



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
Unidad Xochimilco

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS
LICENCIATURA EN QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA

**SÍNTESIS BIOCATALÍTICA Y DERIVATIZACIÓN DEL
DEHIDRODIISOEUGENOL: UN COMPUESTO CON EFECTO ANTIALODINICO**

PERTENECIENTE AL PROYECTO GENÉRICO

“BIOTRANSFORMACIONES. DESARROLLO DE MÉTODOS BIOCATALÍTICOS DE
SÍNTESIS Y PREPARACIÓN DE COMPUESTOS ORGÁNICOS BIOLÓGICAMENTE
ACTIVOS”

REPORTE DE SERVICIO SOCIAL EQUIVALENTE A TESIS

PRESENTA EL ALUMNO
DOMÍNGUEZ HERNÁNDEZ KEVIN
MATRICULA: 2202029134

ASESOR INTERNO: DRA. LILIANA HERNÁNDEZ VÁZQUEZ - 27790

ASESOR INTERNO: DRA. BEATRIZ GODÍNEZ CHAPARRO - 36337

LUGAR DE REALIZACIÓN: LABORATORIO DE BIOCATÁLISIS APLICADA (N-
304), UAM-XOCHIMILCO

FECHA DE INICIO: 01/09/2023

FECHA DE TÉRMINO: 01/03/2024

CIUDAD DE MÉXICO ~ SEPTIEMBRE 2024



LUGAR DE REALIZACIÓN

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Biocatálisis aplicada N-304, tercer piso del Departamento de Sistemas Biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana - Unidad Xochimilco, Calzada del Hueso 1100, Coapa, Villa Quietud, Coyoacán, 04960 Ciudad de México, CDMX.

DIFUSIÓN

Parte de los resultados se presentaron en la 9° Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales con el trabajo titulado “Síntesis biocatalítica y derivatización del dehidrodiisoeugenol: Un compuesto con efecto antialodínico” celebrado en Acapantzingo, Cuernavaca, Morelos.

Así como en la 10° Reunión de Resonancia Magnética Nuclear Experimental con el trabajo titulado “Síntesis de (\pm)-Dehidrodiisoeugenol y de dos derivados” celebrado en Ciudad Universitaria UNAM, Coyoacán, Ciudad de México.

AGRADECIMIENTOS

◇ Universidad Autónoma Metropolitana – Unidad Xochimilco

Por brindarme el conocimiento y las herramientas esenciales para mi formación como químico en los ámbitos académicos, sociales y profesionales durante mi periodo de estudio.

Al financiamiento otorgado en la Categoría Apoyo a Proyectos a Proyectos Terminales, folio DT20 de la Convocatoria para el Desarrollo Académico 2024.

◇ Laboratorio de Biocatálisis Aplicada, laboratorio de Biotransformaciones y laboratorio de RMN

Por permitirme adquirir nuevos conocimientos y demostrar los previamente adquiridos, por concluir satisfactoriamente mi servicio social.

◇ Universidad Autónoma Metropolitana – Unidad Iztapalapa

Por el apoyo brindado en la dilucidación de los espectros de Resonancia magnética nuclear ^1H – ^{13}C y espectroscopía de infrarrojo.

A la *Dra. Liliana Hernández Vázquez y Dra. Beatriz Godínez Chaparro*, por todo el conocimiento aprendido a través de este tiempo, su guía, su confianza, sus consejos para mejorar como estudiante y profesionista, sobre todo, por todo el apoyo que me han brindado.

A los *Doctoras, doctores y compañeros del laboratorio*, por alentarme en seguir mi camino en la ciencia y brindarme sus consejos.

A mis amigos *Ángel Gabriel Romero, Eugenio Reyes, Ethan Gojanname Morales, Jorge Parra, Carlos Limón, Michel Gómez, Pedro Salim, Karla Mejía, Salvador Galindo, Moisés Gutiérrez, Alejandro Hernández, Gabriela Mancilla* por ser parte de mi formación académica, por sus palabras de apoyo, su cariño-amistad incondicional y por los gratos momentos a su lado.

A *mi familia*, por el apoyo recibido, la confianza brindada aun en los momentos difíciles y en especial por su amor, para el cual no existen palabras que expresen lo que ha significado en el transcurso de mi carrera universitaria.

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| ANTECEDENTES | 2 |
| PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN | 16 |
| OBJETIVO GENERAL | 16 |
| OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 16 |
| MÉTODOS Y ACTIVIDADES REALIZADAS | 17 |
| RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS | 38 |
| CONCLUSIÓN | 80 |
| REFERENCIAS | 82 |
| ANEXOS | 87 |

ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS, SÍMBOLOS Y FÓRMULAS

| | |
|--|--|
| (±)-DHIE (±)-Dehidrodiisoeugenol | MeOH – Metanol |
| HRP II – Peroxidasa de rábano picante II o Horseradish Peroxidase II | EtOH – Etanol |
| μM – micromolar | AcOEt – Acetato de etilo |
| M – molar | CH_2Cl_2 – Diclorometano |
| s – segundos | Na_2SO_4 – Sulfato de sodio anhidro |
| min – minutos | NH_4Cl – Cloruro de amonio |
| h – horas | FeCl_3 – Cloruro de hierro III |
| g – gramos | Ag_2O – Óxido de plata |
| mg – miligramos | H_2O_2 - Peróxido de hidrógeno |
| μg – microgramos | O_2 - Oxígeno molecular |
| mL – mililitros | N_2 – Nitrógeno molecular |
| μL – microlitros | APHB – Ácido para hidroxibenzoico |
| $^\circ\text{C}$ – Centígrados | mCPBA – Ácido meta-cloroperbenzoico |
| % - por ciento de | NADPH - Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato |
| cm – centímetros | RMN ^1H - Resonancia magnética nuclear de protón |
| nm - nanómetro | RMN ^{13}C – Resonancia magnética nuclear de carbono 13 |
| U/mg - unidades por miligramo | IR – Espectroscopía de infrarrojo |
| $\mu\text{g}/\text{mL}$ – microgramo por mililitro | UV/Vis – Espectroscopía UV-Visible |
| rpm – revoluciones por minuto | HPLC - High Performance Liquid Chromatography |
| ppm – partes por millón | CCF – Cromatografía de capa fina |

ÍNDICE DE FIGURAS

- Fig 1. Molécula de (\pm)-Dehidroisoeugenol
- Fig 2. Síntesis y obtención de (\pm)-DHIE mediante dimerización oxidativa del isoeugenol
- Fig 3. Mecanismo de acción propuesto de (\pm)-DHIE
- Fig 3.1 Estructura proteica de la peroxidasa de rábano picante
- Fig 4. Mecanismo de acción propuesto de la epoxidación del (\pm)-DHIE
- Fig 5. Reacción de oxidación del (\pm)-DHIE
- Fig 6. Mecanismo de reacción de acetilación del ácido-p-hidroxibenzoico (APHB)
- Fig 7. Mecanismo de reacción de halogenación del ácido-p-hidroxibenzoico acetilado
- Fig 8. Mecanismo de reacción de esterificación del (\pm)-DHIE
- Fig 9. Reacción de la transgalactosilación enzimática de la salicina. E: β -galactosidasa, Lac: Lactosa, Glc: Glucosa, Gal: Galactosa, E Gal: complejo enzima-galactosa
- Fig 10. Esquema de la síntesis biocatalítica de (\pm)-DHIE usando Peroxidasa de rábano picante tipo II
- Fig 11. Esquema de la síntesis biocatalítica de (\pm)-DHIE usando peroxidasa de brócoli
- Fig 12. Esquema de la síntesis de las derivatizaciones de (\pm)-DHIE por reacciones de cadena lateral
- Fig 13. Esquema de la síntesis de las derivatizaciones de (\pm)-DHIE por reacciones de cadena lateral
- Fig 14. Síntesis biocatalítica de (\pm)-DHIE con Peroxidasa de rábano picante II
- Fig 15. Cromatoplas de las 7 repeticiones, repetición 1 (licarina (L), producto obtenido (P)), repetición 2 (licarina (L), producto obtenido (P)), repetición 3 (licarina (L), producto obtenido (P)), repetición 4 (licarina (L), producto obtenido (P)), repetición 5 (licarina (L), producto obtenido (P)), repetición 6 (licarina (L), producto obtenido (P)), repetición 6 (Isoeugenol (E), producto obtenido (P)), repetición 7 (licarina (L), producto obtenido (P)).
- Fig 16. Cromatoplas de las distintas fracciones recolectadas de la purificación de repeticiones 1 a 5, (I)= Isoeugenol, (L)=Licarina A.
- Fig 17. Cromatoplas de las fracciones recolectadas de la purificación de repeticiones 6 y 7, (I)= Isoeugenol, (L)=Licarina A.
- Fig 18. Purificación del producto crudo de (\pm)-DHIE mediante recristalización por MeOH de las repeticiones 2 y 3 posteriores
- Fig 19 – 19.1. Espectros de ^1H RMN con CDCl_3 de los cristales puros de la síntesis de (\pm)-DHIE
- Fig 20. Estructura del (\pm)-DHIE
- Fig 21. Síntesis biocatalítica de (\pm)-DHIE con peroxidasa de brócoli
- Fig 22. Cromatoplas de (\pm)-DHIE con peroxidasa de brócoli contra (\pm)-DHIE con HRP II
- Fig 23. Reacción de epoxidación de (\pm)-DHIE
- Fig 24. Cromatoplas de las fracciones 1 a 40 de la purificación de epoxidación de (\pm)-DHIE

Fig 25. Cromatopla de distintas fracciones de la purificación de epoxidación de (±)-DHIE, LI y LII=Producto antes de purificar, I=Fracciones 1-39 reunidas, II=Fracciones 40-60 reunidas, fracciones 36 a 60.

Fig 26 – 27. Espectros de ¹H RMN con CDCl₃ de (±)-Licarinediol A

Fig 28. Estructura del (±)-Licarinediol A

Fig 29. Reacción de oxidación de (±)-DHIE

Fig 30. Seguimiento de la reacción de oxidación de (±)-DHIE a través del tiempo mediante CCF

Fig 31. Cromatopla de las fracciones 1 a 20 de la purificación del crudo de oxidación de (±)-DHIE, PC (Producto crudo)

Fig 32 – 32.1. Espectros de ¹H RMN con CDCl₃ del producto de oxidación de (±)-DHIE

Fig 33. Estructura del producto de oxidación de (±)-DHIE

Fig 34 – 34.1. Espectros de ¹³C RMN con CDCl₃ del producto de oxidación de (±)-DHIE

Fig 35. Estructura del producto de oxidación de (±)-DHIE

Fig 36. Reacción de esterificación de (±)-DHIE y reacción de acetilación del APHB (A)

Fig 37. Cromatopla de capa fina de la esterificación del (±)-DHIE

Fig 38 – 38.1. Espectros de ¹H RMN con CDCl₃ de la esterificación del (±)-DHIE

Fig 39. Estructura del producto de la esterificación del (±)-DHIE

Fig 40, 40.1 y 40.2. Cromatograma de la muestra de metanol (A), muestra 1(B) y muestra 7 (C) con un gradiente de Metanol/Agua (90:10 v/v)

Fig 41, 41.1 y 41.2. Cromatograma de la muestra de 3 (A), muestra 6 (B) y muestra 7 (C) con un gradiente de Agua/CH₃CN (40:60 v/v).

Fig 42. Espectro de ¹H RMN con CDCl₃ de los cristales puros de la síntesis de (±)-DHIE

Fig 43. Espectro de ¹H RMN con CDCl₃ de (±)-Licarinediol A

Fig 44. Espectros de ¹H RMN con CDCl₃ del producto de oxidación de (±)-DHIE

Fig 45. Espectros de ¹³C RMN con CDCl₃ del producto de oxidación de (±)-DHIE

Fig 46. Espectros de ¹H RMN con CDCl₃ de la esterificación del (±)-DHIE

Fig 47. Reporte del cromatograma de la muestra de MeOH

Fig 48. Reporte del cromatograma de la muestra de 1

Fig 49. Reporte del cromatograma de la muestra de 7

Fig 50. Reporte del cromatograma de la muestra de 3

Fig 51. Reporte del cromatograma de la muestra de 6

Fig 52. Reporte del cromatograma de la muestra de 7

Gráfica 1. Absorbancias en función de la concentración de la curva patrón de ASB

ÍNDICE DE TABLAS

- Tabla 1. Cantidades sometidas en la reacción de (\pm)-DHIE con HRP II
- Tabla 2. Alícuotas tomadas para la curva de calibración
- Tabla 2.1. Alícuotas tomadas de la muestra problema para su cuantificación de proteínas
- Tabla 3. Características de repeticiones realizadas para el derivado 2 del (\pm)-DHIE
- Tabla 4. Características de la fase móvil en la cromatografía de columna
- Tabla 5. Pruebas de reacción de transgalactosilación
- Tabla 5.1. Gradiente de los disolventes a través del tiempo
- Tabla 6. Gradiente ajustado de los disolventes a través del tiempo
- Tabla 7. Peso y rendimiento de las primeras 7 reacciones del crudo de (\pm)-DHIE
- Tabla 8. Características de las primeras 7 repeticiones
- Tabla 9. mL utilizados de los eluyentes de polaridad creciente en la cromatografía de columna
- Tabla 10. Peso obtenido y rendimiento de las 2 repeticiones posteriores
- Tabla 11. Desplazamientos en el espectro de ^1H RMN de los cristales puros de la síntesis de (\pm)-DHIE
- Tabla 12. Peso obtenido y rendimiento de las 2 repeticiones posteriores
- Tabla 13. Absorbancias y concentración de proteína de la curva patrón de ASB
- Tabla 14. Absorbancias y concentración de proteína del extracto de Brassica oleracea
- Tabla 15. Peso y rendimiento de las 3 repeticiones de la reacción de epoxidación de (\pm)-DHIE
- Tabla 16. Características de las 3 repeticiones de la reacción de epoxidación de (\pm)-DHIE
- Tabla 17. mL utilizados de los eluyentes en la cromatografía de columna
- Tabla 18. Desplazamientos en el espectro de ^1H RMN de los cristales puros de la síntesis de (\pm)-DHIE
- Tabla 19. Peso y rendimiento de las 4 repeticiones de la reacción de oxidación de (\pm)-DHIE
- Tabla 20. Características de repeticiones realizadas para el derivado 2 del (\pm)-DHIE
- Tabla 21. Desplazamientos en el espectro de ^1H RMN de los cristales puros de la síntesis de oxidación de (\pm)-DHIE
- Tabla 22. Desplazamientos en el espectro de ^{13}C RMN de los cristales puros de la síntesis de oxidación de (\pm)-DHIE
- Tabla 23. Peso y rendimiento de las 2 repeticiones de la reacción de esterificación del (\pm)-DHIE
- Tabla 24. Características de repeticiones de la reacción de esterificación del (\pm)-DHIE
- Tabla 25. Desplazamientos en el espectro de ^1H RMN del producto de esterificación del (\pm)-DHIE
- Tabla 26. Reporte del cromatograma de la muestra 3 con gradiente Agua/ CH_3CN (40:60 v/v)
- Tabla 27. Reporte del cromatograma de la muestra 6 con gradiente Agua/ CH_3CN (40:60 v/v)
- Tabla 28. Reporte del cromatograma de la muestra 7 con gradiente Agua/ CH_3CN (40:60 v/v)

INTRODUCCIÓN

En los últimos años, se ha incrementado el interés de la industria farmacéutica y de la investigación química en el campo de la biocatálisis (Woodley, 2019). Aunado a ello, la bioactividad de diferentes tipos de metabolitos secundarios presentes en diversas plantas (Butler, 2004) ha conducido a la identificación y propuesta de estrategias de síntesis biocatalíticas de varios metabolitos secundarios (Zwick & Renata, 2020) y de diversas moléculas de interés biológico (Simić et al., 2022).

Algunos de estos metabolitos secundarios que se han encontrado en plantas y animales de interés, son los lignanos y neolignanos (Carocho et al., 2023) donde estos compuestos juegan un papel fundamental en la defensa de las plantas ante diversos microorganismos (Tufano et al., 2020).

Los neolignanos son dímeros que se encuentran unidos a otros enlaces o grupos funcionales y se originan de la ruta del ácido shikímico que es responsable de la producción de vitaminas y aminoácidos aromáticos (Herbert, 1981). Esto les confiere diversas propiedades de interés biológico contra diversas cepas bacterianas, fúngicas, actividad citotóxicas y han exhibido actividad antioxidante (G. Wang et al., 2022) (Alvarenga et al., 2021). Por otra parte los lignanos son dos o más unidades fenilpropanoides dimerizados oxidativamente (Zahra et al., 2022).

El (\pm)-Dehidroiiisoeugenol ((\pm)-DHIE) es un neolignano que fue identificado por primera vez en la corteza de *Myristica fragrans* (Kuetze, 2017; Nikolic et al., 2021) y posteriormente de la corteza de *Licaria aritu* (Aiba et al., 1973). Si bien este compuesto se ha obtenido de fuentes naturales, también ha sido sintetizado químicamente a través de la dimerización oxidativa del isoeugenol (Seshadri et al., 2008), lo cual ha sido de interés debido a que se le ha encontrado diversas propiedades de interés biológico como anticancerígena (Li et al., 2021), antibacterial y antiinflamatoria (Fujisawa et al., 2007).

Por lo que, conociendo las diversas propiedades de interés biológico que puede tener la molécula de (\pm)-DHIE, se plantea realizar y obtener diversas derivatizaciones de la molécula para así aumentar su polaridad y pueda ser utilizada para la evaluación de su efecto antiinflamatorio y/o analgésico, para ello se añadirán azúcares o grupos hidroxilos mediante una síntesis biocatalítica involucrando el uso de enzimas oxidorreductasas (peroxidasas).

ANTECEDENTES

Lignanos y neolignanos

Son metabolitos secundarios fenólicos de origen vegetal, compuestos principalmente por dímeros de unidades de fenilpropanoides (Alvarenga et al., 2021) que poseen muchas propiedades biológicas interesantes que los convierten en candidatos potenciales a fármacos importantes (Saptarini et al., 2014).

Los lignanos y neolignanos tienen su origen mediante el metabolismo de L-fenilalanina, la cual se convierte en ácido cinámico por la reacción de desaminación catalizada por la enzima fenilalanina amino-liasa, posteriormente, el ácido cinámico se transforma en ácido p-cumárico y algunos otros análogos polihidroxilados debido a la acción de las enzimas P450, estos ácidos sufren una metilación mediada por la enzima O-metiltransferasa produciendo derivados del ácido cinámico (fenilpropanoides), en especial los ácidos carboxílicos derivados son reducidos en aldehídos intermedios y posteriormente en alcoholes con la presencia de NADPH, estos compuestos actuarán como monómeros para la biosíntesis de lignanos y neolignanos, su dimerización ocurrirá, principalmente, a través de un mecanismo vía radicales libres, mediado por enzimas como lacasas y peroxidasas, para posteriormente sufrir metilaciones o hidroxilaciones generando una gran variedad de metabolitos secundarios fenólicos (Satake et al., 2013, 2015).

Los lignanos y neolignanos están formados por la unión de dos unidades de fenilpropanoides a través de un enlace β,β' , estas unidades pueden variar en la oxidación de sus cadenas laterales y en la sustitución del anillo aromático (Teponno et al., 2016). Aún así, cabe señalar que los lignanos tienen un enlace directo entre los carbonos C8 y C8' de los dos monómeros, si este enlace no está presente y es reemplazado por otro tipo de enlace, se llaman neolignanos, pero esta clasificación es amplia y no refleja cambios estructurales posteriores a la dimerización, por lo que se han dividido en varios subtipos estructurales para facilitar su identificación y estudio (Pan et al., 2009).

Dehidrodiisoeugenol (DHIE)

También conocido como Licarina A, es un compuesto químico que se obtiene del isoeugenol, un fenol metoxilado, el DHIE es un dihidrobenzofurano natural que posee dos centros quirales en su estructura (Figura 1, Kuete, 2017). Ha sido aislado como polvo blanco, soluble en disolventes orgánicos como acetato de etilo y diclorometano, y la mezcla racémica tiene un punto de fusión en el rango de 120-130 °C; su enantiómero levógiro aparece como un sólido cristalino incoloro con un punto de fusión de 115-120 °C y una rotación óptica negativa, $[\alpha]_D^{25}$, de -44° (El-Ferally et al., 1982). El DHIE se ha encontrado y aislado de diferentes fuentes naturales como las raíces de *Krameria cystoides* (Liu et al., 2013), así como de las plantas, *Aristolochia taliscana*, *Machilus thunbergii* y *Myristica fragrans* (Francis et al., 2019; Nagja et al., 2016). Sin embargo, debido a que la Licarina A se aísla de fuentes naturales, a menudo se obtienen bajos rendimientos, por lo que se ha optado por sintetizarlo mediante isoeugenol (Meleti et al., 2020).

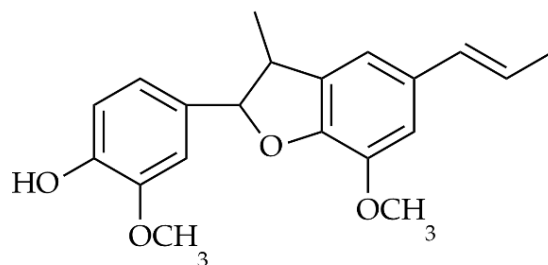


Figura 1. Molécula de (±)-DHIE.

Biocatálisis

La biocatálisis es el uso de enzimas, para llevar a cabo transformaciones químicas en compuestos orgánicos. Este proceso se basa en la capacidad de las enzimas para acelerar reacciones químicas específicas de manera eficiente y selectiva, lo que permite la producción de productos químicos con alta pureza y en condiciones más sostenibles en comparación con los métodos químicos tradicionales (Winkler et al., 2021).

En el contexto de la síntesis orgánica, la biocatálisis puede involucrar el uso de una sola enzima o combinaciones de diferentes enzimas para transformar compuestos orgánicos bien definidos. Esto se realiza sin la necesidad de utilizar organismos vivos, lo que simplifica el proceso y evita las

complicaciones asociadas con el uso de células completas, que contienen miles de enzimas y metabolitos en concentraciones variables, además, la biocatálisis es valorada por su capacidad para realizar reacciones en condiciones suaves, lo que contribuye a la sostenibilidad y la reducción de residuos en los procesos de síntesis química (Nestl et al., 2014).

Síntesis orgánica de (±)-DHIE

Una de las síntesis para obtener (±)-DHIE es través de FeCl_3 propuesta por Mardhatillah et al (2015) ya que la síntesis de este compuesto puede ser complicada, y el uso de catalizadores eficientes es crucial para mejorar los rendimientos y la selectividad de la reacción. En este contexto, el FeCl_3 se presenta como un catalizador prometedor debido a su disponibilidad, bajo costo y efectividad en reacciones de acilo y alquilación; así mismo, FeCl_3 no solo mejora el rendimiento, sino que también simplifica el proceso de síntesis. Por otro lado Liu et al., (2013) llevaron a cabo una reacción de dimerización mediante radicales de isoeugenol, utilizando Ag_2O como catalizador en un medio de tolueno y acetona, logrando obtener un 40% de rendimiento para la reacción.

Síntesis biocatalítica de (±)-DHIE

En la síntesis biocatalítica de (±)-DHIE a través de procesos oxidativos involucra el uso de catalizadores enzimáticos tales como: peroxidasas y lacasas. Las peroxidasas incluyen un grupo de enzimas pertenecientes al grupo de las oxidoreductasas, las cuales se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza (Pandey et al., 2017). Siendo la peroxidasa de rábano picante (HRP) la que se ha establecido como un biocatalizador eficaz para las reacciones de oxidación orgánicas e inorgánicas debido a su capacidad oxidante del peróxido de hidrógeno como aceptor de electrones (Şişecioglu et al., 2010).

Conociendo esto, Nascimento et al (2000), buscan la manera de obtener la dimerización oxidativa del isoeugenol utilizando biocatalizadores como la peroxidasa de rábano picante y H_2O_2 , obteniéndose la mezcla racémica (Figura 2), que luego se transformó en diastereoisómeros por formación de los derivados α -metoxi- α -trifluorometilfenilacetato, los cuales fueron identificaron y separados mediante HPLC y posteriormente convertidos en (±)-DHIE.

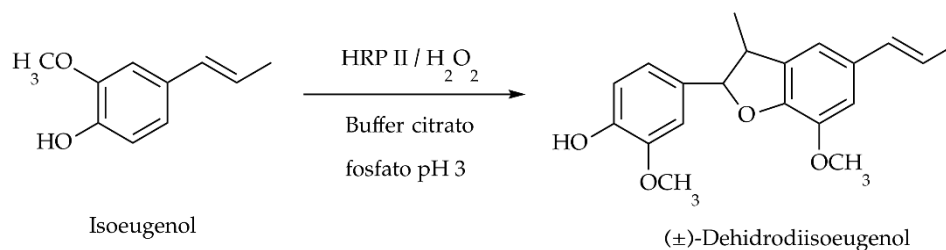


Figura 2. Síntesis y obtención de (±)-DHIE mediante dimerización oxidativa del isoeugenol.

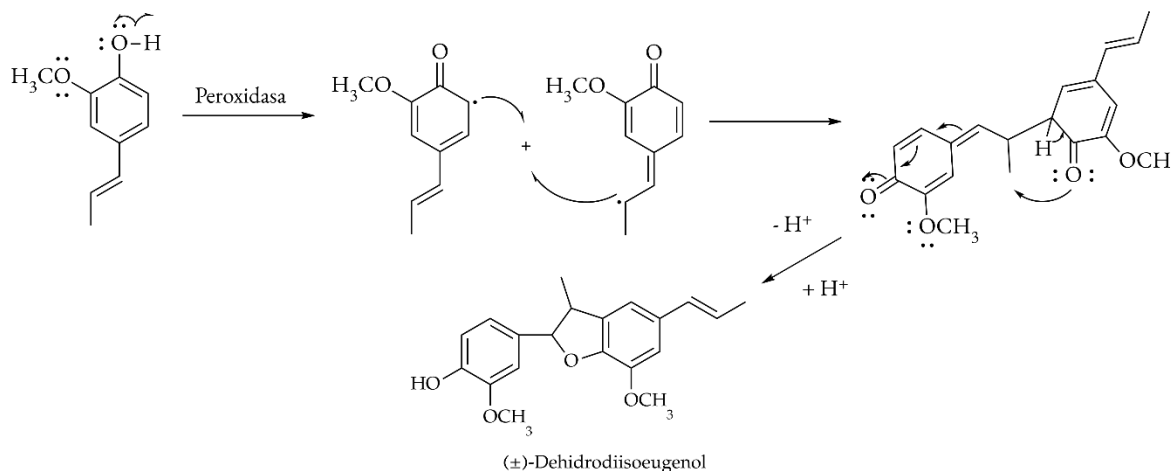


Fig 3. Mecanismo de acción propuesto de (±)-DHIE.

Peroxidasa de rábano picante

La peroxidasa de rábano picante, también conocida como horseradish peroxidase (HRP), es una enzima que se encuentra en la raíz de la planta *Armoracia rusticana*. Esta enzima pertenece a la familia de las peroxidases, que son enzimas que catalizan la reducción de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) utilizando electrones de un sustrato lo que resulta en la oxidación de este. Está compuesta por una única cadena polipeptídica que consta de 308 residuos de aminoácidos y es conocida por su buena estabilidad en sistemas acuosos y no acuosos (Welinder, 1976), además de contener un grupo hemo, que es un complejo de hierro que permite la actividad catalítica de la enzima, este grupo es esencial para la reducción de peróxido de hidrógeno (Ortiz De Montellano, 1992). Asimismo, la HRP presenta varios sitios de glicosilación, lo que contribuye a su estabilidad y funcionalidad, aproximadamente el 75-80% de los carbohidratos en la HRP son de un tipo de heptasacárido (Yang et al., 1996). La HRP participa en diversas reacciones bioquímicas, como la lignificación y el metabolismo del ácido indol-3-acético (Rossiter et al., 2002). De igual

importancia, la HRP no solo se ha empleado en la biotransformación de compuestos orgánicos, sino también en terapias dirigidas contra el cáncer, combinando HRP con derivados del ácido indol-3-acético y en ensayos inmunológicos debido a su capacidad para catalizar reacciones que producen cambios de color detectables (Krieg and Halbhuber, 2003).

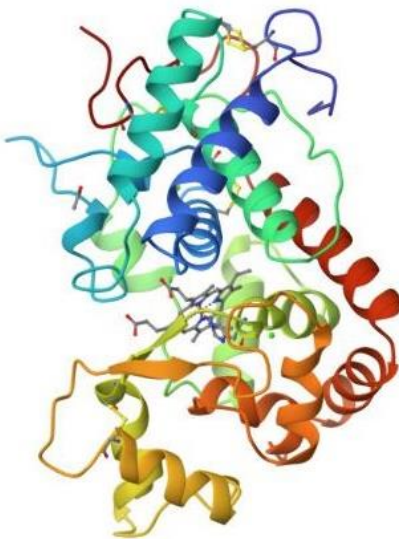


Fig 3.1 Estructura proteica de la peroxidasa de rábano picante (Berglund et al., 2002).

Peroxidasa de brócoli

La peroxidasa de cruda extraída de *Brassica oleracea*, es una enzima que cataliza una variedad de transformaciones oxidativas. En el caso de la familia *Brassicaceae*, la peroxidasa se puede extraer fácilmente de los tallos y hojas, esta abundancia la convierte en una fuente accesible para aplicaciones biocatalíticas. Esta se ha utilizado en diversas aplicaciones biotecnológicas, incluyendo la síntesis de compuestos bioactivos, la eliminación de contaminantes en aguas residuales y la producción de productos químicos de interés industrial, además su capacidad para catalizar reacciones bajo condiciones suaves la hace atractiva para procesos sostenibles y la actividad específica de la peroxidasa de *B. oleracea* se ha reportado en valores como 14.577 U/mg, lo que indica su eficacia en catalizar reacciones de acoplamiento fenólico, la utilización de enzimas derivadas de plantas, como la peroxidasa de *Brassica oleracea*, promueve prácticas sostenibles en la síntesis química, este enfoque reduce la dependencia de productos químicos sintéticos y

condiciones de reacción agresivas; así mismo, el potencial biocatalítico se ha dado con un enfoque en la síntesis de compuestos con propiedades farmacológicas (Anita et al., 2022).

Dimerización oxidativa

Es un proceso en el que dos moléculas idénticas o similares se combinan para formar un dímero a través de una reacción de oxidación, este tipo de reacción es importante en la química orgánica y tiene aplicaciones en la síntesis de compuestos complejos ya que es altamente selectiva, incluyendo productos farmacéuticos, materiales y productos naturales (Hernández-Vázquez et al., 2017). Las moléculas que se dimerizan son activadas por un agente oxidante como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), oxígeno molecular (O_2), o un catalizador metálico en su estado oxidado, lo cual induce la formación de radicales libres en las moléculas, lo cuales se acoplan entre sí para formar un nuevo enlace, este paso es crucial ya que determina la formación del dímero, completándose cuando todos los radicales libres se han acoplado para formar dímeros, en algunos casos, puede ser necesario un paso adicional para estabilizar el producto final, como la eliminación de subproductos o la neutralización de cualquier exceso de agente oxidante (Paris et al., 2018).

Reacción de epoxidación

Los alquenos se oxidan para dar epóxidos en el tratamiento con un peroxiácido (RCO_3H), los peroxiácidos transfieren un átomo de oxígeno al alqueno con estereoquímica syn, ambos enlaces C-O se forman en la misma cara del enlace doble, a través de un mecanismo de una etapa sin intermediarios; se transfiere el átomo de oxígeno más alejado del grupo carbonilo (Figura 4). Un epóxido, también llamado oxirano, es un éter cíclico con un átomo de oxígeno en un anillo con tres miembros, el ácido meta-cloroperbenzoico (mCPBA) es un oxidante fuerte que se utiliza comúnmente para convertir alquenos en epóxidos (McMurry, 2018). Los epóxidos experimentan una apertura de anillo, una hidrólisis para dar el 1,2-dialcohol (diol) correspondiente, llamado también glicol; por tanto, el resultado neto de las dos etapas epoxidación /hidrólisis de alqueno es la hidroxilación, la adición de un grupo -OH a cada uno de los dos carbonos del enlace doble (McMurry, 2018). En este caso, el (\pm)-DHIE posee un grupo funcional alqueno en la cadena lateral, que reaccionará con mCPBA en diclorometano para formar el (\pm)-Licarinediol A.

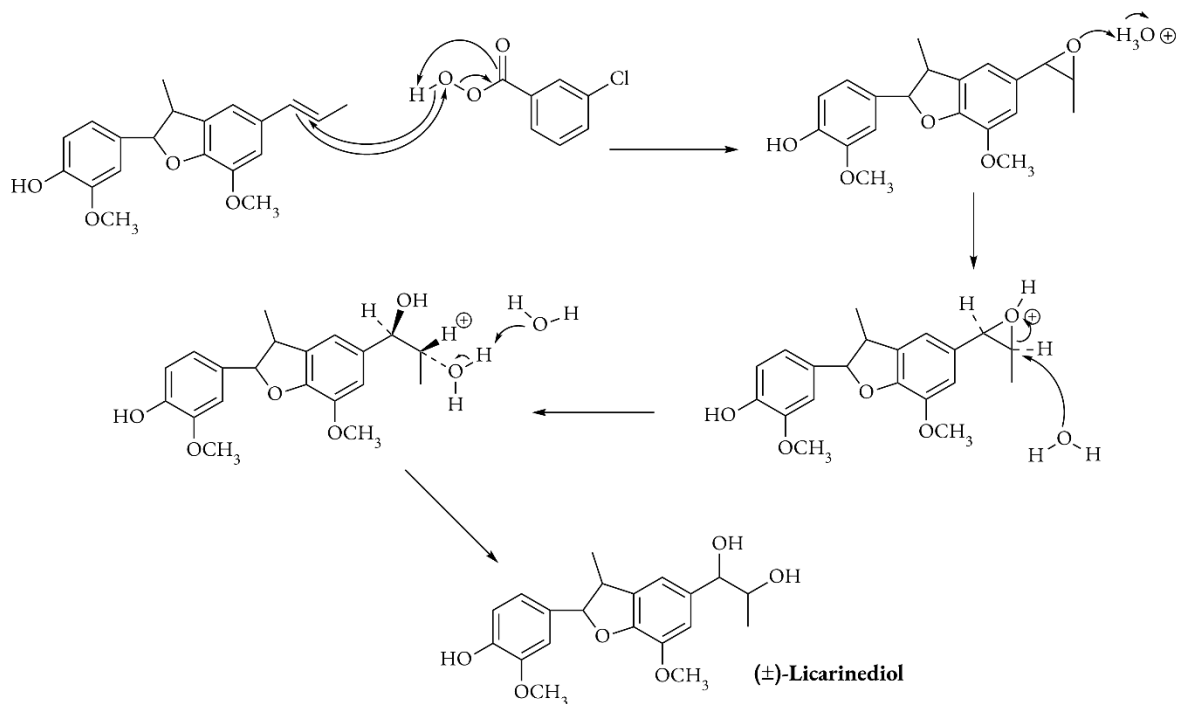


Fig 4. Mecanismo de acción propuesto de la epoxidación del (±)-DHIE.

