



**UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES**

**SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE DERIVADOS DEL β -PINENO.
ACTIVIDAD BIOLÓGICA.**

Br. Stefania Contreras Cedeño

Tutor: Dr. Carmelo Rosquete Porcar

Mérida, octubre de 2021

www.bdigital.ula.ve

www.bdigital.ula.ve

Dedicado a...

Mi hija Victoria Isabella

Por ser mi fuente de motivación e inspiración para poder superarme cada día más y así poder luchar para que la vida nos depare un mejor futuro. Te amo infinitamente

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por bendecirme con el don de la vida, por guiarme a lo largo de mi existencia, por ser el apoyo y fortaleza en aquellos momentos de dificultad y debilidad.

A mi papá, por estar siempre a mi lado.

A mi mami, por darme la vida y haberme forjado como la persona que soy en la actualidad. Me motivaste constantemente para alcanzar mis anhelos.

A mi esposo José, por siempre brindarme su comprensión, cariño y amor; por su sacrificio y esfuerzo por darme una carrera para nuestro futuro, por creer en mí y no dejarme decaer.

A mi Abuelito Gilberto Cedeño, quien desde el cielo me apoya y guía, así como en vida me cuidaste y protegiste; contigo conocí un amor único y diferente a cualquier otro. Me harás falta por siempre, Te amo abuelo te extraño mucho.

A mis amigas M.^a Virginia, Juliana, Gaby y Alba, mis hermanas de corazón quienes llegaron a mi vida para ser mi mano derecha, agradezco su ayuda, consejos y excelentes momentos vividos. Todavía nos faltan experiencias por compartir.

A mis amigos Laura y Manuel, quienes sin esperar nada a cambio me apoyaron compartieron sus conocimientos y alegrías durante la etapa final de mi carrera, logrando que este sueño se haga realidad.

A la Lic. Andrea Baptista, por su esfuerzo para ayudarme a lograr esta nueva meta, contribuyendo a los análisis en el Instituto de Investigaciones Fisicoquímicas de Córdoba de la Universidad de Córdoba, Argentina.

A mi tutor Carmelo Rosquete, por haber compartido sus conocimientos a lo largo de este trabajo y darme la oportunidad de realizarlo en el laboratorio de Productos Naturales.

A la Universidad de los Andes, por darme la oportunidad de recibir una formación profesional de calidad.

A todos aquellos que formaron parte de este logro, gracias por brindarme las palabras de apoyo cuando fueron necesarias.

RESUMEN

Se realizó la síntesis y caracterización de una serie de derivados de β -pineno, mediante el uso de reacciones de adición de alquenos. Mediante transformaciones químicas fueron sintetizados los derivados halogenados: (1*S*,2*R*,5*R*)-2-bromo-2-(bromometil)-6,6-dimetilbiciclo[3.1.1]heptano (*A*₁), R= 74,6 %; (1*S*,2*R*,5*R*)-2-bromo-2,6,6-trimetilbiciclo[3.1.1]heptano (*A*₂), R= 84,9 %; y (1*S*,2*R*,5*R*)-2-cloro-2,6,6-trimetilbiciclo[3.1.1]heptano (*A*₃), R= 85,7 %. Y los derivados hidroxilados; (1*S*,2*R*,5*R*)-2-(hidroximetil)-6,6-dimetilbiciclo[3.1.1]heptan-2-ol (*A*₄) %R= 91,2 %, (1*S*,2*R*,5*R*)-2,6,6-trimetilbiciclo[3.1.1]heptan-2-ol (*A*₅) %R= 75,8 %. Adicionalmente, se evaluó la actividad biológica de los derivados obtenidos sobre el crecimiento de gérmenes frente a la cepa de *Escherichia coli* DH₅ α (bacteria Gram-negativa) determinando valores de concentraciones inhibitorias (CI) inferiores a las requeridas por el antibiótico patrón para los compuestos *A*₁, *A*₂, *A*₄ y *A*₅; por su parte, la cepa utilizada presentó resistencia frente al producto *A*₃.

www.bdigital.ula.ve

ABSTRACT

The synthesis and characterization of a series of β -pinene derivatives was carried out using alkene addition reactions. By chemical transformations were synthesized the halogenated derivatives: (1*S*,2*R*,5*R*)-2-bromo-2-(bromomethyl)-6,6-dimethylbicyclo[3.1.1]heptane (*A*₁), *R*= 74.6 %; (1*S*,2*R*,5*R*)-2-bromo-2,6,6-trimethylbicyclo[3.1.1]heptane (*A*₂), *R*= 84.9 %; and (1*S*,2*R*,5*R*)-2-chloro-2,6,6-trimethylbicyclo[3.1.1]heptane (*A*₃), *R*= 85.7 %. And the hydroxylated derivatives: (1*S*,2*R*,5*R*)-2-(hydroxymethyl)-6,6-dimethylbicyclo[3.1.1]heptan-2-ol (*A*₄), %*R*= 91.2 %; (1*S*,2*R*,5*R*)-2,6,6-trimethylbicyclo[3.1.1]heptan-2-ol (*A*₅) %*R*= 75.8 %. Additionally, the biological activity of the obtained derivatives on the growth of germs was evaluated against the strain of *Escherichia coli* DH₅ α (Gram-negative bacteria) was evaluated, determining values of inhibitory concentrations (IC) lower than those required by the standard antibiotic for compounds *A*₁, *A*₂, *A*₄ and *A*₅, while the strain used showed resistance against *A*₃.

www.bdigital.ula.ve

CONTENIDO

	Página
Acta.	ii
Dedicatoria.	iii
Agradecimientos.	iv
Resumen.	vi
Abstract.	vii
Contenido.	viii
Índice de figuras.	xiii
Índice de tablas.	
1. Introducción.	1
2. Marco teórico.	3
2.1. Síntesis orgánica.	3
2.2. Alquenos.	3
2.2.1. Isomería y nomenclatura.	4
2.2.2. Estructura y estabilidad.	4
2.2.3. Reacciones de alquenos.	5
2.2.3.1. Adición de halógenos.	6
2.2.3.2. Adición de hidrácidos.	7
2.2.3.3. Hidroxilación de alquenos.	8
2.2.3.4. Hidratación de alquenos.	9
2.3. Técnicas de separaciones cromatográficas.	9
2.3.1. Cromatografía de capa fina.	9
2.3.2. Cromatografía de columna.	10
2.4. Técnicas de caracterización.	10
2.4.1. Técnicas espectroscópicas.	10
2.4.1.1. Espectroscopia Infrarrojo (IR):	10
2.4.1.2. Espectrometría de masas (EM):	10
2.5. Terpenos.	11
2.5.1. Clasificación de los terpenos.	11
2.6. Bacterias.	12
2.6.1. Tinción de Gram.	13
2.6.2. Bacterias Gram negativas.	13
2.6.3. Metodologías para evaluar la actividad antibacteriana.	14
2.6.3.1. Métodos de dilución.	14
2.6.3.2. Medios de cultivo.	14
3. Antecedentes.	15

3.1.	Estudio antimicrobiano para el β -pineno.	15
3.2.	Actividad farmacológica para compuestos halogenados con bromo.	17
3.3.	Modificaciones realizadas al β -pineno.	19
4.	Justificación.	22
5.	Hipótesis.	22
6.	Objetivos.	22
6.1.	Objetivo general.	22
6.2.	Objetivos específicos.	22
7.	Metodología experimental.	23
7.1.	Materiales y equipos.	23
7.1.1.	Materiales, reactivos y solventes.	23
7.1.2.	Instrumentación.	23
7.1.3.	Microorganismo a utilizar en la determinación de la actividad antibacteriana de los derivados obtenidos de β -pineno.	24
8.	Resultados y discusión.	25
8.1.	Caracterización organoléptica y espectroscópica de β -pineno.	25
8.2.	Transformaciones químicas realizadas a β -pineno.	26
8.2.1.	Síntesis y caracterización del producto de dihalogenación de β -pineno: (1 <i>S</i> ,2 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)-2-bromo-2-(bromometil)-6,6-dimetilbiciclo [3.1.1] heptano (<i>A</i> ₁).	26
8.2.1.1.	Procedimiento experimental empleado para la dibromación de β -pineno.	26
8.2.1.2.	Rendimiento obtenido para la dibromación de β -pineno.	27
8.2.1.3.	Caracterización organoléptica y fisicoquímica de (1 <i>S</i> ,2 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)-2-bromo-2-(bromometil)-6,6-dimetilbiciclo [3.1.1] heptano (<i>A</i> ₁).	27
8.2.1.4.	Caracterización espectroscópica de (1 <i>S</i> ,2 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)-2-bromo-2-(bromometil)-6,6-dimetilbiciclo [3.1.1] heptano (<i>A</i> ₁).	28
8.2.1.4.1.	Caracterización por espectroscopia FT- IR de (1 <i>S</i> ,2 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)-2-bromo-2-(bromometil)-6,6-dimetilbiciclo [3.1.1] heptano (<i>A</i> ₁).	28
8.2.1.4.2.	Caracterización por cromatografía gaseosa/espectrometría de masas (CG/EM) de (1 <i>S</i> ,2 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)-2-bromo-2-(bromometil)-6,6-dimetilbiciclo [3.1.1] heptano (<i>A</i> ₁).	29
8.2.2.	Síntesis y caracterización del producto de hidrobromación de β -pineno: (1 <i>S</i> ,2 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)-2-bromo-2,6,6-trimetilbiciclo [3.1.1] heptano (<i>A</i> ₂).	33
8.2.2.1.	Procedimiento experimental empleado para la hidrobromación de β -pineno.	33
8.2.2.2.	Rendimiento obtenido para la hidrobromación de β -pineno.	34

8.2.2.3.	Caracterización organoléptica y fisicoquímica de (1 <i>S</i> ,2 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)-2-bromo-2,6,6-trimetilbiciclo [3.1.1] heptano (A ₂).	34
8.2.2.4.	Caracterización espectroscópica de (1 <i>S</i> ,2 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)-2-bromo-2,6,6-trimetilbiciclo [3.1.1] heptano (A ₂).	35
8.2.2.4.1.	Caracterización por espectroscopia FTIR de (1 <i>S</i> ,2 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)-2-bromo-2,6,6-trimetilbiciclo [3.1.1] heptano (A ₂).	35
8.2.2.4.2.	Caracterización por cromatografía gaseosa/espectrometría de masas (CG/EM) de (1 <i>S</i> ,2 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)-2-bromo-2,6,6-trimetilbiciclo [3.1.1] heptano (A ₂).	36
8.2.3.	Síntesis y caracterización del producto de hidroclicación de β-pineno: (1 <i>S</i> ,2 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)-2-cloro-2,6,6-trimetilbiciclo [3.1.1] heptano (A ₃).	39
8.2.3.1.	Procedimiento experimental empleado para la hidroclicación de β-pineno.	39
8.2.3.2.	Rendimiento obtenido para la hidroclicación de β-pineno.	39
8.2.3.3.	Caracterización organoléptica y fisicoquímica de (1 <i>S</i> ,2 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)-2-cloro-2,6,6-trimetilbiciclo [3.1.1] heptano (A ₃).	40
8.2.3.4.	Caracterización espectroscópica de (1 <i>S</i> ,2 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)-2-cloro-2,6,6-trimetilbiciclo [3.1.1] heptano (A ₃).	40
8.2.3.4.1.	Caracterización por espectroscopia FTIR de (1 <i>S</i> ,2 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)-2-cloro-2,6,6-trimetilbiciclo [3.1.1] heptano (A ₃).	40
8.2.3.4.2.	Caracterización por cromatografía gaseosa/espectrometría de masas (CG/EM) de (1 <i>S</i> ,2 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)-2-cloro-2,6,6-trimetilbiciclo [3.1.1] heptano (A ₃).	42
8.2.4.	Síntesis y caracterización del producto de glicolación de β-pineno: (1 <i>S</i> ,2 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)-2-(hidroximetil)-6,6-dimetilbiciclo [3.1.1] heptan-2-ol (A ₄).	44
8.2.4.1.	Procedimiento experimental empleado para la glicolación de β-pineno.	44
8.2.4.2.	Rendimiento obtenido para la glicolación de β-pineno.	44
8.2.4.3.	Caracterización organoléptica y fisicoquímica de (1 <i>S</i> ,2 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)-2-(hidroximetil)-6,6-dimetilbiciclo [3.1.1] heptan-2-ol (A ₄).	45
8.2.4.4.	Caracterización espectroscópica de (1 <i>S</i> ,2 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)-2-(hidroximetil)-6,6-dimetilbiciclo [3.1.1] heptan-2-ol (A ₄).	45
8.2.4.4.1.	Caracterización por espectroscopia FTIR de (1 <i>S</i> ,2 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)-2-(hidroximetil)-6,6-dimetilbiciclo [3.1.1] heptan-2-ol (A ₄).	45
8.2.4.4.2.	Caracterización por cromatografía gaseosa/espectrometría de masas (CG/EM) de (1 <i>S</i> ,2 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)-2-(hidroximetil)-6,6-dimetilbiciclo [3.1.1] heptan-2-ol (A ₄).	47
8.2.5.	Síntesis y caracterización del producto de hidratación de β-pineno: (1 <i>S</i> ,2 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)-2,6,6-trimetilbiciclo [3.1.1] heptan-2-ol (A ₅).	49

8.2.5.1.	Procedimiento experimental empleado para la hidratación de β -pineno.	49
8.2.5.2.	Rendimiento obtenido para la hidratación de β -pineno.	50
8.2.5.3.	Caracterización organoléptica y fisicoquímica (1 <i>S</i> ,2 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)-2,6,6-trimetilbicyclo [3.1.1] heptan-2-ol (<i>A</i> ₅).	51
8.2.5.4.	Caracterización espectroscópica (1 <i>S</i> ,2 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)-2,6,6-trimetilbicyclo [3.1.1] heptan-2-ol (<i>A</i> ₅).	51
8.2.5.4.1.	Caracterización por espectroscopia FTIR de (1 <i>S</i> ,2 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)-2,6,6-trimetilbicyclo [3.1.1] heptan-2-ol (<i>A</i> ₅).	51
8.2.5.4.2.	Caracterización por cromatografía gaseosa/espectrometría de masas (CG/EM) de (1 <i>S</i> ,2 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)-2,6,6-trimetilbicyclo [3.1.1] heptan-2-ol. (<i>A</i> ₅).	53
8.3.	Determinación de la actividad antibacteriana de los derivados de β -pineno obtenidos.	55
8.3.1.	Microorganismo a utilizar.	55
8.3.2.	Preparación de placas y medio de cultivo bacteriano.	55
8.3.3.	Inoculación de medio líquido rico y siembra en placa en medio sólido.	56
8.3.4.	Preparación de los discos de papel.	56
8.3.5.	Lectura de placas.	57
8.3.6.	Ensayos biológicos para determinar la inhibición del crecimiento de bacterias.	57
9.	Conclusiones.	59
10.	Recomendaciones.	60
11.	Referencias bibliográficas.	61
12.	Apéndices.	66
12.1.	Apéndice 1.	66
12.2.	Apéndice 2.	69

ÍNDICE DE FIGURAS.

	Página
Figura 1. Estabilidad de los alquenos.	5
Figura 2. Reacción de halogenación.	6
Figura 3. Intermediario de reacción (ion halogenonio).	6
Figura 4. Mecanismo seguido por la reacción para la obtención de los derivados bromados.	7
Figura 5. Mecanismo de reacción para la obtención de hidrácidos.	8
Figura 6. Mecanismo de reacción para la formación de dioles.	8
Figura 7. Mecanismo seguido para la hidratación de alquenos.	9
Figura 8. Estructura de enantiómeros positivos para α -pineno y β -pineno.	16
Figura 9. Transformación (a través de la transposición del epóxido) de β -pineno en diferentes productos.	20
Figura 10. Reacción de Prins para la síntesis de Nopol.	21
Figura 11. a) Espectro FTIR obtenido de β -pineno comercial; b) Espectro reportado para β -pineno.	25
Figura 12. Compuesto obtenido a partir de la bromación de β -pineno.	27
Figura 13. Espectro FTIR obtenido para el (1S,2R,5R)-2-bromo-2-(bromometil)-6,6-dimetilbicyclo [3.1.1] heptano (A ₁) sintetizado.	28
Figura 14. Cromatograma de gases obtenido para el (1S,2R,5R)-2-bromo-2-(bromometil)-6,6-dimetilbicyclo [3.1.1] heptano (A ₁) sintetizado.	30
Figura 15. Espectro de masas obtenido para el (1S,2R,5R)-2-bromo-2-bromometil)-6,6- dimetilbicyclo [3.1.1] heptano (A ₁) sintetizado.	31
Figura 16. Patrón de fragmentación de (1S,2R,5R)-2-bromo-2-(bromometil)-6,6-dimetilbicyclo [3.1.1] heptano (A ₁).	32
Figura 17. Equipo para la síntesis de hidrácidos de β -pineno.	33
Figura 18. Compuesto obtenido de la síntesis del hidrobromuro de β -pineno.	34
Figura 19. Espectro FTIR obtenido para el (1S,2R,5R)-2-bromo-2,6,6-trimetilbicyclo [3.1.1] heptano (A ₂).	35
Figura 20. Cromatograma de gases obtenido para el (1S,2R,5R)-2-bromo-2,6,6-trimetilbicyclo [3.1.1] heptano (A ₂) sintetizado.	36
Figura 21. Espectro de masas obtenido para el (1S,2R,5R)-2-bromo-2,6,6-trimetilbicyclo [3.1.1] heptano (A ₂) sintetizado.	37
Figura 22. Patrón de fragmentación de (1S,2R,5R)-2-bromo-2,6,6-trimetilbicyclo [3.1.1] heptano (A ₂).	38
Figura 23. Compuesto obtenido de la síntesis del hidrocloreuro de β -pineno.	39
Figura 24. Espectro FTIR obtenido para el (1S,2R,5R)-2-cloro-2,6,6-trimetilbicyclo [3.1.1] heptano (A ₃) sintetizado.	41

Figura 25.	Cromatograma de gases obtenido para el (1 <i>S</i> ,2 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)-2-cloro-2,6,6-trimetilbicyclo [3.1.1] heptano (A ₃) sintetizado.	42
Figura 26.	Espectro de masas obtenido para (1 <i>S</i> ,2 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)-2-cloro-2,6,6-trimetilbicyclo [3.1.1] heptano (A ₃).	42
Figura 27.	Patrón de fragmentación de (1 <i>S</i> ,2 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)-2-cloro-2,6,6-trimetilbicyclo [3.1.1] heptano (A ₃).	43
Figura 28.	a) Mezcla de productos de la reacción de β-pineno con KMnO ₄ ; b) Compuesto puro obtenido de la reacción de hidroxilación de β-pineno.	44
Figura 29.	Espectro FTIR obtenido para el (1 <i>S</i> ,2 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)-2-(hidroximetil)-6,6-dimetilbicyclo [3.1.1] heptan-2-ol (A ₄) sintetizado.	46
Figura 30.	Cromatograma de gases obtenido para el (1 <i>S</i> ,2 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)-2-(hidroximetil)-6,6-dimetilbicyclo [3.1.1] heptan-2-ol (A ₄) sintetizado.	47
Figura 31.	Espectro de masas obtenido para el (1 <i>S</i> ,2 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)-2-(hidroximetil)-6,6-dimetilbicyclo [3.1.1] heptan-2-ol (A ₄) sintetizado.	48
Figura 32.	Patrón de fragmentación de (1 <i>S</i> ,2 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)-2-(hidroximetil)-6,6-dimetilbicyclo [3.1.1] heptan-2-ol (A ₄).	49
Figura 33.	Equipo empleado en la reacción de hidratación de β-pineno.	50
Figura 34.	Compuesto obtenido a partir de la hidratación de β-pineno.	50
Figura 35.	Espectro FTIR obtenido para el (1 <i>S</i> ,2 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)-2-(hidroximetil)-6,6-dimetilbicyclo [3.1.1] heptan-2-ol (A ₅) sintetizado.	52
Figura 36.	Cromatograma de gases obtenido para (1 <i>S</i> ,2 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)-2,6,6-trimetilbicyclo [3.1.1] heptan-2-ol (A ₅) sintetizado.	53
Figura 37.	Espectro de masas obtenido para (1 <i>S</i> ,2 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)-2,6,6-trimetilbicyclo [3.1.1] heptan-2-ol (A ₅) sintetizado.	54
Figura 38.	Patrón de fragmentación de (1 <i>S</i> ,2 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)-2,6,6-trimetilbicyclo [3.1.1] heptan-2-ol (A ₅).	54
Figura 39.	Preparación de placas y medio de cultivos bacterianos.	55
Figura 40.	Preparación de discos para determinar la actividad bacteriana de los derivados obtenidos de las transformaciones de β-pineno.	56

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Clasificación típica de los terpenos	12
Tabla 2. Monoterpenos abundantemente distribuidos en La Naturaleza.	12
Tabla 3. Compuestos sintetizados a partir de α -pineno.	15
Tabla 4. Derivados halogenados con propiedades farmacológicas.	18
Tabla 5. Materiales, reactivos y solventes utilizados.	23
Tabla 6. Equipos e instrumentos empleados en el desarrollo de la investigación.	23
Tabla 7. Asignación de las señales en el espectro de FTIR del β -pineno comercial.	26
Tabla 8. Resultados obtenidos durante las síntesis de (1 <i>S</i> ,2 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)-2-bromo-2-(bromometil)-6,6-dimetilbiciclo [3.1.1] heptano (<i>A</i> ₁).	27
Tabla 9. Características organolépticas y fisicoquímicas de (1 <i>S</i> ,2 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)-2-bromo-2-(bromometil)-6,6-dimetilbiciclo [3.1.1] heptano (<i>A</i> ₁) sintetizado.	27
Tabla 10. Comparación de las señales en el espectro de FTIR para (1 <i>S</i> ,2 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)-2-bromo-2-(bromometil)-6,6-dimetilbiciclo [3.1.1] heptano (<i>A</i> ₁).	29
Tabla 11. Resultados obtenidos durante las síntesis de (1 <i>S</i> ,2 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)-2-bromo-2,6,6-trimetilbiciclo [3.1.1] heptano (<i>A</i> ₂).	34
Tabla 12. Características organolépticas y fisicoquímicas de (1 <i>S</i> ,2 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)-2-bromo-2,6,6-trimetilbiciclo [3.1.1] heptano (<i>A</i> ₂) sintetizado.	34
Tabla 13. Comparación de las señales en el espectro de FTIR para (1 <i>S</i> ,2 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)-2-bromo-2,6,6-trimetilbiciclo [3.1.1] heptano (<i>A</i> ₂).	36
Tabla 14. Resultados obtenidos durante las síntesis de (1 <i>S</i> ,2 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)-2-cloro-2,6,6-trimetilbiciclo [3.1.1] heptano (<i>A</i> ₃).	39
Tabla 15. Características organolépticas y físicoquímicas de (1 <i>S</i> ,2 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)-2-cloro-2,6,6-trimetilbiciclo [3.1.1] heptano (<i>A</i> ₃) sintetizado.	40
Tabla 16. Comparación de las señales en el espectro de FTIR para el (1 <i>S</i> ,2 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)-2-cloro-2,6,6-trimetilbiciclo [3.1.1] heptano (<i>A</i> ₃).	41
Tabla 17. Resultados obtenidos durante las síntesis de (1 <i>S</i> ,2 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)-2-(hidroximetil)-6,6-dimetilbiciclo [3.1.1] heptan-2-ol (<i>A</i> ₄).	45
Tabla 18. Características organolépticas y fisicoquímicas de (1 <i>S</i> ,2 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)-2-(hidroximetil)-6,6-dimetilbiciclo [3.1.1] heptan-2-ol (<i>A</i> ₄) sintetizado.	45
Tabla 19. Comparación de las señales en el espectro de FTIR para el (1 <i>S</i> ,2 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)-2-(hidroximetil)-6,6-dimetilbiciclo [3.1.1] heptan-2-ol (<i>A</i> ₄).	46
Tabla 20. Resultados obtenidos durante las síntesis de (1 <i>S</i> ,2 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)-2,6,6-trimetilbiciclo [3.1.1] heptan-2-ol (<i>A</i> ₅).	51

Tabla 21.	Características organolépticas y fisicoquímicas del (1 <i>S</i> ,2 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)-2,6,6-trimetilbiciclo [3.1.1] heptan-2-ol (A ₅) sintetizado.	51
Tabla 22.	Comparación de las señales en el espectro de FTIR para el (1 <i>S</i> ,2 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)-2-(hidroximetil)-6,6-dimetilbiciclo [3.1.1] heptan-2-ol (A ₅).	52
Tabla 23.	Actividad antibacteriana/CMI de los compuestos sintetizados A ₁ -A ₅ .	57

www.bdigital.ula.ve

1. INTRODUCCIÓN.

El hombre desde sus inicios ha buscado la forma de propiciar su bienestar físico y mental, tomando de la naturaleza los recursos naturales que en ella se encuentran; para ello, ha desarrollado diversas técnicas y estrategias que le permiten el uso de los vegetales, animales y minerales a través de procesos que día a día ha tecnificado.

Las plantas, organismos autótrofos, además del metabolismo primario presente en todos los seres vivos, poseen un metabolismo secundario que les permite producir y acumular compuestos de naturaleza química diversa. Estos compuestos derivados del metabolismo secundario se denominan metabolitos secundarios o productos naturales. Estos se distribuyen diferencialmente entre grupos taxonómicos, presentan propiedades biológicas, muchos desempeñan funciones ecológicas y se caracterizan por sus diferentes usos y aplicaciones como medicamentos, insecticidas, herbicidas, perfumes o colorantes, entre otros. (Pérez-Urria y Ávalos, 2009)

En tal sentido las plantas constituyen una fuente de gran importancia para el uso en el ámbito medicinal, indagándose su aplicación terapéutica a través de la identificación, caracterización y determinación de las propiedades farmacológicas de estos.

