | >250 | >250 | >250 | >250 | 250 | 250 | 250 |
| **2f** | >250 | >250 | >250 | >250 | 250 | >250 | >250 | 250 | 250 | 250 |
| **3e** | >250 | >250 | >250 | >250 | >250 | >250 | >250 | 250 | 250 | 250 |
| **4e** | >250 | >250 | >250 | >250 | >250 | >250 | >250 | 250 | 250 | 250 |
| **5a** | **125** | **125** | **125** | **125** | 250 | >250 | >250 | **62.5** | **62.5** | **62.5** |
| **5e** | >250 | >250 | >250 | 250 | >250 | >250 | >250 | 250 | 250 | 250 |
| **6c** | >250 | >250 | >250 | 250 | 250 | 250 | >250 | **62.5** | **125** | **125** |

[1]*Candida albicans* ATCC 10231; [2]*Candida tropicalis* C 131 2000; [3]*Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763; [4]*Cryptococcus neoformans* ATCC 32264; [5]*Aspergillus fumigatus* ATCC 26934; [6]*Aspergillus flavus* ATCC 9170; [7]*Aspergillus niger* ATCC 9029; [8]*Microsporum gypseum* C 115 2000; [9]*Trichophyton rubrum* C 113 2000; [10]*Trichophyton mentagrophytes* ATCC 9972.

De acuerdo con la **Tabla 3.17**, todos los compuestos evaluados mostraron alguna efectividad contra los hongos *M. gypseum*, *T. rubrum* y *T. mentagrophytes*. De 7 muestras probadas, los dos compuestos **5a** (2-alil acrilato) y **6c** (2,5-dihidro-1-benzoxepina) inhibieron apreciablemente a estos hongos, con CIM menores que 250 μg/mL. El compuesto más activo resultó ser el acrilato de 2-alil fenilo (**5a**) inhibiendo el crecimiento de los hongos *Candida* y *Cryptococcus*, cepas clínicamente importantes.

*** Evaluación de la inhibición contra los parásitos *Tripanosoma cruzi* y *Leishmania chagasi* y citotoxicidad con células Vero y THP-1 de algunos compuestos sintéticos seleccionados.** Los parásitos de la familia

*Trypanosomatidae* representan un problema de salud pública en América Latina, con sus vectores *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania chagasi* causantes de la tripanosomiasis (enfermedad de Chagas) y leishmaniasis cutánea/visceral, respectivamente, las cuales han mostrado altos índices de morbilidad y mortalidad en áreas rurales [165]. Hoy día, los tratamientos existentes para estas patologías son desfavorables ya que los medicamentos disponibles tienen ciertas desventajas, *e.g.*, efectos secundarios, efectividad variable, resistencia y pocas alternativas de elección; además, de aplicación dispendiosa. Por estas razones, es necesaria la búsqueda de compuestos con actividad antiparasitaria que puedan resolver los inconvenientes presentados.

Los siguientes criterios fueron los usados para interpretar los resultados: se consideraron **compuestos activos o tóxicos** a aquellas sustancias que presentaron $IC_{50}$ < 25 µg/mL e $IC_{90}$ < 50 µg/mL. **Parcialmente activos**, a aquellas sustancias con $IC_{50}$ > 25 µg/mL e $IC_{90}$ < 50 µg/mL; y finalmente, **ni activos ni tóxicos**, a aquellos compuestos con $IC_{50}$ >25 µg/mL e $IC_{90}$ >50 µg/mL; esto, para las formas libres de los parásitos y células de mamíferos. Para las formas intracelulares, $IC_{50}$ < 50 µg/mL.

La **Tabla 3.18** presenta los valores de concentraciones inhibitorias y citotóxicas al 50 y al 90% de los compuestos evaluados expuestos a los diferentes estadios del parásito *T. cruzi* y, expresados en µg/mL. Los compuestos evaluados para los parásitos *L. chagasi* y *T. cruzi* correspondieron a los derivados alil-aril éter (**2a-g**), 2-alil fenoles (**3b-g**) y 2-alil-1-aliloxi bencenos (**4a-e**) junto con el compuesto **5d** (2-alil acrilato).

**Tabla 3.18.** Actividad antiparasitaría contra *T. cruzi* y citotoxicidad de los compuestos sintéticos evaluados.

| Compuesto ensayado | Inhibición antiparasitaria en *Trypanosoma cruzi* y Citotoxicidad, μg/mL | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Epimastigotes | | Amastigotes | | Células Vero | |
| | $IC_{50}$ | $IC_{90}$ | $IC_{50}$ | $IC_{90}$ | $CC_{50}$ | $CC_{90}$ |
| Nifurtimox* | 0.7 ± 0.1 | 6.7 ± 0.7 | 0.7 ± 0.2 | 2.6 ± 0.6 | 18 ± 6 | >100 |
| **2a** | ND** | ND** | >33 | >33 | >100 | >100 |
| **2b** | 21.2 ± 0.6 | >100 | >33 | >33 | >100 | >100 |
| **2c** | **15.4 ± 0.5** | **42 ± 2** | >33 | >33 | >100 | >100 |
| **2d** | 27.6 ± 0.6 | >100 | >33 | >33 | **44 ± 2** | >100 |
| **2e** | 25 ± 1 | 95 ± 4 | >33 | >33 | >100 | >100 |
| **2g** | 29 ± 1 | 77 ± 5 | >33 | >33 | **19 ± 2** | >100 |
| **3b** | **4.5 ± 0.2** | **37 ± 3** | >33 | >33 | **66 ± 5** | >100 |
| **3c** | 27 ± 1 | >100 | >33 | >33 | >100 | >100 |
| **3d** | **20.5 ± 0.2** | **46 ± 1** | >33 | >33 | **9.2 ± 0.3** | >100 |
| **3e** | **10.97 ± 0.06** | **12.9 ± 0.3** | >33 | >33 | **59 ± 5** | >100 |
| **3g** | ND** | ND** | >33 | >33 | >100 | >100 |
| **4a** | **6.4 ± 0.2** | **28 ± 4** | >33 | >33 | **29.1 ± 0.1** | >100 |
| **4b** | 14.7 ± 0.4 | 61 ± 3 | >33 | >33 | 54 ± 2 | >100 |
| **4c** | 28 ± 2 | >100 | >33 | >33 | >100 | >100 |
| **4d** | **6.6 ± 0.6** | **56 ± 3** | >33 | >33 | **24.3 ± 0.7** | >100 |
| **4e** | **9.45 ± 0.06** | **14.0 ± 0.4** | >33 | >33 | **16.7 ± 0.5** | **33.7 ± 0.6** |
| **5d** | **3.94 ± 0.04** | **4.8 ± 0.2** | >33 | >33 | **8.3 ± 0.2** | >100 |

* Fármaco de referencia; ND** – No determinado

Con base en los datos obtenidos del experimento con el parásito *T. cruzi*, de los 17 compuestos evaluados 8 fueron activos en la forma libre del parásito en el estadio de epimastigote, con rangos de actividad de $IC_{50}$ entre 3.9 y 25 μg/mL e $IC_{90}$ entre 4.8 y 46 μg/mL. Los compuestos **5d**, **3e** y **4e** fueron los que mostraron mayor actividad con $IC_{50}$ < 11 μg/mL e $IC_{90}$ < 14 μg/mL. Sin embargo, los compuestos **4e** y **5d** fueron tóxicos en las células Vero. Las $CC_{50}$ de los compuestos **2d**, **4a**, **4d**, **2g** y **3d** estuvieron entre 44-9 μg/mL indicando una toxicidad de moderada a alta a nivel celular. Se debe resaltar que, a pesar de la actividad de las moléculas en la forma libre del parásito, ninguna de ellas fue activa en el estadio amastigote; el resto de moléculas no fueron citotóxicas.

En la **Tabla 3.19** se recogen los valores determinados de concentraciones inhibitorias y citotóxicas al 50 y al 90%, respectivamente, de los compuestos evaluados expuestos a los diferentes estadios del parásito *L. chagasi*, expresados en μg/mL.