Reacción de oxidación

Una oxidación es una reacción que resulta en una pérdida de densidad electrónica por un carbono, causada por la formación de un enlace entre el carbono y un átomo más electronegativo, por lo general oxígeno, nitrógeno o un halógeno, o por el rompimiento de un enlace entre el carbono y el átomo menos electronegativo, por lo regular hidrógeno (McMurry, 2018), por consiguiente, el 2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona (DDQ) es un oxidante fuerte que se utiliza comúnmente para deshidrogenar compuestos orgánicos, además el agua participa en la reacción como nucleófilo, facilitando la formación de productos oxidados (Alsharif et al., 2021). El tratamiento de (±)-DHIE con DDQ produce la oxidación de la cadena lateral para formar un grupo funcional aldehído (Figura 5).

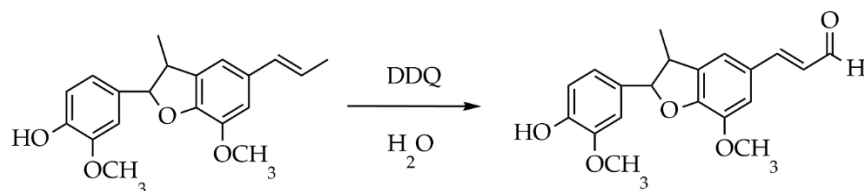


Fig 5. Reacción de oxidación del (±)-DHIE.

Reacción de acetilación

Se da cuando se introduce un grupo acetilo a una molécula, este grupo acetilo reemplaza un átomo de hidrógeno en la molécula original, ya que un ácido fuerte protona el grupo carbonilo del agente acetilante (como el anhídrido acético) aumentando su reactividad, el nucleófilo (como un grupo hidroxilo) ataca el carbono del grupo acetilo protonado formando un intermediario tetraédrico, así el grupo saliente se desprende, dejando el nucleófilo unido al grupo acetilo (McMurry, 2018). Esta reacción se utiliza comúnmente para modificar compuestos orgánicos, como en la síntesis de medicamentos y otros productos químicos (T. Wang et al., 2021), con frecuencia se utiliza el anhídrido acético para preparar ésteres de acetato a partir de alcoholes catalizada en medio ácido bajo el mecanismo propuesto en la Figura 6 (Prieto-Méndez et al., 2010; Saravanan & Singh, 1999).

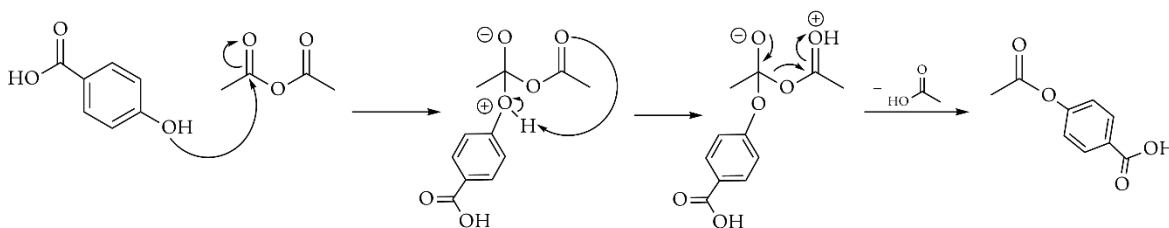


Fig 6. Mecanismo de reacción de acetilación del ácido-p-hidroxibenzoico (APHB).

Reacción de alcoholes con cloruro de oxalilo

El cloruro de oxalilo se ha utilizado durante mucho tiempo para transformar alcoholes en haluros de alquilo. Así mismo el cloruro de oxalilo reacciona de varias maneras con los alcoholes, en los alcoholes primarios pasan muy fácilmente a ésteres, la mayoría de los alcoholes terciarios dan buenos rendimientos de cloruros, los alcoholes secundarios y ciertos alcoholes terciarios dan diferentes tipos de productos de deshidratación, como éteres (Adams & Weeks, 1916). Cabe mencionar que en este proceso generalmente se lleva a cabo en presencia de una base para neutralizar el ácido clorhídrico (HCl) que se produce como subproducto como se observa en la figura 7, además el cloruro de oxalilo también puede reaccionar con ácidos carboxílicos para formar anhídridos (Mohammadkhani & Heravi, 2019).

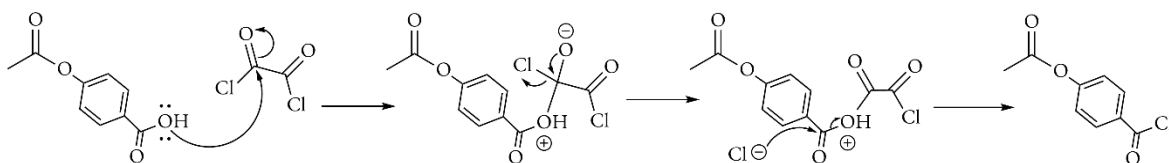


Fig 7. Mecanismo de reacción de halogenación del ácido-p-hidroxibenzoico acetilado.

Reacción de esterificación

La reacción de esterificación es un proceso químico en el que un ácido (generalmente un ácido carboxílico) reacciona con un alcohol para formar un éster y agua como subproducto como se observa en la figura 8. Esta reacción es fundamental en la síntesis de numerosos compuestos orgánicos y se utiliza ampliamente en la industria para la producción de ésteres, que son compuestos importantes en productos como fragancias, sabores, plásticos y biodiésel (Khan et al., 2021). La reacción de esterificación se realiza generalmente de tres formas, es decir, por reacción de anhídrido ácido y alcohol, alcohol y cloruro ácido o alcohol y ácido carboxílico, el enlace éster puede introducirse mediante diversas metodologías, como la esterificación de Yamaguchi basada en la alcoholólisis de anhídrido heterogéneo; la reacción de Corey-Nicolaou para convertir hidroxiácidos en lactonas; la esterificación de Fischer que implica catalizadores ácidos y la esterificación de Steglich que comprende agentes de acoplamiento, en este caso la esterificación mediante haluros de ácido con alcoholes se ha utilizado (Duong et al., 2017; Munawar et al., 2024).

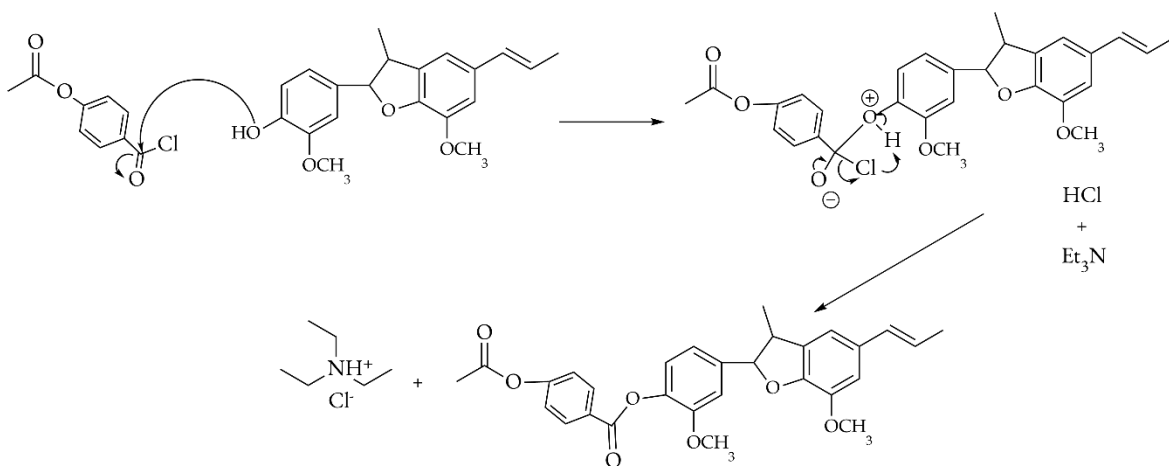


Fig 8. Mecanismo de reacción de esterificación del (±)-DHIE.

Transgalactosilación

La β -galactosidasa actúa sobre un donante de galactosa, como la lactosa, que se descompone en glucosa y galactosa. Sin embargo, en lugar de liberar la galactosa, la enzima cataliza su transferencia a un aceptor, este último puede ser un compuesto que contenga un grupo hidroxilo, como un alcohol o un azúcar, la enzima facilita la formación de un enlace glucosídico entre el residuo de galactosa y el grupo hidroxilo del aceptor, como resultado de este proceso, se forman galactósidos (Figura 9), que son compuestos que contienen un residuo de galactosa unido a otra molécula (Vera et al., 2011). Este tipo de reacción es importante en la síntesis de productos bioactivos y en la modificación de carbohidratos para aplicaciones en la industria alimentaria y farmacéutica (Vera et al., 2020).

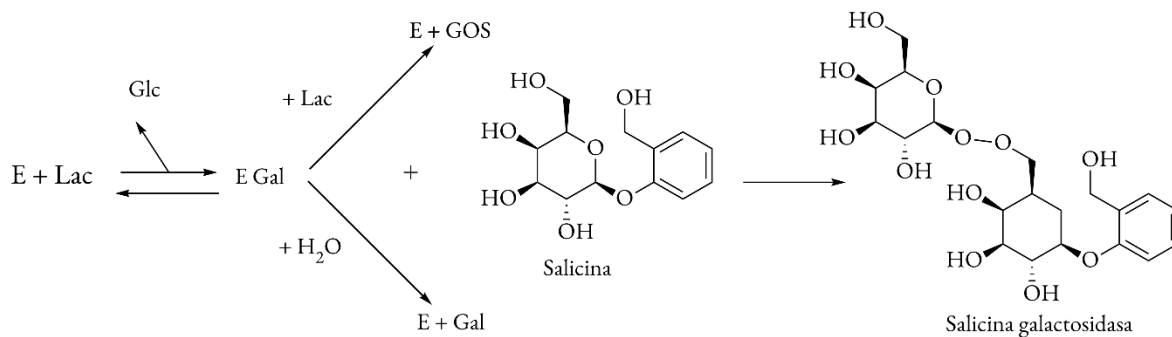


Fig 9. Reacción de la transgalactosilación enzimática de la salicina. E: β -galactosidasa, Lac: Lactosa, Glc: Glucosa, Gal: Galactosa, E Gal: complejo enzima-galactosa.

Método de Bradford para cuantificación de proteínas

Es una técnica utilizada para la cuantificación de proteínas en soluciones biológicas, fue desarrollado por Marion M. Bradford en 1976 y se basa en la interacción del colorante Coomassie Blue G250 con las proteínas que se puede medir espectrofotométricamente, la cantidad de proteína en la muestra se determina midiendo la absorbancia de la solución a una longitud de onda específica (595 nm), la absorbancia es proporcional a la concentración de proteínas en la muestra, para obtener resultados precisos, se construye una curva de calibración utilizando estándares de proteínas conocidas, esto permite correlacionar la absorbancia medida con la concentración de proteínas (Kruger, 2009). La cuantificación precisa de proteínas es esencial para el diseño de

experimentos, la producción de proteínas recombinantes, y el análisis de interacciones proteína-proteína, entre otros (Noble & Bailey, 2009). Este método es popular debido a su simplicidad, rapidez y sensibilidad en comparación con otros métodos de cuantificación de proteínas, como el método de Lowry (Kruger, 2009).

Importancia del (±)-DHIE

Las diversas propiedades biológicas que presenta el (±)-DHIE suelen ser de gran espectro, por ejemplo, su uso antimicrobiano como Meleti y colaboradores (2020) demuestran evaluando su actividad de inhibición contra *Trypanosoma cruzi* y *Schistosoma mansoni*, siendo prometedora por su potencial terapéutico. Así mismo, Mbaveng y colaboradores (2021) evaluaron la actividad biológica del compuesto en líneas celulares cancerosas NCI-H23 y A549, donde se observó que induce apoptosis en las células cancerosas, siendo esto prometedor en la investigación de tratamientos anticancerígenos, ya que no solo induce la muerte celular programada, sino que también puede contribuir a la detención del ciclo celular en la fase G0/G1.

Entre ellas su actividad antiinflamatoria destaca debido a que tiene un efecto inhibitorio sobre la expresión de la COX2, en macrófagos murinos RAW264.7 (Godínez-Chaparro et al., 2022), de igual importancia para su posible uso como agente terapéutico ante el dolor neuropático, el cual es causado por una lesión o enfermedad del sistema somatosensorial lo cual implica alteraciones en los canales iónicos y como es que se modulan las señales de dolor en el sistema nervioso central (Colloca et al., 2017).

Alodinia

La alodinia es una condición en la que el individuo experimenta dolor en respuesta a un estímulo que normalmente no provoca dolor como lo sería una caricia suave o el roce de la ropa, que pueden causar una sensación dolorosa en personas con alodinia, este fenómeno es común en pacientes con dolor neuropático, donde el sistema nervioso se vuelve hipersensible y reacciona de manera exagerada a estímulos que normalmente serían inofensivos (Coutaux et al., 2005); (Bennett, 2012). La sensibilización periférica y los cambios en el sistema nervioso central (SNC) juegan un papel crucial en la generación y mantenimiento del dolor neuropático debido a que en la sensibilización

periférica los nociceptores a nivel periférico se vuelven más sensibles a los estímulos; esto puede ser el resultado de lesiones a nivel del SNC o procesos inflamatorios, lo que lleva a una mayor excitabilidad de los nociceptores, y como resultado, estímulos que normalmente no causan dolor, ahora el individuo los percibe como nocivo, resultando en la amplificación de la percepción del dolor y en la aparición de dolor espontáneo, incluso en ausencia de un estímulo doloroso (Gracely et al., 1992; Kilo et al., 1994; Zeilig et al., 2012).

Se ha encontrado que la alodinia y la hiperalgesia son síntomas comunes en pacientes con dolor neuropático asociadas con una variedad de trastornos, como la neuralgia postoperatoria, la neuropatía diabética, el dolor postoperatorio, entre otros, afectando entre el 15% y el 50% de estos pacientes, la prevalencia puede variar según el tipo de condición neuropática (Baron et al., 2009; Klit et al., 2009). Se ha observado que la expresión de ciertos canales iónicos, como los canales de sodio (NaV), se altera en los nociceptores. Por ejemplo, la sobreexpresión de canales de sodio como NaV1.7 y NaV1.6 puede aumentar la excitabilidad de las neuronas sensoriales, lo que contribuye a la percepción de dolor en respuesta a estímulos no nocivos (Devor, 2006; Dib-Hajj et al., 2010). Además, la reducción de la actividad de neurotransmisores inhibitorios, como el GABA y la glicina, puede contribuir a la excitación de las neuronas de segundo orden en la médula espinal, lo que resulta en una mayor percepción del dolor (Coull et al., 2003). En algunos casos, las fibras A β , que normalmente no están involucradas en la transmisión del dolor, pueden comenzar a expresar neuropéptidos como el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) y la sustancia P, esto puede llevar a una activación anormal de las vías del dolor y contribuir a la alodinia (Nitzan-Luques et al., 2013).

Si bien existen algunos medicamentos que ayudan a contrarrestar esta afección, la gran mayoría pueden provocar reacciones adversas tras su ingesta (Finnerup et al., 2021). Por lo que, el (\pm)-DHIE funge como una alternativa para este tipo de afección debido a su capacidad de inhibir la vía de la COX-2 y la producción de PGD2 (Barboza et al., 2018).

Resonancia Magnética Nuclear

La espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN) se basa en medir la absorción de la radiación electromagnética en la región de radiofrecuencias, de alrededor de 4 a 900 MHz. En contraste con la absorción ultravioleta, visible e infrarroja, los núcleos de los átomos son los que participan en el proceso de absorción en vez de los electrones exteriores, además, para que en los núcleos se formen los estados de energía que hagan posible la absorción, es necesario colocar el analito en un intenso campo magnético (González et al., 2022).

La espectroscopia de resonancia magnética nuclear es una de las técnicas más potentes con la que los químicos y bioquímicos pueden dilucidar las estructuras de las especies químicas, esta técnica también es útil para la determinación cuantitativa de especies absorbentes (Skoog et al., 2014).

Espectroscopia Infrarrojo

Es una técnica en la cual se mide la interacción de la radiación infrarroja con la materia, se refiere a los distintos cambios energéticos provocados por las transiciones de las moléculas desde unos estados energéticos vibracionales y rotacionales a otros. Para absorber radiación infrarroja, una molécula debe sufrir un cambio neto en el momento dipolar cuando vibra o gira, solo en tales casos el campo eléctrico alternante de la radiación puede interactuar con la molécula y modificar la amplitud de alguno de sus movimientos (Skoog et al., 2014).

La etapa de identificación de un compuesto orgánico en un espectro infrarrojo constata dos. En primer lugar, al mirar la región de frecuencia de grupo lucirán irradiado entre 3600 cm^{-1} a 1250 cm^{-1} , se puede decir qué grupos funcionales tienen más probabilidad de estar presentes en el compuesto. En el segundo paso, al comparar cuidadosamente el espectro del compuesto desconocido con los espectros de compuestos puros que contienen todos los grupos funcionales encontrados en el paso 1. Debido a que las moléculas afectan los niveles de fondo después de la irradiación, la región de la huella es especialmente útil en un rango de 600 cm^{-1} a 1200 cm^{-1} (Skoog et al., 2014).

HPLC

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es un tipo de cromatografía que combina una fase móvil líquida y una fase estacionaria finamente dividida, es el tipo de cromatografía por elución más versátil y utilizado. La técnica es utilizada para separar y determinar especies en una variedad de materiales orgánicos, inorgánicos y biológicos. En la cromatografía líquida, la fase móvil es un disolvente líquido que contiene la muestra en forma de una mezcla de solutos, con el fin de obtener velocidades de flujo satisfactorias (Corradini, 2011).

Se pueden distinguir dos tipos de cromatografía con base en las polaridades relativas de la fase móvil y de la fase estacionaria, este tipo de cromatografía se conoce como cromatografía en fase normal y en fase inversa, en esta última, la fase estacionaria es no polar, generalmente un hidrocarburo, y la fase móvil es un disolvente relativamente polar como agua, metanol, acetonitrilo o tetrahidrofurano. En la cromatografía en fase normal el componente menos polar eluye primero; aumentar la polaridad de la fase móvil disminuye el tiempo de elución, en contraste, en la cromatografía en fase inversa el componente más polar es el primero que eluye, y aumentar la polaridad de la fase móvil aumenta el tiempo de elución (Corradini, 2011).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

El (\pm)-DHIE ha recibido mucha atención debido a sus propiedades biológicas como anticancerígeno, antibacteriano y antiinflamatorio. Recientemente se informó que este compuesto presenta efecto antialodínico similar al de gabapentina (fármaco antiepiléptico de primera línea, que se utiliza en el tratamiento del dolor neuropático). Lo que lo hace un compuesto prometedor como una alternativa al tratamiento que ayude al manejo terapéutico adecuado del dolor.

Sin embargo existen algunos problemas para su evaluación farmacológica debido a su escasa solubilidad en agua. Por lo que en este proyecto se pretende derivatizar al (\pm)-DHIE para generar compuestos con mayor solubilidad, adicionalmente la derivatización de este compuesto permitirá investigar el efecto que tienen los diferentes grupos funcionales presentes en la estructura. En este trabajo se explorarán variaciones en la cadena alquílica y en el hidroxilo del anillo aromático.

OBJETIVO GENERAL

Obtener las diferentes derivatizaciones de la molécula de (\pm)-Dehidrodiisoeugenol mediante una síntesis biocatalítica.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ◇ Sintetizar la molécula de (\pm)-DHIE usando peroxidasa de rábano picante tipo II y peroxidasa de brócoli.
- ◇ Realizar derivatizaciones del (\pm)-DHIE sobre la cadena alquílica que involucran la introducción de grupos hidrofílicos.
- ◇ Realizar derivatizaciones del (\pm)-DHIE sobre el grupo hidroxilo del anillo aromático.
- ◇ Purificar y caracterizar los compuestos obtenidos utilizando técnicas como CCF, IR, RMN, EM, HPLC.

MÉTODOS Y ACTIVIDADES REALIZADAS

◇ Síntesis biocatalítica de (±)-DHIE usando peroxidasa de rábano picante tipo II

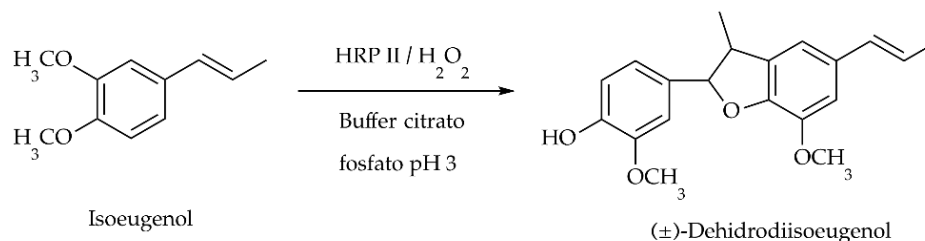


Fig 10. Esquema de la síntesis biocatalítica de (±)-DHIE usando Peroxidasa de rábano picante tipo II.

La síntesis de la mezcla racémica de (±)-DHIE se obtuvo por acoplamiento oxidativo de isoeugenol (Figura 10) siguiendo la metodología de Nascimento et al (2000). Para lo cual, se preparó 1 L de buffer de citrato-fosfato, utilizando 3.48 g de fosfato de potasio dibásico (K₂HPO₄), 4.20 g de ácido cítrico monohidratado (C₆H₈O₇ * H₂O) en 800 mL de agua destilada, el cual se ajustó el pH a 3.0 con el uso del potenciómetro HANNA Instruments HI2211 y una solución de HCl al 1%, para posteriormente aforar el buffer a 1 L con un matraz volumétrico.

Aunado a ello, se preparó una solución de 1.55 g (10 mmol) de isoeugenol en 50 mL de metanol (MeOH) adicionando 450 mL de buffer citrato-fosfato pH 3 en un matraz bola de 1000 mL con agitación magnética. Posteriormente, se adicionó una solución de 12.4 mg de Peroxidasa de rábano picante tipo II (HRP, 2500 U, polvo liofilizado, -150 U/mg, Sigma-Aldrich®) en 20 mL agua destilada, la solución tornó de un color blanco, se añadió 0.6 mL/0.5 mmol de H₂O₂ al 30% gota a gota durante 10 minutos, dónde se observó un cambio de coloración a amarillo, la solución se mantuvo en agitación durante 2 horas.

Transcurrido el tiempo determinado, se observó la formación de un residuo sólido amarillo adherido a las paredes del vaso de precipitado y la mezcla de reacción líquida color amarillo, por lo que se utilizó agitación magnética adicionando 300 mL de acetato de etilo (AcOEt) para disolver los residuos, se observó el comienzo de emulsión a los 5 minutos por lo que se detuvo la agitación a ese tiempo. La solución se trasvasó a un embudo de decantación de 1 L, se esperó 10 minutos para observar una separación de fases y se procedió a realizar 2 lavados con 300 mL de AcOEt, la

fase orgánica fue lavada con 300 mL de una solución saturada de NH_4Cl y posteriormente con 300 mL de agua destilada.

La fase orgánica resultante del lavado con agua destilada se observó con turbidez, por lo que se le adicionó el agente de secado Na_2SO_4 hasta que la solución se observó transparente con un color amarillento, se filtró la solución mediante papel filtro y un embudo de vidrio para eliminar el residuo de Na_2SO_4 .

La solución se pasó a un matraz bola de 500 mL previamente pesado y se llevó a sequedad por vacío mediante el uso del rotavapor digital D402-2 con una temperatura ajustada de $44\text{ }^\circ\text{C}$ y 100 rpm.

Se obtuvo el producto crudo de (\pm)-DHIE siendo un líquido oleoso de color amarillo, el cual se pesó en una balanza granataria digital OHAUS® Adventure Pro. Así mismo se realizó una cromatoplaqueta al producto crudo de (\pm)-DHIE comparándolo con un estándar de (\pm)-DHIE e Isoeugenol.

Esta reacción se repitió 6 veces más para obtener suficiente producto de (\pm)-DHIE. Los 7 productos crudos de (\pm)-DHIE fueron purificados dos veces mediante cromatografía de columna, para lo cual se reunieron los 7 productos crudos con un poco de AcOEt y se adicionaron en 3 g de sílica gel flash para posteriormente dejar secar a temperatura ambiente, se utilizó una columna de sílica gel flash de 30 cm el cual le fue adicionado los 3 g de sílica y utilizando una fase móvil de Hexano/AcOEt de polaridad creciente, empezando con 200 mL de los disolventes a 95:05, 85:15, 80:20 y 70:30, obteniéndose diversas fracciones a las cuales se les realizó una cromatoplaqueta y que fue revelada por sulfato cérico.

Las fracciones de interés fueron reunidas en un matraz bola de 500 mL previamente pesado, el cual se llevó a sequedad por vacío mediante el uso del rotavapor digital D402-2 con una temperatura ajustada de $41\text{ }^\circ\text{C}$ y 80 rpm, obteniéndose el producto de (\pm)-DHIE puro el cual se observó como un sólido blanquecino.

El (\pm)-DHIE puro se llevó a resonancia magnética nuclear de hidrógeno (RMN ^1H) Agilent 600 DD2 con una sonda OneNMR utilizando CDCl_3 como disolvente para la caracterización y corroboración de la estructura comparándolo con la literatura establecida.

La reacción se repitió una segunda ocasión, pero modificando la metodología de Nascimento et al (2000). Por lo cual se preparó 1 L de buffer de citrato-fosfato usando 3.4836 g de fosfato de potasio dibásico (K_2HPO_4), 4.2028 g de ácido cítrico monohidratado ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$) en 800 mL de agua destilada, el cual se le ajustó el pH a 3.0 con el uso del potenciómetro HANNA Instruments HI2211 y una solución de HCl, para posteriormente aforar el buffer a 1 L con un matraz volumétrico.

Aunado a ello, se preparó una solución de 3 g/18.86 mmol de isoeugenol en 90 mL de metanol (MeOH) adicionando 825.21 mL de buffer citrato-fosfato pH 3 en un matraz bola de 2 L con agitación magnética, posteriormente se le adicionó una solución de 10 mg de Peroxidasa de rábano picante tipo II (HRP, 2500 U, polvo liofilizado, -150 U/mg, Sigma-Aldrich®) solubilizado en 20 mL de buffer citrato-fosfato pH 3, la solución tornó a un color blanco, se añadió 1 mL/0.5 mmol de H_2O_2 al 30% gota a gota durante 10 minutos, dónde se observó un cambio de coloración a amarillo, posteriormente se adaptó un septum a la boquilla del matraz bola en el cual se insertó una atmosfera de nitrógeno con el uso de una jeringa y un globo, a la par se insertó un cono con aguja de jeringa para permitir que el oxígeno saliera, el cual fue retirado 5 minutos después y la reacción se mantuvo en agitación magnética durante 2.5 horas.

Finalizado el tiempo se observó la formación de un residuo solido amarillo que se adhirió a las paredes del matraz bola y la mezcla de reacción líquida color amarillo. Se filtró la solución a vacío con el uso de un matraz Kitasato de 1L y un embudo Buchner con papel filtro, se obtuvo un residuo solido amarillo en el papel filtro y un residuo líquido incoloro con poca turbidez. El residuo sólido fue lavado con AcOEt para desprenderse del papel filtro.

El líquido incoloro se pasó a un embudo de decantación de 500 mL, se le realizaron los lavados con 300 mL de AcOEt , posteriormente la fase orgánica del lavado con AcOEt y el residuo sólido lavado con AcOEt fueron reunidos en el embudo de decantación de 500 mL para posteriormente ser

lavados con 300 mL de una solución saturada de NH_4Cl , después con 300 mL de agua destilada, en ninguno de los lavados se observó la formación de emulsiones.

La fase orgánica resultante del lavado con agua destilada se observó con turbidez, por lo que se le adicionó el agente de secado Na_2SO_4 hasta que la solución se observó transparente con un color amarillento, se filtró la solución con el uso de papel filtro y un embudo de vidrio para eliminar el residuo de Na_2SO_4 .

La solución se pasó un matraz bola de 500 mL previamente pesado y se llevó a vacío mediante el uso del rotavapor digital D402-2 con una temperatura ajustada de 44°C y 100 rpm, pero no se llevó a sequedad, se dejaron aproximadamente de 10 a 5 mL de líquido para poder retirarlo del matraz bola.

Se obtuvo el producto crudo de (\pm)-DHIE siendo un líquido de color amarillo, el cual se pesó en una balanza granataria digital OHAUS® Adventure Pro. Así mismo se realizó una cromatoplaça al producto crudo de (\pm)-DHIE comparándolo con un estándar de (\pm)-DHIE.

El producto crudo de (\pm)-DHIE se trasvasó a un vaso de precipitado de 50 mL previamente pesado, se dejó evaporar el disolvente restante a temperatura ambiente y se observó la formación de cristales blanquecinos-amarillos.

Se purificó el producto crudo realizando una recristalización para lo cual se adicionaron 10 mL de metanol (MeOH) y se mantuvo en agitación magnética por aproximadamente 10 minutos, se observó una lenta formación de cristales por lo que se procedió a raspar las paredes del vaso de precipitado con una varilla de agitación de vidrio, se adicionaron 15 mL de MeOH y se llevó a agitación magnética con un poco de calentamiento, posteriormente se llevó a un baño de hielo por aproximadamente 30 minutos, se observó la formación de cristales blancos.

Se filtraron los cristales de (\pm)-DHIE y el residuo líquido mediante vacío usando un matraz Kitasato de 150 mL y un embudo Buchner con papel filtro. Al residuo líquido del matraz Kitasato se le adicionó 10 mL de MeOH y se realizó el mismo proceso pero no se observó recristalización alguna, solo se formó un residuo amarillo oleoso.

Los cristales puros de (\pm)-DHIE se pesaron en un vaso de precipitado de 50 mL previamente pesado y se dejó en un desecador sin el uso de vacío para eliminar cualquier resto de humedad.

La reacción se repitió una tercera vez siguiendo la misma metodología modificada pero utilizando 9 g de enzima de Peroxidasa de rábano picante tipo II (HRP, 2500 U, polvo liofilizado, -150 U/mg, Sigma-Aldrich®)

Los cristales de (\pm)-DHIE puro se llevaron a resonancia magnética nuclear de hidrógeno (RMN ^1H) en CDCl_3 para la caracterización y corroboración de la estructura comparándolo con la literatura establecida.

Se realizó una cromatopla de estándar de (\pm)-DHIE, los cristales puros de (\pm)-DHIE de la reacción 1, los cristales puros de (\pm)-DHIE de la reacción 2, el lavado con MeOH de la reacción 1 y el lavado con MeOH de la reacción 2. Se midió el punto de fusión de los cristales puros de (\pm)-DHIE de la reacción 1 y 2 mediante el equipo de Fisher-Jones. En la tabla 1 se muestran las características de cada reacción.

Tabla 1. Cantidades sometidas en la reacción de (\pm)-DHIE con HRP II.

| Reacción | Isoeugenol (g) | HRP II (mg) | H_2O_2 30% (mL) | Tiempo (h) |
|-----------|----------------|-------------|---------------------------------|------------|
| 1 (1 – 7) | 1.55 | 12.4 | 0.6 | 2 |
| 2 | 3 | 10 | 1 | 2.5 |
| 3 | 3 | 9 | 1 | 2.5 |

◇ Síntesis biocatalítica de (±)-DHIE usando peroxidasa de brócoli (*Brassica oleracea*)

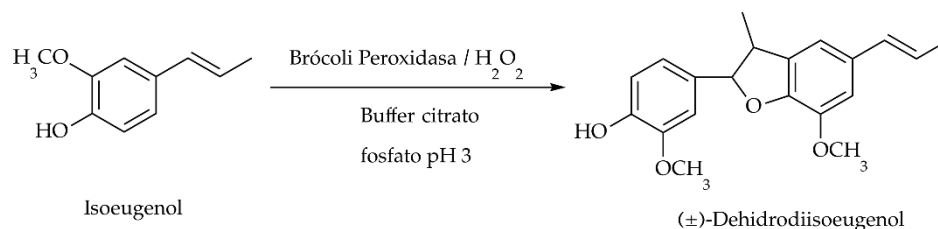


Fig 11. Esquema de la síntesis biocatalítica de (±)-DHIE usando peroxidasa de brócoli.

Se modificó la metodología de Anita et al (2022). Se realizó un extracto de la peroxidasa de brócoli, para lo cual se obtuvo un brócoli fresco que se lavó y se le cortó 10 cm del tallo, seguido de ello se cortó el tallo en trozo pequeños. Se preparó 400 mL de un buffer de fosfatos pH 6.5/0.1M, pesando 1.36 g de fosfato de sodio monobásico (NaH_2PO_4) y 1.42 g de fosfato de sodio dibásico (Na_2HPO_4), el pH se ajustó utilizando un potenciómetro HANNA Instruments HI2211 y HCl 1%.

Se colocaron 30 g de tallo cortado de brócoli dentro de una licuadora a la cual se le adicionó 200 mL de buffer de fosfatos pH 6.5/0.1 M, se procedió a molerlo procurando su completa homogeneización y de no calentar la licuadora a marcha forzada para evitar la desnaturalización de la enzima.

Una vez se terminó de moler, el extracto se trasvasó a un vaso de precipitado de 400 mL y se introdujo inmediatamente en una baño de hielo, posteriormente se trasvasó el extracto a tubos Falcon de 50 mL, se llevó a centrifugación por 10 minutos, 4000 rpm y 5 °C, se recuperó el sobrenadante el cual se colocó en tubos Falcon y manteniendo la temperatura baja constante. Se colocó aproximadamente 30 mL de extracto en un tubo Falcón aparte el cual fue utilizado para la cuantificación de proteína total.

Posteriormente, se preparó 1 L de buffer de citrato-fosfato usando 3.4836 g de fosfato de potasio dibásico (K_2HPO_4), 4.2028 g de ácido cítrico monohidratado ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$) en 800 mL de agua destilada, el cual se le ajustó el pH a 3.0 con el uso del potenciómetro HANNA Instruments

HI2211 y una solución de HCl 1%, para posteriormente aforar el buffer a 1 L con un matraz volumétrico.

