

20/10/87

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



AISLAMIENTO Y DETERMINACION ESTRUCTURAL DE LOS
METABOLITOS SECUNDARIOS PRESENTES EN *Salvia longystyla*
(LABIATAE) Y *Chrysactinia mexicana* (COMPOSITAE).

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A

MARIA YOLANDA RIOS GOMEZ

MEXICO, D. F.

1987



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

C O N T E N I D O :

I).	INTRODUCCION	1
II).	ANTECEDENTES	4
III).	OBJETIVO	10
IV).	PARTE TEORICA	
	a). <i>Chrysactinia mexicana</i>	12
	b). <i>Salvia longystyla</i>	30
V).	PARTE EXPERIMENTAL	
	a). <i>Chrysactinia mexicana</i>	44
	b). <i>Salvia longystyla</i>	52
VI).	REACCIONES	62
VII).	RESUMEN Y CONCLUSIONES	68
VIII).	ESPECTROS	72
	IR (CHCl ₃) (+)-4 <u>S</u> -7-ácetoxi-p-ment-1-en-3-ona	73
	RMN ¹ H (CDCl ₃) (+)-4 <u>S</u> -7-acetoxi-p-ment-1-en-3-ona	74
	RMN ¹³ C (CDCl ₃) (+)-4 <u>S</u> -7-acetoxi-p-ment-1-en-3-ona	75
	IR (CHCl ₃) (+)-4 <u>S</u> -7-hidroxi-p-ment-1-en-3-ona	76
	RMN ¹ H (CDCl ₃) (+)-4 <u>S</u> -7-hidroxi-p-ment-1-en-3-ona	77

IR (CHCl ₃)	(+)-4 <u>S</u> -6-hidroxi-p-ment-1-en-3-ona	78
RMN'H (CDCl ₃)	(+)-4 <u>S</u> -6-hidroxi-p-ment-1-en-3-ona	79
IR (CHCl ₃)	(+)-4 <u>S</u> -p-ment-1-en-3-ona	80
RMN'H (CDCl ₃)	(+)-4 <u>S</u> -p-ment-1-en-3-ona	81
IR (CHCl ₃)	(+)-(3 <u>S</u> ,4 <u>S</u> ,6 <u>R</u>)-p-ment-1-en-3,6-diol	82
RMN'H (CDCl ₃)	(+)-(3 <u>S</u> ,4 <u>S</u> ,6 <u>R</u>)-p-ment-1-en-3,6-diol	83
RMN'H (CDCl ₃ + TAI)	(+)-(3 <u>S</u> ,4 <u>S</u> ,6 <u>R</u>)-p-ment-1-en-3,6-diol	84
IR (CHCl ₃)	Acido acetil oleanólico	85
RMN'H (CDCl ₃)	Acido acetil oleanólico	86

IX). BIBLIOGRAFIA 87

I N T R O D U C C I O N
= = = = =

El desarrollo del conocimiento científico y tecnológico adquirido por el ser humano a lo largo de su existencia, lo ubica actualmente en una posición única en la historia.

Es indudable que el hombre posee ahora mejores condiciones de vida, - sin embargo, existen ciertos problemas a los que, a pesar de las contribuciones modernas, no ha sabido dar solución definitiva. Tal es el caso de - la prevención y cura de ciertas enfermedades, las que han sido objeto de - continuo interés y cuyo estudio ha permitido la interrelación de diversas disciplinas, tales como la medicina, la farmacología, la química, la botánica, etc.

En un principio, la obtención de agentes terapéuticos se hacía a partir de los recursos naturales disponibles, entre los cuales destacaron por su amplia variedad y utilización los vegetales. Estos, en forma de extractos, emplastes, infusiones y muchas otras preparaciones de que fueron objeto, constituyeron el principio de la medicina moderna. El desarrollo de ésta se conforma de varias etapas. Inicialmente, los extractos obtenidos de las plantas se usaron como tales, posteriormente, con el avance en el concimiento de las técnicas de extracción y purificación se consiguió realizar el análisis de las sustancias constitutivas de las plantas en forma individual y con ello se les pudo clasificar de manera más acertada de -- acuerdo a su actividad terapéutica o la ausencia de ella. Con base en la - determinación estructural y el conocimiento de la relación estructura-actividad, se logró llevar a cabo la potencialización de la actividad de sustancias naturales mediante la modificación de su estructura molecular (bio

síntesis, biotecnología y semisíntesis), e inclusive se logró la obtención de sustancias de origen totalmente sintético con el mismo fin.

Sin embargo, la investigación fitoquímica continúa siendo de singular importancia, ya que existen sustancias activas cuya única fuente de obtención, o la más económica, la constituyen los vegetales. Más aún, existen - sustancias de gran importancia que se encuentran en los vegetales con rendimientos bajos y que resultan insuficientes para los requerimientos, pero que pueden ser utilizados como modelo para llevar a cabo su síntesis.

Por ello se hace necesario el conocimiento integral de los constituyentes químicos de la cubierta vegetal de nuestro país, ya que ésta representa un recurso natural cuya explotación racional incidirá positivamente en la vida económica de grandes regiones del país.

Existen muchos criterios bajo los cuales puede llevarse a cabo la selección del material vegetal a trabajar. Para este estudio en particular, se tomó en consideración el conocimiento de medicina popular que sobre las especies *Salvia longystyla* y *Chrysactinia mexicana* se tenía, con el fin de llevar a cabo el estudio de plantas que pudieran de alguna manera ofrecer perspectivas de uso en medicina.

A N T E C E D E N T E S
= = = = =

Las familias Compositae y Labiatae, a las cuales pertenecen *Chrysactinia mexicana* y *Salvia longystyla*, respectivamente, poseen cierta importancia por su uso farmacológico y económico¹⁻². Ambas familias se encuentran ampliamente distribuidas en nuestro país y han sido objeto de numerosos estudios desde diversos puntos de vista³⁻⁶. En particular, los estudios fitoquímicos recientes han generado información sobre la gran variedad estructural de los metabolitos secundarios presentes en ellas. Como consecuencia de esta variedad, se encuentra en ellas también gran diversidad de actividad biológica y terapéutica.

Así, algunas plantas de la familia Labiatae poseen actividad antibacteriana y antiviral, atribuida a la composición química de sus aceites -- esenciales, constituidos principalmente por compuestos fenólicos y monoterpénicos. Otras más se usan por su actividad espasmolítica, o bien, como sedantes y narcóticos¹.

Por otra parte, ciertas plantas de la familia Compositae son bacteriostáticas, virostáticos y fungistáticas², otras plantas son antihepatotóxicas, coleréticas y cianogénicas⁷ y algunas más son fuente de insecticidas naturales⁸.

De no menor importancia es la utilización de ciertas plantas de ambas familias como ornato, en la industria alimentaria y en la de cosméticos⁹.

Químicamente, existen semejanzas y diferencias en ambas familias. Es posible encontrar sustancias comunes y sustancias características en cada una de ellas. Así, los compuestos más característicos de la familia Labiatae por su frecuencia y abundancia relativa son los terpenoides, en particular, mono-, di- y triterpenos, cuya biogénesis ha sido ampliamente des

crita en la literatura¹⁰⁻¹¹. Por otro lado, las sustancias que caracterizan a la familia Compositae son las lactonas sesquiterpénicas, los diterpenos policíclicos y los acetilenos⁸. Los compuestos de tipo flavonoide se han aislado en los dos grupos de plantas.

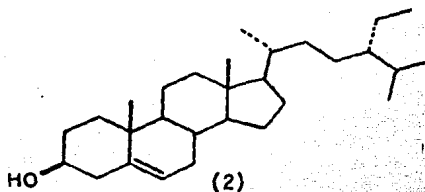
En particular, sobre *Chrysactinia mexicana*, se han publicado dos trabajos, los cuales describen que las sustancias 1,8-cineol (1) y β -sitos-terol (2)¹², así como los derivados del tiofeno (3, 4, 5 y 6) y el 3Z,6Z, 8E-dodecatrien-1-ol (7)¹³, son metabolitos secundarios de esta especie. Es interesante notar, que estos resultados difieren de los obtenidos en el -- presente estudio.

Por otro lado, *Salvia longystyla* no ha sido analizada previamente. -- Sin embargo, las especies de *Salvia* recientemente han sido motivo de estudio fitoquímico para diversos grupos de investigación. De los trabajos que se han publicado se pueden citar los de: *Salvia lavandulifolia* de donde se aislaron como metabolitos secundarios los ácidos ursólico (8) y oleanólico (9) y el galdosol (10)¹⁴; *Salvia nicolsoniana* cuya composición química está conformada por los ácidos betulínico (11), ursólico (8), oleanólico (9), 3 α -24-dihidroxi-olean-12-en-28-oico (12) y 3 α -24-dihidroxi-olean-12-en-28, 30-dioico (13)¹⁵; *Salvia oxyodon* de donde se obtuvieron los ácidos 3 β -dehidroabiético (14), 3 β -acetoxi-abieta-8(14)-en-18-oico-9 α ,13 α -endoperóxido (15) y 3 β -hidroxi-abieta-8(14)-en-18-oico-9 α ,13 α -endoperóxido (16)¹⁴; *Salvia sapinae* constituida por 4-hidroxi-7,4'-dimetoxi flavona (17), 5,4'-dihidroxi-7-metoxi flavona (18), 5,4'-dihidroxi-6,7-dimetoxi flavona (19) y los ácidos ursólico (8), oleanólico (9) y 2 α ,3 α -dihidroxi-olean-12-en-28-oico (20)¹⁶ y *Salvia argentea* cuyos dos metabolitos secundarios principales

son la 1R-hidroxi-20-nor-5(10),6,8,13-abieta tetraen-11,12-diona (21) y la 11,12-dihidroxi-20-nor-5(10),6,8,11,13-abieta pentaen-1-ona (22).¹⁷ Esta in formación se encuentra estructurada en la tabla 1.



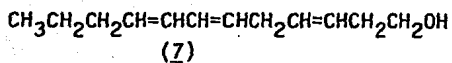
(1)



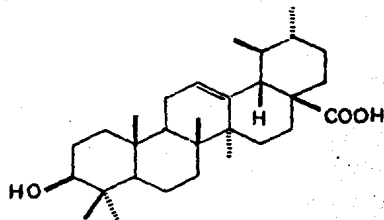
(2)

(3) R= CH=CH₂(4) R= CH₂-CH₂-OAc(5) R= CH₂-OAc-CH₂-OAc

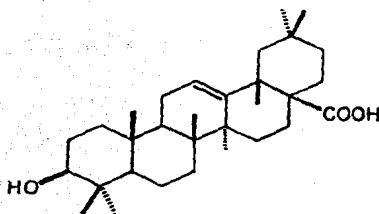
(6)



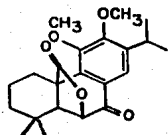
(7)



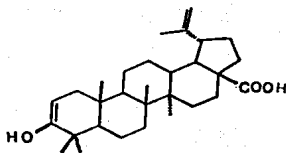
(8)



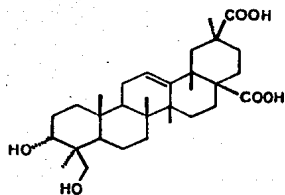
(9)



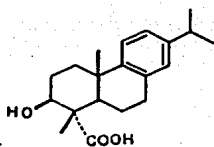
(10)



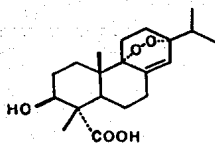
(11)

(12) R=CH₃

(13) R=COOH

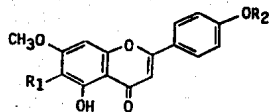
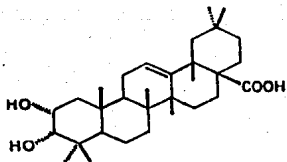


(14)

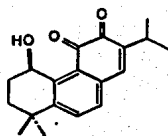


(15) R=H

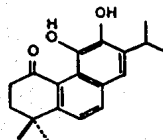
(16) R=Ac

(17) R₁=H R₂=CH₃(18) R₁=H R₂=H(19) R₁=OCH₃ R₂=H

(20)



(21)



(22)

ESPECIE	CONSTITUYENTES
<i>Salvia lavandulifolia</i> ¹⁴	Ac. ursólico (8) Ac. oleanólico (9) Galdosol (10) Ac. betulínico (11) Ac. ursólico (8) Ac. oleanólico (9) Ac. 3 α ,24-dihidroxi-olean-12-en-28-oico (12) Ac. 3 α ,24-dihidroxi-olean-12-en-28,30-dioico (13)
<i>Salvia nicholsoniana</i> ¹⁵	Ac. 3 β -dehidroabiético (14) Ac. 3 β -acetoxi-abieta-8(14)-en-18-oico-9 α ,13 α -endoperóxido (15) Ac. 3 β -hidroxi-abieta-8(14)-en-18-oico-9 α ,13 α -endoperóxido (16)
<i>Salvia oxyodon</i> ¹⁴	4-hidroxi-7,4'-dimetoxiflavona (17) 5,4'-dihidroxi-7-metoxiflavona (18) 5,4'-dihidroxi-6,7-dimetoxiflavona (19) Ac. ursólico (8) Ac. oleanólico (9) Ac. 2 α ,3 α -dihidroxi-olean-12-en-28-oico (20)
<i>Salvia sapinae</i> ¹⁶	1R-hidroxi-20-nor-5(10),6,8,13-abieta tetraen-11,12-diona (21) 11,12-dihidroxi-20-nor-5(10),6,8,11,13-abieta pentaen-1-ona (22)
<i>Salvia argentea</i> ¹⁷	

Tabla 1. Constituyentes químicos de algunas especies del género *Salvia*.

O B J E T I V O
== == == == == ==

Contribuir al conocimiento de los constituyentes químicos de dos plantas mexicanas: *Salvia longystyla* y *Chrysactinia mexicana* con base en el aislamiento, purificación y determinación de la estructura molecular de los metabolitos secundarios en ellas presentes.

PARTE TEORICA

a). *Chrysactinia mexicana*.

Las partes aéreas de *C. mexicana* fueron fragmentadas, desengrasadas - con hexano y maceradas con metanol. El extracto metanólico se sometió a una partición en agua-cloroformo y el residuo orgánico se resolvió en sus componentes por métodos cromatográficos como se describe en la parte experimental.

La resolución del extracto cloroformico en sus componentes permitió - la obtención de cinco sustancias (cuatro de consistencia aceitosa y una - cristalina), cuyas estructuras se establecen por métodos químicos, espec- troscópicos, espectrométricos y por comparación de datos reportados en la literatura para sustancias ya conocidas y relacionadas estructuralmente - con las aisladas.

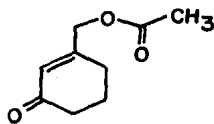
Para el establecimiento de la estructura molecular, se tomará como re ferencia la segunda sustancia obtenida en orden creciente de polaridad, - de la cual se obtuvo mayor información espectroscópica. La elucidación es- tructural de los demás compuestos se fundamentará principalmente por corre lación con los datos aportados por esta sustancia.

Este compuesto es ópticamente activo $[\alpha]_D^{25} = (+) 8.3$ (12 mg/ 10 ml me- tanol) y de peso molecular 210, establecido por espectrometría de masas. - En el espectro de IR (Espectro 1), se observa una señal intensa en $1667 - \text{cm}^{-1}$ que revela la presencia de un carbonilo conjugado, y en 1743 cm^{-1} se observa la absorción de un segundo grupo carbonilo, por lo que la molécula posee al menos dos átomos de oxígeno. La absorción en el UV ($\lambda_{\text{máx}} 228 \text{ nm}$, $\epsilon=12,775$) confirma la presencia de una enona conjugada. La existencia de - un acetato es manifiesta por el singulete que se observa en $\delta 2.15$, que in- tegra para tres protones en RMN'H (Espectro 2), por lo que la absorción en

1743 cm^{-1} en el IR corresponde a esta funcionalidad, y se concluye que la molécula posee tres oxígenos. Por otro lado, la integración total del área bajo la curva en el espectro de RMN¹H indica la presencia de 18 hidrógenos. Esta información, en conjunción con los datos de la espectrometría de masas permite deducir la fórmula molecular $\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{O}_3$ para este compuesto, lo que indica la existencia de cuatro insaturaciones en la molécula, tres de las cuales se encuentran justificadas por la presencia de los dos carbonilos y el doble enlace antes mencionados, por consiguiente, la cuarta insaturación corresponde a la presencia de un ciclo.

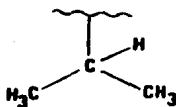
El ciclo arriba mencionado debe corresponder a una ciclohexenona conjugada, ya que esta estructura es la única consistente tanto con la absorción en 1667 cm^{-1} , como con la intensidad de esta banda en el IR (un anillo de cinco miembros absorbería a mayor longitud de onda y un anillo de siete miembros mostraría una banda de menor intensidad)¹⁸.

La naturaleza del doble enlace trisustituido es manifiesta por la presencia de sólo un protón vinílico, el cual resuena en $\delta 5.95$, y que por su desplazamiento químico se deduce es vecinal al carbonilo cetónico. Por otro lado, la señal centrada en $\delta 4.67$ que integra para dos protones, revela la presencia de un metileno alílico que por su desplazamiento químico debe ser la base del acetato. Esta discusión permite proponer la fórmula parcial **A** como base de la estructura.