Dentro de los productos naturales se encuentran los terpenos, los cuales constituyen el grupo más numeroso de metabolitos secundarios con más de 40.000 moléculas diferentes. De acuerdo a su composición estructural, existe una clasificación determinada por el número de unidades de isopreno (C5) que lo conforman, dentro de la cual se encuentran los monoterpenos (poseen 10 átomos de carbono, es decir, contienen dos unidades C5). (Pérez-Urria y Ávalos, 2009)

Después del limoneno, el pineno es el monoterpeno más abundante en la naturaleza. La industria de fragancias y saborizantes consume aproximadamente 30.000 toneladas de pinenos por año, los cuales se usan para obtener un amplio rango de productos. Adicionalmente, el 84 % de los derivados de los pinenos se producen por síntesis química. (Rojas *et al.*, 2009).

Partiendo del estudio de β -pineno y considerando que este presenta actividades biológicas aplicadas en el ramo farmacológico, el presente estudio tiene como finalidad la síntesis de una serie de derivados de β -pineno, de los cuales se puede esperar que posean bioactividad.

www.bdigital.ula.ve

2. MARCO TEÓRICO.

2.1. Síntesis orgánica.

La síntesis orgánica es de gran importancia en las ciencias, siendo indiscutible su uso en la industria química moderna. A partir de los avances en esta área, ha ocurrido la evolución de los plásticos, las drogas, los detergentes, los fertilizantes, los cosméticos y tantos otros productos indispensables para el desenvolvimiento de la sociedad actual.

Los inicios de la química orgánica se fundamentan en una ciencia consagrada a la síntesis que con el avance del tiempo se manifiesta por conocer en detalle la estructura de los compuestos y el mecanismo de su formación. Actualmente, los estudiosos de otras áreas como física, biología, bioquímica y ciencias de los materiales, entre otros, se apoyan de la química orgánica para obtener algunos compuestos relacionados con sus investigaciones. A pesar que en la actualidad existe en líneas generales una inmensa fuente de conocimiento sobre las reacciones orgánicas, la capacidad creativa de la mente humana es la que signa los éxitos de los estudios a realizarse.

En último lugar, es de considerar que la síntesis orgánica simboliza la forma más viable de obtención de compuestos químicos innovadores aplicables en infinidad de espacios de la Ciencia con el fin de contribuir con el hombre en la práctica de sus actividades diarias. (Maldonado, 2012)

2.2. Alquenos.

Los alquenos o compuestos insaturados son hidrocarburos que contienen enlaces dobles carbono-carbono dentro de su molécula. Los alquenos se originan a partir de un alcano que ha perdido dos átomos de hidrógeno dando como resultado un doble enlace entre dos carbonos, por lo tanto, son más reactivos y más ácidos. La fórmula general de un alqueno de cadena abierta con un solo doble enlace es C_nH_{2n} . (Rivera, 2008)

En una estructura de Lewis, el doble enlace se representa mediante dos pares de electrones entre los átomos de carbono, para el etileno cuya fórmula molecular es C_2H_4 .

2.1.1. Isomería y nomenclatura.

La estructura de los alquenos, al presentar un doble enlace, genera un cambio radical en el comportamiento químico, debido a que aparece un centro polar: el doble enlace rico en electrones es susceptible de ser atacado por especies electrofílicas para proporcionar productos de adición. El doble enlace C=C tiene una energía en el orden de 140 Kcal/mol y puesto que la energía de un enlace sencillo C-C vale alrededor de 80 Kcal/mol, se estima que la contribución del enlace π es de unas 60 Kcal/mol. El tamaño de esta energía le concede al doble enlace el carácter de centro rígido, siendo necesario temperaturas muy elevadas para romperlo y permitir la libre rotación. De tal manera que, la rigidez y la falta de rotación de los dobles enlaces carbono-carbono, da lugar a la isomería *cis-trans*, que es una variedad de estereoisomería denominada también isomería geométrica, considerando que los sustituyentes iguales del mismo lado se designan *cis*, mientras que los sustituyentes opuestos se denominan *trans*. (Marcano, 1998)

Los alquenos simples se denominan de modo semejante a los alcanos, empleando como raíz el nombre de la cadena más larga que contiene el doble enlace cambiando la denominación de *-ano* a *-eno*. Los alquenos trisustituídos y tetrasustituídos no pueden mostrar isomería geométrica *cis-trans*, por lo cual el sistema *E-Z* proporciona un método más eficiente para describir el doble enlace.

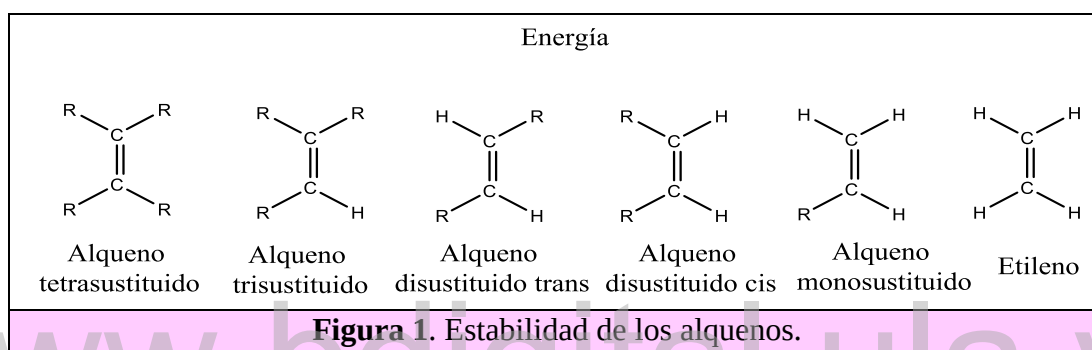
El sistema *E-Z* se diseñó de acuerdo a la convención de Cahn-Ingold-Prelog. Para emplear este sistema existen las siguientes reglas se separa el alqueno en sus dos extremos y se asignan las prioridades, el isómero que tiene los dos átomos prioritarios del mismo lado del doble enlace se llama isómero *Z* y el isómero que los tiene en lados opuestos se denomina isómero *E*; los átomos con enlaces múltiples equivalen a la misma cantidad de átomos con enlaces sencillos. (Wade, 2002)

2.2.2. Estructura y estabilidad.

Se considera que para los alquenos los carbonos olefínicos tienen tres orbitales híbridos sp^2 equivalentes ubicados en un plano, formando ángulos de 120° . Se debe romper temporalmente el enlace π para que ocurra la rotación alrededor del doble enlace, de allí que

la barrera de rotación del doble enlace debe ser como mínimo de la misma magnitud que la fuerza del propio enlace π , estimado en 64 Kcal/mol.

Sin embargo, es posible determinar estabilidades relativas de los isómeros de los alquenos a través de un equilibrio *cis-trans*. Si se trata con ácido fuerte existen otras formas de adquirir la misma información; entre ellas tenemos una propiedad termodinámica como lo es el calor de combustión de los isómeros, obteniendo estabilidades mayores al aumentar el grado de sustitución, siendo más estables los alquenos tetrasustituídos que los monosustituídos.



En la figura 1 se observa un orden condicionado por dos factores: hiperconjugación lo que se refiere a una interacción estabilizadora entre el orbital de antienlace $\pi^* \text{C}=\text{C}$ vacío y un orbital de enlace $\sigma \text{C-H}$ lleno en un sustituyente vecino. El segundo factor, llamado fuerzas de enlace, influye en la determinación de la estabilidad ya que un enlace entre carbono sp^2 - sp^3 es más fuerte que entre dos sp^3 . (McMurry, 2004)

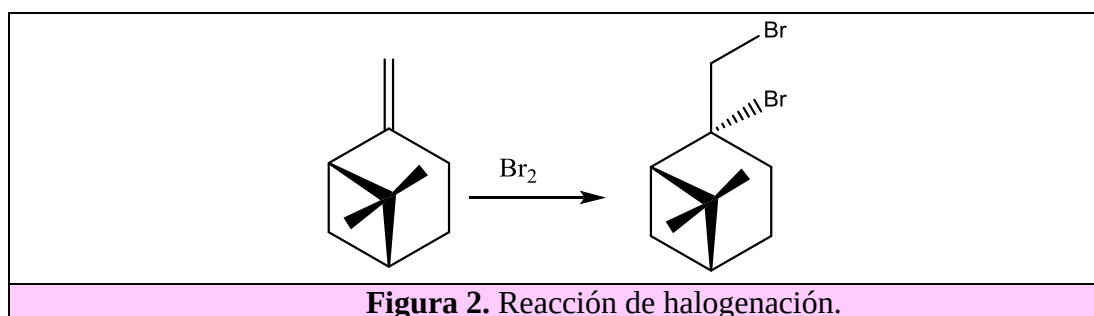
2.2.3. Reacciones de alquenos.

Los alquenos se caracterizan por presentar un doble enlace carbono – carbono. El estudio de las reacciones de los alquenos es en realidad el estudio de la reactividad del doble enlace, su estudio permite predecir las reacciones de muchos de ellos. Como los enlaces sencillos (σ) son más estables que los (π), es de esperarse que el doble enlace reaccione de tal modo que el enlace pi se transforme en enlace sigma. En efecto, es esta la reacción más común de los dobles enlaces. (Wade, 2002)

2.2.3.1. Adición de halógenos.

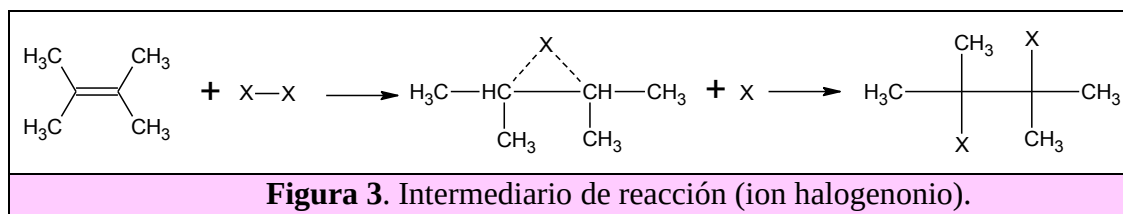
La halogenación se da con la adición de dos átomos de halógeno para generar un dihaluro vecinal, reacción favorable con cloro y bromo, por su parte el flúor reacciona de forma violenta y la formación de un diyoduro es neutra desde el punto de vista termodinámico.

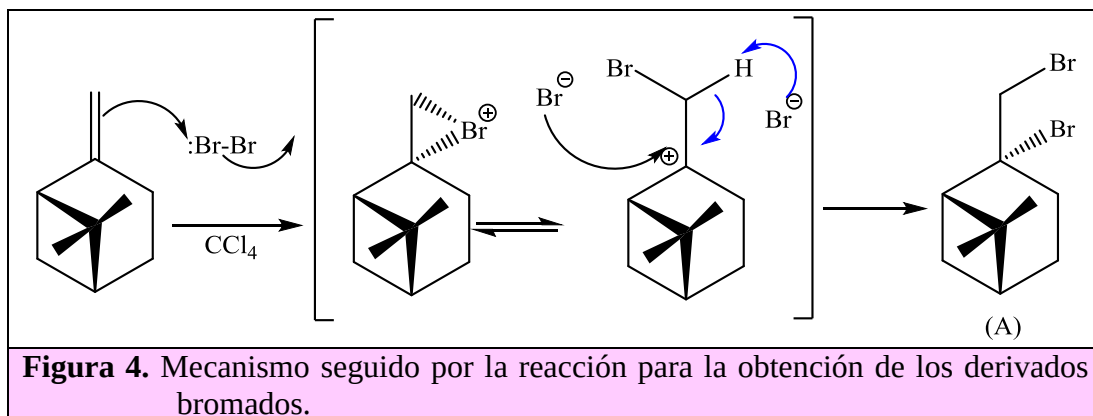
La nube electrónica π del alqueno es nucleófila y ataca a un extremo de la molécula de halógeno con desplazamiento paralelo del segundo halógeno como anión haluro.



Sin embargo, esta reacción no explica la estereoquímica de los productos, no indica cual estereoisómero se forma, o por donde podría atacar el ion Br^- en la segunda etapa de la reacción ya que al ser simétricos los iones halonio, el ataque es probable en cualquiera de los dos átomos de carbono, generando así el producto racémico. Donde uno de los productos tendría los dos átomos de Br en posición *cis* y el otro, en *trans*. Debido a esto se tiene que sólo se produce el *trans*-1,2-dibromoalcano evidenciándose una adición *anti*.

En el caso del bromo, el intermediario es un ion bromonio cíclico que puede considerarse como un híbrido estabilizado por resonancia, cuya principal característica es la unión a los átomos de carbono del doble enlace inicial para formar un anillo de tres miembros cuya estructura es rígida y únicamente puede ser atacada por el lado opuesto al bromo dando origen a la estereoquímica *anti* típica de la bromación. (Rivera, 2008)



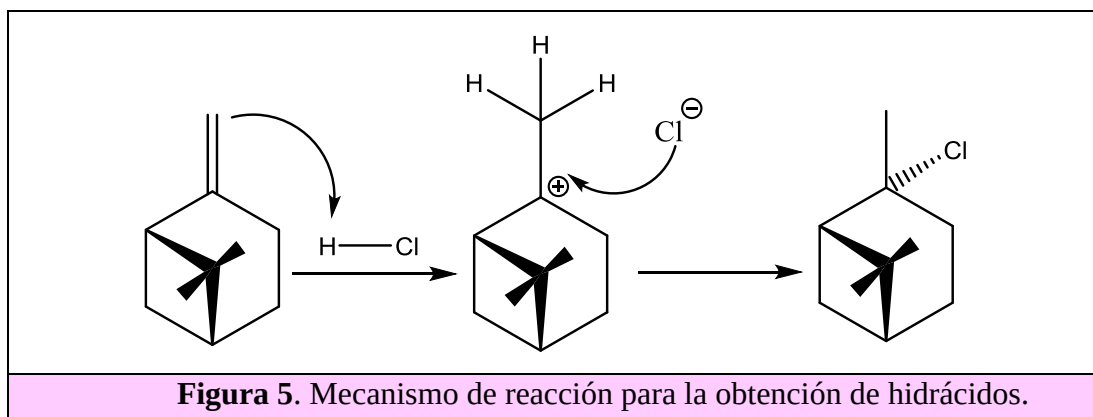


2.2.3.2. Adición de hidrácidos.

La adición de halogenuros de hidrógeno (H-X) al doble enlace tiene lugar por adición electrófila de un protón seguida del ataque dorsal del ion halogenuro para la obtención de haloalcanos. El protón (H^+) del H-X actúa como electrófilo siendo atacado por el alqueno en la primera etapa, mientras el ion X^- actúa como nucleófilo.

Cuando un alqueno no tiene los mismos sustituyentes en sus carbonos sp^2 puede formar dos tipos de productos en reacciones de sustitución electrofílica. El producto mayoritario es el que se obtiene por adición del protón al carbono sp^2 , que genera el carbocatión de mayor estabilidad, es decir, será más estable aquel que tenga mayor número de sustituyentes que por efecto inductivo y de hiperconjugación genere una mayor estabilidad en el intermediario de reacción. (March, 1977)

Debido a este razonamiento el producto formado mayoritariamente sigue la regla de Markovnikov, la cual deduce que el protón se une al carbono que tiene mayor número de átomos de hidrógeno y por consiguiente tiene el menor número de grupos alquilo para estabilizar el ion carbonio del intermediario. (Griffin, 1978)

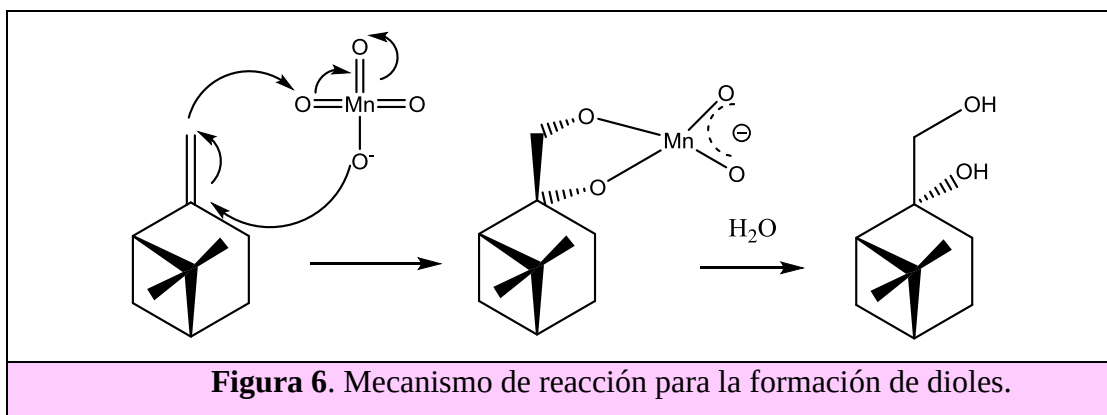


2.2.3.3. Hidroxilación de alquenos.

Esta reacción consiste en la adición de un grupo hidroxilo (OH^-) a cada uno de los carbonos del doble enlace para formar 1,2-dioles, es decir, un glicol. Los glicoles son aquellos dioles en los que los grupos hidroxilos están situados en carbonos contiguos; estereoquímicamente la reacción consiste en una adición *cis* que probablemente tiene lugar a través de un intermediario cíclico que posteriormente se hidroliza. (March., 1977)

Se puede llevar a cabo con distintos reactivos: Con tetraóxido de osmio (OsO_4) para posteriormente reaccionar con sulfito de sodio (Na_2SO_3) acuoso o con una solución diluida de permanganato de potasio (KMnO_4) en medio básico y en frío.

Aunque la reacción con OsO_4 da mejores rendimientos porque se evitan reacciones colaterales que se pueden dar con el KMnO_4 , se debe tener en cuenta que el OsO_4 es un reactivo muy caro y muy tóxico. (Escribano, 2010)



2.2.3.4. Hidratación de alquenos.

El tratamiento de alquenos con una disolución acuosa de un ácido fuerte como el ácido sulfúrico (H_2SO_4) o el ácido fosfórico (H_3PO_4), proporciona alcoholes. El proceso sigue la regla de Markovnikov, de forma que el protón del átomo se une al átomo de carbono menos sustituido y el grupo OH acaba en el carbono más sustituido de la olefina

El mecanismo transcurre con formación de un carbocatión (previa adición del protón al doble enlace), seguido de ataque nucleófilo del agua al carbocatión formado. Finalmente ocurre la desprotonación del alcohol donde el agua actúa como base. (Camps, 2005)

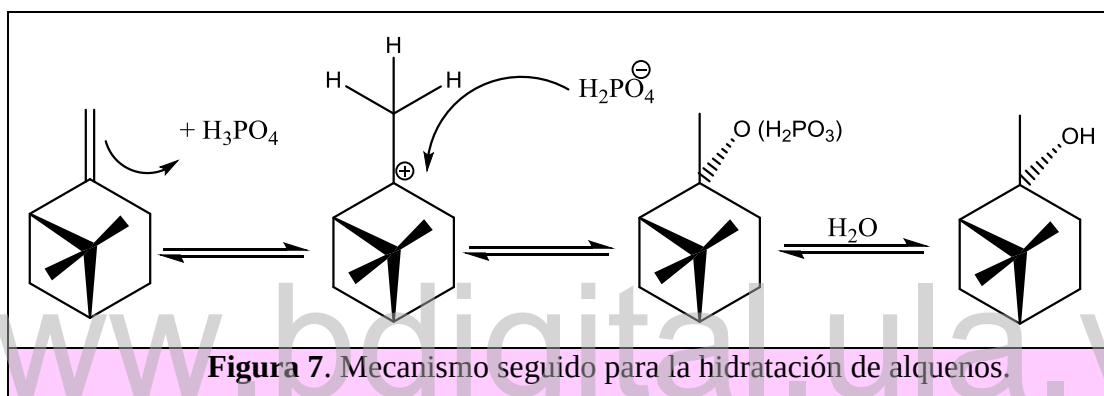


Figura 7. Mecanismo seguido para la hidratación de alquenos.

2.3. Técnicas de separaciones cromatográficas.

Las técnicas cromatográficas de purificación consisten en separar mezclas de compuestos en función de su diferente afinidad entre una fase estacionaria y una móvil. Todas las técnicas cromatográficas dependen de la distribución de los componentes de la mezcla entre dos fases inmiscibles, una de ellas llamada fase móvil, que transporta las sustancias que se separan, y que progresa en relación a otra fase llamada fase estacionaria.

2.3.1. Cromatografía de capa fina.

La técnica de Cromatografía en Capa Fina CCF es una adaptación especial de la cromatografía de adsorción que nos permite:

- Determinar el grado de pureza de una muestra
- Comparar muestras.

- Hacer el seguimiento de una reacción química
- Controlar el contenido de las fracciones obtenidas por cromatografía en columna
- Determinar las condiciones más adecuadas para una Cromatografía en columna.

2.3.2. Cromatografía de columna.

Representa un tipo de cromatografía de adsorción, en donde su distribución tiene lugar entre un adsorbente sólido (fase estacionaria) y un eluyente líquido (fase móvil). Se empleada con el fin de observar la separación de los productos obtenidos. Para esta, se utilizará gel de sílice 60 (63-200 μ m; 70-230 mesh) de la casa Merck. (López *et al.*, 2005)

2.4. Técnicas de caracterización.

2.4.1. Técnicas espectroscópicas.

Los métodos espectroscópicos, especialmente resonancia magnética nuclear (RMN), infrarrojo (IR) y espectrometría de masas (EM) son de uso cotidiano en este campo, a continuación, se revisará brevemente estos métodos.

2.4.1.1. Espectroscopia Infrarrojo (IR).

Las bandas que se observan en los espectros de infrarrojo (4.000-200 cm^{-1}), se relacionan con el cambio de los estados vibracionales y rotaciones de los enlaces presentes en la molécula. La posición e intensidad de las bandas correspondientes a un grupo funcional, que generalmente aparecen distribuidas en varias zonas más o menos constantes del espectro, son muy poco afectadas por el resto de la molécula, por lo tanto, el análisis del espectro ofrece información sobre los grupos funcionales presentes en la molécula, tales como OH, NH, CO, etc., así como el carácter alifático y/o aromático del compuesto.

2.4.1.2. Espectrometría de masas (EM).

Un compuesto orgánico que se expone a una corriente de electrones de alta energía (frecuentemente a 70 eV) se degrada en fragmentos de los cuales las especies con cargas positivas se separan por el campo magnético y se registran en el espectro de EM según la unidad de masa por el número de cargas positivas (m/z , donde $Z=1$ generalmente). Un aparato de alta resolución registra la unidad de masa de ion molecular (la molécula pierde un

solo electrón sin degradarse), además de los fragmentos con hasta cuatro o más cifras decimales, lo cual permite establecer la fórmula molecular correspondiente; la fragmentación es una característica de las diferentes clases de compuestos y esto es aprovechando para la ubicación de ciertos grupos funcionales en entornos particulares de la molécula. (Marcano y Hasegawa, 1991)

2.5. Terpenos.

Los terpenos también denominados isoprenoides, se conforman a partir del isopreno (5 unidades de átomos de carbono); pueden contener desde una hasta ocho unidades que pueden ser arregladas de forma lineal o cíclica. Están presentes en casi todas las formas de vida, sobre todo en las plantas que albergan una extraordinaria variedad de estos compuestos, teniendo además una heterogeneidad en cuanto a función y estructura. Estos constituyen el grupo más abundante de los aceites vegetales responsables de los aromas y sabores específicos de las plantas, mientras mayor sea la cantidad de oxígenos en la molécula, mayor será su aroma. A pesar de ser imperceptibles en la cotidianidad del ser humano, son utilizados por poseer diferentes propiedades tales como saborizantes, colorantes, aromáticas, antitumorales, antioxidantes, antibióticos, insecticidas, entre otras. (González *et al.*, 2016)

2.5.1. Clasificación de los terpenos.

Los terpenoides se derivan del isopentenil difosfato o de su isómero de doble enlace pirofosfato de dimetilalil (DMAP). Es evidente la diversidad de su estructura y función ya que son los productos naturales más abundantes, existen actualmente registrados más de 4600 compuestos. Los terpenos se clasifican según el número de unidades (isopreno) que lo conforman (tabla 1). El primer grupo se divide en mono-, sesqui-, di- y triterpenos, que contienen de dos a seis unidades de isopreno; el segundo grupo, está conformado por los meroterpenos, los indolditerpenos y el heterogéneo grupo de los prenilados aromáticos.

Los monoterpenos hidrocarbonados como α - y β -pineno, limoneno, α -felandreno y mirceno son los principales componentes de los aceites esenciales vegetales, particularmente en aquellos extraídos de hojas, semillas y flores. (González *et al.*, 2016)

Tabla 1. Clasificación típica de los terpenos.

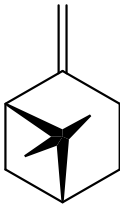
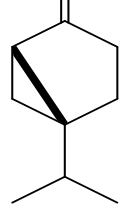
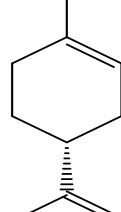
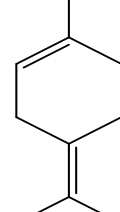
Número de unidades de isopreno	Número de carbonos	Nombre del terpeno
2	10	Monoterpeno
3	15	Sesquiterpeno
4	20	Diterpeno
6	30	Triterpeno
8	40	Tetraterpeno
> 8	> 40	Politerpeno

Fuente: González *et al.*, 2016.

β -Pineno es un monoterpreno bicíclico de fórmula molecular $C_{10}H_{16}$, es un líquido incoloro insoluble en agua y con aroma a pino verde, justo de ahí viene su nombre. Es el terpeno más ampliamente distribuido en la naturaleza y debido a esto, este compuesto ha sido explotado por diferentes industrias, entre ellas la agroalimentaria, cosmética, química y farmacéutica debido a que tiene una amplia actividad antibiótica y terapéutica (anti-inflamatoria y bronco-dilatadora). (González *et al.*, 2016)

A continuación, se presentan algunos de los terpenos que se encuentran de forma abundante en La Naturaleza:

Tabla 2. Monoterpenos abundantemente distribuidos en La Naturaleza.