Aunado a ello, se preparó una solución de 3 g/18.86 mmol de isoeugenol en 100 mL de metanol (MeOH) adicionando 1000 mL de buffer citrato-fosfato pH 3 en un matraz bola de 2 L con agitación magnética, posteriormente se le adicionó 260 mL del extracto acuoso de brócoli, la solución tornó a un color blanco, se añadió 1 mL/0.5 mmol de H_2O_2 al 30% gota a gota durante 5 minutos, donde se observó un cambio de coloración a amarillo, posteriormente se adaptó un septum a la boquilla del matraz bola en el cual se insertó una atmosfera de nitrógeno con el uso de una jeringa y un globo, a la par se insertó un cono con aguja de jeringa para permitir que el oxígeno saliera, el cual fue retirado 5 minutos después y la reacción se mantuvo en agitación magnética durante 3 horas.

Finalizado el tiempo se observó la formación de un residuo sólido amarillo que se adhirió a las paredes del matraz bola y la mezcla de reacción líquida color amarillo. Se filtró la solución a vacío con el uso de un matraz Kitasato de 1L y un embudo Buchner con papel filtro, se obtuvo un residuo sólido amarillo en el papel filtro y un residuo líquido incoloro con poca turbidez. El residuo sólido fue lavado con AcOEt para desprenderse del papel filtro.

El líquido incoloro se trasvasó a un embudo de decantación de 1000 mL, se le realizaron los lavados con aproximadamente 800 mL de AcOEt, posteriormente la fase orgánica del lavado con AcOEt y el residuo sólido lavado con AcOEt fueron reunidos en el embudo de decantación de 1000 mL para posteriormente ser lavados con 300 mL de una solución saturada de NH_4Cl , después con 300 mL de agua destilada, en ninguno de los lavados se observó la formación de emulsiones.

La fase orgánica resultante del lavado con agua destilada se observó con turbidez, por lo que se le adicionó el agente de secado Na_2SO_4 hasta que la solución se observó transparente con un color amarillento, se filtró la solución con el uso de papel filtro y un embudo de vidrio para eliminar el residuo de Na_2SO_4 .

La solución se trasvasó a un matraz bola de 500 mL previamente pesado y se llevó a vacío mediante el uso del rotavapor digital D402-2 con una temperatura ajustada de 44°C y 100 rpm llevándose a sequedad.

Se obtuvo el producto crudo de (±)-DHIE siendo un líquido oleoso de color amarillo, el cual se pesó en una balanza granataria digital OHAUS® Adventure Pro. Así mismo se realizó una cromatoplaquea al producto crudo de (±)-DHIE comparándolo con un estándar de (±)-DHIE.

El producto crudo de (±)-DHIE se pasó a un vaso de precipitado de 100 mL previamente pesado. Se purificó el producto crudo realizando una recristalización para lo cual se adicionaron 10 mL de MeOH y se mantuvo en agitación magnética por aproximadamente 10 minutos, se observó una lenta formación de cristales por lo que se procedió a raspar las paredes del vaso de precipitado con una varilla de agitación de vidrio, se adicionó 15 mL de MeOH y se llevó a agitación magnética con un poco de calentamiento, posteriormente se llevó a un baño de hielo por aproximadamente 30 minutos, se observó la formación de cristales blancos.

Se filtraron los cristales de (±)-DHIE y el residuo líquido mediante vacío usando un matraz Kitasato de 150 mL y un embudo Buchner con papel filtro. Al residuo líquido del matraz Kitasato se le adicionó 10 mL de MeOH y se realizó el mismo proceso, pero no se observó recristalización alguna, solo se formó un residuo amarillo oleoso.

Los cristales puros de (±)-DHIE se pesaron en un vaso de precipitado de 50 mL previamente pesado y se llevó a resonancia magnética nuclear de ^1H y ^{13}C con CDCl_3 para la caracterización y corroboración de la estructura comparándolo con la literatura establecida.

◇ Cuantificación total de proteínas del extracto acuoso de *Brassica oleracea*

Se preparó una solución stock de albúmina de suero bovino (ASB) con 10 mg de ASB los cuales fueron disueltos con agua destilada en un matraz volumétrico de 5 mL llevándose al aforo.

En tubos Eppendorf se colocaron las siguientes alícuotas para realizar la curva de calibración por triplicado como se observa en la tabla 2 y 2.1.

Tabla 2. Alícuotas tomadas para la curva de calibración.

| Tubo Eppendorf | μL de solución stock | μL de agua destilada |
|----------------|---------------------------------|---------------------------------|
| 1 | 300 | 0 |
| 2 | 375 | 125 |
| 3 | 325 | 325 |
| 4 | 175 (del tubo 2) | 175 |
| 5 | 325 (del tubo 3) | 325 |
| 6 | 325 (del tubo 5) | 325 |
| 7 | 325 (del tubo 6) | 325 |
| 8 | 0 | 325 |

Tabla 2.1. Alícuotas tomadas de la muestra problema para su cuantificación de proteínas.

| Tubo | Extracto acuoso de <i>Brassica oleracea</i> (μL) | μL de agua destilada |
|------|---|---------------------------------|
| 1 | 300 | 0 |
| 2 | 375 | 125 |

Cabe mencionar que los tubos 4 a 8 se deben agitar correctamente, los tubos 1 a 3 no se agitan. Posteriormente se tomaron 100 μL de cada tubo y se trasvasó a un matraz volumétrico de 5 mL el cual se llevó al aforo con reactivo Bradford, se homogeneizó la solución en el matraz volumétrico y se pasó a tubos de ensayo previamente etiquetados con el número del tubo Eppendorf.

Cada tubo se leyó en un espectrofotómetro UV-Vis a una longitud de onda de 595 nm, obteniéndose los valores de absorbancia de cada tubo, lo mismo se realizó con la muestra problema.

Se realizó la regresión lineal de los datos obtenidos sacando la R^2 y se interpoló los datos obtenidos de la muestra del extracto acuoso obteniéndose así la cantidad total de proteína.

- ◇ Esquema de la síntesis de las derivatizaciones de (±)-DHIE por reacciones de cadena lateral lateral

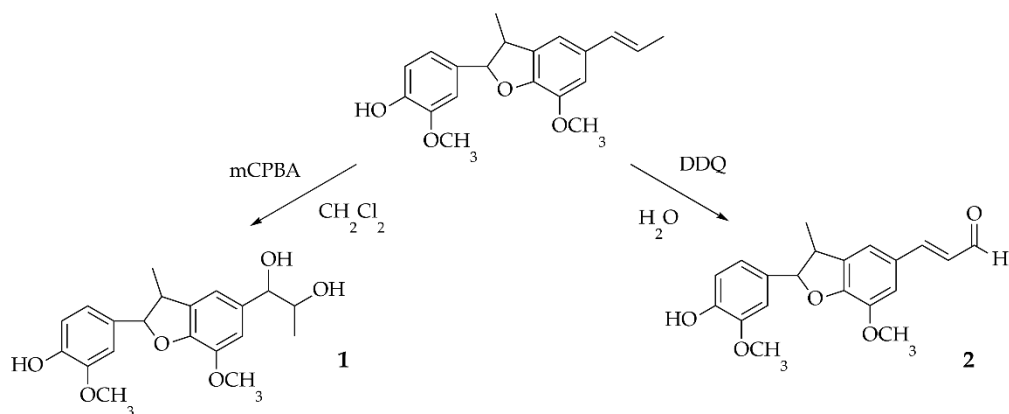


Fig 12. Esquema de la síntesis de las derivatizaciones de (±)-DHIE por reacciones de cadena lateral.

- ◇ Síntesis de las derivatizaciones de (±)-DHIE por reacciones de cadena lateral

Derivado 1 (Licarinediol A)

En un matraz bola de 250 mL se adicionó 0.27 g (0.84 mmol, 1 equivalente) de (±)-DHIE, 20 mL de cloruro de metileno (CH₂Cl₂), 0.25 g (1.44 mmol, 1.72 equivalente) de ácido metacloroperbenzoico (mCPBA) y se dejó en agitación magnética a temperatura ambiente por 24 horas.

Transcurridas las horas determinadas, se le adicionó una solución saturada de Na₂SO₃, se observó la formación de 2 fases siendo la primera de color amarillo que contenía el producto y la segunda incolora que contenía Na₂SO₃.

Se eliminó el disolvente con el uso de presión reducida mediante el rotavapor digital D402-2 con una temperatura ajustada de 44°C y 100 rpm. Se observó la presencia de una espuma que se convirtió en un residuo sólido de color amarillo que se adhirió a las paredes del matraz bola y una parte líquida incolora con poca turbidez.

Se adicionó 10 mL de CHCl₃ al matraz bola que contenía el residuo sólido amarillo y la parte líquida, se trasvasó el contenido a un embudo de decantación de 60 mL, se realizó un lavado con

30 mL de CHCl_3 , se observó la fase orgánica de color amarillenta y la fase acuosa de color rosada tenue, se realizó un segundo lavado con 20 mL de CHCl_3 , se observó la fase orgánica transparente y la fase acuosa de color rosada-morado.

La fase del lavado resultante se observó con turbidez, por lo que se le adicionó el agente de secado Na_2SO_4 hasta que la solución se observó transparente, se filtró la solución mediante papel filtro y un embudo de vidrio para eliminar el residuo de NaSO_4 .

La solución se colocó en un matraz bola de 100 mL previamente pesado y se llevó a sequedad por vacío mediante el uso del rotavapor digital D402-2 con una temperatura ajustada de 44°C y 100 rpm.

Se preparó una cromatografía en columna para purificar el producto crudo obtenido, se realizó con una columna de 10 cm de sílica gel flash y se adicionó 10 mL de disolvente Hexano/AcOEt de polaridad 70:30 para colocarlo en la columna de sílica gel flash, y utilizando una fase móvil de Hexano/AcOEt de polaridad 70:30, empezando con 100 mL de los disolventes, obteniéndose el producto purificado en un matraz bola de 100 ml previamente pesado y se llevó a sequedad por vacío mediante el uso del rotavapor digital D402-2 con una temperatura ajustada de 44°C y 100 rpm obteniéndose (\pm)-Licarinediol A purificado.

Se realizó una cromatoplaquea con estándar de (\pm)-DHIE y (\pm)-Licarinediol A purificado y fue revelado con sulfato cérico. El (\pm)-Licarinediol A puro se llevó a resonancia magnética nuclear de hidrógeno (RMN ^1H) con CDCl_3 para la corroboración de la estructura comparándolo con la literatura establecida.

Se repitió la reacción siguiendo la misma metodología, pero con diferencia que posterior al secado con Na_2SO_4 y su evaporación de disolvente por presión reducida, el producto fue analizado mediante RMN ^1H .

Así mismo el filtrado por columna de sílica gel flash se realizó con disolvente Hexano/AcOEt con polaridad de 70:30 y 50:50, obteniéndose dos productos purificados a diferentes polaridades los cuales también fueron analizados mediante RMN ^1H .

Se realizó una tercera repetición de la reacción siguiendo la misma metodología, pero con diferencia que posterior al lavado con CHCl_3 , se realizó un lavado con 50 mL de NaHCO_3 al 10%, consecutivamente se realizó un lavado con 50 mL de salmuera (NaCl) al 10%, se midió el pH con el uso del potenciómetro HANNA Instruments HI2211 siendo este de 7.0.

La fase del lavado resultante se observó con turbidez, por lo que se le adicionó el agente de secado Na_2SO_4 hasta que la solución se observó transparente, se filtró la solución mediante papel filtro y un embudo de vidrio para eliminar el residuo de NaSO_4 .

La solución se colocó en un matraz bola de 250 mL previamente pesado y se llevó a sequedad por vacío mediante el uso del rotavapor digital D402-2 con una temperatura ajustada de 44°C y 100 rpm.

Se obtuvo el producto crudo el cual se adicionó a 1 g de sílica gel flash y se dejó secar a temperatura ambiente, al momento del secado, la sílica gel flash cambio de coloración a verde y posterior a su secado se observó con una coloración café.

Se preparó una cromatografía en columna para purificar el producto crudo obtenido, se realizó con una columna de 10 cm de sílica gel flash y 1 g de sílica gel flash con el producto crudo, y utilizando una fase móvil de Hexano/ AcOEt de polaridad creciente, empezando con 100 mL de los disolventes a 75:25 y 60:40, obteniéndose diversas fracciones a las cuales se les realizó una cromatoplaqueta con estándar del (\pm)-Licarinediol A puro y crudo obtenidos en experimentaciones anteriores y que fue revelada por sulfato cérico.

Las fracciones de interés fueron reunidas en un matraz bola de 250 mL previamente pesado, el cual se llevó a sequedad por vacío mediante el uso del rotavapor digital D402-2 con una temperatura ajustada de 44°C y 100 rpm, obteniéndose el producto de (\pm)-Licarinediol A puro.

El (\pm)-Licarinediol A puro se llevó a resonancia magnética nuclear de hidrógeno (RMN ^1H) con CDCl_3 para la caracterización y corroboración de la estructura comparándolo con la literatura establecida.

Derivado 2

En un matraz bola de 50 mL se adicionaron 0.5 mL de agua destilada y 50 mg de DDQ (0.22 mmol) la cual se dejó en agitación magnética a temperatura ambiente por 5 minutos. Transcurrido este tiempo, se adicionó 50 mg de (\pm)-DHIE disueltos en 4 mL de CH_2Cl_2 , la reacción se fue siguiendo mediante cromatografía de capa fina aproximadamente por 30 minutos.

Se adicionó 40 mL de ácido ascórbico (0.22 mmol) a la mezcla manteniéndose en agitación magnética por 10 minutos, una vez terminada la reacción, los sólidos fueron removidos mediante filtración al vacío utilizando un matraz Kitasato de 250 mL, el líquido filtrado fue lavado con una solución saturada de NaHCO_3 .

La fase orgánica fue secada con Na_2SO_4 hasta que desapareció la turbidez, se filtró con ayuda de papel filtro, posteriormente se llevó a sequedad mediante vacío con el uso del rotavapor digital a 100 rpm y 44°C , obteniéndose un sólido oleoso color naranja, se colectó con 1 mL de CHCl_3 y se dejó secar el solvente restante en un vial el cual se llevó a resonancia magnética nuclear de hidrógeno (RMN ^1H) con CDCl_3 para la caracterización y corroboración de la estructura comparándolo con la literatura establecida.

Se repitió la reacción con la diferencia que se adicionó 2.5 mL de H_2O destilada, 250 mg de DDQ (0.22 mmol), la cual se dejó en agitación magnética a temperatura ambiente por 5 minutos, donde se observó una coloración naranja.

Posteriormente se adicionó 250 mg de (\pm)-DHIE en 20 mL de CH_2Cl_2 , se observó un cambio de coloración naranja-verdoso y posteriormente naranja-café, se observó la presencia de sólidos finos.

La reacción fue seguida mediante cromatografía de capa fina, se tomó muestra de la reacción y se comparó contra (\pm)-DHIE, a los 15 y 30 minutos, la fase móvil de la CCF fue de Hexano: AcOEt (70:30 v/v)

Cuando se observó la formación de compuesto en la CCF, se adicionó 200 mg de ácido ascórbico a la reacción manteniendo la agitación magnética. Después, los sólidos formados de la reacción fueron removidos mediante vacío utilizando un matraz Kitasato de 125 mL, el líquido filtrado se

observó de color café, el sólido remanente se observó de color café-arenoso claro, se adicionó 30 mL de CH₂Cl₂ al matraz bola para eliminar los posibles residuos restantes y se volvió a filtrar al vacío.

El líquido filtrado fue trasvasado a un embudo de separación de 125 mL, donde se le realizaron 2 lavados con una solución saturada de NaHCO₃, se observó una separación de fases donde la fase orgánica se observó de color naranja y la acuosa de color amarilla, después la fase orgánica fue secada con Na₂SO₄ anhidro y filtrada mediante papel filtro, el filtrado se trasvasó a un matraz bola de 100 mL previamente pesado.

Este se llevó a sequedad mediante vacío utilizando un rotavapor digital a 100 rpm y 44 °C, obteniéndose un sólido crudo coloración naranja; así mismo se pesó el matraz bola nuevamente para obtener el rendimiento, se repitió la reacción una tercera y cuarta vez con la diferencia que esta vez se utilizaron diferentes volúmenes y pesos de los reactivos, como se observa en la tabla 3.

Tabla 3. Características de repeticiones realizadas para el derivado 2 del (±)-DHIE.

| Reacción | H ₂ O (mL) | DDQ (mg) | (±)-DHIE (mg) | CH ₂ Cl ₂ (mL) | Ác. Ascórbico (mg) |
|----------|-----------------------|----------|---------------|--------------------------------------|--------------------|
| 1 | 0.5 | 50 | 50 | 4 | 40 |
| 2 | 2.5 | 250 | 250 | 20 | 200 |
| 3 | 3 | 300 | 300 | 24 | 240 |
| 4 | 5 | 500 | 500 | 40 | 400 |

Posteriormente se realizó la purificación del producto crudo mediante una cromatografía en columna, para lo cual al producto crudo se le adicionó 1 g de sílica gel flash y se dejó secar en la campana de extracción perfectamente, se preparó la columna de cromatografía adicionando algodón del tamaño de un chícharo en la superior de la válvula de control, seguido de sílica gel flash, se adicionó el producto crudo con sílica sobre la sílica gel flash y otro pedazo de algodón sobre el producto crudo con sílica.

Se preparó la fase móvil de Hexano/AcOEt (80:20 v/v), se adicionó a la columna y se le adaptó una entrada de oxígeno a la columna. Se fueron recogiendo las fracciones del producto purificado. Cabe mencionar que la fase móvil fue gradual en la cromatografía en columna, utilizando los siguientes volúmenes ilustrados en la tabla 4.

Tabla 4. Características de la fase móvil en la cromatografía de columna.

| Disolventes | Proporción en volumen (v/v) | Volumen utilizado (mL) |
|--------------|-----------------------------|------------------------|
| Hexano/AcOEt | 80:20 | 50 |
| Hexano/AcOEt | 70:30 | 100 |
| Hexano/AcOEt | 60:40 | 100 |
| AcOEt | 100 | 100 |

Se realizó una CCF a las distintas fracciones para la identificación del producto purificado con una fase móvil de Hexano/AcOEt (70:30 v/v) y reveladas con sulfato cérico. Una vez identificadas, se dejaron esas fracciones en la campana de extracción hasta que el disolvente se eliminó por completo. Las fracciones que no contenían el producto purificado se juntaron en un matraz bola de 250 mL previamente pesado y se llevó a sequedad mediante vacío utilizando un rotavapor digital a 44 °C y 100 rpm.

Se obtuvo el punto de fusión del producto purificado, además se llevó a resonancia magnética nuclear ^1H y ^{13}C con CDCl_3 .

◇ Esquema de la síntesis de las derivatizaciones de DHIE por reacciones sobre el hidroxilo

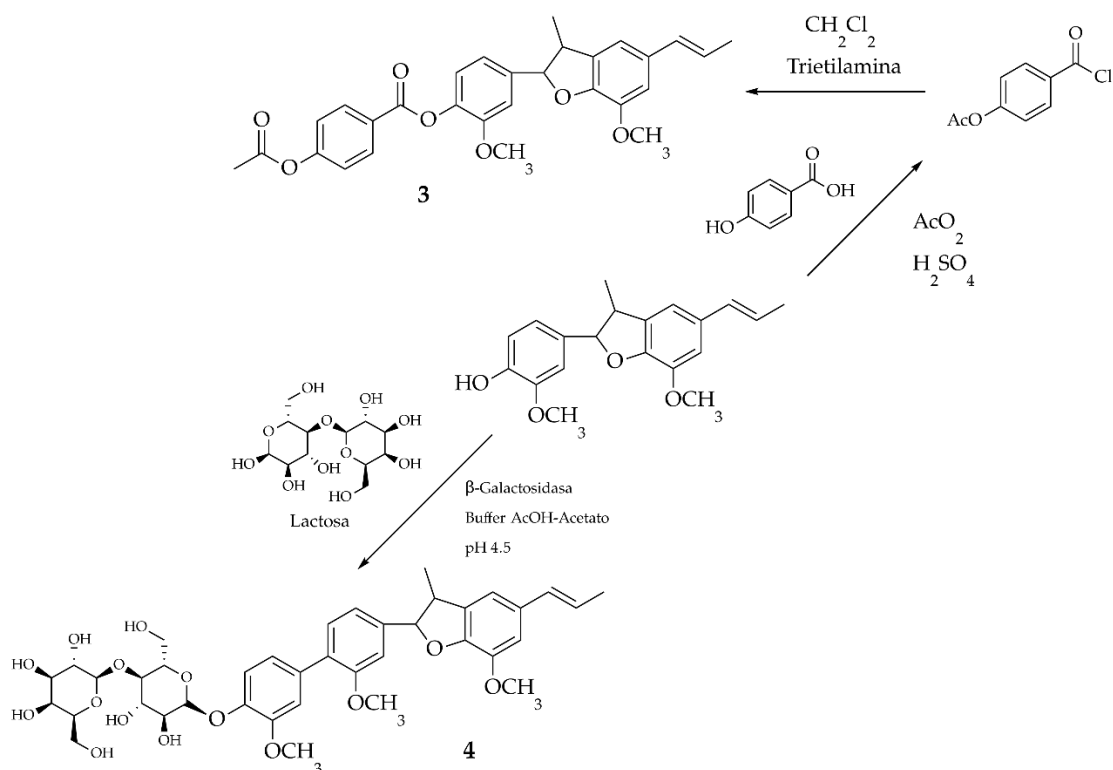


Fig 13. Esquema de la síntesis de las derivatizaciones de (\pm)-DHIE por reacciones de cadena lateral.

◇ Síntesis de las derivatizaciones de (\pm)-DHIE por reacciones sobre el hidroxilo

Derivado 3

Se realizó la reacción siguiendo la metodología de Hernández Vázquez, L. (2005), en un matraz bola de fondo plano se colocaron 5g de ácido-p-hidroxibenzoico (APHB) seguido de 10 mL de AcO_2 con agitación magnética formándose una masa que no se agitaba fácilmente.

Se adicionó 10 gotas de H_2SO_4 , el sistema se puso en reflujo con agitación y calentamiento por 1 hora aproximadamente, se observó un compuesto de color café. Transcurrido ese tiempo, se apagó el calentamiento y se dejó enfriar. Al matraz bola ligeramente tibio se adicionó 5 mL de agua destilada poco a poco con agitación, se observó la formación de un compuesto lechoso.

Se adicionaron 35 mL de agua destilada para posteriormente trasvasar la solución a un vaso de precipitado de 250 mL, se utilizaron 15 mL de agua destilada (divididos en 5 mL) para enjuagar el matraz.

Posteriormente se llevó a enfriamiento en un baño de hielo formándose un sólido color blanco, a la cual se le adicionó 100 mL de una disolución de NaHCO_3 saturada, se observó la formación de espuma y se filtró al vacío con un embudo Butchner. Al filtrado se le adicionó HCl concentrado gota a gota hasta obtener un pH de 3 y observándose la formación de un sólido blanco.

Se colocó en un baño de hielo y se volvió a filtrar observándose un sólido blanco, el cual se recristalizó adicionando 50 mL de etanol caliente, se dejó calentar muy poco y posteriormente se le adicionó agua destilada gota a gota hasta observar turbidez, se colocó nuevamente en un baño de hielo y se filtró al vacío. Se realizó una cromatografía en capa fina del producto contra APHB y utilizando como fase móvil Hexano/AcOEt (80:20 v/v) y unas gotas de CH_3COOH . El producto acetilado de la reacción se llevó a RMN ^1H .

Posteriormente se pesaron 250 mg de producto de la reacción con APHB y se le adicionó 2 mL de cloruro de oxalilo ($\text{C}_2\text{O}_2\text{Cl}_2$) en un matraz bola de 50 mL. La reacción se mantuvo en agitación magnética a temperatura ambiente por 3 horas.

Transcurrido el tiempo, se paró la reacción y se trasvasó a un matraz bola de 100 mL adicionando 15 mL de hexano para posteriormente llevarlo a sequedad utilizando el rotavapor digital a 80 rpm a 45°C , obteniéndose un sólido cremoso y blanquecino.

El producto de APHB se le adicionó 400 mg de (\pm)-DHIE, CH_2Cl_2 y 0.2 mL de NEt_3 , se observó un cambio de la coloración a naranja-café y se mantuvo en agitación magnética aproximadamente por 12 horas.

Se preparó una solución de 100 ml de HCL al 5%, la cual se utilizó para realizar 3 lavados a la reacción, posteriormente se realizó un lavado con 30 mL de una solución de NaCl concentrada. La reacción se secó con NaSO_4 anhidro y se filtró para eliminar los sólidos del proceso, se llevó a sequedad mediante presión reducida con el uso del rotavapor digital D402-2 a una temperatura

ajustada de 44°C y 80 rpm, se realizó una cromatografía de capa fina del producto obtenido contra (±)-DHIE y la esterificación del APHB utilizando como eluyente Hexano: AcOEt 7:3 y 8:2, el producto obtenido fue sólido de coloración café-anaranjado y el producto se llevó a RMN ¹H.

La reacción se repitió una segunda vez, para lo cual se utilizó 560 mg del producto acetilado de APHB adicionándoles 6 mL de cloruro de oxalilo (C₂O₂Cl₂) en un matraz bola de 100 mL, la reacción se dejó en campana de extracción, reflujo y manta de calentamiento a 40 °C, donde se observó una coloración lechosa al iniciar la reacción y posteriormente más transparente, se mantuvo en agitación magnética por 4 horas.

Posteriormente se paró la agitación, el reflujo y se apagó la manta de calefacción esperando 10 minutos a enfriarse, seguido a ello con la campana de extracción encendida, se le adicionó 40 mL de hexano. Después se llevó a sequedad mediante vacío con el uso del rotavapor digital a 44 °C y 50 rpm obteniéndose un sólido blanquecino y que no se identifica cloruro de oxalilo residuales.

Al producto de la halogenación, se le adicionó 400 mg de (±)-DHIE en 40 mL de CH₂Cl₂ y 0.2 mL de NEt₃, dejando en agitación magnética en campana de extracción por 24 horas, se observó una coloración de la reacción naranja-amarilla.

Transcurrido el tiempo, se preparó una solución de 100 mL de HCl al 5%, la cual se utilizó para realizar 3 lavados en un embudo de separación de 33.33 mL por lavado, después se hizo un lavado de 50 mL de una solución concentrada de NaCl, la reacción se secó con Na₂SO₄ anhidro, filtrado y llevado a sequedad mediante vacío con el uso del rotavapor a 44 °C y 55 rpm trasvasando la reacción a un matraz bola de 50 mL previamente pesado, se obtuvo un sólido oleoso color naranja.

Se le realizó una CCF al producto esterificado crudo contra el producto acetilado de APHB y (±)-DHIE, con una fase móvil de Hexano/AcOEt (80:20 v/v). El producto crudo de la esterificación se purificó mediante recristalización con EtOH, se realizó una prueba de solubilidad con EtOH, MeOH y H₂O, siendo EtOH el de mejor solubilidad en caliente, se trasvasó el producto crudo a un vaso de precipitado de 250 mL al cual se le adicionó 50 mL de etanol, se llevó a calentamiento y agitación magnética, posteriormente se llevó a un baño de hielo comenzando así su cristalización.

Derivado 4

Se modificó la metodología de Carević et al (2015), donde se pusieron diferentes pruebas para la reacción en buffer de AcOH-Acetato pH 4,5, como se muestra en la siguiente tabla

Tabla 5. Pruebas de reacción de transgalactosilación.

| Tubo | (±)-DHIE (mg) | Lactosa (mg) | β-Galactosidasa (mg) |
|------|---------------|--------------|----------------------|
| 1 | 0 | 10 | 2 |
| 2 | 10 | 0 | 2 |
| 3 | 10 | 10 | 0 |
| 4 | 20 | 10 | 2 |
| 5 | 10 | 40 | 2 |
| 6 | 10 | 20 | 2 |
| 7 | 10 | 10 | 5 |
| 8 | 10 | 10 | 2 |

Se colocó cada tubo en la incubadora de agitación Labnet Accutherm I-4001-HCS a una temperatura de 55 °C, a 300 rpm en un tiempo de 72 horas. Posteriormente de cada tubo se sacó una CCF a las 20 y 70 horas de reacción, donde la fase móvil fue MeOH/CHCl₃ (80:20 v/v) y revelado con sulfato cérico.

Transcurrido el tiempo, se sacaron de la incubadora con agitación de microtubos Accutherm y los tubos fueron llevados a refrigeración. Posteriormente de cada tubo se identificó la transglicosidación de (±)-DHIE mediante cromatografía de líquido de alta resolución (HPLC) utilizando un HPLC acoplado a un detectó UV de marca Agilent Technologies 1220.

Se prepararon 200 mL de MeOH grado HPLC con 0.1% v/v de ácido fórmico (CH₂O₂) el cual fue filtrado mediante vacío con el uso del sistema de filtración Whatman Agilent, así como 150 mL de H₂O grado HPLC utilizando el mismo sistema, las membranas utilizadas fueron 100 Nylon filter membranes 47 mm 0.45 μm Agilent, cabe mencionar que no se purgaron los solventes porque el HPLC tiene un sistema de purgado automático.

Posteriormente fueron depositadas en los viales de fase móvil correspondientes del HPLC Agilent procurando colocar correctamente los buzos y sin dejar que estuviesen aflojados con las mangueras; así mismo se purgaron las mangueras para eliminar las burbujas de aire de los conductos con el uso una jeringa especial, evitando que haya fugas hacia los sensores.

Se adaptó y utilizó una columna HALO C18 4.6 x 100 mm 2.4 μ m con presión máxima de 600 bar y una temperatura de 22 °C; así mismo se ajustó el analizador DAD a una longitud de onda de 210 y 220 nm, el flujo se ajustó a 1 mL/min. Se ajustó un gradiente como se muestra en la siguiente tabla.

Tabla 5.1. Gradiente de los disolventes a través del tiempo.

| Tiempo (min) | MeOH/ 0.1% CH ₂ O ₂ (%) | H ₂ O (%) | Flujo (mL/min) | Presión máxima (bar) |
|--------------|--|----------------------|----------------|-------------------------|
| 0 | 10 | 90 | 1 | 600 |
| 3 | 20 | 80 | 1 | 600 |
| 6 | 30 | 70 | 1 | 600 |
| 9 | 40 | 60 | 1 | 600 |
| 12 | 30 | 70 | 1 | 600 |
| 15 | 10 | 90 | 1 | 600 |

Se colocó 1 mL de MeOH grado HPLC en un vial de alta recuperación claro con rosca de 1.5 mL con reservorio de 30 μ L Agilent.

De los tubos de la reacción de transglucosidación, se tomaron 1.5 mL de muestra que se colocaron en un tubo Eppendorf los cuales fueron centrifugados a 10000 rpm por 3 min. Posteriormente se tomó 800 μ L del sobrenadante y se colocó en 8 viales con rosca de 1.5 mL con reservorio de 30 μ L Agilent, los viales fueron colocados en el muestreador del HPLC y se procedió a realizar el análisis con las condiciones previamente ajustadas.

Se identificó mediante los picos del análisis correspondiente que este método utilizado no fue el óptimo ya que se observó demasiado ruido en las señales obtenidas y una mala resolución de estas, por lo que se decidió realizar modificaciones al método planteado.

Se cambiaron los disolventes siendo ahora Acetonitrilo/H₂O los cuales fueron filtrados mediante vacío con el uso del sistema de filtración Whatman Agilent. La columna fue una HALO C18 4.6 x 100 mm 2.4 μm con presión máxima de 600 bar y una temperatura de 22 °C, el analizador DAD fue ajustado a una longitud de onda de 210 y 220 nm, el flujo se ajustó a 1 mL/min. Se ajustó un gradiente como se muestra en la siguiente tabla

Tabla 6. Gradiente ajustado de los disolventes a través del tiempo.

| Tiempo (min) | H ₂ O (%) | ACN (%) | Flujo (mL/min) | Presión máxima (bar) |
|--------------|----------------------|---------|----------------|----------------------|
| 0 | 40 | 60 | 1 | 600 |
| 5 | 30 | 70 | 1 | 600 |
| 10 | 20 | 80 | 1 | 600 |
| 13 | 30 | 70 | 1 | 600 |
| 16 | 40 | 60 | 1 | 600 |

Se procedió a realizar el análisis con las condiciones previamente ajustadas obteniéndose los picos a mejor resolución.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

◇ Síntesis biocatalítica de (±)-DHIE usando peroxidasa de rábano picante II

Se realizaron 7 repeticiones de la reacción biocatalítica de (±)-DHIE usando peroxidasa de rábano tipo II en las cuales se obtuvieron los siguientes pesos del producto crudo una vez eliminado el solvente mediante el rotavapor como se muestra en la tabla 7.

