

00570



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE QUIMICA**

**"PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE  
LAS PECTINOLIDAS A-C, PRINCIPALES  
CONSTITUYENTES CITOTOXICOS Y ANTIMI-  
CROBIANOS DE HYPTIS PECTINATA (L.)  
POIT."**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRIA EN CIENCIAS QUIMICAS  
(FARMACIA - QUIMICA FARMACEUTICA)

P R E S E N T A :

**Q. B. MANUELA JUDITH VILLAVIGENCIO GONZALEZ**



MEXICO, D. F.

1993

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



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.

## RESUMEN

*Hyptis pectinata* (L.) Poit. es una planta perteneciente a la familia de las labiadas (Lamiaceae = Labiatae) de amplio uso como agente antiséptico en la medicina tradicional de nuestro país y conocida popularmente con el nombre de "hierba del burro". El fraccionamiento biodirigido del extracto clorofórmico preparado a partir de las partes aéreas de esta especie permitió el aislamiento de tres 5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas con actividad antimicrobiana y citotóxica. Estos productos naturales se denominaron con los nombres triviales de pectinólidas A {24}, B {25} y C {26}. La estructura química de estos productos naturales bioactivos se estableció con base en evidencias químicas, espectroscópicas y quirópticas.

El análisis de los datos espectroscópicos (UV, IR, EM y RMN) y las correlaciones químicas efectuadas permitieron establecer que las pectinólidas B {25} y C {26} corresponden a los derivados monodesacetilados de la pectinólida A {24}, cuya estructura se estableció con anterioridad como la 6S-[3S-acetiloxi-1Z-heptenil]-5S-acetiloxi-5,6-dihidropiran-2-ona.

El empleo del método de Horeau en la pectinólida B {25} y la ozonólisis de las pectinólidas B {25} y C {26} confirmaron la misma estereoquímica absoluta presente en la pectinólida A {24} para estas dos nuevas 5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas de estructura novedosa. Por lo tanto, la estructura de la pectinólida B {25} corresponde a la 6S-[3S-hidroxi-1Z-heptenil]-5S-acetiloxi-5,6-dihidropiran-2-ona y la obtenida para la pectinólida C {26} a la 6S-[3S-acetiloxi-1Z-heptenil]-5S-hidroxi-5,6-dihidropiran-2-ona.

La evaluación de la actividad antimicrobiana de las pectinólidas A-C {24-25} permitió observar un efecto inhibitorio sobre bacterias gram positivas (*Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*). Por otra parte, las tres pectinólidas presentaron una actividad citotóxica significativa contra la leucemia de múridos (P-388) y nueve líneas celulares derivadas de tumores cancerosos humanos.

## ABSTRACT

*Hyptis pectinata* (L.) Poit. (Lamiaceae), popularly known as "hierba del burro" and with the Mexican Indian name of "xoltexnuk", is a very common herbaceous plant valued for its medicinal qualities and for its smell and taste in the regional cuisine of the southeastern region of Mexico.

By bioactivity-directed fractionation, three new antimicrobial and cytotoxic 5,6-dihydro- $\alpha$ -pyrones, pectinolides A-C, have been isolated from this plant remedy. The absolute stereochemistry of pectinolide A (24) was established as 6S-[(3S-acetyloxi)-1Z-heptenyl]-5,6-dihydro-2H-pyran-2-one, on the basis of spectral, chiroptical, and chemical evidence. The structures of pectinolides B (25) and C (26) were determined as the monoacetylated forms of pectinolide A (24) by comparison of their spectral data and chemical correlation with the prototype compound. *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis* were sensitive to pectinolide A (24) in the concentration range of 6.25-12.5  $\mu\text{g/ml}$ . Compounds 24-26 exhibited significant cytotoxic activity ( $\text{ED}_{50} < 4 \mu\text{g/ml}$ ) against a variety of tumor cell lines.

## INDICE

	Página
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>I</b>
<b>LISTA DE CUADROS</b> .....	<b>II</b>
<b>1.- INTRODUCCION</b> .....	<b>1</b>
<b>2.- OBJETIVOS</b> .....	<b>5</b>
<b>3.- ANTECEDENTES</b> .....	<b>7</b>
3.1. 5,6-Dihidro- $\alpha$ -pironas del género <i>Hyptis</i> .....	7
3.2. Constituyentes citotóxicos obtenidos del género <i>Hyptis</i> .....	10
<b>4.- PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	<b>15</b>
4.1. Procedimientos generales.....	15
4.2. Aislamiento biodirigido de los constituyentes antimicrobianos y citotóxicos de <i>Hyptis pectinata</i> .....	15
4.3. Evaluación del potencial antimicrobiano.....	20
4.3.1. Preparación de los inóculos.....	20
4.4. Análisis cualitativo antimicrobiano.....	21
4.4.1. Procedimiento del ensayo.....	21
4.5. Análisis cuantitativo antimicrobiano.....	21
4.6. Evaluación del potencial tóxico para <i>Artemia salina</i> .....	22
4.6.1. Bioensayo.....	22
4.7. Ensayo de citotóxicidad.....	23
4.8. Reacción de acetilación.....	23
4.8.1. Acetilación de la pectinólida B {25}.....	23
4.8.2. Acetilación de la pectinólida C {26}.....	24
4.8.3. Análisis mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) de las reacciones de acetilación.....	24
4.8.3.1. Condiciones instrumentales.....	24
4.9. Método de Horeau.....	25
4.9.1. Preparación del anhídrido mixto del ácido 2-fenilbutanoico.....	25
4.9.2. Determinación de la configuración del centro C-3' de la pectinólida B {25}.....	25
4.10. Reacción de oxidación.....	26
4.10.1. Ozonólisis de la pectinólida B {25}.....	26
4.10.2. Ozonólisis de la pectinólida C {26}.....	26
4.10.2.1. Hidrólisis del ácido 2-acetiloxihexanoico.....	27
<b>5.- RESULTADOS Y DISCUSION</b> .....	<b>28</b>
5.1. Fraccionamiento biodirigido y evaluación biológica preliminar.....	28
5.2. Elucidación estructural de las pectinólidas B {25} y C {26}.....	35
5.3. Características estructurales comunes de las pectinólidas A-C {24-26}.....	35
5.4. Resonancia magnética nuclear de la pectinólida B {25}.....	38

5.5. Resonancia magnética nuclear de la pectinólida C {26}.....	42
5.6. Estereoquímica de las pectinólidas B {25} y C {26}.....	44
5.7. Correlaciones químicas entre las pectinólidas A {24}, B {25} y C {26}.....	48
5.7.1. Métodos no degradativos.....	48
5.7.1.1. Reacción de acetilación.....	48
5.7.1.2. Método de Horeau.....	51
5.7.2. Método degradativo.....	55
5.7.2.1. Ozonólisis de las pectinólidas B {25} y C {26}.....	55
5.8. Evaluaciones biológicas secundarias.....	55
5.8.1. Evaluación cuantitativa de la actividad antimicrobiana.....	55
5.8.2. Evaluación secundaria del potencial citotóxico.....	57
<b>6.- CONCLUSIONES.....</b>	<b>59</b>
<b>7.- BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>61</b>

## LISTA DE FIGURAS.

	Página
<b>Figura 1.-</b> Halos de inhibición desarrollados por los extractos de <i>Hyptis pectinata</i> en contra de bacterias gram positivas.....	32
<b>Figura 2.-</b> Halos de inhibición desarrollados por la pectinólida A {24} en contra de bacterias gram positivas.....	32
<b>Figura 3.-</b> Halos de inhibición desarrollados por la pectinólida B {25} en contra de bacterias gram positivas.....	33
<b>Figura 4.-</b> Halos de Inhibición desarrollados por la pectinólida C {26} en contra de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	33
<b>Figura 5.-</b> Espectro de RMN- <sup>1</sup> H de la pectinólida B {25}.....	37
<b>Figura 6.-</b> Espectro de RMN- <sup>1</sup> H de la pectinólida C {26}.....	37
<b>Figura 7.-</b> Espectro de masas de la pectinólida A {24}.....	39
<b>Figura 8.-</b> Espectro de masas de la pectinólida B {25}.....	40
<b>Figura 9.-</b> Espectro de masas de la pectinólida C {26}.....	41
<b>Figura 10.-</b> Espectro de RMN- <sup>13</sup> C de la pectinólida-B {25}.....	42
<b>Figura 11.-</b> Espectro de RMN- <sup>1</sup> H 2D-COSY de la pectinólida B {25}.....	43
<b>Figura 12.-</b> Espectro de RMN- <sup>13</sup> C de la pectinólida C {26}.....	44
<b>Figura 13.-</b> Espectro de RMN- <sup>1</sup> H bidimensional (2D-COSY) de la pectinólida C {26}.....	45
<b>Figura 14 .-</b> Espectro de RMN bidimensional hetero nuclear (HETCOR) de la pectinólida C {26}.....	46
<b>Figura 15.-</b> Expansión de la region vínilica de los espectros de RMN- <sup>1</sup> H de las pectinólida B {25} (A) y pectinólida C {26} (B).....	47
<b>Figura 16.-</b> Conformaciones enantioméricas para el núcleo de 5 6-dihidro- $\alpha$ -pirona.....	48

<b>Figura 17.-</b> Curvas de dicroísmo circular de las pectinólidas A-C {24-26} en MeOH.....	49
<b>Figura 18.-</b> Correlaciones químicas entre las pectinólidas A-C {24-26}.....	49
<b>Figura 19.-</b> Cromatografía en capa fina para las reacciones de acetilación (15min) de las pectinólidas B {25} y C {26}.....	50
<b>Figura 20.-</b> Análisis mediante HPLC de los productos de acetilación de las pectinólidas B {25} y C{26}.....	52
<b>Figura 21.-</b> Ilustración de la regla de Horeau.....	53
<b>Figura 22.-</b> Configuración absoluta para el centro quiral C-3' de la pectinólida B {25} de acuerdo con la regla de Cahn, Ingold y Prelog.....	54
<b>Figura 23.-</b> Espectro de RMN- <sup>1</sup> H de la mezcla de ésteres obtenidos para la pectinólida B mediante la acilación de Horeau.....	54
<b>Figura 24.-</b> Curva de dicroísmo circular del ácido (+) 2-hidroxihexanoico en MeOH.....	56

### LISTA DE CUADROS

<b>Cuadro 1.-</b> Valores de las dosis efectivas medias (DE <sub>50</sub> ) para las líneas tumorales KB y P-388 de los compuestos citotóxicos aislados del género <i>Hyptis</i> .....	14
<b>Cuadro 2.-</b> Evaluación cualitativa de la actividad antimicrobiana.....	31
<b>Cuadro 3.-</b> Evaluación primaria de la actividad citotóxica.....	34
<b>Cuadro 4.-</b> Evaluación cuantitativa de la actividad antimicrobiana.....	57
<b>Cuadro 5.-</b> Evaluación secundaria del potencial citotóxico.....	58

## 1. INTRODUCCION.

Desde el principio de los tiempos, el hombre y los animales tuvieron que distinguir entre las plantas venenosas y las que no lo eran; así se desarrolló gradualmente el conocimiento de los fármacos de origen natural el cual se ha transmitido, primero verbalmente y, después en forma escrita, como en las farmacopeas y otros trabajos de divulgación científica.<sup>1</sup>

Las plantas continúan siendo excepcionalmente una fuente viable de productos naturales biológicamente activos, los cuales pueden servir como entidades de interés comercial o pueden proporcionar estructuras para el desarrollo de derivados que posean una actividad farmacológica selectiva y reducida toxicidad.<sup>2</sup> De la pequeña porción de las 250,000 especies de plantas<sup>3</sup> superiores que han sido estudiadas, alrededor de 120 agentes terapéuticos se han aislado y sus estructuras se han caracterizado con propósitos comerciales a partir de aproximadamente 90 especies vegetales.<sup>4</sup> Por ejemplo, la morfina (analgésico) obtenida de *Papaver somniferum*, la quinina (antipalúdico) de las especies del género *Cinchona*, la atropina (anticolinérgico y antiespasmódico) de *Duboisia myoporoides* y algunas especies de *Datura*, la digitoxina (cardiotónico) de *Digitalis purpurea*, la cafeína (analéptico) de *Camelia sinensis*, la reserpina (antihipertensivo) de *Rouwolfia serpentina*, la sanguinarina (emético) de *Sanguinaria canadensis*, por tan sólo mencionar algunos fármacos de origen vegetal. El descubrimiento del 74% de los agentes terapéuticos comerciales de origen vegetal se fundamentó en la información etnomédica.<sup>4</sup>

Existen tres criterios para la selección del material vegetal para los estudios químicos que puedan conducir al descubrimiento de nuevos agentes con actividades biológicas selectivas: el azar, la quimiotaxonomía (aspectos taxonómicos y fitoquímicos) y los criterios etnomédicos.<sup>2</sup>

En el primer criterio, las especies vegetales se colectan indiscriminadamente y sin ningún conocimiento previo o experiencia en su uso. En el criterio taxonómico, todas las

especies de un mismo género o familia se consideran con el mismo interés, y por lo tanto, se colectan en diversas localidades y se evalúa su contenido metabólico. Bajo el criterio etnomédico, se confiere la principal importancia a la información relacionada con el uso tradicional de las plantas en la medicina popular y con base en esta información, se selecciona el material vegetal para su recolección y su análisis químico posterior. Un ejemplo de la aplicación de este criterio es el reciente descubrimiento de la artemisina<sup>5</sup> aislada en 1972 por científicos chinos de la planta medicinal quinghao, *Artemisa annua* L., (Asteraceae). Esta planta se ha usado por más de 200 años en Asia como un antipirético, en la terapia de la malaria.<sup>6</sup> En el criterio fitoquímico un tipo de compuesto en particular, por ejemplo los alcaloides indólicos, se consideran de interés biológico y las plantas que probablemente contengan compuestos relacionados son colectadas y evaluadas.<sup>2</sup>

Durante las últimas dos décadas se ha incorporado al estudio químico de las plantas medicinales un método más racional de estudio del contenido metabólico de las mismas, el cual involucra la evaluación del material vegetal utilizando diversos procedimientos de evaluación biológica. De este modo el material que resulte activo se somete a un proceso de fraccionamiento biodirigido para la obtención del principio activo o del conjunto de constituyentes responsables de la actividad biológica.<sup>7,8,9</sup>

Es un hecho bien documentado que las plantas superiores han sido una fuente de compuestos antitumorales con relevancia clínica.<sup>2</sup> Por ejemplo, los alcaloides del género *Cataranthus*, vincristina (Oncovin®) y vinblastina (Velban®) son dos de los más importantes agentes terapéuticos en el tratamiento del cáncer, seguidos por los derivados semisintéticos de la podofilotoxina, aislada de *Podophyllum peltatum*.<sup>10</sup> Algunos derivados de la colchicina,<sup>2</sup> producto obtenido de *Colchicum autumnale* son usados también para el tratamiento del cáncer y el alcaloide pirrolizidínico monocrotalina se aplica tópicamente en China para el tratamiento del cáncer de la piel.<sup>2</sup> Numerosos agentes antitumorales (semisintéticos y antitumorales) derivados de otras plantas han sido sujetos a recientes evaluaciones clínicas, incluyendo el taxol,<sup>11</sup> la harringtonina,<sup>12</sup> la

homoharringtonina,<sup>12</sup> la 10-hidroxi-camptotecina,<sup>13</sup> el tenipósido<sup>2</sup> y los derivados de la elipticina.<sup>3</sup>

El género *Hyptis* está compuesto por aproximadamente 400 especies de la familia de las labiadas (Labiatae) y se encuentra distribuido desde el sur de los Estados Unidos hasta Argentina. Este género está conformado por un grupo de plantas de gran importancia económica en la vida diaria de nuestro pueblo, y sus usos tradicionales han sido transmitidos de generación en generación desde tiempos inmemoriales hasta nuestros días. Todas las plantas de este género se caracterizan por ser aromáticas, singularidad que les confieren sus aceites esenciales.<sup>14</sup> A estos aceites volátiles se les atribuyen las propiedades tónico-estimulantes de las que gozan las plantas de este género<sup>15</sup> y por lo tanto, la potencialidad económica del género se incrementa para la industria particularmente, farmacéutica y de la perfumería<sup>16</sup> y en menor proporción, pero con una gran perspectiva para la industria de los saborizantes.<sup>17</sup>

La gran diversidad de usos populares de las plantas del género *Hyptis* implica en forma indirecta, una amplia diversidad en el metabolismo secundario de estas especies, misma que representa un extenso panorama para la investigación de productos naturales como fuentes potenciales de sustancias biológicamente activas.<sup>18</sup>

*Hyptis pectinata* es una especie ampliamente difundida en las regiones tropicales de nuestro país y destaca por sus propiedades antisépticas en la medicina tradicional,<sup>19,20</sup> se conoce comunmente con los nombres de hierba del burro y salvia entre la población rural mestiza del sureste mexicano.<sup>19</sup> Los indígenas totonacas de la huasteca Veracruzana la conocen con el nombre de Xoltexnuk. Las infusiones de toda la planta se utilizan para el tratamiento de enfermedades infecciosas de la piel y como cicatrizante, las hojas frescas se utilizan en inhalaciones en caso de congestión pulmonar y rinofaringitis, por lo tanto estos usos evidencian sus propiedades antibacterianas y antimicóticas.<sup>19,20</sup>

El presente trabajo describe la elucidación estructural y la estereoquímica de los constituyentes citotóxicos y antimicrobianos, las pectinólidas A-C, obtenidas del extracto

clorofórmico de la hierba del burro. Los criterios utilizados para la selección de la especie en cuestión fueron los siguientes: 1) el criterio quimiotaxonómico ya que el presente protocolo forma parte de un estudio sistemático del género *Hyptis*; 2) el criterio etnomédico, ya que el empleo tradicional de preparaciones a partir de la hierba del burro con propiedades antisépticas, constituyó el indicador para realizar el estudio químico-biodirigido de esta planta medicinal.

