

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

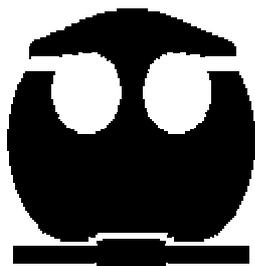
FACULTAD DE QUÍMICA

AISLAMIENTO Y ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DE
METABOLITOS SECUNDARIOS CON ACTIVIDAD
ANTIMICROBIANA DE LA PLANTA MEDICINAL *Verbena*
carolina L. (Verbenaceae)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A :
AGUSTÍN MORALES REYNA



MÉXICO, D.F.

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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	<i>Prof. MARÍA ISABEL AGUILAR LAURENTS</i>
Vocal	<i>Prof. RACHEL MATA ESSAYAG</i>
Secretario	<i>Prof. JOSE FAUSTO RIVERO CRUZ</i>
Primer Suplente	<i>Prof. ISABEL DEL CARMEN RIVERO CRUZ</i>
Segundo Suplente	<i>Prof. MARIO ALBERTO FIGUEROA SALDÍVAR</i>

Sitio de realización de la tesis:

LABORATORIO 125, DEL DEPARTAMENTO DE FARMACIA, CONJUNTO "E",
DIVISIÓN DE POSGRADO DE LA FACULTAD DE QUÍMICA,
UNAM, CU.

ASESOR:

DRA. MARÍA ISABEL AGUILAR LAURENTS

SUSTENTANTE:

AGUSTÍN MORALES REYNA

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por haber pertenecido a ella y brindarme la oportunidad de desarrollo académico y personal.

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM (DGAPA), por el apoyo económico otorgado mediante una beca a través del proyecto IN211807.

A los miembros del jurado designado para la revisión del manuscrito de tesis, por sus valiosos comentarios y observaciones.

Al personal académico de la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI) Facultad de Química, UNAM, particularmente a la Q. F. B. Marisela Gutiérrez, a la M. en C. Rosa Isela del Villar y a la Q. Alejandrina Acosta Huerta, por el registro de los espectros en el infrarrojo y RMN; así como a la Q. Georgina Duarte Lisci y a la Q. F. B. Margarita Guzmán Villanueva por la realización de los análisis de CG-EM y la búsqueda realizada en la base de datos para determinar la composición de algunas mezclas de compuestos.

Al M. en C. Víctor Navarro del Centro de Investigación Biomédica Sur, IMSS por la realización de las pruebas antimicrobianas.

A la M. en C. Isabel Chávez Uribe del Instituto de Química por el registro de los espectros de RMN (500 y 300 MHz) del compuesto 7.

Al Dr. Marcos Flores Alamo del Laboratorio de Difracción de Rayos X de Monocristal Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI) Edificio "B" por el registro de los datos cristalográficos.

Muy especialmente a la Prof. Dra. María Isabel Aguilar Laurents por aceptarme en su grupo de investigación, por el apoyo, confianza, amistad y por todo lo que me ha aportado el trabajar a su lado a lo largo de este tiempo. Gracias.

DEDICATORIAS

A mis padres por haber estado a mi lado en todo momento, ofreciéndome siempre su ayuda y confianza. Gracias.

A mis maestros por compartir generosamente sus conocimientos.

A mis compañeros de laboratorio César, Juan Carlos, Iris, Nancy, Itzel, Irays, por su amistad y hacer que el día a día haya sido más llevadero.

A todas aquellas personas que, de forma más o menos indirecta, han contribuido a hacer posible esta Tesis. Gracias.



ÍNDICE

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS.....	IX
LISTA DE CUADROS.....	XII
LISTA DE FIGURAS.....	XIII
LISTA DE TABLAS.....	XIV
LISTA DE ESQUEMAS.....	XV
LISTA DE ESPECTROS.....	XVI
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	2
2.1 Familia Verbenaceae.....	2
2.2 Género <i>Verbena</i>	2
2.2.1 Distribución y Habitat.....	3
2.2.2 Composición química.....	3
2.3 Características de la especie <i>Verbena carolina</i> L.....	6
2.3.1 Clasificación botánica.....	6
2.3.2 Nombres comunes.....	6
2.3.3 Sinonimia.....	7
2.3.4 Usos.....	7
2.3.5 Descripción.....	7
2.4 Iridoides.....	8
2.4.1 Naturaleza química de los iridoides.....	8
2.4.2 Clasificación de los iridoides.....	11
2.4.3 Biosíntesis de iridoides.....	11
2.4.4 Iridoides como compuestos de defensa.....	13
2.4.5 Actividad biológica de iridoides.....	14
2.4.5.1 Actividad antitumoral.....	14
2.4.5.2 Actividad antiinflamatoria.....	15
2.4.5.3 Actividad antibacteriana.....	16



2.4.5.4 Actividad antioxidante.....	17
3. JUSTIFICACIÓN.....	18
4. OBJETIVOS.....	19
4.1 Objetivo principal.....	19
4.2 Objetivos particulares.....	19
5. PARTE EXPERIMENTAL.....	20
5.1 Material y equipo utilizado.....	20
5.2 Recolección e identificación del material vegetal.....	21
5.3 Extracción.....	22
5.4 Determinación de la actividad antimicrobiana por medio del análisis de la concentración mínima inhibitoria (CMI, mg/mL).....	24
5.4.1 Microorganismos utilizados.....	24
5.4.2 Preparación de las muestras.....	24
5.4.3 Preparación del inóculo.....	24
5.4.4 Bioensayo.....	25
5.5 Determinación de la actividad tóxica de los extractos en el crustáceo <i>Artemia salina</i>	26
5.5.1 Preparación de los organismos.....	26
5.5.2 Preparación de las muestras.....	26
5.5.3 Bioensayo.....	26
5.6 Reacción general de acetilación.....	27
5.7 Metilación de ácidos grasos.....	27
5.8 Análisis químico del extracto diclorometánico.....	28
5.8.1 Fraccionamiento cromatográfico.....	28
5.8.2 Aislamiento y purificación de la mezcla de ácidos grasos.....	29
5.8.3 Aislamiento y purificación del ácido ursólico (6).....	29
5.9 Análisis químico del extracto acetónico.....	30



5.9.1 Fraccionamiento cromatográfico y por partición.....	30
5.9.2 Aislamiento y purificación de la hispidulina (7).....	31
5.9.3 Aislamiento y purificación de la verbenalina (8).....	31
5.9.4 Aislamiento y purificación del hastatósido (9).....	31
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	33
6.1 Determinación de la actividad antimicrobiana por medio del análisis de la concentración mínima inhibitoria (CMI, mg/mL).....	33
6.2 Determinación de la actividad tóxica de los extractos en el crustáceo <i>Artemia salina</i>	34
6.3 Análisis químico y biológico del extracto diclorometánico.....	35
6.3.1 Evaluación de la actividad antimicrobiana del fraccionamiento primario.....	35
6.3.2 Aislamiento e identificación de la mezcla de ácidos grasos.....	37
6.3.3 Aislamiento e identificación del ácido ursólico (6).....	39
6.4 Análisis químico del extracto acetónico.....	41
6.4.1 Aislamiento e identificación de la hispidulina (7).....	41
6.4.2 Aislamiento e identificación de la verbenalina (8).....	43
6.4.2.1 Análisis estructural por difracción de rayos X de la verbenalina (8).....	45
6.4.3 Aislamiento e identificación del hastatósido (9).....	48
6.4.4 Evaluación de la actividad antimicrobiana de los compuestos aislados.....	50
7. CONCLUSIONES.....	51
8. PERSPECTIVAS.....	53
9. BIBLIOGRAFÍA.....	54
10. ANEXOS.....	60

**LISTA DE ABREVIATURAS**

AcOEt	Acetato de etilo
HCl	Ácido clorhídrico
MVA	Acido mevalónico
H ₂ O	Agua
Å	Amstrongs
NaHCO ₃	Bicarbonato de sodio
<i>n</i> -BuOH	Butanol
C	Carbono
cm	Centímetros
CHCl ₃	Cloroformo
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
CI ₅₀	Concentración Inhibitoria 50
CL ₅₀	Concentración Letal 50
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
CG	Cromatografía de gases
δ	Desplazamiento químico
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
DMSO	Dimetil sulfóxido
dd	Doble de dobles
d	Doblete
dm	Doblete multipleteado
HETCOR	Espectroscopía Bidimensional de Correlación Heteronuclear Espectroscopía Bidimensional de Correlación Heteronuclear de
HMBC	Múltiples Ligaduras
COSY	Espectroscopía Bidimensional de Correlación Homonuclear Espectroscopía Bidimensional Incrementada por el Efecto
NOESY	Nuclear Overhauser



EM	Espectroscopía de Masas
R.f.	Factor de retención
ν_{\max}	Frecuencia máxima
°C	Grados centígrados
G+	Gram positivo
G-	Gram negativo
g	Gramos
Hz	Hertz
Hex	Hexano
H	Hidrógeno
KOH	Hidróxido de potasio
OH	Hidroxilo
h	Horas
INAHM	Instituto Nacional de Antropología e Historia de Morelos
IR	Infrarojo
M ⁺	Ión molecular
Kg	Kilogramos
L	Litros
>	Mayor qué
MHz	Megahertz
<	Menor qué
MeOH	Metanol
CD ₃ OD	Metanol deuterado
µg	Microgramos
µL	Microlitros
µm	Micrometros
µM	Micromolar
mg	Miligramos
mL	Mililitros



mm	Milímetros
min.	Minutos
m	Multiplete
nm	Nanómetros
N	Normal
Op cit.	Obra citada
OMS	Organización Mundial de la Salud
ppm	Partes por millón
%	Por ciento
DEPT	Prueba de desacoplamiento de los núcleos de hidrógeno
RA	Reactivo Analítico
<i>m/z</i>	Relación masa-carga
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
[α]	Rotación óptica específica
s	Singulete
$(\text{NH}_4)_4\text{Ce}(\text{SO}_4)_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	
H_2O	Sulfato cérico amoniacal
Na_2SO_4	Sulfato de sodio
TMS	Tetrametilsilano
BF_3	Trifluoruro de Boro
UV	Ultravioleta
UMAS	Unidades de masa atómica
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
v/v	Volumen en volumen
<i>et al</i>	Y otros



LISTA DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Constantes espectroscópicas y espectrométricas de la fracción FD-3 sometida a metilación.....	38
Cuadro 2. Constantes espectroscópicas y espectrométricas del ácido ursólico.....	40
Cuadro 3. Constantes espectroscópicas y espectrométricas de la hispidulina.....	42
Cuadro 4. Constantes espectroscópicas y espectrométricas de la verbenalina.....	44
Cuadro 5. Constantes espectroscópicas y espectrométricas del hastatósido.....	49



LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Metabolitos secundarios mayoritarios del género <i>Verbena</i>	3
Figura 2. <i>Verbena carolina</i> L. (Verbenaceae).....	8
Figura 3. Numeración del esqueleto iridoide y sustituyentes más comunes.....	10
Figura 4. Ruta biosintética I vía iridodial y ácido desoxilogánico.....	12
Figura 5. Ruta biosintética II vía <i>epi</i> -iridodial y ácido <i>epi</i> -desoxilogánico...	13
Figura 6. Ubicación del municipio de Hueyapan, Morelos.....	22
Figura 7. Estructura de los ácidos grasos contenidos en la fracción FD-3.	37
Figura 8. Estructura del ácido ursólico.....	39
Figura 9. Estructura de la hispidulina.....	41
Figura 10. Estructura de la verbenalina.....	43
Figura 11. Estructura molecular de la verbenalina.....	46
Figura 12. Estructura del hastatósido.....	49



LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Microorganismos utilizados en la determinación de la CMI.....	24
Tabla 2. Fraccionamiento cromatográfico del extracto diclorometánico....	28
Tabla 3. Fraccionamiento cromatográfico del extracto n-butanólico.....	30
Tabla 4. Fraccionamiento cromatográfico de la fracción FA-9.....	32
Tabla 5. Determinación de la CMI de los extractos diclorometánico y acetónico obtenido de la planta <i>Verbena carolina</i> L.....	33
Tabla 6. CL ₅₀ de los extractos diclorometánico y acetónico.....	35
Tabla 7. Evaluación de la CMI de las fracciones primarias.....	35
Tabla 8. Datos cristalinos y estructurales refinados para verbenalina.....	47
Tabla 9. Evaluación de la CMI de los compuestos aislados.....	50
Tabla 10. Coordenadas atómicas ($\times 10^4$) y parámetros de desplazamiento isotrópicos equivalentes ($\text{Å}^2 \times 10^3$) para verbenalina (8).....	88
Tabla 11. Longitud de los enlaces [Å] y ángulos [$^\circ$] para verbenalina (8)...	89
Tabla 12. Parámetros de desplazamiento anisotrópico ($\text{Å}^2 \times 10^3$) para verbenalina (8).....	92



LISTA DE ESQUEMAS

	Página
Esquema 1. Procesamiento de hojas y tallos de <i>Verbena carolina</i> L.	23



LISTA DE ESPECTROS

	Página
Espectro 1. Espectro de IR de la mezcla constituida por los ésteres de los ácidos grasos.....	60
Espectro 2. Cromatograma de gases de la mezcla constituida por los ésteres de los ácidos grasos.....	61
Espectro 3. Espectro de masas por impacto electrónico del éster metílico del ácido hexadecanoico (palmítico) (1).....	61
Espectro 4. Espectro de masas por impacto electrónico del éster metílico del ácido octadecanoico (esteárico) (2).....	62
Espectro 5. Espectro de masas por impacto electrónico del éster metílico del ácido (Z,Z) 9,12-octadecadienoico (3).....	62
Espectro 6. Espectro de masas por impacto electrónico del éster metílico del ácido (Z,Z,Z) 9,12,15-octadecatrienoico (4).....	63
Espectro 7. Espectro de masas por impacto electrónico del éster metílico del ácido eicosanoico (araquídico) (5).....	63
Espectro 8. Espectro de IR del ácido ursólico (6).....	64
Espectro 9. Espectro de RMN- ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) del ácido ursólico (6).....	65
Espectro 10. Espectro de RMN- ¹³ C (400 MHz, CDCl ₃) del ácido ursólico (6).....	66
Espectro 11. Espectro en modalidad DEPT (200 MHz, CDCl ₃) del ácido del ácido ursólico (6).....	67
Espectro 12. Espectro en el UV de la hispidulina (7).....	68
Espectro 13. Espectro de IR de la hispidulina (7).....	69
Espectro 14. Espectro de RMN- ¹ H (500 MHz, DMSO-d ₆) de la hispidulina (7).....	70
Espectro 15. Espectro de RMN- ¹³ C (300 MHz, DMSO-d ₆) de la hispidulina (7).....	71



Espectro 16.	Espectro de RMN- ¹ H (500 MHz, DMSO-d ₆) modalidad NOESY-1D de la hispidulina (7).....	72
Espectro 17.	Espectro de RMN- ¹ H (500 MHz, DMSO-d ₆) modalidad HMBC de la hispidulina (7).....	73
Espectro 18.	Espectro de masas modalidad FAB ⁺ de la hispidulina (7).....	74
Espectro 19.	Espectro en el UV de la verbenalina (8).....	75
Espectro 20.	Espectro de IR de la verbenalina (8).....	76
Espectro 21.	Espectro de RMN- ¹ H (300 MHz, MeOD) de la verbenalina (8).....	77
Espectro 22.	Espectro de RMN- ¹³ C (300 MHz, MeOD) de la verbenalina (8).....	78
Espectro 23.	Espectro de RMN- ¹ H (300 MHz, MeOD) modalidad COSY de la verbenalina (8).....	79
Espectro 24.	Espectro de RMN- ¹ H (300 MHz, MeOD) modalidad HETCOR de la verbenalina (8).....	80
Espectro 25.	Espectro de RMN- ¹ H (300 MHz, MeOD) modalidad HETCOR LR de la verbenalina (8).....	81
Espectro 26.	Espectro en el UV del hastatósido (9).....	82
Espectro 27.	Espectro de IR del hastatósido (9).....	83
Espectro 28.	Espectro de RMN- ¹ H (300 MHz, MeOD) del hastatósido (9).	84
Espectro 29.	Espectro de RMN- ¹³ C (300 MHz, MeOD) del hastatósido (9)	85
Espectro 30.	Espectro de RMN- ¹ H (300 MHz, MeOD) modalidad COSY del hastatósido (9).....	86
Espectro 31.	Espectro de RMN- ¹ H (300 MHz, MeOD) modalidad HETCOR del hastatósido (9).....	87



1. INTRODUCCIÓN

La medicina es una necesidad de cada cultura en el mundo por lo que existen tantos tipos de medicinas como culturas sepamos reconocer. En América, los datos históricos y las piezas arqueológicas indican que desde las más antiguas culturas de Mesoamérica, numerosas plantas fueron utilizadas con fines religiosos y curativos, jugando un papel importante en la medicina de los indígenas.¹

México es un país con amplia tradición en el uso de preparados medicinales provenientes de plantas, por lo menos 80% de la población en nuestro país usa plantas medicinales para procurar la salud.² Esta práctica está asociada al empirismo en muchos casos, por lo que son necesarios estudios químicos, clínicos y epidemiológicos que confirmen de forma fehaciente los efectos fisiológicos de las plantas y los principios activos responsables en ellas. No hay que olvidar que el 25% de los fármacos existentes en el mercado se obtienen de extractos vegetales, o bien se han sintetizado a partir de sustancias halladas en la investigación fitoquímica.³

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estructuró en 1985 un Programa de Medicina Tradicional Herbolaria, reconociendo la existencia de 119 sustancias químicas de origen vegetal que pueden considerarse fármacos importantes, útiles en más de 60 categorías terapéuticas y obtenidas principalmente de 91 especies.⁴

Es por lo tanto prioritario investigar sobre la medicina tradicional con los recursos disponibles en el país para conseguir un aprovechamiento y uso de la misma con un respaldo científico sólido.

¹ Lozoya L. "La medicina tradicional en la realidad político-social de México", México, 1989, pp. 27-33.

² Juárez A. (2008). UNAM, Ciudad Universitaria, México, p. 9.

³ Beyra A., *et al.* (2004). "Estudios etnobotánicos sobre plantas medicinales en la provincia de Camagüey (Cuba)". 61(2): 185-204.

⁴ Beyra A., *op. cit.*



2. ANTECEDENTES

2.1 Familia Verbenaceae

Rzedowski & Rzedowski en sus trabajos con la flora mexicana, describen a la familia Verbenaceae como un grupo de taxonomía sumamente complicada, en donde la circunscripción, tanto de la propia familia, como de muchos de sus géneros y especies es incierta. Siguiendo el criterio moderno, aceptado en el trabajo sintético de Thorne, la familia queda ajustada a unos 35 géneros y poco más de 100 especies distribuidas en regiones templadas y cálidas de ambos hemisferios, mayormente en América.⁵

2.2 Género *Verbena*

El género *Verbena* L. se ha dividido tradicionalmente en secciones, series o en grupos informales principalmente sobre la base de caracteres morfológicos, de caracteres anatómicos y de distribución geográfica. O'Leary y colaboradores reconocen para el género *Verbena* 44 especies y 10 variedades, agrupadas en 2 series: *Verbena* y *Pachystachyae*, la primera integrada por tres grupos informales: *Verbena*, *Hastae* y *Bracteosae*; la segunda por dos subseries: *Pachystachyae* y *Pseudoracemosae*. Estudios filogenéticos previos indican que *Verbena* es monofilética y su grupo hermano es *Glandularia*.⁶

Hasta el momento, los trabajos en *Verbena* distan de clarificar las complejas relaciones dentro del género y únicamente se cuenta con estudios a nivel regional o catálogos.⁷

⁵ Rzedowski, J., *et al.* (2002). "*Verbena*". Fasc. 100. Instituto de Ecología. Centro Regional del Bajío, México. pp. 118-139

⁶ O'Leary, N., *et al.* (2007) "Filogenia del género *Verbena* (Verbenaceae) basada en caracteres morfológicos". 45: 103-105

⁷ O'Leary, N., *et al.* (2007). "Revisión Taxonómica de las especies del género *Verbena* (Verbenaceae): Serie *Pachystachyae*". 94: 571-621

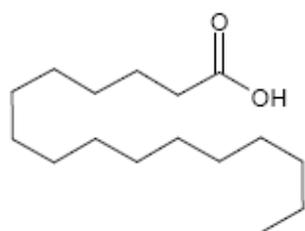


2.2.1 Distribución y Hábitat

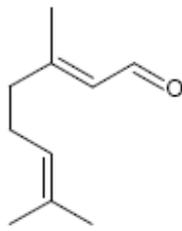
El género *Verbena* es de origen americano; actualmente se extiende por América tropical y templada, norte de África, Asia, Europa y Australia; crece desde el nivel del mar hasta casi 4000 m.s.m., en la región andina de Ecuador, Bolivia y Perú. Existen tres grandes centros de diversidad específica, uno en zonas templado-cálidas del noreste Argentino y sur de Brasil, taxones principalmente pertenecientes a la serie *Pachystachyae*; el segundo en el sudoeste de Estados Unidos de América y norte de México, con algunas especies en la zona Pacífica y montañosa; el tercero en la zona templada del este de Estados Unidos de América y sur de Canadá; estos dos últimos centros representados principalmente por taxones pertenecientes a la serie *Verbena*.⁸

2.2.2 Composición química

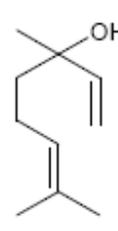
El género *Verbena* biosintetiza diversos tipos de compuestos, como iridoides glicosilados, feniletanoides, flavonoides, triterpenos, esteroides, etc., los cuales han mostrado tener alguna actividad farmacológica.



Ácido hexadecanoico⁹
Verbena officinalis



Geranial¹⁰
Verbena officinalis



Linalol¹¹
Verbena officinalis

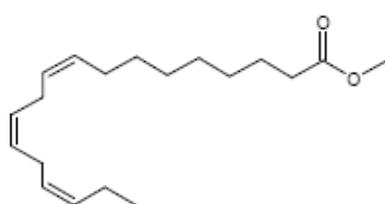
Figura 1. Metabolitos secundarios mayoritarios del género *Verbena*

⁸ O'Leary, N. *op cit.*

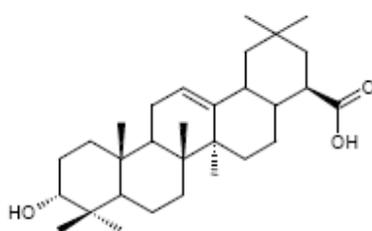
⁹ Ardakani, M., *et al.* (2003). Volatile Constituents from the Aerial Parts of *Verbena Officinalis* L. (Vervain). pp. 39-42

¹⁰ Ardakani, M. *op cit.*

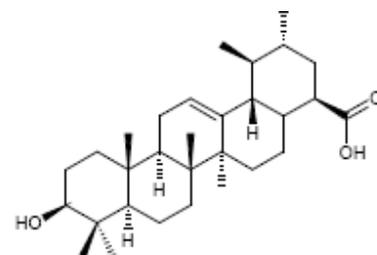
¹¹ Ardakani, M. *op cit.*



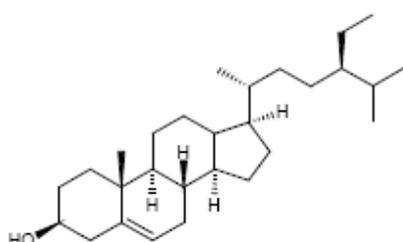
Éster metílico del ácido
linolénico¹²
Verbena officinalis



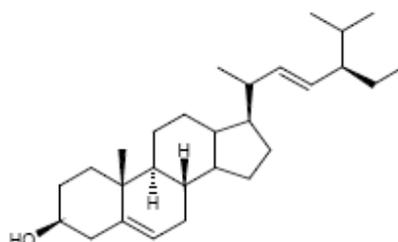
Ácido oleánico¹³
Verbena littoralis



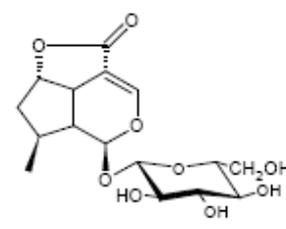
Ácido ursólico¹⁴
Verbena officinalis



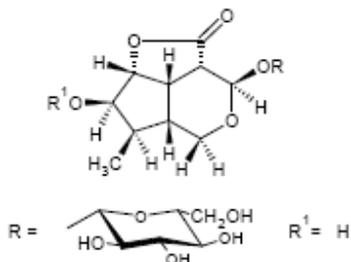
β -Sitosterol¹⁵
Verbena littoralis



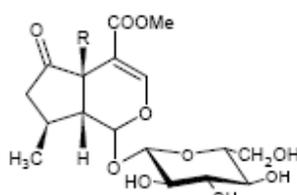
Estigmasterol¹⁶
Verbena littoralis



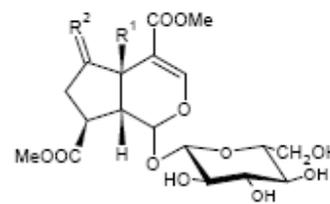
Brasósido¹⁷
Verbena littoralis



Vebrásido¹⁸
Verbena brasiliensis



Verbenalina¹⁹ R = H
Hastatósido R = OH
Verbena officinalis



R¹ = H R² = O
Griselinósido²⁰
Verbena brasiliensis

Figura 1. Metabolitos secundarios mayoritarios del género *Verbena* (continuación)

¹² Ardakani, M. *op cit.*

¹³ Gamboa, C., *et al.* (2004). "Iridoids from the aerial parts of *Verbena littoralis* (Verbenaceae)". 65: 2369-2372

¹⁴ Deepak, M., *et al.* (2000). "Quantitative Determination of the Major Constituents of *Verbena officinalis* using High Performance Thin Layer Chromatography and High Pressure Liquid Chromatography". 11: 351-355

¹⁵ Gamboa, C. *op cit.*

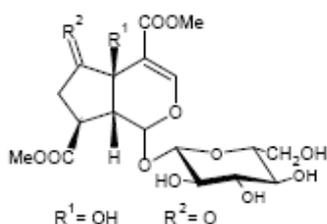
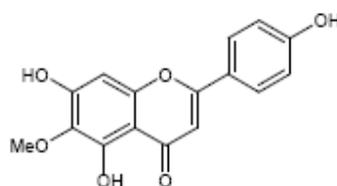
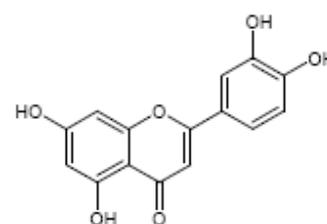
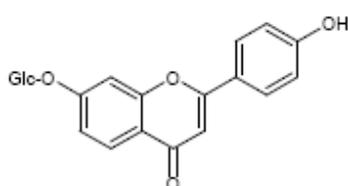
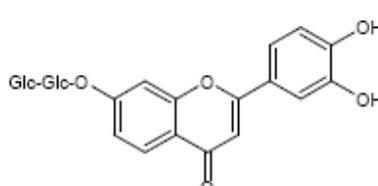
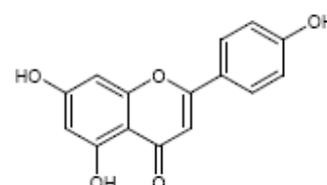
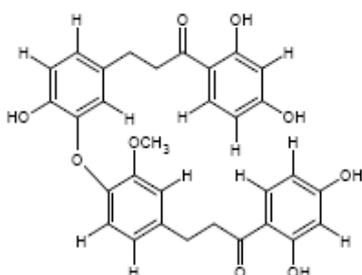
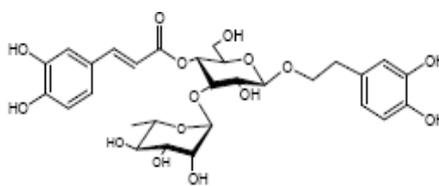
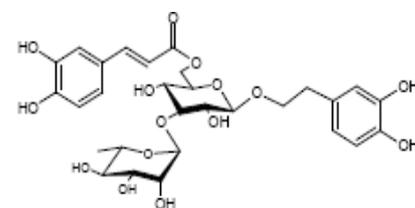
¹⁶ Gamboa, C. *op cit.*

¹⁷ Umaña, E., *et al.* (1990). "Chemical Constituents of *Verbena littoralis*". 3: 175-176

¹⁸ Franke, A., *et al.* (1987). "Vebraside, an iridoid glucoside from *Verbena brasiliensis*". 11: 3015-3020

¹⁹ Müller, A., *et al.* (2004). "Analysis of the Aerial Parts of *Verbena officinalis* L. by Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography". 60: 193-197

²⁰ Ono, M., *et al.* (2006). "New Iridoid Glucosides from the Aerial Parts of *Verbena brasiliensis*". 54(10): 1421-1424

Aralidiósido²¹*Verbena brasiliensis*Hispidulina²²*Verbena citriodora*Luteolina²³*Verbena citriodora*Apigenina 7-glucurónido²⁴*Verbena officinalis*Luteolina 7-diglucurónido²⁵*Verbena officinalis*Apigenina²⁶*Verbena officinalis*Verbenachalcona²⁷*Verbena littoralis*Verbascósido²⁸*Verbena officinalis*Isoverbascósido²⁹*Verbena officinalis***Figura 1.** Metabolitos secundarios mayoritarios del género *Verbena* (continuación)²¹ Ono, M. *op cit.*²² Valento, P., *et al.* (1999). "Análisis of Vervain Flavonoids by HPLC/Diode Array Detector Method. Its Application to Quality Control". 47: 4579-4582²³ Valento, P. *op cit.*²⁴ Casanova, E., *et al.* (2008). "Antioxidant and Antifungal Activity of *Verbena officinalis* L. Leaves". 63: 93-97²⁵ Casanova, E. *op cit.*²⁶ Calvo, M.I., *et al.* (1997). "Identification of the Major Compounds in Extracts of *Verbena officinalis* L. (Verbenaceae) by HPLC with Post-Column Derivatization". 46: 241-244²⁷ Li, Y., *et al.* (2001). "Verbenachalcone, a Novel Dimeric Dihydrochalcone with Potentiating Activity on Nerve Growth Factor-Action from *Verbena littoralis*". 64(6): 806-808²⁸ Deepak, M. *op cit.*²⁹ Bilia, A.R., *et al.* (2007). "HPLC-DAD-ESI-MS análisis of the constituents of aqueous preparations of verbena and lemon verbena and evaluation of the antioxidant activity". 46: 463-470



2.3 Características de la especie *Verbena carolina* L.

2.3.1 Clasificación botánica³⁰

Reino: Plantae
División: Magnoliophyta
Clase: Magnoliopsida
Orden: Lamiales
Familia: Verbenaceae
Género: Verbena
Especie: *Verbena carolina* L.

2.3.2 Nombres comunes³¹

- Verbena
- Ajenjo grande
- Hierba de San José
- Hierba de San Juan
- Hierba lengua de perro
- Nardo de campo
- Santa María
- Verbena del perro
- Verbena corriente
- Poleo negro
- Chilillo chino
- Wahíchuri (Tarahumara)

³⁰ Integrated Taxonomic Information System en : <http://www.itis.gov/>

³¹ Márquez, A.C., *et al.* (1999). "Plantas medicinales de México II. Composición, usos y actividad biológica". México, D.F.