Tabla 7. Peso y rendimiento de las primeras 7 reacciones del crudo de (±)-DHIE.

| Reacción | Peso (g) | Rendimiento % |
|----------|----------|---------------|
| 1 | 1.31 | 84 |
| 2 | 0.26 | 16 |
| 3 | 0.14 | 9 |
| 4 | 5.99 | 386 |
| 5 | 1.45 | 93 |
| 6 | 1.47 | 94 |
| 7 | 1.39 | 89 |

Tabla 8. Características de las primeras 7 repeticiones.

| Reacción | Isoeugenol (mg) | Enzima de rábano picante tipo II (mg) | H ₂ O ₂ 30% (mL) | Tiempo de la reacción (h) |
|----------|-----------------|---------------------------------------|--|---------------------------|
| 1 | 1.55 | 12.4 | 0.6 | 3 |
| 2 | 1.55 | 12.4 | 0.6 | 3 |
| 3 | 1.55 | 12.4 | 0.6 | 3 |
| 4 | 1.55 | 12.4 | 0.6 | 2 |
| 5 | 1.55 | 12.4 | 0.6 | 2 |
| 6 | 1.55 | 12.4 | 0.6 | 2 |
| 7 | 1.55 | 12.4 | 0.6 | 2 |

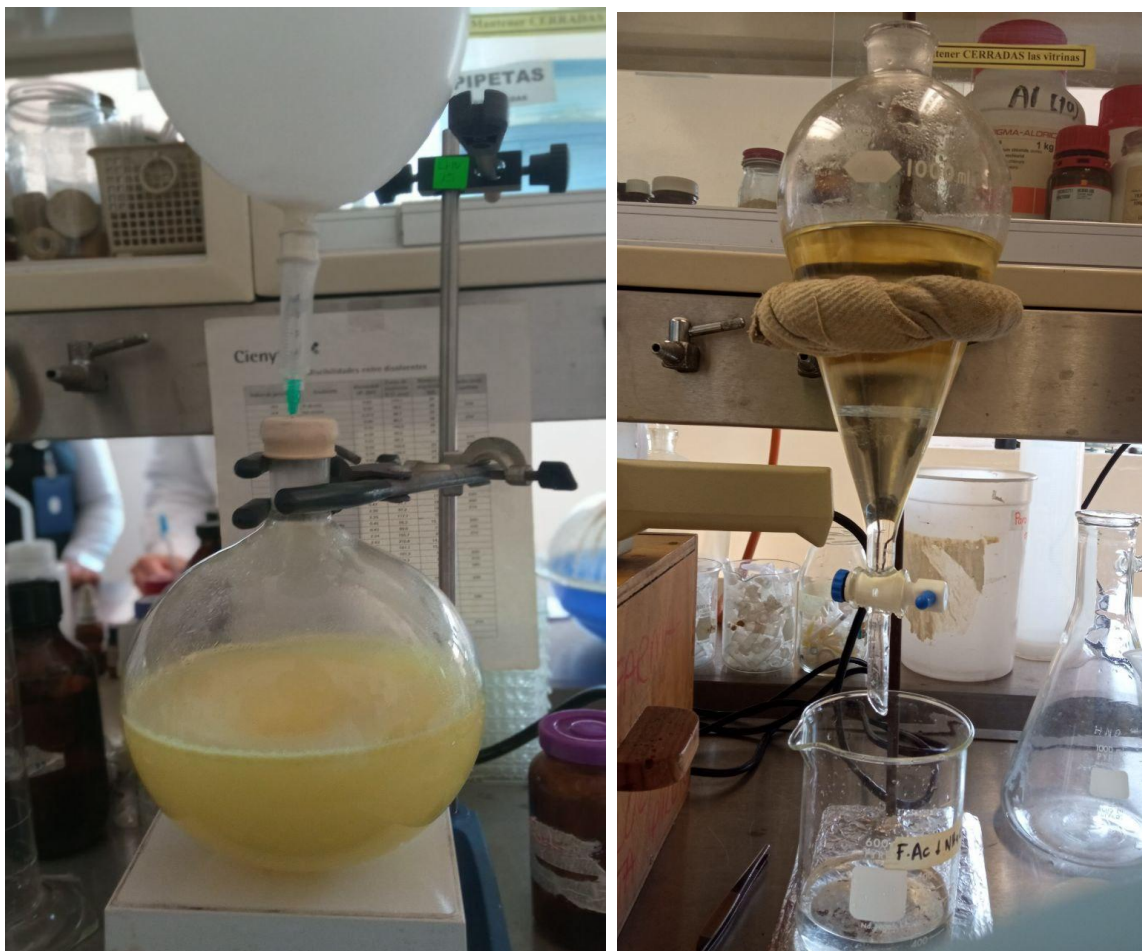


Fig 14. Síntesis biocatalítica de (±)-DHIE con Peroxidasa de rábano picante II.

A las 7 repeticiones se les sacaron cromatoplasmas las cuales fueron reveladas mediante sulfato cérico, como se observa en la figura 15, en los 7 productos se logra observar la formación del (±)-DHIE, aunque con manchas por debajo, se infiere que es debido al uso de la enzima con tiempo de almacenamiento largo lo cual resultaría en formación de impurezas debido a que reaccionó más rápido así como la formación de diversos polímeros.

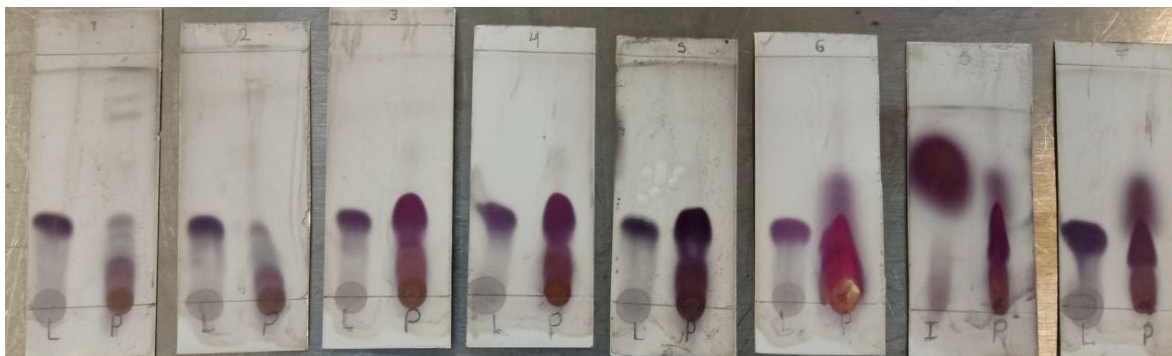


Fig 15. Cromatoplasmas de las 7 repeticiones, repetición 1 (Licarina A(L), producto obtenido (P)), repetición 2 (Licarina A (L), producto obtenido (P)), repetición 3 (Licarina A(L), producto obtenido (P)), repetición 4 (Licarina A (L), producto obtenido (P)), repetición 5 (Licarina A (L), producto obtenido (P)), repetición 6 (Licarina A (L), producto obtenido (P)), repetición 6 (Isoeugenol (E), producto obtenido (P)), repetición 7 (Licarina A (L), producto obtenido (P)).

Como se observó en las repeticiones 1 a 3 un rendimiento relativamente bajo, se modificó el método a partir de la repetición 4, el tiempo de reacción pasó de 3 horas a 2 horas; así mismo se descartó la filtración y se añadió 300 mL de acetato de etilo a la reacción cuando ya habían pasados 2 horas para posteriormente utilizar agitación magnética a un nivel bajo de agitación para evitar la emulsión durante 5 minutos, se procedió a realizar solo 2 extracciones con acetato de etilo en lugar de 3, teniendo un rendimiento más alto a comparación de las repeticiones anteriores.

Conforme a la repetición 4, se tiene un resultado muy discordante debido a que se infiere que el producto aún contenía agua, dando así un aumento en el peso y por lo tanto un mayor rendimiento erróneo. Así mismo, en las reacciones 6 y 7 se observó una coloración de mayor intensidad y un producto mayor, esto debido a que se utilizó un reactivo de isoeugenol nuevo, conllevando una pureza de mayor nivel.

Se realizó la purificación de los productos 1-5 y 6-7 mediante una cromatografía de columna y posteriormente se llevó al rotavapor para eliminar los restos de disolventes de las fracciones recolectadas, además se les realizó cromatoplasmas a las distintas fracciones recolectadas para la identificación del (\pm)-DHIE, así como los productos secundarios de polimerización o que aún contenían Isoeugenol, todas ellas reveladas mediante sulfato cérico.

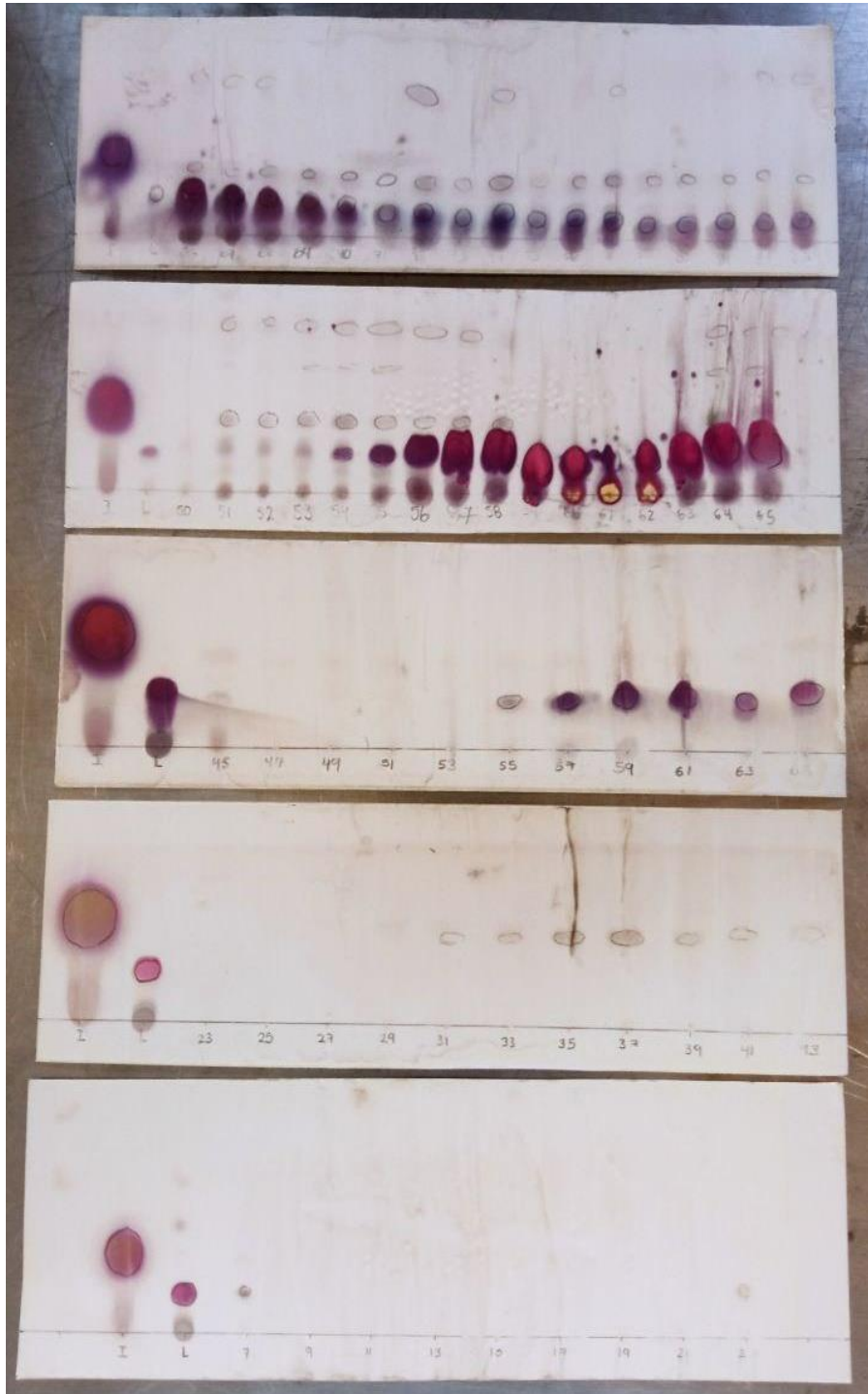


Fig 16. Cromatoplas de las distintas fracciones recolectadas de la purificación de repeticiones 1 a 5, (I)= Isoeugenol, (L)=Licarina.

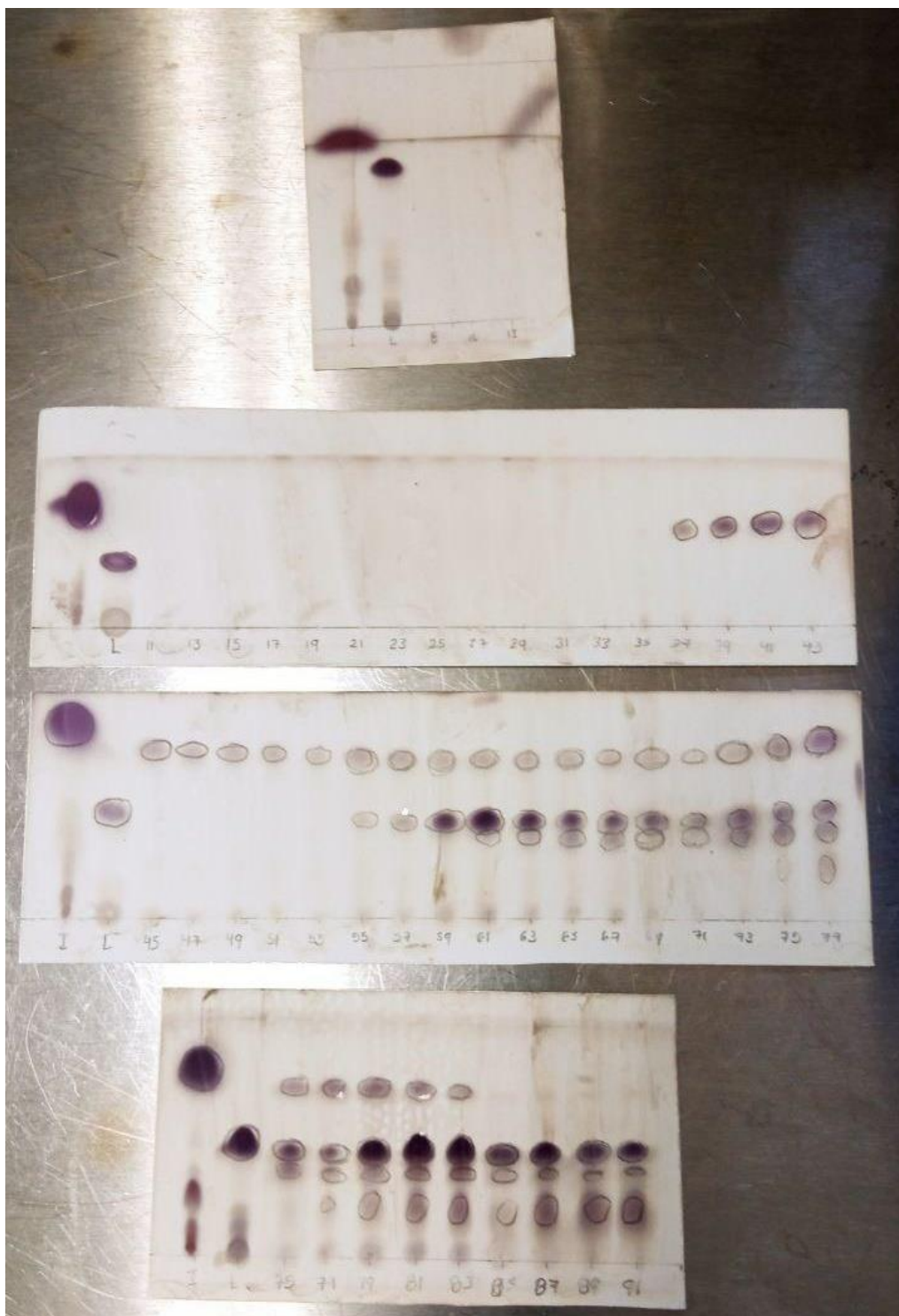


Fig 17. Cromatoplasmas de las fracciones recolectadas de la purificación de repeticiones 6 y 7, (I)= Isoeugenol, (L)=Licarina A.

Tabla 9. mL utilizados de los eluyentes de polaridad creciente en la cromatografía de columna.

| Disolvente | Relación | mL |
|---------------------------|----------|-----|
| Hexano : Acetato de etilo | 95:5 | 400 |
| Hexano : Acetato de etilo | 90:10 | 400 |
| Hexano : Acetato de etilo | 80:20 | 800 |
| Hexano : Acetato de etilo | 70:30 | 800 |
| Acetona | - | 400 |
| Hexano | - | 400 |

Como se observa en la figura 16, en las fracciones 1 a 30 no se observa característica alguna en la cromatoplaça, esto debido a que solo se obtuvo disolvente en esas fracciones, fue a partir de la fracción 31 a la 50 donde se observó la aparición de isoeugenol, posteriormente en la fracción 51 a 69 donde se observa la aparición de (\pm)-DHIE con manchas por debajo y arriba, se infiere que el producto no se purificó lo suficiente solo obteniendo una fracción del mismo quedándose parte en la columna, por último para las fracciones 70 a 83 se obtuvieron productos de diversos polímeros formados.

En las fracciones obtenidas en la figura 17, se observa que de la 1 a la 35 no se observa característica alguna en la cromatoplaça, esto debido a que solo se obtuvo disolvente en esas fracciones, fue a partir de la fracción 37 a la 53 donde se observó la aparición de isoeugenol, posteriormente en la fracción 55 a 75 donde se observa la aparición de (\pm)-DHIE con pocas manchas por debajo y arriba, se infiere que el producto no se purificó lo suficiente solo obteniendo una fracción del mismo quedándose parte en la columna, por último para las fracciones 77 a 90 se obtuvieron productos de diversos polímeros formados.

Los productos de la segunda y tercera repetición purificados por su recrystalización con MeOH, se les midieron el punto de fusión y su rendimiento como se muestra en la tabla 10.



Fig 18. Purificación del producto crudo de (±)-DHIE mediante recristalización por MeOH de las repeticiones 2 y 3 posteriores.

Tabla 10. Peso obtenido y rendimiento de las 2 repeticiones posteriores.

| Reacción | Peso (g) | Rendimiento % | Punto de fusión (°C) |
|----------|----------|---------------|----------------------|
| 2 | 1.91 | 63 | 131 °C |
| 3 | 1.52 | 50 | 133 °C |

Los resultados obtenidos muestran que se obtuvo un rendimiento aceptable, aunque el rendimiento relativamente fue más bajo a comparación de la primera reacción, esto se debe a que se le adicionó menor cantidad de enzima HRP II; así mismo el punto de fusión se mantiene en el rango de temperatura que marca la literatura reportada entre 130-135 °C, dado que el punto de fusión experimental coincide con el rango bibliográfico, se puede considerar que el valor obtenido es adecuado y confiable, por otra parte, se optimizó el proceso de la reacción al adicionar una atmósfera de nitrógeno inerte, así evitando reacciones adversas que puedan ocurrir debido a la presencia de oxígeno o humedad en el aire, se infiere que eso indujo el aumento de pureza del (±)-DHIE permitiendo así el proceso de cristalización.

En la figura 19 y 19.1 se observa el espectro de resonancia magnética nuclear ^1H para la caracterización de los cristales puros de (±)-DHIE, se observa a simple vista que los espectros muestran algunas señales que demuestran impurezas, por lo que se comparó con lo reportado por Nascimento et al (2000).

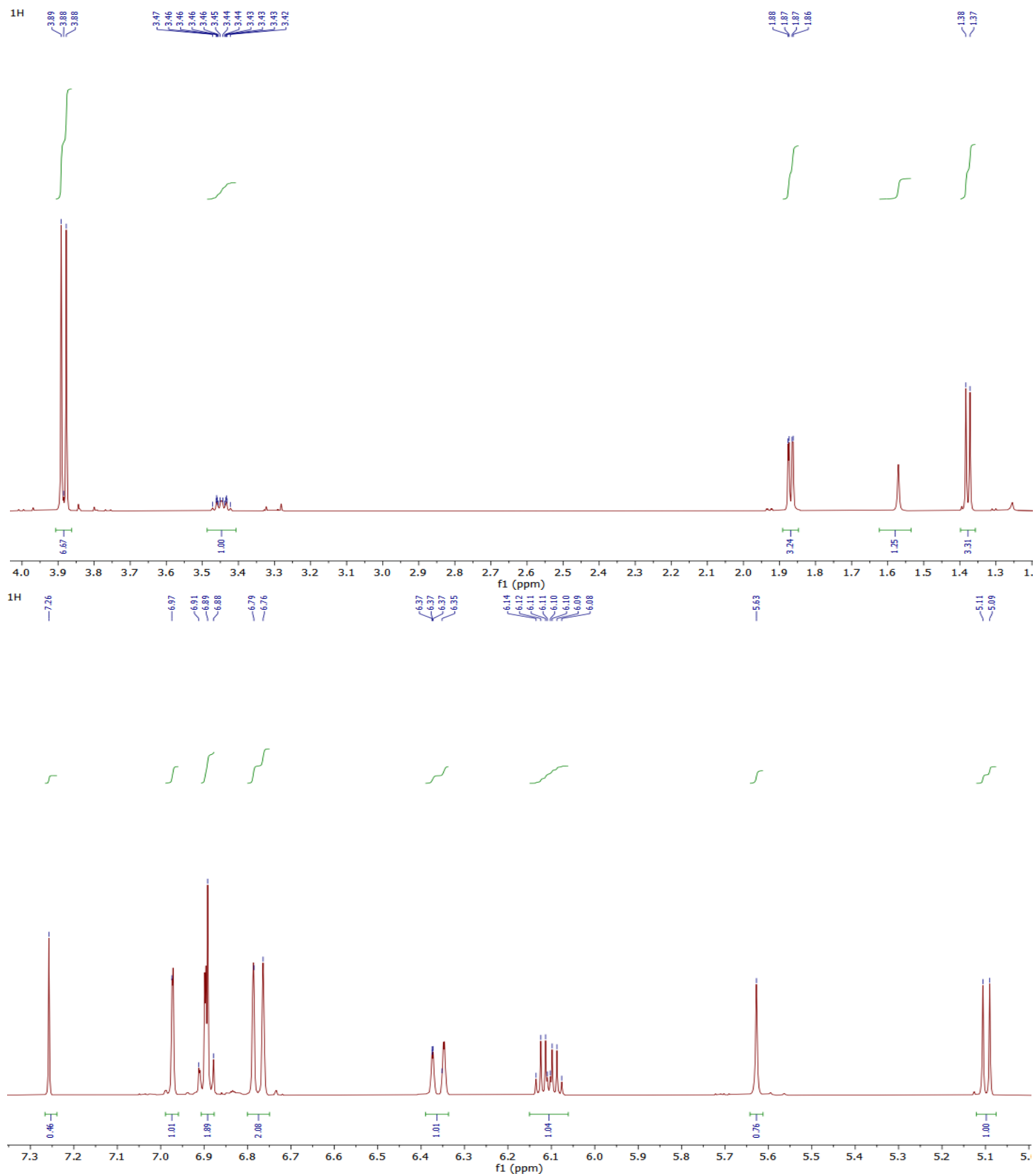


Fig 19 – 19.1. Espectros de ¹H RMN con CDCl₃ de los cristales puros de la síntesis de (±)-DHIE.

En la tabla 11 se observa el tipo de hidrógeno asignado de acuerdo con la señal de desplazamiento de cada átomo de hidrógeno en el espectro de RMN; así mismo, se representan los desplazamientos documentados en la literatura para ello se tomó como referencia la estructura del (±)-DHIE reportada por (Nascimento et al., 2000). Puede observarse que tanto en la figura 19-19.1 como en los datos obtenidos en la tabla 11 las señales características de la molécula siendo muy cercanas a lo reportado en la literatura. Se observa las señales características de aromáticos en el rango de 6 ppm, las señales del vinilo en el rango de 5 a 6 ppm, el alcohol en un rango de 5 ppm, las señales de OCH₃ en su rango característico de 3 a 4 ppm, cabe mencionar que varían un poco los desplazamientos debido a las diferentes interacciones que tienen.

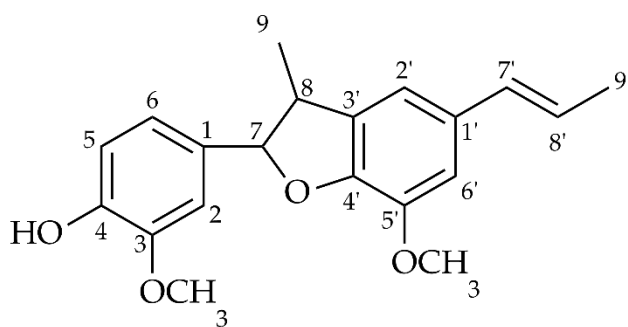


Fig 20. Estructura del (±)-DHIE.

Tabla 11. Desplazamientos en el espectro de ¹H RMN de los cristales puros de la síntesis de (±)-DHIE.

| H | δ (ppm) | Multiplicidad | ∫ | Nascimento et al. (2000) δ (ppm) |
|------------------|-----------|------------------------|------|----------------------------------|
| 9 | 1.38 | Doblete | 3.19 | 1.37 |
| 9' | 1.86 | Doble doblete | 3.26 | 1.87 |
| 8 | 3.44 | Doble cuatriplete | 1.01 | 3.44 |
| OCH ₃ | 3.86-3.89 | Doblete (2 singuletes) | 6.72 | 3.85-3.88 |
| 7 | 5.12 | Doblete | 1.01 | 5.09 |
| OH | 5.64 | Singulete | 0.76 | 5.65 |
| 8' | 6.10 | Doble cuatriplete | 1.05 | 6.11 |
| 7' | 6.39 | Doblete | 1.02 | 6.36 |
| 2' | 6.74 | Singulete | 1.09 | 6.76 |
| 6' | 6.79 | Singulete | 1.09 | 6.79 |

| | | | | |
|-----|-------------|------------------|-------------|-------------------------|
| 5/6 | 6.8-6.907 | Multiplete | 1.90 | 6.8 - 6.88 |
| 2 | 6.95 | Multiplete | 1.02 | 6.97 |
| - | <u>7.26</u> | <i>Singulete</i> | <u>1.08</u> | <u>CDCl₃</u> |

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) Agilent 600 DD2 sonda OneNMR: δ 7.0-6.8 (m, J 7.5, 0.8 Hz, 1H), 6.91- 6.88 (m, J 0.8Hz, 1H), 6.91-6.76 (d, J 7.5Hz, 1H), 6.79 (s, 1H), 6.74 (s, 1H), 6.4 (d, J 15.7, 1.7Hz, 1H), 6.1 (dq, J 15.7, 6.6 Hz, 1H), 5.6 (s, 1H), 5.1 (d, J 9.5, 1H), 3.9 (s, 3H), 3.86 (s, 3H), 3.4 (dq, J 9.5, 6.8 Hz, 1H), 1.86 (dd, J 6.6, 1.7 Hz, 3H), 1.38 (d, J 6.8 Hz, 3H)

Los productos obtenidos en la síntesis de (±)-DHIE utilizando peroxidasa de rábano picante resultaron ser un compuesto sólido cristalino de color blanco. Se observó que los productos de la reacción al ser expuestos a temperatura ambiente cambiaron a un color amarillento, por lo que se decidió conservarlos a baja temperatura.

◇ Síntesis biocatalítica de (±)-DHIE usando peroxidasa de brócoli (*Brassica oleracea*)



Fig 21. Síntesis biocatalítica de (±)-DHIE con peroxidasa de brócoli.

El producto crudo de la reacción fue purificado mediante su recrystalización con MeOH, se les midieron el punto de fusión y su rendimiento como se muestra en la tabla 12.

Tabla 12. Peso obtenido y rendimiento de las 2 repeticiones posteriores.

| Reacción | Peso (g) | Rendimiento % | Punto de fusión (°C) |
|----------|----------|---------------|----------------------|
| 1 | 0.6 | 20 | 129 °C |

Una de las diferencias físicas notables entre la reacción de (±)-DHIE con peroxidasa de rábano picante II y peroxidasa de brócoli fue la coloración de la reacción, ya que fue menos intensa con la peroxidasa de brócoli; así mismo su rendimiento fue mucho más bajo que el obtenido por HRP, se infiere que fue debido que la enzima de brócoli no está lo suficientemente purificada por lo que en el proceso de la reacción podrían interferir impurezas con su actividad. Así mismo, podría deberse a la madurez del brócoli siendo que en etapas más tempranas la actividad enzimática puede ser más alta, mientras que en etapas más avanzadas la actividad puede disminuir, además de que la textura del brócoli puede afectar la facilidad con la que se pueden romper las células para liberar la peroxidasa siendo que un brócoli más maduro puede tener una estructura celular más rígida,

dificultando la extracción, además el punto de fusión bajo un poco a diferencia del punto de fusión de los cristales de (\pm)-DHIE obtenida con HRP II.

Los productos obtenidos en la síntesis de (\pm)-DHIE utilizando peroxidasa de brócoli resultaron ser un compuesto sólido cristalino de color blanco. Se observó que los productos de la reacción al ser expuestos a temperatura ambiente cambiaron a un color amarillento, por lo que se decidió conservarlos a baja temperatura.



Fig 22. Cromatopla de (\pm)-DHIE con peroxidasa de brócoli contra (\pm)-DHIE con HRP II

La figura 22 muestra como los cristales de (\pm)-DHIE obtenida con peroxidasa de brócoli se encuentra pura ya que no se observa una cantidad de subproductos, siendo el primer punto correspondiente a (\pm)-DHIE obtenida con peroxidasa de brócoli y el segundo (\pm)-DHIE obtenida con HRP II.

Conforme al rendimiento obtenido de la reacción, este fue del 20% siendo concordante con lo reportado por (Anita et al., 2022), pero considerablemente bajo a comparación de (\pm)-DHIE obtenida con HRP II.

◇ Cuantificación total de proteínas del extracto acuoso de *Brassica oleracea*

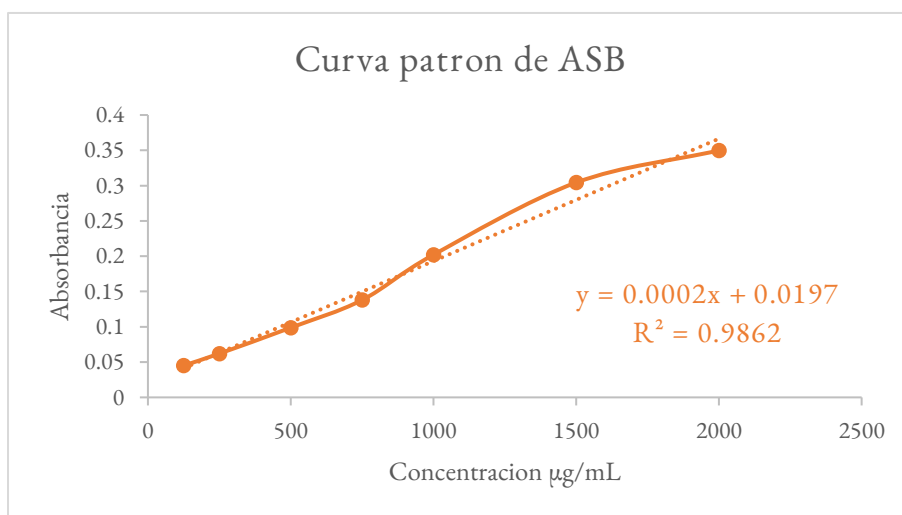
Se obtuvieron las absorbancias así como la concentración de proteína de la curva patrón y del extracto de *Brassica oleracea* mediante espectrofotómetro UV-Vis como se muestra en la tabla 14 y el gráfico 1.

Tabla 13. Absorbancias y concentración de proteína de la curva patrón de ASB.

| [Proteína] $\mu\text{g/mL}$ | Absorbancia |
|-----------------------------|-------------|
| 2000 | 0.3498 |
| 1500 | 0.3043 |
| 1000 | 0.2020 |
| 750 | 0.1379 |
| 500 | 0.0987 |
| 250 | 0.0620 |
| 125 | 0.0451 |

Tabla 14. Absorbancias y concentración de proteína del extracto de *Brassica oleracea*.

| [Proteína] $\mu\text{g/mL}$ | Absorbancia |
|-----------------------------|-------------|
| 480.77 | 0.1021 |
| 241.84 | 0.0601 |



Gráfica 1. Absorbancias en función de la concentración de la curva patrón de ASB.

Se obtuvo la ecuación de la recta y su coeficiente de correlación, así se interpolaron los valores de absorbancia del extracto acuoso de *Brassica oleracea* con la siguiente fórmula:

$$x = \frac{y - b}{m}$$

Donde x es la concentración de proteína, y es la absorbancia obtenida de la lectura del espectrofotómetro UV-Vis, b es la ordenada al origen y m es la pendiente de la recta.

Como se observa en la gráfica 1, el coeficiente de correlación obtenido fue de 0.9862, indicando una alta linealidad de los datos garantizando así una correcta cuantificación de proteínas, también se observa que la tendencia está modelada a partir de la ecuación lineal de orden $y=0.0002x + 0.0197$.

De acuerdo con lo reportado de Anita et al (2022), la actividad enzimática de la peroxidasa de *Brassica oleracea* es de 14.577 U/mg, conociendo que la concentración proteica es de 480.77 $\mu\text{g/mL}$ o equivalentemente a 0.48077 mg/mL, entonces la actividad enzimática del extracto es de 7.008 U/mL, siendo esto la mitad de actividad enzimática de la peroxidasa reportada.

$$\text{Actividad total} = 14.577 \frac{U}{mg} * 0.48077 \frac{mg}{mL} = 7.008 \frac{U}{mL}$$

Se encontró una concentración de 480.77 $\mu\text{g/mL}$ en el extracto acuoso de *Brassica oleracea* lo cual está dentro del rango de cuantificación de la curva, sin embargo, esta concentración de proteína se podría tomar como medianamente baja y se infiere que el factor experimental que influyó en ello fue una molienda ineficaz para la preparación del extracto, un sobrecalentamiento de la licuadora o que se mantuvo en refrigeración algunos días antes de realizar la cuantificación total de proteínas.

◇ Síntesis de las derivatizaciones de (±)-DHIE por reacciones de cadena lateral

Derivado 1

Se realizaron 3 repeticiones de la reacción de derivatización 1, obteniéndose los siguientes pesos y su rendimiento de cada repetición.

Tabla 15. Peso y rendimiento de las 3 repeticiones de la reacción de epoxidación de (±)-DHIE.

| Reacción | Peso (g) | Rendimiento % |
|----------|----------|---------------|
| 1 | 0.022 | 8.1 |
| 2 | 0.035 | 12.9 |
| 3 | 0.063 | 23.3 |

Tabla 16. Características de las 3 repeticiones de la reacción de epoxidación de (±)-DHIE.

| Reacción | (±)-DHIE (g) | CH ₂ Cl ₂ (mL) | mCPBA (g) | Extracciones liquido-líquido (mL) |
|----------|--------------|--------------------------------------|-----------|---|
| 1 | 0.27 | 20 | 0.25 | 60 mL de CHCl ₃ |
| 2 | 0.27 | 20 | 0.25 | 60 mL de CHCl ₃ |
| 3 | 0.27 | 20 | 0.25 | 60 mL de CHCl ₃ 50 mL de NaHCO ₃ al 10% 50 mL de NaCl al 10%, |

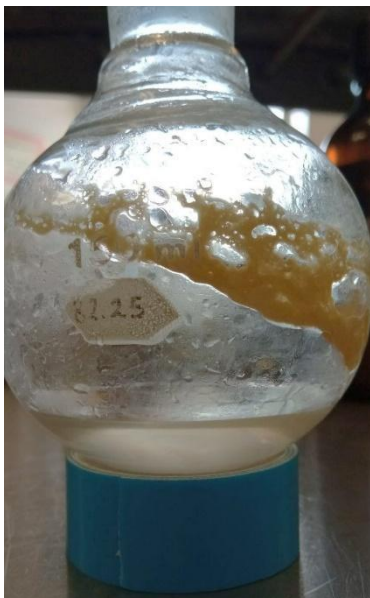
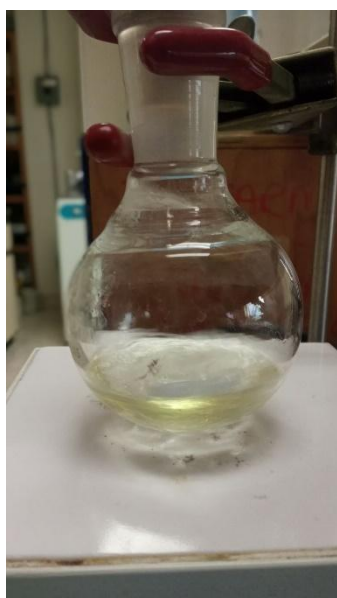


Fig 23. Reacción de epoxidación de (±)-DHIE.

