

53
2.
y



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

AISLAMIENTO Y ELUCIDACION ESTRUCTURAL
DE CUATRO NUEVOS DITERPENOS LABDANICOS DE
Hyptis spicigera Lam. (Lamiaceae).

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A :
EMMA GONZALEZ CHIMEO



MEXICO, D. F.

1996

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

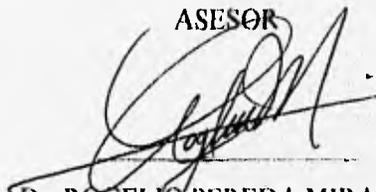
JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE	Q.F.B. María Luisa García Padilla.
VOCAL	Dra. Rachel Mata Essayag.
SECRETARIO	Dr. Rogelio Gregorio Pereda Miranda.
1er. SUPLENTE	M. en C. Perla Carolina Castañeda López.
2do. SUPLENTE	M. en C. Blas Flores Pérez.

Sitio donde se desarrollo el tema:

Departamento de Farmacia,
Laboratorio 123 (Conjunto E),
Facultad de Química.
Universidad Nacional Autónoma de México.

ASESOR



Dr. ROGELIO PEREDA MIRANDA

SUSTENTANTE



EMMA GONZÁLEZ CHIMEO

DEDICATORIAS

A mis Padres: José D. D.F. y Juana Ch.Ch. que siempre caminan conmigo y nunca me dejan sola. Que con su comprensión, paciencia, sacrificios y apoyo (moral y económico); así como, con su legado de amor, ejemplo de honestidad, honradez y su aliento a seguir adelante, me han hecho más fácil mi andar y he logrado llegar hasta esta meta.

Y

A mi hermano Ernesto D. Ch. por compartir alegrías, preocupaciones y logros.

CONTENIDO

	Página
AGRADECIMIENTOS.....	VII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	IX
LISTA DE CUADROS.....	XII
LISTA DE FIGURAS.....	XII
LISTA DE ESPECTROS.....	XV
I INTRODUCCIÓN.....	1
II JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	6
III ANTECEDENTES	
3.1 Etnobotánica del género <i>Hyptis</i>	
3.1.1 Generalidades.....	9
3.1.2 El género <i>Hyptis</i> como una fuente de insecticidas.....	10
3.2 Generalidades fitoquímicas del género <i>Hyptis</i>	11
3.3 Generalidades fitoquímicas y botánicas de la especie <i>Hyptis spicigera</i>	21

IV PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Técnicas analíticas

4.1.1 Procedimientos generales

4.1.1.1 Cromatografía en columna.....24

4.1.1.2 Cromatografía en capa fina.....24

4.1.1.3 Identificación de los compuestos puros.....26

4.2 Material vegetal.....27

4.3 Extracción del material vegetal

4.3.1 Primera extracción.....27

4.3.2 Segunda extracción.....28

4.4 Resolución de los extractos mediante partición cromatográfica.....28

4.5 Aislamiento y purificación de los constituyentes mayoritarios de los extractos hexánico y cloroformo-metanólico

4.5.1 Extracto Hexánico

4.5.1.1 Resolución de la fracción I

4.5.1.1.1 Aislamiento y purificación del compuesto HS I-2A (ácido ent-kaur-16-en-19-óico).....	32
4.5.1.2 Resolución de la fracción II	
4.5.1.2.1 Aislamiento y purificación del β -sitosterol.....	33
4.5.2 Extracto cloroformo-metanólico	
4.5.2.1 Resolución de la fracción III	
4.5.2.1.1 Detección del ácido ursólico.....	36
4.5.2.2 Resolución de la fracción IV	
4.5.2.2.1 Fraccionamiento primario.....	37
4.5.2.2.2 Aislamiento y purificación del compuesto HS-Am (19-acetoxi-2 α ,7 α -dihidroxilabda- 8(17), 13Z-dien-15-al).....	37
4.5.2.2.3 Aislamiento y purificación del compuesto HS-Ax (19-acetoxi-2 α ,7 α -dihidroxi-14,15- dinorlabda-8(17)-en-13-ona).....	38
4.5.2.2.4 Aislamiento y purificación del compuesto HS-Ae (15,19-diacetoxi-2 α ,7 α -dihidroxi- labda-8(17),13Zdieno).....	38

4.5.2.2.5 Aislamiento y purificación del compuesto HS-A (19-acetoxi-2 α ,7 α ,15-tridihidroxiabda- 8(17),13Z -dieno)	
4.5.2.2.5.a Cromatografía en columna.....	39
4.5.2.2.5.b Cromatografía de líquidos de alta resolución.....	40
4.5.2.2.6 Determinación de los factores de retención (R _f) para los diferentes diterpenos.....	43
4.6 Preparación de derivados.....	45
4.6.1 Reacción de alquilación con diazometano	
4.6.1.1 Preparación del reactivo.....	45
4.6.1.2 Alquilación de HS I-2A.....	45
4.6.2 Reacción de acetilación	
4.6.2.1 Acetilación total de HS-A.....	46
4.6.2.2 Acetilación parcial de HS-A.....	47
4.6.3 Reacción de oxidación alílica.....	48

4.7 Caracterización de los metabolitos secundarios aislados	
4.7.1 Caracterización del compuesto HS I-2A (ácido ent-kaur-16-en-19-óico).....	49
4.7.2 Caracterización del compuesto HS I-2Am (ent-kaur-16-en-19-oato de metilo).....	50
4.7.3 Caracterización del compuesto HS-Am (19-acetoxi-2 α ,7 α -dihidroxiabda-8(17),13Z-dien-15-al).....	51
4.7.4 Caracterización del compuesto HS-Ax (19-acetoxi- 2 α ,7 α -dihidroxi-14,15-dinorlabda-8(17)-en-13-ona).....	53
4.7.5 Caracterización del compuesto HS-Ac (15,19-diacetoxi-2 α ,7 α -dihidroxiabda-8(17),13Z-dieno).....	54
4.7.6 Caracterización del compuesto HS-A (19-acetoxi-2 α ,7 α ,15-tridihidroxiabda-8(17),13Z-dieno).....	55
4.7.7 Caracterización del compuesto HS-Aac (2,7,15,19-tetraacetoxi-labda-8(17),13Z-dieno).....	57

V RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Fraccionamiento.....	59
5.2 Elucidación estructural de los compuestos novedosos.....	61

5.2.1 Diterpenos bicíclicos	
5.2.1.1 19-acetoxi-2 α ,7 α ,15-tridihidroxiabda-8(17), 13Z-dieno (HS-A).....	61
5.2.1.2 19-acetoxi-2 α ,7 α -dihidroxiabda-8(17), 13Z-dien-15-al (HS-Am).....	77
5.2.1.3 15,19-diacetoxi-2 α ,7 α -dihidroxiabda-8(17), 13Z-dieno (HS-Ac).....	80
5.2.1.4 19-acetoxi-2 α ,7 α -dihidroxi-14,15-dinorabda-8(17)- en-13-ona (HS-Ax).....	82
5.3 Caracterización de los constituyentes conocidos.....	83
5.3.1 Diterpeno tetracíclico	
5.3.1.1 Ácido Ent-kaur-16-en-19-óico (HS I-2A).....	84
5.3.2 Triterpeno	
5.3.2.1 Identificación del ácido ursólico.....	84
VI CONCLUSIONES.....	86
VII BIBLIOGRAFÍA.....	88
ESPECTROS.	

AGRADEZCO

Al ser que me dio este instante de tiempo en el que vivo,
al que me dio una familia y la conserva unida,
al que construye mi vida y hace mis sueños realidad.

A DIOS.

AGRADECIMIENTOS.

Agradezco:

A todos los miembros del jurado por aceptar formar parte del mismo y, a los comisionados para la revisión del manuscrito por sus valiosas aportaciones y comentarios que permitieron una mejor comprensión de este.

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), UNAM, a través del proyecto IN 206795, por el apoyo financiero otorgado para la realización del trabajo experimental.

Al personal técnico del Departamento de Química Analítica de la Facultad de Química (UNAM), por el registro de los espectros de IR y $[\alpha]$, en especial a la Q.F.B. Graciela Chávez.

A la M. en C. María Isabel Chávez miembro del Instituto de Química (UNAM), por su asistencia técnica y tiempo otorgado en el registro de espectros de RMN.

A la Q.F.B. Mabel Frago Serrano por la implementación y el desarrollo de las técnicas de análisis mediante la cromatografía de líquidos de alta resolución.

A la M. en C. Alma Miriam Novelo Torres por su asistencia técnica durante el estudio fitoquímico y, al M. en C. Moustapha Bah por su asistencia en la interpretación de los espectros de resonancia magnética nuclear.

Finalmente, mi infinito agradecimiento y admiración al Dr. Rogelio Pereda Miranda por ser un excelente asesor a lo largo del desarrollo y conclusión del presente trabajo de investigación. Agradezco también su amistad, apoyo y aportación de ideas, así como el tiempo valiosamente obsequiado en la revisión del manuscrito, en la realización de los espectros de masas y de RMN.

LISTA DE ABREVIATURAS.

$|\alpha|$: índice de refracción.

Ac₂O: anhídrido acético.

AcOEt: acetato de etilo.

°C: grado centígrado.

CC: cromatografía en columna.

CCF: cromatografía en capa fina.

C₆D₆: benceno deuterado.

CDCl₃: cloroformo deuterado.

CE₅₀: concentración efectiva media.

C₆H₆: Benceno.

CHCl₃: cloroformo.

CH₂N₂: diazometano.

CIM: concentración inhibidora media.

CL: cromatografía de líquidos.

cm: centímetros.

COSY: resonancia magnética homonuclear (¹H) bidimensional ("correlated spectroscopy").

δ: desplazamiento químico.

d: doblete.

da: doblete ancho.

dd: doblete de dobletes.

DEPT: "distortionless enhancement by polarization transfer".

EM: espectrometría de masas.

EMIE: espectro de masas por impacto electrónico.

EMIQ: espectro de masas por ionización química.

Et₂O: éter etílico.

EtOH: etanol.

ev: electrón-volts.

g: gramos.

h: horas.

HCl: ácido clorhídrico.

HETCOR: resonancia magnética heteronuclear (¹³C-¹H) bidimensional
("heteronuclear correlated").

HMBC: RMN 2D-HETCOR ("heteronuclear multiple bond correlation").

HMQC: "heteronuclear multiple quantum coherence".

Hz: hertz.

IR: infrarrojo.

J: constante de acoplamiento.

KBr: bromuro de potasio.

Km: kilómetros.

KOH: hidróxido de potasio.

l: litros.

lb: libras.

{M}⁺: ión molecular.

{M+H}⁺: ión cuasimolecular.

m/e: relación masa-carga.

Me₂CO: acetona.

MeOH: metanol.

mg: miligramos.

µg: microgramos.

MHz: megahertzios.
ml: mililitros.
 μ l: microlitros.
mm: milímetros.
 μ m: micrómetros.
 MnO_2 : dióxido de manganeso.
 $NaHCO_3$: bicarbonato de sodio.
 Na_2SO_4 : sulfato de sodio.
nm: nanómetros.
NOESY: “nuclear overhauser effect spectroscopy”.
pf: punto de fusión.
ppm: partes por millón.
 $pulg^2$: pulgada cuadrada.
 R_f : factor de retención. (“Retention Factor”).
RMN: resonancia magnética nuclear.
RMN- 1H : resonancia magnética nuclear protónica.
RMN- ^{13}C : resonancia magnética nuclear de carbono 13.
Rt: tiempo de retención. (“Retention time”).
s: singulete.
sa: singulete ancho.
TMS: tetrametilsilano.
UV: ultravioleta.
 ν max: longitud de onda máxima.

LISTA DE CUADROS.

	Página
Cuadro I. Diterpenos aislados de plantas del género <i>Hyptis</i>	13
Cuadro II. Características botánicas de <i>Hyptis spicigera</i>	23
Cuadro III. Agente cromógeno utilizado para la visualización de las cromatoplasmas.....	26
Cuadro IV. Condiciones de preparación y elución de las columnas cromatográficas.....	29
Cuadro V. Fraccionamiento de los extractos orgánicos totales.....	30
Cuadro VI. Valores de R_f para el β -sitosterol en CCF.....	34
Cuadro VII. Valores de R_f para el ácido ursólico en CCF.....	36
Cuadro VIII. Rendimiento de los productos naturales aislados a partir de <i>Hyptis spicigera</i>	85

LISTA DE FIGURAS.

Figura 1.1. Ejemplos selectos de productos naturales con propiedades insecticidas.....	5
--	---

	Página
Figura 3.1. Principales triterpenos citotóxicos del género <i>Hyptis</i>	12
Figura 3.2. Diterpenos aislados del género <i>Hyptis</i>	14
Figura 3.3. Flavonoides bioactivos aislados del género <i>Hyptis</i>	17
Figura 3.4. Lignanos citotóxicos con un esqueleto de arilnaftaleno y de dibencilbutirolactona de <i>Hyptis verticillata</i>	18
Figura 3.5. Lignanos citotóxicos con esqueleto de ariltetralina de <i>Hyptis verticillata</i>	19
Figura 3.6. Constituyentes antimicrobianos y citotóxicos de <i>Hyptis pectinata</i>	21
Figura 3.7. δ -lactona aislada de <i>Hyptis spicigera</i>	22
Figura 4.1. Estrategia desarrollada para el estudio fitoquímico de <i>Hyptis spicigera</i>	31
Figura 4.2. Fraccionamiento del extracto hexánico de <i>Hyptis spicigera</i>	35
Figura 4.3. Fraccionamiento del extracto cloroformo-metanólico de <i>Hyptis spicigera</i>	41
Figura 4.4. Análisis mediante cromatografía de líquidos de la fracción IV del extracto cloroformo-metanólico de <i>Hyptis spicigera</i>	42

Figura 4.5. Cromatografía en capa fina para los diterpenos de <i>Hyptis spicigera</i>	44
Figura 5.1. Estructura de los diterpenos 1-4 aislados de <i>Hyptis spicigera</i>	60
Figura 5.2. Espectro de RMN- ¹³ C DEPT del compuesto HS-A (1).....	63
Figura 5.3. Biogénesis del núcleo labdánico a partir del geranil-geranil pirofosfato (GGPP).....	64
Figura 5.4. Espectro de RMN bidimensional homonuclear DQF-COSY del compuesto HS-A (1).....	66
Figura 5.5. Espectro de RMN- ¹ H bidimensional homonuclear NOESY del compuesto HS-A (1).....	67
Figura 5.6. Espectro de correlación bidimensional heteronuclear ¹³ C- ¹ H (HMQC) del compuesto HS-A.....	69
Figura 5.7. Principales efectos nucleares de Overhauser observados en el compuesto HS-A (1).....	70
Figura 5.8. Multiplicidad observada para el protón H-2 (δ 4.95) en la RMN- ¹ H del derivado peracetilado (5) del compuesto HS-A.....	72

Figura 5.9. Multiplicidad observada para el protón H-7 (δ 5.01) en la RMN- ^1H del derivado peracetilado (5) del compuesto HS-A.....	74
Figura 5.10. Espectro de correlación bidimensional heteronuclear ^{13}C - ^1H (HMBC) del derivado peracetilado (5) del compuesto HS-A.....	76
Figura 5.11. Correlación química entre HS-A (1) y el aldehído HS-Am (2).....	79
Figura 5.12. Correlación química entre HS-A (1) y el acetato HS-Ae (3).....	81

LISTA DE ESPECTROS.

- Espectro No. 1. IR del ácido ent-kaur-16-en-19-óico (HS I-2A)
- Espectro No. 2. RMN- ^1H del ácido ent-kaur-16-en-19-óico (HS I-2A)
- Espectro No. 3. RMN- ^{13}C del ácido ent-kaur-16-en-19-óico (HS I-2A)
- Espectro No. 4. EMIE del ácido ent-kaur-16-en-19-óico (HS I-2A)
- Espectro No. 5. IR del ent-kaur-16-en-19-oato de metilo (HS I-2Am)

- Espectro No. 6. RMN-¹H del ent-kaur-16-en-19-oato de metilo (**HS I-2Am**)
- Espectro No. 7. RMN-¹³C del ent-kaur-16-en-19-oato de metilo (**HS I-2Am**)
- Espectro No. 8. IR del 19-acetoxi-2 α ,7 α -dihidroxi-8(17),13Z-dien-15-al (**HS-Am; 2**)
- Espectro No. 9. RMN-¹H del 19-acetoxi-2 α ,7 α -dihidroxi-8(17),13Z-dien-15-al (**HS-Am; 2**)
- Espectro No. 10. RMN-¹³C del 19-acetoxi-2 α ,7 α -dihidroxi-8(17),13Z-dien-15-al (**HS-Am; 2**)
- Espectro No. 11. EMIQ del 19-acetoxi-2 α ,7 α -dihidroxi-8(17),13Z-dien-15-al (**HS-Am; 2**)
- Espectro No. 12. IR del 19-acetoxi-2 α ,7 α -dihidroxi-14,15-dinor-8(17)-en-13-ona (**HS-Ax; 4**)
- Espectro No. 13. RMN-¹H del 19-acetoxi-2 α ,7 α -dihidroxi-14,15-dinor-8(17)-en-13-ona (**HS-Ax; 4**)
- Espectro No. 14. RMN-¹³C del 19-acetoxi-2 α ,7 α -dihidroxi-14,15-dinor-8(17)-en-13-ona (**HS-Ax; 4**)
- Espectro No. 15. EMIQ del 19-acetoxi-2 α ,7 α -dihidroxi-14,15-dinor-8(17)-en-13-ona (**HS-Ax; 4**)
- Espectro No. 16. IR del 15,19-diacetoxi-2 α ,7 α -dihidroxi-8(17),13Z-dieno (**HS-Ae; 3**)

- Espectro No. 17. RMN-¹H del 15,19-diacetoxi-2 α ,7 α -dihidroxiabda-8(17),
13Z-dieno (HS-Ae; 3)
- Espectro No. 18. RMN-¹³C del 15,19-diacetoxi-2 α ,7 α -dihidroxiabda-8(17),
13Z-dieno (HS-Ae; 3)
- Espectro No. 19. IR del 19-acetoxi-2 α ,7 α ,15-tridihidroxiabda-8(17),13Z-
dieno (HS-A; 1)
- Espectro No. 20. RMN-¹H del 19-acetoxi-2 α ,7 α ,15-tridihidroxiabda-8(17),
13Z-dieno (HS-A; 1)
- Espectro No. 21. RMN-¹³C del 19-acetoxi-2 α ,7 α ,15-tridihidroxiabda-8(17),
13Z-dieno (HS-A; 1)
- Espectro No. 22. EMIQ del 19-acetoxi-2 α ,7 α ,15-tridihidroxiabda-8(17),
13Z-dieno (HS-A; 1)
- Espectro No. 23. IR del 2,7,15,19-tetraacetoxi-labda-8(17),13Z-dieno
(HS-Aac; 5)
- Espectro No. 24. RMN-¹H del 2,7,15,19-tetraacetoxi-labda-8(17),13Z-dieno
(HS-Aac; 5)
- Espectro No. 25. RMN-¹³C del 2,7,15,19-tetraacetoxi-labda-8(17),13Z-dieno
(HS-Aac; 5)

I. INTRODUCCIÓN.

El descubrimiento de agentes terapéuticos a partir de plantas terrestres constituye una de las metas que el hombre ha perseguido desde los tiempos prehistóricos y es una característica distintiva de todas las culturas de la antigüedad y de la era moderna. Los productos naturales de origen vegetal son fuentes de sustancias químicas de interés económico, algunos son utilizados como importantes fármacos y moléculas prototipo para la síntesis de análogos, así como herramientas para la investigación bioquímica de los receptores involucrados en los procesos de la transducción de señales en las diversas rutas fisiológicas de los mamíferos, entre otros.¹

En todo el mundo, la investigación científica basada en la información etnobotánica que recopila los usos tradicionales de plantas de interés económico y medicinal, es decir, la denominada “**hipótesis etnobotánica**”, ha constituido una de las guías principales para el descubrimiento de compuestos bioactivos. En México, las bastas tradiciones culturales de los pueblos autóctonos, como las civilizaciones Maya y Azteca, junto con el antiquísimo conocimiento occidental del uso de plantas medicinales aportado por los europeos colonizadores del nuevo continente, han proporcionado una abundante Farmacopea que incluye cientos de plantas y, evidentemente otros

cientos de plantas deberían incluirse si fuera posible considerar todas las tradiciones culturales de los numerosos pueblos mesoamericanos. La mayoría de estos conocimientos tradicionales sobre el empleo de la flora medicinal y de interés económico permanece sin explorarse y podría sugerirse que nuestro conocimiento sobre la explotación racional de agentes biológicamente activos de origen natural es en numerosas ocasiones inferior a la comprensión que los pueblos mesoamericanos tenían al respecto.²

Durante el transcurso de la investigación fitoquímica que se realiza en el departamento de Farmacia de la Facultad de Química (UNAM), la hipótesis etnobotánica ha constituido la referencia directa que ha permitido el diseño de un plan efectivo para la selección y la recolecta del material vegetal para la posterior investigación de la composición química y la exploración de algunas actividades biológicas de diversas plantas mexicanas con un amplio uso tradicional.^{2,3} De tal suerte, que la presente investigación forma parte de la propuesta de investigación titulada “Evaluación del potencial citotóxico, antimicrobiano e insecticida de especies selectas del género *Hyptis* (Lamiaceae) como una fuente potencial de agentes terapéuticos y agroquímicos naturales” y se enfocó a la investigación química de la especie *Hyptis spicigera* Lam., una planta utilizada por los agricultores para evitar la

infestación por insectos del garbanzo almacenado. Esta investigación permitirá conocer de manera preliminar el metabolismo secundario de esta especie y proponer futuras investigaciones para la evaluación de su potencial insecticida de interés agroquímico.

Numerosos ejemplos de plantas superiores con propiedades insecticidas y con un reconocido uso en la agricultura tradicional pueden mencionarse y algunas de ellas se han utilizado desde la antigüedad. Así por ejemplo, el piretrum (**fig. 1.1**) que se obtiene de las inflorescencias del *Chrysanthemum cinerifolium* (*C. cinerifolium*) se conoce desde los tiempos del rey persa Darío "El grande" (521-486 A.C).⁴ De la literatura científica contemporánea, se puede hacer referencia a las propiedades insecticidas de la *Artemisia ludoviciana* Willd. (Compositae), que se utiliza seca entre los costales de maíz con el objeto de evitar los daños provocados por los gorgojos; a la hierba de la cucaracha, *Haplophyton cimidum* D.C. (Apocynaceae) que se utiliza en forma de una infusión contra la mosca y el gusano de la naranja y del mango;⁵ al extracto del ajo *Allium sativum* Linné (Liliaceae) que es eficaz contra el ataque de los mosquitos resistentes a los insecticidas organosintéticos y, en especial, a las especies del género **Hyptis** debido a su amplio uso popular como agentes insecticidas. *Hyptis urticoides*

presenta un efecto antidegustativo (“antifeedant”) sobre las larvas del gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda*) e *Hyptis suaveolens* que muestra un efecto tóxico contra el mosquito doméstico (*Culex quinquefasciatus*).⁶

Durante los últimos veinte años y como parte de una búsqueda intensa realizada por numerosos grupos de investigación fitoquímica en todo el mundo, se han identificado a las familias de las meliáceas y de las labiadas como una fuente prometedora de compuestos con propiedades insecticidas. En particular, algunos miembros de los géneros *Azadirachta* y *Melia* (Meliaceae) representan fuentes de tetranortriterpenoides insecticidas, como la azadirachtina (**fig. 1.1**), de interés práctico para el control de las plagas.⁷

Dentro de la familia de las labiadas, las especies de los géneros *Ajuga*, *Teucrium*, *Scutellaria*, *Leonurus*, *Stachys* y *Salvia* son ricas en diterpenos neoclerodánicos con propiedades antidegustativas.⁸ Como ejemplos de este tipo de compuestos se pueden mencionar a la: **ajugarina I**, aislada de la especie *Ajuga remota* que resultó activo en contra de *Spodoptera exempta*, *S. littoralis* y *Heliothis armigera*; la **ajugarina IV**, aislada del mismo material vegetal e inactiva en contra de *S. exempta* pero con propiedades insecticidas en contra de *Bombyx mori*; y la **jodrelina B**, aislada de *Scutellaria*

woronowii y que es considerado como el antidegustativo con núcleo clerodánico más poderoso en contra de *S. littoralis*.

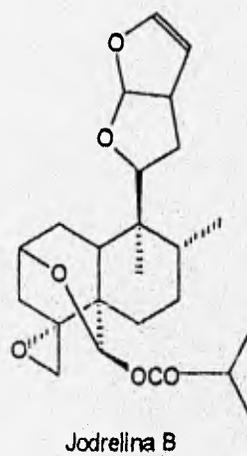
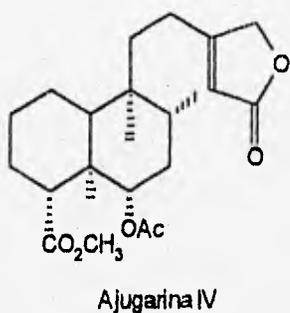
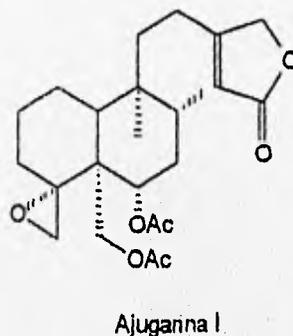
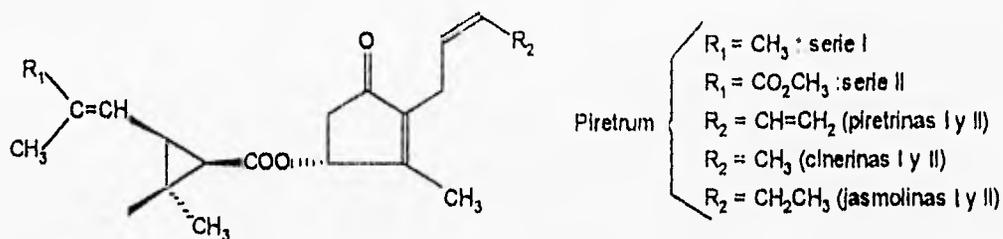


Figura 1.1. Ejemplos selectos de productos naturales con propiedades insecticidas.

II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.

2.1 Justificación.

En las últimas dos décadas, el interés por la búsqueda de nuevos principios activos a partir de materias primas vegetales ha sido notable y la selección de las mismas utilizando como criterio su uso en la medicina tradicional (**hipótesis etnobotánica**) ha permitido el hallazgo de principios biodinámicos de interés terapéutico y agroquímico. En este sentido, la diversidad de la flora mexicana representa una fuente valiosa para la búsqueda de principios activos novedosos y que aún se encuentra prácticamente inexplorada.⁹ Un ejemplo magnífico que ilustra este potencial para el descubrimiento de sustancias bioactivas basado en la hipótesis etnobotánica es el estudio químico-biológico de las especies mexicanas de utilidad económica y medicinal del género *Hyptis*. La investigación fitoquímica de estas especies ha sido sumamente parcial, de tal suerte que la información disponible relacionada con el contenido metabólico de este género y su posible importancia farmacéutica y agroquímica constituye un punto de partida de gran interés para la planeación y el desarrollo de diversos proyectos interdisciplinarios, que contribuyan al conocimiento de la composición química y la actividad biológica de la flora mexicana.²

Es bien conocido que el combate de las plagas de insectos se realiza casi exclusivamente con el empleo de insecticidas sintéticos, los cuales ocasionan numerosos problemas toxicológicos y ambientales. El combate de los insectos, mediante nuevos productos químicos con una menor toxicidad para el medio ambiente y para los otros organismos vivos de los agrosistemas, es una acción que debe considerarse en la actualidad para el desarrollo de agentes agroquímicos, y por ello la búsqueda de insecticidas vegetales efectivos constituye uno de los objetivos primordiales en la investigación de los productos naturales de interés en la agricultura.

2.2 Objetivo general.

Con el objetivo de evitar los inconvenientes antes mencionados de los insecticidas convencionales, en la actualidad se realizan numerosas investigaciones enfocadas al descubrimiento de "insecticidas verdes", es decir productos de origen vegetal con modos de acción altamente específicos (no neurotóxicos), de gran utilidad para el control de las plagas y, por lo tanto, con una baja o nula toxicidad para los mamíferos y otros vertebrados e invertebrados.¹⁰ De esta manera, el propósito fundamental de la presente propuesta de investigación consistió en el aislamiento y la determinación de la

naturaleza química de los constituyentes mayoritarios presentes en la planta *Hyptis spicigera* Lam. (Lamiaceae), una especie con un reconocido empleo en la agricultura tradicional debido a sus propiedades insecticidas.

2.3 Objetivos específicos.

a) Efectuar las operaciones fitoquímicas de acuerdo a una metodología convencional, con el fin de aislar y purificar los metabolitos secundarios mayoritarios presentes en *Hyptis spicigera*.

b) Caracterizar la estructura de los constituyentes mayoritarios aislados de esta especie, mediante la aplicación de técnicas espectroscópicas y espectrométricas contemporáneas: i.e., infrarrojo (IR), espectrometría de masas (EM), resonancia magnética nuclear de hidrógeno (RMN-¹H) y de carbono-13 (RMN-¹³C).

c) Realizar correlaciones químicas entre los compuestos aislados con la finalidad de establecer de manera inequívoca la estructura de los mismos.

d) Discutir en forma detallada la elucidación estructural de los nuevos metabolitos secundarios aislados.

III. ANTECEDENTES.

3.1 *Etnobotánica del Género Hyptis.*

3.1.1 Generalidades.

Las especies de las labiadas (Lamiacea) han constituido recursos naturales importantes para el Viejo y el Nuevo Mundo y sus usos en la medicina popular como importantes remedios para el tratamiento de enfermedades respiratorias, cardíacas, neurológicas y desórdenes gastrointestinales (e.g. *Mentha piperita*, la menta; *Rosmarinus officinalis*, el romero) y, en especial, como condimentos en la culinaria (e.g. *Ocimum basilicum*, el orégano) son de suma importancia en la vida diaria de numerosos pueblos. La medicina tradicional ha puesto un énfasis especial en el empleo de los extractos y en los aceites esenciales de las labiadas debido a sus propiedades antibacterianas, antivirales, carminativas y espasmolíticas.¹¹ Una revisión bibliográfica de la composición química de los aceites esenciales de las labiadas y su explotación en las industrias farmacéutica y de la perfumería (e.g. *Lavandula angustifolia*), se publicó recientemente.¹² Un gran número de las especies medicinales de labiadas se utilizan como remedios gastrointestinales (e.g. *Agastache mexicana*, el toronjil) por las

culturas autóctonas y mestizas de Mesoamérica y, en particular, el género *Hyptis* cuenta con varios representantes (e.g. *H. suaveolens*, la chía; *H. albida*, la salvia blanca) con un amplio uso en la medicina tradicional de México.² A pesar de que este género presenta una variedad considerable de usos populares,¹³ es importante destacar que la mayoría de las especies medicinales de *Hyptis* se utilizan como remedios caseros (e.g. *H. pectinata*, la hierba del burro; *H. verticillata*, la hierba martina) para el tratamiento de malestares gastrointestinales, de infecciones de la piel, del reumatismo y de los dolores musculares y calambres.²

3.1.2 El género *Hyptis* como una fuente de insecticidas.

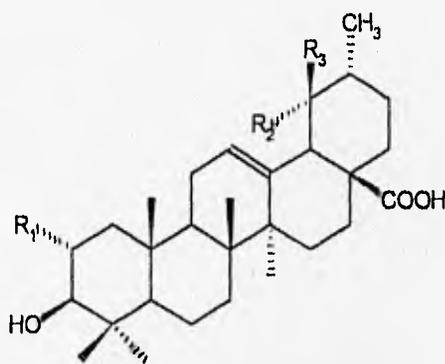
Al igual que otros miembros de la familia de las labiadas, las especies del género *Hyptis* gozan de una reputación como poderosos repelentes de insectos.¹⁴ En nuestro país, son cuatro las especies de este género que se utilizan debido a sus propiedades insecticidas: *H. capitata*, *H. emoryi*, *H. verticillata*, y *H. albida*.¹⁵ Recientemente, se describió el potencial insecticida de la especie *H. spicigera* sobre el gorgojo del frijol (*Acanthoscelides obtectus*), bajo condiciones experimentales controladas.¹⁶ Esta investigación demostró que los extractos etanólicos de *H. spicigera* reducían la oviposición y la eclosión de las larvas de los insectos de prueba

con una concentración efectiva media (CE₅₀) de 0.3-14 µl de extracto por cada gramo de frijol. Desafortunadamente, no existe ninguna otra investigación dirigida al estudio específico del potencial insecticida de los extractos totales y de los metabolitos secundarios de las especies de este género y, por lo tanto, la presente propuesta de investigación se fundamentó en la hipótesis etnobotánica.

3.2 GENERALIDADES FITOQUÍMICAS DEL GÉNERO *Hyptis*.

El género *Hyptis* se caracteriza por ser rico en aceites esenciales que contienen cantidades considerables de mono y sesquiterpenoides.^{12, 17} Por ejemplo, para *Hyptis spicigera* se han aislado: dos monoterpenoides α -pineno y sabineno y el sesquiterpeno β -cariofileno como los constituyentes mayoritarios de sus aceites esenciales.^{18, 19} La actividad bacteriostática o bactericida de las especies medicinales de este género puede ser atribuida, en gran medida a los componentes bioactivos presentes en sus aceites esenciales, como por ejemplo el citral y el linalool.²⁰ El análisis del aceite esencial de las hojas de *H. pectinata*, mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas, demostró la presencia del timol como el constituyente mayoritario (32.2%), y probablemente, este constituyente sea el responsable de las propiedades antisépticas de esta esencia.²

Los triterpenos constituyen los productos del metabolismo secundario más abundantes y ampliamente distribuidos entre las especies de este género y representan derivados pentacíclicos con diferentes grados de oxidación de los esqueletos básicos de lupano, oleanano y ursano.¹⁸ Se ha sugerido que la actividad citotóxica detectada durante los procedimientos de evaluación de extractos orgánicos derivados de remedios tradicionales pertenecientes a la familia de las labiadas se asocia con la presencia de grandes cantidades de triterpenoides moderadamente citotóxicos,² como los ácidos ursólico, 2 α -hidroxiursólico y pomólico (fig. 3.1).