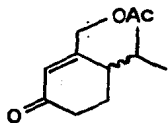
(A)

El par de dobletes en $\delta 0.96$ y $\delta 0.89$ ($J=7\text{Hz}$), que integra para tres -- protones cada uno, revela la presencia de un gem-dimetilo sobre carbono -- terciario, lo que se indica en la fórmula parcial B.

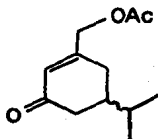


(B)

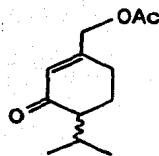
La combinación de los fragmentos A y B permite proponer tres estructuras posibles, las cuales se muestran en el esquema I.



(1)



(2)



(3)

Esquema I

Las estructuras 1 y 2 del esquema I se eliminan por argumentos biogénéticos, ya que la estructura 3 es la única que está de acuerdo con la regla del isopreno¹⁹, y corresponde a la 7-acetoxi-piperitona (23).

La estructura propuesta se confirma con la información proporcionada - por los espectros de desacoplamiento total y parcial de RMN¹³C (Espectro 3). Estos espectros muestran un total de once señales, que por su desplazamiento químico y su multiplicidad son atribuibles a dos carbonilos, uno de cetona (δ 200.37, C-3) y uno de éster (δ 170.11, C-11); dos carbonos vinílicos correspondientes a un doble enlace trisustituído (δ 156.72, C-1) y (δ 125.06, C-2); un carbón base de oxígeno (δ 65.03, C-7); dos metinos (δ 52.38, C-4) y (δ 25.80, C-8); dos metilenos (δ 26.00, C-6) y (δ 22.96, C-5) y tres metilos (δ 20.59, C-12) y (δ 18.59, C-9 y C-10 superpuestos).

Las asignaciones mencionadas anteriormente se hicieron en base a datos reportados en la literatura y a la teoría general del desplazamiento químico²⁰⁻²¹ y se muestran en la figura 1.

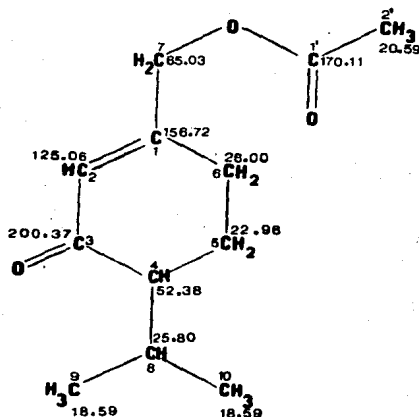
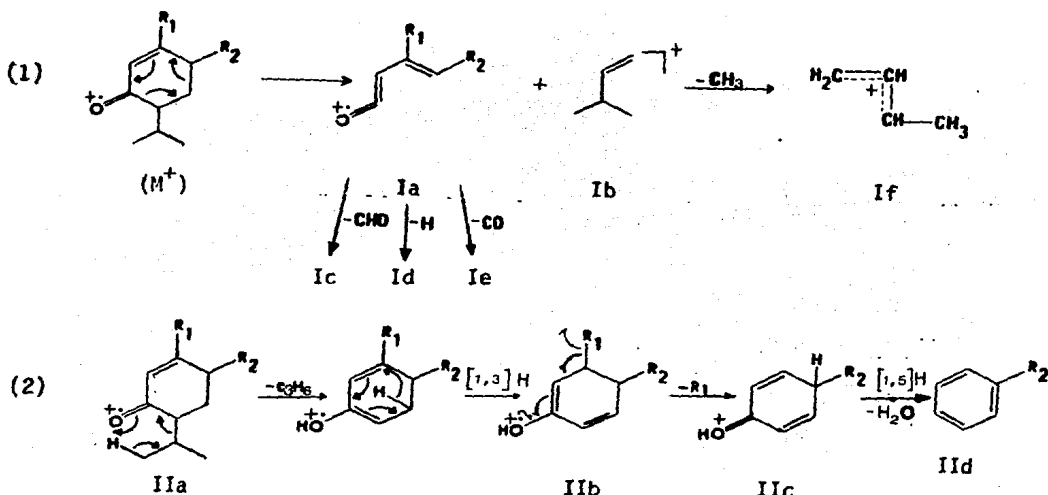


Figura 1. Asignaciones de los datos de RMN¹³C de 7-acetóxi-piperitona (23).

El patrón de fragmentación para este tipo de sustancias es explicable por medio de una ruptura retro-Diels Alder en el anillo (Mecanismo 1) y por una fragmentación del isopropilo con pérdida de hidrógeno (Mecanismo 2) como se muestra en el esquema II. Los valores de m/e para cada uno de los fragmentos generados se encuentran tabulados en la tabla 2.

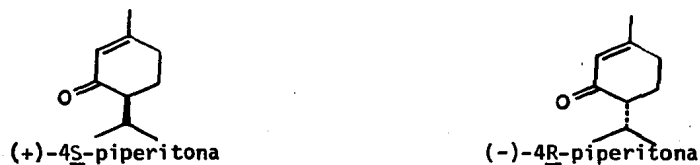


Esquema II

Compuesto	Ia	Ib	Ic	Id	Ie	If	IIa	IIb	IIc	IIId
(1) $R_1=CH_3$ $R_2=H$	82	70	41	81	54	55	110	95	77	92
(2) $R_1=CH_3$ $R_2=OH$	98	70	69	97	70	55	126	111	93	108
(3) $R_1=CH_2OH$ $R_2=H$	98	70	69	97	70	55	126	111	93	108
(4) $R_1=CH_2OAc$ $R_2=H$	139	70	111	139	70	55	168	108	77	150

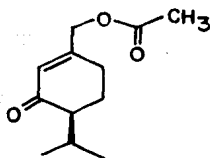
Tabla 2

La configuración de C-4 de 3 se establece por comparación de los valores de rotación óptica reportados en la literatura para los dos enantiómeros de la piperitona: 4R-piperitona es levorrotatoria, y por lo tanto, --4S-piperitona es dextrorrotatoria²², como se muestra en el esquema III.



Esquema III

La 7-acetoxi-piperitona aislada de *C. mexicana* es dextrorrotatoria, y asumiendo que el sustituyente en C-7 no contribuye significativamente a la rotación óptica, la quiralidad del producto natural se establece como 4S. El nombre completo para esta substancia queda definido como (+)-4S-7-acetoxi-piperitona ó bien, (+)-4S-7-acetoxi-p-ment-1-en-3-ona (23).

(23)

Este compuesto ha sido reportado en la literatura como producto de la reacción de acetilación de 7-hidroxi-piperitona, la cual, es obtenida como uno de los productos de la biotransformación de la piperitona 26 por ciertas

especies de hongos²³⁻²⁴. Sin embargo, esta es la primera ocasión que se aíla y caracteriza como producto natural.

Uno de los compuestos más polares de la serie, muestra en su espectro de RMN'H (Espectro 4) gran similitud al del compuesto 23 recién descrito. Las diferencias entre ambos espectros son las siguientes:

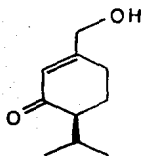
(a). El desplazamiento a campo alto del oximetileno alílico ($\Delta\delta_{4.67-4.22} = 0.45$).

(b). El desplazamiento a campo bajo del protón vinílico ($\Delta\delta_{5.95-6.06} = -0.11$).

(c). La ausencia en esta última substancia de la señal correspondiente al metilo del acetato.

Todas estas diferencias se explican por la ausencia del grupo acetilo en esta última molécula y permite proponer la estructura 24, denominada --7-hidroxi-piperitona, para este producto natural, la cual es consistente con la absorción en el IR (Espectro 5) del grupo hidroxilo (3615 cm^{-1}), -- con el peso molecular de 168 observado en la espectrometría de masas y con la absorción en el UV ($\lambda_{\text{máx}} 228 \text{ nm}$; $\epsilon=10,108$).

La reacción de acetilación en condiciones normales de esta substancia produce el acetyl derivado correspondiente, el cual es idéntico en Rf, color desarrollado en el análisis por CCF, propiedades espectroscópicas y ópticas al producto natural 23, descrito en la primera parte de esta discusión. Esta correlación química confirma la estructura 24 [(+)-4S-7-hidroxi piperitonā] para este producto natural, siendo también esta la primera ocasión que se reporta como producto natural.

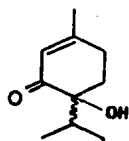


(24)

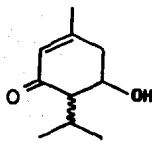
El tercer compuesto obtenido en orden creciente de polaridad, presenta, además de las señales características para enona conjugada en IR, RMN'H (Espectros 6 y 7 respectivamente) y UV, una señal en el espectro de IR en 3602 cm^{-1} , característica de grupo hidroxilo. En el espectro de RMN'H presenta además, con referencia a 23:

- (a). Desplazamiento a campo alto de la señal para el protón vinílico ($\Delta 5.95-5.75=0.20$).
- (b). Desplazamiento a campo alto para los protones en C-7 ($\Delta 4.22-1.75=2.47$) y
- (c). La presencia de una señal como doble de doble que por su desplazamiento químico ($\delta 3.86$) debe corresponder a un protón base de oxígeno y por su multiplicidad debe estar vecino a dos protones diferentes magnéticamente.

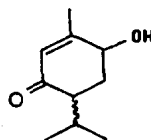
El peso molecular para esta substancia, obtenido por espectrometría de masas es de 168, lo que indica que es un regioisómero de la estructura 24 - ya discutida anteriormente. De acuerdo a estos argumentos el hidroxilo puede estar ubicado en C-4, C-5, C-6, C-8 y C-9 (C-10), posiciones representadas en las fórmulas 1-6 del esquema IV.



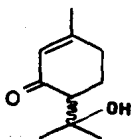
(1)



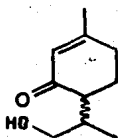
(2)



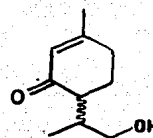
(3)



(4)



(5)



(6)

Esquema IV

La naturaleza terciaria del hidroxilo en la molécula (formulas 1 y 4) se descarta por las siguientes evidencias:

(a). Formación de un acetyl derivado, el cual se obtiene en condiciones normales.

(b). La presencia de los dos dobles centrados en $\delta 0.83$ y $\delta 0.81$ en -RMN'H (Espectro 4), que indica la presencia del gem-dimetilo en C-8.

Esta última evidencia, también excluye la ubicación de la función oxigenada en C-9 (o en el carbono equivalente C-10), por lo cual las posibilidades regioisoméricas se reducen a las representadas en las fórmulas 2 y 3.

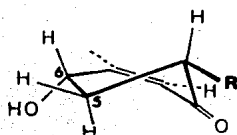
Las estructuras 2 y 3 se discriminan en base a la multiplicidad y desplazamiento químico que muestra el protón geminal al hidroxilo en RMN'H. Para 2 se observaría una señal doble de doble de doble (ocho líneas), mientras que para 3 se observaría un doblete dobleteado (cuatro líneas). Por otro lado, el protón base del hidroxilo de 3 debe encontrarse a campo más bajo debido a su naturaleza alílica.

En efecto, tanto la multiplicidad (dd), como el desplazamiento químico (δ 3.86) observados para el protón geminal al hidroxilo permiten establecer la estructura 3 para el producto natural aislado de *C. mexicana*.

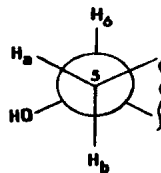
Existen cuatro estereoisómeros con la fórmula estructural 3, sin embargo, para simplificar la discusión, se asumirá *a priori* la configuración 4S - de la molécula, ya que es esta la estereoquímica en las dos sustancias naturales descritas previamente, y a que esta sustancia, al igual que las anteriores, también es dextrorrotatoria.

La orientación α ó β del hidroxilo (cis o trans respectivamente, en relación al isopropilo en C-4), se establece mediante el análisis de las constantes de acoplamiento del protón base del hidroxilo, el cual se describe a continuación.

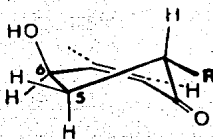
Tomando en consideración que la conformación preferida de la ciclohexona conjugada es aquella en la que el isopropilo tiene orientación ecuatorial, se deducen las representaciones A y B para las dos orientaciones posibles (α y β) del hidroxilo (Esquema V).



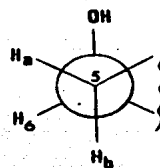
(A)



(a)



(B)

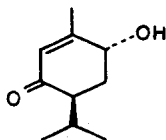


(b)

Esquema V

Las proyecciones de Newman para el enlace C_5-C_6 de A muestra ángulos diedros de 60° y 180° de H_6 con H_a y H_b respectivamente. Por otro lado, la misma proyección para B muestra ángulos diedros similares (60°) de H_6 con H_a y H_b . El valor observado de las constantes de acoplamiento $J_{5a,6}; J_{5b,6}$ de 5,5Hz, indica claramente la relación estereoquímica representada en la figura B, para el producto natural, correspondiente a la relación trans.

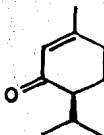
Por lo tanto, esta molécula se denomina (+)-(4S, 6R)-6-hidroxi-piperitona ó bien (+)-(4S, 6R)-6-hidroxi-p-ment-1-en-3-ona (25). Esta substancia también constituye un nuevo producto natural.



(25)

El compuesto menos polar obtenido, es ópticamente activo $[\alpha]_D^{25} = (+) 11.6$ (9.5 mg/ 10 ml metanol), tiene un peso molecular de 152 establecido por espectroscopía de masas. La información obtenida de los espectros de IR, RMN'H (Espectros 8 y 9) y UV, indica la estructura base de la ciclohexenona conjugada. La presencia en RMN'H de un singulete amplio ($W_{1/2} = 4\text{Hz}$) que integra para tres protones en $\delta 1.95$, manifiesta la existencia de un metilo vinílico (C-7), que está de acuerdo con el desplazamiento a campo alto del protón vinílico con respecto a 23 ($\Delta\delta 5.95 - 5.79 = 0.16$). Esta discusión establece la estructura de la piperitona (Figura 26) para este producto natural. El valor positivo de la rotación óptica define la configuración S del centro quiral en C-4, de acuerdo con los valores previamente descritos²⁵⁻²⁶.

Esta substancia ha sido aislada previamente del aceite de *Eucalyptus dives*, *Eucalyptus piperita*²², *Mentha pulegium*, *Mentha piperita* y *Mentha arvensis*²³ entre otras especies.



(26)

El compuesto de mayor polaridad de los aislados en el presente trabajo tiene estructura cristalina, por lo que su purificación final se realizó por recristalizaciones sucesivas.

Esta sustancia muestra en el espectro de IR (Espectro 10) absorciones para grupos hidroxilo (3690 y 3602 cm^{-1}) y doble enlace (1602 y 863 cm^{-1}). El espectro de RMN'H (Espectro 11) muestra los parámetros característicos - que se han descrito para este grupo de sustancias y que son:

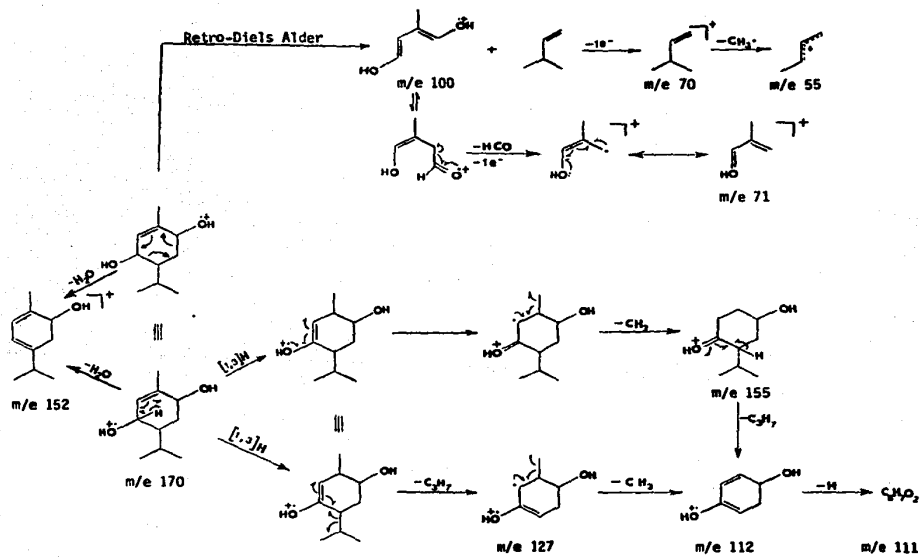
- (a). La señal en $\delta 5.5$ correspondiente al protón vinílico H_2 .
- (b). Un singlete amplio en $\delta 1.78$ ($W_{1/2} = 4\text{Hz}$) asignable al metilo vinílico.
- (c). La presencia de un grupo isopropilo, manifiesta por el par de dobletes centrados en $\delta 0.96$ y $\delta 0.83$ que integran para tres protones cada uno.

Es observable en $\delta 3.96$ una señal compleja que integra para dos protones, que de acuerdo a su desplazamiento químico debe corresponder a protones geminales a función oxigenada. Estos son grupos hidroxilo, ya que al -

adicionar a la muestra isocianato de tricloroacetilo (TAI) se obtiene, -- in situ, el bis-tricloro acetil carbamato correspondiente de acuerdo a la integración para los protones carbámicos, los cuales resuenan en $\delta 8.35$.