2.3.3 Sinonimia³²

- *Verbena biserrata* Kunth
- *Verbena caroliniana* Willd
- *Verbena mollis* Mart. et Galeotti
- *Verbena polystachya* Kunth
- *Verbena varonicaefolia* Kunth

2.3.4 Usos

En la medicina tradicional mexicana, la *Verbena carolina* L., es utilizada en el tratamiento de la diarrea, el vómito, la disentería y como purgante pero principalmente en las enfermedades biliares. La verbena se utiliza en diversos padecimientos renales entre los que destacan la disolución de los cálculos en la vejiga y como diurético.³³

La decocción de las ramas se usa como cicatrizante de granos y heridas, como abortivo, contra la caspa, alergias y dermatitis.³⁴

2.3.5 Descripción

Verbena carolina L. (Figura 2) es una planta herbácea perenne, erecta o ascendente, hasta de 75 cm (1.5 m) de alto; tallo por lo general solitario, ramificado, con pelos comúnmente de menos de 1 mm de largo; hojas opuestas, subsésiles o bien con peciolos, oblongas, oblongo-lanceoladas o algunas veces elípticas, de 2.7 a 8 (12) cm de longitud por 0.8 a 3 cm de ancho, ápice agudo u

³² Perozzi, L., *et al.* "Probable efecto hepatoprotector de la verbena en la hepatitis inducida con tetracloruro de carbono en la rata". 38: 19-25

³³ Perozzi, L. *op cit.*

³⁴ Márquez, A.C. *op cit.*



obtusos, serrados en el margen, cuneados en la base, con pelos concentrados a lo largo de las nervaduras. Sus flores se disponen en espigas de color morado.³⁵



Figura 2. *Verbena carolina* L. (Verbenaceae)

2.4 IRIDOIDES

2.4.1 Naturaleza química de los iridoides

Los iridoides representan un gran grupo de ciclopentano-[c]-piran-monoterpenoides. Se han encontrado como constituyentes naturales en un gran número de familias de plantas regularmente, pero no invariablemente, como glicósidos.³⁶

³⁵ Rzedowski, J. *op cit.*

³⁶ El-Naggar, J., Beal, L. (1980). "Iridoids. A review". 43: 649-707



El nombre iridoide es derivado de una especie de hormigas, *Iridomyrmex*, las cuales biosintetizan la iridomyrmecina y el iridodial **1d** que se encuentran en sus secreciones defensivas.³⁷

El esqueleto de ciclopentano-[c]-pirano puede consistir de diez, nueve o raramente ocho átomos de carbono, en el cual el C₁₁ se pierde con más facilidad que el C₁₀.³⁸ Un biciclo H-5/H-9 β , β -*cis*-fusionado del sistema del anillo ciclopentanopirano **1a** es la característica más común de estos compuestos, sin embargo varios iridoideos enantioméricos también existen en la naturaleza. La escisión en el anillo de ciclopentano de los iridoideos da lugar a los seco-iridoideos **1b**, mientras que la escisión en el anillo de pirano produce iridoideos derivados **1c**, por lo tanto el anillo de ciclopentano es el anillo base del esqueleto de los iridoideos. En el reino vegetal, estos se derivan del 9-hidroxinerol por fosforilación seguida de una ciclización, oxidación y glicosilación en varios pasos. Posiblemente el iridodial o el 8-*epi*-iridodial **1e** son los predecesores de los iridoideos en muchas familias de plantas. Los iridoideos están presentes en diversas plantas medicinales usadas como tónico amargo, sedativo, antipirético, medicamentos para la tos, remedios para heridas, trastornos de la piel y como hipotensivos. Este hecho anima a investigar la bioactividad de estos fitoquímicos. Estudios intensivos de su bioactividad revelan que estos compuestos presentan una amplia gama de bioactividad: cardiovascular, antihepatotóxico, colerético, hipoglicémico e hipolipidémico, antiinflamatorio, antiespasmódico, antitumoral, antiviral, inmunomodulador y purgativo. Quimiotaxonómicamente son útiles como marcadores de diversos géneros en varias familias de plantas tales como, la aucubina **2** del *Plantago* (Plantaginaceae), asperulósido **3** de *Galium* (Rubiaceae) y aucubósido (aucubina) y harpágido **4** de *Scrophularia* (Scrophulariaceae).³⁹ La Figura 3 muestra varios tipos de esqueletos iridoideos y su numeración.

³⁷ Villaseñor, M. (2007). "Bioactivities of Iridoids". 6: 307-314

³⁸ Sampaio-Santos, *et al.* (2001). "Biosynthesis Significance of Iridoids in Chemosystematics". Vol. 12, No. 2, pp. 144-153

³⁹ Dinda, B., *et al.* (2007). "Naturally Occurring Iridoids. A Review, Part 1". 55(2): 159-222

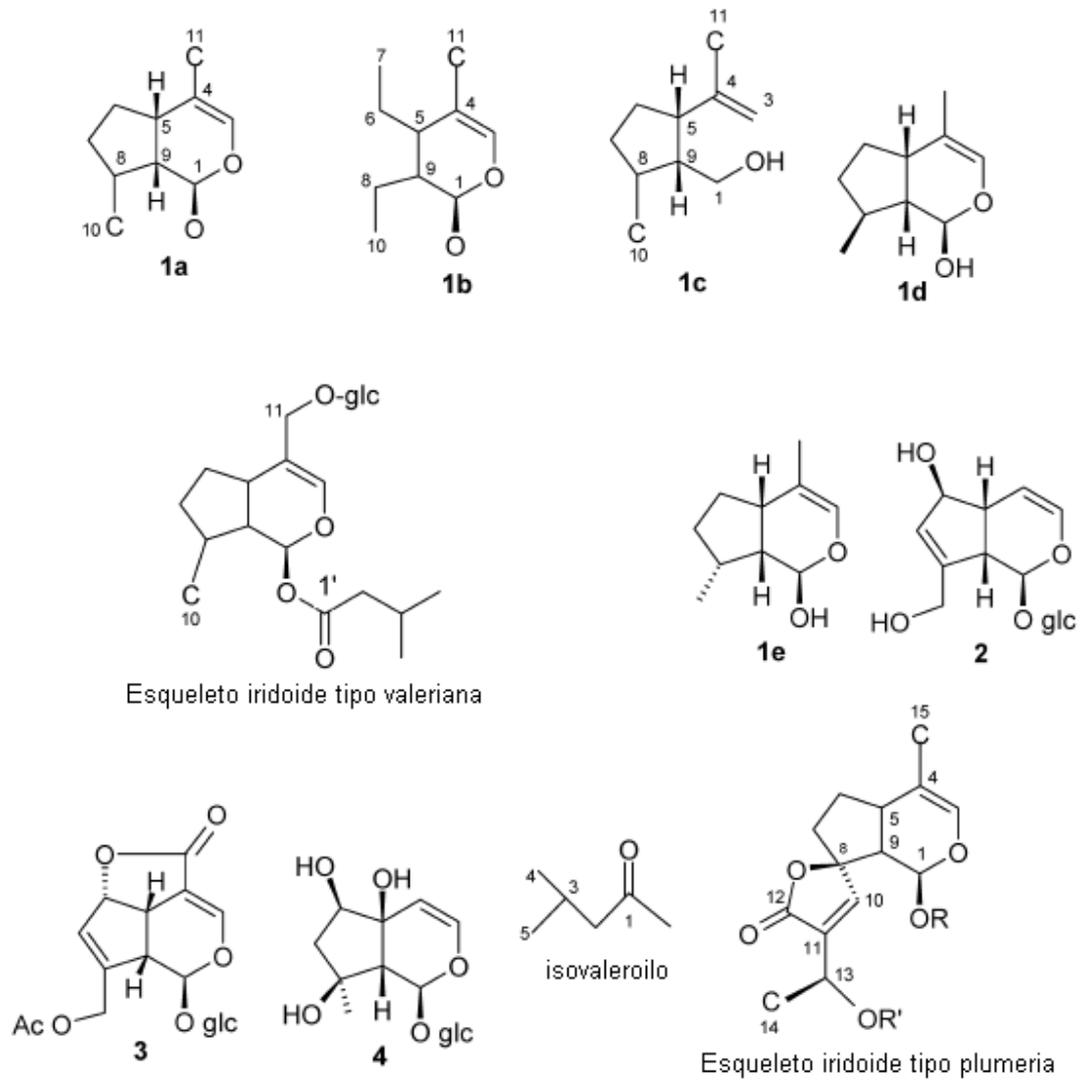


Figura 3. Numeración del esqueleto iridoide y sustituyentes más comunes



2.4.2 Clasificación de los Iridoides⁴⁰

Grupo 1 iridoides con un esqueleto de ocho carbonos.

Grupo 2 iridoides con un esqueleto de nueve carbonos dividido en dos subgrupos dependiendo de si el carbono nueve se une en C-4 (**Grupo 2a**) o en C-8 (**Grupo 2b**)

Grupo 3 iridoides con un esqueleto de diez carbonos y subdividido en cuatro subgrupos: si el azúcar está unido en C-1 (**Grupo 3a**), si el azúcar está unido en otro carbono distinto de C-1 (**Grupo 3b**), tipo valeriana (**Grupo 3c**) y tipo plumeria (**Grupo 3d**).

Grupo 4 agliconas de iridoides

Grupo 5 iridoides derivados

Grupo 6 *bis*-iridoides glicosilados

2.4.3 Biosíntesis de iridoides

Los iridoides son compuestos de naturaleza terpenoide y su biosíntesis ha sido bastante bien investigada⁴¹, por lo que se conoce que existen dos rutas biosintéticas. Una vía principal (ruta I; Figura 4) que va desde el iridodial (**1**) vía iridotrial (**2**) a ácido desoxilogánico (**3**) el cual es un precursor conocido de muchos iridoides carboxílicos con una estereoquímica 8β incluyendo la loganina (**4**) y el ácido logánico (**5**), secologanina (**6**) y ácido secologánico así como los derivados seco-iridoides y el complejo indol alcaloides. Compuestos de esta ruta se encuentran principalmente en el orden Cornales, Gentianales y Oleaceae.

⁴⁰ Dinda, B. *op cit.*

⁴¹ Jensen, S.R. (1992). "Systematic implications of the distribution of iridoids and other chemical compounds in the Loganiaceae and other families of the Asteridae". 79: 284–302.



La ciclización fundamental a iridodial es formulada como una serie de reacciones de hidroxilación y oxidación sobre el geraniol, mientras que la posterior oxidación da iridotrial.

La loganina es un intermediario clave en la biosíntesis de muchas otras estructuras iridoides, y también característico en la vía complejo indol alcaloides y alcaloides del grupo de las tetrahydroisoquinolinas. Fundamental en este nuevo metabolismo es la escisión del esqueleto de los monoterpenos simples aún reconocible en loganina para dar secologanina, representativa de los secoiridoides.

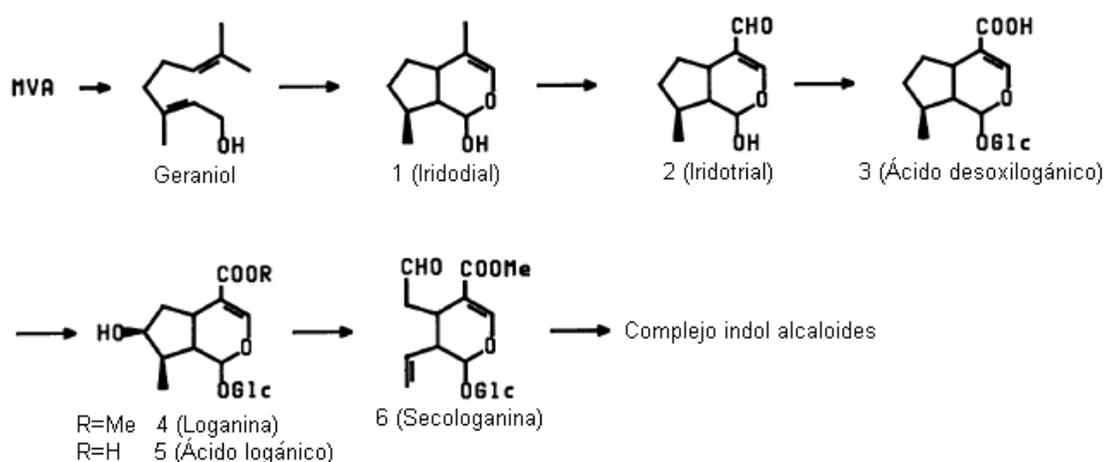


Figura 4. Ruta biosintética I vía iridodial y ácido desoxilogánico

Otra importante vía biosintética (ruta II; Figura 5) implica 8-*epi*-iridodial, 8-*epi*-iridotrial y ácido 8-*epi*-desoxilogánico; estos son los precursores de iridoides carboxílicos descarboxilados como son la aucubina (7) y el catalpol. Estos compuestos se encuentran casi exclusivamente en el orden Lamiales y nunca en Gentianales u Oleaceae⁴².

⁴² Jensen, S.R. *op cit.*



Algunos secoiridoides poco comunes se forman por esta ruta pero tienen diferente estructura de los derivados en la ruta I.

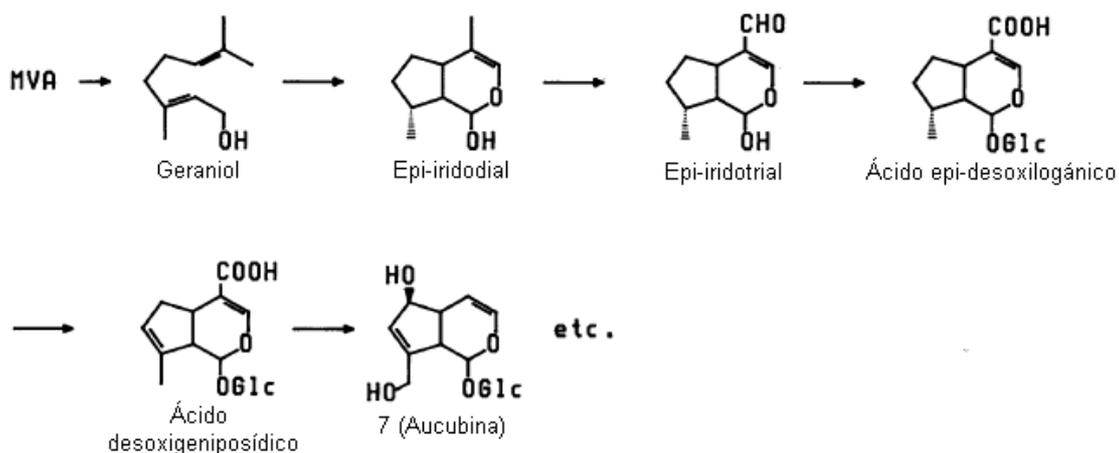


Figura 5. Ruta biosintética II vía epi-iridodial y ácido epi-desoxilogánico

2.4.4 Iridoides como compuestos de defensa

Los iridoides han sido aislados de diversas secreciones de insectos donde estos desempeñan un papel en la defensa química y comunicación. Estos actúan como irritantes para disuadir a sus depredadores.

La inducción de aleloquímicos es otra vía que las plantas emplean para regular con eficacia otras especies como lo demuestra el aumento de los niveles de aucubina y catalpol en *Plantago lanceolata* contra el hongo patógeno *Diaporthe adunca* y contra orugas de la especie *Junonia coenia*, la mariposa común Buckeye⁴³.

⁴³ Villaseñor M.I. *op cit.*



Los iridoides también afectan el desarrollo de herbívoros y sus parásitos y algunos herbívoros especializados podrían usar estas defensas incorporándolas a su cuerpo y usándolas como su propio mecanismo de defensa químico contra sus enemigos naturales, los carnívoros⁴⁴.

Las larvas de *Ceratomia catalpae* (Sphingidae) (polillas de la esfinge o gusano Catawba) las cuales son el mayor defoliador de la especie Catalpa, y la hemolinfa en la cual su parasitoide, la larva de la avispa *Cotesia congregata* crece, presentan grandes cantidades de catalpol. La larva *J. coenia* también secuestra aucubina y catalpol y ambos son retenidos en la pupa.

La oviposición de *Melitaea cinxia*, una mariposa muy común, se mejoró por aucubina y catalpol y ambos actúan como estimulantes para la alimentación de las larvas y como factores de disuasión para la alimentación de *Cotesia melitaeorum*, una avispa parasitoide⁴⁵.

2.4.5 Actividad biológica de iridoides

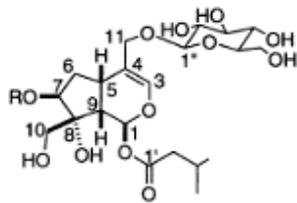
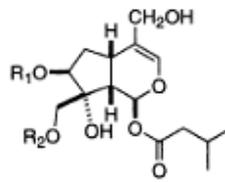
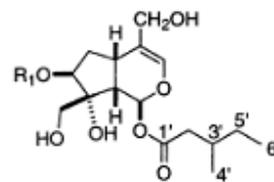
2.4.5.1 Actividad antitumoral

Los iridoides I, II, III, IV, V, VI, VII aislados del extracto metanólico de las hojas de *Viburnum luzonicum* Rolfe⁴⁶, han presentado actividad citotóxica frente a células HeLa S3 (línea celular epitelial humana) con valores de CI_{50} comprendidos entre 3 y 7 μ M.

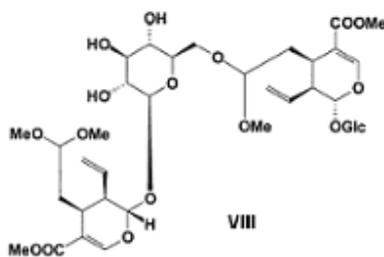
⁴⁴ Peñuelas, J., et al. (2006). "*Lonicera Implexa* Leaves Bearing Naturally Laid Eggs of the Specialist Herbivore *Euphydryas Aurinia* have Dramatically Greater Concentrations of Iridoid Glycosides than other Leaves". 32: 1925-1933.

⁴⁵ Villaseñor M.I. *op cit*.

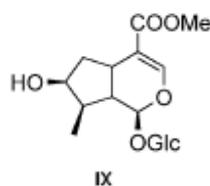
⁴⁶ Fukuyama, Y., et al. (2004). "Iridoid glucosides and p-coumaroyl iridoids from *Viburnum luzonicum* and their cytotoxicity". 67: 1833-1838.

I R = (*E*)-*p*-cumaroiloII R = (*Z*)-*p*-cumaroiloIII R₁ = (*E*)-*p*-cumaroilo, R₂ = HIV R₁ = (*Z*)-*p*-cumaroilo, R₂ = HV R₁ = H, R₂ = (*E*)-*p*-cumaroiloVI R₁ = H, R₂ = (*Z*)-*p*-cumaroiloVII R₁ = (*E*)-*p*-cumaroilo

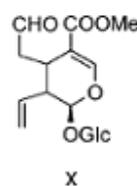
Del extracto metanólico de las hojas de *Lonicera chrysantha*, planta empleada en medicina popular china, se han aislado crisataina⁴⁷ (VIII), loganina (IX), secologanina (X) y 8-epi-kingísido (XI), los cuales han mostrado actividad antitumoral frente a células HL-60.



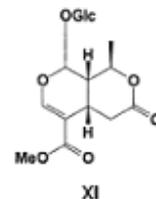
VIII



IX



X



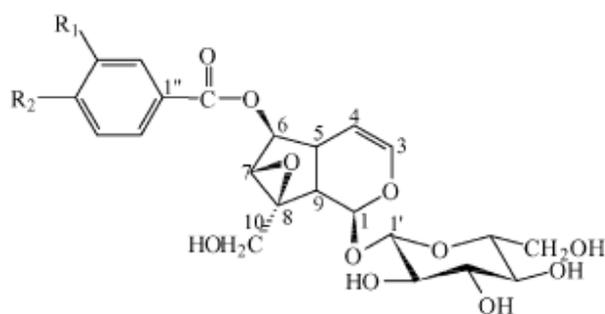
XI

2.4.5.2 Actividad antiinflamatoria

Los iridoides catalpósido (XII) y verprósido (XIII), aislados de *Veronica anagallis* L., planta usada en la medicina popular china, han mostrado actividad antiinflamatoria a dosis de 500 mg/Kg⁴⁸.

⁴⁷ Wang, Y., *et al.* (2003). "Iridoid glucosides from Chinese herb *Lonicera chrysantha* and their antitumor activity". 10: 676-677

⁴⁸ Küpeli, E., *et al.* (2005). "Bioassay-guided isolation of iridoid glucosides with antinociceptive and anti-inflammatory activities from *Veronica anagallis-aquatica* L. 102: 170-176.

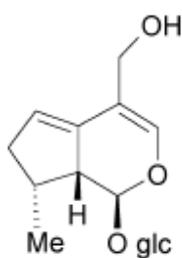


XII R₁ = H, R₂ = OH Catalpósido

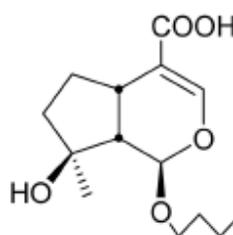
XIII R₁ = OH, R₂ = OH Veprósido

2.4.5.3 Actividad antibacteriana

El iridoide glicosídico kansuenósido (XIV) y el iridoide kansuenina (XV), aislados de *Pedicularis kansuensis*, presentan actividad antibacteriana contra *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* a concentraciones de 100 µg/mL⁴⁹.



XIV



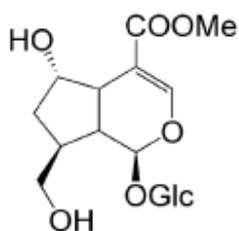
XV

⁴⁹ Cheng-Shan, *et al.* (2003). "Iridoids from *Pedicularis kansuensis* forma *albiflora*". 58: 428-430.

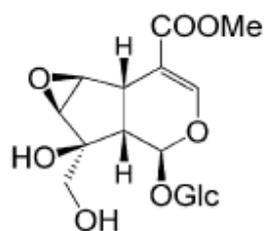


2.4.5.4 Actividad antioxidante

Morinda citrifolia, comúnmente llamada Noni o mora India, ha sido utilizada durante mucho tiempo como planta medicinal en Asia y en Australia. De ella se han aislado los iridoides glicosídicos **XVI** y **XVII**, los cuales han mostrado actividad antioxidante ($CI_{50} = 30\mu M$)⁵⁰.



XVI 6 α -Hidroxiadoxósido



XVII 6 β ,7 β -Epoxi-8-epi-esplendósido

⁵⁰ Su, B.N., *et al.* (2005). "Chemical constituents of the fruits of *Morinda citrifolia* (Noni) and their antioxidant activity". 68(4): 592-595.



3. JUSTIFICACIÓN

Los vegetales producen una diversidad de sustancias, producto del metabolismo secundario, algunas responsables de la coloración y aromas de flores y frutos, otras vinculadas con interacciones ecológicas. Las investigaciones han demostrado que en muchos casos, estos compuestos participan en el mecanismo de defensa de las plantas, lo que a su vez ha generado una gama de usos y aplicaciones en la agricultura y en la medicina.

Estrictamente hablando, la Fitoquímica estudia los metabolitos secundarios extraídos de las plantas. Para ello esta rama de la química enseña cómo aislar e identificar los principios químicos de numerosos vegetales, muchos de ellos con importante actividad biológica, tal es el caso del estudio de las plantas medicinales. Muchos de estos principios activos constituyen nuevas fuentes de materia prima para el desarrollo de la medicina actual, ya que muchas moléculas aisladas de plantas medicinales sirven de prototipo para el desarrollo de nuevos fármacos con una mayor eficacia y/o potencia terapéutica.

Un punto importante en el conocimiento de las moléculas provenientes de plantas con actividad biológica, es la determinación de su estructura y de su comportamiento químico. Ello permite establecer los métodos de control, racionalizar los procesos extractivos y algunas veces prever la actividad farmacológica.

Por lo descrito anteriormente, se presenta en esta tesis el estudio fitoquímico de la planta *Verbena carolina* L. (Verbenaceae), como parte de un proyecto que permita contribuir a su conocimiento metabólico y a su potencial antimicrobiano para eventualmente integrar estos resultados dentro de una monografía de la planta y a futuro poder desarrollar preparados que pudieran resultar benéficos para la salud del ser humano.



4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo principal:

Llevar a cabo el aislamiento y elucidación estructural de los metabolitos secundarios mayoritarios contenidos en la planta medicinal *Verbena carolina* L. (Verbenaceae) y ponderar su potencial antimicrobiano.

4.2 Objetivos particulares:

- Obtener los extractos diclorometánico y acetónico a partir de los tallos y hojas de la planta *V. carolina* L. (Verbenaceae) por un proceso de maceración.
- Realizar pruebas de actividad antimicrobiana de los extractos obtenidos contra bacterias G+ y G-, así como en hongos levaduriformes y filamentosos representativos.
- Realizar el fraccionamiento primario del extracto diclorometánico mediante métodos cromatográficos.
- Realizar el fraccionamiento primario del extracto acetónico mediante la combinación de métodos de partición y cromatográficos.
- Evaluar la actividad antimicrobiana de las fracciones y productos obtenidos contra bacterias G+ y G- así como en hongos dermatofitos y levaduriformes representativos.
- Aislar e identificar los metabolitos secundarios contenidos en los extractos diclorometánico y acetónico mediante métodos físicos, químicos, espectroscópicos y espectrométricos.
- Integrar los resultados químicos y biológicos del estudio de la planta *Verbena carolina* L. (Verbenaceae) para obtener conclusiones al respecto.



5. PARTE EXPERIMENTAL

5.1 Material y equipo utilizado

Los análisis por cromatografía en capa fina se llevaron a cabo en cromatofolios Alugram Sil G/UV₂₅₄ Macharey-Nagel Duren. Como reveladores cromatográficos se emplearon una lámpara de luz UV Spectroline modelo ENF-240c de longitud de onda a 254 y 365 nm y solución de sulfato cérico amoniacal $[(\text{NH}_4)_4\text{Ce}(\text{SO}_4)_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}]$ al 1% con H_2SO_4 2N⁵¹.

Para las cromatografías en columna abierta se utilizó como fase estacionaria gel de sílice 60 (malla 0.063-0.200 nm) Merck. Las cromatografías preparativas se realizaron en placas Merck de 1mm de grosor y una superficie de 20 x 20 cm.

Los puntos de fusión fueron determinados en un aparato Fisher Johns y no están corregidos.

Los espectros en el UV se determinaron en un espectrofotómetro Perkin-Elmer Lambda 2.

Los espectros en el IR se obtuvieron en un espectrofotómetro Perkin-Elmer Spectrum RX 1 FTIR.

Los espectros de RMN se determinaron a 300 ó 500 MHz para el caso de ¹H, a 75.5, 200 y 300 MHz para el caso de ¹³C. Para esto se utilizaron espectrómetros de alta resolución Varian Unity Inova 300 y Varian Unity Inova 500, dependiendo del caso. Como disolventes se emplearon CDCl_3 , CD_3OD , DMSO-d_6 y como referencia interna TMS.

⁵¹ Stahl, E., *et al.* (1965). "Thin Layer Chromatography-A Laboratory Handbook". p. 384, Berlin



Los espectros de masas se obtuvieron en un espectrómetro marca Termo-Electron, modelo DFS (Double Focus Sector), utilizando la técnica de ionización por impacto electrónico.

Los ángulos de rotación óptica se midieron en un polarímetro Perkin-Elmer 241, utilizando celdas de 1.0 dm de longitud, a una temperatura de 25 °C y longitud de onda de 589 nm.

Los datos de rayos X fueron colectados a temperatura ambiente en un Oxford Diffraction Gemini "A" equipado con una fuente de rayos X de molibdeno incrementada, con un monocromador de grafito Mo κ_{α} y un detector CCD-Atlas. Todas las reflexiones fueron colectadas utilizando la técnica " ω -scan" con $\Delta\omega = 1.0^{\circ}$. Los parámetros de la celda unitaria fueron obtenidos de un refinamiento de mínimos cuadrados de 2604 reflexiones. A todos los datos se les aplicó la corrección por absorción empírica. La estructura se resolvió utilizando el programa SHELXLS-97⁵² y se refinó con SHELXL-97. Todos los átomos de no-hidrógeno fueron localizados en el mapa de densidad. Para generar las tablas de longitudes y ángulos de enlace se utilizó la paquetería de WinGX publication routines⁵³ y las figuras fueron generadas con Ortep-3 for Windows⁵⁴.

5.2 Recolección e identificación del material vegetal

El material vegetal empleado en esta tesis se recolectó en el municipio de Hueyapan, Morelos (Figura 6) en abril del 2005 y fue identificado por la M. C. Margarita Avilés y la M. C. Macrina Fuentes. La muestra vegetal fue depositada en el herbario del Instituto Nacional de Antropología e Historia de Morelos, con el siguiente número de clasificación: INAHM-2018.

⁵² Sheldrick, G. M. (1997). *SHELXS97* and *SHELXL97*. University of Göttingen, Germany.

⁵³ Farrugia, L. J. (1999). *J. Appl. Cryst.* 32: 837-838

⁵⁴ Farrugia, L. J. (1997). *J. Appl. Cryst.* 30: 565.



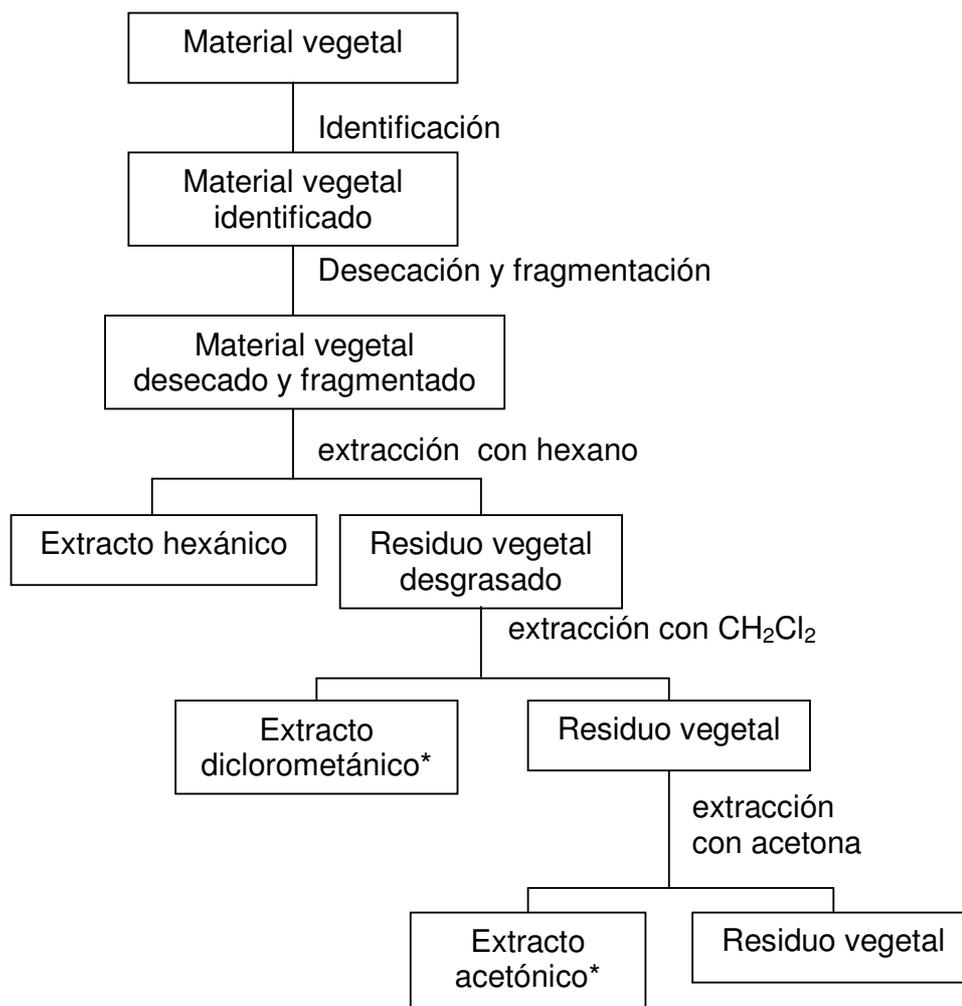
Figura 6. Ubicación del municipio de Hueyapan, Morelos.

