

101
29



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

FALLA DE ORIGEN

5 , 7-DIHIROXI-4' METOXIFLAVANONA, LA ISOSAKURANETINA, CONSTITUYENTE BIOACTIVO DE LA SALVIA BLANCA (HYPTIS ALBIDA)



SECRETARIA DE EDUCACION PUBLICA
FAC. DE QUIMICA

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A
ALMA MIRIAM NOVELO TORRES

MEXICO, D. F.

1990



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.

	Pág.
5. Resultados y Discusión	
5.1 Fraccionamiento biodirigido	27
5.2 Caracterización del Flavonoide Activo	39
5.3 Caracterización de los Flavonoides Inactivos .	46
6. Conclusiones	54
7. Espectros	55
8. Bibliografía	75

1. Introducción

La inquietud por clasificar a las plantas medicinales de acuerdo a sus propiedades terapéuticas proviene de tiempos prehispánicos. En México, durante el siglo XV se elaboró el primer herbario llamado "Ama machehua" (libro de medicamentos) en donde las plantas se clasificaron de acuerdo a sus virtudes medicinales. Esta tradición en el uso folklórico de sustancias de origen natural se ha preservado en la cultura nacional y transmitido de generación en generación. En nuestros días, esta inquietud constituye el interés de numerosas investigaciones farmacognósicas estrechamente relacionadas con la Etnobotánica y la Química Vegetal.

En la actualidad, las plantas medicinales y de utilidad económica tienen una gran importancia para la industria química, ya que de ellas se obtienen compuestos orgánicos como aceites, resinas, taninos, goma, ceras, tintas, saborizantes, fragancias, plagicidas y productos farmacéuticos. Más aún para cada clase de fármaco siempre se incluye un prototipo representado por un producto natural. La búsqueda de nuevos agentes terapéuticos de origen natural constituye una de las metas de mayor importancia para el área de la química farmacéutica. De ahí que el uso popular de las plantas medicinales representa el criterio primario en el cual se basa la farmacognosia para la selección de sus fuen-

tes vegetales de estudio. Numerosas investigaciones fitoquímicas dan prueba de la efectividad de esta aproximación (1,2).

La detección de los constituyentes activos es una tarea difícil. Sin embargo, la tendencia contemporánea en esta línea de investigación se enfoca al estudio de los agentes medicinales, mediante la aplicación de bioensayos durante el desarrollo del análisis fitoquímico de los extractos vegetales (3). Diferentes análisis han permitido demostrar que las plantas medicinales exhiben un gran espectro de actividades biológicas potenciales. Por lo tanto, el empleo de algún tipo de bioensayo ayuda al fitoquímico a no descartar compuestos activos, que de otra manera pasarían inadvertidos, contribuyendo simultáneamente a la investigación química y biológica de las especies medicinales. Los bioensayos utilizados incluyen desde sencillos análisis microbiológicos in vitro, hasta complejos estudios farmacológicos in vivo utilizando organismos superiores (4).

Sin embargo, la mayoría de las plantas superiores de interés económico y medicinal aún no se han descrito desde un punto de vista etnobotánico y, mucho menos, se ha realizado la investigación de sus constituyentes químicos o biológicamente activos. Por lo tanto, nuevas fuentes de materiales con valor comercial permanecen por ser descubiertas (5). En consecuencia, las plantas superiores constituyen una reserva de compuestos químicos de utilidad potencial no sólo como fármacos, sino como fuentes importantes

de núcleos químicos estructurales que servirán como un punto de partida para la síntesis de análogos, y como una herramienta alternativa para el conocimiento de los procesos biológicos (6).

El presente trabajo describe la aplicación de un ensayo sencillo con el cual se realizó el monitoreo de la bioactividad durante el fraccionamiento del extracto orgánico de la "salvia blanca" (Hyptis albida), una especie utilizada popularmente como un antiparasitario y como condimento en la culinaria nacional. Sus partes aéreas tienen propiedades insecticidas, esta hierba también es utilizada como remedio para el mal de oídos y, en fomentos para los dolores reumáticos (7,8). El bioensayo empleado fue la determinación de la toxicidad para las larvas del crustáceo Artemia salina (9).

Hyptis albida pertenece a la familia Lamiaceae (10), y un primer estudio químico del contenido metabólico de esta especie medicinal se realizó con fines meramente quimiotaxonomicos, el cual permitió el aislamiento de una serie de compuestos flavonoides y triterpenoides (11). En esta ocasión, la reinvestigación del extracto metanólico de H. albida mediante un fraccionamiento biodirigido permitió detectar la potencialidad larvicida del mismo y aislar al agente responsable de esta actividad. El cuadro sinóptico 1 presenta una breve descripción botánica de esta especie.

Cuadro 1. Descripción de la especie vegetal en estudio (7,8,10).

Familia: Lamiaceae

Nombre científico: Hyptis albida

Nombres vulgares: Orégano (Sinaloa)
 Salvia (Sinaloa, Jalisco, Aguascalientes)
 Salvia real (Guerrero)
 Salvia blanca (Michoacán y Guerrero)

Distribución: Especie estable y bien diferenciada en la región intertropical del suroeste de la República Mexicana, se encuentra también en Sonora, Puebla y Chiapas.

Descripción: Arbusto pequeño, hasta de 6 m de alto, blanquesino con pubescencia en penachos lanosos; láminas foliares generalmente de 3-6 cm de largo por 1-2.5 cm de ancho; predominantemente oblongoovadas; cimas sesiles, blancas, globosas, generalmente monoliformes; tubo de cáliz en la flor de 1.3-2 mm de largo; los dientes acirculares de 1.5-2.5 mm; el tubo maduro de 2.5-3 mm de largo; tubo de la corola de 2.5-4 mm de largo; corola bilabiada.

Uso popular: Condimento, carmitativo, remedio para el mal de ojo y dolores reumáticos, antihelmíntico y como repelente de insectos.

Constituyentes químicos: Se han descrito triterpenos y flavonoides (11,12).

2. Objetivos

2.1 Objetivo General.

El estudio químico de las labiadas mexicanas con virtudes medicinales ha sido sumamente limitado hasta hoy y, por lo tanto, la información disponible relacionada con el contenido metabólico de estas plantas es también escaso. En consecuencia, la investigación fitoquímica del metabolismo secundario de esta familia representa un punto de partida para el desarrollo de proyectos de investigación que contribuyan al conocimiento de la composición química de la flora mexicana de importancia económica y medicinal y, en la medida de lo posible de la actividad biológica de los productos naturales.

Dentro de este contexto, el propósito primordial del presente estudio fue la realización del análisis fitoquímico biodirigido de la especie Hyptis albida (Lamiaceae) con el objeto de detectar los metabolitos secundarios responsables de la actividad larvicida mostrada por el extracto obtenido de las partes aéreas de esta planta medicinal.

2.2 Objetivos específicos.

- 2.2.1 Efectuar las operaciones fitoquímicas preliminares relacionadas con la preparación del extracto original a partir de las partes aéreas de Hyptis albida.

- 2.2.2 Evaluar el efecto larvicida potencial de los diferentes extractos orgánicos preparados utilizando el bioensayo de la toxicidad para la Artemia salina.
- 2.2.3 Realizar el estudio fitoquímico de los extractos activos mediante el empleo de un fraccionamiento biodirigido para la detección de los principios activos.
- 2.2.4 Separar y purificar los constituyentes de cada una de las fracciones activas.
- 2.2.5 Establecer la estructura de los metabolitos activos mediante la aplicación de las técnicas analíticas modernas.

3. Antecedentes

3.1 Bioensayos sencillos para la detección y el aislamiento de productos naturales.

Uno de los propósitos fundamentales en toda investigación fitoquímica es el aislamiento de constituyentes "nuevos" y principios activos. Sin embargo, los metabolitos bioactivos, algunas veces, son difíciles de aislar y con frecuencia un gran número de los compuestos obtenidos no presentan alguna actividad biológica.

Debido al elevado costo de operación, al prolongado tiempo en la ejecución, y a la controversia suscitada por el empleo de animales de laboratorio en los ensayos n vivo, en la última década la necesidad de desarrollar nuevos métodos para la detección preliminar de compuestos bioactivos constituye uno de los retos más importantes para las investigaciones biológicas. En consecuencia, se han incorporado a los estudios fitoquímicos convencionales técnicas sencillas que permiten la evaluación de la actividad del extracto orgánico vegetal y, de esta manera, la detección preliminar de los metabolitos secundarios bioactivos. De tal suerte, que la actividad biológica de la planta en estudio puede ser analizada al inicio y durante todo el proceso de fraccionamiento para poder, así, identificar a los compuestos responsables de ésta.

Dos son los métodos más sencillos que se utilizan para el análisis fitoquímico biodirigido y cumplen con los requisitos necesarios para ser considerados de utilidad en estos estudios; es decir, son metodologías de fácil implementación, bajo costo, alta capacidad de operaciones y que proporcionan resultados en tiempos relativamente cortos (13). El bioensayo en discos de papa (14) y el ensayo de la toxicidad para Artemia salina (9) son metodologías de evaluación biológica cuya aplicación es prometedora.

El primero es una técnica utilizada para la detección de agentes citotóxicos mediante la evaluación del efecto inhibitorio del crecimiento de los tumores (agallas) inducidas por la bacteria gram negativa Agrobacterium tumefaciens. En 1980, Galsky demostró que la inhibición de tales tumores inducidos, aparentemente, se correlacionaba de manera satisfactoria con la actividad antileucémica 3PS en evaluaciones in vivo efectuadas en mûridos (15). Posteriormente, McLaughlin y colaboradores modificaron y evaluaron esta técnica como un bioensayo general para la determinación inicial de la actividad citotóxica y su monitoreo durante el proceso de fraccionamiento de los extractos vegetales (14).

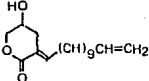
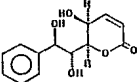
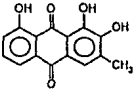
El segundo método es un bioensayo que detecta un amplio rango de actividades biológicas y una gran diversidad de estructuras químicas. La Artemia salina es un organismo que se ha utilizado en diferentes ensayos biológicos, de entre los cuales destacan el análisis de residuos plagicidas (16-18),

de micotoxinas (19,24), de anestésicos (25), de compuestos relacionados con la morfina (26), y de ésteres carcinogénicos del forbol (27). Su empleo en los estudios de plantas medicinales es reciente y se recomienda en la detección y evaluación de compuestos antihelmínticos (28,29) y de poderosos agentes citotóxicos (13,30,31). El procedimiento determina los valores de LC_{50} expresados en $\mu\text{g/ml}$ de los compuestos y extractos activos. La actividad se manifiesta como el efecto tóxico letal para las larvas del crustáceo Artemia salina.

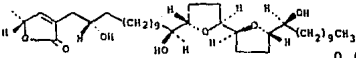
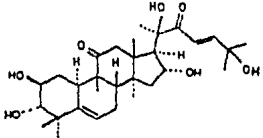
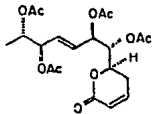
El cuadro sinóptico 3.1 presenta algunas de las investigaciones fitoquímicas efectuadas de plantas medicinales en las que se ha utilizado para el monitoreo de la actividad biológica alguno de estos dos ensayos mencionados. En todos los casos se incluye el compuesto responsable de la actividad biológica y su correlación con pruebas de citotoxicidad.

En el presente protocolo de investigación, el bioensayo de la toxicidad para la Artemia salina desempeñó un papel fundamental en la evaluación biológica preliminar del extracto acetónico, obtenido de las partes aéreas de Hyptis albidá, y durante el proceso de su fraccionamiento mediante el monitoreo de la actividad larvicida.

Cuadro sinóptico 3.1 Algunos ejemplos de investigaciones fitoquímicas biodegradadas.

Fuente natural	Compuesto aislado	Bioactividad					Ref.
		AS ^a	DP ^b	citotoxicidades			
				A-549 ^c	MCF-7 ^d	HT-29 ^e	
<u>Persea</u> <u>mayor</u> Mill. (Laureaceae)		0.36	86	1.70	2.58	2.61	(30)
<u>Goniothalamus</u> <u>giganteus</u> Hook F. y Tomás (Annonaceae)		269	38	> 10	5.9	> 10	(31)
<u>Myrsine</u> <u>africana</u> L. (Myrsinaceae)		35	40	4.2	-	> 10	(32)

Cuadro 3.1 Continuación.

Fuente natural	Compuesto aislado	Bioactividad					Ref.
		AS ^a	DP ^b	A-549 ^c	MCF-7 ^d	HT-29 ^e	
<u>Annona bullata</u> (Annonaceae)		0.0016	-	1.25×10^{-13}	-	10^2	(33)
<u>Exostema mexicanum</u> (Rubiaceae)		16	-	3.44×10^{-1}	0.523	3.27×10^1	(34)
<u>Hyptis oblongifolia</u> (Lamiaceae)		85	-	56.3	34.7	31.2	(35)

a: Artemia Salina (" Brine Shrimp bioassay ") LC₅₀ (ppm).

b: Disco de Papa (" Potato Disc Assay ") % inhibición tumoral.

Sistemas Tumorales Humanos, ED₅₀ (µg/ml): c, pulmón; d, pecho; e, colon.

