

UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



ESTUDIO FITOQUIMICO DE DOS PLANTAS MEDICINALES
MEXICANAS: *Cunila lythrifolia* y *Lepechinia caulesces*
(LABIATAE).

T E S I S

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

JULIO HERNANDEZ SALGADO

MEXICO, D. F.

1987



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CONTENIDO

I.	OBJETIVOS	1
II.	INTRODUCCION	3
III.	ANTECEDENTES Y GENERALIDADES	6
IV.	DISCUSION DE RESULTADOS	10
	A. <i>Cunila lythriifolia</i>	11
	B. <i>Lepechinia caulesces</i>	34
V.	PARTE EXPERIMENTAL	45
	A. <i>Cunila lythriifolia</i>	46
	B. <i>Lepechinia caulesces</i>	61
VI.	RESUMEN Y CONCLUSIONES	68
VII.	ESPECTROS	71
	IR(CHCl ₃) 2-epitormentato de metilo	72
	RMN ¹ H(CDCl ₃) 2-epitormentato de metilo	73
	EMIE 2-epitormentato de metilo	74
	IR(CHCl ₃) 2-epiacetil-3-acetiltormentato de metilo	75
	RMN ¹ H(CDCl ₃) 2-epiacetil-3-acetiltormentato de metilo	76
	EMIE 2-epiacetil-3-acetiltormentato de metilo	77
	RMN ¹³ C(CDCl ₃) 2-epiacetil-3-acetiltormentato de metilo	78
	RMN ¹ H(CDCl ₃) 2α-hidroxiursolato de metilo	79
	RMN ¹ H(CDCl ₃) 2α-acetoxi-3-acetilursolato de metilo	80
	IR(CHCl ₃) 8α,9α,13α,14α-diepoxiabietan-18-oato de metilo	81
	RMN ¹ H(CDCl ₃) 8α,9α,13α,14α-diepoxiabietan-18-oato de metilo	82
	RMN ¹³ C(CDCl ₃) 8α,9α,13α,14α-diepoxiabietan-18-oato de metilo	83
	IR(CHCl ₃) 7α-hidroxi-8,11,13-abietatrien-18-oato de metilo	84
	RMN ¹ H(CDCl ₃) 7α-hidroxi-8,11,13-abietatrien-18-oato de metilo	85
	RMN ¹ H(C ₅ D ₅ N) 7α-hidroxi-8,11,13-abietatrien-18-oato de metilo	86
	RMN ¹ H(C ₆ D ₆) 7α-hidroxi-8,11,13-abietatrien-18-oato de metilo	87
VIII.	BIBLIOGRAFIA	88

I. O B J E T I V O S

Realizar el estudio fitoquímico de las especies *Cunila lythrifolia* y *Lepechinia caulesces* (LABIATAE)

Establecer la estructura molecular de las substancias inéditas aisladas de cada especie.

Relacionar la composición de metabolitos secundarios en ambas especies, con los constituyentes principales de la familia Labiatae.

II. I N T R O D U C C I O N

El estudio científico de los recursos naturales ha hecho posible un mayor conocimiento del medio ambiente que nos rodea. Esto ha permitido, en muchas ocasiones, el aprendizaje del aprovechamiento de tales recursos.

Desde los minerales y compuestos inorgánicos en general, y hasta los compuestos orgánicos obtenidos de microorganismos, vegetales y animales, han sido tema de investigación conjunta de botánicos, biólogos, químicos y farmacéuticos.

La industria alimenticia hace uso de dichos materiales para la elaboración de alimentos de conserva; la industria química los aprovecha como reactivos químicos en muchas síntesis; y así, en muchas otras industrias son ampliamente utilizados. Pero, de particular interés para los farmacéuticos es el estudio de plantas de uso medicinal, lo cual, puede ser aprovechado para el desarrollo de diversos medicamentos.

Es bien sabido que las plantas medicinales son utilizadas desde los principios de nuestra era para aliviar el dolor de muchas enfermedades. Actualmente, se sigue haciendo uso de dichos vegetales con fines curativos cuando se les ingiere en forma de infusiones ó cuando son aplicados sobre la piel; así como con fines preventivos al adicionarlos a la dieta diaria, (un ejemplo clásico de tipo preventivo es la vitamina C, contenida en algunos cítricos y verduras).

Sin embargo, en la mayoría de los casos, la población emplea estos recursos de una manera meramente empírica, ya que el conocimiento de las plantas y su uso específico se ha transmitido de una generación

a otra sin un fundamento científico, aunque con bastante certeza, lo que ha motivado a un estudio interdisciplinario para conocer los constituyentes activos y de alguna manera establecer una posible relación de la estructura molecular con la actividad farmacológica.

Nuestro país se ha caracterizado por la amplia gama de especies con que cuenta su vegetación, lo anterior aunado a su cultura milenaria explican en parte el gran uso que aquí se hace de las plantas medicinales.

Es importante notar también que la medicina popular no se contrapone a los medicamentos oficinales, sino que es fuente posible de materias primas para la elaboración de estos últimos.

Por lo anterior, se hace evidente la necesidad de un estudio fitoquímico profundo de las plantas medicinales mexicanas.

En este trabajo se presenta el correspondiente análisis fitoquímico de dos especies mexicanas de la familia Labiatae cuya selección fue realizada en base al conocimiento popular que de ellas se tiene, esperando contribuir de algún modo al bienestar humano.

III. ANTECEDENTES Y
GENERALIDADES

La gran variedad de constituyentes que son encontrados en especies de la familia Labiatae, la hace merecedora de estudios continuos, mismos que justifican el amplio uso que como plantas medicinales se hace de ellas.¹

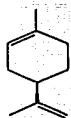
Las rutas biosintéticas principales son llevadas a cabo por estas especies para dar origen a diversos compuestos tales como flavonoides, coumarinas y compuestos fenólicos (ruta del ácido siquímico-corísmico), terpenoides (ruta del acetato-mevalonato) y compuestos sintetizados por rutas mixtas.^{2,3}

Sin embargo, los compuestos de tipo fenólico y monoterpénico son frecuentemente encontrados en esta familia⁴⁻¹¹ lo mismo que compuestos diterpénicos¹²⁻²⁰ y triterpénicos.²¹⁻²⁴

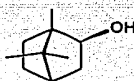
No es raro entonces, encontrar en los géneros *Cunila* y *Lepechinia* (pertenecientes a esta familia) aceites esenciales tales como: limoneno (A), borneol (B), alcanfor (C), p-cimeno (D), α -pineno (E), β -pineno (F), canfeno (G), 1-8 cineol (H), etc., lo mismo que compuestos diterpénicos del tipo isopimarano (I)²⁰ y abietano (J)¹⁹ y triterpenos pentacíclicos con esqueleto base de ursano (K)²² oleanano (L)²⁴ y lupaneno (M).²¹⁻²³

Si bien es cierto que varias especies del género *Lepechinia* han sido ya estudiadas (*L. floribunda*,^{4-6,10-11} *L. calycina*,⁷ *L. speciosa*,⁸ *L. graveolens*,⁹ *L. glomerata*²⁰ y *L. chamaedryoides*²²), este es el primer estudio fitoquímico realizado sobre *L. caulesces* y el segundo sobre especies de este género originarias de nuestro país.

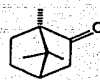
En cuanto al género *Cunila*, solo se encontraron tres reportes previos basados en el estudio de los compuestos de tipo fenólico (*Cunila maiana*,²⁵ *Cunila maiana*,^{26,27}) y un estudio de los componentes monoterpénicos encontrados en *Cunila lythriifolia*.²⁸



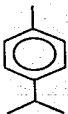
A



B



C



D



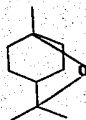
E



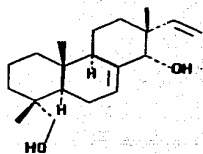
F



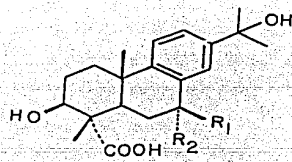
G



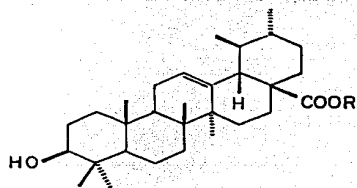
H



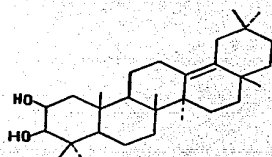
I



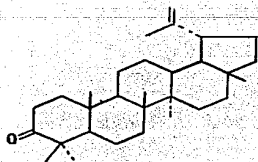
J



K



L



M

IV. D I S C U S I O N D E
R E S U L T A D O S

A. *Cunila lythriifolia*.

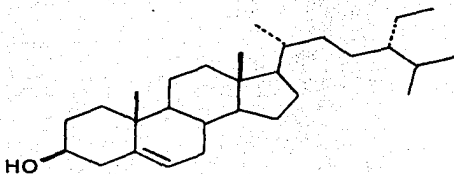
Del extracto clorofórmico de las partes aéreas de *Cunila lythriifolia* se aislaron por cromatografías sucesivas siete compuestos, uno de los cuales representa un nuevo producto natural. Todos ellos fueron analizados por espectroscopía de infrarrojo y resonancia magnética nuclear, así como por espectrometría de masas.

El establecimiento de la estructura molecular de las sustancias previamente reportadas en la literatura se realizó por comparación directa con los datos publicados y con muestras auténticas, por lo que en la presente discusión solo serán descritos y asignados sus parámetros espectroscópicos y espectrométricos característicos.

La determinación estructural de la sustancia inédita será descrita con mayor detalle y mediante el establecimiento inicial de fórmulas parciales.

β -sitosterol (1).

Aislado en las fracciones menos polares en forma de agujas blancas. Su peso molecular de 414 fue determinado por espectroscopía de masas y corresponde a la fórmula molecular $C_{29}H_{50}O$ (fig. 1).



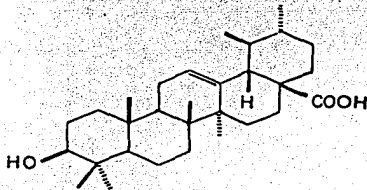
Su pico principal en EMIE corresponde a m/e 213 ($C_{10}H_{21}$) para la cadena lateral en C-17 del anillo D. La presencia de un pico en m/e 119 sugiere un Δ^5 - 3β -esterol.²⁹

Muestra bandas de absorción en el espectro de infrarrojo en 3610 cm^{-1} para el grupo hidroxilo y en 958 cm^{-1} para la doble ligadura tri-substituida además de las bandas correspondientes para metilos y metilenos.

El espectro de RMN^1H muestra una señal múltiple para el protón vinílico en 5.35 ppm y una señal para el protón base de hidróxilo centrada en 3.26 ppm. La señal en 1.52 ppm desaparece al intercambiar con agua deuterada.

Acido ursólico (2).

Fue aislado de la recromatografía de fracciones de polaridad correspondiente a una mezcla de n-hexano-acetato de etilo (80:20) en forma de polvo blanco de punto de fusión $279\text{--}281\text{ }^\circ\text{C}$ (reportado $282\text{--}283\text{ }^\circ\text{C}$). De peso molecular 456 correspondiente a la fórmula molecular $C_{30}H_{48}O_3$ (fig. 2).

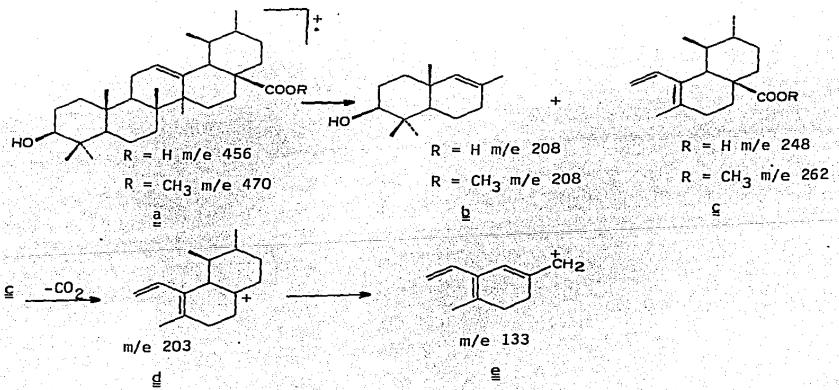


Su espectro de infrarrojo (CHCl_3) muestra una banda en 3430 cm^{-1} característica del grupo hidroxilo; en 1690 cm^{-1} una banda angosta para el carbonilo del ácido y en 948 cm^{-1} una banda para la olefina trisubstituida.

En el espectro de RMN^1H se observa una señal en 5.18 ppm que aparece como doble de doble con valores de constante de acoplamiento de 2.5, 2.5 Hz y que corresponde al protón vinílico en C-12. La señal en 3.85 ppm que aparece como un singlete amplio de $w_{1/2} = 26 \text{ Hz}$ desaparece al intercambiar con agua deuterada y es asignada al protón del grupo hidroxilo. La señal doble de doble centrada en 3.1 ppm con valores de constante de acoplamiento de 7, 4 Hz se atribuye al protón base del hidroxilo en C-3. Un doblete con un desplazamiento químico de 0.94 ppm cuyo valor de constante de acoplamiento es de 7 Hz y el cual es asignado al metilo en C-30³¹⁻³⁵ confirma la presencia de un metilo secundario (la señal para el otro metilo secundario se encuentra superpuesta con otras señales). Dichos metilos secundarios se presentan solo en triterpenos pentacíclicos con esqueleto base de ursano.

El espectro de masas presenta el patrón de fragmentación característico de triterpenos pentacíclicos Δ^{12} insaturados³⁶ que se muestra en el esquema 1.

La fragmentación principal para el ión molecular \underline{a} m/e 456, sigue un mecanismo vía una reacción retro Diels-Alder para producir los fragmentos \underline{b} m/e 208 y \underline{c} m/e 248. El fragmento \underline{c} m/e 248 pierde el radical $-\text{COOR}$ para producir la especie \underline{d} m/e 203 el cual corresponde al

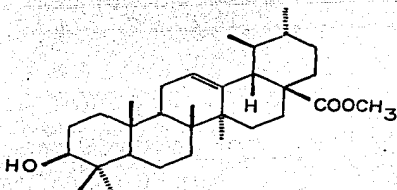


Esquema 1.

pico base del espectro. La pérdida de 70 unidades de masa (C_5H_{10}) del fragmento \underline{g} conduce al fragmento \underline{e} m/e 133 de poca abundancia relativa.

Ursolato de metilo (3).

La reacción de ácido ursólico con diazometano en éter etílico a temperatura ambiente produce el derivado metilado correspondiente, cuyos datos físicos y espectroscópicos se detallan en la parte experimental (fig. 3).



3

En particular, en el espectro de infrarrojo se observa la banda del grupo hidroxilo en 3613 cm^{-1} y en 1719 cm^{-1} se observa una banda angosta correspondiente al grupo carbonilo del éster formado.

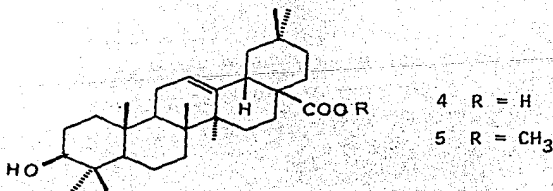
La resonancia magnética protónica muestra para el compuesto 3 la señal en forma de singulete que integra para tres protones, centrada en 3.6 ppm característica del grupo metoxilo.

Un aumento de catorce unidades de masa para el ión molecular \underline{g} (esquema 1) y un pico intenso (pico base) a m/e 262 correspondiente a

La especie g esterificada son observados en el espectro de masas, lo que comprueba que el producto formado por la reacción anterior es el ursolato de metilo (3).

La mezcla natural de ácidos ursólico y oleanólico (4) en varias especies de Labiatae se encuentra bien documentada en la literatura.¹⁹ Dicha mezcla fue también extraída en las fracciones de polaridad correspondiente a la mezcla de n-hexano-acetato de etilo (80:20); sin embargo, debido a la baja proporción del ácido oleanólico con respecto al ácido ursólico, el primero no pudo ser separado y purificado por métodos cromatográficos sencillos*.

