

67
201



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

ESTUDIO QUIMICO DE UNA PLANTA MEDICINAL
MEXICANA, Hyptis pectinata (LAMIACEAE)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

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

MEXICO, D. F.



1990



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

INDICE GENERAL

I.	INTRODUCCION	1
II.	OBJETIVOS	5
III.	ANTECEDENTES	6
	3.1 Perfil fitoquímico del género <u>Hyptis</u>	6
	3.2 Actividad biológica y metabolismo secundario del género <u>Hyptis</u>	17
IV.	PARTE EXPERIMENTAL	21
	1. Material vegetal	21
	2. Extracción del material vegetal y elaboración del extracto orgánico	21
	3. Resolución del extracto mediante partición cromatográfica	21
	4. Aislamiento y purificación de los constitu- yentes mayoritarios	23
	4.1 Aislamiento del compuesto HP-I-6 (β -sitosterol)	27
	4.2 Aislamiento del compuesto HP-II-16 (pectinólida)	27
	4.3 Aislamiento del compuesto HP-III-58 (ácido betulínico)	28
	4.4 Aislamiento del compuesto HP-IV-69 (ácido ursólico)	28
	4.5 Aislamiento del compuesto HP-V-128 (glucósido del β -sitosterol)	29

5.	Preparación de derivados	29
5.1	Reacciones de acetilación	29
5.2	Reacciones de alquilación	31
6.	Determinación de las constantes físicas de las sustancias aisladas y de sus derivados preparados	32
7.	Determinación de las constantes espectroscópicas de las sustancias aisladas y de sus derivados preparados	32
V.	DISCUSION	33
1.	Caracterización de los triterpenos conocidos .	
1.1	Caracterización del β -sitosterol (HP-I-6) y de su glucósido (HP-V-128) ...	33
1.2	Caracterización del ácido betulínico (HP-III-58)	34
1.3	Caracterización del ácido ursólico (HP-IV-69)	38
2.	Elucidación estructural de la nueva δ -lactona α, β -insaturada, la pectinólida (HP-II-16)	41
VI.	CONCLUSIONES	51
VII.	ESPECTROS	59
VIII.	BIBLIOGRAFIA	83

INTRODUCCION

El género *Hyptis* (Lamiaceae) está compuesto por aproximadamente 400 especies. Se encuentra distribuido desde el sur de los Estados Unidos hasta Argentina. Generalmente son plantas de una gran diversidad en la forma vegetativa, variando desde anuales efímeras hasta árboles pequeños, predominantemente subarbustos o hierbas perennes; sus hojas en la mayoría de los casos son ovaladas y muy amplias, pecioladas o sésiles y con una estructura floral extraordinariamente uniforme, la corola es bilabiada, característica de esta familia (Epling, 1949).

Este género está conformado por un grupo de plantas de gran importancia económica en la vida diaria de nuestro pueblo, y su uso específico ha sido transmitido de generación en generación desde tiempos inmemoriales hasta nuestros días. La Tabla 1.1 presenta una recopilación de los usos que los pueblos latinoamericanos han dado a algunas plantas de este género.

Todas las especies de este género se caracterizan por ser aromáticas, propiedad que le confiere su alto contenido en aceites esenciales (Altschul, 1973), de ahí su gran uso como tónico-estimulantes (Roig, 1974).

Por lo tanto, estas especies representan una gran importancia económica tanto para la industria farma-

TABLA 1.1. USOS POPULARES DE LAS PLANTAS DEL GENERO HYPTIS.

	H. albidá	H. branchiata	H. brevipes	H. capitata	H. carpinifolia	H. crenata	H. decurrens	H. emoryi	H. laniflora	H. melepoeifolia	H. multiflora	H. mutabilis	H. pectinata	H. rhytidea	H. savannarum	H. suaveolens	H. sinuata	H. tomentosa	H. verticillata
Afecciones intestinales																X			
Analgésico	X				X					X			X			X			X
Analgésico estomacal							X			X	X		X			X			X
Antipirético								X				X	X			X			X
Antiséptico		X		X											X				
Asmatismo																	X		
Bebidas refrescantes																X			
Carminativo			X			X	X		X		X	X					X	X	X
Cefalalgias										X									
Combatir la tos													X						X
Como condimento	X											X							
Diarrea y disentería			X													X			
Diurético													X			X			X
Enfermedades del hígado													X			X			X
Galactógeno									X										
Hemostático		X		X									X			X			X
Insecticida y plaguicida	X			X				X					X						X
Parásitos intestinales													X			X			X
Paludismo												X							
Picaduras de insectos																			
Problemas del oído	X							X											X
Problemas del ojo												X							
Soluciones sudoríficas						X												X	

céutica como para la de la perfumería (Wagner, 1977), y en menor proporción, pero con una gran perspectiva, para la industria de los saborisantes (Paredes, 1973). Así, la gran variedad de usos en este género, implica en forma indirecta, una amplia diversidad en el metabolismo secundario de estas especies, y conjuntamente un amplio panorama en la investigación de nuevos productos naturales como fuentes potenciales de sustancias biológicamente activas.

El presente trabajo describe el estudio químico de algunos metabolitos secundarios en una de las especies de este género, la Hyptis pectinata, cuyas características se describen a continuación:

Nombre científico: Hyptis pectinata (L) Poit.

Familia: Lamiaceae

Nombre vulgar: Salvia (México), hierba del burro. .

Descripción: Subarbusto de hasta 3 m de alto, ramificado; tallos leñosos, pubescentes; hojas opuestas, ovadas y dentadas, de 2-4 cm de largo y 1-2 cm de ancho; peciolo de 4-5 cm de largo; abundantes flores pequeñas formando glomérulos apretados y en espiga; la corola bilabiada es de color azul; semillas aplanadas, subovales, de 4-5 mm y comestibles.

Planta difundida como maleza.

Distribución:

Se distribuye abundantemente en los trópicos de ambos hemisferios. Lo mismo se ha encontrado en Africa, en las Indias Orientales, que en Colombia y México (Epling, 1949).

Usos:

Principalmente se usa como analgésico estomacal, antipirético y en enfermedades respiratorias (García, 1975; Martínez, 1979).

OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

El objetivo fundamental del presente trabajo es el análisis químico de la especie medicinal Hyptis pectinata como parte de un estudio sistemático de este género, con el fin de contribuir al conocimiento del contenido metabólico de la flora mexicana de importancia económica.

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Realizar una revisión bibliográfica que compendie la información quimiotaxonómica del género Hyptis, con el propósito de establecer un perfil fitoquímico de estas plantas.
- Efectuar las operaciones fitoquímicas según la metodología convencional con el fin de separar y purificar los metabolitos secundarios presentes en Hyptis pectinata.
- Identificar los metabolitos aislados mediante el empleo de los métodos químicos tradicionales y el análisis de la información proporcionada por las diferentes técnicas analíticas modernas (IR, EM, RMN¹H, RMN¹³C).
- Discutir en forma detallada la elucidación estructural y estereoquímica de los nuevos metabolitos secundarios aislados de esta fuente natural.

ANTECEDENTES

Diversos estudios fitoquímicos del género Hyptis han permitido establecer un perfil químico parcial de estas plantas.

Las investigaciones del contenido metabólico de este género se han conducido sobre una base casi exclusivamente empírica, es decir, de acuerdo a la utilización tradicional que la medicina popular le ha dado a cada planta. De tal manera, que un estudio químico sistemático ofrece un enfoque alternativo para las investigaciones fitoquímicas. Así, las investigaciones químicas de un grupo taxonómico, con antecedentes en el aislamiento de sustancias activas, puede conducir al descubrimiento de nuevos componentes activos (Wagner, 1977).

3.1 PERFIL FITOQUIMICO DEL GENERO Hyptis.

A continuación se resumen las investigaciones fitoquímicas que se han realizado sobre la distribución de los metabolitos secundarios en el género Hyptis.

A) Terpenoides. Se le da este nombre a compuestos hidrocarbonados que tienen un origen biosintético común fundamentado en la molécula del isopreno, $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)-\text{CH}=\text{CH}_2$. Se clasifican de acuerdo al número de unidades C_5 que contengan: C_{10} , monoterpenos; C_{15} , sesquiterpenos; C_{20} , diterpenos; C_{25} , sestesterpenos; C_{30} , triterpenos y C_{40} ,

tetraterpenos. Cabe aclarar que aunque el esqueleto básico de los terpenoides se deriva biogenéticamente del isopreno, éste no es el precursor in vivo (Harbone, 1973), sino que son derivados del ácido mevalónico (Domínguez, 1979).

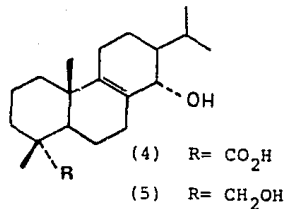
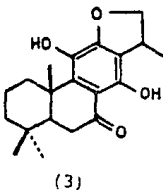
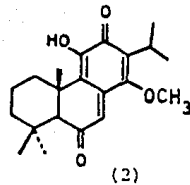
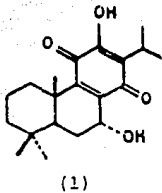
Los aceites esenciales de las Labiadas son mezclas de sustancias orgánicas olorosas constituidas en su mayoría por compuestos de naturaleza terpénica, basados en 2 ó 3 unidades de isopreno. Estos principios son los responsables de las características aromáticas de las especies del género Hyptis utilizados ampliamente como condimentos en la culinaria nacional. Por ejemplo para H. pectinata se han aislado: β -elemeno, β -cariofileno, germacreno D y biciclogermacreno (Brophy y Lassak, 1987).

Los diterpenos comprenden un grupo de compuestos heterogéneos químicamente, todos con un esqueleto carbonado C_{20} basado en 4 unidades de isopreno (Harbone, 1973). Estos compuestos tienen un valor taxonómico por la distribución limitada que presentan (Domínguez, 1979). En el género Hyptis se han aislado sólo cinco diterpenos, todos con un esqueleto de abietano.

En H. fructicosa, del extracto metanólico de la raíz, se aislaron tres hidroquinonas: la horminona (1), la 14-metoxitaxodiona (2) y el hiptol (3), (De Araujo, et al., 1974; Marletti et al., 1976; Delle Monache et al., 1977).

Del extracto de las partes aéreas de H. suaveolens se

aislaron dos derivados estructurales del abietano: el ac. suaveólico (4) y el suaveolol (5), (Manchand et al., 1974).

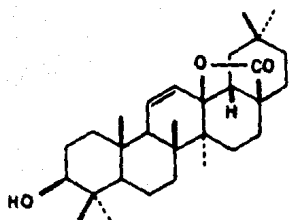


Los triterpenoides son compuestos con un esqueleto carbonatado basado en seis unidades de isopreno (C₃₀). Son compuestos ópticamente activos, frecuentemente sólidos cristalinos con altos puntos de fusión (Harbone, 1973) y se encuentran extensamente distribuidos en el reino vegetal (Dominguez, 1979). Los triterpenos constituyen los productos del metabolismo secundario más abundantes y ampliamente distribuidos en el género Hyptis.

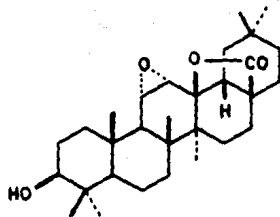
Se han aislado e identificado hasta el momento diecinueve compuestos triterpenoides en las diferentes especies del género Hyptis. Todos estos son derivados pentáclicos con diferentes grados de oxidación de los esqueletos bá-

sicos de lupano, ursano y oleanano. La especie medicinal H. albida constituye un ejemplo representativo de la diversidad metabólica de estos triterpenos pentacíclicos en el género. El estudio fitoquímico de estas plantas permitió la caracterización de novedosos constituyentes. Por ejemplo, las δ -lactonas (6) y (7), (Pereda-Miranda, 1988) derivadas del ácido oleanólico. Al mismo tiempo, corroboró la coexistencia de derivados del urseno, oleanano y lupano en esta especie, como ya había sido observado para la especie H. suaveolens: (8), (9) (Misra et al., 1983, a y b) y (10) (Mukherjee et al., 1984). La friedelina (11) constituye un caso aislado ya que sólo se ha reportado en H. suaveolens (Saluja y Santini, 1984).

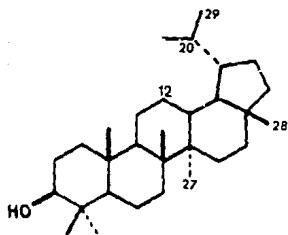
Los esteroides son compuestos sólidos con C_{27} a C_{29} átomos, basados estructuralmente en el sistema tetracíclico de perhidrofenantreno. Tres de ellos se encuentran en plantas superiores, ya sea en estado libre o como glucósidos simples: el sitosterol (12), el estigmasterol (13) y el camfesterol (14), (Harbone, 1973). En el género Hyptis se han aislado sólo dos de ellos: el camfesterol y el sitosterol, ambos sin ningún valor taxonómico debido a su amplia distribución en el reino vegetal.



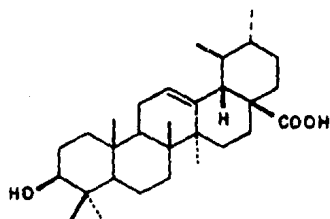
(6)



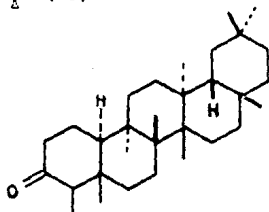
(7)



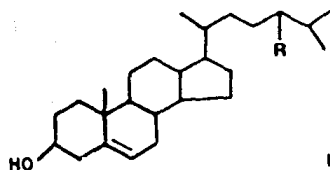
(8) 27- COOH, Δ^{12}
 (9) 28- COOH, $\Delta^{20(29)}$



(10)

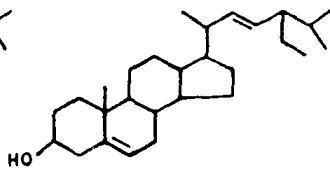


(11)



(12) R= Et

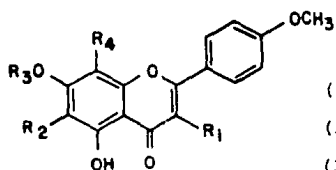
(14) R= Me



(13)

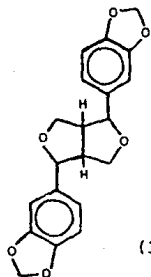
B) Compuestos fenólicos. Este término incluye un amplio grupo de sustancias vegetales que poseen un anillo aromático con uno o más sustituyentes hidroxilo (Harbone, 1973).

Los flavonoides son pigmentos vegetales que poseen un esqueleto carbonatado $C_6-C_3-C_6$ (Domínguez, 1979) estructuralmente derivados de la flavona (Harbone, 1973). La distribución de los flavonoides en el género Hyptis es sumamente escasa y aislada. El metabolismo de estos compuestos en este género se caracteriza por la metoxilación de las posiciones C_6, C_8 y C_3 del núcleo básico de apigenina (Pereda-Miranda, 1988). Esta tendencia se ejemplifica con el contenido de los constituyentes de H. albidá: nevadencina (15); 4',7-éter dimetilico de la apigenina (16); 3,4',7-éter trimetilico del kaemferol (17) y ermanina (18). Esta característica la comparte con algunos quimiotipos de especies de los géneros Mentha, Thymus y Sideritis.

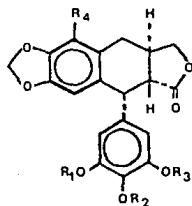


	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
(15)	H	H	Me	H
(16)	OMe	H	Me	H
(17)	OMe	H	H	H
(18)	H	OMe	H	OMe

Los lignanos son dímeros oxigenados del fenil propano (Domínguez, 1979), responsables junto con la celulosa de la rigidez de los tallos vegetales (Harbone, 1973). Se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal (Germán, 1971) y sólo cuatro de estos compuestos se han aislado en el género *Hyptis*: la sesamina (19), la desoxipodofilotoxina (20), la 4'-dimetildesoxipodofilotoxina (21) y la β-peltantina (22), los cuales demostraron una importante actividad citotóxica (German, 1971, Kingston *et al.*, 1979).



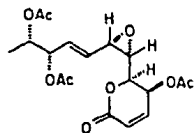
(19)



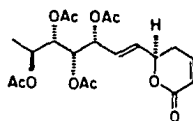
- (20) R₁=R₂=R₃=Me; R₄=H
 (21) R₁=R₃=Me; R₂=R₄=H
 (22) R₁=R₂=R₃=Me; R₄=OH

C) α -pironas. Dentro del género Hyptis existen compuestos pertenecientes a las α -pironas, específicamente lactonas de 6 miembros α, β -insaturadas con una cadena lateral C-7 en el carbono C₆. Estructuralmente, estas δ -lactonas son derivados del ácido dodecanoico y su distribución se limita casi exclusivamente a este género. Biosintéticamente, la estructura principal de este grupo de lactonas parece relacionada con una derivación policétida; sin embargo, la posible participación de carbohidratos no debe excluirse (Achmand et al., 1987). Este grupo de compuestos se caracteriza también por poseer la misma estereoquímica absoluta (R) en el centro quiral C₆ (Delgado et al., 1985; Davies-Coleman y Rivett, 1987; Achmand et al., 1987).