				
α- Pineno	β- Pineno	Sabineno	Limoneno	Terpinoleno

2.6. Bacterias.

Las bacterias son microorganismos unicelulares que solo se pueden observar al microscopio, constituidos por una sola célula autónoma y no posee membrana nuclear, por lo tanto, son microorganismos procarióticos. Se reproducen por fisión binaria, la mayoría son de vida libre a excepción de algunas que son de vida intracelular obligada. Poseen

mecanismos de energía y el material genético que les permite su desarrollo y crecimiento. Su tamaño oscila entre 0.5 y 3 μm , llegando a alcanzar algunos tipos hasta 10 μm .

Existen diversidad de formas que la diferencian entre sí generado por la rigidez de su pared celular, entre ellas se encuentran: Cocos (esféricas u ovaladas), bacilos (cilíndricas o de bastón; rectos o curvos) y espirilos (espiral). (Pírez y Mota, 2013). De igual forma, pueden diferenciarse por su capacidad para retener un colorante básico (violeta cristal) después de su fijación con yodo y de coloración con alcohol (reacción de Gram), se dividen en Gram positivas y Gram negativas. (Cue y Morejón, 1998)

2.6.1. Tinción de Gram.

Las tinciones son las primeras herramientas que se utilizan en el laboratorio para realizar diagnósticos, datan desde el año (1844). Se denomina tinción de Gram al procedimiento empleado en los laboratorios donde se efectúa pruebas microbiológicas. Se considera una tinción diferencial, debido a que utiliza dos colorantes que permite clasificar las bacterias en dos grandes grupos: bacterias Gram negativas y bacterias Gram positiva.

Sus principios están basados en las características de las paredes celulares de las bacterias, la cual le otorga propiedades determinantes a cada microorganismo. La descripción del proceso en forma sencilla consiste en colocar colorante primario cristal violeta, posteriormente se añade lugol (funciona como mordiente, formando el complejo de cristal violeta-yodo); enseguida se coloca una mezcla de alcohol/acetona, posteriormente se añade safranina (colorante secundario) durante un periodo de 1-2 min. (López *et al.*, 2014)

2.6.2. Bacterias Gram negativas.

Están constituida por una capa fina de peptidoglicano que representa entre el 5-10 % del peso total de la pared celular, y pared celular externa de 10 nm de espesor por lo que es más compleja que las Gram positivas tanto química como estructuralmente. Al ser su pared celular delgada, se encuentra unida mediante lipoproteínas a otra membrana plasmática externa soluble en solventes orgánicos, lo que no permite la retención del complejo cristal violeta., por lo que se tiñe de color rosa mediante un colorante secundario (safranina) con la prueba de tinción de Gram. (Mollinedo y González, 2014)

2.6.3. Metodologías para evaluar la actividad antibacteriana.

Los métodos para la evaluación de la actividad antibacteriana se clasifican principalmente en tres grupos: métodos de difusión, métodos de dilución y bioautobiografía. En general se plantea utilizar los métodos de difusión para estudiar compuestos polares y los métodos de dilución para compuestos polares y no polares. (Ramírez y Marín, 2009)

2.6.3.1. Métodos de dilución.

El método de dilución en agar se emplea como test de susceptibilidad bacteriana para la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI), la cual se define como la concentración más baja en la que una sustancia que puede inhibir el crecimiento visible de un microorganismo luego de incubar por 24 horas. (Ramírez y Marín, 2009)

2.6.3.2. Medios de cultivo.

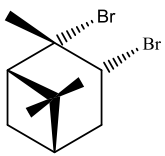
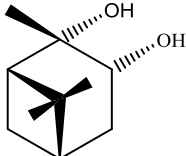
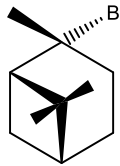
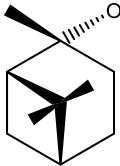
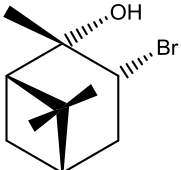
De manera general se denomina medio de cultivo a cualquier material que presente una adecuada combinación de nutrientes para permitir el crecimiento o el incremento del número de células de una población microbiana. El medio Luria-Bertani (LB), es uno de los más usados para el cultivo de *Escherichia coli* y de otras especies bacterianas, ya que es rico en nutrientes, de fácil elaboración y permite el crecimiento de una gran variedad de cepas. Está constituido por dos componentes orgánicos: la triptona (o peptona) y el extracto de levadura; y cloruro de sodio (NaCl) como tercer componente de origen inorgánico. (Garboza *et al.*, 2011)

3. ANTECEDENTES.

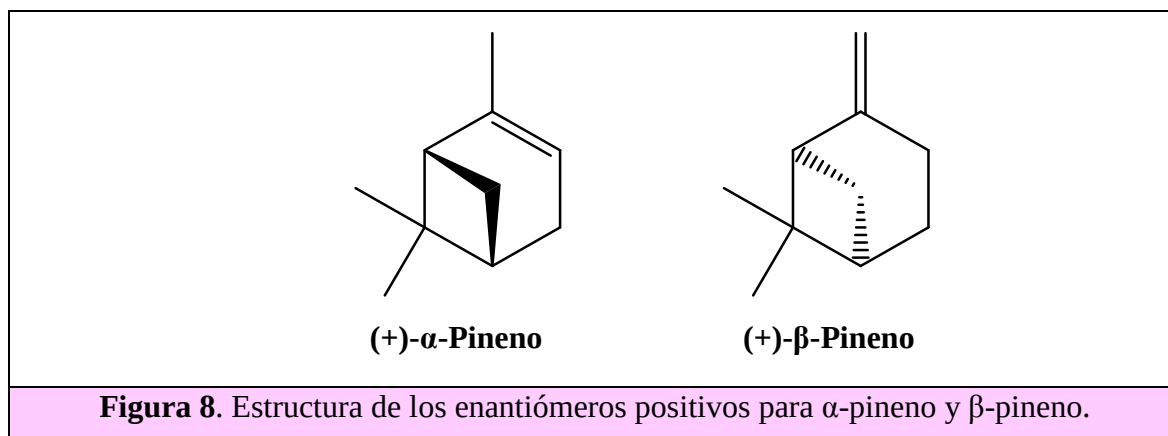
3.1. Estudio antimicrobiano para el β -pineno.

❖ Fernández en 2017 estudió la composición y la actividad del aceite esencial del Pino Caribe donde existe una proporción de 17,02 % de β -pineno, obteniendo efectos positivos frente a cepas de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, determinándose una CMI de 78 mg/L y ≤ 5 mg/L respectivamente. (Fernández, 2017) De igual forma sintetizó siete compuestos a partir de α -pineno, los cuales se muestran a continuación

Tabla 3. Compuestos sintetizados a partir de α -pineno.

Nombre	Estructura
 (1S,2S,3R,5S)-2,3-Dibromo-2,6,6-trimetilbicyclo[3.1.1]heptano.	 (1S,2S,3R,5S)-2,6,6-Trimetilbicyclo[3.1.1]heptano-2,3-diol.
 (1S,2S,3R,5S)-2,6,6-Trimetilbicyclo[3.1.1]heptano-2,3-epoxiheptano.	 (1S,2R,5R)-2-Cloro-2,6,6-trimetilbicyclo[3.1.1]heptano.
 (1S,2R,5R)-2-Bromo-2,6,6-trimetilbicyclo[3.1.1]heptano.	 (1S,2R,5R)-2,6,6-Trimetilbicyclo[3.1.1]heptano-2-ol.
 (1S,2R,5R)-3-Bromo-2,6,6-trimetilbicyclo[3.1.1]-2-heptanol.	

❖ Rivas y colaboradores en 2012 evaluaron la actividad antimicrobiana de los isómeros y enantiómeros de α -pineno y β -pineno contra células bacterianas y fúngicas, donde determinaron que solo los enantiómeros positivos de α y β -pineno eran activos. (Rivas *et al*, 2012)



Además, estos mostraron actividad microbica contra todos los hongos y bacterias con concentración mínima microbica (CMM) desde 117 hasta 4150 $\mu\text{g/mL}$; demostrándose que fueron altamente tóxicos a *Candida albicans* en un 100 % a los 60 minutos mientras que en *Staphylococcus aureus* el efecto se produjo después de 6 horas. De igual manera, se obtuvieron mejores resultados de inhibición con los *Cryptococcus neoformans* en actividades de fosfolipasa y esterasa. Finalmente, se evaluó la citotoxicidad de los enantiómeros (+) de pineno a macrófagos murinos, obteniendo para el β -pineno una reducción en la viabilidad celular de 57,7 %.

❖ Leite y colaboradores en 2007 estudiaron el efecto inhibidor del β -pineno, α -pineno y eugenol en el crecimiento de bacterias *Gram-positivas* causantes de endocarditis infecciosa obteniendo resultados positivos, determinándose así la concentración mínima inhibitoria para los tres compuestos, resultando para el β -pineno de 20 $\mu\text{L/mL}$ y de 40 $\mu\text{L/mL}$ para las especies *Staphylococcus aureus* y *S. epidermidis* respectivamente. (Leite *et al.*, 2007)

❖ Pessoa y colaboradores en 2007 realizaron un estudio para la evaluación de la efectividad del aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* Blume y β -pineno en la inhibición del crecimiento de diversas cepas de mohos dematiáceos (*Alternaria brassicola*,

Cladosporium herbarium, *C. resinae*, *C. cladosporioides*, *Chaetomium globosum*, *Curvularia* sp, *Fonsecaea compacta* y *Piedraia hortae*). A través del procedimiento de difusión de medio sólido y observando la interferencia de CMI se encontró para el β -pineno valores de CMI de 125 μ L/mL para la mayoría de las cepas de moho. Estos resultados muestran un intenso potencial antioxidante que podría considerarse para su uso en las formulaciones farmacéuticas utilizadas para tratar algunas micosis, en particular por dematiáceas moldes. (Pessoa *et al.*, 2007)

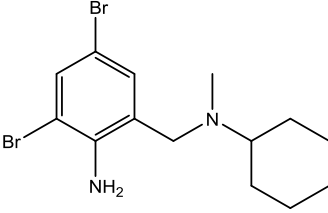
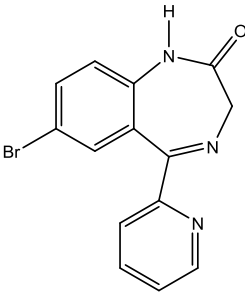
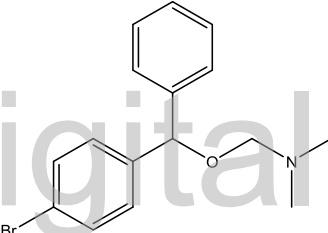
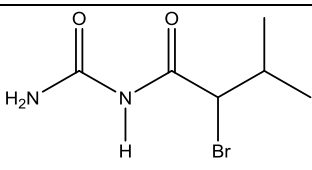
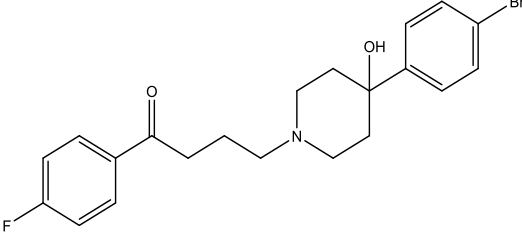
❖ Maguna y colaboradores en 2006 realizaron el estudio de la actividad antimicrobiana en un grupo de terpenoides dentro de los cuales se tomó bajo estudio el β -pineno, encontrándose que para las bacterias Gram-negativas (*Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*) no presenta inhibición, mientras que con la gram-positiva, (*Staphylococcus aureus*) presenta un halo de inhibición irregular. (Maguna *et al.*, 2006)

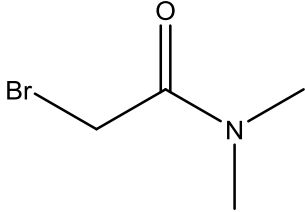
❖ Paavolainen y colaboradores en 1998 estudiaron la inhibición de la nitrificación en suelo forestal no tratado de un stand de abeto rojo (*Picea abies* L.) por monoterpenos, con el fin de determinar si la inhibición aleloquímica de la nitrificación por monoterpenos (mezcla de terpenos, con productos mayoritarios α - y β -pineno 38 %), desempeña algún papel en la inhibición de la nitrificación en el rodal. Donde se obtuvo que aumentó la actividad respiratoria de los suelos, lo que indica inhibición indirecta de la nitrificación por parte de los monoterpenos. Por lo tanto, estos podrían desempeñar un papel en la inhibición de la nitrificación en el suelo del bosque. (Paavolainen *et al.*, 1998)

3.2. Actividad farmacológica para compuestos halogenados con bromo.

Se encontró que derivados halogenados (específicamente con bromo) de compuestos orgánicos poseen actividad farmacológica, en la siguiente tabla se muestran dichos compuestos y sus propiedades (Korolkovas y Burckhalter, 1982)

Tabla 4. Derivados halogenados con propiedades farmacológicas.

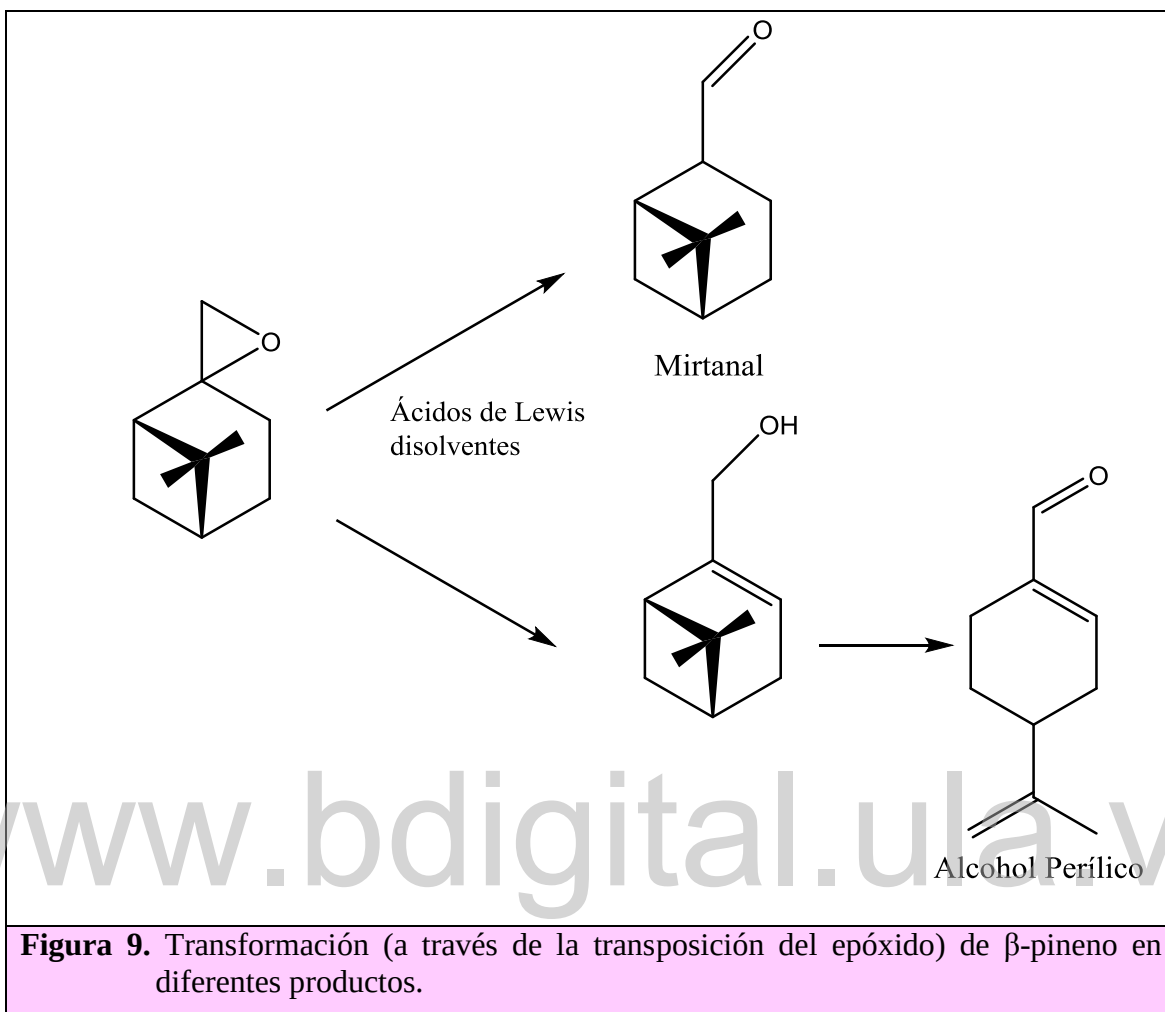
Compuesto	Estructura	Propiedades
Bromexina		Indicado en el tratamiento de enfermedades bronquiales como mucolítico (antitusígeno)
Bromazepan		Agente psicotrópico usado para tratar la ansiedad
Bromazina		Usado como <u>antihistamínico</u> y <u>anticolinérgico</u>
Bromisoval		Principalmente usado como hipnótico y sedativo diurno.
Bromperidol		Agente psicotrópico empleado como antipsicótico.

2-bromodietilacetamida		Poseen acción sedativa, aunque, en general, son más utilizadas como miorrelajantes o ansiolíticos
------------------------	--	---

3.3. Modificaciones realizadas al β -pineno.

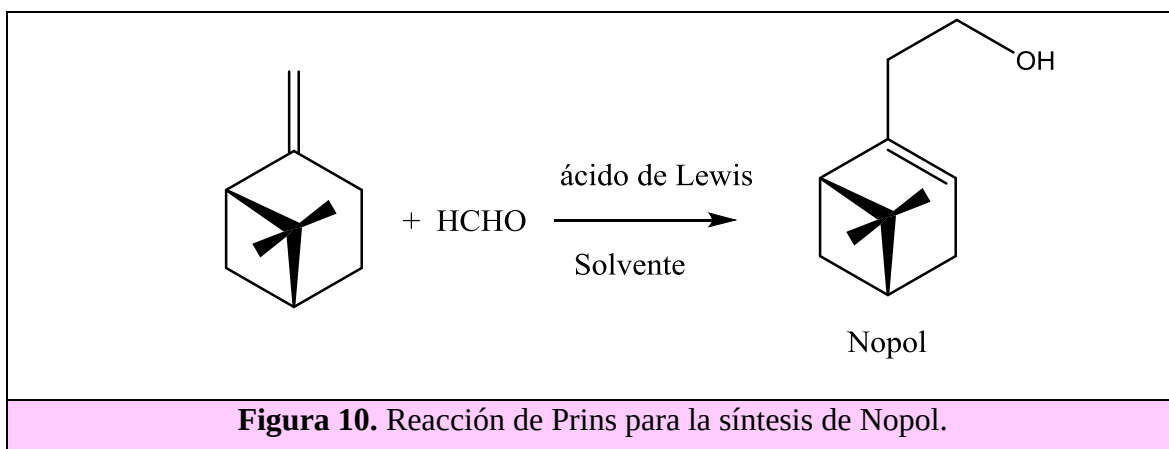
❖ Orozco en 2012 realizó una revisión de numerosos estudios utilizando la transformación de compuestos químicos para la obtención de productos con un alto valor agregado en la industria. A través de la reacción de epoxidación del β -pineno, seguida de una transposición se produce el mirtanal, mirtenol y el alcohol perfílico, los cuales son compuestos con valiosas propiedades organolépticas, precursores de fragancias, sabores y sustancias activas terapéuticamente. (Orozco, 2012)

www.bdigital.ula.ve



- ❖ En 1999 Barthelmie y Pryor desarrollaron un modelo de mecanismo para describir la oxidación de α -pineno y β -pineno en base a la química de átomo de cobre y estudios de cámara de gas, manganeso y aerosoles, con la finalidad de reemplazar la producción de aerosol utilizados actualmente en modelos numéricos de transporte de química atmosférica. Se emplearon condiciones de temperatura a 30 °C y concentraciones de pinenos entre 0 y 100 ppb. Las rutas de oxidación realizadas en este proceso fueron: oxidación con OH, oxidación con ozono y oxidación por el radical nitrato (NO₃). (Barthelmie y Pryor, 1999)
- ❖ Alarcón en 2006 obtuvo nopol mediante la reacción de Prins por condensación de β -pineno y *p*-formaldehído usando el catalizador Sn-MCM-41, con la finalidad de obtener nopol el cual es un compuesto de gran utilidad en la industria agroquímica para la producción

de pesticidas, jabones perfumados y productos de hogar. Las reacciones se realizaron partiendo de β -pineno de alta pureza o aceite comercial de trementina donde se alcanzaron rendimientos cercanos a 100 % con β -pineno de alta pureza. De igual forma usando trementina como fuente de β -pineno se alcanzaron selectividades a nopol hasta del 93 %. (Alarcón *et al.*, 2006)



4. JUSTIFICACIÓN.

El desarrollo de la industria química en el país presenta gran debilidad por la falta de recursos económicos para la adquisición de los reactivos aplicables en el ámbito farmacológico, agrícola, agroalimentario y cosmético, entre otros; de allí la necesidad de obtener nuevos derivados sintetizados a partir del β -pineno, compuesto que se encuentra ampliamente distribuido en la Naturaleza en gran variedad de plantas en las hojas, semillas y flores; considerándose que su estudio puede determinar si realmente los derivados obtenidos de este tienen las mismas propiedades aplicables en las diferentes ramas de la industria química. Adicionalmente, por un lado, estos compuestos conllevarían a ampliar la gama de reactivos que permitan la elaboración de infinidad de productos para el bienestar de la población y por el otro aportar a la industria farmacéutica nuevas sustancias que permitan ampliar las áreas de investigación y desarrollo relacionadas ella.

5. HIPÓTESIS.

Es posible a partir del β -pineno sintetizar derivados de este que podrían ser aplicables como bases eventualmente activas desde el ámbito farmacológico.

6. OBJETIVOS.

6.1. Objetivo general.

Sintetizar derivados del β -pineno y analizar la posible actividad biológica de los compuestos obtenidos de las síntesis.

6.2. Objetivos específicos.

- Sintetizar derivados de β -pineno mediante reacciones de adición de alquenos.
- Caracterizar mediante las técnicas espectroscópicas de infrarrojo (RI), ultravioleta visible (UV-vis) resonancia magnética nuclear (RMN) y cromatografía de bases (CG) los derivados obtenidos.
- Estudiar la posible actividad biológica de los derivados obtenidos en el crecimiento de bacterias.

7. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.

7.1. Materiales y equipos.

7.1.1. Materiales, reactivos y solventes.

En la tabla 5 se muestran los materiales, reactivos y solventes empleados durante los estudios realizados.

Tabla 5. Materiales, reactivos y solventes utilizados.

Reactivos y solventes	Pureza	Marca
β -Pineno	98 %	Aldrich
Ácido fosfórico	86 %	JT Baker Chemicals
Ácido sulfúrico	95-97 %	AnalaR
Bromo	99,98 %	Merck
Bromuro de potasio	-	BDH
Cloruro de sodio	-	Científica Andina
Etanol	Destilado (95.5 %)	Científica Andina
Hexano	Secado y destilado.	-
Permanganato de potasio	99,5 %	AnalaR
Sulfato de magnesio	99,5 %	Prolabo Venezolana
Tetracloruro de carbono	Grado analítico	Aldrich
β -Pineno	98 %	Aldrich

7.1.2. Instrumentación.

Los equipos e instrumentos utilizados en el desarrollo de los estudios realizados se presentan en la tabla 6.

Tabla 6. Equipos e instrumentos empleados en el desarrollo de la investigación.

Equipo	Marca
Balanza analítica	AdventureOhaus ($\pm 0,001$) g
Centrífuga	Minor
Lámpara UV-Visible	Mineralight 366-254 nm
Manta de calentamiento	Glas-col
Rotaevaporador	Büchi R-200
Espectrofotómetro IR ⁽¹⁾	IR-FT Perkin-Elmer modelo Frontier
CG/EM ⁽²⁾	GC-MS Shimadzu QP-5050

⁽¹⁾ Los espectros fueron obtenidos en fase líquida (sobre ventana de NaCl) en el Laboratorio de Cinética y Catálisis del Departamento de Química, Facultad de Ciencias, ULA, empleando un espectrofotómetro infrarrojo-FT Perkin-Elmer modelo Frontier. Se tomaron los espectros entre 4.000 y 380 cm^{-1} .

⁽²⁾ Los cromatogramas fueron realizados empleando un cromatógrafo de gases acoplado a masas GC-MS Shimadzu QP-5050, en el Instituto de Investigaciones Físicoquímicas de Córdoba (INFIQC) de la Universidad de Córdoba, Argentina.

7.1.3. Microorganismo a utilizar en la determinación de la actividad antibacteriana de los derivados obtenidos de β -pineno.