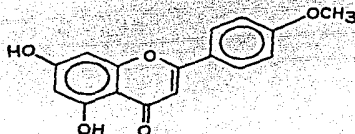
La comparación directa con los espectros de IR y RMN¹H de mezclas en diferentes proporciones de tales moléculas aisladas en nuestro laboratorio sirvió como prueba concluyente de la presencia de ácido oleanólico, lo mismo que para el oleanolato de metilo (5) producido en la reacción con diazometano en éter.



*La separación puede lograrse por métodos químicos.³⁷

5,7-dihidroxi-4'-metoxiflavona (6).

De la misma recromatografía, pero en fracciones de mayor polaridad se extrajo una substancia en forma de pequeñas agujas amarillas que fue identificada como la 5,7-dihidroxi-4'-metoxiflavona (acacetina) (6) por comparación de datos de IR y RMN¹H con los reportados en la literatura^{38,39} así como por espectroscopía de masas (Esquema 2).

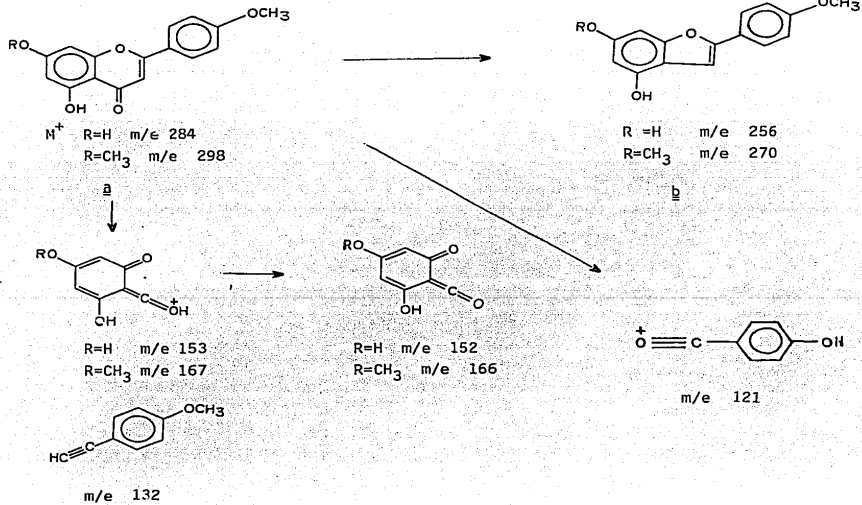


6

En el espectro de IR se observa una banda angosta en 1652 cm^{-1} que corresponde al grupo carbonilo de la γ -pirona.

Un sistema A_2B_2 centrado en 7.8 y 6.99 ppm con constante de acoplamiento de 9 Hz que integra para cuatro protones, se asigna a los hidrógenos 3',5' y 2',6' respectivamente. Un protón vinílico desplazado a campo bajo por la presencia de la cetona conjugada se observa como singlete en 6.5 ppm.

La señal para los protones H-6 y H-8 aparece como un sistema AB centrado en 6.35 ppm. Se observa además un singlete amplio en 5.1 ppm con un valor de $w_{1/2} = 44\text{ Hz}$ correspondiente a los grupos hidroxilos



Esquema 2.

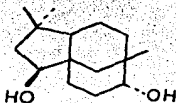
y un singulete centrado en 3.85 ppm que integra para tres protones y que se asigna al metoxilo en 4'.

La mayor información para esta sustancia es obtenida de su análisis de espectrometría de masas que permite situar al grupo metoxilo en la molécula y diferenciarla de sus isómeros en 5-OH y 7-OH.

El esquema 2 muestra el patrón de fragmentación característico de este tipo de sustancias. El ión molecular a m/e 284 pierde primero 28 unidades de masa en forma de CO para originar el fragmento b m/e 256 el cual, por subsecuente pérdida de metilo genera el fragmento c m/e 241. Por otro lado, el ión molecular puede perder un protón y producir el fragmento d m/e 283.

Clovandiol (7).

El clovandiol fue también aislado de la misma recromatografía y su identificación fue realizada por comparación directa con muestras auténticas.



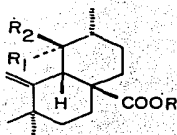
Una sexta sustancia (8), aislada de las fracciones más polares de la cromatografía inicial y separada y purificada por recromatografías sucesivas, previa esterificación con diazometano en éter etílico, representa un nuevo producto natural.

Dicho compuesto es una sustancia polar de consistencia aceitosa, soluble en cloroformo, metanol, etanol, acetato de etilo y acetona. Su peso molecular de 502 fue determinado por espectrometría de masas.

Exhibe bandas de absorción en infrarrojo para grupos hidroxilo en 3621 cm^{-1} y 3571 cm^{-1} , así como una banda angosta en 1718 cm^{-1} correspondiente a un carbonilo de éster (Espectro 1).

La observación del espectro de RMN^1H y del espectro de masas de este compuesto permiten proponer como primera opción uno de dos esquemas de triterpenos pentacíclicos: oleanano o ursano.

En el espectro de RMN^1H (Espectro 2), un singulete centrado en 2.6 ppm con un valor de $w_{1/2} = 7\text{ Hz}$ y que integra para un hidrógeno es asignado al protón sobre el átomo de carbono C-18 cuando en C-19 no existen protones.^{34,35} Esto indica la doble sustitución en el átomo de carbono C-19 (fig. I).



El doblete observado en 0.95 ppm con una constante de acoplamiento de 6 Hz que integra para tres protones es característico del metilo C-30 cuando este es secundario³¹⁻³⁵ lo que permite descartar el esqueleto del oleanano, el cual solo contiene metilos terciarios, y confirmar el esqueleto del ursano. Por lo tanto, uno de los substituyentes en C-19 debe ser un grupo metilo.

El número de átomos de oxígeno y la observación de grupos hidroxilo en la molécula por el espectro de infrarrojo (Espectro 1), además del desplazamiento a campo bajo del protón en C-18, hacen suponer que el otro substituyente en C-19 podría ser un grupo hidroxilo.

Un singulete centrado en 3.6 ppm que integra para tres hidrógenos se asigna a un grupo metoxilo que se sitúa en el átomo de carbono C-28 de acuerdo con su fragmentación en espectroscopía de masas (esquema 3).

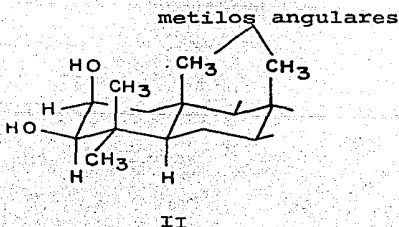
Un grupo hidroxilo en la posición 3β es supuesto por razones biogénicas, las cuales se encuentran documentadas en la literatura.⁴¹

Así, cuatro átomos de oxígeno se han colocado ya en la molécula (OH en C-19, C-28 OCH_3 y OH en 3β).

La existencia de un grupo hidroxilo adicional en el átomo de carbono C-2 es presumible debido a la interacción de este grupo con el protón base en C-2, así como la interacción de este protón con el situado en el átomo de carbono C-3, la cual se pone de manifiesto en el espectro de RMN^1H (Espectro 2) en el que la señal correspondiente al protón en C-3 aparece como señal múltiple centrada en 3.2 ppm con un valor de $w_{1/2} = 8$ Hz, misma que es resuelta en un doblete al intercam-

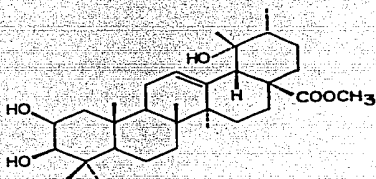
bicar con agua deuterada. Este desplazamiento químico es característico para protones base de hidroxilo en C-3 que están en posición axial, lo que determina que la posición del grupo hidroxilo es ecuatorial (β o *cis* a los metilos angulares C-25 y C-26)^{24,31,33,42-46}.

El protón en C-2 se observa como una señal doble de doble de doble con constantes de acoplamiento 4,4,4 Hz, centrada en 4.06 ppm. El desplazamiento químico a campo bajo y los pequeños valores de constante de acoplamiento, que son dados por la interacción del protón en C-3 con el protón en C-2, hacen suponer que este último hidrógeno es ecuatorial,^{24,42} con lo que el grupo hidroxilo en C-2 queda axial (β o *cis* a los metilos angulares).⁴⁶ Por lo tanto, se establece la disposición axial-ecuatorial de los hidroxilos en C-2 y C-3 respectivamente, como se muestra en la figura II.



Una señal múltiple centrada en 5.35 ppm que integra para un protón se atribuye a un hidrógeno de tipo vinílico, característico de triterpenos Δ^{12} insaturados.

Lo anterior, aunado a la interpretación del espectro de masas establece la naturaleza del anillo C mismo que sirve de unión de las fórmulas parciales I y II integrándose de este modo la estructura propuesta para la substancia inédita (8).

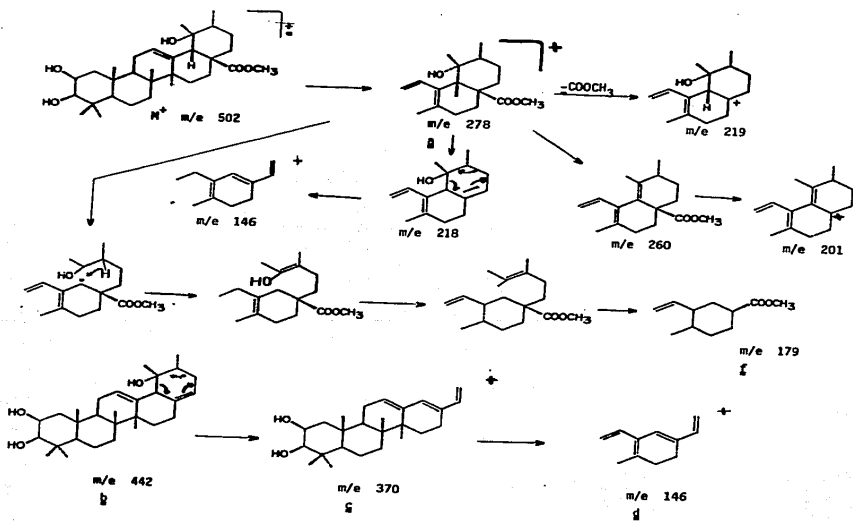


8

El espectro de masas (Espectro 3) muestra un pico pequeño en m/e 502 para el ión molecular. La fragmentación observada para esta molécula es semejante a la de los triterpenos pentacíclicos que contienen un esqueleto de Δ^{12} -amirina,^{31,36} por esta razón, puede observarse una ruptura que sigue un mecanismo de tipo retro Diels-Alder conduciendo así a un fragmento a que contiene los anillos D y E (esquema 3).

En el mismo espectro de masas puede observarse además un pico a m/e 278 para este fragmento a, mismo que por diversas pérdidas de masa origina los picos a m/e 260 (a - H₂O), 201 (a - H₂O - COOCH₃), 219 (a - COOCH₃) y 218 (a - HCOOCH₃).

La pérdida del grupo carbometoxilo angular y de un hidrógeno a partir del ión molecular, conduce a un fragmento b m/e 442 que por ruptura del anillo E por reacción retro Diels-Alder da lugar a un fragmen-



Esquema 3

to \underline{c} m/e 370 ($C_{25}H_{38}O_2$). La ruptura subsecuente de este fragmento, vía un segundo proceso retro Diels-Alder genera al fragmento \underline{d} m/e 146 correspondiente a la fórmula $C_{11}H_{14}$.

Es importante considerar de la fórmula $C_{31}H_{50}O_5$ que la sustancia \underline{g} contiene dos grupos hidroxilos en el anillo \underline{A} . La presencia de un pico en m/e 223 atribuida al fragmento \underline{e} confirma esta suposición.

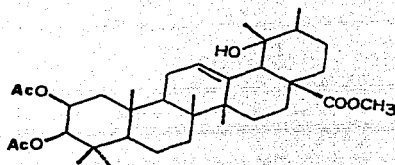
El pico de mayor importancia del espectro de masas está situado en m/e 179 (fragmento \underline{f}). La medida de este pico permite atribuirle la fórmula $C_{11}H_{15}O_2$.

Es válido suponer que la presencia del pico m/e 179 es característica del ambiente particular que el grupo hidroxilo terciario en el anillo \underline{E} le da a los triterpenos.

La reacción de la sustancia \underline{g} con anhídrido acético en piridina a temperatura ambiente, produce el derivado diacetilado (9), el cual mediante sus datos espectroscópicos y espectrométricos corrobora la estructura propuesta.

En el espectro de infrarrojo se observa una banda de absorción en 3621 cm^{-1} lo que prueba la existencia de un alcohol terciario en la molécula (Espectro 4).

Las señales correspondientes a los dos metilos de los grupos acetatos aparecen en el espectro de resonancia magnética protónica (Espectro 5) centradas en 2.04 ppm y 2.02 ppm. Las señales de los protones sobre los átomos de carbono C-2 y C-3 fueron desplazadas a campo bajo



9

en 5.32 ppm y 4.6 ppm respectivamente.^{24,47} Los singuletes de los metilos cis a los acetatos son desplazados a campo alto (Tabla 1).

La interpretación del espectro de masas (Espectro 6) del diacetil derivado corrobora el análisis del espectro de masas para la sustancia g.

Un aumento en 84 unidades de masa para el ion molecular confirma la presencia de dos alcoholes secundarios. Además, los picos correspondientes a los fragmentos g, d y f (esquema 3) no cambian, mientras que los picos para los fragmentos que contienen los anillos A y B si son desplazados: b m/e 442+526, c m/e 370→ 454 y e m/e 223+307.

La espectroscopía de RMN¹³C fue también utilizada para confirmar la estructura de esta molécula cuyas asignaciones fueron establecidas por los experimentos de desacoplamiento parcial y total de hidrógeno y por comparación de los datos obtenidos con los reportados para molécula-

las relacionadas.^{23,34,48}

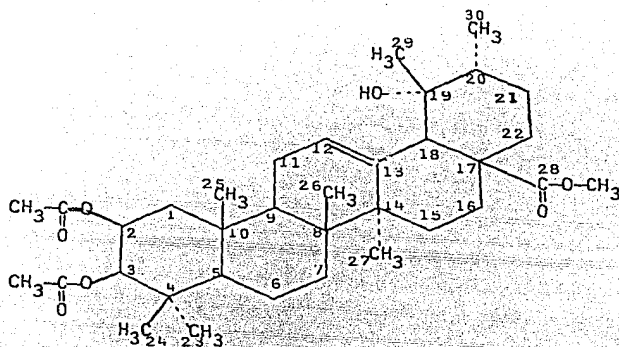
En el espectro 7 se observa una señal en 178.2 ppm para el carbonilo del éster C-28 OOCCH_3 , así como las señales en 170.5 ppm y 170.1 ppm para los carbonilos de los acetatos en C-2 y C-3.

Los dos carbonos olefínicos C-12 y C-13 resuenan en 128.8 ppm y 138.4 ppm respectivamente, desacoplándose las señales como doblete para C-12 y singulete para C-13.

La señal para el carbono C-19 el cual soporta al grupo hidroxilo es desplazada a campo bajo, centrándose en 73.14 ppm, lo mismo que para las señales de los carbonos C-2 y C-3 las cuales aparecen en 78.78 ppm y 78.14 ppm.

El total de las asignaciones se muestra en la figura III.

Una sustancia con estructura semejante es encontrada en la literatura.³¹ La única diferencia con la sustancia 8 es la configuración del grupo hidroxilo en C-2; la sustancia reportada tiene el grupo hidroxilo en posición 2α . Dicha sustancia es nombrada como tormentato de metilo, por lo que el nombre para la sustancia aquí descrita podría ser el de 2 epi-tormentato de metilo. Sin embargo el nombre más correcto es el de $2\beta,3\beta,19\alpha$ -trihidroxi-12-en-28-ursolato de metilo.