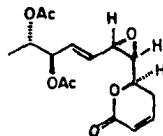
A continuación se presentan las δ -lactonas que han sido aisladas y estudiadas dentro de la familia de las Labiadas. La olguina (23) y anamarina (24) representan los constituyentes mayoritarios de las partes aéreas de una especie sudamericana no identificada perteneciente al género Hyptis (Alemany et al., 1979 a; idem., b). Del extracto acetónico de las partes aéreas de Hyptis oblongifolia (Delgado et al., 1985) se aisló la 4-desacetoxi-10-epi-olguina (25) y recientemente tres α -pironas adicionales: la 6-(5',6'-diacetoxi-1',2'-dihidroxi-3-heptenil)-5,6-dihidro-2H-piran-2-ona (26a) y su derivado acetilado (26b), y la 6-(5,6-diacetoxi-1-hidroxi-2-metoxi-3-heptenil)-5,6-dihidro-2H-piran-2-ona (27). Estos tres



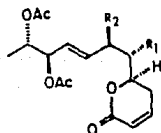
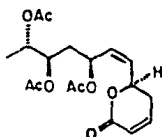
(23)



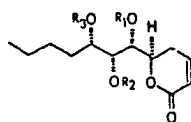
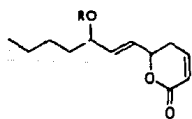
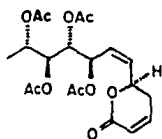
(24)



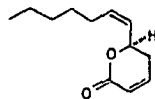
(25)

(26a) $R_1=R_2=OH$ (26b) $R_1=R_2=OAc$ (27) $R_1=OH, R_2=OMe$ 

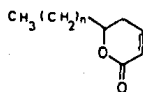
(28)

(29) $R_1=R_2=R_3=Ac$ (30) $R_1=R_2=R_3=H$ (31) $R_1=R_2=H, R_3=Ac$ (32) $R=Ac$ (33) $R=H$ 

(34)



(35)

(36) $n=6$ (37) $n=4$

compuestos aislados de H. oblongifolia presentan una moderada actividad biológica en ensayos con larvas de Artemia salina y fueron inactivas en pruebas de citotoxicidad (Pereda-Miranda et al., 1990).

La hiptólida (28) se obtuvo del extracto etanólico de hojas secas de Hyptis pectinata (Gorter, 1920; Achmand et al., 1987).

La boronólida (29) obtenida del extracto de los tallos y la corteza de Tetradenia fructicosa (France y Polonsky, 1971; Kjaer et al., 1985) y de las hojas de Tetradenia barberae (Davies-Coleman y Rivett, 1987). Dos derivados de este compuesto han sido aislados en otra especie, la desacetilboronólida (30) y la 1',2'-didesacetilboronólida (31), aisladas del extracto clorofórmico de las hojas de Tetradenia riparia (Van-Puyvelde et al., 1979; idem. 1981), al igual que la umuravumbólida (32) y su derivado desacetilado (33).

El extracto acetónico de las hojas de Syncolosteron rotundifolius proporcionó la sinrotólida (34) (Davies-Coleman y Rivett, 1987).

También en otros géneros no pertenecientes a la familia de las Labiadas se han encontrado compuestos de este grupo de α -pironas, como en la Aristolochia argentina (Aristolochiaceae) cuyo extracto de éter de petróleo obtenido de las raíces proporcionó la argentilactona (35). De las hojas de Cryptocarya massoia (Lauraceae) se aislaron

dos α -lactonas α, β -insaturadas (36, 37) (Priestap et al., 1977).

Ninguno de estos compuestos presentó actividad farmacológica o quimioterapéutica. Por el contrario, estos metabolitos se consideran, al igual que todas las lactonas α, β -insaturadas, como posibles agentes carcinogénicos potenciales (Vlietinck, 1987).

3.2 ACTIVIDAD BIOLÓGICA Y METABOLISMO
 SECUNDARIO DEL GENERO Hyptis

La gran variedad de metabolitos aislados en este género permite atribuir una gran diversidad de actividades biológicas a las especies de Hyptis:

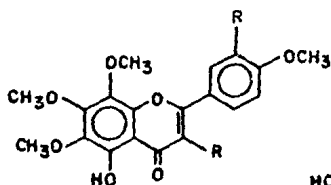
a) Actividad antibacteriana. En la mayoría de los casos la actividad bacteriostática y bactericida se atribuye a los constituyentes de los aceites esenciales. Por ejemplo, los componentes mayoritarios de las esencias del género Hyptis como: el citral, el citronelal y linolcol son monoterpenos bacteriostáticos (Möse y Luckas, 1957).

Las propiedades antisépticas de algunos aceites esenciales se deben al alto contenido de borneol y eucaliptol (Hegnauer, 1967). El timol, también constituyente mayoritario de algunos aceites esenciales, se usa en la terapéutica de las inflamaciones de las vías respiratorias y como profiláctico, por su gran acción bactericida (Wagner, 1977). Un diterpenoide de la serie del abietano, la 14-metoxitaxodiona (2) aislada de H. fructicosa, mostró una buena actividad contra bacterias Gram positivas (De Araujo et. al., 1974).

- b) Actividad carminativa y espasmolítica. Diversas investigaciones han demostrado que todos los alcoholes y fenoles monoterpénicos presentan una poderosa actividad musculotrópica espasmolítica (Imaseki y Kitabatake, 1962; Wagner y Sprinkmeyer, 1973), la cual explica la actividad carminativa de las especies del género Hyptis, ricas en estos aceites esenciales (Roig, 1974).
- c) Actividad citotóxica y anticancerígena. La observación de que los extractos acuosos de las hojas y tallos de H. verticillata inhibían el desarrollo de los huevecillos del erizo de mar, permitió el aislamiento de dos lignanos: la 6-peltantina y la 4'-demetil-desoxipodofilotoxina, que demostraron ser agentes antimetabólicos en pruebas de células fibroblásticas de ratón (German, 1971). Un estudio con plantas con actividad antitumoral demostró que el extracto cloroformico de las partes aéreas de H. emoryi era activo contra el carcinoma de Walker en ratas y el compuesto responsable de esta acción es el ácido betulínico (Sheth et al., 1972; Kingston y Munjal, 1978).
- La 14-metoxitaxodiona (2), aislada de H. fructicosa, también es activa sobre el carcinoma de Erlich en ratas (De Araujo et al., 1974). Un estudio relacionado con la actividad citotóxica del extracto etanólico de las partes aéreas de H. tomentosa demostró la actividad potencial de esta planta sobre un sistema de leucemia

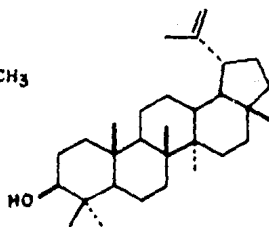
linfocítica y sobre un cultivo de células KB. De este extracto se aislaron tres componentes activos. El agente citotóxico más efectivo (ED_{50} 0.038 $\mu\text{g/ml}$) fue identificado como el lignano desoxipodofilotoxina (20). Dos constituyentes adicionales que contribuían con la citotoxicidad total del extracto (ED_{50} 6.0 $\mu\text{g/ml}$) fueron dos flavonoides: la gardenina B (38) (ED_{50} 6.0 $\mu\text{g/ml}$), que también es el constituyente mayoritario de H. albida (Pereda-Miranda, 1987), y la 5-OH-4',3,6,7,8-pentametoxiflavona (39) (ED_{50} 1.8 $\mu\text{g/ml}$) (Kingston *et al.*, 1979; Edwards *et al.*, 1979).

De la raíz de H. suaveolens se aisló el lupeol (40) que mostró ser un potente agente citotóxico (Kingston y Munjal, 1978).



(38) R=H

(39) R=OMe



(40)

d) Otras actividades. El extracto bencénico de las raíces de H. suaveolens mostró una actividad fungicida efectiva sobre el hongo patógeno Helminthosporium oryzae. Cuatro especies de este género se utilizan como insecticidas: H. capitata, H. verticillata, H. emoryi y H. albida (Altschul, 1973), pero no existe ninguna investigación fitoquímica específica relacionada con tal acción.

Otra actividad que presentan los extractos acuosos y metanólicos de H. pectinata y H. suaveolens es el efecto molusquicida potencial (Kloos y Mc Cullough, 1987). Estas tres actividades en conjunto podrían presentar una alternativa biológica al control de las plagas con mínimas repercusiones ecológicas.

PARTE EXPERIMENTAL

La Figura 4.1 muestra, mediante un diagrama de bloques, la secuencia de trabajo desarrollada en el presente estudio. Cada paso se describe a continuación en forma detallada.

1. MATERIAL VEGETAL.

Las partes aéreas de una población de H. pectinata Poit. (Lamiaceae) se colectaron en noviembre de 1987, en el Km. 9 de la carretera Jalapa-Puerto de Veracruz, estado de Veracruz, México. Un ejemplar de referencia se depositó en el Herbario Nacional, Instituto de Biología, UNAM (M-21853).

2. EXTRACCION DEL MATERIAL VEGETAL Y ELABORACION DEL EXTRACTO ORGANICO.

El material vegetal se dejó secar a temperatura ambiente y se cortó en trozos pequeños proporcionando un total de 3.7 Kg mismos que fueron sometidos a una extracción con cloroformo (13 l) a temperatura ambiente durante 5 días. Posteriormente, el residuo vegetal se decantó y el disolvente filtrado se concentró a presión reducida, obteniéndose 200 g de extracto.

3. RESOLUCION DEL EXTRACTO MEDIANTE PARTICION CROMATOGRAFICA.

El total del extracto se fraccionó en una columna em-

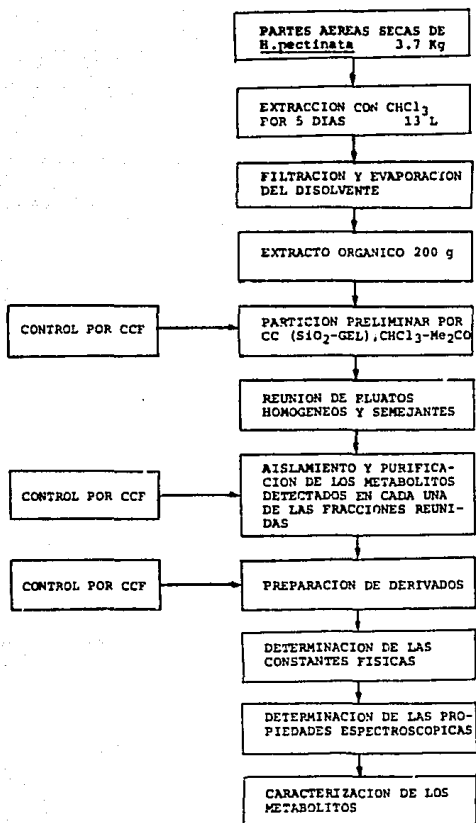


Fig. 4.1 Estrategia propuesta para el estudio fitoquímico convencional de H. pectinata.

pacada con 2.5 Kg de gel de sílice, utilizando como sistema de elución mezclas de CHCl_3 - Me_2CO de polaridad creciente. Todos los eluatos de aproximadamente 800 ml cada uno se analizaron por CCF y se reunieron considerando la homogeneidad y semejanza de los constituyentes presentes en ellos. Cada fracción obtenida se trató de manera independiente a fin de poder aislar y purificar todos los metabolitos presentes.

Las cromatografías en columna (CC) se realizaron en gel de sílice (Merck 60).

Las cromatografías en capa fina (CCF) se realizaron en cromatoplasmas de gel de sílice (Merck 60 F-254).

De la reunión de eluatos se obtuvieron cinco fracciones numeradas en orden creciente de polaridad, las cuales contenían cinco compuestos mayoritarios perfectamente diferenciables por CCF (Tabla 4.1).

4. AISLAMIENTO Y PURIFICACION DE LOS CONSTITUYENTES MAYORITARIOS.

En la Figura 4.2 se esquematiza la secuencia desarrollada para el aislamiento y la purificación de los constituyentes. La caracterización de cada uno de los compuestos será discutida en la siguiente sección.

La Tabla 4.2 enlista los productos naturales aislados, así como su rendimiento expresado en base al peso seco del material vegetal empleado.

TABLA 4.1 FRACCIONAMIENTO DEL EXTRACTO ORGANICO DE H. pectinata MEDIANTE CROMATOGRAFIA EN COLUMNA SOBRE GEL DE SILICE.

Sistema de elución CHCl ₃ -Me ₂ CO	No. de eluatos	Sistemas de elución para la visualización en CCF	Eluatos combinados	No. de fracción	No. de constituyentes mayoritarios visualizados mediante CCF	*Clave de la muestra
		CHCl ₃ -Me ₂ CO				
100:0	1- 5	10:0	desechados	---	---	---
	6- 53	10:0	6- 14	I	1	HP-I-6
			15- 57	II	2	HP-I-6 HP-II-16
95:5	54- 68	9:1	58- 67	III	1	HP-III-58
		9:1	69-101	IV	1	HP-IV-69
75:25	94-114	1:1	102-127	---	---	---
		1:1	128-147	V	1	HP-V-128
		1:1	148-162	---	---	---
50:50	115-173	1:1	163-177	---	---	---
0:100	174-212	1:1	178-214	---	---	---

*La clave utilizada para la numeración de los diferentes compuestos aislados, de cada una de las fracciones, está constituida por tres elementos. El primero representa las iniciales del nombre genérico y específico de la especie vegetal en estudio (HP). El segundo señala el número de la fracción de la columna original de la cual se obtuvo el metabolito en cuestión. Por último, el tercero indica el número del eluato a partir del cual se obtuvo el producto natural.

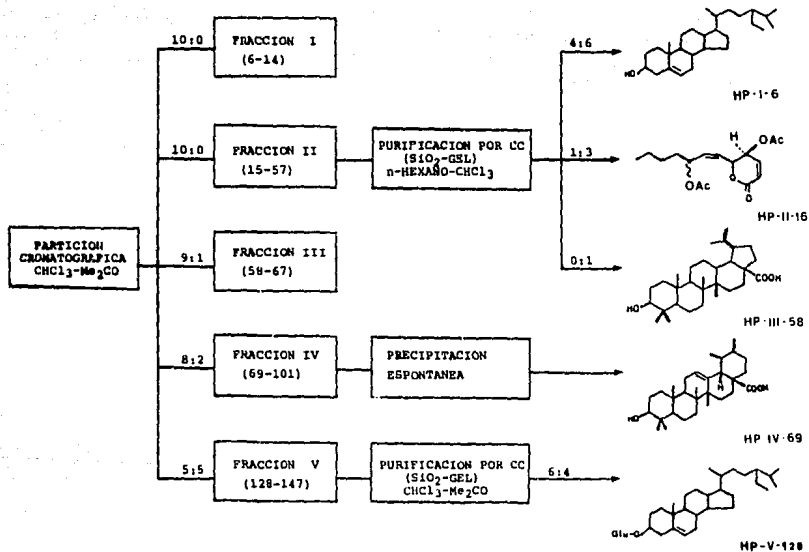


Fig. 4.2 Secuencia de análisis cromatográfico del extracto acétonico de *H. pectinata*.

TABLA 4.2 RENDIMIENTO DE LOS METABOLITOS AISLADOS DE H. pectinata

COMPUESTO AISLADO	CLAVE	RENDIMIENTO	
		gramos	% (peso seco)
ACIDO URSOLICO	HP- IV-69	27.27	0.7370
PECTINOLIDA	HP- II-16	5.6	0.1513
ACIDO BETULINICO	HP-III-58	5.0	0.1351
GLUCOSIDO DEL β -SITOSTEROL	HP- V -128	1.28	0.0346
β -SITOSTEROL	HP- I -6	0.479	0.0129

4.1 AISLAMIENTO DEL COMPUESTO HP-I-6 (β -sitosterol).

La fracción II (13.07 g) de la columna original se purificó mediante CC (300 g gel de sílice). De las fracciones eluidas con n-hexano- CHCl_3 (2:3) precipitaron 209 mg del sólido incoloro HP-I-6, con un punto de fusión 135-137°C.

4.2 AISLAMIENTO DEL COMPUESTO HP-II-16 (pectinólida).

La fracción II (23.79 g) fue recromatografiada mediante una columna de gel de sílice (250 g) y eluida con n-hexano- CHCl_3 (1:3). De las fracciones de menor polaridad ($R_f = 0.35$) se obtuvieron 270 mg adicionales del sólido HP-I-6. Las fracciones posteriores de esta columna ($R_f = 0.5$) mostraron mediante CCF un producto activo en UV y que desarrollaba un color azul con $\text{CeSO}_4/\text{H}_2\text{SO}_4$. El total de estas fracciones se reunieron en dos partes: fracción I (fracciones 50-96) y fracción II (fracciones 99-142), debido a que las primeras fracciones presentaron una gran cantidad de pigmentos.