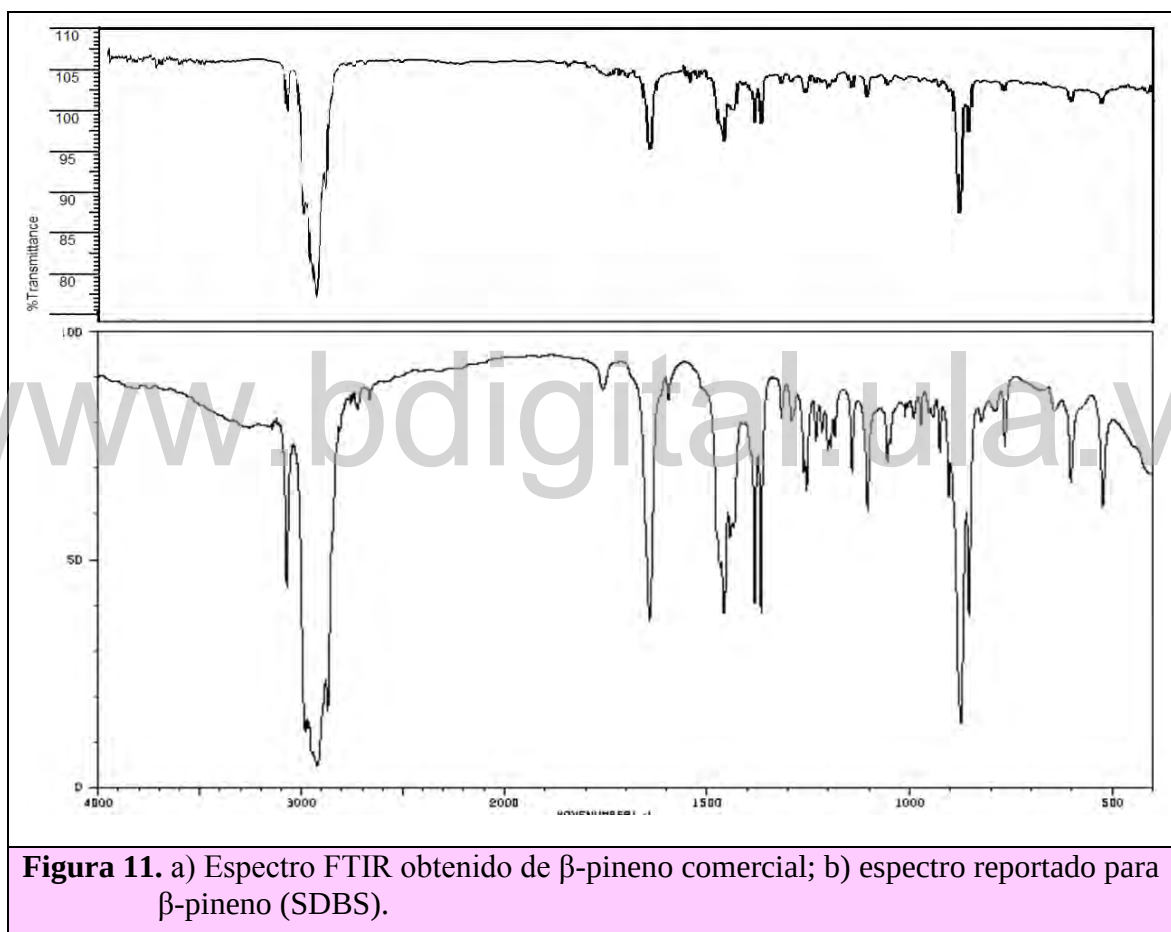
Para este estudio se seleccionó *Escherichia coli* (DH5 α), bacteria Gram negativa, suministrada por el Laboratorio de Genética y Química Molecular de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Los Andes.

www.bdigital.ula.ve

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

8.1. Caracterización organoléptica y espectroscópica de β -pineno.

El β -pineno comercial utilizado para el desarrollo de este trabajo experimental poseía las siguientes características organolépticas; líquido incoloro de aspecto oleoso, de olor característico al árbol de pino. Por otro lado, se realizó la caracterización espectroscópica por FT-IR mostrándose en la figura 11 el espectro obtenido.



En la tabla 7 se presenta la asignación de las principales bandas para β -pineno.

Tabla 7. Asignación de las señales en el espectro de FTIR del β -pineno comercial.

Grupo	Número de onda (cm ⁻¹)		Asignación
	Experimental	Reportado	
=C-H	3.071	3.071	Vibraciones de tensión Csp ² -H
C-H	2.923	2.923	Vibración de tensión asimétrica Csp ³ -H
C-H	2.880	2.869	Vibración de tensión simétrica Csp ³ -H
C=C	1.642	1.642	Vibración de tensión C=C (=CH ₂)
=CH ₂	1.458	1.469	Vibración de flexión en el plano =C-H
>C(CH ₃) ₂	1.202	1.202	Vibración esqueléticas de <i>gem</i> -dimetilos
	1.224	1.217	
=CH ₂	875	874	Vibración de flexión fuera del plano =C-H

8.2. Transformaciones químicas realizadas a β -pineno.

Valiéndose de la limitación de productos de reacción posibles impuesta por el impedimento estérico producido por los metilos geminales sobre el puente anular y como continuación del trabajo previo de Fernández y Rosquete en 2017, se procedió a la síntesis de: 1) derivado dibromado; 2) derivado monobromado (Markovnikof); 3) derivado monoclorado (Markovnikof); 4) derivado dihidroxilado, y 5) derivado hidroxilado ((Markovnikof).

8.2.1. Síntesis y caracterización del producto de dihalogenación de β -pineno: (1*S*,2*R*,5*R*)-2-bromo-2-(bromometil)-6,6-dimetilbicyclo [3.1.1] heptano (A₁).

8.2.1.1. Procedimiento experimental empleado para la dibromación de β -pineno.

En un balón de fondo redondo de 10 mL se disolvieron 136 mg de β -pineno en 2 mL de tetracloruro de carbono (CCl₄). Seguidamente, con una pipeta calibrada (1 ± 0,05 mL) se añadieron gota a gota 3,40 mL de Br₂/CCl₄ al 3 % v/v; durante este proceso, se observó un cambio en la coloración de la solución, pasando de incolora a color amarillo pálido. La solución se dejó con agitación mecánica en una campana extractora de gases 2 horas aproximadamente. Finalmente se eliminó el solvente (CCl₄) mediante el uso del rotavapor (ver figura 4). (Shriner *et al.*, 1979)

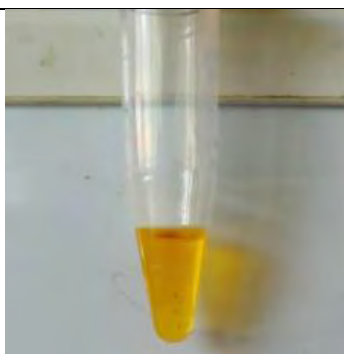


Figura 12. Compuesto obtenido a partir de la bromación de β -pineno.

8.2.1.2. Rendimiento obtenido para la dibromación de β -pineno.

El porcentaje promedio de rendimiento de reacción fue de 74,6 %, observándose en la tabla 8 los valores obtenidos para las síntesis.

Tabla 8. Resultados obtenidos durante las síntesis de (1S,2R,5R)-2-bromo-2-(bromometil)-6,6-dimetilbicyclo [3.1.1] heptano (**A₁**).

Síntesis	M _t (g)	M _e (g) $\pm$ 0.001	Porcentaje de rendimiento (%)
1	0,296	0,233	78,8
2		0,217	73,4
3		0,212	71,7
Promedio		0,221	74,6

M_t = masa esperada (teórica) de la reacción de halogenación. M_e = masa obtenida (experimental) de la reacción de dibromación.

8.2.1.3. Caracterización organoléptica y fisicoquímica de (1S,2R,5R)-2-bromo-2-(bromometil)-6,6-dimetilbicyclo [3.1.1] heptano (**A₁**).

Algunas características organolépticas y fisicoquímicas que presentó el compuesto dihalogenado obtenido se reflejan en la tabla 9.

Tabla 9. Características organolépticas y fisicoquímicas de (1S,2R,5R)-2-bromo-2-(bromometil)-6,6-dimetilbicyclo [3.1.1] heptano (**A₁**) sintetizado.

Estado	Líquido.
Color	Amarillo.
Olor	Ligeramente desagradable, característico del compuesto.
Solubilidad	Soluble en: hexano, heptano, DMSO, diclorometano, cloroformo. Insoluble en: agua.

8.2.1.4. Caracterización espectroscópica de (1S,2R,5R)-2-bromo-2-(bromometil)-6,6-dimetilbicyclo [3.1.1] heptano (A₁).

Para la caracterización espectroscópica del compuesto obtenido se utilizaron las técnicas de FTIR y CG/EM, donde ambos resultados obtenidos muestran la presencia del compuesto halogenado.

8.2.1.4.1. Caracterización por espectroscopia FT- IR de (1S,2R,5R)-2-bromo-2-(bromometil)-6,6-dimetilbicyclo [3.1.1] heptano (A₁).

Se realizó la caracterización por infrarrojo de (1S,2R,5R)-2-bromo-2-(bromometil)-6,6-dimetilbicyclo [3.1.1] heptano. El espectro FT-IR es mostrado en la figura 13, observándose gran similitud al ser comparado con el espectro obtenido por Fernández (Fernández, 2017) quien realizó la halogenación empleando α -pineno como compuesto de partida para obtener un producto dibromado. En la tabla 10 se presentan las asignaciones de las bandas más características.

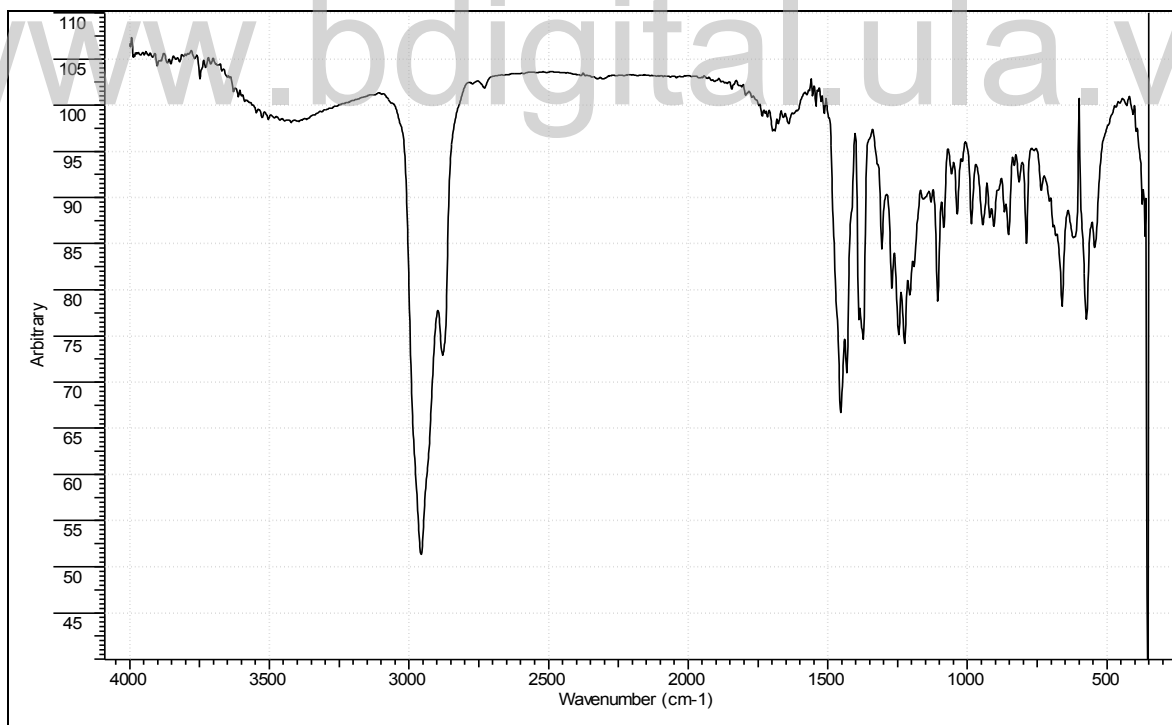


Figura 13. Espectro FTIR obtenido para el (1S,2R,5R)-2-bromo-2-(bromometil)-6,6-dimetilbicyclo [3.1.1] heptano (A₁) sintetizado.

Tabla 10. Comparación de las señales en el espectro de FTIR para (1*S*,2*R*,5*R*)-2-bromo-2-(bromometil)-6,6-dimetilbicyclo [3.1.1] heptano (**A₁**).

Grupo	Número de onda (cm ⁻¹)		Asignación
	Experimental	Reportado*	
C-H	2956	2940-2910	Vibración de tensión asimétrica C-H
C-H	2870	2870-2840	Vibración de tensión simétrica C-H
C-H	1449	1470-1435	Vibración de flexión C-H
>C(CH ₃) ₂	1196	1200-1190	Vibraciones esqueléticas de <i>gem</i> -dimetilos
	1245	1220-1210	
C-X	565	750-515	Vibración de tensión C-Br

*(Nakanishi y Solomon, 1977)

El análisis detallado comparativo con el producto de partida permite notar:

- a) No se observan las bandas características para =CH₂, (vibraciones de tensión Csp²-H a 3.071 cm⁻¹, vibración de flexión en el plano =C-H a 1.469 cm⁻¹ y vibración de flexión fuera del plano =C-H a 875 cm⁻¹) evidenciándose la desaparición del doble enlace olefínico.
- b) Aparición de una banda en 565 cm⁻¹, la cual se encuentra dentro del rango de 750-515 cm⁻¹ característica de la vibración de tensión C-Br para hidrocarburos bromados.

8.2.1.4.2. Caracterización por cromatografía gaseosa/espectrometría de masas (CG/EM) de (1*S*,2*R*,5*R*)-2-bromo-2-(bromometil)-6,6-dimetilbicyclo [3.1.1] heptano (**A₁**).

El compuesto obtenido fue analizado mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, apreciándose en el cromatograma una señal mayoritaria ubicada a un tiempo de retención de 11,822 minutos (figura 14).

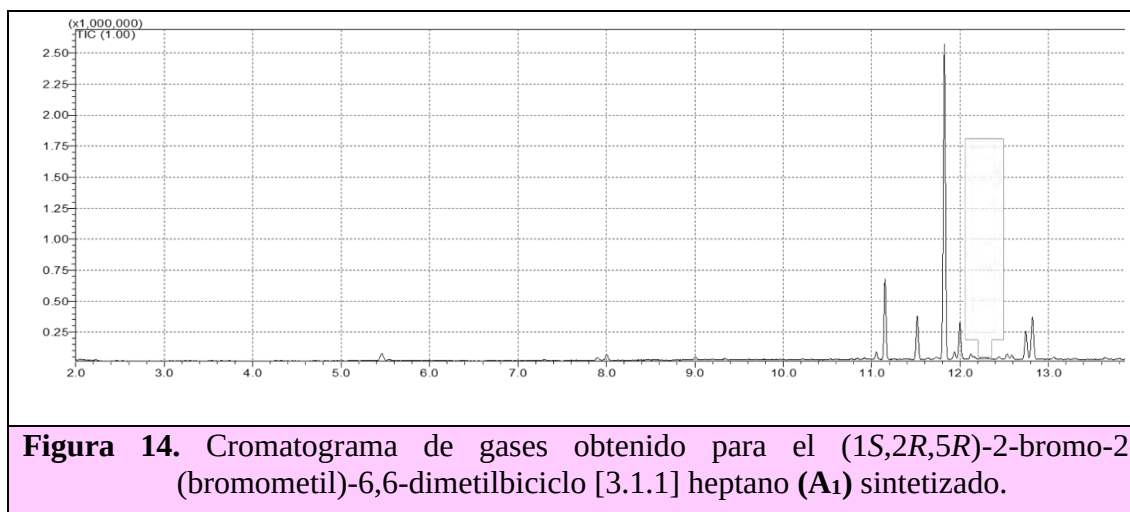
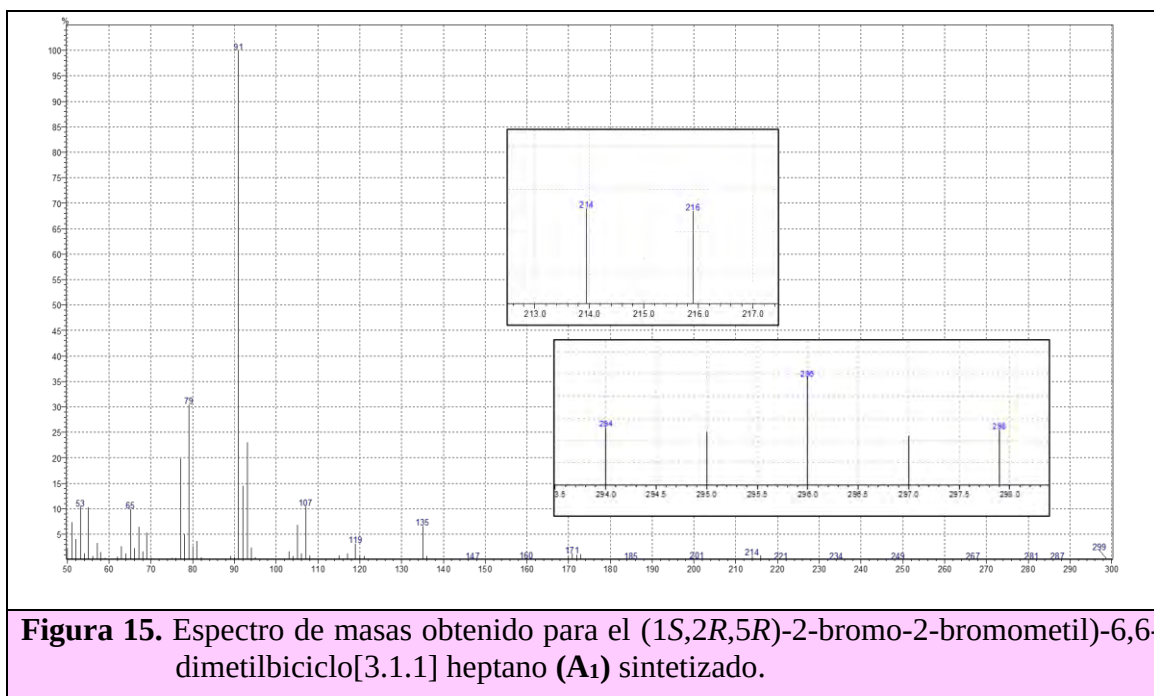


Figura 14. Cromatograma de gases obtenido para el (1*S*,2*R*,5*R*)-2-bromo-2-(bromometil)-6,6-dimetilbicyclo [3.1.1] heptano (**A₁**) sintetizado.

La figura 15 muestra el espectro de masas correspondiente al compuesto **A₁**, donde es posible observar un grupo de señales correspondientes al ion molecular $M^+ [C_{10}H_{16}Br_2]^{++}$ con valores de m/z : 294, 296 y 298 e intensidades relativas 1:2:1 características de las posibles combinaciones de los isótopos del bromo: $^{79}Br-^{81}Br$, $^{79}Br-^{79}Br$, $^{79}Br-^{81}Br$ y $^{81}Br-^{81}Br$ (Pavia *et al.*, 2001). Su patrón de fragmentación se presenta en la figura 16. En este, es posible observar que la primera ruptura (mayor valor de m/z después de M^+) corresponde a la pérdida de una molécula de ácido bromhídrico (HBr) generando los carbocationes-radicales a m/z 214 y 216 $m/z [C_{10}H_{15}Br]^{++}$, posteriormente se pierde la segunda molécula de HBr originando el carbocatión-radical a 134 $m/z [C_{10}H_{14}]^{++}$; esta especie química presenta tres posibles reacciones: a) una que corresponde a la ganancia de un radical hidrógeno ($H^\cdot$) dando lugar a un carbocatión más estable 135 $m/z [C_{10}H_{14}]^+$, la segunda fragmentación se genera con la pérdida de un radical metilo ($\cdot CH_3$) formando el fragmento m/z 119 $[C_9H_{11}]^+$ y como tercera posibilidad, la generación del pico base a m/z 91 $[C_7H_7]^+$ debido a la pérdida del radical isopropilo ($\cdot C_3H_7$) representado por la estructura, estabilizada por resonancia, del carbocatión bencilo.



www.bdigital.ula.ve

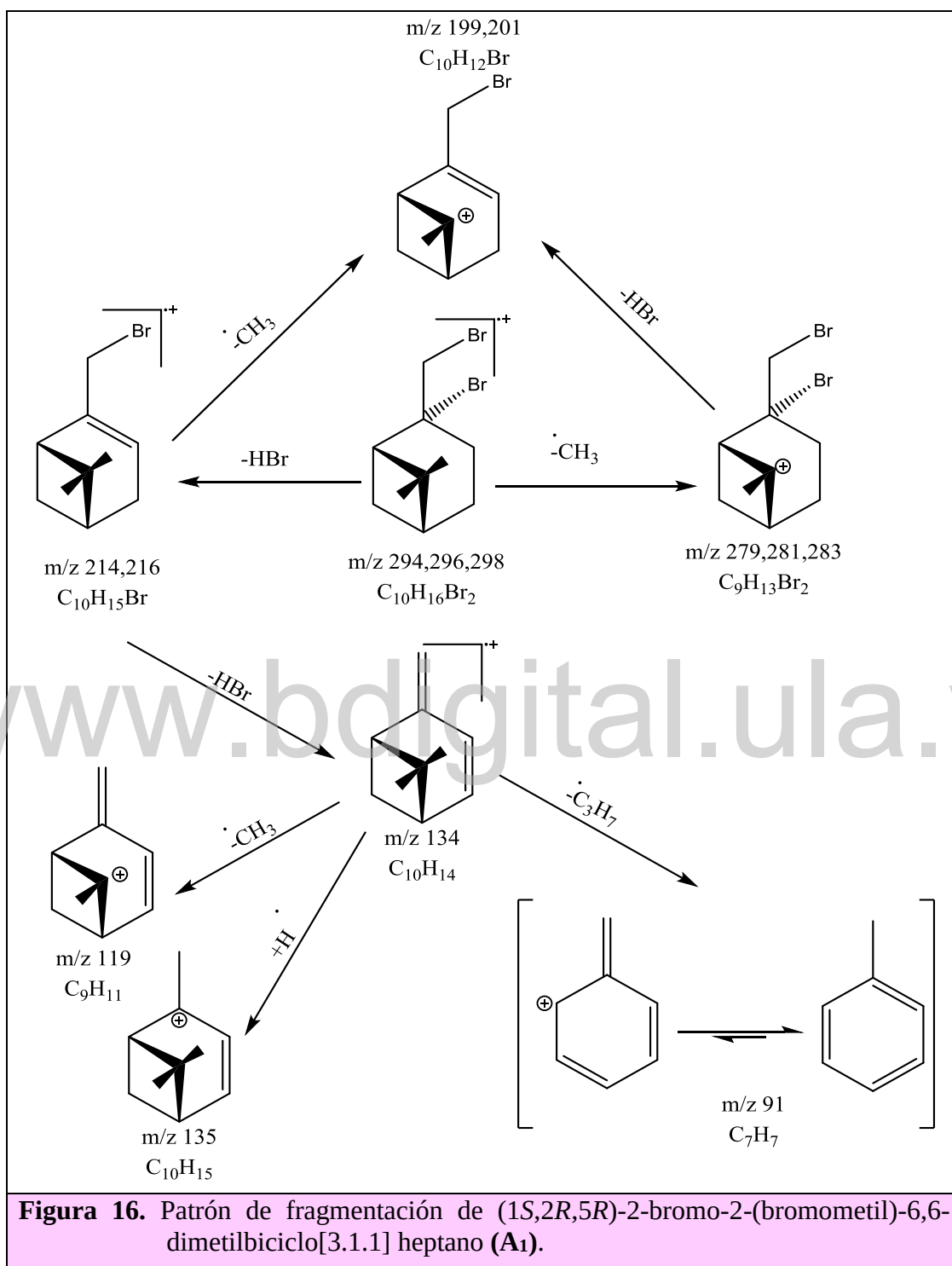


Figura 16. Patrón de fragmentación de (1S,2R,5R)-2-bromo-2-(bromometil)-6,6-dimetilbicyclo[3.1.1] heptano (**A1**).

8.2.2. Síntesis y caracterización del producto de hidrobromación de β -pineno: (1S,2R,5R)-2-bromo-2,6,6-trimetilbiciclo [3.1.1] heptano (A₂).

Con la finalidad de formar un compuesto monohalogenado que siga la regla de Markovnikov, el estado físico en el que debe encontrarse el haluro de hidrógeno (HX) debe ser gaseoso, por lo que se generó HBr gaseoso a partir de KBr/H₂SO₄.

8.2.2.1. Procedimiento experimental empleado para la hidrobromación de β -pineno.

Dentro de una campana extractora se realizó la instalación de un sistema con trampa para gases (ver figura 17). En detalle, en un balón de tres bocas (50 mL) se colocaron 540 mg de bromuro de potasio (KBr); luego, empleando un embudo de adición (10 mL) se agregaron gota a gota 5,0 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) con la finalidad de generar HBr gaseoso, el cual pasó al balón de reacción que contenía una solución de 136 mg de β -pineno en 2 mL de hexano, generando un burbujeo constante durante 20 minutos; el sistema se dejó en reposo durante 60 minutos con la finalidad de garantizar el consumo del gas producido, transcurrido el tiempo se abrió el sistema y finalmente, se rotaevaporó el solvente (hexano) obteniéndose así un líquido de color amarillo claro de aspecto viscoso (figura 18).



Figura 17. Equipo para la síntesis de hidrácidos de β -pineno.

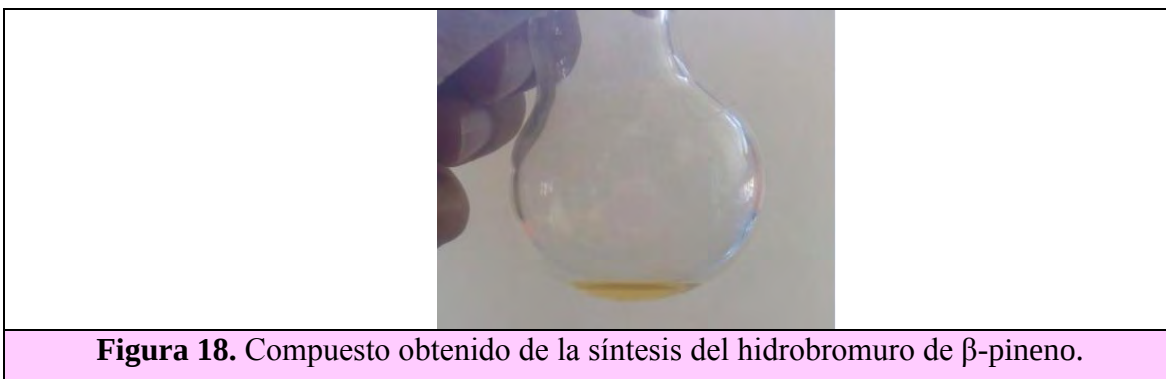


Figura 18. Compuesto obtenido de la síntesis del hidrobromuro de β -pineno.