## 2.- OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GENERAL:

El objetivo fundamental de la presente investigación fue el aislamiento y la caracterización estructural de los constituyentes bioactivos detectados en la fracción citotóxica y antimicrobiana obtenida a partir del extracto clorofórmico de *Hyptis pectinata* (L.) Poit.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS.

2.2.1 Aislar y purificar los constituyentes antimicrobianos y citotóxicos presentes en el extracto clorofórmico.

2.2.2 Establecer la estructura molecular y la estereoquímica de los constituyentes bioactivos mediante reacciones degradativas, correlaciones químicas y técnicas de análisis instrumental contemporáneas como la espectrometría de masas y la resonancia magnética nuclear (1D- $^1\text{H}$ , 1D- $^{13}\text{C}$ , 2D-COSY y HETCOR).

2.2.3 Evaluar el potencial antimicrobiano de los constituyentes bioactivos en contra de *Candida albicans* y bacterias gram positivas (*Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus*) y gram negativas (*Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*).

2.2.4 Evaluar el potencial citotóxico de los principios activos en un panel de líneas celulares derivadas de tumores cancerosos humanos (carcinoma nasofaríngeo humano; cáncer de pecho; fibrosarcoma; cáncer pulmonar; melanoma; cáncer de colon; KB resistente a la vinblastina; carcinoma epidermoide y cáncer de próstata) y leucemia linfocítica de móridos.

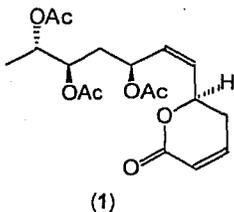
### 3. ANTECEDENTES.

Las 5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas se encuentran ampliamente distribuidas en el reino vegetal, pero se asocian particularmente con las familias Lamiaceae (=Labiatae) Piperaceae, Lauraceae y Annonaceae. Se han aislado a partir de todas las partes vegetales incluyendo hojas, tallos, flores y frutos. También se encuentran ampliamente distribuidas entre los hongos.<sup>21</sup>

#### 3.1 5,6-DIHDRO- $\alpha$ -PIRONAS DEL GENERO HYPTIS.

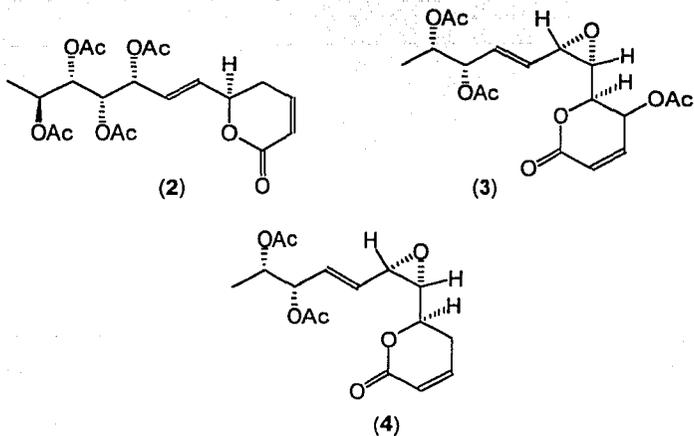
Aunque la distribución de estos compuestos es amplia en el reino vegetal, hasta este momento sólo se han descrito ocho 5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas en el género *Hyptis* perteneciente a la familia de las labiadas.

La primera 5,6-dihidro- $\alpha$ -pirona sustituida en el núcleo C-6 aislada de la familia Lamiaceae fue la hiptólida (1) de *Hyptis pectinata* (L.) Poit.<sup>22</sup>



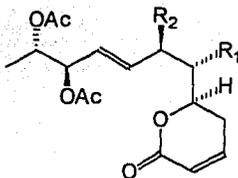
De especies del género *Hyptis* se han aislado siete alquenil-5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas adicionales. Dos compuestos, la anamarina (2)<sup>23</sup> y la olguina (3)<sup>24</sup> se obtuvieron de una especie sudamericana no identificada de este género.

Un tercer compuesto, la 5-desacetoxi-5'-epiolguina (4) se aisló del extracto acetónico de las partes aéreas de la especie mexicana *Hyptis oblongifolia* Bentham,<sup>25</sup> su estructura se estableció por difracción de Rayos X.



Otras tres  $\alpha$ -pironas adicionales, la 6R-[5R, 6S-diacetoxi-1S,2R-dihidroxi-3E-heptenil]-5,6-dihidro-piran-2-ona (5) y su derivado acetilado (6) y la 6R-[ 5R, 6S-diacetiloxi -1R-hidroxi -2R-metoxi -3E-heptenil]-5,6,dihidro-2H-piran-2-ona (7) se caracterizaron de esta especie mexicana.<sup>25</sup> La estructura de la 5-desacetoxi-5'-*epi*olguina (4) difiere de la olguina (3) en la ausencia del grupo acetoxilo en el átomo C-5 del núcleo de  $\alpha$ -pirona y la configuración para el centro quiral C-5 en la cadena lateral. La relación "pref" para C-5' y C-6' en la 5-desacetoxi-5'-*epi*olguina (4) se estableció mediante difracción de Rayos X, por lo tanto, la configuración (5'R) y (6'S) se asignaron a estos centros quirales.<sup>26</sup>

Por otra parte, la estereoquímica de los metabolitos 5-7 se obtuvo mediante correlación química con la 5 desacetoxi-5'-*epi*olguina.<sup>26</sup>

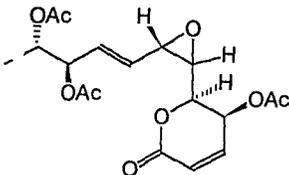


(5)  $R_1=R_2= OH$

(6)  $R_1=R_2= AcO$

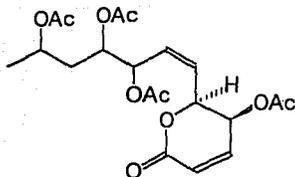
(7)  $R_1= OH; R_2= MeO-$

El estudio químico del extracto orgánico de *Hyptis capitata* Jacq. permitió el aislamiento de un isómero de la olguina, la 10-epiolguina (8); la determinación de su estructura se realizó por cristalografía de rayos X.<sup>27</sup>



(8)

La última  $\delta$ -lactona reportada para el género *Hyptis* es la urticina (9) la cual se obtuvo del extracto etanólico de las partes aéreas de *Hyptis urticoides* Kunth.<sup>28</sup> La estereoquímica absoluta para los centros quirales C-3', C-4' y C-6' de esta  $\delta$ -lactona aún no se ha establecido. Cabe destacar que la estereoquímica absoluta de todas las  $\delta$ -lactonas se ha confirmado mediante el valor del efecto Cotton positivo en 260 nm, el cual se establece mediante dicroísmo circular.

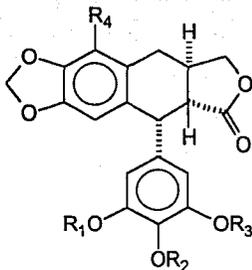


(9)

### 3.2 CONSTITUYENTES CITOTÓXICOS OBTENIDOS DEL GÉNERO

#### *HYPTIS.*

Como un resultado de la continua investigación química de plantas con un potencial de actividad citotóxica, el género *Hyptis* también ha sido sujeto de varios estudios. Así, la observación de que los extractos acuosos de las hojas y tallos de *Hyptis verticillata* Jacq. inhibían el desarrollo de los huevecillos del erizo de mar, condujo al aislamiento de dos lignanos, la  $\beta$ -peltantina (10) y la 4'-desmetildesoxipodofilotoxina (11). Estos productos demostraron ser agentes antimitóticos en pruebas con células fibroblásticas de ratón.<sup>29</sup> Un estudio sobre agentes citotóxicos de origen vegetal, condujo a examinar el extracto etanólico de las partes aéreas de *H. tomentosa* Poit. el cual mostraba actividad sobre el sistema de leucemia linfocítica de mûridos P-388 y sobre el cultivo de células del carcinoma nasofaríngeo humano KB. Esta investigación permitió el aislamiento de tres componentes activos. El principal constituyente responsable de la actividad citotóxica fue identificado como el lignano desoxipodofilotoxina (12). (Cuadro 1).

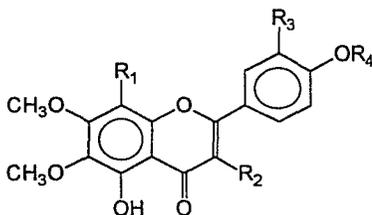


(10)  $R_1=R_2=R_3= \text{Me}$ ;  $R_4= \text{OH}$

(11)  $R_1=R_3= \text{Me}$ ;  $R_2=R_4= \text{OH}$

(12)  $R_1=R_2=R_3= \text{Me}$ ;  $R_4= \text{OH}$

Los otros compuestos citotóxicos aislados de esta especie fueron los flavonoides gardenina B (13) y la 5-OH, 4',3,6,7,8 pentametoxiflavona (14)<sup>30,31</sup>. La gardenina B (13) también es uno de los constituyentes mayoritarios del extracto de las partes aéreas de *Hyptis albida* Kunth.<sup>32</sup> El fraccionamiento biodirigido de *H. verticillata* mediante el bioensayo para *Artemia salina* condujo al aislamiento de otro flavonoide citotóxico, la sideritoflavona (15)<sup>33</sup> (Cuadro 1).



(13)  $R_1= \text{OMe}$ ;  $R_2=R_3= \text{H}$ ;  $R_4= \text{Me}$

(14)  $R_1=R_2= \text{OMe}$ ;  $R_3= \text{H}$ ;  $R_4= \text{Me}$

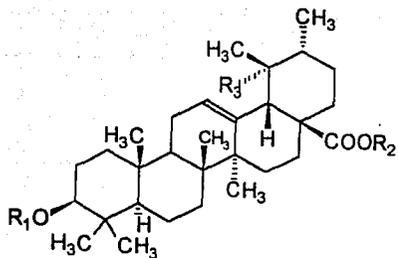
(15)  $R_1= \text{OMe}$ ;  $R_2=R_4= \text{H}$ ;  $R_3= \text{OH}$

Investigaciones recientes han demostrado que la acumulación de cantidades significativas de diterpenos y triterpenos moderadamente citotóxicos, como el ácido ursólico (16) y sus derivados son los responsables de la actividad detectada en las evaluaciones de la potencialidad citotóxica de las especies medicinales de la familia labiatae<sup>34</sup> (Cuadro 1). Un estudio de los principios citotóxicos de *H. capitata*<sup>35</sup> permitió el aislamiento del ácido ursólico (16) como el principal componente del extracto

metanólico citotóxico al evaluarse sobre las líneas celulares P-388 y KB. En este mismo estudio, se prepararon los mono y diésteres correspondientes [ácido 3-O-acetilursólico (17), ursolato de metilo (18), 3-O-acetilursolato de metilo (19)] los cuales mostraron una actividad citotóxica menor a la del ácido ursólico.<sup>35</sup> Una investigación fitoquímica sobre plantas mexicanas y del sudeste de los Estados Unidos con actividad antitumoral demostró que el extracto clorofórmico de las partes aéreas de *Hyptis emoryi* Torr. era activo en contra del carcinoma de Walker en ratas. Este estudio estableció que el responsable de tal acción es el ácido betulínico (20)<sup>36,37</sup> triterpeno que también ha sido aislado del extracto de la raíz de *Hyptis suaveolens* (L.) Poit.<sup>38</sup> y de las partes aéreas de *Hyptis albida* Kunth.<sup>32</sup> y *H. pectinata*.<sup>39</sup>

De igual forma, resulta interesante conocer que uno de los diterpenos aislado de la raíz de *Hyptis fruticosa* Salzm. ex Bentham, la 14-metoxi-taxodiona (21) no sólo desarrolla una actividad bacteriostática en contra de diversos microorganismos, sino que también es un agente antitumoral efectivo sobre el carcinoma de Erlich en ratas.<sup>30</sup> Otro compuesto triterpénico aislado de la raíz de *H. suaveolens*, el lupol (22),<sup>40</sup> ha demostrado ser un potente agente anticancerígeno.<sup>38</sup>

Una reciente investigación<sup>41,42</sup> demostró que el ácido pomólico (23) aislado con anterioridad de *Hyptis mutabilis* (A. Rich.) Briq.,<sup>41</sup> posee una actividad citotóxica en contra de la línea tumoral P-388<sup>42</sup> (Cuadro 1).



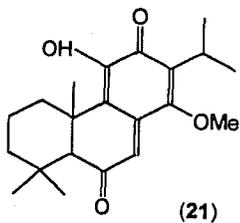
(16)  $R_1 = R_2 = R_3 = H$

(17)  $R_1 = COCH_3$ ;  $R_2 = R_3 = H$

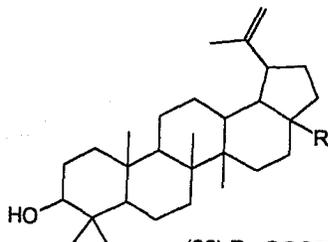
(18)  $R_1 = R_2 = R_3 = H$

(19)  $R_1 = COCH_3$ ;  $R_2 = CH_3$ ;  $R_3 = H$

(23)  $R_1 = R_2 = H$ ;  $R_3 = OH$



(21)



(20)  $R = COOR$

(22)  $R = Me$

**Cuadro 1.** Valores de las dosis efectivas medias ( $DE_{50}$ ) para las líneas tumorales KB y P-388 de los compuestos citotóxicos aislados del género *Hyptis*.

COMPUESTOS	$DE_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )		FUENTES <sup>a</sup>	REFERENCIAS
	KB	P-388		
4-desmetildesoxipodofilotoxina.	0.01	0.005	HV	29
Desoxipodofilotoxina	0.032	0.005	HT, HE.	30, 31
B-peltantina	0.1	0.007	HV	29, 32
Gardenina B	6.0	-----	HA, HT	30, 32
5-OH, 4', 3,6,7,8, pentametoxiflavona	1.8	-----	HT	30, 31
Sideritoflavona	1.6	3.9	HV	31
Ac.ursólico	6.6	9.0	HC, HV	35
Ac. 3-O-acetilursólico	3.7	-----	HC	35
ursolato de metilo	> 4.0	-----	HC	35
3-O-acetilursolato de metilo	> 4.0	-----	HC	35
Ac. pomólico	-----	2.9	HM	41, 42
Ac.maslínico	-----	13.0	HV	41, 42
Ac.betulínico	-----	5.3	HA, HE, HS, HP	32, 36, 37, 38
2- $\alpha$ -hidroxiursólico	-----	3.2	HM, HV	42

<sup>a</sup> HA = *Hyptis albida*, HC = *Hyptis capitata*, HE = *Hyptis emoryi*, HM = *Hyptis mutabilis* HP = *Hyptis pectinata*, HS = *Hyptis suaveolens*, HT = *Hyptis tomentosa*, HV = *Hyptis verticillata*.

## 4. PARTE EXPERIMENTAL.

### 4.1 PROCEDIMIENTOS GENERALES

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Büchi 530 y no están corregidos. Los espectros de IR y UV se obtuvieron en espectrofotómetros Perkin-Elmer modelo 599B y 330. Los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  se determinaron en un aparato Varian VXR-300S, utilizando TMS como referencia interna. Los espectros de masas se registraron en un espectrofotómetro MS-Finnigan Mat 90. El dicroísmo circular se obtuvo en un polarímetro JASCO-60 CD. Las cromatografías en columna se realizaron con gel de sílice 60 F<sub>254</sub> Merck (tamaño de partícula 70-230). La cromatografía en capa fina (ccf) se realizó con gel de sílice 60 F<sub>254</sub> (Merck) y los compuestos se visualizaron con luz UV de onda corta ( $\lambda=254\text{nm}$ ) o por revelado con una solución al 10% de  $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$  en  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2N, seguido por calentamiento a 110°C.

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

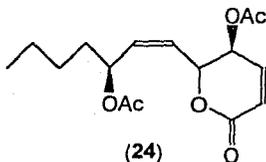
### 4.2 AISLAMIENTO BIODIRIGIDO DE LOS CONSTITUYENTES ANTIMICROBIANOS Y CITOTOXICOS DE *Hyptis pectinata*.