$R_1 = R_3 = H, R_2 = CH_3$: ácido ursólico

$R_1 = OH, R_2 = CH_3, R_3 = H$: ácido 2 α -hidroxiursólico

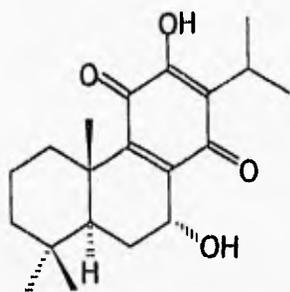
$R_1 = H, R_2 = CH_3, R_3 = OH$: ácido pomólico

Figura 3.1. Principales triterpenos citotóxicos del género *Hyptis*.

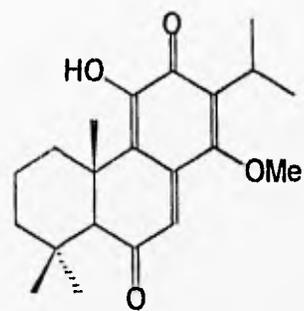
En el género *Hyptis* se han aislado seis diterpenos, cinco de los cuales tienen esqueleto de abietano y un sexto con esqueleto de isopimarano (cuadro I). El extracto metanólico de la raíz de la especie medicinal *Hyptis fruticosa* proporciona tres hidroquinonas: la horminona, la 14-metoxitaxodiona y el hiptol (fig. 3.2). La 14-metoxitaxodiona constituye el principio antitumoral de la fracción diterpénica de esta raíz.^{21, 22, 23} El ácido suaveólico y el suaveolol (fig. 3.2) son otros derivados estructurales del abietano que han sido aislados de los extractos orgánicos de las partes aéreas de *Hyptis suaveolens*.²⁴ Por último, el Salzol aislado de *Hyptis salzmanii* (fig. 3.2).²⁵

Cuadro I.-Diterpenos aislados de plantas del género *Hyptis*.

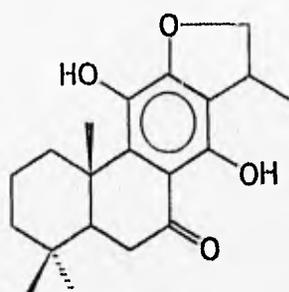
<i>Diterpeno</i>	<i>p.f</i>	$[\alpha]$	<i>Fuente natural</i>
Horminona	176-178° C	-130 ⁰	H. fruticosa
14-metoxitaxodiona	170-171° C	+113 ⁰	H. fruticosa
Acido suaveolico	198-201° C	+68.2 ⁰	H. suaveolens
Suaveolol	186-187° C	+81.3 ⁰	H. suaveolens
Hiptol	202-203° C	+56 ⁰	H. fruticosa
Salzol	196-197° C	-10.5 ⁰	H. salzmanii



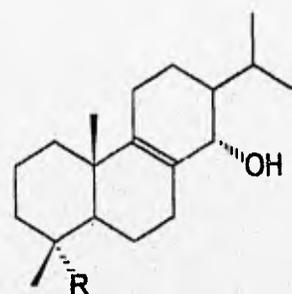
Homionona



14-metoxitaxodiona

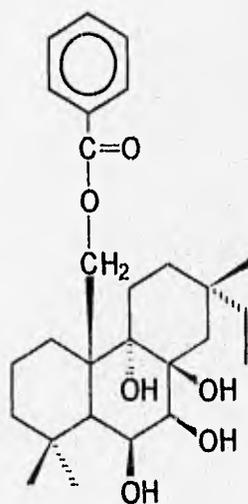


Hiptol



R = CH₂OH : Suaveolol

R = CO₂H : ácido suaveólico



Salzol

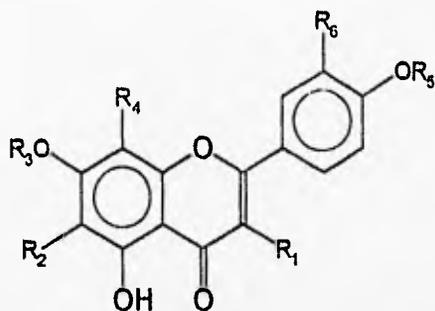
Figura 3.2. Diterpenos aislados del género *Hyptis*.

Los diterpenos, que presentan una gran diversidad estructural,²⁶ son de gran interés tanto por su comportamiento químico como por sus propiedades biológicas, entre las que destacan su papel en las interacciones planta-insecto como inhibidores del crecimiento larvario y antidegustativo.²⁷ Otras importantes actividades biológicas asociadas a los diterpenos son las propiedades antitumorales, antimicrobianas y alelopáticas como inhibidores del crecimiento vegetal.^{27, 28}

La distribución de los flavonoides en el género *Hyptis* es sumamente limitada y no se ha realizado ningún estudio quimiotaxonómico para establecer su abundancia en este género. Sin embargo, los flavonoides aislados se caracterizan por la metoxilación de las posiciones C₃, C₆ y C₈ del núcleo básico de apigenina (5,7,4'-trihidroxi-flavona).¹⁷ Las fracciones lipofílicas de los extractos orgánicos preparados a partir de la salvia blanca (*H. albida*), han demostrado importantes actividades antimicrobianas que pueden atribuirse, en primera instancia, al alto contenido de ácido rosmarínico (0.2% peso seco) y, en segundo término, a la presencia de diversos flavonoides.² Entre estos últimos, la cirsimaritina demostró un amplio espectro de actividad antimicrobiana en contra de *Staphylococcus aureus* [CIM (concentración inhibidora media) = 31.25 µg/ml]; *Bacillus subtilis*

(CIM = 15 $\mu\text{g/ml}$); *Pseudomonas aeruginosa* (CIM = 31.25 $\mu\text{g/ml}$) y *Candida albicans* (CIM = 50 $\mu\text{g/ml}$). La ermanina, la nevadensina y la isosakuranetina desarrollan una actividad marginal en contra de las bacterias Gram positivo (CIM = 50-70 $\mu\text{g/ml}$).²⁹ La gardenina B y la 5-hidroxi-4',3,6,7,8-pentametoxiflavona constituyen parte de la fracción citotóxica del extracto etanólico de *H. tomentosa*,³⁰ en tanto que la sideritoflavona es uno de los constituyentes moderadamente citotóxicos presentes en las partes aéreas de *H. verticillata*.³¹ La **figura 3.3** ilustra las estructuras de los flavonoides bioactivos de algunas especies medicinales del género *Hyptis*.

La hierba negra o hierba martina (*H. verticillata*) representa una fuente alternativa a las especies de *Podophyllum* (Berberidaceae) para la obtención de lignanos del tipo de la podofilotoxina (**fig. 3.5**).^{31, 32} De tal suerte que las propiedades catárticas, antihelmínticas y antitumorales de las infusiones preparadas con esta planta, así como su uso tradicional en la dermatología para el tratamiento de las verrugas, puede asociarse fácilmente a su elevado contenido de lignanos citotóxicos con esqueleto de arilnaftaleno (**fig. 3.4**), dibenzilbutirolactona (**fig. 3.4**) y ariltetralina del tipo de la podofilotoxina (**fig. 3.5**), los cuales poseen un espectro diverso de actividades biodinámicas de gran interés para el desarrollo de agentes farmacológicos novedosos.²



$R_1 = R_2 = R_4 = \text{OCH}_3$; $R_3 = R_5 = \text{CH}_3$; $R_6 = \text{H}$: 5-OH,4',3,6,7,8-pentametoxiflavona

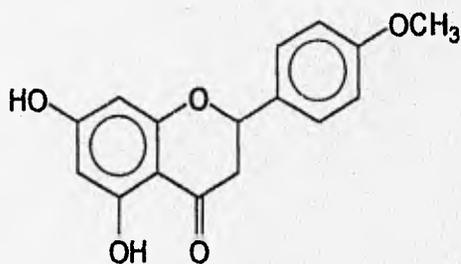
$R_1 = R_6 = \text{H}$; $R_2 = R_4 = \text{OCH}_3$; $R_3 = R_5 = \text{CH}_3$: Gardenina B

$R_1 = R_4 = R_5 = \text{H}$; $R_2 = \text{OCH}_3$; $R_3 = \text{CH}_3$; $R_6 = \text{OH}$: Sideritoflavona

$R_1 = R_4 = R_5 = R_6 = \text{H}$; $R_2 = \text{OCH}_3$; $R_3 = \text{CH}_3$: Cirsimaritina

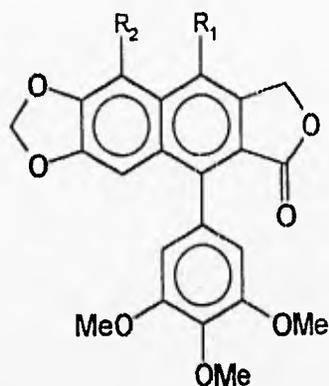
$R_1 = \text{OCH}_3$; $R_2 = R_3 = R_4 = R_6$; $R_5 = \text{CH}_3$: Ermanina

$R_1 = R_3 = R_6 = \text{H}$; $R_2 = R_4 = \text{OCH}_3$; $R_5 = \text{CH}_3$: Nevadensina

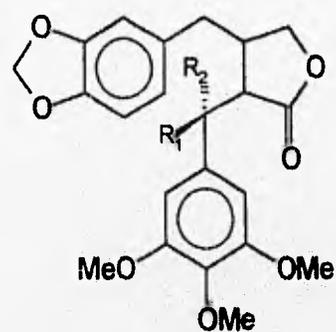


Isosakuranetina

Figura 3.3. Flavonoides bioactivos aislados del género *Hyptis*.

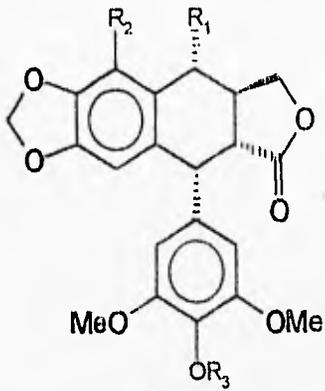


- $R_1 = R_2 = H$:Deshidrodeshidropodofiloxina
 $R_1 = H; R_2 = OH$:Dehidropeltantina
 $R_1 = OH; R_2 = H$:Deshidropodofiloxina
 $R_1 = OH; R_2 = OCH_3$:5-metoxideshidropodofiloxin

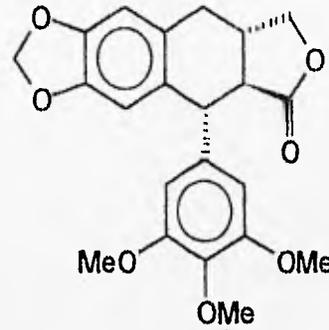


- $R_1 = R_2 = H$:Yatelina
 $R_1 = OH; R_2 = H$:Podorhizol
 $R_1 = H; R_2 = OH$:Epipodorhizol

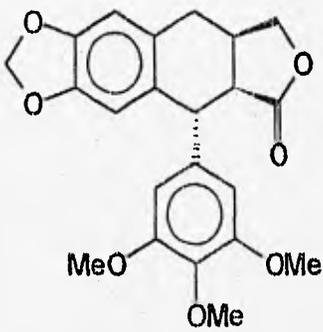
Figura 3.4. Lignanos citotóxicos con un esqueleto de arilnaftaleno y de dibencilbutirolactona de *Hyptis verticillata*.



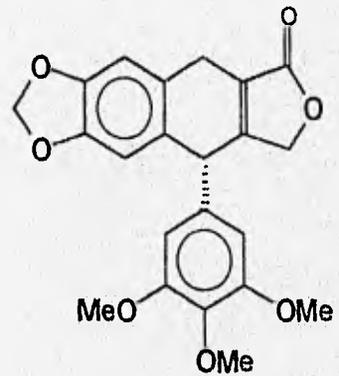
$R_1 = \text{OH}; R_2 = \text{H}; R_3 = \text{CH}_3$: Podofilotoxina
 $R_1 = \text{H}; R_2 = \text{OH}; R_3 = \text{CH}_3$: β -peltantina
 $R_1 = R_2 = R_3$: 4-D esmetildesoxipodofilotoxina
 $R_1 = R_2 = \text{H}; R_3 = \text{CH}_3$ Δ^2 : β -Apopicropodofiloto



Isodesoxipodofilotoxina



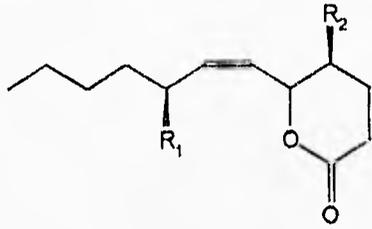
Desoxipicropodofilotoxina



Hyptinina

Figura 3.5. Lignanos citotóxicos con esqueleto de aritetralina de *Hyptis verticillata*.

Un grupo distintivo de metabolitos secundarios para este género de labiadas, desde el punto de vista quimiotaxonómico, son las 5,6-dihidro- α -pironas. La estructura de estas δ -lactonas parece estar relacionada con una derivación policética a partir de la ruta del acetato-malonato. Sin embargo, no debe excluirse la posible participación de carbohidratos en la génesis de estos metabolitos.^{33, 34} La distribución de estos compuestos en el reino vegetal es amplia,³⁵ sin embargo, sólo se han descrito ocho δ -lactonas en el género *Hyptis*, las cuales se caracterizan por poseer la misma estereoquímica absoluta en el centro quiral C-6.³⁶ La actividad antimicrobiana y citotóxica de los extractos orgánicos de *H. pectinata* se asoció con la presencia de tres 5,6-dihidro- α -pironas, denominadas con el nombre de pectinólidas A-C (fig. 3.6).³⁷ Se han descrito interesantes propiedades fisiológicas de posible interés terapéutico para esta clase de compuestos, e.g, actividad antiinflamatoria, antipirética, antimicrobiana, antifúngica y relajante muscular.²



$R_1 = R_2 = \text{OAc}$: Pectinólida A

$R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{OAc}$: Pectinólida B

$R_1 = \text{OAc}$, $R_2 = \text{OH}$: Pectinólida C

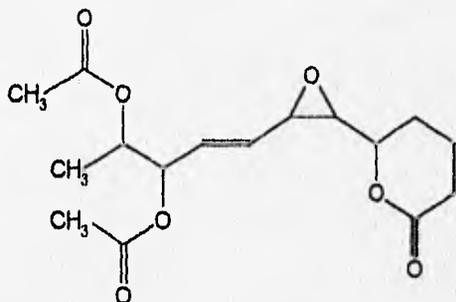
Figura 3.6. Constituyentes antimicrobianos y citotóxicos de *Hyptis pectinata*.

3.3 GENERALIDADES FITOQUÍMICAS Y BOTÁNICAS DE LA ESPECIE *Hyptis spicigera*.

La investigación etnobotánica realizada en 1985 de la planta *Hyptis spicigera* se enfocó al uso que dan los granjeros y a la eficiencia de esta especie para controlar la infestación por insectos de los granos de garbanzo almacenados.¹⁶ En segunda instancia, la primera investigación fitoquímica realizada de las partes aéreas de *Hyptis spicigera* permitió la identificación, mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas, de 34 constituyentes de naturaleza terpenoide en los aceites esenciales usados en la perfumería y en baños medicinales para el tratamiento de enfermedades de la piel en el norte de Nigeria.³⁸ Este análisis demostró un alto contenido de β

cariofileno (57-66 %), α pineno (2-5 %), sabineno (4-5 %) y la presencia de los ésteres metílicos de los ácidos grasos palmítico (1-1.5 %) y oleico (1.2 %).^{19, 38} Recientemente, se aisló del extracto de éter de petróleo de la inflorescencia de esta planta una δ -lactona, la cual se caracterizó como la 6-[5,6-(diacetiloxi)-1,2-(epoxi)-3E-heptenil]-5,6-dihidropiron-2-ona (fig. 3.7), mediante el análisis de datos espectroscópicos de IR, RMN-¹H, RMN-¹³C y RMN-homo y heteronuclear.¹⁴ Desafortunadamente, no se proporcionó ninguna evidencia para el establecimiento de la configuración absoluta de los centros quirales de esta 5,6-dihidro- α -pirona, denominada con el nombre trivial de la lactona spicigera.

El cuadro II resume las principales características botánicas de *Hyptis spicigera*.



6-[5,6-(diacetiloxi)-1,2-(epoxi)-3E-heptenil]-5,6-dihidropiron-2-ona.

Figura 3.7. δ -lactona aislada de *Hyptis spicigera*.

Cuadro II.- Características botánicas de *Hyptis spicigera*.³⁹

<i>Familia</i>	Lamiaceae
<i>Nombre científico</i>	<i>Hyptis spicigera</i> Lam
<i>Nombre vulgar</i>	Hierba del burro.
<i>Descripción</i>	<p>Espigas muy densas, continuas, el cáliz imbricado; tallos generalmente ramificados; hojas ovadas.</p> <p>Maleza anual comúnmente menor de un metro de alto, pero hasta 3 m, más o menos ramificada, delicadamente hirsuta con pelos diminutos y escabrosos sobre los ángulos; láminas foliares estrechamente ovadas u ovales, de 3-8 cm de largo, agudos en el ápice, uniformemente estrechados en la base, irregularmente aserrados, ambas superficies semi-glabras, menuda y delicadamente hirsutas a lo largo de las venas; peciolo de 1-3 cm de largo; flores apretadas en espigas densas, hasta de 8 cm de largo a la madurez y de 1.5 cm de diámetro; bracteolas lineares, bastante rígidas para la sección, ciliado pectinadas, de 3.5-4 mm de largo; tubo del cáliz en flor turbinado, levemente hispido, de 1.5 mm de largo, los dientes lineares, erectos, casi de 2 mm de largo, el tubo maduro de 5 mm de largo; núculos de 1.3 mm de largo.</p>
<i>Distribución</i>	<p>Extensamente distribuida a través de los trópicos de ambos hemisferios pero coleccionada más frecuentemente en el Viejo Mundo. En las Américas puede ser encontrada desde México central y Cuba hasta Brasil y Perú. Es coleccionada con frecuencia en las Indias Orientales y se presenta con abundancia en África tropical en Senegal, Sierra Leona, Nigeria, el Sudán, el Congo, Zaire y en Madagascar.</p>

IV. PARTE EXPERIMENTAL.

4.1 TÉCNICAS ANALÍTICAS.

4.1.1 Procedimientos Generales.

4.1.1.1 Cromatografía en columna.

Las técnicas de separación que utilizaron la cromatografía en columna se realizaron empacando una columna de vidrio con gel de sílice para cromatografía flash de 40 μm (Baker). El sistema de disolventes seleccionado que constituyó la fase móvil, se eluyó administrando una presión de 7 lb/pulg² con una bomba de mediana presión (GE Motors).

4.1.1.2 Cromatografía en capa fina.

Se utilizaron cromatoplasmas de vidrio (5 x 10 cm, espesor 0.25 mm) cubiertas con gel de sílice 60 F₂₅₄ (Merck) para los análisis cromatográficos de cada uno de los eluatos obtenidos durante la resolución de los extractos orgánicos.

Para la separación y la purificación a nivel preparativo en cromatografía en capa fina, se utilizaron cromatoplasmas de vidrio (20 x 20 cm, espesor 2 mm y 0.25 mm) cubiertas con gel de sílice 60 F₂₅₄ (Merck).

El análisis cromatográfico de cada uno de los eluatos, las fracciones y los compuestos puros obtenidos durante la resolución de los extractos totales se realizó de la siguiente manera:

1.- Mediante un capilar fino se tomó una alícuota de la muestra problema en solución y se depositó en un punto sobre la superficie de la cromatoplaaca a una distancia de aproximadamente 1.3 cm por arriba del límite inferior.

2.- La resolución cromatográfica de la muestra problema se efectuó mediante el empleo de un sistema de elución adecuado contenido dentro de una cámara cromatográfica, la cual previamente se saturó con el eluyente.

3.- Para la detección de los constituyentes en la placa cromatográfica; en primer lugar, se dejó evaporar el eluyente de la placa y se expuso a la luz de una lámpara con emisión de luz ultravioleta de onda corta (254 nm) y de onda larga (365 nm). Se marcó cualquier zona que presentara fluorescencia. Finalmente, las placas se impregnaron con el agente cromógeno (**cuadro III**) mediante aspersion y se revelaron por calentamiento sobre una parrilla a una temperatura de 80 °C.

Cuadro III.- Agente cromógeno utilizado para la visualización de las cromatoplasmas.

<i>Revelador</i>	<i>Composición</i>
Sulfato cérico/ H ₂ SO ₄ .	Sulfato cérico (12 g) y H ₂ SO ₄ (22 ml), en 350 g de hielo.

4.1.1.3 Identificación de los compuestos puros.

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato digital (Electrothermal I-A 9100) y se reportan sin corregir. Los espectros de **IR** se corrieron en un espectrómetro Perkin-Elmer Mod 1600 en la modalidad de pastilla de KBr. En general, sólo las absorciones "intensas" se describen. Los espectros de **RMN-¹H** y **RMN-¹³C** se generaron en los espectrómetros Brecker AMX-500 y Varian XL-300, los cuales se operaron a una frecuencia de 500 y 300 MHz (espectros de **RMN-¹H**) así como, a 125 y 75.4 MHz (espectros de **RMN-¹³C**), respectivamente. Los desplazamientos químicos se asignaron en unidades δ (ppm) referidas al TMS como referencia interna y utilizando como disolvente CDCl₃. Los espectros de masas fueron registrados en un aparato Hewlett-Packard 5985-B mediante ionización química. Las rotaciones ópticas se midieron en un polarímetro Perkin-Elmer 241, tras previa disolución de la muestra en MeOH. Los **Rt** se midieron en un

cromatógrafo de líquidos (Waters 600E), integrado a un detector de índice de refracción (Differential Refractometer 410) y conectado a un controlador y analizador de datos IBM PC (Millennium 2.10).

4.2 MATERIAL VEGETAL.

Para el desarrollo del presente trabajo de investigación, se utilizaron las partes aéreas de una población de *Hyptis spicigera* Lam. (Lamiaceae) colectadas en Noviembre de 1989 en el Km 18 de la carretera Jalapa-Veracruz, estado de Veracruz, México. Un ejemplar de esta especie se depositó en el Herbario Nacional (Voucher H-2 M21851), Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México.

4.3 EXTRACCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL.

4.3.1 Primera extracción.

El material vegetal seco (787.5 g) se cortó en pequeños trozos que posteriormente se molieron hasta obtener un polvo fino. Esta materia prima se sometió a una extracción por maceración con hexano (4 l) a temperatura ambiente, durante 5 días. Posteriormente, el disolvente de extracción se decantó y filtró para ser concentrado por destilación a presión reducida. Esta

operación se repitió en tres ocasiones. Finalmente, se obtuvo un total de 37.5 g del extracto hexánico.

4.3.2 Segunda extracción.

El material vegetal residual se sometió a una extracción adicional con una mezcla de cloroformo-metanol (1:1), siguiendo el procedimiento descrito anteriormente. Esta segunda extracción proporcionó un total de 54.5 g de un residuo pastoso de color verde oscuro.

4.4 RESOLUCIÓN DE LOS EXTRACTOS MEDIANTE MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS.

Los extractos orgánicos (hexánico y cloroformo-metanólico) se adsorbieron en gel de sílice para cromatografía flash, por separado. Cada uno se empacó con gel de sílice para cromatografía flash en una columna cromatográfica para su posterior fraccionamiento (**cuadro IV**).

Una vez que cada una de las columnas se preparó para la resolución del extracto correspondiente, la elución se realizó mediante el uso de una bomba generadora de presión para la administración de la mezcla de disolventes adecuada en forma de un gradiente de polaridad creciente. El volumen de los eluatos se concentró independientemente al vacío a presión reducida. Cada

uno de los eluatos se analizaron por CCF y las fracciones se reunieron tomando en cuenta la homogeneidad cromatográfica (R_f) de los constituyentes presentes. Finalmente, a partir de cada extracto se obtuvieron dos fracciones para su posterior análisis químico (**cuadro V**), las cuales se sometieron de manera independiente a un proceso de separación con el fin de poder aislar y purificar los metabolitos secundarios mayoritarios presentes en cada uno de ellos.

Las fracciones de menor polaridad en ambos extractos representaron sólo una mezcla de ceras y grasas por lo que no se continuó con su estudio.

Cuadro IV.- Condiciones de preparación y elución de las columnas cromatográficas.

<i>Extracto</i>	<i>Adsorbente</i> ^a	<i>Columna</i> ^b	<i>Eluatos</i> ^c
Hexánico	50g	500g	100 ml
Cloroformo-Metanólico	30g	450g	200 ml

^a gramos de gel de sílice utilizados para adsorber la muestra.

^b gramos de gel de sílice utilizados para empacar la columna.

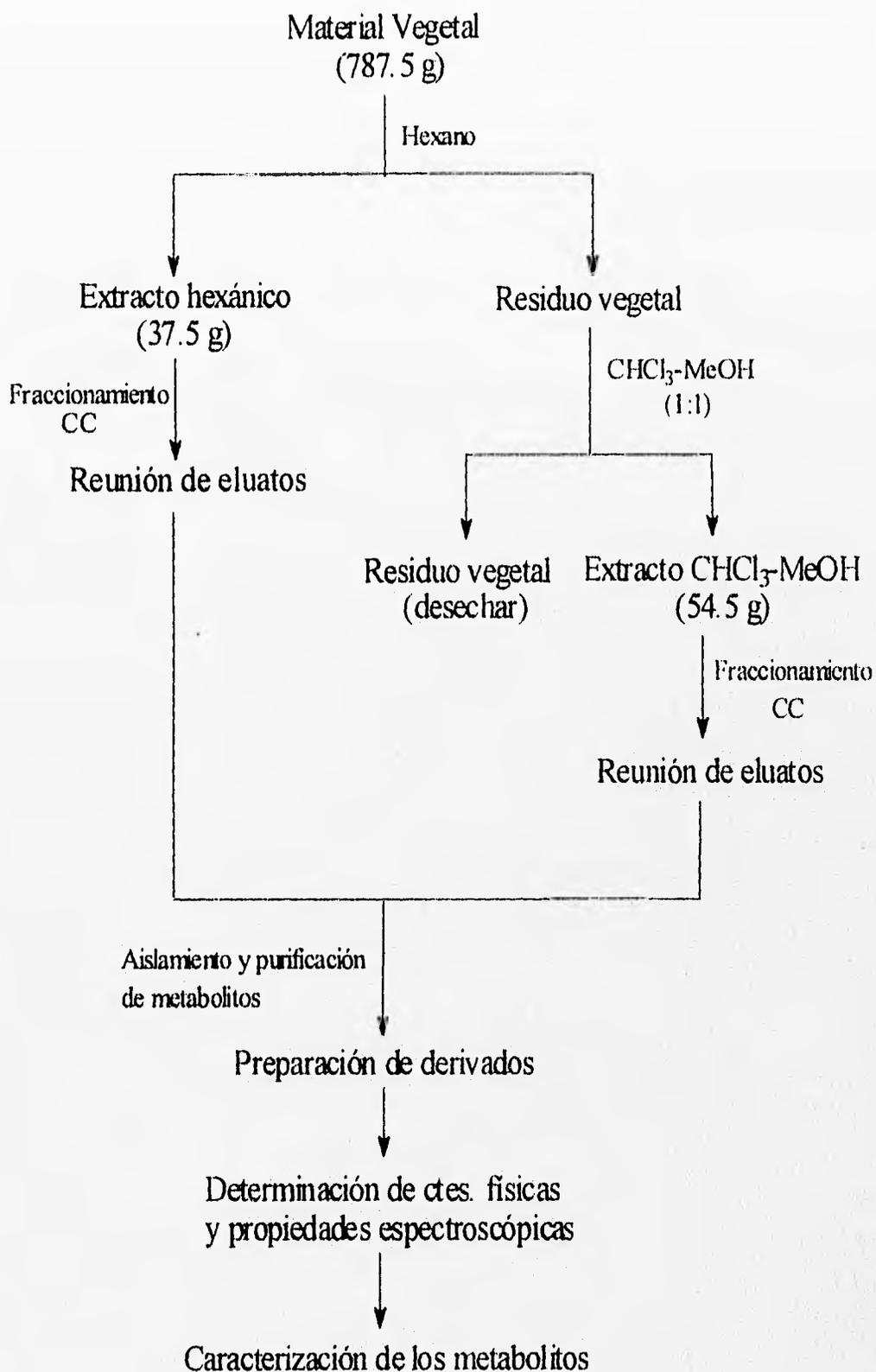
^c volumen de los eluatos colectados.

Cuadro V. - Fraccionamiento de los extractos orgánicos totales.

<i>Extracto</i>	<i>Eluatos</i>	<i>Elución</i>	<i>Fracción</i>	<i>Peso</i>
Hexánico	1-10	hexano		
	11-26	hexano-CHCl ₃ (8:2)		
	27-40	hexano-CHCl ₃ (1:1)		
	41-52	hexano-CHCl ₃ (1:1)		
	53-69	CHCl ₃		
	70-82	CHCl ₃ -Me ₂ CO (9:1)	I	513 mg
	83-113	CHCl ₃ -Me ₂ CO (9:1)	II	26.7 g
CHCl ₃ -MeOH (1:1)	1-5	CHCl ₃		
	6-8	CHCl ₃ -Me ₂ CO (6:4)		
	9-16	CHCl ₃ -Me ₂ CO (6:4)	III	10 g
	17-22	CHCl ₃ -Me ₂ CO (6:4)		
	23-37	CHCl ₃ -Me ₂ CO (4:6)	IV	6 g
	38-45	CHCl ₃ -Me ₂ CO (4:6)		
	46-54	Me ₂ CO		
	55-58	Me ₂ CO-MeOH (7:3)		
	59-62	Me ₂ CO-MeOH (7:3)		
	63-70	MeOH		

La figura 4.1 Esquematiza mediante un diagrama de bloques, la secuencia de trabajo desarrollada en el presente estudio fitoquímico.

Fig 4.1 Estrategia desarrollada para el estudio fitoquímico de *Hyptis spicigera*.



4.5 AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE LOS CONSTITUYENTES MAYORITARIOS DE LOS EXTRACTOS HEXÁNICO Y CLOROFORMO-METANÓLICO.

4.5.1 Extracto hexánico.

4.5.1.1 Resolución de la fracción I.

4.5.1.1.1 Aislamiento y purificación del compuesto HS I-2A (ácido ent-*kaur-16-en-19-óico*).

La fracción I (**Cuadro V**) se recromatografió en una columna de 4 cm de diámetro, con una altura de la gel de sílice para cromatografía flash, de 20 cm y utilizando 88 g del material adsorbente. La elución se inició con el sistema de disolventes hexano- CHCl_3 (8:2), incrementando la polaridad con CHCl_3 y Me_2CO . Se colectaron eluatos de 50 ml cada uno, obteniéndose 188 mg de las subfracciones 173-225 eluidas con hexano- CHCl_3 (1:9). Esta subfracción se sometió a un proceso de purificación en **CC** utilizando una columna de 2 cm de diámetro y 14 g de gel de sílice para cromatografía flash, para obtener una altura de 20 cm. La elución se inició con hexano- CHCl_3 (6:4), y se incrementó la polaridad con CHCl_3 . El volumen de los eluatos colectados fue de 20 ml cada uno; las subfracciones 31-36 obtenidas de esta

segunda recromatografía proporcionaron 75 mg de un constituyente en forma pura, el cual se denominó con la clave **HS I-2A**.

