

Nº 98
251

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION ESTRUCTURAL DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS MINORITARIOS DE LA PLANTA MEDICINAL

Chrysactinia mexicana (Compositae)

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
INGENIERO QUIMICO
P R E S E N T A
CARLOS RODRIGUEZ HERNANDEZ

MEXICO D. F.

1992

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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.

INDICE

CONTENIDO

I.	INTRODUCCION.	1
II.	ANTECEDENTES.	5
III.	DISCUSION DE RESULTADOS.	11
	Teoría <i>Chrysactinia mexicana</i> Determinación estructural de los constituyentes Químicos de <i>Chrysactinia mexicana</i> .	
IV.	SECCION EXPERIMENTAL.	31
	Aislamiento, propiedades físicas, Espectroscópicas y Espectrométricas de los constituyentes Químicos de <i>Chrysactinia mexicana</i> .	
V.	RESUMEN Y CONCLUSIONES.	44
VI.	ESPECTROS.	46
1.	RMN ¹ H (80 MHz) de Piperitona (12).	46
2.	RMN ¹ H (80 MHz) de 7-Acetoxi-piperitona (13).	47
3.	RMN ¹ H (200 MHz) de 7-Acetoxi-piperitona (13).	48
4.	RMN ¹³ C (75 MHz) de 7-Acetoxi-piperitona (13).	49
5.	RMN ¹ H (80 MHz) de 7-Hidroxi-piperitona (14).	50
6.	RMN ¹ H (80 MHz) de 6 α -Hidroxi-piperitona (15).	51
7.	RMN ¹ H (200 MHz) de la mezcla 5 α - y 5 β -Hidroxi- dihidro-carvona (17) y (18).	52
8.	RMN ¹³ C (75 MHz) de la mezcla 5 α - y 5 β -Hidroxi- dihidro-carvona (17) y (18).	53

9.	RMN ¹³ C (APT) (75 MHz) de la mezcla 5 α - y 5 β -Hidroxi -dihidro-carvona (17) y (18).	54
10.	RMN ¹ H (200 MHz) de 6 α -Hidroxi-piperitol (16).	55
11.	RMN ¹³ C (75 MHz) de 6 α -Hidroxi-piperitol (16).	56
12.	RMN ¹ H (200 MHz) de la mezcla de monoterpenos hidroxilados.	57
13.	RMN ¹ H (80 MHz) de Xantorrizol (20).	58

VII.	BIBLIOGRAFIA.	59
------	---------------	----

INTRODUCCION

Los procesos de transformación a nivel industrial han influido notablemente en la sociedad moderna, y por lo tanto, en el nivel y calidad de vida del ser humano. Estos procesos aprovechan principalmente materias primas tales como hidrocarburos y minerales, entre otros. El valor agregado de los productos de transformación es notablemente mayor con respecto al de las materias primas; por lo que la tecnología empleada para estos procesos, en su mayoría, procesos químicos, es materia de investigación continua.

Los recursos naturales han sido aprovechados y explotados por el hombre desde su misma existencia, y pueden considerarse como materias primas para ciertas transformaciones. Hace algunos siglos, dicha explotación fué casi imperceptible, pero con el paso del tiempo, la utilización de tecnología cada día más avanzada, aunada a la presión poblacional, se empezó a consumir a mayor escala la mayoría de los recursos naturales. Actualmente, la renovación de tales recursos es extremadamente lenta comparada con su consumo, y se ha tomado conciencia de la pérdida, en muchos casos irreparable, de los mismos.

Un ejemplo evidente de lo anterior lo presenta la vegetación, que si bien puede considerarse como un recurso natural de gran importancia, se desconocen muchos aspectos básicos, que coadyuven al aprovechamiento racional de la misma.

De los vegetales pueden obtenerse diversos agentes

terapéuticos, aceites esenciales, grasas, ceras, pigmentos, colorantes, entre otros muchos productos. Además, es una fuente natural de sustancias orgánicas de notable potencial industrial. Sin embargo, aproximadamente la mitad de los bosques y selvas mundiales han sido destruidos y cerca de 25 a 30 millones de hectáreas se pierden cada año.^{1,2} Esto puede acarrear consecuencias ecológicas impredecibles y una pérdida irreparable desde el punto de vista humano.

Las plantas silvestres son ricas en los llamados metabolitos secundarios, entre los que pueden mencionarse por ejemplo a los alcaloides, terpenoides, flavonoides, entre otros. El papel ecológico que desempeñan este tipo de sustancias es materia de investigación, sin embargo, es generalmente aceptado que su producción está modulada para la propia protección de las plantas.

El estudio de los productos naturales orgánicos ha contribuido a que diversas disciplinas se relacionen entre sí, en particular, la biología y la química, cuyo fin genérico, como el de todas las ciencias, es el conocimiento de la naturaleza, y en este caso particular, lograr su eventual aprovechamiento racional.

Los vegetales actualmente constituyen un medio importante y económico para obtener algunas sustancias de suma importancia a nivel industrial. Dentro de estas, podemos mencionar a la industria farmacéutica, la alimenticia, la de cosméticos, azucarera, papelería, de colorantes y pinturas, entre otras.

En la actualidad, una de las prioridades internacionales es

el revertir el proceso de destrucción de los bosques y selvas, lo cual requiere de una cooperación multinacional amplia en muchos aspectos de interés, que en ciertos casos, pueden ser divergentes, principalmente entre naciones desarrolladas y subdesarrolladas.¹

En investigaciones recientes realizadas por expertos de ciertas compañías de países desarrollados en bosques y selvas de algunos países de flora abundante, se ha comprobado que se pueden extraer sustancias de alto valor comercial de la flora y fauna de estos lugares, y a su vez, evaluar el potencial económico de interés para las industrias farmacéuticas.²

Hace algunas décadas, las compañías farmacéuticas de los países desarrollados tenían la tendencia a alejarse de su dependencia de las plantas para la obtención de ciertas sustancias, subestimando sus propiedades curativas. En años recientes, se ha renovado el interés en las posibilidades de desarrollar fármacos partiendo de las mismas fuentes naturales.

Lo anterior deriva del hecho que cerca del 80% de los 4000 millones de habitantes del mundo todavía confían principalmente en las medicinas tradicionales para sus necesidades primarias en el cuidado de su salud.³

Para este fin, se ha avanzado en el conocimiento de las técnicas de extracción, purificación y caracterización de las sustancias constitutivas de las plantas, y se ha logrado dinamizar la evaluación terapéutica, tanto de los

extractos, como de las sustancias puras.

El presente trabajo es un estudio químico de una planta endémica de nuestro país, *Chrysactinia mexicana* (nombre común: falsa damiana), perteneciente a la familia de las compuestas, la cual se emplea en la medicina tradicional. Dicho estudio comprende el aislamiento y determinación estructural de los metabolitos secundarios minoritarios presentes en este vegetal, la determinación de la toxicidad de algunas sustancias frente al camarón de salmuera *Artemia salina*, y los resultados obtenidos de este estudio pretenden contribuir a la correlación entre las propiedades curativas atribuidas al vegetal y sus constituyentes químicos.

ANTECEDENTES

La familia *Compositae* (sinónimo: *Asteraceae*), a la que pertenece *Chrysactinia mexicana*, se encuentra distribuida prácticamente en todo el mundo, y se considera una de las más importantes del reino vegetal, tanto por su abundancia como por su diversidad.^{4,5} Esta diversidad se hace más evidente en áreas montañosas y en los límites con regiones semiáridas ó desérticas. Estudios químicos realizados a especies pertenecientes a esta familia, han generado información acerca de los principales metabolitos secundarios presentes en la misma, encontrando una gran variedad de ellos, la cual puede ser atribuida en parte, a la diversidad anteriormente comentada para esta familia, la que determina también un amplio espectro en cuanto a actividad biológica y terapéutica se refiere.⁶

Algunas especies de la familia *Compositae* tienen una notable importancia tanto por su uso medicinal como por el interés económico; tal es el caso de la manzanilla (*Matricaria chamomilla*) y del girasol (*Helianthus annuus*), entre otras.⁷

Las sustancias más características de esta familia son los terpenoides, entre los que destacan las lactonas sesquiterpénicas⁸ y los diterpenos policíclicos,⁹ los poliacetilenos, los flavonoides,^{10,11} y en cierto grupo, los alcaloides derivados de la pirrolizidina (en la tribu *Senecioneae* de la familia).

Muchas de las sustancias elaboradas por la familia son tóxicas ó muestran otra actividad fisiológica significativa, y esto es posiblemente una de las razones por lo que las plantas incluidas en ella son poco usadas en dietas humanas o en la

alimentación de animales.⁴

Chrysactinia mexicana pertenece a la tribu *Tageteae*, y se encuentra ampliamente distribuida en nuestro país, donde es utilizada en la medicina tradicional para el tratamiento de ciertas enfermedades respiratorias e infecciones de la piel, entre otros usos terapéuticos,¹² aunque cabe señalar que no existen estudios etnobotánicos recientes sobre este vegetal.^{13,14}

Esta especie ha sido objeto de varios estudios químicos, encontrándose una variación notable en el contenido metabólico de las diferentes poblaciones analizadas.¹⁵⁻¹⁸ En particular, se han publicado cuatro estudios sobre la composición química de *Ch. mexicana*, y en términos generales, se pueden mencionar a los monoterpenos, a los derivados del tiofeno, y a los glucósidos de flavonoides como los constituyentes principales. (tabla 1).

Tabla 1. Constituyentes químicos caracterizados de *Chrysactinia mexicana*.

Lugar de colección	Substancias aisladas	Referencias	
Nuevo León:			
	* 1,8 Cineol	(1)	(15)
	* β -Sitosterol	(2)	(15)
	* Derivados del tiofeno	(3)	(16)
		(4)	(16)
		(5)	(16)
		(6)	(16)
	* 3Z,6Z,8E dodecatrien- -1-ol	(7)	(16)

Lugar de colección	Substancias aisladas	Referencias	
	* Quercetagetin		
	3-glucósido	(8)	(17,40)
	7-glucósido	(9)	(17,40)
	* 6-hidroxikaempferol		
	7-glucósido	(10)	(17,40)
	7-acetilglucósido	(11)	(17,40)

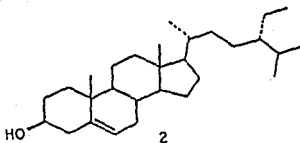
Hidalgo:

* Piperitona	(12)	(18)
* 7-Acetoxi-piperitona	(13)	(18)
* 7-Hidroxi-piperitona	(14)	(18)
* 6 α -Hidroxi-piperitona	(15)	(18)
* 6 α -Hidroxi-piperitol	(16)	(18)

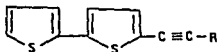
Cabe mencionar que este género comprende algunas especies adicionales, que son: *Ch. pinnata* (Tula, Tamaulipas), *Ch. truncata* (Saltillo, San Luis Potosí) y *Ch. acerosa* (Galeana, Nuevo León), cuya localización es restringida al noreste de México, en las orillas de las tierras altas xéricas,¹⁹ de acuerdo a la revisión de los especímenes depositados en el Herbario Nacional (Instituto de Biología de la UNAM). El estudio químico de estas especies adicionales aún no ha sido efectuado.