La fracción clorofórmica (Fracción II, 23.79g) responsable de una significativa actividad antimicrobiana (7-10 mm zona de inhibición) en contra de bacterias Gram positivas y que desarrolló la mayor actividad citotóxica (P-388,  $\text{ED}_{50} = 2.2 \mu\text{g/ml}$ ), se recromatografió sobre una columna de gel de sílice utilizando n-hexano- $\text{CHCl}_3$  (1:3). El total de los eluatos obtenidos de 150 ml cada uno se reunieron en dos subfracciones secundarias bioactivas. La purificación de la fracción secundaria de mayor polaridad (subfracción II; 9-11 mm zona de inhibición, P-388  $\text{ED}_{50} 2.0 \mu\text{g/ml}$ ) se realizó mediante

una decoloración de la muestra disuelta en  $\text{CHCl}_3$  con carbón activado. Después de reposar la suspensión por una hora, se filtró en vacío a través de celita y se efectuaron sucesivos lavados con  $\text{CHCl}_3$ . El filtrado se concentró a presión reducida obteniéndose un aceite amarillo (16 g). Este residuo se sometió a una cromatografía en columna (600 g de gel de sílice), eluida con hexano- $\text{CHCl}_3$  (1:3).

La actividad antimicrobiana (10 mm zona de inhibición) se detectó en los eluatos de  $R_f = 0.52$  ( $\text{CHCl}_3$ -hexano- $\text{Me}_2\text{CO}$ ; 7:2:1), los cuales proporcionaron 5.6 g de un aceite incoloro, el cual se caracterizó como una 5,6-dihidro- $\alpha$ -pirona y se denominó con el nombre trivial de la pectinólida-A {24}.

Las constantes espectroscópicas registradas para la pectinólida A {24} son las siguientes:



$\{\alpha\}_D + 202^\circ$  ( $c = 0.15$ , MeOH)

UV  $\lambda$  max (MeOH) ( $\log \epsilon$ ): 208nm (3.96);

IR  $\nu$  max ( $\text{CHCl}_3$ )  $\text{cm}^{-1}$  2925, 2850, 2750 1730, 1450, 1420, 1360, 1225, 1060, 1020, 940, 818.

EM-IE (alta resolución)  $m/z$  310.1418 ( $M^+$ , calculado para  $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_6$ : 310.1416).

EM-IE (70 eV)  $m/z$  (%)  $\{M\}^+$  310 (0.2),  $\{M\text{-HOAc}\}^+$  250 (0.1),  $\{M\text{-2 (CH}_2\text{CO)}\}^+$  226 (0.1),  $\{250\text{-CH}_2\text{CO}\}^+$  113(5),  $\{126\text{-CH}_2\text{CO}\}^+$  84(16.2), 55(12.2), 43(100), 41(8.8).

EMIQ  $m/z$ (%)  $\{MHC\}^+$  311(100),  $\{MH\text{-HOAc}\}^+$  251(58);

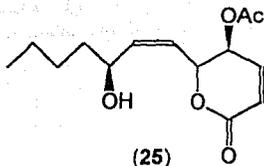
DC ( $c = 0.13$ , MeOH)  $\Delta\epsilon$  (nm) O(310), +2.45(265), +1.20(246), O(239), +24.7(214).

RMN-<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 6.96(1H, dd, J = 9.7 y 5.7 Hz, H-4); 6.24 (1H, d, J = 9.7 Hz, H-3); 5.73 (1H, dd, J = 10.5 y 8.1 Hz, H-1'); 5.62 (1H, dd, J = 10.5 y 10.1 Hz, H-2'); 5.6 (1H, dd, J = 8.1 y 2.9 Hz, H-6); 5.35 (1H, ddd, J = 10.1, 7.3, y 6.6 Hz, H-3'); 5.19 (1H, dd, J = 5.7 y 2.9 Hz, H-5); 2.09 (3H, s, 5-OAc); 2.05 (3H, s, 3'-OAc); 1.70 (2H, m, H-4'); 1.54 (2H, m, H-5'); 1.29 (2H, m, H-6'); 0.09 (1H, t, J = 6.9Hz, H-7').

RMN-<sup>13</sup>C (75.4 Mz, CDCl<sub>3</sub>) δ 170.25, 169.75 (Me-CO-); 162.12 (C-2); 140.01 (C-4); 133.17(C-1'); 126.18 (C-2'); 124.99 (C-3); 75.04 (C-6); 69.42 (C-3'); 64.24 (C-5); 34.01 (C-4'); 27.20 (C-5'); 22.40 (C-6'); 13.88(C-7'); 21.07, 20.46(Me-CO-).

La subfracción II también desarrolló una actividad antimicrobiana y citotóxica significativa (zona de inhibición 9-11 mm; P-388, ED<sub>50</sub> 2.0 µg/ml). Esta subfracción se recromatografió en una columna de gel de sílice (30 g) utilizando CHCl<sub>3</sub>-Me<sub>2</sub>CO (9:5:0.5) y proporcionó 500 mg de la pectinólida A {24} (R<sub>f</sub> = 0.59), como el constituyente mayoritario, la cual era seguida en la elución cromatográfica por dos constituyentes de mayor polaridad activos al UV. Las fracciones que contienen en mayor cantidad estos dos constituyentes se sometieron a un análisis por cromatografía en capa fina (ccf) utilizando el sistema de elución CHCl<sub>3</sub>-Me<sub>2</sub>CO (9:1) y se reunieron en una sola fracción, la cual se denominó con la clave 200-224 y proporcionó 462.9 mg de un aceite amarillo claro (P-388, ED<sub>50</sub> 2.0 µg/ml).

La purificación de esta fracción mediante sucesivas cromatografías en capa fina a nivel preparativo proporcionó 58 mg (0.0015% peso seco) del compuesto minoritario (R<sub>f</sub> = 0.55; CHCl<sub>3</sub>-Me<sub>2</sub>CO, 4:1). Este compuesto se purificó como un aceite incoloro y se denominó como la pectinólida B {25}.



{ $\alpha$ }<sub>D</sub> + 89.6° (c=0.57 MeOH)

UV  $\lambda_{\text{max}}$  (MeOH) (log $\epsilon$ ): 204nm (4.23)

IR  $\nu_{\text{max}}$  (CHCl<sub>3</sub>) 4375, 3038, 3018, 2929, 1735, 1455, 1375, 1249, 1066, 976, 815

EM-IE (alta resolución)  $m/z$  268.1311 (M<sup>+</sup>, calculado para C<sub>19</sub>H<sub>20</sub>O<sub>5</sub>: 268.1310);

EM-IE (70 eV)  $m/z$  (%) {M}<sup>+</sup> 268 (0.3), 250 (0.5), 208 (2.87), 167 (8.19), 155 (4.70),  
151 (30.95), 149 (22.20), 126 (11.05), 125 (100), 113 (6.5), 97 (10.67), 96  
(5.6), 95 (10.92), 85 (10.5), 84 (51.62), 83 (44.96), 57 (46.63), 55 (50).

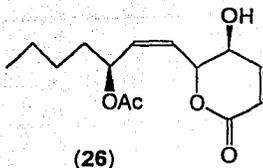
EMIQ  $m/z$  (%) {MH}<sup>+</sup> 269 (100), {MH-H<sub>2</sub>O}<sup>+</sup> 271 (47), {MH-HOAc}<sup>+</sup> 209 (68).

D.C. (c=0.02, MeOH)  $\Delta\epsilon$  (nm) 0 (310), + 0.34 (285), + 1.27 (267), +0.48 (247).

RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)  $\delta$  6.98 (1H, dd, J = 9.8 y 5.6 Hz, H-4), 6.22 (1H, d, J = 9.8, H-3); 5.76 (1H, dd, J = 11.1 y 7.3 Hz, H-2'); 5.64 (1H, ddd, J = 11.1, 8.1 y 0.9, H-1'); 5.54 (1H, dd, J = 8.1 y 3.0, H-6); 5.26 (1H, dd, J = 5.6 y 3.0 Hz, H-5); 4.39 (1H, qd, J = 7.3 y 0.9 Hz, H-3'); 1.6 (2H, m, H-4'); 1.50 (2H, m, H-5'); 1.29 (2H, m, H-6'); 0.09 (1H, t, J = 7 Hz, H-7'); 2.10 (3H, s, S-OAc).

RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 75.4 MHz)  $\delta$  169.85 (Me-CO-); 162.35 (C-2); 140.48 (C-4); 129.24 (C-2'); 124.62 (C-3); 122.77 (C-1'); 74.84 (C-6); 68.32 (C-3'); 63.94 (C-5); 36.83 (C-4'); 27.43 (C-5'); 22.59 (C-6'); 20.52 (Me-CO-); 13.96 (C-7').

El compuesto mayoritario en esta mezcla ( $R_f$  = 0.50; CHCl<sub>3</sub>-Me<sub>2</sub>CO, 4:1) se obtuvo con un rendimiento de 100 mg (0.0027% peso seco) y se denominó con el nombre de pectinólida C {26}. Este compuesto también se aisló como un aceite incoloro que presentó las siguientes propiedades espectroscópicas.



$(\alpha)_D + 80.99$  ( $c=0.76$ , MeOH).

UV  $\lambda_{max}$  (MeOH) ( $\log \epsilon$ ): 204nm (3.96)

IR  $\nu_{max}$  ( $\text{CHCl}_3$ ) 3475, 3088, 3018, 2929, 1735, 1435, 1423, 1374, 1249, 1066, 1030, 976, 876  $\text{cm}^{-1}$ .

EMIE (alta resolución)  $m/z$  268.1812 ( $\text{M}^+$ , calculado para  $\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{O}_5$ : 268.1310);

EMIE  $m/z$  (%)  $\{\text{M}\}^+$  268 (0.3), 250 (0.32), 209 (10.63), 208 (3.85), 191 (3.14), 155 (5.80), 151 (18.75), 126 (10.14), 125 (100), 113 (7.85), 97 (8.58), 96 (4.67), 95 (9.87), 85 (14.14), 84 (55.48), 83 (42.89), 81 (19.32), 57 (27.21), 56 (13.97), 55 (49.41).

EMIQ  $m/z$  (%)  $\{\text{MH}\}^+$  269 (100),  $\{\text{MH}-\text{H}_2\text{O}\}^+$  270 (67),  $\{\text{MH}-\text{HOAc}\}^+$  209 (59).

DC ( $c=0.04$ , MeOH)  $\Delta \epsilon$  (nm) + 0.38 (285), + 1.24 (264), -1.16 (243), + 16.32

RMN- $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta$  7.01 (1H, dd,  $J = 9.8$  y  $5.4$ , H-4); 6.08 (1H, d,  $J = 9.8$ , H-3); 5.82 (1H, dd,  $J = 11.2$  y  $8\text{Hz}$ , H-1'); 5.66 (1H, dd,  $J = 11.2$ , y  $9.2\text{Hz}$ , H-2'); 5.44 (1H, ddd,  $J = 9.2$ ,  $6.8$ ,  $5.8$ , H-3'); 5.35 (1H, dd,  $J = 8.0$  y  $3.0$  Hz, H-6); 4.12 (1H, dd,  $J = 5.4$ , y  $3.0$ , H-5); 2.04 (3H, s, Me-CO); 1.68 (2H, m, H-4'); 1.55 (2H, m, H-5'); 1.29 (2H, m, H-6'); 0.90 (1H, t,  $J = 6.9$ , H-7').

RMN- $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 75.4 MHz)  $\delta$  170.87 (Me-CO); 163.32 (C-2); 144.83 (C-4); 133.25 (C-2'); 126.29 (C-1'); 77.65 (C-6); 70.28 (C-3'); 63.12 (C-5); 34.09 (C-4'); 27.01 (C-5'); 22.33 (C-6'); 21.05 (Me-CO-); 13.79 (C-7')

### 4.3 EVALUACION DEL POTENCIAL ANTIMICROBIANO

Se realizó la evaluación cualitativa de la actividad antimicrobiana de las pectinólidas A-C {24-26} utilizando el bioensayo de difusión en agar<sup>43</sup> en contra de los siguientes microorganismos:

	ATCC No.	CLASIFICACION
<i>Bacillus subtilis</i>	6633	Gram positivo
<i>Staphylococcus aureus</i>	6538	Gram positivo
<i>Escherichia coli</i>	8739	Gram negativo
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9027	Gram negativo
<i>Candida albicans</i>	10231	Levadura

El valor de la concentración mínima inhibitoria (MIC) para las pectinólidas A-C se determinó utilizando las técnicas de análisis cuantitativo de dilución en caldo nutritivo.<sup>44</sup>

#### 4.3.1 PREPARACION DE LOS INOCULOS.

Las bacterias se prepararon mediante incubación en caldo nutritivo (Merck) durante 24 horas a 37°C. *Candida albicans* se cultivó en caldo-glucosa 2% - Sabouraud (Merck) y se incubó por 48 horas a 28°C. La concentración final de organismos en cada uno de los cultivos preparados se ajustó mediante una dilución en solución salina isotónica (NaCl 0.9%) hasta obtener la turbidez equivalente a un medio del estandar No. 1 de McFarland (0.1 ml de BaCl<sub>2</sub> 1% y 9.9 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1%), correspondiente a un número aproximado de 10<sup>6</sup> células/ml.

#### **4.4. ANALISIS CUALITATIVO ANTIMICROBIANO**

2 mg de las pectinólidas B{25} y C{26} se suspendieron en una solución acuosa de Twen 80 al 1%. Las tres pectinólidas se evaluaron a una concentración de 1 mg/ml. Los controles positivos se prepararon utilizando 1 mg/ml de sulfato de estreptomycin y 30 mg/ml de nistatina en solución acuosa.

##### **4.4.1 PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO.**

Un mililitro de la suspensión bacteriana se sembró de manera uniforme en cada caja Petri (100 x 15mm) de prueba, conteniendo 15 ml de agar-antibiótico No. 1 (Merck) para las bacterias o agar-Sabouraud (Glucosa 4% Merck) para *C. albicans*. Con un horador cilíndrico se removió el agar de las placas para producir tres perforaciones de un diámetro aproximado de 11 mm. Posteriormente, se adicionaron 100 µl del control positivo en una de las perforaciones y 100 µl de la solución de prueba se adicionaron de manera independiente en las cavidades restantes.

Las placas así preparadas se mantuvieron por un periodo de 1 a 2 horas a temperatura ambiente para facilitar la difusión de las muestras. Transcurrido ese tiempo, las placas se incubaron por 24 horas a 37 °C para las bacterias y durante 48 horas a 28 °C para la levadura. Para cada muestra de prueba, el ensayo se realizó por duplicado. La actividad antimicrobiana se registró mediante el diámetro (mm) de la zona de inhibición que circundó a cada una de las perforaciones

#### **4.5 ANALISIS CUANTITATIVO ANTIMICROBIANO.**

Para cada una de las determinaciones de la concentración mínima inhibitoria (MIC) se preparó una serie de 10 tubos de ensayo conteniendo caldo nutritivo estéril. El primer tubo en esta serie contenía 4.5 ml de caldo nutritivo y los restantes 2.5 ml cada uno. El compuesto de prueba se disolvió a una concentración de 1 mg/ml en una mezcla de MeOH-H<sub>2</sub>O (1:1) y 0.5 ml de esta solución se transfirieron al primer tubo con agitación

vigorosa. 2.5 ml de esta suspensión se transfirieron del primer tubo al segundo mezclando cuidadosamente. Esta misma operación se realizó con el tubo siguiente y así sucesivamente, resultando en una serie de diluciones que correspondieron a las concentraciones de 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12, 1.56, 0.78, 0.39 y 0.19  $\mu\text{g/ml}$ . Cada tubo se inoculó con 10  $\mu\text{l}$  de la suspensión "stock" de *B. subtilis* o *S. aureus*. ( $10^6$  células/ml). Posteriormente, se incubaron a la temperatura y durante el periodo apropiados. Cada evaluación se realizó por duplicado.

El sulfato de estreptomicina (100  $\mu\text{g/ml}$ ) se utilizó como un control positivo. La concentración mínima que inhibió completamente la proliferación del organismo de prueba se registró como la concentración mínima inhibitoria, MIC ( $\mu\text{l/mg}$ ).

