

00570



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

2
20

FACULTAD DE QUIMICA

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION ESTRUCTURAL DE
LOS PRINCIPIOS ACTIVOS CON POTENCIAL
ANTINEOPLASICO DE *Hyptis Verticillata* Jacq., (Lamiaceae)

T E S I S

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

P R E S E N T A :

ALMA MIRIAM NOVELO TORRES



MEXICO, D. F.

1994

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.


JURADO ASIGNADO

Presidente	Dra. Carmen Rivera.
Primer Vocal	Dr. José Calderón.
Secretario	Dra Rachel Mata.
Primer Suplente	Dr. Eugene Bratoeff.
Segundo Suplente	M. en C. Isabel Aguilar.

Sitio donde se desarrollo el tema:

Departamento de Farmacia. División de Bioquímica y Farmacia,
Facultad de Química, UNAM.

ASESOR:



Dr. Rogelio Pereda Miranda.

SUSTENTANTE:



Q.F.B. Alma Miriam Novelo Torres.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradezco a las instituciones que otorgaron el apoyo financiero para la realización del presente trabajo de investigación:

A la Coordinación General de Estudios de Posgrado (UNAM) a través de su "Programa de Apoyo a las Divisiones de Estudios de Posgrado" (Proyectos PADEP No. FQ-9127 y FQ-9204).

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, mediante el "Programa de Fortalecimiento del Posgrado Nacional" (Convenio No. PFPN/112/92).

De manera especial, a la Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM (Proyecto IN202493).

Mis agradecimientos también van dirigidos:

A la M. en C. María de Lourdez Hernández de Jesús, profesora de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas (IPN), por su amistad y colaboración en la realización de los análisis antimicrobianos.

Al personal técnico del Departamento de Química Analítica de la Facultad de Química (UNAM), por el registro de los espectros de U.V., I.R. y Masas, en especial a la Q.F.B. Graciela Chávez y a la Q. Marisela Gutiérrez.

Al Instituto de Química (UNAM) por las facilidades proporcionadas para el registro de los espectros de resonancia magnética nuclear y, especialmente, a los M.en C. Isabel Chávez y Atilano Gutiérrez por su diligente asistencia técnica.

Al Dr. John M. Pezzuto, Director del Centro de Evaluaciones Biológicas, "College of Pharmacy" (University of Illinois at Chicago, EE.UU.), por las facilidades otorgadas para la realización de las evaluaciones de citotoxicidad.

A todos los miembros del jurado por sus valiosas observaciones y comentarios. De manera particular, a la Dra. Rachel Mata por sus pertinentes aclaraciones.

A Moustapha, José, Emma, Aurora, Ernesto y Alberto por su invaluable contribución a este trabajo.

Finalmente, mi mayor agradecimiento y admiración son para el Dr. Rogelio Pereda Miranda por la realización de los análisis citotóxicos; su acertada dirección, aportación de ideas, consejos, amistad y apoyo personal, durante el desarrollo y conclusión del presente trabajo de investigación.

A MI MADRE Y HERMANOS

Por su cariño y apoyo desde siempre.

**A mi amigo, confidente y compañero, Alberto
in ollinyotl in nemiliztli.**

**Con agradecimiento a mis Maestros,
Compañeros y Amigos.**

Al Consejo Estudiantil Universitario-FQ.

A la Tuna de Química.

RESUMEN

La medicina tradicional de nuestro país atribuye a todas las especies medicinales del género *Hyptis* (Lamiaceae = Labiatae) propiedades carminativas, antihelmínticas y en especial antisépticas. En el presente trabajo de investigación se realizó un fraccionamiento biodirigido, mediante el bioensayo de toxicidad para las larvas del crustáceo *Artemia salina*, del extracto clorofórmico preparado a partir de las partes aéreas de *Hyptis verticillata* Jacq. (hierba martina), especie medicinal sumamente apreciada por las poblaciones rurales de los estados de Oaxaca y Veracruz para el tratamiento de desórdenes gastrointestinales e infecciones de la piel. La estrategia propuesta para el estudio fitoquímico de la hierba martina permitió aislar nueve constituyentes bioactivos relacionados con el lignano podofiltoxina, y cuya presencia en un alto rendimiento justifica las actividades citotóxicas y antimicrobianas observadas para el extracto original.

Esta investigación permitió el aislamiento de un nuevo lignano citotóxico (P-388, $ED_{50} = 4 \mu\text{g/ml}$) con esqueleto de arilnaftaleno, y cuya estructura se caracterizó como la 5-metoxideshidropodofiltoxina (HV-IV-3D₁). Se aislaron ocho lignanos adicionales de estructura conocida mediante el monitoreo de su actividad citotóxica. De éstos, el éter metílico de la deshidro- β -peltantina (HV-IV-3E; P-388, $ED_{50} = 1.8 \mu\text{g/ml}$) representa un nuevo producto natural. Los restantes constituyentes bioactivos se identificaron como la deshidropodofiltoxina (HV-IV-1), la 4'-desmetilpodofiltoxina (HV-IV-2), la β -apopropodofilina (HV-IV-3A), la isodesoxipodofiltoxina (HV-IV-3B), la desoxipropodofiltoxina (HV-IV-3C), la deshidrodesoxipodofiltoxina (HV-IV-3D₂) y la (-)yateína (HV-IV-4A).

La caracterización estructural de estos constituyentes se realizó mediante técnicas de análisis instrumental contemporáneas (IR, UV, EM y RMN). Se evaluó el potencial citotóxico de cada uno de estos lignanos en un conjunto de líneas celulares tumorales que

incluyeron leucemia de mridos (P-388) y diversas células cancerígenas humanas (pecho, colon, fibrosarcoma, pulmón, próstata y carcinoma nasofaríngeo).

Otras actividades evaluadas fueron el potencial antimitótico y el potencial antimicrobiano. La evaluación de la actividad antimicrobiana detectó un poderoso efecto antimicótico para los lignanos 4'-desmetilpodofilotoxina, (-)-yateína y β -apopicropodofilina en contra de *Candida albicans*. Finalmente, el lignano 4'-desmetilpodofilotoxina demostró una potente actividad antimitótica (0.0064 μ g/ml), misma que se evaluó mediante la utilización del ensayo del astrocitoma (ASK).

ABSTRACT

A new cytotoxic (P-388, $ED_{50} = 4 \mu\text{g/ml}$) aryl-naphthalene lignan has been isolated from the Mexican medicinal plant *Hyptis verticillata* Jacq. (Lamiaceae) and characterized as 5-methoxydehydropodophyllotoxin {HV-IV-3D₁}. Eight additional lignans were also obtained by bioactivity-directed fractionation using brine shrimp lethality test. Of these, the dehydro- β -peltatin methyl ether {HV-IV-3E} (P-388, $ED_{50} = 1.8 \mu\text{g/ml}$) has been isolated from a natural source for the first time. The other bioactive compounds were identified as dehydropodophyllotoxin {HV-IV-I}, 4'-demethyldeoxypodophyllotoxin {HV-IV-II}, β -apopicropodophyllin {HV-IV-3A}, isodeoxypodophyllotoxin {HV-IV-3B}, deoxypicropodophyllin {HV-IV-3C}, deoxidehydropodophyllotoxin {HV-IV-3D₂} and (-) yatein {HV-IV-4A}. Each of these compounds were evaluated against a panel of cell lines comprising a number of human cancer cell types {breast, colon, fibrosarcome, lung, melanoma, prostate, KB and KB-IV (a multidrug resistant cell line derived from KB)} and murine lymphocytic leukemia (P-388). Lignans HV-IV-I, HV-IV-D₁, HV-IV-D₂ and HV-IV-3E showed marginal cytotoxic activity against the human cell line tested. In contrast, compounds HV-IV-II, HV-IV-3A, HV-IV-3B, HV-IV-3C and HV-IV-4A demonstrated a general nonspecific activity comparable to that of podophyllotoxin ($ED_{50} < 10^{-2} \mu\text{g/ml}$). In addition, their potential antimetabolic activity was determined in the astrocytoma (ASK) assay.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE CUADROS.....	I
LISTA DE FIGURAS.....	II
LISTA DE ESPECTROS.....	III
1.-INTRODUCCIÓN.....	1
2.-OBJETIVOS.....	5
3.-ANTECEDENTES.....	6
3.1.- Actividad Biológica del género <i>Hyptis</i>	6
3.1.1.- Actividad antibacteriana.....	6
3.1.2.- Actividad carminativa y espasmolítica.....	7
3.1.3.- Actividad citotóxica y antitumoral.....	7
3.2.- Generalidades fitoquímicas y etnobotánicas de la especie <i>Hyptis verticillata</i>	8
3.3.- Definición, biosíntesis y distribución de los lignanos.....	10
3.3.1.- Utilización de los lignanos en la medicina tradicional moderna.....	12
3.3.2.- Propiedades Farmacológicas.....	13
3.3.2.1.- Efectos biológicos sobre plantas e insectos.....	15
3.3.3.- Historia de la Podofilotoxina.....	16
3.3.3.1.- Propiedades biológicas y mecanismo de acción de la podofilotoxina.....	17
3.3.3.2.- Etopósidos y Tenipósidos.....	18
4.-PARTE EXPERIMENTAL.....	21
4.1.- Técnicas Analíticas.....	21
4.1.1.- Procedimientos generales.....	21
4.1.1.1.- Técnicas cromatográficas preparativas y analíticas.....	21
4.1.1.2.- Análisis por Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas (CG-EM).....	22
4.1.1.3.- Identificación de los compuestos puros.....	22
4.2.- Material Vegetal.....	23
4.2.1.- Preparación del extracto orgánico.....	23

	Página
4.3.- Metodología para el Fraccionamiento Biodirigido.....	23
4.3.1.- Fraccionamiento en columna del extracto orgánico.....	23
4.3.2.- Purificación y caracterización de los constituyentes mayoritarios presentes en la fracción activa HV-IV.....	24
4.3.2.1.- Purificación del compuesto HV-IV-I (zona no. 1, Rf = 0.14).....	25
4.3.2.2.- Purificación del compuesto HV-IV-II (zona no. 2, Rf = 0.42).....	26
4.3.2.3.- Purificación de la zona no. 3 (Rf = 0.57).....	26
4.3.2.4.- Fraccionamiento de las aguas madres de la fracción activa HV-IV.....	27
4.3.2.5.- Fraccionamiento de la subfracción HV-IV-F4.....	29
4.3.2.5.1.- Purificación del compuesto HV-IV-4A (Rf = 0.68).....	30
4.3.2.6.- Purificación de la mezcla HV-IV-M3.....	31
4.3.2.6.1.- Purificación y caracterización del compuesto HV-IV-3A.....	37
4.3.2.6.2.- Purificación y caracterización del compuesto HV-IV-3B.....	37
4.3.2.6.3.- Purificación y caracterización del compuesto HV-IV-3C.....	38
4.3.2.6.4.- Purificación y caracterización del compuesto HV-IV-3D ₁	39
4.3.2.6.5.- Purificación y caracterización del compuesto HV-IV-3D ₂	41
4.3.2.6.6.- Purificación y caracterización del compuesto HV-IV-3E.....	44
4.4.- Monitoreo de la Actividad Citotóxica Potencial.....	44
4.4.1.- Evaluación de la toxicidad para las larvas de <i>Artemia salina</i> . (BST).....	44
4.4.1.1.- Material.....	45
4.4.1.2.- Procedimiento.....	45
4.4.2.- Evaluación del potencial citotóxico de los constituyentes aislados de <i>H. verticillata</i>	45

	Página
4.4.3.- Evaluación de la actividad antimicrobiana potencial de los constituyentes aislados de <i>H. verticillata</i>	46
4.4.3.1.- Microorganismos de prueba.....	46
4.4.3.2.- Preparación de los inóculos.....	47
4.4.3.3.- Análisis cualitativo antimicrobiano.....	47
4.4.3.3.1.- Preparación de las muestras de prueba.....	47
4.4.3.3.2.- Preparación de los medios.....	47
4.4.3.3.3.- Procedimientos de ensayo.....	48
4.5.- Preparación de Derivados Metilados.....	48
4.5.1.- Preparación del reactivo.....	48
4.5.2.- Metilación de la muestra.....	49
5.-RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	50
5.1.- Fraccionamiento Biodirigido y Evaluación Preliminar del Potencial Citotóxico.....	50
5.1.1.- Evaluación secundaria de la actividad citotóxica y antimitótica.....	57
5.1.2.- Evaluación del potencial anticándida.....	58
5.2.- Caracterización de los compuestos mayoritarios.....	61
5.2.1.- Arintaftalenos.....	61
5.2.1.1.- Características espectroscópicas generales.....	61
5.2.1.2.- Caracterización del compuesto IV-IV-I (Deshidropodofilotoxina).....	63
5.2.1.3.- Caracterización del compuesto IV-IV-3E (Eter metílico de la deshidro- β -peltantina).....	64
5.2.1.4.- Caracterización del compuesto IV-IV-3D ₁ (5-Metoxideshidropodofilotoxina).....	68
5.2.1.5.- Caracterización del compuesto IV-IV-3D ₂ (Desoxideshidropodofilotoxina).....	71
5.2.2.- Arintetrahidronaftalenos.....	74
5.2.2.1.- Características espectroscópicas generales.....	74
5.2.2.2.- Caracterización del compuesto HV-IV-II (4'-Desmetil-desoxipodofilotoxina).....	75
5.2.2.3.- Caracterización del compuesto HV-IV-3A (β -apopicropodofilina).....	78

	Página
5.2.2.4.- Caracterización del compuesto HV-IV-3B (Isodesoxipodofiloxina).....	80
5.2.2.5.- Caracterización del compuesto HV-IV-3C (Desoxipicropodofilina).....	85
5.2.2.6.- Caracterización del compuesto HV-IV-4A [(-)-yateína].....	87
6.- CONCLUSIONES.....	92
7.- ESPECTROS.....	95
8.- PUBLICACIÓN.....	112
8.- BIBLIOGRAFÍA.....	121

LISTA DE CUADROS

	Página
Cuadro 1.- Características etnobotánicas de la "hierba martina".....	9
Cuadro 1.- Preparación de agentes cromógenos.....	22
Cuadro 2.- Fraccionamiento inicial del extracto clorofórmico de <i>Hyptis verticillata</i>	24
Cuadro 3.- Evaluación de la actividad larvicida de los constituyentes puros HV-IV-I y HV-IV-II, la subfracción HV-IV-M3 y las aguas madres obtenidas de la fracción activa HV-IV.....	27
Cuadro 4.- Fraccionamiento mediante cromatografía en columna de las aguas madres de la fracción activa HV-IV.....	28
Cuadro 5.- Fraccionamiento de la subfracción HV-IV-F4.....	29
Cuadro 6.- Sistemas de eluyentes evaluados para la resolución de la mezcla HV-IV-M3.....	32
Cuadro 7.- Desdoblamientos observados en la banda M ₄ durante el ajuste del sistema de elución.....	35
Cuadro 8.- Rendimiento de cada uno de los lignanos aislados de <i>Hyptis verticillata</i> y evaluación preliminar de su potencial citotóxico.....	56
Cuadro 9.- Evaluación del potencial citotóxico de los lignanos aislados y purificados de <i>Hyptis verticillata</i>	59
Cuadro 10.- Evaluación del potencial antimicótico (ensayo ASK) para los lignanos aislados de <i>Hyptis verticillata</i>	60
Cuadro 11.- Desplazamientos químicos calculados y observados para los núcleos de ¹³ C en el compuesto HV-IV-3D ₁	70
Cuadro 12.- Valores para los desplazamientos químicos (δ) obtenidos en la RMN- ¹ H de los lignanos con núcleo de arilnaftaleno aislados de <i>Hyptis verticillata</i>	72
Cuadro 13.- Valores para los desplazamientos químicos (δ) obtenidos en la RMN- ¹³ C de los lignanos con núcleo de arilnaftaleno aislados de <i>Hyptis verticillata</i>	73
Cuadro 14.- Valores de los desplazamientos obtenidos en la RMN- ¹ H para los protones de los lignanos con núcleo estructural de ariltetrahidronaftaleno y la diarilbutirolactona (ppm).....	90
Cuadro 15.- Valores de los desplazamientos obtenidos en la RMN- ¹³ C para los protones de los lignanos con núcleo estructural de ariltetrahidronaftaleno y la arilbutirolactona (ppm).....	91

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1.- Reproducción del cromatograma del crudo precipitado de la fracción activa HV-IV.....	25
Figura 2.- Reproducción del cromatograma obtenido de la subfracción HV-IV-M3 y de las bandas M ₁₋₄ (placa 10x5 cm, 0.2 mm con gel de sílice).....	33
Figura 3.- Conjuntos isotópicos de la banda M ₄ en el espectro CG-EM.....	34
Figura 4.- Reproducción de los cromatogramas obtenidos de la mezcla HV-IV-M3 y de sus bandas purificadas.....	36
Figura 5.- Espectro de masas obtenido de la banda HV-IV-3D.....	40
Figura 6.- Diagrama de flujo que resume la separación de los compuestos HV-IV-3D ₁ y HV-IV-3D ₂	43
Figura 7.- Fraccionamiento biodirigido del extracto orgánico y purificación de los constituyentes citotóxicos de <i>Hyptis verticillata</i>	52
Figura 8.- Conjuntos isotópicos observados en el espectro de masas de la banda M4 de menor polaridad de la mezcla HV-IV-M3 que permitieron determinar la estructura y fórmula molecular de sus constituyentes mayoritarios presentes.....	54
Figura 9.- Valores de los desplazamientos químicos descritos para los protones aromáticos de las posiciones 4 y 8 del núcleo de naftaleno del éter metílico de la deshidro- β -peltantina.....	64
Figura 10.- Experimentos SINEPT.....	67
Figura 11.- Espectro de correlación bidimensional homonuclear generada por el constituyente HV-IV-II, la 4'-desmetildesoxipodofiloxina.....	76
Figura 12.- Espectro de masas generado por la β -apopicropodofilina aislada de la fracción activa de <i>Hyptis verticillata</i>	78
Figura 13.- Espectroscopía bidimensional homonuclear correspondiente al lignano Isodesoxipodofiloxina aislado de <i>Hyptis verticillata</i>	83
Figura 14.- Constantes de acoplamiento calculadas para la interacción entre los protones H-1, H-2 y H-3 del anillo tetrahidronaftalénico del compuesto HV-IV-3B.....	84
Figura 15.- Espectro de RMN- ¹ H (COSY-B) generado por el constituyente HV-IV-3C.....	86
Figura 16.- Iones tropilio (m/e) generados en el espectro de masas por el constituyente bioactivo HV-IV-4A aislado de <i>Hyptis verticillata</i>	88

Figura 17.- Señales correspondientes a los grupos metílenos bencílicos observados en el espectro de RMN-¹³C generado por la (-)-yateína.....89

LISTA DE ESPECTROS

	Página
Espectro No. 1.- Resonancia Magnética Nuclear ¹ H del compuesto HV-IV-I (Deshidropodofilotoxina).....	95
Espectro No. 2.- Resonancia Magnética Nuclear ¹³ C del compuesto HV-IV-I (Deshidropodofilotoxina).....	96
Espectro No. 3.- Resonancia Magnética Nuclear ¹ H del compuesto HV-IV-II (4 ^L -Desmetildesoxipodofilotoxina).....	97
Espectro No. 4.- Resonancia Magnética Nuclear ¹³ C del compuesto HV-IV-II (4 ^L -Desmetildesoxipodofilotoxina).....	98
Espectro No. 5.- Resonancia Magnética Nuclear ¹ H del compuesto HV-IV-4A ([-]-Yateína).....	99
Espectro No. 6.- Resonancia Magnética Nuclear ¹³ C del compuesto HV-IV-4A ([-]-Yateína).....	100
Espectro No. 7.- Resonancia Magnética Nuclear ¹ H del compuesto HV-IV-3A (β-Apopicropodofilina).....	101
Espectro No. 8.- Resonancia Magnética Nuclear ¹³ C del compuesto HV-IV-3A (β-Apopicropodofilina).....	102
Espectro No. 9.- Resonancia Magnética Nuclear ¹ H del compuesto HV-IV-3B (Isodesoxipodofilotoxina).....	103
Espectro No. 10.- Resonancia Magnética Nuclear ¹³ C del compuesto HV-IV-3B (Isodesoxipodofilotoxina).....	104
Espectro No. 11.- Resonancia Magnética Nuclear ¹ H del compuesto HV-IV-3C (Desoxipicropodofilotoxina).....	105
Espectro No. 12.- Resonancia Magnética Nuclear ¹³ C del compuesto HV-IV-3C (Desoxipicropodofilotoxina).....	106
Espectro No. 13.- Resonancia Magnética Nuclear ¹ H del compuesto HV-IV-3D ₁ (5-Metoxideshidropodofilotoxina).....	107
Espectro No. 14.- Resonancia Magnética Nuclear ¹³ C del compuesto HV-IV-3D ₁ (5-Metoxideshidropodofilotoxina).....	108

Espectro No. 15.- Resonancia Magnética Nuclear ^1H del compuesto HV-IV-3D₂ (Deshidrodesoxipodofiloxina).....	109
Espectro No. 16.- Resonancia Magnética Nuclear ^1H del compuesto HV-IV-3E (Eter metílico de la Deshidro-β-peltantina).....	110
Espectro No. 17.- Resonancia Magnética Nuclear ^{13}C del compuesto HV-IV-3E (Eter metílico de la Deshidro-β-peltantina).....	111

1.-INTRODUCCION.

En su paso sobre la tierra, a través de los tiempos, la humanidad a tenido como una de sus preocupaciones principales el problema de la salud. No obstante que aún hoy en día en que se cuenta con un notorio avance tecnológico y científico, no se ha podido satisfacer la demanda de atención médica poblacional. La medicina tradicional ha sido para ciertos pueblos socialmente marginados la única alternativa para solucionar sus problemas de salud. Sin embargo, algunas de las terapias tradicionales son utilizadas, a veces indiscriminadamente, como remedios caseros o como último recurso para el tratamiento de enfermedades mortales por diversos sectores urbanos, práctica que a la fecha ha tenido un creciente resurgimiento. De tal manera, que este auge por la fitoterapia ha provocado un mayor interés por realizar estudios fitoquímicos y etnobotánicos de las plantas utilizadas en la medicina tradicional popular (Lozoya, 1989).

La utilización de plantas medicinales como fuente de ayuda terapéutica ha existido desde tiempos inmemoriales. Los descendientes de pueblos ancestrales, bajo la memoria histórica de su riqueza cultural, han salvaguardado el conocimiento de las técnicas tradicionales de la medicina utilizada en otros tiempos, y que es aplicada al margen de la medicina oficialista. La medicina tradicional contiene un profundo conocimiento alcanzado por una práctica acumulada y sistematizada de las propiedades curativas de las hierbas y otros productos naturales de origen animal o mineral, de acuerdo a las experiencias de cada cultura (Lozoya, 1989).

El dominio práctico de la herbolaria y otros recursos animales y minerales permitió a los sabios y curanderos obtener la experiencia básica para poder diagnosticar algunas enfermedades y padecimientos comunes, estableciendo terapias y medicaciones para su atención. El efecto terapéutico de los productos medicinales de origen natural se ve reforzado por un contexto simbólico y emotivo, con un sentido propio en cada nación indígena. La medicina tradicional es una terapia múltiple que reconoce el carácter

psicosomático de muchas dolencias y atiende el mal del cuerpo tanto como del alma (Fragoso, 1993).

Dentro de la medicina tradicional es imposible establecer límites estrictos con otras áreas del pensamiento y la vida social, pues la conducta condiciona la salud. El individuo sano tiene un equilibrio psico-fisio-social. El conocimiento de las propiedades curativas de las plantas, los animales y los minerales forma parte de la concepción total de la naturaleza y de la visión cosmogónica del hombre y su relación con el universo.

El uso empírico de las preparaciones vegetales y los primeros aislamientos de principios activos como los alcaloides morfina, estroquina, y quinina alrededor del siglo XIX, marcaron una nueva era en el uso de las plantas medicinales. Los metabolitos vegetales se investigaron principalmente desde el punto de vista fitoquímico y taxonómico. A partir de 1945 el interés por realizar síntesis farmacéuticas tuvo un tremendo desarrollo, utilizando como punto de referencia metabolitos vegetales con actividad farmacológica. Durante la última década, sin embargo, la investigación de fármacos de origen natural ha tenido un crecimiento notable debido al incremento en el consumo de plantas medicinales. El empleo de plantas se incrementó casi al doble por algunas comunidades europeas y latinoamericanas durante ese periodo (Hamburger y Hostettmann, 1991).

En el área de la investigación fitoquímica actual, el conocimiento etnobotánico y medicinal de las especies vegetales utilizadas en la medicina tradicional es una base importante para proponer la realización de un estudio químico (Der Marderosian, 1991). Las plantas medicinales se utilizan básicamente en dos formas diferentes (Hamburger y Hostettmann, 1991): a] como una mezcla compleja (infusiones, aceites esenciales, tinturas, extractos) que contiene un amplio rango de constituyentes y b] como fuente de principios activos químicamente identificables. Los compuestos puros son generalmente empleados cuando se trata de principios activos de la planta medicinal que exhiben una actividad efectiva y específica y/o su índice terapéutico es elevado. Las preparaciones fitoquímicas en forma de cataplasmas, infusiones, tinturas, etc, son muy populares en comunidades con

una fuerte tradición herbolaria, como en China (Tang y Eisenbrand, 1992) y México (Treviño, 1979). No obstante, en algunos países tales como Alemania, Francia y Suiza, se cuenta con disposiciones legales que facilitan el registro de tales preparaciones aún siendo originarias de otras comunidades (Der Marderosian, 1991).

Se estima que de un grupo de 250 000 a 500 000 especies vegetales, únicamente un pequeño porcentaje ha sido investigado fitoquímicamente, por lo que el campo de investigación aún es extenso e inexplorado. De tal porcentaje sólo una fracción ha sido sometida a evaluaciones biológicas o farmacológicas. Por ejemplo, el Instituto Nacional de Cáncer de los EE.UU. en el periodo de 1957 a 1986 ha investigado el potencial citotóxico de aproximadamente 35 000 especies vegetales en sistemas tumorales de múridos *in vitro* e *in vivo* o en la línea tumoral humana KB, y actualmente está en el proceso de adquirir algunas 20 000 especies tropicales procedentes de América Latina, África y del suroeste de Asia. El potencial farmacológico de estas plantas aún no ha sido evaluado (Cordell *et al.*, 1991).

Las plantas contienen un sin número de metabolitos secundarios de tal forma que cualquier investigación fitoquímica de una especie vegetal revelará únicamente un pequeño espectro de sus constituyentes. El proceso que conduce a la obtención de un constituyente puro y farmacológicamente activo es muy largo y laborioso, además requiere de una colaboración multidisciplinaria que incluye botánicos, farmacognostas, químicos, farmacólogos y toxicólogos. Este proceso involucra la siguiente serie de etapas: (según Hamburger y Hostettmann, 1991):

- 1.- Recolección, identificación apropiada y deshidratación del material vegetal.
- 2.- Preparación del extracto apropiado y análisis cromatográfico preliminar por cromatografía en capa fina (TLC) y cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).
- 3.- Evaluación del potencial farmacológico del extracto crudo.

- 4.- Numerosas y consecutivas etapas de separación cromatográfica, donde cada fracción se debe someter a bioensayos sencillos para el monitoreo de la actividad biológica (fraccionamiento biodirigido).
- 5.- Verificación de la pureza de los compuestos aislados.
- 6.- Elucidación estructural por métodos químicos y fisicoquímicos.
- 7.- Síntesis parcial o total.
- 8.- Preparación de derivados o análogos para la investigación de las posibles relaciones entre la estructura y la actividad biológica.
- 9.- Aislamiento y purificación a gran escala para evaluaciones farmacológicas y toxicológicas posteriores.

El presente trabajo de investigación describe el fraccionamiento biodirigido, mediante la utilización de bioensayos para monitorear la actividad citotóxica del extracto orgánico de la "hierba martina" (*Hyptis verticillata*). Esta especie vegetal se utiliza ampliamente en la medicina tradicional de varias regiones de los estados de Oaxaca y Veracruz como remedio casero para el tratamiento de diversos malestares, en especial aquellos asociados con desórdenes gastrointestinales como los dolores de estómago, la indigestión, los cólicos y la parasitosis; también se recomienda su uso para la cura de infecciones de la piel, la cicatrización de heridas y para aliviar los piquetes de insectos (Heinrich, 1992b).

2.- OBJETIVOS.

2.1 OBJETIVO GENERAL:

Realizar el estudio fitoquímico de la planta medicinal *Hyptis verticillata* Jacq., como una fuente potencial de sustancias con actividad antimicrobiana y citotóxica.

2.2.- OBJETIVOS ESPECIFICOS.

2.2.1.- Realizar el análisis químico de los extractos de *Hyptis verticillata* mediante el monitoreo de la actividad citotóxica.

2.2.2.- Caracterizar la estructura de los principios bioactivos mediante análisis instrumental contemporáneo: i.e., espectrometría de masas, resonancia magnética nuclear ($1D-^1H$, $1D-^{13}C$, $2D-COSY$ y $SINEPT$).

2.2.3.- Realizar la evaluación de las sustancias activas como agentes antimicrobianos y antitumorales potenciales.

3.-ANTECEDENTES.

3.1.- Actividad biológica del género *Hyptis*.

De la enorme riqueza vegetal existente en la República Mexicana, el género *Hyptis* (Labiatae = Lamiaceae) está conformado por un extenso número de especies, que deben su importancia económica al amplio uso dado por nuestro pueblo. El empleo de especies medicinales de este género representa una tradición que se ha preservado y transmitido desde tiempos inmemoriales hasta nuestros días.

Numerosas especies del género *Hyptis* deben su importancia no sólo al empleo en la medicina popular sino también a su uso en forma de condimentos en la culinaria nacional. El aislamiento de diversos compuestos asociados con una actividad biológica de interés terapéutico de algunas plantas del género *Hyptis* ha marcado la pauta a seguir en numerosas investigaciones fitoquímicas de las cuales se han descrito importantes propiedades terapéuticas (Gascón-Figueroa, 1989; Hernández, 1991, Villavicencio, 1993). En tanto que a este género se le atribuyen numerosas propiedades medicinales, es importante destacar que un gran número de especies medicinales se utilizan para el tratamiento de infecciones gastrointestinales y de la piel (Gascón-Figueroa, 1989; Heinrich, 1992a,c).

3.1.1.-Actividad antibacteriana

La actividad bacteriostática de las plantas del género *Hyptis* puede ser atribuida, en gran medida a los componentes de los aceites esenciales como por ejemplo, el citral, el citronelal y el linalool (Möse y Lukas, 1957). Otros estudios señalan que las propiedades antisépticas de algunos aceites esenciales son debidas al alto contenido de borneol, eucaliptol y timol (Hegnauer, 1967; Malan *et al.*, 1988)). Todos estos compuestos, representan los constituyentes mayoritarios de los aceites esenciales del género *Hyptis* (Hegnauer, 1967).

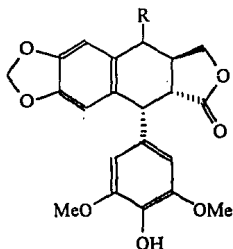
3.1.2.-Actividad carminativa y espasmolítica.

Las infusiones de las hojas de albahaca (*Hyptis mutabilis*) son utilizadas en la medicina popular como tónicos estomacales y carminativos, lo mismo que las preparadas con las hojas de la incana (*Hyptis tormentosa*) y con las flores de la especie *Hyptis multiflora*, que se usan como analgésico estomacal (Alzulgaray y Alzulgaray, 1984). Diversas investigaciones han demostrado que los alcoholes y los fenoles monoterpénicos de los aceites esenciales presentan una poderosa actividad musculotrópica espasmolítica (Wagner, 1977; Roig, 1974), la cual explicaría perfectamente la actividad carminativa atribuida por el uso tradicional a las plantas del género *Hyptis*.

3.1.3.-Actividad citotóxica y antitumoral.

El género *Hyptis* posee un número significativo de compuestos con una actividad citotóxica potencial, demostrada mediante numerosas evaluaciones realizadas a diferentes especies de este género (German, 1971; Sheth *et al.*, 1972; Mirsa *et al.*, 1983; Pereda-Miranda, 1993).

La podofiloxina (**Ia**) y la desoxipodofiloxina (**Ib**) son lignanos presentes en *Hyptis*. Estos constituyentes poseen una significativa actividad citotóxica y antitumoral (Inamori *et al.*, 1986; Mac Rae y Neil, 1984), además de que se les ha demostrado propiedades antivirales (Mac Rae y Neil, 1984).



Ia: R = OH; Ib: R = H.

Otros estudios sobre agentes anticancerígenos de origen vegetal determinaron que el extracto etanólico de las partes aéreas de *Hyptis tormentosa* mostraba actividad sobre un sistema celular de leucemia linfocítica y sobre un cultivo de células KB. Este estudio permitió el aislamiento de tres componentes activos, el de mayor actividad fue identificado como el lignano desoxipodofilotoxina, los otros compuestos identificados fueron los flavonoides: la gardenina B y la 5-hidroxi-4',3,6,7,8-pentametoxiflavona que también demostraron actividad citotóxica (Kingston *et al.*, 1979; Edwards *et al.*, 1979).

Una investigación fitoquímica sobre plantas con posible actividad antitumoral demostró que el extracto de las partes aéreas de *Hyptis emoryi* era activo contra el carcinoma de Walker en ratas. Este estudio estableció que el agente responsable de esta acción es el ácido betunílico (Sheth *et al.*, 1972). La 14-metoxitaxodiona, triterpeno que también ha sido aislado de la raíz de *Hyptis fructicosa*, no sólo presenta actividad bacteriostática sino que resultó ser igualmente efectivo sobre el carcinoma de Erlich en ratas (De Araujo *et al.*, 1974). El lupeol, un triterpeno aislado de la raíz de *Hyptis suaveolens*, ha demostrado ser un potente agente citotóxico (Upadhyay *et al.*, 1982).

3.2.-Generalidades fitoquímicas y etnobotánicas de la especie *Hyptis verticillata*.

La primera investigación fitoquímica realizada en el extracto clorofórmico de la hierba martina (German, 1971) permitió el aislamiento y purificación del lignano 4'-desmetildesoxipodofilotoxina como el constituyente responsable de la actividad antimitótica observada en el extracto original. Más recientemente, además de este lignano se obtuvieron como constituyentes activos, que demostraron un efecto larvicida marginal, a la sideritoflavona (5,3',4',-trihidroxi-6,7,8-trimetoxiflavona), los ácidos oleanólico, maslínico y 2 α -hidroxiursólico, los cuales contribuyen a la citotoxicidad total del extracto original (Cruz, 1991). El cuadro I resume las principales características taxonómicas y etnobotánicas de la hierba martina, *Hyptis verticillata*.

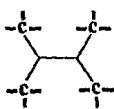
Cuadro I.- Características Etnobotánicas de la "hierba martina"
(Martínez, 1979; Epling, 1949).

Familia	Labiatae
Nombre científico	<i>Hyptis verticillata</i> Jacq.
Nombres vulgares	Hierba martina (Tehuantepec, Oaxaca). Hierba negra (Región de El Tajín, Ver.).
Descripción	Subarbusto perenne de 1-3 m de alto, sus ramas delgadas, alargadas, puberulentas, a veces revestidas con pelos extendidos más largos; láminas foliares elípticas u oblongolanceoladas, de 3-10 cm de largo, agudas en el ápice, estrechadas en la base, semicuneiformes, agudamente aserradas, ambas superficies delicadamente pubescentes; peciolos de 5-10 mm de largo, las hojas más superiores subsésiles; flores en verticilios, apretadas en glomérulos globosos, que son generalmente monoliformes y comúnmente apanojadas; tubo del cáliz en la flor de 1mm de largo, casi glabro; corola blanca o violeta claro, su tubo de 2m de largo; núculas oblongas, de 1.3 mm de largo, redondo truncadas en el ápice, menudamente reticuladas.
Distribución	Se presenta en gran abundancia en América del Norte, y es especialmente abundante en el área tropical del Caribe y América Central. También ha sido colectada en Colombia y el Ecuador (Guayaquil). En México se localiza en los estados de Veracruz, Puebla, San Luis Potosí y Oaxaca.
Usos	Se le utiliza en infusiones o como cataplasma en los casos de dolor de cabeza y de estómago; para aliviar la sarna, piquetes de mosco, mordedura de vibora, enfermedades del aparato respiratorio, malestares de las articulaciones; hemostático, antiparasitario, antihelmíntico, diurético y carminativo (Gascón-Figueroa, 1989; Heinrich, 1992b).

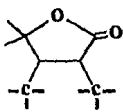
3.3.- Definición, biosíntesis y distribución de los lignanos.

Los lignanos forman un grupo de fenoles vegetales cuya estructura está determinada por la unión β - β' de dos residuos del ácido cinámico. unidades fenilpropanol C_6-C_3 , o sus equivalentes biogénéticos (Haworth y Richardson, 1935). Estos dímeros se encuentran unidos por los carbonos centrales de la cadena lateral. En la naturaleza se ha encontrado constituyentes con una unión $C_8-C_8^n$, entre estos dímeros, que se conocen como neolignanos y tienen una mayor limitación en su número y distribución filogenética (Gottlieb, 1978).