1



2



3 R= CH=CH₂

4 R= CH₂-CH₂-OAc

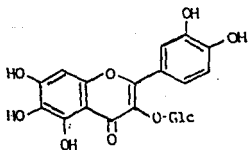
5 R= CH₂-OAc-CH₂-OAc



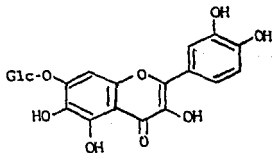
6

CH₃CH₂CH₂CH=CHCH=CHCH₂CH=CHCH₂CH₂OH

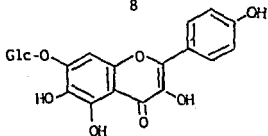
7



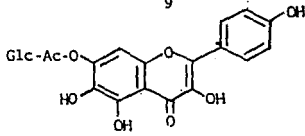
8



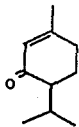
9



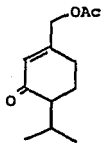
10



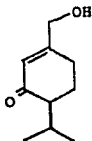
11



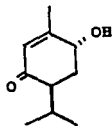
12



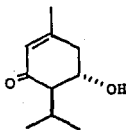
13



14



15



16

OBJETIVO

El objetivo general del presente trabajo es la generación de conocimientos nuevos acerca de los constituyentes químicos de la vegetación de nuestro país, la cual es un importante recurso natural, que se ha explotado de manera relativamente irracional, pero que aún se considera de enorme potencial.

El objetivo particular es el aislamiento, caracterización estructural, y bioevaluación preliminar de los metabolitos secundarios de una planta empleada en la medicina tradicional mexicana: *Chrysactinia mexicana*, la cual se conoce comúnmente como falsa damiana. El estudio químico se dirigirá principalmente a los metabolitos secundarios minoritarios, los cuales fueron detectados en un estudio previo de este vegetal, pero que no fueron caracterizados. Por otro lado, este estudio pretende coadyuvar al establecimiento de las bases químicas del empleo biológico del vegetal.

DISCUSION DE RESULTADOS

2.127 Kg de las hojas secas de *Ch. mexicana* se sometieron a maceración con *n*-hexano y posteriormente con metanol, obteniéndose los extractos correspondientes. La aplicación de los métodos cromatográficos convencionales, descritos en la sección experimental, permitieron la resolución de los mismos en sus componentes. El análisis de las propiedades físicas, químicas, espectroscópicas y espectrométricas, y la comparación de éstas con las informadas en la literatura para las mismas y/o compuestos relacionados fueron los argumentos utilizados para su elucidación estructural.

A partir del extracto hexánico fue posible aislar y caracterizar tres sustancias: dos monoterpenos, y un sesquiterpeno: piperitona (12), 7-acetoxi-piperitona (13), y el xantorrizol (19), respectivamente.

El material vegetal desengrasado fue extraído con metanol y el extracto metanólico (231g) se sometió a una partición agua-acetato de etilo, lo que permitió obtener 121g del extracto correspondiente.

A partir del extracto de acetato de etilo se aislaron y caracterizaron ocho productos naturales; el esteroide β -sitosterol (2), los monoterpenos piperitona (12), 7-acetoxi-piperitona (13), 6 α -hidroxi-piperitol (16), una mezcla de 5 α -hidroxi-dihidrocarvona (17) y 5 β -hidroxi-dihidrocarvona (18), 6 α -hidroxi-piperitona (15) y la 7-hidroxi-piperitona (14).

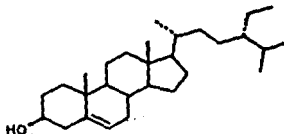
La discusión de la determinación estructural se realizará tomando en consideración el orden creciente de polaridad observado

por las sustancias aisladas, clasificándolas en tres grupos, de acuerdo a su estructura:

- I) Esteroles.
- II) Monoterpenos.
- III) Sesquiterpenos.

I) ESTEROLES.

El β -sitosterol (2) se aisló del extracto de acetato de etilo (AcOEt), y fue caracterizado por comparación con una muestra auténtica. Las propiedades físicas y espectroscópicas obtenidas para el mismo se encuentran descritas en la sección experimental.



2

II) MONOTERPENOS.

La Piperitona (12) se aisló a partir de las fracciones menos polares de los extractos hexánico y de acetato de etilo. Esta sustancia es de consistencia aceitosa, muy volátil y de aroma característico.²⁰ Las propiedades físicas y espectroscópicas obtenidas para la misma se encuentran descritas

en la sección experimental.

Para el establecimiento de la estructura molecular de esta sustancia, se tomará en cuenta principalmente la información obtenida de sus datos espectroscópicos.

Este compuesto es ópticamente activo, $(\alpha)_D^{25} = + 11.6$ (9.5mg/10ml metanol), y presenta un peso molecular de 152, establecido por espectrometría de masas (EM). En el espectro de infrarrojo (IR) presenta una señal intensa en 1658 cm^{-1} , lo que determina la presencia de una cetona α, β -insaturada.

Por otro lado la integración del área bajo la curva en el espectro de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno (RMN^1H) (Espectro 1) indica la presencia de 16 hidrógenos. Esta información, en conjunto con los datos de espectrometría de masas, permite deducir la fórmula molecular $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}$ para este compuesto, lo que indica que existen tres insaturaciones en la molécula, dos de las cuales están justificadas por la presencia del carbonilo α, β -insaturado (evidenciado en IR). La tercera insaturación puede ser atribuida a la presencia de un ciclo.

El ciclo anteriormente mencionado debe corresponder a una ciclohexenona conjugada, ya que esta estructura es la única consistente tanto con la absorción en 1658 cm^{-1} como con la intensidad de esta banda en el IR (un anillo de cinco miembros absorbería a mayor frecuencia y un anillo de siete miembros mostraría una banda de menor frecuencia).²¹

La naturaleza del doble enlace trisustituído es manifiesta

por la presencia de sólo un protón vinílico, el cual absorbe en δ 5.79, y que por su desplazamiento químico, se deduce es vecinal al carbonilo cetónico.

La absorción en el ultravioleta (UV) (λ_{max} 235 nm, ϵ =17780 (0.4 mg/ml etanol)) confirma la presencia de este grupo cromóforo.

Por otro lado, una señal singulete amplio a δ 1.95 con $W/2=4$ Hz, que integra para tres protones, sugiere la presencia de un metilo vinílico.

De acuerdo con los datos anteriores es posible proponer la estructura parcial indicada en la figura 1.



Figura 1

Los datos espectroscópicos indican además la existencia de protones unidos a carbonos secundarios distintos y vecinales, de lo que se puede deducir la siguiente estructura parcial (figura 2):



Figura 2

La unión de los fragmentos estructurales anteriores permite

proponer la estructura parcial mostrada en la figura 3.



Figura 3

El par de dobletes centrados en δ 0.96 y δ 0.89 ($J=7\text{Hz}$) con integración para tres protones cada uno, indican la presencia de un gem-dimetilo sobre carbono terciario (figura 4).

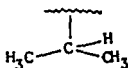
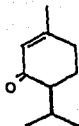


Figura 4

Los fragmentos estructurales deducidos indican que esta sustancia posee el esqueleto de p-mentano, por lo que se establece la estructura 12, la cual pertenece a la piperitona. La propiedad dextrorrotatoria del producto natural permitió establecer la configuración absoluta del mismo, de acuerdo a estudios previamente informados en la literatura.²²



12

Para el establecimiento de la estructura molecular de los seis monoterpenos restantes obtenidos de *Ch. mexicana*, se tomará como referencia al análisis de los datos espectroscópicos descritos para este compuesto.

El segundo compuesto aislado en orden creciente de polaridad corresponde a un aceite color amarillo oscuro y de olor agradable, que fué obtenido de ambos extractos (hexánico y AcOEt).

Este compuesto es ópticamente activo ($[\alpha]_D^{25} + 8.3$ (12mg/10ml metanol)) y de peso molecular 210, establecido por espectrometría de masas. Al igual que 12, presenta en su espectro de IR la banda de absorción característica para una cetona α,β -insaturada en 1667 cm^{-1} , cuya presencia es confirmada por el máximo de absorción registrado en el espectro de UV ($\lambda_{\text{max}} 228\text{ nm}$, $\epsilon = 12775$).

En el espectro de RMN^1H (Espectros 2 y 3) para esta sustancia es observable un par de dobletes centrados en $\delta 0.95$ y $\delta 0.85$, que integran para tres protones cada uno, correspondientes a metilos gem- unidos a carbono terciario. También puede

observarse la señal característica del hidrógeno vinílico, el cual resuena en δ 5.94, lo que indica su vecindad al carbonilo cetónico. Estos datos indican que esta sustancia también posee el esqueleto de p-mentano.

A diferencia de 12, esta sustancia presenta en IR una banda de absorción en 1743 cm^{-1} , que determina la absorción para un segundo grupo carbonilo, por lo que la molécula posee al menos dos átomos de oxígeno. La existencia de un grupo acetato es manifiesta por un singulete que resuena en δ 2.15, el cual integra para tres hidrógenos en RMN^1H por lo que la absorción en 1743 cm^{-1} corresponde a esta funcionalidad, y se concluye que esta molécula posee tres oxígenos. Por otro lado, al realizar la integración total del área bajo la curva en el espectro de RMN^1H es posible deducir la presencia de 18 hidrógenos.

La señal centrada en δ 4.62, que integra para dos hidrógenos, revela la presencia de un metileno alílico que por su desplazamiento químico debe estar unido a un acetato.

La presencia de los fragmentos estructurales deducidos se confirma con la información proporcionada por el espectro de RMN^{13}C (Espectro 4), el cual muestra un total de doce señales que pudieron ser asignadas de acuerdo a la teoría general del desplazamiento químico,²³ y en datos informados en la literatura para sustancias análogas, y que son mostradas en la figura 5.

C-1;	156.76
C-1';	170.13
C-2;	124.57
C-2';	20.44
C-3;	200.55
C-4;	52.10
C-5;	22.54
C-6;	25.64
C-7;	64.75
C-8;	25.52
C-9;	18.33
C-10;	18.33

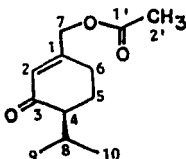
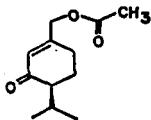


Figura 5

Por tanto, la estructura propuesta para este producto natural corresponde a la 7-acetoxi-piperitona (13). La comparación directa con una muestra patrón¹⁸ confirmó la identidad de esta substancia.



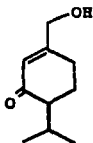
13

De los datos obtenidos del espectro de RMN¹H (espectro 5), se pudo determinar la estructura de una tercera substancia monoterpénica. En dicho espectro, esta substancia muestra señales análogas a las mostradas por la 7-acetoxi-piperitona (13), como son el par de dobletes a campo alto debidos a la presencia

del grupo gem-dimetilo, el multiplete asignable a los metilenos y la señal para el hidrógeno vinílico. Sin embargo, existen ciertas diferencias, las cuales son las siguientes:

- a)- El desplazamiento a campo alto de las señales correspondientes al oximetileno alílico ($\Delta\delta$ 0.45).
- b)- El desplazamiento a campo bajo del hidrógeno vinílico ($\Delta\delta$ 0.11).
- c)- La ausencia en el espectro de esta última substancia de la señal correspondiente al metilo del acetilo.