8.2.2.2. Rendimiento obtenido para la hidrobromación de β -pineno.

El porcentaje promedio de rendimiento de reacción fue de 84,9 %, observándose en la tabla 11 los valores obtenidos para las síntesis.

Tabla 11. Resultados obtenidos durante las síntesis de (1*S*,2*R*,5*R*)-2-bromo-2,6,6-trimetilbicyclo [3.1.1] heptano (**A₂**).

Síntesis	M _t (g)	M _e (g) $\pm$ 0.001	Porcentaje de rendimiento (%)
1	0,216	0,188	87,0
2		0,182	84,3
3		0,180	83,3
Promedio		0,183	84,9

M_t = masa esperada (teórica) de la reacción de halogenación. M_e = masa obtenida (experimental) de la reacción de hidrobromación.

8.2.2.3. Caracterización organoléptica y fisicoquímica de (1*S*,2*R*,5*R*)-2-bromo-2,6,6-trimetilbicyclo [3.1.1] heptano (**A₂**).

Algunas características organolépticas y fisicoquímicas que presentó el compuesto bromado obtenido se reflejan en la tabla 12.

Tabla 12. Características organolépticas y fisicoquímicas de (1*S*,2*R*,5*R*)-2-bromo-2,6,6-trimetilbicyclo [3.1.1] heptano (**A₂**) sintetizado.

Estado	Líquido
Color	Amarillo
Olor	Ligeramente desagradable, característico del compuesto
Solubilidad	Soluble en: hexano, heptano, DMSO, diclorometano, cloroformo. Insoluble en: agua

8.2.2.4. Caracterización espectroscópica de (1S,2R,5R)-2-bromo-2,6,6-trimetilbicyclo [3.1.1] heptano (A₂).

Para la caracterización espectroscópicas del compuesto obtenido se utilizaron las técnicas de FTIR y CG/EM, donde ambos resultados obtenidos muestran la presencia del compuesto halogenado.

8.2.2.4.1. Caracterización por espectroscopia FTIR de (1S,2R,5R)-2-bromo-2,6,6-trimetilbicyclo [3.1.1] heptano (A₂).

Se realizó la caracterización por infrarrojo de (1S,2R,5R)-2-bromo-2,6,6-trimetilbicyclo [3.1.1] heptano. El espectro FTIR es mostrado en la figura 19, observándose identidad al ser comparado con el espectro obtenido por Fernández (Fernández, 2017) quien realizó la halogenación empleando α -pineno como compuesto de partida para obtener un producto monobromado. En la tabla 13 se presentan las asignaciones de las bandas más características.

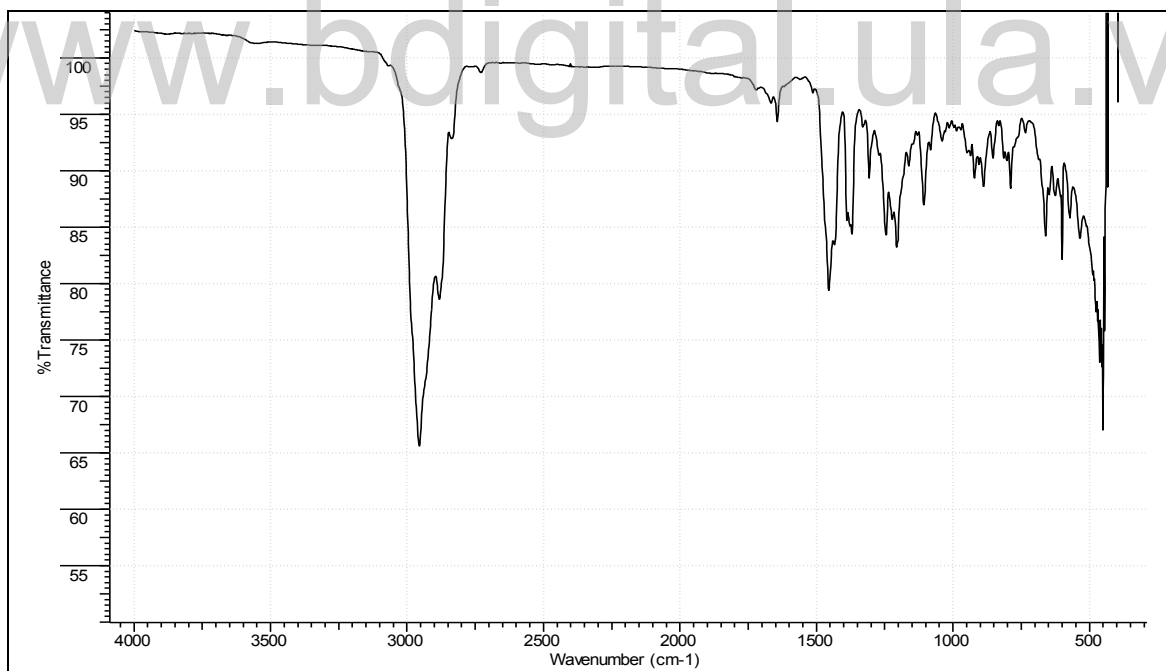


Figura 19. Espectro FTIR obtenido para el (1S,2R,5R)-2-bromo-2,6,6-trimetilbicyclo [3.1.1] heptano (A₂).

Tabla 13. Comparación de las señales en el espectro de FTIR para (1S,2R,5R)-2-bromo-2,6,6-trimetilbiciclo [3.1.1] heptano (**A₂**).

Grupo	Número de onda (cm ⁻¹)		Asignación
	Experimental	Reportado*	
C-H	2955	2940-2910	Vibración de tensión asimétrica C-H
C-H	2870	2870-2840	Vibración de tensión simétrica C-H
C-H	1455	1470-1435	Vibración de flexión C-H
>C(CH ₃) ₂	1200	1200-1190	Vibraciones esqueléticas de <i>gem</i> -dimetilos
	1245	1220-1210	
C-X	661	750-515	Vibración de tensión C-Br

* (Nakanishi y Solomon, 1977)

El análisis detallado comparativo con el producto de partida permite notar:

a) No se observan las bandas características para =CH₂, (vibraciones de tensión Csp²-H a 3.071 cm⁻¹, vibración de flexión en el plano =C-H a 1.469 cm⁻¹ y vibración de flexión fuera del plano =C-H a 875 cm⁻¹) evidenciándose la desaparición del doble enlace olefínico.

b) Aparición de una banda en 661 cm⁻¹, la cual se encuentra dentro del rango de 750-515 cm⁻¹ característica de la vibración de tensión C-Br para hidrocarburos bromados.

c) El espectro es idéntico al reportado para el mismo compuesto por Fernández (Fernández, 2017).

8.2.2.4.2. Caracterización por cromatografía gaseosa/espectrometría de masas (CG/EM) de (1S,2R,5R)-2-bromo-2,6,6-trimetilbiciclo [3.1.1] heptano (**A₂**).

El compuesto obtenido fue analizado mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, apreciándose en el cromatograma una señal mayoritaria ubicada a un tiempo de retención de 10,037 minutos (figura 20).

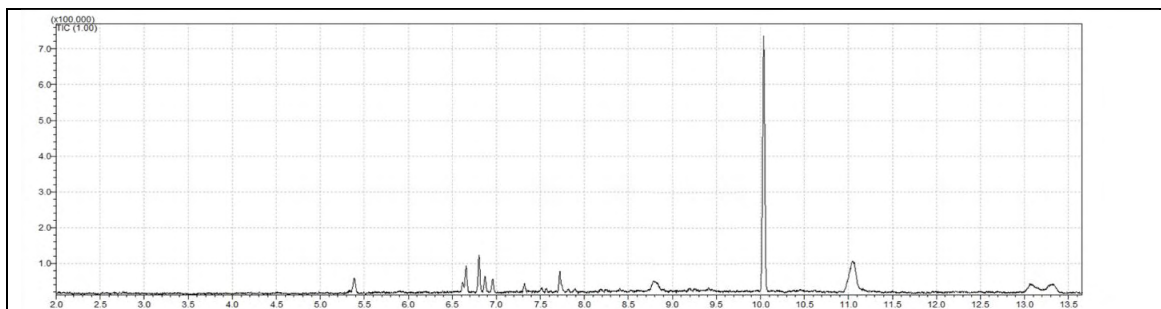


Figura 20. Cromatograma de gases obtenido para el (1S,2R,5R)-2-bromo-2,6,6-trimetilbiciclo [3.1.1] heptano (**A₂**) sintetizado.

En el análisis del espectro de masas del compuesto A₂ (figura 21) se puede observar dos señales que corresponden al ion molecular [C₁₀H₁₇Br] de intensidad 1:1 originada por los dos isotopos del bromo presentes en la molécula, como es [C₁₀H₁₇Br⁸¹]^{•+} m/z 218 y m/z 216 para [C₁₀H₁₇Br⁷⁹]^{•+}. Este ion-radical molecular sufre una pérdida de HBr generando un ion-radical de fórmula molecular [C₁₀H₁₆]^{•+} y m/z 136, el cual por ganancia de un radical hidrógeno H[•], origina el fragmento 137 m/z [C₁₀H₁₇]⁺. A partir del fragmento de m/z 136 puede ocurrir que se origine el fragmento a m/z 123 [C₉H₁₅]⁺ debido a la pérdida de un radical [•]CH₃ seguido de la adición de dos radicales hidrógenos; o de manera inversa, se adicionan dos hidrógenos H[•] para generar [C₁₀H₁₈]^{•+} m/z 138, seguida de la pérdida de un radical [•]CH₃ llegando de igual manera al fragmento de 123 m/z [C₉H₁₅]⁺. El patrón de fragmentación se observa en la figura 22. El pico base de valor m/z 81 [C₆H₉]⁺, correspondiente al ion-radical alílico ciclohexenilo, se genera por la pérdida del radical isopropilo [•]C₃H₇, más la pérdida del radical metilo [•]CH₃, más la ganancia de dos radicales H[•], en cualquier orden secuencial.

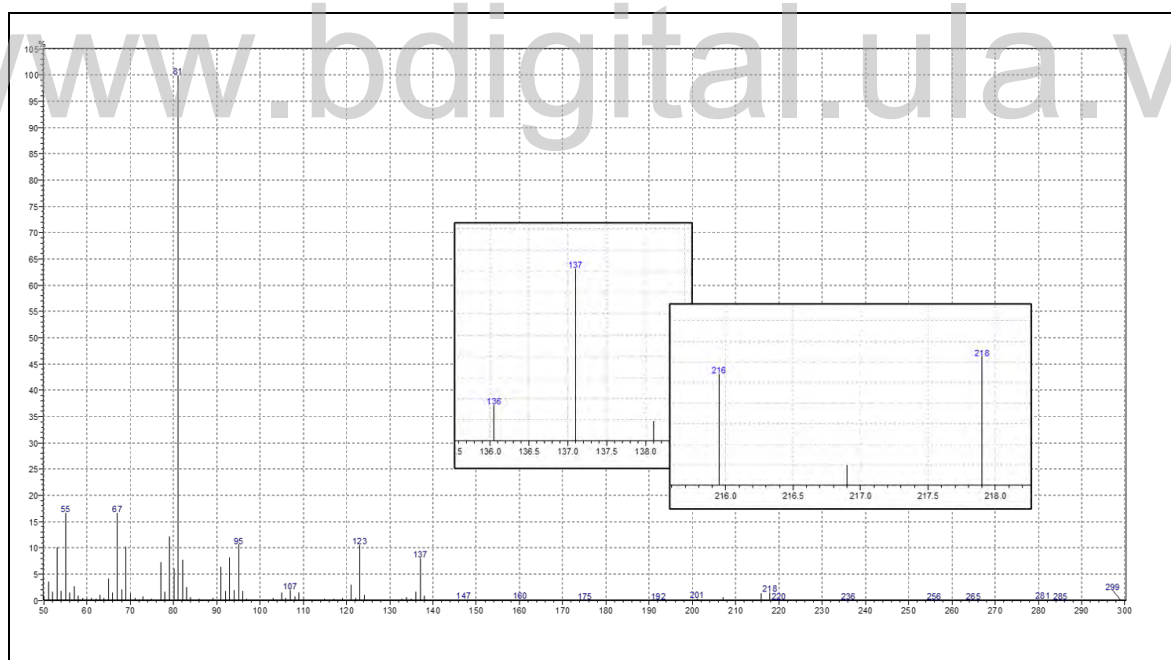
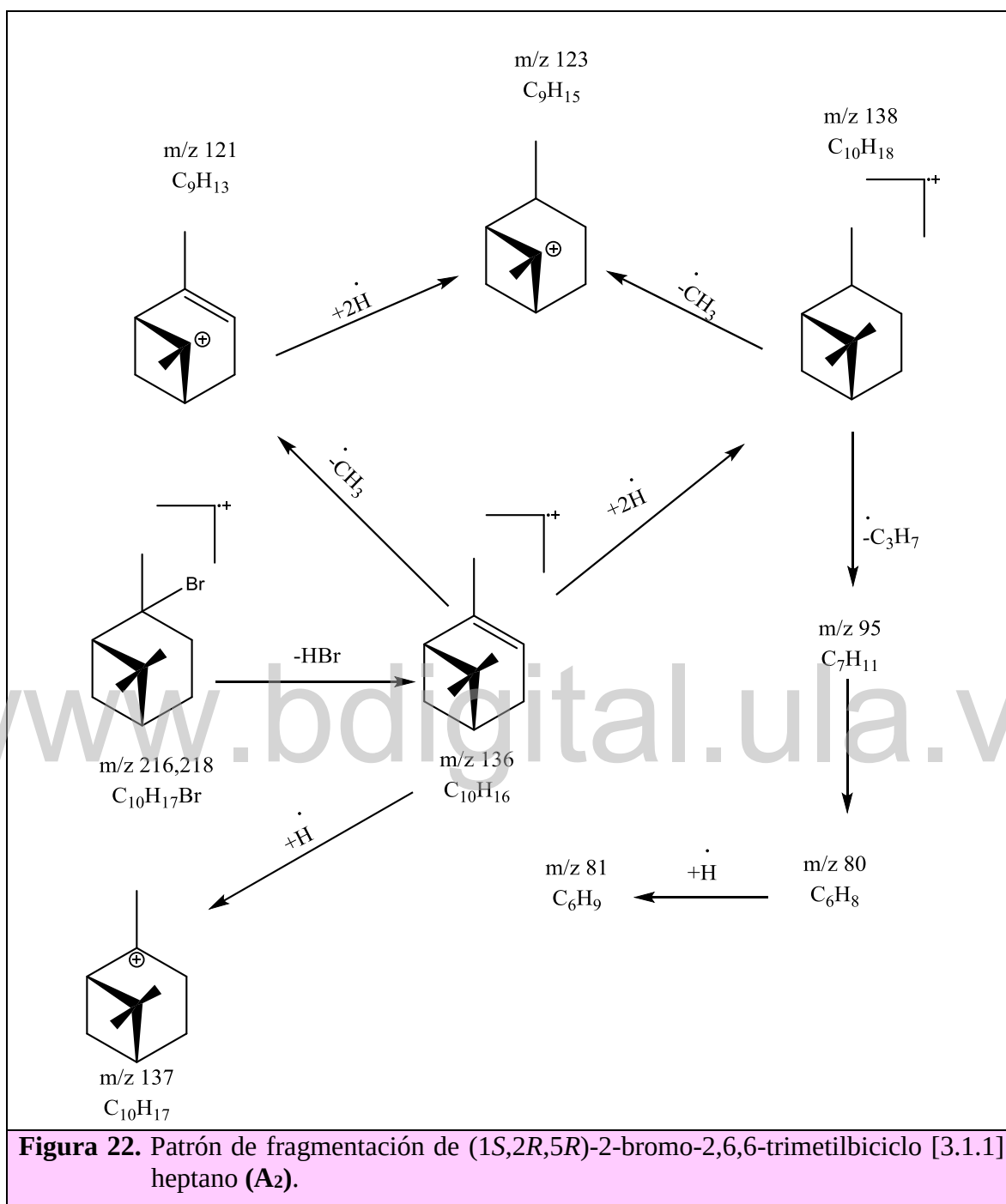


Figura 21. Espectro de masas obtenido para el (1S,2R,5R)-2-bromo-2,6,6-trimetilbicyclo [3.1.1] heptano (A₂) sintetizado.



8.2.3. Síntesis y caracterización del producto de hidrocloración de β -pineno: (1S,2R,5R)-2-cloro-2,6,6-trimetilbicyclo [3.1.1] heptano (**A₃**).

8.2.3.1. Procedimiento experimental empleado para la hidrocloración de β -pineno.

Para esta síntesis se utilizó el mismo equipo de la hidrobromación de β -pineno (figura 17). En un balón de tres bocas se pesaron 263 mg de cloruro de sodio (NaCl) y empleando el embudo de adición, se agregaron gota a gota 5,0 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) con la finalidad de generar HCl gaseoso; el gas paso al balón de reacción que contenía una solución de 136 mg de β -pineno en 2,0 mL de hexano, generando un burbujeo constante durante 20 minutos. Luego, durante 60 minutos el sistema permaneció en reposo y finalmente se rotaevaporó el solvente (hexano) obteniéndose así un líquido incoloro de aspecto viscoso (ver figura 23).



8.2.3.2. Rendimiento obtenido para la hidrocloración de β -pineno.

El porcentaje promedio de rendimiento de reacción fue de 85,7 %, observándose en la tabla 14 los valores obtenidos para las síntesis.

Tabla 14. Resultados obtenidos durante las síntesis de (1S,2R,5R)-2-cloro-2,6,6-trimetilbicyclo [3.1.1] heptano (**A₃**).

Síntesis	M _t (g)	M _e (g) $\pm$ 0.001	Porcentaje de rendimiento (%)
1	0,172	0,151	87,9
2		0,144	83,7
3		0,147	85,5
Promedio		0,147	85,7

M_t = masa esperada (teórica) de la reacción de halogenación. M_e = masa obtenida (experimental) de la reacción de hidrocloración.

8.2.3.3. Caracterización organoléptica y fisicoquímica de (1*S*,2*R*,5*R*)-2-cloro-2,6,6-trimetilbicyclo [3.1.1] heptano (**A₃**).

Algunas características organolépticas y fisicoquímicas que presentó el compuesto clorado obtenido se reflejan en la tabla 15.

Tabla 15. Características organolépticas y fisicoquímicas de (1*S*,2*R*,5*R*)-2-cloro-2,6,6-trimetilbicyclo [3.1.1] heptano (**A₃**) sintetizado.

Estado	Líquido
Color	Incoloro
Olor	Ligeramente desagradable, característico del compuesto
Solubilidad	Soluble en: hexano, heptano, DMSO, diclorometano, cloroformo. Insoluble en: agua

8.2.3.4. Caracterización espectroscópica de (1*S*,2*R*,5*R*)-2-cloro-2,6,6-trimetilbicyclo [3.1.1] heptano (**A₃**).

Para la caracterización espectroscópica del compuesto obtenido se utilizaron las técnicas de FTIR y CG/EM, donde ambos resultados obtenidos muestran la presencia del compuesto halogenado.

8.2.3.4.1. Caracterización por espectroscopia FTIR de (1*S*,2*R*,5*R*)-2-cloro-2,6,6-trimetilbicyclo [3.1.1] heptano (**A₃**).

Se realizó la caracterización por infrarrojo de (1*S*,2*R*,5*R*)-2-cloro-2,6,6-trimetilbicyclo [3.1.1] heptano. El espectro FTIR es mostrado en la figura 24, observándose identidad al ser comparado con el espectro obtenido por Fernández (Fernández y Rosquete, 2017) quien realizó la halogenación empleando α -pineno como compuesto de partida para obtener un producto monoclorado. En la tabla 16 se presentan las asignaciones de las bandas más características.

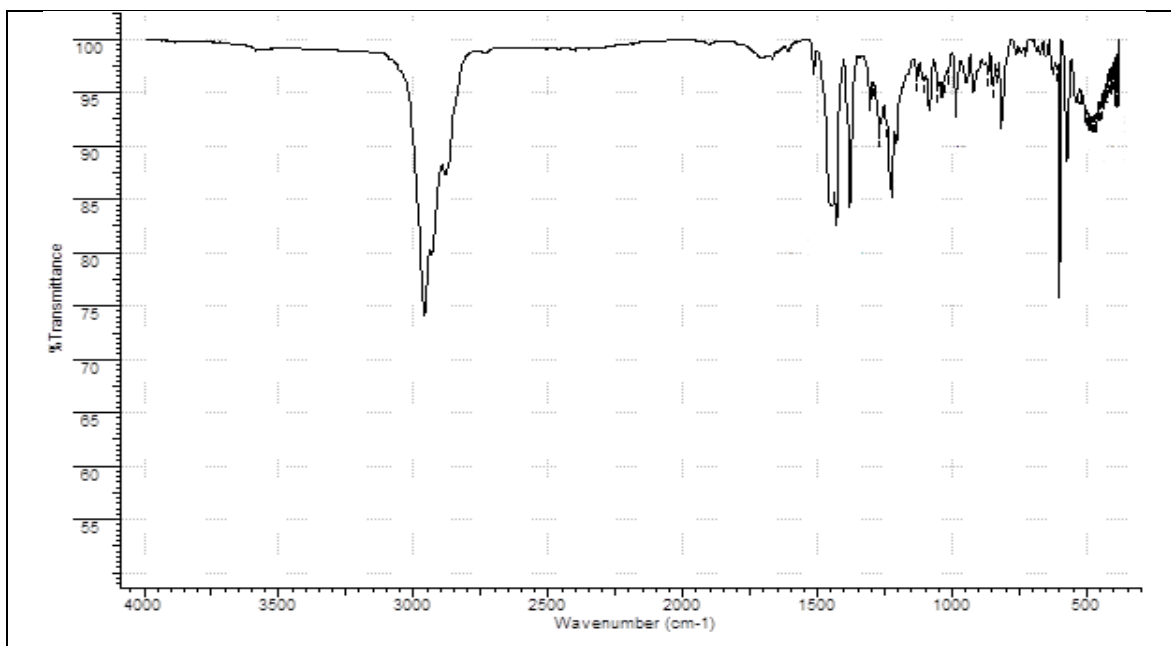


Figura 24. Espectro FTIR obtenido para el (1S,2R,5R)-2-cloro-2,6,6-trimetilbicyclo [3.1.1] heptano (**A₃**) sintetizado.

Tabla 16. Comparación de las señales en el espectro de FTIR para el (1S,2R,5R)-2-cloro-2,6,6-trimetilbicyclo [3.1.1] heptano (**A₃**).

Grupo	Número de onda (cm ⁻¹)		Asignación
	Experimental	Reportado*	
C-H	2960	2940-2910	Vibración de tensión asimétrica C-H
C-H	2870	2870-2840	Vibración de tensión simétrica C-H
C-H	1454	1470-1435	Vibración de flexión C-H
>C(CH ₃) ₂	1208	1200-1190	Vibraciones esqueléticas de <i>gem</i> -dimetilos
	1224	1220-1210	
C-X	800	800-560	Vibración de tensión C-Cl

*(Nakanishi y Solomon, 1977)

El análisis detallado comparativo con el producto de partida permite notar:

- No se observan las bandas características para =CH₂, (vibraciones de tensión Csp²-H a 3.071 cm⁻¹, vibración de flexión en el plano =C-H a 1.469 cm⁻¹ y vibración de flexión fuera del plano =C-H a 875 cm⁻¹) evidenciándose la desaparición del doble enlace olefínico.
- Aparición de una banda en 800 cm⁻¹, la cual se encuentra dentro del rango de 800-560 cm⁻¹ característica de la vibración de tensión C-Cl para hidrocarburos clorados.
- El espectro es idéntico al reportado por Fernández (Fernández y Rosquete, 2017).

8.2.3.4.2. Caracterización por cromatografía gaseosa/espectrometría de masas (CG/EM) de (1*S*,2*R*,5*R*)-2-cloro-2,6,6-trimetilbiciclo [3.1.1] heptano (**A**₃).

El compuesto obtenido fue analizado mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, apreciándose en el cromatograma una señal mayoritaria ubicada a un tiempo de retención de 8,895 minutos (figura 25).

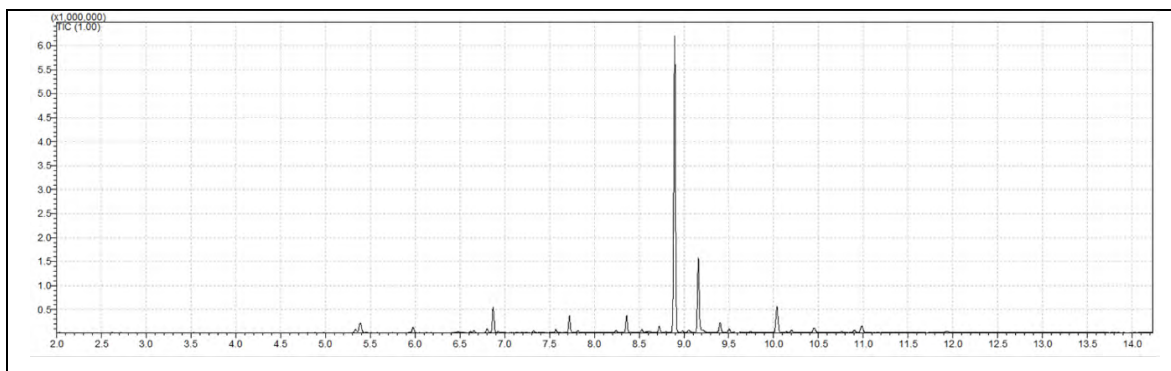


Figura 25. Cromatograma de gases obtenido para el (1*S*,2*R*,5*R*)-2-cloro-2,6,6-trimetilbiciclo [3.1.1] heptano (**A**₃) sintetizado.