#### **4.6 EVALUACION DEL POTENCIAL TOXICO PARA *Artemia salina***

Se preparó una solución original de las muestras (extractos y compuestos puros) disolviendo 20 mg en 2 ml del disolvente adecuado (MeOH o  $\text{CHCl}_3$ ). De esta solución se transfirieron 5, 50 y 500  $\mu\text{l}$  a frascos viales de manera independiente y por triplicado. Se dejó evaporar el disolvente a sequedad y posteriormente se agregó a cada vial con 5 ml de un medio salino artificial, obteniéndose así concentraciones de 10, 100, y 1000 ppm, respectivamente.<sup>45</sup>

##### **4.6.1 BIOENSAYO**

Después de haber desarrollado los huevos de *A. salina* L. en un medio salino durante 48 horas, se transfirieron 10 crustáceos a cada uno de los viales conteniendo las muestras. Transcurridas 24 horas, se registró el número de organismos sobrevivientes. Los resultados finales se expresaron en porcentaje de mortalidad. La concentración letal media ( $\text{LC}_{50}$ ) se calculó mediante un análisis estadístico de Probit.<sup>46</sup>

#### **4.7 ENSAYO DE CITOTOXICIDAD**

El potencial citotóxico de las pectinólidas A-C {24-26} aisladas de la hierba del burro se determinó de acuerdo a los procedimientos establecidos por el Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos de Norteamérica.<sup>47</sup>

Se utilizaron los siguientes cultivos de células tumorales; BC-1 (cáncer de pecho humano), HT-1080 (fibrosarcoma humano), Lu-1 (cáncer pulmonar humano), Mel-2 (melanoma humano), Col-2 (cáncer de colón), KB (carcinoma nasofaríngeo humano), KB-V (KB resistente a la vinblastina), A-431 (carcinoma epidermoide humano), LNCaP (cáncer de próstata humano), ZR75-1 (cáncer de pecho humano), y P-388(leucemia linfocítica de mórvidos). Los cultivos celulares en su fase de crecimiento logarítmica se trataron con cinco diferentes concentraciones de cada una de las muestras de prueba (20.0-0.03 µg/ml) disueltas en DMSO y se incubaron durante un periodo de 48 horas para las líneas celulares P-388, HT-1080, Lu-1 y 72 horas para todas las restantes líneas celulares (a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> y 100% de humedad). La cuantificación de las células en cada tubo se determinó por conteo para las líneas celulares P-388 y análisis protéico para las restantes. Los resultados se expresaron en valores de ED<sub>50</sub>.

#### **4.8 REACCION DE ACETILACION.**

##### **4.8.1 ACETILACION DE LA PECTINOLIDA B {25}.**

5 mg de pectinólida B {24} se disolvieron en 0.5ml de piridina anhidra y 0.5ml de Ac<sub>2</sub>O. La mezcla de reacción se agitó durante 45 minutos a temperatura ambiente. El curso de la reacción se monitoreó mediante ccf hasta la completa desaparición de la pectinólida B en la mezcla de reacción. Después de 45 minutos, se adicionaron 5 ml de agua destilada y se realizaron dos extracciones sucesivas utilizando en cada una un volumen de 10 ml de AcOEt. Las fases orgánicas se reunieron y fueron tratadas con 10 ml de HCl 1N, seguido de un tratamiento alcalino con una solución saturada de NaHCO<sub>3</sub>. La fase orgánica se lavó dos veces con volúmenes de 5 ml de agua en cada ocasión, se secó

con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro y se concentró a presión reducida. Por último, el crudo de la reacción se analizó por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). Este análisis proporcionó un cromatograma compuesto por un solo pico, ( $R_t = 12.73$ ), el cual coeluyó con la pectinólida A {23} utilizada como un estándar de referencia ( $R_t = 13.03$ ).

#### **4.8.2 ACETILACION DE LA PECTINOLIDA C {26}**

10 mg de pectinólida C {25} se disolvieron en 0.5ml de piridina anhidra y 0.5ml de  $\text{Ac}_2\text{O}$ . La mezcla de reacción se agitó durante 30 minutos a temperatura ambiente. El curso de la reacción se monitoreó mediante ccf hasta que la pectinólida C {25} desapareció de la mezcla de reacción. Posteriormente, se adicionaron 5 ml de agua destilada y se realizó el mismo procedimiento de extracción y purificación utilizado para la pectinólida B. Posteriormente, el crudo de reacción se analizó por HPLC, obteniéndose un cromatograma con un solo pico ( $R_t = 12.91$ ). La coelución con la pectinólida A proporcionó un cromatograma constituido por un pico con un  $R_t = 12.73$ .

#### **4.8.3 ANALISIS MEDIANTE CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION (HPLC) DE LAS REACCIONES DE ACETILACION.**

##### **4.8.3.1 CONDICIONES INSTRUMENTALES.**

El análisis por HPLC de los crudos de reacción de la acetilación de las pectinólidas B {24} y C {25} se efectuó en un cromatógrafo de líquidos de alta resolución que consiste de una bomba Millipore Waters U6K con un loop de 25  $\mu\text{l}$ , un detector de longitud de onda variable (Detector de Diodos Waters 991). Una columna de fase reversa, ultrasfer ODS (5  $\mu\text{m}$ ) de 4.6 mm de diámetro por 25 cm. La fase móvil utilizada consistió de MeOH a una velocidad de 1.5 ml/min durante 20 min.

#### **4.9 METODO DE HOREAU.**

##### **4.9.1 PREPARACION DEL ANHIDRIDO DEL ACIDO**

###### **2-FENILBUTANOICO.**

10 g del ácido 2-fenilbutanoico se mezclaron con 10 g de anhídrido acético ( $\text{Ac}_2\text{O}$ ) y la mezcla se hirvió a reflujo, a 144 °C durante 1 hora. El ácido acético generado en la reacción se destiló a presión reducida. Posteriormente, se adicionaron otros 10 g de  $\text{Ac}_2\text{O}$  a la mezcla de reacción y se sometió a reflujo a una temperatura de 155 °C por 1 hora. De nuevo el ácido acético subproducto de esta reacción se eliminó mediante destilación al vacío. Una tercera porción de  $\text{Ac}_2\text{O}$  (10 g) se adicionó a la mezcla de reacción y se reflujo a una temperatura de 165°C por 1 hora. El ácido acético y el exceso de  $\text{Ac}_2\text{O}$  se separaron nuevamente mediante destilación a presión reducida. Se obtuvo un líquido amarillo.

##### **4.9.2 DETERMINACION DE LA CONFIGURACION ABSOLUTA DEL CENTRO C-3' DE LA PECTINOLIDA B {25}.**

18 mg de la pectinólida B se adicionaron a una solución del anhídrido del ácido 2-fenilbutanoico (33 mg) en piridina anhidra (0.5 ml) y la mezcla resultante se agitó durante seis horas a temperatura ambiente. La reacción se monitoreó mediante ccf hasta que la materia prima desapareció de la mezcla de reacción. Posteriormente, se adicionó  $\text{H}_2\text{O}$  (5 ml) y la mezcla se agitó durante 30 min. Esta mezcla se tituló con una solución de NaOH 0.1 N en presencia de  $\text{C}_6\text{H}_6$  (10 ml) y unas gotas de fenofaleína, como un indicador de pH. Las dos fases se separaron mediante un embudo de separación, y la fase acuosa básica de color rosa, se lavó con  $\text{CHCl}_3$  (10 ml), para remover las trazas de éster y. Posteriormente, esta solución se acidificó con HCl 1N (15 ml). El ácido 2-fenilbutanoico formado se extrajo con  $\text{C}_6\text{H}_6$  y se registró su rotación óptica  $\{\alpha\}_D = -2.57$ . ( $c = 2.9$ ,  $\text{C}_6\text{H}_6$ ).

La fase orgánica obtenida en la separación anterior se reunió con el lavado clorofórmico realizado a la fase acuosa y se concentró a presión reducida obteniéndose un

aceite amarillo (11.8 mg). Este residuo representó la mezcla de los dos ésteres diastereoisoméricos generados a partir de la pectinólida B {25}.

#### 4.10 REACCIONES DE OXIDACION.

##### 4.10.1 OZONOLISIS DE LA PECTINOLIDA B {25}.

Un exceso de ozono se burbujeó durante 2 horas a una solución de 50 mg de pectinólida B {25} disuelta en  $\text{CHCl}_3$  (20ml) a la temperatura de 0 °C. La mezcla de reacción se trató con  $\text{H}_2\text{O}_2$  (30%) y en agitación continua durante toda la noche. Posteriormente, las fases fueron separadas y la fase acuosa se lavó con  $\text{Et}_2\text{O}$ . Las fases orgánicas se reunieron y concentraron a presión reducida. El producto mayoritario de la ozonólisis se purificó mediante HPLC usando una mezcla isocrática de  $\text{CHCl}_3$  como fase móvil.

##### 4.10.2 OZONOLISIS DE LA PECTINOLIDA C {26}.

Un exceso de ozono se burbujeó durante 2 horas a una solución de 200 mg de pectinólida C {26} disuelta en  $\text{CHCl}_3$  (20 ml) a la temperatura de 0 °C. La mezcla de reacción se trató con  $\text{H}_2\text{O}_2$  (30 %) en agitación continua durante toda la noche. Posteriormente, las fases fueron separadas y la fase acuosa se lavó con  $\text{Et}_2\text{O}$ . Las fases orgánicas se reunieron y concentraron a presión reducida. El producto mayoritario de la ozonólisis se purificó mediante HPLC usando una mezcla compuesta por  $\text{MeOH-CHCl}_3$  (9:1) como fase móvil con un flujo de 5 ml/min, obteniéndose 35.6 mg del ácido 2-acetiloxi-hexanoico.

IR  $\nu$  max ( $\text{CHCl}_3$ )  $\text{cm}^{-1}$ : 3010, 2990, 2910, 1730, 1710, 1440, 1240, 1100.

EMIE  $m/z$  (%) {M}<sup>+</sup> 174 (0.5); {M -  $\text{CO}_2\text{H}$ }<sup>+</sup> 129 (76); {M - HOAc}<sup>+</sup> 114 (18); 69 (30); 57 (10); 55(90); 43 (100).

EMIQ  $m/z$  (%) {MH}<sup>+</sup> 175 (45), {MH -  $\text{H}_2\text{O}$ }<sup>+</sup> 157 (19); {MH - HOAc}<sup>+</sup> (100).

RMN-<sup>1</sup>H (300MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 9.45 (1H, s, OH); 4.95 (1H, t, J 0 6.0Hz); 2.09 (3H, s); 1.85 (2H, m); 1.38 (4H, m); 0.09 (3H, t, J= 7Hz).

RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) δ 176.00 (C-1); 72.18 (C-2); 30.76 (C-3); 30 (C-4); 22.35 (C-5); 20.70 (CH<sub>3</sub>CO-); 13.90 (C-6).

#### 4.10.2.1 HIDROLISIS DEL ACIDO 2-ACETILOXIHEXANOICO.

35 mg del producto de ozonólisis en 3 ml de NaOH al 2% se agitó durante 24 horas a temperatura ambiente. La mezcla de reacción fue lavada con éter y se adicionó HCl a la fase acuosa hasta obtener pH de 4. El precipitado se filtró y recristalizó en acetona obteniéndose 19.8 mg del ácido 2-hidroxihexanoico.

Pf= 60°-62°C

{α}D + 14.8° (c = 1.85, MeOH)

DC (c = 0.6, MeOH) Δε (nm) +0.12 (190); +1.58 (209); +0.19 (230); 0(238); -0.01 (244).

EMIE, RMN-<sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C idénticos a una muestra comercial (Sigma).

## 5. RESULTADOS Y DISCUSION.

### 5.1 FRACCIONAMIENTO BODIRIGIDO Y EVALUACION BIOLOGICA PRELIMINAR.

De la riqueza florística mexicana el género *Hyptis* está conformado por un grupo de plantas de gran importancia económica y medicinal en la vida diaria de nuestro pueblo. Todas las especies medicinales de este género deben su importancia medicinal a sus propiedades antisépticas, antiparasitarias y tónico-estimulantes. Esta diversidad de usos populares constituye el indicador de su potencialidad farmacológica.

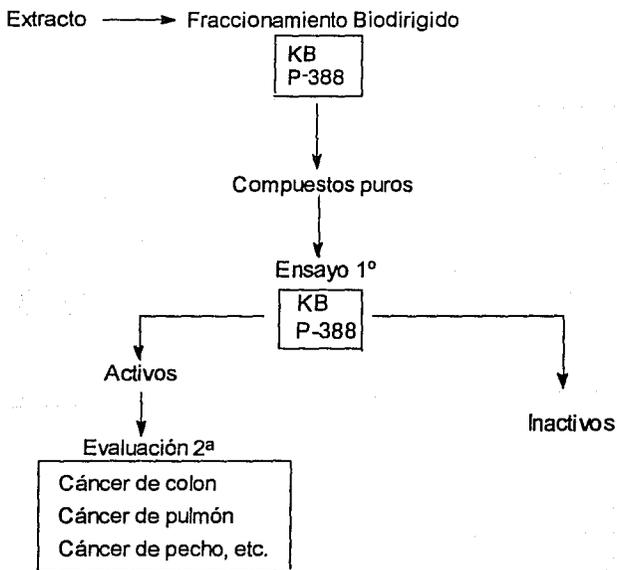
El plan de trabajo propuesto para el estudio del contenido metabólico de la hierba del burro (*Hyptis pectinata*) se dividió en los procedimientos metodológicos incluidos en el Esquema No. 1. El aspecto más importante de esta secuencia consistió en el empleo de bioensayos simples que permitieron detectar las actividades antimicrobiana y citotóxica potenciales de los extractos preparados a partir del material vegetal. Estos ensayos permitieron monitorear estas actividades biológicas a lo largo de todo el estudio fitoquímico con el objeto de aislar y purificar los principios activos.

- 1.- RECOLECTA DEL MATERIAL VEGETAL
- 2.- ANALISIS FITOQUIMICO PRELIMINAR.
  - 2.1 EXTRACCION
  - 2.2 ANALISIS CUALITATIVO PRELIMINAR
- 3.- EXTRACCION EN GRAN ESCALA.
- 4.- EVALUACION BIOLOGICA PRELIMINAR
- 5.- ESTUDIO FITOQUIMICO.
  - 5.1 FRACCIONAMIENTO BODIRIGIDO
  - 5.2 SEPARACION Y PURIFICACION DE LOS PRINCIPIOS ACTIVOS
  - 5.3 CARACTERIZACION DE LOS COMPUESTOS ACTIVOS
- 6.- EVALUACION BIOLOGICA SECUNDARIA

#### Esquema 1.

Los ensayos que se utilizaron incluyen el bioensayo de la toxicidad para *Artemia salina*<sup>9</sup> para evaluar el potencial citotóxico y los métodos cualitativos<sup>43</sup> y cuantitativos microbiológicos para evaluar la actividad antimicrobiana.<sup>44</sup>

Los compuestos puros aislados que presentaron un efecto tóxico letal significativo para *Artemia salina*, ( $CL_{50} < 1000$  ppm) se sometieron a una evaluación primaria de su potencialidad citotóxica utilizando cultivos *in vitro* de dos sistemas tumorales; el carcinoma epidermoide humano KB y el linfoma de mórvidos P-388. Los compuestos que resultaron activos en esta preevaluación se sometieron a un panel de ocho líneas celulares cancerosas humanas. El esquema 2 ilustra la secuencia de bioensayos para evaluar el potencial citotóxico de los extractos y compuestos puros.



Esquema 2

En un estudio inicial los extractos orgánicos preparados de *H. pectinata* desarrollaron una actividad inhibitoria significativa en contra de bacterias Gram positivas<sup>18</sup>. La figura 1 muestra los halos de inhibición que desarrollaron los extractos de *H. pectinata* en contra de los organismos de prueba, *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus*. Esta evaluación preliminar permitió el inicio del estudio fitoquímico de *Hyptis pectinata* con el objetivo de aislar y caracterizar los constituyentes responsables de la actividad antimicrobiana.

El extracto clorofórmico de *H. pectinata* se sometió a una separación mediante cromatografía en columna de gel de sílice y las fracciones obtenidas se sometieron de manera independiente a la evaluación de su potencial antimicrobiano. Esta metodología concentró la actividad biológica en dos fracciones que correspondieron a la elución con cloroformo.<sup>18</sup> Estas dos fracciones se sometieron a procedimientos de purificación adicional los cuales permitieron el aislamiento de dos constituyentes bioactivos, la pectinólida A aislada de la fracción II y la hiptólida aislada de la fracción III. Como resultado de esta primera fase de investigación se estableció la estructura del constituyente mayoritario, la pectinólida A<sup>18</sup> {24}. A continuación se describen los resultados de una segunda fase de investigación que permitió caracterizar los principales constituyentes citotóxicos presentes en el extracto clorofórmico de la hierba del burro.

La fracción que desarrolló la actividad antimicrobiana proporcionó 5.6 g de la pectinólida A {24} (0.1513 % peso seco), la cual era seguida en la elución cromatográfica por dos constituyentes adicionales de mayor polaridad, activos al exponerse a la luz ultravioleta ( $\lambda = 254\text{nm}$ ). Esta fracción se denominó con la clave 200-224 la cual se resolvió mediante procedimientos cromatográficos adicionales. Estos permitieron el aislamiento de los dos compuestos de mayor polaridad que se denominaron con los nombres genéricos de pectinólidas B {25}(Rf 0.55) y C {26}(Rf 0.50). El aislamiento y la purificación de estos dos constituyentes se realizó mediante el empleo de sucesivas cromatografías en capa fina a nivel preparativo, utilizando los sistemas de elución  $\text{CHCl}_3$ -

Me<sub>2</sub>CO (4:1). Los procesos de purificación utilizados para estos dos constituyentes minoritarios proporcionaron 58 mg de la pectinólida B {25} (0.0015 % peso seco) y 100 mg de la pectinólida C {26} (0.0027 % peso seco).