**Tabla 3.19.** Actividad contra el parásito *L. chagasi* y citotoxicidad de los compuestos sintéticos evaluados.

| Compuesto ensayado | Inhibición antiparasitaria en *Leishmania chagasi* y citotoxicidad, μg/mL | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Promastigotes | | Amastigotes | | Células THP-1 | |
| | $IC_{50}$ | $IC_{90}$ | $IC_{50}$ | $IC_{90}$ | $CC_{50}$ | $CC_{90}$ |
| AmB* | 0.0170 ± 0.0002 | 0.0200 ± 0.0006 | 0.067 ± 0.006 | 0.12 ± 0.03 | 7.2 ± 0.5 | >100 |
| **2a** | ND** | ND** | >33 | >33 | >100 | >100 |
| **2b** | 52 ± 4 | >100 | >33 | >33 | >100 | >100 |
| **2c** | >100 | >100 | >33 | >33 | >100 | >100 |
| **2d** | 58 ± 2 | >100 | >33 | >33 | >100 | >100 |
| **2e** | 54 ± 4 | >100 | >33 | >33 | >100 | >100 |
| **2g** | 11.5 ± 0.4 | 65 ± 4 | >33 | >33 | >100 | >100 |
| **3b** | 4.7 ± 0.2 | >100 | >33 | >33 | >100 | >100 |
| **3c** | 42.6 ± 0.6 | >100 | >33 | >33 | >100 | >100 |
| **3d** | 28 ± 1 | >100 | >33 | >33 | >100 | >100 |
| **3e** | 6.6 ± 0.9 | 58 ± 3 | >33 | >33 | **48 ± 10** | >100 |
| **3g** | ND** | ND** | >33 | >33 | >100 | >100 |
| **4a** | **3.47 ± 0.03** | **4.12 ± 0.09** | >33 | >33 | >100 | >100 |
| **4b** | **7.2 ± 0.3** | **22 ± 4** | >33 | >33 | >100 | >100 |
| **4c** | 46 ± 2 | >100 | >33 | >33 | >100 | >100 |
| **4d** | **9.1 ± 0.5** | **45 ± 1** | >33 | >33 | **58 ± 3** | >100 |
| **4e** | **8.4 ± 0.5** | **29 ± 3** | >33 | >33 | >100 | >100 |
| **5d** | **4.43 ± 0.08** | **8.55 ± 0.06** | >33 | >33 | **19 ± 2** | >100 |

*AmB – Amfotericina B; **ND – No determinado

De acuerdo con la **Tabla** del experimento con el parásito *L. chagasi*, 5 moléculas de los 17 compuestos evaluados fueron activos en la forma libre del parásito en el estadio de promastigote, con rangos de actividad de $IC_{50}$ entre 3.5 y 9 μg/mL e $IC_{90}$ entre 4.1 y 45 μg/mL. Los compuestos **4a** y **5d** mostraron mayor actividad, con $IC_{50}$ < 5 μg/mL e $IC_{90}$ < 9 μg/mL; sin embargo, el bioensayo en las células THP-1 reveló que el compuesto **5d** fue tóxico y el compuesto **3e** mostró una toxicidad moderada (48 μg/mL). A pesar de la actividad, en la forma libre del parásito, que mostraron las moléculas ninguna de ellas fue activa en el estadio amastigote. Finalmente, las 15 moléculas restantes evaluadas no revelaron ninguna toxicidad en las células THP-1.

## 3.7 CONCLUSIONES

1. El *screening* por microdilución en placas del ensayo $ABTS^{+\bullet}$ permitió disminuir considerablemente las cantidades de muestra (0.08-20 mg), de disolvente (200 μL), del error de lectura (CV < 5%) y la subestimación de los valores TEAC de las muestras evaluadas. El método mejorado posibilitó el manejo eficiente y el

procesamiento rápido de un gran número de muestras y manipulación fácil de los datos.

2. Los AE evaluados, por los dos métodos de decoloración de $ABTS^{+\bullet}$, presentaron actividad moderada que no alcanza la de los antioxidantes control BHT, BHA y $\alpha$-tocoferol. El potencial inhibitorio de $ABTS^{+\bullet}$, medido por el método de microdilución, para los AE disminuyó en el siguiente orden: *Plectranthus amboinicus* > *Lippia origanoides* > *Thymus vulgaris* > *Lippia micromera* > *Tagetes lucida* (flores) > *Ocimum sp.* > *Tagetes lucida* (hojas) > *Illicium verum* > *Tagetes filifolia* > *Foeniculum vulgare*.

3. La capacidad antiradicalaria de los AE evaluados está directamente relacionada con su composición química; los AE ricos en estragol y *trans*-anetol, mostraron actividades más altas que sus constituyentes individuales; mientras que timol y carvacrol fueron más activos que los AE que los contienen. En cuanto a la comparación de la capacidad antioxidante entre los ensayos $ABTS^{+\bullet}$ e inhibición del ácido linoleico, éstos mostraron tendencias similares tanto para compuestos puros como para los AE.

4. La reactividad hacia el catión-radical $ABTS^{+\bullet}$ de la mayoría de las moléculas sintetizadas (éteres, ésteres y ciclo de 7 miembros) fue muy baja; se obtuvieron valores de TEAC cercanos a cero. Sin embargo, algunos de los fenoles precursores y 2-alil fenoles sintetizados revelaron una inhibición igual o mayor de la de los antioxidantes control, así: eugenol > **3c** > BHT> **1c** > BHA > **3f** > **3a** > **1e**, **1f** > **3e** > vitamina E > **1a** > **3d**. Se observó la influencia de la posición (*o*- o *p*-) y tipo de sustituyente (GED o GEA) en la facilidad de las moléculas de transferir electrones y reducir (produciendo la decoloración) al catión-radical $ABTS^{+\bullet}$.

5. La confrontación de los potenciales de ionización con los valores TEAC manifestó una tendencia general para los compuestos fenólicos: a mayor valores de IP menores valores de TEAC (influidos por los grupos sustituyentes).

6. Las sustancias fenólicas, derivados etéreos junto con los AE evaluados que los tienen, presentaron un efecto inhibidor moderado sobre la AChE comparado con la galantamina, fisostigmina y el diazinón. El potencial inhibitorio de la AChE por los AE y sus constituyentes principales disminuyó en el siguiente orden: carvacrol > timol > *trans*-anetol > estragol > *Plectranthus amboinicus* > *Lippia origanoides* > *Thymus vulgaris* > *Lippia micromera*.

7. Las $IC_{50}$, determinadas para la serie de compuestos obtenidos en la síntesis (Etapas I-III), indicaron que la presencia del grupo alilo potencializó la acción de estas moléculas sobre la AChE. Los compuestos análogos de carvacrol y 4-hidroxibenzaldehído presentaron inhibiciones más altas.

8. Los ensayos de antiparasitarios y de citotoxicidad mostraron que aproximadamente el 50% de las moléculas evaluadas manifestaron alguna actividad de moderada a alta contra *T. cruzi*. En cuanto a los ensayos de antifúngicos, se hace necesario extender el experimento a un mayor número de muestras.

## 3.8 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS


1. SVOBODA, K.P. and HAMPSON, J.B. Bioactivity of essential oils of selected temperate aromatic plants: antibacterial, antioxidant, antiinflamatory and other related pharmacological activities. Scotland: Plant Biology Department, **1999**. p. 1-17.

2. KOUL, O. and DHALIWAL, G.S. Phytochemical biopesticides. Singapore: Harwood Academic Publishers, **2001**. 223p.

3. RECHCIGL, J.E. and RECHCIGL, N.A. Biological and biotechnological control of insect pests. Boca Raton: CRC Press, **1998**. p. 109-130.

4. LAHLOU, M. Essential oils and fragrance compounds: bioactivity and mechanisms of action. *Flavour Fragr. J.* **2004**, 19; p. 159-165.

5. WILLCOX, J.K.; ASH, S.L. and CATIGNANI, G.L. Antioxidants and prevention of chronic disease. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2004**, 44; p. 275-295.

6. CHEVION, M. A site-specific mechanism for free radical induced biological damage: the essential role of redox-active transition metals. *Free Radical Bio. Med.* **1988**, 5; p. 27-37.

7. DENISOV, E.T. and AFANAS'EV, I.B. Oxidation and antioxidants in organic chemistry and biology. Boca Raton: CRC Press - Taylor & Francis Group, **2005**. 992 p.

8. BUTTERFIELD, D.A.; CASTEGNA, A.; DRAKE, J.; SCAPAGNINI, G. and CALABRESE, V. Vitamin E and neurodegenerative disorders associated with oxidative stress. *Nutr. Neurosci.* **2002**, 5(4); p. 229-239.

9. MARKESBERY, W.R. Oxidative stress hypothesis in Alzheimer´s disease. *Free Radical Biol. Med.* **1997**, 23(1); p. 134-147.

10. PERRY, G.; RAINA, A. K.; NUNOMURA, A.; WATAYA, T.; SAYRE, L. M. and SMITH, M. A. How important is oxidative damage? Lessons from Alzheimer´s disease. *Free Radical Biol. Med.* **2000**, 28(5); p. 831-834.

11. FRANKEL, E.N. Antioxidants in lipid foods and their impact on food quality. *Food Chem.* **1996**, 57(1); p. 51-55.

12. MOURE, A.; CRUZ, J.M.; FRANCO, D.; DOMINGUEZ, J.M.; SINEIRO, J.; DOMÍNGUEZ, H.; NÚÑEZ, M.J. and PARAJÓ, J.C. Natural antioxidants from residual sources. *Food Chem.* **2001**, 72; p. 145-171.

13. NGUYEN, M.T.; KRYACHKO, E.S. and VANQUICKENBORNE, L.Q. General and theoretical aspects of phenols. En: Rappoport, Z. Chemistry of Phenols. Chichester: John Wiley & Sons, **2003**. p. 1-198.

14. DENISOV, E.T. and KHUDYAKOV, I.V. Mechanisms of action and reactivities of the free radicals of inhibitors. *Chem. Rev.* **1987**, 87(6); p. 1313-1357.

15. ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, P.D.; PATSALIDES, E.; McDONALD, S. and ROBARDS, K. Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*. **2002**, 127; p. 183-198.