Estas diferencias, aunadas a la observación de una banda de absorción para grupo hidroxilo en el espectro de IR (3615 cm^{-1}), indican la ausencia del grupo acetilo en esta última molécula, y la presencia en su lugar de un grupo hidroxilo, por lo que la estructura propuesta para la misma debe corresponder a la de la 7-hidroxi-piperitona (14).



14

Dicha estructura, está de acuerdo con los datos obtenidos del espectro de masas ($M^+ = 168$, $C_{10}H_{16}O_2$) y con el máximo de absorción registrado en el espectro de UV (λ_{max} 228 nm, ϵ -10108). La comparación directa con una muestra patrón obtenida en nuestro

laboratorio,^{18, 26} confirmó esta estructura.

La cuarta substancia de naturaleza monoterpénica obtenida en orden creciente de polaridad, se aisló como un aceite amarillo pálido y de olor agradable, cuyos datos físicos y espectroscópicos se describen en la sección experimental. Presenta un peso molecular de 168 de acuerdo con el análisis por espectrometría de masas, siendo por tanto un isómero de 14.

Este compuesto presenta en IR las bandas de absorción para enona conjugada (1667 cm^{-1}) y grupo hidroxilo (3602 cm^{-1}). En su espectro de RMN¹H (espectro 6) se observan las señales doblete del residuo isopropilo. Realizando una comparación entre los espectros de este compuesto y el de 14, podemos detectar ciertas diferencias, que son las siguientes:

a)- La aparición en el espectro de la substancia en análisis de una señal característica de metilo vinílico a campo alto ($\delta\ 2.05$, 3H), el cual se encuentra ubicado por tanto en la posición C-1, y que no aparece en el espectro de 14.

b)- El desplazamiento a campo alto de la señal singlete correspondiente al protón vinílico, el cual resuena en $\delta\ 5.95$ en 14, desplazándose a $\delta\ 5.75$ en este compuesto.

c)- Presencia de una señal doble de doble (dd), que por su desplazamiento químico ($\delta\ 4.30$) corresponde a un hidrógeno carbinólico, y por su multiplicidad, es vecinal a dos hidrógenos magnéticamente diferentes (Espectro 6).

Analizando los argumentos anteriores es posible postular la

presencia del grupo hidroxilo en cualquiera de las posiciones, C-5 ó C-6, las que son mostradas en la figura 6.

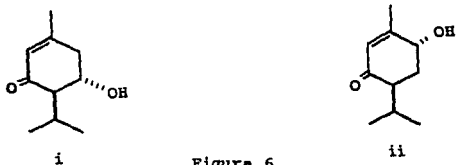


Figura 6

Estas posibilidades se pueden discriminar aplicando la teoría de desplazamiento químico,²³⁻²⁷ ya que en la estructura (i) el hidrógeno carbinólico debe aparecer entre δ 3 y δ 4, y su multiplicidad debe ser doble de doble de doble (ddd), lo que no corresponde con los datos espectroscópicos de la sustancia en cuestión. Por otro lado, si analizamos el desplazamiento químico que presenta el hidrógeno gem al hidroxilo de la estructura ii, y por consiguiente su multiplicidad, tenemos que la señal doble de doble (dd) debe resonar a campo más bajo que la señal ddd del hidrógeno de la estructura i, por su carácter alílico. La anterior discusión permite concluir que el producto natural de *Cn. mexicana* es ii.

Ahora bien, sabiendo que la constante de acoplamiento (J) de las señales en RMN¹H está en función del ángulo diedro formado entre protones vecinales,²⁸ tenemos que para la estructura con el hidroxilo en posición α , los hidrógenos en C-5 forman ángulos diedros similares (45° cada uno,

aproximadamente) con el hidrógeno de C-6, de lo que se deduce una señal doble de doble (dd) con constantes de acoplamiento similares. Esta multiplicidad (doble de doble con la misma constante de acoplamiento, (5 Hz) es la que se observa para el hidrógeno carbinólico (espectro 6).

La disposición de los hidrógenos en cuestión se muestra en la figura 7.

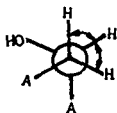


Figura 7

El análisis de la disposición de los protones en C-5 con respecto al hidrógeno en C-6 α (hidroxilo con orientación β), permite observar que existe una diferencia apreciable entre los ángulos diedros, los cuales son diferentes entre sí. Esta disposición se muestra a continuación en la figura 8.

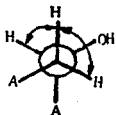


Figura 8

Esta disposición permite predecir la presencia de una señal

aproximadamente) con el hidrógeno de C-6, de lo que se deduce una señal doble de doble (dd) con constantes de acoplamiento similares. Esta multiplicidad (doble de doble con la misma constante de acoplamiento, (5 Hz) es la que se observa para el hidrógeno carbinólico (espectro 6).

La disposición de los hidrógenos en cuestión se muestra en la figura 7.

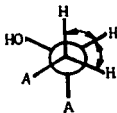


Figura 7

El análisis de la disposición de los protones en C-5 con respecto al hidrógeno en C-6 α (hidroxilo con orientación β), permite observar que existe una diferencia apreciable entre los ángulos diedros, los cuales son diferentes entre sí. Esta disposición se muestra a continuación en la figura 8.

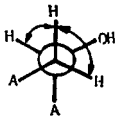
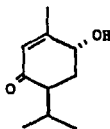


Figura 8

Esta disposición permite predecir la presencia de una señal

doble de doble de doble (ddd) con distintas constantes de acoplamiento (J), lo cual no se aprecia en el espectro de RMN¹H de referencia (espectro 6), para la señal ubicada en δ 4.30.

Por lo tanto, se concluye que el hidroxilo en la posición 6 tiene una orientación α respecto al plano, es decir, posee una configuración 6R. La comparación directa con una muestra auténtica permitió confirmar la estructura de esta sustancia como 6 α -hidroxi-piperitona (15).^{26, 27}



15

Las siguientes dos sustancias caracterizadas son también monoterpenos, sin embargo, fueron aisladas como constituyentes minoritarios y presentan un comportamiento cromatográfico homogéneo en diferentes mezclas de eluyentes, por lo que no lograron separarse. Sin embargo, el análisis comparativo de las constantes espectroscópicas de esta muestra, en particular, de los datos de RMN ¹H (espectro 7), permitió establecer la estructura molecular de esta mezcla binaria de compuestos, de acuerdo a la discusión que se describe a continuación.

El espectro de RMN ¹H (espectro 7) presenta señales en δ 1.81 y en δ 1.78 en forma de singulete, integrando cada una de

ellas para tres protones; esto implica la presencia de dos metilos vinílicos, presumiblemente, uno para cada componente de la mezcla. En el mismo espectro se observa otro par de señales centradas en δ 6.79 y δ 6.66, muy parecidas entre sí, integrando cada una para un protón, correspondientes a hidrógenos vinílicos, los cuales por su desplazamiento a campo bajo con respecto a los identificados en los compuestos anteriormente discutidos (los cuales resuenan en ca. 5.95) pueden ubicarse en la posición β de un sistema de carbonilo α, β -insaturado. La presencia de la banda en IR a 1668 cm^{-1} característica de carbonilo conjugado, confirma la asignación.

A campo alto se observan cuatro señales dobles (la superposición de dos de las señales centrales de cada una de las señales del isopropilo hace que sólo se vean seis líneas de las ocho esperadas) las cuales deben corresponder a la presencia de grupos isopropilo (uno en cada sustancia, de la mezcla de dos compuestos). Estas señales se encuentran centradas en δ 0.97 y δ 1.04, δ 0.90 y δ 0.97.

Finalmente se observa una banda amplia en el espectro de IR con absorción en 3400 cm^{-1} , lo que indica la presencia de un grupo hidroxilo. La discusión anterior permite concluir que estas sustancias poseen también el esqueleto de p-mentano, pero con diferente ubicación (regioquímica) del carbonilo (figura 9).

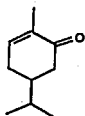
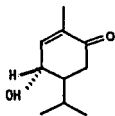


Figura 9

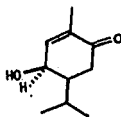
La posición del hidroxilo en la estructura anteriormente descrita puede establecerse mediante los siguientes argumentos:

El desplazamiento a campo bajo de las señales atribuidas a los hidrógenos carbinólicos de la mezcla, permite establecer su naturaleza alifática. La señal de estos hidrógenos se localiza entre δ 4.30 y 4.50. Un exámen cuidadoso de esta zona permite discernir dos señales: una centrada en δ 4.35 (ddd, $J = 10, 1, 1$ Hz), y otra centrada en δ 4.42 (dd, $J = 8, 4$ Hz). Este análisis permite concluir que la relación estructural entre los constituyentes de la mezcla es de epímeros en C-5 (es decir, hidroxilo con orientación α e hidroxilo con orientación β). Estas estructuras se establecen como 5 α -hidroxi-dihidro-carvona (17) y 5 β -hidroxi-dihidro-carvona (18). Los datos de espectrometría de masas y ultravioleta, los cuales se informan en la parte experimental, están de acuerdo con las estructuras propuestas.

Esta mezcla de sustancias se había caracterizado anteriormente como constituyentes de *Chenopodium multifidum*.²⁹ La comparación de los datos reportados en la literatura confirmó la identificación de los constituyentes de *Chrysactinia mexicana*.



17



18

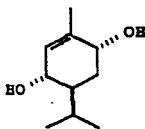
Otra de las sustancias aisladas de la falsa damiana se obtuvo con una polaridad de 4:1 hexano-AcOEt. Dicha sustancia se aisló en su forma cristalina, y sus propiedades físicas y espectroscópicas (Espectros 10 y 11) se describen en la sección experimental.

Esta sustancia carece de la banda de absorción en la zona de 1660-1750 cm^{-1} en el espectro de IR, característica de grupo carbonilo. Se observan absorciones en 3690 cm^{-1} y 3602 cm^{-1} , propias de grupos hidroxilo, y otras señales en 1602 y 803 cm^{-1} , atribuibles a dobles enlaces.

En el espectro de RMN^1H (Espectro 10) aparece una señal singlete amplio centrado en δ 5.50, que integra para un hidrógeno, y establece la presencia de un hidrógeno vinílico. Una segunda señal simple aparece centrada en δ 1.78 y su integración, para tres protones, determina la presencia de un metilo vinílico ($W/\Delta = 4$ Hz).

Al igual que las sustancias descritas anteriormente, esta sustancia presenta un par de señales dobles a campo alto (δ 0.96 y δ 0.83, $J = 7$ Hz) cuya integración, para tres protones para cada señal, indican la presencia de un par de metilos unidos al mismo átomo de carbono, y una señal más en δ 3.96 que integra para dos hidrógenos, que de acuerdo con su desplazamiento químico, corresponden a hidrógenos gem- a función oxigenada.