Se realizó una decoloración a 2 g de muestra de la fracción II disueltos en CHCl_3 con carbón activado, después de reposar la suspensión durante diez minutos se filtró en vacío a través de celita y se efectuaron sucesivos lavados con CHCl_3 . El filtrado se concentró a presión reducida y luego de una CCF se comprobó que el producto no sufrió ninguna alteración. De esta misma forma se procedió con el resto de la fracción II y con toda la fracción I.

Del tratamiento a la fracción II se obtuvo un semisólido (6 g) de color amarillo y textura aceitosa, el cual luego de 4 días en reposo mostró la presencia de un precipitado que se pudo separar mediante filtración a vacío. Este sólido blanco (4.5 mg) no fue activo en UV y no generó ninguna coloración con $\text{CeSO}_4/\text{H}_2\text{SO}_4$. Todo el residuo (5 g) de la fracción II se sometió a una CC (300 g de sílice) eluida con n-hexano- CHCl_3 (1:3) y de las fracciones de $R_f = 0.52$ se obtuvo un aceite amarillo (3g).

De la fracción I, después de la decoloración se obtuvo un producto (10 g) que fue tratado mediante una CC (300 g de gel de sílice), eluida con n-hexano- CHCl_3 (1:3) obteniéndose de las fracciones de $R_f = 0.53$ un semisólido amarillo aceitoso (7 g). Este producto junto con el aislado de la fracción II (3 g), se purificaron a través de una columna de gel de sílice (100 g) eluida con n-hexano- CHCl_3 (1:3), proporcionando 5.6 g de un aceite amarillo inodoro de $R_f = 0.38$.

4.3 AISLAMIENTO DEL COMPUESTO HP-III-58 (ácido betulínico).

La fracción III (2.6 g) después de ser sometida a CC (300 g gel de sílice) y eluida con CHCl_3 , proporcionó 5 g de un sólido amorfo (HP-III-58) insoluble en disolventes no polares.

4.4 AISLAMIENTO DEL COMPUESTO HP-IV-69 (ácido ursólico).

De la fracción IV precipitaron 27.27 g de un sólido

amorfo, el cual al compararse con referencias auténticas de metabolitos aislados de otras plantas del género Hyptis se comprobó que se trataba del ácido ursólico.

Esta identificación se realizó mediante CCF utilizando diferentes sistemas de elución, la determinación del punto de fusión mixto (280-282°C) y la comparación con el espectro paralelo de IR del producto natural obtenido de la fracción IV con el registrado para la muestra auténtica.

4.5 AISLAMIENTO DEL COMPUESTO HP-V-128 (glucósido del β -sitosterol).

La fracción V (7.81 g) de la columna original se purificó mediante CC (200 g gel de sílice). Las fracciones eluidas con $\text{CHCl}_3\text{-Me}_2\text{CO}$ (3:1) proporcionaron 1.28 g de un sólido cristalino incoloro con un punto de fusión de 282-284°C.

5. PREPARACION DE DERIVADOS.

A continuación se describe la metodología utilizada en las reacciones químicas realizadas a los productos aislados de H. pectinata para facilitar su completa identificación.

El desarrollo de las reacciones y la obtención de los derivados sintetizados se comprobó mediante CCF.

5.1 REACCIONES DE ACETILACION.

a) Acetilación del β -sitosterol (HP-I-6). 100 mg del compuesto se disolvieron en 0.5 ml de Ac_2O y 0.5 ml de pi-

ridina. La mezcla de reacción se dejó reaccionar con agitación y a temperatura ambiente durante 12 hs. Transcurrido este tiempo, se adicionaron 10 ml de agua destilada y se realizaron dos extracciones sucesivas utilizando en cada una volúmenes de 20 ml de CHCl_3 . Las fases orgánicas se reunieron y fueron tratadas con 20 ml de HCl 1N, seguido de un tratamiento alcalino con una solución saturada de NaHCO_3 . Por último, la fase orgánica se lavó dos veces con volúmenes de 10 ml de agua en cada ocasión, se secó con Na_2SO_4 y se concentró a presión reducida, obteniéndose un precipitado amorfo blanco, el cual se purificó mediante CC (15 g gel de sílice) eluida con CHCl_3 . De las fracciones de $R_f = 0.32$ precipitaron 80 mg de un sólido blanco (HP-I-6a) con un punto de fusión de 95-97°C.

b) Acetilación del ácido betulínico (HP-III-58).

200 mg del compuesto HP-III-58 se disolvieron en 0.5 ml de Ac_2O y 0.5 ml de piridina, dejándose reaccionar con agitación y a temperatura ambiente durante 48 hs. Transcurrido este tiempo, la mezcla de reacción se trató siguiendo el procedimiento indicado en el inciso anterior. El crudo de reacción (165 mg) se purificó mediante una CC (15 g gel de sílice) utilizando CHCl_3 como eluyente. El producto acetilado (HP-III-58a) se obtuvo como un sólido blanco cristalino con un punto de fusión de 275-278°C.

c) Acetilación del glucósido del β -sitosterol (HP-V-128).

100 mg del glucósido del β -sitosterol se disolvieron en

0.5 ml de Ac_2O y 0.5 ml de piridina, dejándose reaccionar a temperatura ambiente durante toda una noche. Después de este tiempo se realizó el mismo tratamiento utilizado en la reacción 5.1.a para la extracción del producto. De aquí se obtuvieron 76 mg de un sólido blanco con un punto de fusión de $159-160^\circ\text{C}$ (HP-V-128a).

5.2 REACCIONES DE ALQUILACION CON DIAZOMETANO.

Preparación del reactivo:

A 4 ml de una solución de KOH (50%) y 20 ml de éter etílico se adicionaron 2 g de N-nitroso-N-metilurea en 10 ml de Et_2O . La mezcla de reacción se mantuvo en un baño de hielo.

a) Obtención del betulinato de metilo (HP-III-58c). 50 mg del ácido betulínico (HP-III-58) se disolvieron en 10 ml de EtOH y fueron alquilados con un exceso de solución etérea de CH_2N_2 a una temperatura de 5°C . La adición del agente alquilante se efectuó hasta que ya no se observó desprendimiento de N_2 . La mezcla de reacción se evaporó al vacío, proporcionando un semisólido que al ser purificado por CC (15 g gel de sílice) eluida con CHCl_3 . Se obtuvieron de las fracciones de $R_f = 0.45$, 30 mg de un sólido blanco con un punto de fusión de $206-208^\circ\text{C}$.

b) Obtención del acetyl betulinato de metilo (HP-III-58b). 80 mg del producto acetylado (Hp-III-58a) se disolvieron en 10 ml de EtOH y fueron alquilados con un exceso de solución etérea de CH_2N_2 a una temperatura de 5°C . La

obtención del producto de reacción se realizó siguiendo la metodología descrita en el inciso anterior. El derivado metilado (HP-III-58b) se obtuvo como un sólido incoloro (60 mg) con un punto de fusión de 192-194°C.

c) Obtención del ursolato de metilo (HP-IV-69a).

32 mg del ácido ursólico (HP-IV-69) se disolvieron en 5 ml de EtOH y se metilaron con un exceso de la solución alquilante ($\text{CH}_2\text{N}_2\text{-Et}_2\text{O}$) proporcionando 34 mg del éter metílico derivado, como un sólido amorfo blanco (11 mg) con un punto de fusión de 168-169°C.

6. DETERMINACION DE LAS CONSTANTES FISICAS DE LAS SUSTANCIAS AISLADAS Y DE SUS DERIVADOS PREPARADOS.

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Büchi 530 y no están corregidos. Las rotaciones ópticas se midieron en un polarímetro Perkin-Elmer 241, tras previa disolución de los productos en CHCl_3 .

7. DETERMINACION DE LAS CONSTANTES ESPECTROSCOPICAS DE LAS SUSTANCIAS AISLADAS Y SUS DERIVADOS PREPARADOS.

Los espectros de IR se realizaron en un espectrofotómetro Perkin-Elmer 599B. Los espectros de masas se obtuvieron en un aparato Hewlett-Packard 5985-B mediante la introducción directa a 70 eV. Los espectros de RMN de baja resolución se registraron en un aparato Varian M-390 y los de alta resolución (RMN¹H y ¹³C) en un aparato Varian VXR-300.

DISCUSION

Las diversas cromatografías realizadas del extracto acetónico obtenido de las partes aéreas de una población de H. pectinata permitieron el aislamiento de una nueva σ -lactona- α, β -insaturada:

De este mismo estudio se aislaron y caracterizaron cuatro metabolitos conocidos: el β -sitosterol (HP-I-6), el ácido hetulínico (HP-III-58), el ácido ursólico (HP-IV-69) y el glucositolsterol (HP-V-128).

En el presente capítulo se describe el análisis de los resultados que permitieron la caracterización e identificación de estos productos naturales, prestando una atención especial a la elucidación estructural y estereoquímica del nuevo producto natural, la pectinólida.

1. CARACTERIZACION DE LOS CONSTITUYENTES CONOCIDOS.

Para estos compuestos el análisis de las constantes espectroscópicas, además de la comparación con muestras auténticas (pf, IR y RMN¹H), fueron las herramientas que permitieron su completa caracterización.

1.1 CARACTERIZACION DEL β -SITOSTEROL (HP-I-6) y DE SU GLUCOSIDO (HP-V-128).

Las constantes físicas y espectroscópicas del producto natural HP-I-6 se resumen en el cuadro sinóptico 5.1.

La caracterización de ambos productos se realizó por comparación de las constantes físicas y las propiedades espectroscópicas con las descritas en la literatura para β -sitosterol y su glucósido, así como la comparación con muestras auténticas de estos productos (Espectros 1 y 2).

1.2 CARACTERIZACION DEL ACIDO BETULINICO (HP-III-58)

La fracción HP-III-58 permitió el aislamiento de un sólido amorfo insoluble en disolventes no polares apróticos por lo que se procedió a su derivatización mediante reacciones de acetilación (HP-III-58a), esterificación (HP-III-58c) y ambas reacciones de manera consecutiva HP-III-58b). Las constantes físicas y las propiedades espectroscópicas de estos derivados sintetizados se incluyen en los cuadros sinópticos 5.2, 5.3 y 5.4. Las características espectroscópicas que permitieron establecer la estructura propuesta para el producto (HP-III-58) se analizaron como sigue:

a) El espectro de IR para el éster metílico (HP-III-58c) mostró una banda en 3550 cm^{-1} característica para el grupo hidroxilo, una banda en 1720 cm^{-1} para un grupo éster y una olefina trisustituida que se identificó con las señales a 1640 y 980 cm^{-1} .

Al formar el derivado acetilado (HP-III-58a) del producto natural, su espectro de IR mostró la desaparición de la banda del grupo hidroxilo y se observó la presencia de una señal adicional en 1735 cm^{-1} característica del

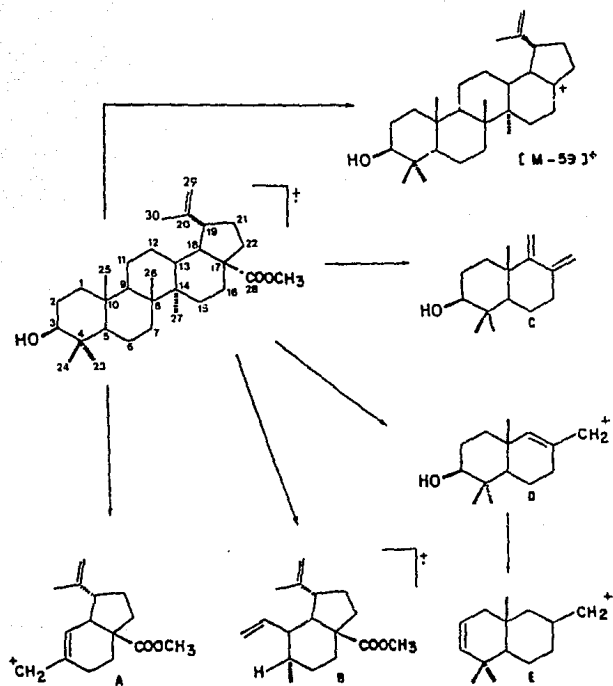


Fig. 5.1 Iones fragmento diagn6sticos para el betulinato de metilo (HP-III-58c).

grupo acetoxilo y otra señal a 1690 cm^{-1} asignable al grupo carboxílico. Estas observaciones estructurales se comprobaron al generar el derivado esterificado del acetato (HP-III-58b) su espectro de IR mostró una sola señal en 1730 cm^{-1} correspondiente a las funciones carbonílicas de los dos esteres en los carbonos C_3 y C_{28} .

b) El espectro de masas para el ester metílico (HP-III-58c) presentó un ión molecular de $m/e\ 470\ [M]^+$, compatible con la fórmula molecular $C_{31}H_{50}O_3$. Además, mostró el patrón de fragmentación característico para la serie del $\Delta^{20(29)}$ lupeno. Los principales fragmentos se generan mediante rupturas de los enlaces en el anillo C, ya sea en los carbonos C_8-C_{14} y C_9-C_{11} o en los carbonos $C_{12}-C_{13}$ y C_8-C_{14} , seguidas de una migración de hidrógeno a fin de formar los iones catiónicos (A) y (B) con los anillos restantes D y E del esqueleto básico (Budzikiewickz, *et. al.*, 1963). La Figura 5.1 muestra los fragmentos más importantes que corresponden a los iones $m/e\ 207$ (D) y su forma deshidratada $m/e\ 189$ (E).

c) Por último, los espectros de RMN constituyeron la principal evidencia para la caracterización del producto natural como el ácido betulínico. Las características de los espectros RMN^1H para los tres derivados son: la presencia de cinco señales simples correspondientes a grupos metilo terciarios, un grupo metilo vinílico centrado en $\delta 1.68$ (3H, s) y dos protones olefínicos corres-

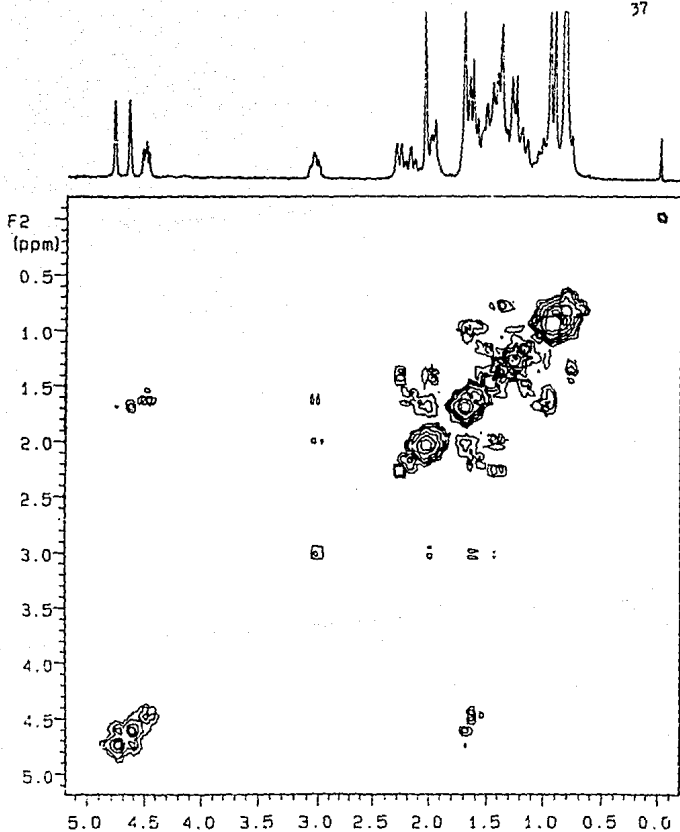


Fig. 5.2 Espectro de RMN¹H bidimensional (COSY-2D) del ácido acetil betulínico (HP-III-58a).

pondientes a un grupo metilénico terminal en δ 4.73 y δ 4.60 donde las señales aparecen como singuletes. Estos datos comprobaron la presencia de un grupo isopropenilideno en el núcleo estructural básico y sus desplazamientos químicos correspondieron con los observados para un esqueleto triterpénico pentacíclico de lup-20 (29)-eno (Chin et al., 1973; Rasool et al., 1989). De manera especial, el desplazamiento químico y la multiplicidad para el núcleo H-19 β (δ 3.00, ddd, J=10.6, 10.6, 5.3 Hz) demostró la presencia del grupo isopropenilideno y por lo tanto corroboró la asignación estructural correspondiente al ácido betulínico (Achmand et al., 1987).