16. KAHL, R. and KAPPUS, H. Toxicology of the synthetic antioxidants BHA and BHT in comparison with the natural antioxidant vitamin E. *Z. Lebensm.-Unters. Forsch.* **1993**, 196; p. 329-338.

17. LANIGAN, R.S. and YAMARIK, T.A. Final report on the safety assessment of BHT. *Int. J. Toxicol.* **2002**, 21(Suppl. 2); p. 19-94.

18. IVERSON, F. Phenolic antioxidants: health protection branch studies on butylated hydroxyanisole. *Cancer Lett.* **1995**, 93; p. 49-54.

19. KNAPP, M.J.; KNOPMAN, D.S.; SOLOMON, P.R.; PENDLEBURY, W.W.; DAVIS, C.S. and GRACON, S.I. A 30-week randomized controlled trial of high-dose tacrine in patients with Alzheimer's disease. The Tacrine study group. *J. Am. Med. Assoc.* **1994**, 271; p. 985-991.

20. GUTTERIDGE, J.M.C. Biological origin of free radicals, and mechanisms of antioxidant protection. *Chem.-Biol. Interact.* **1994**, 91; p. 133-140.

21. KOHEN, R. and NYSKA, A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol. Pathol.* **2002**, 30(6); p. 620-650.

22. DE ZWART, L.L.; MEERMAN, J.H.N.; COMMANDEUR, J.N.M. and VERMEULEN, N.P.E. Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. *Free Radical Bio. Med.* **1999**, 26(1/2); p. 202-226.

23. HALLIWELL, B. Food-derived antioxidants: How to evaluate their importance in food and *in vivo*. En: Packer, L. and Cadenas, E. Handbook of antioxidants: Second edition, revised and expanded. New York: Marcel Dekker, Inc., **2002**. p. 18-62.

24. RILEY, P.A. Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation. *Int. J. Radiat. Biol.* **1994**, 65(1); p. 27-33.

25. HAMILTON, R.J.; KALU, C.; PRISK, E.; PADLEY, F.B. and PIERCE, H. Chemistry of free radicals in lipids. *Food Chem.* **1997**, 60(2); p. 193-199.

26. GORDON, M.H. The development of oxidative rancidity in foods. En: Pokorny, J; Yanishlieva, N. and Gordon, M. Antioxidants in food. Practical applications. Cambridge (Eng.) and Boca Raton: Woodhead Publishing Ltd and CRC Press LLC, **2001**. p. 7-21.

27. PORTER, N.A. Mechanisms for the autoxidation of polyunsaturated lipids. *Acc. Chem. Res.* **1986**, 19; p. 262-268.

28. LAGUERRE, M.; LECOMTE, J. and VILLENEUVE, P. Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. *Prog. Lipid Res.* **2007**, 46; p. 244-282.

29. GARDNER, H.W. Oxygen radical chemistry of polyunsaturated fatty acids. *Free Radical Bio. Med.* **1989**, 7; p. 65-86.

30. PORTER, N.A.; LEHMAN, L.S.; WEBER, B.A. and SMITH, K.J. Unified mechanism for polyunsaturated fatty acid autoxidation. Competition of peroxy radical

hydrogen atom abstraction, b-scission, and cyclization. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, 103(21); p. 6441-6455.

31. PACKER, L. and CADENAS, E. Oxidants and antioxidants revisited. New concepts of oxidative stress. *Free Radical Res.* **2007**, 41(9); p. 951-952.

32. HALLIWELL, B. Antioxidant characterization. Methodology and mechanism. *Biochem. Pharmacol.* **1995**, 49(10); p. 1341-1348.

33. _____. How to characterize a biological antioxidant. *Free Radical Res. Commun.* **1990**, 9; p. 1-32.

34. PRIOR, R.L. and CAO, G. *In vivo* total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. *Free Radical Bio. Med.* **1999**, 27(11/12); p. 1173-1181.

35. NIKI, E. and NOGUCHI, N. Evaluation of antioxidant capacity. What capacity is being measured by which method? *IUBMB Life*. **2000**, 50; p. 323-329.

36. BLOIS, M.S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*. **1958**, 181(4617); p. 1199-1200.

37. MUKAI, K.; YOKOYAMA, S.; FUKUDA, K. and UEMOTO, Y. Kinetic studies of antioxidant activity of new tocopherol model compounds in solution. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1987**, 60; p. 2163-2167.

38. MILLER, N.J.; RICE-EVANS, C.A.; DAVIES, M.J.; GOPINATHAN, V.; MILNER, A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin. Sci.* **1993**, 84; p. 407-412.

39. RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M. and RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biol. Med.* **1999**, 26; p. 1231-1237.

40. ARNAO, M.B.; CANO, A. and ACOSTA, M. Methods to measure the antioxidant activity in plant material. A comparative discussion. *Free Radical Res.* **1999**, 31; p. S89-96.

41. ESTERBAUER, H. and ZOLLNER, H. Methods for determination of aldehydic lipid peroxidation products. *Free Radical Bio. Med.* **1989**, 7; p. 197-203.

42. SNYDER, J.M.; FRANKEL, E.N. and SELKE, E. Capillary gas chromatographic analyses of headspace volatiles from vegetable oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1985**, 62(12); p. 1675-1679.

43. JAEN, J.C.; MOOS, W.H. and JOHNSON, G. Cholinomimetics and Alzheimer´s disease. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1992**, 2(8); p. 777-780.

44. SAVOLAINEN, K. Understanding the toxic actions of organophosphates. En: Krieger, R.I. Handbook of pesticides toxicology. Principles. London: Academic Press, **2001**. p. 1013-1041.

45. GOLAN, D.E.; TASHJIAN, A.H.; ARMSTRONG, E.J. and ARMSTRONG, A.W. Principles of pharmacology: the pathophysiologic basis of drug therapy. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, **2008**. 985p.

46. OFFERMANNS, S. and ROSENTHAL, W. Encyclopedia of molecular pharmacology. Heidelberg: Springer-Verlag, **2008**. 1505p.

47. LÜLLMANN, H.; MOHR, K.; HEIN, L.; BIEGER, D. and WIRTH, J. Color atlas of pharmacology. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, **2005**. 402p.

48. BACHMANN, K. Drug metabolism. En: Hacker, M.; Bachmann, K. and Messer, W. Pharmacology. Principles and practice. London: Academic Press, **2009**. p. 131-173.

49. HOUGHTON, P.J.; REN, Y. and HOWES, M.-J. Acetylcholinesterase inhibitors from plants and fungi. *Nat. Prod. Rep.* **2006**, 23; p. 181-199.

50. WILSON, B.W. Cholinesterases. En: Krieger, R.I. Handbook of pesticides toxicology. Principles. London: Academic Press, **2001**. p. 967-985.

51. ALPÍZAR-QUESADA, C.L. y MORALES-ALPÍZAR, C. La enfermedad de Alzheimer y los inhibidores de la colinesterasa. *Acta Méd. Costarric.* **2003**, 45(2); p. 50-56.

52. SAMUELS, M.A. Manual of neurologic therapeutics. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, **2004**. p. 501-502.

53. FELDMAN, H.H. Atlas of Alzheimer's disease. London: Informa UK Ltd., **2007**. 141p.

54. ORHAN, I. and ŞENER, B. Acetylcholinesterase inhibitors from natural resources. *FABAD J. Pharm. Sci.* **2003**, 28; p. 51-58.

55. MARKLUND, S.L. Endogenous free radicals and antioxidants in the brain. En: Beal, M.F.; Lang, A.E. and Ludolph, A.C. Neurodegenerative diseases. Neurobiology, pathogenesis and therapeutics. Cambridge: Cambridge University Press, **2005**. p. 3-17.

56. EBERHARDT, M.K. Reactive oxygen metabolites: chemistry and medical consequences. Boca Raton: CRC Press LLC, **2001**. 591p.

57. RAO, A.V. and BALACHANDRAN, B. Role of oxidative stress and antioxidants in neurodegenerative diseases. *Nutr. Neurosc.* **2002**, 5(5); p. 291-309.

58. TANG-WAI, D. F.; JOSEPHS, K.A. and PETERSEN, R.C. Alzheimer's disease – overview. En: Beal, M.F.; Lang, A.E. and Ludolph, A.C. Neurodegenerative diseases. Neurobiology, pathogenesis and therapeutics. Cambridge: Cambridge University Press, **2001**. p. 416-432.

59. REITER, R.J.; TAN, D.-X.; MANCHESTER, L.C. and CALVO, J.R. Antioxidative capacity of melatonin. En: CADENAS, E. and PACKER, L. Handbook of antioxidants. New York: Marcel Dekker, Inc., **2002**. p. 548-596.

60. CASTELLANI, R.J.; HONDA, K.; ZHU, X.; CASH, A.D.; NUNOMURA, A.; PERRY, G. and SMITH, M.A. Contribution of redox-active iron and copper to oxidative damage in Alzheimer disease. A*ge. Res. Rev.* **2004**, 3; p. 319-326.

61. SIGEL, A; SIGEL, H. and SIGEL, R.K.O. Neurodegenerative diseases and metal ions. Chichester: John Wiley & Sons Ltd., **2006**. 463p.

62. JUCKER, M.; BEYREUTHER, K.; HAASS, C.; NITSCH, R.M. and CHRISTEN, Y. Alzheimer:100 years and beyond. Heidelberg: Springer-Verlag, **2006**. 543p.