La integración de los datos descritos permiten establecer la estructura de 6 α -hidroxi-piperitol (16), aislado anteriormente de las partes aéreas de *Eupatorium macrocephalum*,³⁰ y de una población de *Ch. mexicana*.²⁶ La comparación directa con una muestra auténtica confirmó su identidad.^{31,32}



16

Substancias monoterpénicas adicionales fueron detectadas como constituyentes del extracto de acetato de etilo, sin embargo, estas fueron obtenidas en una mezcla, cuya complejidad, la baja proporción de los compuestos en la misma, su alta volatilidad y la carencia del instrumental necesario para su adecuada manipulación (cromatógrafos de gases y líquidos), dificultaron su

caracterización (espectro 12).

III) SESQUITERPENOS.

Otra de las sustancias aisladas, eluida con una polaridad relativamente baja, resultó un aceite de cierta labilidad, por lo que se mantuvo a la oscuridad, a temperatura baja, y en atmósfera inerte. Las propiedades físicas y espectroscópicas de esta sustancia se informan en la sección experimental.

La presente sustancia muestra absorción característica de grupo hidroxilo en 3602 cm^{-1} en el espectro de IR. Presenta una señal simple en δ 2.20 en el espectro de RMN¹H (espectro 13), la cual integra para tres hidrógenos, lo que hace suponer la presencia de metilo sobre anillo aromático. Por otro lado, dos señales simples centradas en δ 1.67 y δ 1.52, cuya integración es de tres hidrógenos para cada una, determina la presencia de dos metilos vinílicos unidos al mismo átomo de carbono, el cual presenta una tetrasustitución. Una señal doble en δ 1.18 indica la presencia de un metilo sobre metino. La señal en δ 2.58, que integra para un hidrógeno, corresponde, de acuerdo a su multiplicidad (un cuarteto, (c)) al protón del metino antes mencionado.

De acuerdo con estos datos se proponen los fragmentos estructurales mostrados en la figura 10.

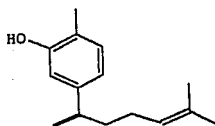


Figura 10

Por otro lado, una señal multiplete (m) en δ 5.05 pertenece a un hidrógeno vinílico.

Las señales que aparecen en δ 6.58 , δ 6.62 y en δ 6.98, son propias de un anillo aromático, en particular, de un fenol, y por su desplazamiento y multiplicidad (singulete, doblete y doblete, respectivamente) se puede establecer la sustitución 1,2,4- del anillo aromático.

La unión de los fragmentos anteriormente propuestos permite deducir la estructura del xantorrizol (19).³³ Esta sustancia ha sido aislada previamente de varias fuentes naturales,³³ y recientemente se aisló en nuestro laboratorio de *Iostephane heterophylla*.³⁴ La comparación directa con una muestra patrón permitió confirmar la identidad de esta sustancia.



19

30

SECCION EXPERIMENTAL

Chrysactinia mexicana es un matorral de aproximadamente 25 cm semileñoso; con ramas numerosas y apretadas; hojas alternas casi lineales de unos 8 mm de largo; con dos hileras de glándulas negruzcas. Flores en capítulos amarillos. Florece de abril a octubre.¹²

Este vegetal fue recolectado en la barranca de Tolantongo (estado de Hidalgo, México) e identificada por el Profesor Esteban M. Martínez del Centro de Ecología de la UNAM. La muestra botánica de la planta se encuentra depositada en el Herbario Nacional (Instituto de Biología de la UNAM) con el número de registro EM 22633.

Las partes aéreas de la planta se dejaron secar a temperatura ambiente. 2.127 Kg. del material vegetal seco y molido se extrajo por maceración, primero con n-hexano en una ocasión. El disolvente de las extracciones fué eliminado a presión reducida, obteniéndose 5.86 g de residuo. El extracto metanólico se preparó de manera similar a la antes mencionada, obteniéndose 231.25 g de residuo del mismo. A este residuo metanólico se le realizó una partición agua-acetato de etilo, para la obtención de los extractos correspondientes. Cabe señalar que la metodología aplicada para la preparación de los extractos fué ensayada inicialmente con una muestra alícuota, tomando en consideración el procedimiento experimental previamente desarrollado en el análisis del vegetal efectuado en nuestro laboratorio, y con el objetivo de aislar las sustancias minoritarias que no lograron ser caracterizadas en dicho análisis.

Los extractos obtenidos fueron resueltos en sus componentes por métodos cromatográficos convencionales tales como la cromatografía en columna (CC) y la cromatografía en capa fina (CCF), tanto analítica como preparativa. A lo largo de todos los procesos cromatográficos la composición de las fracciones obtenidas, y la homogeneidad y pureza de las sustancias aisladas se controló por cromatografía analítica, en placas Merck 60-F254, usando sulfato cérico al 1% en ácido sulfúrico 2N como revelador.

La determinación estructural de los metabolitos secundarios aislados a partir de esta especie se realizó mediante la interpretación de los datos obtenidos de las técnicas espectroscópicas: resonancia magnética nuclear de hidrógeno y de carbono 13 (RMN^1H , RMN^{13}C), infrarrojo (IR), ultravioleta (UV) y rotación óptica (RO); así como de la espectrometría de masas (EM) como técnica espectrométrica. Los datos obtenidos fueron comparados analíticamente con los reportados en la literatura.

Los puntos de fusión fueron determinados en un aparato Fisher-Johns. Los espectros de IR fueron obtenidos en solución de cloroformo (CHCl_3). Los espectros de RMN^1H y RMN^{13}C fueron determinados a 75, 80, 200 o 300 MHz, según se especifica en cada espectro, en solución de cloroformo deuterado (CDCl_3), utilizando como referencia interna al tetrametilsilano (TMS).

Los espectros de masas fueron obtenidos de un espectrómetro Hitachi Perkin-Elmer RMU 6D de doble foco, utilizando la técnica de impacto electrónico con un potencial de ionización de 70 eV.

SEPARACION CROMATOGRAFICA DE LOS CONSTITUYENTES DEL EXTRACTO
HEXANICO.

5.86g del extracto hexánico se adsorbieron en 6g de sílica-gel malla 70-230 ASTM, desarrollando el proceso cromatográfico a presión reducida.³⁵

La elución de la columna se inició con *n*-hexano 100% aumentándose gradualmente la polaridad. Se colectaron fracciones de 250 ml cada una.

Se obtuvieron siete grupos de fracciones, en orden de polaridad creciente (I,II,III,IV,V,VI y VII), en los cuales, de los primeros tres se obtuvieron compuestos cromatográficamente homogéneos. La separación de estos componentes se describe a continuación.

De las fracciones 8-23 (Grupo I) eluidas con *n*-hexano 100% se obtuvo un residuo (70 mg) que mostraba en cromatografía en capa fina un compuesto mayoritario homogéneo, por lo que se aplicó a una cromatoplaça preparativa (20 x 20 cm y 2mm de espesor), la cual se eluyó con *n*-hexano-acetato de etilo (2:1) por una ocasión. La sílice de la cromatoplaça fué extraída con acetato de etilo, en varias ocasiones. Este procedimiento permitió el aislamiento de 25 mg de xantorrizol (19).

Las propiedades físicas y espectroscópicas del xantorrizol (19) están de acuerdo con las informadas en la literatura,³³ y son las siguientes:

$$\alpha_D^{20} - 63.88 \text{ (0.72mg/ml de Metanol)}$$

RMN¹H 80 MHz (CHCl₃) (desplazamiento químico δ , multiplicidad, constante de acoplamiento J, asignación).

δ 1.18 (d, J=7, 3H); δ 1.52 (sa, W/2=4Hz, 3H); δ 1.67 (sa, W/2=4Hz, 3H); δ 2.2 (sa, W/2=4Hz, 3H); δ 2.58 (c, J=8Hz, 1H); δ 4.55 (m, 1H); δ 5.05 (m, 2H); δ 6.58 (sa, W/2=4Hz, 1H); δ 6.62 (d, J=2, 2H); δ 6.98 (d, J=8Hz, 1H).

IR (CHCl₃) 3602, 3426, 3043, 2963, 2924, 2859, 2732, 1716, 1621, 1580, 1454, 1176, 1116, 992 y 858 cm⁻¹

De este mismo grupo de fracciones (Grupo I) eluidas con n-hexano 100% (fracciones 48-63) se aisló un aceite de color anaranjado-rojizo (430 mg), el cual fué identificado como piperitona (12):

Rf 0.6 (Hexano-Acetato de etilo 65:35)

α_D^{25} : + 11.6 (9.5 mg/ml Metanol)

UV (λ_{max} 235 nm, c=17780 (0.4 mg/ml Etanol))

RMN¹H 80 MHz (CDCl₃): δ 5.79 (c, J=1Hz, 1H, H-2); δ 1.95 (sa, W/2=4Hz, 3H, H-7); δ 0.96 (d, J=7Hz, 3H, H-9); δ 0.89 (d, J=7Hz, 3H, H-10)

EM: m/e (Especie)(intensidad relativa): 152(M⁺) (30); 137 (M⁺-CH₃) (30); 110 (M⁺-C₃H₇) (92); 95 (M⁺-C₃H₇-CH₃) (25); 82 (M⁺-C₅H₁₀) (100); 69 (M⁺-C₅H₇O) (8); 54 (M⁺-C₅H₈O -CH₃) (20)

La última de las sustancias aisladas del extracto hexánico se obtuvo a partir de las fracciones 170-178, cuyo residuo pertenece al grupo III de las fracciones iniciales, las cuales fueron eluidas con n-hexano-acetato de etilo 95:5. Esta sustancia tiene color amarillo, y es un aceite, el cual fué purificado al aplicar el residuo a una cromatoplaca

preparativa, la cual se eluyó con n-hexano-acetato de etilo 95:5 en una ocasión. La sílice de la placa se extrajo con acetato de etilo 100%, obteniéndose 40 mg de sustancia pura, que fué identificada como 7-acetoxi-piperitona (13). Esta sustancia presenta las siguientes características físicas y espectroscópicas:

Rf: 0.5 (Hexano-AcOEt 65:35)

RO: $\alpha_D^{25} + 8.3$ (12 mg/10 ml Metanol)

UV: (λ_{max} 236 nm; $c=12900$ (0.3 mg/ml etanol))

(CDCl ₃)	H-2	H-7	H-9, H-10	CH ₃ CO
RMN ¹ H				
80MHz	δ 5.94 dd J=1.5,1.5	δ 4.62 sa W/2=3 Hz	δ 0.85 d,J=7 δ 0.95 d,J=7	δ 2.14 s
200MHz	δ 5.98 q J=1.2	δ 4.66 sa W/2=3 Hz	δ 0.86 d,J=7 δ 0.95 d,J=7	δ 2.13 s
300MHz	δ 5.98 q J=1.4Hz	δ 4.66 sa W/2=3 Hz	δ 0.86 d,J=6.83 δ 0.95 d,J=7.08	δ 2.13s

RMN¹³C (60 MHz, CDCl₃)(desplazamiento, asignación)

δ 200.546 (C-3, C=O cetona); δ 170.130 (C-1', C=O éster); δ 156.758 (C-1); δ 124.570 (C-2); δ 64.752 (C-7); δ 52.095 (C-4); δ 25.640 (C-6); δ 25.516 (C-8); δ 22.540 (C-5); δ 20.435 (C-2'); δ 18.333 (C-9 y C-10).