Como se observa en la tabla 15, el rendimiento en general de la reacción es demasiado bajo a comparación de las otras derivatizaciones, aunado a ello el rendimiento de la reacción 1 y 2 es considerablemente más bajo a diferencia de la reacción 3 que es equivalente a lo reportado por (Oliveira et al., 2019) siendo este del 20%. Se infiere que esto sucede debido a que el mCPBA es un agente oxidante fuerte que puede reaccionar con múltiples sitios en la molécula de (\pm)-DHIE, lo que puede llevar a la formación de subproductos no deseados, así mismo el producto puede ser inestable lo que lo llevaría a su descomposición parcial posiblemente por la presencia de grupos funcionales reactivos o insaturaciones que lo hacen susceptible a reacciones secundarias, sobre oxidación o descomposición. Además, se infiere que la técnica de purificación utilizada puede no ser completamente efectiva para separar el producto deseado de los subproductos, reduciendo así el rendimiento final.

El aumento del rendimiento en la reacción 3 podría haberse debido a las extracciones adicionales realizadas con NaHCO_3 y NaCl como se observa en la tabla 16. Se infiere que estas extracciones pudieron haber ayudado a eliminar impurezas o subproductos que estarían interfiriendo con la pureza del producto final; así mismo haber ajustado el pH a 7 con NaHCO_3 pudo haber estabilizado el producto evitando su descomposición y mejorando su recuperación, además que el uso de NaCl puede haber mejorado la separación de fases permitiendo así una extracción más eficiente del producto deseado.

Cabe mencionar que cuando se adicionó 1 g de sílica gel flash al producto crudo de la reacción para proseguir con la purificación en cromatografía de columna, esta se tornó de una coloración verde, se infiere que esto sucedió debido a los grupos ácidos de la sílica gel flash que pudo haber alterado el pH del sistema, afectando la estabilidad del producto y la eficiencia de la separación o que pudo interactuar fuertemente con compuestos básicos o neutros, reteniéndolos más de lo esperado y dificultando su elución, resultando de igual manera en una separación ineficiente.

Al producto purificado por cromatografía en columna se les sacaron cromatoplasmas de las fracciones colectadas y que fueron reveladas mediante sulfato cérico, como se observa en la figura 24 en las fracciones 1 a 39 no se observa característica alguna en la cromatoplasma, fue a partir de la

fracción 40 donde se observó la aparición del producto (\pm)-Licarinediol A, se infiere que el producto no se purificó lo suficiente solo obteniendo una fracción de este quedándose gran parte en la columna.

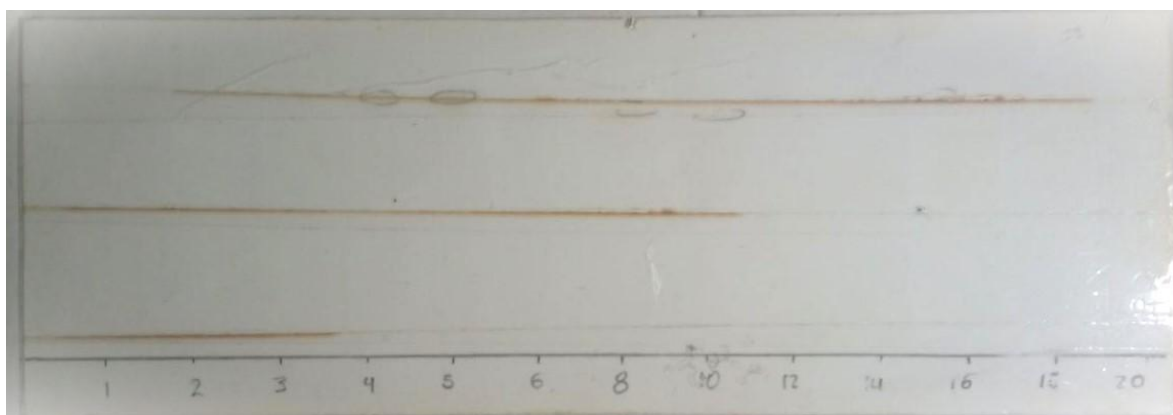


Fig 24. Cromatoplaça de las fracciones 1 a 40 de la purificación de epoxidación de (\pm)-DHIE.

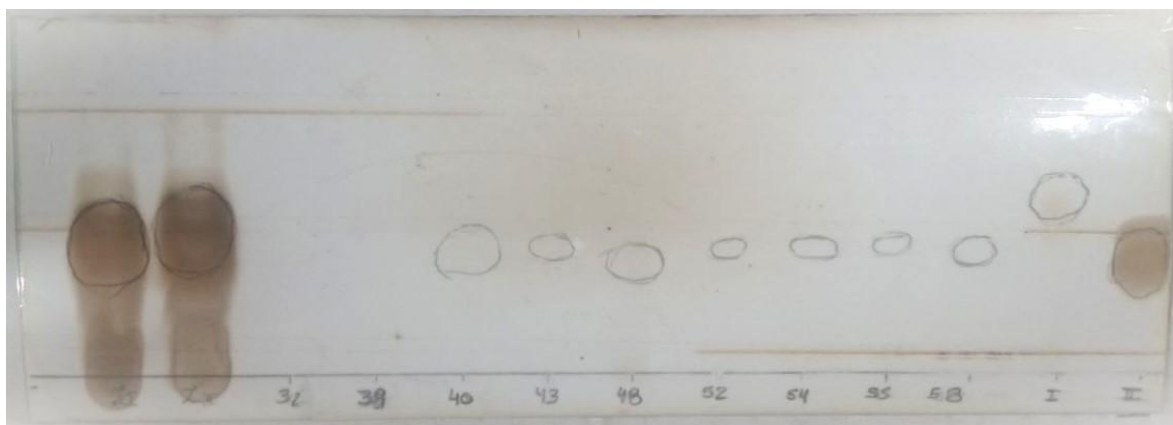


Fig 25. Cromatoplaça de distintas fracciones de la purificación de epoxidación de (\pm)-DHIE, LI y LII=Producto antes de purificar, I=Fracciones 1-39 reunidas, II=Fracciones 40-60 reunidas, fracciones 36 a 60.

Tabla 17. mL utilizados de los eluyentes en la cromatografía de columna.

| Disolvente | Relación | mL |
|--------------|----------|-----|
| Hexano/AcOEt | 75:25 | 500 |
| Hexano/AcOEt | 70:30 | 400 |

En la figura 25, se observa que la fracción LI, LII, 40 a 60 y II la aparición del producto (\pm)-Licarinediol A, cabe mencionar que la fracción denominada como LI y LII a pesar de que se observa que existe producto, tiene varias manchas por debajo indicando la presencia de subproductos o polímeros formados debido a que no había sido purificado, producto que desaparecieron en su gran mayoría posterior a su purificación como se observa en las fracciones 40 a 60 y II. Además, en la fracción denominada I, se observa una mancha por encima del producto esperado, se infiere que es la presencia de (\pm)-DHIE ya que son las fracciones que han salido primero de la columna. Posiblemente se deba tomar en cuenta la optimización del método de la purificación en cromatografía de columna, específicamente la relación de disolventes deba de aumentar su gradiente y quizá se obtenga una mejor purificación y recuperación del producto.

En la figura 26 y 27 se observa el espectro de resonancia magnética nuclear ^1H para la caracterización del (\pm)-Licarinediol A purificado, se observa que los espectros muestran algunas señales que demuestran impurezas, por lo que se comparó con lo reportado por Oliveira et al (2019).

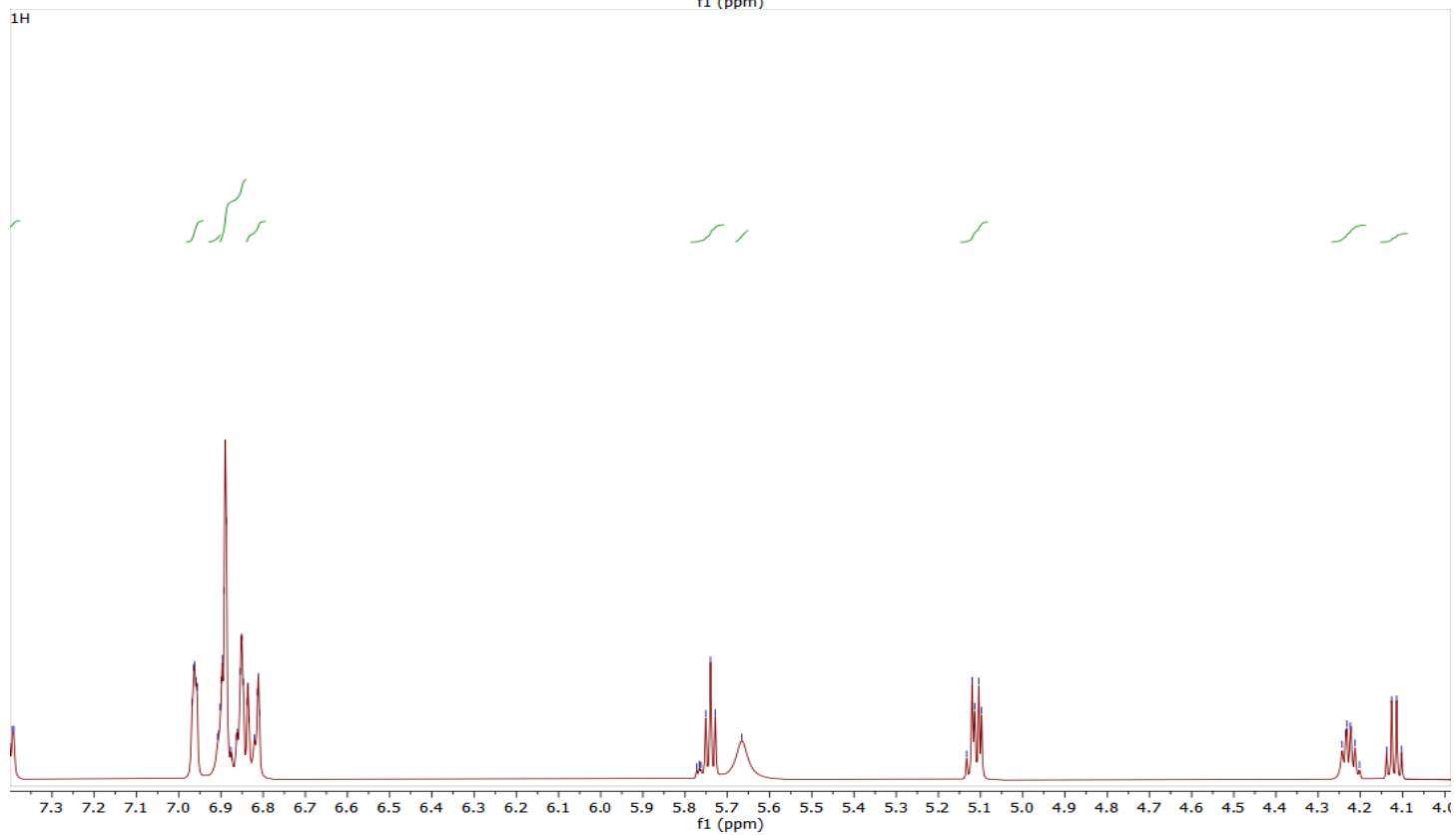
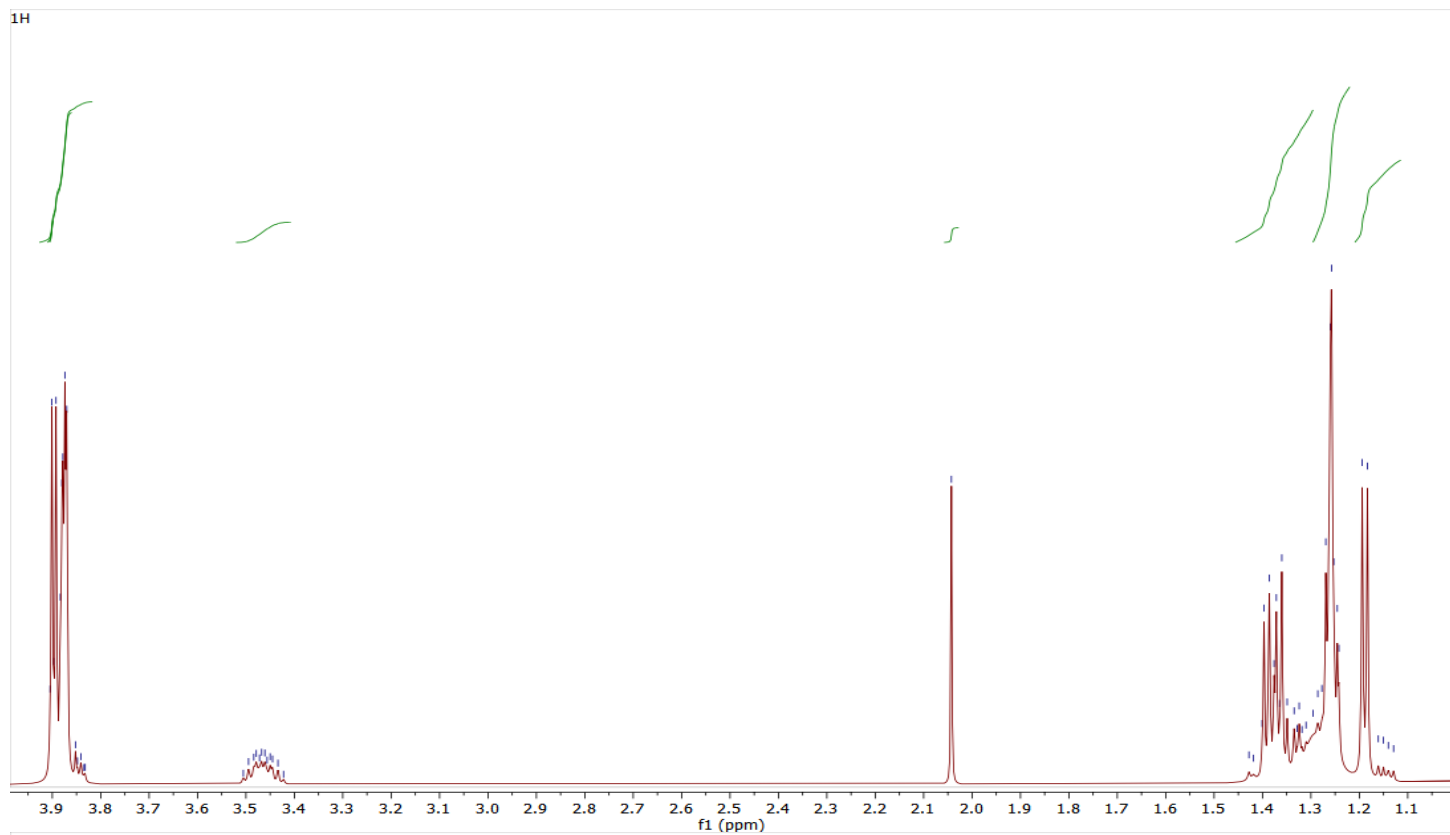


Fig 26 – 27. Espectros de ^1H RMN con CDCl_3 de (\pm)-Licarinediol A.

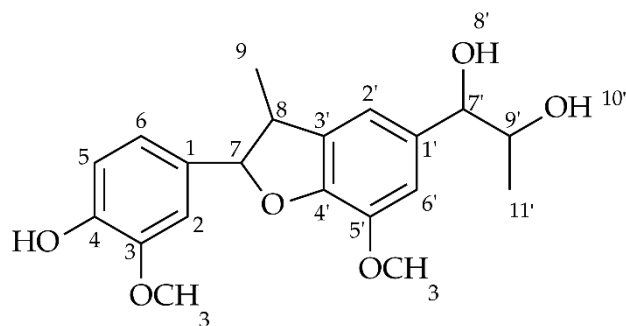


Fig 28. Estructura del (±)-Licarinediol A.

Tabla 18. Desplazamientos en el espectro de ^1H RMN de los cristales puros de la síntesis de (±)-DHIE.

| H | δ (ppm) | Multiplicidad | J | Oliveira et all. (2019) δ (ppm) |
|------------------|----------------|------------------|------|--|
| 11' | 1.19 | Doblete | 3.14 | 1.18 |
| - | 1.26 | Triplete | 3.31 | - |
| 9 | 1.37 | Multiplete | 1.26 | 1.37 |
| - | 2.04 | Singlete | 1.40 | - |
| 8 | 3.49 - 3.44 | Multiplete | 1.01 | 3.49 - 3.44 |
| OCH ₃ | 3.87 - 3.88 | Doble doblete | 6.48 | 3.87 - 3.88 |
| 10' - OH | 3.90 | Singlete | 1.09 | 3.90 |
| 9' | 4.12 | Multiplete | 1.15 | 4.11 |
| 8' - OH | 4.23 | Doble doblete | 1.08 | 4.23 |
| 7 | 5.12 | Multiplete | 1.06 | 5.11 |
| 7' | 5.67 | Singlete | 1.31 | 5.66 |
| - | 5.74 | Triplete | 0.87 | - |
| 6/6' | 6.79 - 6.87 | Multiplete | 2 | 6.79 - 6.84 |
| 2 | 6.89 | Singlete | 1.10 | 6.88 |
| 2' | 6.98 - 6.94 | Multiplete | 1.11 | 6.97 - 6.95 |
| OH | 7.41 | Triplete doblete | 1.14 | 7.2 |

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) Agilent 600 DD2 sonda OneNMR: δ 7.41 (td, $J = 7.9, 2.1$ Hz, 1H), 6.98 - 6.94 (m, 1H), 6.89 (s, 1H), 6.87 - 6.79 (m, 2H), 5.74 (t, $J = 6.9$ Hz, 1H), 5.67 (s, 1H), 5.12 (m, 1H), 4.23 (dd, $J = 6.7, 5.2$ Hz, 1H), 4.12 (m, 1H), 3.93 - 3.82 (m, 7H), 3.46 (dd, $J = 13.3, 6.7$ Hz, 1H), 2.04 (s, H), 1.46 - 1.30 (m, 1H), 1.26 (s, 3H), 1.19 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H)

Se observan los picos característicos del diol a 3.90 y 4.23 ppm, respectivamente, estando en el rango adecuado para alcoholes, los picos característicos del CHO_3 en un rango de 3.87 - 3.88; así mismo se observan señales extra de impurezas en 1.25, 2.04 y 5.74, todas ellas pertenecientes a impurezas de AcOEt, se infiere que provienen del solvente utilizado para la purificación de (\pm)-Licarinediol A.

Los productos obtenidos en la síntesis de (\pm)-Licarinediol A resultaron ser un compuesto sólido de color amarillo tenue.

Derivado 2

Se realizaron 4 repeticiones de la reacción de oxidación, obteniéndose los siguientes pesos y su rendimiento de cada repetición.

Tabla 19. Peso y rendimiento de las 4 repeticiones de la reacción de oxidación de (\pm)-DHIE.

| Reacción | Peso (mg) | Rendimiento % |
|----------|-----------|---------------|
| 1 | 34 | 68 |
| 2 | 210 | 84 |
| 3 | 240 | 80 |
| 4 | 330 | 66 |

Tabla 20. Características de repeticiones realizadas para el derivado 2 del (\pm)-DHIE.

| Reacción | H ₂ O (mL) | DDQ (mg) | (\pm)-DHIE (mg) | CH ₂ Cl ₂ (mL) | Ác. Ascórbico (mg) |
|----------|-----------------------|----------|---------------------|--------------------------------------|--------------------|
| 1 | 0.5 | 50 | 50 | 4 | 40 |
| 2 | 2.5 | 250 | 250 | 20 | 200 |
| 3 | 3 | 300 | 300 | 24 | 240 |
| 4 | 5 | 500 | 500 | 40 | 400 |





Fig 29. Reacción de oxidación de (±)-DHIE.

Como se observa en la tabla 19, el rendimiento de las reacciones es alto y equivalente a lo reportado por Oliveira et al (2019) siendo este del 80%. Aun así, se infiere que en la última repetición el rendimiento bajo se debió probablemente a que podría estarse saturando el sistema, así como puede que no se disuelva completamente o que no se disperse adecuadamente los reactivos en el disolvente, además que es posible que al cambiar la cantidad de (±)-DHIE, también se alteren inadvertidamente otras condiciones experimentales, lo que finalmente podría llevar a una disminución en la eficiencia de la reacción y/o lo puede llevar a la formación de subproductos no deseados.

Cabe mencionar que el rendimiento global de la reacción fue del 42% después de la purificación por cromatografía en columna, se infiere que la técnica de purificación utilizada puede no ser completamente efectiva para separar el producto deseado de los subproductos, reduciendo así el rendimiento final.

Durante la reacción con DDQ y (±)-DHIE, se obtuvieron las cromatoplas de CCF para seguir la reacción a los 15 y 30 minutos después de empezada y con una fase móvil de Hexano/AcOEt (70:30 v/v) reveladas con sulfato como se muestra en la figura 30.

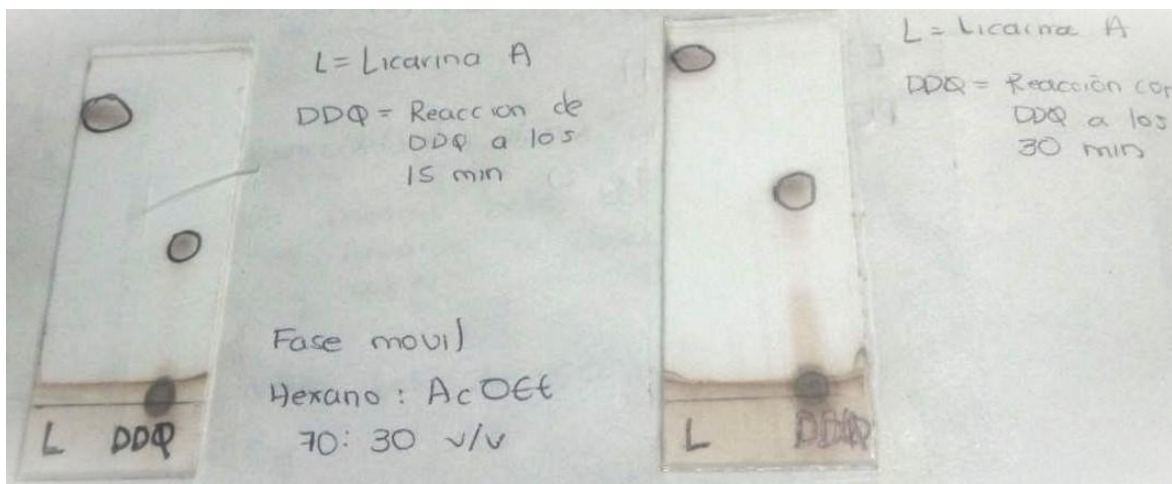


Fig 30. Seguimiento de la reacción de oxidación de (±)-DHIE a través del tiempo mediante CCF.

Al producto purificado por cromatografía en columna se les sacaron cromatoplasmas de las fracciones colectadas y fueron reveladas mediante sulfato cérico, como se observa en la figura 26, donde las fracciones 1 a 5 y 13 a 20 no se observa característica alguna en la cromatoplasma, fue a partir de la fracción 6 a 12 donde se observó la aparición del producto de la reacción, se infiere que parte del producto se quedó gran parte en la columna al tener un rendimiento bajo a comparación con el crudo.

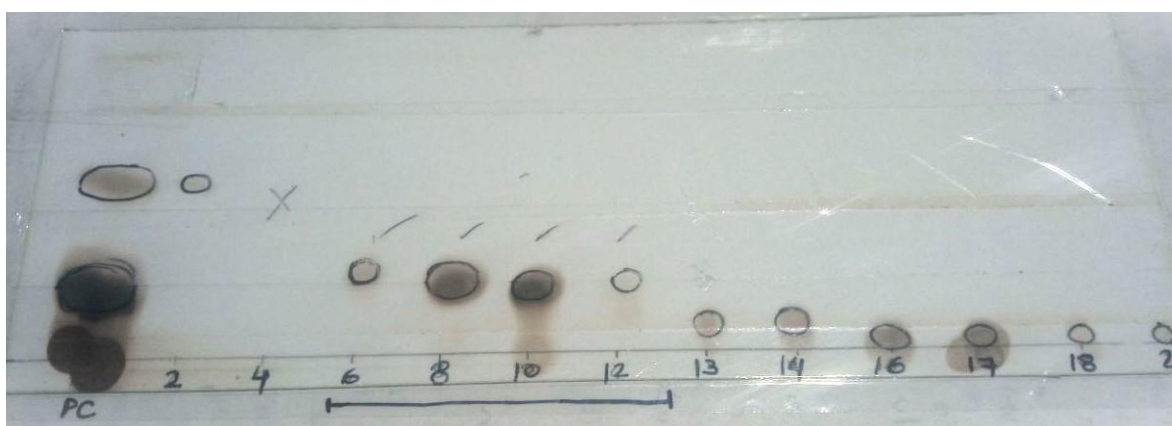


Fig 31. Cromatoplasma de las fracciones 1 a 20 de la purificación del crudo de oxidación de (±)-DHIE, PC (Producto crudo).

En la figura 31, se observa que la fracción 6 a 12 la aparición del producto de la oxidación de (±)-DHIE, cabe mencionar que la fracción denominada como 13 a pesar de que se observa la posible existencia de producto, tiene varias manchas por debajo indicando la presencia de subproductos o

polímeros formados debido a que no había sido purificado, además se observan algunas manchas por encima del producto esperado, se infiere que es la presencia de (\pm)-DHIE. Posiblemente se deba tomar en cuenta la optimización del método de la purificación en cromatografía de columna, específicamente la relación de disolventes deba de aumentar su gradiente y quizá se obtenga una mejor purificación y recuperación del producto.

En la figura 32 y 32.1 se observa el espectro de resonancia magnética nuclear ^1H para la caracterización del producto de reacción purificado, se observa que los espectros muestran señales características con lo reportado por Alvarenga et al (2020).

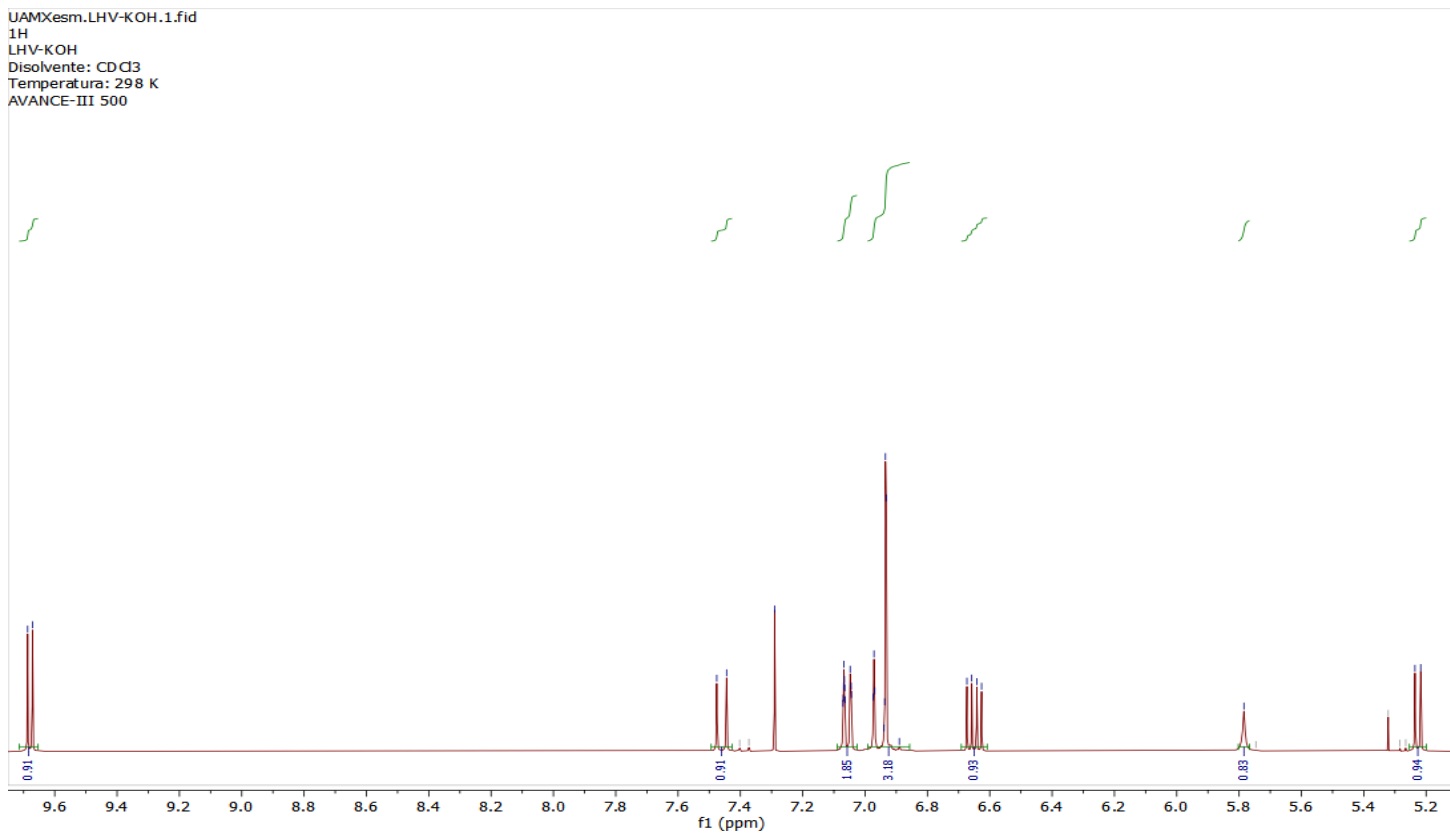
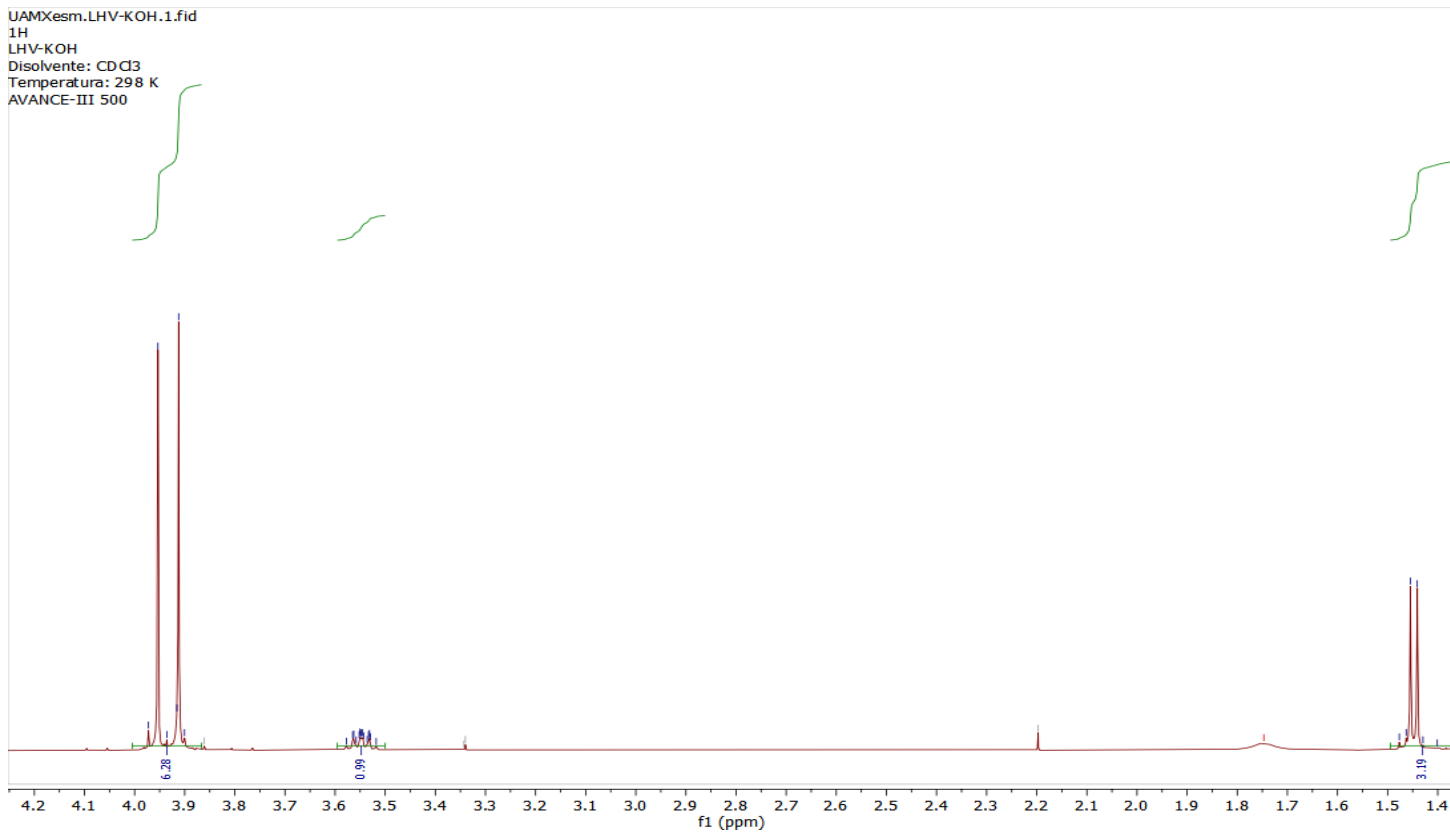


Fig 32 – 32.1. Espectros de ¹H RMN con CDCl₃ del producto de oxidación de (±)-DHIE.

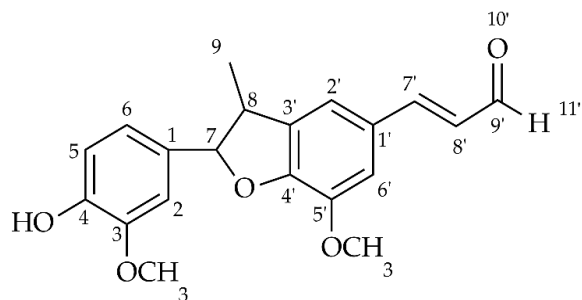


Fig 33. Estructura del producto de oxidación de (±)-DHIE

Tabla 21. Desplazamientos en el espectro de ^1H RMN de los cristales puros de la síntesis de oxidación de (±)-DHIE.

| H | δ (ppm) | Multiplicidad | J | Alvarenga et al. (2020) δ (ppm) |
|------------------|----------------|---------------|------|--|
| 9 | 1.45 | Doblete | 3.19 | 1.41 |
| 8 | 3.60 – 3.50 | Multiplete | 0.99 | 3.55–3.46 |
| OCH ₃ | 4.00 – 3.87 | Multiplete | 6.28 | 3.87–3.91 |
| 7 | 5.22 | Doblete | 0.94 | 5.10 |
| 7' | 5.78 | Singulete | 0.89 | 5.19 |
| 8' | 6.65 | Doble doblete | 0.93 | 6.64–6.56 |
| 5/6/2 | 6.99 – 6.85 | Multiplete | 3.18 | 6.96–6.84 |
| 2'/OH | 7.09 – 7.03 | Multiplete | 1.89 | 7.02–7.00 |
| 6 | 7.46 – 7.29 | Multiplete | 1.30 | 7.44–7.27 |
| 11' | 9.68 | Doblete | 0.91 | 9.64 |

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) Agilent 600 DD2 sonda OneNMR: δ ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 9.68 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.46 – 7.29 (m, 1H), 7.09 – 7.03 (m, 2H), 6.99 – 6.86 (m, 3H), 6.65 (dd, $J = 15.8, 7.7$ Hz, 1H), 5.78 (s, 1H), 5.22 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H), 4.00 – 3.87 (m, 6H), 3.60 – 3.50 (m, 1H), 1.45 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H).