4.5.1.2 Resolución de la fracción II.

4.5.1.2.1 Aislamiento y purificación del β -sitosterol.

La fracción II (**Cuadro V**) se sometió a un proceso cromatográfico en una columna de 6 cm de diámetro, utilizando 362 g de gel de sílice para cromatografía flash, para alcanzar una altura de 35 cm en la columna. El volumen de los eluatos colectados fue de 50 ml cada uno. Las subfracciones 153-188 eluidas con CHCl_3 proporcionaron 180 mg de un residuo verdoso, el cual se recromatógrafió en una columna de 3 cm de diámetro, con una altura en la columna de 20 cm y utilizando 50 g de gel de sílice para cromatografía flash. Se colectaron eluatos con un volumen de 30 ml cada uno. De esta recromatografía, se colectaron las fracciones 1-87, eluidas con un sistema de disolventes que consistió de la mezcla de hexano- CHCl_3 . Estas fracciones se purificaron posteriormente mediante **CCF** a nivel preparativo usando el sistema de disolventes CHCl_3 - Me_2CO -hexano (9:1:0.5) para obtener 54 mg del β -sitosterol. El **cuadro VI** muestra el valor de **R_f** encontrado para este

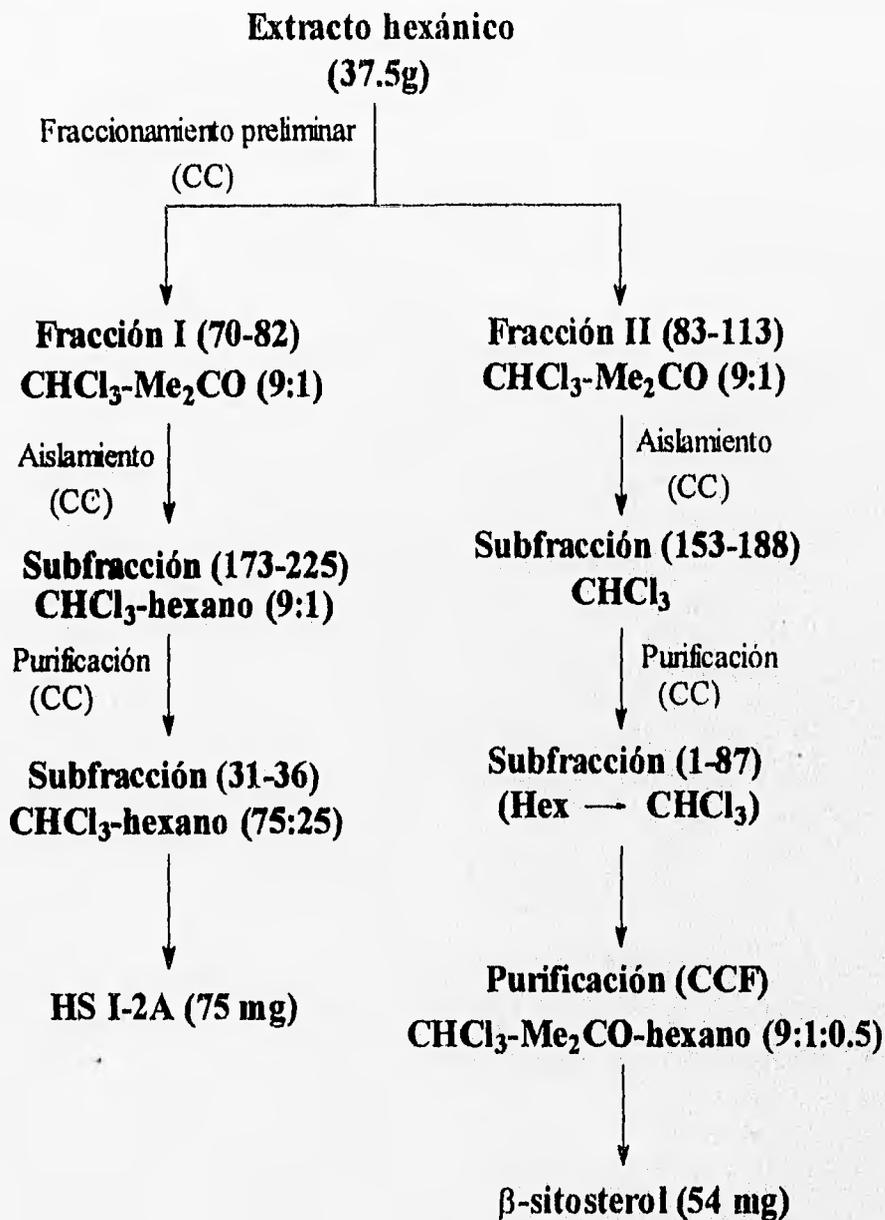
metabolito en diferentes sistemas de elución. El proceso de su identificación se realizó mediante la comparación con una muestra auténtica.

Cuadro VI.- Valores de R_f para el β -sitosterol en CCF.

<i>Sistema de elución</i>	<i>Composición</i>	<i>R_f</i>
AcOEt-Me ₂ CO	(1:1)	0.82
Me ₂ CO-MeOH	(8:2)	0.8
CHCl ₃ -AcOEt	(1:1)	0.71
MeOH-CHCl ₃	(2:8)	0.68
hexano-AcOEt	(1:1)	0.58

La figura 4.2 esquematiza la secuencia desarrollada para el aislamiento y la purificación de los constituyentes mayoritarios del extracto hexánico de *Hyptis spicigera*.

Fig. 4.2 Fraccionamiento del extracto hexánico de *Hyptis spicigera*.



4.5.2 Extracto cloroformo-metanólico.

4.5.2.1 Resolución de la fracción III.

4.5.2.1.1 Detección del ácido ursólico.

Se detectó la presencia del ácido ursólico en los eluatos 9-16 provenientes de la columna original utilizada para el fraccionamiento del extracto cloroformo-metanólico (ver cuadro V). Este ácido representó un compuesto mayoritario (100 mg) y su presencia se determinó mediante la comparación con una muestra auténtica de sus constantes espectroscópicas y del valor de R_f en diversos sistemas de elución (cuadro VII).

Cuadro VII.- Valores de R_f para el ácido ursólico en CCF.

<i>Sistema de elución</i>	<i>Composición</i>	<i>R_f</i>
AcOEt-MeOH	(2:8)	0.82
Me ₂ CO-MeOH	(8:2)	0.79
hexano-Me ₂ CO	(3:7)	0.75
CHCl ₃ -AcOEt	(1:1)	0.69
MeOH-CHCl ₃	(2:8)	0.64

4.5.2.2 Resolución de la fracción IV.

4.5.2.2.1 Fraccionamiento primario.

La fracción IV (Cuadro V) se sometió a una recromatografía en una columna de 5 cm de diámetro y 23 cm de altura de gel de sílice para cromatografía flash, utilizando 200 g del mismo adsorbente. El volumen colectado de los eluatos fue de 50 ml cada uno. De esta forma, se colectaron las subfracciones 83-86, 87-90 y 91-103, las cuales se procesaron por separado.

4.5.2.2.2 Aislamiento y purificación del compuesto HS-Am (19-acetoxi-2 α ,7 α -dihidroxiabda-8(17),13Z-dien-15-al).

Las subfracciones 83-86 resultantes del fraccionamiento primario se colectaron con el sistema de elución CHCl_3 - Me_2CO (7:3) y proporcionaron un residuo con un peso total de 49 mg. Estas subfracciones se sometieron a un fraccionamiento adicional en una columna de 2 cm de diámetro y utilizando 25 g de gel de sílice para cromatografía flash para alcanzar una altura de 20 cm. Se colectaron eluatos de 25 ml cada uno. De esta recromatografía se obtuvieron las subfracciones 39-50, eluidas con el sistema de disolventes CHCl_3 - Me_2CO (8:2), se purificaron mediante CCF a nivel preparativo con el sistema de elución CHCl_3 - Me_2CO -hexano (5:4.5:1) y

proporcionaron 5.6 mg de un compuesto en forma pura, el cual se denominó con la clave **HS-Am**.

4.5.2.2.3 Aislamiento y purificación del compuesto HS-Ax (19-acetoxi-2 α ,7 α -dihidroxi-14,15-dinorlabda-8(17)-en-13-ona).

Las subfracciones 87-90 del fraccionamiento primario proporcionaron 230 mg de un residuo que correspondió a la elución con el sistema de disolventes CHCl_3 - Me_2CO (7:3). Esta subfracción se recromatografió en una columna de 3 cm de diámetro y utilizando 50 g de gel de sílice para cromatografía flash para obtener una altura en la columna de 20 cm. Se colectaron eluatos con un volumen de 300 ml cada uno. Mediante este proceso se aislaron las subfracciones 16-34, las cuales se purificaron en CCF a nivel preparativo eluyendo dos veces con el sistema de disolventes CHCl_3 - Me_2CO -hexano (5:5:1.5) para proporcionar 20 mg de un compuesto puro, denominado con la clave **HS-Ax**.

4.5.2.2.4 Aislamiento y purificación del compuesto HS-Ae (15,19-diacetoxi-2 α ,7 α -dihidroxilabda-8(17),13Z-dieno).

Las subfracciones 91-103 (4.5 g), obtenidas a partir del fraccionamiento primario con el sistema de elución CHCl_3 - Me_2CO (1:1), se recromatografiaron en una columna de 5 cm de diámetro y utilizando 200 g de

gel de sílice para cromatografía flash para obtener una altura de 24 cm. El volumen de los eluatos colectados fue de 100 ml para las primeras 37 fracciones y de 50 ml para las restantes. Se reunieron las fracciones 34-59 y 60-83 para su posterior análisis.

La purificación de las fracciones 34-59 se realizó mediante CCF a nivel preparativo con el sistema de elución CHCl_3 - Me_2CO -hexano (5:4.5:1) para obtener de esta manera, 3.8 mg de un compuesto puro denominado con la clave **HS-Ae**.

4.5.2.2.5 Aislamiento y purificación del compuesto HS-A (19-acetoxi- $2\alpha,7\alpha$ -15-trihidroxiabda-8(17),13Z-dieno).

4.5.2.2.5.a Cromatografía en columna.

Las fracciones 60-83 (3.5 g), obtenidas de la resolución de las subfracciones 91-103 (ver sección 4.5.2.2.4), se sometieron a una recromatografía en una columna de 4 cm de diámetro utilizando 200 g de gel de sílice para cromatografía flash y obtener 45 cm de altura en la columna. El volumen de eluatos colectados fue de 125 ml cada uno. Este procedimiento permitió la obtención de 2.8 g de las subfracciones 49-63, las cuales se recromatografiaron en CC, utilizando una columna de 5 cm de diámetro, con una altura de gel de sílice para cromatografía flash de 20 cm, para lo cual se

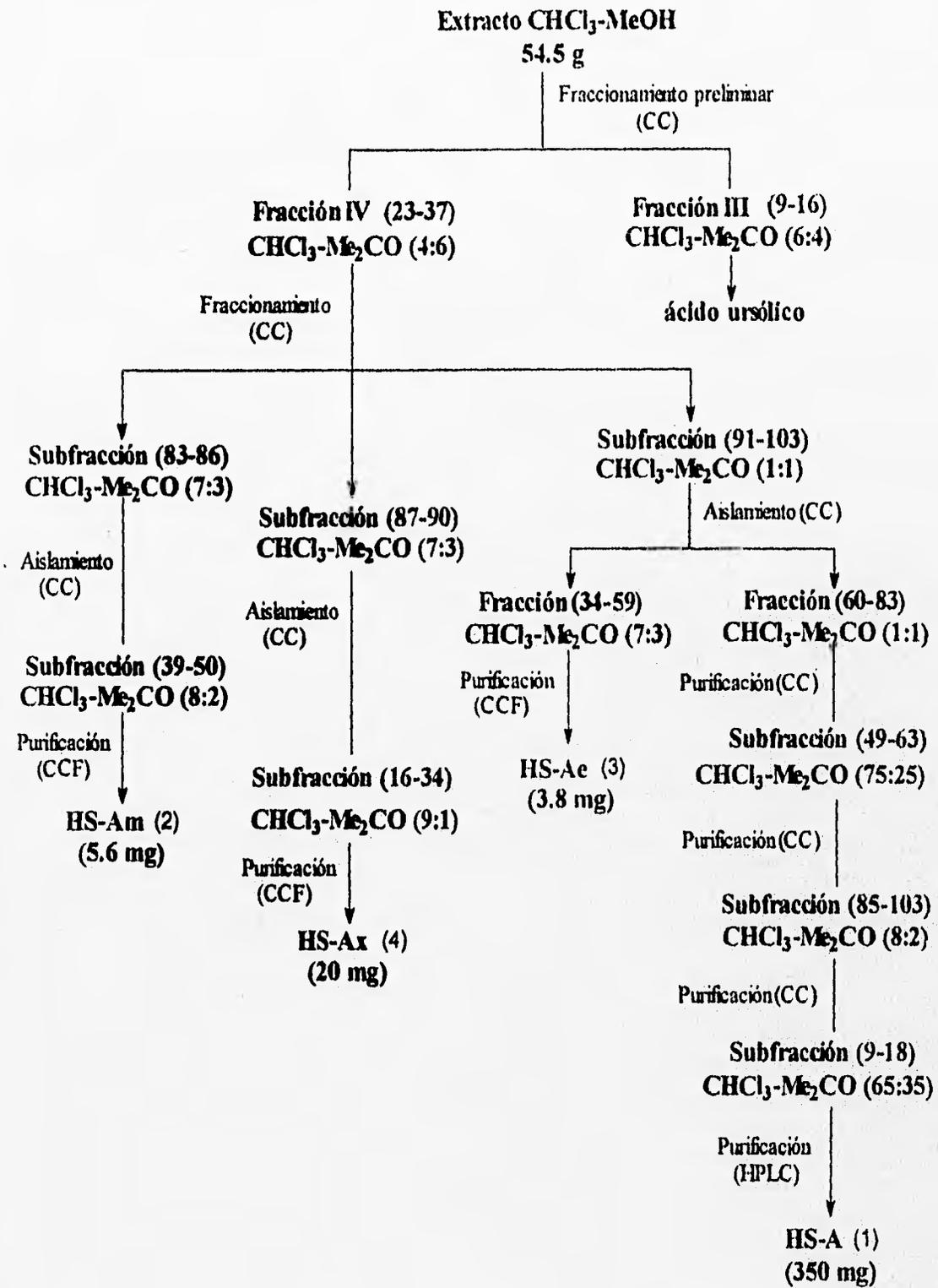
necesitaron 200 g del material adsorbente. Se colectaron eluatos de 100 ml cada uno. Las subfracciones 85-103 (1.42 g) de esta segunda recromatografía se purificaron mediante cromatografía en una columna con un diámetro de 3 cm, utilizando 50 g de gel de sílice para cromatografía flash para alcanzar una altura de 20 cm en la columna. El volumen de los eluatos colectados fue de 500 ml cada uno. Las subfracciones 9-18 de esta última recromatografía proporcionaron 350 mg de un compuesto de consistencia aceitosa y que se denominó con la clave **HS-A**.

La figura 4.3 esquematiza la secuencia desarrollada para el aislamiento y purificación de los constituyentes mayoritarios del extracto cloroformo-metanólico de *Hyptis spicigera*.

4.5.2.2.5.b Cromatografía de líquidos de alta resolución.

La purificación final del compuesto **HS-A** se logró mediante el empleo de la cromatografía de líquidos, utilizando un sistema cromatográfico Waters, integrado a una bomba modelo 600, un detector de índice de refracción modelo 410 y una columna preparativa de fase normal (μ Porasil; 250 x 21.2 mm, diámetro de partícula = 10 μ m). En este análisis la fase móvil consistió de un sistema isocrático de hexano-AcOEt (1:4) con un flujo de 6 ml/min, durante 45 min (fig. 4.4).

Fig. 4.3 Fraccionamiento del extracto cloroformo-metanólico de *Hypsis spicigera*.



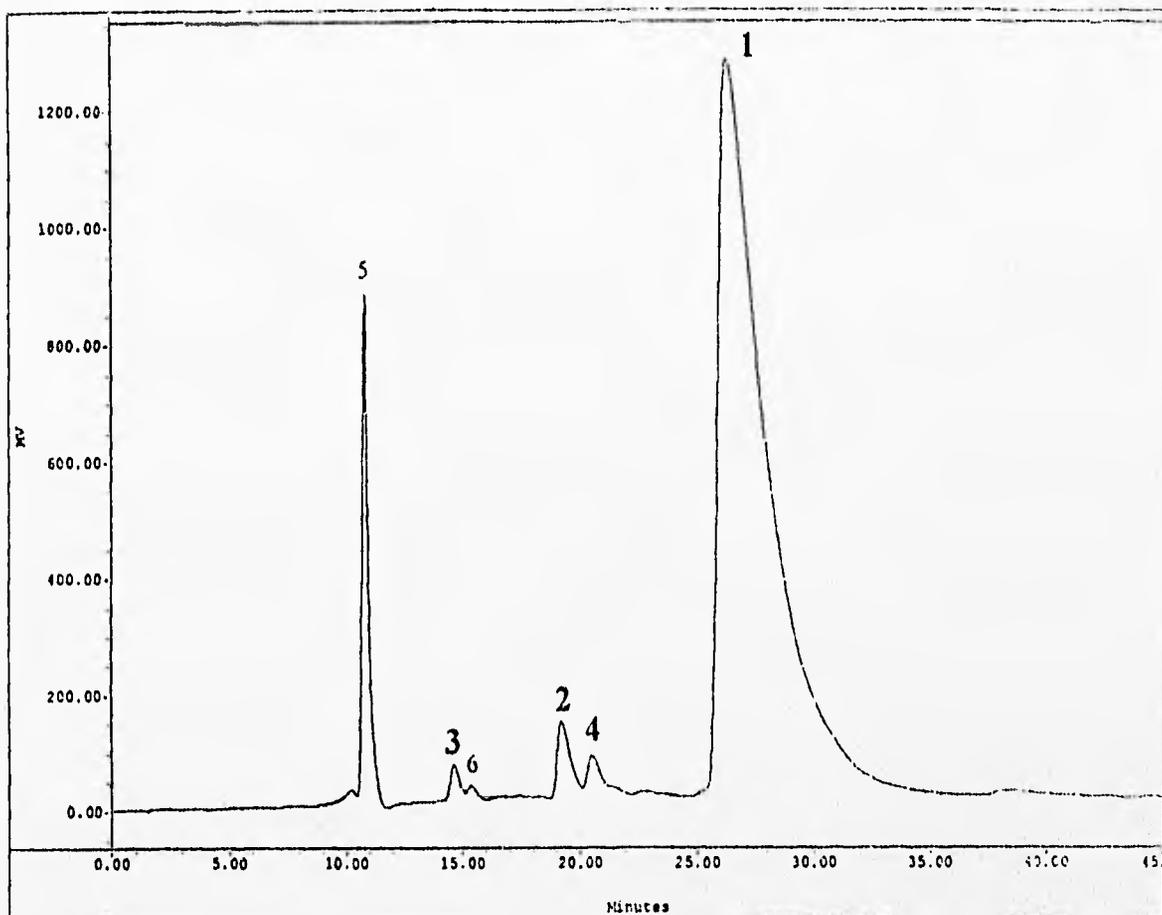


Figura 4.4. Análisis mediante cromatografía de líquidos de la fracción IV del extracto cloroformo-metanólico de *Hyptis spicigera*. Condiciones instrumentales: columna, fase normal μ Porasil (ISCO, 250 X 21.2 mm; 10 μ m); fase móvil, Hexano-AcOEt (1:4), 6 ml/min; detector, índice de refracción; concentración de la muestra 1 mg/10 μ l. Asignación de los picos: 1, HS-A (Rt = 26.22); 2, HS-Am (Rt = 19.18); 3, HS-Ae (Rt = 14.63); 4, HS-Ax (Rt = 20.50); 5, impureza (Rt = 10.8); 6, constituyente minoritario no caracterizado (Rt = 15.5).

Se inyectaron alícuotas (500 μ l) de una solución hexano-AcOEt (1:4) de las fracciones 9-18 obtenidas de la CC (ver sección 4.5.2.2.5.a) a una concentración de 0.1 mg/ μ l. Este procedimiento repetido en sucesivas ocasiones permitió la obtención del compuesto HS-A (R_t = 26.16 min) con una pureza del 100%.

4.5.2.2.6. Determinación de los factores de retención (R_f) para los diterpenos.

Los R_f para cada uno de los diterpenos aislados de *Hyptis spicigera* se determinaron mediante la cromatografía en capa fina utilizando gel de sílice como la fase estacionaria. Los procedimientos para la realización de los análisis cromatográficos se describieron anteriormente. (ver sección 4.1.1.2). La figura 4.5 muestra la cromatografía en capa fina para cada uno de los diterpenos purificados.

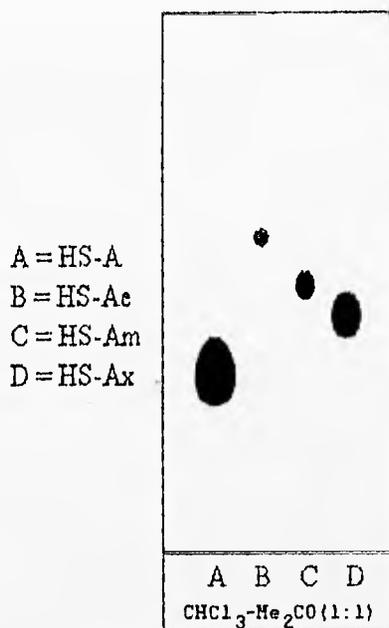


Figura 4.5. Cromatografía en placa fina de los diterpenos de *Hyptis spicigera*. Condiciones cromatográficas: cromatoplaqueta de vidrio (5 x 10 cm, espesor 0.25 mm) cubierta con gel de sílice 60 F₂₅₄; sistema de elución: $\text{CHCl}_3\text{-Me}_2\text{CO (1:1)}$. Asignación de las bandas: A, HS-A ($R_f = 0.34$); B, HS-Ae ($R_f = 0.57$); C, HS-Am ($R_f = 0.48$); D, HS-Ax ($R_f = 0.44$).

4.6 PREPARACIÓN DE DERIVADOS.

A continuación se describe la metodología utilizada en las reacciones químicas realizadas a los productos aislados de *Hyptis spicigera*, mismas que fueron desarrolladas para facilitar la completa identificación y caracterización de los productos naturales. En todos los casos, el desarrollo de las reacciones y la obtención de los derivados se comprobó mediante CCF.

4.6.1 Reacción de alquilación con diazometano.

4.6.1.1 Preparación del reactivo.

A una solución de KOH (7 mg en 12 μ l de agua destilada), 36 μ l de EtOH y 22 μ l de Et₂O se adicionaron 35.5 mg de N-metil-N-nitroso-p-toluensulfonamida (Diazald) en 42 μ l 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 5 ml de Et₂O en un baño de hielo.

4.6.1.2 Alquilación de HS I-2A.

50 mg del compuesto (HS I-2A) se disolvieron en 5 ml de CHCl₃ y se alquilaron con un exceso de solución etérea de CH₂N₂ a una temperatura de 5 °C. La adición del agente alquilante se efectuó hasta que ya no se observó

desprendimiento de nitrógeno. La cromatografía en capa fina a nivel preparativo con el sistema de elución CHCl_3 - Me_2CO (9:1) permitió la purificación de 44.9 mg del derivado metilado denominado con la clave **HS I-2Am**.

4.6.2 Reacción de acetilación.

4.6.2.1 Acetilación total de HS-A.

Las fracciones 60-65 (159.8 mg) provenientes del aislamiento del compuesto **HS-Ae** (ver sección 4.5.2.2.4), se disolvieron junto con 17.9 mg del compuesto **HS-A** en 1.7 ml de Ac_2O y 0.85 ml de piridina. Esta mezcla de reacción se mantuvo con agitación continua a temperatura ambiente durante 24 h. Posteriormente, se procedió a extraer el producto de reacción adicionando 5 ml de agua destilada. La mezcla se mantuvo en agitación durante 5 min y se realizaron 3 extracciones sucesivas utilizando en cada una volúmenes de 5 ml de AcOEt . Las fases orgánicas se reunieron y se trataron con 5 ml de HCl (por tres ocasiones), seguido de un tratamiento alcalino con una solución saturada de NaHCO_3 (7 ml). Por último, la fase orgánica se lavó dos veces con 5 ml de agua destilada en cada ocasión. Esta fase se secó con Na_2SO_4 anhidro y se concentró a presión reducida. Finalmente, el producto se

purificó mediante CC, utilizando 25 g de gel de sílice para cromatografía flash en una columna de 2 cm de diámetro y alcanzar una altura de 20 cm. El volumen de los eluatos fue de 25 ml cada uno. De esta manera, se obtuvieron 45 mg del producto denominado con la clave **HS-Aac** a partir de las fracciones 12-16, eluidas con hexano-AcOEt (75:25).

4.6.2.2 Acetilación parcial de HS-A.

57 mg del compuesto **HS-A** se disolvieron en 14 μ l de Ac_2O y 12 μ l de piridina. Esta mezcla de reacción se mantuvo en agitación continua en baño de hielo ($-5\text{ }^\circ\text{C}$) durante 10 min. Posteriormente, se procedió a extraer el producto de reacción adicionando 2.5 ml de agua destilada; la mezcla se mantuvo en agitación durante 5 min, se realizaron tres extracciones sucesivas utilizando en cada una volúmenes de 2.5 ml de AcOEt. La fase orgánica se trató con 2.5 ml de HCl (por dos ocasiones), seguido de un tratamiento alcalino con una solución saturada de NaHCO_3 (5 ml). Por último, la fase orgánica se lavó dos veces con 2.5 ml de agua destilada en cada ocasión. Esta fase se secó con Na_2SO_4 anhidro y se concentró a presión reducida. Finalmente, el producto se purificó mediante CCF a nivel preparativo, utilizando el sistema de elución CHCl_3 - Me_2CO (6:4), obteniéndose 9.5 mg de

un compuesto puro ($R_f = 0.57$), el cual fue idéntico al producto natural **HS-Ae**. La banda con $R_f = 0.34$ permitió la recuperación de 14.6 mg de la materia prima (**HS-A**).

4.6.3 Reacción de oxidación allica.

10.8 mg del compuesto denominado **HS-A** se disolvieron en 2 ml de CHCl_3 y se le adicionaron 116 mg de MnO_2 dejándose en agitación a temperatura ambiente durante 16 h. Posteriormente, la mezcla de reacción se filtró sobre celita y el filtrado se concentró a presión reducida para su posterior purificación mediante **CC** en una pipeta pasteur empacada con gel de sílice 60 Merck (Malla 70-230). La elución se llevó a cabo mediante la adición de CHCl_3 como la fase móvil. Se colectaron volúmenes de 2 ml cada uno, obteniéndose 5.6 mg de un producto puro a partir de las fracciones 8-21, el cual fue idéntico al producto natural **HS-Am**.

4.7 CARACTERIZACIÓN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS AISLADOS.

4.7.1 Caracterización del compuesto HS I-2A (ácido ent-kaur-16-en-19-óico).

El compuesto **HS I-2A** se aisló como un sólido amorfo de color blanco y presentó las siguientes propiedades físicas y espectroscópicas:

pf = 163-165 °C.

IR ν max (KBr): Espectro No. 1.

3062, 2928, 1694, 1464, 1262, 1182, 874, 740 cm^{-1} .

RMN-¹H (300 MHz, CDCl_3 , TMS): Espectro No. 2.

δ 4.80 (1H, s a, H-17); 4.74 (1H, s a, H-17'); 1.24 (3H, s, H-18);
0.95 (3H, s, H-20).

RMN-¹³C (75.4 MHz, CDCl_3 , TMS): Espectro No. 3.

δ 184.08 (C-19), 155.85 (C-16), 102.95 (C-17), 57.01 (C-5), 55.07 (C-9), 48.92 (C-15), 44.22 (C-4), 43.82 (C-13), 43.73 (C-8), 41.26 (C-14), 40.68 (C-7), 39.67 (C-10 y C-1), 37.79 (C-3), 33.11 (C-12), 28.96 (C-18), 21.83 (C-6), 19.09 (C-11), 18.45 (C-2), 15.62 (C-20).

EMIE m/e (int.rel.): Espectro No. 4.

302 $\{M\}^+$ (29.2), 287 (35.7), 259 (48.7), 257 (20.9), 256 (12.3),
243 (27.9), 241 (37.2), 213 (34.9), 187 (21.8), 149 (62), 131
(76.7), 105 (65.4), 93 (61.1), 91 (58.6), 57 (100).

La identificación de este metabolito secundario como el ácido ent-kaur-16-en-19-óico se realizó mediante comparación con una muestra auténtica.⁴⁰

4.7.2 Caracterización del compuesto HS I-2Am (ent-kaur-16-en-19-oato de metilo).

La alquilación del compuesto **HS I-2A** permitió la obtención de un producto denominado con la clave **HS I-2Am**. Este derivado se aisló como un sólido de color blanco. Las constantes físicas y las propiedades espectroscópicas de este compuesto correspondieron con las descritas para el ent-kaur-16-en-19-oato de metilo⁴¹ y son las siguientes:

pf = 71-72 °C.

IR ν máx (KBr): Espectro No. 5.

2922, 2850, 1724, 1460, 1374, 1234, 1150, 1032 cm^{-1} .

RMN-¹H (300 MHz, CDCl_3 , TMS): Espectro No. 6.

δ 4.80 (1H, s a, H-17); 4.74 (1H, s a, H-17'); 3.63 (3H, s, $-\text{OCH}_3$);

1.17 (3H, s, H-18); 0.84 (3H, s, H-20).

RMN-¹³C (75.4 MHz, CDCl₃, TMS): Espectro No. 7.

δ 178.05 (C-19), 155.85 (C-16), 102.92 (C-17), 57.04 (C-5), 55.07 (C-9), 51.10 (-CH₂CH₃), 48.92 (C-15), 44.22 (C-4), 43.82 (C-8 y C-13), 41.29 (C-14), 40.74 (C-7), 39.67 (C-1), 39.42 (C-10), 38.09 (C-3), 33.11 (C-12), 28.75 (C-18), 21.93 (C-6), 19.15 (C-11), 18.42 (C-2), 15.43 (C-20).

4.7.3 Caracterización del compuesto HS-Am (19-acetoxi-2α,7α-dihidroxiabda-8(17),13Z-dien-15-al).

El compuesto **HS-Am** se aisló como un aceite incoloro, que con el paso del tiempo adquiere una coloración amarillo ámbar $R_f = 0.48$ (fig. 4.5).

Este metabolito secundario se caracterizó como el 19-acetoxi-2α,7α-dihidroxiabda-8(17),13Z-dien-15-al y presentó las siguientes propiedades físicas y espectroscópicas:

$$[\alpha]_D = + 10^\circ$$

IR ν máx (KBr): Espectro No. 8.

3382, 2926, 2858, 1732, 1667, 1456, 1374, 1246, 1128, 1058, 902
cm⁻¹.

RMN-¹H (300 MHz, C₆D₆, TMS): Espectro No. 9.

δ 9.89 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-15); 5.85 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-14);
5.44 (1H, s a, H-17); 4.58 (1H, s a, H-17'); 4.19 (1H, d, $J = 11.4$
Hz, H-19); 3.73 (1H, d, $J = 11.4$ Hz, H-19'); 3.69-3.53 (2H, m, H-
7; H-2); 1.69 (3H, s, $\text{CH}_3\text{CO-}$); 1.44 (3H, s a, H-16); 0.88 (3H, s,
H-18); 0.55 (3H, s, H-20).

RMN- ^{13}C (75.4 MHz, C_6D_6 , TMS): Espectro No. 10.

δ 190.19 (C-15), 170.47 ($\text{CH}_3\text{C}\underline{\text{O}}$ -), 162.91 (C-13), 149.28 (C-8),
129.59 (C-14), 104.78 (C-17), 73.38 (C-7), 66.98 (C-19), 64.33
(C-2), 53.42 (C-9), 52.98 (C-5), 47.63 (C-1), 45.26 (C-3), 40.19
(C-10), 38.59 (C-4), 33.61 (C-6), 30.38 (C-12), 27.67 (C-18),
24.17 (C-16), 21.86 (C-11), 20.38 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{CO-}$), 16.14 (C-20).

EMIQ m/e (int.rel.): Espectro No. 11.

379 $\{\text{M}+\text{H}\}^+$ (16.8), 378 (9.2), 377 (9.0), 361 $\{\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}\}^+$
(47.6), 343 $\{\text{M}+\text{H}-2\text{H}_2\text{O}\}^+$ (61.0), 301 $\{\text{M}+\text{H}-2\text{H}_2\text{O}-\text{C}_2\text{H}_2\text{O}\}^+$
(76.5), 283 $\{\text{M}+\text{H}-3\text{H}_2\text{O}-\text{C}_2\text{H}_2\text{O}\}^+$ (100), 265 $\{\text{M}+\text{H}-4\text{H}_2\text{O}-$
 $\text{C}_2\text{H}_2\text{O}\}^+$ (57.8), 257 (24.0), 255 (35.1), 239 (37.1), 205 (5.0), 199
(36.2), 187 (13.7), 149 (17.2), 133 (16.5), 125 (6.3), 121 (30.5),
119 (26.2), 111 (8.3), 109 (22.3), 107 (33.8).

4.7.4 Caracterización del compuesto HS-Ax (19-acetoxi-2 α ,7 α -dihidroxi-14,15-dinorlabda-8(17)-en-13-ona).

El compuesto HS-Ax con $R_f = 0.44$ (fig. 4.5) se purificó en forma de un aceite incoloro. La estructura de este compuesto se caracterizó como la 19-acetoxi-2 α ,7 α -dihidroxi-14,15-dinorlabda-8(17)-en-13-ona y presentó las siguientes propiedades físicas y espectroscópicas:

IR v máx (KBr): Espectro No. 12.

3398, 2928, 2857, 1732, 1372, 1244, 1034, 980, 906 cm^{-1} .

RMN-¹H (500 MHz, CDCl_3 , TMS): Espectro No. 13.

δ 5.21 (1H, s a, H-17); 4.65 (1H, s a, H-17'); 4.12 (1H, d, $J = 11.1$ Hz, H-19); 3.94-3.85 (2H, m, H-7; H-2); 3.77 (1H, d, $J = 11.1$ Hz, H-19'); 2.08 (3H, s, H-16); 2.02 (3H, s, $\text{CH}_3\text{CO-}$); 1.03 (3H, s, H-18); 0.71 (3H, s, H-20).

RMN-¹³C (125 MHz, CDCl_3 , TMS): Espectro No. 14.

δ 208.73 (C-13), 171.12 ($\text{CH}_3\text{CO-}$), 148.80 (C-8), 104.35 (C-17), 73.69 (C-7), 66.92 (C-19), 64.75 (C-2), 54.00 (C-9), 52.89 (C-5), 47.71 (C-1), 44.98 (C-3), 42.07 (C-12), 40.54 (C-10), 38.57 (C-4), 33.49 (C-6), 30.02 (C-16), 27.74 (C-18), 20.90 ($\text{CH}_3\text{CO-}$), 17.37 (C-11), 15.88 (C-20).

EMIQ *m/e* (int.rel.): Espectro No. 15.

353 {M+H}⁺ (1.4), 335 {M+H-H₂O}⁺ (11.7), 317 {M+H-2H₂O}⁺ (13.8), 309 {M+H-C₂H₄O}⁺ (8.1), 279 (37.2), 275 {M+H-2H₂O-C₂H₂O}⁺ (15.9), 257 {M+H-3H₂O-C₂H₂O}⁺ (50.2), 205 (32.8), 199 (18.3), 187 (5.2), 149 (29.0), 133 (11.5), 125 (10.0), 121 (11.1), 119 (40.6), 111 (13.0), 109 (12.0), 107 (100).