3.2 Flavonoides en el Género Hyptis.

Los flavonoides son pigmentos fenólicos vegetales que poseen un esqueleto carbonatado $C_6-C_3-C_6$ (36), estructuralmente derivados de la flavona (37). Los estudios fitoquímicos realizados en la distribución de estos compuestos es sumamente escasa y aislada en la familia Lamiaceae. El patrón estructural de los flavonoides obtenidos es bastante heterogéneo y difícilmente cualquiera de los compuestos hasta el momento aislados en Lamiaceae es exclusivo de este grupo de plantas. No obstante, en los constituyentes aislados de las partes aéreas de estas especies, el patrón de oxidación predominante está basado en los esqueletos de la apigenina (5,7,4'-trihidroxi-flavona) y la luteólina (5,7,3',4'-tetrahidroxi-flavona) y, con seguridad, constituye una característica común a todos los géneros de Lamiaceae.

El metabolismo de los flavonoides aislados hasta el momento de las especies del género Hyptis se caracteriza por la metoxilación de las posiciones C-3, C-6 y C-8 del núcleo de la apigenina y el kaempferol, rasgo que comparte con otras especies de esta familia incluidas en algunos quimiotipos de los géneros Mentha, Thymus y Sideritis (38,39). El cuadro 3 presenta los compuestos flavonoides aislados en Hyptis.

Las combinaciones glucosídicas de las flavonas y flavanoles son de mayor valor sistemático, debido a que la naturaleza del azúcar o de los azúcares presentes y la posi-

Cuadro 3.1 Flavonoides del género Hyptis.

Sustancia	Sustitución	Especie	Referencia
Ermanina	5,7-OH 3,4'-di-OMe	<u>H. albida</u>	(11)
4',7-Eter dimetilico de la apigenina	5-OH 4',7-di-OMe	<u>H. albida</u>	(11)
3,4',7-Eter trimetilico del Kaempferol	5-OH 3,4',7-Tri-OMe	<u>H. albida</u>	(11)
Nevadensina A	5,7-di-OH 4',6,7-Tri-OMe	<u>H. albida</u>	(11)
Eupatorina	3',5-di-OH 4',6,7-Tri-OMe	<u>H. albida</u> <u>H. tomentosa</u>	(42)
Gardenina B	5-OH 4',6,7,8-Tetra-OMe	<u>H. albida</u> <u>H. tomentosa</u>	(11) (42)
3',4',6,7-éter tetrametilico de la apigenina	5-OH 3',4',6,7-Tetra-OMe	<u>H. tomentosa</u>	(42)
3,4-,6,7,8-éter pentametilico del Kaempferol	5-OH 4',3,6,7,8-Penta-OMe	<u>H. tomentosa</u>	(42)
Kaempferol-Ramnoglucósido	4-,5,7-Tri-OH 3-(Ramosil-glucosa)	<u>H. capitata</u>	(40)

ción de la unión al núcleo flavonoide, con frecuencia, son específicas a un grupo particular de plantas. Las flavonas luteonina y apigenina se presentan con mayor frecuencia en la forma de sus derivados 7 -glucosídicos, en las hojas y raíces de las labiadas. Hasta el momento, en el género Hyptis se ha logrado aislar un solo glucósido (ver cuadro 3.1).

Por último, es necesario indicar la importancia farmacológica de los flavonoides de esta familia. Numerosos estudios, aplicados a los constituyentes flavonoides de distintas especies de utilidad medicinal, dan pruebas de la potencialidad de éstos como metabolitos secundarios bioactivos. En Scutellaria baicalensis, una planta endémica de China y Japón que se utiliza como remedio efectivo para la dermatitis supurativa, las alergias, la hiperlipemia y la arterosclerosis, se ha encontrado que los diversos flavonoides presentes en los extractos metanólicos son productos anti-alérgicos (40). De la Salvia palaestina, hierba usada en Turquía como cicatrizante, se aisló la cirsimaritina como flavonoide mayoritario, el cual demostró una significativa actividad antibacteriana (41). Por otro lado, en investigaciones farmacológicas de los flavonoides del género Hyptis, que se realizaron como parte de un programa de evaluación de productos naturales como posibles anticancerígenos, dos flavonas con actividad citotóxica fueron aisladas; la 5-OH-4',3,6,7,8-tetrametoxiflavona y la 5-OH-4',6,7,8-tetrametoxiflavona (42).

4. Parte Experimental

4.1 Material Vegetal.

Para la realización del presente trabajo se utilizaron las partes aéreas de la "salvia blanca" (Hyptis albida), las cuales se recolectaron en el Km 10 de la carretera Guanajuato-San Miguel de Allende, en febrero de 1988.

4.2 Extracción del material vegetal y elaboración del extracto orgánico.

El material vegetal seco se cortó en pequeños trozos que posteriormente se molieron hasta obtener un polvo fino con un peso total de 1.6 Kg. La extracción de este material se realizó con Me_2CO (10 l x 2) a temperatura ambiente durante cuatro días. Posteriormente, el disolvente de extracción se decantó y filtró para ser concentrado por destilación a presión reducida. La concentración final proporcionó 102.18 g del extracto orgánico total.

El diagrama 4.1 resume la estrategia general utilizada para el estudio fitoquímico desarrollado en el presente trabajo experimental.

4.3 Análisis Cromatográficos Preliminares.

Los análisis preliminares del extracto orgánico se realizaron mediante cromatografías en capa fina (CCF) de la siguiente manera: una pequeña cantidad del residuo sólido

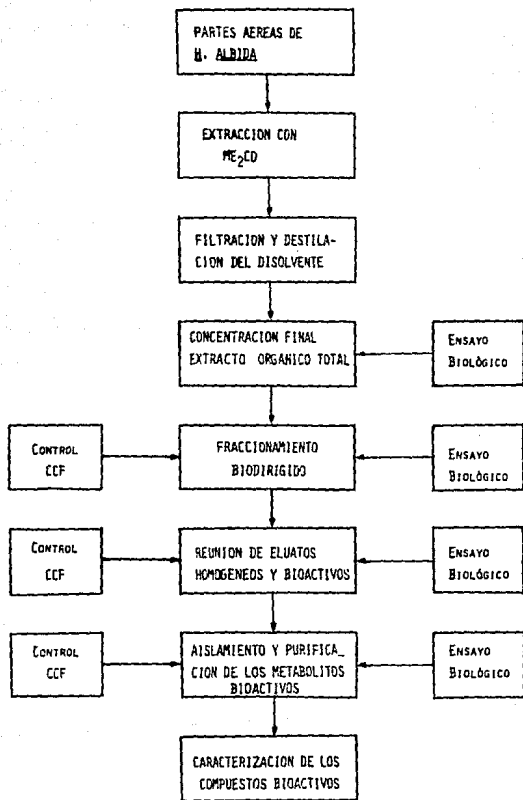


Fig. 4.1 Estrategia propuesta para el estudio fitoquímico de la salvia blanca (*Hyptis alba*).

(5 mg) se disolvió en MeOH y se aplicó una gota de esta solución sobre un cromatofolio (gel de sílice 60 F₂₅₄, Merck). Los sistemas de elución utilizados se incluyen en el Cuadro 4.1. Las mezclas C, E y G proporcionaron una buena resolución.

Para la detección de los constituyentes, el primer paso consistió en exponer las placas cromatográficas, previa evaporación del eluyente, a luz ultravioleta de onda corta y larga. Cualquier zona que exhibiera fluorescencia fue marcada. Inmediatamente, las placas se humedecieron mediante un aspersor con cada uno de los reactivos indicados en el Cuadro 4.2, por separado. Posteriormente, se revelaron por calentamiento sobre una parrilla a una temperatura de 80°C. La mezcla H₂SO₄-sulfato cérico fue el reactivo que permitió visualizar un mayor número de constituyentes y, por lo tanto, se utilizó como el agente cromógeno general para el presente estudio.

4.3.1 Detección del ácido ursólico.

Debido a que el ácido ursólico representó el constituyente mayoritario aislado en el primer estudio fitoquímico de esta especie (11), la presencia de este triterpeno en la presente reinvestigación se determinó mediante la comparación con una muestra auténtica en CCF. Las placas se desarrollaron en los sistemas de elución ya mencionados. El ácido ursólico no presentó actividad en el U.V. y de-

sarrolla un color rojo al ser expuesto al agente cromógeno general, los valores de R_f para este triterpeno se incluyen en el Cuadro 4.3.

Cuadro 4.1 Sistemas de elución utilizados en los análisis cromatográficos preliminares (CCF).

Sistema de disolventes	Composición	Proporción
A	Eter-di-isopropílico-Acetona	5:2
B	Benceno-AcOEt	7:3
C	n-hexano-AcOEt	1:1
E	n-hexano-AcOEt	3:7
F	CHCl_3 -MeOH	9:1
G	CHCl_3 -MEOH	4:1
H	Benceno-Acetona	4:1

Cuadro 4.2. Reactivos utilizados para la visualización de los constituyentes en CCF (43,44).

Mezcla	Preparación
Ac. sulfúrico al 30% en MeOH	Después de su asperción sobre la placa, ésta se calienta a 100°C por 5 min. hasta el desarrollo completo de color
Reactivo de Ferrocianato de Potasio	Se prepara mezclando 2 ml de cloruro férrico al 10%, 1 ml de ferrocianato de potasio al 5%, y 8 ml de H ₂ O
Sulfato cérico-Ac. sulfúrico	En una mezcla de 12 g y 22 ml, respectivamente, en 350 g de hielo

4.3.2 Detección de Flavonoides (37-39).

En el presente análisis fitoquímico, la gardenina B y el 4',7-éter dimetílico de la apigenina representaron los constituyentes flavonoides mayoritarios del extracto metanólico y, por tanto, su detección preliminar se realizó de manera sencilla mediante CCF, al compararse con las muestras auténticas obtenidas del estudio anterior (11). Las cromatografías analíticas del extracto orgánico total desarrolladas con la mezcla E permitieron visualizar a estos compuestos, con ayuda de su absorción en U.V. y la comparación de su R_f con el de muestras auténticas (Cuadro 4.3).

Cuadro 4.3. Valores de Rf para los constituyentes mayoritarios de H. albida.

Compuestos ^(a)	Sistemas de elución ^(b)			
	A	B	E	G
Acido ursólico	0.67	0.64	0.5	0.48
Gardenina B	0.70	0.68	0.67	0.60
4',7-eter dimetilico de la apigenina	0.75	0.73	0.73	0.67

(a) Comparación con muestras auténticas

(b) Sistemas de elución referidos en el cuadro 4.1.

4.4 Resolución del extracto orgánico.

El extracto total se fraccionó en una columna empacada con 1 Kg de gel de sílice (Merck 60, 35-70 Mesh). Se utilizó la mezcla n-hexano-ACOEt (9:1) como sistema de elución inicial. El volumen de los eluatos fue de 700 ml y cada uno se concentró al vacío hasta un volumen de 30 ml, aproximadamente. Por último, la semejanza y la homogeneidad de los constituyentes observados mediante el análisis en CCF permitió la reunión de cada uno de los eluatos, obteniéndose cuatro fracciones concentradas que se trataron por separado a fin de poder aislar y purificar los metabolitos mayoritarios responsables de la actividad demostrada por el extracto original. Es importante mencionar que esta resolución se rea-

lizó mediante un fraccionamiento biodirigido, de tal suerte que sólo la fracción activa se analizó cromatográficamente de manera detallada.

Siete fueron los compuestos mayoritarios perfectamente diferenciables que se observaron en las fracciones concentradas, las restantes fueron desechadas, ya que no presentaron un perfil cromatográfico homogéneo, Cuadro 4.4.

Cuadro 4.4. Fraccionamiento del extracto acetónico de Hyptis albida.

Sistema de elución	Fracción	No. de eluatos	Sistema de elución (CCF)	No. de constituyentes mayoritarios
n-Hexano/AcOEt			n-Hexano/AcOEt	
9:1	-	1-20	8:2	-
8:2	-	21-30	8:2	-
8:2	I	31-42	7:3	1
8:2	-	43-59	7:3	-
7:3	II	60-80	6:4	3
7:3	III	81-90	6:4	3

4.4.1 Monitoreo de la Actividad Biológica.

El extracto acetónico y cada una de las fracciones obtenidas se analizaron, de manera independiente, para determinar su potencialidad larvívica, utilizando el bioensayo de la toxi-

cidad para el crustáceo Artemia salina.

4.4.1.1 Evaluación del efecto larvicida.

A. Material

1. Huevos de Artemia salina.
2. Medio salino artificial.
3. Recipiente de vidrio y lámpara de luz neón.
4. Jeringa de 500, 100 y 10 μ l.
5. Tres frascos viales de 10 ml por cada dilución (9 en total).

B. Procedimientos.

1. Los huevecillos se desarrollaron en el medio salino durante 48 hs. a una temperatura de 25°C.
2. Preparación de los viales para el ensayo: se prepararon concentraciones de prueba inicial para cada fracción y del compuesto puro de 10, 100 y 1000 ppm; cada concentración se preparó por triplicado para obtener un total de nueve viales. Para ésto, 20 mg de la muestra de prueba se disolvieron con 2 ml de Me_2CO y de esta solución se transfirieron 500, 50 ó 5 μ l a los viales correspondientes a 1000, 100 y 10 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente. El disolvente se evaporó al vacío.
3. Se adicionó a cada vial 3 ml del medio salino

y se transfirieron 10 larvas por vial (30 individuos por dilución). Se ajustó el volumen a 8 ml con el medio salino artificial.