5.3 Extracción

El material vegetal (1.2 kg de hojas y tallos) se dejó secar a temperatura ambiente. El material se fragmentó y desgrasó con hexano para posterior extracción con disolventes de diferente polaridad (diclorometano y acetona) por el método de maceración. En ambos casos, el disolvente se eliminó por destilación al vacío obteniéndose 174.9 g de extracto diclorometánico y 90.0 g de extracto acetónico (Esquema 1).



Esquema 1. Procesamiento de hojas y tallos de *Verbena carolina* L.



* Pruebas de actividad antimicrobiana



5.4 Determinación de la actividad antimicrobiana por medio del análisis de la concentración mínima inhibitoria (CMI, mg/mL).

5.4.1 Microorganismos utilizados

Tabla 1. Microorganismos utilizados en la determinación de la CMI.

Microorganismo	Descripción
<i>Staphylococcus aureus</i>	Bacteria Gram (+)
<i>Enterococcus faecalis</i>	Bacteria Gram (+)
<i>Escherichia coli</i>	Bacteria Gram (-)
<i>Salmonella typhi</i>	Bacteria Gram (-)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Bacteria Gram (-)
<i>Candida albicans</i>	Hongo levaduriforme
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	Hongo filamentoso
<i>Trichophyton rubrum</i>	Hongo filamentoso

5.4.2 Preparación de las muestras

Los extractos y productos puros (10 mg) fueron disueltos en 1 mL de DMSO. A partir de esta disolución, se prepararon diluciones para obtener concentraciones finales en un rango de 0.750 a 3.0 mg/mL para el caso de los extractos íntegros y de 0.00625 a 0.100 mg/mL para los productos puros.

5.4.3 Preparación del inóculo

Para activar las cepas, las bacterias se desarrollaron en caldo nutritivo, la levadura y los hongos filamentosos se desarrollaron en agar Sabouraud; luego se incubaron durante un periodo de 48 horas a 37 °C las bacterias y durante 7 días a 28 °C los hongos.



El inóculo de cada muestra de bacterias fue preparado a partir de cultivos que contenían 10^8 unidades formadoras de colonias (UFC)/mL. El inóculo de *Candida albicans* tenía una concentración final de 10^5 células/mL, y de 10^6 esporas/mL para los hongos filamentosos. Las concentraciones de los inóculos fueron establecidas por comparación contra estándares turbidimétricos establecidos (escala de McFarland).

5.4.4 Bioensayo

Las muestras preparadas a diferentes diluciones se mezclaron con el medio de cultivo apropiado, en el cual se inoculó previamente el microorganismo de prueba; después de la incubación se examinó por comparación visual turbidimétrica la cantidad de crecimiento del microorganismo en cada tubo de ensayo, comparando en cada caso la turbidez existente con la de los patrones de turbidez de McFarland. Este procedimiento se efectuó por duplicado. La menor concentración de muestra requerida para la inhibición de crecimiento visible será considerada la concentración mínima inhibitoria (CMI).

Como controles positivos se utilizaron gentamicina para las bacterias Gram (+) y Gram (-), miconazol para los hongos filamentosos y nistatina contra el hongo levaduriforme. Adicionalmente se preparó un control de crecimiento negativo.



5.5 Determinación de la actividad tóxica de los extractos en el crustáceo

Artemia salina^{55, 56}

5.5.1. Preparación de los organismos

Se preparó una solución de sales de mar comercial (38 g de medio salino artificial por litro de agua destilada), en un vaso de precipitados al cual se le acondicionó una bomba de oxígeno y se burbujeó durante 20 minutos. Posteriormente se adicionaron los huevecillos de *Artemia salina* Leach, los cuales se incubaron durante 48 horas en un baño de agua con temperatura controlada de 28-30 °C.

5.5.2. Preparación de las muestras

Se pesaron 20 mg de cada extracto (diclorometánico y acetónico) en un tubo de ensayo por separado, se disolvieron en 2 mL de disolvente adecuado, posteriormente se tomaron de cada tubo de ensayo alícuotas por triplicado de 500, 50 y 5 µL y fueron depositadas de manera independiente en tubos de ensayo y se dejó evaporar el disolvente a temperatura ambiente.

5.5.3. Bioensayo⁵⁷

Pasado el tiempo de incubación descrito en el punto 5.5.1 se depositaron 10 larvas de *A. salina* en cada uno de los tubos conteniendo la muestra por evaluar y se aforó hasta tener un volumen final de 5 mL con la solución de agua de mar, obteniendo así concentraciones finales de 1000, 100 y 10 µg/mL.; se

⁵⁵ Meyer, B., *et al.* (1982). "Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents". 45: 31-4

⁵⁶ Mc Laughlin, J., *et al.* (1991). "Bench-top bioassay for the discovery of bioactive natural products: an update". 9: 383-409.

⁵⁷ Teng, W.S. (1993). "Bioactive Natural Products: Toxicity Testing Using the Brine Shrimp: *Artemia salina*". pp. 441-457.



dejaron las larvas 24 horas en contacto con la muestra a 28 °C. Posteriormente se contaron los crustáceos sobrevivientes y el resultado se expresó por medio de la CL₅₀ (el cálculo se realizó utilizando gráficas en excel, graficando organismos vivos y muertos acumulados vs el logaritmo de la concentración).

5.6 Reacción general de acetilación⁵⁸

A 100 mg de compuesto o fracción se adicionaron 1.0 mL de anhídrido acético y 0.3 mL de piridina a temperatura ambiente y se dejó con agitación magnética durante 24 h. Transcurrido el tiempo de reacción se añadieron 5.0 g de agua/hielo y se aciduló con una solución de HCl al 10%. Posteriormente se extrajo con tres porciones de 15 mL de acetato de etilo. La fase orgánica se extrajo con tres porciones de 5 mL de solución saturada de NaHCO₃ y se lavó dos veces con porciones de 5 mL de H₂O; finalmente el extracto orgánico se secó con Na₂SO₄ anhidro y por evaporación del disolvente se obtuvieron los productos acetilados.

5.7 Metilación de ácidos grasos

Se colocaron 20 mg de compuesto o fracción en un tubo con tapón de rosca de 20 mL al cual se adicionaron 2 mL de KOH al 5% en metanol y la mezcla se sometió a calentamiento en Baño María a 80 °C durante una hora en tubo cerrado. Al cabo de este tiempo se añadieron 2 mL de HCl al 10% en metanol y 100 µL de BF₃. La mezcla se calentó en Baño María a 80 °C por una hora adicional. La mezcla de la reacción se dejó enfriar y se agregaron 4 mL de agua destilada y se sometió a un proceso de partición con mezcla tolueno:hexano (8:2). Se agitó en vórtex durante 1 min. y se separó la fase orgánica, la cual se concentró a presión reducida hasta sequedad.

⁵⁸ Shriner, R., *et al.* (1997). "Identificación Sistemática de Compuestos Orgánicos". p. 269.



5.8 Análisis químico del extracto diclorometánico

5.8.1 Fraccionamiento cromatográfico

Se adsorbieron 174.9 g del extracto diclorometánico en 100 g de sílica gel, y se aplicaron a una columna cromatográfica abierta de vidrio conteniendo 1 kg. de sílica gel. La muestra se eluyó (recolectando fracciones de 400 mL cada una), con mezclas de hexano/AcOEt de polaridad creciente, posteriormente con mezclas de CHCl_3 /acetona en proporciones de menor a mayor polaridad y finalmente con una mezcla de CHCl_3 /MeOH y MeOH 100%. Las fracciones obtenidas (261 fracciones) fueron agrupadas de acuerdo a la similitud que presentaban sus características cromatográficas en capa fina, obteniéndose 20 fracciones las cuales se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Fraccionamiento cromatográfico del extracto diclorometánico

Sistema de elución	Fracciones recolectadas	Clave	Cantidad (g)
Hexano, Hex/AcOEt	3-28	FD-1	1.118
Hexano/AcOEt	29-31	FD-2	0.108
Hexano/AcOEt	32-44	FD-3	7.841
Hexano/AcOEt	45-55	FD-4	0.784
Hexano/AcOEt	56-64	FD-5	3.090
Hexano/AcOEt	65-67	FD-6	0.996
Hexano/AcOEt	68-79	FD-7	1.254
Hexano/AcOEt	80-105	FD-8	2.213
Hexano/AcOEt	106-114	FD-9	2.394
Hexano/AcOEt	115-124	FD-10	2.866
Hexano/AcOEt	125-137	FD-11	1.703
Hexano/AcOEt	138-145	FD-12	1.912
Hexano/AcOEt	146-154	FD-13	1.623



Tabla 2. Fraccionamiento cromatográfico del extracto diclorometánico (continuación)

Hexano/AcOEt	155-165	FD-14	1.417
Hexano/AcOEt	166-175	FD-15	1.766
Hexano/AcOEt, AcOEt	176-196	FD-16	3.773
AcOEt	197-206	FD-17	1.979
CHCl ₃ , CHCl ₃ /Acetona	207-241	FD-18	2.539
CHCl ₃ /Acetona, Acetona, MeOH/CHCl ₃ , MeOH	242-246	FD-19	0.725
MeOH	247-261	FD-20	2.017

5.8.2 Aislamiento y purificación de la mezcla de ácidos grasos

La fracción FD-3 de la columna cromatográfica, eluída con hexano/AcOEt 90:10 se metiló por el procedimiento descrito en el punto 5.7 y el producto se analizó por espectrometría de masas acoplado a cromatografía de gases (CG/EM). Se identificaron los ésteres metílicos de los ácidos grasos que componen el extracto cuyas características espectroscópicas se muestran en la página 38.

5.8.3 Aislamiento y purificación del ácido ursólico (6)

De la fracción primaria FD-13 de la columna cromatográfica, eluída con hexano/AcOEt 55:45 precipitó un sólido verde que fue lavado repetidas veces con hexano y posteriormente con AcOEt para dar un polvo verde claro que se separó y lavó con acetona. Este sólido se recrystalizó de MeOH RA dando un polvo blanco que fue caracterizado como ácido ursólico de acuerdo a sus características físicas y espectroscópicas, mismas que se muestran en la página 40.



5.9 Análisis químico del extracto acetónico

5.9.1 Fraccionamiento cromatográfico y por partición

90 g del extracto acetónico de *V. carolina* fueron disueltos en 1 L de agua destilada con calentamiento moderado. Una vez disuelto, el extracto se dejó enfriar y se filtró. El filtrado fue particionado sucesivamente con hexano (6 x 250 mL), AcOEt (10 x 250 mL) y *n*-BuOH (8 x 250 mL). El extracto *n*-butanólico fue llevado a sequedad (13.92 g) y aplicado a una columna cromatográfica (231.0 g de sílica-gel) empleando para la elución mezclas de polaridad creciente de CHCl₃/MeOH, según se indica en la Tabla 3.

Tabla 3. Fraccionamiento cromatográfico del extracto *n*-butanólico

Sistema de elución	Fracciones recolectadas	Clave	Cantidad (g)
CHCl ₃	1-5	FA-1	0.001
CHCl ₃ /MeOH	6-11	FA-2	0.093
CHCl ₃ /MeOH	12-13	FA-3	0.214
CHCl ₃ /MeOH	14-19	FA-4	0.680
CHCl ₃ /MeOH	20-24	FA-5	1.114
CHCl ₃ /MeOH	25-27	FA-6	0.191
CHCl ₃ /MeOH	28-32	FA-7	0.673
CHCl ₃ /MeOH	33-41	FA-8	0.926
CHCl ₃ /MeOH	42-47	FA-9	0.282
CHCl ₃ /MeOH	48-62	FA-10	2.448
CHCl ₃ /MeOH	63-69	FA-11	1.040
CHCl ₃ /MeOH	70-76	FA-12	1.692
CHCl ₃ /MeOH	77-96	FA-13	0.717
CHCl ₃ /MeOH	97-102	FA-14	0.204
MeOH	103-110	FA-15	0.055



5.9.2 Aislamiento y purificación de la hispidulina (7)

De la fracción primaria FA-4 de la columna cromatográfica, eluída con $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 90:10 se obtuvo espontáneamente por precipitación un polvo de color verde que fue purificado por recristalización con EtOH dando un precipitado amarillo. Posteriormente se acetiló por el procedimiento descrito en el punto 5.6 y fue caracterizado como hispidulina de acuerdo a sus características físicas y espectroscópicas, las cuales se muestran en la página 42.

5.9.3 Aislamiento y purificación de la verbenalina (8)

De la fracción primaria FA-8 de la columna cromatográfica, eluída con $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 85:15, cristalizó espontáneamente un producto de color blanco que fue purificado por recristalización con una mezcla de $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 85:15. El producto de la recristalización fue separado de las aguas madres y lavado con EtOH R.A. De acuerdo a sus características físicas y espectroscópicas se caracterizó como verbenalina (página 44).

5.9.4 Aislamiento y purificación del hastatósido (9)

Se intentó separar los componentes de la fracción primaria FA-9 de la columna cromatográfica, eluída con $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 85:15 usando cromatografía en placa preparativa de sílice (acetona:AcOEt 50:50). Éste método no resultó efectivo ya que el rendimiento era casi nulo debido a que gran parte de los compuestos no se desadsorbían satisfactoriamente de la gel de sílice con mezcla acetona:AcOEt 50:50 en agitación constante. Por lo que se decidió desarrollar una CC con esta fracción del modo siguiente. 400 mg de la fracción primaria FA-9 se adsorbieron en 200 mg de sílica gel, la mezcla se dejó secar a temperatura ambiente por 24 h. Lo anterior se aplicó a una columna cromatográfica abierta de vidrio conteniendo 4 g de sílica gel. Eluyendo con AcOEt y finalmente se lavó con MeOH, recolectando



fracciones de 50 mL cada una, las fracciones secundarias obtenidas (29 fracciones) fueron agrupadas de acuerdo a la similitud que presentaban sus características cromatográficas en capa fina, obteniéndose 6 fracciones secundarias las cuales se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Fraccionamiento cromatográfico de la fracción FA-9

Sistema de elución	Fracciones recolectadas	Clave	Cantidad (g)
AcOEt	1	FH-1	0.063
AcOEt	2	FH-2	0.037
AcOEt	3-16	FH-3	0.124
AcOEt	17-23	FH-4	0.082
AcOEt	24-27	FH-5	0.019
MeOH	28-29	FH-6	0.056

De la fracción secundaria FH-4 de la columna cromatográfica, eluída con AcOEt 100% se obtuvo espontáneamente un sólido de color ámbar el cual de acuerdo a sus características físicas y espectroscópicas se caracterizó como hastatósido (página 49).



6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La utilización de plantas medicinales en nuestro medio, y el hecho de que en gran cantidad de vegetales se encuentren principios activos empleados en el tratamiento de diversas enfermedades, ha incrementado el interés por su estudio. El análisis fitoquímico de un material vegetal es una medida necesaria para aislar componentes químicos de las plantas que en muchas ocasiones pueden ser los responsables de las actividades biológicas atribuidas a éstas. En México, *Verbena carolina* L. es utilizada en el tratamiento de la diarrea, el vómito, contra la caspa, alergias y dermatitis principalmente. Por esta razón los siguientes, son los resultados del trabajo fitoquímico y biológico preliminar para conocer los contenidos químicos de la planta medicinal *V. carolina* L. y su comportamiento biológico preliminar.

6.1 Determinación de la actividad antimicrobiana por medio del análisis de la concentración mínima inhibitoria (CMI, mg/mL).

Se determinó la actividad antimicrobiana de los extractos diclorometánico y acetónico utilizando cepas de microorganismos Gram (+) y Gram (-), así como en hongos levaduriformes y filamentosos representativos. Los resultados de CMI obtenidos para cada uno de los extractos se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Determinación de la CMI de los extractos diclorometánico y acetónico obtenidos de la planta *Verbena carolina* L.

Extracto	Valores de CMI (mg/mL)						
	Sa	Ef	Ec	St	Ca	Tm	Tr
Diclorometánico	1.5	1.5	3.0	3.0	1.5	0.7	0.7
Acetónico	3.0	1.5	3.0	1.5	0.7	0.7	0.7



Sa: *Staphylococcus aureus*; **Ef:** *Enterococcus faecalis*; **Ec:** *Escherichia coli*; **St:** *Salmonella typhi*; **Ca:** *Candida albicans*; **Tm:** *Tricophyton mentagrophytes*; **Tr:** *Tricophyton rubrum*.

Como se observa en la tabla 5, los extractos acetónico y diclorometánico de hojas y tallos de *Verbena carolina* L., denotan importante actividad inhibitoria contra hongos dermatofitos.

El extracto diclorometánico además resultó con actividad inhibitoria para el crecimiento de bacterias Gram positivas como *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* y para hongos levaduriformes como *Candida albicans*, mientras que para el caso del crecimiento de las bacterias Gram negativas *Escherichia coli* y *Salmonella typhi*, la actividad inhibitoria fue mínima.

Por lo que respecta al extracto acetónico, los resultados indican una buena actividad inhibitoria contra *Candida albicans* y considerable actividad inhibitoria contra *Enterococcus faecalis* y *Salmonella typhi*, mientras que para *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, la actividad inhibitoria fue mínima.

6.2 Determinación de la actividad tóxica de los extractos en el crustáceo *Artemia salina*

El bioensayo de toxicidad al crustáceo *Artemia salina*, es de carácter general y es útil en los procedimientos fitoquímicos para correlacionar con las actividades biológicas como citotoxicidad *in vitro* para células cancerígenas, actividad antihelmíntica y actividad antipalúdica,⁵⁹ por lo cual y a pesar de que el estudio se enfocó a la actividad antimicrobiana, se realizó el de toxicidad por su accesibilidad, así los extractos diclorometánico y acetónico se analizaron con este ensayo con la finalidad de extender la perspectiva de estudio de la planta.

⁵⁹ Mata, R. (2000). Curso Teórico de Farmacognosia, 2ª versión. UNAM. México. p. 11.



Los resultados del bioensayo con los extractos crudos presentaron una concentración letal media mayor a 1000 µg/mL (Tabla 6), lo cual se considera inactivo para un extracto o una fracción proveniente de una planta, de acuerdo a los protocolos internacionales.⁶⁰

Tabla 6. CL₅₀ de los extractos diclorometánico y acetónico

Extractos	Conc. (µg/mL)	No. de sobrevivientes			No. de muertos			CL ₅₀ (µg/mL)
Extracto diclorometánico	1000	9/10	8/10	9/10	1/10	2/10	1/10	>1000
	100	10/10	9/10	9/10	0/10	1/10	1/10	
	10	10/10	10/10	10/10	0/10	1/10	1/10	
Extracto acetónico	1000	10/10	10/10	10/10	0/10	0/10	0/10	>1000
	100	9/10	10/10	9/10	1/10	0/10	1/10	
	10	10/10	10/10	10/10	0/10	0/10	0/10	

6.3 Análisis químico y biológico del extracto diclorometánico

6.3.1 Evaluación de la actividad antimicrobiana del fraccionamiento primario

Tabla 7. Evaluación de la CMI de las fracciones primarias

Fracción probada	CMI (mg/mL)							
	Sa	Ef	Ec	Pa	St	Ca	Tm	Tr
FD-2	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1
FD-3	>1	>1	>1	>1	>1	>1	0.250	0.250
FD-4	0.5	0.5	>1	>1	>1	0.5	0.125	0.125
FD-5	0.5	0.5	1.0	1.0	1.0	1.0	0.125	0.125
FD-6	0.5	0.5	1.0	1.0	1.0	1.0	0.062	0.062

⁶⁰ Anderson, J.E., *et al.* (1991). "A Blind Comparison of Simple Bench-top Bioassays and Human Tumor Cell Cytotoxicities as Antitumor Prescreens". 2: 107-111



Tabla 7. Evaluación de la CMI de las fracciones primarias (continuación)

FD-13	0.250	0.5	>1	>1	>1	0.5	0.250	0.125
FD-20	>1	>1	>1	>1	>1	>1	0.5	0.5
Gentamicina	0.002	0.002	0.004	0.004	0.004	NP	NP	NP
Miconazol	NP	NP	NP	NP	NP	NP	0.004	0.004
Nistatina	NP	NP	NP	NP	NP	0.008	NP	NP

NP. No probado; **Sa:** *Staphylococcus aureus*; **Ef:** *Enterococcus faecalis*; **Ec:** *Escherichia coli*; **Pa:** *Pseudomonas aeruginosa*; **St:** *Salmonella typhi*; **Ca:** *Candida albicans*; **Tm:** *Tricophyton mentagrophytes*; **Tr:** *Tricophyton rubrum*.

De acuerdo con la tabla 7, se observa que las fracciones FD-3, FD-4, FD-5, FD-6 y FD-13 presentaron buena actividad inhibitoria contra hongos dermatofitos, siendo la fracción FD-6 la de mayor potencial antifúngico.

Se observó además que las fracciones FD-4, FD-5, FD-6 y FD-13 mostraron actividad inhibitoria frente a *S. aureus* y *E. faecalis*, siendo la fracción FD-13 la que mayor potencial de inhibición presentó contra *S. aureus*. Para el resto de las cepas bacterianas utilizadas (*E. coli*, *P. aeruginosa* y *S. typhi*) las fracciones con una mejor actividad inhibitoria fueron FD-5 y FD-6.

Con respecto a la actividad inhibitoria contra *C. albicans*, los resultados muestran que las fracciones FD-4 y FD-13 tuvieron la mayor actividad inhibitoria.

La actividad mostrada por la fracción FD-13 contra *C. albicans* y *S. aureus* así como la presentada por la fracción FD-3 frente a hongos dermatofitos justifica el estudio posterior para reconocer las moléculas allí presentes.



6.3.2 Aislamiento e identificación de la mezcla de ácidos grasos

La fracción primaria FD-3 de aspecto aceitoso, se analizó por IR, observándose bandas para vibraciones de C-H y de carboxilo, sugiriendo la presencia de ácidos grasos por lo que se sometió a una reacción de metilación con MeOH y BF_3 para posteriormente analizarse por CG/EM, lográndose identificar los ésteres metílicos de los siguientes ácidos grasos que componen la fracción (Figura 7), por comparación de sus respectivos espectros de masas con la base de datos del equipo:

- Ácido hexadecanoico (1)
- Ácido octadecanoico (2)
- Ácido (Z,Z) 9,12- octadecadienoico (3)
- Ácido (Z,Z,Z) 9,12,15- octadecatrienoico (4)
- Ácido eicosanoico (5)

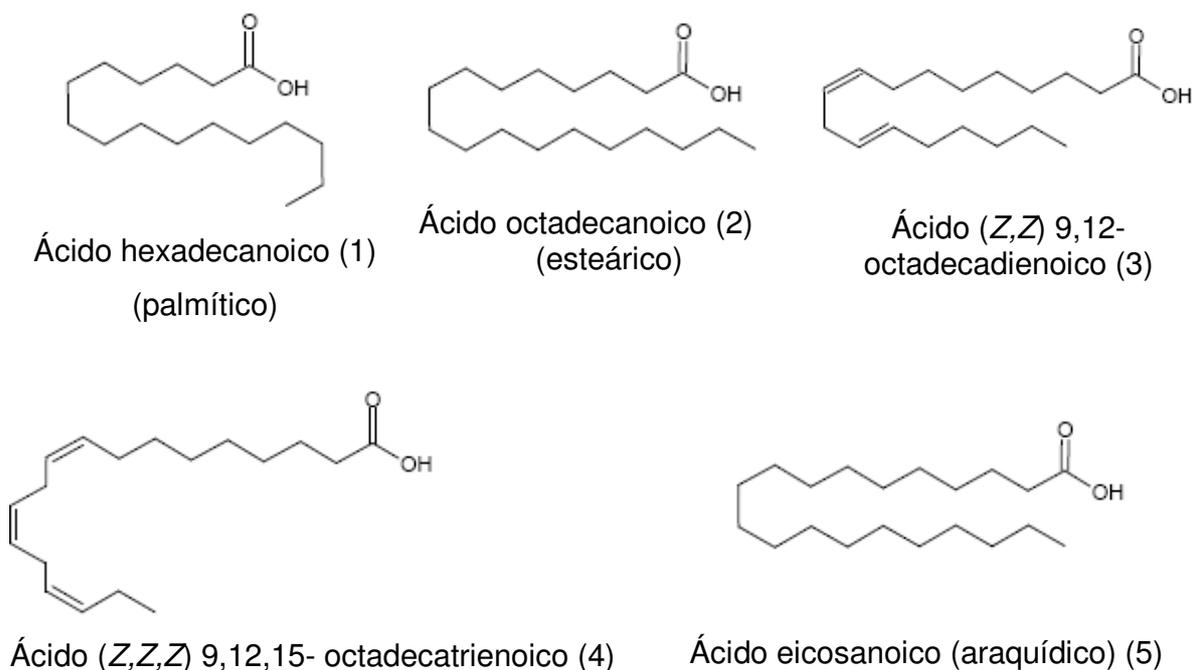


Figura 7. Estructura de los ácidos grasos contenidos en la fracción FD-3



El análisis espectroscópico y espectrométrico de la fracción FD-3 metilada (Cuadro 1) mostró en el IR una pequeña señal en 3470 cm^{-1} , asignada a grupos hidroxilos presentes en la molécula; metilos, metilenos y metinos en 2925 , 2854 , 1463 y 1377 cm^{-1} , cadena de metilenos en un número mayor a cuatro en 721 cm^{-1} , carboxilo de éster en 1746 cm^{-1} y vibración carbono-oxígeno en 1100 cm^{-1} .

El perfil en el espectro de masas de estos compuestos presentó un patrón de decaimiento progresivo en la intensidad de las señales adyacentes, este tipo de fragmentación es típico de ácidos grasos de cadena larga. Por otra parte, el espectro de masas (Espectros 3, 4, 5 y 7) confirmó el peso molecular de cada especie, así como la pérdida en todos los casos de 31 unidades de masa, correspondientes al ión $\text{CH}_3\text{-O}^-$ salvo en el compuesto (4), con la pérdida del fragmento $\text{CH}_3\text{-CH}_2^-$ (Espectro 6) y la pérdida sucesiva en todos ellos de 14 unidades de masas de los grupos metileno.

Cuadro 1. Constantes espectroscópicas y espectrométricas de la fracción FD-3 sometida a metilación

IR (Espectro 1):	$\nu_{\text{máx.}}$ (pastilla) cm^{-1} : 3470, 2925, 2854, 1746, 1463, 1377, 1100, 721.
CG/EM (1) t.r.=14.07 min. (Espectro 3):	m/z (int. rel.): 270 [M^+] (6), 239 (6), 227 (17), 199 (4), 185 (6), 171 (4), 157 (2), 143 (26), 129 (11), 115 (2), 97 (9), 87 (96), 74 (100), 69 (15), 55 (19).
CG/EM (2) t.r.=16.01 min. (Espectro 4):	m/z (int. rel.): 298 [M^+] (11), 267 (6), 255 (19), 241 (2), 199 (9), 185 (2), 171 (1), 157 (2), 143 (23), 129 (9), 111 (2), 97 (6), 87 (91), 74 (100), 55 (13).
CG/EM (3) t.r.=15.72 min. (Espectro 5):	m/z (int. rel.): 294 [M^+] (6), 263 (9), 236 (2), 220 (2), 191 (2), 178 (4), 164 (6), 149 (11), 135 (13), 121 (15), 109 (30), 95 (79), 81 (96), 67 (100), 59 (9), 55 (43).
CG/EM (4) t.r.=15.80 min. (Espectro 6):	m/z (int. rel.): 292 [M^+] (4), 264 (19), 249 (1), 236 (9), 222 (11), 191 (4), 180 (6), 163 (6), 149 (15), 135 (19), 121 (28), 108 (53), 95 (89), 87 (32), 79 (100), 74 (32), 67 (83), 59 (13), 55 (66).



Cuadro 1. Constantes espectroscópicas y espectrométricas de la fracción FD-3 sometida a metilación (continuación)

CG/EM (5) t.r.=17.76 min. (Espectro 7):	m/z (int. rel.): 326 [M^+] (2), 295 (1), 283 (4), 241 (1), 227 (1), 199 (2), 185 (2), 143 (15), 129 (4), 111 (2), 97 (6), 87 (77), 83 (6), 74 (100), 57 (17), 55 (17).
---	--

6.3.3 Aislamiento e identificación del ácido ursólico (6)

El producto recristalizado de la fracción primaria FD-13 mostró pureza cromatográfica (acetona/AcOEt 5:5, R.f. 0.5) y fue identificado como ácido ursólico (Figura 8) de acuerdo a sus características espectroscópicas y espectrométricas (Cuadro 2) que se refieren a continuación.

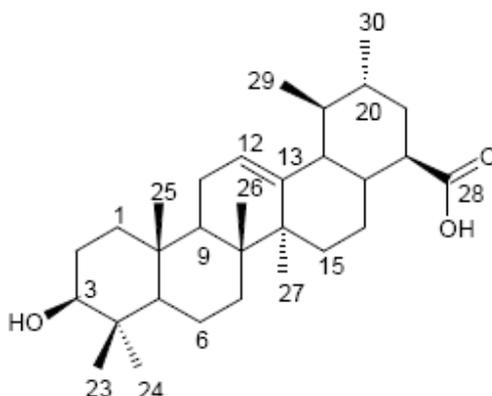


Figura 8. Estructura del ácido ursólico

En el espectro IR, se observan una banda ancha a 3453 cm^{-1} , que se asoció a la presencia de grupos hidroxilo. Dos bandas intensas en 2927 y 2872 cm^{-1} típicas para la vibración de grupos carbono-hidrógeno alifáticos, además de bandas en 1456 y 1378 que corroboran la presencia de grupos metilo, metileno y metino en la molécula y una banda intensa en 1696 cm^{-1} correspondiente a la presencia de un grupo carboxilo de ácido.



El espectro de RMN-¹H evidenció cinco señales de metilos angulares en δ 1.25, 1.08, 0.98, 0.95 y 0.92, típicos de una estructura terpenoide y dos metilos adicionales observados como dobletes en δ 0.85 y 0.79. Además mostró un triplete en δ 5.25 correspondiente a un hidrógeno vinílico trisustituído y un hidrógeno de grupo hidroxilo en δ 3.22.

Su espectro de RMN-¹³C, muestra la presencia de 30 señales atribuidas a los carbonos de un compuesto de naturaleza triterpénica. Estas señales en su espectro DEPT se pueden adjudicar a siete carbonos primarios (-CH₃), nueve secundarios (-CH₂), siete terciarios (-CH) y seis carbonos cuaternarios (-C). La comparación de estas características con las publicadas en la literatura confirmó la identidad del ácido ursólico para el compuesto **6**.