63. CHAMBERS, H.W.; BOONE, J.S.; CARR, R.L. and CHAMBERS, J.E. Chemistry of organophosphorus insecticides. En: Krieger, R.I. Handbook of pesticide toxicology. Agents. London: Academic Press, **2001**. p. 913-917.

64. SREBOČAN, E.; HRLEC, G.; GRABAREVIĆ, Ž.; POMPE-GOTAL, J. and SABOČANEC, R. Poisoning with acetylcholinesterase inhibitors in dogs: two case reports. *Vet. Med. - Czech*. **2003**, 48(6); p. 175-176.

65. BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review*. Int. J. Food Microbiol.* **2004**, 94; p. 223-253.

66. TISSERAND, R. and BALACS, T. Essential oil safety. A guide for health care professionals*.* London: Harcourt Publishers Limited, **1999**. 279p.

67. DUKE, J.A.; POLJAKOFF-MAYBER, A.; MAYER, A.M.; PUTIEVSKY, E. and LERNER, H.R. CRC handbook of medicinal spices. Boca Raton: CRC Press LLC, **2003**. 326p.

68. RAGHAVAN, S. Handbook of spices, seasonings, and flavorings. Boca Raton: CRC Press LLC and Taylor & Francis Group, **2007**. 330p.

69. GANG, D.R.; WANG, J.; DUDAREVA, N.; HEE NAM, K.; SIMON, J.E.; LEWINSOHN, E. and PICHERSKY, E. An investigation of the storage and biosynthesis of phenylpropenes in sweet basil. *Plant Physiol.* **2001**, 125; p. 539-555.

70. BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D. and IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. *Food Chem. Toxicol.* **2008**, 46; p. 446-475.

71. DUDAI, N. POLJAKOFF-MAYBER, A.; MAYER, A.M.; PUTIEVSKY, E. and LERNER, H. R. Essential oils as allelochemicals and their potential use as bioherbicides. *J. Chem. Ecol.* **1999**, 25(5); p. 1079-1089.

72. EDRIS, A.E. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: A review. *Phytother. Res.* **2007**, 21(4); p. 308-323.

73. ALLAHVERDIYEV, A.; DURAN, N.; OZGUVEN, M. and KOLTAS, S. Antiviral activity of the volatile oils of *Melissa officinalis* L. against Herpes simplex virus type-2. *Phytomedicine*, **2004**, 11(7); p. 657-661.

74. TEPE, B.; ASGAR, S.; ANI, M.; SARRAF-ZADEGAN, N. and SAFARI, M. Antimicrobial and antioxidative activities of the essential oils and methanol extracts of *Salvia cryptantha* (Montbret et Aucher ex Benth.) and *Salvia multicaulis* (Vahl). *Food Chem.* **2004**, 84; p. 519-525.

75. TALPUR, N.; ECHARD, B.; INGRAM, C.; BAGCHI, D. and PREUSS, H. Effects of a novel formulation of essential oils on glucose-insulin metabolism in diabetic and hypertensive rats: a pilot study. *Diabetes Obes. Metab.* **2005**, 7; p. 193-199.

76. MORITA, T.; JINNO, K. and KAWAGISHI, H. Hepatoprotective effect of myristicin from nutmeg (*Myristica fragrans*) on lipopolysaccharide/d-galactosamine-induced liver injury. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51; p. 1560-1565.

77. NADERI, G.; ASGAR, S.; ANI, M.; SARRAF-ZADEGAN, N. and SAFARI, M. Effect of some volatile oils on the affinity of intact and oxidized low-density lipoproteins for adrenal cell surface receptors. *Mol. Cell. Biochem.* **2004**, 267; p. 59-66.

78. BARTER, P. The inflammation: Lipoprotein cycle. *Atherosclerosis*. **2005**, Suppl 6(2); p. 15-20.

79. BALLABENIA, V.; TOGNOLINIA, M. and CHIAVARINIA, M. Novel antiplatelet and antithrombotic activities of essential oil from *Lavandula hybrida* Reverchon 'grosso'. *Phytomedicine.* **2004**, 11; p. 596-601.

80. KENDLER, B. Garlic (*Allium sativum*) and onion (*Allium cepa*): a review of their relationship to cardiovascular disease. *Prevent Med.* **1987**, 16; p. 670-685.

81. DAHANUKAR, S. A.; KULKARNI, R. A. and REGE, N. N. Pharmacology of medicinal plants and natural products. *Indian J. Pharmacol.* **2000**, 32; p. S81-S118.

82. KUMAR, V. Potential medicinal plants for CNS disorders: an overview. *Phytother. Res.* **2006**, 20; p. 1023-1035.

83. ADAMS, M.; BERSET, C.; KESSLER, M. and HAMBURGER, M. Medicinal herbs for the treatment of rheumatic disorders - A survey of European herbals from the 16th and 17th century. *J. Ethnopharmacol.* **2009**, 121; p. 343-459.

84. ANTHONY, J.-P.; FYFE, L. and SMITH, H. Plant active components - a resource for antiparasitic agents? *Trends Parasit.* **2005**, 21(10); p. 462-468.

85. KOROCH, A.R.; JULIANI, H.R. and ZYGADLO, J.A. Bioactivity of essential oils and their components. En: Günter Berger, R. Flavours and fragrances. Chemistry, bioprocessing and sustainability. Heidelberg: Springer-Verlag, **2007**. p. 87-115.

86. NEWTON, S.; LAU, C. and WRIGHT, C.W. A review of antimycobacterial natural products. *Phytother. Res.* **2000**, 14; p. 303-322.

87. TAMURA, H. and YAMAGAMI, A. Antioxidative activity of monoacylated anthocyanins isolated from muscat bailey a grape. *J. Agric. Food Chem.* **1994**, 42(8); p. 1612-1615.

88. DELGADO ÁVILA, W.A. Evaluación de la actividad antioxidante *in vitro* de los aceites esenciales de algunas plantas de las familias Labiatae y Umbelliferae. Bucaramanga, **2002**, 87p. Trabajo de grado (Magister en Química). Universidad Industrial de Santander. Escuela de Química.

89. STASHENKO, E.E.; FERREIRA, M.C.; SEQUEDA, L.G.; MARTÍNEZ, J.R. and WONG, J.W. Comparison of extraction methods and detection systems in the gas chromatographic analysis of volatile carbonyl compounds. *J. Chromatogr. A*. **1997**, 779; p. 360-369.

90. ELLMAN, G.L.; COURTNEY, D.; ANDRES, V.; FEATHERSTONE, R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* **1961**, 7; p. 88-95.

91. KLEIN, E. and LUKEŠ, V. Study of gas-phase O-H bond dissociation enthalpies and ionization potentials of substituted phenols - Applicability of *ab initio* and DFT/B3LYP methods. *Chem. Phys.* **2006**, 330; p. 515-525.

92. AWIKA, J.M.; ROONEY, L.W.; WU, X.; PRIOR, R.L. and CISNEROS-ZEVALLOS, L. Screening methods to measure antioxidant activity of sorghum (*Sorghum bicolor*) and sorghum products. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51; p. 6657-666.

93. PRIOR, R.L.; WU, X. and SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53; p. 4290-4302.

94. HUANG, D.; OU, B.; SCHAICH, K. and PRIOR, R.L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53; p. 1841-1856.

95. SÁNCHEZ-MORENO, C. Review: methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Sci. Technol. Int.* **2002**, 8; p. 121-137.

96. ARTS, M.J.T.J.; DALLINGA, J.S.; VOSS, H.P.; HAENEN, G.R.M.M. and BAST, A. A new approach to assess the total antioxidant capacity using the TEAC assay. *Food Chem.* **2004**, 88; p. 567-570.

97. BUENGER, J.; AACKERMANN, H.; JENTZSCH, A.; MEHLING, A.; PFITZNER, K.A.; SCHROEDER, K.R. and WOLLENWEBER, U. An interlaboratory comparison of methods used to assess antioxidant potential. *Int. J. Cosmetic Sci.* **2006**, 28; p. 135-146.

98. PÉREZ-JIMÉNEZ, J. and SAURA-CALIXTO, F. Anti-oxidant capacity of dietary polyphenols determined by ABTS assay: a kinetic expression of the results. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2008**, 43; p. 185-191.

99. ARTS, M.J.T.J.; DALLINGA, J.S.; VOSS, H.P.; HAENEN, G.R.M.M. and BAST, A. A critical appraisal of the use of the antioxidant capacity (TEAC) assay in defining optimal antioxidant structures. *Food Chem.* **2003**, 80; p. 409-414.

100. KARADAG, A.; OZCELIK, B. and SANER, S. Review of methods to determine antioxidant capacities. *Food Anal. Methods.* **2009**, 2; p. 41-60.

101. MacDONALD-WICKS, L.K.; WOOD, L.G. and GARG, M.L. Methodology for the determination of biological antioxidant capacity in vitro: a review. *J. Sci. Food Agric.* **2006**, 86; p. 2046-2056.