4. Después de 24 hs. se contabilizó el número de sobrevivientes y se determinaron los valores de concentración letal media (LC_{50}) mediante el método estadístico Finney.

4.5 Aislamiento y Purificación de los Constituyentes.

4.5.1 Resolución de la Fracción I.

La fracción I (17.06 g) presentó como compuesto mayoritario al ácido ursólico que fue detectado mediante CCF, utilizando como referencia una muestra auténtica. Al mismo tiempo, se visualizó un constituyente flavonoide minoritario de semejante polaridad al ácido ursólico. Mediante la acetilación (Ac_2O -Piridina) de esta muestra (1 g) se obtuvo una mejor resolución en CCF.

El empleo de muestras auténticas permitió identificar a este flavonoide como el derivado acetilado del 3,4',7-éter trimetilico del kaempferol. Sin embargo, no se prosigió a su purificación final debido a la ausencia de actividad biológica en esta fracción.

4.5.2 Resolución de la Fracción II.

Con objeto de obtener muestras auténticas de los cons-

tituyentes mayoritarios de esta especie, se procedió a realizar el análisis fitoquímico de los eluatos inactivos de polaridad intermedia. La fracción II (30 g) se purificó mediante una CC utilizando 1 Kg de gel de sílice (60 Merck; 70-230 mesh), y como mezcla de elución n-hexano-AcOEt (9:1). El volumen de los eluatos colectados permitió la cristalización de un sólido amarillo en un rendimiento de 64 mg al que se le asignó la clave HA-II-A, el cual se caracterizó mediante comparación con una muestra auténtica del 3,4',7-éter trimetílico del kaempferol (Cuadro 4.5).

De los eluatos 38-61, obtenidos con n-hexano-AcOEt (4:1) precipitó un sólido cristalino amarillo (clave HA-II-B) el cual se trituroó con éter isopropílico. El rendimiento total de este compuesto fue de 167.8 mg y el análisis en CCF permitió identificarlo de manera preliminar como el 4',7-éter dimetílico de la apigenina (Cuadro 4.6).

La reunión de los eluatos 94-101, obtenidos con la misma polaridad, proporcionó 48 mg de un sólido blanquecino amorfo. El tratamiento con diazometano etéreo de este precipitado generó un producto identificado como el éter metílico del ácido betulínico, por comparación con una muestra auténtica mediante CCF.

4.5.3 Resolución de la Fracción III.

La fracción III (60 g) que presentó la mayor actividad (LC_{50} 165 ppm), se cromatografió en una columna de gel de

sílice (1.8 Kg). La elución se inició con n-hexano- AcOEt (8:2) y el volumen de cada eluato colectado fue de 50 ml. El monitoreo de la actividad biológica también se realizó mediante el bioensayo ya descrito.

La subfracción (III-A) de menor polaridad (17 g), eluatos 1-43, se purificó mediante CC sobre gel de sílice (600 g) utilizando la misma mezcla de elución (4:1). Las fracciones 14-20 de esta recromatografía proporcionaron 104 mg de un sólido inactivo (LC_{50} 840 ppm), la comparación de su R_f mediante análisis cromatográficos preliminares en capa fina, así como sus constantes espectroscópicas (Cuadro 4.7), constató su identidad como la gardenina B (HA-III-A1).

De la reunión de las fracciones 24-38 se obtuvieron 238 mg del ácido ursólico (LC_{50} > 1000 ppm), caracterizado de la forma antes descrita. El rendimiento total de este triterpeno fue de 17.269 g.

La subfracción III-B activa (LC_{50} 135 ppm) de mayor polaridad, eluatos 44-60 (25.3 g), eluida con n-hexano- COEt (3:2) se recromatografió en CC de gel de sílice (600 g). La elución se inició con cloroformo, incrementando la polaridad con acetona. De la fracción cloroformica, eluatos 9-16, se aislaron 125 mg del compuesto HA-III-B1 (LC_{50} 664 ppm), cuyas constantes físicas y espectroscópicas se incluyen en el cuadro sinóptico 4.8. Las aguas madres de esta cristalización presentaron la misma actividad que la subfracción III-B, y se reunieron con los eluatos

17-21 dada su homogeneidad cromatográfica. La purificación de esta mezcla (460 mg) mediante CC con 12 g de gel de sílice y utilizando $\text{CHCl}_3\text{-Me}_2\text{CO}$ (9:1) como eluyente, permitió obtener 26.8 mg del compuesto HA-III-B1 (LC_{50} 664 ppm); 15.6 mg del compuesto HA-III-B2 (LC_{50} 860 ppm) y 145.4 mg del compuesto activo HA-III-B3 (LC_{50} 36.1 ppm). Las principales características espectroscópicas del compuesto HA-III-B2 se presentan el Cuadro 4.9.

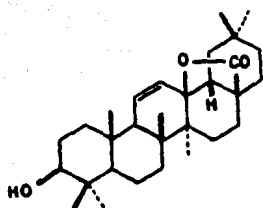
De los eluatos 22-43 obtenidos con la mezcla de elución $\text{CHCl}_3\text{-Me}_2\text{CO}$ (9:1) cristalizaron 68.1 mg de un compuesto que por comparación mediante CCF con las fracciones anteriores, permitió concluir que se trataba del compuesto HA-III-B2.

5. Resultados y Discusión

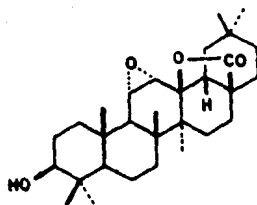
5.1 Fraccionamiento Biodirigido.

El estudio fitoquímico previo realizado de las partes aéreas de la "salvia blanca" (Hyptis albida H.K.B.) permitió el aislamiento de tres lactonas triterpénicas (11): 3 β -hidroxi-olean-11-en-28,13 β -ólida (1), 3 β -hidroxi-olean-28,13 β -ólida (2) y 3 β -hidroxi-olean-11 α ,12 α -epoxiolean-28,13 β -ólida (3). Este análisis también condujo a la separación de cuatro triterpenos adicionales: los ácidos oleanólico (4), acetyl oleanólico (5), ursólico (6) y betulínico (7), junto con los flavonoides: 4',7-éter dimetilico de la apigenina (8), 3,4',7-éter-trimetílico de kaempferol (9), la ermanina (10), la nevadensina A (11) y la gardenina B (12). Ninguno de estos constituyentes presentó una actividad larvicida significativa cuando fueron sometidos a su evaluación biológica de manera independiente y que, por lo tanto, justificará la toxicidad demostrada por el extracto acetónico. Esta observación constituye el punto de partida que permitió proponer la reinvestigación de este material vegetal.

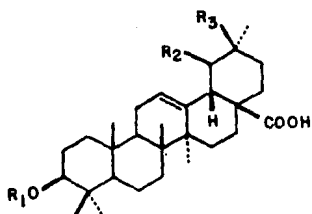
Los resultados de la evaluación preliminar del efecto larvicida observado en el extracto acetónico total y las sustancias puras aisladas de H. albida se incluyen en el Cuadro 5.1. Estos resultados evidenciaron la presencia de un constituyente minoritario responsable de la actividad



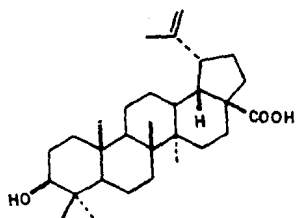
1
2 11,12-dihidro



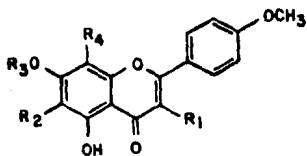
3



	R ₁	R ₂	R ₃
<u>4</u>	H	H	CH ₃
<u>5</u>	Ac	H	CH ₃
<u>6</u>	H	CH ₃	H



7



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
<u>8</u>	H	H	CH ₃	H
<u>9</u>	OCH ₃	H	CH ₃	H
<u>10</u>	OCH ₃	H	H	H
<u>11</u>	H	OCH ₃	H	OCH ₃
<u>12</u>	H	OCH ₃	CH ₃	OCH ₃

demostrada por el extracto total. De esta manera, se procedió a realizar el fraccionamiento biodirigido mediante la determinación de la toxicidad para las larvas del crustáceo Artemia salina (9).

Cuadro 5.1 Evaluación preliminar del extracto acético de H. albida y de sus constituyentes mayoritarios.

Muestra evaluada	AS* LC ₅₀ (ppm)
Extracto acetónico total	224
Lactonas triterpénicas:	
(<u>1</u> , <u>2</u> , <u>3</u>)	> 1000
Ac. triterpénicos	
(<u>4</u> , <u>5</u> , <u>6</u> , <u>7</u>)	> 1000
Flavonoides:	
<u>8</u>	> 1000
<u>9</u>	> 1000
<u>10</u>	864
<u>11</u>	664
<u>12</u>	840

*Bioensayo de la toxicidad para Artemia salina.

En este proceso de separación, que se realizó mediante una cromatografía en columna a nivel preparativo, cada fracción obtenida se sometió a una evaluación mediante el bioensayo ya mencionado. De tal suerte, que esta metodología condujo a la separación de una sola fracción activa (III), la cual correspondió a la elución con n-hexano-AcOEt (8:2). La Figura 5.1 presenta el fraccionamiento biodirigido del extracto acetónico de H. albida. Las fracciones activas se enmarcan con una línea gruesa.

La cromatografía de la fracción activa III (LC_{50} 165 ppm) permitió obtener dos subfracciones. La porción activa correspondió a los eluatos de mayor polaridad y fue denominada III-B. La recromatografía preparativa de esta subfracción proporcionó una sustancia amarilla cristalina como el único constituyente mayoritario (HA-III-B1). Este compuesto se identificó mediante la comparación en CCF con una muestra auténtica de la nevadensina A (11). Debido a que la actividad observada para este compuesto (LC_{50} 664 ppm) no correspondió con el efecto larvicida mostrado por las fracciones III y III-B se procedió a evaluar la toxicidad de las aguas madres de cristalización. Los resultados relacionados con el monitoreo de la actividad biológica durante el proceso de purificación de esta fracción activa se incluyen en el Cuadro 5.2.

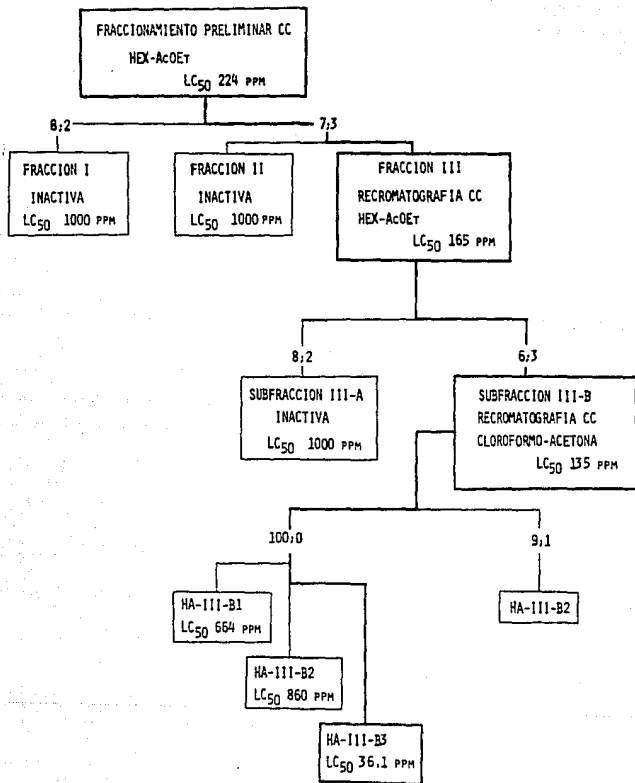


Fig. 5.1 Fraccionamiento Biodirigido del extracto orgánico de *Hyptis alba*.

Cuadro 5.2. Monitoreo de la actividad biológica durante el fraccionamiento de los eluatos activos.

Muestra evaluada	AS LC ₅₀ (ppm)
Fracción activa III	165
Subfracción III-A	990
Subfracción III-B	135
HA-III-A1 (<u>12</u>)	840
HA-III-B1 (<u>11</u>)	664
Aguas Madres (HA-III-B1)	135

La evaluación biológica efectuada a la subfracción III-B y a sus aguas madres confirmó la presencia de dos constituyentes minoritarios adicionales, los cuales se detectaron mediante CCF. Para la purificación de estos metabolitos se procedió a la recromatografía de las aguas madres (HA-III-B1) y los resultados del monitoreo de la actividad biológica durante este proceso cromatográfico de purificación se resume en el Cuadro 5.3.

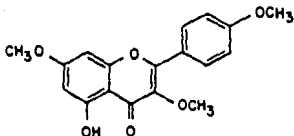
Cuadro 5.3. Monitoreo de la actividad biológica durante el proceso de separación de las aguas madres HA-III-B1.

Fracciones	Clave	Rendimiento	AS LC ₅₀	Compuesto aislado
Aguas Madres	HA-III-B1	460 mg*	135 ppm	
1-20	HA-III-B2	15.6 mg	860 ppm	<u>10</u>
21-43	HA-III-B1	28.8 mg	664 ppm	<u>11</u>
44-52	-	13.4 mg	98.5 ppm	
53-68	-	10.8 mg	54.2 ppm	
69-80	HA-III-B3	145.4 mg	36.1 ppm	
81-94	-	21.0 mg	246 ppm	<u>13</u>
95-109	-	12.6 mg	1000 ppm	

*Peso inicial de la fracción.