Las interacciones de acoplamiento se verificaron mediante la correlación bidimensional ^1H - ^1H (COSY-2D), la cual mostró la conectividad entre los núcleos H₂-29 y el singulete para el grupo Me-30, al mismo tiempo se observaron los acoplamientos para el H-19 β con los hidrógenos H-18 α y H₂-21. Estas conectividades se ejemplifican en el espectro del derivado acetilado (Figura 5.2).

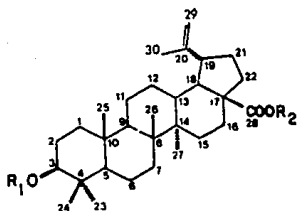
Los espectros de RMN¹³C (Tabla 5.1) de los derivados fueron similares a los descritos para el betulinato de metilo (HP-III-58c) y el acetil betulinato de metilo (HP-III-58b) (Monaco y Previtera, 1984; Wenkert et al., 1978).

1.3 CARACTERIZACION DEL ACIDO URSOLICO (HP-IV-69).

Las constantes físicas y espectroscópicas para este metabolito se resumen en el cuadro sinóptico 5.5.

Tabla 5.1 Espectros de RMN¹³C de los derivados del ácido betulínico (HP-III-58).

c	δ		
	a	b	c
1	38.31	38.32	38.79
2	23.63	23.63	25.46
3	80.94	80.87	78.81
4	34.74	37.74	38.66
5	55.34	55.35	55.30
6	18.09	18.12	18.25
7	34.16	34.17	34.26
8	40.62	40.61	40.62
9	50.33	50.38	50.49
10	37.06	37.04	37.15
11	20.78	20.83	20.83
12	25.36	25.40	27.29
13	38.35	38.16	38.22
14	42.35	42.32	42.34
15	30.51	30.51	29.63
16	32.10	32.10	32.13
17	56.36	56.48	56.51
18	46.90	46.92	46.92
19	49.19	49.37	49.41
20	150.41	150.49	150.55
21	29.63	29.60	30.55
22	37.01	36.91	36.93
23	27.90	27.88	27.93
24	16.41	16.44	16.08
25	16.12	16.13	15.90
26	15.98	15.89	15.33
27	14.59	14.61	14.27
28	171.15	176.71	176.67
29	109.73	109.59	109.54
30	19.29	19.28	19.33



a, R₁=Ac, R₂=H

b, R₁=Ac, R₂=Me

c, R₁=H, R₂=Me

a) El espectro de IR presentó bandas de absorción en 3430 y 1030 cm^{-1} características para el grupo hidroxilo, una banda intensa en 1700 cm^{-1} asignable al grupo carboxílico y una señal en 1000 cm^{-1} para una olefina trisustituida.

b) El espectro de masas presentó un ión molecular m/e 456 $[M]^+$ que es compatible con la fórmula molecular $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_3$ y un patrón de fragmentación característico para la serie de triterpenos pentacíclicos con esqueleto básico de 12-urseno y 12-oleaneno (Budzikiewichz et al., 1963). El mecanismo de fragmentación sucede a través de una reacción de Retro Diels-Alder del anillo C y que coincide con la generación del pico base del espectro con una m/e de 248. El catión de m/e 203 se produce mediante la eliminación parcial del anillo E para generar el catión de m/e 133.

c) Por último, el espectro de RMN^1H presentó cinco señales simples centradas entre δ 0.70 y δ 1.80 asignables a los grupos metilo terciarios. Las señales para los metilos secundarios característicos de este compuesto aparecen sobrepuestas a las anteriores señales, por lo que no son distinguibles. Se observa también un doblete centrado en δ 2.2 (1H) asignable al protón H-18; el cual constituye una señal característica del esqueleto de urs-12-eno (Cheung y Yan, 1972). Una señal en δ 3.17 (1H, dd, $J=9, 7$ Hz) en forma de doblete de dobletes que corresponde al protón germinal del grupo OH secundario

y una señal centrada en δ 5.24 (1H, m) asignable al protón vinílico H-12.

Las características de este compuesto, así como las observadas para su éster metílico sintetizado (HP-IV-69a; (cuadro sinóptico 5.6), coinciden perfectamente con las reportadas en la literatura (Romo de Vivar *et al.*, 1985) para el ácido ursólico. Este constituyente se identificó por comparación de sus constantes físicas y espectroscópicas con las observadas para una muestra auténtica aislada de *H. mutabilis* (Pereda-Miranda y M. Gascón, 1988).

2. ELUCIDACION ESTRUCTURAL DE UNA NUEVA δ -LACTONA α , β -INSATURADA, LA PECTINOLIDA.

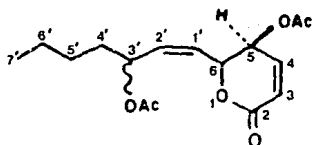
El compuesto HP-II-16 corresponde a la fórmula molecular $C_{16}H_{22}O_6$ (espectrometría de masas) y sus constantes físicas y espectroscópicas se resumen en el cuadro sinóptico 5.7.

Su espectro de IR presentó una banda ancha en 1735 cm^{-1} característica de los alargamientos del grupo carbonilo en funciones de ésteres y otra señal en 1240 cm^{-1} correspondiente a las flexiones de los enlaces C-O. También se observaron varias señales que sugieren la presencia de dobles enlaces, cuyos máximos se obtuvieron en 3015 , 1620 y 815 cm^{-1} .

La absorción en UV (MeOH) a una λ_{max} de 208 nm apoyó

Tabla 5.2 Desplazamientos químicos y multiplicidades para los núcleos de hidrógeno de la pectinó-
lida (HP-II-16).

NUCLEO	δ / ppm	MULTIPLICIDAD J (Hz)
H - 3	6.24 (1H, d)	J= 9.7
H - 4	6.96 (1H, dd)	J= 9.7, 5.7
H - 5	5.19 (1H, dd)	J= 5.7, 2.9
H - 6	5.60 (1H, dd)	J= 8.1, 2.9
H - 1'	5.73 (1H, dd)	J= 10.5, 8.1
H - 2'	5.62 (1H, dd)	J= 10.5, 10.1
H - 3'	5.35 (1H,ddd)	J= 10.1, 7.3 , 6.6
H - 4'	1.70 (2H, m)	
H - 5'	1.54 (2H, m)	
H - 6'	1.29 (2H, m)	
H - 7'	0.90 (3H, t)	J= 6.9



la presencia de una lactona α, β -insaturada.

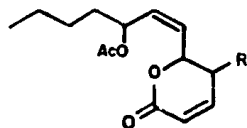
El espectro de RMN^1H (Tabla 5.2) presentó resonancias que fácilmente fueron asignadas de la siguiente manera:

1. dos singuletes que integraron cada uno para tres protones con el desplazamiento característico para grupos metilo de funciones acetoxilo (δ 2.05 y 2.09);
2. un grupo metilo primario (3H, t, δ 0.9, J=6.9 Hz);
3. dos protones olefínicos de una función carbonílica α, β -insaturada (δ 6.24, d, J=9.7 Hz; 6.96, dd, J=9.7, 5.7 Hz);
4. dos protones olefínicos centrados en δ 5.72.

El espectro de RMN^{13}C confirmó las observaciones anteriores y proporcionó información adicional. En los experimentos de desacoplamiento total y APT se observaron resonancias para núcleos carbonílicos de dos grupos acetoxilo (δ 170.25, s, y 169.78, s) y de una δ -lactona α, β -insaturada (δ 162.12, s), cuatro señales simples para átomos de carbono olefínicos centrados en δ 140.01, 133.17, 126.18 y 124.99. Las señales restantes en el espectro fueron asignadas como se indica a continuación: tres carbonos secundarios geminales a un átomo de oxígeno (δ 75.04, 69.42 y 64.24), tres metilenos alifáticos (δ 34.01, 27.20 y 22.44), dos metilos para las funcionalidades acetoxilo (δ 21.07 y 20.46) y, finalmente, un singulete para un grupo metilo terminal (δ 13.88), (Tabla 5.3).

Tabla 5.3 Espectros de RMN¹³C de la pectinólida (HP-II-16) y la umuravumbólida (32).

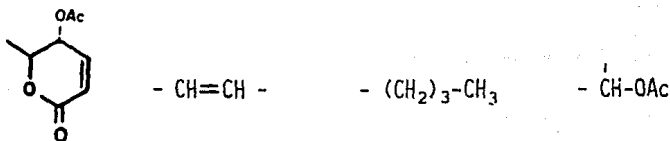
c	δ	
	a	b
2	163.37	162.12
3	121.73	124.99
4	144.15	140.01
5	30.09	64.24
6	74.07	75.04
1'	131.72	133.17
2'	130.12	126.18
3'	69.45	69.42
4'	34.32	34.01
5'	27.60	27.20
6'	22.47	22.44
7'	13.88	13.88



a, R=H (32)

b, R=OAc (HP-II-16)

Los siguientes fragmentos estructurales satisfacen los requerimientos para la fórmula molecular $C_{16}H_{22}O_6$ y, al mismo tiempo, ebedecen a las observaciones espectroscópicas anteriores:



La correlación bidimensional de cada uno de los núcleos de hidrógeno (2D-COSY) Y los experimentos de doble resonancia realizados permitieron establecer la conectividad de estos fragmentos proporcionando las siguientes conclusiones:

1. La multiplicidad observada para la señal centrada en $\delta 6.24$ (H-3) correspondió con el valor de acoplamiento olefínico CIS con el protón en $\delta 6.96$ (H-4, $J_{3-4} = 9.7$) (Figura 5.3).
2. El acoplamiento adicional que se observó para esta última señal se correlacionó con el protón geminal a una de las funciones acetoxilo centrada en $\delta 5.19$ (H-5), cuya interacción se identificó fácilmente en el espectro 2D-COSY (Figura 5.3) y correspondió al valor de $J=5.7$ Hz. Esta observación permitió asignar inequívocamente la resonancia correspondiente al nú-

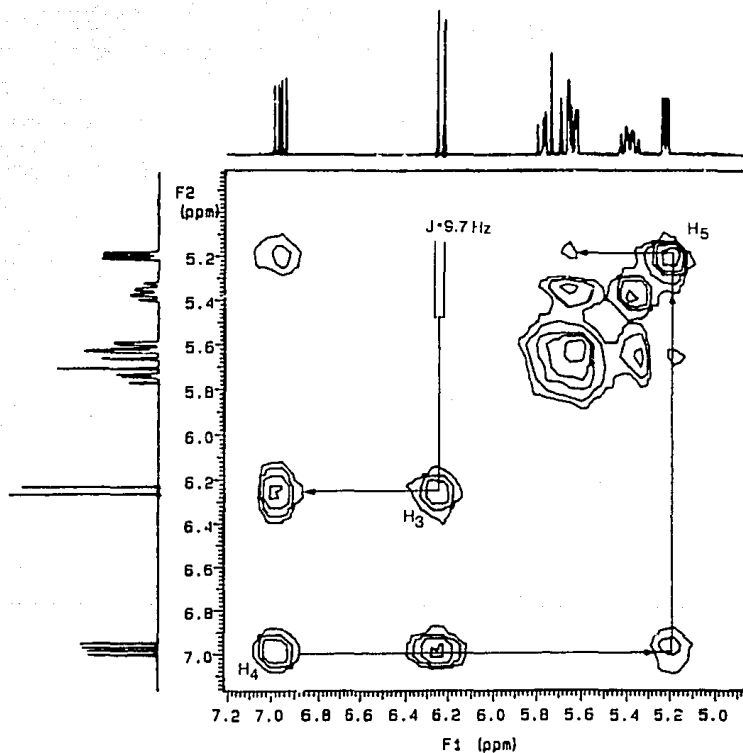


Fig. 5.3 Expansión del espectro 2D-COSY (^1H - ^1H) para la región vinílica de la pectinólida.

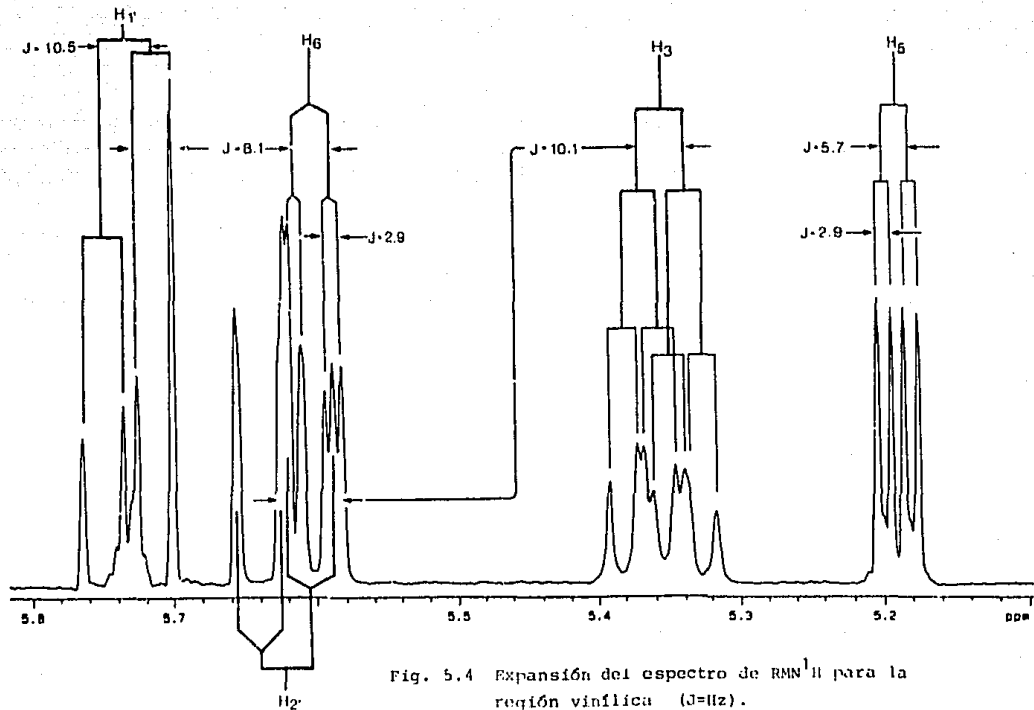


Fig. 5.4 Expansión del espectro de RMN¹H para la región vinílica ($J=Hz$).

cleo H-5 y, por lo tanto, la interacción restante representó la constante de acoplamiento con el protón geminal a la función etérea de la lactona, cuyo desplazamiento químico se observó en $\delta 5.60$ (1H, dd, $J=8.1$, 2.9 Hz) (Figura 5.4).

El valor de esta interacción fue similar al observado para la olguina (23) ($J_{5-6}=2.9$ Hz) (Alemany *et al.*, 1979), el cual confirmó una configuración cuasi-ecuatorial para la cadena lateral y una orientación axial para el protón H-6 y el grupo acetoxilo en C_5 (Figura 5.5).

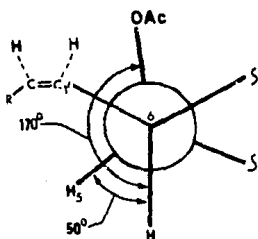


Fig. 5.5 Proyección de Newman del enlace C_5-C_6 de la pectinólida.

- La señal compleja centrada en $\delta 5.25$, que se asignó al protón geminal del grupo acetoxilo restante, presentó interacciones vecinales con la cadena alifática y con las señales vinílicas del doble enlace de la cadena lateral. Esta observación se verificó mediante el desaco-

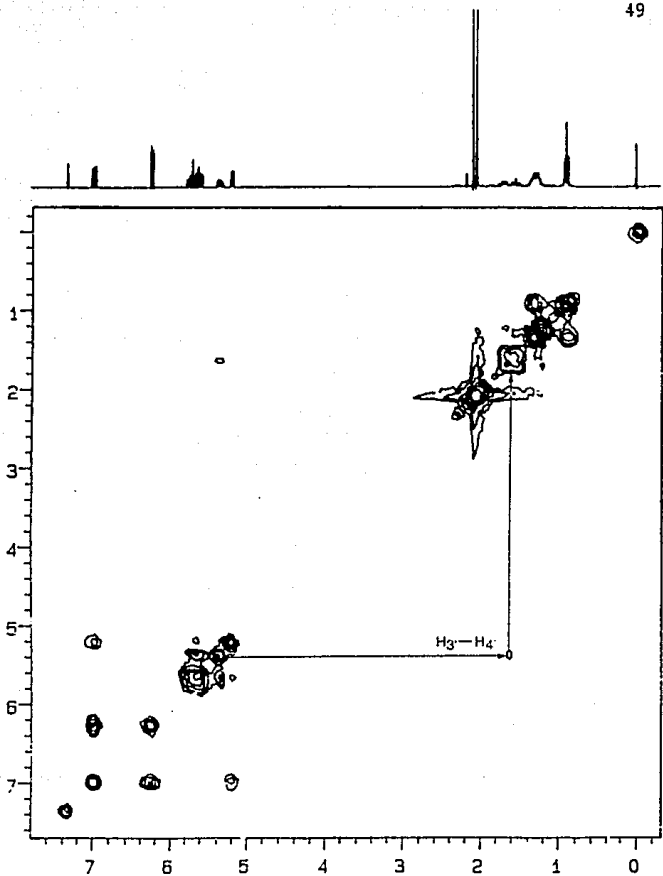


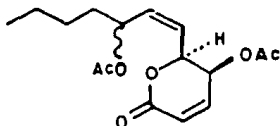
Fig. 5.6 Espectro de RMN¹H bidimensional (COSY-2D) de la pectinólida (HP-II-16).

plamiento del metileno centrado en $\delta 1.70$ y que permitió calcular la constante de acoplamiento con el protón vinílico ($J = 10.1$ Hz) (Figura 5.6).