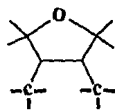
De acuerdo a la forma como el oxígeno es incorporado dentro del esqueleto estructural se pueden reconocer cuatro grupos de lignanos lineares: a) derivados del butano, b) lignaloides o derivados del butanólido, c) monoepoxilignanos o derivados del tetrahydrofurano, d) bisepoxilignanos o derivados del 3,7-dioxabicyclo-(3,3,0)-octano.



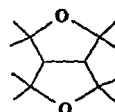
a)



b)

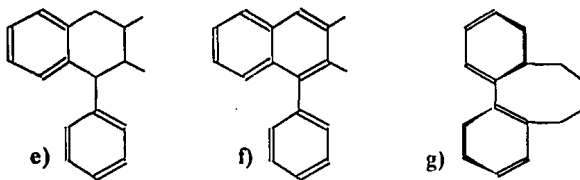


c)



d)

La ciclización de la estructura general permite la existencia de un gran número de compuestos denominados colectivamente como ciclolignanos (Freudenberg y Weinges, 1961), de esta forma encontramos la presencia de derivados del tetrahidronaftaleno (e), del naftaleno (f) y del dibenzociclo-octadieno (g).



Existen evidencias que permiten asumir que la biosíntesis de los lignanos involucra la combinación de dos unidades fenilpropanóicas por un acoplamiento oxidativo (Cole y Weidhorpf, 1978), debido a que estos compuestos pueden estar relacionados a la biosíntesis de la lignina.

Los lignanos tienen una amplia distribución en el reino vegetal y se han encontrado cincuenta y cinco familias de plantas vasculares que contienen lignanos. Las gimnospermas están representadas por familias como Magnoliaceae, Piperaceae, Cucurbitaceae, Anacardiaceae y Lamiaceae, entre otras (Cole y Wiedhorpf, 1978).

Los lignanos han sido aislados de todas partes de las plantas: de la madera, de la corteza, de las resinas, de las raíces, de las hojas, de las flores, de los frutos y de algunas semillas (Mac Rae y Towers, 1984).

Un número escaso de lignanos han sido recientemente identificados tanto en humanos como en otros mamíferos. La trans-8,8-bis-(3-hidroxibencil)- γ -butirolactona y la 8,8'-bis-(3-hidroxibencil)-buteno-9,9'-diol, conocidos respectivamente como la enterolactona y el enterodiol, son los lignanos presentes en mayor proporción en el suero, la orina, la bilis y los fluidos seminales (Setchell *et al.*, 1980 y 1981; Aldlercreutz, 1981). La diferencia entre los lignanos de mamíferos y los lignanos vegetales es la presencia de grupos oxidrilos fenólicos específicamente en la posición meta de los anillos aromáticos. Se piensa que el grupo *Clostridia* de la flora intestinal es el responsable durante la digestión de las fibras vegetales, de la producción de lignanos en los mamíferos (Setchell *et al.*, 1981). Tanto la enterolactona como el enterodiol se producen a partir del

secoisolariceresinol por acción de las bacterias facultativas fecales, mientras la enterolactona se produce a partir del mataresinol (Borriello *et al.*, 1985).

De manera general, la cantidad de lignanos excretada por el ser humano se correlaciona directamente con la cantidad de fibra ingerida. De esta forma, las personas vegetarianas producen una gran cantidad de lignanos, que en la bilis y en la orina comúnmente son conjugados por el ácido glucurónico (Axelson y Stchell, 1980). Por otra parte, en las heces fecales hay formas no conjugadas de lignanos que entran por la circulación enterohepática. El centeno, la avena, el mijo, la soya, el trigo y la cebada son las fuentes primarias de lignanos en la dieta de los mamíferos. Sin embargo, se observa que en personas jóvenes vegetarianas existe una alta excreción de lignanos mientras que en las personas de edad avanzada es menor, aunque sea similar la cantidad de fibra ingerida (Adlercreutz *et al.*, 1981).

3.3.1.- Utilización de productos vegetales ricos en lignanos dentro la medicina tradicional moderna.

Algunos productos vegetales ricos en el contenido de lignanos tienen una larga y fascinante historia empezando con su utilización como remedios caseros en la medicina tradicional de numerosas culturas indígenas. El testimonio más cercano data de aproximadamente mil años (Kelly y Hartwell, 1954). En The "Leech Book of BALD", un antiguo Libro Inglés de Medicina, se describe que las raíces del perifollo (*Anthriscus cerefolium*), que contiene varios lignanos además de la desoxipodofilotoxina, se utilizaron para el tratamiento del cáncer (Cockayne, 1961).

Aproximadamente hace unos 400 a 600 años, los nativos del Himalaya y los antiguos indios americanos de la tribu Penobscot, de lo que hoy se conoce como la región de Maine, EE.UU., descubrieron que la resina producida por el extracto alcohólico de las raíces y rizomas de *Podophillum perennials* presenta propiedades purgantes y que provoca envenenamiento. Los indios americanos creyeron que las raíces poseían antídotos

efectivos contra el veneno de los crótalos y aplicaron tópicamente la resina para el tratamiento de mordeduras venenosas de víboras, o utilizaban las raíces como un agente de acción mortal (Kelly y Hartwell, 1954). Los colonizadores norteamericanos también utilizaron los extractos de las raíces y los rizomas de la mandrágora (*Podophyllum peltatum*) como un purgante y un agente antihelmíntico (Kelly y Hartwell, 1954; Hartwell y Sheeker, 1958).

Los productos vegetales ricos en lignanos también han sido utilizados para el tratamiento de diversas enfermedades en China y Japón, como parte de su rica medicina tradicional (Tang y Eisenbrand, 1992). Desafortunadamente, muchos de los constituyentes activos de estos extractos vegetales no han sido evaluados científicamente como agentes terapéuticos. Las raíces y las ramas secas de *Kadsura coccinea* se encuentran incluidas en la farmacopea China para el tratamiento de la artritis reumatoide, y las úlceras gástricas y duodenales. Las raíces de esta especie medicinal son ricas en lignanos del tipo dibenzociclo-octadieno (Lian-niang *et al.*, 1985).

Otro ejemplo lo representan las hojas de *Olea europaea*, las cuales se han utilizado durante mucho tiempo en el oriente como un antipirético, antireumático, tónico y como remedio en el tratamiento de escrófula, una enfermedad como la tuberculosis de las glándulas linfoides generalmente localizadas en el cuello. La presencia de lignanos en esta planta medicinal podría ser la responsable de estas propiedades farmacéuticas (Tsukamoto *et al.*, 1984).

3.3.2.-Propiedades Farmacológicas.

La estructura difenólica de algunos lignanos les confiere una similitud estructural con varias sustancias estrogénicas como el dienolestrol, el dietilestilboestrol y su deshidroderivado, el hexoestrol. Esta similitud ha permitido inferir que los lignanos desempeñan un papel biológico en el hombre. En experimentos realizados con ratas de laboratorio, se ha demostrado que la enterolactona inhibe la síntesis de RNA uterino

(Waters y Knowler, 1982). En la mujer, el pico de excreción de lignanos se observa en la fase lútea del ciclo menstrual, y valores elevados de éstos son detectados durante el embarazo temprano (Stchell *et al.*, 1980).

En estudios realizados en mujeres con cáncer de mama se ha demostrado que existe una menor excreción de lignanos que en el caso de una mujer sana. Se especula que tal diferencia puede deberse en parte a una dieta rica en fibra con precursores de lignanos (Adlercreutz *et al.*, 1982). Por lo tanto, es posible que los lignanos sirvan como antiestrógenos o para suprimir el desarrollo de malestares humanos. Sin embargo, las evidencias demuestran que el papel de protección de dietas ricas en lignanos contra diversos cánceres es limitado (Hartwell, 1976; Adlercreutz *et al.*, 1982; Fagoo *et al.*, 1986, Cordell *et al.*, 1991).

Existen numerosos estudios que describen nuevas e interesantes propiedades biológicas de los lignanos provenientes de los mamíferos. Por ejemplo, se ha demostrado que los lignanos compiten por los sitios de unión en los receptores de los digitalicos, causan inhibición de la ATPasa dependiente de Na^+ , K^+ de los humanos y de corazón de los cobayos (Fagoo *et al.*, 1986), exhiben propiedades inhibitorias significativas, *in vitro*, contra la enzima colesterol-7 α -hidroxilasa que participa como limitante de la formación de los ácidos biliares (Sanghvi *et al.*, 1984).

El ácido nordihidroguaiarético (NDHGA), un lignano cíclico, es utilizado comercialmente como un antioxidante y tiene un uso limitado en el tratamiento del Mal de Parkinson. El NDHGA ha sido llamado "la penicilina de las hidroquinonas" y se ha demostrado que exhibe una actividad inhibitoria sobre la citocromo oxidasa en el proceso de la fosforilación oxidativa (Elakovich y Stevents, 1985).

El primer constituyente aislado de la clase dibenzociclooctadienos se obtuvo del aceite de las semillas de *Schizandra chimesis* Baill (Kochetkov *et al.*, 1961). El eschizandrol B y otros compuestos con grupos metilendioxi se utilizan en la medicina de China para proteger al hígado de la acción tóxica de algunos fármacos y en el tratamiento

de la hepatitis viral (Fang *et al.*, 1981; Hikino y Kiso, 1988). Se piensa que la presencia del grupo metilendioxi en este tipo de compuestos inhiben la compleja función de la enzima hepática oxidasa (Casida, 1970).

Algunas dibencilbutirolactonas (lignanós acíclicos) y los furofuranos (bisepóxilignanós) inhiben la acción de la fosfodiesterasa (AMPc) (Sutherland y Ral, 1958).

Se ha observado que el neolignanó kadsurenona inhibe la acción del factor de activación plaquetario (PAF) sobre la agregación de los neutrófilos humanos. El ácido (+)-dihidroguaiarético también es un antagonista del PAF, tanto como lo son los presteganos relacionados A y B, y los metoximetaresinóles. El 9,9'-epoxilignanó bursenano es un inhibidor moderado del PAF (Braquett *et al.*, 1986). Esta acción antagónica con el PAF también se ha detectado en lignanós de la clase furofurano que ha sido aislada de las flores de *Magnolia biondii*. Esta fuente natural se utiliza en la medicina china para el tratamiento del dolor de cabeza y el enfisema nasal (Pan *et al.*, 1987).

3.3.2.1-Efectos biológicos sobre plantas e insectos.

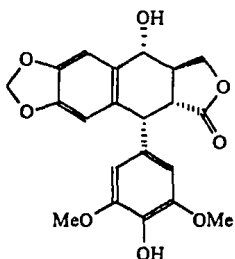
Se ha visto que los lignanós juegan un papel en la regulación del crecimiento vegetal. En común con otros compuestos fenólicos, incluyendo al ácido cinámico y los ácidos orto- y para-cumáricos, la inhibición que ellos ejercen sobre la germinación de semillas es el resultado de la interferencia que causan en el transporte de aminoácidos y en la síntesis proteica (Van Sumere *et al.*, 1972).

En el caso de algunos lignanós acíclicos y furofuranos con grupos metilendioxi se presenta un efecto sinérgico sobre cierto número de insecticidas (Haller *et al.*, 1942). Las propiedades antimitóticas e insecticidas de varios de los lignanós sugieren que éstos compuestos pueden servir a la planta parasitada en su sistema de defensa.

3.3.3-Historia de la Podofilotoxina.

El papel de los lignanos en la dieta, su actividad antiviral y su presumible papel como protector contra ciertos tipos de cáncer, así como su utilización prevalente en la medicina tradicional ha ofrecido interesantes alternativas en el desarrollo de nuevos agentes farmacológicos.

La mandrágora americana (*Podophillum peltatum*) es un miembro de la familia Berberidaceae. La resina obtenida del extracto alcohólico de las raíces y el rizoma de la mandrágora se conoce como "la podofilina" y contiene como su principio activo a la podofilotoxina (g) además de otros lignanos minoritarios. "La podofilina" fue tan popular como purgante y colago en norteamérica que estuvo incluida en la farmacopea de los EE.UU. desde 1920 a 1942, año en que fue suprimida debido a su severa toxicidad gastrointestinal. Irónicamente, el mismo año, Kaplan describió que la aplicación tópica de "la podofilina" era un tratamiento efectivo contra las verrugas venéreas (Aires y Loike, 1990). Actualmente, la podofilina continúa utilizándose como una terapia contra las verrugas anogenitales (Pérez *et al.*, 1976) y es efectiva en el tratamiento de los papilomas nasales (Benett *et al.*, 1985).



g)

La podofilina es una resina extramadamente tóxica (Cassidy *et al.*, 1982; Fisher, 1981), y su ingestión y absorción a través de las superficies mucosas en dosis elevadas produce náuseas, vómitos y diarrea seguidas de delirio, aletargamiento y coma. También puede causar daño renal y una mielosupresión con un decremento leucocitario y plaquetario, además de otros efectos colaterales. La dosis letal de una preparación al 25 % de podofilina ha sido estimada entre 0.3 y 0.6 g, equivalente aproximadamente a la mitad de una cucharada tetera con resina.

3.3.3.1.-Propiedades biológicas y mecanismo de acción de la podofilotoxina.

El efecto particular de la podofilotoxina sobre las verrugas venéreas y nasales está mediado por las propiedades antivirales de este compuesto (Markkanen *et al.*, 1981). Ya que la forma más común de verruga venérea es causada por un virus, *Condyloma acuminatum*. Sin embargo, la aplicación de la podofilotoxina en el tratamiento de otras infecciones causadas por virus permanece prácticamente sin exploración.

A pesar de las numerosas propiedades biológicas de la podofilotoxina, la acción sobre los microtúbulos citoplasmáticos es la mejor conocida. Este lignano actúa sobre el huso celular alterando el equilibrio dinámico durante el ensamblaje de los microtúbulos (microtúbulos-tubulina) *in vivo* como *in vitro*. El resultado neto es la destrucción del sistema citoesquelético en el citoplasma y en las fibras del huso. De tal manera que el mayor efecto citotóxico de este metabolito vegetal es su pronunciada inhibición en la división celular durante la metafase, destruyendo las fibras del huso cromático y previniendo la separación de los cromosomas duplicados (Mc. Keithan y Rosenbaum, 1984).

Otros inhibidores microtubulares incluyen a la colchicina, la esteganacina, el taxol y los alcaloides del tipo vinblastina-vincristina. En experimentos realizados sobre la tubulina del embrión de la langosta, se demostró que el mecanismo de inhibición de la formación de microtúbulos de la podofilotoxina y la colchicina es similar. Sin embargo, la

podofilotoxina compete por el sitio de unión en un proceso más rápido y reversible (Wilson y Freedkin, 1967).

Experimentos *in vitro* para analizar la relación existente entre la estructura y la actividad biológica de la podofilotoxina y sus análogos han permitido concluir que los anillos B y el láctónico de este tipo de lignanos se encuentran involucrados en la interacción con la tubulina. La configuración, el tamaño, el carácter hidrofóbico de los sustituyentes de la posición C-4 en el anillo B y la estereoquímica de la posición C-2 del anillo de la lactona afecta dramáticamente la actividad de los análogos de la podofilotoxina sobre la tubulina (Brewer *et al.*, 1979; Kelleher, 1977).

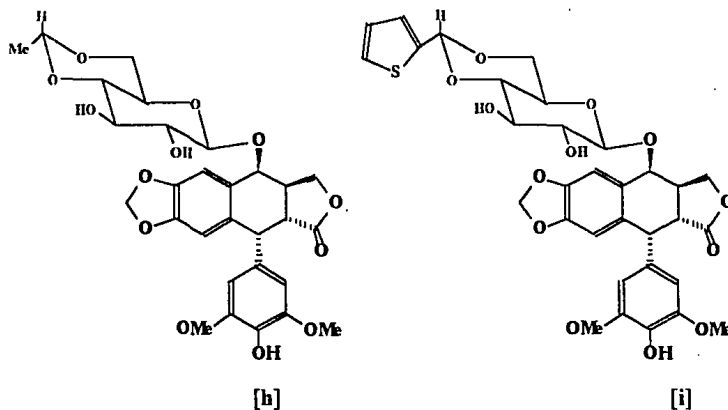
Existen algunas investigaciones que describen propiedades antimicrobianas, inhibiendo el crecimiento de algunas especies de *Streptococcus*, *Staphilococcus*, *Bacillus* y *Pseudomonas*; antimicóticas contra *Rhizoctonia solani*, *R. oxysporum*, *Pythium spp.* y *Rhizopus nigran* (Inamori *et al.*, 1986; Sheriha *et al.*, 1987); inhibitorias de la síntesis de los ácidos nucleicos DNA y RNA (Waters y Knowler, 1982); inhibición enzimática en ciertos procesos que se efectúan en tejidos malignos manifestándose como una actividad antitumoral y en alguno de los procesos involucrados en la respiración celular y de la glucólisis (Waravdekar *et al.*, 1956).

3.3.3.2-Etopósidos y tenipósidos.

La podofilotoxina y sus derivados semisintéticos, los etopósidos y los tenipósidos, son los lignanos con mayor aplicación en la medicina clínica.

El etopósido (VP-16-213: 4'-desmetil-7-[4,6-O-etiliden-β-D-glucopiranosil epipodofilotoxina]) [h] y el tenipósido (VM-26: 4'-desmetil-7-[4,6,-O-teniliden-β-D-glucopiranosilepipodofilotoxina]) [i] son dos derivados semisintéticos de la podofilotoxina desarrollados por Sandoz en la década de los 70's en un intento por obtener derivados que no presentaran los efectos severos de toxicidad gastrointestinal de la podofilotoxina (O' Dwyer *et al.*, 1985). Mediante el empleo de un modelo tumoral de leucemia de múridos

(L-1210), se desarrollaron estos derivados de la podofilotoxina como agentes antitumorales potenciales en el tratamiento clínico.



El uso de los etopósidos en el tratamiento de cáncer es una fase relativamente nueva, éstos derivados de la podofilotoxina están siendo incorporados en varias combinaciones de los regímenes terapéuticos de primera línea en el tratamiento de una gran variedad de tumores carcinogénicos (Hainsworth *et al.*, 1985). Se ha observado que incluso diversos tipos de cáncer que han desarrollado resistencia a los fármacos de primera línea responden positivamente a los etopósidos. Resultados halagadores se han obtenido utilizando únicamente a los etopósidos en el tratamiento de ciertas clases de leucemia (Pinkel, 1987), o en combinación con fosfamida, metatrexato y metil-GAG en tratamientos de linfomas recurrentes o refractarios (O'Donnell *et al.*, 1987). Los estudios utilizando etopósidos o tenipósidos en tratamiento sobre carcinoma ovárico (Piver, 1986), adenocarcinomas del tracto superior gastrointestinal (Kelsen *et al.*, 1987) carcinoma refractario del pecho (Cox *et al.*, 1989) y linfohistiocitosis eritrofagocítica (Henter *et al.*,

1986), proponen respuestas parciales que requieren de investigaciones clínicas más profundas.

No obstante, los tenipósidos son agentes citotóxico más efectivos que los etopósidos sobre las líneas de células tumorales L-9210 y Hela, su aplicación clínica como agente anticarcinógeno aún se encuentra bajo investigación. Los tenipósidos parecen tener su mejor actividad en males hematológicos tales como el linfoma refractario (Grossberg *et al.*, 1987) y la leucemia linfocítica aguda (Jacobs y Gale, 1984).

Los etopósidos y tenipósidos no son inhibidores de la formación de microtúbulos *in vivo* ni *in vitro* como la podofilotoxina, debido a presencia de las porciones glucosídicas de la posición C-4 del anillo B (Brewer *et al.*, 1979). No obstante, estos derivados mantienen la inhibición en el transporte de nucleótidos observada por la podofilotoxina.

La nueva actividad biológica demostrada por estos derivados semisintéticos es el rompimiento de la estructura de hélice simple y doble de DNA, tanto *in vitro* como *in vivo*. Estudios publicados en los últimos años, apoyan la idea de que el rompimiento del DNA ocurre a través de una interacción del tenipósido o etopósido con la topoisomerasa II, una enzima esencial en la replicación del DNA (Chen *et al.*, 1984; Long *et al.*, 1984).

4.-PARTE EXPERIMENTAL

4.1.-TECNICAS ANALITICAS.

4.1.1- Procedimientos generales.

4.1.1.1-Técnicas Cromatográficas Preparativas y Analíticas.

Las cromatografías en columna (CC) se realizaron en gel de sílice 60 Merck (malla 70-230). Para los análisis cromatográficos en capa fina (CCF) se utilizaron cromatofolios de aluminio recubiertos con gel de sílice 60-F₂₅₄ Merck. La purificación de los compuestos mediante cromatografía en capa fina a nivel preparativo se realizó en placas de vidrio recubiertas con gel de sílice (20 x 20 cm; 0.2 mm). El análisis cromatográfico de cada uno de los eluatos, fracciones y compuestos puros obtenidos durante la resolución del extracto clorofórmico se realizó de la siguiente manera:

1.- Mediante un capilar fino se tomó una alícuota de la muestra problema en solución (2 mg/ml) y se aplicó sobre un punto en la superficie del cromatofolio.

2.- La resolución de la muestra problema se realizó mediante el empleo de un sistema de elución adecuado para cada ocasión, utilizando una cámara cromatográfica previamente saturada con el eluyente y en la cual se introdujo el cromatofolio.

3.- Para la detección de los constituyentes, en primer lugar, se dejó evaporar el disolvente de la placa y, después, se observaron expuestos a la luz de una lámpara con emisión de luz ultravioleta de onda corta (254 nm) y de onda larga (365 nm). Cualquier zona que presentase fluorescencia fue marcada inmediatamente.

4.- Posteriormente, las placas se impregnaron con el agente cromógeno (cuadro 1) mediante aspersión y se revelaron por calentamiento sobre una parrilla a una temperatura de 80 °C.

Cuadro 1.- Preparación de agentes cromógenos.

Revelador	Composición
1.- H ₂ SO ₄	H ₂ SO ₄ concentrado o diluido al 50% con H ₂ O o MeOH.
2.- Sulfato cérico/ Ac. sulfúrico	Sulfato cérico (12 g) y H ₂ SO ₄ conc. (22 ml), en 350 g de hielo.
3.- Nitrato-Yodato	HNO ₃ (5M) + KIO ₄ (2%) [1:1]

4.1.1.2.-Análisis por Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas (CG-EM).

Los espectros de masas se registraron con un espectrofotómetro Hewlett Packard S985-B equipado con una columna capilar de sílica fundida (10 mm x 0.1 mm d.i.) con una fase estacionaria de metilsilicón (OV-101); el programa fue isotérmico a 50 °C durante un minuto, y posteriormente se incrementó a una velocidad de 4.5°/min hasta alcanzar 350 °C. Se utilizó Helio como gas acarreador a una presión manométrica de 0.6 Kg/cm², con una velocidad de 30 cm/seg y un flujo de 1.5 ml/min. La temperatura del inyector y la interfase fue de 220 °C con un voltaje de ionización de 70 eV, y la temperatura de la fuente iónica fue de 200 °C.

4.1.1.3.-Identificación de los compuestos puros.

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fisher-Johns. Los espectros de ir se corrieron en un aparato Perkin-Elmer 699B. Los espectros de uv se obtuvieron en un espectrofotómetro Beckman DU-7. Los espectros de rnm se generaron en un aparato Varian VXR-300-5, utilizando como disolvente CDCl₃ y como referencia interna TMS. Por último, los espectros de masa fueron registrados en un aparato Hewlett-Packard 5985-B.

4.2.-MATERIAL VEGETAL.

Para el desarrollo experimental del presente trabajo de investigación, se utilizaron las partes aéreas de *Hyptis verticillata* Jacq. (Lamiaceae) colectadas en el municipio de San Juan Guichicovi, Oaxaca (México), en marzo de 1986. Un ejemplar de la especie se depositó en el Herbario Nacional (Voucher MEXU-431167), Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México.

4.2.1- Preparación del extracto orgánico.

La extracción del material vegetal se inició con el desgrase de la planta (1, 459.9g) seca y pulverizada, utilizando hexano. La extracción secundaria se realizó con CHCl_3 a temperatura ambiente vía maceración durante tres días. Posteriormente, el disolvente de extracción se decantó y filtró para su concentración final por destilación a presión reducida. Este proceso de extracción se realizó en dos ocasiones. Finalmente, se obtuvo un extracto con un peso seco de 133.32 g.

4.3.- METODOLOGIA PARA EL FRACCIONAMIENTO BIODIRIGIDO.

4.3.1.-Fraccionamiento en columna del extracto clorofórmico.

El extracto clorofórmico total (133.3 g) se fraccionó en una columna empacada con 1 Kg de gel de sílice, utilizando como eluyente inicial *n*-hexano. La polaridad del sistema se incrementó utilizando mezclas de hexano-cloroformo y, posteriormente, cloroformo-acetato de etilo. El volumen de los eluatos obtenidos fue de 500 ml y cada uno se concentró hasta un volumen de 30 ml aproximadamente.

La semejanza y la homeogeneidad de los constituyentes detectados mediante diversos análisis cromatográficos en capa fina permitieron la reunión de cada uno de los eluatos. Este proceso proporcionó ocho fracciones combinadas (cuadro 2). Se evaluó el potencial citotóxico de cada una de las fracciones mediante la determinación del efecto larvícida para la *Artemia salina* (Anderson *et al.*, 1991).

Cuadro 2.-Fraccionamiento inicial del extracto clorofórmico de *Hyptis verticillata*.

Código ^a	No. de eluatos ^b	Sistema de elución	Peso seco	BST (LC ₅₀) ^c
d-	1-37	n-hexano	d	NE ^e
HV-I	38-99	n-hex/CHCl ₃ (4:1)	14.7 g	> 1000
HV-II	100-123	n-hex/CHCl ₃ (7:3)	5.13 g	> 1000
HV-III	124-144	n-hex/CHCl ₃ (1:1)	9.5 g	340
HV-IV	145-172	n-hex/CHCl ₃ (3:2)	10 g	7.96
HV-V	173-209	Cloroformo	75.6 g	260
HV-VI	210-241	CHCl ₃ /AcOEt (95:5)	16.3 g	> 1000
HV-VII	242-250	CHCl ₃ /AcOEt (9:1)	50 mg	536.5
HV-VIII	251-306	CHCl ₃ /AcOEt (85:15)	4.02 g	> 1000
Extracto total		Cloroformo	133.32 g	13.41

a: Clave asignada para cada una de las fracciones.

b: Cada eluato correspondió a un volumen de 500 ml.

c: Toxicidad para *Artemia salina* (BST); concentración letal media (LC₅₀=µg/ml).




d: Fracción desechada.

e: No se evaluó.

4.3.2.-Purificación y caracterización de los constituyentes mayoritarios presentes en la fracción activa HV-IV.

La fracción HV-IV (10 g; LC₅₀ = 7.96 µg/ml), eluida con hexano-CHCl₃ (2:3) y responsable de la actividad larvicida demostrada por el extracto clorofórmico (LC₅₀ = 13.41 µg/ml), proporcionó un precipitado sólido de color amarillento con un peso de 2 g y punto de fusión de 223-225 °C. El análisis cromatográfico en capa fina (C₆H₆-CHCl₃-MeOH, 1:1:0.1), de este crudo precipitado, permitió la separación de tres zonas activas a la luz uv y con Rf de 0.14, 0.42 y 0.57 (figura 1). La purificación de cada banda se realizó mediante sucesivas cromatografías en capa fina a nivel preparativo.

Figura 1.-Reproducción del cromatograma obtenido del crudo precipitado de la fracción activa HV-IV.

Benceno/CHCl ₃ /MeOH (1.0;1.0;0.1)		
Banda		R.f.
3		0.57
2		0.42
1		0.14

Precipitado HV-IV

4.3.2.1-Purificación del compuesto HV-IV-1 (zona no.1, Rf = 0.14).

La banda de mayor polaridad se extrajo de la gel de sílice con la mezcla de disolventes C₆H₆-CHCl₃-MeOH (1:1:0.5). La disolución obtenida se concentró a presión reducida y se evaporó al vacío. De esta manera, se obtuvo un compuesto puro denominado con la clave HV-IV-1 en forma de un sólido blanco, en un rendimiento de 54 mg (0.09 %). Este compuesto se identificó como el lignano deshidropodofilotoxina, ópticamente inactivo [α]_D²⁰ = 0°; p.f.= 260-263 °C; UV (log ϵ): 264 (4.71), 318 (3.92), 356 (3.65); IR (KBr) ν cm⁻¹: 2957, 2926, 2856, 1727, 1582, 1462, 1413, 1378, 1356, 1272, 1241, 1120, 1072, 1032, 939, 740; RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃) (Espectro No. 1): δ 9.85 (1H, s, OH-4), 7.67 (1H, s, H-5), 6.98 (1H, s, H-8), 6.54 (2H, s, H-2',6'), 6.10 (2H, s, O-CH₂-O), 5.18 (2H, s, H-10), 3.92 (3H, s, OMe-4'), 3.82 (6H, s, OMe-3',5'); RMN-¹³C (75.4 MHz, CDCl₃) (Espectro No 2): δ 169.72 (C-9), 151.73 (C-3',5'), 148.02 (C-6), 147.65 (C-7), 144.89 (C-4), 136.25 (C-4'), 130.75 (C-1,C-1'), 130.23 (C-8a), 124.41 (C-4a), 121.29 (C-2), 118.26 (C-3), 106.85 (C-2',6'), 102.85 (C-8), 100.8 (C-11), 97.78 (C-5), 66.09 (C-10), 59.83 (MeO-4'), 55.20 (MeO-3',5'); EMIE (70 eV) m/e (% de abundancia relativa): 411 (26), 410 (100), 396 (10), 395 (46), 337 (7), 281 (7), 139 (8), 39 (15).

4.3.2.2.-Purificación del compuesto HV-IV-II (zona no.2, Rf = 0.42).

La banda de polaridad intermedia (Rf 0.42) se purificó de la misma manera que la anterior, dando por resultado la obtención de un segundo compuesto como un sólido amorfo e incoloro al que se le asignó la clave HV-IV-II, en un rendimiento de 36 mg (0.0135 %). Este constituyente se caracterizó como el lignano ópticamente activo ($[\alpha]_D^{25} = -130^\circ$) 4'-desmetildesoxipodofilotoxina, p.f.= 251-253 °C. UV(log ϵ): 226(4.23), 272(3.3); IR (KBr) ν (cm^{-1}): 3360, 2960, 2889, 1750, 1590, 1449, 1450, 1410, 1200, 1150, 1100, 1020, 980, 910; RMN- ^1H (300 MHz, C_6D_6) (Espectro No. 3): δ 8.09 (1H, s, OH-4'), 6.60 (2H, s, H-2',6'), 6.56 (1H, s, H-5), 6.55 (1H, s, H-8), 5.52 (2H, dd, O-CH $_2$ -O), 4.5 (1H, d, H-1; $J_{1-2} = 4.8$ Hz), 3.97 (1H, dd, H-10 α ; $J_{10\alpha-10\beta} = 10.6$ Hz), 3.59 (6H, s, OMe-3',5'), 3.43 (1H, dd, H-10 β ; $J_{10\beta-3} = 7.35$ Hz), 2.56 (1H, m, H-3; $J_{3-2} = 13.77$ Hz; $J_{3-4\alpha} = 5.3$ Hz), 2.48 (1H, dd, H-4 α ; $J_{4\alpha-4\beta} = 15.93$ Hz), 2.32 (1H, dd, H-2), 2.21 (1H, dd, H-4 β ; $J_{4\beta-3} = 4.6$ Hz); RMN- ^{13}C (75.4 MHz; CDCl_3) (Espectro No 4): δ 174.44 (C-9), 147.67 (C-3',5'), 146.76 (C-6), 146.45 (C-7), 136.05 (C-1'), 131.24 (C-4a), 131.21 (C-8a), 128.79 (C-4'), 110.26 (C-8), 109.36 (C-5), 108.20 (C-2',6'), 100.8 (C-11), 71.26 (C-10), 56.07 (MeO-3',5'), 46.88 (C-2), 43.51 (C-3), 32.40 (C-1), 32.34 (C-4); EMIE (70 eV) m/e (% de abundancia relativa): 385 (23), 384 (100), 230 (14), 218 (12), 212 (11), 186 (19), 185 (39), 174 (7), 173 (26), 172 (8), 167 (22), 165 (9), 154 (15), 153 (7), 152 (11), 139 (13), 129 (10), 128 (16), 127 (9), 115 (20), 89 (6), 77 (8), 39 (6).

4.3.2.3.- Purificación de la zona no. 3 (Rf = 0.57).

Para la purificación de la banda de menor polaridad (Rf 0.57), se prosiguió con el mismo tratamiento utilizado para la obtención de las dos bandas de mayor polaridad. Sin embargo, un detallado análisis cromatográfico en capa fina demostró que la banda no. 3, en realidad, estaba constituida por una mezcla compleja de compuestos activos al uv; ésta se obtuvo como un sólido amarillento en un rendimiento total de 144.9 mg (0.054 %). La clave asignada a esta banda fue HV-IV-M3.

4.3.2.4.-Fraccionamiento de las aguas madres de la fracción activa HV-IV.

Utilizando el ensayo de la toxicidad para las larvas de la *Artemia salina*, se procedió a evaluar el potencial citotóxico del crudo precipitado, de los dos constituyentes aislados en forma pura (HV-IV-I y HV-IV-II), de las aguas madres resultantes de la fracción HV-IV y de la mezcla HV-IV-M3. El cuadro 3 resume los valores de las concentraciones letales medias (LC₅₀) obtenidas en cada caso.

Cuadro 3.- Evaluación de la actividad larvica de los constituyentes puros HV-IV-I y HV-IV-II, de la subfracción HV-IV-M3 y de las aguas madres obtenidas de la fracción activa HV-IV.

Muestra	LC ₅₀ * (ppm)
Fracción HV-IV	7.96
Crudo precipitado	0.032
Aguas madres (fracción HV-IV)	0.06
Compuesto HV-IV-I	255
Compuesto HV-IV-II	0.024
Subfracción HV-IV-M3	0.046

* Bioensayo de la *Artemia salina*.

Las aguas residuales de la precipitación de los constituyentes bioactivos, a partir de la mezcla cruda (fracción HV-IV), continuaron desarrollando un valor de LC₅₀ sumamente significativo (0.06 µg/ml). Por lo tanto, se procedió a realizar la subsecuente purificación iniciando, en primer lugar, con un proceso de decoloración de las aguas madres con carbón activado, lo que permitió obtener un crudo total de 5.036 g.

La muestra se adsorbió en 5g de gel de sílice. Se inició el fraccionamiento en una columna empacada con 250g de gel de sílice utilizando benceno como eluyente inicial, la polaridad se incrementó agregando cloroformo. Se obtuvieron eluatos de 50 ml que fueron concentrados a un volumen final de 10 ml. La reunión de los eluatos se realizó

mediante un monitoreo en CCF que permitió la comparación de los constituyentes (Rf) presentes en cada uno, utilizando el sistema de elución C_6H_6 - $CHCl_3$ -MeOH (6.0:4.0:0.1). Mediante este proceso se obtuvieron ocho subfracciones denominadas con el código AM[1-8] (Cuadro 4).

Cuadro 4.- Fraccionamiento mediante cromatografía en columna de las aguas madres de la fracción activa HV-IV.

Número de eluatos	Subfracción (clave)	Sistema de elución	Compuesto precipitado ^a
1-6	HV-AM-1	benceno	NP ^b
7-12	HV-AM-2	benceno	NP
13-14	HV-AM-3	$C_6H_6/CHCl_3$ (7:3)	HV-IV-M3 (8 mg) ^c
15-19	HV-AM-4	$C_6H_6/CHCl_3$ (7:3)	HV-IV-I y M3 (14.7 mg) ^c
20-62	HV-AM-5	$C_6H_6/CHCl_3$ (1:1)	HV-IV-I (19.7 mg) ^c
63-89	HV-AM-6	$C_6H_6/CHCl_3$ (1:1)	NP
90-102	HV-AM-7	$C_6H_6/CHCl_3$ (2:3)	NP
103-115	HV-AM-8	$C_6H_6/CHCl_3$ (1:4)	NP

a: Precipitados obtenidos por trituración de la subfracción con éter.

b: No hubo precipitado (NP).

c: Rendimiento obtenido.

El análisis cromatográfico en capa fina reveló la presencia de los compuestos HV-IV-I y HV-IV-II, así como de la mezcla HV-IV-M3, anteriormente aislados del crudo precipitado HV-IV, en las subfracciones AM[3-5]. Por consiguiente, se realizó la trituración de cada una utilizando éter. Este proceso de purificación proporcionó precipitados correspondientes al compuesto HV-IV-I (19.7 mg), y a la mezcla HV-IV-M3 (cuadro 4). Las aguas madres resultantes presentaron cromatogramas similares por lo que se reunieron y concentraron, obteniendo un crudo de 2.106 g al que se le asignó la clave HV-IV-F4.

4.3.2.5.-Fraccionamiento de la subfracción HV-IV-F4.