El espectro de masas (EM) correspondiente al compuesto con RT: 8,895 minutos se muestra en la figura 26.

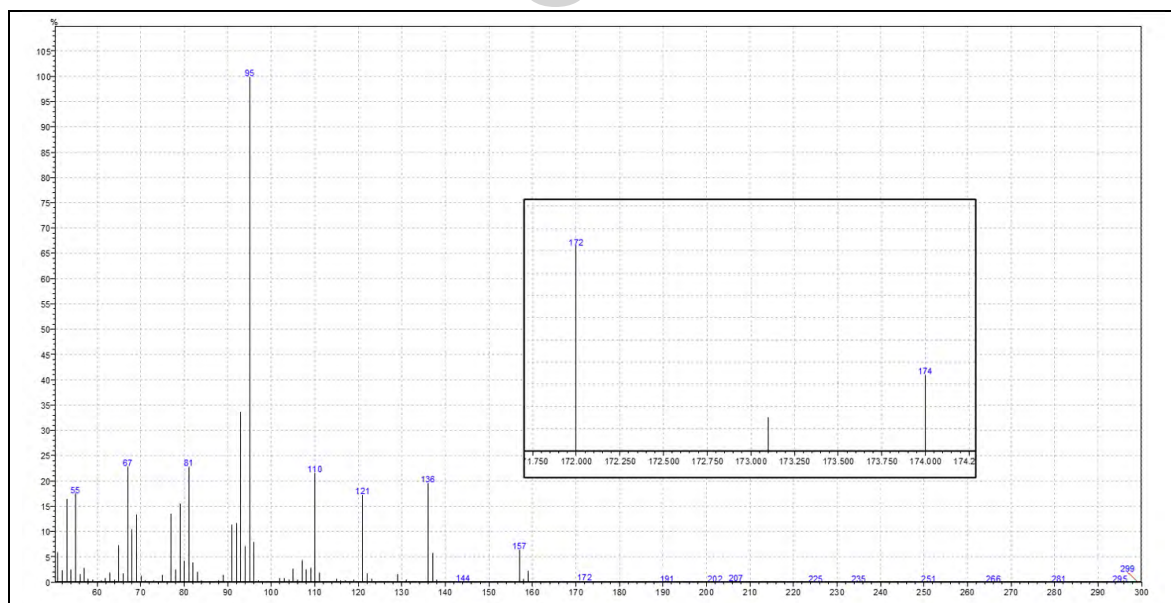
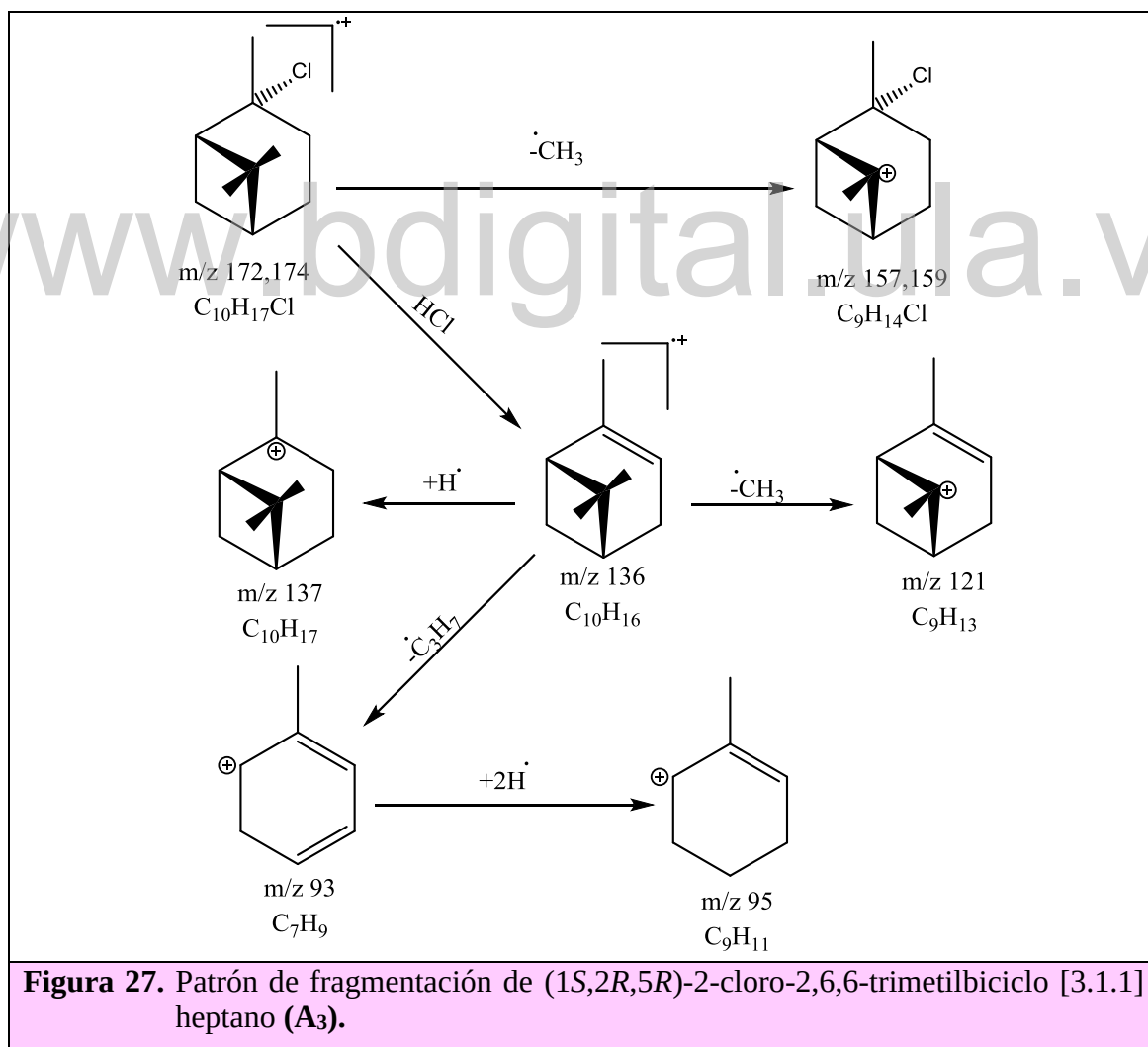


Figura 26. Espectro de masas obtenido para (1*S*,2*R*,5*R*)-2-cloro-2,6,6-trimetilbiciclo [3.1.1] heptano (**A**₃).

En el EM se observan dos señales a m/e 172 y m/e 174, de intensidades relativas 3:1 correspondientes a los iones moleculares $[C_{10}H_{17}Cl^{35}]^{+\bullet}$ y $[C_{10}H_{17}Cl^{37}]^{+\bullet}$ respectivamente. La figura 27 muestra el patrón de fragmentación donde, inicialmente se produce la pérdida de un radical metilo ($\cdot CH_3$) dando lugar a los fragmentos m/z 157 $[C_9H_{14}Cl^{35}]^+$ y m/z 157 $[C_9H_{14}Cl^{37}]^+$; o puede ocurrir la pérdida de (HCl) generando el fragmento de m/e 136 $[C_{10}H_{11}]^{+\bullet}$. El fragmento de m/z 121 $[C_9H_{13}]^+$ se produce por la pérdida de un radical metilo ($\cdot CH_3$) de $[C_{10}H_{11}]^{+\bullet}$ o por la pérdida de (HCl) de los fragmentos m/z 157 $[C_9H_{14}Cl^{35}]^+$ y m/z 157 $[C_9H_{14}Cl^{37}]^+$. La pérdida del radical isopropilo ($\cdot C_3H_7$) más la ganancia de dos radicales hidrógenos ($\cdot H$) generan el carbocatión 1-metil-6-ciclohexenilo $[C_7H_{11}]^+$ correspondiente al pico base m/z 95.



8.2.4. Síntesis y caracterización del producto de glicolación de β -pineno: (1S,2R,5R)-2-(hidroximetil)-6,6-dimetilbiciclo [3.1.1] heptan-2-ol (A₄).

8.2.4.1. Procedimiento experimental empleado para la glicolación de β -pineno.

En un tubo de ensayo fue preparada una solución de 136 mg de β -pineno en 2 mL de etanol. Por otro lado, se prepararon 10 mL de una solución de permanganato de potasio (KMnO₄) al 2 % en etanol. Ambas soluciones se colocaron en un baño de agua hielo por 10 minutos y después se comenzó a añadir 8 mL de la solución de KMnO₄ al tubo de ensayo observándose la precipitación de un sólido marrón (MnO₂). Luego de conservar la mezcla de reacción por 30 minutos en un baño de agua hielo, ésta fue centrifugada por 15 minutos a 5000 rpm antes de ser decantada en un balón fondo redondo de 10 mL. Finalmente, se eliminó el solvente empleando rotaevaporación obteniéndose un líquido incoloro de aspecto viscoso (ver figura 28). (Shriner *et al.*, 1979)



8.2.4.2. Rendimiento obtenido para la glicolación de β -pineno.

El porcentaje promedio de rendimiento de reacción fue de 91,2 %, observándose en la tabla 17 los valores obtenidos para las síntesis.

Tabla 17. Resultados obtenidos durante las síntesis de (1*S*,2*R*,5*R*)-2-(hidroximetil)-6,6-dimetilbicyclo [3.1.1] heptan-2-ol (**A₄**).

Síntesis	M _t (g)	M _e (g) ± 0.001	Porcentaje de rendimiento (%)
1	0,170	0,156	91,7
2		0,152	89,4
3		0,159	93,5
Promedio		0,155	91,2

M_t = masa esperada (teórica) de la reacción de glicolación. M_e= masa obtenida (experimental) de la reacción de glicolación.

8.2.4.3. Caracterización organoléptica y fisicoquímica de (1*S*,2*R*,5*R*)-2-(hidroximetil)-6,6-dimetilbicyclo [3.1.1] heptan-2-ol (**A₄**).

Algunas características organolépticas y fisicoquímicas que presentó el compuesto glicolado obtenido se reflejan en la tabla 18.

Tabla 18. Características organolépticas y fisicoquímicas de (1*S*,2*R*,5*R*)-2-(hidroximetil)-6,6-dimetilbicyclo [3.1.1] heptan-2-ol (**A₄**) sintetizado.

Estado	Líquido
Color	Incoloro
Olor	Agradable, característico del compuesto
Solubilidad	Soluble en: hexano, heptano, DMSO, diclorometano, cloroformo. Insoluble en: agua

8.2.4.4. Caracterización espectroscópica de (1*S*,2*R*,5*R*)-2-(hidroximetil)-6,6-dimetilbicyclo [3.1.1] heptan-2-ol (**A₄**).

Para la caracterización espectroscópica del compuesto obtenido se utilizaron las técnicas de FTIR y CG/EM, donde ambos resultados obtenidos muestran la presencia del compuesto halogenado.

8.2.4.4.1. Caracterización por espectroscopia FTIR de (1*S*,2*R*,5*R*)-2-(hidroximetil)-6,6-dimetilbicyclo [3.1.1] heptan-2-ol (**A₄**).

En la figura 29 se muestra el espectro FT-IR del compuesto sintetizado **A₄**. Las asignaciones de las diferentes bandas de absorción se resumen en la tabla 19.

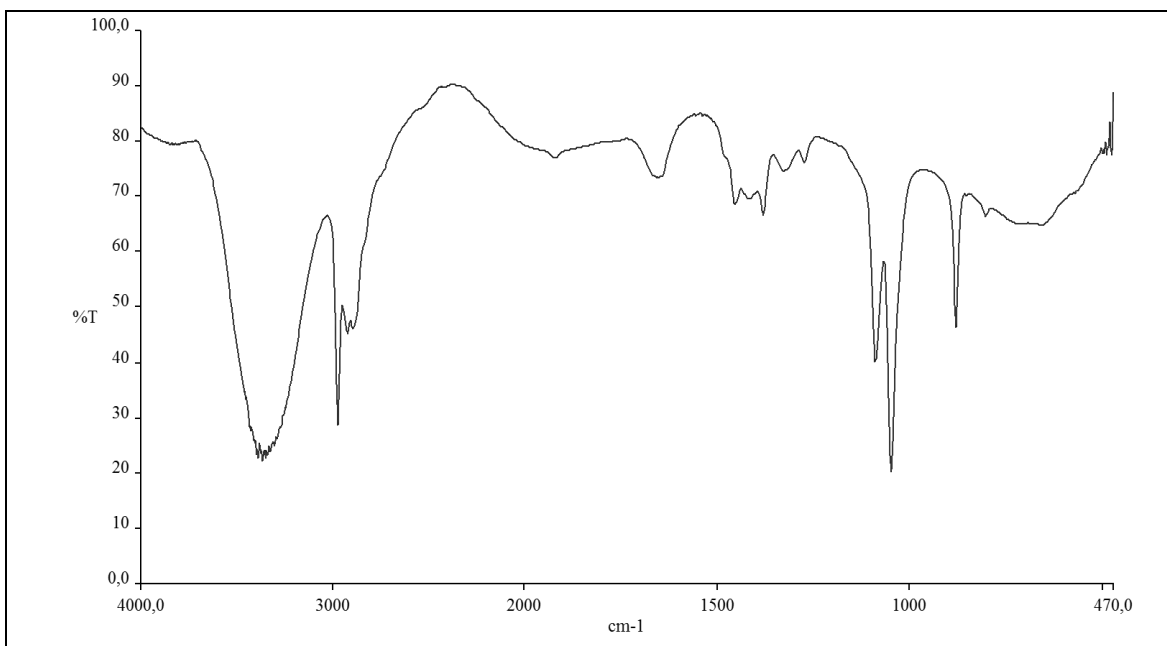


Figura 29. Espectro FTIR obtenido para el (1S,2R,5R)-2-(hidroximetil)-6,6-dimetilbicyclo [3.1.1] heptan-2-ol (**A₄**) sintetizado.

Tabla 19. Comparación de las señales en el espectro de FTIR para el (1S,2R,5R)-2-(hidroximetil)-6,6-dimetilbicyclo [3.1.1] heptan-2-ol (**A₄**).

Grupo	Número de onda (cm ⁻¹)		Asignación
	Experimental	Reportado*	
O-H	3.400-3.340	3.400-3.320	Vibración de tensión O-H
C-H	2.955	2.940-2.910	Vibración de tensión asimétrica C-H
C-H	2.870	2.870-2.840	Vibración de tensión simétrica C-H
C-H	1455	1.470-1.435	Vibración de flexión C-H
R₃COH	1.410	1.410-1.310	Vibración de flexión O-H terciario
RCH₂OH	1.256	1.350-1.260	Vibración de flexión O-H primario
>C(CH₃)₂	1.200	1.200-1.190	Vibraciones esqueléticas de <i>gem</i> -dimetilos
	1.245	1.220-1.210	
CR₃OH	1.090	1.210-1.100	Vibración de tensión C-O terciario
CRH₂OH	1.065	1.075-1.000	Vibración de tensión C-O primario

*(Nakanishi y Solomon, 1977)

El análisis detallado comparativo con el producto de partida permite notar:

a) No se observan las bandas características para =CH₂, (vibraciones de tensión Csp²-H a 3.071 cm⁻¹, vibración de flexión en el plano =C-H a 1.469 cm⁻¹ y vibración de flexión fuera del plano =C-H a 875 cm⁻¹) evidenciándose la desaparición del doble enlace olefínico.

b) Aparición de bandas generales típicas de alcoholes: t O-H entre $3.400\text{--}3.340\text{ cm}^{-1}$.
c) Aparición de bandas específicas de alcoholes primarios: f O-H a 1.256 cm^{-1} y t C-O a 1.065 cm^{-1} .

c) Aparición de bandas específicas de alcoholes terciarios: f O-H a 1.410 cm^{-1} y t C-O a 1.090 cm^{-1} .

8.2.4.4.2. Caracterización por cromatografía gaseosa/espectrometría de masas (CG/EM) de (1*S*,2*R*,5*R*)-2-(hidroximetil)-6,6-dimetilbicyclo [3.1.1] heptan-2-ol (**A₄**).

El compuesto obtenido fue analizado mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, apreciándose en el cromatograma una señal mayoritaria ubicada a un tiempo de retención de 5,923 minutos (figura 30).

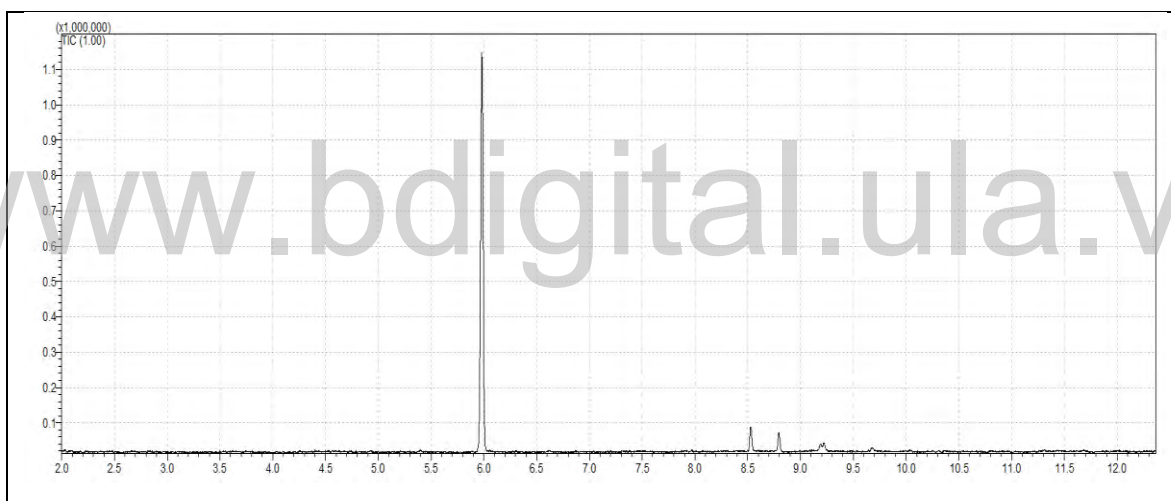


Figura 30. Cromatograma de gases obtenido para el (1*S*,2*R*,5*R*)-2-(hidroximetil)-6,6-dimetilbicyclo[3.1.1] heptan-2-ol (**A₄**) sintetizado.

Al analizar el espectro de masas obtenido para el compuesto **A₄** (figura 31), se observa que este posee gran similitud con el obtenido por Fernández y colaboradores, lo cual era de esperarse debido a que posee la misma masa molecular y difiere únicamente en la posición de los grupos hidroxilos que están como sustituyentes. En este espectro no se observa el ion molecular ya que los iones moleculares de los alcoholes decaen fácilmente con la pérdida de OH o de una molécula de agua (H_2O) generando el fragmento $(\text{M}-17)^+$ y $(\text{M}-18)^+$ respectivamente. (Stashenko y Martínez, 2009)

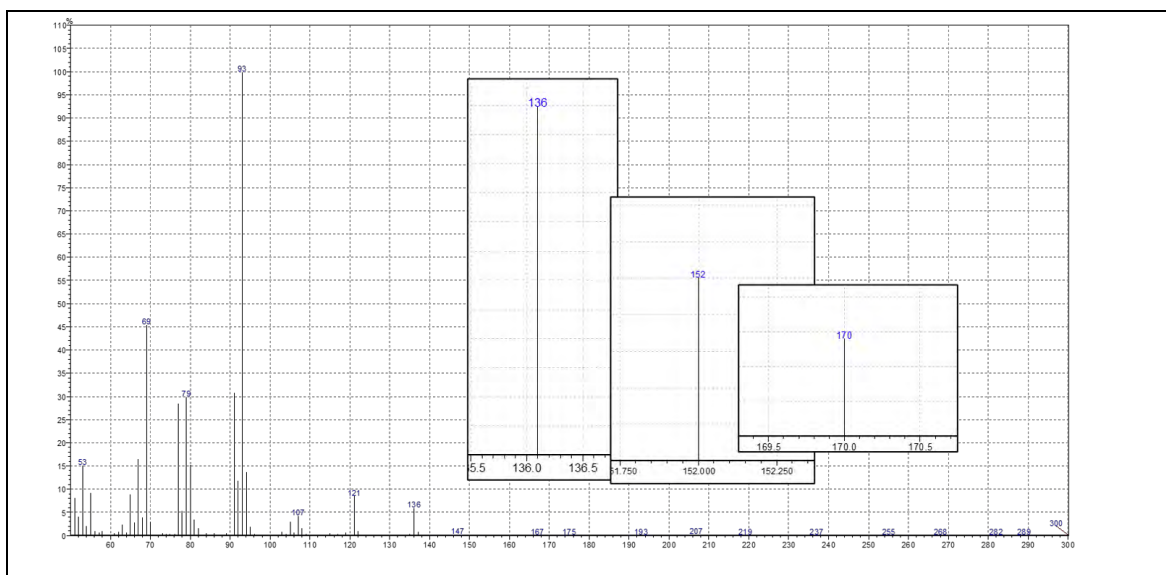
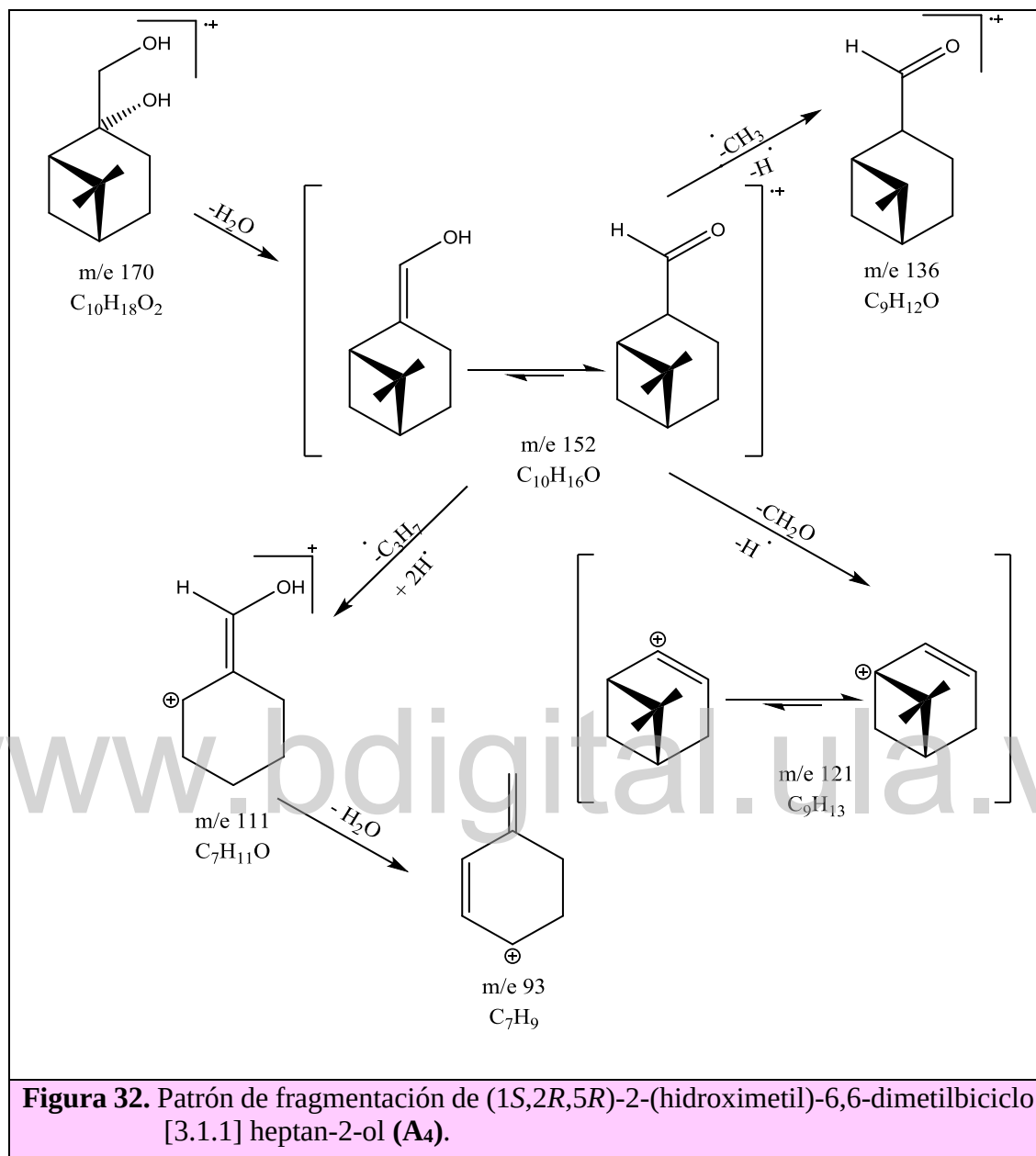


Figura 31. Espectro de masas obtenido para el (1*S*,2*R*,5*R*)-2-(hidroximetil)-6,6-dimetilbicyclo [3.1.1] heptan-2-ol (**A4**) sintetizado.

El patrón de fragmentación se muestra en la figura 32. Inicialmente, se pierde una molécula de agua generando el fragmento a m/z 152 $[C_{10}H_{16}O]^+$ estabilizado por tautomerismo ceto-enólico; a m/z 136 se encuentra un ion radical $[C_9H_{12}O]^+$ generado por la pérdida de un radical metilo ($\cdot CH_3$) de la especie química anterior, que luego es estabilizado por medio de un rearrreglo por medio de la pérdida de un radical hidrógeno ($\cdot H$). por otro lado, la especie a m/z 152 puede también perder directamente una molécula de formaldehído (CH_2O) seguido de la pérdida de un hidrógeno para generar el fragmento a m/z 121 $[C_9H_{13}]^+$. De igual modo, el ion correspondiente a m/z 152 sufre la pérdida del radical isopropilo ($\cdot C_3H_7$) y la posterior adición de dos radicales $\cdot H$ generando el fragmento a m/z 111 $[C_7H_{11}O]^+$ que está estabilizado por resonancia. Finalmente, ocurre la pérdida de una molécula de agua (H_2O) generando el carbocatión a m/z 93 $[C_7H_9]^+$ correspondiente al pico base.