III

Atomo de carbono	δ	Atomo de carbono	δ
1	42.03 (t)	19	73.14 (s)
2	69.68 (d)	20	41.51 (d)
3	78.14 (d)	21	26.11 (t)
4	37.46 (s)	22	36.81 (t)
5	51.48 (d)	23	27.43 (q)
6	18.22 (t)	24	17.7 (q)
7	32.88 (t)	25	15.92 (q)
8	40.19 (s)	26	16.85 (q)
9	47.79 (d)	27	24.58 (q)
10	37.39 (s)	28	178.29 (s)
11	23.81 (t)	29	29.16 (q)
12	128.83 (d)	30	16.10 (q)
13	138.45 (s)	COOCH ₃	55.30 (q)
14	41.33 (s)	O ₂ COCH ₃	21.18 (q)
15	28.25 (t)	O ₃ COCH ₃	20.77 (q)
16	25.57 (t)	O ₂ COCH ₃	170.57 (s)
17	48.05 (s)	O ₃ COCH ₃	170.12 (s)
18	53.44 (d)		

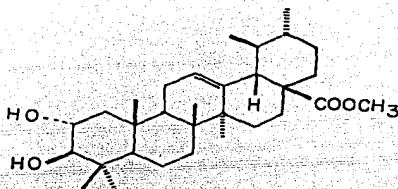
2 α -hidroxiursolato de metilo (10).

Aislado de las fracciones de mayor polaridad de la cromatografía inicial y separado y purificado por recromatografías sucesivas, previa esterificación con diazometano en éter.

Su identificación se llevó a cabo por comparación de los datos obtenidos por espectroscopía de IR y RMN¹H y de su espectro de masas con los reportados en la literatura.^{33,49}

Su espectro de IR muestra una banda en 3597 cm⁻¹ para grupos hidroxilo. Un carbonilo de éster es evidenciado por la banda en 1719 cm⁻¹ y una olefina trisubstituida puede presumirse por la banda en 949 cm⁻¹.

En el espectro de RMN¹H se observa la señal múltiple centrada en 5.24 ppm correspondiente al protón vinílico en el átomo de carbono C-12. Una señal múltiple en 4.15 ppm es atribuida al protón ubicado en el átomo de carbono C-2. En 3.6 ppm se observa la señal singulete que integra para tres protones correspondiente al grupo metoxilo. La señal doble que aparece en 3.0 ppm con un valor de constante de acoplamiento de 9 Hz es asignada al protón base de hidroxilo en C-3. El valor de la constante de acoplamiento de este protón indica que su interacción con el protón en C-2 es tal que deben guardar una disposición trans-diaxial,^{31,42,44,50,51} lo que hace que los grupos hidroxilos sean trans-diecuatoriales. Por lo tanto, el hidroxilo en C-2 es α o trans a los metilos angulares (fig. II) mientras que el hidroxilo en C-3 es β o cis a los mismos metilos.



10

La interacción del protón en C-18 con un protón vecino se pone de manifiesto por la señal doble centrada en 2.25 ppm con una constante de acoplamiento de 6 Hz. El desplazamiento a campo alto y la multiplicidad de este protón en C-18 elimina la presencia del alcohol terciario en el anillo E.

El espectro de masas para la sustancia 10 prueba el patrón de fragmentación de triterpenos pentacíclicos Δ^{12} insaturados ya descrito (esquema 1) observándose los picos principales en m/e 262 (c + 14), m/e 203 (c - COOCH₃), m/e 224 (b + 16) y m/e 133 (e).

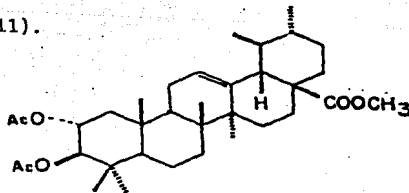
El derivado diacetilado (11) fue preparado por la reacción a temperatura ambiente del 2 α -hidroxiursolato de metilo con anhídrido acético en piridina. Los datos espectroscópicos y espectrométricos de 11 fueron comparados con los correspondientes datos de 10.

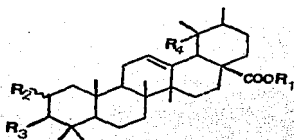
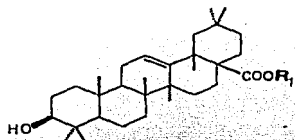
El espectro de infrarrojo no muestra bandas de hidroxilo, lo que comprueba la ausencia de alcoholes terciarios.

En el espectro de RMN¹H (Espectro 9) del compuesto 11 se observa la señal múltiple centrada en 5.23 ppm correspondiente al protón vinílico. Las señales de los protones en C-2 y C-3 son desplazadas a campo bajo: se observa en 5.0 ppm la señal doble de doble para el protón en C-2 con constantes de acoplamiento 4,4 Hz y en 4.65 ppm la señal doble con constante de acoplamiento de 10 Hz atribuida al protón en C-3. El singulete que integra para tres protones y que está centrado en 3.6 ppm se asigna al grupo metoxilo; el doblete en 2.2 ppm corresponde al protón en C-18. Dos señales singuletes centradas en 2.02 ppm y 1.95 ppm que integran cada una para tres protones, se atribuyen a los metilos de los grupos acetatos.

El espectro de masas muestra un aumento de 84 unidades de masa para el ión molecular; la ruptura de la molécula por reacción retro-Diels-Alder produce los fragmentos m/e 262 y m/e 203 (esquema 1).

El análisis descrito confirma la estructura del 2 α -acetoxi-3-acetilursolato de metilo (11).





	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
I	H	-	-	-
II	CH ₃	-	-	-
III	H	H	OH	H
IV	CH ₃	H	OH	H
V	CH ₃	βOH	OH	OH
VI	CH ₃	βOAc	OAc	OH
VII	CH ₃	αOH	OH	H
VIII	CH ₃	αOAc	OAc	H

Tabla 1. Señales de RMN¹H características de ursano y oleanano.

	¹³ C ₁₂ H	C ₁₈ H	C ₃ H	COOCH ₃	OAc	OAc
I	5.25, m, w _{1/2} =12 Hz, 1H	2.85, dd, J= 5,4 Hz, 1H	3.02, m, w _{1/2} =6 Hz, 1H	*	*	*
II	5.25, m, w _{1/2} =12 Hz, 1H	2.85, m, J= 5,4 Hz, 1H	3.23, m, w _{1/2} =6 Hz, 1H	3.6, s, 3H	*	*
III	5.18, dd, J= 2.5, 3 Hz, 1H	2.16, dd, J= 5,4 Hz, 1H	3.1, dd, J= 7,8 Hz, 1H	*	*	*
IV	5.25, dd, J= 3,3 Hz, 1H	2.24, dd, J= 4,4 Hz, 1H	3.22, dd, J= 7,8 Hz, 1H	3.6, s, 3H	*	*
V	5.35, dd, J= 4,4 Hz, 1H	2.6, s, w _{1/2} =6 Hz, 1H	3.2, m, w _{1/2} =8 Hz, 1H	3.6, s, 3H	*	*
VI	5.32, dd, J= 4,4 Hz, 1H	2.58, s, w _{1/2} =5 Hz, 1H	4.6, d, J= 5 Hz, 1H	3.6, s, 3H	2.04, s, 3H	2.02, s, 3H
VII	5.24, m, w _{1/2} =6 Hz, 1H	*	3.0, d, J= 10 Hz, 1H	3.6, s, 3H	*	*
VIII	5.24, m, w _{1/2} =7 Hz, 1H	*	*	3.58, s, 3H	2.02, s, 3H	1.95, s, 3H

	C ₂₃	C ₂₄	C ₂₅	CH ₃ C ₂₆	C ₂₇	C ₂₉	C ₃₀
I	*	1.08, s, 3H	*	0.71, s, 3H	*	*	*
II	*	1.08, s, 3H	*	0.71, s, 3H	*	*	*
III	*	1.08, s, 3H	0.82, s, 3H	0.75, s, 3H	*	*	0.94, d, J=6 Hz, 3H
IV	*	1.08, s, 3H	0.79, s, 3H	0.75, s, 3H	*	*	0.96, d, J=6 Hz, 3H
V	1.24, s, 3H	1.24, s, 3H	1.04, s, 3H	0.71, s, 3H	1.23, s, 3H	1.27, s, 3H	0.95, d, J=6 Hz, 3H
VI	1.18, s, 3H	1.05, s, 3H	0.90, s, 3H	0.71, s, 3H	1.20, s, 3H	1.27, s, 3H	0.94, d, J=6 Hz, 3H
VII	*	*	1.05, s, 3H	0.73, s, 3H	*	0.87, d, 3H	0.96, d, J=7Hz, 3H
VIII	*	1.05, s, 3H	0.94, s, 3H	0.74, s, 3H	*	0.87, d, 3H	0.94, d, J=6 Hz, 3H

*Las señales correspondientes a estos protones se encuentran superpuestas.

B. *Lepechinia caulesces*.

Del extracto clorofórmico de las partes aéreas de *Lepechinia caulesces* se logró la separación y purificación de dos sustancias que constituyen nuevos productos naturales, además del aislamiento de los ácidos triterpénicos ursólico y oleanólico y del glucósido de β -sitosterol.

De las fracciones menos polares de la cromatografía inicial del extracto clorofórmico, se separó, previa derivatización con diazometano en éter, una sustancia sólida de color blanco, cuyos datos físicos y espectroscópicos se incluyen en la parte experimental.

Dicha sustancia tiene un peso molecular de 348, determinado por espectrometría de masas, que en conjunción con el análisis elemental permite establecer la fórmula molecular $C_{21}H_{32}O_4$.

El número de átomos de carbono presentes en la molécula, así como el tipo de constituyentes encontrados en el género *Lepechinia*^{20,22} hacen suponer como primera instancia que se trata de un compuesto diterpénico.

La naturaleza del esqueleto fundamental y la ubicación y funcionalidad de los átomos de oxígeno se establecieron mediante comparación de datos espectroscópicos y espectrométricos con los correspondientes de moléculas relacionadas.⁵²⁻⁵⁶

La banda en 1718 cm^{-1} en el espectro de infrarrojo, corresponde a un éster metílico formado por reacción con diazometano. La ausencia de bandas anchas en la zona de 3600 cm^{-1} descarta la posibilidad de te-

ner grupos hidroxilo en la molécula (Espectro 10).

El éster metílico formado, es confirmado por la señal singulete que aparece en 3.65 ppm en el espectro de RMN^1H (Espectro 11), la cual integra para tres protones. En el mismo espectro, se observa un singulete centrado en 2.76 ppm que integra para un protón. La multiplicidad de esta señal indica la ausencia de protones vecinos y el desplazamiento químico a campo bajo corresponde a un átomo de hidrógeno unido a un átomo de carbono el cual está unido a un grupo electronegativo. Por esta razón, se propone la siguiente estructura parcial:



donde X debe ser oxígeno, ya que no se contienen otros grupos electro-negativos.

Una señal doble de doble con constantes de acoplamiento 4, 7 Hz centrada en 2.35 ppm y que integra para un protón corresponde a un hidrógeno que interactúa con dos protones diastereotópicos. Esta señal es característica para el protón axial H-5 de la fusión A/B de una trans-decalina con una disposición *synclinal* con un carbometoxilo.⁵⁷

Las dos señales simples que integran para tres protones cada una de ellas, centradas en 1.17 ppm y 1.05 ppm corresponden a metilo geminal y a metilo angular respectivamente. Estos datos permiten dibujar la estructura parcial de la figura IV.

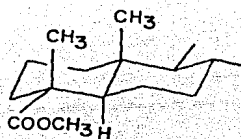
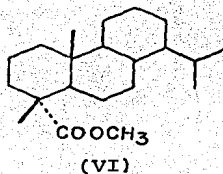
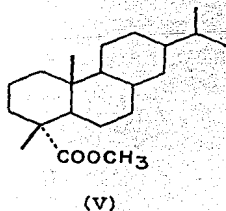


Figura IV

También se observan dos señales dobles cada una con un valor de constante de acoplamiento de 7 Hz, que integran para tres hidrógenos, centradas en 0.95 ppm y 0.92 ppm y que se atribuyen a un radical isopropilo. 12-16,18,52,54

Las estructuras parciales establecidas permiten suponer un esqueleto fundamental de uno de dos diterpenos tricíclicos: abietano (V) o totarano (VI)



Por otro lado, la frecuencia de metabolitos secundarios diterpénicos con esqueleto base de abietano en especies de la familia Labiatae^{12-17,19} sugiere este mismo esqueleto para la molécula en cuestión.

En la estructura (V) se hace necesario la ubicación de dos átomos de oxígeno y dos grados de insaturación adicionales, de acuerdo a la fórmula molecular.

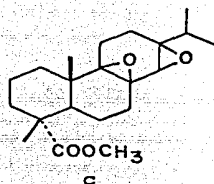
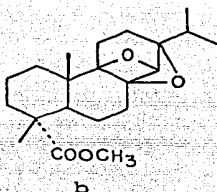
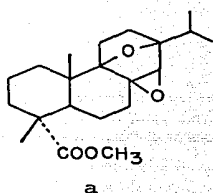
Los espectros obtenidos por desacoplamiento parcial y total de hidrógeno en RMN¹³C permitieron llevar a cabo estas determinaciones (Espectro 12).

La señal en 179 ppm corresponde al carbono carbonílico del éster.

Las señales centradas en 65.5 ppm, 62.8 ppm y 58.7 ppm se asignan a carbonos base de oxígeno que además deben resultar cuaternarios debido a su desacoplamiento parcial de hidrógeno. Por las mismas razones, la señal en 57.7 ppm corresponde a un carbono terciario unido a oxígeno.

Para que cuatro átomos de carbono sean base de dos átomos de oxígeno, estos últimos deben ser compartidos por los primeros formando dos heterociclos, lo que además explica los dos grados de insaturación.

En el esqueleto de átomos de carbono propuesto (V), los únicos carbonos que satisfacen las condicionantes anteriores son C-8, C-9, C-13 y C-14. Por lo tanto, se deducen tres estructuras posibles, las cuales se muestran en la figura VII.

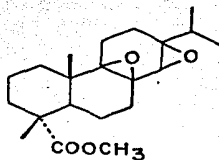


VII

Las estructuras que poseen anillos de tetrahydrofurano (VIIa) y oxetano (VIIb) quedan descartadas porque las señales correspondientes a los carbonos base de oxígeno en este tipo de anillos aparecen por arriba de 72 ppm, lo cual no se observa en esta sustancia.

Los carbonos base de oxígeno en un epóxido son observados en 39 ppm cuando no son substituidos y entre 55 ppm y 65 ppm cuando son terciarios y cuaternarios.

Lo anterior está de acuerdo con las señales observadas en el espectro y confirma la estructura que posee el diepóxido (VIIc).

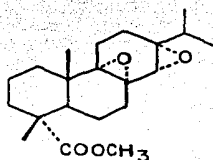


La configuración relativa de la molécula se determinó por el efecto de compresión estérica que desplaza a los átomos de carbono y al átomo de oxígeno y que están sobre la misma cara que el epóxido, a campo alto, con relación a moléculas semejantes.^{52,53}

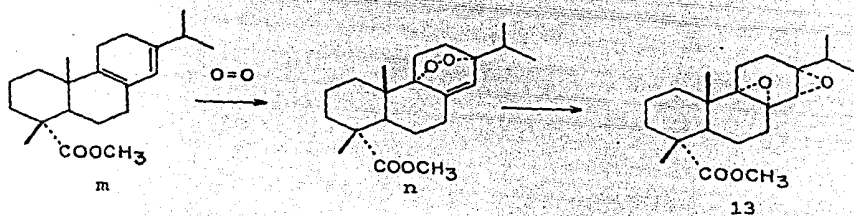


Así, los átomos de carbono C-5 y C-7 son desplazados de un valor de 44.3 ppm hacia 37.86 ppm y de 27.6 ppm hacia 26.08 ppm respectivamente; mientras que el átomo de carbono C-20 se desplaza a campos más bajos (de 13.7 ppm a 16.97 ppm) en relación al compuesto con epóxido-beta.⁵²

Por lo tanto, la estructura y estereoquímica de esta sustancia (13) queda expresada por la fórmula 13:



La biogénesis terminal de la sustancia descrita merece un comentario adicional. El diepóxido 13 deriva de una transposición del peróxido precursor n y éste a su vez, proviene de una reacción de Diels-Alder (cicloaddición 4 + 2) del dieno conjugado m con oxígeno (esquema 4). Esta evidencia biosintética ha sido propuesta para diversos productos naturales que contienen epóxidos vecinales.^{12,52}



El nuevo diepóxido natural puede identificarse como el ácido 8 α ,9 α -13 α ,14 α -diepoxi-abietan-18-oico.

Los ácidos triterpénicos ursólico y oleanólico fueron aislados en fracciones de polaridad intermedia. Sus características físicas y espectroscópicas son enlistadas en la página 49.