4.7.5 Caracterización del compuesto HS-Ae (15,19-diacetoxi-2 α ,7 α -dihidroxiabda-8(17),13Z-dieno).

El compuesto de menor polaridad con $R_f = 0.57$ (fig. 4.5) denominado **HS-Ae** se aisló como un aceite incoloro y su estructura se caracterizó como el 15,19-diacetoxi-2 α ,7 α -dihidroxiabda-8(17),13Z-dieno. Este compuesto presentó las siguientes propiedades físicas y espectroscópicas:

IR ν máx (KBr): Espectro No. 16.

3380, 2924, 2856, 1730, 1456, 1374, 1240, 1126, 1056, 900 cm^{-1} .

RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃, TMS): Espectro No. 17.

δ 5.36 (1H, dd, $J = 6.9, 7.0$ Hz, H-14); 5.29 (1H, s a, H-17); 4.78 (1H, s a, H-17'); 4.57-4.45 (2H, m, H-15); 4.18 (1H, d, $J = 11.1$ Hz, H-19); 3.92 (2H, m, H-7; H-2); 3.77 (1H, d, $J = 11.1$ Hz, H-

19); 2.054 (3H, s, CH₃CO-); 2.052 (3H, s, CH₃CO-); 1.75 (3H, s, H-16); 1.06 (3H, s, H-18); 0.72 (3H, s, H-20).

RMN-¹³C (75.4 MHz, CDCl₃, TMS): Espectro No. 18.

δ 171.5 (CH₃C=O-), 170.0 (CH₃C=O-), 144.20 (C-13), 142.23 (C-8), 119.87 (C-14), 104.31 (C-17), 73.74 (C-7), 66.94 (C-19), 64.79 (C-2), 61.13 (C-15), 53.69 (C-9), 53.01 (C-5), 47.60 (C-1), 45.14 (C-3), 40.34 (C-10), 38.62 (C-4), 33.20 (C-6), 30.07 (C-12), 27.73 (C-18), 23.27 (C-16), 21.48 (C-11), 20.90 [2(CH₃CO-)], 16.13 (C-20).

4.7.6 Caracterización del compuesto HS-A (19-acetoxi-2 α ,7 α ,15-trihidroxilabda-8(17),13Z-dieno).

El compuesto HS-A de mayor polaridad con $R_f = 0.34$ (fig. 4.5) se purificó como un aceite incoloro translucido y se caracterizó como el 19-acetoxi-2 α ,7 α ,15-trihidroxilabda-8(17),13Z-dieno. Este diterpeno presentó las siguiente propiedades físicas y espectroscópicas:

$$[\alpha]_D = + 58^\circ$$

IR ν máx (KBr): Espectro No. 19.

3368, 2926, 2856, 1724, 1456, 1374, 1246, 1034, 902 cm⁻¹.

RMN-¹H (500 MHz, CDCl₃, TMS): Espectro No. 20.

δ 5.40 (1H, dd, J = 6.4, 7 Hz, H-14); 5.26 (1H, s a, H-17); 4.77 (1H, s a, H-17'); 4.14 (1H, d, J = 11.1 Hz, H-19); 4.03 (2H, d a, J = 7 Hz, H-15); 3.92-3.86 (2H, m, H-7; H-2); 3.75 (1H, d, J = 11.1 Hz, H-19'); 2.03 (3H, s, CH₃CO-); 1.74 (3H, s a, H-16); 1.03 (3H, s, H-18); 0.70 (3H, s, H-20).

RMN-¹³C (125 MHz, CDCl₃, TMS): Espectro No. 21.

δ 171.15 (CH₃CO-), 149.20 (C-8), 139.80 (C-13), 124.91 (C-14), 104.27 (C-17), 73.69 (C-7), 66.95 (C-19), 64.77 (C-2), 59.01 (C-15), 53.68 (C-9), 52.96 (C-5), 47.58 (C-1), 45.10 (C-3), 40.32 (C-10), 38.62 (C-4), 33.37 (C-6), 29.92 (C-12), 27.72 (C-18), 23.27 (C-16), 21.56 (C-11), 20.91 (CH₃CO-), 16.15 (C-20).

EMIQ *m/e* (int.rel.): Espectro No. 22.

381 {M+H}⁺ (0.27), 363 {M+H-H₂O}⁺ (29.9), 345 {M+H-2H₂O}⁺ (48.7), 327 {M+H-3H₂O}⁺ (58.6), 303 {M+H-2H₂O-C₂H₂O}⁺ (27.8), 285 {M+H-3H₂O-C₂H₂O}⁺ (89.4), 267 {M+H-4H₂O-C₂H₂O}⁺ (100), 257 (20.8), 205 (13.1), 199 (10.5), 187 (11.9), 149 (23.1), 133 (14.4), 125 (11.8), 121 (29.4), 119 (16.4), 111 (11.0), 109 (29.0), 107 (51.9).

4.7.7 Caracterización del compuesto HS-Aac (2 α ,7 α ,15,19-tetraacetoxi-labda-8(17),13Z-dieno).

La acetilación del compuesto HS-A permitió obtener su derivado peracetilado denominado con la clave HS-Aac (2 α ,7 α ,15,19-tetraacetoxi-labda-8(17),13Z-dieno). Este derivado se purificó en forma de un aceite incoloro y presentó las siguientes propiedades espectroscópicas:

IR ν máx (KBr): Espectro No. 23.

3458, 2966, 2856, 1738, 1366, 1240, 1030, 904 cm^{-1} .

RMN-¹H (500 MHz, CDCl_3 , TMS): Espectro No. 24.

δ 5.34 (1H, dd, $J = 6.9, 7$ Hz, H-14); 5.10 (1H, s a, H-17); 5.01 (1H, dd, $J_{ae} = J_{ee} = 6$ Hz, H-7); 4.95 (1H, dddd, $J_{1a-2} = J_{2-3a} = 12$ Hz; $J_{1e-2} = J_{2-3e} = 4.2$ Hz, H-2); 4.73 (1H, s a, H-17'); 4.05 (1H, d, $J = 11.2$ Hz, H-19); 4.51 (1H, dd, $J = 11.4, 6.6$ Hz, H-15); 4.47 (1H, dd, $J = 11.4, 6.6$ Hz, H-15'); 4.06 (1H, d, $J = 11.2$ Hz, H-19); 3.87 (1H, d, $J = 11.2$ Hz, H-19'); 2.11 (3H, s, $\text{CH}_3\text{CO-}$); 2.03 (3H, s, $\text{CH}_3\text{CO-}$); 2.02 (3H, s, $\text{CH}_3\text{CO-}$); 2.01 (3H, s, $\text{CH}_3\text{CO-}$); 1.73 (3H, s a, H-16); 1.01 (3H, s, H-18); 0.77 (3H, s, H-20).

RMN-¹³C (125 MHz, CDCl_3 , TMS): Espectro No. 25.

δ 170.97 ($\text{CH}_3\text{C}\underline{\text{O}}$ -), 170.37 ($\text{CH}_3\text{C}\underline{\text{O}}$ -), 169.9 ($\text{CH}_3\text{C}\underline{\text{O}}$ -), 143.94 (C-8), 142.32 (C-13), 119.90 (C-14), 105.30 (C-17), 74.48 (C-7), 68.12 (C-2), 66.50 (C-19), 60.94 (C-15), 54.16 (C-9), 52.82 (C-5), 43.55 (C-1), 41.01 (C-3), 40.20 (C-10), 38.47 (C-4), 30.13 (C-6), 29.97 (C-12), 27.68 (C-18), 23.41 (C-16), 21.79 (C-11), 21.36 ($\text{C}\underline{\text{H}}_3\text{C}\underline{\text{O}}$ -), 21.13 ($\text{C}\underline{\text{H}}_3\text{C}\underline{\text{O}}$ -), 21.03 ($\text{C}\underline{\text{H}}_3\text{C}\underline{\text{O}}$ -), 20.85 ($\text{C}\underline{\text{H}}_3\text{C}\underline{\text{O}}$ -), 15.77 (C-20).

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

5.1 FRACCIONAMIENTO.

El plan de trabajo desarrollado para el estudio fitoquímico convencional del contenido metabólico de *Hyptis spicigera*, la hierba del burro, se dividió en los procedimientos metodológicos siguientes:

- 1.- Recolección del material vegetal.
- 2.- Fragmentación (molienda del material vegetal seco).
- 3.- Extracción (vía maceración con disolventes orgánicos).
- 4.- Fraccionamiento (mediante cromatografía en columna).
- 5.- Separación (mediante cromatografía en columna y cromatografía en capa fina a nivel preparativo).
- 6.- Purificación (por cromatografía en capa fina a nivel preparativo y cromatografía de líquidos de alta resolución).
- 7.- Identificación (propiedades físicas, métodos espectroscópicos y espectrométricos).

El análisis cromatográfico de los dos extractos orgánicos (hexánico y cloroformo-metanólico) preparados a partir de las partes aéreas de *Hyptis spicigera* permitió el aislamiento y la purificación de siete constituyentes. Se

logró establecer la estructura química de cuatro nuevos diterpenos bicíclicos: tres **labdanos** [19-acetoxi-2 α ,7 α ,15 trihidroxilabda-8(17),13Z-dieno (1); 19-acetoxi-2 α ,7 α -dihidroxiabda-8(17),13Z-dien-15-al (2); 15,19-diacetoxi-2 α ,7 α -dihidroxiabda-8(17),13Z-dieno (3)], y un **norlabdano** 19-acetoxi-2 α ,7 α -dihidroxi-14,15-dinorlabda-8(17)-en-13-ona (4) (fig. 5.1). De manera adicional, se aislaron e identificaron tres metabolitos conocidos: el ácido ent-kaur-16-en-19-óico (diterpeno tetracíclico), el β -sitosterol (esterol) y el ácido ursólico (triterpeno).

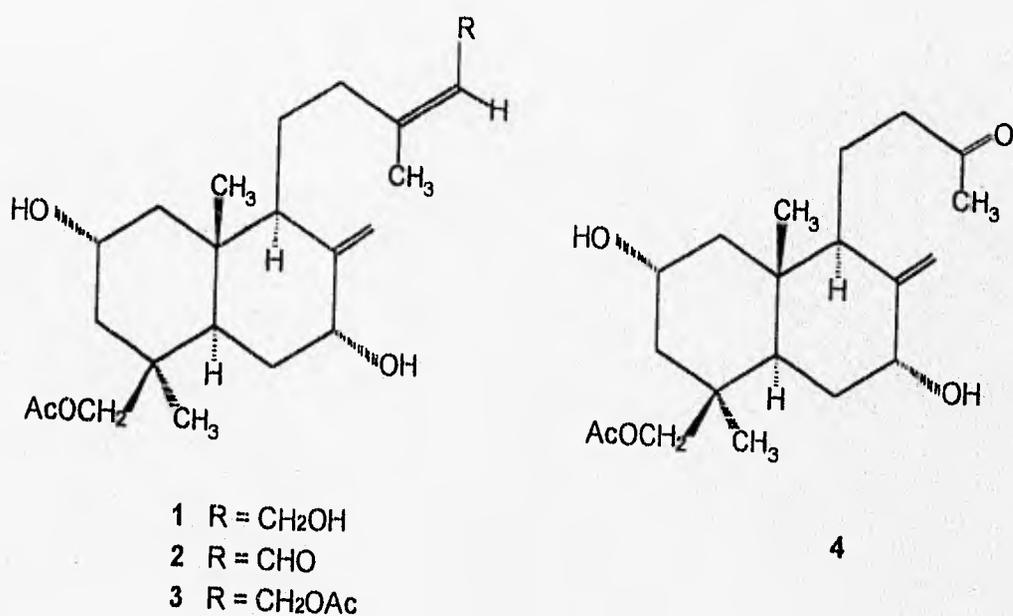


Figura 5.1. Estructura de los diterpenos 1-4 aislados de *Hyptis spicigera*.

5.2 ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DE LOS COMPUESTOS NOVEDOSOS.

A continuación se describe el análisis de los datos espectroscópicos y espectrométricos que permitió la identificación de los productos naturales aislados.

5.2.1 Diterpenos bicíclicos.

5.2.1.1 19-acetoxi-2 α ,7 α ,15-trihidroxiabda-8(17),13Z-dieno (HS-A).

El constituyente mayoritario se aisló como un aceite incoloro translúcido y fue ópticamente activo. Este constituyente presentó la mayor polaridad con un $R_f = 0.34$ (ver fig. 4.5).

El espectro de IR (espectro # 19) presentó bandas de absorción asociadas con la presencia del grupo hidroxilo (3368 cm^{-1}), además de las absorciones correspondientes a los alargamientos del carbonilo de un éster (1724 cm^{-1}).

El esqueleto estructural diterpenoide que correspondió al núcleo de labdano se propuso mediante el análisis de las constantes espectroscópicas: en especial, las generadas en la espectrometría de masas y en la resonancia

magnética nuclear protónica (RMN-¹H) y de carbono-13 (RMN-¹³C) de la siguiente manera:

1) El análisis del espectro de masas obtenido mediante ionización química (espectro # 22) permitió determinar la fórmula molecular de C₂₂H₃₆O₅ mediante la detección del ión cuasimolecular {M+H}⁺ con una relación de masa-carga (*m/e*) de 381 unidades de masa atómica. El número de átomos de carbono se confirmó mediante el espectro de RMN-¹³C (espectro # 21) y mediante un experimento DEPT (fig. 5.2) se corroboró el número de átomos de hidrógeno del núcleo estructural.

2) La fórmula molecular calculada permitió establecer cinco grados de insaturación para este compuesto. Además, la diferencia sucesiva de 18 unidades de masa (H₂O) a partir del ión cuasimolecular, con los fragmentos de *m/e* 363 {M+H-H₂O}⁺, 345 {M+H-2H₂O}⁺ y 327 {M+H-3H₂O}⁺, así como la pérdida adicional de 42 unidades (C₂H₂O) para generar los fragmentos de *m/e* 303 {M+H-2H₂O-C₂H₂O}⁺, 285 {M+H-3H₂O-C₂H₂O}⁺ y 267 {M+H-4H₂O-C₂H₂O}⁺ corroboraron la presencia de tres grupos hidroxilo⁴² y un acetoxilo.^{43, 44}

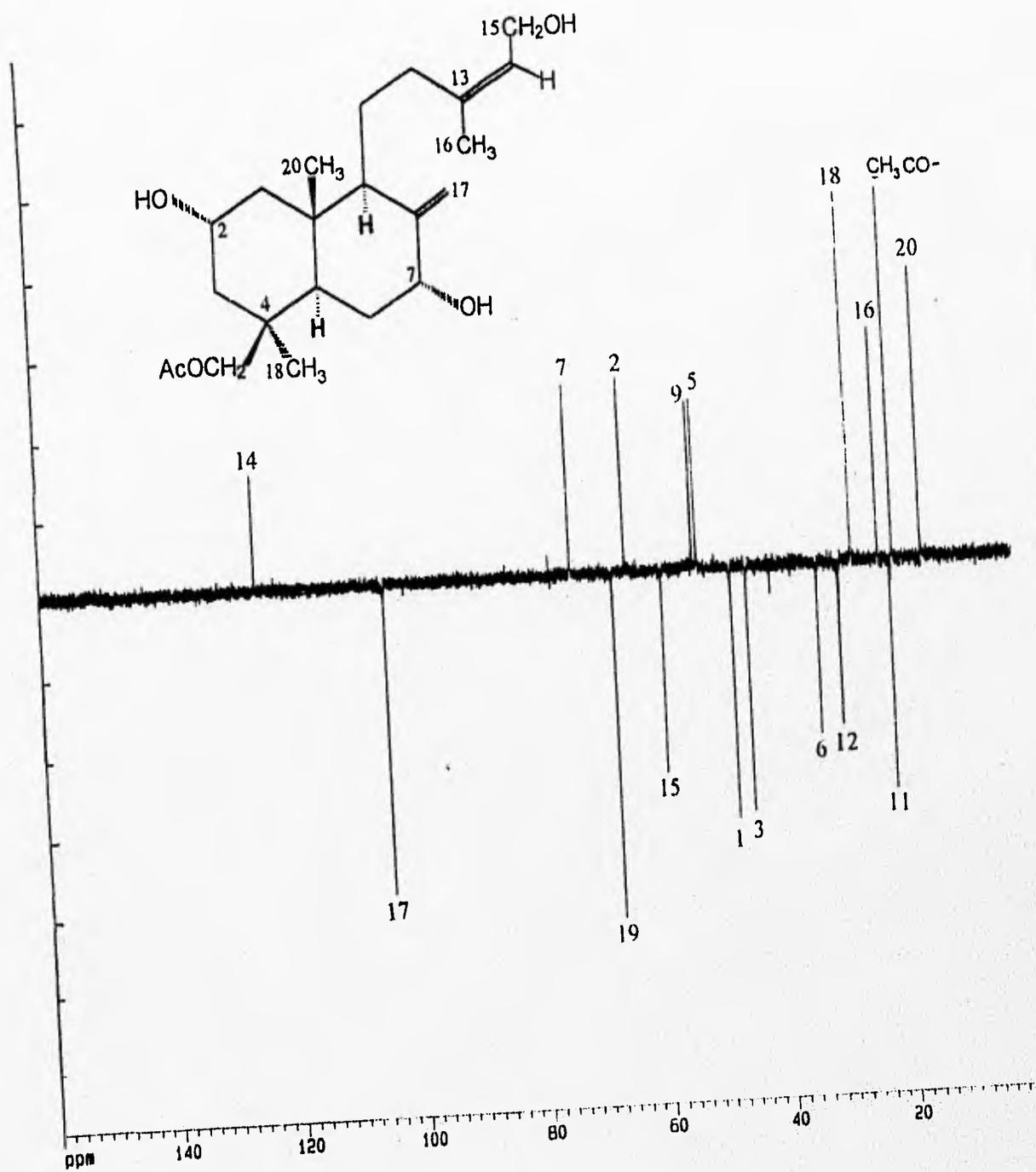


Figura 5.2. Espectro de RMN- ^{13}C DEPT del compuesto HS-A (1).

3) En el espectro de RMN- ^1H (espectro # 20) el triplete centrado en δ 5.40 y los singletes en δ 5.26 y 4.77 permitieron identificar tres hidrógenos vinílicos. De éstos, las dos últimas señales deberían corresponder a un metileno exocíclico y, por lo tanto, la restante formaba parte de una doble ligadura trisustituida. De esta manera, se satisfacían tres de las cinco insaturaciones calculadas al considerar adicionalmente la insaturación del grupo carbonilo de éster presente en la molécula. Así, el núcleo diterpénico debería corresponder a un sistema bicíclico derivado del geranil geranil pirofosfato para satisfacer las dos insaturaciones restantes. Por lo tanto, resulta evidente que el núcleo diterpénico en cuestión debería tratarse del esqueleto de labdano^{45, 46} (fig. 5.3).

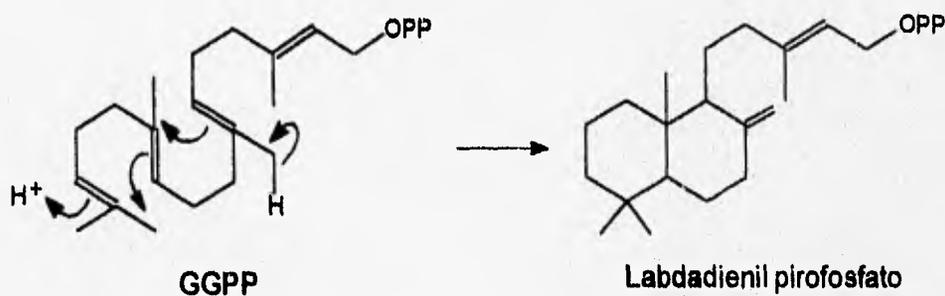


Figura 5.3. Biogénesis del núcleo labdánico a partir del geranil-geranil pirofosfato (GGPP).

La señal vinílica centrada en δ 5.40 (H-14) presentó un acoplamiento de tipo vecinal con el doblete centrado en δ 4.03 y una interacción alílica con el grupo metilo en δ 1.74, mismos que fueron observados en el espectro de **RMN bidimensional ^1H - ^1H COSY** (fig. 5.4). La señal en δ 4.03 integró para dos hidrógenos y por su desplazamiento químico debía corresponder a un hidroximetileno ($-\text{CH}_2\text{OH}$). De esta manera, estas señales identificaron dos de los sustituyentes de la olefina trisustituída. La estereoquímica **Z**, i.e., la orientación en lados opuestos para el grupo metilo (C-16) y el hidroximetileno, se confirmó mediante el efecto nuclear de Overhauser observado entre el protón vinílico centrado en δ 5.40 y el grupo metilo en δ 1.74 (fig. 5.5).

4) El espectro de **RMN- ^{13}C** en su modalidad **DEPT** (fig. 5.2) mostró nueve señales positivas, cuatro de las cuales corresponden a grupos metilo [δ 27.72 (C-18), 23.27 (C-16), 20.91 ($\text{C}\text{H}_3\text{CO}-$) y 16.15 (C-20)], y las cinco restantes a metinos. De éstas, una correspondía al carbono terciario de una doble ligadura trisustituída [δ 124.91 (C-14)]; por su desplazamiento químico, dos señales debían corresponder a los carbonos geminales a funciones hidroxilo secundario [δ 73.69 (C-7); δ 64.77 (C-2)] y las restantes a los metinos C-5 (δ 52.96) y C-9 (δ 53.68) del núcleo diterpénico básico.

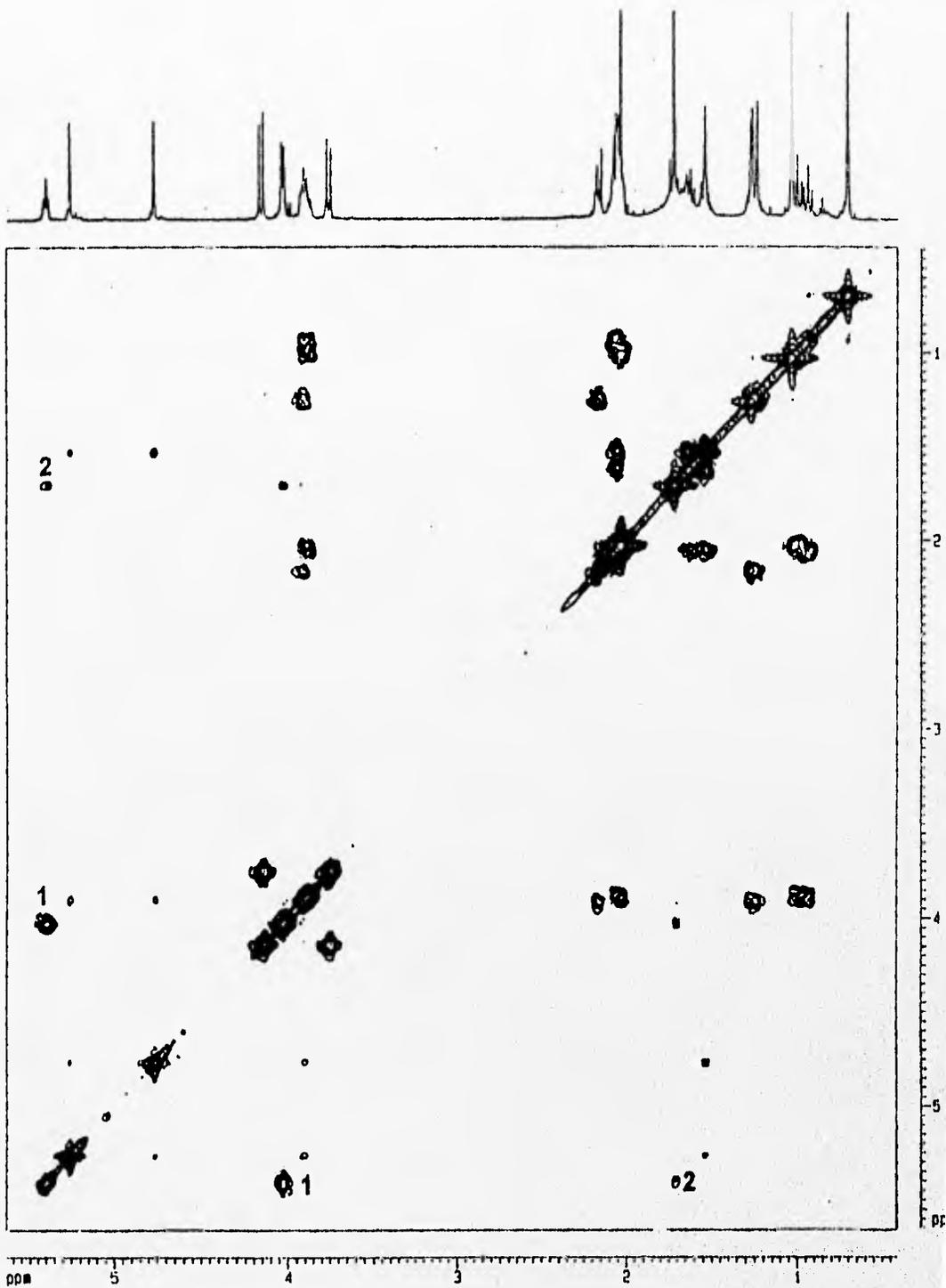


Figura 5.4. Espectro de RMN bidimensional homonuclear DQF-COSY del compuesto HS-A (1). Principales correlaciones ^1H - ^1H : 1, H_{14} - H_{15} ; 2, H_{14} - H_{16} .

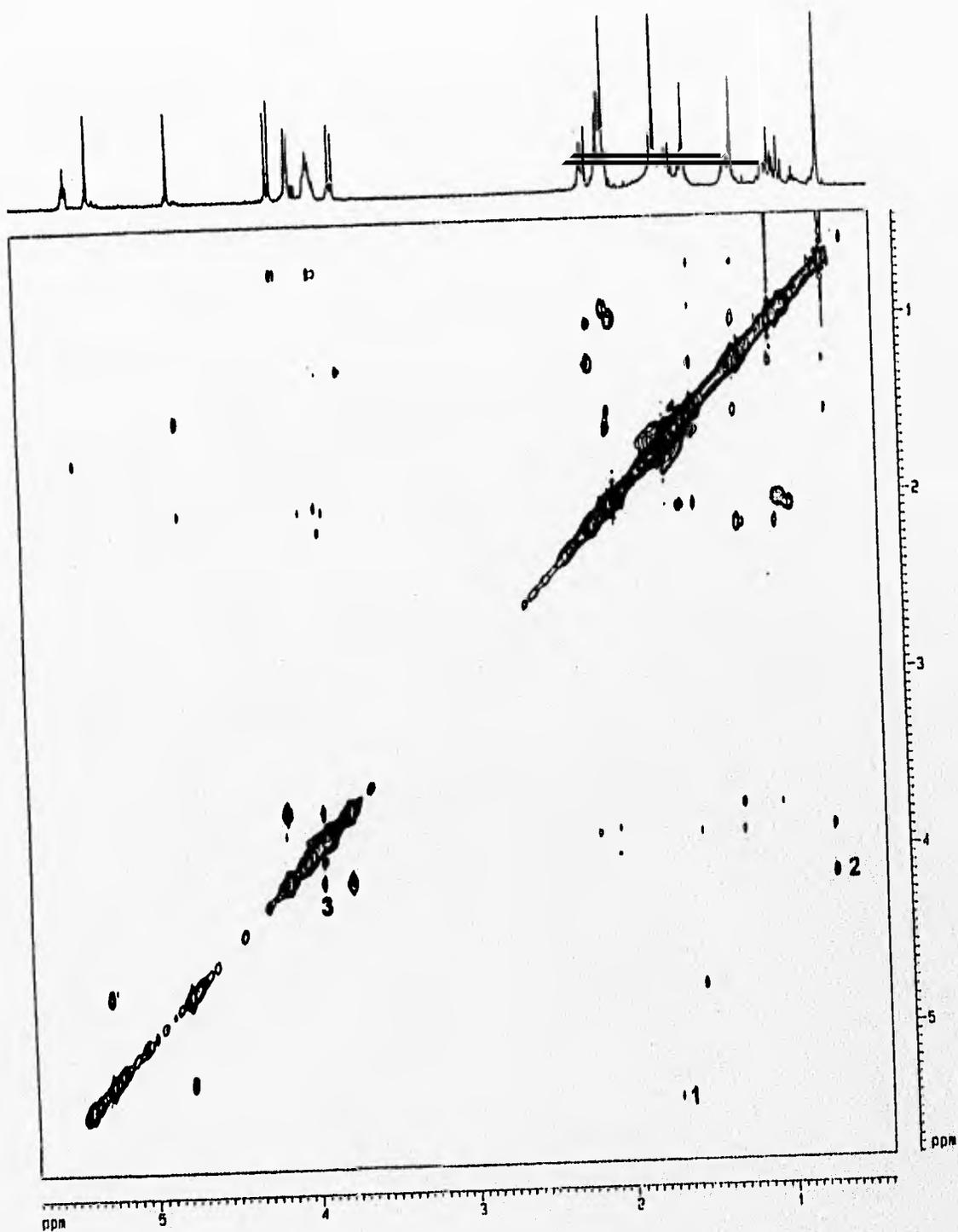


Figura 5.5. Espectro de RMN- ^1H bidimensional homonuclear NOESY del compuesto HS-A (1). Principales efectos nucleares de Overhauser (nOes): 1, $\text{H}_{14}\text{-H}_{16}$; 2, $\text{H}_{19}\text{-H}_{20}$; 3, $\text{H}_{19}\text{-H}_2$.

Las asignaciones para los átomos de carbono se realizaron mediante las correlaciones ^1H - ^{13}C geminales observadas en el espectro **HMOC** (fig. 5.6). Las señales negativas observadas en el espectro **DEPT** correspondían al metileno exocíclico C-17 (δ 104.27), al hidroximetileno, C-15 (δ 59.01) y al acetoximetileno C-19 (δ 66.95), a los metilenos del núcleo bicíclico C-1 (δ 47.58), C-3 (δ 45.10) y C-6 (δ 33.37) y a los dos metilenos de la cadena lateral, C-12 (δ 29.92) y C-11 (δ 21.56). Por lo tanto, las cinco señales restantes del espectro total de **RMN- ^{13}C** se asignaron a los carbonos cuaternarios, de éstos el que mostraba el mayor desplazamiento paramagnético correspondía al carbonilo de un grupo éster (δ 171.15). Se identificaron fácilmente a los dos carbonos vinílicos cuaternarios C-8 (δ 149.20) y C-13 (δ 139.80), y a los dos carbonos tetrasustituídos del núcleo bicíclico, es decir los centros C-10 (δ 40.32) y C-4 (δ 38.62).

5) Se observaron las señales correspondientes a los hidrógenos diastereotópicos de un grupo $-\text{CH}_2\text{OAc}$ sin protones en el carbono adyacente, centrado en δ 4.14 y 3.75 (AB, 2H, $J = 11.1$ Hz) y cuyo desplazamiento químico a campo bajo ($\frac{1}{2} \delta\text{A} + \delta\text{B} = 3.95$) es diagnóstico de una función acetoximetilénica con orientación axial unida al carbono cuaternario C-4.⁴⁷

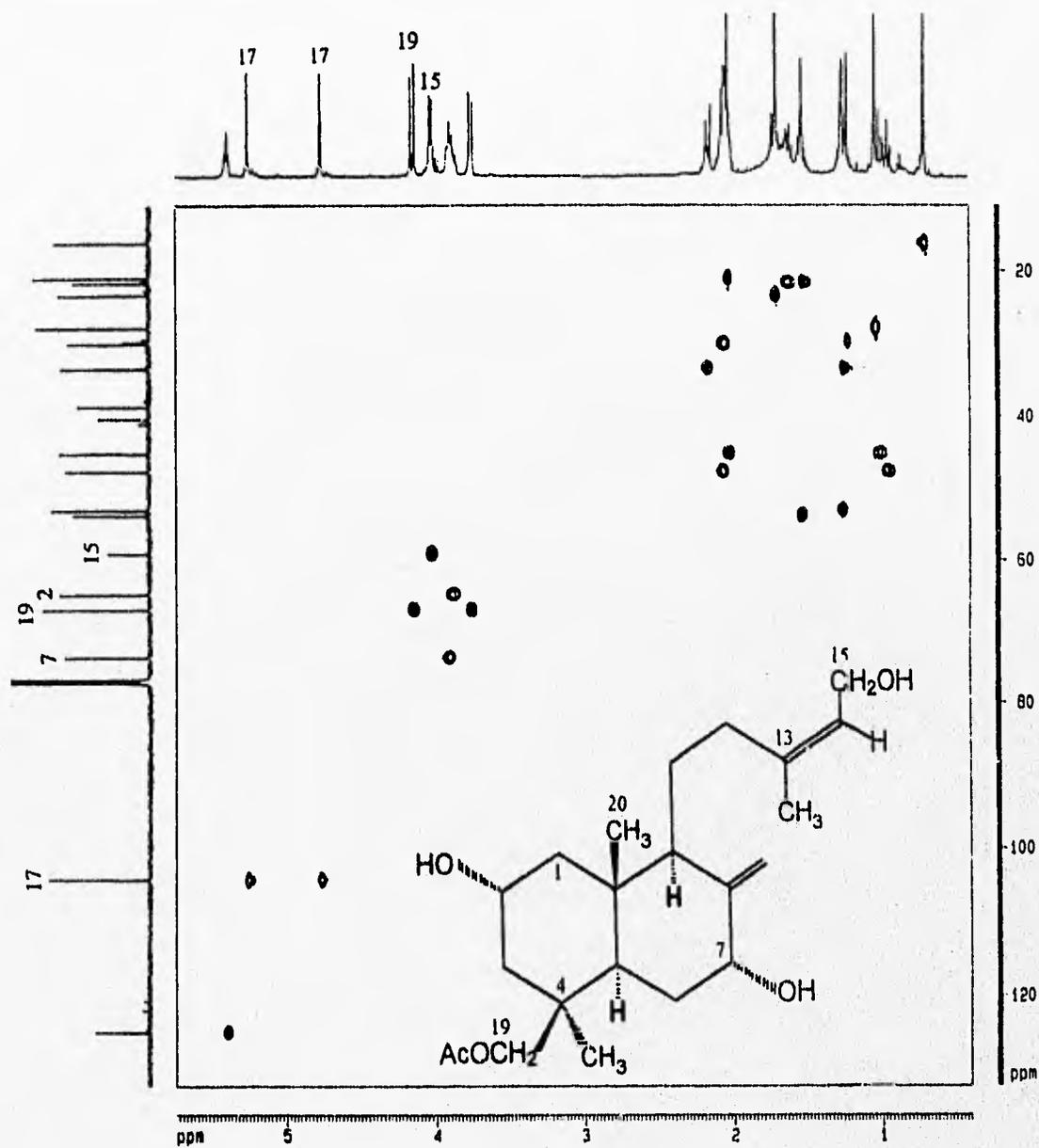


Figura 5.6. Espectro de correlación bidimensional heteronuclear ^{13}C - ^1H (HMQC) del compuesto HS-A (1).