102. STASHENKO, E.; RUÍZ, C.; MUÑOZ, A.; CASTAÑEDA, M. and MARTÍNEZ, J. Composition and antioxidant activity of essential oils of *Lippia origanoides* H.B.K. grown in Colombia. *Nat. Prod. Commun.* **2008**, 3; p. 563-566.

103. STASHENKO, E.E.; JARAMILLO, B.E. and MARTÍNEZ, J.R. Comparison of different extraction methods for the analysis of volatile secondary metabolites of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown, grown in Colombia, and evaluation of its in vitro antioxidant activity. *J. Chromatogr. A* **2004**, 1025; p. 93-103.

104. VARLAMOV, A.; KOUZNETSOV, V.; ZUBKOV, F.; CHERNYSEV, A.; SHURUPOVA, O.; VARGAS, M.L.Y.; PALMA, R.A.; RIVERO, C.J. and ROSAS-ROMERO, A.J. An improved and stereoselective route to all-*cis*-2,6-disubstituted 4-hydroxipiperidines from accessible 4-substituted 4-*N*-benzylaminobut-1-enes. *Synthesis.* **2002**, 6; p. 771-783.

105. SOOBRATTEE, M.A.; NEERGHEEN, V.S.; LUXIMON-RAMMA, A.; ARUOMA, O.I. and BAHORUN, T. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. *Mutat. Res.* **2005**, 579; p. 200-213.

106. CAMPOS, A.M. and LISSI, E.A. Kinetics of reaction between 2,2-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic) acid (ABTS) derived radical cations and phenols. *Int. J. Chem. Kinet.* **1999**, 29; p. 219-224.

107. OZGEN, M.; REESE, R.N.; TULIO, A.Z.J.; SCHEERENS, J.C. and MILLER, R. Modified 2,2-azino-bis-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) method to measure antioxidant capacity of selected small fruits and comparison to ferric reducing antioxidant power (FRAP) and 2,2´-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) methods. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, 54; p. 1151-1157.

108. BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E. and BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss. Technol.* **1995**, 28; p. 25-30.

109. ARTS, M.J.T.J.; HAENEN, G.R.M.M.; VOSS, H.P. and BAST, A. Antioxidant capacity of reaction products limits the applicability of the trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay. *Food Chem. Toxicol.* **2004**, 42; p. 45-49.

110. VAN DEN BERG, R.; KIM, Y.J.; KANG, N.J.; KIM, J.H.; LEE, S.J.; KIM, D.O.; LEE, C.Y. and LEE, H.J. Applicability of an improved trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidants capacity measurements of mixtures. *Food Chem.* **1999**, 66; p. 511-517.

111. HENNING, S.M.; NIU, Y.; LEE, N.H.; THAMES, G.D.; MINUTTI, R.R.; WAND, H.; GO, V.L.W. and HEBER, D. Bioavailability and antioxidant activity of tea flavanols after consumption of green tea, black tea, or a green tea extract supplement. *Am. J. Clin. Nutr.* **2004**, 80; p. 1558-1564.

112. SEERAM, N.P.; AVIRAM, M.; ZHANG, Y.; HENNING, S.M.; FENG, L.; DREHER, M. and HEBER, D. Comparison of antioxidant potency of commonly consumed polyphenol-rich beverages in the United States. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, 56; p. 1415-1422.

113. KAMBAYASHI, Y.; BINH, N.T.; ASAKURA, H.W.; HIBINO, Y.; HITOMI, Y.; NAKAMURA, H. and OGINO, K. Efficient assay for total antioxidant capacity in human plasma using a 96 well microplate. *J. Clin. Biochem. Nutr.* **2009**, 44; p. 46-51.

114. LEE, K.W.; KIM, Y.J.; KANG, N.J.; KIM, J.H.; LEE, S.J.; KIM, D.O.; LEE, C.Y. and LEE, H.J. Improved assay for determining the total radical-scavenging capacity of antioxidants and foods. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **2009**, 60; p. 12-20.

115. MILLER, N.J.; SAMPSON, J.; CANDEIAS, L.P.; BRAMLEY, P.M. and RICE-EVANS, C.A. Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. *FEBS Lett.* **1996**, 384; p. 240-242.

116. HENRIQUEZ, C.; ALIAGA, C. and LISSI, E. Formation and decay of the ABTS derived radical catión: a comparison of different preparation procedures. *Int. J. Chem. Kinet.* **2002**, 34; p. 659-665.

117. YU, T.W. and ONG, C.N. Lag-time measurement of antioxidant capacity using myoglobin and 2,2´-azino-*bis*(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid): rationale, application, and limitation. *Anal. Biochem.* **1999**, 275; p. 217-223.

118. KIM, D.O.; LEE, K.W.; LEE, H.J. and LEE, C.Y. Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, 50; p. 3713-3717.

119. APAK, R.; GÜÇLÜ, K.; DEMIRATA, B.; ÖZYÜREK, M.; ÇELIK, S.E.; BEKTAŞOĞLU, B.; BERKER, K.I. and ÖZYURT, D. Comparative evaluation of various

total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. *Molecules.* **2007**, 12; p. 1496-1547.

120. KORDALI, S.; KOTAN, R.; MAVI, A.; CAKIR, A.; ALA, A. and YILDIRIM, A. Determination of the chemical composition and antioxidant activity of the essential oil of *Artemisia dracunculus* and of the antifungal and antibacterial activities of turkish *Artemisia absinthium*, *Artemisia dracunculus*, *Artemisia santonicum*, and *Artemisia spicigera* essential oils. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53; p. 9452-9458.

121. POLITEO, O.; JUKIĆ, M. and MILOŠ, M. Chemical composition and antioxidant activity of essential oils of twelve spice plants. *Croat. Chem. Acta*. **2006**, 79; p. 545-552.

122. DORMAN, H.J.D.; FIGUEIREDO, A.C.; BARROSO, J.G. and DEANS, S.G. In vitro evaluation of antioxidant activity of essential oils and their components. *Flavour Fragr. J.* **2000**, 15, p. 12-16.

123. PADMASHREE, A.; ROOPA, N.; SEMWAL, A.D.; SHARMA, G.K.; AGATHIAN, G. and BAWA, A.S. Star-anise (*Illicium verum*) and black caraway (*Carum nigrum*) as natural antioxidants. *Food Chem.* **2007**, 104; p. 59-66.

124. KATALINIC, V.; MILOS, M.; KULISIC, T. and JUKIC, M. Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. *Food Chem.* **2006**, 94; p. 550-557.

125. SACCHETTI, G.; MAIETTI, S.; MUZZOLI, M.; SCAGLIANTI, M.; MANFREDINI, S.; RADICE, M. and BRUNI, R. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chem.* **2005**, 91; p. 621-632.

126. NENADIS, N.; WANG, L. F.; TSIMIDOU, M. and ZHANG, H.Y. Estimation of scavenging activity of phenolic compounds using the $ABTS^{+\bullet}$ assay. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, 52; p. 4669-4674 .

127. YANISHLIEVA, N.V.; MARINOVA, E.M.; GORDON, E.M. and RANEVA, V.G. Antioxidant activity and mechanism of action of thymol and carvacrol in two lipid systemas. *Food Chem.* **1999**, 64; p. 59-66.

128. FOTI, M.C. and INGOLD, K.U. Mechanism of inhibition of lipid peroxidation by $\gamma$-terpinene, and unusual and potentially useful hydrocarbons antioxidant. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51; p. 2758-2765.

129. RUBERTO, G. and BARATTA, M. T. Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. *Food Chem.* **2000**, 69; p. 167-174.

130. BURDOCK, G.A. Fenaroli´s handbook of flavor ingredients. Boca Raton: CRC Press, **2005**. 1943p.

131. CHEN, I.S.; CHEN, J.J. and TSAI, I.L. Alkaloids from *Hernandia sonora*. *Phytochemistry.* **1995**, 40; p. 983-986.

132. SEIDEMANN, J. World spice plants. Economic usage, botany, taxonomy. Heidelberg: Springer-Verlag, **2005**. 591p.

133. AZEEZ, S. Fennel. En: Parthasarathy, V. A.; Chempakam, B. and Zachariah, T. J. Chemistry of spices. Cambridge: CAB International, **2008**. p. 227-241.

134. LEELA, N.K. and SAPNA, V.P. Clove. En: Parthasarathy, V. A.; Chempakam, B. and Zachariah, T. J. Chemistry of spices. Cambridge: CAB International, **2008**, p. 146-164.

135. PRIYADARSINI, K.I.; GUHA, S.N. and RAO, M.N.A. Physico-chemical properties and antioxidant activities of methoxy phenols. *Free Radical Biol. Med.* **1998**, 24(6); p. 933-941.

136. BONDET, V; BRAND-WILLIAMS, W and BERSET, C. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH$^{\bullet}$ free radical method. *Lebensm. Wiss. Technol.* **1997**, 30; p. 609-615.

137. POKORNY, J. Major factors affecting the autoxidation in lipids. En: Chang, H. Autoxidation of unsaturated lipids. London: Academic Press, **1987**. p. 141-206.

138. YANISHLIEVA-MASLAROVA, N.V. Inhibiting oxidation. En: Pokorny, J.; Yanishlieva, N. and Gordon, M. Antioxidants in food. Practical applications. Boca Raton: Woodhead Publishing Ltd and CRC Press LLC, **2001**. p. 22-70.