Cuadro 2. Constantes espectroscópicas y espectrométricas del ácido ursólico

p.f.	270-280 °C
F.M	C ₃₀ H ₄₈ O ₃
IR (Espectro 8):	$\nu_{\text{máx.}}$ (pastilla) cm ⁻¹ : 3453, 2927, 2872, 1696, 1456, 1378, 1029, 997.
RMN- ¹ H (Espectro 9):	400 MHz, CDCl ₃ , δ : 5.25 (1H, t, $J=3.6$ Hz, H-12), 3.22 (1H, dd, $J=11.0, 4.6$ Hz, H-3), 2.18 (1H, d, $J=10.8$ Hz, H-18), 1.25, 1.08, 0.98, 0.95 y 0.92 (cada uno 3H, s, H-26, 24, 23, 27, 25), 0.85 (3H, d, $J=6.8$ Hz, H-30) y 0.79 (3H, d, $J=4.4$ Hz, H-29)
RMN- ¹³ C (Espectro 10):	400 MHz, CDCl ₃ , δ : 181.7 (C-28), 138.0 (C-13), 125.9 (C-12), 79.1 (C-3), 55.3 (C-5), 52.8 (C-18), 48.0 (C-17), 47.6 (C-9), 42.1 (C-14), 39.6 (C-8), 39.1 (C-19), 38.9 (C-1), 38.8 (C-4), 38.7 (C-20), 37.1 (C-10), 36.8 (C-22), 33.0 (C-7), 30.7 (C-21), 29.8 (C-15), 28.2 (C-23), 28.1 (C-27), 27.3 (C-2), 24.3 (C-16), 23.4 (C-29), 21.3 (C-30), 18.4 (C-6), 17.2 (C-11), 17.1 (C-26), 15.7 (C-25), 15.6 (C-24).



6.4 Análisis químico del extracto acetónico

6.4.1 Aislamiento e identificación de la hispidulina (7)

El compuesto recristalizado de la fracción primaria FA-4 mostró pureza cromatográfica (hexano/AcOEt 2:8, R.f. 0.7) y su absorción en el UV de onda larga (color azul) fue la típica para un compuesto de naturaleza flavonoide, identificado como hispidulina (Figura 9).

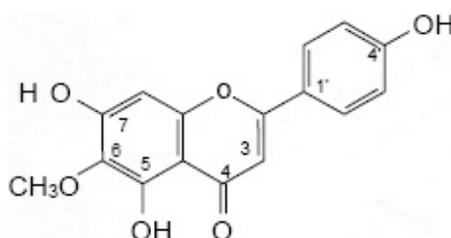


Figura 9. Estructura de la hispidulina

Sus características espectroscópicas y espectrométricas se muestran en el Cuadro 3, en el cual resaltan las siguientes. El espectro IR mostró bandas características para grupos -OH , en 3340 cm^{-1} , metoxilo en 2942 y 2839 con sus señales de corroboración en 1495 , 1371 , 1251 , 1178 y 1096 cm^{-1} y el carbonilo del grupo cromona en 1653 cm^{-1} . El espectro de RMN- ^1H fue realizado en DMSO- d_6 dada la insolubilidad del compuesto en otros disolventes orgánicos. En $\delta 7.9$ se observó un doblete que integró para dos hidrógenos y en $\delta 6.91$ otra señal similar con la misma constante de acoplamiento que señaló la presencia de hidrógenos de tipo A_2X_2 , asignados a H-2', H-6' y H-3', H-5' en un sistema aromático *para* disustituido. En 6.74 ppm una señal singulete que integró para un hidrógeno se asignó a la posición 3 del flavonoide y al haber una sola señal remanente en 6.58 que integró para un hidrógeno (H-8), se dedujo que el anillo "A" del flavonoide permanecía trisustituido con funciones oxigenadas.



El espectro de RMN-¹³C permite confirmar la localización del enlace C-2 (163.6 ppm) con un radical fenilo. La posición del metoxilo en el anillo "A" se infirió mediante sus correlaciones en el espectro NOESY (Espectro 16) con ambos hidroxilos en 5 y 7 estableciéndose su posición en 6. Los espectros HMBC confirman la presencia de grupos C-OH bencénicos en 152.6, 152.2 y 161.0 ppm en C-5, C-7 y C-4' respectivamente.

El espectro de masas (Espectro 18) confirmó el peso molecular de la hispidulina.

Cuadro 3. Constantes espectroscópicas y espectrométricas de la hispidulina

p.f.	277-281 °C
F.M	C ₁₆ H ₁₂ O ₆
UV(Espectro12)	λ _{máx} (MeOH), nm, 273 y 333
IR (Espectro 13):	ν _{máx.} (pastilla) cm ⁻¹ : 3340, 2942, 2839, 1653, 1609, 1582, 1495, 1371, 1251, 1178, 1096, 828.
RMN- ¹ H (Espectro 14):	500 MHz, DMSO-d ₆ , δ: 7.90 (2H, d, J=8.5 Hz, H-2', H-6'), 6.91 (2H, d, J=9.0 Hz, H-3', H-5'), 6.74 (1H, s, H-3), 6.58 (1H, s, H-8) y 3.73 (3H, s, O-CH ₃)
RMN- ¹³ C (Espectro 15):	300 MHz, DMSO-d ₆ , δ: 181.9 (C-4), 163.6 (C-2), 161.0 (C-4'), 157.1 (C-9), 152.6 (C-5), 152.2 (C-7), 131.2 (C-6), 128.3 (C-2' y C-6'), 121.1 (C-1'), 115.8 (C-3' y C-5'), 103.9 (C-10), 102.3 (C-3), 94.1 (C-8), 59.8 (O-Me).
CG/EM t.r.=0.22-0.45 min. (Espectro 18):	m/z (int. rel.): 301 [M ⁺] (28), 300 (17), 289 (7), 171 (5), 165 (8), 155 (21), 154 (58), 81 (51), 71 (52), 69 (80), 57 (95), 55 (100).



6.4.2 Aislamiento e identificación de la verbenalina (8)

El producto recristalizado de la fracción primaria FA-8 mostró pureza cromatográfica (acetona/AcOEt 5:5, R.f. 0.4) y absorción en el UV. Fue identificado como verbenalina (Figura 10) de acuerdo a sus características espectroscópicas y espectrométricas (Cuadro 4) que se discuten a continuación.

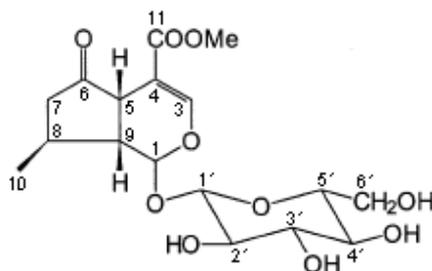


Figura 10. Estructura de la verbenalina

El compuesto **8** presentó un p.f. de 180-183 °C con absorción en el espectro UV (Espectro 19) $\lambda_{\text{máx}}$ (MeOH) a 236 nm. Esta absorción de la molécula se relacionó con la presencia de dobles enlaces conjugados en ella. El valor de rotación óptica obtenido para este producto fue $[\alpha]_{\text{D}}^{25}:-176.5^{\circ}$ (c, 9.5, MeOH). Comparando este resultado con la bibliografía ($[\alpha]_{\text{D}}^{25}:-173^{\circ}$ (c, 3.98, H₂O))⁶¹, reveló la S como su configuración absoluta.

El espectro IR (Espectro 20) reveló una banda ancha de gran intensidad en 3358 cm⁻¹, que se asoció a la presencia de grupos hidroxilo. Dos bandas intensas en 2911 y 2898 cm⁻¹ fueron típicas para la vibración de grupos carbono-hidrógeno alifáticos, además de bandas en 1444 y 1360 que corroboran la presencia de grupos metilo, metileno y metino en la molécula, una banda intensa en 1738 cm⁻¹ se relacionó con el grupo carbonilo de una cetona y del carboxilo del éster α,β -insaturado; la banda intensa en 1694 cm⁻¹ corresponde al doble enlace de este último.

⁶¹ Büchi, G., *et al.* (1962). "Constitution of Verbenalin". 18: 1049-1059.



El espectro de RMN-¹H (Espectro 21) evidenció seis señales para grupos metino a 4.64, 3.86, 3.36, 3.28, 3.26 y 3.21 ppm, adicionalmente el espectro de RMN-¹³C manifestó resonancias de grupos CH en 100.6, 78.4, 78.0, 74.7, 71.6 y 62.8 ppm, mostrando claramente la presencia de una β-D-glucosa. En δ_H 1.23 se apreció un doblete que integró para tres hidrógenos, lo que indica un metilo asignado en C-8. Señales protónicas correspondientes a un sistema conjugado enol-eter (δ_H 7.44, H-3) y un grupo carbometoxilo en δ_H 3.70 fueron observadas. Además de estas señales, un carbono cuaternario en δ_C 105.5 (C-4) se asignó a un carbono base de dos oxígenos. Las señales en 153.8 y 105.5 ppm relacionadas un hidrógeno vinílico establece la presencia de un doble enlace asignado entre C-3 y C-4.

En el espectro COSY (Espectro 23) se observan señales de correlación entre H-1 y H-9, y H-9 con H-8, mientras que H-5 es vecino de H-9, y H-8 es vecino tanto de H-8 como de H-9.

El esqueleto iridoide fue confirmado a través de los datos de los desplazamientos COSY, HETCOR y HETCOR a largo alcance (Espectros 23, 24 y 25).

Cuadro 4. Constantes espectroscópicas y espectrométricas de la verbenalina

p.f.	180-183 °C (180-183 °C lit.)
F.M	C ₁₇ H ₂₄ O ₁₀
[α] _D ²⁵	-176.5
UV(Espectro19)	λ _{máx} (MeOH), nm, 236
IR (Espectro 20):	ν _{máx.} (pastilla) cm ⁻¹ : 3358, 2911, 2898, 1738, 1694, 1645, 1444, 1407, 1360, 1251, 1100, 1075, 1032, 992, 953, 910, 887, 871, 853, 816, 794, 769, 687.



Cuadro 4. Constantes espectroscópicas y espectrométricas de la verbenalina (continuación)

RMN- ¹ H (Espectro 21):	300 MHz, MeOD, δ : 7.44 (1H, d, $J=1.2$ Hz, H-3), 5.21 (1H, d, $J=7.2$ Hz, H-1), 4.64 (1H, d, $J=7.8$ Hz, H-1'), 3.86 (1H, dd, $J=11.85, 2.1$ Hz, H _a -6'), 3.70 (3H, s, O-Me), 3.61 (1H, dd, $J=11.85, 6.0$ Hz, H _b -6'), 3.60 (1H, dd, $J=12, 6.0$ Hz, H-7), 3.48 (1H, dm, $J=8.1$ Hz, H-5), 3.36 (1H, m, H-3'), 3.28 (1H, m, H-5'), 3.26 (1H, m, H-4'), 3.21 (1H, dd, $J=10.35, 3.9$ Hz, H-2'), 2.48 (1H, m, H-8), 2.19 (1H, m, H-9) y 1.23 (3H, d, $J=6.9$ Hz H-10)
RMN- ¹³ C (Espectro 22):	300 MHz, MeOD, δ : 215.7 (C-6), 168.8 (C-11), 153.8 (C-3), 105.5 (C-4), 100.6 (C-1'), 97.1 (C-1), 78.4 (C-5'), 78.0 (C-3'), 74.7 (C-2'), 71.6 (C-4'), 62.8 (C-6'), 51.9 (O-Me), 45.6 (C-9), 43.7 (C-7), 43.6 (C-5), 29.9 (C-8), 20.6 (C-10).

6.4.2.1 Análisis estructural por difracción de rayos X de la verbenalina (8)

Los datos cristalinos y el refinamiento de la estructura se muestran en la Tabla 8, mientras que el resto de los parámetros cristalográficos aparecen en la parte de Anexos (Tablas 10, 11 y 12.)

La estructura fue resuelta utilizando el método directo, y el refinamiento se realizó por el método de mínimos cuadrados para la matriz total en (F^2). La disposición molecular y la asignación de números a los diferentes átomos se puede observar en la Figura 11.

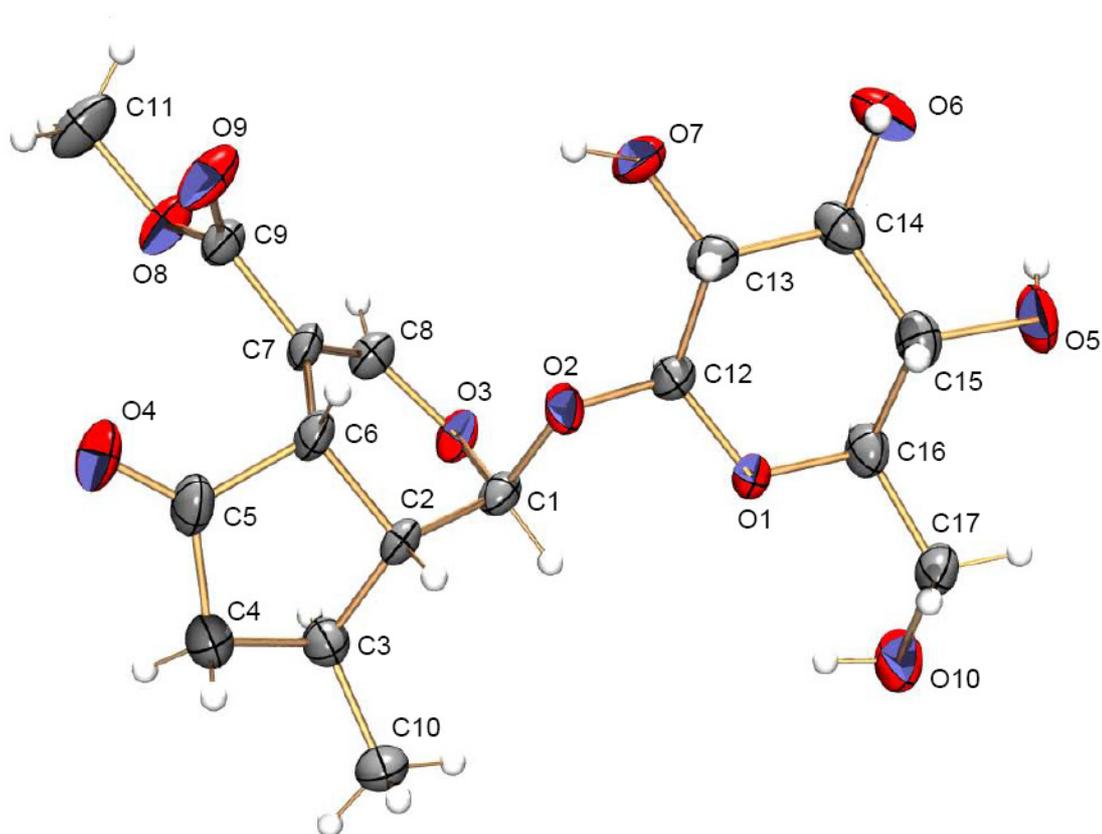


Figura 11. Estructura molecular de la verbenalina

De acuerdo a los parámetros cristalinos mostrados en la tabla 8 es posible afirmar que la estructura molecular obtenida corresponde a un sistema cristalino monoclinico. Los parámetros geométricos de la molécula son sustancialmente como se esperaban y la configuración mostrada en la figura 11 se ajusta con una disposición bicíclica característica de un compuesto de tipo iridoide. La distancia $C(sp^3)-C(sp^3)$ [1.526(6) Å] es la misma [1.526(3) Å] indicada por Rajnikant⁶² para la verbenalina; la longitud del enlace $C(sp^3)-C(sp^2)$ [1.510(5) Å] es casi la misma [1.509(3) Å]⁶³; la distancia del enlace $C(sp^3)-O$ [1.414(5) Å] concuerda con el valor

⁶² Rajnikant, *et al.* (1998). "Crystal structure of 1 α -(β -D-glucopyranosyloxy)-1,4 α ,5,6,7,7 α -hexahydro-7 α -methyl-5-oxocyclopenta[c]pyran-4-carboxylic acid methyl ester (verbenalin)" 43(3): 487-492

⁶³ Rajnikant. *op cit.*



teórico [1.426(5) Å]⁶⁴ y la longitud de enlace C(sp²)=O [1.195(6) Å] es casi la misma (1.198 Å) que la encontrada en cetonas y ésteres.

La estructura molecular evidencia una conformación de silla para el anillo glucopiranosil, en donde la suma de puentes de hidrógeno intra e intermoleculares O-H...O y C-H...O contribuyen a la estabilidad de la estructura cristalina.

Tabla 8. Datos cristalinos y estructurales refinados para verbenalina

Fórmula empírica	C ₁₇ H ₂₄ O ₁₀	
Peso molecular	388.36 g/mol	
Temperatura	293(2) K	
Longitud de onda	0.71073 Å	
Sistema cristalino	Monoclínico	
Grupo espacial	P21	
Dimensiones de la celda elemental	a=5.7470(5) Å	α=90°
	b=8.1850(5) Å	β=98.034(7)°
	c=19.501(3) Å	γ=90°
Volumen	908.31(16) Å ³	
Z	2	
Densidad (calculada)	1.420 mg/m ³	
Coeficiente de absorción	0.118 mm ⁻¹	
F(000)	412	
Tamaño del cristal	0.3402 x 0.2991 x 0.2079 mm ³	
Intervalo de θ	3.16 a 28.33°	
Intervalo de los índices	-5<=h<=7, -8<=k<=10, -21<=l<=24	
Reflexiones recolectadas	4034	

⁶⁴ Sutton, L.E. (1965). "Tables of Interatomic Distances and Configuration in Molecules and Ions". (Supplement). *The Chemical Society*, London.

**Tabla 8.** Datos cristalinos y estructurales refinados para verbenalina (continuación)

Reflexiones independientes	2502 [R(int) = 0.0196]
Porcentaje de reflexiones a $\theta = 25.00^\circ$	93.4%
Transmisión máxima y mínima	1 y 0.92351
Método de refinamiento	Mínimos cuadrados en F^2 -matriz completa
Datos / restricciones / parámetros	2502 / 1 / 246
Bondad de ajuste en F^2	1.239
Índice R final [$I > 2\sigma(I)$]	R1 = 0.0500, wR2 = 0.1096
Índice R (todos los datos)	R1 = 0.0606, wR2 = 0.1146
Parámetro de la estructura absoluta	-1.2(18)
Diferencia más grande entre máximo y mínimo	0.227 y -0.229 e \AA^3

Por las consideraciones anteriores, la estructura para el compuesto **8** corresponden al éster metílico del ácido 1α -(β -D-glucopiranosiloxi)-1,4 α ,5,6,7,7 α -hexahidro-7 α -metil-5-oxociclopentano[c]pirano-4-carboxílico (verbenalina)

6.4.3 Aislamiento e identificación del hastatósido (9)

El sólido de la fracción secundaria FH-4 mostró pureza cromatográfica (acetona/AcOEt 5:5, R.f. 0.1) y absorción en el UV de ondas corta y larga. Fue identificado como hastatósido (Figura 12) de acuerdo a sus características espectroscópicas (Cuadro 5).

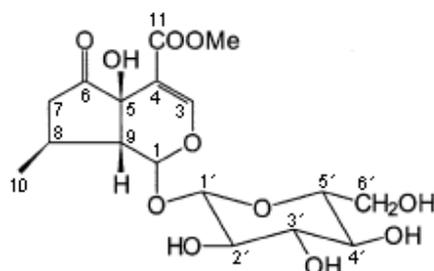


Figura 12. Estructura del hastatósido

La estructura del hastatósido es muy similar a la del compuesto **8** (verbenalina) y la única diferencia espectroscópica, comparando sus espectros de RMN (^1H , ^{13}C , COSY y HETCOR), fue la presencia de un carbono cuaternario oxigenado en δ_{C} 74.5 (C-5) en el hastatósido. A diferencia de la verbenalina, el compuesto **9** se presentó como un polvo amorfo.

Cuadro 5. Constantes espectroscópicas y espectrométricas del hastatósido

F.M	$\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{O}_{11}$
UV(Espectro26)	$\lambda_{\text{máx}}$ (MeOH), nm, 232
IR (Espectro 27):	$\nu_{\text{máx}}$. (pastilla) cm^{-1} : 3381, 2957, 2926, 1753, 1710, 1621, 1440, 1408, 1383, 1297, 1076, 932, 870, 853, 778, 686, 635.
RMN- ^1H (Espectro 28):	300 MHz, MeOD, δ : 7.70 (1H, s, H-3), 5.94 (1H, d, $J=1.8$ Hz, H-1), 4.62 (1H, d, $J=7.8$ Hz, H-1'), 3.91 (1H, dd, $J=11.85, 2.1$ Hz, $\text{H}_{\text{a}}-6'$), 3.67 (3H, s, O-Me), 3.66 (1H, dd, $J=12, 6.0$ Hz, $\text{H}_{\text{b}}-6'$), 3.36 (1H, dd, $J=14.8, 8.7$ Hz, H-5'), 3.34 (1H, m, H-3'), 3.26 (1H, m, H-4'), 3.18 (1H, dd, $J=9.15, 8.1$ Hz, H-2'), 2.74 (1H, dd, $J=18.4, 9.8$ Hz, $\text{H}_{\text{a}}-7$), 2.15 (1H, dd, $J=12, 4.2$ Hz, H-9), 2.01 (1H, m, H-8), 1.86 (1H, dd, $J=18.6, 9.8$ Hz, $\text{H}_{\text{b}}-7$) y 1.19 (3H, d, $J=6.3$ Hz H-10)
RMN- ^{13}C (Espectro 29):	300 MHz, MeOD, δ : 211.8 (C-6), 167.1 (C-11), 156.2 (C-3), 107.1 (C-4), 100.5 (C-1'), 94.6 (C-1), 78.4 (C-5'), 77.4 (C-3'), 74.5 (C-5), 74.1 (C-2'), 71.4 (C-4'), 62.5 (C-6'), 53.2 (C-9), 51.6 (O-Me), 41.0 (C-7), 27.0 (C-8), 19.8 (C-10).



6.4.4 Evaluación de la actividad antimicrobiana de los compuestos aislados

Los compuestos **7**, **8**, y **9** aislados fueron ensayados en cuanto a su potencial antimicrobiano con los microorganismos mencionados en la parte experimental.

Tabla 9. Evaluación de la CMI de los compuestos aislados

Compuesto probado	CMI (mg/mL)						
	Sa	Ef	Ec	St	Ca	Tm	Tr
Hispidulina (7)	0.100	>0.100	>0.100	>0.100	>0.100	0.012	0.012
Verbenalina (8)	0.100	0.100	>0.100	>0.100	>0.100	>0.100	>0.100
Hastatosido (9)	0.100	>0.100	>0.100	>0.100	>0.100	>0.100	>0.100
Gentamicina	0.002	0.002	0.004	0.004	NP	NP	NP
Miconazol	NP	NP	NP	NP	NP	0.004	0.004
Nistatina	NP	NP	NP	NP	0.008	NP	NP

NP. No probado

Sa: *Staphylococcus aureus*; **Ef:** *Enterococcus faecalis*; **Ec:** *Escherichia coli*; **St:** *Salmonella typhi*; **Ca:** *Candida albicans*; **Tm:** *Tricophyton mentagrophytes*; **Tr:** *Tricophyton rubrum*.

De acuerdo con la tabla 9, se aprecia que el flavonoide hispidulina resultó activó contra hongos dermatofitos, con un valor de CMI de 12 µg/mL, que podemos considerar como una buena actividad antifúngica y probablemente responsable de la actividad observada en el extracto íntegro.

Los resultados evidencian que los iridoides ensayados aparentemente no son muy activos frente a las bacterias y hongos probados excepto contra *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis* a una concentración de 100 µg/mL que es una concentración que se considera alta, lo cual sugiere que los iridoides como glucósidos, no tienen buena actividad antimicrobiana.



7. RESUMEN Y CONCLUSIONES

1. De las hojas y tallos de *Verbena carolina* L. se prepararon dos extractos orgánicos: diclorometánico y acetónico los cuales denotaron actividad inhibitoria para el crecimiento de bacterias Gram positivas y Gram negativas Gram (+) y Gram (-), así como en hongos levaduriformes y filamentosos representativos. Del fraccionamiento de estos extractos se obtuvieron y elucidaron las estructuras de ácidos grasos, dos iridoideas glicosilados, un flavonoide y un ácido triterpénico.
2. Ninguno de los extractos ensayados resultó ser activo contra el crustáceo *Artemia salina* Leach.
3. De la fracción FD-3 del fraccionamiento primario del extracto diclorometánico se identificaron los ésteres metílicos de los ácidos grasos: hexadecanoico (palmítico) **(1)**, octadecanoico (esteárico) **(2)**, (Z,Z) 9,12-octadecadienoico **(3)**, (Z,Z,Z) 9,12,15- octadecatrienoico **(4)** y eicosanoico (araquídico) **(5)**, los cuales presentaron actividad inhibitoria frente a hongos dermatofitos. A su vez, de la fracción primaria FD-13 se logró aislar un compuesto de naturaleza triterpénica, identificado como ácido ursólico **(6)**, el cual inhibió el crecimiento de *C. albicans* y *S. aureus*
4. El extracto *n*-butanólico permitió el aislamiento de la hispidulina **(7)** y la verbenalina **(8)** por métodos cromatográficos. El compuesto **7** resultó tener potencial antifúngico al inhibir el crecimiento de los hongos dermatofitos *Tricophyton mentagrophytes* y *Tricophyton rubrum* con valores de CMI de 12 µg/mL, mientras que el compuesto **8** aparentemente no es activo frente a las bacterias y hongos probados excepto contra *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis* a una concentración de 100 µg/mL que es una concentración que se considera alta.



5. Del fraccionamiento secundario realizado a partir de la fracción primaria FA-9 se aisló un compuesto de naturaleza iridoidal identificado como hastatósido (**9**), el cual al igual que la verbenalina (**8**) no tiene actividad alguna frente a las bacterias y hongos probados excepto contra *Staphylococcus aureus* a una concentración de 100 µg/mL que es una concentración que se considera alta.
6. El análisis químico y biológico de los tallos y hojas de la planta *Verbena carolina* L. permitió el aislamiento e identificación estructural de compuestos con potencial antimicrobiano y/o antifúngico que podrían validar el uso de la planta en la medicina tradicional mexicana.
7. De acuerdo a la literatura consultada, este trabajo constituye el primer estudio químico y biológico realizado a la planta medicinal *Verbena carolina* L.



8. PERSPECTIVAS

A lo largo del trabajo presentado se han puesto de manifiesto paralelamente otras líneas futuras de investigación principalmente relacionadas con los otros usos medicinales de la planta. A continuación se exponen las que más interesan y que están relacionadas con los aspectos tratados en esta tesis:

- Investigar la participación de los extractos de *V. carolina* sobre la contracción de las células de músculo liso uterino, en estudios *in vitro*.
- Evaluar la actividad antiinflamatoria de los iridoïdes aislados (verbenalina y hastatósido).
- Realizar pruebas de actividad antiparasitaria contra *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica* y *Trichomonas hominis*.
- Profundizar más en los estudios químicos y biológicos de la planta a fin de aislar y elucidar un mayor número de metabolitos secundarios que pudieran resultar benéficos para la salud del ser humano.
- Debido al uso elevado de *V. carolina* en México y al potencial de actividades biológicas descritas, la prospección de la planta en el país es una necesidad con vistas a desarrollar medicamentos herbolarios.

**9. BIBLIOGRAFÍA**

- Anderson, J.E., Gotees, C. M., McLaughlin, J.L. (1991). "A Blind Comparison of Simple Bench-top Bioassays and Human Tumor Cell Citotoxicities as Antitumor Prescreens". *Phytochemical Analysis*. 2: 107-111
- Ardakani, M., Mosaddegh, M., Shafaati, A. (2003). "Volatile Constituents from the Aerial Parts of *Verbena Officinalis* L. (Vervain)". *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*. pp. 39-42
- Beyra Á., León M., Iglesias E. (2004). "Estudios etnobotánicos sobre plantas medicinales en la provincia de Camagûey (Cuba)". *Anales del Jardín Botánico de Madrid*. 61(2): 185-204
- Bilia, A.R., Giomi, M., Innocenti, M., Gallori, S., Vincieri, F.F. (2007). "HPLC-DAD-ESI-MS análisis of the constituents of aqueous preparations of verbena and lemon verbena and evaluation of the antioxidant activity". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 46: 463-470
- Büchi, G., Manning, R.E. (1962). "Constitution of Verbenalin". *Tetrahedrom*. 18: 1049-1059.
- Calvo, M.I., Julian, A., Fernández, M. (1997). "Identification of the Major Compounds in Extracts of *Verbena officinalis* L. (Verbenaceae) by HPLC with Post-Column Derivatization". *Chromatographia*. 46: 241-244
- Casanova, E., García-Mina, J.M., Calvo, M.I. (2008). "Antioxidant and Antifungal Activity of *Verbena officinalis* L. Leaves". *Plant Foods Hum Nutr*. 63: 93-97



- Cheng-Shan, Y., Qi, Z., Wei-Dong, X., Xiu-Ping, Y., Zhong-Jian, J. (2003). "Iridoids from *Pedicularis kansuensis* forma *albiflora*" *Pharmazie*. 58: 428-430.

- Deepak, M., Handa, S. (2000). "Quantitative Determination of the Major Constituents of *Verbena officinalis* using High Performance Thin Layer Chromatography and High Pressure Liquid Chromatography". *Phytochemical Analysis*. 11: 351-355

- Dinda, B., Debnath, S., Harigaya, Y. (2007). "Naturally Occurring Iridoids. A Review, Part 1". *Chem. Pharm. Bull.* 55(2):159-222

- El-Naggar, J., Beal, L. (1980). "Iridoids. A review". *Journal of Natural Products*. 43: 649-707

- Farrugia, L. J. (1997). "ORTEP-3 for Windows - a version of ORTEP-III with a Graphical User Interface (GUI)". *J. Appl. Cryst.* 30: 565.

- Farrugia, L. J. (1999): "WinGX suite for small molecule single-crystal crystallography". *J. Appl. Cryst.*, 32: 837-838

- Franke, A., Rimpler, H. (1987). "Vebraside, an iridoid glucoside from *Verbena brasiliensis*". *Phytochemistry*. 11: 3015-3020

- Fukuyama, Y., Minoshima, Y., Kishimoto, Y., Chen, I., Takahashi, H., Esumi, T. (2004). "Iridoid glucosides and *p*-coumaroyl iridoids from *Viburnum luzonicum* and their cytotoxicity". *J. Nat. Prod.* 67: 1833-1838.