Una sustancia de color blanco y punto de fusión 103 - 106 °C fué aislada como componente minoritario en las fracciones eluidas con n-hexano-acetato de etilo (75:25) de la cromatografía inicial, después

de la derivatización con diazometano en éter y separación por cromatografía en columna. Los datos físicos y espectroscópicos de esta sustancia (14) se reportan en la parte experimental.

El peso molecular de esta sustancia es de 330 y fue determinado por espectrometría de masas, que junto con el análisis elemental corresponde a la fórmula molecular $C_{21}H_{30}O_3$ (14).

El espectro de infrarrojo (Espectro 13) muestra bandas características para hidroxilo (3596 cm^{-1}), doble ligadura carbono-carbono (3032 y 3007 cm^{-1}), metilos y metilenos (2954 , 2870 cm^{-1}) y una banda angosta en 1717 cm^{-1} característica del grupo carbonilo de éster.

En los espectros de RMN^1H (Espectros 14, 15 y 16) se observa una señal múltiple que integra para tres protones, los cuales se superponen en la zona de 7.1 ppm - 7.22 ppm y cuya amplitud media de la señal es $w_{1/2} = 9\text{ Hz}$ lo que indica solo una interacción orto, lo cual es consistente con una sustitución 1,2,4 del anillo bencénico y que corresponde al esqueleto del abietano.⁵⁹

Del mismo modo que para el compuesto anterior, el número de átomos de carbono y el tipo de constituyentes encontrados en el género *Lepechinia* sugieren la presencia de un diterpeno tricíclico con esqueleto base de abietano.

La existencia de un anillo aromático solo puede ser posible en

el anillo C obteniéndose un esqueleto de abietatrieno. 12,14,15,19,58

Una señal doble de doble con constantes de acoplamiento 4,3 Hz, centrada en 4.73 ppm y que integra para un hidrógeno, se atribuye a un protón base de oxígeno. La interacción con dos protones vecinos diastereotópicos sólo puede ocurrir si se coloca el átomo de oxígeno en C-1, C-3 ó C-7. Sin embargo, el desplazamiento químico a campo bajo de esta señal, debido a la interacción con el anillo bencénico, establece la ubicación del hidroxilo en C-7.

La señal doble de doble centrada en 2.5 ppm con constantes de acoplamiento 13, 2 Hz, que integra para un protón, es característica del protón en C-5, el cual interacciona con los protones diastereotópicos C-6ax y C-6ec.

La funcionalidad del átomo de oxígeno es confirmada por la banda en 3596 cm^{-1} como grupo hidroxilo, además de la desaparición de la señal en 1.8 ppm al intercambiar con agua deuterada.

Se observan además en el espectro la presencia de un grupo metoxilo por la señal simple en 3.65 ppm. La señal múltiple heptuplete centrada en 2.87 ppm con valor de constante de acoplamiento de 7 Hz que integra para un protón y la señal doble con el mismo valor de constante de acoplamiento centrada en 1.25 ppm que integra para seis protones son características del grupo isopropilo en la molécula. 12-16,52,54

La presencia de los metilos en C-18 y C-20 se confirma por las señales singuletes en 1.28 ppm y 1.16 ppm respectivamente, al utilizar CDCl_3 como disolvente. Estas mismas señales son observadas en 1.35 ppm

Tabla 2. Señales características del abietatrieno 14.

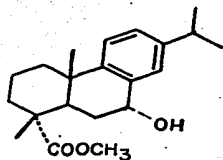
DISOLVENTE	C ₅ H	C ₇ H	C _{11,12,14} H	C ₁₅ H
CDCl ₃	2.53, dd, J=13,2 Hz, 1H	4.72, dd, J=5,3 Hz, 1H	7.18, m, w _{1/2} =9Hz, 3H	2.87, hept, J=7 Hz, 1H
C ₅ D ₅ N	2.82, dd, J=13,3 Hz, 1H	4.95, dd, J=5,3 Hz, 1H	*	*
C ₆ D ₆	2.55, dd, J=13,2 Hz, 1H	4.62, m, w _{1/2} =9Hz, 3H	*	2.77, hept, J=7 Hz, 1H

DISOLVENTE	C _{16,17} H	CH ₃ C ₁₈ H	C ₂₀ H	C ₁ ,H	OH
CDCl ₃	1.24, d, J=7 Hz, 6H	1.28, s, 3H	1.16, s, 3H	3.65, s, 3H	1.8, s, 1H
C ₅ D ₅ N	1.2, d, J=7 Hz, 6H	1.35, s, 3H	1.14, s, 3H	3.65, s, 3H	*
C ₆ D ₆	1.2, d, J=7 Hz, 6H	1.29, s, 3H	1.01, s, 3H	3.42, s, 3H	*

*Las señales correspondientes a estos protones se encuentran superpuestas.

y 1.14 ppm cuando se utiliza C_5D_5N y en 1.29 ppm y 1.01 ppm en C_6D_6 .

Los cambios en los desplazamientos químicos de las señales de esta sustancia por el efecto del disolvente permitieron asignar las señales características en la molécula (Tabla 2).



V. P A R T E E X P E R I M E N T A L

Material vegetal.

Las partes aéreas de *Cunila lythrifolia* Bentham fueron colectadas en el Monumento a Morelos, en la carretera México-Cuernavaca, en el límite del Distrito Federal y el Estado de Morelos.

Las muestras de referencias se encuentran en el Herbario Nacional, voucher 8812-M, en el Instituto de Biología de la UNAM.

Extracción.

La planta seca y fragmentada (6.3Kg) se maceró con cloroformo durante tres días a temperatura ambiente. El extracto clorofórmico obtenido se concentró a sequedad. El peso del extracto seco fue 216.0 g.

Fraccionamiento, separación y purificación.

El extracto clorofórmico seco (216.0 g) adsorbido en gel de sílice, se aplicó en una columna cromatográfica utilizando 2.5 Kg de gel de sílice desactivada al 10% con agua destilada. Como sistema de elución se utilizó una mezcla preparada con n-hexano y acetato de etilo con polaridad creciente. Se colectaron eluatos de aproximadamente 1000 ml y una vez concentrados por destilación en rotavapor se reunieron en fracciones identificadas como A, B, C, D, E, F, G y H.

En la primera fracción (A), que fue obtenida por elución de la columna con n-hexano al 100%, constituida por los primeros cuatro eluatos, se encontraron grasas y ceras como componentes principales, por

lo que fueron descartadas.

La fracción B (eluatos 5-7) se sometió a un análisis por cromatografía de gases, debido al desprendimiento de diversos aromas. En esta fracción se identificaron los siguientes compuestos como componentes mayoritarios: limoneno, mirceno, 1-8 cineol, alcanfor, canfeno, geraniol, mentona, borneol, p-cimeno, α -pineno y β -pineno.

β -sitosterol (1)

Fue el componente principal contenido en la fracción C, la cual se obtuvo por elución de la columna con n-hexano-acetato de etilo (90:10) formada por los eluatos 26-79.

Su separación del resto de los constituyentes de esta fracción se logró por cristalización del β -sitosterol, en una mezcla de n-hexano-acetato de etilo (1:1).

Se purificó por recristalización en etanol obteniéndose como cristales blancos en forma de pequeñas agujas (1.86 g). Su identificación fue realizada en base a sus propiedades físicas y espectroscópicas:

pf = 138 - 139 °C

Rf = 0.425 (hexano-acetato de etilo 80:20). Revela como una mancha redonda de color café al reaccionar con sulfato cérico amoniacal.

IR (CHCl₃) cm⁻¹: 3610, 3027, 2959, 2938, 2869, 1464, 1380, 1044, 1019, 960, 834, 797.

RMN¹H (80 MHz, CDC1₃): 5.35 ppm (C₆=H, m, w_{1/2} = 9 Hz, 1 H), 5.07 ppm (m, 1 H), 2.25 ppm (d, J = 7 Hz, 2 H), 1.52 ppm (OH, s, 1 H), 1.00 ppm (s, 3H), 0.85 ppm (d, J = 2 Hz, 3H), 0.78 ppm (s, 3H), 0.68 ppm (s, 3H).

EMIE, m/e: M⁺ 414 (67), 400 (12), 399 (20), 396 (27), 381 (18), 329 (17), 303 (20), 273 (18), 250 (20), 213 (25), 163 (19), 161 (22), 159 (30), 147 (17), 145 (20), 133 (20), 131 (17), 121 (27), 120 (20), 119 (30), 117 (17), 109 (18), 107 (38), 105 (46), 95 (33), 93 (36), 91 (20), 81 (26), 79 (25), 71 (18), 69 (34), 67 (50), 57 (70), 55 (80), 43 (100).

Los resultados anteriores fueron comparados con los ya reportados y confirman la estructura de β -sitosterol.

La fracción D (81-161) eluida con n-hexano-acetato de etilo (80:20) no fué analizada debido a la difícil resolución que muestran sus componentes y a la poca proporción de todos ellos.

La fracción E (162-242) también eluida con n-hexano-acetato de etilo (80:20), con un peso en seco de 12.4 g fue resuelta en sus componentes por recromatografía de la misma. Para este fin se utilizó una columna de vidrio empacada con 300 g de gel de sílice desactivada al 10% con agua destilada, asimismo, se utilizó una mezcla de n-hexa-

no-acetato de etilo como sistema de elución o fase móvil cuya polaridad fue en aumento a medida que eran separados los componentes.

A partir de la fracción 20 y hasta la fracción 34, correspondientes a una polaridad de n-hexano- acetato de etilo (70:30) se obtuvo un polvo blanco cristalino identificado como ácido ursólico.

Acido ursólico (2)

pf = 279-281 °C

Rf = 0.25 (hexano-acetato de etilo 80:20)

0.51 (hexano-acetato de etilo 40:60) Revela como una mancha de color rosa al reaccionar con sulfato cérico amónico.

IR (CHCl₃) cm⁻¹: 3430, 2927, 2871, 1693, 1457, 1386, 1321, 1303, 1261, 1170, 1032, 994, 947, 915.

RMN¹H (80 MHz, CDCl₃ + DMSO): 5.18 ppm (=C₁₂H, dd, J = 2.5, 3 Hz, 1H), 3.85 ppm (OH, s, w_{1/2} = 26 Hz, 1H), 3.1 ppm (C₃H, dd, J = 7, 8 Hz, 1H), 2.16 ppm (C₁₈H, dd, J = 2, 4 Hz, 1H), 1.08 ppm (s, 3H), 0.94 ppm (d, J = 6 Hz, 3H), 0.82 ppm (s, 3H), 0.75 (s, 3H).

EMIE, m/e: M⁺ 456 (20), 208 (8), 248 (20), 203 (100), 133 (40), 119 (35), 105 (20), 91 (20), 81 (25), 69 (25), 55 (30), 43 (40), 41 (30).

Ursolato de metilo (3)

112 mg de ácido ursólico se hicieron reaccionar con solución éterea de diazometano a temperatura ambiente durante una hora. El produc-

to obtenido fue purificado por recristalización en acetato de etilo y éter isopropílico. Se obtuvieron pequeños cristales blancos en forma de aguja.

pf = 171 °C

Rf = 0.32 (hexano-acetato de etilo 80:20)

0.62 (hexano-acetato de etilo 40:60)

IR (CHCl₃) cm⁻¹: 3613, 2950, 2867, 1719, 1462, 1386, 1363, 1321, 1308, 1261, 1170, 994, 948.

RMN¹H (80 MHz, CDCl₃): 5.25 ppm (=C₁₂H, dd, J = 3, 3 Hz, 1H), 3.6 ppm (COOCH₃, s, 3H), 3.22 ppm (C₃H, dd, J = 7, 8 Hz, 1H), 2.24 ppm (C₁₈H, dd, J = 4, 4 Hz, 1H), 1.08 (s, 3H), 0.96 (d, J = 6 Hz, 3H), 0.79 ppm (s, 3H), 0.75 ppm (s, 3H).

EMIE, m/e: M⁺ 470 (33), 411 (20), 395 (7.5), 262 (100), 249 (5), 207 (28), 203 (90), 189 (20), 133 (45), 119 (30), 105 (25), 81 (20), 69 (20), 55 (25), 43 (35), 41 (30).

Los datos anteriores identifican al producto de la reacción como ursolato de metilo (3).

De la misma recromatografía de la fracción E se obtuvo un polvo blanco que correspondía a la mezcla de ácidos ursólico y oleanólico, como fue comprobado por la reacción de esterificación con diazometano del polvo obtenido, cuyo producto muestra dos señales para metoxilo en

el espectro de RMN^1H .

Sin embargo, a manera de consulta se reportan aquí los datos físicos y espectroscópicos del ácido oleanólico y su derivado metilado, encontrados en la literatura.

Acido oleanólico (4)

pf = 310 °C

IR (Pastilla de KBr) cm^{-1} : 3610, 2950, 2865, 1690, 1462, 1380, 1257, 1170, 1080, 1028, 995, 950.

RMN^1H (80 MHz, CDCl_3 + DMSO): 5.25 ppm ($=\text{C}_{12}\text{H}$, m, $w_{1/2} = 12$ Hz, 1H), 3.8 ppm (s, $w_{1/2} = 16$ Hz, 1H), 3.0 ppm (C_3H , m, 1H), 2.85 ppm (C_{18}H , dd, $J = 5, 4$ Hz, 1H), 1.08 ppm (s, 3H), 0.71 ppm (s, 3H).

EMIE, m/e: M^+ 456 (15), 208 (8), 248 (20), 203 (100), 133 (20), 43 (30).

Oleanolato de metilo (5)

pf = 201 °C

IR (CHCl_3) cm^{-1} : 3613, 2950, 2867, 1720, 1460, 1386, 1170, 1080, 994, 947.

RMN^1H (80 MHz, CDCl_3): 5.25 ppm ($=\text{C}_{12}\text{H}$, m, $w_{1/2} = 12$ Hz, 1H), 3.6 ppm (COOCH_3 , s, 3H), 2.85 ppm (m, 1H), 1.08 ppm (s, 3H), 0.75 (s, 3H).

EMIE, m/e: M^+ 470 (20), 262 (100), 203 (90), 133 (20), 43 (30), 41 (20).

Las fracciones 175-179 de la misma recromatografía (fracción E) eluidas con hexano-acetato de etilo (60:40) contenían principalmente una sustancia de color amarillo claro que cristaliza en forma de agujas pequeñas y que presenta los siguientes datos físicos y espectroscópicos:

5,7-dihidroxi-4'-metoxiflavona (6)

pf = 168 - 169 °C

Rf = 0.27 (hexano-acetato de etilo 80:20)

0.45 (hexano-acetato de etilo 40:60) Revela como mancha amarilla.

IR (CHCl₃) cm⁻¹: 1652, 1606, 1561, 1509, 1430, 1368, 1298, 1239, 1187, 1164, 1119, 1097, 1032, 907, 825, 807, 761.

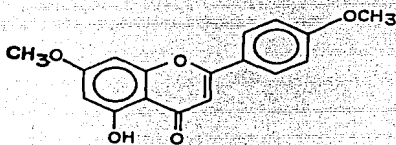
RMN¹H (80 MHz, CDCl₃ + DMSO): 7.8 ppm, 6.99 ppm (A₂B₂, 2',6'-H, 3',5'-H, J = 9 Hz, 4H), 6.43 ppm, 6.27 ppm (AB, 6-H,8-H, J = 2 Hz, 2H), 5.1 ppm (OH, s, w_{1/2} = 44 Hz, 1H), 3.85 ppm (COOCH₃, s, 3H).

EMIE, m/e: M⁺ 284 (100), 269 (3), 241 (10), 213 (5), 152 (7.5), 132 (12.5), 124 (7.5), 118 (5), 96 (3), 89 (5), 69 (7.5).

Dicha sustancia fue identificada como la 5,7-dihidroxi-4'-metoxiflavona (acacetina) por comparación de los datos anteriores con los reportados en la literatura.

7,4'-dimetilapigenina (12).

Es el producto principal de la reacción de la acetina con diazometano en éter a temperatura ambiente. Revela como una mancha de color amarillo al reaccionar con sulfato cérico amoniacal.



12

pf = 175 -176 °C

λ_{max} (nujol) 1645 cm^{-1} (carbonilo)

RMN¹H (CDCl₃): mostró las señales esperadas con 5-OH singulete

a 2.8 ppm.