La isocronía en la resonancia de los protones base de oxígeno indica el ambiente electrónico similar de ambos. La ubicación de los hidroxilos - en las posiciones 3 y 6 satisface este requisito ya que los dos quedan en posición alílica (Espectro 12).

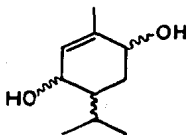
Esta ubicación está de acuerdo con el patrón de fragmentación observado en el espectro de masas, el cual se muestra en el esquema VI.



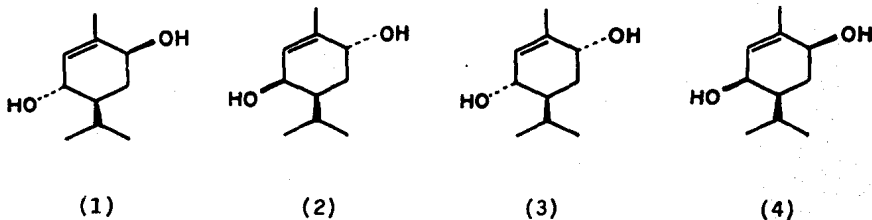
Esquema VI. Patrón de fragmentación para (+)-(3S,4S,6R)-p-ment-1-en-3,6-diol.

La presencia de los picos con relación m/e 100 y m/e 70 se explican - por una reacción retro-Diels Alder. Por otro lado, el ión de m/e 152 proviene de la pérdida de una molécula de agua y el ión m/e 127 corresponde a la pérdida del isopropilo.

Por tanto, la estructura propuesta para este producto natural es:

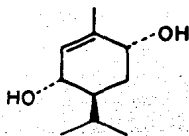


Dado que los cuatro compuestos anteriormente discutidos han presentado configuración S para el centro quiral en C-4, puede suponerse esta misma configuración en este centro para la estructura en discusión. De esta manera, existen cuatro posibles estereoisómeros para la estructura, los cuales se muestran en el esquema VII.



Esquema VII

La configuración de los centros C-3 y C-6 para el compuesto 27 puede establecerse con base en la comparación de sus propiedades físicas y espectroscópicas, con las reportadas en la literatura para los compuestos con fórmulas 1-4 (Esq VII)²⁷⁻²⁹. De esta manera se puede establecer la similitud de los mismos con los del compuesto 3. Así, los hidroxilos se encuentran en posición cis- uno con respecto al otro y trans- respecto al isopropilo de C-4. La estructura deducida así para este producto natural es:



(27)

cuyo nombre es (+)-(3S, 4S, 6R)-p-ment-1-en-3-diol, aislado anteriormente de las partes aéreas de *Eupatorium macrocephalum*³⁰.

P A R T E T E O R I C A

b). *Salvia longistyla.*

De la planta *S. longystyla* se aislaron seis compuestos después de la separación y purificación por cromatografías sucesivas como se indica en la parte experimental.

La determinación estructural para estos compuestos se basó en los siguientes argumentos:

(a). Propiedades físicas, espectroscópicas y espectrométricas para el producto natural.

(b). Reacciones químicas de caracterización.

(c). Propiedades físicas, espectroscópicas y espectrométricas para -- los derivados obtenidos.

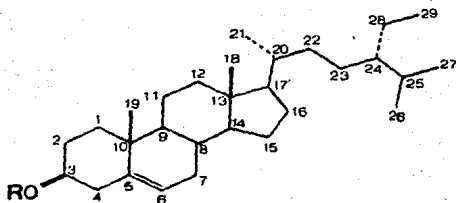
(d). Comparación de los datos antes mencionados con los reportados en la literatura y

(e). La información sobre el tipo de compuestos aislados previamente de algunas especies de la familia Labiatae.

El estudio de la información obtenida permitió determinar que los --- seis compuestos aislados en el presente estudio corresponden a la serie de los triterpenos, dos de ellos derivados del lanostano, uno del lupano y -- los tres restantes de la estructura de la amirina.

El primer compuesto aislado y el de menor polaridad, fué caracterizado con base en el análisis anteriormente descrito y en la comparación directa con una muestra auténtica por análisis por CCF, como β -sitosterol (2), compuesto ya conocido y ampliamente distribuido en las plantas superiores.

Por similitud entre los datos obtenidos para la espectroscopía de esta sustancia 2 con los datos para la sustancia de mayor polaridad de las ais-
 ladas a partir de *Salvia longystyla* y específicamente en los espectros de -
 IR en las bandas de absorción localizadas en: [2(28)] 2959(2962), 2938(2935),
 2869(2869), 1464(1463), 1380(1376), 1044(1076) y 1019(1024) cm^{-1} y de RMN¹H
 en la zona de campo alto en las señales con δ 0.99(1.00), δ 0.87(0.87), δ 0.85
 (0.84), δ 0.79 (0.79), δ 0.76(0.76), δ 0.68(0.67), se caracterizó el β -D-glucó-
 sido de β -sitosterol (28). Su estructura se confirmó por la obtención del -
 per-acetil derivado correspondiente. Los parámetros físicos y espectroscó-
 picos para estas dos sustancias se describen en la parte experimental.



(2) R=H

(28) R= β -D-Glucopiranososa

Los cuatro compuestos siguientes pertenecen a la serie de los triterpenos pentacíclicos. Es importante señalar que este tipo de compuestos presenta en su espectro de masas un patrón de fragmentación característico, - que permite identificar los diferentes esqueletos base³¹.

El tercer compuesto, obtenido de la recromatografía de la fracción 3 (Ver parte experimental), presentó el patrón de fragmentación característico para la estructura base del lupano³¹ (Figura 2). En particular los fragmentos con relación m/e 207, 248 y 249 indican ácido carboxílico e hidroxilo para los sustituyentes R₁ y R₂ respectivamente, con base en las rupturas indicadas en el esquema VIII.

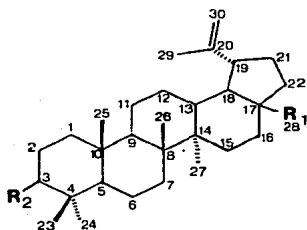
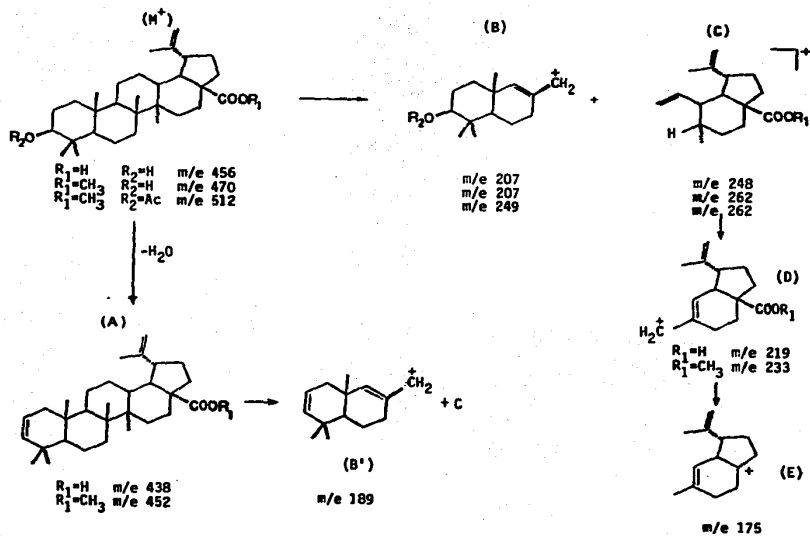


Figura 2

De acuerdo con la funcionalidad propuesta, el espectro de IR presenta absorciones características de ácido (banda ancha en 3435 cm^{-1}), grupo carbonilo (1700 cm^{-1}) y doble ligadura (1454 cm^{-1}).

La existencia en el espectro de RMN¹H de dos señales como singuletes - amplios ($W_{1/2}=5\text{Hz}$) con $\delta 4.63$ y $\delta 4.53$ que integran para un protón cada uno, pone de manifiesto la presencia de dos protones vinílicos en la molécula, - localizados en C-30, lo que es consistente con el patrón de fragmentación observado.



Esquema VIII. Patrón de fragmentación para derivados del lupano³¹.

Un singulete, con integración para tres protones en $\delta 1.65$, es atribuible a un metilo terciario. Esta señal, por estar desplazada a campo bajo, - permite establecer la vecindad de este grupo metilo a un grupo electroatrac tor. Esta información coincide con las características estructurales para - el metilo vinílico C-29.

La existencia de cinco metilos terciarios adicionales en la molécula, es indicada por la presencia de cuatro señales singulete entre $\delta 0.94$ y -- $\delta 0.79$ que integra para un total de 15 protones.

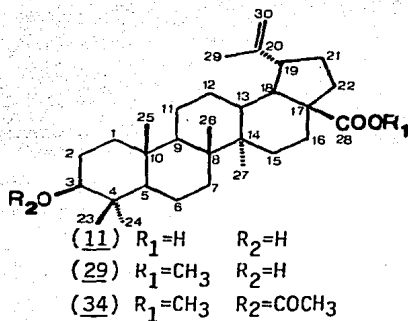
La molécula posee un grupo hidroxilo, como se ha establecido previa-- mente, el cual debe ser secundario, ya que se observa una señal dd centra- da en $\delta 3.05$ que se desplaza a campo bajo en el acetyl derivado descrito -- posteriormente, por lo cual, esta señal corresponde al protón geminal de - la función oxigenada.

La reacción de este producto natural con diazometano (Ver técnica en la parte experimental), permitió obtener el éster metílico correspondiente y confirmar químicamente la presencia del grupo carboxílico.

En el espectro de IR para el derivado metilado, es observable una ban- da para hidroxilo (3611 cm^{-1}) antes oculta por la banda ancha del ácido. - En la RMN¹H aparece nuevamente la señal del protón base de oxígeno (hidro- xilo) en $\delta 3.16$ que presumiblemente, por razones biogénéticas, se localiza en C-3. A campo alto, se observa un conjunto de señales simples, atribuidas a los metilos terciarios y una señal adicional en $\delta 3.64$ asignada al grupo _ metoxilo.

El aumento en 14 unidades de masa con respecto al producto natural, -- permite afirmar que este último sólo posee una función ácida, ubicada en -- C-17 de acuerdo al fragmento C del esquema VIII. Esta información sugiere -- la identidad con el ácido betulínico (11) de este producto natural.

Esta proposición se confirma con la obtención del acetyl derivado 34 -- del éster metílico 29.



El tercer tipo de los compuestos aislados corresponde a los triterpenos pentacíclicos derivados de la amirina (Figura 3), de acuerdo al patrón de fragmentación característico para estos compuestos y mostrado en el esquema IX³¹.

Cabe mencionar que la amirina tiene dos variantes estructurales, la estructura base del oleanano (Figura 4) y la del ursano (Figura 5). Existen dos diferencias entre ambas moléculas:

(1). En el anillo E, los derivados del ursano presentan dos metilos secundarios, uno en la posición C-19 y otro en C-20, mientras que, los derivados del oleanano tienen los correspondientes metilos localizados en C-20. Esta diferencia es observable en el espectro de RMN'H: los metilos secundarios del ursano se presentarán generalmente como dobletes y los terciarios del oleanano como singulete.

(2). En el caso del ursano, el protón en C-18 tiene vecinos en C-19 - un protón y un metilo y se presentará en el espectro de RMN'H generalmente como doblete. En el oleanano, C-19 presenta dos protones y la señal para el protón en C-18 será un dd.

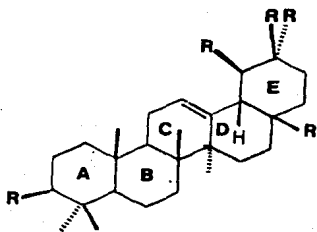


Figura 3

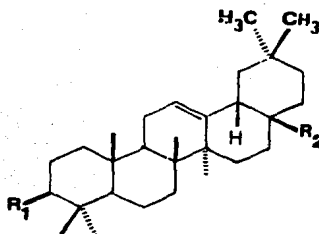


Figura 4

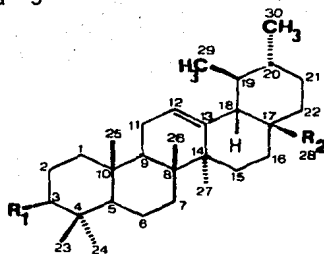


Figura 5

Tomando en consideración estos antecedentes, el compuesto aislado de la recromatografía de la fracción 5, muestra en su espectro de IR bandas características para ácido carboxílico (banda ancha de 3422 a 2480 cm^{-1}): doble ligadura (1461 cm^{-1}) y gem-dimetilo (1387 cm^{-1}). La banda en 948 cm^{-1} en el mismo espectro revela la presencia de una doble ligadura.

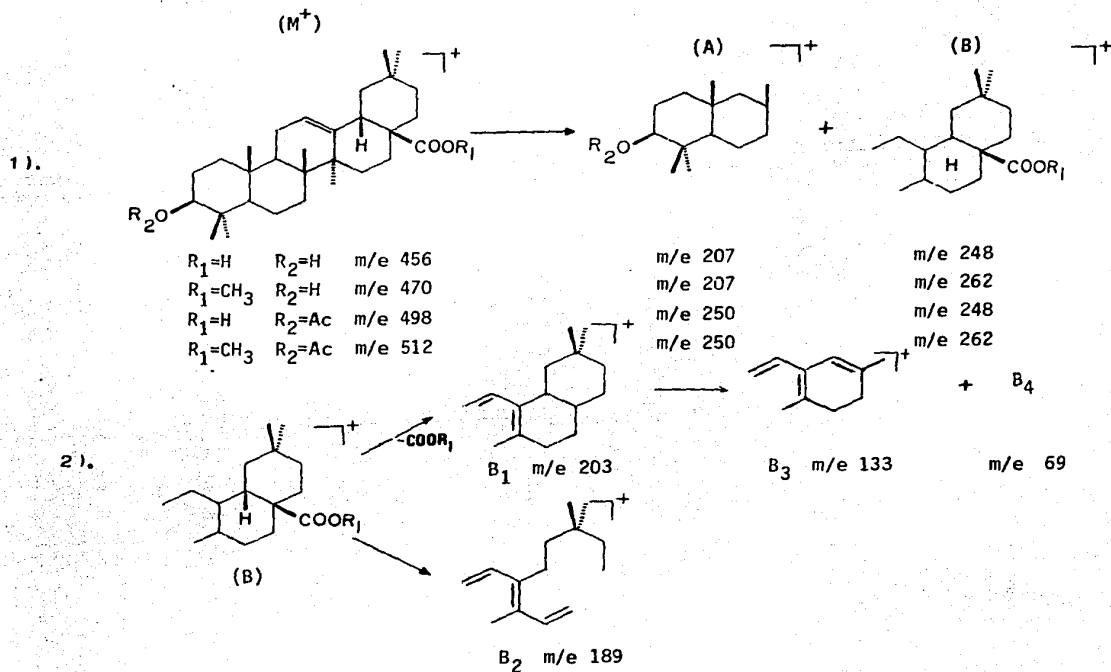
El estudio del espectro de RMN¹H en la zona de aparición de los metilos, indica la presencia de seis señales singuletes (de δ 1.24 a δ 0.72), que integran para un total de 21 protones, lo que indica la existencia de siete metilos, todos ellos de tipo terciario, por lo cual podemos suponer que el compuesto descrito presenta la estructura base del oleanano (Figura 4).

El doble de doble situado en δ 2.85 con $J=5,5\text{Hz}$, es atribuible al protón en C-18. La señal centrada en δ 5.18 que integra para un protón, la cual aparece también como doble de doble con $J=3,3\text{Hz}$, es asignable a un protón vinílico, localizable en el C-12 de la estructura.

Un protón sobre un átomo de carbono base de oxígeno es manifiesto por la señal en δ 3.20, que por su multiplicidad (doble de doble) debe estar vecino a dos protones diferentes magnéticamente.

De acuerdo a la biosíntesis para estos triterpenos, este oxígeno se localiza en la posición 3 como un grupo hidroxilo ($R_1=\text{OH}$)¹⁰. El valor de $J=7,10\text{Hz}$, indica la orientación β de este grupo funcional.

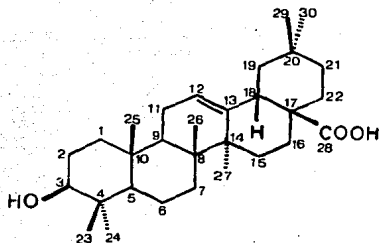
La naturaleza del grupo R_2 en C-17 es revelada por la señal del ácido carboxílico en el espectro de IR (3422 a 2480 cm^{-1}), y por el fragmento B del patrón de fragmentación de este tipo de sustancias, el cual se muestra en el esquema IX ($R_2=\text{COOH}$).



Esquema IX. Patrón de fragmentación para derivados del oleanano.

Este mismo espectro muestra un ión molecular con relación m/e 456, el cual corresponde a la fórmula molecular $C_{30}H_{48}O_3$. El análisis de este espectro permite afirmar que los picos para los iones moleculares característicos de esta sustancia, se originan vía una reacción de retro-Diels-Alder en el anillo C de la molécula, posible por la presencia de la insaturación $C_{12}-C_{13}$.

La identificación de todos estos picos es posible al analizar el espectro de masas, por lo que la estructura deducida para este producto natural corresponde al ácido oleanólico (9).