La interacción observada en el NOESY (fig. 5.5) entre el doblete centrado en δ 4.14 ($-\text{CH}_2\text{OAc}$) y el grupo metilo C-20 (δ 0.70) permitió corroborar la ubicación del acetoximetileno sobre el núcleo C-4 con una orientación axial (fig 5.7).

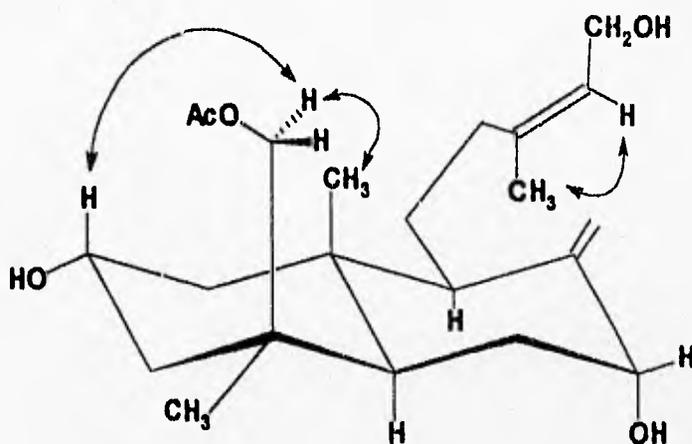


Figura 5.7. Principales efectos nucleares de Overhauser observados en el compuesto HS-A (1).

6) Hasta este momento, durante el análisis de las evidencias espectroscópicas, sólo restaba por localizar la posición de los dos grupos hidroxilos secundarios en el núcleo bicíclico de labdano. En el producto natural (1), la elucidación de la ubicación de estos sustituyentes no fue posible debido a la sobreposición de las resonancias correspondientes a los hidrógenos geminales a estas funciones en el multiplete centrado en δ 3.92-

3.86. Por lo tanto, se procedió a la síntesis del derivado peracetilado (5) con el objetivo de diferenciar la multiplicidad de cada una de las señales geminales a los carboxilos secundarios mediante el desplazamiento paramagnético que sufrirían los hidrógenos H-2 y H-7 en los ésteres resultantes.

La RMN-¹H (espectro # 24) del derivado 5 presentó una magnífica resolución para las señales en cuestión. Se observó una señal centrada en δ 4.95 (1H, dddd, $J = 12, 4.2$ Hz). Estos valores experimentales demostraron que este protón se encuentra sujeto a dos interacciones vecinales de tipo diaxial ($\phi \approx 180^\circ$)⁴⁸ con un valor de $J = 12$ Hz ($J_{1a-2} = J_{2-3a}$) y a dos acoplamientos axial-ecuatorial ($\phi \approx 60^\circ$)⁴⁸ de aproximadamente 4.2 Hz ($J_{1e-2} = J_{2-3e}$). Esta combinación de constantes de acoplamiento resultan en una señal ancha ($J = 32$ Hz) como se ilustra en la **figura 5.8**. Por lo tanto, la única posición para la localización del primer hidroxilo secundario en el esqueleto labdánico que permitiría esta multiplicidad correspondió al núcleo C-2 y la orientación del grupo hidroxilo sería α -ecuatorial.

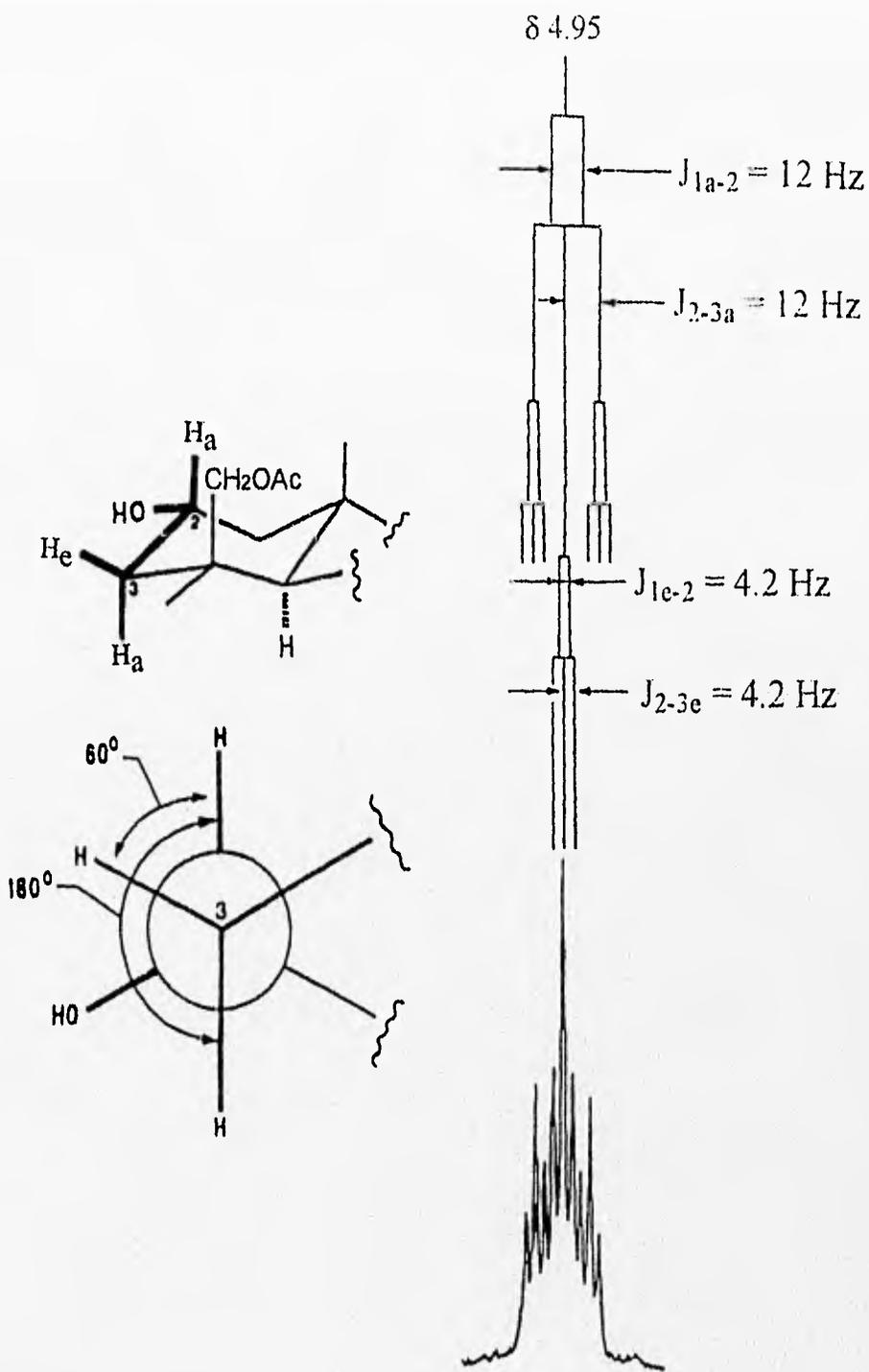


Figura 5.8. Multiplicidad observada para el protón H-2 (δ 4.95) en la RMN-¹H del derivado peracetilado (5) del compuesto HS-A.

Por otra parte, el hidrógeno geminal al grupo hidroxilo secundario restante, i.e., H-7 (δ 5.01), mostró una anchura media de $J = 12$ Hz y una multiplicidad en forma de un triplete ($J_{ae} = J_{ee} = 6\text{Hz}$). Este patrón de acoplamiento es debido a las interacciones vecinales de tipo axial-ecuatorial ($\phi \approx 60^\circ$) y diecuatorial ($\phi \approx 60^\circ$) con un grupo metileno vecinal y, en consecuencia, la única posición del bicíclico diterpenoide que proporcionaría esta combinación de constantes de acoplamiento sería el núcleo C-7 y la stereoquímica del grupo hidroxilo correspondería a una orientación α -axial (fig. 5.9).

Finalmente, se discutirá el espectro de ^1H - ^{13}C bidimensional HMBC que registra las interacciones a larga distancia, es decir, a dos ($^2J_{\text{C-H}}$) y tres ligaduras ($^3J_{\text{C-H}}$), y que permitió verificar las asignaciones de manera inequívoca para los conjuntos de átomos C₁-C₃, C₄-C₁₀ y C₅-C₉, cuya resonancia podría intercambiarse debido a la proximidad en su desplazamiento químico.

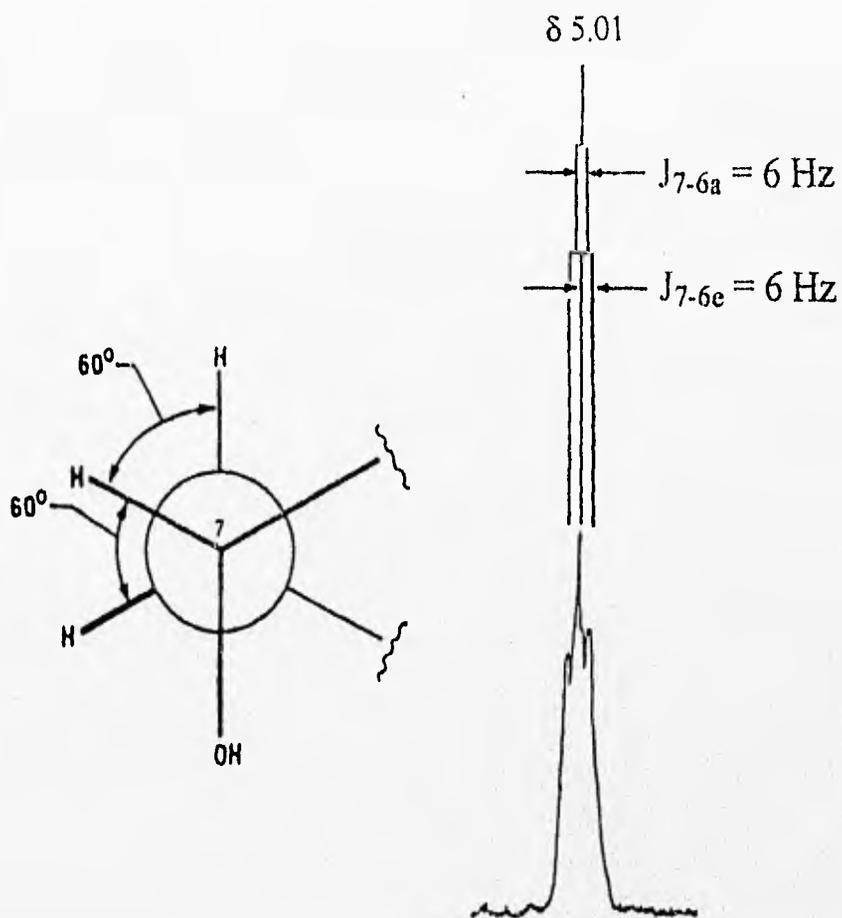


Figura 5.9. Multiplicidad observada para el protón H-7 (δ 5.01) en la RMN-

^1H del derivado peracetilado (5) del compuesto HS-A.

La **figura 5.10** ilustra el espectro **HMBC** generado por el derivado **5**, y en él se indican las principales interacciones observadas, las cuales se resumen a continuación:

Protón (δ)	$^2J_{C-H}$ (δ)	$^3J_{C-H}$ (δ)
H-17 (5.10)	C-8 (143.94)	C-7 (74.48); C-9 (54.16)
H-18 (1.01)	C-4 (38.47)	C-5 (52.82)
H-19 (3.87)	C-4	C-3 (41.01)
H-20 (0.77)	C-10 (40.20)	C-1 (43.55); C-5; C-9

Con base en la información espectroscópica antes discutida, la estructura del compuesto denominado con la clave **HS-A** se caracterizó como el **19-acetoxi-2 α ,7 α ,15-trihidroxilabda-8(17),13Z-dieno** (fig. 5.1).

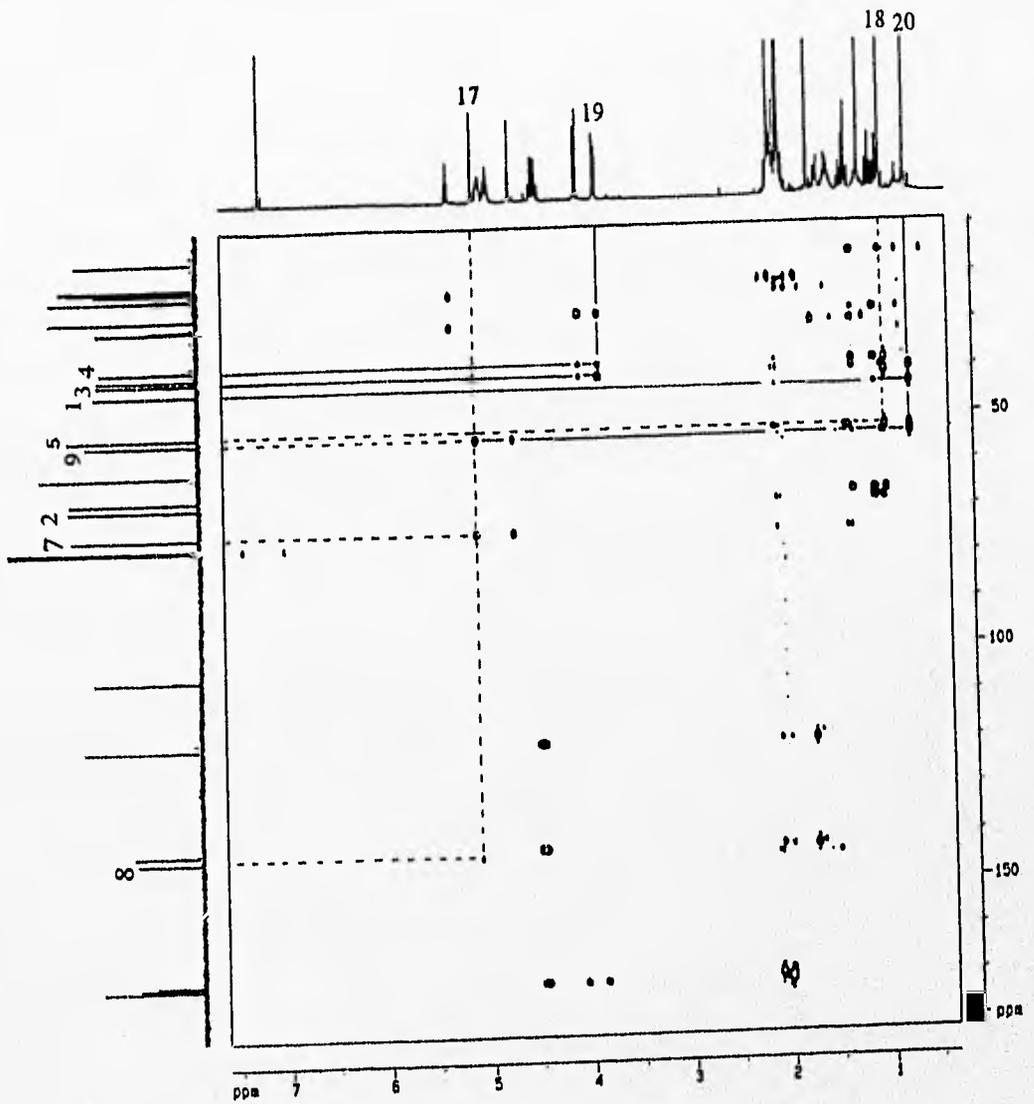


Figura 5.10. Espectro de correlación bidimensional heteronuclear ^{13}C - ^1H (HMBC) del derivado peracetilado (5) del compuesto HS-A.

5.2.1.2 19-acetoxi-2 α ,7 α -dihidroxiabda-8(17),13Z-dien-15-al (HS-Am).

Este constituyente se aisló como un aceite incoloro ópticamente activo que con el paso del tiempo adquirió una coloración amarillo ámbar, esta observación indicaba la inestabilidad de este compuesto soluble en CHCl₃, C₆H₆ y AcOEt.

La espectrometría de masas mediante ionización química (espectro # 11) permitió calcular su fórmula molecular como C₂₂H₃₄O₅, {M+H}⁺ 379, la cual estableció seis grados de insaturación. La diferencia de dos unidades de masa atómica, entre el ión cuasimolecular de HS-Am (2) con el generado por el compuesto HS-A (1), suponía la oxidación de uno de los grupos hidroxilo del triol (1). La presencia de los cationes de *m/e* 378 {M+H-1}⁺ y 377 {M-1}⁺, así como la abundancia relativa del ión cuasimolecular (16.8 %), sugirieron la presencia de un grupo aldehído y, por lo tanto, el grupo hidroximetileno de la cadena lateral del compuesto HS-A (1) debería encontrarse oxidado a un grupo aldehído en (2). Esta consideración fue congruente con el decrecimiento observado en la polaridad ($R_f = 0.48$) del compuesto **HS-Am** (2), en comparación con la desarrollada por el compuesto **HS-A** (1), en la cromatografía en capa fina (ver fig. 4.5).

Las características espectroscópicas de este compuesto fueron similares a las obtenidas para el labdano **HS-A (1)** y a continuación se describirán las principales diferencias observadas:

1) En el espectro de **IR** (espectro # 8) se observó una absorción adicional a la centrada en 1732 cm^{-1} para el grupo acetato y que evidenció la presencia de un grupo aldehído α, β -insaturado⁴⁹ mediante la banda de absorción en 1667 cm^{-1} .

2) En la **RMN-¹H** (espectro # 9) del compuesto **2** se detectaron dos diferencias significativas en la apariencia del espectro al comparar con el generado por el compuesto **1**: en primer lugar, se observó la desaparición de la señal centrada en δ 4.03 correspondiente a los hidrógenos del grupo hidroximetileno (CH_2OH) en C-15 del triol **HS-A (1)** y se registró en el espectro del aldehído **HS-Am (2)** una señal adicional centrada en δ 9.89 que integró para un hidrógeno y cuyo desplazamiento químico correspondía al hidrógeno de un grupo aldehído. Por lo tanto, estos resultados confirman que el grupo aldehído se encuentra en la posición C-15 en la estructura de **HS-Am (2)**. En segundo lugar, la aparición de un doblete centrado en δ 5.85 (H-14) en el espectro de **HS-Am (2)**, en lugar del triplete en δ 5.40 como aparece en el espectro de **HS-A (1)**, garantizó no solamente la trisustitución

de la olefina presente en la cadena lateral, sino que también corroboró su posición vecinal a la del grupo aldehído.

3) El espectro de RMN-¹³C (espectro # 10) confirmó las observaciones anteriores mediante la desaparición de la señal en δ 59.01 correspondiente al C-15 del compuesto **HS-A** (1), y la aparición de la señal para el carbonilo del grupo aldehído en δ 190.19 en el espectro de **HS-Am** (2).^{50, 51}

Por último, se realizó la correlación química entre los productos naturales 1 y 2 mediante una reacción de oxidación alílica utilizando MnO₂ a temperatura ambiente (fig. 5.11). De manera sorprendente, sólo se obtuvo la oxidación del alcohol alílico primario y esta reacción sirvió para la caracterización estructural inequívoca del compuesto HS-Am como el 19-acetoxi-2 α ,7 α -dihidroxiabda-8(17),13Z-dien-15-al (fig. 5.1).

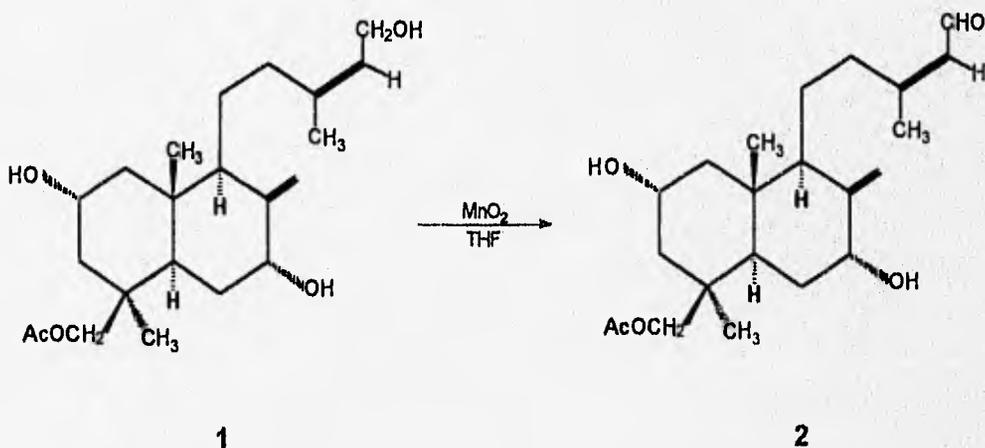


Figura 5.11. Correlación química entre HS-A (1) y el aldehído HS-Am (2).

5.2.1.3 15-19-diacetoxi-2 α ,7 α -dihidroxiabda-8(17),13Z-dieno (HS-Ae).

El tercer compuesto con $R_f = 0.57$ (fig. 4.5) se aisló como un aceite incoloro y su fórmula molecular se calculó a partir del espectro de masas por ionización química como $C_{24}H_{38}O_6$, $\{M+H\}^+$ 423. Esta permitió calcular seis grados de insaturación y la diferencia de 42 unidades de masa atómica con la fórmula del compuesto 1 permitía suponer la presencia de un grupo acetilo adicional. Esta propuesta era congruente con la diferencia observada en los valores de R_f en CCF (fig. 4.5).

La comparación de los espectros de RMN- 1H (espectro # 17) obtenidos para HS-Ae (3) con los generados por el compuesto 1 (HS-A; espectro # 20), permitieron observar de nueva cuenta la presencia del sistema AB para los hidrógenos del metileno C-19 (δ 4.18); los singuletes para los grupos metilos C-16 (δ 1.75), C-18 (δ 1.06) y C-20 (δ 0.72); el multiplete perteneciente a los hidrógenos H-2 (δ 3.92) y H-7 (δ 3.92); los singuletes asociados a los hidrógenos vinílicos del metileno exocíclico H-17 (δ 5.29; 4.78) y el triplete asociado a los hidrógenos H-14 (δ 5.36). El desplazamiento paramagnético observado ($\Delta\delta$ 0.5) para el metileno H-15 (δ 4.57-4.45) en el compuesto HS-Ae (3) en comparación con la señal equivalente en HS-A (1)

sugirió la presencia de un grupo acetato en esta posición. Este grupo funcional se identificó, de manera adicional, mediante el área de integración de la señal centrada en δ 2.05 que correspondía a seis hidrógenos y, por lo tanto, indicaba la presencia de dos unidades CH_3CO - en la molécula. Con el objeto de establecer de manera inequívoca la estructura del compuesto **HS-Ac (3)**, se procedió a realizar una correlación química con el compuesto **HS-A (1)**. Esta reacción de acetilación (**fig. 5.12**) se realizó controlando los equivalentes molares de Ac_2O (1 mol) y mediante una exposición a baja temperatura ($-5\text{ }^\circ\text{C}$) y durante un corto tiempo con el propósito de obtener únicamente la acetilación del grupo hidroxilo de la cadena lateral. Estas condiciones resultaron en un rendimiento del 15% en masa del compuesto **3**. Por lo tanto, la estructura del compuesto **HS-Ac (3)** corresponde al **15-19-diacetoxi-2 α ,7 α -dihidroxiabda-8(17),13Z**-dieno (**fig. 5.1**).

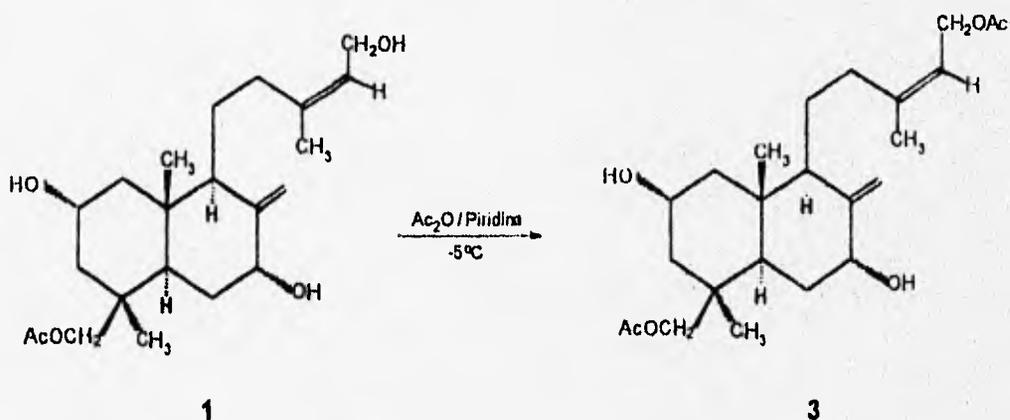


Figura 5.12. Correlación química entre HS-A (1) y el acetato HS-Ac (3).

5.2.1.4 19-acetoxi-2 α ,7 α -dihidroxi-14,15-dinorlabda-8(17)-en-13-ona

(HS-Ax).

El cuarto compuesto se aisló como un aceite incoloro, con $R_f = 0.44$ (fig 4.5), ópticamente activo. Su fórmula molecular se determinó a partir del espectro de masas por ionización química (espectro # 15) como $C_{20}H_{32}O_5$, $\{M+H\}^+$ m/e 353. Esta fórmula permitió calcular cinco grados de insaturación para el compuesto e indicaba una diferencia de 28 unidades de masa atómica con el compuesto HS-A (1)

Este compuesto presentó características espectroscópicas semejantes al compuesto HS-A (1) y que garantizaban la similitud de la porción bicíclica del núcleo estructural. La comparación del espectro de RMN- 1H (espectro # 20) del compuesto HS-A (1) con el espectro de RMN- 1H (espectro # 13) generado por HS-Ax (4) permitió identificar las siguientes similitudes: a) el sistema AB perteneciente a los hidrógenos del hidroximetileno axial en C-19 (δ 4.12, 3.77); b) el multiplete asignado a los metinos H-2 y H-7 (δ 3.94-3.85); c) la señal para el metileno vinílico exocíclico H-17 (δ 5.21, 4.65); y d) los metilos H-18 (δ 1.03) y H-20 (δ 0.71). Por otra parte, se observó la desaparición de la señal correspondiente al hidrogeno vinílico H-14 y al hidroximetileno H-15. Por lo tanto, estas diferencias espectroscópicas

sugirieron la posible oxidación de la doble ligadura trisustituida en **HS-A** (1) para originar una metil cetona durante la biogénesis del compuesto **HS-Ax** (4). Esta proposición se confirmó mediante el metilo centrado en δ 2.08 asignable a los tres hidrógenos equivalentes del grupo C-16.

El espectro de **RMN-¹³C** (espectro # 14) indicó la presencia de la metil cetona mediante las señales en δ 208.73 para el grupo carbonilo en C-13^{50, 52} y en δ 30.02 para el metilo C-16; con este análisis se determinó el núcleo estructural de **norlabdano** para **HS-Ax** (4) y se estableció su estructura como la **19-acetoxi-2 α ,7 α -dihidroxi-14,15-dinorlabda-8(17)-en-13-ona** (fig. 5.1).

5.3 CARACTERIZACIÓN DE LOS CONSTITUYENTES

CONOCIDOS.

Para estos compuestos el análisis de las constantes espectroscópicas, además de la comparación con muestras auténticas (R_f , p.f., IR, **RMN-¹H** y **RMN-¹³C**), fueron las herramientas utilizadas que permitieron su completa caracterización.

5.3.1 Diterpeno tetracíclico.

5.3.1.1 Ácido ent-kaur-16-en-19-óico (HS I-2A).

Uno de los componentes del extracto hexánico se aisló como un sólido amorfo de color blanco. Su fórmula molecular ($C_{20}H_{30}O_2$) se calculó a partir de la normalización del conjunto isotópico del ión molecular (M^+ 302; espectro # 4) generado por el espectro de masas mediante impacto electrónico.

La comparación de los espectros de $RMN-^1H$ del compuesto **HS I-2A** (espectro # 2) y su derivado metilado (espectro # 6) con los generados por una muestra auténtica del **ácido ent-kaur-16-en-19-óico**^{40, 41} permitieron la identificación inequívoca de este metabolito secundario.

5.3.2 Triterpeno.

5.3.2.1 Identificación del ácido ursólico.

Debido a que el ácido ursólico representa frecuentemente uno de los constituyente mayoritario de los extractos orgánicos preparados a partir de las especies de la familia de las labiadas (Lamiaceae), la presencia de este

triterpeno en *Hyptis spicigera* se estableció mediante la comparación en CCF con una muestra auténtica obtenida de *H. pectinata*.³⁷

El cuadro VIII enumera los productos naturales aislados en el presente estudio así como el rendimiento expresado en relación con el peso seco del material vegetal de partida.

Cuadro VIII.- Rendimiento de los productos naturales aislados a partir de *Hyptis spicigera*.

<i>Compuesto aislado</i>	<i>Clave</i> ^B	<i>mg</i> ^C	<i>%</i> ^D
ácido ent-kaur-16-en-19-óico ^A	HS I-2A	75	9.52 x 10 ⁻³
β-sitosterol	_____	54	6.85 x 10 ⁻³
ácido ursólico	_____	100	12.69 x 10 ⁻³
19-acetoxi-2α,7α,15-trihidroxiabda-8(17),13-dieno ^A	HS-A	350	44.44 x 10 ⁻³
15,19-diacetoxi-2α,7α-dihidroxiabda-8(17),13-dieno ^A	HS-Ae	3.8	0.48 x 10 ⁻³
19-acetoxi-2α,7α-dihidroxiabda-8(17),13-dien-15-al ^A	HS-Am	5.6	0.71 x 10 ⁻³
19-acetoxi-2α,7α-dihidroxi-14,15-dinorlabda-8(17)-en-13-ona ^A	HS-Ax	20	2.50 x 10 ⁻³

^A Nombre IUPAC.

^B Clave asignada durante el presente estudio fitoquímico.

^C Rendimiento (mg).

^D Rendimiento obtenido a partir del material vegetal (% peso seco).

VI. CONCLUSIONES.

La presente investigación se inició con el objetivo de aislar y caracterizar los constituyentes mayoritarios presentes en la especie mexicana *Hyptis spicigera* Lam. (hierba del burro) mediante un estudio fitoquímico convencional. Esta investigación permitió generar las siguientes conclusiones:

a) El fraccionamiento del extracto hexánico preparado a partir de las partes aéreas de esta planta permitió el aislamiento de dos constituyentes mayoritarios representados por un diterpenoide con esqueleto estructural de ent-kaureno (ácido ent-kaur-16-en-19-óico) y un esteroide (β -sitosterol).

b) A su vez el fraccionamiento del extracto cloroformo-metanólico condujo al aislamiento de cinco componentes terpénicos mayoritarios; cuatro compuestos diterpenoides novedosos con un esqueleto estructural de labdano, los cuales se caracterizaron como: el 19-acetoxi- $2\alpha,7\alpha,15$ -trihidroxiabda-8(17),13Z-dieno (HS-A; 1), 19-acetoxi- $2\alpha,7\alpha$ -dihidroxiabda-8(17),13Z-dien-15-al (HS-Am; 2), 15,19-diacetoxi- $2\alpha,7\alpha$ -dihidroxiabda-8(17),13Z-dieno (HS-Ae; 3), 19-acetoxi- $2\alpha,7\alpha$ -dihidroxi-14,15-dinorlabda-8(17)-en-13-ona (HS-Ax; 4). El otro metabolito aislado correspondió a un triterpenoide, el

ácido ursólico, que se encuentra ampliamente distribuido en la familia Lamiaceae.

c) Los resultados obtenidos en la presente investigación fitoquímica del contenido metabólico de esta especie representa una contribución al conocimiento de la naturaleza química de las especies de importancia económica y medicinal del género *Hyptis*. Este trabajo constituye la primera descripción de la presencia de los diterpenos con un esqueleto estructural labdánico en el género. Además permite recomendar la realización de estudios adicionales que contribuyan a completar el perfil químico de *Hyptis spicigera* y, de manera especial, aquellos enfocados a la evaluación del potencial insecticida de los diterpenos aislados debido a su posible aplicación agroquímica.