- Gamboa, C., Castro, O. (2004). "Iridoids from the aerial parts of *Verbena littoralis* (Verbenaceae)". *Phytochemistry*. 65: 2369-2372



- Jensen, S.R. (1992). "Systematic implications of the distribution of iridoids and other chemical compounds in the Loganiaceae and other families of the Asteridae". *Ann. Missouri Bot. Gard.* 79: 284–302.
- Juárez A. (2008). Gaceta UNAM, Ciudad Universitaria, México, 1 de diciembre de 2008, pp. 9
- Küpeli, E., Harput, U.S., Varel, M., Yesilada, E., Saracoglu, I. (2005). "Bioassay-guided isolation of iridoid glucosides with antinociceptive and anti-inflammatory activities from *Veronica anagallis-aquatica* L. *Journal of Ethnopharmacology* 102: 170-176.
- Li, Y., Matsunaga, K., Kato, R., Ohizumi, Y. (2001). "Verbenachalcone, a Novel Dimeric Dihydrochalcone with Potentiating Activity on Nerve Growth Factor-Action from *Verbena littoralis*". *J. Nat. Prod.* 64(6): 806-808
- Lozoya L. (1989). "La medicina tradicional en la realidad político-social de México". Revista de difusión. IMSS, México, pp. 27-33.
- Márquez, A.C., F. Lara O., B. Esquivel R., R. Mata E. (1999). "Plantas medicinales de México II. Composición, usos y actividad biológica". Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.
- Mata, R. (2000). "Curso Teórico de Farmacognosia", 2ª versión. Facultad de Química, UNAM. México. p. 11.
- Meyer, B., Ferrigni, N., Putnam, J., Jacobsen, L., Nichols, D., McLaughlin, J. (1982). "Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents". *Planta Medica.* 45: 31-34



- McLaughlin, J., Chang, C., Smith, D. (1991). "Bench-top bioassay for the discovery of bioactive natural products: an update". *Studies in Natural Products Chemistry* 9: 383-409.
- Müller, A., Ganzera, M., Stuppner, H. (2004). "Analysis of the Aerial Parts of *Verbena officinalis* L. by Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography". *Chromatographia*. 60: 193-197
- O'Leary, N., Múlgura M., Morrone O. (2007) "Filogenia del género *Verbena* (Verbenaceae) basada en caracteres morfológicos". *Darwiniana* 45: 103-105
- O'Leary, N., Múlgura M., Morrone O. (2007). "Revisión Taxonómica de las especies del género *Verbena* (Verbenaceae): Serie *Pachystachyae*". *Ann. Missouri Bot. Gard.* 94: 571-62
- Ono, M., Oishi, K., Abe, H., Masuoka, C., Okawa, M., Ikeda, T., Nohara, T. (2006). "New Iridoid Glucosides from the Aerial Parts of *Verbena brasiliensis*". *Chem. Pharm. Bull.* 54(10): 1421-1424
- Peñuelas, J., Sardans, J., Stefanescu, C., Parella, T., Filella, I. (2006). "*Lonicera Implexa* Leaves Bearing Naturally Laid Eggs of the Specialist Herbivore *Euphydryas Aurinia* have Dramatically Greater Concentrations of Iridoid Glycosides than other Leaves". *J. Chem. Ecol.* 32: 1925-1933.
- Perozzi, L., Álvarez, R., Camargo, Ma. E. (2007). "Probable efecto hepatoprotector de la verbena en la hepatitis inducida con tetracloruro de carbono en la rata". *Rev Mex de Ciencias Farmacéuticas.* 38: 19-25



- Rajnikant, Madan Lal, Gupta, V.K., Singh, A., Suri, O.P. (1998). "Crystal Structure of 1 α -(β -D-Glucopyranosyloxy)-1,4 $\alpha\alpha$,5,6,7,7 $\alpha\alpha$ -Hexahydro-7 α -Methyl-5-Oxocyclopenta[c]pyran-4-Carboxylic Acid Methyl Ester (Verbenalin)". *Crystallography Reports*. 43(3): 487-492

- Rzedowski, J., Rzedowski, G. C. (2002). "Verbena". *Flora del Bajío y de Regiones Adyacentes*. Fasc. 100. Instituto de Ecología. Centro Regional del Bajío, México. pp. 118-139.

- Sampaio-Santos, M., Kaplan, C. (2001). "Biosynthesis Significance of Iridoids in Chemosystematics". *J. Braz. Chem. Soc.* Vol. 12, No. 2, pp. 144-153

- Sheldrick, G. M. (1997). *SHELXS97* and *SHELXL97*. University of Göttingen, Germany.

- Shriner, R., Fuson, R., Curtin, D. (1997). "Identificación Sistemática de Compuestos Orgánicos". Edit. Limusa, México. p. 269.

- Stahl, E., Schorn, P.J. (1965). "Thin Layer Chromatography-A Laboratory Handbook". Edit. E. Stahl., p. 384, Berlin

- Su, B.N., Pawlus, A.D., Jung, H.A., Séller, W.J., McLaughlin, J.L., Kinghorn, A.D. (2005). "Chemical constituents of the fruits of *Morinda citrifolia* (Noni) and their antioxidant activity". *J. Nat. Prod.* 68(4): 592-595.

- Sutton, L.E. (1965). "Tables of Interatomic Distances and Configuration in Molecules and Ions". (Supplement). *The Chemical Society*, London.

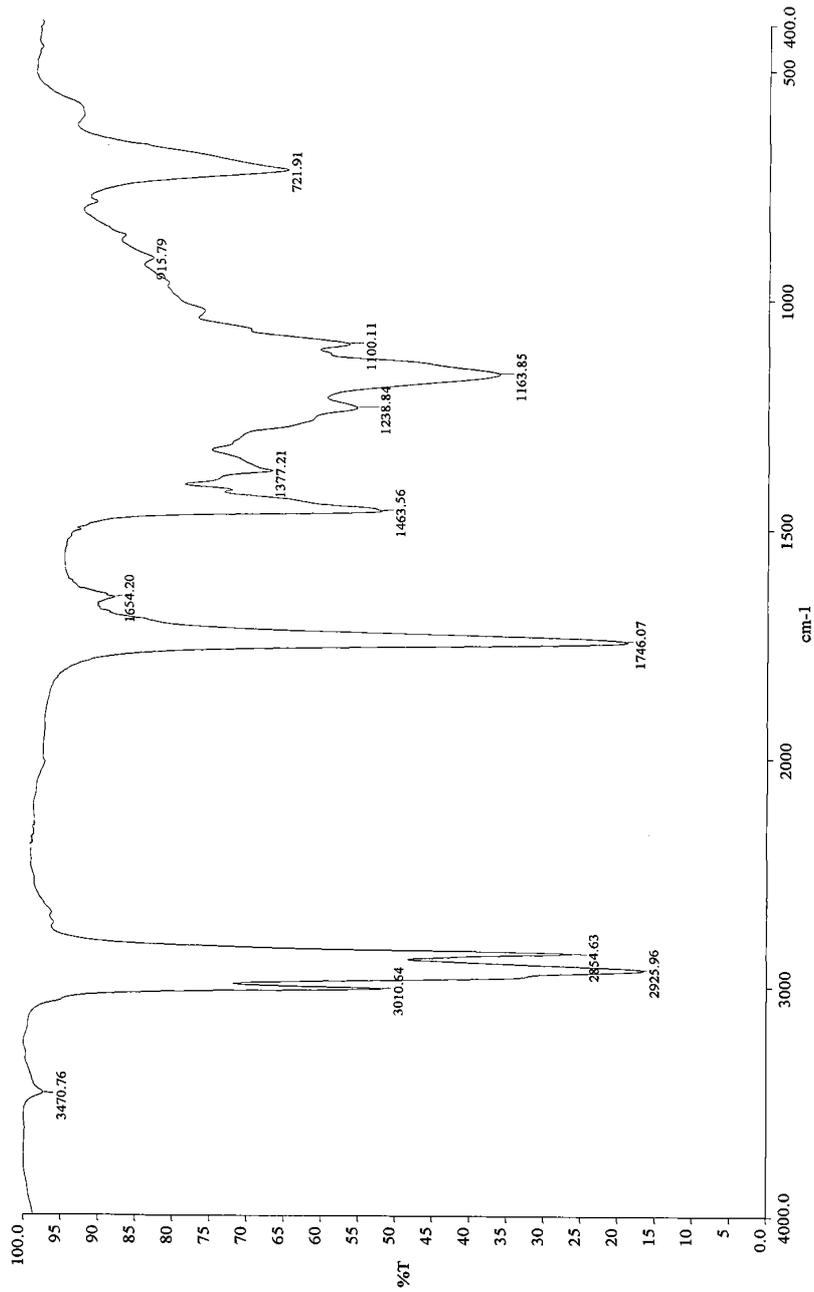


- Teng, W.S. (1993). "Bioactive Natural Products: Toxicity Testing Using the Brine Shrimp: *Artemia salina*". Edit. S. M. Colegate and R. J. Molyneaux, CRC Press, INC. E.U.A. pp. 441-457.
- Umaña, E., Castro, O. (1990). "Chemical Constituents of *Verbena littoralis*". *Int. J. Crude Drug Res.* 3: 175-176
- Valento, P., Andrade, P., Areias, F., Ferreres, F., Seabra, R. (1999). "Análisis of Vervain Flavonoids by HPLC/Diode Array Detector Method. Its Application to Quality Control". *J. Agric. Food Chem.* 47: 4579-4582
- Villaseñor. M. (2007). "Bioactivities of Iridoids". *Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry.* 6: 307-314
- Wang, Y., Wei, Q., Yang, Li., Liu, Z.L. (2003). "Iridoid glucosides from Chinese herb *Lonicera chrysantha* and their antitumor activity". *Journal of Chemical Research.* 10: 676-677
- Integrated Taxonomic Information System en : <http://www.itis.gov/>

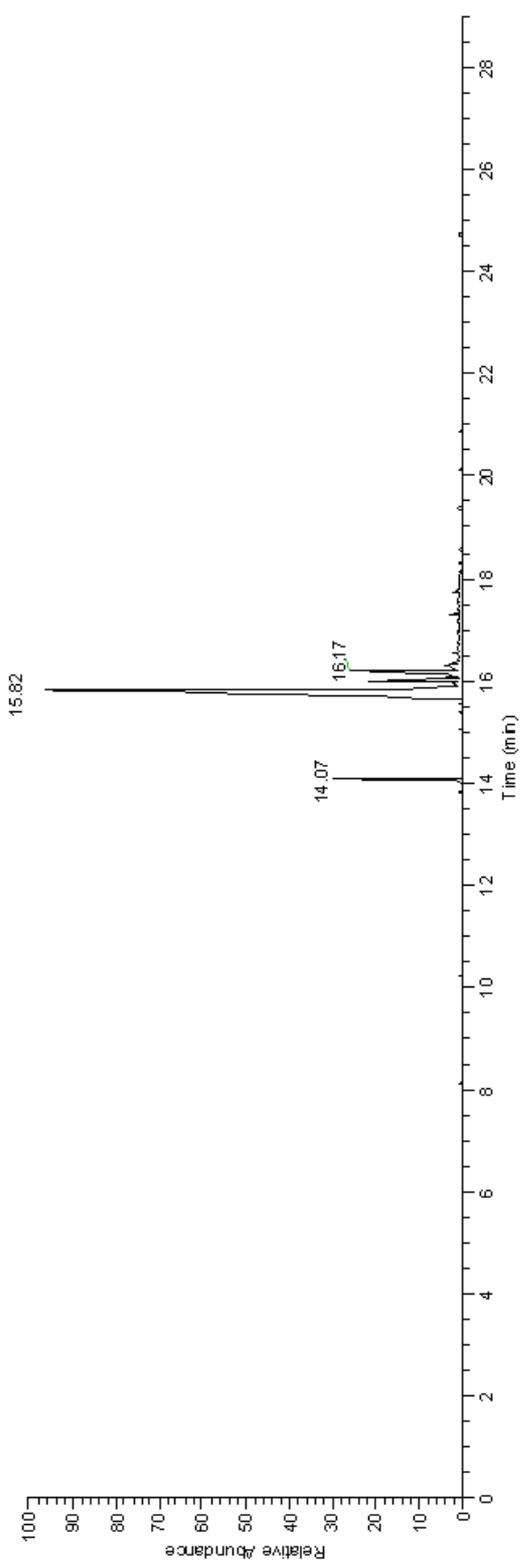


10. ANEXOS

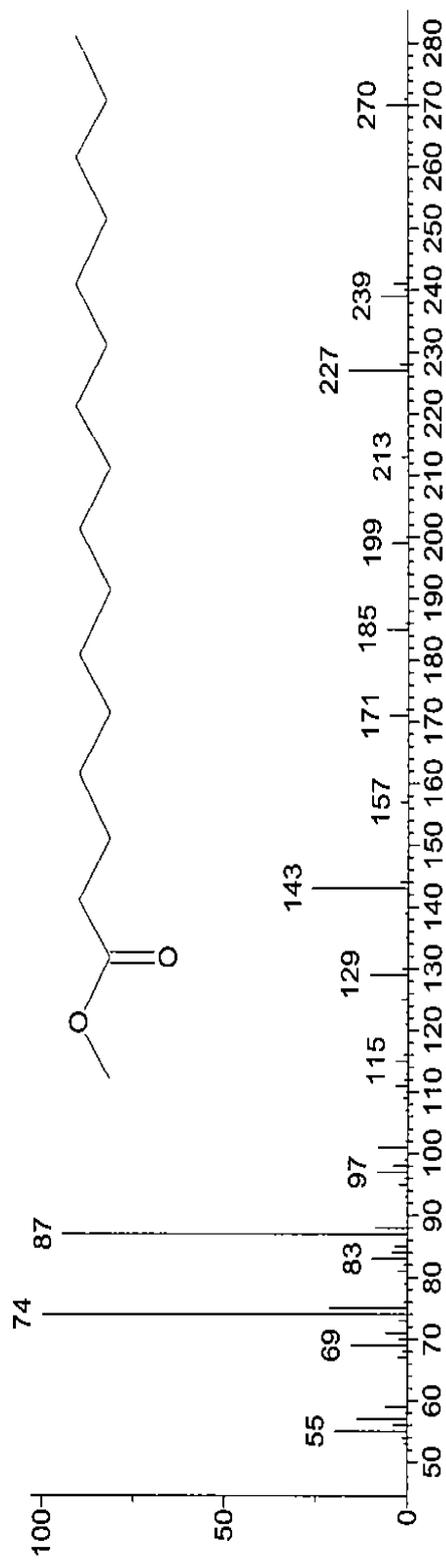
A-1. Espectros



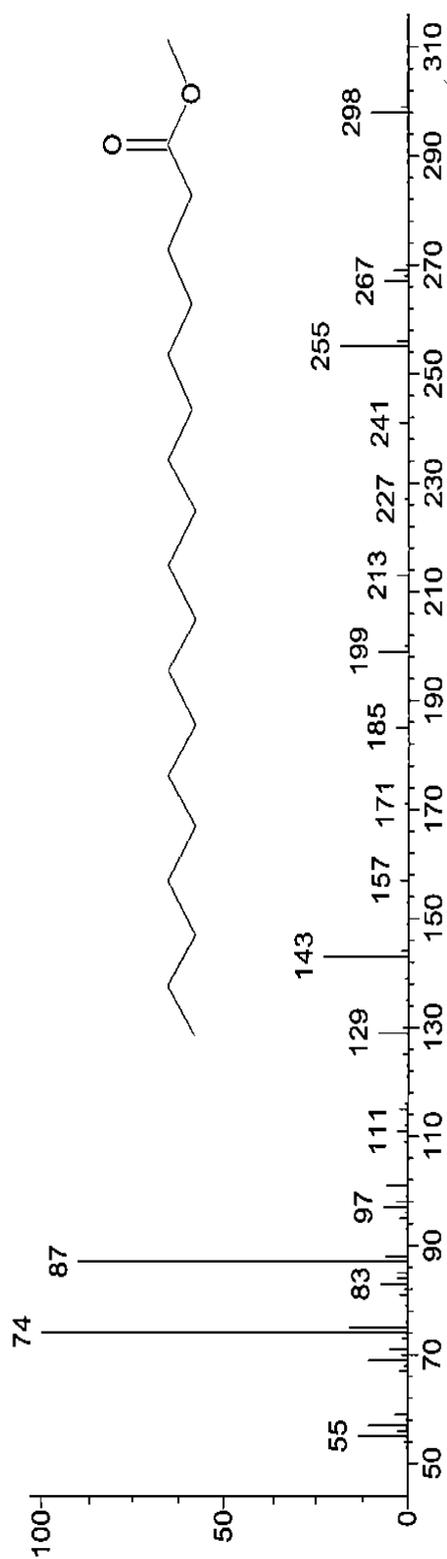
Espectro 1. Espectro de IR de la mezcla constituida por los ésteres de los ácidos grasos: Hexadecanoico (palmitico) (1), Octadecanoico (2), (Z,Z) 9,12- octadecadienoico (3), (Z,Z,Z) 9,12,15- octadecatrienoico (4) y eicosanoico (araquidico) (5).



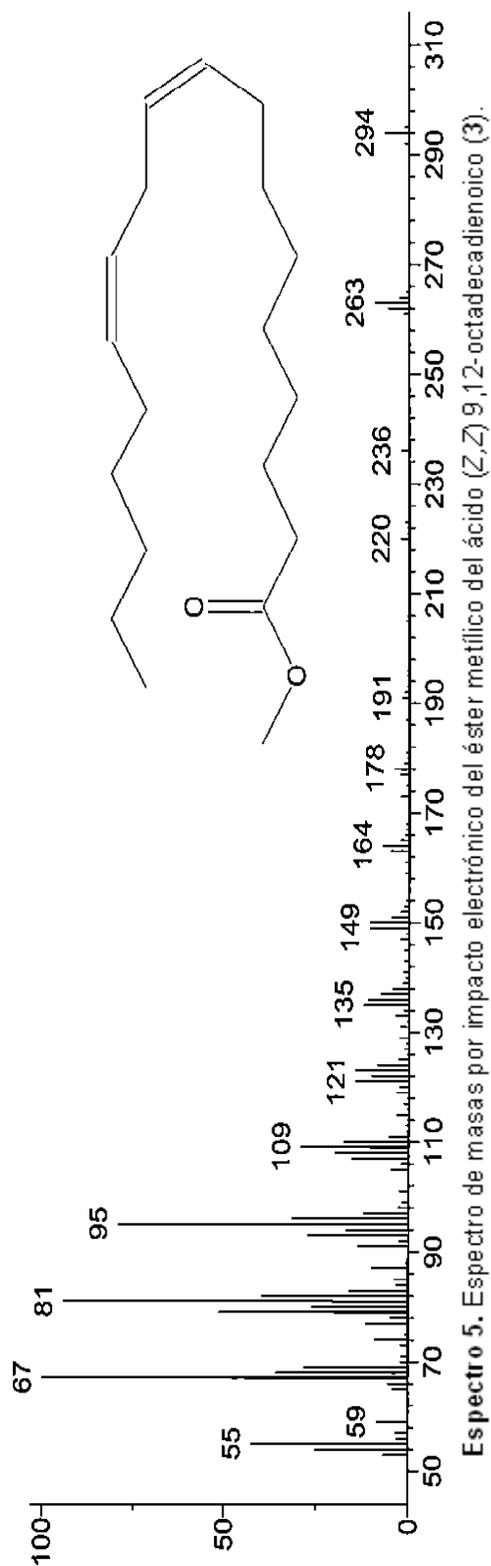
Espectro 2. Cromatograma de gases de la mezcla constituida por los ésteres de los ácidos grasos: Hexadecanoico (1), Octadecanoico (2), (Z,Z) 9,12-octadecadienoico (3), (Z,Z,Z) 9,12,15-octadecatrienoico (4) y Eicosanoico (5).



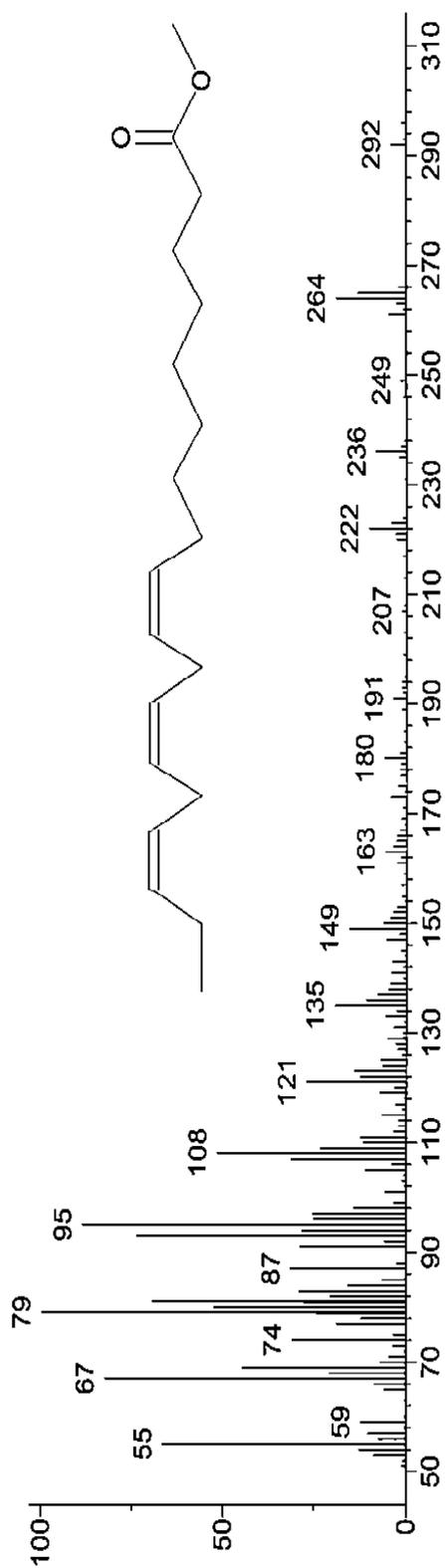
Espectro 3. Espectro de masas por impacto electrónico del éster metílico del ácido hexadecanoico (palmitico) (1).



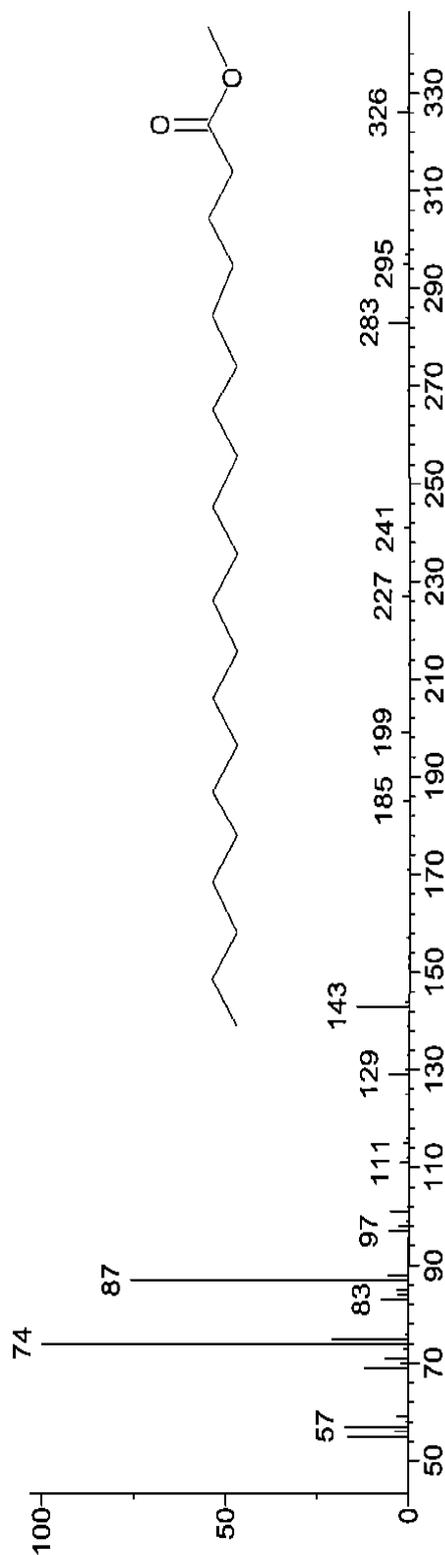
Espectro 4. Espectro de masas por impacto electrónico del éster metílico del ácido octadecanoico (esteárico) (2).



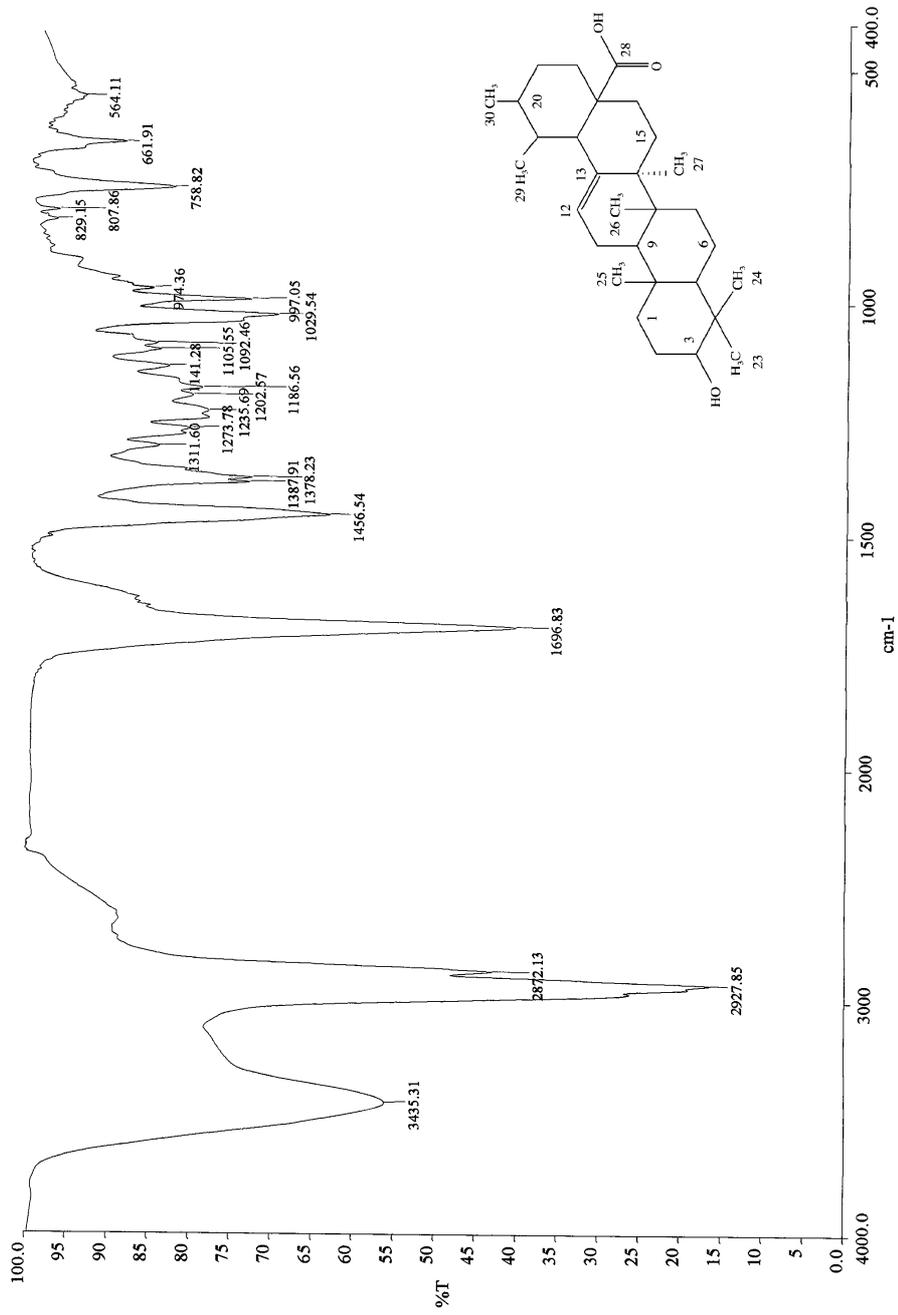
Espectro 5. Espectro de masas por impacto electrónico del éster metílico del ácido (Z,Z)-9,12-octadecadienoico (3).



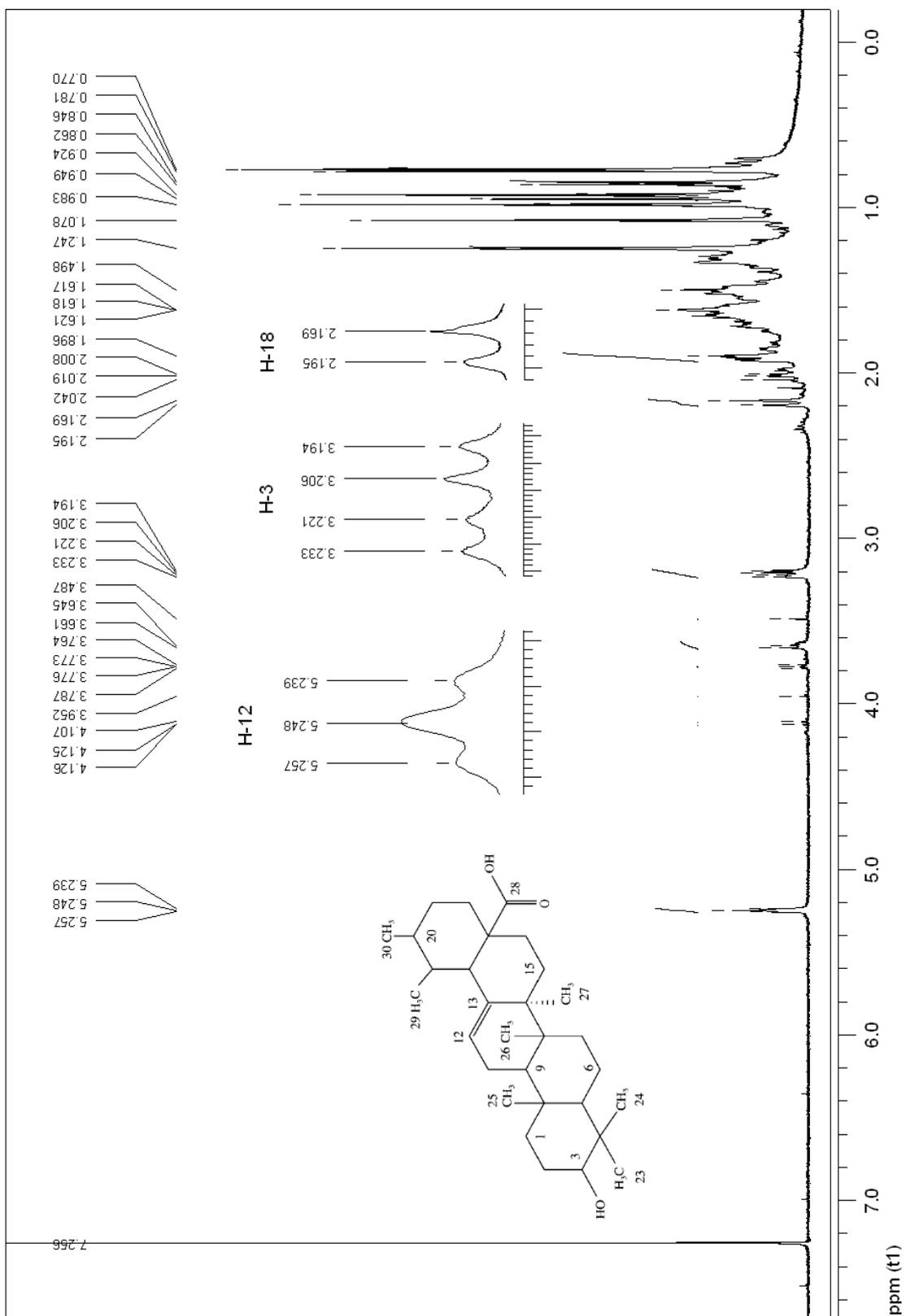
Espectro 6. Espectro de masas por impacto electrónico del éster metílico del ácido (Z,Z,Z) 9,12,15-octadecatrienoico (4).