(9)

La preparación del correspondiente éster metílico permitió la obtención de un sólido blanco de pf 271-273°C. El espectro de IR indica la misma funcionalidad en la molécula, con ausencia únicamente de la señal correspondiente al ácido carboxílico. La RMN¹H presenta además de las señales -- discutidas la presencia de una señal fina como singulete en δ 3.6 atribuible a los protones del metilo del éster.

El espectro de masas para este derivado presenta los picos característicos con relación m/e 470 (M^+), 207 (Fragmento A), 262 (Fragmento B), 203 (Fragmento B_1), 189 (Fragmento B_2), 133 (Fragmento B_3), 69 (Fragmento B_4) y 58 (Fragmento $-COOCH_3$ generado en la descarboxilación del paso 2). Los fragmentos correspondientes a estos picos se representan en el Esquema IX.

Los datos físicos y espectroscópicos para este derivado corresponden al oleanolato de metilo (32, $R_1=OH$, $R_2=COOCH_3$).

Otro de los compuestos aislados, muy relacionado estructuralmente con el producto natural 9, descrito previamente, con base en la similitud de -- sus datos espectroscópicos, fué obtenido en la fracción 2. Este compuesto se obtuvo en forma de cristales blancos de pf 253-255°C. Su espectro de IR - (Espectro 13) permite establecer la presencia de grupo hidroxilo (3615 cm^{-1}); doble ligadura (3023 y 1464 cm^{-1}); ácido carboxílico (banda ancha de 3280 a 2560 cm^{-1}); grupo carbonilo (1721 cm^{-1}); gem- dimetilo (1370 cm^{-1}) y doble ligadura (984 cm^{-1}) en la molécula.

En el espectro de RMN'H (Espectro 14) es observable, en similitud al - compuesto 9, el protón vinílico C-12 ($\delta 5.25$), cinco señales singuletes con integración total de 21 protones indican la presencia de siete metilos terciarios ($\delta 1.12$ a $\delta 0.75$).

El desplazamiento a campo alto del protón base de oxígeno en C-3 --- ($\Delta\delta 4.45-3.20=1.25$) con respecto a 9, y la presencia de una señal adicional como singulete en $\delta 2.03$, permite establecer la naturaleza de R_1 como grupo

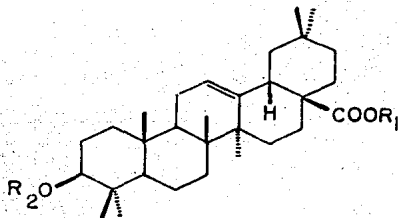
acetato ($R_1 = \text{OCOCH}_3$). Esta estructura corresponde al ácido acetil oleanólico (30).

Esta sustancia puede obtenerse por reacción de ácido oleanólico -- con anhídrido acético en piridina, sin embargo, esta es la primera ocasión que se obtiene como producto natural.

El espectro de masas es consistente con esta proposición, ya que permite la localización de los picos característicos con relación m/e 498 (M^+); 250 (Fragmento A); 248 (Fragmento B); 203 (Fragmento B_1); 189 (Fragmento - B_2) y 133 (Fragmento B_3). (Esquema IX).

El tratamiento con diazometano de esta sustancia permite obtener el éster metílico correspondiente (31), el cual resultó idéntico al producto de acetilación del oleanolato de metilo (32).

Esta correlación química confirma la estructura 30 para este producto natural.



(30) $R_1 = \text{H}$ $R_2 = \text{Ac}$

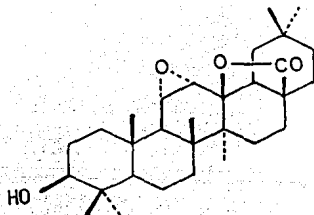
(31) $R_1 = \text{CH}_3$ $R_2 = \text{Ac}$

(32) $R_1 = \text{CH}_3$ $R_2 = \text{H}$

Finalmente, el análisis de las características espectroscópicas (IR, RMN'H) y espectrométricas (EM) de la sustancia obtenida de la recromatografía de la fracción 4, estableció la estructura base del oleanano.

La ausencia de la señal para el protón vinílico en C-12 en el espectro de RMN'H, la ausencia del grupo -COOH y la señal en 1766 cm^{-1} , establecen la presencia de una C-28 \rightarrow C-13 γ -lactona. Por otro lado, la señal en $\delta 3.50$ en este mismo espectro y la banda en 870 cm^{-1} en el espectro de IR, indican la existencia de un epóxido disustituído vecinalmente, que si se ubica en C₁₁-C₁₂, corresponde a la estructura de la 11 α ,12 α -epoxi-lactona oleanónica (33).

La comparación directa de esta sustancia con una muestra auténtica - confirmó la identidad de la misma. Por lo tanto la sustancia 33 es un producto natural de *S. longistyla*.



(33)

P A R T E E X P E R I M E N T A L

a). *Chrysactinia mexicana*.

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fisher-Jones y no están corregidos. Las cromatografías en columna se efectuaron en Sílica--gel 60 Merck (70-230 mesh ASTM). La pureza de los productos y el desarrollo de las reacciones se siguió por cromatoplaqa de sílica-gel Merck F-254 usando como revelador sulfato cérico al 1% en ácido sulfúrico 2N. Los espectros de IR fueron corridos en solución de CHCl_3 . Los espectros de RMN¹H se determinaron en un aparato FT-80A Varian en solución de CDCl_3 , C_6D_6 y $\text{-CDCl}_3 + \text{TAI}$, los desplazamientos químicos están reportados en ppm referidos al tetrametilsilano como referencia interna. El espectro de RMN¹³C se efectuó en el espectrómetro FT-80 (20 MHz), tomando la misma referencia. Los espectros de masas se determinaron en un espectrómetro Hitachi Perkin-Elmer RMU 6D de doble foco.

La planta *Salvia longystyla* fué identificada por el profesor Esteban Manuel Martínez del Instituto de Biología de la UNAM, a quien expresamos - nuestro agradecimiento por su colaboración.

3.5 Kg de la planta *Chrysactinia mexicana* fueron recolectados en el estado de Hidalgo. La planta se dejó secar a temperatura ambiente, obteniéndose 700 g de planta seca, la cual, previamente fragmentada, se desengrasó con hexano y se maceró con metanol para llevar a cabo una extracción total. Para eliminar los azúcares y compuestos hidrosolubles extraídos por el metanol, se llevó a cabo una partición agua-cloroformo, conservándose la fase clorofórmica, que se concentró hasta sequedad.

El residuo clorofórmico así obtenido (14.2 g) se cromatografió, adsorbiéndose previamente en 15 g de sílice y aplicándose después en una columna de vidrio empacada con 450 g de sílice suspendida en cloroformo. La columna se eluyó inicialmente con cloroformo 100% y se usó un gradiente de polaridad con mezclas de cloroformo-acetona (9:1, 7:3, 1:1), terminando la elución con acetona 100%.

Algunas fracciones obtenidas con cloroformo-acetona (9:1) se reunieron obteniéndose un residuo constituido por una mezcla de cinco sustancias de acuerdo al análisis por cromatografía en capa fina (CCF). Para llevar a cabo la separación de las mismas, el extracto (4 g) se aplicó directamente a una columna empacada con 120 g de sílice (desactivada al 10% con agua) suspendida en hexano. La columna se eluyó inicialmente con hexano 100%, polaridad con la que se obtuvieron 25 fracciones con el fin de eliminar impurezas de baja polaridad y se continuó con un gradiente de polaridad con mezclas de hexano-acetato de etilo (95:5, 9:1, 85:15, 8:2, 75:25, 7:3 y 1:1).

Con la polaridad impartida por la mezcla hexano-acetato de etilo --- (95:5) se eluyeron 25 fracciones, en las cuales se obtuvieron dos compuestos. De las fracciones inicialmente eluidas con esta polaridad, se obtuvie

ron 352 mg de un aceite amarillo, puro y que desarrolla en la cromatoplaica analítica una mancha amarilla homogénea, el cual, se identificó como piperitona [(+)-4S-p-ment-1-en-3-ona] (26), cuyas características físicas y espectroscópicas son las siguientes: ²²

Rf 0.6 (hexano-acetato de etilo 65:35)

RO $[\alpha]_D^{25}$: (+) 11.6 (9.5 mg/ 10 ml metanol)

UV (Etanol) : $\lambda_{m\acute{a}x}$ = 235 nm ; ϵ = 17,780 (0.4 mg/ml).

IR (CHCl₃ ; Espectro 8) : 3084, 3043, 2935, 2873, 2830, 1658, 1465, - 1431, 1381, 1314, 1253, 1168, 1131, 1020, 989, 965, 893 y 873 cm⁻¹.

RMN'H (80 MHz, CDCl₃ ; Espectro 9) : δ (Integración, Multiplicidad, J, Asignación) : δ 5.79 (1H, c, J=1Hz, H₂); δ 1.95 (3H, s amplio, W_{1/2}=4Hz, H₇); δ 0.96 (3H, d, J=7Hz, H₉); δ 0.89 (3H, d, J=7Hz, H₁₀).

EM : m/e [Especie] (Intensidad relativa) : 152 [M⁺] (30); 137 [M⁺ - CH₃] (30); 110 [M⁺ - C₃H₇] (92); 95 [M⁺ - C₃H₇ - CH₃] (25); 82 [M⁺ - C₅H₁₀] (100); 69 [M⁺ - C₅H₇O] (8); 54 [M⁺ - C₅H₆O - CH₃] (20). (Ver patrón de fragmentación en el Esquema II, Tabla 2).

El segundo compuesto eluído con esta polaridad, se obtuvo en mínima proporción, y a pesar de que el análisis por cromatografía (CCF), mostraba cierta homogeneidad, en el espectro de RMN'H se observa una señal principal en δ 1.25, por lo que no se continuó su análisis.

Con la polaridad hexano-acetato de etilo (9:1) se eluyeron 28 fracciones, en 14 de las cuales se observa en el análisis por CCF, el desarrollo de una mancha amarillo-café, por lo que se reúnen y se obtienen 289 mg de

un aceite de color naranja, que corresponde a la 7-acetoxi-piperitona [(+)-4S-7-acetoxi-p-ment-1-en-3-ona] (23) y presenta las siguientes propiedades físicas y espectroscópicas:²³

Rf 0.5 (hexano-acetato de etilo 65:35)

RO $[\alpha]_D^{25}$: (+) 8.3 (12 mg/ 10 ml metanol)

UV (Etanol) : $\lambda_{\text{máx}}$ =236 nm ; ϵ =12,900 (0.3 mg/ml).

IR (CHCl₃ ; Espectro 1): 3008, 2962, 2932, 2872, 2833, 1743, 1667, -- 1603, 1460, 1427, 1371, 1237, 1131, 1098, 1035 y 889 cm⁻¹.

RMN¹H (80MHz, CDCl₃ ; Espectro 2) : δ 5.95 (1H, t, J=2Hz, H₂); δ 4.64 - (2H, s amplio, W_{1/2}=4Hz, H₇); δ 2.15 (3H, s, H₂); δ 0.96 (3H, d, J=7Hz, H₉); δ 0.89 (3H, d, J=7Hz, H₁₀).

RMN¹³C (20MHz, CDCl₃ ; Espectro 3) : δ (Multiplicidad, Asignación) : δ 200.37 (s, C=O de cetona); δ 170.11 (s, C=O de éster), δ 156.72 (s, C₁); --- δ 125.06 (d, C₂); δ 65.03 (t, C₇) δ 52.38 (d, C₄); δ 26.00 (d, C₆); δ 25.80 (t, C₈); δ 22.96 (t, C₅); δ 20.59 (c, C₁₂); δ 18.59 (c, señal superpuesta, C₉-C₁₀).

EM : 210 [M⁺] (7); 178 [M⁺- 32] (23); 150 [M⁺- C₂H₃O₂] (8); 108 [150 - C₃H₅] (100); 98 [M⁺- COCH₃ - C₅H₁₀ - 2H⁺] (67); 79 [M⁺- OCOCH₃ - C₅H₁₀] -- (9); 43 [M⁺ - OCOCH₃ - C₇H₈O] (14).

Con la polaridad hexano-acetato de etilo (85:15) se obtuvieron 42 mg - de un cuarto compuesto, que es un aceite amarillo-café y que a la cromatoplaque analítica revela de color rosa-violáceo. Este compuesto corresponde a la 6-hidroxi-piperitona [(+)-4S-trans-6-hidroxi-p-ment-1-en-3-ona] (25). - Sus propiedades físicas y espectroscópicas son:²³

Rf 0.5 (hexano-acetato de etilo 55:45)

UV (Etanol): $\lambda_{\text{máx}}=227 \text{ nm}$; $\epsilon=6,360$ (0.3 mg/ml).

IR (CHCl_3 ; Espectro 6) : 3602, 3464, 3445, 2963, 2873, 1710, 1667, - 1464, 1440, 1376, 1239, 1195, 1181, 1070, 1083, 985, 906 y 883 cm^{-1} .

RMN'H (80MHz, CDCl_3 ; Espectro 7) : $\delta 5.77$ (1H, s amplio, $W_{1/2}=4\text{Hz}$, H_2); $\delta 4.32$ (1H, dd, $J=5,5\text{Hz}$, H_6); $\delta 2.04$ (3H, s amplio, $W_{1/2}=4\text{Hz}$, H_7); $\delta 0.94$ (3H, d, $J=7\text{Hz}$, H_9); $\delta 0.90$ (3H, d, $J=7\text{Hz}$, H_{10}).

RMN'H (80MHz, C_6D_6): $\delta 5.75$ (1H, s amplio, $W_{1/2}=8\text{Hz}$, H_2); $\delta 3.86$ (1H, - dd, $J=5,5\text{Hz}$, H_6); $\delta 2.04$ (3H, s amplio, $W_{1/2}=4\text{Hz}$, H_7); $\delta 0.83$ (3H, d, $J=7\text{Hz}$, H_9); $\delta 0.81$ (3H, d, $J=7\text{Hz}$, H_{10}).

EM : 168 [M^+] (14); 153 [$\text{M}^+ - \text{CH}_3$] (5); 140 [$\text{M}^+ - \text{CO}$] (4); 126 [$\text{M}^+ - \text{C}_3\text{H}_6$] (48); 125 [$\text{M}^+ - \text{C}_3\text{H}_6 - \text{H}^+$] (26); 124 [$\text{M}^+ - \text{C}_3\text{H}_6 - 2\text{H}^+$] (25); 111 [$\text{M}^+ - \text{C}_3\text{H}_6 - \text{CH}_3$] (31); 108 [$\text{M}^+ - \text{C}_3\text{H}_6 - \text{H}_2\text{O}$] (22); 98 [$\text{M}^+ - \text{C}_5\text{H}_{10}$] (100); 97 [$\text{M}^+ - \text{C}_5\text{H}_{10} - \text{H}^+$] (22); 83 (18); 71 [$\text{M}^+ - \text{C}_5\text{H}_9 - \text{CO}$] (30); 70 [$\text{M}^+ - \text{C}_5\text{H}_{10} - \text{CO}$] (19); 69 [$\text{M}^+ - \text{C}_5\text{H}_{10} - \text{CHO}$] (49); 55 [$\text{M}^+ - \text{C}_5\text{H}_{10} - \text{CH}_3$] (21); 43 [$\text{M}^+ - \text{C}_7\text{H}_{10}\text{O}_2$] (42).

Con la polaridad hexano-acetato de etilo (8:2) y (75:25) no se eluyó - ningún compuesto de acuerdo al análisis por CCF de las fracciones correspondientes.

El quinto compuesto eluyó en las fracciones obtenidas con la polaridad hexano-acetato de etilo (7:3). De estas fracciones se obtuvieron 53.5 mg de un aceite amarillo-café que revela en su análisis por CCF como una mancha - pura y homogénea de color rosa que al paso del tiempo se torna café. Esta -

substancia corresponde a la 7-hidroxi-piperitona [(+)-4S-7-hidroxi-p-ment-1-en-3-ona] (24). Sus propiedades físicas y espectroscópicas son reportadas a continuación:

Rf 0.4 (hexano-acetato de etilo 55:45)

UV (Etanol) : $\lambda_{\text{máx}}=228$ nm ; $\epsilon=10,108$ (0.26 mg/ml).

IR (CHCl₃ ; Espectro 4) : 3615, 3005, 2960, 2932, 2875, 1665, 1468, - 1370, 1030 y 890 cm⁻¹.

RMN'H (80MHz, CDCl₃ ; Espectro 5) : δ 6.06 (1H, t, J=1Hz, H₂); δ 4.22 - (2H, s amplio, $W_{1/2}=4$ Hz, H₇); δ 1.99 (2H, m, H₆); δ 0.96 (3H, d, J=7Hz, H₉); δ 0.87 (3H, d, J=7Hz, H₁₀).

RMN'H (80MHz, C₆D₆) : δ 6.12 (1H, s amplio, $W_{1/2}=5$ Hz, H₂); δ 3.66 (2H, s, H₇); δ 1.29 (2H, m, H₆); δ 0.85 (3H, d, J=7Hz, H₉); δ 0.80 (3H, d, J=7Hz, H₁₀).

EM : 168 [M⁺] (25); 153 [M⁺-CH₃] (24); 140 [M⁺-CO] (13); 126 [M⁺-C₃H₆] (100); 111 [M⁺-C₃H₆-CH₃] (17); 109 [M⁺-C₃H₅-H₂O] (23); 107 -- [M⁺-C₃H₇-H₂O] (23); 98 [M⁺-C₃H₁₀] (97); 97 [M⁺-C₅H₁₀-H⁺] (83); 95 (56); 69 [M⁺-C₅H₁₀-CHO] (38); 67 (30); 55 [M⁺-C₅H₁₀-CH₃] (41); 43 -- [M⁺-C₇H₉O₂] (45); 41 (50).