VII. BIBLIOGRAFÍA.

1. Evans, F.J. (1991) Natural products as probes for new drug target identification. *Journal of Ethnopharmacology* **32**, 91-101.
2. Pereda-Miranda, R. (1995) Bioactive natural products from traditionally used Mexican plants. En: J.T. Arnason, R. Mata, J.T. Romeo (eds.), *Phytochemistry of Medicinal Plants*. Plenum Press, New York, pp. 83-112.
3. Mata, R. (1993) Chemical studies and biological aspects of some Mexican plants used in tradicional medicine. En: K.R. Downum, J.T. Romeo, H.A.P. Stafford (eds.), *Phytochemical Potencial of Tropical Plants*. Plenum Press, New York, pp. 41-64.
4. Benner, J.P. (1993) Pesticidal compounds from higher plants. *Pesticidal sciences* **39**, 95-102.
5. Lagunes, T.A., C. Arenas., C. Rodríguez. (1984) Extractos acuosos y polvos vegetales con propiedades insecticidas. Ed. Futura. México, p. 203.
6. Rodríguez, H.C. (1982) Búsqueda de sustancias con propiedades tóxicas contra gusano cogollero del maíz (*Spodoptero frugiperda*. J.E Smith) y mosquito casero (*Culex quinquefasciatus* Say.). Tesis de licenciatura. Departamento de parasitología agrícola, UACH. 89 p.
7. Schmitterer, H. (1995) The neem tree *Azadirachta indica* A. Juss. and

- other Meliaceous plants. Sources of Unique Natural Products for Integrated Pest Management, Medicine, Industry and other Purposes. VCH Publishers, Alemania, 696 pp.
8. Rodríguez-Hahn, L., Esquivel, B., Cárdenas, J. (1995) Neo-clerodane diterpenoids from American *Salvia* species. En: J.T. Arnason, R. Mata, J.T. Romeo (eds.), *Phytochemistry of Medicinal Plants*. Plenum Press, New York, pp. 311-332.
 9. Bye, R., Linares, E., Estrada, E. (1995) Biological diversity of medicinal plants in Mexico. En: J.T., Arnason, R. Mata, J.T. Romeo (eds.), *Phytochemistry of Medicinal Plants*. Plenum Press, New York, pp. 65-82.
 10. Arnason, J.T., Mackinnon, S., Durts, T., Philogene, B.J.R., Hasbun, C., Sanchez, P., Poveda, L., San Roman, L., Isman, M.B., Satasook, C., Towers, G.H.N., Wiriyaichitra, P., McLaughlin, J.L. (1993) Insecticides in tropical plants with non-neurotoxic modes of action. En: K.R. Downum, J.T. Romeo, H.A.P. Stafford (eds.), *Phytochemical Potencial of Tropical Plants*. Plenum Press, New York, pp. 107-131.
 11. Wagner, H. (1977) Pharmaceutical and economic use of the Labiatae and Rutaceae families. *Revista Latinoamericana de Quimica* **8**, 16-25.
 12. Lawrence, B.M. (1992) Chemical components of labiatae oils and their exploitation. En: R.M. Harley, T. Reynolds (eds.), *Advances in Labiatae Science*. Royal Botanical Gardens, Kew, Inglaterra, pp. 399-436.
 13. Heinrich, M. (1992) Economic Botany of American Labiatae. En: R.M.

- Harley, T. Reynolds (eds.), *Advances in Labiatae Science*. Royal Botanical Gardens, Kew, Inglaterra, pp. 475-488.
14. Aycard, J.P., Kini, F., Kam, B., Gaydou, E.M., Faure, R. (1993) Isolation and identification of spicigera lactone: complete ^1H and ^{13}C assignments using two-dimensional NMR experiments. *Journal of Natural Products* **56**, 1171-1173.
 15. Altschul, S.V.R. (1973) *Drugs and food from little-known plants*. Ed. Harvard University Press, U.S.A., p. 263.
 16. Lambert, J.D., Gale, J., Arnason, J.T., Philogene, B.J.R. (1985) Bruchid control with traditionally used insecticidal plants *Hyptis spicigera* and *Cassia nigricans*. *Insect Science and its Application* **6**, 167-170.
 17. Gascón Figueroa, M. (1989) Estudio Fitoquímico de *Hyptis mutabilis* (Labiatae). Tesis de licenciatura. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, pp. 9-30.
 18. Pereda Miranda, R. (1987) Elucidación estructural y estereoquímica de nuevos metabolitos secundarios aislados de Labiatae (*Salvia* e *Hyptis*). Tesis de maestría. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, pp. 18-41
 19. Kini, F., Kam, B., Aycard, J.P., Gaydou, E.M., Bombarda, I. (1993) Chemical composition of the essential oil of *Hyptis spicigera* Lam. from Burkina Faso. *Journal of Essential oil Research* **5**, 219-221.

20. Möse, J.R., Lucas, G. (1957) *Arzneimittel-Forschung: Drug Research* **7**, 687.
21. De Araujo, M.C.M., Calvacanti, M.S.B., De mello, J.F., D' Albuquerque, I.L. (1974) Antimicrobial substances of higher plants. Communication XLV. Primary observations on two quinonoids isolated from *Hyptis fructicosa* Salzm ex Benth (Labiatae). *Review of the Institute Antibiotics* **14**, 101-104.
22. Marletti, F., Delle Monache, F., Marini-Bettolo, G.B., De Araujo, M.C.M., Calvacanti, M.S.B., D' Albuquerque I.L., De Lima, O.G. (1976) Diterpenoid Quinones of *Hyptis fructicosa* (Labiatae). *Gazzeta Chimica Italiana* **106**, 119-126.
23. Delle Monache, F., Marletti, F., Marini-Bettolo, G., De Mello, J.F., D' Albuquerque, I.L. (1977) Diterpenoids of *Hyptis fructicosa* (Labiatae) II. Hyptol. *Gazzeta Chimica Italiana* **107**, 319-321.
24. Manchand, P.S., White, J.D., Fayos, J., Clardy, J. (1974) Structures of suaveolic acid and suaveolol. *Journal Organic Chemistry* **39**, 2306-2307.
25. Messana, I., Ferrari, F., De Moraes e Souza, M.A., Gács-Baitz, E. (1990) (-) Salzol, an isopimarane diterpene, and a chalcone from *Hyptis salzmanii*. *Phytochemistry* **29**, 329-332.
26. Manitto, P. (1981) *Biosynthesis of Natural Products*. Ed. Ellis Horwood Limited, Inghilterra, pp. 255-264.
27. Cooper-Driver, G.A., Le Quesne, P.W. (1987) Diterpenoids as insect

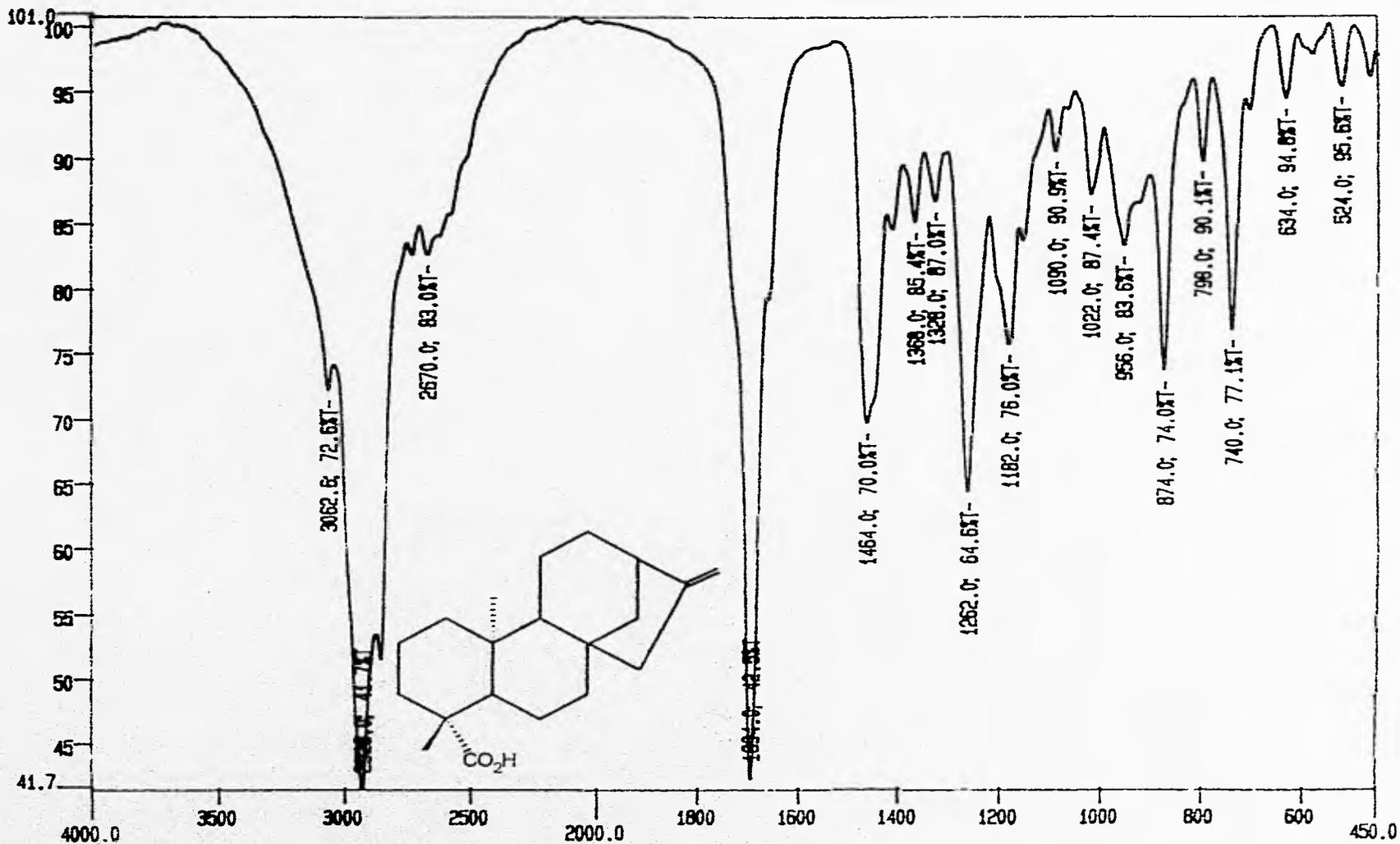
- antifeedants and growth inhibitors: Role in *Solidago* species. En: G.R. Waller (eds.), *Allelochemicals: Role in Agriculture and Forestry*. *American Chemical Society*, Washington, pp. 534-548.
28. Romo de Vivar, A. (1985) *Productos Naturales de la Flora Mexicana*. Ed. Limusa, México, pp. 139-148.
29. Rojas A., Hernández, L., Pereda-Miranda, R., Mata, R. (1992) Screening for antimicrobial activity of crude drug extracts and pure natural products from Mexican medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology* **35**, 275-283.
30. Kingston, D.G.I., Rao, M.M., Zucker, W.V. (1979) Plant anticancer agents IX. Constituents of *Hyptis tomentosa*. *Journal of Natural Products* **42**, 496-499.
31. Novelo, M., Cruz, J.G., Hernández, L., Pereda-Miranda, R., Chai, H., Mar W., Pezzuto, J.M. (1993) Cytotoxic constituents from *Hyptis verticillata*. *Journal of Natural Products* **56**, 1728-1736.
32. Kuhnt, M., Rimpler, H., Heinrich, M. (1994) Lignans and other compounds from the mixe indian medicinal plant *Hyptis verticillata*. *Phytochemistry* **36**, 485-489.
33. Achmed, S., Hoye, T., Kjaer, A., Makmur, L., Norrestam, R. (1987) Molecular and crystal structure of hyptolide, a naturally occurring α,β -unsaturated δ -lactone. *Acta Chemica Scandinovica B* **41**, 599-609.

34. Villavicencio González, J.M. (1993) Purificación y Caracterización de las Pectinólidas A-C, Principales Constituyentes Citotóxicos y Antimicrobianos de *Hyptis pectinata* (L.) Poit. Tesis de maestría. Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, 65 p.
35. Davies-Coleman, M.T., Rivett, D.E.A. (1989) Naturally occurring 6-substituted 5,6-dihydro- α -pyrones. En: W. Herz, H. Grisebach, G.W. Kirby, C. Tamm (eds.), *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*. Springer-Verlag, New York, pp. 1-35.
36. Pereda-Miranda, R., García, M., Delgado, G. (1990) Structure and stereochemistry of four α -pyrones from *Hyptis oblongifolia*. *Phytochemistry* **29**, 2971-2974.
37. Pereda-Miranda, R., Hernández, L., Villavicencio, M.J., Novelo, M., Ibarra, P., Chai, H., 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.
38. Onayade, O.A., Looman, A., Scheffer, J.J.C., Svendsen, A.B. (1990) Composition of the herb essential oil of *Hyptis spicigera* Lam. *Flavor and Fragrance Journal* **5**, 101-105.
39. Epling, C. (1949) Revisión del género *Hyptis* (Labiatae). *Revista del Museo de la Planta*. Tomo VII. Sec. Botánica, Argentina, pp. 153-497.
40. Delgado, G., Romo de Vivar, A., Cárdenas, J., Pereda-Miranda, R., Huerta, E. (1984) Ent-beyerene and ent-atisene diterpenes from *Viguiera insignis*. *Phytochemistry* **23**, 2285-2288.

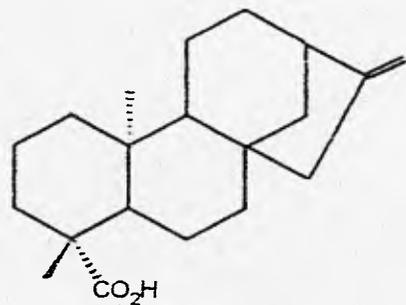
41. Castellaro, S.J., Dolan, S.C., Mac Millan, J., Willis, Ch.L. (1990) Deuterium labelling of ent-kaur-16-en-19-oic acid at carbon-6 and-7. *Phytochemistry* **29**, 1823-1831.
42. Budzikiewicz, H., Djerassi, C., Williams, D.H. (1964) *Interpretation of Mass Spectra of Organic Compounds*. Ed. Holden-Day, INC. San Francisco, pp. 39-47.
43. Kingston, E.E., Shannon, J.S, Lacey, M.J. (1983) Rearrangements in chemical ionization mass spectra. *Organic Mass Spectrometry* **18**, 183-192.
44. Silverstein, R.M., Bassler, C.G., Morrill, T.C. (1991) *Spectrometric Identification of Organic Compounds*. 5a ed. Ed. John Wiley & Sons. U.S.A., p. 28.
45. Torssell, K.B.G. (1983) *Natural Product Chemistry. A Mechanistic and Biosynthetic Approach to Secondary Metabolism*. Ed. John Wiley & Sons, U.S.A., pp. 189-194.
46. Herbert, R.B. (1989) *The Biosynthesis of Secondary Metabolites*. Ed. Chapman & Hall, Lugar, pp. 86-89.
47. Pereda-Miranda, R., Delgado, G., Romo de Vivar, A. (1986) New triterpenoids from *Salvia nicholsoniana*. *Journal of Natural Products* **49**, 225-230.
48. Bhacca, N.S., Williams, D.H. (1964) *Application of NMR Spectroscopy in Organic Chemistry*. Ed. Halden-Day. San Francisco, pp. 49-52.

49. Pretsch, E., Clerc, T., Seibl, J., Simon, W. (1980) *Tablas para la Elucidación Estructural de Compuestos Orgánicos por Métodos Espectroscópicos*. Ed. Alhambra, España, p. 201.
50. Levy, G.C., Lichter, R.L., Nelson, G.L. (1980) *Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*. Ed. John Wiley & Sons, pp. 136-145.
51. Su, Wen-Chiung., Fang, Jim-Min., Cheng, Yu-Shia. (1994) Labdanes from *Cryptomeria japonica*. *Phytochemistry* **37**, 1109-1114.
52. González A.G., Bermejo-Barrera, J., Díaz, J.G., Rodríguez-Pérez, E.M., Yanes, A.C., Rauter, P., Pozo, J. (1990) Diterpenes and other constituents of *Eupatorium salvia*. *Phytochemistry* **29**, 321-323.

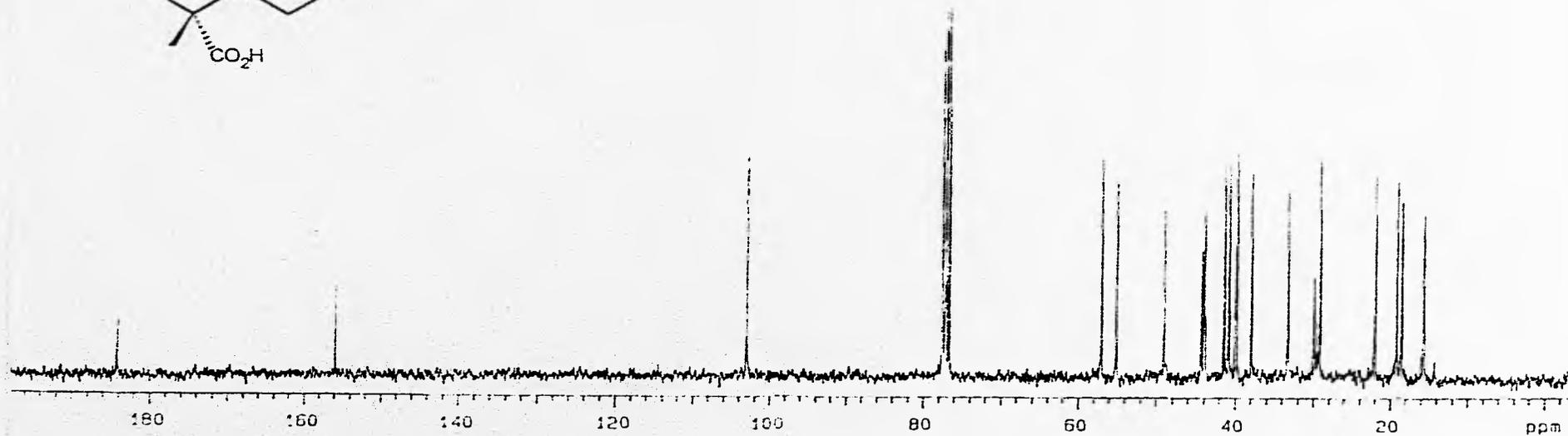
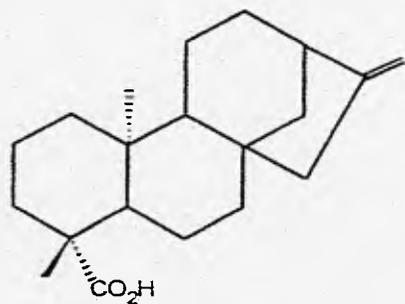
ESPECTROS



Espectro No. 1. IR del ácido ent-kaur-16-en-19-oico (HS I-2A)

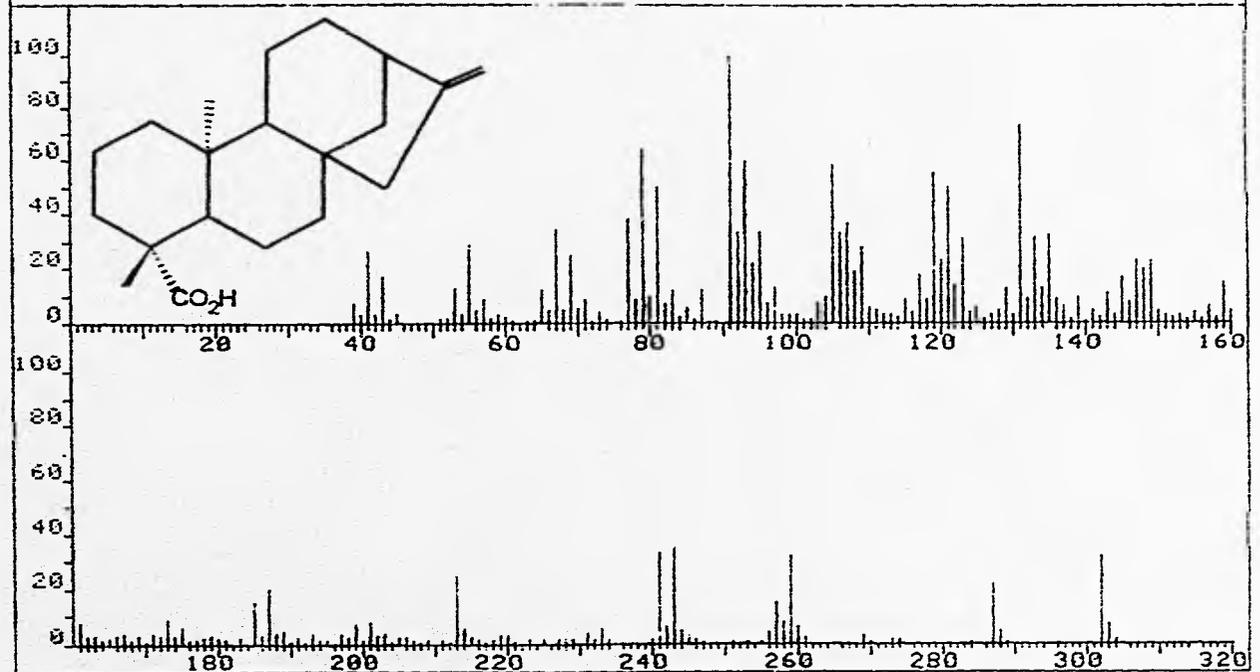


Espectro No. 2. RMN-¹H del ácido ent-kaur-16-en-19-óico (HS I-2A)

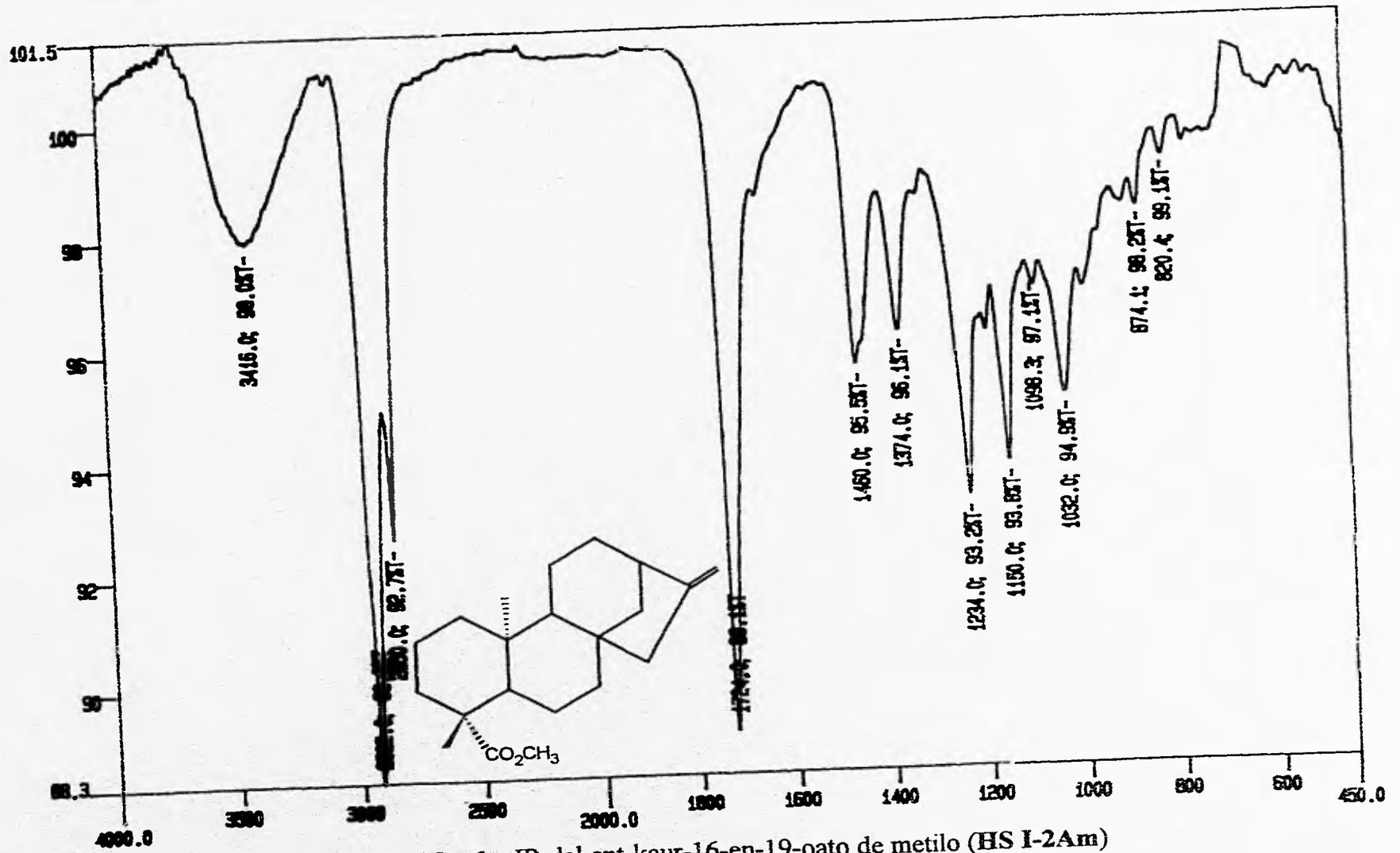


Espectro No. 3. RMN-¹³C del ácido ent-kaur-16-en-19-óico (HS I-2A)

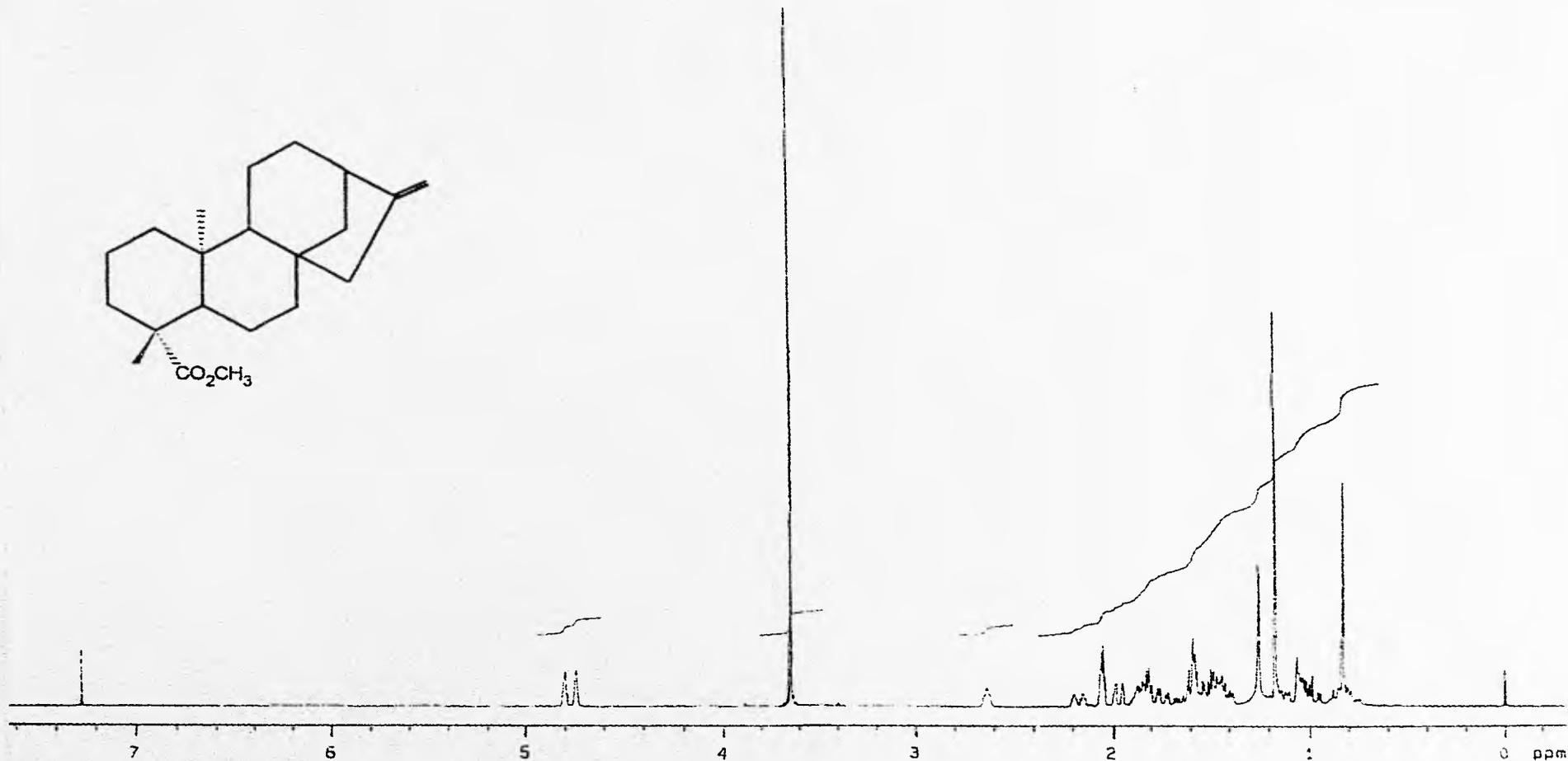
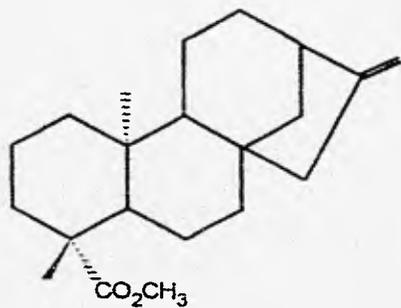
FRN 9708	SPECTROM 5		RETENTION TIME .4	
LARGST 4:	91.1, 100.0	131.1, 72.6	79.2, 64.1	93.1, 60.1
LAST 4:	289.2, .7	302.2, 31.9	303.2, 6.9	304.2, 1.0
				PAGE 1 V = 1.00



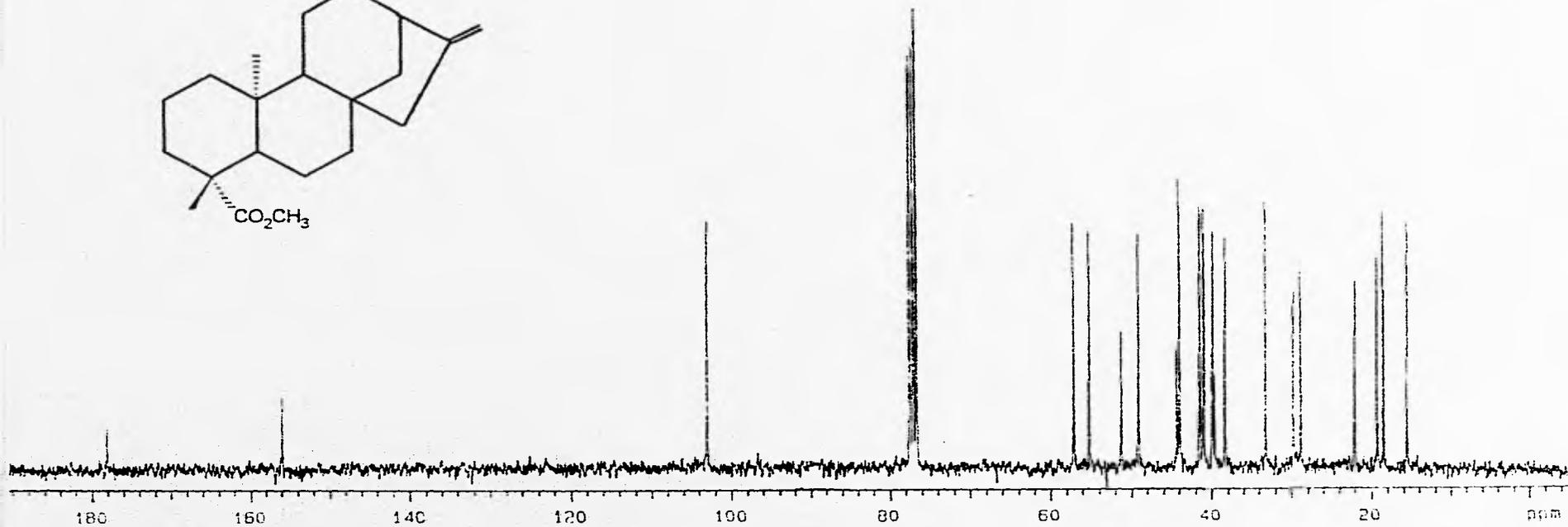
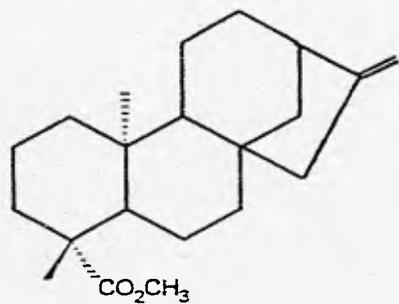
Espectro No. 4. EMIE del ácido ent-kaur-16-en-19-óico (HS I-2A)