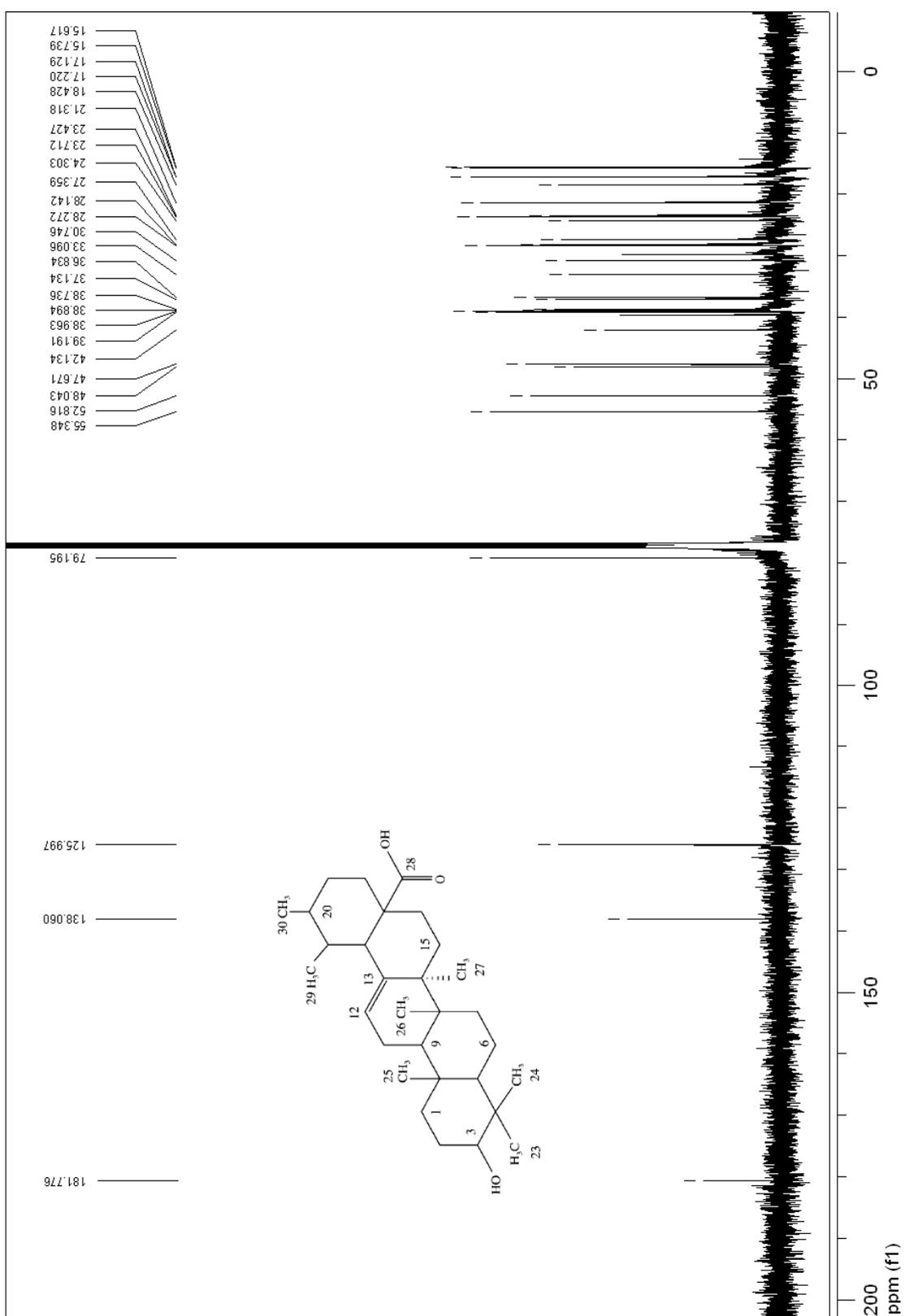


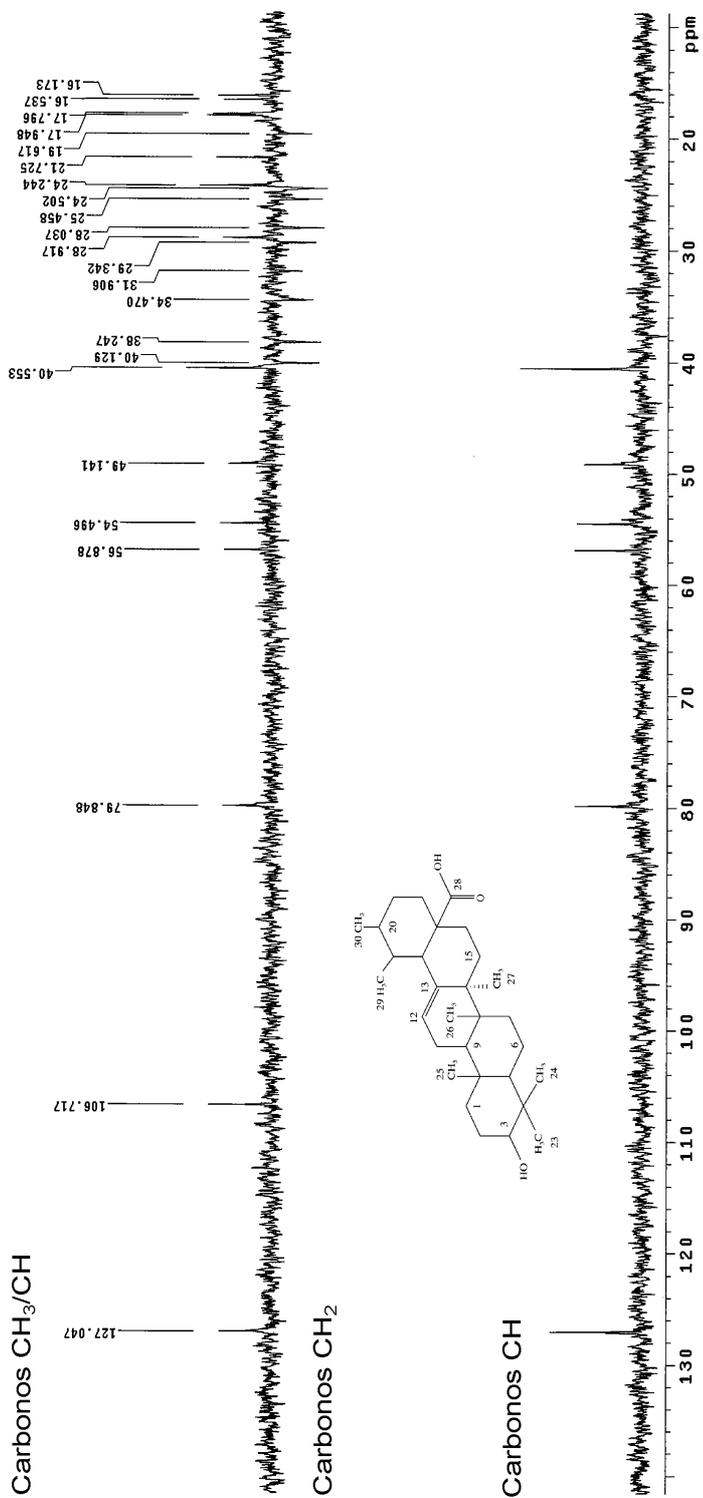
Espectro 7. Espectro de masas por impacto electrónico del éster metílico del ácido eicosanoico (araquídico) (5).



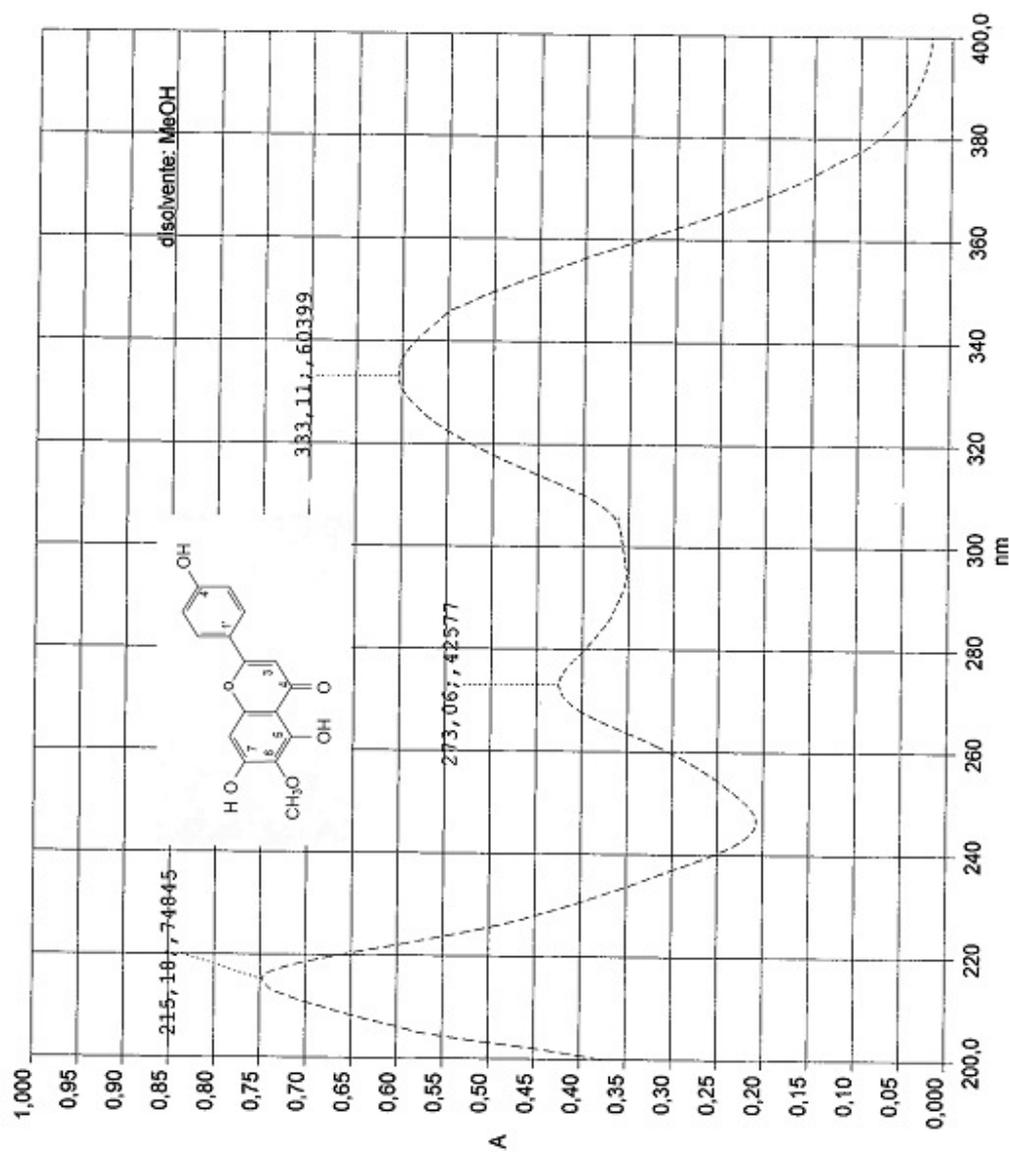
Espectro 8. Espectro de IR del ácido ursólico (6).



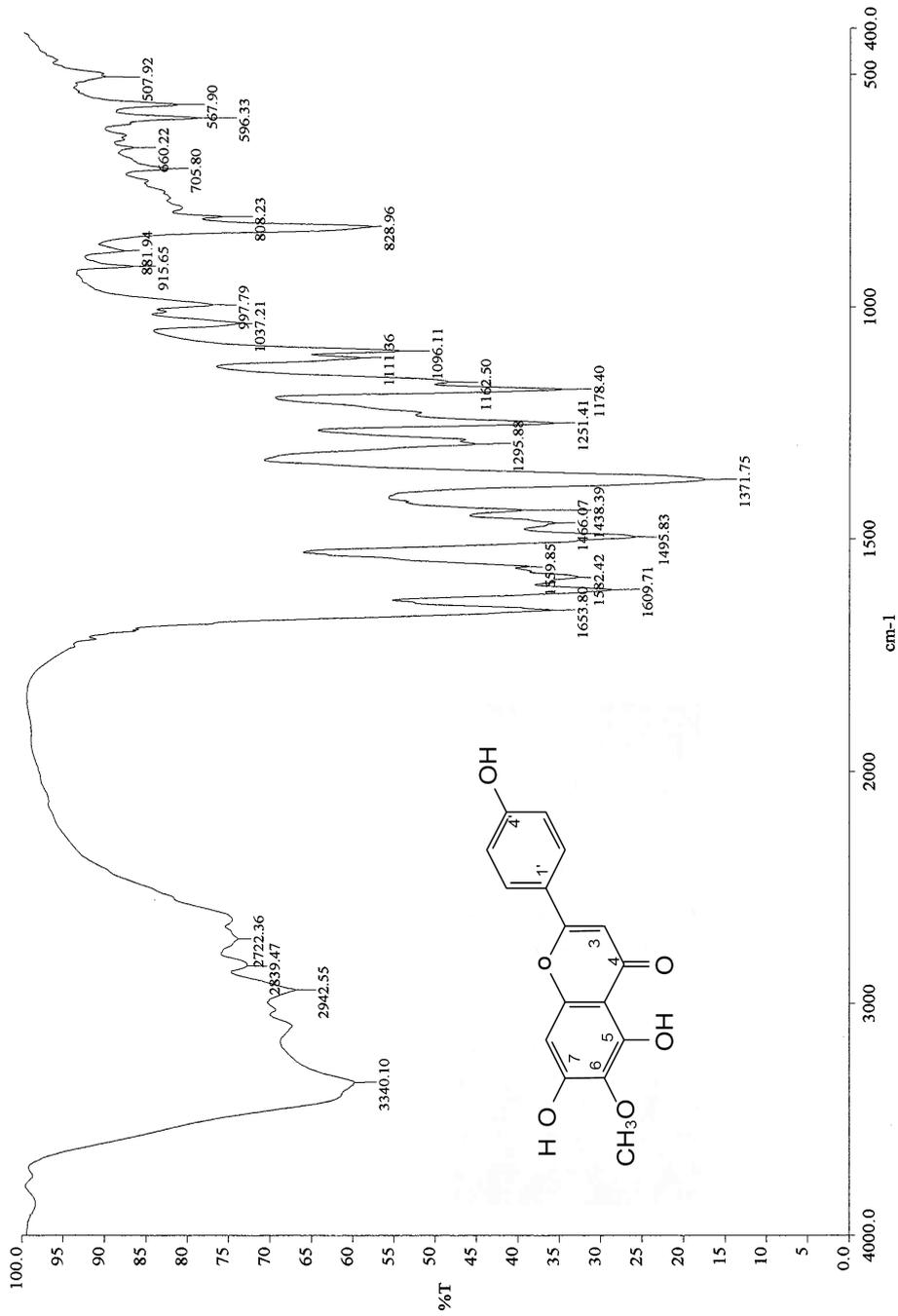




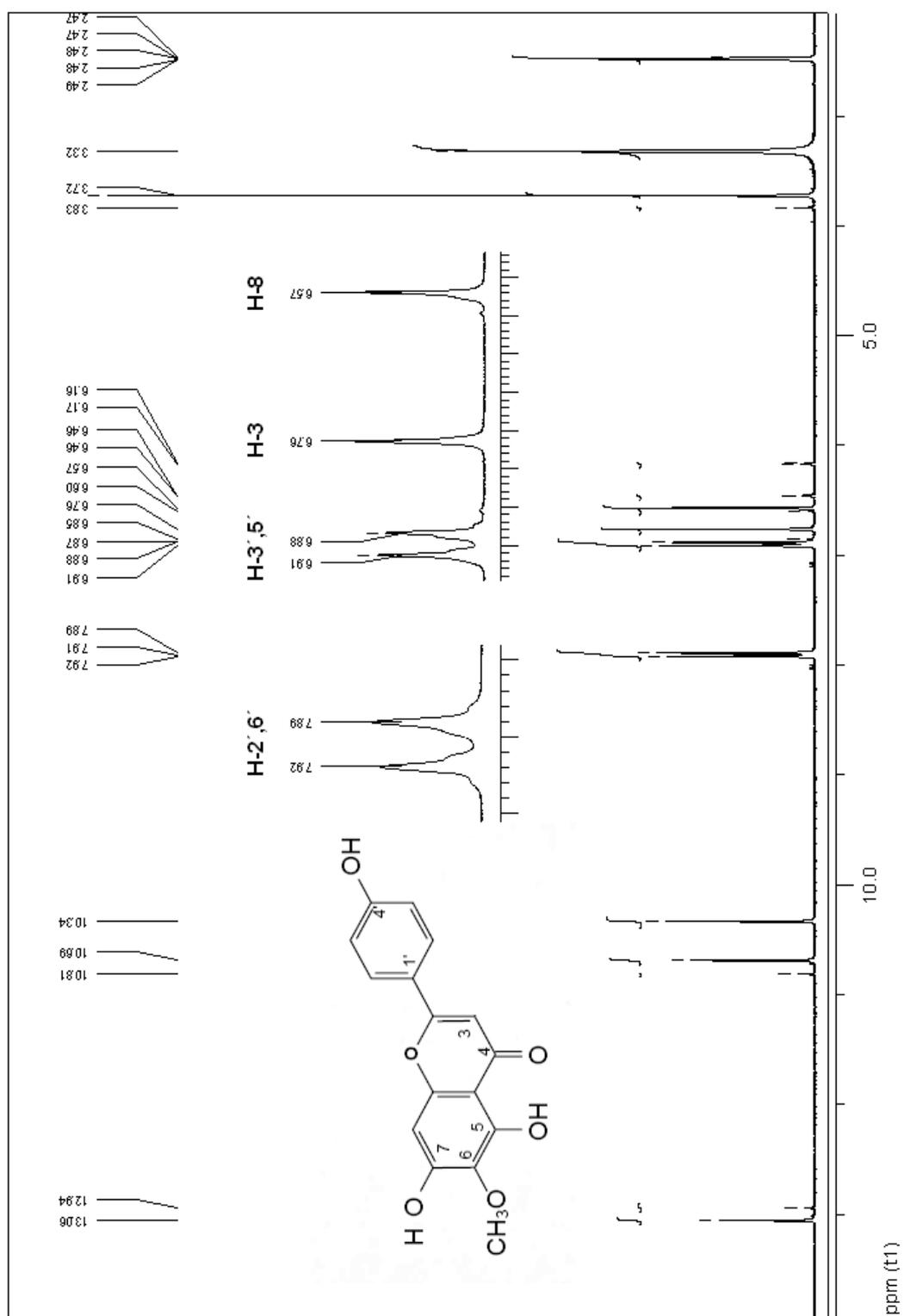
Espectro 11. Espectro en modalidad DEPT (200 MHz, CDCl_3) del ácido ursólico (6).



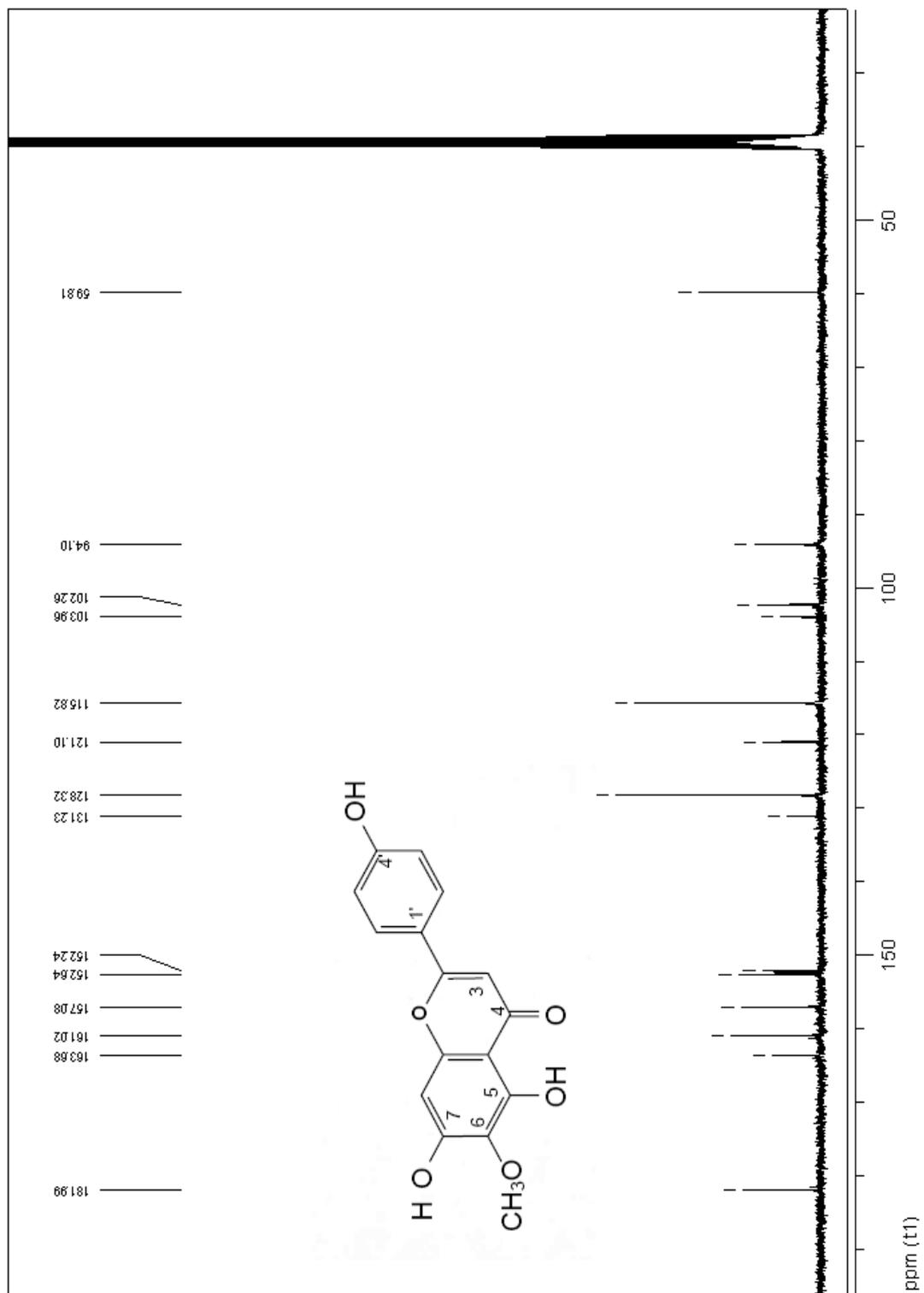
Espectro 12. Espectro en el UV de la hispidulina (7).



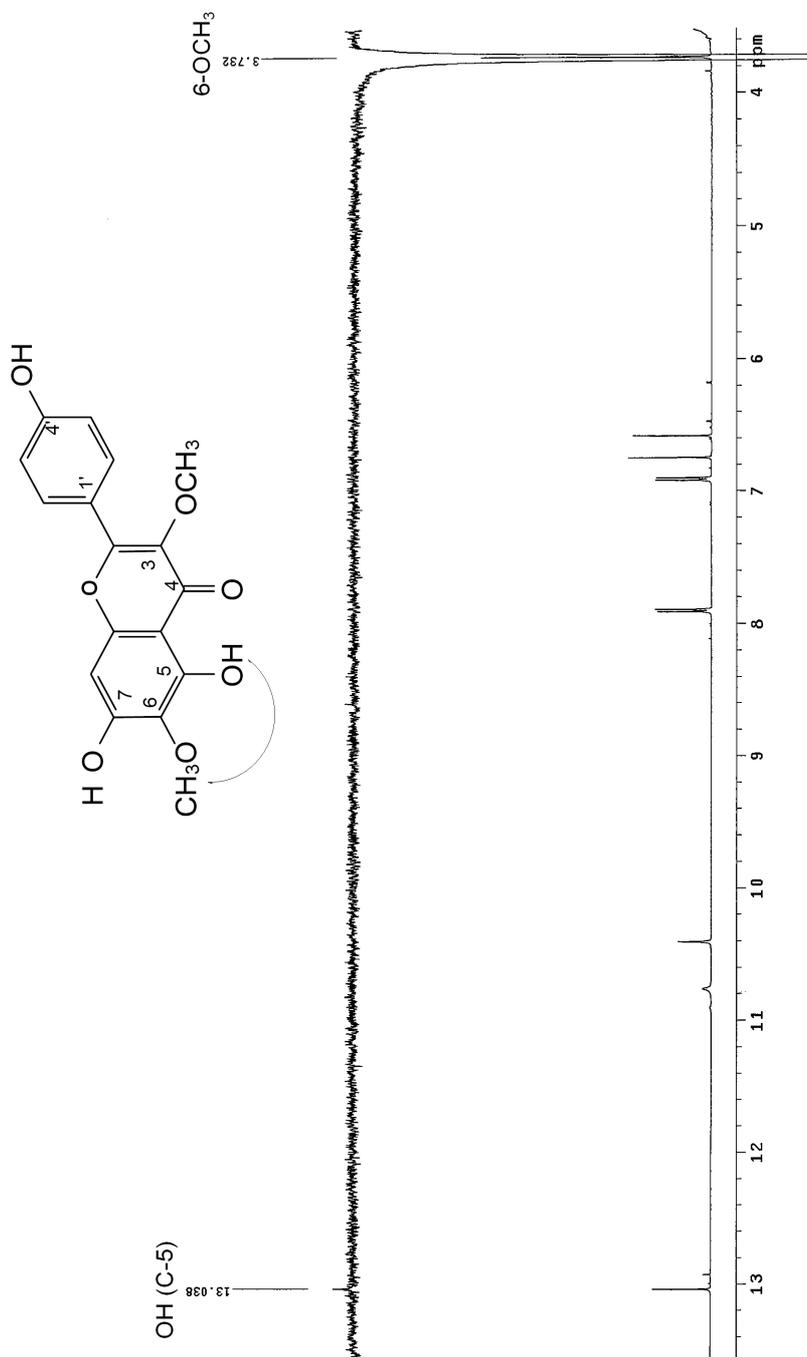
Espectro 13. Espectro de IR de la hispidulina (7).



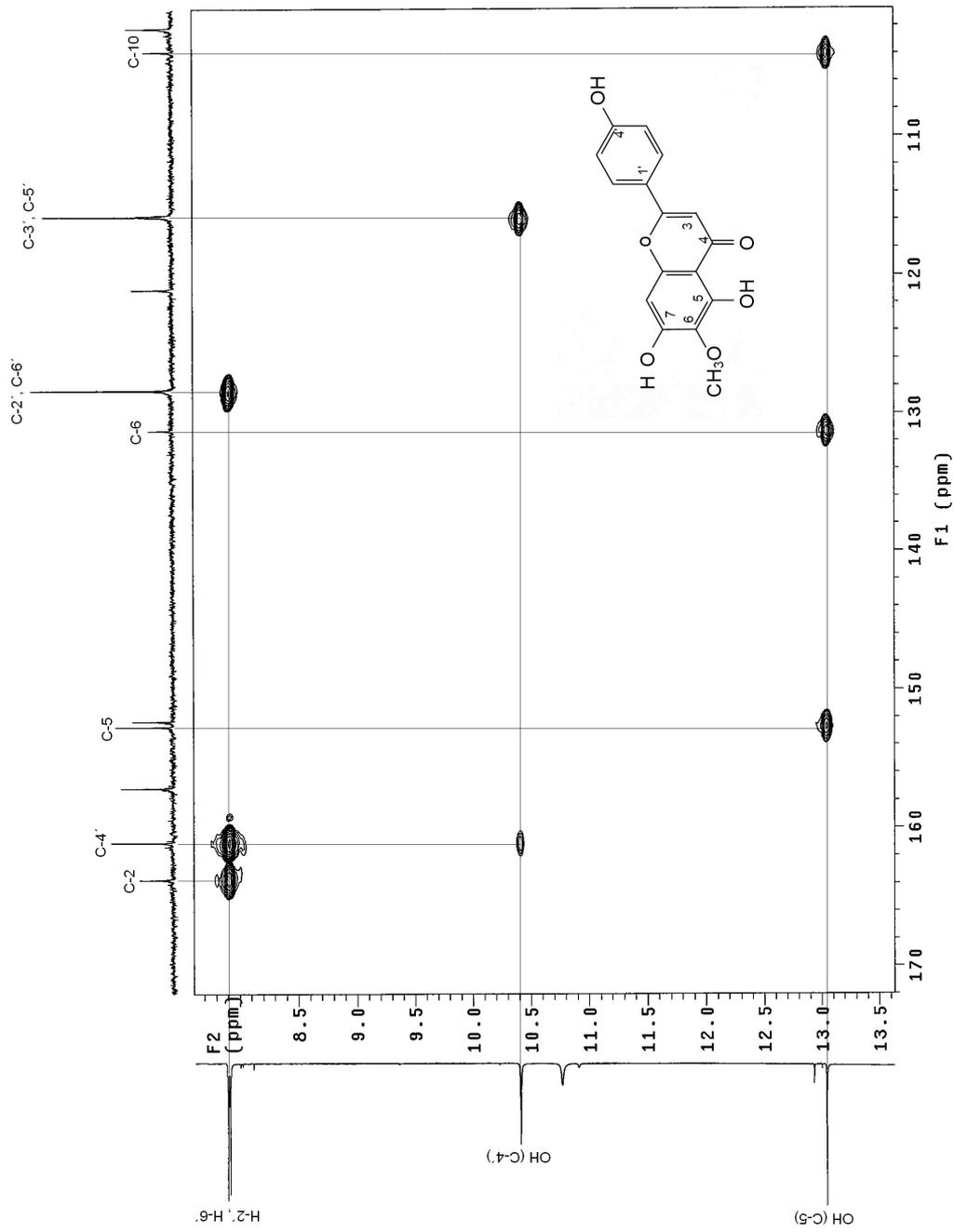
Espectro 14. Espectro de RMN- ^1H (500 MHz, DMSO-d_6) de la hispidulina (7).



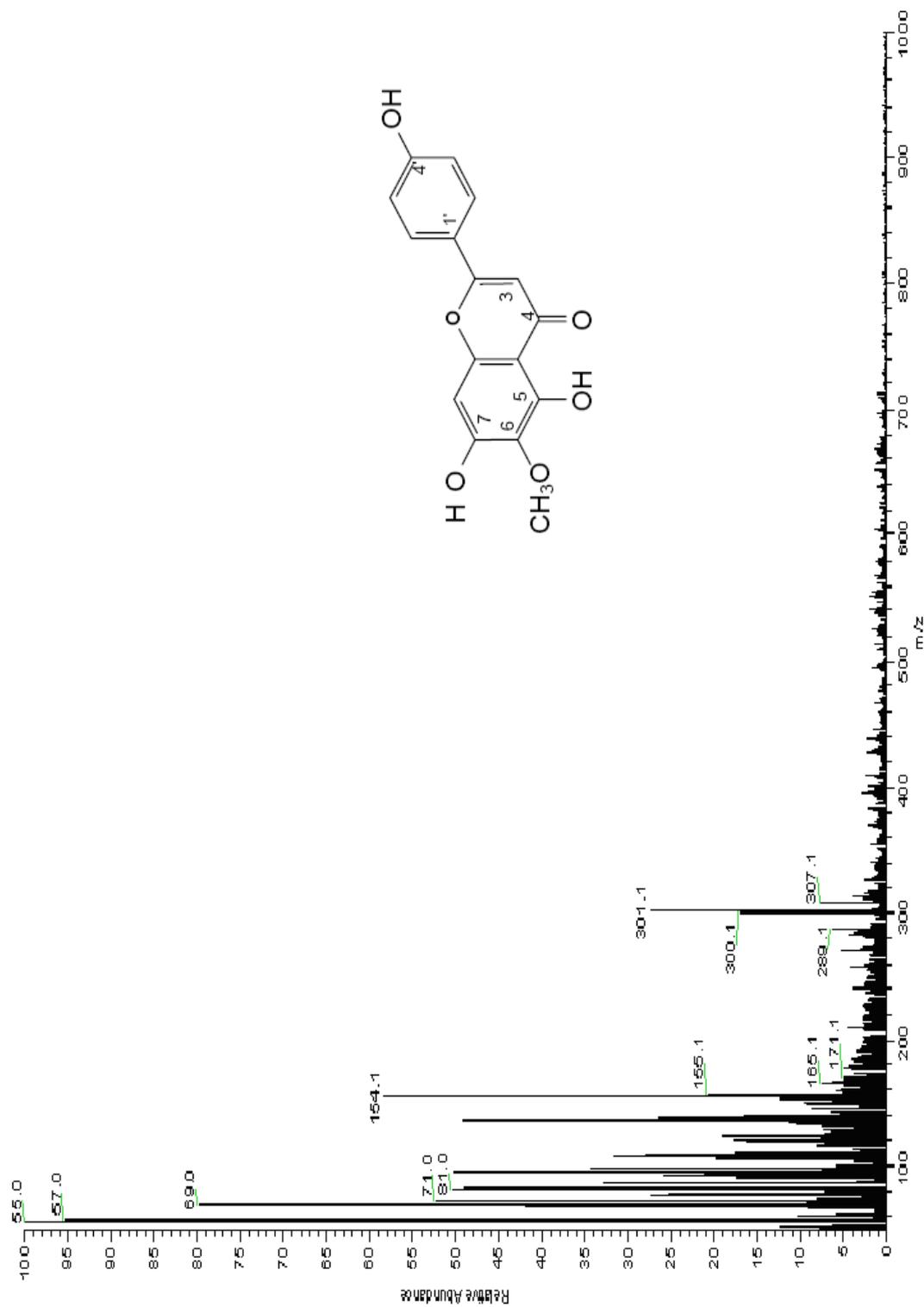
Espectro 15. Espectro de RMN-¹³C (300 MHz, DMSO-d₆) de la hispidulina (7).