Las fracciones obtenidas con las polaridades subsecuentes (hexano-acetato de etilo (1:1) y acetona 100%), no revelaron, en su análisis por CCF, la presencia de ninguna sustancia principal, por lo cual, la elución se concluyó.

De las fracciones obtenidas con la polaridad cloroformo-acetona (7:3) de la columna inicial, cristalizaron 53.5 mg de una substancia que a la -- cromatoplaça revela como una mancha pura y homogénea de color gris claro. Sus propiedades físicas y espectroscópicas la identifican como 6-hidroxi-piperitol [(+)-(3S,4S,6R)-p-ment-1-en-3,6-diol] (27)²⁷.

Rf : 0.2 (Cloroformo-acetato de etilo 7:3).

pf : 165-166°C.

RO : (+) 28.4 (46 mg/10 ml metanol)²⁸.

IR (CHCl₃ ; Espectro 10) : 3690, 3602, 3005, 2961, 2929, 2874, 1602, 1466, 1447, 1371, 1188, 1066, 981, 959, 919 y 863 cm⁻¹.

RMN'H (80MHz, CDCl₃ ; Espectro 11) : δ5.50 (1H, s amplio, W_{1/2}=4Hz, H₂); δ3.96 (2H, s amplio, W_{1/2}=8Hz, H₃₍₆₎); δ1.78 (3H, s amplio, W_{1/2}=4Hz, H₇), δ1.53 (2H, s, -OH); δ0.96 (3H, d, J=7Hz, H₉); δ0.83 (3H, d, J=7Hz, H₁₀).

RMN'H (80MHz, CDCl₃+ TAI ; Espectro 12) : δ8.35(2H, s, H carbámico); - δ5.73 (1H, m, H₂); δ5.30 (2H, s amplio, W_{1/2}=8Hz, H₃₍₆₎); δ1.79 (3H, s, H₇) δ0.97 (3H, d, J=7Hz, H₉); δ0.89 (3H, d, J=7Hz, H₁₀).

RMN'H (80MHz, Py-d₅) : δ5.87 (1H, s amplio, W_{1/2}=5Hz, H₂); δ4.23 (2H, s amplio, W_{1/2}=15Hz, H₃₍₆₎); δ1.95 (3H, s, H₇); δ1.52 (1H, d, J=4Hz, -OH); δ1.02 (3H, d, J=7Hz, H₉); δ0.90 (3H, d, J=7Hz, H₁₀).

EM : 170 [M⁺] (1.5); 155 [M⁺- CH₃] (4); 152 [M⁺- H₂O] (1); 137 [M⁺- CH₃ - H₂O] (7); 127 (20); 111 (70); 109 (25); 100(78); 95 (18); 85 (25) 81 (17); 79 (13); 77 (13); 71 (100); 69 (45); 55 (24); 43 (37).

P A R T E E X P E R I M E N T A L .
= = = = = = = = = = = =

b). *Salvia longystyla.*

La planta *S. longystyla* fué recolectada el 7 de noviembre de 1984 por el profesor Esteban Manuel Martínez en la carretera Morelia-Zitácuaro, a la altura de la sierra de Mil Cumbres. Una muestra botánica de la misma se encuentra depositada en el herbario de la UNAM bajo registro con la clave M-8521.

El material vegetal se dejó secar a temperatura ambiente y 3.95 Kg -- del mismo se sometió a un proceso de maceración con acetona durante una semana. Después de eliminar el disolvente con ayuda de un rotaevaporador, se obtuvieron 87.2 g de extracto total, el cual, adsorbido en 100 g de sílice, se aplicó en una columna de vidrio empacada con 2.5 Kg de sílice suspendida en hexano.

La elución de la columna se inició con hexano 100% con recolección de fracciones de 0.5 lt (con esta polaridad no eluyó ningún componente del extracto), y se continuó con un gradiente de polaridad con mezclas de hexano-acetato de etilo (9:1, 4:1, 7:3, 1:1), acetato 100% y finalmente se efectuó un lavado de la columna con acetona 100%.

Con la mezcla hexano-acetato de etilo (9:1) se obtuvieron un total de 95 fracciones; con hexano-acetato de etilo (4:1) se obtuvieron 21 fracciones; con hexano-acetato de etilo (7:3) 38 fracciones; con hexano-acetato de etilo (1:1) 48 fracciones; con acetato de etilo 100% 51 fracciones y finalmente con acetona 100% 32 fracciones, obteniéndose un total de 289 fracciones a lo largo de toda la cromatografía.

Después del análisis por CCF de todas estas fracciones y de acuerdo con la homogeneidad y composición de las mismas, se reunieron en 8 fracciones de polaridad creciente que se trabajaron de la siguiente manera:

Fracción 1: Fracciones 23-29 de la columna inicial, eluidas con hexano-acetato de etilo (9:1).

Después de la elución y reunión de estas fracciones, se logró aislar - 932 mg de un sólido blanco, amorfo, de Pf 133-135°C y Rf 0.5 [hexano-acetato de etilo (6:4)]. Sus propiedades físicas y espectroscópicas lo identifican como β -sitosterol, comprobándose su identidad por comparación directa - con una muestra auténtica del mismo.

IR (CHCl₃) : 3605, 3027, 2959, 2869, 1464, 1380, 1044 y 1019 cm⁻¹.

RMN'H (80MHz, CDCl₃) : δ 5.75 (1H, m, H₆); δ 3.20 (1H, dd, J=7,7Hz, H₃); δ 2.25 (2H, d, H₄); δ 1.51 (3H, s, -OH); δ 1.00 (3H, s, H₁₉); δ 0.78-0.85 (12H, m, H_{21,26,27,29}); δ 0.68 (3H, s, H₁₈).

EM : 414 [M⁺] (82); 400 (12); 396 (27); 381 (18); 329 (17); 323 (27); 273 (12); 255 (16); 213 (25); 163 (19); 161 (22); 159 (30); 145 (20); 133 (20); 121 (27); 120 (20); 119 (30); 107 (38); 105 (46); 95 (33); 93 (36); - 91 (22); 81 (26); 79 (25); 69 (34); 67 (30); 57 (50); 55(62); 43 (100); -- 41 (47).

Fracción 2 : Fracciones 30-35 de la columna inicial, eluida con hexano-acetato de etilo (9:1).

Estas fracciones estaban constituídas principalmente por β -sitosterol (2) y ácido acetil oleanólico (30). Estas dos sustancias se separaron por cristalización fraccionada, ya que inicialmente cristalizó 2 y de las aguas madres se obtuvieron 34 mg de cristales blancos en forma de agujas, que por sus propiedades físicas y espectroscópicas se identificaron como 30. El Pf para esta sustancia es de 253-255°C, y su Rf de 0.57 [hexano-acetato de --

etilo (4:1)].

IR (CHCl₃ ; Espectro 13) : 3516, 3023, 2950, 2878, 1721, 1464, 1370, 1256, 1145 y 984 cm⁻¹.

RMN'H (80 MHz, CDCl₃ ; Espectro 14) : δ5.25 (1H, t, J=4Hz, H₁₂); -- δ4.45 (2H, dd, J=8,8Hz, H₃); δ2.82 (1H, dd, J=5,5Hz, H₁₈); δ2.03 (3H, s, -COOCH₃); δ1.12 (3H, s, H₂₅); δ0.92 (6H, s, H₂₃₍₂₄₎); δ0.84 (6H, s, H₂₉₍₃₀₎); δ0.75 (3H, s, H₂₆); δ0.69 (3H, s, H₂₇).

EM : 498 [M⁺] (1.5); 438 (4.5); 423 (2.3); 395 (3); 248 (77); 203 (77); 190 (12.5); 189 (12.5); 133 (22); 121 (12); 119 (20); 109 (10); 107 (15); - 105 (21); 95 (13); 81 (18); 79 (12); 69 (28); 55 (22); 43 (100); 41 (15).

Fracción 3 : Fracciones 49-66 de la columna inicial, eluída con hexano-acetato de etilo (9:1).

La reunión de estas fracciones permitió obtener 2.24 g de extracto, -- que en su análisis por CCF desarrolla dos manchas principales. Para su re-- cromatografía, se adsorben en 3 g de sílice y se aplican en una columna de vidrio empacada con 67 g de sílice desactivada al 10% con agua y suspendida en hexano 100%. La elución se lleva a cabo con un gradiente de polaridad, - impartido por mezclas de hexano-acetato de etilo.

La substancia menos polar se obtuvo con la polaridad hexano-acetato de etilo (9:1) y correspondió de acuerdo a su espectroscopía (en RMN'H presenta como señal principal un singulete en δ1.25) a una cera. La substancia -- más polar, eluyó con hexano-acetato de etilo (3:1), se obtuvo como un polvo blanco, amorfo de Pf 259-260°C y Rf 0.5 [hexano-acetato de etilo (3:2)] que

corresponde al ácido betulínico (11), sus propiedades espectroscópicas son:

IR (Pastilla de KBr) : 3435, 2942, 2870, 1700, 1642, 1454, 1375, 1319, 1274, 1235, 1186, 1134, 1105 y 1036 cm^{-1} .

RMN¹H (80 MHz, CDCl_3 ; DMSO) : δ 4.65 (1H, s amplio, $W_{1/2}=5\text{Hz}$, H_{30}); -
 δ 4.53 (1H, s amplio, $W_{1/2}=5\text{Hz}$, H_{30}); δ 3.05 (1H, dd, $J=8,8\text{Hz}$, H_3); δ 1.65
 (3H, s, H_{29}); δ 0.94 (6H, s, $\text{H}_{23(24)}$); δ 0.91 (6H, s, $\text{H}_{26(27)}$); δ 0.79 (3H, s,
 H_{26}); δ 0.70 (3H, s, H_{25}).

EM : 456 [M^+] (23); 438 (10); 248 (37); 234 (17); 220 (22); 219 (20);
 207 (39); 203 (25); 191 (17); 190 (33); 189 (100); 187 (27); 177 (15); 175
 (38); 136 (27); 135 (43); 133 (27); 123 (27); 121 (38); 119 (43); 109 (28);
 107 (48); 105 (40); 95 (45); 93 (36); 91 (35); 81 (44); 79 (35); 71 (23);
 69 (50); 67 (47); 57 (22); 55 (53); 43 (61); 41 (47).

Fracción 4. Fracciones 67-92 de la columna inicial, eluida con hexano-
 acetato de etilo (9:1).

La cromatoplaca analítica de estas fracciones reveló la presencia de -
 una mezcla sin homogeneidad en las manchas desarrolladas en su análisis por
 CCF. Con el objeto de mejorar la resolución se hizo una metilación de las -
 mismas con diazometano etéreo en exceso. Después de este tratamiento fué po-
 sible la observación de tres manchas principales en la mezcla. El peso de -
 la fracción fué de 1.6 g, los cuales, adsorbidos en 2 g de sílice desactiva-
 da al 10% con agua, se aplican a una columna empacada con 45 g de sílice -
 igualmente desactivada suspendida en hexano.

Después de la elución con hexano-acetato de etilo (mezclas de polaridad
 creciente), se obtuvieron tres compuestos puros. El menos polar de ellos --

[fracciones 75-80 de esta recromatografía, eluidas con hexano-acetato de etilo (9:1)] corresponde al éster metílico del ácido betulínico (29) (21.5 mg), aislado ya en fracciones anteriores como ácido libre.

El compuesto de polaridad intermedia [fracciones 82-97 de esta recromatografía, eluidas con hexano-acetato de etilo (9:1)], cristalizó en forma de agujas muy finas. Después de la comparación directa con una muestra auténtica se demostró su identidad como 11 α ,12 α -epoxilactona oleanólica (33, 29 mg). El análisis espectroscópico indica:³²

IR (CHCl₃) : 3613, 3004, 2936, 2868, 1766, 1467, 1391, 1362, 1320, - 1301, 1238, 1169, 1141, 1030, 992, 931, 911 y 870 cm⁻¹.

RMN'H (80MHz, CDCl₃) : δ 3.22 (1H, dd, J=6,6Hz, H₃); δ 3.05 (2H, s, --- H₁₁₍₁₂₎); δ 1.50 (3H, s, -OH); δ 1.09 (3H, s, H₂₇); δ 1.05-0.79 (18H, 5s, -- H_{23,24,25,26,29,30}).

EM : 470 [M⁺] (17); 263 (15); 248 (17); 235 (17); 217 (17); 204 (31); 203 (30); 189 (37), 187 (21), 175 (25), 135 (25), 133 (23), 121 (38), 119 (41), 109 (30), 107 (48), 105 (38), 95 (60), 93 (50), 91 (37), 81 (43), 79 (38); 75 (25), 69 (67), 67 (43), 57 (72), 55 (67), 43 (100), 41 (83).

El compuesto de mayor polaridad eluido en las fracciones 100-127 de esta cromatografía, con hexano- acetato de etilo (85:15), fué el que se obtuvo con mayor proporción (142 mg). Sus propiedades físicas y espectroscópicas lo identifican como el éster metílico del ácido oleanólico (32).

Por tanto, los productos naturales aislados en esta recromatografía -- corresponden a: Acido betulínico (11), 11 α ,12 α -epoxilactona oleanólica (33) y ácido oleanólico (9).

Fracción 5 : Fracciones 93-99 de la columna inicial, eluidas con hexano- acetato de etilo (4:1).

La cromatoplaaca analítica de este conjunto de fracciones reveló la presencia de solo una substancia principal. El peso del extracto del extracto fué de 1 g, el cual, se adsorbió en 1 g de sílice desactivada de la misma - manera previamente reportada, y se aplicó a una columna empacada con 33 g - de sílice igualmente desactivada suspendida en hexano. Se eluyó con un gra- diente de polaridad impartido por mezclas de hexano-acetato de etilo.

En las fracciones eluidas con hexano-acetato de etilo (95:5) se obtu- vieron 112 mg de ácido oleanólico (obtenido en la fracción 4 como éster me- tilico). Este compuesto tiene un Pf de 271-273°C y un Rf de 0.4 en hexano- acetato de etilo (75:25).

IR (Pastilla de KBr) : 3422, 2943, 2870, 1719, 1697, 1461, 1387, 1363, 1270, 1182, 1029, 995 y 948 cm^{-1} .

RMN'H (80Mhz, CDCl_3) : δ 5.25 (1H, t, J=3Hz, H_{12}); δ 3.2 (1H, dd, J=7,7 Hz, H_3); δ 2.85 (1H, dd, J=5,5Hz, H_{18}); δ 1.15 (3H, s, H_{27}); δ 1.11 (3H, s, - H_{25}); δ 0.97 (3H, s, H_{26}); δ 0.89 (6H, s, $\text{H}_{29(30)}$); δ 0.77 (3H, s, H_{24}); δ 0.72 (3H, s, H_{18}).

EM : 456 [M^+]; 248 (100); 203 (58); 133 (18); 49 (20); 57 (40); 55 -- (35); 43 (42); 41 (24).

Fracción 6 : Fracción 121-176 de la columna inicial eluida con hexano-acetato de etilo (1:1).

La cromatoplaaca analítica de esta fracción es de difícil interpretación, ya que aún probando diferentes mezclas de eluyentes, no se pudo deducir el número de constituyentes de la misma.

8.7 g de extracto (de consistencia aceitosa) se aplicaron directamente en una columna empacada con 260 g de sílice desactivada al 10% con agua, suspendida en cloroformo. La columna se eluyó usando un gradiente de polaridad impartido por mezclas de cloroformo-acetona. Después de la elución de 178 fracciones de 0.5 lt, se concluye con un lavado de la columna con acetona - 100%. Sin embargo, aún después de la separación, no se observó ningún constituyente principal de acuerdo al análisis por CCF, y aún la interpretación de este análisis no permitió el control de la pureza de los constituyentes en estas fracciones, ni la identificación de los mismos.

Fracción 7 : Fracciones 177-207 de la columna inicial, eluida con acetato de etilo 100%.

El análisis por CCF revela la presencia de un mancha extendida a lo largo de toda la placa, aún utilizando mezclas diversas de eluyentes.

10.6 g del extracto se aplican adsorbidos en 12 g de sílice desactivada al 10% con agua, en una columna empacada con 318 g de sílice igualmente desactivada al 10% suspendida en hexano. A partir de la fracción 117 y hasta la 167, se obtiene un polvo amorfo, verde, insoluble en cloroformo y que al IR revela la presencia de grupo hidroxilo y lactona. Es de notar, que en este caso no fué posible el control de la pureza por CCF.

En un intento por mejorar la resolución de la mezcla en su análisis - por CCF y hacer la muestra más manejable se procedió a la obtención del -- per-acetil derivado. 101 mg de este sólido, disueltos en 1 ml de piridina, se hicieron reaccionar con 1 ml de anhídrido acético durante tres horas -- (La metodología de la reacción de acetilación se describe en detalle en la parte de reacciones). Como resultado de ésta se obtuvo un polvo amorfo, --- igualmente verde que se purificó por cromatografía en placa fina, utilizan do para ello una placa PSC-Fertigplatten (60F₂₅₄) de 20 X 20 cm y mezcla - de hexano-acetato de etilo (1:1) como eluyente.