El fraccionamiento de esta subfracción (2.11 g) se realizó en una columna empacada con gel de sílice (100 g), iniciando la elución con benceno. La polaridad se incrementó paulatinamente mediante la adición de CHCl_3 . El volumen de los eluatos obtenidos fue de 10 ml aproximadamente. Este procedimiento de purificación permitió la obtención de trece subfracciones reunidas, las cuales se nombraron con la clave AM-SF [1-13] (cuadro 5).

Cuadro 5.-Fraccionamiento de la subfracción HV-IV-F4.

Sistema de elución (CC)	No. de eluatos	Subfracción	Sistema de elución (CCF)	Compuesto ^a
C_6H_6	1-51	AM-SF-1	$\text{C}_6\text{H}_6/\text{CHCl}_3$ (8:2)	-
$\text{C}_6\text{H}_6/\text{CHCl}_3$ (9:1)	52-98	AM-SF-2	"	-
"	99-122	AM-SF-3	$\text{C}_6\text{H}_6/\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (1.5:2.5:0.1)	-
"	123-175	AM-SF-4	"	HV-IV-4A
"	176-224	AM-SF-5	2.0:2.0:0.2	HV-IV-4A, HV-IV-M3, HV-IV-II, HV-IV-I
8.0:2.0	225-270	AM-SF-6	7.0:3.0:0.5	HV-IV-M3, HV-IV-II, HV-IV-I
"	271-394	AM-SF-7	"	-
1.0:1.0	395-460	AM-SF-8	"	-
"	461-496	AM-SF-9	"	-
"	497-505	AM-SF-10	"	-
"	506-517	AM-SF-11	"	-
$\text{CHCl}_3/\text{Me}_2\text{CO}$ (8.0:2.0)	518-549	AM-SF-12	5.0:5.0:1.0	-
"	550-566	AM-SF-13	5.0:5.0:1.0	-

a: Detectados mediante CCF por sus características de color.

El análisis cromatográfico en capa fina, utilizando como sistema eluyente la mezcla $C_6H_6-CHCl_3-MeOH$ (6.0:4.0:0.7), permitió observar la presencia de dos bandas mayoritarias de mediana polaridad ($R_f = 0.68$ y 0.56), en la subfracción AM-SF-4. La purificación de estas bandas se realizó mediante consecutivas cromatografías en placas con gel sílice a nivel preparativo, utilizando como eluyentes la mezcla de disolventes $C_6H_6-CHCl_3-MeOH$ (1.0:1.0:0.2).

4.3.2.5.1-Purificación del compuesto HV-IV-4A ($R_f = 0.68$).

La banda de menor polaridad ($R_f = 0.68$) se extrajo de la gel de sílice con la mezcla de disolventes $C_6H_6-CHCl_3$ (3:2). Finalmente, el concentrado de esta banda proporcionó 69.1 mg (0.0259 %) de un compuesto puro en forma de un aceite incoloro. La evaluación de su actividad larvicida demostró un valor de $LC_{50} = 2.8 \mu g/ml$. A este compuesto se le asignó la clave HV-IV-4A y se caracterizó como la (-)yateína. $[\alpha]_D^{25} = 29.5^\circ$; UV ($\log \epsilon$): 250 (3.23), 298 (3.27), 317 (3.14); IR ($CHCl_3$) ν (cm^{-1}): 2996, 2928, 2839, 2778, 1767, 1590, 1504, 1489, 1462, 1456, 1445, 1423, 1381, 1345, 1335, 1321, 1243, 1188, 1149, 1127, 1037, 1016, 978, 926, 810; RMN- 1H (300 MHz, $CDCl_3$) (Espectro No. 5): δ 6.71 (1H, d, H-5'), 6.48 (1H, dd, H-6'), 6.45 (1H, d, H-2'), 6.35 (2H, s, H-2", 6"), 5.93 (2H, dd, H-7), 4.18 (1H, dd, H-4 α ; $J_{4\alpha-4\beta} = 9.23$, $J_{4\alpha-3} = 7.17$ Hz), 3.83 (9H, s, MeO-3", 4", 5"), 3.8 (1H, dd, H-4 β ; $J_{4\beta-3} = 7.13$ Hz), 2.91 (2H, m, H-6), 2.49-2.60 (4H, m, H-2, 3, 5); RMN- ^{13}C (75.4 MHz, $CDCl_3$) (Espectro No 6): δ 178.43 (C-1), 153.17 (C-3", 5"), 147.84 (C-3'), 146.32 (C-4'), 137.61 (C-4"), 133.35 (C-1"), 133.45 (C-1'), 121.47 (C-6'), 108.25 (C-2'), 108.71 (C-5'), 106.14 (C-2", 6"), 101.04 (C-7), 71.16 (C-4), 60.84 (MeO-4"), 56.07 (3".5"-OMe), 46.43 (C-2), 41.0 (C-3), 38.33 (C-5), 37.73 (C-6); EMIE (70 eV) m/e (% de abundancia relativa): 401 (10), 400 (52), 182 (40.5), 180 (100), (151 (13), 149 (10), 148 (11), 136 (14), 135 (72), 131 (12), 105 (18), 103 (10), 91 (12), 55 (22), 51 (21), 43 (32), 40 (20), 39 (12).

La banda de mayor polaridad ($R_f = 0.56$) se trató de igual forma que la anterior, obteniendo un aceite amarillento en un bajo rendimiento (10 mg). El análisis cromatográfico en capa fina reveló que se trataba de una mezcla compleja de constituyentes. El escaso rendimiento no permitió continuar con su purificación ni su evaluación biológica. Del mismo modo, la purificación de la subfracción AM-SF-6 proporcionó 6 mg adicionales del compuesto HV-IV-II. De tal suerte que este constituyente bioactivo se obtuvo con un rendimiento total de 0.0135 % en peso seco.

4.3.2.6.-Purificación de la mezcla HV-IV-M3.

Para realizar la purificación de la mezcla HV-IV-M3, obtenida en los procesos anteriores (ver incisos 3.2.3 y 3.2.5), se procedió a seleccionar un sistema de eluyentes adecuado que permitiera la máxima resolución cromatográfica. El cuadro 6 presenta todos los sistemas de elución evaluados para tal fin.

Cuadro 6.-Sistemas de eluyentes evaluados para la resolución de la mezcla HV-IV-M3.

Sistema	Composición	Proporción	Rf ^a
1	ben/CHCl ₃ /MeOH	8.0:2.0:0.5	0.47
2	"	4.0:4.0:2.0	0.6 ^a
3	"	1.0:9.0:0.3	0.35
4	benceno	100%	0.27
5	cloroformo	100%	0.52 ^b
6	hexano	100%	0.20
7	ben/CHCl ₃ /MeOH	1.0:8.5:0.5	0.4
8	ben/CHCl ₃ /Me ₂ CO	3.0:3.0:3.0	0.56 ^b
9	"	5.0:3.0:2.0	0.54 ^b
10	"	7.0:2.5:0.5	0.39
11	"	6.0:3.5:0.5	0.44
12	"	1.0:8.0:1.0	0.63 ^b
13	benceno/MeOH	10.0:0.5	0.33
14	"	8.0:2.0	0.6 ^b
15	hexano/CHCl ₃	0.5:9.5	0.25
16	"	2.0:8.0	0.1
17	CHCl ₃ /Me ₂ CO	9.0:1.0	0.4
18	"	1.0:1.0	0.66
19	hex/CHCl ₃ /MeOH	1.0:8.5:0.5	0.7
20	"	0.5:9.5:0.5	0.78
21	hex/CHCl ₃ /Me ₂ CO	1.0:8.5:0.5	0.52
22	"	0.5:8.0:1.0	0.65
23	"	0.5:9.0:0.5	0.61, 0.59, 0.56 ^c
24	Hex/CHCl ₃ /AcOEt	0.5:9.0:0.5	0.83

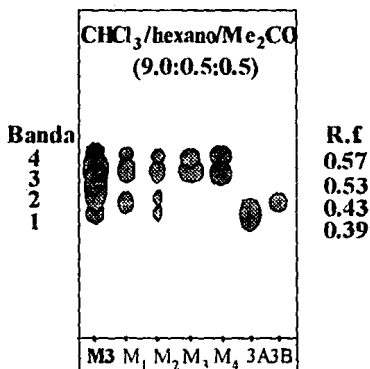
a: En la mayoría de los casos el cromatograma obtenido evidenció una sola banda después de un desarrollo.

b: Se observó un ligero desdoblamiento de la banda cromatográfica.

c: Máximo desdoblamiento observado después de un desarrollo.

El sistema no. 23 constituido por la mezcla de los disolventes hexano- CHCl_3 - Me_2CO (0.5:9.0:0.5), permitió obtener el mejor desdoblamiento de la mezcla HV-IV-M3, cuando ésta se eluía por tres ocasiones consecutivas. Este procedimiento generó un cromatograma compuesto por cuatro bandas con Rf de 0.39, 0.43, 0.53 y 0.57 (figura 2).

Figura 2.- Reproducción del cromatograma obtenido de la subfracción HV-IV-M3 y de las bandas M_{1-4} (placa 10x5 cm, 0.2 mm con gel de sílice).



M3 = mezcla HV-IV-M3.

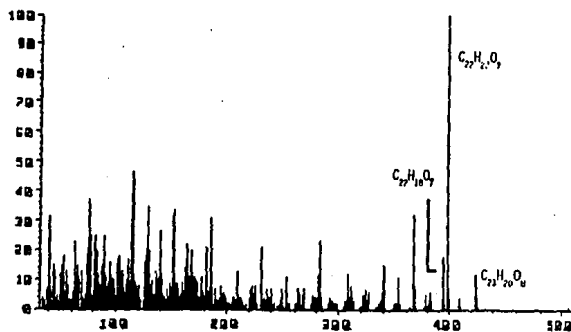
M_{1-4} = bandas obtenida de la CCF-preparativa.

3A = compuesto HV-IV-3A puro.

3B = compuesto HV-IV-3B puro.

De esta forma, se inició la purificación de la mezcla M3 (33 mg) mediante sucesivas cromatografías en capa fina a nivel preparativo, obteniendo en primera instancia, cuatro mezclas con diferente grado de complejidad en su composición (figura 3, bandas M_1 - M_4).

Figura 3.-Conjuntos isotópicos de la banda M₄ observados en el espectro CG-EM.



La banda M₄ de menor polaridad (figura 2) también se extrajo de la gel de sílice con la mezcla cloroformo-hexano (8.0:2.0), proporcionando un sólido amarillo (15 mg). Una alícuota de esta mezcla se sometió a un análisis de cromatografía de gases-espectroscopía de masas (CG-EM), encontrando que por lo menos estaba constituida por tres compuestos mayoritarios (figura 3). Mediante este procedimiento analítico se logró identificar a la desoxipodofilotoxina, o a un isómero de ésta, como el constituyente mayoritario y cuya fórmula molecular se calculó a partir de su ión molecular (m/e 398.5) como C₂₂H₂₂O₇. La normalización de las abundancias relativas de los conjuntos isotópicos para los iones moleculares adicionales permitió calcular sus fórmulas como C₂₂H₁₈O₇ y C₂₃H₂₀O₈.

Para lograr una mejor resolución de esta banda, se procedió a realizar un ajuste en la composición del sistema de elución elegido. El cuadro 7 incluye los sistemas de elución evaluados para la resolución de la mezcla M₄. La muestra utilizada en este análisis cromatográfico fue la subfracción HV-IV-M3, debido al bajo rendimiento de las bandas M₃ y M₄.

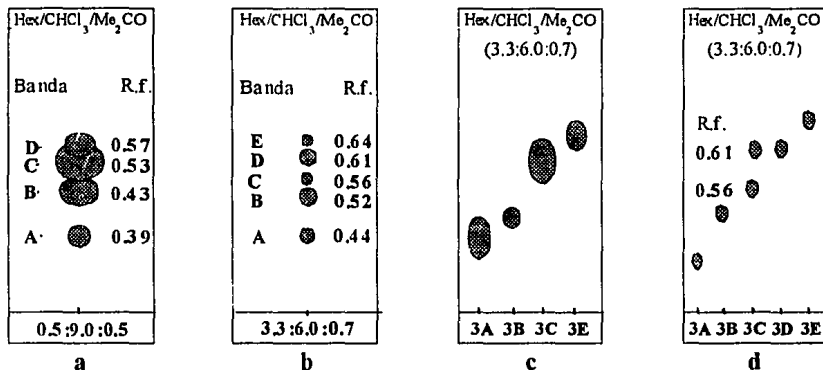
Cuadro 7.-Desdoblamientos observados en la banda M₄ durante el ajuste del sistema de elución.

Sistema	hex/CHCl ₃ /Me ₂ CO proporción	Número de bandas observadas	Rf ^a
1	5.0:4.5:0.5	2	0.59, 0.64
2	4.5:5.0:0.5	1	0.24
3	3.0:6.5:0.5	2	0.25, 0.33
4	3.0:7.0:0.5	4	0.51, 0.57, 0.64, 0.68
5	3.0:6.0:1.0	5	0.44, 0.52, 0.56, 0.61, 0.64.

a: Cada cromatograma fue el resultado de tres desarrollos con el sistema de elución ensayado.

El sistema No. 5 (cuadro 7) se ajustó finalmente a una proporción de hex-CHCl₃-Me₂CO (3.3:6.0:0.7), de tal suerte que la resolución de la mezcla HV-IV-M3 se inició implementando la siguiente metodología. Una vez aplicada la muestra, ésta se eluyó dos veces con el sistema ajustado y, posteriormente, una vez más con un segundo sistema de apoyo de menor polaridad (hex/CHCl₃; 2:3). Esta secuencia de elución permitió una mejor definición de las cinco bandas que constituyen la fracción HV-IV-M3. La figura 4 ilustra los cromatogramas obtenidos durante este análisis.

Figura 4.-Reproducción de los cromatogramas obtenidos de la mezcla HV-IV-M3 y de sus bandas purificadas.



- 4a:** Desdoblamiento observado en la resolución de la mezcla HV-IV-M3 utilizando el sistema No. 23 (tabla 6).
- 4b:** Desdoblamiento observado en la resolución de la mezcla HV-IV-M3 utilizando el sistema No. 5 ajustado (tabla 6) en combinación con el sistema de apoyo (hex/CHCl₃, 2:3).
- 4c:** Bandas obtenidas en la purificación de la mezcla HV-IV-M3 mediante la combinación de los sistemas de elución implementada.
- 4d:** Cromatograma que muestra el resultado de la purificación de la banda 3C.

De esta manera, se procesaron cuarenta cromatoplas a nivel preparativo para lograr la purificación de 200 mg de la mezcla HV-IV-M3 y obtener un buen rendimiento de cada uno de los constituyentes mayoritarios presentes en ella. Debido a la complejidad de esta subfracción, inicialmente sólo se logró la purificación de las bandas con Rf. 0.37, 0.38, 0.45 y 0.48.

4.3.2.6.1.-Purificación y caracterización del compuesto HV-IV-3A.

La banda de mayor polaridad ($R_f = 0.37$) se extrajo de la gel de sílice con la mezcla CHCl_3 -hex (4.0:1.0). Una vez concentrada, esta solución proporcionó un sólido amorfo ámbar denominado con la clave HV-IV-3A (33.2 mg; 0.0112 %), el cual se caracterizó como el lignano β -apocicropodofilina, p.f.= 207-209 °C; efecto Cotton $\Delta\epsilon_{287} = +2.8$, $\Delta\epsilon_{274} = -4.2$; UV ($\log \epsilon$): 250(3.30), 301(3.12), 317(3.01); IR (KBr) $\nu \text{ cm}^{-1}$: 2993.9, 2937, 2840, 1754, 1696, 1619, 1585, 1506, 1485, 1463, 1421, 1385, 1333, 1321, 1231, 1181, 1127, 1099, 1036, 1016, 1005, 940, 930, 869, 832, 786, 770, 761, 684, 661; RMN-¹H (300 MHz, CDCl_3) (Espectro No. 7): 6.72 (1H, s, H-5), 6.63 (1H, s, H-8), 6.37 (2H, s, H-2',6'), 5.95 (2H, dd, O-CH₂-O), 4.87-4.79 (3H, m, H-10 α -10 β ; H-1), 3.84 (1H, d, H-4 α), 3.79 (3H, s, OMe-4') 3.78 (6H, s, OMe-3',5'), 3.69 (1H, d, H-4 β); RMN-¹³C (75.4 MHz, CDCl_3) (Espectro No. 8): δ 166.10 (C-9), 157.33 (C-3), 153.22 (C-3',5'), 147.24 (C-6), 147.03 (C-7), 138.29 (C-1'), 137 (C-4'), 129.61 (C-4a), 128.11 (C-8a), 123.74 (C-2), 109.52 (C-5), 107.74 (C-8), 105.55 (C-2',6'), 101.30 (C-11), 70.98 (C-10), 60.75 (OMe-4'), 29.18 (C-4), 56.13 (OMe-3',5'), 42.71 (C-1); EMIE (70 eV) m/e (% de abundancia relativa): 398 (3), 397 (24), 396 (100), 351 (10), 337 (10), 320 (10), 229 (10), 199 (10), 185 (20), 168 (70), 153 (47), 139 (9), 128 (9), 126 (10), 81 (12), 77 (10), 66 (12), 43 (10).

4.3.2.6.2.-Purificación y caracterización del compuesto HV-IV-3B.

La banda con un R_f de 0.43 se purificó de igual manera que la anterior de mayor polaridad proporcionando un compuesto cristalino en forma de agujas de color blanco al cual se le asignó la clave HV-IV-3B y fue caracterizado como la isodesoxipodofilotoxina. Se obtuvo con un rendimiento de 35.5 mg (0.019 %) y su punto de fusión fue de 246-248 °C; UV ($\log \epsilon$): 242 (2.81), 289 (2.24)nm; IR (KBr) $\nu \text{ cm}^{-1}$: 2996.7, 2936, 2897, 2842, 1786, 1590, 1506, 1483, 1464, 1425, 1366, 1328, 1248, 1226, 1169, 1125, 1095, 1036, 998, 949, 930, 884, 868, 850, 785, 749, 670; RMN-¹H (300 MHz, CDCl_3)

(Espectro No. 9): δ 6.6 (1H, s, H-5), 6.41 (2H, s, H-2',6'), 6.34 (1H, s, H-8), 5.89 (2H, dd, O-CH₂-O), 4.52 (1H, dd, H-10 α ; $J_{10\alpha-3} = 5.82$ Hz; $J_{10\alpha-10\beta} = 8.73$ Hz), 4.05 (1H, dd, H-10 β ; $J_{10\beta-3} = 11.2$ Hz), 3.98 (1H, d, H-1), 3.85 (3H, s, OMe-4'), 3.82 (6H, s, OMe-3',5'), 2.53-2.96 (4H, m, H-2,3,4); **RMN-¹³C** (75.4 MHz; CDCl₃) (Espectro No. 10): δ 175.28 (C-9), 153.08 (C-3',5'), 146.63 (C-7), 146.79 (C-6), 138.65 (C-1'), 132.23 (C-8a), 127.72 (C-4a), 109.96 (C-8), 108.40 (C-5), 106.49 (C-2',6'), 101.09 (C-11), 70.94 (C-10), 56.24 (OMe-3',5'), 48.71 (C-2), 46.70 (C-3), 40.13 (C-1), 32.99 (C-4); **EMIE** (70 eV) m/e (% de abundancia relativa): 398 (4), 397 (24), 396 (100), 351 (10), 337 (9), 320 (10), 229 (10), 199 (10), 185 (18), 168 (70), 153 (47), 139 (9), 126 (10), 81 (12), 77 (10), 66 (12), 43 (10).

4.3.2.6.3.-Purificación y caracterización del compuesto HV-IV-3C.

La banda denominada 3C correspondió al desdoblamiento observado inicialmente con valores de Rf de 0.56 y 0.61 (figura 4b). La separación de esta banda a partir de la mezcla original HV-IV-3M permitió obtener un sólido amarillo con un rendimiento de 56.6 mg. Este sólido se sometió al mismo proceso de purificación antes descrito y permitió la obtención en forma pura de sus constituyentes. La banda con Rf de 0.56 (figura 4d) proporcionó un sólido ámbar translúcido al cual se le asignó la clave HV-IV-3C, su rendimiento fue de 25.5 mg (0.0092 %) y se caracterizó como la desoxipicropodofilotoxina, con un punto de fusión de 163-165 °C. **UV**(log ϵ): 251 (3.34), 289 (3.34), 292 (3.35), **IR** (KBr) ν cm⁻¹: 2994.2, 2933, 2892, 2842, 1782, 1587, 1506, 1483, 1464, 1425, 1360, 1325, 1243, 1228, 1163, 1125, 1095, 1036, 998, 947, 925, 882, 865, 869, 785, 749, 670; **RMN-¹H** (300 MHz, CDCl₃) (Espectro No. 11): δ 6.67 (1H, s, H-5), 6.59 (1H, s, H-8), 6.34 (2H, s; H-2',6'), 5.93 (2H, dd, O-CH₂-O), 4.45 (1H, dd, H-10 α), 4.37 (1H, dd, H-1), 3.98 (1H, dd, H-10 β), 3.83 (3H, s, OMe-4'), 3.78 (6H, s, OMe-3',5'), 3.24 (1H, dd, H-2), 3.04 (1H, m, H-3), 2.87 (1H, dd, H-4 α), 2.45 (1H, dd, H-4 β); **RMN-¹³C** (75.4 MHz, CDCl₃) (Espectro No. 12): δ 178.31 (C-9), 153.28 (C-3',5'), 146.79 (C-6),

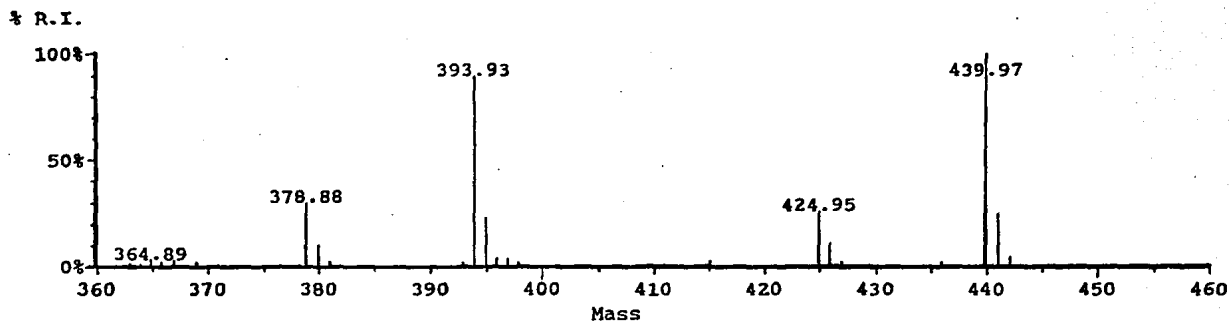
146.69 (C-7), 138.13 (C-1'), 136.67 (C-4'), 130.38 (C-4a), 128.22 (C-8a), 109.81 (C-8), 108.76 (C-5), 104.87 (C-2',6'), 100.95 (C-11), 72.72 (C-10), 60.84 (OMe-4'), 56.17 (OMe-3',5'), 46.36 (C-2), 45.30 (C-3), 32.03 (C-4), 32.98 (C-1); EMIE (70 eV) m/e(% de abundancia relativa): 398 (3), 397 (25), 396 (100), 351 (9), 337 (8), 320 (10), 229 (11), 199 (10), 185 (20), 168 (68), 153 (45), 139 (9), 128 (9), 126 (10), 81 (10), 77 (10), 66 (12), 43 (10).

4.3.2.6.4.-Purificación y caracterización del compuesto HV-IV-3D₁.

La banda de Rf = 0.61 (figura 4d) proporcionó 16.3 mg (0.0059 %) de un sólido amarillo pálido cuyo análisis espectroscópico (EMIE; RMN-¹H) demostró que se trataba de una mezcla con dos constituyentes mayoritarios. El espectro de masas (figura 5) permitió calcular las fórmulas moleculares a partir de sus iones moleculares como C₂₃H₁₉O₉ y C₂₂H₁₈O₇ (figura 5). Las estructuras designadas mediante estos análisis correspondieron a los lignanos 5-metoxideshidropodofilotoxina (HV-IV-3D₁) y desoxideshidropodofilotoxina (HV-IV-3D₂), respectivamente.

Una separación adicional mediante CCF de esta mezcla (16.3 mg) permitió obtener nuevamente dos bandas con Rf de 0.52 y 0.56. El análisis cromatográfico (CCF) y espectroscópico reveló que la banda de menor polaridad era la misma mezcla de lignanos, mientras que la banda de mayor polaridad estaba constituida únicamente por la 5-metoxideshidropodofilotoxina, siendo este un producto natural no descrito en la literatura y con un rendimiento de 8 mg (0.0028 %).

Figura 5.- Espectro de masas obtenido de la banda HV-IV-3D.



Mass	Intensity	% R.I.	Mass	Intensity	% R.I.
363.982	164	1.07	423.072	86	0.56
364.89	536	3.51	424.951	4080	26.75
365.876	380	2.49	425.984	1791	11.74
366.966	509	3.33	427.016	418	2.74
367.978	137	0.89	428.023	209	1.37
369.017	360	2.36	429.004	116	0.76
369.979	124	0.81	435.984	266	1.74
370.94	150	0.98	437.021	85	0.55

La clave asignada para la 5-metoxideshidropodofilotoxina fue HV-IV-3D₁, pf > 225 °C. UV (log ε): 223(4.52), 268(4.36), 325(3.68), 357(3.38); IR (KBr) ν cm⁻¹: 3400, 1763, 1614, 1582, 1465, 1448, 1251, 1199, 1125, 1089, 1055, 1035, 1022, 1004, 939; RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃) (Espectro No. 13): δ 9.58 (1H, s, OH), 6.86 (1H, s, H-8), 6.49 (2H, s, H-2',6'), 5.35 (2H, s, H-10), 6.10 (2H, s, H-11), 4.29 (3H, s, OMe-5), 3.96 (3H, s, OMe-4'), 3.82 (6H, s, OMe-3',5'); RMN-¹³C (75.4 MHz, CDCl₃) (Espectro No. 14): δ 169.65 (C-9), 152.83 (C-3',5'), 149.1 (C-7), 147.25 (C-4), 136.45 (C-6), 136.30 (C-4'), 132.75 (C-8a), 132.03 (C-1), 130.28 (C-5,C-1'), 122.98 (C-3), 120.43 (C-2), 116.0 (C-4a), 107.2 (C-2',6'), 101.66 (C-11), 99.73 (C-8), 66.85 (C-10), 61.15 (OMe-5), 60.90 (OMe-4'), 56.10 (OMe-3',5'); EMIE (70 eV) m/e (% de abundancia relativa): 442(5), 441(26), 440 (100), 425 (28), 379 (30), 365 (5).

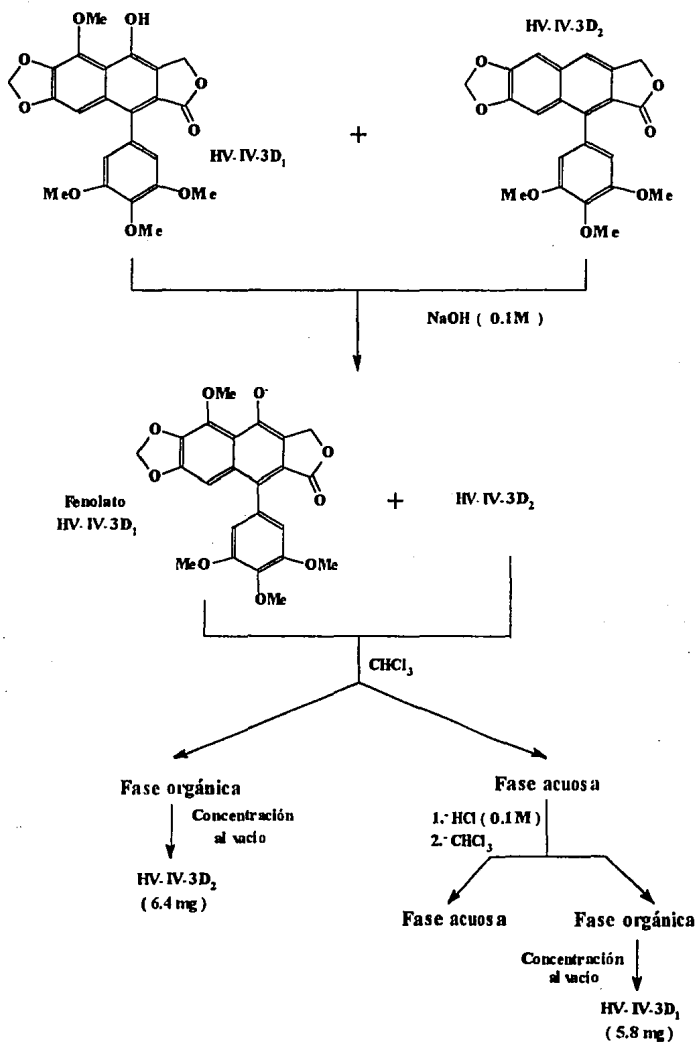
4.3.2.6.5.-Purificación y caracterización del compuesto HV-IV-3D₂.

En un intento por lograr la purificación total de los constituyentes de la mezcla HV-IV-3D, y establecer sus constantes espectroscópicas, se procedió a realizar la formación del fenolato de la 5-metoxideshidropodofilotoxina (HV-IV-3D₁) mediante la siguiente secuencia metodológica. A 14 mg de la mezcla HV-IV-3D en solución clorofórmica (1 ml) se añadieron 2.5 ml de una solución de NaOH 0.1M. Después de dos horas de reacción con agitación continua a temperatura ambiente, se agregó 1.5 ml de CHCl₃ y mediante un embudo de separación se recuperaron las dos fases de manera independiente. A la fase acuosa que adquirió un color naranja intenso se le adicionó HCl (0.1M) hasta la desaparición del color (2 ml), y se extrajo de nueva cuenta con 3 ml de CHCl₃. Las dos soluciones orgánicas obtenidas se concentraron a sequedad por separado. La fase orgánica resultante de la neutralización de la fase acuosa básica proporcionó 5.8 mg adicionales (0.0049 % total) del compuesto HV-IV-3D₁. Por último, la fase orgánica obtenida de la primera partición proporcionó 6.4 mg del compuesto HV-IV-3D₂ en forma

pura. La figura 6 resume la secuencia metodológica implementada para la resolución de la mezcla HV-IV-3D.

El compuesto HV-IV-3D₂ (6.4 mg, 0.0023 %) fue purificado como un polvo amarillo pálido con p.f.>250 °C. UV (log ε): 251 (3.19), 317 (3.29), 349 (3.20); IR (KBr) ν cm⁻¹: 2954, 2918, 2850, 2793, 1763, 1740, 1614, 1580, 1491, 1415, 1367, 1353, 1336, 1237, 1201, 1176, 1150, 1030, 1021, 1007, 982, 939, 900, 846, 797; RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃) (Espectro No. 15): δ 7.69 (1H, s, H-4), 7.21 (1H, s, H-5), 7.10 (1H, s, H-8), 6.55 (2H, s, H-2',6'), 6.12 (2H, s, O-CH₂-O), 5.40 (2H, s, H-10), 3.99 (3H, s, OMe-4'), 3.84 (6H, s, OMe-3',5'); RMN-¹³C (75.4 MHz, CDCl₃): δ 169.05 (C-9), 152.5 (C-3',5'), 148.58 (C-6), 148.37 (C-7), 140.19 (C-2), 139.03 (C-1), 137 (C-4'), 134.22 (C-4a), 130.38 (C-1'), 129.19 (C-8a), 119.56 (C-4), 118.3 (C-3), 107.37 (C-2',6'), 103.65 (C-5), 102.26 (C-8), 101.01 (C-11), 67.93 (C-10), 61.1 (OMe-4'), 56 (OMe-3',5'); EMIE (70 eV) m/e (% de abundancia relativa): 396.05 (4), 395.05 (24), 394.05 (100), 378.88 (15).

Figura 6.-Diagrama de flujo que resume la separación de los compuestos HV-IV-3D₁ y HV-IV-3D₂



4.3.2.6.6.- Purificación y caracterización del compuesto HV-IV-3E

La banda de menor polaridad ($R_f = 0.64$) denominada HV-IV-3E proporcionó pequeños cristales de color amarillo pálido con un rendimiento de 15 mg (0.0083). Este compuesto se caracterizó como el éter metílico de la deshidro- β -peltantina con un punto de fusión de 265-276 °C. UV (log ϵ): 263 (4.62), 320 (3.92), 355 (3.61); IR (KBr) ν cm^{-1} : 2988, 2925, 2851, 1761, 1648, 1615, 1582, 1508, 1491, 1465, 1448, 1438, 1412, 1397, 1367, 1353, 1339, 1251, 1242, 1199, 1125, 1089, 1055, 1035, 1022, 1004, 939, 859, 796, 774, 711, 696; RMN- ^1H (300 MHz, CDCl_3) (Espectro No. 16): δ 8.16 (1H, s H-4), 7.28 (1H, s, H-5), 6.86 (1H, s H-8), 6.53 (2H, s, H-2',6'), 6.06 (2H, s, O- CH_2 -O), 5.39 (2H, s, H-10), 4.22 (3H, s, OMe-5), 3.96 (3H, s, OMe-4'), 3.83 (6H, s, OMe-3',5'); RMN- ^{13}C (75.4 MHz, CDCl_3) (Espectro No. 17): δ 169.65 (C-9), 152.82 (C-3',5'), 149.58 (C-7), 139.96 (C-1), 137.59 (C-4'), 138.99 (C-3), 136.02 (C-6), 135.62 (C-5), 130.47 (C-8a, C-1'), 128.92 (C-4a), 119.16 (C-2), 113.95 (C-4), 107.19 (C-2',6'), 101.64 (C-11), 98.33 (C-8), 68.26 (C-10), 60.13 (OMe-4'), 60.0 (OMe-5), 56.11 (OMe-3',5'); EMIE (70 eV) m/e(% de abundancia relativa): 425 (23.78), 424 (100), 409 (28.88), 394 (27.89), 379 (12), 351 (4.92), 321 (2.67), 293 (2.33), 196 (4.43), 139 (2.18), 117 (2.38).

4.4.- MONITOREO DE LA ACTIVIDAD CITOTOXICA POTENCIAL.

4.4.1.-Evaluación de la toxicidad para las larvas de *Artemia salina* (BST).

El extracto clorofórmico, cada una de las fracciones y los compuestos purificados se analizaron de manera independiente para determinar su potencial larvicida, utilizando el bioensayo de la toxicidad para el crustáceo *Artemia salina* (Anderson *et al.*, 1991).

4.4.1.1.- Material

- 1.-Huevos de *Artemia salina*.
- 2.- Salmuera.
- 3.- Recipiente de vidrio y lámpara de luz neón.
- 4.- Jeringas de 500, 100 y 10 μ l.
- 5.- Tres frascos viales de 10 ml por cada una de las diluciones (9 en total).

4.4.1.2.-Procedimiento

1.-Los huevecillos de *Artemia salina* se desarrollaron mediante incubación en salmuera durante 48 hrs. a una temperatura de 30 °C.

2.-Se prepararon concentraciones de prueba inicial para cada una de las fracciones y compuestos puros aislados, correspondientes a 10, 100 y 1000 μ g/ml. Cada concentración se preparó por triplicado. 20 mg de la muestra de prueba se disolvieron en 2 ml de CHCl_3 , y de esta solución se transfirieron 500, 50 y 5 μ l a viales independientes correspondiente. El disolvente se evaporó al vacío.

3.-Se adicionó a cada vial 3 ml de la salmuera y se transfirieron 10 larvas de *Artemia salina* a cada vial (30 individuos por dilución). Se ajustó el volumen de cada frasco a 5 ml con la salmuera.

4.-La lectura del número de sobrevivientes se realizó después de 24 hrs., y se determinaron los valores de concentración letal media (LC_{50}) mediante el método estadístico de Finney, utilizando un programa de cómputo (Lieberman, 1973).

4.4.2.-Evaluación del potencial citotóxico de los constituyentes aislados de *H. verticillata*.

La actividad citotóxica de la fracción activa y de los constituyentes aislados de *Hyptis verticillata* se determinó de acuerdo con los procedimientos establecidos por el Instituto Nacional de Cáncer de los Estados Unidos de Norteamérica (Suffness y Pezzuto,

1991). Las líneas celulares utilizadas fueron los carcinomas de mama (BC-1), de colon (Col-2), de pulmón (Lu-1), de mama hormona-dependiente (ZR 75-1), fibrosarcoma (HT), glioblastoma (U-373), nasofaríngeo (KB), epidermoide (A-431), KB resistente a vinblastina (KB IV) y de próstata hormona-dependiente (LN CaP). Los cultivos celulares obtenidos de cada uno de los tipos tumorales se trataron con diferentes concentraciones de cada muestra ($0.03-20 \mu\text{g} \times \mu\text{l}^{-1}$) disuelta en DMSO, y se incubaron por períodos de 48 hrs. para la línea celular P-388 y por 72 hrs. las restantes. Al término del periodo de incubación, se determinó la cantidad de células en cada tubo de ensayo mediante un análisis colorimétrico para evaluar el contenido protéico celular utilizando el método de tinción de sulforodamina B. Los resultados se expresaron finalmente en términos de dosis efectivas medias (ED_{50}).