La fracción F de la cromatografía inicial se obtuvo al eluir la columna con hexano-acetato de etilo (70:30) y reunir los eluatos 243-282 concentrados por destilación en rotaevaporador.

El peso en seco de la fracción F fue de 7.3 g los cuales se aplicaron absorbidos en silicagel sobre una columna de cromatografía empacada con 240.0 g de gel de sílice desactivada con agua destilada al -

10%. Aquí también se eligió como fase móvil una mezcla de n-hexano-acetato de etilo, puesto que al probar en cromatografía en placa fina funcionaba mejor que otras fases móviles para la resolución de los componentes. Se colectaron eluatos de aproximadamente 100 ml.

En esta fracción (F), estuvieron presentes también (aunque en menor proporción) el ácido ursólico (0.210 g) y la mezcla de ácidos ursólico y oleanólico (0.320 g).

En las fracciones 46-79 de esta recromatografía se contenía una mezcla de varios componentes, los cuales debido a su valor tan cercano de R_f y a la poca proporción de cada uno de ellos no fue posible analizar por las técnicas convencionales de cromatografía en columna y en cromatografía en placa fina preparativa.

A partir de la fracción 80 y hasta la 91 eluidas con hexano-acetato de etilo (60:40) se separó una sustancia que revela azul con luz ultravioleta y al reaccionar con sulfato cérico amoniacal en cromatografía en placa fina. Aquí su color se torna de azul a morado y finalmente a café a medida que transcurre el tiempo.

Por comparación directa con muestras auténticas en cromatografía en placa fina, utilizando diversos sistemas de elución como fase móvil y por observación de los cambios de color característicos en cada una de las cromatoplasmas, pudo realizarse la identificación de esta sustancia como clovandiol (7).

El rendimiento obtenido fué de 0.053 g.

La fracción G (8.05 g, eluatos 296-344) fue obtenida por elución de la cromatografía inicial con la mezcla n-hexano-acetato de etilo (60:40) y concentración por destilación de las fracciones correspondientes.

Esta fracción estaba constituida por diversas sustancias en pequeña proporción y difícilmente separables por métodos sencillos de cromatografía.

La espectroscopía de infrarrojo se utilizó para averiguar la presencia de grupos funcionales ácidos. Al comprobarse estos, se procedió a la esterificación de los mismos con diazometano en éter como sigue:

960 mg de esta fracción se trataron con diazometano étereo a temperatura ambiente durante aproximadamente una hora. El producto de la reacción mostró manchas más homogéneas y separables al ser analizado por cromatografía en placa fina en diversos sistemas de elución.

El producto de la reacción (834 mg) se concentró a sequedad y se aplicó en una columna de cromatografía utilizando 30 g de silicagel desactivada al 10% con agua destilada. La fase móvil estuvo conformada por una mezcla de cloroformo-acetona con polaridad creciente, en base a los criterios de resolución y eficacia discutidos anteriormente.

Las fracciones 6-13 de esta recromatografía contenían como componente principal los derivados metilados de los ácidos ursólico y oleonólico, los cuales fueron comparados por cromatografía en placa fina con los correspondientes productos de las reacciones de esterificación de dichos ácidos mostrando los mismos valores de R_f y el mismo color

al reaccionar con sulfato cérico amoniacal.

Las fracciones siguientes (14-37) contenían solo pequeñas cantidades de sus componentes por lo que no se analizaron.

De la fracción 38 y hasta la 41 se observó la aparición de una mancha homogénea que revela de color café al reaccionar con sulfato cérico amoniacal.

Se obtuvieron 19.8 mg de esta substancia (8) que presenta consistencia aceitosa de color amarillo claro. Sus datos espectrales son los siguientes:

2-epitormentato de metilo (8).

R_f = 0.63 (cloroformo-acetona 9:1)

= 0.45 (cloroformo-acetona-metanol 9:1: 1 gota)

IR (CHCl₃) cm⁻¹, (Espectro 1): 3621, 3571, 3029, 2933, 2879, 1718, 1648, 1602, 1458, 1381, 1320, 1259; 1239, 1231, 1190, 1149, 1112, 1092, 1048, 1030, 1001, 972, 929, 900, 865.

RMN¹H (80 MHz, CDCl₃), (Espectro 2): 5.35 ppm (=C₁₂H, dd, J = 4, 4 Hz, 1H), 4.06 ppm (C₂H, ddd, J = 4, 4, 4 Hz, 1H), 3.6 ppm (COOCH₃, s, 3H), 3.2 ppm (C₃H, m, w_{1/2} = 8 Hz, 1H), 2.6 ppm (C₁₈H, s, w_{1/2} = 6 Hz, 1H), 1.27 ppm (s, 3H), 1.24 ppm (s, 6H), 1.23 ppm (s, 3H), 1.04 ppm (s, 3H), 0.94 ppm (d, J = 6 Hz, 3H), 0.71 ppm (s, 3H).

EMIE, m/e, (Espectro 3): M⁺ 502 (5), 442 (15), 262 (10), 260 (15), 250 (15), 224 (20), 203 (25), 201 (35), 179 (70), 147 (20), 146 (30), 69 (40), 55 (40), 43 (100), 41 (40).

La fracción G total (8.12 g) se sometió a esterificación con diazometano y posterior separación y purificación por cromatografía en columna en las mismas condiciones que la anterior, con el objeto de obtener mayor cantidad de la sustancia 8.

Se obtuvo un total de 170 mg de la sustancia 8.

Derivado diacetilado de 8 (9).

145 mg de la sustancia 8 se sometieron a condiciones normales de acetilación con anhídrido acético en piridina, a temperatura ambiente durante dos horas.

De la reacción anterior se obtuvo un producto de menor polaridad que el sustrato y que presenta consistencia aceitosa de color amarillo (125 mg).

La sustancia anterior (9) presenta los siguientes datos:

Rf = 0.7 (cloroformo-acetona 9:1)

IR (CHCl₃) cm⁻¹, (Espectro 4): 3684, 3622, 3030, 1735, 1630.

RMN¹H (80 MHz, CDCl₃), (Espectro 5): 5.32 ppm (=C₁₂H, dd, J = 4, 4 Hz, 1H), 4.6 ppm (C₃H, d, J = 5 Hz, 1H), 3.6 ppm (COOCH₃, s, 3H), 2.58 ppm (C₁₈H, s, w_{1/2} = 5 Hz, 1H), 2.04 ppm (OAc, s, 3H), 2.02 ppm (OAc, s, 3H), 1.25 ppm (s, 3H), 1.2 ppm (s, 3H), 1.18 ppm (s, 3H), 1.05 ppm (s, 3H), 0.94 ppm (d, J = 6 Hz, 3H), 0.9 ppm (s, 3H), 0.71 ppm (s, 3H).

RMN¹³C (80 MHz, CDCl₃), (Espectro 7): 178.29 ppm (s), 170.57 ppm

(s), 170.12 ppm (s), 138.45 ppm (s), 128.83 ppm (d), 78.14 ppm (d), 73.14 ppm (s), 69.68 ppm (d), 55.3 ppm (q), 53.44 ppm (d), 51.48 ppm (d), 48.05 ppm (s), 47.79 ppm (d), 42.03 ppm (t), 41.51 ppm (d), 41.33 ppm (s), 40.19 ppm (s), 37.46 ppm (s), 37.39 ppm (s), 36.81 ppm (t), 32.88 ppm (t), 29.16 ppm (q), 28.25 ppm (t), 27.43 ppm (q), 26.11 ppm (t), 25.57 ppm (t), 24.58 ppm (q), 23.81 ppm (t), 21.18 ppm (q), 20.77 ppm (q), 18.22 ppm (t), 17.7 ppm (q), 16.85 ppm (q), 16.1 ppm (q), 15.92 ppm (q).

EMIE, m/e, (Espectro 6): M^+ 586 (8), 568 (3), 526 (25), 510 (3), 466 (8), 454 (10), 307 (3), 260 (8), 203 (4), 201 (20), 179 (50), 146 (30), 119 (20), 81 (20), 69 (15), 55 (20), 43 (100), 41 (10).

2 α -hidroxiursolato de metilo (10).

Se aisló de la fracción G como un producto de mayor polaridad que la substancia g (eluatos 43-44 de esta recromatografía). Se obtuvieron 24 mg de esta substancia que cristaliza en forma de agujas pequeñas de color blanco. Presenta los siguientes datos físicos y espectroscópicos.

pf = 133 - 134 °C

Rf = 0.43 (cloroformo-acetona-metanol 9:1: 1 gota)

IR (CHCl₃) cm⁻¹: 3597, 3038, 2972, 2950, 2872, 1719, 1602, 1512, 1457, 1380, 1326, 1306, 1167, 1125, 1106.

RMN¹H (80 MHz, CDCl₃). (Espectro 8): 6.67 ppm (s, 1H), 5.24 ppm (=C₁₂H, m, w_{1/2} = 6 Hz, 1H), 3.6 ppm (COOCH₃, s, 3H), 3.0 ppm (d, J = 10 Hz, 1H), 0.93 ppm (s, 3H), 0.75 ppm (s, 3H).

EMIE, m/e: M^+ 486 (15), 471 (5), 468 (17.5), 450 (7.5), 446 (7.5), 426 (20), 411 (7.5), 409 (15), 393 (7.5), 262 (90), 203 (100), 189 (25), 133 (45).

El rendimiento total de la sustancia 10 en la fracción G fue de 245 mg.

2 α -acetoxi-3-acetilursolato de metilo (11).

100.4 mg de 2 α -hidroxiursolato de metilo se hicieron reaccionar con anhídrido acético en piridina, a temperatura ambiente durante dos horas. El producto obtenido de esta reacción (87 mg) es de menor polaridad que el sustrato correspondiente y muestra los datos siguientes:

Consistencia aceitosa de color amarillo.

Rf = 0.52 (cloroformo-acetona-metanol 9:1:1 gota)

IR (CHCl₃) cm⁻¹: 2961, 2931, 2862, 1720, 1607, 1580, 1463, 1381, 1284, 1130, 1076, 1039, 958.

RMN¹H (80 MHz, CDCl₃), (Espectro 9): 5.24 ppm (=C₁₂H, m, w_{1/2} = 7 Hz, 1H), 5.01 ppm (dd, J = 4, 4 Hz, 1H), 3.58 ppm (COOCH₃, s, 3H), 2.02 ppm (OAc, s, 3H), 1.95 ppm (OAc, s, 3H), 1.05 ppm (s, 3H), 0.94 ppm (d, J = 6 Hz, 3H), 0.74 ppm (s, 3H).

EMIE, m/e: M^+ 570 (12.5), 510 (17.5), 495 (5), 450 (15), 445 (10), 407 (3), 391 (5), 262 (90), 249 (10), 203 (100), 189 (20), 186 (12.5), 173 (10), 133 (40), 119 (25).

La fracción H (eluatos 345-398) obtenida por la elución de la cromatografía inicial con n-hexano-acetato de etilo (50:50) presentó manchas barridas muy polares al analizarla por cromatografía en capa fina en diversos sistemas de elución (incluyendo la adición de metanol, ácido acético, piridina), por lo que se intentó la separación mediante la esterificación con diazometano en éter. Sin embargo, la resolución de los componentes no fue grandemente mejorada.

El mismo tratamiento se realizó a la fracción I (eluatos 400-440) eluida con acetato de etilo al 100%. Aquí tampoco se logró mejor resolución y solo una substancia pudo ser separada y purificada, pero debido a la baja proporción y a la poca solubilidad en los disolventes comunes de análisis no se realizó su estudio espectroscópico y espectrométrico.

Materia] vegetal.

Las partes aéreas de *Lepechinia caulesces* (Ort) EpI se colectaron el 7 de noviembre de 1984 en la carretera Morelia-Zitácuaro.

Las muestras herborizadas se encuentran en el Herbario Nacional voucher M-8525 del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Extracción.

5.1 Kg de planta seca y fragmentada se maceraron con acetona durante dos días a temperatura ambiente. La operación se efectuó dos veces.

Un total de 63 g de extracto acetónico fueron obtenidos, una vez eliminado el disolvente por destilación y sequedad a vacío.

Fraccionamiento, separación y purificación.

El total del extracto acetónico (63 g) fue absorbido en 100 g de gel de sílice desactivada al 10% con agua destilada y fue aplicado a una columna de cromatografía empacada con 1.35 Kg de gel de sílice desactivada en la misma proporción y suspendida en hexano.

El desarrollo de la cromatografía se llevó a cabo con un gradiente de n-hexano-acetato de etilo y se concluyó con acetona. Se colectaron eluatos de aproximadamente 1000 ml.

Las fracciones iniciales, eluidas con n-hexano estaban constitui-

das, de acuerdo a su aspecto físico por hidrocarburos y ceras, por lo que no fueron analizadas en detalle.

Las primeras fracciones eluidas con n-hexano-acetato de etilo (90:10) fueron tratadas con diazometano en éter, observandose burbujeo en la reacción, sin embargo, la recromatografía de este residuo desarrollada con mezclas de polaridad creciente de n-hexano-acetato de etilo (iniciando con 95:5), no permitió el aislamiento de metabolitos secundarios característicos, puesto que los espectros de RMN¹H de algunas fracciones alternadas, solo mostraron una señal simple centrada en 1.25 ppm.

Las fracciones finales de la cromatografía inicial, que fueron eluidas con n-hexano-acetato de etilo (90:10), fueron reunidas y se obtuvo un residuo que pesó 10.0 g mismos que se hicieron reaccionar con diazometano en solución etérea. El producto de la reacción se aplicó a una columna de cromatografía empacada con 350 g de silicagel suspendida en cloroformo. Este disolvente fue también utilizado como el sistema de elución durante el desarrollo de la cromatografía. Se colectaron eluatos de aproximadamente 300 ml.

De las fracciones 13-28 de esta recromatografía, cristalizó una sustancia de punto de fusión 130-135 °C cuyas aguas madres fueron recromatografiadas en una columna en condiciones similares, obteniéndose un total de 140 mg de la misma sustancia.

Mediante recrystalizaciones sucesivas, se logró obtener la muestra analítica del 8 α , 9 α , 13 α , 14 α -diepoxiabietan-18-oato de metilo (13) y se obtuvieron los siguientes datos:

$\rho F = 130 - 132 \text{ } ^\circ\text{C}$

IR (CHCl_3) cm^{-1} , (Espectro 10): 3009, 3007, 2951, 2873, 1718, 1464, 1434, 1386, 1367, 1255, 1192, 1171, 1151, 1114, 1065, 1040, 953, 937, 919, 884, 693.

RMN^1H (80 MHz, CDCl_3): 3.65 ppm (COOCH_3 , s, 3H), 2.76 ppm (C_{14}H , s, 1H), 2.35 ppm (C_5H , dd, $J = 4, 7$ Hz, 1H), 2.15 ppm (m, 1H), 0.95 ppm (d, $J = 6$ Hz, 3H), 0.92 ppm (d, $J = 6$ Hz, 3H), 1.17 ppm (s, 3H), 1.05 ppm (s, 3H), 1.02 ppm (s, 3H), 1.9 - 1.3 ppm (m, 14H).

RMN^1H (500 MHz, CDCl_3), (Espectro 11): 3.64 ppm (COOCH_3 , s, 3H), 2.78 ppm (C_{14}H , s, 1H), 2.34 ppm (C_5H , dd, $J = 4, 7$ Hz, 1H), 2.14 ppm (m, 1H), 0.97 ppm (d, $J = 6$ Hz, 3H), 0.93 ppm (d, $J = 6$ Hz, 3H), 1.15 ppm (s, 3H), 1.02 ppm (s, 3H), 1.9 - 1.3 ppm (m, 14H).

RMN^{13}C (500 MHz, CDCl_3), (Espectro 12): 179 ppm (s), 65.5 ppm (s), 62.8 ppm (s), 58.7 ppm (s), 57.7 ppm (d), 52.12 ppm (q), 47.2 ppm (s), 37.85 ppm (d), 37.11 ppm (s), 36.44 ppm (t), 33.73 ppm (d), 32.96 ppm (t), 26.07 ppm (t), 23.3 ppm (t), 21.35 ppm (t), 19.43 ppm (t), 18.53 ppm (q), 18.35 ppm (q), 17.87 ppm (t), 16.97 ppm (q), 16.6 ppm (q).