IR (CHCl₃) 3008, 2962, 2932, 2872, 2833, 1743, 1667, 1603, 1460, 1427, 1371, 1237, 1131, 1098, 1035 y 889 cm⁻¹.

**SEPARACION CROMATOGRAFICA DE LOS CONSTITUYENTES DEL EXTRACTO
DE ACETATO DE ETILO.**

121 gramos del extracto de AcOEt se adsorbieron en 121 g de sílica-gel malla 70-230 ASTM., y se aplicó a una columna cromatográfica empacada con 355 g de la misma sílica.

La elución de la columna se inició con *n*-hexano 100% aumentándose gradualmente la polaridad con acetato de etilo.

Se obtuvieron seis conjuntos de fracciones (A, B, C, D, E y F), en orden de polaridad creciente, cuya separación en sus componentes se describe a continuación.

De las fracciones 5-56 (conjunto A) eluidas con *n*-hexano 100% se logró aislar, por medio de la aplicación de dichas fracciones a una cromatoplaque preparativa, un aceite de color anaranjado-rojizo, que fué identificado como piperitona (12). Obteniéndose 2103 mg. de este compuesto.

De las fracciones 57-85 (conjunto B), eluidas con mezcla de disolventes *n*-hexano-AcOEt 95:5 se obtuvieron 8.78 g de residuo que fueron adsorbidos en 8.8 g de sílica-gel malla 70-230 ASTM., y aplicados en una columna cromatográfica empacada con 351.2 g de la misma sílice, para su recromatografía.

La columna fué eluida con cloroformo (CHCl₃) 100%, aumentándose gradualmente la polaridad con acetona. Este proceso permitió la obtención de un grupo adicional de fracciones, al que se le denominó conjunto B', que incluyó a las fracciones 18-47, obtenidas con CHCl₃ 100%. Este conjunto de fracciones

fué un residuo de 1.2768 g, el cual fue adsorbido en una relación 1:1 en peso con sílica-gel malla 70-230 ASTM., y aplicado a una columna cromatográfica previamente empacada con 63.84 g de la misma sílica para su recromatografía, lo que permitió obtener cuatro subconjuntos de fracciones (a, b, c y d) en orden de polaridad creciente.

Del subconjunto (a) se aisló una mezcla de sustancias de naturaleza monoterpénica cuyos componentes individuales no se pudieron caracterizar debido a la alta volatilidad de los mismos, así como su baja proporción en la mezcla, (espectro 12).

Del subconjunto (b), eluido con una mezcla de *n*-hexano-AcOEt 98:2, se obtuvieron las fracciones 102-127. De estas fracciones se logró aislar, por cristalizaciones sucesivas, 15 mg de β -sitosterol (2).

Del subconjunto (c), eluido con una mezcla de *n*-hexano-AcOEt 95:5, se obtuvieron las fracciones 128-146, de donde se aisló una sustancia aceitosa de color naranja claro. Mediante la aplicación de dichas fracciones a una cromatoplaça preparativa, eluida con *n*-hexano-AcOEt 95:5 en una ocasión, y extracción de la sílice de dicha placa con AcOEt 100%, se obtuvieron 40 mg de 7-acetoxi-piperitona (13).

Del subconjunto (d), eluido con una mezcla de *n*-hexano-AcOEt 9:1, se obtuvieron las fracciones 147-206, de donde se aislaron 52 mg de una sustancia aceitosa de color rosa claro, apareciendo en las fracciones 161-172. Esta sustancia fué identificada como 7-hidroxi-piperitona (14).

Las propiedades físicas y espectroscópicas de 14 son las siguientes:

Rf: 0.4 (Hex : AcOEt 55:45)

UV: (λ_{max} = 228 nm; c = 10108 (0.26 mg/ml Etanol)).

(CDCl ₃)	H-2	H-7	H-9	H-10
RMN ¹ H 80 MHz	δ 6.06 t	δ 4.42 sa	δ 0.96 d	δ 0.87 d
	J = 1Hz	W/2 = 4Hz	J = 7Hz	J = 7Hz

RMN ¹ H 200 MHz	δ 6.08 sa	δ 4.22 sa	δ 0.96 d	δ 0.87 d
	W/2 = 3Hz	W/2 = 3Hz	J = 7Hz	J = 7Hz

IR (CDCl₃) 3615₁, 3005, 2960, 2932, 2875, 1665, 1468, 1370, 1030 y 890 cm⁻¹.

EM: 168 (M⁺) (25); 153 (M⁺-CH₃) (24); 140 (M⁺-CO) (13); 126 (M⁺-C₃H₆) (100); 111 (M⁺-C₃H₆-CH₃) (17); 109 (M⁺-C₃H₅-H₂O) (23); 107 (M⁺-C₃H₇-H₂O) (23); 98 (M⁺-C₃H₁₀) (97); 97 (M⁺-C₅H₁₀-H) (83); 95 (56); 69 (M⁺-C₅H₁₀-CHO) (38); 67 (30); 55 (M⁺-C₅H₁₀-CH₃) (41); 43 (M⁺-C₇H₉O₂) (45); 41 (50).

Del conjunto C de fracciones (96-111), eluidas con una mezcla de *n*-hexano-AcOEt 9:1 se obtuvo 4.9 g de residuo, los cuales se adsorvieron en el mismo peso de sílica-gel malla 70-230 ASTM., para su recromatografía.

La columna fué eluida con *n*-hexano 100%, y acetato de etilo añadido gradualmente, para aumentar la polaridad en la misma forma.

Este procedimiento permitió la obtención de tres sustancias en un sólo grupo de fracciones, eluidas éstas con una mezcla de *n*-hexano-AcOEt 9:1.

La primera de las tres sustancias apareció en las fracciones 95-107, y fué identificada como 7-acetoxi-piperitona (13), aislada como un aceite de color naranja-rojizo de olor agradable, cuyos datos físicos y espectroscópicos fueron descritos anteriormente.

La segunda y tercera sustancias se aislaron como una mezcla, apareciendo en las fracciones 158-164, siendo identificadas como 5 α -hidroxi-dihidro-carvona (17) y 5 β -hidroxi-dihidro-carvona (18). Se obtuvieron 26.5 mg de la mezcla, la cual tuvo un comportamiento cromatográfico homogéneo en eluyentes de diversa composición. Esta mezcla fué purificada adicionalmente al recromatografiarla en una cromatoplaça preparativa, eluyendo con *n*-hexano-AcOEt 9:1, y posterior extracción de la sílice de dicha placa con AcOEt 100%. Se obtuvieron 15 mg de un aceite muy volátil de olor agradable y color amarillo claro.

Las propiedades físicas y espectroscópicas de ésta mezcla de compuestos son las siguientes:

Datos de RMN¹H de 200 MHz (CDCl₃) de la 5 α -hidroxi-dihidro-carvona (17):

H-6	H-5	H-7	H-9	H-10
δ 6.66 sa	δ 4.34 ddd	δ 1.78 sa	δ 0.97 d	δ 0.90 d
W/2=3Hz	J=(10,1,1)	W/2=4Hz	J=6.6Hz	J=7Hz

Datos de RMN¹H de 200 MHz (CDCl₃) de la 5β-hidroxi-dihidro-carvona (18):

H-6	H-5	H-7	H-9	H-10
δ 6.79 dd J=6,1.5Hz	δ 4.42 dd J=8,4Hz	1.81 sa W/2=4Hz	δ 1.04 d J=6.4Hz	δ 0.97 d J=6.6Hz

IR (CHCl₃) 3400, 3050, 2955, 2920, 1668, 1462, 1370, 1210 y 924 cm⁻¹.

UV: (Etanol λ_{max} 230nm ; ε=9340)

EM (70 eV) 168 M⁺(5), 126 (9), 111 (14), 99 (38), 83 (15), 71 (10), 70 (45), 55 (60), 43 (100), 41 (92), 39 (76).

De las fracciones 112-123 (conjunto D) eluidas con una mezcla de n-hexano-AcOEt 9:1 se obtuvieron 2.3 g de residuo, el cual fué adsorbido en el mismo peso de sílica-gel malla 70-230 ASTM., y aplicado posteriormente a una columna cromatográfica empacada con 69.11 g de la misma sílice, para su recromatografía.

La columna fué eluida inicialmente con n-hexano 100%, y se aumentó gradualmente la polaridad con AcOEt.

De esta columna se obtuvieron cuatro sustancias, dos de ellas, la 7-acetoxi-piperitona (13) y la piperitona (12) fueron aisladas de las fracciones 151-161 de esta recromatografía, con una polaridad de 98:2 n-hexano-AcOEt, los datos físicos y espectroscópicos de estas sustancias se han descrito anteriormente.

Las otras dos sustancias se identificaron como una mezcla de 5α- (17) y 5β-hidroxi-dihidrocarvona (18), apareciendo en las

fracciones 205-213, con una polaridad 9:1 n-hexano-AcOEt, cuyas propiedades físicas y espectroscópicas se describen arriba.

De las fracciones 124-160 (conjunto E) eluidas con una mezcla de n-hexano-AcOEt que abarca desde 9:1 hasta 4:1, se obtuvieron 3.6 g de residuo, el cual fué adsorbido en el mismo peso de sílica-gel malla 70-230 ASTM., y aplicado a una columna empacada con 190 g de la misma sílica-gel, para su recromatografía.

La columna fue eluida con n-hexano 100% aumentándose la polaridad gradualmente adicionando AcOEt.

De esta columna se aislaron dos sustancias, la primera de ellas apareció en las fracciones 70-86 con una polaridad 85:15 n-hexano-AcOEt de la cual se obtuvieron 35 mg de un aceite amarillo oscuro, el cual fué identificado como 6 α -hidroxi-piperitona (15).

Rf: 0.5 (n-hexano- AcOEt 55:45)

UV: (Etanol: λ_{max} = 227 nm; $c=6360$, 0.3 mg/ml)

(CDCl ₃)	H-2	H-6	H-7	H-9	H-10
RMN ¹ H					
80 MHz	δ 5.78 sa W/2=4Hz	δ 4.33 dd J=5,5Hz	δ 2.03 sa W/2=4Hz	δ 0.97 d J=7Hz	δ 0.89 d J=7Hz

IR (CHCl₃) 3602, 3464, 2930, 2873, 1710, 1667, 1509, 1464, 1440, 1376, 1033, 1009, 906 y 883 cm⁻¹

EM : 168 (15), 153 (5), 126.2 (58.2), 125 (24), 124.2 (43), 111 (30), 110 (15), 109 (25), 108 (8), 107 (9), 99 (10), 98.1 (100), 97 (24), 83 (18), 71 (30), 70 (42), 69.1 (47.4), 55 (23), 43 (42), 42 (16), 41 (36), 39 (23).