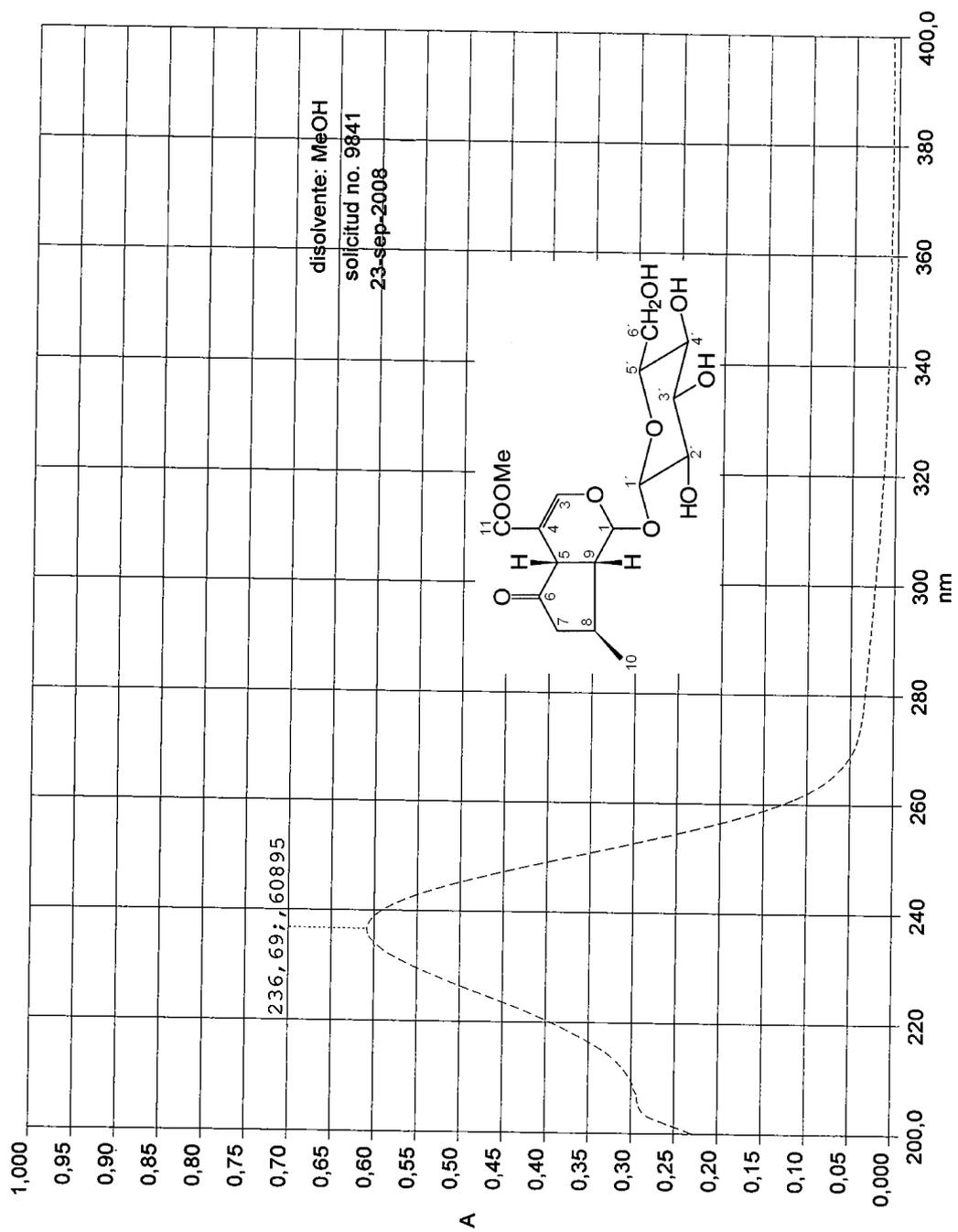
Espectro 16. Espectro de RMN-1H (500 MHz, DMSO-d₆) modalidad NOESY-1D de la hispidulina (7).



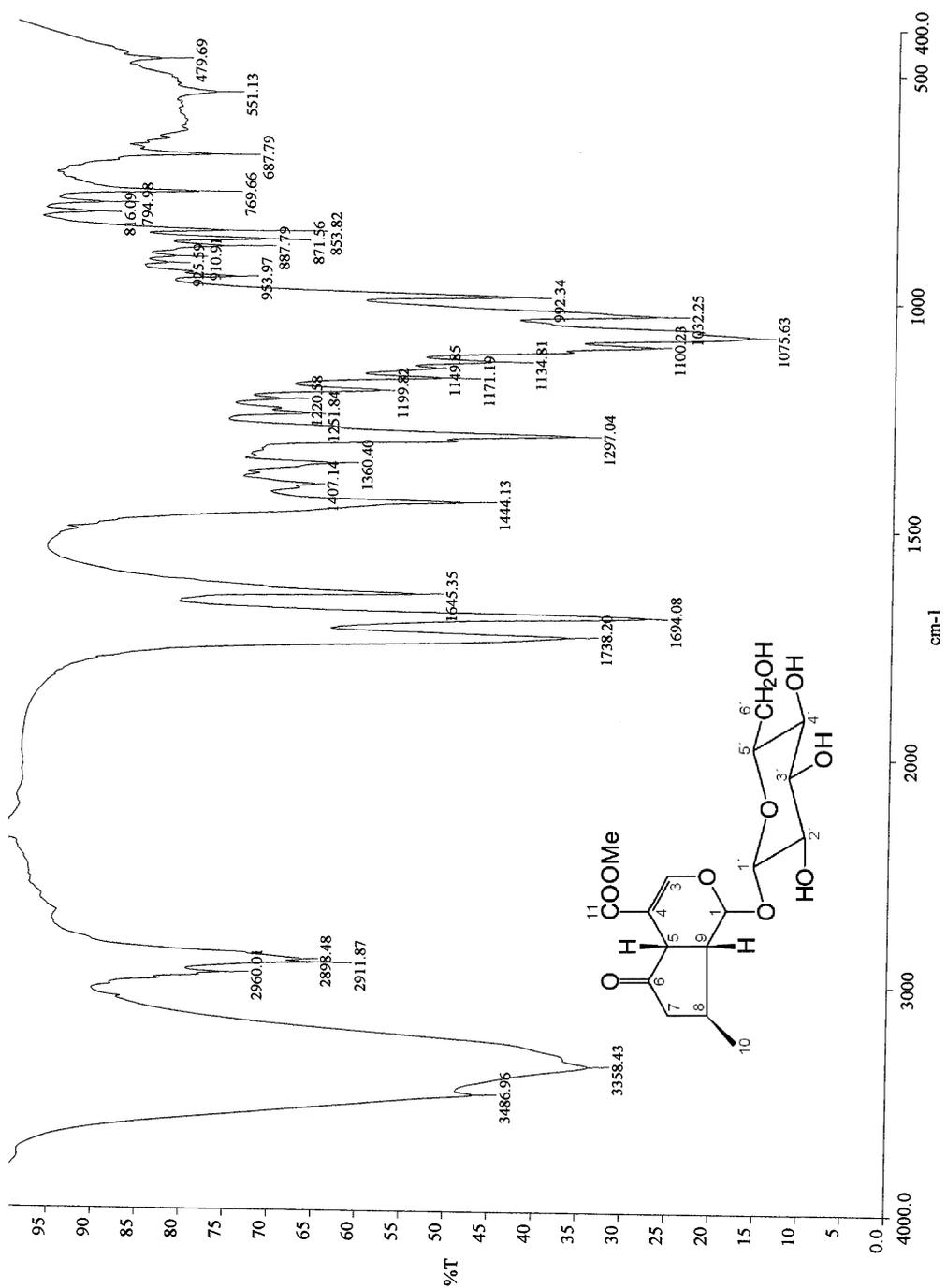
Espectro 17. Espectro de RMN-1H (500 MHz, DMSO-d₆) modalidad HMBC de la hispidulina (7).



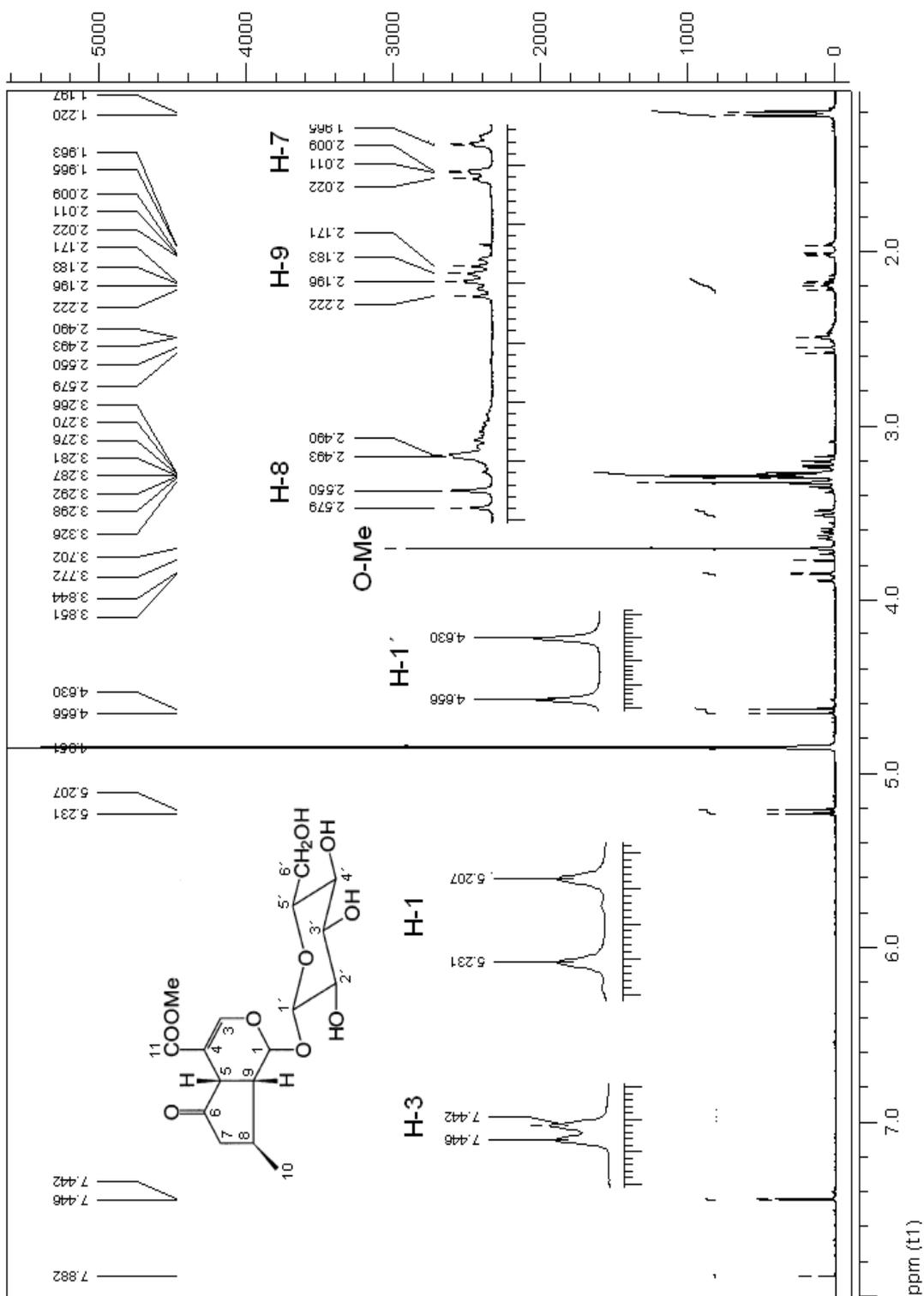
Espectro 18. Espectro de masas modalidad FAB⁺ de la hispidulina (7)

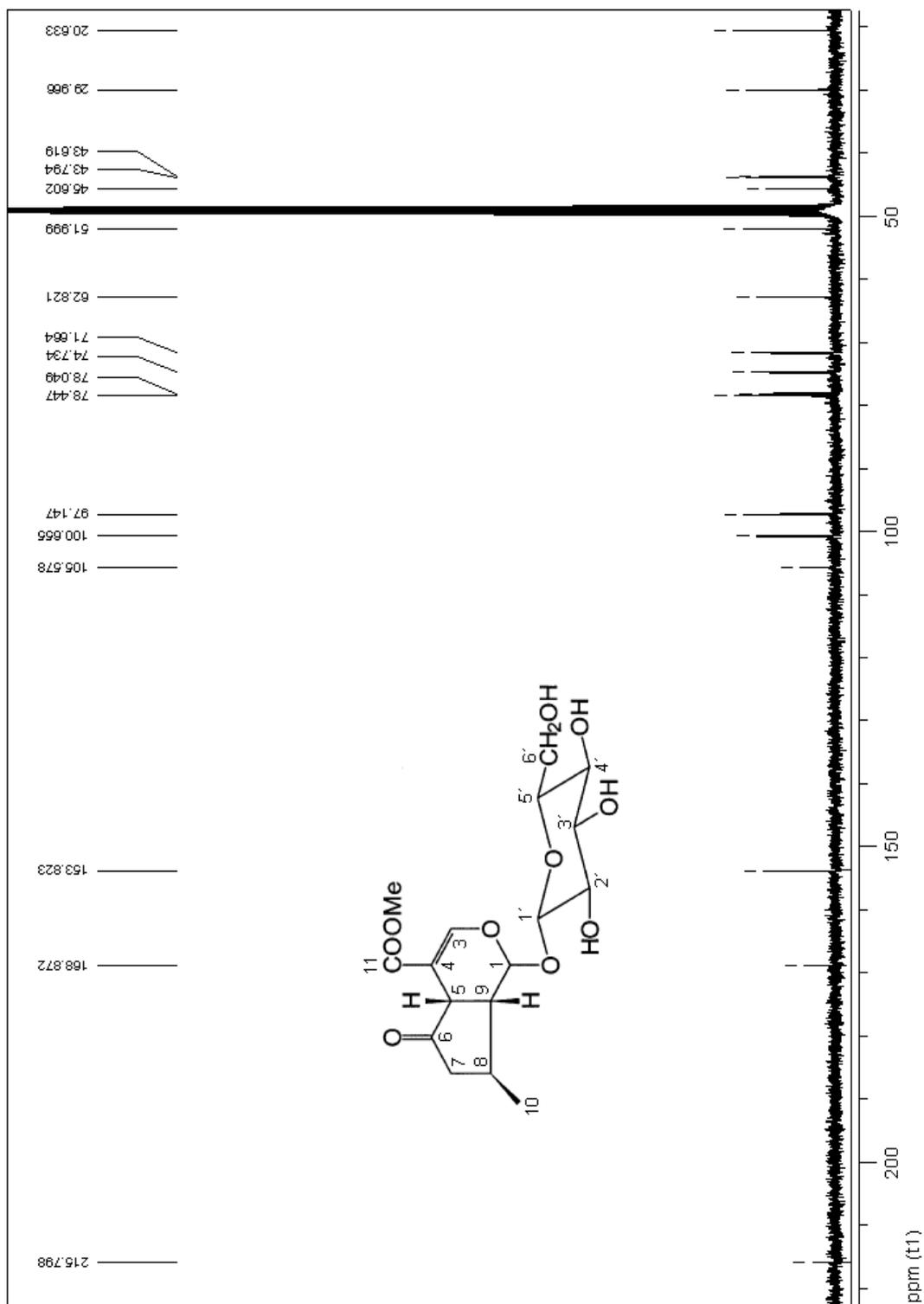


Espectro 19. Espectro en el UV de la verbenalina (8)

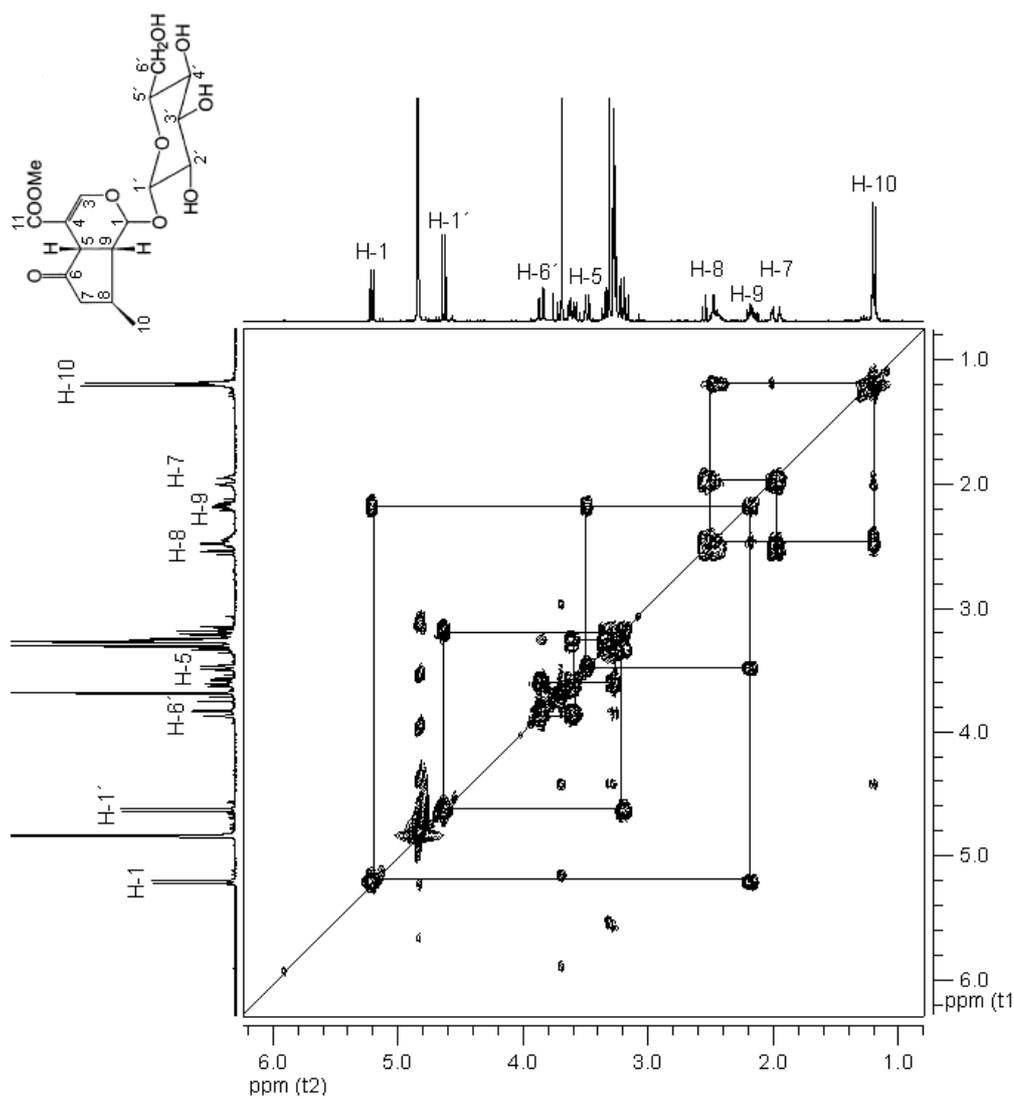


Espectro 20. Espectro de IR de la verbenaquina (8).

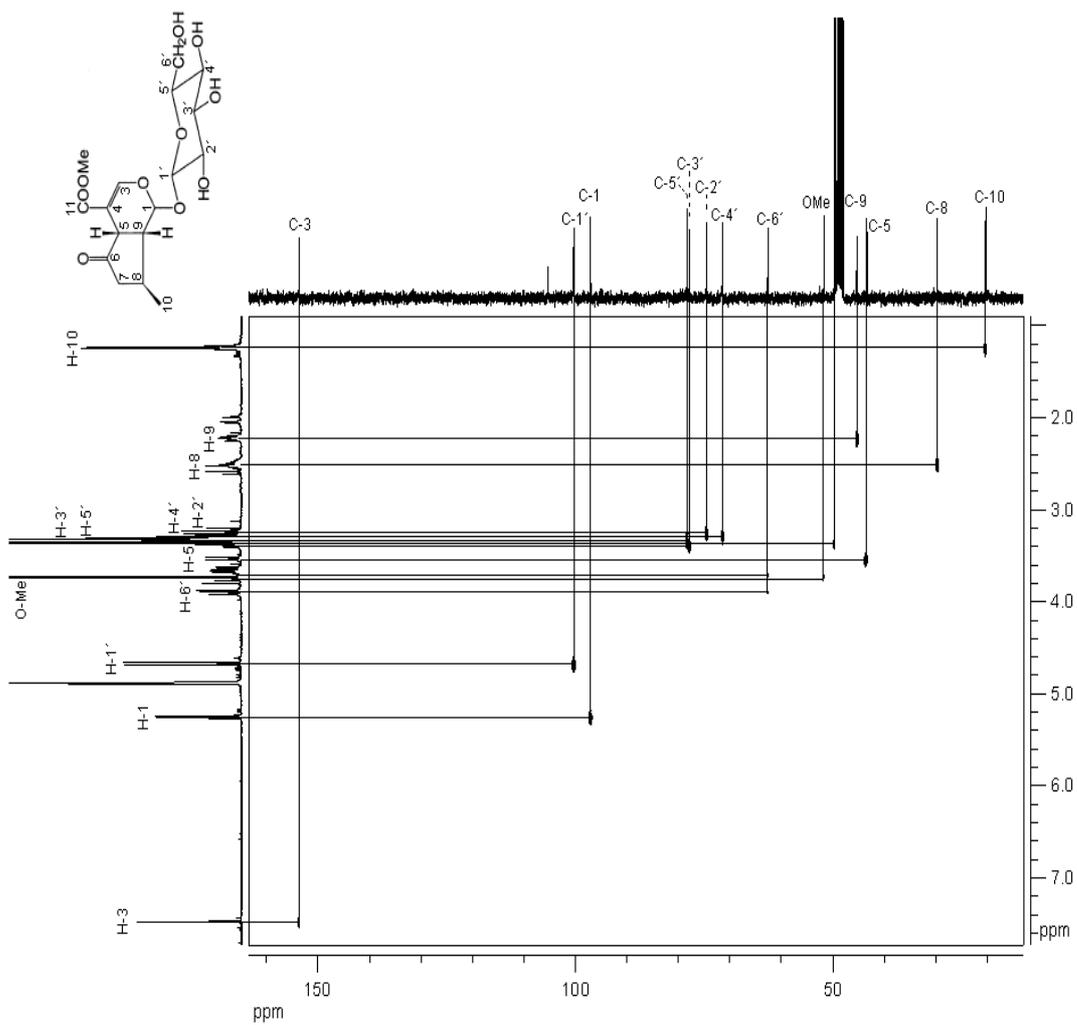




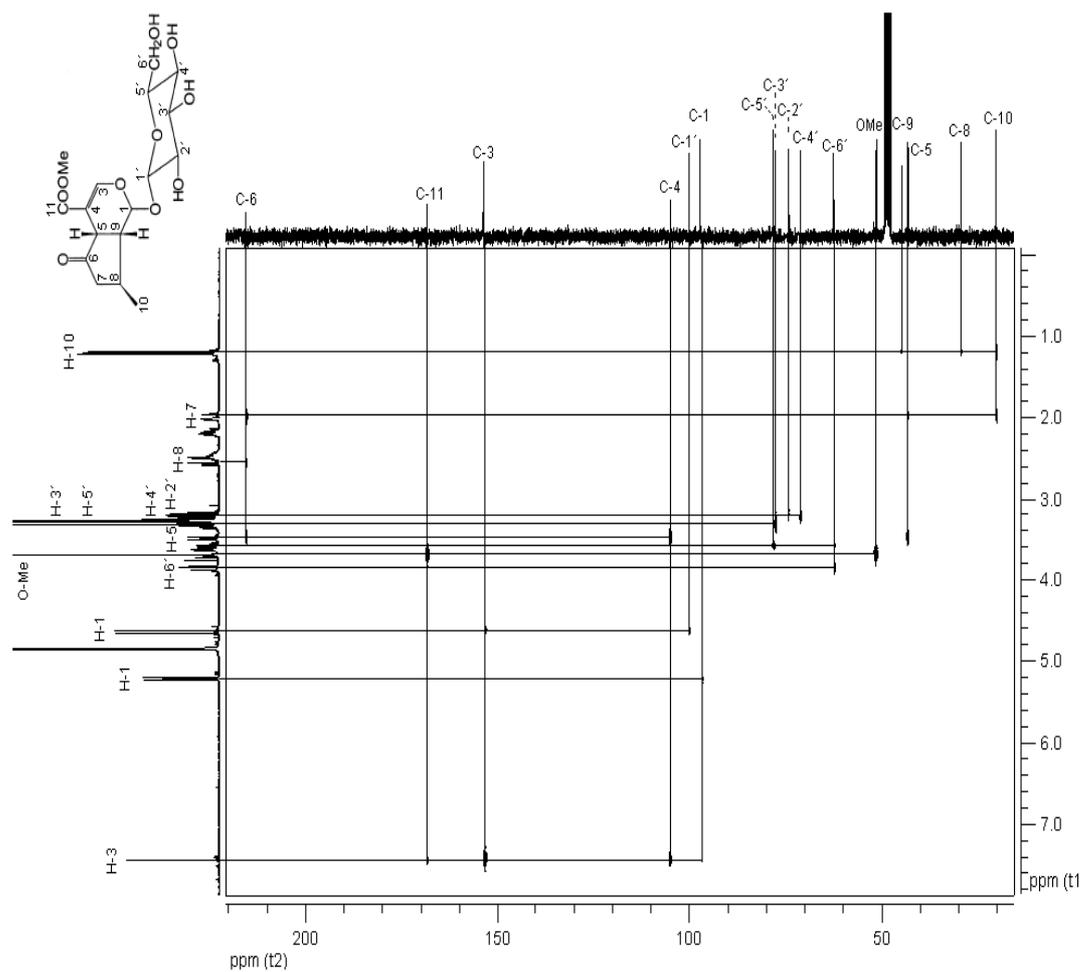
Espectro 22. Espectro de RMN-¹³C (300 MHz, MeOD) de la verbenalina (8)



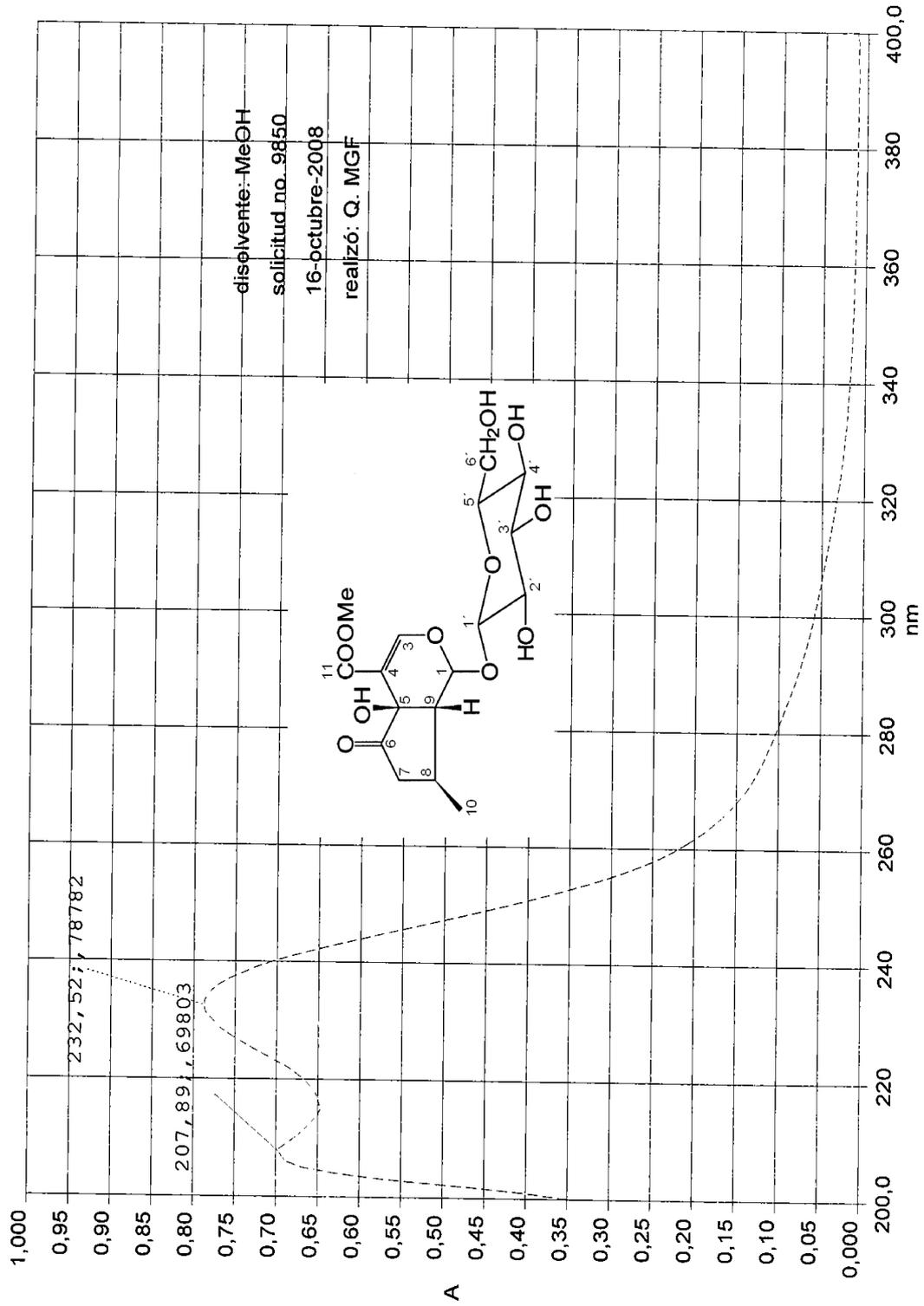
Espectro 23. Espectro de RMN-1H (300 MHz, MeOD) modalidad COSY de la verbena (8).