4.4.3 Evaluación de la actividad antimicrobiana potencial de los constituyentes aislados de *H. verticillata*.

La evaluación preliminar del potencial antimicrobiano del extracto original, así como de cada uno de los compuestos aislados se realizó utilizando las técnicas microbiológicas cualitativas por el método de difusión en agar (Rojas *et al.*, 1992; Pereda-Miranda, 1993).

4.4.3.1.- Microorganismos de Prueba.

Las siguientes cepas se utilizaron como organismos de prueba en las evaluaciones primarias:

Microorganismo	ATCC No.
<i>Bacillus subtilis</i>	6633
<i>Staphylococcus aureus</i>	6538
<i>Escherichia coli</i>	8739
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	9027
<i>Candida albicans</i>	10231

4.4.3.2.-Preparación de los inóculos.

Las bacterias se cultivaron en un caldo nutritivo (Merck) por medio de incubación, durante 24 hrs. a una temperatura de 37 °C. El crecimiento de la levadura *Candida albicans*. se afectuó en caldo glucosa 2% Sabouraud (Merck), incubando por un lapso de 48 hrs a una temperatura de 28 °C.

La concentración de cada uno de los microorganismos se ajustó mediante una dilución con solución salina isotónica estéril (NaCl 0.9 %), hasta obtener la turbidez equivalente a la solución de referencia No. 1 de Mc. Farland (0.1 ml de BaCl₂ 1% y 9.9 ml de H₂SO₄ 1%) que corresponde a un número aproximado de 1×10^9 células ml⁻¹.

4.4.3.3.-Análisis cualitativo antimicrobiano.

4.4.3.3.1.-Preparación de las muestras de prueba.

Las muestras a evaluar se suspendieron en una solución acuosa de tween 80 al 1%. El extracto y los compuestos aislados se evaluaron a una concentración de 20 y 1 mg·ml⁻¹, respectivamente. Los controles positivos se prepararon utilizando 1 mg·ml⁻¹ de sulfato de estreptomicina y 30 mg ml⁻¹ de histamina en solución acuosa.

4.4.3.3.2.-Preparación de los medios.

Para las bacterias se utilizó agar antibiótico No.1 (Merck) y para la levadura agar sabouraud (Merck). De cada uno de los medios se preparó una dispersión acuosa que posteriormente se esterilizó a 15 lb de presión. En condiciones de esterilidad se transfirieron 15 ml del medio preparado a cada caja Petri de prueba (100 x 15 mm) y se dejó solidificar a temperatura ambiente.

4.4.3.3.-Procedimientos de ensayo.

Un mililitro de la suspensión microbiana (10^9 células ml^{-1}) fue sembrado de manera uniforme sobre la superficie del medio. Posteriormente, se removió el agar de las placas para producir tres perforaciones con un diámetro aproximado de 11mm cada una, con ayuda de un horador cilíndrico estéril. Se añadieron 100 μl del control positivo en una de las perforaciones, 100 y 50 μl de la solución problema por separado en los pozos restantes. Las cajas Petri así preparadas, se mantuvieron a una temperatura de 5 °C por espacio de 2 hrs. para permitir la difusión de las suspensiones. Transcurrido este tiempo, las cajas se incubaron durante 24 hrs. a temperatura de 37 °C, en el caso de las bacterias, y a 28 °C durante 48 hrs. para la levadura. Finalmente, la actividad antimicrobiana se registró midiendo el diámetro (mm) de la zona de inhibición del crecimiento microbiano que circundó a cada uno de los pozos.

4.5.-PREPARACION DE DERIVADOS METILADOS.

La alquilación con diazometano se realizó para facilitar la completa caracterización de los compuestos HV-IV-I y HV-IV-II aislados de *Hyptis verticillata*.

4.5.1.-Preparación del reactivo.

A una solución de KOH (5g en 7.5 ml de agua destilada), 25 ml de EtOH y 15 ml de Et₂O se adicionaron 25.5 g de N-metil-N-nitroso-O-toluensulfonamida en 30 ml de Et₂O. La mezcla de reacción se mantuvo en agitación continua a una temperatura de 5 °C. Después de cinco minutos, el CH₂N₂ etéreo se destiló utilizando un baño maría (58-60 °C). El destilado se colectó en 20 ml de Et₂O en un baño de hielo.

4.5.2.-Metilación de la muestra.

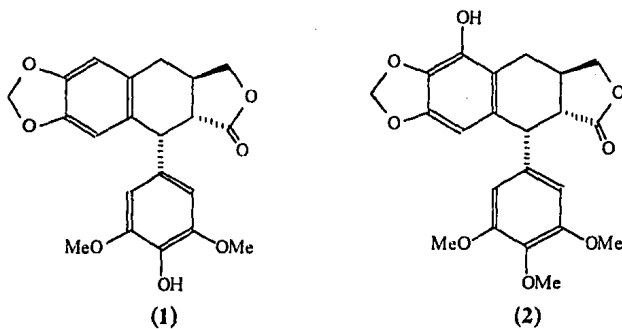
20 mg del compuesto se disolvieron en 10 ml de C_6H_6 -MeOH (1:1) y se alquilaron con un exceso de solución etérea de CH_2N_2 a una temperatura de 5 °C. La adición del agente alquilante se efectuó hasta que ya no se observó desprendimiento de nitrógeno. Al cabo de 10 minutos, ya había reaccionado toda la materia prima obteniéndose un sólido amorfo. La cromatografía en capa fina a nivel preparativo permitió la purificación de los derivados metilados.

HV-IV-IE (éter metílico de la deshidropodofilotoxina): p.f.= 250-253 °C; **RMN-¹H** (300 MHz, $CDCl_3$): δ 7.57 (1H, s, H-5), 7.06 (1H, s, H-8), 6.51 (2H, s, H-2',6'), 6.09 (2H, s, H-11), 5.52 (2H, s, H-1), 4.09 (3H, s, OMe-4), 3.96 (3H, s, OMe-4'), 3.83 (6H, s, OMe-3',5'); **RMN-¹³C** (75.4 MHz, $CDCl_3$): δ 152 (C-3',5'), 149.89 (C-6), 148.37 (C-4), 135.32 (C-4'), 132.12 (C-1), 130.35 (C-1'), 127.69 (C-8a), 125.66 (C-4a), 119.41 (C-3), 107.38 (C-2), 107.31 (C-2',6'), 104 (C-8), 101.83 (C-11), 98.49 (C-5), 66.49 (C-10), 61.01 (OMe-4), 61.01 (OMe-4'), 56.1 (OMe-3',5').

HV-IV-IIIE (éter metílico del compuesto HV-IV-I, la desoxipodofilotoxina): rendimiento de 15.2 mg, p.f.=241-242 °C; **RMN-¹H** (300 MHz, $CDCl_3$): δ 6.67 (1H, s, H-5), 6.52 (1H, s, H-8), 6.34 (2H, s, H-2',6'), 5.94 (2H, dd, J = 1.3, H-11), 4.44 (2H, m, H-10 α , H-1), 3.8 (3H, s, OMe-4'), 3.75 (6H, s, OMe-3',5'), 3.05 (2H, m, H-10 β , H-4 α), 2.74, (3H, m; H-2, H-3, H-4 β); **RMN-¹³C** (75.4 MHz, $CDCl_3$): δ 174.92 (C-9), 151.95 (C-5'), 151.92 (C-3'), 146.3 (C-6), 145.9 (C-7), 137.01 (C-1'), 136.32 (C-4'), 130.5 (C-8a), 129.05 (C-4a), 109.89 (C-8), 108.45 (C-5), 108.17 (C-6', C-2'), 100.9 (C-11), 71.54 (C-10), 59.9 (OMe-4'), 55.76 (OMe-3'), 55.72 (OMe-5'), 46.1 (C-2), 43.03 (C-1), 32.57 (C-3), 32.0 (C-4).

5.-RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Estudios fitoquímicos previos de la planta medicinal *Hyptis verticillata* Jacq. (Lamiaceae), realizados de manera independiente, permitieron detectar y aislar dos constituyentes citotóxicos con un esqueleto estructural de ciclolignano: la 4'-desmetil-desoxipodofiltoxina (1) y la β -peltantina (2) (Cruz, 1991; German, 1971). Como parte de un programa de investigación química de la flora medicinal mexicana, el cual está enfocado a la búsqueda de agentes antimicrobianos y citotóxicos (Rojas *et al.*, 1991; Pereda-Miranda *et al.*, 1993), se propuso iniciar la reinvestigación de las partes aéreas de la hierba martina. Al mismo tiempo, se consideró el potencial farmacológico de interés en la terapéutica del cáncer de esta planta medicinal mediante la cuantificación del contenido de lignanos derivados de la podofiltoxina.



5.1.-Fraccionamiento Biodirigido y Evaluación Preliminar del Potencial Citotóxico.

La principal estrategia utilizada en el estudio fitoquímico del extracto clorofórmico preparado a partir de las partes aéreas de *Hyptis verticillata* fue el empleo del ensayo de la

toxicidad para las larvas de *Artemia salina* (Meyer *et al.*, 1982; Anderson *et al.*, 1991), como un método de análisis preliminar para la detección y el monitoreo de actividad citotóxica a lo largo de toda la secuencia metodológica utilizada en la presente investigación fitoquímica.

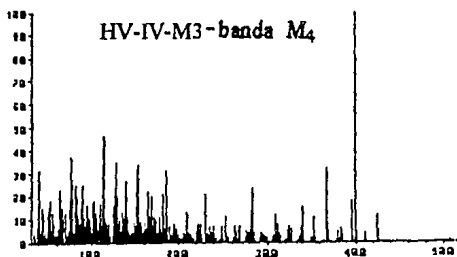
La preparación del extracto clorofórmico a partir del material vegetal seco, previamente desgrasado, se realizó mediante la metodología de extracción convencional. La evaluación de su potencial larvicida demostró una significativa actividad tóxica ($LC_{50} = 13 \mu\text{g/ml}$). Por lo tanto, se decidió proceder con el análisis químico, de tal suerte que el extracto total se sometió a un fraccionamiento mediante cromatografía en columna empacada con gel de sílice. Las ocho fracciones reunidas de acuerdo con su similitud cromatográfica se evaluaron de manera independiente con el bioensayo antes mencionado. Este procedimiento demostró que la actividad biológica se concentró solamente en una fracción ($LC_{50} = 7.96 \text{ ppm}$), la cual se denominó con la clave HV-IV y proporcionó un crudo precipitado que también demostró la actividad observada en el extracto original ($LC_{50} = 0.032 \mu\text{g/ml}$). Las aguas madres resultantes continuaron presentando un potencial tóxico significativo para las larvas de *Artemia salina* ($LC_{50} = 0.06 \mu\text{g/ml}$).

El análisis cromatográfico en capa fina permitió observar que ambas subfracciones estaban constituidas por una mezcla compleja de metabolitos activos a la luz ultravioleta. Mediante sucesivas cromatografías en columna y en placa fina a nivel preparativo se aislaron y purificaron nueve constituyentes bioactivos. Los análisis espectroscópicos permitieron establecer su estructura de lignano para estos compuestos. La figura 7 ilustra la secuencia metodológica implementada para la purificación de cada uno de los constituyentes citotóxicos de *Hyptis verticillata*.

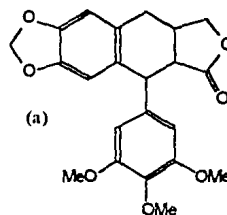
Al realizar el análisis cromatográfico en capa fina del crudo precipitado obtenido de la fracción activa HV-IV, utilizando el sistema de eluyentes conformado por los disolventes $C_6H_6-CHCl_3-MeOH$ en la proporción 6.0:4.0:0.5, se observó su desdoblamiento en tres bandas con R_f de 0.14, 0.42 y 0.57. La purificación de cada una de estas zonas se realizó por cromatografía en capa fina a nivel preparativo. Las bandas con R_f de 0.14 y 0.47 proporcionaron la deshidropodofilotoxina (clave asignada HV-IV-I) y la 4'-desmetildesoxipodofilotoxina (Clave HV-IV-II), respectivamente. En tanto que la zona de menor polaridad ($R_f = 0.57$) continuó representando una mezcla de compuestos y se le asignó la clave HV-IV-M3.

La complejidad de la mezcla HV-IV-M3 se determinó, de manera preliminar, mediante un análisis en CCF utilizando el mismo sistema de eluyentes antes mencionado y desarrollando por dos ocasiones la placa cromatográfica. Este procedimiento permitió observar un desdoblamiento ligero de la banda M3. La utilización de la cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas (CG-EM) verificó la complejidad de esta mezcla al permitir detectar los conjuntos isotópicos correspondientes a tres iones moleculares en el espectro registrado para una de las bandas de menor polaridad obtenida de la purificación inicial en CCF a nivel preparativo de la subfracción M3, utilizando la mezcla de disolventes hexano- $CHCl_3-Me_2CO$ (0.5:9.0:0.5). De tal suerte que se pudieron calcular las fórmulas moleculares para los constituyentes presentes en la mezcla purificada con clave M_4 ($R_f = 0.53$). La figura 8 presenta el espectro de masas obtenido para esta subfracción.

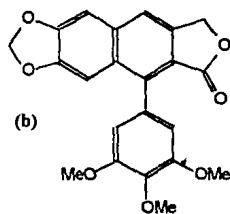
Figura 8.- Conjuntos isotópicos observados en el espectro de masas de la banda M₄ de menor polaridad de la mezcla HV-IV-M3 que permitieron determinar la estructura y fórmula molecular de sus constituyentes mayoritarios presentes.



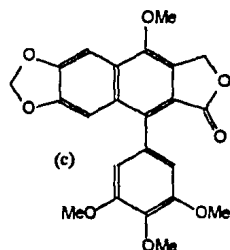
Conjunto isotópico observado			
m/e		Intensidad observada	Fórmula molecular
M ⁺	398.05	100%	C ₂₂ H ₂₂ O ₇
M+1	399.05	24%	
M+2	400.05	4%	



Conjunto isotópico observado				
m/e		Abundancias(%) obs. norm.*		Fórmula molecular
M ⁺	394.05	18	100	C ₂₂ H ₁₈ O ₇
M+1	395.05	4	24	
M+2	396.05	1	4	



Conjunto isotópico observado				
m/e		Abundancias(%) obs. norm.*		Fórmula molecular
M ⁺	424.05	12	100	C ₂₃ H ₂₀ O ₈
M+1	425.05	3	26	
M+2	426.05	1	5	



*.- Por ciento de la intensidad normalizada.

El constituyente mayoritario detectado mediante CG-EM correspondió a la fórmula molecular $C_{22}H_{22}O_7$ y, por lo tanto, se propuso la estructura de la desoxipodofilotoxina (figura 8a), o alguno de sus isómeros naturales. La presencia de este lignano citotóxico explicaría la marcada actividad larvicida demostrada por la mezcla HV-IV-M3.

La normalización de los dos conjuntos isotópicos adicionales observados en el espectro de masas permitió proponer la presencia de los lignanos deshidrodesoxipodofilotoxina y de un isómero del éter metílico de la deshidropodofilotoxina (figuras 8b y 8c, respectivamente).

La resolución total de la mezcla M3 se logró con el sistema de elución constituido por los disolventes hexano- $CHCl_3$ - Me_2CO (3.3:6.0:0.7), el cual permitió la mejor resolución cromatográfica. Mediante este procedimiento se obtuvieron cinco bandas activas a la luz ultravioleta con valores de R_f igual a 0.44, 0.52, 0.56, 0.61 y 0.64, siendo a su vez la banda de polaridad intermedia 3D ($R_f = 0.61$) una mezcla de dos constituyentes. Los lignanos aislados de estas bandas fueron designados con las siguientes claves: HV-IV-3A ($R_f = 0.44$, β -apopicropodofilina), HV-IV-3B ($R_f = 0.52$, isodesoxipodofilotoxina), HV-IV-3C ($R_f = 0.56$, desoxipicropodofilina), HV-IV-3D₁ ($R_f = 0.61$, 5-metoxideshidropodofilotoxina), HV-IV-3D₂ ($R_f = 0.61$, desoxideshidropodofilotoxina), y HV-IV-3E ($R_f = 0.64$, éter metílico de la deshidro- β -peltantina). El Cuadro 8 incluye el rendimiento de los metabolitos citotóxicos aislados de la hierba martina y resume los resultados del fraccionamiento biodirigido mediante la toxicidad para *Artemia salina*. Este cuadro también incluye la evaluación preliminar del potencial citotóxico en la cual se utilizaron los cultivos celulares de las líneas cancerosas P-388 (leucemia de múridos) y KB (carcinoma nasofaríngeo humano). Estos resultados demuestran que el rendimiento total de los lignanos aislados de esta planta medicinal contribuye al efecto citotóxico total evaluado en el extracto original.

Cuadro 8.- Rendimiento de cada uno de los lignanos aislados de *Hyptis verticillata* y evaluación preliminar de su potencial citotóxico.

Muestra	LC ₅₀ (ppm) ^a	ED ₅₀ P-388 ^b	(µg/ml) KB ^c
Extracto clorofórmico	13.4	0.3	-
Fracción HV-IV	7.9	0.1	-
Arinaftalenos			
HV-IV-1 (0.09) ^d	255	>5	5.0
HV-IV-3D ₁ (0.0059)	>500	4.0	6.0
HV-IV-3D ₂ (0.003)	>500	>5	11.4
HV-IV-3E (0.0083)	434.7	1.8	2.2
Aritetrahidronaftalenos			
HV-IV-II (0.0135)	0.2	0.005	0.1
HV-IV-3A (0.0112)	0.2	0.002	0.05
HV-IV-3B (0.0197)	>500	>20	6.7
HV-IV-3C (0.0314)	141.5	0.1	0.1
Dibencilbutirolactona			
HV-IV-4A (0.0101)	2.8	0.4	0.08
Podofilotoxina^e	0.2	0.003	0.08

a: Bioensayo de la *Artemia salina*.

b: Leucemia linfocítica de múridos.

c: Carcinoma nasofaríngeo.

d: Rendimiento (%) en peso seco.

e: Lignano antitumoral utilizado como referencia.

Nuevamente, la correlación existente entre el bioensayo de la toxicidad para *Artemia salina* y la evaluación citotóxica utilizando las líneas celulares P-388 y KB quedó demostrada al observar una correlación aproximada de 1×10^{-2} (Meyer *et al.*, 1982; Anderson *et al.*, 1991) entre los valores de LC₅₀ (*Artemia salina*) y ED₅₀ (líneas celulares) obtenidos para los nueve lignanos. Por lo tanto, la actividad citotóxica observada para el extracto clorofórmico de *Hyptis verticillata* se atribuyó, de manera

particular, a la presencia de los lignanos 4'-desmetildesoxipodofilotoxina (HV-IV-II), β -apopropodofilina (HV-IV-3A) y (-)-yateína (HV-IV-4A). Sin embargo, la toxicidad total del extracto orgánico de la hierba martina representa la sumatoria de los efectos individuales de cada uno de los constituyentes bioactivos aislados.

5.1.1.-Evaluación Secundaria de la Actividad Citotóxica y Antimitótica.

El potencial citotóxico de los constituyentes bioactivos de *Hyptis verticillata* se evaluó utilizando los siguientes cultivos celulares derivados de tumores humanos: carcinoma nasofaríngeo (KB), fibrosarcoma (HT), carcinoma epidermoide (A-431), glioblastoma (U 373) y células cancerosas de pecho (BC-1; ZR-75-1), de colon (Col 2), de próstata (LN Cap) y de pulmón (Lu-1).

Los resultados presentados en Cuadro 9 indican que la dibencilbutirolactona HV-IV-4A y los lignanos ariltetrahidronaftalenos HV-IV-II, HV-IV-3A, HV-IV-3B y HV-IV-3C, desarrollaron una actividad citotóxica no específica ($ED_{50} < 10^{-2}$ $\mu\text{g/ml}$) comparable a la observada para la podofilotoxina (Cordell *et al.*, 1991). La magnitud de la respuesta generada por los lignanos HV-IV-II y HV-IV-3A es similar entre ellos y, aproximadamente, de 10 a 100 veces más intensa en comparación con la respuesta observada para los lignanos iso y picroisoméricos (HV-IV-3B y HV-IV-3C). Por su parte, los constituyentes con núcleo estructural de arinaftalenos demostraron una actividad citotóxica 100 a 1000 veces menor a la desarrollada por la podofilotoxina, agente antitumoral utilizado como un estándar de comparación. Los compuestos HV-IV-3D₂ y HV-IV-3E únicamente demostraron una actividad citotóxica marginal en las líneas celulares BC-1 (cáncer de pecho), KB (carcinoma nasofaríngeo) y KB VI (KB resistente a vinblastina); la actividad más intensa se observó en el cultivo celular de leucemia linfocítica de mûridos (P-388, $ED_{50} = 4.0$ y 1.8 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente). De manera adicional, se evaluó la actividad antimitótica (cuadro 10) para todos los metabolitos aislados mediante el ensayo ASK (Swanson *et al.*, 1988). La dosis necesaria para efectuar el 100% de la

conversión de un huso celular a su forma astrocítica en un cultivo de glioma de rata (ASK) evaluada para los compuestos ariltetrahidronaftalenos es comparable (0.032 µg/ml) con la encontrada para la podofilotoxina. La (-)yateína (HV-IV-4A) mostró una menor actividad con un valor de 0.16 µg/ml. El rango de concentración observado para la actividad antimitótica en el sistema ASK para los lignanos arilnaftalénicos, HV-IV-3B y HV-IV-3C fue de 0.8-20.0 µg/ml.

5.1.2.-Evaluación del Potencial Anticándida.

Finalmente, los constituyentes HV-IV-I, HV-IV-3A y HV-IV-4A demostraron una poderosa actividad inhibitoria contra *Candida albicans* con una concentración entre 0.2-1.0 mg/ml, cuando ésta se evaluó mediante la técnica de dilución en caldo nutritivo (Pereda-Miranda *et al.*, 1993). Dicha actividad antimicótica explicaría, en parte, las propiedades antisépticas observadas para las infusiones preparadas a partir de la hierba martina (*Hypsis verticillata*) y, presumiblemente, también se deba a la actividad antimitótica descrita con anterioridad para la serie de lignanos derivados de la podofilotoxina (Ayres y Loike, 1990), la cual se confirmó para los compuestos citotóxicos aislados en la presente investigación.

Cuadro 9.- Evaluación del Potencial citotóxico de los lignanos aislados y purificados de *Hyptis verticillata*.

Muestra	Línea Celular Humana ^a ED ₅₀ (µg/ml)									
Ariinaftalenos	A-431	BC-1	Col-2	HT	KB	KB V1	LN CaP	Lu-1	U-373	ZR 75-1
HV-IV-I	> 20	15.2	8.9	9.7	5.0	13.0	11.7	10.6	> 20	> 20
HV-IV-3D ₁	6.2	7.6	12.8	15.6	6.0	8.7	11.6	11.7	16.3	> 20
HV-IV-3D ₂	6.2	> 20	16.7	> 20	11.4	> 20	11.6	18.8	> 20	> 20
HV-IV-3E	> 20	2.9	3.2	3.4	2.2	4.2	3.2	4.3	5.0	> 20
Ariitetrahidro-naftalenos										
HV-IV-II	0.08	0.01	0.03	0.01	0.01	0.02	0.02	0.03	0.1	2.1
HV-IV-3A	4.3	0.001	0.01	0.003	0.05	0.06	0.01	0.002	0.001	2.0
HV-IV-3B	6.2	17.5	8.9	10.7	6.7	11.5	12.0	15.9	2.9	13.2
HV-IV-3C	> 20	2.1	0.3	0.2	0.1	0.7	0.2	0.09	-	0.6
HV-IV-4A ^b	> 20	0.05	0.08	0.07	0.08	0.06	0.16	0.1	0.3	0.5
Podofilotoxina^c	0.03	0.03	0.005	0.003	0.08	0.06	0.04	0.008	0.004	0.4

a: Abreviaciones: A-431, carcinoma epidermoide; BC-1, cáncer de pecho; Col-2, cáncer de colon; HT, fibrosarcoma; KB, carcinoma nasofaríngeo; KB V1, KB resistente a vinblastina; LN CaP, cáncer de próstata hormona dependiente; Lu-1, cáncer pulmonar; U-373, glioblastoma; ZR 75-1, cáncer de pecho hormona-dependiente.

b: Diarilbutirolactona.

c: Agente antitumoral utilizado como estándar de comparación.

Cuadro 10.- Evaluación del potencial antimitótico (ensayo ASK) para los lignanos aislados de *Hyptis verticillata*.

Compuesto	Concentración ^a (µg/ml)							
	100	20.0	4.0	0.8	0.16	0.032	0.0064	0.00128
Podofilotoxina ^b	100%	100%	100%	100%	100%	100%	0%	NE ^d
HV-IV-1	100%	100%	0%	0%	0%	0%	0%	NE ^d
HV-IV-3D ₁	100%	100%	0%	0%	0%	0%	0%	NE ^d
HV-IV-3D ₂	100%	0%	0%	0%	NE	NE	NE	NE ^d
HV-IV-3E	100%	100%	100%	0%	0%	0%	0%	NE ^d
HV-IV-II	100%	100%	100%	100%	100%	100%	0%	NE ^d
HV-IV-3A	100%	100%	100%	100%	100%	100%	0%	NE ^d
HV-IV-3B	100%	100%	0%	0%	0%	0%	0%	NE ^d
HV-IV-3C	100%	100%	100%	100%	0%	0%	0%	NE ^d
HV-IV-4A	100%	100%	100%	100%	100%	0%	0%	NE ^d
Colchicina ^c	100%	100%	100%	70%	0%	0%	0%	0%
Vincristina ^c	100%	100%	100%	100%	100%	0%	0%	0%
Vinblastina ^c	100%	100%	100%	100%	100%	100%	0%	0%
Maytansina ^c	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	0%

a: Porcentaje de formación de astrocitos.

b: Lignano usado como un agente antimitótico estándar.

c: Fármaco usado como estándar de comparación.

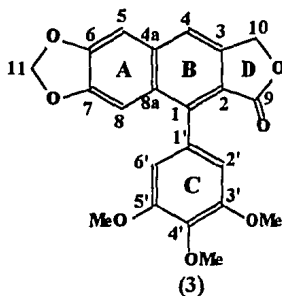
d: No evaluado.

5.2.-Caracterización de los compuestos mayoritarios

5.2.1.-Ariinaftalenos

5.2.1.1.-Características Espectroscópicas Generales.

El análisis espectroscópico de los lignanos purificados demostró la presencia de un núcleo estructural de lactona ariinaftalénica (3) común para los constituyentes HV-IV-I, HV-IV-3D₁, HV-IV-3D₂ y HV-IV-3E.



Las características espectroscópicas comunes para estos constituyentes se describen a continuación:

1.- Los espectros de uv revelaron la presencia de un núcleo de naftaleno al registrar las siguientes rangos de absorciones intensas: $\lambda_{\text{máx}}$, 251-268, 318-325 y 349-357 nm.

2.- Los espectros de ir presentaron absorciones asociadas con un grupo carbonilo de γ -lactona ($\nu_{\text{máx}} = 1775\text{cm}^{-1}$) y un grupo metilendioxi (945cm^{-1}).

3.- El análisis de los espectros obtenidos por RMN-¹H permitió confirmar la propuesta de núcleo estructural de arilnaftaleno debido a la ausencia de señales entre 5 y 2 ppm, las cuales corresponderían a los protones del anillo B en el homólogo saturado. Al mismo tiempo, se asignó la sustitución simétrica del anillo C, observándose las siguientes señales características:

a).- Un singlete que integró para dos protones aromáticos, desplazado entre 6.50-6.51 ppm, el cual se asignó a las posiciones C-6' y C-2'.

b).- La señal simple centrada en 3.82 ppm, la cual integró para 6 protones, correspondió a la presencia de dos grupos metoxilos en las posiciones C-3' y C-5'.

c).- Un singlete que integró para tres protones con un desplazamiento químico entre 3.91-3.96 ppm se asignó al grupo metoxilo de la posición C-4'.

d).- El metino de la posición C-8 del anillo de naftaleno aparece como un singlete que integró para un protón con un desplazamiento químico entre 6.98-7.26 ppm.

e).- Una señal simple que integró para dos protones con un desplazamiento químico en el intervalo de 5.36-5.56 ppm, el cual se asignó al metileno de la γ -lactona.

f).- La señal en singlete que integró para dos protones con un desplazamiento en el intervalo de 5.35-6.19 ppm se asignó al metilendioxi de las posiciones C-6 y C-7 del anillo de naftaleno.

5.2.1.2.- Caracterización del compuesto HV-IV-I (Deshidropodofilotoxina).

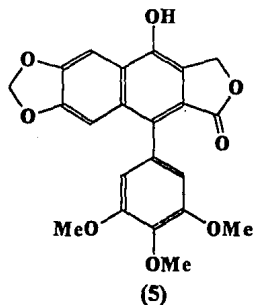
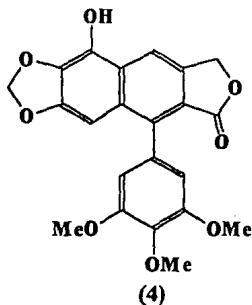
El constituyente de mayor polaridad ($R_f = 0.14$) presente en la fracción activa se aisló como un sólido ópticamente inactivo. Las señales particulares observadas en el espectro de RMN- ^1H para este compuesto son:

a).- Una señal en forma de un singlete desplazada a campo bajo (9.85 ppm), y que desapareció al equilibrar la solución con D_2O , se asignó a un grupo hidroxilo.

b).- Se observó un singlete que integró para un protón centrado en 7.67 ppm.

La intensidad observada en el espectro de masas para el ión molecular (m/e 410.15), el cual correspondió al pico base del espectro, verificó la naturaleza aromática del núcleo de arilnaftaleno para este compuesto. Por otra parte, los picos correspondientes a $M(-15)$ y $M(-15-28)$ evidenciaron la trisustitución del anillo C por grupos metoxilo.

Este análisis espectroscópico satisfacía la estructura de dos isómeros, el primero correspondiente a la deshidro- β -peltantina (4), y el segundo a la deshidropodofilotoxina (5). Los valores descritos en la literatura para el desplazamiento químico de los protones del núcleo naftalénico del éter metílico derivado de la deshidro- β -peltantina permitió diferenciar entre estas dos estructuras isoméricas (Klemm y Santhanam, 1968).



La señal para el protón en la posición C-4 aparece centrado en 8.17 ppm y, por lo tanto, la ausencia de un singlete en esta región sería diagnóstica de la sustitución en esta posición del núcleo de arilnaftaleno (figura 9). Al considerar estas diferencias espectroscópicas, se procedió a realizar la obtención del éter metílico derivado del compuesto HV-IV-I mediante la alquilación con diazometano. El espectro de RMN- ^1H del éter metílico derivado no presentó ninguna señal por debajo de 8 ppm y, por lo tanto, permitió proponer la estructura para el producto natural como la deshidropodofiloxina (5).

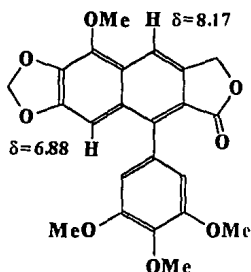


Figura 9.- Valores de los desplazamientos químicos descritos para los protones aromáticos de las posiciones 4 y 8 del núcleo de naftaleno del éter metílico de la deshidro- β -peltantina.

5.2.1.3.- Caracterización del compuesto HV-IV-3E (Eter metílico de la deshidro- β -peltantina).

El constituyente de menor polaridad ($R_f = 0.64$) de la mezcla HV-IV-M3 se aisló como un sólido cristalino de color amarillo pálido. Su fórmula molecular se calculó a partir del conjunto isotópico del ión molecular de m/e 424 como $\text{C}_{23}\text{H}_{20}\text{O}_8$. La diferencia de 14 unidades de masa atómica con el ión molecular del compuesto HV-IV-I (5) permitió

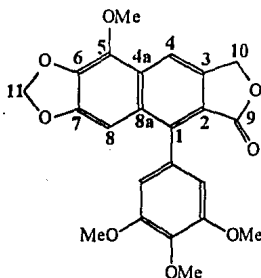
proponer que el grupo hidroxilo se encontraba sustituido por un grupo metoxilo en el metabolito HV-IV-3E. El análisis del espectro obtenido mediante la RMN- ^1H para este compuesto confirmó esta propuesta estructural al observar las siguientes señales características:

a).- Un singlete que integró para tres protones desplazado a 4.22 ppm, el cual correspondió a un grupo metoxilo adicional asignado a la posición C-5 del núcleo de naftaleno.

b).- Una señal en singlete que integró para un protón aromático del núcleo de naftaleno, la cual presentó el desplazamiento por debajo de 8 ppm descrito en la literatura para el protón H-4 del éter metílico de la deshidro- β -peltantina ($\delta = 8.16$).

c).- El desplazamiento del protón H-8 en forma de un singlete a 6.86 ppm.

Las asignaciones de la RMN- ^{13}C (Espectro 17) se realizaron mediante experimentos de exaltación nuclear selectiva por transferencia de polaridad "SINEPT" (Cordell y Kinghom, 1991). La figura 10 presenta los experimentos SINEPT realizados para la asignación de la RMN- ^{13}C del éter metílico de la deshidro- β -peltantina (6).



(6)

Este análisis espectroscópico permitió realizar las siguientes observaciones características:

a).- Se observó una exaltación de la señal del carbono C-7 (δ 149.58), al irradiar la señal del protón H-8 (δ 6.86), observando también una transferencia de polarización a tres ligaduras en los carbonos C-1 (δ 139.96), C-6 (δ 136.02) y C-4a (δ 128.92); a más de tres ligaduras en los carbonos C-2',6' (δ 107.19) [figura 10A].

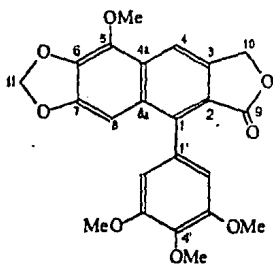
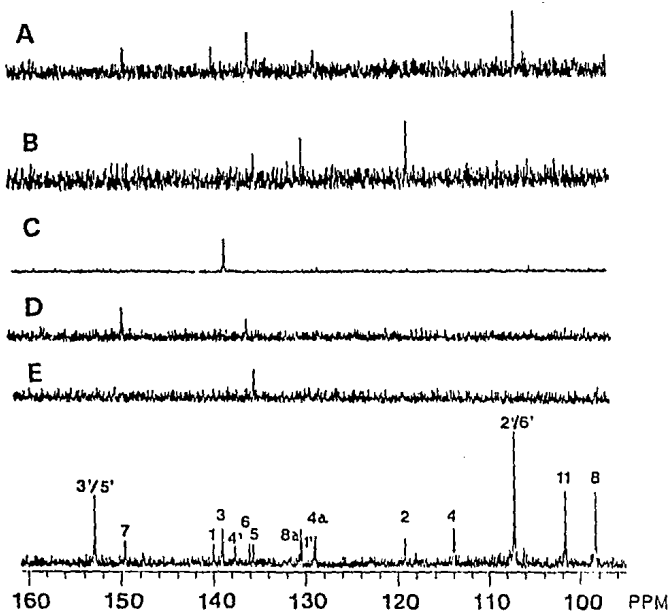
b).- Cuando se irradió la señal en δ 8.16 correspondiente a H-4, la exaltación en el espectro de la RMN- ^{13}C se observó para C-5 (δ 135.62), C-8a (δ 130.47), C-4a (δ 128.92) y C-2 (δ 119.16) [Figura 10B].

c).- La irradiación del metileno de la lactona (δ 5.39) provocó la mayor exaltación en el carbono C-3 (δ 138.99) [Figura 10C].

d).- Al irradiar los protones del grupo metilendioxi (δ 6.06), las señales exaltadas correspondieron a los carbonos C-6 (δ 136.02) y C-7 (δ 149.58) [Figura 10D].

e).- Finalmente cuando se irradió la señal en 4.22 ppm correspondiente al grupo metoxilo, se observó la exaltación de la señal para el carbono C-5 (δ 135.62) y así se confirmó la propuesta para la posición del grupo metoxilo en el núcleo de naftaleno de manera inequívoca [Figura 10E].

Figura 10.- Experimentos SINEPT.



5.2.1.4.- Caracterización del compuesto HV-IV-3D₁ (5-Metoxideshidropodofilotoxina).

Este constituyente se aisló como un sólido amarillo pálido cuyo espectro de masas obtenido permitió calcular su fórmula molecular como C₂₃H₂₀O₉. Las absorciones máximas registradas para el espectro de uv a 268, 325 y 357 indicaron claramente la presencia del núcleo de naftaleno. El espectro de ir presentó absorciones correspondientes al grupo hidroxilo y a un grupo carbonilo a 3400 y 1763 cm⁻¹, respectivamente. Concordante a la presencia de una función fenólica, los máximos observados en uv sufrieron un corrimiento batocrómico con la adición de una solución alcalina.