Tres fueron los constituyentes purificados de las fracciones de menor polaridad. Se aislaron la nevadensina A (HA-III-B, l 11) y la ermanina (HA-III-B2), la toxicidad observada para estos constituyentes no correspondió con la determinada para la fracción original, en tanto que la fracción de mayor polaridad fue la responsable de la actividad larvicida (LC₅₀ 36.1 ppm). De estos eluatos bioactivos, por cristalización, se obtuvo un sólido de color amarillo (HA-III-B3) cuyo rendimiento fue de 145.4 mg.

Cuadro 4.5 Constantes espectroscópicas de la 5-hidroxi-
3,4',7- trimetoxiflavona (HA-II-A).



- p.f. = 146-147°C

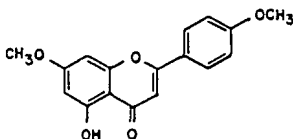
- UV $\lambda_{\text{máx.}}^{\text{MeOH}}$ nm (log ϵ) (espectro 1): 268 (4.46), 345 (4.39).

- IR $\nu_{\text{máx.}}^{\text{KBr}}$ (cm^{-1}) (espectro 2): 3018, 2890, 1630, 1605, 1595, 1500, 1320, 1260, 1220, 1178, 1025, 1000, 825.

- RMN¹H (80 MHz, CDCl₃) (espectro 3): 3.75 (3H, s, -OMe);
3.80 (3H, s, -OMe); 6.25 (1H, s, H-6); 6.35 (1H, s, H-8);
6.90, 7.98 (A₂B₂, 4H, J= 9 Hz, H-3'-5', H-2'-6').

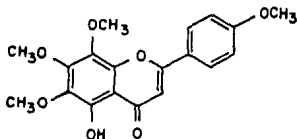
- EM 70 eV m/e (% abundancia rel.) : 328 (100), 327 (82.3),
313 (8), 310 (11.5), 309 (16), 299 (12), 297 (11), 285
(38.5), 167 (5.5), 166 (2), 150 (10), 135 (14.5).

Cuadro 4.6 Constantes espectroscópicas de la 5-hidroxi-
4',7-dimetoxiflavona (HA-II-B).



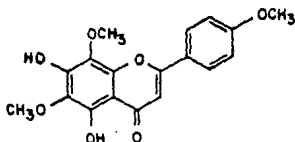
- p.f. = 172-173°C
- UV $\lambda_{\text{máx.}}^{\text{MeOH}}$ nm (log ϵ) (espectro 4): 268 (3.78), 328 (3.62).
- IR $\nu_{\text{máx.}}^{\text{KBr}}$ (cm^{-1}) (espectro 5): 3400-3000, 2980, 1650, 1600, 1500, 1430, 1375, 1260, 1005, 820.
- RMN¹H (80 MHz, CDCl₃-DMSO-d₆): 3.90 (6H, s, -OMe); 6.30 (1H, s, H-6); 6.50 (1H, s, H-8); 6.58 (1H, s, H-3); 7.00, 7.85 (A₂B₂, 4H, J= 9 Hz, H-3'-5', H-2'-6').(espectro 6)
- EM 70 eV m/e (% abundancia rel.): 298 (100), 297 (16.9), 269 (24.), 255 (14), 167 (2), 166 (9), 138 (14), 137 (4), 135 (17.5), 132 (13), 117 (8), 95 (12), 89 (8), 69 (7).

Cuadro 4.7 Constantes espectroscópicas de la 5-hidroxi-4',6,7,8-tetrametoxiflavona (HA-III-A1').



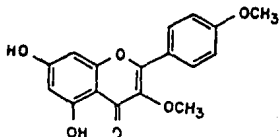
- p.f. = 180-181°C
- UV $\lambda_{\text{máx.}}^{\text{MeOH}}$ nm (log ϵ) (espectro 7): 208 (4.49), 295 (4.44), 328 (4.47).
- IR $\nu_{\text{máx.}}^{\text{CHCl}_3}$ (cm^{-1}) (espectro 8): 3018, 3008, 2938, 1652, 1603, 1574, 1509, 1369, 1268, 1225, 1180, 1109, 1069, 1026, 826.
- RMN¹H (80 MHz, CDCl₃) (espectro 9): 3.90 (3H, s, -OMe); 3.99 (3H, s, -OMe), 4.13 (3H, s, -OMe); 6.60 (1H, s, H-3); 7.08, 7.90 (A₂B₂, 4H, J= 9 Hz, H-3'-5', H-2'-6').
- EM 70 eV m/e (% abundancia rel.): 358 (67), 343 (100), 329 (3.5), 328 (9), 327 (2), 315 (8.6), 135 (4.7), 132 (2.8), 69 (10.2).

Cuadro 4.8 Constantes espectroscópicas de la 5,7-dihidroxi-4',6,8,-trimetoxiflavona (HA-III-B1).



- p.f. = 195-195°C
- UV $\lambda_{\text{máx.}}^{\text{MeOH}}$ nm (log ϵ) (espectro 10): 282 (4.30), 330 (4.23).
- IR $\nu_{\text{máx.}}^{\text{CHCl}_3}$ (cm^{-1}) (espectro 11): 3495, 3084, 2842, 1656, 1586, 1510, 1461, 1384, 1300, 1262, 1179, 1112, 1030, 836.
- RMN¹H (80 MHz, CDCl₃) (espectro 12): 3.88 (3H, s, -OMe); 3.98 (3H, s, -OMe); 4.02 (3H, s, -OMe); 6.5 (1H, s, H-3); 6.95, 7.83 (A₂B₂, 4H, J= 9 Hz, H-3'-5', H-2'-6').
- EM 70 eV m/e ($\%$ abundancia rel.): 344 (82.3), 329 (100), 326 (5), 315 (4.3), 314 (5), 313 (2), 301 (15.6), 286 (8), 284 (3.5), 197 (15), 186 (8), 183 (3.5), 172 (5), 169 (21.5), 150 (8), 135 (8.3), 132 (8.5), 131 (8), 69 (12.4).

Cuadro 4.9 Constantes espectroscópicas de la 5,7-dihidroxi-3,4'-dimetoxiflavona (HA-III-B2).



- p.f. = 232-234°C

- UV $\lambda_{\text{máx.}}^{\text{MeOH}}$ nm (log ϵ) (espectro 13) : 267 (4.93), 348 (3.52).

- IR $\nu_{\text{máx.}}^{\text{KBr}}$ (cm^{-1}) (espectro 14) : 3100, 2920, 1655, 1610, 1585, 1500, 1365, 1260, 1210, 1175, 1160, 1020, 825, 800.

- RMN¹H (80 MHz, DMSO-d₆) (espectro 15) : 3.75 (3H, s, -OMe); 3.80 (3H, s, -OMe); 6.20 (1H, s, H-6); 6.40 (1H, s, H-8); 7.05, 7.95 (A₂B₂, 4H, J = 9 Hz, H-3'-5', H-2'-6').

- EM 70 eV m/e (% abundancia rel.) : 314 (100), 313 (85.9), 300 (4), 299 (8), 297 (6), 296 (12), 295 (13), 285 (14), 284 (7), 283 (12), 281 (8), 271 (44.4), 228 (9), 201 (5), 153 (4.6), 152 (3), 143 (8), 135 (10), 69 (14).

5.2 Caracterización del Flavonoide Activo (HA-III-B3).

El compuesto responsable de la actividad larvicida se aisló como un sólido cristalino con un punto de fusión de 177°C y su fórmula molecular calculada mediante espectrometría de masas correspondió a $C_{16}H_{14}O_5$. Las absorciones en el ultravioleta ($\lambda_{\text{máx}}$ 288) y en el infrarrojo ($\nu_{\text{máx}}$ 1640) corroboraron la naturaleza del núcleo estructural de flavanona para este producto natural (43).

Este compuesto (13) genera un $[M]^+$ de m/e 286, de acuerdo con un núcleo de flavanona con dos grupos hidroxilo y un sustituyente metoxilo. Esta postulación se verificó al comparar sus espectros de masas, RMN^1H y UV con los descritos para la naringenina (4',5,7-trihidroxiflavanona) indicando el mismo patrón de sustitución (45). Las fragmentaciones observadas en la espectroscopía de masas presentaron la ruptura de retro Diels-Alder para generar los iones correspondientes a los mismos fragmentos de m/e 152 $[A_1]^+$ y 153 $[A_1+H]^+$ observado para la naringenina. Sin embargo, la diferencia en 14 unidades de masa para el ión $[B_3]^+$ (m/e 134) comprobó la presencia del grupo metilo adicional en el anillo B. El fragmento $[B_4]^+$ constituye el ión diagnóstico más importante para la identificación del núcleo estructural de flavanona (46) y el mecanismo propuesto para su derivación involucra la migración de uno de los hidrógenos de la posición C-3 y C-2 que sucede en

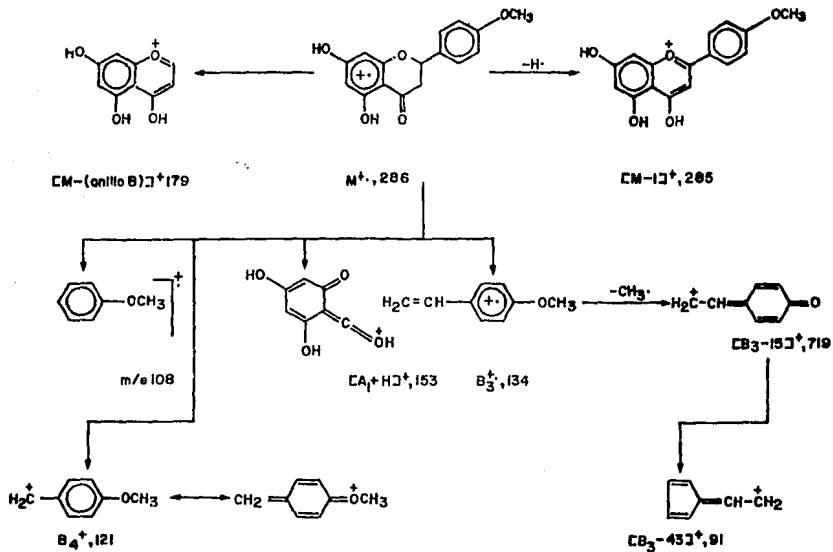


Fig. 5.2 Patrón de fragmentación propuesto para la isosakuranetina (13) en la Espectrometría de Masas.

el ión molecular con la concomitante ruptura tipo bencílica. La abundancia relativa de este ión (73.1%) se encuentra asociada a la estabilización obtenida mediante la generación del ión oxonio, producto de la resonancia a través de la participación del sustituyente metoxilo en C-4 (Fig. 5.2).

El espectro de RMN¹H comprobó claramente la sustitución 4',5,7 para el núcleo de flavanona (Fig. 5.3). Los valores para los desplazamientos químicos de las señales observadas se resumen a continuación:

1. Los núcleos H-6 y H-8 aparecen como dos señales con desplazamientos químicos casi idénticos formando un sistema AB con una constante de acoplamiento meta ($J=1.95$ Hz) centradas en δ 5.89 y 5.87.

2. Las señales para el anillo B en forma de un sistema A₂B₂ aparecen centrados en δ 6.96 y 7.42, con un valor de $J=8.78$ Hz, correspondientes a los protones en las posiciones C-3'-5' y C-2'-6', respectivamente.

3. El protón del grupo hidroxilo en C-5 se encuentra fuertemente desprotegido (δ 12.01) confirmado el establecimiento de un puente de hidrógeno con el grupo ceto de la posición C-4.

4. El hidrógeno en C-2 aparece como un doblete de dobletes originado por el acoplamiento con los dos núcleos vecinales en C-3. Los valores de las constantes de acoplamiento correspondieron a una interacción trans de 12.16 Hz y una cis de 3.40 Hz. Por lo tanto, estas interacciones espín-espín entre los núcleos de hidrógeno en C-2 y

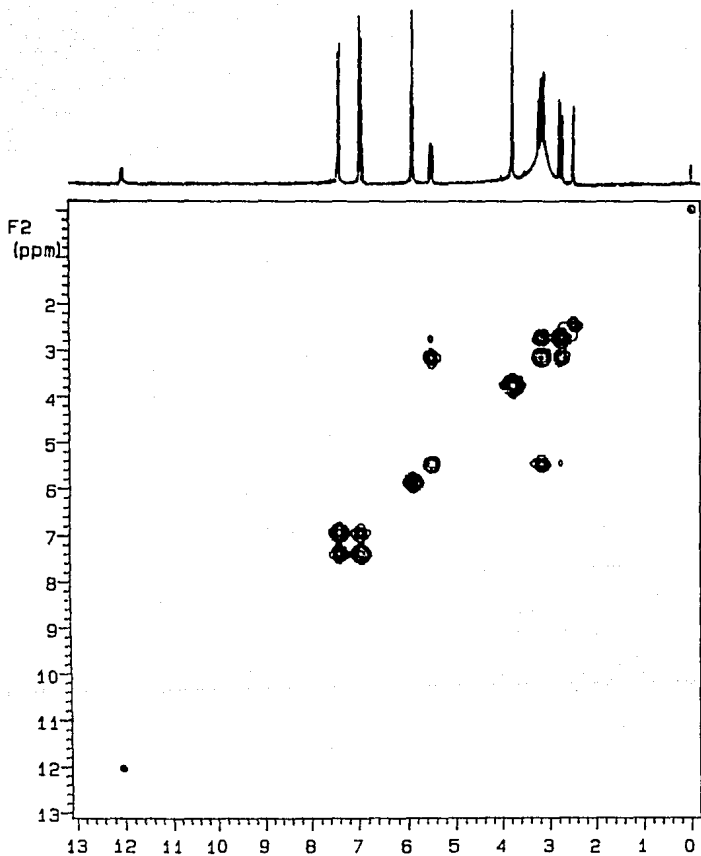


Fig. 5.3 Espectro de RMN^1H (COSY-2D) de la isosakuranetina (13).