Los resultados de la evaluación cualitativa preliminar de la actividad antimicrobiana permitieron observar un efecto inhibitorio del crecimiento de las bacterias gram positivas desarrollado por la fracción 200-224. Esta actividad antimicrobiana reproducía la inhibición observada para el extracto orgánico original. La resolución de esta fracción concentró la actividad antimicrobiana en la elución que correspondía a la pectinólida A {24}, en tanto que las pectinólidas B {25} y C {26} desarrollaron un menor efecto inhibitorio. El Cuadro 2 resume los resultados de esta evaluación cualitativa antimicrobiana. Las figuras 4-6 presenta los halos de inhibición desarrollados por las pectinólidas A-C {24-26} en contra de *Bacillus subtilis* y *S. aureus*.

**Cuadro 2.** Evaluación Cualitativa de la Actividad Antimicrobiana.<sup>a</sup>

MUESTRA	Zona de inhibición (mm)	
	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
	(ATCC 6633)	(ATCC 6538)
Extracto <sup>b</sup>	7	6
Fracción 200-224 <sup>b</sup>	9	8
Pectinólida A <sup>c</sup>	10	9
Pectinólida B <sup>c</sup>	2	4
Pectinólida C <sup>c</sup>	2	2
Estreptomicina <sup>c</sup>	13	7

<sup>a</sup> Metodo de difusión en agar. Volumen de la solución de prueba 100 µl.

<sup>b</sup> Concentración: 20 mg/ml.

<sup>c</sup> Concentración de la solución: 1 mg/ml.

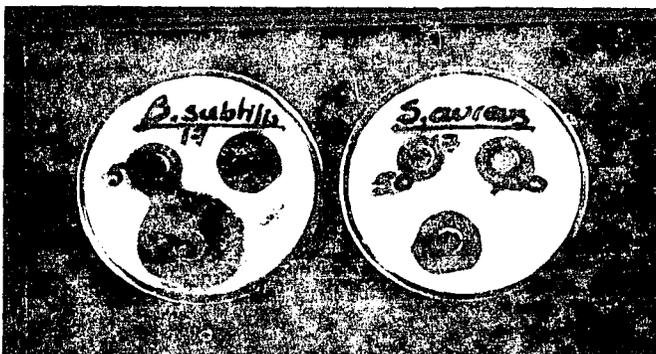


Figura 1.- Halos de inhibición desarrollados por el extracto ( $\text{CHCl}_3$ ) de *Hyptis pectinata* en contra de bacterias gram positivas (*Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus*). Control positivo: estreptomina.

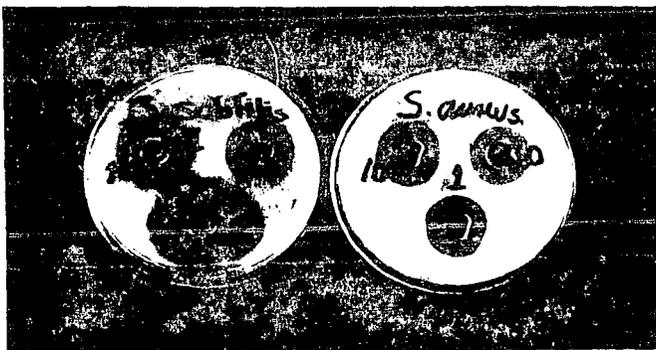


Figura 2.- Halos de inhibición desarrollados por la pectinólida A [24] en contra de bacterias gram positivas (*Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus*). Control positivo: estreptomina



Figura 3.- Halos de inhibición desarrollados por la pectinólida B {25} en contra de bacterias gram positivas (*Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus*). Control positivo: estreptomina.

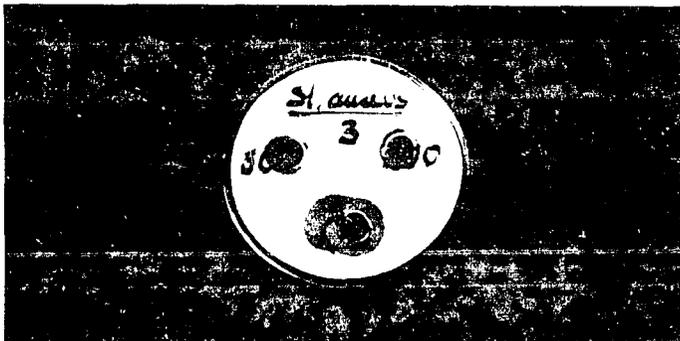


Figura 4.- Halos de Inhibición desarrollados por la pectinólida C {26} en contra de *Staphylococcus aureus*. Control positivo: estreptomina.

La evaluación del potencial citotóxico de *Hyptis pectinata* se realizó en primera instancia utilizando la toxicidad para *Artemia salina*. El extracto presentó una concentración letal media (CL<sub>50</sub>) de 1000 ppm. Esta actividad se asoció con la citotoxicidad observada para la leucemia de múridos P-388 con una dosis efectiva media (DE<sub>50</sub>) de 2.2 µg/ml. La fracción 200-224 concentró la actividad larvicida con un LC<sub>50</sub> de 320 ppm y desarrolló un mayor efecto citotóxico (P-388 DE<sub>50</sub> = 1.5 µg/ml). Esta evaluación primaria del potencial citotóxico demostró que las pectinólidas A-C {24-26} contribuían de manera significativa a la actividad antitumoral demostrada para el extracto total. El cuadro 3 resume la evaluación primaria del potencial citotóxico para las pectinólidas A-C {24-26} en las líneas celulares P-388 y KB.

**Cuadro 3.** Evaluación Primaria de la Actividad Citotóxica.

MUESTRA	LC <sub>50</sub> (ppm) <sup>a</sup>	DE <sub>50</sub> (µg/ml)	
		P-388 <sup>b</sup>	KB <sup>c</sup>
Extracto	1000	2.2	5.7
Fraccion 200-224	320	1.5	2.9
Pectinólida A {24}	160	0.9	1.8
Pectinólida B {25}	270	1.3	1.4
Pectinólida C {26}	280	2.2	1.7

<sup>a</sup>Toxicidad para *Artemia salina*.

<sup>b</sup>Leucemia de múridos.

<sup>c</sup>Carcinoma nasofaríngeo humano.

## 5.2 ELUCIDACION ESTRUCTURAL DE LAS PECTINOLIDAS B {25} Y C {26}.

Para la determinación de la estructura química de las pectinólidas B {25} y C {26} se utilizó la espectroscopía de resonancia magnética nuclear, asistida por la espectrometría de masas y la espectroscopía ultravioleta visible e infrarroja. El dicroísmo circular fue la técnica utilizada para la determinación de la configuración absoluta de las pectinólidas B y C {25-26}. De manera adicional, para el establecimiento de la configuración absoluta de estos constituyentes se utilizaron correlaciones químicas y reacciones químicas degradativas.

## 5.3 CARACTERISTICAS ESTRUCTURALES COMUNES DE LAS PECTINOLIDAS A-C {25-26}.

Los dos nuevos constituyentes citotóxicos {25 y 26} aislados de *Hyptis pectinata*, se purificaron como aceites ópticamente activos. Su fórmula molecular se estableció mediante espectrometría de masas de alta resolución como  $C_{14}H_{20}O_5$ .

Al igual que la pectinólida A {24}, estos compuestos presentaron las características espectroscópicas asociadas con la presencia del núcleo de 5,6-dihidro- $\alpha$ -pirona<sup>18</sup>

El espectro de UV presentó un máximo de absorción a 204 nm correspondiente a la transición  $n \rightarrow \pi^*$  de la lactona  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturada.

Los espectros de IR presentaron las absorciones características para el grupo carbonilo de una  $\delta$ -lactona  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturada en  $1710-1730\text{ cm}^{-1}$  y las absorciones para los dobles enlaces de la lactona a  $1590-1640$  y  $826\text{ cm}^{-1}$ .

Con base en estas evidencias espectroscópicas, se estableció que las pectinólidas B {25} y C {26} poseían el mismo cromóforo presente en la pectinólida A {24}, el cual corresponde al núcleo de 5,6-dihidro- $\alpha$ -pirona. La principal diferencia observada en los espectros de IR desarrollados por las pectinólidas B {25} y C {26} de las absorciones en

el espectro de la pectinólida A {24} fue una absorción intensa en  $3630\text{ cm}^{-1}$  la cual evidenció la presencia de un hidroxilo en las pectinólidas B {25} y C {26}. Esta observación era congruente con el incremento en la polaridad desarrollada por estos compuestos al compararse con el compuesto mayoritario, la pectinólida A {24}. Los espectros de masas de las pectinólidas B {25} y C {26} presentaron un ión molecular de  $m/z$  268 el cual difirió en 42 unidades de masa del ión molecular observado para la pectinólida A {24} ( $M^+$ ,  $m/z$  310). Por lo tanto, estos datos espectroscópicos confirmaron que las pectinólidas B {25} y C {26} correspondían a las dos posibilidades isoméricas monodesacetiladas de la pectinólida A.

El análisis de la RMN- $^1\text{H}$  de las pectinólidas B {25} y C {26} permitió establecer las siguientes conclusiones relacionadas con la naturaleza estructural de estos dos compuestos.

El espectro de RMN- $^1\text{H}$  de las pectinólidas B {25} y C {26} presentó el mismo sistema ABX para el núcleo de 5,6-dihidro- $\alpha$ -pirona de la pectinólida A {24}, el cual fue identificado para la pectinólida B {25} mediante el doblete en  $\delta$  6.22 (H-3) y el doblete de dobletes en  $\delta$  6.98 (H-4) asignados a los protones vinílicos del doble enlace conjugado al carbonilo de la pirona y el doblete de dobletes centrado en  $\delta$  5.26, para el protón alílico H-5. Por otra parte, las señales que indicaban la presencia de la  $\delta$  lactona  $\alpha,\beta$ -insaturada en la pectinólida C {26} se localizan de la manera siguiente: un doblete en 6.08 ppm para H-3, un doblete de dobletes en 7.01 ppm para H-4 y el doblete de dobletes centrado en 9.12 para H-5. De manera adicional, los espectros de RMN- $^1\text{H}$  de las pectinólidas B {25} y C {26} presentaron una sola señal para un grupo acetoxilo (Figura 5 y 6). Estas evidencias permiten concluir de manera contundente que las pectinólidas B {25} y C {26} son formas diastereoisoméricas que corresponden a los dos productos de monodesacetilación de la pectinólida A {24}.

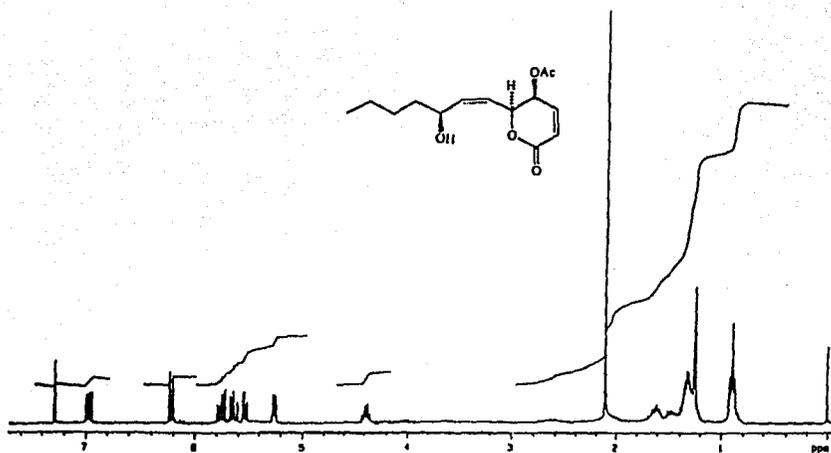


Figura 5.- Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de la pectinólida B {25} (CDCl<sub>3</sub>, 300MHz, TMS).

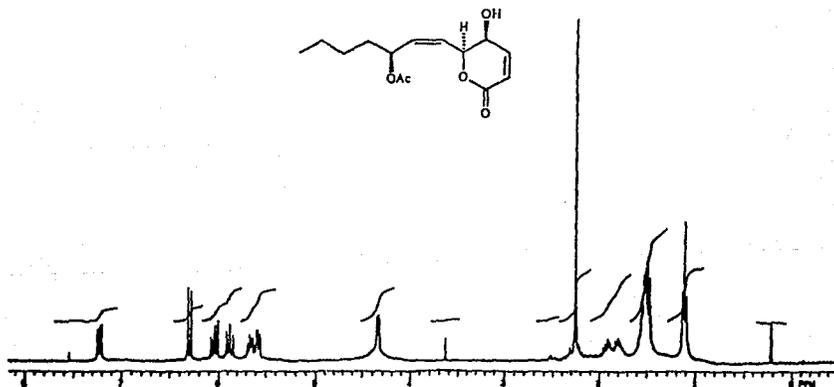


Figura 6.- Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de la pectinólida C {26} (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz, TMS).

La espectrometría de masas a diferencia de la RMN se utilizó principalmente como una técnica suplementaria para la determinación de la estructura química de las pectinólidas A-C {24-26}.

Los principales fragmentos que caracterizan a las 5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas sustituidas en la posición C-6 se producen mediante la ruptura  $\alpha$  inducida por el oxígeno heterocíclico, la cual provoca la eliminación de la cadena lateral. Los iones de  $m/z$  155 para las pectinólidas A {24} (Figura 7) y B {25} (Figura 8) y el de  $m/z$  113 para la pectinólida C {26} (Figura 9) se generaron mediante esta ruta. La diferencia de 42 unidades de masa ( $-C_2H_2=0$ ) corroboraba la sustitución por un grupo acetoxilo en la posición C-5 de la pectinólida B {25}, y por lo tanto, el grupo acetato en la pectinólida C {26} se localizaba en la cadena lateral. La ausencia del fragmento de  $m/z$  126 en la pectinólida C {26} constituye un argumento adicional para la localización del grupo acetoxilo en la posición C-3' de la cadena lateral.

La fragmentación multicéntrica que involucran la eliminación de la molécula de cetena ( $-CH_2=C=O$ ) provoca la generación del mismo producto de desacetilación en las tres pectinólidas y por lo tanto la similitud observada en los espectros.

#### 5.4 RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR DE LA PECTINOLIDA B {25}.

Los espectros de RMN- $^{13}C$  y  $^1H$  permitieron identificar el residuo de 3-hidroxi-1-heptenilo que sustituye la posición C-6 del núcleo de  $\alpha$ -pirona en la pectinólida B (Figura 10).

El empleo de la RMN- $^1H$  y  $^{13}C$  asistidos por las correlaciones bidimensionales permitió localizar al grupo hidroxilo en la posición C-3' de la cadena lateral en la pectinólida B {25}, ya que la señal para el protón H-3' presentó un desplazamiento diamagnético, al compararse con la señal correspondiente de la pectinólida A {24}.

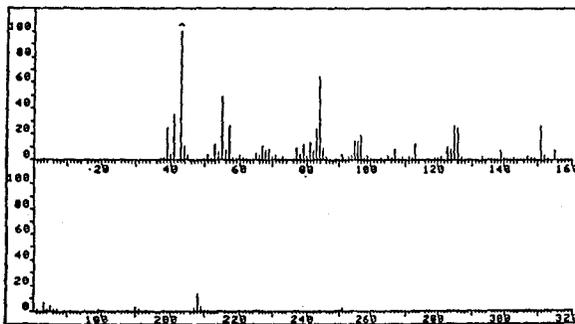
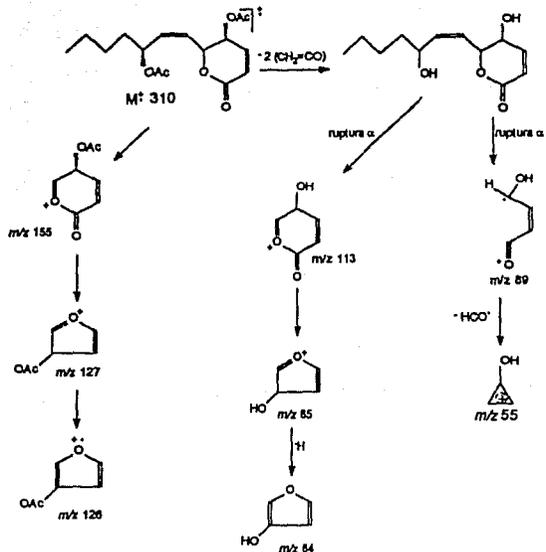


Figura 7.- Espectro de masas de la pectinólida A (24).