1.- La RMN-¹H (Espectro 13) para este compuesto registró las siguientes señales características:

a).- Una señal en forma de singlete centrada en 9.58 ppm la cual desaparece al agregar D₂O, y cuya integración correspondió a un protón. Esta señal se asignó a un grupo hidroxilo en el núcleo de naftaleno.

b).- Un singlete que integró para tres protones, centrado en 4.29 ppm, el cual correspondió a un grupo metoxilo en el núcleo de naftaleno.

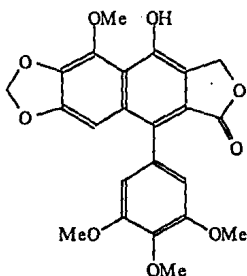
c).- La presencia de sólo un singlete aromático para el núcleo de naftaleno desplazado a 6.86 ppm, el cual se asignó al protón H-8.

d).- El resto de las señales fueron semejantes a las descritas para la deshidropodofilotoxina (HV-IV-I) y el éter metílico de la deshidro-β-peltantina (HV-IV-3E).

La confirmación de la posición propuesta para el grupo metoxilo en la posición C-5 y, por lo tanto, del grupo hidroxilo en la posición C-4, se realizó mediante

experimentos de exaltación nuclear de Overhauser en la RMN- ^1H (Noggle y Schirmer, 1971). Como se esperaba, no se observó ninguna intensificación en el área de integración para los protones del metileno del anillo de la lactona (δ 5.34) al irradiar la señal perteneciente al grupo metoxilo en el núcleo naftalénico. De manera adicional, se observó que el protón H-8 presentó un efecto nuclear de Overhauser recíproco con la señal en δ 6.48, la cual corresponde a los protones equivalentes H-2' y H-6' del anillo C.

Los valores para el desplazamiento químico en el espectro de RMN- ^{13}C (Espectro 14) obtenidos inequívocamente para el compuesto HV-IV-3E (6) se utilizaron, junto con los efectos calculados que provoca la introducción de un grupo hidroxilo en C-4 en el desplazamiento químico de los carbonos en el núcleo de naftaleno (Abdullaev *et al.*, 1987), para asignar las resonancias del compuesto HV-IV-3D₁ (cuadro 11). De acuerdo a estas evidencias espectroscópicas se concluyó que la estructura de este producto bioactivo correspondía a la del lignano 5-metoxideshidropodofilotoxina (7), el cual representa un nuevo lignano de origen natural.



(7)

Cuadro 11.- Desplazamientos químico calculados y observados para los núcleos de ^{13}C en el compuesto HV-IV-3D₁.

Núcleo	$\delta \text{ C (HV-IV-3E)}^{\text{a}}$	Efecto aditivo del OH ^b	$\delta \text{ C calculado}$	$\delta \text{ C observado}^{\text{c}}$
(C-1)	139.96	- 8.7	131.26	132.03
(C-2)	119.16	+ 0.8	119.96	120.41
(C-3)	138.99	- 17.9	121.09	122.98
(C-4)	113.95	+ 25.2	139.15	147.25
(C-4a)	128.92	- 9.5	119.42	116.00
(C-5)	135.62	- 5.8	129.82	130.28
(C-6)	136.02	- 1.0	135.02	136.45
(C-7)	149.58	+ 0.0	149.58	149.10
(C-8)	98.33	+ 0.8	97.53	99.73
(C-8a)	130.47	+ 1.8	132.27	132.75

a.- 75.4 MHz, CDCl_3 ($\delta \text{ TMS} = 0$). Asignaciones confirmadas mediante SINEPT.

b.- Ref. Abdullaey *et al.*, 1987.

c.- 75.4 MHz, CDCl_3 ($\delta \text{ TMS} = 0$).

5.2.1.5.-Caracterización del compuesto HV-IV-3D₂ (desoxideshidropodofilotoxina).

La fórmula molecular para este compuesto aislado como un sólido blanco ópticamente activo, se calculó a partir de su espectro de masas como C₂₂H₁₈O₇ (M⁺, m/e 396.05). El análisis del espectro de RMN-¹H obtenido para este compuesto permitió realizar las siguientes observaciones particulares:

a).- La ausencia de la señal correspondiente al grupo metoxilo del núcleo de naftaleno observada en los constituyentes HV-IV-3D₁ y HV-IV-3E.

b).- La presencia de un singlete aromático desplazado a 7.69 ppm el cual corresponde al protón de la posición C-4.

c).- El desplazamiento de la señal correspondiente al protón H-8 se observó centrado en 7.10 ppm.

Por último, los desplazamientos químicos en el espectro de RMN-¹³C para los carbonos C-4 (119.56 ppm) y C-5 (103.65), además de su multiplicidad como metinos, en lugar de carbonos cuaternarios, permitieron identificar a este constituyente bioactivo como el lignano deshidrodesoxipodofilotoxina, cuyas constantes físicas y datos espectroscópicos correspondieron con los descritos en la literatura (Ito *et al.*, 1992).

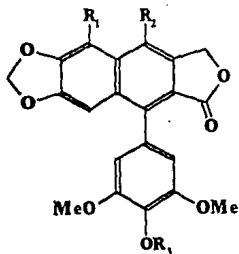
El cuadro 12 resume las resonancias para los núcleos de hidrógeno (RMN-¹H) de los lignanos con núcleo de arilnaftaleno aislados de *Hyptis verticillata*. El cuadro 13 presenta los valores de desplazamiento para los núcleos de carbono (RMN-¹³C).

Cuadro 12.-Valores para los desplazamientos químicos (δ) obtenidos en la RMN- $^1\text{H}^a$ de los lignanos con núcleo arilnaftaleno aislados de *Hypis verticillata*.

Protones (multiplicidad)	HV-IV-1 ^b (1)	HV-IV-3E (2)	HV-IV-3D ₁ (3)	HV-IV-3D ₂ (4)
H-4 (s)	-	8.16	-	7.69
H-5 (s)	7.67	7.28	-	7.21
H-8 (s)	6.98	6.86	6.86	7.10
H-11 (s)	6.10	6.06	6.10	6.12
H-10 (s)	5.18	5.39	5.35	5.40
H-2',6' (s)	6.54	6.53	6.49	6.55
OMe-4' (s)	3.92	3.96	3.96	3.99
OMe-3',5' (s)	3.82	3.83	3.82	3.84
OMe-5 (s)	-	4.22	4.29	-
OH-4 (s)	9.85	-	9.58	-

a: 300 MHz, CDCl_3 , TMS.

b: 300 MHz, C_6D_6 , TMS.



1: $R_1 = \text{H}$; $R_2 = \text{OH}$; $R_3 = \text{OMe}$.

2: $R_1, R_3 = \text{OMe}$; $R_2 = \text{H}$.

3: $R_1, R_3 = \text{OMe}$; $R_2 = \text{OH}$.

4: $R_1, R_2 = \text{H}$; $R_3 = \text{OMe}$.

Cuadro 13.- Valores para los desplazamientos químicos (δ) obtenido en la RMN- $^{13}\text{C}^a$ de los lignanos con núcleo de arilnaftaleno aislados de *Hyptis verticillata*.

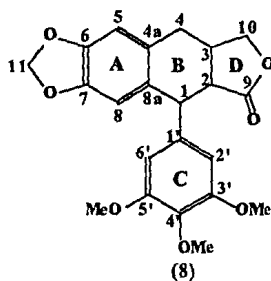
Carbono	HV-IV-1	HV-IV-3E	HV-IV-3D ₁	HV-IV-3D ₂
C-1	130.75	139.96	132.03	139.03
C-2	121.29	119.16	120.41	140.19
C-3	118.26	138.99	122.98	118.30
C-4	144.89	113.95	147.25	119.56
C-4a	124.41	128.92	116.00	134.22
C-5	97.78	135.62	130.28	103.65
C-6	148.02	136.02	136.45	148.58
C-7	147.65	149.58	149.10	148.37
C-8	102.85	98.33	99.73	102.26
C-8a	130.23	130.47	132.75	129.19
C-9	169.72	169.65	169.65	169.05
C-10	66.09	68.26	66.65	67.93
C-11	100.80	101.64	102.01	101.01
C-1'	130.75	130.37	130.28	130.38
C-2',6'	106.85	107.19	107.20	107.37
C-3',5'	151.73	152.82	152.83	152.50
C-4'	136.24	137.59	136.30	137.00
OMe-3',5'	55.20	56.11	56.10	56.00
OMe-4'	59.83	60.13	60.00	61.10
OMe-5	-	60.90	61.15	-

a: 75.4 MHz, CDCl₃, TMS.

5.2.2- Ariltetrahidronaftalenos.

5.2.2.1.- Características Espectroscópicas Generales.

La segunda serie de compuestos bioactivos aislados de *Hypis verticillata* fueron los lignanos con la clave asignada HV-IV-II, HV-IC-3A, HV-IV-3B, HV-IV-3C y HV-IV-4A, cuyo núcleo estructural común es el de ariltetrahidronaftaleno (8). A continuación se describen sus principales características espectroscópicas:



1.- Los espectros de ultravioleta revelan la presencia de anillos aromáticos al observarse absorciones en los rangos de $\lambda_{\text{máx.}}$ 226-251, 272-301 y 297-317nm.

2.- Los espectros de infrarojo presentan absorciones para un grupo carbonilo de δ -lactona (1750 cm^{-1}) y un grupo metilendioxi (990 cm^{-1}).

3.- El análisis de RMN- ^1H permitió asignar el núcleo estructural de ciclo lignano derivado del ariltetrahidronaftaleno observándose las siguientes señales características generales para estos compuestos:

a).-Un doblete cercano a 4.5 ppm asignado al protón H-1, cuyo desplazamiento químico indicó su carácter doblemente bencílico.

b).-Un singlete aromático para cada uno de los protones de las posiciones C-5 y C-8, centrados aproximadamente en 6.55 y 6.71 ppm, respectivamente.

c).- Dos dobles para los protones del grupo metilendioxi de las posiciones C-6 y C-7, desplazado en 5.5-5.9 ppm y que establecían un sistema AB.

d).- Un singlete aromático que integró para dos protones asignado a las posiciones C-2' y C-6' con un desplazamiento químico aproximado en 6.3-6.6 ppm.

e).- Un singlete centrado en 3.78 ppm que integró para seis protones correspondiente a los dos grupos metoxilo de las posiciones C-3' y C-5', confirmando la sustitución simétrica del anillo C.

f).- Un singlete centrado en 3.8 ppm que integró para tres protones y que se asignó al grupo metoxilo de la posición C-4'.

5.2.2.2.- Caracterización del compuesto HV-IV-II (4'-desmetildesoxipodo-filotoxina).

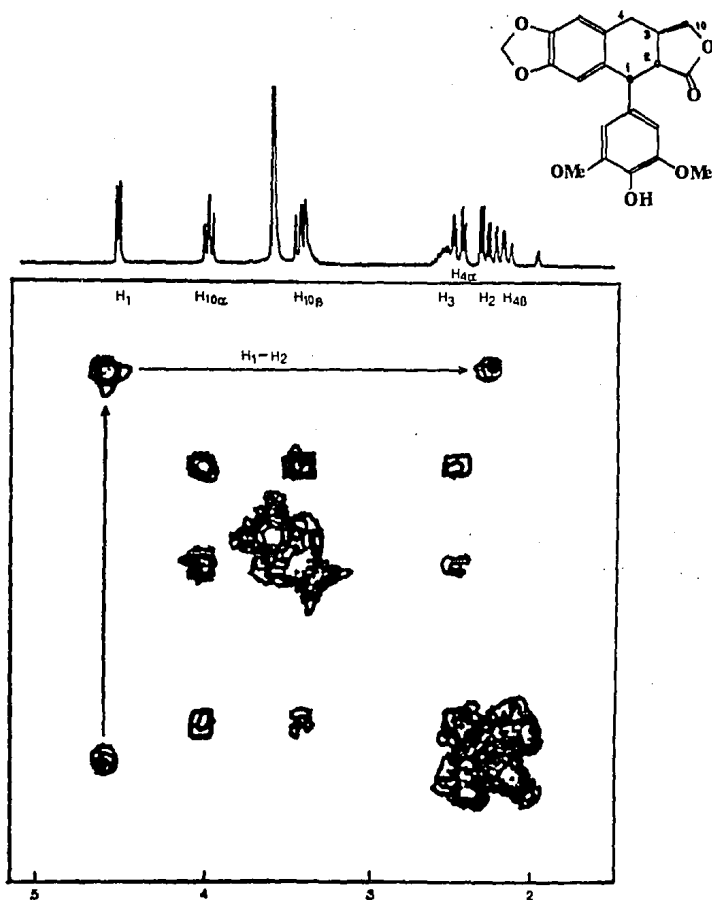
El segundo compuesto (Rf 0.42) aislado del crudo precipitado de la fracción bioactiva demostró el mayor efecto larvicida con un valor de $LC_{50} = 0.02 \mu\text{g/ml}$ y presentó las siguientes señales en el espectro de la RMN- ^1H (Espectro 3):

a).- El singlete que integró para un protón con un desplazamiento químico de 8.09 ppm, el cual se intercambió con D_2O se asignó a un grupo hidroxilo en la posición C-4' del núcleo estructural de ariltetrahidronaftaleno.

b).-El análisis de correlación bidimensional homonuclear (2D-COSY) permitió la localización del grupo carbonilo en posición vecinal al carbono C-2, al observar el

desplazamiento químico y la multiplicidad de su protón geminal como un doblete de dobletes centrado en 2.32 ppm. Al mismo tiempo, las constantes de acoplamiento observadas entre los protones H-1 y H-2 ($J_{1,2} = 4.8$ Hz) y entre los núcleos H-2 y H-3 ($J_{2,3} = 13.77$ Hz) confirmaron la esteoquímica *trans* para la fusión de la lactona (figura 11).

Figura 11.- Espectro de correlación bidimensional homonuclear generada por el constituyente HV-IV-II, la 4'-desmetil-desoxipodofilotoxina.



La localización de las señales para los protones restantes de la porción saturada de este ciclogignano se realizó mediante el análisis de los cuadros de conectividad observados en el espectro de RMN- ^1H bidimensional (figura 11). Los resultados de este análisis son los siguientes:

c).- El doblete de dobletes centrado en 2.21 ppm se asignó al protón H-4 β ($J_{4\beta-4\alpha} = 15.93$ Hz).

d).- El doblete de dobletes centrado en 2.48 ppm correspondiente al protón H-4 α ($J_{4\alpha-3} = 5.3$ Hz).

e).- El multiplete que integró para un protón centrado en 2.56 ppm se asignó al protón H-3 ($J_{3-2} = 13.17$ Hz; $J_{3-4\beta} = 5.3$ Hz; $J_{3-10\beta} = 7.35$ Hz).

f).- Un doblete de dobletes centrado en 3.97 ppm correspondió al protón H-10 α del anillo de la lactona.

g).- Por último, un doblete de dobletes centrado en 3.43 ppm se asignó al protón H-10 β de la lactona.

Estas constantes espectroscópicas permitieron proponer la estructura de este compuesto bioactivo como la 4'-desmetildesoxipodofilotoxina, cuyas propiedades físicas correspondieron perfectamente con las descritas en la literatura para el agente citotóxico aislado de *Polygala macradenia* (Hoffman *et al.*, 1982).

5.2.2.3.- Caracterización del compuesto HV-IV-3A (β -apopropodofilina).

El compuesto de mayor polaridad aislado de la mezcla HV-IV-M3 y principal constituyente responsable de la actividad biológica demostrada por esta mezcla de lignanos presentó las siguientes señales espectroscópicas y espectrométricas:

1.-Su fórmula molecular de $C_{22}H_{20}O_7$ se calculó mediante la espectroscopía de masas a partir de su ión molecular (M^+ , m/e 396.20), el cual representó el pico base del espectro (figura 12). La diferencia de dos unidades de masa atómica con respecto a la desoxipodofilotoxina ($C_{22}H_{22}O_7$) indicó que se podía tratar de cualquiera de las tres apopropodofilinas que se obtienen por deshidratación de la podofilotoxina.

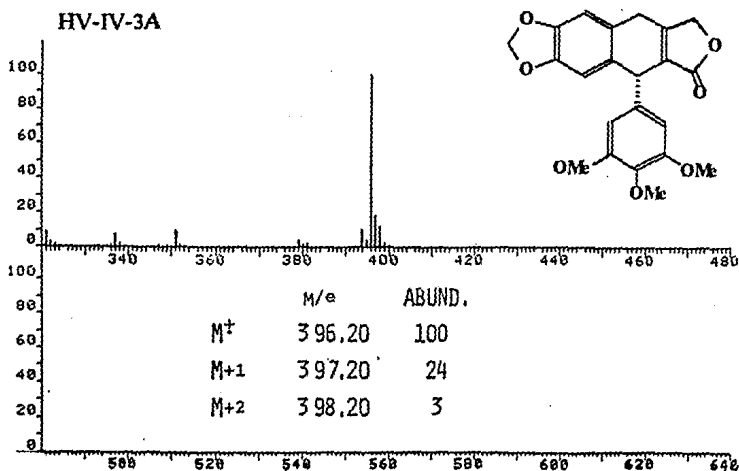


Figura 12.- Espectro de masas generado por la β -apopropodofilina aislada de la fracción activa de *Hyptis verticillata*.

2.- El espectro de infrarojo generado por este constituyente permitió proponer la estructura de la β -apocicropodofilina a través de la absorción para el carbonilo de la butenólida en 1754 cm^{-1} (Schrecker y Hartwell, 1958). Esta proposición se confirmó mediante el análisis del espectro obtenido por RMN- ^1H (Espectro 7) de la siguiente manera:

a).- El desplazamiento paramagnético observado para todos los protones de los anillos B y D, apoyó esta propuesta estructural. Por otra parte, la ausencia de los protones H-2 y H-3 produjeron una simplificación en la multiplicidad de los protones H-1, H-4 y H-10 en comparación con las señales observadas en el espectro del compuesto HV-IV-II.

b).- El protón H-1 presentó un desplazamiento a campos bajos entre 4.87 y 4.79 ppm, debido a la presencia de la doble ligadura de las posiciones C-2 y C-3, además de sus carácter doblemente bencilico.

c).- De manera semejante, los protones de la posición C-4 cuya señal se observa como un doblete de dobletes presentaron un desplazamiento químico de 3.84 ppm (H-4 α) y de 3.69 ppm (H-4 β).

d).- Las señales que se observaron como un doblete de dobletes, correspondientes a los protones de la posición C-10, mostraron un desplazamiento entre 4.87 y 4.79 ppm.

e).- Los protones del grupo metilendioxi de las posiciones C-6 y C-7, se observaron como una señal simple ancha con un desplazamiento químico de 5.95 ppm.

f).- La presencia de una señal como singulete correspondiente al grupo metoxilo de la posición C-4' centrada en 3.79 ppm, la cual sustituye al grupo hidroxilo observado en la estructura de la 4'-desmetil-desoxipodofiltoxina.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA.

3.- El efecto cotton positivo a 287 nm y negativo a 274 nm estableció la configuración absoluta para el centro quiral C-1 como R (Ayres y Loike, 1990).

4.- En el espectro de RMN-¹³C (Espectro 8) obtenido para el compuesto HV-IV-3A también se observó un desplazamiento paramagnético de las señales C-1, C-2, C-3 y C-9 al compararse con las señales de la 4'-desmetildesoxipodofilotoxina:

a).- La señal para el núcleo C-1 se observa centrada en 42.71 ppm, en tanto que para la 4'-desmetildesoxipodofilotoxina se observa en 32.4 ppm.

b).- Las señales correspondientes a los carbonos C-2 y C-3 se observaron en 123.74 ppm y 157.3 ppm. Para el constituyente HV-IV-II se presentan centrados en 46.88 ppm y 40.00 ppm, respectivamente.

c).- El desplazamiento para la señal del carbonilo en la posición C-9, se encuentra en 166.10 ppm, de manera semejante al valor observado para los lignanos con un núcleo estructural de arilnaftaleno.

El conjunto de las propiedades físicas y espectroscópicas para este constituyente bioactivo correspondieron con los datos descritos en la literatura para la β-apopicropodofilina (Gensler *et al.*, 1971).

5.2.2.4.- Caracterización del compuesto HV-IV-3B (Isodesoxipodofilotoxina).

Este constituyente se aisló como un sólido cristalino blanco. La espectrometría de masas permitió calcular su fórmula molecular como C₂₂H₂₂O₇, observándose una abundancia relativa del 100% para el ión molecular de m/e 398. Esto sugería que podía tratarse del lignano desoxipodofilotoxina. Sin embargo, la ausencia de actividad biológica

demostrada por este compuesto (BST, $LC_{50} > 500$ ppm; P-388, $ED_{50} > 20$ $\mu\text{g/ml}$) indicó que se trataba de uno de los posibles diastereoisómeros inactivos de dicho producto natural.

Las características espectroscópicas del compuesto HV-IV-3B fueron similares a las observadas para el lignano HV-IV-II (4'-desmetildeoxipodofilotoxina). El espectro de RMN- ^1H presentó una señal adicional que integró para tres protones y que se asignó a un grupo metoxilo centrado en 3.79 ppm, correspondiente al sustituyente en la posición C-4' del núcleo de ariltetrahidronaftaleno. El efecto cotton positivo observado en 287 nm seguido de un efecto cotton negativo en 271 nm establecieron la configuración absoluta de R para el núcleo quiral C-1.

El empleo de la RMN- ^1H bidimensional (C_6D_6) permitió realizar la asignación de los desplazamientos químicos observados para cada uno de los protones de la porción saturada de este lignano (figura 13):

a).- La interacción *trans* diaxial entre el protón H-2 que se observa como un doblete de dobletes centrado en 2.64 ppm y el protón H-1 en 3.99 como una señal doble con un valor de constante de acoplamiento $J = 11.4$ Hz, permitió proponer la orientación β para el grupo carbonilo que sustituye al núcleo C-2. Para el compuesto HV-IV-II en esta posición la orientación es α .

b).- La interacción *trans* diaxial entre el protón H-2 y el protón H-3, el cual se observa como un multiplete centrado en 2.18 ppm con una constante de acoplamiento $J = 13.4$ Hz, permitió establecer la orientación α para el metileno de la lactona que sustituye al núcleo C-3, en contraste con la orientación β de la 4'-desmetildesoxipodofilotoxina (figura 14).

c).- El desplazamiento para cada uno de los dobletes de dobletes, correspondientes a los protones del grupo metilénico en C-4, se observó centrado en δ 2.53 (H-4 α) y δ 2.38 (H-4 β) con un valor de constante de acoplamiento de $J_{4\alpha-4\beta} = 13.4$ Hz.

d).- Los protones de las posiciones C-5 y C-8 presentaron el mismo desplazamiento químico (δ 6.57).

e).- Los protones del metilendioxi de las posiciones C-6 y C-7 generaron una señal doble centrada a 5.58 ppm.

Este análisis espectroscópico permitió identificar al constituyente HV-IV-3B aislado de la hierba martina como el lignano isodesoxipodofilotoxina (Robin *et al.*, 1982).

Figura 13.- Espectroscopía bidimensional homonuclear correspondiente al lignano
Isodesoxipodofilotoxina aislado de *Hypis verticillata*.

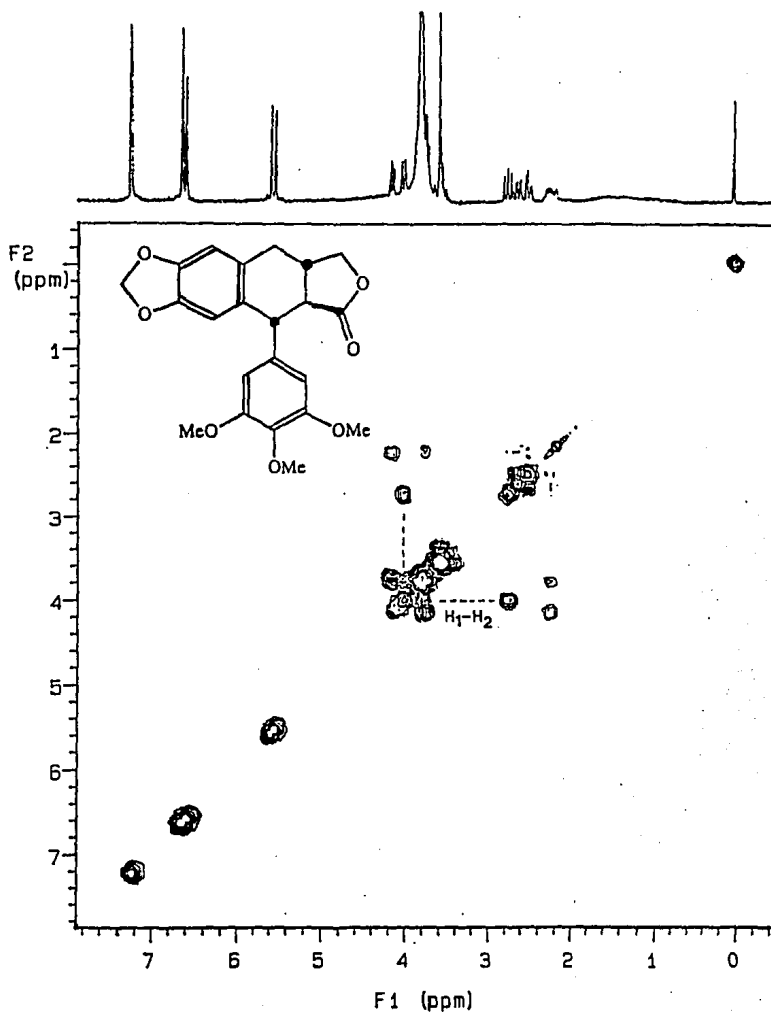
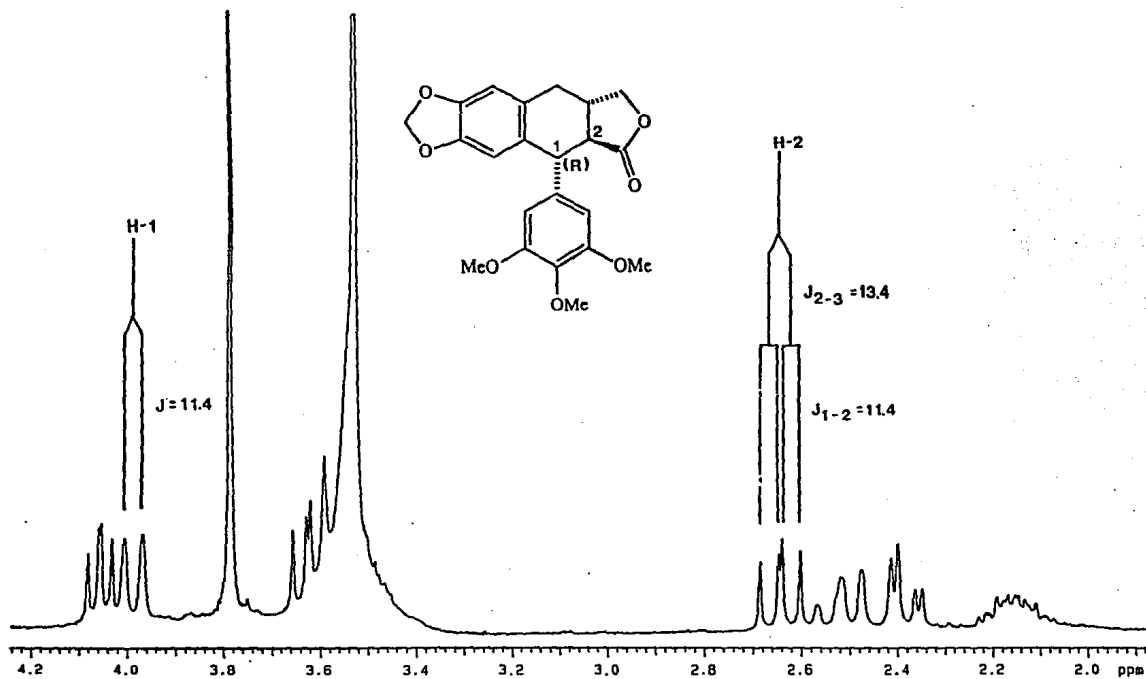


Figura 14.- Constantes de acoplamiento calculadas para las interacciones entre los protones H-1, H-2 y H-3 del anillo tetrahidronaftalénico del compuesto HV-IV-3B.



5.2.2.5.- Caracterización del compuesto HV-IV-3C (Desoxipodofilina).

La purificación de la tercera banda de la mezcla bioactiva HV-IV-M3 permitió el aislamiento de un compuesto cuya fórmula molecular de $C_{22}H_{22}O_7$ se calculó a partir de su espectro de masas. La actividad larvicida marginal desarrollada por este compuesto indicó nuevamente la presencia de otro diastereoisómero de la desoxipodofilotoxina. La resonancia magnética nuclear también presentó un espectro similar a los dos constituyentes HV-IV-II (4'-desmetildesoxipodofilotoxina) y HV-IV-3B (Isodesoxipodofilotoxina), previamente discutidos.

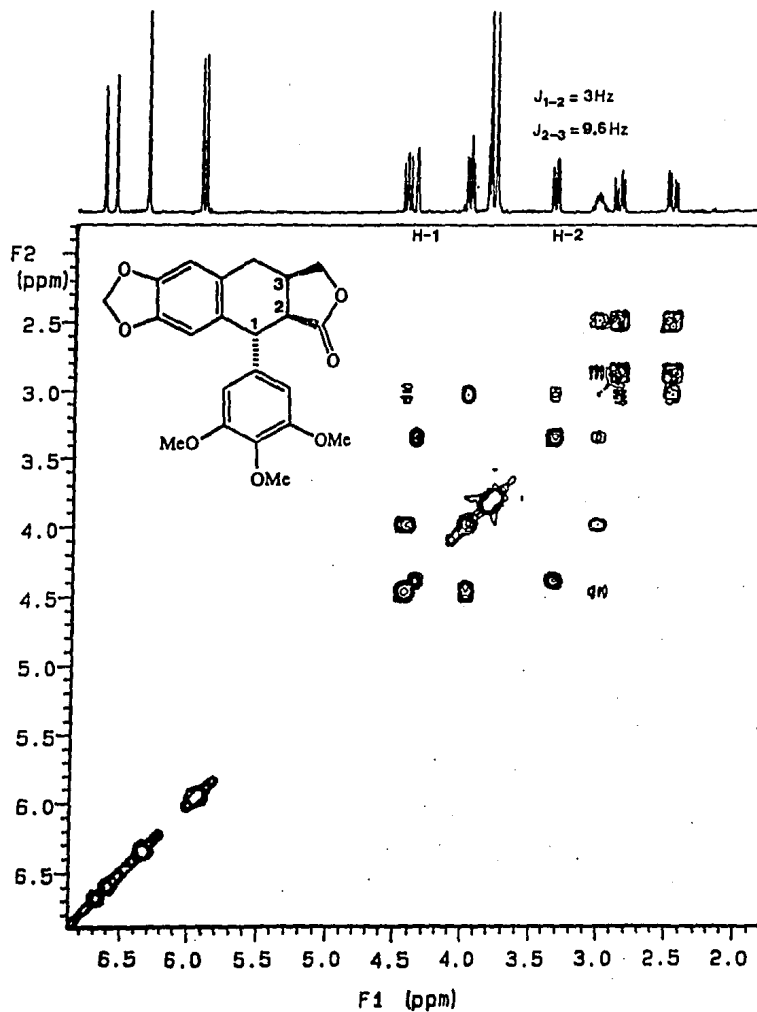
Una vez más, el análisis de la resonancia magnética nuclear bidimensional homonuclear permitió establecer la posición vecinal del carbonilo de la lactona al centro C-2 del núcleo de tetrahidronaftaleno. Las constantes de acoplamiento entre los protones H-1, H-2 y H-3 permitieron establecer la estereoquímica cis- β para la lactona (figura 15):

a).- El valor obtenido para la interacción entre los protones H-1 y H-2 fue de $J = 3$ Hz.

b).- El valor obtenido de la constante de acoplamiento observada entre los protones H-2 y H-3 fue de $J = 9.6$ Hz.

Este análisis espectroscópico permitió proponer la estructura del compuesto HV-IV-3C como la desoxipodofilina (Gensler, 1972).

Figura 15.- Espectro de RMN-¹H (COSY) generado por el constituyente HV-IV-3C.



5.2.6.- Caracterización del compuesto HV-IV-4A [(-)yateína].

Este constituyente se aisló durante el fraccionamiento y la purificación de las aguas madres de la fracción activa HV-IV. Su fórmula molecular se calculó mediante la normalización del ión molecular observado en el espectro de masas y correspondió a $C_{22}H_{24}O_7$. Esta fórmula permitió calcular once grados de insaturación y, por lo tanto, sugería la ruptura del enlace entre el carbono C-8a y el carbono C-1 del núcleo de tetrahidronaftaleno. Esta propuesta estructural se fundamentó al obtener en el espectro de masas los picos correspondientes a los cationes tropilios resultantes de las rupturas benéficas del anillo A y del anillo B, las cuales generaron los fragmentos m/e 135 y 181. Este último como el pico base del espectro de masas (figura 16).

El análisis de la RMN- ^{13}C confirmó la propuesta estructural de diarilbutirolactona para este lignano mediante la presencia de un metino aromático adicional a los tres que normalmente están presentes en los espectros generados por los tetrahidronaftalenos y cuyo desplazamiento químico se observó en δ 120. Al mismo tiempo, se identificaron las señales correspondientes para los dos grupos metilenos benéficos en δ 38.33 (C-5) y 37.73 (C-6) [figura 17].

El espectro de la RMN- 1H (Espectro 5) verificó una vez más la estructura asignada a este constituyente, al observar en primer lugar el desplazamiento del protón H-1 por arriba de 4.5 ppm y, por otra parte, la mayor multiplicidad que éste presentó en forma de un doblete de dobletes. Tanto las propiedades físicas, como el total de las constantes correspondieron a la (-)yateína, uno de los lignanos aislados de las especies *Hernandia ovigera* y *Piper cubeba* (Tanoguchi *et al.*, 1991; Bharathi *et al.*, 1985).

Los cuadros 14 y 15 muestran los valores de los desplazamientos químicos observados para los lignanos ariltetrahidronaftalenos (HV-IV-II, -3A, -3B y -3C) y la diarilbutirolactona (HV-IV-4A).

Figura 16.-Iones tropilio (m/e) generados en el espectro de masas por el constituyente bioactivo HV-IV-4A aislado de *Hyptis verticillata*.

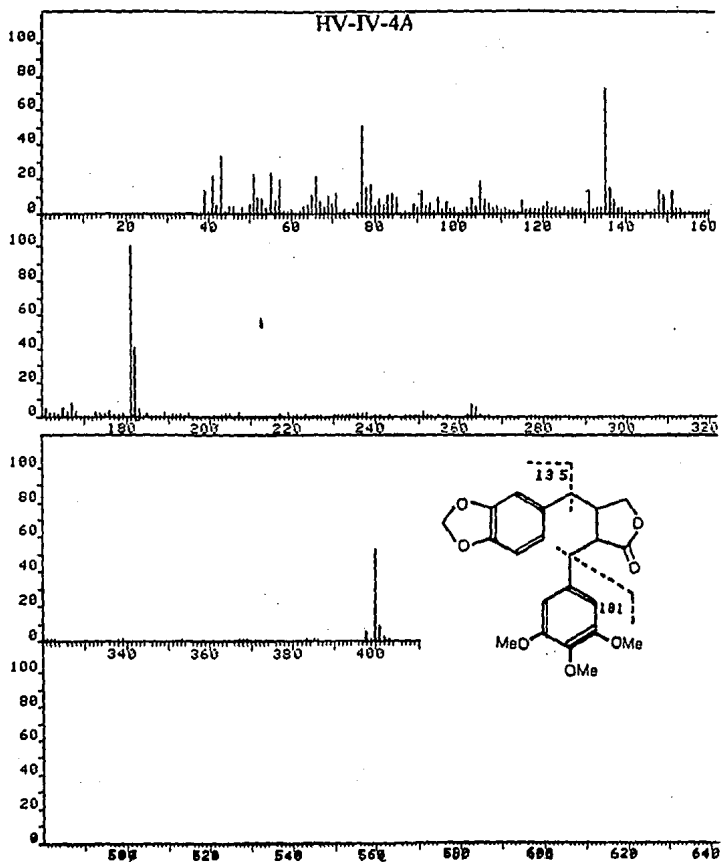
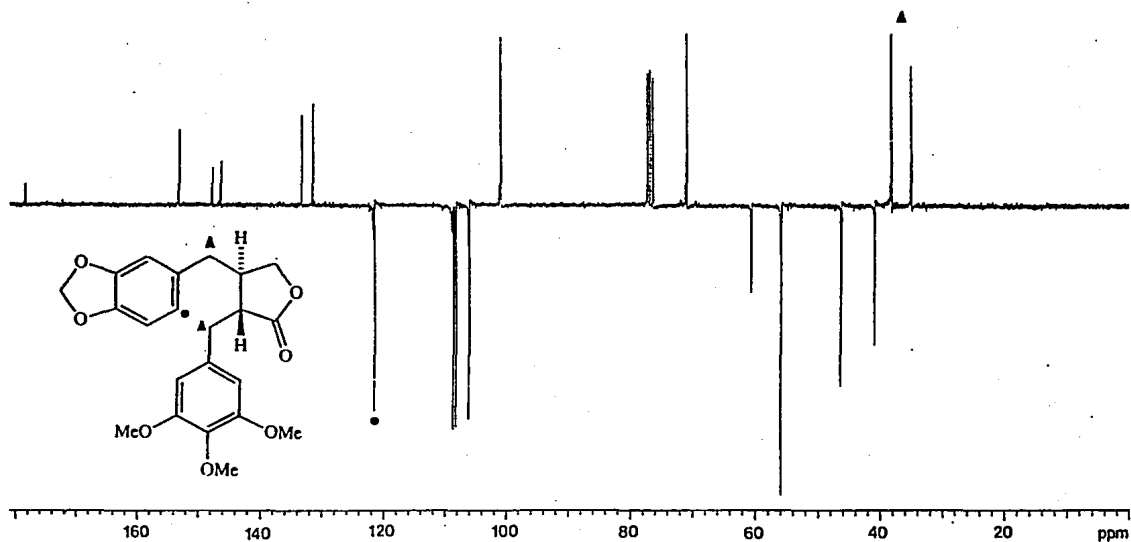


Figura 17.- Señales correspondientes a los grupos metilenos bencílicos observadas en el espectro de RMN-¹³C generado por la (-)-yateína.