Después de raspar la sílice de la placa en la zona donde se encuentra el compuesto esperado (la localización del mismo se hace revelando con sul fato cérico un extremo de la placa), se lavó con acetona hasta ausencia to tal del compuesto en la sílica gel, haciendo análisis de las aguas de lava do por CCF. Se obtuvieron 46.1 mg de un sólido blanco de Pf 224-226°C, sin embargo, el espectro de RMN'H no presentó resolución y presentó señales -- continuas desde δ 7.00 hasta δ 0.5, por lo que no fué posible interpretar.

No se continuó el análisis de esta muestra.

Fracción 8 : Fracciones 214-221 de la cromatografía inicial, eluidas con acetato de etilo 100%.

De estas fracciones se obtuvo un polvo blanco, amorfo, de Pf 272-274°C soluble sólo en etanol y metanol y Rf 0.2 en cloroformo-acetona (3:7).

La espectroscopía de IR presenta las siguientes características:

IR (Pastilla de KBr) : 3415, 3383, 2935, 2869, 1463, 1376, 1162, 1076 y 1024 cm^{-1} .

La banda intensa en 3415 cm^{-1} permitió prever la presencia de varios grupos hidroxilo en la molécula, lo que la hace muy polar y poco manejable para análisis espectroscópicos, razón por lo cual, fué necesaria la preparación del correspondiente per-acetil derivado, para ello, 84.6 mg de este compuesto se hicieron reaccionar con 1 ml de anhídrido acético en presencia de 1 ml de piridina por 30 minutos. De esta reacción se obtuvieron 46 mg de producto impuro, el cual se aplicó en una cromatoplaaca analítica para su purificación, utilizando como eluyente hexano-acetato de etilo (1:1). Después de este proceso se obtuvieron 36 mg de cristales blancos que se pudieron identificar como per-acetil-glucósido de β -sitosterol (28). Sus propiedades físicas y espectroscópicas son:

IR (CHCl_3) ; 2958, 2870, 1754, 1513, 1463, 1436, 1371, 1243, 1168, -- 1134, 1039, 953 y 909 cm^{-1} .

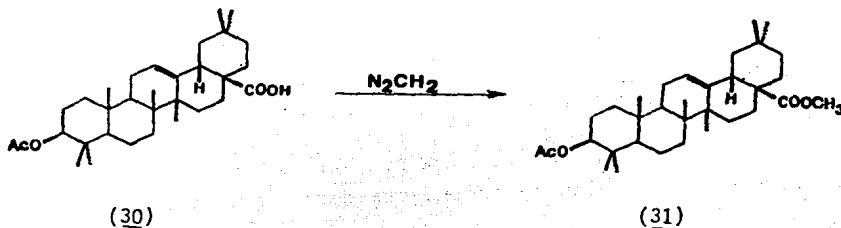
RMN'H (80MHZ, CDCl_3) : δ 5.33 (1H, dd, $J=4,2\text{Hz}$, H_6); δ 2.07-2.00 (12H, 4s, 4 [-OCOCH₃]); δ 0.99 (3H, s, H_{19}); δ 0.93-0.77 (12H, m, $H_{21,26,27,29}$); δ 0.67 (3H, s, H_{18}).

EM : 396 [M^+ -348] (100); 331(18); 169 (64); 145 (15); 127 (13); 109 (38); 95 (15); 81 (19); 43 (58).

REACCIONES

Metilación del ácido acetil oleanólico 30.

15 mg de esta sustancia se hicieron reaccionar con diazometano etéreo en exceso (hasta que no se observó burbujeo), el medio de reacción se dejó reposar por 24 hrs., al cabo de las cuales se obtuvieron 15.7 mg de un polvo blanco muy fino correspondiente al éster metílico del ácido acetil oleanólico 31.



P.M. 512

Pf 158-160°C

RF 0.8 hexano-acetato de etilo (4:1)

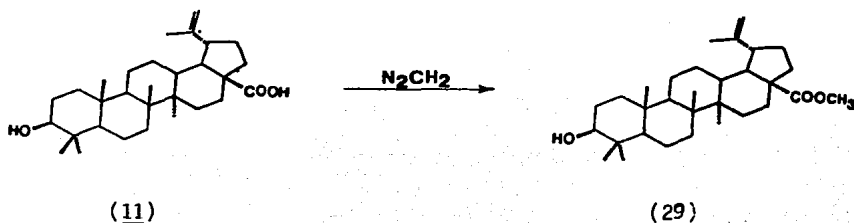
IR (CHCl₃) : 2950, 2877, 1719, 1463, 1370, 1257, 1168, 1028 y 896 cm⁻¹.

RMN'H (80MHz, CDCl₃) : δ5.25 (1H, t, J=4Hz, H₁₂); δ4.47 (2H, dd, J=8,8 Hz, H₃); δ3.58 (3H, s, -OCH₃); δ2.85 (1H, dd, J=5,5Hz, H₁₈); δ2.06 (3H, s, -COOCH₃); δ1.19 (3H, s, H₂₅); δ0.88 (6H, s, H₂₃₍₂₄₎); δ0.86 (3H, s, H₂₇); --- δ0.81 (6H, s, H₂₉₍₃₀₎); δ0.70 (3H, s, H₂₆).

EM : 512 [M⁺] (2); 262 (72); 203 (100); 202 (28); 190 (18); 189 (34); 175 (10); 133 (13); 107 (19); 105 (18); 95 (15); 81 (12); 79 (10); 55 (13); 43 (55).

Metilación de ácido betulínico 11.

19.70 mg de este producto natural se hicieron reaccionar con diazometano etéreo en exceso, dejando reposar por 24 hrs. Se obtuvieron 22.4 mg del correspondiente éster metílico 28.



P.M. 470.

Pf 208-209°C

Rf 0.6 hexano-acetato de etilo (3:2)

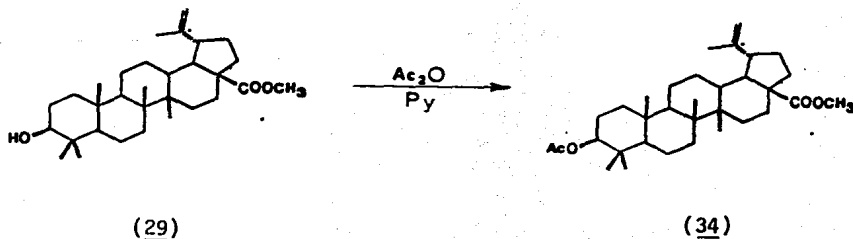
IR ($CHCl_3$) : 3611, 3011, 2949, 1719, 1455, 1376, 1161, 1135, 1029, 982, y 889 cm^{-1} .

RMN'H (80MHz, $CDCl_3$) : δ 4.69 (1H, s amplio, $W_{1/2} = 5Hz$, H_{24}); δ 4.56 (1H, s amplio, $W_{1/2} = 6Hz$, $H_{24'}$); δ 3.64 (3H, s, $-OCH_3$); δ 3.16 (1H, dd, $J=6,6Hz$, H_3); δ 1.69 (3H, s, H_{23}); δ 0.93 (3H, s, H_{26}); δ 0.89 (3H, s, $H_{29}(30)$); δ 0.80 (3H, s, H_{28}); δ 0.74 (3H, s, H_{27}).

EM : 470 [M^+] (18); 411 (14); 262 (52); 220 (28); 207 (56); 203 (42); 201 (27); 190 (37); 189 (100); 188 (24); 187 (25); 175 (35); 147 (25); 135 (38); 133 (38); 121 (30); 101 (44); 105 (50); 95 (47); 93 (48); 91 (41); 81 (52); 79 (44); 69 (44); 67 (48); 55 (38); 43 (50); 41 (35).

Acetilación de betulinato de metilo 29.

10 mg de betulinato de metilo 29, obtenido a partir de la reacción de metilación del producto natural 2 (ácido oleanólico), se hicieron reaccionar con 1 ml de anhídrido acético en piridina durante 1 hora (el control de la reacción se llevó a cabo por CCF). Una vez concluida la reacción se destruyó el exceso de anhídrido acético con aproximadamente 6 g de hielo picado. Se hicieron cuatro extracciones con volúmenes de 10 ml de acetato de etilo cada una y la fase orgánica total se lavó con solución al 10% de HCl para eliminar la piridina como clorhidrato e inmediatamente después con solución saturada de bicarbonato de sodio para eliminar el ácido acético (producto de la reacción de anhídrido acético y agua) y el exceso de HCl. Un último lavado con agua se llevó a cabo para eliminar remanentes de cualquiera de los subproductos de la reacción. La fase orgánica de esta manera tratada se secó con sulfato de sodio anhidro y se dejó reposar para cristalización. Se obtuvieron 8 mg de acetyl betulinato de metilo 34.



P.M. 512

Pf 182-184°C

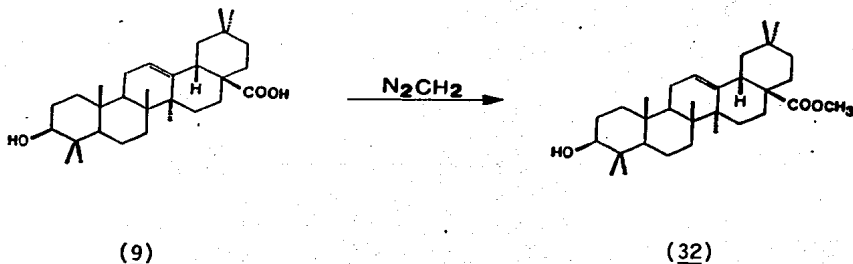
Rf 0.75 hexano-acetato de etilo (3:2)

IR (CHCl₃) : 3023, 2951, 2871, 1719, 1640, 1512, 1454, 1374 1317, 1255, 1192, 1157, 1135, 1107, 1074, 1026, 979, 945 y 890 cm⁻¹.

RMN¹H (80MHz, CDCl₃) : δ4.67 (1H, s amplio, W_{1/2}=5Hz, H₂₄); δ4.56 (1H, s amplio, W_{1/2}=7Hz, H₂₄); δ4.37 (1H, dd, J=6,6Hz, H₃); δ3.64 (3H, s, -OCH₃); δ2.04 (3H, s, -COCH₃); δ1.24 (3H, s, H₂₃); δ0.94 (3H, s, H₂₆); δ0.89 (3H, s, H₂₉(30)); δ0.82 (6H, s, H₂₇(28)).

EM : 512 [M⁺] (7); 452 (18); 262 (27); 249 (22); 135 (18); 190 (32); 189 (66); 175 (27); 119 (22); 69 (30); 43 (100).

Metilación de ácido oleanólico 9.



PM 470

Pf 271-273°C

Rf : 0.5 (hexano-acetato de etilo 4:1)

IR (CHCl₃) ; 3613, 3019, 2950, 1719, 1462, 1386, 1364, 994 y 915 cm⁻¹.

RMN'H (80MHz ; CDCl₃) : δ5.18 (1H, t, J=3Hz, H₁₂); δ3.6 (3H, s, ---
-OCOCH₃); δ3.2 (1H, dd, J=7,7Hz, H₃); δ2.85 (1H, dd, J=5,5Hz, H₁₈); δ1.24
(3H, s, H₂₇); δ1.11 (3H, s, H₂₅); δ0.97 (3H, s, H₂₈); δ0.89 (6H, s, H₂₉₍₃₀₎);
δ0.77 (3H, s, H₂₄); δ0.72 (3H, s, H₂₃).

EM : 470 [M⁺] (38); 411 (25); 262 (52); 202 (100); 189 (20); 133 (23);
119 (20); 105 (23); 95 (20); 91 (20); 69 (21); 43 (25); 41 (18).

Acetilación de Glucósido de β-sitosterol (28)

La técnica de acetilación empleada para este producto natural, es la misma que se describió para la acetilación de betulinato de metilo (29). El tiempo de reacción en este caso fué de 3 horas. Las propiedades espectroscópicas para el producto de esta reacción se encuentran reportados en la -- parte experimental (Fracción 8).

RESUMEN Y CONCLUSIONES

=====

El estudio fitoquímico de las plantas mexicanas *Chrysactinia mexicana* y *Salvia longystyla* tuvo como base los métodos de extracción, separación y purificación, así como la determinación estructural de los metabolitos secundarios presentes en ellas.

Los métodos de separación y purificación empleados fueron: Cromatografía en columna, cromatografía en capa fina y las recristalizaciones sucesivas.

Los análisis espectroscópicos (IR y RMN'H) y espectrométricos (EM), así como las técnicas de rotación óptica y ultravioleta, proporcionaron las bases para la elucidación estructural. El punto de fusión, el Rf y los datos reportados en la literatura para las sustancias aisladas u otras relacionadas estructuralmente con las mismas, constituyeron un criterio de corroboración a las estructuras propuestas.

De la planta *Chrysactinia mexicana* se aislaron cinco compuestos, cuatro de los cuales presentan la estructura base de una p-ment-1-en-3-ona, deducida de acuerdo con las siguientes evidencias espectroscópicas:

(a). Presencia en el espectro de IR de una banda intensa en 1667 cm^{-1} que revela la presencia de una enona conjugada cíclica (anillo de seis miembros).

(b). Señal singulete amplio con $W_{1/2}=4\text{Hz}$ en el espectro de RMN'H en el rango de $\delta 5.50$ a $\delta 6.06$, con integración para un protón de tipo vinílico.

(c). Señal como singulete amplio en RMN'H con $W_{1/2}=4\text{Hz}$ entre $\delta 1.77$ y $\delta 1.95$, con integración para tres protones, correspondiente a un metilo vinílico.

(d). Presencia de un par de dobletes centrados en $\delta 0.96$ y $\delta 0.89$ con $J=7\text{Hz}$ e integración para tres protones cada uno, que indican la presencia de un gem-dimetilo en la molécula.

(e). Absorción en el UV a $\lambda_{\text{máx}}=227\text{-}236\text{ nm}$, característica de una enona conjugada.

La diferencia entre estos cuatro compuestos radica en los grupos que funcionalizan la estructura base de p-ment-1-en-3-ona. Esta funcionalización se determina para cada compuesto con ayuda de la espectroscopía de IR, RMN'H y EM.

El quinto compuesto aislado de esta planta mexicana presenta como base estructural un p-ment-1-en-3-ol. Las diferencias espectrales de esta estructura con respecto a una p-ment-1-en-3-ona radica en:

(a). Ausencia de la banda en 1667 cm^{-1} en el IR.

(b). Presencia de la banda para grupo hidroxilo en 3690 cm^{-1} en el mismo espectro.

(c). Presencia de una señal singulete en $\delta 1.53$ para el protón base de oxígeno localizado en la posición 3.

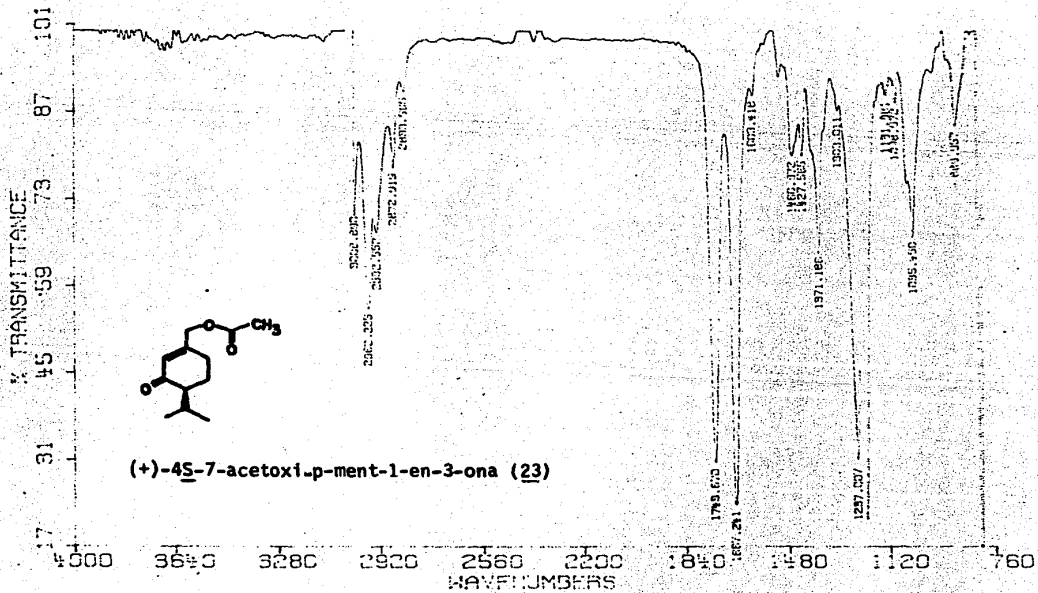
Una investigación bibliográfica sobre monoterpenos con base estructural de p-mentanos permitió concluir que tres de estos compuestos constituyen productos naturales nuevos [7-acetoxi-piperitona (23), 7-hidroxi-piperitona (24) y 6-hidroxi-piperitona (25)], los dos compuestos restantes se han aislado con anterioridad de otras plantas mexicanas y se conocen con los nombres de piperitona (26)²²⁻²³ y 6-hidroxi-piperitona (27)³⁰.

De la planta *Salvia longistyla* se aislaron seis compuestos todos ellos de tipo triterpénico. La determinación estructural de estos compuestos tuvo como criterio principal los datos aportados por el espectro de masas, en el que este tipo de compuestos presenta un patrón de fragmentación característico.