Se observan los picos característicos del aldehído a 9.68 ppm, respectivamente, los picos característicos del CHO_3 en un rango de 4.00 – 3.87 y las señales del vinilo a 5.78 y 6.65 respectivamente. En la figura 34 y 34.1 se observa el espectro de resonancia magnética nuclear ^{13}C para la caracterización del producto de reacción purificado mostrando señales características con lo reportado por Alvarenga et al (2020).

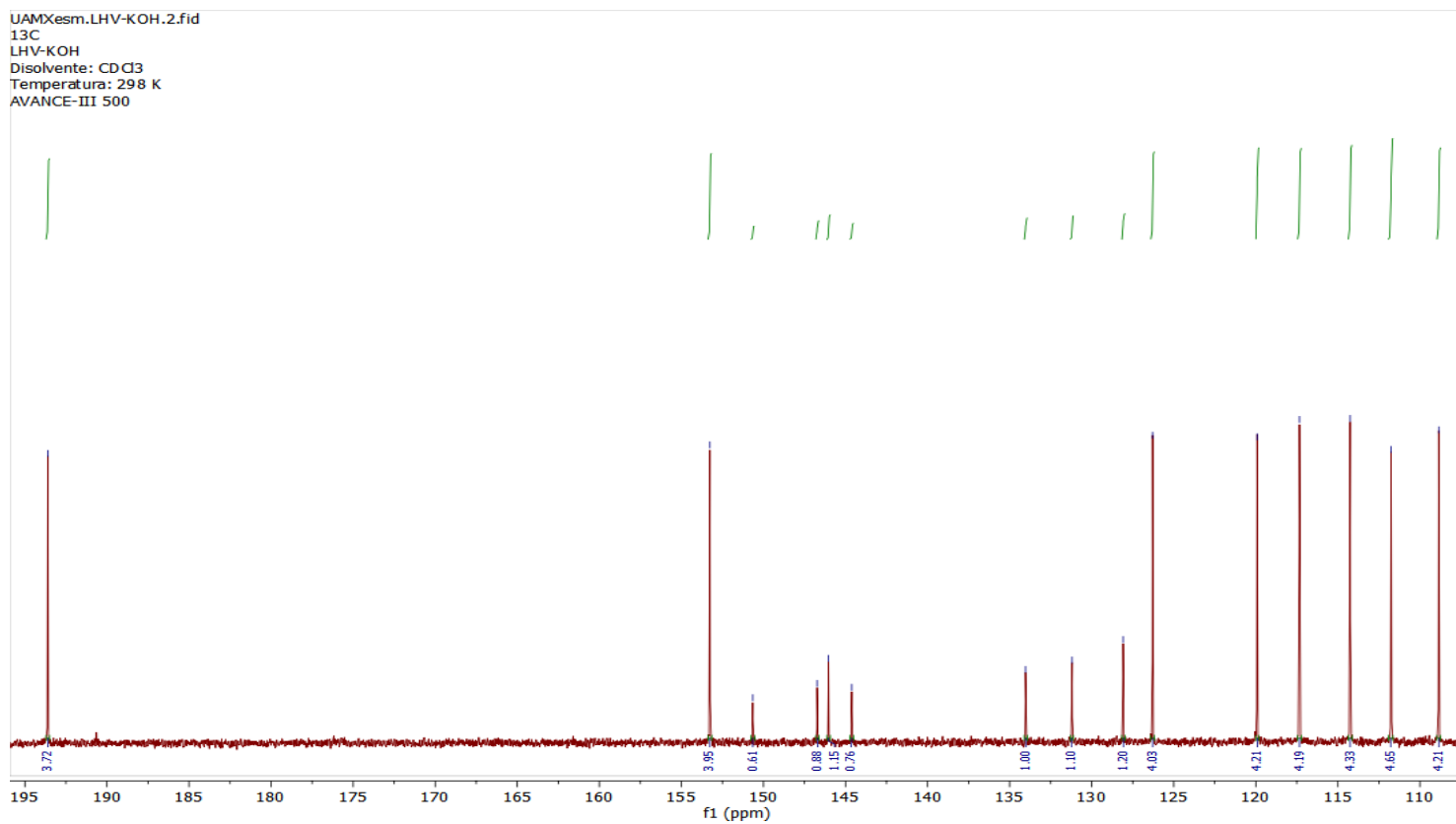
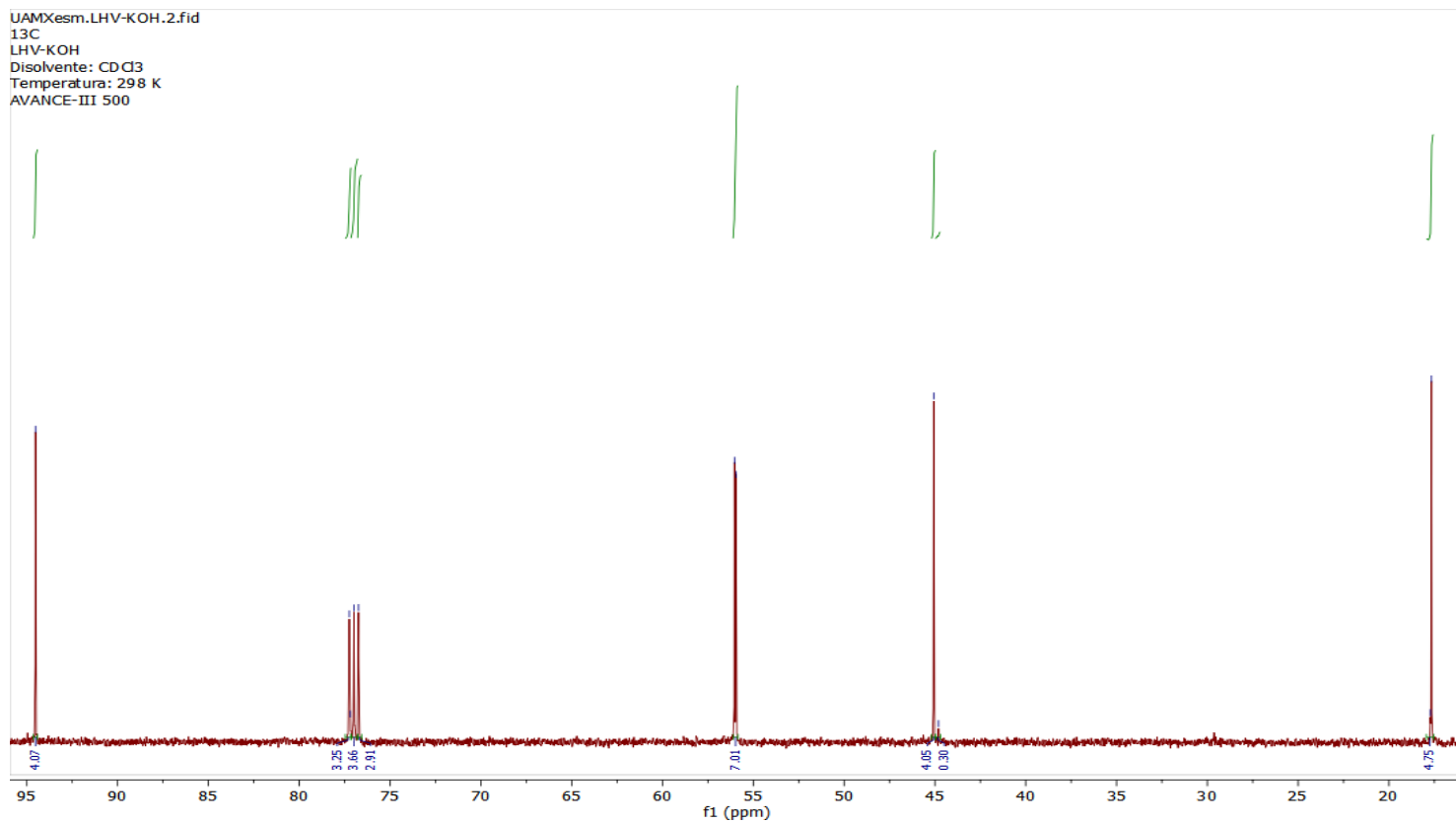


Fig 34 – 34.1. Espectros de ^{13}C RMN con CDCl_3 del producto de oxidación de (\pm) -DHIE.

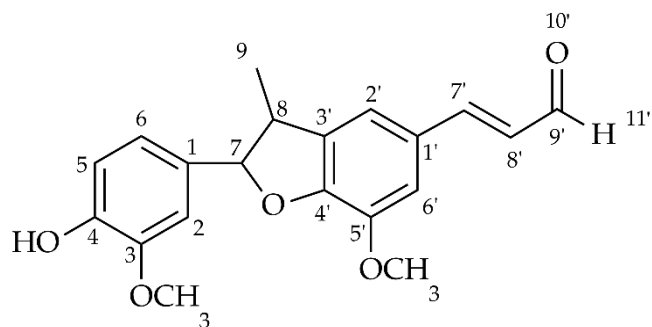


Fig 35. Estructura del producto de oxidación de (±)-DHIE.

Tabla 22. Desplazamientos en el espectro de ^{13}C RMN de los cristales puros de la síntesis de oxidación de (±)-DHIE.

| C | δ (ppm) | Multiplicidad | Alvarenga et al. (2020) δ (ppm) |
|-------------------|----------------|---------------|--|
| 9 | 17.6 | Singulete | 17.8 |
| 8 | 45.0 | Singulete | 45.0 |
| OCH ₃ | 55.9 | Doblete | 56.0 |
| CDCl ₃ | 77.42 – 76.54 | Multiplete | - |
| 7 | 94.5 | Singulete | 94.2 |
| 2 | 108.8 | Singulete | 110.0 |
| 5 | 111.7 | Singulete | 111.7 |
| 2' | 114.2 | Singulete | 113.9 |
| 6' | 117.3 | Singulete | 117.3 |
| 6 | 119.9 | Singulete | 119.0 |
| 8' | 126.2 | Singulete | 126.3 |
| 1' | 128.8 | Singulete | 128.1 |
| 1 | 131.1 | Singulete | 132.6 |
| 3' | 134.0 | Singulete | 133.9 |
| 7' | 144.6 | Singulete | 144.6 |
| 5' | 146.0 | Singulete | 148.1 |
| 4' | 146.7 | Singulete | 149.9 |
| 3 | 150.6 | Singulete | 150.6 |
| 4 | 153.2 | Singulete | 153.1 |
| 9' | 193.6 | Singulete | 193.5 |

^{13}C NMR (600 MHz, CDCl_3) Agilent 600 DD2 sonda OneNMR: δ 193.60, 153.27, 150.65, 146.73, 146.03, 144.62, 134.03, 131.19, 128.08, 126.29, 119.92, 117.34, 114.25, 111.76, 108.85, 94.52, 77.42 – 76.54 (m), 55.99 (d, $J = 9.8$ Hz), 45.07, 17.66.

Se observan los picos característicos del carbonilo a 193.6, los picos característicos del C-OH en 153.2, los picos característicos del CHO_3 en 55.9; así mismo se observan señales extra de impurezas en 77.42 a 76.54, todas ellas pertenecientes a impurezas de CDCl_3 provienen del solvente utilizado para la dilucidación del espectro de ^{13}C .

Los productos obtenidos en la síntesis de oxidación de (\pm)-DHIE resultaron ser un compuesto sólido cristalino de color blanquecino, se observó que los productos de la reacción al ser expuestos a temperatura ambiente cambiaron a un color amarillento, por lo que se decidió conservarlos a baja temperatura.

◇ Síntesis de las derivatizaciones de (±)-DHIE por reacciones sobre el hidroxilo

Derivado 3

Se realizaron 2 repeticiones de la reacción de oxidación, obteniéndose los siguientes pesos y su rendimiento de cada repetición.

Tabla 23. Peso y rendimiento de las 2 repeticiones de la reacción de esterificación del (±)-DHIE.

| Reacción | Peso (mg) | Rendimiento % |
|----------|-----------|---------------|
| 1 | 176 | 44 |
| 2 | 280 | 70 |

Tabla 24. Características de repeticiones de la reacción de esterificación del (±)-DHIE.

| Reacción | (±)-DHIE (mg) | CH ₂ Cl ₂ (mL) | NEt ₃ |
|----------|---------------|--------------------------------------|------------------|
| 1 | 400 | 40 | 0.2 |
| 4 | 400 | 40 | 0.2 |





Fig 36. Reacción de esterificación de (\pm)-DHIE y reacción de acetilación del APHB (A).

Como se observa en la tabla 23, el rendimiento de la primera reacción fue bajo en comparación con la segunda repetición siendo esta del 70%. Como se realizó modificaciones de la reacción inicial planteada por Hernández Vázquez L (2015), no se tiene una comparación establecida en la literatura debido a que esta propuesta de reacción es nueva. Aun así, se infiere que el rendimiento de la segunda reacción incremento debido a que se le realizó dos veces el proceso de adición de hexano y su posterior secado mediante vacío del rotavapor en la reacción de halogenación del producto acetilado, esto con el fin de asegurarse de haber eliminado por completo los remanentes de cloruro de oxalilo. Así mismo, en la reacción de esterificación del (\pm)-DHIE se realizaron las extracciones líquido-líquido con 50 mL de salmuera en comparación con los 30 mL ocupados en la primera reacción, obteniéndose el producto crudo de la reacción. Al cual se les sacaron cromatoplasmas mediante CCF y reveladas mediante sulfato cérico, se comparó contra (\pm)-DHIE y el producto acetilado de APHB.

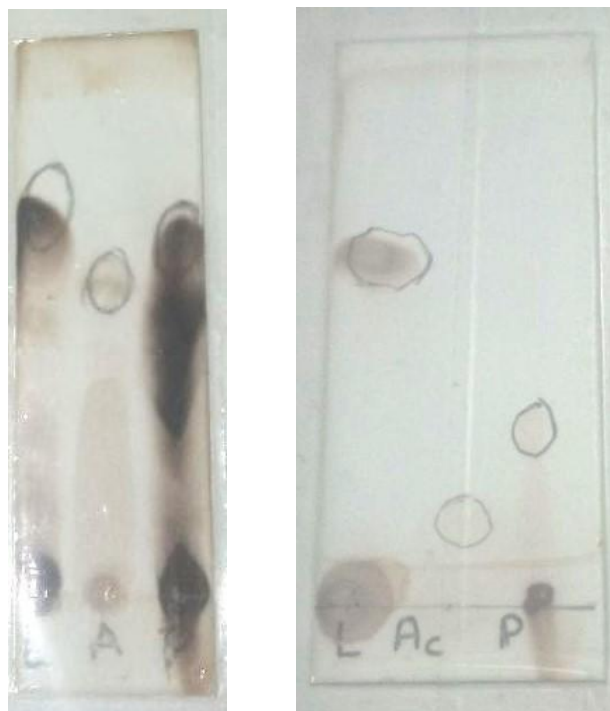


Fig 37. Cromatopla de capa fina de la esterificación del (±)-DHIE.

En la figura 37 se observa que en la primera reacción realizada se encuentra el producto requerido pero también manchas por debajo indicando la presencia de subproductos o polímeros formados; así mismo se observa una mancha por encima del producto esperado, se infiere que es la presencia de (±)-DHIE, aun así para la segunda reacción no se observó formación de polímeros o subproductos en la parte inferior así como presencia de (±)-DHIE en la parte superior. Este cambio se infiere que sucedió debido a las modificaciones y optimización de las condiciones de reacción.

En la figura 38 y 38.1 se observa el espectro de resonancia magnética nuclear ^1H para la caracterización del producto de la reacción de esterificación del (±)-DHIE, se observa que los espectros muestran algunas señales que demuestran impurezas.

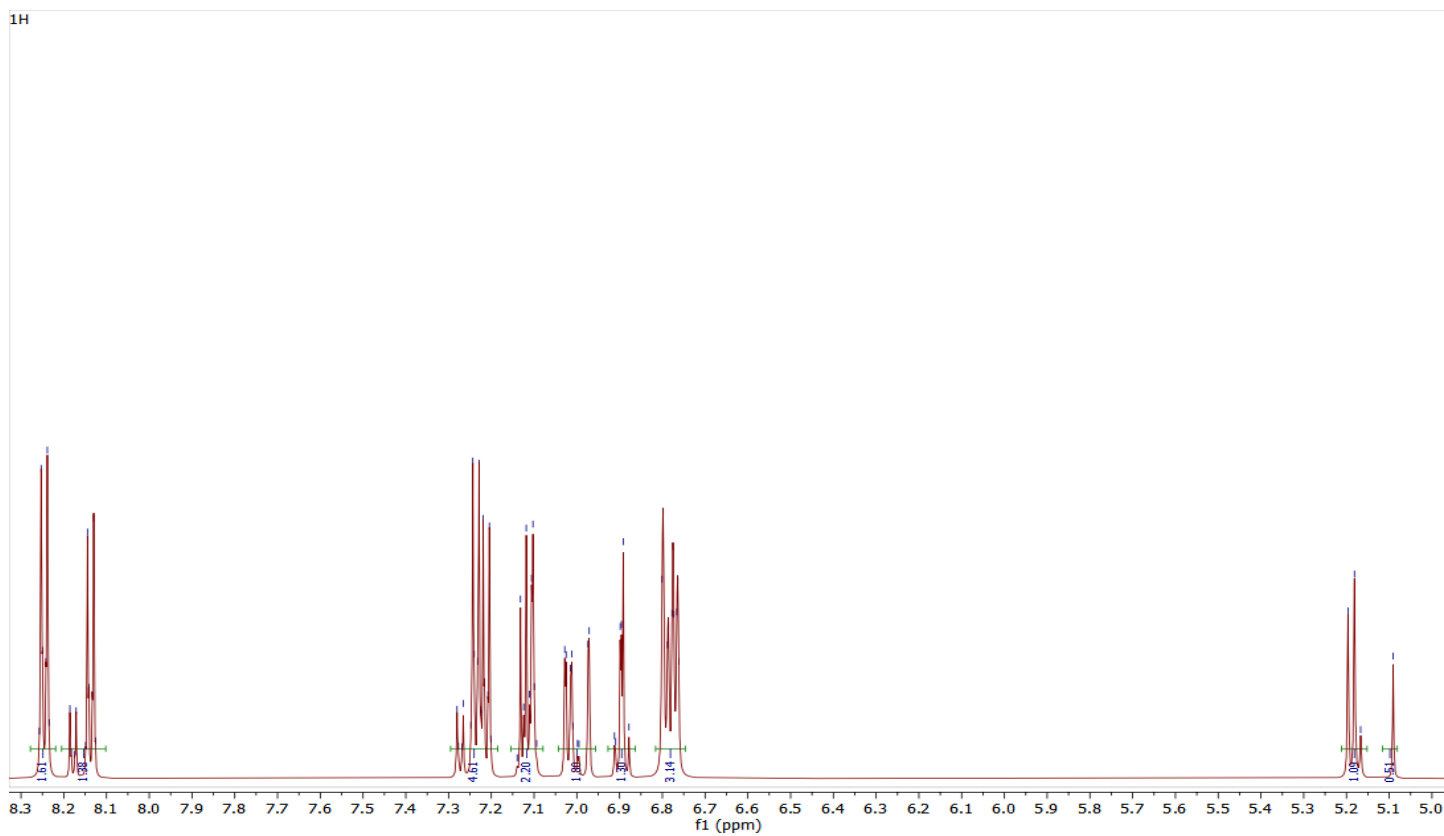
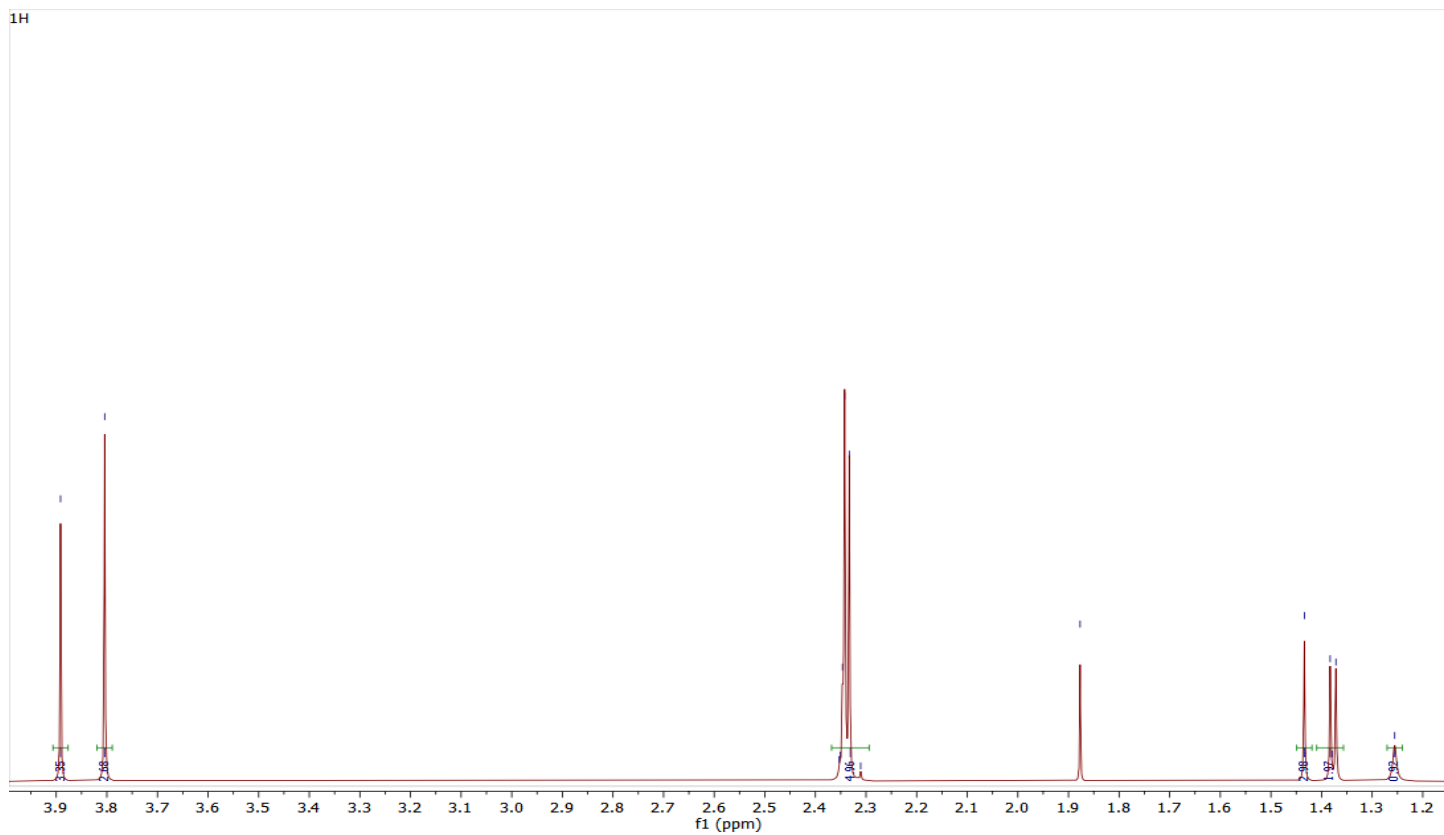


Fig 38 – 38.1. Espectros de ^1H RMN con CDCl_3 de la esterificación del (\pm) -DHIE.

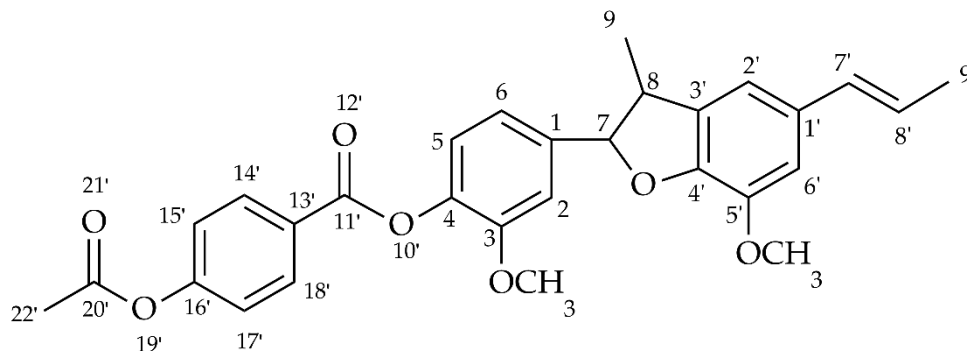


Fig 39. Estructura del producto de la esterificación del (±)-DHIE.

Tabla 25. Desplazamientos en el espectro de ^1H RMN del producto de esterificación del (±)-DHIE.

| H | δ (ppm) | Multiplicidad | J |
|-------------------|----------------|---------------|------|
| AcOEt | 1.26 | Singulete | 0.98 |
| 9 | 1.38 | Doblete | 1.97 |
| 9' | 1.43 | Singulete | 2.98 |
| 22' | 2.37 – 2.29 | Multiplete | 4.96 |
| 8 | 3.80 | Singulete | 2.68 |
| OCH ₃ | 3.89 | Singulete | 3.35 |
| 7 | 5.09 | Singulete | 0.61 |
| 7' | 5.18 | Triplete | 1.09 |
| 2'/6' | 6.82 – 6.75 | Multiplete | 3.14 |
| 8' | 6.93 – 6.86 | Multiplete | 1.30 |
| 2/6 | 7.04 – 6.96 | Multiplete | 1.80 |
| 15'/17' | 7.15 – 7.08 | Multiplete | 2.20 |
| CDCl ₃ | 7.30 – 7.19 | Multiplete | 4.61 |
| 5 | 8.20 – 8.10 | Multiplete | 1.3 |
| 14/18 | 8.28 – 8.22 | Multiplete | 1.61 |

^1H NMR (600 MHz, CDCl₃) Agilent 600 DD2 sonda OneNMR: δ 8.28 – 8.22 (m, 2H), 8.20 – 8.10 (m, 1H), 7.30 – 7.19 (m, 5H), 7.15 – 7.08 (m, 2H), 7.04 – 6.96 (m, 2H), 6.93 – 6.86 (m, 1H), 6.82 – 6.75 (m, 3H), 5.18 (t, J = 8.9 Hz, 1H), 5.09 (s, 1H), 3.89 (s, 3H), 3.80 (s, 3H), 2.37 – 2.29 (m, 5H), 1.43 (s, 3H), 1.38 (d, J = 6.8 Hz, 2H), 1.26 (s, 1H).

Se observan los picos característicos del éster a 2.29-2.37 ppm respectivamente, los picos característicos del CHO_3 en un rango de 3.87 - 3.89 ppm; así mismo se observan señales extra de algunas impurezas en 1.26, 2.37 y 7.30 – 7.19 ppm, pertenecientes a impurezas de AcOEt y CDCl_3 , aun así no se descarta que también sean impurezas de Hexano a 1.26 ppm, se infiere que provienen de los solventes utilizados, cabe mencionar que posiblemente algunas señales varían su desplazamiento debido a las diferentes interacciones que tienen con la molécula y debido a que las señales de los protones no han sido asignadas con anterioridad, no se puede tener una forma de comparación descrita en la literatura.

Derivado 4

Se obtuvieron las señales de los picos del HPLC con el primer gradiente a 210 nm propuesto como se observa en la figura 40, 40.1 y 40.2.

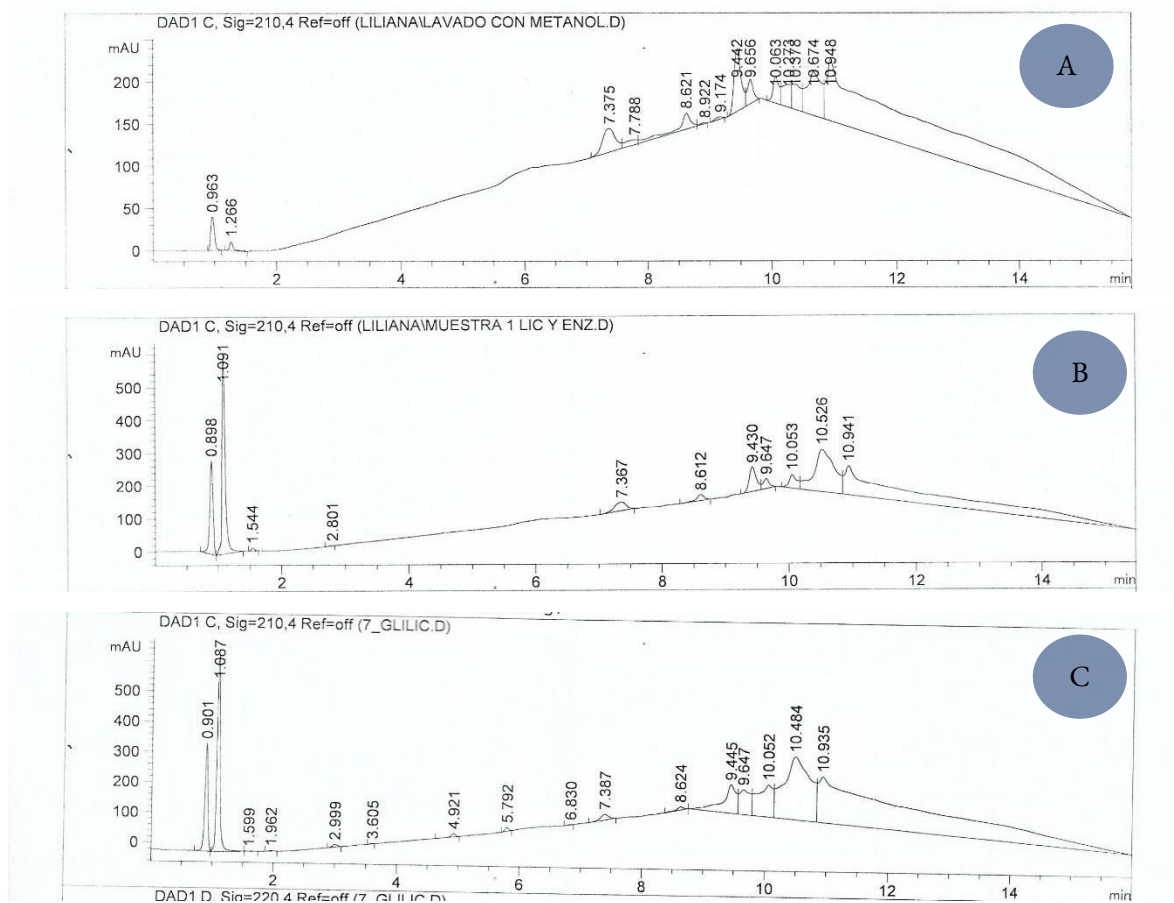


Fig 40, 40.1 y 40.2. Cromatograma de la muestra de metanol (A), muestra 1(B) y muestra 7 (C) con un gradiente de Metanol/Agua (90:10 v/v).

En el cual se observa que el gradiente propuesto no fue el adecuado para la columna, esto debido a la aparición de picos superpuestos en el cromatograma de HPLC, los cuales mostraban una tendencia ascendente y que no se distinguía alguna señal característica de (\pm)-DHIE o lactosa.

Con ello, se modificó el gradiente de disolventes, pasando del gradiente inicial de Metanol/Agua (90:10 v/v) a Agua/CH₃CN (40:60 v/v), manteniéndose las condiciones de temperatura y a 210 nm de lectura, obteniéndose así los siguientes cromatogramas.

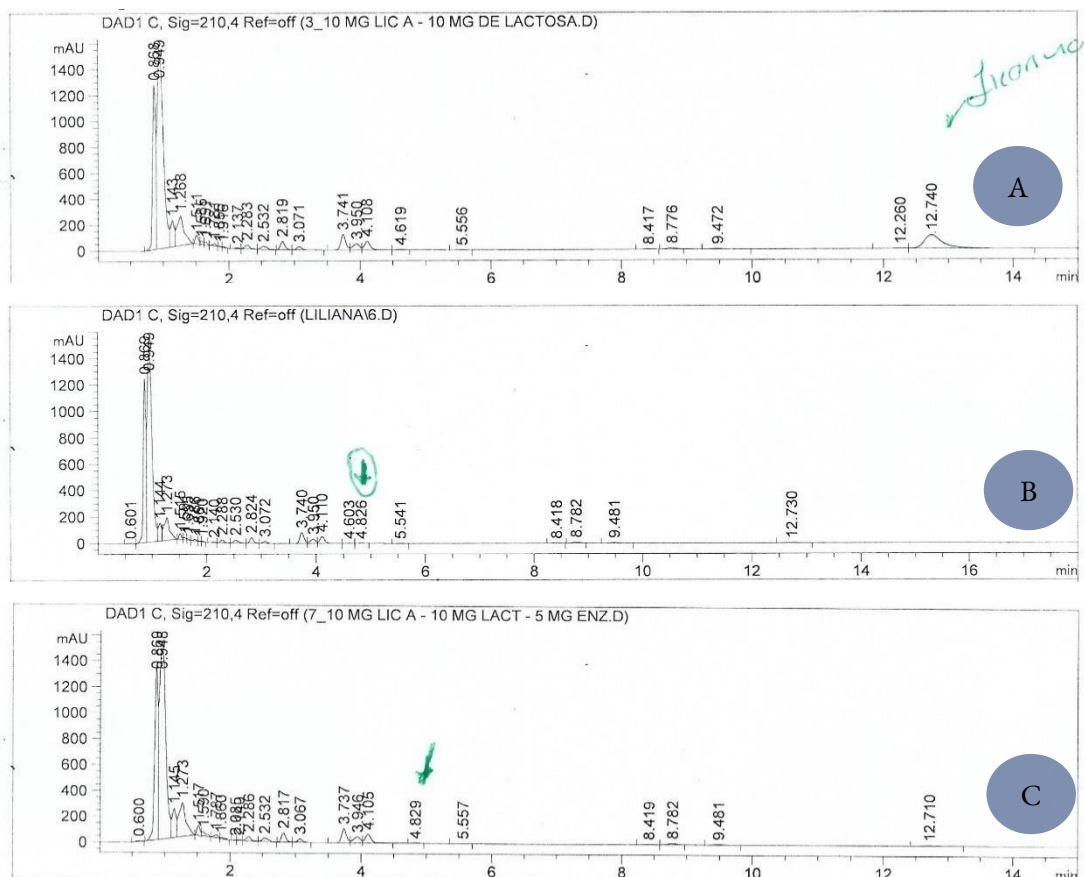


Fig 41, 41.1 y 41.2. Cromatograma de la muestra de 3 (A), muestra 6 (B) y muestra 7 (C) con un gradiente de Agua/CH₃CN (40:60 v/v).