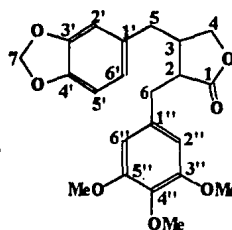
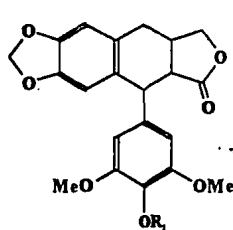
Cuadro 14 - Valores de los desplazamientos obtenidos en la RMN-¹H para los protones de los lignanos con núcleo estructural de tetrahidronaftaleno y la diarilbutirolactona (7) (ppm).

Protón multiplicidad	HV-IV-II ^a	HV-IV-3A ^a	HV-IV-3B ^b	HV-IV-3C ^a	HV-IV-4A ^a
H-1 (d)	4.5	4.85	3.99	4.37	(H-6,dd) ^c 2.91
H-2 (dd)	2.33	-	2.64	3.24	(H-2) 2.49-2.60
H-3 (m)	2.55	-	2.18	3.04	(H-3) 2.49-2.60
H-4 _α (dd)	2.48	3.84	2.53	2.87	(H-5) 2.49-2.60
H-4 _β (dd)	2.21	3.69	2.38	2.45	
H-5 (s)	6.56	6.72	6.60	6.67	(H-2') 6.45
H-8 (s)	6.55	6.63	6.60	6.59	(H-5') 6.71
H-8a (s)	-	-	-	-	(H-6') 6.48
H-10 _α (dd)	3.97	4.87	4.60	4.45	(H-4 _α) 4.18 (H-4 _β) 3.8
H-10 _β (dd)	3.42	4.82	3.63	3.98	
H-11 (dd)	5.52	5.95	5.58	5.93	(H-7) 5.93
H-2',6' (s)	6.60	6.37	6.57	6.34	(H-2'',6'') 6.35
OMe-3',5'	3.59	3.78	3.54	3.78	(OMe-3'',5'') 3.83
OMe-4'	-	3.79	3.79	3.83	(OMe-4'') 3.83
OH-4'(s)	8.08	-	-	-	-

a: 300 MHz, CDCl₃, TMS.

b: 300 MHz, C₆D₆, TMS.

c: Posición en el núcleo de diarilbutirolactona.



(7)

Cuadro 15.- Valores de Desplazamiento obtenidos en la RMN-¹³C para los lignanos con núcleo estructural de ariltetrahidronaftalenos y la diarilbutirolactona (7) (ppm).

Carbono	HV-IV-II	HV-IV-3A	HV-IV-3B	HV-IV-3C	HV-IV-4A ^a
C-1	32.40	42.71	40.13	32.98	(C-6) ^b 37.73
C-2	46.88	123.74	48.71	46.36	(C-2) 47.43
C-3	44.00	157.33	46.70	45.30	(C-3) 41.00
C-4	32.34	29.18	32.99	32.03	(C-5) 38.33
C-4a	131.24	129.61	127.72	130.38	(C-1') 133.45
C-5	109.36	109.52	108.40	108.76	(C-2') 108.25
C-6	146.76	147.24	146.79	146.79	(C-3') 147.84
C-7	146.45	147.03	146.63	146.69	(C-4') 146.32
C-8	110.26	107.74	109.96	109.81	(C-5') 108.71
C-8a	131.21	128.11	132.23	128.22	(C-6') 121.47
C-9	174.44	166.10	175.28	178.31	(C-1) 178.43
C-10	71.26	70.98	70.94	72.72	(C-4) ^b 71.16
C-11	100.8	101.30	101.09	100.95	(C-7) 101.04
C-1'	136.05	138.29	138.65	138.13	(C-1'') 133.45
C-2',6'	108.20	105.55	106.49	104.87	(C-2'',6'') 106.14
C-3',5'	147.67	153.22	153.08	153.28	(C-3'',5'') 153.17
C-4'	128.79	137.00	136.67	136.67	(C-4'') 137.61
OMe-3',5'	56.07	56.13	56.24	56.17	(OMe-3'',5'') 56.07
OMe-4'	-	60.75	60.84	60.84	(OMe-4'') 60.84

a.-Lignano (-)yateína con núcleo estructural de diarilbutirolactona (7).

b.-Posición en el núcleo de diarilbutirolactona.

6.-CONCLUSIONES.

1.- La investigación química del contenido metabólico la planta medicinal *Hyptis verticillata* Jacqs. demostró la presencia de un alto rendimiento de lignanos relacionados con la podofilotoxina, un compuesto con una poderosa actividad citotóxica. Por lo tanto, el presente estudio evidenció el potencial anticancerígeno de esta especie como una fuente alternativa de derivados de la podofilotoxina.

2.- La aplicación de los bioensayos sencillos para el monitoreo de la actividad citotóxica durante el fraccionamiento cromatográfico del extracto clorofórmico (P-388, $ED_{50} = 0.3 \mu\text{g/ml}$; BST, $LC_{50} = 13.4 \mu\text{g/ml}$), fue decisivo para la detección de los constituyentes bioactivos presentes en esta planta medicinal. Se observó una correlación de aproximadamente 1×10^{-2} entre la citotoxicidad (ED_{50}) para los cultivos celulares de la leucemia de múridos P-388 y la toxicidad (LC_{50}) para las larvas de *Artemia salina*. De esta manera, el fraccionamiento biodirigido de *Hyptis verticillata* condujo al aislamiento de un nuevo lignano citotóxico (P-388, $ED_{50} = 4 \mu\text{g/ml}$) con un esqueleto estructural de ariinaftaleno, el cual se caracterizó como la 5-metoxideshidropodofilotoxina (HV-IV-3D₁).

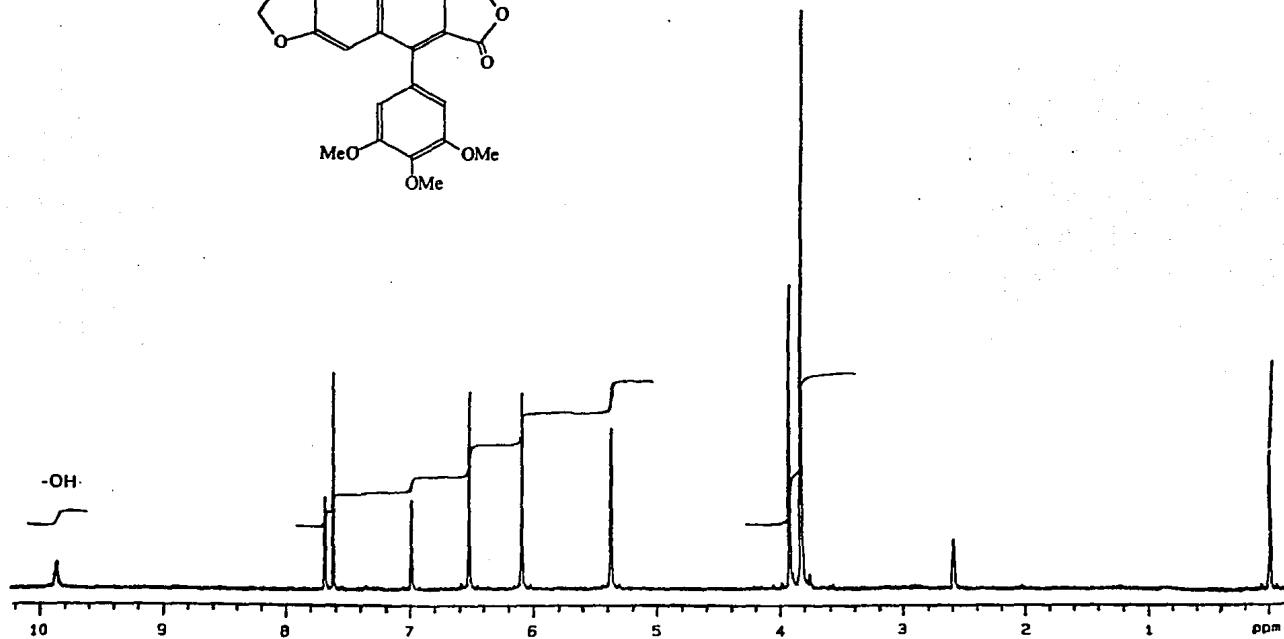
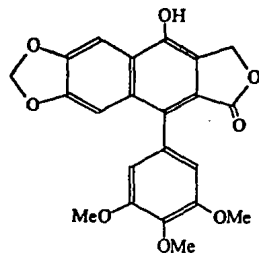
3.- El monitoreo de la actividad citotóxica a lo largo de los procedimientos de aislamiento permitió la purificación y caracterización de ocho lignanos bioactivos adicionales, de los cuales el éter metílico de la deshidro- β -peltantina (HV-IV-3E; P-388, $ED_{50} = 1.8 \mu\text{g/ml}$) se detectó por vez primera como un producto natural. Los otros lignanos adicionales que fueron identificados son: la deshidropodofilotoxina (HV-IV-I), la deshidrodesoxipodofilotoxina (HV-IV-3D₂), la (-)yateína (HV-IV-4A), la 4'-desmetil-desoxipodofilotoxina (HV-IV-II), la isodesoxipodofilotoxina (HV-IV-3B), la desoxipicropodofilotoxina (HV-IV-3C) y la β -apopicropodofilotoxina (HV-IV-3A).

4.- El alto rendimiento de los lignanos relacionados con la podofilotoxina, en la hierba martina, permite justificar algunas de las propiedades medicinales atribuidas a esta planta. En especial, las propiedades antisépticas de las infusiones preparadas con esta planta pueden claramente asociarse con la actividad antimitótica demostrada para los lignanos con esqueleto de ariltetrahidronaftaleno. De la misma forma, se justifica su utilización popular como antiparasitario y antihelmíntico por algunas poblaciones indígenas de Oaxaca.

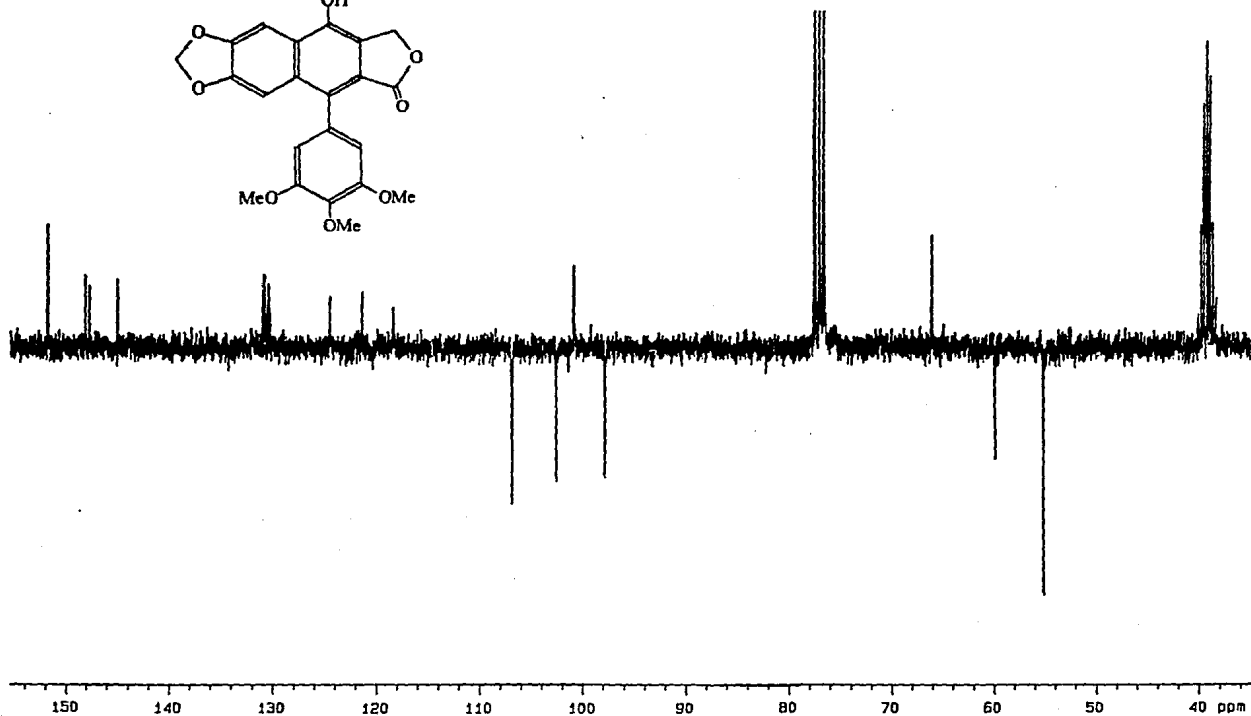
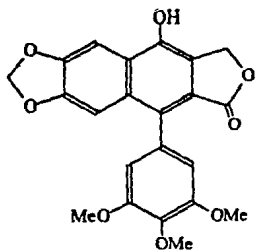
5.- Los resultados de las evaluaciones biológicas, i.e. actividades citotóxica, antimitótica y antimicrobiana, corroboraron que los lignanos con un núcleo estructural de ariltetrahidronaftaleno presentan un mayor potencial de actividad biológica de interés en la terapéutica del cáncer.

ESPECTROS

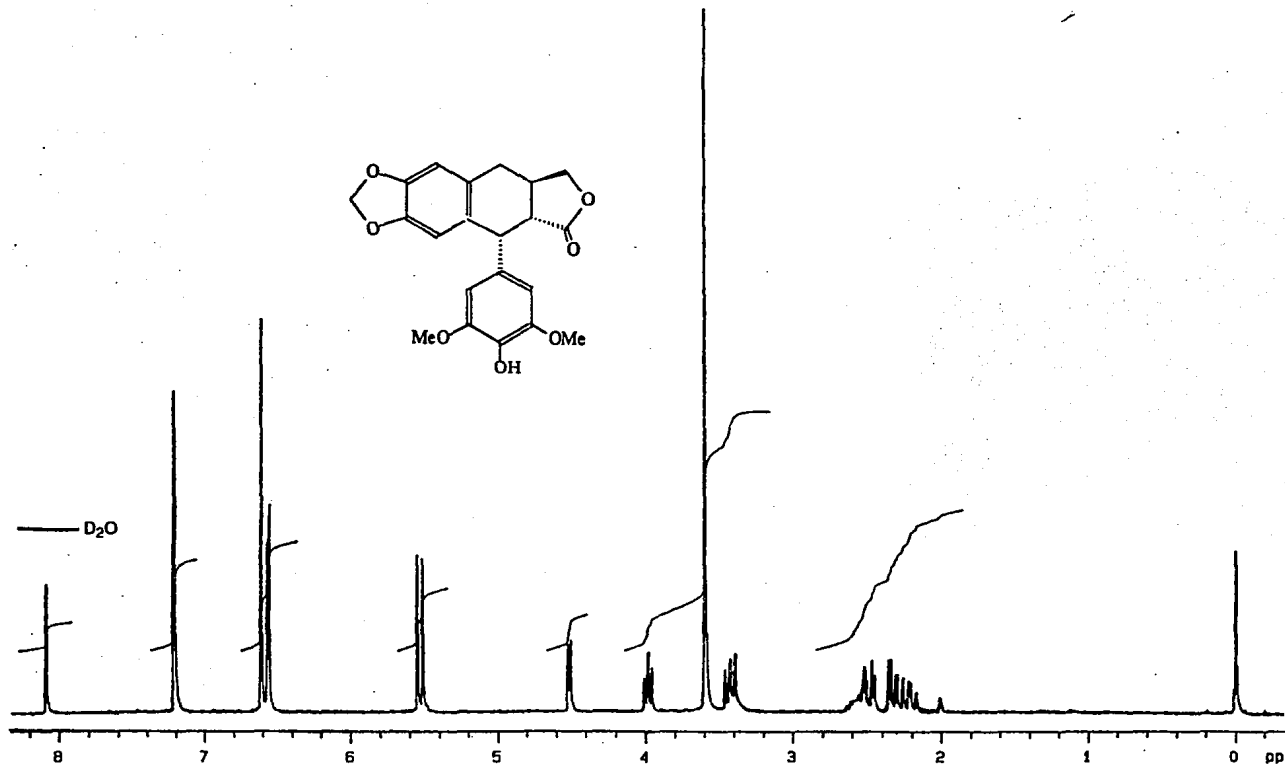
Espectro No. 1.- Resonancia Magnética Nuclear ^1H del compuesto HV-IV-1 (Deshidropodofiloxina).



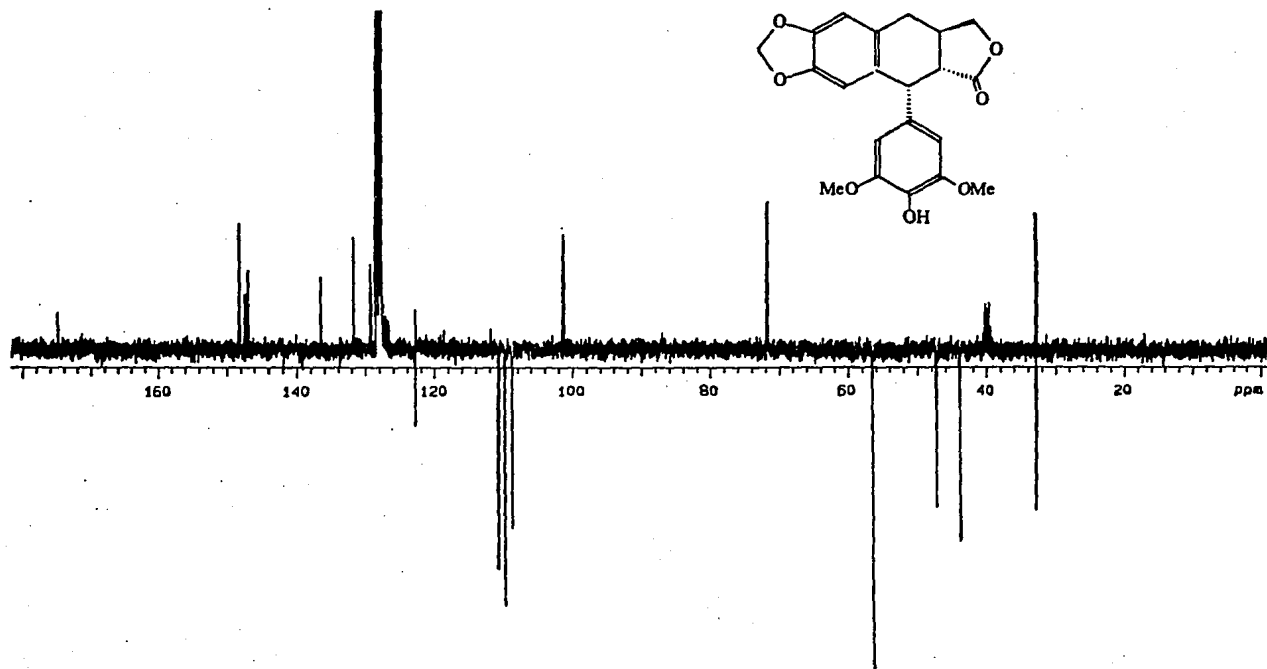
Espectro No. 2.- Resonancia Magnética Nuclear ^{13}C del compuesto HV-IV-1 (Deshidropodofiloxina).



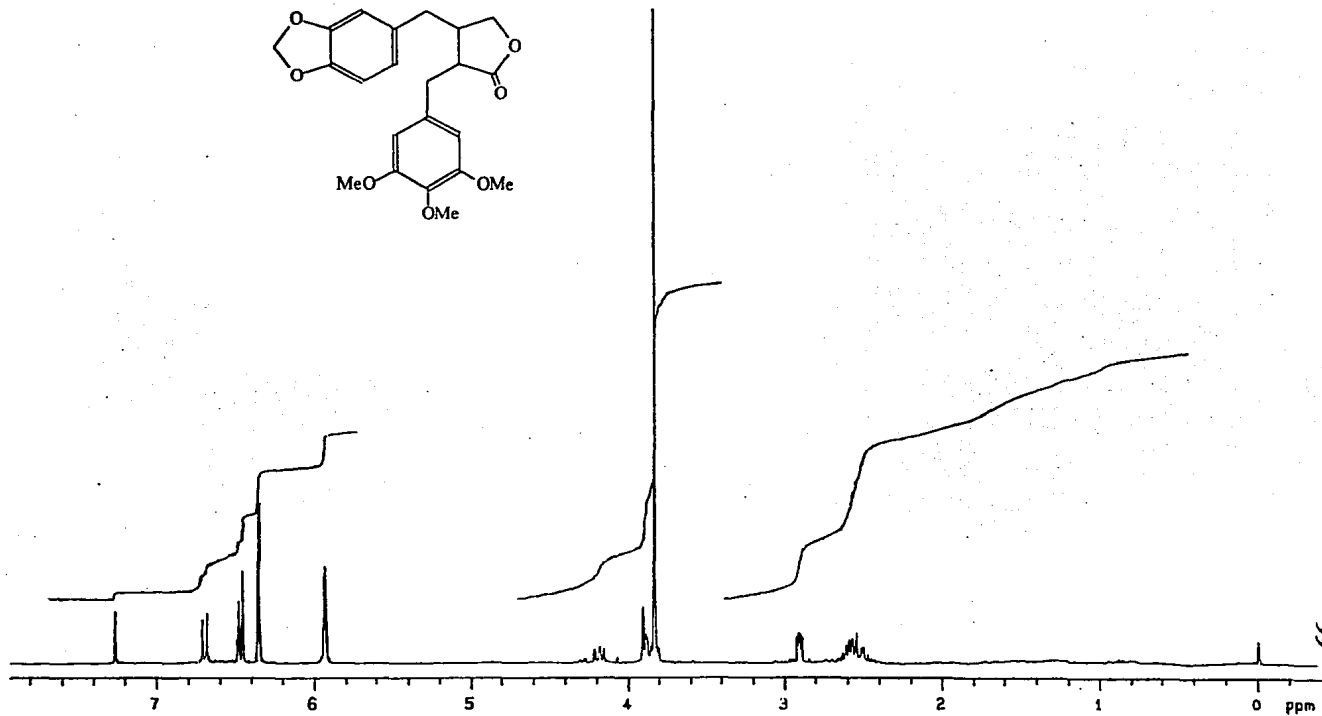
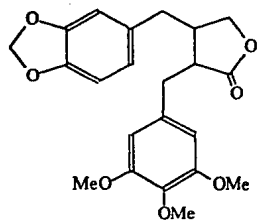
Espectro No. 3.- Resonancia Magnética Nuclear ^1H del compuesto HV-IV-11 (4'-Desmetildesoxipodofiloxina).



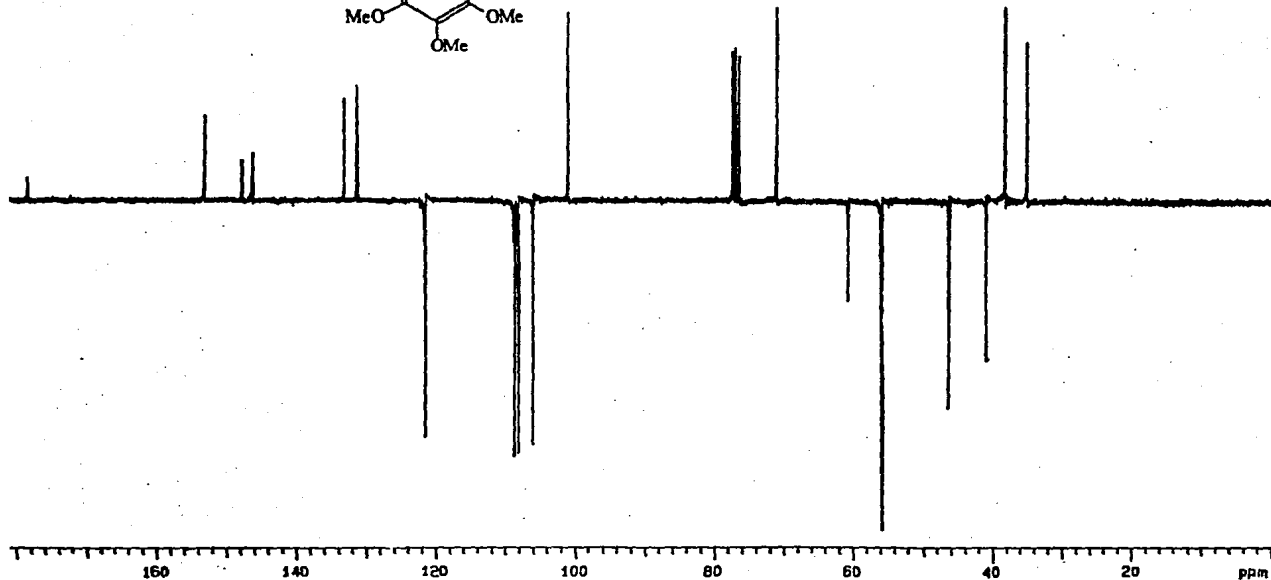
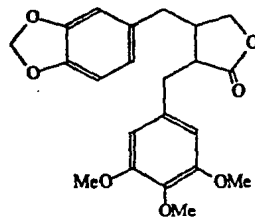
Espectro No. 4.- Resonancia Magnética Nuclear ^{13}C del compuesto HV-IV-11 (4'-Desmetildesoxipodofiloxina).



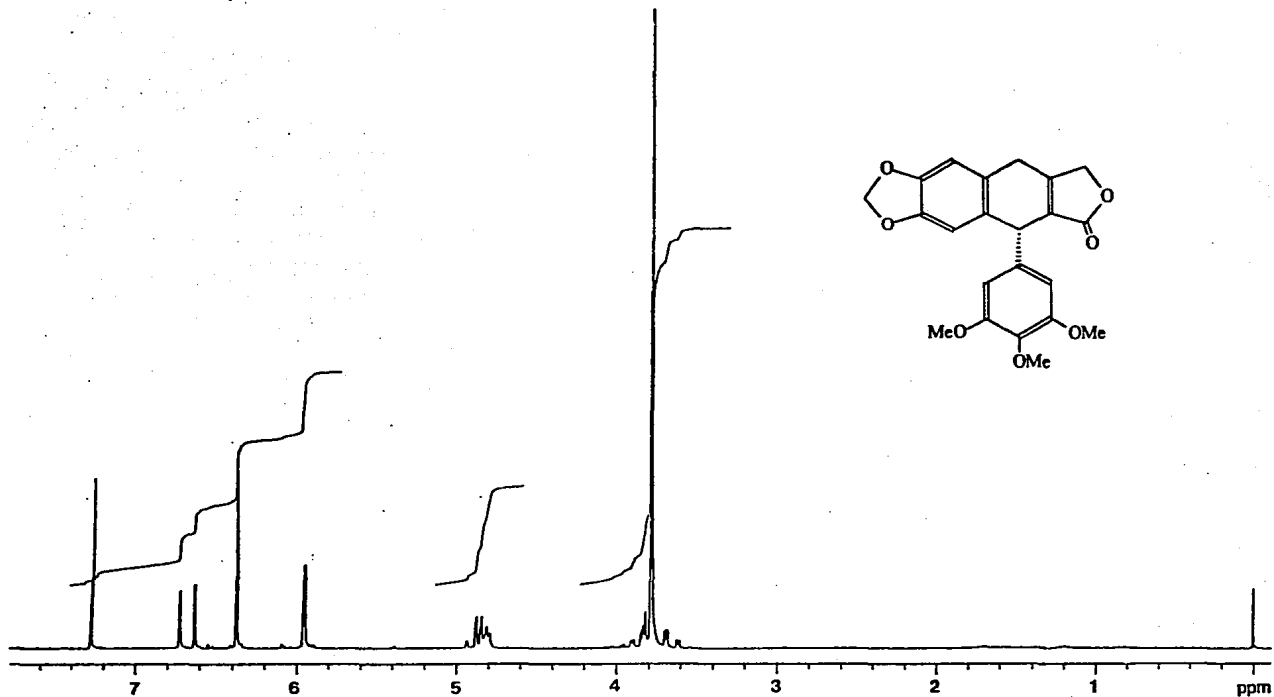
Espectro No. 5.- Resonancia Magnética Nuclear ^1H del compuesto HV-IV-4A ([-]-Yateina).



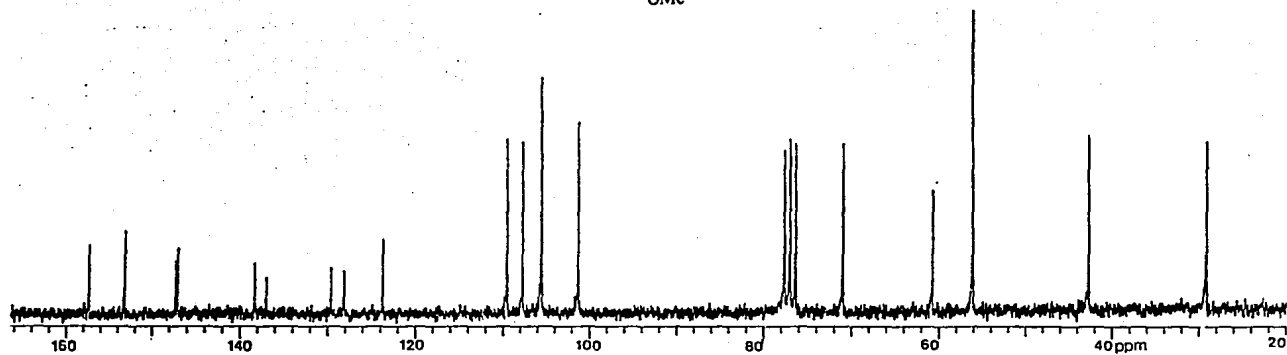
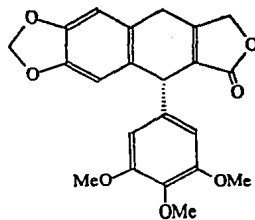
Espectro No. 6.- Resonancia Magnética Nuclear ^{13}C del compuesto HV-IV-4A ([-]-Yateína).



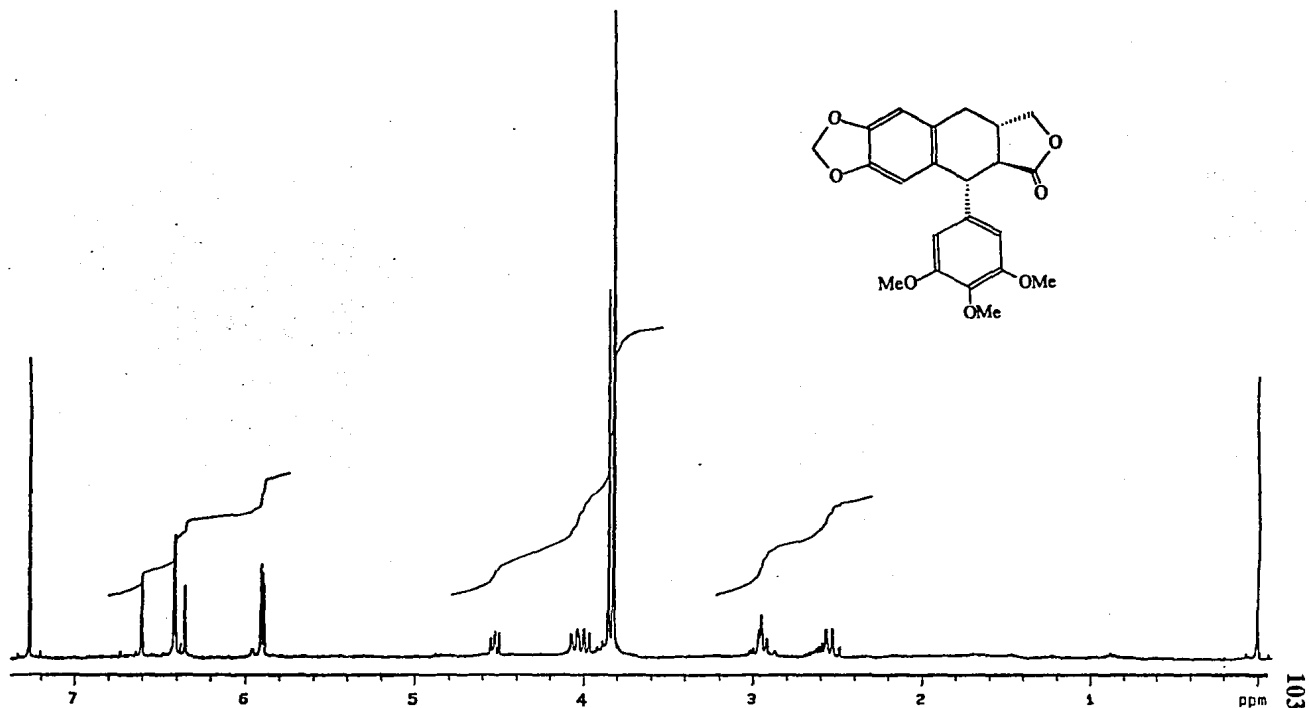
Espectro No. 7.- Resonancia Magnética Nuclear ^1H del compuesto HV-IV-3A (β -Apopicropodofilina).



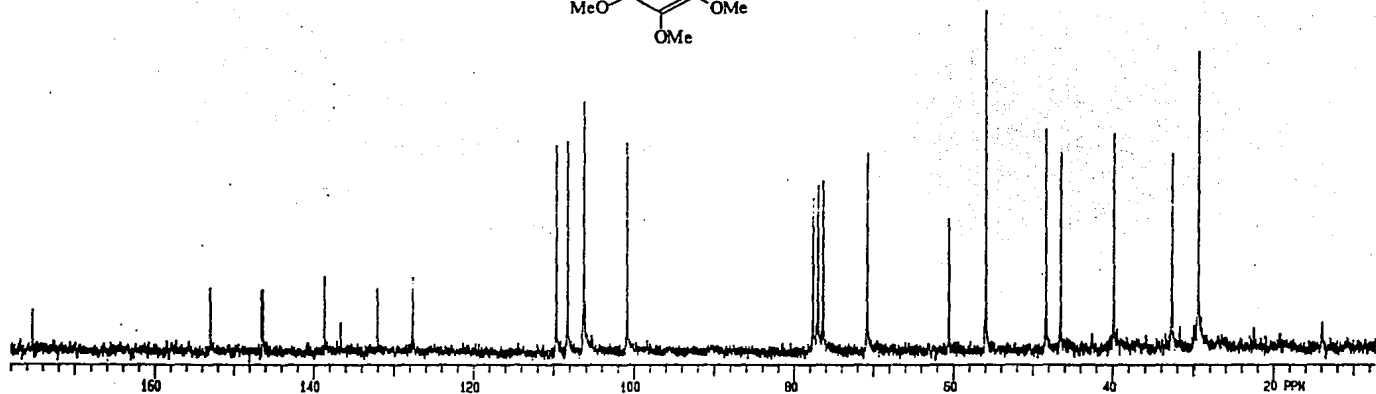
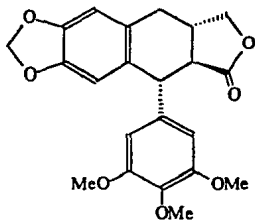
Espectro No. 8.- Resonancia Magnética Nuclear ^{13}C del compuesto HV-IV-3A (β -Apopicropodofilina).