C-3 generaron un arreglo de tipo ABX (Fig. 5.4).

5. Cada uno de los protones en C-3 aparece como un doblete de dobletes debido a las interacciones de tipo geminal ($J=17.50$ Hz) y vecinal con H-2. El espectro de correlación bidimensional homonuclear (COSY-2D) verificó estas asignaciones (Fig. 5.3).

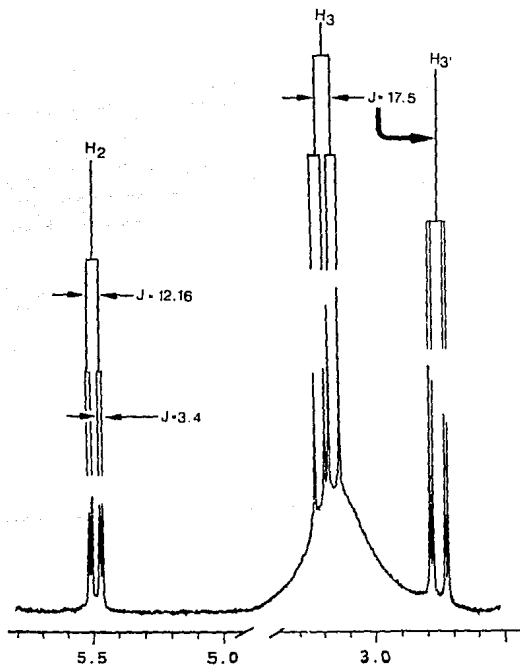
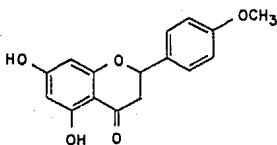
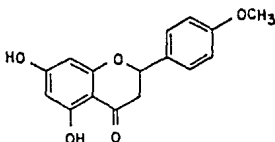


Fig. 5.4 Sistema ABX para las interacciones espín-espín entre los protones de los núcleos C-2 y C-3.

La propiedad levorrotatoria $[\alpha]_D = -27.7^\circ$ (0.09 EtOH) determinada para esta flavona confirmó la configuración absoluta C-2(S), característica para todas las flavonas de origen natural (47). Por lo tanto, la estructura del compuesto 13 se estableció como la (-)-5,7-dihidroxi-4'-metoxiflavanona, conocida comúnmente como la isosakuranetina (48). Las principales características físicas y espectroscópicas de este producto natural bioactivo se incluyen en el cuadro sinóptico 5.4

13

Cuadro 5.4 Constantes físicas y espectroscópicas de la
5,7-dihidroxi-4'-metoxiflavanona (HA-III-B3).



- p.f. = 176-178°C

- $[\alpha]_D^{25} = -27.7^\circ$

- UV $\lambda_{\text{máx.}}^{\text{EtOH}}$ nm (log ϵ) (espectro 16): 288 (4.22), 325 (4.81).

- IR $\nu_{\text{máx.}}^{\text{KBr}}$ (cm⁻¹) (espectro 17): 3150, 2920, 1640, 1520, 1460, 1300, 1245, 1160, 825.

- RMN¹H (300 MHz, DMSO-d₆) (espectro 18): 2.75 (1H, dd, J= 17.5, 3.4 Hz); 3.18 (1H, dd, J= 17.5, 12.1 Hz); 5.48 (1H, dd, J= 12.1, 3.4 Hz); 5.8 (1H, d, J=1.95 Hz); 5.89 (1H, d, J= 1.95 Hz); 6.95 (2H, d, J= 8.78 Hz); 7.42 (2H, d, J= 8.75 Hz); 12.1 (OH).

- EM 70 eV m/e (% abundancia rel.) (espectro 19) : 286 (59.5), 285 (33), 269 (6), 268 (4), 179 (9), 178 (5), 153 (88), 152 (7), 134 (100), 133 (5), 124 (18), 123 (6), 121 (73), 119 (18), 108 (10), 96 (11), 91 (34), 69 (28), 65 (17), 39 (18).

5.3 Caracterización de los flavonoides inactivos.

El análisis fitoquímico biodirigido de la H. albida permitió el aislamiento y caracterización de cinco flavonoides adicionales y que correspondieron a los identificados en la primera investigación química de esta especie (11); la 5-hidroxi-3,4',7-trimetoxiflavona 9 (HA-II-A), la 5-hidroxi-7,4'-dimetoxiflavona 8 (HA-II-B), la 5-hidroxi-4',6,7,8-tetrametoxiflavona 12 (HA-III-A1), la 5,7-dihidroxi-4',6,8-trimetoxiflavona 11 (HA-III-B1) y la 5,7-dihidroxi-3,4'-dimetoxiflavona 10 (HA-III-B2)

La estrategia utilizada para la caracterización de todos los constituyentes inactivos se basó en la comparación de su comportamiento cromatográfico (Rf) y la determinación del punto de fusión mixto con muestras auténticas. Los compuestos mayoritarios que precipitaron durante el proceso de purificación se sometieron al registro de sus constantes espectroscópicas y, de esta manera, se logró confirmar su identidad de manera inequívoca. La comparación de los espectros de RMN¹H generados por los compuestos 8, 9 y 10 (Cuadro 5.5) permitió establecer el patrón de sustitución correspondiente a un núcleo de flavona sustituido en las posiciones 4',5 y 7. Las características principales asociadas con los desplazamientos químicos y las multiplicidades observadas para cada una de las señales se resumen a continuación.

Cuadro 5.5. Espectros de RMN¹H de los Flavonoides 8-12 (CDCl₃, 80 MHz, TMS)¹.

FLAVONOIDE	H-3	H-6	H-8	H-2' H-6'	H-3' H-5'	-O-Me	5-OR
5-OH-4',7-OMe (<u>8</u>) ²	6.58s	6.3d (2.5)	6.50d (2.5)	7.85d (9)	7.00d (9)	3.90s	11.3(OH)
5-OH-3,4-,7-OMe (<u>9</u>)	-	6.25d (2.5)	6.35d (2.5)	7.98d (9)	6.90s (9)	3.75s 3.80s	12.00(OH)
5,7-OH-3,4'-OMe (<u>10</u>) ³	-	6.20d (2.5)	6.40d (2.5)	7.95d (9)	7.05d (9)	3.75s 3.80s	11.50(OH)
5,7-OH-4',6,8-OMe (<u>11</u>)	6.5 s	-	-	7.83d (9)	6.95d (9)	3.88s 3.98s 4.02s	12.5 (OH)
5-OH-4',6,7,8-OMe (<u>12</u>)	6.60s	-	-	7.90d (9)	7.08 (9)	3.90s 3.94s 3.99s 4.13s	12.5 (OH)

¹Constantes de acoplamiento (Hz) en paréntesis

²CDCl₃: DMSO-d₆ (1:1)

³DMSO-d₆

1. El sistema AB, con una constante de acoplamiento meta ($J=2.5$ Hz), generado por los protones H-6 y H-8 confirmó la 5,7 disustitución del anillo A.

2. Los protones H-2' y H-3' (H-5' y H-6') formando un sistema A_2B_2 ($J=9$ Hz). Los núcleos H-2' - H-6' (H-5' y H-5') producen señales idénticas centradas aproximadamente en $\delta 7.9$ y 6.9 .

3. El patrón 5-OH centrado en $\delta 11.5-12.0$ desaparece cuando se equilibró la solución con D_2O .

4. La única diferencia significativa observada entre los espectros 8, 9 y 10 fue la correspondiente a la resonancia del núcleo H-3 de la flavona 8 centrada en $\delta 6.58$.

Esta última observación utilizando la RMN¹H permitió ubicar a uno de los sustituyentes metoxilo en C-3 en los compuestos 9 y 10. Las características observadas en el comportamiento de estos compuestos (8-10), bajo las condiciones de impacto electrónico (70 eV), permitieron confirmar las asignaciones estructurales realizadas (Cuadro 5.6). El compuesto 8 mostró un [M]⁺ de m/e 298 (100%) congruente con la estructura de 5-hidroxi-4',7-dimetoxiflavona. Cuyas constantes físicas fueron idénticas a las descritas en la literatura (49).

El flavonoide 9 presentó un [M]⁺ de m/e 328 (100%), confirmando el núcleo de flavonol 5-hidroxi-3,4',7-trimetoxilado. El patrón de fragmentación demostró esta propo-

Cuadro 5.6 Espectrometría de Masas de los flavonoides 8-12 (70eV).

Flavonoide	M ⁺	M-H ⁺	M-CH ₃ ⁺	M-H ₂ O ⁺	M-CO-H ⁺	M-OCH ₃ ⁺	M-CH ₃ CO ⁺	A ₁ + H ⁺	A ₁ -29 ⁺	B ₁ ⁺	B ₂ ⁺
	M-1 ⁺	M-15 ⁺	M-18 ⁺	M-29 ⁺	M-31 ⁺	M-43 ⁺					
8, 5-OH-4',7-OHc	298 (100%)	297 (16.9%)	283 (2.0%)	-	269 (22.0%)	-	255 (14.5%)	167 (2.0%)	137.0% (4.6%)	132 (8.3%)	135 (14.5%)
9, 5-OH-3,4',7-OHc	328 (100%)	327 (82.3%)	313 (8.0%)	310 (11.5%)	299 (12.0%)	297 (11.0%)	285 (38.5%)	167 (5.5%)	-	-	135 (14.5%)
10, 5,7-OH-3,4'-OHc	314 (100%)	313 (85.9%)	299 (10.0%)	296 (14.5%)	285 (15.0%)	283 (12.0%)	271 (44.4%)	153 (4.6%)	-	-	135 (17.4%)
11, 5,7-OH-4',6,8-OHc	344 (82.3%)	-	329 (100%)	326 (5.0%)	315 (4.3%)	313 (2.0%)	301 (15.6%)	-	183 (3.5%)	132 (8.3%)	135 (8.3%)
12, 5-OH-4',6,7,8-OHc	358 (67.0%)	-	343 (100%)	-	329 (5.0%)	327 (2.0%)	315 (8.6%)	-	-	132 (2.8%)	135 (4.7%)

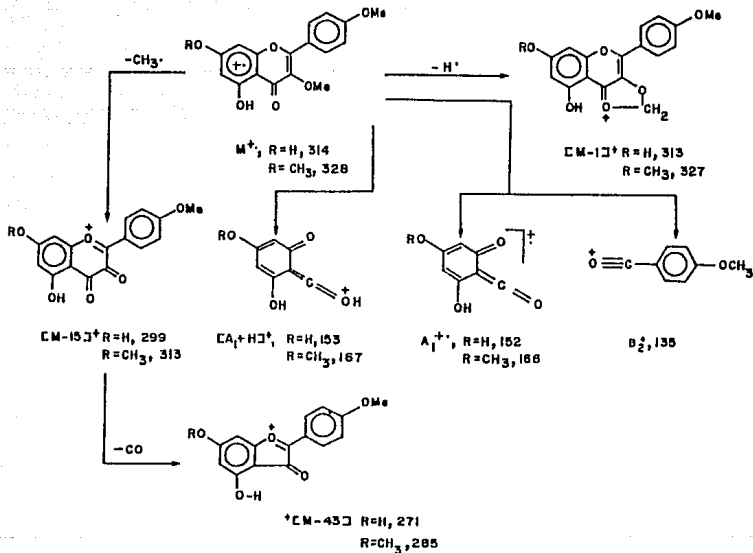


Fig. 5.5 Patrón de fragmentación de la ermanina (10) y su 7- éter metílico (9) en la Espectrometría de Masas.

sición estructural a través de la observación del fragmento correspondiente a la pérdida de un radical hidrógeno ($[M-1]^+$, 82.3%). Este proceso se produce mediante el desplazamiento que ejerce el grupo carbonilo ionizado sobre uno de los átomos de hidrógeno del grupo metoxilo en C-3 (50). El catión M-43 ($[M-CH_3-CO]^+$, m/e 285) distintivo para flavonoides se derivado de la pérdida de un radical metilo y una molécula de monóxido de carbono (Fig. 5.5). Por consiguiente, la estructura del compuesto 9 se estableció como la 5-hidroxi-3,4',7-trimetoxiflavona, cuyas constantes físicas fueron similares a las descritas en la literatura (51).

El compuesto 10 presentó en el espectro de masas un $[M]^+$ de m/e 314 (100%), demostrando una aglicona con dos grupos hidroxilo y dos sustituyentes metoxilo (Cuadro 5.6). La ubicación del grupo metoxilo en C-3 se detectó por los fragmentos $[M-1]^+$ (m/e 313) y $[M-43]^+$ ($[M-CH_3-CO]^+$, m/e 271); en tanto que los iones $[A_1+H]^+$ (m/e 153) y $[B_2]$ (m/e 135) corroboraron la presencia de los sustituyentes 4'-OMe y 7-OH (Fig. 5.5). De esta manera, la estructura del compuesto 10 se identificó como la 5,7-dihidroxi-3,4'-dimetoxiflavona, la ermanina (52).