EMIE, m/e: M^+ 348 (2), 330 (12), 321 (6), 320 (6), 305 (20), 262 (12), 260 (8), 259 (10), 249 (18), 247 (10), 246 (5), 245 (45), 227 (25), 199 (25), 189 (25), 187 (2), 185 (12), 175 (20), 173 (18), 171 (16), 161 (18), 123 (100), 121 (76), 55 (59), 43 (59).

Las fracciones 34-43 de la misma recromatografía fueron reunidas y el residuo obtenido (720 mg) se recromatografiaron en una columna de cromatografía empacada con silicagel (30 g) desactivada al 10% con agua destilada, utilizando cloroformo como sistema de elución.

Del anterior procedimiento se obtuvieron 88 mg de una sustancia que por comparación directa con muestras auténticas y de sus datos espectrales con los reportados, se identifica como el oleanolato de metilo (5), cuyos datos físicos y espectroscópicos se encuentran reportados en la página 51.

Algunas fracciones de la cromatografía inicial, eluidas con una mezcla de n-hexano-acetato de etilo (75:25) fueron reunidas y concentradas a sequedad por destilación en rotaevaporador.

El residuo total (8.1 g) correspondiente a estas fracciones, fue aplicado sobre una columna de cromatografía empacada con 250 g de gel de sílice desactivada al 10% y suspendida en n-hexano. El desarrollo de la cromatografía se llevó a cabo utilizando mezclas de polaridad creciente de n-hexano-acetato de etilo, como sistema de elución.

Las fracciones 20-46 de esta recromatografía, que fueron eluidas con n-hexano-acetato de etilo (80:20), contenían como componente principal mezclas de los ácidos triterpénicos libres, ursólico y oleanólico, cuya identificación fue realizada por comparación directa con muestras disponibles en el laboratorio.

Las fracciones siguientes (47-70) eluidas con n-hexano-acetato de etilo (50:50) se reunieron, obteniéndose 1.4 g de residuo seco, el cual se sometió a esterificación con diazometano en éter.

El producto de la reacción se resolvió en sus componentes mediante un método de cromatografía en columna, empacada con 50 g de silicagel, desactivada al 10% y eluida con una mezcla constante de n-hexano-acetato de etilo (80-20).

De la anterior recromatografía se logró el aislamiento, en las fracciones 31-36 del 7 α -hidroxi-8,11,13-abietatrien-18-oato de metilo (14) como componente puro (11 mg) que muestra los datos espectrales siguientes:

pf = 103 -106 °C

IR (CHCl₃) cm⁻¹, (Espectro 13): 3596, 3032, 3007, 2954, 2870, 1717, 1496, 1460, 1435, 1385, 1332, 1251, 1181, 1155, 1125, 1077, 1044, 976, 954, 894, 867, 831, 630.

RMN¹H (80 MHz, CDCl₃), (Espectro 14): 7.18 ppm (m, 3H), 4.72 ppm (C₇H, dd, J = 5, 3 Hz, 1H), 3.65 ppm (COOCH₃, s, 3H), 2.87 ppm (C₁₅H, hept, J = 7 Hz, 1H), 2.53 ppm (C₅H, dd, J = 13, 2 Hz, 1H), 1.8 ppm (OH, s, 1H), 1.28 ppm (s, 3H), 1.24 ppm (d, J = 7 Hz, 6H), 1.19 ppm (s, 3H).

RMN¹H (80 MHz, C₅D₅N), (Espectro 15): 4.95 ppm (C₇H, dd, J = 5, 3 Hz, 1H), 3.65 ppm (COOCH₃, s, 3H), 2.82 ppm (C₅H, dd, J = 13, 2 Hz, 1H), 1.35 ppm (s, 3H), 1.2 ppm (d, J = 7 Hz, 6H), 1.14 ppm (s, 3H).

RMN¹H (80 MHz, C₆D₆), (Espectro 16): 4.64 ppm (C₇H, m, w_{1/2} = 9 Hz, 1H), 3.45 ppm (COOCH₃, s, 3H), 2.55 ppm (C₅H, dd, J = 13, 2 Hz, 1H), 2.77 ppm (C₁₅H, hept, J = 7 Hz, 1H), 1.29 ppm (s, 3H), 1.2 ppm (d, J = 7 Hz, 6H), 1.01 ppm (s, 3H).

EMIE, m/e: M⁺ 330 (12), 312 (25), 238 (25), 237 (100), 195 (30), 162 (25), 141 (18), 91 (17.5).

Algunas fracciones más polares de la cromatografía inicial, las cuales fueron eluidas con acetato de etilo al 100%, se reunieron y concentraron a sequedad con lo cual se obtuvo 5.8 g de residuo seco.

Este residuo se aplicó a una columna de cromatografía empacada con 200 g de silicagel desactivada al 10% con agua destilada.

Para el desarrollo de la columna se utilizó el sistema n-hexano-acetato de etilo (70:30) como eluyente constante hasta la fracción 57 y n-hexano-acetato de etilo (50:50) de la fracción 58 a la 141.

El análisis por cromatografía en placa fina de las primeras fracciones (1-57), muestra solo manchas difusas, por lo que su identificación mostró extrema dificultad.

De algunas fracciones subsecuentes se obtuvo un sólido amorfo (40 mg) que por sus características de solubilidad en los disolventes convencionales de análisis, no pudo ser caracterizado.

De las fracciones más polares de esta recromatografía, eluidas con acetona, se obtuvieron 14 mg de un sólido amorfo.

La substancia anterior fue sometida a reacción de acetilación

con anhídrido acético en piridina. El producto de la reacción registró los siguientes datos:

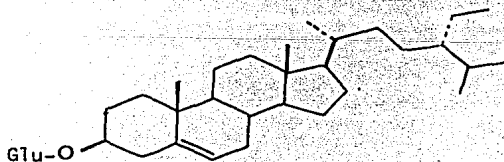
pf = 151 °C

IR (CHCl₃) cm⁻¹: 2958, 2870, 1754, 1513, 1463, 1436, 1371, 1243, 1168, 1134, 1039, 953, 909.

RMN¹H (80 MHz, CDCl₃): 5.33 ppm (=C₆H, m, w_{1/2} = 9 Hz, 1H), 5.07 ppm (dd, J = 16, 8 Hz, 3H), 2.07 - 2.0 ppm (OAc, 4s, 12H), 1.00 ppm (s, 3H), 0.85 ppm (d, J = 6 Hz, 6H), 0.78 ppm (s, 3H), 0.68 ppm (s, 3H).

EMIE, m/e: 397 (50), 396 (M⁺ - 348, 100), 331 (20), 169 (70), 145 (15), 127 (13), 109 (40), 95 (15), 81 (20), 69 (15), 57 (10), 55 (10), 43 (60).

Los datos anteriores identifican a la substancia 15 como el derivado acetilado de β-D-glucósido de β-sitosterol.



15

VI. R E S U M E N Y
C O N C L U S I O N E S

Dos plantas medicinales mexicanas, pertenecientes a la familia Labiatae fueron investigadas de acuerdo a los procedimientos convencionales de maceración y separación y purificación por cromatografía en columna y placa fina preparativa.

La identificación de los constituyentes se llevó a cabo por medio de comparación de datos y de muestras auténticas.

En la especie *Cunila lythriifolia* fue aislado como componente minoritario un nuevo ácido triterpénico (previa derivatización con diazometano) cuya estructura se estableció por medio de las técnicas de espectroscopía de infrarrojo y de resonancia magnética nuclear y de espectrometría de masas, llamado ácido 2-epitorméntico.

Además de una gran variedad de aceites esenciales se aislaron también los ácidos ursólico (2), oleanólico (4), 2 α -hidroxiursólico (10), y β -sitosterol (1) como componentes terpénicos; el flavonoide acacetina (6) y clovandiol (7) en esta planta.

La especie *Lepechinia caulesces*, es estudiada por primera vez y su composición de metabolitos secundarios está formada por los ácidos triterpénicos ursólico (2) y oleanólico (4) además del β -D-glucósido de β -sitosterol (15).

En esta especie se aislaron también dos nuevos ácidos diterpénicos naturales (previa esterificación con diazometano en éter): el 8 α , 9 α , 13 α , 14 α -diepoxiabietan-18-oato de metilo (13) y el 7 α -hidroxi-8, 11,13-abietatrien-18-oato de metilo (14) cuyas estructuras se estable-

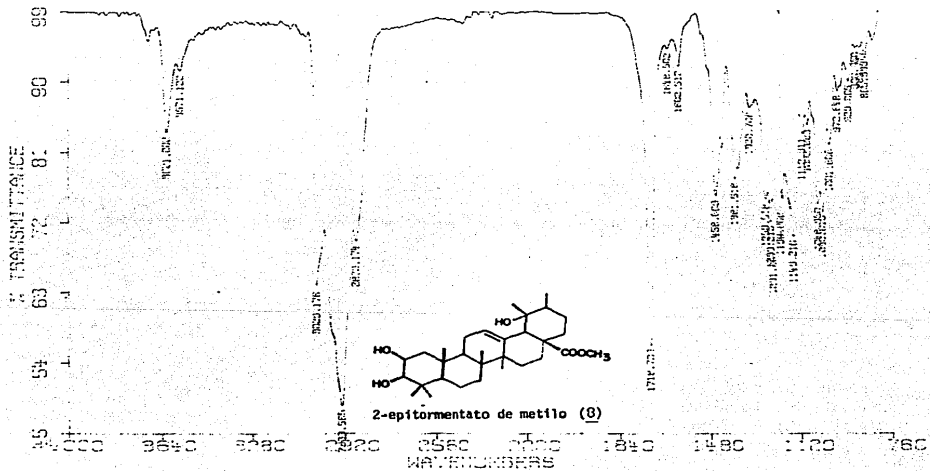
cieron por métodos espectroscópicos.

De esta manera, se ha llevado a cabo el análisis fitoquímico de las especies *Cunila lythriifolia* y *Lepechinia caulesces*.

Cabe señalar que no se termina aquí el estudio total a realizar en una planta medicinal, sino solo la correspondiente a la parte fitoquímica o de composición de constituyentes y que la continuación de tal estudio requiere la participación de disciplinas tales como la Biología, la Farmacología, la Toxicología, etc.

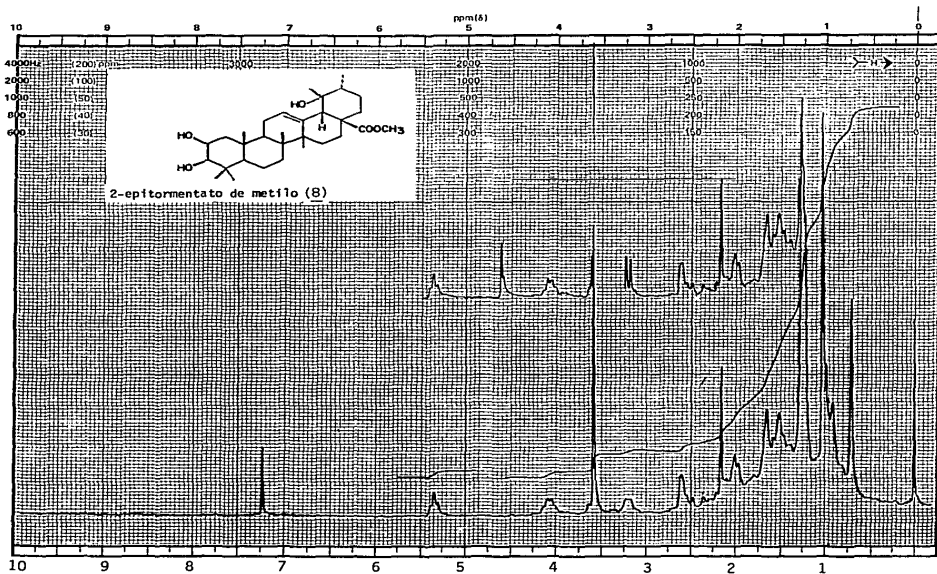
Sin embargo, el conocimiento de los constituyentes principales de estas plantas y la obtención de los mismos facilita de gran manera la realización de los estudios subsecuentes.

VII. ESPECTROS

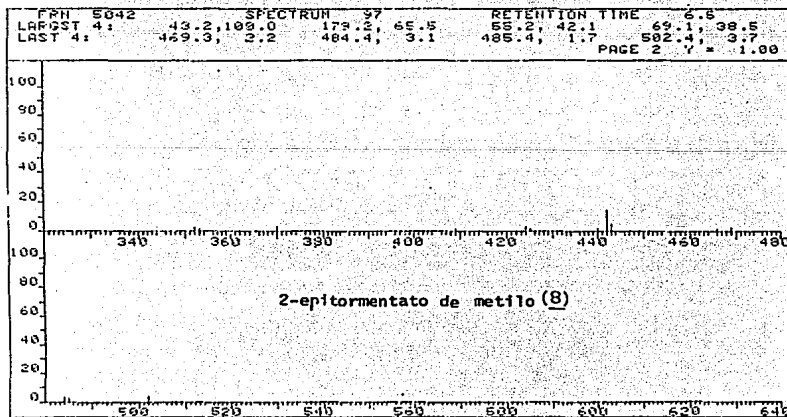
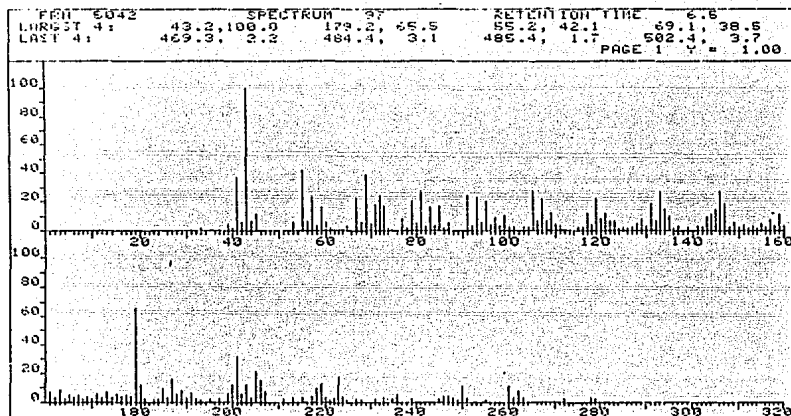