Donde se observa que se eliminó la tendencia ascendente de los picos debido a que la columna era más afín a estos disolventes, por otro lado como se muestra en el cromatograma A de la figura 41, debido a que la muestra 3 contenía 10 mg de (±)-DHIE, 10 mg de lactosa y 0 mg de enzima se pudo observar de mejor manera donde se encontraba la señal característica de (±)-DHIE, siendo a 12.7 min, esto sirvió como referente para los cromatogramas posteriores donde también se observó esa señal.

Conforme al cromatograma de la muestra 6 que contenía 20 mg de (±)-DHIE, 10 mg de lactosa y 2 mg de enzima y el cromatograma de la muestra 7 que contenía 10 mg de (±)-DHIE, 10 mg de lactosa y 5 mg de enzima se observa que la gran mayoría del cromatograma coincide con el cromatograma 3, exceptuando la señal 4.826 y 4.829 min para el cromatograma 6 y 7, respectivamente, lo cual infiere que esa señal muestra el resultado de la reacción de la transgalactosilación. Se eligieron estas muestras en específico ya que eran las que contenían mayor

cantidad de (\pm)-DHIE y de enzima a comparación de las otras muestras que solo variaba pocos aspectos.

Aunado a lo anterior se obtuvieron las características de cada pico como se muestra en la tabla 26, 27 y 28.

Tabla 26. Reporte del cromatograma de la muestra 3 con gradiente Agua/CH₃CN (40:60 v/v).

| Pico | Tiempo de retención (min) | Ancho (min) | Área (mAU*s) | Peso (mAU) | Área % |
|------|---------------------------|-------------|----------------------|------------|---------|
| 1 | 0.868 | 0.0504 | 4191.26904 | 1272.04492 | 19.0685 |
| 2 | 0.949 | 0.0998 | 1.00067 ⁴ | 1540.66724 | 45.5262 |
| 3 | 1.143 | 0.0623 | 870.77631 | 201.78540 | 3.9617 |
| 4 | 1.268 | 0.1033 | 1746.35315 | 228.21417 | 7.9452 |
| 5 | 1.511 | 0.0533 | 232.37189 | 68.90452 | 1.0572 |
| 6 | 1.585 | 0.0473 | 78.54915 | 24.58741 | 0.3574 |
| 7 | 1.651 | 0.0477 | 65.75227 | 21.49382 | 0.2991 |
| 8 | 1.781 | 0.0519 | 53.80693 | 16.55413 | 0.2448 |
| 9 | 1.855 | 0.0484 | 8.29025 | 2.39406 | 0.0377 |
| 10 | 1.916 | 0.0521 | 17.55570 | 5.38167 | 0.0799 |
| 11 | 2.137 | 0.0652 | 37.60193 | 8.24705 | 0.1711 |
| 12 | 2.283 | 0.0741 | 170.01241 | 33.00268 | 0.7735 |
| 13 | 2.532 | 0.1087 | 161.46965 | 23.94525 | 0.7346 |
| 14 | 2.819 | 0.0739 | 311.51883 | 64.99452 | 1.4173 |
| 15 | 3.071 | 0.0807 | 135.12749 | 25.15401 | 0.6148 |
| 16 | 3.741 | 0.0844 | 664.36414 | 120.37483 | 3.0226 |
| 17 | 3.950 | 0.1072 | 351.85660 | 48.19436 | 1.6008 |
| 18 | 4.108 | 0.0937 | 429.80795 | 68.01105 | 1.9554 |
| 19 | 4.619 | 0.0972 | 27.41150 | 4.36730 | 0.1247 |
| 20 | 5.556 | 0.1173 | 13.31024 | 1.77945 | 0.0606 |
| 21 | 8.417 | 0.1414 | 26.72795 | 2.95837 | 0.1216 |
| 22 | 8.776 | 0.1480 | 88.28915 | 9.53729 | 0.4017 |
| 23 | 9.472 | 0.1797 | 66.44402 | 5.71047 | 0.3023 |
| 24 | 12.260 | 0.2338 | 46.25006 | 2.93597 | 0.2104 |
| 25 | 12.740 | 0.2988 | 2178.43579 | 107.33865 | 9.9110 |

Tabla 27. Reporte del cromatograma de la muestra 6 con gradiente Agua/CH3CN (40:60 v/v).

| Pico | Tiempo de retención (min) | Ancho (min) | Área (mAU*s) | Peso (mAU) | Área % |
|------|---------------------------|-------------|--------------|------------|---------|
| 1 | 0.601 | 0.1148 | 28.78739 | 4.26045 | 0.1655 |
| 2 | 0.869 | 0.0512 | 4175.74658 | 1241.83215 | 24.0060 |
| 3 | 0.949 | 0.0928 | 9198.80566 | 1516.31250 | 52.8832 |
| 4 | 1.144 | 0.0618 | 578.98065 | 135.51321 | 3.3285 |
| 5 | 1.273 | 0.1002 | 1257.07117 | 170.19308 | 7.2268 |
| 6 | 1.515 | 0.0519 | 144.76521 | 44.52704 | 0.8322 |
| 7 | 1.591 | 0.0490 | 61.16621 | 18.28536 | 0.3516 |
| 8 | 1.655 | 0.0435 | 28.76878 | 10.67142 | 0.1654 |
| 9 | 1.786 | 0.0564 | 49.53925 | 13.00481 | 0.2848 |
| 10 | 1.861 | 0.0502 | 16.52602 | 4.79686 | 0.0950 |
| 11 | 1.920 | 0.0485 | 16.48755 | 5.27393 | 0.0948 |
| 12 | 2.140 | 0.0633 | 20.78127 | 4.72329 | 0.1195 |
| 13 | 2.288 | 0.0668 | 109.83480 | 24.29085 | 0.6314 |
| 14 | 2.530 | 0.0861 | 140.40437 | 23.38165 | 0.8072 |
| 15 | 2.824 | 0.0731 | 208.68961 | 44.17346 | 1.1997 |
| 16 | 3.072 | 0.0837 | 93.53531 | 17.12584 | 0.5377 |
| 17 | 3.740 | 0.0840 | 465.98889 | 84.94009 | 2.6789 |
| 18 | 3.950 | 0.1053 | 240.38573 | 33.67700 | 1.3820 |
| 19 | 4.110 | 0.0963 | 338.86713 | 53.22433 | 1.9481 |
| 20 | 4.603 | 0.0945 | 10.36051 | 1.76543 | 0.0596 |
| 21 | 4.826 | 0.0946 | 16.74970 | 2.76597 | 0.0963 |
| 22 | 5.541 | 0.1093 | 8.61368 | 1.20591 | 0.0495 |
| 23 | 8.418 | 0.1427 | 21.88721 | 2.43831 | 0.1258 |
| 24 | 8.782 | 0.1498 | 72.99227 | 7.75760 | 0.4196 |
| 25 | 9.481 | 0.1755 | 53.10688 | 4.71313 | 0.3053 |
| 26 | 12.730 | 0.2149 | 35.74438 | 2.49910 | 0.2055 |

Tabla 28. Reporte del cromatograma de la muestra 7 con gradiente Agua/CH₃CN (40:60 v/v).

| Pico | Tiempo de retención (min) | Ancho (min) | Área (mAU*s) | Peso (mAU) | Área % |
|------|---------------------------|-------------|----------------------|------------|---------|
| 1 | 0.600 | 0.1102 | 38.64184 | 6.07601 | 0.1831 |
| 2 | 0.869 | 0.0547 | 4677.30957 | 1341.87866 | 22.1630 |
| 3 | 0.948 | 0.1046 | 1.03539 ⁴ | 1536.17603 | 49.0609 |
| 4 | 1.145 | 0.0624 | 976.22504 | 225.75417 | 4.6257 |
| 5 | 1.273 | 0.1026 | 1996.95850 | 262.85388 | 9.4624 |
| 6 | 1.517 | 0.0534 | 264.60251 | 78.36597 | 1.2538 |
| 7 | 1.590 | 0.0632 | 151.78076 | 33.25931 | 0.7192 |
| 8 | 1.787 | 0.0600 | 101.13857 | 25.62813 | 0.4792 |
| 9 | 1.860 | 0.0770 | 53.41294 | 9.02570 | 0.2531 |
| 10 | 2.085 | 0.0408 | 8.93847 | 3.47313 | 0.0424 |
| 11 | 2.140 | 0.0498 | 25.09195 | 7.74560 | 0.1189 |
| 12 | 2.286 | 0.0709 | 164.69412 | 35.01374 | 0.7804 |
| 13 | 2.532 | 0.1036 | 177.20412 | 27.34581 | 0.8397 |
| 14 | 2.817 | 0.0728 | 336.61551 | 71.66879 | 1.5950 |
| 15 | 3.067 | 0.0806 | 137.81807 | 25.68058 | 0.6530 |
| 16 | 3.737 | 0.0846 | 606.13470 | 109.53902 | 2.8721 |
| 17 | 3.946 | 0.1155 | 346.53479 | 47.26011 | 1.6420 |
| 18 | 4.105 | 0.0942 | 440.57422 | 69.31477 | 2.0876 |
| 19 | 4.829 | 0.0959 | 9.28941 | 1.50668 | 0.0440 |
| 20 | 5.557 | 0.1169 | 9.81455 | 1.28764 | 0.0465 |
| 21 | 8.419 | 0.1408 | 26.20485 | 2.91713 | 0.1242 |
| 22 | 8.782 | 0.1494 | 87.46518 | 9.33079 | 0.4144 |
| 23 | 9.481 | 0.1732 | 61.99055 | 5.51143 | 0.2937 |
| 24 | 12.710 | 0.2366 | 51.83678 | 3.34776 | 0.2456 |

Con ello, se observa que existe tienen tiempos de retención muy cercanos, lo que podría indicar una posible superposición siendo por lo general los picos 1 y 2 quienes tienen este comportamiento; así mismo en la tabla 26, los picos 24 y 25 muestran una tendencia ascendente en el tiempo de retención, lo que podría indicar compuestos de mayor peso molecular o mayor

afinidad por la fase estacionaria. Conforme al pico 12 donde se infiere esta (\pm)-DHIE, posee un tiempo de retención de 2.283 minutos lo que sugiere que este compuesto tiene una afinidad moderada por la fase estacionaria, además de un ancho de 0.0741 minutos lo que indica que el pico es relativamente estrecho siendo una buena resolución y una separación adecuada a diferencia de otros compuestos, su área y peso son significativos.

Así mismo, con respecto a las tablas 27 y 28, se puede observar que el pico 21 y 19 son los interés, donde su tiempo de retención sugiere que este componente tiene una afinidad moderada con la fase estacionaria, además de que los anchos de ambos picos indica que es relativamente estrecho, dando una buena resolución y una separación eficiente del componente, por otra parte, estos picos son uno de los componentes menores en las muestras, lo que sugiere que está presente en una cantidad muy pequeña. Conociendo esto, se infiere que si existió la reacción de transgalactosilación pero a una cantidad menor a lo esperado, por lo que sería óptimo analizar estos picos característicos mediante una espectroscopia de masas.

CONCLUSIÓN

Se realizó la síntesis biocatalítica del (\pm)-DHEI mediante dimerización oxidativa obteniéndose buenos rendimientos, así como 4 nuevas derivatizaciones. Se propusieron los mecanismos de reacción del (\pm)-DHEI y de las 4 derivatizaciones realizadas

La gran mayoría de las reacciones fueron caracterizadas mediante CCF, UV-Vis, RMN ^1H y ^{13}C , dándole sus asignaciones características de cada molécula y demostrando que se obtuvieron las moléculas propuestas.

Pese a que se realizaron varias repeticiones y modificaciones a lo largo de la investigación, se lograron optimizar las condiciones de reacción en las derivatizaciones propuestas, obteniendo así un rendimiento usualmente más alto a lo reportado en la literatura.

Se logró obtener la cantidad de proteína total dentro de los extractos de *Brassica oleracea*, la cual no había sido descrita antes en la literatura mediante el proceso de extracción.

Se obtuvo la molécula de (\pm)-Licarinediol A, pero se debe optimizar la reacción para obtener un mayor rendimiento del producto.

Se obtuvieron las moléculas de las reacciones de oxidación, esterificación y transglucosidación con buenos rendimientos y se demostró su correcta obtención mediante la caracterización de estas.

Con todo ello, se concluye que se lograron cumplir los objetivos deseados en esta investigación.

RECOMENDACIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS

Pese a que esta investigación engloba estrategias de síntesis biocatalítica del (\pm)-DHEI y de sus 4 reacciones de derivatización propuestas, aún queda mucho campo de estudio en investigaciones posteriores por lo cual:

- ◇ Para la reacción de dimerización oxidativa del (\pm)-DHEI se recomienda no omitir el uso de la atmósfera de N_2 , ya que con ella se ha obtenido un mejor rendimiento en la reacción
- ◇ Así mismo, el uso de HRP II se recomienda que no sea menor a 12.4 mg, conforme a las extracciones líquido-líquido se recomienda realizar mínimo 3.

- ◇ En la extracción de la peroxidasa de *Brassica oleracea*, se recomienda cortar el tallo de brócoli mediante la técnica de corte brunoise, esto con el fin de obtener una trituración uniforme; así mismo se recomienda el adicionar 100 mL de buffer en vez de 200 mL para su trituración en licuadora.
- ◇ Se recomienda investigar y optimizar las condiciones de reacción, así como las de purificación de la reacción de epoxidación del (±)-DHEI ya que su rendimiento es muy bajo, aunado a ello se propone una reacción de hidrobtoración del compuesto como posible sustitución a la reacción de epoxidación.
- ◇ Se recomienda buscar nuevas alternativas u optimización a la forma de purificación de las moléculas para obtener un mayor rendimiento global de cada reacción.
- ◇ Se recomienda ampliamente realizar estudios de solubilidad en diferentes disolventes para de ser factible, utilizar la recristalización como forma de purificación.
- ◇ Se recomienda purificar el producto crudo cuantas veces sea necesaria para obtener espectros de RMN ^1H y ^{13}C de mayor calidad.
- ◇ Se recomienda utilizar el método y columna adecuado para el proceso de HPLC para una mejor separación de los compuestos.
- ◇ No se recomienda exponer los productos de reacción purificados o enzimas al medio ambiente por un periodo de tiempo largo, ya que se observó que la gran mayoría sufre algún tipo de modificación en su coloración y actividad.
- ◇ Se recomienda utilizar la técnica de HPLC-MS para dilucidar de mejor manera los picos característicos de la reacción de transgalactosilación.
- ◇ Se recomienda el uso de técnicas de quimioinformática como DFT o dinámica molecular para tratar de dilucidar de mejor manera como actúan los mecanismos de reacción en estas moléculas y así obtener un panorama más amplio para su optimización.
- ◇ Se propone realizar la evaluación de estas 4 derivatizaciones de la molécula de (±)-DHEI en modelos murinos o modelos en peces cebra, siendo posibles candidatos antialodínicos.

REFERENCIAS

- Adams, R., & Weeks, L. F. (1916). Action of Oxalyl Chloride on Primary, Secondary. *Journal of the American Chemical Society*, *38*(1908), 2514–2519.
- Aiba, C. J., Campos Corrba, R. G., & Richard Gottlieb, O. (1973). Natural occurrence of erdtman's Dehydrodiisoeugenol. *Phytochemistry*, *12*, 1163–1164. [https://doi.org/doi.org/10.1016/0031-9422\(73\)85034-4](https://doi.org/doi.org/10.1016/0031-9422(73)85034-4)
- Alsharif, M. A., Raja, Q. A., Majeed, N. A., Jassas, R. S., Alsimaree, A. A., Sadiq, A., Naeem, N., Mughal, E. U., Alsantali, R. I., Moussa, Z., & Ahmed, S. A. (2021). DDQ as a versatile and easily recyclable oxidant: a systematic review. *RSC Advances*, *11*(47), 29826–29858. <https://doi.org/10.1039/d1ra04575j>
- Alvarenga, D. J., de Figueiredo Peloso, E., Marques, M. J., de Souza, T. B., Hawkes, J. A., & Carvalho, D. T. (2021). Natural and Semi-synthetic Licarins: Neolignans with Multi-functional Biological Properties. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, *31*(3), 257–271. <https://doi.org/10.1007/s43450-021-00144-7>
- Alvarenga, D. J., Matias, L. M. F., Oliveira, L. M., Leão, L. P. M. de O., Hawkes, J. A., Raimundo, B. V. B., Castro, L. de F. D., Campos, M. M. A. de, Siqueira, F. dos S., Santos, T. dos, & Carvalho, D. T. (2020). Exploring how structural changes to new Licarin A derivatives effects their bioactive properties against rapid growing mycobacteria and biofilm formation. *Microbial Pathogenesis*, *144*(March), 104203. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104203>
- Anita, Y., Sundowo, A., Hanafi, M., Lotulung, P. D. N., & Istyastono, E. P. (2022). Synthesis of Licarin A from Isoeugenol Catalyzed by Brassica juncea Peroxidase and Its Cytotoxicity on MCF-7 Cell Line. *AIP Conference Proceedings*, *2493*(1). <https://doi.org/https://doi.org/10.1063/5.0109933>
- Barboza, J. N., da Silva Maia Bezerra Filho, C., Silva, R. O., Medeiros, J. V. R., & de Sousa, D. P. (2018). An overview on the anti-inflammatory potential and antioxidant profile of eugenol. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2018*. <https://doi.org/10.1155/2018/3957262>
- Baron, R., Tölle, T. R., Gockel, U., Brosz, M., & Freynhagen, R. (2009). A cross-sectional cohort survey in 2100 patients with painful diabetic neuropathy and postherpetic neuralgia: Differences in demographic data and sensory symptoms. *Pain*, *146*(1–2), 34–40. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2009.06.001>
- Bennett, G. J. (2012). What is spontaneous pain and who has it? *Journal of Pain*, *13*(10), 921–929. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2012.05.008>
- Berglund, G. I., Carlsson, G. H., Smith, A. T., Szöke, H., Henriksen, A., & Hajdu, J. (2002). The catalytic pathway of horseradish peroxidase at high resolution. *Nature*, *417*(6887), 463–468. <https://doi.org/10.1038/417463a>
- Butler, M. S. (2004). The role of natural product chemistry in drug discovery. *Journal of Natural Products*, *67*(12), 2141–2153. <https://doi.org/10.1021/np040106y>
- Carević, M., Veličković, D., Stojanović, M., Milosavić, N., Rogniaux, H., Ropartz, D., & Bezbradica, D. (2015). Insight in the regioselective enzymatic transgalactosylation of salicin catalyzed by β -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. In *Process Biochemistry* (Vol. 50, Issue 5, pp. 782–788). <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2015.01.028>
- Carocho, M., Heleno, S. A., & Barros, L. (2023). Natural Secondary Metabolites. In *Natural Secondary Metabolites: From Nature, Through Science, to Industry*. https://doi.org/10.1007/978-3-031-18587-8_13
- Colloca, L., Ludman, T., Bouhassira, D., Baron, R., Dickenson, A. H., Yarnitsky, D., Freeman, R., Truini, A., Attal, N., Finnerup, N. B., Eccleston, C., Kalso, E., Bennett, D. L., Dworkin, R. H., & Raja, S. N. (2017). Neuropathic pain. *Nature Reviews Disease Primers*, *3*, 1–20. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.2>

- Corradini, D. (2011). *Handbook of HPLC* (2° ed.). Taylor & Francis Group.
- Coull, J. A. M., Boudreau, D., Bachand, K., Prescott, S. A., Nault, F., Si'k, A., Koninck, P. De, & Koninck, Y. De. (2003). Trans-synaptic shift in anion gradient in spinal lamina I neurons as a mechanism of neuropathic pain. *Nature*, *424*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/nature01868>
- Coutaux, A., Adam, F., Willer, J. C., & Le Bars, D. (2005). Hyperalgesia and allodynia: Peripheral mechanisms. *Joint Bone Spine*, *72*(5), 359–371. <https://doi.org/10.1016/j.jbspin.2004.01.010>
- Devor, M. (2006). Sodium channels and mechanisms of neuropathic pain. *Journal of Pain*, *7*(1 SUPPL.), S3. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2005.09.006>
- Dib-Hajj, S. D., Cummins, T. R., Black, J. A., & Waxman, S. G. (2010). Sodium channels in normal and pathological pain. *Annual Review of Neuroscience*, *33*, 325–347. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-060909-153234>
- Duong, N. N., Wang, B., Sooknoi, T., Crossley, S. P., & Resasco, D. E. (2017). Enhancing the Acylation Activity of Acetic Acid by Formation of an Intermediate Aromatic Ester. *ChemSusChem*, *10*(13), 2823–2832. <https://doi.org/10.1002/cssc.201700394>
- El-Feraly, F. S., Cheatham, S. F., Hufford, C. D., & Li, W. S. (1982). Optical resolution of (±)-dehydrodiisoeugenol: Structure revision of acuminatin. *Phytochemistry*, *21*(5), 1133–1135. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)82431-0](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)82431-0)
- Finnerup, N. B., Kuner, R., & Jensen, T. S. (2021). Neuropathic pain: From mechanisms to treatment. *Physiological Reviews*, *101*(1), 259–301. <https://doi.org/10.1152/physrev.00045.2019>
- Francis, S. K., James, B., Varughese, S., & Nair, M. S. (2019). Phytochemical investigation on *Myristica fragrans* stem bark. *Natural Product Research*, *33*(8), 1204–1208. <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1457670>
- Fujisawa, S., Ishihara, M., Murakami, Y., Atsumi, T., Kadoma, Y., & Yokoe, I. (2007). Predicting the biological activities of 2-methoxyphenol antioxidants: Effects of dimers. *In Vivo*, *21*(2), 181–188.
- Godínez-Chaparro, B., Pérez-Gutiérrez, S., Pérez-Ramos, J., Heyerdahl-Viau, I., & Hernández-Vázquez, L. (2022). Synthesis and Biological Activities of Dehydrodiisoeugenol: A Review. *Pharmaceuticals*, *15*(11). <https://doi.org/10.3390/ph15111351>
- González, M. A. G., Mendoza, E. S., Minsky, N. H. W., & Saucedo, A. L. (2022). Fundamentals and analogies to better understand NMR spectroscopy. *Educacion Quimica*, *33*(4), 3–13. <https://doi.org/10.22201/fq.18708404E.2022.4.0.81520>
- Gracely, R. H., Lynch, S. A., & Bennett, G. J. (1992). Painful neuropathy: altered central processing maintained dynamically by peripheral input. *Pain*, *51*(2), 175–194. [https://doi.org/10.1016/0304-3959\(92\)90259-E](https://doi.org/10.1016/0304-3959(92)90259-E)
- Herbert, R. B. (1981). The shikimic acid pathway. In *The Biosynthesis of Secondary Metabolites* (Vol. 20). https://doi.org/10.1007/978-94-009-5833-3_5
- Hernández-Vázquez, L., de Jesús Olivera-Flores, M. T., Luna, H., & Navarro-Ocaña, A. (2017). Obtención de dehidrodiisoeugenol por dimerización de isoeugenol con cultivos celulares de *Bouvardia ternifolia* (trompetilla). *TIP Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, *20*(2), 15–22. <https://doi.org/10.1016/j.recqb.2017.04.002>
- Khan, Z., Javed, F., Shamair, Z., Hafeez, A., Fazal, T., Aslam, A., Zimmerman, W. B., & Rehman, F. (2021). Current developments in esterification reaction: A review on process and parameters. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, *103*, 80–101. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2021.07.018>
- Kilo, S., Schmelz, M., Koltzenburg, M., & Handwerker, H. O. (1994). Different patterns of hyperalgesia induced by experimental inflammation in human skin. *Brain*, *117*(2), 385–396.

- <https://doi.org/10.1093/brain/117.2.385>
- Kim, Y. B., Park, I. Y., & Shin, K. H. (1991). The crystal structure of Licarin-B (C₂₀H₂₀O₄), a component of the seeds of *Myristica fragrans*. *Archives of Pharmacal Research*, 14(1), 1–6. <https://doi.org/10.1007/BF02857805>
- Klit, H., Finnerup, N. B., & Jensen, T. S. (2009). Central post-stroke pain: clinical characteristics, pathophysiology, and management. *The Lancet Neurology*, 8(9), 857–868. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(09\)70176-0](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(09)70176-0)
- Krieg R, Halbhuber KJ. Recent advances in catalytic peroxidase histochemistry. Cellular and Molecular Biology (Noisy-le-Grand, France). 2003 Jun;49(4):547-563. PMID: 12899447.
- Kruger, N. J. (2009). The Bradford Method. In *The Protein Protocols Handbooks* (pp. 17–24). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-198-7_4
- Kuete, V. (2017). *Myristica fragrans*: A Review. In *Medicinal Spices and Vegetables from Africa: Therapeutic Potential Against Metabolic, Inflammatory, Infectious and Systemic Diseases*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809286-6.00023-6>
- Liu, S. yan, Wang, G. qiang, Liang, Z. ying, & Wang, Q. an. (2013). Synthesis of dihydrobenzofuran neoligans licarin a and dihydrocarinatin as well as related triazolylglycosides. *Chemical Research in Chinese Universities*, 29(6), 1119–1124. <https://doi.org/10.1007/s40242-013-3131-6>
- Mardhatillah, A., Mutakin, M., & Levita, J. (2015). FeCl₃-catalyzed Synthesis of Dehydrodiisoeugenol. *International Journal of Chemistry*, 8(1), 1. <https://doi.org/10.5539/ijc.v8n1p1>
- Mbaveng, A. T., Wamba, B. E. N., Bitchagno, G. T. M., Tankeo, S. B., Çelik, İ., Atontsa, B. C. K., Nkuété Lonfouo, A. H., Kuete, V., & Efferth, T. (2021). Bioactivity of fractions and constituents of *Piper capense* fruits towards a broad panel of cancer cells. *Journal of Ethnopharmacology*, 271(July 2020). <https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.113884>
- McMurry, J. (2018) Organic Chemistry. 9^o ed. (239-240) México. CENGAGE.
- Meleti, V. R., Esperandim, V. R., Flauzino, L. G. B., Prizantelli, A. H., Paula, L. A. de L., Magalhães, L. G., Cunha, W. R., Laurentiz, R. da S., Pissurno, A. P. da R., Nanayakkara, N. P. D., Pereira, A. C., Bastos, J. K., Parreira, R. L. T., Orenha, R. P., & e Silva, M. L. A. (2020). (±)-Licarin A and its semi-synthetic derivatives: In vitro and in silico evaluation of trypanocidal and schistosomicidal activities. *Acta Tropica*, 202(August 2019), 105248. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.105248>
- Mohammadkhani, L., & Heravi, M. M. (2019). Oxalyl Chloride: A Versatile Reagent in Organic Transformations. *ChemistrySelect*, 4(20), 6309–6337. <https://doi.org/10.1002/slct.201900120>
- Munawar, S., Zahoor, A. F., Hussain, S. M., Ahmad, S., Mansha, A., Parveen, B., Ali, K. G., & Irfan, A. (2024). Steglich esterification: A versatile synthetic approach toward the synthesis of natural products, their analogues/derivatives. *Heliyon*, 10(1), e23416. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e23416>
- Nagja, T., Vimal, K., & Sanjeev, A. (2016). *Myristica fragrans*: A comprehensive review. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 8(2), 27–30.
- Nascimento, I. R., Lopes, L. M. X., Davin, L. B., & Lewis, N. G. (2000). Stereoselective Synthesis of 8,9-Licarinediols. *Tetrahedron*, 56(47), 9181–9193. [https://doi.org/doi/10.1016/S0040-4020\(00\)00873-5](https://doi.org/doi/10.1016/S0040-4020(00)00873-5)
- Nestl, B. M., Hammer, S. C., Nebel, B. A., & Hauer, B. (2014). New generation of biocatalysts for organic synthesis. *Angewandte Chemie - International Edition*, 53(12), 3070–3095. <https://doi.org/10.1002/anie.201302195>

- Nikolic, V., Nikolic, L., Dinic, A., Gajic, I., Urosevic, M., Stanojevic, L., Stanojevic, J., & Danilovic, B. (2021). Chemical Composition, Antioxidant and Antimicrobial Activity of Nutmeg (*Myristica fragrans* Houtt.) Seed Essential Oil. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, 24(2), 218–227. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2021.1907230>
- Nitzan-Luques, A., Minert, A., Devor, M., & Tal, M. (2013). Dynamic genotype-selective “phenotypic switching” of CGRP expression contributes to differential neuropathic pain phenotype. *Experimental Neurology*, 250, 194–204. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2013.09.011>
- Noble, J. E., & Bailey, M. J. A. (2009). Quantitation of Protein. In *Methods in Enzymology* (1st ed., Vol. 463, Issue C). Elsevier Inc. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(09\)63008-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)63008-1)
- Oliveira, B. H. M., Silva, L. A. A., Leite, F. F., Duarte, G. D., Duarte, S. S., Silva, D. K. F., Sobral, M. V., & Rodrigues, L. C. (2019). Síntese e avaliação antitumoral do (±)-4-O-demethylKadsurenin M um composto natural e seus análogos. *Brazilian Journal of Development*, 5(10), 19109–19123. <https://doi.org/10.34117/bjdv5n10-144>
- Ortiz De Montellano, P. R. (1992). Catalytic sites of hemoprotein peroxidases. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 32(7), 89–107. <https://doi.org/10.1146/annurev.pa.32.040192.000513>
- Pan, J. Y., Chen, S. L., Yang, M. H., Wu, J., Sinkkonen, J., & Zou, K. (2009). An update on lignans: Natural products and synthesis. *Natural Product Reports*, 26(10), 1251–1292. <https://doi.org/10.1039/b910940d>
- Pandey, V. P., Awasthi, M., Singh, S., Tiwari, S., & Dwivedi, U. N. (2017). A Comprehensive Review on Function and Application of Plant Peroxidases. *Biochemistry & Analytical Biochemistry*, 06(01). <https://doi.org/10.4172/2161-1009.1000308>
- Paris, E., Bigi, F., Cauzzi, D., Maggi, R., & Maestri, G. (2018). Oxidative dimerization of anilines with heterogeneous sulfonic acid catalysts. *Green Chemistry*, 20(2), 382–386. <https://doi.org/10.1039/c7gc03060f>
- Prieto-Méndez, J., Trejo-Cárdenas, C. L., Prieto-García, F., Méndez-Marzo, M. A., Bello-Pérez, L. A., & Román-Gutiérrez, A. D. (2010). Acetilación y caracterización del almidón de cebada. *Revista Latinoamericana de Recursos Naturales*, 6(1), 32–43. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Rossiter, S., Folkes, L. K., & Wardman, P. (2002). Halogenated indole-3-acetic acids as oxidatively activated prodrugs with potential for targeted cancer therapy. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 12(18), 2523–2526. [https://doi.org/10.1016/S0960-894X\(02\)00505-X](https://doi.org/10.1016/S0960-894X(02)00505-X)
- Saptarini, N. M., Saputri, F. A., & Levita, J. (2014). Molecular Modeling Study of PPAR α Agonists: Dehydro-Di-Isoeugenol, Macelignan, Pioglitazone, Netoglitazone, and Rosiglitazone as Antidiabetic Drugs. *International Journal of Chemistry*, 6(2). <https://doi.org/10.5539/ijc.v6n2p48>
- Saravanan, P., & Singh, V. K. (1999). An efficient method for acylation reactions. *Tetrahedron Letters*, 40(13), 2611–2614. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(99\)00229-4](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(99)00229-4)
- Satake, H., Koyama, T., Bahabadi, S. E., Matsumoto, E., Ono, E., & Murata, J. (2015). Essences in metabolic engineering of lignan biosynthesis. *Metabolites*, 5(2), 270–290. <https://doi.org/10.3390/metabo5020270>
- Satake, H., Ono, E., & Murata, J. (2013). Recent advances in the metabolic engineering of lignan biosynthesis pathways for the production of transgenic plant-based foods and supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(48), 11721–11729. <https://doi.org/10.1021/jf4007104>
- Seshadri, R., Lamm, A. S., Khare, A., & Rosazza, J. P. N. (2008). Oxidation of isoeugenol by *Nocardia iowensis*. *Enzyme and Microbial Technology*, 43(7), 486–494. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2008.09.004>

- Simić, S., Zukić, E., Schmermund, L., Faber, K., Winkler, C. K., & Kroutil, W. (2022). Shortening Synthetic Routes to Small Molecule Active Pharmaceutical Ingredients Employing Biocatalytic Methods. *Chemical Reviews*, 122(1), 1052–1126. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c00574>
- Şişecioğlu, M., Gülçin, I., Çankaya, M., Atasever, A., Şehitoğlu, M. H., Kaya, H. B., & Özdemir, H. (2010). Purification and characterization of peroxidase from Turkish black radish (*Raphanus sativus* L.). *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(12), 1187–1196. <https://doi.org/10.5897/JMPR10.071>
- Skoog, Douglas A., West, Donald M., Holler, F. James, Crouch, Stanley R. (2014). *Fundamentals of Analytical Chemistry* (Ed. 9^o). México: Cengage Learning.
- Teponno, R. B., Kusari, S., & Spiteller, M. (2016). Recent advances in research on lignans and neolignans. In *Natural Product Reports* (Vol. 33, Issue 9). <https://doi.org/10.1039/c6np00021e>
- Tufano, I., Buommino, E., Iesce, M. R., De Filippis, A., Grieco, P., Lembo, F., & DellaGreca, M. (2020). Synthesis of novel lignan-like compounds and their antimicrobial activity. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 30(17), 127413. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2020.127413>
- Vera, C., Guerrero, C., Aburto, C., Cordova, A., & Illanes, A. (2020). Conventional and non-conventional applications of β -galactosidases. In *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* (Vol. 1868, Issue 1). <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2019.140271>
- Vera, C., Guerrero, C., & Illanes, A. (2011). Determination of the transgalactosylation activity of *Aspergillus oryzae* β -galactosidase: Effect of pH, temperature, and galactose and glucose concentrations. *Carbohydrate Research*, 346(6), 745–752. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2011.01.030>
- Wang, G., Hou, L., Wang, Y., Liu, H., Yuan, J., Hua, H., & Sun, L. (2022). Two new neolignans and an indole alkaloid from the stems of *Nauclea officinalis* and their biological activities. *Fitoterapia*, 160(May), 105228. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2022.105228>
- Wang, T., Li, L., Zhuang, W., Zhang, F., Shu, X., Wang, N., & Wang, Z. (2021). Recent Research Progress in Taxol Biosynthetic Pathway and Acylation Reactions Mediated by *Taxus* Acyltransferases. *Molecules*, 26(10), 1–13. <https://doi.org/10.3390/molecules26102855>
- Welinder, K. G. (1976). Covalent structure of the glycoprotein horseradish peroxidase. *FEBS Letters*, 72(1), 19–23. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(76\)80804-6](https://doi.org/10.1016/0014-5793(76)80804-6)
- Winkler, C. K., Schrittwieser, J. H., & Kroutil, W. (2021). Power of Biocatalysis for Organic Synthesis. *ACS Central Science*, 7(1), 55–71. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.0c01496>
- Witulski, B., & Alayrac, C. (2006). Halogenation of Acetylene. *Three Carbon-Heteroatom Bonds: Ketenes and Derivatives*, 1. <https://doi.org/10.1055/sos-sd-024-00712>
- Woodley, J. M. (2019). Accelerating the implementation of biocatalysis in industry. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(12), 4733–4739. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09796-x>
- Yang, B. Y., Gray, J. S. S., & Montgomery, R. (1996). The glycans of horseradish peroxidase. *Carbohydrate Research*, 287(2), 203–212. [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(96\)00073-0](https://doi.org/10.1016/0008-6215(96)00073-0)
- Zahra, S. S., Haq, I., & Farooq, O. (2022). Lignans. In J. Kour & G. A. Nayik (Eds.), *Nutraceuticals and Health Care* (pp. 61–86). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/C2020-0-03223-8>
- Zeilig, G., Enosh, S., Rubin-Asher, D., Lehr, B., & Defrin, R. (2012). The nature and course of sensory changes following spinal cord injury: Predictive properties and implications on the mechanism of central pain. *Brain*, 135(2), 418–430. <https://doi.org/10.1093/brain/awr270>
- Zwick, C. R., & Renata, H. (2020). Harnessing the biocatalytic potential of iron- And α -ketoglutarate-dependent dioxygenases in natural product total synthesis. In *Natural Product Reports* (Vol. 37, Issue 8, pp. 1065–1079). <https://doi.org/10.1039/c9np00075e>

ANEXOS

1. Espectros de RMN ^1H Y ^{13}C de las diferentes moléculas

^1H

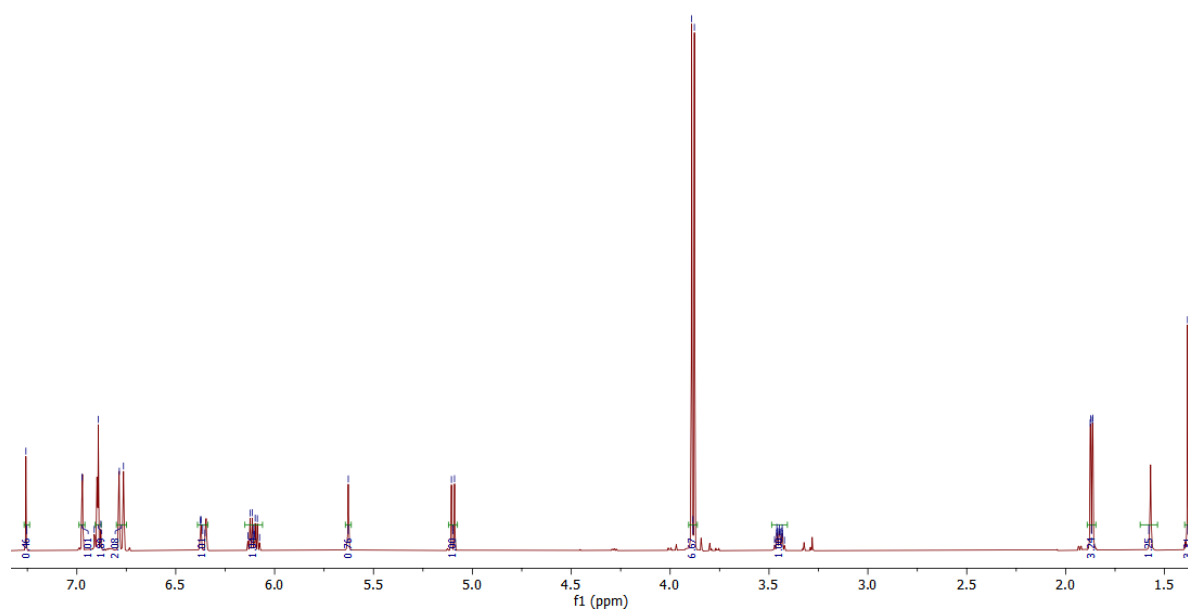


Fig 42. Espectros de ^1H RMN con CDCl_3 de los cristales puros de la síntesis de (\pm) -DHIE.