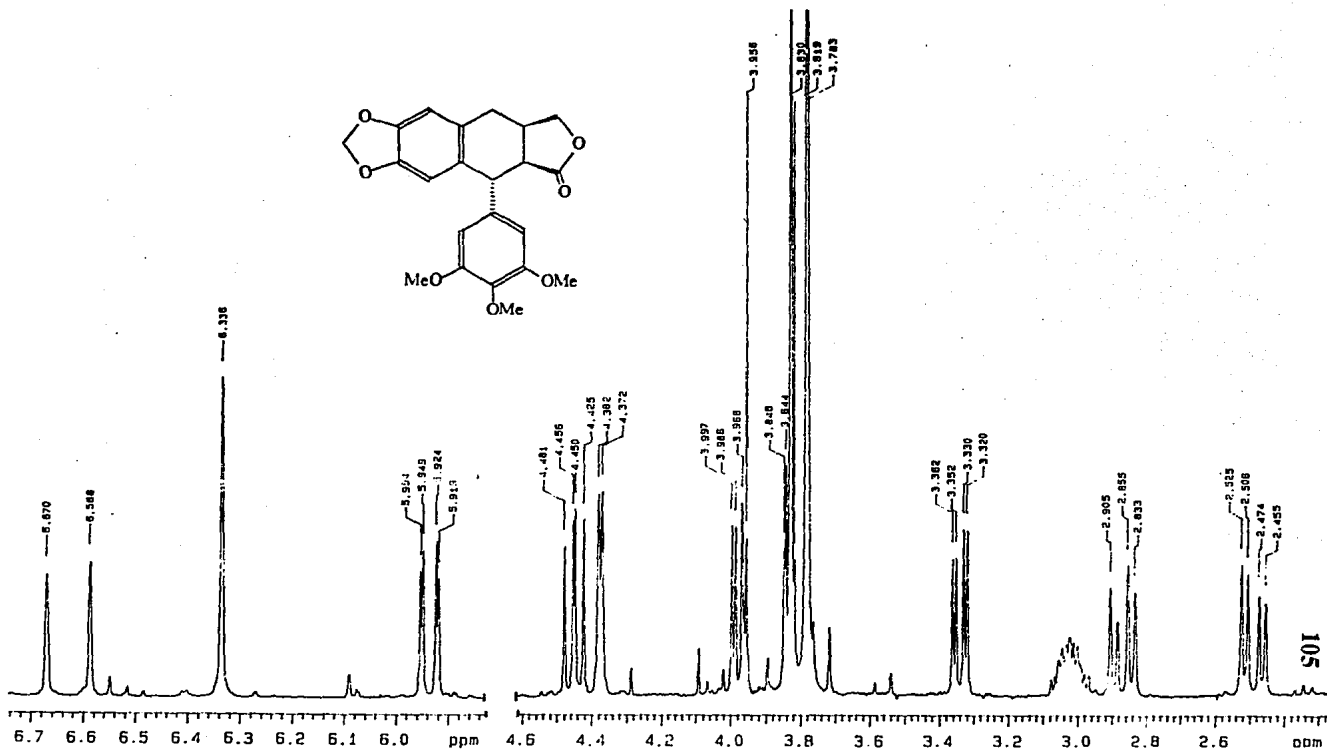
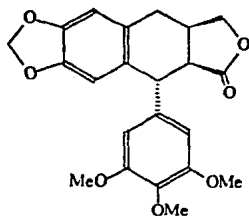
Espectro No. 9.- Resonancia Magnética Nuclear ^1H del compuesto HV-IV-3B (Isodesoxipodofilotoxina).



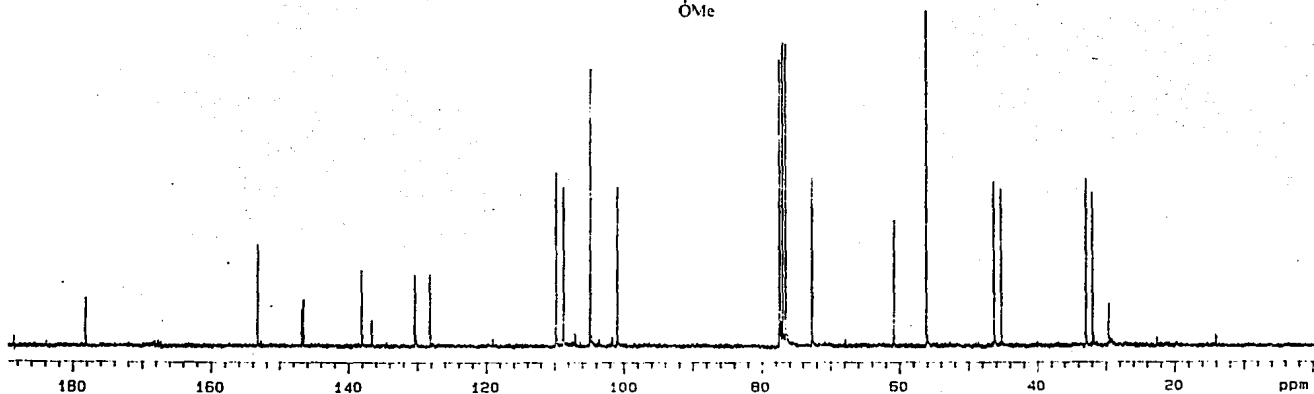
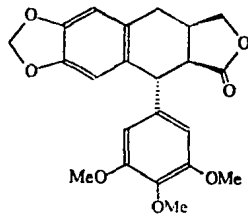
Espectro No. 10.- Resonancia Magnética Nuclear ^{13}C del compuesto HV-IV-3B (Isodesoxipodofilotoxina).



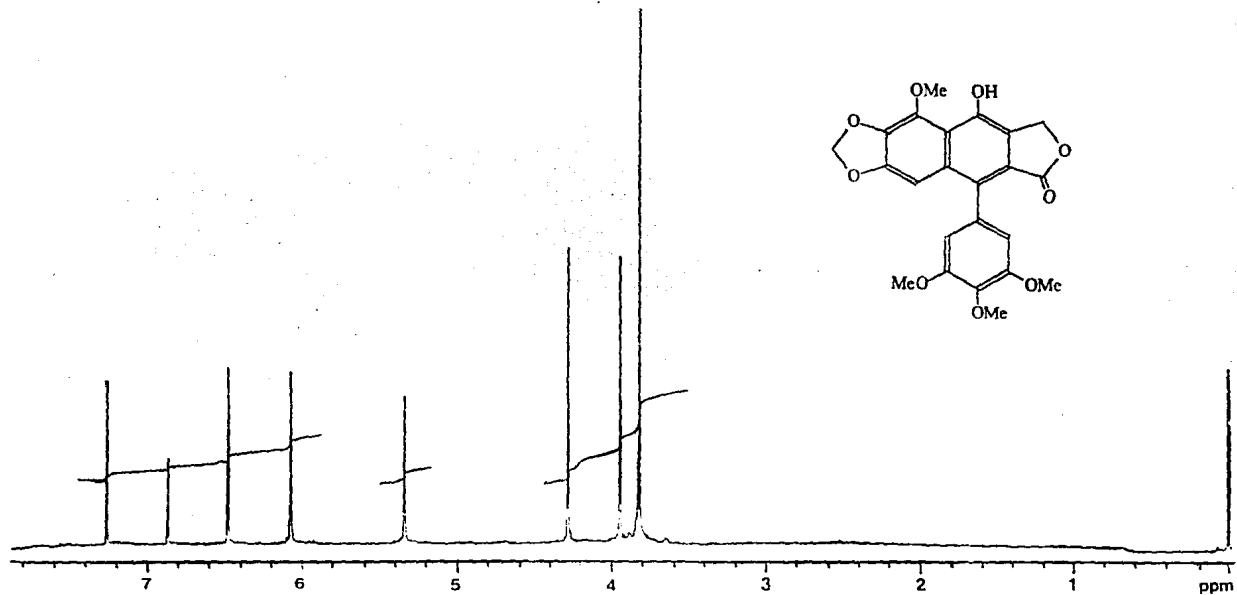
Espectro No. 11.- Resonancia Magnética Nuclear ^1H del compuesto HV-IV-3C (Desoxipicropodofilina).



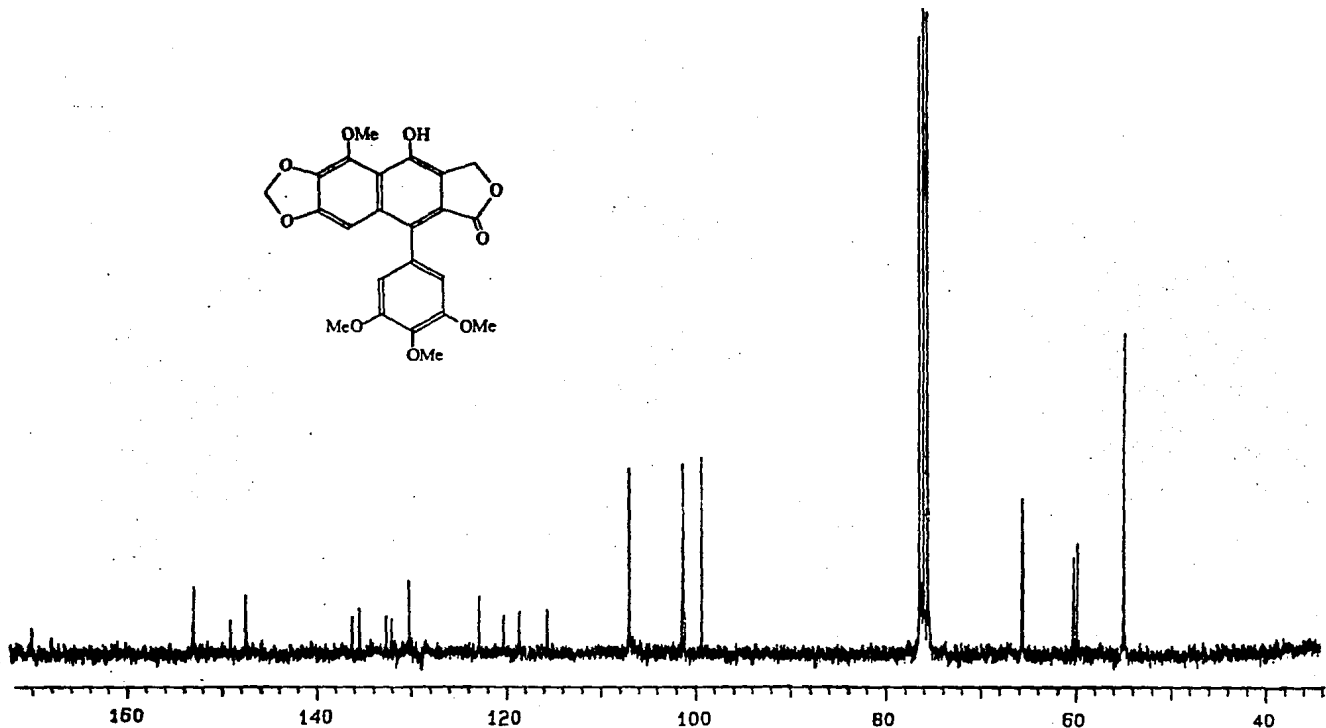
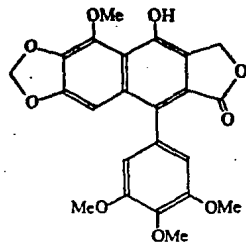
Espectro No. 12.- Resonancia Magnética Nuclear ^{13}C del compuesto HV-IV-3C (Desoxipicropodofilina).



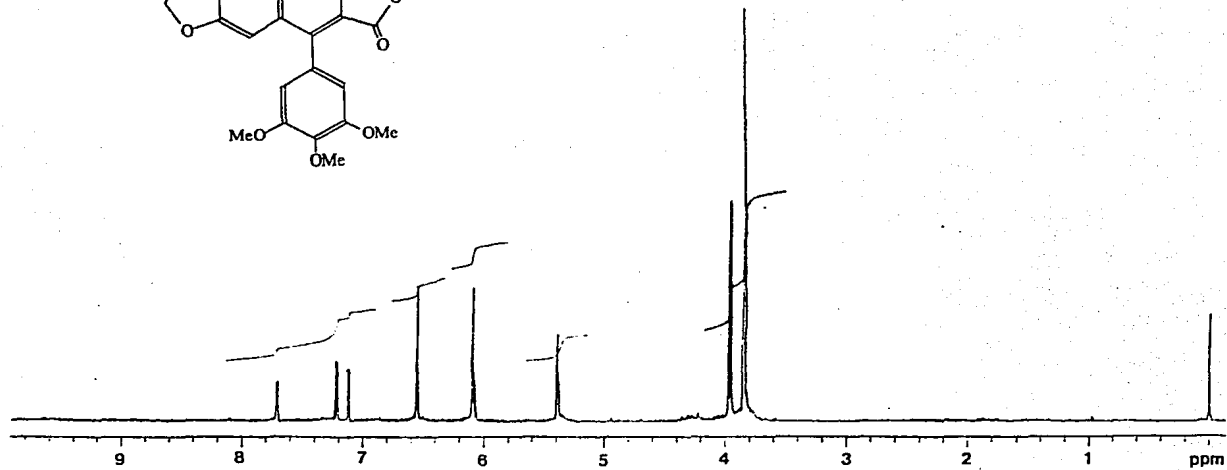
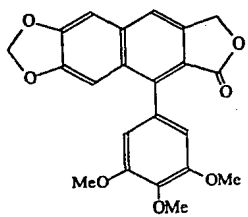
Espectro No. 13.- Resonancia Magnética Nuclear ^1H del compuesto HV-IV-3D₁ (5-Metoxideshidropodofiloxina).



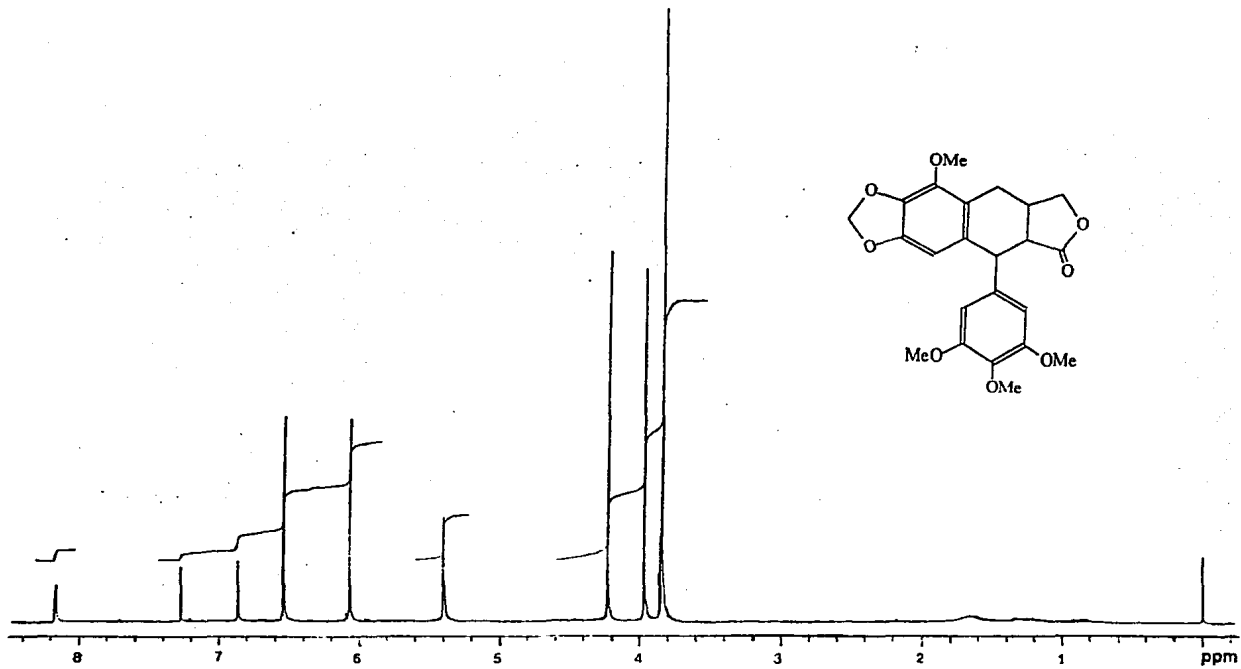
Espectro No. 14.- Resonancia Magnética Nuclear ^{13}C del compuesto HV-IV-3D₁ (5-Metoxideshidropodofilotoxina).



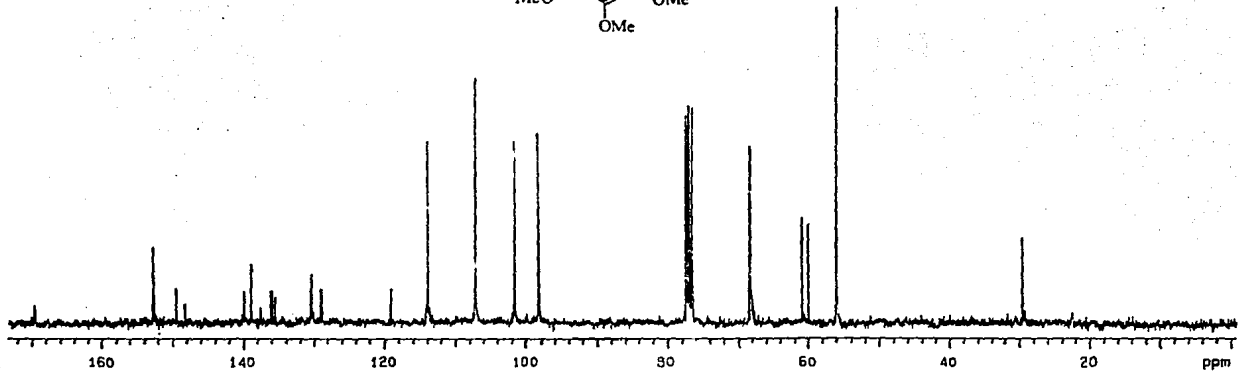
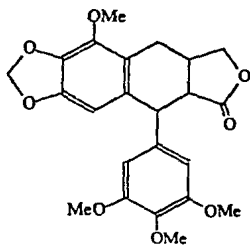
Espectro No. 15.- Resonancia Magnética Nuclear ^1H del compuesto HV-IV-3D₂ (Deshidrodesoxipodofiloxina).



Espectro No. 16.- Resonancia Magnética Nuclear ^1H del compuesto HV-IV-3E (Eter metílico de la Deshidro- β -peltantina).



Espectro No. 17.- Resonancia Magnética Nuclear ^{13}C del compuesto HV-IV-3E (Eter metílico de la Deshidro- β -peltantina).



PUBLICACIÓN

Journal of Natural Products
Vol. 56, No. 10, pp. 1728-1736, October 1993

CYTOTOXIC CONSTITUENTS FROM *HYPTIS VERTICILLATA*¹

MIRIAM NOVELO, JOSÉ G. CRUZ, LOURDES HERNÁNDEZ,² ROGELIO PEREIRA-MIRANDA,*

Laboratorio de Fitoquímica, Departamento de Farmacia, División de Bioquímica y Farmacia,
Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México,
Apartado Postal 70-265, C.P. 04511, D.F., México

HEEBYUNG CHAI, WONGCHON MAR, and JOHN M. PEZZUTO

Department of Medicinal Chemistry and Pharmacognosy, College of Pharmacy,
University of Illinois at Chicago, Chicago, Illinois 60612

ABSTRACT.—A new cytotoxic (P-388 ED₅₀ 4 µg/ml) aryl-naphthalene lignan has been isolated from the Mexican medicinal plant *Hyptis verticillata* (Lamiaceae) and characterized as 5-methoxydehydrodopodophyllotoxin (1). Eight additional lignans were also obtained by bioactivity-directed fractionation using the brine shrimp lethality test. Of these, the dehydro-β-peltatin methyl ether 2 (P-388 ED₅₀ 1.8 µg/ml) is reported for the first time as a natural product isolate. The other bioactive compounds were identified as dehydrodopodophyllotoxin (3), deoxydehydrodopodophyllotoxin (4), (–)-yatein (5), 4'-demethyloxydopodophyllotoxin (6), isodeoxydopodophyllotoxin (7), deoxypicropodophyllin (8), and β-apopicropodophyllin (9). Each of these compounds was evaluated against a panel of cell lines comprising a number of human cancer cell types (breast, colon, fibrosarcoma, lung, prostate, KB, and KB-V1 (a multi-drug resistant cell line derived from KB)) and murine lymphocytic leukemia (P-388). Lignans 1–4 showed marginal cytotoxic activity against the human cell lines tested. In contrast, compounds 5–9 demonstrated a general nonspecific activity comparable to that of podophyllotoxin (12) (ED₅₀ <10⁻⁷ µg/ml). In addition, the antimitotic potential of these compounds was determined in the astrocytoma (ASK) assay. Finally, the plant was also shown to contain the flavonoid sideritoflavone (KB ED₅₀ 1.6 µg/ml) and the known pentacyclic triterpenoids ursolic, maslinic, 2α-hydroxyursolic, and oleanolic acids.

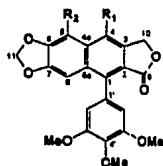
Hyptis verticillata Jacq. (Lamiaceae) is a bitter-aromatic herb widely used by the rural population in tropical regions of Mexico (1–4). The leaves of this medicinal plant, popularly known as “hierba mattina,” are used orally in the treatment of headache, stomachache, and gastrointestinal disorders (3–5). The whole plant is boiled and rubbed for rheumatism (2) and skin infections (4) and used as a bath for undiagnosed ailments (1–5). It is also valued for its anthelmintic and cathartic properties (5). The only previous chemical study of this plant has revealed the presence of two aryltetralin lignans, 4'-demethyloxydopodophyllotoxin (6) and β-peltatin (10), which accounted for the antimitotic action of the *H. verticillata* aqueous extracts (6). Recently, organic extracts derived from the aerial parts of this plant were found to demonstrate strong antibacterial activity in qualitative assays (4,7).

As a part of our ongoing investigation on Mexican medicinal plants (8), we now report the isolation and identification of a novel aryl-naphthalene lignan, 1. In addition to the previously reported bioactive compound 6, seven other lignans were also obtained as the cytotoxic constituents of *H. verticillata*: three aryl-naphthalene lignans, including dehydro-β-peltatin methyl ether (2), dehydrodopodophyllotoxin (3), and deoxydehydrodopodophyllotoxin (4), a dibenzylbutyrolactone, (–)-yatein (5), and three compounds bearing an aryltetralin nucleus, namely isodeoxydopodophyllotoxin (7), deoxypicropodophyllin (8), and β-apopicropodophyllin (9). To the best of our knowl-

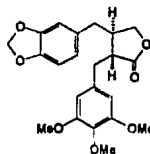
¹Paper No. VI in the series, “Chemical studies on Mexican *Hyptis* species,” and paper No. II in the series, “Biologically active natural products from Mexican medicinal plants.”

²Departamento de Farmacia, Escuela Nacional de Ciencias, Biológicas, Instituto Politécnico Nacional.

October 1993]

Novelo *et al.*: Constituents from *Hypis*

- 1 $R_1 = \text{OH}, R_2 = \text{OMe}$
 2 $R_1 = \text{H}, R_2 = \text{OMe}$
 3 $R_1 = \text{OH}, R_2 = \text{H}$
 4 $R_1 = R_2 = \text{H}$



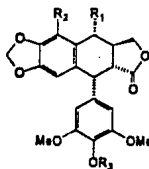
5

edge, compound **2** is hitherto unreported from any natural source. However, it has been obtained by dehydrogenation of β -peltatin B methyl ether [**11**] (9).

RESULTS AND DISCUSSION

In an initial screening of plant extracts for biological activity, the CHCl_3 -soluble extract of *H. verticillata* was found to have a noteworthy activity in the brine shrimp lethality test (BST; LC_{50} 13.4 $\mu\text{g/ml}$). This extract showed significant cytotoxicity when tested with cultured mammalian cells (P-388, ED_{50} , 0.3 $\mu\text{g/ml}$; KB, ED_{50} , 0.4 $\mu\text{g/ml}$). When this CHCl_3 extract was subjected to Si gel cc, one of eight combined fractions was found to demonstrate significant cytotoxic activity (BST, LC_{50} 7.9 $\mu\text{g/ml}$; P-388, ED_{50} 0.1 $\mu\text{g/ml}$; KB, ED_{50} 0.09 $\mu\text{g/ml}$). Bioassay-directed fractionation of this active fraction, using lethality to brine shrimp as a monitor, yielded compounds **1-9**. Table 1 summarizes the activities of the total extract, the bioactive fraction (pool IV), and the cytotoxic isolates **1-9** in the preliminary biological screening. Also shown in this table is the cytotoxic activity of these samples with cultured P-388 cells. In general, P-388 cells were more sensitive to the cytotoxic effect mediated by lignans **1-9**, but the activity did show a good correlation with that demonstrated in the BST.

Compound **1** exhibited a molecular formula of $\text{C}_{23}\text{H}_{20}\text{O}_9$, based on its mass data. The uv absorption maxima at 268, 325, and 357 nm were a clear indication for the presence of a naphthalene nucleus. The ir spectrum showed OH and carbonyl absorption at 3400 and 1763 cm^{-1} , respectively. Consonant with the presence of a phenolic function, the spectrum underwent a bathochromic shift on addition of alkali. The ^1H -nmr spectrum of compound **1** was quite comparable to that obtained for dehydro- β -peltatin methyl ether [**2**] (9). The only differences were the absence of the low-field



- 6 $R_1 = R_2 = R_3 = \text{H}$
 9 $R_1 = R_2 = \text{H}, R_3 = \text{Me}, \Delta^7$
 10 $R_1 = \text{H}, R_2 = \text{OH}, R_3 = \text{Me}$
 11 $R_1 = \text{H}, R_2 = \text{OMe}, R_3 = \text{Me}$
 12 $R_1 = \text{OH}, R_2 = \text{H}, R_3 = \text{Me}$

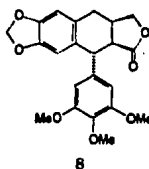
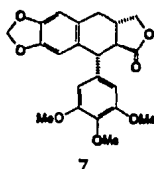


TABLE I. Screening for Cytotoxic Activity of Total Extract, Bioactive Fraction IV, and Pure Isolates 1-9 from *Hyptis verticillata*.

Sample	BST ^a	P-388 ^b
CHCl ₃ Extract	13.4	0.3
Pool IV	7.9	0.1
1	>500	4.0
2	434.7	1.8
3	255.0	>5
4	>500	>5
5	2.8	0.4
6	0.2	0.005
7	>500	>20
8	141.5	0.1
9	0.2	0.002
Podophyllotoxin ^c [12]	0.2	0.003

^aBrine shrimp lethality test, LC₅₀ μg/ml.

^bMurine lymphocytic leukemia; ED₅₀ μg/ml.

^cAntitumor agent used as standard for comparison.

singlet at δ 8.16, which was ascribed to the proton on C-4 of compound **2**, and the presence of a phenolic-OH proton resonance at δ 9.58, which disappeared on addition of D₂O. Verification of the proposed C-4 position for the OH group on lignan **1** was provided by ¹H-nmr nOe experiments. As expected, any enhancement was observed for the methylene protons of the lactone ring (δ 5.34) on irradiation of the signal belonging to the MeO group on the naphthalene nucleus (δ 4.29). This result was in full agreement with the placement of the MeO substituent at C-5. In addition, the H-8 proton (δ 6.87) showed reciprocal nOe's with the singlet at δ 6.48 for the equivalent methine protons on ring C. Assignment of the ¹³C nmr (Table 2) of compounds **1** and **2** was achieved by selective INEPT experiments (10). The unambiguous chemical shifts values obtained for **2** were used, together with the additive effects induced on the naphthalene nucleus by the introduction of an OH group at C-4 (11), to assign the resonances of compound **1**. Accordingly, these spectral data provided conclusive evidence for the formulation of **1** as 5-methoxydehydropodophyllotoxin.

Known lignans, dehydro- β -peltatin methyl ether [**2**] (9), dehydropodophyllotoxin [**3**] (12), deoxydehydropodophyllotoxin [**4**] (12), (-)-yatein [**5**] (13), 4'-demethyldeoxydehydropodophyllotoxin [**6**] (14), isodeoxydehydropodophyllotoxin [**7**] (15), deoxypicropodophyllin [**8**] (16), and β -apicropodophyllin [**9**] (17), were also isolated and characterized by comparison of physical and spectroscopic data (uv, ir, and ¹H-nmr)

October 1993]

Novelo *et al.*: Constituents from *Hypis*TABLE 2. ^{13}C -nmr Spectra of Lignans **1**, **2**, and **6-9**.^a

Carbon	Compound					
	1 ^b	2 ^b	6 ^c	7	8	9
C-1	132.03	139.96	32.40	40.13	32.98	42.71
C-2	120.43	119.16	46.88	48.71	46.36	123.74
C-3	122.98	138.99	43.51	46.70	45.30	137.33
C-4	147.58	113.95	32.34	32.99	32.04	29.18
C-4a	116.00	128.92	131.20	127.72	130.38	129.61
C-5	130.55	135.62	109.36	108.40	108.76	109.52
C-6	136.30	136.02	146.76	146.40	146.79	147.24
C-7	149.10	149.58	146.47	146.63	146.69	147.03
C-8	100.07	98.33	110.26	109.96	109.81	107.74
C-8a	132.75	130.47	131.20	132.23	128.22	128.11
C-9	169.65	169.65	174.44	175.28	178.31	166.10
C-10	66.65	68.26	71.26	70.94	72.72	70.98
C-11	101.81	101.64	100.80	101.09	100.95	101.30
C-1'	130.28	130.37	136.05	138.65	138.13	138.29
C-2', -6'	107.18	107.18	108.29	106.49	104.86	105.55
C-3', -5'	152.85	152.82	147.67	153.08	153.28	153.22
C-4'	136.30	137.59	128.79	136.60	136.67	137.00
3', 5'-OMe	56.10	56.11	56.07	56.24	56.17	56.13
4'-OMe	60.90	60.13	—	60.84	60.84	60.75
5-OMe	61.02	60.94	—	—	—	—

^aMeasured at 75.4 MHz in CDCl₃ (δ TMS=0).^bAssignments confirmed by SINEPT.^cRecorded in C₆D₆-DMSO-*d*₆ (4:1).

with the literature values. Full assignments of their ^{13}C -nmr spectra were carried out for their structural identification (Table 2).

The cytotoxic potential of isolates **1-9** was evaluated with a number of human cultured cell lines. As indicated in Table 3, the dibenzylbutyrolactone **5** and the aryltetralin lignans **6-9** demonstrated general nonspecific cytotoxic activity ($\text{ED}_{50} < 10^{-2}$ $\mu\text{g/ml}$) comparable to that of podophyllotoxin [**12**] (18). The intensities of the responses displayed by **6** and **9** were similar to each other and approximately 10- to 100-fold more intense than that demonstrated by the iso- and picroisomers, compounds **7** and **8**, respectively. As expected, the aryl-naphthalenes **1-4** were 100- to 1000-fold less active than podophyllotoxin [**12**] because of the planar aromatized naphthalene ring which alters the conformation of the molecule significantly relative to **12**. Compounds **1** and **2** showed only marginal cytotoxicity with the human cancer cell lines, and the most intense activity was observed with the murine lymphocytic leukemia in cell culture (P-388, ED_{50} 4.0 and 1.8 $\mu\text{g/ml}$, respectively).

In addition, demonstrable antimitotic activity was observed for all the isolates as judged by the astrocytoma (ASK) assay (19). As summarized in Table 4, the dose required (0.032 $\mu\text{g/ml}$) for compounds **6** and **9** to effect 100% reversal conversion of cultured ASK cells was comparable to that of podophyllotoxin [**12**]. Compound **5** was less active, with an antimitotic activity of 0.16 $\mu\text{g/ml}$. The ASK system activity of lignans **1-4**, **7**, and **8** was in the concentration range of 0.8-100 $\mu\text{g/ml}$ (Table 4).

Finally, the aryltetralin lignans **6** and **9**, as well as (-)-yarein [**5**], were found to show strong inhibitory activity against *Candida albicans* at the concentrations of 0.2-1.0 $\mu\text{g/ml}$ when examined by the standard dilution technique (8). This activity, which could

TABLE 3. Evaluation of the Cytotoxic Potential of Lignans 1-9 from *Hyptis verticillata* and of Podophyllotoxin (12).

Compound	Human cell line ^a ED ₅₀ (µg/ml)									
	A431	BC-1	Col-2	HT	KB	KB-V1	LNCaP	Lu-1	U373	ZR-75-1
1	6.2	7.6	12.8	15.6	6.0	8.7	11.6	11.7	16.3	>20
2	>20	2.9	3.2	3.4	2.2	4.2	3.2	4.3	5.9	>20
3	>20	15.2	8.9	9.7	5.0	13.0	11.7	10.6	>20	>20
4	6.2	>20	16.7	>20	11.4	>20	11.6	18.8	>20	>20
5	>20	0.05	0.08	0.07	0.08	0.06	0.16	0.1	0.3	0.5
6	0.08	0.01	0.03	0.01	0.01	0.02	0.02	0.03	0.1	2.1
7	6.2	17.5	8.9	10.7	6.7	11.5	12.0	15.9	2.9	13.2
8	>20	2.1	0.3	0.2	0.1	0.7	0.2	0.09	0.1	0.6
9	4.3	0.001	0.01	0.003	0.05	0.06	0.01	0.002	0.001	2.0
12 ^b	0.03	0.03	0.005	0.003	0.08	0.06	0.04	0.008	0.004	0.4

^aAbbreviations: A431, epidermoid carcinoma; BC-1, breast cancer; Col-2, colon cancer; HT, fibrosarcoma; KB, nasopharyngeal carcinoma; KB-V1, vinblastine resistant KB; LNCaP, hormone-dependent prostate cancer; Lu-1, lung cancer; U373, glioblastoma; ZR-75-1, hormone-dependent breast cancer.

^bData for podophyllotoxin (12) were reported previously (18) and are listed here for comparison.

October 1993]

Novelo *et al.*: Constituents from *Hyptis*TABLE 4. Evaluation of the Antimitotic Potential (ASK Assay) of Pure Isolates 1-9 from *Hyptis verticillata*.

Compound	Concentration ^a (µg/ml)							
	100	20.0	4.0	0.8	0.16	0.032	0.0064	0.00128
Colchicine ^b	100%	100%	100%	70%	0%	0%	0%	0%
Vincristine ^b	100%	100%	100%	100%	100%	0%	0%	0%
Vinblastine ^b	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	0%
Maytansine ^b	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	0%
1	100%	100%	0%	0%	0%	0%	0%	NT ^c
2	100%	100%	100%	0%	0%	0%	0%	NT
3	100%	100%	0%	0%	0%	0%	0%	NT
4	100%	0%	0%	0%	NT	NT	NT	NT
5	100%	100%	100%	100%	100%	0%	0%	NT
6	100%	100%	100%	100%	100%	100%	0%	NT
7	100%	100%	0%	0%	0%	0%	0%	NT
8	100%	100%	100%	100%	0%	0%	0%	NT
9	100%	100%	100%	100%	100%	100%	0%	NT
12 ^d	100%	100%	100%	100%	100%	100%	0%	NT

^aPercentage of reversal astrocyte formation.^bAntimitotic drug used as standard for comparison.^cNot tested.^dPodophyllotoxin used as an antimitotic lignan standard.

account for the antiseptic properties of the infusions prepared from *H. verticillata*, is presumably due to the established antimitotic activity of the podophyllotoxin lignan series (20), and is consistent with the ASK activity observed for the cytotoxic isolates 1-9 in this study.

EXPERIMENTAL

GENERAL EXPERIMENTAL PROCEDURES.—Mp's, optical rotations, ir, ms, and nmr spectra were measured as described previously (8). Selective INEPT experiments were performed on a Nicolet NMC-360 (90.8 MHz) spectrometer. ¹H-nmr nOe experiments were performed on a Varian VXR-300S instrument.

PLANT MATERIAL.—The aerial parts of *H. verticillata* were collected in San Juan Guichicovi, Oaxaca, Mexico, in March 1986. A voucher specimen (MEXU-431167) is deposited at the National Herbarium, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México

EXTRACTION AND ISOLATION.—The air-dried, milled plant material (1.5 kg) was defatted exhaustively by maceration with hexane. The residual material was extracted with CHCl₃ three times overnight. After filtration, the solvent was removed under high vacuum to yield 133.3 g of a dark-green resinous extract (KB, ED₅₀ 0.6 µg/ml; P-388, ED₅₀ 0.1 µg/ml). The whole isolation procedure was directed by the brine shrimp lethality test (BST) (21). The crude extract (BST, LC₅₀ 13.4 µg/ml) was fractionated by chromatography on a Si gel (1 kg) column, using a gradient of CHCl₃/EtOAc in hexane and collecting 310 fractions of 500 ml each. The eluates were combined, based on tlc similarities, into eight pools (I-VIII) and assayed for toxicity. Fractions 145-172 (pool IV) were most toxic to brine shrimp, with LC₅₀ values of 7.9 µg/ml. Fractions 242-250 (pool VII) and 124-144 (pool III) had LC₅₀ values of 260 and 340 µg/ml, respectively, while fractions 1-37 (pool I), 38-99 (pool II), 178-189 (pool V), 210-241 (pool VI), and 251-310 (pool VIII) had LC₅₀ values > 500 µg/ml. A white precipitate was removed from bioactive pool IV (10 g; KB₁₀ 0.09 µg/ml) and subjected to preparative tlc with C₁₈H₁₆-CHCl₃-MeOH (1:1:0.1). Three clearly defined zones were located by uv and separately eluted.