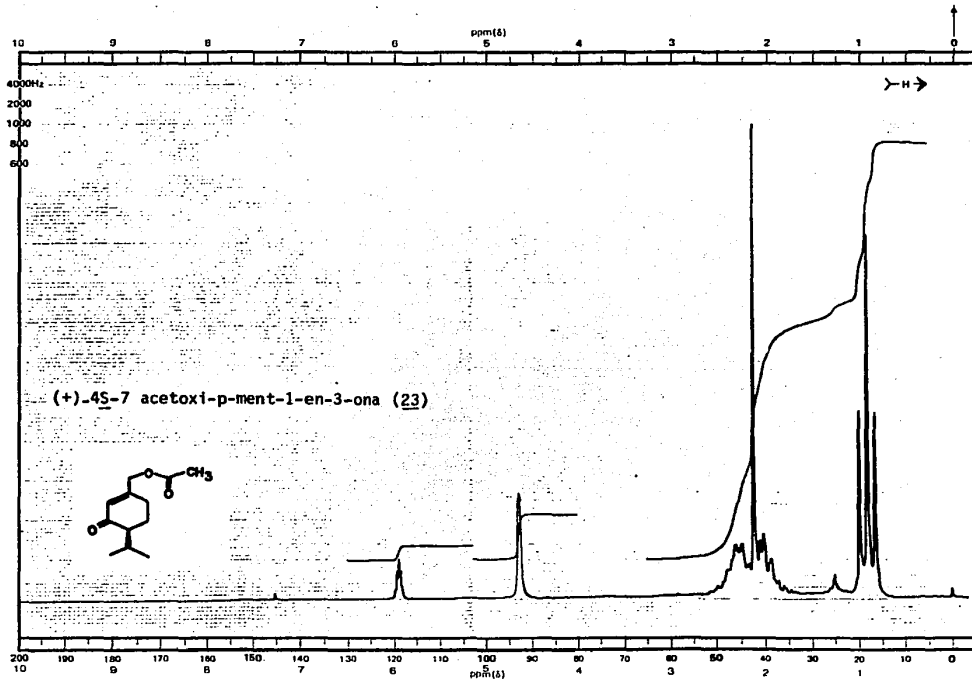
Uno de estos compuestos corresponde a un nuevo producto natural [ácido acetil oleanólico (30)]. Los cinco compuestos restantes son productos naturales ya conocidos y perfectamente estudiados estructuralmente [β -Sitosterol (2), ácido oleanólico (9), ácido betulínico (11), β -D-glucósido de β -Sitosterol (28) y 11 α ,12 α -epoxilactona oleanólica (33)]. Su identificación se basó en datos espectroscópicos reportados en la literatura y por comparación directa con muestras auténticas en análisis por CCF.

ESPECTROS
=====

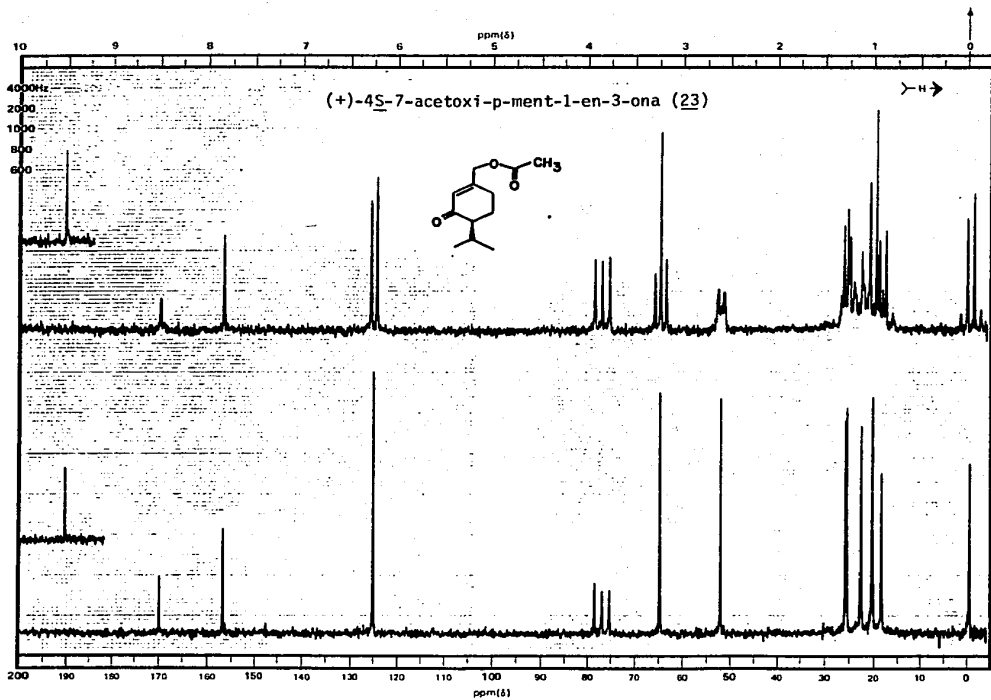
ESPECTRO 1



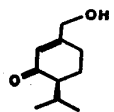
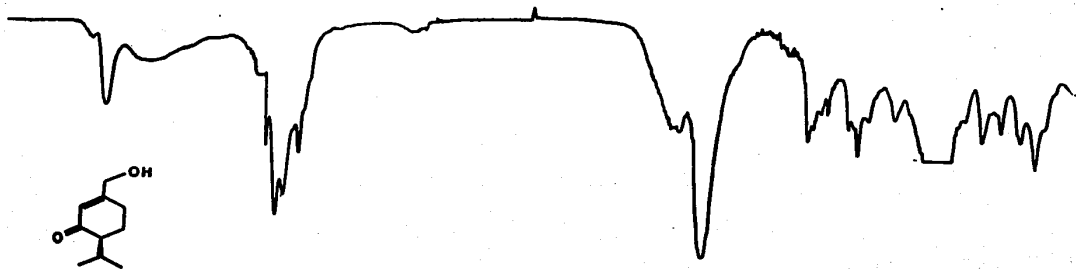
ESPECTRO 2



ESPECTRO 3



ESPECTRO 4



(+)-4_S-7-hidroxi-p-ment-1-en-3-ona (24)