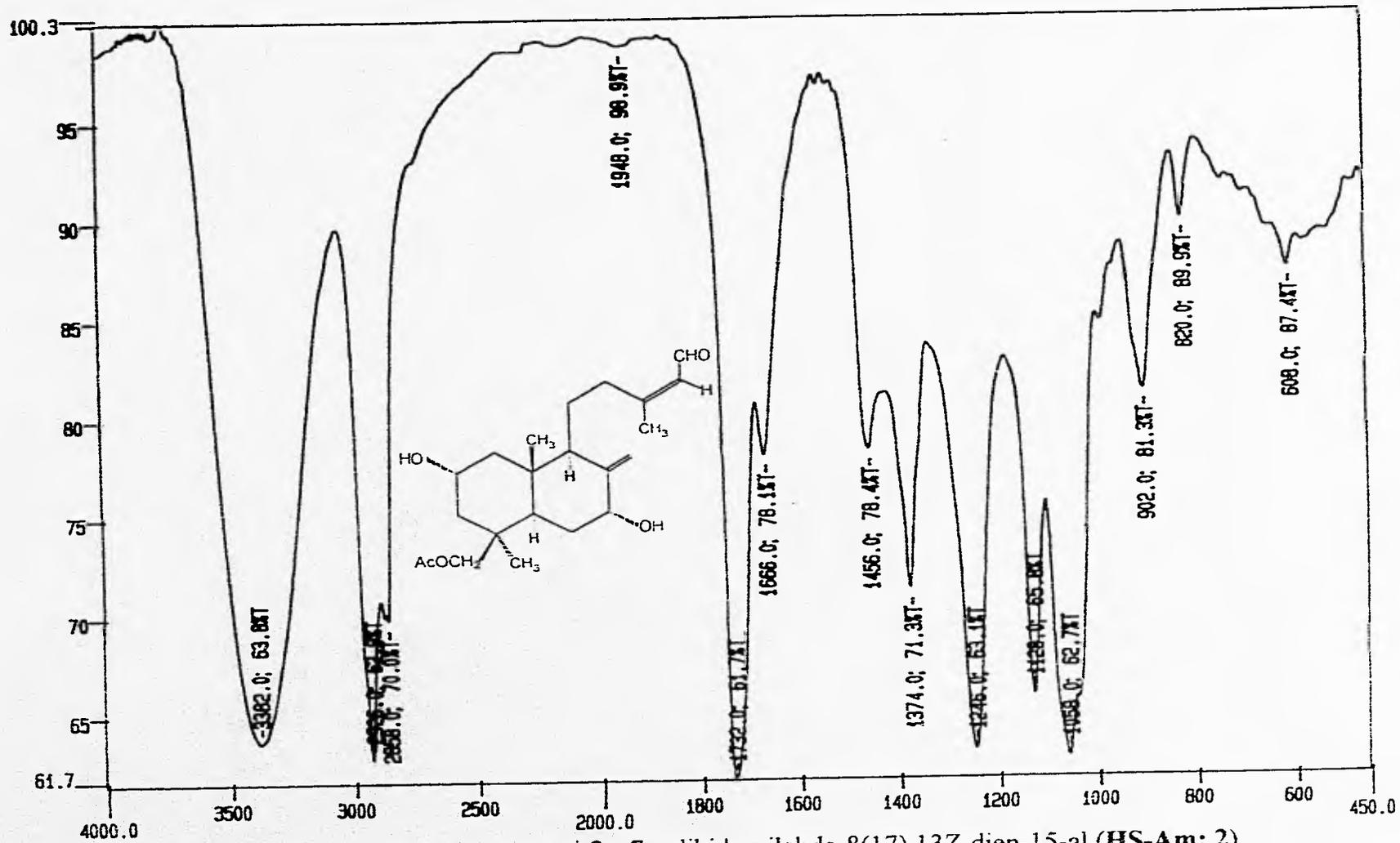
Espectro No. 5. IR del ent-kaur-16-en-19-oato de metilo (HS I-2Am)



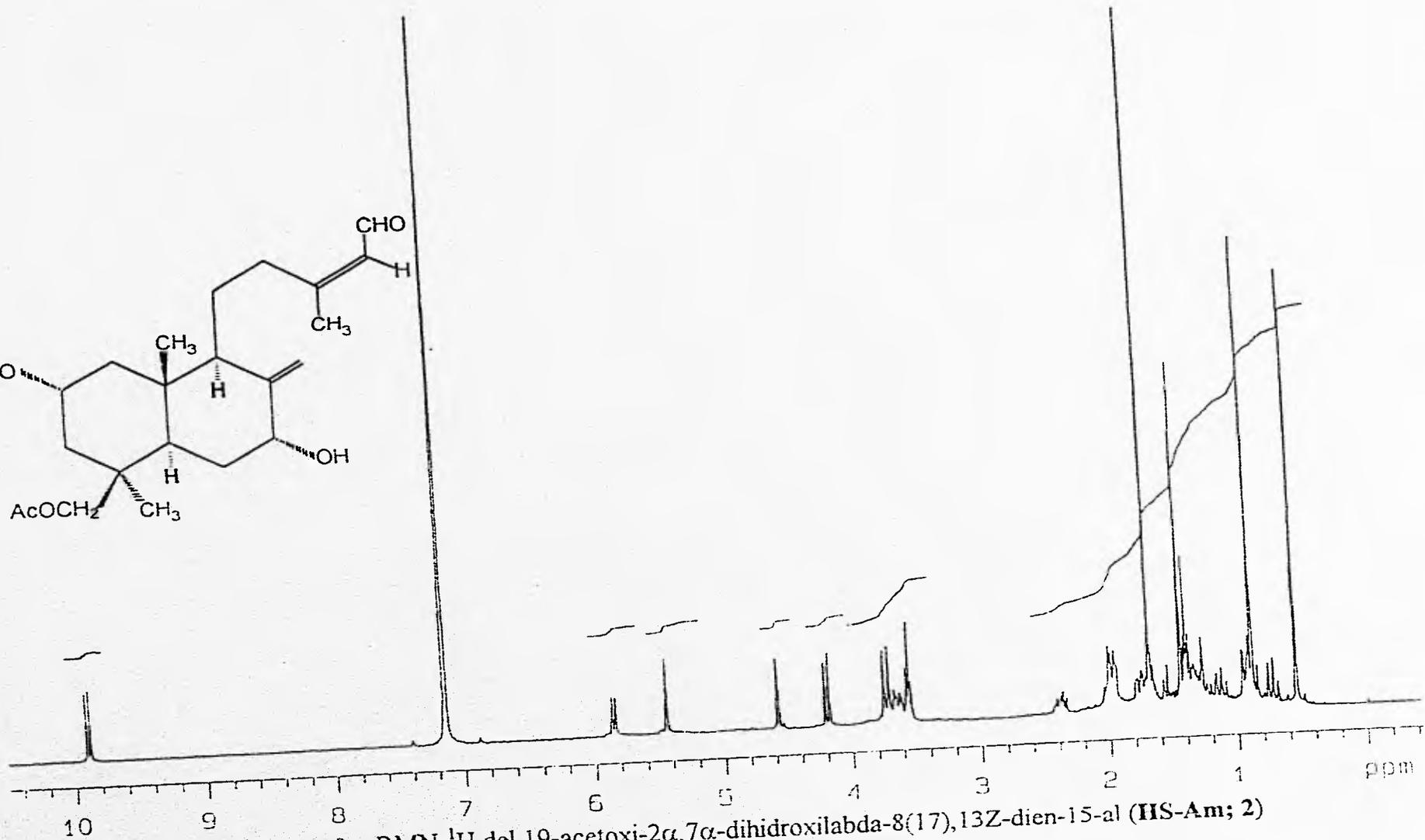
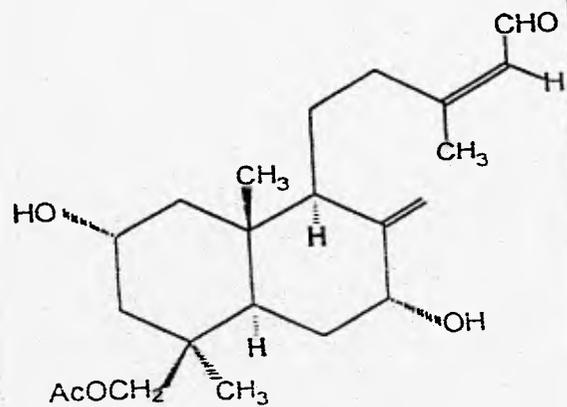
Espectro No. 6. RMN-¹H del ent-kaur-16-en-19-oato de metilo (HS I-2Am)



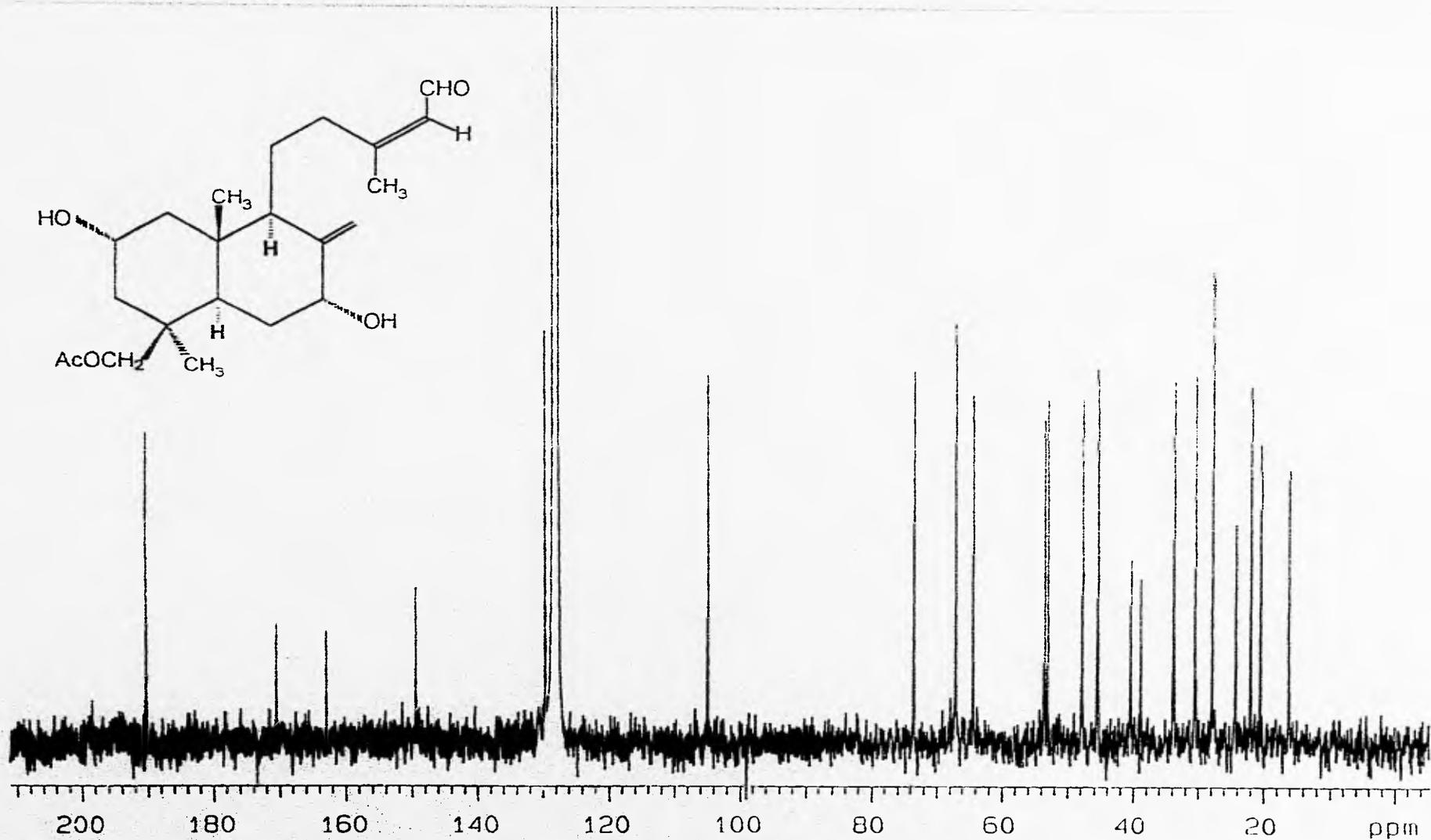
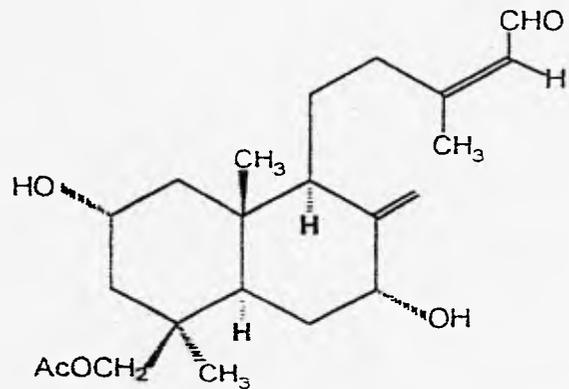
Espectro No. 7. RMN-¹³C del ent-kaur-16-en-19-oato de metilo (HS I-2Am)



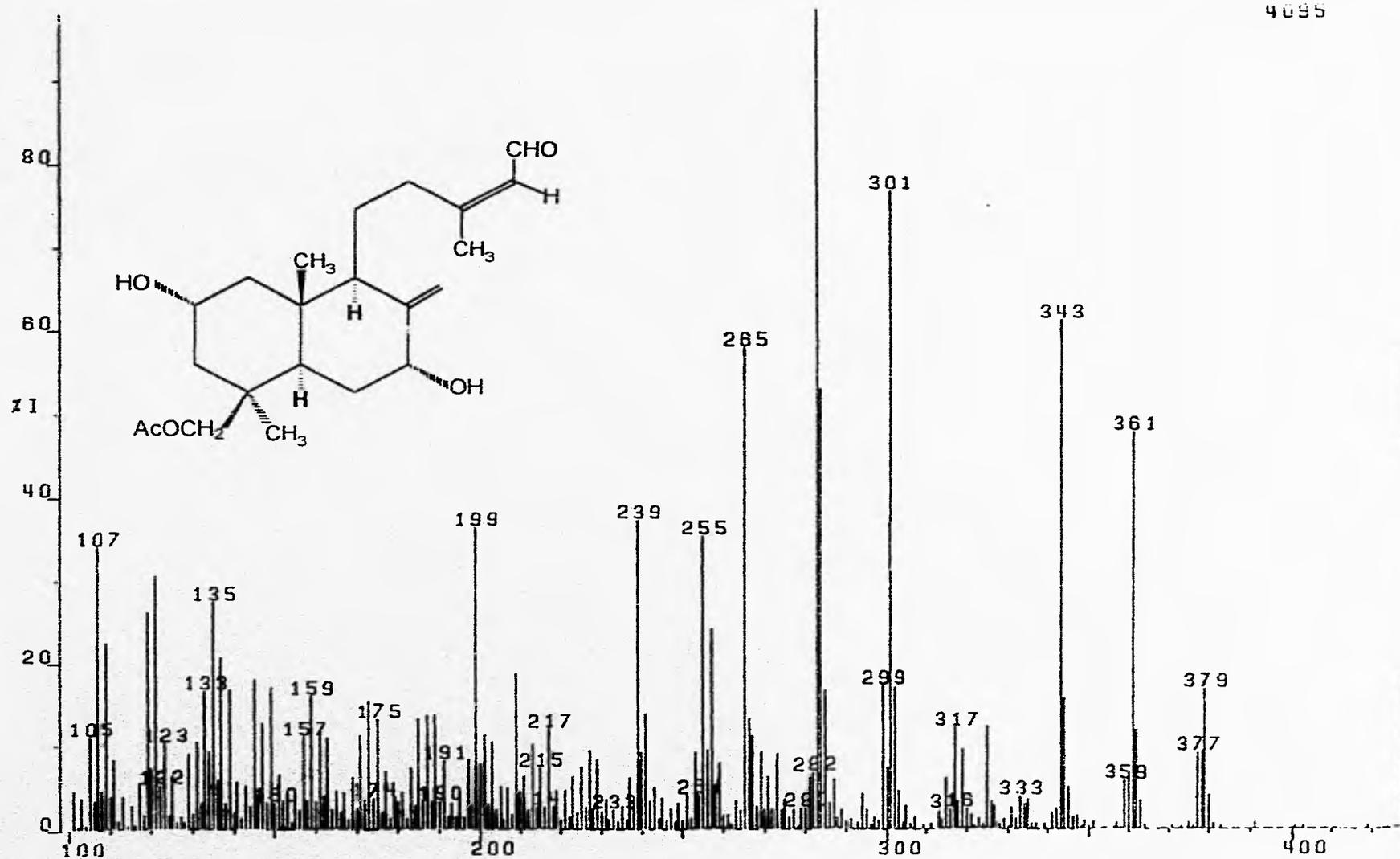
Espectro No. 8. IR del 19-acetoxy-2 α ,7 α -dihydroxilabda-8(17),13Z-dien-15-al (HS-Am; 2)

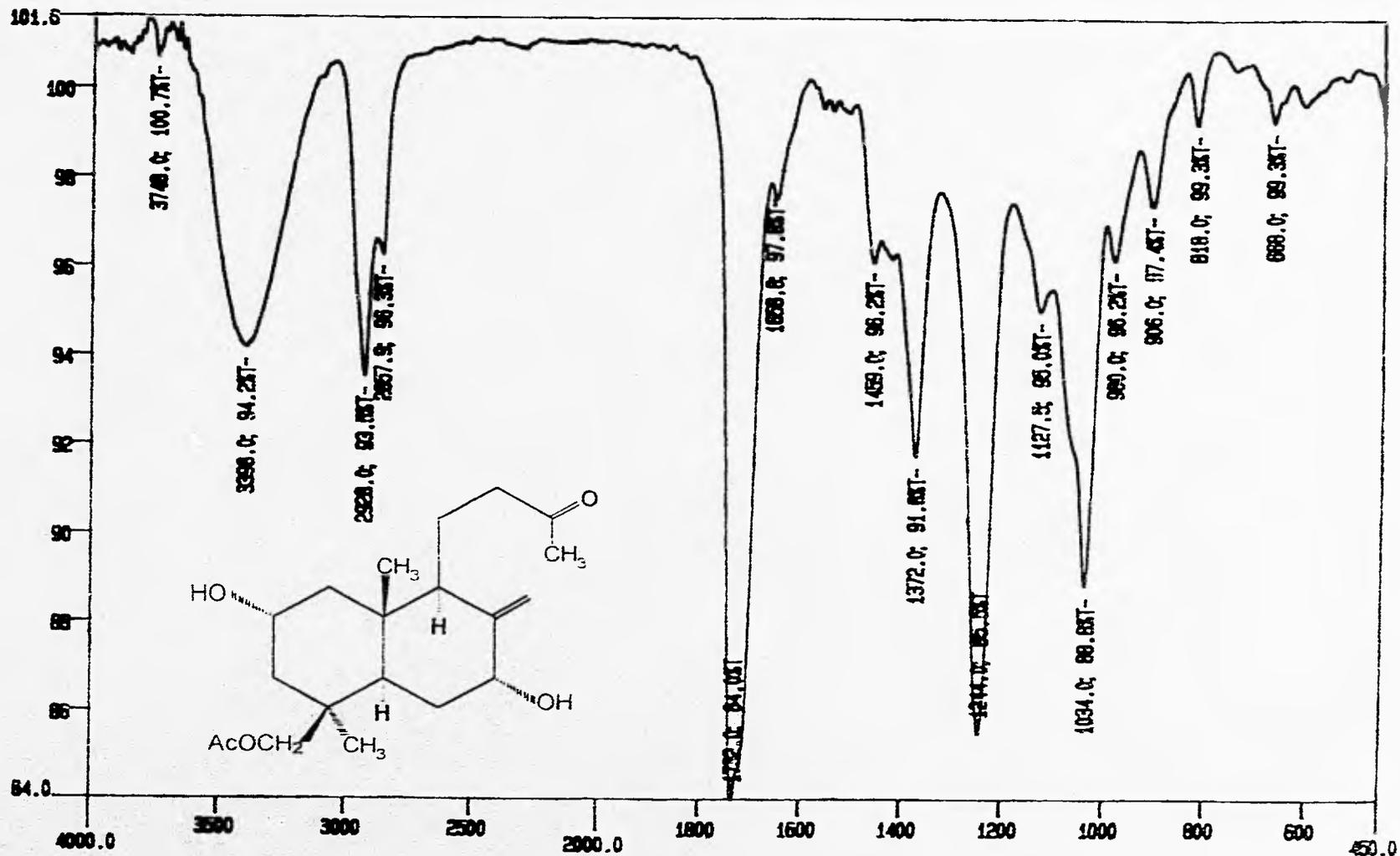


Espectro No. 9. RMN-¹H del 19-acetoxi-2 α ,7 α -dihidroxilabda-8(17),13Z-dien-15-al (HIS-Am; 2)

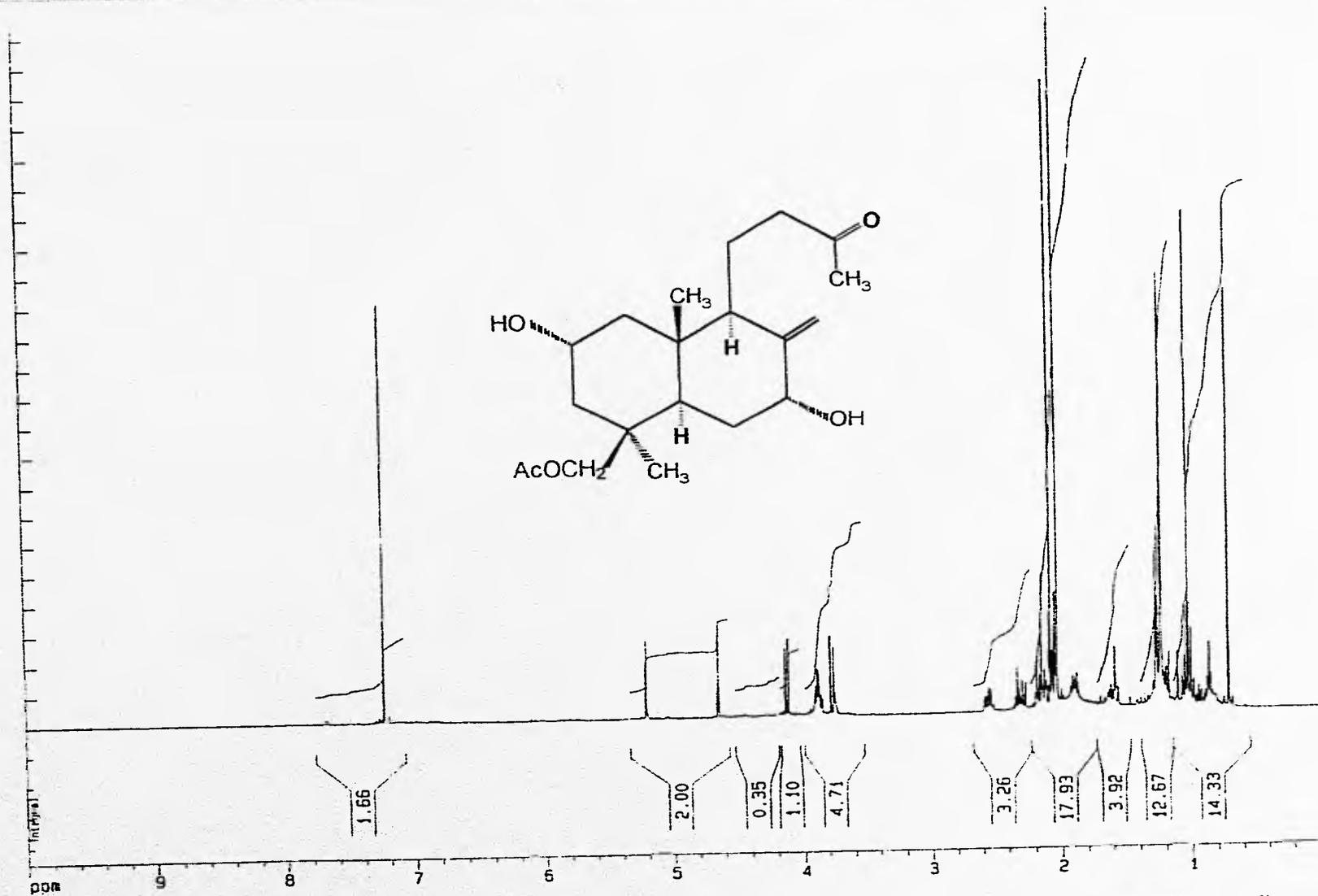


Espectro No. 10. RMN- ^{13}C del 19-acetoxy-2 α ,7 α -dihydroxilabda-8(17),13Z-dien-15-al (HS-Am; 2)

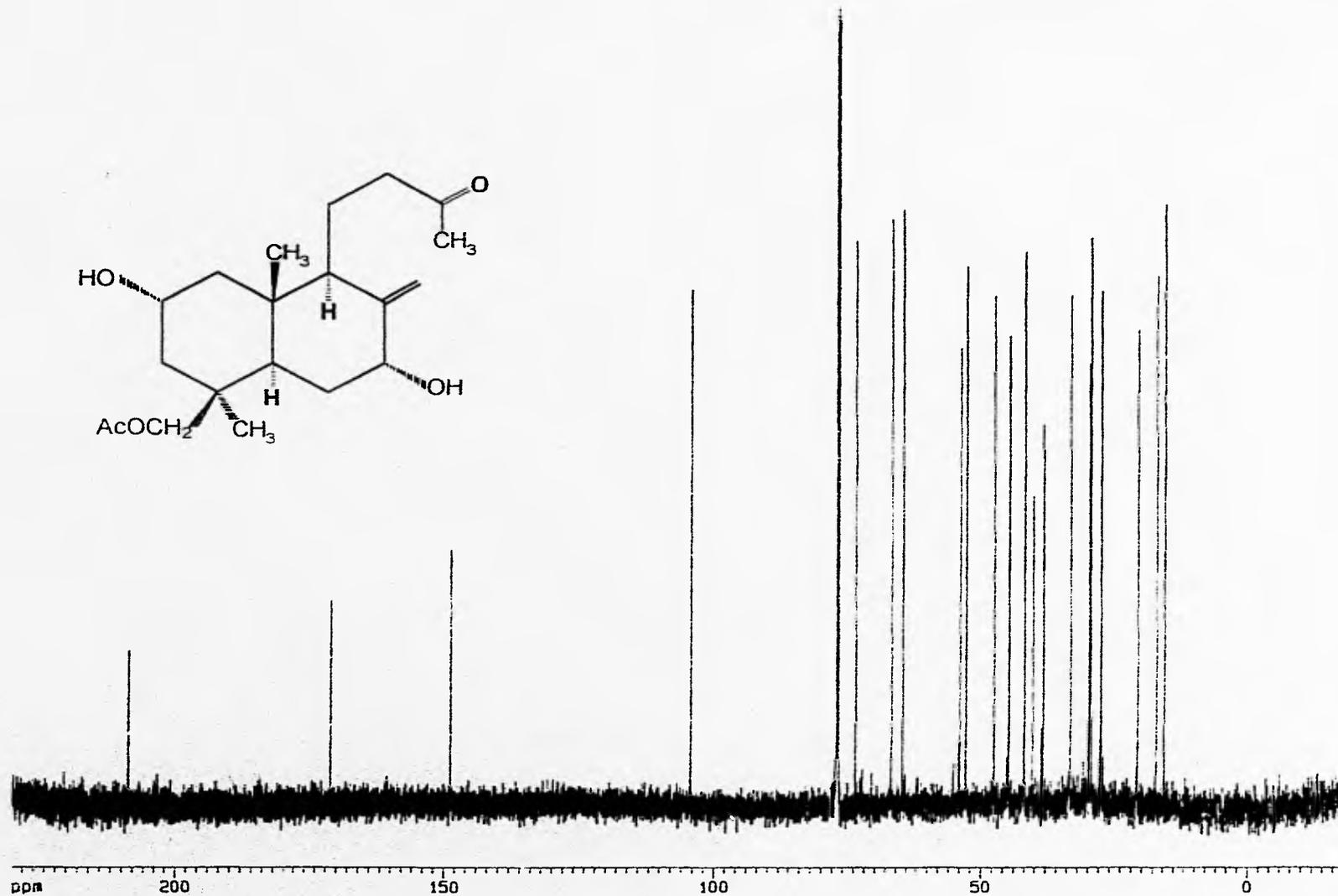
Espectro No. 11 EMIQ del 19-acetoxi-2 α ,7 α -dihidroxilabda-8(17),13Z-dien-15-al (HS-Am; 2)



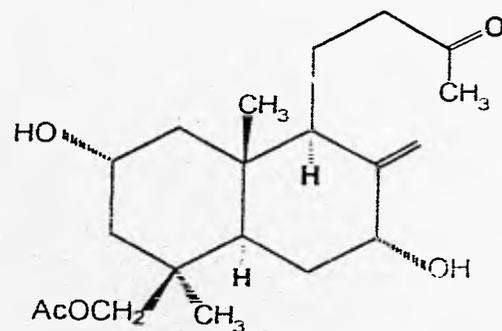
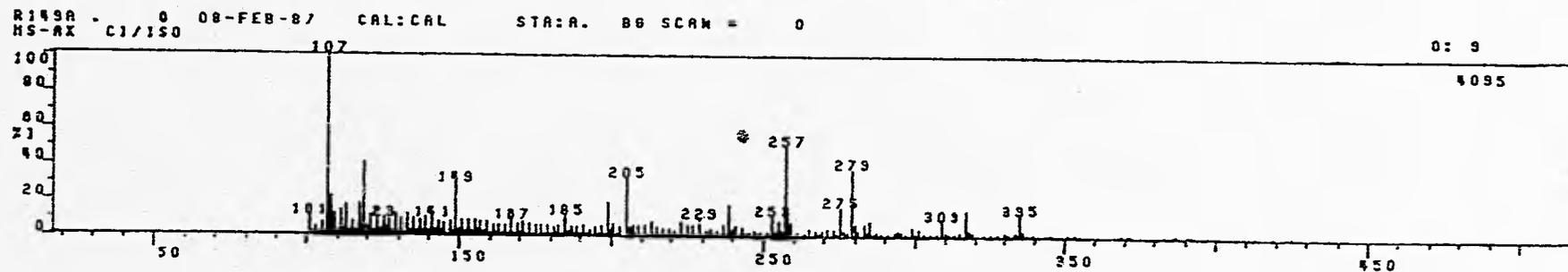
Espectro No. 12. IR del 19-acetoxi-2 α ,7 α -dihidroxi-14,15-dinorlabda-8(17)-en-13-ona (HS-Ax; 4)



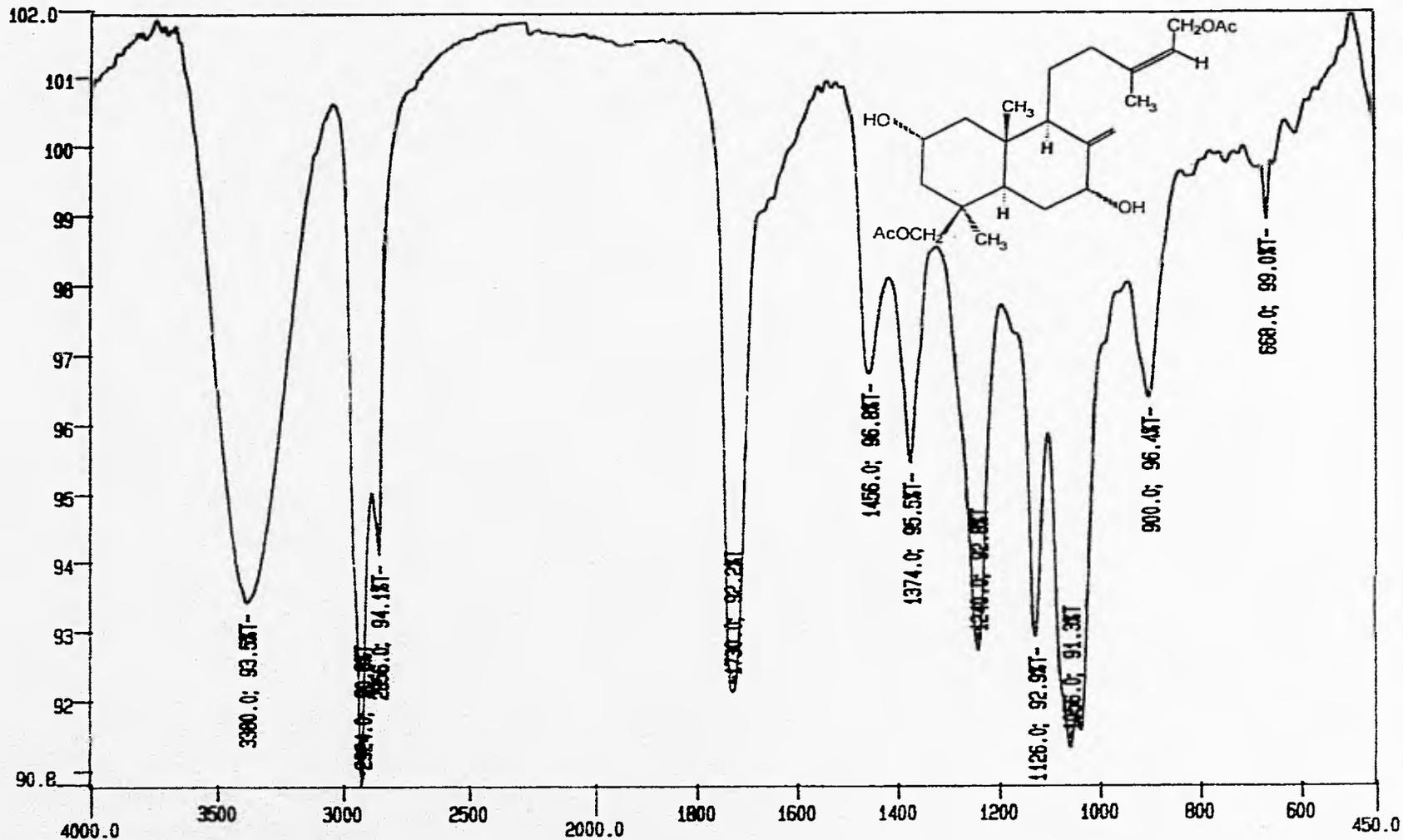
Espectro No. 13. RMN-¹H del 19-acetoxi-2 α ,7 α -dihidroxi-14,15-dinorlabda-8(17)-en-13-ona (HS-Ax; 4)