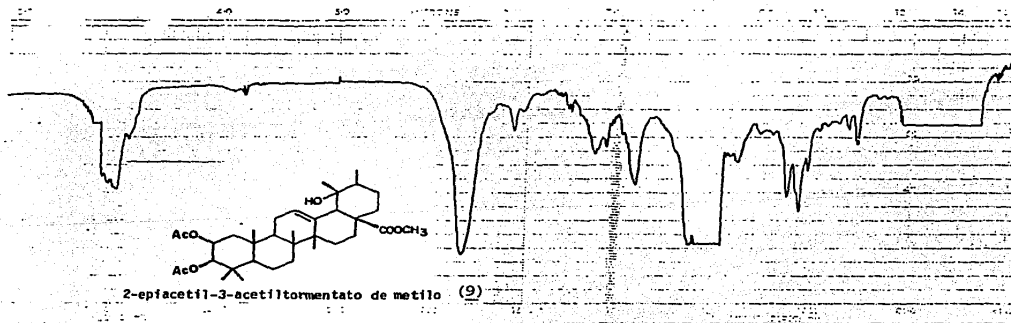
ESPECTRO 1

TESIS CON
FALLAS DE ORIGEN

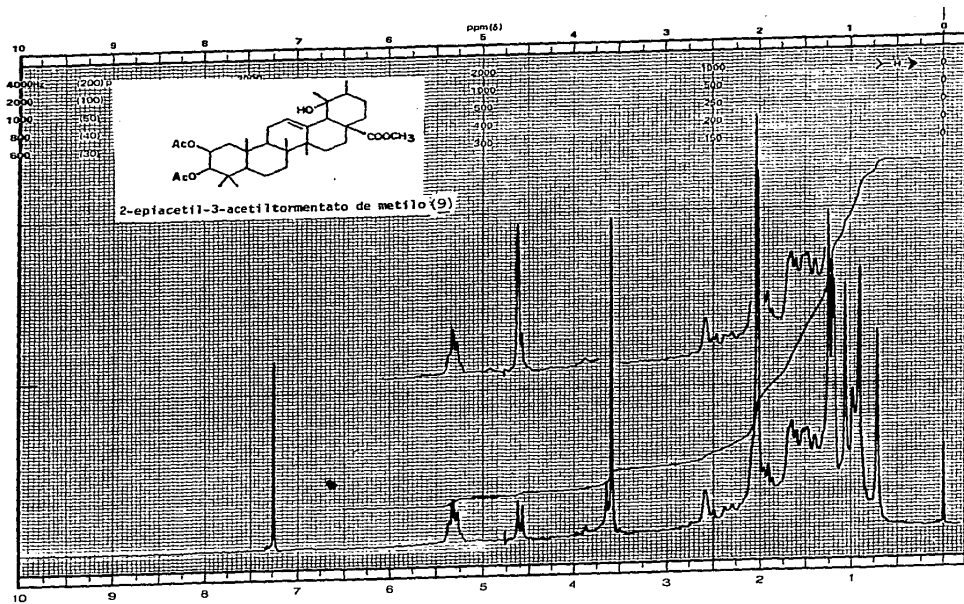


ESPECTRO 2

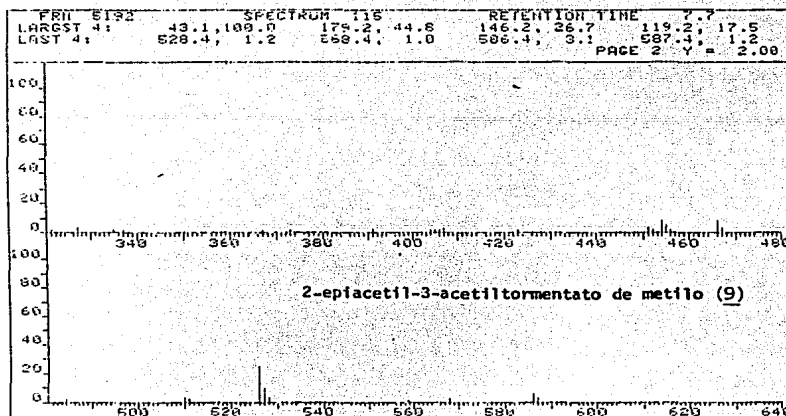
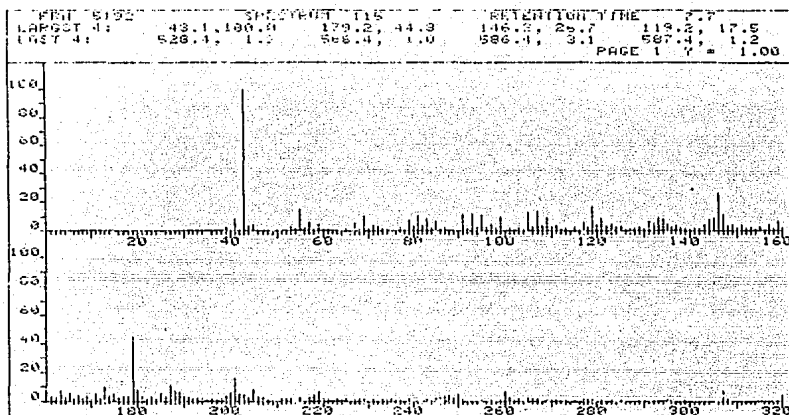




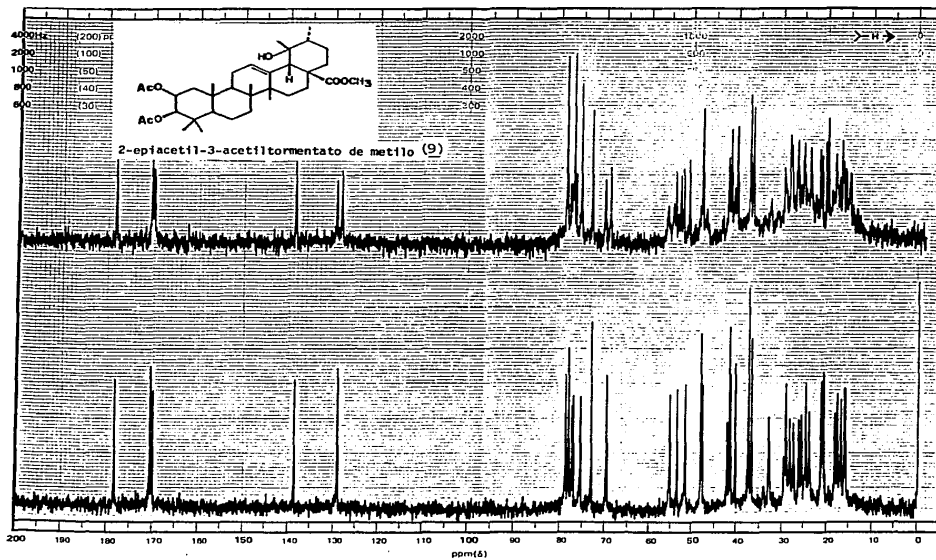
ESPECTRO 4



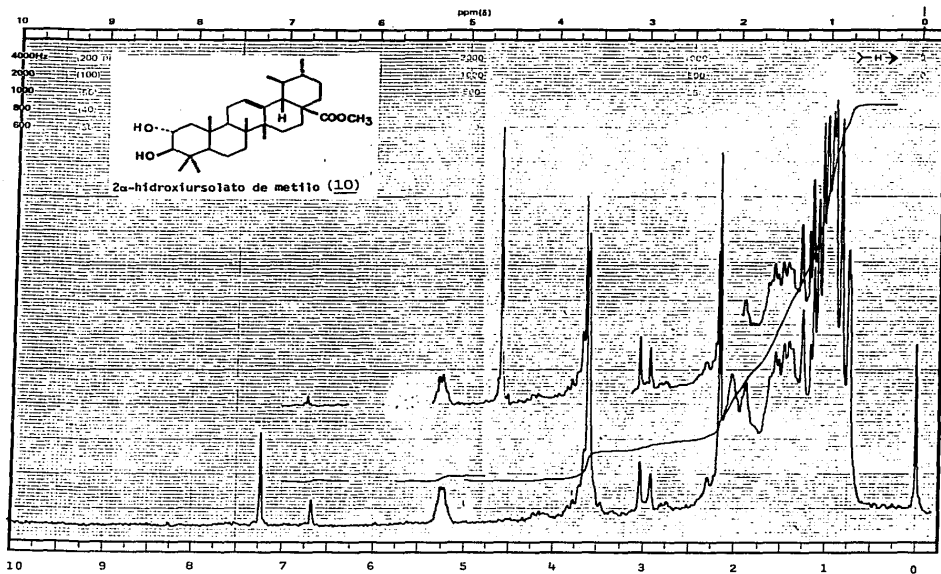
ESPECTRO 5

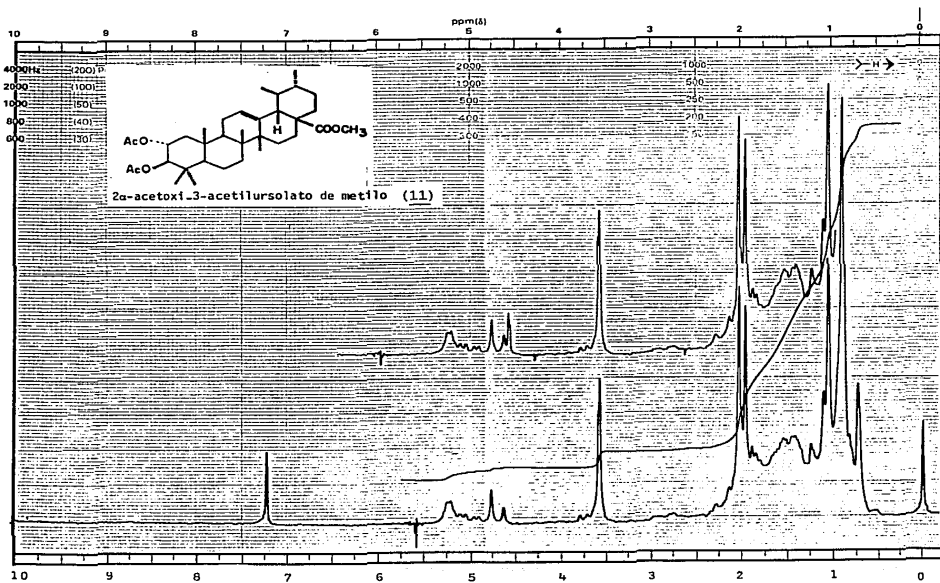


ESPECTRO 6

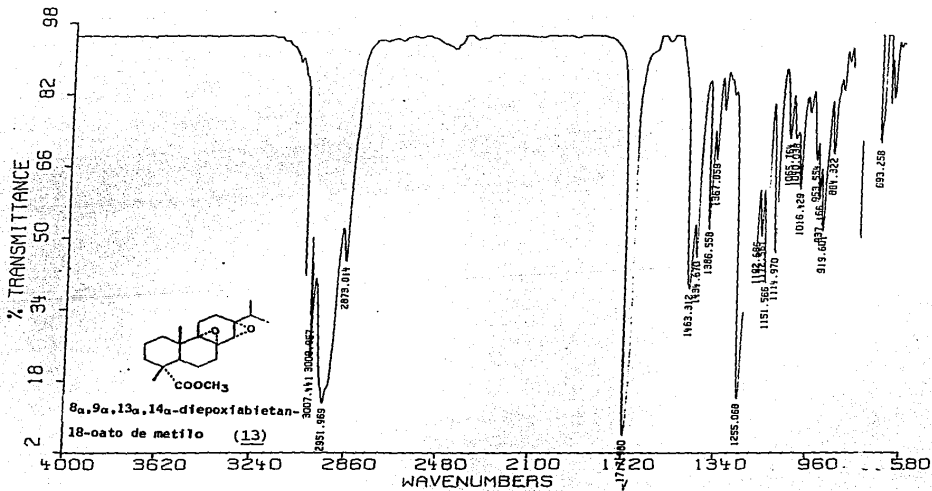


ESPECTRO 7

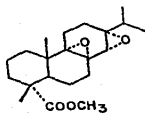




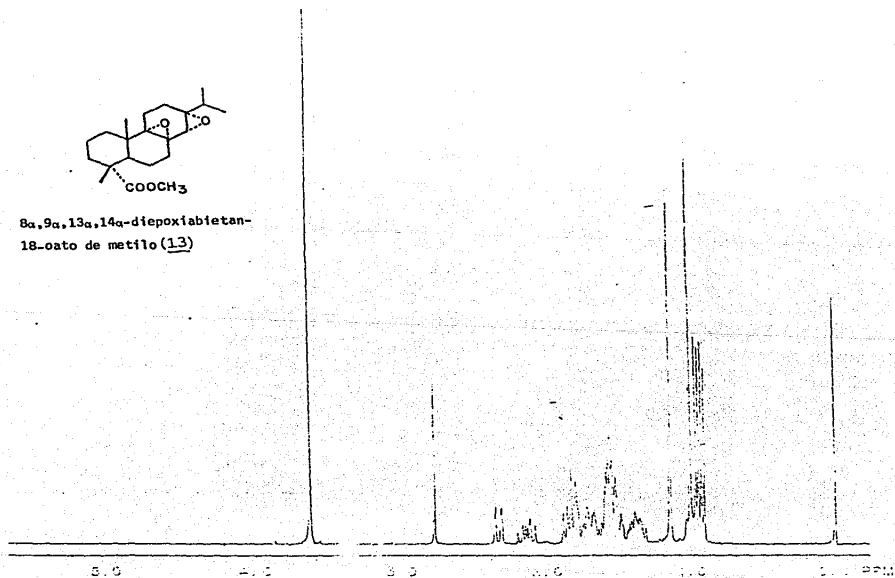
ESPECTRO 9



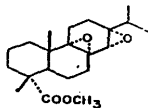
ESPECTRO 10



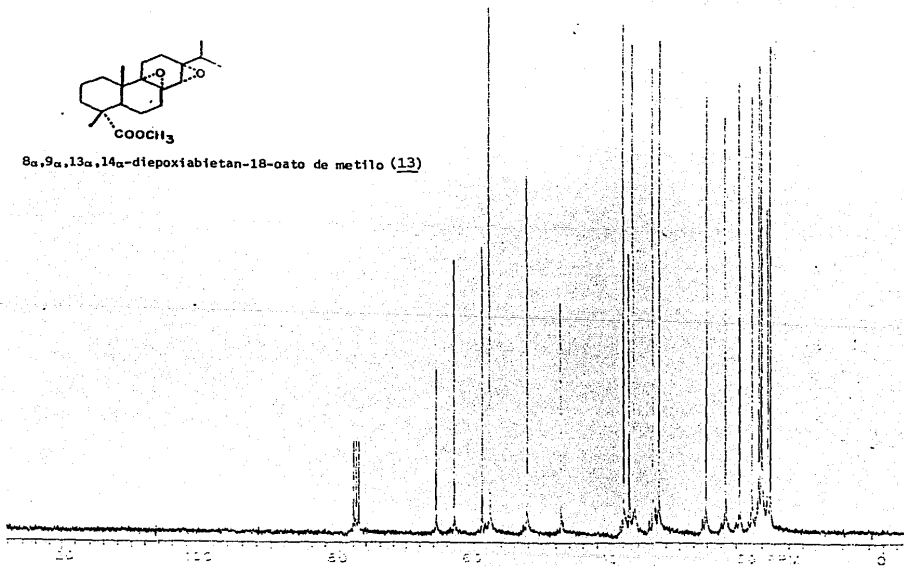
8 α ,9 α ,13 α ,14 α -diepoxiabietan-
18-oato de metilo (13)



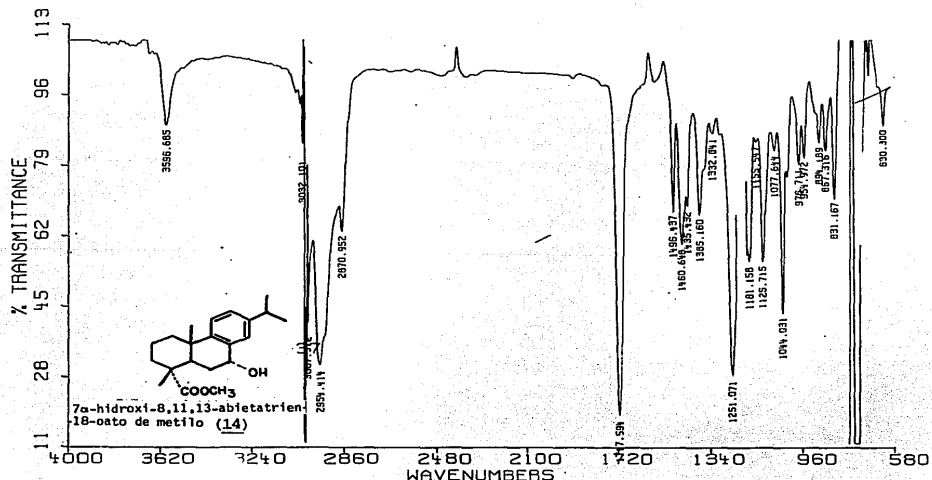
ESPECTRO 11



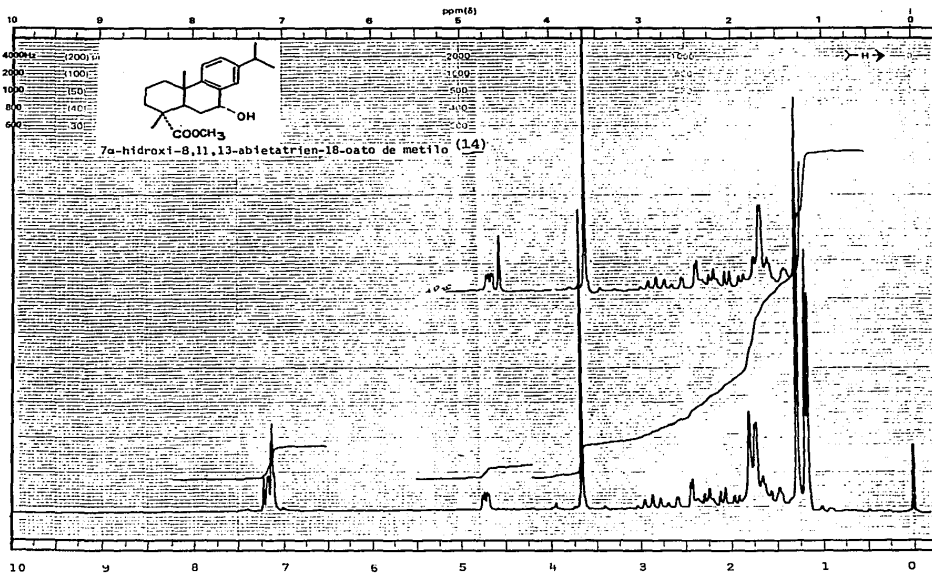
8 α ,9 α ,13 α ,14 α -diepoxiabietan-18-ato de metilo (13)