4. La multiplicidad observada para la señal centrada en $\delta 5.73$ correspondió con el valor de acoplamiento olefínico CIS con la señal centrada en $\delta 5.62$ (H-2', $J_{1',-2'} = 10.5$) (Figura 5.4).

Las asignaciones propuestas para los núcleos de ^{13}C (Tabla 5.3) se establecieron por comparación con los datos descritos para ambientes estructurales semejantes, en especial con los valores descritos para la umuravumbólida (32) (Davies *et al.*, 1987).

Por lo tanto, la correspondencia encontrada en los datos espectroscópicos ($J_{\text{H-H}}$ y $\delta^{13}\text{C}$) con los modelos utilizados permitieron proponer la siguiente fórmula parcial para el compuesto HP-II-16:



Finalmente, sólo resta por establecer la configuración relativa del núcleo C-3' y la configuración absoluta para este compuesto.

CONCLUSIONES

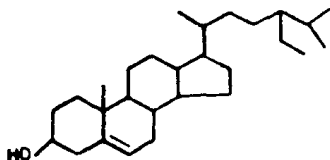
El estudio fitoquímico de Hyptis pectinata (L) Poit., objetivo principal del presente trabajo, permite generar las siguientes conclusiones relacionadas con el metabolismo de esta especie:

- Los principales constituyentes del metabolismo secundario de esta especie medicinal son los triterpenos pentacíclicos, representados por los ácidos betulínico (HP-III-58) y ursólico (HP-IV-69).

El constituyente más abundante del extracto acetónico fue el ácido ursólico, característica biosintética que comparte con otros miembros de la familia Lamiaceae (Pereda-Miranda, 1988).

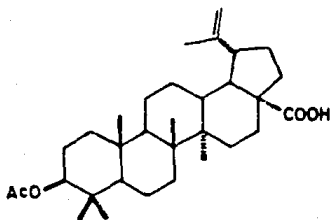
- Se aisló y caracterizó una nueva δ -lactona α, β -insaturada denominada pectinólida (HP-II-16), cuya estructura se estableció como la 5-(acetiloxi)-5,6-dihidro-6-[3-(acetiloxi)-1-heptenil]-2H-piran-2-ona.
- Los metabolitos restantes fueron dos esteroides conocidos y ampliamente distribuidos en la familia Lamiaceae: el β -sitosterol (HP-I-5) y su glucósido (HP-V-128).

Cuadro sinóptico 5.1 Constantes físicas y espectroscópicas del β -sitosterol.



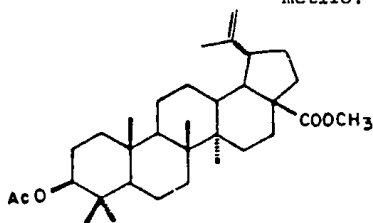
p.f.	135-137 °C
$[\alpha]_D^{25}$	- 35.0 (c 1.0, CHCl ₃)
IR $\nu_{\text{máx}}$ (KBr) (cm ⁻¹) (Espectro 1)	3400, 2920, 2850, 1460, 1375, 1050, 950.
EM 70 eV m/e (% abund. rel.)	416 M ⁺² (7.2), 415 M ⁺¹ (29.3), 414 M ⁺ (100.0), 399 M-15 (37.5), 396 M-18 (51.2), 381 M-15-18 (36.5), 330(44.2), 303(56.7), 275 (12.0), 273(28.2), 255(34.0), 246 (6.2), 231(28.3), 213(41.2), 145 (43.8), 135(30.9), 95(48.0), 81 (41.2).

Cuadro sinóptico 5.2 Constantes físicas y espectroscópicas del ácido acetil betulínico.



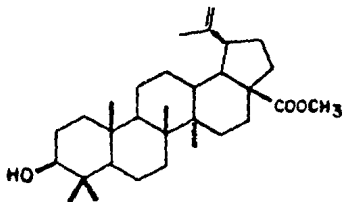
p.f.	275-278 °c
$[\alpha]_D^{25}$	+23.4 (c 0.043, CHCl ₃)
IR $\nu_{\text{máx.}}$ $\frac{\text{KBr}}{(\text{cm}^{-1})}$ (Espectro J)	2925, 2850, 1735, 1690, 1450, 1360, 1240.
RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃ , TMS) (Espectro 4)	64.73(1H, m, H-29), 4.6(1H, m, H-29'), 4.46(1H, dd, H-3a), 3.0(1H, ddd, J=10.6, 10.6, 5.3Hz, H-19), 2.05(3H, s, -OOCMe), 1.7(3H, s, Me-30), 0.97(6H, s, Me-27), 0.93(3H, s, Me-26), 0.84(3H, s, Me-24), 0.82(3H, s, Me-25).
RMN ¹³ C (75 MHz, CDCl ₃ , TMS) (Espectros 5 y 6)	Ver tabla 5.1
EM 70 eV m/e (% abund. rel.)	498[M] ⁺ (3.0), 483[M-Me] ⁺ (2.0), 339[M-CO ₂ Me] ⁺ (5.0), 338[M-(CO ₂ +H)] ⁺ (15.0), 395(13.0), 135(12.0), 119(10.0), 93(24.0), 81(26.0), 79(19.0), 43(100.0).

Cuadro sinóptico 5.3 Constantes físicas y espectroscópicas del acetil betulinato de metilo.



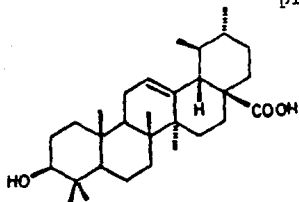
p.f.	192-194 °C
$[\alpha]_D^{25}$	+20.0 (c 0.04, CHCl ₃)
$\nu_{\text{KBr máx.}}$ (cm ⁻¹) (Espectro 7)	3450, 2950, 2875, 1735, 1460, 1380, 1365, 1245, 1160, 1135, 1025, 980, 900.
RMN^1H (300 MHz, CDCl ₃ , TMS) (Espectro 8)	64.73 (1H, m, H-29), 4.6 (1H, m, H-29'), 4.46 (1H, dd, H-3 α), 3.66 (3H, s, -COOMe), 3.0 (1H, ddd, H-19), 2.05 (3H, s, -OOCMe), 1.68 (3H, s, Me-30), 0.96 (6H, s, Me-23,-27), 0.91 (3H, s, Me-26), 0.85 (3H, s, Me-24), 0.83 (3H, s, Me-25).
RMN^{13}C (Espectros 9 y 10)	Ver tabla 5.1
EM 70 eV m/e (% abund. rel.)	512 [M] ⁺ (6.0), 455 [M-Me] ⁺ (2.0), 452 [M-H ₂ O] ⁺ (18.0), 437 [M-H ₂ O-Me] ⁺ (5.0), 411 [M-CO ₂ Me] ⁺ (2.0), 410 [M-(CO ₂ Me-H)] ⁺ (2.0), 262(27.0), 249(23.0), 233(10.0), 189(94.0), 149(34.0), 81(37.0), 43(100.0).

Cuadro sinóptico 5.4 Constantes físicas y espectroscópicas del betulinato de metilo.



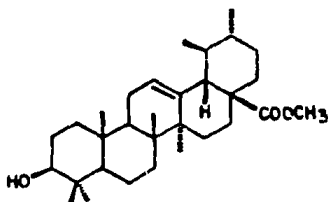
p.f.	206-208 °C
$[\alpha]_D^{25}$	+ 0.03 (c 0.006, CHCl ₃)
IR ν $\frac{KBr}{máx.}$ (cm ⁻¹)	3540, 3450, 2940, 2860, 1730, 1700, (Espectro 11) 1450, 1380, 1360, 1160, 890.
RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃ , TMS) (Espectro 12)	54.73 (1H, m, H-29), 4.6 (1H, m, H-29'), 3.66 (3H, s, -COOMe), 3.18 (1H, dd, J=9, 7 Hz, H-3), 3.0 (1H, ddd, J=10.6, 10.6, 5.3 Hz, H-19), 1.68 (3H, s, Me-30), 0.96 (3H, s, Me-25, 29), 0.91 (3H, s, Me-26), 0.81 (3H, s, Me-24), 0.75 (3H, s, Me-25).
RMN ¹³ C (Espectros 13 y 14)	Ver tabla 5.1
EM 70 eV m/e (# abund. rel.)	470 [M] ⁺ (12.0), 455 [M-Me] ⁺ (3.0), 452 [M-H ₂ O] ⁺ (8.0), 437 [M-H ₂ O-Me] ⁺ (5.0), 411 [M-CO ₂ Me] ⁺ (11.0), 410 [M-(CO ₂ Me+H)] ⁺ (10.0), 262 (43.0), 233 (12.0), 220 (25.0), 207 (45.0), 189 (101.0), 81 (55.0), 55 (39.0), 43 (59.0).

Cuadro sinóptico 5.5 Constantes físicas y espectroscópicas del ácido ursólico .



p.f.	292-294 °C
$[\alpha]_D^{20}$	+18.8 (c 6.9, CHCl ₃)
IR $\nu_{\text{máx}}$ (KBr) (cm ⁻¹)	3430, 2920, 2870, 1700, 1450, 1380, 1280, 1230, 1030, 1000.
RMN ¹ H (80 MHz, CDCl ₃ , TMS) (Espectro 16)	<p> δ 5.24(1H, m, H-12), 3.17(1H, dd, J=9, 7 Hz, H-3α), 2.20(1H, d, J=10 Hz, H-18β), 1.08(3H, s, Me-27), 0.99(3H, s, Me-23), 0.93(3H, s, Me-25), 0.84(3H, s, Me-26), 0.78(3H, s, Me-24). </p>
EM 70 eV m/e (% abund. rel.)	<p> 456 M ⁺ (3.8), 248(100.0), 235 (2.5), 233(8.7), 207(15.8), 203(48.7), 189(16.3), 133(18.8), 69(29.5), 43(38.0). </p>

Cuadro sinóptico 5.6 Constantes físicas y espectroscópicas del Ursolato de metilo.



p.f. 168-169 °C

$[\alpha]_D^{25}$ + 66.8 (c 1.6, CHCl₃)

I.R. $\nu_{\text{máx.}}^{\text{KBr}}$ (cm⁻¹) 3600, 2952, 2868, 1719, 1462,
(Espectro 17) 1387, 1364, 1261, 1236, 1193,
1169, 1029, 994.

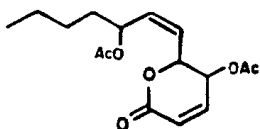
RMN¹H
(80 MHz, CDCl₃, TMS) (Espectro 18)

δ 5.24(1H, m, H-12), 3.60(3H, s, MeCOO-), 3.19(1H, dd, J=9, 7Hz, H-3), 2.22(1H, d, J=10 Hz, H-18), 1.07(3H, s, Me-27), 0.97(3H, s, Me-23), 0.91(3H, s, Me-25), 0.78(3H, s, Me-24), 0.75(3H, s, Me-26).

EM 70 eV
m/e (% abund. rel.)

470 |M|⁺ (4.5), 468(1.0), 455 |M-Me|⁺ (1.0), 452 |M-H₂O| (1.2), 437 |M-H₂O-Me|⁺ (1.0), 411 |M-CO₂-Me|⁺ (2.0), 410 |M-(CO₂Me+H)|⁺ (2.0), 262(100.0), 249(6.0), 207(27.3), 203(73.8), 189(10.0), 133(33.4).

Cuadro sinóptico 5.7 Constantes físicas y espectroscópicas de la Pectinólida.



U.V. $\lambda_{\text{máx.}}$

208 nm.

$[\alpha]_D^{25}$

+ 202

IR $\nu_{\text{máx.}}$ CHCl_3 (cm^{-1})
(Espectro 19)

3440, 2925, 2840, 1735, 1620, 1450,
1420, 1360, 1220, 1060, 1020, 940,
815.

RMN^1H
(300 MHz, CDCl_3 , TMS)
(Espectro 20)

Ver tabla 5.2

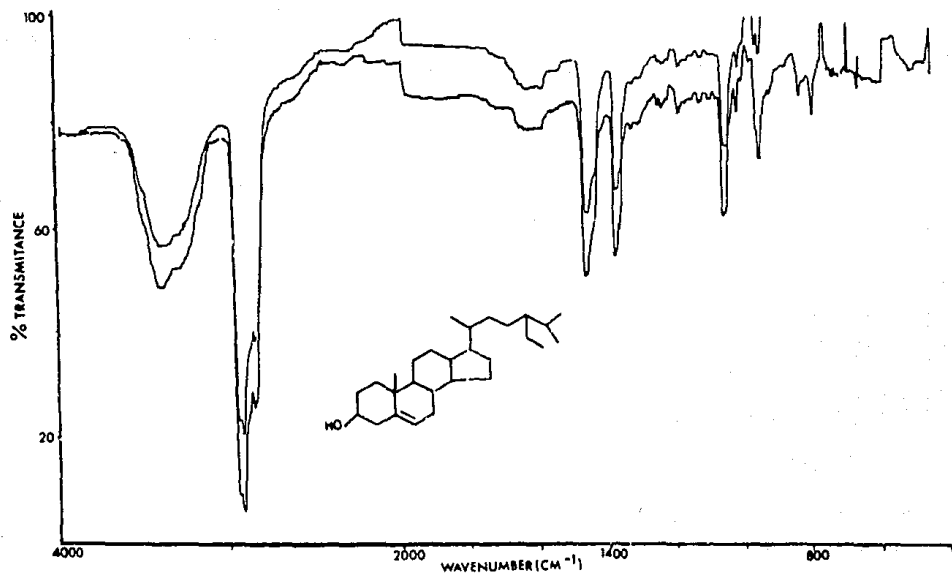
RMN^{13}C
(75 MHz, CDCl_3 , TMS)
(Espectros 21 y 22)

Ver tabla 5.3

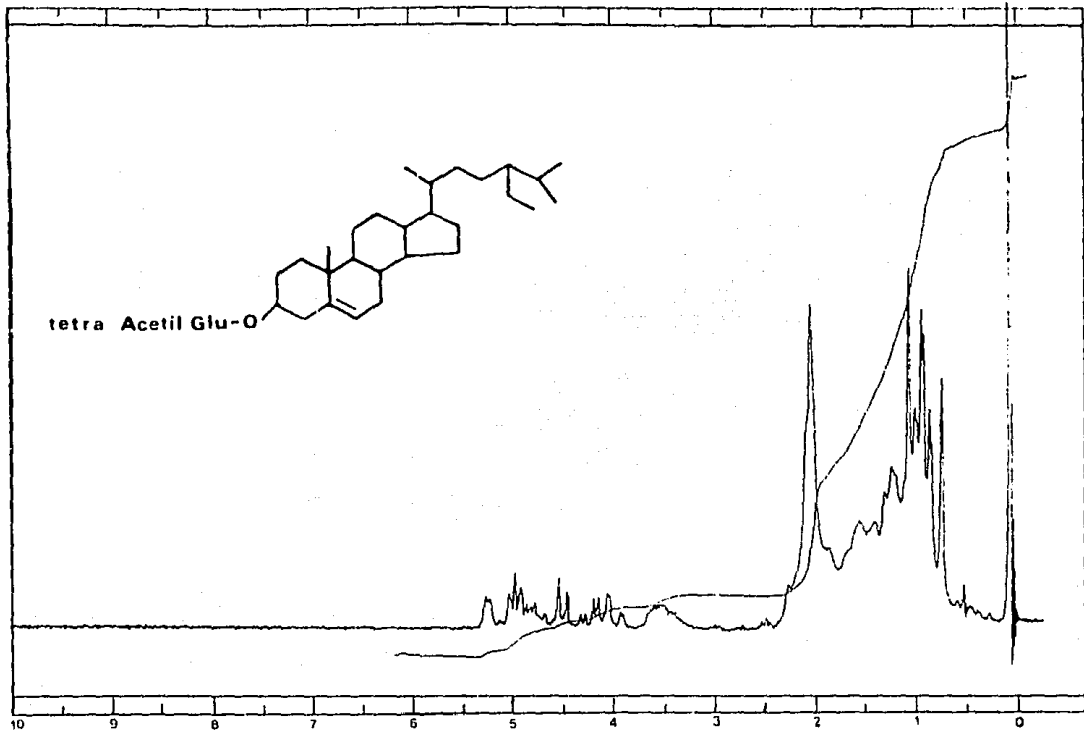
EM 70 eV
m/e (% abund. rel.)
(Espectro 23)

250 $|\text{M-OHAc}|^+$ (0.1), 226 $|\text{M-2}(\text{CH}_2\text{CO})|^+$
(0.1), 208 $|\text{250-CH}_2\text{CO}|^+$ (5.0), 155
(3.0), 151 (10.0), 126 (10.0), 125
(9.0), 113 $|\text{155-CH}_2\text{CO}|^+$ (5.0), 84
 $|\text{126-CH}_2\text{CO}|^+$ (16.2), 55 (12.2), 43
(100.0), 41 (8.8).