8.2.5. Síntesis y caracterización del producto de hidratación de β -pineno: $(1S,2R,5R)$ -2,6,6-trimetilbicyclo [3.1.1] heptan-2-ol (A_5).

8.2.5.1. Procedimiento experimental empleado para la hidratación de β -pineno.

En un balón fondo redondo se agregaron 136 mg de β -pineno y 10 mL de una solución acuosa al 5 % de ácido fosfórico (H_3PO_4). El balón fue colocado en una manta de calentamiento a reflujo durante 6 horas (figura 33).



Figura 33. Equipo empleado en la reacción de hidratación de β -pineno.

Culminado este proceso, se observaron 2 fases en el balón; éstas fueron separadas un embudo de decantación. La fase acuosa fue extraída líquido-líquido empleado hexano como solvente inmiscible en agua; ambas fases orgánicas se reunieron, se lavaron con agua fría y se secaron sobre sulfato de magnesio. Finalmente, la solución orgánica fue filtrada por gravedad para eliminar el agente desecante y rotaevaporada para eliminar el hexano, obteniéndose un líquido incoloro de aspecto viscoso (figura 34).



Figura 34. Compuesto obtenido a partir de la hidratación de β -pineno.

8.2.5.2. Rendimiento obtenido para la hidratación de β -pineno.

El porcentaje promedio de rendimiento de reacción fue de 75,8 %, observándose en la tabla 20 los valores obtenidos para las síntesis.

Tabla 20. Resultados obtenidos durante las síntesis de (1*S*,2*R*,5*R*)-2,6,6-trimetilbicyclo [3.1.1] heptan-2-ol (**A₅**).

Síntesis	M _t (g)	M _e (g) ± 0.001	Porcentaje de rendimiento (%)
1	0,153	0,112	73,2
2		0,120	78,4
3		0,116	75,8
Promedio		0,116	75,8

M_t = masa “teórica” de la reacción de hidratación. M_e= masa “experimental” de la reacción de hidratación.

8.2.5.3. Caracterización organoléptica y fisicoquímica (1*S*,2*R*,5*R*)-2,6,6-trimetilbicyclo [3.1.1] heptan-2-ol (**A₅**).

Algunas características organolépticas y fisicoquímicas que presentó el compuesto glicolado obtenido se reflejan en la tabla 21.

Tabla 21. Características organolépticas y fisicoquímicas del (1*S*,2*R*,5*R*)-2,6,6-trimetilbicyclo [3.1.1] heptan-2-ol (**A₅**) sintetizado.

Estado	Líquido
Color	Incoloro
Olor	Dulce agradable, característico del compuesto
Solubilidad	Soluble en: hexano, heptano, DMSO, diclorometano, cloroformo. Insoluble en: agua

8.2.5.4. Caracterización espectroscópica (1*S*,2*R*,5*R*)-2,6,6-trimetilbicyclo [3.1.1] heptan-2-ol (**A₅**).

Para la caracterización del compuesto obtenido se utilizaron las técnicas de FTIR y CG/EM, donde ambos resultados obtenidos muestran la presencia del compuesto halogenado.

8.2.5.4.1. Caracterización por espectroscopia FTIR de (1*S*,2*R*,5*R*)-2,6,6-trimetilbicyclo [3.1.1] heptan-2-ol (**A₅**).

En la figura 35 se muestra el espectro FT-IR del compuesto sintetizado **A₅**. Las asignaciones de las diferentes bandas de absorción se resumen en la tabla 22.

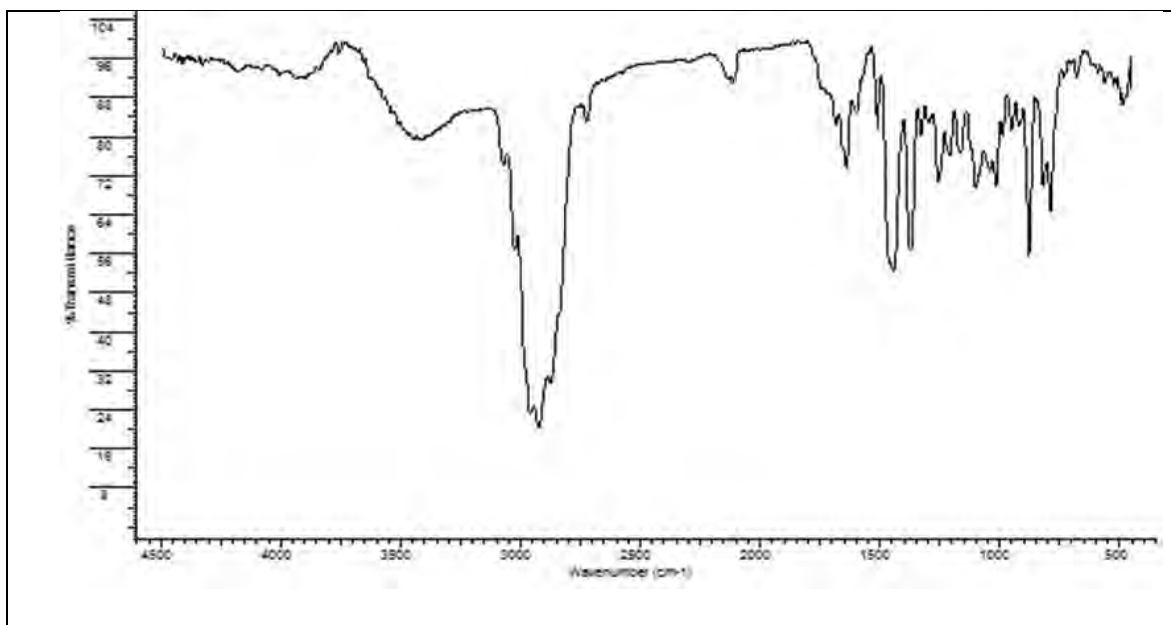


Figura 35. Espectro FTIR obtenido para el (1S,2R,5R)-2-(hidroximetil)-6,6-dimetilbicyclo [3.1.1] heptan-2-ol (**A5**) sintetizado.

Tabla 22. Comparación de las señales en el espectro de FTIR para el (1S,2R,5R)-2-(hidroximetil)-6,6-dimetilbicyclo [3.1.1] heptan-2-ol (**A5**).

Grupo	Número de onda (cm ⁻¹)		Asignación
	Experimental	Reportado*	
O-H	3530-3250	3.670-3.200	Vibración de tensión O-H
C-H	2.958	2.940-2.910	Vibración de tensión asimétrica C-H
C-H	2.874	2.870-2.840	Vibración de tensión simétrica C-H
C-H	1.444	1.470-1.435	Vibración de flexión C-H
R₃COH	1.372	1.410-1.310	Vibración de flexión O-H terciario
>C(CH₃)₂	1.200	1.200-1.190	Vibraciones esqueléticas para <i>gem</i> -dimetilos
	1.245	1.220-1.210	
CR₃OH	1.100	1.210-1.100	Vibración de tensión C-O terciario

*(Nakanishi y Solomon, 1977)

El análisis detallado comparativo con el producto de partida permite notar:

a) No se observan las bandas características para =CH₂, (vibraciones de tensión Csp²-H a 3.071 cm⁻¹, vibración de flexión en el plano =C-H a 1.469 cm⁻¹ y vibración de flexión fuera del plano =C-H a 875 cm⁻¹) evidenciándose la desaparición del doble enlace olefínico.

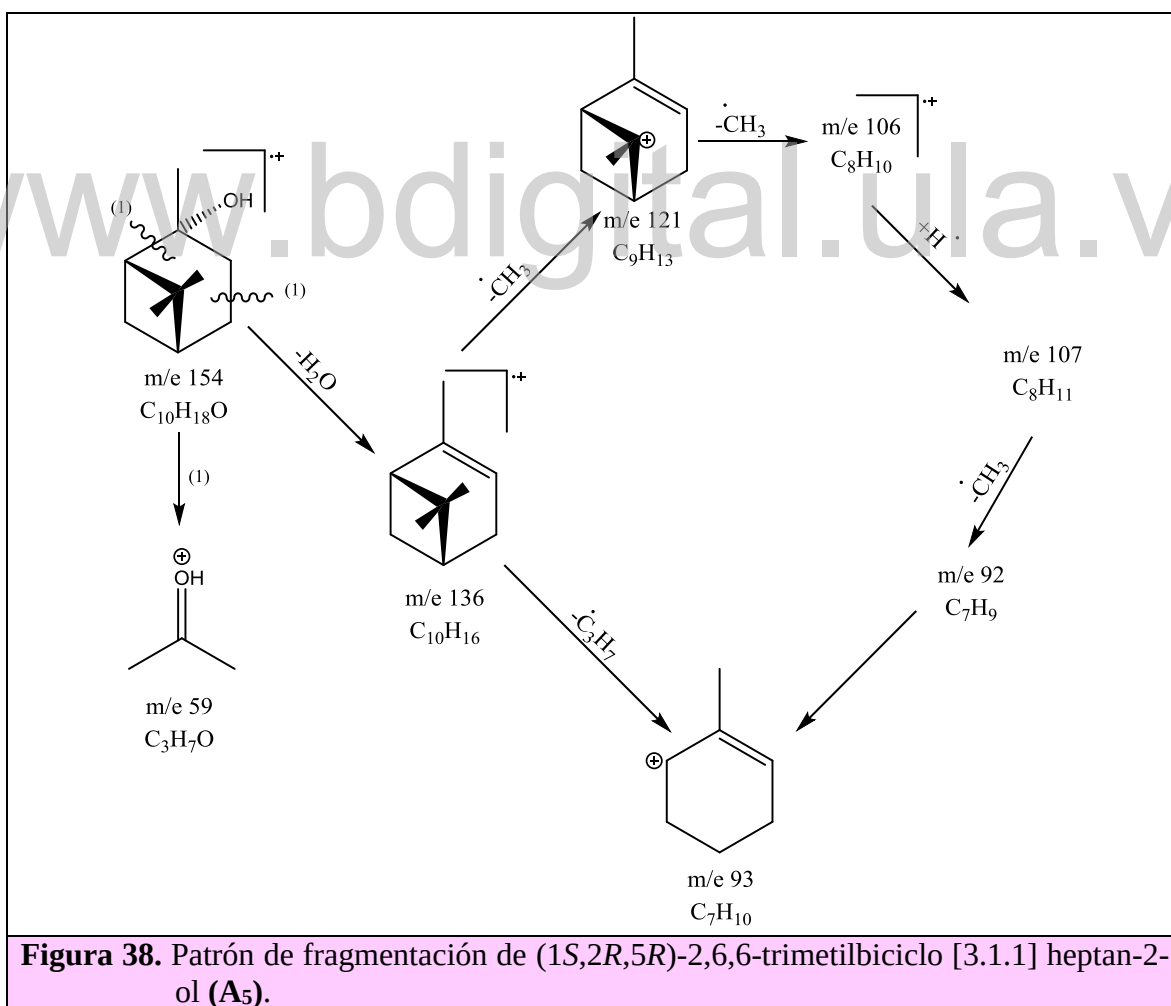
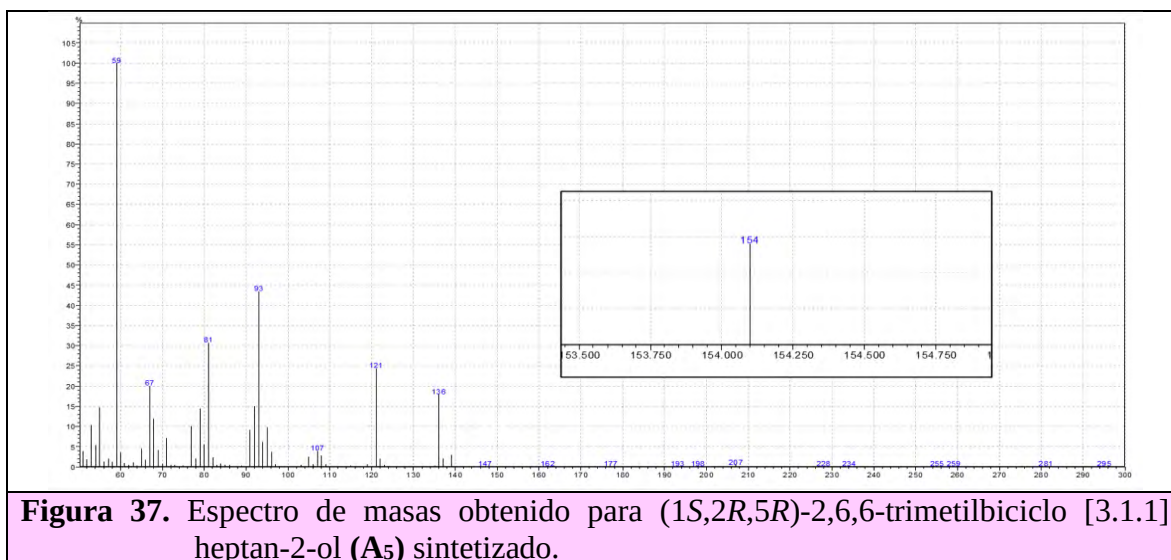
b) Aparición de bandas específicas de alcoholes terciarios: *t* O-H entre 3.530-3.250 cm⁻¹, *f* O-H a 1.372 cm⁻¹ y *t* C-O a 1.100 cm⁻¹.

8.2.5.4.2. Caracterización por cromatografía gaseosa/espectrometría de masas (CG/EM) de (1*S*,2*R*,5*R*)-2,6,6-trimetilbiciclo [3.1.1] heptan-2-ol. (A₅).

El compuesto obtenido fue analizado mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, apreciándose en el cromatograma una señal mayoritaria ubicada a un tiempo de retención de 7,425 minutos (figura 36).



El espectro de masas (EM) correspondiente al compuesto con RT: 7,425 minutos se muestra en la figura 37 y en este se puede observar el ion molecular del compuesto a m/z 154 $[C_{10}H_{18}O]^+$; este puede sufrir, bien sea, la pérdida de una molécula de agua (H_2O) generando así un ion-radical alquénico con valor m/z 136 $[C_{10}H_{16}]^+$ y la subsecuente pérdida de un radical isopropilo ($\cdot C_3H_7$) para generar el fragmento a m/z 93. Por otro lado, el ion molecular puede sufrir una ruptura homolítica del anillo que soporta el grupo hidroxilo terciario liberando un carbocatión constituido por una molécula de acetona protonada generando a m/z 59 $[C_3H_7O]^+$ (pico base). (Stashenko y Martínez, 2010). El patrón de fragmentación detallado se puede observar en la figura 38.



8.3. Determinación de la actividad antibacteriana de los derivados de β -pineno obtenidos.

8.3.1. Microorganismo a utilizar.

Para este estudio se seleccionó *Escherichia coli* (DH5 α), bacteria Gram negativa, suministrada por el Laboratorio de Genética y Química Molecular de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Los Andes.

8.3.2. Preparación de placas y medio de cultivo bacteriano.

Utilizando el medio Luria-Bertani (LB) para la preparación de medios de cultivo líquidos para el crecimiento bacteriano, se disolvieron 10 g de cloruro de sodio (NaCl), 10 g de peptona y 5 g de levadura en 1 L de agua destilada. Seguidamente, se preparó el medio de cultivo sólido para crecimiento bacteriano mezclando 7,5 g de agar con 500 mL del medio LB líquido previamente preparado; esta solución se calentó por espacio de 20 minutos bajo constante agitación hasta apreciar un color ámbar totalmente homogenizado. Ambas soluciones (medio líquido y medio sólido) se trasvasaron a dos fioles de 500 mL y se esterilizaron, junto con las cápsulas de Petri (dispuestas para el ensayo), durante 1 hora en un autoclave a 140 °C (figura 39). Se adicionaron 20 mL de la solución de agar en cada cápsula, y finalmente, se observó la coagulación de la solución y se llevó a una estufa a 37 °C sin agitación por espacio de 24 horas. (Moya *et al.*, 2015)



Figura 39. Preparación de placas y medio de cultivos bacterianos.

8.3.3. Inoculación de medio líquido rico y siembra en placa en medio sólido.

Se inocularon *E. coli* en el medio líquido LB a 37°C y se incubaron sin agitación durante 24 horas. Por último, se introdujo un rastrillo dentro de la suspensión para la aplicación de la bacteria sobre el agar (siembra) y al retirarlo se rotó varias veces contra las paredes de la capsula de Petri, sin dejar ninguna zona libre. Esto se consigue deslizando el rastrillo por la superficie del agar tres veces, rotando la placa unos 60° cada vez para conseguir una siembra uniforme y así obtener concentraciones cada vez menores de los microorganismos (Cantón *et al.*, 2000)

8.3.4. Preparación de los discos de papel.

Se utilizaron discos de papel de filtro de 6 mm de diámetro, los cuales fueron esterilizados con luz UV, y luego impregnados, por separado, con los derivados obtenidos a distintas diluciones (10, 100, 1000 y 10000) utilizando como solvente dimetilsulfóxido (DMSO); de igual forma fueron impregnados papeles con DMSO que se utilizaron como control negativo; como control positivo se usaron discos impregnados con un antibiótico comercial (piperacilina) que inhibe el crecimiento bacteriano de la cepa a ensayar. Ésta experiencia fue realizada por triplicado para cada una de las concentraciones de los derivados obtenidos; además, se realizó el ensayo con un disco control en el cual la bacteria se desarrolló sin interferentes. El ensayo se llevó a cabo por espacio de 24 horas tomando en cuenta el tiempo de crecimiento de la especie bacteriana trabajada (figura 40).

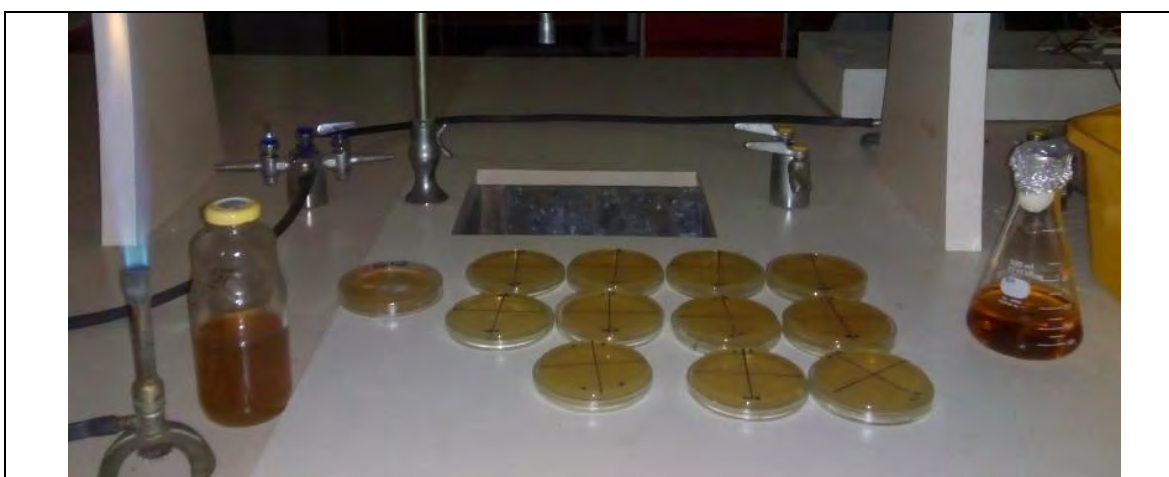


Figura 40. Preparación de discos para determinar la actividad bacteriana de los derivados obtenidos de las transformaciones de β -pineno.

8.3.5. Lectura de placas.

Transcurridas las 24 horas de incubación, y una vez alcanzada la temperatura ambiente en las placas, se realiza la lectura con luz indirecta o con un espejo examinando cada una de ellas midiendo con una regla la distancia en mm desde el borde de los discos hasta donde se observa el crecimiento bacteriano (halo de inhibición).

8.3.6. Ensayos biológicos para determinar la inhibición del crecimiento de bacterias.

La actividad antibacteriana fue explorada mediante la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los compuestos sintetizados frente a la cepa bacteriana *Escherichia coli* (DH₅α). Los resultados se muestran claramente en la tabla 23.

Tabla 23. Actividad antibacteriana/CMI de los compuestos sintetizados A₁-A₅.

Bacteria: <i>Escherichia coli</i> (DH ₅ α)					
Concentración de las muestras (10 ³ µg/mL; 10 ⁻² M)	Halo de inhibición (mm)	Dilución (x 10 ⁻⁴ [M])			
		1/10	1/100	1/1000	1/10000
A ₁ (21,2; 7,21)		6	6	5 (0,721)	0
A ₂ (11,0; 5,09)		5	5	4	4 (0,0509)
A ₃ (14,7; 8,54)		0	0	0	0
A ₄ (15,9; 9,35)		5	4	4	4 (0,0935)
A ₅ (11,6; 7,53)		6	5	5	5 (0,0753)
^a ATB		25			
^b DMSO	0				
^a ATB: antibiotico (Piperacilina 100 µg/mL; 1,94 x 10 ⁻⁴ M) empleado como control positivo para la bacteria gram negativa <i>E. coli</i> . ^b DMSO: dimetilsulfóxido, empleado como blanco para la bacteria gram negativa <i>E. coli</i> . CMI (Concentración mínima inhibitoria): los halos de inhibicion sombreados en la tabla pertenecen a la CMI ensayada de cada compuesto.					

La piperacilina es un antimicrobiano que se utiliza como un inhibidor de la β-lactamasa (enzimas producidas por bacilos gram negativos que inactivan las penicilinas y sus derivados originando resistencia a ese tipo de antibióticos) y posee un amplio espectro de actividad bactericida que incluye a dichos microorganismos (Vega *et al.*, 2017). Los reportes de sensibilidad microbiana de *Escherichia coli* usando Piperacilina como control positivo confirman la evaluación realizada en el presente estudio (Sánchez *et al.*, 2003 y Álvarez *et al.*, 2018).

Antibióticos como Piperacilina-Tazobactam siguen mostrando una excelente actividad tanto sobre microorganismos aeróbicos (*E. coli*) como anaeróbicos, continúan siendo a pesar del paso de los años la mejor opción terapéutica en la infección polimicrobiana (García-Rodríguez *et al.*, 2003).

En la tabla 23, se puede notar que los compuestos A₁, A₂, A₄ y A₅ poseen una muy buena actividad bacteriostática/bactericida frente al microorganismo estudiado aun a concentraciones más bajas que el antibiótico patrón. El hecho de que el halo de inhibición para dichos compuestos permanezca constante a través de las diluciones parece sugerir un problema de difusión de los compuestos ensayados en el medio de cultivo.

Haciendo una observación general, el compuesto A₃ no presentó actividad alguna frente a la bacteria ensayada. Por otro lado, el hecho de que el β -pineno contenga por si mismo una amplia gama de actividades biológicas proporciona un punto de partida importante para el uso del mismo en el tratamiento de infecciones asociadas al microorganismo estudiado, por lo tanto, una vez estudiada su toxicidad, los compuestos sintetizados podrían ser útiles para el desarrollo de nuevos fármacos antimicrobianos.

9. CONCLUSIONES.

- ❖ A partir de β -pineno se realizó la síntesis de (1*S*,2*R*,5*R*)-2-bromo-2-(bromometil)-6,6-dimetilbicyclo [3.1.1] heptano, obteniendo un líquido amarillo de aspecto oleoso con un porcentaje de rendimiento de 74,6 %.
- ❖ Partiendo de β -pineno se sintetizó el líquido amarillo viscoso (1*S*,2*R*,5*R*)-2-bromo-2,6,6-trimetilbicyclo [3.1.1] heptano, con porcentaje de rendimiento de 84,9 %.
- ❖ Se sintetizó el (1*S*,2*R*,5*R*)-2-cloro-2,6,6-trimetilbicyclo [3.1.1] heptano a partir de β -pineno, líquido incoloro de apariencia aceitosa con un porcentaje de rendimiento 85,7 %.
- ❖ Se realizó la síntesis de (1*S*,2*R*,5*R*)-2-(hidroximetil)-6,6-dimetilbicyclo [3.1.1] heptan-2-ol partiendo de β -pineno, obteniendo un líquido incoloro aceitoso con un porcentaje de rendimiento de 91,2 %.
- ❖ Partiendo de β -pineno se sintetizó un líquido incoloro viscoso (1*S*,2*R*,5*R*)-2,6,6-trimetilbicyclo [3.1.1] heptan-2-ol a partir de β -pineno, con un porcentaje de rendimiento 75,8 %.
- ❖ Los derivados obtenidos A₁, A₂, A₄ y A₅ presentaron actividad inhibitoria contra la bacteria Gram-negativa *Eschechia coli* DH₅ α , determinando valores de concentraciones inhibitorias (CI) inferiores a las requeridas por el antibiótico patrón.
- ❖ La bacteria Gram-negativa *Eschechia coli* DH₅ α presentó resistencia frente al producto A₃.

10. RECOMENDACIONES.

- ❖ Optimizar los parámetros de síntesis que pudieran llevar a mejores resultados de los compuestos obtenidos.
- ❖ Caracterizar los productos obtenidos por medio de espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN) con la finalidad de obtener un análisis más preciso.
- ❖ Realizar nuevos ensayos biológicos utilizando diferentes bacterias Gram-positivas y Gram-negativas para explorar la amplitud del espectro antibiótico de las sustancias sintetizadas.
- ❖ Realizar los ensayos pertinentes para determinar la toxicidad de los compuestos obtenidos en las síntesis.

www.bdigital.ula.ve

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

Alarcón, E.; Villa, A.; Montes, C. 2006. Síntesis de nopol a partir de β -pineno y aceite de trementina con el catalizador Sn-MCM-41. **Revista Facultad de Ingeniería Universidad de Antioquia**, **36**: 45-55 p.