La segunda sustancia aislada apareció en las fracciones 218-272 con una polaridad de 4:1 n-hexano-AcOEt. Esta sustancia se aisló en su forma cristalina con un punto de fusión 160-165°C. Se obtuvieron 40 mg de 6 α -hidroxi-piperitol (16). Esta sustancia fué evaluada como agente tóxico sobre el camarón de salmuera (*Artemia salina*). Los resultados que a continuación se presentan indican una toxicidad media de 6 α -hidroxi-piperitol (16).^{36,37}

ppm	vivos/30	No.muertes
500	14	16
300	30	0
100	30	0
50	30	0
5	30	0

De lo que se obtiene LC₅₀ = 478.63 μ g/ml

Las propiedades físicas y espectroscópicas de este compuesto son las siguientes:

Rf: 0.2 (CHCl₃-AcOEt 7:3)

pf: 160-165°C

RO: + 28.4 (46 mg/10 ml de metanol)

RMN¹H (200 MHz):

H-2	H-3	H-6	H-7	H-9, H-10
δ 5.45 sa W/2=7.2Hz	δ 3.81 dd J=6Hz	δ 3.86 sa W/2=8Hz	δ 1.76 s W/2=4Hz	δ 0.80 d, J=7 δ 0.95 d, J=7

RMN¹³C (200 MHz): δ 135.126 (C-1); δ 128.891 (C-2); δ 67.37 (C-3); δ 65.892 (C-6); δ 40.660 (C-4); δ 28.976 (C-5); δ 24.887 (C-8); δ 20.027 (C-9); δ 19.523 (C-10); δ 15.981 (C-7).

IR (CHCl₃) 3690, 3602, 3005, 2961, 2929, 2874, 1602, 1466,
1447, 1371, 1188, 1066, 981, 959, 919 y 863 cm⁻¹

EM : 170 M⁺ (1.5); 155 M⁺-CH₃ (4); 152 M⁺-H₂O (1); 137 M⁺
-CH₃-H₂O (7); 127 (20); 111 (70); 109 (25); 100 (78);
95 (18); 85 (25); 81 (17); 79 (13); 77 (13); 71 (100);
69 (45); 55 (24); 43 (37).

De las fracciones 161-188 (conjunto F) eluidas con una mezcla de *n*-hexano-AcOEt que va desde 4:1 hasta 7:3, se obtuvieron 2.2 g de residuo, recromatografiado de la manera usual.

Se aislaron dos sustancias, la primera de ellas apareció en las fracciones 44-58 y se identificó como 7-hidroxi-piperitona (14).

La segunda sustancia apareció en las fracciones 72-92 con una polaridad 85:15 *n*-hexano-AcOEt, Se aisló por recristalizaciones sucesivas, obteniéndose 40 mg de cristales de punto de fusión 160-165°C, identificada como el 6α-hidroxi-piperitol (16).³⁸

RESUMEN Y CONCLUSIONES

El estudio químico de los diferentes extractos orgánicos de *Chrysactinia mexicana* (la cual es utilizada en la medicina tradicional de nuestro país), tendiente a la caracterización de los metabolitos secundarios que no lograron identificarse en un estudio previo de este vegetal, permitió el aislamiento de nueve metabolitos secundarios: siete monoterpenos, un sesquiterpeno, y un esteroide. Las sustancias fueron aisladas por métodos cromatográficos convencionales, y las estructuras fueron deducidas mediante el análisis comparativo y la integración de los datos espectroscópicos y espectrométricos.

Las sustancias aisladas de *Ch. mexicana* son las siguientes: β -sitosterol (2), piperitona (12), 7-acetoxi-piperitona (13), 7-hidroxi-piperitona (14), 6 α -hidroxi-piperitona (15), 6 α -hidroxi-piperitol (16), 5 α -hidroxi-dihidro-carvona (17), 5 β -hidroxi-dihidro-carvona (18) y el xantorizol (19).

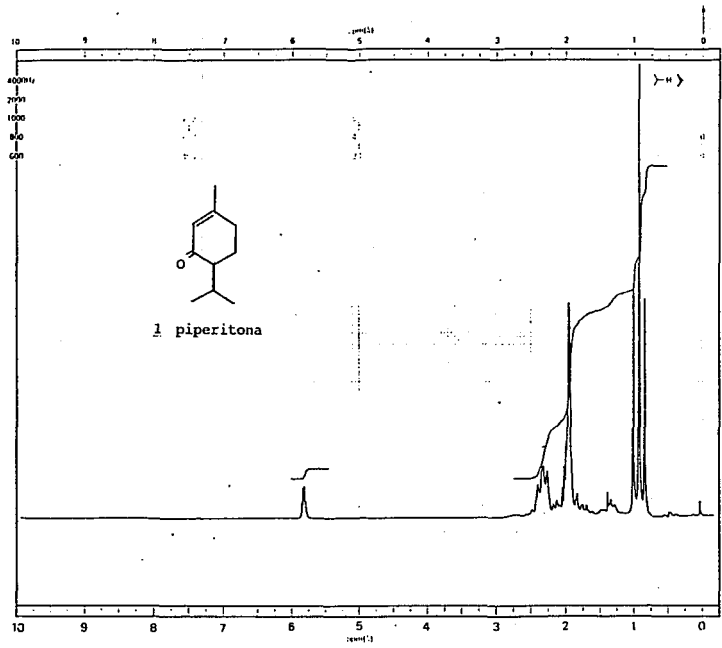
Se aislaron seis metabolitos secundarios previamente aislados de este vegetal y tres terpenoides adicionales conocidos.

Estos resultados permiten correlacionar preliminarmente la composición química de este vegetal con el uso popular del mismo, ya que la actividad terapéutica de los monoterpenos está estrechamente relacionada con la actividad antiséptica de los aceites esenciales,²³ por lo que el empleo del vegetal como desinfectante y expectorante puede relacionarse con la presencia de los monoterpenos y el sesquiterpeno aislados en el presente trabajo. Por otro lado, cabe mencionar que el xantorizol 19, presente en *Ch. mexicana*, ha mostrado actividad antitumoral.³⁹

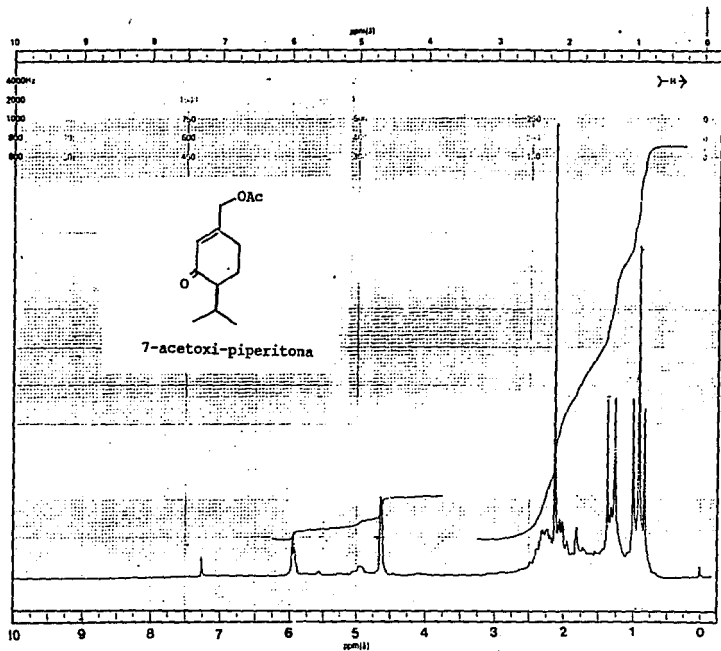
Estos resultados son congruentes con la toxicidad de 12, 13, 16 y 19 (LC₅₀ < 1000 ppm) hacia *Artemia salina*.³⁷

Aunque esta planta puede considerarse como fuente de sustancias bioactivas, es conveniente mencionar la dificultad extrema que presenta el aislamiento de los monoterpenos de *Ch. mexicana* por métodos clásicos de separación cromatográfica, debido a la labilidad y volatilidad de los mismos, por lo que es deseable la aplicación de metodología instrumental para su aislamiento en cantidades adecuadas que permitan efectuar su bioevaluación apropiada.

ESPECTROS

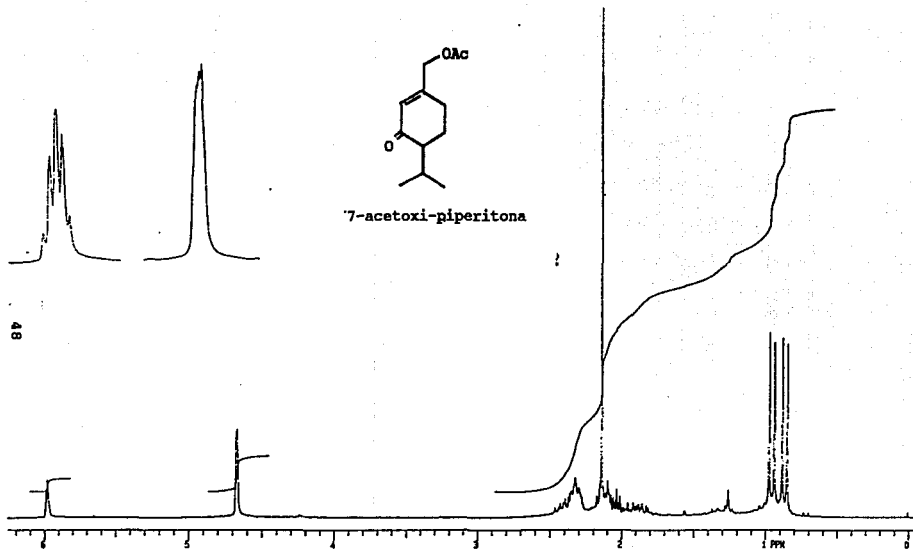


(Espectro 1) RMN¹H (80 MHz) de la Piperitona. (12)

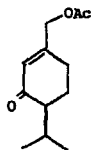


47

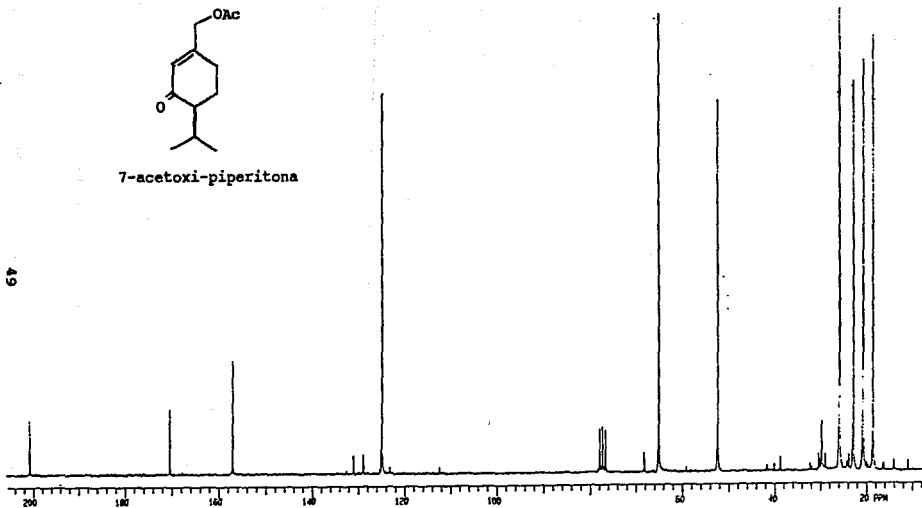
(Espectro 2) RMN¹H (80 MHz) de la 7-Acetoxi-piperitona. (13)