ESPECTROS

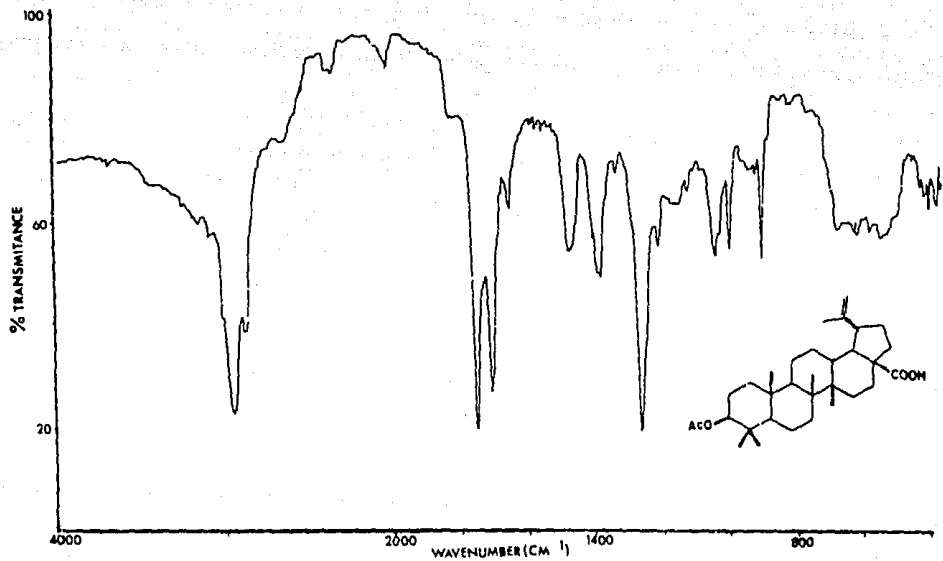


ESPECTRO 1

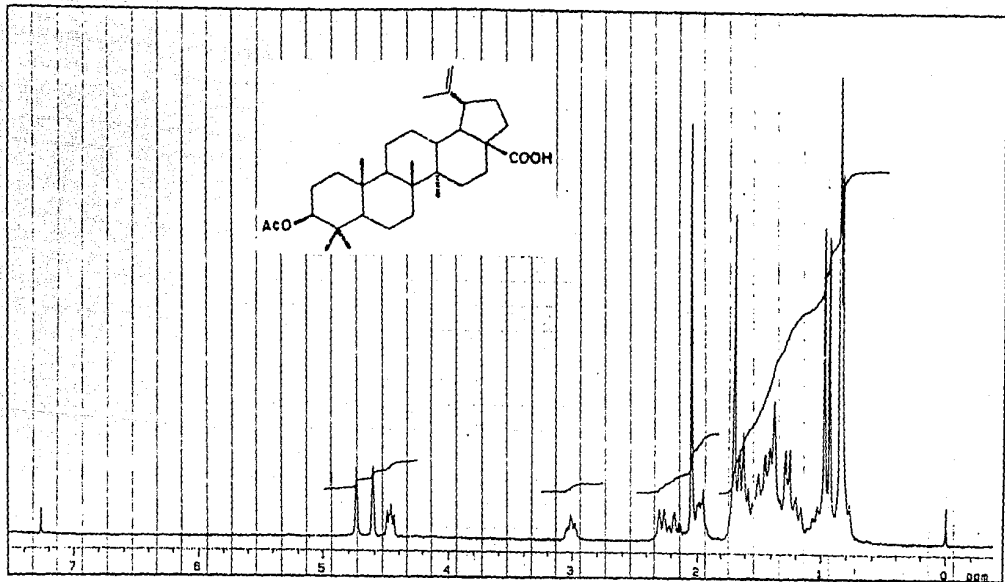


tetra Acetil Glu-O

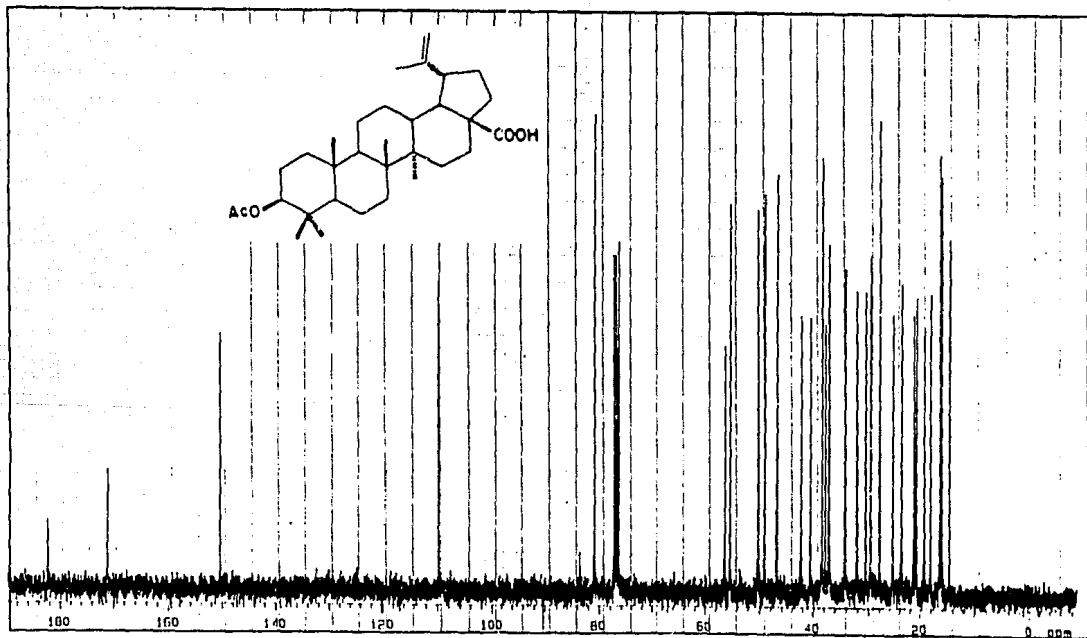
ESPECTRO 2



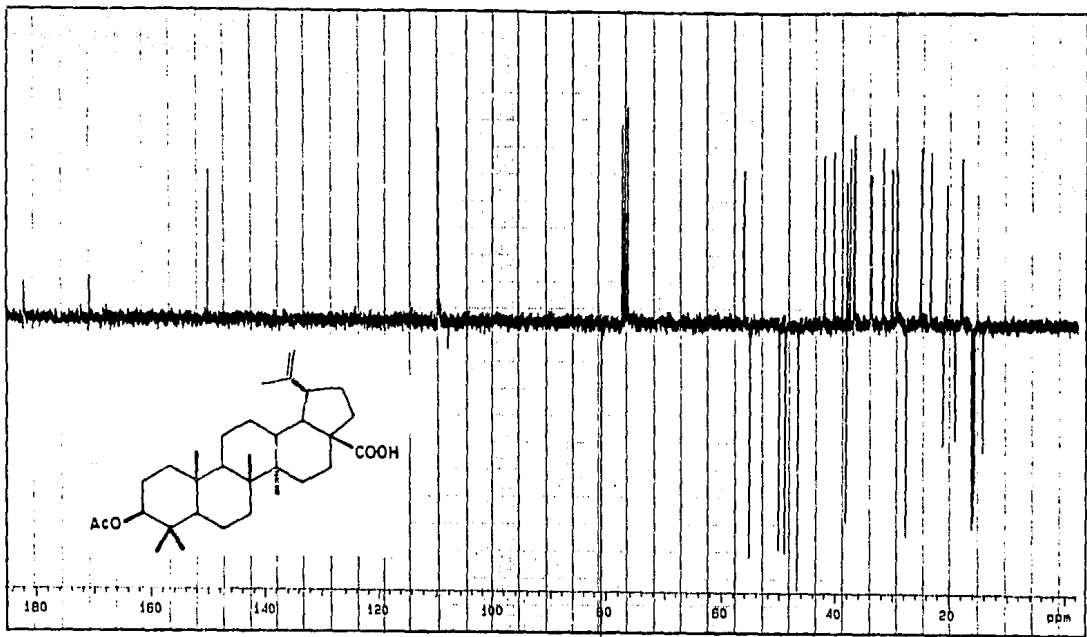
ESPECTRO 3



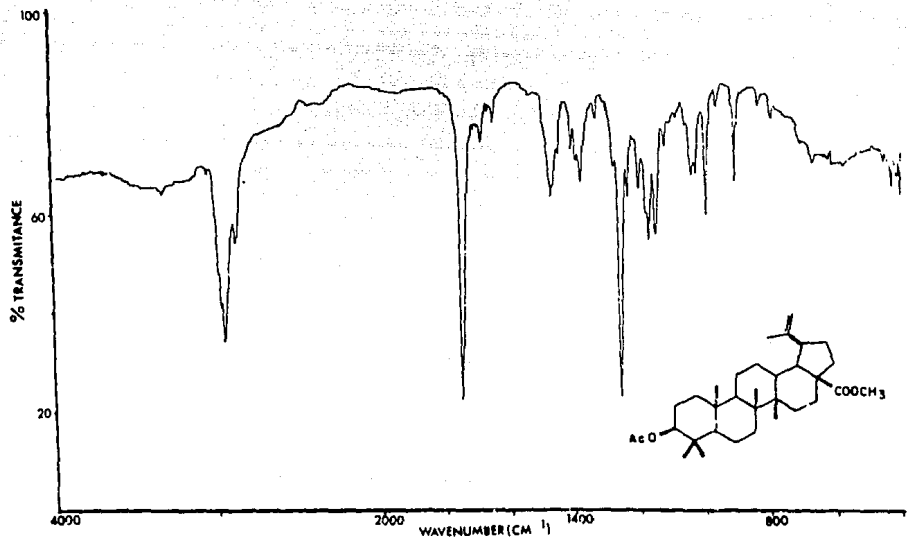
ESPECTRO 4



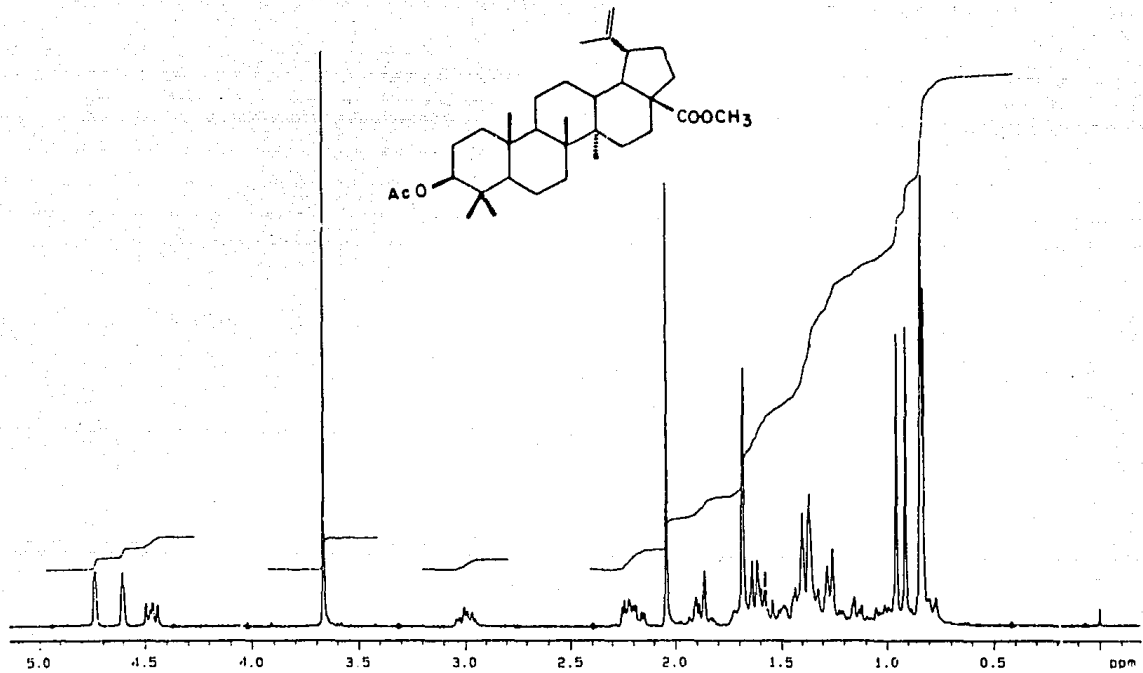
ESPECTRO 5



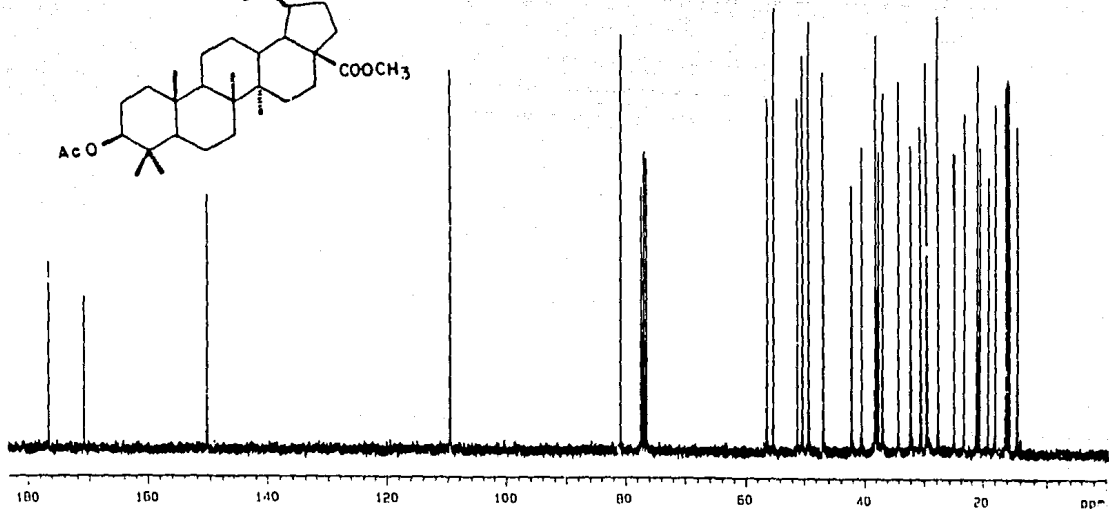
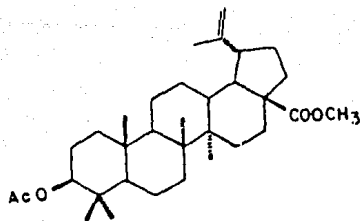
ESPECTRO 5