Álvarez, J.; Rojas, Á.; Carvajal, C.; Revello, J.; Meza, P.; Guggiana, P.; García, P.; Labarca, J. 2018. Evaluación de suceptibilidad y respuesta al tratamiento con Piperacilina/tazobactam en paciente con infecciones por *Escherichia coli* productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) CTX-M. **Revista Chilena de Infectología**, **35**(4): 343-350 p.

Barthelmie, R.; Pryor, S. 1999. A model mechanism to describe oxidation of monoterpenes leading to secondary organic aerosol. **Journal of Geophysical Research**, **104**; 23.657-23.669 p.

Camps, P.; Vázquez, S.; Escolano, C. 2005. **Fundamentos de síntesis de fármacos**. Capítulo I. 32-33 p.

Cantón, R.; García, J.; Gómez, L.; Martínez, L.; Rodríguez, C.; Vila, J.; García, J. A. 2000. **Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos**. En: Picazo, J.J. (Ed.). *Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 54 p.

Cué, M.; Morejón, M. 1998. Antibacterianos de acción sistémica. Parte I. Antibióticos betalactámicos. **Revista Cubana Medicina General Integral**, **14**(4): 348 p.

Escribano, F.C.; Escribano, F.C.; Cabello, J.V. 2010. Alquenos III. Open course ware. Universidad de Sevilla. 7 p.

Fernández, J.; Rosquete, C. 2017. **Derivados del α -pineno (Componente mayoritario del aceite esencial de pino extraído de la resina de *Pinus caribaea*) obtenido de los desechos de la explotación maderera de Uverito, (Estado Monagas). Ensayos Biológicos**. Trabajo Especial de Grado, Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes. Mérida- Venezuela. 81 p.

Garboza, F.; Frontado, R.; Noguera, N.; Ávila, H.; Ojeda, L.; Ramírez, N.; Triana, J.; Triana, F. 2011. Uso de medios alternativos a base de hidrolizado de caseína y extracto de *Aspergillus niger* y su efecto sobre la expresión genética de una cepa de *Escherichia coli*. **Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología**, 31(2): 138-143 p.

García-Rodríguez, J.; Casal, M.; Rodríguez, F. 2003. Evolución de la resistencia antibiótica de *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* y *Bacteroides fragilis* (1997-2001). **Revista Española de Quimioterapia**, 16(4): 421-427 p.

González, A.; Quiñones, E.; Rincón, G. 2016. Actividad biológica de los terpenos en el área agroalimentaria. **Revista Digital Biotecnología Vegetal (Nanobio)**: 33-35 p.

Griffin, R. 1978. Química Orgánica Moderna. Editorial Reverté, S.A. España. 86-94 p.

Korolkovas, A.; Burckhalter, J. 1982. Química Farmacéutica. Editorial Guanabara Dois. 139, 141, 150, 221, 236 y 352 p.

Leite, A.; Lima, E.; Souza, E.; Diniz, M.; Trajano, V.; Medeiros, I. (2007). Inhibitory effect of beta-pinene, alpha-pinene and eugenol on the growth of potential infectious endocarditis causing Gram-positive bacteria. **Revista Brasileira de Ciencias Farmaceuticas**, 43(1): 121-126 p.

López, L.; Hernández, M.; Colín, Cl.; Ortega, S.; Cerón, G.; Franco, R. 2014. Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. **Investigaciones en discapacidad**, 3(1): 10-12 p.

López, M.; Triana, J.; Pérez, F.; Torres, M.; 2005. **Métodos físicos de separación y purificación de sustancia orgánicas**. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Departamento de Química. 20-28 p.

Maguna, F.; Romero, A.; Garro, O.; Okulik, N. 2006. Actividad antimicrobiana de un grupo de terpenoides. Universidad Nacional del Nordeste Comunicaciones Científicas y Tecnológicas en internet. Facultad de agroindustrias. 57:4-5 p.

Maldonado, L.; Abad, J. 2012. **Síntesis del derivado diterpenil 7-oxima-13-metoxi-8,11,13-podocarpatrieno a partir del (+)-manool**. Trabajo de Grado, Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad de los Andes. Mérida- Venezuela. 22-23 p.

Marcano, D.; Hasegawa, M. 2002. **Fitoquímica orgánica**. Editorial Torino. Caracas. 80-86 p.

Marcano, D.; Cortés, L. 1998. **Fundamentos de Química Orgánica**. Editorial Reverté. Caracas. 200-201 p.

March, J. 1977. **Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure**. Second Edition. McGraw-Hill Kogakusha, LTD. Japan. 739-741 p.

McMurry, J. 2001. **Química Orgánica. 5ª. edición**. Internacional Thomson Editores, Ciudad de México. 1354 p.

Mollinedo, M.; González, C. 2014. Bacterias Gram negativas. **Revista de Actualización Clínica**, **49**: 2609-2613 p.

Moya, J.; Torrecillas, R.; Cabal, B.; Álvarez Díaz, E. 2015. Procedimientos para la inhibición del crecimiento microbiano. 2: 529-557 p.

Nakanishi, K.; Solomon, P. 1977. **Infrared Absorption Spectroscopy. 2ª edición**. San Francisco, Ca. USA. 287 p.

National Institute of Advanced Industrial Science and Tecnology. (1R-(1 α ,2 α ,3 α ,5 α))-2,6,6-trimethylbicyclo(3.1.1)heptane-2,3-diol. **SBDSWEB**.

https://sdb.sdb.aist.go.jp/sdb/cgi-bin/direct_frame_top.cgi.

Acceso 26/02/2020

National Institute of Advanced Industrial Science and Tecnology. (1S)-(-)-2(10)-Pinene. **SBDSWEB**.

https://sdb.sdb.aist.go.jp/sdb/cgi-bin/direct_frame_top.cgi.

Acceso 25/02/2020

Orozco, L. 2012. **Transposición del epóxido de β -pineno en mirtanal usando catalizadores ácidos alternativos al empleo de zeolitas beta sustituidas con Zr y Sn.** Trabajo Fin de Máster en Química Sostenible, Instituto de Tecnología Química, Universidad Politécnica de Valencia. Valencia-España. 64 p.

Paavolainen, L.; Kitunen, V.; Smolander, A.1998. Inhibition of nitrification in forest soil by monoterpenes. **Plant and Soil**, **205**: 147–154 p.

Pavia, D.; Lampman, G.; Kriz, G. 2001. **Introduction to Spectroscopy.** Thomson Learning. Inc., Stamford. USA, 24-29 p.

Pessoa, A.; de Oliveira, E.; Leite, E.; Araujo, M.; Nogueira, V. 2007. Inhibitory effect of *Cinnamomum zeylanicum* Blume (Lauraceae) essential oil and β -pinene on the growth of Dematiaceous Moulds. **Brazilian Journal of Microbiology**, **38**: 33-38 p.

Pérez-Urría, E.; Ávalos, A. 2009. Metabolismo secundario de plantas. **Reduca**, **2**: 119-145 p.

Pírez, M.; Mota, M. 2013. Morfología y estructura bacteriana. Temas de bacteriología y virología médica. Universidad de Montevideo. Facultad de Medicina. Montevideo. 23-25 p.

Ramírez, L.; Marín, D. 2009. Metodologías para evaluar *in vitro* la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. **Sciences Techniques**, **42**: 263-268 p.

Rivas, A.; Monteiro, P.; Barros, M.; Machado, D.; Sales, C.; Sales, D. 2012. Biological activities of α -pinene and β -pinene enantiomers. **Molecules**, **17**: 6306-6316 p.

Rivera, W. 2008. **Síntesis y reactividad de alcanos, alquenos y alquinos.** 10-19 pp. https://www.alipso.com/monografias4/Sintesis_y_reactividad_de_alcanos_alquenos_y_alquinos/.

Rojas, J.; Perea, J.; Ortiz, Cl.; 2009. Compuestos con potencial aplicación farmacológica obtenidos por biotransformación de geraniol y pineno. **Revista de la Universidad de Santander. Salud**, **41**(3): 251-258 p.

Sánchez, J.; Guillán, C.; Fuster, C.; López, R.; Jiménez, M.; García, J. 2004. Sensibilidad microbiana de *Escherichia coli* en bacteriurias en el area sanitaria del Bierzo en el año 2003. **Actas Urológicas Españolas**, **28**(8): 588-593 p.

SHIMADZU 2016. **SHIMADZU/GCMS - Gas Chromatography Mass Spectrometry, Software GCMS solution. Versión 4.44.** Shimadzu Santa Clara, CA, USA.

Shiner, R.; Fuson, R.; Curtin, D.; Merrill, T. 1980. **The Systematic Identification of Organic Compounds, a Laboratory Manual. 6th edition.** John Wiley & Sons. New York. 603 p.

Stashenko, E.; Martínez, J. 2009. Aspectos prácticos de la ionización con electrones en la obtención de espectros de masas y su interpretación. **Scientia Chromatographica**, **1**: 19-36 p.

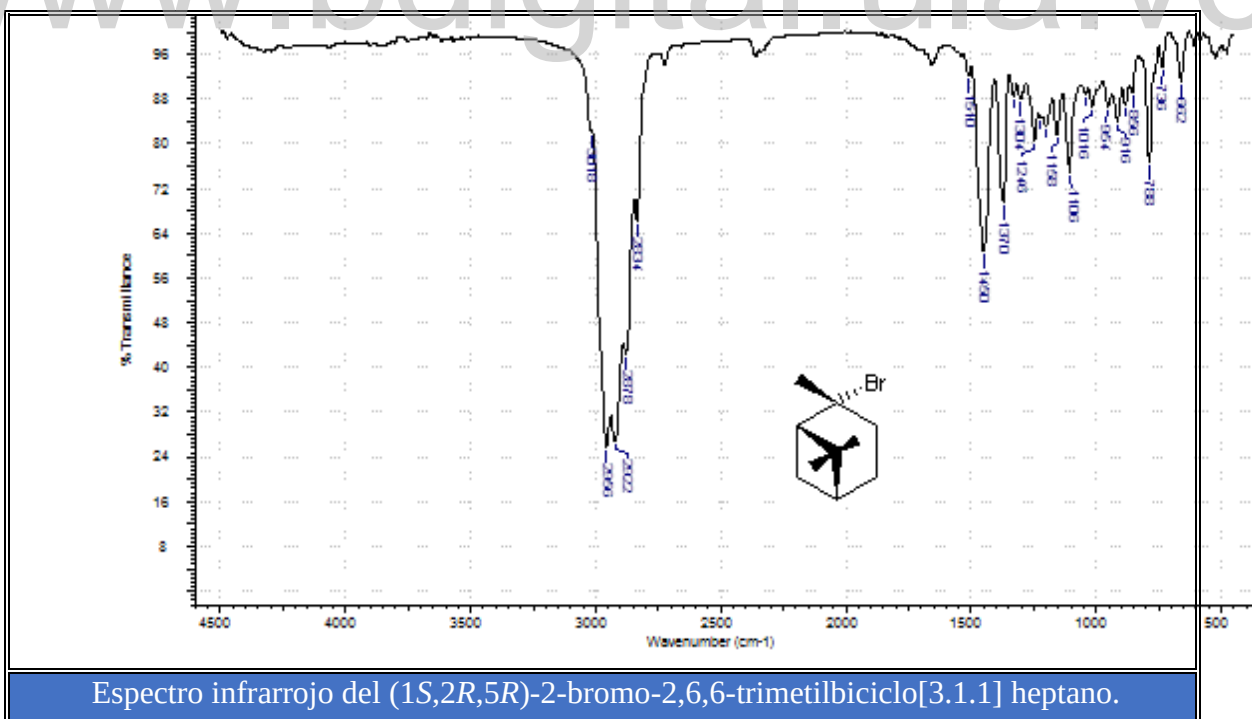
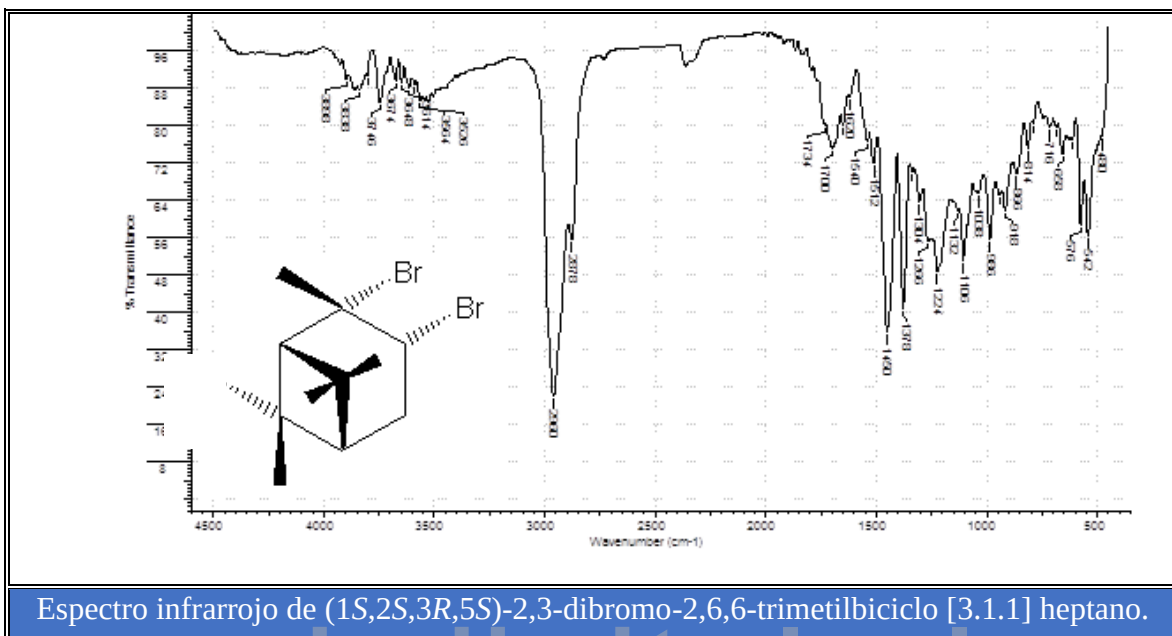
Stashenko, E.; Martínez, J. 2010. Separar, fragmentar e integrar: la rutina de un análisis por GC-MS. Patrones de fragmentación de moléculas orgánicas. **Scientia Chromatographica**, **2**: 23-46 p.

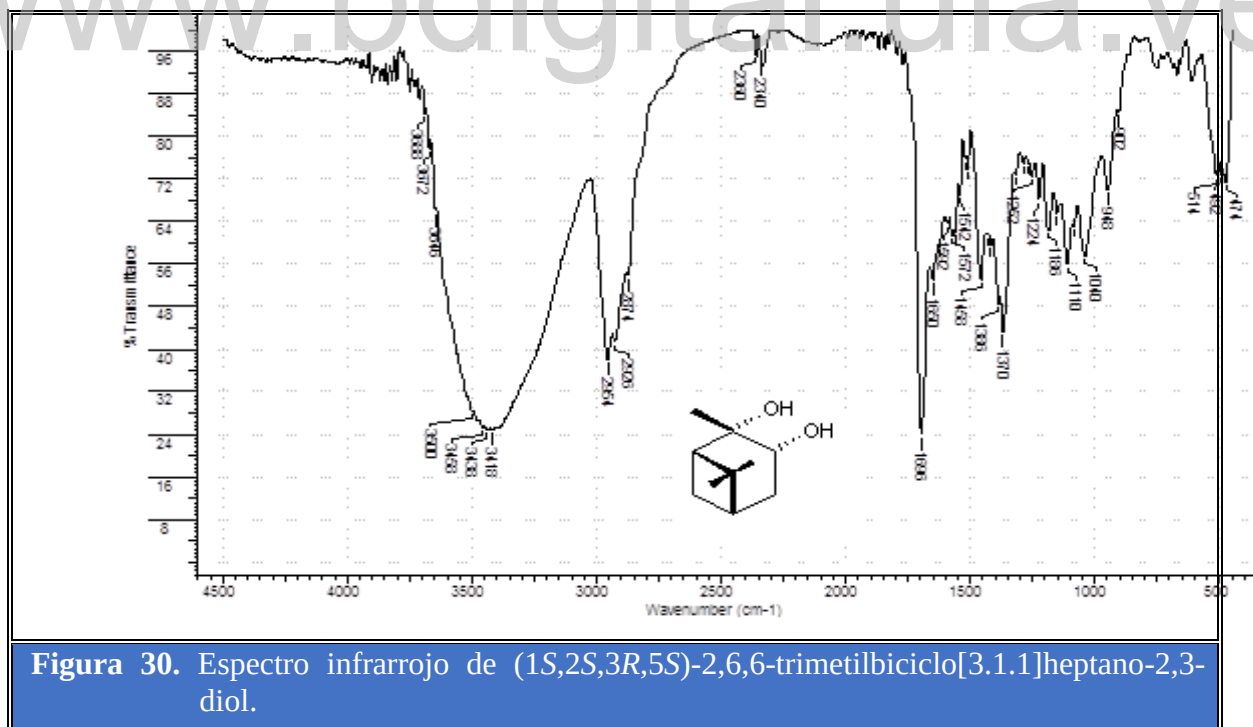
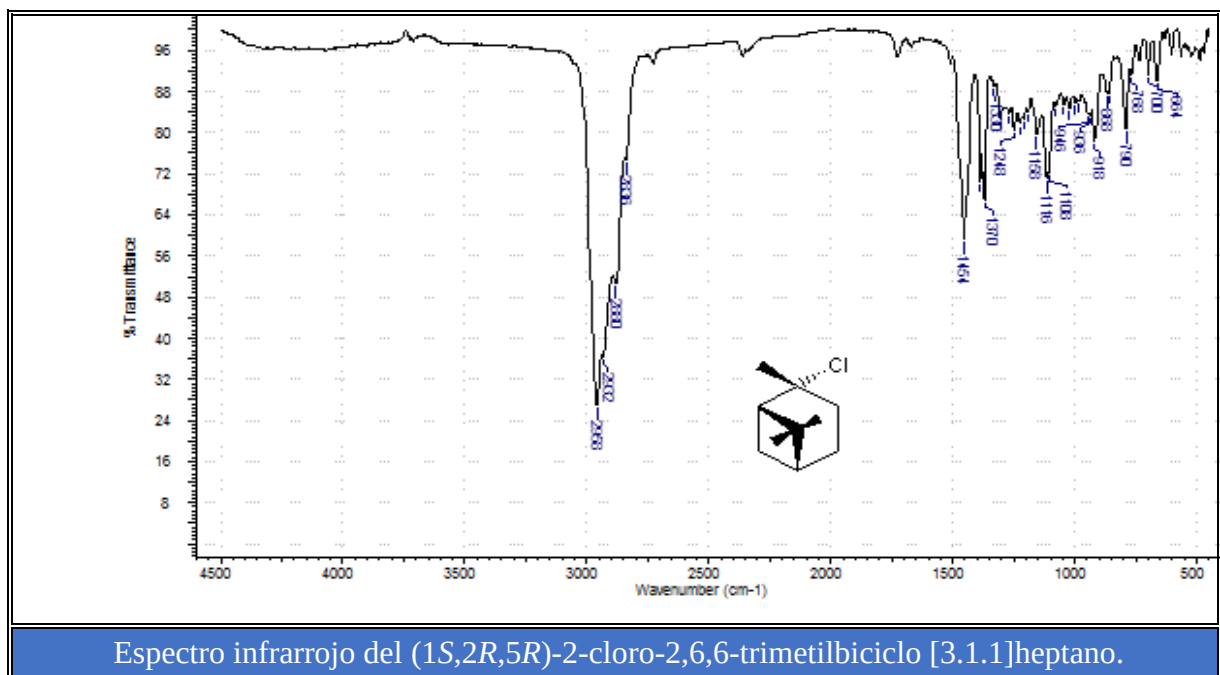
Vega, J.; Benadof, D.; Veas, A.; Acuña, M. 2017. Susceptibilidad de enterobacterias a piperacilina/tazobactam en un hospital pediátrico de Chile. **Revista Chilena de Infectología**, **34**: 563-569 p.

Wade, Jr. 2002. **Química Orgánica. 2da Edición.** Editorial Prentice Hall. Madrid 7: 304-307 p.

12. APÉNDICES.

12.1. Apéndice 1.





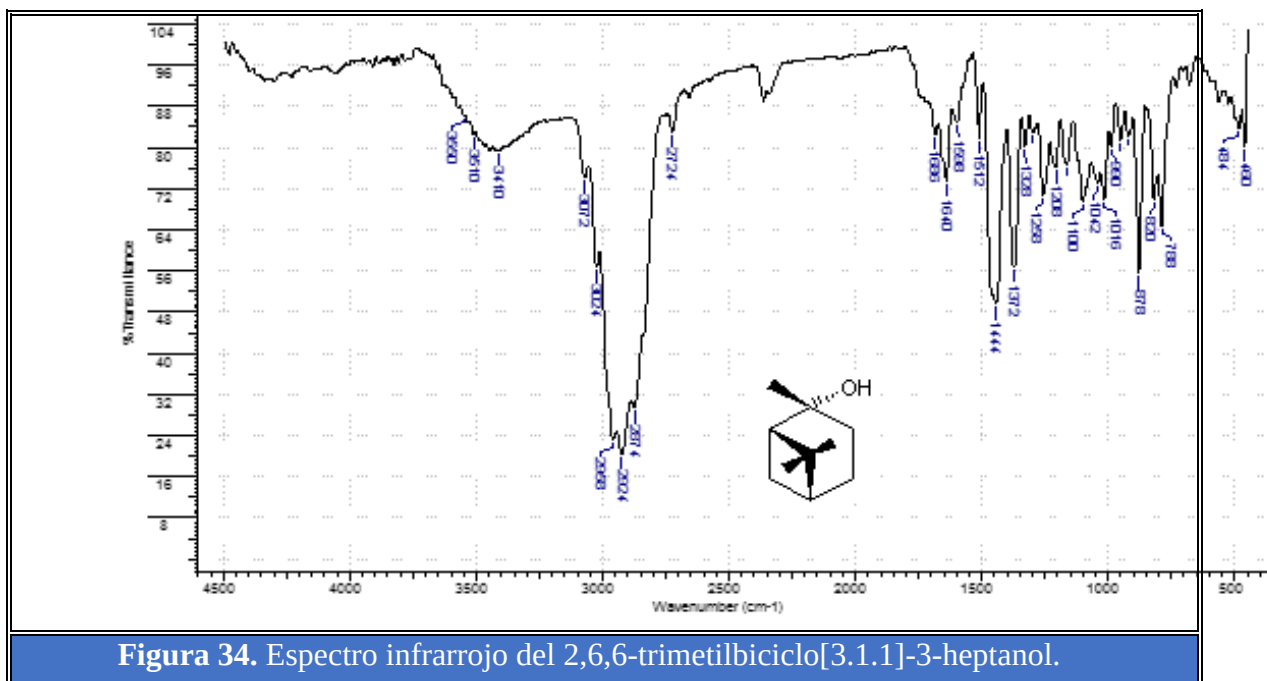


Figura 34. Espectro infrarrojo del 2,6,6-trimetilbicyclo[3.1.1]-3-heptanol.

www.bdigital.ula.ve

12.2. Apéndice 2.

Cálculos estequiométricos:

Reacción 1. Síntesis del producto de dihalogenación de β -pineno: (1S,2R,5R)-2-bromo-2-(bromometil)-6,6-dimetilbiciclo [3.1.1] heptano (A₁).

Reactivo	PM (g/mol)	d(g/mL)	V (mL)	mg ($\cdot 10^{-3}$)	mMol	P.P
β-pineno	136,24	0,859	0,16	136,24	1	1
Br ₂	160	3,11	0,1	320	2	2

3 mL Br₂ $\longrightarrow$ 100 mL de solución

0,100 mL Br₂ $\longrightarrow$ x= 3,40 mL

Reacción 2. Síntesis del producto de hidrobromación de β -pineno: (1S,2R,5R)-2-bromo-2,6,6-trimetilbiciclo [3.1.1] heptano (A₂).

Reactivo	PM (g/mol)	d(g/mL)	V (mL)	mg ($\cdot 10^{-3}$)	mMol	P.P
β-Pineno	136,24	0,859	0,16	136,24	1	1
KBr	119,00	-	-	540	4	4,5
H ₂ SO ₄	98,3	1,84	4,915			

Reacción 3. Síntesis del producto de hidroclicación de β -pineno: (1S,2R,5R)-2-cloro-2,6,6-trimetilbiciclo [3.1.1] heptano (A₃).

Reactivo	PM (g/mol)	d(g/mL)	V (mL)	mg ($\cdot 10^{-3}$)	mMol	P.P
β-pineno	136,24	0,859	0,16	136,24	1	1
NaCl	58,44	-	-	263	4,5	4,5
H ₂ SO ₄	98,3	1,84	4,915			

Reacción 4. Síntesis del producto de glicolación de β -pineno: (1S,2R,5R)-2-(hidroximetil)-6,6-dimetilbiciclo [3.1.1] heptan-2-ol (A₄).

Reactivo	PM (g/mol)	d(g/mL)	V (mL)	mg ($\cdot 10^{-3}$)	mMol	P.P
β-pineno	136,24	0,859	0,16	136,24	1	1
KMnO ₄	158,034	-	-	158,034	1	1

2 g KMnO₄ $\longrightarrow$ 100 mL de solución

0,158 g KMnO₄ $\longrightarrow$ x= 7,9 mL

Reacción 5. Síntesis del producto de hidratación de β -pineno: (1S,2R,5R)-2,6,6-trimetilbiciclo [3.1.1] heptan-2-ol (A₅).

Reactivo	PM (g/mol)	d(g/mL)	V (mL)	mg ($\cdot 10^{-3}$)	mMol	P.P
β-pineno	136,24	0,859	0,16	136,24	1	1
H ₃ PO ₄	97,994	1,88	0,5	97,994	1	1

5 mL H₃PO₄ $\longrightarrow$ 100 mL de solución

0,5 mL H₃PO₄ $\longrightarrow$ x= 10 mL