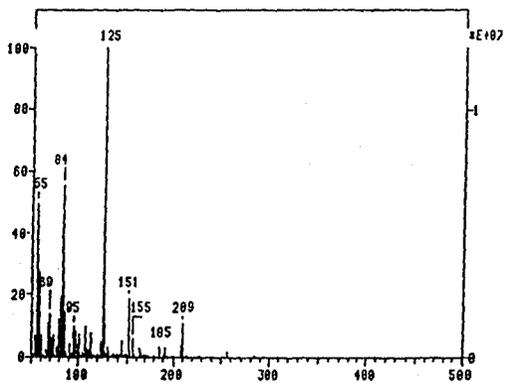
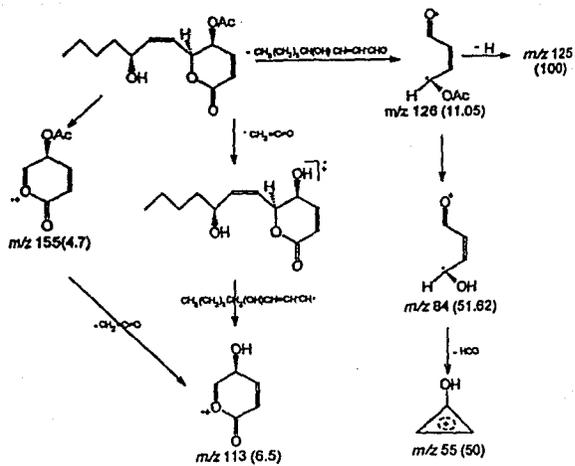


Figura 8.- Espectro de masas de la pectinólida B (25).

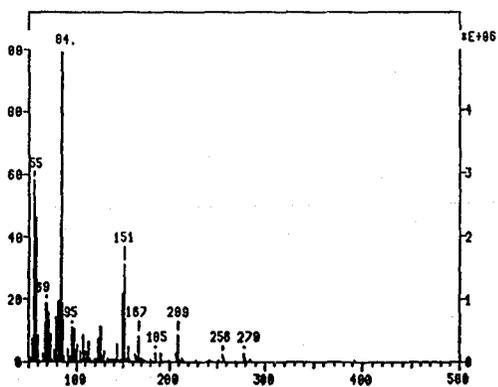
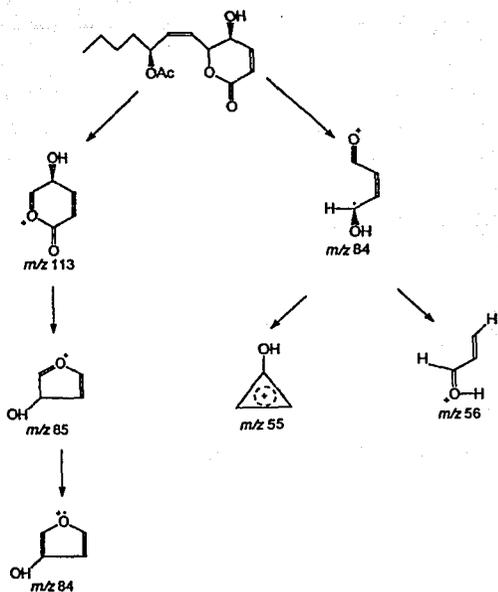


Figura 9.- Espectro de masas de la pectinólida C (26).

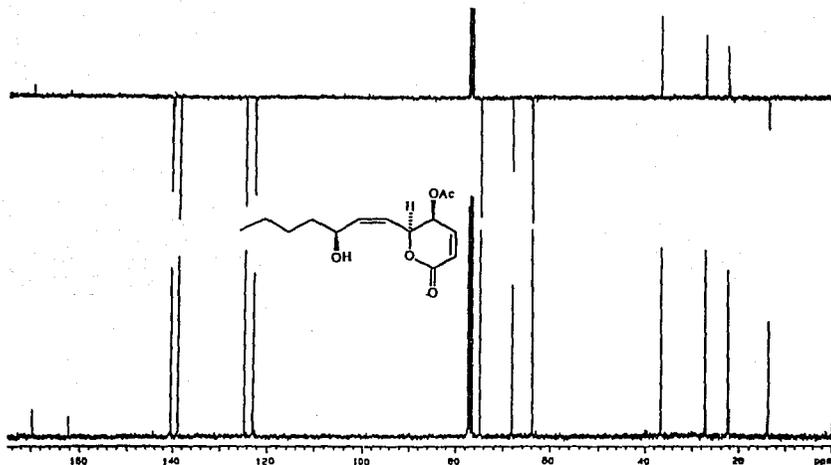


Figura 10.- Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  de la pectinólida B {25} ( $\text{CDCl}_3$ , 75.4 MHz, TMS).

Al mismo tiempo, se observó un efecto diamagnético para el desplazamiento químico del núcleo C-3' ( $\Delta\delta = -1.1$ ). La asignación para esta señal también se basó en los cuadros de conectividad que establece el protón H-3' con el metileno de la cadena lateral H-4' ( $\delta$  1.60) con la señal vinílica H-2' ( $\delta$  5.76) (Figura 11). Por lo tanto, la estructura de la pectinólida B corresponde a la 6-[3-hidroxi-1-heptenil]-5-acetiloxi-5,6-dihidro-piran-2-ona.

### 5.5 RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR DE LA PECTINOLIDA C {26}.

Las asignaciones realizadas en la RMN- $^{13}\text{C}$  para la cadena lateral de la pectinólida C {26} identificaron la presencia de la olefina disustituida, en C-1 ( $\delta$  126.29) y C-2' ( $\delta$  133.25), y un protón geminal a un grupo acetoxilo con un desplazamiento en  $\delta$  5.44 (H-3'). La figura 12 muestra las asignaciones de los núcleos de  $^{13}\text{C}$  que satisfacen los requisitos para la fórmula molecular  $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{O}_5$ .

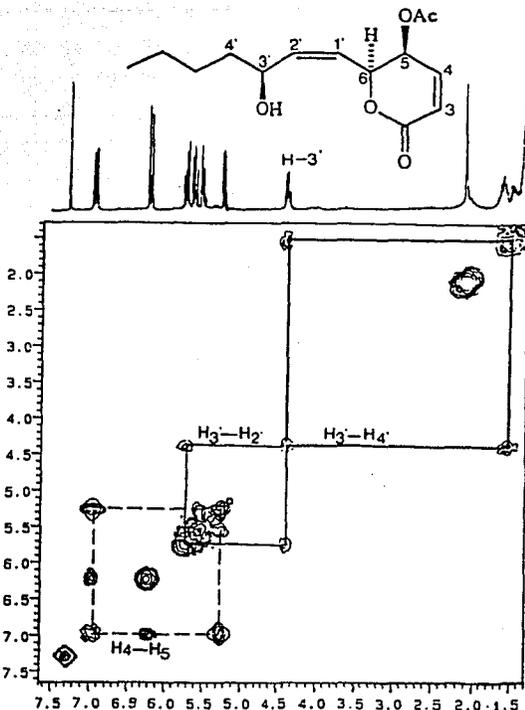
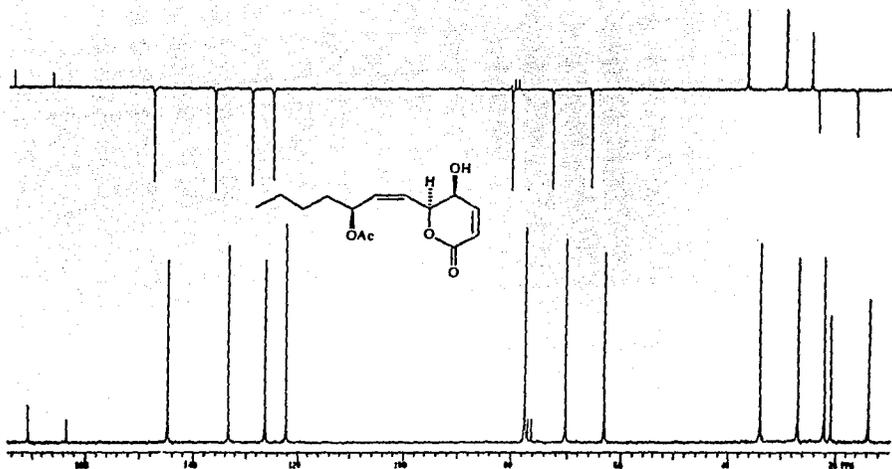


Figura 11.- Espectro de RMN-<sup>1</sup>H 2D-COSY de la pectinólida B (25).

El empleo de la RMN-<sup>1</sup>H bidimensional de nueva cuenta permitió verificar la localización del grupo hidroxilo en el esqueleto de la pectinólida C (26) en la posición C-5 del núcleo de  $\alpha$ -pirona. En esta ocasión, el protón que presentaba el desplazamiento diamagnético H-5 ( $\delta$  4.12) correlacionó con el protón vinílico H-4 del doble enlace conjugado al grupo carbonilo de la pirona. La Figura 13 muestra los cuadros de conectividad que se observaron en la RMN bidimensional protónica (2D-COSY) entre los protones H-5 ( $\delta$  4.12) y H-4 ( $\delta$  7.01). También se ilustra el cuadro de conectividad que



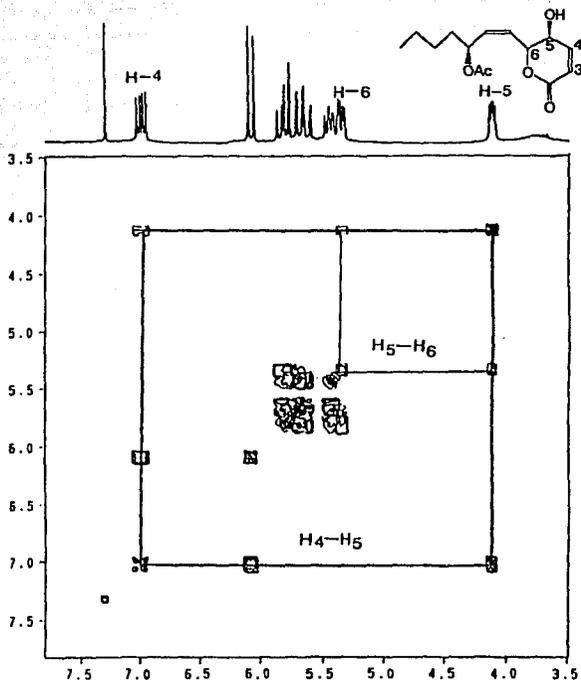
**Figura 12.-** Espectros de RMN- $^{13}\text{C}$  de la pectinólida C {26} ( $\text{CDCl}_3$ , 75.4 MHz, TMS).

estableció la señal para H-5 con la señal asignada al protón H-6, el protón geminal al oxígeno etéreo de la lactona.

De manera adicional, el empleo de la RMN bidimensional heteronuclear (HETCOR) permitió establecer, de manera inequívoca, las asignaciones para cada uno de los núcleos de carbono de la pectinólida C {26} (fig. 14). Por lo tanto, este conjunto de evidencias espectroscópicas permitieron formular la estructura de la pectinólida C {26} como la 6-[3-acetiloxi-1-heptenil]-5-hidroxi-5,6-dihidro-piran-2-ona.

### 5.6 ESTEREOQUIMICA DE LAS PECTINOLIDAS B {25} Y C{26}.

La configuración pseudoecuatorial para la cadena lateral y la orientación axial para el grupo sustituyente en el núcleo C-5 de la 5,6-dihidro- $\alpha$ -pirona se estableció mediante el valor de la constante de acoplamiento ( $J = 3\text{Hz}$ ) entre H-5 y H-6. Por lo tanto, este



**Figura 13.-** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H bidimensional (2D-COSY) de la pectinólida C {26}.

acoplamiento indicó una orientación axial para el protón H-6 y una disposición ecuatorial para el protón H-5 de las dos pectinólidas B {25} y C {26}.

La figura 15 ilustra la expansión de los espectros de RMN-<sup>1</sup>H de la región vinílica de las pectinólidas B y C en la cual se indican las asignaciones para las multiplicidades de los protones H-5 y H-6 del núcleo de 5,6-dihidro- $\alpha$ -pirona y los protones H-1', H-3' y H-2' de la cadena lateral.

De manera análoga a la descripción hecha para la estereoquímica de la pectinólida A, <sup>18</sup> {24} la orientación pseudoecuatorial de la cadena lateral de las pectinólidas B y C

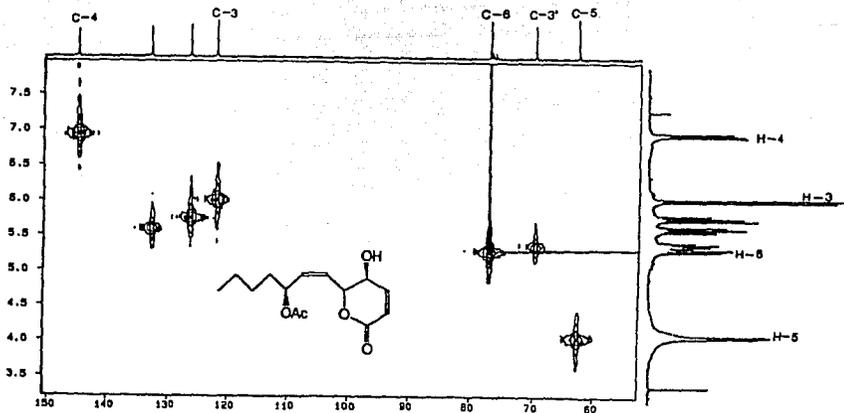


Figura 14.- Espectro de RMN bidimensional hetero nuclear (HETCOR) de la pectinólida C (26).

B y C limitó las posibilidades conformacionales de estas  $\delta$ -lactonas y así se establecieron cualquiera de las dos conformaciones enantioméricas (I ó II) ilustradas para el anillo de la 5,6-dihidro- $\alpha$ -pirona en la Figura 16.

El empleo de la regla de Sznatzke<sup>48</sup> estableció la estereoquímica absoluta (S) para el centro quiral C-6 de las pectinólidas B (25) y C (26). Esta asignación se fundamentó en la correlación entre el efecto Cotton positivo para la curva obtenida en el dicroísmo circular para cada una de las pectinólidas y la transición  $n \rightarrow \pi^*$  del carbonilo (260-270 nm) de la  $\delta$ -lactona (Figura 17), cuya conformación correspondería al enantiómero II de la figura 16.

Por lo tanto las pectinólidas B (25) y C (26) comparten la misma estereoquímica absoluta establecida para los centros quirales C-6 y C-5 de la pectinólida A (24). Por otra parte, la similitud observada en las curvas de dicroísmo circular generados por las pectinólidas A-C (24-26) indicó en primera instancia la misma estereoquímica absoluta para el centro quiral C-3'. Con el objeto de corroborar esta afirmación se procedió a

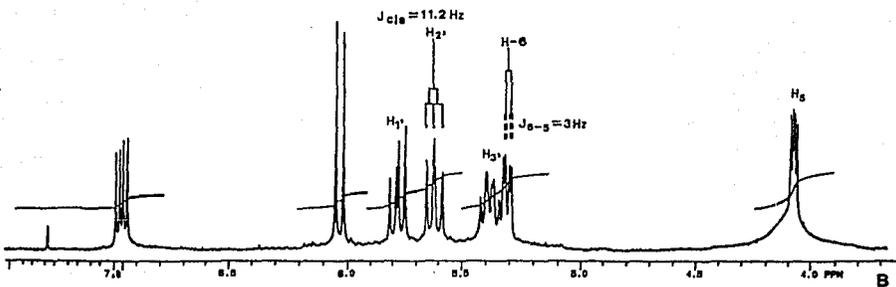
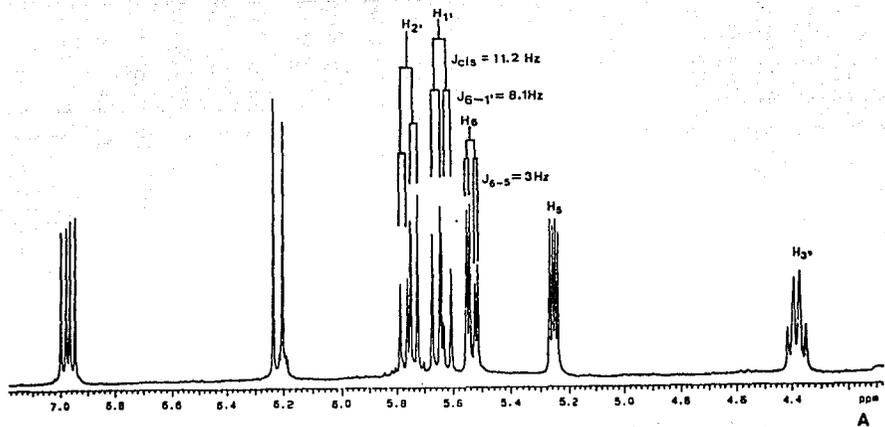
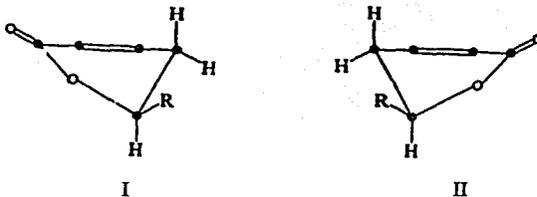


Figura 15.- Expansión de la región vinílica de los espectros de RMN-<sup>1</sup>H de las pectinólicas B {25} (A) y pectinólicas C {26} (B).



**Figura 16.-** Conformaciones enantioméricas (I y II) ilustradas para el anillo de la 5,6-dihidro- $\alpha$ -pirona

realizar correlaciones químicas que permitieran establecer sin lugar a dudas la estereoquímica absoluta para el centro quiral de la cadena lateral (Figura 18).