139. OGATA, M.; HOSHI, M; URANO, S. and ENDO, T. Antioxidant activity of eugenol and related monomeric and dimeric compounds. *Chem. Pharm. Bull.* **2000**, 48(10); p. 1467-1469.

140. FUJISAWA, S.; ATSUMI, T.; MURAKAMI, Y. and KADOMA, Y. Dimerization, ROS formation, and biological activity of *o*-methoxyphenols. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* **2005**, 53; p. 28-38.

141. OGATA, M.; SHIN-YA, K; URANO, S. and ENDO, T. Antioxidant activity of propofol and related monomeric and dimeric compounds. *Chem. Pharm. Bull.* **2005**, 53(3); p. 344-346.

142. BURTON, G.W.; DOBA, T.; GABE, E.J.; HUGHES, L.; LEE, F.L.; PRASAD, L. and INGOLD, K.U. Autoxidation of biological molecules. 4. Maximizing the antioxidant activity of phenols. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, 107(24); p. 7053-7065.

143. LUCARINI, M.; PEDRIELLI, P. and PEDULLI G.F. Bond dissociation energies of O-H bonds in substituted phenols from equilibration studies. *J. Org. Chem.* **1996**, 61; p. 9259-9263.

144. WRIGHT, J.S.; JOHNSON, E.R. and DiLABIO, G.A. Predicting the activity of phenolic antioxidants: Theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123(6); p. 1173-1183.

145. LUCARINI, M.; PEDREILLI, P.; PEDULLI, G.F.; VALGIMIGLI, L.; GIGMES, D. and TORDO, P. Bond dissociation energies of the N-H bond and rate constants for the reaction with alkyl, alkoxyl, and peroxyl radicals of phenothiazines and related compounds. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121; p. 11546-11553.

146. THANH LEE, H.; FLAMMANG, R.; GERBAUX, P.; BOUCHOUX, G. and NGUYEN, M.T. Ionized phenol and its isomers in gas phase. *J. Phys. Chem. A* **2001**, 105(51); p. 11582-1192.

147. MUKHERJEE, P.K.; KUMAR, V.; MAL, M. and HOUGHTON, P.J. Acetylcholinesterase inhibitors from plants. *Phytomedicine*. **2007**, 14; p. 289-300.

148. GERTZ, H.J. and KIEFER, M. Review about Ginkgo biloba special extract EGb 761 (Ginkgo). *Curr. Pharm. Des.* **2004**, 10; p. 261-264.

149. ADAMS, M.; GMÜNDER, F. and HAMBURGER, M. Plants traditionally used in age related brain disorders - A survey of ethnobotanical literature. *J. Ethnopharmacol.* **2007**, 113; p. 363-381.

150. RECHCIGL, J.E. and RECHCIGL, N.A. Insect pest management: techniques for environmental protection. Boca Raton: CRC Press, **2000**. p. 103-131.

151. FIGUEIREDO, A.C.; BARROSO, J.G.; PEDRO, L.G.; SALGUEIRO, L.; MIGUEL, M.G. and FALEIRO, M.L. Portuguese *Thymbra* and *Thymus* species volatiles: chemical composition. *Curr. Pharmac. Des.* **2008**, 14; p. 3120-3140.

152. MATA, A.T.; PROENÇA, C.; FERRERIA, A.R.; SERRALHEIRO, M.L.M.; NOGUEIRA, J.M.F. and ARAUJO, M.E.M. Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of five plants used as Portuguese food spices. *Food Chem.* **2007**, 103; p. 778-786.

153. JUKIĆ, M. POLITEO, O.; MAKSIMOVIĆ, M.; MILOŠ, M. and MILOŠ, M. *In vitro* acetylcholinesterase inhibitory properties of thymol, carvacrol and their derivatives thymoquinone and thymohydroquinone. *Phytoth. Res.* **2007**, 21(3); p. 259-261.

154. DOHI, S.; TERASAKI, M. and MAKINO, M. Acetylcholinesterase inhibitory activity and chemical composition of commercial essential oils. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, 57(10); p. 4313-4318.

155. MIYAZAWA, M.; WATANABE, H.; UMEMOTO, K. and KAMEOKA, H. Inhibition of acetylcholinesterase activity by essential oils of *Mentha* species. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, 46(9); p. 3431-3434.

156. MIYAZAWA, M. and YAMAFUJI, C. Inhibition of acetylcholinesterase activity by bicyclic monoterpenoids. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53(5); p. 1765-1768.

157. PERRY, N.S.L.; BOLLEN, C.; PERRY, E.K. and BALLARD, C. *Salvia* for dementia therapy: review of pharmacological activity and pilot tolerability clinical trial. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **2003**, 75; p. 651-659.

158. _____. In vitro inhibition of human erythrocyte acetylcholinesterase by *Salvia lavandulaefolia* essential oil and constituent terpenes. *J. Pharm. Pharmacol.* **2000**, 52; p. 895-902.

159. BARBOSA FILHO, J.M.; MEDEIROS, K.C.P.; DINIZ, M.F.F.M.; BATISTA, L.M.; ATHAYDE-FILHO, P.F.; SILVA, M.S.; DA-CUNHA, E.V.L.; SILVA ALMEIDA, J.R.G. and QUINTANS-JUNIOR, L.J. Natural products inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase. *Braz. J. Pharmacogn*. **2006**, 16(2); p. 258-285.

160. SAVELEV, S.U.; OKELLO, E.J. and PERRY, E.K. Butyryl- and acetyl-cholinesterase inhibitory activities in essential oils of *Salvia* species and their constituents. *Phytoth. Res.* **2004**, 18; p. 315-324.

161. ŞENOL, F.S.; ORHAN, I.; CELEP, F.; KAHRAMAN, A.; DOĞAN, M.; YILMAZ, G. and ŞENER, B. Survey of 55 turkish *Salvia* taxa for their acetylcholinesterase inhibitory and antioxidant activities. *Food Chem.* **2010**, 120(1); p. 34-43.

162. HOWES, M.J. and HOUGHTON, P.J. Plants used in chinese and indian traditional medicine for improvement of memory and cognitive function. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **2003**, 75; p. 513-527.

163. ESCOBAR, A. Final report on the safety assessment sodium *p*-chloro-*m*-cresol, *p*-chloro-*m*-cresol, chlorothymol, mixed cresols, *m*-cresol, *o*-cresol, *p*-cresol, isopropyl cresols, thymol, *o*-cymen-5-ol, and carvacrol. *Internat. J. Toxicol.* **2006**, 25(Suppl. 1); p. 29-127.

164. CHUNG, S.-K.; RYOO, C.H. and YAND, H.W. Synthesis and bioactivities of steroid derivatives as antifungal agents. *Tetrahedron.* **1998**, 54; p. 15899-15914.

165. DE LIMA, H.; CARRERO, J.; RODRÍGUEZ, A.; GUGLIELMO, Z. y RODRÍGUEZ, N. *Trypanosomatidae* de importancia en salud pública en animales silvestres y sinantrópicos en un área rural del municipio Tovar del Estado Mérida, Venezuela. *Biomédica.* **2006**, 26; p. 42-50.

## RECOMENDACIONES

Determinar la producción por kg/ha/año de todos los AE estudiados. Aunque hay reportes de literatura se debe llevar a las condiciones colombianas.

Aislar algunas de las sustancias encontradas (*e.g.*, cumarinas) de interés biológico, mediante SFE en modo dinámico, para aumentar la calidad y eficiencia de su extracción y poder llevarlo a escala industrial. Además, evaluar sus actividades biológicas.

Ampliar la serie de compuestos, mediante la reacción de metalilación y RCM para obtener compuestos análogos de radulanina y aplicar la ruta sintética a otros aceites esenciales que contengan fenoles y que puedan emplearse para la síntesis de benzoxepinas.

Realizar otros ensayos de actividad antioxidante que involucren ROS (*e.g.*, TRAP, ORAC, etc.) y comparar con los ensayos de $ABTS^{+\bullet}$ microescalado. Adicionalmente, aplicar este ensayo a un mayor grupo de moléculas con diversidad estructural.

Determinar los potenciales de ionización experimentales para las moléculas sintéticas y correlacionarlos con los valores teóricos de IP junto con los valores de TEAC; de esta forma se podrá comprender o verificar el mecanismo por el cual el método ABTS mide la capacidad antioxidante en el sistema evaluado.

Realizar el estudio completo de actividades biológicas (*e.g.*, antifúngico, antiparasitario y citotoxicidad) a todas las moléculas sintétizadas y AE.