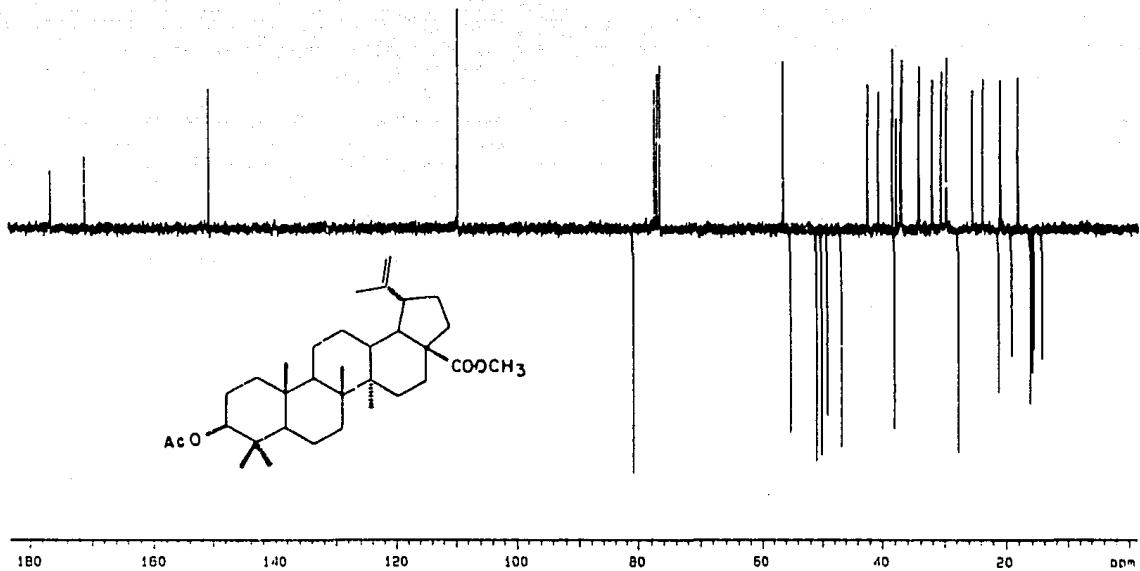
ESPECTRO 7



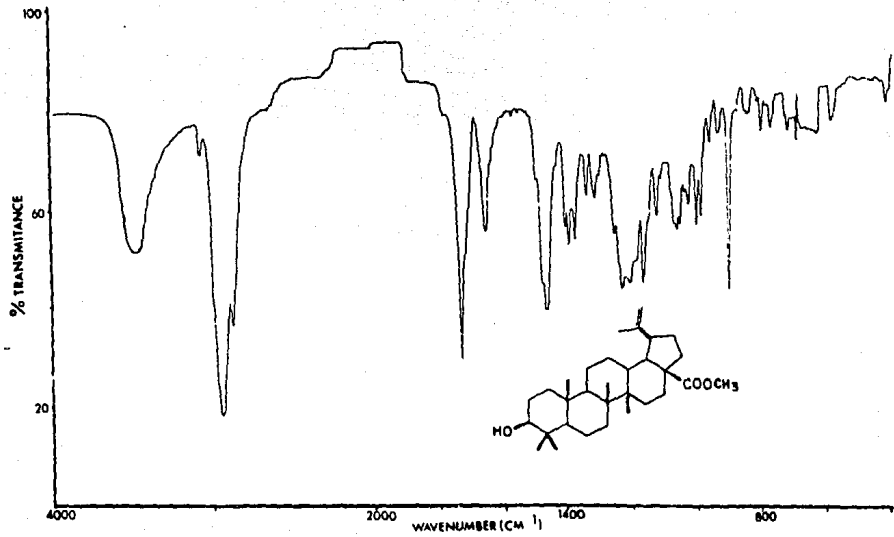
ESPECTRO 8



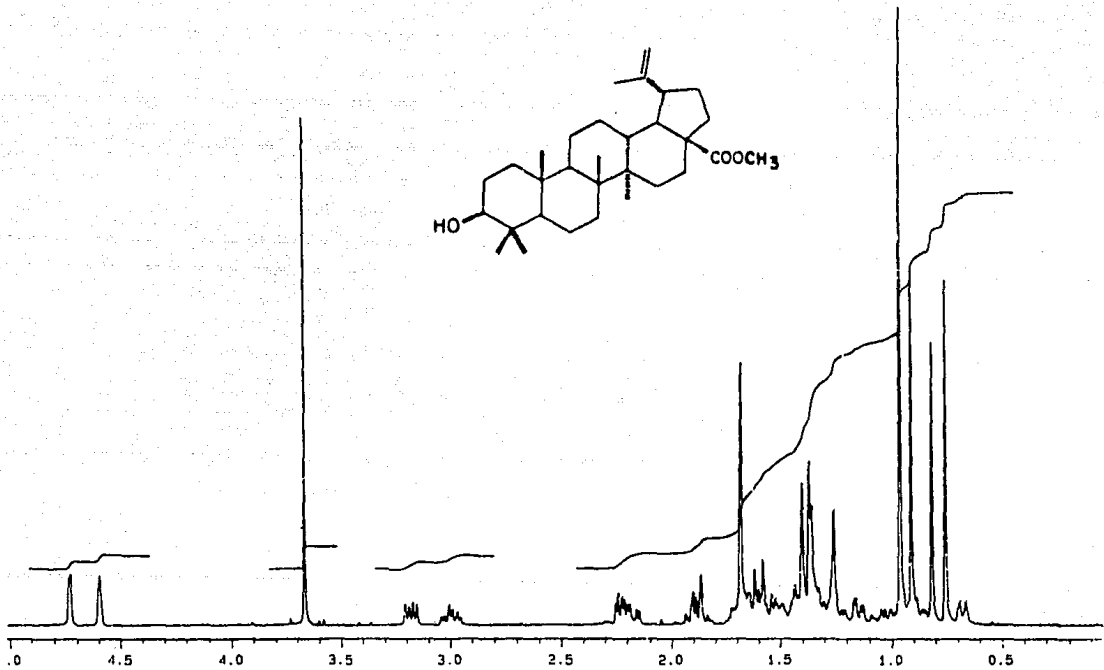
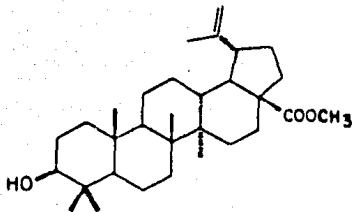
ESPECTRO 9



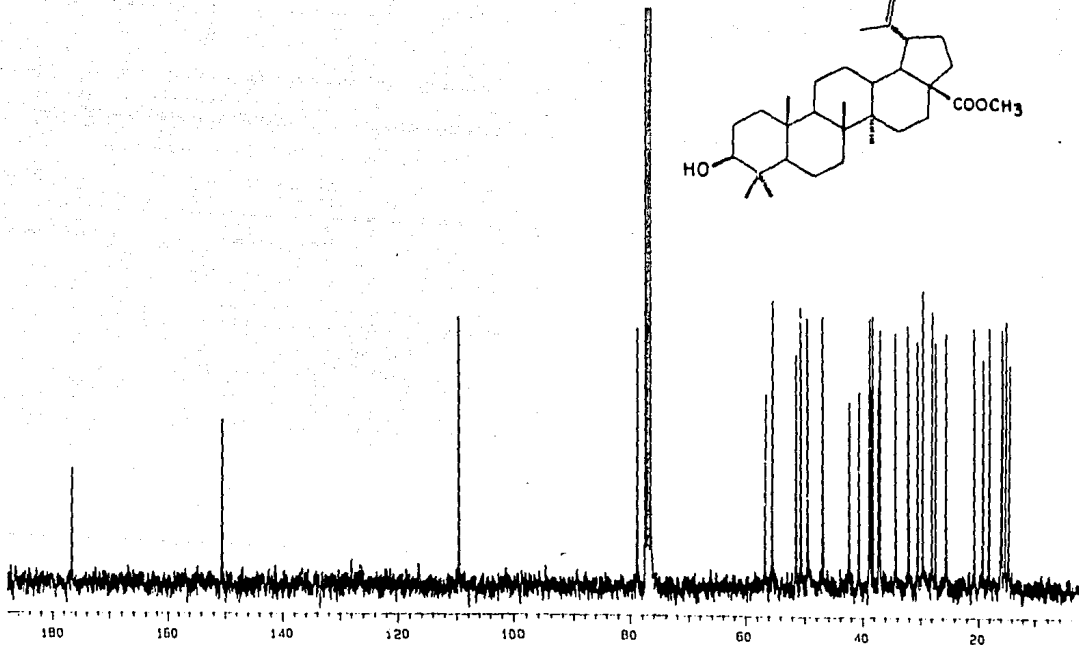
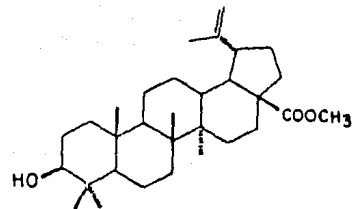
ESPECTRO 10