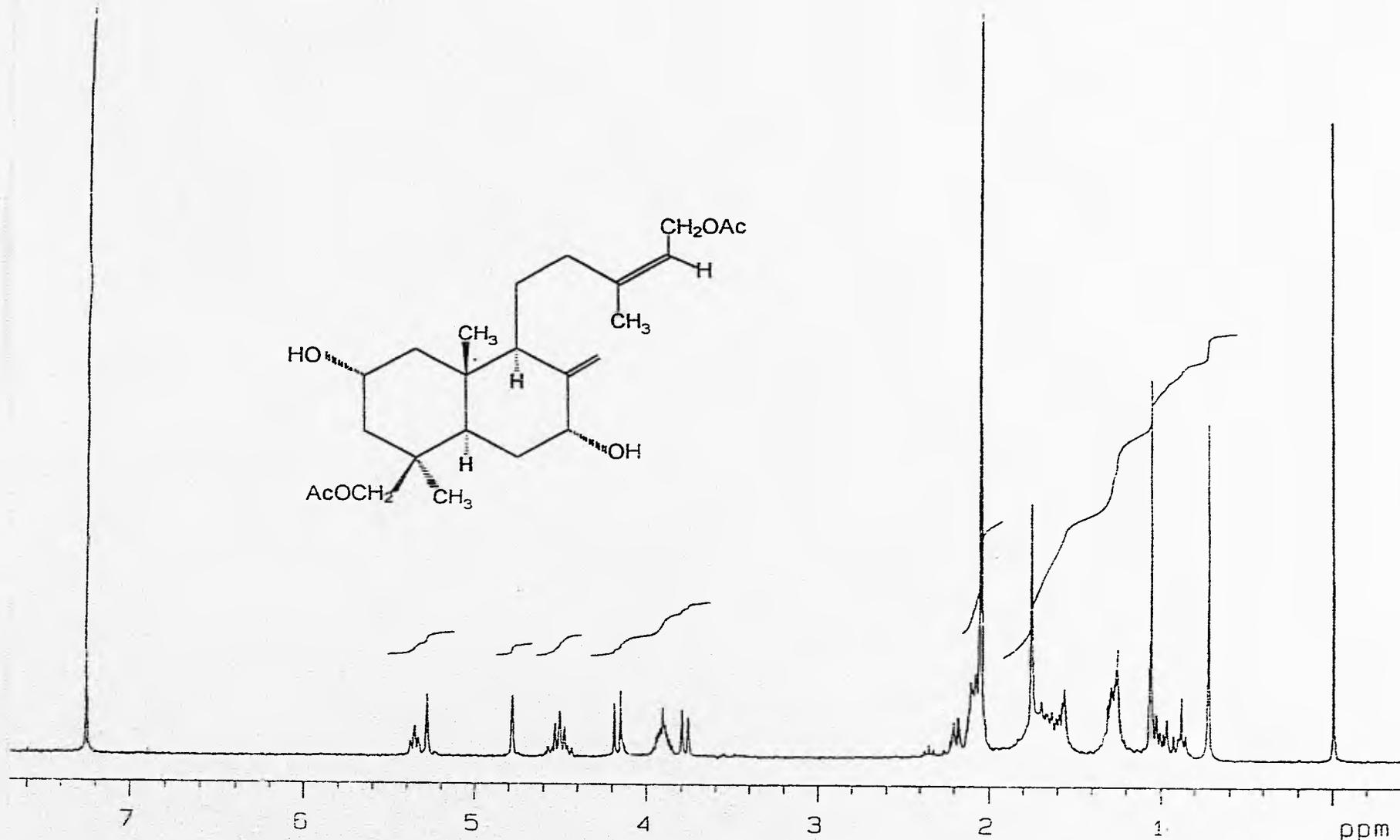
Espectro No. 14. RMN- ^{13}C del 19-acetoxi-2 α ,7 α -dihidroxi-14,15-dinorlabda-8(17)-en-13-ona (HS-Ax; 4)



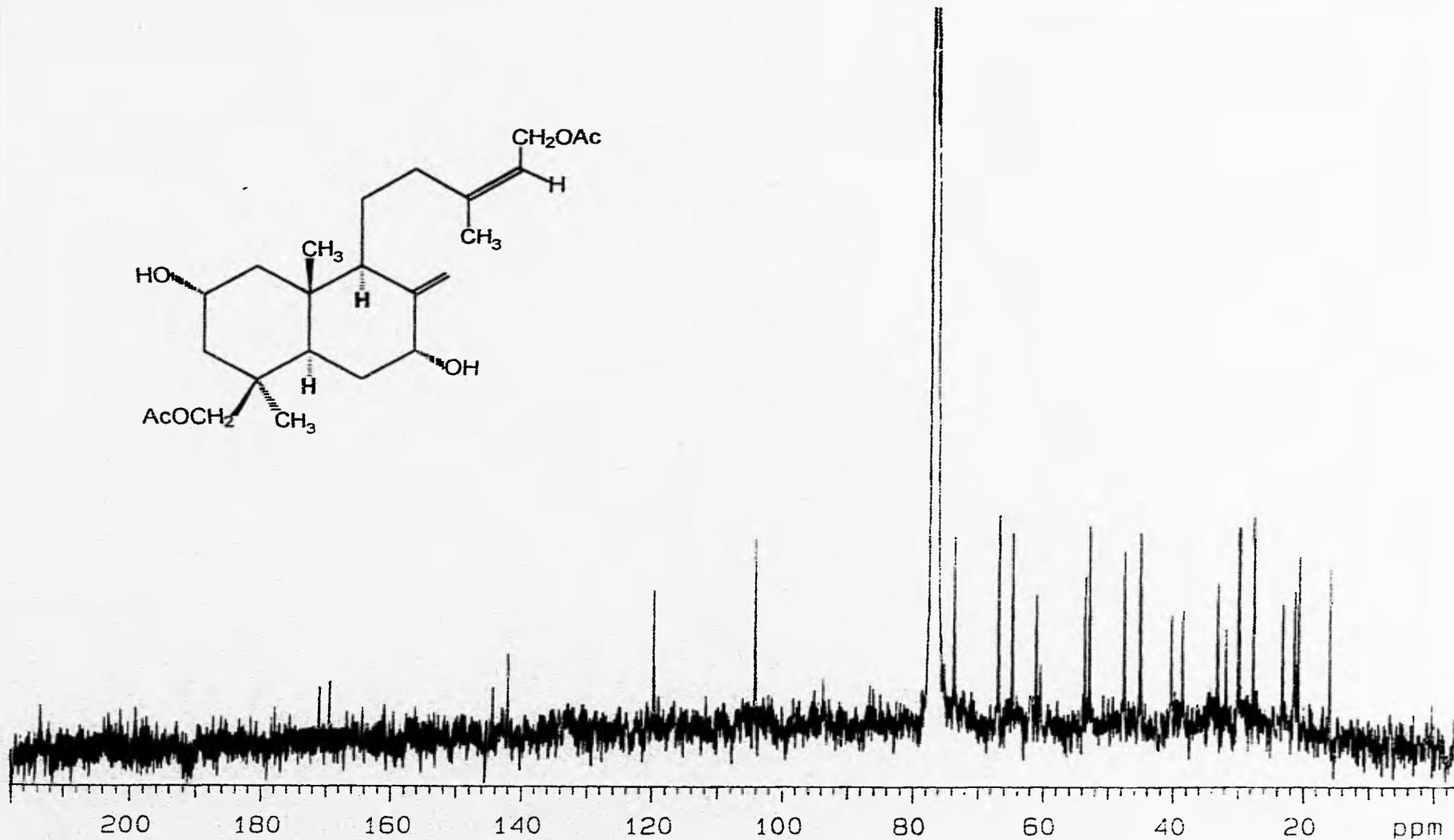
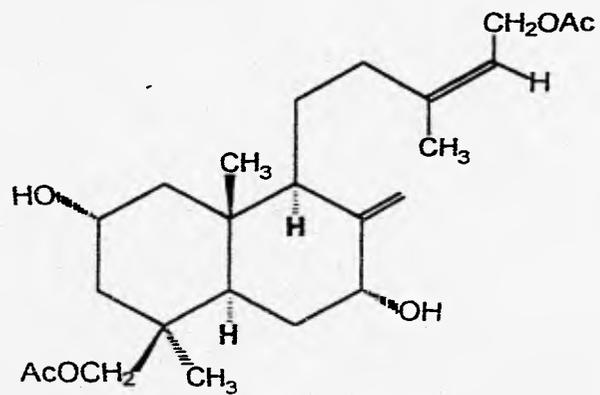
Espectro No. 15. EMIQ del 19-acetoxi-2 α ,7 α -dihidroxi-14,15-dinorlabda-8(17)-en-13-ona (HS-Ax; 4)



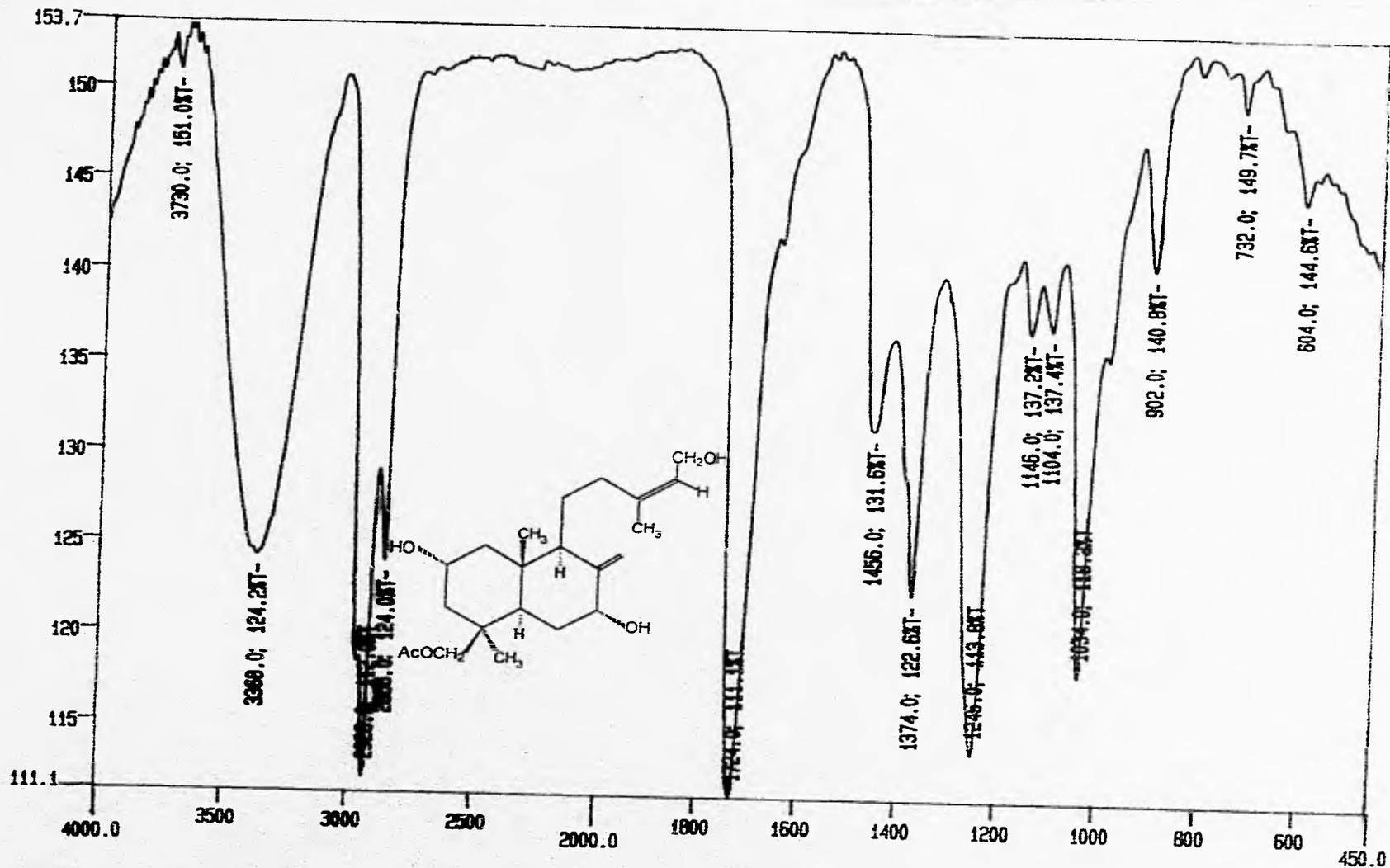
Espectro No. 16. IR del 15,19-diacetoxi-2 α ,7 α -dihidroxiabda-8(17),13Z-dieno (HS-Ae; 3)



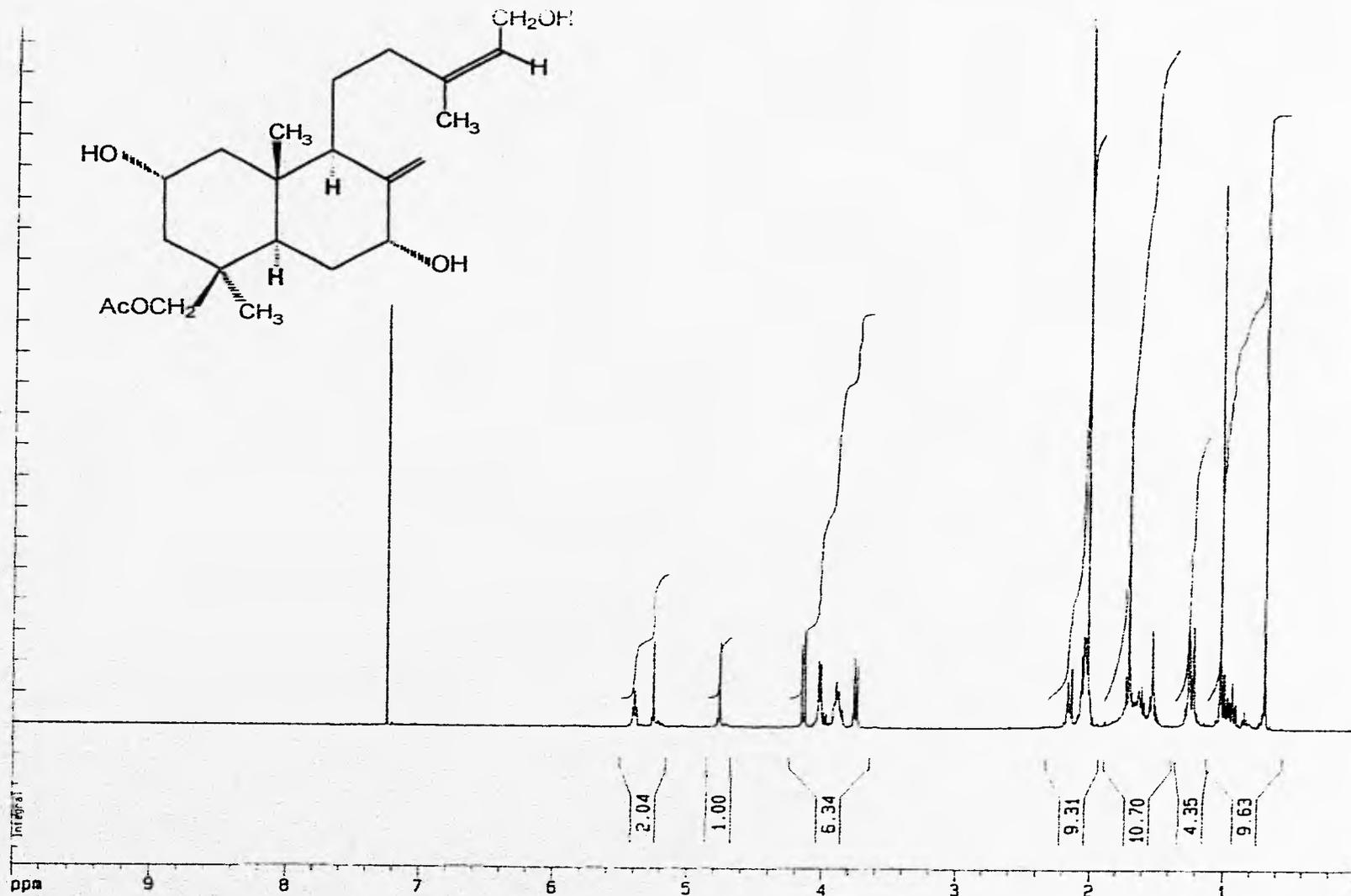
Espectro No. 17. RMN-¹H del 15,19-diacetoxy-2α,7α-dihydroxylabda-8(17),13Z-dieno (HS-Ae; 3)



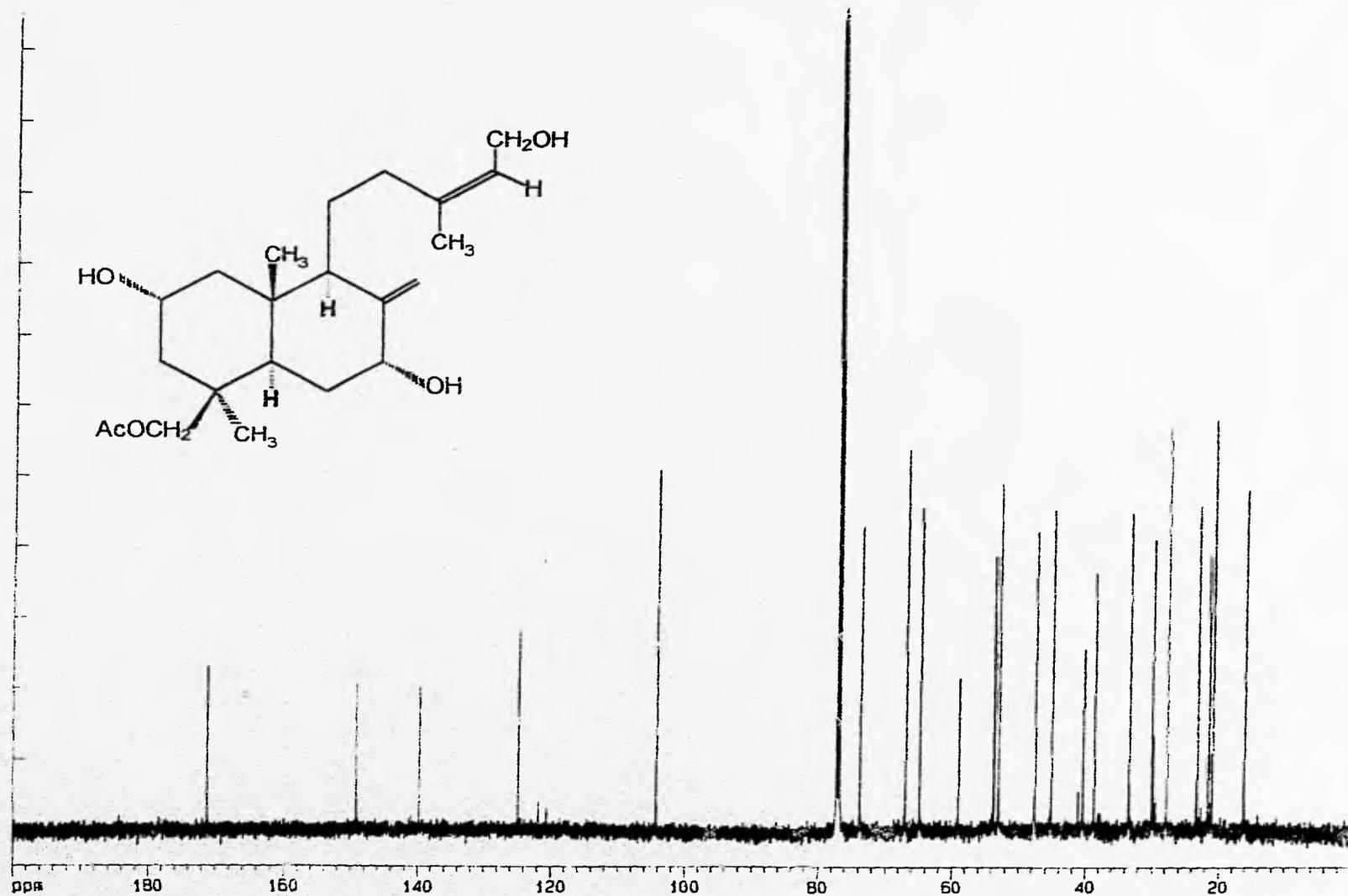
Espectro No. 18. RMN-¹³C del 15,19-diacetoxi-2 α ,7 α -dihidroxiabda-8(17),13Z-dieno (HS-Ae; 3)



Espectro No. 19. IR del 19-acetoxi-2 α ,7 α ,15-tridihidroxiabda-8(17),13Z-dieno (HS-A; 1)

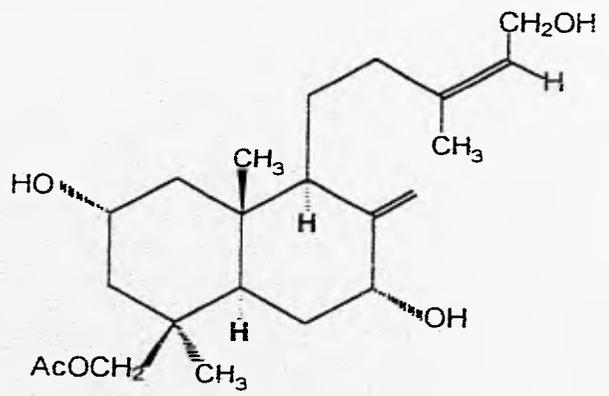
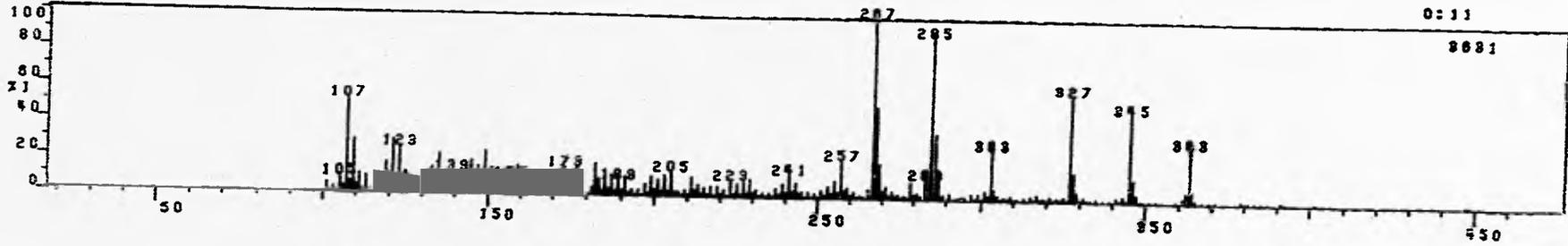


Espectro No. 20. RMN- ^1H del 19-acetoxy-2 α ,7 α ,15-trihidroxi-labda-8(17),13Z-dieno (HS-A; 1)

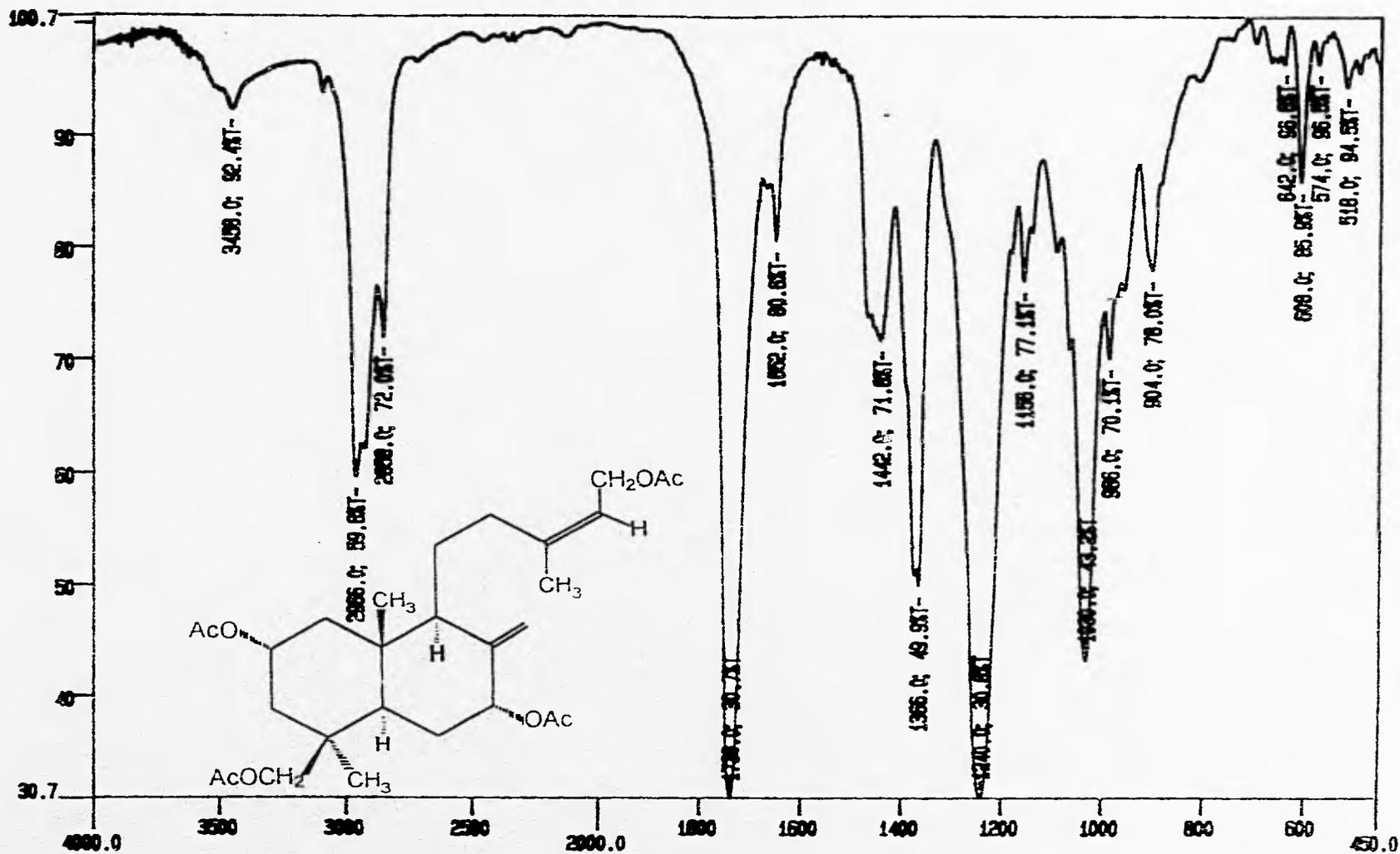


Espectro No. 21. RMN- ^{13}C del 19-acetoxi-2 α ,7 α ,15-tridihidroxiabda-8(17),13Z-dieno (HS-A; 1)

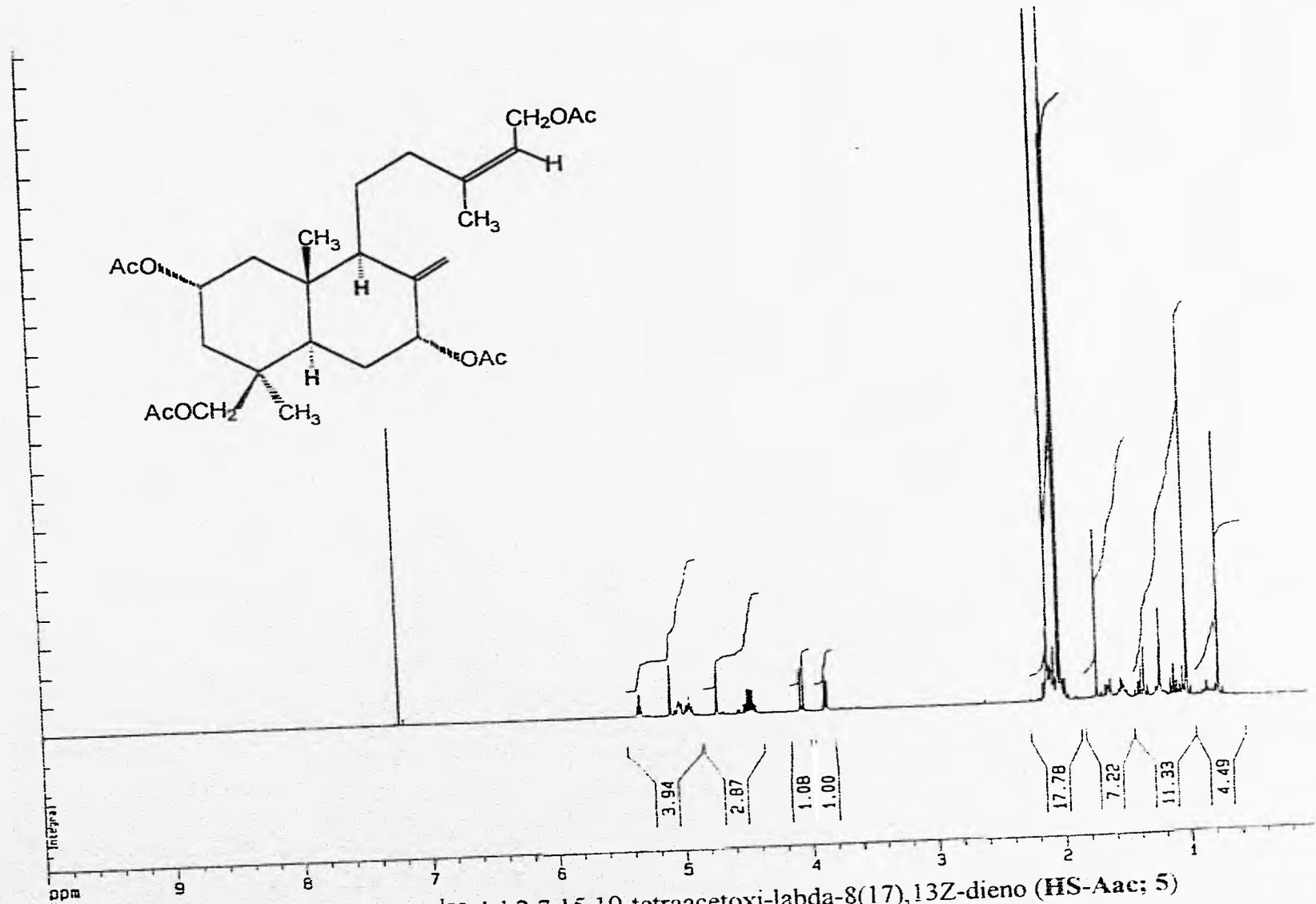
R150A 0 08-FEB-87 CAL:CAL STA:A. 88 SCAM = 0
MS-A C1/150



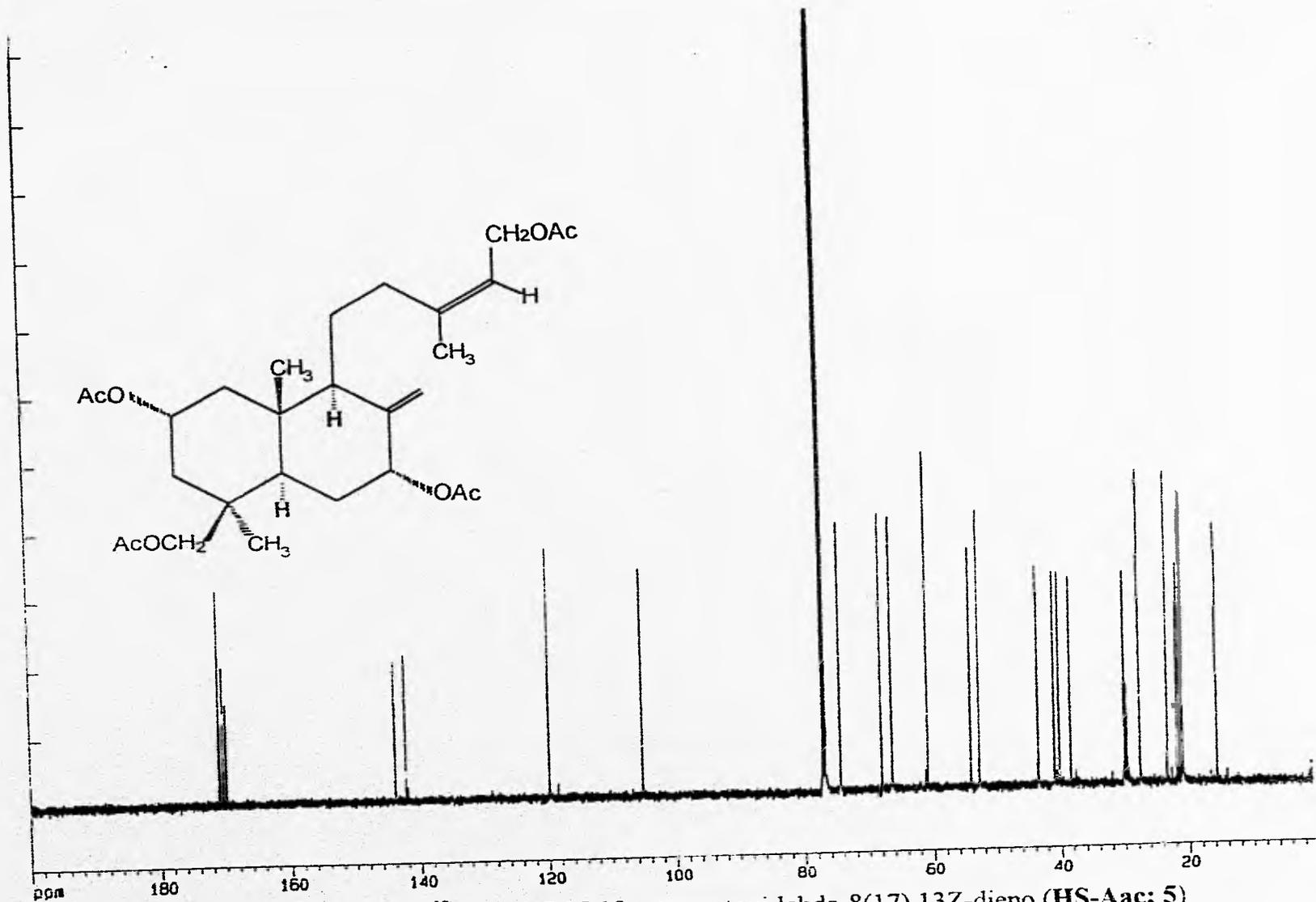
Espectro No. 22. EMIQ del 19-acetoxi-2 α ,7 α ,15-tridihidroxiabda-8(17),13Z-dieno (HS-A; 1)



Espectro No. 23. IR del 2,7,15,19-tetraacetoxy-labda-8(17),13Z-dieno (HS-Aac; 5)



Espectro No. 24. RMN-¹H del 2,7,15,19-tetraacetoxi-labda-8(17),13Z-dieno (HS-Aac; 5)



Espectro No. 25. RMN-¹³C del 2,7,15,19-tetraacetoxi-labda-8(17),13Z-dieno (HS-Aac; 5)