# ANEXOS

## ANEXO 1



*Lippia micromera* Schauer (COL 519797)



*Ocimum sp* 2 (COL 512280)



*Plectrantus amboinicus* (Lour.) Spreng (COL 523701)



*Ocimum americanum* (COL 519795)



*Satureja brownei (Sw.) Briqn* (COL 519796)



*Ocimum basilicum* (COL 526759)



*Tagetes lucida* (COL 512074)



*Lippia origanoides* (COL 512270)



*Illicium verum*



*Origanum majorana*



*Foeniculum vulgare*



*Tagetes filifolia*



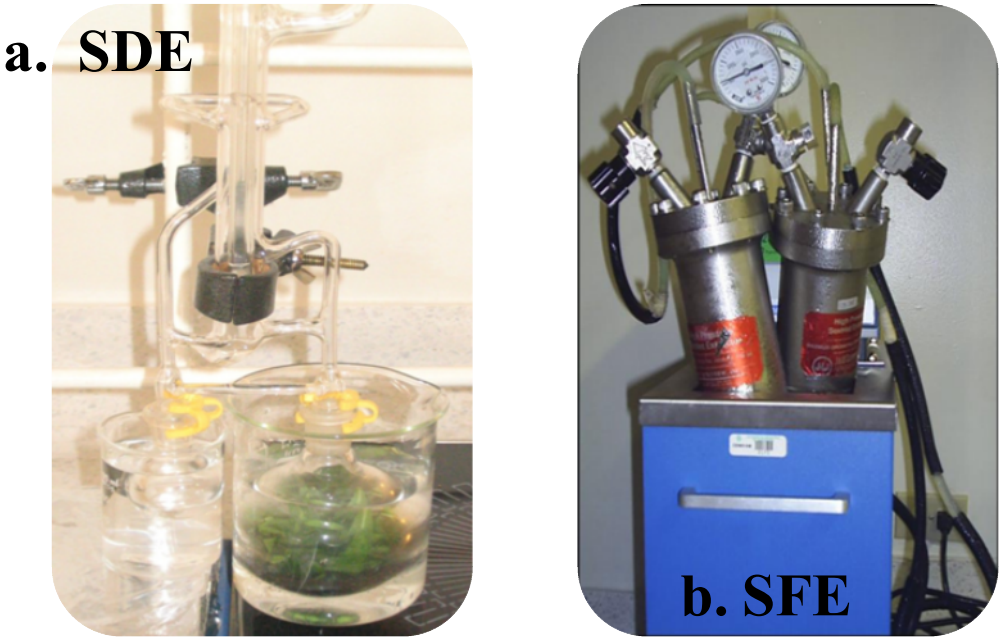
*Thymus vulgaris*



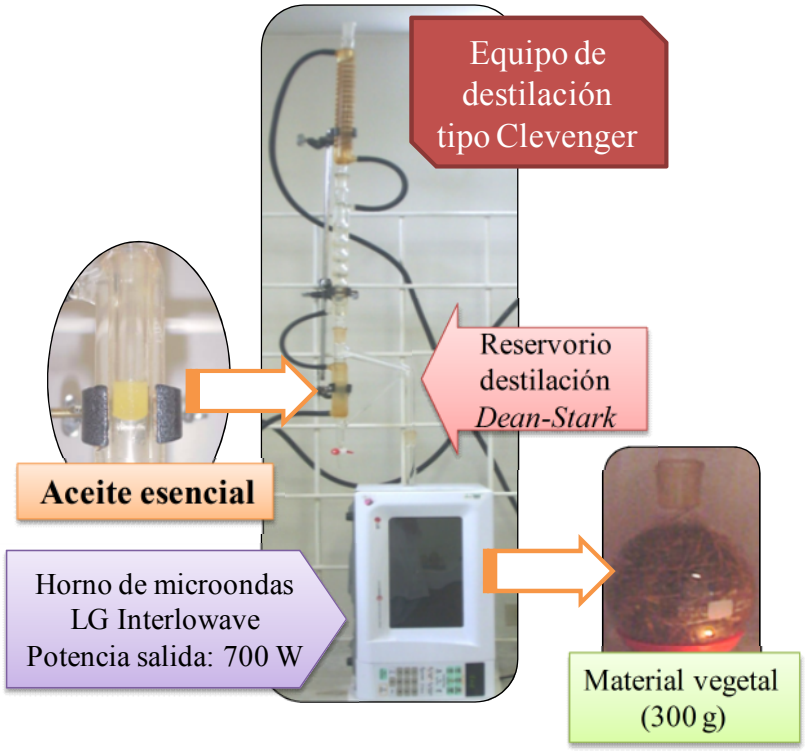
*Artemisia dracunculus*

Fotografías de algunas de las especies vegetales cultivadas en el complejo agroindustrial CENIVAM o adquiridas del mercado local

## ANEXO 2




Montajes empleados para la obtención de los extractos de las plantas por (a). destilación-extracción simultánea con solvente y (b). extracción con fluido supercrítico.




Montaje de hidrodestilación empleado para la obtención de los aceites esenciales, con calentamiento de la radiación de micro-ondas

## ANEXO 3

Aporte de las variables (compuestos químicos) a los Factores 1 y 2 del análisis PCA

| Variables | Factor 1 | Factor 2 |
|---|---|---|
| *trans*-3-Hexen-1-ol | 0.000049 | 0.084974 |
| 1-Octen-3-ol + β-Pineno | 0.001040 | 0.069576 |
| b-Mirceno | 0.000388 | 0.101094 |
| Eucaliptol | 0.006274 | 0.103308 |
| trans-β-Ocimeno | 0.000499 | 0.040659 |
| Fenchona | 0.000194 | 0.052318 |
| Linalol | 0.052301 | 0.016325 |
| Alcanfor | 0.000373 | 0.008410 |
| Fotocitral A | 0.065666 | 0.007893 |
| N.I. ($C_{10}H_{16}O$) | 0.036044 | 0.002678 |
| Verbenol | 0.036044 | 0.002678 |
| α-Terpineol | 0.012840 | 0.030381 |
| Estragol | 0.000802 | 0.004973 |
| Nerol | 0.049631 | 0.010926 |
| Neral | 0.064458 | 0.007612 |
| Geraniol | 0.053510 | 0.010970 |
| Geranial | 0.063203 | 0.007330 |
| Acetato de bornilo | 0.003368 | 0.002456 |
| cis-Cinamato de metilo | 0.000019 | 0.000925 |
| Acetato de nerilo | 0.072101 | 0.012224 |
| Eugenol | 0.006436 | 0.034546 |
| β-Bourboneno + β-Elemeno | 0.027744 | 0.034624 |
| trans-Cinamato de metilo | 0.000005 | 0.000025 |
| trans-β-Cariofileno | 0.049943 | 0.011463 |
| trans-α-Bergamoteno | 0.001096 | 0.011285 |
| α-Guaieno | 0.027636 | 0.057701 |
| trans-β-Farneseno | 0.002416 | 0.003623 |
| α-Humuleno | 0.001704 | 0.042551 |
| Germacreno D | 0.022968 | 0.076512 |
| Biciclogermacreno | 0.066522 | 0.000719 |
| α-Bulneseno | 0.034149 | 0.052098 |
| γ-Cadineno + δ-Cadineno | 0.052564 | 0.005035 |
| β-Sesquifelandreno + *trans*-Calameneno | 0.002076 | 0.011751 |
| trans-α-Bisaboleno | 0.063485 | 0.012116 |
| 1,10-*di-epi*-Cubenol | 0.023607 | 0.012710 |
| t-Cadinol | 0.047229 | 0.009059 |
| α-Muurolol + β-Eudesmol | 0.017600 | 0.037554 |
| Farnesol | 0.034017 | 0.008918 |

## ANEXO 4

## COORDENADAS GEOMÉTRICAS OPTIMIZADAS DE ALGUNAS MOLÉCULAS Y VALORES DE ENERGÍAS OBTENIDOS A TRAVÉS DE CÁLCULOS COMPUTACIONALES

6-Formilo-9-metoxi-2,5-dihidro-1-benzoxepina
Symbolic Z-matrix:
Charge = 0 Multiplicity = 1

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| C | | | | | | | |
| C | 1 | B1 | | | | | |
| C | 2 | B2 | 1 | A1 | | | |
| C | 3 | B3 | 2 | A2 | 1 | D1 | 0 |
| C | 4 | B4 | 3 | A3 | 2 | D2 | 0 |
| C | 1 | B5 | 2 | A4 | 3 | D3 | 0 |
| C | 4 | B6 | 3 | A5 | 2 | D4 | 0 |
| C | 7 | B7 | 4 | A6 | 3 | D5 | 0 |
| C | 8 | B8 | 7 | A7 | 4 | D6 | 0 |
| C | 9 | B9 | 8 | A8 | 7 | D7 | 0 |
| C | 6 | B10 | 1 | A9 | 2 | D8 | 0 |
| C | 3 | B11 | 2 | A10 | 1 | D9 | 0 |
| H | 1 | B12 | 2 | A11 | 3 | D10 | 0 |
| H | 2 | B13 | 1 | A12 | 6 | D11 | 0 |
| H | 7 | B14 | 4 | A13 | 3 | D12 | 0 |
| H | 7 | B15 | 4 | A14 | 3 | D13 | 0 |
| H | 8 | B16 | 7 | A15 | 4 | D14 | 0 |
| H | 9 | B17 | 8 | A16 | 7 | D15 | 0 |
| H | 10 | B18 | 9 | A17 | 8 | D16 | 0 |
| H | 10 | B19 | 9 | A18 | 8 | D17 | 0 |
| H | 11 | B20 | 6 | A19 | 1 | D18 | 0 |
| H | 12 | B21 | 3 | A20 | 2 | D19 | 0 |
| H | 12 | B22 | 3 | A21 | 2 | D20 | 0 |
| H | 12 | B23 | 3 | A22 | 2 | D21 | 0 |
| O | 4 | B24 | 3 | A23 | 2 | D22 | 0 |
| O | 11 | B25 | 6 | A24 | 1 | D23 | 0 |
| O | 3 | B26 | 2 | A25 | 1 | D24 | 0 |