## 5.7 CORRELACIONES QUÍMICAS ENTRE LAS PECTINÓLIDAS A-C {24-26}.

Las correlaciones químicas entre las pectinólidas A-C se realizaron mediante el empleo de dos clases de procedimientos metodológicos. En primer lugar se utilizaron dos métodos no degradativos, los cuales incluyeron la reacción de acetilación de las pectinólidas B {25} y C {26} y la aplicación del método de Horeau de resolución parcial para la determinación de la configuración absoluta de los alcoholes secundarios.<sup>50</sup> De manera alternativa, se utilizó un método degradativo a través de las reacciones de ozonólisis de las pectinólidas B {25} y C {26}.

### 5.7.1 METODOS NO DEGRADATIVOS

#### 5.7.1.1 REACCION DE ACETILACION.

Durante la reacción de acetilación de las pectinólidas B {25} y C {26} se observó una diferencia significativa en la velocidad de reacción (Figura 19). A los 15 minutos del inicio de la acetilación de la pectinólida C {26}, ésta había reaccionado casi en su

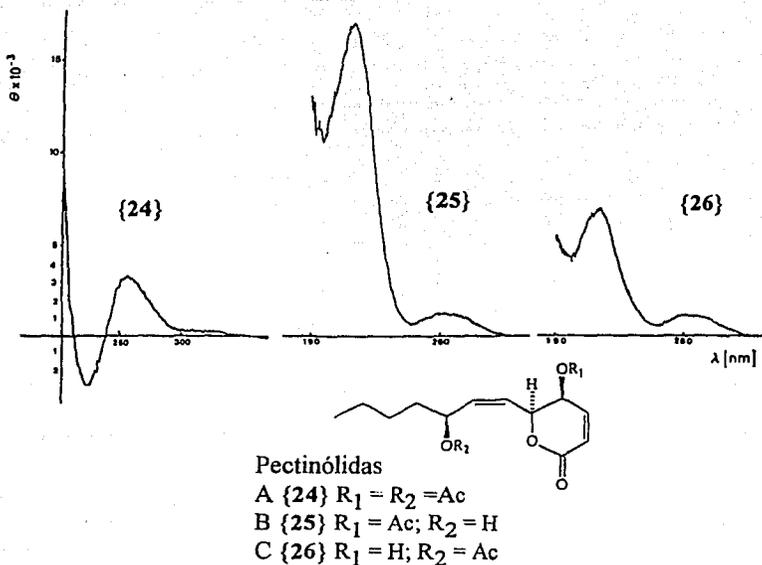


Figura 17.- Curvas de DC de las pectinólidas A-C {24-26} en MeOH

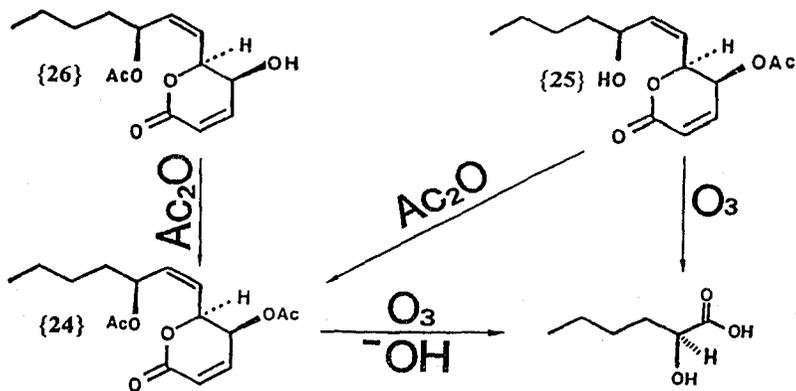
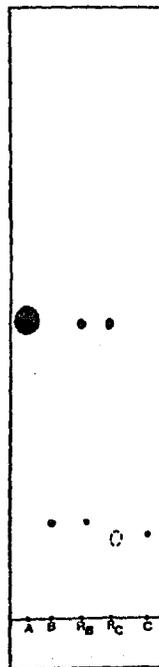
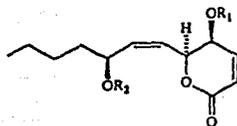


Figura 18.- Correlaciones químicas entre las pectinólidas A-C {24-26}.



A = Estandar pectinólida A {24}

B = Estandar pectinólida B {25}

C = Estandar pectinólida C {26}

$R_B$  = Reacción de acetilación pec-B {25}

$R_C$  = Reacción de acetilación pec-C {26}

○ = Detectado con U V.

● = Visualizado con sulfato cerico.

**Figura 19.-** Cromatografía en capa fina para las reacciones de acetilación (15min) de las pectinólidas B {25} y C {26}. Condiciones cromatográficas: cromatoplaca impregnada con gel de sílice (2 x 20 cm); sistema de elución:  $\text{CHCl}_3\text{-Me}_2\text{CO}$  (9:1).

totalidad. La pectinólida B {25} reaccionó con mayor lentitud y la reacción tomó 45 minutos en llevarse al cabo.

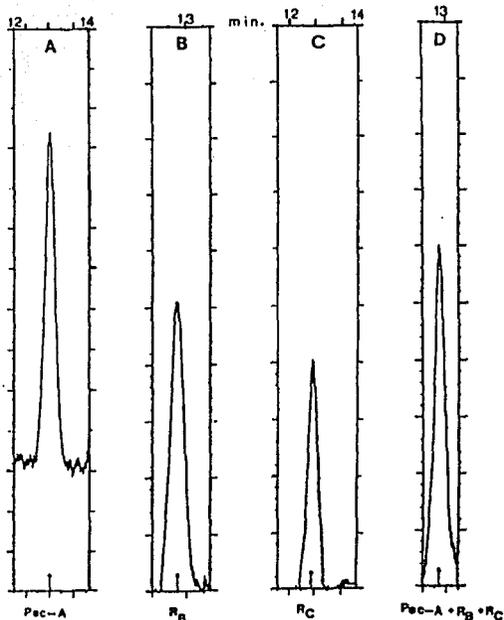
Los productos de las reacciones de acetilación de las pectinólidas B {25} y C {26} se analizaron de manera independiente mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). Estos análisis proporcionaron cromatogramas idénticos para las mezclas de reacción de las pectinólidas B {25} y C {26}, (Figura 20) los cuales estuvieron constituidos por un sólo pico con el mismo tiempo de retención relativo al del estándar utilizado, la pectinólida A {24} (Figura 20).

Con el objeto de verificar que los productos de acetilación de las pectinólidas B {25} y C {26} correspondían a la pectinólida A {24}, se procedió a efectuar la coelución de la pectinólida A {24} con las mezclas de acetilación de las pectinólidas B {25} y C {26}. La Figura 20 muestra el cromatograma obtenido mediante este procedimiento, el cual presentó un sólo pico (Rt 12.73 min). De esta manera, se demostró que la estereoquímica absoluta para el centro quiral C-3' de la cadena lateral era idéntica en los tres constituyentes bioactivos, las pectinólidas A-C {24-26} de *H. pectinata*.

#### 5.7.1.2 METODO DE HOUREAU

De manera adicional, para verificar la configuración absoluta del centro quiral de la cadena lateral en la pectinólida B {25}, se utilizó el método de Horeau de resolución cinética parcial.<sup>50</sup> En este método se hace reaccionar un alcohol secundario cuya estereoquímica absoluta se desea establecer con un exceso del anhídrido racémico del ácido 2-fenilbutanoico y se obtiene como subproducto de esta reacción el ácido 2-fenilbutanoico.

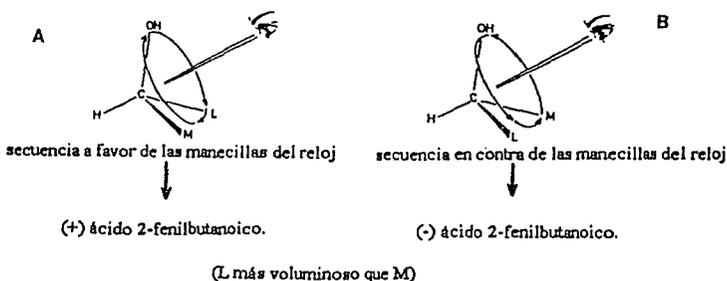
La regla propuesta por Horeau<sup>50</sup> indica que cuando el ácido fenilbutanoico obtenido tiene una rotación óptica dextrógira, los diferentes sustituyentes del centro quiral en el alcohol secundario presentan el arreglo estereoquímico indicado en la figura 21. Por otra parte, la estereoquímica contraria, resultará cuando el ácido obtenido es levógiro (Figura 21).



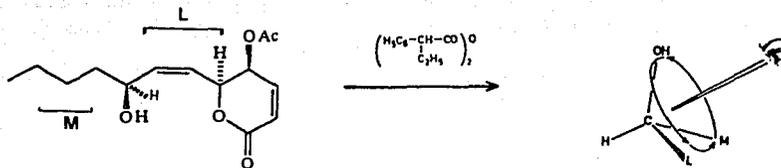
**Figura 20.-** Análisis mediante HPLC de los productos de acetilación de las pectinólidas B {25} y C {26}. A: Cromatograma desarrollado por el estándar de la pectinólida A {24}. B: Cromatograma desarrollado por el producto de acetilación de la pectinólida B {25}. C: Cromatograma desarrollado por el producto de acetilación de la pectinólida C {26}. D: Cromatograma desarrollado por la coelución de los productos de acetilación de las pectinólidas B {25}, C {26} y el estándar de la pectinólida A {24}. Condiciones cromatográficas: Columna ODS fase reversa (25cm, 4.6mm d.i., 5  $\mu$ m); fase móvil, MeOH (15 ml/min).

La rotación óptica del ácido obtenido al aplicar el método de Horeau en la pectinólida B {25} fue levógira por lo tanto este resultado indica el arreglo estereoquímico para el centro quiral C-3' ilustrado en la figura 22. De esta manera, se corroboró la estereoquímica absoluta (S) propuesta para este centro quiral.

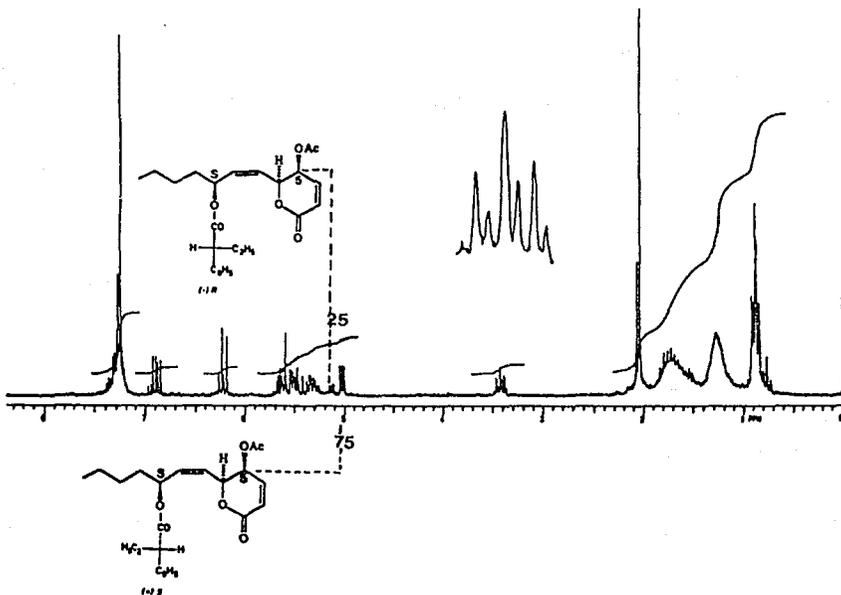
El espectro de RMN-<sup>1</sup>H de la mezcla de ésteres obtenidos para la pectinólida B {25} mediante la acilación de Horeau permitió calcular en esta reacción un exceso enantiomérico del 50 % a través de la comparación de las áreas de integración registradas para la señal del protón H-5 en los dos diastereoisómeros generados, (3'S, 2"S) y (3'S, 2"S) (Figura 23). La acumulación del ácido (-)-2-fenilbutanoico en esta reacción indicó que la pectinólida B {25} reaccionaba preferentemente con el anhídrido del ácido (+)S-2-fenilbutanoico y, por lo tanto, el éster mayoritario producto de la reacción de acilación correspondía al diastereoisómero (3'S, 2"S) (Figura 23).



**Figura 21.-** Ilustración de la regla de Horeau: Si el ácido fenilbutanoico obtenido al aplicar este método tiene una rotación óptica dextrógiro, los diferentes sustituyentes del centro quiral presentarán el arreglo estereoquímico indicado en la figura A. Por otra parte, la estereoquímica contraria resultará cuando la rotación óptica del ácido obtenido sea negativa (levógiro).



**Figura 22.-** Configuración absoluta para el centro quiral C-3' de la pectinólida B {25} de acuerdo a la regla de Cahn, Ingold y Prelog.



**Figura 23.-** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de la mezcla de ésteres obtenidos para la pectinólida B {25} mediante la acilación de Horeau.

## **5.7.2 METODO DEGRADATIVO.**

### **5.7.2.1 OZONOLISIS DE LA PECTINOLIDAS B {25} Y C {26}**

Con el objeto de diferenciar entre las dos posibilidades estereoquímicas para el centro quiral C-3' de la cadena lateral de las pectinólidas B y C se realizó la degradación de las dos pectinólidas mediante una reacción de oxidación con ozono.

El producto mayoritario de la reacción de ozonólisis de la pectinólida C {26} correspondió al ácido 2-acetiloxihexanoico derivado de la cadena lateral. La hidrólisis de este residuo proporcionó el ácido 2-hidroxihexanoico ópticamente activo.

Por otra parte, la ozonólisis de la pectinólida B {25} proporcionó el ácido (+) 2-hidroxihexanoico, idéntico al obtenido por la hidrólisis del ácidil hidroxihexanoico derivado de la degradación oxidativa de la pectinólida C {26}. La figura 22 muestra el espectro de dicroísmo circular para este compuesto, el cual permitió confirmar la configuración absoluta (S) para este ácido mediante el efecto Cotton positivo en 209 nm y el efecto Cotton positivo en 245 nm desarrollado por todos los  $\alpha$ -hidroxiácidos de la serie L.<sup>51</sup>

Finalmente, esta secuencia degradativa permitió establecer de manera inequívoca la estereoquímica (S) para el centro quiral C-3' de la cadena lateral en las pectinólidas A-C {24-26}.

## **5.8. EVALUACIONES BIOLOGICAS SECUNDARIAS.**

### **5.8.1 EVALUACION CUANTITATIVA DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA.**

El cuadro 4 incluye los resultados de la evaluación cuantitativa de la actividad antimicrobiana de las pectinólidas A-C {24-26}. La pectinólida A {24} demostró una actividad significativa en contra de *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis* a una

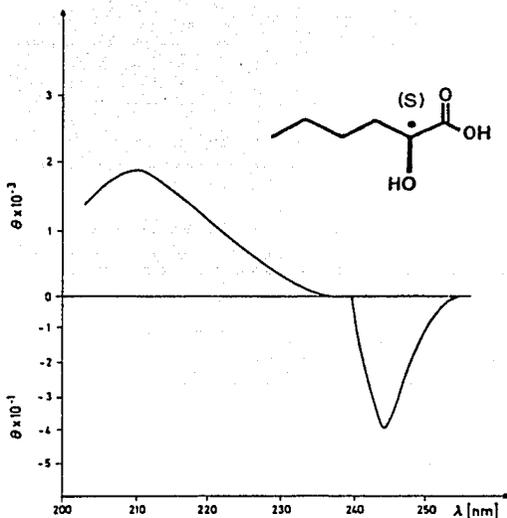


Figura 24.- Curva de dicroísmo circular del ácido (+) 2-hidroxihexanoico.

concentración de 6.25 y 12.5  $\mu\text{g/ml}$ , respectivamente. Sin embargo, las pectinólidas B {25} y C {26} fueron menos activas, desarrollando un MIC de 12.5-25 mg/ml en contra de *B. subtilis* y un valor de 100  $\mu\text{g/ml}$  en contra de *S. aureus* (Cuadro 4). Estos resultados sugieren que la presencia de un grupo acetoxilo en la posición C-5 y posiblemente las propiedades hidrofóbicas conferidas por el residuo de 3-acetiloxi-1-heptenilo en la posición C-6 del núcleo de 5,6-dihidro- $\alpha$ -pirona confieren una mayor actividad antimicrobiana a la pectinólida A {24}.

**Cuadro 4** Evaluación cuantitativa de la actividad antimicrobiana

MUESTRA	CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA ( $\mu\text{g/ml}$ )				
	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
Pectinólida A	6.25	12.5	200	200	250
Pectinólida B	25	100	300	300	300
Pectinólida C	12.5	100	> 500	> 500	> 500
Estreptomicina	1.56	3.12	3.12	12.5	NE
Nistatina	NE	NE	NE	NE	6.25

NE = No Evaluada.