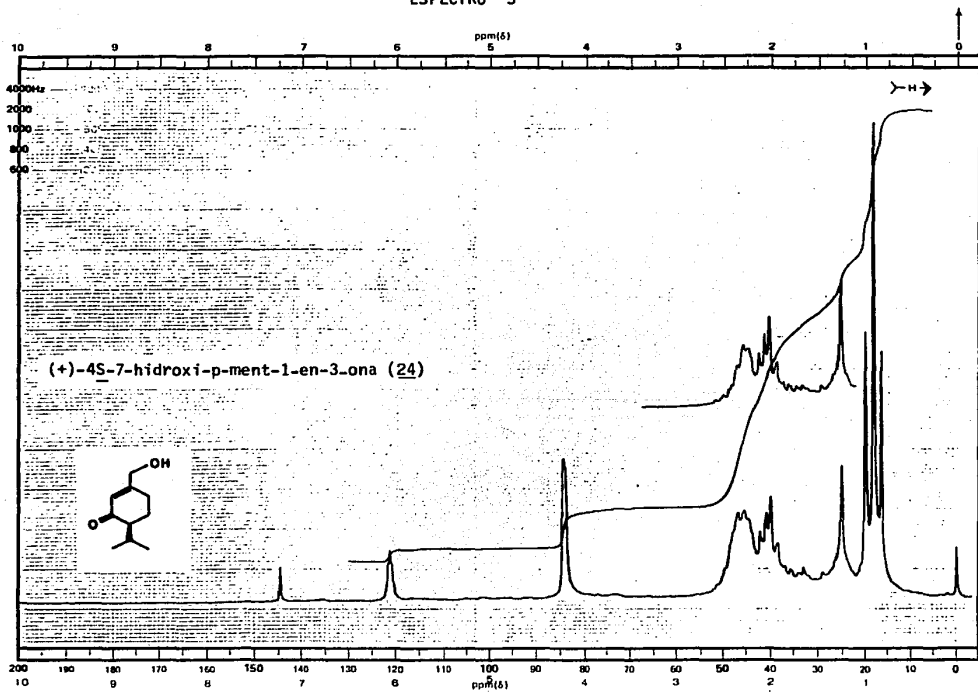
3620

3000

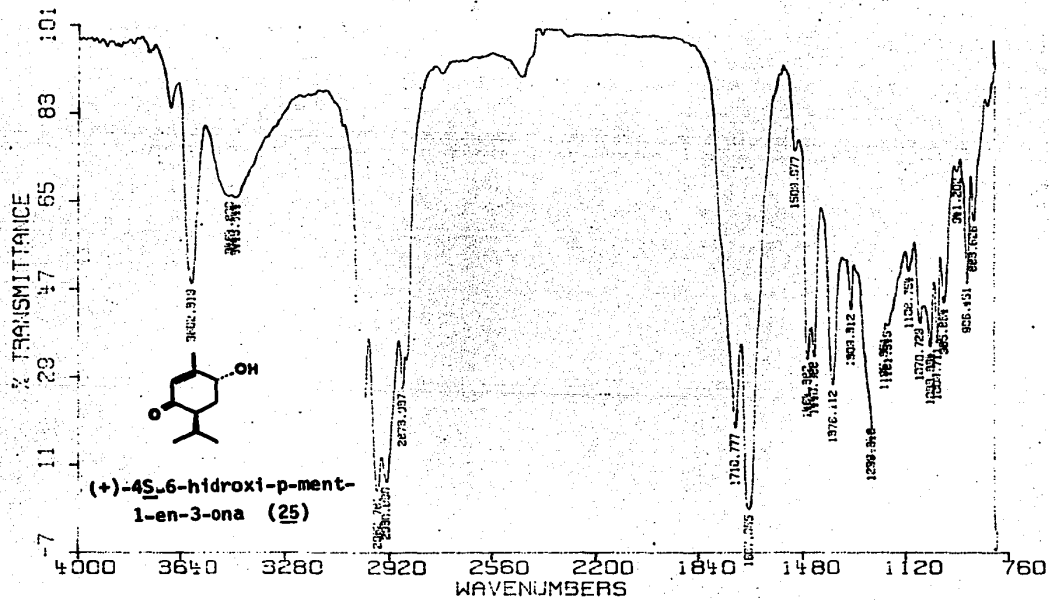
1665

1400

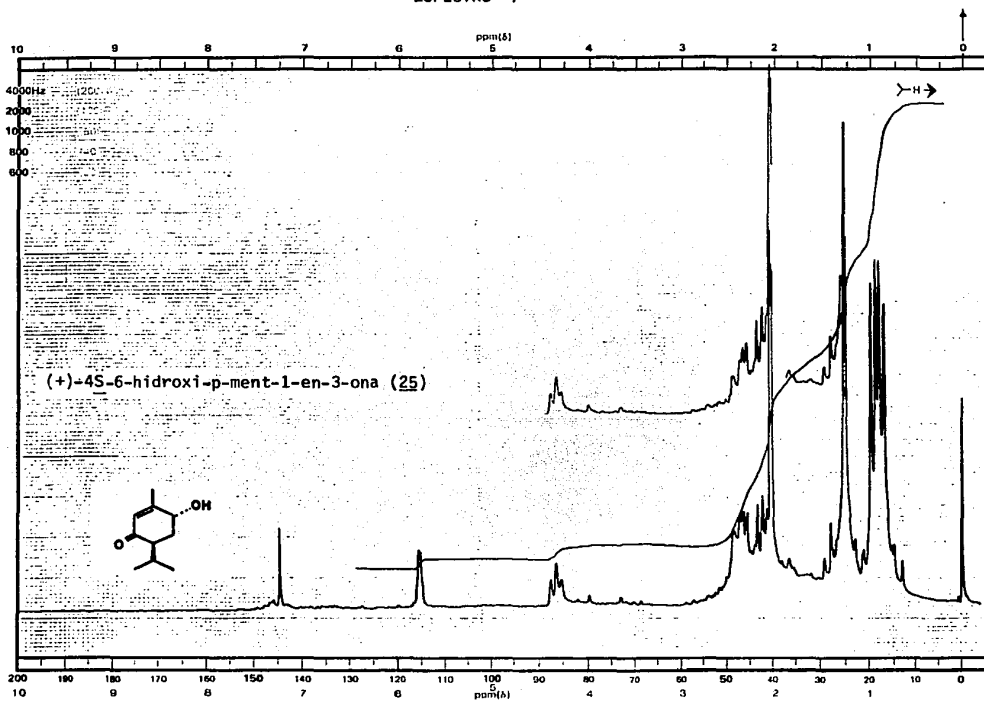
ESPECTRO 5



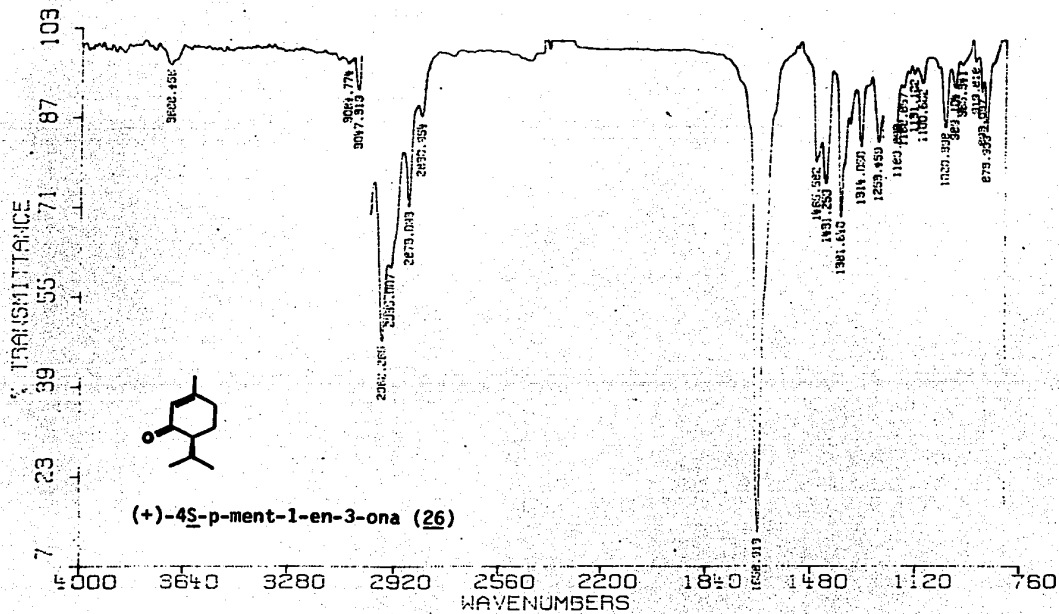
ESPECTRO 6



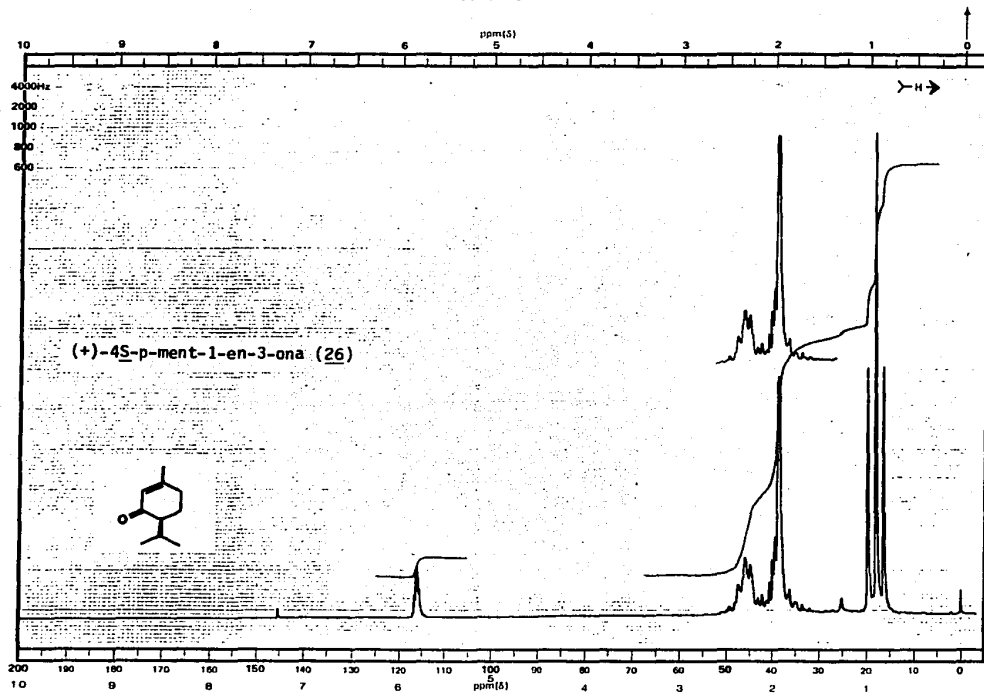
ESPECTRO 7

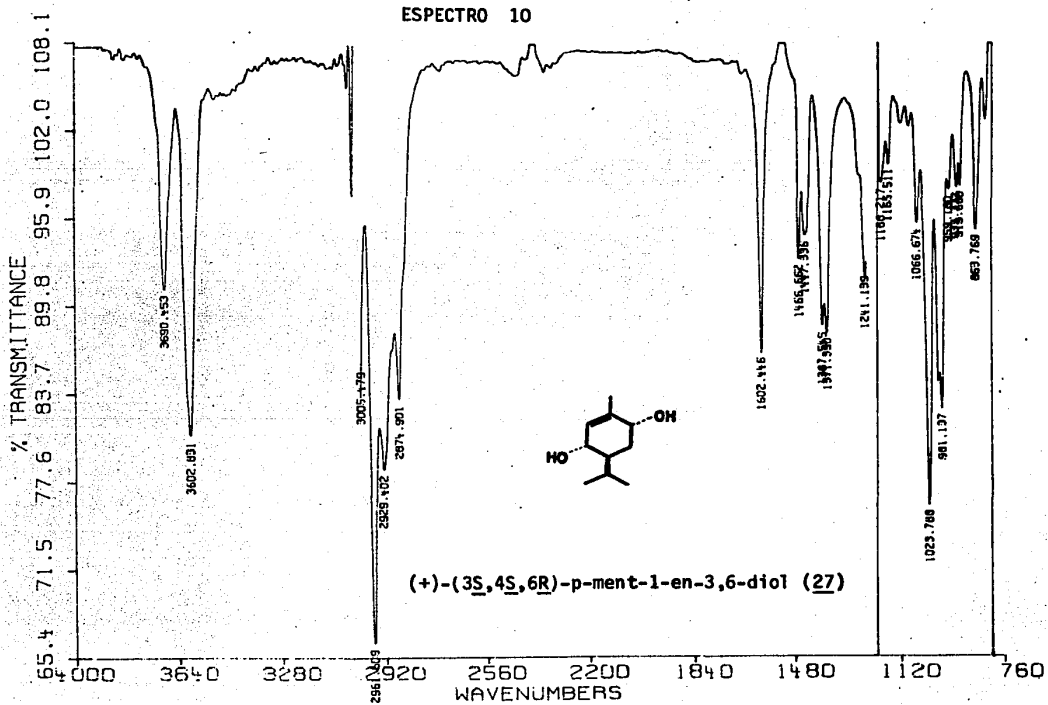


ESPECTRO 8

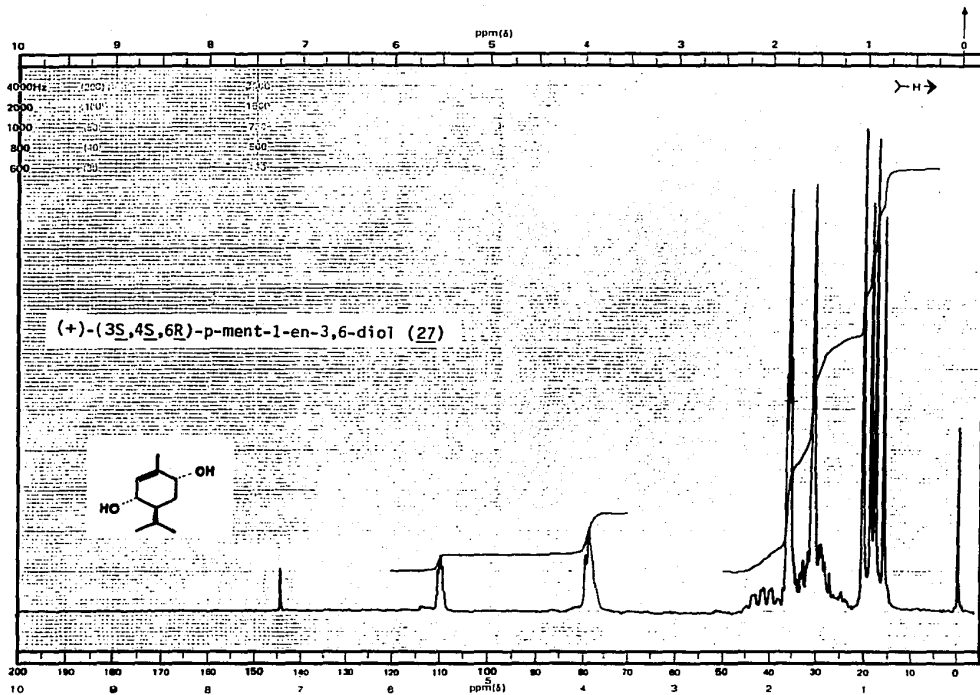


ESPECTRO 9

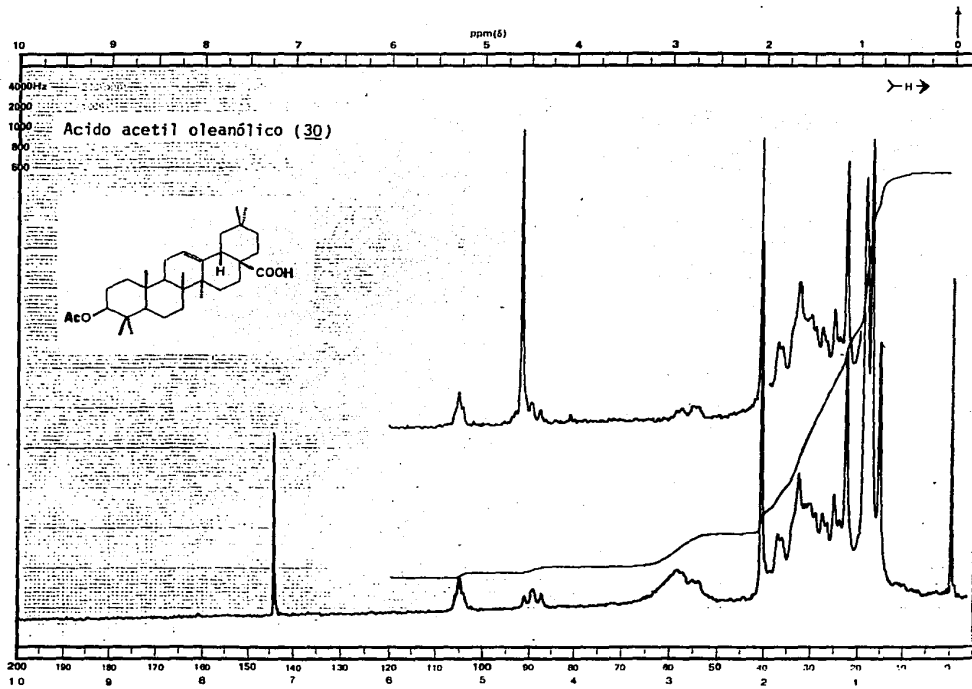




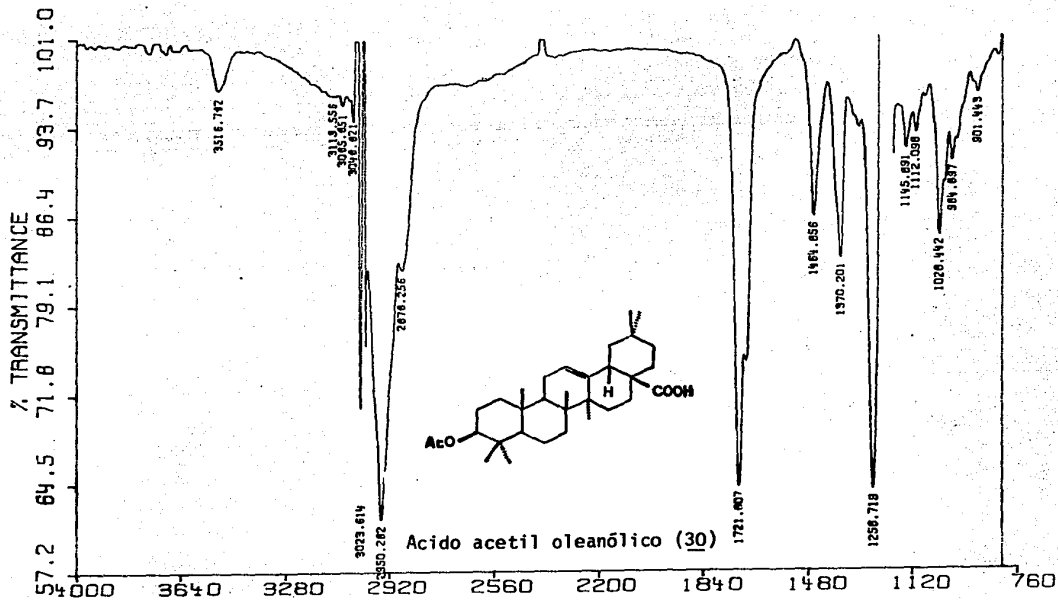
ESPECTRO 11



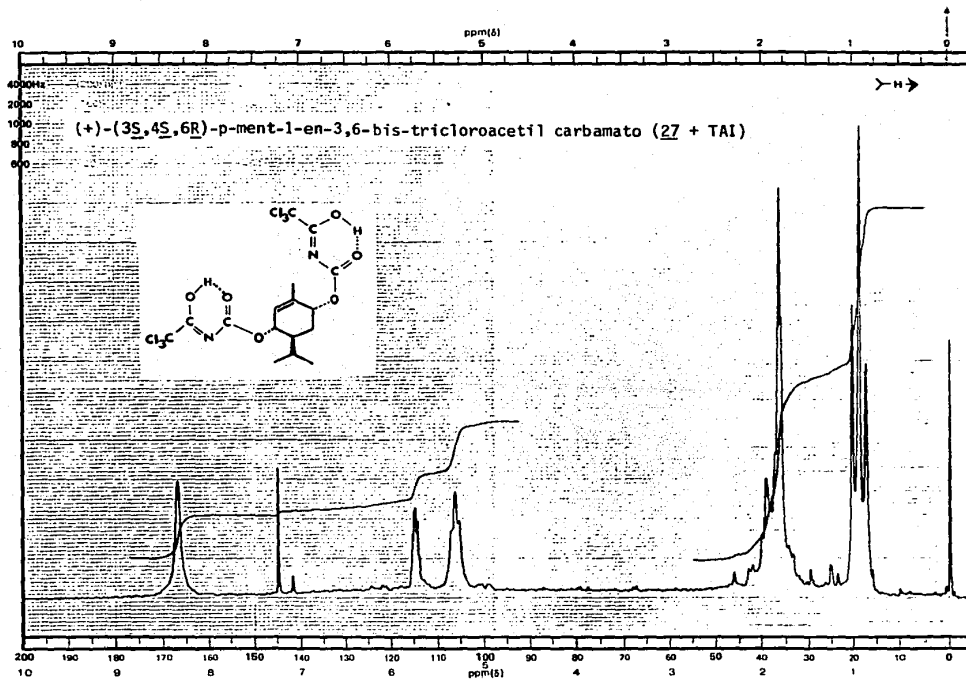
ESPECTRO 14



ESPECTRO 13



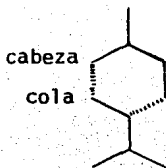
ESPECTRO 12



B I B L I O G R A F I A
= = = = =

1. Wagner, H. Pharmaceutical and economic use of the Labiatae and Rutaceae families, *Rev. Latinoamericana de Química* 8, 16 (1977).
2. Wagner, H. En: The Biology and Chemistry of the Compositae (Heywood, V. H., Harborne, J. B. and Turner, B. L., eds.) Vol. 1, pp 411-28, - Academic Press (1977).
3. Lawrence, B. M., Hogg, J. W., Terhone, S. J., Morton, J. K. and Gill, L. S., Terpenoids Composition of some Canadian Labiatae. *Phytochemistry* 11, 2636 (1972).
4. Delgado, G., Pereda-Miranda, R. and Romo de Vivar, A., Structure and Stereochemistry of 4-deacetoxy-10-epi-olguine, a New δ -lactone from *Hypis oblongifolia* Bentham (Labiatae). *Heterocycles* 23, 1869 (1985).
5. Pacheco, P., Crawford, D., Silva, M. and Stuessy T., Compositae, Chemotaxonomy based on Flavonoids. *Bol. Soc. Chil. Qim.* 27, 172 (1982).
6. González, A. G., Darias, V., Boada, J. N., and Feria, M., Citostatic Activity of Sesquiterpene Lactonas from Compositae. *Arch. Farmacol. Toxicol.* 3, 241 (1977).
7. Fikenscher, L. H., Hegnauer, R. and Ruijgrok, H. W. L., The distribution the Hydrocyanic Acid in Cromophytes. New observations on Cyanogenesis in Compositae. *Planta Med.* 40, 202 (1980).
8. Heywood, V. H., Harborne, J. B. and Turner B. L. En: The Biology and Chemistry of the Compositae (Heywood, V. H., Harborne, J. B. and Turner, B. L. eds.) Vol. 1, pp 9-14, Academic Press (1977).
9. Wagner, H. En: The Biology and Chemistry of the Compositae (Heywood,

- V. H., Harborne, J. B. and Turner, B. L., eds.) Vol. 1, pp 422, --
Academis Press (1977).
10. Barton, D. and Ollis, D., *Comprehensive Organic Chemistry, The Synthesis and Reactions of Organic Compounds*. E. Haslam Pergamon Press, pp 989-1042, (1979).
 11. Pinder, A. R., *The Chemistry of the Terpenes*. John Wiley & Sons. - Inc. ed., New York, pp 1-4 y 69-70 (1960).
 12. Domínguez, X. A. and Peirantozzi, E., 1,8-Cineole and Sitosterol - from *Chrysactinia mexicana*. *Phytochemistry* 11, 2929 (1972).
 13. Domínguez, X. A., Vázquez, G. and Baruoch, R. N., Constituents from *Chrysactinia mexicana*, *J. Nat. Prod.* 48, 681 (1985).
 14. Escudero, J., Pérez, L., Rabanal, R. M. and Valverde, S., Diterpenoids from *Salvia oxyodon* and *Salvia lavandulifolia*. *Phytochemistry* 22, 585 (1983).
 15. Pereda-Miranda, R., Delgado, G. and Romo de Vivar, A., New Triterpenoids from *Salvia nicolsoniana*. *J. Nat. Prod.* 49, 225 (1986).
 16. Pereda-Miranda, R., Delgado, G. and Romo de Vivar, A., An Abietane Diterpenoid from *Salvia sapinae*. *Phytochemistry* 25, 1931 (1986).
 17. Michavila, A., De la Torre, M. C. and Rodríguez B., 20-nor-abietane Diterpenoid from the Root of *Salvia argentea*. *Phytochemistry* 25, -- 1935 (1986).
 18. Nakanishi, K., *Infrared Spectroscopy*. Holden Day, 1977.
 19. La regla del isopreno es la unión cabeza-cola de dos ó más unidades del mismo.



20. Levy, G. C. and Nelson, G. L., Resonancia Magnética Nuclear de Carbono-13. Ed. Balletera S. A., New York, pp 67-69 (1976).
21. Wehrli, F. W. and Nishida, T., The Use of Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy in Natural Products Chemistry, Progress in the Chemistry in the Organic Natural Products. Vol. 36, New York, pp 26-28 (1979).
22. Burbott, A. J., Hennessey, J. P., Curtis, J. W. and Loomis, D., Configuration of the Piperitone from Oil of the *Mentha piperita*. *Phytochemistry* 22, 2227 (1983).
23. Lassak, E. V., Pinhey, J. T., Ralph, B. J., Sheldon, T. and Simes, J. J. H., Extractives of fungus. Microbial Transformation Products of Piperitone. *Aust. J. Chem.* 26, 845 (1973).
24. Overton, K. H., Connolly, J. D., Hanson, J. R., Kirk, D. N., May, P. J., Moss, G. P., Roberts, J. S. and Thomas, A. F., Terpenoids and Steroids. Specialist Periodical Reports. The Chemical Society. Burlington House, London.
 - (a). Vol. 1, pp 23 (1970).
 - (b). Vol. 3, pp 49 (1972).

- (c). Vol. 4, pp 35, (1973).
25. Devon, T. K. and Scott, A. I., Handbook of Naturally Occurring Compounds, Vol. 2, Academic Press, New York, pp 15-16 (1972).
 26. Dev, S., Anubhav, P. S., Narula, R. and Jhillu, S. Y., Handbook of Terpenoids. Vol. 2, CRC Press Inc., pp 245, 274 y 277 (1982).
 27. Stolow, R. D. and Sachdev, J., The p-menth-1-ene-3,6-diols. Correlation of absolute configuration with Optical Rotation. *Tetrahedron* 21, 1889 (1965).
 28. Stolow, R. D. and Sachdev K., Absolute Configurations of the p-menthane-2,5-diones and p-menthane-2,5-diols. *J. Org. Chem.* 36, 960 - - (1971).
 29. De Pascual, J., Bellido, I. S., Torres, C., Sastre, B. A. and Grande, M., Phellandrene Endoperoxides from the Essential Oil of *Chenopodium multifidum*. *Phytochemistry* 20, 163 (1981).
 30. González, A. G., Bermejo, B. J., Bermejo, B. J. L. and Massanet, - G. M. *Anales de Química* 68, 319 (1972).
 31. Budzikiewicz, H., Wilson, J. M. and Djerassi, C. Mass Spectrometry in Structural and Stereochemical Problems. Pentacyclic Triterpenes. *J. Am. Chem. Soc.* 85, 3688 (1963).
 32. Delgado, G., Cárdenas, X., Alvarez, L., Romo de Vivar, A. and Pere da-Miranda, R., New Oleanane and Isopimarane Terpenoids from *Lepechinia glomerata*. *J. Chem. Res.* (S) 286 (1986), (M) 2565 (1986).