Por otra parte, la comparación de las señales observadas en RMN^1H (Cuadro 5.5) para los flavonoides 11 y 12 demostró la presencia del patrón de sustitución 4',5,6,7,8-OR para el núcleo estructural. Los rasgos característicos de estos espectros se resumen de la siguiente manera:

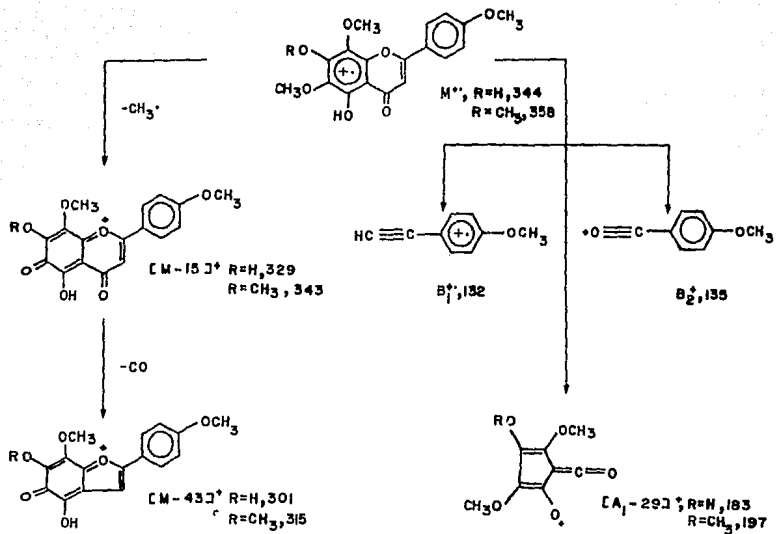


Fig. 5.6 Patrón de fragmentación propuesto para la nevadensina (11) y su 7-éter metílico (12), la gardenina B, en la Espectrometría de Masas.

1. Las señales para el anillo B en forma de un sistema A_2B_2 .

2. Un singulete centrado en δ 6.55 asignable al núcleo H-3.

3. Un grupo hidroxilo en la posición 5 fácilmente reconocible por su característico desplazamiento a campo bajo.

El compuesto 11 generó un $[M]^+$ de m/e 344 (82.3%). La abundancia del ión de m/e 329 ($[M-15]^+$, 100%) así como la ausencia del ión $[M-H]^+$, eliminaron la posibilidad de encontrar un grupo metoxilo en C-3, y confirmaron las sustituciones C-6 y C-8-OMe (Fig. 5.6) (50). El fragmento $[B_2]^+$ corroboró la presencia de un grupo metoxilo en C-4' y, por lo tanto, los grupos hidroxilo fueron ubicados en las posiciones C-5 y C-7. Por último, el compuesto 12 mostró un $[M]^+$ de m/e 358 (67.7%) indicando una flavona con un sustituyente hidroxilo y cuatro grupos metoxilos. El análisis de los espectros de RMN^1H (Cuadro 5.5) y de masas (Cuadro 5.6), permitieron localizar al grupo hidroxilo en C-5 y en los restantes grupos carbonos sustituidos a los cuatro grupos metoxilo (Fig. 5.6). En consecuencia, la estructura del compuesto 11 se caracterizó como la 5,7-dihidroxi-4',6,8-trimetoxiflavona (nevadensina A) (53) y la del compuesto 12 como la 5-hidroxi-4',6,7,8-tetrametoxiflavona (gardenina B) (54).

6. Conclusiones.

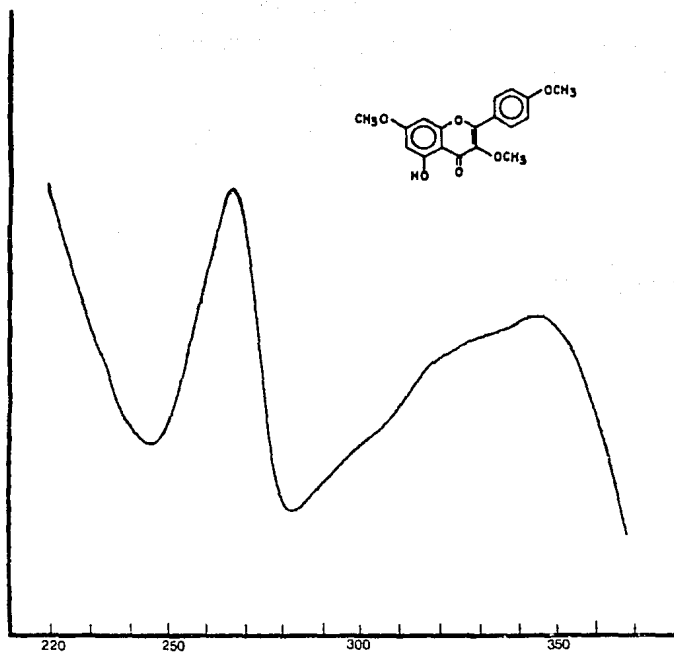
El estudio fitoquímico biodirigido de la salvia blanca, Hyptis albida, propuesto como objetivo fundamental de la presente disertación permitió generar las siguientes conclusiones relacionadas con el metabolismo secundario de esta planta medicinal:

1. Los constituyentes mayoritarios del extracto acetónico no fueron los agentes responsables del efecto larvicida observado mediante la determinación de la toxicidad para las larvas del crustáceo Artemia salina. Estos metabolitos representaron triterpenos pentacíclicos (1-7) y flavonoides (8-12).

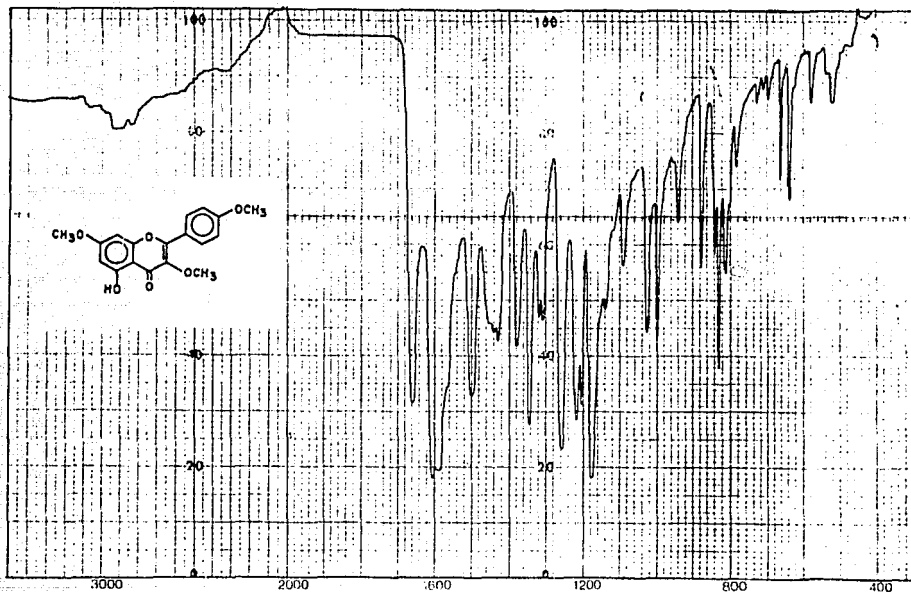
2. El fraccionamiento biodirigido del extracto total condujo al aislamiento de la 5,7-dihidroxi-4'-metoxiflavanona (13), la isosakuranetina, como el único constituyente activo y, por lo tanto, responsable de la actividad larvicida.

3. El bioensayo utilizado constituyó una metodología de fácil implementación que permitió obtener resultados en un tiempo relativamente corto y demostró una alta sensibilidad para el monitoreo del constituyente activo.