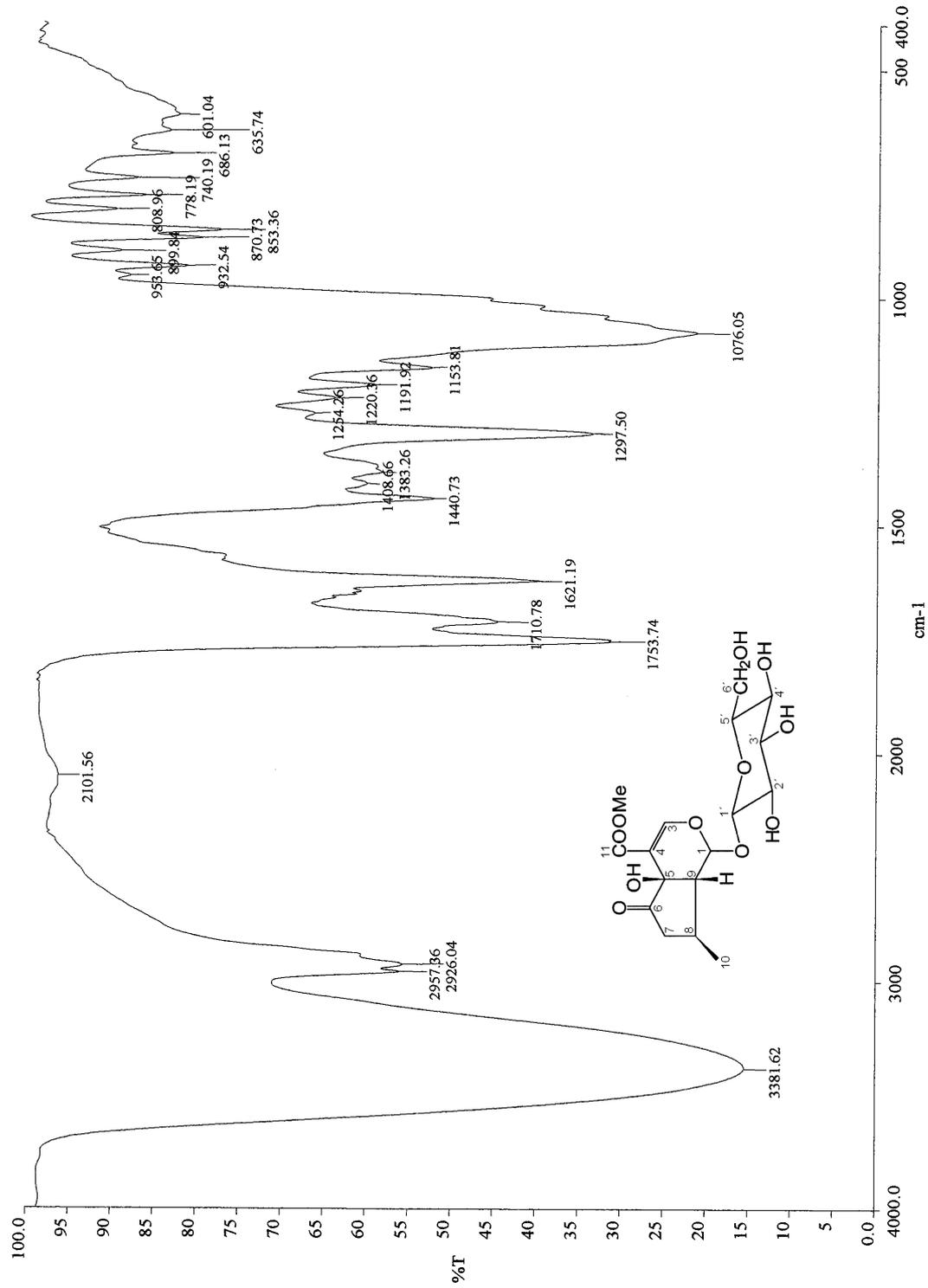
Espectro 24. Espectro de RMN- ^1H (300 MHz, MeOD) modalidad HETCOR de la verbenalina (8).



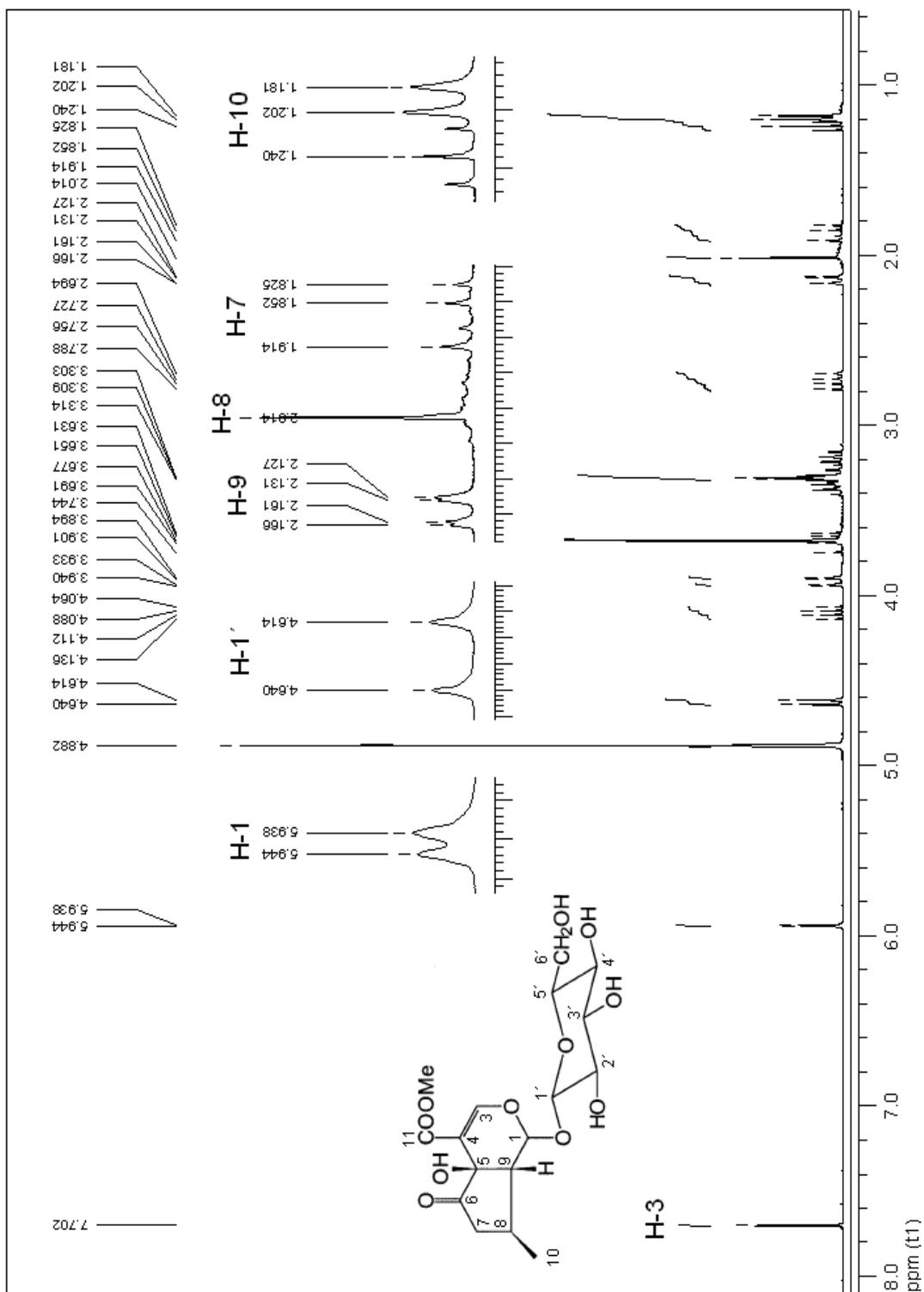
Espectro 25. Espectro de RMN-1H (300 MHz, MeOD) modalidad HETCOR LR de la verbenalina (8).



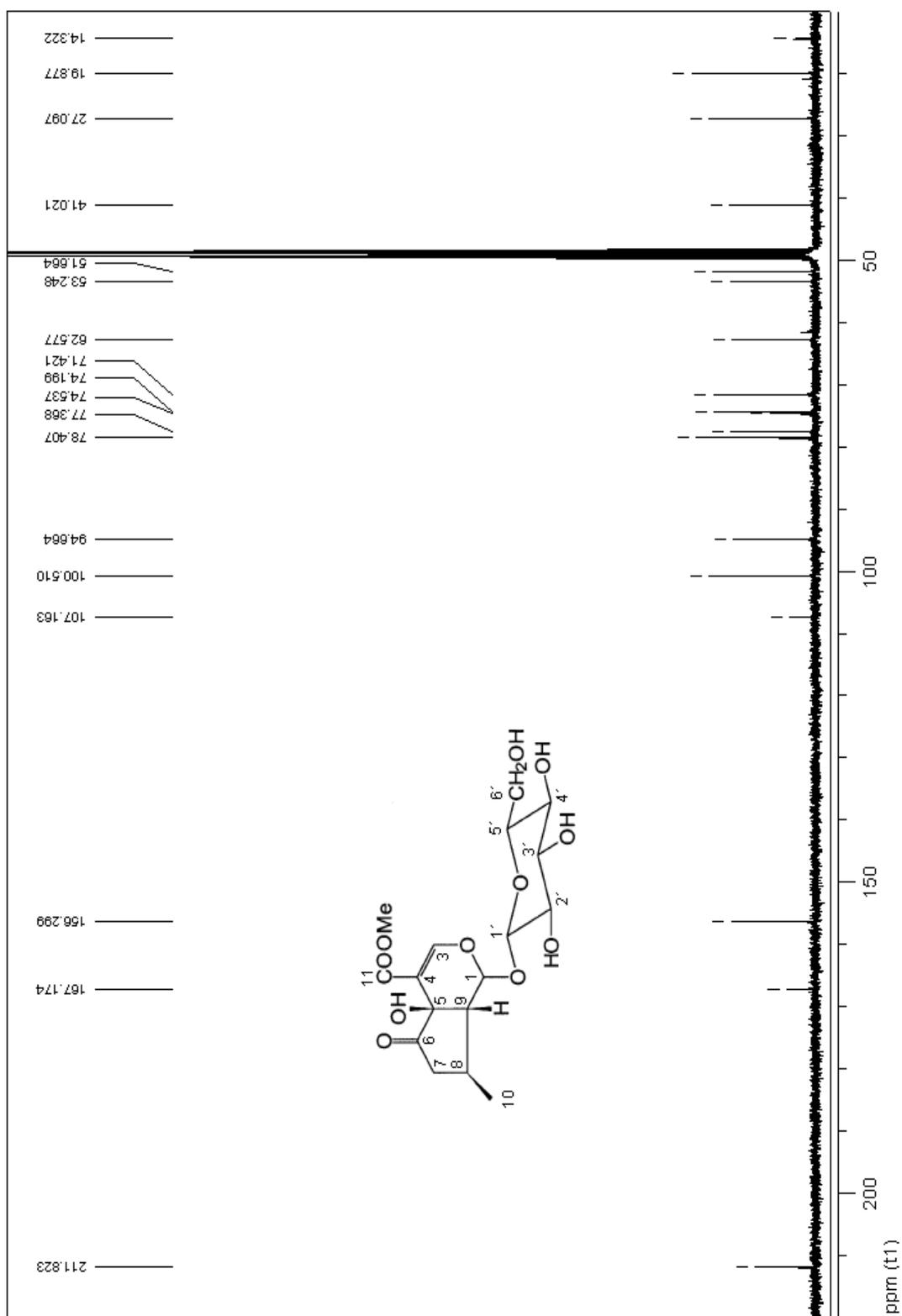
Espectro 26. Espectro en el UV del hastatósido (9).



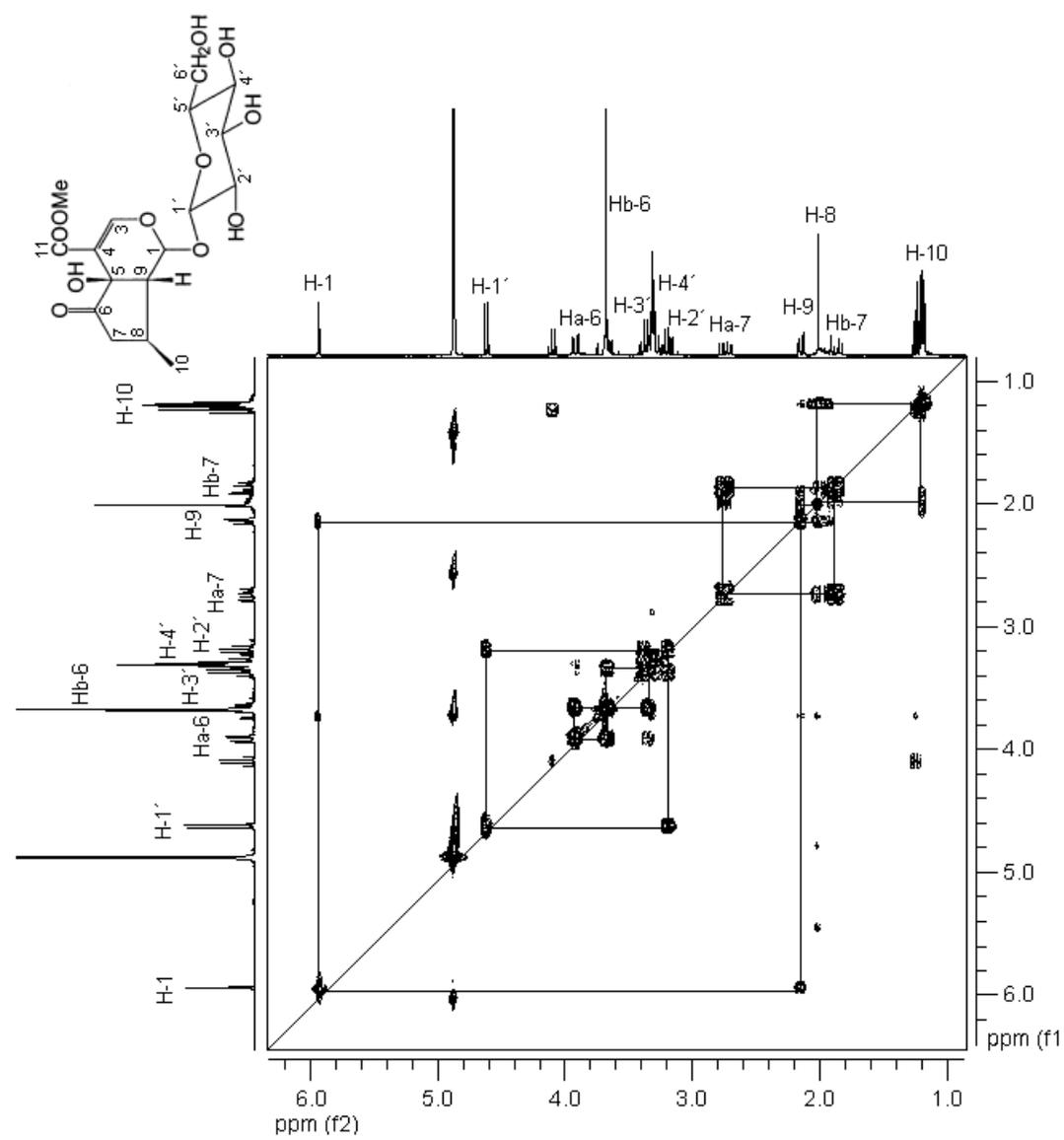
Espectro 27. Espectro de IR del hastatosido (9).



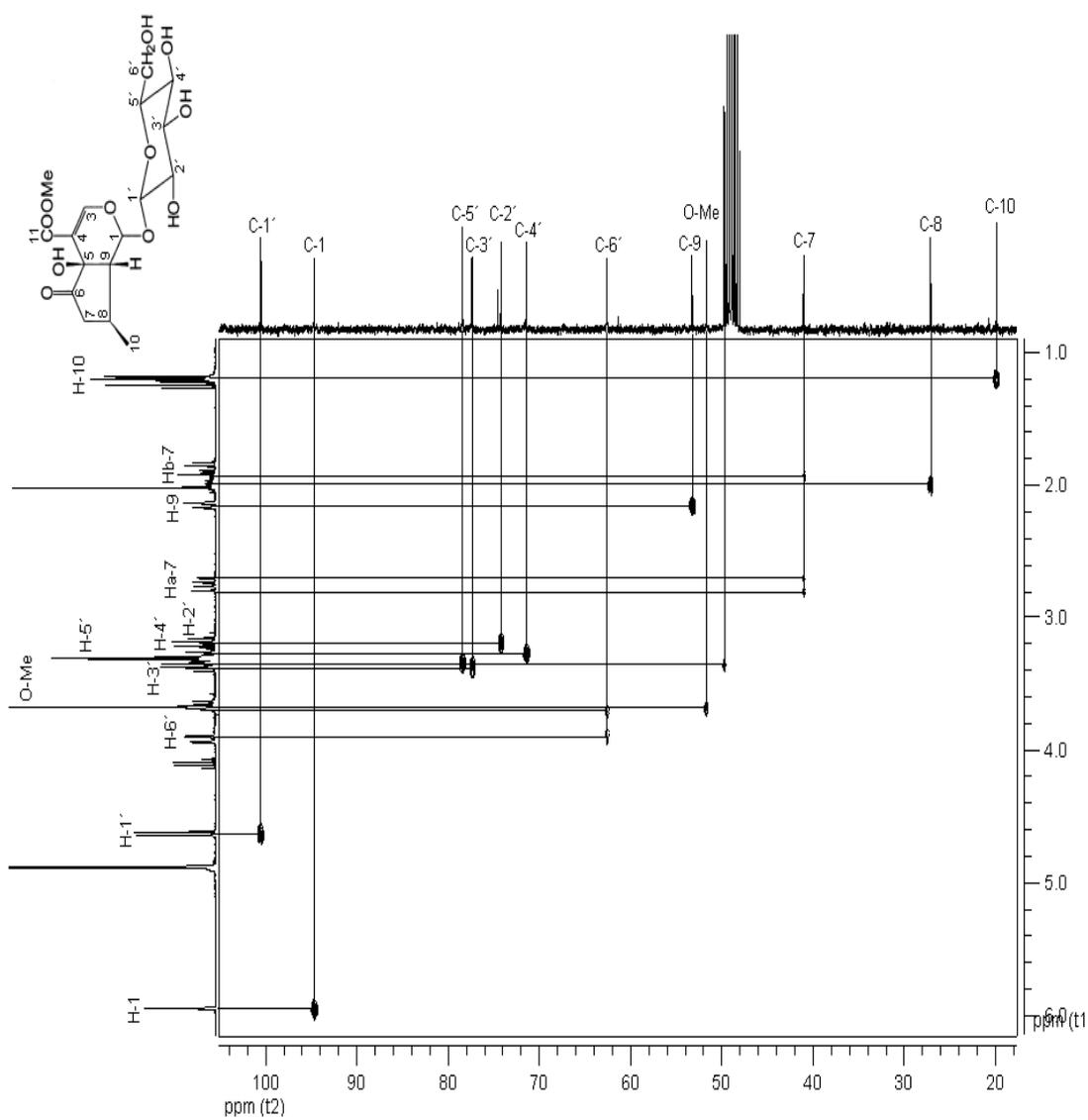
Espectro 28. Espectro de RMN-1H (300 MHz, MeOD) del hastatósido (9).



Espectro 29. Espectro de RMN-¹³C (300 MHz, MeOD) del hastatosido (9).



Espectro 30. Espectro de RMN-¹H (300 MHz, MeOD) modalidad COSY del hastatósido (9).



Espectro 31. Espectro de RMN-¹H (300 MHz, MeOD) modalidad HETCOR del hastatósido (9).



A-2. Datos cristalográficos

Tabla 10. Coordenadas atómicas ($\times 10^4$) y parámetros de desplazamiento isotrópicos equivalentes ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) para verbenalina (**8**). $U(\text{eq})$ está definida como una tercera parte del trazo del tensor ortogonalizado U^{ij} .

	x	y	z	U(eq)
C(1)	4089(7)	1284(5)	2140(2)	27(1)
C(2)	2782(7)	2091(4)	1504(2)	24(1)
C(3)	3538(8)	1556(5)	815(2)	33(1)
C(4)	2591(10)	2941(6)	324(2)	43(1)
C(5)	2803(8)	4452(6)	767(2)	38(1)
C(6)	3077(8)	3949(5)	1536(2)	29(1)
C(7)	5472(7)	4408(5)	1876(2)	26(1)
C(8)	7004(7)	3315(5)	2171(2)	30(1)
C(9)	6075(7)	6152(5)	1926(2)	29(1)
C(10)	2641(10)	-96(5)	564(3)	42(1)
C(11)	8922(9)	8164(6)	1813(3)	53(1)
C(12)	3643(8)	941(5)	3314(2)	30(1)
C(13)	2950(8)	2004(5)	3891(2)	32(1)
C(14)	3153(8)	1034(6)	4568(2)	33(1)
C(15)	1713(8)	-521(6)	4439(2)	34(1)
C(16)	2631(8)	-1487(5)	3863(2)	33(1)
C(17)	1277(9)	-3063(6)	3679(2)	43(1)
O(1)	2307(5)	-515(4)	3245(1)	32(1)
O(2)	3063(5)	1828(3)	2703(1)	31(1)
O(3)	6552(5)	1695(4)	2229(1)	31(1)
O(4)	2810(8)	5828(4)	561(2)	65(1)
O(8)	8213(5)	6472(4)	1786(2)	40(1)
O(9)	4766(6)	7199(4)	2073(2)	47(1)
O(7)	4446(6)	3370(4)	3987(2)	46(1)
O(10)	2391(7)	-4062(4)	3224(2)	58(1)
O(5)	1745(6)	-1485(4)	5042(2)	45(1)
O(6)	2515(6)	1977(4)	5117(2)	46(1)

**Tabla 11.** Longitud de los enlaces [Å] y ángulos [°] para verbenalina (**8**)

C(1)-O(2)	1.390(5)	C(12)-H(12)	0.9800
C(1)-O(3)	1.442(5)	C(13)-O(7)	1.407(5)
C(1)-C(2)	1.510(5)	C(13)-C(14)	1.532(6)
C(1)-H(1)	0.9800	C(13)-H(13)	0.9800
C(2)-C(6)	1.531(5)	C(14)-O(6)	1.411(5)
C(2)-C(3)	1.532(6)	C(14)-C(15)	1.520(6)
C(2)-H(2)	0.9800	C(14)-H(14)	0.9800
C(3)-C(10)	1.504(6)	C(15)-O(5)	1.414(5)
C(3)-C(4)	1.534(6)	C(15)-C(16)	1.526(6)
C(3)-H(3)	0.9800	C(15)-H(15)	0.9800
C(4)-C(5)	1.503(7)	C(16)-O(1)	1.435(5)
C(4)-H(4A)	0.9700	C(16)-C(17)	1.523(6)
C(4)-H(4B)	0.9700	C(16)-H(16)	0.9800
C(5)-O(4)	1.195(6)	C(17)-O(10)	1.423(6)
C(5)-C(6)	1.543(6)	C(17)-H(17A)	0.9700
C(6)-C(7)	1.490(6)	C(17)-H(17B)	0.9700
C(6)-H(6)	0.9800	O(7)-H(7D)	0.8339
C(7)-C(8)	1.329(6)	O(10)-H(10D)	0.8528
C(7)-C(9)	1.469(5)	O(5)-H(5D)	0.8437
C(8)-O(3)	1.358(5)	O(6)-H(6D)	0.8511
C(8)-H(8)	0.9300		
C(9)-O(9)	1.201(5)	O(2)-C(1)-O(3)	110.4(3)
C(9)-O(8)	1.322(5)	O(2)-C(1)-C(2)	107.0(3)
C(10)-H(10A)	0.9600	O(3)-C(1)-C(2)	111.3(3)
C(10)-H(10B)	0.9600	O(2)-C(1)-H(1)	109.4
C(10)-H(10C)	0.9600	O(3)-C(1)-H(1)	109.4
C(11)-O(8)	1.443(5)	C(2)-C(1)-H(1)	109.4
C(11)-H(11A)	0.9600	C(1)-C(2)-C(6)	111.2(3)
C(11)-H(11B)	0.9600	C(1)-C(2)-C(3)	115.2(3)
C(11)-H(11C)	0.9600	C(6)-C(2)-C(3)	106.1(4)
C(12)-O(2)	1.396(5)	C(1)-C(2)-H(2)	108.0
C(12)-O(1)	1.414(5)	C(6)-C(2)-H(2)	108.0
C(12)-C(13)	1.517(6)	C(3)-C(2)-H(2)	108.0



Tabla 11. Longitud de los enlaces [Å] y ángulos [°] para verbenalina (**8**)
(continuación)

C(10)-C(3)-C(2)	114.6(4)	H(10A)-C(10)-H(10B)	109.5
C(10)-C(3)-C(4)	112.7(4)	C(3)-C(10)-H(10C)	109.5
C(2)-C(3)-C(4)	102.5(4)	H(10A)-C(10)-H(10C)	109.5
C(10)-C(3)-H(3)	108.9	H(10B)-C(10)-H(10C)	109.5
C(2)-C(3)-H(3)	108.9	O(8)-C(11)-H(11A)	109.5
C(4)-C(3)-H(3)	108.9	O(8)-C(11)-H(11B)	109.5
C(5)-C(4)-C(3)	104.8(4)	H(11A)-C(11)-H(11B)	109.5
C(5)-C(4)-H(4A)	110.8	O(8)-C(11)-H(11C)	109.5
C(3)-C(4)-H(4A)	110.8	H(11A)-C(11)-H(11C)	109.5
C(5)-C(4)-H(4B)	110.8	H(11B)-C(11)-H(11C)	109.5
C(3)-C(4)-H(4B)	110.8	O(2)-C(12)-O(1)	107.1(3)
H(4A)-C(4)-H(4B)	108.9	O(2)-C(12)-C(13)	106.2(3)
O(4)-C(5)-C(4)	125.9(4)	O(1)-C(12)-C(13)	111.1(4)
O(4)-C(5)-C(6)	124.9(5)	O(2)-C(12)-H(12)	110.8
C(4)-C(5)-C(6)	109.2(4)	O(1)-C(12)-H(12)	110.8
C(7)-C(6)-C(2)	111.0(3)	C(13)-C(12)-H(12)	110.8
C(7)-C(6)-C(5)	109.1(4)	O(7)-C(13)-C(12)	109.6(4)
C(2)-C(6)-C(5)	103.2(4)	O(7)-C(13)-C(14)	109.0(3)
C(7)-C(6)-H(6)	111.1	C(12)-C(13)-C(14)	110.2(3)
C(2)-C(6)-H(6)	111.1	O(7)-C(13)-H(13)	109.3
C(5)-C(6)-H(6)	111.1	C(12)-C(13)-H(13)	109.3
C(8)-C(7)-C(9)	119.3(4)	C(14)-C(13)-H(13)	109.3
C(8)-C(7)-C(6)	122.5(4)	O(6)-C(14)-C(15)	113.0(4)
C(9)-C(7)-C(6)	118.0(3)	O(6)-C(14)-C(13)	112.0(4)
C(7)-C(8)-O(3)	124.8(4)	C(15)-C(14)-C(13)	108.5(3)
C(7)-C(8)-H(8)	117.6	O(6)-C(14)-H(14)	107.7
O(3)-C(8)-H(8)	117.6	C(15)-C(14)-H(14)	107.7
O(9)-C(9)-O(8)	122.6(4)	C(13)-C(14)-H(14)	107.7
O(9)-C(9)-C(7)	124.0(4)	O(5)-C(15)-C(14)	112.7(3)
O(8)-C(9)-C(7)	113.3(4)	O(5)-C(15)-C(16)	110.9(4)
C(3)-C(10)-H(10A)	109.5	C(14)-C(15)-C(16)	108.6(4)
C(3)-C(10)-H(10B)	109.5	O(5)-C(15)-H(15)	108.1



Tabla 11. Longitud de los enlaces [Å] y ángulos [°] para verbenalina (**8**)
(continuación)

C(14)-C(15)-H(15)	108.1	O(10)-C(17)-H(17B)	109.2
C(16)-C(15)-H(15)	108.1	C(16)-C(17)-H(17B)	109.2
O(1)-C(16)-C(17)	105.6(3)	H(17A)-C(17)-H(17B)	107.9
O(1)-C(16)-C(15)	108.3(3)	C(12)-O(1)-C(16)	112.4(3)
C(17)-C(16)-C(15)	113.2(4)	C(1)-O(2)-C(12)	115.5(3)
O(1)-C(16)-H(16)	109.9	C(8)-O(3)-C(1)	114.5(3)
C(17)-C(16)-H(16)	109.9	C(9)-O(8)-C(11)	116.6(4)
C(15)-C(16)-H(16)	109.9	C(13)-O(7)-H(7D)	119.4
O(10)-C(17)-C(16)	112.0(4)	C(17)-O(10)-H(10D)	105.0
O(10)-C(17)-H(17A)	109.2	C(15)-O(5)-H(5D)	108.2
C(16)-C(17)-H(17A)	109.2	C(14)-O(6)-H(6D)	108.0



Tabla 12. Parámetros de desplazamiento anisotrópico ($\text{Å}^2 \times 10^3$) para verbenalina(8). El factor exponencial del desplazamiento anisotrópico toma la forma: $-2\pi^2 [h^2 a^{*2} U^{11} + \dots + 2 h k a^* b^* U^{12}]$

	U11	U22	U33	U23	U13	U12
C(1)	32(2)	17(2)	33(2)	-2(2)	9(2)	-1(2)
C(2)	24(2)	16(2)	33(2)	2(2)	6(2)	-2(2)
C(3)	41(2)	29(2)	30(2)	0(2)	5(2)	2(2)
C(4)	61(3)	36(3)	30(2)	3(2)	5(2)	-3(2)
C(5)	41(3)	33(3)	38(3)	13(2)	-1(2)	-3(2)
C(6)	33(2)	18(2)	35(2)	6(2)	3(2)	-2(2)
C(7)	32(2)	16(2)	31(2)	5(2)	7(2)	-1(2)
C(8)	28(2)	24(2)	38(2)	0(2)	6(2)	-3(2)
C(9)	32(2)	21(2)	35(2)	-1(2)	8(2)	-3(2)
C(10)	60(3)	28(3)	37(3)	-6(2)	6(2)	-4(2)
C(11)	40(3)	32(3)	85(4)	0(3)	5(3)	-12(2)
C(12)	36(2)	22(2)	31(2)	-1(2)	5(2)	0(2)
C(13)	36(2)	26(2)	33(2)	-3(2)	-2(2)	2(2)
C(14)	34(2)	39(3)	26(2)	1(2)	0(2)	8(2)
C(15)	34(2)	36(3)	31(2)	6(2)	5(2)	5(2)
C(16)	40(3)	27(2)	33(3)	6(2)	6(2)	5(2)
C(17)	69(3)	25(3)	38(3)	1(2)	20(2)	-7(2)
O(1)	51(2)	21(2)	26(2)	2(1)	10(1)	-6(1)
O(2)	45(2)	22(2)	26(2)	5(1)	11(1)	7(1)
O(3)	31(2)	21(2)	41(2)	7(1)	4(1)	3(1)
O(4)	108(3)	30(2)	53(2)	20(2)	-1(2)	-4(2)
O(8)	31(2)	25(2)	66(2)	3(2)	14(2)	-4(1)
O(9)	45(2)	22(2)	80(3)	-2(2)	27(2)	1(2)
O(7)	70(2)	24(2)	40(2)	1(1)	-10(2)	-9(2)
O(10)	104(3)	27(2)	46(2)	6(2)	25(2)	2(2)
O(5)	47(2)	61(2)	28(2)	16(2)	2(1)	-10(2)
O(6)	53(2)	57(2)	26(2)	-10(2)	0(1)	11(2)