VALORES DE ENERGIA

| | |
|---|---|
| Zero-point correction= | 0.215203 (Hartree/Particle) |
| Thermal correction to Energy= | 0.228453 |
| Thermal correction to Enthalpy= | 0.229397 |
| Thermal correction to Gibbs Free Energy= | 0.175352 |
| Sum of electronic and zero-point Energies= | -690.090750 |
| Sum of electronic and thermal Energies= | -690.077500 |
| Sum of electronic and thermal Enthalpies= | -690.076556 |
| Sum of electronic and thermal Free Energies= | -690.130601 |

6-Formilo-9-metoxi-2,5-dihidro-1-benzoxepina catión-radical

Symbolic Z-matrix:
Charge = 1 Multiplicity = 2

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| C | | | | | | | |
| C | 1 | B1 | | | | | |
| C | 2 | B2 | 1 | A1 | | | |
| C | 3 | B3 | 2 | A2 | 1 | D1 | 0 |
| C | 4 | B4 | 3 | A3 | 2 | D2 | 0 |
| C | 1 | B5 | 2 | A4 | 3 | D3 | 0 |
| C | 4 | B6 | 3 | A5 | 2 | D4 | 0 |
| C | 7 | B7 | 4 | A6 | 3 | D5 | 0 |
| C | 8 | B8 | 7 | A7 | 4 | D6 | 0 |
| C | 9 | B9 | 8 | A8 | 7 | D7 | 0 |
| C | 6 | B10 | 1 | A9 | 2 | D8 | 0 |
| C | 3 | B11 | 2 | A10 | 1 | D9 | 0 |
| H | 1 | B12 | 2 | A11 | 3 | D10 | 0 |
| H | 2 | B13 | 1 | A12 | 6 | D11 | 0 |
| H | 7 | B14 | 4 | A13 | 3 | D12 | 0 |
| H | 7 | B15 | 4 | A14 | 3 | D13 | 0 |
| H | 8 | B16 | 7 | A15 | 4 | D14 | 0 |
| H | 9 | B17 | 8 | A16 | 7 | D15 | 0 |
| H | 10 | B18 | 9 | A17 | 8 | D16 | 0 |
| H | 10 | B19 | 9 | A18 | 8 | D17 | 0 |
| H | 11 | B20 | 6 | A19 | 1 | D18 | 0 |
| H | 12 | B21 | 3 | A20 | 2 | D19 | 0 |
| H | 12 | B22 | 3 | A21 | 2 | D20 | 0 |
| H | 12 | B23 | 3 | A22 | 2 | D21 | 0 |
| O | 4 | B24 | 3 | A23 | 2 | D22 | 0 |
| O | 11 | B25 | 6 | A24 | 1 | D23 | 0 |
| O | 3 | B26 | 2 | A25 | 1 | D24 | 0 |

VALORES DE ENERGIA

| | |
|---|---|
| Zero-point correction= | 0.215293 (Hartree/Particle) |
| Thermal correction to Energy= | 0.228806 |
| Thermal correction to Enthalpy= | 0.229750 |
| Thermal correction to Gibbs Free Energy= | 0.174274 |
| Sum of electronic and zero-point Energies= | -689.807528 |
| Sum of electronic and thermal Energies= | -689.794016 |
| Sum of electronic and thermal Enthalpies= | -689.793071 |
| Sum of electronic and thermal Free Energies= | -689.848548 |

Acrilato de 2-alil-4-formil fenilo
Symbolic Z-matrix:
Charge = 0 Multiplicity = 1

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| C | | | | | | | |
| C | 1 | B1 | | | | | |
| C | 2 | B2 | 1 | A1 | | | |
| C | 3 | B3 | 2 | A2 | 1 | D1 | 0 |
| C | 4 | B4 | 3 | A3 | 2 | D2 | 0 |
| C | 5 | B5 | 4 | A4 | 3 | D3 | 0 |
| C | 1 | B6 | 6 | A5 | 5 | D4 | 0 |
| C | 4 | B7 | 3 | A6 | 2 | D5 | 0 |
| C | 8 | B8 | 4 | A7 | 3 | D6 | 0 |
| C | 9 | B9 | 8 | A8 | 4 | D7 | 0 |
| C | 5 | B10 | 4 | A9 | 3 | D8 | 0 |
| C | 11 | B11 | 5 | A10 | 4 | D9 | 0 |
| C | 12 | B12 | 11 | A11 | 5 | D10 | 0 |
| H | 2 | B13 | 1 | A12 | 6 | D11 | 0 |
| H | 3 | B14 | 2 | A13 | 1 | D12 | 0 |
| H | 6 | B15 | 5 | A14 | 4 | D13 | 0 |
| H | 7 | B16 | 1 | A15 | 6 | D14 | 0 |
| H | 9 | B17 | 8 | A16 | 4 | D15 | 0 |
| H | 10 | B18 | 9 | A17 | 8 | D16 | 0 |
| H | 10 | B19 | 9 | A18 | 8 | D17 | 0 |
| H | 11 | B20 | 5 | A19 | 4 | D18 | 0 |
| H | 11 | B21 | 5 | A20 | 4 | D19 | 0 |
| H | 12 | B22 | 11 | A21 | 5 | D20 | 0 |
| H | 13 | B23 | 12 | A22 | 11 | D21 | 0 |
| H | 13 | B24 | 12 | A23 | 11 | D22 | 0 |
| O | 7 | B25 | 1 | A24 | 6 | D23 | 0 |
| O | 8 | B26 | 4 | A25 | 3 | D24 | 0 |
| O | 8 | B27 | 4 | A26 | 3 | D25 | 0 |

VALORES DE ENERGIAS

| | |
|---|---|
| Zero-point correction= | 0.215193 (Hartree/Particle) |
| Thermal correction to Energy= | 0.231096 |
| Thermal correction to Enthalpy= | 0.232041 |
| Thermal correction to Gibbs Free Energy= | 0.169102 |
| Sum of electronic and zero-point Energies= | -727.913592 |
| Sum of electronic and thermal Energies= | -727.897688 |
| Sum of electronic and thermal Enthalpies= | -727.896744 |
| Sum of electronic and thermal Free Energies= | -727.959683 |

Acrilato de 2-alil-4-formil fenilo catión-radical

Symbolic Z-matrix:
Charge = 1 Multiplicity = 2

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| C | | | | | | | |
| C | 1 | B1 | | | | | |
| C | 2 | B2 | 1 | A1 | | | |
| C | 3 | B3 | 2 | A2 | 1 | D1 | 0 |
| C | 4 | B4 | 3 | A3 | 2 | D2 | 0 |
| C | 5 | B5 | 4 | A4 | 3 | D3 | 0 |
| C | 1 | B6 | 6 | A5 | 5 | D4 | 0 |
| C | 4 | B7 | 3 | A6 | 2 | D5 | 0 |
| C | 8 | B8 | 4 | A7 | 3 | D6 | 0 |
| C | 9 | B9 | 8 | A8 | 4 | D7 | 0 |
| C | 5 | B10 | 4 | A9 | 3 | D8 | 0 |
| C | 11 | B11 | 5 | A10 | 4 | D9 | 0 |
| C | 12 | B12 | 11 | A11 | 5 | D10 | 0 |
| H | 2 | B13 | 1 | A12 | 6 | D11 | 0 |
| H | 3 | B14 | 2 | A13 | 1 | D12 | 0 |
| H | 6 | B15 | 5 | A14 | 4 | D13 | 0 |
| H | 7 | B16 | 1 | A15 | 6 | D14 | 0 |
| H | 9 | B17 | 8 | A16 | 4 | D15 | 0 |
| H | 10 | B18 | 9 | A17 | 8 | D16 | 0 |
| H | 10 | B19 | 9 | A18 | 8 | D17 | 0 |
| H | 11 | B20 | 5 | A19 | 4 | D18 | 0 |
| H | 11 | B21 | 5 | A20 | 4 | D19 | 0 |
| H | 12 | B22 | 11 | A21 | 5 | D20 | 0 |
| H | 13 | B23 | 12 | A22 | 11 | D21 | 0 |
| H | 13 | B2 | 12 | A23 | 11 | D22 | 0 |
| O | 7 | B25 | 1 | A24 | 6 | D23 | 0 |
| O | 8 | B26 | 4 | A25 | 3 | D24 | 0 |
| O | 8 | B27 | 4 | A26 | 3 | D25 | 0 |

Zero-point correction= 0.206527 (Hartree/Particle)
Thermal correction to Energy= 0.220281
Thermal correction to Enthalpy= 0.221225
Thermal correction to Gibbs Free Energy= 0.163447
Sum of electronic and zero-point Energies= -614.577415
Sum of electronic and thermal Energies= -614.563661
Sum of electronic and thermal Enthalpies= -614.562717
Sum of electronic and thermal Free Energies= -614.620495