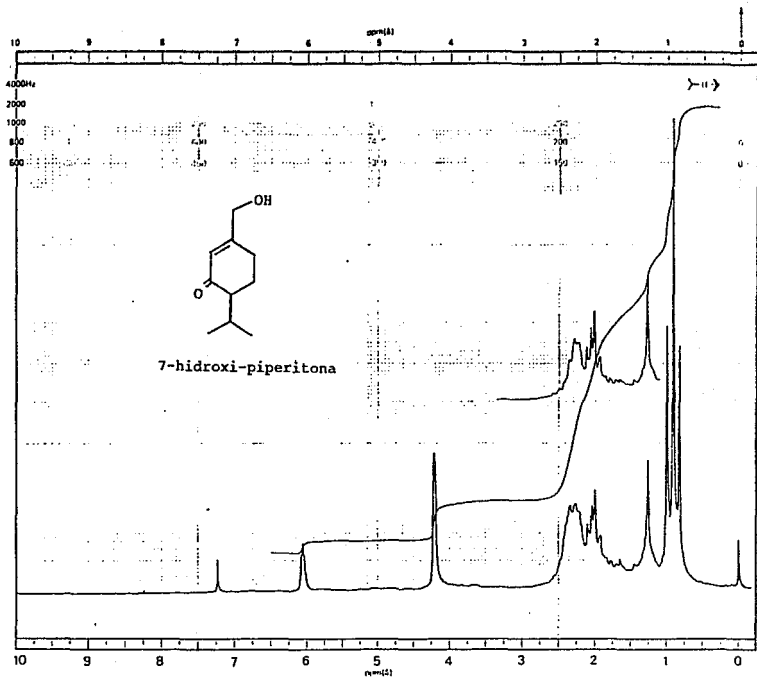
(Espectro 3) RMN^1H (200 MHz) de la 7-Acetoxi-piperitona. (13)



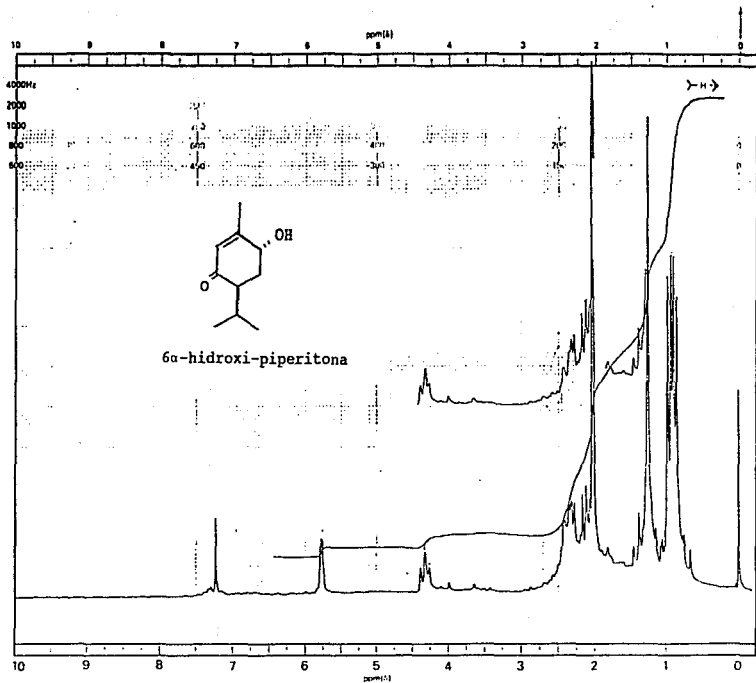
7-acetoxi-piperitona



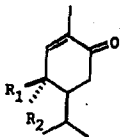
(Espectro 4) RMN¹³C de la 7-Acetoxi-piperitona. (13)



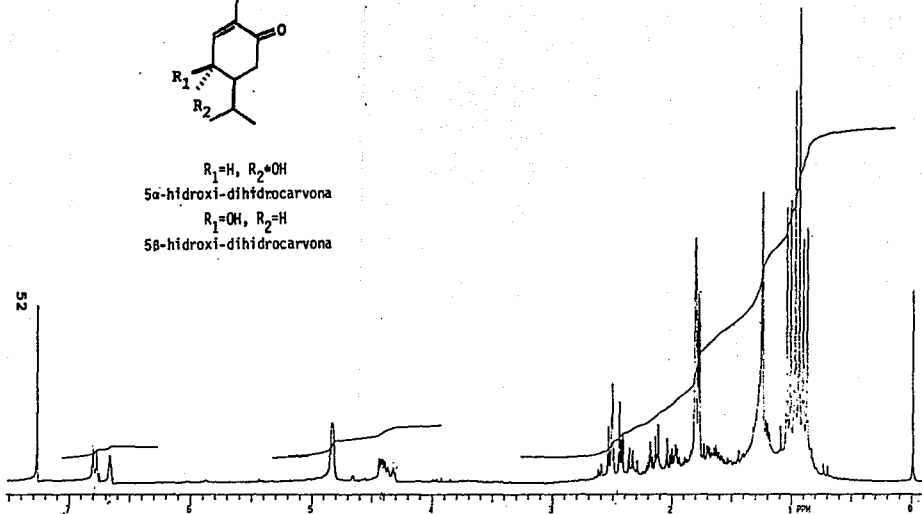
(Espectro 5) RMN¹H (80 MHz) de la 7-Hidroxi-piperitona. (14)



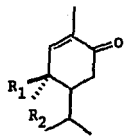
(Espectro 6) RMN^1H (80 MHz) de la 6α-Hidroxi-piperitona. (15)



$R_1=H, R_2=OH$
 5 α -hidroxi-dihidrocarvona
 $R_1=OH, R_2=H$
 5 β -hidroxi-dihidrocarvona

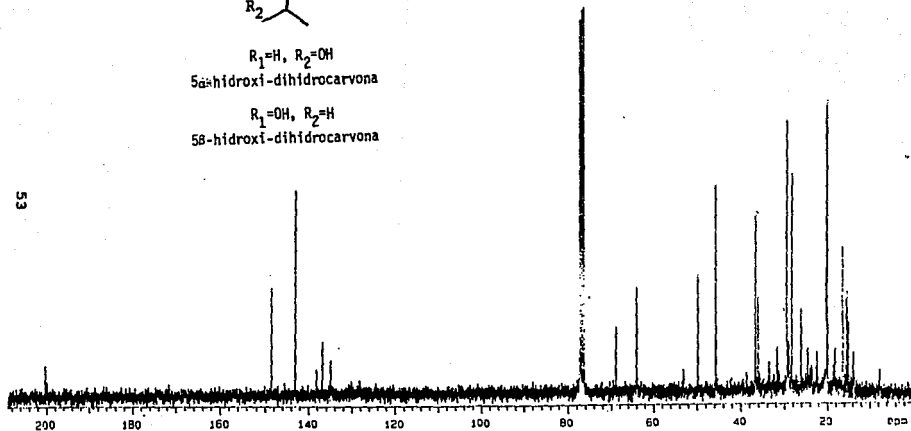


(Espectro 7) RMN^1H (200 MHz) de la mezcla 5 α y 5 β -Hidroxi-dihidro-carvona. (17) y (18)

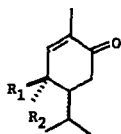


$R_1=H, R_2=OH$
5 α -hidroxi-dihidrocarvona

$R_1=OH, R_2=H$
5 β -hidroxi-dihidrocarvona



(Espectro 8) RMN¹³C de la mezcla 5 α y 5 β -Hidroxi-dihidro-carvona. (17) y (18)

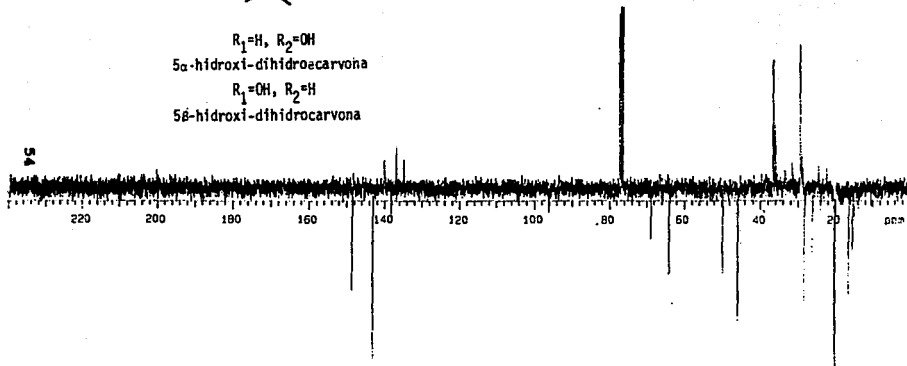


$R_1=H, R_2=OH$

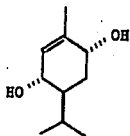
5 α -hidroxi-dihidrocarvona

$R_1=OH, R_2=H$

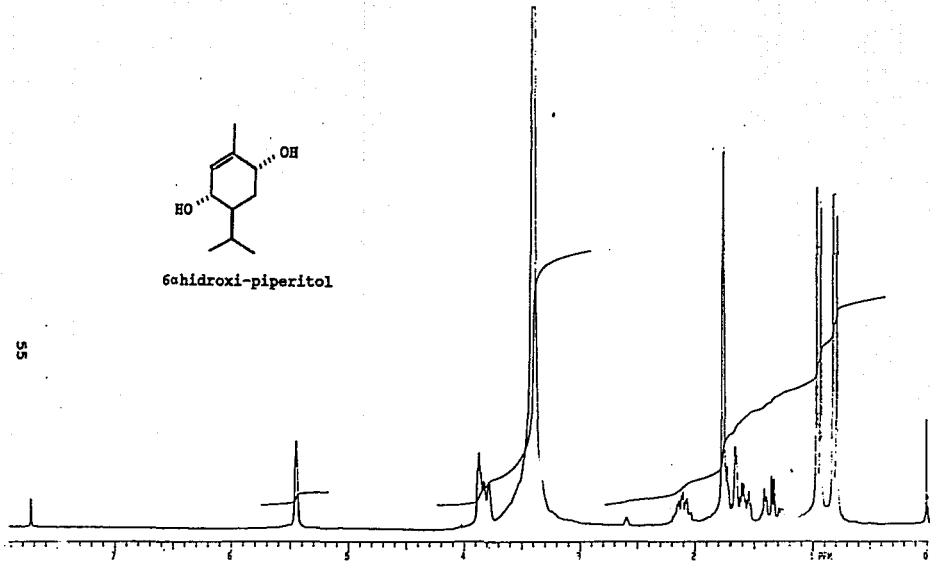
5 β -hidroxi-dihidrocarvona



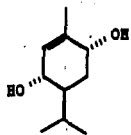
(Espectro 9) RMN¹³C (APT) de la mezcla 5 α y 5 β -Hidroxi-dihidro-carvona. (17) y (18)



6hidroxi-piperitol

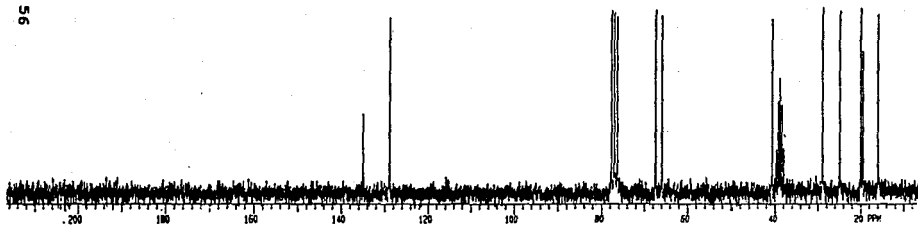


(Espectro 10) RMN¹H (200 MHz) del 6hidroxi-piperitol. (16)