7. ESPECTROS



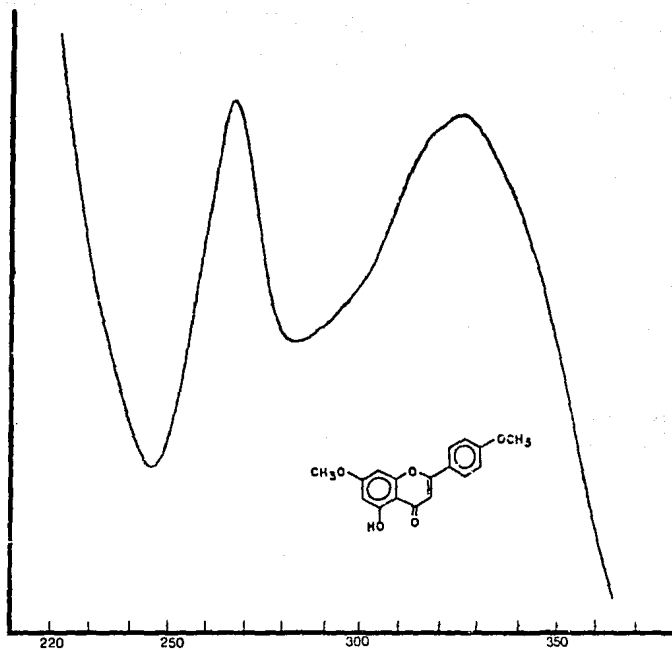
ESPECTRO 1



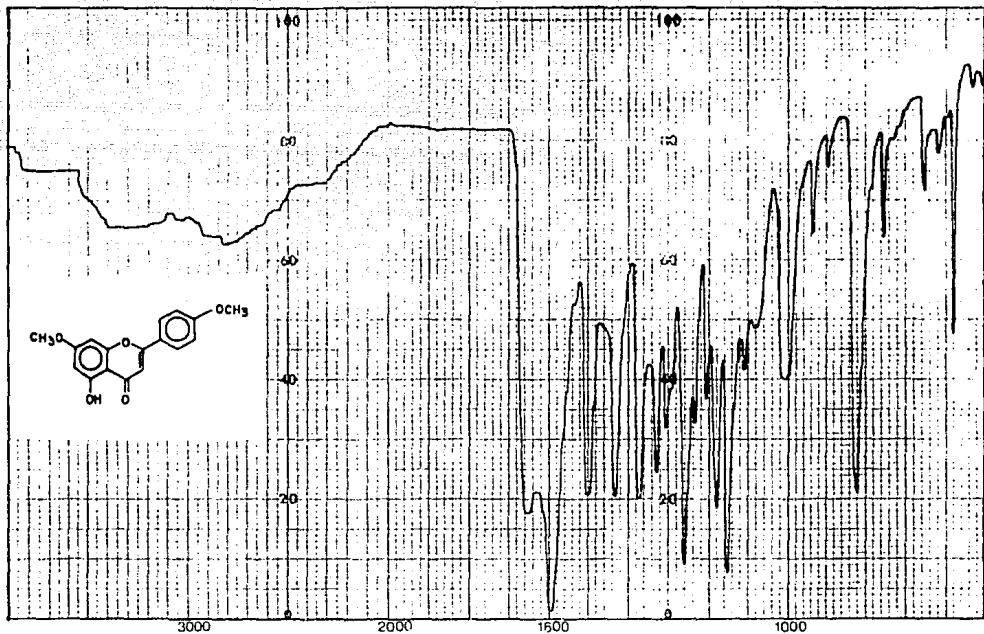
ESPECTRO 2



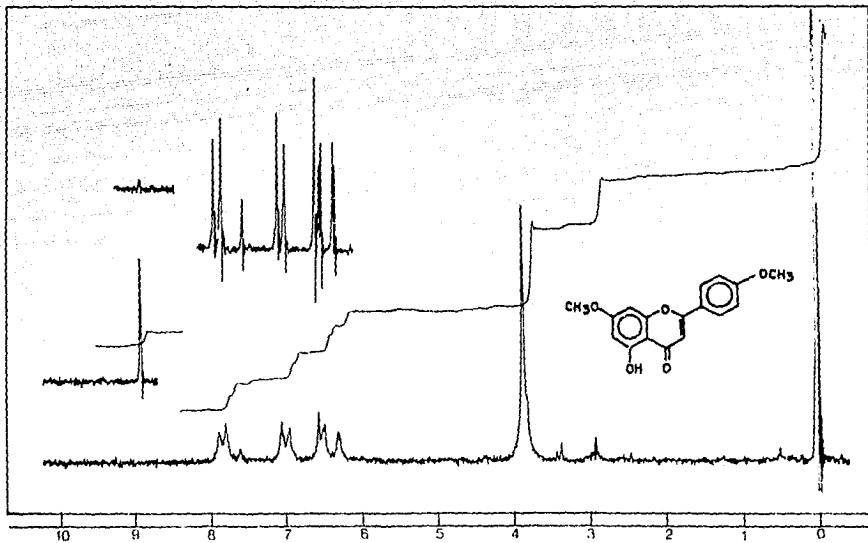
ESPECTRO 3



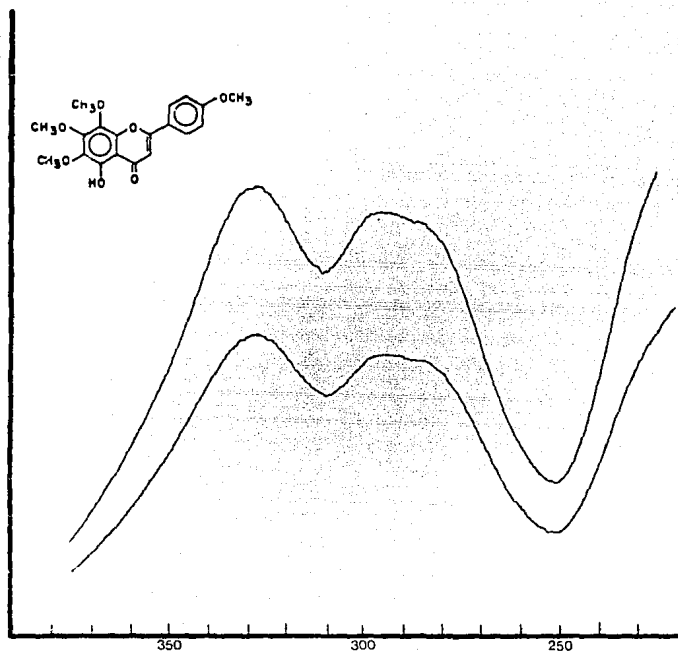
ESPECTRO 4



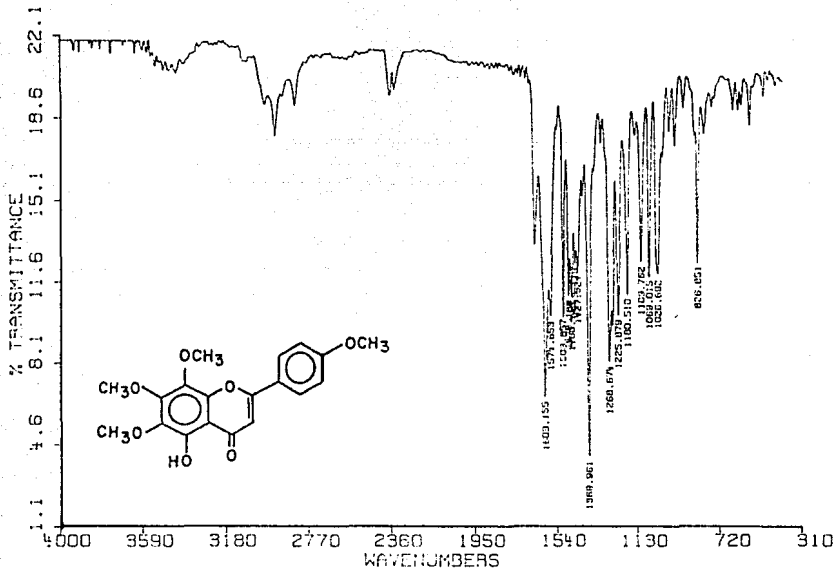
ESPECTRO 5



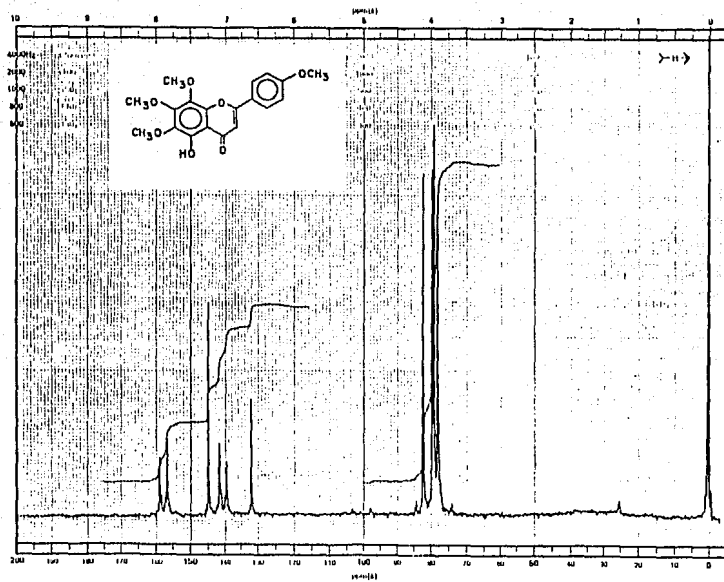
ESPECTRO 6



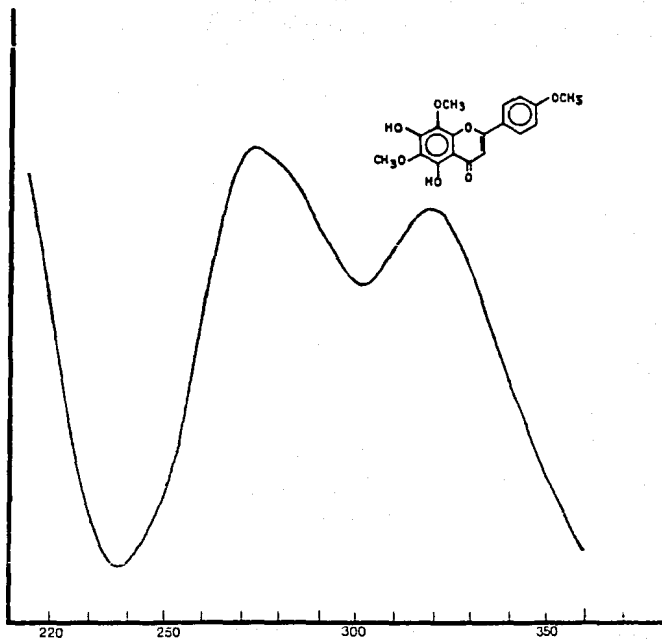
ESPECTRO 7



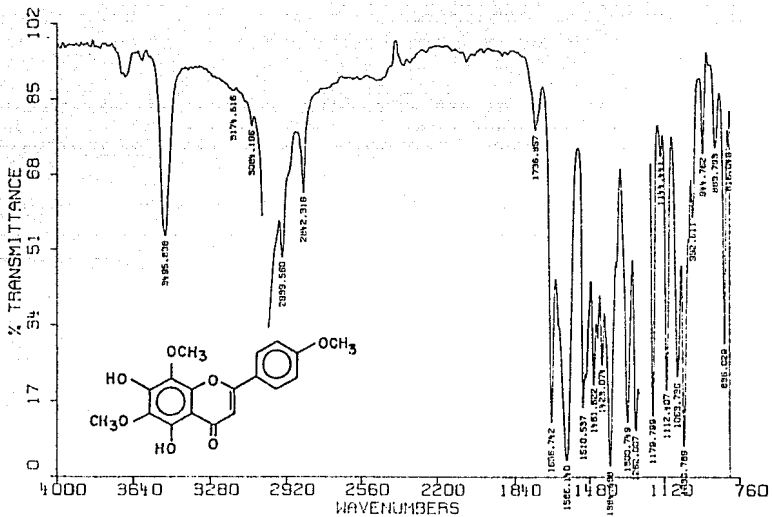
ESPECTRO 8



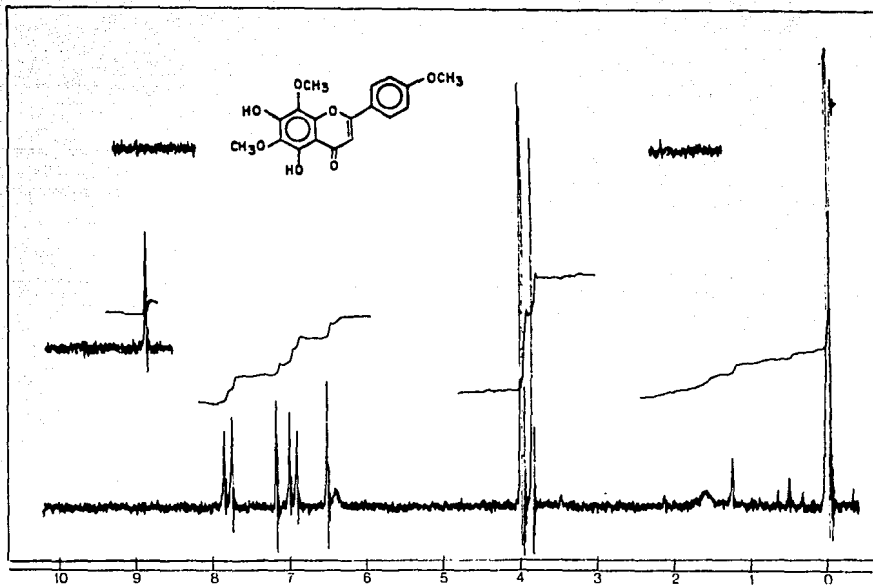
ESPECTRO 9



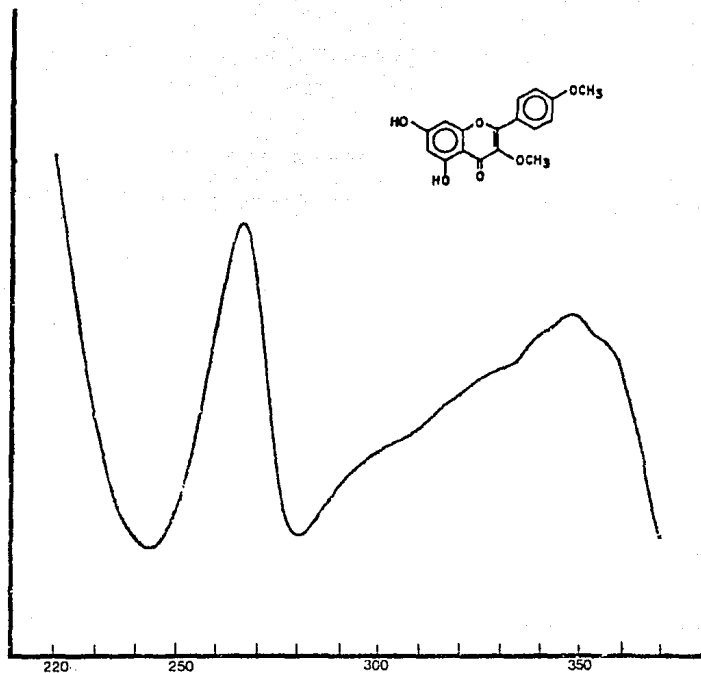
ESPECTRO 10



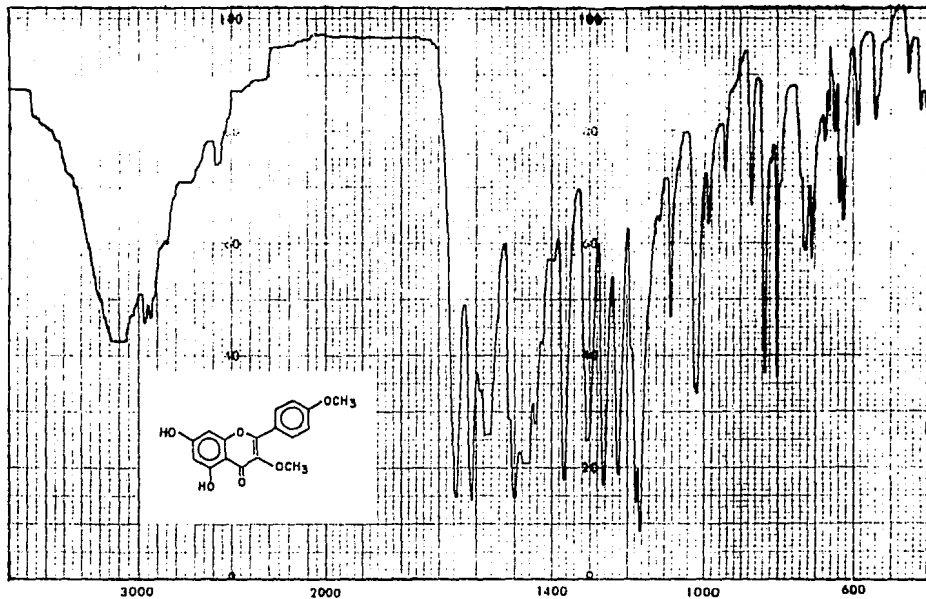
ESPECTRO 11



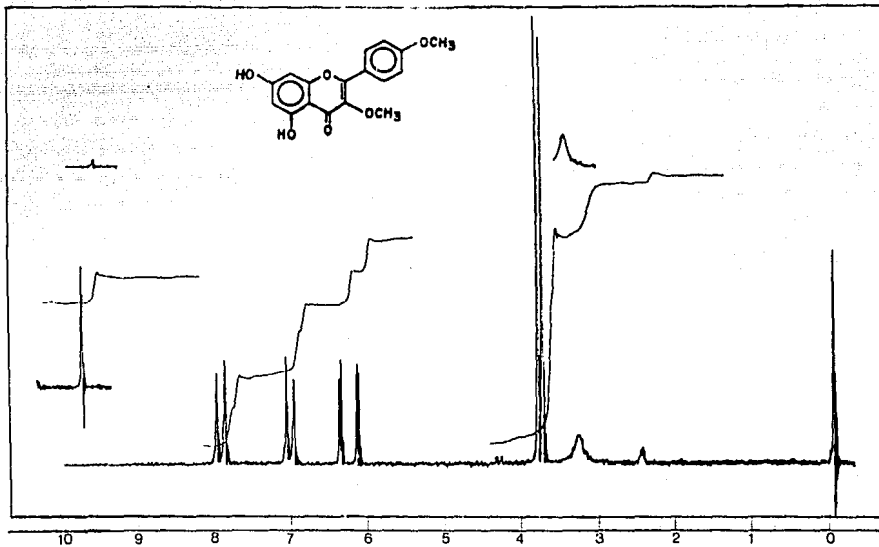
ESPECTRO 12



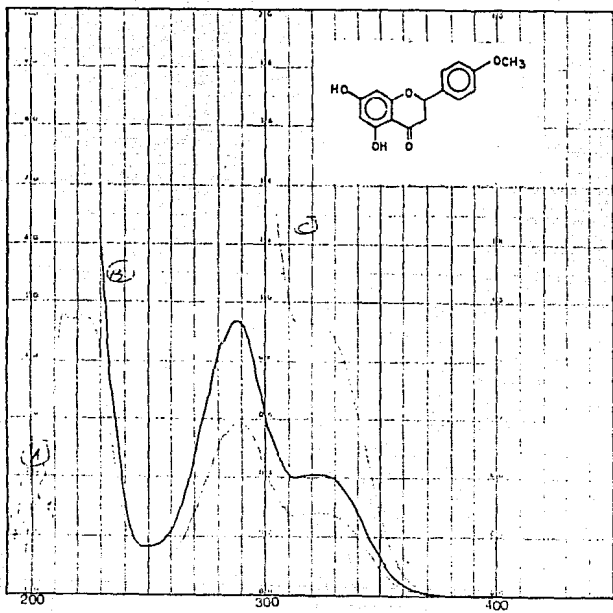
ESPECTRO 13



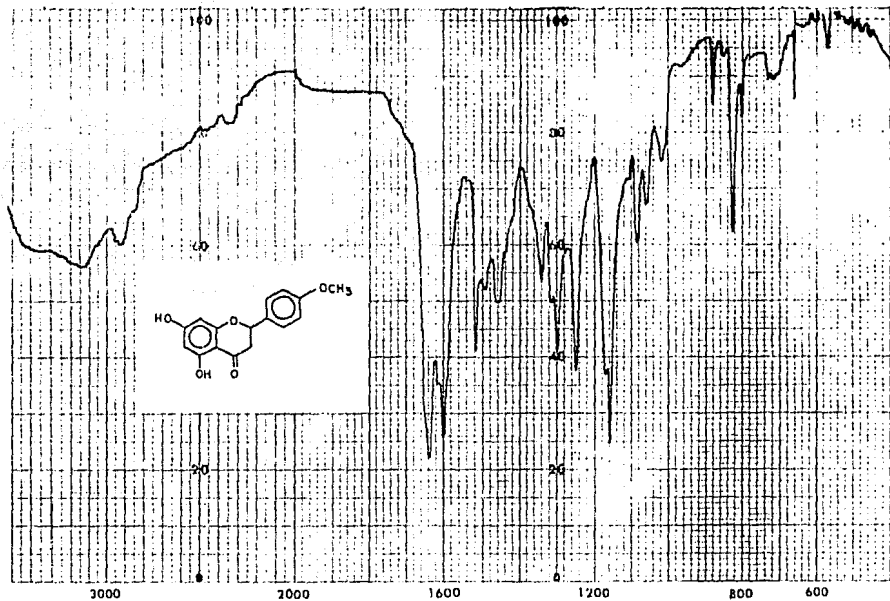
ESPECTRO 14



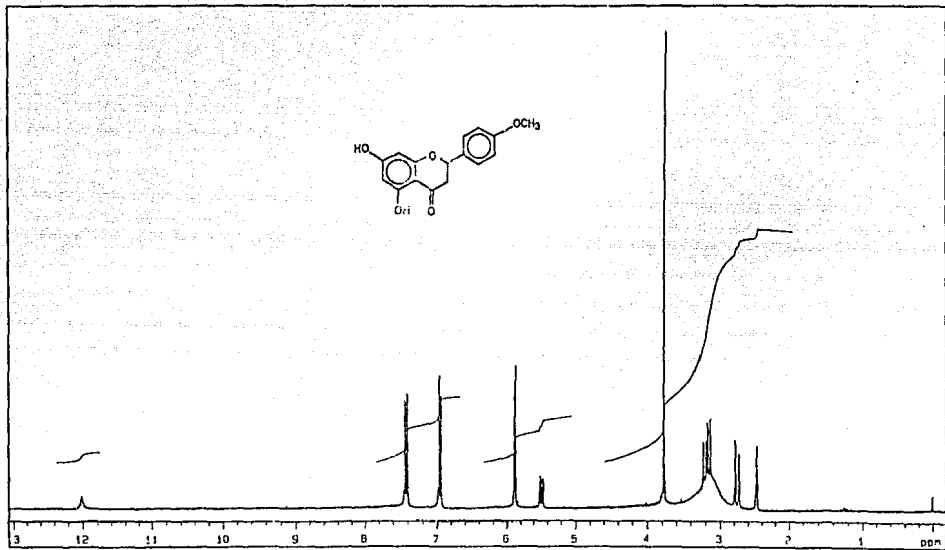
ESPECTRO 15



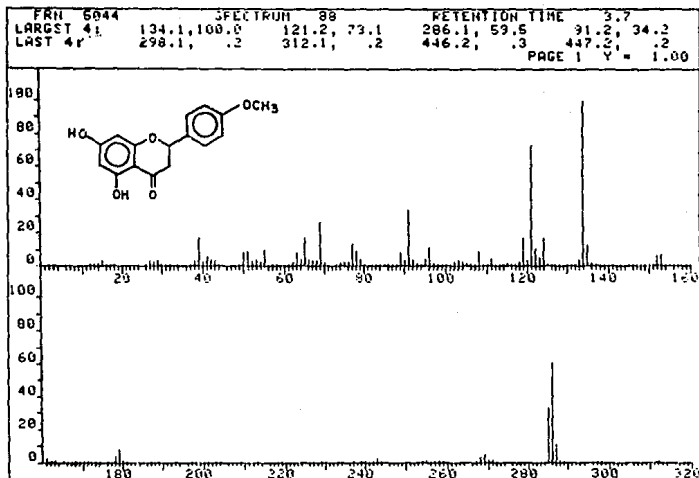
ESPECTRO 16



ESPECTRO 17



ESPECTRO 18



ESPECTRO 19

Bibliografía

1. L.A. Mistscher, S. Drake, S.R. Gollapudi y S.K. Okwute, J. Nat. Prod. 50, 1025 (1987).
2. A. Marston y K. Hostettmann, en "Biologically Active Natural Products", (Eds. K. Hostettmann y P.J. Lea) Oxford University Press, Great Britain, p.65 (1987).
3. M. Suffness y J. Dourous, Methods Cancer Research, 16, 73 (1979).
4. A.J. Vlietinck, en "Biologically Active Natural Products", (Eds. K. Hostettman y P.J. Lea) Oxford University Press, Great Britain, p.33 (1987).
5. R.N. Farnsworth y A.S. Bingel en "New Natural Products and Plants Drugs with Farmacological, Biológicoal or Therapeutical Activity" (Eds.H. Wagner y P. Wolff) New York, pp. 1-23 (1977).
6. R.N. Farnsworth en "Natural Products and Drug Development", (Eds. P. Krosggaard-Larsen, S.B. Christensen and H. Rofod) Copenhagen, p.17 (1984).
7. M. Martínez en "Plantas Medicinales de México", Ed. Batas, México (1986).
8. E. Matuda en "Las Labiadas del Estado de México", Dir. de Agric. y Ganadería, México (1957-1958).
9. B.N. Meyer, N.R. Ferrigni, J.E. Putnam, L.B. Jacobsen, D.E. Nichols y J.L. McLaughlin, Plante Medsica, 45, 31 (1982).

10. C. Epling, Rev. del Museo de la Plata, Secc. Botánica Argentina, p. 153 (1949).
11. R. Pereda Miranda, "Elucidación Estructural y Estereoquímica de Nuevos Metabolitos Secundarios Aislados de Labiatae (Salvia e Hyptis)". Tesis de Maestría. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional (1988).
12. M. Gascon Figueroa, "Estudio Fitoquímico de Hyptis mutabilis (Labiatae)". Tesis de Licenciatura. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional (1989).
13. J.L. McLaughlin en "Workshop on simple bioassays: An introduction". Memorias de la XXX Reunión Anual de la Sociedad Norteamericana de Farmacognosia (American Society of Pharmacognosy) (1989).
14. N.R. Ferrigni, J.E. Putman, B.N. Meyer, L.B. Jacobsen, E.D. Nichols y J.L. McLaughlin, J. Nat. Prod. 45, 679 (1982).
15. A.G. Galsky, J.P. Wilsey y R.G. Powell, Plant Physiol., 65, 184 (1980).
16. A.S. Michael, C.G. Thompson y M. Abromovitz, Science, 123, 454 (1956).
17. W.A. Tarpley, J. Econ. Entomo., 51, 781 (1958).
18. S. Areekul y R.F. Harwood, J. Agric. Food Chem., 8, 32 (1960).
19. R.F. Brown, J.D. Wildman y R.M. Eppley, J. Assoc. Off. Anal. Chem., 51, 905 (1968).