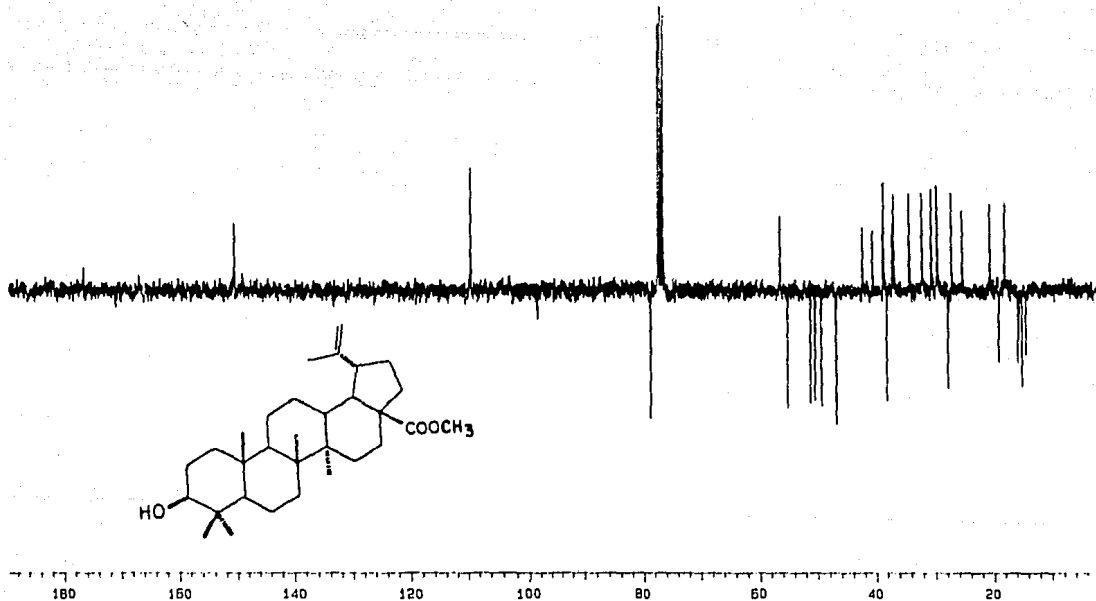
ESPECTRO 11



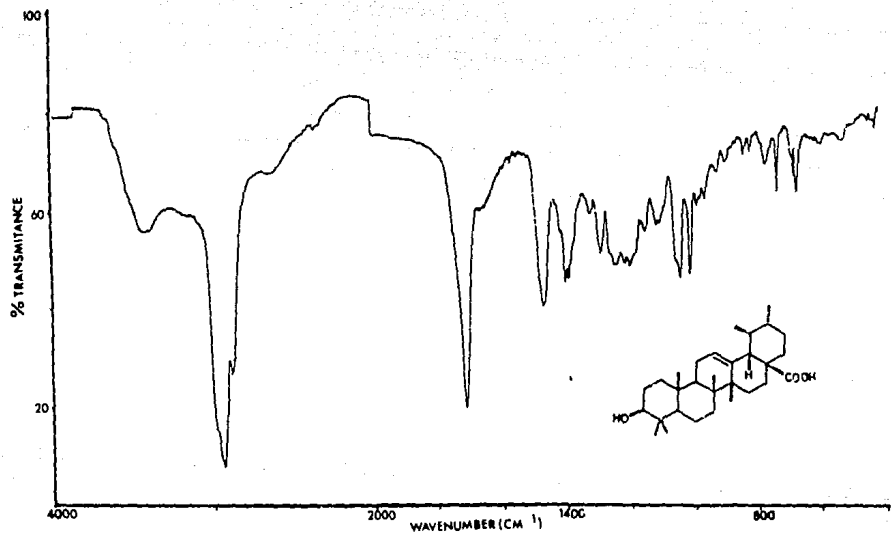
ESPECTRO 12



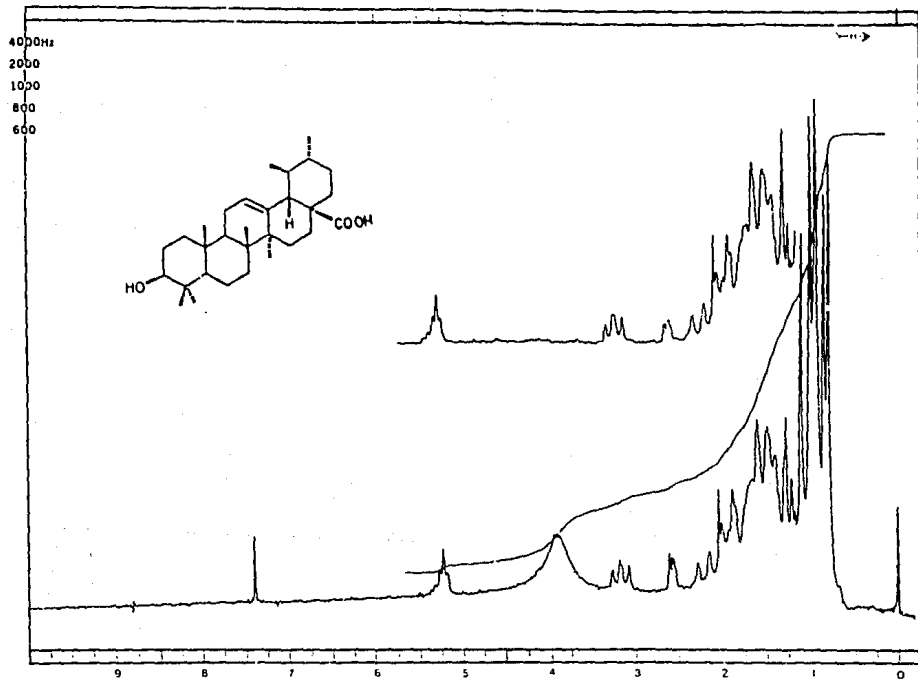
ESPECTRO 13



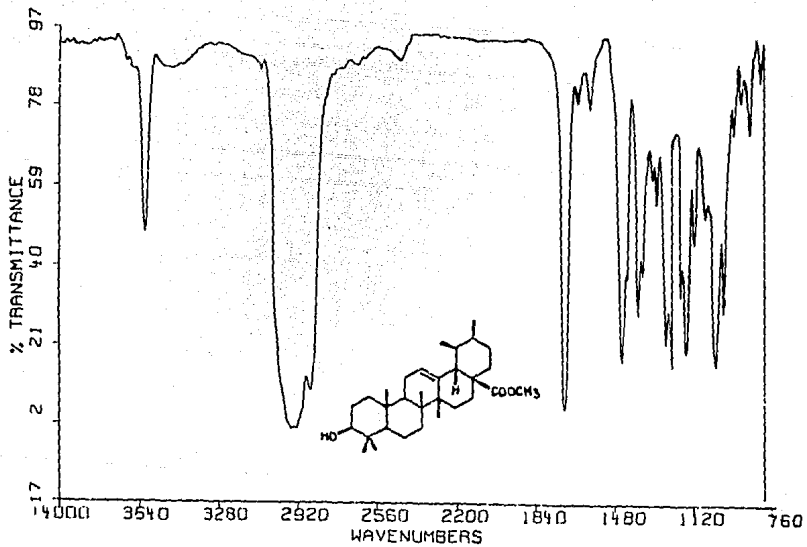
ESPECTRO 14



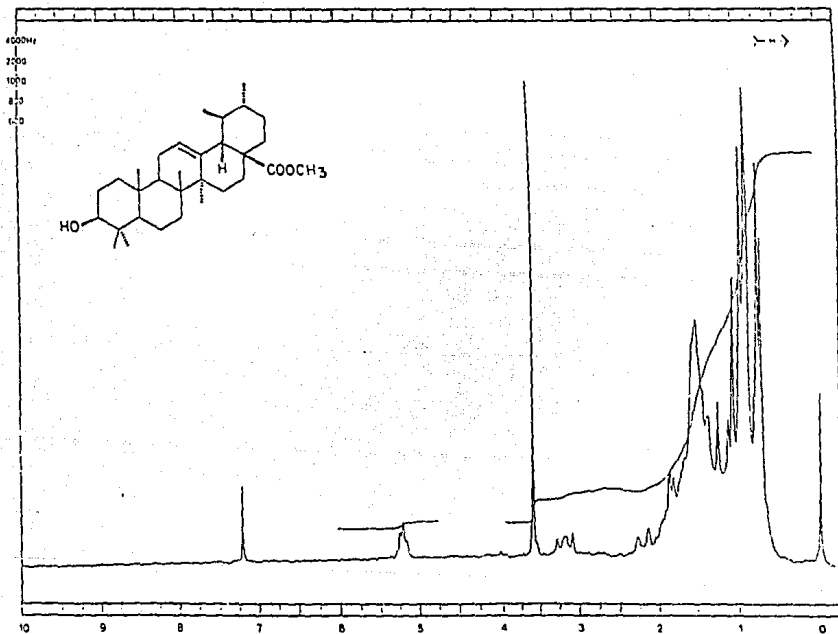
ESPECTRO 15

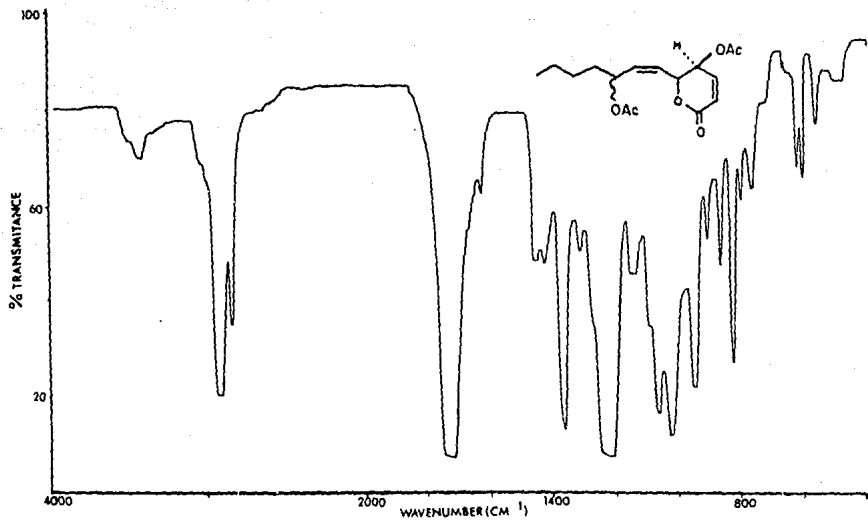


ESPECTRO 16

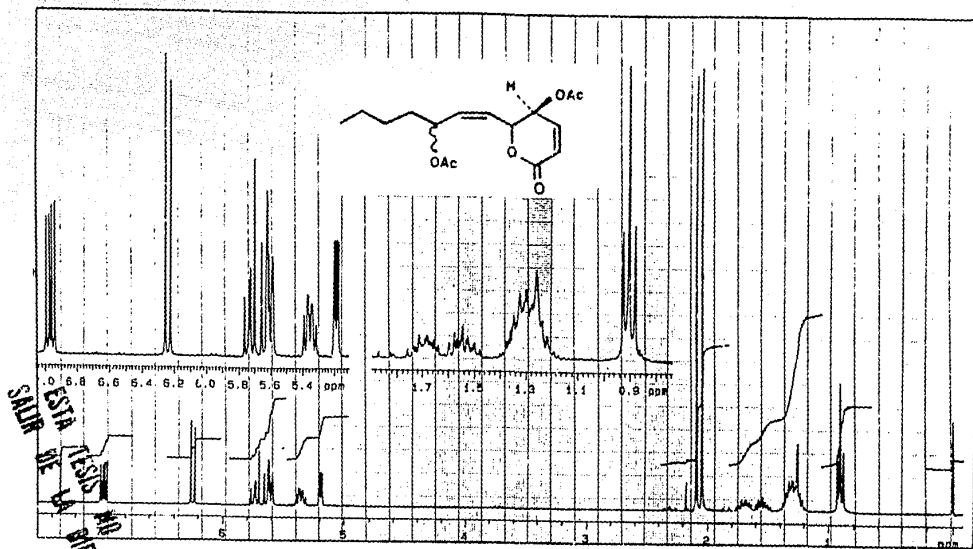


ESPECTRO 17



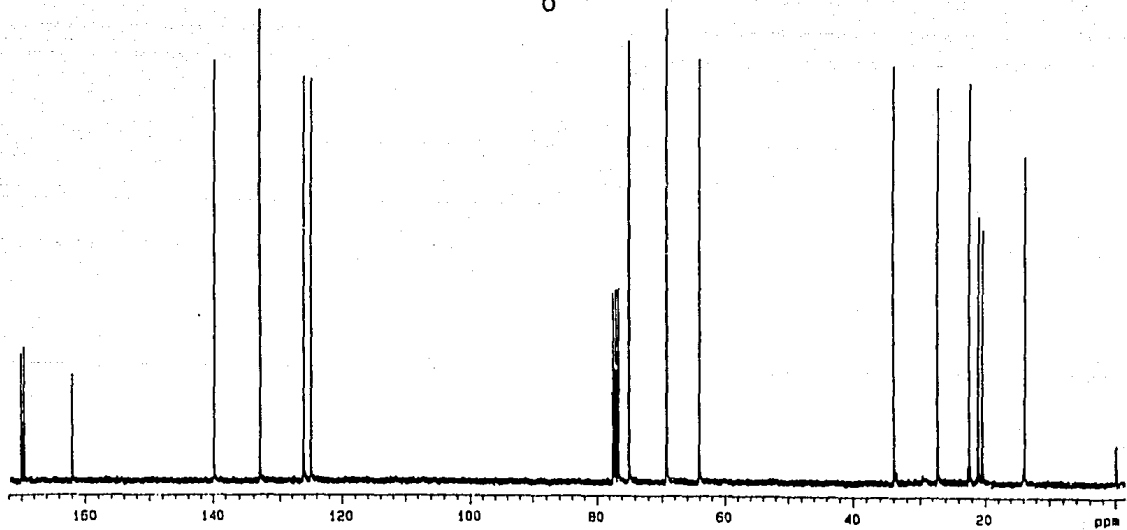
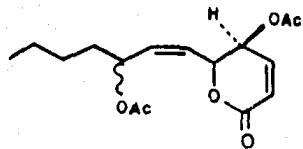


ESPECTRO 19

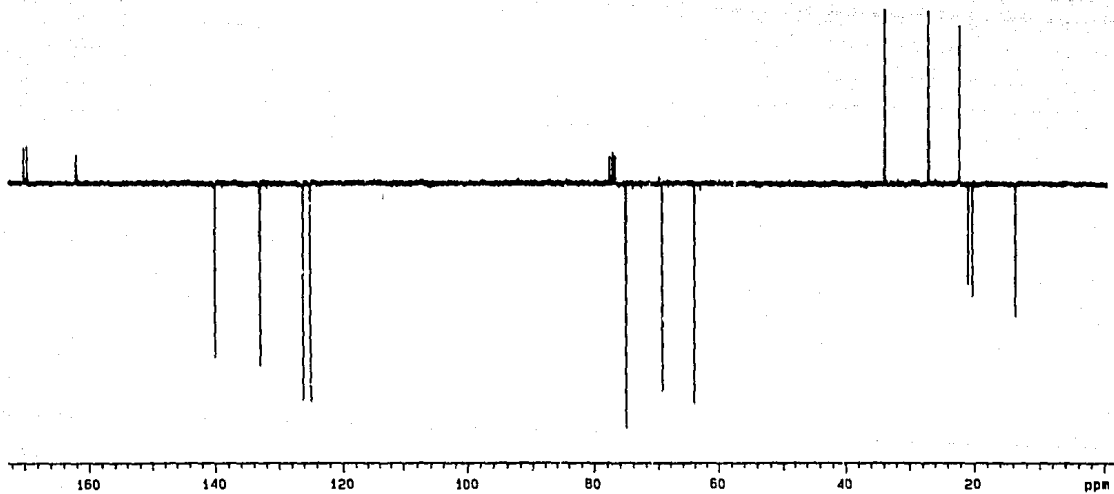
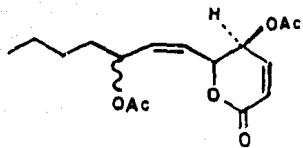


ESPECTRO 20

SALIR
 ESTA TESIS NO DEBE
 DE LA BIBLIOTERA

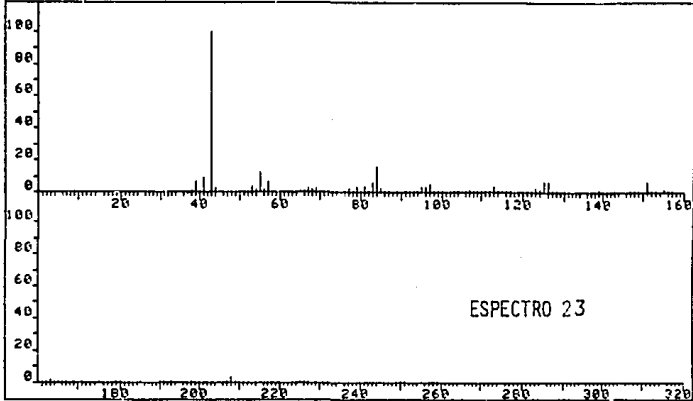


ESPECTRO 21

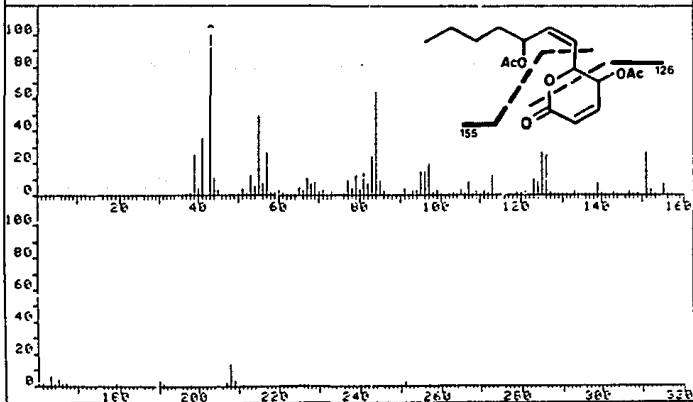


ESPECTRO 22

FRN	5170	SPECTRUM	6	RETENTION TIME	.6
LARGST 4:	43.1, 100.0	84.1, 16.2	55.2, 12.2	41.1, 8.8	
LAST 4:	226.2, .1	227.1, .1	250.1, .1	251.1, .4	
					PAGE 1 Y = 1.00



FRN	5170	SPECTRUM	6	RETENTION TIME	.6
LARGST 4:	43.1, 100.0	84.1, 16.2	55.2, 12.2	41.1, 8.8	
LAST 4:	226.2, .1	227.1, .1	250.1, .1	251.1, .4	
					PAGE 1 Y = 4.00



BIBLIOGRAFIA

- Achmand S., T. Hoyer, A. Kjaer, L. Makmur y R. Norrestam
(1987) ACTA CHEMICA SCAND., SER. B, 41, 509.
- Alemaný A., C. Marquez, C. Pascual, S. Valverde, M. Martínez-
Ripoll, J. Fayos y A. Perales (1979a)
TETRAHEDRON LETT., 3579.
- Alemaný A., C. Marquez, C. Pascual, S. Valverde, M. Martínez-
Ripoll, J. Fayos y A. Perales (1979b)
TETRAHEDRON LETT., 3583.
- Altschul S.V. R. (1973) "Drugs and Food from Little-Know
Plants", Ed. Harvard University Press, U.S.A.,
p. 263.
- Alzugaray D. y D. Alzugaray (1984) "Plantas que Curan",
Ed. Grupo Comunicacão Tres, Brasil, Vol. I p. 4,
Vol. III p. 253.
- Brophy J. J. y E. V. Lassak (1987) FLAVOUR FRAGRANCE J., 2, 41.
- Budzikiewickz H., J. M. Wilson y C. Djerassi (1963) J. AM.
CHEM. SOC., 85, 3688.
- Cheung H. T. y T. C. Yan (1972) AUST. J. CHEM., 25, 2003.
- Chín W. J., R. F. Corbett, C. K. Heng y A. L. Wilkins (1973)
J. CHEM. SOC. PERKIN TRANS I., 1437.
- Davies-Colleman M. T. y D. E. A. Rivett (1987) PHYTOCHEMIS-
TRY, 26, 3047.
- De Araujo M. C. M., M. S. B. y Cavalcanti, J. F. De Mello
y I. L. Albuquerque (1974) REV. INST. ANTIBIOT.,
14, 101.

- Del Amo R. S. (1979) "Plantas Medicinales del Estado de Veracruz", Ed. Inst. Nal. de Investigaciones sobre Recursos Bióticos, México, p. 110.
- Delgado G., R. Pereda-Miranda y A. Romo de Vivar (1985) HETEROCYCLES, 23, 1869.
- Delle Monache F., F. Marletti, G. Marini-Bettolo, J. F. De Mello y I. L. D'Albuquerque (1977) GAZZ. CHIM. ITAL., 107, 319.
- Díaz J. L. (1976) "Usos de las Plantas Medicinales de México", Inst. Mexicano para el Estudio de las Plantas Medicinales, p. 65.
- Domínguez X. A. (1979) "Métodos de Investigación Fitoquímica", Ed. Limusa, México, p. 67.
- Edwards J. M., R. F. Raffaui y P. W. Le Quesne (1979) J. NAT. PROD., 42, 85.
- Epling C. (1949) "Revisión del género Hyptis (Labiatae)", Revista del Museo de la Planta, Tomo VII, Secc. Botánica, Argentina, p. 153.
- France N. C. y J. Polonsky (1971) COMPT. REND. HEBD. SEANCES, ACAD. SCI., SER. C, 273, 439.
- García B. H. (1975) "Flora Medicinal de Colombia: Botánica Médica", Inst. de Ciencias Naturales de la Univ. de Colombia, Tomo III, p. 15-16.
- German V. F. (1971) J. PHARM. SCI., 60, 649.
- Gorter K. (1920) BULL. JARD. BOT. BUITENZORG, 1, 327.

- Harbone J. B. (1973) "Phytochemical Methods", Ed. John Wiley, U.S.A., p. 114.
- Hegnauer R. (1967) "Chemotaxonomie Der Pflanzen", Birkhauser Verlag, Basel, Vol. IV, p. 289.
- Imaseki I. y Y. Kitabatake (1962) YAKUGAZU ZASSHI, 82, 1326.
- Kingston D. G. I. y R. C. Munjal (1978) LLOYDIA, 41, 499.
- Kingston D. G. I., M. M. Rao y W. V. Zucker (1979) J. NAT. PROD., 42, 496.
- Kjaer A., R. Norrestam y J. Polonsky (1985) J. ACTA. CHEM. SCAND. SER. B, 39, 745.
- Kloos H. y F. S. Mc Cullough (1987) en "Plant Molluscicide", Ed. Kenneth Mott, John Wiley, New York, p. 45.
- Manchand P. S., J. D. White, J. Fayos y J. Clardy (1974) J. ORG. CHEM., 39, 2306.
- Marletti F., F. Delle Monache, G. B. Marini-Bettolo, M. C. M. De Araujo, M. S. B. Cavalcanti, I. L. D'Alburquerque y O. G. De Lima (1976) GAZZ. CHIM. ITAL., 106, 119.
- Martínez M. (1936) "Plantas Útiles de México", Ed. Batas, México, p. 144.
- Martínez M. (1979) "Flora del Estado de México", Biblioteca Enciclopedia del Edo. de México, Tomo II, p. 141.
- Misra T. N., R. S. Singh y J. Upadhyay (1983a) PHYTOCHEMISTRY, 22, 603.

- Misra T. N., R. S. Singh y J. Upadhayay (1983b) PHYTOCHEMISTRY, 22, 2557.
- Monaco P. y L. Previtiera (1984) J. NAT. PROD., 47, 673.
- Möse J. R. y G. Lukas (1957) ARZNEIMITTEL-FORSCH, 7, 687.
- Mukherjee K. S., R. K. Mukherjee y P. K. Ghosh (1984) J. NAT. PROD., 47, 377.
- Paredes C. A. (1973) POLITECNICA, 3, 163.
- Pereda-Miranda R. (1987) "Elucidación Estructural y Esteoquímica de Nuevos Metabolitos Secundarios Aislados de Labiatae (Salvia e Hyptis)", Tesis de Maestría, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional.
- Pereda-Miranda R. y M. Cascón-Figueroa (1988) J. NAT. PROD., 51, 996.
- Pereda-Miranda R., M. García y G. Delgado (1990) PHYTOCHEMISTRY, en Prensa.
- Priestap H. A., J. D. Bonafede y E. A. Ruveda (1977) PHYTOCHEMISTRY, 16, 1579.
- Rassol N., A. Q. Khan y A. Malik (1989) J. NAT. PROD., 52, 749-752.
- Roig M. J. T. (1974) "Plantas Medicinales Aromáticas o Venenosas de Cuba", Ed. Inst. del Libro, La Habana, Cuba, p. 596.
- Romo de Vivar A., J. M. González y A. L. Pérez (1985) REV. LATINOAMER. QUIM., 16, 51.
- Saluja A. y D. D. Santini (1984) INDIAN DRUGS, 21, 423.

- Sheth K., S. Jolad, R. Wuedhoff y J. R. Cole (1972)
J. PHARM. SCI., 61, 1819.
- Souza N. N. (1943) "Plantas Medicinales", Inst. Téc.
Henequenero Yuc., México, p. 16.
- Van Puyvelde L., S. Dube, E. Uwimana, C. Uwera, L. A.
Dommise, E. L. Esmans, O. V. Van Schoor y A.
J. Vlietinck (1979) PHYTOCHEMISTRY, 18, 1215.
- Van Puyvelde L., S. Dube, E. Uwimana, C. Uwera, L. A.
Dommise, E. L. Esmans, O. V. Van Schoor y A.
J. Vlietinck (1981) PHYTOCHEMISTRY, 20, 2753.
- Vlietinck A. J. (1987) en "Biologically Active Natural
Products", Ed. K. Hostettmann y P. J. Lea,
Oxford Science Publications, p. 33.
- Wagner H. (1977) REV. LATINOAMER. QUIM., 8, 16.
- Wagner H. y L. Sprinkmeyer (1973) DISCH. APOTH. ZTG.,
113, 1159.
- Wenkert E., G. Vernon Baddeley, I. R. Burfitt y L. N.
Moreno (1978) ORG. MAGN. RESON., 11, 337.