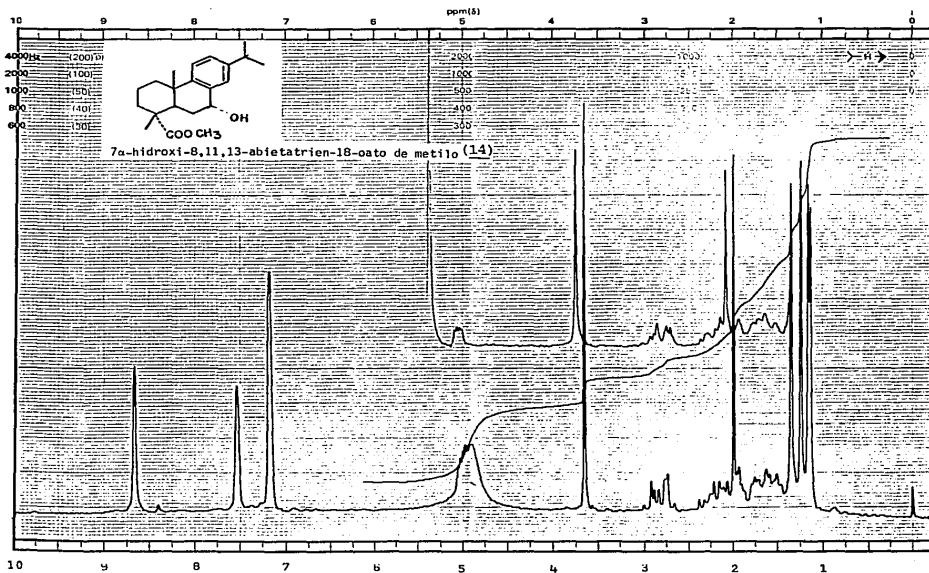
ESPECTRO 12



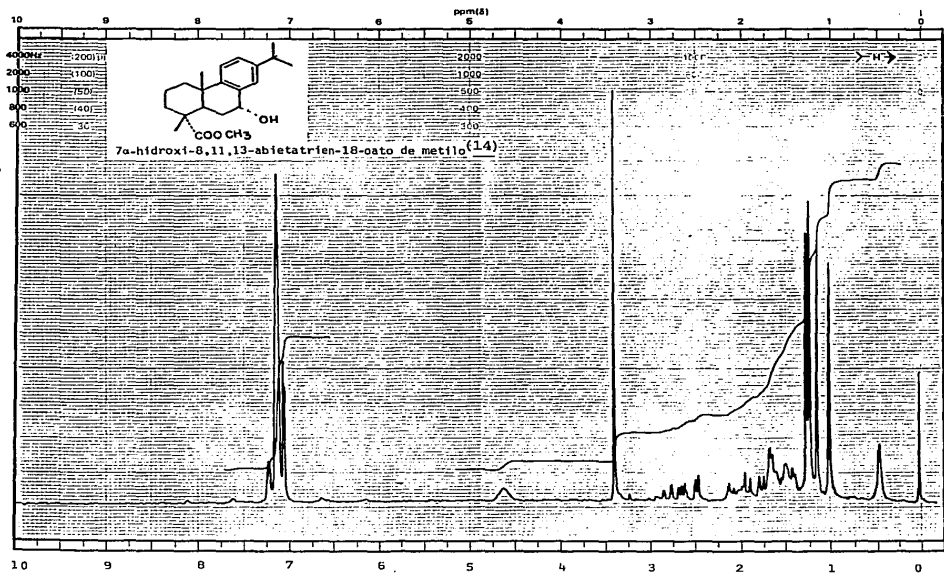
ESPECTRO 13



ESPECTRO 14



ESPECTRO 15



ESPECTRO 16

VIII. BIBLIOGRAFIA

- 1).- H. Wagner "Pharmaceutical and Economic use of the Labiatae and Rutaceae Families" Rev. Latinoamer. Quím. 8, 16 (1977).
- 2).- E. E. Conn "The Biochemistry of Plants" Academic Press U. S. A. (1981).
- 3).- B. V. Milborrow "Biosynthesis and its Control in Plants" Academic Press Inc. (London) LTD, Great Britain, 175 (1973).
- 4).- G. A. Fester, E. A. Martinuzzi, J. A. Retamar, A. I. A. Ricciardi and F. Taboada "Algunas Esencias Volátiles" 6a. Comunicación, Rev. Fac. Ing. Quím. 23, 15 (1954).
- 5).- G. A. Fester, J. A. Retamar and A. I. A. Ricciardi "Algunas Esencias Volátiles" 8a. Comunicación, Rev. Fac. Quím. 25, 37 (1956).
- 6).- G. A. Fester, J. A. Retamar and A. I. A. Ricciardi "Algunas Esencias Volátiles" 10a. Comunicación, Rev. Fac. Quím. 27, 5 (1958).
- 7).- B. M. Lawrence and J. K. Morton "Volatile Constituents of *Lepechinia calycina*" Phytochemistry 18, 1887 (1979).
- 8).- A. Alpande de Moraes, J. Correa Mourão, O. R. Gottlieb, M. Koket-su, L. Lannes Moura, M. Leão da Silva "Óleos Terpênicos do Estado do Rio do Janeiro" QT/b-34, 320.
- 9).- E. C. de Riscalá and J. A. Retamar "Aceites Esenciales de la provincia de Tucumán, Esencia de *Lepechinia graveolens*" Archivos de Bioquímica, Química y Farmacia, Tucumán, 25 (1973).
- 10).- G. A. Fester, J. A. Retamar and A. I. A. Ricciardi "Metodología del Estudio de Esencias Volátiles" Rev. Fac. Ing. Quím. 77 (1959).
- 11).- G. A. Fester, E. A. Martinuzzi, J. A. Retamar and A. I. A. Ri-

- cciardi "Estudio de Esencias Volátiles de Córdoba y San Luis" Boletín de la Academia Nacional de Ciencias, 375 (1956).
- 12).- J. Escudero, L. Pérez, R. M. Rabanal and S. Valverde "Diterpenoids from *Salvia oxyodon* and *Salvia lavandulifolia*" Phytochemistry 22, 585 (1983).
- 13).- F. Simões, A. Michavila, B. Rodríguez, M. C. García-Alvarez and M. Hasan "A quinone methide diterpenoid from the root of *Salvia moorcraftiana*" Phytochemistry 25, 755 (1986).
- 14).- A. Michavila, M. C. de la Torre and B. Rodríguez "20-nor-abietane and rearranged abietane diterpenoids from the root of *Salvia argentea*" Phytochemistry 25, 1935 (1986).
- 15).- J. A. Hueso-Rodríguez, M. L. Jimeno, B. Rodríguez, G. Savona and M. Bruno "Abietane diterpenoids from the root of *Salvia phlomoides*" Phytochemistry 22, 2005 (1983).
- 16).- F. Delle Monache, F. De Mello and I. L. D'Albuquerque "Diterpenoids of *Hyptis fruticosa* (Labiatae) II. Hyptol" Gazzeta Chimica Italiana 107, 319 (1977).
- 17).- S. Valverde, J. Escudero, J. C. López and R. M. Rabanal "Two terpenoids from *Salvia bicolor*" Phytochemistry 24, 111 (1985).
- 18).- P. S. Manchand, J. D. White, J. Fayos and J. Clardy "Structures of suaveolic acid and suaveolol" J. Org. Chem. 39, 2306 (1974).
- 19).- R. Pereda-Miranda, G. Delgado and A. Romo de Vivar "An abietane diterpenoid from *Salvia sapinae*" Phytochemistry 25, 1931 (1986).
- 20).- G. Delgado, X. Cárdenas, L. Alvarez, A. Romo de Vivar and R. Pe-

reda-Miranda "New oleanane and isopimarane terpenoids from *Lepechinia glomerata*" J. Chem. Research, 286 (1986).

- 21).- M. C. García-Alvarez, G. Savona and B. Rodríguez "Triterpenoids from *Salvia phlomoides*, three new Lupane derivatives" Phytochemistry 20, 481 (1980).
- 22).- M. Silva "Triterpenic constituents of *Lepechinia chamaedryoides*" J. Pharm. Sci. 57, 864 (1968).
- 23).- P. Monaco and L. Previtera "Isoprenoids from the leaves of *Quercus suber*" J. Nat. Products 47, 673 (1984).
- 24).- A. Ulubelen, C. H. Brieskorn and N. Ozdemir "Triterpenoids of *Salvia horminum*, constitution of a new diol" Phytochemistry 16, 790 (1977).
- 25).- W. W. Stockberger "*Cunila mariana* L. a substitute for *Spigelia*" J. Am. Pharm. Assoc. 3, 33 (1914).
- 26).- G. Blaque "Thymol plants" Bull. Sci. Pharmacol. 30, 201 (1923).
- 27).- F. Tateo, M. A. Lionetto "Selectivity in the production of vegetable food-flavoring extracts" Ital. Sci. Aliment. 9, 205 (1980).
- 28).- A. Manjarrez and V. Mendoza "Perfumary and Essential Oil" Record 57, 561 (1966).
- 29).- T. C. Jain and C. M. Banks "22-dihydrostigmasterol from *Saussurea lappa*" Can. J. Chem. 46, 2325 (1968).
- 30).- A. Zurcher, O. Jeger and L. Ruzika "Zur kenntnis der triterpene. Überführung der chinovasaure in Phyllanthol und Uvaol. Über die konstitution der ursolsaure und des uvaols" Helv. Chim. Acta 37,

2145 (1954).

- 31).- P. Potier, C. Das, A. M. Bui, M. Marie-Janot, A. Pourrat and H. Pourrat "Structure de l'acide tormentique, acide triterpenique pentacyclique isolé des racimes de *Potentilla tormentilla*" Bull. Soc. Chim. Fr. 3458 (1966).
- 32).- W. H. Hui, M. M. Li and K. Luk "Triterpenoids and steroids from *Rhodomyrtus tomentosa*" Phytochemistry 14, 833 (1975).
- 33).- M. C. Das and S. B. Mahato "Triterpenoid sapogenols from the leaves of *Careya arborea*: Structure of careyagenolide" Phytochemistry 21, 2069 (1982).
- 34).- M. Takani, K. Kubota, M. Nozawa, T. Ushiki and K. Takahashi "Studies on constituents of medicinal plants. Constituents of the leaves of *Clethra barbinervis*" Chem. Pharm. Bull. 25, 981 (1977).
- 35).- K. Takahashi and M. Takani "Studies on the constituents of the medicinal plants. Constituents of the leaves of *Clethra barbinervis* and the ¹³C-Nuclear Magnetic Resonance Spectra of 19 α -hydroxiurs-12-en-28-oic acid type of triterpenoids" Chem. Pharm. Bull. 26, 2689 (1978).
- 36).- W. Budzikiewicz and C. Djerassi "Mass Spectrometry in structural and stereochemical problems. Pentacyclic triterpenes" J. Am. Chem. Soc. 85, 3688 (1963).
- 37).- K. G. Lewis and D. J. Tucker "The separation of substituted olean-12-en-28-oic acids from the corresponding urs-12-en-28-oic acid isomers" Aust. J. Chem. 36, 2297 (1983).

- 38).- J. B. Harbone and T. J. Mabry "The flavonoids, advances in research" Chapman and Hall U. S. A. 191 (1982).
- 39).- T. A. Geissman "The chemistry of flavonoid compounds" The McMillan Company New York 418 (1962).
- 40).- G. Delgado, H. Cárdenas, G. Peláez, R. Pereda-Miranda and A. Romo de Vivar "Terpenoids from *Vigüera excelsa* and *Vigüera oaxacana*" J. Nat. Prod. 47, 1042 (1984).
- 41).- J. H. Richards and J. B. Hendrickson "Biosynthesis of terpenes, steroids and acetogenins" W. A. Benjamin Inc. New York (1969).
- 42).- C. D. Bannon, R. A. Eade, P. James, G. P. McKenzie and J. J. H. Simes "Extractives of *Australian timbers*. Minor sapogenins of *Castanospermum australe* a stereospecific synthesis of methyl 2 β -3 β -dihydroxyolean-12-en-28-oate" Aust. J. Chem. 26, 692 (1973).
- 43).- I. Kitagawa, K. Kitazawa and I. Yosioka "Photooxidation of oleonic acid: Formation of 11 α , 12 α -epoxy- and 12 α -hidroxy oleonic lactones" Tetrahedron Letters, 509 (1968).
- 44).- I. Kitagawa, K. Kitazawa and I. Yosioka "Photochemical transformations leading to euteleogenin-II. Introduction of epoxy-lactone system" Tetrahedron 28, 907 (1972).
- 45).- N. Kumar and T. R. Seshadri "A new triterpene from *Pterocarpus santalinus*" Phytochemistry 15, 1417 (1970).
- 46).- R. J. Fessenden and J. S. Fessenden "Química Orgánica" Grupo Editorial Iberoamérica, 915 (1982).
- 47).- H. T. Cheung and T. C. Yan "Nuclear Magnetic Resonance of triter

- penes. 2, 3 - and 2, 3 -dihydroxiolean-12-en-28-oic acids" Chem. Commun. 369 (1970).
- 48).- M. Yoshikawa, H. K. Wang, V. Tosirisuk and I. Kitagawa "Chemical modification of oleanane-oligoglycosides by means of anodic oxidation" Chem. Pharm. Bull. 30, 3057 (1982).
- 49).- A. T. Glen, W. Lawrie, J. McLean and M. El-Garby Younes "Triterpenoid constituents of Rose-bay Willow-herb" J. Chem. Soc. 510 (1967).
- 50).- G. Cainelli and L. Caglioti "A partial synthesis of maslinic acid" Tetrahedron 18, 1061 (1962).
- 51).- R. Tschesche, E. Henckel und G. Snatzke "Die konstitution von bredemol und crataegolsaure" Liebigs Ann. Chem. 175 (1964).
- 52).- P. S. Manchand and J. F. Blount "X-Ray structure and absolute stereochemistry of stemolide, a novel diterpene bisepoxide" Tetrahedron Lett. 2489 (1976).
- 53).- J. E. Godfrey and J. M. Waters "The crystal and molecular structure of the bisnorditerpenoid inumakilactone" Aust. J. Chem. 28, 745 (1975).
- 54).- M. Ochi, H. Kotsuki, K. Hirotsu and Tokoroyama "Sendanin, a new limonoid from *Melia azedarach*" Tetrahedron Lett. 2877 (1976).
- 55).- Y. Hayashi, T. Matsumoto and Y. Yoki, T. Sakan "New congeners of cytotoxic nor-diterpenoid dilactones in *Podocarpus nagi*; three new components of 7,8-epoxienolide type" Tetrahedron Lett 4215 (1977).

- 56).- R. L. Williams, R. Subramonia Iyer, F. S. Rowland "Triptolide and triptidiolide, novel antileukemic diterpenoid triepoxides from *Tripterygium wilfordii*" J. AM. Chem. Soc. 94, 7194 (1972).
- 57).- J. R. Hanson and M. Sivers "13C Nuclear Magnetic Resonance spectra of some steroidal unsaturated ketones" J. Chem. Soc. 1956 (1975).
- 58).- H. Fukui, K. Koshimizu and H. Egawa "A new diterpene with antimicrobial activity from *Chamaecyparis pisifera*" Agric. Biol. Chem. 42, 1419 (1978).
- 59).- El esqueleto de totarano presentaría protones aromáticos en una señal múltiple con $w_{1/2} = 2 J_{orto}$ (12-16 Hz).