20. R.F. Brown, J. Am. Oil Chem. Soc., 46, 119 (1969).
21. J. Harwing y P.M. Scott, Applied Microbiology, 21, 1011 (1971).
22. R.M. Eppley. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 57, 618 (1974).
23. E.L. Korpien. Acta Path. Microbiol. Scand., 82 Sect. B, 465 (1974).
24. D. Eng-Wilmont y D.F. Martin, J. Pharm. Sci., 68, 963 (1979).
25. A.B. Robinson, R.F. Manly, M.P. Anthony, J.F. Catchpool y L. Pauling, Science, 149, 1255 (1965).
26. J.A. Richter and A. Goldstein, Psychopharmacology, 17, 327 (1970).
27. A.D. Kinghorn, K.K. Harjes y N.J. Doorenbos, J. Pharm. Sci., 66, 1369 (1967).
28. R.J. Marles, N.R. Farnsworth y D.A. Neill, J. Nat. Prod., 52, 261 (1989).
29. M.R. Camacho Corona, "Nuevos Metabolitos Secundarios de la Hintonia latiflora y aislamiento de los compuestos bioactivos del Teloxys graveolens". Tesis de Maestría. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México (1990).
30. W.W. Ma, J.E. Anderson, C.J. Chang, D.L. Smith, J.L. McLaughlin, J. Nat. Prod., 52, 1263 (1989).

31. A. Alkofahi, W.W. Ma., A.T. Mc Kenzie, S.R. Byrn y J.L. McLaughlin, *J. Nat. Prod.*, 52, 1371 (1989).
32. Y-H Hui, J.K. Rupprecht, Y-M. Liu, J.G. Anderson, D.L. Smith, C.J. Chang y J.L. McLaughlin, *J. Nat. Prod.*, 52, 463 (1989).
33. X-H. Li y J.L. McLaughlin, *J. Nat. Prod.*, 52, 660 (1989).
34. R. Mata, C. Albor, R. Pereda-Miranda y J.L. Mc Laughlin, *Planta Medica*, en prensa (1989).
35. R. Pereda-Miranda, M. García y G. Delgado, *Phytochemistry*, en prensa (1990).
36. X.A. Domínguez, "Métodos de Investigación Fitoquímica", Ed. Limusa, México, p. 141 (1973).
37. J.B. Harbone, "Phytochemical Methods", Ed. John Wiley, U.S.A., p.114 (1973).
38. F.A. Tomás-Barberan, R.J. Grayer-Barkmeijer, M.I. Gil y J.B. Harbone, *Phytochemistry*, 27, 2631 (1988).
39. F. Jullien, B. Voirin, J. Bernillon y J. Favre-Bonuin, *Phytochemistry*, 23, 2972 (1984).
40. M. Kubo, H. Matsuda, Y. Kimura, H. Okuda y S. Arichi, *Chem. Pharm. Bull.*, 32, 5051 (1984).
41. M. Miski, A. Ulubelen y C. Johansson, *J. Nat. Prod.*, 46, 874 (1983).
42. D.G.I. Kingston, M.M. Rao y W.V. Zucker, *J. Nat. Prod.*, 42, 497 (1979).

43. K.R. Markham, "Techniques of Flavonoid Identification", Ed. Academic Press, p. 105 (1982).
44. M.A. Ebrahim Ahmed, "Antitumor Fractionation of Goniolthalamus giganteus (Annonaceae)". Tesis Maestría. Purdue University, USA (1984).
45. T.J. Mabry, K.R. Markham y M.B. Thomas, "The Systematic Identification of flavonoids", Springer-Verlag, Berlin (1970).
46. T.J. Mabry y K.R. Markham en "The Flavonoids" (Eds. J.B. Harborne J.J. Mabry y H. Mabry). Chapman and Hall, London, p. 78 (1975).
47. B.A. Brom en "The Flavonoids" (Eds. J.B. Harborne, J.J. Mabry y H. Mabry). Chapman and Hall, London, p. 560 (1975).
48. M. Hasegawa y T. Shirato, J. Am. Chem. Soc. 79, 450 (1957).
49. K.H. Bauer y H. Dietrich, Chem. Ber., 66, 1053 (1933).
50. D.G.I. Kingston, Tetrahedron, 27, 2691 (1971).
51. G. Vidari, P.V. Finzi y M. de Bernardi, Phytochemistry, 10; 3335 (1971).
52. E. Wollenweber, Tetrahedron Lett., 1767 (1971).
53. L. Farkas, M. Nogradi, V. Sudarsanam y W. Herz, J. Org. Chem. 31, 3228 (1966).

54. J. Rodríguez, H. Tello, L. Quijano, J. Calderón, F. Gómez, J. Romo y T. Rios, *Rev. Latinoamericana Quím.*, 5, 41 (1974).