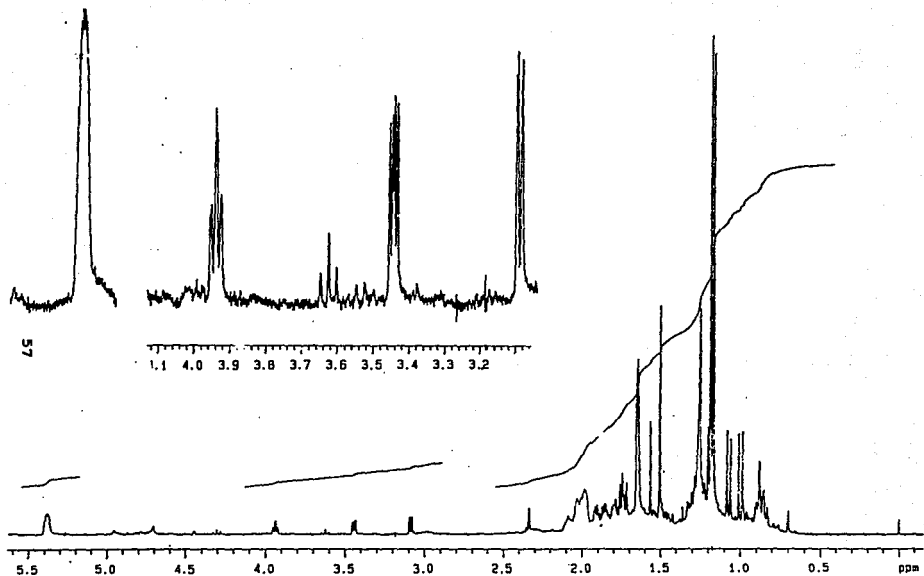


6αhidroxi-piperitol

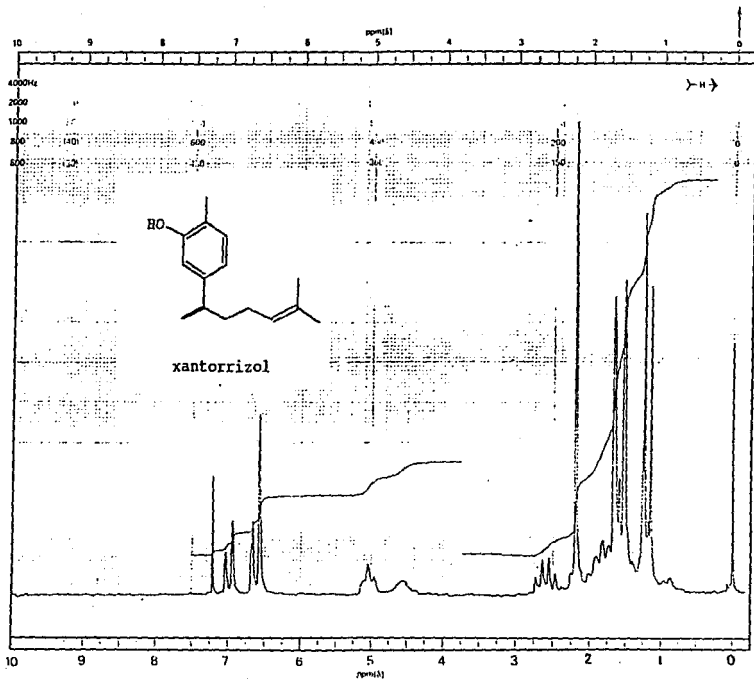
55



(Espectro 11) RMN¹³C del 6αHidroxi-piperitol. (16)



(Espectro 12) RMN^1H (300 MHz) de la mezcla de monoterpenos hidroxilados.



(Espectro 13) RMN^1H (80 MHz) del Xantorrizol. (19)

BIBLIOGRAFIA

1. Bird, C.; Medicines from the Rainforest, *New Scientist* August 17, 1991, p. 34-39.
2. Encyclopaedia Britannica Macropaedia, Vol. 7 p. 534, (1980).
3. Joyce, C.; Prospectors for Tropical Medicines, *New Scientist*, October 19, 1991, p. 36-40.
4. Heywood, V. H., Harborne, J. B. and Turner, B. L. in: *The Biology and Chemistry of the Compositae* (Heywood, V. H., Harborne, J.B. and Turner, B. L., eds) Vol. 1, pp. 11, Academic Press, New York, (1977).
5. Heywood, V. H., Harborne, J. B. and Turner, B. L. in: *The Biology and Chemistry of the Compositae*. Vol. 1, p. 9. Academic Press, New York, (1977).
6. Wagner, H. in: *The Biology and Chemistry of the Compositae* (Heywood, V. H., Harborne, J. B. and Turner, B. L., eds) Vol. 1, pp. 411, Academic. Press (1977).
7. Martínez, M.; Catálogo de Nombres Vulgares y Científicos de Plantas Mexicanas, 2a. edición, Ed. Botas, México, 1969, p. 313.
8. Strother, J. L., *The Biology and Chemistry of the Compositae* (Heywood, V. H., Harborne, J. B. and Turner, B. L., eds.) Vol. 2, p. 769. New York, (1977).
9. Delgado, G., Organic Natural Products from Some Mexican Plants. In: *Trends in Organic Chemistry (India) 1992* (en prensa).

10. Harborne J. B. and Mabry T. J., *The Flavonoids Advances in Research, First Published, Ed. Chapman and Hall (1982) New York, p. 289.*
11. Pacheco, P., Crowford, D., Silva, M. and Stuessy, T.; *Compositae, Chemotaxonomy based on Flavonoids. Bol. Soc. Chil. Quim. 27, 172 (1982).*
12. Martínez, M., *Las Plantas Medicinales de México, Ediciones Botas, México, 1969, p. 130.*
13. Martínez, M., *Plantas Utiles de México, Editorial Botas, México, 1936.*
14. Moreno, N. P., *Glosario Botánico Ilustrado, CECSA, 1984.*
15. Domínguez, X. A. and Pierantozzi, E., 1,8-Cineole and β -Sitosterol from *Chrysactinia mexicana*, *Phytochemistry* 11, 2629 (1972).
16. Domínguez X. A., Vázquez, G. Baruah, R. N., *Constituents from Chrysactinia mexicana, J. Nat. Prod. 48, 681 (1985).*
17. Harborne, J. B. Greenham, J., Eagles, J. and Wollenweber, E., 6-Hydroxyflavonol Glycosides from *Chrysactinia mexicana*, *Phytochemistry* 30, 1044 (1991).
18. Delgado, G. and Rios, M. Y., *Monoterpenes from Chrysactinia mexicana, Phytochemistry* 30, 3129 (1991).
19. Wagner, H. in : *The Biology and Chemistry of the Compositae (Heywood, V. H., Harborne, J. B. and Turner , B. L., eds.) Vol. 1, p. 422.*

20. Lassak, E. V., Pinhey, J. T., Ralph, B. J., Sheldon, T. and Simes, J. J. H., Extractives of fungi. Microbial Transformation Products of Piperitone, *Aust. J. Chem.* 26, 845 (1973).
21. Nakanishi, K., *Infrared Absorption Spectroscopy*, Holden Day Inc., London, 1977.
22. Burbott, A. J., Hennessey, J. P., Curtis, J. W. and Loomis, D., Configuration of the Piperitone from Oil of *Mentha piperita*, *Phytochemistry* 22, 2227 (1983).
23. Levy, G. C. and Nelson, G. L. Resonancia Magnética Nuclear de Carbono-13. Ed. Balletera, New York, p. 67 (1976).
24. Wehrli, F. W. and Nishida, T., The use of Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy in Natural Products Chemistry. In: *Progress in the Chemistry of the Organic Natural Products*. Vol. 36, New York, p. 26-28 (1979).
25. Diaz, E. y Joseph-Nathan, P., *Introducción a la Resonancia Magnética Nuclear*, Ed. Limusa, México, 1980, p. 19.
26. Rios, M. Y. Tesis de Licenciatura. Aislamiento y Determinación Estructural de los Metabolitos Secundarios Presentes en *Salvia longystyla* (Labiatae) y *Chrysactinia mexicana* (Compositae). Facultad de Química, UNAM (1987).
27. Dev, S., Anubhav, P. S., Narula, R. and Jhillu, S. Y., *Handbook of Terpenoids*, Vol. 2, CRC Press Inc., p. 245, 274, 277 (1982).
28. Silverstein, R. M., Bassler, G. C., Morrill, T. C., *Spectrometric Identification of Organic Compounds*, 5th ed., John Wiley & Sons. Inc., New York, 1991, p. 197.

29. Pascual, J., Bellido, T. I. S., Torres, C., Sastre, B. A. and Grande, M., Phellandrene Endoperoxides from the Essential Oil of *Chenopodium multifidum*, *Phytochemistry* 20, 163 (1981).
30. González, A. G., Bermejo, B. J., Bermejo, B. J. L. and Massanet, G. M.; *Química de las Compuestas, Anales de Química* 68, 319 (1972).
31. Delord, T. J., Malcolm, A. J., Fronczek, F. R., Fisher, N. B. and Watkins, S. F.: 1-p-Menthene-3,6-diol, a Monoterpene. *Acta Cryst.* C44, (1988) 765.
32. Stolow, R. D. and Sachdev, K., Absolute Configurations of the p-menthane-2,5-diones and p-menthane-2,5-diols. *J. Org. Chem* 36, 960 (1971).
33. Rimpler, H. Hansel, R. and Kochendoerfer, L., Xanthorrhizol ein Neues Sesquiterpen aus *Curcuma Xanthorrhiza*, *Z. Naturforsch.* 25 b, 993 (1970).
34. Delgado, G., Aguilar, M. I., Bye, R. and Linares E., Bisabolenes, Polycyclic Diterpenoids and Other Bioactive Constituents from the Mexican Medicinal Plant *Iostephane heterophylla* (*Asteraceae*). Resultados aún no publicados. (1992).
35. You, E. K., Coward, J. K., Filtering-Column Chromatography, a Fast Convenient Chromatographic Method. *Aldrichimica Acta*, 21 No. 4 (1988), p. 106-107.
36. Sticher, O. in: *New Natural Products and Plant Drugs with Pharmacological, Biological or Therapeutic Activity.* (Wagner, H. and Wolff, P., eds.), Springer (1977). p 137.

37. Meyer, B. N., Ferrigni, N. R., Putnam, J. E., Jacobsen, L. B., Nichols, D. E. and McLaughlin, J. L., *Planta Medica* 45, 31 (1982).
38. Stolow, R. D. and Sachdev, J., The p-Menth-1-ene-3,6 Diols. Correlation of Absolute Configuration with Optical Rotation. *Tetrahedron* 21, 1889 (1965).
39. Itokawa, H., Hirayama, F., Funakoshi, K. and Takeya, K., *Chem. Pharm. Bull.* 33, 3488 (1985).