Zone 1 (*R_f* 0.14) contained 54 mg of dehydropodophyllotoxin (3). Zone 2 (*R_f* 0.42) afforded 36 mg of 4'-demethyldeoxy-podophyllotoxin (6). Zone 3 (*R_f* 0.57) was further purified by preparative tlc [hexane-CHCl₃-Me₂CO (3:3:6:0:0.7)] to give 33.2 mg of β-apocicropodophyllin [9] (*R_f* 0.37), 58.3 mg of isodeoxy-podophyllotoxin [7] (*R_f* 0.43), 56.6 mg of deoxycicropodophyllin [8] (*R_f* 0.56), 15 mg of dehydro-β-peltatin methyl ether [2] (*R_f* 0.64), and 16.3 mg of a mixture of compounds 1 and 4 (*R_f* 0.61). The mother

liquors of bioactive pool IV (1 g; BST, $1.C_{10}$, 0.1 μ g/ml) were subjected to cc to afford 19.7 mg of additional compound 1 and 20.5 mg of (-)-yatein (5) (R, 0.68).

In order to accomplish the resolution of the mixture of lignans 1 and 4, 14 mg of this mixture was dissolved in $CHCl_3$ (1 ml) containing 0.1 M NaOH (0.5 ml) and stirred for 2 h. Then H_2O (2 ml) was added, and the mixture was extracted three times with $CHCl_3$ (1.5 ml each). The organic layer was washed with H_2O , dried over anhydrous Na_2SO_4 , and evaporated to afford 6.4 mg of pure compound 4. The aqueous alkaline solution was adjusted to pH 6 with 1 N HCl and extracted with $CHCl_3$ (2×1.5 ml). The resulting organic phase was dried to give an oily residue which was purified by tlc to yield 5.8 mg of compound 1.

Pool III contained 16.1 g of a mixture of oleonic and ursolic acids. Pool V afforded 150 mg of sideritoflavone, 5,3',4'-trihydroxy-6,7,8-trimethoxyflavone (KB, ED₅₀, 1.6 μ g/ml). Pool VII left a residue which was recrystallized from MeOH to yield 1.32 g of a mixture of malinic and 2 α -hydroxyursolic acids. All triterpene acids were identified by comparison of the physical and spectral data with those of authentic material in our files (22).

5-Methoxydehydropodophyllotoxin (1).—White needles, mp > 225° (dec), uv λ max (MeOH) (log ϵ) 223 (4.52), 268 (4.36), 325 (3.68), 357 nm (3.38); ir ν max (KBr) 3400, 1763, 1614, 1582, 1465, 1448, 1251, 1199, 1125, 1089, 1055, 1035, 1022, 1004, 939 cm^{-1} ; 1H nmr ($CDCl_3$) δ 9.58 (1H, s, OH), 6.86 (1H, s, H-8), 6.48 (2H, s, H-2', H-6'), 6.07 (2H, s, -OCH₃O-), 5.34 (2H, s, lactone-CH), 4.29 (3H, s, 5-O-Me), 3.95 (3H, s, 4'-OMe), 3.82 (6H, s, 3', 5'-OMe); ^{13}C nmr ($CDCl_3$) see Table 2; eims (70 eV) m/z : [M+2]⁺ 442 (5), [M+1]⁺ 441 (26), [M]⁺ 440 (100), 425 (28); hreims 440.1119 (calcd for $C_{23}H_{22}O_6$, 440.1107).

Dehydro- β -peltatin methyl ether (2).—Mp 265–267° [lit. (9) mp 266–268°]; spectroscopic data (uv, ir, 1H nmr) comparable to literature values (9); ^{13}C nmr see Table 2; eims (70 eV) m/z : [M+2]⁺ 426 (5), [M+1]⁺ 425 (24), [M]⁺ 424 (100), 409 (29), 394 (28), 379 (12), 351 (5).

Dehydropodophyllotoxin (3).—White amorphous powder, mp 280°; spectroscopic data (uv, ir, 1H nmr) identical to those reported (12).

Deoxydehydropodophyllotoxin (4).—Colorless needles: mp 269–270°; spectroscopic data (uv, ir, ms, nmr) comparable to literature values (12).

Yatein (5).—Pale yellow glassy solid: $[\alpha]_D -28.9^\circ$ ($c=0.4$, $CHCl_3$). It was identified by comparison of the physical and spectral data (uv, ir, ms, nmr) with those reported for yatein (13).

4'-Demethyldeoxydehydropodophyllotoxin (6).—White small cubic crystals: mp 246–248° [$[\alpha]_D -130^\circ$ ($c=0.2$, $CHCl_3$)]; spectroscopic data (uv, ir, ms) identical to those previously reported (14); 1H nmr (CD_3CO) δ 8.09 (1H, s, OH), 6.61 (2H, s, H-2', H-6'), 6.56 (1H, s, H-5), 6.55 (1H, s, H-8), 5.52 (2H, dd, -OCH₃O-), 4.50 (1H, d, $J=4.8$ Hz, H-1), 3.98 (1H, dd, $J=7.1$, 10.6 Hz, H-10 α), 3.59 (6H, s, 3', 5'-OMe), 3.42 (1H, dd, $J=8.3$, 10.6 Hz, H-10 β), 2.56 (1H, m, H-3), 2.48 (1H, dd, $J=5.3$, 15.9 Hz, H-4 α), 2.32 (1H, dd, $J=4.8$, 13.7 Hz, H-2), 2.21 (1H, dd, $J=4.6$, 15.9 Hz, H-4 β); ^{13}C nmr see Table 2. When compound 6 (10 mg) was methylated with CH_3N_3 , 9.5 mg of a product identical (mp, ms, nmr) to deoxydehydropodophyllotoxin was obtained (23).

Isodeoxydehydropodophyllotoxin (7).—White needles: mp 246–248° [lit. (15) 256–258°], $[\alpha]_D -38.5^\circ$ ($c=0.4$, $CHCl_3$); 1H nmr (CD_3CO) δ 6.62 (2H, s, H-2', H-6'), 6.57 (2H, s, H-5, H-8), 5.57 and 5.52 (2H, s each, -OCH₃O-), 4.15 (1H, dd, $J=6.7$, 8.0 Hz, H-10 α), 4.01 (1H, d, $J=11.4$, H-1), 3.79 (3H, s, 4'-OMe), 3.60 (1H, dd, $J=8.0$, 11.3 Hz, H-10 β), 3.56 (6H, s, 3', 5'-OMe), 2.75 (1H, dd, $J=11.0$, 13.4 Hz, H-2), 2.63 (1H, dd, $J=13.0$, 13.4 Hz, H-4 α), 2.49 (1H, dd, $J=4.5$, 13.0 Hz, H-4 β), 2.23 (1H, m, H-3); ^{13}C nmr see Table 2; eims (70 eV) m/z : [M+2]⁺ 400 (4.3), [M+1]⁺ 399 (24.8), [M]⁺ 398 (100) 385 (10).

Deoxydehydropodophyllin (8).—White amorphous powder: mp 163–165°; 1H nmr identical to those reported (16); ^{13}C nmr see Table 2; eims (70 eV) m/z : [M+2]⁺ 400 (4.3), [M+1]⁺ 399 (24.8), [M]⁺ 398 (100) 383 (18).

β -Apocarpinopodophyllin (9).—White amorphous powder: mp 218° [lit. (17) 220–222°]; $[\alpha]_D +96.8^\circ$ ($c=0.5$, $CHCl_3$); uv λ max (MeOH) (log ϵ) 250 (3.8), 301 (3.6), 317 (2.7); ir ν max (KBr) 3016, 2993, 2840, 1734, 1619, 1589, 1506, 1485, 1463, 1385, 1231, 1181, 1099, 1036, 940, 902, 869 cm^{-1} ; 1H nmr ($CDCl_3$) δ 6.72 (1H, s, H-5), 6.63 (1H, s, H-8), 6.37 (2H, s, H-2', H-6'), 5.95 (2H, brs, -OCH₃O-), 4.87–4.79 (3H, m, H-1, H-10 α and H-10 β), 3.84 (1H, dd, $J=2.3$, 27.8 Hz, H-4 α), 3.79 (3H, s, 4'-OMe), 3.78 (6H, s, 3', 5'-OMe), 3.74 (1H, dd, $J=3.7$, 27.8 Hz, H-4 β); ^{13}C nmr see Table 2; eims (70 eV) m/z : [M+2]⁺ 398 (3), [M+1]⁺ 397 (24), [M]⁺ 396 (100), 395 (5), 394 (8), 381 (5), 379 (8), 351 (10), 337 (10).

Sideritoflavone.—Yellow crystals: mp 216–218° [lit. (24) 196–198°]; identified by comparison of the spectral data (uv, 1H nmr, ms) with those reported for 5,3',4'-trihydroxy-6,7,8-trimethoxyflavone previously isolated from *Sideritis leucantha* (24); ^{13}C nmr ($DMSO-d_6$) δ 182.98, 164.99, 153.02, 150.63, 148.97, 146.32, 145.80, 136.32, 133.15, 121.93, 119.84, 116.79, 113.74, 106.67, 103.13, 62.65, 62.23, 61.34.

CYTOTOXICITY ASSAYS.—Extract, fractions, and compounds were evaluated for cytotoxic potential as described previously (8,25). The culture cell lines P-388, human fibrosarcoma (HT-1080), human oral epidermoid carcinoma (KB), human epidermoid carcinoma (A431), human hormone-dependent breast cancer (ZR-75-1), prostate cancer (LNCaP), and the human glioblastoma (U373) were purchased from the American Type Culture Collection. The multidrug-resistant cell line KB-V1 was developed from KB cells by treatment with sublethal doses of vinblastine over an extended period of time. Other human cancer cell types, which include breast (BC-1), colon (Col-2), and lung (LU-1) cancers, were established from primary human tumors in the Specialized Cancer Center, University of Illinois College of Medicine at Chicago.

ASTROCYTE FORMATION ASSAY (ASK).—Pure cytotoxic lignans were evaluated for antimitotic potential using cultured rat glioma (ASK) cells essentially by the procedures reported by Swanson *et al.* (19).

ANTIMICROBIAL ASSAY.—Pure compounds were evaluated for quantitative antimicrobial activity against *C. albicans* (ATCC 10231) by the dilution technique (8). A solution of the test compound (0.5 ml, 1 mg/ml) dissolved in MeOH-H₂O (1:1) was added to 4.5 ml of glucose (2%) Sabouraud broth. Doubling serial dilutions were aseptically prepared from this broth with concentrations ranging from 100 to 0.2 µg/ml. Each dilution was inoculated with 10 µl of a suspension of *C. albicans* to a final concentration of 10⁷/ml. After overnight incubation at 28°, the minimum inhibitory concentration was determined.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was financed, in part, by grants from Coordinación General de Estudios de Posgrado and Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM through "Programa de Apoyo a las Divisiones de Estudios de Posgrado" (Proyectos PADEP No. FQ-9127, FQ-9127 and FQ-9204) and "Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación y de Innovación Docente" (Proyecto DGAPA No. IN202493). Partial financial support from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología through "Programa de Fortalecimiento del Posgrado Nacional" (Convenio No. PFPN/112/91) is also acknowledged. Finally, we express our grateful recognition to Dr. A. Douglas Kinghorn (College of Pharmacy, University of Illinois at Chicago) for the hreims and SINEPT analysis.

LITERATURE CITED

1. M.A. Martínez-Alfaro, *J. Ethnopharmacol.*, **11**, 203 (1984).
2. M.C. Zamora-Martínez and C. Nieto de Pascual Pola, *J. Ethnopharmacol.*, **35**, 229 (1992).
3. M. Heinrich, H. Rimpler, and N.A. Barrera, *J. Ethnopharmacol.*, **36**, 63 (1992).
4. M. Heinrich, M. Kuhn, C.W. Wright, H. Rimpler, J.D. Phillipson, A. Schandelmaier, and D.C. Warhurst, *J. Ethnopharmacol.*, **36**, 81 (1992).
5. M.J.T. Roig, "Las Plantas Aromáticas o Venenosas de Cuba," Instituto del Libro, La Habana, Cuba, 1974, p. 596.
6. V.F. German, *J. Pharm. Sci.*, **60**, 649 (1971).
7. A. Rojas, L. Hernández, R. Pereda-Miranda, and R. Mata, *J. Ethnopharmacol.*, **35**, 275 (1991).
8. R. Pereda-Miranda, L. Hernández, M.J. Villavicencio, M. Novelo, P. Ibarra, H. Chai, and J.M. Pezzuto, *J. Nat. Prod.*, **56**, 583 (1993).
9. L.H. Klemm and P.S. Santhanam, *J. Org. Chem.*, **33**, 1266 (1968).
10. G.A. Cordell and A.D. Kinghorn, *Tetrahedron*, **47**, 3521 (1991).
11. N.D. Abdullae, M.R. Yagudaev, E.K. Batirov, and V.M. Mallikov, *Chem. Nat. Compd.*, **23**, 63 (1987).
12. C. Ito, T. Matsui, T.-S. Wu, and H. Fukurawa, *Chem. Pharm. Bull.*, **40**, 1318 (1992).
13. M. Tanoguchi, M. Arimoto, H. Saika, and H. Yamaguchi, *Chem. Pharm. Bull.*, **35**, 4162 (1987).
14. D.E. Jackson and P.M. Dewick, *Phytochemistry*, **23**, 1447 (1984).
15. J.P. Robin, R. Dhal, and E. Brown, *Tetrahedron*, **38**, 3667 (1982).
16. Y. Inamori, Y. Kato, M. Kubo, K. Baba, T. Ishida, K. Nomoto, and M. Kozawa, *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 704 (1985).
17. W.J. Gensler, Q.A. Ahmed, Z. Muljiani, and C.D. Gatsonis, *J. Am. Chem. Soc.*, **93**, 2515 (1970).
18. G.A. Cordell, C.W.W. Beecher, and J.M. Pezzuto, *J. Ethnopharmacol.*, **32**, 117 (1991).
19. S.M. Swanson, J.-X. Jiang, Y.-S. Chang, N.J. De Souza, and J.M. Pezzuto, *J. Nat. Prod.*, **51**, 929 (1988).
20. D.C. Ayres and J.D. Loike, "Lignans: Chemical Biological and Clinical Properties," Cambridge University Press, Cambridge, UK, 1990, pp. 85-132.
21. J.E. Anderson, C.M. Goetz, J.L. McLaughlin, and M. Suffness, *Phytochem. Anal.*, **2**, 107 (1991), and references cited therein.
22. R. Pereda-Miranda, L. Hernández, and R. López, *Planta Med.*, **58**, 223 (1992).
23. A.J. Pullockaran, D.G.I. Kingston, and N.G. Lewis, *J. Nat. Prod.*, **52**, 1290 (1989).

24. F. Tomás, F. Fernández, and A. Guiraldo, *Phytochemistry*, **18**, 185 (1979).
25. K. Lichitwitayawud, C.K. Angerhofer, G.A. Cordell, J.M. Pezzuto, and N. Ruangrunsi, *J. Nat. Prod.*, **56**, 30 (1993).

Received 22 February 1993

6.-BIBLIOGRAFIA

- Abdullaev, N.D., Yagudaev, M.R., Baritov, E.K., y Mallikov, V.M. (1987). ^{13}C NMR Spectra of arylnaphthalene lignans. *Chemistry of Natural Compounds* 23, 63-74.
- Adlercreutz, H., Fotsis, T., Heikkinen, R., Dwer, J.T., Goldin, B.R. y Gorbach, S.L. (1981). diet and urinary excretion of lignans in female subjects, *Medicinal-Biology* 59, 259-261.
- Adlercreutz, H., Fotsis, T., Heikkinen, R., Dwyer, J.T., Woods, M., Goldin, B.R. y Goebach, S.L. (1982). Excretion of lignans enterolactone and enterodiol and equol in omnivorous and vegetarian postmenopausal women with breast cancer. *Lancet* 2, 1295-1299.
- Anderson, J.E., Goetz, C.M., McLaughlin, J.L., y Suffness, M. (1991). A Blind comparison of simple bench-top bioassays and human tumor cell cytotoxicities as antitumor prescreens. *Phytochemical Analysis* 2, 107-111.
- Axelson, M. y Setchell, K.D. (1980). Conjugación of lignans in human urin. *FEBS Letters*. 122, 49-53.
- Ayres D.C. y Loike J.D. (1990) *Lignans: Chemical, Biological and Clinical Properties*. Cambridge University Press. Cambridge. UK. pp. 85-132.
- Alzulgaray, D. y Azulgaray, D. (1984). *Plantas que curan*. Ed. Grupo Comunicação três. São Brasil, Vol. I. p. 4: Vol. III, p. 253.
- Benett, R.G. y Grist, W.J. (1985). Nasal papillomas: Successful treatment with podophyllin, *Southern Medicinal Journal* 78, 224-225.
- Bharathi, R.P. y Newand, B.M. (1985). Lignans from *Piper cubeba*. *Phytochemistry* 24, 329-331.
- Borriello, S.P., Setchell, K.D., Axelson, M. y Lawson, A.M. (1985). Production and metabolism of lignans by the human faecal flora. *Journal of Applied Bacteriology* 58, 37-43.

- Braquett, P. y Godfroid, J.J. (1986). PAF-Acether Specific Binding Sites. Part 2. Design of specific antagonists. *Trends in Pharmacology Sciences*, 397-399
- Brewer, C.F, Loike, J.D., Horwitz, S.B., Sternlicht, H. y Gensler, W.J. (1979). Conformational Analysis of Podophyllotoxin and its Congeners: Structure activity relationship in microtubule assembly. *Journal of Medicinal Chemistry* 22, 215-221.
- Chen, G.L., Yang, L., Rowe, T.C., Halligan, B.D., Tewey, K.M. y Liu, L.F. (1984). Nonintercalative antitumor drugs interfere with the breakage-reunion reaction cells. *Biochemical Pharmacology* 37, 2145-2149.
- Casida, J.E. (1970). Mixed function oxidase involvement in the biochemistry of insecticide synergists. *Journal of Agriculture Food Chemistry* 18, 753-772.
- Cassidy, D.E., Drewry, J. y Fanning, J.P. (1982). Podophyllum toxicity: a report of a fatal case and a review of the literature. *Journal of Toxicological Clinical Toxicology* 19, 35-44.
- Cockayne, T.O. (1961). Leech Book of Bald: En: *Lecchdom, Wortcumings and Starcraft of Early England*. vol II. The Holland Press, London, p. 313.
- Cole, J.R. y Wiedhopf, R.M. (1978). Distribution. En: *Chemistry of Lignans*. ed. Rao, C.B.S. Andhra Univ. Press, pp. 39-64.
- Cordell, G.A., Beecher C.W.W., y Pezzuto, J.M. (1991) Can Ethnopharmacology contribute to the development of new anticancer drugs? *Journal of Ethnopharmacology* 32, 117-133.
- Cordell, G.A., y Kinghorn, A.D. (1991). One dimensional proton-carbon correlations for the structure of natural products. *Tetrahedron* 47, 3521-3534.
- Cox, E.B., Burton, G.V., Olsen, G.A. y Vugrin, D. (1989). Cisplatin and etoposide: an effective treatment for refractory breast carcinoma. *American Journal Clinical Oncology* 12, 53-6.

- Cruz Martínez José Guadalupe (1991) Estudio Fitoquímico Preliminar de la "Hierba Martina" (*Hyptis verticillata*, Jacq.), Tesis de licenciatura. Escuela Nacional de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma Benito Juárez de Oaxaca.
- De Araujo, M.C.M., Calvacanti, M.S.B., De mello, J.F. y D'Albuquerque I.L. (1974). Antimicrobial Substances of Higher Plants. Communication XLV. Primary observations on two quinonoids insolated from *Hyptis fruticosa* Salzm ex Benth (Labiatae). *Review of The Institute Antibiotics* 14, 101-104.
- Der Maderosian, A.H. (1991). The need for cooperation between modern and traditional medicine. *Herbal Gram, The Journal of American Botanical Cocencil and the Herb Research Foundation*, 24, 30-37.
- Edwards, J.M., Raffauf, R.F., y Le Quense, P.W. (1979). *Journal of Natural Products* 42, 496.
- Elakovich, S.D. y Stevents, K.L. (1985). Phytotoxic properties of norhhdihidroguaiaretic acid, a lignan from *Larrea tridentata* (Crosote Bush). *Journal of Chemical Ecology* 11, 27-33.
- Epling, C. (1949). *Revista del museo de la Plata*, sec. botánica, Argentina, pp. 248-249.
- Fagoo, M., Braquet, P., Robin, J.P., Esanu, A. y Godfraind, T. (1986). Evidence that mammalian lignans show endogenous digitalis-like activities. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 134, 1064-1070.
- Fang, S.D., Xu, R.S. y Gao, Y-S. (1981). Some recent advances in the chemical studies of Chinese herbal medicine. *American Journal Botany* 68, 300-303.
- Farnsworth, N. (1985). Plants and modern medicine: Where science and folklore meet. *World Healt Forum* 6, 76-80.
- Fisher, A.A. (1981). Severe systemic and local reactions to topical podophyllum resin. *Cutis* 28, 233.
- Fragoso, L.C.G. (1993). Orígenes de la cultura médica en Aridoamérica y Mesoamérica. *Ce-Acatl, Revista de la Cultura del Anáhuac* 38/39, 7-11.

- Freudenberg, K., y Weinges, K. (1961). A system of nomenclature for lignans. *Tetrahedron* **15**, 115-128.
- Gascón Figueroa, Mariano (1989). Estudio Fitoquímico de *Hyptis Mutabilis* (Labiatae) Tesis de Licenciatura. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional.
- Gensler, W.J., Ahmed, Q.A., Muljani, Z., y Gatsonis, C.D. (1971). Ultraviolet irradiation of α -apopropodofiline. *Journal of American Chemical Society* **93**, 2515.
- German, V.F. (1971). Isolation and characterization of cytotoxic principles from *Hyptis verticillata* Jacq. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **60**, 649-650.
- Gottlieb, O.R. (1978). Neolignans. *Progress in Chemical Organic of Natural Products*. **35**, 1-72.
- Grossberg, H., Opfell, R., Glick, J., Bakemeier, R., Schnetzer, G-III y Muggia, F. (1987). Treatment of advanced refractory lymphoma with Teniposide and Lomustine. *Cancer Treatment Reports* **71**, 215-216.
- Hainsworth, J.D., Porter, LL 3d, Johnson, D.H., Hande, K.R., Wolff, S.N., Birch, R., Enas, G. y Greco, F.A. (1986). Combination chemotherapy with vindesine, etoposide, and cisplatin in non-small cell lung cancer: a pilot study of The Southeastern Cancer Study Group. *Cancer Treatment Reports* **70**, 339-341.
- Haller, H.L., La Forge, F.B. Sullivan, W.N. (1942). Some compounds related to sesamin: their structure & their synergistic effect with pyrethrum insecticides. *Journal of Organic Chemistry* **7**, 185-188.
- Hamburger, M., y Hostettmann, K. (1991). Bioactivity in Plants: The link between phytochemistry and medicine. *Phytochemistry* **30**, 3864-3874.
- Hartwell, J.L. (1976). Types of anticancer agents isolated from plants. *Cancer Treatment Reports* **60**, 1031-1067.

- Hartwell, J.L., y Schrecker, A.W. (1958). The chemistry of podophyllum. *Progress in The Chemistry of Organic Natural Products* 15, ed. L. Zechmeister; Springer, Berlin. pp. 83-166.
- Haworth, R.D. y Richardson, T. (1935). The constituents of natural phenolic resins Part I: Matairesinol. *Journal of Chemical Society*: 633-636.
- Hegnauer, R. (1967). *Chemotaxonomie der Pflanzen*. Ed. Kirhauser Verlag, Alemania IV, p. 289.
- Heinrich, M. (1992a). Economic Botany of American Labiatae. En: *Advances in Labiatae Science*. Royal Botanical Gardens, Kew. R.M. Harley and T. Reynolds (eds.), pp 475-488.
- Heinrich, M., Kunt, M., Wrihgt, C.W., Rimpler, H., Phillipson, J.D. Schandelmaier, A. y Warhust, D.C. (1992b). Parasitological and microbiological evaluation of Mixe indian medicinal plants (México). *Journal of Ethnopharmacology* 36, 81-85.
- Heinrich, M., Rimpler, H., y Barrera, N.A. (1992c). Indigenous phytotherapy of gastrointestinal disorders in a lowland Mixe community (Oaxaca, México). Ethnopharmacologic evaluation. *Journal of Ethnopharmacology* 36, 63-80.
- Henter, J.I., Elinder, G., Finkel, Y. y Soder, O. (1986). Successful induction with chemotherapy including Tenoposide in familial erythrophagocytic lymphohistiocytosis. *Lancet* 2, 1402.
- Hernández de Jesús, Lourdez. (1991). "Estructura y estereoquímica de la pectinólida, una nueva 5,6-dihidro- α -pirona con propiedades antimicrobianas de *Hyptis pectinata* (L.) Poit". Tesis de Maestría. Departamento de Bioquímica y Farmacia, División de Estudios de Posgrado, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Hikino, H. y Kiso, Y. (1988). Natural products for liver diseases. En: *Economical & Medicinal Plant Research* 2, Wager, H., Hikino, H. and Farnsworth, N.R.. (eds). Academic Press, London, pp. 39-72.

- Hoffman J.J., Wiedhopf, M.R., y Cole, R.J. (1982). Cytotoxic and tumor inhibitory agent from *Poligala macradenia* Gray (Poligalaceae): 4'-demethyldeoxipodophyllotoxin. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 66, 586-587.
- Inamori, Y., Kubo, M., Tsujibo, H., Ogawa, M., Baba, K., Kosawa y M. Fujita, E. (1986). The Biological activities of podophyllotoxin compounds. *Chemical Pharmaceutical Bulletin* 34, 3928-3932.
- Ito, C., Matsui, T., Wu, T.S., y Fukurawa, H. (1992). Isolation of 6,7-Demethylene-desoxypodophyllotoxin from *Hernandia ovigera*. *Chemical Pharmaceutical Bulletin* 40, 1318-1321.
- Jacobs, A.D. y Gale, R.P. (1984). Recent advances in the biology and treatment of acute lymphoblastic leukemia in adults. *New England Journal Medicine* 311, 1219-1231.
- Jacksonn y Dewick, P.M. (1987). Aryltetralin lignans from *Hexandrum and Podophyllum peltatum*. *Phytochemistry* 23, 1147.
- Kelleher, J. K. (1977). Tubulin binding affinities of podophyllotoxin and colchicine analogues. *Molecular Pharmacology* 13, 232-241.
- Kelly, M.G. y Hartwell, J.L. (1954). The biological effects and the chemical composition of podophyllin: A review. *Journal of National Cancer Institute* 14, 967-1010.
- Kelsen, D.P, Buckner, J., Einzig, A., Magill, G., Heelan, R. y Vinciguerra, V. (1987). Phase II Trial of Cisplatin and Etoposide in adenocarcinomas of the upper gastrointestinal trac. *Cancer Treatmet Reports* 71, 329-30.
- Kingston, G.I., Rao, D.M.M. y Zucker, W.V. (1979). Plants Anticancer Agents IX: Constituents of *Hyptis tormentosa*. *Journal of Natural Products* 42, 496-499.
- Klemm, L.H., y Santhanam, P.S. (1968). Intramolecular Diels-Alder reactions. V. Synthesis of dehidro- β -peltantin methyl ether. *Journal of Organic Chemisry* 33, 1268.
- Kochetkov, N.K., Khorlin, A., Chizhov, O.S. y Sheinchenko, V.I. (1961). *Schizandrin* lignan of unusual structure. *Tetrahedron Letters*. 730-734.

- Lian-niang, L., Hung, X. y Rui, T. (1985). Dibenzocyclooctadiene lignans from roots and stems of *Kadsura coccinea*. *Planta Medica* 51, 297-300.
- Lieberman, H.R. (1973). Estimating EC₅₀ using The Probit Technique: a basic computer program. *Drug and Chemical Toxicology* 6, 111-116.
- Long, B.H., Musial, S.T. Brattain, M.G. (1984). Comparison of cytotoxicity and DNA breakage activity of congeners of podophyllotoxin including VP16-213 and VM-26: a quantitative structure-activity relationship. *Biochemistry* 23, 1183-1188.
- Lozoya, L.X. (1989). La medicina tradicional en la realidad político-social de México. *Ciencias*, 4, 27-33.
- Mac Rae W.D. y Neil, G.H. (1984). Review article number 2. Biological activities of lignans. *Phytochemistry*, 23, 1207-1220.
- Mac Rae, W.D. y Towers, G.H.N. (1984). An ethnopharmacological examination of *Virola elongata* bark: a South American arrow poison. *Journal of Ethnopharmacology* 12, 75-92.
- Mc Keithan T.W y Rosenbaum, J.L. (1984). The biochemistry of microtubules. *Cell Muscle Motility* 5, 225-288.
- Malan, K., Pelissier, Y., Marion, Ch., Blaise, A., y Bassiere, J.M. (1988) The essential oil of *Hyptis pectinata*. *Planta Medica* 54, 531-532.
- Markkanen, T., Makinen, M.L., Maunuksela, E. y Himanen, P. (1981). Podophyllotoxin lignans under experimental antiviral research. *Drugs Experimental Clinical Research* 7, 711-718.
- Martínez M. (1979). "*Catálogo de Nombres Vulgares y Científicos de Plantas Mexicanas*". Fondo de Cultura Económica, 2ª Ed., México, pp. 428-429.
- Meyer, B.N., Ferrigni, N.R., Putnam, J.E., Jacobsen, L.B., Nichols, D.E. y Mc Laughlin, J.L. (1982). Brine Shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Journal of Medicinal Plant Research* 45, 31-34.

- Mirsa, T.N., Singh, R.S., Ojha, T.N. y Upadhyay. (1981). Chemical constituents of *Hyptis suaveolens* Part I. Spectral and biological studies on a triterpenic acid. *Journal of Natural Products* 44, 735-738.
- Möse, J.R. y Lucas, G. (1957). *Arzneimittel-Forschung: Drug Research*. 7, 687.
- Noggle, J.H. y Schirmer, R.E. (1971). *The Nuclear Overhauser Effect: Chemical applications*. Academic Press, New York.
- O'Donnell, M.R., Forman, S.J., Levine, A.M., Territo, M., Frbstein, M.J., Fahey, J.L., Gill, P., Lazar, G., Nadamane, A., Neely, S. y Snyder, D.S. (1987). Cytarabine, Cisplatin, and Etoposide chemotherapy for refractory non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer Treatment Reports* 71, 187-189.
- O'Dwyer, P.J., Leyland Jones, B., Alonso, M.T., Marsoni, S. y Wittes, R.E. (1985). Etoposide (VP-16-213). Current status an active anticancer drug. *New England Journal Medicine* 312, 692-700. (Review).
- Pan, J-X., Hensens, O.D., Zink, D.L., Chang, M.N. y Hwang, S.B. (1987). Lignans with platelet activating factor antagonist activity from *Magnolia bloudii*. *Phytochemistry* 26, 1377-1379.
- Pereda-Miranda, R., Hernández L., López, R. (1992). Antimicrobial abietane-type diterpene from *Salvia albocaerulea*. *Planta Médica* 58, 223-224.
- Pereda-Miranda, R., Hernández L., Villavicencio, M.J., Novelo, M., Ibarra, P., Chai, H., y Pezzuto, J.M. (1993). Structure and Stereochemistry of pectinolides A-C, novel antimicrobial and cytotoxic 5,6-dihydro- α -pyrones from *Hyptis pectinata*. *Journal of Natural Products* 56, 583-593.
- Pérez-Figgarado, R.A. y Baden, H.P. (1976). The pharmacology of podophyllum. *Progress in Dermatology* 10, 1-4.
- Pinkel, D. (1987). Curing children of leukemia, *Cancer* 59, 1683-1691.
- Piver, M.S. (1986). Cisplatin plus Etoposide as second-line treatment in advanced ovarian carcinoma. *Cancer Treatment Reports* 70, 1446.

- Pullockraran, A.J., Kingston, D.G.I., y Lewis, N.G. (1989). Synthesis of stereospecifically deuterated desoxypodophyllotoxins and $^1\text{H-NMR}$ assignment of desoxypodophyllotoxin. *Journal of Natural Products* **52**, 1290-1295.
- Robin, J.P., Dhal, R. y Brown, E. (1982). Syntheses totales et etudes des lignanes biologiquement actifs-II. *Tetrahedron*, **38**, 3667-3671.
- Roig, M.J.T. (1974). *Plantas medicinales aromáticas o Venenosas de Cuba*, Instituto del libro, La Habana, Cuba, p. 596.
- Rojas, A., Hernández, L., Pereda-Miranda, R., y Mata, R. (1992). Screening for antimicrobial activity of crude extracts and pure products from Mexican medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology* **35**, 275-83.
- Sanghvi, A., Diven, W.F., Seltam, H., Warty, V., Rizk, M., Kritchevsky, D. y Setchell, K.D.R. (1984). Inhibition of rat liver cholesterol 7 hydroxylase and acyl CoA: cholesterolacyl transferase activities by enterodiol and enterolactone. En *Drugs affecting lipid metabolism*, Vol. 8. Krichevsky, D., Parletti, R. and Holmes, W.L. (ed.), Plenum Press, New York, pp. 311-322.
- Sheriha, G.H., Abouamer, K., Elshtaiwi, B.Z., Ashour, A., Abed, F.A. y Allhallaq, H.H. (1987). Quinoline alkaloids & cytotoxic lignans from *Haplophyllum tuberculatum*. *Phytochemistry* **61**, 841-845.
- Setchell, K.D., Lawson, A.M., Mtichell, F.L., Adlercreutz, H., Kirk, D.N. y Axelson, M. (1980). Lignans in man and in animal species. *Nature* **287**, 740-742.
- Setchell, K.D., Lawson, A.M., Conway, E., Taylor, N.F., Kirk, D.N., Cooley, G., Farrant, R.D., Wynn, S. y Axelson, M. (1981). The definitive identification of the lignans trans-2,3-bis(3-hydroxybenzyl)-gamma-butyrolactone and 2,3-bis(3-hydroxybenzyl)butane-1,4-diol in human and animal urine, *The Biochemical Journal* **197**, 447-459.
- Sheth, K., Jolad, S., Wuedhoff, R. y Cole, J.R. J. (1972). Tumor-Inhibitory Agent from *Hyptis emoryi* (Labiatae). *Journal of Pharmaceutical Sciences* **61**, 1819.

- Suffness, M. y Pezzuto, J.M. (1991). Assay Related to Cancer Drug Discovery. En: *Methods in Plant Biochemistry. Assay for Bioactivity*. Vol. 6. K. Hossettman (Ed.), Academic Press, Great Yarmouth, Norfolk, pp. 71-133.
- Sutherland, E.W. and Ral, T.W. (1958). Fractionation & characterisation of cyclic adenine ribonucleotide formed by tissue particles. *Journal of Biological Chemistry* 232, 1077-91.
- Swanson, S.M., Jiang, J.X., Chang, Y.S., De Souza, N.J., y Pezzuto, J.M. (1988). *Journal of Natural Products* 51,929.
- Tang, W., y Eisenbrand, G. (1992) Chinese Drugs of Plant Origen. Chemistry. Pharmacology and Use. En: *Traditional and Modern Medicine*. Springer-Verlag. Alemania, pp. 1056.
- Tanoguchi, M., Arimoto, M., Saika, H., y Yamaguchi, H. (1987). Studies en the constituents of seed of hermandía ovigera L. IV. Isolation and structural determination of three lignans. *Chemical Pharmaceutical Bulletin* 35, 4162-4168.
- Treviño Vda. de Sáenz Herlinda (1979). Primer Herbario Azteca y Mestizaje Agrícola. Siglo XV al XX. Luysil de México S.A. edit, pp. 100
- Tsakamoto, H., Hisada, S. y Nishibe, S. (1984). Lignans from the bark of Olea Plants (*Olea europea*). *Chemical Pharmaceutical Bulletin* 32, 4482-449.
- Upadhyay, J., Singh, R.S. y Misra, T.N. (1982). Chemical constituents of Hyptis suavecolens. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences* 44, 19-20.
- Van Sumere, C.F., Cottenie, J., De Greef, J. y Kint, J. (1972). Biochemical studies in relation to the possible germination regulatory role of naturally occurring coumarins & phenolics. *Recent Advances in Phytochemistry* 4, 165-221.
- Villavicencio González Manuela Judith (1993). Purificación y caracterización de las pectinólidas A-C, principales constituyentes citotóxicos y antimicrobianos de *Hyptis pectinata* (L.) Poit., Tesis de Maestría. Departamento de Bioquímica y Farmacia, División de Estudios de Posgrado, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.

- Wagner, H. (1977). Pharmaceutical and economic use of the Labiatae and Rutaceae families. *Revista Latinoamericana de Quimica* 8, 16-25.
- Waravdekar, V.S., Paradis, A.D. y Leiter, J. (1955). Enzyme changes induced in normal & malignant tissues with chemical agents. *Journal of National Cancer Institute* 16, 31.
- Waters, A.P. y Knowler, J.T. (1982). Effect of a lignan (HOMF) on RNA synthesis in the rat uterus. *Journal of Reproduction & Fertility* 66, 379-381.
- Wilson, L. y Friedkin, M. (1967). The biochemical events of mitosis. II. The *in vivo* and *in vitro* binding of colchicine in grasshopper embryos and its possible relation to inhibition of mitosis. *Biochemistry* 6, 3126-3135.