### 5.8.2 EVALUACION SECUNDARIA DEL POTENCIAL CITOTOXICO

El potencial citotóxico de las pectinólidas A-C {24-26} se evaluó en un panel de ocho líneas celulares tumorales humanas. Los resultados de la citotoxicidad se incluyen en el cuadro 5 y se expresan en dosis efectivas medias ( $ED_{50}$   $\mu\text{g/ml}$ ), las cuales representan las concentraciones requeridas para inhibir el 50% del crecimiento celular. El criterio de actividad establecido por el Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos de Norteamérica considera como un valor significativo para la  $ED_{50}$  aquellas concentraciones menores a 20  $\mu\text{g/ml}$  para los extractos y menores a 4  $\mu\text{g/ml}$  para los compuestos puros.<sup>52</sup> Esta evaluación permitió observar que las pectinólidas A-C {24-26} contribuyen de manera similar al potencial citotóxico desarrollado por el extracto total de *Hyptis pectinata* (cuadro 5). Las tres pectinólidas demostraron una actividad citotóxica inespecífica ( $ED_{50} < 4\mu\text{g/ml}$ ) y marginal al compararse con la citotoxicidad observada para la vinblastina y la vincristina. Es evidente que la citotoxicidad desarrollada por las pectinólidas se asocia con la capacidad alquilante del núcleo de  $\delta$ -lactona  $\alpha,\beta$ -insaturada.

**Cuadro 5** Evaluación Secundaria del Potencial Citotóxico.

COMPUESTO	LINEAS CELULARES DE <sub>50</sub> (µg/ml) <sup>a</sup>							
	BC-1	HT-1080	Lu-1	Mel-2	Col-2	A431	LNCaP	ZR75-1
Pectinólida A	1.0	1.7	0.9	0.7	1.0	1.4	0.7	3.6
Pectinólida B	2.5	2.3	3.8	2.2	1.1	0.6	0.9	1.6
Pectinólida C	2.0	1.8	2.3	3.3	1.6	0.8	0.8	1.9
Vinblastina <sup>b</sup>	0.06	0.02	0.02	0.01	0.01	0.05	0.1	0.3
Vincristina <sup>b</sup>	0.01	0.02	0.05	0.02	0.02	0.01	0.1	0.4

<sup>a</sup>Abreviaciones: BC-1, cáncer de pecho humano; HT-1080, fibrosarcoma humano; Lu-1, cáncer pulmonar humano; Mel-2, melanoma humano; Col-2, cáncer de colon; A431, carcinoma epidermoide humano; LNCaP, cáncer de próstata humano; ZR75-1, cáncer de pecho humano.

<sup>b</sup> Agente terapéutico antitumoral.

## 6. CONCLUSIONES

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

El fraccionamiento biodirigido mediante la evaluación del potencial antimicrobiano del extracto clorofórmico de *Hyptis pectinata* (L.) Poit. permitió aislar y caracterizar dos constituyentes adicionales {25 y 26} a la pectinólida A {24}, constituyente mayoritario de la fracción bioactiva. Estos productos naturales se denominaron con los nombres triviales de pectinólida B {25} y pectinólida C {26}, respectivamente.

Los datos espectroscópicos (IR, EM y RMN) y las correlaciones químicas efectuadas permitieron concluir que las pectinólidas B{25} y C{26} corresponden a los derivados monodesacetilados de la pectinólida A {24}, cuya estructura se estableció anteriormente como la 6S-[3'S-acetiloxi-1'Z-heptenil]-5S-acetiloxi-5,6-dihidro-piran-2-ona.

El dicroismo circular demostró que las tres pectinólidas A-C {24-26} poseen la misma estereoquímica absoluta para el centro quiral C-6 del anillo de  $\delta$ -lactona. La orientación  $\beta$ -axial para el sustituyente en el núcleo C-5 de estas 5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas se estableció mediante el valor de la constante de acoplamiento en la RMN- $^1\text{H}$  ( $^3J_{5,6} = 3 \text{ Hz}$ ) entre H-5 y H-6. Por lo tanto la estereoquímica absoluta para el núcleo C-5 se estableció como (S) en las pectinólidas A-C {24-26}. El empleo del método de Horeau en la pectinólida B corroboró la estereoquímica absoluta (S) para el centro quiral C-3' de las pectinólidas B. De manera adicional, la secuencia de degradación oxidativa de las pectinólidas B {25} y C {26} confirmó la configuración absoluta (S) del único centro quiral en la cadena lateral de las pectinólidas B y C. Por lo tanto los métodos espectroscópicos, químicos y quirópticos empleados permitieron establecer la estructura de la pectinólida B {25} como la 6S-[3'S-hidroxi-1'Z-heptenilo]-5S-hidroxi-5,6-

dihidropiran-2-ona, y la estructura de la pectinólida C {26} como la 6S [3'S-acetoxi-1'Z-heptenil]-5S-hidroxi-5,6-dihidropiran-2-ona.

La evaluación de la actividad antimicrobiana de las pectinólidas A-C permitió concluir que su efecto inhibitorio para *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus* se asocia con el núcleo de 5,6-dihidro- $\alpha$ -pirona sustituido en la posición C-5 por un grupo hidroxilo o acetoxilo. Al parecer, las propiedades hidrofóbicas del residuo de 1-acetoxilo-*n*-heptenilo de la pectinólida A confieren una mayor selectividad en contra de las bacterias gram positivas. Por último, resulta evidente que la citotoxicidad de las pectinólidas A-C {24-26} se debe asociar a la presencia del núcleo de  $\delta$ -lactona  $\alpha,\beta$ -insaturada.

## 7. BIBLIOGRAFIA

- 1.- W.C. Evans. *Farmacognosia*. 13a ed., Editorial Interamericana. México, D.F., p. 3 (1992)
- 2.- G.A. Cordell, W. Christopher W. Beecher y J.M. Pezzuto. Can ethnopharmacology contribute to the development of new anticancer drugs? *Journal of Ethnopharmacology* **32**, 117-133, (1991).
- 3.- G.T. Prance. Floristic inventory of the tropics: where do we stand? *Annals of the Missouri Botanical Garden* **64**, 659-684, (1976).
- 4.- N.R. Farnsworth, O. Akerele, A.S. Bingel, D.D. Soejarto y Z. Gur. Medicinal plants in therapy. *Bulletin of the World Health Organization* **63**, 965-981, (1985).
- 5.- J.D. Phillipson and M.J. O'Neill. Antimalarial and amoebicidal natural products. En: "Biologically Active Natural Products;" K. Hostettmann y P.J. Lea (Eds.). Oxford University Press, Gran Bretaña, pp. 49-64, (1987).
- 6.- M. Hamburger y K. Hostettmann. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. *Phytochemistry* **30**, 3869-3874, (1991).
- 7.- A. Rojas, L. Hernández, R. Pereda-Miranda y R. Mata. Screening for antimicrobial activity of crude drug extracts and pure natural products from Mexican medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology* **35**, 275-283, (1992).
- 8.- J. L. McLaughlin, Ch.-J. Chang, y D. L. Smith. Simple bioassays for the detection and isolation of bioactive natural products; In "Plantes Medicinales et Substances d'Origine Naturelle." P Delareau (Ed.). Université D'Angers, Angers, pp. 225-252, (1988).
- 9.- B.N. Meyer, N.R. Ferrigni, J.E. Putnam, L.B. Jacobsen, D.E. Nichols y J.L. McLaughlin. Brine Shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica* **45**, 31-34, (1982).
- 10.- D.C. Ayres y J.D. Loike. "Lignans: Chemical, Biological and Clinical Properties". Cambridge University Press, Cambridge, U.K., pp. 85-137, (1990).
- 11.- P.H. Wiernik, E.L. Schwartz, J.J. Strauman, J.P. Dutcher, R.B. Lipton, y E. Paasietta. Phase I clinical and pharmacokinetic study of taxol-1. *Cancer Research* **47**, 2486-2493, (1987).
- 12.- Y.H. Li, S.F. Guo, F.Y. Zhou, S.Z. Xu, y H.L. Zhang. Combined harringtonine or homoharringtonine chemotherapy for acute nonlymphocytic leukemia in 25 children. *Chung-Hua I Hsuen Tsa Chin (English ed.)* **96**, 303-305, (1983).

- 13.- B. Hsu, y J.L. Yang. Hydroxycamptothecin as an antitumor agent. En: H.M. Chang, *Advances in Chinese Medicinal Materials Research*. World Scientific Press, Philadelphia. pp 377-389, (1984).
- 14.- V.R. Altschul. "Drugs and food from little-known plants". Ed. Harvard University Press, U.S.A., p.263, (1973)
- 15.- J.T. Roig. "Plantas Medicinales Aromáticas o venenosas de Cuba". Ed. Inst. del Libro, La Habana, Cuba, p. 596, (1974).
- 16.- H. Wagner. Pharmaceutical and economic use of the Labiatae and Rutaceae families. *Revista Latinoamericana de Química* 8, 16-25, (1977).
- 17.- M. Gascón Figueroa. "Estudio Fitoquímico de *Hyptis mutabilis* (Labiatae)". Tesis de Licenciatura. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, I.P.N. (1989).
- 18.- L. Hernández de Jesús; "Estructura y estereoquímica de la pectinólida, una nueva 5,6-dihidro- $\alpha$ -pirona con propiedades antimicrobianas de *Hyptis pectinata* (L.) Poit". Tesis de Maestría, Facultad de Química, U.N.A.M. (1991).
- 19.- M. Martínez. Las Plantas Medicinales de México. 6a. ed., Ed. Botas, México, p. 508, (1990).
- 20.- K. Malan, Y. Pelissier, Ch. Marion, A. Blaise y J.M. Bassiere. The essential oil of *Hyptis pectinata*. *Planta Medica* 54,531-532, (1988).
- 21.- M.T. Davies-Coleman y D.E.A. Rivett. Naturally Occurring 6-substituted 5,6-dihidro- $\alpha$ -pyrones. *Progress in The Chemistry of Organic Natural Products* 55. Springer-Verlag, New York, pp. 1-35, (1988).
- 22.- S. Achmed, T. Hoye, A. Kjaer, L. Makmur y R. Norrestam. Molecular and crystal structure of hyptolide, a naturally occurring  $\alpha,\beta$ -unsaturated  $\delta$ -lactone. *Acta Chemica Scandinavica* B 41, 599-609, (1987).
- 23.- A. Alemany, C. Marquez, C. Pascual, S. Valverde, M. Martínez-Ripoll, J. Fayos y A. Perales. New compounds from *Hyptis*. X-Ray cristal and molecular structure of anamarine. *Tetrahedron Letters* 37, 3583-3586, (1979).
- 24.- A. Alemany, C. Marquez, C. Pascual, S. Valverde, A. Perales, J. Fayos y M. Martínez-Ripoll. New compounds from *Hyptis*. X-Ray crystal and molecular structures of olguine. *Tetrahedron Letters* 37, 3579-3582, (1979).

25. G. Delgado, R. Pereda-Miranda y A. Romo de Vivar. Structure and stereochemistry of 4-Deacetoxi-10-Epi-Olguina, a new  $\delta$ -lactona from *Hyptis oblongifolia* Bentham (Labiatae). *Heterocycles* **23**, 1869-1872, (1985).
- 26.- R. Pereda-Miranda, M. Gacia, y G. Delgado. Structure and Stereochemistry of four  $\alpha$ -pyrones from *Hyptis oblongifolia*. *Phytochemistry* **29**, 2971-2974, (1990).
- 27.- A. T. Gunvort, C. Hazell, B. Kurt, y G. Torszell. A lignan, an  $\alpha$ -pyrone and other constituents from *Hyptis capitata*. *Phytochemistry* **30**, 2753-2756, (1991).
- 28.- A. Romo de Vivar, P. Vidales y A.L. Pérez. An aliphatic  $\delta$ -lactone from *Hyptis urticoides*. *Phytochemistry* **30**, 2417-2418, (1991).
- 29.- V. F. German. Isolation and characterization of cytotoxic principles from *Hyptis verticillata* Jacq. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **60**, 649-650, (1971).
- 30.- G.I. Kingston, D.M.M. Rao y W.V. Zucker. Plant anticancer agents IX: constituents of *Hyptis tomentosa*. *Journal of Natural Products* **42**, 496-499, (1979).
- 31.- P.W. Le Quesne, Menachary, D. Mary y R.F. Raffauf. Antitumor plants. Part IX. Structural reassignments for three flavonoids from *Lychnophora affinis* Gardn. *Journal of Natural Products* **42**, 322-333, (1979).
- 32.- R. Pereda-Miranda y G. Delgado. Triterpenoids and flavonoids from *Hyptis albida*. *Journal of Natural Products* **53**, 182-185, (1990).
- 33.- M. Novelo, J.G. Cruz, L. Hernández y R. Pereda-Miranda. Cytotoxic constituents from *Hyptis verticillata*. *Journal of Natural Products*, en prensa (1993).
- 34.- R. Pereda-Miranda, L. Hernandez y R. López. Antimicrobial abietane-type diterpene from *Salvia albocaerulea*. *Planta Medica* **58**, 223-224, (1992).
- 35.- K.-H. Lee, Y.-M. Lin, T.-S. Wu, D.-C. Zhang, T. Yamagishi, T. Hayashi, I. Hall, J.-J. Chang, R.-Y. Wu, and T.-H. Yang. The cytotoxic principles of *Prunella vulgaris*, *Psychotria serpens* and *Hyptis capitata*: Ursolic acid and related derivatives. *Planta Medica* **54**, 308-311, (1988).
- 36.- K. Sheth, S. Jolad, R. Wuedhoff, y J.R. Cole. Tumor-inhibitory agent from *Hyptis emoryi* (Labiatae). *Journal of Pharmaceutical Sciences* **61**, 1819, (1972).
- 37.- D.G.I Kingston y R.C. Mujal. Plant anticancer agents. VIII. constituents of *Inga pictata*. *Lloydia* **41**, 499-500, (1978).

- 38.- T.N. Misra, R.S. Singh, T.N. Ojha y J. Opadhayay. Chemical constituents of *Hyptis suaveolens*, part I. Spectral and biological studies on a triterpene acid. *Journal of Natural Products* **44**, 735-738, (1981).
- 39.- C.M. De Araujo, M.S.B. Cavalcanti, J.F. De Mello y I.L. D'Albuquerque. Antimicrobial substances of higher plants. Communication XLV. Primary observations on two new quinonoids isolated from *Hyptis fruticosa* Salzm ex Benth (Labiatae). *Rev. Inst. Antibiot.* **14**, 101-104, (1974).
- 40.- J. Upadhayay, R.S. Singh, y T.N. Misra. Chemical constituents of *Hyptis suaveolens*. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences* **44**, 19-20, (1982).
- 41.- R. Pereda-Miranda y M. Gascón-Figueroa Chemistry of *Hyptis mutabilis*: New pentacyclic triterpenoids. *Journal of Natural Products* **51**, 996-998, (1988).
- 42.- A. Numata, P. Yang, Ch. Takahashi, R. Fujiki, M. NaBae, y E. Fujita. Cytotoxic triterpenes from a Chinese medicine, Gureishi. *Chemical Pharmaceutical Bulletin* **37**, 648-651, (1989).
- 43.- C.D. Hufford, M.J. Funderburk, J.M. Morgan y L.W. Robertson. Two antimicrobial alkaloids from heartwood of *Liriodendron tulipifera* L. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **64**, 789-792, (1975).
- 44.- A.C. Clark, F.S. El-Ferally y W-S. Li. Antimicrobial activity of phenolic constituents of *Magnolia grandiflora* L. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **70**, 951-952, (1981).
- 45.- J.E. Anderson, C.M. Goetz, J.L. McLaughlin y M Suffness. A blind comparison of simple bench-top bioassays and human tumour cell cytotoxicities as antitumor prescreens. *Phytochemical Analysis* **2**, 107-111, (1991).
- 46.- H.R. Lierberman. Estimating EC<sub>50</sub> using the probit technique: A basic computer program. *Drug and Chemical Toxicology* **6**, 111-116, (1973).
- 47.- K. Likhitwitayawuid, C.K. Angerhofer, G.A. Cordell, J.M. Pezzuto, y N. Ruangrunsi. Cytotoxic and antimalarial bisbenzylisoquinoline alkaloids from *Stephania erecta*. *Journal of Natural Products* **56**, 30-38, (1993).
- 48.- A.F. Beecham. The CD of  $\alpha,\beta$ -unsaturated lactones. *Tetrahedron* **28**, 5543-5554, (1972).
- 49.- D. Lavie, I. Kirson, E. Glotter. y G. Snatzke. Conformational studies on certain 6-membered ring lactones. *Tetrahedron* **26**, 2221-2228, (1970).

50.- A. Horeau. Determination of configuration of secondary alcohols by partial resolution. En "Stereochemistry." H.B. Kagan (Ed.). Georg Thieme Publishers. Stuttgart, Vol. 3, pp. 51-94, (1977).

51.- M. Legrand y M.J. Rougier. Application of the optical activity to stereochemical determinations. En "Stereochemistry." H.B. Kagan (Ed.). Georg Thieme Publishers. Stuttgart, Vol. 2, pp. 130-135, (1977).

52.- M. Suffnes y J.M. Pezzuto, Assays related to cancer drug discovery. En "Methods in Plant Biochemistry". K. Hostettmann (Ed.). Vol. 6, pp. 71-133, (1991).