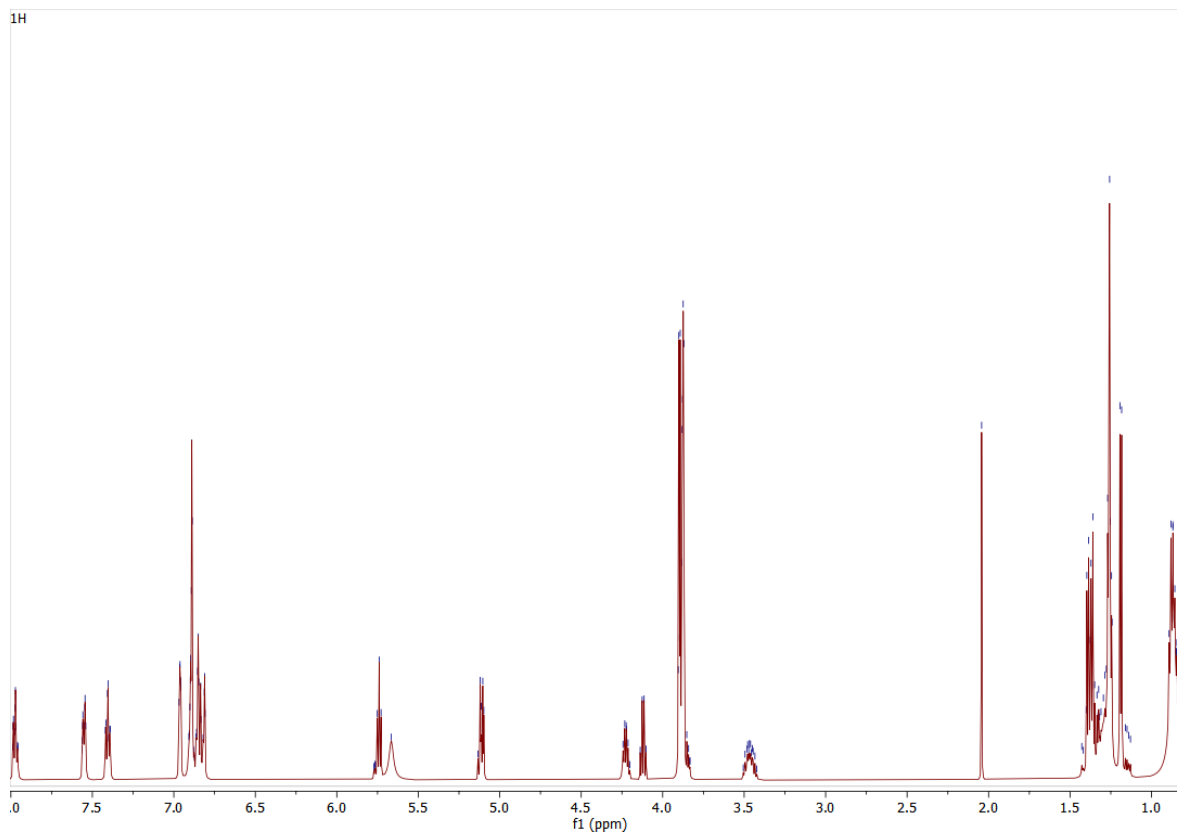


Fig 43. Espectro de ^1H RMN con CDCl_3 de (\pm) -Licarinediol A.

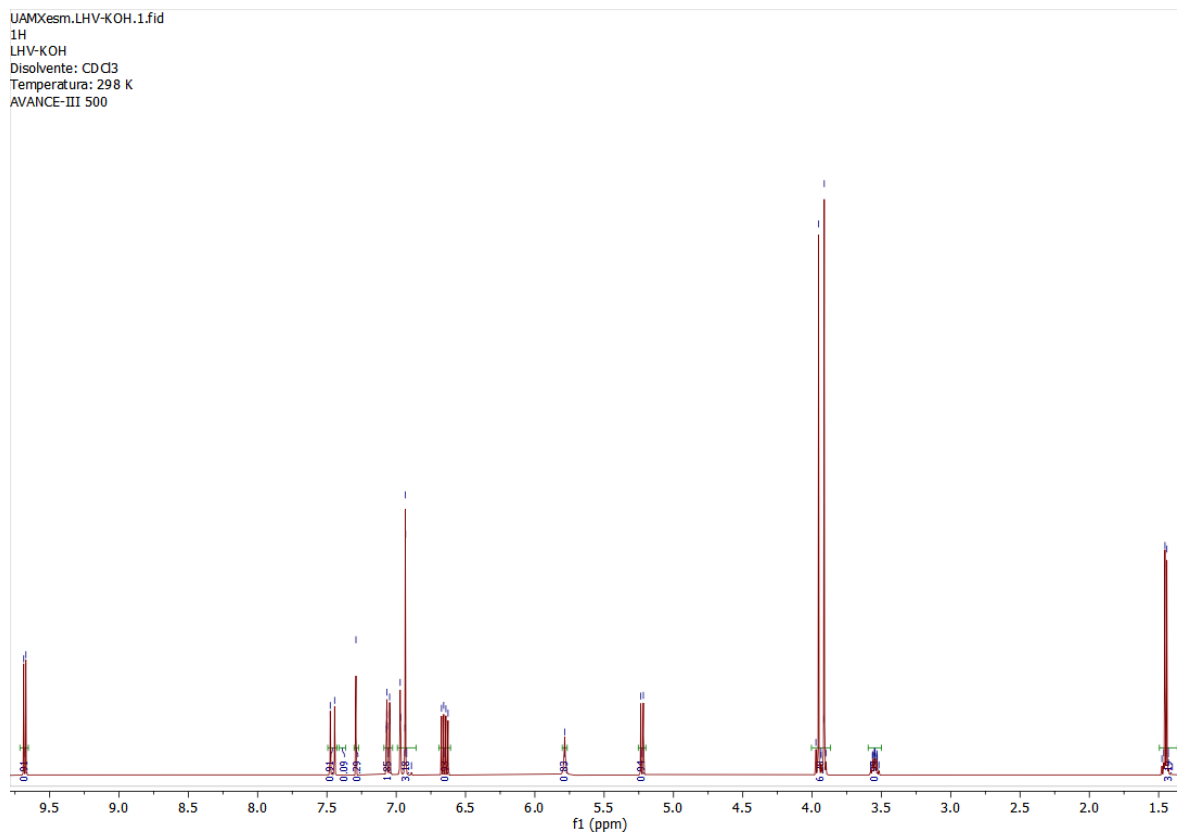


Fig 44. Espectros de ^1H RMN con CDCl_3 del producto de oxidación de (\pm) -DHIE.

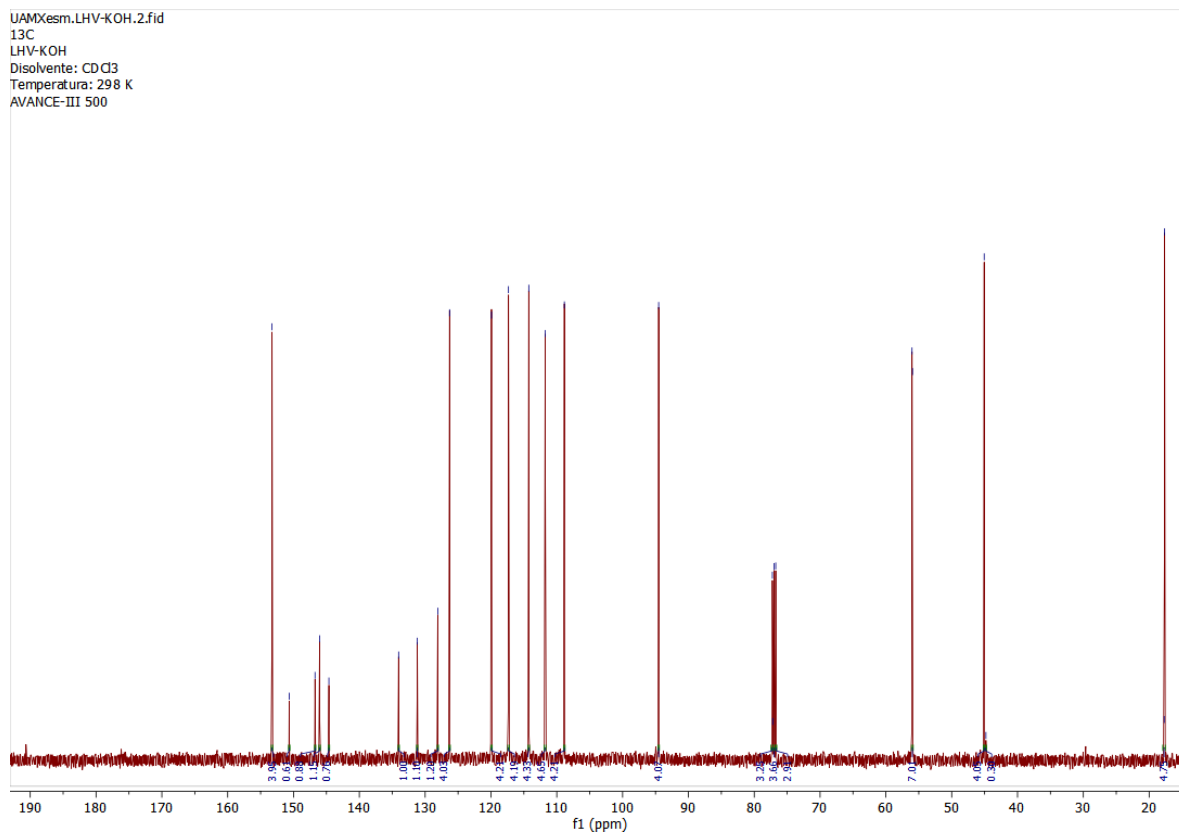


Fig 45. Espectros de ^{13}C RMN con CDCl_3 del producto de oxidación de (\pm) -DHIE.

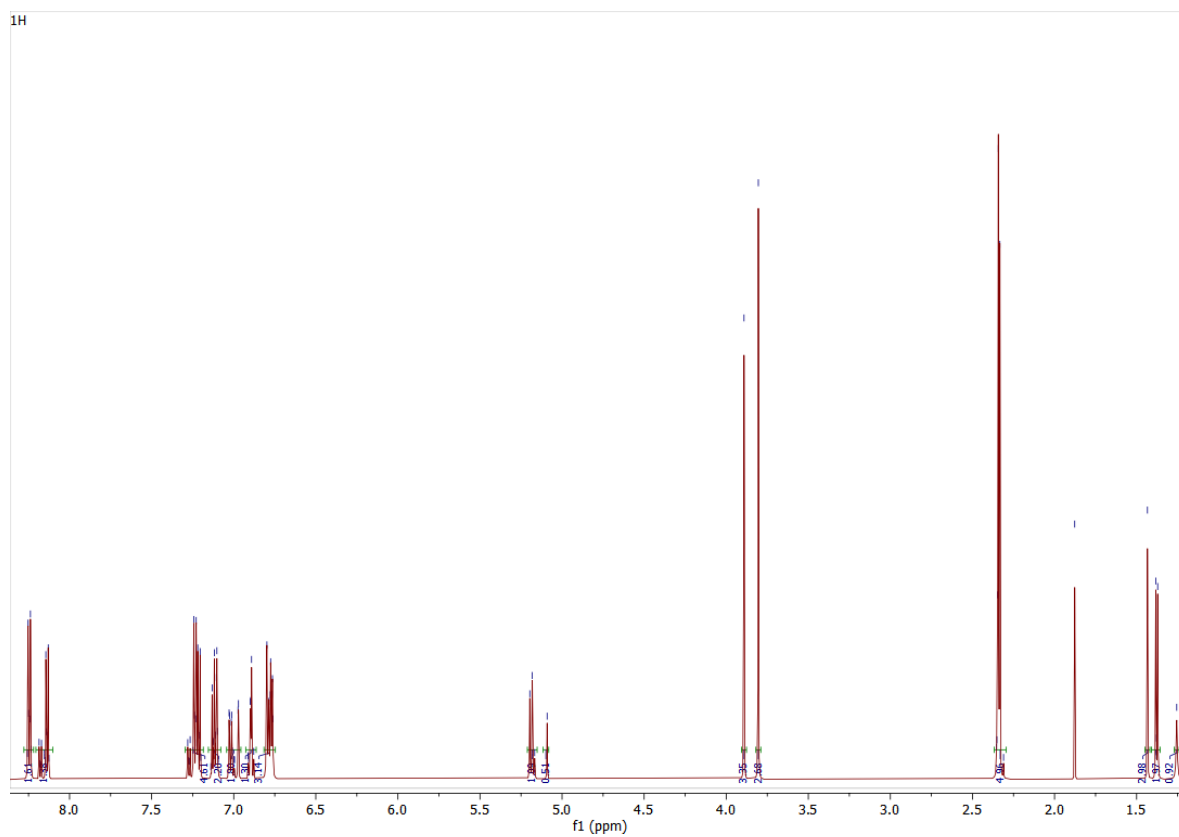


Fig 46. Espectros de ^1H RMN con CDCl_3 de la esterificación del (\pm) -DHIE.

2. Cromatogramas de las distintas muestras corridas en el HPLC

Data File C:\CHEM32\1\DATA\LILIANA\LAVADO CON METANOL.D
Sample Name: Metanol - vial 32

Metanol

=====
Acq. Operator :
Acq. Instrument : HPLC_N007 Location : Vial 32
Injection Date : 7/25/2024 3:00:31 PM Inj Volume : 2.000 µl
Method : C:\CHEM32\1\METHODS\KEVINLIC.M
Last changed : 7/25/2024 2:56:53 PM
(modified after loading)
Sample Info : Se inyector metanol como lavado

Metanol
+
H₂O
90:10

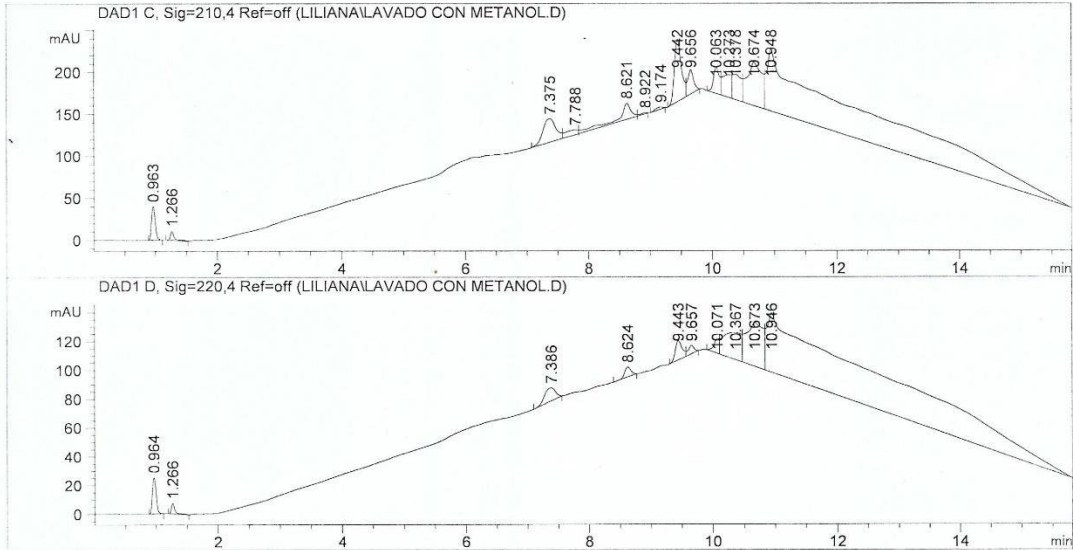


Fig 47. Reporte del cromatograma de la muestra de MeOH.

File C:\CHEM32\1\DATA\LILIANA\MUESTRA 1 LIC Y ENZ.D
Sample Name: Muestra 1 - lic y enz (vial 4)

1

=====
Acq. Operator :
Acq. Instrument : HPLC_N007 Location : Vial 4
Injection Date : 7/25/2024 3:20:31 PM Inj Volume : 2.000 µl
Method : C:\CHEM32\1\METHODS\KEVINLIC.M
Last changed : 7/25/2024 3:19:37 PM
Sample Info : Se inyector el compuesto 1 (vial 4), 2 microL, se inicio con isocratico de Me
(90%), y termino en isocratico Met (90%) y H2O (10%) hasta los 15 min / a 21

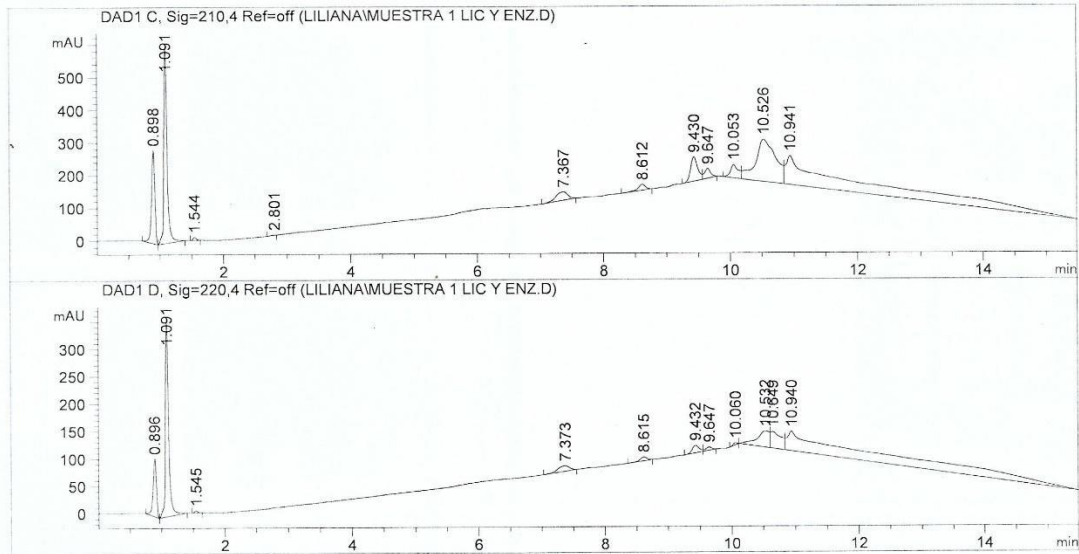


Fig 48. Reporte del cromatograma de la muestra de 1.

File C:\CHEM32\1\DATA\LILIANA\KEVINLISEC 2024-07-25 17-25-08\7_GLILIC.D
Sample Name: 7_gliclic

7

=====

| | | | | | |
|-----------------|---|----------------------|------------|---|----------|
| Acq. Operator | : | | Seq. Line | : | 2 |
| Acq. Instrument | : | HPLC_N007 | Location | : | Vial 13 |
| Injection Date | : | 7/25/2024 5:43:02 PM | Inj | : | 1 |
| | | | Inj Volume | : | 2.000 µl |

Sequence File : C:\Chem32\1\DATA\Liliana\KEVINLISEC 2024-07-25 17-25-08\KEVINLISEC.S
Method : C:\CHEM32\1\DATA\LILIANA\KEVINLISEC 2024-07-25 17-25-08\KEVINLIC.M (Sequence Method)
Last changed : 7/25/2024 5:27:18 PM
(modified after loading)

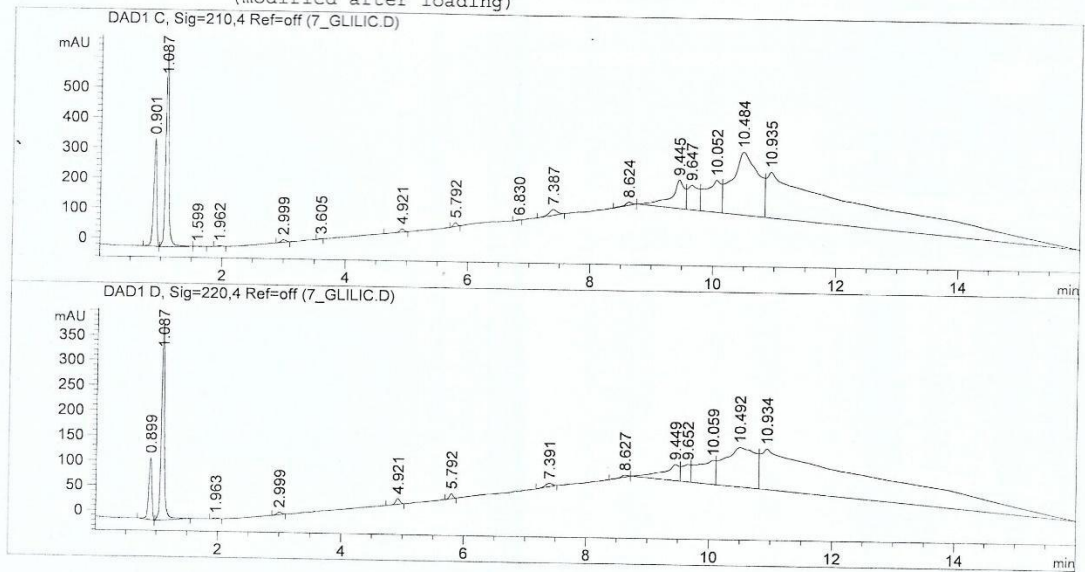


Fig 49. Reporte del cromatograma de la muestra de 7.

Data File C:\CHEM32\...A\KEVINLISEC 2024-08-01 13-20-56\3_10 MG LIC A - 10 MG DE LACTOSA.D
 Sample Name: 3_10 mg Lic A - 10 mg de lactosa

```

=====
Acq. Operator   :                               Seq. Line :    1
Acq. Instrument : HPLC_N007                    Location  : Vial 7
Injection Date  : 8/1/2024 1:21:53 PM          Inj       :    1
                                                Inj Volume: 10.000 µl
Sequence File   : C:\Chem32\1\DATA\Liliana\KEVINLISEC 2024-08-01 13-20-56\KEVINLISEC.S
Method          : C:\CHEM32\1\DATA\LILIANA\KEVINLISEC 2024-08-01 13-20-56\KEVINLIC.M (
Sequence Method)
Last changed    : 8/1/2024 1:20:56 PM
  
```

H₂O 215CN
60:40

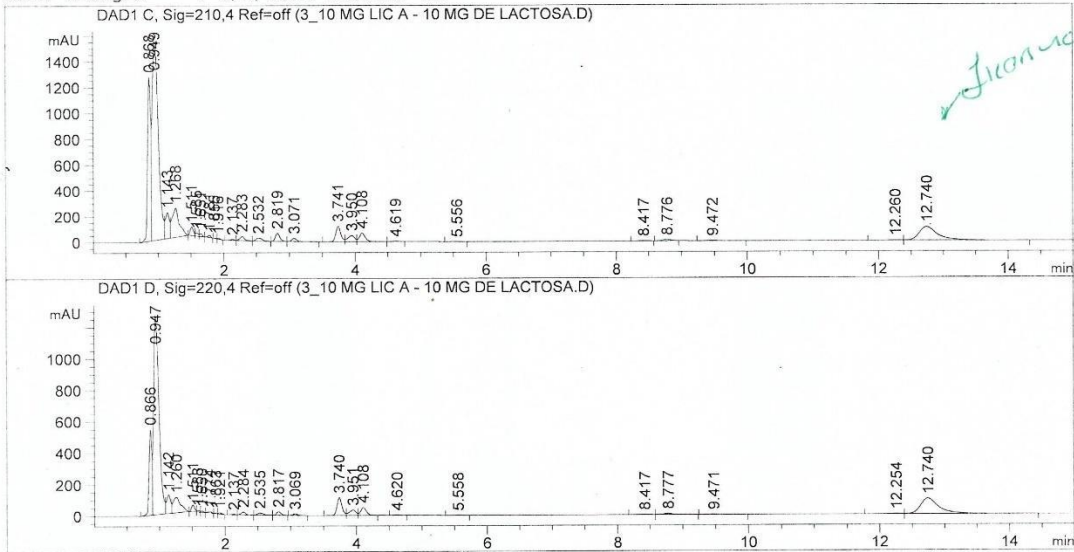


Fig 50. Reporte del cromatograma de la muestra de 3.

Data File C:\CHEM32\1\DATA\LILIANA\6.D
Sample Name: 6 - 20 mg Lic A - 10 mg Lac - 2 mg de en

=====
Acq. Operator :
Acq. Instrument : HPLC_N007 Location : Vial 24
Injection Date : 8/1/2024 1:58:18 PM Inj Volume : 10.000 µl
Method : C:\CHEM32\1\METHODS\KEVINLIC.M
Last changed : 8/1/2024 1:57:10 PM
Sample Info : Se inyector muestra 6 - 20 mg Lic A - 10 mg Lac - 2 mg de enzima - H2O/CH3CN
microL por 20 min

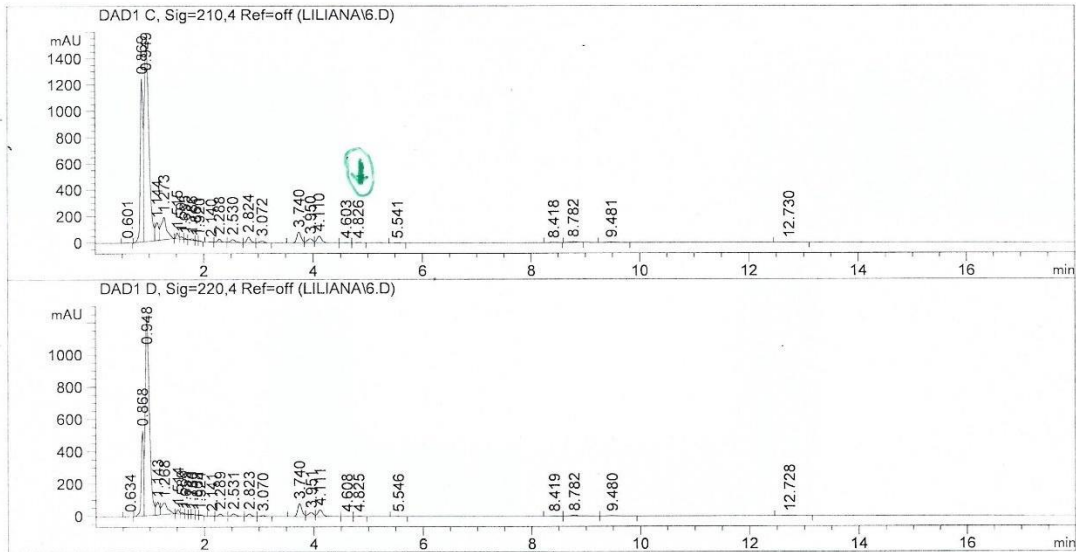


Fig 51. Reporte del cromatograma de la muestra de 6.

Data File C:\CHEM32\...INLISEC 2024-08-01 13-20-56\7_10 MG LIC A - 10 MG LACT - 5 MG ENZ.D
Sample Name: 7_10 mg Lic A - 10 mg lact - 5 mg enz

```
=====
Acq. Operator   :                               Seq. Line :    2
Acq. Instrument : HPLC_N007                     Location  : Vial 26
Injection Date  : 8/1/2024 1:37:53 PM           Inj       :    1
                                                Inj Volume: 10.000 µl
Sequence File   : C:\Chem32\1\DATA\Liliana\KEVINLISEC 2024-08-01 13-20-56\KEVINLISEC.S
Method          : C:\CHEM32\1\DATA\LILIANA\KEVINLISEC 2024-08-01 13-20-56\KEVINLIC.M (
                  Sequence Method)
Last changed    : 8/1/2024 1:20:56 PM
=====
```

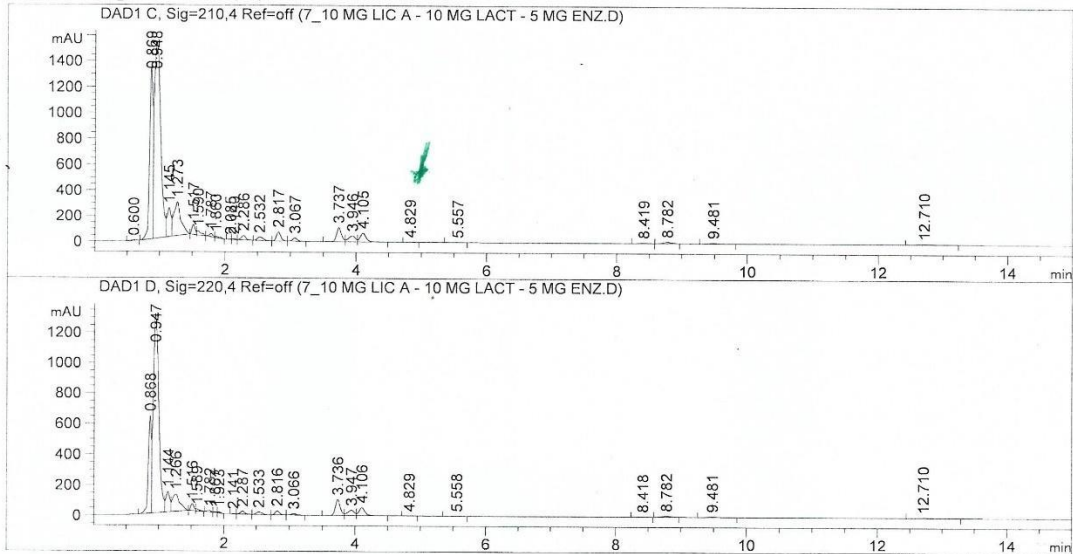
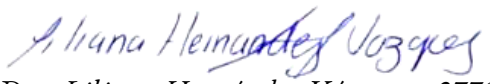


Fig 52. Reporte del cromatograma de la muestra de 7.

Vo.Bo. del (las) o los asesores


Dra. Liliana Hernández Vázquez - 27790

Asesor interno

Nombre, firma y No. económico


Dra. Beatriz Godínez Chaparro - 36337

Asesor externo

Nombre, firma y No. económico



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
Unidad Xochimilco